を整理すると、本法における脂肪酸の R_F 値とその構造との関係は概ね次の如く結論することが出来る。

即ちこの方法は逆相クロマトグラフィに属する方法であるから、 R_F 値は低級酸ほど大きく、高級酸ほど小さい。これはヒドロキシザム酸法のような普通のペーパークロマトグラフィにおける色斑の配列とは全く逆の配列を示しているわけで、その脂肪酸相互の R_F 値の差が高級酸部に於て著しいのも普通法と異なるところである。次に不飽和結合および水酸基の存在が R_F 値に及ぼす影響は大きく、同一炭素数の脂肪酸では飽和脂肪酸が最も小さい R_F 値を示し、オキシ不飽和酸が最も大きな R_F 値を示した。即ち同一炭素数の脂肪酸の場合について、 R_F 値の小さいものから順に列べてみると次の如き一般的な系列が得られる。

飽和酸 < モノエチレン酸 < デエチレン酸 < トリエチレン酸 (共軛) < モノアセチレン酸 < トリエチレン酸 < オキシモノエチレン酸

なおエルシン酸とブラシデン酸の場合を除き、一般に幾何異性体間の R_F 値の差は僅少である。

(1) 井上吉之, 野田万次郎: 農化, 26, 634 (昭 2)。

(2) J.S. FRANKEL and J.B. BROWN: *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 415 (1943)。

Summary

To provide a simple method for the separation and identification of the component fatty acids of fats, the study of the paper chromatography of unsaturated higher fatty acids was made by using the reversed-phase technique which was developed in the preceding paper [Y. INOUE and M. NODA: *This Journal*, 26, 634 (1952).]. The R_F values for fourteen unsaturated acids given with the suitable solvent systems, methanol-petroleum hydrocarbon or methanol-acetone-petroleum hydrocarbon, were measured. For detection of fatty acids on the chromatograms, a solution of 0.2% bromocresol green in alcohol was generally used, while either 2% iodine in alcohol or WIJS' iodine monochloride solution was useful to detect only unsaturated fatty acids. Therefore by pairing these spray reagents, it becomes easier to distinguish the spots of unsaturated from that of saturated acids on the paper chromatograms.

On the effects of structure of the fatty acids upon the R_F values, the following generalizations can be made in the descending chromatography with methanol-petroleum hydrocarbon system. Generally, the longer the aliphatic chain of a fatty acid, the lower the R_F value. With acids of equal chain length, increasing the number of double or triple bonds and hydroxyl groups also increases R_F value: saturated < monoethenoid < diethenoid < triethenoid (conj.) < monoethinoid < triethenoid < hydroxymonoethenoid acids. Differences in R_F values between *cis*- and *trans*-isomers are slight in general cases.

The method is suitable for the analysis of the component fatty acids of natural fats.

生体内に於ける蛋白質の合成機作に関する研究 (第 4 報)

蚕兒五齡中の Alkali Phosphatase の変化について

板橋宏子, 小出英興, 志村憲助 (東北大学農学部生物化学研究室)

昭和 27 年 2 月 2 日 受理

Studies on the Protein Synthesis. Part 4. Alkali Phosphatase in Blood and Silk glands of Silkworm

By Hiroko ITABASHI, Fusaoki KOIDE, and Kensuke SHIMURA

(Biochemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai)

緒言 組織化学的研究から蛋白質合成と関連のある細胞や組織中には多量の phosphatase⁽¹⁾⁽²⁾ が見出され、又その activity は歯の成長⁽³⁾、骨⁽⁴⁾、毛髪⁽⁵⁾⁽⁶⁾の成長、コラーゲン形成⁽⁷⁾⁽⁸⁾等にも関係を有する事が見出された。壊血病のモルモットではコラーゲン形成部の傷が回復しなかつたが、アスコルビン酸給与後 phosphatase が現われ、繊維結締組織の回復の行われたこと⁽⁸⁾、又皮の傷の回復⁽⁷⁾は phosphatase が繊維組織再生と高度に関連し、完全に回復した後は弱く普通の細胞程度であつた。BRADFIELD⁽⁹⁾ は alkali phosphatase は

多くの繊維蛋白質の形成に関係している事を示し, JEENER⁽¹⁰⁾によつて支持された。BRADFIELD⁽¹¹⁾は蜘蛛と蚕の絹糸腺で核蛋白質と蛋白質分泌に関係ある事を示し, SULKIN 等⁽¹²⁾は回復中の肝臓の alkali phosphatase は核と細胞質に於て増すことを認めている。ANTONIO⁽¹³⁾によるとこの phosphatase は繊維蛋白質の合成, リボ核酸が蛋白質合成と分化に関係あるといつている。

生体内に於ける蛋白質合成に核酸が関係する事は CASPERSSON^(14,15)等の細胞化学的研究により更に確らしくなつて来た。特に細胞質に於る盛な蛋白質合成とリボ核酸の代謝との関係については現在の所はほぼ確実な証明が与えられたかに見える。EULER 等⁽¹⁶⁾はネズミの JENSEN 肉腫について核酸分子の新しい合成には、予め存在する分子の分解を伴うことを認め、核酸分解酵素 (Nucleotidase) は alkali phosphatase であらうと推定されている⁽¹⁷⁾。

又 alkali phosphatase は fructose-1-phosphate, fructose-6-phosphate, galactose-6-phosphate と glycerol-phosphate の合成⁽¹⁸⁾にも関与し、中村氏⁽¹⁹⁾は蚕体中に hexosediphosphatase, α -, β -glycerophosphatase, diphenylpyrophosphatase の存在並に至適 pH が 9.6 である事を報告している。

更に alkali phosphatase の賦活剤としてアスコルビン酸とマグネシウムが知られているが、アスコルビン酸については上記 DANIELLI⁽⁸⁾ 等の実験により、或は第 2 報⁽²⁰⁾に於て我々が示した如く蛋白質の生成を促進する事が明らかとなつた。又マグネシウムに関しても第 2 報に於て既に蛋白質の合成を促進する事を報告したが、又井上氏等⁽²¹⁾は蚕児体液無機物中の含量を定量し、盛蚕期に於て最大なる事を認めている。

以上の如く alkali phosphatase は蛋白質の合成と密接に関係するが、我々は従来の組織化学的方法とは別に Péter B'ALINT 等⁽²²⁾の方法に準じ di-Na-phenylphosphate を基質として遊離する phenol を FOLIN 試薬⁽²³⁾にて定量し、蚕児五令中の体液、中部糸腺、後部糸腺中の alkali phosphatase 作用と絹糸腺に於ける蛋白質合成作用と如何なる関係にあるかを見た。

実 験 の 部

I. 体液中の Alkali phosphatase 作用

a. 実験方法： 蚕児は前報と同じく日 102 × 支 114 号なる品種を用い、給桑 1 時間後のものを実験に供した。基質 di-Na-phenylphosphate⁽²⁴⁾ (純度 97%) M/100 溶液 (2.18 g を 1 l に溶解) 2 cc と、veronal buffer (pH 9.0, 0.0133 M MgCl₂ 添加) 4 cc を試験管に取り、37° の水浴中に 5 分間保つ。これに蚕の体液*

Table 1. Alkali phosphatase activity of the blood during the 5th larval stage. (pH 9.0, 37°C, 1 hour)

Date	Days in 5th instar	Liberated phenol (mg)
Sept. 8th	1	0.049
9	2	0.037
10	3	0.055
11	4	0.099
12	5	0.060
13	6	0.045
14	7	0.018
15	8	0.036

0.1 cc を加え、37° に 1 時間静置後取り出して直に冷し、Folin 試薬** (phenol 試薬) 1.9 cc を加え、10 分後東洋濾紙 No. 5c にて濾過し、濾液 5 cc をとり 25% 無水炭酸ソーダ液 1.25 cc を加え、37° に 10 分間保つて発色せしめ、Pulfrich Photometer filter S 72 を用いて測定した。

b. 実験結果： 第 1 表に示す通りで、5 令第 1, 2 日目は弱い、3 日目より強くなり 4 日目が最高で 5 日目より下り始めている。之は絹糸腺の蛋白質合成

が 4, 5 日目に最大の activity を示すことと平行した関係にある。

II. 中部糸腺の Alk. phosphatase 作用

a. 実験方法： 方法は体液の場合と同じであるが、酵素液の調整は 1), 中部糸腺全体の activity 測定の場合は蚕児を前記塩類溶液を 3 倍に稀釈したもので解剖し、中部糸腺全体をとり、別器の塩類溶液で洗い、濾紙

* 体液の採取は蚕の尾角を切り、小さい蚕は出るだけ全部、大きいのは 1 匹より 15 滴を 3~5 匹よりとり、硝子容器に入れ、細い硝子棒で混和した。

実験は蚕児 5 齢第 1, 2 日目は 7 匹より、以後は 3 匹について 2 組づつ 1 日 2 回実験を行った。

** Folin 試薬： タングステン酸ソーダ Na₂WO₄·2H₂O 100 g, モリブデン酸ソーダ Na₂MoO₄·2H₂O 25 g を 700 cc の水に溶し、85% 燐酸 50 cc, 濃塩酸 100 cc を加え、逆流冷却器をつけて 10 時間静かに沸騰させ、冷してから硫酸リチウム 150 g, 水 50 cc, 臭素数滴を加え、冷却器なしで 15 分間沸騰させて過剰の臭素を除き、水を加えて 1 l にしたものの。

で軽く水分を除いた後秤量し、冷 veronal buffer 2 cc の入った homogenizer で氷冷しつつ homogenize する。2) 中部糸腺外側のみの測定の場合は中部糸腺の寒天状内容物を除去したる後採取秤量し、1) と同様に homogenize する。

実験は 5 令第 1, 2 日は 8 匹より、以後は大体 4 匹について 2 組ずつ 1 日 2 度測定を行った。

Table 2. Alkali phosphatase activity of the middle- and posterior silk glands during the 5th larval stage. (pH 9.0, 37°C, 1 hour)

Date	Days in 5th instar	Liberated phenol in mg per one gram of tissue		
		whole middle gland	middle gland tissue*	posterior gland
Sept. 26 th	2	0.000		0.400
" 27 "	3	0.249		0.450
" 28 "	4	0.310		0.155
" 29 "	5	0.102	0.515	0.554
" 30 "	6	0.158	0.318	0.290
Oct. 1 "	7	0.060	0.206	0.099
" 2 "	8	0.060	0.147	0.327

* The contents in gland cavity was omitted.

Table 3. Alkali phosphatase activity of the middle- and posterior silk glands during the 5th larval stage. (pH 9.0, 37°C, 1 hour)

Date	Days in 5th instar	Liberated phenol in mg per one gram of tissue		
		whole middle gland	middle gland tissue*	posterior gland
Oct. 3 id	1	0.327		0.424
" 4	2	0.274		0.468
" 5	3	0.000		0.222
" 6	4	0.086		0.370
" 7	5	0.244	0.626	0.411
" 8	6	0.167	0.473	0.357
" 9	7	0.112	0.495	0.428
" 10	8	0.078	0.361	0.122
" 11	9	0.064	0.422	0.143

* The contents in gland cavity was omitted.

漸次増大して第 4 日目に最高値を示し、以後再び減少した。

3. 中部糸腺全体の homogenate の phosphatase 作用は第 2 日目又は 3 日目に僅少となり、再び 4, 5 日目に増大し体液と同じく第 5 日目附近に最高値を示した。又内容物を除去した中部糸腺組織の homogenate の phosphatase 作用は第 5 日目以後のものを測定したが、第 5 日目が最高値を示した。

4. 後部糸腺の alk. phosphatase は 5 令第 3, 4 日目に一旦小となり、再び第 4 日目又は 5 日目に強くなり、7 日目及び 8 日目に於て急激に弱くなる。

5. 以上の結果から体液・中部及び後部糸腺の alk. phosphatase 作用は糸腺に於る蛋白質合成作用の activity とほぼ平行関係にある如く見做されるが、中部糸腺及び後部糸腺に於て 5 令第 2 日目及び 3 日目に作用が著しく低下する現象、或は実際に phosphatase 作用が加水分解的に働いているのか、その逆反応即ち phosphate bond 形成に関与している等の問題に関しては今後の研究に俟たねばならない。

* これ以前のものは腺組織のみを取出すことは困難である。

b. 実験結果： 第 2 表及び第 3 表に示した如く中部糸腺全体を homogenize した場合には、5 令第 2 又は 3 日目附近で極めて低い値を一旦示し、以後第 4, 第 5 日目迄は次第に増加し、熟蚕に近づくに従つて再び減少する。併しこの際に同時に内容物の著しい蓄積が行われているから、実際に腺組織そのものの phosphatase 作用をも見なければならぬ。第 2 及び第 3 表に 5 日目以後*の絹糸腺のみを homogenize した場合の値を示したが第 5 日目に於て phosphatase 作用が最も強いことは明らかである。以上の結果から中部糸腺の phosphatase は第 5 日目前後に最も強くなるのではないかと推定される。

III. 後部糸腺の Alk. phosphatase 作用

a. 実験方法： 中部糸腺と同様にして採取秤量しそのまま homogenize して用いた。

実験は第 1, 2 日は 10 匹ずつ、以後は 4 乃至 2 匹使用し、2 組ずつ 1 日 2 度実験を行った。

b. 実験結果： 第 2 及び第 3 表に見る如く phosphatase 作用は 5 令初期は比較的強く、第 3 日目又は第 4 日目に一旦著しく下つた後再び増大し、第 5 日目以後は漸次減少の傾向にある。

綜 括

1. 蚕児 5 令中に於ける体液・中部糸腺及び後部糸腺の alk. phosphatase 作用を測定した。

2. 体液の phosphatase 作用は 5 令の日数と共に

- (1) E. W. DEMPSEY and G. B. WISLOCKI : *J. Cellular Comp. Physiol.*, 26, 25 (1945).
- (2) F. MOOG : *Biochem. Revs. Cambridge. Phil. Soc.*, 21, 41 (1946).
- (3) G. BEVELANDER and P. L. JOHNSON : *Phil. Soc.*, 21, 41 (1946).
- (4) G. H. BOURNE : *Quart. J. Exptl. Physiol.* 32, 1 (1943).
- (5) P. L. JOHNSON, E. O. BUTOCHER and G.

- BEVELANDER *Anat. Record*, 93, 355 (1945).
- (6) P. C. JOHNSON and G. BEVELANDER : *Anat. Record*, 95, 193 (1946).
- (7) H. B. FELL and J. F. DANIELLI : *Brit. J. Exptl. Path.*, 24, 196 (1943).
- (8) J. F. DANIELLI, H. B. FELL and E. HODICEK : *Brit. J. Exptl. Path.*, 26, 3671 (1945).
- (9) J. R. G. BRADFIELD *Nature*, 157, 876 (1946).
- (10) R. JEENER : *Nature*, 159, 578 (1947).
- (11) R. G. BRADFIELD ; *Proc. 6th. Intern. Congr. Exptl. Cytol., Stockholm*, 1947; *Exptl. Cell. Research, Suppl.*, 1, 338~55 (1949).
- (12) N. M. SULKIN and J. H. GORDEN : *Anat. Record*, 100, 143~57 (1948).
- (13) M. ANTONIO *Riv. biol. (Pemgia)*, 42, 295~313 (1950).
- (14) T. CASPERSSON : *Naturwiss.*, 29, 33 (1941).
- (15) T. CASPERSSON : *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, 1, 127 (1947).
- (16) H. V. EULER and G. HEVESY : *Arkiv Kemi, Mineral, Geol.*, A, 17, No. 3 (1944).
- (17) 神前武和 酵素学, p. 252, 256.
- (18) O. MEYERHOF and H. GREEN : *J. Biol. Chem.*, 178, 655~57 (1949).
- (19) 中村恒夫 : 京都府立医大, 28, 335~410 (1940).
- (20) 志村憲助, 小出英興, 板橋宏子 : 農化, 27, 1, 5 (1953)
- (21) 井上柳梧, 岩岡末彦, 平沢 勝 : 農会, 23, 322~340 ; 上田蚕同窓報, 8, 1~23.
- (22) PETER BALINT, ISTV'AN KOM'AROMY, and MARIANNE LENNER : *Chem. Abst.*, 43, 4314 g (1949).
- (23) O. FOLIN and V. CIOCALTEN : *J. Biol. Chem.*, 73, 629 (1927).
- (24) H. F. FREEMAN and C. W. COLNER : *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 750~1 (1938).

Summary

1. The activities of alkali phosphatase in blood and middle and posterior silk glands during the 5th larval stage were measured.
2. Alkali phosphatase in blood showed maximal activity at the 4th day of the 5th instar.
3. The activities of alkali phosphatase in middle and posterior silk glands were found to have a peak at the 4th to 5th day of the 5th instar.
4. From these results it appeared that alkali phosphatase was concerned in the protein formation in the silk gland.