

目 次

報 文

飲料用水（上水，井水，天水など）中のセシウム137の分析法	長沢佳熊，亀谷勝昭，城戸靖雅	1
特殊クリームの試験法について（第2報）	市川重春，南城 実，林 悦子， 狩野静雄	5
煉炭磨中の銅クロロフィリンナトリウムの試験法について	市川重春，南城 実，林 悦子	9
自動車等の内燃機関の排気ガスによる空気汚染について（第2報）		
ガレージおよび修理工場内の鉛，一酸化炭素量について	山手 昇	15
自動車等の内燃機関の排気ガスによる空気汚染について（第3報）		
都内街路空気中の鉛，一酸化炭素および塵埃量の測定結果について	市川重春，山手 昇	19
自動車等の内燃機関の排気ガスによる空気汚染について（第4報）		
関門トンネル内の排気ガス調査結果について	浦久保五郎，山手 昇	23
ガスクロマトグラフィーの医薬品分析への応用（第1報）		
エアゾール，メタノールおよびエタノール	河合 聡	27
クロル酢酸エチルのポーラログラフ定量法	藤井正道，佐藤 寿	35
有機化合物のポーラログラフによる研究（第14，15報）	佐藤 寿	39
有機化合物のポーラログラフによる研究（第16報）		
芳香性カルボニル化合物のポーラログラフィー	佐藤 寿	51
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用（第7報）		
混合人工甘味料中のチクロヘキシルスルファミン酸ナトリウムの 定量	大場琢磨，岡田太郎，吉川克業， 川城 巖	61
赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用（第10報）		
混合カゼ薬の定量	大場琢磨，小川秀子，佐子 茂， 小林茂子，中島利章，吉川克業	67
フッ素化合物の光電比色定量法の検討	板井孝信，中島利章	75
二酸化セレンによる呈色反応（第3報）		
血清中のコレステロールの比色定量法	渡辺俊雄	81
コレステロールの Liebermann-Burchard 反応による呈色物質および その反応機構について	渡辺俊雄	87
ホルモン，ビタミン混合製剤中のエチステロン，メチルテストステロン の分離定量法およびエチステロン，テストステロン，プロビオン酸 テストステロンおよびメチルテストステロンの分離法	長沢佳熊，越村榮之助，土屋雅一， 木村俊夫	95
国民医薬品集ピラピタル注射液定量法の検討	海東常敏，齊藤恵美子	99
強酸性陽イオン交換樹脂によるピラピタルの分離定量	小川秀子，辻 章夫	105
キレート滴定によるピラピタル中のアミノピリンおよびバルピタル の定量法について	立沢政義	109
スルピリンの比色定量	守田 実	113
アルコールの光による品質変化について	海東常敏，小林茂子	117
L- フォースの合成に関する研究	谷村顕雄	123
ドリン製剤試験法に関する二，三の知見	板井孝信，神谷庄造	127
次亜塩素酸ナトリウムによるイソニアジドおよびその誘導体の定量 について	立沢政義	131

エアゾール殺虫剤中のピレトリン定量に関する研究 (第2報)

効力増強剤 (MGK-264) の定量におよぼす影響について……………山口一孝, 西本和光 135

あへんのメコン酸およびモルヒネの定量……………朝比奈晴世, 大野昌子 139

あへんの Folin-Ciocalteu 試液による呈色……………朝比奈晴世, 大野昌子 149

クロモトローブ酸による繊維素グリコール酸ナトリウムの置換度の

測定について……………藤井清次, 原田基夫 153

食品中の繊維素グリコール酸ナトリウムの定量に関する研究

(第4報) ジャム中の定量について……………藤井清次, 原田基夫, 林 敏夫 159

食用色素におよぼす放射線の影響 (第1報)……………寺島敏雄, 松倉秋彦, 笹倉 博,
植村律二……………163

食用色素に関する研究 (第1報)

食用赤色1号 (Ponceau 3R) の低スルホン化色素について……………藤井清次, 神蔵美枝子 167

食品添加物の検出に関する研究 (第2報)

抗酸化剤の逆相クロマトグラフィーによる分離確認について……………川城 巖, 川田公平, 細貝祐太郎 175

合成樹脂製容器の研究 (第5報)

スチレン樹脂中の残存モノマーの定量……………川城 巖, 岡田太郎, 細貝祐太郎,
辰濃 隆……………179

合成樹脂製容器の研究 (第6報) ビニル樹脂中の可塑剤の分析……………川城 巖, 岡田太郎, 大場琢磨 183

融点測定について……………長沢佳熊, 鹿島 哲, 竹中祐典 189

インシュリンの薬化学的研究 (第25報)

DNP法によるカツオ・インシュリンのN-末端基について……………長沢佳熊, 西崎笹夫 197

インシュリンの薬化学的研究 (第26報)

DNP法によるビンナガマグロ・インシュリンのN-末端基について……………長沢佳熊, 西崎笹夫 203

インシュリンの薬化学的研究 (第27報)

DNP法によるCryst. TAのN-末端基について……………長沢佳熊, 西崎笹夫 209

インシュリンの薬化学的研究 (第28報)

カツオ・インシュリンの抽出過程におけるpH8の無効な

蛋白性沈澱物の構成アミノ酸の種類およびN-末端基について……………長沢佳熊, 西崎笹夫 215

インシュリンの薬化学的研究 (第29報)

ヒドラジン分解法によるウシ, クジラ, カツオおよびビンナガ

マグロ・インシュリンのC-末端基について……………西崎笹夫 219

ラウオルフィア・アルカロイドの定量に関する研究……………中川雄三, 伊阪 博 229

バクカクアルカロイドの定性ならびに定量法の研究 (第1報)

p-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液による定量法の検討……………山口一孝, 伊東 宏, 伊藤巳代子,
川谷豊彦, 鹿島 哲……………235

輸入食糧中に混入した「ヒルガオ科植物の種子」について……………川城 巖, 川田公平, 細貝祐太郎,
天野立爾……………239

春日部における *Rauwolfia* 属植物特に印度蛇木の試作栽培について……………川谷豊彦, 石原活磨, 逸見誠三郎 243

種子島における印度蛇木の栽培試験 (第2報) 2年生植物の成績……………高城正勝 259

ケシ (*Papaver somniferum* L.) の生育ならびに収量におよぼす

窒素質肥料配合の影響について……………木下孝三, 中川雄三, 伊阪 博 267

ケシ (*Papaver somniferum* L.) の花芽分化と開花について……………木下孝三 273

ジギタリスの検定 (第3報)

ジギタリス日局標準品の製造およびその検定について……………長沢佳熊, 中山豪一, 木村俊夫,
福田秀男……………279

リジン製剤中リジンの微生物定量法……………南原精一, 江島 昭, 平岡栄一 285

パンクレアチン溶液中の α -アミラーゼの安定化	高橋昭江, 朝比奈正人	289
ヒアルロニダーゼの試験法について	朝比奈正人	295
性腺刺激ホルモンの研究 (第8報)		
幼若 SM 系マウスおよび幼若雑系マウスの卵巣重量増加および		
子宮重量増加による血清性性腺刺激ホルモンの検定	長沢佳熊, 越村栄之助	305
卵胞ホルモンの研究 (第12報)		
シクロペンチルプロピオン酸エストラジオールの幼若マウス子宮		
重量増加による検定法	長沢佳熊, 越村栄之助	313
発熱性物質およびその試験法に関する研究 (第3報)		
<i>Pr. vulgaris</i> の菌体外発熱性物質について	北川純男, 川崎浩之進	315
発熱性物質およびその試験法に関する研究 (第4報)		
発熱性物質に対する SH 基の機能について	北川純男	323
Thiothiamine (SB ₁) の体温におよぼす影響	吉田 稔, 川崎浩之進, 北川純男, 小川俊太郎	331
食品の異物試験法 (第4報) 食品添加物のイーストについて	川城 巖, 宮島弘衛, 二郷俊郎	339
食品中の糸状菌に関する研究 (第1報) 粉末状食品の糸状菌試験法	稲垣尚起, 池田峰子	341
食品中の糸状菌に関する研究 (第2報)		
穀粉中の <i>Penicillium</i> 属菌および <i>Aspergillus</i> 属菌の分類	稲垣尚起, 池田峰子	347
腸線縫合糸の無菌試験法に関する研究 (第2報)		
J.I.S., U.S.P. および旧 J.I.S. の比較	山地幸雄, 石関忠一, 小嶋秩夫, 幸田和子, 志波 剛	367
腸線縫合糸の無菌試験法に関する研究 (第3報)		
J.I.S. 法についての検討	山地幸雄, 石関忠一, 小嶋秩夫, 幸田和子, 志波 剛	373
脱脂粉乳由来ブドウ球菌の生物学的性状および抗生物質に対する態度		
ならびにフェージ型について, 特に輸入品と国産品の比較	鈴木 昭, 河西 勉	381
Staphylocoagulase に関する研究 (第1報)		
Staphylocoagulase の産生条件について	林 富子	387
Staphylocoagulase に関する研究 (第2報)		
Staphylocoagulase の分離について	林 富子	391
抗腫瘍性物質の Screening Method について (第1報)		
Eosine 染色法	中村正夫, 宮沢文雄, 佐久間英子, 岡 信江, 八田貞義, 青山好作	395
<i>Allium cepa</i> Ext. の白血球増多作用に関する研究	中村正夫, 宮沢文雄, 佐久間英子, 八田貞義, 青木孝好	399
銀錫アマルガム合金の硬化膨縮について (第6報)		
練和方法および練和温度の物理的性質におよぼす影響について	藤井正道, 堀部 隆	405
レジン歯について (第1報)		
レジン歯の硬度および義歯床用レジンとの結合強さについて	藤井正道, 堀部 隆	415
衛生材料の研究 (第10報) 精練条件の検討		
	吉村 淳, 遠藤 勝	421
速 報		
ジチゾンベンゼン溶液による鉛の定量	市川重春, 南城 実, 狩野静雄	427
イソニコチン酸ヒドラジドメタンスルホン酸ナトリウムのポーラロ		
グラフ法による定量	江島 昭, 佐子 茂	429
魚類, クジラおよびウシ・インシュリンの過ギ酸酸化産物の比較	西崎笹夫	431

魚類, クジラおよびウシ・インシュリンの紫外線吸収スペクトルの比較	西崎笹夫	433
魚類, クジラ, ウシ・インシュリン, Cryst. TA, グルカゴンおよび プロタミンの赤外線吸収スペクトルの比較	西崎笹夫	435
魚類およびウシ・インシュリンの汚紙電気泳動の比較	西崎笹夫	439
食用色素におよぼす放射線の影響 (第2報)		
インジゴカルミンに対する反応	寺島敏雄, 松倉秋彦	443
食用色素に関する研究 (第2報)		
食用赤色 106号 (Acid Red) の附随色素について	藤井清次, 神蔵美枝子	447
フィッシュミールの殺菌に関する研究	山地幸雄, 小嶋鉄夫	449
<i>Rauwolfia</i> 属植物の染色体数 (第3報)	川谷豊彦, 宮崎幸男, 大野忠郎, 逸見誠三郎	451
資 料		
原水爆実験による放射能汚染の研究 (第9報)		
昭和33年度における放射能汚染魚類肝臓の放射性核種分析	長沢佳熊, 樫田義彦, 亀谷勝昭, 城戸靖雅	453
天水中のストロンチウム90の定量	長沢佳熊, 河村正一, 城戸靖雅, 亀谷勝昭	467
灯台の飲料用天水の放射能調査 (第2報)	長沢佳熊, 河村正一	473
昭和33年度日本産あへんのモルヒネ含量について	中川雄三, 伊阪 博, 宮下信枝	479
輸入食品の人工着色料について (第2報)	細貝祐太郎, 天野立爾	481
輸入食品のなかの重金属について	細貝祐太郎, 天野立爾	485
食品中のホルムアルデヒド試験法について	川城 巖, 田辺弘也, 近藤竜雄	487
せんべい中の微量ホウ酸の定量について	川城 巖, 田辺弘也, 近藤竜雄, 藤田昌彦	491
モノフルオール酢酸アミドの残留試験 (第4報)		
液剤と水和剤について	川城 巖, 竹内末久	495
合成樹脂製容器の研究 (第7報) ポリエチレンの透湿性について	川城 巖, 岡田太郎, 辰濃 隆	497
図下垂体後葉注射液およびオキシトシン注射液の力価と pH の変化 について	中山豪一, 福田秀男	501
腸線の強度について (第1報)		
腸線の物理的性質について (径, 長さ, 引張強さ)	藤井正道, 堀部 隆	505
ラウオルフィアセルベンチナ製剤の規格に関する厚生研究の概要	山口一孝, 下村 孟, 堀島清吾, 庄司初枝, 伊藤巳代子	511
伊豆における <i>Rauwolfia</i> 属植物特に印度蛇木 (<i>R. serpentina</i> BENTH.) の栽培試験 (第1報) 1958年度の成績	宮崎幸男, 五太子小太郎	519
<i>Rauwolfia</i> 属植物特に印度蛇木 (<i>R. serpentina</i> BENTH.) の種子の 発芽に関する研究 (第1報) 外国産種子の場合	宮崎幸男, 五太子小太郎	527
熱帯産有用植物目録 昭和34年	宮崎幸男	537
抄 録		545
講演要旨		548
業務報告		555
国家検定, 国家検査等の試験成績報告	総 務 部	555
国立衛生試験所の標準品について	総 務 部	567
^{60}Co 照射装置について	特殊薬品部	569
所内講演会		571

インシュリンの薬化学的研究 (第25報)*

DNP 法によるカツオ・インシュリンの N-末端基について**

長 沢 佳 熊, 西 崎 笹 夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XXV.

On the Nitrogen Terminal End-Groups of Bonito Fish (*Katsuwonnus vagans*)

Insulin by 2,4-Dinitrophenyl Method.

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

ま え が き と ま と め

Sanger らはウシ結晶インシュリンのN-末端アミノ酸***を決定し¹⁾, その構成アミノ酸の配列順序を決めた^{2,3)}.

著者らは第14報⁴⁾においてクジラのインシュリンの結晶化について報告したが, その試料についても Sanger らはブタ, ヒツジ, ウマのインシュリンとともにそれらの構成アミノ酸の配列順序を報告している^{5,6)}. これらウシ, ブタ, ヒツジ, ウマおよびクジラから抽出した結晶インシュリンはいずれもN-末端アミノ酸として Gly と Phe の2種であることが明らかになった. 今回著者らはN-末端基既知のウシおよびクジラの結晶インシュリンを対照としてカツオのインシュリンのN-末端基を2,4-dinitrophenyl 化(以下DNP 化と略する)法により分析することができたので報告する. なおカツオ・インシュリンについてはまだ結晶が得られていないので****, ここに使用したものは純度約90%(生理的力価から考え, 22u/mgのものを100%純度と仮定した)の無晶型カツオ・インシュリンである. 著者らは第18報⁷⁾において粗カツオ・インシュリンに60%アセトンを加え, アルカリ性側から等電点を利用してpHにより分割沈殿を行なうとき, pH 7.2~6.3の区分にもっとも高単位のインシュリンが集

* 第24報は衛生試報, 76, 221 (1958).

** この報告は1958年10月26日 第2回日本薬学会関東支部大会で講演.

*** 本誌, 本号以後著者らの用いるアミノ酸の略号を Table 1 [水島, 赤堀編: 蛋白質化学, 共立出版(1954) から引用] に示す.

Table 1. Abbreviation for amino-acid residues

Abbrev.	Amino-acid	Abbrev.	Amino-acid	Abbrev.	Amino-acid	Abbrev.	Amino-acid
Ala	Alanine	CySO ₃ H	Cystic acid	Leu	Leucine	Ser	Serine
Arg	Arginine	Glu	Glutamic acid	Lys	Lysine	Thr	Threonine
Asp	Aspartic acid	Glu(NH ₂)	Glutamine	Met	Methionine	Try	Tryptophane
Asp(NH ₂)	Asparagine	Gly	Glycine	Orn	Ornithine	Tyr	Tyrosine
Cys	Cystine	His	Histidine	Phe	Phenylalanine	Val	Valine
CySH	Cystein	Ileu	Isoleucine	Pro	Proline		

**** 著者らはカツオ, マグロの粗インシュリンから数種のペプチドと思われる六面体および球型結晶を得たが, それらは生理作用が弱く, あるものは生理作用がほとんどなく, いずれもインシュリン結晶と確認することはできなかった. カツオ・インシュリンの結晶については伊藤四十二, 佐藤武雄の報告 [化学の領域, 2, 132 (1948), 化学療法とホルモン療法, 1, 24 (1948), 第6改正日本薬局方注解795頁 (南江堂版) (1951)] があるが, 結晶の恒数についての確実性にとほしい.

まることを報告した。この方法によって得た pH 6.9~6.3 の区分のカット・無晶型インシュリンをウシおよびクジラの結晶インシュリンを対照として2時間 DNP 化した結果、DNP 化カット・インシュリンの黄色沈殿物はウシ、クジラの場合のその約半量であった⁸⁾。これらのDNP 化物質を塩酸加水分解し(実験1参照)、酸性でエーテル層へ移行した部分および水層残留部分についてDNP-アミノ酸の濾紙クロマトグラフィ(以下 PPC と略する)を行なった。

DNP-アミノ酸のPPCに関する報告は最近多数あるが、あるものは Sanger らの述べるように tailing しがちである。著者らは Iwainsky の方法⁹⁾の変法で好結果を得たので、以下その変法にしたがい、緩衝液の pH が異なる2種の展開溶液を用いた(実験2-1参照)。

カット・インシュリンおよび対照に用いたウシおよびクジラのインシュリンのDNP 化物質を塩酸で加水分解し、まずエーテル層への移行部分を PPC の試料として展開するとき、いずれも 2,4-dinitroaniline, 2,4-dinitrophenol の2個のスポットを検出した。これらのほかにウシ、クジラの場合、DNP-Gly, DNP-Phe のスポットを認めた。これは Sanger らの報告における N-末端アミノ酸の種類と全く一致する。一方カットの場合は DNP-Gly のほか別に2個のスポットを確認した。そのうちの1個はその Rf 値が DNP-Phe より明らかに大きく、その Rf 値に相当するものは DNP-Leu または DNP-Ileu と考えられた。ほかの1個はその Rf 値から DNP-Ala または DNP-Pro* であろうと考えられた(実験2-2, Fig. 1参照)。DNP-Leu, DNP-Ileu, DNP-Ala および DNP-Pro を対照としてカットの PPC を行なった結果、DNP-Leu と DNP-Ileu との判別は明らかでなかったが、ほかの1個は DNP-Ala であることを確認した(実験2-3, Fig. 2参照)。DNP-Leu と DNP-Ileu との判別は展開溶媒のpHをアルカリ性とするとき、DNP-Leu の Rf 値が DNP-Ileu のそれよりやや大きいことを知り、これら2種のDNP-アミノ酸および DNP-Ala を対照としてカットの PPC を行なった結果、わずかの Rf 値の差で DNP-Leu であろうと推定し、またほかの未知のスポットも DNP-Ala とよく一致した(実験2-4, Fig. 3参照)。

一方水層残留部分について PPC を行なった結果、いずれも 2,4-dinitrophenol および DNP-ε-Lys の2個のスポットを認めた(実験2-5, Fig. 4参照)。これはウシ、クジラの場合の Sanger の報告と全く一致している。

以上の推定にもとづいて念のためエーテル層移行部分、水層残留部分を以上の実験から推定された DNP-アミノ酸を対照として同時に展開した結果、カット・インシュリンの N-末端アミノ酸は DNP-Gly, DNP-Ala および DNP-Leu と全く一致することを確かめた(実験2-6, Fig. 5参照)。

したがってカット・インシュリンの N-末端基は3種存在し、Gly, Ala および Leu であると結論する**。ただし Leu は Ileu と明らかには区別し得なかったが、実験2-4で示す点から推定した。この点はさらに今後の研究にゆずる。なお各 N-末端アミノ酸の詳細な定量は目下検計中であるが、それぞれの DNP-アミノ酸のスポットはほぼ同じ強さであることを附記する。

実験の部

試料

ウシ: ウシ結晶インシュリン (24.5u/mg)

クジラ: クジラ結晶インシュリン (22u/mg)

カット: カット無晶型インシュリン (20.0u/mg, マウス・ケイレン法による)

これらのインシュリンを DNP 化したものを試料とした。

実験1 加水分解: ウシ、クジラおよびカットの試料をそれぞれ 25 mg ずつとり、6N塩酸 2.5 cc ずつ加え、ガラス管に封入し、黒色紙に包み3時間 115° の恒温箱中で加水分解した。この条件ではカットの場合はほとんど残留物を認めなかったが、ウシの場合約 5 mg, クジラの場合約 2 mg の黄色ないし微帯褐色の残留物を得た。冷後

* DNP-Pro は試料を塩酸加水分解するときは、他のDNP-アミノ酸と比較し残存率がきわめて小さい[Porter, R. R., Sanger, F.: *Biochem. J.*, 42, 287 (1948)] が、著者らの経験からその Rf 値のみから判断して、著者らの得たスポットにやや近いのではないかと考えられた。

** 本研究の講演発表の際、都立大学佐竹研究室員はカット・インシュリンの N-末端基は Gly, Leu であることを実験したと述べたが、その後[化学 Vol.14, No. 2, p.80 (1959) 山本ほか(未発表)]Ileu, Ala, Gly であると記している

それぞれの澄明な液についてエーテルで数回抽出し, 抽出液を蒸留水でよく洗い, 洗液は水層に合する。エーテル抽出液は減圧で濃縮し PPC の試料とした。水層は水酸化ナトリウム液で pH 5.05 に調節し, 蒸発皿上で濃縮し PPC の試料とした。

実験 2-1 PPC 操作法

展開溶媒: (a); n-ブタノール-イソアミルアルコール-エタノール-フタル酸水素カリウム, 水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 5.05) [30:30:11:45]

(b); (a) のうちの緩衝液をリン酸二ナトリウム, 水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 11.25) としたもの。

展開操作: 展開溶媒を分液ロートでよくふりまぜたのち, 下層液に汚紙 (東洋汚紙 No.51) を浸し風乾する。汚紙の一端から 7 cm の距離に引いた直線上に一定間隔に試料および対照の DNP-アミノ酸をつけ, 上層液を用いて上昇法により展開した。なお (a) では DNP-Leu と DNP-Ileu との区別は明らかでないが, (b) では DNP-Leu の Rf 値 (0.79) が DNP-Ileu の Rf 値 (0.77) よりやや大きい。

実験 2-2 ウシ, クジラおよびカツオのエーテル層へ移行部分について, DNP-Gly, DNP-Phe, 2,4-dinitrophenol および 2,4-dinitroaniline を対照として展開溶媒 (a) で展開した。そのペーパクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

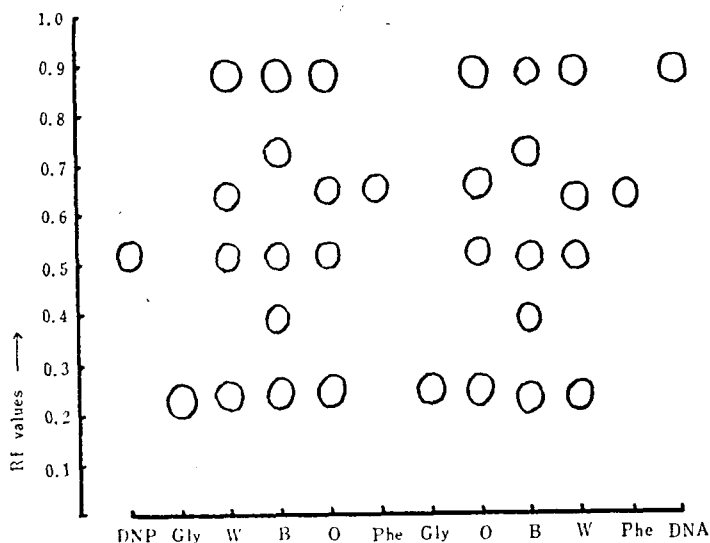


Fig. 1. The paper chromatogram of DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysates of DNP-insulins

O: from DNP-ox insulin, W: from DNP-whale insulin, bonito fish insulin, Gly: DNP-glycine, Phe: DNP-phenylalanine, DNA: 2,4-dinitroaniline, B: from DNP-DNP: 2,4-dinitrophenol
Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium bi-phthalate and sodium hydroxide) [30:30:11:45]

実験 2-3 Fig. 1 においてカツオの場合の Rf 0.7 附近および 0.4 附近のスポットを決定する目的で, それらの Rf 値附近の DNP-アミノ酸の単体, すなわち DNP-Leu, DNP-Ileu, DNP-Ala および DNP-Pro を対照として展開溶媒 (a) で展開した。そのペーパクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

実験 2-4 Fig. 2 における DNP-Leu と DNP-Ileu とを決定する目的でその 2 種を対照として展開溶媒 (b) で展開した。なお念のため DNP-Ala をも対照とした。そのペーパクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

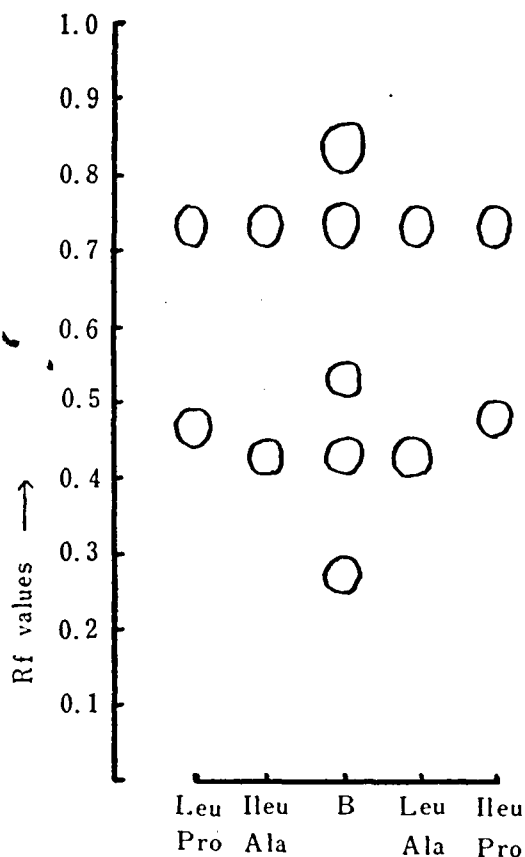


Fig. 2. The paper chromatogram of DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysate of DNP-bonito fish insulin. B : from DNP-bonito fish insulin, Leu : DNP-leucine, Ileu : DNP-isoleucine, Ala : DNP-alanine, Pro : DNP-proline. Solvent : n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium bi-phthalate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

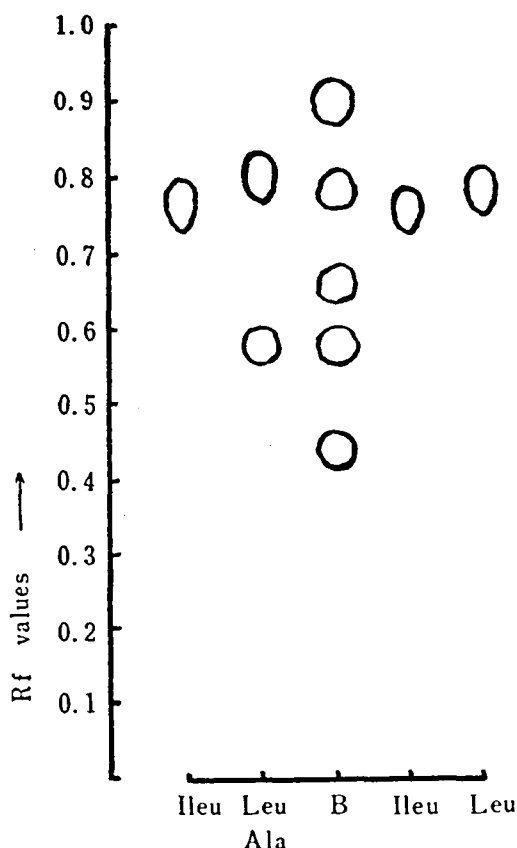


Fig. 3. The paper chromatogram of DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysate of DNP-bonito fish insulin. B : from DNP-bonito fish insulin, Leu : DNP-leucine, Ileu : DNP-isoleucine, Ala : DNP-alanine. Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 11.25 buffer (consists of dibasic sodium phosphate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

実験 2-5 ウシ、クジラおよびカツオの水層残留部分について、DNP- ϵ -Lys および 2,4-dinitrophenol を対照として展開溶媒 (a) で展開した。そのペーパクロマトグラムを Fig. 4 に示す。

実験 2-6 カツオの N-末端基を確かめるため、実験 2-2 ~ 5, Fig. 1 ~ 4 の結果に基づき、それぞれのスポットについて推定した DNP-アミノ酸を対照として、エーテル層、水層部分を同時に同じ濾紙で展開溶媒 (a) で展開した。そのペーパクロマトグラムを Fig. 5 に示す。

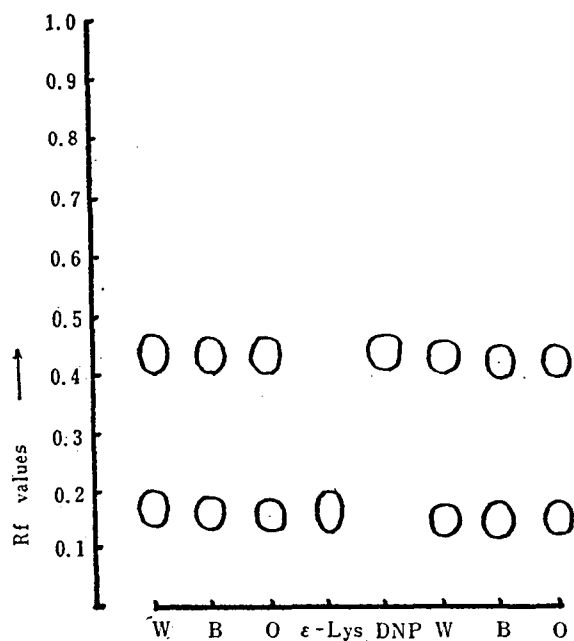


Fig. 4. The paper chromatogram of DNP-amino acids in the water layer obtained from the acid hydrolysates of DNP-insulins

O : from DNP-ox insulin, W : from DNP-whale insulin, B : from DNP-bonito fish insulin, ϵ -Lys : DNP- ϵ -lysine, DNP : 2,4-dinitrophenol

Solvent : n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

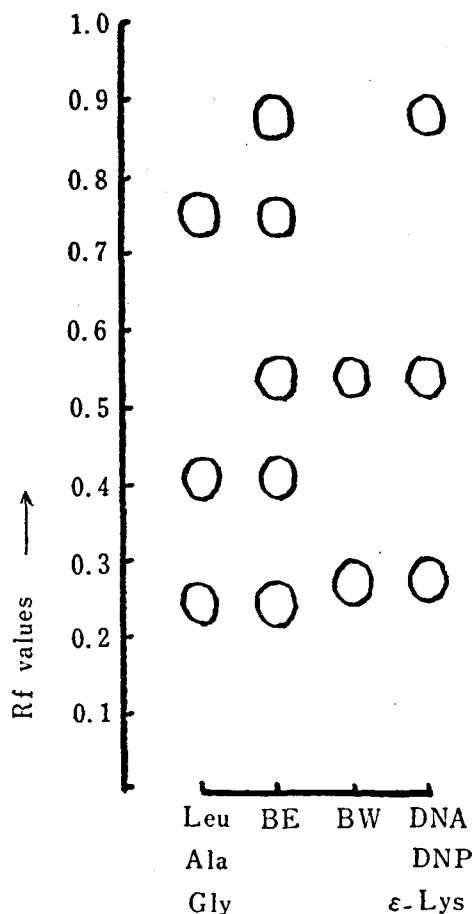


Fig. 5. The paper chromatogram of DNP-amino acids obtained from the acid hydrolysate of DNP-bonito fish insulin

BE : DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysate of DNP-bonito fish insulin, BW : DNP-amino acids in the water layer obtained from the acid hydrolysate of DNP bonito fish insulin, Leu : DNP-leucine, Ala : DNP-alanine, Gly : DNP-glycine, DNA : 2,4-dinitroaniline, DNP : 2,4-dinitrophenol, ϵ -Lys : DNP- ϵ -lysine

Solvent : n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

文 献

- 1) Sanger, F. : *Biochem. J.*, 39, 507 (1945).
- 2) Sanger, F. and Tuppy, H. : *ibid.*, 49, 463, 481 (1951).
- 3) Sanger, F. and Thompson, E. O. P. : *ibid.*, 53, 353, 366 (1953).
- 4) 長沢佳熊外 : 衛生試験報, 74, 167 (1956).
- 5) Brown, H., Sanger, F. and Kitai, R. : *Biochem. J.*, 60, 556 (1955).
- 6) Harris, J. I., Sanger, F. and Naughton, M. A. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 427 (1956).
- 7) 長沢佳熊, 西崎笹夫 : 衛生試験報, 74, 179 (1956).
- 8) 長沢佳熊, 西崎笹夫 : 衛生試験報, 76, 323 (1958).
- 9) Iwainsky, H. : *Z. physiol. Chem.*, 297, 194 (1954).

Summary

The N-terminal residues of amino acids of bonito fish insulin were compared with those of ox and whale insulin crystals, which had been isolated by the authors¹⁾.

On applying DNP-amino acids in the ether layer obtained from the hydrolysates of DNP-insulin to the paper chromatography, four spots were found, 2,4-dinitrophenol, 2,4-dinitroaniline, DNP-glycine and DNP-phenylalanine in the case of both ox and whale insulin, while 2,4-dinitrophenol and 2,4-dinitroaniline, DNP-glycine and two unknown spots in the case of bonito fish insulin. (Exp. 2-2, Fig.1) One of the unknown spots was proved to be DNP-alanine and the other, either DNP-leucine or DNP-isoleucine (Exp. 2-3, Fig.2).

In the subsequent experiment (Exp. 2-4), DNP-leucine was suggested by the R_f value difference though the R_f values of DNP-leucine and DNP-isoleucine were very close (Fig.3).

As for the water layer, the three insulins had two spots, one was DNP-ε-lysine and the other, 2,4-dinitrophenol (Exp. 2-5, Fig.4).

As a result, the authors suggested that bonito fish insulin had three N-terminal residues, glycine, alanine and leucine.

Received June 30, 1959

インシュリンの薬化学的研究 (第26報)*

DNP 法によるピンナガマグロ・インシュリンの N-末端基について**

長 沢 佳 熊, 西 崎 笹 夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XXII.

On the Nitrogen Terminal End-Groups of Tunny Fish (*Thynnus alalunga*)

Insulin by 2,4-Dinitrophenyl Method.

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

まえがきとまとめ

Sanger らはウシ, ブタ, ヒツジ, ウマおよびクジラの結晶インシュリンの構成アミノ酸の配列順序を決定しそれらの構造を明らかにした¹⁻⁴⁾。これら哺乳動物から抽出したインシュリンはいずれも N-末端基として Gly と Phe の 2 種である。

著者らは第25報⁵⁾においてウシおよびクジラの結晶インシュリンを対照とし, 同じ条件で同時にカツオのインシュリンの N-末端基を比較検討し, ウシおよびクジラの結晶インシュリンの場合は Gly と Phe の 2 種で, これは Sanger らの報告と全く一致するが, カツオのインシュリンの場合は Gly, Ala および Leu の 3 種存在すると報告した。今回著者らは N-末端基既知のクジラの結晶インシュリンおよび第25報で述べたカツオのインシュリンを対照としてピンナガマグロのインシュリンの N-末端基を 2,4-dinitrophenyl 化(以下 DNP 化と略する)法により分析することができたので報告する。なおマグロ・インシュリンについては著者らは第20報⁶⁾において Cryst. TA, および Cryst. TB, 第22報⁷⁾において Cryst. TC なる結晶性蛋白質の単離について報告したが, それらは生理作用をほとんど示さず, いずれもマグロ・インシュリンの結晶とは認め難いので, ここに使用したものは純度約 90%(生理的力価から考え, 22u/mg のものを 100%純度と仮定した)の無晶型マグロ・インシュリンである。著者らは第18報⁸⁾においてカツオ・インシュリンの精製について述べたが, 今回のマグロ・インシュリンの場合も同様に操作し, pH 7.3~6.3 の区分をとり, クジラ・結晶インシュリンを対照として同時に3時間 DNP 化した。DNP 化物質の収量は第25報のカツオの場合よりはるかに良好であった(実験1参照)。これらの DNP 化物質を塩酸で加水分解し, さらに著者らが第25報で述べたと同じ方法で浮紙クロマトグラフィ(以下 PPC と略する)を行なった(実験2参照)。

マグロ・インシュリンおよびクジラ・インシュリンの DNP 化物質の加水分解物につき, 酸性でエーテル層へ移行する部分を第25報におけるカツオの試料およびそれらの推定された DNP-アミノ酸の単体を対照として PPC を行なうときクジラ, カツオの場合は第25報と全く同じ結果が得られたが, マグロの場合にはクジラと比較し DNP-Leu と思われるスポットを認め, カツオと比較し DNP-Ala を認めず DNP-Phe を認めた(実験3-1, Fig. 1参照)。DNP-Leu と DNP-Ileu との判別には第25報に準じ, アルカリ性の展開溶媒を用いて展開した結果, Rf 値のわずかな差で DNP-Leu であろうと推定した(実験3-2, Fig. 2参照)。

一方水層残留部分について PPC を行なった結果クジラ, マグロともに DNP-ε-Lys および 2,4-dinitrophenol のスポットを認めた(実験3-3, Fig. 3参照)。

以上の推定にもとづいて念のためエーテル層移行部分, 水層残留部分を以上の実験から推定された DNP-アミノ酸単体を対照として同時に展開した結果, マグロ・インシュリンの N-末端アミノ酸は DNP-Gly, DNP-Phe および DNP-Leu と全く一致することを確かめた(実験3-4, Fig. 4参照)。

したがってマグロ・インシュリンの N-末端基は 3 種存在し, Gly, Phe および Leu であると結論する。ただ

* 第25報は衛生試験, 77, 197 (1959)。

** この報告は1958年12月20日 日本薬学会関東支部12月第2例会で講演。

し Leu と Ileu との区別は明らかではないが、実験3-2, Fig. 2 で示す点から推定した。この点はさらに今後の研究にゆずる。なお各N-末端アミノ酸の詳細な定量は目下検討中であるが、それぞれの DNP-アミノ酸のスポットはほぼ同じ強さであることを付記する。

終りに本研究に当り、ビンナガマグロ・インシュリンの試料を提供された清水製薬株式会社にたいし謝意を表する。

実験の部

試料

クジラ：クジラ・結晶インシュリン (22u/mg)

マグロ：ビンナガマグロ・無晶型インシュリン (20.3u/mg, 米局XVの検定法による)

これらのインシュリンを DNP 化したものを試料とした。

なお Fig. 1 に示したカツオの試料は第25報に記したと同一のものである。

実験1 ビンナガマグロ・インシュリンの DNP 化：粗ビンナガマグロ・インシュリン (約15u/mg) 900 mg をとり第18報の方法により pH 7.3~6.3 の区分 105 mg, 20.3u/mg: 信頼限界 88~114%, (米局XVの検定法による) を得た。

このビンナガマグロ・無晶型インシュリン 50 mg をとり、炭酸水素ナトリウム 50 mg, 水 0.5 cc を加えて澄明に溶かし、エタノール 1 cc を加える。

別に対照としてクジラ・結晶インシュリン (22u/mg) 100 mg をとり、炭酸水素ナトリウム 100 mg, 水 1 cc を加えて澄明に溶かし、エタノール 2 cc を加える。

両方の溶液へ同時に 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene をマグロの場合 0.05 cc, クジラの場合 0.1 cc 加え、暗室で 3 時間ふりまぜながら DNP 化を行ない、反応した DNP-インシュリンの黄色沈でん物を遠心分離し、水、エタノールおよびエーテルで洗い減圧乾燥した。以上の操作で得られた DNP 化インシュリンの黄色沈でん物はマグロの場合 51 mg クジラの場合 135 mg であった。

実験2 加水分解および PPC: クジラおよびマグロの試料をそれぞれ 25 mg ずつをとり第25報と全く同じ条件で加水分解を行なった。この条件ではクジラの場合少量の残留物を認めたが、マグロの場合残留物はほとんど認めなかった。冷後加水分解した溶液をエーテルで抽出し、エーテル層移行部分、水層残留部分に分ち PPC の試料とした。これらの試料を第25報と全く同じ方法で PPC を行なった。

実験3-1 実験1により DNP 化したクジラおよびマグロのほか、第25報におけるカツオのエーテル層移行部分について、DNP-Gly, DNP-Ala, DNP-Leu, DNP-Phe, 2,4-dinitrophenol および 2,4-dinitroaniline を対照として展開溶媒(a)⁵⁾で展開した。そのペーパクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

実験3-2 Fig. 1 におけるマグロの場合の DNP-Leu, DNP-Ileu のいずれかを決定する目的でそれらを対照として展開溶媒 (b)⁵⁾で展開した。そのペーパクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

実験3-3 クジラおよびマグロの水層残留部分について、DNP-ε-Lys, 2,4-dinitrophenol を対照として展開溶媒 (a) で展開した。そのペーパクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

実験3-4 マグロ・インシュリンの N-末端基を確かめるため、実験3-1~3, Fig. 1~3 の結果に基づきそれぞれのスポットについて推定した DNP-アミノ酸を対照として、エーテル層、水層部分を同時に同じ濾紙で展開溶媒 (a) で展開した。そのペーパクロマトグラムを Fig. 4 に示す。

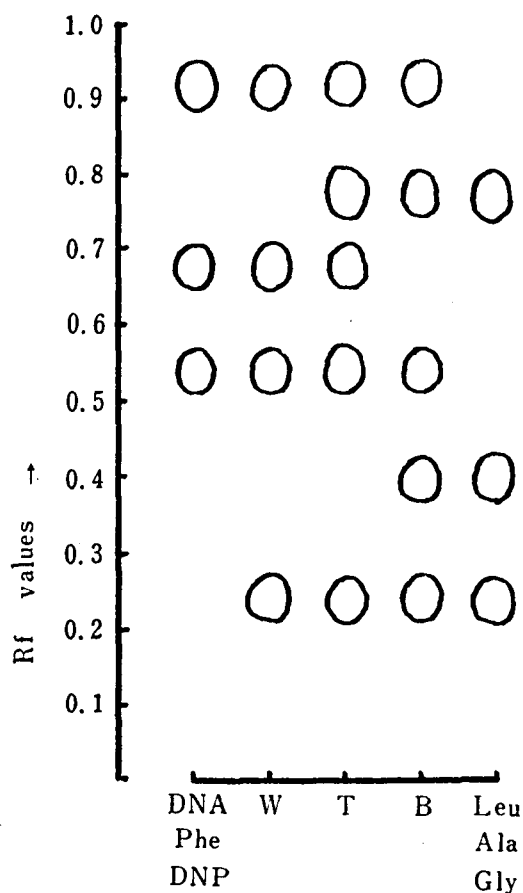


Fig. 1. The paper chromatogram of DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysates of the DNP-insulins from various animal sources
W: from DNP-whale insulin, B: from DNP-bonito fish insulin, T: from DNP-tunny fish insulin, Gly: DNP-glycine, Ala: DNP-alanine, Leu: DNP-leucine, Phe: DNP-phenylalanine, DNA: 2, 4-dinitroaniline, DNP: 2, 4-dinitrophenol
Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30:30:11:45]

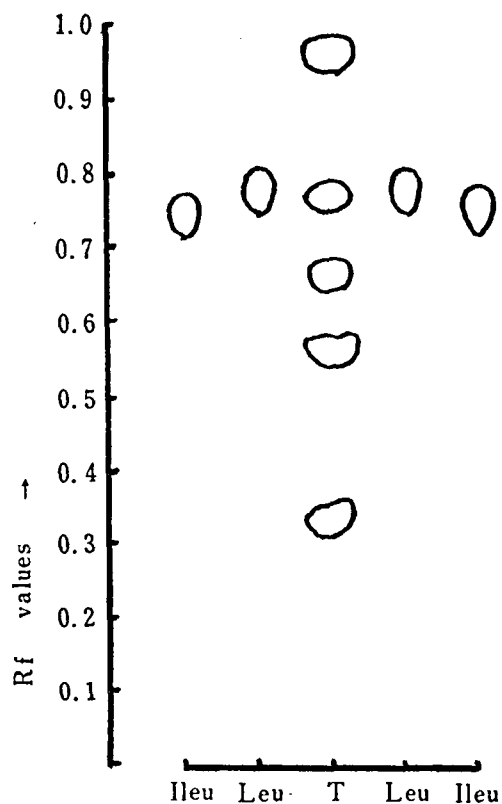


Fig. 2. The paper chromatogram of DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysate of the DNP-tunny fish insulin
T: from DNP-tunny fish insulin, Leu: DNP-leucine, Ileu: DNP-isoleucine
Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 11.25 buffer (consists of dibasic-sodium phosphate and sodium hydroxide) [30:30:11:45]

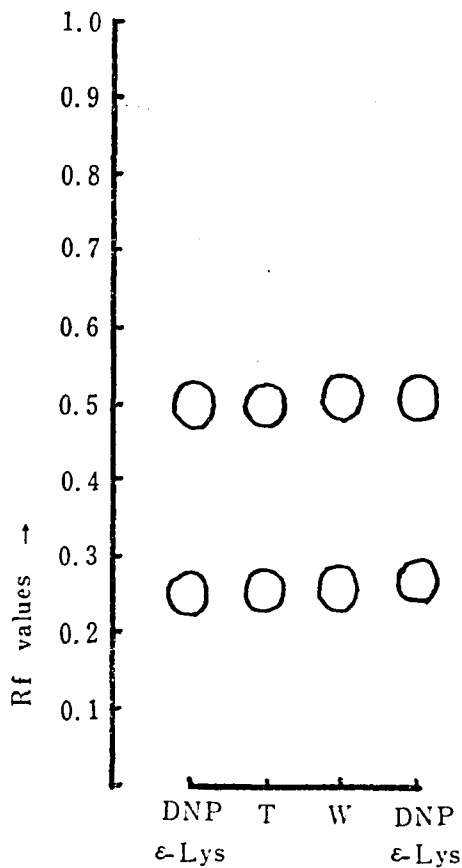


Fig. 3. The paper chromatogram of DNP-amino acids in the water layer obtained from the acid hydrolysates of DNP-insulins
W: from DNP-whale insulin, T: from DNP-tunny fish insulin, ε-Lys: DNP-ε-lysine
Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol- pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

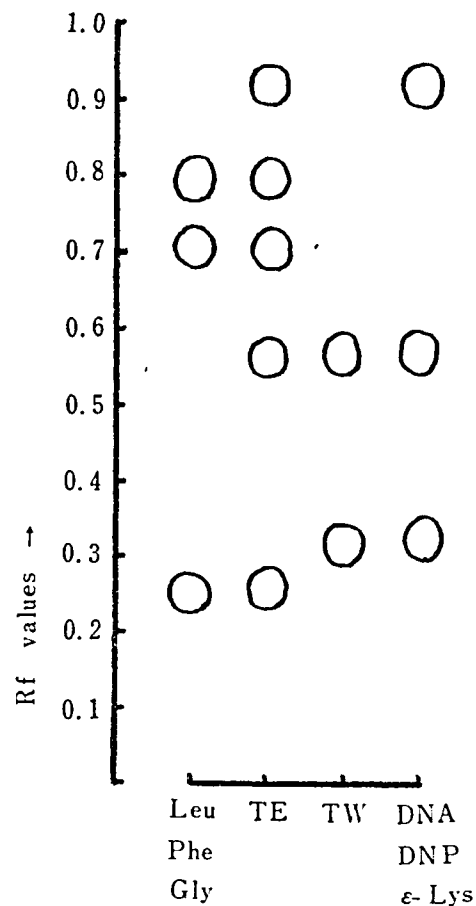


Fig. 4. The paper chromatogram of DNP-amino acids obtained from the acid hydrolysate of DNP-tunny fish insulin
TE: DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysate of DNP-tunny fish insulin, TW: DNP-amino acids in the water layer obtained from the acid hydrolysate of DNP-tunny fish insulin, Leu: DNP-leucine, Phe: DNP-phenylalanine, Gly: DNP-glycine, DNA: 2,4-dinitroaniline, DNP: 2,4-dinitrophenol, ε-Lys: DNP-ε-lysine
Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

文 献

- 1) Sanger, F. and Tuppy, H. : *Biochem. J.*, 49, 463, 481 (1951).
- 2) Sanger, F. and Thompson, E. O. P. : *ibid.*, 53, 353, 366 (1953).
- 3) Brown, H., Sanger, F. and Kitai, R. : *ibid.*, 60, 556 (1955).
- 4) Harris, J. I., Sanger, F. and Naughton, M. A. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 427 (1956).
- 5) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 77, 198 (1959).
- 6) 長沢佳熊, 西崎笹夫, 平岡孝, 深沢真司: 衛生試験, 75, 95 (1957).
- 7) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 76, 213 (1958).
- 8) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 74, 179 (1956).

Summary

On applying DNP-amino acids in ether layer obtained from the acid hydrolysates of DNP-insulin to the paper chromatography, 2,4-dinitrophenol, 2,4-dinitroaniline, DNP-glycine and DNP-phenylalanine were found in the case of whale insulin, and 2,4-dinitrophenol, 2,4-dinitroaniline, DNP-glycine, DNP-alanine and DNP-leucine were found in the case of bonito fish insulin as described in our previous report⁵⁾, while 2,4-dinitrophenol, 2,4-dinitroaniline, DNP-glycine, DNP-phenylalanine and DNP-leucine were found in the case of tunny fish insulin (Exp.3-1~2, Fig.1~2).

As for the water layer, the two insulins had two spots, one was DNP- ϵ -lysine, and the other, 2,4-dinitrophenol (Exp.3-3, Fig.3).

As the N-terminal residues of tunny fish insulin of about 90% purity, Gly, Phe and Leu were found in our experiment.

Received June 30, 1959

インシュリンの薬化学的研究 (第27報)*

DNP 法による Cryst. TA の N-末端基について**

長 沢 佳 熊, 西 崎 笹 夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XXVII.

On the Nitrogen Terminal End-Groups of Cryst. TA

by 2,4-Dinitrophenyl Method.

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

ま え が き と ま と め

著者らは第20報¹⁾において粗ビンナガマグロ・インシュリンの結晶操作の過程において一部分が完全な六面体の結晶性の蛋白質を認め、これを単離したものを Cryst. TA と称することにし、若干の物理化学的恒数を検討したが、インシュリンの生理作用はきわめて弱いことを報告した。

さらに第22報²⁾において Cryst. TA の構成アミノ酸の種類を報告し、また Cryst. TA の結晶型が Staub³⁾らの報告したグルカゴンの結晶とよく似ていることから、両者の生理作用を比較したが、Cryst. TA はグルカゴンの生理作用を全く示さなかつた⁴⁾。

著者らは第25報⁵⁾において DNP 法によるカツオ・インシュリン、第26報⁶⁾においてビンナガマグロ・インシュリンの N-末端基について報告した。

今回は粗ビンナガマグロ、インシュリンから第20報¹⁾の Fig. 1 に示す六面体結晶の Cryst. TA を分離した。その生理作用もほとんど認められなかった (実験1, Fig. 1 参照)。この Cryst. TA を除いた無晶型インシュリンを第18報⁷⁾において記した等電点を利用する分割洗滌法で精製し pH7.3~6.3 の区分を集めたが、その生理単位は 14.4u/mg でこれは生理単位から考えた純度としては第26報の試料の約 72%, 22u/mg のものを純度 100% と仮定すれば約 65% のものである (実験2 参照)。実験1, 実験2 で得た試料を同時に 3 時間暗室で 2,4-dinitrophenyl 化 (以下 DNP 化と略する) したもの (実験3 参照) を第25, 26報と同様にガラス管中へ封入し、遮光して 110° で 5 時間 6 N 塩酸で加水分解し、その加水分解物をエーテル層移行物と水層残留物に分け、汙紙クロマトグラフィー (以下 PPC と略する) の試料とした (実験4 参照)。この試料をカツオ、マグロの場合と同様に PPC を行なった結果、エーテル層移行物中にマグロの場合は 3 種の DNP-アミノ酸すなわち DNP-Gly, DNP-Phe および DNP-Leu を認め第26報の純度約 90% のマグロの場合と一致したが、Cryst. TA の場合はこれら 3 種の DNP-アミノ酸のほか 2 個の DNP-アミノ酸と思われるスポットを認めた。なお水層残留物を同時に展開し、2,4-dinitrophenol および DNP-ε-Lys の 2 個のスポットを認めた (実験5-1, Fig. 2 参照)。Cryst. TA の場合の 2 個の未知の DNP-アミノ酸のスポットは、それらの Rf 値に近似のものは DNP-Asp, DNP-Glu および DNP-Ser の 3 種のうちの 2 個と推定し、それらを対照として PPC を行なった (実験5-2, Fig. 3 参照)。このうち DNP-Asp および DNP-Ser がよく一致したので、つぎに 2,4-dinitroaniline, 2,4-dinitrophenol, DNP-Leu, DNP-Phe, DNP-Gly, DNP-Ser および DNP-Asp を対照として展開し、Cryst. TA の 5 個のスポットはいずれも対照に用いたこれらの DNP-アミノ酸とよく一致することを確かめた (実験5-3, Fig. 4 参照)。以上の実験から Cryst. TA の N-末端基は 5 種存在し、Leu, Phe, Gly, Ser および Asp で、このうち Leu, Phe および Gly はマグロ・インシュリンに存在するが、他の 2 種すなわち Ser, Asp は Cryst. TA だけにみ存在する。したがって Cryst. TA

* 第26報は衛生試験, 77, 203 (1959)。

** この報告は1958年12月20日 日本薬学会関東支部 12 月第2例会において第26報のマグロ・インシュリンの N-末端基の発表に補足して講演したものである。

がマグロ・インシュリンと他の蛋白質との関係については今後の研究にゆずる。

また Cryst. TA を除いた残りのマグロ・インシュリンを精製した今回の試料は生理単位から考えた純度は約 65 %であったが、第26報で記したマグロ試料(純度約 90%)とN-末端基には差異は認められなかった。

実験の部

実験 1 Cryst. TA の単離とその生理作用：粗ビンナガマグロ・無晶型インシュリン粉末(約 16u/mg)1.5 gをとり第20報と同じ操作を行ない、六面体の結晶性蛋白質60 mgを得た。

この結晶を第20報と同様に第六改正日本薬局方のインシュリン稀釈液に溶かし、20 時間絶食した家兎の耳静脈に注射し、注射後の血糖の量を第20報の場合と比較して Fig. 1 に示す。

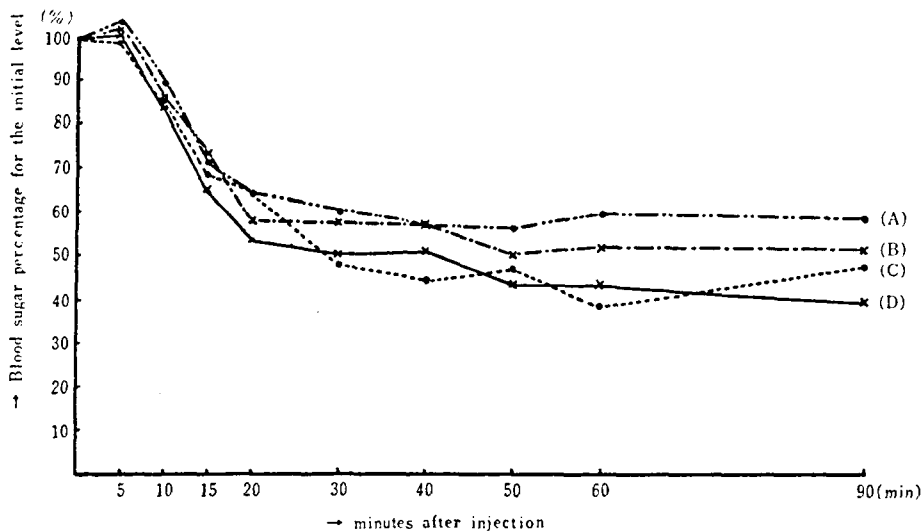


Fig. 1. Assay of blood sugar

(A) ———— : injected 400r/rabbit

(C) : injected 800r/rabbit

(B) —·—×—·— : injected 800r/rabbit

(D) ———×—— : injected 800r/rabbit

These rabbits were fasted for 20 hrs before injection.

(A), (B) : obtained in this experiment

(C), (D) : from the data in our previous report¹⁾

実験 2 Cryst. TA の除去蛋白質の精製：実験 1 において Cryst. TA を単離した残りの粗ビンナガマグロ・無晶型インシュリンを第18報の方法で60%アセトンを加えアルカリ性側から等電点による分割沈澱を行ない、pH 7.3 ~ 6.3 の区分をとりその生理作用を家兎を用い Marks 法で検定した結果 14.4u/mg を得た。本品の性状はほとんど純白色である。

実験 3 Cryst. TA およびその除去蛋白質(実験 2, pH 7.3~6.3の沈澱区分)の DNP 化：それぞれの試料 40 mgずつをとり、第26報と同じ方法により3時間暗室で DNP 化した。

DNP 化した Cryst. TA の黄色沈澱物の収量は 60 mg, 残留マグロ・インシュリン(除去蛋白質と称したもの)の場合のそれは 55 mgであった。

実験 4 DNP-Cryst. TA および DNP-マグロ・インシュリンの酸加水分解：DNP 化物質それぞれ 20 mgをとり第26報と同様に 6N塩酸を用い密封ガラス管中で 110°, 5時間加水分解し、冷後エーテル層移行物と水層残留物に分け PPC の試料とした。

実験 5-1 実験 4 の試料につき第26報の方法により PPCを行なった。そのペーパクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

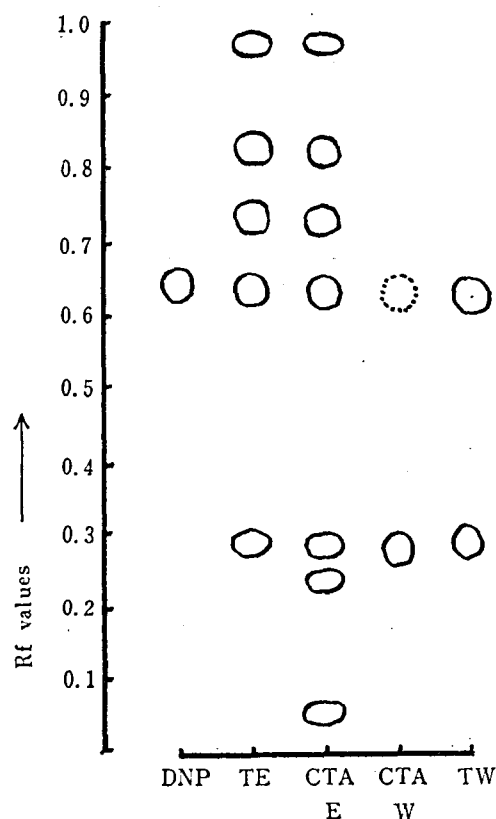


Fig. 2. The paper chromatogram of DNP-amino acids obtained from the acid hydrolysates of the DNP-tunny fish insulin and the DNP-Cryst. TA

DNP: 2,4-dinitrophenol, TE: DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysate of DNP-tunny fish insulin, TW: DNP-amino acids in the water layer obtained from the acid hydrolysate of DNP-tunny fish insulin, CTAE: DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysate of DNP-Cryst. TA, CTAW: DNP-amino acids in the water layer obtained from the acid hydrolysate of DNP-Cryst. TA

Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30:30:11:45]

実験 5-2 Fig. 2 の結果から今回のマグロ・インシュリンは第26報の結果と全く一致したが、DNP-Cryst. TA はマグロの場合のほかに2個の未知のスポットを認めた (R_f : 0.05附近および0.2附近)。これら2個の DNP-アミノ酸と近い R_f 値を示す DNP-アミノ酸として DNP-Asp, DNP-Glu, および DNP-Ser を対照としてふたたび DNP-Cryst. TA のエーテル移行層の PPCを行なった。そのペーパクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

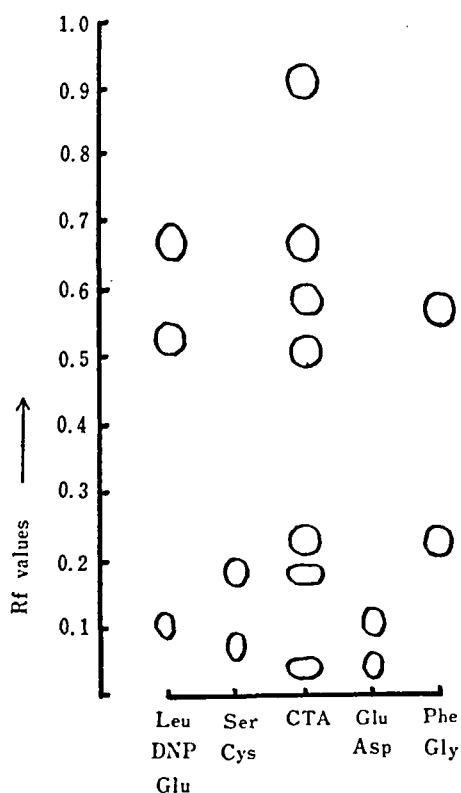


Fig. 3. The paper chromatogram of DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysate of the DNP-Cryst.TA

Leu:DNP-leucine, Glu:DNP-glutamic acid, Ser:DNP-serine, Cys:di-DNP-cystine,

Asp:DNP-aspartic acid, Phe:DNP-phenylalanine, Gly:DNP-glycine, CTA : from DNP-Cryst.TA

Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide)[30:30:11:45]

実験 5-3 Fig. 3 の結果から未知のスポットは DNP-Asp および DNP-Ser を推定されたので 2,4-dinitro-aniline, 2,4-dinitrophenol, DNP-Leu, DNP-Phe, DNP-Gly, DNP-Ser および DNP-Asp を対照として PPC を行なった。そのペーパクロマトグラムを Fig. 4 に示す。

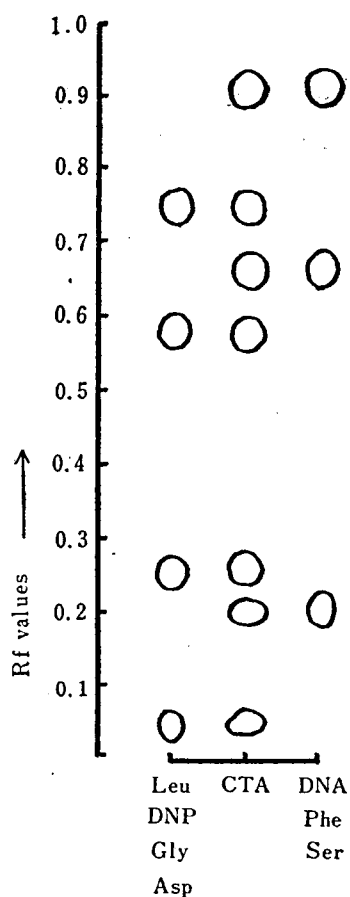


Fig. 4. The paper chromatogram of DNP-amino acids in the ether layer obtained from the acid hydrolysate of the DNP-Cryst.TA

CTA : from DNP-Cryst. TA, Leu: DNP-leucine, Gly: DNP-glycine, Asp : DNP-aspartic acid, Ser : DNP-serine, Phe: DNP-phenylalanine, DNP: 2, 4-dinitrophenol, DNA: 2, 4-dinitroaniline

Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol. pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30:30:11:45]

文 献

- 1) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 75, 95 (1957).
- 2) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 76, 213 (1958).
- 3) Staub, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 214, 619 (1955).
- 4) 長沢佳熊, 西崎笹夫, 佐藤浩, 白井浄二: 衛生試験, 76, 321 (1958).
- 5) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 77, 197 (1959).
- 6) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 77, 203 (1959).
- 7) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 74, 179 (1956).

Summary

The N-terminal residues of amino acids of Cryst. TA were compared with those of tunny fish insulin, reported in our previous report⁶⁾.

On applying DNP-amino acids in ether layer obtained from the acid hydrolysates of DNP-tunny fish insulin and DNP-Cryst. TA to the paper chromatography, 2, 4-dinitroaniline, 2, 4-dinitrophenol, DNP-glycine, DNP-phenylalanine, DNP-leucine were found in the case of tunny fish insulin and were identical to our previous report⁶⁾, whereas, in the case of Cryst. TA, 2, 4-dinitroaniline, 2, 4-dinitrophenol, DNP-glycine, DNP-phenylalanine, DNP-leucine, DNP-serine and DNP-aspartic acid were found. (Exp. 5-1~3, Fig. 1~4). As for the water layer, the both had two spots, one was DNP- ϵ -lysine and the other,

2,4-dinitrophenol (Exp. 5-1). As a result, the authors would suggest that, Cryst. TA has five N-terminal residues, glycine, phenylalanine and leucine, which exist in tunny fish insulin, serine and aspartic acid, which do not exist.

Received June 30, 1959

インシュリンの薬化学的研究 (第28報)*

カツオ・インシュリンの抽出過程における pH 8 の無効な蛋白性
沈澱物の構成アミノ酸の種類およびN-末端基について

長 沢 佳 熊, 西 崎 笹 夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XXVIII.

On the Amino Acid Composition and the Nitrogen Terminal End-Groups of
the Inactive Protein Precipitated at pH 8 from Bonito Fish Stannius Corpuscle.

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

ま え が き と ま と め

著者らは第24報¹⁾においてカツオ・インシュリンの抽出過程における pH8 の蛋白性沈澱物につき物理化学的検討を行ない、特に pH 2.2 の塩酸-塩化カリウム緩衝溶液中でセロファン膜で透析した試料はチゼリウス電気泳動では1成分とみなされ、しかもその泳動速度はウシ・インシュリンのそれよりも速いことを報告した。著者らは第18報²⁾においてカツオ・インシュリンの構成アミノ酸の種類をマグロ、ウシ、クジラのインシュリンと比較して報告し、さらに第25報³⁾においてカツオ・インシュリンのN-末端基が、Gly, Ala および Leu の3種存在することを報告した。今回著者らはカツオ・インシュリンの製造過程におけるいわゆる pH 8 の沈澱蛋白質とカツオ・インシュリンとの関係を知るため、pH 8 の沈澱物の塩酸加水分解を行ない2次元汙紙クロマトグラフィにより構成アミノ酸の種類、および第25報で述べた DNP 法によりN-末端基を検討した。

カツオの Stannius 小体からインシュリンの抽出過程における pH 8 の無効沈澱物を稀塩酸で透析し、汙過後汙液の約半量は構成アミノ酸の種類を検する試料に供し、残りの汙液は2,4-dinitrophenyl 化(以下 DNP 化と略する)し、N-末端基を検する試料とした(実験1参照)。

構成アミノ酸の種類を検するため、12 N塩酸で加水分解し2次元汙紙クロマトグラフィ(以下 PPC と略する)を行ない、得られた15個のスポットを対照に用いたアミノ酸単体のスポットと比較し、それぞれのスポットのアミノ酸を推定するとともにそれらの強さを第18報のカツオ・インシュリンのそれらと比較するとき、Arg, Lys および His のスポットが強く、未分解物と思われる1個のスポットを得たが、Phe のスポットは対照に用いたスポットからは推定することができなかった(実験2, 3, Fig. 1, Table 1 参照)。

またN-末端基に関しては第25報と同じ操作により DNP 化し、そのDNP化物質の5時間の酸加水分解物をエーテル層への移行物と水層残留物に分けたがエーテル層移行物はきわめて少なく、PPC を行なうときエーテル層ではDNP-アミノ酸を検出できず、わずかに 2,4-dinitrophenol のみを微に認めたに過ぎなかった。一方水層残留物中には DNP-ε-Lys のスポットのほか $R_f=0.15$ 附近に1個の黄色のスポットを得たが** これに相当する DNP-アミノ酸は決定できなかった。さらに18時間酸加水分解物についても PPC の結果は5時間加水分解の場合と全く同じであった(実験 4, 5 参照)。

したがって著者らはpH 8 の沈澱物はカツオ・インシュリンと比較しその構成アミノ酸に Arg, Lys および His の占める比率が大きく、なお phe のスポットは明らかに検出されなかったのものでその存在は疑わしい。また N-末端基に関してはそのDNP化物質をカツオと同じ実験条件、およびさらに加水分解したものについても検出し得な

* 第27報は衛生試報, 77, 209 (1959)。

** カツオ、マグロおよび哺乳動物のインシュリンの場合も、まれに展開後しばらくしてこの R_f 値附近に灰黄色のスポットが現われることがある。

ったので N-末端基はきわめて検出し難い分子構造ではないかと推定する。
終りに本研究の原料を提供された日本栄養化学株式会社に謝意を表する。

実験の部

試料：第24報で用いたカツオから抽出した試料と同じもの。

実験 1 pH 8 の沈澱物の精製：試料 300 mg をとり、N/100 塩酸 6 cc を加えセロファン膜内に入れ、外部に N/100 塩酸を満たし 4°C の冷室で 2 昼夜透析した。このときセロファン膜内には帯褐色不溶物を認めた。この液を濾過し、濾液の約半量を水酸化ナトリウム液で約 pH 8 に調節し、得られた沈澱物をアセトン、エーテルで減圧乾燥した。

実験 2 塩酸加水分解：実験 1 により精製した粉末試料約 10 mg をとり、12N 塩酸 5 cc を加え密封ガラス管中で 110~115° の乾燥器へ入れ 18 時間保ち、加水分解した。加水分解後小蒸発皿に移し、水浴上蒸発乾燥を数回繰返し、できるだけ塩酸を除いた。

実験 3 酸加水分解物の PPC：実験 2 の試料を東洋汙紙 No. 51 (40×40cm) で 2 次元 PPC を行なった。最初ブタノール：酢酸：水 = 4 : 1 : 5 で展開し、つぎに 80% フェノールで展開した。展開後 2%-ニンヒドリン-ブタノール溶液を噴霧し、約 100° に数分間加熱し呈色した。そのペーパクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

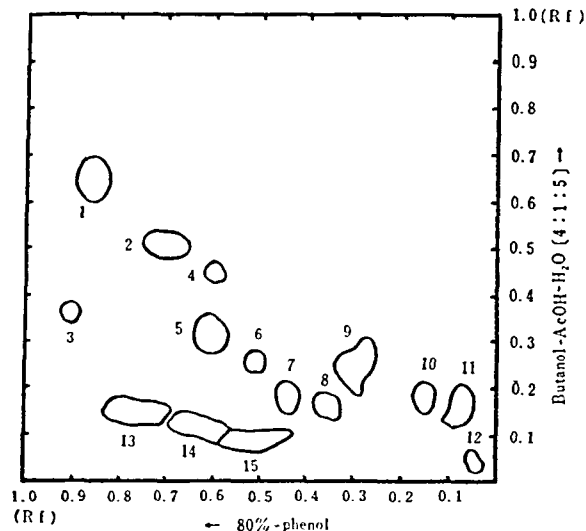


Fig. 1. The paper chromatogram of the acid hydrolysate of inactive protein precipitated at pH 8 from the bonito fish *Stannius Corpuscle*

Numbers of the spots show the spot No. in the first column in the Table 1.

Fig. 1 の結果から推定されるアミノ酸およびそのスポットの強さを第18報のカツオ・インシュリンと比較した。その結果をTable 1に示す。

Table 1. Comparison of the amino acids from the inactive protein and the bonito fish insulin

Spot No.	Inactive protein precipitated at pH 8		Bonito fish insulin
	Amino acid	Strength of spot	Strength of spot
1	Leu, Ileu	+++	+++
2	Val	++	+++
3	Pro	+	++
4	Tyr	+	±
5	Ala	++	+++

Spot No.	Inactive protein precipitated at pH 8		Bonito fish insulin
	Amino acid	Strength of spot	Strength of spot
6	Thr	+	++
7	Gly	++	++
8	Ser	++	++
9	Glu	+++	+++
10	Asp	++	+
11	unknown	+++	—
12	Cys	+	+
13	His	+++	+
14	Arg	+++	+
15	Lys	+++	+
	Phe	?	+++

実験 4 実験 1 の精製物の DNP 化: 実験 1 において記した蛋白質の溶液 2 cc をとり炭酸水素ナトリウム粉末を加えて pH 8 に調節する。これに 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene 0.2 cc を含むアルコール溶液 4 cc を加え 3 時間暗室で DNP 化を行なった。反応した DNP 化物質の黄色沈澱物を水, アルコールおよびエーテルでよく洗い減圧乾燥した (収量約 50 mg)。

実験 5 酸加水分解およびその PPC: (a) 第25報のカツオの場合と同様に DNP 化物質 20 mg をとり, 6N 塩酸 2 cc 加えガラス封管中で 5 時間 110° で加水分解し, 分解後エーテル層移行物および水層残留物に分けたが, エーテル移行物はきわめて少量であった。これらの PPC を行ない, そのペーパクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

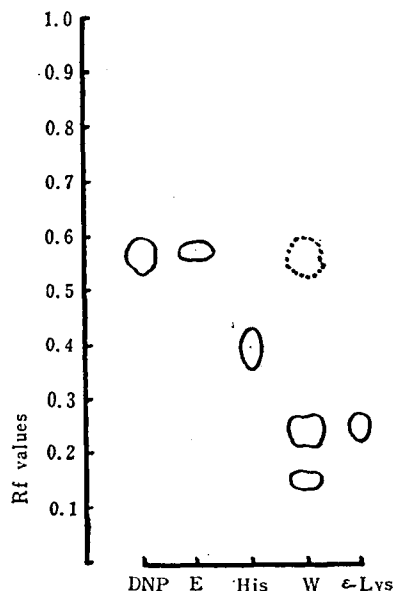


Fig. 2. The paper chromatogram of DNP-amino acids obtained from the acid hydrolysate of the DNP- inactive protein precipitated at pH 8 from the bonito fish Stannius Corpuscle

E: DNP-amino acids in the ether layer, W: DNP-amino acids in the water layer, DNP: 2,4-dinitrophenol, His: di-DNP-histidine, ε-Lys: DNP-ε-lysine

Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol- pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30:30:11:45]

(b) a)の結果から加水分解をさらに18時間行ない、a)と同様に操作したが、そのペーパクロマトグラムは Fig. 2 と全く同じであった。

文 献

- 1) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 76, 221 (1958).
- 2) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 74, 179 (1956).
- 3) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試験, 77, 197 (1959).

Summary

The amino acid composition and the nitrogen terminal end-groups of the inactive protein precipitated at pH 8 from the bonito Stannius Corpuscle were studied.

In comparing the amino acid composition of the inactive protein with that of the bonito fish insulin by the two dimensional paper chromatography, it was found that the spots of histidine, arginine and lysine were larger, and the existence of phenylalanine ere doubtful.

The nitrogen terminal end-groups of the inactive protein was studied by the DNP method described in our previous report³⁾, and any DNP-amino acids could not be found.

Received June 30, 1959

インシュリンの薬化学的研究 (第29報)*

ヒドラジン分解法によるウシ, クジラ, カツオおよび
ビンナガマグロ・インシュリンの C-末端基について

西 崎 笹 夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XXX.

On the Carboxyl Terminal End-Groups of Ox, Whale, Bonito Fish (*Katsuwonnus vagans*) and Tunny Fish (*Thynnus alalunga*) Insulins by Hydrazinolysis.

Sasao NISHIZAKI

まえがきとまとめ

インシュリンの C-末端アミノ酸の分析に関する報告は種々あるが¹⁻⁷⁾, それらの結果はかならずしも一致してない. 例えば Lens は Carboxypeptidase 法により Ala (1~3)¹⁾, Framageot らは LiAlH_4 法により Ala(2), Gly (2), Asp (NH_2) (2)^{2,3)}, Chibnall と Rees は LiBH_4 法により Ala (2), Gly (1), Asp (NH_2)(2), Leu (<1)^{4,5)}, Harris と Li は Carboxypeptidase 法により Ala, Asp (NH_2)⁶⁾, Waley と Watson は Thiohydantoin 法により Ala と報告している⁷⁾.

Sanger ら⁹⁻¹³⁾はウシの結晶インシュリンをはじめ, 種々の哺乳動物から抽出したインシュリンの構成アミノ酸の配列順序を決定したが, それらのインシュリンの C-末端アミノ酸はいずれも Ala と Asp(NH_2) の 2 種であることが明らかになった. 一方赤堀らはヒドラジン分解法により C-末端アミノ酸を分析し, ウシの場合⁸⁾ Gly, Ala, カツオの場合¹⁴⁾ Lys, Gly (Ala) と報告している.

著者は第25報¹⁵⁾において 2,4-dinitrophenyl 化 (以下 DNP 化と略する) 法によりウシおよびクジラの結晶インシュリンを対照としてカツオ・インシュリンの N-末端基を, 第26報¹⁶⁾においてビンナガマグロ・インシュリンの N-末端基を分析したが, ウシおよびクジラの場合 Gly と Phe を得て Sanger らの報告した N-末端基と一致したが, カツオの場合は Gly, Ala および Leu の 3 種, マグロの場合は Gly, Phe および Leu の 3 種を得ることを報告した. 今回は赤堀らのヒドラジン分解法¹⁷⁾によりウシおよびクジラの結晶インシュリンの C-末端基を分析し, Sanger らの報告とよく一致することを確かめ, ついで第25, 26報に述べたと同じカツオおよびビンナガマグロのインシュリンの試料について C-末端基を検討したので報告する.

トルエン共沸蒸留法¹⁸⁾によって得た無水ヒドラジン (純度: 96.0%) (実験1参照) を用い, ウシ, クジラ, カツオおよびビンナガマグロ・インシュリンの試料 30 mg ずつをとりヒドラジン分解標準法¹⁷⁾により DNP-C-末端アミノ酸を得た (実験2, Table 1 参照).

実験2によって得た DNP-アミノ酸を第25報と全く同じ操作により薄紙クロマトグラフィ (以下 PPC と略する) を行なうとき, ウシ, クジラの場合いずれも 3 個の黄色スポットを得た. これらのうち Rf 0.37 附近のスポットは対照に用いた DNP-Ala とよく一致し, Rf 0.53 附近のスポットは対照に用いた 2,4-dinitrophenol とよく一致する. これら 2 個のスポットのほか Rf 0.65 附近のスポットを認めた. また対照に用いた DNP-Gly のスポットは試料中に検出されなかったため, 赤堀らの報告した Gly は C-末端に存在しないと推定した (実験3-1 ~ 2, Fig. 1 参照). 著者は実験3-2の試料の一部をとり, 残部を 6 N 塩酸で加水分解しエーテル層へ移行した部分と実験3-2の試料を同時に PPC を行なった結果, 加水分解前の試料は実験3-2と全く同じ結果を得たが, 加水分解後の試料は Rf 0.65 附近のスポットは認められず, 別に Rf 0.04 附近および Rf 0.11 附近にスポットを検

* 第28報は衛生試験, 77, 215 (1959).

出し、これらは対照に用いた DNP-Asp および DNP-Glu とよく一致し、それらのスポットの強さは前者の方が後者に比し明らかに弱いことを認めた(実験3-3, Fig. 2参照)。ヒドラジン分解を行なうとき、これら2個のスポットは遊離の形で分子内に存在する場合および酸アミドの形でC-末端に存在する場合にのみ生成されることが知られている¹⁷⁾。したがって Sanger らの報告によれば分子内で遊離の形の Glu は4分子存在し、Asp はすべて酸アミドの形をとる。以上の理由から実験3-3によって得られた DNP-Asp はC-末端に存在する Asp(NH₂) 1分子、DNP-Glu は分子内の遊離の Glu 4分子と想定されなければならない。

一方カツオ、マグロの試料につきそれらのヒドラジン分解物の PPC を行なった結果、カツオの場合 DNP-Asp, 微に DNP-Gly, DNP-Ala 附近, di-DNP-Orn*, 2,4-dinitrophenol, ウシ, クジラの場合と全く同じ Rf 値を示す不明のスポット** および微に 2,4-dinitrophenylhydrazine*** のスポットを得、マグロの場合微に DNP-Asp, 微に DNP-Gly, DNP-Thr, DNP-Ala 附近, di-DNP-Orn, 2,4-dinitrophenol, カツオの場合と同じ不明のスポットおよび微に 2,4-dinitrophenylhydrazine を得た(実験3-4, Fig. 3参照)。

実験3-4の試料をウシの場合と全く同様に塩酸加水分解を行ない PPC で展開するとき、カツオの場合、DNP-Asp, DNP-Glu, 微に DNP-Ser と DNP-Gly, DNP-Thr, di-DNP-Orn, 2,4-dinitrophenol および 2,4-dinitrophenylhydrazine を得、マグロの場合、DNP-Asp, DNP-Glu, 微に DNP-Ser と DNP-Gly, DNP-Thr, di-DNP-Orn, 2,4-dinitrophenol および 2,4-dinitrophenylhydrazine を得た(実験3-5, Fig 4参照)。

ウシ, クジラ, カツオおよびマグロの加水分解後の試料を同時に PPC を行なうとき、ウシ, クジラの場合は前述と全く同じく DNP-Asp, DNP-Glu, DNP-Ala および 2,4-dinitrophenol 4個のスポットを認めたが、カツオ, マグロの場合は DNP-Asp, DNP-Glu, 微に DNP-Ser と DNP-Gly, DNP-Thr, di-DNP-Orn, 2,4-dinitrophenol および 2,4-dinitrophenylhydrazine のスポットを得た(実験3-6, Fig 5参照)。

またカツオ, マグロについての2回目の実験試料(BNo.2, TNo.2)も同様の実験をくり返したが1回目とほとんど同じ結果を得た。その加水分解物中にはカツオ, マグロともに DNP-Asp, DNP-Glu, 微に DNP-Gly と DNP-Ser, DNP-Thr, di-DNP-Orn, 2,4-dinitrophenol および 2,4-dinitrophenylhydrazine を得た(実験3-6, Fig. 6参照)。

著者は同様な PPC を数回くり返したがそれらの結果は原点につけた試料の量やその他のわずかの条件の差異によるものか、つねには同一の結果は得られず、その差異はカツオ, マグロにおいては、ウシ, クジラの場合よりとくに著しい傾向を示した。

しかしウシ(O), クジラ(W), カツオ(BNo.1, BNo.2) およびマグロ(TNo.1, TNo.2)の結果を総合的に比較するとき、つぎの知見を得る。

ヒドラジン分解法によりこれらのインシュリンのC-末端アミノ酸を分析するとき、

1) ウシおよびクジラの結晶インシュリンではAlaを検出し、他にSanger らの報告による構造式から Asp(NH₂) の存在を想定した。なおまれにきわめて弱い Ser, Gly のスポットが現われることがある。

2) カツオ・インシュリンでは弱い Ser, Gly を認めた。これらはウシ, クジラの場合に比しやや強いが、他の DNP-Asp, DNP-Glu, DNP-Thr, di-DNP-Orn, 2,4-dinitrophenol, 2,4-dinitrophenylhydrazine に比しかなり弱く、ウシ, クジラの場合にもまれに微に検出されることからヒドラジン分解法により副産物として生じた

* このスポットの Rf 値は DNP-Ala と di-DNP-Lys との中間に位する。蛋白質中の Arg はヒドラジン分解により di-DNP-Orn を生成するとの報告¹⁷⁾があるが、著者は常法により Orn の DNP 化を行ない顕微鏡融点測定法により mp 202° の黄色物質を得た。この融点は Rao¹⁹⁾ らの報告した mp 156~157° とは差があるが PPC の結果1個のスポットを認めその Rf 値がよく一致するので di-DNP-Orn であろうと推定した。

** このスポットは di-DNP-Asp-β-Hydrazide または di-DNP-Glu-α-Hydrazide と推定される(水島, 赤堀篇: 蛋白質化学 IV p. 255)。

*** 2,4-dinitrophenylhydrazine の Rf 値は 2,4-dinitroaniline のそれに近いが、前者はスポットの色調が橙色であるに対し、後者は黄色であるため区別できる。なおこの場合の 2,4-dinitrophenylhydrazine の生成は魚類の場合にことに強い。

ものとする。Ala はきわめてまれにスポットを検出し、di-DNP-Lys は 2,4-dinitrophenol とその Rf 値わずかに小さく 2,4-dinitrophenol を昇華* させた試料についてもなお 2,4-dinitrophenol の附近にスポットを認めることがあったので、それが di-DNP-Lys か 2,4-dinitrophenol の残留物かは断定できなかった。したがって Ala, Lys の存在は疑わしい。むしろ DNP-Ala と DNP-Lys, DNP-Gly と DNP-Ala との中間にスポットを認めることが多いので、これら2個のスポットは対照に用いた di-DNP-Orn, DNP-Thr とその Rf 値がよく一致するため Arg と Thr の存在する可能性がきわめて強いと考える。

3) マクロ・インシュリンに関してはつねにカツオの場合とほとんど同じ結果を得たが未加水分解物の Asp の存在は No.1, No.2 で やや逆の傾向を示した。またカツオの場合に比較し、Thr の存在はきわめて強いと考える。

4) 鎖の中間の遊離の Asp と Glu および C-末端の Asp(NH₂) と Glu(NH₂) は加水分解後すべて Asp, Glu となる。その Asp/Glu の比率はウシ、クジラの場合 Sanger らの報告によれば 1/4 となり著者の追試し得たそれらのスポットの強さとよく共通する。カツオの場合 Asp と Glu とはほとんど同じ強さを示し、マクロの場合は Asp のスポットが Glu のそれより明らかに強くウシ、クジラの場合のそれと全く逆の傾向を示した。このことは鎖の中間の遊離の Asp, Glu, C-末端の Asp(NH₂), Glu(NH₂) の数にそれぞれの種特異性を示すものとして興味深い。

またカツオ、マクロの C-末端における Asp(NH₂), Glu(NH₂) の存在はこの実験からは結論し得ない。

5) 0.65 附近のスポットは酸加水分解によりいずれも消失し、DNP-Asp, DNP-Glu のスポットを認めることからそれらのいずれか、または両者の誘導体であると考えられる。

6) カツオ、マクロの場合の 2,4-dinitrophenylhydrazine はウシ、クジラに比し明らかに強い。(以上実験 3-8, Table 2 参照)。

著者は 1) 第25, 26報でカツオおよびマクロ・インシュリンに3種の N-末端アミノ酸を検出し、しかもそれらのスポットがほとんど同じ強さ**であったことは、微量に混有する不純蛋白によるものではないであろう。2) 過ギ酸酸化により少くとも3種の鎖に分れること²¹⁾。3) C-末端として Arg, Thr そのほか Asp, Asp(NH₂), Glu(NH₂) などが考えられるが、ウシ、クジラのインシュリンと同じものとして、未加水分解試料から Asp があらわれることはかならずしも C-末端の Asp の存在を確認するものではないから、後三者については Asp(NH₂) の存在を仮定した。以上の理由によりカツオおよびマクロのインシュリンの化学構造は Sanger らの報告した哺乳動物のそれ(下図参照)と比較すると、4本の鎖のうち2本はほとんど共通で、他の2本は互に構造の異なるものであろうと推定し、さらに今後の検討にゆずる。

N-末端アミノ酸			C-末端アミノ酸		
ウシ・ クジラ	カツオ	マクロ	ウシ・ クジラ	カツオ	マクロ
Phe	Ala	Phe	Ala	Arg	Arg
Gly	Gly	Gly	Asp(NH ₂)	Asp(NH ₂)	Asp(NH ₂)
Gly	Gly	Gly	Asp(NH ₂)	Asp(NH ₂)	Asp(NH ₂)
Phe	Leu	Leu	Ala	Thr	Thr

さらに 4) 濾紙電気泳動でカツオ・マクロのインシュリンの等電点がアルカリ性側にかたよること²²⁾、および過ギ酸酸化により得た3種の鎖のうち1本がアルカリ性が強いことは²¹⁾、塩基性アミノ酸の多いことが考えられる。

5) Tyr の存在がウシ、クジラの場合4分子に対し、カツオ、マクロの場合3分子²³⁾であろうなどのことが想像される。

本研究に際し終始御懇切な御指導と御校閲を賜った特殊薬品部長長沢佳熊博士に深謝するとともに本研究に御援助いただいた竹中祐典技官に感謝の意を表する。

* 2,4-dinitrophenol は昇華法によりほとんど除去できるという²⁰⁾。

** Sanger らの報告によればこの条件では DNP-Gly の収率は DNP-Leu, DNP-Phe, DNP-Ala の約半量であるという。

実験の部

試料:

ウシ: ウシ・結晶インシュリン (24.5u/mg)

クジラ: クジラ・結晶インシュリン (22u/mg)

カツオ: カツオ・無晶型インシュリン (20u/mg)

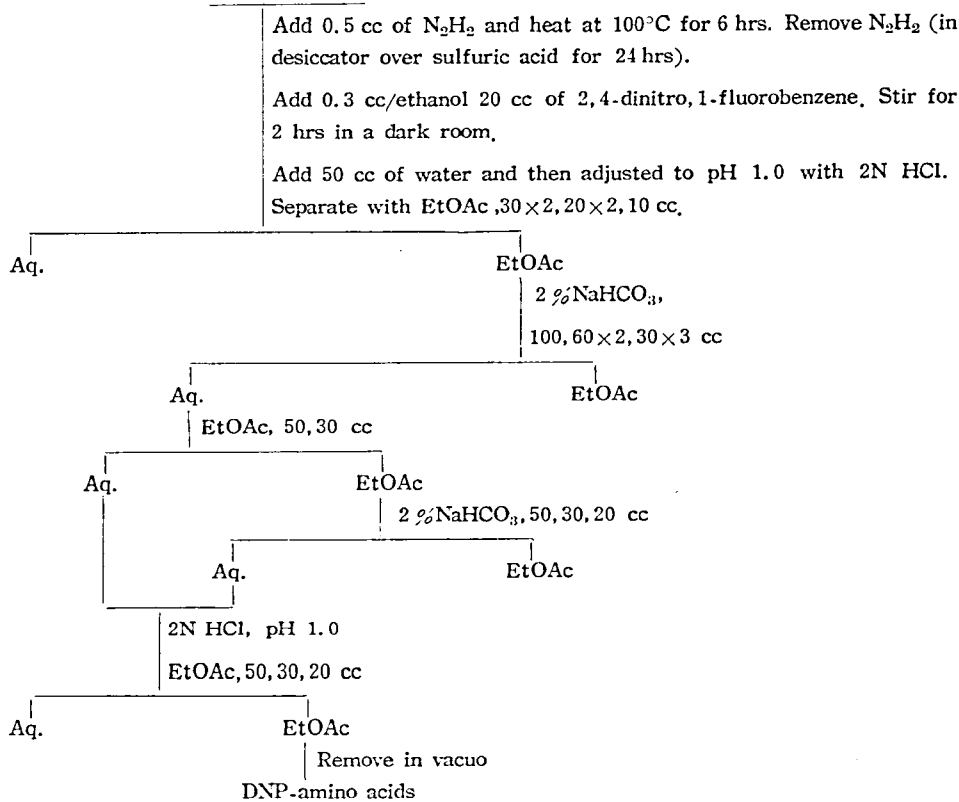
マグロ: ビンナガマグロ・無晶型インシュリン (20.3u/mg)

これらはすべて第25, 26報と同じ試料である。

実験1 無水ヒドラジンの製法: 80%ヒドラジンヒドレート50gをとり, トルエン500g, 生石灰500gと混合し, 密栓して1夜放置後還流冷却器に水酸化ナトリウム管を附し, 3時間加熱したのち蒸留した。93~94°Cの留分の下層を約1ccずつ褐色アンプルに封管し実験に供した。この無水ヒドラジンをアゾメトリで純度を検定し96.0%を得たこの程度の無水ヒドラジンは充分使用できるといわれる¹⁸⁾。

実験2 ウシ, クジラ, カツオおよびマグロ・インシュリンのヒドラジン分解: それぞれの試料30mgをとり Table 1に示す操作にしたがってヒドラジン分解を行ない, DNP-C-末端アミノ酸を得た。その操作を Table 1に示す。

Table 1. Procedure of hydrazinolysis of insulin
insulin 30 mg



なおカツオとマグロの場合両者の結果は完全には一致しなかったためそれらの結果を確かめるため2回ずつ操作を行なった。カツオの場合 BNo.1, BNo.2, マグロの場合 TNo.1, TNo.2 と称することにする。

実験3-1 実験2の試料およびそれらの塩酸加水分解物のPPC: 実験2によって得た DNP-アミノ酸を第25報と全く同じ方法で pH 5.05 の緩衝液を用いる展開溶液により展開した。なおこれらの試料に 6N 塩酸 2cc を加え, 100°C の水浴中で5時間加水分解し, 冷後エーテル層へ移行した試料についても同様に PPC を行なった。

実験 3-2 ウシ、クジラの場合の実験 2 の試料について、DNP-Ala, DNP-Asp, DNP-Gly および 2,4-dinitrophenol を対照として PPC を行なった。そのペーパクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

実験 3-3 実験 3-2 の一部を対照とし、残部を実験 3-1 の方法で塩酸加水分解を行ない、エーテル層への移行物について PPC を行なった。そのペーパクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

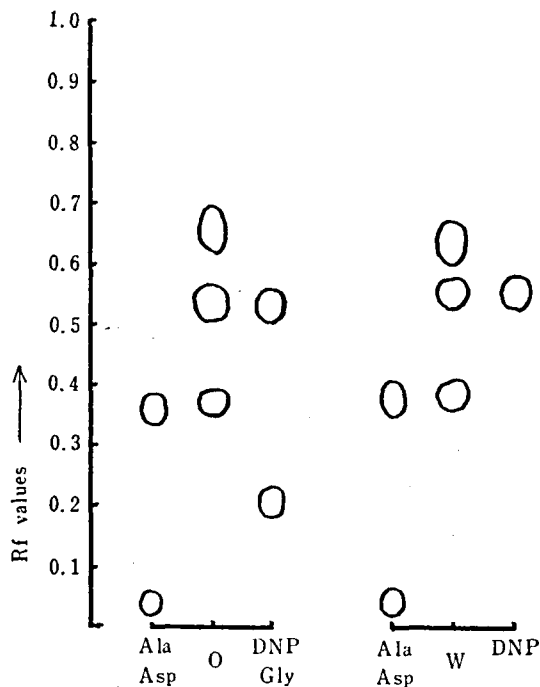


Fig. 1. The paper chromatograms of DNP-amino acids obtained from the hydrazinolysates (see Table 1) of ox (O) and whale (W) insulins

O : DNP-amino acids from ox insulin,
W : DNP-amino acids from whale insulin,
Asp : DNP-aspartic acid, Ala : DNP-alanine,
Gly : DNP-glycine, DNP : 2,4-dinitrophenol
Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol
-pH 5.05 buffer (consists of potassium
bipthalate and sodium hydroxide)
[30 : 30 : 11 : 45]

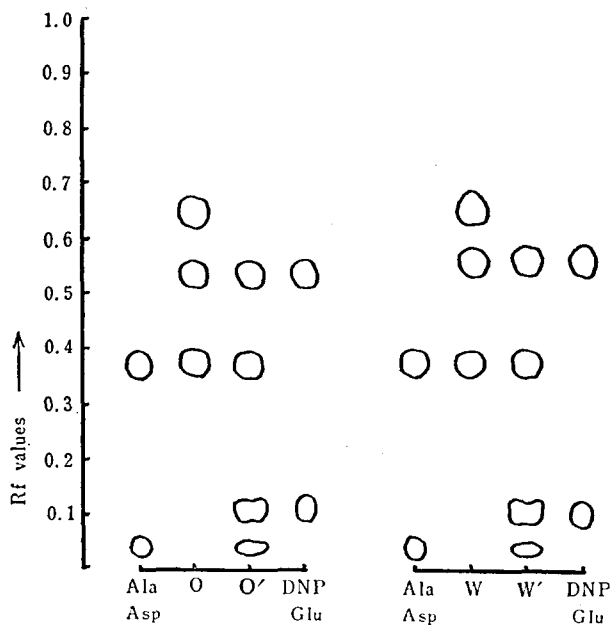


Fig. 2. The paper chromatograms of DNP-amino acids obtained from the acid hydrolysates of (O) and (W) shown in Fig. 1

O, W : see Fig. 1
O' : after hydrolysis of O
W' : after hydrolysis of W
Asp : DNP-aspartic acid, Glu : DNP-glutamic acid, Ala : DNP-alanine, DNP : 2,4-dinitrophenol
Solvent: n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol
-pH 5.05 buffer (consists of potassium
bipthalate and sodium hydroxide)
[30 : 30 : 11 : 45]

実験 3-4 BNo.1, TNo.1 の試料について DNP-Thr, DNP-Ala, di-DNP-Orn および di-DNP-Lys を対照として PPC を行なった。そのペーパクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

実験 3-5 実験 3-4 における BNo.1, TNo.1 の塩酸加水分解を行ない、エーテル層への移行物について di-DNP-Orn, DNP-Ala, DNP-Thr および di-DNP-Lys を対照として PPC を行なった。そのペーパクロマトグラムを Fig. 4 に示す。

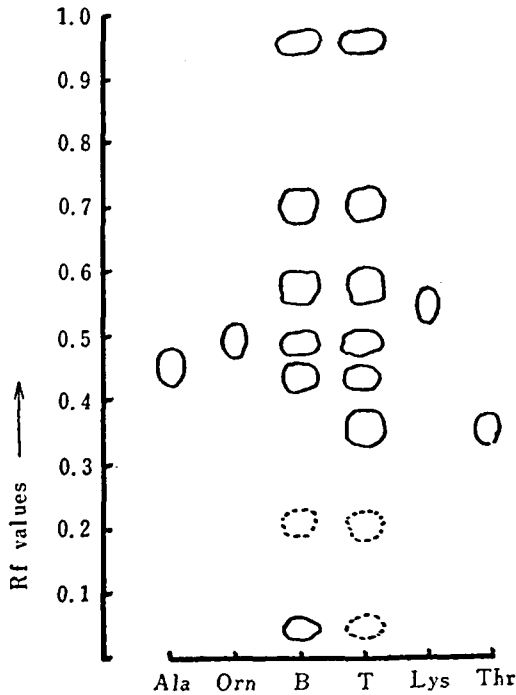


Fig. 3. The paper chromatogram of DNP-amino acids obtained from the hydrazinolysates (see Table 1) of bonito fish and tunny fish insulins B : DNP-amino acids from bonito fish insulin, T : DNP-amino acids from tunny fish insulin, Ala : DNP -alanine, Orn : di-DNP-ornithine, Lys : di-DNP-lysine, Thr : DNP-threonine Solvent : n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

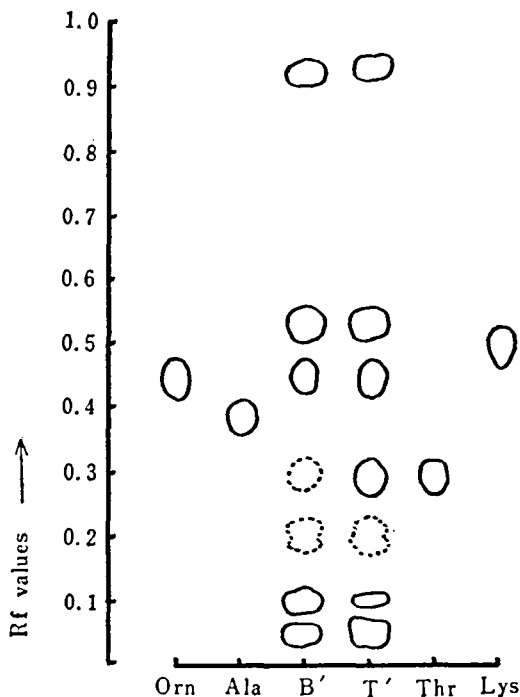


Fig. 4. The paper chromatogram of DNP-amino acids obtained from the acid hydrolysates of (B) and (T) shown in Fig. 3

B, T : see Fig. 3

B' : after hydrolysis of B,

T' : after hydrolysis of T

Lys, Ala, Orn, Thr : see Fig. 3

Solvent : n-Butanol-Isoamyl alcohol-Ethanol-pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

実験 3-6 実験 3-5 における加水分解後の BNo.1, TNo.1 を実験 3-3 における加水分解後のウシ、クジラを
対照として同時に PPC を行なった。そのペーパクロマトグラムを Fig. 5 に示す。

実験 3-7 BNo.2, TNo.2 の塩酸加水分解を行ない、エーテル層への移行物について di-DNP-Lys, DNP-Ala,
di-DNP-Orn および DNP-Thr を対照として PPC を行なった。そのペーパクロマトグラムを Fig. 6 に示す。

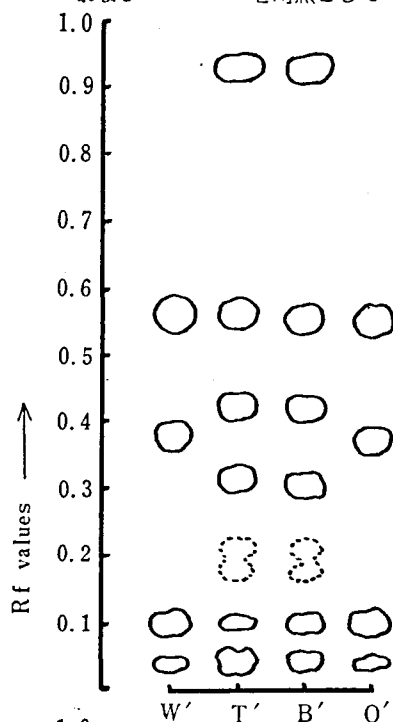


Fig. 5. The paper chromatogram of DNP-amino acids obtained from the acid hydrolysates of hydrazinolysates of ox, whale, bonito fish and tunny fish insulins

O' : from ox insulin, W' : from whale insulin, B' : from bonito fish insulin, T' : from tunny fish insulin
Solvent : n-Butanol-Isoamyl alcohol - Ethanol - pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

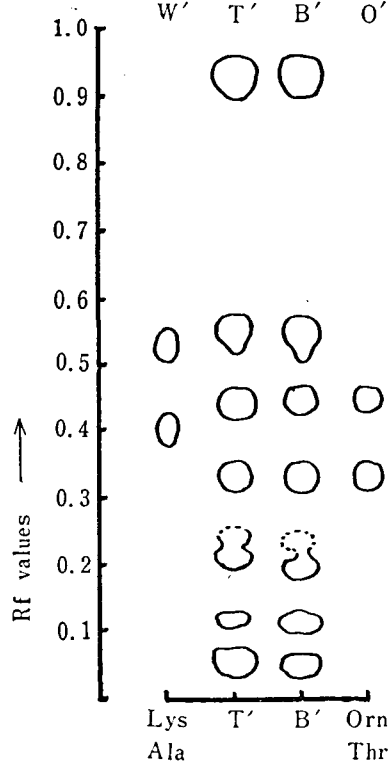


Fig. 6. The paper chromatogram of DNP-amino acids obtained from the acid hydrolysates of hydrazinolysates of bonito fish and tunny fish insulin in Exp. 3-7

B', T' : see Fig. 5

Orn, Ala, Thr, Lys : see Fig. 3

Solvent : n-Butanol-Isoamyl alcohol - Ethanol - pH 5.05 buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide) [30 : 30 : 11 : 45]

実験 3-8 以上の実験を数回くり返すとき, PPC の試料の量およびそのほかのわずかの条件の差異によるもの
と考えるが, 得られた結果は必ずしも一定ではない. この傾向はとくにカツオ, マグロの場合に著明である, それ
ぞれの実験について推定された DNP- アミノ酸のスポットおよびその強さを Table 2 に示す.

Table 2. Spots of DNP-amino acids obtained from the hydrazinolysis of insulins

	Asp	Glu	Ser	Gly	Thr	Ala	Orn	Lys	DNP	Unknown	DNPH**
Rf	0.05	0.10	0.18	0.20	0.30	0.40	0.45	0.52	0.55	0.65	0.93
W	—	—	—	—	—	++	—	—	+++	++	—
O	—	—	—	—	—	++	—	—	+++	++	—
W'	—	—	—	—	—	++	—	—	+++	++	—
W'	+	+++	—	—	—	++	—	—	+++	—	—
O'	—	—	—	—	—	++	—	—	+++	++	—
O'	+	+++	—	—	—	++	—	—	+++	—	—
B No.1	+	—	—	±	±	—	+	—	++	+	±
T No.1	—	—	—	++	—	—	+	—	++	±	+
B No.1	+	—	±	—	—	+	+	—	+++	—	++
T No.1	±	—	±	—	++	+	+	—	+++	—	+
B No.1	+	—	—	—	—	—	+	—	++	+	—
T No.1	±	—	—	—	++	—	+	—	+++	±	+++
B' No.1	++	++	±	±	±	—	+	—	++	—	++
T' No.1	+++	+	±	±	++	—	+	—	++	—	++
B No.2	+	—	±	±	—	+	+	—	+++	+	++
T No.2	++	—	±	±	+	+	+	—	+++	+	++
B' No.1	++	++	±	±	—	—	+	—	+++	—	+++
B' No.2	++	++	±	±	+	+	+	+	++	—	+++
B No.1	+	—	±	—	—	±	+	—	++	+	—
B' No.1	++	++	±	—	—	—	+	—	++	—	+++
B' No.2	++	++	±	±	++	—	+	±	++	—	+++
T' No.2	+++	++	±	±	++	—	+	±	++	—	+++
B' No.2	++	++	+	±	+	—	+	±	++	—	+++
T' No.2	+++	+	+	±	++	—	+	±	++	—	+++
T' No.1	+++	+	±	±	+++	—	—	—	+++	—	+++
T' No.2	+++	+	±	±	++	—	++	+	++	—	+++
B' No.2	++	++	+	±	+	—	+	—	±	—	++
T' No.2	+++	+	+	±	+	—	+	—	±	—	++
O'	+	+++	—	—	—	++	—	—	+++	—	—
W'	+	+++	—	—	—	++	—	—	+++	—	—
B' No.1	++	++	—	—	+	—	+	—	++	—	+++
T' No.1	+++	+	±	—	+++	—	+	—	+++	—	+++
O'	+	+++	—	—	—	+	—	—	+++	—	—
W'	+	+++	—	—	—	+	—	—	+++	—	—
B' No.2	++	++	+	±	+	—	+	—	+++	—	+++
T' No.2	+++	+	+	±	+	—	+	—	+++	—	+++

* see Fig.1~6

** 2,4-dinitrophenylhydrazine

文 献

- 1) Lens, J. : *Biochim. Biophys. Acta*, 3, 367 (1949).
- 2) Framageot, C., Jutisz, M., Meyer, D. and Pénasse, L. : *ibid.*, 6, 283 (1950).
- 3) Jollès, P. and Framageot, C. : *ibid.*, 9, 416 (1952).
- 4) Chibnall, A. C. and Rees, M. W. : *Biochem. J.*, 48, xlvii (1951).
- 5) Chibnall, A. C. and Rees, M. W. : *ibid.*, 52, iii (1952).
- 6) Harris, J. I. and Li, C. H. : *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 2944 (1952).
- 7) Waley, S. G. and Watson, J. : *J. Chem. Soc.*, 1951, 2394.
- 8) 赤堀二郎, 大野光, 成田耕造 : *Bull. Chem. Soc. Japan*, 25, 214 (1952).
- 9) Sanger, F. and Tuppy, H. : *Biochem. J.*, 49, 463, 481 (1951).
- 10) Sanger, F. and Thompson, E. O. P. : *ibid.*, 53, 353, 366 (1953).
- 11) Sanger, F., Thompson, E. O. P. and Kitai, R. : *ibid.*, 59, 509 (1955).
- 12) Brown, H., Sanger, F. and Kitai, R. : *ibid.*, 60, 556 (1955).
- 13) Harris, J. I., Sanger, F. and Naughton, M. A. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 427 (1956).
- 14) 赤堀二郎, 大野光 : 第二回国際生化学会パリ, 1952年7月.
- 15) 長沢佳熊, 西崎笹夫 : 衛生試験, 77, 197 (1959).
- 16) 長沢佳熊, 西崎笹夫 : 衛生試験, 77, 203 (1959).
- 17) 日本化学会篇 : 実験化学講座, No. 23, I, p. 204 丸善 (1957).
Akabori, S. et al. : *Bull. Chem. Soc. Japan*, 29, 507 (1956).
水島, 赤堀篇 : 蛋白質化学, IV, p. 250 共立出版 (1956).
- 18) Kusama, K. : *J. Biochem. Japan*, 44, 375 (1957).
- 19) Rao, K. R. and Sober, H. A. : *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 1328 (1954).
- 20) 佐竹一夫, 奥山典生 : 化学の領域増刊, 34, 67 (1958) 南江堂.
- 21) 西崎笹夫 : 衛生試験, 77, 431 (1959).
- 22) 西崎笹夫 : 衛生試験, 77, 439 (1959).
- 23) 西崎笹夫 : 衛生試験, 77, 433 (1959).

Summary

The C-terminal residues of amino acids of ox, whale, bonito and tunny fish insulin were studied by the method of hydrazinolysis described by Akabori et al.

On applying DNP-amino acids obtained through the procedure of hydrazinolysis (see Table 1) to the paper chromatography, three spots, DNP-Ala, 2,4-dinitrophenol and unknown were found in the case of ox and whale insulin, whereas DNP-Asp (seldom), DNP-Ser (faint), DNP-Gly (faint), DNP-Thr, DNP-Ala (seldom), di-DNP-Orn, 2,4-dinitrophenol, unknown and 2,4-dinitrophenylhydrazide were found in the case of bonito and tunny fish insulin.

In the hydrolysates of these hydrazinolysates, DNP-Asp, DNP-Glu, DNP-Ala and 2,4-dinitrophenol were found in the ox and whale insulin, DNP-Asp, DNP-Glu, DNP-Ser (faint), DNP-Gly (faint), DNP-Thr, di-DNP-Orn, 2,4-dinitrophenol and 2,4-dinitrophenylhydrazide were found in bonito and tunny fish insulin.

In the ox and whale insulin, Asp(NH₂) and Ala were found as the C-terminal residues of amino acids. This result agrees with Sanger's report. In the bonito and tunny fish insulin, Arg and Thr were found, but Asp(NH₂) and Glu(NH₂) could not be certainly confirmed.

Received June 30, 1959