

Title	Phosphorylase活性に及ぼす界面活性剤, 過酸化ベンゾイルおよびSH化合物の影響
Sub Title	Influence of surface active agent, benzoyl peroxide and sulfhydryl compounds on the activity of phosphorylase
Author	今村, 稔子(Imamura, Toshiko) 宮本, 貞一( Miyamoto, Sadaichi)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1969
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.14 (1969. ), p.35- 42
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	<a href="http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-0000014-0035">http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-0000014-0035</a>

Phosphorylase 活性に及ぼす界面活性剤, 過酸化  
ベンゾイルおよび SH 化合物の影響

今村 稔子, 宮本 貞一

Influence of surface active agent, benzoyl peroxide and  
sulfhydryl compounds on the activity of phosphorylase  
Toshiko IMAMURA and Sadaichi MIYAMOTO

- 1) The activity of phosphorylase was inhibited by addition of neutral cleanser on the market. In the rate of inhibition, the higher concentration, the more inhibition.
- 2) The activity of phosphorylase was also inhibited by benzoyl peroxide. In this case too, the increase of the amount of benzoyl peroxide caused the intensification of the inhibition.
- 3) Inhibition of the activity of phosphorylase was observed also with sulfhydryl compounds, and in the group of the compounds, the smaller molecular weight, the more intensive inhibition.

近年, 各種の公害問題は急速にその深刻性を増しつつあり, 人体に及ぼす影響が各方面で論議されている。しかし, その論議の基礎となるべき実験的裏付けは概ね不十分であって, 適確な実験法の探索が要求されている。生化学的観点よりすれば, 酵素活性に対する影響がまず対象としてとり上げられるであろう。われわれは先に界面活性剤が catalase 活性を阻害することを報告した<sup>1)</sup>が, 今回更に phosphorylase 活性に及ぼす阻害を検した。また同じく phosphorylase 活性に対する過酸化ベンゾイルおよび数種の SH 化合物の影響について実験を行なったのでその結果を報告する。

実 験

1. Phosphorylase の調製

Phosphorylase (2.4.1.1,  $\alpha$ -1,4-glucan: orthophosphate glucosyl transferase) は glycogen およびデンプンが存在する動植物の組織, 微生物に広く存在するが, 筋の phosphorylase と植物のそれとはやや性質を異にしている。筋の酵素は phloridin, 硫酸,  $\beta$ -glycerophosphoric acid, glucose 等によって阻害されるが, ジャガイモから精製された酵素ではこれらによって阻害されず, また adenylic acid や cysteine によって活性化されない<sup>2)</sup>といわれている。ジャガイモの phosphorylase は詳細に研究され, ジャガイモ汁をフラクシヨネーションした後, 硫酸を用い<sup>3)</sup>, またはアミロース存在エタノール中で<sup>4)</sup>結晶化されている。酵素の active site は知られていないが,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$  により阻害され,  $\text{HgCl}_2$  では阻害されない<sup>5)</sup>といわ

- 1) 宮本貞一, 三島和子, 回陽栄子: 共立薬科大学研究年報, **11**, 38 (1966).
- 2) B. Shapiro & E. Wertheimer: Biochem. J., **37**, 397 (1943).
- 3) E. H. Fischer & H. M. Hilpert: Experientia., **9**, 176 (1953).
- 4) H. Baum & G. A. Gilbert: Nature, Lond., **171**, 983 (1953).

れる。最近では Hollo ら<sup>6)</sup>によってジャガイモ phosphorylase の DEAE cellulose による精製が行なわれている。われわれの実験においてはジャガイモの phosphorylase を部分的に精製して用いた。即ち、バレイショの皮をすり下し、KCN 処理した後、圧搾し、汁液を遠心、上清を pH 6.4~6.8 に中和し、50°、5 分間加熱、次に流水で冷却する。飽和硫酸液で分別し、d = 1,100~1,135 間の沈澱をできるだけ少量の精製水にとる<sup>7)</sup>。かくして得られた酵素溶液は淡黒褐色で冷蔵庫内の保存に約 3 週間耐える。バレイショ 8 kg から酵素溶液約 40ml が得られた。

## 2. 酵素活性の測定

$(\alpha\text{-1,4-glucosyl})_n + \alpha\text{-D-glycose-1-phosphate} \rightleftharpoons (\alpha\text{-1,4-glucosyl})_{n+1} + \text{orthophosphate}$   
の右向きの反応で生じた無機リン酸 (Pi) を Fiske-Subbarow 法<sup>8)</sup>により定量した。却ち 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 1ml, 5% 可溶性澱粉液 1ml, 酵素溶液 1ml を試験管にとり、各種濃度の検体溶液 1ml を加え、37°、10 分放置後、0.1M glucose-1-phosphate 溶液 1ml を加え、直後および 5, 10, 15, 20 分後にその 0.5ml 宛を 5% trichloroacetic acid 2.0ml 中に注入し、約 5 分後濾過、濾液 1.0ml につき Pi を定量した。各種検体の水あるいはエタノール溶液の代りに、それぞれ水あるいは 70% エタノールを用いて測定した値を control とした。

## 3. 検体溶液の調製

中性洗剤は市販の液体洗剤を水 1ml 中に 0.0035ml, 0.007ml, 0.07ml 宛溶解した希釈液を用いた。

食品添加物としての過酸化ベンゾイルは純品でなく、ミョウバン、リン酸のカルシウム塩類、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウムおよびデンプンのうち、1種または2種以上をもって希釈したもので、過酸化ベンゾイルの 19~22% を含む。これを 10 mg/ml の割合に温 70% エタノールに溶かし、その 0.1, 0.15, 0.5, 0.75ml (1, 1.5, 5, 7.5 mg) を用いた。

SH 化合物としては cysteine (0.04, 0.05, 0.30mM), ethylmercaptan (1.65, 10.0mM), propylmercaptan (5.0, 7.5mM), n-butylmercaptan (5.0, 10.0mM), benzylmercaptan (2.5, 5.0, 10.0mM) の 5 種を用いた。Cysteine 以外は水に難溶なので、70% エタノールに溶解して用いた。何れも pH 6.0 に調整した。

## 実 験 結 果

### 1. 界面活性剤の影響

中性洗剤の添加により phosphorylase 活性は Fig. 1 の如く、洗剤を含まぬ水のみ Control の場合に比し何れも阻害され、使用濃度の異なるほど、阻害率も大となった。即ち 0.0035ml 添加の場合、平均阻害率は 5.2% であるが、0.007ml では 8.0%、0.07ml では 25.1% であった (Table 1)。

### 2. 過酸化ベンゾイルの影響

過酸化ベンゾイルの添加により酵素活性は Fig. 2 の如く阻害された。阻害は添加量の増加とともに増大し、1mg および 1.5mg の添加による平均阻害率は、エタノールのみの Control に

5) K. H. Meyer & P. Bernfeld: *Helv. Chim. Acta.*, **25**, 399 (1942).

6) J. Hollo, E. Laszlo & A. Hoschke: *Staerke.*, **18**, 337 (1966).

7) 赤堀四郎編: *酵素研究法*, Vol. 2, p. 574 (1956).

8) C. H. Fiske & Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).

対し、それぞれ 2.7%, 6.6% であるに対し、5mg および 7.5mg の添加では 87.2%, 94.7% とほぼ完全に活性を阻害した。中性洗剤、過酸化ベンゾイルによる阻害率を Table 1 に示した。

### 3. SH 化合物の影響

Cysteine, ethylmercaptan, propylmercaptan, butylmercaptan, benzylmercaptan 等についてそれぞれ検した結果、Fig. 3~7 に示すような成績が得られた。これらの平均阻害率を通覧すると Table 2 の如くであり、同族体物質では分子量の大なるものほど阻害が小さくなる傾向がみられた。

## 考 察

中性洗剤はその強い lipid 親和性から、皮膚の脂肪を洗い流し、また細胞膜の透過も容易であろうところから、各種酵素の活性に対して何らかの影響を及ぼすことは当然考えられる。前述のようにわれわれは catalase 活性に及ぼす阻害を知ったが、phosphorylase に対しても阻害作用のあることが明らかとなった。恐らくはこれら酵素のみならず、広汎な酵素系に影響を及ぼすことが推察される。日常頻繁に使用されるものであるだけに、使用濃度はできるだけうすく、短時間に処理されることが望ましい。

食品添加物公定書によれば過酸化ベンゾイルの使用基準は“小麦粉および押麦以外の食品に使

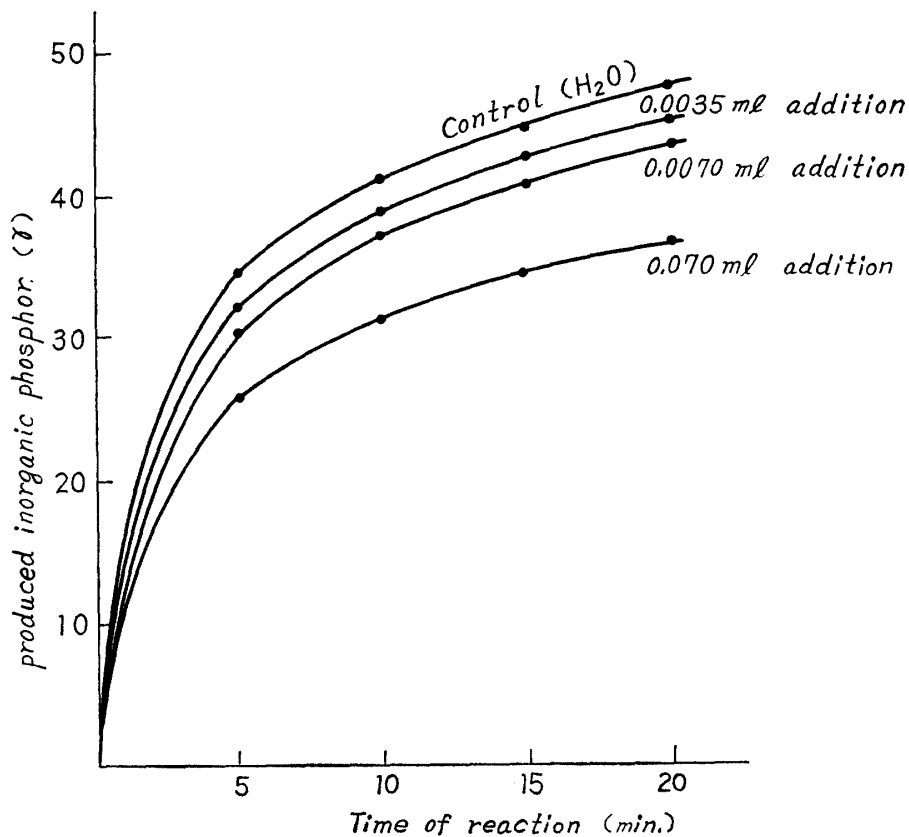


Fig. 1 Inhibition of the activity of phosphorylase by neutral cleanser

Table 1 Inhibition rate (%) of the activity of phosphrylase by neutral cleanser and benzoyl peroxide

Amounts added	Inhibition rate by the time of reaction				Average inhibition rate (%)
	5min	10min	15min	20min	
Neutral cleanser					
0.0035 ml	5.2	5.2	5.2	5.1	5.2
0.0070 ml	8.8	10.5	4.4	8.4	8.0
0.070 ml	25.1	28.2	23.8	23.4	25.1
Benzoyl peroxide					
1.0 mg	3.8	2.1	2.2	1.3	2.7
1.5 mg	8.0	6.8	6.2	5.5	6.6
5.0 mg	92.3	88.4	84.5	83.6	87.2
7.5 mg	97.1	93.7	93.9	94.2	94.7

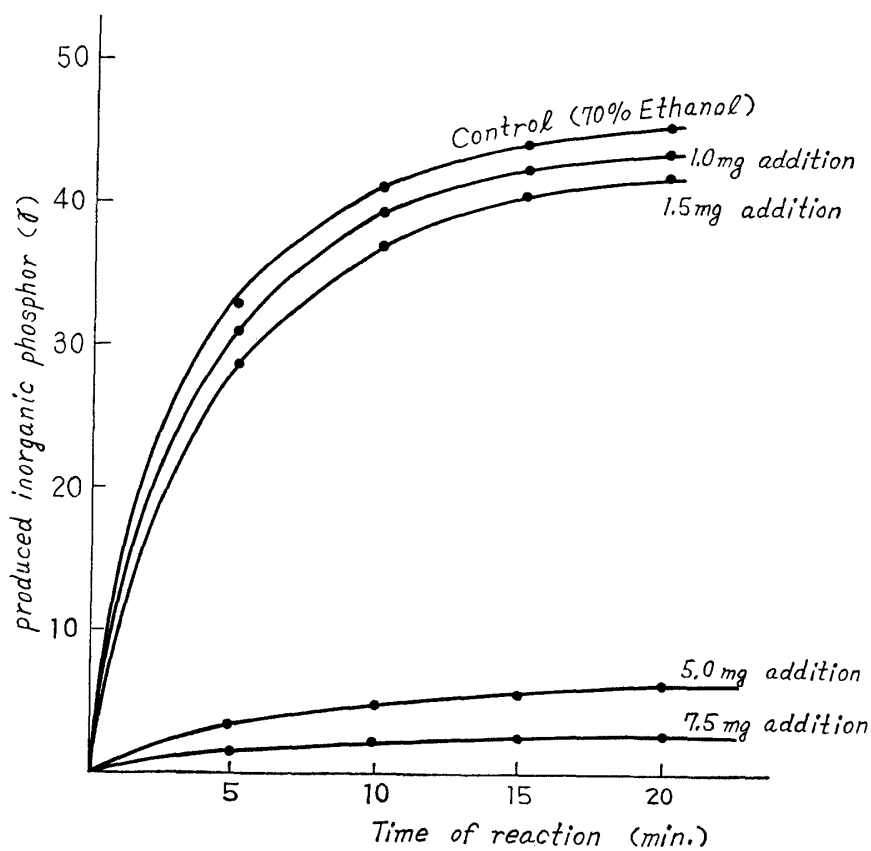


Fig. 2 Inhibition of the activity of phosphorylase by benzoyl peroxide

Table 2 Average inhibition rate\* (%) of the activity of phosphorylase by several sulfhydryl compounds

mM	Cysteine	ethyl-mercaptan	propyl-mercaptan	butyl-mercaptan	benzyl-mercaptan
0.02	20.5				
0.04	23.0				
0.05	40.5				
0.30	89.7				
0.50	96.0				
1.25			18.3		
1.65		89.3			
2.50			35.0		7.7
5.00			50.8	23.6	82.9
7.50			85.2		
10.00		92.7			

\* Average inhibition rate calculated from the measurement 5, 10, 15 and 20 minutes after reaction. The method of measurement is described under the head of experiments.

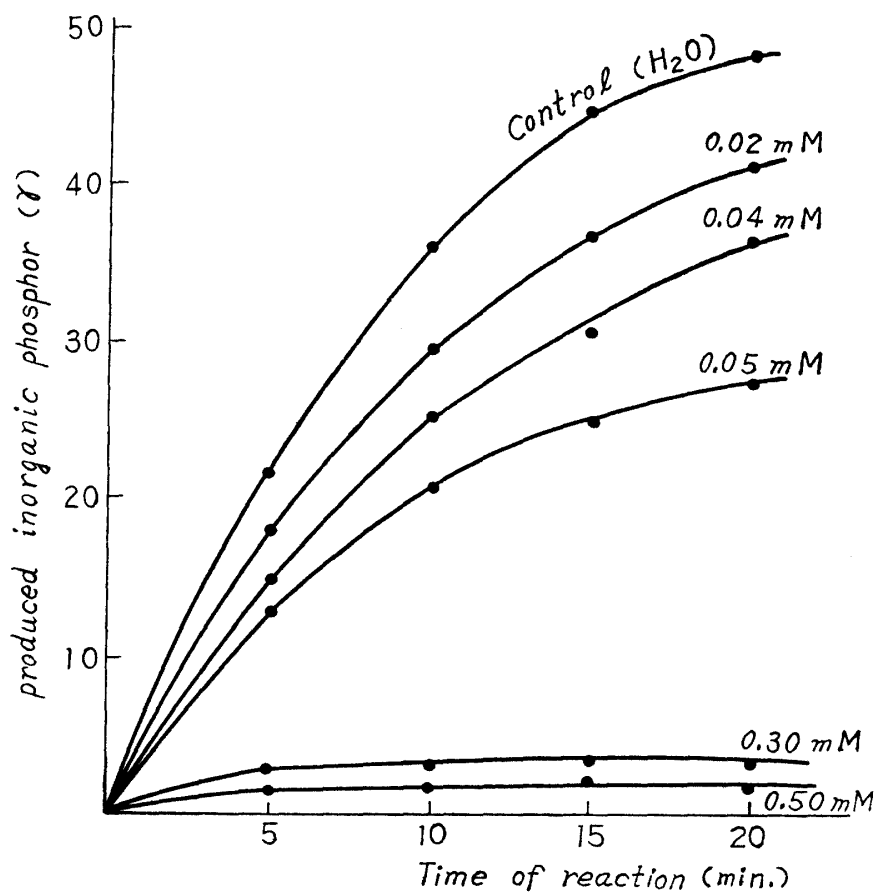


Fig. 3 Inhibition of the activity of phosphorylase by Cysteine

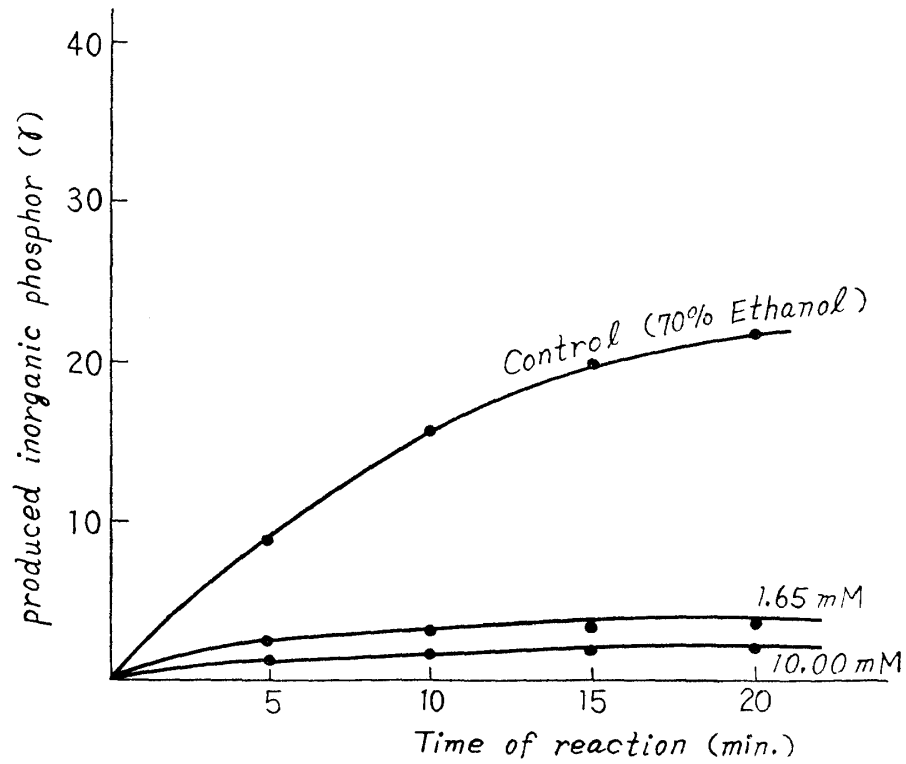


Fig. 4 Inhibition of the activity of phosphorylase by ethylmercaptan

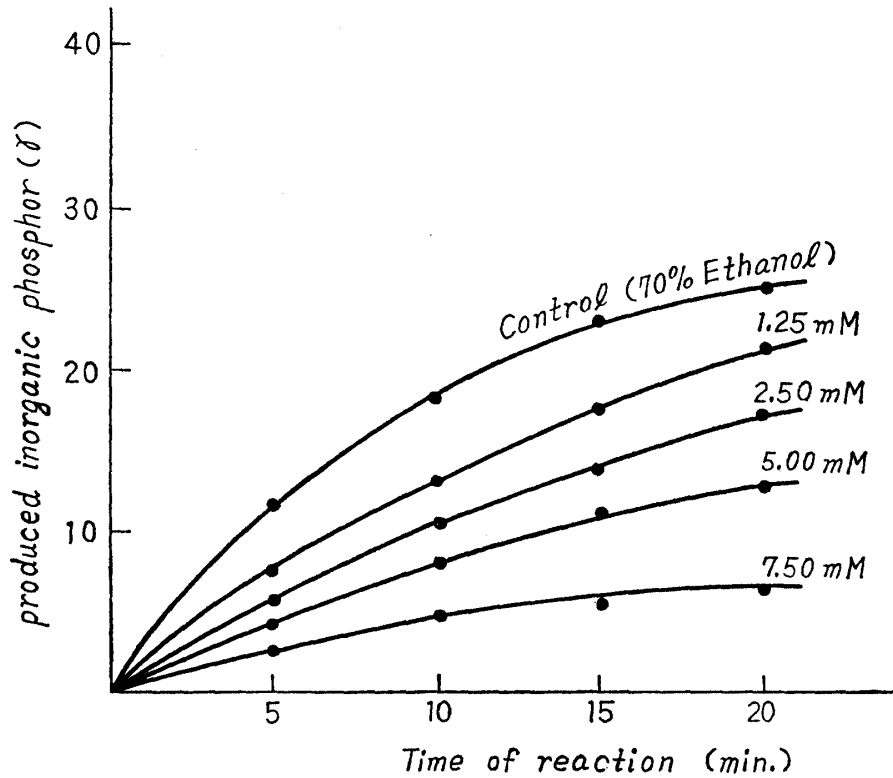


Fig. 5 Inhibition of the activity of phosphorylase by propylmercaptan

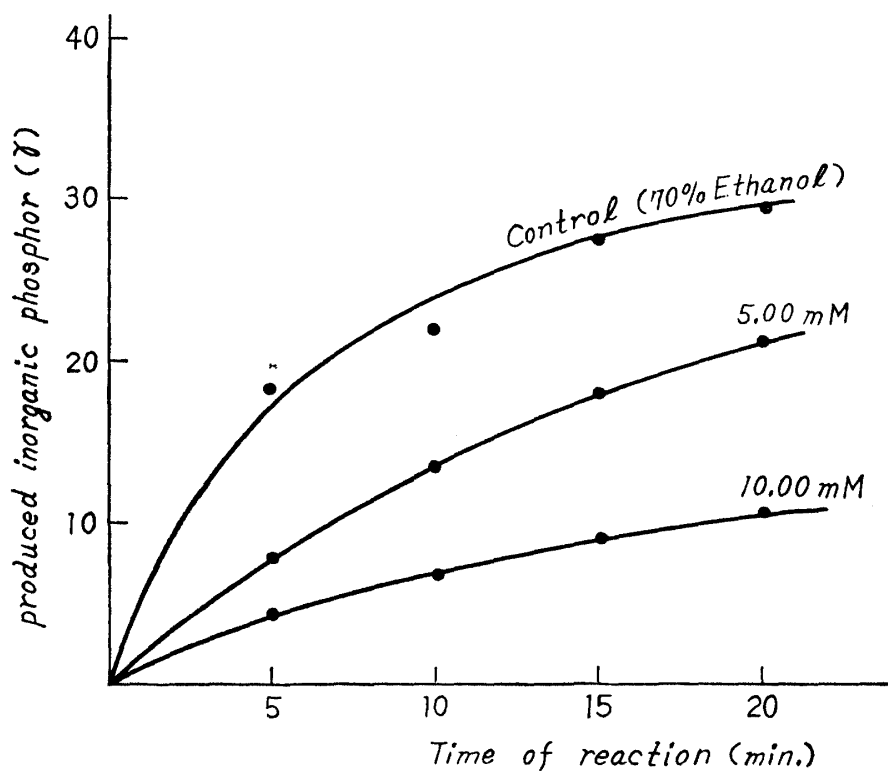


Fig. 6 Inhibition of the activity of phosphorylase by buthylmerbaptan

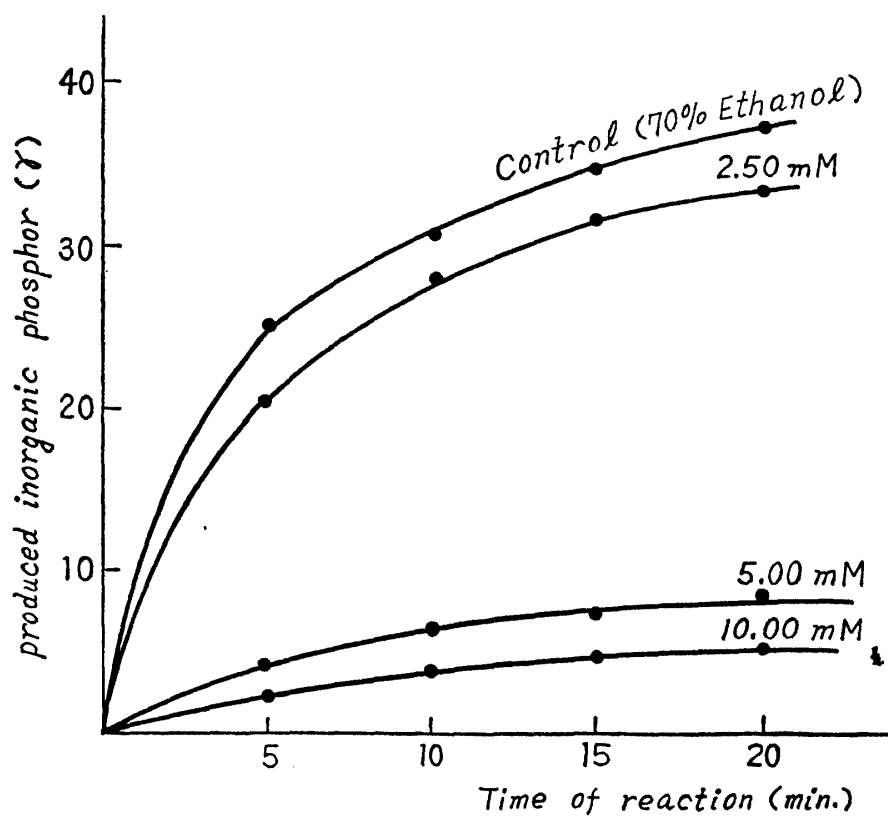


Fig. 7 Inhibition of the activity of phosphorylase by benzylmercaptan



No. 14 (1969)

用してはならない。又使用量は小麦粉および押麦の 1kg につき 0.3g (0.03%) 以下とする”と定められている。本実験で 5mg 添加の場合、全液量 (5ml) の 0.1% に当り、87.2% の阻害をみたが、1mg 添加の場合、即ち全液量に対して 0.02% の濃度では阻害率が 2.4% と激減するところからみて、使用濃度の限度を 0.03% 以下と定められているのは安全圏の下限とみなされているものと思われる。しかし長期間の連続摂取による影響を考慮すれば、いろいろ問題もあることであろうし、完全に無害とは断言できないであろう。最近、無漂白パンに人々の関心が向けられ始めたことは、好ましい傾向といえよう。

本実験で使用した SH 化合物について phosphorylase 阻害度を検するに、分子量の小さなものほど阻害が大であることが示されたが、これは、これら SH 化合物を結合する今後の薬剤の開発に対して一つの示唆を与えるものといえよう。

終りに本実験にご協力頂いた江藤はるみ、海法美千子、角田喜代子、新名節子の諸嬢に感謝申し上げます。