(9:1:5), iii) 1% NH_4OH 飽和 BuOH の3種類を用いた. なお展開液として i), ii) を用いた時には沔紙(東洋沔紙 No. 51) は pH 6.0 のフタレート緩衝液で前処置した. その結果, Et_2O 層からは 2,4-dinitrophenol, 2,4-dinitroaniline および DNP-アスパラギン酸が, 一方水層からは ϵ -DNP-リジンが検出された. なお, さらに確認するため KOH の EtOH 飽和溶液と Me_2CO による呈色法⁸⁾ でも行なつたが, 上の結果と一致した. つぎに pipsyl 法についても同様に血清パロチンを NaHCO_3 アルカリ性で pipsyl 化し, 加水分解し, Et_2O 抽出を行ない, DNFB 法の場合と同様に Et_2O 層を濃縮して PPC にかけた結果, アスパラギン酸のみを確認し, プロリンおよびハイドロキシプロリンが N 末端にないことを上記3つの展開溶媒系で確認した.

以上の結果 N 末端アミノ酸としてはアスパラギン酸のみが検出された.

なおパロチンは DNP 化することにより Ca 低下効力が減少するが, DNP 化血清パロチンも Ca 低下効力 $8.47 \pm 2.29\%$ (1 mg/rabbit) とほとんど失われている. さらに白血球効力も全く認められない.

結 論

- (1) 牛血清から唾液腺ホルモン活性を有するパロチン様物質を抽出, 単離し, 血清パロチンと命名した.
- (2) 血清パロチンは純度 90.8% で家兎血清 Ca 低下効力は $20.07 \pm 1.32\%$ (1 mg/rabbit), 循環白血球数効果もパロチンと同様な一時減少後増多反応を有する.
- (3) UV スペクトルはパロチンと同じく 277 m μ に吸収極大を示し, その構成アミノ酸もパロチンと同じ17種である. なお沈降定数は $S_{20,w} = 3.80$ である.
- (4) その N 末端アミノ酸は DNFB 法および pipsyl 法で検索した結果アスパラギン酸である.

東京大学薬学部, 大阪大学薬学部

8) 佐藤: 生化学 31, 398(1959).

UDC 577.173.16:612.11

75. 青沼 繁, 三村 務, 林 富美子, 江川 宏: 血清パロチンの研究 (第3報^{*1})

各種プロテアーゼによる血清パロチンの分解

Shigeru Aonuma, Tsutomu Mimura, Fumiko Hayashi, and Hiroshi Egawa:

Studies on Serum Parotin. III. Influences of Proteolytic

Enzymes on Serum Parotin.

(Faculty of Pharmacy, University of Osaka^{*2})

It was considered that application of various proteases to serum parotin, obtained from bovine serum, might afford low-molecular substances with parotin-like activity, and trypsin, chymotrypsin, pepsin, and papain were reacted with serum parotin. Examination of the calcium-lowering and leucocyte activities of the resultant hydrolyzate showed that the calcium-lowering effect was increased than that of the control after 40 hours with trypsin or 24 hours with pepsin. Papain was found to cancel the calcium-lowering effect of serum parotin but inversely increased its action to increase the leucocytes. Chymotrypsin did not seem to change either of the effects of serum parotin. From the ultraviolet absorption and paper chromatography of the various enzymatic hydrolyzates, it was found that substances not precipitating with trichloroacetic acid increased with increasing length of incubation time.

(Received September 26, 1961)

唾液腺ホルモンの本体であるパロチンが腎臓の糸球体を通過し, 尿中にもウロパロチンとしてその存在が認められている¹⁾ 現在, 当然血液中でもパロチンが存在する可能性が確信され, すでに著者等によつて牛血清中から

*1 第2報: 生化学 32, 528(1960).

*2 Hotarugaike, Toyonaka, Osaka-fu.

1) 伊藤, 青沼, 沢田: 本誌 74, 142(1954).

血清パロチンの単離が報告されている。²⁾ このものはパロチンそのまゝの形ではなく、パロチンの作用団が血清中の他の蛋白質と結合した形ではないかと考えられる。血清パロチンに種々のプロテアーゼを作用させることにより、パロチンの作用団により近い低分子の活性度の強い物質が得られるのではないかと考え、血清パロチンを酵素分解し、分解物の唾液腺ホルモン効力を検定したところ、トリプシンとペプシン分解により効力の増強がみられることを認めた。その他分解物の性質についても種々の基礎的知見を得たのでここに報告する。

実 験 の 部

実験方法

酵素分解法 i) トリプシン分解 血清パロチン 20 mg を精秤し、0.1N NaOH で pH 8.0 に調整した蒸留水に溶解、トリプシン (1600 U/mg, メルク社製) を 0.04 mg/cc になるように加え最終容量を 10 cc にする。分解は 37° で 3, 5, 24, 40 hr 行なう。対照実験として酵素を加えずに血清パロチンを同様に処理する。反応終了後、氷冷してトリプシンを失活させて反応をとめる。

ii) ペプシン分解 血清パロチン 20 mg を精秤し 0.1N HCl で pH 2.0 に調整した蒸留水に溶解、ペプシン (1300 U/mg, メルク社製) を 0.04 mg/cc になるように加え、最終容量を 10 cc にする。酵素分解の時間、温度はトリプシン分解の場合と同様に行なう。酵素を加えずに同様に処理したものを対照実験とする。反応終了後、pH 7.0 にしてペプシンを失活させ氷冷して反応をとめる。

iii) パパイン分解 血清パロチン pH を 7.0 でパパイン (Worthington Biochem. Corporation) を用い分解する。他はトリプシン分解の場合と同様に行なう。

iv) キモトリプシン分解 トリプシン分解と全く同様にキモトリプシン (1230 U/mg, 持田製薬製) で分解する。反応終了後 pH 9.0 に調整して氷冷して反応をとめる。

家兎血清カルシウム量の定量 各酵素分解液を 24 hr 絶食させた体重 2.0~3.0 kg の正常雄家兎を 3 匹 1 群とし、0.5 cc/kg (血清パロチン 1 mg/kg 相当量) を静脈内注射する。注射直前と注射後 6, 7 hr に耳静脈より採血して血清 Ca 量を Kramer and Tisdall 変法にしたがって定量する。注射前の Ca 量に対する最高減少量の比を血清 Ca 低下率とする。

家兎循環白血球数の測定 酵素分解物注射後、1, 2, 4, 6, 8 hr 目に混合ビベットに 0.1 cc 採血し、Türk's solution で 10 倍に希釈し Thoma の計数板を用いて計数する (Thoma Zeiss 法)。

酵素分解物の UV 吸収 各酵素分解液を 1 cc ずつ 3 本の試験管 (A), (B), (C) に入れる。(A) には 1 cc の氷酢酸を加え、さらに水を加えて 8 cc にする。(B) には 7 cc の pH 5.8, 0.1M 酢酸緩衝液を加え、生成した等電点沈殿を遠心分離して除き、その上澄液をとる。(C) には 10% CCl₃COOH 1 cc を加え、沈殿を遠心分離して除き上澄液 1 cc に水を加えて 4 cc にする。対照実験の反応液についても同様に (A), (B), (C) の 3 つの検体を作る。このようにして作った (A), (B), (C) 3 検体の 277 mμ における吸光度を Beckmann spectrophotometer で測定する。

ペーパークロマトグラフィー (PPC) UV 吸収測定の際に調製した (A) について一次元上昇法ペーパークロマトグラフィーを行なう。展開溶媒は AcOH・BuOH・H₂O (1:4:5)、濾紙は東洋濾紙 No. 50 を用い、発色はニンヒドリンおよび BPB 染色法により行なつた。

Table I. Influence of Various Proteolytic Enzymes on Serum Calcium-decreasing Activity of Serum Parotin

Enzyme	pH	Incubation time (hr.) ^{a)}	Ca-decreasing activity (mean ± S.E.) (%)
None (control)	8.0	0	15.04 ± 1.97
"	8.0	24	13.02 ± 0.40
"	8.0	40	15.20 ± 3.80
"	2.0	0	10.23 ± 2.34
"	2.0	24	12.14 ± 2.80
"	2.0	40	15.21 ± 2.98
Trypsin	8.0	3	13.09 ± 3.12
"	8.0	5	14.13 ± 1.66
"	8.0	24	12.00 ± 1.18
"	8.0	40	21.94 ± 5.20
Trypsin without serum parotin	8.0	0	4.39 ± 0.49

2) 伊藤, 青沼, 三村: 本誌 82, 425(1962).

Chymotrypsin	8.0	3	15.65 ± 3.35
"	8.0	5	11.14 ± 4.12
"	8.0	24	12.32 ± 4.53
"	8.0	40	14.76 ± 0.41
Pepsin	2.0	3	10.98 ± 0.54
"	2.0	5	9.68 ± 4.16
"	2.0	24	13.42 ± 4.02
"	2.0	40	10.84 ± 3.20
Pepsin without serum parotin	2.0	0	3.17 ± 0.97
Chymotrypsin without serum parotin	8.0	0	4.91 ± 1.17
Papain	7.0	3	14.81 ± 2.34
"	7.0	5	9.35 ± 0.51
"	7.0	24	4.30 ± 2.50
Papain without serum parotin	7.0	0	9.58 ± 1.82

a) Incubation temperature: 37°

b) Dose of serum parotin: 1 mg./kg., i.v.; mean value of 3 rabbits

Fig. 1. Influence of Trypsin on Leucocyte Activity of Serum Parotin

Fig. 2. Influence of Chymotrypsin on Leucocyte Activity of Serum Parotin

Fig. 3. Influence of Pepsin on Leucocyte Activity of Serum Parotin

Fig. 4. Influence of Papain on Leucocyte Activity of Serum Parotin

実験結果

各酵素による血清パロチンの分解物の唾液腺ホルモン効力の変化をしらべた。Ca 効力については Table I に示したようにトリプシン分解の場合には対照に比べて 24 hr まで漸次効力が減少するが、40 hr 後には逆に効力が増加し、分解前よりむしろ強くなっている。つぎにペプシン分解の場合には対照よりも 24 hr 後には効力が強く残っているが 40 hr 後になると Ca 効力は逆に減弱してくる。ところがパバイン分解では 5 および 24 hr 分解においてみられるようにすみやかに効力が失われ、しかもパバイン自体にも Ca 効力があるのでパバイン分解は Ca 効力の増強という見地からは全くとり上げるに足りない。キモトリプシン分解では 24 hr 分解まで漸次 Ca 効力が減弱し、40 hr でやや増加するが対照に比べて殆んど差がみられない。

一方、循環白血球数におよぼす影響については Fig. 1~4 に示すように、一時減少後増多反応は各酵素、各時間の分解ともすべてみとめられる。ただペプシン分解では incubate 時間が 3, 5, 24 hr と順次注射後 8 hr 目の増加の程度が減少しているが、40 hr 分解で再び回復している。これに対してトリプシン、パバイン分解では 24 hr 分解物の注射後 8 hr 目の増多が著しい。

血清パロチンの酵素分解により生成する非血清パロチン性分解物の増加を pH 5.8 等電点沈殿上澄液 (B) すなわち非血清パロチン性物質の生成量と 5% CCl_3COOH による非沈殿性分解物 (C) を 277 $\text{m}\mu$ の UV 吸収によつて測定した結果、Fig. 5~7 に示したように、トリプシン、キモトリプシンにおいて殆んど同様な傾向で分解されていることが認められた。これに対してペプシン分解の場合には対照反応でも少し分解されているので血清パロチンは pH 8.0 では安定であるが、pH 2.0 では不安定であるように思われる。

Fig. 5. Influence of Trypsin on Ultraviolet Absorption Spectra of Serum Parotin

— without trypsin
- - - with trypsin

(A) AcOH soln.
(B) pH 5.8 supernatant
(C) 5% CCl_3COOH supernatant

Fig. 6. Influence of Chymotrypsin on Ultraviolet Absorption Spectra of Serum Parotin

— without chymotrypsin
- - - with chymotrypsin

(A) AcOH soln.
(B) pH 5.8 supernatant
(C) 5% CCl_3COOH supernatant

Fig. 7. Influence of Pepsin on Ultraviolet Absorption Spectra of Serum Parotin

— without pepsin
- - - with pepsin

(A) AcOH soln.
(B) pH 5.8 supernatant
(C) 5% CCl_3COOH supernatant

Table II. Rf Values of Serum Parotin digested by Various Enzymes

Enzyme ^{a)}	BPB stain	Ninhydrin test
Trypsin	0.01~0.12	none
Chymotrypsin	0.05, 0.15	0.01~0.40
Pepsin	0.08, 0.18	0.08, 0.18
Papain	0.01~0.21	0.03

a) Digestion for 24 hr.

Solvent: $\text{AcOH} \cdot \text{BuOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1:4:5).

Control (without enzyme) was not developed with this solvent.

これらの分解の様子をさらに PPC によつて追究した。Table II に 24 hr 分解例を示したが、これによつて明らかなようにペプシンおよびキモトリプシンで分解の程度が著しいが、特にペプシン分解において明確に新しく二つのスポットが分離している。他方対照物では BPB 染色で検出されるスポットが全くみられない。

考 察

用いた種々のプロテアーゼのうち新しい血清パロチンペプチドの調製に利用され得ると考えられるものはペプシンとトリプシンである。この二者のうちペプシンは分解の程度が強くトリプシンよりも低分子の活性物質を調製するのに充分価値があると考えられ、一方トリプシンでは分解前よりかなり Ca 効力が増加しているので、より効力の強い物質を得るのに役立つと考えられる。

パペイン分解では白血球効力は対照に比べてその増多効力が一層強くなつており、しかも Ca 効力が全く失なわれていることから現在 Ca 効力と白血球効果とが異なる因子によるものではないかという説に対し、一つの示唆を与えるものとして興味深い。

各酵素による分解の程度は紫外部吸収によつて判るようにトリプシン分解の場合には伊藤等によつて報告されているパロチンの場合³⁾と分解速度がやや異なるようであり、Ca 効力も血清パロチンの方がかなり安定であることから血清中ではパロチンは他の蛋白質と結合し、保護されていると考えられる。

総 括

1) 血清パロチンはトリプシン、ペプシン、キモトリプシンに対してはその Ca 低下効力、白血球効力共にかなり安定で特にトリプシンとペプシンの場合には対照に比べ Ca 効力の増加がみられる。

2) 血清パロチンはパペインによつてその Ca 効力は全く失活してしまう。しかし白血球数の増多反応は逆に増加する。

3) 各酵素分解物の UV 吸収およびペーパークロマトグラフィーから酵素分解時間とともにトリクロロ酢酸非沈殿物の増加がみられる。

大阪大学薬学部

3) Y. Ito, M. Shinoda: Endocrinol. Japon. 5, 221(1958); *ibid.* 5, 227(1958).