Studies on the Biochemical and Immunological Properties
of Human Placental Lactogen (hPL: Human
Chorionic Somatomammotropin, hCS)
Part II. Biochemical Properties of hPL (hCS)

Hajime MORIKAWA

Department of Obstetrics and Gynecology Kobe University, School of Medicine
Ikutaku, Kobe 650, Japan (Director: Professor Shimpei Tojo, M.D.)

In this paper the author describes the biochemical and physicochemical properties of hPL-Kobe which was purified by the author and reported in the previous manuscript.

HPL-Kobe was a simple protein with the maximum absorption in the ultraviolet region at 278 m μ and with the minimum at 257 m μ .

The tyrosine/tryptophan ratio was 3.26.

Using the Orcinol sulfuric acid method, carbohydrates were not detected, and analysis of amino acid content with Moore and Stein's method revealed that it contained aspartate and glutamate remarkably. These findings resembled those of Li's hGH.

With the Archibald method ultracentrifugal analysis of hPL-Kobe in 5 M guanidine hydrochloride or 8 M urea revealed a single peak with a molecular weight between 25000 and 26500, but in 0.2 M, sodium chloride did not reveal a homogeneous precipitation pattern because of its suspected aggregation.

Tryptophan residues were not estimated in acetate buffer, but absorption spectrum of the hPL treated with N-bromosuccinimide in 5 M urea indicated tryptophan was present at 0.97%. These results suggest that tryptophan residues might be important in stabilizing the conformation of the protein by hydrophobic interactions with other non-polar residues.

Free SH residues and histidine residues were not detected in the hPL and one or two disulfide bonds were estimated in each molecule.

Compared the native hPL, reduced and carboxymethylated hPL was eluted only in a small retarded fraction on sephadex G-75 gel filtration, and its immunological and biological activities markedly decreased.

It appears likely, therefore, that hPL is a kind of one chain peptides with a flat form, and its interactions responsible for the tertiary structure are essentially independent of the disulfide bridge, which is suspectedly important for hormone activities and stabilization of hPL.

The NH₂-terminal amino acid of hPL-Kobe was valine, and after the treatment with LAP or crude urea (it is considered as the action of contaminated cyanate) the bio-

logical activity of it disappeared completely, but the immunological was not altered. Therefore, it is considered that the fragments with biological activity may exist on the N-terminal and the immunological one on the C-terminal of the hPL.

Since the immunological and biological activities were lost after heating or incubation in acidic solution, so hPL-Kobe may be an unstable protein hormone.

(See pp. 1059~1079)

ヒト胎盤ラクトーゲン (Human Placental Lactogen: hPL, Human Chorionic Somatomammotropin: hCS) の生化学的ならびに免疫学的性格に関する研究

第二編 HPL (hCS) の生化学的性格に関する研究

神戸大学医学部産科婦人科学教室 (主任 東条伸平教授)

森 川 肇

(昭和48年2月21日受付)

hPL-Kobe は、酸性アミノ酸を主体とする分子量約26,000の単純蛋白体で、tryptophan 含有率は0.97%, tyrosine/tryptophan molar ratio は3.26であり、free の SH 残基や histidine 残基は存在せず、helix の少い平坦な一鎖ペプチドであり、三次結合はおそらく S-S 結合であろう。生物活性は N 末端に、免疫活性はおそらく C 末端に分れて存在すると考えられ、わずかな条件の変化や立体構造の変化によっても生物、免疫活性が消失し蛋白体として極めて不安定である。

序 論

著者は、前編においてヒト胎盤から均一な蛋白体として human Placental Lactogen (hPL, human Chorionic Somatomammotropin : hCS) を抽出精製し、これを hPL-Kobe と名づけて報告した¹⁾。

本編においては、その蛋白体としての性格、つまり構成分子、分子量、立体構造や蛋白体としての安定性を検討し、若干の知見を得たので報告する。

I 研究の目的と計画

著者は、hPL が精製過程に於いて示す態度から、本物質は pH 9.0 の DEAE-C に密に吸着され、かつ酸性荷電性の強い性格をもち、しかもセファデックス G-100ゲル濾過における態度から分子形態が平坦であるか、あるいは小さいこと、さらには透析操作中に aggregate しやすい性格を持つことなどを報告した。

著者はこの hPL-Kobe を用いて、まずその構成アミノ酸及び糖成分を検討し、分子量、S-S 結合、遊離アミノ基、C末端及びN末端の検討などから、hPL の蛋白体としての大きさと形態をきめ、さらに熱及び pH 処理により蛋白体としての安定性を検討することとした。

II 実験材料と方法

A 実験材料

1. HPL

実験に用いた hPL は、著者が第一編¹⁾において報告した。ヒト胎盤より精製した hPL-Kobe である。

2. 主たる化学薬品

i Glucose

糖成分の分析の対称として用いた標準 glucose は、半井化学薬品株式会社製試薬 特級(無水塩)を用いた。

ii Pure Urea

半井化学薬品株式会社製試薬特級のものを再結晶させ、さらに Amberlite MB-3 を用いて含有されている cyanate などを除去したものを使用した。

iii N-Bromosuccinimide (NBS)

1060 ヒト胎盤ラクトローゲン (Huma Placental Lactogen: hPL' Human Chorionic Somatomammotropin:hCS) の生化学的ならびに免疫学的性格に関する研究 (森川)

半井化学薬品株式会社製試薬特級を使用した。

IV グアニジン塩酸

半井化学薬品株式会社製試薬特級を使用した。

v 5, 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) : (DTNB)

半井化学薬品株式会社製試薬特級のものをを使用した。

vi 5-amino-1-H-tetrazole (DHT)

東京化成工業株式会社製 DHT 1g を、1.6規定塩酸 23ml に溶解し、氷浴中でゆつくりと 0.7g sodium nitrate/10mlH₂O 溶液を加えてゆき、さらに使用直前に苛性カリを加えて pH 5.0 とした。

VII 2-メルカプトエタノール

半井化学薬品株式会社製特製試薬を使用した。

VIII ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP)

SIGMA Chemical Company (U.S.A.) のものにつき、ジイソプロピルフルオリン酸 (DFP) 処理を行つて混在するプロテアーゼを除去して使用した。

B 実験方法

1. hPL であることの指標

S-S 結合やN末端の切断或いは尿素による分子形態の変化、さらには熱、pH 処理を行つた場合の、hPL の構造の変化と生物活性及び免疫活性の関係を検討する指標として次のものをを用いた。

I 生物活性の指標

ラット副腎脂の脂質分解作用を hPL の生物活性の指標とした¹⁾。

II 免疫活性の指標

免疫学的には、Ouchterlony 法²⁾により、抗 hPL 血清に対する交叉性を指標とした。抗 hPL 血清は、hPL-Kobe を、雄成熟モルモットに反復投与して作成し、正常ヒト血漿粉末による吸収操作を行つた後使用した。

2. 構成要素の分析

1 吸光度の検討

0.05モルトリス塩酸緩衝液 pH 8.1 に、hPL-Kobe を 500 μ g/ml に溶解し、波長 240m μ から 450m μ までの吸光度を、連続分光光度計 (島津製作所製) で測定し、吸光度曲線を作成した。

II アミノ酸成分

構成アミノ酸は、Moore and Stein³⁾ の方法でしらべた。加水分解には 6 規定塩酸を使用し、110°C で 25 時間と 43 時間加熱する 2 方法を用いた。加水分解終了後は、アミノ酸自動分析装置 (Shibata type AA-600) を用いてアミノ酸分析を行つた。

III トリプトファン含有量

0.1モル、pH 4.0 acetate buffer 中に、hPL-Kobe を 1 mg/3 ml 溶解し、NBS を 0.15及び 0.3 μ mol 加えて、波長 210m μ から 310m μ までの吸光度曲線をそれぞれ作成し、波長 280m μ での吸光度の減少を測定した。また、さらに、同じ緩衝液に 5 モル尿素を加えて hPL-Kobe を溶解し、NBS を 0.0.3及び 0.5 μ mol 加えて吸光度曲線を作成し、波長 280m μ での吸光度の減少を測定した。

それぞれの波長 280m μ での吸光度の減少を、Spande and Witkop⁴⁾ の公式を用いて計算し、hPL-Kobe のトリプトファン含有量を決定した。

IV チロジーントリプトファン比

0.1規定苛性ソーダ溶液 (pH12.4) に、hPL-Kobe を 1 mg/3 ml に溶解し、波長 250m μ から 300m μ の吸光度曲線を作成した。波長 282m μ 及び 292m μ に出現する 2 つのピークの吸光度から、Bencze and Schmid の公式⁵⁾を用いて、チロジーントリプトファン比を計算した。

V 糖成分

Orcinol 硫酸法により測定し、標準物質としては glucose を用いた。

3 分子量の検討

Archibald 法⁷⁾により測定した。溶媒には、0.2モル塩化ナトリウム溶液、8モル尿素溶液及び4モル塩酸グアニジン溶液の3種を用い、日立分析用超遠心機 (UCA-1A) で超遠心し、光学系はシュリレン光学系 (シュリレン角度70度) を用いた。

I 沈降係数

溶媒に4モル塩酸グアニジンを使用し、hPL 濃度を0.4%、0.8%及び1.2%の3種とし、それぞれダブルセクターセルで60000r.p.m. で10℃、60分間超遠心し、得られた沈降図形からそれぞれの場合のみかけの沈降係数 S_{20w} (app.) を計算し、 S_{20w} (0.4)、 S_{20w} (0.8) 及び S_{20w} (1.2) の三点から、沈降係数を決定した。

II 0.2モル塩化ナトリウム

hPL-Kobe を、0.2モル塩化ナトリウム溶液に1.0%の濃度に溶解し、10℃、60000r.p.m. で120分間超遠心し、その21、46、60、120分後の沈降図形から Archibald 法により分子量を検討した。

III 8モル尿素溶液

溶媒に8モル尿素溶液を使用し、hPL-Kobe 濃度は0.6%及び1.0%の2種とした。それぞれ、合成界面セルを用いて超遠心し、初濃度を決定したあと、ダブルセクターセルで、25090r.p.m.、60分間超遠心し、12分毎に得られた沈降図形から、0.6%及び、1.0%のみかけの分子量、 M_{app} (0.6)、 M_{app} (1.0) を計算した。 M_{app} (0.6) 及び M_{app} (1.0) の2点から、hPL-Kobe の分子量 $M(0)$ を計算した。

IV 4モル塩酸グアニジン溶液

溶媒に4モル塩酸グアニジン溶液を用いた場合の hPL-Kobe 濃度は、0.4%、0.8%及び1.2%の3種とした。初濃度を決定したあと、0.4%の場合は25090r.p.m. で、0.8%の場合は16880r.p.m. で、1.2%の場合は15590r.p.m. で10℃、60分間超遠心し、12分毎に得た沈降図形からそれぞれみかけの分子量、 M_{app} (0.4)、 M_{app} (0.8) 及び M_{app} (1.2) を計算しこの3点から hPL-Kobe の分子量 $M(0)$ を計算した。

4. 立体構造の検討

I SH 残基

遊離の SH 残基の検討は、Ellman の方法⁷⁾によつた。溶媒には、0.5モル、pH 8.6 トリス塩酸緩衝液と、この溶液に pure urea を5モルの濃度に溶解した溶液の2種を用いた。hPL-Kobe の濃度を1mg/ml とし、DTNB を0.2ml 加えて、波長350m μ から450m μ までの吸光度曲線を作成した。DTNB と SH 残基の反応による p-nitrophenol の吸光度 (波長412m μ) から、hPL1モル当りの SH 残基のモル濃度を求めた。

II ヒスチジン残基

遊離のヒスチジン残基は、Horinishi の方法⁸⁾により測定した。溶媒には、0.67モル bicarbonate buffer と、0.1モル、pH 8.6 トリス緩衝液に pure urea を5モル濃度に溶解した2種を用い、hPL-Kobe 濃度は1mg/3ml とした。まず0.67モル bicarbonate buffer の場合には、DHT 溶液を10 μ l 加え、20分及び40分後の波長480m μ での吸光度を、また5モル尿素溶液の場合には DHT 溶液を25 μ l、50 μ l、75 μ l 及び175 μ l 加えて40分後の480m μ での吸光度を測定した。いずれの場合も DHT を加えて生ずる。

histidine-bisazo-1-H-tetrazole の480m μ での吸光度から histidine 残基を求めた。

III 分子形態中の S-S 結合とその切断

hPL-Kobe を、8モル尿素溶液と1モル及び2モル塩酸グアニジン溶液とインキュベーションして S-S 結合を切断し、DTNB を加えて、切断されて生じた SH 残基と DTNB が反応する割合から、分子内 SH 残基を測定した。

まず8モル、pure urea、0.01モル EDTA、0.05モルトリス緩衝液に、hPL-Kobe 0.84mg を溶解し、DTNB を0.2ml 加えて、30分インキュベーションした。インキュベーション前後の、412m μ での吸光度の差 (ΔOD) を測定した。また1モル及び2モル塩酸グアニジン、0.1モル EDTA 0.05モルトリス緩衝液に、hPL-Kobe 0.84mg を溶解し、DTNB を0.2ml 加えて、30分間インキュベーションし、412m μ での ΔOD を測定した。それぞれの場合の hPL1モル当りの分子内 SH 残基モル濃度 (S) は、それぞれの ΔOD

から次の公式を用いて計算した。

$$S = \frac{\Delta OD \times K \times V}{H}$$

ΔOD : DTNB 添加前後の波長 $412m\mu$ での吸光度の差

K: 切断された S-S 結合と DTNB との化合物の分子吸光係数 $= \frac{1}{1.36 \times 10^4}$

V: 反応全溶液量 = 3 (ml)

H: 用いた hPL-Kobe の量 (ミリモル), 分子量を25000として計算した。

$$H = 3.23 \times 10^{-5}$$

分子中の S-S 結合の切断は, まず多量のメルカプトエタノールで hPL 分子中の S-S 結合を還元し, 遊離した SH 残基が空気中の酸素により容易に酸化され再び S-S 結合となるのを防ぐため, モノヨード酢酸を用いて SH 残基を保護した。即ち密栓遮光できる容器に, 0.5モル pH 5.6 トリス緩衝液 1 ml と pure urea 10モル溶液に EDTA 0.2% を溶解したもの 8 ml を入れ, これにメルカプトエタノール 0.1ml を加え, その pH を 2 規定塩酸又は10規定苛性ソーダ溶液で pH 8.6 に調整した。これに hPL-Kobe 5mg を加え, 密栓遮光後器内を連続的に窒素ガスで飽和状態となるようにし, 22-25°C で4時間攪拌, 次いで容器を完全に遮光したまま, モノヨード酢酸 0.268 g を 1 規定苛性ソーダ溶液 1 ml に溶解したものを少量ずつ加えてゆき, pH を8.0以上としたあと, 15分間反応させ, 5%酢酸溶液を加えて pH 4.0 として反応を停止させた。セファデックスG-75カラム (1 cm × 20cm) を 5%酢酸溶液で平衡とし, 遮光しつつ反応終了液を上端に添加し, 5%酢酸溶液でゲル透過を行つた。溶出液を 1 ml ずつブールし, $278m\mu$ での吸光度を測定して吸光度曲線を作成した。

また, native hPL-Kobe 5mg を反応終了液と同量の 5%酢酸溶液に溶解し, セファデックスG-75でゲル透過して吸光度曲線を作成し, コントロールとした。

IV N末端の分析

ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) により hPL-Kobe のN末端を切断した。基質として使用する hPL-Kobe は, $100\mu\text{g/ml}$ の濃度になる如く 0.005 モル塩化マグネシウム—0.05モルトリス緩衝液に溶解した。LAP は, $4\mu\text{g}$ 及び $40\mu\text{g}$ の2種とし, インキュベーション時間はそれぞれ3時間, 8時間, 12時間とした。反応終了後は氷酢酸により pH4.0 として反応を停止させ, 各インキュベーション溶液中の遊離アミノ酸をアミノ酸自動分析装置で測定した。

5. 立体構造と生物学的並びに免疫学的活性との関係

I. N末端と生物活生の関係

前述した方法でN末端を切断したそれぞれの hPL-Kobe の生物活性を, ラット副辜脂の脂質分解作用で検討した。

II. N末端と免疫活性の関係

前述した方法でN末端を切断した hPL-Kobe の抗 hPL 血清に対する免疫学的交叉性を, Ouchterlony 法で検討した。

III S-S 結合と生物活性の関係

前述した如く, メルカプトエタノールで, S-S 結合を還元し, モノヨード酢酸で SH 残基を保護したあと, セファデックス G-75 でゲル透過を行つた hPL につき, 脂質分解作用を検討した。

IV S-S 結合と免疫活性の関係

S-S 結合を切断し, carboxymethylation を行つた hPL の抗 hPL 血清に対する免疫学的交叉性を Ouchterlony 法で検討した。

V HPL の生物, 免疫両活性に及ぼす尿素の影響

用いた尿素は, 市販試薬特級の尿素, 同尿素を再結晶したもの及び純化尿素の3種とし, pH 7.4 の酢酸

アンモニウム緩衝液にそれぞれ2モル, 6モル, 8モルの濃度に溶解し, ついで hPL-Kobe を $100\mu\text{g/ml}$ の割合に加えたあと, 37°C で1時間及び6時間インキュベーションし, それぞれの生物活性を脂質分解作用から, 免疫活性を抗 hPL 血清に対する交叉性から検討した.

6 安定性に関する検討

I. 熱に対する安定性

熱に対する安定性は, hPL-Kobe を 1mg/ml の割合で, 0.05モル , $\text{pH } 7.6$ リン酸緩衝液に溶解したあと, 0°C , 37°C , 50°C 及び 90°C でそれぞれ1時間インキュベーションしたあと, それぞれの生物, 免疫両活性を検討した.

II 酸, 塩基に対する安定性

酸, 塩基に対する安定性は, hPL-Kobe を $\text{pH } 2.0, 4.0, 8.0$ 及び 10.0 の溶液に 1mg/ml の割合に溶解し, 37°C , 1時間インキュベーションしたあと, それぞれの生物, 免疫両活性を検討した.

III 実験成績

A 構成要素の分析

1. 吸光度の検討

hPL-Kobe の吸光度曲線は, Fig. 1 に示す如くで, $257\text{m}\mu$ に最少吸光を, $278\text{m}\mu$ に最大吸光を示した.

2. アミノ酸成分

アミノ酸分析の結果を Table 1 に示す. asparate, glutamate などの酸性アミノ酸の含有がきわめて多く, cystine の含有は少なかった.

3. トリプトファン含有量

トリプトファン含有量の検討では, まず 0.1モル acetate buffer 中の native hPL では, Fig. 2 の如く NBS とトリプトファン残基の反応を認めなかった.

一方, 5モル 尿素処理を行つた hPL では, Fig. 3 の如く NBS とトリプトファン残基の反応が起り, $280\text{m}\mu$ での吸光度が減少し, Spande and Witkop の公式から, トリプトファン含有率は 0.97% と計算された.

4. チロジーントリプトファン比

$\text{pH } 12.4$ の溶液中での hPL-Kobe の吸光度曲線は, Fig. 4 に示す如くであつた. チロジン残基のイオン化による最大吸光は, $275\text{m}\mu$ に変位し, Bencze and Schmid の公式からチロジーントリプトファンの molar ratio は 3.26 であつた.

5. 糖成分

分析結果は, Table 2 の如くであり, 糖成分は認められなかった.

B 分子量の検討

1. 沈降係数

$S_{20\text{w}(0.4)} = 2.114$, $S_{20\text{w}(0.8)} = 2.090$ 及び $S_{20\text{w}(1.2)} = 2.092$ が沈降図形から計算され, この三点から $S_{20\text{w}(\text{app})} = 2.121 - 0.0275\text{C}$ (C: hPL 濃度, %) となり, hPL-Kobe の沈降係数 $S_{20\text{w}(0)}$ は 2.121 となつた.

2. 0.2モル 塩化ナトリウム溶液

溶媒に 0.2モル 塩化ナトリウム溶液を用いた場合の超遠心による沈降パターンは, Fig. 5 の如く, 回転時間の経過とともに均一ではなくなり, 分子量の検討は不可能であつた.

Fig. 1. Absorption spectrum of hPL-Kobe
hPL-Kobe $270\mu\text{g/ml}$
 0.05M tris buffer $\text{pH } 8.1$

Table 1. Amino acid content of hPL

	hPL-Kobe	
	hydrolysis	
	25hr.	43hr.
Lysine	7.35	5.61
Histidine	5.78	5.44
Arginine	5.87	8.33
Aspartate	15.40	15.64
Threonine	8.10	7.14
Serine	8.74	7.14
Glutamate	12.70	11.73
Proline	4.15	5.82
Glycine	3.72	4.08
Alanine	3.27	3.61
Cystine	0.46	0.25
Valine	3.23	3.23
Methionine	2.02	1.74
Isoleucine	2.52	3.61
Leucine	10.10	10.41
Tyrosine	2.64	2.21
Phenylalanine	3.93	3.99

each amino acid residue (μg) per total amino acid residues (μg)
 Amino acid content of hPL-Kobe was determined by the Moore and Stein's method.

Fig. 2. Absorption spectra of hPL-Kobe modified with N-bromosuccinimide in acetate buffer pH 4.0

a. NBS 0.15 μmole + hPL-Kobe 1mg
 b. NBS 0.3 μmole + hPL-Kobe 1mg
 c. NBS 0.3 μmole

Fig. 3. Absorption spectra of hPL-Kobe modified with N-bromosuccinimide in 5M urea and acetate buffer pH 4.0

a. NBS 0 + hPL 1mg
 b. NBS 0.3 μmole + hPL 1mg
 c. NBS 0.5 μmole + hPL 1mg

3. 8 モル尿素溶液

hPL-Kobe の濃度を0.6%とした場合の超遠心による沈降パターンは、Fig. 6 の如くであり、左右対称の一つのピークを示した。合成界面セルを用いて初濃度を決定した後、沈降図形から0.6%でのみかけの分子量を計算したところ、Fig. 7 の如くであり、 $M_{app(0.6)}=17358$ となった。hPL-Kobe の濃度を1.0%とした場合の超遠心の沈降パターンは、Fig. 8 の如くであり、みかけの分子量は Fig. 9 の如くであり、 $M_{app(1.0)}=11260$ となった。

$M_{app(0.6)}$ と $M_{app(1.0)}$ の二点から、hPL の分子量を計算すると、Fig. 10 の如く、 $M_{(0)}=26505$ となった。

4. 4 モル塩酸グアニジン溶液

hPL-Kobe の濃度を0.4%とした場合の超遠心による沈降パターンは、Fig. 11 の如くとなり、左右対称の一つのピークを示した。0.4%でのみかけの分子量は沈降図形から計算して、Fig. 12 の如くであり、 $M_{app(0.4)}=24343$ となった。

hPL-Kobe の濃度を0.8%とした場合には沈降パターンは、Fig. 13 の如くとなり、みかけの分子量は、Fig. 14 の如く計算され、 $M_{app(0.8)}=26660$ となった。

hPL-Kobe の濃度を1.2%とした場合には、沈降パターンは、Fig. 15 の如くとなり、みかけの分子量は、Fig. 16 の如く計算され、 $M_{app(1.2)}=24498$ となった。

以上の $M_{app(0.4)}$ 、 $M_{app(0.8)}$ 及び $M_{app(1.2)}$ の三点から、hPL-Kobe の分子量 $M_{(0)}$ は、Fig. 17 の如く、25012 となった。

C 立体構造の検討

1. SH 残基

0.5モルトリス塩酸緩衝液中の native hPL 及び5モル尿素処理後の hPL にそれぞれ、DTNBを加えた場合の吸光度曲線は、それぞれ、Fig. 18, Fig. 19 の如くであった。DTNB と SH 残基の反応による412m μ の吸光度の増加が認められず、遊離の SH 残基は存在しなかった。

2. ヒスチジン残基

native hPL 及び5モル尿素処理 hPL に DHT を加えた場合の吸光度曲線は、Fig. 20 の如くであった。DHT とヒスチジン残基の反応による480m μ の吸光度の増加は認められず、遊離のヒスチジン残基は存在しなかった。

3. 分子中の S-S 結合とその切断

8モル尿素、1モル及び2モル塩酸グアニジンを用いて hPL 分子内の S-S 結合を切断して SH 基とし、DTNB を作用させて、412m μ での吸光度の差から、分子内 SH 基を検討した成績は、Fig. 21 の如くであり、SH 基として hPL 1分子中2ヶであることが判明した。S-S 結合をメルカプトエタノールで切断し、carboxymethylation を行つたあと、セファデックス G-75でゲル濾過を行つた成績を、Fig. 22 に示す。denatured hPL(B) は、対称の native hPL(A) に比し遅れて溶出してはいるが、ただ一つのピークのみを示している。

4. N 末端の分析

DFP 処理を行つて純化した LAP と hPL をインキュベーションし、N末端の切断を行つたところ、遊離アミノ酸として valine が検出された。

D 立体構造と生物学的並びに免疫学的活性との関係

Fig. 4. Absorption spectrum of hPL-Kobe at pH 12.4

Table 2. Carbohydrate contents of hPL determined with orcinol sulfuric acid method

	540m μ	g/100g
crude hPL	0.005	0.3
purified hPL (hPL-KOBE)	0.001	0

Fig. 5. Precipitation pattern of purified hPL on ultracentrifugation

hPL 1.0%, 0.2M NaCl, 60000r.p.m., 10°C

Fig. 6. Precipitation pattern of purified hPL on ultracentrifugation (10°C)

1 hPL 0.6%, 8M Urea, 12290 r.p.m.

2 hPL 0.6%, 8M Urea, 25090 r.p.m.

1. N末端と生物活性の関係

LAP によるN末端切断を行つた hPL-Kobe の脂質分解作用は, Table 3 に示す如くである. hPL に LAP 4 μ g/ml を加えた時には, 8時間のインキュベーションで, また LAP 40 μ g/ml を加えた時には3時間で, hPL-Kobe の脂質分解作用は消失した.

2. N末端と免疫活性の関係

LAP によりN末端を切断された hPL-Kobe の抗 hPL 血清に対する免疫学的交叉性を検討した成績を Fig. 23 に示す. LAP 40 μ g/ml の濃度で, 12時間インキュベーションしてもなお抗 hPL 血清に対する hPL の交叉性は存在した.

3. S-S 結合と生物活性の関係

S-S 結合を切断された denatured hPL-Kobe はFig.22の如く, native hPL よりもやや遅れて溶出されたが, その脂質分解作用は Table 4 の如くであり, 生物活性は消失していた.

4. S-S 結合と免疫活性の関係

S-S 結合を切断した hPL-Kobe の抗 hPL 血清に対する反応を Fig. 24 に示す.

Fig. 7. Molecular weight of hPL-Kobe

Fig. 8. Precipitation pattern of purified hPL on ultracentrifugation (10°C)

- 1 hPL 1.0%, 8M Urea, 9690 r.p.m.
 2 hPL 1.0%, 8M Urea, 25090 r.p.m.

hPL-Kobe の抗 hPL 血清に対する免疫学的交叉性は、消失していた。

5. HPL の生物、免疫両活性に及ぼす尿素の影響

hPL-Kobe を各種尿素とインキュベーションした場合の脂質分解作用を検討した成績を Table 5 に示す。市販尿素及び再結晶尿素とのインキュベーションで、hPL-Kobe の脂質分解作用は消失したが、純化尿素との、インキュベーションを行つてもその脂質分解作用は保たれていた。

hPL-Kobe と各種尿素のインキュベーション後の抗 hPL 血清に対する反応は、Fig. 25 に示す如くであり、いずれも抗 hPL 血清に対して明瞭な沈降線を示した。

E 安定性に関する検討

1. 熱に対する安定性

Fig. 9. Molecular weight of hPL-Kobe

Fig. 10. Molecular weight of hPL-Kobe in ultracentrifugation

hPL-Kobe を、0°C, 37°C, 50°C, 及び90°Cでインキュベーションしたあと、その脂質分解作用を検討したのが、Table 6 である。即ち37°Cでのインキュベーションで、hPL-Kobe の最も強い生物活性が認められたが、50°C及び90°Cではその活性が50%以下と著明に減少した。

また抗 hPL 血清に対する免疫学的交叉性を検討した成績は、Fig. 26 の如くで、0°C及び37°Cのインキュベーションでは、明瞭な沈降線となり、90°Cでは全く沈降線を認めなかつた。

2. 酸、塩基に対する安定性

hPL-Kobe を各種 pH の溶媒とインキュベーションし、その生物活性及び免疫活性を検討した成績を Table 7 及び Fig. 27 に示す。

hPL-Kobe は、Table 7 の如く弱アルカリ性で最も強い脂質分解作用を示し、酸性溶液中では弱い活性しか示さなかつた。

一方免疫活性は、Fig. 27 の如くであり、hPL-Kobe はアルカリ性溶液とのインキュベーションでは、抗 hPL 血清に対し明瞭な沈降線を示したが、酸性溶液とのインキュベーションでは、沈降線を認めなかつた。

IV 考 按

すでに著者は、第一編で hPL の純化精製法につき詳述し、きわめて純度の高い hPL-Kobe を採取し、その精製操作中の態度から hPL は不安定な蛋白ホルモンであることを推察した¹⁾。そこでこの hPL-Kobe を用いて、構成成分、分子量、立体構造、安定性の面から、hPL の蛋白体としての性格を検討した。

まず、hPL-Kobe の吸光曲線は、278m μ に最大吸光を、257m μ に最小吸光があり、OD280/OD260=1.7

Fig. 11. Precipitation pattern of purified hPL on ultracentrifugation (10°C)

- 1 hPL 0.4%, 4M Guanidine-HCl, 9690 r.p.m.
 2 hPL 0.4%, 4M Guanidine-HCl, 25090 r.p.m.

Fig. 12. Molecular weight of hPL-Kobe

で、芳香族アミノ酸の存在が認められた。さらに pH 12.4 の塩基性溶液中では、吸光曲線はチロジン残基のイオン化により最大吸光が $275m\mu$ に変位し、チロジン-トリプトファン比は、 $R=3.26$ であつた。

Friesen(1965)⁹⁾によると、hPL 分子は最大吸光を $278m\mu$ に、最小吸光を $257m\mu$ に有し、0.1 規定苛性ソーダ溶液中の吸光度曲線の変化からチロジン-トリプトファン比は、3~3.5であり、著者の成績と一致している。

hPL-Kobe のアミノ酸組成は、全体的にみると酸性アミノ酸の含有が多いのに反して、シスチンの含有

Fig. 13. Precipitation pattern of purified hPL on ultracentrifugation (10°C)

- 1 hPL 0.8%, 4M Guanidine-HCl, 8950 r.p.m.
2 hPL 0.8%, 4M Guanidine-HCl, 16880 r.p.m.

Fig. 14. Molecular weight of hPL-Kobe

量がきわめて少い。また hPL のアミノ酸組成と胎盤より抽出精製した hCG (hC-LH, hC-FSH)^{10)~12)} のそれを比較すると、hC-LH に特異的に多く含まれるプロリンの含有量は hPL で少く、全体的な傾向としては hPL と hC-FSH がきわめてよく似ている。一方、hPL では糖成分はまったく検出されなかった。

つまり hPL-Kobe は糖を含まない酸性荷電傾向の強い単純蛋白体である。

ところで Florini et al (1966)¹³⁾ は、hPL は少くとも lipoprotein 或いは glycoprotein ではないと推察し、著者も hPL が単純蛋白体であることを証明したが、最近の Li et al (1972)¹⁴⁾、Niall et al (1971)¹⁵⁾

Fig. 15. Precipitation pattern of purified hPL on ultracentrifugation (10°C)

- 1 hPL 1.2%, 4M Guanidine-HCl, 8950 r.p.m.
- 2 hPL 1.2%, 4M Guanidine-HCl, 15590 r.p.m.

Fig. 16. Molecular weight of hPL-Kobe

1.2% hPL-Kobe in 4M guanidine-HCl 25090 r.p.m., 10°C, 60 min.

や Neri et al (1972)¹⁶⁾ の hGH の amino acid sequence と hPL のそれを比較した報告をみると、hPL は 190 個のアミノ酸連鎖から成り、両者間では 85% の類似性がみられるというが、この彼等の hPL のアミノ酸組成は著者の成績と類似している。

また hPL-Kobe から未処置の状態ではトリプトファン残基を検出することはできないが、5 モル尿素下で hPL に NBS を作用させると、トリプトファンが検出されるようになり、0.97% 程度を含有していることが判明した。

この様な操作を加えないとトリプトファン残基が検出できないということから、トリプトファン残基は hPL 分子の中にくるまつた形で存在し、hydrophobic bonding 又は non polar amino acid 間の ionic bonding によつて hPL 分子を結合させ、その立体構造を安定化させるような役割をもつようである。

hPL-Kobe の分子量は、Archibald 法によれば溶媒に塩化ナトリウム溶液を用いると容易に集合体を作り均一な沈降像を得ることができなかつたが、尿素溶液や塩酸グアニジン溶液を buffer として使用すれば、左右対称な一つのピークの沈降パターンが得られ、約 25000~26500 という値が得られた。hPL の分子量については、Friesen (1965)⁹⁾ はセファデックス G-100 ゲル濾過により約 30000 と推定し、一方 Florini (1966)¹³⁾ は hPL 分子が水素結合で結ばれた二鎖ペプチドであり、超遠心により全体としての分子量は 38000 で、一鎖では 18600 であると述べている。著者も当初 2 鎖ペプチドの可能性を示唆したことがあるが hPL が容易に集合体を作ることや塩酸グアニジン或いは尿素を作用させただけではその形態の変化がほとんどないことなどから、水素結合で結ばれた二鎖のペプチドであるとは考えにくく、しかも著者の成績では、hPL 分子内 S-S 結合を切断しても分子形態はやや平坦になるのみで分子量の変化が認められなかつたところから、hPL は分子内に S-S 結合を持つ一鎖ペプチドであろうと思われる。つまり、Florini は集合体を作った hPL を dimer であると考えたために分子量が大きく、一方 Friesen の方法ではセファデックスゲル濾過の誤差のため hPL の分子量が大きな値となつたと思われる、この点を十分に考慮して純化した hPL-Kobe の分子量が最も妥当性があると考えてよいと思われる。

次に酵素の生物活性に関与すると考えられている SH 残基やヒスチジン残基は、分子の表面に遊離の形では存在せず、SH 残基は hPL の tertial structure を構成するのにきわめて重要な残基のように思われる。

Fig. 17. Molecular weight of hPL-Kobe
hPL-Kobe in 4M guanidine-HCl
25090 r.p.m., 10°C, 60 min.

Fig. 18. Absorption spectra of hPL-Kobe modified with 5,5'-dithiobis (DTNB)
in 0.5M tris buffer pH 8.6

Fig. 19. Absorption spectra of hPL-Kobe modified with 5, 5'-dithiobis (DTNB) in 5M urea and tris buffer

即ち Sherwood¹⁷⁾ らは、S-S 結合が生物活性に重要な意義を持つのであろうと推察しているが、著者が行った実験、つまり分子内の SH 基を carboxymethylation して切断すると、hPL の個々の脂質分解作用がなくなると同時に免疫交叉性も消失したところから、一鎖内 S-S 結合の切断は分子形態をわずかに変化しただけにすぎないのにもかかわらず、ホルモンとしての性質を全く変化させる程大きな影響を持っている。従って hPL の S-S 結合は、活性の発現に必要な条件であると考えてよいようである。

ところでポリペプチドホルモン、特に hGH や ACTH¹⁹⁾ などでは、その N 末端や C 末端が生物あるいは免疫活性の発現に重要な意義をもつと推論されている。hPL に関しては著者の成績によると、LAP による N 末端の切断や粗尿素の N 末端アミノ酸への作用によって（おそらく混在している cyanate の作用であろう）、hPL-Kobe の生物活性のみが失われ、免疫活性は保たれていたところから、N 末端は生物活性の発現に関与していると思われる。また N 末端のアミノ酸はバリンであつた。このような成績と ACTH における成績を合わせ勘案すると、hPL の免疫活性基はおそらく N 末端に存在すると考えてよいであろう。

一方蛋白体としての hPL の安定性の検討では、高

Fig. 20. Absorption spectra of hPL treated with diasonium-1-H-tetrazole (DHT)

- A. hPL in 0.67M bicarbonate buffer
- B. hPL in 0.67M bicarbonate buffer + 0.01ml DHT (0min.)
- C. hPL in 0.67M bicarbonate buffer + 0.01ml DHT (20min.)
- D. hPL in 0.67M bicarbonate buffer + 0.01ml DHT (40min.)
- E. hPL in 5M urea + 0.025ml DHT
- F. hPL in 5M urea + 0.05 ml DHT
- G. hPL in 5M urea + 0.075ml DHT
- H. hPL in 5M urea + 0.175ml DHT

Fig. 21. Rates of reaction between SH-groups of hPL-Kobe and 5, 5'-dithiobis (DTNB)

Fig. 22. Gel filtration of hPL on sephadex G-75

A. hPL 5mg resolved in 5% acetic acid

B. hPL 5mg treated with 8M urea, reduced with mercaptoethanol and carboxymethylated by CH_2ICOOH

column size $1.0 \times 50(\text{cm})$, Each effluent volume 1 ml, eluted with 5% acetic acid

Table 3. Action of leucin amino peptidase (LAP) at pH 8.5 on the biological activity of human placental lactogen (hPL)

sample	FFA μ eq per liter				
	incubation time (37°C)				
	pre	post	3hr.	8hr.	12hr.
Control	500 $\pm$ 41.6	567 $\pm$ 38.2			
buffer		667 $\pm$ 80.5			
hPL+buffer				950 $\pm$ 50.1	
hPL+LAP (4 μ g)			700 $\pm$ 51.3	578 $\pm$ 30.1	500 $\pm$ 11.5
hPL+LAP (40 μ g)			434 $\pm$ 18.9	567 $\pm$ 25.5	500 $\pm$ 15.5

Fig. 23. Action of leucine aminopeptidase at pH 8.5, 0.14M trimethylamine acetate buffer containing 0.002M $MgCl_2$ on the immunological activity of human placental lactogen

- 1 hPL (1 mg/ml)
 2 hPL (100 μ g/ml) + LAP (4 μ g/ml), incubation 3 hrs. 37°C
 3 hPL (") + LAP ("), " 8 hrs. 37°C
 4 hPL (") + LAP ("), " 12 hrs. 37°C
 5 hPL ("), incubation 8 hrs. 37°C
 6 hPL (") + LAP (40 μ g/ml), incubation 3 hrs. 37°C
 7 hPL (") + LAP ("), " 8 hrs. 37°C
 8 hPL (") + LAP ("), " 12 hrs. 37°C
 center well : anti hPL serum

Table 4. Effect of hPL and denatured hPL to the mobilization of FFA (μ eq per liter)

	average
control pre	600 $\pm$ 23.3
post	867 $\pm$ 54.5
denatured hPL 150 μ g/ml	833.5 $\pm$ 31.5
none treated hPL 150 μ g/ml	1033.5 $\pm$ 71.7

温や酸性溶液中で hPL の生物ならびに免疫活性が容易に減弱するところから, hPL はきわめて不安定であらうと考えられる。

つまり第一編でも述べた如く, 純化された hPL を採取するためには, 酸性溶液での抽出や精製に長時間かけることは禁物である。これまでの諸家の報告をみると, この点に十分留意しているものは意外と少く, このようなところに hPL の生化学的分析についての諸家の成績が一定しない原因があると思われる。

これまでの著者ら^{20)~22)}の成績から判断すると, hPL-Kobe は, 「OD 278m μ に最大吸光を有し, 酸性アミノ酸が主体をなす糖を含まない, 分子量 約 25000 ~26500 の単純蛋白体であり, ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸は遊離の形で存在せず, 塩基性溶液では芳香族アミノ酸は容易にイオン化される傾向を示すし, また SH 残基は遊離の形で存在せず, かつカルボキシメチレーションによつて S-S 結合を切断しても, 化学的な処置をうけたヒト胎盤ラクトーゲンの立体構造は未処置のそれに比して平坦になる傾向を示すのみで, 分子量の変化をきたさない。

したがつて本物質の立体構造の連結や活性部位に関係するペプチドは, 水素結合よりはもつと結合力の弱い酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸間のイオン化結合か, 或いは non polar amino acid 間の hydrophobic bonding が主体をなすと考えられ, 一鎖ペプチドの可能性が強く, ねじれ (helix) の少ない平坦な蛋白構造をもち, 三次構造はおそらく S-S 結合であろう。

また hPL の生物活性は N 末端に, 免疫活性はおそらく C 末端に分かれて存在するように思われ, pH や温度などの条件やわずかの立体構造の変化によつて両活性が消失するから蛋白体としてはきわめて不安定な

Fig. 24. Action of carboxymethylation on the immunocrossreactivity of hPL

Table 5. Action of urea at pH 7.4 on the biological activity of human placental lactogen (hPL)

treatment	FFA μ eq per liter			
	pre	post	1 hr.	6 hr.
control	567 $\pm$ 31.5	610 $\pm$ 45.0		
2M commercial urea+hPL			640 $\pm$ 35.0	610 $\pm$ 40.0
2M recrystallised urea+hPL			658 $\pm$ 15.0	600 $\pm$ 40.0
2M purified urea+hPL			940 $\pm$ 65.0	878 $\pm$ 60.0
6M commercial urea+hPL			580 $\pm$ 30.0	550 $\pm$ 20.0
6M recrystallised urea+hPL			610 $\pm$ 20.0	590 $\pm$ 40.0
6M purified urea+hPL			960 $\pm$ 50.0	900 $\pm$ 50.0
8M commercial urea+hPL			580 $\pm$ 40.0	600 $\pm$ 15.0
8M recrystallised urea+hPL			580 $\pm$ 50.0	550 $\pm$ 30.0
8M purified urea+hPL			934 $\pm$ 50.0	850 $\pm$ 50.0

Fig. 25. Action of urea at pH 7.4, 0.01M phosphate buffer on the immunological activity of hPL

- 1 hPL (1 mg/ml)
 - 2 hPL (100 μ g/ml) + crude urea 1 hr.
 - 3 hPL (100 μ g/ml) + recrystallized urea 1 hr.
 - 4 hPL (100 μ g/ml) + pure urea 1 hr.
 - 5 hPL (100 μ g/ml) + crude urea 6 hrs.
 - 6 hPL (100 μ g/ml) + recrystallized urea 6 hrs.
 - 7 hPL (100 μ g/ml) + pure urea 6 hrs.
- center well : anti hPL serum

Table 6. Stability of hPL-Kobe after heat treatment in 0.01M phosphate buffer pH 7.4 for 1 hour

sample	FFA μ eq per liter		
	pre	post	1 hr.
control	240 $\pm$ 22.5	248 $\pm$ 19.0	
hPL 0°C			435 $\pm$ 39.8
37°C			561 $\pm$ 10.9
50°C			369 $\pm$ 32.8
90°C			216 $\pm$ 41.0

ものであろうと考えられる。

IV 結 語

1. hPL-Kobe の生化学的性格につき検討した。
2. 構成要素の分析では、酸性アミノ酸が主体をなし、トリプトファンは0.97%含有され、チロジノートリプトファン比は3.26であつた。糖成分は検出されなかつた。
3. Archibald 法による分子量の検討では、hPL-Kobe は約25000~26500である。
4. SH 残基、ヒスチジン残基は遊離の形では存在せず、三次結合は S-S 結合であらう。
5. 生物活性はN末端に、免疫活性はおそらくC末端に、それぞれ分離して存在するようである。
6. わずかな条件の変化や立体構造を変えることによつて、容易に生物、免疫活性が消失するところから、

Fig. 26. Stability of hPL-Kobe after heat treatment in 0.01M phosphate buffer pH 7.4 for 1 hour

1 hPL 0°C
2 37°C
3 50°C
4 90°C
center well : anti hPL serum

Fig. 27. Stability of hPL-Kobe to various pH at 37°C for 1 hour

1 hPL pH 2.0
2 pH 4.0
3 pH 8.0
4 pH 10.0
center well : anti hPL serum

Table 7. Stability of hPL-Kobe to various pH at 37°C for 1 hour

sample	FFA μ eq per liter		
	pre	post	1 hr.
control	230 $\pm$ 16.2	239 $\pm$ 12.2	
hPL pH 2.0			299 $\pm$ 23.5
pH 4.0			292 $\pm$ 30.3
pH 8.0			775 $\pm$ 35.7
pH10.0			422 $\pm$ 29.0

hPL は蛋白体としてきわめて不安定である。

稿を終るに臨み、御指導御校閲をいただいた恩師東条伸平教授に深謝いたします。また終始直接の御指導御鞭達をいただいた望月真人講師および教室の蛋白ホルモングループの諸兄姉に感謝いたします。

本研究の一部は、第4回国際内分泌学会で報告した。またアメリカ、N.Y., Rockfeler University における特別セミナーで講演した。

参 考 文 献

- 1) 森川 肇 : 日内泌誌, 49 : 882, (1973).
- 2) Ouchterlony, O. : Acta. Path. Microbiol. Scand., 32 : 231, (1953).
- 3) Moore, S. and Stein, W.H. : J. Biol. Chem., 192 : 663, (1951).
- 4) Spande, T.F. and Witkop, B. : Methods in Enzymology, xII, 498, ACADEMIC PRESS, N.Y. and London.
- 5) Bencze, W.L. and Schmid, K. : Analytical Chem., 29, (1957).
- 6) Archibald, W.J. : J. Phys. Chem., 51 : 1204, (1947).
- 7) Ellman, G.L. : Arch. Biochem. Biophys., 82 : 70 (1959).
- 8) Horinishi, H., Hachimori, Y., Kurihara, K., and Shibata, K. : Biochem. Biophys.

- Acta, 86 : 477 (1964). 9) Friesen, H. : Endocrinology, 76 : 369, (1965). 10) Ashitaka, Y. : Acta. Obst. et Gynaec. Jap., 17 : 124, (1970). 11) Ashitaka, Y., Tokura, Y., Tane, M., Mochizuki, M. and Tojo, S. : Endocrinology, 87 : 233 (1970). 12) 東条伸平, 望月真人, 大賀祐造, 志村利之, 丸尾猛, 西本弘之 : 日内泌誌, 48, 639 (1972). 13) Florini, J.R., Tonelli, G., Breuer, C.B., Coppola, J., Ringler, I. and Bell, P.H. : Endocrinology, 79 : 692, (1966). 14) Li, C.H. and Dixon, J.S. : Arch. Biochem., 146 : 233, (1971). 15) Niall, D., Hogan, M.L., Sauer, R., Rosenblum, I.Y. and Greenwood, F.C. : Proc. Nat. Acad. Sci., 68 : 866, (1971). 16) Neri, P., Arezzini, C., Ganali, G., Cocola, F. and Tarli, P. : Growth and Growth Hormone, Excerpta Medica, AMSTERDAM, (1972). 17) Sherwood, L.M. : Proc. N.A.S., 58 : 2307, (1967.) 18) Bornstein, J. : Growth and Growth Hormone, Excerpta Medica AMSTERDAM (1972).
- 19) 井村裕夫 : ペプチドホルモン, 朝倉書店, 105, (1973). 20) 望月真人, 森川 肇, 椋田 享, 曹 洙銘, 東条伸平 : 日産婦誌, 23, 450, (1971). 21) 望月真人, 森川 肇, 岡部桂一郎, 曹洙銘, 東条伸平 : 日産婦誌, 23, 320, (1971). 22) 東条伸平, 望月真人 : 最新医学, 26, 1148, (1971).