



К 60-летию открытия мелатонина. Перевод оригинальной статьи А. Лернера

Открытие мелатонина связано с именем профессора дерматологии из Йельского университета Аарона Лернера, который занимался изучением природы витилиго. Он обратил внимание на публикацию К. Маккорда и Ф. Аллена (1917), которые обнаружили, что применение экстракта шишковидных желез коров приводило к осветлению покрова головастика путем сжимания темных эпидермальных меланофор. Профессор А. Лернер пришел к выводу, что в эпифизе образуется некое вещество, отвечающее за пигментацию и разрушение пигментов, и решил, что оно, возможно, поможет при лечении заболеваний кожи. В начале 1950-х гг. у группы Лернера получилось выделить из коровьих эпифизов экстракт, осветляющий кожу лягушек. Далее необходимо было выделить активный компонент этой смеси, что было непростой задачей. Эксперимент затянулся настолько, что было принято решение завершить работу над ним, однако незадолго до окончания срока команде удалось выделить и определить структуру основного вещества – это оказался N-ацетил-5-метокситриптамин, который был назван мелатонином. Свое открытие Лернер описал в статье, опубликованной в 1958 г. в *Journal of American Chemical Society* (Lerner A., Case J., Takahashi Y. et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. Vol. 80. № 10. P. 2587–2587). В ней он объяснил, почему открытое им вещество получило такое название. Проблему витилиго Аарон Лернер так и не решил... Приводим перевод статьи, подготовленный А.Б. КАСУМЯН и М.Г. ПОЛУЭКТОВЫМ.

Выделение мелатонина, фактора шишковидной железы, вызывающего осветление меланоцитов (письмо редактору)

В течение последних 40 лет в различных публикациях сообщалось, что инъекция экстрактов шишковидной железы в головастика, лягушек, жаб и рыб способствует осветлению их кожи¹⁻³. Недавно было обнаружено, что такие экстракты, вызывая агрегацию гранул ме-

ланина в меланоцитах изолированных кусочков кожи лягушки, ингибируют эффект меланостимулирующего гормона (МСГ), приводящего к потемнению кожи⁴. Мы хотим сообщить о выделении из коровьих шишковидных желез активного фактора, который может осветлить кожу и ингибировать МСГ. Предлагаем называть это вещество мелатонином. 50 г порошкообразных лиофилизированных говяжьих

шишковидных желез экстрагировали петролейным эфиром в течение двух часов в экстракторе Сокслета. Обезжиренный порошок смешали с 900 мл воды в Waring Blendor. После центрифугирования при 16 000 g в течение 30 минут надосадочную жидкость экстрагировали с помощью 900 мл этилацетата. Этилацетатный слой концентрировали в вакууме при 50 °С и подвергали распределению в 30-трубном

¹ McCord C.P., Allen F.P. Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation // *J. Exp. Zool.* 1917. Vol. 23. P. 207–224.

² Bors A., Ralston W.C. A simple assay of mammalian pineal extracts // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1951. Vol. 77. № 4. P. 807–808.

³ Kitay J.O., Altschule M.D. The pineal gland: a review of the physiologic literature. Cambridge: Harvard University Press, 1954.

⁴ Takahashi Y., Lerner A.B. To be published.



противоточном аппарате с системой растворителей этилацетатом, гептаном, водой в соотношении 1:1:2. Трубы 8–15 комбинировали. Водный слой дважды экстрагировали с помощью 80 мл этилацетата. Экстракты органического растворителя объединяли и выпаривали досуха в вакууме при 50 °С. Остаток сублимировали при 80 °С в вакууме. Сублимат переносили с этанолом на фильтровальную бумагу Whatman № 1 и хроматографировали по нисходящей методике с помощью системы бензола, этилацетата, воды в соотношении 19:1:20. Тест-полоска при реакции с реагентом Эрлиха (р-диметиламинобензальдегид) стала синей при $R_f = 0,38$. Непрореагировавшую полосу разрезали на секции и промывали этанолом. Биоанализ проводили с использованием изолированной кожи *Rana pipiens* (леопардовых лягушек), затемненной кофеином. Осветляющий эффект испытуемого вещества на меланоцитах измерялся фотометрически проходящим светом. Оказалось, что 95% восстановившейся биологической активности присутствовало при синей реакции индикатора. Спектрофотометрический анализ активного элюата продемонстрировал один флуоресцентный пик при 8380 Å, который был максимально активен при 2930 Å. Анализ ультрафиолетового поглощения выявил максимум при 2728 Å с переходами при 2950 и 3080 Å. Флуоресценция и поглощение ультрафиолета были характерны для гидроксинидолов. Активный материал рехроматографировали и вымывали в трех последовательных сменах растворителей. Биологическая активность, характерная флуоресценция и синий цвет с реактивом Эрлиха оставались вместе на этих хроматограммах. Растворителями служи-

May 20, 1958
COMMUNICATIONS TO THE EDITOR
2587

berg for stimulating discussions, and to Esso Standard Oil Company for financial support.

(7) Esso Standard Oil Company Fellow, 1955-57.

CHEMISTRY DEPARTMENT TULANE UNIVERSITY NEW ORLEANS, LOUISIANA U. S. NAVAL ORDONANCE TEST STATION CHINA LAKE, CALIFORNIA	HANS B. JONASSEN ROBERT I. STREANS* JOURO KENTYÄMÄA DONALD W. MOORE A. GREENVILLE WHITTAKER
--	---

RECEIVED MARCH 25, 1958

ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES¹

Sir:

During the past forty years investigators have reported that injection of pineal gland extracts into tadpoles, frogs, toads and fish produces lightening of skin color.²⁻⁴ Recently it was found that such extracts, by causing aggregation of melanin granules within the melanocytes of isolated pieces of frog skin, reverse the darkening effect of the melanocyte stimulating hormone (MSH).⁵ We wish to report isolation from beef pineal glands of the active factor that can lighten skin color and inhibit MSH. It is suggested that this substance be called *melatonin*.

Fifty grams of powdered lyophilized beef pineal glands⁶ was extracted with petroleum ether for two hours in a Soxhlet extractor. The defatted powder was mixed with 900 ml. water in a Waring Blender. After centrifugation at 16,000 X g for 30 minutes the supernatant was extracted with 900 ml. ethyl acetate. The ethyl acetate layer was concentrated *in vacuo* at 50° and subjected to distribution in a 30-tube countercurrent apparatus with the solvent system ethyl acetate, heptane, water (1:1:2 v./v.). Tubes 8-15 were combined. The water layer was extracted twice with 80 ml. portions of ethyl acetate. All the organic solvent extracts were combined and evaporated to dryness *in vacuo* at 50°. The residue was sublimed at 80° *in vacuo*. The sublimate was transferred with ethanol to Whatman No. 1 filter paper and chromatographed by descending technique with solvent system benzene, ethyl acetate, water (19:1:20). A test strip on reaction with Ehrlich reagent (*p*-dimethylamino-benzaldehyde) showed a blue spot at R_f 0.38. The unreacted strip was cut into sections and eluted with ethanol. Bioassay was performed using isolated *Rana pipiens* skin darkened with caffeine. The lightening effect of the test substance on the melanocytes was measured photometrically with transmitted light. This revealed that 95% of recoverable biologic activity was present at the position of the blue spot. Spectrophotofluorometric analysis of the active eluate showed a single fluorescent peak at 3380 Å, which was excited maximally at 2950 Å. Ultraviolet absorption analysis showed

(1) This investigation was supported by grants from the American Cancer Society and the United States Public Health Service.

(2) C. P. McCord and F. P. Allen, *J. Exp. Zool.*, **21**, 207 (1917).

(3) O. Bors and W. C. Ralston, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **77**, 807 (1951).

(4) J. O. Kitay and M. D. Altshuler, "The Pineal Gland," Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1954, p. 56.

(5) Y. Takahashi and A. R. Lerner, to be published.

(6) We are grateful to the Armour Laboratories for supplying us with several kilograms of beef pineal glands.

a maximum at 2725 Å, with inflections at 2950 and 3080 Å. The fluorescence and ultraviolet absorption were characteristic of hydroxyindoles.

The active material was rechromatographed and eluted in three successive solvent systems. The biologic activity, characteristic fluorescence, and blue color with Ehrlich reagent remained exclusively together as a spot on these chromatograms. The solvent systems were isopropyl alcohol, concentrated ammonium hydroxide, water (16:1:3) $R_f = 0.83$; 1-butanol, acetic acid, water (4:1:5) $R_f = 0.87$; isopropyl alcohol, concentrated ammonium hydroxide, water (10:1:1) $R_f = 0.86$.

In preventing darkening of frog skin by MSH, melatonin, the active pineal gland factor, was at least 100 times as active on a weight basis as adrenaline or noradrenaline, 200 times as active as triiodothyronine and 5,000 times as active as serotonin.⁶ Melatonin had no adrenaline nor noradrenaline-like activity on rat uterus and no serotonin-like activity on clam heart. No melatonin activity was detected in beef pituitary, hypothalamus, thymus, thyroid, adrenal, ovary, testis or eye.

SECTION OF DERMATOLOGY DEPARTMENT OF MEDICINE YALE UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE NEW HAVEN 11, CONNECTICUT	AARON B. LERNER JAMES D. CASE YOSHIVATA TAKAMASHI TEE H. LEE WATARU MORI
--	--

RECEIVED MARCH 28, 1958

THE STRUCTURE OF BOVINE CORTICOTROPIN^{1,2}

Sir:

The isolation of bovine corticotropin, a 39 amino-acid polypeptide possessing ACTH activity, has been reported from this laboratory³; its amino acid composition is identical with that found for ovine α -corticotropin but different from that of the porcine hormone. It was further demonstrated that the porcine, ovine and bovine hormones possess identical N- and C-terminal residues. We wish to report herein the complete amino acid sequence of bovine corticotropin. It will be noted that there is a difference in certain portions of the amino acid sequence among the hormones of all three species.

By means of the paper-strip modification⁴ of the phenyl isothiocyanate method,⁵ the N-terminal amino acid sequence Ser.Tyr.Ser.Met.Glu... was established for bovine corticotropin. The rate of release of amino acids from the carboxyl end of the peptide hormone by the carboxypeptidase procedure⁶ indicated the sequence ...Leu.Glu.Phe at the C-terminus.

Chymotryptic digests of the hormone (substrate/enzyme = 100/0.6 (w./w.), pH 9.0, 40°, for 24 hours) were fractionated by zone electrophoresis on paper for 7 hours at 200 volts with a collidine-acetic acid buffer of pH 7; after elution of each band, the peptide fragments were further purified by paper chromatography in either *n*-BuOH/

(1) Paper XIV of the corticotropins (ACTH) series; for Paper XIII, see C. H. Li, R. D. Cole, D. Chung and J. Lennis, *J. Biol. Chem.*, **227**, 207 (1957).

(2) This work is supported in part by the U. S. Public Health Service (G-2907) and the Albert and Mary Lasker Foundation.

(3) C. H. Li and J. S. Dixon, *Science*, **124**, 934 (1954).

(4) H. Fraenkel-Conrat, *This Journal*, **76**, 3506 (1951).

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

(6) J. I. Harris and C. H. Li, *J. Biol. Chem.*, **212**, 199 (1955).

Первая публикация о мелатонине

ли изопропиловый спирт, концентрированный гидроксид аммония, вода в соотношении 16:1:3 $R_f = 0,83$; 1-бутанол, уксусная кислота, вода в соотношении 4:1:5 $R_f = 0,87$; изопропиловый спирт, концентрированный гидроксид аммония, вода в соотношении 1:1:1 $R_f = 0,86$.

В предотвращении потемнения кожи лягушки под действием меланоцитостимулирующего гормона мелатонин, активный фактор шишковидной железы, оказался по мень-

шей мере в 100 раз активнее адреналина или норадреналина, в 200 раз активнее триiodтиронина и в 5000 раз активнее серотонина. Мелатонин не оказывал адреналино- или норадреналиноподобного влияния на матку крыс и серотониноподобного влияния на сердце моллюска. Не обнаружено активности мелатонина в коровьем гипофизе, гипоталамусе, тимусе, щитовидной железе, надпочечниках, яичниках, яичках или глазах. *