H₂SO₄ で酸性とし、Et₂O 抽出し、Et₂O 液を飽和 NaHCO₃ 液つぎに水で洗浄し、無水 Na₂SO₄ で乾燥後、Et₂O を留去すると、エキスは結晶化する。これを 95% EtOH から再結晶して、mp 125° の結晶 (V) を得。C₁₂H₁₈O₃N 計算値 C 65.74, H 5.98, N 6.39, 実験値 C 65.72, H 6.00, N 6.30.

Ethyl 4-(3,4-dimethoxyphenyl)acetoacetate (VII) (V) を無水 EtOH に溶解し、0° に冷しながら乾燥 HCl ガスを飽和させる。これを室温に 12 時間放置後減圧濃縮して EtOH と HCl を除去し、残渣にイミド酸エステル HCl 塩の加水分解に必要な計算量の水の 3 倍を含む無水 EtOH と、conc HCl の混合物を加え、これを水浴上に 30 分加温する。冷後これを氷水中に注ぎ、Et₂O で抽出、水洗後無水 Na₂SO₄ で乾燥し、Et₂O を留去、残油を減圧蒸留に付す。(VII) bp_s 173° C₁₄H₁₈O₅ 計算値 C 63.14, H 6.81, 実験値 C 63.23, H 6.79.

3-Methoxy-4-(3,4-dimethoxyphenyl)butyric acid (IX) 1 mol の NaBH₄ の 95% EtOH 液に冷却しつつ (VII) 1 mol の 95% EtOH 液を少量ずつ加え、これを一夜室温に放置後 H₂SO₄ 酸性とし、Et₂O 抽出、Et₂O 液は無水 Na₂SO₄ で乾燥し、Et₂O を留去して残渣を得。本残渣は、酸とエステルの混合物である。これを無水 MeOH に溶解し、10 mol の CH₃I と 5 mol の乾燥 Ag₂O とを加えると、漸次発熱しつつ反応する。反応終了後水浴上に 2 時間加温後汙過、汙液を減圧濃縮して油状物を得。これをふたたび MeOH に溶解し、10% NaOH 液と水浴上に 4 時間加温して加水分解する。これを減圧濃縮し、水で希釈し、H₂SO₄ 酸性とし、Et₂O 抽出する。Et₂O 液は水洗後 Et₂O を留去し、残渣を熱水から再結晶して mp 165° の針状晶 (IX) を得。C₁₈H₁₈O₅ 計算値 C 61.40, H 7.14, 実験値 C 61.16, H 7.03.

藤沢薬品工業株式会社大阪研究所

UDC 547.173 : 547.96.02 : 541.24

守屋 寛：Callicrein に関する化学的研究 (第8報*) 分子量についておよび補遺

Hiroshi Moriya : Chemical Studies on Callicrein. VIII. Molecular Weight of Callicrein and the Supplement.

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

Physical constants of the purified and homogeneous callicrein (Product L, 570 U/mg.) extracted from hog pancreas were measured in order to find its molecular weight. Sedimentation constant by ultracentrifugal analysis was 2.85×10^{-13} and diffusion constant was 8.39×10^{-7} cm²/sec. from which the molecular weight was calculated as 33,000. Absorption maximum of this Product L was found to be at 281 mμ, same as that in the Product G²⁾ (220 U/mg.). Amine-terminal amino acid was examined through phenyl isothiocyanate by the dinitrophenylation method and was found to be phenylalanine. The fact that this callicrein product did not lose potency by trypsin treatment was reported earlier³⁾ and the variation in ultraviolet absorption, paper electrophoretic migration, and paper chromatographic movement were examined.

(Received May 9, 1959)

前報* 迄に豚の膵臓から抽出した callicrein について純化精製法および化学的性質についてそのあらましを報告し、ガラクトースおよびグルコサミンを含む糖蛋白であることを明らかにした。今回はその分子量を推定すべく測定を行なつたので二、三の補遺と共に報告する。

実験に用いた callicrein は Product (L)¹⁾ の 570 U/mg のもので沈降定数の測定は磷酸緩衝液を用い超遠心機による沈降界面の移動から計算した。callicrein は 1%濃度に溶解し偏比重は 0.75 と仮定した。この結果計算して得られた沈降定数 ($S_{20,w}$) は 2.85 S であった。沈降定数の算出には各濃度における値を求めてその濃度依存性を確かめなければ正確な値とはいえないのでこれは一種の概算値と考えられよう。つぎに拡散定数の測定にはペロナール緩衝液を用いて 2, 4, 6, 21 時間における拡散界面を撮影し 5~7 倍に引伸ばした印画紙を切りとりこの重量を計つて面積を測定し $D_{20,w} = 8.39 \times 10^{-7}$ cm²/sec なる値を得た。拡散定数の計算には変曲点法、

* 第7報：本誌 79, 1394(1959).

** Shimosakunobe, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken.

1) 第3報：本誌 79, 374(1959).

逐次解析法等も存在するが著者は同一像を印画紙に数枚づつ引伸ばしたものの重量の平均から面積を測定することによつて拡散像を解析する際生ずる誤差を他の方法によるより小さく出来たのではないかと考えた。このようにして得られた沈降定数と拡散定数とを基にして

$$M = \frac{RTS}{(1-V\rho)D} = 2.44 \times 10^{10} \times \frac{S_{20,w}}{(1-0.9982 V_{20}) D_{20,w}}$$

なる式²⁾より分子量を計算した結果, callicrein の分子量は 33,000 であつた。(但し S : 沈降定数, D : 拡散定数, V : 偏比容, ρ : 溶液の密度, $V_{20}=0.75$).

しかしこの値は沈降定数($S_{20,w}$)が有限濃度における値でありまた計算には荷電の影響を無視しさらに粒子の水和の影響による偏比容の誤差を伴なつてゐるので, 分子量の概算値と考えられるが, callicrein を 35%硫酸溶液表面に添加して生ずる単分子膜の表面圧を測定して得られた分子量概算値約 30,000 とほぼ一致した結果が得られた。

つぎに第2報³⁾において Product (G) 220 U/mg のものについて紫外外部吸収を測定し 281 m μ 附近に吸収極大が存在することをのべたがその後さらに Product (L)⁴⁾ 570 U/mg の均質なもののについて測定を行なつたところ, 同様 281 m μ に吸収極大が存在することを確認した。また第6報⁵⁾では callicrein のアミノ末端アミノ酸をジニトロフェニル化法で検索しフェニルアラニンであることをのべたが, 今回は Edman 等⁶⁻⁷⁾のフェニルイソチオチアネートを用いた方法で再確認を行ない同様にフェニルアラニンを検出した。第5報⁸⁾では callicrein にトリプシンを作用させて効力を失なわないことを報告したが, 今回はトリプシンの作用によつて callicrein 分子の形状が変わるかどうかを調べる目的でトリプシン処理前後の紫外外部吸収状態および浮紙電気泳動, ペーパークロマトグラフィー(以下 PPC と略)による移動度の変化を観察した。先ず紫外外部吸収状態の変化は検体として 100~300 U/mg の callicrein を使用したが, トリプシンと 37° で incubate することによつて, 用いた callicrein の純度が低い程 275~281 m μ 附近の吸収極大が低下し, また incubate 後 10%トリクロル酢酸で処理した上澄では純度が低くなるにつれて 275~281 m μ 附近の吸収値が上つており, 300 U/mg のものでは incubate 前後の前記二つの増減が低下した。PPC では 200 U/mg 迄の純度のものではトリプシンと incubate することによつて分解産物と思われるスポットが出現したが 500 U/mg のものではこの移動度は incubate 前のものと同様で殆んど移動せずまた分解産物も検出し難かつた。浮紙電気泳動では 570 U/mg のものを用い incubate 前のスポットと全く同様なスポットを得たのみで分解して生じたと思われるスポットは存在しなかつた。以上のことからトリプシン処理を行なつても callicrein 分子には本質的な変化はおこらないものと思われる。そしてこのことは脾臓を自己融解させて活性 callicrein を抽出していることとあわせ考えてもこの場合脾臓中のトリプシンの作用を受けている事実から考え得ることである。

本研究に当たり発表を許可して頂いた当社山口社長, 御指導を賜つた東大伊藤教授, 高木教授, 久保田幸穂氏, 当社新延研究部長, 松島主任研究員に謹謝し, 沈降および拡散実験をして下さつた東大薬学部高橋道子氏, 同応用微生物研究所三井宏美氏, 綿津氏および単分子膜実験について御指導ならびに実施をして下さつた東大薬学部今堀助教, 玉木国夫氏に深謝し, 実験の一部を担当された当社研究部島沢英一郎氏に深謝する。

実 験 の 部

沈降定数の測定 Product (L) 570 U/mg を燐酸緩衝液 pH 7.6, $\mu=0.39$ に 1%濃度にとかし超遠心機により 56,100 rpm の速度で沈降させ, 32 分間隔に 5 つの沈降界面を撮影, この沈降度からみかけの沈降定数を測定, 標準状態に換算した。但し偏比容は 0.75 とした。

拡散定数の測定 Product (L) 570 U/mg をペロナル緩衝液 pH 8.6, $\mu=0.1$ に 0.5% 濃度にとかし 100 倍量の緩衝液に 24 時間セロファン膜を用いて透析を行なつた膜外液に対して拡散させ 2, 4, 6, 21 時間目の拡散界面の像を撮影し, 5~7 倍に引伸ばしたものを各時間について 4 枚づつ作成しこの拡散像をきりとり重量を測定してその平均から面積を算出し拡散時間の逆数に対する直線から無限大時間のみかけの拡散定数をよみとり,

2) 水島, 赤堀: “蛋白質化学” II 357(1954).

3) 第2報: 本誌 79, 32(1959).

5) P. Edman: Acta Chem. Scand. 4, 283(1950).

6) H.F. Conrat, J.F. Conrat: Ibid. 5, 1409(1951).

7) M. Ottesen: Nature 170, 801(1952).

4) 第6報: 本誌 79, 1390(1959).

8) 第5報: 本誌 79, 1216(1959).

Table I.

Calculation of Molecular Weight of Callicrein

Sedimentation constant	: 2.85 S
Diffusion constant	: 8.39×10^{-7} cm. ² /se.c
Molecular weight	: 3.30×10^4

標準状態に換算した。

フェニルイソチオチアネートによるアミノ末端アミノ酸の検出法 Product (L) 500 U/mg, 10 mg を蒸留水 1 cc, ピリジン 1 cc にとかし, フェニルイソチオチアネート 0.3 cc を加え, N NaOH をマイクロビュレットから滴下して pH 8.7 とする。これを 40° に保つて時々振盪し, pH が下つたら N NaOH を滴下して pH 8.7 に保つ。2.5 時間振盪後クロロヘキサンで 5 回抽出, 水層に 4N HCl を加えて HCl 濃度を 0.9N とし 75° に保つ。2.5 時間振盪後 Et₂O で 8 回抽出, Et₂O 層を合して HCl 酸性の水で 1 回洗い Et₂O をとばして乾固, これを 0.25N Ba(OH)₂ 1 cc にとかし封管中 140°, 25 時間加熱ついでドライアイスを加えて BaCO₃ を沈殿させ上澄液を 2×40 cm のワットマン No. 1 濾紙上にスポット, BuOH·AcOH·H₂O (4:1:2) および 0.1N NH₄OH 添加 23% フェノールでそれぞれ展開, 乾燥後ニンヒドリンを噴霧して 90~100° に 5 分間加熱, 検出した。

帝国臓器製薬株式会社研究部

UDC 547.92 : 545.844.42

西岡五夫：ステロイドおよびトリテルペノイドのペーパークロマトグラフィー (第2報¹⁾)
ステロールのペーパークロマトグラフィー

Itsuo Nishioka : Paper Chromatography of Steroids and Triterpenoids. II.
Paper Chromatography of Sterols.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyushu*)

In order to examine relationship between the structure and R_f value of steroids, various steroids were separated by the reverse-phase chromatography using liquid paraffin as the stationary phase and developing with a polar solvent. It was thereby found from R_f values of stanols (Table I) and stanones (Table II) that the effect of the A/B ring (configuration of H at C-5) of a steroid ring on the polarity of the molecule was greater in the coprostane type (A/B *cis*) than in cholestane type (A/B *trans*). It was also found from R_f values of 3β-stenols [cholestenols (Table III) and ergostenols (Table IV)] that the effect of a double bond in a steroid ring on the polarity of a molecule decreases in the order of the position of the double bond at 14, 8(14), 4 or 7, and 5.

(Received May 11, 1959)

第1報¹⁾で、著者は流動パラフィンを固定相とする逆相ペーパークロマト法によりステロイドを分離し、ステロイドの各種置換基が R_f 値におよぼす影響について報告した。今回、著者はステロイドの A/B 環融合形式 (C₅-H の立体配位) および 3β-stenol 類の各位置の二重結合が R_f 値におよぼす影響について検討する目的で本研究を行ない新知見を得た。

すなわち、濾紙に流動パラフィンを保持させ固定相とし、移動相としては、下記 (1)~(5) の溶媒を用いる逆相法により、ステロール類を分離した。

展開溶媒 (1) MeOH·H₂O (95 : 5), (2) MeOH·H₂O (97 : 3), (3) PrOH·MeOH·H₂O (15 : 82 : 3), (4) PrOH·MeOH·H₂O (20 : 75 : 5), (5) ethylcellosolve·PrOH·MeOH·H₂O (40 : 15 : 35 : 15)

* Katakasu, Fukuoka.

1) 西岡：本誌 78, 1428(1958).