[農化 第 50 巻, 第 9 号, p. R 185~R 192, 1976]

ウシ成長ホルモンの活性フラグメントに関する研究 (昭和 51 年度農芸化学奨励賞受賞)

山 崎 信 行
(愛媛大学農学部)

Studies on Active Fragments of Bovine Growth Hormone

By Nobuyuki YAMASAKI

Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama City

成長ホルモン (growth hormone, 以下 GH と略) は、脊椎動物の脳下垂体前葉から分泌される蛋白質ホルモンであり、その分泌は、大脳視床下部の GRH (growth hormone releasing hormone) により促進され、GHI (別名 somatostatin) により抑制される⁽¹⁾。GH の作用はきわめて多種多様であり、蛋白合成の促進効果、骨端軟骨の伸長促進効果をはじめ、糖消費の抑制 (抗インスリン作用) や脂肪の分解促進など、その効果は糖質や脂質の代謝にまで及んでいる。また、このホルモンはプロラクチン (乳腺刺激ホルモン) とも密接な関係を有することが知られている⁽²⁾。これまでに、ヒト⁽³⁾、ブタ⁽⁴⁾、ウシ⁽⁵⁾、ヒツジ⁽⁶⁾など多くの哺乳動物の GH が単離されており、最近、ヒト⁽⁷⁾、ウシ⁽⁸⁾、ヒツジ⁽⁹⁾の GH の 1 次構造が相ついで決定されている。なかでもヒトの GH は、固相法⁽¹⁰⁾による全ペプチド合成も完成されている⁽¹¹⁾。一方、GH には種特異性があることが、かなり古くから知られている。たとえば、ウシやブタの GH は、ヒトやサルのような霊長類に対してホルモン作用を示さないが^(12,13)、ラットは、他の多くの哺乳動物の GH の作用を受けることができる。また、魚類の GH は魚類に対しては有効であるが、ラットに対しては無効である⁽¹⁴⁾。このような GH の種特異性は、おもに各種属の GH 分子間の化学構造の差異によるものと考えられている。ところで、GH によって引き起こされる生体内の種々の効果は、種属のいかんにかかわらず同様であることから、各種属の GH 分子中には種属間に共通な “common active core” が存在することが予想されていた。なんらかの方法で GH 分子を低分子化し、活性を保持したフラグメン

トを得ることができれば、このような active core の実体を明らかにすることも可能となり、さらに、GH の構造と機能に関する多くの知見を得ることができると期待される。

ここでは、ウシの GH をトリプシンによって限定分解して得られる活性フラグメントを中心にして述べてみたい。

1. GH の限定分解とその意義

ACTH (副腎皮質刺激ホルモン) のペプシンによる限定分解⁽¹⁵⁾などの結果からも類推されるように、一般に、蛋白質系ホルモンの活性発現には、酵素蛋白質において要求されるような高度に規定された高次構造を必ずしも必要としないということを示唆するいくつかの実験結果が報告されている。GH については、最初、Li ら⁽¹⁶⁾がヒト GH (以下、HGH と略す) にキモトリプシンやペプシンを作用させて、分子全体の約 40% 近くまで加水分解しても、なお活性が保持されることを見出した。同様な結果は、ウシ GH (以下 BGH と略す) の種々の蛋白分解酵素による限定分解においても認められ⁽¹⁷⁻²¹⁾、ここに GH 分子中には “active core” が存在するという説が支配的となった。このような限定分解に関する研究は、活性部位構造の解明を目的として進められてきたが、一方では、“common active core” の存在を前提にして、ウシやブタの GH を限定分解し、ヒトに対して有効にしようとするのが試みられるようになった^(17,20,22,23)。

2. BGH とそのトリプシンによる限定分解

BGH は他の種属の GH に先がけて単離されたにもかかわらず, HGH に比べてその化学構造に関する研究が遅れた 1 つの原因は, その分子量と N-末端基の不ぞろいにある. ヒト, サル, ブタ, ラットの GH は, いずれも分子量が 21,000 であり, N-末端基は Phe (1 モル) であるのに対して, BGH やヒツジ GH (OGH と略す) の分子量は 45,000 であり, その N-末端基は Phe と Ala であることから, 一時は, これらの分子中には枝分れ構造が存在すると考えられていた⁽¹⁹⁾. その後この説は否定され, 45,000 という分子量は会合体としての値であり, 単量体の分子量はいずれも HGH と同じ 21,000 であることが明らかにされた⁽²⁴⁾.

BGH の C-末端基は, 分子量 21,000 当り 1 モルの Phe であるが, N-末端基は不ぞろいであり, 標品によっては, ほぼ等モルの Phe と Ala のほかに, Met, Glu, Gly などが少量ずつ検出されることがある⁽²⁵⁾. 筆者ら⁽²⁶⁾や Dellacha ら⁽²⁷⁾はそれぞれ独立に, 高純度の BGH⁽²⁸⁾ の N-末端基を定量し, 約 0.5 モルずつの Phe と Ala を得ている. これと同様な結果は, OGH についても認められている⁽²⁹⁾. BGH や OGH でみられるこのような N-末端基の不ぞろいは, これらの分子は, N-末端近傍の構造が若干異なる異種分子の等モル混合物であるということによって説明されていた⁽³⁰⁾. 最近, Ellis ら⁽³¹⁾は, 等電点分離法により 8 M 尿素中で BGH や OGH をそれぞれ, Phe-鎖と Ala-鎖に分離している. この N-末端基の不ぞろいは, おそらくこれらのホルモンの抽出過程における酵素消化の結果生じたものと考えられている^(32,33).

BGH の 1 次構造は, 最初 Santomé ら⁽³⁴⁾ によって報告されたが, 後に Gráf と Li⁽⁸⁾ によって訂正され, 2 個の S-S 結合を含む 191 残基からなる全アミノ酸配列が決定された.

前述のように, BGH はヒトに対しては無効である. このことは免疫学的にも証明されている⁽³⁵⁾が, このものを酵素消化すると, その挙動はかなり変ってくる. Sonenberg ら⁽²⁰⁾は, BGH のトリプシンによる限定分解物が脳下垂体機能不全症患者に対して, HGH と同様の代謝効果を示すことを見出した. さらに, その患者の抗血清が HGH との間で免疫学的な交差反応を起すことも明らかにされた⁽²³⁾. これらの結果は, 限定分解物が単に活性を保持しているというばかりではなく, HGH

との類似性を獲得したという重要な意味を持っている. BGH のトリプシン消化物がヒトに対して有効になるという原因を究明するためには, まず消化物からヒトに対して有効な分画を単離し, その性質を明らかにしなければならない.

BGH のトリプシン限定分解物 (TBGH) とは, pH 9.5, 25°C で BGH に 1/300 倍量のトリプシンを作用させ, BGH 分子当り 2~3 個のペプチド結合を切断して得たものである^(20,26,36). TBGH から DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを主体にして分離精製したヒトに対して有効な分画 (TBGH-d と略) は, 電気泳動的にまた, 超遠心的に均一成分であった. 沈降平衡法から求めた分子量は 20,800 であり, BGH の単量体の分子量 21,000 とよく一致している. また, アミノ酸組成も BGH のアミノ酸組成とほぼ等しい^(26,36) (第 1 表参照).

第 1 表 BGH, TBGH-d および各フラグメントの
アミノ酸組成と末端基

アミノ酸	BGH	TBGH-d	A-I	A-II	RCM-A-I ₁	RCM-A-I ₂
Lys	10.5	10.8	8.8	2.0	4.3	4.4
His	3.0	3.4	3.2	0	2.4	1.1
Arg	12.2	12.3	10.5	2.8	6.9	4.4
Asp	15.1	15.4	10.8	3.8	6.3	4.3
Thr	11.3	10.9	7.1	2.8	5.6	2.2
Ser	11.7	12.5	10.0	1.9	8.9	2.9
Glu	21.6	21.7	18.1	4.9	17.6	2.2
Pro	6.1	5.9	5.9	1.1	6.9	0
Gly	9.8	10.8	6.5	3.1	5.3	2.1
Ala	13.5	12.6	12.1	1.3	10.6	2.8
Cys(1/2)	4.6	4.5	3.9	0	0	0
Val	6.4	6.8	3.0	2.9	3.1	1.0
Met	4.4	4.2	2.3	0.9	1.1	0.9
Ile	6.5	6.4	5.5	1.0	5.3	0
Leu	24.3	23.9	19.5	5.8	14.9	5.8
Tyr	6.0	5.7	4.6	1.0	3.9	2.4
Phe	11.6	11.4	9.5	1.8	7.5	2.8
CM-Cys	0	0	0	0	1.4	2.8
N-末端基						
Phe	0.51	0.51	0.48	0	0.49	0
Ala	0.51	0.48	0.44	0	0.45	0
Val	0	0.90	0	0.92	0	0
Ser	0	0.90	0.84	0	0	0.95
C-末端基						
Phe	0.85	0.93	0.76	0	0	0.84
Arg	0	1.94	0.92	1.1	0.95	0

N-末端基は DNP 法により, また C-末端基はヒドラジン分解法により定量し, いずれも (mole/蛋白 1 mole) で表わした.

BGH の N-末端基は、分子量 21,000 当り各 0.5 モルの Phe と Ala であり、C-末端基は 1 モルの Phe である。一方、TBGH-d では、これらの末端基のはかに、さらに Ser と Val (各 1 モル) が新しい N-末端基として、また、2 モルの Arg が新しい C-末端基として検出された^(26,37)。このように、明らかにトリプシンによるペプチド結合の開裂が起っているにもかかわらず分子量やアミノ酸組成が BGH と変らないのは、TBGH-d は BGH のトリプシン分解の結果生じたフラグメントの会合体であることが推定された。上で求めた TBGH-d の分子量は変性剤非存在下で測定した値であるが、TBGH-d を 5 M 尿素溶液に対して十分に透析した後、沈降平衡法により測定すると、分子量は 16,300 と求められた⁽³⁶⁾。さらに、5 M 尿素存在下あるいは高濃度の酢酸溶液中でゲルろ過を行うと、TBGH-d は 2 つのペプチドに分離された^(26,37)。50 % 酢酸中での Sephadex G-75 によるゲルろ過の溶出順序に従って、それぞれフラグメント A-I、A-II と称した。

3. フラグメントの構造と生理活性⁽³⁹⁾

(1) 蛋白化学的性質

沈降平衡法から求めたフラグメント A-I、A-II の分子量は、それぞれ 16,000 と 5000 であり⁽²⁶⁾、A-II の分子量はその後、高濃度酢酸溶液中でのゲルろ過⁽³⁹⁾およびアミノ酸組成から約 4500 と求められた。フラグメント A-II の N-末端基は Val、C-末端基は Arg で、このペプチドは His, Trp, Cys を含まない。一方、フラグメント A-I は、2 個の S-S 結合を含み、その N-末端基は Phe と Ala (各 0.5 モル) と Ser (1 モル) であり、C-末端基は Phe と Ala (各 1 モル) である。このフラグメント中の S-S 結合を完全に還元し、カルボキシメチル化した後、Sephadex G-75 を用いて 50 % 酢酸中でゲルろ過すると、分子量 11,000 の RCM-A-I₁ と分子量 5000 の RCM-A-I₂ とに分離された。各ペプチドのアミノ酸組成と N-末端基の定量結果 (第 1 表参照) から、RCM-A-I₁ と RCM-A-I₂ は、それぞれ BGH 分子の N-末端および C-末端部位のペプチドに由来するものと判断した。以上の結果をもとにして、BGH から TBGH-d および各フラグメントへの生成機構を模式化したのが第

第 1 図 TBGH-d から各フラグメントへの生成機構とフラグメントの解離-会合の模式図
SCM: S-カルボキシメチルシステイン。

1 図である。TBGH-d は、BGH の N-末端側にある S-S 結合によって形成されているポリペプチドループが、トリプシンによって加水分解を受け、その結果生じたフラグメントが会合体を形成したものであって、変性剤存在下でこの会合体は解離して、フラグメント A-I と A-II を生成すると考えられる (第 1 図参照)。

(2) フラグメントの高次構造と解離-会合

円偏光二色性の測定から求めた TBGH-d の α -helix 含量は、BGH とほぼ同じ 50 % であり、10~15 % の β -構造を含む。また、フラグメント A-I は、約 20 % の α -helix のほかに、かなりの量の β -構造を有する。一方、フラグメント A-II は約 10 % の α -helix のほかは、大部分ランダムな構造をとっている⁽⁴⁰⁾。これらの結果は、TBGH-d から高濃度酢酸中での A-I、A-II への解離は、かなりの高次構造の変化を伴うことを示している。この A-I、A-II への解離は低濃度の酢酸溶液中では起らず、これら両フラグメントは会合体として挙動する。このような限定分解により得られるフラグメントの解離-会合からは、RNase の S-蛋白質と S-ペプチド⁽⁴¹⁾において見られるような生理活性蛋白質の構造と機能について興味ある結果を得ることが期待できる。上で単離した A-I と等モル (重量比で 3:1) の A-II との間に低濃度酢酸中で再会合体を形成させることができるが、この場合、会合体形成に伴う α -helix 含量の増加が認められ、両フラグメント間には、なんらかの特異的な相互作用があることを示唆している。

一方、各フラグメント自体の解離-会合をゲルろ過を用いて検討したところ、分子量 16,000 のフラグメント

A-I は常に単量体として挙動するが、分子量 4500 の A-II は、中性～弱アルカリ性領域および 1.5 M 以上の酢酸溶液中では単量体として存在し、酢酸濃度の低下に伴い二量体、三量体を形成する⁽³⁹⁾。前述のように、生の BGH は容易に会合体を形成するが、この会合体形成には、BGH 分子中の A-II に相当する部位が関与していることも考えられる。一方、A-II 中には 1 個の Tyr 残基が含まれており、この残基の存在状態は会合体形成に伴い変化する。0.05 M 酢酸に溶かした A-II と、これよりも高濃度の酢酸に溶かした A-II との間で差スペクトルを測定すると、286 nm に吸収極大を持つ差スペクトルが得られる。286 nm の差スペクトルの強度は、酢酸濃度が高くなるにつれて増加するが、酢酸濃度が 1.5 M 以上になると、それ以上は増加せず一定となる。この差スペクトルの酢酸濃度に対する依存性は、ゲルろ過での A-II の会合体形成における酢酸濃度依存性とよく一致する。これらの結果は、A-II 中の 1 個の Tyr 残基は、A-II が単量体の場合には分子表面に存在し、会合体形成によって分子内部に埋没することを示している。

これらフラグメントの解離-会合とは別に、筆者らは BGH および A-II 分子中の Lys と Met 残基の存在状態をスピララベル法⁽⁴²⁾により検討した結果、A-II の Lys と Met および BGH の Lys 残基は、いずれも分子表面に露出しているが、BGH 中にある 4 個の Met 残基のうち、いくつかは分子表面に露出しており、一部は分子内部の疎水性領域に存在していることを示唆する結果を得た⁽⁴³⁾。

(3) 活性フラグメントの生理活性

GH の *in vivo* での活性は、脳下垂体を切除した幼若ラットに対する体重増加効果と脛骨骨端軟骨幅の増大効

果により測定される。分子量 4500 のフラグメント A-II は BGH の約 50% の活性を示したが、フラグメント A-I は分子量が大きいにもかかわらず、20% 弱の活性しか示さなかった^(20,44)。さらに興味あることには、A-I と A-II の等モル混合物（再会合体、以下、A-I+A-II と略）は、各フラグメント単独の場合よりも高い活性を示した（第 2 図）。しかし、各フラグメントおよび（A-I+A-II）の活性に対する response の仕方には、かなりの相違がみられる。これは、おそらく各フラグメントの大きさや化学構造のちがいが、生体内での移行の速さや標的器官との親和性、さらには生体内での蛋白分解酵素による分解の受けやすさを反映しているものと考えられる。一方、これらフラグメントや（A-I+A-II）の *in vitro* での代謝効果を脳下垂体切除幼若ラットの副睾丸脂肪組織を用いて検討した結果、¹⁴C-glucose の消費とその CO₂ への変化、¹⁴C の脂肪へのとり込みおよび脂肪の分解に及ぼす効果は、強弱の差こそあれ、A-I および A-II 両者に認められるが、いずれも BGH や TBGH-d に比べて弱い効果しか示さない。また、脂肪分解に及ぼす効果は、各フラグメント単独の場合よりも（A-I+A-II）において強い促進効果が認められる。さらに、¹⁴C-His の脂肪組織中の蛋白質へのとり込みは、各フラグメント単独ではほとんど効果を示さないが、（A-I+A-II）によってはじめて促進される⁽⁴⁵⁾。

in vivo と *in vitro* で得られたこれらの結果は、会合体形成における A-I と A-II 間の相互作用が、ホルモン活性と密接な関係を有することを示している。

一方、フラグメント A-II のヒトに対する有効性についても検討されており^(44,46)、HGH の 10 倍量の A-II を下垂体機能不全症患者に投与すると、抗インスリン作用をはじめ、血中尿素態窒素や尿中窒素および尿中クレアチンの減少や尿中カルシウムの増加など、HGH を投与した場合と同様な代謝効果が認められている。

4. GH の common active site

フラグメント A-II は、BGH の 1/4 の分子量であるにもかかわらず、かなり高いホルモン活性を保持し、さらにヒトに対しても HGH 同様の活性を示す興味あるペプチドであり、このフラグメント中には、ホルモン活性発現に関与する重要な部位が含まれていると考えられる。

A-II のアミノ酸配列の決定にあたっては、まず直接 Edman 法⁽⁴⁷⁾を適用して N-末端近傍の構造を決定し、

第 2 図 ラットに対する BGH と各フラグメントの活性

第3図 活性フラグメント A-II のアミノ酸配列

C, T, CB はそれぞれキモトリプシン, トリプシン, CNBr による
↓ ↓
ペプチド結合の切断個所を示す.

ついで CNBr 分解⁽⁴⁸⁾で得たペプチド断片を用いて、C-末端近傍の構造を決定した。さらに、キモトリプシンおよびトリプシン消化ペプチドについて検討し、第3図に示すような 38 アミノ酸残基の配列を決定した^(49,50)。その結果、A-II は BGH⁽⁸⁾ の Val₉₆-Arg₁₃₃ 間のペプチドに相当することが明らかとなった。また、この部位は1次構造の決定に先立って第1図で推定したように、BGH の N-末端側にある S-S 結合によって形成されるポリペプチド上にある。さらに、このアミノ酸配列を他種属の GH の部分構造と比較してみると、A-II は、OGH⁽⁹⁾ の Val₉₆-Arg₁₃₃ 間、HGH⁽⁷⁾ の Val₉₆-Arg₁₃₄* 間および HCS⁽⁵¹⁾ (human chorionic somatomammotropin, ヒト胎盤にあるプロラクチン作用と GH 活性を有するホルモン) の Met₉₆-Arg₁₃₃* 間のペプチドのアミノ酸配列とよ

く似ている（第4図参照）。

これらのペプチドはいずれも BGH の場合と同様、各ホルモン分子の N-末端側にある S-S 結合によって形成されるポリペプチド上に存在している。このように、BGH から得た活性フラグメント A-II が、他の哺乳動物の GH の部分構造との間でアミノ酸配列における高いホモロジーを示し、また、ラットのみならずヒトに対してもホルモン作用を示すことから、筆者らは、各哺乳動物の GH 分子の N-末端側にある S-S 結合によって形成されるポリペプチドループ上には、種属間に共

通な活性部位，すなわち“common active site”が存在すると結論した⁽⁵⁰⁾。したがって，BGH のトリプシン限定分解物がヒトに対して有効になるという現象は，“common active site”の遊離ということによって一応説明されよう。一方，GH の酵素消化をホルモン分子の高次構造と関連づけて考えてみるのも興味深い。最近，HGH の Arg₁₃₄-Thr₁₃₅ 間および Lys₁₄₀-Gln₁₄₁ 間のペプチド結合が，ヒトのプラスミンによってトリプシン様の加水分解を容易に受けることが報告されている^(52, 53)。これらの結果は，TBGH-d の結果とかなりよく対応しており，HGH の上記の部位および BGH の A-II に相当する部位は，いずれも各分子の表面に露出しており，酵素による攻撃を受けやすいコンフォーメーションをとっていると推定される。

A-II (BGH)	Val-Phe-Thr-Asn-Ser-Leu-Val-Phe-Gly-Thr-Ser-Asp- 96 100	Arg-Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Lys- 110
OGH	Val-Phe-Thr-Asp-Ser-Leu-Val-Phe-Gly-Thr-Ser-Asp- 96 100	Arg-Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Lys- 110
HGH	Val-Phe-Ala-Asn-Ser Leu-Val-Tyr-Gly-Ala-Ser-Asn-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys- 96 100	110
HCS	Met-Phe-Ala-Asn-Asn-Leu-Val-Tyr-Asp-Thr-Ser-Asp-Ser-Asp-Asp-Tyr-His-Leu-Leu-Lys- 96 100	110
A-II (BGH)	Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Leu-Ala-Leu-Met-Arg-Glu-Leu-Glu-Asp-Gly-Thr-Pro-Arg 120	133
OGH	Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Leu-Ala-Leu-Met-Arg-Glu-Leu-Glu-Asp-Val-Thr-Pro-Arg 120	133
HGH	Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Glu-Thr-Leu-Met-Gly-Arg-Leu-Glu-Asp-Gly-Ser-Pro-Arg 120	134
HCS	Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln-Thr-Leu-Met-Gly-Arg-Leu-Gly-Asp-Gly-Ser-Arg-Arg 120	134

第4図 活性フラグメント A-II とヒツジ GH (OGH), ヒト GH (HGH) およびヒトの chorionic somatomammotropin (HCS) の部分構造の比較

* HGH や HCS の 1 次構造には、最近訂正が加えられたので、ここでは、それぞれ新しい 1 次構造に対応した番号を用いた。

これまでに述べてきたような酵素的な断片化とは別に、ペプチド結合の化学的開裂反応を利用して活性フラグメントを得ることも試みられており、BGH やブタの GH 中のメチオニルペプチド結合を CNBr で開裂して、興味ある活性フラグメントが得られている^(25,54)。筆者らは、BGH にオゾン酸化-ヒドラジン分解法⁽⁵⁵⁾を適用して、Trp₈₆-Leu₈₇ 間のペプチド結合を選択的に開裂したが、それによって得た各々のフラグメントの生理活性については、まだ十分に検討されていない⁽⁵⁶⁾。

一方、種々の活性フラグメントから得られる情報を主体にして、GH の部分構造のペプチド合成も進められている。Blake と Li⁽⁵⁷⁾ は、HGH の N^α-acetyl (Ser₉₅-Thr₁₃₃) を合成し、このペプチドがラットに対して骨端軟骨の伸長促進活性を有することを報告している。また、Chillemi と Pecile⁽⁵⁸⁾ は HGH の 81~121 間、122~153 間に相当する合成ペプチド標品のいずれにも活性を認めている。さらに、A-II フラグメントの C-末端部位の 9 残基よりなるペプチド合成品が、BGH の 50% 近い活性を示すという、きわめて興味ある結果も得られている⁽⁵⁹⁾。このような GH の部分構造のペプチド合成に関する研究は、今後、酵素的あるいは化学的な限定分解とともに、GH の構造と機能や種特異性に関する多くの情報を提供するものと期待される。

5. お わ り に

以上、GH の活性フラグメントについて述べてきたが、これらの結果は、GH の活性発現には、必ずしも分子全体が必要ではなく、分子中に局在する特定のアミノ酸残基の一定の配列によって規定されるペプチド、すなわち common active site が重要であることを示唆している。しかも、A-II のみならず A-I にも若干の活性が見られたことや^(26,44)、HGH のプラスミン消化で得られた 2 つのフラグメントのいずれもが活性を有すること⁽⁶²⁾、および、HGH の部分構造のペプチド合成の結果⁽⁵⁹⁾などが示すように、GH の active core は複数個存在する可能性もある。

では、GH 分子の高次構造や active core 以外の部分は、いったいどのような役割を持っているのであろうか。まず第 1 に、脳下垂体から分泌された GH が血液を通して標的器官まで運ばれる間に、これらは、酵素消化から active core を保護していることが考えられる。次に、HGH のプラスミン消化によって得られたフラグメ

ント⁽⁶³⁾が、HGH の 4.9 倍の GH 活性と 14.5 倍のプロラクチン活性を有することからも推察されるように、脳下垂体で生産される GH は、実際には GH の前駆体であるとする説も出されている。第 3 に、分子全体のコンフォメーションもしくは active core 以外の部位が、種特異性の決定に関与していることも十分に考えられる。現時点では、いずれが正しいとは断言できないが、今後、解決すべき重要な課題の 1 つである。さらに重要な問題は、GH の活性中心の構造と作用機構の解明である。活性フラグメント A-II の単離により、active core および common active site の実体をつかむことができたが、まだ真の活性中心構造を明らかにするにはいたっていない。この問題を解明するためには、まず、活性フラグメントを構成する個々のアミノ酸残基の活性発現における役割を明らかにしなければならない。さらに、真の活性中心の姿とは、単にホルモン分子の化学構造のみから論じられるものではなく、作用を受ける側、すなわち、細胞との相互の関係において論議されるべき性質のものである。残念ながら、GH の標的器官は現在のところ明らかにされていないが、最近ようやく、GH によって引き起される細胞膜構造のコンフォメーションの変化が分光学的にもとらえられるようになり⁽⁶⁰⁻⁶²⁾、また、活性フラグメント A-II が、HGH と同様にヒト赤血球膜と相互作用を示すことも明らかにされるにいたっている⁽⁶⁰⁾。

今後、このような研究から、GH のレセプターの実体が明らかになり、さらに、GH の化学構造と生理活性との関係がより明らかにされたときに、はじめて GH の作用機構を分子レベルで説明できるようになるであろう。

- (1) E. Frieden and H. Lipnen: "Biochemical Endocrinology of the Vertebrate," Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs., New Jersey, 1971, p. 21.
- (2) S. L. Kaplan and M. M. Grunbach: *J. Clin. Endocrinol.*, **24**, 80 (1964).
- (3) C. H. Li and H. Papkoff: *Science*, **124**, 293 (1956).
- (4) P. Andrew: *Nature*, **209**, 155 (1966).
- (5) C. H. Li and M. A. Evans: *Science*, **99**, 183 (1944).
- (6) J. M. Dellacha, M. A. Enero, J. A. Santomé and A. C. Paladini: *Eur. J. Biochem.*, **12**, 289 (1970).
- (7) C. H. Li: *Proc. Amer. Phil. Soc.*, **116**, 365 (1972).

- (8) L. Gráf and C. H. Li : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 168 (1974).
- (9) C. H. Li, D. Gordon and J. Knorr : *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 493 (1973).
- (10) R. B. Merrifield : *Biochemistry*, **3**, 1385 (1964).
- (11) C. H. Li and D. Yamashiro : *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 7608 (1970).
- (12) M. S. Raben : *New Eng. J. Med.*, **266**, 31 (1962).
- (13) C. H. Li and W. K. Liu : *Experientia*, **20**, 169 (1964).
- (14) A. Wilhelmi : "Hypophyseal Growth Hormone, Nature and Action," ed. by R. W. Smith, D. H. Gaebler and C. N. H. Long, McGraw-Hill, New York, 1955, p. 59.
- (15) P. H. Bell, K. S. Haward, R. G. Shepherd, B. M. Finn and J. M. Meisenhelder : *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 5659 (1956).
- (16) C. H. Li : The Abstract of Papers, The 2nd Int. Congr. Endocrinol., London, 1964, p. 1192.
- (17) Z. Laron, A. Yed-Lekack, S. Assa and A. Owadło-Silbergeld : *Endocrinology*, **74**, 532 (1964).
- (18) C. H. Li, H. Papkoff, P. Fønss-Bech and P. G. Condliffe : *J. Biol. Chem.*, **218**, 41 (1956).
- (19) C. H. Li : *Adv. in Protein Chem.*, **11**, 101 (1956).
- (20) M. Sonenberg, C. A. Free, J. M. Dellacha, G. Bondonna, H. Haymowitz and A. C. Nadler : *Metabolism*, **14**, 1189 (1965).
- (21) F. Rensser : *Acta Endocr.*, **49**, 578 (1965).
- (22) E. Knobil and J. Hotchkiss : *Annu. Rev. Physiol.*, **26**, 47 (1964).
- (23) S. M. Glick : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **26**, 374 (1966).
- (24) J. M. Dellacha, M. A. Enero and I. Faiferman : *Experientia*, **15**, 16 (1966).
- (25) R. E. Fellows and A. D. Rogal : *J. Biol. Chem.*, **244**, 1567 (1969).
- (26) N. Yamasaki, M. Kikutani and M. Sonenberg : *Biochemistry*, **9**, 1107 (1970).
- (27) J. M. Dellacha and A. V. Fontanive : *Experientia*, **21**, 351 (1965).
- (28) C. A. Free and M. Sonenberg : *J. Biol. Chem.*, **239**, 1515 (1964).
- (29) C. Peña, C. P. Paladini, J. M. Dellacha and J. A. Santomé : *Eur. J. Biochem.*, **17**, 27 (1970).
- (30) M. Wallis : *FEBS Letters*, **3**, 118 (1969).
- (31) S. Ellis, M. Lorenson, R. E. Grindeland and P. X. Callahan : *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.*, **244**, 55 (1972).
- (32) R. E. Fellows, Jr., A. D. Rogal and A. Mudge : *ibid.*, **244**, 42 (1972).
- (33) C. Peña, A. C. Paladini, J. M. Dellacha and J. A. Santomé : *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 320 (1969).
- (34) J. A. Santomé, J. M. Dellacha, A. C. Paladini, C. E. M. Wolfenstein, C. Peña, S. T. Daurat, M. J. Biscoglico, Z. M. de Sasé and A. V. F. de Sangiesa : *FEBS Letters*, **68**, 1051 (1971).
- (35) C. H. Li, N. R. Moudgal and H. Papkoff : *J. Biol. Chem.*, **235**, 1038 (1960).
- (36) M. Sonenberg, M. Kikutani, M. Free, C. A. Nadler and J. M. Dellacha : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **148**, 532 (1968).
- (37) N. Yamasaki and M. Sonenberg : The Abstract of Papers, The 51th Meeting of the American Endocrine Society, N. Y., 1969, p. 16.
- (38) 山崎信行 : 蛋白分解酵素と生体制御, 村地 孝, 浅田敏雄, 藤井節郎編, 東京大学出版会, 1973, p. 141.
- (39) N. Yamasaki and K. Kangawa : *Agr. Biol. Chem.*, **11**, 2631 (1973).
- (40) M. Sonenberg and S. Beychock : *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 88 (1971).
- (41) F. M. Richards : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 162 (1958).
- (42) S. Onishi and H. McConnel : *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 2293 (1965).
- (43) 嶋中寿一郎, 寒川賢治, 山崎信行, 高桑正義 : 日農化大会講演要旨, p. 250 (1974).
- (44) M. Sonenberg, N. Yamasaki, M. Kikutani, N. I. Swislocki, L. Levine and M. New : *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.*, **244**, 75 (1972).
- (45) N. I. Swislocki, M. Sonenberg and N. Yamasaki : *Endocrinology*, **87**, 900 (1970).
- (46) L. Levine, M. Sonenberg and M. New : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **37**, 607 (1973).
- (47) P. Edman : "Protein Sequence Determination," ed. by S. B. Needleman, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1970, p. 211.
- (48) E. Gross : "Methods in Enzymology," Vol. XI, ed. by C. H. W. Hirs, Academic Press, p. 238.
- (49) N. Yamasaki, K. Kangawa, S. Kobayashi, M. Kikutani and M. Sonenberg : *J. Biol. Chem.*, **247**, 3874 (1972).
- (50) N. Yamasaki, J. Shimanaka and M. Sonenberg : *ibid.*, **250**, 2510 (1975).
- (51) C. H. Li, J. S. Dixon and D. Cahung : *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 95 (1973).
- (52) C. H. Li and L. Gráf : *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, **71**, 1197 (1974).
- (53) R. N. P. Sigh, B. K. Seavey, V. P. Rice, T. T. Lindsey and U. J. Lewis : *Endocrinology*, **94**, 883 (1974).

- (54) D. F. Nutting, J. C. Kostyo, J. M. Mills and A. F. Wilhelmi : *Biochem. Biophys. Acta*, **200**, 601 (1970).
- (55) M. Morishita, T. Sowa, F. Sakiyama and K. Narita : *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 433 (1967).
- (56) 山崎信行, 嶋中寿一郎 : 日農化大会講演要旨, p. 429 (1975).
- (57) J. Blake and C. H. Li : *Int. J. Protein Peptide Res.*, **5**, 123 (1973).
- (58) F. Chillemi and A. Pecile : *Experientia*, **27**, 385 (1971).
- (59) S. S. Wang, C. C. Yang, I. D. Kulesha, M. Sonenberg and M. Merrfield : *Int. J. Protein Peptide Res.*, **6**, 103 (1974).
- (60) M. Sonenberg : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **68**, 1051 (1971).
- (61) *idem* : *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 450 (1969).
- (62) M. P. Vinay, M. Sonenberg and N. I. Swislocki : *Biochim. Biophys. Acta*, **332**, 156 (1974).

(51年6月28日受理)