〔農化 第 36 卷, 第 5 号, p.398~402, 1962〕

Bacillus colistinus Koyama の生産する抗生物質

コリスチンについて (第 4 報)*

コリスチン A₁ のアミノ酸結合順序

森 戸 敏 明 (万有製薬株式会社)

昭和 36 年 7 月 13 日 受 理

前報⁽¹⁾で述べたコリスチン A₁ の化学構造を決定するためにアミノ酸結合順序の検討を行った。まずコリスチンの化学構造に関する鈴木⁽²⁾の方法を追試すると共に、同氏が得たペプチドとは別に新しいペプチドを得るために、同氏と異なる条件でコリスチン A₁ を加水分解し、また新たに 1N-HCl を溶出溶剤に用いたアンバーライト XE-64 (Na 型) によるカラムクロマトグラフィーによってペプチドの混合物よりペプチドの分離を試みた。

同氏方法に基づき、そして上記カラムクロマトグラフィーによって 10 個のペプチドを分離し、そのペプチドのアミノ酸配列を検討する際は同氏とは別法、すなわちアミノ酸の定量には L. Lowdon⁽³⁾, S. Moore, W. H. Stein⁽⁴⁾ のペーパークロマト法を、N 末端アミノ酸の決定には D. M. P. Phillips et al.⁽⁵⁾, E. F. Mellon et al.⁽⁶⁾ の方法に改良を加えた DNP-アミノ酸のペーパークロマト法を採用した。

分析の結果、これら 10 個のアミノ酸配列は第 2 表の通りである。peptide 1, 2, 6, 7, 10 は同氏が分離した 7 個のペプチドのうち peptide C, D, G, E, B と一致している。したがって部分加水分解の条件をかえたことによって同氏方法に基づくペーパークロマトグラフィーにおいて新たに 1 個 (peptide 3), そして上記カラムクロマトグラフィーによってペプチドの混合物より新たに 3 個 (peptide 4, 8, 9) のペプチドが分離し得たことを知った。

一方コリスチン A₁ の構成アミノ酸の分子比はロイシン:スレオニン: α, γ -ジアミノ酪酸=2:1:5 であり、DNP-コリスチン A₁ の加水分解物の酢酸エチル可溶部からは DNP-ロイシン, DNP-スレオニン, α, γ -diDNP-アミノ酪酸が検出されず、水層部からロイシン, スレオニン, α, γ -ジアミノ酪酸及び α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸が検出され、それらの分子比は 2:1:1:4 であることを知った。また同氏方法に従って分離した脂肪酸と結合していたペプチド (peptide 10) のアミノ酸配列は、 α, γ -ジアミノ酪酸→スレオニンであること、そしてヒドラジン分解法^(3,7) をコリスチン A₁ について試みたところ、遊離カルボキシル基は存在しないことを知ったので、コリスチン A₁ は α 位アミノ基でアミド結合している環状ポリペプチドであり、5 モルの α, γ -ジアミノ酪酸中 1 モルがその γ 位アミノ基で脂肪酸とアミド結合していることを知ることができた。なお同氏方法に基づいて 2 モルのロイシン中 1 モルは D 型, 1 モルは L 型であることも確認した。

したがって以上の結果からコリスチン A₁ のアミノ酸結合順序は次のように推定し得るわけで、同氏の与えたコリスチンのアミノ酸結合順序と一致していることを知ったので、その実験結果を報告する。

実 験 の 部

I. アミノ酸の定量法及びコリスチン A₁ の構成アミノ酸の分子比

A) アミノ酸の定量法^(3,4): アミノ酸の定量は L. Lowdon⁽³⁾, S. Moore, W. H. Stein⁽⁴⁾ に従って行った。すなわちコリスチン A₁ 及びその部分加水分解物より分離したペプチドを加水分解して得られるそれぞれの試料について、次のように定量した。東洋濾紙 No. 50 (15×40 cm) の原線 (紙の端より 5 cm, 以下同じ) に試料

* Antibiotic Colistin from *Bacillus colistinus* Koyama. Part IV. The Amino Acid Sequence of Colistin A₁.

By Toshiaki MORITO (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.)

第 1 図 ロイシン, スレオニン, α, γ -ジアミノ酪酸の検量線

1.6% 塩化第一錫溶液, 2 ml の 2% ニンヒドリン溶液を加え, 沸騰水浴中にて 30 分間加熱する。ついで 10 ml の希釈液 (*n*-プロピルアルコール : 水 = 1 : 1) を加え, 570 m μ の吸光密度を測定する。各アミノ酸の検量線は第 1 図である。

B) コリスチン A₁ の構成アミノ酸の分子比 : 小田等⁽⁸⁾に基づいて 9.85 mg のコリスチン A₁ に 1 ml の 10 N-HCl を加え, 封管にて 110°, 10 時間加熱分解する, 分解液を減圧下に濃縮乾固をくり返し塩酸を除去し, 1 夜苛性ソーダデシケーター中に放置する。残渣に 2 ml の水を加えて溶解し試料とする。東洋濾紙 No. 50 (2 $\times$ 40 cm) の原点に上記試料をスポットし, *n*-ブチルアルコール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5⁽⁸⁾ 及び 4 : 1 : 4 (上層) を用い, 一次元上昇法で 16 時間展開, ニンヒドリンで呈色させるとき 3 つのスポットを得た。

n-ブチルアルコール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5 の場合

Spot 1.	$R_F=0.12$	対照 α, γ -ジアミノ酪酸	$R_F=0.12$	(8) 記載	$R_F=0.14$
Spot 2.	$R_F=0.32$	" スレオニン	$R_F=0.32$	"	$R_F=0.32$
Spot 3.	$R_F=0.66$	" ロイシン	$R_F=0.65$	"	$R_F=0.66$

n-ブチルアルコール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 4 (上層) の場合

Spot 1.	$R_F=0.12$	対照 α, γ -ジアミノ酪酸	$R_F=0.12$
Spot 2.	$R_F=0.32$	" スレオニン	$R_F=0.32$
Spot 3.	$R_F=0.65$	" ロイシン	$R_F=0.65$

なお α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸を栗原等⁽⁹⁾に従って調製し, *n*-ブチルアルコール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 4 (上層) を用いた上記同様のペーパークロマトグラフィーによって, そのものの R_F を測定したところ $R_F=0.73$ であった。

試料 0.04 ml (コリスチン A₁ 塩酸塩 197 γ に相当) について上記方法によって各アミノ酸の定量を行った結果が第 1 表である。表中の A は酸処理を行わないアミノ酸そのものの測定値で,

第 1 表 コリスチン A₁ の加水分解物 (構成アミノ酸) の比色測定値

	A		B		C		C の補正値 mM
	O. D.	mM	O. D.	mM	O. D.	mM	
ロイシン	0.491	0.59	0.470	0.565	0.545	0.655	0.684
スレオニン	0.450	0.595	0.420	0.555	0.242	0.320	0.345
DABA	0.563	0.605	0.552	0.590	0.315	0.335	0.342

(注) O. D.: 吸光密度

B はコリスチン A₁ と同一の条件で酸処理を行ったアミノ酸の測定値で, C はコリスチン A₁ の各アミノ酸の測定値で, その右欄は A, B の結果からの補正值である。以上の測定結果からコリスチン A₁ の構成アミノ酸の分子比はロイシン : スレオニン : α, γ -ジアミノ酪酸 = 2 : 1 : 5 と推定し得る。

C) α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸及び α, γ -diDNP-アミノ酪酸の定量法⁽²⁾ : α, γ -diDNP-アミノ酪酸は栗原等⁽⁸⁾に従って調製し, 上記の定量は鈴木⁽²⁾に従い 350 m μ の吸光密度を測定し比色定量した。

II. N 末端アミノ酸の決定方法 DNFB 法^(2,10)により行ったが, N 末端アミノ酸の DNP-アミノ酸の確認は D. M. P. Phillips et al.⁽⁶⁾, E. F. Mellon et al.⁽⁶⁾ のペーパークロマトグラフィーによった。

アミノ酸の DNP-化は K. R. Rao, H. A. Sober⁽¹¹⁾, 鈴木⁽²⁾に従って調製した。1.2 mM の各アミノ酸よりそれぞれ DNP-L-ロイシン 0.15 g, m. p. 94~5°, DNP-L-スレオニン 0.17 g, m. p. 144~5°, α, γ -diDNP-L-アミノ酪酸 0.2 g, m. p. 120~2° を得た [(11) 記載値, DNP-L-ロイシン 94~5°, DNP-L-スレオニン 145°, α, γ -diDNP-L-アミノ酪酸 120~2°]。

DNP-アミノ酸のペーパークロマトグラフィーを文献^(5,6)に従って行ったところスポットが tailing した。しかし東洋濾紙 No. 50 に 0.1 M フタル酸緩衝液 (pH 6.0) を噴霧し、風乾した後に試料をスポットし、また展開溶剤である水飽和 *n*-ブチルアルコール溶液の水の代りに上記緩衝液にかえてペーパークロマトグラフィーを文献記載の方法で行うとき tailing が防止されたので、以後はこの方法で DNP-アミノ酸のペーパークロマトグラフィーを行った。一次元上昇法, 16 時間展開の各 DNP-アミノ酸の R_F は次の通りであった。

DNP-L-ロイシン $R_F=0.56$, DNP-L-スレオニン $R_F=0.25$, α, γ -diDNP-L-アミノ酪酸 $R_F=0.45$ 。

III. ペプチドの分離 鈴木⁽²⁾と異なる条件で部分加水分解を行い、ペプチドの分離を試みた。すなわち 1 g のコリスチン A₁ に 20 ml の 10 N-HCl を加え、80°, 2.5 時間加熱する。後可及的に塩酸を除去、残渣に 2 ml の水を加えて溶解し試料とする。部分加水分解物よりペプチドを分離するため、ペーパークロマトグラフィー及び新たに 1 N-HCl を溶出溶剤としたアンバーライト XE-64 (Na 型) によるカラムクロマトグラフィーを行った。また同氏方法に従って DNP-コリスチン A₁ の部分加水分解物より脂肪酸と結合していたペプチドを分離した。

A) ペーパークロマトグラフィー: 東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) の原点に試料 0.002 ml をスポットする。80% フェノール, *n*-ブチルアルコール:酢酸:水=4:1:4 (上層) を展開溶剤とし、上昇法で二次元展開を行う。展開時間は 80% フェノールの際は 20 時間, *n*-ブチルアルコール:酢酸:水の際は 16 時間。展開後 0.2% ニンヒドリン溶液を噴霧し風乾後 100°, 5 分間加熱して発色させた結果が第 2 図である。

東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) 8 枚にそれぞれ試料 0.2 ml ずつ原線にスポットし、*n*-ブチルアルコール:酢酸:水=4:1:4 (上層) を用い、上昇法による一次元展開 (16 時間) を行った結果が第 3 図である。peptide 1 (文献 (2) の peptide C), peptide 2 (文献 (2) の peptide D), peptide 3 (新たに得られた) 及び part A, B の部分を紫外線照射によって発する蛍光により切り取り、それぞれ水で抽出し、減圧下に濃縮乾固する。

Peptide 1. 48 mg [m. p. 155~7° (dec.), mol. wt. 648 (計算値 666.5)], peptide 2. 34 mg [m. p. 164~7° (dec.)] mol. wt. 370 (計算値 380.5)], peptide 3. 23 mg [m. p. 142~5° (dec.) mol. wt. 275 (計算値 267.5)], part A 130 mg, part B 217 mg (mol. wt. は Rast 氏方法による)。

第 2 図 コリスチン A₁ の塩酸部分加水分解物の二次元ペーパークロマトグラム

第 3 図 コリスチン A₁ の塩酸部分加水分解物の一次元ペーパークロマトグラム

B) Part A 及び B のイオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー 数種のペプチドの混合物である part A 及び B よりペプチドを分離する目的で、アンバーライト XE-62 (Na 型, 200 mesh), 溶出溶剤として 1 N-HCl を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。すなわち常法により樹脂を Na-型とし、管径 9 mm のクロマト管に樹脂の高さ 30 cm 充填する。試料 (part A の場合 100 mg, part B の場合 200 mg) を少量の水で溶

第4図 Part A のイオン交換樹脂によるカラムクロマトグラム

第5図 Part B のイオン交換樹脂によるカラムクロマトグラム

分解液に 10 ml の水を加えてから酢酸エチルで抽出, 水層液を減圧下に濃縮乾固する。残渣に 1 ml の 1N-HCl を加えると沈殿が生じるから 1 夜放置後濾別する。濾液より鈴木⁽²⁾, 赤堀⁽¹³⁾の方法に従ってタルクにより DNP-化合物を除去し, ついでペーパークロマト法⁽²⁾によって脂肪酸と結合していたペプチド, すなわち peptide 10 2mg を分離した。

IV. 各ペプチドの構成アミノ酸及びN末端アミノ酸 10 mg のペプチドを 1 ml の 10 N-HCl にて封管中 110°, 8 時間加水分解する。塩酸を除去した残渣に 5 ml または 10 ml (ペプチドにより異なる) の水を加えて試料とする。実験 I A) に従って構成アミノ酸を検討し, そして試料 0.05 ml を用いて各アミノ酸の定量を行った。

N-末端アミノ酸については DNFB 法⁽⁹⁾に従って行った。すなわち 10 mg のペプチドを DNP-化し, ついで塩酸で加水分解する。分解物を酢酸エチル可溶部と水層部とに分け, 実験 II に従って DNP-アミノ酸を検討して N-末端アミノ酸を決定した。また水層部について実験 I に従って各アミノ酸及び α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸について検討を行った。

各ペプチドの分析結果は第2表の通りである。

V. コリスチン A₁ のヒドラジン分解 鈴木⁽²⁾及び赤堀⁽⁷⁾に従って 20 mg のコリスチン A₁ 塩基についてヒドラジン分解法による検討を加えたところ, DNP-アミノ酸は検出されず, 遊離カルボキシル基が存在しないことを知った。

VI. DNP-コリスチン A₁ の加水分解 実験 III C) の DNP-コリスチン A₁ を鈴木⁽²⁾, 赤堀⁽¹⁵⁾に従って加水

解し, カラム上部に注加する。ついで展開温度 20°, 流速 10 ml/hr で 1N-HCl を通ずる。1 ml ずつ捕集し, 各フラクションに 10 ml の水を加えて希釈し, その 1 ml にさらに 10 ml の 0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を加える。希釈された 0.5 ml の試料について S. Moore, W. H. Stein⁽⁸⁾ に従い, ニンヒドリン呈色による比色を行った結果が第4図, 第5図である。第5図の peptide 7 及び 8 は再度カラムクロマトグラフィーを行ったことを意味する。分画されたペプチド部分のフラクションを合して減圧下に濃縮乾固する。各ペプチドは食塩を含有するが次のように得られた。

Peptide 4 70 mg, peptide 5 6 mg, peptide 6 31 mg, peptide 7 56 mg, peptide 8 70 mg, peptide 9 28 mg。

C) 脂肪酸と結合していたペプチドの分離: 鈴木⁽²⁾に従って行った。すなわち同氏及び L. Carig et al.⁽¹²⁾に基づいて DNP-コリスチン A₁ を調製した。m. p. 149~150°. ついで W. Hausmann⁽¹³⁾ の方法に基づいて 100 mg の DNP-コリスチン A₁ に 10 ml の酢酸及び 4 ml の濃塩酸を加えて溶解し, 遮光下に封管 37°, 7 日間分解する。

第 2 表 各ペプチドの分析結果

Peptide	構成アミノ酸		N-末端アミノ酸		N-末端アミノ酸以外 (酢酸エチル抽出の水層部)	
	構成アミノ酸	構成アミノ酸の分子比	N-末端アミノ酸			
1	Leu, Dab, (Ipel)	Leu : Dab=1 : 1(2 : 2)	D-Leu***	L-Leu:Dab, α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸***		
2	Leu, Dab	Leu : Dab=2 : 1	D-Leu***	L-Lew, α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸***		
3	Leu, Dab	Leu : Dab=1 : 1	Leu	α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸		
4	Leu, Dab, Thr	Leu : Dab : Thr=1:1:1	Leu	Thr, α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸		
5*	Thr, Dab	—	—	—		
6	Dab	(diDNP** : monoDNP =1 : 2)	Dab	α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸		
7	Thr, Dab	Thr : Dab=1 : 1	Thr	α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸		
8	Thr, Dab	Thr : Dab=1 : 2	Thr	α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸		
9	Thr, Dab	Thr : Dab=1 : 3	Thr	α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸		
10	Thr, Dab	Thr : Dab=1 : 1	Dab	Thr		

* 試料が少ないため定性的結果しか得られなかった。

** diDNP= α - γ -diDNP-アミノ酪酸, monoDNP= α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸

*** 実験 I B) のコリスチン A₁ の加水分解物の試料 0.2 ml (コリスチン A₁ 塩酸塩 4.925 mg に相当) について, 鈴木¹⁾, L. Lowdon⁽²⁾ の方法に従ってワールブルグ検圧法による (D-アミノ酸オキシダーゼ法) 酸素吸収は 95 μ l であった。これは D-leucine 0.575 mg に相当し, コリスチン塩酸塩の 11.7% である。N-末端アミノ酸の決定における酢酸抽出の水層部について同様に酸素吸収を検したところ, peptide 1 及び 2 共吸収は認められず, 従って N-末端ロイシンが D-型であることを知った。

註 表中アミノ酸の表示記号は E. Brand: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 47, 257 (1946) に従った。本文中の記号も同じである。なお Ipel は イソペラルゴン酸の記号である。

第 3 表 DNP-コリスチン A₁ の加水分解物の分析結果

	O. D.	mM	μ M	DABA と して換算
ロイシン	0.530	0.640	—	—
スレオニン	0.228	0.305	—	—
DABA	0.295	0.315	—	17 γ
2-アミノ-1,4-DNP- アミノ酪酸	0.107	—	33.0	71 γ

註 1) 水層部を減圧乾固したものに水 20 ml を加えて溶解し試料とする。試料 0.05 ml についての定量結果が上記結果である。
 α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸の定量値は所定の希釈液の倍値を使用した値である。

2) O. D.: 吸光密度

ン: α , γ -ジアミノ酪酸: α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸=2 : 1 : 1 : 4 であった。

分解し, 酢酸エチル可溶部と水層部に存在する DNP-アミノ酸とアミノ酸を実験 I 及び II によって検討した。すなわち 100 mg の DNP-コリスチン A₁ と 5 ml の 6 N-HCl とを封管中 105°, 24 時間加熱分解する。実験 II によって酢酸エチル可溶部からは DNP-ロイシン, DNP-スレオニン, 及び α , γ -diDNP-アミノ酪酸は検出されず, 水層部からは実験 I によって検討したところ, ロイシン, スレオニン, α , γ -ジアミノ酪酸及び α -アミノ- γ -DNP-アミノ酪酸が検出された。各アミノ酸の分析結果は第 3 表の通りで, ロイシン: スレオニ

本研究に当り御鞭撻を賜りました北海道大学小幡弥太郎教授, 並びに種々助言と便宜とをいただきましたお茶の水女子大学山西貞教授に厚く感謝の意を表します。

本研究の発表を許可された万有製薬株式会社岩垂享社長並びに会社幹部の方々に深く感謝の意を表します。

- (1) 森戸敏明: 本誌, 36, 393 (1962).
- (2) 鈴木謙次: 東北薬大紀要, 4, 117, 127, 135 (1957).
- (3) L. Lowdon: *Biochem. J.*, 48, 327 (1951).
- (4) S. Moore, W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, 176, 367 (1948).
- (5) D. M. P. Phillips et al.: *Nature*, 162, 152 (1948).
- (6) E. F. Mellon et al.: *J. A. C. S.*, 75, 1675 (1953).
- (7) 水島三一郎, 赤堀四郎編: 蛋白質化学, Vol. 4, p. 250 (1956).
- (8) 小田武等: 薬学, 74, 1246 (1954).
- (9) 栗原藤三郎等: 東北薬大紀要, 1, 16 (1954).
- (10) S. Sanger: *Biochem. J.*, 39, 507 (1945).
- (11) K. R. Rao, H. A. Sober: *J. A. C. S.*, 76, 1328 (1954).
- (12) L. C. Carig et al.: *Anal. Chem.*, 22, 1462 (1950).
- (13) Hausmann: *J. A. C. S.*, 78, 3663 (1956).
- (14) 水島三一郎, 赤堀四郎編: 蛋白質化学, Vol. 4, p. 220 (1956).
- (15) 水島三一郎, 赤堀四郎編: 同上, Vol. 4, p. 245 (1956).