唾液腺ホルモンの活性フラグメントに関する 生理化学的研究

大阪大学薬学部

青 沼 繁, 小 浜 靖 弘, 小 宮 山 豊
中 陳 静 男, 山 田 康 子

The Study of Physiological Chemistry on Active Fragments of
the Salivary Gland Hormone

Shigeru AONUMA, Yasuhiro KOHAMA, Yutaka KOMIYAMA,
Shizuo NAKAJIN and Yasuko YAMADA

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University

We previously presented evidence that the salivary gland hormone, parotin, is composed of a subunit which has a molecular weight of 45000 and possesses the biological and immunological activities of parotin. In this paper the isolation of fragments from a tryptic digest of the subunit and their physiological chemistry were investigated to obtain active components of the subunit.

After 2 g of the subunit were digested with 20 mg of trypsin for 20 hours at 37°C, the tryptic digest was chromatographed on a Sephadex G-25 column equilibrated with 0.1 M NH_4HCO_3 . The eluate was fractionated into 9 parts from Fr. A to Fr. I in order of their molecular size. An increasing activity in the rabbit-circulating leucocyte number of the subunit was separated into 4 fractions of Fr. A, B, D and E. Rabbit serum Ca decreased and immunological activities were recovered into only Fr. H and Fr. A, respectively. Leucocyte increase and immunological activities of Fr. A were concentrated by successive chromatographies with Sephadex G-50 and QAE-Sephadex A-25 column. A purified component, Fr. AA-1, was found to have a molecular weight of 9100 by 15% polyacrylamide gel electrophoresis in 0.1% sodium dodecyl sulfate, N-terminal amino acid sequence of Leu-Tyr-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Glx- by combined dansyl-Edman procedure, C-terminal amino acid sequence of -Ile-Val-Leu-Leu-Lys(OH) by carboxypeptidase A + B method and glycopeptide consisting of 6.9% amino sugar and 7.4% uronic acid. A Ca decreasing active principle, Fr. H-1, purified from Fr. H by paper chromatography, was characterized to be pentapeptide of Asp-Tyr-Glu-Trp-Lys(OH). Both Fr. AA-1 and Fr. H-1 were not positioned on N- and C-terminals of the subunit molecule.

Whole - body autoradiographies of the subunit and active components labeled with

^{131}I in mice revealed that the subunit and Fr. AA-1 specifically were localized in the bone in addition to the liver, kidney, thyroid, spleen, adrenal and submaxillary gland, but Fr. H-1 did not distribute to the bone.

緒 言

著者らはすでに唾液腺ホルモン活性を有する分子量45,000の parotin-subunit (subunit) を精製, 単離し, その化学的諸性質を明らかにするとともに, このものが骨における cyclic AMP-adenyl cyclase 系を賦活化し, Ca 代謝調節に関与していることを認め報告した^{3, 4)}. 本報では subunit より低分子活性フラグメントを得る目的で trypsin 加水分解を行なって検討し, 家兔血清 Ca 低下効力 (Ca 効力) を示すペプタペチドと家兔循環白血球数増加効力 (白血球効力) および subunit と免疫化学的交叉反応を示す糖ペプチドを分離することに成功した. さらに活性フラグメントのアミノ酸配列分析および全身オートラジオグラフィーを行ない知見を得たので報告する.

実 験 方 法

Subunit : 既報³⁾に従い調製した.

Trypsin 加水分解物の調製 : Subunit 2 g を 0.2M NH_4HCO_3 200ml に溶解し, 希アンモニア水で pH8.2 に調製後 0.1M CaCl_2 2 ml に溶解した trypsin (TPCK, 193.5U/mg, Worthington) 20mg を加え 37°C で反応を行なった. 5 時間後再び同量の trypsin を加えさらに 15 時間反応後 CH_3COOH を加え pH3.0 とし凍結乾燥した. また限定分解物を調製するために subunit 1 g を蒸留水 500ml に溶解し, 0.05N NaOH で pH8.5 に調製後蒸留水 1 ml に溶解した trypsin 10mg を加え 37°C で反応を行ない, pH スタット (HS-2A, TOA) を用いて 175 m mole のカルボン酸が遊離した時点で CH_3COOH により pH3.0 とし反応を止め凍結乾燥した. 分解物はカラムクロマトグラフィーおよびペーパークロマトグラフィーを用いて分画, 精製した. Sephadex G-25 および Sephadex G-50 は 0.05M NH_4HCO_3 , Sephadex G-75 は 0.2N CH_3COOH でそれぞれ緩衝化し, また QAE-Sephadex A-25 は 0.01M tris-HCl buffer (pH8.0) で緩衝化し食塩濃度による gradient elution を行なった. 溶出液は紫外部 235, 280nm における吸光度または ニンヒドリン反応により分析した. ペーパークロマトグラフィーは東洋汙紙 No.50 (60×60cm) を用い n-BuOH:pyridine: $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ (15:10:3:12) により展開し, ニンヒドリン反応で検出した.

全身オートラジオグラフィー : 正常雄性 ddY 系マウス (体重 25~27 g) を用い, 尾静脈より 1 匹当り ^{131}I 標識検体 6~7 μCi を投与し, 所定時間後にエーテル麻酔致死せしめ, 直ちに凍結した. さらに一夜 -25°C にて保存した後クライオスタット (中川製作所) 中でマイクローム (Leitz 1400) を用い厚さ 35 μ の凍結全身切片を作製した. 切片はクライオスタット中で凍結乾燥した後 X 線フィルム (Type N) を用いコンタクト法により冷暗所において露出し全身オートラジオグラムを得た. Subunit および trypsin 加水分解物 (Fr. AA-1, Fr. H-1) のヨウ素化は前報⁴⁾に従って行ない, ^{131}I -Subunit および ^{131}I -Fr. AA-1 は 0.15M phosphate buffer (pH7.5) で緩衝化した Sephadex G-25 カラムで, ^{131}I -Fr. H-1 は 0.2M NaHCO_3 で緩衝化した Dowex (1×8) を用いて分離した. 比放射能はそれぞれ 171, 24, 34 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ であった.

Radioimmunoassay : Subunit 500 μg を 200 μl の生理食塩水に溶解後等量の Freund complete adjuvant に懸濁し, 正常雄性 hartley 系モルモット (体重 800 g) の背部皮下に投与した. 1 ヶ月後同様に免疫しさらに 1 週間おいて追加免疫し, 1 週間後に全採血を行ない subunit モルモット抗血清を得た. モルモット γ -グロブリン家兔抗血清は, モルモット正常血清から硫酸分画法により分離した γ -グロブリンを用い, complete adjuvant 法により週 1 回 2 mg の割合で 4 回体重 2 kg の正常雄性家兔を免疫し, 最終免疫から 1 週間後

全採血を行ない抗血清を得た。 ^{125}I -Subunitはparotinの場合と同様に調製した。²⁾比放射能は53mCi/mgであった。Radioimmunoassayは ^{125}I -Subunit約20,000cpm/50 μl , 1/100希釈のsubunitモルモット抗血清50 μl , 試料または標準subunit 100 μl およびbuffer 100 μl を混合し, 4℃にて3日間反応後, 牛血清 γ -グロブリン50 μg /100 μl および1/2希釈の γ -グロブリン家兔抗血清200 μl を加え, 4℃にて1日反応後3,000 rpm, 10分間遠心分離し, 沈殿の放射活性をウエル型シンチレーションカウンターで測定した。結果は添加した ^{125}I -Subunitに対する沈殿のカウント(B%)で求め, 標準曲線より測定値を算出した。希釈用bufferとして0.25%牛血清アルブミンを含む0.05M phosphate buffer (pH7.5)を用いた。なお ^{125}I -Subunitがsubunitと同様にCa効力を有していることを確認している。

アミノ酸配列分析: Dansyl-Edman法⁶⁾によりアミノ酸配列分析を行ないN末端から順次アミノ酸を検索した。試薬はすべてアミノ酸配列分析用(和光)を用いた。Dansylアミノ酸の同定はpolyamide layer sheet (5×5cm, CHENG CHIN TRADING CO.LTD)を用い, Hartleyらの方法⁸⁾に従い, dansyl-Asp, dansyl-Gluを検出した場合には相当するPTH-アミノ酸を調製しWako gel B-5Fを用いた薄層クロマトグラフィーによりAsnあるいはGlnの有無を調べた。¹⁴⁾C末端アミノ酸配列についてはMaghuin-Rogisterらの方法¹²⁾に準じcarboxypeptidase A+B法により行なった。すなわち10%LiClで10倍希釈したcarboxypeptidase A (21mg/ml, 47U/mg, Sigma) 10 μl およびcarboxypeptidase B (6mg/ml, 101U/mg, Worthington) 50 μl を0.1M tris-HCl buffer (pH8.0) 100 μl に溶解した検体0.1 μmole 中に加え37℃にて反応を行なった。所定時間後-25℃に凍結することにより反応を停止し, アミノ酸自動分析計により遊離アミノ酸の定量を行なった。

生物学的効力, アミノ酸組成, 糖含量の測定およびポリアクリルアミドゲル電気泳動: すべて既報^{3, 4)}に従った。

Fig. 1. Gel Filtration of Tryptic Digest of Parotin-Subunit on Sephadex G-25 Column (3.2 × 124 cm) Equilibrated with 0.05M NH_4HCO_3
a) One hundred μl aliquot was taken for sugar determination by phenol- H_2SO_4 method.

Table I. Biological Activity of Tryptic Peptides of Parotin-Subunit

Fr. a)	Ca decreasing activity (%) ^{b)}	Leucocyte activity ^{c)}	
		Decreasing	Increasing
A	1.68	-	+
B	2.85	-	+
C	0.42	-	-
D	1.05	-	+
E	2.38	-	+
F	1.30	-	-
G	1.30	-	-
H	10.32	-	-

a) dose; 20 μ g/kg, i.v.

b) mean of Ca decreasing % in rabbit serum at 6 or 7 hr after injection

c) variation over 20% in circulating leucocyte number of rabbit blood at 1, 2, 4, 6 or 8 hr after injection

Fig. 2. Gel Filtration of Partial Tryptic Digest of Parotin-Subunit on Sephadex G-75 Column (3.6 $\times$ 115 cm) Equilibrated with 0.2N Acetic Acid

a) One ml aliquot was taken for protein determination by ninhydrin reaction.

b) Five hundred μ l aliquot was taken for sugar determination by phenol-H₂SO₄ method.

Table 2. Biological and Immunological Activities of Partial Tryptic Peptides of Parotin-Subunit

Fr. a)	Ca decreasing activity (%) ^{b)}	Immunological activity ^{c)}
a	1.38	36
b	-0.20	< 1
c	-2.00	< 1
d	8.32	< 1

a) dose; 20 μ g/kg, i.v.

b) See Table I.

c) relative activity in weight to weight when activity of parotin-subunit referred as 100 in radioimmunoassay

実験結果

Trypsin 加水分解物の分画: Fig. 1 に示すように trypsin による完全加水分解物を Sephadex G-25 カラムによりゲル濾過を行ない, 紫外部235nm における吸光度および糖含量より Fr.A-I の9ヶに分画しそれぞれ凍結乾燥品として回収した. Subunit に含まれる糖は Fr.A にのみ認められ, 生物学的効力については Table 1 に示すように20 μ g/kgの用量で Fr.H が Ca 効力を示し, Fr.A,B,D および E が白血球効力を示すことを認めた. なお Fr. I はアミノ酸分析の結果 Lys,Arg および subunit のC末端アミノ酸である Leu⁴⁾ を含まず, 加水分解による副産物と考えられる. また Fig. 2 に示すように trypsin の限定分解物を Sephadex G-75カラムを用いて分画し, 各分画の radioimmunoassay による免疫活性および Ca 効力を測定した. その結果を Table 2 に示すように, 糖を含む Fr.a に免疫活性が, Fr.d に Ca 効力が存在することを認めた. なお Fr.a の前に溶出するピークはポリアクリルアミドゲル電気泳動法により元の subunit であることを確認している. 以上のことから Ca 効力, 白血球効力および免疫活性が subunit 分子上の異なる部位に存在することが明らかとなり, 以下完全加水分解物中より免疫活性および白血球効力を有する Fr.A と Ca 効力を有する Fr.H について精製を行なった.

Fig. 3. Polyacrylamide Gel Electrophoretic Pattern of Fr. AA-1
top: cathode staining: Amido Black 10B

活性フラグメントの分離: Fr.A を Sephadex G-50 ($2.0 \times 103\text{cm}$) を用いて分画し糖を含む Fr.AA を得, さらに QAE-Sephadex A-25 ($2.0 \times 30\text{cm}$) を用いて gradient elution を行ない食塩濃度 $0.3 \sim 0.4\text{M}$ で溶出される分画 Fr.AA-1 を得た. このものは Fig. 3 に示すようにポリアクリルアミドゲル電気泳動で均一な挙動を示した. Fr.AA-1 の収量は 90.0mg であった. Fr.H については Fig. 4 に示すようにペーパークロマトグラフィーを行ない, $R_f = 0.4$ を示す Fr.H-1 を $10\% \text{CH}_3\text{COOH}$ により回収した. 収量は 2.1mg であった. このように分離した Fr.AA-1 および Fr.H-1 の生物学的効力を検定したところ Table 3 に示すように $20\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で Fr.AA-1 は Ca 効力は示さないが白血球効力を示し, また subunit の radioimmunoassay を用いて免疫活性を測定したところ強い活性を有することを認めた. Fr.H-1 は $20\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で 12.33% の Ca 効力を示したが白血球効力は示さなかった. なお Fr.AA-1 は $20\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で subunit および Fr.H-1 と異なり投与後 4 時間目に 7.34% の家兔血清 Ca 低下作用を示すことを認めた.

Fig. 4. Paper Chromatogram of Fr.H
 paper: Toyo filter paper No. 50 ($2 \times 40\text{cm}$)
 solvent: n-BuOH: Pyridine: CH_3COOH : H_2O
 (15:10:3:12)
 staining: ninhydrin reagent

Table 3. Biological and Immunological Activities of Fr.AA-1 and Fr.H-1

Fr.	a) Ca decreasing activity (%) ^{b)}	Leucocyte activity ^{b)}		Immunological activity ^{c)}
		Decreasing	Increasing	
AA-1	1.98	-	+	1600
H-1	12.33	-	-	< 1

a) dose; $20\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.

b) See Table 1.

c) See Table 2.

Fig. 5. Whole-Body Autoradiograms of Male Mice Injected with ^{131}I -Parotin-Subunit

a) 20 min after injection

b) 60 min after injection

Fig. 6. Whole-Body Autoradiograms of Male Mice 20 min after Injected with ^{131}I -Fr.AA-1 and ^{131}I -Fr.H-1

a) ^{131}I -Fr.AA-1

b) ^{131}I -Fr.H-1

Fig. 7. Whole-Body Autoradiograms Showing the Specific Localization in Pelvic Bone of Male Mice 20 min after Injected with ^{131}I -Parotin-Subunit and ^{131}I -Fr.AA-1

a) ^{131}I -Parotin-Subunit

b) ^{131}I -Fr.AA-1

Table 4. Localization of ^{131}I -Subunit, ^{131}I -Fr.AA-1, ^{131}I -Fr.H-1 and Radio-Iodine in Mouse by Whole-Body Autoradiography

Tissue	Relative degree of localization ^{a)}							
	^{131}I -Subunit		^{131}I -Fr.AA-1		^{131}I -Fr.H-1		Radio-Iodine	
	20	60	20	60	20	60	20	60 (min)
Bone	+	±	+	+	-	-	-	-
Incisors	+	+	+	±	-	-	-	-
Liver	+	±	+	+	+	+	-	-
Spleen, Adrenal	+	-	+	±	+	-	+	-
Thyroid, Kidney, Stomach	+	+	+	+	+	+	+	+
Submaxillary gland, Urine	+	+	±	+	+	+	+	+

a) shown as follows: - lower than blood, ± equal to blood, + higher than blood

全身オートラジオグラフィー：まず ^{131}I -Subunit のマウス正中断面における全身オートラジオグラムを Fig. 5 に示すが、投与後20分において椎骨、肋骨、頭蓋冠などの骨組織、肝臓、甲状腺および顎下腺などの組織に血中濃度よりも高い放射活性の分布を認め、次いで尿および唾液に血中濃度と同程度の放射活性の分布を認めた。投与後60分においては、甲状腺、胃、尿および唾液に血中濃度よりも高い放射活性の分布を認め、次いで骨組織、肝臓および睪丸に血中濃度と同程度の放射活性の分布を認めた。なお雌性マウスにおいても生殖器をのぞき雄と同様の結果を得た。Fig. 6 に ^{131}I -Fr.AA-1 および ^{131}I -Fr.H-1 の投与後20分における正中断面の全身オートラジオグラムを示すが、 ^{131}I -Fr.AA-1 については、 ^{131}I -Subunit と同様に骨組織および肝臓などの組織に血中濃度よりも高い放射活性の分布を認め、次いで顎下腺および尿に血中濃度と同程度の放射活性の分布を認めた。なお投与後60分においても生殖器をのぞき ^{131}I -Subunit と同様の結果を得ている。しかし ^{131}I -Fr.H-1 については、肝臓、甲状腺および顎下腺などに放射活性の分布を認

めたが骨組織への分布は認められなかった。Fig. 7 に左側面の全身オートラジオグラムを示すが、投与後20分において ^{131}I -Subunit および ^{131}I -Fr.AA-1 とともに骨盤、腎臓、脾臓、歯髄および副腎に血中濃度よりも高い放射活性の分布を認めた。以上の結果を Table 4 にまとめ、Na ^{131}I の放射活性の分布と比較すると、骨組織、肝臓および歯髄に ^{131}I -Subunit および ^{131}I -Fr.AA-1 が特異的に分布することを認めた。

Table 5. Amino Acid Compositions of Fr.AA-1 and Fr.H-1

amino acid	Fr.AA-1	Fr.H-1
	residues/mole	residues/mole
	(nearest integral/mole)	(nearest integral/mole)
Asp	8.81 (9)	0.81 (1)
Thr	2.80 (3)	
Ser	2.02 (2)	
Glu	11.58 (12)	1.06 (1)
Gly	1.75 (2)	
Ala	2.97 (3)	
Val	2.55 (3)	
Met	1.00 (1)	
Ile	3.38 (3)	
Leu	6.60 (7)	
Tyr	2.30 (2)	1.02 (1)
Phe	1.69 (2)	
Lys	3.97 (4)	1.00 (1)
His	0.36 (0)	
Arg ^{a)}	2.36 (2)	
Trp	2.09 (2)	1.19 (1)

a) by ultraviolet absorption method

Table 6. Sequential Degradations of Fr.AA-1 and Fr.H-1

Stage	Fr.AA-1	Fr.H-1	
	End group	End group	
	DNS ^{a)} method	DNS ^{a)} method	PTC ^{b)} method
1	DNS-Leu, DNS-Val (trace)	DNS-Asp	PTH-Asp
2	bis-DNS-Tyr, -DNS-Tyr (trace)	bis-DNS-Tyr	
3	DNS-Ile	DNS-Glu, bis-DNS-Tyr (trace)	PTH-Glu
4	DNS-Leu	DNS-Ala (trace), DNS-Gly (trace)	
5	α -DNS-Tyr, bis-DNS-Tyr (trace)	bis-DNS-Lys, α (or ϵ)-DNS-Lys	
6	DNS-Phe		
7	DNS-Phe		
8	DNS-Glu, DNS-Thr (trace)		

a) DNS; dansyl

b) PTC; phenylisothiocyanate, identified as phenylthiohydantoin amino acid

Table 7. Molecular Weight and Sugar Component of Fr.AA-1

Molecular weight by 15 % polyacrylamide gel electrophoresis in 0.1 % SDS ^{a)}	9100
Sugar component	uronic acid (as glucuronic acid)
	7.4 %
	amino sugar (as glucosamine)
	6.9 %

a) sodium dodecyl sulfate

Fig. 8. Time Course of Amino Acids Liberated from Fr.AA-1 by Carboxypeptidase A and B

Fr.AA-1およびFr.H-1のアミノ酸配列分析, 糖含量および分子量: Table 5 にアミノ酸組成を示すが, Fr.AA-1はsubunitと同様にGlu, Asp, Leuの含量が多く, Fr.H-1はGlu, Asp, Tyr, TrpおよびLysの各々1分子から成ることを認めた. 各フラグメントにつきdansyl-Edman法によりN末端アミノ酸配列分析を行なったところ, Table 6 に示すようにFr.AA-1のN末端アミノ酸配列はLeu-Tyr-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Glx-であり, またFr.H-1はN末端よりAsp-Tyr-Glu-となり, 4番目はアミノ酸組成の結果とも考えあわせTrp, 5番目はLysと決定した. Fr.AA-1のC末端アミノ酸配列分析の結果をFig. 8に示すが, carboxypeptidase AおよびBにより遊離してくるアミノ酸を定量した結果-Ile-Val-Leu-Leu-Lys(OH)であることを認めた. なおFr.AA-1およびFr.H-1ともにC末端アミノ酸はLysでありtrypsin加水分解物として適当であった. Table 7 に示すようにFr.AA-1の分子量はSDS-ゲル電気泳動法により9,100であることを認め, 糖含量はフェノール硫酸法によりグルクロン酸に換算して7.4%のウロン酸, また4N HCl中, 100℃, 6時間の加水分解物についてBlix変法によりグルコサミンに換算して6.9%のアミノ糖を含むことを認めた. Fr.H-1の分子量はアミノ酸配列分析の結果により740であった. なおDCC法¹⁵⁾により合成したFr.H-1のN末端ジペプチドAsp-Tyr(OH)およびFr.H-1の構成アミノ酸につきそれぞれ生物学的検定を行なったが, 20μg/kgの用量ではいずれも効力を示さなかった.

考 察

近年ホルモンの化学構造研究の進歩にともない, ガストリン⁷⁾, ACTH¹⁰⁾, 成長ホルモン⁵⁾などにおいて生理作用発現には全構造を必要とせず, いわゆる活性フラグメントが存在することが知られている. 著者らもsubunitからより低分子の活性フラグメントを得る目的でtrypsin加水分解を行なったところ活性は失われず, しかもsubunit分子上でCa効力, 白血球効力および免疫活性が分散していることを明らかにする

とともに活性フラグメントの分離に成功した。Ca 効力を有する Fr.H-1 は Asp-Tyr-Glu-Trp-Lys(OH) のペントペプチドで、Ca 代謝に影響をおよぼす他の蛋白性ホルモンのアミノ酸配列と類似性はみられず新しい物質であった。また subunit と免疫化学的に交叉反応を示し白血球効力を有する Fr.AA-1 は分子量 9,100 の糖ペプチドで 14.3% の糖含量を示し、分子量 45,000 の subunit が 3.3% の糖を含むことから⁴⁾ subunit 中の糖がすべてこの Fr.AA-1 に局在するものと思われる。Fr.AA-1 の N 末端は Leu, C 末端は Lys で、また Fr.H-1 の N 末端は Asp, C 末端は Lys で、すでに報告した subunit の N および C 末端はそれぞれ Gly, Leu であり^{3, 4)}、今回得た活性フラグメント Fr.AA-1 および Fr.H-1 はいずれも subunit の末端部に位置しないことを認めた。Subunit および活性フラグメント Fr.AA-1, Fr.H-1 の作用および代謝を比較検討する目的でマウスにおける全身オートラジオグラフィーを行なったところ、骨における cyclic A-MP-adenyl cyclase 系および Ca 代謝に影響をおよぼす subunit は^{3, 4)}、骨組織および歯髄に高い分布を示し、Na ¹³¹I あるいは成長ホルモン¹³⁾、カルシトニン⁹⁾、副甲状腺ホルモン¹¹⁾ などとは異なる特異性を有することを認めたが、subunit と同様の Ca 効力を示す Fr.H-1 は骨組織に分布しなかった。一方 Ca 効力を示さない Fr.AA-1 が subunit と同様骨組織に分布することが認められた。すでに parotin あるいは subunit などの唾液腺ホルモン関連物質の体内分布実験により¹⁾、肝臓および腎臓に高い放射能の分布が報告されているが、今回の全身オートラジオグラフィーにより単なる体内分布実験では検出されなかった骨組織および歯髄において高い分布を認め、唾液腺ホルモン研究の初期より明らかにされてきた骨に対する作用を裏付ける極めて興味ある結果を得たものと考えられる。

結 論

- 1) Subunit の trypsin 加水分解物中より、subunit との免疫化学的交叉性と家兎循環白血球数増加効力を示す Fr.AA-1 および家兎血清 Ca 低下効力を示す Fr.H-1 の 2 種の活性フラグメントを分離することに成功した。
- 2) Fr.AA-1 は分子量 9,100 の糖ペプチドであり N 末端アミノ酸配列は Leu-Tyr-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Glx-, C 末端アミノ酸配列は -Ile-Val-Leu-Leu-Lys(OH) であった。糖組成は 7.4% のウロン酸および 6.9% のアミノ糖であった。Fr.H-1 は Asp-Tyr-Glu-Trp-Lys(OH) のペントペプチドであった。
- 3) ¹³¹I-Subunit および ¹³¹I-Fr.AA-1 は、マウスにおける全身オートラジオグラフィーにおいて骨組織に特異的に分布することを認めたが、¹³¹I-Fr.H-1 は骨組織に分布しないことを認めた。

謝辞 最後に実験材料の一部を提供された帝國臓器製薬株式会社に心から感謝する。

文 献

- 1) 青沼 繁, 三村 務: I¹³¹ 標識パロチンの研究, 生化学, 32: 528-560, 1960.
- 2) 青沼 繁, 小浜靖弘: 顎下腺の研究(第14報)パロチンの Radioimmunoassay, 薬学雑誌, 92: 828-835, 1972.
- 3) 青沼 繁, 小浜靖弘, 中陳静男, 屋敷伸治, 江川 宏: 唾液腺ホルモンの Subunit に関する生理化学的研究, 日内分泌会誌, 50: 1468-1476, 1974.
- 4) 青沼 繁, 小浜靖弘, 中陳静男, 屋敷伸治, 江川 宏, 和田昌師, 小宮山豊: 唾液腺ホルモンの Subunit に関する生理化学的研究(その2), 日内分泌会誌, 52: 93-104, 1976.
- 5) Gráf, L. and Li, C.H.: Isolation and properties of two biologically active fragments from limited tryptic hydrolysis of bovine and ovine pituitary growth hormone, Biochemistry, 13: 5408-5415, 1974.
- 6) Gray, W.R.: Methods in Enzymology XI, Academic Press, New York, 1976, P. 469-475.
- 7) Gregory, R.A.: The isolation and chemistry of gastrin, Gastroenterology, 51: 953-959,

1966. 8) Hartley, B.S.: Strategy and tactics in protein chemistry, *Biochem. J.*, 119: 805–822, 1970. 9) Hicks, E.P., Cooper, C.W. and Waddell, W.J.: Whole-body autoradiography of the distribution of ^{125}I -Thyrocalcitonin in mice, *J. Dent. Res.*, 50: 1307–1313, 1971. 10) Hofmann, K., Yajima, H., Yanaihara, N., Liu, T. and Lande, S.: Studies on polypeptide XIII The synthesis of a tricopeptide possessing essentially the full biological activity of natural ACTH, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83: 487–489, 1961. 11) de Kretser, D.M., Martin, J.J. and Melick, R.A.: The radioautographic localization of ^{125}I -labeled bovine parathyroid hormone, *J. Endocr.*, 46: 507–510, 1970. 12) Maghuin-Rogister, G., Closset, J. and Hennen, G.: The carboxy-terminal primary structure of the β -Subunit from bovine and porcine lutenizing hormone, *FEBS lett.*, 13: 301–305, 1971. 13) Mayberry, H.E., Van den Brand, J.L., Van Wyk, J.J. and Waddell, W.J.: Early localization of ^{125}I -labeled human growth hormone in adrenal and other organs of immature hypophysectomized rats, *Endocrinology*, 88: 1309–1317, 1971. 14) Schroeder, W.A.: *Methods in Enzymology XI*, Academic Press, New York, 1967, P. 445–461. 15) Sheehan, J.C. and Hess, G.P.: New method of forming peptide bonds, *J. Amer. Chem. Soc.*, 77: 1067–1068, 1955.