

Diese Arbeit wurde unter der freundlichen Leitung von Herrn Prof. T. Tsukamoto und Herrn Prof. N. Toida durchgeführt, wofür die Verfasser zu großem Dank verpflichtet sind. Herrn S. Soejima danken die Verfasser für seine Mithilfe bei der Aufzeichnung der Elektroretinogramme.

Zusammenfassung

Die Untersuchung über die Rhodopsin-Regeneration *in vivo* sowie den Einfluß verschiedener Alkohole auf das Elektroretinogramm kleiner Stückchen der Retina zeigten, daß die Wirkungen auf die Förderung der Regeneration des Rhodopsins *in vivo* und auf die Zunahme der Höhe der b-Welle des ERG miteinander in Zusammenhang steht. Beide Effekte sind insbesondere im Zentrum der Retina einander direkt proportional.

(Eingegangen am 15. Februar 1960)

UDC 612.843.14

80. Takeo Tsukamoto, Tetsuya Komori und Yasuko Inoue : Chemische Studien über die visuelle Funktion. VIII.¹⁾ Über den Aminosäure-Bestandteil und die N-terminale Aminosäure von Kröten-Scotopsin.

(Pharmazeutisches Institut, Medizinische Fakultät, Universität Kyushu*¹⁾)

In der letzten Mitteilung²⁾ haben die Verfasser über das Scotopsin, den Protein-Bestandteil des lichtempfindlichen Pigments, d. h. das Rhodopsins, das in den visuellen Zellen vorkommt, berichtet und auch darüber, daß das Scotopsin des Rindes aus 18 Aminosäuren zusammengesetzt ist, und daß sich Histidin und Cystein — nach Untersuchung der Titrierungs-Kurve — an dem Bleichungs-Prozeß des Rhodopsins wahrscheinlich beteiligen.

Im Nachstehenden folgen die bei beiden Experimenten erhaltenen Resultate über den Aminosäure-Bestandteil und die N-terminale Aminosäure des Kröten-Scotopsins.

Experimentelles

Die Reinigung des Scotopsins von Kröten-Retina wurde nach der im früheren Bericht beschriebenen Methode^{2,3)} vorgenommen, wodurch die weißen Außen segmente der Stäbchen erhalten wurden.

Um den Scotopsin-Extrakt zu erhalten, wurden die weißen Außen segmente mit 2-proz. wäßriger Lösung von Digitonin extrahiert. Dieser Extrakt wurde bei 12000 r.p.m. 15 Min. lang zentrifugiert. Aus der klaren, überstehenden Flüssigkeit wurde das Trockenpulver im Vakuum bei 2 mm Hg, bei -50° hergestellt. Das erhaltene Trockenpulver wurde nach der elektrophoretischen Untersuchung als rein befunden.

Qualitative Analyse des Aminosäure-Bestandteils durch Hydrolyse—Zur wäßrigen Lösung von Scotopsin-Digitonid wurde die 1.5-fache Menge von HCl (Wako Pure Chemicals Co. Reagens besonderer Qualität, 35%) zugesetzt und die erhaltene Lösung 24 Std. lang bei $105\sim 110^{\circ}$ im Bombenrohr erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der braune Niederschlag abfiltriert und mit H_2O gewaschen. Das Filtrat wurde bei vermindertem Druck abgedampft und getrocknet. Zu dem erhaltenen getrockneten Niederschlag wurde wieder eine geringe Menge H_2O zugefügt und die erhaltene Lösung unter vermindertem Druck wiederholt (fünfmal) abgedampft. Der Rückstand des Niederschlags, den man so von HCl befreit hatte, wurde als Lösung für die Untersuchung verwendet.

*¹⁾ Katakasu, Fukuoka (塚本赳夫, 古森徹哉, 井上雍子).

1) VII. Mitt. T. Komori, H. A. Kuriyama : Dieses Bulletin, **9**, 560 (1961).

2) T. Tsukamoto, T. Komori, N. Kinoshita, N. Toida, H. A. Kuriyama : *Ibid.*, **6**, 81 (1958).

3) T. Komori : *Ibid.*, **9**, 551 (1961).

Die Untersuchung der alkalischen Hydrolyse wurde nach der folgenden Methode ausgeführt: Der wäßrigen Lösung von Scotopsin-Digitonid wurde die zweifache Menge wäßrige Lösung von $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (4%) zugesetzt und die erhaltene Lösung 7 Std. lang im Bombenrohr auf 100° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 1N H_2SO_4 genau neutralisiert und dann abfiltriert. Der dabei erhaltene weiße Niederschlag wurde mit heißem H_2O gewaschen. Das Waschwasser wurde mit dem Filtrat vereinigt und diese Lösung sofort auf dem Wasserbad abgedampft. Für die weiteren Untersuchungen wurde dem Rückstand nach dem Trocknen im Exsiccator eine bestimmte Menge Wasser zugefügt.

Die ein- und zwei-dimensionale Papierchromatographie nach der aufsteigenden Methode wurde im früheren Bericht²⁾ beschrieben. Die aromatischen Aminosäuren trennen sich nach folgender Methode: 1 g Aktiv-Kohle wurde in 20-proz. AcOH-Lösung 1 Std. auf 100° erhitzt und nach dem Abkühlen mittels eines Nr. 3 Glas-Filters (Innen-Durchmesser: 1 cm) abfiltriert und dann mit Wasser gewaschen, um eine Aktiv-Kohle-Säule zu bilden. Auf diese Säule wurden 2 ccm von obenerwähntem alkalischem Hydrolyse-Produkt gegossen. Sodann wurde mit 10 ccm AcOH (10%) und schließlich mit 30 ccm H_2O eluiert (Durchlaufgeschwindigkeit: 0.5 ccm/Min.). Die dabei in der Säule verbliebenen aromatischen Aminosäuren wurden mit 40 ccm AcOH-Phenol-Lösung herausgewaschen (Phenol wurde bis zu 5-proz. Konzentration in 50 ccm von 20-proz. AcOH aufgelöst). Aus der hierbei erhaltenen Lösung wurde das Phenol mit Et_2O extrahiert, beseitigt und dann abgedampft. Die eindimensionalen papierchromatographischen Untersuchungen ließen zwei Aminosäuren erkennen, und zwar Tyrosin und Phenylalanin.

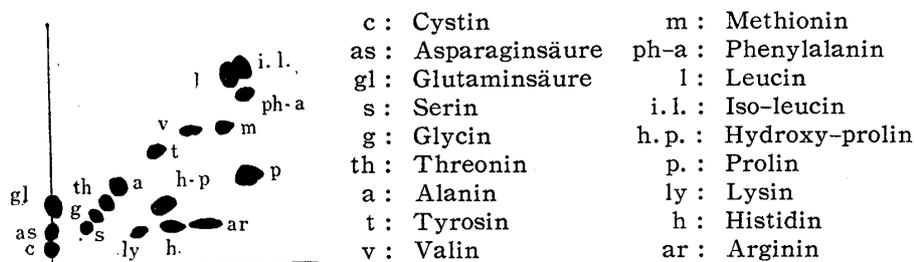


Fig. 1. Zweidimensionales Papierchromatogramm des Kröten-Scotopsins

Als Resultat der zweidimensionalen Papierchromatographie wurden 18 Aminosäuren als Bausteine des Kröten-Scotopsins nachgewiesen, d. h. Cystin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glycin, Threonin, Alanin, Tyrosin, Valin, Methionin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Hydroxyprolin, Prolin, Lysin, Histidin und Arginin.

N-Terminale Aminosäure—Zur 2.5 ccm Scotopsin-Digitonid-Lösung (Kjeldahl-N : 0.173 mg/ccm) wurden 0.1M KCl Lösung (3 ccm) und 2,4-Dinitrofluorbenzol (0.1 ccm) zugesetzt. Diese Reaktionsmischung wurde mit 0.5N KOH Lösung auf pH 8~8.5 gebracht und mit Infrarotstrahlen unter starkem Rühren auf $20\sim 24^\circ$ erwärmt. Nach 12 Std. langem Rühren wurde der gelbe Niederschlag aus der Reaktionsmischung abgetrennt und bei 3000 r.p.m. 15 Min. lang zentrifugiert. Der hierbei erhaltene Niederschlag wurde erst mit H_2O , dann mit EtOH, ferner mit Et_2O gut gewaschen, und unter vermindertem Druck getrocknet. Das getrocknete DNP-Protein wurde mit 3 ccm HCl, das beim konstanten Siedepunkt (110°) destilliert wurde, 8 Std. lang im Bombenrohr auf $105\sim 110^\circ$ erhitzt. Das dabei erhaltene hydrolysierte Produkt wurde nach bekannter Methode⁴⁾ mit Et_2O extrahiert und in 2 Teile geteilt, d. h. in einen Et_2O -löslichen und einen H_2O -löslichen Teile. Jeder Teil wurde von ein- und zwei-dimensional Papierchromatographie untersucht. Wenn der in Et_2O lösliche Teil nach Levys zweidimensionaler Methode entwickelt wurde, kam ein gelber Fleck zum Vorschein. Der Fleck kann Dinitrophenol oder DNP-Glycin sein.

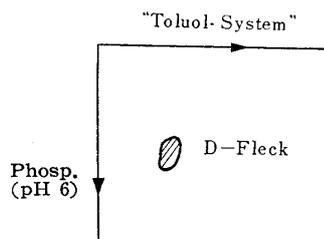


Fig. 2. Das von dem in Äther-löslichen Teil erhaltene zweidimensionale Papierchromatogramm des Hydrolyse-Produkts von DNP-Kröten-Scotopsin

4) A. L. Levi, C. H. Li : J. Biol. Chem., **213**, 487 (1955).

Wenn DNP-Glycin mit HCOOH oder mit 1N HCl besprüht wird, verschwindet die gelbe Farbe im allgemeinen nicht, im Falle von Dinitrophenol aber verschwindet sie.

Der von dem in Et₂O-löslichen Teil erhaltene Fleck (das nennen die Verfasser D-Fleck) zeigte dieselbe Eigenschaft wie Dinitrophenol bei der Prüfung mit HCl oder HCOOH. Wenn der D-Fleck mit H₂O extrahiert und dann im Toluol-System nach der Methode der eindimensionalen Papierchromatographie entwickelt wurde, zeigte sich ein gelber Fleck (Rf 0.27), der beim Besprühen mit HCOOH und HCl dieselbe Eigenschaft wie Dinitrophenol zeigte. Fig. 3 zeigt die Prüfung der

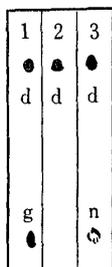


Fig. 3. Eindimensionales Papierchromatogramm des D-Flecks
(Benzol-1% AcOH (1:1))

- 1 : Standard
2 : vom D-Fleck erhaltenes Material
3 : von der Origin.-Lösung mit Äther extrahierten Lösung
d : Dinitrop. g : DNP-Gly. n : negativ. unter dem U. V.

eindimensionalen Papierchromatogramme (Lösungsmittel : Benzol-1% AcOH=1:1). Nr. 1 in Fig. 3 zeigt das Standardchromatogramm. Während Dinitrophenol mit der Lösungsmittelfront wanderte, ist das DNP-glycin am Ausgangspunkt geblieben. Nr. 2 in Fig. 3 zeigt das Chromatogramm des von dem D-Fleck erhaltenen Materials. Dieser Fleck zeigt dieselbe Eigenschaft wie Dinitrophenol. Nr. 3 in Fig. 3 zeigt das Chromatogramm der von der Originallösung mit Et₂O extrahierten Lösung. Der Fleck am Ausgangspunkt von Nr. 3 in Fig. 3 zeigt eine andere Farbe als das DNP-Glycin, und wenn dieser Fleck am Ausgangspunkt mit Ultraviolettstrahlen belichtet wurde, trat schwache Fluoreszenz auf. Alle DNP-Aminosäuren zeigten bei diesem Verfahren aber schwarze Farbe. Aus obigem Resultat ist der D-Fleck als Dinitrophenol zu betrachten.

Die im H₂O-lösliche Gruppe wurde getrocknet und dann in einer kleinen Menge AcOEt gelöst. Die hierbei erhaltene Lösung wurde auf das Filtrierpapier (Toyo Roshi Nr. 51) aufgetragen und mit BuOH-AcOH-H₂O entwickelt. Im allgemeinen kommen basische DNP-Aminosäuren in der im H₂O-löslichen Gruppe vor. Man findet in diesem Chromatogramm oberhalb von DNP-Arginin einen gelben Fleck (Rf 0.82). Diesen Fleck könnte man nach seinem Rf-Wert als O-DNP-Tyrosin betrachten. Dieses zeigt keine gelbe Farbe und färbt sich mit Ninhydrin-Reagens violett. Dieser Fleck (Rf 0.82) aber zeigt keine schwarze Farbe unter der Ultraviolett-Lampe und reagiert nicht mit Ninhydrin-Reagens. Somit gibt es in dieser H₂O-löslichen Gruppe keine DNP-Aminosäure. Außer der 8 Std. langen Hydrolyse auch eine 4 Std. lange ausgeführt. Beide ergaben dasselbe Resultat.

Eine Ionen-Austauschersäule wurde mit einer Mischung von Amberlite IRA-400 (OH-Typ : 3 ccm) und Amberlite IR-120 (H-typ : 1.5 ccm.) (20~50 Masche) gefüllt. In diese Säule wurde die Scotopsin-Digitonid-Lösung gegossen und 17 Std. lang bei 6~7° stehengelassen.

Nachdem das Scotopsin-Digitonid mit 0.5 ccm/Min. Geschwindigkeit durchgelaufen war, wurde das Innere der Säule mit 20 ccm. wässriger Digitonin-Lösung (1%) und 10 ccm H₂O gewaschen. Die hierbei erhaltene Lösung wurde bei -60°, 2 mm Hg gefroren und getrocknet, um trockenes Pulver zu erhalten. Mit diesem Pulver wurde obiges Dinitrophenyl-Verfahren bei pH 7 ausgeführt. Zu der Reaktionsmischung wurde das EtOH bei pH 2 zugefügt und die so erhaltene Lösung im Kühlschrank 1 übernacht lang stehengelassen. Der hierbei erhaltene Niederschlag wurde in zwei Teile, in den in Et₂O-löslichen und den in H₂O-löslichen geteilt. In dem in Et₂O-löslichen Teil befand sich Dinitrophenol und in dem H₂O-löslichen Teil ε-DNP-Lysin, das nicht als N-terminale Aminosäure betrachtet werden kann.

Aus obigem Resultat wurde festgestellt, daß die N-terminale Aminosäure nicht mit dem DNP-Verfahren gefunden werden kann. Diese Resultat stimmt überein mit Albrechts⁵⁾ Bericht, wonach er im Rinder-Rhodopsin keine N-terminale Aminosäure hatte nachweisen können.

Zusammenfassung

Die Verfasser reinigten Scotopsin von *Bufo vulgaris formosus* BOULENGER nach der früher beschriebenen Methode, untersuchten den Aminosäure-Bestandteil und wiesen 18 Aminosäuren mit zweidimensionaler Papierchromatographie nach.

Gleichzeitig suchten die Verfasser mit 2,4-Dinitrofluorbenzol die N-terminale Aminosäure nachzuweisen; jedoch konnte nach dieser Methode eine N-terminale Aminosäure nicht gefunden werden.

(Eingegangen am 15. Februar 1960)

5) G. Albrecht : J. Biol. Chem., **229**, 477 (1957).