



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | タカラミラーゼAの基質特異性に関する研究  |
| Author(s)    | 伊勢村, 譲  |
| Citation     | 大阪大学, 1968, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/2634">https://hdl.handle.net/11094/2634</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# タカアミラーゼ A の基質特異性 に関する研究

## 目 次

### 緒 言

1

### I. 部分 O-メチル化アミロースに対する タカアミラーゼ A の作用

5

### II. 部分 O-メチル化 フェニル $\alpha$ -マルトシド に対するタカアミラーゼ A の作用

27

### 謝 辞

## 緒言

デンプン、グリコーゲンなどのメースルコースの重合体、  
 $\alpha$ -1,4-グルカノンに作用して、その加水分解を触媒する酵素は  
アミラーゼと総称され、その作用様式によって  $\alpha$ -アミラーゼ、  
 $\beta$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼに大別されている(1)。  
 $\alpha$ -アミラーゼは、アミロースに働きいた場合、最終生成物として  
マルトース、マルトトリオースおよびグルコースの  $\alpha$ -アノマーを主と  
 $\alpha$ -1,4-グルカノンの 収部のグリコシド結合を無秩序に切  
断することが知られている(2)。1881年、Atkinson はこうい  
かば Aspergillus oryzae が強力デンプン分解作用をも  
つ物質を産生することを見つけ、その後高峰年に至り、粉末  
酵素剤 タカシターゼが販売され、1951年に至り、  
Underkoflerら、Fischerら および赤堀らによると、それ  
を独立にタカアミラーゼ A が結晶標品として得られる  
ようになつた(1, 3)。動植物および微生物起源の  
種々の  $\alpha$ -アミラーゼが多く結晶としてまたかなりの純度で  
得られており、酵素化学的、蛋白質化学的研究がひらく  
行われてきている。インシエリ、リボヌクレアーゼその他  
のいくつかの蛋白質が行われた一次構造の決定や  
ミオブロビン、リソチムその他で行われた高次構造  
の決定は、いずれの  $\alpha$ -アミラーゼにも未だ成功して  
はいないけれども、それらが明らかになる日も、とう  
遠いものではない期待される。

Phillips ら(4, 5)のX線研究により、リソチム  
およびリゾチームトリ-N-アセチルキトオリース複合体の三次元的  
構造が明らかにされ、酵素作用のメカニズムが具体的

に提出されるに至り、化学的、物理化学的研究の裏付けが待たれている。現在までに得られていく多くの結果は、Phillips のモデルと矛盾する二つなく説明されるようであるが、なお多くの実験事実の集積が必要であることはいうまでもない。この意味からも松島ら(6-9)により行われてきた、合成基質または修飾基質を用いたリソチームの基質特異性に関する一連の研究は、重要な示唆を含むものといえる。そして、酵素の基質特異性を正しく知ることは、酵素の作用機作のモデルを創りあげる上に不可欠であり、またそのモデルが正当か否かの鍵を握るものなのであることは明白である。

タカアミラー-ゼ A の作用機作についには、リソチームの場合のように具体的なモデルはまだ提出されていないが、Phillips のモデルが基本的にはカルボヒドラー-ゼ一般に、したがってまたタカアミラー-ゼ A にも、あくまでもう一つではないかとも想像される。リソチームの基質特異性について得られていく化学的な結果(9-12)とタカアミラー-ゼ A の基質特異性と比較検討してみると、この意味から興味深いことである。

そこでタカアミラー-ゼ A が D-1,4-グルカンに作用するとき各ケトース残基との位置の水酸基が必須であるかを O-メチル化の方法により知ることを試みた。O-メチル化による効果は立体的なものと電気的のとのとの両面を考えられ、他の方法、例えは O-エチル化、O-ハイドロキシエチル化や元オキセ音節体を用いる方法などの実験結果との関連の間には、そこには得られた結果の適正な説明、角張尺には自

すと制限があるけれども、タカラミラーゼ A の基質特異性を明らかにしていく第一歩として本実験を行った。

第一章では タカラミラーゼ A の天然の基質であるアミロースを部分的に O-メチル化し、タカラミラーゼ A 触媒下の加水分解様式を調べた。第二章では 合成基質として知られている フェニル α-マルトシドを 同様に部分 O-メチル化して、その影響を調べた。

$\alpha$ -アーピ  $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼなどの单糖のアリコシドが食の加水分解と触媒する酵素の基質特異性で、同様な実験によく明らかなされたものは多くけれども、アミラーゼの分野では、二糖にわたっての各位置の水酸基のメチル化による影響が、本実験により、はじめて明らかになったものと思われる。

### 引用文献

- (1) Boyer, Lardy, Myrbäck 編, "The Enzymes", Academic Press (1960) Vol. 4, p. 313.
- (2) 赤堀監修, "酵素ハンドブック", 朝倉書店 (1966) p. 455.
- (3) 赤堀・水島編, "蛋白質化学", 基立出版 (1955) 3巻 p. 255.
- (4) D.C. Phillips, Sci. American, 215, 78 (1966).
- (5) C.C.F. Blake, L.N. Johnson, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips and V.R. Sarma, Proc. Royal Soc., B167, 378 (1967).

- (6) K. Yamamoto, M. Fujinaga and Y. Matsushima,  
Bull. Chem. Soc. Japan, 36, 1275 (1963).
- (7) S. Isemura and Y. Matsushima, Bull. Chem.  
Soc. Japan, 39, 2583 (1966)
- (8) K. Yamamoto and Y. Matsushima, Bull.  
Chem. Soc. Japan, 40, 194 (1967)
- (9) S. Hara and Y. Matsushima, J. Biochem.,  
62, 118 (1967)
- (10) 山本・松島、日本化学会第20年会講演  
稿集III, p. 700 (1967).
- (11) 松島・宮崎、日本化学会第20年会講演  
稿集IV, p. 698 (1967).
- (12) 原・松島, 生化学, 39, 672 (1967).

## 第一章 部分 O-メチル化アミロースに対する タカアミラーゼ A の作用 \*

化学的に修飾した基質を用いて、酵素反応のメカニズムを探ろうとする試みは、すでに数多く行われてきており、ある程度の成果が収められている。

種々の α-リコシダーゼの基質特異性も、部分修飾した基質や基質アナローグを用いて明らかとなつたものも多い(1, 2)。アミラーゼの領域においては、化学修飾したアミロースを基質として 2, 3 の実験が報告されている(3, 4)。最近では Weill と Bratt (5) が 6-O-メチルアミロースを基質として走源の異なる種々のアミラーゼによる加水分解反応の検討を行つてゐる。

タカアミラーゼ A [EC. 3.2.1.1] はすでに結晶化され、(6, 7)，それゆえ、この酵素に関する研究が数多く報告されていてもかかわらず、その基質特異性に関する記述は不明な点が残されている。

Phillips ら(8, 9)のすぐれた研究によりリソチド [EC. 3.2.1.17] の三次元構造が X 線解析から求められ、従来より一通り具体的な形で酵素作用機作のモデルが提出され、新たに興味をひいている。このモデルは原と松島(10)

\* 生化学, 39, 520 (1967);

M. Fujinaga-Isemura, T. Ikenaka and Y. Matsushima,  
J. Biochem., 64, 67 (1968)

により明らかにされたリゾチームの基質特異性に関する  
3化字的な実験結果とよく符合しており、修飾した  
基質を用いて酵素の作用メカニズムを探ることが有効  
であることの一端を示しているものと思われる。

この章では部分O-メチル化アミロースを用いて明ら  
かになったタカアミラーゼA(TAA)の基質特異性  
についての実験および結果が述べられている。

### 実験材料 および方法

酵素：タカアミラーゼA(TAA)は水アセトンから  
三回結晶化したもの用いた。少量の混在も予想され  
るマルターゼ[EC.3.2.1.20]による影響を最小限に  
するため、Hamaguchi(11)の方法に従って、TAAを  
0.02M 酢酸カルシウムに5.5%にとかし、1N NaOH  
を加えてpH 8.6-8.8で80°C, 30分保った後。  
3遍し、3液を標準酵素液とした。酵素濃度は  
280mμlにあける吸光度を島津分光光度計で測定  
し、 $E_{1\%}^{280m\mu} = 22.1$ の値(12)を用いて決定した。

部分O-メチル化アミロース：長瀬産業株式会社から  
貰ったメチル化アミロース(2g)に40mlの1N  
NaOHを加えて一晩、冷藏庫中に保ち完全に溶  
解する。この溶液に30% NaOHとジメチル硫酸  
を交互に加えてメチル化を行つた。反応物を1N  
酢酸で中和後、2日間流水で透析した後、凍  
結乾燥し、メチル化剤の量と反応温度を適当に  
選んでO-メチル化の程度の異なる4種の標品、

MA-1, MA-2, MA-3 および MA-4 を得た。

これらの Xyl-Pミロース 標品\* は水 および 鹽溶液  
によく溶け、また 遷動の増加 (= 4.34 ± 0.31)%  
TAA の基質となることがわかった。

標準用試料のモル-ク-メチルグルコース および Xyl-P  
モル-ク-メチル-グルコシドの合成： Xyl 2-O-Xyl-  
α-グルコヒドラシド は Haworth う (15) の方法に従つ  
て Xyl 2, 3, 4-Tri-O-アセチル-α-グルコシドを  
CH<sub>3</sub>I-Ag<sub>2</sub>O でメチル化して 調製した。

m.p. 146-147°C, [x]<sub>D</sub><sup>18</sup> -155° (C=1.55, H<sub>2</sub>O)

分析値： C, 46.29; H, 7.73; C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> と L<sub>2</sub>  
の計算値： C, 46.15; H, 7.15%.

2-O-Xyl-グルコース は Xyl 2-O-Xyl-グルコシド  
を Dowex 50×4 (H<sup>+</sup>型) を用いて 加水分解し  
調製した。 m.p. 151-159°C,  
分析値： C, 43.18; H, 7.30; C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> と  
L<sub>2</sub> の計算値： C, 43.29; H, 7.21%.

3-O-Xyl-グルコース は 1, 2 = 5, 6 = O-イソ  
アロヒドロ-α-グルコラクトース を Hakomori (15)  
の方法に従つて Xyl 化し、次に水 分解し  
調製した。 m.p. 164-165°C, [x]<sub>D</sub><sup>18</sup> 56° (C=1.45,  
H<sub>2</sub>O) 分析値： C, 43.20; H, 7.22%.

\* Xyl 基がアミロース中の一部の水酸基にのみ  
導入されているが、これらの標品と Xyl-Pミロースと  
区別せねばならぬ。

$\times 4\text{IL}\text{-}4\text{O}-\times 4\text{IL}-\beta-\text{ケルコセラ}$  は Bouvenot と  
 (17) の方法に従い、 $\times 4\text{IL}\text{-}2\text{,}3\text{,}4\text{-H}-\text{O}-\text{P}_2\text{O}_{10}-\beta-$   
 ケルコシドをジ $\times 4\text{IL}$  ヘルムアミド中、 $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$  で  
 $\times 4\text{IL}$  化し、後  $\text{CH}_3\text{ONa}$  で脱 $\text{P}_2\text{O}_{10}$  して調製  
 $m.p.$   $99\text{-}100^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{10} -19.5^\circ$  ( $C=1.64$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ )  
 分析値: C, 46.33; H, 7.75%.

$\beta\text{-O}-\times 4\text{IL}-\text{ケルコス}$  は Hough と (18) の方法  
 に従い、ビス $\times 4\text{L}$  ケルコスを  $\times 4\text{IL}$  化して調製した  
 $m.p.$   $147\text{-}148^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{10} 57^\circ$  ( $C=1.88$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ )  
 分析値: C, 43.27; H, 7.24%.

$\text{NaBH}_4$  による還元末端の検索 および

標準用試料の  $\text{M}_1\text{-O}-\times 4\text{IL}$ -ケルコスの調製:

TAA 存在下の  $\times 4\text{IL}$  ピロースの加水分解の際、との  
 ケルコント結合が切断されたことを示すものに。  
 素早く生成される還元末端部を  $\text{NaBH}_4$  で還元  
 し、メタリシス後、ケルコントラストの O- $\times 4\text{IL}$  調  
 单体としてガスクロマトグラフーで同定、定量を行  
 $T=0$   $\times 4\text{IL}$  ピロースの各標品を  $0.1\text{M}$ ,  $\text{pH } 5.1$  の  
 酢酸緩衝液中で TAA と共に  $37^\circ\text{C}$   
 に保ち、24 時間後、反応物を  $\text{NaHCO}_3$  で  
 $\text{pH } 8.1$  にしたのち、 $\text{NaBH}_4$  を加え  $4^\circ\text{C}$  で 24  
 時間、還元を行った。還元終了後、 $\text{Dowex } 50$   
 $\times 4$  ( $\text{H}^+$  型) で脱水し、メタールと共に蒸発し  
 蒸発乾固してホウ酸 $\times 4\text{IL}$  を残した後、 $2\text{N}$   
 メタールに  $\text{HCl}$  を加えてメタリシスを行った。  
 ガスクロマトグラフーの分析試料とした。

一方、モ1-O-メチルエカルペースを  $\text{NaBH}_4$  で還元して  
対応するモ1-O-メチルエカルペートンを得、標準用試  
料とした。

還元力の測定： TAA 1 =  $\frac{1}{2} \times \text{モ1-O-メチルエカルペース}$  の  
加水分解の程度は Nelson-Somogyi (13)  
の方法に従って還元力の  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  を測定して、決定した。  
1 ml の銅液に 0.5 ml の TA4 液を加え  
を加え、沸騰水浴 25 分間、加熱後、冷却し  
1 ml のヒ素モリドアン酸塩試葉を加えて。20  
分後に 20 ml の水を加えて、710 nmL における  
吸光度を測定した。

ガスクロマトグラフ： Chromosorb W 上、5%  
SE-30 の  $0.3 \times 300$  cm のカラムを充填した。  
島津 ガスクロマトグラフ ディテクタ GC-4A を用いた。  
カラム温度は  $180^\circ\text{C}$ 、 $\text{N}_2$  ガス流量は  $70 \text{ ml/min}$ 、  
であった。試料を封管にて  $2\text{N HCl}$  中  
 $105^\circ\text{C}$ 、20 時間メタノール溶解し、減圧下に  
濃縮乾燥を固め、内部標準として既入った  $10\text{ mg}$   
エリスリitol を既知量たてて含むヒドロキシル化  
を加え、ヘキサメチルシランとトリメチルシリル  
エーテルを加えてトリメチルシリル化を行った (14)。  
したがって、カルボース酸モ1-O-メチルカルボース  
酸基はそれそれメチルカルボニド又はメチルモ1-  
O-メチルカルボニドのトリメチルシリルエーテルとして  
ガスクロマトグラフで分析されることになる。  
糖アルコールもまたトリメチルシリルエーテルとして、

ガスクロマトグラフで分析した。

## 結果

メチルアミロースに対するTAAの活性に対するPHの影響： MA-1を種々のPHの酢酸緩衝液中でTAAと共に保ち、15分後の還元力の増加量を $710 \text{ m}\mu$ で測定して、TAA活性に対するPHの影響を調べた結果を図1に示す。

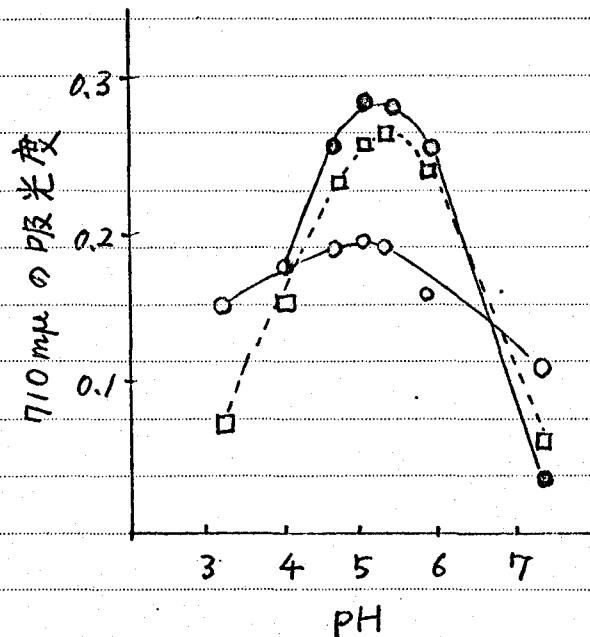


図1. MA-1 (-○-) , フェルム-マルトイド (-□-) およびアミロース (-●-) を基質としたときのTAA活性に対するPHの影響。アミロースに対する値は Matsubara ら (19) の報告から引用した。

フェニルメーマルトシドを基質としたときの PH の影響も同様に求めた。アミロース自身を基質としたときの実験結果は松原ら (19) の報告から引用して併せて図 1 に示した。MA-1 の濃度は 0.01%，TAA はその  $1/100$ ，フェニルメーマルトシドは 0.125%，TAA はその  $1/10$  を用いた。これら三種の基質に対して類似の曲線が得られたが、メチルアミロースを基質とした場合には、かなり酸性側でも若干の活性が認められた。図 1 から酵素反応の最適 PH として 5.1 を選び、以下の実験を行った。

メチルアミロース および それらの TAA 消化後の還元生成物の化学組成： 図 2 には、既知量の各標準用試料の混合物 (A)，MA-2 (B) および その TAA 消化物の還元生成物 (C) のメタリシス後の成分をガスクロマトグラフィーで分析した結果を示した。図 2 (A) の  $\text{D}_1\text{-}\alpha\text{-X}$  はグルクトールのメタリシス中に生成する副生物によるものである。4-O-メチルグルコースの 2 位のヒークは  $\text{D}_1\text{-}\alpha\text{-X}$  より C の位置に重なって検出されることがわかったが、メチルアミロース中の 4-O-メチルグルコースの量は理論的にも無視されるので図には示さなかった。図 2 (B) のヒーク I は、最初、3-O-メチルグルコースによるものと思われたが、カラム温度を下げて保持時間は 2 位くらいにすると 3-O-メチルグルコースによる  $\text{D}_1\text{-}\alpha\text{-X}$  前にあらわれることがわかった。ヒーク I は 2,6-3-O-メチルグルコースによるものと思われるが確認はされていない。

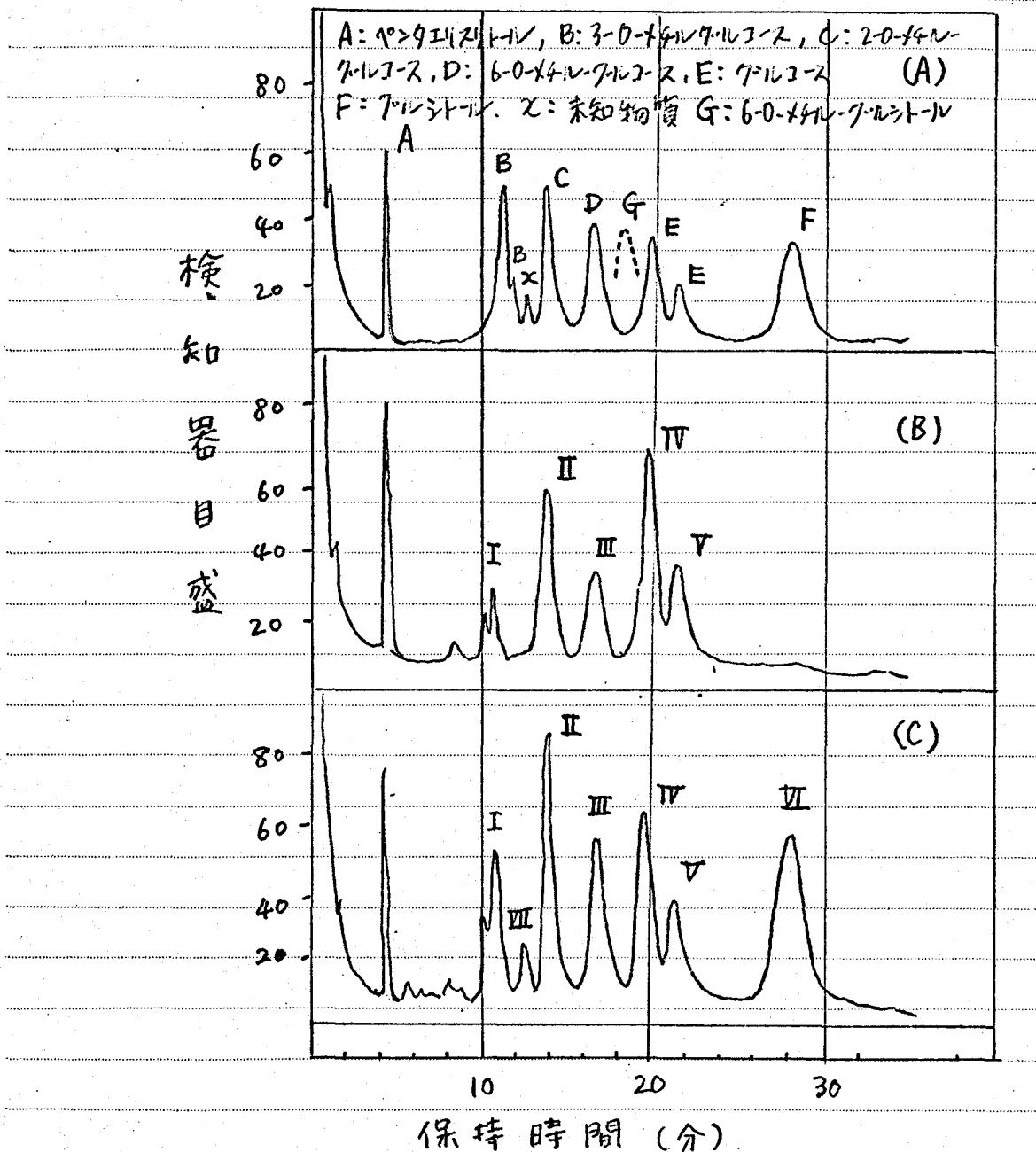


図2. 標準用試料混合物(A), MA-2(B)およびMA-2のTAA-硝化物の還元生成物(C)のかスクロコトグラフ. 各試料はメタリシス後、トリメチルシリル化して分析した。

ともかく、各メチルアミロース標品中の 3-O-メチルグルコースの量は無視できる程度であった。

他のピーク II, III および IV+V はそれぞれ 2-O-メチルグルコース、6-O-メチルグルコース および グルコースによるものと同定した。これらの成分の存在量をその比<sup>17</sup>面積とヘンタエリスリトール（図2の(A)のA）によると比<sup>17</sup>面積との比から求めて表 I に示した。

一方、メチルアミロースの各標品の NaBH<sub>4</sub>還元後の組成を表 I に併記し、MA-2 の場合のガスクロマトグラフィーの分析図を図2(C) に示した。新らしく生じるピークはピーク IV と V のみで、前者はグルコントール、後者は グルシトールのメチリシス中の副生成物と同定された。いずれの標品を用いた場合も、TAA 消化物の還元生成物とヨードの標品の間の 2-O-メチルグルコースと 6-O-メチルグルコース残基の存在量の比にはほとんど変化は認められなかった。しかしグルコース含量は著しく減少し、それに對応してグルシトールの生成が認められた。還元前のグルコース含量に対する還元後の グルコース + グルシトールの含量を 6-O-メチルグルコースに対するモル比で回収率として調べると MA-1 では 90%，MA-2 では 102%，MA-3 では 90%，MA-4 では 94% であったので TAA の作用により新しく生じた還元末端部が NaBH<sub>4</sub> によりほぼ完全に半糖アルコールに還元されていることが示された。2-O-メチルグルコースと 6-O-メチルグルコースの含量の比に還元前後で変化がみえたことは、これらのグリコンド結合が TAA の攻撃を受けたことを示すものと解釈される。

表 I. メチルアミロース標準品 および それらの TAA-消化後  
の還元生成物の化学組成 \*

|      | グルコース          | グルクロン | 2-O-メチル    | 6-O-メチル     |
|------|----------------|-------|------------|-------------|
|      | グルコース          | グルコース | グルコース      | グルコース       |
| MA-1 | 3.16 (47.5) ** | —     | 0.61 (9.9) | 1.00 (16.3) |

TAA-消化-NaBH<sub>4</sub>  
還元 MA-1 1.88 0.97 0.63 1.00

|      |             |   |             |             |
|------|-------------|---|-------------|-------------|
| MA-2 | 3.42 (41.6) | — | 1.22 (16.1) | 1.00 (13.1) |
|------|-------------|---|-------------|-------------|

TAA-消化-NaBH<sub>4</sub>  
還元 MA-2 2.69 0.81 1.22 1.00

|      |             |   |             |             |
|------|-------------|---|-------------|-------------|
| MA-3 | 1.66 (24.3) | — | 1.43 (22.6) | 1.00 (15.7) |
|------|-------------|---|-------------|-------------|

TAA-消化-NaBH<sub>4</sub>  
還元 MA-3 1.08 0.44 1.42 1.00

|      |             |   |            |             |
|------|-------------|---|------------|-------------|
| MA-4 | 0.79 (12.6) | — | 0.44 (7.5) | 1.00 (17.1) |
|------|-------------|---|------------|-------------|

TAA-消化-NaBH<sub>4</sub>  
還元 MA-4 0.57 0.20 0.41 1.00

\* 6-O-メチルグルコースに対するモル比で示した。

\*\* ( ) 内の数字は 各メチルアミロース標準品中の  
各残基の 水分・灰分の補正前の重量%を示す。

TAAによるメチルアミロースの加水分解反応の時間経過による変化：各メチルアミロース標品のTAA触媒下の加水分解の様子を還元力の増加量を710 m $\mu$ で測定して追跡し、その結果を図3に示した。50時間後の加水分解度はマルトースの還元力から換算してMA-1で29%，MA-2で13%，MA-3で6%，MA-4

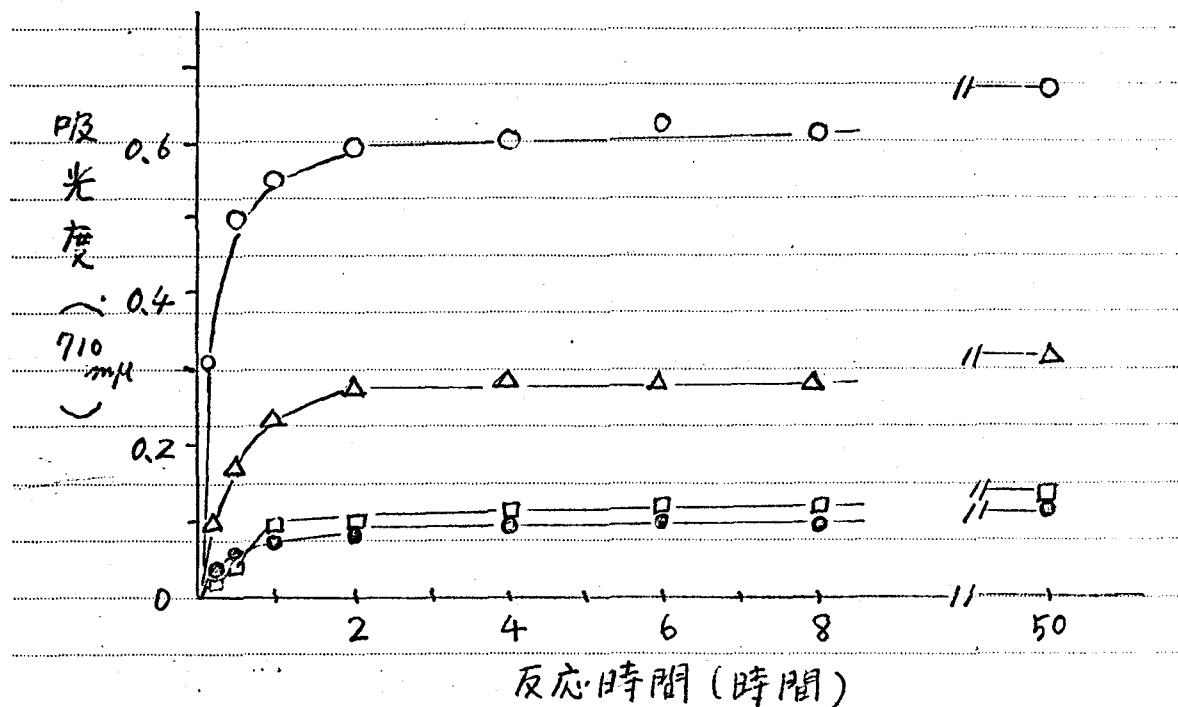


図3. TAA触媒下のメチルアミロースの加水分解反応過程。  
反応温度, 37°C. 基質濃度 0.05%, 酶素濃度は  
基質濃度の 1/400。

—○— MA-1, —△— MA-2, —□— MA-3,  
—●— MA-4.

で 5% であった。これらの数値は グルシートールの生成量から求めた値、16%，11%，7%，4% とほぼ一致して 113（表 I）。MA-1 では 減少したグルコース量から計算するとさらに良い一致が得られる。このことからメチル基の置換を受けているグルコース残基が多く存在するほど、そのオレイン酸素作用をよく受けていることが明らかである。

しかし、MA-1 と MA-2 の還元力の増加の差、L/T から カロ水分解率の差は、両者のグルコース含量がほぼ等しいことを考慮すると少し聞きすぎるようと思われる。これら両者の 6-O-メチルグルコース残基の含量はほぼ等しいけれども、2-O-メチルグルコース残基の含量は著しく異なっており、MA-2 には MA-1 の 2 倍程度多く含まれている（表 I）。そして MA-2 が MA-1 の 1/2 程度しかカロ水分解を受けていることから、アミロースの 6-O-メチル化よりも 2-O-メチル化の方が一歩効果的に TAA の作用を阻害しているように見える。同様の推定は、MA-3 と MA-4 の比較からも導き出される。MA-3 は MA-4 よりずっと多くの無置換グルコース残基を含有している（表 I）ので、もし 2-O-メチル基および 6-O-メチル基の与える影響が同じであれば、メチル基のナチュラル MA-3 の方が MA-4 より カロ水分解度はずっと大きくなると期待できるが、実験結果は 両者が同程度のカロ水分解を受けたことを示した（図 3、表 I）。この場合も MA-3 中の 2-O-メチルグルコース残基の含量に注目するとよく理解できる。

2-O-メチル化を与える影響は、部分 O-メチル化  $\text{Fe}=\text{IV}$  マルトシドを用いた実験でくわしく検討した

が、その結果は第二章に示す。

### メチルアミロースの TAA- 反応生成物の分離と確認：

メチルアミロースの TAA- 三硝化物の中から、当の生成物のいくつかを単離、同定するために  $n\text{-}ブ\cdotタ\text{-}1\text{L} = \text{イタ}\text{-}1\text{L} = \text{水}$  ( $10=1=2$ ) の系を用いて  $\text{ペ}\text{-}\text{パ}\text{-}\text{クロ}\text{ズ}\text{-}\text{ア}\text{-}\text{ラ}\text{イ}\text{-}$  を行った。図 4 に示すように還元力を示す 4 つのスポット

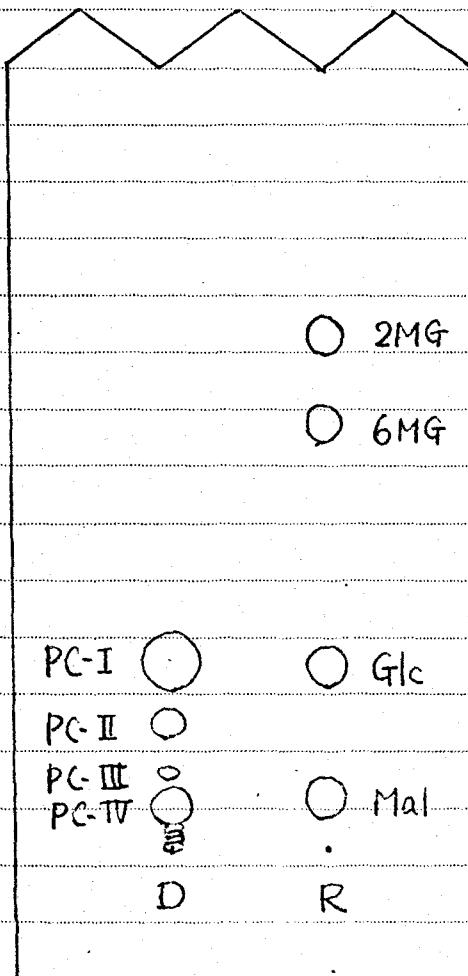


図 4. TAA- 角触媒下の  
MA-2 の加水分解生成物の  
ペ-パ-クロコマトグラフィー。

$n\text{-}ブ\cdotタ\text{-}1\text{L} = \text{イタ}\text{-}1\text{L} = \text{水}$   
( $10=1=2$ ) を展開し、

ペクトン性  $\text{AgNO}_3 - \text{NaOH}$  で  
発色。

D : MA-2 の TAA- 三硝化物  
R : 標準用試料、

Mal : マルトース

Glc : グルコース

2MG : 2-O-メチルグルコース

6MG : 6-O-メチルグルコース

の分離が得られた。スポット PC-I および PC-IV はそれをこれグルコース および ストースのスポットに一致した。モノマーのモノ- $\alpha$ -X-4ル-ケルコースに対するスポットは全く検出されなかった。調製用のペーパークロマトグラムは、5日間展開後、3紙の両端を切りとって発色させ各スポットの位置を確めてから、その部分を切り取り水で抽出して、そのまゝメタリシスした場合と、NaBH<sub>4</sub>還元後メタリシスした場合との成分を分析した。PC-I はカスクロストグラフ上でグルコースに対するモーティドを示し、還元するとグルシトールのみを示す。したがって PC-I はグルコースであると同定した。PC-II は 6-O-メチルグルコースとグルコースを 1 : 0.94 のモル比で含んでおり、NaBH<sub>4</sub>還元後は、6-O-メチルグルコースとグルシトールが 1 : 1.13 のモル比で得られたが、6-O-メチル-グルシトールは全く検出されなかった。以上のことから PC-II は 6-O-メチルグルコニル-グルコース、すなわち 6'-O-メチル-マルトースであると同定した。この MA-2 には 6-O-メチルグルコース残基よりも 2-O-メチルグルコース残基の方が多く含まれている(表 I)にもかかわらず、その酸素反応生成物中に 6'-O-メチルマルトースが相当量含まれており、一方、2-O-メチル-グルコースを含む二糖はほとんど確認できなかったことからも 2-O-メチル基による強い阻害作用が考えられる。

PC-III はグルコース、2-O-メチルグルコース および 6-O-メチル-グルコースを 0.79 : 0.15 : 1 のモル比で含み、NaBH<sub>4</sub>還元後は、7-ルコース、グルシトール、2-O-メチルグルコース および 6-O-メチルグルコースが 0.24 : 0.57 : 0.16 : 1 のモル比で検出されたので

グルコースを還元末端部にもつ H1サッカリドの混合物であると考えられる。この PC-III についてはさうに分離・精製すべき要であり、少量の 2'-O-メチル-マルトースの混在も否定しえることはできないが、PC-IV の量でさえ、非常にわかること（図 4）から考えて、その存在量は無視できる程度と推定している。

PC-IV はペーパークロマトグラフィー および カスクロマトグラフィーの結果からマルトースであると同定した。

## 考察

グルコース および 其の 2-O-マルトース、3-O-マルトース、6-O-マルトース単体の分析の際、直接トリマルチルシル化してカスクロマトグラフィーで分析した場合には 1 本のビーグルの重なりが認められ、相互の分離はよくないが、たゞ 11 ミニ後、マルトオリコシドトリマルチルシリルエーテルとして場合には相互に分離、定量が可能であることがわかる（図 1）。この方法で 3-O-マルトース-グルコース、4-O-マルトース-グルコース および グルコースは  $\alpha$ 、 $\beta$ -P1R-1 に対する比をそれぞれ与えた。グルコースの定量にはこの 2 つのビーグルの面積の比を用いた。2-O-マルトース-1-は  $\alpha$ -アノマーが優先的に生成して、 $\beta$ -P1R-1 に対する比は検出されなかつたので、 $\alpha$ -アノマーによるビーグルを用いて定量を行つた。6-O-マルトース-グルコースの場合は  $\alpha$ 、 $\beta$ -P1R-1 に対する比の値が重なつてまとめて測定され、それが 1 本のビーグルで示されたので、それが定量の場合も既知の存在量とペーパークロマトゲルの強度比の間に直線関係が成立し、定量が可能

であることが示された。もとの X4LP3D-2 の組成と TAA による加水分解反応後  $\text{NaBH}_4$  で還元したものとの比較により、X4LP3D-2 中の無置換ペルコース残基のケリコンド結合の半が加水分解されたり、2-O-メチル および 6-O-X4LP3D-2 残基のケリコンド結合は切断されていたことが推定された。6-O-メチルケリコンドは 図 2(A) に示すように、他の共存するピーカーとは重なりず、その存在は容易に確認できるのであるが、実際には、検出できなかった。2-O-X4LP3D-2 のピーカーはケリコース I および 2 のピーカーの間にくるので、分離しがた。2 つの標準用試料を故意に混ぜたときにみられるピーカーの形の変化は全く認められていなかったことから、2-O-X4LP3D-2 も存在しなかったと思われる。また、ペーパークロマトライアードにより分離確認されたオリゴ糖の還元末端部としては、ケリコースしか確認されておらず、こうした諸事実は、TAA が無置換ケリコースのケリコンド結合のみの加水分解を行なうことを強く示している。

一方、多くのケリコンターゼのアケリコン部に対する特異性はケリコン部の特異性に比べて一般にそれほど高いものではない(1, 2)。でんぶんの唾液アミラーゼによる加水分解物中の  $\alpha$ -D-ガラクトースの半分は、6-O-位にペルコース残基のついたオリゴ糖が含まれていることが知られており、この場合でもまた、ケリコース残基と 6-O-置換ペルコース残基の間のケリコンド結合が加水分解を受けた(20-22)。また TAA は X4LP, エ4LP, フエ4LP, P-4LP

フェニルなどの  $\alpha$ -マルトシドを加水分解することが報告され<sup>23</sup> (19.23). TAA は他の  $\alpha$ -アミラーゼ (20-22, 24) と同様に、かなり幅広いアガリコーン糖鎖性をもつているとのと考えられる。それゆえグルコース残基と, 2-O- $\alpha$ -グルコース残基またはアラロース残基と b-O- $\alpha$ -グルコース残基の間のグリコシド結合が加水分解され、2-O- $\alpha$ -グルコースや 6-O- $\alpha$ -グルコース残基がオリゴ糖の主鎖末端部にくさることは十分考えられる。もしこれらの O- $\alpha$ -グルコース残基のグリコシド結合が TAA にて完全に分解されたらまたは加水分解されるのがければ、モスマーの 2-O- $\alpha$ グルコースや 6-O- $\alpha$ -グルコースが検出されるはずであるが、したがって得られるのはグルコースのみで、2-O- $\alpha$ -グルコースや 6-O- $\alpha$ -グルコースも検索されなかつた。この事実もこれを O- $\alpha$ -グルコースのグリコシド結合が TAA 角骨質- $\beta$ -D-グルコースを脱けないことを示してゐる。

すでに三池中 (25) は フェニル b-O- $\alpha$ -グルコマルトシドが TAA の作用を全く受けないことを報告している。最近、Weill と Bratt (5) は部分 b-O- $\alpha$ -グルコマルトシドを基質としてブタ肺臓より *Bacillus subtilis* の  $\alpha$ -アミラーゼ、すなはちの  $\beta$ -P<sub>M</sub> ターゼ、ニアカイドのオヌホリターゼよりアメブリジン (*Aspergillus niger* からのアルコアミラーゼ粗標品) にかけ加水分解反応を検討してゐる。いずれの場合も b-O- $\alpha$ -グルコース残基のグリコシド結合は D-123 に分解されなかつたことを報告している。それゆえ C-6 位の OH 基は一般にアミラーゼと基質の相互作用、あたかも

基質-酵素複合体の形成に重要な役割を果して  
いるものといえる。 TAAの場合には、 6'-O-メチルマルトースが  
単離されたことから、 二糖単位で考えるとき、 非還元末端部の 6 位の OH の水素は 1 位か 3 位の 酢酸基及  
び 2' 位の OH に吸収はないと言われる。一方、 2'-O-  
メチルマルトースの存在量は十分確立できることは  
多くないことを考慮すると、 二糖単位の 非還元末端  
部の 2 位の OH には吸収のものと考えられ、 OCH<sub>3</sub>  
に変換すると、 酢酸基及び 3 位とんと反応しなくなる  
と考えられる。 マントス、 2-デオキシ-グルコース および  
ケルロミン等との基質アドグローブ阻害剤として  
用い、 TAA による フェニル-マルトシド 及び D-ニトロ-  
フェニル-マルトシド の加水分解の研究から、 小野寺ら  
(26) は TAA の基質結合部にあける、 基質との親  
和性生は、 C-2 の立体的变化に大きく影響さ  
れることを報告している。 このように C-2 の OH は  
C-6 の OH と同様またはそれ以上に アミロースが酵  
素反応を受けるときに、 重要な役割を果しているものと  
思われる。

キトオリコ-糖や 細菌細胞壁や部分 D-ヒドロ  
キシエカルキド-1 などの キソン誘導体の 2-アセトアミ  
ド基がリソナ-1-基質複合体の形成に不可欠  
であることから Phillips ら (8, 9) の X-線解析による研  
究也、 原と松島 (10) による 化学的研究から、 明ら  
かにわかっている。 リソナ-1, TAA や他のアミロース、  
セルラーゼなどの種々の炭水化物加水分解酵素の  
基質特異性を比較、 推定することにより、 リソナ-1  
で提唱された Phillips らのモデルが 基本的には

普遍性をもつものであることを確かめようかとも思はれており。

3-O-メチル化の影響は以上の実験からは不明であるが、その影響を調べた実験は後に述べられてる。

### 総括

- 1) タカアミラーゼ A (TAA) の基質であるアミロースを Haworth 法にキリ D-メチル化して、部分 D-メチル化アミロースを用意し、TAA の基質として用い、TAA の作用様式を検討した。
- 2) メチル基の置換のないグルコース残基のアセチド結合の 2 が TAA 作用に与りにくく分解を受け、2-O-メチルグルコース および 6-O-メチルグルコース 残基のアセチド結合は作用を受けたことなく不変である。この実験結果が得られた。
- 3) 二糖、6-O-メチルグルコシルグルコースが TAA 消化物中より単離確認されたことから、TAA は 6-O-メチルグルコースに続くグルコース残基のアセチド結合には作用するといふことがわかった。
- 4) 6-O-メチル化よりも 2-O-メチル化による方が基質は一歩 TAA 作用を受けにくくなり、2-OH の重要性がわかった。

本研究を行ふにあたり、アミロースを供与下さった  
長瀬自産業株式会社、ならびにウカミヨズイ-エ<sup>社</sup>を  
供与下さった三共株式会社に深く感謝申します。

### 引用文献

- (1) Boyer, Lardy, Myrbäck 編, "The Enzymes", Academic Press (1960) Vol. 4, p369.
- (2) Boyer, Lardy, Myrbäck 編, "The Enzymes", Academic Press (1960) Vol. 4, p.409.
- (3) B. J. Barnes and W. J. Whelan, Chem. Ind., 997 (1960).
- (4) C. E. Weill and R. Rebhahn, Carbohydrate Res., 3, 242 (1966).
- (5) C. E. Weill and M. Bratt, Carbohydrate Res., 4, 230 (1967).
- (6) S. Akabori, B. Hagiwara and T. Ikenaka, Proc. Japan Acad., 27, 350 (1951); J. Biochem., 41, 577 (1954).
- (7) E.H. Fisher and R. de Montmollin, Nature, 168, 606 (1951)
- (8) D.C. Phillips, Sci. American, 215, 78 (1966).
- (9) C.C.F. Blakee, L.N. Johnson, G.A. Main, A.C.T. North, D.C. Phillips and V.R. Sarna, Proc. Royal Soc., B 167, 378 (1967).
- (10) S. Hara and Y. Matsumura, J. Biochem., 62, 118 (1967)

- (11) Z. Hamaguchi, K. Hironi and S. Ono,  
J. Biochem., 51, 42 (1965).
- (12) H. Toda and S. Akabori, J. Biochem., 53,  
102 (1963).
- (13) M. Sonoyama, J. Biol. Chem., 160, 69 (1945);  
195, 19 (1952).
- (14) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita  
and W. W. Willis, J. Am. Chem. Soc., 85,  
2497 (1963).
- (15) W. N. Haworth, E. L. Hirst and E. G.  
Teace, J. Chem. Soc., 2858 (1931).
- (16) S. Hakomori, J. Biochem., 51, 205 (1964).
- (17) H. O. Bouyoucos, B. Lindberg and O. Thieander,  
Acta Chem. Scand., 11, 1783 (1957).
- (18) L. Hough, J. K. N. Jones and M. S. Magson,  
J. Chem. Soc., 1525 (1952).
- (19) S. Matsubara, T. Ikenaka and S. Akabori,  
J. Biochem., 46, 425 (1959).
- (20) P. Nordin and D. French, J. Chem. Soc., 80,  
1445 (1958).
- (21) B. J. Bines and W. J. Whelan, Biochem. J.,  
76, 253 (1960).
- (22) G. J. Walker and W. J. Whelan, Biochem. J.,  
76, 257 (1960).
- (23) S. Matsubara, J. Biochem., 49, 232 (1961).
- (24) K. M. Meyer and W. F. Goran, Helv. Chim.  
Acta, 34, 308 (1951).
- (25) T. Ikenaka, J. Biochem., 54, 328 (1963).

(26) S. Ono, K. Hiromi, Y. Nitta, N. Suestugu,  
and M. Takagi, 酶素代謝シンポジウム  
予稿集 18巻 p 229 (1966); 7th Intern.  
Congr. Biochem., Abstracts IV p. 768 (1967).

## 第二章 部分 O-メチル化 フエル α-マルトシドに対する タカラミラーゼの作用

第一章において部分 O-メチル化アミロースを用いた実験から、タカラミラーゼ A (TAA) [EC. 3.2.1.1] の基質特異性のいくつかがすでに明らかになつた。すなはち、図 1 に示す如く、1) TAA が切断する

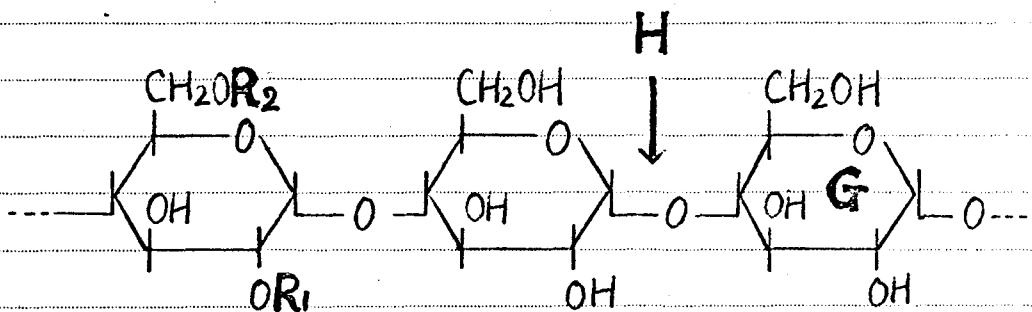


図 1 TAA の作用点

H : TAA 作用による加水分解点

I,  $R_1 = CH_3$ ;  $R_2 = H$

II,  $R_1 = H$ ;  $R_2 = CH_3$

のはメチル基の置換のないグルコース残基のグリコシド結合のみであり (H 点)、しかも 2) I の場合のように 2 位の OH が置換されたグルコース残基に続く場合は H 点での加水分解は起り難く、3) II の場合のように 6 位が  $OCH_3$  であれば、H 点での加水分解が可能であること、および 4) アグリコ

ン部にあたるG残基が $\beta$ -O-メチル化されていて、H点における加水分解は可能であること、などであった。以上のことからTAAが基質の少くとも二糖単位に対して特異性を有していることがわかる。そこでTAAの合成基質として知られているフェニル $\alpha$ -マルトシド(1,2)に対してもメチルアミロースと同様の取扱いを行ってTAAの基質特異性をさらにくわしく検討する実験を行った。

### 実験材料 および方法

酵素： TAAは第一章で述べた処理を行った標品を用いた。Rhizopus niveus のグルコアミラーゼ [E.C. 3.2.1.3] は生化学工業株式会社の製品(21エンzyme mg, 分子量 58,000, 最適 pH 4.5~5.0)をそのまま使用した。

フェニル $\alpha$ -マルトシド： 文南犬(3)の方法に従って合成した。ただし脱アルカリ反応には NaOCH<sub>3</sub> を用い、反応後 Dowex 50×4(H<sup>+</sup>)で処理する方法を用いた。m.p. 204~205°C, [α]<sub>D</sub><sup>28</sup> 211°(c=1.14, H<sub>2</sub>O)

分析値 = C, 51.66; H, 6.22; C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub> との計算値 = C, 51.67; H, 6.22%.

### 部分O-メチル化 フェニル $\alpha$ -マルトシド：

a) 部分O-アミル化 フェニル $\alpha$ -マルトシドを CH<sub>3</sub>I-Ag<sub>2</sub>O でメチル化すると、アミル基がかなり多く糖の一端の

位置だけをメチル化することは困難であることが知られる  
ている(4)。この重合移を利用して無秩序にメチル化  
されたフェニルα-マルトシドの混合物を調製した。

1g のフェニルα-マルトシドを 20 ml のヒドロキシル  
0.59 g の H4 フェニルクロルメタン(5) を加えて、30°C  
で一夜、かきまぜる。トルエン:エーテル:エタノール  
(v=2=1) を用いた三層塔 H12-クラン-1=キリ。  
2つの一部水酸基のいがれか一方に H4 基が  
導入されたもののか 反応の生成物であることが  
わかる。反応混合物を水に注ぎ、沈殿を  
を集め、ヒドロキシベンゾイルクロリドとベンゾイル  
エステルは離す。0°C で飽和した H3-水酸化銀を  
を 40°C で加えてトリフルオロ基を除き、部分ベンゾイル化  
物を  $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$  でメチル化し。ベンゾイル基と  
 $\text{CH}_3\text{ONa}$  で除き、酸性脱脂油および二硫化炭素で  
処理後、津結乾燥すると、約 0.5 g の黒色の  
部分 O-メチル化 フェニルα-マルトシド混合品 (MP-A)  
が得られた。

b) フェニルα-マルトシドをメタノールに溶解し、過  
当量の  $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$  でメチル化し、3 時間後、津結  
乾燥して O-メチル基含量の異なる 4 種の部分 O-  
メチル化フェニルα-マルトシド混合品 MP-1, MP-2,  
MP-3 および MP-4 を調製した。

標準用試料: メチル 2,3-ジ-O-メチル-α-グルコ  
ピラノシドはメチル 4,6-O-ベンゾイル-β-D-グルコピラ  
ノシドを  $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$  でメチル化して合成した(6)。  
m.p. 83-84°C, [α]D 146 (c=1.40, H2O).

分析値: C, 48.58; H, 8.16;  $C_9H_{18}O_6$  としての  
計算値: C, 48.14; H, 8.10 %.

4.6-ジ-O-メチルケルコスは Bell(7) の方法  
の変法を用い、メチル 4.6-O-ペニシルテノン  $\alpha$ -ケルコ  
シドと  $100^{\circ}\text{C}$  のジオキサン中で  $\text{NaH}$  とペニシルクドリド  
1=ヨウ。メチル 4.6-O-ペニシルテノン-2,3-ジ-O-ペニシル-  
 $\alpha$ -ケルコシドに導き、60% 酢酸でペニシルテノン基  
を除き、ジオキサン中、 $70^{\circ}\text{C}$  で  $\text{Pd-C}$  触媒存在の  
接着剤還元で脱ペニシル化を行って後、塩酸加  
水分解して合成した。m.p.  $162\text{-}163^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{18}$   
68 (C=0.85,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

分析値: C, 46.11; H, 7.77;  $C_8H_{16}O_6$  としての  
計算値: C, 46.15; H, 7.75 %.

Kuhn's (8) がこの物質に対する m.p.  
 $163\text{-}164^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{23}$  67.5 の値を報告している。

この 4,6-ジ-O-メチルケルコスを  $\text{NaBH}_4$  で  
還元したものと単離できることはなく、4,6-ジ-O-メチル  
ケルコスの標準用試料とした。

フェニル  $\alpha$ -ケルコシドは文南大 (9) の方法  
に従って合成した。m.p.  $172\text{-}173^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{28}$   
178 (C=0.92,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

分析値: C, 55.98; H, 6.28;  $C_{12}H_{16}O_6$  とし  
ての計算値: C, 56.24; H, 6.29 %.

他の標準用試料は第一章で述べたものを使用

した。

フェノールの定量： フェノールの定量は松原ら(2)の方法に従った。酵素反応液または、 $105^{\circ}\text{C}$ 、16時間、2N HCl 加水分解物を  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  液で中和した溶液の0.5mlを3mlの5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液に加え、4倍にうすめたフェノール試薬1mlを加え、全体を $37^{\circ}\text{C}$ に30分保つた後、 $660\text{ m}\mu$ における吸光度を測定した。

過ヨウ素酸変化： 過ヨウ素酸の消費量は池中(10)の方法に従って、 $290\text{ m}\mu$ の吸光度の減少率から求めた。過ヨウ素酸変化による糖の分解の追跡には、予めヘンタエリスリトルと一定量試料中に加えて過ヨウ素酸変化を行い、一定時間毎にその一部を取り出し、イソレニクトリオールを加えて後、カスクロマトグラフィーで糖を分析し、ヘンタエリスリトルとの摩耗比から、分解率を求める方法をとった。

10-10- あさひ薄層クロロゲラフィー： 東洋  
口紙 No.51, あさひ Merck社製 Kieselgel  
G を用いて行った。展開剤は、溶媒A =  
 $n\text{-}7\text{-ターレ}: \text{エタノール} = \text{水} (10 = 1 = 2)$ ,  
溶媒B =  $n\text{-}7\text{-ターレ}: \text{酢酸} = \text{H}_2\text{O} (3 = 1 = 1)$ ,  
溶媒C = 水食飽和ブタノール  
の三種を用いた。

その他、 $\text{NaBH}_4$ による還元末端の分析法、還元力の測定法、ガスクロマトグラフーなどは、第一章で述べた方法に従つた。

## 結果

MP-A の化学組成： 表 I に MP-A をメタリシス後、トリメチルシリルエーテルとしてガスクロマトグラフーで分析した。MP-A の化学組成がより名標準試料によると、 $\times 4\text{ル}\ \alpha\text{-ケルコビド}$  (保持時間は約 20 分) に対する相対保持時間  $R_t$  を示す。 $\times 4\text{ル}\ 4\text{-O-}\times 4\text{ル}\beta\text{-ケルコシド}$  によると  $\beta\text{-ケルコシド}$  と  $\times 4\text{ル}\ 2\text{-O-}\times 4\text{ル}\beta\text{-ケルコシド}$  は約 0.68 ので、 $2\text{-O-}\times 4\text{ル}\beta\text{-ケルコシド}$  の定量には、 $\times 4\text{ル}\ 4\text{-O-}\times 4\text{ル}\beta\text{-ケルコシド}$  によると  $\alpha, \beta\text{-ケルコシド}$  の面積比を取る。標準試料で決定しておき、この比から算出した  $\times 4\text{ル}\ 4\text{-O-}\times 4\text{ル}\beta\text{-ケルコシド}$  によると  $\beta\text{-ケルコシド}$  の面積から差し引いた値を用いた。

MP-A の TAA-DRK 分解生成物の分離と確認： 部分  $\text{O-}\times 4\text{ル}\beta\text{-ケルコシド}$  の場合と同じ様に  $\text{H-O-}\text{P}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{Cl}$  によると DRK 分解生成物の単離、確認を行つた。  
 100 mg の MP-A を 10 ml, 0.2 M, pH 5.1 の酢酸緩衝液中に溶解し、0.1% ピルカドスミスした TAA 滴定液 10 ml を加えて  $37^\circ\text{C}$  に保つ。20 時間後、フェノールの遊離量が止めたか DRK 分解率は 36% であった。 $\text{NaBH}_4$  還元後のガスクロマトグラ

表 I. 部分 O-メチル化 フェニル α-ケトシド標準品 MP-A の  
化学組成とその成分糖の相対保持時間\*

|                     | MP-A 中の残基の<br>重量 % | R <sub>t</sub> ** |
|---------------------|--------------------|-------------------|
| グルコース               | 31.8               | { 1.00<br>1.09    |
| 2-O-メチル-グルコース       | 7.0 ***            | 0.68              |
| 3-O-メチル-グルコース       | 16.0               | { 0.55<br>0.58    |
| 4-O-メチル-グルコース       | 7.2                | { 0.61<br>0.68    |
| 6-O-メチル-グルコース       | 9.1                | 0.82              |
| 4,6-β-D-O-メチル-グルコース | 4.4                | { 0.49<br>0.51    |
| 2,3-β-D-O-メチル-グルコース | —                  | { 0.38<br>0.41    |

\* メチルケリコシド + メチルシリレーテルとして 加えクロロヘン  
で分析した。

\*\* メチルメチルコビラシド 1 = 73 ピーク (保持時間, 約 20 分)  
1 = 3.8 相対保持時間。

\*\*\* メチル 4-O-メチルコシドの α および β P/P - 1 = 73  
279 ピークの面積比 (1 = 0.47) を用ひ  $\beta - P / P - \alpha$   
のピーカ面積を求め、それを  $R_t = 0.68$  のピーカ面  
積から差し引いて計算した値。

ついで、糖アルコールとしては、グルシトールのみが検出された。TAA-消化物を100°Cで3分間加熱後、Dowex 50 (H<sup>+</sup>型)で脱塩し、凍結乾燥しておく。一部をペーパークロマトグラフィーにかけた。アセトン+生AgNO<sub>3</sub>-NaOHまたはアリニン水素フル酸試葉で発色させると還元力を有する物質として、図2に示すよう4つのスポットが検出された。

各スポットの Nelson-Somogyi 法より求めた還元力の比率は PC-A, 19%; PC-B, 8%; PC-C, 37% および PC-D, 36% であった。この場合モマーのモード-メチルコスは全く検出されなかった。

PC-Aはグルコスとミロースの成分を含む。この成分は4,6-ジ-O-メチルフルコスであることが、以下のようにLC法で確かめた。PC-Aをメタリシス後トリメチルシリエーテルと乙酸エチルで分別分析すると、メチル-フルコビドリドに相当する保持時間Rtが0.49, 0.51, 1.00 および 1.09の4つのピークが得られ。後の2つのピークはグルコス1, 5-3糖との同定され、前の2つのピークは標準用試料の4,6-ジ-O-メチルフルコスと同様又は全く同じ保持時間Rtに得られた(表I)。PC-AのHCl加水分解物は溶媒Aおよび溶媒Bを用い3分子のペントクロマトグラフィー。グルコスに對応する3つのスポットと4,6-ジ-O-メチルフルコスに對応するスポットをえた(図2)。さらに4,6-ジ-O-メチルフルコスに對応する部分を切りとり、口紙から水で抽出後

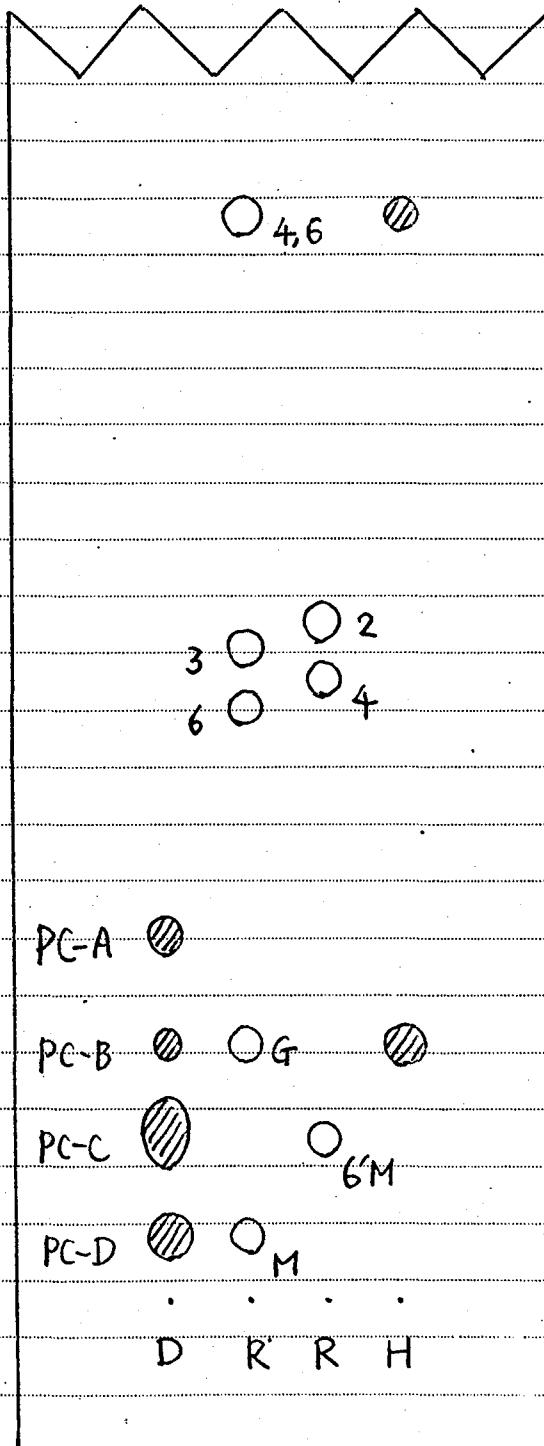


図2. MP-AのTAA

消化物 および PC-A  
の 塩酸 及び 水 分解 產物  
の 1'-10'-ケロコトノン。  
溶媒 A を 使用。

D: MP-A の TAA-  
消化物。

H: PC-A の 加水分解 物

R: 標準用試料。

M: 21L-2,

G: 7-1L2-2,

6'M: 6'-0-X4L-21L-  
L-2\*

2: 2-0-X4L-71L2-2

3: 3-0-X4L-7-1L2-2

4: 4-0-X4L-71L2-2

6: 6-0-X4L-7-1L2-2

4,6: 4,6-3'-0-X4L-  
7-1L2-2

\* X4L P-1D-2 の TAA-消化  
物 中 に 単離 した 標品  
(第一章 参照)。

そのまゝ、 $\text{Ti} \times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1$ としてガスクロマトグラフで分析すると、 $R_t$ が 0.58 と 0.76 の 2 つのビーグルが得られる。これらは 4,6-ジ-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$   $\text{Ti} \times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{I}$ -テルの  $\alpha$ 、 $\beta$ -P12-1 または 2 のビーグルに合致することもわかる。またロ紙からのおよき物を  $\text{NaBH}_4$  で還元後、ガスクロマトグラフ-2、4,6-ジ-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{I}$ -テル  $\text{Ti} \times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{I}$ -テルと L2 が得られることが示された ( $R_t = 0.65$ )。LT が  $\alpha$  と PC-A は ケルコスと 4,6-ジ-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$  を含むことか P12-1 と T2-1。モル比をまとめると  $0.98 = 1$  と  $T2-1/T2=0$ 。理論的 T1 = 4,6-ジ-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$  は、二末端の非還元末端にしか来れないので、PC-A は 4,6-ジ-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$  と見えてくる。余の T2 は PC-A の  $\text{NaBH}_4$  還元後の分析を行ふと、ケルシテルと 4,6-ジ-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$  が  $0.93 = 1$  のモル比で得られるので、PC-A の構造が 4,6-ジ-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$  であることは確実となつた。

PC-B および PC-D は  $1^\circ - 1^\circ$  およびガスクロマトグラフ-2 の結果から、それぞれケルコスおよびケルコス-T-アミドと決定した。

PC-C は 部分 O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{I}$  P310-2 の TAA-消化物中から単離された 6'-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$  と同一の  $R_f$  値を示してゐる(図 2)。PC-C は 4-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$ 、6-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$  およびケルコスを  $1 = 1.52 = 2.58$  のモル比で含んでおり。PC-C は  $\text{NaBH}_4$  で還元後には 4-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$ 、6-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$  およびケルシテルが  $1 : 1.55 : 2.79$  のモル比で得られケルコスは検出されなかつた。4-O- $\times 4\text{IL}\text{C}_1\text{H}_1\text{L}_1\text{C}_2\text{-2}$

トルも 6-O-メチルアラルコールも全く検出されなかつた。また、 $\text{NaBH}_4$  過元の前後で 4-O-メチルアラルコースと 6-O-メチルアラルコースのモル比はほとんど変化せなかつた。PC-C は 4'-O-メチルジルコースと 6'-O-メチルジルコースのモル比で約  $1 = 1.5$  の混合物であることを認め。

MP-1, MP-2, MP-3 および MP-4 の化学組成とそれらの TAA-消化後の置換生成物の化学組成：

表Ⅱに示す化学組成からもわかるように、メタノール中で  $\text{CH}_3\text{I} - \text{Ag}_2\text{O}$  によるメチル化を行ふと、主として 2 位の OH 基に  $\text{CH}_3$  基が導入され、2 位の OH 基の酵素反応における後割を調べるのに都合がよい。これらの部分 O-メチル化アラルコールトリニドで TAA を作用させた後、 $\text{NaBH}_4$  2-過元してかスルコロストラフラン-7-分木行した結果を表Ⅱに併せて示す。糖アルコールとしてはグルコシトルのみが検出され、他のメチル置換アラルコース組成のモル比には、TAA 作用を受ける前と比べて、ほとんど差異がないことがわかつた。別に取れたフェルの含量は MP-1 で 22.9%, MP-2 で 22.5%, MP-3 で 22.2%, MP-4 で 21% であつたので表Ⅱに示す成分とあわせてある。これらの成分は、水分を補正後は、各部分 O-メチルアラルコールトリニドの 93~99% が説明されるに至つた。

TAA による部分 O-メチル化 アラルコールの水分組成の時間経過による変化：最終基質

部分 O-X41/1C7C=1L d-ZM1-3ド やよび それらの TAA-  
表 II. 消化物の NaBH<sub>4</sub>還元生成物の化学组成

|                       | ケルコス    | ケルシ<br>トール | 2-O-X41/1C7C=1L d-ZM1-3ド | 3-O-X41/1C7C=1L d-ZM1-3ド | 4-O-X41/1C7C=1L d-ZM1-3ド | 6-O-X41/1C7C=1L d-ZM1-3ド | 2,3-ジ-O-X41/1C7C=1L d-ZM1-3ド |
|-----------------------|---------|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|
| MP-1                  | (49.5)* | (0)        | (15.8)                   | (5.4)                    | (1.0)                    | (1.0)                    | —                            |
|                       | 9.88    | 0          | 2.93                     | 1.00                     | 0.19                     | 0.19                     | —                            |
| MP-1のTAA-消化-<br>還元生成物 | 7.21    | 3.15       | 2.96                     | 1.00                     | 0.19                     | 0.21                     | —                            |
| MP-2                  | (32.6)  | (0)        | (24.5)                   | (8.5)                    | (1.1)                    | (1.2)                    | (2.0)                        |
|                       | 4.16    | 0          | 2.88                     | 1.00                     | 0.13                     | 0.14                     | 0.22                         |
| MP-2のTAA-消化-<br>還元生成物 | 3.73    | 0.29       | 2.82                     | 1.00                     | 0.13                     | 0.10                     | 0.25                         |
| MP-3                  | (27.0)  | (0)        | (29.0)                   | (9.6)                    | (1.2)                    | (1.3)                    | (7.5)                        |
|                       | 3.05    | 0          | 3.00                     | 1.00                     | 0.13                     | 0.14                     | 0.34                         |
| MP-3のTAA-消化-<br>還元生成物 | 3.26    | +          | 3.33                     | 1.00.                    | 0.13                     | 0.14                     | 0.38                         |
| MP-4                  | (27.2)  | (0)        | (27.2)                   | (7.4)                    | (1.1)                    | (1.3)                    | (3.7)                        |
|                       | 4.00    | 0          | 3.68                     | 1.00                     | 0.15                     | 0.18                     | 0.46                         |
| MP-4のTAA-消化-<br>還元生成物 | 4.02    | 0          | 3.61                     | 1.00                     | 0.15                     | 0.16                     | 0.42                         |

\* ( )内の数値は各標品中の残基の重量%を示す。

\*\* ケルシトールのメタリシス中に生成する物質によると

ヒートと重なるため、直接求められなかつたので。

NaBH<sub>4</sub>還元を行う前の値を使用した。

\*\*\* 痕跡程度の存在が認められた。

濃度 0.1%，酵素濃度 0.01%，0.1M. pH 5.1 の  
酢酸緩衝液中で 37°C で酵素及  
水を行い、フェルの活性度から、加水分解率を  
測定したと図 3 のよろは測定された。

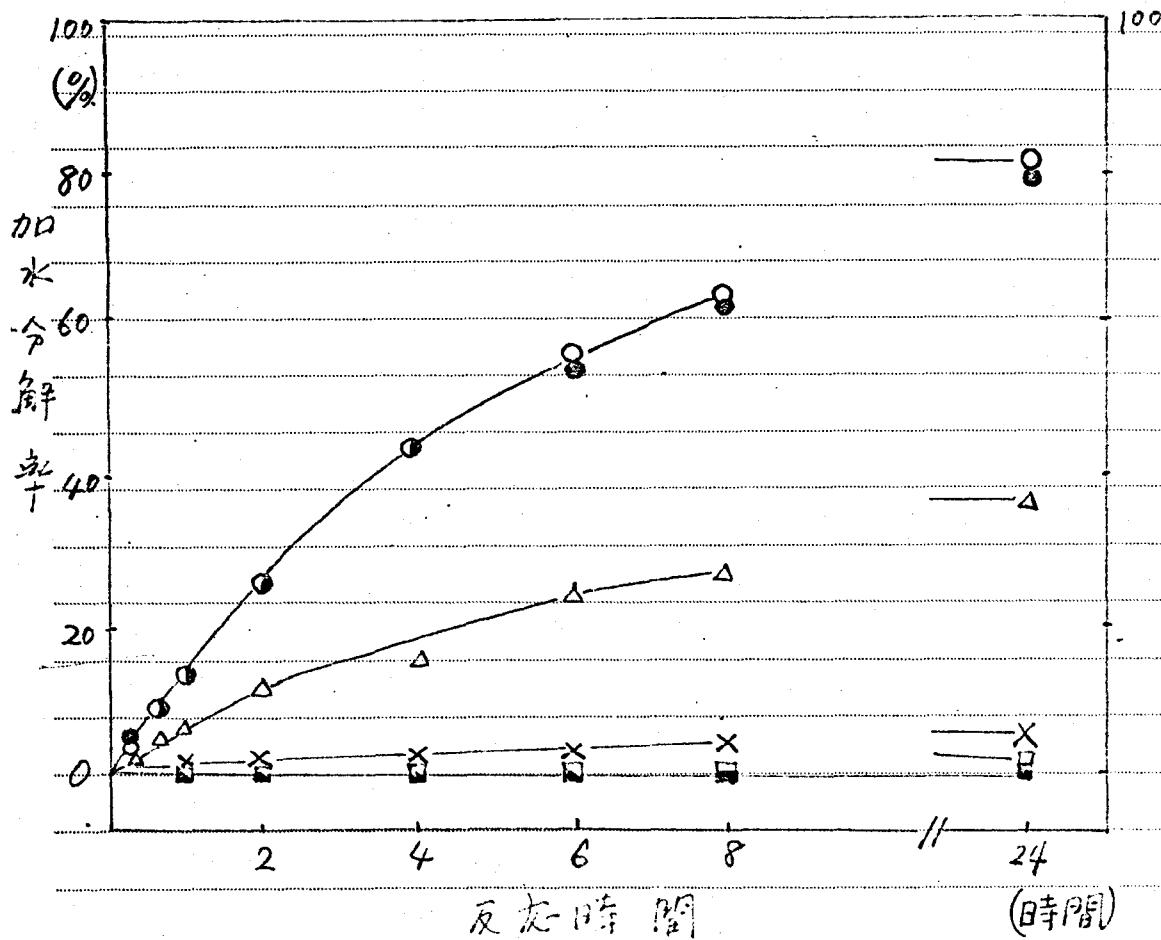


図 3. フェル α-マルトヘptaオースの部分 D-マルトオースの  
TAA 作用による加水分解過程。

—○— フェル α-マルトヘptaオース, —●— フェル α-マルトヘptaオース + MP-4  
—△— MP-1, —×— MP-2, —□— MP-3, —■— MP-7  
基質濃度 0.1%; 酵素濃度 0.01%; 0.1M 酢酸緩  
衝液, pH 5.1. 37°C.

24日<sup>2</sup>部屋の TAA 水分解率は MP-1 で 34.8%, MP-2 で 5.0%, MP-3 で 1.6% で、T=0 MP-4 の場合  
は フェニルの遊離度も 2% である。過酸化水素も全  
く消費されない。表 II に示した各標準品の組成  
から、3-O-メチルケルコス、4-O-メチルケルコス および 6-O-  
メチルケルコス などの存在量は もちろんなく、T=0  
時の存在モル比は どの標準品もおなじと見なして  
いいことわかるので、カルボン酸分解率の大さな差は  
2-O-メチル基の 与える大きさに影響によるものとみた。  
37-あ33。

MP-4 標準中に含まれる 部分 O-メチル化 フェニルα-  
ケルトシドの化学構造： すでに示されたように、MP-4  
は TAA がカルボン酸分解を全く受けない。LT=0.32.  
この標準品中に、TAA の作用を強く阻害する物質一  
種が含まれていないことが判明すれば、この  
標準品中に存在しないすべてのフェニル α-ケルトシドの  
誘導体は TAA の作用を受けないと見える。MP-4  
には 2-O-メチルケルコス残基が多量に含まれてい（表 II）  
る。図 4 に示した 3 種の化合物が存在し、それら

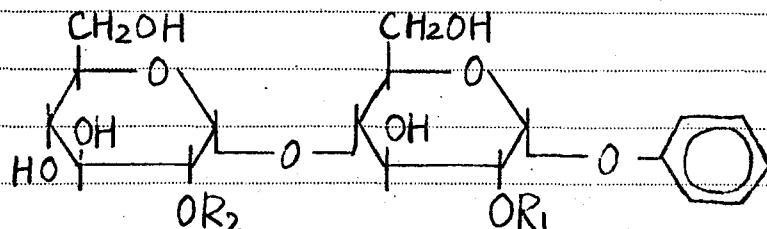


図 4. III :  $R_1 = CH_3$ ;  $R_2 = H$ ,

IV :  $R_1 = H$ ;  $R_2 = CH_3$ ,

V :  $R_1 = CH_3$ ;  $R_2 = CH_3$

か TAA の作用を受けたらしいことは充分想像できます。  
ところで、これらの物質が存在しているか否かの確認を正  
を得る目的で、*Rhizopus niveus* のアルコアミラーゼに  
MP-4 の加水分解と、その生成物の確認を行  
う。

100 mg の MP-4 に対して 10 mg のアルコアミラーゼ  
を加え、0.1 M, pH 5.0 の酢酸緩衝液中で加水分  
解を 2 日間行い、さらに 5 mg のアルコアミラーゼ  
を追加して、1 日反応を行う。Dowex 50×4 (H<sup>+</sup>型)  
で脱塩後、凍結乾燥して無色の粉末を得る。  
その一部を薄層 C を用いて Kieselgel G 薄層クロ  
マトグラフィーで分離し、図 5 に示すように結果立  
得る。

スポット TLC-I はフェルを含むほか、2-O-4-  
ケルコースと 3-O-4-1-7-1-2-2-3 残基を約 10% 含  
んでおり、フェル 2-O-4-1-2-1-7-1-2-3 と  
少量のフェル 3-O-4-1-2-1-7-1-2-3 から成る。  
ものと考えられる。また、フェル 4-ケルコースは相当  
する Rf 値に近いにとかかわらず、ケルコースを全く含  
んでいないことから、TLC-I 中のフェル 4-ケルコースの  
存在は否定された。一方、還元力を示す唯一のスポット  
TLC-IV は薄層 B を用いて薄層クロマトグラフ  
用溶媒 A を用いて 7-O-7-1-2-2-7-1-2-1-4-1-2-1-  
2-7-1-2-1 の結果からケルコースであると同定した。これ  
モルの 2-O-4-1-7-1-2-2 と 3-O-4-1-2-1-7-1-2-2 の存在を  
認めることはできなかった。TLC-I および TLC-IV は  
ケルコースミラーゼ消化後に検出されたスポットであり、  
いずれも糖部分はモルであることを考慮すると、両者が

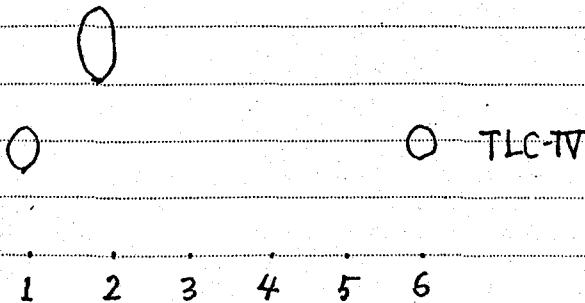
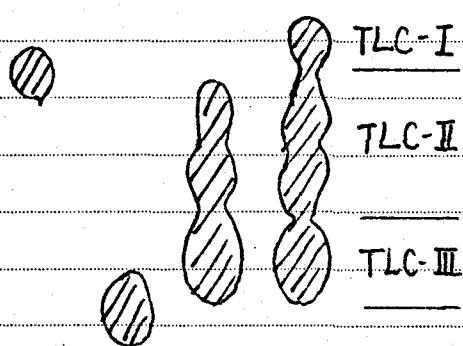


図5. MP-4のR.

niveus. グルコアミラーゼ  
加水分解物の薄層

クロマトグラフィー。  
溶媒Cで展開し  
5%メタール性硫酸  
で発色させた。斜線  
で示したスポットは  
赤、味がかかるに黒色に、  
その他のスポットは褐  
色に発色した。

- 1: グルコース
- 2: 2-O-メチル-グルコ-  
ゼ
- 3: フエノラル-  
アルコニド
- 4: フエノラル-  
アルクトシド
- 5: MP-4
- 6: MP-4のグルコ-  
アミラーゼ消化物

同じ化合物から由来したものと推定される。すなわち MP-4 標品中には フェニル 2-O- $\alpha$ -D-グルコシド(図 4 の II) および少量のフェニル 3-O- $\alpha$ -D-グルコシドが存在しており、おそらくその大部分が *R. niveus* のグルコアミラーゼの作用によりかか水分解を受け、TLC-I と TLC-IV のスポットを示したと考えることができます。*R. niveus* グルコアミラーゼの基質特異性は明らかでないが他のグルコシターゼのグルコン特異性(II)から考へて、フェニル 2-O- $\alpha$ -D-グルコシドやフェニル 3-O- $\alpha$ -D-グルコシドには僅かに特異性と思われる。これら(10)は *Rhizopus delemar* グルコアミラーゼがフェニル 6-O- $\beta$ -D-吡喃糖 $\alpha$ -D-グルコシドのグルコシド結合には作用しないことをすでに報告している。

MP-4 中の III およびフェニル 3-O- $\alpha$ -D-グルコシドの存在量は、*R. niveus* グルコアミラーゼ作用によるグルコースの遊離量を還元力の増加から求めることで決定した。基質濃度および酵素濃度の異なる A, B 2 の条件下でかか水分解を行い、フェニルの定量または還元力の増加量をグルコース換算した値より求めた結果を表Ⅲに示す。MP-4 のみかけの分子量として、HCl 加水分解後のフェニルの定量より求めた値、438 を用いた。A の条件下、すなわち、基質濃度  $1 \times 10^{-3}$  M, 酵素濃度  $1 \times 10^{-6}$  M で、フェニル  $\alpha$ -D-グルコシドは完全にかか水分解されることは明らかである。MP-4 の還元力の増加は 434 であること、B の条件下、すなわち基質濃度  $5 \times 10^{-3}$  M, 酵素濃度  $3.3 \times 10^{-6}$  M で標準作用試料のフェニル  $\alpha$ -D-グルコシドからフェニルの遊離がみられるのに、MP-4 からは全くみとめられなかったこと、あとはフェニル  $\alpha$ -D-グルコシドが MP-4 の消化物中に存在して

表Ⅲ. *Rhizopus niveus* ツルコミラーゼによる加水分解率\*

|             | 条件 A | 条件 B |       |
|-------------|------|------|-------|
| 基質          | 30分後 | 30分後 | 24時間後 |
| フェルダ-グルコシド  | 0    | 24   | 47.6  |
| MP-4.       | 0    | 24   | 20.9  |
| X41-α-ツルコシド | 0    | 0    | 0     |
| フェルダ-マルチシド  | 100  | 100  | 100   |

条件 A: 基質濃度  $1 \times 10^{-3}$  M, 酵素濃度  $1 \times 10^{-6}$  M,

条件 B: 基質濃度  $5 \times 10^{-3}$  M, 酵素濃度  $3.3 \times 10^{-6}$  M.

0.1 M 酢酸-亜硫酸ソーダ緩衝液 pH 5.0, 37°C.

\* Nelson-Somogyi 法により還元力を測定してツルコ-2  
として計算し、% で示した。

\*\* 2つのツルコス残基間のツリコシド結合の加水分解率  
の2を考慮し、溶媒 C を用いる薄層クロマトグラフィー  
で フェルダ-マルチシドのスポットが消失したとき  
を 100% の加水分解率とした。

II 18 II 二とすとの錯事室は、MP-4 中に、置換を全く受けないフェニルアリルトリドが存在していなかつたことと強く示唆している。II-2が、II フェニルアリルトリドから由来するケルコースの量は無視でき、II-2は定量されるケルコースは フェニルアリルトリドの 2-O-メチル (図4のⅣ) および 3-O-メチル等单体の非還元末端部ヨリのみ由来するものとして、それらの存在量を矢印で示された。

B の条件下で 24 時間後に MP-4 の 2407t の 1 モルあたり 0.2 モルのケルコースが遊離 TLC (表Ⅲ) のごく多くて MP-4 の 18% 程度は フェニル 2-O-メチルアリルトリド (Ⅲ), 2% 程度は フェニル 3-O-メチルアリルトリドであることが考えられる。

TAAs が MP-4 に全く作用かなかった事実は、II-III および フェニル 3-O-メチルアリルトリドにも作用しないことを示しており、メチル基の置換のあるケルコース残基のトリエニード結合には TAA が作用 (TAA-II) といふべきを得られた結果とよく一致している。

TLC-II のスポットは ケルト-2, 2-O-メチル, 3-O-メチル, 4-O-メチル-ケルコースなどを含んでおり、残りの O-メチルフェニルアリルトリドの混合物であると考えられるが、さすがにくわしい検討は行われなかった。

スポット TLC-III は TLC-II との分離が完全とはいいえないのに、その中-4生は保証されなければいけないが、この部分に含まれる化合物の構造、およびその存在率を以下のようにして決定した。TLC-III は還元力を有せず、HCl 加水分解によりフェニルを遊離する。

ガスクロマトグラフ-1 によると分析で、2-O-メチルケルト-2 とケルコースの比が検出され、そのモル比は 1 = 0.82

であった。過ヨウ素酸の消費量は 図6に示すように、フェノールの定量から求めた TLC-III のみかけの 1 モルあたり 2.04 モルで、6 日間の過ヨウ素酸酸化後の成分を分析すると、この TLC-III 中のクルコース残基は 100% 分解し、2-O-グルコース-1-残基は 81% が分解していることがわかった。TLC-III を R. niveus のクルコアミラーゼで、更に加水分解を行ふと TLC-III のみかけの 1 モルあたり 0.08 モルのフルコースの遊離がみられた。MP-4 中に 何ら修飾を受けているかフェノール-2-オルトシト酸存在していることはすぐに否定されたので TLC-III 中に フェノール-2-オルトシト酸存在するとは考えられてい。以上の場合を総合すると、TLC III には 図4の III が 約 10% IV が 約 80% V が 約 10% 含まれていてものと推定される。この場合の計算値は、2-O-グルコースとフルコース残基のモル比が 1 : 0.82、過ヨウ素酸酸化後の 2-O-グルコース残基の分解率は 81.8% となるので、得られた実験値と一致する。したがって、相当量の IV がこの TLC III の画分に含まれてゐることは、間違いないといえる。この TLC III を含む MP-4 は TAA の作用を全く受けなかつた（図3）、薄層クロマトグラフ-1 は 4 分離した。TLC-III も TAA の作用は全く受けなかつた。MP-4 は TAA の作用の阻害実験では、2.4 mM の フェノール-2-オルトシト酸を基液とした場合、50 mM (MP-4 のみかけの分子量を 438 と仮定) まで TAA の阻害が認められたが、また フェノール-2-オルトシト酸の重量で 1.5 倍量の MP-4 を加え、時間経過

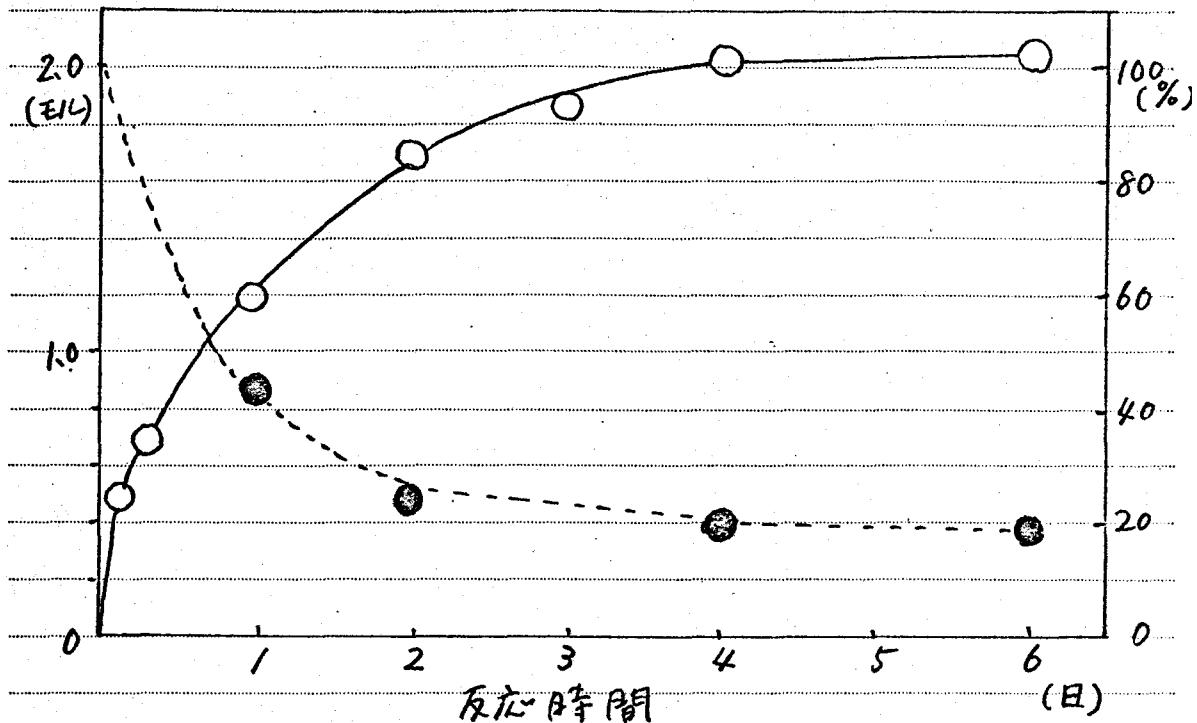


図 6. TLC-III の過ヨウ素酸酸化。

—○— : TLC-III のみかけの 1 モルあたりの過ヨウ素酸の消費量。(左側目盛)

---●--- : もとの TLC-III 中の 2-O-メチル-2-L-アラニド-2-L-アラニドに対する残存 2-O-メチル-2-L-アラニド-2-L-アラニドの存在率。(右側目盛)

とともにフェールの遊離を追跡したが、図3に示すようにMP-4を加えない場合とほとんど差異はない。したがってMP-4標準品中にTAAの作用を全く抑えてしまうようだ。あるいは強く阻害するような物質は含まれておらずと言えるので、フェル2'-O-メチルテリウム(図4のIV)はじめMP-4中のフェルd-2'UテリウムのO-メチル誘導体はずべて、TAAの作用を免けない物質であると考へている。

MP-2のTAA-消化生成物の分離と確認： MP-2のTAA-消化物を溶媒Aを用いたペーパークロマトグラフィーにより分離すると図7に示すような結果が得られた。

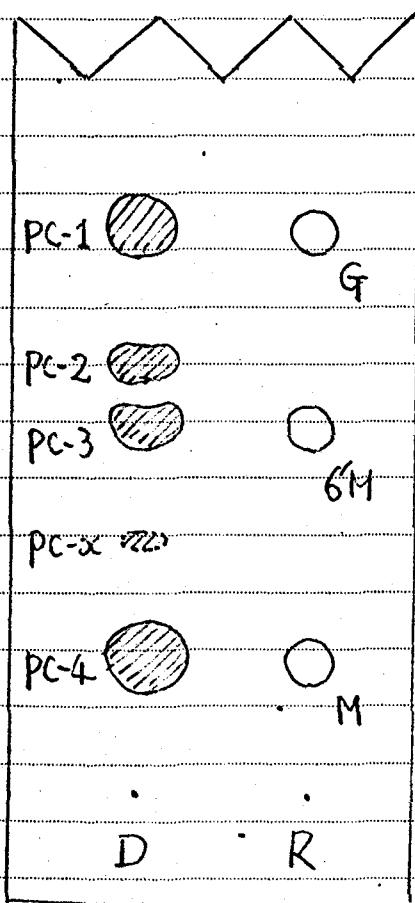


図7. MP-2のTAA-消化物の  
ペーパーカロマトグラフィー。  
溶媒Aで5日間展開し、  
アルカリ性  $\text{AgNO}_3\text{-NaOH}$  試葉  
で発色させた。

D: MP-2のTAA-消化物

R: 標準用試料

G: フルコ-ス

M: マルト-ス

6M: 6'-O-メチルテリウム\*

\* X4LUP3D-メチルテリウムのTAA-消化  
物中よりペーパーカロマトグラフ-  
分離したもの。

PC-1, PC-4 はそれ自身グルコースか $\alpha$ -D-グルコースであることを  
かかへー $\beta$ -D-ガラクトーストクルラノースの結果からわかった。

PC-2 および PC-3 は再度 ヘムペプチドアセタブリドで  
分解し、ガラクトーストクルラノースで分析した結果。

PC-2 は  $\beta$ -D-メチルグルコース、PC-3 は  $\beta$ -D-メチルグルコース  
であると決定した。その PM-2 は  $\beta$ -D-メチルグルコース  
残基や  $\beta$ -D-メチルグルコース残基の存在量がさわめて  
少ないものかわらず、これらの 2 種が確認されたことは注目に値するものと思われる。

PC-X はガラクトーストクルラノースで グルコースと  $\beta$ -D-メチル  
グルコースに相当にするビートを与えるが、現在得られる  
いるモル比は  $1 = 0.6$  程度で、さらに精製が未だ  
である。NaBH<sub>4</sub>還元後はグルコールの生成が認められ  
るので  $\beta$ -D-メチルグルコースが非常にわずかに存在する  
可能性はある。Nelson-Somogyi 法より各画分の  
抽出物の還元力をみると、その比率は PC-1 が  
24%，PC-2 が 16%，PC-3 が 15%，PC-4 が  
39%，PC-X が 6% であった。

### 考察

フェニル  $\alpha$ -アラントイドの  $\beta$ -D-メチル 3T-I は  $\beta$ -D-メチル  
誘導体をベンゾイル基と保護基として CH<sub>3</sub>I-Ag=O  
によるとメチル化によって合成する試みには成功した  
かった。表 I に示したように、おなじいアラントイド  
がおこして(4)種々の位置の OH がメチル化  
された混合物が得られた。トリフルオロ基が 6-OH,  
6'-OH のどちらに導入されたかは不明であるが、

マリトースにあたる反応性(12)から考えると, 6'-OHに  
メチル基が導入されたものが相当量あるものと考  
えられ、その後のメチル化により、非還元末端部のみ  
メチル基による修飾を受けたフェニル- $\alpha$ -マリトースも相  
当量、生成しているものと思われる。Pセル壁交換を行  
して調製したMP-A標品のTAA-消化物中に、 $\alpha$ -D-  
コース、マリトースの他に 4'-O-メチル-マリトース、6'-O-メチル-  
マリトース および 4,6'-ジ-O-メチル-マリトースの存在が  
確認された。TAA が  $\alpha$ -L-4-ケルカノンの内部の  
ケトコシド結合のカルボン酸を触媒する事実を考慮  
すれば、フェニル 4'-O-メチル-マリトースが TAA 作用(12)  
でカルボン酸が解離されることは容易に理解できる。

4,6'-ジ-O-メチル-マリトースが、単離され確認された  
ことは、すなはち部分メチル化 P-ミロースを基質とした  
ときに得られた知見、すなはち図 1 の II が TAA  
の作用により H 点でカルボン酸されること、一通り  
強く支持する結果である。一方、MP-A の TAA-消化  
物中に、2-O-メチルケルコース残基または 3-O-メチル-  
ケルコース残基を含む還元力を有する糖は確認  
することができなかつた。モー-0-メチル-ケルコース および  
その他のメチルケトコシドのカルボン酸に対する分析  
は Dick (13)によれば最近報告されている。本  
実験の結果ともほぼ一致するところである。  
4-O-メチルケトコシドの  $\beta$ -D-1,2-1=+3  $\pi$ -C が 2-O-メチル-  
ケルコース 1=+3  $\pi$ -C と重なるので図 2 のスポット PC-C  
に 2-O-メチルケルコース残基が含まれる可能性が  
存在するが、メチル 4-O-メチルケトコシドの  $\alpha$ -D-1,2-  
 $\pi$ -C が 2-O-メチルケルコース、ケルヒテールの分析には相異がある。

標準用のメチル 4-O-メチル-β-D-フルクト糖をメタノリシスして  
ガスクロマトグラフィーで分析した場合と同じ値  
( $\alpha\text{-D}-\text{F} = \beta\text{-D}-\text{F} = 1:0.47$ ) を示すので、2-O-  
メチルフルコース残基の存在量は無視できる程度と  
考えられる。3-O-メチルフルコース残基は、もし存在すれば  
はっきり確認できず(表I)はまでもある。これらの  
メチル基が 2つのフルコース残基のどちら側に位置して  
いたかは不明であるが、2-OH, 2'-OH, 3-OH, 3'-OH  
の全部又は一部が酵素反応に重要な役割を  
果してゐるところとは容易に想像される。

フェニル α-マルトントをメタノール中で  $\text{CH}_3\text{I}-\text{AgNO}_3$  を  
用ひてメチル化すると表IIに示すように、主として  
ケルコース残基の2位のOH基に導入され、一般  
に認められる 2-OH の高い活性性に基く結果  
と考えられる(14)。図3に示すように 2-O-メチ  
ルフルコース残基の含量の増加とともに、TAAによ  
るカルボ水分解率は急激に減少する。他のD-メチ  
ルフルコース残基の存在量は少なくて、そのモル比は大  
きな差があるのでも、2-O-スは 2'-O-メチル化は TAA  
作用への影響はそれほど大きくないものといえる。  
部分 D-メチル化 フェニル α-マルトント標準品 MP-4 は全く  
TAAの作用を受けず、従つてこの中に含まれるすべての  
フェニル α-マルトント誘導体は TAAの作用を受けな  
いものと思われる。MP-4 の少くとも 18% を占める  
フェニル 2-O-メチル-α-マルトント(図4のⅣ)もまた  
フェニル 2'-O-メチル-α-マルトント(図4のⅤ)も TAA  
の作用を受けなかったことにわかる。こうした実験事  
実は、酵素反応における基質側のフルコース残基

の2位のOH基の重要性を明確に示しており、ある種の化学反応においてケルコース残基の他のOH基に比べて2位のOH基の反応性が半分以上高い事実(4,14)と何が同じでいるように見える。

MP-2のTAA-加水分解物からケルコースと2-O-メチルケルコースを含むと思われるスポットPC-X(図7)が得られた。しかし、その存在量は、さわめて少く、ほとんどのMP-2の0.3%から由来してきたものにすぎない、たので、正確な構造決定は困難である。

しかし、TAAのケルコース活性(15)を認めることはまだ非常な高い速度でフェニル-2'-O-メチル-α-ケルコントリ-β-ケルコニウム-β-ケルコニウム活性があることは、ケルコニウム活性があれば、わずかのフェニル-α-ケルコニウム-β-ケルコニウム活性の存在(16)が期待できる。また、たとえ、フェニル-α-ケルコニウム-β-ケルコニウム活性がない場合でも、さうに2-O-メチルケルコース残基がつながらて糖鎖の延び方に、フェニル-α-ケルコントリ-β-ケルコニウム活性すらも、大きな親和力が生じることか充分考へてみるからである。とにかく、この点の結果(17)は、フェニル-2'-O-メチル-α-ケルコントリ-β-ケルコニウム活性をもつた存在のところ、この合成はさわめて困難であると想われる。

ケルコース残基の3位のOH基の重要性についてさうにくわしい実験が必ずあるか、現在までには得られてゐる結果から、次のようになります。

MP-4中に少くとも2%程度のフェニル-3-O-メチル-α-ケルコントリ-β-ケルコニウム活性が存在していると思われが、MP-4が全くTAAの作用を受けないところ、この点もTAAの作用

を受けないと考えてる。また MP-2 の TAA-消化物中に  
3'-O-メチルグルコースの存在が確証されたことから、  
フエール 3'-O-メチル-α-2-ヒドロ-1-は TAA の作用を受ける  
ものと考へられる。最近 Saine & Ballou (17) は  
*Mycobacterium phlei* のリポ多糖体をフタの肺  
臓 α-アミラーゼで加水分解し、その消化物中に  
3'-O-メチル-2-ヒドロ-1-は同定しており、TAA も類  
似の作用を有しているものと推定される。

以上の結果をまとめると、フエール-α-2-ヒドロ-1-の  
3', 4', 6' の各 OH 基はメチル化を受けても TAA の  
作用を受け、フエールを遊離するが、2, 3, 2' の  
各 OH 基がメチル化されると TAA の作用をほとんど  
受けなくなるか、全く受けないことがわかる。加水分  
解はすでに第一章で明白に示されたごとく、加水分  
解は受けないものと判別できる。ということにな  
る。ここで、TAA が天然の寡糖 Pミロース I に働く場合  
について、第一章あたり本章で得られた結果から、  
リソースとして提示された西脇及ぶのメカニズムを  
借りて、次のように推定した。

今図 8 に示した Q 環と R 環の間に  
TAA の作用により加水分解が起こると仮定すると、

P 環の 2, 3, 6 位の各 OH 基は TAA の、  
(あるいはケロシン残基を含む) アミノ酸残基と水素  
結合を作り安定化し、基團-酸素複合体が形  
成される。もちろん他の Q 環や R 環と P 環  
残基間の水素結合も存在する。P 環の 2 位  
の OH 基の隣子する水素結合は? 自由エネルギー  
変化は基團-酸素複合体の形成にとって、逆わり

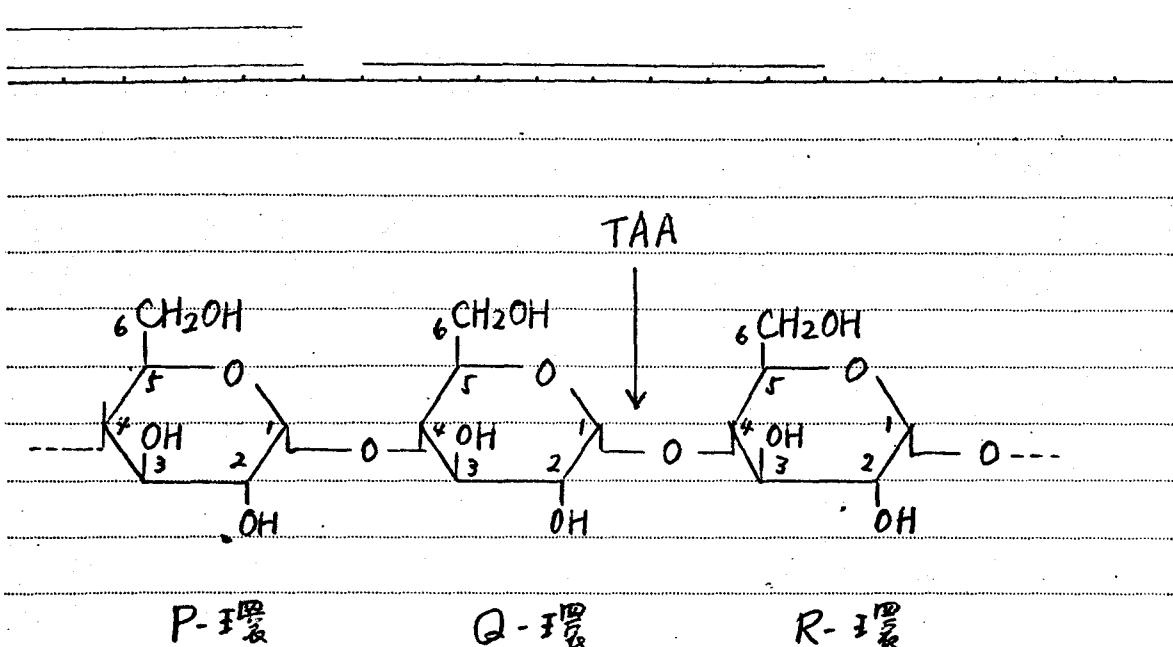


図8.

で重要なくらい十分に大きいものと思われる。それにヒビベリ  
6-OH や 3-OH の関与する水素結合による自由エネルギー  
変化は小さく、O-メチル化による立体障害をほとんどの  
受けTAA程度に、酵素蛋白とは離れた位置に  
P環がまではいるものと考えられる。ヒビベリ環上のOや  
ケルコシド結合を形成してはOからの水素結合も多分、  
関与して、P環が固定され、その結果 Q環が  
TAA中の加水分解の触媒であるTAAトンを提供  
するアミノ酸残基 かたび ルコシルカチオンを安  
定化させ、TAAトンの受容体となるアミノ酸残基に  
近づけられ、Q環とR環の間の加水分解率が  
行われるものと想像される。このとき、Q環上の  
2,3,b 位の各OH基は、いずれも酵素蛋白と  
さわめ2近い位置にくることから予想され、メチル基  
が導入されると立体的干渉を避けるために、加水分解  
の触媒となるアミノ酸残基の存在する、狭義の

活性生点に近づくことによってはなくなり、加水分解反応はおこらなくなるものと推定される。

R環について、フェニルメルカトナイトの加水分解速度がアミノ-2に比べて非常に小さくなることや、小野ら(18)のマルトオリオースとマロテトラオースの加水分解速度の比較から、酵素-基質複合体の分解速度定数に大きな変化があるというデータなどを見ると、酵素の binding process よりもむしろ catalytic process が関与しているものと思われる。この過程では R-環の 6 位の OH 基はメチル基またはグルコニル基で置換されても加水分解反応が止まるところから、必ず活性生点ではないと推定される。

### 総括

1) アミル転移を利用してフェニルメルカトナイトの部分 O-メチル誘導体 MP-A を、またフルコース残基の 2 位の水酸基の高い反応性を利用して 4 種の部分 O-メチル化 フェニルメルカトナイトを商品 MP-1, MP-2, MP-3 および MP-4 と同様製造し、これらの基質に対するタカラミラーゼ A (TAA) の作用様式を検討した。

2) MP-A の TAA-消化物中に、フルコ-2, 2'レト-2, 4'-O-メチルフルコ-2, 6'-O-メチルフルコ-2 および 4',6'-ジ-O-メチルフルコ-2 が存在することが示された。

- 3) 部分 O-メチル化 フエニル α-ケートシドの TAA に  
よる加水分解率は、2-O-メチルグルコース 残基  
の含量が増すに従って、著しく減少した。
- 4) MP-4 標品は TAA の作用を全く受けなか  
った。二の標品中 1 は、フエニル α-ケートシドの  
2-O-メチル、3-O-メチル および 2'-O-メチル  
誘導体が存在していることを確認されたこと  
ができたので、これらの誘導体は TAA の  
作用を受けないことがわかった。
- 5) DM-2 の TAA-消化物中 1 は 3'-O-メチル-2'ルト-  
スが存在していたことが明らかになったので  
フエニル 3'-O-メチル-α-ケートシドは TAA の作用  
を受けるものと推定される。
- 6) 部分 O-メチル化 DM-2 および部分 O-メチル  
化 フエニル α-ケートシドを基質として、得られ  
た知見を総合して、リヤクルの場合には  
提出された酵素反応モデルを使って、TAA  
の反応メカニズムに関する若干の考察を行った。

本研究を行ふにあたり タカシロスターを惠与  
下さった三共株式会社に深く感謝いたします  
」

## 引用文献

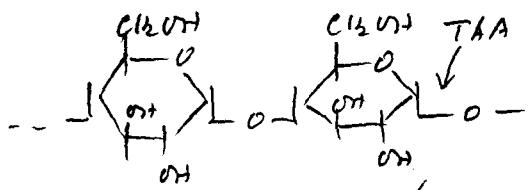
- (1) B. Helterich and S. R. Petersen, Ber., 62, 790 (1935).
- (2) S. Matsubara, T. Ikenaka and S. Akabori, J. Biochem., 46, 425 (1959).
- (3) S. Matsubara, Bull. Chem. Soc. Japan, 34, 718 (1961).
- (4) I. D. Mattronadi, S. M. Flematti, J. O. Deterrari, and E. G. Gros, Carbohyd. Res., 3, 177 (1966); 第一章引用文献 (15), (17).
- (5) D. D. Reynolds and W. L. Evans, J. Am. Chem. Soc., 60, 2559 (1938).
- (6) J. C. Irvine and J. P. Scott, J. Chem. Soc., 103, 575 (1945).
- (7) D. J. Bell and J. Lorber, J. Chem. Soc., 453 (1940).
- (8) R. Kuhn, I. Löw and H. Trischmann, Chem. Ber., 90, 203 (1957).
- (9) 赤堀研究室編, "生化学薬品調製法," 岩波社 (1949) p. 49.
- (10) T. Ikenaka, J. Biochem., 54, 328 (1963).
- (11) 赤堀監修, "酵素ハンドブック", 朝倉書店 (1966) p. 473; 第一章引用文献 (1).
- (12) 平坂, 松永, 梅本, 助川, 薬誌, 83, 966 (1963).
- (13) W. E. Dick, Jr., B. G. Baker and J. E. Hodge, Carbohyd. Res., 6, 52 (1968).

- (14) J.M. Sugihara, "Adv. Carbohyd. Chem.", Vol. 8.  
Academic Press, (1953) p. 16;  
E.J. Roberts and S.P. Rowland, Carbohyd.  
Res., 5, 1 (1961).
- (15) Y. Nitta, K. Hiromi and S. Ono, J. Bioclem.,  
63, 632 (1968).
- (16) 赤堀正彦, “酵素研究法”, 第2巻, 朝倉書店  
(1957) p. 95.
- (17) M.H. Saier and C.E. Ballou, J. Biol. Chem.,  
243, 992 (1968).
- (18) 小里三・赤堀, 新田, 未次, 高木, 酵素七字シンポ。  
シウム予稿集, 18巻 p.229 (1966).

## 謝 言

本研究は大阪大学大学院理学研究科博士課程において行つたものであり、終始、御懇意な御指導と御激励を賜つた 松島祥夫教授、池中徳治助教授に謹んで御礼申し上げます。

また種々の御教示、討論をいたいたいに山本和彦博士はじめ 大阪大学理学部木村研究室の皆様に御礼申し上げます。



2-O-Me = ~~non selective~~

3. In some of one deriv. is inhibitory ~~to L.~~