

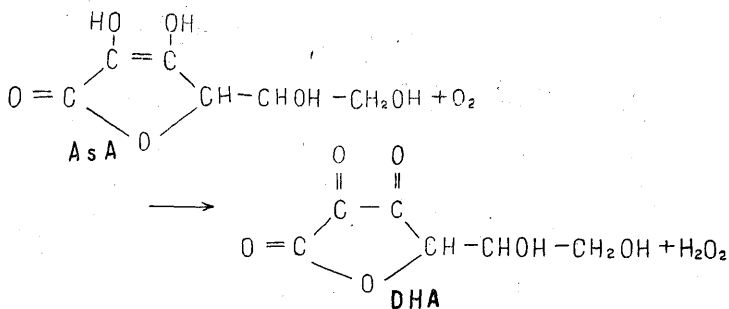
アスコルビン酸と他の天然物との 非酵素的相互作用 その1

八 木 一 文

水溶性ビタミンの1つとして古くから知られているビタミンCすなわちアスコルビン酸 (AsA) の生理作用については非常に多くの研究がなされている⁽¹⁾が、現在のところビタミン中もっとも大量摂取する必要があるところから、助酵素としてではなくてむしろ酸化還元されやすい点に注目して細胞内の rH すなわち酸化還元状態を一定に保つ役割を有しているのではないかと考えられている。

一方 AsA の生理的活性物質としての化学的性質についてもかなり多方面からの研究がなされており、それはいずれも AsA の有するケト・エンジオール基—C(OH)=C(OH)—CO—の特性にもとづいている。ケト・エンジオール基を有する化合物は酸性溶液中でも還元性を保持する点で、レダクトン (Reductone) 類の中で特に aci-レダクトンとよばれ、アルカリ性溶液中でのみエンジオール型—C(OH)=C(OH)—に移行することによって還元性を示す α -オキシカルボニル化合物すなわちレダクトネート (Reductonate)⁽²⁾と区別される。

AsAの水溶液は痕跡の金属を除去してもなお空気中の酸素によって脱水素され、この自動酸化の速度は溶液の酸度に大きく影響される。Lawendel⁽³⁾は十分な嫌気的条件あるいは D-ソルビットまたは EDTA のような金属キレート剤添加のもとで自動酸化を避けることによって AsA の UV スペクトルを正しく測定することができた。ところで AsA の水溶液は空気中の酸素によって脱水素され、デヒドロアスコルビン酸 (DHA) の外に過酸化水素 (H_2O_2) を生成する⁽⁴⁾が、Calcutt⁽⁵⁾は AsA の水溶液調製後わずか10分ですでに H_2O_2 が生成することを明らかにした。すなわち、水溶液のエーテル抽出物は硫酸チタン(無色)を酸化して過チタン酸 (オレンジ色) を与える。さらに最近になって、AsA の



酸化で生じた H_2O_2 は未反応の AsA と結合し、AsA-hydroperoxide を生ずるといふ推定が行われている⁽⁶⁾。このような AsA-hydroperoxide はきわめて不安定であるし、その存在の確証はまだなされていないが、AsA- H_2O_2 系による酸化作用は、AsA または H_2O_2 単独のそれより遙に強力であることに関して多くの実験的事実がある。また AsA が Fe, Cu その他の金属イオンによって強く自動酸化を促進されることを利用し、AsA-metal ion 系による酸化、さらに AsA- H_2O_2 -metal ion 系による酸化に関しても多くの知見がある。

筆者は天然に存在する生理的活性物質の化学的性質をそれらの相互間の非酵素的な interactions の面で究明し、生化学的諸現象と対比すると同時に、新しい応用面をつくりだそうとする立場をとっている関係上、AsA と他の天然の生理的活性物質との非酵素的な相互作用についての内外の諸研究ならびに筆者らの知見について紹介を試みる次第である。なお最近、レダクトン類の化学および生化学に関する Hans von Euler 教授の著書⁽⁸⁾およびその邦訳⁽⁹⁾が出版され、この方面の研究の調査に多大の便宜が与えられた。筆者のこの論文もこれに負うところが多い。

I 芳香核の水酸化 (hydroxylation of aromatic nucleus)

AsA の自動酸化に伴って共存する芳香族化合物の核に水酸化が導入されることは有機化学的および生化学的に興味深い事実である。筆者はすでにこの点に関する綜説と研究結果の一部を紹介したが、多くの研究者による諸結果にか

なりの矛盾を認めるのは容易であった。最近 Breslow⁽¹¹⁾らは AsA による非酵素的 hydroxylation の機構を再検討している。

彼らの得た結論は、(1) AsA による hydroxylating system では、従来報告されたようなジケト化合物が AsA の代用をすることは誤りであり、(2) この系での hydroxylating species は従来提案された強い親電子性のものではなく、OH ラジカルである、というのである。

すなわち、キノリンおよびアセトアニリドを基質とし、AsA, DHA, または diethyl diketosuccinate (DKS), FeSO₄, EDTA, H₂O₂ (モル比 60, 142, 15, 80, 400) を hydroxylating system に (H₂O₂ を除くときは O₂ 気流中), pH 3.3~6.1 (phosphate or succinate buffer), 室温で 10 分~1 $\frac{3}{4}$ 時間反応させて、つぎの結果を得た。

第 1 表 キノリンの水酸化における DHA の効果

Exp. No.	Additions	Quinoline utilized	Hydroxy-quinoline produced
		μ moles/ml	μ moles/ml
(Final volume : 3.3ml)			
H ₂ O ₂ System 1 {pH 5.7} {10min}	None	3.1	0.03
	AsA	15.3	0.64
	DHA	3.1	0.04
	AsA and DHA	15.3	0.52
(Final volume : 24ml)			
O ₂ System* 2 {pH 5.7} {1 $\frac{3}{4}$ hrs.}	None	1.4	0.06
	AsA	10.4	0.42
	DHA	2.2	0.05
3 {pH 3.3} {1 $\frac{1}{2}$ hrs.}	AsA and DHA	9.7	0.29
	None	0.4	0.009
4 {pH 4.4} {1 $\frac{1}{2}$ hrs.}	DHA	1.0	0.008
	None	1.4	0.02
5 {pH 5.3} {1 $\frac{1}{2}$ hrs.}	DHA	1.8	0.02
	None	1.3	0.04
	DHA	2.8	0.09

(* Exp. 2~5では各成分の濃度は Exp. 1の場合の1.1倍)

第2表 アセトアニリドの水酸化における DHA および DKS の効果
 [反応液の組成: Exp. 1 は第1表, Exp. 1; Exp. 2 は第1表, Exp. 2 と同じ]

Vessel No.	Additions	Acetanilide utilized	
		μ moles/ml	
	Exp. 1; H₂O₂ System		
1	None	5	} After 15min
2	AsA	17.5	
3	DHA	6	
4	DKS	2	
5	Aged DHA	16	
		After 20min	After 75min
	Exp. 2; H₂O₂ System		
1	None	0	0
2	AsA	5	8
3	DHA	0	3
4	DKS	0	

以上のデータからわかることは: (1) H₂O₂ system ではもちろん, O₂ system でも DHA はほとんど不活性, (2) DKS も DHA と同様に不活性、(3) H₂O₂ および O₂ system で DHA を反応液に加える前に酸性側の中性付近で preincubate するか (たとえば第2表, Exp. 1, vessel 5), O₂ system でも反応を長びかせると活性が出るが (Exp. 2), pH 5.5での preincubation では活性がでない, などの諸点である。

DHA の弱酸性および中性溶液中での変化は複雑であるが, アルカリ分解と⁽¹²⁾同様に結局は 2, 3-ジケトギユロン酸ないしそのエノール型 (aci-レダク⁽¹³⁾

- * 1. $Fe^{++} + HO-OH \rightarrow Fe^{+++} + HO \cdot + (:OH)^-$ (first step)
2. $HO \cdot + HO-OH \rightarrow HO-H + O-OH$
3. $O-OH + HO-OH \rightarrow O=O + H-OH + \cdot OH$
4. $Fe^{++} + \cdot OH \rightarrow Fe^{+++} + (:OH)^-$
5. $Fe^{+++} + HO-OH \rightarrow Fe^{++} + H^+ + O-OH$ (弱酸性で)
6. $Fe^{+++} + O-OH \rightarrow Fe^{++} + O_2 + H^+$ (弱アルカリ性で)

4では $\cdot OH$ がつよい酸化剤, 6では $O-OH$ (hydroperoxide radical) が還元剤として働くことが示されている。

トン構造)を生じ、そのため上の(9)のような結果となったと考えられる。

一方 Breslow は同じような hydroxylation が Fenton 試薬によっても行われ、かつそれが OH フリーラジカルを生ずる*⁽¹⁵⁾ことを通じてであるところから、Fenton 試薬における Fe^{++} の一定量と同程度の効果が、触媒量の Fe^{++} の存在における AsA によって発揮されるかどうかを化学量論的に追求している。すなわち、 H_2O_2 system では AsA 1 mole は触媒量の Fe^{++} の酸化で生ずる Fe^{+++} の 2 moles を再び Fe^{++} に還元する筈であるから**、第1表, Exp. 1における 142μ moles の AsA は 284μ moles の Fe^{++} に相当し、合計約 300μ moles の Fe^{++} を含む Fenton 試薬と同じ効果を示すことになる。そこで第1表, Exp. 1と同じ条件のもとで、AsA の代りに種々の量の Fe^{++} を含む modified Fenton reagent を用いてキノリンの消費と水酸化を測定したところ、反応液 3ml 中 240μ moles の Fe^{++} でキノリン消費が 96% に達し、消費キノリンに対する 3-ヒドロキシキノリンの収量がごく大体ではあるが、第1表, Exp. 1の場合と一致することから、これら 2つの系では同じ hydroxylating species、すなわち OH ラジカルが生ずるが、ただしこれら 2つの系ではそれが異った分子環境で作用するため副反応をひきおこす可解性に相違があろう、というのがその結論である。

以上にのべた Breslow の報告は、 $AsA-H_2O_2-Fe^{++}$ および $AsA-O_2-Fe^{++}$ systems に対する詳細な最新の知見であるが、 H_2O_2 system において AsA が化学量論的な量の Fe^{++} の代用をする点に関する実験的根拠に多少の疑問はのこるとしても、Fenton 試薬と同様にその反応指向性の randomness の点は否定できないように思われる。またのちにのべるような金属イオンを含まない $AsA-H_2O_2$ 系では反応機構は上と異なるものと考えねばならない(これについては次報にゆずる)。

II 天然高分子物質の酸化分解

AsA および H_2O_2 が有機高分子物質の粘度低下に顕著な作用を有すること

* 前頁脚註

** O_2 system ではこの外に自動酸化によって H_2O_2 を作りだす機能も必要である。

は古くから知られており、現在までに研究対象とされたものは、ペクチン、ミュシン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デンプン、セルロース、グリコーゲン、寒天、タンパク質、核酸、酵素などである。

1943年、Deuel⁽¹⁶⁾は、ペクチンの H_2O_2 単独およびこれに AsA, Fe^{++} その他の物質添加のもとにおける分解について最初の詳細な研究と、それまでに知られていた上記物質のこの種の酸化分解に関する文献とについて報告した。

また最近では放射線によるこれらの物質の分解の研究が盛に行われているが、それらの諸結果との反応機構上の関連においていま問題にしている酸化分解反応は再検討されるべきもの⁽¹⁷⁾と考える。

Deuel のペクチンに関する報告によれば：(1) AsA および類似のエンシオールは酸素の存在でペクチンを分解するが、この際、温度が高いほど、また中性付近であるほど分解が急速であり、これが AsA の酸化と共転する。(2) DHA は上記の作用がきわめて弱い。(3) H_2O_2 は低濃度においてもペクチンを分解するが、これも温度が高いほどはげしく、また AsA, Fe^{++} , ヒドラゼン、ヒドロキシルアミンなどの添加で促進される。(4) アルコールや糖によってペクチンの上述の酸化は阻害され、また H_2S , H_2SO_3 , I_2 によって阻止される。(5) この種のペクチン分解がペクチナーゼや過ヨード酸による場合と似ているが、反応機構を異にする。(6) AsA の酸化で生ずる活性 H_2O_2 はペクチンだけでなく種々の炭水化物をも分解する。

ペクチンの酸化分解はその後 Euler 一派によって詳細に研究された。たとえば、⁽¹⁸⁾つぎのような条件でのペクチンの H_2O_2 による粘度低下は、デオキシンマレイン酸、aci-レダクトン I、レダクテン酸、AsA, 3,4-Dioxy-5-methyltetron および Fe^{++} によって著しく促進され、DHA やヒドロキシルアミンは全く効果がない：

2.8mg ペクチン+0.17mg H_2O_2 +添加物*/ml buffer

* 0.0025mole/L ; 30°C ; pH 6.2

特に、 H_2O_2 -aci-レダクトン- Fe^{++} において最も粘度低下が急激で、5 分後ですでに粘度低下は maximum に達し、以後はほとんど constant である。

またペクチン—H₂O₂—AsA 系ではペクチンの粘度低下は AsA の減少 (消費) とほぼ平行しており, 反応終期には AsA の酸化で生ずべき DHA は認められなかった。

さらに彼らは, AsA—H₂O₂ によってペクチンからガラクトースの生成, および H₂O₂—FeCl₃ によってペクチンがわづかながら酸化的脱炭酸をうけることをみとめた。⁽¹⁹⁾

セルロースに対する H₂O₂ の作用は, 次亜塩素酸 (HOCl) のそれとともにセルロース性繊維の漂白に関連して研究されたが, これらの酸化剤は Fe⁺⁺ の添加によってよりいっそう分解的にセルロースに作用すること, およびデアゾ化合物の添加によっても分解が促進されることは特に興味深い。⁽¹⁶⁾ 最近になってはじめてセルロースの AsA による分解が報告された。⁽²⁰⁾ これによると, セルロース粉末 1g を含む AsA 溶液 (500mg/100ml) 20ml は 37°C に数日間たもつことによって, AsA の減少がセルロースをふくまない対照に比べて明らかに早くなる。また AsA で処理したセルロースの分解による還元性は反応時間と平行して増大し, これは AsA の濃度に伴ってふえるが 3% 以上となればほぼ constant に近づく。また還元性は反応温度上昇とともにふえる。AsA 処理セルロースの粘度を Schweizer 試薬に溶解して測定したところ明らかな低下がみとめられた (第3表)。

第3表

セルロースの処理方法(20°C, 3日間)	セルロース溶液の粘度, η
対 照	16.6
3% AsA	10.6

第4表

セルロースの処理方法(37°C, 3日間)	粘 度 η
H ₂ O	14.3
AsA soln. (1%)	9.4
AsA soln. (1%) + Fe ⁺⁺ 20mg/100ml	7.3
H ₂ O ₂ (0.075%)	10.8

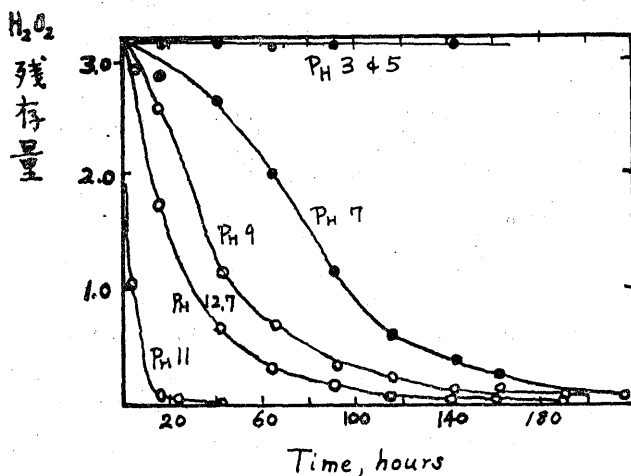
また H₂O₂ の作用や AsA に Fe⁺⁺ 添加の効果は第4表の通りである。

Ivanov らによれば,⁽²¹⁾ 十分に激しい酸化条件のもとで H₂O₂ を作用させると, セルロースの C—C 結合までも分裂して分子全体が完全に崩壊するが, この際 Fe⁺⁺ 塩が触媒となるのであろう。

メチルセルロース（水溶性）の H_2O_2 による分解は AsA または Fe^{++} で促進され、 Fe^{+++} はこの場合ほとんど無効であるが、過ヨード酸によっては隣接する水酸基がメチルセルロースにないためにほとんど分解されない⁽¹⁶⁾。詳細なデータはないが、以上のことから、AsA- H_2O_2 による酸化では酸化的加水分解が主として行われるものと推定される。

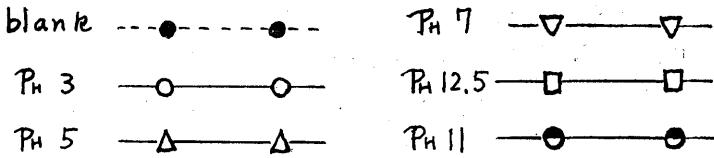
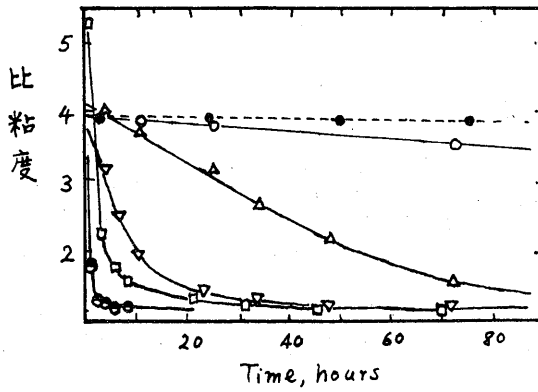
デンプンに対する H_2O_2 の作用については古くから研究されているが、それが単なる酸化的加水分解だけに止まらないことが最近 Whistler および Schweiger⁽²²⁾ によって明らかにされた。すなわち、1.25% または 2% のアミロペクチン (corn) に対して、その glucose unit につき 2moles に相当する H_2O_2 を種々の pH level において 25°C で作用させたところ、pH 値が大となるほど H_2O_2 の消費量が増大し（第 1 図）、また粘度低下が著しい（第 2 図）。

第 1 図



また、pH11で10gのアミロペクチンにその glucose unit につき 18moles の H_2O_2 を同様の条件で作用させ、 H_2O_2 が完全に消費されたのち加水分解して反応生成物をペーパクロマトグラフィーでしらべたところ、8種類の物質がみとめられ、その中5種を確認の上定量し、のこりの3種（微量）を確認した(第5表)。

第 2 図



第5表

Product	Moles/mole D-glucose unit in amylopectin
D-Glucose	0.46
Formic acid	1.0
CO ₂	0.15
Methylglyoxal	0.008
D-Arabinose	0.003
D-Erythronic acid
Glyoxylic acid
Glycolic acid

以上の結果から、アミロペクチンの H₂O₂ による酸化分解は：(1)アルカリ側で著しく、(2)酸化の第一段階は加水分解であり、(3)第二段階は第一段階の解重合によって生じた反応性に富む部分の酸化分解 (CO₂, D-arabinose, HCOOH

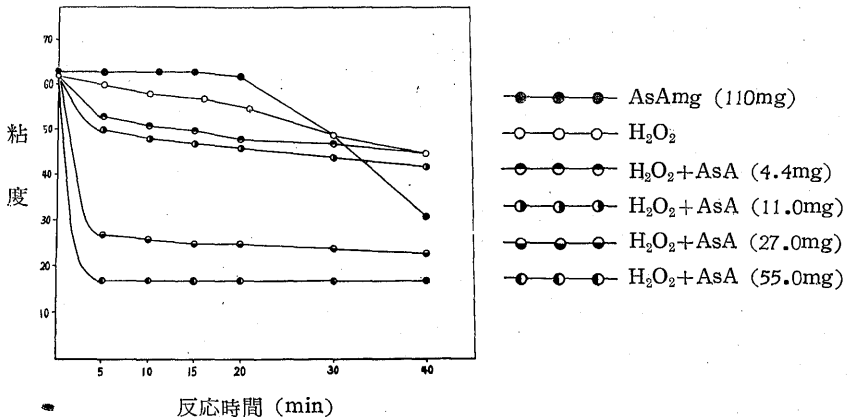
の生成), (4)以上の外に side reaction として, glucose unit の C₂-C₃間の開裂 (glycol cleavage, D-erythronic acid と glyoxylic acid の生成) および C₃-C₄ 間の開裂 (methylglyoxal の生成), などの諸過程を含むものと考えられる。

AsA によるデンプンの分解について最初に報告した Woker および Antener⁽²³⁾ は, 自動酸化した AsA の作用を “diastatische Wirkung” といっているが, 正しくは酸化的加水分解いべきであろう。その後 Robertson⁽²⁴⁾ らは, デンプン糊液が AsA と H₂O₂ とによって粘度を著しく低下し, 1 時間後に比粘度が 497 から 4.05 になったと簡単に記載している。

著者は AsA をふくめた aci-レダクトン類やヒドロキシルアミン, ヒドラジン, デアゾ化合物などの共存下における H₂O₂ による天然物の酸化分解に深い興味をもっており, 最近ではデンプン溶液および生デンプンのこの種の酸化分解を研究中であるが, その一例としてアミロペクチン (Amp) 溶液の H₂O₂ (一定量) による粘度低下における AsA の効果を第 3 図に示す。

[40°C; pH 7.0; モル比, Amp-H₂O₂-AsA (110mg の場合) 1 : 0.33 : 0.33]。

第 3 図



第 3 図から明らかなように, Amp の H₂O₂ による解重合は AsA によって著しく促進され, 低濃度の H₂O₂ でも AsA との協同作用 (hydroperoxide の

生成) によって解重合が急速に進行する。また AsA 単独でも、一定時間後にその自動酸化によって生ずる H_2O_2 との協同作用によって解重合が進行することがわかる。なお粘度低下は一定時間後 constant となるのがふつうであるが、これは不安定な中間物 AsA—hydroperoxide の完全消費によるものか、あるいは Amp の酸化分解によって生じた還元性物質 (分解に伴って還元性末端が増加する) による酸化的加水分解の阻止によるものか不明であり、今後の研究にまたねばならないが、一定の粘度を有し、したがって分子量分布の狭いデキストリンの生成の可能性があり、特許出願の準備中である。またこのような方法による生デンプンよりのデキストリンの製造、外地米の品質改善、セルロース酸糖化の前処理などに研究を拡張している。

つぎに天然高分子物質としてのタンパク質と AsA との相互作用について述べる。AsA はその自動酸化と共扼して共存する種々のアミノ酸の脱アミノ、ヘテロ環の開裂、芳香核の水酸化などを行う。このことから当然タンパク質の AsA による分解が予期されるし、一方では多種類の AsA による解重合と同様にペプチド結合の酸化的加水分解がおこることも考慮にいれなければならない。 H_2O_2 単独または種々の添加物の存在におけるタンパク質の酸化的加水分解については古くから報告されているが、AsA の作用に関してはほとんど⁽¹⁶⁾ 知見がない。タンパク質の AsA による予期されるような分解の研究材料としては、単純タンパク質である加水分解酵素が最適であろう。そこで著者は Bacterial α -amylase (BAm) の AsA による inactivation をしらべた。⁽²⁶⁾ その結果の一例についてのべるならば：

第6表	残 存 青 価	第7表	還 元 力
	Optical density, 570m μ		Optical density
a	0.113	a	0.246
b	0.503	b	0.040
c	0.450	c	0.044
d	0.196	d	0.125
control (BAmなし)	0.490	(Sumner's dinitrosalicylic acid method)	
a. BAm	b. BAm+AsA	c. BAm+AsA+Cu ⁺⁺	d. BAm+Cu ⁺⁺

の4種の溶液を 40°C で1時間振とうしながら preincubate したものを soluble starchに20分作用させたときに示す残存青価 (第6表), および還元力 (第7表) の比較, さらにBAm+AsA 系に空気を通ずると時間の経過に伴ってデンプン分解力が低下する事実から, BAm は AsA の自動酸化に伴ってその活性を失うことがわかる。

このような酵素タンパク質の AsA による酸化分解に伴う活性低下の機構については詳細な研究を必要とするが, タンパク質分子の側鎖における種々の置換基(-NH₂, -COOH, -SH, フェニル基, イミダゾール基, インドール核など) やペプチド結合のいずれが AsA-hydroperoxide に対してもっとも reactive であるかは興味ある問題であろう。これらについては次報で論じたい。

References

- (1) Felix, K. : Deut. med. Wochenschr., **12**, 1107 (1959)
- (2) Euler, H. von und Hasselquist, H. : Ark. Kemi, **8**, nr. 8 (1955)
- (3) Lawendel, J. S. : Nature, **180**, 434 (1957)
- (4) Silverblatt, E., Robinson, A.L., and King, C.G. : J. Am. Chem. Soc., **65**, 137 (1943)
- (5) Calcutt, G. : Experimentia, **7**, 26 (1951)
- (6) Euler, H. von und Hasselquist, H. : Z. physiol. Chem., **303**, 176 (1956)
- (7) 同様の hydroperoxide complex, たとえば Alloxan-H₂O₂ は Witkop, B. : J. Am. Chem. Soc., **76**, 5813 (1954): Acetaldehyde-H₂O₂ は D'Ans, J. et al. : Angew. Chem., **66**, 653 (1954) にそれぞれ報告されている。
- (8) Euler, H. von : Grundlagen der Reduktion-Chemie und Biochemische Ergebnisse an Ascorbinsäure
- (9) 野村男次ほか: レダクトンの化学の基礎とビタミン C の生化学的成果(内田老鶴圃, 1960)
- (10) 八木一文, 薄井睦子: 神戸女学院大学論集, 第5巻第1号. P. 25 (1958)
- (11) Breslow, R. and Lukens, L.N. : J. biol. Chem., **235**, 292 (1960)
- (12) ref. (9) pp. 198-9

- (13) ref. (9) pp. 196-7
- (14) Mead, J.A.R., Smith, J. N., and Williams, R.T. : *Biochem. J.*, **68**, 67 (1958).
 Raper, H. S. : *Biochem. J.*, **26**, 2000 (1932) Dalglish, C.E. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **53**, 214 (1955) Loebel, H., Stein, G., and Weiss, J. : *J. Chem. Soc.*, 2074(1949).
- (15) Waters, W.A. : "Oxidation Process" in H. Gilman's "Organic Chemistry, An Advanced Treatise" Vol. IV
- (16) Deuel, H. : *Helv. Chim. Acta*, **26**, 2002 (1943)
- (17) 八木一文 : 神戸女学院大学論集, 第4巻, 第2号, p. 47 (1957)
- (18) Euler, H. von, und Hasselquist, H. : *Ark. Kemi*, **8**, 375 (1955); ref.(9) pp. 226
- (19) Euler, H. von, Hasselquist, H., und Eriksson, E. : *Makromol. Chem.*, **18/19**, 375 (1956)
- (20) Herrmann, J. und Grossman, H.G. : *Z. Lebensm.-Untersuch. u.-Forschung*, **113**, 395 (1960)
- (21) Ivanov, V.I., Kaverzneva, E. D., und Kuznecova, Z.I. : *Isvest. Akad. Nauk. S.S.S.R. Otdel., Kim. Nauk.* 374 (1953)
- (22) Whistler, R.L. and Schweiger, R. : *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3136 (1959)
- (23) Woker, G. und Antener, J. : *Helv. Chim. Acta*, **20**, 144 (1937)
- (24) Robertson, W.v.B., Ropes, M.W., and Bauer, W. : *Biochem. J.*, **35**, 903 (1941)
- (25) 八木一文, 池ノ内友子 : 未発表データ
- (26) 八木一文, 池ノ内友子, 植田靖子 : 未発表データ

Yagi, Kazufumi

Non-enzymatic Interactions between Ascorbic Acid and Other Naturally Occurring Substances

Part I

Résumé

From the author's standpoint which aims to elucidate the chemical behavior of naturally occurring physiologically active substances by investigating non-enzymatic interactions between them, to compare their chemical behavior with biochemical phenomena in question, and, consequently, to develop some new industrial applications, this treatise was made to review some of important experimental results, including the author's, concerning the interactions of ascorbic acid with aromatic compounds and with natural high polymers.