

Das Umlagerungsprodukt wird auch hier als *m*-Dinitrobenzoat isoliert; es bildet, aus Aceton-Methanol umkrystallisiert, nahezu farblose Nadeln vom Schmp. 147—148°.

17.1 mg Sbst., 2 ccm Chloroform,  $l = 1$  dm,  $\alpha_D$ : +0.05°,  $[\alpha]_D^{25}$ : +5.85°.

5.095 mg Sbst.: 13.170 mg CO<sub>2</sub>, 3.610 mg H<sub>2</sub>O. — 4.073 mg Sbst.: 0.177 ccm N<sub>2</sub> (24°, 765 mm).

C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub>N<sub>2</sub>. Ber. C 70.55, H 8.02, N 4.84. Gef. C 70.50, H 7.92, N 5.03.

Der durch Verseifung gebildete Alkohol schmilzt bei 136°, er fällt nicht mit Digitonin.

22.4 mg Sbst., 2 ccm Chloroform,  $l = 1$  dm,  $\alpha_D$ : -0.72°,  $[\alpha]_D^{20}$ : -64.5°.

Das Acetat bildet aus Aceton-Methanol Blättchen vom Schmp. 92°.

8.0 mg Sbst., 2 ccm Chloroform,  $l = 1$  dm,  $\alpha_D$ : -0.18°,  $[\alpha]_D^{20}$ : -35°.

4.530 mg Sbst.: 13.540 mg CO<sub>2</sub>, 4.420 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub>. Ber. C 81.62, H 10.88. Gef. C 81.52, H 10.92.

Auch dieses Umlagerungsprodukt addiert bei der katalytischen Hydrierung nur 1 Mol. Wasserstoff. Das gebildete Dihydro-Derivat bildet ein *m*-Dinitrobenzoat vom Schmp. 112—113°.

30.7 mg Sbst., 2 ccm Chloroform,  $l = 1$  dm,  $\alpha_D$ : +0.28°.  $[\alpha]_D^{25}$ : +18.2°.

5.008 mg Sbst.: 12.910 mg CO<sub>2</sub>, 3.710 mg H<sub>2</sub>O. — 3.138 mg Sbst.: 0.143 ccm N<sub>2</sub> (23°, 745 mm).

C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub>N<sub>2</sub>. Ber. C 70.29, H 8.33, N 4.83. Gef. C 70.31, H 8.29, N 5.15.

Hrn. Prof. Windaus bin ich für die Leitung meiner Versuche zu großem Dank verpflichtet. Der I.-G. Farbenindustrie A.-G., Werk Elberfeld, und der Chem. Fabrik E. Merck, Darmstadt, danke ich vielmals für die Förderung dieser Arbeit.

## 58. Tanehiro Kazama: Zusammenwirken von zwei Faktoren im enzymatischen Abbau von Benzoyl-diglycin\*).

[Aus d. medizin.-chem. Institut d. Kaiserl. Universität Kyoto.]

(Eingegangen am 28. Februar 1940.)

Durch die Untersuchungen von G. Yoshimatsu<sup>1)</sup> und K. Komatu<sup>2)</sup> ist gezeigt worden, daß einige Acylderivate von Eiweißkörpern, wie  $\beta$ -Naphthalinsulfo-Gelatine,  $\beta$ -Naphthalinsulfo-Gelatinepepton,  $\beta$ -Naphthalinsulfo-Casein, Benzolsulfo-Gelatine, Benzolsulfo-Gelatinepepton, Benzolsulfo-Casein und  $\beta$ -Naphthalinsulfo-Keratin, durch das Zusammenwirken von Pankreas- und Nierenprotease viel rascher zerlegt werden, als durch jedes einzelne dieser Fermente für sich. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde von ihnen die Vermutung ausgesprochen, daß eine der beiden Proteasen die betreffenden Substrate so weit abbaut, — wenn auch in manchen Fällen die Spaltungen kaum meßbar sind — daß sie der weiteren Hydrolyse durch die andere zu-

\*) Die vorstehende Arbeit wurde in den Hauptzügen am 17. Oktober 1938 beim XIV. Generalkongreß der Japanischen Biochemischen Gesellschaft protokolliert. Die Versuche mußten vorzeitig abgebrochen werden; da sich bis jetzt keine Gelegenheit geboten hat, dieselben wieder aufzunehmen, sollen sie als vorläufige Mitteilung veröffentlicht werden.

1) Acta Scholae med. Univ. imp. Kyoto **12**, 131, 141, 147 [1929].

2) Nippon Seikagakkai Kaihō **11**, 224 [1936].

gänglich werden. Die hier wirksame Nierenprotease soll nach Komatu die sog. „Sulfopeptidase“<sup>3)</sup> sein. Diese Annahme Komatus ist aber nicht ganz folgerichtig, denn die „Sulfopeptidase“ ist definitionsgemäß spezifisch auf  $\beta$ -Naphthalinsulfo-, *p*-Toluolsulfo- und Benzolsulfo-diglycin eingestellt und nicht auf Acylderivate von hochmolekularen Eiweißkörpern. Außerdem ist eine Spezifität in bezug auf die Atomgruppe  $-SO_2-NH-$  meines Wissens niemals erwiesen worden.

Um in dieser Richtung einen Schritt weiter zu kommen, prüfte ich die analogen Verhältnisse an den Acylderivaten von künstlich hergestellten Peptiden genau bekannter Konstitution. Für diesen Zweck wurden zwei Peptid-Derivate gewählt:  $\beta$ -Naphthalinsulfo-triglycin und Benzoyl-diglycin.

Der Abbau von  $\beta$ -Naphthalinsulfo-triglycin durch Pankreasauszug war mäßig, mit Nierenauszug aber war fast kein Abbau nachzuweisen; durch Zusammenwirken beider wurde er nur unbedeutend beschleunigt (Tafel 1).

Bei der Aufspaltung von Benzoyl-diglycin war jeder der beiden Auszüge für sich allein fast unwirksam, erst ihre Vereinigung führte zu einer erheblichen Fermentwirkung (Tafel 2).

Da diese Reaktionsbeschleunigung in solchem Ausmaße eintritt, ist der stufenweise Abbau durch zwei Fermente fast undenkbar, um so mehr, als die ersten Angriffspunkte der Fermente nach meinen früheren Versuchen<sup>4)</sup> wahrscheinlich nicht in der Peptidbindung zwischen Benzoyl und Diglycin liegen, sondern in der zwischen beiden Glykokollkomponenten liegenden Peptidbindung.

Die Beteiligung der sog. „Sulfopeptidase“ ist hier wiederum ausgeschlossen, da eine Reaktionssteigerung bei Benzoyl-diglycin beobachtet wird, welches gar keine Sulfamidgruppe enthält.

Diese Befunde zeigen zum mindesten, daß für die Zerlegung von Benzoyl-diglycin wenigstens zwei zusammenwirkende Faktoren verantwortlich sind. Über die Natur dieses Zusammenwirkens lassen sich allerdings noch keine weiteren Aussagen machen.

<sup>3)</sup> S. Otani, Acta Scholae med. Univ. imp. Kyoto **17**, 164, 170, 182 [1934].

<sup>4)</sup> Weil diese Tatsache in meinen früheren Mitteilungen nicht erläutert wurde, müssen hier einige Erklärungen beigelegt werden:

Da ein Enzympräparat (1. Eluat), auch wenn es nur eine kleine Menge Histozym enthält, mit noch genügender Geschwindigkeit Benzoyl-diglycin angreift, kommt die Möglichkeit, daß durch Histozym in der Peptidbindung zwischen der Benzoylgruppe und Diglycin eine Spaltung stattfindet, nicht in Frage. (Vergl. Tafel 4, Acta Scholae med. Univ. imp. Kyoto **23**, 159 [1939].)

Der Angriffspunkt der Nierenpeptidase auf Benzoyl-triglycin liegt auch auf Grund des Vergleichs seiner Zerlegungsgeschwindigkeit mit der des Benzoyl-diglycins höchstwahrscheinlich in der Mitte der Peptidkette. Die Aufspaltung der freien Carboxylgruppe des Peptids benachbarten Peptidbindung ist deshalb ausgeschlossen, weil das Hydrolysergebnis dasjenige des Benzoyl-diglycins um einen 1 Mol. Glykokoll entsprechenden Aciditätszuwachs übersteigt. Die Zerlegung in Benzoesäure und Triglycin ist auch unwahrscheinlich, weil das entstandene Triglycin bedeutend langsamer als Diglycin angegriffen wird. (Vergl. Tafel 1 u. 4, Acta Scholae med. Univ. imp. Kyoto **23**, 172 [1939].) Die hier wirksame Peptidase ist infolgedessen eine Endopeptidase, wie sie vor kurzem von M. Bergmann festgestellt wurde (Journ. biol. Chem. **117**, 189 [1937]).

Tafel 1. Versuche mit  $\beta$ -Naphthalinsulfo-triglycin; 14. 9. — 24. 9. 1938.

| Zusammensetzung der Fermente<br>(Glycerinauszug 1:10) in ccm |          | Aciditätszuwachs<br>in ccm $n/5$ -KOH<br>in 24 Stdn. | Spaltung<br>% |
|--|----------|--|---------------|
| Niere  | Pankreas |  |               |
| 0.125  | —        | 0.04   | 2             |
| —  | 0.25     | 0.66   | 39.5          |
| 0.125  | 0.25     | 0.76   | 45.5          |
| 0.063  | 0.125    | 0.55   | 33            |

Tafel 2. Versuche mit Benzoyl-diglycin; 14. 9. — 24. 9. 1938.

| Zusammensetzung der Fermente<br>(Glycerinauszug 1:10) in ccm |          | Aciditätszuwachs<br>in ccm $n/5$ -KOH<br>in 24 Stdn. | Spaltung<br>% |
|--|----------|--|---------------|
| Niere  | Pankreas |  |               |
| 0.25   | —        | 0.03   | 1.5           |
| —  | 0.50     | 0.12   | 7             |
| 0.25   | 0.50     | 0.55   | 33            |
| 0.125  | 0.25     | 0.31   | 18.5          |
| 0.20   | 0.10     | 0.27   | 16            |
| 0.05   | 0.40     | 0.37   | 22            |

Tafel 3. Mitwirkung des Dünndarmauszugs auf Benzoyl-diglycin;  
14. 9. — 24. 9. 1938.

| Zusammensetzung der Fermente<br>(Glycerinauszug 1:10) in ccm |          |          | Aciditätszuwachs<br>in ccm $n/5$ -KOH<br>in 24 Stdn. | Spaltung<br>% |
|--|----------|----------|--|---------------|
| Niere  | Pankreas | Dünndarm |  |               |
| —  | —        | 0.50     | 0.03   | 1.5           |
| 0.25   | —        | 0.50     | 0.00   | 0             |
| —  | 0.50     | 0.10     | 0.06   | 3             |
| —  | 0.25     | 0.25     | 0.02   | 1             |

Die Tafeln 1—3 zeigen die Ergebnisse, die bei den Versuchen vom 14. bis 24. September 1938 mit den Mitte Mai 1938 hergestellten Auszügen erhalten wurden.

Tafel 4. Versuch mit frischeren Fermenten (Benzoyl-diglycin);  
18. 11. — 25. 11. 1938.

| Zusammensetzung der Fermente<br>(Glycerinauszug 1:10) in ccm |          | Aciditätszuwachs<br>in ccm $n/5$ -KOH<br>in 24 Stdn. | Spaltung<br>% |
|--|----------|--|---------------|
| Niere  | Pankreas |  |               |
| 0.25*  | —        | 0.05   | 3             |
| —  | 0.50*    | 0.14   | 8             |
| 0.25*  | 0.50*    | 0.32   | 19            |
| 0.25*  | 0.05*    | 0.14   | 8             |
| —  | 0.50*    | 0.13   | 8             |
| 0.25*  | 0.50*    | 0.14   | 8             |

Die hier benutzten Auszüge wurden im September, also 2 Monate vor dem Gebrauch hergestellt. Zum Unterschied von den früher hergestellten werden sie, sowohl in dieser Tafel als auch in den folgenden, mit \* gekennzeichnet.

Tafel 5. Die Folge einer Vorbehandlung (Benzoyl-diglycin);  
28. 11. — 1. 12. 1938.

| Zusammensetzung der Fermente<br>(Glycerinauszug 1:10) in ccm |          | Aciditätszuwachs<br>in ccm $n/5$ -KOH<br>in 24 Stdn. | Spaltung<br>% |
|--|----------|--|---------------|
| Niere  | Pankreas |  |               |
| 0.25   | 0.50     | 0.45   | 27            |
| 0.25*  | 0.50*    | 0.42 <sup>5)</sup>                                   | 25            |
| 0.25*  | 0.50*    | -0.04 <sup>6)</sup>                                  | 0             |

Tafel 6. Versuch mit älteren und frischeren Fermenten einen Monat nach  
den vorigen (Benzoyl-diglycin); 16. 12. — 21. 12. 1938.

| Zusammensetzung<br>der Fermente (Glycerin-<br>auszug 1:10) in ccm |          | Vor-<br>behandlung | Aciditäts-<br>zuwachs<br>in ccm<br>$n/5$ -KOH<br>in 24 Stdn. | Spaltung<br>% | Abiditäts-<br>zuwachs<br>in ccm<br>$n/5$ -KOH<br>in 48 Stdn. | Spal-<br>tung<br>% |
|---|----------|--------------------|--|---------------|--|--------------------|
| Niere   | Pankreas |                    |  |               |  |                    |
| 0.25*   | 0.50     | keine              | 0.34   | 20            | 0.70   | 42                 |
| 0.25  | 0.50*    | keine              | 0.30   | 18            | 0.64   | 38                 |
| 0.25*   | 0.50*    | keine              | 0.34   | 20            | 0.60   | 36                 |
| 0.25*   | 0.50*    | 30 Min. 37°C       | 0.35   | 21            | 0.60   | 36                 |

Wie in den Tafeln belegt ist (vergl. Tafel 4 u. 5 mit den anderen), ist mit über 3 Monate im Eisschrank aufbewahrten Ferment-Auszügen die Wirksamkeitssteigerung sofort nach dem Zusammenbringen der Fermente erzielt worden, während mit frischeren Auszügen dies gar nicht oder nur mit geringem Erfolg möglich war. Um die volle Reaktionsbeschleunigung auch hier zur Entfaltung zu bringen, genügte es in diesen Fällen, die Fermentpräparate nach dem Zusammenbringen 30 Min. bei 37° stehen zu lassen.

Da bei einem Zusatz von Dünndarmschleimhaut-Extrakt (Tafel 3) keine Beschleunigung der Spaltung erfolgte, so ist eine Aktivierung der Nierenpeptidase durch die in dem Pankreasextrakt befindliche Enterokinase ausgeschlossen.

### Beschreibung der Versuche.

Die Versuche wurden in derselben Weise wie meine früheren<sup>7)</sup> angestellt. Die Einwaage der Substrate war  $1/4$  Millimol. Diese Menge wurde mit 1.0 ccm  $m/5$ -Phosphatpuffer vom  $p_H$  7.65 vermischt, dann mit  $n/5$ -NaOH auf  $p_H$  7.6—7.8 gebracht und mit destilliertem Wasser auf 5.0 ccm aufgefüllt. Zu diesen  $m/20$  Substratlösungen wurden 2.5 ccm verdünnte, neutrale Fermentlösung gegeben, deren jeweilige Zusammensetzung in den Tafeln angegeben ist. Als Fermente dienten 1:10-Glycerinauszüge (87% Glycerin) aus den Organpulvern vom Schwein, die nach Waldschmidt-Leitz<sup>8)</sup> durch Entwässerung mit Aceton und Äther hergestellt worden waren. Die Konzentration des Ansatzes in bezug auf die Substrate war also  $m/30$ .  $p_H$  7.6—7.8 gegen Phenolrot.

Der zeitliche Verlauf der Hydrolyse wurde in je einer Analysenprobe von 2.0 ccm nach van Slyke ermittelt, dann in ccm  $n/5$ -KOH auf eine 10.0 ccm Probe umgerechnet und in den Tafeln zusammengestellt. 100% Spaltung einer Peptidbindung entspricht somit 1.67 ccm  $n/5$ -KOH.

<sup>5)</sup> Nach dem Mischen der beiden Fermente, 30 Min. bei 37° C stehen gelassen.

<sup>6)</sup> 30 Min. bei 37° C gesondert behandelt und vor dem Gebrauch gemischt.

<sup>7)</sup> Acta Scholae med. Univ. imp. Kyoto 23, 154, 160, 167, 176 [1939].

<sup>8)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 147, 292 [1925].