

Title	タカアミラーゼAの基質特異性に関する研究
Author(s)	伊勢村, 護
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	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

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 フェイロ $\alpha$ -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、トリコーゲンなどの  $\alpha$ -グルコースの重合体、 $\alpha$ -1,4-グルカンに作用して、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  $\alpha$ -アミラーゼを有する  $\alpha$ -1,4-グルカンの内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 はこの働き *Aspergillus oryzae* が強いデンプン分解作用をもつ物質を産生することを見つけ、その後高橋により、粉末酵素剤タカジアスターゼが調製され、1951年に至り、Underkoflerら、Fischerら および 赤堀らにより、それぞれ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った(1,3)。動物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広く行われてきている。インシュリン、リボヌクレオース その他いくつかの蛋白質で行われた一次構造の決定やミオグロビン、リンチム 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、そう遠いものではないと期待される。

Phillips ら(4,5)のX線研究により、リンチムおよびリンチム-ムトリノペプチドトリオ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

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る多くの結果は、Phillips らのモデルと矛盾すること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ゾ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にぎるものの一つであることは明かである。

タカアミラーゼ A の作用機作については、リゾチームの場合のような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、あてはまるのではないかと想像される。リゾチームの基質特異性について得られている化学的な結果 (9-12) とタカアミラーゼ A の基質特異性を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  $\alpha$ -L-4-グルカンに作用するとき各グルコース残基のど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りことを試みた。O-メチル化による効果は立体的なものや電気的なものとの両面が考えられ、他の方法、例えば O-エチル化、O-ハイドロキシエチル化やテオキレ糖基体を用いる方法などの実験結果が不明の間は、そこに得られた結果の適正な説明、解釈には自

すゝと制限があるけれども、タカアミラーゼ 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。

第一章ではタカアミラーゼ 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、タカアミラーゼ 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。

α-アロビ β-グルコシターゼ, α-ガラクトシターゼなどの単糖のトリコシド結合の加水分解を触媒する酵素の基質特異性で、同様な実験によって明らかにされたものは多いけれども、アミラーゼの分野では、二糖にわたって各位置の水酸基のメチル化による影響が本実験により、ほぼ明らかにされたものと思われる。

## 引用文献

- (1) Boyer, Lardy, Myrback 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", 共立出版 (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, 1295 (1963).
- (7) S. Isemura and Y. Matsushima, Bull. Chem. Soc. Japan, 39, 2553 (1966)
- (8) K. Yamamoto and Y. Matsushima, Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 194 (1967)
- (9) S. Hara and Y. Matsushima, J. Biochem., 62, 118 (1964).
- (10) 山本・松島, 日本化学会第20年会講演予稿集III, p. 700 (1967)
- (11) 松島・宮崎, 日本化学会第20年会講演予稿集III, 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。

種々のグリコシダーゼの基質特異性も、部分的修飾した基質や基質アナログを用いて明らかとなったものも多い(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起原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っている。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るにもかかわらず、その基質特異性に関してには不明な点が残されている。

Phillipo ら(8, 9)のすぐれた研究により、リン4-4 [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、そう具体的な形で酵素作用機作のモデルが提出され、新たな興味をひいている。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化学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したタカアミラーゼ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を用いた。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、Hamauzura (11) の方法に従って、TAAを0.02 M 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、ろ過し、3液を標準酵素液とした。酵素濃度は280 mμにおける吸光度を島津分光光度計で測定し、 $E_{280}^{280 \text{ m}\mu} = 22.1$  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恵与いただいたアミロース (2g) に40 mlの1N NaOHを加えて一夜、冷蔵庫中に保ち完全に溶解させる。この溶液に30% NaOHとメチル硫酸を交互に加えてメチル化を行った。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  $\alpha$ -グルコース標品\* は水および緩衝液によく溶け、また還元力の増加に与えられるように TAA の基質となることがわかった。

標準用試料の  $\alpha$ -D-グルコース および  $\alpha$ -D-グルコピラノシドの合成:  $\alpha$ -D-グルコピラノシドは Haworth (15) の方法に従って、 $\alpha$ -D-2,3,4-トリ-O-アセチル-D-グルコシドを  $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$  に  $\alpha$ -D-グルコシドとして調製した。

m.p. 146-147°C,  $[\alpha]_D^{15}$  155 (c=1.55, H<sub>2</sub>O)

分析値: C, 46.29; H, 7.73; C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> としての計算値: C, 46.15; H, 7.75%.

2-O-グルコースは  $\alpha$ -D-2-O-グルコピラノシドを Dowex 50X4 (H<sup>+</sup>型) を用いて加水分解し調製した。 m.p. 157-159°C,

分析値: C, 43.18; H, 7.30; C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> としての計算値: C, 43.29; H, 7.27%.

3-O-グルコースは 1,2:5,6-ジ-O-イソプロピリデン-D-グルコフラノースを Haworth (15) の方法に従って  $\alpha$ -D-グルコシドとして加水分解して調製した。 m.p. 164-165°C,  $[\alpha]_D^{15}$  56 (c=1.45, H<sub>2</sub>O) 分析値: C, 43.20; H, 7.22%.

\*  $\alpha$ -グルコースがアミノ酸中の一部の水酸基にのみ導入されているが、これらの標品を  $\alpha$ -D-グルコースと呼ぶことにする。

$\alpha$ -D-グルコース-4-O- $\beta$ -D-グルコースは Bouvençour (17) の方法に従い、 $\alpha$ -D-グルコース-2,3,4-O- $\beta$ -D-グルコースを  $\alpha$ -D-グルコース中、 $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$  で  $\alpha$ -D-グルコース化し、後  $\text{CH}_3\text{ONa}$  で脱アセチル化して調製した。
   
 $\text{mp. } 99-100^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{16} -19.5^\circ$  ( $C=1.64$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ )
   
 分析値: C, 46.33; H, 7.75%.

6-O- $\alpha$ -D-グルコースは Hough (18) の方法に従い、ヒス  $\alpha$ -D-グルコースを  $\alpha$ -D-グルコース化して調製した。
   
 $\text{mp. } 147-148^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{18} 57^\circ$  ( $C=1.88$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ )
   
 分析値: C, 43.27; H, 7.24%.

$\text{NaBH}_4$  還元による還元末端の検索および

標準用試料の 1-O- $\alpha$ -D-グルコースの調製:

TAA 存在下の  $\alpha$ -D-グルコースの加水分解の程度、どのグリコシド結合が切ばれたかを知るために、新しく生成される還元末端部分を  $\text{NaBH}_4$  で還元し、メタリシス後、グリコシルアミンの O- $\alpha$ -D-グルコース誘導体としてガスクロマトグラフィーで同定、定量を行った。
   
 $\alpha$ -D-グルコースの各標品を 0.1M, pH 5.1 の酢酸-酢酸ソーダ緩衝液中で TAA と共に  $37^\circ\text{C}$  に保ち、24 時間後、反応物を  $\text{NaHCO}_3$  で pH 8 にしたのち、 $\text{NaBH}_4$  を加えて  $4^\circ\text{C}$  で 2 日時間、還元を行った。還元終了後、Dowex 50  $\times 4$  ( $\text{H}^+$ 型) で脱塩し、メタールと共に蒸発乾燥し、蒸発乾燥後、ホウ酸  $\alpha$ -D-グルコースを除去した後、2N メタール性  $\text{HCl}$  を加えてメタリシスを行い、ガスクロマトグラフィーの分析試料とした。

一方、 $\alpha$ -D-グルコースを  $\text{NaBH}_4$  で還元して対応する  $\alpha$ -D-グルキシトールを得、標準用試料とした。

還元力の測定： TAA による  $\alpha$ -D-グルコ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増加を追跡して決定した。1 ml の銅液に 0.5 ml の TAA 消化物を加えて沸とう水上で 25 分間、加熱後、冷却し 1 ml のヒ素モリブデン酸塩試薬を加える。20 分後に 20 ml の水を加えて、710 m $\mu$  における吸光度を測定した。

ガスクロマトグラフィ： Chromosorb W 上、5% SE-30 の 0.3 x 300 cm のカラムを装置した島津 ガスクロマトグラフ モデル GC-4A を用いた。カラム温度は 180°C,  $\text{N}_2$  ガス流量は 70 ml/min. であった。試料を封管中で 2N  $\alpha$ -ヒドロキシ HCl で 105°C, 20 時間  $\alpha$ -グリシニシスし、減圧下に濃縮乾燥し、内部標準として糖に  $\alpha$ -D-グリシニールを既知量だけ含む  $\alpha$ -グリシニールを加えて溶解し、 $\alpha$ -D-グルキシトールとトリメチルシリルクロリドを加えてトリメチルシリル化を行った (14)。したがって、グルコースおよび  $\alpha$ -D-グルコース残基はそれぞれ  $\alpha$ -D-フルクトシド、又は  $\alpha$ -D- $\alpha$ -D-グルキシトール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ィ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

α-アミノ酸に対するTAAの活性に及ぼす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を710 mμ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。

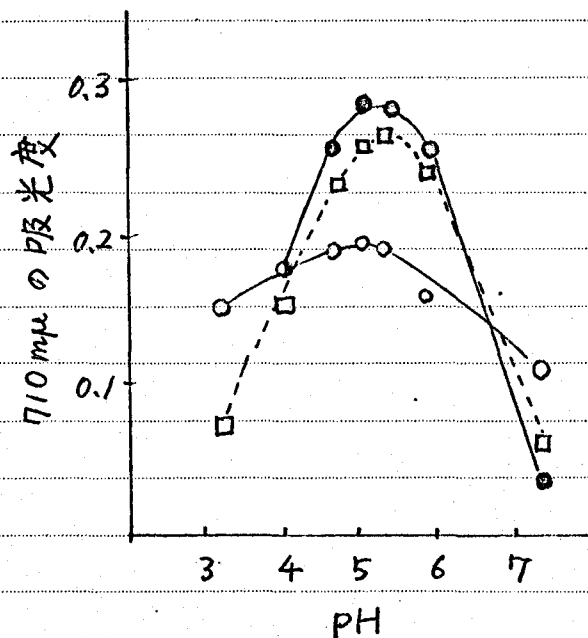


図1. MA-1 (—○—), フェルシマ-マルチド (—●—) および α-アミノ酸 (—○—) を基質としたときのTAA活性に対するpHの影響。α-アミノ酸に対する値はMatsubaraら(19)の報告から引用した。

フェル $\alpha$ -マルチ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 $1/100$ 、フェル $\alpha$ -マルチドは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、 $\alpha$ -グルコ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。

$\alpha$ -グルコアミロース 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で分析した結果を示した。図2(A)のピークXはフルクトールのメタリシス中に生成する側生物によるものであった。4-O- $\alpha$ -グルコ- $\alpha$ -グルコ-2のピークはピークXとピークCの位置に重なる検出される二つがわかったが、 $\alpha$ -グルコアミロース中の4-O- $\alpha$ -グルコ- $\alpha$ -グルコ-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)のピークIは、最初、3-O- $\alpha$ -グルコ- $\alpha$ -グルコ-によるものと思われたが、カラム温度を下げて保持時間を2倍くらいにすると3-O- $\alpha$ -グルコ- $\alpha$ -グルコ-によるピークの前にあることがわかった。ピークIは2,6-ジ-O- $\alpha$ -グルコ- $\alpha$ -グルコ-によるものと思われるが確認はされていない。

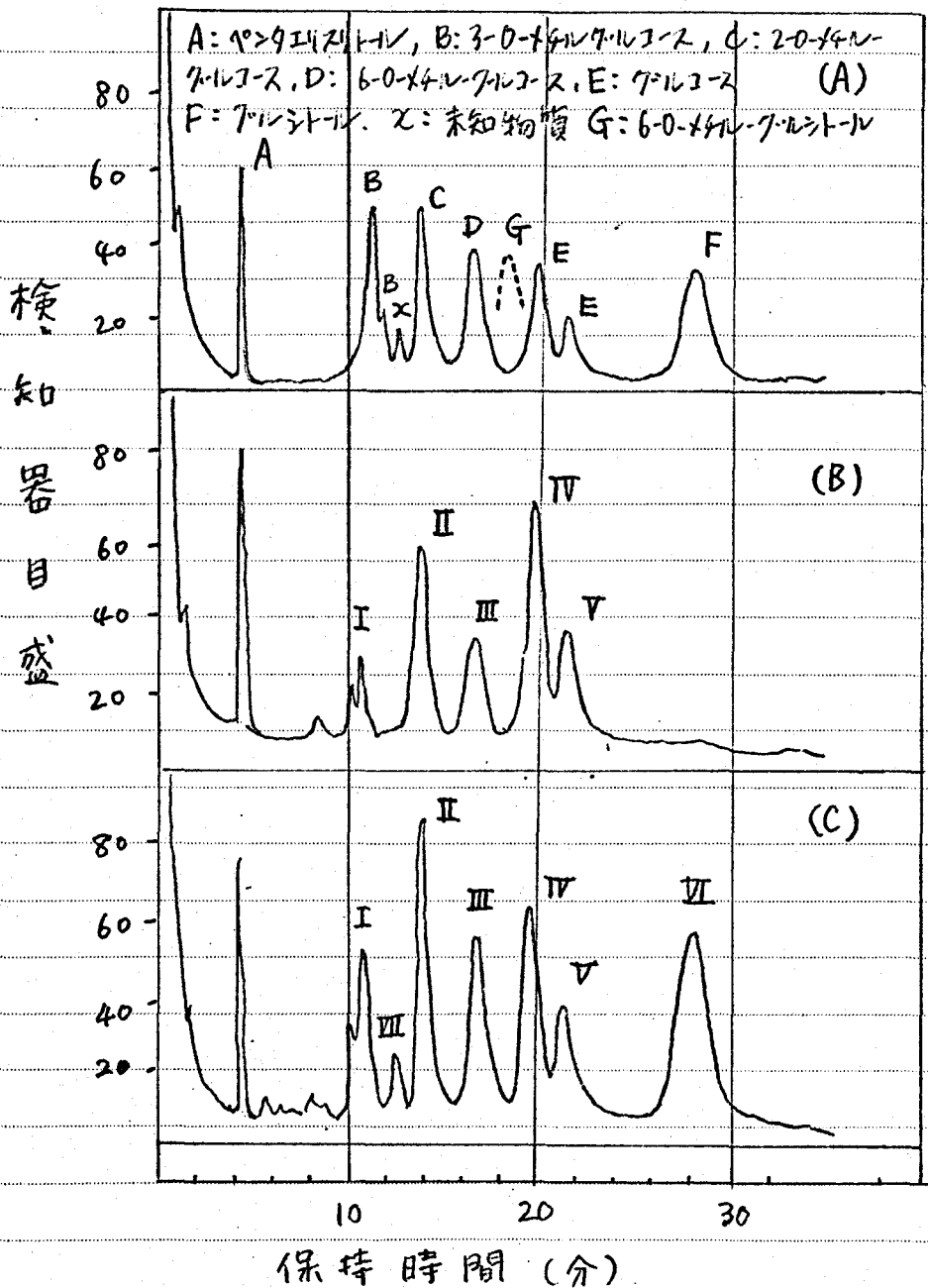


図2. 標準用試料混合物(A), MA-2(B)およびMA-2のTAA-消化物の還元生成物(C)のガスクロマトグラム。各試料はメタリシス後、トリメチルシリル化して分析した。

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ピーク面積とペンタエリスリトール (図2の(A)のA) によるピーク面積との比から求めて表Iに示した。

一方、メチルアミロスの各標品の  $\text{NaBH}_4$  還元後の組成を表Iに併記し、MA-2の場合の加水分解トクろフィーの分析図を図2(C)に示した。新しく生じるピークはピークⅥとⅦのみで、前者はグリシトール、後者はグリ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元の標品の間の 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、それに対応してグリ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+グリシトールの含量を 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  $\text{NaBH}_4$  によりほぼ完全に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なかったことはこれらのグリコシド結合がTAAの攻撃を受けなかったと推定されることが説明がつく。

表 I.  $\alpha$ -フルアミロス標品 および それらの TAA-消化後  
の還元生成物の化学組成 \*

	フルコース	フルシトル	2-O-フル フルコース	6-O-フル フルコース
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 (15.9)
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-フルフルコースに対するモル比で示した。

\*\* ( ) 内の数字は各 $\alpha$ -フルアミロス標品中の  
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 nm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

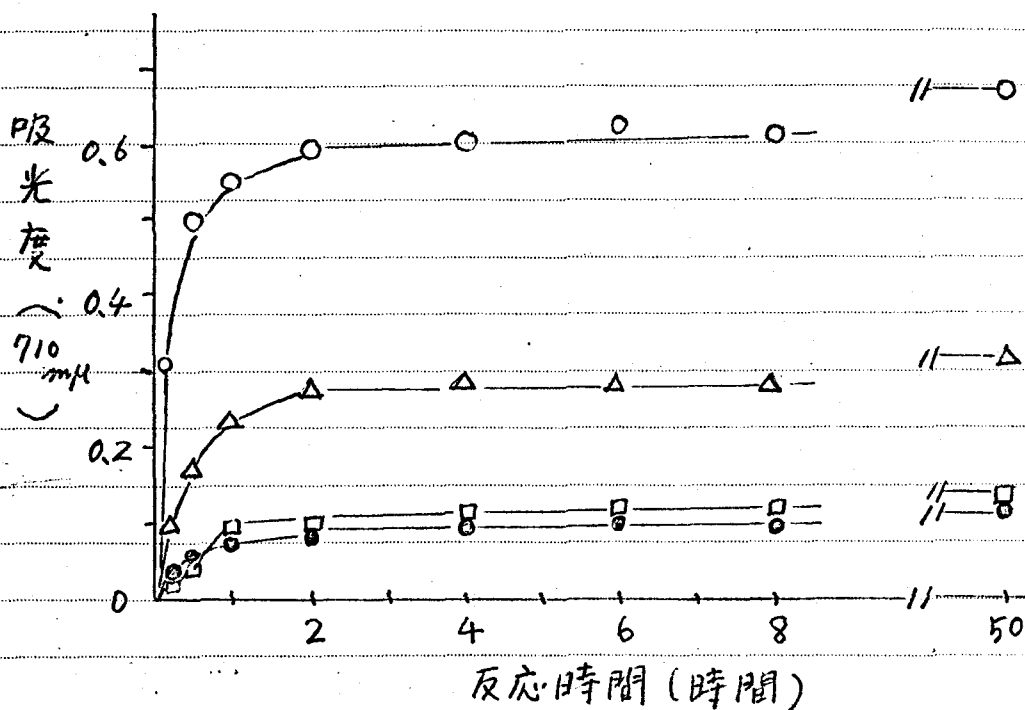


図3. TAA触媒下のメチルアミロースの加水分解反応過程。  
反応温度、37°C。基質濃度 0.05%、酵素濃度は  
基質濃度の 1/400。

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

で5%であった。これらの数値はグルコースの生成量から求めた値、16%、11%、7%、4%とほぼ一致している(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ないグルコース残基が多く存在するほど、その標品は酵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、しかた加水分解率の差は、両者のフルコース含量がほぼ等しいことを考えると、少し開きすぎるように思われる。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-メチルフ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程度しか加水分解を受けていないことから、アミロースの6-O-メチル化よりも2-O-メチル化の方が一層効果的に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フ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、メチル基の少ないMA-3の方がMA-4より加水分解度はずっと大きくなると期待できるが、実験事実も両者が同程度の加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-メチル化が与える影響は、部分O-メチル化フェニルメチル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。

メチルアミロスのTAA-反応生成物の分離と確認:

メチルアミロスのTAA-消化物中から、その生成物のいくつかを単離、同定するために、 $n$ -ブタノール:エタノール:水 (10:1:2) の系を用いてペーパークロマトグラフィーを行った。図4に示すように還元力を示す4つのスポット

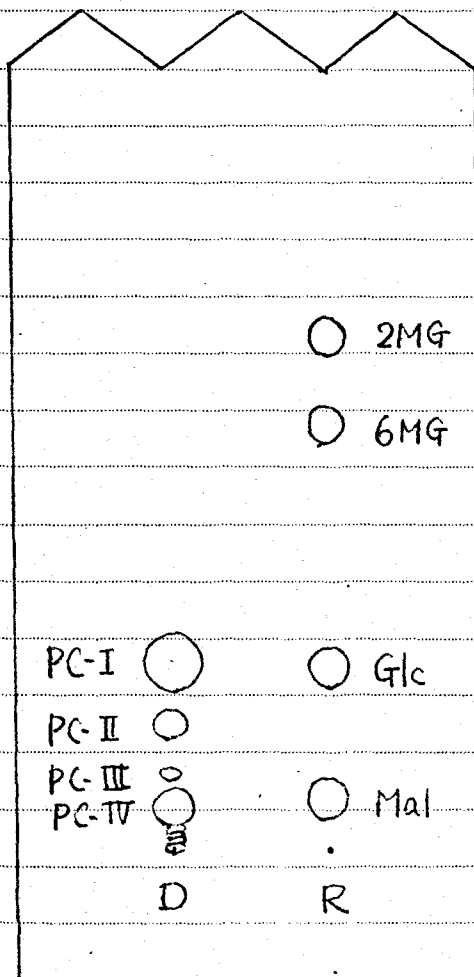


図4. TAA-菌媒下のMA-2の加水分解生成物のペーパークロマトグラフィー。

$n$ -ブタノール = エタノール = 水 (10 = 1 = 2) で展開し、  
 ペットロキシ  $\text{AgNO}_3$  -  $\text{NaOH}$  で発色。

D: MA-2のTAA-消化物  
 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 はそれぞれ グルコース および マルトースのスポットに一致した。モルター の 6-O- $\alpha$ -フルクトース に対応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フィーは、5日間展開後、ろ紙の両端を切りとって発色させ各スポットの位置を確かめてから、その部分を切り取り水を抽出し、そのままメタリシした場合は、 $\text{NaBH}_4$ 還元後メタリシした場合はとの成分を分析した。PC-I はホスホクロマトグラフィーでグルコースに対応するピークを与え、還元するとフルクトールのみを与える。したがって PC-I はグルコースであると断定した。PC-II は 6-O- $\alpha$ -フルクトースとグルコースを 1:0.94 のモル比で含んでおり、 $\text{NaBH}_4$ 還元後は、6-O- $\alpha$ -フルクトースとフルクトールが 1:1.13 のモル比で得られたが、6-O- $\alpha$ -フルク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- $\alpha$ -フルクトース $\beta$ -グルコース、すなわち 6'-O- $\alpha$ -フルクトースであると断定した。この MA-2 には 6-O- $\alpha$ -フルクトース残基よりも 2-O- $\alpha$ -フルクトース残基の方が多く含まれている (表 I) にもかかわらず、その酵素反応生成物中に 6'-O- $\alpha$ -フルクトースが相当量含まれており、一方、2-O- $\alpha$ -フルクトースを含む二糖はほとんど確認されなかったことから、2-O- $\alpha$ -フルクトース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- $\alpha$ -フルクトース および 6-O- $\alpha$ -フルクトースを 0.79:0.15:1 のモル比で含み、 $\text{NaBH}_4$ 還元後は、グルコース、フルクトール、2-O- $\alpha$ -フルクトース および 6-O- $\alpha$ -フルクトースが 0.24:0.57:0.16:1 のモル比で検出されたのである。

グルコースを還元末端部にもつトリサッカリドの混合物であると考えている。このPC-IIIについてはさらに分離・精製が必要であり、少量の2'-O-メチル-2'-デオキシ-グルコースの混在も否定し去ることはいかぬが、PC-IIIの量でさえ、非常にわずかであること(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-おまひがスクロマトグラフの結果から2'-デオキシ-グルコースと同定した。

## 考 察

グルコース おまひがその2'-O-メチル、3'-O-メチル、6'-O-メチル誘導体の分析の際、直接トリメチルシリル化してスクロマトグラフで分析した場合にはピークの重なりが認められ相互の分離はよくはなれなかったが、メタリニス後、メチルグリコシド-トリメチルシリルエーテルとした場合には相互に分離・定量が可能であることがわかった(図1)。この方法で3'-O-メチル-グルコース、4'-O-メチル-グルコース おまひがグルコースは $\alpha$ 、 $\beta$ -PIR-に対応する2つのピークをそれぞれ与えた。グルコースの定量にはこの2つのピークの面積の比を用いた。2'-O-メチル-グルコースでは $\alpha$ -PIR-が優先的に生成し、 $\beta$ -PIR-に対するピークは検出されなかったため、 $\alpha$ -PIR-によるピークを用いて定量を行った。6'-O-メチル-グルコースの場合は $\alpha$ 、 $\beta$ -PIR-による2つのピークが重なっているものと認められ一つのピークしか検出されなかった。いずれの定量の場合も既知の存在量とペーパークロマトグラフの相対比の間には直線関係が成立し、定量が可能

であることが示された。もとの $\alpha$ -4-ルピロ-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、 $\alpha$ -4-ルピロ-2中の無置換グルコース残基 のグリコシド結合のみが加水分解されており、2-O- $\alpha$ -4-ル および 6-O- $\alpha$ -4-ルグルコース残基のグリコシド結合 は切断されていないことが推定された。6-O- $\alpha$ -4-ルピロ-1は 図2(A)に示すように、他の共存する ピークとは重ならず、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- $\alpha$ -4-ルピロ-1のピークは グルコースによる2つのピーク の間にくるので、紛わしいが、2つの標準用試料 を故意に混ぜたときにみられるピークの形の変化 は全く認められなかったことから、2-O- $\alpha$ -4-ルピロ-1も存在しなかったと思われる。また、ペパー クロマトグラフにより分離確認し得たオリゴ糖の 還元末端部としては、グルコースしか確認できなかった。 こうした諸事実は、TAAが無置換グルコースの グリコシド結合のみの加水分解を行うことを強く示 している。

一方、多くのグリコシターゼのアグリコン部に対 する特異性は、グ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)。ヒルゾンの 唾液ピロ-ゼによる加水分解物中の $\alpha$ -限界アキ ストリンの中には、6-O-位にグ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 明らかに、グルコース残基と6-O-置換グルコース残基 の間のグリコシド結合が加水分解を受けている(20-22)。また TAAは $\alpha$ -4-ル, 1-4-ル, 1-6-ル, p-2+D

フェニルなどの $\alpha$ -マルチドを加水分解することが報告されている(19, 23)。TAAも他の $\alpha$ -アミラーゼ(20-22, 24)と同様に、かなり幅広いアグリコン特異性を持っているものと考えられる。与れゆえ、グルコース残基と、2-O- $\alpha$ -グルコース残基またはグルコース残基と、6-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非還元末端部にくること十分考えられる。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により加水分解されていたかまたは加水分解されるのであれば、モノマーの2-O- $\alpha$ -グルコースや6-O- $\alpha$ -グルコースが検出される可能性は存在する。しかしモノマーとして得られるのはグルコースのみで、2-O- $\alpha$ -グルコースも6-O- $\alpha$ -グルコースも検出されなかった。この事実もこれらO- $\alpha$ -グルコースのグリコシド結合がTAA触媒下で加水分解を受けないことを示している。

すでに池中(25)はフェニル6-O- $\beta$ - $\alpha$ -マルチドがTAAの作用を全く受けないことを報告している。最近、WeillとBrott(5)は大部分6-O- $\alpha$ -グルコースを基質として、下々貯臓および*Bacillus subtilis*の $\alpha$ -アミラーゼ、また同じ $\beta$ -アミラーゼ、ジヤカイモのホスホリラーゼおよび*Aspergillus niger*からのグリコピラーゼ粗標品における加水分解反応を検討しているが、いずれの場合も6-O- $\alpha$ -グルコース残基のグリコシド結合は加水分解されなかったことを報告している。与れゆえ、C-6位のOH基は一般にアミラーゼと基質の相互作用、あるいは

基質-酵素複合体の形成に重要な役割を果た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、非還元末端端部の6位のOHの水素は必らずしも酵素反応を受けるとは必ずしも思われる。一方、2'-O-メチルマルトースの存在量は十分確認できるほどは多くないことを考慮すると、二糖単位の非還元末端端部の2位のOHは複数のものと考えられ、OCH<sub>3</sub>に変換すると、酵素反応はほとんど受けなくなると考えられる。マンノース、2-デオキシグルコースおよびフルクトシミンなどの基質アクトグを阻害剤として用い、TAAによるフェニル $\alpha$ -マルトシド又はp-ニコトフェニル $\alpha$ -マルトシドの加水分解の研究から、小野ら(26)はTAAの基質結合部における、基質との親和性は、C-2の立体的な変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、重要な役割を果たしているものと思われる。

キトオリゴ糖や細菌細胞壁や部分D-ヒドロキシエチルキチンなどのキチン誘導体の2-アセチルアミノ基がリゾチム-基質複合体の形成に不可欠であることがPhillipsら(8,9)のX線による研究や、原と松島(10)による化学的研究から明らかになっている。リゾチム、TAAその他のアミラーゼ、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検討することにより、リゾチムで提唱された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が明らかになるかも知れない。

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ている。

## 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 法により 0-メチル化して、部分0-メチル化アミロースを調製し、TAA の基質として用い、TAA の作用様式を検討した。
- 2) メチル基の置換の無いグルコース残基のグリコシド結合のみが TAA 作用により加水分解を受け、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グリコシド結合は作用を受けないことを示すいくつかの実験結果が得られた。
- 3) 二糖、6-O-メチルトリコシル-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グリコシド結合には作用することはいま明らかになった。
- 4) 6-O-メチル化よりも 2-O-メチル化による方が基質はさう TAA 作用を受けにくくなり、2-OH の重要性がわかった。

本研究を行うにあたり、アミロースを恵与下さった  
長瀬産業株式会社、ならびにタカシマアミロースを  
提供下さった三共株式会社に深く感謝します。

### 引用文献

- (1) Boyer, Lardy, Myrbäck 編, "The Enzymes",  
Academic Press (1960) Vol. 4, p. 369.
- (2) Boyer, Lardy, Myrbäck 編, "The Enzymes",  
Academic Press (1960) Vol. 4, p. 409.
- (3) B. J. Bines 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. Hagihara 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. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair,  
A. C. T. North, D. C. Phillips and V. R. Sarma,  
Proc. Royal Soc., B 167, 378 (1967).
- (10) S. Hara and Y. Matsumura, J. Biochem.,  
62, 118 (1967)

- (11) Z. Hamanau, K. Hiromi and S. Ono, *J. Biochem.*, 57, 42 (1965).
- (12) H. Toda and S. Akabori, *J. Biochem.*, 53, 102 (1963).
- (13) M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, 160, 69 (1945); 195, 19 (1952).
- (14) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2497 (1963).
- (15) W. N. Haworth, E. L. Hirst and E. G. Teece, *J. Chem. Soc.*, 2858 (1931).
- (16) S. Hakomori, *J. Biochem.*, 55, 205 (1964).
- (17) H. O. Bouveng, B. Lindberg and O. Thander, *Acta Chem. Scand.*, 11, 1785 (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).  
Am.
- (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. Goron, *Helv. Chim. Acta*, 34, 308 (1957).
- (25) T. Ikenaka, *J. Biochem.*, 54, 328 (1963).

(26) S. Omo, K. Hirami, Y. Nitta, N. Suestugu.  
and M. Takagi, 酵素化学の本  
予稿集 18 卷 p 229 (1966); 7th Intern.  
Congr. Biochem., Abstracts IV p. 768 (1967).

## 第二章 部分 O-メチル化 フェル α-マルチドに対する タカアミラーゼの作用

第一章において 部分 O-メチル化 P-トロースを用いた  
実験から、タカアミラーゼ 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された。  
すなわち、図 1 に示す如く、1) TAA が切断する

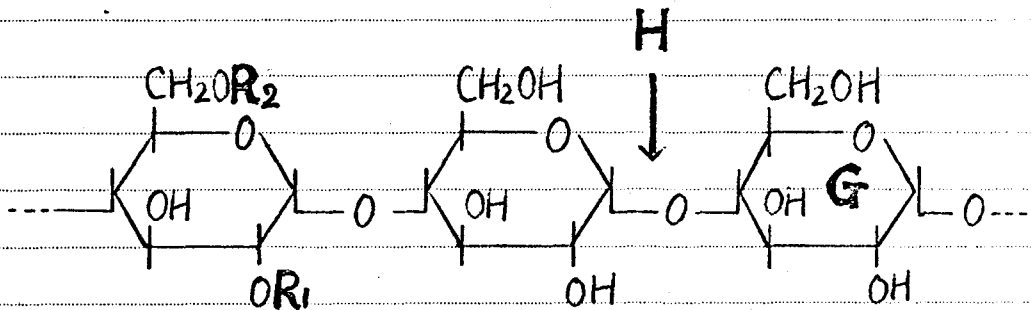


図 1 TAA の作用点

H : TAA 作用による加水分解点

I,  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{H}$

II,  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{CH}_3$

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  $\text{OCH}_3$  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6-O-メチル化されていても、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が基順の少な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の合成基順として知られているフェイルα-マルチド(1,2)に対してもメチルアミノと同様の取扱いを行った。TAAの基順特異性をさらにくわ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ユニット/mg, 分子量58,000, 最適pH 4.5~5.0)をそのまま使用した。

フェイルα-マルチド: 文献(3)の方法に従って合成した。ただし脱アセチル化反応にはNaOCH<sub>3</sub>を用い、反応後Dovex 50×4(H+)で処理する方法を用いた。m.p. 204-205°C,  $[\alpha]_D^{25}$  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>としての計算値 = C, 51.67; H, 6.22%.

部分O-メチル化 フェイルα-マルチド:

a) 部分O-メチル化フェイルα-マルチドをCH<sub>3</sub>I-Ag<sub>2</sub>Oでメチル化すると、アシル糖残基がオリ・糖の一定の

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ている(4)。この転移を利用して無秩序にメチル化されたフェル $\alpha$ -マルチドの混合物を調整した。

1gのフェル $\alpha$ -マルチドを20mlのトルエンに溶かし、0.5gのトリフェルグリメタン(5)を加えて、30°Cで一晩、かきまぜる。トリエンニエ-テルニエタール(7=2=1)を用いた三層グリメタン-1に依り、2つの-級水酸基のいづれか一方にトリメチル基を導入したものが反応の主生成物であることがわかった。反応混合物を水に注ぎ込み、泥状物を集めて、トルエン-ベンゾイルクロリドをベンゾイルイソチンに導き、0°Cで飽和したHBr-酢酸溶液を40°Cで加えてトリメチル基を除き、部分ベンゾイル化物を $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$ でメチル化した。ベンゾイル基を $\text{CH}_3\text{ONa}$ で除き、酸性樹脂および活性炭で処理後、凍結乾燥すると、約0.5gの無色の部分O-メチル化フェル $\alpha$ -マルチド標品(MP-A)が得られた。

b) フェル $\alpha$ -マルチドをメタノールに溶解し、適当量の $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$ でメチル化し、三層後、凍結乾燥してO-メチル基含量の異なる4種の部分O-メチル化フェル $\alpha$ -マルチド標品MP-1, MP-2, MP-3 および MP-4 を調整した。

標準用試料: メチル 2,3-ジ-O-メチル- $\alpha$ -グルコピロシドはメチル 4,6-O-ベンジリデン- $\alpha$ -グルコピロシドを $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$ でメチル化して合成した(6)。  
m.p. 83-84°C,  $[\alpha]_D^{20}$  146 (c=1.40, H<sub>2</sub>O).

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*-メチルフルクトースは Bell<sup>3</sup>(7) の方法  
の変法を用い、メチル 4,6-*O*-ベンジリテン α-フルコ  
シドを 100°C のジオキサン中で NaH とベンジルクロリド  
により、メチル 4,6-*O*-ベンジリテン-2,3-ジ-*O*-ベンジリ  
α-フルコシドに導き、60% 酢酸でベンジリテン基  
を除き、ジオキサン中、70°C で Pd-C 触媒下の  
接觸還元で還元ベンジリル基を行って後、塩酸加  
水分解して合成した。m.p. 162-163°C,  $[\alpha]_D^{18}$   
68 (C=0.85, H<sub>2</sub>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<sup>3</sup>(8) はこの物質に対して、m.p.  
163-164°C,  $[\alpha]_D^{23}$  67.5 の値を報告している。

この 4,6-ジ-*O*-メチルフルクトースを  $NaBH_4$  で  
還元したものを単離することなく、4,6-ジ-*O*-メチル  
フルクトールの標準用試料とした。

フェニル α-フルコシドは文献(9)の方法  
に従って合成した。m.p. 172-173°C,  $[\alpha]_D^{28}$   
178 (C=0.92, H<sub>2</sub>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。

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

過ヨウ素酸酸化: 過ヨウ素酸の消費量は池中(10)の方法に従った。 $290\text{ m}\mu$  の吸光度の減少量から求めた。過ヨウ素酸酸化による糖の分解の追跡には、予め  $\gamma$ -ベンチルアルコールを一定量試料中に加えて過ヨウ素酸酸化を行い、一定時間毎にその一部を取り出し、 $\text{I}_4$ -リングリコールを加えて後、カスクロマトグラフで糖を分析し、 $\gamma$ -ベンチルアルコールとの同量比から、分解率を求める方法をとった。

ローパー および薄層 クロマトグラフ: 東洋口紙 No 51, および Merck 社製 Kieselgel G を用いて行った。展開剤は、溶媒 A =  $\text{m-ブタール} : \text{EtOH} : \text{水} (10 : 1 : 2)$ , 溶媒 B =  $\text{m-ブタール} : \text{酢酸} : \text{H}_2\text{O} (3 : 1 : 1)$ , 溶媒 C = 水飽和ブタール 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- などは、第一章で述べた方法に従った。

## 結果

MP-Aの化学組成：表IにMP-Aをメタリシ後、トリメチルシリルエーテルとしてガスクロマトグラフ-で分析した。MP-Aの化学組成および各標準用試料によるピークのメチル $\alpha$ -グルコピラノシド（保持時間は約20分）に対する相対保持時間  $R_t$ を示した。メチル 4-O-メチル- $\beta$ -グルコシドによるピークとメチル 2-O-メチル-グルコシドによるピークが重なる（ $R_t = 0.68$ ）ので、2-O-メチル-グルコースの定量には、メチル 4-O-メチル-グルコシドによる $\alpha$ 、 $\beta$ アマーの面積比を予め、標準試料で決定しておき、その比から算出したメチル 4-O-メチル $\beta$ -グルコシドによるピーク面積を、 $R_t = 0.68$ のピーク面積から差し引いた値を用いた。

MP-AのTAA-加水分解生成物の分離と確認：部分O-メチル化P $\beta$ D-2の場合と同様に、 $\alpha$ -パークロマトグラフ-による加水分解生成物の分離、確認を行った。100mgのMP-Aを10ml、0.2M、pH5.1の酢酸緩衝液中に溶かし、0.1%、アルコール処理したTAA溶液10mlを加えて37°Cに保つ。20時間後の、フェールの遊離量から求めた加水分解率は36%であった。 $\text{NaBH}_4$ 還元後のガスクロマト

表I. 部分O-メチル化フェルロコキシト標品MP-Aの  
化学組成とその成分糖の相対保持時間\*

	MP-A中の残糖の 重量%	$R_t$ **
グルコース	31.8	{ 1.00 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 0.58
4-O-メチルグルコース	7.2	{ 0.61 0.68
6-O-メチルグルコース	9.1	0.82
4,6-ジ-O-メチルグルコース	4.4	{ 0.49 0.51
2,3-ジ-O-メチルグルコース	—	{ 0.38 0.41

\* メチルグリコシドトリメチルシリルエーテルとしてカスクロマトグラフィーで分析した。

\*\* メチルグリコシド標品MP-Aにおけるピーク(保持時間, 約20分)に対する相対保持時間。

\*\*\* メチル4-O-メチルグリコシドの $\alpha$ および $\beta$ ピラノ-1における2つのピークの面積比(1=0.47)を用いて $\beta$ -ピラノ-1のピーク面積を求め、それを $R_t=0.68$ のピーク面積から差し引いて計算した値。

フィード。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 $100^{\circ}\text{C}$ で3分間加熱後、Dowex 50 ( $\text{H}^+$ 型)で脱塩し、凍結乾燥しておく。一部をパーフロマトグラフ-1にかけて、アセトン性  $\text{AgNO}_3$ - $\text{NaOH}$  または アリン水素ワタル酸試薬で発色させると還元力を有する物質として、図2に示すような4つのスポットが検出された。

各スポットの Nelson-Somogyi 法に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。この場合モイラーのモイ-D-4L-グルコースは全く検出されなかった。

PC-Aはグルコースともう2つの成分を含み、この成分は4,6-ジ-O-4L-グルコースであることが、以下のように明らかにされた。PC-Aをメタリシス後ト4x4Lシリルエーテルとしてカスクロマトグラフ-1で分析すると、4L-D-グルコースに対して相対保持時間  $R_t$  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ースによるものと特定され、前の2つのピークは標準用試料の4,6-ジ-O-4L-グルコースも同様反応させたときに得られるピークと全く一致した(表I)。PC-AのHCl加水分解物は溶媒Aおよび溶媒Bを用いる別々のパーフロマトグラフ-1で、グルコースに対応するスポットと4,6-ジ-O-4L-グルコースに対応するスポットを与えた(図2)。さらに4,6-ジ-O-4L-グルコースに対応する部分を切りとり、口紙から水で抽出後

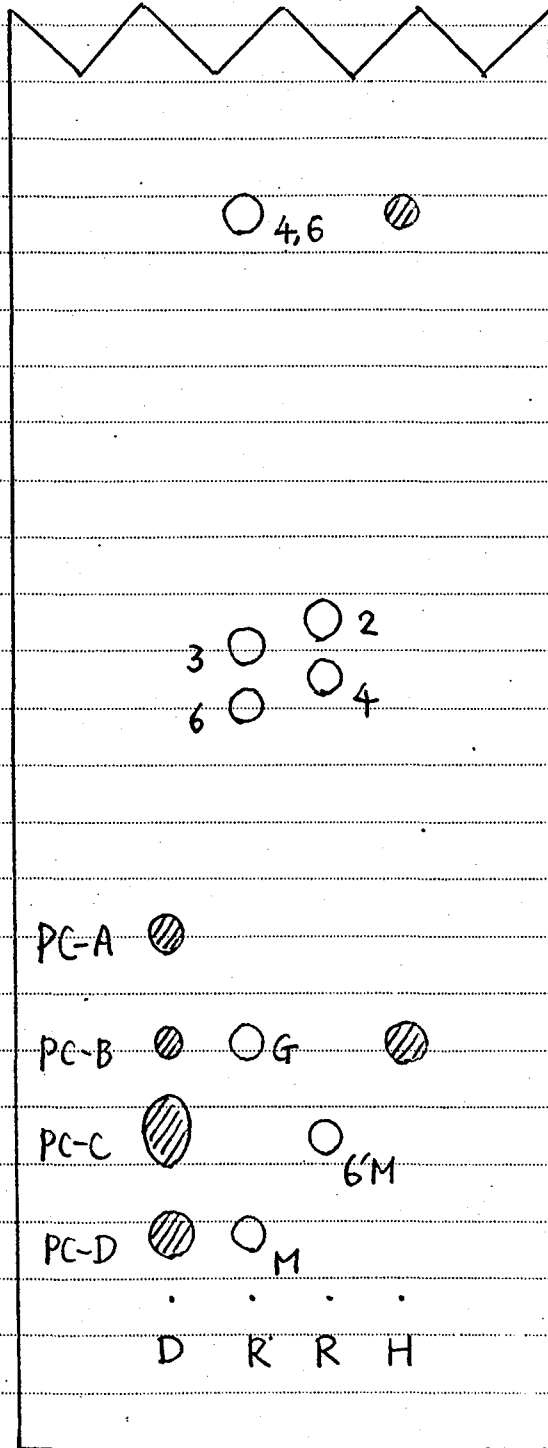


図2. MP-AのTAA消化物およびPC-Aの塩酸加水分解物のペーパークロマトグラフィー。溶媒系Aを使用。

D: MP-AのTAA-消化物。  
 H: PC-Aの加水分解物  
 R: 標準用試料,  
 M: 2-IL-2,  
 G: 7-IL-2,  
 6M: 6-O-メチル2-IL-2\*

2: 2-O-メチル7-IL-2  
 3: 3-O-メチル7-IL-2  
 4: 4-O-メチル7-IL-2  
 6: 6-O-メチル7-IL-2  
 4,6: 4,6-ジ-O-メチル7-IL-2

\* メチルπ-D-2のTAA-消化物中より単離した標準品 (第一章参照)。

そのまゝ、トリメチルシリル化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つのピークが得られ、これは4,6-ジ- $\alpha$ -D-メチルグルコース トリメチルシリルエーテルの $\alpha$ ,  $\beta$ -ピーク-1による2つのピークに合致することもわかった。また口紙からの抽出物を $\text{NaBH}_4$ で還元後、ガスクロマトグラフで、4,6-ジ- $\alpha$ -D-メチルグルコース トリメチルシリルエーテルとして確認することもできた ( $R_t=0.65$ )。LTから2 PC-Aはグルコースと4,6-ジ- $\alpha$ -D-メチルグルコースを含むことがわかった。モル比を求めると0.98=1とT対T=0。理論的に4,6-ジ- $\alpha$ -D-メチルグルコースは、二糖の非還元末端にしか来れないので、PC-Aは4,6'-ジ- $\alpha$ -D-メチル-2-フルクトースと考えられる。念のために、PC-Aの $\text{NaBH}_4$ 還元後の分析を行うと、フルクトールと4,6-ジ- $\alpha$ -D-メチルグルコースが0.93=1のモル比で得られたので、PC-Aの構造が4,6-ジ- $\alpha$ -D-メチルフルクトースであることは確実とされた。

PC-B および PC-D は  $\alpha$ -D-グルコース および  $\beta$ -D-グルコースの結果から、それぞれグルコース および 2-フルクトースであると決定した。

PC-C は 部分 D-メチル化 P-3-D-2 の TAA-消化物中から単離された  $\beta$ -D-メチル-2-フルクトースと同じ  $R_f$  値を示している (図2)。PC-C は 4-D-メチルグルコース、 $\beta$ -D-メチルグルコース および グルコース を 1:1.52=2.58 のモル比で含んでおり、PC-C を  $\text{NaBH}_4$  で還元後には、4-D-メチルグルコース、 $\beta$ -D-メチルグルコース および フルクトール が 1:1.55=2.79 のモル比で得られ、グルコース は検出されなかった。4-D-メチル-2-

トールも 6-O-メチルグルコシドも全く検出されなかった。  
 また、 $\text{NaBH}_4$ 還元の前後も 4-O-メチルグルコースと  
 6-O-メチルグルコースのモル比には変化がなかったこと  
 から、PC-C は 4'-O-メチルグルコースと 6'-O-メチルグルコース  
 のモル比で約 1 = 1.5 の混合物であると考  
 えられる。

MP-1, MP-2, MP-3 および MP-4 の化学組成と  
 これらの TAA-消化後の還元生成物の化学組成:

表 II に示した化学組成からわかるように、メチル  
 中で  $\text{CH}_3\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$  によるメチル化を行うと、主として  
 2位の OH 基に  $\text{CH}_3$  基が導入されているので 2位  
 の OH 基の酵素反応における役割を調べるのに  
 は都合がよい。これらの部分 O-メチル化フェル  
 シンに TAA を作用させた後、 $\text{NaBH}_4$  で還元  
 し、加糖アルコールとして分析した結果を表 II に  
 併せて示す。糖アルコールとしては グルコシドのみ  
 が検出され、他のメチル置換グルコース相互のモ  
 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った。別に求めたフェル  
 シンの含量は MP-1 で 22.9%, MP-2 で 22.5%, MP-3  
 で 22.2%, MP-4 で 21% であったので表 II に示す  
 成分とあわせて考えると、これらの成分は、水分の  
 補正後は、各部分 O-メチルフェルシンの  
 93 ~ 99% が説明されることになる。

TAA による部分 O-メチル化フェルシンの  
 加水分解の時間経過による変化: 最終基質

部分O-メチル化フェニル $\alpha$ -ジリトシドおよびそれらのTAA-  
表II. 消化物の $\text{NaBH}_4$ 還元生成物の化学組成

	ケルコース	ケルシ トール	2-O-メチル ケルコース	3-O-メチル ケルコース	4-O-メチル ケルコース	6-O-メチル ケルコース	2,3-ジ-O-メチル ケルコース
MP-1	(49.5) <sup>*</sup>	(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- 還元生成物	7.21	3.15	2.96	1.00	**	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- 還元生成物	3.73	0.29	2.82	1.00	**	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- 還元生成物	3.26	***	3.33	1.00	**	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- 還元生成物	4.02	0	3.61	1.00	**	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  
ピークと重なるため、直接求められなかったのこ。  
 $\text{NaBH}_4$ 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. pH5.1 の  
 酢酸-酢酸γ-ア-緩衝液中で 37°C で酵素反  
 応を行い、フェルの遊離量から加水分解率を  
 追跡すると図3のような曲線が得られた。

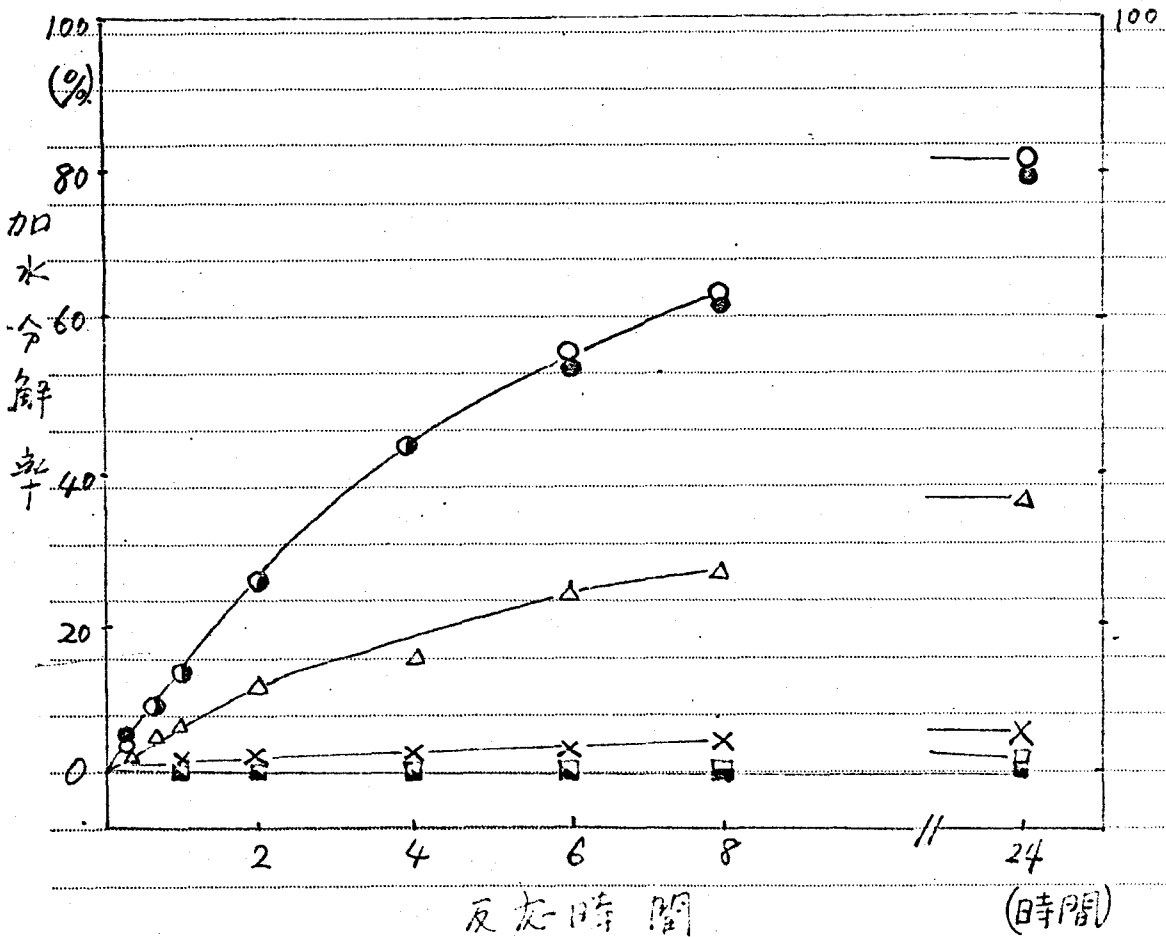


図3. フェル α-2,4-ジヒド オキド その部分D-グルコース誘導体の  
 TAA作用による加水分解過程。

—○— フェル α-2,4-ジヒド, —●— フェル α-2,4-ジヒド + MP-4  
 —△— MP-1, —×— MP-2, —□— MP-3, —◇— MP-4

基質濃度 0.1%; 酵素濃度 0.01%; 0.1M 酢酸緩  
 衝液, pH5.1. 37°C.

24時間後の加水分解率は MP-1 で 34.8%, MP-2 で 5.0%, MP-3 で 1.6% である。MP-4 の場合はフェニルの遊離性もみられず、還元力の増加も全く認められなかった。表 II に示した各標品の組成から、3-O-メチルグルコース、4-O-メチルグルコース および 6-O-メチルグルコース などの存在量はきわめて少なく、またその存在モル比はどの標品においても等しいといえることがわかるので、加水分解率の大きな変化は 2-O-メチル基の与える大きな影響によるものとみられる。

MP-4 標品中に含まれる 部分 D-メチル化 フェニル α-D-リボシドの化学構造は、すでに示したように、MP-4 は TAA による加水分解を全く受けていない。したがって、この標品中に、TAA の作用を強く阻害する物質 - 阻害剤 が含まれていないことが明らかになった。この標品中に存在しているすべてのフェニル α-D-リボシドの誘導体は TAA の作用を受けないといえる。MP-4 には 2-O-メチルグルコース残基が多量に含まれている (表 II) のため、図 4 に示した 3 種の化合物が存在し、それら

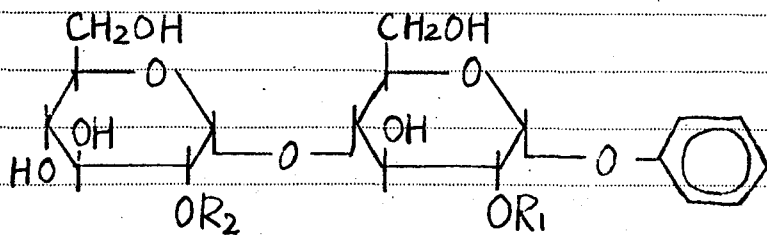


図 4. III = R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = H,  
IV = R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>,  
V = R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

がTAAの作用を受けたいらしいことは充分想像できる。そこで、これらの物質が存在しているか否かの確認を得る目的で、*Rhizopus niveus* のグルコピラセによるMP-4の加水分解と、その生成物の確認を行った。

100mgのMP-4に対して10mgのグルコピラセを加え、0.1M, pH5.0の酢酸緩衝液中で加水分解を2日間行い、さらに5mgのグルコピラセを追加して、1日反応を行う。Dowex 50X4 (H<sup>+</sup>型) で脱塩後、凍結乾燥して無色の粉末を得た。その一部を溶媒Cを用いるKieselgel G薄層クロマトグラフィーで分離し、図5に示すような結果を得た。

スポットTLC-Iはフェニルを含むほか、2-O-4H-グルコ-スと3-O-4H-グルコ-ス残基を約10=1のモル比で含んでおり、フェニル 2-O-4H-α-グルコ-シドと少量のフェニル 3-O-4H-α-グルコ-シドから成っているものと考えられる。また、フェニル α-グルコ-シドに相当するR<sub>f</sub>値に近いにもかかわらず、グルコ-スを全く含んでいないことから、TLC-I中のフェニル α-グルコ-シド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は溶媒Bを用いる薄層クロマトグラフィー、溶媒Aを用いる70%クロマトグラフィー、かつクロマトグラフィーの結果からグルコ-スであると特定した。これら2-O-4H-グルコ-スも3-O-4H-グルコ-スの存在も認めるとはできなかった。TLC-IおよびTLC-IVはグルコピラセ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比であると考えられると、両者が

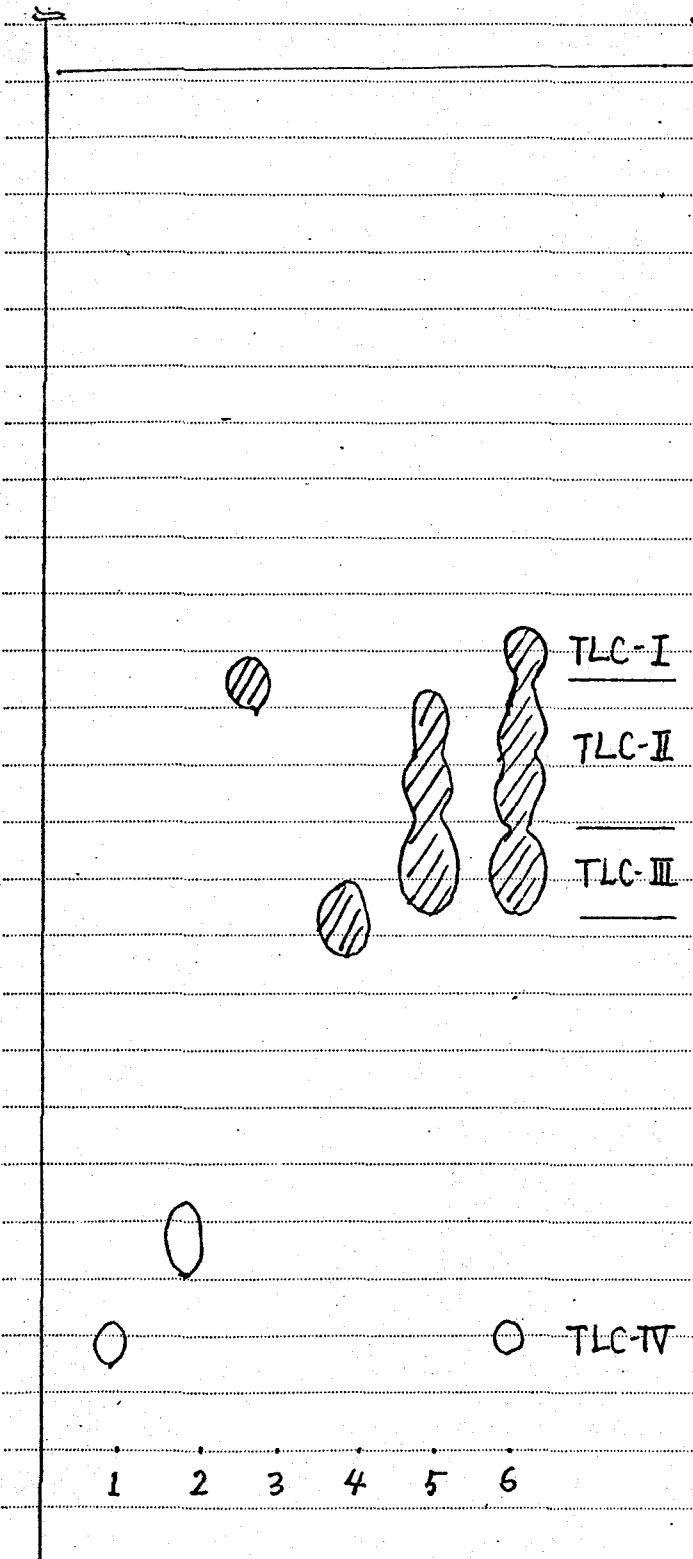


図5. MP-4のR.  
niveus. グルコアミラーゼ  
加水分解物の薄層  
クロマトグラフィー。  
溶媒として展開し  
5%メタノール性硫酸  
で発色させた。斜線  
で示したスポットは  
赤味がかつた黒色に、  
その他のスポットは褐  
色に発色した。

- 1 : グルコース
- 2 : 2-O-メチルグルコース
- 3 : フェイル $\alpha$ -グルコシド
- 4 : フェイル $\alpha$ -マルチド
- 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てき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-メチル $\alpha$ -D-リボシド (図 4 の III) および少量の フェニル 3-O-メチル $\alpha$ -D-リボシドが存在しており、おそらくその大部分が *R. niveus* の  $\alpha$ -D-リボシドの作用により加水分解を受け、TLC-I と TLC-IV のスポットを占めたと考えられることができる。*R. niveus*  $\alpha$ -D-リボシドの基質特異性は明らかではないが他の  $\alpha$ -D-リボシドの  $\alpha$ -D-リボシド特異性 (11) から考えて、フェニル 2-O-メチル $\alpha$ -D-リボシドや フェニル 3-O-メチル $\alpha$ -D-リボシドには僅かしかないものと思われる。池田 (10) は *Rhizopus delamar*  $\alpha$ -D-リボシドが フェニル 6-O-アセチル $\alpha$ -D-リボシドの  $\alpha$ -D-リボ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-メチル $\alpha$ -D-リボシドの存在量は、*R. niveus*  $\alpha$ -D-リボシド作用による  $\alpha$ -D-リボシドの遊離量を還元力の増加から求めて決定した。基質濃度および酵素濃度の異なる A, B 2つの条件で加水分解を行い、フェニルの定量または還元力の増加量を  $\alpha$ -D-リボシドに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-リボシドは完全に加水分解されるにもかかわらず、MP-4 の還元力の増加はみられなかったこと、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 で標準用試薬の フェニル $\alpha$ -D-リボシドからフェニルの遊離量のみみられるのに、MP-4 からほとんどみられなかったこと、および フェニル $\alpha$ -D-リボシドが MP-4 の消化物中に存在して

表 III. *Rhizopus niveus* アリコキシラーゼによる加水分解\*

基質	条件 A	条件 B	
	30分後	30分後	24時間後
フェル α-D-グルコシド	0	2.4	47.6
MP-4.	0	2.4	20.9
α-D-グルコシド	0	0	0
フェル α-D-リボシド	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-酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0, 37°C.

\* Nelson-Somogyi 法による還元力を測定してグルコースとして計算し、% で示した。

\*\* 2つのグルコース残基間のグリコシド結合の加水分解のみを考慮し、溶媒 C を用いる薄層クロマトグラフィーでフェル α-D-リボ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。

11ないことなどの諸事實は、MP-4中に、置換を全く  
 受けずともフェニル $\alpha$ -ニチトが存在していることが  
 を強く示唆している。したがってフェニル $\alpha$ -ニチトから  
 由来する $\gamma$ -ルゴスの量は無視でき、この定量される  
 $\gamma$ -ルゴスはフェニル $\alpha$ -ニチトの2-O- $\gamma$ ル (図4のIII)  
 および3-O- $\gamma$ ル<sup>1</sup>糖単体の非還元末端部からのみ由来  
 するものとして、その存在量を知ることができた。  
 Bの条件下で24時間後にMP-4のみが1セル  
 あたり0.2セルの $\gamma$ -ルゴスが分離してくる(表III)のど  
 少くもMP-4の18%程度はフェニル2-O- $\gamma$ ル  
 $\alpha$ -ニチト(III), 2%程度はフェニル3-O- $\gamma$ ル $\alpha$ -  
 $\alpha$ -ニチトであったと考えられる。

TAAがMP-4に全く働きがなかった事實は、また  
 III およびフェニル3-O- $\gamma$ ル $\alpha$ -ニチトにも作用しない  
 ことを示しており、 $\gamma$ ル基の置換のある $\gamma$ -ルゴス残基  
 の $\gamma$ -ルゴス結合にはTAAが作用しないという、すでに  
 得られた結果とよく一致している。

TLC-IIのスポットは $\gamma$ -ルゴス, 2-O- $\gamma$ ル, 3-O- $\gamma$ ル,  
 4-O- $\gamma$ ル- $\gamma$ -ルゴスなどを含んでおり、4種の0- $\gamma$ ル  
 フェニル $\alpha$ -ニチトの混合物であると考えられるが、  
 さらに詳しい検討は行われなかった。

スポット TLC-III は TLC-II との分離が完全とい  
 えないので、その単一性は保証されたいけれども、この  
 画分に含まれる化合物の構造およびその存在率  
 を以下の方法によって決定した。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による分析で、2-O- $\gamma$ ル $\gamma$ -ルゴス  
 と $\gamma$ -ルゴスのみが発見され、そのセル比は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、フェニルの定量から求めた TLC-III のみかけの 1 エルあたり 2.04 エルで、6 日間の過ヨウ素酸化後の成分を分析すると、その TLC III 中のフルコース残基は 100% 分解し、2-O-44ルフルコース残基は、81% が分解していることがわかった。TLC-III を R. niveus のフルコプミラセで、さらに加水分解を行うと TLC-III のみかけの 1 エルあたり 0.08 エルのフルコースの遊離量が見られた。MP-4 中に何ら修飾も受けていないフェニル  $\alpha$ -2-リクトドが存在していることは否定されたので TLC-III 中にフェニル  $\alpha$ -2-リクトドが存在することは考えられない。以上の結果を総合すると、TLC III には図4の III が約 10% IV が約 80% V が約 10% 含まれていたものと推定される。この場合の計算値は、2-O-44ルフルコースとフルコース残基のエル比が 1:0.82、過ヨウ素酸の消費量は TLC III のみかけの 1 エルあたり 1.9 エル、過ヨウ素酸化後の 2-O-44ルフルコース残基の分解率は 81.8% となるので、得られた実験値とほぼ一致する。したがって、相当量の IV がこの TLC III の画分に含まれてい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ったし (図3)、薄層クロマトグラフィにより分離した TLC-III も TAA の作用は全く受けなかった。MP-4 による TAA 作用の阻害実験では、2.4 mM のフェニル  $\alpha$ -2-リクトドを基質とした場合、50 mM (MP-4 のみかけの分子量を 438 と仮定) まで何ら阻害が認められなかった。またフェニル  $\alpha$ -2-リクトドの量を 1.5 倍量の MP-4 を加えて、時間経過



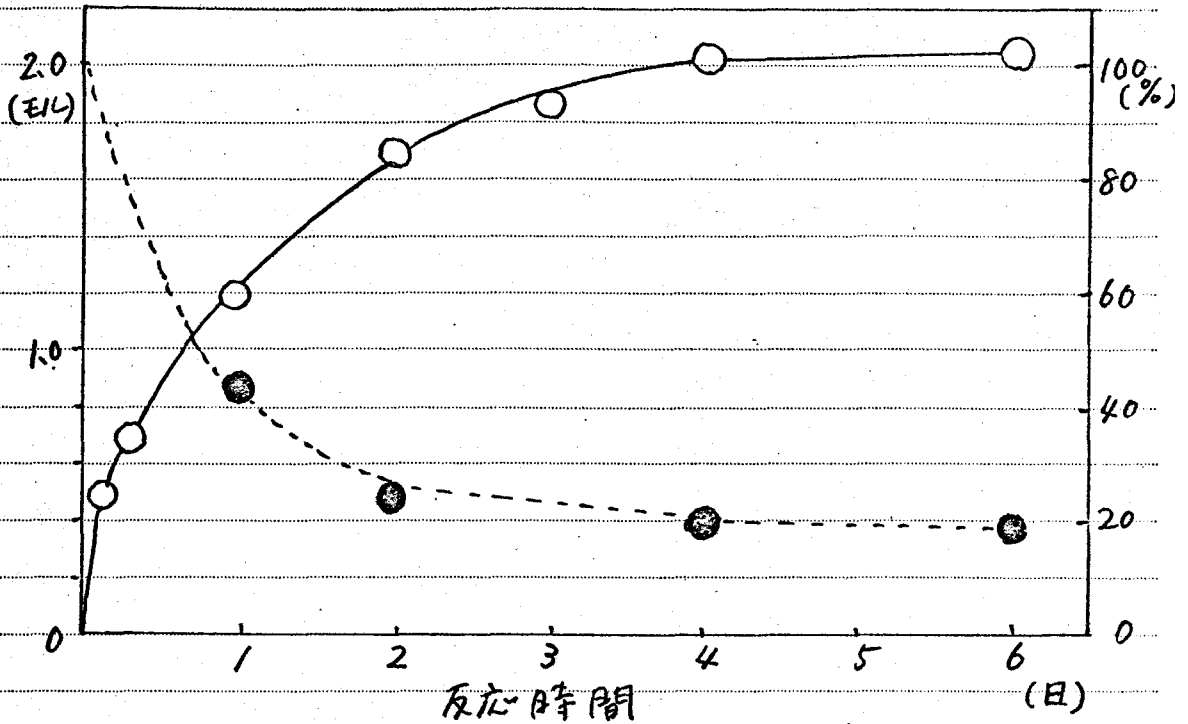


図 6. TLC-III の過ヨウ素酸化反応。

- : TLC-III のみかけの 1 EIL あたりの 過ヨウ素酸化の消費量. (左側目盛)
- : もとの TLC-III 中の 2-O-4-N-7-ルース残基量に対する 残存 2-O-4-N-7-ルース残基の存在率. (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かった。したがってMP-4標品中にTAAの作用を全く抑えてしまうような、あるいは強く阻害するもの物質は含まれていなかったと言えるので、フェール 2'-O-メチル- $\alpha$ -D-リボシ (図4のIV) はじめ MP-4 中の フェール- $\alpha$ -D-リボシの O-メチル誘導体はすべて、TAAの作用を受けない物質であると考えている。

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。

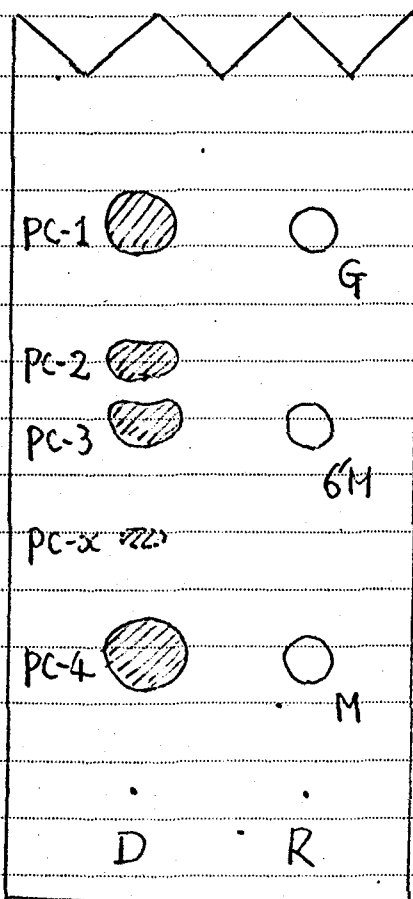


図7. MP-2のTAA-消化物のペーパークロマトグラフィー。溶媒Aで5日間展開し、アセトニヒ酸  $\text{AgNO}_3$ - $\text{NaOH}$  試薬で発色させた。

D: MP-2のTAA-消化物

R: 標準用試料

G: フェール

M: リボシ

6M: 6-O-メチルリボシ\*

\* メチルリボシ標品のTAA-消化物中にペーパークロマトグラフィーで分離したものの。

PC-1, PC-4 はそれぞれ グルコース および ギュルコース  
 が ペーパー および カスクロマトグラフィーの結果からわかった。

PC-2 および PC-3 は再度 ペーパー-クロマトグラフィーで  
 分離し、カスクロマトグラフィーで分析した結果、

PC-2 は 3'-O-メチル ギュルコース, PC-3 は 4'-O-メチル ギュル  
 コースであると決定した。よって PM-2 には 3'-O-メチル グルコース  
 残基や 4'-O-メチル グルコース残基の存在量から推定して  
 少しは 1-にもかわらぬ、これらの 2 糖が確認されたこと  
 は注目には値するものと思われる。

PC-2 は カスクロマトグラフィーで グルコースと 2-O-メチル  
 グルコースに相当するピークを与えるが、現在得られて  
 いるものは 1-に 0.6 程度で、さらに精製が必要  
 である。NaBH<sub>4</sub>還元後はグリシールの生成が認められ  
 るので 2-O-メチル ギュルコースが非常にわずかに存在し  
 ている可能性はある。Nelson-Somogyi 法より各画分の  
 抽出物の還元力を求めると、その比率は PC-1 が  
 24%, PC-2 が 16%, PC-3 が 15%, PC-4 が  
 39%, PC-2 が 6% であった。

## 考 察

7-エノル α-マルチドの 6-O-メチル または 6'-O-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<sub>2</sub>O  
 によるメチル化によって合成する試みは成功しな  
 かった。表 I に示したように、1-へのアシル転移  
 があつて (4) 種々の位置の OH がメチル化  
 された混合物が得られた。トリメチル基が 6-OH,  
 6'-OH のところに導入されたかは不明であるが、

マルチスにおける反応性(12)から考えると、6'-OHにトリフ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ルニルマルチドも相当量、生成しているものと思われる。アシル転移を利用して調製したMP-A標品のTAA-消化物中に、グルコース、マルチスの他に4'-O-メチルマルチス、6'-O-メチルマルチスおよび4,6'-ジ-O-メチルマルチスの存在が確認された。TAAがα-D-6,4-フルクトースの内部のグリコシド結合の加水分解を触媒する事実を考慮すれば、フェルニル4'-O-メチルマルチドがTAA作用により加水分解されることは、容易に理解できる。

4,6'-ジ-O-メチルマルチドが、単離、確認されたことは、すでに部分メチル化P3D-スチルを基質としたときに得られた知見、すなわち図1のIIがTAAの作用によりH点で加水分解されることを、一層強く支持する結果である。一方、MP-AのTAA-消化物中に、2-O-メチルフルクトース残基または3-O-メチルフルクトース残基を含む還元力を有する糖は確認できなかった。モ1-O-メチルフルクトースおよびそのメチルグリコシドの加水分解反応については Dickら(13)によっても最近、報告されており、本実験の結果ともほぼ一致がみられている\*。メチル4-O-メチルフルクトースのβ-PIR-1によるC-7が2-O-メチルフルクトースによるC-7と重なること(図2のスポットPC-C)に2-O-メチルフルクトース残基が含まれている可能性が存在するが、メチル4-O-メチルフルクトースのα-およびβ-PIR-1によるC-7の面積比は、同じ条件にて

\* 6-O-メチルフルクトース、フルクトースの分析には相異がある。

標準用の $\alpha$ -フルクトース 4-O- $\alpha$ -フルクトース-7-グリコシドをメタリシして  
 カスクロマトグラフィーで分析した場合と同じ値  
 ( $\alpha$ -PIR- $\beta$ -PIR- = 1:0.47)を示すので、2-O- $\alpha$ -  
 $\alpha$ -フルクトース残基の存在量は無視できる程度と  
 考えられる。3-O- $\alpha$ -フルクトース残基は、もし存在すれば  
 はっきり確認できる(表I)はずである。これらの  
 $\alpha$ -フルクトース残基は2つのフルクトース残基のどちら側に位置して  
 いるかは不明であるが、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  
 果たしているであろうことは容易に想像される。

フェニル $\alpha$ -マルチドをメタリシして  $\text{CH}_2\text{I}-\text{Ag}_2\text{O}$  を  
 用いて $\alpha$ -フルクトースと表IIに示すように、主として  
 フルクトース残基の2位のOH基に導入され、一般  
 に認められている2-OHの高い反応性に基づく結  
 果と考えられる(14)。図3に示すように2-O- $\alpha$ -  
 $\alpha$ -フルクトース残基の含量の増加とともに、TAAによ  
 る加水分解率は急激に減少する。他のO- $\alpha$ -フル  
 $\alpha$ -フルクトース残基の存在量は少なく、そのモル比にも  
 大差がないので、2-O-又は2'-O- $\alpha$ -フルクトースによる  
 TAA作用への影響はきわめて大まかものとされる。  
 部分O- $\alpha$ -フルクトースフェニル $\alpha$ -マルチド標品MP-4は全く  
 TAAの作用を受けず、従って、この中に含まれるすべての  
 フェニル $\alpha$ -マルチド誘導体は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- $\alpha$ -フルクトース- $\alpha$ -マルチド(図4のIII)もまた  
 フェニル2'-O- $\alpha$ -フルクトース- $\alpha$ -マルチド(図4のIV)もTAA  
 の作用を受けなかったことによる。こうした実験事  
 実は、酵素反応における基質側のフルクトース残基

の2位のOH基の反応性を明らかに示しており、あつ種の化学反応においてグルコース残基の他のOH基に比べて2位のOH基の反応性が特に高い事象(4,14)と何か通っているように見える。

MP-2のTAA-加水分解物からグルコースと2-O- $\alpha$ -フルクトースも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、きわめて少なく、また、MP-2の0.3%から由来してきたものに対するほかだったので、正確な構造決定は困難であった。

しかし、TAAのマルト糖活性(15)を認めざるは、非常に高い速度でフェニル 2'-O- $\alpha$ -フルクトリブシトがTAAに於て加水分解を受け得る可能性がある。すなわち、マルト糖活性があれば、おそれのフェニル  $\alpha$ -フルクトリブシト糖活性の存在(16)が期待でき、また、たとえば、フェニル  $\alpha$ -フルクトリブシト糖活性がみられたい場合でも、さらに2-O- $\alpha$ -フルクトース残基が、つたからと糖鎖鎖が反応すれば、フェニル  $\alpha$ -フルクトリブシトに対するおそれ、大きな親和力が生じることが充分考えられるからである。としか、この点の解明には、フェニル 2'-O- $\alpha$ -フルクトリブシトの合成に待つほかはないが、現在のところ、この合成はきわめて困難であると思われる。

グルコース残基の3位のOH基の反応性については、さらによくわいた実験が必要であるが、現在までに得られている結果から、次のように推定している。

MP-4中には、少なくとも2%程度のフェニル 3-O- $\alpha$ -フルクトリブシトが存在していると思われるが、MP-4が全くTAAの作用を受けないことから、このものはTAAの作用

を受けたいと考えている。また MP-2 の TAA-消化物中に 3'-O-メチル- $\alpha$ -D-リボースの存在が確認されたことから、7-エチル 3'-O-メチル- $\alpha$ -D-リボースは TAA の作用を受けるものと考えている。最近 Saïev と Ballou (17) は *Mycobacterium phlei* のリボ多糖体をフタの肝臓  $\alpha$ -アミラーゼで加水分解し、その消化物中より 3'-O-メチル- $\alpha$ -D-リボースを単離・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、7-エチル- $\alpha$ -D-リボースの 3', 4', 6' の各 OH 基はメチル化を受けると TAA の作用を受けず 7-エチルを脱離するが、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、全く受けなくなる。6-O-メチル多糖体はすでに第一章で明らかにしたように、加水分解を受けないものと判断される。ということになる。ここで、TAA が天然の基質  $\alpha$ -D-リボースに働く場合について、第一章および本章で得られた結果から、リソチムで提出された酵素反応のメカニズムを借りて、次のように推定した。

今回 8 に示した Q 環と R 環の間で TAA の作用により加水分解がおこると推定すると、P 環の 2, 3, 6 位の各 OH 基は TAA の、(おそらく 4-ヒドロキシ残基を含む)  $\alpha$ -アミノ酸残基と水素結合を作って安定にし、基質-酵素複合体が形成される。もちろん他の Q 環や R 環と  $\alpha$ -アミノ酸残基間の水素結合も存在する。P 環の 2 位の OH 基の間接的な水素結合による自由回転変化は基質-酵素複合体の形成にとりかわり

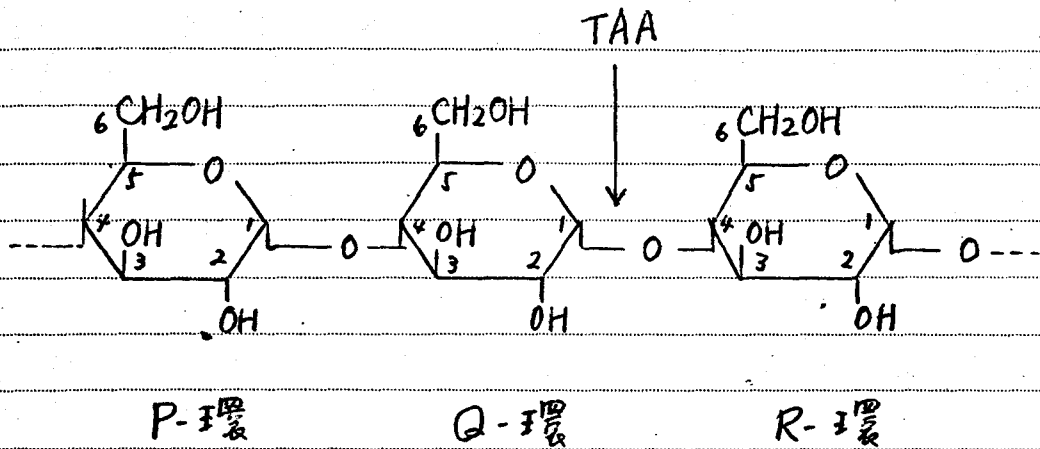


図 8.

て重要はくさい十分に大きいものと思われる。それと比べて 6-OH や 3-OH の間を有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受けたい程度に、酵素素蛋白とは隔った位置に P-環がまわっているものと考えられる。ヒドロキシ環上の Oセクリコシ結合を形成している 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プロトンを提供するアミノ酸残基 および フルコシルカチオンを安定化させ、プロ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-環の間の加水分解が行われるものと想像される。このとき、Q-環上の 2, 3, 6 位の各 OH 基は、いわゆる酵素素蛋白とまわめつ近い位置にくることが予想され、メチル基が導入されると立体的な障害のために、加水分解の触媒となるアミノ酸残基の存在する、狭義の



活性点に近づくことかひきよくなり、加水分解反応はあつらなくなるものと推定される。

R環については、フェニル  $\alpha$ -D-リボシドの加水分解速度が  $\alpha$ -D-2に比べて非常におそくなる

こと、山野ら(18)のマルトトリスとマルクトリ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を考えると、酵素の binding process がおそい

Catalytic process に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  $\alpha$ 4L基またはグルコシル基で置換されても加水分解反応がなされることから、必須なものではないと推定される。

## 総括

1)  $\alpha$ シル転移を利用してフェニル  $\alpha$ -D-リボシドの部分  $\alpha$ -4L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  $\alpha$ -4L化フェニル  $\alpha$ -D-リボシド標品 MP-1, MP-2, MP-3 および MP-4 を調製し、これらの基質に対するタカミラーゼ A (TAA) の作用様式を検討した。

2) MP-A の TAA-消化物中には、フルクトース, リブトース, 4'- $\alpha$ -D-リボシド, 6'- $\alpha$ -D-リボシド および 4',6'-ジ- $\alpha$ -D-リボシドが存在することが確かめられた。

- 3) 部分 O-メチル化 フェニル  $\alpha$ -D-リボシドの 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。この標品中には、フェニル  $\alpha$ -D-リボシドの 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かめることができたので、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) PM-2 の TAA-消化物中には 3'-O-メチル- $\alpha$ -D-リボシドが存在していたことが明らかになったので、フェニル 3'-O-メチル- $\alpha$ -D-リボシドは TAA の作用を受けるものと推定される。
- 6) 部分 O-メチル化 アリドース および 部分 O-メチル化 フェニル  $\alpha$ -D-リボシドを基質として、得られた知見を総合して、1144-6 の場合に提出された 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。

本研究を行うにあたり、タカジプスター社を専ら下された三共株式会社には深く感謝いたします。

## 引用文献

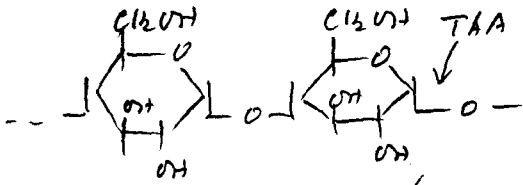
- (1) B. Helferich and S.R. Petersen, Ber., 68, 790 (1935).
- (2) S. Matsubara, T. Ikenaka and S. Akabori, J. Biochem., 46, 425 (1959).
- (3) S. Matsubara, Bull. Chem. Soc. Japan, 34, 718 (1961)
- (4) I.O. Maltronadi, S.M. Flematti, J.O. Deterrari. and E.G. Gros, Carbohydr. Res., 3, 177 (1966); 第一章引用文献 (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", 富元社 (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, Carbohydr. Res., 6, 52 (1968).

- (14) J.M. Sugikara, "Adv. Carbohydr. Chem." Vol. 8.  
Academic Press, (1953) p. 16;  
E. J. Roberts and S. P. Rowland, Carbohydr.  
Res., 5, 1 (1967).
- (15) Y. Nitta, K. Hironi and S. Ono, J. Biochem.,  
63, 632 (1968)
- (16) 赤堀 信彦 "酵素研究法", 第2卷, 朝倉書店  
(1957) p. 95.
- (17) M. H. Saier and C. E. Ballou, J. Biol. Chem.,  
243, 992 (1968).
- (18) 小野 左海, 新田, 未次, 高木, 酵素化学シホ  
シムム予稿集, 18巻 p. 229 (1966).

## 謝 辞

本研究は大阪大学大学院理学研究科博士課程  
において行ったものであり、終始、御懇篤な御指  
導と御激励を賜った 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、討論をいただいた山本  
和彦博士をはじめ 大阪大学理学部松島研究室  
の皆様にも御礼申し上げます。



2-O-Me ⇒ 2-O-Me 糖

3-O-Me 6-O-Me deriv. ⇒ inhibitory effect