餌料蛋白の化學的研究

第一報 Methionine の分布に就て

富山哲夫

(水産講習所)

Chemical Studies of the Proteins of Feeding-stuffs.

I. On the Distribution of Methionine.

Tetuo TOMIYAMA

SYNOPSIS

Methionine, a sulfur containing amino acid which was discovered by MUELLER (1921), has been found to be present in casein, egg-albumin, edestin, wool (?), gelatine (?), fibrin, protein of rice-bran, and brewery yeast, by several authors, such as MUELLER (1923), ODAKE (1925), DU VIGNEAUD and MEYER (1931), and PIRIE (1932). BAERNSTEIN (1932) determined the methylthiol group, characteristic of methionine, in several proteins, and assumed that methionine is widely distributed in many kinds of proteins. Recently, JACKSON and BLOCK (1931, 1932), T. E. WEICHSELBAUM, M. B. WEICHSELBAUM and STEWART (1932) reported that the methionine, like cystine, is capable of unmistakably stimulating growth in albino rats subsisting on a basal diet poor in cystine.

Nevertheless, as far as we know, this amino acid has not yet been isolated in the proteins of feeding-stuffs such as muscle, silk-worm pupa, and soy-bean. The present author isolated methionine in crystalline form from these feeding-stuffs by Mueller's method, slightly modified by ODAKE, and identified it by elementary analysis both of the free amino acid and of its derivatives, namely copper salt and α -naphthyl-isocyanate. The yield of free methionine from the proteins of sardine muscle, whale muscle, silk-worm pupa, and soy-bean was 0.52, 0.37, 0.43, and 0.08% respectively; that is, from moisture- and ash-free coagulable protein. Contrary to the result of ODAKE, methionine was isolated with certainty, though in a small amount, from the soy-bean protein. Furthermore, it was found that the methionine fraction isolated from silk-worm pupa only was largely contaminated with glutamic acid. Although only a few kinds of protein were investigated in this present study, it might perhaps be presumed that methionine would be generally wide-spread in proteins, especially in those of animal origin.

MUELLER 氏 (1921) によりて始めて發見され BARGER and COYNE 兩氏 (1928) により合成され、發見者と合成者との協議の上 Methionine と命名されたる所謂新含硫黃アミノ酸は其後 WINDUS and MARVEL (1930), BARGER and WEICHSELBAUM (1931) 氏等によりて更に合成され、又 MUELLER (1923), 大嶽 (大正十五年), DU VIGNEAUD and MEYER (1931) 及び PIRIE (1932) 氏等によりて Casein, Egg-albumin, Edestin, Wool (?), Gelatine (?), Fibrin, 糖蛋白及び麥酒酵母より結晶狀に分離された。他方 BAERNSTEIN 氏 (1932) は諸種の蛋白に就いて Methionine に特有なる Methylthiol group の測定を行ひ、多數の蛋白質中に Methionine の存在を推定したれども、未だ肉蛋白・蛹・大豆の如き餌料蛋白より結晶として單離されたるを聞かず、しかも最近該アミノ酸は JACKSON and BLOCK (1931, 1932)

及び WEICHELBAUM, T. E., WEICHELBAUM, M. B. and STEWART (1932) 氏等により, 栄養上 Cystine を代用し得ると報告されて居る。故に著者は上記の餌料蛋白中に其存在を明にせんと欲して此實驗に着手した。

[I] Methionine の単離

1. 單離方法 Methionine を分離するには大嶽氏の改良したる Mueller 法に多少の變改を施して行つた。即蛋白質を硫酸にて水解し, 硫酸第二水銀を加へ, 次に硫酸の大部分を中和し微酸性にして沈澱せしめる。この沈澱をバリタにて温浸し, 浸出液より水銀及びバリタを除去し, 昇汞にて沈澱せしめ, 沈澱より水銀及び鹽酸を除去し, アルコールを加へて結晶せしめた。

2. 供試蛋白の調製

(1) 鰯肉蛋白: 新鮮なる大羽鰯の頭部・骨・皮・臓器を除き可及的に肉部のみを採り肉挽にて數回碎き, 多量の水と共に煮沸し醋酸を加へて沈澱せしめ, 冷却後布にて濾別す。之は更に水と共に煮沸し醋酸を加へ微酸性とし濾過する事 3 回, 次にアルコール及びエーテルにて順次處理して調製した。

(2) 鯨肉蛋白: 鰯肉の場合と同様にして調製した。

(3) 蠶蛹蛋白: 繰絲後の家蠶蛹を碎き水と煮沸し醋酸を加へて濾過し, 次にアルコール, エーテルにて順次處理した。

(4) 大豆蛋白: 一夜水中に浸したる白大豆を碎き水を加へ苛性曹達にて中和して後煮沸し残渣を壓搾濾別し, 尚 2 回同様に水と煮沸浸出す。濾液は之を集め煮沸し醋酸を加へ弱酸性となし蛋白質を沈澱せしめ, 布にて濾別したる蛋白をアルコール, エーテルにて順次に處理した。

3. 各種蛋白の分析並に Methionine の收量 供試蛋白の水分・灰分・窒素含量並に其水解物より結晶として得られたる Methionine の收量は第 1 表の如くである。

第 1 表

種 類	水 分	灰 分	窒 素	蛋白 供試量 (g)	Methionine 收量 (g.)	Methionine 收量 %
鰯 肉 蛋 白	12.14	1.04	13.67	200	0.897	0.45
鯨 肉 蛋 白	12.17	0.35	14.04	400	1.314	0.32
蠶 蛹 蛋 白	8.19	0.93	12.85	{ 200 200	{ 0.788 0.615	{ 0.39 0.31
大 豆 蛋 白	10.96	2.78	12.50	400	0.286	0.07

4. 分離せる Methionine-fraction の結晶の性質 分離したる Methionine-fraction の

第 2 表

種 類	融 點
鰯肉蛋白—Methionine	267—269°C.
鯨肉蛋白—Methionine	267—269°C.
蠶蛹蛋白—Methionine	265—268°C.
大豆蛋白—Methionine	268—269°C.

結晶は毛細管中に加熱するに 230—240°C. 附近より着色し 270°C. 附近に於て熔融分解し黑色液化した。各餌蛋白より分離したる結晶の融點 (uncorr.) は第 2 表の如くであつた。

各種蛋白より分離したる結晶は何れも水に易溶, アルコール又はエーテルに不溶にして, 種々の第二水銀鹽にて沈澱を生じ, 銅鹽も亦結晶し易

く、ニンヒドリン反應は顯著なるもビュレット、ニトロプルシットの諸反應を呈しない、又隣タングステン酸又はピクリン酸によりて沈澱を生じない。

[II] 分離せる Methionine 結晶の査定

A. 遊離 Methionine $C_5H_{11}SNO_2$ の分析

各種蛋白より得たる Methionine-fraction の結晶を真空内 $100^\circ C$. に於て恒量となし、炭素・水素 (Pregl 法) 及び窒素 (Mikro-Dumas 法) の元素分析を行ひ、表 A の如き結果を得

第 3 表

$C_5H_{11}SNO_2$ としての理論値				C%	H%	N%
				40.23	7.43	9.39
鰹	肉	蛋	白	39.82	7.65	9.13
鯨	肉	蛋	白	40.77	7.75	9.50
蠶	蛹	蛋	白	40.20	7.62	9.33
大	豆	蛋	白	40.67	7.81	9.52

た。之等を理論値と比較するに第 3 表の如くである、即尙多少の不純物を含有するがその大部は Methionine と認める事が出来る。

B. Methionine 誘導體の元素分析

(1) 銅鹽 $Cu(C_5H_{10}SNO_2)_2$ Methionine-fraction の結晶 0.1 g. を約 25 ccm. の水に溶解し、醋酸銅の飽和溶液 1.6 ccm. を加ふれば暫時にして結晶析出す。尙之を温めたる後冷却し生成した青紫色板狀結晶を吸引

濾過し冷水を以て洗滌後 $100^\circ C$ に乾燥恒量とした。第一回の結晶の收量は次に示す如くであつた。

鰹肉蛋白—Methionine 0.10 g. より	0.09 g. 銅鹽
鯨肉蛋白—Methionine 0.10 g. より	0.084 g. "
蠶蛹蛋白—Methionine 0.10 g. より	0.09 g. "
大豆蛋白—Methionine 0.05 g. より	0.015 g. "

(2) Methionine- α -naphthylisocyanate 誘導體 $C_{16}H_{18}SN_2O_3$ Methionine-fraction の結晶 0.1 g. に 6.7 ccm $n/10$ -NaOH を加へ溶解し、之に 0.12 ccm. α -Naphthylisocyanate (Kahlbaum) を加へ 2 時間振盪器にて充分振盪する。之を濾過しその濾液を稀鹽酸を以て酸性とすれば白色針狀の結晶として析出す。之を遠心分離し冷水で洗滌する事 2 回の後吸引濾過し、 $80-90^\circ C$. に乾燥恒量とす。その收量は次の如くであつた。

鰹肉蛋白—Methionine 0.1 g. より	0.16 g. Naphthylisocyanate 誘導體
鯨肉蛋白—Methionine 0.1 g. より	0.19 g. "
蠶蛹蛋白—Methionine 0.1 g. より	0.19 g. "
大豆蛋白—Methionine 0.1 g. より	0.19 g. "

第 4 表

種 類	(a) $^\circ C$.	(b) $^\circ C$.
鰹肉蛋白	186	192
鯨肉蛋白	186	192
蠶蛹蛋白	186	192
大豆蛋白	183	190

水溶液よりの結晶にては第 4 表の (a) の融點 * を示し、之を約 70% 温アルコールより再結する時は (b) の融點に上昇するのを認めた。

以上の兩誘導體を元素分析し表 B に示せる結果を得た。而して理論値と比較するに第 5 表の如くである。

* 大嶽氏によると M. P. $187^\circ C$. (uncorr.)
Mueller 氏によると M. P. $186^\circ C$. (uncorr.)

即分離せる Methionine-fraction の結晶より調製した之等の誘導體は第 5 表に見る如く元素組成に於てそれ等の Methionine 誘導體の理論値とよく一致して居る。

第 5 表

誘 導 體 供 試 蛋 白	銅 鹽		α -Naphthyl isocyanate 誘導體	
	N%	Cu%	N%	S%
	Cu(C ₅ H ₁₀ SN ₂ O ₂) ₂ としての理論値		{C ₁₆ H ₁₆ SN ₂ O ₂ としての理論値	
	7.79	17.66	8.80	10.07
鰵 肉 蛋 白	7.80	17.69	8.84	10.36
鯨 肉 蛋 白	7.92	17.67	8.75	10.11
蠶 蛹 蛋 白	7.72	17.94	8.87	10.12
大 豆 蛋 白	7.66	17.66	8.96	10.28

[III] Methionine 結晶に Glutamic acid の混在

多くの蛋白に於ては直ちに純粹の Methionine 結晶を得たが、蠶蛹蛋白の場合には 2 回の分離實驗の中 1 回は Glutamic acid の混在したる結晶を得た、此混合結晶より Glutamic acid を分取するには混合結晶の少量溶液より昇汞によりて Methionine を沈澱せしめ、其濾液に硫化水素を通じて水銀を除去し、減壓濃縮して鹽酸の大部分を蒸溜し去り、酸化銀を用ひて鹽酸の殘部を去り、銀を硫化水素にて除去し濃縮したるに供試蛋白の約 0.25% に當る結晶を得た。

該結晶は 220°C. (WALDEN 氏によると M. P. 213°C.) に於て熔融分解し、Mikro-Dumas 法及び Van Slyke 法による窒素の定量値は殆ど Glutamic acid としての理論値に一致し、又苛性曹達により中和したる酸度は稍低 (85%) かりしも、其曹達鹽は所謂「味の素」に特有なる味を呈した。

分析の結果は次の如くである。

(a) Mikro-Dumas 法による全窒素量

供試量 (mg.)	窒素 (ccm.)	溫度 (°C.)	氣壓 (mm.)	N%
3.820	0.331	20.5	768.0	9.97
			C ₅ H ₉ NO ₄ としての理論値	9.50

(b) Van Slyke 法による窒素量

供試量 (mg.)	窒素 (ccm.)	溫度 (°C.)	氣壓 (mm.)	N%
1.00	0.17	23.0	769.0	9.65

(c) 酸度

供試量	滴定に要した n/45 NaOH	滴定數よりの計算値
5.00 mg.	1.30 ccm.	4.24 mg.
1.00 mg.	0.26 ccm.	0.85 mg.

總 括

1) 鰹肉蛋白・鯨肉蛋白・家蠶蛹蛋白・大豆蛋白より Methionine を單離し、分析の結果殆ど純粹なる事を確めた。其收量は水分及び灰分なき蛋白質に於て次の如くであつた。

鰹肉蛋白	鯨肉蛋白	蠶蛹蛋白	大豆蛋白
0.52%	0.37%	0.43%	0.08%

2) 大豆蛋白に於ける Methionine の發見は大嶽氏の實驗結果に相反するものである。

3) 實驗數少きを以て斷定を下し難きも Methionine は動物性蛋白には比較的多量に且つ廣く存在する事を推察し得る。

4) 蠶蛹蛋白の場合には Glutamic acid が Methionine 結晶に混在したので之を分離決定した。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導を賜つた恩師奥川讓教授に對し茲に深謝の意を表し、且又此研究を行ふに當つて實驗上の助力を與へられた花田稔氏に厚く感謝の意を表す。

昭和八年十月二十九日稿

文 献

- BAERSTEIN (1932): J. Biol. Chem., **97**, 663.
 BARGER and COYNE: Biochem. J., **22**, 1417.
 BARGER and WEICHELBAUM (1931): Biochem. J., **25**, 997.
 DU VIGNEAUD and MEYER (1931): J. Biol. Chem., **94**, 641.
 JACKSON and BLOCK (1931): Science, **74**, 414.
 JACKSON and BLOCK (1932): J. Biol. Chem., **98**, 465.
 MUELLER (1921): Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **18**, 14.
 MUELLER (1923): J. Biol. Chem., **56**, 157.
 ODAKE (1925): Biochem. Z., **161**, 446.
 大嶽 (大正 15 年): 日本農藝化學會誌, **2**, 742.
 PIRIE (1932): Biochem. J., **26**, 1270.
 WEICHELBAUM, T. E., WEICHELBAUM, M. B. and STEWART (1932): Nature, **129**, 795.
 WINDUS and MARVEL (1930): J. Amer. Chem. Soc., **52**, 2575.

表 A 遊離 Methionine の元素分析

分離に供試せる 各種蛋白	Sample	N ₂	t.	p.	N	Sample	CO ₂	H ₂ O	C	H
	mg.	ccm.	°C.	mm.	%	mg.	mg.	mg.	%	%
鰯肉蛋白	3.600	0.292	29.5	760.0	9.15	3.708	5.400	2.530	39.72	7.63
	4.435	0.356	28.5	761.0	9.10	3.930	5.740	2.686	39.84	7.65
鯨肉蛋白	5.380	0.448	29.3	759.5	9.39	4.852	7.231	3.315	40.65	7.64
	3.360	0.281	30.0	759.0	9.60	4.445	6.665	3.125	40.89	7.86
蠶蛹蛋白	2.630	0.216	29.0	759.8	9.27	3.485	5.120	2.420	40.07	7.77
	4.310	0.358	29.5	760.0	9.34	4.067	6.015	2.715	40.34	7.47
大豆蛋白	6.345	0.524	29.5	760.0	9.34	4.011	6.000	2.790	40.78	7.78
	3.495	0.299	30.5	760.0	9.69	4.112	6.115	2.880	40.56	7.83

表 B Methionine 誘導體の元素分析

(1) 銅 鹽

分離に供試せる 各種蛋白	Sample	N ₂	t.	p.	N	Sample	CuO	Cu
	mg.	ccm.	°C.	mm.	%	mg.	mg.	%
鰯肉蛋白	4.700	0.323	24.5	751.5	7.80	10.815	2.395	17.69
鯨肉蛋白	4.215	0.300	24.5	752.5	7.92	10.670	2.350	17.59
蠶蛹蛋白	4.710	0.320	24.5	751.0	7.72	11.155	2.505	17.94
大豆蛋白	4.832	0.338	24.5	752.5	7.66	8.230	1.820	17.66

(2) α -Naphthylisocyanate 誘導體

分離に供試せる 各種蛋白	Sample	N ₂	t.	p.	N	Sample	BaSO ₄	S
	mg.	ccm.	°C.	mm.	%	mg.	mg.	%
鰯肉蛋白	4.184	0.331	30.5	755.3	8.84	10.519	7.935	10.36
鯨肉蛋白	5.085	0.397	30.0	756.0	8.75	10.690	7.870	10.11
蠶蛹蛋白	4.693	0.372	30.5	355.0	8.87	11.425	8.419	10.12
大豆蛋白	5.113	0.407	28.0	745.0	8.96	11.235	8.412	10.28