Summary

Various chemical reagents were applied on parotin in order to examine the essential groups responsible for the appearance of its effect as the lowering of serum calcium level. This effect was found to either decrease or disappear when the free amino radical in parotin was fixed or shielded by the ketene, nitrous acid, or formaldehyde, or when the thyrosine-phenyl ring was substituted by iodine. Treatment of parotin with 40 volumes of cysteine hydrochloride, in order to reduce the -S-S- bond in its molecule, gave no effect on the calcium lowering activity, but the treatment with 20 volumes of thioglycollic acid was found to decrease the effect (at level of significance 7.3%). From these experiments, it is assumed that the free amino radical, thyrosine-phenyl ring, and the -S-S- bond are responsible for the appearance of the specific effect in parotin.

(Received July 26, 1952)

425. 水谷 彰：パロチンの化学的研究 その2 変性剤のパロチンに及ぼす影響に就いて（唾液腺ホルモンの研究 第20報*）

Akira Mizutani: Studies on the Salivary Gland Hormones. XX.

Chemical Studies on the Parotin. (2). Effect of Denaturing Agents on Parotin Activity.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Tokyo)

前報¹⁾ではパロチンの分子内の或る特定の官能基と効力との関係について論じたが、本報ではパロチンの分子を全体的のものとして扱い、パロチン分子に或る変形を起させた場合に効力にどのような影響を及ぼすかを調べた。

一般に蛋白質の溶液に或る pH で尿素、塩酸グアニジン、detergent 等を適当な濃度に溶かすと、蛋白質の分子の形或は構造等に変化が起り、自然の状態では現われなかつた SH 基が活性化したり、時には分子の分裂或は会合などが起ることが知られている。生理的活性な蛋白質では其の結果、活性が消失することも屢々認められる。これ等のことは蛋白質の分子に一種の変性が起つたことを意味するが、一度変性が起きてもその程度が弱い場合には変性剤を透析などにより除去すると再び元の分子状態に戻ることもあり、そのような場合には蛋白質の生理的活性の復活することも屢々認められる。然し分子の形状、構造等の変化と生理的活性とは必ずしも平行しないことも認められている。以上の見地から著者はパロチンを尿素及び塩酸グアニジン等の溶液で処理した後、家兎の血清 Ca 量低下試験により変性の程度がどのように効力に影響を及ぼすかを調べ、パロチンを 3.0 mol 及び 6.66 mol 尿素溶液 (pH 7.0) で処理した場合は可逆的の変性が起り、6.0 mol 塩酸グアニジン溶液 (pH 7.0) で処理した場合には不可逆的の変性が起ることを知つた。

実験に用いたパロチン製品は第 18 報²⁾中パロチンの安定性の試験に用いたものと同製品 (第 18 報 Fig. 2) で、家兎体重 2 kg 当り 3 mg で 15.3% の低下率を示したものである。

尿素による変性 尿素は蛋白質の変性剤として最もしばしば用いられるが、変性剤の中では割合に作用の緩和な試薬である。尿素で処理したものを生物試験する場合には尿素溶液のまま動物に注射するが多いが、この実験では家兎の血清 Ca 量低下試験の際、動物の静脈内に注射する必要があるために、パロチンを尿素溶液で処理した後、透析して尿素を除去した液について効力検定を行つた。その結果はからずも、透析後の経過時間が

* 伊藤四十二：唾液腺ホルモンの研究 (第 20 報)。

1) 伊藤，水谷：本誌 72, 1503 (1952)。

2) 伊藤，水谷：本誌 72, 1499 (1952)。

短い場合にはパロチンの効力は全く現われないが、或る時日を経過すれば効力がほとんど処理前に回復することが判明した (Table I)。

Table I Effect of Urea on the Parotin Activity

Experiments	Concentration of urea mol	Time of dialysis day	Time passed after dialysis day	Assays		
				Date (1951)	Dose mg./2kg. body wt.	Mean rate of Ca dec. % (5 rabbits)
Expt. I	3.0	2	1	III. 2	3.0	2.88 ^{a)}
ditto*	0		15	III. 16	3.0	12.40 ^{b)}
Expt. II	6.66	5	1	III. 6	3.0	14.56 ^{c)}
ditto*	0		15	III. 20	3.0	10.30
Untreated				II. 1	3.0	15.3

* 14 days after assays were carried out, the solutions were saturated with toluene and preserved in a refrigerator.

^{a)} The difference between 2.88 and 15.3 is significant. (Pro.: 0.59%)

^{b)} 2.88 12.40 (Pro.: 0.66%)

^{c)} 2.88 14.56 (Pro.: 0.1%)

実験〔I〕に於ける尿素 3.0 mol 溶液で処理したものの透析液は血清 Ca 量低下率平均値 2.88%を示した。この値は、尿素処理前に於ける検体の低下率平均値 15.3%と比較すれば殆ど無効であると思われる。これ等二つの値の差は危険率 0.59%で有意である。ところが実験〔II〕では、6.66 mol の尿素溶液で処理したのであるから当然効力は失われていることが予想されたのであるが、検定の結果は予想に反して、処理前の検体の効力と全く同程度であつた。実験〔I〕に於ける 2.88%と実験〔II〕に於ける 14.56%の値の差は危険率 0.1%で有意である。このことは一見甚だ不可解の如く思われたが、実験〔I〕と実験〔II〕に於ける各条件を比較検討したところ、実験〔I〕では2日間透析して1夜間放置後効力検定したのに対し、実験〔II〕では透析に5日を費し、1夜間放置後効力検定を行つたため、実験〔I〕の場合よりも3日間だけ多く経過していることになる。そのために実験〔II〕の場合は、尿素により一度は変性して効力を失つたものが3日間多く経過したため、その間に変性が元に戻り、その結果効力もほとんど回復したものと考えられる。このことに思い至つた為実験〔I〕の検液の残部がトルオールで防腐し冷蔵庫中に保存してあつたので、このものについて第1回の検定日より14日たつた後に再び効力検定を行つたところ、効力は著しく回復して、尿素処理前の検体の効力に近い値を示した。第1回の効力検定の平均値 2.88%と、第2回の効力検定の平均値 12.40%の差は、危険率 0.66%で有意となる。念のために、実験〔II〕の検液の残部の冷蔵庫中に保存してあつたものについて、14日後に再び効力検定したところやはり有効であつた。14日間放置した検液は実験〔I〕及び〔II〕の場合ともに尿素処理前の検体の効力よりは幾分低い値を示したが、これは保存期間が長かつた為冷蔵庫中でも効力の低下を来したものと考えられる。

以上の実験により、パロチンを尿素溶液中で処理した場合に変性が起り、透析により尿素を除去しても短い期間ではなお効力は回復しないが数日経過すれば殆ど確実に変性は元に戻り効力も回復することが判明した。即ち尿素 3.0 mol 及び 6.66 mol 溶液でパロチンを処理した場合には可逆的の変性が起るものと思われる。このような例は脳下垂体 lactogenic hormone を 3.0 mol 尿素溶液 (pH 7.0) 中で 24 時間、25° で処理した場合ホルモンの効力は失われるが、透析により尿素を除去した場合ホルモンの効力は回復する³⁾ ことと全く似ている。これに対して脳下垂体 growth hormone は 6.66 mol 尿素溶液 (pH 7.0) 中で室温に 24 時間放置しても効力は失われない⁴⁾。この場合は尿素溶液中で growth hormone 分子はやはり変性を受けるのであろうが効力には影響しないものと考えられる。

塩酸グアニジンによる変性 塩酸グアニジンは変性剤として尿素と並んで従来しばしば用いられ、尿素よりも変性作用が強力であることが認められている。塩酸グアニジンそのものは入手出来なかつた為、一定量の炭酸グアニジンを採り注意して濃塩酸で中和し一度強酸性にしてから水浴上で空気を吹きつけて蒸発乾涸し、出来

3) Li, Lyons, Evans: J. Biol. Chem. **140**, 43 (1941); Li: J. Biol. Chem. **155**, 45 (1944).

4) Li, Evans, Simpson: J. Biol. Chem. **159**, 353 (1945).

るだけ塩酸を除き、少量の水に溶かし注意して N-NaOH 液で中和し、pH 7.0 に調製した。

尿素変性の実験に使用した製品と同一のパロチン試料を使つてそれと同様に実験を行つた (Table II)。塩酸グアニジン 6.0 mol 溶液中で変性されたパロチンは、透析により塩酸グアニジンを除去後数日乃至 12~13 日経過するも効力の回復は困難であることが判明した。即ちパロチンを尿素で処理した場合には、透析により尿素を除去した後数日経過すれば効力は殆んど回復したが、その際回復に要したと同じ程度或いはそれ以上の日数を経過しても、塩酸グアニジン処理の場合には効力の回復が認められなかつた。

実験条件のわずかの相違により Ca 量低下率に多少の変動が生じたが、効力減損の傾向は全く同じであることが認められた。実験 [III] の場合には、倍量注射したにもかかわらず処理前の検体の Ca 量低下率 15.4% に及ばなかつた。

対照として、試料溶液に変性剤を加えないで放置、透析等を上述の実験と同様に操作して効力検定を行つた。(Table III)。

Table II Effect of guanidine hydrochloride on the parotin activity.

Experiments	Concentration of guanidine-HCl mol.	Time of dialysis day	Time passed after dialysis day	Assays		
				Date (1951)	Dose, mg./2kg. body wt.	Mean rate of Ca dec. % (5 rabbits)
Expt. [I]	6.0	3	3	III. 27	3.0	4.16 #
ditto*	0		15	IV. 9	3.0	3.49
Expt. [II]	6.0	4	1	IV. 6	3.0	9.52 #
ditto**	0		13	IV. 13	3.0	6.05
Expt. [III]	6.0	7	1	IV. 8	6.0	10.51 #
untreated				II. 1	3.0	15.3

* 13 days later since assays were carried out. } The solutions were saturated with toluene

** 12 days later since assays were carried out. } and preserved in a refrigerator.

Dialyses were carried out in a refrigerator.

A 群と B 群に於ける血清 Ca 量低下率平均値の間には、ほとんど有意の差が認められなかつた。パロチン溶液は放置、透析等の操作によつて効力の低下を来すようである。

Table III Effect of dialysis and storage on the parotin activity.
(Control experiments)

Groups of rabbits used	Dose, mg./2 kg. body wt.	Mean rate Ca dec. % (5 rabbits)
A	3.0	10.88
B	3.0	12.38
C	3.0	15.3

Both groups A and B were injected with the solutions of the same treatments.

Group C was injected with the untreated solution.

静脈内注射の場合に注射液量の血清 Ca 量低下率に及ぼす影響 効力検定の際に検液を家兎の静脈内に注射するために、注射液量の多少が血清 Ca 量低下率に対する影響の有無は問題になるところである為、簡単ながら Table IV に示すごとき実験を行つた。

家兎体重 2 kg 当り 1 cc の生理食塩水を静脈内に注射した場合には血清 Ca 量低下率に殆ど影響はなかつたが、

Table IV Effect of intravenous injections of physiological saline solution
on rabbit serum calcium level.

Dose: saline injected intravenously cc./2 kg. body wt.	Mean rate of Ca dec. % (5 rabbits)
1	2.13
4	5.61

4 cc の注射の場合には軽微ではあるが血清 Ca 量の低下が認められた。この結果から、家兎の静脈内に検液を注射する場合は、注射液量が家兎体重 2 kg 当り 1 cc 前後であれば、注射液量の血清 Ca 量低下率に及ぼす影響をほとんど無視することが出来るものと考えられる。

本研究に際し終始御懇篤な御指導御鞭撻を賜つた伊藤四十二教授並びに熱心に御援助下さつた緒方章名誉教授に対し謹謝する。本研究の費用の一部は文部省科学研究費によつた。又パロチンの原料は帝国臓器製薬株式会社により提供された。併せて深謝する。

実 験 の 部

尿素による変性 [I] 試料 60 mg を 10 cc のメスフラスコに採り、pH 7.0, mol/15 phosphate buffer に溶かす。その中へ、尿素の pH 7.0 phosphate buffer 溶液を加え、更に同じ buffer を追加して 10 cc となし、尿素の終濃度が 3.0 mol 溶液となるようにした。この溶液を 13° 附近で 24 時間放置後 (沈澱析出せず)、水道水に対し、次いで蒸留水に対して合計 2 日間透析後膜内液を 1 夜間冷蔵庫に放置して効力検定を行つた。

[II] 試料 60 mg を 10 cc のメスフラスコに採り、pH 7.0, mol/15 phosphate buffer に溶かし、[I] と同様にして、6.66 mol 尿素溶液となるようにした。19° 附近で 24 時間放置後 (沈澱析出せず) 水道水に対し、次いで冷蔵庫中で蒸留水に対し合計 5 日間透析後膜内液を 1 夜間冷蔵庫中に放置した液について効力検定を行つた。

塩酸グアニジンによる変性 [I] 試料 60 mg を 10 cc のメスフラスコにより pH 7.0, mol/15 phosphate buffer に溶かし、前述の如くにして調製した塩酸グアニジンの 6.0 mol 溶液が得られるようにした。この溶液を 20° 附近で 24 時間放置後 (少量の沈澱析出)、冷蔵庫中で 3 日間透析し膜内液を更に 3 日間冷蔵庫中に放置したものについて効力検定を行つた。

[II] 試料 120 mg を 10 cc メスフラスコにとり、[I] と同様にして塩酸グアニジン 6.0 mol 溶液となし 19° で 24 時間放置後 (少量の沈澱析出)、4 日間透析 (冷蔵庫中)、1 夜間放置後効力検定した。

[III] 試料 60 mg をとり [I] と同様にして塩酸グアニジン 6.0 mol 溶液となし、24° 附近で 24 時間放置後 (少量の沈澱析出)、7 日間透析 (冷蔵庫中)、1 夜間放置後効力検定した。

東京大学医学部薬学科

Summary

It was found that, taking the parotin test of the lowering of calcium level in rabbit serum as the criterion, treatment of parotin with 3.0 and 6.66 moles urea solution (pH 7.0) resulted in reversible denaturation (Table I), while the treatment with 6.0 moles guanidine hydrochloride solution (pH 7.0) resulted in irreversible denaturation (Table II). The mean lowering rate of serum calcium level, when 4 cc. per 2 kg. wt. of physiological saline solution is intravenously injected into rabbits (5 rabbits were used), is 5.61%, while it is 2.13% when 1 cc. per 2 kg. wt. is injected (Table IV). It was assumed that if the amount of sample intravenously injected into rabbits is around 1 cc. per 2 kg. of weight, such injection has practically no effect on the lowering rate of serum calcium level.

(Received July 26, 1952)