85. *Über die Spezifität der Proteinasen.*

Von Shiro AKABORI und Shin'ichiro TAKASE.

Aus dem Chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Osaka.

(Comm. by R. MAJIMA, M.I.A., Oct. 12, 1936.)

Eine der wichtigsten Aufgaben der gegenwärtigen Eiweisschemie ist es die Natur der durch Proteinase spaltbaren chemischen Bindungen in genuinen Eiweisskörpern aufzufinden. Es hatte einmal den Anschein, als ob diese Aufgabe durch die Arbeiten von Matsui,¹⁾ Ishiyama²⁾ und Shibata³⁾ völlig gelöst worden sei, indem die genannten Autoren gefunden haben, dass gewisse Carboxylgruppen oder Aminogruppen tragende Diketopiperazinderivate durch Proteinase gespalten werden. Nach Matsui und Ishiyama sind Diketopiperazin-carbonsäure, Diketopiperazin-essigsäure, Diketopiperazin-diessigsäure und Diketopiperazin-propionsäure durch Trypsin und Trypsin-Kinase spaltbar. Prof. Shibata schlägt vor, Trypsin, Papain und Kathepsin Carboxy-cyclopeptidase zu nennen, weil sie Carboxylgruppen tragende Diketopiperazinringe spalten. Und pepsin solle Amino-cyclopeptidase genannt werden, weil es Aminogruppen tragende Diketopiperazinringe spaltet. Dazu zieht Prof. Shibata noch Schlüsse auf die Eiweissstruktur, die er als ein Assoziat kleinmolekularer Diketopiperazine auffasst.

Auf der anderen Seite haben Northrop und Kunitz⁴⁾ gezeigt, dass die Pankreasproteinase aus zwei Enzymen, nämlich aus Trypsin und Chymotrypsin besteht, welche beide von den genannten Autoren in krystallinischem Zustand isoliert worden sind. Waldschmidt-Leitz und Akabori⁵⁾ haben Vergleichsversuche bezüglich der Verdauungswirkungen von Trypsin und Chymotrypsin auf Casein und Protamine ausgeführt und einen wesentlichen Unterschied in der Spezifität der beiden Enzyme gefunden. In diesem Zusammenhang haben wir die vorliegende Arbeit vorgenommen, um festzustellen, ob Trypsin oder Chymotrypsin dasjenige Enzym ist, das Diketopiperazinringe spaltet.

In zwischen haben M. Bergmann u. Mitarbeiter⁶⁾ schöne Arbeiten über die Spezifität des Papains publiziert. Nach einer Tabelle der Ergebnisse ihrer Arbeit ist Diketopiperazin-propionsäure nicht spaltbar durch Papain. Prof. Waldschmidt-Leitz⁷⁾ schreibt in der zweiten Mitteilung seiner Arbeit über die Struktur der Protamine wie folgt: „Angaben über die Spaltbarkeit von carboxy-substituierten Dioxopiperazinen, die neuerdings veröffentlicht wurden, haben sich in eigenen Versuchen in keinem Fall bestätigen lassen.“ Die genaue Beschreibung seiner Versuche ist nach einem persönlichen Brief von Prof. Waldschmidt-Leitz an einen der Verfasser (A.) ist bereits im Druck. Unsere Experimente über die Spaltbarkeit von Diketopiperazin-essigsäure und Diketopiperazin-propionsäure durch Trypsin-Kinase,⁸⁾ gereinigtes Trypsin⁹⁾ und Papain sind auch, übereinstimmend mit Prof. Waldschmidt-Leitz, völlig negativ ausgefallen.

Die für die Versuche gebrauchte Diketopiperazin-essigsäure (I) bzw. Diketopiperazin-propionsäure (III) ist wie Ishiyama²⁾ nach der Fischer-

schen Methode¹⁰⁾ aus Chloracetylasparginsäure-äthylester bzw. Chloracetylglutaminsäure-äthylester über der Diketopiperazin-essigsäure-äthylester (II) bzw. Diketopiperazin-propionsäure-äthylester (IV) dargestellt worden. Die Schmelzpunkte unserer Präparate zeigen aber bei (I) und (IV) bedeutende Unterschiede von den Angaben Ishiyamas.

		Schmelzpunkt	
		Ishiyama	Verfasser
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{CO-NH} \\ \diagdown \text{NH-CO} \end{array} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{CH-CH}_2\text{-COOH}$	I	270°	217-218° ($[\alpha]_D=0$)
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{CO-NH} \\ \diagdown \text{NH-CO} \end{array} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{CH-CH}_2\text{-COOC}_2\text{H}_5$	II	211°	207-207.5°
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{CO-NH} \\ \diagdown \text{NH-CO} \end{array} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{COOH}$	III	225°	222-223° ($[\alpha]_D^{28} = +15.09$)
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{CO-NH} \\ \diagdown \text{NH-CO} \end{array} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOC}_2\text{H}_5$	IV	140°	176-178°

Enzymatische Versuche.

1. Verdauungsversuche mit reinem Trypsin

Reines Trypsin ist nach Kunitz und Northrop⁹⁾ durch Selbstaktivierung von Trypsinogen hergestellt worden.

Ansätze A: M/5 I-Na 2 ccm + n/5 Phosphat (pH 7.7) 1 ccm + Trypsinlösung 1 ccm. Ansätze B: M/5 III-Na 2 ccm + n/5 Phosphat (pH 7.7) 1 ccm + Trypsinlösung 1 ccm. Ansätze C: Wasser 2 ccm + n/5 Phosphat (pH 7.7) + Trypsinlösung 1 ccm. Ansätze D: 6% Kaseinlösung 2 ccm + n/5 Phosphat (pH 7.7) 1 ccm + Trypsinlösung 1 ccm.

Stdn.	COOH-Zuwachs (ccm n/5 KOH)			
	A	B	C	D
5	0.03	0.02	0.03	0.53
24	0.02	0.04	0.03	—

2. Verdauungsversuche mit Trypsin-Kinase

Trypsin-Kinase-Lösung ist nach Waldschmidt-Leitz⁸⁾ hergestellt worden.

Ansätze A: M/5 I-Na 2 ccm + n/5 Phosphat (pH 7.7) 1 ccm + Trypsin-Kinase 1 ccm. Ansätze B: M/5 III-Na 2 ccm + n/5 Phosphat (pH 7.7) 1 ccm + Trypsin-Kinase 1 ccm. Ansätze C: Wasser 2 ccm + n/5 Phosphat (pH 7.7) 1 ccm + Trypsin-Kinase 1 ccm. Ansätze D: 6% Kaseinlösung 2 ccm + n/5 Phosphat (pH 7.7) 1 ccm + Trypsin-Kinase 1 ccm.

Stdn.	COOH-Zuwachs (ccm n/5 KOH)			
	A	B	C	D
1/3	—	—	—	0.33
1	—	—	—	0.93
5	0.02	0.00	0.02	—
24	0.08	0.04	0.06	—

3. Verdauungsversuche mit Papain

Papainlösung: 5 g Handelspapain wurden mit 50 ccm Wasser ge-

schüttelt, von unloslicher Substanz abfiltriert, auf übliche Weise mit Cysteinhydrochlorid aktiviert und auf 100 ccm aufgefüllt.

Ansätze A: M/5 I-Na 2 ccm + n/5 Acetat (pH 5) 1 ccm + Papainlösung 1 ccm. Ansätze B: M/5 III-Na 2 ccm + n/5 Acetat (pH 5) 1 ccm + Papainlösung 1 ccm. Ansätze C: Wasser 2 ccm + n/5 Acetat (pH 5) 1 ccm + Papainlösung 1 ccm. Ansätze D: 4% Gelatinlösung 2 ccm + n/5 Acetat (pH 5) 1 ccm + Papainlösung 1 ccm.

Stdn.	COOH-Zuwachs (ccm n/5 KOH)			
	A	B	C	D
5	-0.03	-0.02	0.02	1.00
24	0.03	-0.03	0.07	—

Literatur.

- 1) J. Matsui: J. Biochem. **17**, 253 (1933).
- 2) T. Ishiyama: J. Biochem. **17**, 285 (1933).
- 3) K. Shibata: Acta Phytochimica **8**, 173 (1934).
- 4) M. Kunitz and J. H. Northrop: Science **78**, 558 (1933). J. Gen. Physiol. **18**, 433 (1935).
- 5) E. Waldschmidt-Leitz u. S. Akabori: Z. f. physiol. Chem. **228**, 224 (1934).
- 6) M. Bergmann, L. Zervas and J. S. Fruton: J. Biol. Chem. **111**, 225 (1935).
- 7) E. Waldschmidt-Leitz u. E. Kofranyi: Z. f. physiol. Chem. **236**, 181 (1935).
- 8) E. Waldschmidt-Leitz: Z. f. physiol. Chem. **132**, 181 (1924).
- 9) M. Kunitz u. J. H. Northrop: Science **80**, 190 (1934).
- 10) E. Fischer u. E. Koenigs: Ber. **37**, 4585 (1904).