

目 次

報 文

アンチピリン誘導体の分析的応用に関する研究 (第2報)

4-formylantipyrine を用いるパラアミノサリチル酸ナトリウムまたは

カルシウム中のメタアミノフェノールの比色定量.....守田 実... 1

2, 2'-dimethyl-5, 5'-diethyl-4, 4'-azopyridine 1, 1'-dioxide および

2, 2'-dimethyl-5, 5'-diethyl-4, 4'-azopyridine のポーラログラフィー.....守田 実... 3

有機化合物のポーラログラフによる研究

(第21報) PCNB および DNOC の交直ポーラログラフィー.....佐藤 寿... 8

(第22報) DDT およびそれら関連ニトロ化合物の交直ポーラログラフィー.....佐藤 寿... 10

定電位電解法の研究 (第6報)

EDTA を用いる銀パラジウム合金の電解分析.....辻 楠雄... 13

p- ジオキサンと酢酸との会合 (ラマンスペクトルによる研究 第3報).....鹿島 哲... 15

氷酢酸・トルエン混合溶媒を用いる

カイニン酸の非水溶液滴定 (非水溶液滴定の研究 第17報).....鹿島 哲... 18

3-acetyl-4-hydroxycoumarin および

dehydroacetic acid の pKa について.....足立 透・江島 昭... 20

麻薬類の薄層クロマトグラフィー (第1報)

あへん製剤中のアルカロイドの検出.....高橋一徳・水町彰吾・朝比奈晴世... 23

尿中麻薬の検出について (第2報).....大野昌子・朝比奈晴世... 26

インシュリンの薬化学的研究 (第30報)

等電点沈澱法による精製カツオおよびマグロ・インシュリンの

N- 末端アミノ酸と化学構造について.....西崎笹夫... 30

インシュリンの薬化学的研究 (第31報)

Crystal TA のN- および C- 末端アミノ酸について.....西崎笹夫... 34

卵胞ホルモンの研究 (第13報)

クリーム中のエストロンの比色定量法.....長沢佳熊・越村栄之助・木村俊夫... 36

薬剤耐性因子の伝達におよぼす培地の影響.....岩原繁雄・小島満子... 38

資 料

赤外吸収スペクトル測定における二、三の工夫.....大場琢磨・河端五郎... 41

解熱鎮痛剤中のフェナセチンの定量法の改良.....辻 章夫・中村晃忠... 42

第七改正日本薬局方パラアミノサリチル酸カルシウム,

パラアミノサリチル酸ナトリウムおよび

その製剤の定量法について.....辻 章夫・中村晃忠... 43

日本薬局方プロテイン銀定量法の検討.....斎藤恵美子... 44

製剤中のグルクロン酸の定量.....中島辰己・吉村 淳・西本喜重... 45

ネオビタミン A 混在時のビタミン A 定量法の選択.....小川俊太郎・小林 正... 47

クロロフェノール類中の PCP の分析.....河合 聡・近藤常功・時枝妙子... 49

ペンタクロロフェノールおよび

関連化合物の薄層クロマトグラフィー.....鈴木郁生・加藤せえ... 51

昭和 37 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... 53

コールドパーマメントウェーブ用

第2剤の処理効果について.....市川重春・南城 実・狩野静雄... 54

歯磨中の ABS の試験について.....市川重春・南城 実・狩野静雄... 55

II

カラムクロマトグラフィーによる

法定化粧品用タル色素(一部)の分離……………森 秀将・横山 剛・浜田和子… 57
 飲料水中の微量フェノールの定量について……………藤井正道・島峯皇彦… 60
 灯台飲料用天水中の ⁹⁰Sr の定量……………長沢佳熊・城戸靖雅・池淵秀治… 62
 水中の放射性物質除去装置の性能試験成績について……………長沢佳熊・城戸靖雅・時本好子・
 市場克也…………… 71

昭和 37 年 (1962) 産茶葉の ⁹⁰Sr および

¹³⁷Cs の汚染について……………長沢佳熊・亀谷勝昭… 73

昭和 37 年 (1962) 度に製造された粉乳の

⁹⁰Sr および ¹³⁷Cs の汚染について……………長沢佳熊・亀谷勝昭… 77

食品中の農薬の残留と中性洗剤による

洗浄効果について……………川城 岐・岡田太郎・辰濃 隆・
 藤巻昌子…………… 78

輸入食品の人工着色料について (第 4 報) ……………細貝祐太郎・天野立爾・武見和子… 80

食品添加物の消長について (第 1 報) 乾果物中の亜硫酸……………川城 岐・川田公平・福沢富美・
 細貝祐太郎・天野立爾・武見和子… 81

医療用プラスチックに関する研究 (第 6 報)

総 プラスチック製注射筒について……………藤井正道・佐藤 寿・堀部 隆・
 島峯皇彦・竹内 勝…………… 83

医療用プラスチックに関する研究 (第 7 報)

医療用塩化ビニールについて (その I) ……………藤井正道・佐藤 寿・堀部 隆・
 竹内 勝…………… 85

歯科用セメント中のヒ素含有量について……………藤井正道・堀部 隆・石塚弘章… 87

マロン酸処理内毒素の反覆投与について……………石関忠一・岩原繁雄… 89

赤痢菌感染実験に際しおこったサル糞便内細菌叢ならびに

生時・感染死後における腸管各部位の細菌叢について……………林 長男… 90

benzophenone 誘導体より spiran 環への微生物転換の試み……………名取信策・宇田川俊一… 93

殺菌剤によるカビ胞子の細胞変化の電子顕微鏡的観察 (第 1 報)

Aspergillus 分生胞子の正常微細構造……………一戸正勝・松島 崇・倉田 浩… 95

癌および細菌に対する化学療法剤のスクリーニング試験成績 (第 4 報)

主として含窒素異項環化合物について (4) ……………宮沢文雄・橋本泰而・岩原繁雄・
 板井孝信・鈴木郁生・佐子 茂・
 神谷庄造・夏目幸子・中島利章・
 大草源三…………… 98

真菌に対する化学療法剤のスクリーニング試験成績 (第 1 報)

主として含窒素異項環化合物について……………岩原繁雄・倉田 浩・稲垣尚起・
 板井孝信・鈴木郁生・神谷庄造・
 中島利章……………101

インスタント食品の細菌および真菌汚染度について……………衛生微生物部…102

抄 録……………105

講演要旨……………124

衛試例会……………129

国家検定, 国家検査などの試験成績報告……………131

日本薬局方標準品および国立衛生試験所標準品……………140

薬用植物栽培試験場報告

報 文

春日部において栽培された若干の

麻黄のアルカロイド含有量について (続報)川谷豊彦・藤田早苗之助・久保木憲人・
真木義次.....147

放射線照射のケシの発芽におよぼす影響.....川谷豊彦・藤田早苗之助...148

放射線照射がケシのアヘン生産におよぼす影響 (第1報)川谷豊彦・藤田早苗之助・大野忠郎...150

ブルガリア産 *Artemisia maritima* L. var. *salina* Koch の

試作栽培について.....川谷豊彦・大野忠郎...153

春日部における *Duboisia myoporoides* R. Br. の

栽培について.....川谷豊彦・藤田早苗之助・久保木憲人・
原 定雄・真木義次.....156

ガラタミン原料としてのナツズイセンの

試作栽培について.....川谷豊彦・石原活磨・大野忠郎...159

Rauwolfia 属植物とくに印度蛇木 (*R. serpentina* Benth.) の

種子の発芽に関する研究 (第5報)

硫酸処理が印度蛇木の種子の発芽におよぼす影響.....宮崎幸男・五太子小太郎...163

伊豆における *Rauwolfia* 属植物とくに印度蛇木

(*R. serpentina* Benth.) の栽培試験 (第5報)

圃場における3年生および4年生株の成績.....宮崎幸男・五太子小太郎...165

伊豆におけるココアの栽培試験 (第2報)

温室内においてしゃ光がココアの生育, 収量,

コカイン含量におよぼす影響.....宮崎幸男・渡辺宏之...167

伊豆におけるガラタミン含有植物の栽培試験 (第1報)

ショウキラン (*Lycoris aurea* Herb.), ナツズイセン (*L. squamigera* Maxim.),

スノーフレック (*Leucojum aestivum* L.), スノードロップ (*Galanthus nivalis* L.) の

1961~1962年における一般生育状態.....宮崎幸男・五太子小太郎...172

伊豆におけるガラタミン含有植物の栽培試験 (第2報)

温室内においてしゃ光がショウキラン (*Lycoris aurea* Herb.)

の生育ならびに収量におよぼす影響.....宮崎幸男・五太子小太郎...176

資 料

春日部におけるカンゾウの試作栽培について.....川谷豊彦・大野忠郎・石原活磨・
逸見誠三郎.....180

放射線照射の印度蛇木の発芽におよぼす影響 (続報)川谷豊彦・逸見誠三郎...181

ミシマサイコの病害について (第1報)

根および葉からの病原菌の分離.....倉田 浩・藤田早苗之助...182

ミシマサイコの病害について (第2報)

分離糸状菌の病原性.....倉田 浩・藤田早苗之助...184

種子島における印度蛇木の栽培試験 (第4報)

4年生植物の月別収穫の成績.....高城正勝...186

抄 録

インシュリンの薬化学的研究 (第 30 報)*
等電点沈殿法による精製カツオおよびマグロ・インシュ
リンの N- 末端アミノ酸と化学構造について

西 崎 笹 夫

著者らは第 15 報¹⁾ によって精製した魚類・インシュリンの N- 末端アミノ酸は、カツオ・インシュリンの場合²⁾ には Gly, Ala および Leu または Ileu を、ビンナガマグロ・インシュリンの場合³⁾ には Gly, Val** および Ileu または Ileu を検出し、C-末端アミノ酸は両者について Arg, Lys および Asp (NH₂)** を検出した⁴⁾。

本報においては、これらのインシュリンの N- 末端アミノ酸について比色分析を行なって定量した (実験 1)。

また Leu と Ileu とについては、濾紙クロマトグラフィーのみでは明らかに区別し得ないので、微生物学的検定法を適用した (実験 2)。

著者は前報^{5), 6)} において魚類・インシュリンの等電点が哺乳動物・インシュリンのそれより塩基性を示すことを述べ、さらに魚類・インシュリンの過ギ酸酸化物について 3 種のペプチド鎖を認めたが、今回はカツオおよびマグロのインシュリン分子を構成するペプチド鎖の特性を明らかにするため、Harris⁷⁾ らの方法にはば準じてカツオおよびマグロのインシュリンの過ギ酸酸化物の濾紙電気泳動を行なった (実験 3)。

なお以上の実験結果から魚類・インシュリンの化学構造についても論ずる。

実 験 の 部

実験 1. カツオおよびマグロ・インシュリンの N-末端アミノ酸の定量

構造の明らかにされたウシ・結晶インシュリンを対照として用い、以下の実験を行なった。

i) 実験試料:

ウシ・結晶インシュリン: 24.5 u/mg

カツオ***・インシュリン: 20.8 u/mg

マグロ****・インシュリン: 20.3 u/mg

以上の試料からの DNP- インシュリンの調製は前報⁸⁾ に準じた。

ii) 定量操作: DNP- ウシ, DNP- カツオおよび DNP- マグロ・インシュリンをそれぞれ 1 回の実験について 5.0 mg (DNP- インシュリン中の単体インシュリンを 80% と仮定し⁹⁾, 魚類・インシュリンの分子量を哺乳動物のそれと同じく 6,000 と想定するとき, 0.67 μmole に相当) をとり, 5.7 N- 塩酸を加えてガラス閉管中で 135° で加水分解した。なお加水分解時間は各試料について 5 時間または 7 時間とし, 加水分解液中のエーテル可溶性区分について第 25 報⁹⁾ で述べたと同じ方法で濾紙クロマトグラフィーを行なった。クロマトグラム上の各 DNP- アミノ酸の黄色バンドを 1% 炭酸水素ナトリウム溶液を用いて溶出し, 360 mμ における吸光度を測定して, 各 DNP- アミノ酸の分子吸光係数¹⁰⁾ からそれらの μmole 数 (x) を次式によって算出した。

$$x (\mu \text{mole}) = \frac{E}{\epsilon_m / 10^5} \times V / 1,000$$

E: 分光光度計の読み; $-\log T$

ϵ_m : DNP- アミノ酸の分子吸光係数

V: バンドの溶出に用いた溶媒の体積 (ml)

iii) 定量値の補正および実験結果: 前述の定量値に対して, 各 DNP-アミノ酸約 1 μmole ずつをとり, 試料の場合と同じ条件での回収率を求めて (Table 1.* 参照), 補正した。各インシュリン 1 mole 当りの N-末端アミノ酸の mole 数を Table 1 に示す。

実験 2. 微生物学的検定法による DNP-Leu と DNP-Ileu との判別

* 第 29 報は西崎笹夫: 衛生試験, 77, 219(1959)

本報の大部分は昭和 35 年 12 月, 日本薬学会関東支部例会において講演した。またその一部は竹中祐典技官によって, Produits Pharmaceutiques, 17, 421(1962) に紹介された。アミノ酸の略号は第 25 報⁹⁾ に準じた。

** 昭和 37 年 9 月, 日本薬学会関東支部例会¹⁴⁾ において, 第 26 報³⁾ で報告したマグロ・インシュリンの N- 末端アミノ酸のうち Phe を Val に, また第 29 報⁴⁾ において述べた C- 末端アミノ酸の Thr は構成アミノ酸にそれを認めないので除くことに訂正した。

*** *Katsuwonus vagans*.

**** 主としてビンナガマグロ; *Thynnus alauanga* で, キハダマグロ; *Neothunnus macropterus* の 1 部を含む。

Table 1. N-terminal amino acid residue content* (mole/mole) of bovine, bonito fish and tunny fish insulins, by dinitrophenylation.

Species of insulin	Time of hydrolysis** (hr)	DNP-Ileu	DNP-Phe	DNP-Val	DNP-Ala	DNP-Gly
Bovine	5	—	1.05	—	—	1.10
	7	—	1.08	—	—	1.07
Bonito fish	5	0.41	—	—	0.42	0.84
	7	0.43	—	—	0.42	0.95
Tunny fish	5	0.34	—	0.49	—	0.95
	7	0.36	—	0.42	—	0.81

* These values were corrected by the recovery co-efficient shown in the following: DNP-Ileu; 0.51, 0.34 DNP-Phe; 0.55, 0.39 DNP-Val; 0.55, 0.39 DNP-Ala; 0.46, 0.28 DNP-Gly; 0.22, 0.09

** Hydrolyzed at 135°, in a sealed glass tube, with 5.7 N-HCl

i) 試料の調整: DNP-カツオ, DNP- マグロ・インシュリンそれぞれ 50 mg をとり, それらの塩酸加水分解物のうちエーテル可溶性 DNP- 化合物について実験 1 と同じ方法によって浮紙クロマトグラフィーを行なった. DNP-Leu または DNP-Ileu のバンドを 1% 炭酸水素ナトリウム溶液を用いて溶出し, 溶出液を塩酸性としたのちエーテルを用いて抽出し, 抽出液からエーテルを減圧留去した. 残留物にアンモニア水 (28%) 2 ml を加え, ガラス閉管中で 8 時間, 100° の水浴上で反応させた液について, 再び浮紙クロマトグラフィーを行ない, 無色の遊離アミノ酸 (Rf: 0.3, 1 部をニソヒドリンで発色させて検出) バンドのみを熱水で溶出した. これをさらに精製するため, ブタノール: 酢酸: 水 = 4: 1: 5 の溶媒を用

いて浮紙クロマトグラフィーを行ない, Rf: 0.7 近付のバンドを溶出し, 蒸発乾固したものを微生物学的検定法の試料とした. 本試料中には, 菌の発育を阻止するおそれのある DNP- 化合物はほとんど含まない.

ii) 菌株: *Lactobacillus arabinosus* 17-5

iii) 基礎培地: Dunn の培地組成¹¹⁾ に水を加えて 90 ml とし, 45 ml ずつに 2 分する. Leu の定量を目的とする系列に DL-Ileu 10 mg を, Ileu の定量を目的とする系列に L-Leu 5 mg を加え, 全量を 50 ml とした.

iv) 操作: 前記基礎培地を硬質試験管に 2 ml ずつ分注し, 標準系列溶液および試料溶液を加え, さらに水を加えて個々の試験管の液量を 4 ml とした. 綿せんを付して 123°, 15 ポンド/inch² で 5 分間滅菌し, 冷後 *Lactobacillus arabinosus* 17-5 の 20 倍希釈液 1 滴ずつを各試験管に接種し, 37° で 22 時間培養後 610 m μ で濁度を測定した. Fig. 1 にその検量曲線を示す.

v) 実験結果: Fig. 1 に示した検量曲線において, カツオ・インシュリンについては L-Leu の場合は吸光度が 0.011, 0.010 で陰性, DL-Ileu のそれは 0.264, 0.258 で平均約 12 μ g の DL-Ileu に相当する量を得た. またマグロ・インシュリンについては L-Leu の場合は吸光度が 0.010, 0.011 で陰性, DL-Ileu のそれは 0.220, 0.200 で平均約 10 μ g の DL-Ileu に相当する量を得た. したがって著者らが前報^{2), 3)} で Leu または Ileu であると述べたが, 今回の微生物学的方法によって Ileu であることを確かめた.

実験 3. カツオおよびマグロ・インシュリンの過ギ酸酸化物の浮紙電気泳動法による検討

i) 過ギ酸の調整: 市販特級ギ酸 (85% 以上) 9 容に特級過酸化水素水 (30%) 1 容を加え, 密せんしてよく混和し, 60 分間放置後のものを用いた.

ii) 過ギ酸酸化操作: 試料 0.4~0.5 mg をとり,

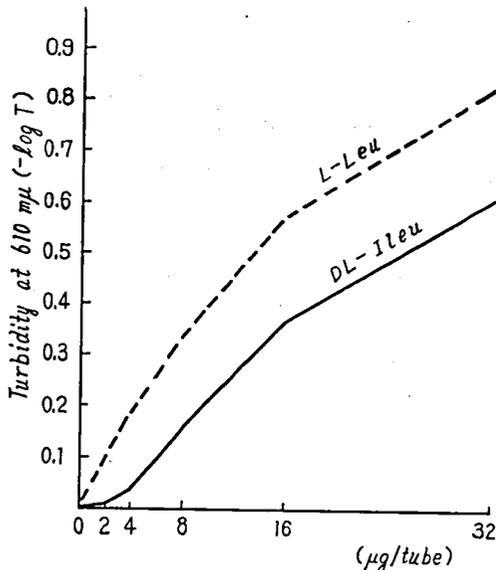


Fig. 1. Calibration curves for determination of leucine and isoleucine by microbioassay.

過ギ酸 0.02 ml を加えて 20 分室温に放置したのち水 0.02 ml を加えて反応を中止した。

iii) 過ギ酸酸化物の濾紙電気泳動: 東洋濾紙 No. 51 を用い、20% ギ酸 (pH 1.3) を泳動溶媒として、前述の過ギ酸酸化物を直接原線につけ、300V/40cm、5時間泳動を行なった。

iv) 発色法: 種々の発色試薬のうち、つぎに示すチロジン試薬¹²⁾ がもっとも適当であった。すなわち、1% α -ニトロソ- β -ナフトール・95% アルコール溶液を噴霧して風乾したのち、10% 硝酸を噴霧して 110° に 5 分間保つとき、チロジンを含むペプチドは紅色を呈した。その泳動図を Fig. 2 に示す。

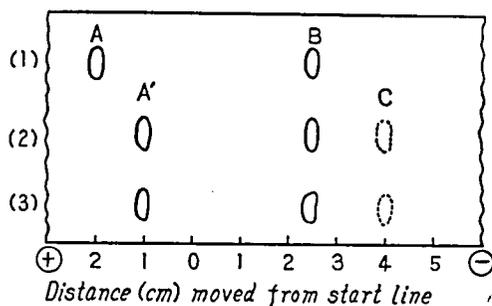


Fig. 2. Electrophoretic patterns of oxidized bovine(1), bonito fish(2) and tunny fish(3) insulins. Solvent: 20% of formic acid solution Voltage: 300 volt/40 cm Time: 5 hr.

v) 実験結果: Fig. 2 からウツ・結晶インシュリンの場合は A, B の 2 本のペプチド鎖を認め Harris⁷⁾ の報告とよく一致した。一方、カツオおよびマグロ・インシュリンの場合はウツの場合の B 鎖と一致するバンドのほか、ウツの場合の A 鎖よりも泳動速度の遅いバンド (A'), および微に B 鎖よりもさらに泳動速度のはやいバンド (C) を検出した。

考察とむすび

著者はカツオおよびマグロ・インシュリンについて N-末端アミノ酸を定量的に分析した。

これら魚類のインシュリンの分子量を哺乳動物のインシュリンのその 2 倍と仮定するとき、カツオ・インシュリン (20.8u/mg) の N-末端アミノ酸として Gly 2 分子, Ala 1 分子および Ileu 1 分子を得、またマグロ・インシュリン (20.3u/mg) では同様に Gly 2 分子, Val 1 分子および Ileu 0.7 分子を得た (Table 1)。

なお C-末端アミノ酸については、カツオおよびマグロ・インシュリンはともに Asp (NH₂), Lys および Arg をすでに認めている⁹⁾。

以上の知見からカツオ、マグロのインシュリンの N-末端アミノ酸に対応する C-末端アミノ酸の組合わせをウツ・結晶インシュリンを対照とするとき Table 2 に示すように想像される。

Table 2. Assumed chemical structures of fish insulins.

Species of insulins	N-terminal amino acids	C-terminal amino acids
Bovine	Gly — S — S — S S S S Phe ————— Ala	Asp(NH ₂)
Bonito fish	Gly — S — S — S S S S Ileu —————	Asp(NH ₂) Arg or Lys
	Gly — S — S — S S S S A'a —————	Asp(NH ₂) Lys or Arg
Tunny fish	Gly — S — S — S S S S Ileu —————	Asp(NH ₂) Arg or Lys
	Gly — S — S — S S S S Val —————	Asp(NH ₂) Lys or Arg

以上の組合わせのうち、カツオ・インシュリンについては I 式と II 式との比率について製造番号の異なるカツオ・インシュリン試料を用いて検討した結果、いずれも近似的に 1:1 にかなりよく一致する。これに対してマグロ類・インシュリンの場合は I 式が II 式の 50~80% を示すことが多い¹³⁾。したがってカツオおよびマグロ・インシュリンは、I 式および II 式が単独に共存するものか、または I 式と II 式がある種の結合をなし、数本のペプチド鎖の集まりが 1 個のインシュリン分子を構成するものとも考えられる。

なお過ギ酸酸化物の濾紙電気泳動実験の結果、カツオおよびマグロ・インシュリンの B 鎖はウツ・インシュリンのそれと泳動速度がきわめてよく似るが、カツオおよびマグロ・インシュリンの A 鎖はウツ・インシュリンのそれよりも明らかに塩基性が強いことを示している。著者は以前にカツオ、マグロのインシュリンの等電点が哺乳動物・インシュリンのそれより塩

基性を示すことを述べたが⁹⁾、今回の実験によって意外にもその原因が主に末端アミノ酸が合致するA鎖に依存することを認めた(実験4)。また魚類・インシュリンの場合のみにしばしば認められる(C)は、インシュリンの生理活性を示さない塩基性のペプチドである¹⁴⁾。

山本、小滝¹⁵⁾らはカツオ・インシュリンについてCM-セルローズクロマトグラフィーを行ない、N-末端アミノ酸の1種にLeuを認めているが、著者の今回の微生物学的検定法の結果からIleuと思われる。また彼らが検出してないC-末端アミノ酸としてのArg⁹⁾は、著者の実験では確実であると思う。

以上の実験結果から、カツオ・インシュリンとマグロ・インシュリンとの間には、N-末端アミノ酸の種類とそれらの比率において差異のあることを認めた。

最近Wilson¹⁶⁾も、魚類のインシュリンについての報告があり、カツオ、マグロおよびカジキマグロ・インシュリンの混合試料について、N-末端アミノ酸としてGly, Ala, Leu および Val を検出しているが、Alaはカツオ、Valはマグロ類・インシュリンのN-末端に存在するものと解釈することによって、Leu以外は著者の得た結果とよく一致する。

終わりに臨み、本研究に当り終始御指導と御鞭撻とさらに原稿の御校閲を賜わった生物化学部長長沢佳熊博士に深謝する。またN-末端アミノ酸の定量に際し、種々有益な御助言を賜った大阪大学たん白質研究所教授成田耕造博士に感謝する。さらに本実験に終始御協力載いた生物化学部竹中祐典技官および微生物学的検定法について御助力を戴いたビタミン化学部江島昭技官に厚く御礼申し上げる。

文 献

- 1) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試報, 74, 171(1956)
- 2) 長沢佳熊, 西崎笹夫: *ibid.*, 77, 197(1959)
- 3) 長沢佳熊, 西崎笹夫: *ibid.*, 77, 203(1959)
- 4) 西崎笹夫: *ibid.*, 77, 219(1959)
- 5) 西崎笹夫: *ibid.*, 77, 437(1959)
- 6) 西崎笹夫: *ibid.*, 77, 431(1959)
- 7) J.I. Harris, F. Sanger and M.A. Naughton: *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 427(1956)
- 8) 長沢佳熊, 西崎笹夫: 衛生試報, 76, 323(1958)

- 9) R.R. Porter, F. Sanger: *Biochem J.*, 42, 287(1948)
- 10) 佐竹一夫, 奥山典生: 化学の領域, 増刊 No.34, p. 86(1958) 南江堂版
- 11) M.S. Dunn, M.N. Camien and S. Shankman: *J. Biol. Chem.*, 163, 577(1946)
- 12) R. Acher and J. Chauvet: *Biochim. Biophys. Acta.*, 12, 487(1953)
- 13) 西崎笹夫: 未発表
- 14) 西崎笹夫: 昭和37年9月, 日本薬学会関東支部例会において講演発表
- 15) M. Yamamoto, A. Kotaki, T. Okuyama and K. Satake: *J. Biochem.*, 48, 84(1960)
- 16) S. Wilson and G.H. Dixon: *Nature.*, 191, 876(1961)

Summary

Pharmaceutical and Chemical Studies on Insulin. XXX. On N-Terminal Amino Acids and Chemical Structures of Bonito Fish and Tunny fish Insulins Purified by Precipitation at Isoelectric Point. Sasao NISHIZAKI

N-Terminal amino acid residues of bonito fish (20.8u/mg) and tunny fish (20.3u/mg) insulins were determined by dinitrophenylation, quantitatively.

It could be found that bonito fish insulin has two mole of glycine, one mole of alanine and one mole of isoleucine, whereas, tunny fish insulin has two mole of glycine, one mole of valine and approximately 0.7 mole of isoleucine as N-terminal. (Exp. 1)

In above experiments, N-terminal isoleucine was identified by microbioassay using *Lactobacillus arabinosus* 17-5. (Exp. 2)

It is suggested that two types (I and II) of insulin were existed in bonito fish and tunny fish insulins, and the author assumed their chemical structures.

And differences in chemical properties from mammalian insulin were found in A-chain from the result of paper electrophoretic patterns of these insulins oxidized with performic acid. (Exp. 3)

The only difference between bonito fish and tunny fish insulin was found in the N-terminal, alanine in the former and valine in the latter.

(昭和38年5月31日受付)

インシュリンの薬化学的研究 (第 31 報)*

Crystal TA の N- および C- 末端アミノ酸について

西 崎 笹 夫

著者らは市販カツオおよびマグロ類・インシュリンから数種の結晶性たん白質を単離したが^{1)~3)}, マグロ類・インシュリンから得た3種の結晶 (Cryst. TA, Cryst. TB および Cryst. TC) はいずれもインシュリンの生理作用をほとんど認めなかった。それらのうち Cryst. TA については若干の生理的および物理化学的性質を報告し^{2), 4), 5)}, さらにその N- 末端アミノ酸を定性的に分析した⁶⁾。

今回著者は Cryst. TA について, DNP- 法によって N- 末端アミノ酸を (実験 1), ヒドラジン分解法によって C- 末端アミノ酸を (実験 2) 定量的に分析した結果を報告する。

実 験 の 部

実験 1. Cryst. TA の N- 末端アミノ酸の定量

DNP-Cryst. TA 5.0 mg をとり, 第 30 報⁷⁾ で述べたとまったく同じ条件と操作に従って N- 末端アミノ酸を定量した。その実験結果を Table 1 に示す。ただし, この結晶性たん白質が, インシュリンと何らかの関連性があるものと予想し, 仮りに分子量の同じ 6,000 と仮定して各 N- 末端アミノ酸のモル数を算出した。

Table 1. N-terminal amino acid residue content* (mole/mole) of Cryst. TA by dinitrophenylation.

DNP-Ileu	DNP-Val	DNP-Gly	DNP-Ser	DNP-Asp
0.15	0.23	0.32	trace	trace

* These values were corrected by the recovery co-efficient cited from Table 1 in the previous paper⁷⁾.

実験 2. Cryst. TA の C- 末端アミノ酸の定量

著者は第 29 報⁸⁾ においてヒドラジン分解法によってインシュリンの C- 末端アミノ酸を分析した際, その濾紙クロマトグラム上のスポットはテイリングしやすく, そのほか若干の C- 末端アミノ酸以外の DNP- 化合物と思われるスポットをしばしば検出することがあった。そこで今回は赤堀ら⁹⁾ によって改良

されたヒドラジン分解法を適用し, 濾紙クロマトグラフィは二次展開を行なった。

1) ヒドラジン分解操作 Cryst. TA 2.76 mg に無水ヒドラジン 0.2 ml を加え, 100° に 6 時間保ったのち, 硫酸デシケーター中で 24 時間減圧にして, 未反応のヒドラジンを除去した。この反応物全量に水 1 ml を加え, さらにベンズアルデヒド 0.2 ml を加えて共せん付き遠沈管中で 2 時間よく振り混ぜたのち, 上澄液を定量的に分取し, 炭酸水素ナトリウム溶液を加えてアルカリ性とし, DNFB を含むエタノール溶液 2 ml を加えて 2 時間 DNP- 化反応を行なった。反応後水 20 ml を加え, さらに 2 N- 塩酸を加えて酸性とし, 酢酸エチル 20 ml を用いて 2 回抽出し, 抽出液に 2 倍量のエーテルを加え, さらに 2%

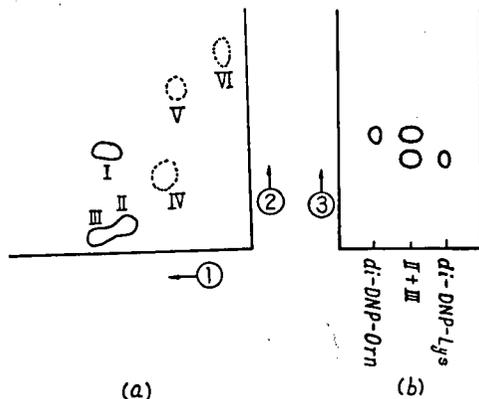


Fig. 1. (a) The paperchromatogram of DNP-compounds in the hydrazinolysate of Cryst. TA (hydrazinolysed for 6 hr) (b) The paper chromatogram of II and III spots isolated from (a)

I : Dinitrophenol II : di-DNP-Orn III : di-DNP-Lys IV : DNP-Gly V : DNP-Ser VI : DNP-Asp

Developer ① n-Butanol saturated with 10% ammonia water

② 1.5 M-phosphate buffer (pH 6.0)

③ n-Butanol : isoamylalcohol : ethanol : pH 5.05 of buffer (consists of potassium biphthalate and sodium hydroxide)

[30 : 30 : 11 : 45]

炭酸水素ナトリウム溶液 50 ml を用いて抽出し、抽出液を酸性としたのち、酢酸エチル 15 ml を用いて 2 回抽出した。酢酸エチルを減圧で留出したものを浮紙クロマトグラフィーの試料とした。

ii) 浮紙クロマトグラフィー 東洋浮紙 No.51 の角型 (40×40 cm) を用い、1 次元はアンモニア水を飽和したブタノールを、2 次元は 1.5 M-リン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて上昇展開し、スポットの定量は第 30 報⁷⁾ に述べた方法に準じた。その浮紙クロマトグラムを Fig. 1 (a) に示す。また di-DNP-Orn と di-DNP-Lys のスポットを再確認するため、比色定量に用いた液を塩酸酸性とし、エーテルを用いて抽出し、抽出液を第 29 報⁷⁾ の方法によって再クロマトグラフィーを行なった。その浮紙クロマトグラムを Fig. 1 (b) に示す。

iii) ヒドラジン分解の補正および実験結果

単体の Lys, Arg それぞれ約 1 μmol をとり、前述のヒドラジン分解法とまったく同じ操作によって得られた DNP-アミノ酸を定量して回収率を求めて (Table 2,* 参照) 補正を行なった。その実験結果を Table 2 に示す。

Table 2. C-terminal amino acid residue content* (mole/mole) of Cryst TA, by hydrazinolysis.

di-DNP-Lys	di-DNP-Orn	DNP-Gly	DNP-Ser	DNP-Asp
0.62	0.38	trace	trace	trace

* These values were corrected by the recovery co-efficient shown in following. Lys: 0.25 Arg: 0.21 (as di-DNP-Orn)

考察とむすび

Cryst. TA の N- および C- 末端アミノ酸を定量的に分析した。

N- 末端アミノ酸については、Ileu, Val および Gly を認め、それらの定量値をマグロ・インシュリン (第 30 報参照) のそれと比較するとき、1/2~1/3 に当たる。また第 27 報において報告した Ser と Asp は定量の結果、きわめて微量であることを知った。

C- 末端アミノ酸については、Arg (di-DNP-Orn として検出) と Lys を認め、その定量値は N- 末端のそれより明らかに大きい。またこれらのほか C- 末端に Asp (NH₂) が存在しないとはいえない。なお N- 末端における Val/Ileu=1.5, C- 末端における Lys/Arg=1.6 で、両者の比率がほぼ一致することは、第 30 報⁷⁾ の結果と関連して考えるとき、マグロ・イン

シュリンの化学構造が N- 末端アミノ酸として Val を有する鎖の C- 末端アミノに酸 Lys が、また N- 末端アミノ酸として Ileu を有する鎖の C- 末端アミノ酸に Arg が存在するのであろう。要するに Cryst. TA は生理的には不活性であるが、その N- 末端および C- 末端アミノ酸は、C- 末端に Asp (NH₂) が存在するものと仮定すればマグロ・インシュリンと一致しているとも想像できることは興味深い。ただし N- 末端アミノ酸の定量値がマグロ・インシュリンのそれよりも小さい値を示すことが明らかな相違点である。

終わりに臨み、本研究に終始御指導と御鞭達を賜わった生物化学部長長沢佳熊博士に深謝する。また本研究の一部は大阪大学蛋白質研究所教授成田耕造博士のもとで行なった。種々有益な御助言を戴いた同教授に謹謝の意を表す。

文 献

- 1) 長沢佳熊, 西崎笹夫, 平岡 孝, 深沢真司: 衛生試報, 75, 95 (1957)
- 2) 長沢佳熊, 西崎笹夫: *ibid*, 76, 213 (1958)
- 3) 長沢佳熊, 西崎笹夫, 竹中祐典, 本間輝武, 平岡 孝: *ibid*, 76, 217 (1958)
- 4) 長沢佳熊, 西崎笹夫, 佐藤 浩, 白井浄二: *ibid*, 76, 321 (1958)
- 5) 西崎笹夫: *ibid*, 77, 435 (1959)
- 6) 長沢佳熊, 西崎笹夫: *ibid*, 77, 209 (1959)
- 7) 西崎笹夫: *ibid*, 81, 30 (1963)
- 8) 西崎笹夫: *ibid*, 77, 219 (1959)
- 9) 水島, 赤堀編: 蛋白質化学, IV, p. 253 (1956), 共立出版

Summary

Pharmaceutical and Chemical Studies on Insulin. XXXI. On N- and C-Terminal Amino Acids of Cryst. TA. Sasao NISHIZAKI

N- and C-terminal amino acid residues of Cryst. TA were determined by dinitrophenylation and by hydrazinolysis quantitatively, and the results were following.

0.15 mole of isoleucine, 0.23 mole of valine, 0.32 mole of glycine and trace of serine and aspartic acid were found as N-terminal amino acids, and 0.62 mole lysine, 0.38 mole of arginine and trace of glycine, serine and aspartic acid were found as C-terminal.

(昭和38年5月31日受付)