($c=0.3786$, $l=0.5$ dm, CHCl_3). IR (CHCl_3) により OH 基の存在しないことを確認。

Ethyl ether (IX) の液体アンモニア中金属ナトリウムによる第 2 次分解 上記 ethyl ether (IX) 0.67 g をテトラヒドロフラン 5 cc, Et_2O 20 cc の混液に溶解し、これを液安 500 cc 中に烈しく攪拌しながら滴下し、同時に金属 Na 1 g を少量ずつ投入。所要時間 50 分間、反応温度 $-35\sim-45^\circ$ 。なお 1 時間 20 分間烈しく攪拌。反応終了後常法により処理して非フェノール性塩基 0.32 g とフェノール性塩基 0.25 g とに分離した。

開裂非フェノール性塩基の処理 (*d*-O-ethylarmepavine (X)) 上記非フェノール性生成体をベンゼンにとかし、アルミナクロマトにより精製したが結晶化困難。これを MeOH に溶解し過剰の CH_3I と水浴上 3 時間加温し、常法により処理して EtOH より再結, mp $195\sim197^\circ$, $[\alpha]_D^{16.5}: +152.0^\circ$ ($c=0.3156$, $l=0.5$ dm, EtOH) を示す微黄色柱状晶, $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}\cdot\text{CH}_3\text{I}$ (*d*-O-ethylarmepavine methiodide) 計算値 C 54.66, H 6.26, 実験値 C 54.39, H 6.44。本物質を *d*-O-ethylarmepavine methiodide (XI) の標本 (mp $196\sim197^\circ$) と混融および IR スペクトル (Nujol) により同一物質であることを確認。

開裂フェノール性塩基の処理 (*d*-1-(4-hydroxybenzyl)-2-methyl-6-ethoxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (XII)) 開裂フェノール性生成体は $\text{Me}_3\text{CO}\cdot\text{Et}_2\text{O}$ 混液より再結, mp $135\sim137^\circ$ の無色針状晶, $[\alpha]_D^{16.5}: +104.2^\circ$ ($c=0.2994$, $l=0.5$ dm, CHCl_3)。 $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_3\text{N}$ (*d*-1-(4-hydroxybenzyl)-2-methyl-6-ethoxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) 計算値 C 73.36, H 7.70, OCH_3 9.47, OC_2H_5 13.74, 実験値 C 73.17, H 7.75, OCH_3 10.07, OC_2H_5 14.63。

O-methyl 誘導体 (XIII) 上記フェノール性塩基を少量の MeOH にとかし nitrosomethylurea より製した CH_2N_2 の Et_2O 溶液を加えて 4 日間放置。常法により処理して淡橙色粘稠油状物を得。これを EtOH にとかし対応量の稀酸 EtOH 溶液を加え放置するに結晶析出。EtOH より再結, mp 145° (decomp), $[\alpha]_D^{17}: +146.3^\circ$ ($c=0.3008$, $l=0.5$ dm, MeOH) を示す無色羽毛状晶を得。 $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}\cdot(\text{COOH})_2$ (*d*-1-(4-methoxybenzyl)-2-methyl-6-ethoxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (XIII) oxalate) 計算値 C 64.02, H 6.77, 実験値 C 63.86, H 7.12。本物質を *l*-1-(4-methoxybenzyl)-2-methyl-6-ethoxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline oxalate の標本 (mp 143° (decomp))⁶⁾ と IR スペクトル (Nujol) 比較の結果全く一致。

徳島大学薬学部

UDC 577.173 : 547.96.02 : 547.466

280. 守屋 寛: Callicrein に関する化学的研究 (第 6 報⁵⁾) 構成アミノ酸および
末端アミノ酸について

Hiroshi Moriya: Chemical Studies on Callicrein. VI. Amino Acid
Composition and Terminal Amino Acids.

(Research Laboratory, Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.*)

In continuation of earlier works,¹⁻⁵⁾ amino acids constituting the homogeneous callicrein obtained and purified from hog pancreas were examined through paper chromatography. Hydrolysis of callicrein (Product L, 570 U/mg.) with hydrochloric acid afforded 15 kinds of amino acid, viz. cystine, aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, threonine, tyrosine, alanine, proline, valine, leucine, phenylalanine, arginine, histidine, and lysine. Determination of these amino acids was effected by hydrolysis of callicrein with hydrochloric acid, followed by the dinitrophenylation method of Sanger,⁶⁾ Schroeder,⁷⁾ and Levy,⁸⁾ and a two-dimensional paper chromatography. For the determination of tryptophan, which is likely to be destroyed by acid hydrolysis, colorimetry with *p*-dimethylaminobenzaldehyde by the method of Spies and Chamber⁹⁾ was carried out. Content of each amino acid is listed in Table I. For the detection of amine-terminal amino acid, dinitrophenylation and two-dimensional paper chromatography were carried out and it was identified as phenylalanine while the carbonyl-terminal amino acid was found to be alanine alone through Akabori's hydrazone decomposition method.¹⁰⁾

(Received February 14, 1959)

* Shimosakunobe, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken.

2) 第 2 報: 本誌 79, 32(1959).

4) 第 4 報: 本誌 79, 688(1959).

1) 第 1 報: 本誌 78, 346(1958).

3) 第 3 報: 本誌 79, 374(1959).

5) 第 5 報: 本誌 79, 1216(1959).

著者は第3報³⁾で豚の脾臓から精製した callicrein に対し最終段階の精製法として zone electrophoresis による方法を行なつて均質な製品を得たこと、第4報⁴⁾でこのものの等電点、第5報⁵⁾でこの安定性について報告したが、今回はこのものの構造研究として構成アミノ酸を定性的に追跡し、ついでこの組成を定量し、さらにアミノ末端アミノ酸ならびにカルボキシル末端アミノ酸について研究を行なつた。

実験材料としては第3報³⁾で報告した Product (L) の均質と考えられる最高純度のもの (500~570 U/mg) を使用した。まず構成アミノ酸の定性は塩酸で加水分解し、二次元ペーパークロマトグラフィーを行なつてニンヒドリンで発色させて行なつた。展開溶媒にはしばしば用いられる酢酸-ブタノール系およびフェノール-アンモニア系を用いた。この操作によつてシスチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、グリシン、スレオニン、チロニン、アラニン、プロリン、バリン、ロイシンの11種類のアミノ酸を認め、さらにロイシン部分、ヒスチジン部分周辺の汚紙を切りとり抽出し、それぞれ水飽和ベンジルアルコール、フェノール-アンモニアを溶媒とする一次元ペーパークロマトグラフィーを再度行なつてロイシン部分からフェニルアラニン、ヒスチジン部分からアルギニン、ヒスチジン、リジンを認め合計15種のアミノ酸を検出した。なおロイシン、イソロイシンの分離を標準アミノ酸を用いて試みたところ水飽和ベンジルアルコールでは分離せず、3%アンモニア飽和ブタノールで分離し得た。しかし吾々の検体では分離することが出来なかつた。またロイシン部分からメチオニンを検出することも出来なかつた。

これらの構成アミノ酸の定量には callicrein を塩酸で加水分解し、Sanger⁶⁾、Schroeder⁷⁾、Levy⁸⁾等のジニトロフェニル化法および二次元ペーパークロマトグラフィーを参考にして行ない、各 DNP-アミノ酸に対するスポットをきりとり抽出し比色定量した。結果は Table I に示す通りであるが、アスパラギン酸とグルタミン酸が多くヒスチジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸が極めて少ないということは第4報⁴⁾で示した等電点が可成り低く2.4であつたという酸性蛋白質としての組成を肯定させるものであつた。この定量値には各アミノ酸の酸加水分解に対する抵抗の強弱による差およびジニトロフェニル化 (DNP 化) に対する収率の差が存在することも考えられて厳密な定量値としては不十分かと思われるが、アミノ酸相互の量を比較すべく mol 比を算出し、さらに後述のトリプトファン量および糖類定量値¹¹⁾を分子量¹²⁾から差引いてアミノ酸量を算出した。Table I 第2項に示した各アミノ酸 mol 数に対応するアミノ酸残基相当全分子量を合計したものは13,995、後述の分子量値33,000からトリプトファン、糖類の量を差引いたものは27,918となつてアミノ酸量の2倍がほぼこの値と一致しており callicrein 1分子中には Table I に示すアミノ酸が丁度2倍の mol 数ずつ含有されていると想像される。

つぎに酸加水分解に弱く殆んど全量が破壊されると考えられるトリプトファンの定量には蛋白質のまま直接定量出来る Spies, Chamber⁹⁾の *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドによる比色定量を行なつた。Spies 等によれば硫酸濃度 19*N*で *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドに蛋白質を加えて 25° に放置する時間は分析すべき蛋白質によつて異なり通常12時間程度が適当であろうとされているが、著者は7, 10, 12, 14, 17時間について検討した結果10~14時間値が安定していることを知り、12時間値を以つてトリプトファン含有量を決定し3.3%なる値を得た。

つぎにアミノ末端アミノ酸の分析には Sanger⁶⁾、Schroeder⁷⁾、Levy⁸⁾等のジニトロフェニル化法および二次元ペーパークロマトグラフィーを参考にして行なつた。すなわち2,4-ジニトロ-1-フルオルベンゼン (DNFB) で DNP 化して得られる DNP-callicrein を塩酸で加水分解したが、12時間加水分解したものではエーテル可溶性部分から2,4-ジニトロフェノールと DNP-フェニルアラニンの明瞭なスポットを認め、6時間加水分解したものでは同じくエーテル可溶性部分から上記二つのスポットの他に極めて薄い不明瞭なペプチドらしい二つのスポットを得たが、これは分解不完全の結果生じたものと考えられる。なお水溶性部分からは ϵ -DNP-リジンに相当す

6) F. Sanger: Biochem. J. **39**, 507(1945).

7) W. A. Schroeder, J. Legette: J. Am. Chem. Soc. **75**, 4612(1953).

8) A. L. Levy: Nature **174**, 126(1954).

9) J. R. Spies., D. C. Chamber: Anal. Chem. **20**, 30(1948); *ibid.* **21**, 1249(1949).

10) 赤堀: Proc. Japan Acad. **29**, 561(1953); Bull. Chem. Soc. Japan **29**, 508(1956).

11) 第7報: 本誌 **79**, 1394(1959).

12) 第8報: 本誌 **79**, 1451(1959).

Table I. Amino Acid Composition of Callicrein

Amino acid	Calcd. ratio of amino acid residue	Assumed ratio of amino acid residue	Amino acid residue (%)
Tyrosine	3.56	4	4.0
Lysine	3.32	3	2.3
Cystine	1.75	2	2.7
Phenylalanine	2.86	3	2.7
Glycine	25.20	25	8.6
Leucine	10.48	10	6.8
Valine	9.14	9	5.4
Alanine	14.42	14	6.0
Proline	13.28	13	7.6
Threonine	8.32	8	4.9
Serine	12.64	13	6.9
Glutamic acid	14.78	15	11.7
Aspartic acid	18.35	18	12.5
Histidine	1.75	2	1.7
Arginine	1.00	1	0.9
Tryptophan			3.3
Galactose			9.2*
Glucosamine			2.9*
Total		140	100.1

* observed in next report.

る唯一のスポットを得たのみであり、これらのことからアミノ末端アミノ酸としてはフェニルアラニンのみであることを知った。

カルボキシル末端アミノ酸の決定は赤堀¹⁰⁾等のヒドラチン分解法にしたがって行なつた。callicrein を無水ヒドラジンと加熱し分解したものを DNP 化して重曹溶液で処理しさらに塩酸酸性とした時酢酸エチルに移行する部分について Levy の方法にしたがい二次元ペーパークロマトグラフィーを行なつた結果、三つのスポットを得た。その一つは著しく赤褐色を帯びていたことから bis-DNP-アスパラギン酸 (もしくはグルタミン酸) ヒドラジドであろうと考えられ、一つはジニトロフェノール、他が DNP-アラニンに対応する黄色の鮮明なスポットであった。

以上のことからカルボキシル末端アミノ酸として検出されたものはアラニンのみであり、ペプチド鎖中にカルボキシル基が遊離して存在するアスパラギン酸またはグルタミン酸の存在が予想された。

本研究に当たり発表を許可して頂いた当社山口社長、御指導を頂いた東大伊藤教授、高木教授、当社新延研究部長、松島主任研究員に謹謝し、実験の一部を担当された島沢英一郎氏に深謝する。

実 験 の 部

アミノ酸の定性的検出法 Product (L) 570 U/mg のもの 5 mg を 6N HCl 3 cc に溶解、封管中 110° で 24 時間加水分解後、NaOH デンケーター中で減圧乾固、水を加えてさらに乾固させ HCl を除去、0.5 cc の水にとかし (pH 3.8) ワットマン No. 1 濾紙 (40×40 cm) にて二次元ペーパークロマトグラフィーを行ないアミノ酸を定性的に検出した。第一次元展開は BuOH・AcOH・H₂O (4:1:2) の溶媒で 16 時間、第二次元展開は N/10 NH₄OH 加 23% フェノールで 15 時間展開、スポットの検出は 0.2% ニンヒドリン溶液を噴霧、90~95° に加温して行なつた。別に標準アミノ酸を全く同条件で展開したものと比較し、シスチン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、グリシン、スレオニン、チロシン、アラニン、プロリン、バリン、ロイシンの 11 種のアミノ酸を認め、さらにロイシン部分周辺の濾紙を切り抜き抽出して水飽和ベンジルアルコールを溶媒として一次元下降法にて 18 時間展開、フェニルアラニンを検出した。またヒスチジン部分周辺の濾紙を切りとり抽出したものは N/10 NH₄OH 加 23% フェノールにて上昇法で 18 時間展開、アルギニン、ヒスチジン、リジンを検出した。

アミノ酸の定量法 Product (L) の 570 U/mg のもの 5.5 mg を 6N HCl 1 cc にとかし、110°, 24 時間加熱して加水分解したものをアルカリデンケーター中減圧で蒸発乾固、pH 9.0 の NaHCO₃-Na₂CO₃ 緩衝液 2 cc にとかし DNFB 0.1 cc を含む EtOH 2 cc を加え室温で 2 時間烈しく振盪。混液を Et₂O で 6 回抽出して未反応の DNFB を除去、6N HCl を滴加酸性とし再び Et₂O で 6 回振盪抽出、Et₂O 液を合して HCl 酸性の水で洗い Et₂O 層とこの洗液を再び Et₂O で抽出した Et₂O 液とを合し Et₂O を留去したものを Me₂CO 0.5 cc に

とかし、この一定量を濾紙上にスポットした。Et₂O と振盪した HCl 酸性の水溶液は減圧で蒸発乾固し、酸性 Me₂CO 0.5 cc にとかし、この一定量を濾紙上にとつて DNP-Arg および DNP-His の定量に用いた。Et₂O 可溶性部分の展開には第一次元目に BuOH・NH₄OH (BuOH と同容の 0.1% NH₄OH とを振盪した上層) で 19 時間行ない、暗所で乾燥後第二次元目は 1.5M 磷酸緩衝液 (0.5M Na₂HPO₄・1M NaH₂PO₄) で 17 時間展開乾燥した。水可溶性部分は BuOH・AcOH・H₂O (4:1:5) の上層で 17 時間展開。クロマトグラム上の各 DNP-アミノ酸の同定は標準 DNP-アミノ酸の対応する位置から容易に判断することが出来た。各スポットは巾 3 mm 位の外縁を切りとり同時に盲検用としてスポット以外の部分をきりとつて試験管中各 4 cc の水と 55~60°, 15 分間加熱抽出。ベックマン spectrophotometer にて 360 mμ における吸光度を測定した。但し Pro のみは 385 mμ における吸光度を測定した。

トリプトファンの定量法 Product (L) 570 U/mg のもの 3 mg および 1.5 mg を蒸留水 1 cc 中に含むように検液を調製。別に 23.8N H₂SO₄ 8 cc と *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 30 mg を 2N H₂SO₄ 1 cc 中に含むように調製した液 1 cc を混合し 25° の恒温槽に 30 分以上保つたものに前記の検液を加え遮光して 25° に 12 時間放置後、0.04% NaNO₂ 0.1 cc を加えて 30 分後生じた青紫色の吸光度を波長 590 mμ で測定。比色の盲検には 23.8N H₂SO₄ 8.1 cc 蒸留水 0.9 cc を混合し検体 1.5 mg/cc を用いて *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドだけを含まないものを使用し、同時に標準 Try 90, 60, 30 γ/cc を用いて検量直線を作成し、これから検液中の Try 含有量を求めた。

アミノ末端アミノ酸の決定法 Product (L) 500 U/mg のもの 5 mg を pH 9 の NaHCO₃-Na₂CO₃ 緩衝液 1 cc にとかし、DNFB 0.1 cc を含む EtOH 0.7 cc を加え室温で 2 時間よく振盪した後、HCl を加えて酸性とし Et₂O で 4 回振盪抽出、未反応の DNFB を除く。水層に HCl を加えて 6N とし 110°, 12 時間加熱して加水分解、6 倍にうすめて 1N HCl 濃度とし Et₂O で 5 回振盪抽出、Et₂O 層を合して水で 1 回洗浄、Et₂O を留去し残渣を少量の Me₂CO にとかしワットマン No. 1 濾紙上にスポット、第一次元を BuOH・NH₄OH (BuOH を同容の 0.1% NH₄OH と振盪した上層) で 22 時間展開、暗所で乾燥後、1.5M 磷酸緩衝液 (0.5M Na₂HPO₄・1M NaH₂PO₄) で 17 時間第二次元を展開し、2,4-ジニトロフェノールおよび DNP-Phe に対応する明瞭なスポットを認めた。水に可溶性の部分は Et₂O で 1 回洗った後適当量に濃縮、この一部を濾紙上にとり BuOH・AcOH・H₂O (4:1:5) の上層を展開溶媒としてペーパークロマトグラフィーを行なつたところ ε-DNP-Lys に一致する唯一のスポットを得た。

カルボキシル末端アミノ酸の決定法 ヒドラジン水和物 50 g, トルエン 500 g, CaO 500 g を混合し熱をかけて処理¹³⁾ した共沸混合物の下層である無水ヒドラジン 0.5 cc を 500 U/mg の Product (L) 7.5 mg に加え還流冷却器を付し防湿用カルシウム管をつけて湯浴上 100° で 5 時間処理して分解、H₂SO₄ デンケーター中減圧で可及的にヒドラジンを除去、乾燥後 3% NaHCO₃ 7.5 cc にとかし、DNFB 0.25 cc を 15 cc の EtOH にとかしたものを加え 2 時間室温でよく振盪、水 50 cc を加え 6N HCl で酸性とし、AcOEt 30 cc 宛で 3 回抽出。AcOEt 層を 2% NaHCO₃ 70 cc, 40 cc, 30 cc でそれぞれ抽出、NaHCO₃ に移行する部分を新しい AcOEt 40 cc, 30 cc で振盪抽出。NaHCO₃ 部分をさらに HCl 酸性とし AcOEt 45 cc, 30 cc, 30 cc で抽出、抽出液を合して減圧濃縮し乾固したものを Me₂CO にとかし、ペーパークロマトグラフィー用ワットマン No. 1 濾紙上にスポットし第一次元は BuOH・NH₄OH で 22 時間展開、乾燥後第二次元は 1.5M 磷酸緩衝液で 17 時間展開した。これによつて *bis*-DNP-Asp (または Glu) ヒドラチドと思われる赤褐色を帯びたスポット、ジニトロフェノール、C 末端アミノ酸と考えられる DNP-Ala の黄色のスポットを認めたので、黄色スポット部分をきりと水で抽出、再度クロマトで標準 DNP-アミノ酸と同時に展開して C 末端アミノ酸として Ala を検出した。

帝国臓器製薬株式会社研究部

13) K. Kusama: J. Biochem. (Japan) 44, 375(1957); 日本化学会編: 実験化学講座 23, 204(1957).