用し得ることを報告している。翻つて、本実験に供した阻害物質試料はいずれも trypsin inhibitor としての作用力をも有することは上述の如くであるが、trypsin に対するこの種の inhibitor に就いては比較的古くから最近に至る迄、各種の動植物体、特に各種の豆類 (soybean⁽⁶⁾, lima bean^(7,8), navy bean⁽⁹⁾, field bean 及び double bean⁽¹⁰⁾) からいずれも結晶性蛋白として分離されているが、ソラ豆及びインゲン豆中の阻害物質も恐らく之等の豆類中の trypsin inhibitor と類似のグロブリン性蛋白質であろうと思われる。なお最近, Sohonie 等⁽¹²⁾によつて馬鈴薯中より 2 種の trypsin inhibitor が結晶蛋白として単離されたことを知つたが、これらとの関係に就いては今後の研究に待ちたい。

終りに臨み、貴重なる御助言と御校閲を賜つた東大応用微生物研究所北原覚雄教授、常々御鞭撻、御支援を戴いている三重大学農学部田中庄助教授に対し厚く御礼申上げる。本実験に使用したタカジアスターゼは三共高峰研究所岡崎浩氏、結晶細菌プロテアーゼは長瀬産業株式会社小巻利章氏の御好意によるものである。記して謝意を表する。又結晶レンニンを快く恵与して下された日本獣医畜産大学大条方義教授に対して厚く御礼申上げる。尚又本研究に関連して種々資料を提供された東大農化安井恒男氏に感謝する次第である。

(1) 松島欽一 : 本誌, 29, 883 (1955).	1155 (1949).
(2) T. Amano, S. Isojima, H. Fujio : <i>Med. Jour. of Osaka Univ.</i> , 4, 255 (1953).	(8) H. Fraenkel-Conrat et al. : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 37, 393 (1952).
(3) 藤山公雄 : 醸工, 33, 53 (1955).	(9) D. E. Bowman : <i>Arch. Biochem.</i> , 16, 109 (1948).
(4) 松島欽一 : 本誌, 29, 781 (1955).	(10) K. Sohonie, K. S. Ambe : <i>Nature</i> , 175, 508 (1955).
(5) H. Lineweaver, C. W. Murray : <i>J. Biol. Chem.</i> , 171, 565 (1947).	(11) 安井恒男 : 農化関東支部講演会 (31.1.28).
(6) M. Kunitz : <i>J. Gen. Physiol.</i> , 29, 149 (1946); 30, 291 (1947).	(12) K. Sohonie, K. S. Ambe : <i>Nature</i> , 176, 972 (1955).
(7) H. Tauber et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 179,	

複合脂質に関する研究 (第 8 報)*

牛脊髓から得た糖脂質 Phrenosine の構成成分

藤 野 安 彦 (帯広畜産大学生化学研究室)

昭和 31 年 8 月 17 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁾において牛の脊髓から得た糖脂質 phrenosine は、そのものの自体の物理的及び化学的性状から推して純 phrenosine であることは先ず疑いない。従つてその構成成分は厳密に、cerebrone 酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{CHOH-COOH}$ sphingosine $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH=CH-CHOH-CHNH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$, 及びガラクトース $\text{CHO-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$ の 3 つの部分から成り立つべきである。然し phrenosine と同族の糖脂質である kersine, nervone, oxynervone 等は、それぞれ構成脂酸として cerebrone 酸と炭素同数 (C_{24}) の高級脂酸 lignocerine 酸, nervone 酸及び oxynervone 酸を有し、phrenosine 調製の際にこれら同族の糖脂質が、その近似せる物理化学的性状の故に一部混入し得ることは想像に難くない。又 Carter 等⁽²⁾によれば、牛の脳髓殊に脊髓から分離される糖脂質の中には dihydrosphingosine を構成塩基とするものがかなりの量に達するという。更に又 Halliday 等⁽³⁾は、糖脂質はそれを構成する炭水化合物がガラクトースなるかグルコースなるか従つて 2 群に分つことが出来ると報じている。かくして牛の脊髓から調製された“phrenosine”の構成成分を確認するために、phrenosine の加水分解を行いその水解産物を追究することが要求せられる。

糖脂質を加水分解するには従来硫酸 (硫酸又は塩酸) の水溶液又はアルコール溶液が用いられて来たが、此の中最も普通に使われるのはメタノール性硫酸による方法^(2,4)である。よつて“phrenosine”をメタノール性硫酸

* Studies on the Conjugated Lipids. Part VIII. Constituents of Phrenosine obtained from Beef Spinal Cord.

By Yasuhiko FUJINO (Laboratory of Biochemistry, Obihiro University, Obihiro)

で加水分解し、第 1 表に示す様な方式に従つて生成される加水分解産物を検討したところ、脂酸として cerebrone 酸、塩基として sphingosine 及び糖としてガラクトースを証明することが出来、且つ他の糖脂質の混在に由来する化学成分は全く見出すことが出来なかつた。このことは前報⁽¹⁾の結果とも併せて、此処に調製された牛脊髄の“phrenosine”が純 phrenosine であることを明確に立証するものである。

実 験

1. Phrenosine の加水分解

Carter 等⁽²⁾の方法に従い phrenosine の加水分解を行つた。即ち 6 g の phrenosine を、6.9 ml の濃硫酸を含有する 138 ml のメタノールと混じて還流加熱すると、1 時間で透明な溶液となるから更に 5 時間水解を継続する。メタノール溶液を氷室に越夜し、大量に生じた脂酸及び脂酸エステルの沈澱を濾別して沈澱を少量の冷メタノールで洗滌する—脂酸画分。

濾液を 60 ml 宛の低沸点石油エーテルで 5 回抽出して残存する脂酸乃至脂酸エステルを除去後、水浴上で石油エーテルを蒸発せしめる。ついで 4 N のメタノール性苛性カリを約 50 ml 加え、フェノールフタレンを指示薬として中和する。氷室に越夜後生じた硫酸カリの沈澱を遠心分離して無色透明の上澄液を得た。これに約 1.5 ml の氷酢を加えて pH 4.0 とし、水浴上で約 30 ml に迄濃縮、これに濃苛性カリ溶液を加えて pH 9.5 とし、80 ml のエーテルを以て 2 回、40 ml のエーテルで 1 回抽出すれば、両者併せて 200 ml の混濁せるエーテル抽出液を得る—塩基画分。

抽出残液は糖及び糖のメチル誘導体を含み後述の実験に供せられた—糖画分。

2. 脂酸画分より Cerebrone 酸の分離

上記の脂酸画分から Thierfelder の方法⁽³⁾を参照しつつ脂酸の分離を試みた。脂酸画分を石油エーテルに溶解、このとき微量の sphingosine が混在すれば遠心除去する。上澄液を減圧濃縮し、水及び 0.5 N のメタノール性苛性カリを加えて水浴上に 1 時間加熱、この処理で脂酸メチルエステルは鹼化せられ且つメタノールは蒸発除去された。脂酸カリ塩の水溶液を分液漏斗に移し、2 N 硫酸と共に振盪して脂酸を遊離せしめ、エーテルを以て抽出する。エーテル層を水でよく洗つた後硫酸ソーダを投入して越夜乾燥し、エーテルを溜去して淡黄色の粉末を得た。収量 2.6 g (計算収量 2.8 g)。これをエタノールから再結晶したものは白色の結晶性粉末で、m.p. 99.5~100.5°, $[\alpha]_D^{25} = +3.5$ (c 0.5 ピリジン) を有し、Klenk⁽⁴⁾ が純 cerebrone 酸に対して与えた値と一致した。この物質は水、石油エーテルに不溶であるが、エーテル、アセトン、ピリジン及び熱エタノールに可溶である。

3. 塩基画分より Sphingosine を硫酸塩として分離

混濁せる 200 ml のエーテル抽出液を半量に濃縮し、60 ml の氷冷水を以て 2 回洗う。このとき洗滌が過度になるとエーテル層は乳濁するが、これは遠心分離により除くことが出来た。透明なエーテル層に硫酸ソーダを投入して越夜乾燥し、エーテルを溜去すれば淡黄色の粗 sphingosine base を得る。収量 1.64 g (計算収量 2.16 g)。

此の中 1.6 g を 10 倍量の無水エタノールに溶解し、1 N のエタノール性硫酸 (27.7 ml の濃硫酸を 1 l の無水エタノールに溶解したもの) をコンゴレッドが僅かに青変する迄滴下する。氷室に放置して生じた硫酸塩の沈澱を濾別し、少量の氷冷無水エタノールで洗つて減圧乾燥し、淡黄色の粉末を得た。この硫酸塩の中には sphingosine 硫酸の他に、O-methylsphingosine 硫酸及び dihydrosphingosine 硫酸が共存する可能性が懸念された。依つてこれを 25 倍量のメタノールと共に水浴上で加熱溶解した後室温に放冷する操作を 2 回繰返すとメタノール易溶性の O-methylsphingosine 硫酸は濾液中に移行される。沈澱を少量のメタノールで洗つた後、更に 100 倍量のメタノールと共に室温で数時間処理したところ、殆ど不溶部分を認めず、従つてメタノール難溶性の dihydrosphingosine 硫酸の混在せざることがほぼ推定された。このメタノール溶液からメタノールを溜去し、残渣を乾燥すれば淡褐色の物質が得られ、これをエタノールから再結して淡黄色を帯びた吸湿性の結晶を得た。収量 0.38 g (計算収量 1.86 g)。m.p. 248~250°. $[\alpha]_D^{25} = -10.8^\circ$ (c 1.0 クロロホルム)。これは Rosenheim⁽⁵⁾

第 1 表 Phrenosine 構成成分の検索

が sphingosine 硫酸に与えた値とはほぼ同じく, dihydrosphingosine 硫酸に相当するものは全く見出だされなかつた. sphingosine の確認のため更に次のようにして triacetyl sphingosine 及び tribenzoyl sphingosine の調製を行った.

4. Sphingosine 硫酸より Triacetyl sphingosine の調製

Sphingosine 硫酸 0.36 g を 4 ml の 0.5 N 苛性ソーダ及び 10 ml のエーテルと振盪, エーテル層に移行せる遊離 sphingosine をエーテル溜去により乾燥製取する. 得られた 0.3 g の sphingosine を 2 ml 宛の新鮮なるピリジン及び無水酢酸に投入混和し, そのまま室温に 5 時間静置後生じた沈澱を濾別, 少量の氷冷アセトンでよく洗い減圧乾燥する. これを 2 ml のアセトンから再結して 0.33 g の白色結晶を得た. m. p. 99~101°, $[\alpha]_D^{25} = -11.2^\circ$ (c 1.0 クロロホルム). 即ち Carter 等⁽²⁾の得た triacetyl sphingosine と一致する.

鹼化価: 0.2125 g (0.5 mM) の triacetyl sphingosine を 20 ml の 0.1 N エタノール性苛性カリに溶解し, 室温に 12 時間放置して過剰のアルカリを 0.1 N 塩酸で逆滴定したところ, 10.2 ml の 0.1 N 苛性カリ (1 mM) が鹼化に消費せられたことを知つた. 即ち 2 個の O-アセチル基が水解により遊離されたことを示す. 反応混液を水で稀釈してエーテルで抽出, エーテル層を水で洗い硫酸ソーダで乾燥後エーテルを溜去して, ゴム状の N-acetyl sphingosine を得たがこれを結晶化せしめるに至らなかつた.

5. Triacetyl sphingosine より Tribenzoyl sphingosine の調製

上記の triacetyl sphingosine (鹼化により得た N-acetyl sphingosine を含めて約 0.25 g) を 10 ml の 0.5 N エタノール性苛性カリで水浴上に 8 時間還流加熱し, 冷却した溶液を 50 ml の水で稀釈して 20 ml のエーテルで 2 回抽出, エーテル層を水で洗い硫酸ソーダで乾燥後エーテルを溜去して 0.15 g の粗 sphingosine を得た. m. p. 78~80°. これを 3 ml のピリジンに溶解して 1 ml の塩化ベンゾイルを添加, 室温に 5 時間放置した後氷冷し, 1 ml の氷冷水を加えて過剰の塩化ベンゾイルを分解, 溶液を 20 ml の水で稀釈し, 生じた沈澱を濾別水洗して 0.2 g の粗 tribenzoyl 誘導体を得た. これを 5 ml のエタノールから 2 回再結すれば tribenzoyl sphingosine の白色結晶を得る. これは m. p. 121°, $[\alpha]_D^{25} = -11.0^\circ$ (c 1.0 クロロホルム) を有し Carter 等⁽²⁾の得た tribenzoyl sphingosine と同一物質であることを示す.

6. 糖画分よりガラクトースの証明

塩基割合を抽出した残液に 7% 硫酸を約 70 ml 加えて 2 時間還流加熱, 冷却後コンゴアレッド中性になる迄酢酸ソーダを加える. 全容を 100 ml とし糖含量を Somogyi⁽⁶⁾の方法で測定したところ, ガラクトースとして 1.15 g/dl であつた (計算値 1.3 g/dl).

この一部を取り数滴の methylphenylhydrazine を加えて室温に放置すればヒドラゾンの結晶が析出して来る. これを濾別して水でよく洗い, 90% エタノールから再結を行うと美しい白色結晶が得られた. これは m. p. 190° で, galactose-methylhydrazone のそれと全く一致した. N 9.95% (計算値 9.86%).

総 括

牛の脊髄から得た phrenosine をメタノール性硫酸で加水分解してその構成分を検討した. その結果脂酸として cerebrone 酸, 塩基として sphingosine 及び糖としてガラクトースを分離証明することが出来, その他の類縁の糖脂質に由来する構成分を全く認め得なかつた. 依つてこのものが, その化学構成分の上から純粋な phrenosine (cerebronyl-sphingosyl-galactose) であることが確認された.

尚ペーパークロマトグラフィによる各構成分の検索を実施中であるが, これについては他日報告したいと思う.

撰筆するに当り, 御教示と御校閲をいただいた北海道大学農学部中村幸彦教授に厚く御礼申し上げる次第である.

(1) 藤野安彦: 本誌, 30, 764 (1956).

(2) H. E. Carter, W. P. Norris, F. J. Glick, G. E. Phillips, R. Harris: *J. Biol. Chem.*, 170, 269 (1947).

(3) N. Halliday, H. J. Duel, Jr., L. J. Traegerman, W. E. Ward: *J. Biol. Chem.*, 132, 171 (1940).

(4) E. Klenk, W. Diebold: *Z. physiol. Chem.*,

198, 25 (1931).

(5) H. Thierfelder: *Z. physiol. Chem.*, 85, 35 (1913).

(6) E. Klenk: *Z. physiol. Chem.*, 174, 214 (1928).

(7) O. Rosenheim: *Biochem. J.*, 10, 147 (1916).

(8) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, 160, 61 (1945).