UDC 577.173.16 : 612.11

76. 青沼 繁, 三村 務, 友永郁子: 血清パロチンの研究 (第4報^{*1})トリプシンおよびペプシンによる血清パロチン分解物
の精製ならびに性質Shigeru Aonuma, Tsutomu Mimura, and Ikuko Tomonaga: Studies on
Serum Parotin. IV. Separation and Properties of
Hydrolyzates in Digested Serum Parotin by
Trypsin and Pepsin.(Faculty of Pharmacy, University of Osaka^{*2})

In order to obtain a low-molecular, parotin-active substance with weak immunochemical antigenity by enzymatic hydrolysis of serum parotin, hydrolyzates with increased calcium-lowering activity, obtained by incubation with trypsin for 40 hours and with pepsin for 24 hours, were purified, first by acetone fractionation and by column chromatography through acidic alumina. Pepsin-fraction IIc, obtained from the 24-hour hydrolyzate of pepsin, had calcium effect of $13.91 \pm 0.33\%$ and a leucocyte effect. Trypsin-fraction IIb, obtained from the 40-hour hydrolyzate of trypsin, had a calcium effect of $21.00 \pm 0.35\%$ and a leucocyte effect. These substances had chemical properties similar to serum parotin but were fairly different in immunochemical properties. Both pepsin-fraction IIc and trypsin-fraction IIb had only about 1/7 the anaphylactic susceptibility of the original serum parotin when tested with guinea pig uterus sensitized with serum parotin as the antigen.

(Received September 26, 1961)

唾液腺ホルモン研究の一環としてすでに著者等は血清パロチンを単離し,¹⁾ つづいてこの血清パロチンの酵素分解について基礎的研究を行ない,^{*1} 血清パロチンがトリプシン, ペプシンによつては効力を失うことなく, 対照に比してむしろ Ca 効力の増強を来すことをみとめた. そこで血清パロチンを失活させることなく, より強力な効力を有し, しかも免疫化学的な性質の弱いポリペプチドを得るために, 対照に比べて効力の増強がみられるトリプシン 40 時間分解物とペプシン 24 時間分解物をアセトン分画, ついでカラムクロマトグラフィーを行ない精製し, その化学的諸性質をしらべた. さらに血清パロチンはパロチン, S-パロチン, サリバパロチン等のパロチン関連物質と免疫化学的性質が極めて類似していることがすでに明らかにされている²⁾ ので, ここに併わせて酵素分解物精製過程で得られる各フラクションの免疫化学的性質をモルモット子宮アナフィラキシー反応により検索したところ, 種々興味ある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 血清パロチンを pH 8.0 の蒸留水に溶解し $1/50$ 量のトリプシン (1600 U/mg) を加えて 40 hr, 37° で incubate する (トリプシン分解). 血清パロチンを pH 2.0 の蒸留水に溶解し $1/50$ 量のペプシン (1300 U/mg) を加え 37° で 24 hr incubate する (ペプシン分解).

酵素分解物の精製法 酸性アルミナカラムによる分画: アルミナ (Brockmann No. 53489) を蒸留水で上澄が澄明になるまで攪拌, 静置, 傾斜をくり返して洗浄し, アルミナの約 15 倍量の 2% HCl を加え約 2 hr 時々攪拌しつつ静置後, 上澄が pH 4.0~5.0 になるまで水洗する. このようにして調製したアルミナをカラムに充填し, 再び流出液が澄明となるまで蒸留水で洗浄した後, 1 管 5 cc のサイフォン式フラクションコレクターに設置する. 展開溶媒は蒸留水と磷酸ナトリウム溶液を用いた. 各溶出フラクションの蛋白濃度の測定は Beckmann spectrophotometer を用い, 277 m μ の吸収により行なつた. 溶出フラクションは適当な部分を合一し, 別に既知濃度の標準溶液を作成し, 含有濃度を決定し, セロファン膜を用いて蒸留水に対して透析した後, 45° 以下で減圧蒸留を行ない, 各分層を得た.

^{*1} 第3報: 本誌 82, 429(1962).

1) 伊藤, 青沼, 三村: 本誌 82, 425(1962).

^{*2} Hotarugaike, Toyonaka, Osaka-fu.

2) 青沼, 三村: 本誌 82, 438(1962).

ペーパークロマトグラフィー (PPC) 一次元展開溶媒は $\text{AcOH} \cdot \text{BuOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1:4:5), 濾紙は東洋濾紙 No. 51 を用い, 展開時間は約 9 hr, 二次元展開溶媒としては first run に *m*-cresol·phenol, second run には $\text{AcOH} \cdot \text{BuOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1:4:5) を用いた. 濾紙は東洋濾紙 No. 131 を用いた. なお特別な記載のない場合はニンヒドリン発色, あるいは BPB 染色法でスポットの位置を検出した.

濾紙電気泳動 pH 8.6, $\mu=0.1$ の Veronal 緩衝液を用い東洋濾紙 No. 51 で 3 hr 泳動した. band の検出はニンヒドリン発色, BPB 染色により行なつた. なおモルモット子宮アナフィラキシー反応は第5報²⁾に記載したように行なう.

実験結果

酵素分解物の精製とその化学的性質 血清パロチンのペプシン 24 hr 分解物およびトリプシン 40 hr 分解物を Chart 1 のように Me_2CO 分画を行なう. その結果ペプシン分解の場合には fr. I, II のみが得られ fr.

Table I. Serum Calcium-decreasing Activity of Each Fraction

Fraction	Ca-decreasing activity ^{a)} (mean $\pm$ S. E.) (%)
Pepsin fr. I	11.94 $\pm$ 3.41
Pepsin fr. II	15.99 $\pm$ 3.45
Trypsin fr. II	19.86 $\pm$ 1.85
Trypsin fr. III	16.62 $\pm$ 4.32
Serum parotin ^{b)}	15.04 $\pm$ 1.97

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

b) Before treatment.

Fig. 1.
Leucocyte Activity of Each Fraction

III は極く微量しか得られない。一方トリプシン分解の方は fr. II, III のみが得られ等電点沈殿である fr. I は生成せず分解前と全く異なっている。

上記各分層について唾液腺ホルモン効力を検定した結果, Ca 効力は Table I のようにペプシン, トリプシン両分解とも等電点で沈殿せず 80% Me₂CO で沈殿する fr. II に最も強く, 白血球効力も Fig. 1 に示したように他に比べて強い。そこでこれらの fr. II について一次元上昇法 PPC を行なつたところ単一なスポットを示し, 沱紙電気泳動においても Fig. 2 のように単一な band がみとめられた。

Fig. 2.

Paper Electrophoresis of Pepsin fr. II
and Trypsin fr. II

pH 8.6 Veronal buffer ($\mu=0.1$) 250 V, 10 mA, 3 hr. BPB stain.

これらの2つの fr. II は Biuret, xanthoprotein, Millon, Hopkins-Cole, Ninhydrin, 坂口, Ehrlich's diazo 等の蛋白質, アミノ酸の反応はすべて陽性で, その構成アミノ酸を HCl による酸分解, および Ba(OH)₂ によるアルカリ分解で検索した結果, ペプシン fr. II は Arg, His, Lys, Cys, Pro, Ala, Thr, Ser, Glu, Met, Val, Asp, Gly, Tyr, Phe, Leu, Try の 17 種でトリプシン fr. II は Ser が1つ少なく 16 種のアミノ酸から成ることが判つた。これらのペプシン fr. II, トリプシン fr. II はかなり精製されていると考えられるが, さらにこれらを純化するために酸性アルミナカラムクロマトグラフィーにかけると Fig. 3 に示すようにペプシン fr. II, トリプシン fr. II はともに血清パロチンと殆んど同じ UV 吸収を示すので, 以下の酸性アルミナカラムクロマトグラフィーにより流出する各分層は 277 m μ の吸光度で測定した。その流出曲線を Fig. 4 に示す。この図から明らかなようにペプシン, トリプシンのどちらの fr. II にも蒸留水で流出する部分 (A) と 0.1M 磷酸ナトリウムで流出する分層 (B) と 0.25M 磷酸ナトリウムで流出する部分 (C) の3つのフラクションに分離される。トリプシン fr. II, ペプシン fr. II の両方の場合とも (A) は比較的少なく, 0.1M 磷酸ナトリウムで流出する (B) が主部分である。一方酵素分解していない血清パロチン, トリプシン, ペプシンは蒸留水で殆んど流出してしまうので極く微量混在しているこれらの不純物は (A) 部分にあると考えられる。そして (B) および (C) 部分は酵素分解の結果新しく生成した成分であると考えられる。これら fr. IIa, IIb, IIc について Ca 効力, 白血球効力をしらべると, Table II および Fig. 5 から明らかなように, Ca 効力はペプシン fr. IIc

Fig. 3.

Ultraviolet Absorption Spectra of
Pepsin fr. II and Trypsin fr. II

Fig. 4.

Chromatography of Pepsin fr. II
and Trypsin fr. II on Acid
Alumina Column

----- pepsin fr. II
—— trypsin fr. II

Sixty mg. of each fr. II was applied
on 1.0 × 30 cm. column.

Fig. 5.
Leucocyte Activity of Pepsin
fr. IIc and Trypsin fr. IIb

Table II. Serum Calcium-decreasing Activity of Fractions eluted by
Alumina Column Chromatography of Fr. II

Fraction	Ca-decreasing activity ^{a)} (mean $\pm$ S.E.) (%)	Leucocyte activity
Pepsin fr. IIa	<5.00	—
" fr. IIb	13.54 $\pm$ 3.89	—
" fr. IIc	13.91 $\pm$ 0.33	+
Trypsin fr. IIa	<5.00	—
" fr. IIb	21.00 $\pm$ 0.35	+
" fr. IIc	11.29 $\pm$ 3.04	—

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

とトリプシン fr. IIb に最も強くこれらのフラクションのみが白血球効力を有している。

モルモット子宮アナフィラキシー 上述のようにして Me_2CO 分画, アルミナカラムクロマトグラフィーで精製した各フラクションは化学的な性質ではかなり純粋であるが, その蛋白質としての性質の差は区別できない。そこで血清パロチンと酵素分解物との免疫化学的な性質の差をモルモット子宮アナフィラキシー反応で調べてみると Fig. 6 に示すようにペプシン分解物を Me_2CO 分画して得たペプシン fr. II ではすでにもとの血清パロチンに比べて反応がかなり減弱している。そしてこの fr. II をさらにアルミナカラムクロマトグラフィーで精製して得られる fr. IIa では血清パロチンの 10 倍量で, fr. IIb では 2 倍量で, そして最もパロチン効力の強い fr. IIc では 6~7 倍量加えてやらないと同程度の収縮を示さない。すなわち血清パロチンに比べて酵素分解後精製したフラクション程アナフィラキシーが弱くなっている。これと全く同様な結果がトリプシン分解物でもみられ, トリプシン fr. II では血清パロチンの 3 倍量加えても反応は同程度におこらず, fr. IIa, IIb, IIc, ではさらに減弱していることをみとめた。

Fig. 6. Anaphylactic Susceptibility of Serum Parotin-sensitized
Guinea Pig Uterus (Schultz-Dale reaction)

考 察

血清パロチンはパロチンの血中存在形と考えられ, その化学的, 物理化学的性質も極めて類似している¹⁾が, 生物学的にも ^{131}I で標識した血清パロチンを用いて研究したその体内分布がパロチン, S-パロチンと非常に良く

一致することが報告されている。³⁾ さらにパロチンのトリプシン分解について伊藤、篠田はパロチンがトリプシンによつてさらに小さな fragment に分解され、そのものもパロチン効力を有していることを報告している。^{4,5)} 血清パロチンも同様にトリプシン、ペプシンによつて失活することなく分解をうけてかなり小さいペプチドになるようである。特にトリプシン分解の場合には等電点沈殿する fragment がほとんどなくなつており、血清パロチンとはかなり異なつた物質が生成していると考えられる。酵素分解物はアルミナカラムクロマトグラフィーで純化を進めてもその化学的性質は血清パロチンとほとんど変らない。そこで蛋白分子の構造上の変化を免疫化学的にアナフィラキシー反応で追究した結果、酵素分解物は抗原性が不完全になり、その傾向は純化が進むにつれて強くみられる。このことから所期の目的の一つであるアナフィラキシー反応の弱い活性物質を得るのに、この酵素分解法と精製法が適切な方法であると考えられる。

総 括

1) 血清パロチン (Ca 低下効力 15.04 ± 1.97) をペプシンで 24 時間、トリプシンで 40 時間分解した分解物をアセトン分画、アルミナカラムクロマトグラフィーで精製すると、トリプシン 40 時間分解物からは Ca 効力 21.00 ± 0.35 の分解前より有効な物質が得られ、一方ペプシン 24 時間分解物からは Ca 効力 13.91 ± 0.33 の物質が得られる。なおこれらの物質はいずれも白血球効力を有している。

2) 血清パロチン分解物の化学的性質は血清パロチンと極めて類似しており、泳動電気泳動で単一の band を示す。

3) 血清パロチンは酵素分解により抗原としての性質が著しく変化し、精製されるにしたがつてモルモット子宮アナフィラキシー反応において抗原性が $1/6 \sim 1/7$ に減弱する。

大阪大学薬学部

3) 青沼, 三村: 生化学 32, 528(1990).

4) Y. Ito, M. Shinoda: Endocrinol. Japon. 8, 13(1961).

5) M. Shinoda: Ibid. 8, 86(1961); *ibid.* 8, 108(1961).

UDC 577.173.16 : 612.11

77. 青沼 繁, 三村 務: 血清パロチンの研究 (第5報^{*1}) 血清パロチンのモルモット臓器アナフィラキシーについて

Shigeru Aonuma and Tsutomu Mimura: Studies on Serum Parotin. V.
Effect of Serum Parotin on Anaphylactic
Susceptibility of Guinea Pig Organs.

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

In order to see whether the serum parotin had any specificity as a salivary gland hormone, anaphylactic susceptibility, a means of immunochemical examination, was examined with guinea pig organs (Schutz-Dale reaction). Serum parotin, as well as parotin, S-parotin, and saliva parotin showed anaphylactic susceptibility with guinea pig uterus sensitized with serum parotin but bovine serum albumin, egg albumin, callicrein-like substance, or a calcium-lowering substance from a bovine kidney did not. The same result was obtained when sensitized with parotin and S-parotin, indicating that serum parotin has specificity of substances related to parotin. Dinitrophenylation and pipsylation of serum parotin resulted in the loss of this specificity but not by iodination.

(Received September 26, 1961)

従来唾液腺ホルモンの抗原性についてはほとんど報告されていない。しかし最近になつて蛋白質系ホルモンの

*1 第4報: 本誌 82, 434(1962).

*2 Hotarugaike, Toyonaka, Osaka-fu.