オットセイの骨格筋に存在する新生理活性 ペプチッド様物質

林 　　　　　・鈴木たね子

(1967 年 8 月 7 日受理)

A New Biologically Active Peptide in Fur Seal Muscle

Takashi HAYASHI* and Taneko SUZUKI**

The presence of a new biologically active peptide which has been named callopeptide by the authors was presumed in the digested muscle of fur seal as follows: Skeletal muscle brei including a small portion of bone or internal organs was digested by protease after eliminated fats and oils. Ethanol was added to the digested muscle, the soluble portion obtained at alcohol concentration of 60 to 80 percent passed through a column of Sephadex G-25 after concentrated under reduced pressure to remove the alcohol, and the effluents were divided into four fractions as in Figs. 1 and 2. It was observed that the second fraction develops an intense color by biuret reaction and shows the presence of 12 unknown peptides and small amounts of free amino acids on the chromatogram of amino acid analysis using an analyzer (Table 4).

When the test animal (rabbit, cat, etc.) was affected with an aliquot of the second fraction, a strong capillary vasodilatory effect was observed which was disappeared by the complete hydrolysis of this fraction. The biological actions of the fraction are, however, differed from those of vasoactive peptide for instance, bradykinin as shown in Tables 1 and 2, and it was presumed that the digested fur seal muscle contains a new type of biologically active peptide.

生理活性を持つペプチッドは近年多様の生物体をオリジンとして発見されている。それらは insulin のように内分泌ホルモンペプチッドといわれるもの、angiotensin, bradykinin, kalidin, substance-P のような tissue hormone といわれるもの、および gramicidin のような抗生物質などに分類される^{1,2)}。このうちで近年特に興味を中心になつてゐるのは tissue hormone である³⁻⁵⁾。これらのうち bradykinin や angiotensin のように構成アミノ酸からその配列順序まで明らかになつてゐるものの外、ただ単にペプチッドらしいとおもわれるものまで含めると、かなり多数にのぼつてゐるが、著者らはオットセイ (*Callorhinus urisus*) の骨格筋肉に tissue hormone とおもわれるペプチッド様の新生理活性物質が存在することを観察し、これを Callopeptide と名づけた。従来発見されている tissue hormone のオリジンは哺乳動物の血清蛋白より bradykinin をとる外は、蜂類の毒液、両生類の皮膚、軟体動物の唾液腺など天然物を原料としている生産の困難なものが多い^{1,2)}。Callopeptide のオリジンはオットセイであるが、もちろん類縁の他の動物にも見出されることが想像される。オットセイは現在国際条約によつて世界で年間約 40 万頭が捕獲され、毛皮は珍重されるが筋肉は一部ミンクの餌とする外、廃棄されている状態である。本論文では、Callopeptide の抽出、化学的性質および生理活性の特性について記述する。

実験方法および結果

試料 試料 1 はオットセイの筋肉を骨の 1 部も一緒にしてミンチし数ヶ月凍結貯蔵したもの、試料 2 は、

* 慶応義塾大学医学部 (Keio Gijuku University) 東京都新宿区信濃町

** 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab.) 東京都中央区勝どき

Fig. 1. Fractionation of alcohol soluble portion of sample 1 by gel-filtration.

●—● at 545 mμ (biuret reaction)   ○—○ at 270 mμ
 Column; Sephadex G-25 fine   Eluant; distilled water

Fig. 2. Fractionation of alcohol soluble portion of sample 2 by gel-filtration.

●—● at 545 mμ (biuret reaction)   ○—○ at 270 mμ
 Column; Sephadex G-25 fine   Eluant; distilled water

オットセイの筋肉を内臓の1部も混入したまま細砕したものである。

有効成分の抽出と分画 はじめに脂質を除くため試料1あるいは試料2の一定量に約同量のアセトンまたはヘキサンを加えて、攪拌浸漬を行ない、3時間放置後、アセトン層またはヘキサン層を除き常温で乾燥した。原料のなま肉と同量の水を加え、水によく膨潤させて肉泥とし、これに蛋白分解酵素 Biopraser sp-4 (長瀬産業製) を原料肉 1g あたり 150~500 単位を加え、攪拌しつつ 45°C に加温し3時間消化を行なった。消化液は 90~95°C で 15 分間加熱して酵素を失活させ、放冷後濾過して、固形物を除去した。濾液を 80°C 以下で減圧濃縮し、局方エタノールを濃度が 60~80% になるように添加し 70°C で 15 分間還流すると、白色沈澱が生成するがこれを濾別して、黄褐色のアルコール溶液を得た。80°C 以下でアルコールを留去し約 1/20 量にまで濃縮し、Sephadex G-25 fine をつめたカラム (全長 50 cm, 径 2.5 cm) に濃縮液 5 ml ずつを入れ1時間当たり 100 ml の流速で蒸留水を流下させゲル濾過を行なった。流出液 5 ml ずつを採取し、ビュレット試薬による発色を 545 m μ で測定し、一方 270 m μ におけるチロジン残基吸収を測定した。その結果は、Fig. 1 および 2 に示すごとくであり、試料によつてほとんど相違がみられない。次に Fig. 1 および 2 に示したようにゲル濾過によつてえられる分画を4つに区分した。第1の区分は流出に用いた蒸留水であり、第2の区分はビュレット反応がもつとも強く発色する部分を含み、黄色を呈し、ほとんど無臭である。第3の区分は 270 m μ でもつとも強い吸光度を示す部分を含み淡黄色で焦性ブドウ酸様の刺激臭があつた。第4区分はビュレット反応を全く示さず 270 m μ における吸収がわずかにあり、無色で動物性の異臭があつた。それぞれの区分について生理活性の検討を行なった。

生理活性の測定 上述の各区分を一定濃度に調製してウサギに静注し、注射前後の網膜の血管拡張をカラー写真によつて判定した。一方内臓血管の拡張をウサギを用いて腹窓法⁶⁾によつて観察した。

Plate I はウサギ網膜の血管拡張を示したものである。A は注射前のコントロール、B は 2.0% のペプチッド (ビュレット反応によつて算出される蛋白態窒素に 6.25 をかけてペプチッド量とした) を含有する第2区分を体重 1 kg あたり 0.9 ml 静注して1時間経過したもの、C は2時間経過したものである。これらの Plate を比較することによつて、第2区分で明らかに網膜の血管拡張が起こることがみとめられた。同様な実験を第1、第3、第4区分について検討したところ Table 1 に示したように第1、第4には全く作用がみられず、第3に微弱な血管拡張作用がみられた。

Table 1. Property of each fraction.

Fraction No.	Color	Odor	Hypotensive action	Vasodilating action
Fraction 1	Colorless	Odorless	—	—
Fraction 2	Yellow	Odorless	++	++
Fraction 3	Pale yellow	Pyruvic acid like	±	+
Fraction 4	Colorless	Meat like	—	—

なお第2区分を混入した軟膏をつくり、体重 2.5 kg のウサギの胸部の剃毛部 2×20 cm に体重 1 kg 当たりペプチッドとして 0.06~0.08 mg を塗布すると腹窓法によつて内臓血管の拡張すなわち充血が観察された。

この血管拡張作用をヒスタミンの作用と比較するため体重 2.5 kg のネコの腹腔に注射し頭蓋を開いて大脳を露出し、大脳表面の血管の拡張を調べた。その結果は Table 2 に示したとおりで、ヒスタミンは全身濃度 0.00089~0.0089% において初めて血管拡張を起こすのに対し、第2区分はさらに低濃度の 0.00014% で血管拡張を起こし、しかもヒスタミンの場合は、最終的に実験動物は死亡した。

つぎに血圧降下作用の検討を行なった。正常血圧 150~160 mmHg (体重 2.5~3.5 kg) のウサギの耳静脈に 1.0% の第2区分を体重 1 kg 当たり 2 ml 注射することによつて 30~40 分後に血圧は約 15~20

Table 2. Histamine and the fraction 2 upon cortical vascular system

Item	Histamine	Fraction 2
Animal	Cat (2.5 kg)	Cat (2.5 kg)
Dose of peritoneal injection	1 ml of 0.2~2.0 M	1 ml of 0.358% peptide
Calculated concentration	0.00089%~0.00889%	0.000143%
Congestion	+	+
Diffuse bleeding (after several hours surgical manipulation on the exposed corotex)	-	+
End effect	dead	alive

mmHg 低下することを認めた。また体重 1 kg 当たり 5~7 ml の大量をあたえても 25 mmHg 以上の降下は示さなかつた。第 1, 第 4 区分では血圧降下作用は全くみとめられず第 3 区分では血圧降下作用がある場合とない場合とが現われ統計学的処理によつて有意な差を確認することが困難であつた。

血圧降下作用のあるペプチッド bradykinin と第 2 区分の作用とを比較してみると Table 3 に示したように, bradykinin は急速に血圧を下げるが, 第 2 区分 (あるいは第 3 区分) では溶液の濃度をいくら高めても血圧降下作用は緩慢でありしかも 20~25 mmHg 以上の降下を起こさなかつた。

Table 3. Physiological action of bradykinin and the fraction 2.

Action	Bradykinin	Fraction 2
Hypotensive action	strong	medium
Contraction of visceral smooth muscle	+	slight
Dilatation of vascular smooth muscle	+	+
Permeability of capillary	with some controversies	(Cat, Rabbit Rat)
Pain producing action	increase severe pain	increase severe pain (Human)

第 2 区分を透析用セロファンバッグに入れ 20°C で一昼夜蒸溜水に対して透析を行なつた後に, 透析内液についてウサギを用いて, 血圧降下作用, 腹窓法による内臓血管拡張作用を観察したがいずれもマイナスであつた。

第 2 区分を用いてウサギ, ラットについて致死量を測定すると, LD₅₀ は 7.78 g/kg で, 毒性を認めがたかつた。

第 2 区分の精製とアミノ酸分析 上述の実験によつて, 血圧降下作用, 血管拡張作用は第 2 区分に存在することが明らかとなつたので, この区分を精製する目的で Sephadex G-25 fine を用いてさらにゲル濾過を行ない, 5 ml ごとに集めた分画液のビュレット反応による発色を測定した。Fig. 3 は再濾過の分画パターンを示した。このうちビュレット反応の発色する部分である Fig. 3 中の No. 13 から No. 25 までの分画液を集め濃縮して血管拡張作用, 血圧降下作用があることを確認した後, アミノ酸自動分析機によつてアミノ酸組成をしらべた。ただし tryptophan については Spies 法⁷⁾によつて測定した。Table 4 にみられるように加水分解前では遊離アミノ酸はきわめて少量存在するのみでまたその種類も非常にわずかであつた。ただしリジンの位置に出現する化合物はニンヒドリンによる呈色が純リジンのそれとやや異なつており, 他のニンヒドリン陽性物質が同時に流出していたものと判断されたが, ここでは一応リジンとして算出した。加水分解前の試料にニンヒドリンによつて発色する 12 の未知のピークが発見されたが, これらピークは加水分解によつて全部消失し, 17 種類のアミノ酸が出現した。

Fig. 3. Gel-filtration pattern of fraction 2 of sample 1.

Table 4. Amino acids in the fraction 2. (Amino acid r/ml)

Peak	After hydrolysis	Before hydrolysis	Peak	After hydrolysis	Before hydrolysis
Alycine	1560	12	Threonine	1080	11
Alanine	1380	7	Cystine	86	
Valine	1280	13	Methionine	284	
Leucine	1170		Arginine	743	
Isoleucine	1150		Histidine	613	
Proline	1510		Lysine	2410	454
Phenylalanine	232		Aspartic acid	2330	19
Tyrosine	249	12	Glutamic acid	3970	84
Tryptophan	422	trace	Ammonia	234	49
Serine	829		Unknown (peptide)	—	12 peaks

考 察

従来発見された生理活性を持つペプチッドにはそのまま生体からなら前処理を必要とすることなく抽出されるものと、酵素、酸などで生体を人工的に処理することによって初めて生成抽出されるものがある¹⁻²⁾。bradykinin は血清をトリプシンで消化してえられ、著者らの生理活性物質も骨格筋をプロテアーゼで消化してえられる。血圧降下作用のある点においては bradykinin と似ているが、この生理活性物質は前述したように bradykinin とは明らかに異つた生理作用を示し、したがって異つた構造をもつ化合物であると考えられる。第2区分には従来報告のなかつた特異な生理活性を有する物質を含有すると推定される。

上記生理活性を有する区分を精製してイオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーを行なうと、ニンヒドリンによって発色する未知の 12 のピークがえられるが、加水分解によつてすべてのピークが消失することか

Plate I

Pictures of retinal funduscopy of a rabbit,

A: before the injection. B: 60 min, C: 120 min. after the injection.

ら、これらのピークはペプチッドであろうと考えられる。また加水分解によつて当該生理活性が消失すること、生理活性の強い区分とビュレット反応の発色の強い部分とが一致する点からも、生理活性を有する物質はペプチッドであろうと想像することは困難ではない。しかし透析セロファン膜を透過することから、これらが分子量の大きいポリペプチッドであるとは考えにくく、またビュレット反応が陽性であるので、少なくともアミノ酸は3個以上によつて構成されていると思われる。従来発見されている血圧降下作用のあるペプチッドは構成アミノ酸が8~11個の低分子のものである。著者らは有効ペプチッドをまだ純粋に採り出してないがゲル濾過による区分に含まれる生理活性を有するペプチッドを Callopeptide と名づけた。将来の問題は、これら何種類かのペプチッドの混合物のうちの一種類が生理活性有効物質であるとする、その物質を単離して、そのアミノ酸組成、配列順序を決定することである。

このようにペプチッドがオットセイ（またはアシカ科動物）の骨格筋には存在するが、イヌやネコの筋肉からは本法で抽出できなかつた。筋肉を構成する主成分である筋原せんい性蛋白に種特異性があるという事実はあるが^{8~10)}、その特異性は究極には構成アミノ酸の配列順序に由来するであろう。したがつて蛋白の分解過程で種によつて特異的なアミノ酸配列順序をもつたペプチッドが遊離されると解釈することは容易である。これらの問題は今後の研究によつて明らかにしたい。

本研究を行なうにあたりオットセイの生物学的問題について御教示いただいた東京大学海洋研究所西脇昌治教授、およびアミノ酸分析について御協力いただいた東京水産大学の須山三千三博士に厚く御礼を申し上げます。

要 約

オットセイの筋肉を蛋白分解酵素で消化しアルコール 60~80% 可溶部をゲル濾過してえられるビュレット反応陽性の区分に血管拡張、血圧降下作用があることを見出した。この区分をさらに精製し、ニンヒドリンによつて発色するペプチッドと思われる 12 種の成分が確認された。生理活性を示す有効成分はペプチッドと思われるが、従来発見されている生理活性ペプチッドとは生理作用を異にするので、新規のペプチッドと思われる。これを Callopeptide と名づけた。

文 献

- 1) M. SCHACHTEY: "Polyptides which affect smooth muscles and blood vessels" Pergamon Press London (1960).
- 2) E. SCHRÖDER and K. LÜBKE: "The Peptides" Vol. II. Academic Press, New York and London (1966).
- 3) 守屋 寛: 生体の科学, **16**, 2~13 (1965).
- 4) 関根隆光・守屋 寛・鈴木光雄・江橋節郎: 同上, **16**, 14~23 (1965).
- 5) 木村徳次・曾我部博文・江橋節郎: 同上, **16**, 22~29 (1965).
- 6) T. HAYASHI, T. OTSUKA, S. AIKAWA, and H. HOSHINO: *Keio. J. Med.*, **15**, 227~243 (1966).
- 7) J. R. SPIES and D. C. CHAMBERS: *Anal. Chem.*, **20**, 1249~1266 (1949).
- 8) 鈴木たね子・右田正男: 本誌, **28**, 61~72 (1962).
- 9) 鈴木たね子・神名孝一: 同上, **32**, 590~599 (1966).
- 10) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **80**, 503~507 (1961).