carbazide-HCl を用い semicarbazone を得た. 50% アルコールより再結, m. p. 245~248° (dec.) で分析結果 IV の trisemicarbazone に一致する. 然るに FARKSTROP 等は m. p. 225° と報告しており, 我々のと 20° の差があり, これが純度の異によるか又は立体異性体によるのかは目下の所明らかでない. (Analysis: Found C 33.55, 33.66; H 5.20, 4.94; N 43.32. Calcd. for $C_8H_{15}O_3N_9$ C 33.60, H 5.26, N 44.20%. MW (RAST) 311, Calcd. for $C_8H_{15}O_3N_9$ 285)

要 約

フルフラールから 2,5-diethoxy-tetrahydrofurfural diethyl acetal を合成し, これを 0.1 N HCl で開環させて 2-ketoglutaraldehyde を trisemicarbazone として得た.

終りに臨み液体アンモニアの使用に関して御助言を頂いた東北大学工学部応用化学科天笠正孝教授並びに同研究室の山口格氏, オートクレーブを使用させて頂いた東北大学工学部応用理学教室の三井研究室, 並びに元素分析の労を煩した東京大学農学部農芸化学教室分析室の方々に深謝する. なお本研究費の一部は文部省科学研究費に依つたものであり, 附記して謝意を表する. (本報は昭和 30 年 4 月 日本農芸化学会大会で口演した.)

(1) 麻生: 農化, 10, 1189 (1934).	(5) 未発表
(2) 麻生: 農化, 15, 160 (1939).	(6) J. FARKSTROP, D. RALEIGH and L. E.
(3) 麻生: 理研彙報, 18, 171 (1939).	SCHNIEPP <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 72, 869
(4) 麻生: 農化, 15, 251 (1939).	(1950).

Summary

1) 2,5-Diethoxy-dihydrofurfural diethylacetal (II) was prepared from furfural, bromine and ethanol at a low temperature.

2) By using a Raney nickel catalyst at 25°, (II) was hydrogenated to its corresponding 2,5-diethoxy-tetrahydrofurfural diethylacetal (III).

3) By hydrogenation over a Raney nickel at 100°, in the absence of solvent, the product had the formula $C_8H_8O_2$ which might be a carbonyl derivative.

4) The trisemicarbazone of 2-ketoglutaraldehyde was obtained from (III) by hydrolysis with 0.1 N hydrochloric acid followed by addition of the particular reagent made in the usual manner, m. p. 245~248° (dec.), M. W. by RAST 311 (Calcd. 285).

蚕体組織の Transaminase について

小出英興, 長山英男, 志村憲助 (東北大学農学部農芸化学科)

昭和 30 年 9 月 8 日 受理

Transaminases in Silkworm Tissues

By Fusaoki KOIDE, Hideo NAGAYAMA and Kensuke SHIMURA

(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tohoku University, Sendai)

蚕は桑葉を唯一の飼料として多量の絹糸蛋白質を合成し, 5 令盛食期に於ては消化桑葉蛋白質の約 60% が絹糸蛋白質に変化するが⁽¹⁾, 桑葉蛋白質のアミノ酸組成は絹糸蛋白質のアミノ酸組成と著しく異り, 従つて蚕体内に於て速やかなアミノ酸相互転移反応の行われていることが推定される. 又前報⁽²⁾に於て示した如く, 絹糸腺を用いた蛋白質合成反応に対しては α -ケト酸類が特に顕著な促進作用を有する. 吾等はこれらの問題をより明らかにする目的で, 蚕の絹糸腺, 消化管等の組織中の transaminase について検索を行った.

以前は transamination に関与するアミノ酸の種類は比較的狭い範囲であると考えられたが, 最近 COHEN, CAMARATA⁽³⁾ は動物の肝臓, 腎臓, 筋肉組織等の抽出液を用い, α -ketoglutaric acid と 11 種のアミノ酸よりグルタミン酸が生成することを明らかにし, 又 AWAPARA, BEALE⁽⁴⁾ は白ネズミの殆ど全ての組織中に, pyruvic acid 及び α -ketoglutaric acid と多くのアミノ酸との間の transaminase が存在することを認めた. 蚕体組織中の transaminase に関しては未だ報告に接しないが, 福田等⁽⁵⁾は蚕体液及び絹糸腺中より α -keto-glutaric acid, oxalacetic acid, glyoxylic acid 等を分離確認した. 本実験に於ては, 以下に示す如く絹糸腺,

消化管, 脂肪体等の組織中に強い transaminase が存在し, しかもかなり広い範囲のアミノ酸について transamination が行われていることが明らかとなった。

材料及び実験方法

蚕 宮城県立蚕業試験場の御好意により分譲を受けたもので, 各蚕期を 3~4 回に分け, 計 10 回に亘り飼育した蚕を 5 令起蚕時に実験室に移して実験に供した。品種は春蚕は太平, 夏秋蚕は日 122×支 115 号を用いた。

試薬 Pyruvic acid は HOWARD⁽⁶⁾ の方法, oxalacetic acid は BURRIS⁽⁷⁾ の方法, α -ketoglutaric acid は UMBREIT⁽⁸⁾ の方法によりそれぞれ調製した。上記 3 種の α -ケト酸との反応に用いたアミノ酸類は次の如きもので, いずれもペーパークロマトグラフィにより純粋であることを確認して使用した。Glycine, DL-alanine, DL-serine, DL-threonine, DL-valine, L-leucine, DL-norleucine, L-cystine, L-cysteine, DL-methionine, L-aspartic acid, L-asparagine, L-glutamic acid, L-arginine·HCl, L-lysine·HCl, L-phenylalanine, L-tyrosine, DL-tryptophan, L-histidine·HCl, L-proline。

実験方法 生理的食塩溶液中で蚕体を開いて供試組織を取り出し, 生理的食塩溶液で洗い濾紙上で軽く水分を除き秤量する。これに 10 倍量の磷酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて冷却しながら磨砕し, 2500 r. p. m. で 5 分間遠心分離, 上澄を酵素液とした。

アミノ酸溶液 (20 μ M/cc) 1 cc, α -ケト酸溶液 (100 μ M/cc) 0.2 cc を試験管 (12 mm×100 mm) にとり, これに酵素液 1 cc を加えて全容を 2.2 cc とし 37° で 1 時間反応を行つた。反応後沸騰水中に 5 分間入れ反応を停止した。

反応の結果 α -ケト酸より生成したアミノ酸を GIRI⁽⁹⁾ のペーパークロマトグラフィにより定量した。即ち反応液 1.5 cc を 30 mm×20 mm の小型ビーカーに移し, 真空硫酸デシケーター内で蒸発乾固した後, これに 0.2 cc の蒸留水を加えて全体を均一に溶解し供試液とした。供試液一定量を東洋濾紙 No. 50 (2 cm×40 cm) に spot し一次元ペーパークロマトグラフィにより 23% 含水フェノールで展開し, 風乾後 0.5% のニンヒドリンを含むアセトン溶液で 65°, 30 分間発色し, 定量するアミノ酸部分を切り取り, CuSO₄ を含む 75% エタノール 4.0 cc で 1 時間抽出後抽出液を Beckman spectrophotometer を用い, 波長 540 m μ で比色定量した。

実験結果並びに考察

(1) 絹糸腺の Transaminase 上記の方法により各種アミノ酸と 3 種の α -ケト酸を基質とし, 絹糸腺中

Table 1. Transaminase Activity in Silk gland with Pyruvic Acid and Various Amino Acids.

Amino Acids	Days is 5th Stage			
	2	4	6	8
	Alanine Formed μ M per 1.0g Fresh Tissue			
Glycine	9.0	25.0	23.0	6.0
Serine	9.0	21.0	15.0	5.5
Valine	11.0	22.0	18.0	5.0
Leucine	11.5	12.5	15.0	*
Norleucine	4.0	20.5	20.0	10.5
Cystine	4.5	22.0	20.5	8.5
Cysteine	4.5	21.0	19.0	12.0
Methionine	6.5	*	19.0	6.0
Aspartic acid	36.0	55.0	64.5	35.5
Asparagine	9.5	16.0	18.0	14.5
Glutamic acid	50.0	103.0	97.0	67.5
Lysine	*	20.0	20.5	*
Phenylalanine	9.0	18.0	19.0	9.5
Tyrosine	16.0	31.0	*	*
Tryptophan	12.0	22.0	17.5	5.0
Histidine	10.0	*	*	*
Proline	17.0	21.0	20.5	9.5
Enzyme+Pyruvate	5.0	11.0	12.5	7.0

* Tailing prevented from determination of alanine.

The reaction systems contained 20 μ M of amino acid, 20 μ M of pyruvic acid 1.0 cc of enzyme solution in a total volume of 2.2 cc.

Incubated 1 hour at 37°, 1/15M phosphate buffer (pH 7.4).

の transaminase により生成したアミノ酸の定量の結果を Table 1, 2, 3 に示した。Table 1 は pyruvic acid と各種のアミノ酸との間の反応を示したもので, 生成したアラニンの量を新鮮組織 1 g 当りの μ M で示した。従来動物組織中に多く見出されている glutamic-pyruvic, aspartic-pyruvic transaminase は共に高い活性度を示している。その他のアミノ酸との間の transaminase 作用は上記 2 者に比すればかなり低い値ではあるが, 明らかに各種アミノ酸と pyruvic acid からアラニンが生成しており, 実際に蚕体内でのアミノ酸の相互転換にも重要な役割を演じているものと推定される。

同様に各種アミノ酸と oxalacetic acid 及び α -ketoglutaric acid を基質として生成したアスパラギン酸及びグルタミン酸の定量結果を Table 2 及び 3 に掲げた。この場合に於ても両者共 glutamic-oxalacetic, glutamic-pyruvic 及び alanine-oxalacetic transaminase 等が顕著であるが, その他のアミノ酸との間の transamination 反応もかなり行われており, 絹糸腺の transaminase の種類は比較的広い範囲に亘

Table 2. Transaminase Activity in Silk gland with Oxalacetic Acid and Various Amino Acids.

Amino acid	Days in 5th Stage			
	2	4	6	8
	Aspartic Acid Formed, μM per 1.0 g Fresh Tissue			
Glycine	14.0	21.0	21.0	11.0
Alanine	17.5	33.0	40.0	15.0
Serine	16.0	20.0	15.0	12.0
Valine	16.0	*	10.0	10.0
Leucine	15.0	22.0	10.0	11.0
Norleucine	*	22.0	20.0	*
Cystine	18.0	21.0	11.0	9.0
Cysteine	18.0	15.0	20.0	9.0
Methionine	16.5	*	*	*
Glutamic acid	29.5	35.0	84.0	50.0
Asparagine	15.0	20.0	20.0	15.0
Arginine	16.0	14.0	20.0	15.0
Lysine	*	*	*	*
Phenylalanine	13.5	20.0	22.0	9.0
Tyrosine	14.0	15.0	22.0	9.0
Tryptophan	20.0	20.0	24.0	9.0
Histidine	16.0	15.0	30.0	9.0
Proline	18.0	16.0	17.0	10.0
Enzyme + Oxalacetate	17.0	16.0	11.0	9.0

* Tailing prevented from determination of aspartic acid.

The reaction systems contained $20 \mu M$ of amino acid, $20 \mu M$ of oxalacetic acid, 1.0 cc of enzyme solution in a total volume 2.2 cc.

Incubated 1 hour at 37° , $1/15 M$ phosphate buffer (pH 7.4).

Table 3. Transaminase Activity in Silk gland with α -Ketoglutaric Acid and Various Amino Acids.

Amino Acids	Days in 5th Stage			
	2	4	6	8
	Glutamic Acid Formed, μM per 1.0 g Fresh Tissue			
Glycine	14.0	12.0	14.5	13.0
Alanine	51.0	55.0	34.0	38.0
Serine	13.0	12.0	13.0	8.5
Valine	12.5	9.0	10.0	16.0
Leucine	12.5	9.0	10.0	10.0
Norleucine	8.0	*	*	*
Cystine	12.5	6.0	14.0	5.0
Cysteine	12.5	7.0	5.0	5.5
Methionine	*	7.0	10.0	*
Aspartic acid	43.0	55.0	31.0	31.5
Asparagine	*	11.0	10.0	*
Arginine	10.0	17.0	10.0	21.0
Lysine	*	*	*	*
Phenylalanine	17.0	15.0	*	*
Tyrosine	15.0	16.0	7.0	9.0
Tryptophan	11.0	*	*	16.0
Histidine	10.0	11.0	7.0	12.0
Proline	9.0	11.0	5.0	14.0
Threonine	18.0	19.0	*	*
Enzyme + α -Ketoglutarate	10.0	7.0	5.0	8.0

* Tailing prevented from determination of glutamic acid.

The reaction systems contained $20 \mu M$ of amino acid, $20 \mu M$ of α -ketoglutaric acid, 1.0 cc. of enzyme solution in a total volume of 2.2 cc.

Incubated 1 hour at 37° , $1/15 M$ phosphate buffer (pH 7.4).

Table 4. Transaminase Activity in Alimentary Canal of Silkworm.

Substrate		Days in 5th Stage			
α -Keto acids	Amino Acids	2	4	6	8
α -Ketoglutaric acid	Alanine	52.0	71.0	36.0	25.0
	Aspartic acid	74.0	96.0	56.0	18.0
	Without Amino acid	15.0	18.0	13.5	15.5
Pyruvic acid	Aspartic acid	41.0	57.0	56.0	76.0
	Glutamic acid	55.0	75.0	44.0	27.0
	Without Amino acid	14.0	18.5	18.0	16.0

Table 5. Transaminase Activity in Fatty Body of Silkworm.

Substrate		Days in 5th Stage			
α -Keto acids	Amino acids	2	4	6	8
α -Keto glutaric acid	Alanine	25.0	71.0	21.0	49.0
	Aspartic acid	45.0	65.0	55.0	30.0
	Without Amino acid	3.0	3.0	4.0	3.0
Pyruvic acid	Aspartic acid	40.0	88.0	22.0	15.0
	Glutamic acid	55.0	75.0	44.0	65.0
	Without Amino acid	2.0	2.0	2.0	3.0

The reaction systems contained $20 \mu M$ of amino acid, $20 \mu M$ of α -keto acid, 1.0 cc of solution in a total volume of 2.0 cc.

Incubated 1 hour at 37° , $1/15 M$ Phosphate buffer (pH 7.4).

る。Table 4 に示した消化管の活性度は絹糸腺に匹敵する強さを示し、特に glutamic-pyruvic transaminase は顕著である。aspartic-pyruvic transaminase を除いて、いずれも 5 令 4 日目に活性度が最も大きい。

脂肪体は蚕体内の生理作用について余り明らかにされていないが、Table 5 に示す如く transaminase の活性度は上述の組織と同程度の強さを示し、熟蚕期に於て著しい低下を示さない事は他の組織に較べ異なる所であ

っている。5 令日数と各 transaminase 活性度との関係は、一般的に見て、4 日目に明らかに最も高い値を示す場合が多い。蚕の絹糸腺に於ける絹蛋白質の生成速度は 3~5 日目に最高値を示す事実⁽¹⁾と関連して興味深いことである。

(2) 消化管及び脂肪体の Transaminase 絹糸腺の場合と同様の方法により蚕の消化管及び脂肪体より酵素液を調製し、これらの組織中の transaminase の検索を行つた。本実験では絹糸腺に於て特に顕著な活性度を示した glutamic-pyruvic, aspartic-pyruvic 及び glutamic-oxalacetic transaminase の作用を見た。絹糸腺と同様 5 令期の隔日に組織を取り、それぞれのケト酸から生成したアミノ酸を定量した。その結果は Table 4 及び 5 の如くである。

る。

又体液を酵素液として同様の方法に従つて活性度を検索したが transamination は全く認められなかつた。

要 約

1) 5 令中の蚕の絹糸腺, 消化管及び脂肪体の各組織中には種類の transaminase が存在することを明らかにした。しかし体液では transaminase 作用は認められなかつた。

2) 5 令中 transaminase 活性度の変化はいずれも同様の傾向を示し, 5 令 4 日前後に於て最も強く, 5 令初期及び熟蚕期には低下している。この傾向は絹糸腺に於ける絹蛋白質の合成速度と平行するようである。

3) 19 種のアミノ酸と pyruvic acid, oxalacetic acid 及び α -ketoglutaric acid の 3 種の α -ケト酸との間の反応を絹糸腺組織について検索し, glutamic-pyruvic, glutamic-oxalacetic 及び aspartic-pyruvic transaminase の 3 種が特に顕著であるが, その他のアミノ酸に関する transaminase 作用も明らかに認められ, これらの各種の transaminase は蚕体内でのアミノ酸の相互転換に重要な役割を演じているものと推定される。

終りに臨み, 蚕の飼育その他に多大の御援助をいただいた宮城県立蚕業試験場々長 野口活也氏をはじめ試験場の各位に厚く感謝します。

(1) 尾崎準一 蚕糸化学と副産物利用, 303 頁, 朝倉書店 (昭 18).	(5) 福田紀文: 蚕糸研究, 7, 35 (1954).
福田紀文: 蚕糸試験場報告, 13, 423 (1952).	(6) J. W. HOWARD Org. Synthesis, Vol. 1, 462.
(2) 小出英興, 板橋宏子, 志村憲助 農化, 26, 607 (1952).	(7) R. H. BURRIS: Manometric Technique and tissue Metabolism., 210 (1951), Burgess Publishing Co.
(3) P. P. COHEN and P. S. CAMARATA: J. Biol. Chem., 136, 565 (1940).	(8) W. W. UMBREIT <i>ibid.</i> , 209 (1951).
(4) J. AWAPARA and B. SEALE <i>ibid.</i> , 194, 497 (1952).	(9) K. V. GIRI: <i>Nature</i> , 170, 1025 (1952).

Summary

(1) Transaminase activity in posterior silk gland, alimentary canal and fatty body of the silkworm in the 5th stage has been determined by employing quantitative paper chromatographic method,

(2) In the case of silk gland tissue, nearly every amino acid investigated was found active in its reaction with pyruvic acid, oxalacetic acid and α -ketoglutaric acid.

(3) Transaminase activity in the silk gland appears to be parallel with the rate of silk protein formation.

(4) The rate of transamination in the alimentary canal and fatty body was found to be as high as those in the silk gland.

(5) The transaminating reaction in the blood of silkworm could not be recognized under the condition employed.