

# ビタミンCとアミノ酸との相互作用

八 木 一 文

薄 井 睦 子

## 序 論

ビタミンCすなわちアスコルビン酸は発見の歴史も古く、構造の簡単なビタミンであるにもかかわらず、その生理作用の機構についてはまだよく知られていない。多くのビタミンが特定の酵素の補欠分子群として作用することが証明されているが、アスコルビン酸に関してそのような事実はまだ見出されていない。

ごく最近になって、生体内において芳香族化合物への水酸基の導入(hydroxylation)に際してアスコルビン酸が特殊な役割を果すらしい事実が報告され注目をひいた。すなわち、Udenfriendらは<sup>1)</sup>副腎髄質のhomogenatesによるtyramineのhydroxytyramineへの変化がアスコルビン酸の添加によって最大に達すること、さらにこのhydroxylationは副腎組織を要せず、単にアスコルビン酸、金属イオンおよび酸素の存在でおこりうることを観察した。彼等の得た結論は次のように要約されよう。(1)アスコルビン酸、 $\text{FeSO}_4$ 、ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) および基質 (tyramine, quinoline, acetanilide) を含む系を酸素気流中で $35^\circ$ で振とうすれば、基質にhydroxylationがおこる。(2)アスコルビン酸濃度が大であるほどhydroxylationの程度も大きい。(3)EDTAはこの反応に不可欠ではないが、反応速度を著しく早める。(4) $\text{Fe}^{++}$ はこの反応の触媒として必要である。 $\text{Fe}^{+++}$ も同様の効果があるが、 $\text{Cu}^+$ 、 $\text{Cu}^{++}$  および  $\text{Co}^{++}$  は効果が少ない。(5)アスコルビン酸それ自身はhydroxylating agentではない。反応がすすむとアスコルビン酸は消失しデヒドロアスコルビン酸が生ずるが、この際発生を予想される $\text{H}_2\text{O}_2$ は検出されなかった。しかしおそらく $\text{H}_2\text{O}_2$ が発生し、これがデヒドロアスコル

ピン酸と反応して hydroperoxide型の active oxidant となるのであろう。(6) アスコルビン酸は pH 7.5 までは活性をもつが、デヒドロアスコルビン酸は pH 6.5以下でのみ前者と同様の活性がある。アスコルビン酸と同様 ene-diol 化合物であるデケトグロン酸、D—イソアスコルビン酸、デオキシマレイン酸、デケトコハク酸エステルなども同程度の活性を発揮した。

彼等はこれらの知見にもとづいて、hydroxylation agent が従来主張され<sup>2)</sup> ていた金属イオンの存在でのアスコルビン酸の自己酸化によって生じた  $H_2O_2$  なのではなく、むしろ  $H_2O_2$  とアスコルビン酸との反応生成物によって、hydroxylation が媒介されると推論した。

さらに Udenfriendら<sup>3)</sup> は多くの芳香族化合物について上記の反応を試み、hydroxylation の結果導入される水酸基の位置について検討し、生産物の収量を調べた。アスコルビン酸系によって導入される水酸基は芳香環の electro-negative の位置に指向される。このことは in vivo の実験結果と一致している。たとえば体内における薬剤の代謝では、

acetanilide  $\longrightarrow$  N—acetyl—p—aminophenol

aniline  $\longrightarrow$  p—and o—aminophenol

antipyrine  $\longrightarrow$  4—hydroxyantipyrine

salicylic acid  $\longrightarrow$  gentisic acid

quinoline  $\longrightarrow$  3—hydroxyquinoline

1, 3—dimethylxanthine  $\longrightarrow$  1,3—dimethyluric acid

p—ethoxyacetanilide  $\longrightarrow$  N—acetyl—p—aminophenol

のように、hydroxylation の結果としてフェノール性物質が生成するのであるが、アスコルビン酸—第二鉄塩—酸素の系でもまったく同様の生産物が認められた。

上にのべたような芳香族化合物の生体内における hydroxylation の意義ならびにそれとアスコルビン酸との関連についてはその後多くの研究者の興味をひきおこした。まづ第一に考慮される点は、体内における芳香族化合物の代謝における hydroxylation には二種あって、一つは hydroxylation をふくむ芳香族アミノ酸の代謝が普通特異な酵素によって行なわれるが、他方生体と関

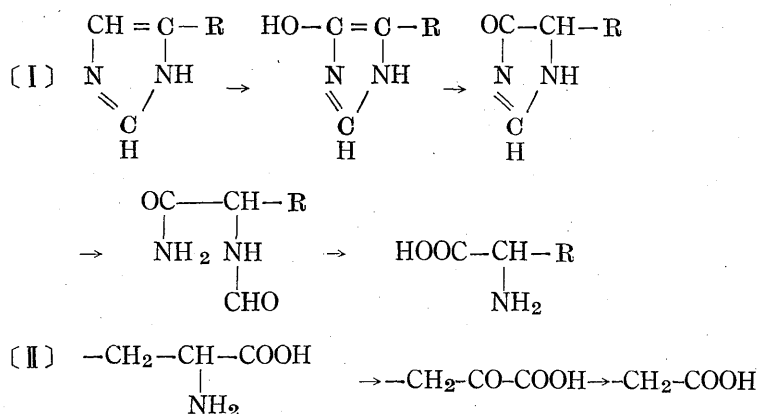
係のない芳香族化合物（たとえば薬剤）の解毒もまた hydroxylation をふくみ、しかも前記の Udenfriend の報告から明らかなように、広範囲の芳香族化合物が同様の变化をうけることからみて、いちじるしく非特異的な酵素によって行われるものと考えられる。このような hydroxylation によって生じたフェノールはたとえば硫酸エステルまたはグルキュロナイドとして体外に排泄されて解毒されるのであろう。

Dalgliesh<sup>4)</sup> もまたアスコルビン酸の関与する非特異的な hydroxylation system の芳香族アミノ酸およびそれらの代謝物への作用をしらべた。彼は前記の Udenfriend<sup>3)</sup> らのと同様の hydroxylating system を用い、アンスラニル酸、キヌレニン、トリプトファン、インドール酢酸、チロシン、フェニルアラニンなどを処理し、生成物をペーパークロマトグラフィーによって調べた。この際も生成物は o—または p—hydroxy 置換体であり、これらはこの系ではそれ以上の酸化分解をほとんどうけないとことを報告している。

アスコルビン酸の生体内での非特異的な hydroxylation への寄与に関する報告もかなりなされている。動物体ではアスコルビン酸が肝臓、腎臓、脾臓、副腎に多く分布しているので、これらの器官の機能とアスコルビン酸との関連についての詳細な研究が必要である。Udenfriend<sup>5)</sup> 一派はその後の研究で還元型 triphosphopyridine nucleotide (TPNH) と O<sub>2</sub> とを必要とする芳香族化合物の hydroxylating system をモルモットの肝臓の microsomes 中に見出し、この反応が酵素作用にもとづくことを示した。壊血病にかからせたモルモットでは種々の芳香族化合物の hydroxylation の程度は減退するが、正常および壊血病症状のモルモットから得られた microsomes にアスコルビン酸を加えても効果なく、10<sup>-3</sup> M のアスコルビン酸ではかえって抑制されることからみて、その効果は間接的であろうとのべている。

アスコルビン酸と金属イオンによる上述のような反応の例はすでに戦前から知られていた。Edlbacher<sup>6)</sup> らは pH 7, 38°C においてアスコルビン酸とヒスチジンまたはその誘導体との混液に第二鉄塩の存在で O<sub>2</sub> を長時間通じる際に側鎖の脱アミノに伴ってイミダゾール核が開裂することを、発生するアンモニ

アの定量によって確認した。ほとんど同時に Holtz<sup>7)</sup> らもほぼ同様の現象を観察している。最近になって Torii<sup>8)</sup> らはアスコルビン酸と酸素の存在でトリプトファンが分解してキヌレニンとなることを報告し、この際  $\text{Cu}^{++}$  がこの反応を触媒することを見た。一方 Imanaga<sup>9)</sup> はアスコルビン酸の自己酸化におよぼすヒスチジンその他のイミダゾール誘導体の影響を追及し、誘導体の種類によって促進的なものと抑制的なものがあり、これは pH に支配されること、およびアスコルビン酸とイミダゾール誘導体とは特別な化合物を形成しないことを紫外線吸収スペクトル図から証明した。さらにヒスチジン誘導体の分解がアスコルビン酸の自己酸化で生ずる  $\text{H}_2\text{O}_2$  によるものでないことを間接的に証明し、かつヒスチジンが3モルの  $\text{H}_2\text{O}_2$  によってアスパラギン酸を生ずることを確認し、アスコルビン酸によっても同様の生成物を与えることを主張した。Imanaga は本報告においてヒスチジンの分解機構として hydroxylation を含む次の2つを示した。



ヒスチジンやトリプトファンとアスコルビン酸との相互作用の生化学的意義についてはチロシンその他の芳香族化合物の場合ほどよくわかっていないが、この場合もたとえば histidase system によるヒスチジンよりグルタミン酸の生成のごとき特異的な酵素作用によるものと、イミダゾール誘導体に一般的におこりうるかもしれない非特異的な反応とを区別し、前者におけるアスコルビン酸の寄与を追及する必要がある。最近 Hayaishi<sup>10)</sup> らは微生物によるイミダゾ

ール核の開裂に還元型 diphosphopyridine nucleotide (DPNH) と  $O_2$  が関与することを報告しており、さきにのべた芳香族化合物の hydroxylating system が TPNH と  $O_2$  を要求する事実などの考慮するとき、生物体内での種々の hydroxylation におけるアスコルビン酸の寄与の有無を明確ならしめる必要に迫られている。

他方において、〔アスコルビン酸—金属イオン—酸素〕系それ自体は純化学的にも、また静的な生化学の問題としても興味が深い。その hydroxylating agent としての核置換の指向性と、緩和な反応条件などを考慮するとき、収量さえ向上するならば有機試剤として合成化学上検討の余地が充分にある。たとえばステロイドへの水酸基の導入などに有力な手段を提供するのではないだろうか。また反応条件を適当に選ぶことによって蛋白質中の特定のアミノ酸残基に modification を行うことができれば酵素化学に有効な知見を加えることができるかもしれない。著者らはこのような見地から、まずその基礎的段階として、ヒスチジン (His) およびチロシン (Tyr) とアスコルビン酸 (L-AsA) との  $Cu^{++}$  の存在における相互作用について、両成分の経時的变化の分析手段ならびに全系への紫外線照射の影響を知るための予備的実験を行ったので、ここに報告する次第である。

## 実 験 の 部

### 定 量 法

ヒスチジン.: Pauly 法<sup>11)</sup>

デヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) : Arnow 法<sup>12)</sup>

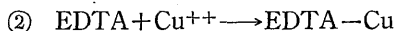
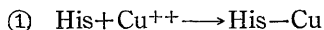
L-アスコルビン酸: ニトロアニリン法<sup>13)</sup>

〔I〕 ヒスチジン—L-アスコルビン酸— $CuSO_4$  における定量法の修正

#### (i) ヒスチジン

ヒスチジンの Pauli 法 (スルファニル酸を用いるジアゾ法) による定量では、アスコルビン酸はほとんど阻害しないが、 $Cu^{++}$  では大いに阻害され、正常のオレンジ色の発色が  $Cu^{++}$  の存在で褐色をおびる。おそらく

ヒスチジンと  $\text{Cu}^{++}$  との chelation によるものと考えて、分析試料に ethylenediamine tetracetic acid (EDTA ; 4 Na塩) を加えた。それは、



①より②の方がおとりやすい反応と考えられるからである。

1mg/ml His 30ml. 1mg/ml L-AsA 30ml. M/10  $\text{CuSO}_4$  1ml

この混液 1ml (M/610  $\text{CuSO}_4$ を含む) に対し、一定量の M/500 EDTA を添加したのち、Pauli法で発色させ、比色した結果を次に示す。

M/500 EDTA (ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	control
Optical density	0.19	0.25	0.31	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32

これによって、EDTA は  $\text{CuSO}_4$  の 3 倍加えれば正常の値を得ることがわかる。

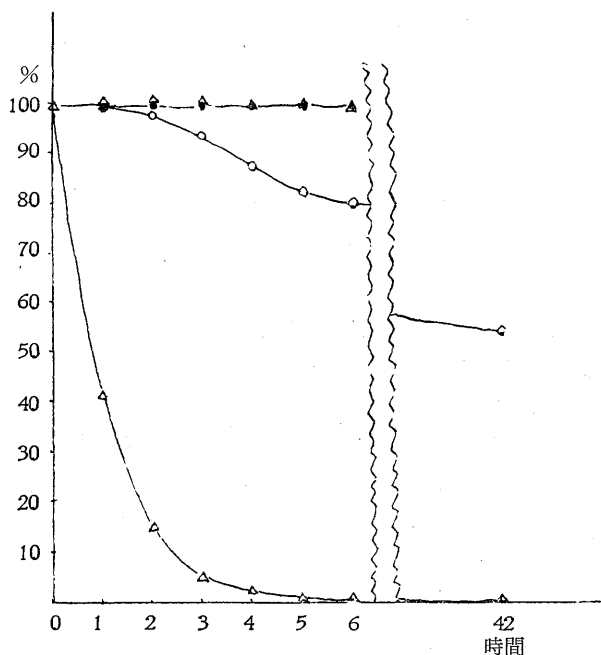
#### (ii) L-アスコルビン酸

L-アスコルビン酸もやはり  $\text{Cu}^{++}$  によって 4-methoxy-2-nitroaniline による発色が阻害されるので、(i)と同様 EDTA を添加する試験を行い、この場合は  $\text{CuSO}_4$  の約 7 倍量の EDTA が最適であることを知った。

〔Ⅱ〕 ヒスチジン—L—アスコルビン酸—CuSO<sub>4</sub>

- |   |   |                   |   |   |                            |
|---|---|-------------------|---|---|----------------------------|
| ① | { | 1mg/ml His 30ml   | ② | { | 1mg/ml His 30ml            |
|   |   | 6mg/ml L-AsA 30ml |   |   | 6mg/ml L-AsA 30ml          |
|   |   | distd. water 1ml  |   |   | M/10 CuSO <sub>4</sub> 1ml |

この2種の混液を、大気中、40°Cの恒温槽中に静置し、〔Ⅰ〕に示した修正に従って両成分の経時的变化を調べた結果を第1図に示す。

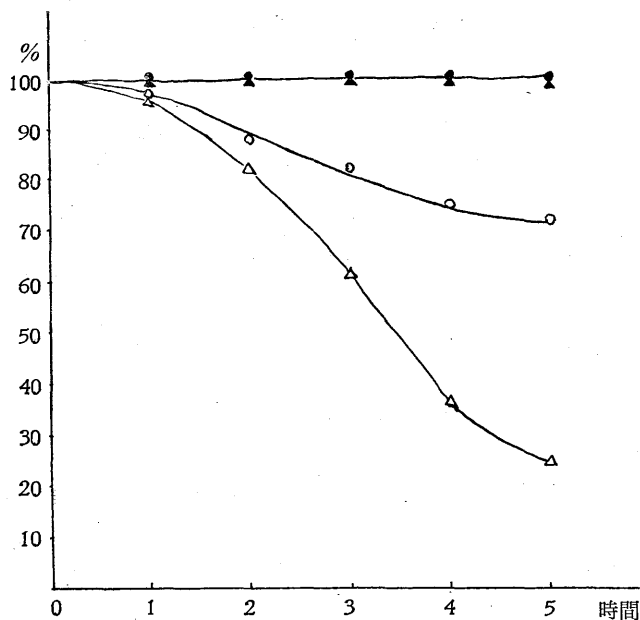


第1図：Histidine および L-AsAの残存率 [A]

His	{	①—●—●—●	L-AsA	{	①—▲—▲—▲
		②—○—○—○			②—△—△—△

つぎに、ヒスチジンに対してアスコルビン酸量のみを増加させた場合を第2図に示す。

- |   |   |                    |   |   |                            |
|---|---|--------------------|---|---|----------------------------|
| ③ | { | 1mg/ml His 30ml    | ④ | { | 1mg/ml His 30ml            |
|   |   | 13mg/ml L-AsA 30ml |   |   | 13mg/ml L-AsA 30ml         |
|   |   | distd. water       |   |   | M/10 CuSO <sub>4</sub> 1ml |



第2図：Histidine および L-AsA の残存率 [B]

His { ③ ●—●—●      ④ ○—○—○      L-AsA { ③ ▲—▲—▲      ④ △—△—△

### 〔Ⅲ〕 チロシン—L—アスコルビン酸— $\text{CuSO}_4$ における定量法の修正

DOPA は Arnow法にしたがって、pyrocatechol の nitrite-molybdate による発色を規準としてあらかじめ標準曲線をとっておく。その際若干の修正を行う。すなわち試料溶液 2ml を 10ml のメスフラスコにとり、0.5 N HCl 2ml, nitrite-molybdate 2ml を加え、次に N NaOH 2ml を加え、水を加えて全体を 10ml とする。

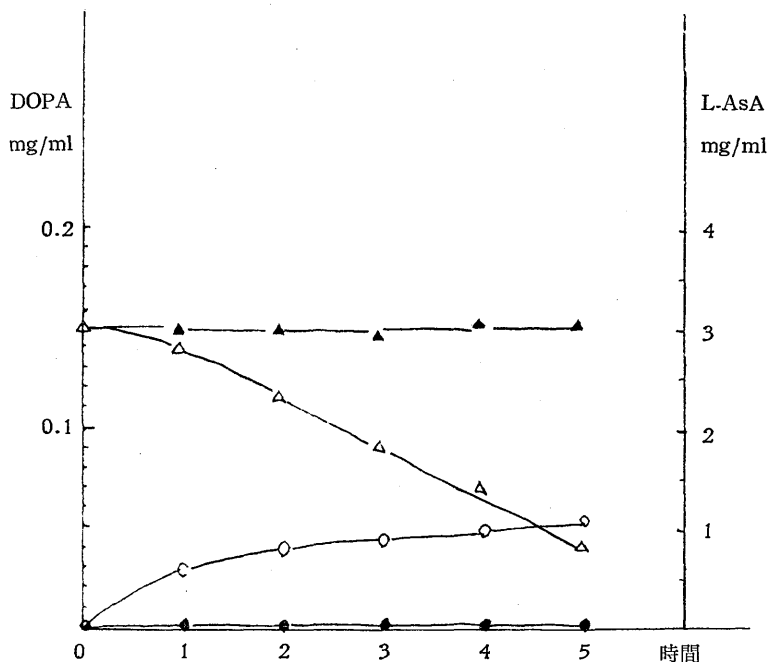
チロシン、ピロカテコール、アスコルビン酸、 $\text{CuSO}_4$  の混液でやはり  $\text{Cu}^{++}$  によってピロカテコールの値が非常に過大となるので、EDTA の添加で補正しなければならない。この場合 EDTA は  $\text{CuSO}_4$  に対して 7 倍以上で一定の、正しい optical density を与える。アスコルビン酸の定量に際しても同様の実験を行い、 $\text{CuSO}_4$  に対して正しく 3 倍量の EDTA を添加したのち、発色操作をすればよいことを知った。



〔Ⅳ〕 チロシン—L—アスコルビン酸—  $\text{CuSO}_4$

①	1mg/ml Tyr	30ml	②	1mg/ml Tyr	30ml
	6mg/ml L-AsA	30ml		6mg/ml L-AsA	30ml
	distd. water	1ml		M/10 $\text{CuSO}_4$	1ml

この2種の混液を大気中、 $40^\circ\text{C}$ の恒温槽中に静置し、〔Ⅲ〕に示した修正に従って両成分の経時的变化を調べる。すなわち DOPA の場合は、検液 2ml をとり出し、これに M/10 EDTA 0.3ml を、アスコルビン酸のときは検液 2ml に M/100 EDTA 1ml を加えて全量を 10ml とし、その中から 1ml とり出しておのおの発色させ分析に供する。その結果を第3図に示す。



第3図： DOPA の生成と L-アスコルビン酸の減少 [A]

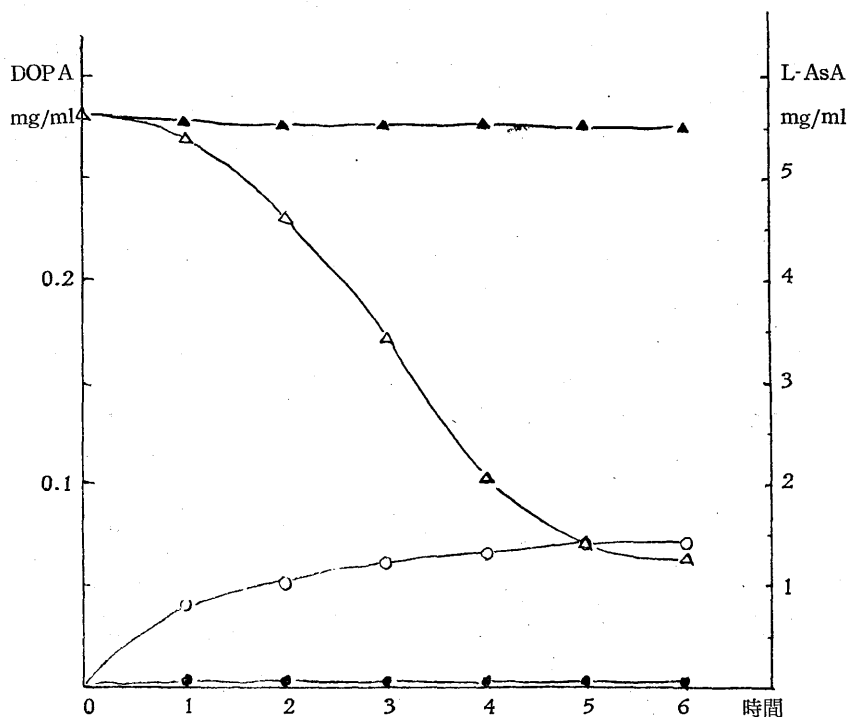
DOPA { ① ●—●—●  
           ② ○—○—○

L-AsA { ① ▲—▲—▲  
           ② △—△—△

つぎに、チロシンに対して L-アスコルビン酸のみを増加させた場合を第4図に示す。

③ { 1mg/ml Tyr 30ml  
13mg/ml L-AsA 30ml  
distd. water 1ml

④ { 1mg/ml Tyr 30ml  
13mg/ml L-AsA 30ml  
M/10 CuSO<sub>4</sub> 1ml



第4図: DOPA の生成 と L-アスコルビン酸の減少 [B]

DOPA { ③ ●—●—●  
④ ○—○—○  
L-AsA { ③ ▲—▲—▲  
④ △—△—△

# 〔V〕 紫外線照射の影響

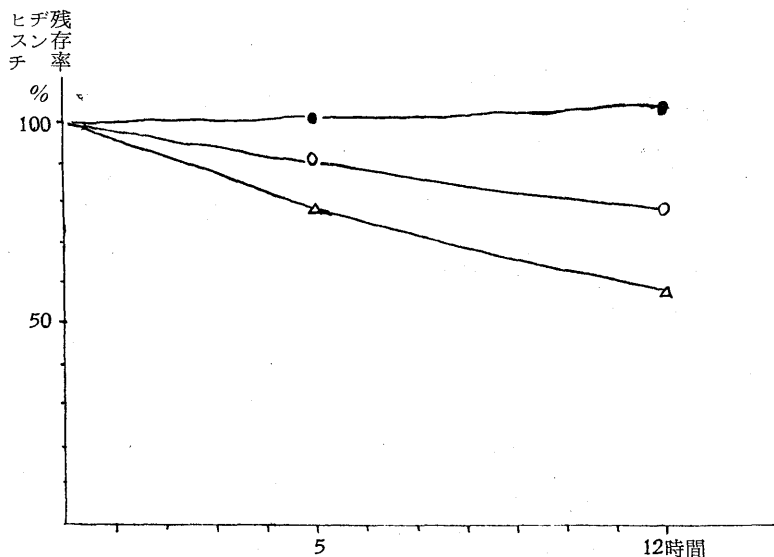
## (i) ヒスチジン

① { 1mg/ml His 10ml  
distsd. Water 11ml

② { 1mg/ml His 10ml  
13mg/ml L-AsA 10ml  
distsd. water 1ml

③ { 1mg/ml His 10ml  
13mg/ml L-AsA 10ml  
M/10 CuSO<sub>4</sub> 1ml

この3種の混液を 40°C の恒温槽中で東芝製サークライン蛍光灯 (20W) を約 30cm の距離から照射して、ヒスチデンの残存を比較した結果を第5図に示す。



第5図：紫外線照射によるヒスチデンの分解

①—●—●      ②—○—○      ③—△—△

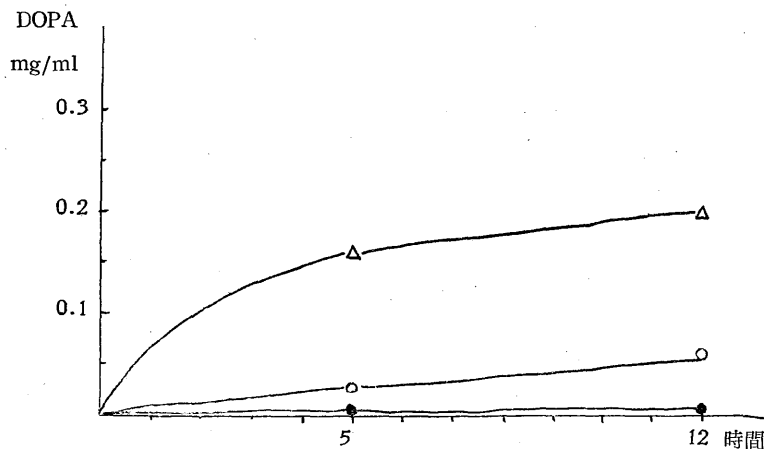
(ii) チロシン

① { 1mg/ml Tyr 10ml  
distsd. water 11ml

② { 1mg /ml Tyr 10ml  
13mg/ml L-AsA 10ml  
distsd. water 1ml

$$\textcircled{3} \begin{cases} 1\text{mg/ml Tyr} & 10\text{ml} \\ 13\text{mg/ml L-AsA} & 10\text{ml} \\ \text{M/10 CuSO}_4 & 1\text{ml} \end{cases}$$

この3種の混液を、40°Cの恒温槽中で(i)と同様にして紫外線照射を行い、生成するDOPAを前述の方法で定量した結果を第6図に示す。



第6図： 紫外線照射によるチロシンからDOPAの生成

DOPA { ① —●—●  
② —○—○  
③ —△—△

## 考 察

His—L-AsA—Cu<sup>++</sup> における第1図にみられるように、L-AsA が消失してから後でも、His がかなり分解しつづけることがわかる。このことは、His の分解が L-AsA の酸化と共転しておこるのではなくて、序論にのべたように L-AsA の酸化で生じた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と L-AsA またはデヒドロ AsA とから生ずる hydroperoxide によってなされるという推論を支持する。

AsA の濃度が大であると、共存するアミノ酸の変化がいく分か促進されるようである。(第1～4図)。Udenfriendら<sup>1)</sup>が、Fe<sup>++</sup>と L-AsA による芳香族化合物の hydroxylation の反応速度が EDTA の添加によって大となると

のべていることを前に引用したが、この理由が明らかにされていない。われわれの実験では紫外線照射が促進的に働くことが示されたが、これはおそらく光酸化作用の相乗効果ではあるまいか。ヒスチジン、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニンなどが紫外線で分解することが知られているが、それがアスコルビン酸によって、またさらにアスコルビン酸と  $\text{Cu}^{++}$  によって促進される（第5、6図）ことは興味深い。さらに適当な条件を探求すればほとんど完全にこれらのアミノ酸を変化させることもできよう。また種々の有機化合物のこの系による *hydroxylation* での収量をこれによって高めることも可能となろう。

本研究の予備的部分は家政学科学生中野あけみの1957年度卒業研究として行われたことを付記する。

## 引用文献

- 1) Udenfriend, S. et al: J. Biol. Chem. **208**, 731 (1954)
- 2) Kauffmann, H. J. : J. Am. Chem. Soc. **73**, 4311 (1951)
- 3) Udenfriend, S. et al : J. Biol. Chem. **208**, 741 (1954)
- 4) Dalglish, C. E. : Arch. Biochem. Biophys. **58**, 214 (1955)
- 5) Mitoma, C. et al : *ibid.* **61**, 431 (1956)
- 6) Edlbacher, S. et al : Biochem. Z. **209**, 370 (1937)
- 7) Holtz, P. et al : Z. physiol. Chem. **248**, 5 (1937)
- 8) Torii, K. et al : J. Biochem. **42**, 193, 201 (1955)
- 9) Imanaga, Y. : J. Biochem. **42**, 657, 669 (1955)
- 10) Hayaishi, O. et al : J. Am. Chem. Soc. **76**, 5570 (1954)
- 11) Macpherson, H. T. : Biochem. J. **40**, 470 (1946)
- 蛋白質化学 I. P. 237 (共立出版、1954)
- 12) Arnow, L. E. : J. Biol. Chem. **118**, 531 (1937)
- 13) 福場、山崎、稲垣: ビタミン **9**, 312 (1955)

Yagi, Kazufumi

Usui, Mutsuko

## Studies on the Interaction between Vitamin C and Certain Amino Acids.

### R é s u m é

It is a noteworthy finding from both biochemical and organic-chemical standpoint of view that ascorbic acid exerts the hydroxylating function towards various aromatic compounds under suitable artificial reaction conditions. Although the evidence of participation of ascorbic acid in the oxidation of aromatic nucleus in vivo is not fully established, its application in the reaction in vitro seems to be an interesting field of research.

In this publication, we deal with the preliminary experiment concerning the conversion of histidine and tyrosine by ascorbic acid, cupric ion and atmospheric oxygen. New modification for determining the conversion of the components in these reaction system was worked out. Accelerating effect of ultraviolet irradiation in the system was also found.