Summary

The WILLGERODT reaction has been applied to the synthesis of glutaric acid from levulinic acid in two methods ; i) Levulinic acid was heated with sulfur and ammonium polysulfide in an autoclave, and the yield of glutaric acid was 18% of the theoretical amount, ii) levulinic acid and methyl levulinate was heated under reflux with sulfur morpholine. The yield of glutaric acid was 18% from free acid (ca. 1% of succinic acid was obtained as the by-product) and 20% from methyl levulinate. This is one of the few examples which have ever been applied to the aliphatic compounds.

豚の小腸粘膜ペプチダーゼによる Glycyl-L-leucine 分解作用 に及ぼす Mn 及び Co イオンの影響に関する知見

佐藤正一, 赤塚尹己, 栗屋行義 (茨城大学農学部生物化学教室)

昭和 30 年 7 月 30 日 受理

Note on the Effect of Mn and Co Ions upon the Splitting of

Glycyl-L-leucine by the Intestinal Peptidase of Pigs.

By Masakazu SATO, T. AKATSUKA, and Y. AWAYA

(Biochem. Lab., Fac. of Agr., Ibaraki University)

緒 言

著者等は豚の小腸粘膜のグリセリン抽出液をコロジオン膜囊に入れ, S. P. L. SÖRENSEN の減圧透析装置を用いて低温 1° で透析したるに, この透析酵素液による glycyl-L-leucine 分解作用は Mn や Co イオンによりその 1 mM 濃度において賦活されないことを認めた. この関係は同上の水抽出透析液をアセトンで沈澱した酵素の水溶液を用いた場合にも同様であつた.

然るに SMITH, BERGMANN¹⁾ 等の従前の研究によれば, 腸の小腸粘膜のペプチダーゼによる glycyl-L-leucine 分解作用は Mn や Co により賦活されると報告されている. よつて著者等はこの点に不審を抱き, 更に同氏等と同じ酵素液調製法により, 即ち水抽出液をアセトンで沈澱し又はアセトンと硫酸で分別沈澱し然る後これらの沈澱の水抽出液を低温減圧透析して酵素液をつくり, この関係を検討したるに, これらの場合には glycyl-L-leucine 分解作用は Mn や Co イオンにより賦活される事実を確認し, 同氏等の従前の報告と一致することを見た.

ただここに大いに注目すべき点は, 透析酵素液と雖も其の調製法の如何によつては glycyl-L-leucine 分解作用に対する Mn 又は Co イオンの賦活作用に + 又は - の結果を生ずることである (Table 1 参照).

その理由に関しては種種考察されるが, この賦活作用に関する機構が未だ充分に究明されていないのでその発表を保留する. なお glycyl-glycine 及び leucyl-glycine 分解作用に対するこれらの金属イオンの影響について

ても同様な実験を試みたが, これらの場合には酵素の調製法を上述の如く異にしてもさしたる差異は認められなかつた.

実 験 の 部

(I) 酵素液の調製法

(a) グリセリン抽出透析液

豚の腸粘膜 44g に濃グリセリン (88%) 2 倍量 (88 g) を加え, 乳鉢中で磨砕し室温 11° で 1 時間 放置後 遠心分離 (3,500 r. p. m., 15 分) を行い, 上澄液 25cc を得た. この上澄液を

Table. 1. Variations of the Effect of some Metal Ions upon the Splitting of Peptides, according to the Methods of Preparation of Enzyme Extracts.

Enzyme preparations*	Splitting of peptides					
	1 mM Mn			1 mM Co		
	XGL	XGG	XLG	XGL	XGG	XLG
(a) Glycerine extract subjected to dialysis	-	+	+	-	+	
(b) Water extract subjected to dialysis and precipitated by acetone	-			-		
(c) Water extract subjected to dialysis after precipitation by acetone.	+	+	+	+	+	
(d) Water extract subjected to dialysis after fractional precipitation by acetone and (NH ₄) ₂ SO ₄	+		+	+		-

* The detailed descriptions on the methods of enzyme preparations were made on the experimental parts, I and IV.

濾過し、コロジオン膜減圧透析を 1° で 50 時間行い遠沈して沈澱物を除き、得たる上澄液 15 cc に水 10 cc を加え、更に濃グリセリン 25 cc を加えて振盪混和し冷蔵庫中に 1° で保存した。同様な方法で 3 回酵素液を調製した。

(b) 水抽出透析アセトン沈澱酵素液 同上濃グリセリンの代りに水で抽出した粗酵素液 60 cc を低温減圧透析して 20cc とし、遠沈、濾過、得たる上澄液に 2 倍容量のアセトンを冷却しつつ加えて遠沈、沈澱部に水 20 cc を加えて濾過し酵素液を得た。

(c) 水抽出アセトン沈澱透析液 豚の腸粘膜 110 g に海砂 11 g, 水 10 cc を加えて磨碎し、抽出液を遠沈して上澄液を採る、沈澱残渣には再び水 110 cc を加えて磨碎し、抽出液を遠沈し上澄液をとり、両者を合して上澄液 200 cc を得た。これに寒剤で冷却しつつ等量の冷アセトンを加え 10 分後に遠沈して沈澱を減圧濾過し、冷アセトンで洗滌して真空デシケーター中で乾燥する。かくして粗酵素粉末 6 g を得た。この粗酵素粉末 2.5 g を採り水 30 cc 宛で 2 回抽出して遠沈し、上澄液 50 cc を採る。これをコロジオン膜に入れ 1° で 46 時間減圧透析を行い、約 1/3 容となし、再び遠沈して沈澱部を除去し上澄液を採つて酵素液とした。

(d) 水抽出アセトン硫酸分別沈澱透析液 前述 (c) の粗酵素粉末 2.5 g を採り水 30 cc 宛で 2 回抽出後遠沈して上澄液 50 cc を得た。これに硫酸を加えて 40% 飽和とし、遠沈後沈澱部を除去し、上澄液には更に硫酸を加えて 60% 飽和とし、遠沈後沈澱部をとる。この沈澱部を水 25 cc に溶かし、1° で 46 時間、減圧透析を行い約 1/5 容とする。この際生ずる沈澱を遠沈して除去し、上澄液を濾過して酵素液とした。

以上の酵素調製を総括して Table 2 に示す。

Table 2. A Survey of the Enzyme Solutions Prepared,

No. of Enzyme Solns.	I	II	III	IV	V	VI	VII
Date of preparations	1954		1955				
Duration of dialysis, hrs.	24/11	11/12	11/1	14/2	17/4	8/6	11/6
$V_a/V_b = \frac{\text{Volume after Dial.}}{\text{Volume before Dial.}}$	49	50	72	48	72	46	46
pH of enzyme solns.	ca.	ca.	1/3	1/4	1/3	1/5	1/3
Methods of preparation	6.0	6.0	6.0	6.2	6.2	6.2	6.2
	a	a	a	d	b	d	c

(II) 分解基質溶液の調製法 及び分解力測定法

Glycyl-L-leucine (=G-L-L) 及び glycylglycine (=GG) は phthalyl 法⁽²⁾により、DL-leucylglycine (=DL-LG) は FISCHER 法⁽³⁾により合成した。

G-L-L 及び GG の場合は 0.1 M, DL-LG の場合は 0.2 M, 何れも pH 8 の $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ buffer の基質溶液として調製した。即ち

分解力の測定法は従前の報告と同様に LINDERSTRÖM-LANG and SATO の方法⁽⁴⁾によつた。即ち消化混液の全容は 5 cc で消化前後にその 2 cc 宛をとり、N/20 KOH アルコール液で滴定し、消化前後の滴定差を以て酵素力を表わす。

[III] 実験結果

実験結果は Table 3~6 に掲げた。

表 示 記 号

C_S = 消化混液中の分解基質のモル濃度

C_E = 消化混液中の酵素濃度、即ち消化混液 2 cc 中に含まれる酵素液 (原液に相当する) cc 数

Table 4. Effect of Some Metal Ions upon the Splitting of Peptides by Enzyme Solutions Prepared by the Method (b)

Substrate	X				
	No Me.	Co	Mg	Mn	Zn
G-L-L	1.22	0.49	1.20	0.55	0.87

Conditions of digestion: Enzyme No. V, stored for a day at 1°, $C_S = 0.05 \text{ M}$, $C_E = 0.2 \text{ cc}$, $C_G = 0$, $C_M = 1 \text{ mM}$, pH = 8.0, Digested at 40° for 60 min.

Table 3. Effect of Some Metal Ions upon the Splitting of Peptides by Enzyme Solutions prepared by the Method (a)

Substrate	X					Remarks
	No Me.	Co	Mg	Mn	Zn	
G-L-L	0.95	0.65	0.89	0.68	0.81	Enzyme No. I, stored for 5 days at 1°. $t = 60 \text{ min.}$
	1.04	0.32	0.99	0.28	0.88	Enzyme No. II, stored for 4 days at 1°. $t = 60 \text{ min.}$
	0.97	0.19	0.79	0.31	0.16	Enzyme No. II, stored for 9 days at 1°. Phosphate buffer $t = 60 \text{ min.}$
	0.99	0.31	0.81	0.36	1.01	Enzyme No. III, stored for 5 days at 1°. Contact of enzyme and metal ions at 30° for 60 min. before digestion. $t = 60 \text{ min.}$
GG	0.13	0.45	—	0.33	—	Enzyme No. I, stored for 5 days at 1°. $t = 60 \text{ min.}$
DL-LG	1.72	—	—	1.90	—	Enzyme No. I, stored for 5 days at 1°. $t = 60 \text{ min.}$

Conditions of digestion: $C_S = 0.05 \text{ M}$ except for DL-LG where 0.1 M was used. $C_E = 0.4 \text{ cc}$, $C_G = 8.8\%$, $C_M = 1 \text{ mM}$, pH 8.0 (ammonia ammonium chloride buffer except the case marked * where phosphate buffer was used).

Digested at 40° for t minutes as noted in the above table.

C_G = 消化混液中のグリセリン濃度 (%)

C_M = 消化混液中における金属イオンのミリモル濃度

X = 消化混液 2 cc について増加せる carboxyl 基を $N/20$ KOH アルコール液で滴定した cc 数

Table 5. Effect of Some Metal Ions upon the Splitting of Peptides by Enzyme Solutions Prepared by the Method (c)

Substrate	X				
	No Me.	Co	Mg	Mn	Zn
G-L-L	0.38	0.76	—	1.03	—
GG	0.11	0.22	—	0.24	—
DL-LG	1.49	—	1.75	1.77	—

Conditions of digestion: Enzyme No. VII, $C_S=0.05M$ except for DL-LG where $0.1M$ was used. $C_E=0.4cc$, $C_G=5.9\%$, $C_M=1mM$, $pH=8.0$. Digested at 40° for 60 minutes except for DL-LG where 30 minutes were used.

Table 6. Effect of Some Metal Ions upon the Splitting of Peptides by Enzyme Solutions Prepared by the Method (d)

Substrate	X					Remarks
	No Me.	Co	Mg	Mn	Zn	
G-L-L	0.11	0.17	0.17	0.62	0.07	Enzyme No. VI, $C_E=0.5cc$, $C_G=4.4\%$
	0.34	0.55	0.42	1.08	0.17	Enzyme No. IV, $C_E=0.8cc$, $C_G=8.8\%$
DL-LG	0.34	—	0.55	1.14	—	Enzyme No. VI. Stored for a day at 1° . $C_E=0.5cc$, $C_G=4.4\%$
	1.04	0.80	1.07	1.55	0.52	Enzyme No. IV. Stored for a day at 1° . $C_E=0.4cc$, $C_G=4.4\%$

Conditions of digestion: $C_S=0.05M$ except for DL-LG where $0.1M$ was used. $C_M=1mM$, $pH=8.0$

Digested at 40° for 60 minutes in the case of G-L-L and 30 minutes in the case of DL-LG.

(1) E. L. SMITH *J. Biol. Chem.*, 176, 9 (1948).

2) J. C. SHEEHAN and V. S. FRANK *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1856 (1949);
W. GRASSMANN and E. S. UEBBING *Chem. Ber.*, 83, 244 (1950);
K. YAMASHITA and Y. SAHASHI *J. Agr. Chem. Soc. Japan.*, 28, 672 (1954).

(3) E. FISCHER: Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine, Bd. I. II.; M. SATO et. al. *Sci. Rep. Fac. Agr., Ibaraki Univ. Japan*, No. (1) 29 (1953).

(4) K. LINDERSTRÖM-LANG and M. SATO: *Z. physiol. Chem.*, 184, 83 (1929).

Summary

(1) The authors carried out experiments on the effect of Mn and Co ions in a $1mM$ concentration upon the splitting of glycyl-L-leucine by the dialyzed intestinal peptidase of pigs and remarkable variations, whether negative or positive, were found according to the methods of preparation of enzyme extracts.

(2) Negative effects (inhibitions) were obtained in the cases of using either a glycerine extract subjected to dialysis or a water extract subjected to dialysis and precipitated by acetone.

(3) Positive effects (activations) were obtained in the cases of using either a water extract subjected to dialysis after precipitation by acetone or a water extract subjected to dialysis after fractional precipitations by acetone and $(NH_4)_2SO_4$.

In cases (2) and (3), the dialysis was carried out at 1° in a refrigerator under reduced pressure using a collodion sack, following S. P. L. SÖRENSEN.

(4) A survey of these remarkable variations is given in Table 1.

(5) With regard to the explanation of the reason why these remarkable variations, whether negative or positive, occur, the authors have reserved to express their opinions, since mechanism on the activation of the metals upon the splitting of the peptide has not yet been fully clarified.

(6) It should also be noted here that such remarkable variations of the effect are not to be found in the cases of splitting glycylglycine and DL-leucylglycine. (cf Table 3)