

## 細菌 Proteinase に及ぼす

### Ascorbic acid の作用について

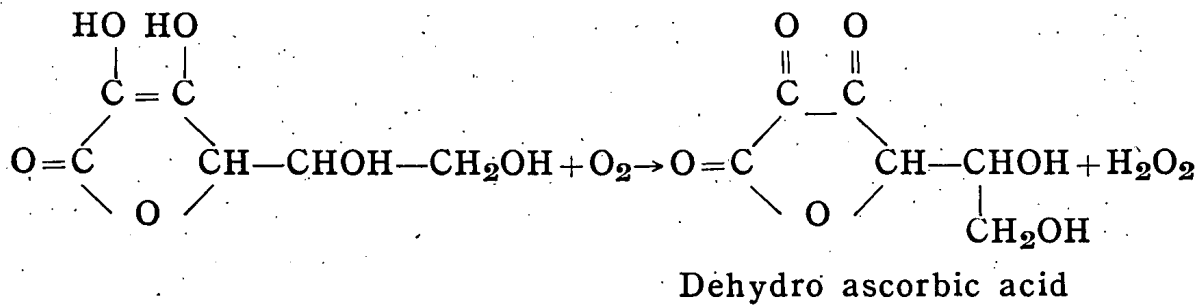
大橋 (小笠原) 愛子

#### 序 言

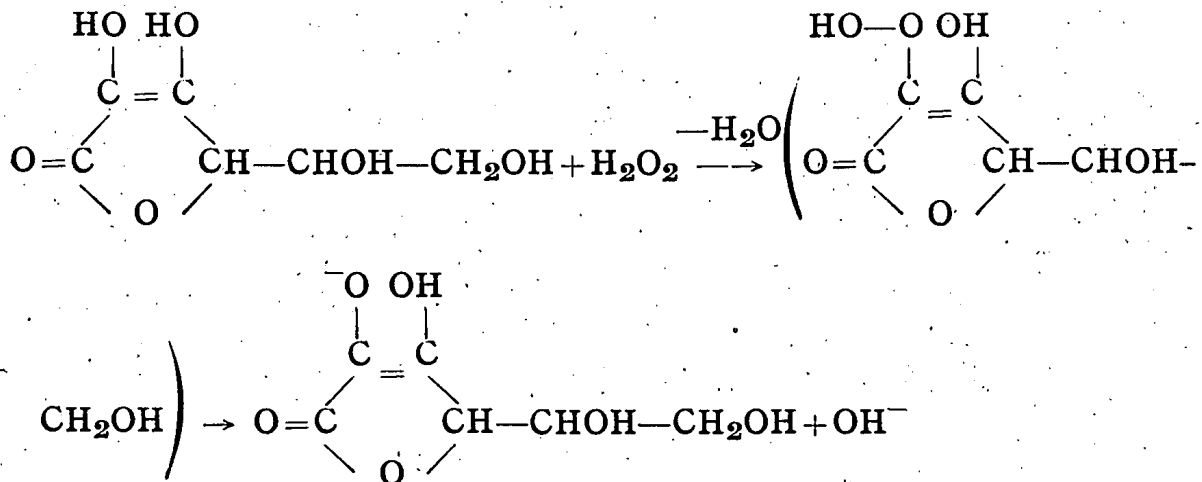
Ascorbic acid の酵素反応阻害については多くの研究があり、現在まで種々の酵素につきいろいろな現象が知られている。即ち、<sup>1)</sup>伊藤等はヒマシ、豚、血清、乳等の脂肪酵素は Ascorbic acid により分解反応は促進されるが、合成反応が阻害される。又これ等の酵素は  $H_2O_2$  では逆に合成が促進され、分解が阻害される事を明らかにしている。左右田等はホラ貝の Glucosulfatase も Ascorbic acid により強く阻害されることを報告している。又 Xanthine oxidase も同じく阻害される事を Philip Feigelson は報じている。Urease については Sizer 等の研究により Ascorbic acid,  $H_2O_2$  共に強く阻害を示す事が明らかにされ、その機構は彼等は酸化還元電位に関連させて説明している。又 Elson L.A., Quastel J.H, Mapson, L.W. 等も Urease につき同じ様に阻害を認めている。酸 Phosphatase については Courtois, J. 及び Giri, K.V. の研究がありやはり阻害が認められている。又 Aconitase については Ascorbic acid は促進を示すが、使用法によっては逆に阻害的にも作用するという報告がある。 $\beta$ -Amylase については Purr によって阻害作用が認められ、その後多くの研究があり次のような事が明らかになっている。即ちこの阻害作用は多くの物質によって軽減される特徴を有しており、赤血塩 methylen blue HCN, Cyseine, Glutathione によって再活性化される。これ等の再活性化剤は Ascorbic acid によって不活性化された Urease 等についても同じ作用を示す。Papain に対する阻害は Maschmann, Helmert, Purr 等により報告されている。

以上の各酵素はいずれもその分子中に SH 基を有し、これが Ascorbic acid との間で反応する結果阻害を示すものと考えられ、又このような考えのもとに研究された報告も数多く認められる。

一方 Ascorbic acid の水溶液は微量の金属を除去しても尚空气中の酸素によって脱水素され、この自動酸化の速度は溶液の酸度に大きく影響される。そして酸化の結果は次式の如く Dehydro-ascorbic acid と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が生成する。



この生成物の一つである H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は更に Ascorbic acid と結合し Ascorbic acid hydroperoxide を生じ、これが更に分解して Ascorbic acid の Free radical と OH radical を生ずる事により、種々の新しい化学作用を発揮する。この現象は Ascorbic acid に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加しても同じである。



Ascorbic acid は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により Ascorbic acid Free radical となるが、OH Radical も当然生成されるので、この Ascorbic acid-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系は強力な Free radical 生成系 となるので、この系と共存する物質は Free

radical の攻撃を受けることになる。この系の作用については、種々な Ring 化合物への水酸化反応、ヘテロ環の開裂、高分子物質の解重合、脱アミノ反応、酵素活性の阻害等がある。この中で酵素反応の阻害については、Ascorbic acid によって SH 酵素が阻害される事は前述したが、Ascorbic acid-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系の化学作用によっても酵素蛋白に一部変化をきたすことによる活性の阻害も考えられる<sup>2)</sup>。

Free radical 生成系の蛋白質に対する作用については Lissitzky S. 等は Ascorbic acid-Fe<sup>++</sup>-O<sub>2</sub> 系により蛋白質のチロジン残基が OH 化される事を報告し、八木等は細菌 α-Amylase を SH free の純蛋白基質として、Ascorbic acid の自己酸化に伴う活性低下を報告しているが、これが Cyseine の添加により再活性化する事を認め、この実験条件下では酵素蛋白の一次構造には何等変化しないものと考えている。

以上の事実により、前述の各種 SH 酵素の Ascorbic acid による阻害作用は酸化生成物や、Ascorbic acid それ自身によるものではなく、よって Ascorbic acid の作用は再検討しなければならないようである。

著者等は以上の種々な報告より考え、Ascorbic acid の阻害作用の再検討、並びに Ascorbic acid-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系の蛋白質に対する作用についての研究の一部として、結晶 Proteinase に及ぼす Ascorbic acid の作用を実験的に調べ、その結果を報告する。

尚 Ascorbic acid は PH 6.0 以上で非常に不安定であることは既知の事実であり、我々が U.V. スペクトルの変化を調べた結果も、PH 7.0 では調製直後でも分解を起こしている。よって反応系を作り反応を進めた場合の Ascorbic acid はすべて変化し、dehydro ascorbic acid として系中に存在すると考えられる。しかしながら H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の加わった反応系においては、Ascorbic acid は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によりすぐに Free radical を作り Ascorbic acid の dehydroascorbic acid への変化は起こらないと考えられる。よって反応系の PH は 7.0 であっても、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の存在する場合には Ascorbic acid の安定性は問

題にならないとして実験を進めた。

### 実験方法

実験に使用した酵素、その他試薬溶液は次の如くである。

1. 酵素 長瀬産業製の結晶細菌 Al-Proteinase で、その力価は  $112.5 \times 10^4$  P.U.N/g であつた。この酵素を実験の都度 0.02 Mol 燐酸 Buffer 溶液 (PH 7.0) にとかし調製する。
2. Buffer 溶液 0.02 Mol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  系 Buffer 溶液を用い、pH は 7.0 とする。
3. 基質 Cazein 溶液 乳製 Cazein (岸田化学) 3 g に 0.02 Mol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液約 80ml を加え、沸とう浴中で加熱溶解する。冷却後 1/10 N-NaOH で PH 7.0 に調節した後、水で全量を 100ml とする。

尚本実験における PH の調節は、すべて堀場製ガラス電極 PH メーター T 型を使用した。

4. Ascorbic acid 溶液 試薬特級の Ascorbic acid 結晶を水より一度再結し、真空デシケーター中で完全に乾燥した結晶を使用の都度蒸溜水に溶解して直ちに使用した。
5. l-Cysteine 溶液 試薬特級の Cysteine 結晶(和光純薬)を、使用の都度 0.02Mol Phosphate buffer に溶解し使用する。
6.  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 試薬特級の  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 (30% 和光純薬) を使用の都度水に溶解稀釈する。
7. 中性 Formol 溶液 局方ホルマリン溶液 (約37%) を N-NaOH で PH メーターを使用し PH 8.0 まで中和して使用する。保存性悪く使用の都度調製する。

#### 酵素の Ascorbic acid 処理

30°C の恒温水槽中に保った径 30mm の試験管に適量の酵素液を入れ加温した後、Ascorbic acid 又は  $\text{H}_2\text{O}_2$  を加え充分混合した後、直ちにその一部をとり酵素力を測定し対照とし、残りを 30°C、水槽中に一定時間保ち反応させた

後、この混合液の一部をとり、その力価を測定した。

### 酵素力価の測定

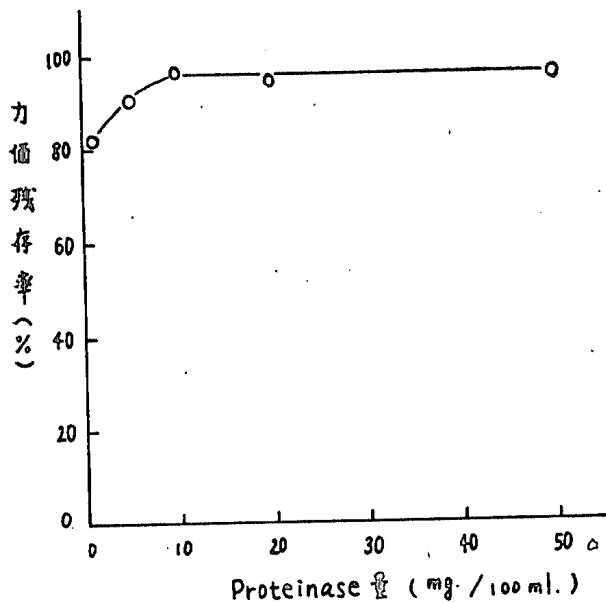
径 18mm の試験管に 3% Cazein 溶解 5 ml を入れ、30°C の水槽中に 5 分間保った後、Ascorbic acid 処理酵素液 1 ml を入れて反応させ、30分後に中性 Formol 液 5 ml を加え反応を止める。基質 Formol 液酵素液の順に添加し、30°Cに30分放置したものを対照とする。反応混合液とその数倍容の洗浄液を合わせビーカーに入れ、充分攪拌しながら O.ON-NaOH で pH メーターを使用し、pH 8.5 まで滴定する。滴定値より対照値を差引き、酵素力価の測定値とする。又反応により失活した酵素力価は、反応時間 0 の測定値を 100 とした時の残存力価の測定値の%で示した。

## 実験結果

### 1. Proteinase の自然失活

細菌 Al-proteinase の濃度を 10r/ml より 500r/ml まで変化させた時の、30°C 5 時間後の自然失活を調べた結果は、Table 1 及び Fig. 1 の如く

Fig. 1 Proteinase 自然失活 である。



pH 7.0  
Temp. 30°C  
Time 5 hour

Table 1 Proteinase の自然失活 (30°C pH7.0)

Proteinase 濃度	0 hr	5 hrs	%
10 d/ml	0.53	0.39	82.1
50 "	1.25	1.13	90.4
100 "	2.26	2.18	96.5
200 "	3.65	3.44	94.4
500 "	5.18	4.55	95.7

即ち 50r/ml 以下では 10% 以上の失活をみるが、100r/ml 以上になると 5% 以内しか失活しないことが

明らかとなった。更に 100 $\gamma$ /ml 以上の濃度では濃度によって失活程度は変化しないが、50 $\gamma$ /ml 以下では稀薄な程自然失活は大きくなる傾向にある。

## 2. Ascorbic acid のみによる阻害

Ascorbic acid のみによる阻害を Proteinase 2mg/10ml, pH 7.0, 30°C の条件で、5 時間処理後の力価を調べた結果を Table 2 及び Fig. 2 に示す。

Fig. 2 Ascorbic Acid 濃度による影響

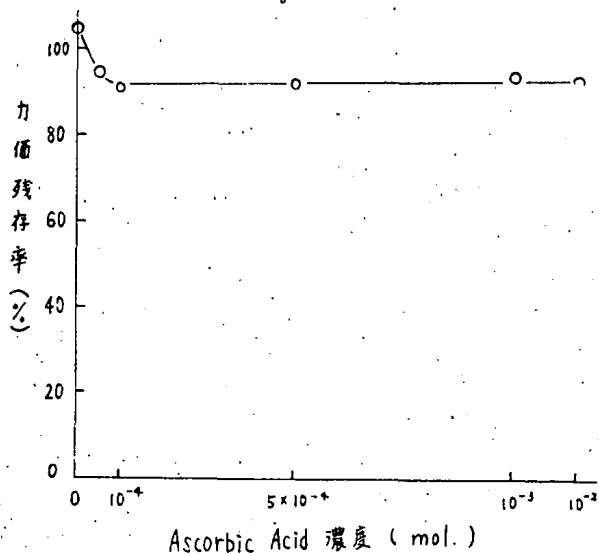


Table 2 Ascorbic acid のみによる阻害

Ascorbic acid 濃度	0 hr.	5 hrs.	%
0 mol	3.68	3.86	104.9
5 × 10 <sup>-5</sup>	3.37	3.18	94.2
10 <sup>-4</sup>	3.57	3.25	91.0
5 × 10 <sup>-4</sup>	3.57	3.28	91.9
10 <sup>-3</sup>	3.53	3.30	93.5
10 <sup>-2</sup>	3.50	3.28	92.4

Ascorbic Acid 濃度 (mol.)

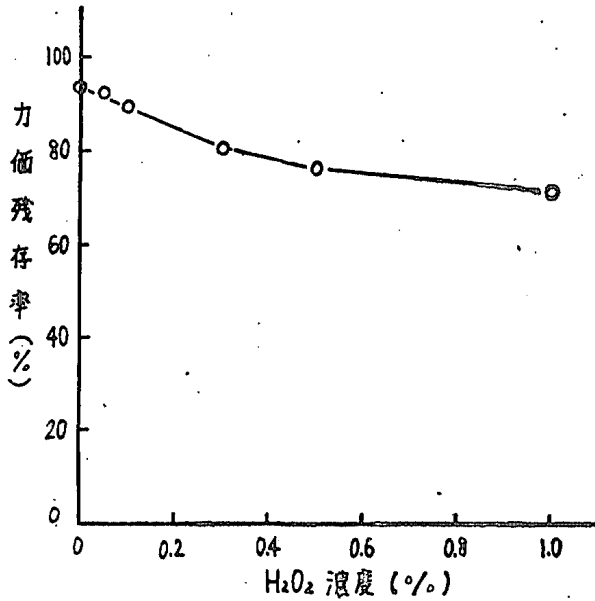
pH 7.0  
 Proteinase 2mg./10ml.  
 Temp. 30°C  
 Time 5 hour

Ascorbic acid 濃度 10<sup>-4</sup>~10<sup>-2</sup> mol の間では、各濃度における残存力価は大差なく、又自然失活との差もあまり認められない。この程度の条件においては、Ascorbic acid 詳しくは dehydro ascorbic acid による阻害は極く小さいようである。

## 3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のみによる阻害

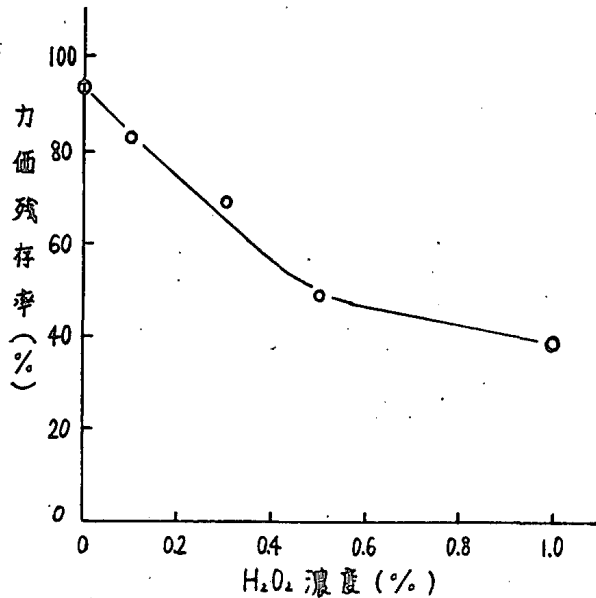
Proteinase 20mg/10ml, pH 7.0, 30°C で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の各濃度における 5 時間処理の阻害を示したのが、Table 3 及び Fig. 3 である。

Fig. 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度による影響



pH 7.0  
 Proteinase 2mg./10ml.  
 Temp. 30°C  
 Time .5 hour

Fig. 4 Ascorbic Acid と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の影響



pH 7.0  
 Proteinase 2 mg./10ml.  
 As. A. 10<sup>-3</sup> mol.  
 Temp. 30°C.  
 Time 5 hour

Table 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のみによる阻害

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度	0 hr.	5 hrs.	%
0 %	3.30	3.10	93.9
0.05	3.38	3.12	92.3
0.1	3.50	3.13	89.4
0.3	3.37	2.70	80.4
0.5	3.81	2.90	76.2
1.0	3.54	2.52	71.2

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が高濃度になる程阻害は大きくなる。又 Ascorbic acid のみよりはるかに阻害は強い。

4. Ascorbic acid と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による阻害(1)

Proteinase 2 mg/10ml, pH 7.0, 30°C で Ascorbic acid を 10<sup>-3</sup> mol 一定とし, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度を変化させて阻害程度を調べた結果は, Table 4 及び Fig. 4 に示される。

Table 4 Ascorbic acid と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による阻害(1)

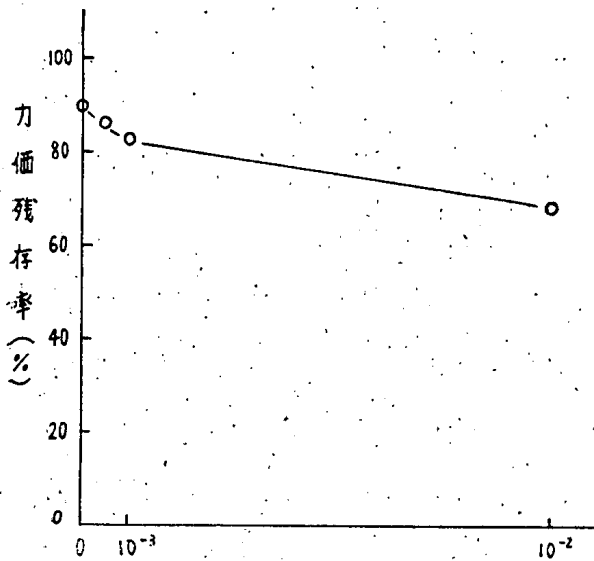
Ascorbic acid 濃度	0 hr.	5 hrs.	%
0 %	3.53	3.30	93.5
0.1	3.30	2.70	83.0
0.3	3.48	2.40	69.1
0.5	3.51	1.70	49.5
1.0	3.49	1.35	38.7

非常に強い阻害を示し、又  $H_2O_2$  の濃度に比例して強くなる。

### 5. Ascorbic acid と $H_2O_2$ による阻害(2)

Proteinase は同じく 2 mg/10ml/ pH 7.0, 30°C で  $H_2O_2$  を 0.1 % とした  
場合の Ascorbic acid の濃度を変えた場合は、Table 5 及び Fig. 5 の如く  
なる。

Fig. 5 Ascorbic Acid と  $H_2O_2$  の影響



Ascorbic Acid 濃度 (mol.)

pH 7.0  
Proteinase 2mg./10ml.  
 $H_2O_2$  0.1%  
Temp. 30°C  
Time 5 hour

Table 5 Ascorbic acid と  $H_2O_2$  による阻害 (2)

Ascorbic acid 濃度	0 hr.	5 hrs.	%
0 mol	3.50	3.13	89.4
$5 \times 10^{-4}$	3.54	3.10	87.4
$10^{-3}$	3.30	2.74	83.0
$10^{-2}$	3.24	2.22	68.5

この場合は  $H_2O_2$  を変えた場合程大きくはならないが、夫々単独の場合より多小大きくなるようである。

### 6. Cysteine による活性の復活について

Proteinase 2 mg/10ml, pH 7.0, 30°C で Ascorbic acid  $5 \times 10^{-4}$  mol  
 $H_2O_2$  0.5% で 5 hrs 処理した酵素液に Cysteine を加えた場合の活性復活  
を調べた結果は Table 6 に示す。



Table 6 Cysteine による失活酵素の再生

Cysteine 濃度	測定値	%
対 照	3.10	—
0	1.70	54.9
$0 \times 10^{-2}$ mol	1.17	37.8
$2 \times 10^{-2}$	1.60	51.6
$10^{-2}$	1.60	51.6
$5 \times 10^{-3}$	1.65	53.2
$10^{-3}$	1.40	45.2

結果は予想に反し全く逆の結果になった。即ち、濃度による変化はあまりなく、全て阻害促進を示し全く再生されない。

### 考 察

以上の結果を考察すると、実験に使用した細菌 Al-Proteinase は、水溶液中で自然失活のみられることは、酵素蛋白の空気酸化による変性と考えられる。酵素の酸素の酸化による変性の起こることは、 $H_2O_2$  を作用させた場合強い阻害作用がみられることから、自然失活の原因の一つに空気酸化が関係しているものとして差しつかえないと思われる。

自然失活、 $H_2O_2$  の作用による失活等の酸化により生ずるとされる失活に対して、Ascorbic acid のみによる失活は Free radical の生成が不完全なため、この場合は阻害は強く示されないと考えられる。

次に Ascorbic acid と  $H_2O_2$  の共同作用の場合に失活が大きく起きるのは、序言で述べた如く酸化、還元による変性より、Free radical による変性がよく強く現われたものと思われる。しかしながら Free radical のみの作用ではなく、酸化・還元による変性も同時に現われることは、夫々の濃度を变化させた場合に、特に  $H_2O_2$  を高濃度にするると強い失活を起こすことながらも推定される。又 Cysteine により活性の再生しないことは、酵素の活性基が  $SH \rightleftharpoons S-S-$  等の酸化還元系ではないか、又は Free radical の作用で蛋白変性が強く起こったためと思われる。更に又変性した酵素蛋白が、未変性の酵素

の作用を受け分解したとも考えることが出来る。しかし詳細なことに実験をして検討すべきで、我々の結果から種々論ずることは非常に危険である。

### 要 約

1. Ascorbic acid のみによる阻害は小さい。
2.  $H_2O_2$  のみによる阻害は、Ascorbic acid より大きく最大 30% まで阻害する。
3. Ascorbic acid と  $H_2O_2$  の共同による阻害は大きく 60% まで阻害する。
4. Ascorbic acid と  $H_2O_2$  の共同による阻害は Cysteine により再生しない。

### 文 献

- (1) 酵素研究法 (1)
- (2) 八木; 神戸女学院大学論集 8, 103(1961), 9, 95(1962)
- (3) 酵素研究法 (1), 長瀬産業尼崎工場酵素パンフレット

この研究は、私学研修福祉会の援助(昭和37年4月~昭和38年3月)により、大阪府立大学農学部で研究したものである。

御指導戴きました府立大学教授辰巳先生、宮浦先生に感謝の意を表します。