UDC 547.963.2-115:545.3

230. 石川信雄：ヨード化蛋白の研究（第5報*）

濾紙電気泳動法によるヨード化カゼインの研究

Nobuo Ishikawa: Studies on Iodinated Proteins. V. Studies of various Iodinated Caseins by Paper Electrophoresis.

(Hoshi Pharmaceutical College**)

The degree of denaturation of casein when iodinated under various conditions was followed by paper electrophoresis. Under milder conditions, effecting partial iodination, α , β -peaks are still observed but after complete iodination, oxidation of the β -peak occurs and the phoretic pattern becomes indistinct. In incubated iodocasein, separation of α - and β -peaks becomes impossible.

(Received March 27, 1958)

ヨードカゼインが単なるヨード化合物ではなく甲状腺ホルモン様生理作用を有する事が認められたのは Ludwig, Mutzenbecher の報告を端緒とする¹⁾。即ちカゼインをヨード化しただけではこの生理作用が弱い、二次的に行われる熟成操作によつて初めて強力なサイロアクチブの性質を示すようになる。

Reinecke, Turner²⁾ は蛋白内サイロキシン生成量に及ぼす諸条件を検討し、熟成温度、触媒、攪拌速度、ヨード添加量の各因子が影響する事を報告した。湊、田中³⁾ は電解透析法を用いる脱無機ヨード操作により生理作用の強力な製品を得るに成功した。

先に著者はヨード化蛋白に関する研究の綜説を発表したが⁴⁾、現在までの何れの文献もヨード化条件にのみ研究の重点が向けられ、基質蛋白の問題に關しての報告は見当らない。著者は今まで単にヨードカゼインと称せられて居たものを少なくとも α 及び β の二成分に分けて考える必要を感じ、その分画の予備的研究として濾紙電気泳動法を応用する実験を行つた。

実験方法

試料の調製 1. カゼイン (I) 搾乳直後の脱脂乳より Carter 法⁵⁾により調製した。本品の乾燥は真空冷凍乾燥法によつた。

本品を pH 8.5 のベロナール緩衝液に 5%濃度に溶解し、試料とする。

2. ヨードカゼイン (II') (部分ヨード化) カゼイン 5g を 0.02 M Na_2CO_3 , 0.1 M NaHCO_3 混液 200 cc に溶解し攪拌下に I_2 溶液 29 cc (0.1 N I_2 +0.2 M KI) を 30 分を費して滴下する。38°, 2時間攪拌を継続すると初め pH 9.23 であつた液性は次第に pH 9.0 に近づく。10% H_2SO_4 を以つて pH 6.8 となし 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5 cc を添加し 5 分間攪拌後 15° となし 24 時間透析する。然る後 1.5 倍容の $\text{AcOH}+\text{EtOH}$ (pH 4.5) 液中に攪拌下に注加する。得たる沈澱を EtOH 次いで Me_2CO で夫々 2 回宛洗浄し乾燥する。(分析値 $\text{I}_2=4.2\%$)

2. の操作中ヨード添加を省略して得たカゼインを (II) とする。

3. ヨードカゼイン (II'') 0.1 N I_2 溶液 75 cc を用いて操作 2 を実施して得る。(分析値 $\text{I}_2=7.1\%$)

4. 熟成ヨードカゼイン (III') (高温ヨード化) カゼイン 10g に NaHCO_3 3g を添加した蒸留水 400 cc を加えて溶解し 38° 攪拌下 30 分間に粉末 I_2 1.8g を少量宛反応せしめる。然る後なお 1 時間攪拌を継続、次いで 60° に液温をあげ該温度にて 18 時間強攪拌を続ける。熟成完了後 10% H_2SO_4 をもつて沈澱せしめ水洗 2 回後 400 cc の温水に移し可及的小量の 10% NaOH の添加により溶液となし不溶分を遠心して除去し、得た透明液をセロファン膜内に入れ流水中 24 時間透析する。2 倍量の AcOH 酸性 EtOH (pH 4.5) 中に注加し得た沈澱を遠心し EtOH 次いで Me_2CO を用いて夫々 2 回宛洗浄し乾燥する。(分析値 $\text{I}_2=7.2\%$)

I_2 添加を省略して操作 4 を実施して得たものをカゼイン (III) とする。

* 第4報：星薬大紀要 20 6, (1957). ** Ebara, Shinagawa, Tokyo.

1) Ludwig, Mutzenbecher: Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's) 258, 195 (1939).

2) Reinecke, Turner: J. Biol. Chem. 162, 369 (1946).

3) 湊、田中：本誌 71, 578 (1951).

4) 石川：星薬大紀要 4, 57 (1954).

5) H.E. Carter: "Biochemical Preparation" 22 (1949).

濾紙電気泳動試験 Grassmann⁶⁾ 式にて実施。pH 8.5 ペロナル緩衝液をもつて湿潤せしめた濾紙 (東洋濾紙 No. 50; 2.5×40 cm) の中央部原点に試料の5%溶液 0.01 cc を線状に添付し、500 V, 5時間泳動させる。室温風乾後常法の如く1% BPB 試液にて染色, パラフィン固定処理後デンストメーターにて吸光度を測定。

Fig. 1. Paper Electrophoresis of Caseins

Veronal Buffer (pH 8.5)

Ionic Strength (0.045 μ)

500 V, 300 min.

Detection (1% B.P.B.)

実験結果

加温処理による影響 カゼイン (I), 38° 処理カゼイン (II), 60° 処理カゼイン (III) の泳動図は Fig. 1 および Fig. 3 に示される。(I) および (II) の何れも2個の主峰が観察される。特に (I) では第3の峰まで分離し、泳動度の異なる順に夫々 α , β , γ の各分層が見られる。

(II) の加熱処理の範囲では, α , β 二成分の分離に障害を及ぼさない事が判る。然るに (III) の 60° 熱処理した蛋白ではただ一峰のみしか出現せず明らかに変性の起つた事が認められる (Fig. 3)。

Fig. 2. Paper Electrophoresis of Iodinated Caseins

Fig. 3. Paper Electrophoresis of Incubated Proteins

ヨード化の影響 (Fig. 2) II' (部分ヨード化) は明らかに二成分分離像を示す。II'' (低温完全ヨード化) は β 峰の分離が不鮮明となる。即ちヨード添加量が一定量を越えると β カゼインの酸化による変性が先に起ると推測される。ヨード化により各峰の泳動度は原蛋白のそれより大となる傾向が示される。

熟成ヨード化の影響 (Fig. 3) 熟成ヨード化カゼイン (III') は対照カゼイン (III) と同じく熱処理による影響で只一峰のみを示す。ヨード化による影響は泳動度の増大となつて現われる。峰の位置は原蛋白 α および β 部分の中間に出現する。

考 察

以上の実験結果は Tiselius 法によるカゼイン分層の泳動実験の報告⁷⁻¹¹⁾ と大体に於て一致する。なお、緩衝液としては磷酸、酢酸、ペロナル各緩衝液を用いたがペロナル緩衝液が最も良い分離像を示す。然し何れの場合も Warner⁹⁾ の報告による α 部分の2峰の存在は濾紙泳動では識別するに至らなかった。

6) W. Grassmann: Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's) **290**, 1 (1952).

7) O. Mellander: Biochem. Z. **300**, 240 (1939).

8) R.C. Warner: J. Am. Chem. Soc. **66**, 1725 (1944).

9) N.J. Hipp: J. Am. Chem. Soc. **72**, 4928 (1950).

10) C.W. Turner: J. Dairy. Sci. **34**, 790 (1951).

11) N.J. Hipp: Ibid. **35**, 272 (1952).

38° 部分ヨード化蛋白では2峰の分離が示されるに反し同一条件にても完全ヨード化蛋白では原蛋白と異なる泳動図を示し部分変性が既起る。この様に部分ヨード化蛋白では各分層の分離が行われる現象はヨード化蛋白の分割操作に重要な知見と思われる。熟成したヨードカゼインでは全く異なつた泳動像を呈し一主峰が現われる。即ちこの場合は熱による影響とヨード化による影響とが重なつて変性現象は著しい。

結 論

以上の研究によりヨード化蛋白より各分層を分割するには部分ヨード化に止めたものを試料とせねばならない事が判つた。蛋白の完全ヨード化による酸化現象は β 部分に於て先に生起される。

本研究に熱心に協力された武藤玲子、竹石トシ子両嬢に厚く感謝する。

星薬科大学

UDC 582.46 : 581.19

231. 刈米達夫, 木村碩志*, 中村郁美**: イチョウ心材成分の研究 (第1報) ビロバノンの分離

Tatsuo Kariyone, Hiroshi Kimura, and Ikumi Nakamura: Studies on the Components of *Ginkgo biloba* L. I. Isolation of Bilobanone.

(National Hygienic Laboratory*, and Institute of Pharmaceutical Resources**.)

The heartwood of *Ginkgo biloba* L. was extracted with ether and approx. 5% of essential oil was obtained together with 0.52% of *d*-sesamin and 0.15% of crystals of m.p. 77~78°, $C_{17}H_{34}O$. Lowpressure distillation of this essential oil afforded about 40% of main distillate as pale yellow oil, b.p. 165~170°; d_4^{22} 0.978, n_D^{20} 1.509, $[\alpha]_D^{22} +44.36^\circ$. Its molecular formula corresponded to $C_{15}H_{20}O_2$ and it formed a semicarbazone of m.p. 142~143°, an oxime of m.p. 64°, and a 2,4-dinitrophenylhydrazone of m.p. 140°. It seemed to be an unknown sesquiterpene ketone and was named bilobanone.

Catalytic reduction of bilobanone with palladium-carbon resulted in absorption of two moles of hydrogen. The oxygen atom other than that forming the ketone was assumed to be in ether linkage and this was in good agreement with its infrared absorption data (9.05 μ). Reduction of the ketone with lithium aluminum hydride afforded a compound, $C_{15}H_{22}O_2$, b.p. 175~180°, and its acetylation formed a compound of b.p. 85~95, $C_{17}H_{24}O_4$. Wolff-Kishner reduction of the ketone gave a product of b.p. 140~143°, $C_{15}H_{22}O$, and dehydrogenation of bilobanone with selenium gave a product of b.p. 130~140°, $C_{15}H_{18}O$, and a small amount of sublimable crystals, m.p. 212~213°.

(Received March 28, 1958)

イチョウ *Ginkgo biloba* L. の葉及び果肉の成分については従来研究^{1,2)} があるが材の成分についてはまだ報告をみない。著者等はイチョウ材の粉末が地方で防虫の効ありと伝えられるので心材成分の研究に着手した。

イチョウ心材をエーテルで浸出し, mp. 123° 及び mp 77~78° の2種の結晶 (収量それぞれ 0.52%, 0.15%) と精油約5%を得た。京都大学薬学教室に於いて刈米, 飛永(美)は, この mp 123° の結晶が *d*-sesamin である事を証明し, ゴマ油から分離したものと混融し, これを確認した。

エーテル抽出物から *d*-sesamin を濾別し, 油分をエーテルに溶解して, 5% 重炭酸ソーダ溶液と振盪し, 暫

* 2-chome, Tamagawa yoga-machi, Setagaya-ku, Tokyo.

** 952, Nukii, Koganei-cho, Kitatama-gun, Tokyo.

1) Furukawa: Jap. J. Chem, **3**, 2 (1928); 古川: 理研報, **8**, 62 (1926); Furukawa: Sci. PapPers Inst. Phys. Chem. Research (Tokyo) **19**, 27, 39 (1932).

2) 刈米, 上田: “刈米教授退官記念論文集” 12.