

# デヒドロアスコルビン酸の不安定性 と生物試験のための条件

中 村 泰 彦

Lability of Dehydroascorbic Acid and Conditions for Applying to Biological Tests

Yasuhiko NAKAMURA

アスコルビン酸 (AsA) の酸化物であるデヒドロアスコルビン酸 (DAsA) は, AsA と共に動植物中に比較的広く分布しているが, 一部の組織を除いて, AsA に対する DAsA の比は非常に小さく, その生理的意義も AsA ほどには明らかにされていない。しかし, 組織には  $AsA \rightleftharpoons DAsA$  の変換を触媒する酵素や低分子化合物が多種あり, DAsA が単に AsA の酸化生成物として二次的に存在するだけでなく, 物質代謝やそれを通しての細胞分裂や生長の調節に対して, もっと積極的に関与していることも考えられる。Edgar<sup>(1,2)</sup>は, DAsA の *in vitro* における種々の物質に対する作用や *in vivo* における試験結果を総合して, DAsA が細胞分裂の調節物質になりうるとの考えを提示した。このように細胞分裂や生長における DAsA の重要な役割が示唆されているにもかかわらず, これに直接応える報告が AsA にくらべて少ない原因の1つは, DAsA が不安定な物質であることにありと思われる。著者ら<sup>(3,4)</sup>も先に, DAsA が癌の増殖を抑制し, デオキシリボ核酸を特異的に切断することを報告したが, DAsA 分解物の作用の可能性は残されている。

そこで, 植物の生長に対する DAsA の影響を調べるに先だって, まず DAsA を安定な状態で芽生えに作用させるための条件について検討を行なった。

## 実 験 方 法

### 1. 芽生えの調製

種子 (レタスを除く) は70%エタノールで洗い, ついで有効塩素2%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に10~30分間浸漬して殺菌し, 殺菌水で2回洗ったのち水中に1~3時間つけ, 吸水させた。この種子をシャーレ中の2枚重ねの湿濾紙上に並べ, 27°Cの恒温器に入れ発芽させた。レタスは直接殺菌水で洗い, 発芽は室温, 自然光中で行なわせた。ほぼ全体が発芽したとき(約2日後), できるだけ大きさの揃った芽生え15個を選び試験に供した。

### 2. 生長試験

レタス, ハクサイには濾紙を敷いた2×9cmの並型シャーレを, イネ, コムギ, エンドウには脱脂

綿をしいた6×9cmの深型シャーレを用いた。pH, 塩濃度の試験では, 濾紙および脱脂綿に直接試験液をそれぞれ3mlおよび15ml保持させ, その上に芽生えをおいた。浸漬時間の試験では芽生えを5mlの試験液に一定時間浸し, 殺菌水で十分に洗ったのち3mlの水を保持させた濾紙上に並べた。いずれの場合も27°Cの暗中に保ち, レタス, ハクサイでは3日後に, イネ, コムギ, エンドウでは5日後にshootと根の長さを測定し, その長さまたは対照に対するそのパーセントで生長の度合を示した。レタス, ハクサイでは下胚軸を, イネ, コムギでは第一葉の先端までを, エンドウでは最上位の葉の先端までを便宜的にshootとした。

### 3. DAsAの定量

Hegenauerら<sup>(5)</sup>のイオン交換樹脂による分別測定法に準じて行なった。すなわちDowex 1×2(200~400メッシュ)をIN水酸化ナトリウムと0.625Mリン酸それぞれ50倍量ずつで洗い, 0.05Mリン酸に懸濁して直径1cmのカラムに詰め, 100倍量の0.05Mリン酸を流してカラムを平衡化する。ベットの高さを55cmにして0.05Mリン酸を含む試料溶液2mlを添加し, 0.05Mリン酸で40ml/hrの流速で展開・溶出を行なった。溶出液は10mlずつ集め, その0.5mlに0.625Mリン酸2.0ml, 0.1M 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン0.5mlを加え, 57°Cに45分間孵置したのち氷冷しながら16M硫酸2.5mlを加えてオサゾン进行を溶かし, 520nmの吸光度を測定した。

別にAsA(和光純薬製, 特級)100mgを精秤し, 水に溶かして50mlとした溶液に臭素2滴を加えて酸化し, 過剰の臭素を通気により除き, 0.05Mとなるようにリン酸を加えて100mlとしたもの2mlをDAsAの標準溶液としてカラムにかけた。この標準溶液は溶出画分のオサゾン発色試験および260nmの吸収測定から, AsAを含まないが少量の2,3-ジケトグルコン酸(DKG)を含んでいることが確かめられた。従って被検液のDAsA含量は, そのDAsA溶出位置の520nmの吸光度の合計と標準溶液のDAsAとDKG溶出部分のそれとの比から算出した。

### 4. DAsA溶液の安定性の測定

DAsAの結晶200mgを9mlの水に加温溶解し, 冷却後IN水酸化ナトリウムでpH5とし, 水を補って10mlとし, これに10mlの0.2Mクエン酸カリウム-0.2M水酸化ナトリウム緩衝溶液(pH5.0)を加えて混合し, 27°Cの恒温器中においた。一定時間後にその3.68mlをとり, 0.625Mリン酸0.32mlを加えてリン酸濃度を0.05Mとしたもの2mlをDowex 1×2のカラムにかけ, 分別定量した。調製直後の溶液のDAsA溶出部位の吸光度の合計を100とし, 各時間の残存率を出した。DAsAはEulerら<sup>(6)</sup>の方法とKurataら<sup>(7)</sup>の方法を組合せて調製した。得られた結晶の純度は上記定量法によると95%であった。

## 実験結果および考察

### 1. 生長のためのpH範囲

植物が最もよく生長するためのpHは植物の種類によって異なるが, 一般的には弱酸性から弱アルカリ性の範囲内にあると考えられる。ところがDAsAは中性ないしアルカリ性では極端に不安定にな

り、例えば寺田ら<sup>(8)</sup>によるとその半減期は37°C, pH7で10分, pH8では3~4分であるという。従って中性ないし弱アルカリ性でDAsAを作用させる場合には、数分以内の短時間でなければ意味をなさなくなる。ところが植物体に外部から与えて吸収あるいは浸透させるにはこのような短時間では十分でないと思われるし、また実験操作上も困難な点が多い。低pHによる多少の生長阻害が起こるとしても、DAsAのより安定な酸性領域を選び、接触時間を長くすることがDAsAの植物体への作用を検討する上ではより好ましいと思われる。そこで数種の植物の芽生えについて、酸性領域のpHと生長との関係を試験した。Fig. 1に示したように、pH4以下ではどの植物も根の生長が著しく抑制された。

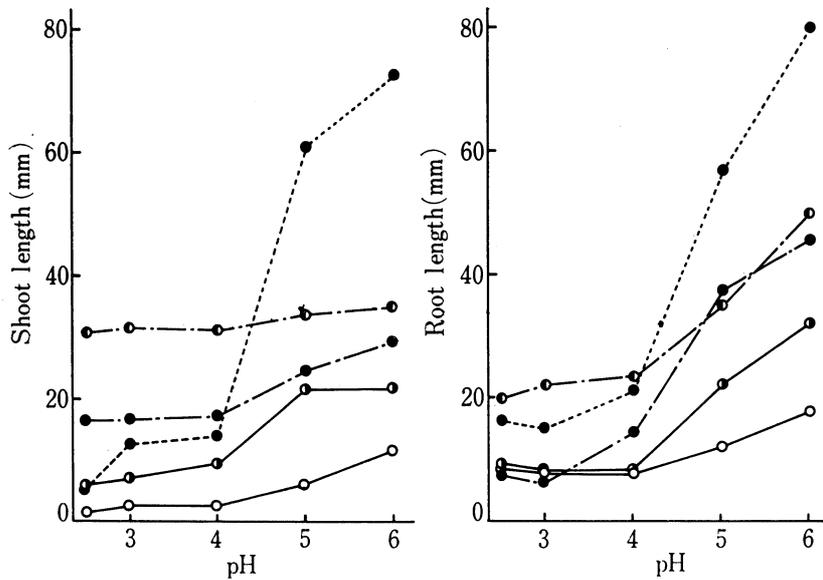


Fig. 1. Effect of pH on the Growth of Seedlings.

The sterilized seeds of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv., Wayahead), chinese cabbage (*Brassica pekinensis* RUPR. var. *dentata* MATSUM. cv., Shinsantosai), rice (*Oryza sativa* L. cv., Reiho), wheat (*Triticum vulgare* VILL.) or pea (*Pisum sativum* L. cv., Kinusaya) were sown on the moistened filter papers in petri dishes, which were incubated at 27°C in darkness. After 2 days, fifteen seedlings with a uniform size were chosen and transferred into each 9-cm petri dish containing a sheet of filter paper (for lettuce and chinese cabbage) or a thin absorbent cotton layer (for rice, wheat and pea). They were moistened with 3ml (for lettuce and chinese cabbage) or 15ml (for rice, wheat and pea) of 0.03M potassium biphthalate-0.03M NaOH buffer and incubated at 27°C in the dark. The length of shoots and roots was measured after 3 days (lettuce and chinese cabbage) or 5 days (rice, wheat and pea). ○—○ chinese cabbage, ●—● lettuce, ●—● pea, ●—● rice, ●—● wheat.

とくにレタスやハクサイはこのpHでは全く生長しなかった。またpH4以上ではいずれもpHが高い程生長はよかった。一方shootではpHの違いによる差異は概して根より少ないが、やはり高いpHでよい生長がみられた。pH4と5の差に比べるとpH5と6の差は小さいので、DAsAの安定度を考慮に入れると、pH6よりpH5で試験する方がよいと考えられる。またpH4以下ではレタスやハクサイのように芽生えの根や茎の組織が軟らかくかつ小形のものは枯死してしまうのでpH4以下は用いられない。

## 2. 塩濃度

DAsAは不安定であるため、植物体内への取り込みを多くするためには溶液を更新しながら長時間

接触させるとか、あるいは高濃度の溶液で短時間処理するとかの方法を取らなければならない。後者の場合は溶液の浸透圧が高くなるので生きた細胞の処理にはおのずから限界が生じる。塩化カリウムを用いて塩濃度と芽生えの生長との関係を見ると Fig. 2 のようになり、0.3M 以上ではどの植物も根、

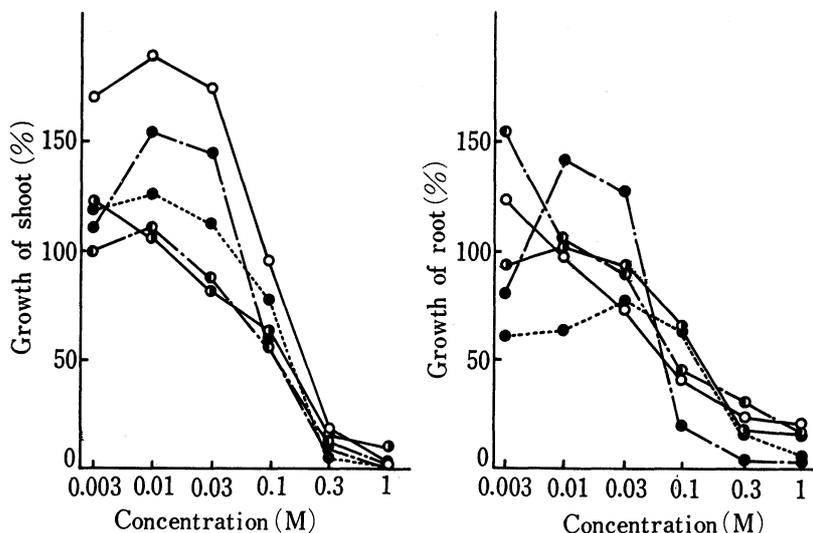


Fig. 2. Effect of KCl concentrations on the Growth of Seedlings.

A potassium chloride solution of various concentrations ranging from 0.03 to 1M was used instead of buffer in Fig. 1. The results were expressed as percentage length of the controls grown in distilled water. ○—○ chinese cabbage, ●—● lettuce, ●—● pea, ●—● rice, ●.....● wheat.

shootともほとんど生長しなかった。0.1Mでshootは対照(水)の55~95%の生長を示し、根はそれより生長阻害が大きく対照の20~65%にとどまった。0.03M以下ではshootの生長は対照よりよいものが多いが、これはカリウムが植物生長に必須な元素の1つであることによるものであろう。どの植物でも塩濃度による生長阻害はshootより根が大きい。このことは水素イオン濃度の場合も同様であり、根が直接溶液に触れているためとも考えられるが、芽生え全体を溶液に漬したようなときにも認められるので、根とshootの感受性の違いも関係していると思われる。いずれにしても0.03M以上の塩濃度では根は多少とも生長阻害を受けることを示している。

### 3. 緩衝液の種類と浸漬時間

中和したDAsAの水溶液を放置しておくると溶液のpHは次第に低下してくる。この低下はDAsAの分解に基づくものと考えられるが、実際その速度はpHに依存し、pHが高い程大きい。Fig.1から明らかのように、pH5附近でのpH変化は芽生えの生長に大きな影響を与えるので、作用中のDAsA溶液のpH変化は好ましくない。これを防ぐためには緩衝液を使用すればよいが、その際には濃度と同時に塩の種類の影響が考慮されねばならない。予備試験により、DAsA溶液のpHを5に保つには同モル濃度以上の緩衝液が必要であることが確かめられたので、かりに1%のDAsA溶液(0.057M)をpH5で用いるとすれば緩衝液は0.05~0.1Mとなる。この場合には塩の濃度による生長阻害が現われる可能性があるため、芽生えとの接触時間を短くするなどの工夫が必要となってくる。Fig.3と4は

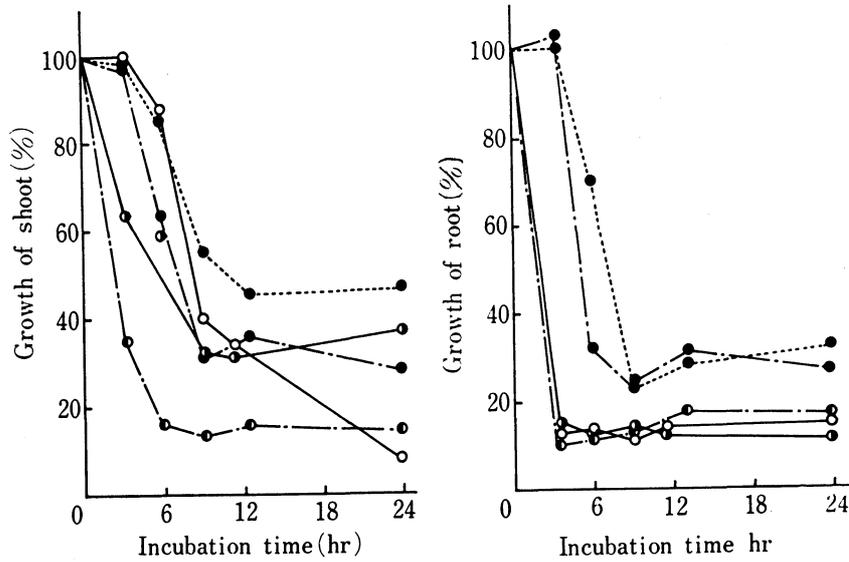


Fig. 3. Effect of Different Buffer Systems and Incubation Time on the Growth of Lettuce Seedlings. Fifteen seedlings with a uniform size were soaked in 5ml of water or 0.05M buffer (pH5.0) containing 0.05M sucrose in a test tube. After the tube was incubated at 27°C for a given time, the seedlings were washed with water (3×10ml) and put on a sheet of filter paper in a petri dish containing 3ml of water. Control experiments were performed without soaking. The measurement and the expression of growth was the same as in Fig.1 and Fig.2. ○—○ potassium biphthalate-NaOH, ◐—◐ potassium citrate-NaOH, ◑—◑ sodium acetate-NaOH, ●—● sodium succinate-NaOH, ●.....● H<sub>2</sub>O.

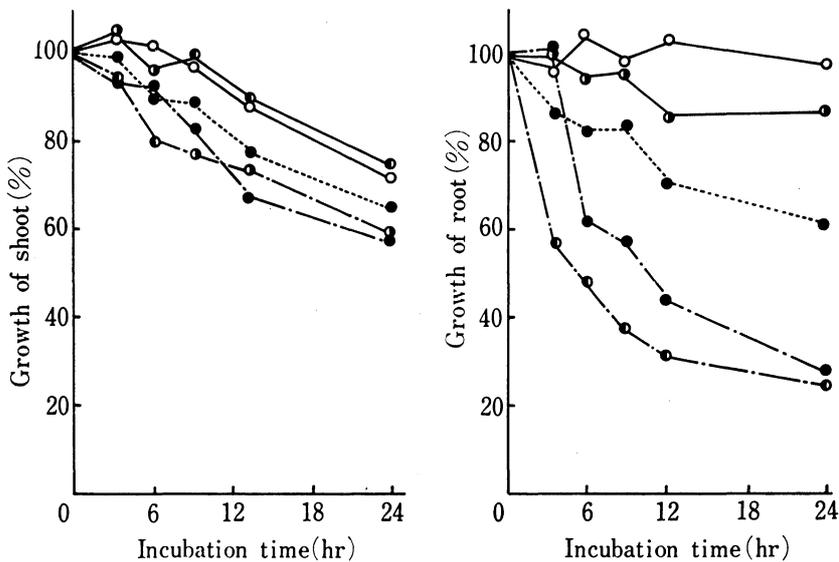


Fig.4. Effect of Different Buffer Systems and Incubation Time on the Growth of Rice Seedlings. Experimental methods were the same as in Fig. 3 except that rice was used instead of lettuce. ○—○ potassium biphthalate-NaOH, ◐—◐ potassium citrate-NaOH, ◑—◑ sodium acetate-NaOH, ●—● sodium succinate-NaOH, ●.....● H<sub>2</sub>O.

pH5 の 4 種 の 0.05M 緩衝液 へ の 芽 生 え の 浸 漬 時 間 と 生 長 阻 害 と の 関 係 を 示 し た も の で あ る 。 緩 衝 液 は 0.05M の 重 フ タ ル 酸 カ リ ウ ム , ク エ ン 酸 カ リ ウ ム , 酢 酸 ナ ト リ ウ ム , コ ハ ク 酸 ナ ト リ ウ ム の 各 溶

液と 0.05M 水酸化ナトリウム溶液との混合により調製し、これに DAsA のかわりに蔗糖を 0.05M となるように溶かして用いた。

レタスの胚軸の生長は酢酸緩衝液では著しく阻害され、クエン酸緩衝液でもかなり抑制された。コハク酸ならびに重フタル酸緩衝液も 9 時間以上これらに浸漬したときには水に浸漬したものより劣ったが、コハク酸緩衝液では 3.5 時間、重フタル酸緩衝液では 6 時間程度までは水とほとんど差がなく、また浸漬処理をしないものにも比べてもその 85% 以上という良好な生長を示した。根は 3.5 時間の短時間処理でも、酢酸、クエン酸、重フタル酸各緩衝液で著しい生長阻害がみられた。コハク酸緩衝液は水とあまり差がなく、とくに 3.5 時間では無処理のものと同様な生長を示した。結局、0.05M コハク酸緩衝液 (pH5.0) に 3~4 時間浸漬するくらいの処理であれば、レタスの生長はほとんど影響を受けないことが確かめられた。

一方イネでは、酢酸緩衝液が shoot, 根とも生長抑制作用が大で、レタスに対しては良好であったコハク酸緩衝液も 3.5 時間処理の根を除いて水より悪い傾向を示した。重フタル酸およびクエン酸緩衝液では shoot, 根とも水より生長がよかった。イネはレタスに比べて全般的に浸漬処理による生長阻害が小さく、3~4 時間程度の浸漬であれば重フタル酸、クエン酸、コハク酸各緩衝液とも無処理の 90% 以上の生長を示し、いずれも試験に十分用いるものであることがわかった。緩衝液の種類や浸漬時間が芽生えの生長に与える影響は植物の種類によって異なるが、レタス、イネの例からみると、緩衝液は重フタル酸カリウム-水酸化ナトリウムまたはコハク酸ナトリウム-水酸化ナトリウムがよく、浸漬時間は pH5.0, 0.05M 濃度で 3~4 時間が妥当と思われる。

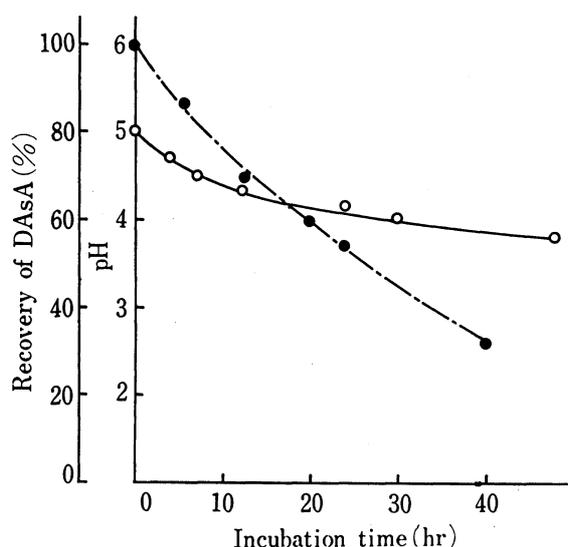


Fig. 5. Degradation of Dehydroascorbic Acid in Buffer Solution.

A solution of 2% dehydroascorbic acid (DAsA) neutralized with 1N NaOH was mixed with an equal volume of 0.2M potassium citrate-0.2M NaOH buffer (pH 5.0) and kept at 27°C. At the time given in this figure, 3.68ml of the mixture was withdrawn and added to 0.32ml of 0.625M  $H_3PO_4$ . A 2.0ml of the final mixture was placed on a column (1×55cm) of Dowex 1×2 and eluted with 0.05M  $H_3PO_4$  at the flow rate of 40ml/hr. The DAsA content in the effluent was determined by the method described in the text. ○—○ pH, ●—● recovery of DAsA.

#### 4. DAsA 溶液の安定性

1% DAsA 溶液を pH5 で作用させようとするとき、作用時間中の DAsA の分解がどの程度であるかは結果の解釈に際して重要となる。

Fig. 5 は 0.1M クエン酸カリウム—0.1M 水酸化ナトリウム緩衝液を用いて調べた結果である。

試料液調製直後の DAsA 量を 100 としたときの DAsA の残存率は 3 時間で 92% であった。

$\log C_t/C_0$  と  $t$  との関係は Fig. 6 のようになり、この条件下で DAsA の分解は一次反応であることを示している。また速度定数  $k$  は  $4.6 \times 10^{-4}$  となる。pH の低下は 3 時間で 0.25 であった。かりにこの条件で芽生えに DAsA を 3 時間作用させるとすれば、その間の DAsA の濃度低下、言い換えれば DAsA 分解生成物の濃度上昇、や pH 低下の影響は無視しうる程度といえる。しかし実際には 0 時間ですでにかなりの DKG を含むことがある。例えば加温溶解した DAsA を IN 水酸化ナト

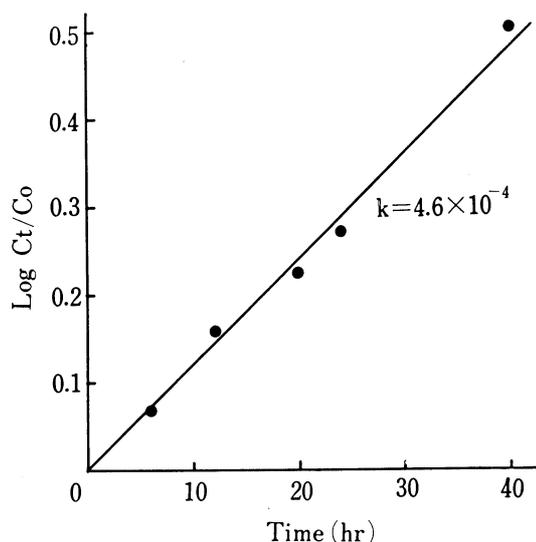


Fig. 6. Relation between  $\log C_t/C_0$  and Time. The value of  $\log C_t/C_0$  was calculated from the data in Fig. 5.

リウムで中和しクエン酸緩衝液 (pH5.0) と混合したものを直ちにカラムにかけても、30~40% の DKG が検出されることがあるが、加温溶解したのち中和せずにそのままカラムにかけると、DKG はほとんど認められない。27°C, pH5.0 での DAsA の半減期は、Fig. 5 から 20 時間以上であるから、緩衝液と混合してからカラムにかけるとの間の分解はわずかである。またカラム操作での分解は DAsA 結晶の純度測定の場合からも考えられない。結局、アルカリでの中和段階で局部的に高い pH になるためではないかと思われるが、この点については別に検討する必要がある。

#### 要 約

芽生えの生長に及ぼすデヒドロアスコルビン酸 (DAsA) の影響を、DAsA の分解ができるだけ少ない状態で試験することを目的として、その作用時の条件について検討した。

試験した植物の芽生えは、pH6 以下では pH が高い程よく生長したが、shoot より根の方が pH の違いによる影響を受けやすかった。どの芽生えも 0.3M 以上の塩化カリウム中ではほとんど生長しなかった。0.1M では shoot は対照の 55~95%、根は 20~65%、0.03M では shoot は対照の 80% 以上、根は 70% 以上の生長を示した。等モルの蔗糖を含む pH5.0 の 0.05M 緩衝液の中では、レタスではコハク酸ナトリウム—水酸化ナトリウムが、イネでは重フタル酸カリウム—水酸化ナトリウムまたはクエン酸カリウム—水酸化ナトリウムが生長阻害が少なかった。これらの溶液にそれぞれの芽生えを

3.5時間浸漬しても、その生長はほとんど抑制されなかった。pH5.0の0.1M緩衝液中に1%となるようDAsAをとかした溶液の27°C、3時間後のDAsAの残存率は92%、pHの低下は0.25であった。

種子を分与して下さった本学妹尾正助教授に謝意を表します。また実験に協力された平田淑子さんに感謝します。

#### 文 献

- (1) J.A. Edgar: *Experientia*, **25**, 1214 (1969).
- (2) J.A. Edgar: *Nature*, **227**, 24(1970).
- (3) 中村泰彦, 山藤一雄: 九大農学芸誌, **23**, 119 (1968).
- (4) K. Yamafuji, Y. Nakamura, H. Omura, T. Soeda and K. Gytoku: *Z. Krebsforsch.*, **76**, 1 (1971).
- (5) J. Hegenauer and P. Saltman: *J.Chromatogr.*, **74**, 133 (1972).
- (6) H. Euler: *Arkiv Kemi*, **8**, 67 (1955).
- (7) T. Kurata, H. Wakabayashi and Y. Sakurai: *J. Agr. Chem.*, **31**, 101 (1967).
- (8) 寺田和子, 大村京生: 農化, **40**, 196 (1966).

#### Summary

Experiments were designed using the seedlings of several plants in order to investigate the conditions under which dehydroascorbic acid was as stable as possible and plants could grow without a marked depression.

When the pH value of medium was below 6, the higher it was, the better the growth of seedlings was. The growth of seedlings was rarely observed in more than 0.3M concentration of KCl. The respective lengths of the shoots and the roots of the seedlings grown in 0.1MKCl were 55~95% and 20~65% of the controls. In case of 0.03M KCl, they were over 80% and over 70%, respectively. Among four different buffers (0.05M, pH5.0) containing 0.05M sucrose, sodium succinate-NaOH was the most suitable to lettuce, and potassium biphthalate-NaOH to rice. Lettuce which was soaked in the above sodium succinate-NaOH buffer for 3.5 hr grew almost the same as the untreated control. Similar results were obtained in rice soaked in the potassium biphthalate-NaOH buffer for 3.5 hr. When a 1% solution of dehydroascorbic acid in 0.1M potassium citrate-NaOH buffer (pH5.0) was incubated for 3hr at 27°C, the recovery of the acid was 92% of the total and the pH of the solution fell to 4.75.