II, p. 90.

(7) H. S. RAPEP; *Biochem. J.*, 26, 2000(1932).

(8) M. DAMODARAN and R. RAMAWAMY :

Biochem. J., 31, 136 (1937):

Summary

(1) Melanic pigments were formed by exposure to sunlight from L-tyrosine solutions. As intermediate of the pigmentation, 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) was isolated in crystalline form by buffered solutions and identified by microanalysis, melting point, and other characters.

(2) The detection of the separated DOPA and tyrosine on paper chromatogram was made successfully by spraying the FOLIN's phenol reagent and then exposing to ammoniacal vapor.

(3) The formation of DOPA by the photooxidation of tyrosine was maximal at pH 4~5, but the color development was greatest at pH 6. The mechanism of the phenomenon was explained.

(4) DOPA was relatively stable for the oxidation at lower pH values than 5 and was little destroyed in a room. The oxidation proceeded rapidly at pH 6 or higher with melanization.

(5) Thiourea was preventive for tyrosine-oxidation, but ineffective for DOPA-oxidation.

パントテン酸及び其の誘導體 (第4報)*

Pantethine の合成と Coenzyme A への生合成

舟橋三郎, 宮野真光, 爪谷郁三 (名古屋大学農学部農芸化学科生物化学教室)

— 昭和 28 年 6 月 27 日 受理 —

Pantothenic Acid and Its Derivatives. Part 4. Synthetic Pantethine
and Its Biosynthesis to Coenzyme A.

By Saburô FUNAHASHI, Masateru MIYANO and Ikuzô URITANI (Lab.
of Biol. Chem., Fac. of Agr., University of Nagoya)

或る種の乳酸菌に対する未知の増殖促進因子 (*Lactobacillus Bulgaricus* Factor) の存在は SNELL 等⁽¹⁾によつて指摘され、彼等は此のものが N-D-pantotheryl-2-mercaptoethylamine 又はその disulfide であることを合成的に証明し、それぞれ pantetheine [I], pantethine [II] と命名した⁽²⁾。彼等はパントテン酸メチルエステルと β -mercaptoethylamine [IV] とをアセタミドの存在下にメタノール中で縮合せしめて pantetheine を合成しペーパークロマトグラムの R_F 値、*Lactobacillus helveticus* 等に対する効力、肝酵素によるパントテン酸の脱離反応等が天然物と一致することによつてこれを確認した。その後 BADDILEY 等⁽³⁾は D-pantolactone [III] と N- β -alanyl- β -mercaptoethylamine とを加熱縮合し、WIELAND 等⁽⁴⁾は ethyl pantothencilcarbonate [V] と cystamine hydrochloride とを 2N 苛性曹達で縮合して pantethine を合成した。最近生物化学の領域での中心問題の一つである coenzyme A (CoA) が pantetheine の dinucleotide であることに対して種々の実験的証明が出されてお⁽⁵⁾り、合成による最後の証明を待つ段階にあるが、CoA の作用基 -SH が分子中の pantetheine に由来する点からも pantetheine, pantethine の合成は興味ある問題である。

Pantetheine は合成操作中に酸化されて pantethine の生成を避け得ないので、著者等は bis-(β -aminoethyl)-disulfide (cystamine) とパントテン酸メチルとの縮合を行つた。但し pantethine は pantetheine と同様粘重な硝子様物質であつて、向流分配、溶媒による分別沈殿、イオン交換樹脂による精製等を行つたが分析的純な標品を得ることが出来なかつた。著者等は此の pantethine 合成標品より CoA の生合成を行つた。既に OLSON, KAPLAN⁽⁶⁾は鶯鳥及び鼠の肝 homogenate を用い、パントテン酸添加により CoA の生合成されることを *in vitro* に証明し、又 GOVIER, GIBBON⁽⁷⁾は鳩肝アセトン粉末中に pantethine を CoA に生合成する酵素が存在すること及び LBF そのものは Co 作用のないことを証明し、最近 LEVINTOW, NOVELLI⁽⁸⁾

* 第3報 舟橋, 道: 理研報, 22, 972 (1943).

は鳩肝浸出液による A.T.P. と pantethine よりの CoA 合成は3段階よりなることを各段階の酵素を分離することにより証明している。著者等はマウス或は鳩の肝酵素を apoenzyme として A.T.P. 添加の下に上記合成 pantethine より CoA の生成の有無を KAPLAN, LIPMANN⁽⁹⁾の方法によつて検定したが、添加 pantethine の最高9%が CoA に転化することを認めた。以上の研究終了後 KING 等⁽¹⁰⁾及び WITTLE 等⁽¹¹⁾によつて pantetheine, pantethine の合成報告に接した。Pantetheine 及び pantetheine そのものの精製は依然として困難のようである。

実 験

遊離 Cystamine Cystamine hydrochloride* を出来るだけ少量の水に溶解し、計算量の約 2 倍の苛性曹達を加えて遊離アミンとする。この溶液に炭酸加里を徐徐に加えてゆくと遊離 cystamine は油状になつて分離するから、これをクロロフォルムに溶解し、クロロフォルム溶液を窒素気流中にて濃縮し、最後に真空 (61°) にて乾燥する。空気にふれると直ちに炭酸塩となる故に密栓して冷室中に保存する。

パントテン酸メチルエステル 従来の方法によつて pantolactone [III] と β -alanine との縮合によつても合成したが、最近市販のパントテン酸石灰が比較的安価に入手出来るため、パントテン酸のジアゾメタンによるエステル化をも行つたのでここに述べる。KING, STRONG⁽¹⁴⁾ も同様の方法を採用したようであるが詳細は述べてない。 d -パントテン酸石灰 20.0 g (0.084 モル) を 400 cc の蒸留水に溶解し、Amberite IR-120 を通じて石灰を除去し水で洗滌する。濾液洗液を合して浴温 50° 以下で濃縮してシラップ状とする。完全な脱水は行わなかつた（ラクトン化の可能性がある故に）。100 cc のアセトンに溶解し、氷冷し乍らジアゾメタンのエーテル溶液を徐々に加えて黄色を呈するに到らしめる。数時間室温に放置した後 5% 塩酸を加えて過剰のジアゾメタンを分解し、炭酸加里を加えて充分振盪しながら 1 晩放置後、減圧濃縮し真空乾燥する。粘稠なる淡黄色シラップ状で僅かのアセトン重合体を含有する。収量 15.0 g (76.2%)。ポットスチルにて蒸溜すると少量の前溜液を生ずるが、大部分は 10⁻² mm Hg, 120~125° にて溜出し殆ど残渣を残さない。

Pantethine の合成と精製 Cystamine 1.21 g (0.00795 モル) とパントテン酸メチルエステル 3.34 g (モル) を 50 cc メタノールに一旦溶解した後メタノールを追出して均一な混合物として後、更に 100°, 3 時間、次で 140°, 40 分間加熱する。反応混合物に就て上昇法によりペーパークロマトグラフィを行うと A, B, C の 3 物質を検出し得る (Table 1)。100°, 3 時間の加熱を行つた後の展開では A, B, C がほぼ等モル位検出された (-S-S-反応の強度による) が 140° に加熱した後には大部分が A、一部 B で、C は痕跡となつた。Spot A (主

Table 1. Paper Chromatography of Synthetic Pantethine.

Solvent	<i>R_F</i>			Character of spots	
	<i>n</i> -Butanol saturated with water	<i>n</i> -Butanol : water : acetic acid 4 5 1		S-S- test	-NH ₂ test
Spot A	0.78	0.73		+	-
Spot B	0.52	0.50		+	+
Spot C	0.30	0.32		+	+

Toyo filter paper No. 50 was used. Disulfide group was detected with NaCN-nitroprusside reagent according to the procedure of TOERNIES and KOLB⁽¹²⁾ and amino group with ninhydrin. Spot A has the same *RF* value for pantethine as reported by SNELL *et al.* and BADDILEY⁽³⁾ *et al.* Spot C indicates the presence of cystamine and spot B is presumably considered to be due to mixed disulfide of pantetheine and cysteamine.

* 製法は続報に記載する。

生成物)は文献記載⁽³⁾⁽⁴⁾の pantetheine (展開中に酸化されて pantethine になる)とほぼ一致し, spot C は cystamine の R_F と一致する。B は pantetheine と cystamine との mixed disulfide と思われる。なお -S-S-基の呈色反応は TOENNIES, KOLB⁽¹²⁾の方法に依つて行つたが, 今回のように還元型(-SH 基)を含まぬ場合には文献記載とは逆に, 先ず青酸曹達試薬をかけて後にニトロプルシッド試薬をかける方が遙かに鋭敏である。 -NH₂ 基の呈色としてはニンヒドリンを使用した。

精製: 反応混合物 (3.34 g パントテン酸メチルエステルから出発したもの)を 50 cc の蒸留水に溶解し, Amberite IR-120, IR-4B に通して (この操作によつて spot B, C は完全に消失する)塩基性, 酸性物質を除き, 濾液 (洗滌液を含んで相当多量になつてゐる)を約 50 cc に濃縮し *n*-ブタノール 50 cc にて 2 回抽出しブタノール溶液を濃縮する。かくして得られたシラップを向流抽出法によつて精製した。溶媒としては (飽水ブタノール水), (ブタノール (4) - 水 (5) - 醋酸 (1)), (エタノール (1) - クロロフォルム (1) - 水 (1)) の 3 種類を使用した。Pantethine の peak は (飽水ブタノールと水) にて 19, 20 (24 stages), (ブタノール, 水, 醋酸) にて 12 (18 stages), (エタノール, クロロフォルム, 水) にて 3 (16 stages) の管に認められた。いづれの溶媒を使用しても白色泡沫状の半固体として得られるが, その標品について満足な分析値を得ることは出来なかつた。収量 0.8~1.05 g (0.0014~0.0019 モル, 18~24%)。アルコール溶液からエーテルに依る沈澱を行い, 又は水溶液から不純物のエーテル抽出を行つた後に再び向流抽出を行つても効果は明らかでなかつた。反応後 amberite に通す前に 1 規定アルコール加里で未反応のメチルエステルを加水分解⁽²⁾した場合にも効果は認められず, 遂に分析値を計算値に一致させることは出来なかつた。

反応条件の検討: そこで最初の反応条件を検討するため, 溶媒と還流煮沸時間を変更してみた。即ち *n*-ブタノール溶液として 10 時間, ビリジン溶液として 15 時間 (ビリジン溶液は予期に反してブタノール溶液よりも反応速度が遅かつた), メタノール溶液として 20 時間加熱還流した場合にも大きな差異は認められなかつた。如何なる理由に依るのか不明であるが, 以上の方法で合成した pantethine を analytical pure に精製することは出来なかつた。然し得られたものが pantethine であることは R_F 値の測定, 及び後述する酵素反応に依つて CoA を生成すること等から明かである。

Pantetheine Pantethine 0.511 g (0.00092 モル) を約 50 cc の液体アンモニアに溶解し, 液温 -70° 位に冷却する。時々攪拌しながら 0.046 g (0.0020 モル) のナトリウムを加える。ナトリウムは青色の物質を噴出しながら消失する。液体アンモニアを追出した後 15 cc の蒸留水を加えて残渣を溶解し, 速かに Amberite IR-120 の筒を通し, 濾液を水素気流中で濃縮する。収量 0.46 g (0.00165 モル, 90%)。製品は強いニトロプルシッド反応, ferricyanide-ferric ion 呈色⁽⁶⁾を示し -SH 基に還元されたことを示す。このものに就てペーパークロマトグラフィを行つと前記の pantethine と同一の R_F 値を示す。その Spot は青酸曹達処理によつて始めてニトロプルシッド反応を示すので pantethine である。即ち展開中 (約 10 時間) に酸化されて pantethine になるものと思われる。BADDILEY 等⁽³⁾が報告せる pantetheine の R_F 値 (飽水ブタノールにて 0.7, ブタノール, 水, 醋酸にて 0.75) も恐らく pantethine の値と思う。Pantetheine は醋酸水銀によつて mercaptide を形成し, これを硫化水素で遊離すると pantetheine を更生するがやはり分析値は合致しない。なお LIPMAN 等⁽¹³⁾は CoA の精製過程に亜鉛と 0.5 *N* 塩酸による還元を行つてゐるので, これを応用して pantethine を還元せんとした所, 還元と同時に分解を起して思ひしい結果を得なかつた。

合成 Pantethine から CoA の生合成

酵素液の調製 1) 鳩肝酵素液: - KAPLAN⁽⁹⁾等の方法によりアセトン粉末の 0.02 *M* 重曹溶液による浸出液を用いた。2) マウス肝酵素液: - マウスの肝に 2 倍量の 0.9% KCl 溶液を加えて磨碎, 遠心分離し上澄液を酵素液とした。

反応液の組成 1) 鳩肝酵素液 0.5 cc, 塩化マグネシウム 2.5 μ M, 重曹 50 μ M, pantethine 0.8 μ M, A.T.P. 5.85 μ M, 全量 2 cc 2) マウス肝酵素液 1.0 cc, 塩化マグネシウム 5 μ M, 弗化曹達 30 μ M, 重曹 100 μ M, pantethine 0.4 μ M, A.T.P. 4.7 μ M, 全量 3 cc 但し pantethine は S 含量 (実験分析値 10.28%, 計算値 11.56%) を基準として秤量した。

反応条件 37°, 60 分

処理 1) 反応終了後 0.1 cc NaF (20 μ M) を加え 2 分間煮沸し, 水冷後遠心分離して上澄液 0.3 cc につ

いて KAPLAN 等⁽⁹⁾ の方法により CoA を測定した (Table 2)

2) 反応終了後 3 cc 蒸留水を加え、同様に煮沸、水冷、遠心分離を経て得た上澄液 0.2 cc について CoA を測定した。尚 1), 2) 共に pantethine を含有しない対照区を設け、同様に反応を実施し、次に CoA を測定した。

Table 2. Biosynthesis of CoA from Synthetic Pantethine

Enzyme solution from	Section	Pantethine added		CoA formed		
		(γ calculated as pantothenic acid)	units	calculated γ of pantothenic acid	net value	yield %
pigeon liver acetone powder	pantethine	24.1	2.7	1.89	1.82	7.6
	control	0	0.1	0.07		
mouse liver	pantethine	3.0	0.8	0.56	0.28	9.3
	control	0	0.4	0.28		

CoA was assayed by the procedure of kaplan and Lipmann⁽⁹⁾.

この研究に当り終始協力下さった赤沢堯学兄と CoA の定量を引受けた瓜谷美代子さんに深謝いたします。

此の報告の大意は昭和 28 年 4 月 5 日、日本農芸化学会大会及び同年 5 月 6 日ビタミン学会で講演した。なお本研究の一部は文部省科学研究費によつた。

(1) W. L. WILLIAMS, E. HOFF-JÖRGENSEN and E. E. SNELL, : <i>J. Biol. Chem.</i> , 177, 933 (1949).	(9) N. O. KAPLAN and F. LIPMANN <i>J. Biol. Chem.</i> , 174 37 (1948).
(2) E. E. SNELL <i>et al.</i> <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 72, 5349 (1950).	(10) T. E. KING, C. J. STEWART and V. H. CHELDELIN : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 1920 (1953).
(3) J. BADDILEY and E. M. THAIN : <i>J. Chem. Soc.</i> , 800 (1952).	(11) E. L. WITTLE <i>et al.</i> <i>ibid.</i> , 75, 1694 (1953).
(4) T. WIELAND and E. BOKELMAN : <i>Naturwiss.</i> , 38, 384 (1951).	(12) G. TOENNIES and J. J. KOLB : <i>Anal. Chem.</i> , 23, 823 (1951).
(5) <i>Phosphorus Metabolism</i>	(13) T. D. GREGORY, G. D. NOVELLI and F. LIPMANN. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 74, 854 (1952).
(6) MIRSKY and ANSON : <i>J. Gen. Physiol.</i> , 24 399 (1941).	(14) T. E. KING and F. M. STRONG : <i>J. Biol. Chem.</i> , 189, 315 (1951).
(7) GOVIER and GIBBONS : <i>Arch. Biochem.</i> , 32, 347 (1951).	
(8) LEVINTOW and NOVELLI : <i>Am. Chem. Soc. Meetig</i> (Autumn 1952).	

Summary

Pantethine was synthesized from methyl pantothenate and cystamine by heating at 100~140° for several hours with or without solvent. Attempts to complete purification were unsuccessful, which included solvent precipitation, countercurrent distributions, ionexchange, and regeneration from mercuric mercaptide. The synthetic pantethine was converted into coenzyme A by pigeon or mouse liver enzyme in the presence of A. T. P.

パントテン酸及び其の誘導体 (第 5 報)

Cystamine Hydrochloride の新合成法

舟橋三郎, 宮野真光 (名古屋大学農芸化学科)

昭和 28 年 6 月 27 日 受理

Pantothenic Acid and Its Derivatives. Part 5. A New
Synthesis of Cystamine hydrochloride.

by Saburō FUNAHASHI and Masateru MIYANO.

(Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Nagoya.)

Cysteamine (β -Mercaptoethylamine) [IV], 及びその disulfide 型たる cystamine [V] は coenzyme A, *Lactobacillus bulgaricus* Factor (L.B.F.) 等の構成要素であることが明らかにされた。著者等は L. B.