人唾液中の高分子パロチン活性物質に関する研究 (第1報¹⁾) 精製および化学的性質

植木 寛, 久保田幸穂,^{2a)} 伊藤四十二^{2b)}

熊本大学薬学部,^{2a)} 東京大学薬学部^{2b)}

Studies on the High Molecular Weight Parotin-like Substance in Human Saliva. I.¹⁾ Purification and Chemical Properties

HIROSHI UEKI, YUKIHO KUBOTA,^{2a)} and YOSHI ITO^{2b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University^{2a)} and

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo^{2b)}

(Received July 5, 1968)

A high-molecular parotin-active substance, E-3, was isolated by zone electrophoresis, using Pevikon as the supporting agent, from the fraction possessing a parotin-like activity obtained from the Pronase digest of saliva-parotin-A. This E-3 contained 31.33% of amino acid residue, rich in the content of proline and glutamic acid. The N-terminal amino acid was not detected by the DNP method, while C-terminal was proved to be serine by hydrazine decomposition. E-3 contains sugars consisting of 30.16% of hexose residue and 11.25% of hexosamine residue, and does not contain uronic and sialic acids. E-3 also contains 26.80% of lipid which was assumed to be a glycolipid from its qualitative estimation. Isoelectric point measured by electrophoresis on cellulose acetate was at pH.4.4, and the molecular weight of E-3 measured by the Archibald method was 55000, agreeing with the value calculated from the content of amino acid residue.

著者等は前報³⁾において, saliva-parotin-A (SPA) を Pronase P によって消化し, 夾雑不純物を低分子量の断片とした後, ゲル濾過によって高分子パロチン活性物質を含む画分 P-I を得たが, この画分は濾紙電気泳動による分析ではまだ数成分を含むことを報告した. また久保田等⁴⁾は P-I を Sephadex G-75 および G-100 を用いるゲル濾過で分画し, いずれの場合にも高分子画分に生物活性を認め, またこれら活性画分の純度をセルローズアセテート膜電気泳動によって検討した結果, なお 2, 3 成分を含むことを報告した. そこで著者等はこれまで行なった精製法とはタイプの異なるゾーン電気泳動法を用いて, P-I からの活性物質の分離を試みた. 伊藤等⁵⁾が β -パロチンの精製に, また守屋等⁶⁾がカリクレインの精製に用いた方法は澱粉を支持体とするゾーン電気泳動であったが, P-I に含まれる活性物質は糖および脂質を含む複合蛋白と考えられ,⁷⁾したがって支持体に用いる澱粉の混入が実験結果に影響を与える可能性がある. このため本実験では, Müller-Eberhard⁸⁾が高い回収率で血清蛋白の分離に成功した Pevikon C-870 を支持体として高分子パロチン活性物質の精製を試み, これを均質な状態で単離することができた.

ついでこの活性物質 (E-3) の化学的, 物理化学的性質の決定を行なった. まず E-3 のアミノ酸組成をアミノ酸自動分析計により決定し, また糖はペーパークロマトグラフィーにより定性的に確認したのち, 定量を行なった. さらに脂肪酸をガスクロマトグラフィーによって定性的に確認後, E-3 からクロロホルム-メタノールによって脂質を抽出し秤量によってその含有率を求めた. N および C 末端アミノ酸はそれぞれ DNP 法およびヒドラジン分解法によって検討した. またセルローズアセテート膜電気泳動法による等電点測定, 沈降平衡法による

1) 本研究を Y. Kubota, Biochemical Studies on Human Salivary Proteins. IV とする.

2) Location: a) 5-1 Oe-honcho, Kumamoto, b) 3-7-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo.

3) Y. Kubota, H. Ueki, Y. Ito, *Endocrinol. Japon.*, **13**, 420 (1966).

4) 日本薬学会九州支部第 50 回例会, 熊本, 1966 年 12 月.

5) Y. Ito, S. Okabe, S. Namba, *Endocrinol. Japon.*, **12**, 69 (1965).

6) 守屋 寛, 島沢英一郎, 薬誌, **79**, 374 (1959).

7) Y. Kubota, H. Ueki, Y. Hara, *Endocrinol. Japon.*, **15**, 281 (1968).

8) H.J. Müller-Eberhard, *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **12**, 33 (1960).

分子量測定を行ない、E-3 の蛋白化学的性質を明らかにした。

実 験 の 部

実験方法

ゾーン電気泳動条件の検討 支持体として Pevikon C-870 (polyvinyl chloride と polyvinyl acetate の copolymer, 二葉商事) を使用した。Pevikon 200g を 400 ml の水 (イオン交換樹脂による脱イオン水) に懸濁, 1 夜膨潤させ, ついで同量の水で 5 回洗い, さらに 300 ml の緩衝液で 4 回洗って平衡化させた。これを用いて $1.5 \times 3.0 \times 26.0$ cm のブロックを作った。緩衝液は酸性側として, 0.05 M AcONH_4 緩衝液, pH 3.2, および 1 M 酢酸, pH 2.2, アルカリ性側として 0.1 M ベロナール緩衝液, pH 8.6 を用いた。泳動は室温 ($20-30^\circ$), 定電流 (2 mA/cm^2) で行ない, 泳動時間は酸性側では 4—8 hr, アルカリ性側では 20 hr であった。予備通電を 3 hr 行なった後, 中心に幅 0.7 cm の溝を作った。検体 50—70 mg を 0.4 ml の緩衝液に溶かし, この全量を溝に流し込んだ。種々の時間泳動させた後, 1 cm 幅にブロックを切り出し, 各ブロックを 3 ml の水で 2 回抽出した。この抽出液 0.5 ml をとって Cu-Folin 試薬⁹⁾ で発色させ, 660 m μ で蛋白含量を測定して泳動曲線をえがき, その曲線のパターンに応じて数ブロックを集めた。酸性緩衝液で泳動させた場合は揮発性であるためそのまま凍結乾燥し, ベロナール緩衝液の場合は 3 日間攪拌透析した後凍結乾燥した。これらの標品について生物活性を検索し, また純度をセルローズアセテート膜電気泳動法によって検討した。

ゾーン電気泳動による精製 上記泳動条件の検討の結果から, 0.1 M ベロナール緩衝液, pH 8.6 を使用して泳動を行なうこととした。温度条件によって泳動距離の変動および泳動物質の変性による生物活性の低下が考えられたので, 泳動はすべて 4° で行なった。P-I 70 mg を上記緩衝液 0.3 ml に溶かし, これに Pevikon 0.8 g を加えて泥状としたものを試料とした。他の泳動条件はすべて前記と同じである。活性物質は泳動後, 陽極側 3 cm のブロックに集中することが確認されたので, 陽極側 2, 3, 4 cm を 1 cm 幅ずつのブロックに切り取り, おのおのを 3 ml の水で抽出し, 抽出液を 3 日間攪拌透析した。ついで膜内液を polyvinyl pyrrolidone (K-90, 片山化学) で 2—3 ml に濃縮し, 凍結乾燥した。生物試験およびセルローズアセテート膜電気泳動の結果から, 活性物質のセルローズアセテート膜上の位置を決定することができたので, 以後の実験ではセルローズアセテート膜電気泳動によって活性物質をチェックして抽出分離した。以後この活性物質を E-3 と略称する。

再電気泳動による活性物質の純度の検討 E-3 の純度を検討するため, Pevikon を支持体として再電気泳動を行なった。E-3 6.3 mg を前記と同じ条件で泳動させ, 陰極側 1 cm から陽極側 6 cm までを幅 1 cm のブロックとして切り取り, 各ブロックを 3 ml の水で 2 回抽出した。各抽出液 0.5 ml を Cu-Folin 試薬で発色させ, 660 m μ で蛋白含量を測定して泳動曲線をえがいた。

セルローズアセテート膜電気泳動による純度の検討 セルローズアセテート膜 (Separax, 常光産業) は幅 1—5 cm, 長さ 6 cm のものを, また緩衝液は 0.05 M ベロナール緩衝液, pH 8.6, および 0.05 M AcONa 緩衝液, pH 4.3 を用いた。検体 50—100 μg を 2 μl の緩衝液に溶かし, 全量を長さ 0.7 cm の帯状に塗布した。定電流 (0.6 mA/cm) で 40 min 泳動させた後, 1% HgCl_2 を含む 2% 酢酸に 0.005% の濃度に溶かしたニグロシン溶液で染色した。

超遠心分析による純度の検討 E-3 9.0 mg を 0.1 M KCl を含む 0.05 M ベロナール緩衝液, pH 8.6 の 0.9 ml に溶かし, Visking tube を用いて同じ緩衝液に対し 16 hr 透析して最終濃度 0.8% となったものを試料とした。沈降パターンは日立 UCA-1A 型超遠心機および合成界面セルを用い, ローター速度 51,200 rpm で求めた。

生物活性の検定 従来パロチン関連物質の検定に用いられている 2 種の方法, すなわち家兔血清カルシウム濃度低下活性および循環白血球数変動活性の測定¹⁰⁾ によって行なった。血清カルシウム低下活性の測定はつぎのように行なった。24 hr 絶食させた体重 2.5—3.0 kg の家兔の耳静脈に検体を注射し, 注射後 4, 5.5, 7 hr に採血してキレート滴定法によりカルシウム濃度を定量した。各時間のうち最低値をとり, 注射前の initial 値に対する減少率を求め, これによって活性をあらわした。緒方等¹¹⁾ によって報告されたように, 5% 以下の減少率を示すものは無効と判定した。この方法で検定される活性を以後 Ca-活性と略称する。

家兔循環白血球数変動活性の検定は Ca-活性測定と同時に行なった。採血は注射後 2, 4, 7 hr に行ない, 各時間における総白血球数を算定し, initial 値に対する変化率を求め, これを時間に対してプロットして白血球数変動曲線を得た。活性物質の場合, 白血球数は注射後 2 hr で減少し, 7 hr で著しい増加を示す。この方法で検定される活性を以後 L-活性と略称する。なお本報では L-活性の表現法としてつぎの記号を用いた。

V: 2 hr 後に白血球数の減少, 7 hr 後に増加を示す。/: 初期の減少がなく, 7 hr 後まで持続的に増加する。 $\wedge$: 2 hr または 4 hr 後に一過性の増加があり, 7 hr 後に正常値にもどる。—: 白血球数に変動がないことを示す。

9) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

10) Y. Ito, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85**, 228 (1960).

11) 緒方 章, 伊藤四十二, 薬誌, **64**, 416 (1944).

アミノ酸分析 加水分解¹²⁾は酸およびアルカリを用いて行なった。酸加水分解の場合は E-3 1.8 mg を 6N HCl 1 ml に溶かし、真空封管したものを 105° で 6, 12, 24, 48 の各時間加水分解し、沈殿物を汙過後、上清を減圧乾固し、さらに水を加えて同様操作を繰り返して HCl を除いた。トリプトファン定量の場合はアルカリ加水分解によった。すなわち E-3 1.6 mg と Ba(OH)₂ 1.869 g をガラス管に入れ、水 2 ml を加えて封管し、105° で 24 hr 加水分解した。分解液を 6N H₂SO₄ で中和し、BaSO₄ を除き、減圧乾固して試料とした。これらの試料を用いて三田村 580-II 型アミノ酸自動分析計により、アミノ酸およびアミノ糖を定量した。アミノ酸含量は各種加水分解時間からの最大値によって求めた。

末端アミノ酸残基の決定 N 末端アミノ酸残基の検討はアルコール溶液中での DNP 化法¹³⁾を用いて行なった。E-3 5.7 mg および同量の NaHCO₃ を水 0.5 ml に溶かし、5% 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene (FDNB) エタノール溶液 1 ml を加えて DNP 化を行なった。これを塩酸で加水分解した後、エーテルで繰り返し抽出し、Mills の装置でジエトロフェノールを除き、残渣を少量のアセトンに溶かして試料とした。C-末端アミノ酸残基の検討はヒドラジン分解法¹⁴⁾を用いて行なった。E-3 5.3 mg を無水ヒドラジンで分解し、ベンズアルデヒド処理後、上清を DNP 化した。反応液を酢酸エチルで抽出し、ついで DNP-アミノ酸を NaHCO₃ 液に転溶し酸性としたのち、再び酢酸エチルで抽出し、Mills の装置を用いてジエトロフェノールを除き、残渣を少量のアセトンに溶かして試料とした。DNP-アミノ酸の同定は薄層クロマトグラフィーで行なった。溶媒としてはトルエン-ピリジン-エチレンクロロヒドリン-0.8N NH₃ 水 (100: 30: 60: 60) およびクロロホルム-ベンジルアルコール-酢酸 (70: 30: 3) を用いた。

糖の定性および定量 定性の場合は、E-3 1.0 mg を 0.5N H₂SO₄ 1 ml に溶かし、封管中 105° で 8 hr 加水分解した後、¹⁵⁾ Dowex 50×2 のカラム (0.7×20 cm) および展開剤として 0.5N HCl を用いるクロマトグラフィー¹⁶⁾によってヘキソース画分 (E-3₁) とヘキソサミン画分 (E-3₂) に分離してペーパークロマトグラフィーの試料とした。溶媒は水飽和 *sym*-コリジンおよびフェノール-0.1% NH₃ 水 (4: 1) を用い、アニリン水素フタル酸で発色させ、ヘキソース、ヘキソサミンおよびウロン酸を検索した。ヘキソースの定量の場合、E-3 を加水分解せずそのまま Anthrone 法¹⁷⁾で、また加水分解物については Carbazole 法¹⁸⁾で、それぞれガラクトースで作った検量曲線からヘキソース含量を算出した。ヘキソサミンの定量は Elson-Morgan の変法¹⁹⁾を用い、加水分解物についてグルコサミンによる検量曲線を用いてヘキソサミン含量を算出した。

シアル酸の定性 伊藤等¹⁵⁾がウロパロチン中のシアル酸の検出に用いた方法に準じて行なった。E-3 0.8 mg を 0.1N H₂SO₄ 1 ml に溶かし、封管中 80° で 1 hr 加水分解した。分解液を Ba(OH)₂ 液で中和し、沈殿を除き、上清を蒸発乾固して試料とした。同定は *n*-ブタノール-酢酸-水 (4: 1: 2) を溶媒とする一次元ペーパークロマトグラフィーによって行なった。対照として N-アセチルノイラミン酸を用い、Ehrlich-トリクロル酢酸試薬²⁰⁾によって発色させた。

脂質の定性および定量 E-3 中の脂肪酸のガスクロマトグラフィーによる定性的検索は、主として高橋等およびその他の総説²¹⁾を参照して行なった。まず試料からの脂肪酸メチルエステルの調製は Stoffel 等²²⁾の方法を少し変えて行なった。E-3 0.9 mg を 5% HCl-MeOH 2 ml, ベンゼン 0.25 ml とともに封管し、沸騰水浴中で 3 hr 加熱してメチルエステル化した。開封後、石油エーテルで抽出し、脱水して石油エーテル層を減圧デシケター中で乾固し試料とした。試料は微量のエーテルに溶かし、その 2 μl をカラムに注入した。測定は島津ガスクロマトグラフ GC-1B 型水素炎イオン化検出器付を用いて行なった。条件はつぎの通りである。カラム: Diethylene glycol succinate (DEGS) 10% on Shimalite 60-80 mesh, 4 mmφ×3 m. カラム温度: 200°. キャリアーガス: N₂ 60 ml/min. レンジ: 0.8V.

定量は E-3 2.5 mg をクロロホルム-メタノール (1: 1) 2.5 ml を用いて 4° で 20 hr 抽出した後、遠沈し、上清をグラスフィルターで汙過し、汙液を減圧蒸発させ、さらに P₂O₅ デシケター中で 12 hr 減圧乾燥後、秤量して脂質含量を決定した。またこの抽出脂質を少量のクロロホルム-メタノール混液に溶かし、薄層プレート上に

- 12) 波多野博行, “アミノ酸自動分析法,” 第 1 版, 化学同人, 東京, 1964, p. 63.
- 13) F. Sanger, *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945); 岩井浩一, 藤岡英子, “蛋白質およびペプチドの末端構造分析,” 生物化学実験法 I (蛋白質核酸酵素臨時増刊), 共立出版, 東京, 1963, pp. 5-26.
- 14) 川西康博, 成田耕造, “蛋白質およびペプチドの末端構造分析,” 生物化学実験法 I (蛋白質核酸酵素臨時増刊), 共立出版, 東京, 1963, pp. 67-82.
- 15) Y. Ito, M. Yamamoto, *Endocrinol. Japon.*, **6**, 201 (1959).
- 16) N.F. Boas, *J. Biol. Chem.*, **204**, 553 (1953).
- 17) T.A. Scott, Jr., E.H. Melvin, *Anal. Chem.*, **25**, 1656 (1953).
- 18) F.B. Seibert, J. Atno, *J. Biol. Chem.*, **163**, 511 (1946).
- 19) R. Belcher, A.T. Nutten, C.M. Samlorook, *Analyst*, **79**, 201 (1954).
- 20) E. Svennerholm, L. Svennerholm, *Nature*, **181**, 1154 (1958).
- 21) 高橋善弥太, 田中 圭, 深沢俊男, “脂質実験法,” 生物化学実験法 VII (蛋白質核酸酵素臨時増刊), 共立出版, 東京, 1967, pp. 30-58; 安藤鋭郎, 寺山 宏, 西沢一俊, 山川民雄編, “生化学研究法 I,” 朝倉書店, 東京, 1967, p. 75.
- 22) W. Stoffel, F. Chu, E. H. Ahrens, Jr., *Anal. Chem.*, **31**, 307 (1959).

スポットして、モリブデン青試薬、0.1%。ブロムチモールブルーの 10% エタノール溶液、ジフェニルアミン試薬および 0.2% ニンヒドリンの水飽和ブタノール溶液²³⁾ の噴霧による定性確認試験を行なった。

等電点の測定 セルローズアセテート膜電気泳動法²⁴⁾ によって E-3 の等電点を測定した。電気浸透現象は D-グルコースによって補正し、真の移動が零のときの pH を等電点とした。セルローズアセテート膜 (1.5×6.0 cm) の中心に長さ 5 mm, 幅 1.5 mm のバンド状に E-3 50 μ g/0.5 μ l あるいは D-グルコース 10 μ g/0.5 μ l を塗布した。緩衝液はイオン強度が 0.1 になるように調製した酢酸緩衝液, pH 4.2, 4.6, 5.1, および 5.7 を用い、定電流 (0.6 mA/cm) で 30 min 泳動を行なった。E-3 は 0.005% ニグロシン染色液で染色し、D-グルコースは 1% KMO₄ 液で発色させた。

分子量の測定 分子量測定は Archibald 法²⁵⁾ によって行なった。溶媒は 0.1M KCl を含む 0.05M ベロナール緩衝液を用いた。E-3 10.0 mg を緩衝液 1 ml に溶かし、同じ緩衝液に対して 16 hr 透析して試料とした。測定は日立 UCA-1A 型分析用超遠心機、標準セルおよび合成界面セルを用い、ローター速度 14400 rpm で行なった。

結 果

ゾーン電気泳動の条件

Table I は酸性緩衝液を用いて行なった 3 回の実験 (PV 2—4) の結果を示す。PV 2 では原線より得た画分に L-活性を認めたが、Ca-活性はどの画分にも見いだされなかった。また同じ条件で泳動を 8 時間に延長した場合

TABLE I. Zone Electrophoresis of P-I in Acidic Media

cm	PV 2 0.05 M NH ₄ Ac, pH 3.2			PV 3 0.05 M NH ₄ Ac, pH 3.2			pV 4 1 M HAc, PH 2.2						
	Yield (%)	Activity Ca	L	Yield (%)	Activity Ca	L	Yield (%)	Activity Ca	L				
+1				6.68	3.99	✓	}	3.75	6.21	△			
0	24.57	4.94	✓	13.73	6.78	/							
-1	11.28	-0.82	—	11.43	4.12	△							
-2				}	20.01	3.77	}	12.29	4.42	✓			
-3	3.48	-5.37	—										
-4													
-5	}	3.26	2.70	}	9.93	4.51	}	26.25	7.04	—			
-6													
-7													
-8								11.35	-0.31	—			

sample: 50 mg of P-I

current: 2 mA/cm²

time: PV2 and PV4, 4 hr; PV3, 8 hr

block: Pevikon, 1.5×3×26 cm

(PV 3) も、原線をはさんで両極側へ各 1 cm の画分に典型的な L-活性または一過性の増加を認めたが、Ca-活性は全く認められなかった。1M 酢酸, pH 2.2 で 4 時間泳動を行なった場合 (PV 4), 陰極側 2—3 cm の画分に L-活性を認めたが、Ca-活性は全く見られなかった。

Table II はアルカリ性緩衝液での 4 回の実験 (PV 7—10) の結果を示す。室温 (20—30°) で泳動を 20 時間行なったため条件が厳密には一定せず、活性物質の移動距離に若干の変動があるが、PV 8 以外はすべて陽極側 2—4 cm の画分に L-活性と弱い Ca-活性が認められた。また PV 10 では陽極側 3 cm の画分の血清カルシウム低下率は 9.10% で、かなり強い Ca-活性をもっていた。

23) 野田万次郎, “脂質実験法,” 生物化学実験法 VII (蛋白質核酸酵素臨時増刊), 共立出版社, 東京, 1967, pp. 3—29.

24) Y. Kubota, H. Ueki, *J. Biochem. (Tokyo)*, **64**, 405 (1968).

25) H.K. Schachman, “Ultracentrifugation, Diffusion and Viscosity,” in *Methods in Enzymology*, Vol. 4, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1957, pp. 32—103.

TABLE II. Zone Electrophoresis of P-I in Alkaline Buffer

cm	PV 7			PV 8			PV 9			PV 10		
	Yield (%)	Activity Ca	L	Yield (%)	Activity Ca	L	Yield (%)	Activity Ca	L	Yield (%)	Activity Ca	L
+6	1.85	2.08	/	4.31	7.95	V	3.75	6.32	/	1.64	-0.37	—
+5												
+4												
+3	8.31	8.16	V	10.58	-0.23	^	5.47	3.77	V	2.09	9.10	V
+2												
+1												
0	11.23	3.36	/	5.77	1.72	—	7.97	2.67	—	7.02	8.38	V
-1												
-2												
-3	4.15	1.16	—									
-4												

sample: 50 mg of P-I
buffer: 0.1 M veronal buffer, pH 8.6
current: 2 mA/cm²

time: 20 hr
block: Pevikon, 1.5 × 3 × 26 cm

Fig. 1. Cellulose Acetate Paper Electrophoresis of Each Fraction

sample: 100 μ g
buffer: 0.05 M veronal buffer, pH 8.6
current: 0.6 mA/cm
time: 40 min
staining: 0.005% nigrosin in 2% AcOH
paper: 2 × 6 cm

PV 2—10 の活性を示した画分についてセルローズアセテート膜電気泳動を行なった結果を Fig. 1 に示す。P-I に比していずれもかなり精製されているが、陽極側 3 cm のブロックから得た PV10-(+3) は、原線上のバンド以外に 1 個のバンドのみを示した。この原線上のバンドは、精製操作の途中で活性物質の変性により生じたものと考えられる。PV 8, 9 も原線以外の同じ位置にそれぞれ 1 個のバンドが認められるが、これらはいずれも活性物質のものと推定される。PV 9 ではこのバンドに相当する画分に Ca-活性が認められないが、これは精製途上での変性によると考えられる。

ゾーン電気泳動による精製

上記の結果はベロナール緩衝液, pH 8.6 によるゾーン電気泳動が、活性物質の精製に用いることを示している。70 mg の P-I を用い 4° で調製的に泳動を行なった場合は、Table III に示すように活性画分の収量にかなりの再現性が認められた。陽極側 3 cm のブロックより得た活性物質 (E-3) の 4 回の実験の平均収率は 2.3% であった。E-3 を得るまでの操作を、Table III の Exp. 1 を例として出発原料からの収量とともに要約すると Fig. 2 のようになる。この場合 SPA 300 mg から P-I 70 mg が得られ、さらにこれをゾーン電気泳動で精製すると E-31.9 mg (SPA に対し 0.6%) が得られた。唾液 1 liter から E-3 1.9 mg が得られたことになる。

E-3 の均一性

純度検討のために行なった E-3 の再電気泳動による泳動曲線を Fig. 3 に示す。陽極側 3 cm にピークを持つ、ほとんど左右対称の曲線であり、E-3 が均一であることを示している。Fig. 4 はセルローズアセテート膜電気泳動による結果を示す。pH 4.3 の酢酸緩衝液および pH 8.6 のベロナール緩衝液で泳動させた場合、いずれも 1 個のバンドのみを示し、やはり E-3 が電気泳動的に均一であることを示している。Fig. 5 は E-3 の沈降像である。7 分後および 90 分後において左右対称な沈降界面が得られ、E-3 が超遠心的に均一であることを示している。

TABLE III. Yield of Active Fraction separated from P-I by Zone Electrophoresis on Pevikon

Migration distance to anode (cm)		2	3 ^{a)}	4
Yield from 70 mg of P-I	exp. 1	2.8	1.9	0.9
	2	2.5	1.5	0.6
	(mg) 3	0.8	1.6	0.3
	4	1.9	1.2	0
	average	2.0	1.6	0.5
	exp. 1	4.0	2.7	1.3
	2	3.6	2.1	0.9
	(%) 3	1.1	2.3	0.4
	4	2.7	1.9	0
	average	2.9	2.3	0.6

a) Fraction possessed hypocalcemic and leukocytosis-promoting activities.

Each block was cut out in 1 cm width and extracted twice with 3 ml of water. The extract was dialyzed against water for 3 days and lyophilized.

Fig. 2. Preparation of E-3

Fig. 4. Cellulose Acetate Paper Electrophoresis of E-3

I: 0.05M acetate buffer, pH 4.3
II: 0.05M veronal buffer, pH 8.6
current: 0.6 mA/cm time: 40 min
staining: 0.005% nigrosin in 2% AcOH
paper: 2 × 6 cm

Fig. 3. Re-electrophoresis of E-3 on Pevikon

sample: 6.3 mg of E-3
buffer: 0.1 M veronal buffer, pH 8.6
current: 2 mA/cm²
time: 20 hr
extraction: 3 ml × 2 with water
protein determination: Cu-Folin, 660 mμ
block: Pevikon, 1.5 × 3 × 26 cm

Fig. 5. Sedimentation Pattern of E-3

buffer: pH 8.6 veronal buffer containing 0.1M KCl,
ionic strength 0.15
protein concentration: 0.8%
rotor speed: 51200 rpm
cell: synthetic boundary cell

TABLE IV. Amino Acid Compositions obtained with Four Different Times of Hydrolysis of E-3

Amino acid residue	Hours of hydrolysis (μ mole/mg)				Max. value (μ mole/mg)
	6	12	24	48	
Asp	0.212	0.213	0.179	0.144	0.213
Thr	0.095	0.091	0.067	0.090	0.095
Ser	0.198	0.179	0.148	0.138	0.198
Glu	0.490	0.499	0.561	0.311	0.561
Pro	0.782	0.856	1.104	0.474	1.104
Gly	0.473	0.483	0.552	0.285	0.552
Ala	0.101	0.093	0.059	0.095	0.101
Val	0.029	0.033	0.007	0.036	0.036
Ile	0.010	0.013	0.005	0.021	0.021
Leu	0.026	0.031	0.010	0.040	0.040
Lys	0.126	0.143	0.112	0.080	0.143
His	0.019	0.019	0.011	0.017	0.019
NH ₃	1.122	1.028	0.184	0.908	1.122
Arg	0.033	0.036	0.036	0.034	0.036
Trp			0.018		0.018

アミノ酸組成

Table IV は各加水分解時間における E-3 のアミノ酸の測定値および最大値を示す。バリン、イソロイシン、ロイシンは 48 時間値が最大で、これらのアミノ酸は遊離されにくいことが認められた。一方アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、リジンなどは 48 時間の加水分解では著しく分解することが認められた。トリプトファンはアルカリ加水分解物についての測定値である。Table V には前述の最大値、およびそれ

TABLE V. Amino Acid Composition of E-3 calculated from Maximal Values

Amino acid residue	Max. value (μ mole/mg)	$\frac{\text{gA. a. residue}}{100 \text{ g protein}}$	$\frac{\text{mmole A. a.}}{100 \text{ g protein}}$
Asp	0.213	2.45	21.3
Thr	0.095	0.96	9.5
Ser	0.198	1.74	19.8
Glu	0.561	7.24	56.1
Pro	1.104	10.75	110.4
Gly	0.552	3.14	55.2
Ala	0.101	0.72	10.1
Val	0.036	0.36	3.6
Ile	0.021	0.23	2.1
Leu	0.040	0.45	4.0
Lys	0.143	1.83	14.3
His	0.019	0.56	1.9
NH ₃ ^{a)}	1.122	1.80	11.2
Arg	0.036	0.56	3.6
Trp	0.018	0.34	1.8
Total		31.33	

a) Excluded from total.

から算出される蛋白 100 g 当りのアミノ酸残基 g 数と mmole 数を示した。E-3 は 31.33% のアミノ酸残基を含み、そのうちプロリン含量が最も大きく 10.75% であった。

Fig. 6. Thin-Layer Chromatograms of Terminal Amino Acids of E-3

solvents

I: toluene-pyridine-ethylene chlorohydrin-
0.8N NH_3 (100:30:60:60)

II: chloroform-benzylalcohol-acetic acid
(70:30:3)

Fig. 7. Paper Chromatograms of Sugar

solvents

I: phenol-0.1% NH_3 (4:1)

II: *sym*-collidine saturated with H_2O

III: *n*-BuOH-AcOH- H_2O (4:1:2)

spot detection

I and II: aniline hydrogen phthalate solution

III: Ehrlich's reagent

N 末端および C 末端アミノ酸

Fig. 6 に示すように N 末端アミノ酸は DNP 法によっては検出されなかった. C-末端アミノ酸としてはヒドロラジン分解法によりセリンを検出した.

糖

Fig. 7 に示すように E-3 はヘキソースとしてはガラクトース, ヘキソサミンとしてはグルコサミンを含み, ウロン酸およびシアル酸は含まないことが確認された. 加水分解しない E-3 について Anthrone 法で定量した場合のヘキソース含量は 33.58%, 0.5N H_2SO_4 加水分解物を Carbazole 法で定量した場合は 22.28% であった. Table VI にあげたヘキソース残基含量は Anthrone 法による定量値から算出したものである. 上記加水分解物について Elson-Morgan 法で定量したヘキソサミン含量は 9.43% であった. また E-3 を 6N HCl により 6, 12, および 24 時間加水分解し, アミノ酸自動分析計によって各加水分解物中のヘキソサミンを定量して得た値は, それぞれ 0.618, 0.524, および $0.125 \mu\text{mole/mg}$ であった. これから得られる時間 0 への外挿値は $0.698 \mu\text{mole/mg}$ で, % 含量に換算するとヘキソサミンとして 12.51%, ヘキソサミン残基として 11.25% となる. Table VI にはこの外挿値から算出した値をあげた.

脂質

E-3 に含まれる脂肪酸のガスクロマトグラムを Fig. 8 に示す. ミリスチン酸, パルミチン酸, パルミトオレイン酸, ステアリン酸, オレイン酸およびリノレニン酸が検出された. また E-3 のクロロホルム-メタノール抽出物の乾燥重量から算出した脂質含量は 26.80% であった. 定性分析の結果, モリブデン青試薬によるリン脂質試験は陰性, ジフェニルアミン試薬による糖脂質試験, ブロムチモールブルー液による酸性物質試験, およびニンヒドリン液によるアミノ基の試験はいずれも陽性で, この脂質は糖脂質と推定される.

以上測定された各成分の組成を Table VI にまとめている.

等電点

セルローズアセテート膜電気泳動により E-3 の等電点を測定した結果を Fig. 9 に示す. 曲線と横軸との交点が等電点を示し, その値は pH 4.4 であった.

Fig. 8. Gas Chromatogram of Fatty Acids of E-3

TABLE VI. Chemical Composition of E-3

Composition		Method
Amino acid residue	31.33%	autoanalyzer
Hexose residue	30.16	anthrone
Hexosamine residue	11.25	autoanalyzer
Lipid	26.80	CHCl ₃ -MeOH extn.
Uronic acids, sialic acid	—	paper chromato.
Total	99.54

Fig. 9. Estimation of Isoelectric Point of E-3 by Cellulose Acetate Paper Electrophoresis

sample: 50 μ g of E-3 and 10 μ g of D-glucose
 buffer: acetate buffers, ionic strength 0.1
 current: 0.6 mA/cm
 time: 30 min
 staining: E-3, 0.005% nigrosin; D-glucose,
 1% KMnO₄

Migration caused by electro-osmosis was corrected
 with D-glucose.

分子量

E-3 の偏比容はその化学組成から 0.659 ml/g と算出された。この値を用い Archibald 法によって分子量を算出した結果 55000 であった。Table VII にアミノ酸および糖の組成から算出した分子量を示す。アミノ酸残基および糖残基の合計は 72.74% となり、また各残基分子量と残基数の積の合計は 39903 となる。一方超遠心分析による分子量 55000 の 72.74% は 40007 で、両者の値はきわめてよく一致した。

Table VIII は E-3 の化学的物理的諸性質をまとめたものである。アルギニン含量から算出した最小分子量は 27900、バリンからのそれは 27500 で超遠心的に得た値のほぼ半分となるが、E-3 1 分子中にアルギニン、バリン各 2 分子が含まれていると仮定すると対応する分子量はそれぞれ 55800 および 55000、またトリプトファンから算出した最小分子量は 54700 となり、いずれも Archibald 法による測定値とよく一致した。

TABLE VII. Calculation of Minimal Molecular Weight of E-3

	I	II	III	IV
Asp	2.45	11.7	12	1381
Thr	0.96	5.2	5	506
Ser	1.74	11.0	11	958
Glu	7.24	30.7	31	3999
Pro	10.75	60.9	61	5924
Gly	3.14	30.3	30	1712
Ala	0.72	5.6	6	426
Val	0.36	2.0	2	198
Ile	0.23	1.1	1	113
Leu	0.45	2.2	2	226
Lys	1.83	7.9	8	1025
His	0.56	2.2	2	274
Arg	0.56	2.0	2	312
Trp	0.34	1.0	1	186
Hexose	30.16	102.3	102	16538
Hexosamine	11.25	38.4	38	6125
Total	72.74	314.5	314	39903

I: gram of residues per 100 g of protein

II: number of residues per molecule

III: nearest integral number of residues for 55000

IV: integral number of residues multiplied by residue molecular weight

TABLE VIII. Chemical and Physicochemical Properties of E-3

Partial specific volume	0.659	C-terminal	serine
Molecular weight	55000	Hexose	galactose
Minimal molecular weight calculated from amino acid contents	(Arg → 27900 Val → 27500 Trp → 54700)	Hexosamine	glucosamine
Isoelectric point	pH 4.4	Fatty acids	(myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linolenic)
N-terminal	—		

考 察

ゾーン電気泳動において、pH 3.2 の酢酸アンモニウム緩衝液および pH 2.2 の 1M 酢酸を用いた場合は分離状態が悪く、また Ca-活性の消失が見られた。岡部²⁶⁾ は精製 SPA を長時間高濃度の酸で処理すると Ca-活性のみが消失して L-活性は残存することを報告し、また難波²⁷⁾ は β -パロチンの酸処理によってやはり Ca-活性のみが減弱することを認めている。この現象は上記ゾーン電気泳動の結果と類似しており、これらの事実は、パロチン関連物質の Ca-活性を現わす活性部位が L-活性のそれと同一でない可能性、および Ca-活性を現わす部位がより不安定であるらしいことを推定させる。泳動条件の検討において操作を室温 (20—30°) で行なった場合、活性の低下あるいは消失が見られたが、全操作を 4° で行なうことによって蛋白質の変性や生物活性の低下を防ぎ、活性物質を均質な状態に分離することができた。このことは E-3 が再電気泳動によって対称的なピークを示し、またセルローズアセテート膜電気泳動および超遠心分析で単一成分と認められたことから確かめられた。また各操作の実施条件を厳密に一定に保つことによって、活性物質 E-3 をかなり再現性よく得ることができた。

E-3 のアミノ酸組成の著しい特徴はグルタミン酸、プロリンの含量がきわめて高く、31.33% の全アミノ酸残基中両者の和が 17.99% と半分以上を占めることである。精製 SPA ではこの両アミノ酸残基の和は全体の 1/3 以下であり、²⁸⁾ E-3 との間に著しい差が認められる。またヘキソース、ヘキソサミン含量の和が 41.41% と高く、さらに脂質が 26.80% 含まれているのも他のパロチン関連物質と著しく異なる点である。等電点が pH 4.4 とかなり酸性側にあるのも、グルタミン酸の高い含量を考えると理解し得る。E-3 の分子量は 55000 であるが、精製 SPA のそれは 15900 であり、²⁸⁾ 上述の結果と合わせて、E-3 は精製 SPA とは異なる新しい高分子パロチン活性物質であると考えられる。ガスクロマトグラフィーによって脂肪酸が検出され、また定性的に糖脂質と考えられる脂質が 26.80% 含まれているが、SPA をクロロホルムメタノール混液でソックスレー抽出器中 60 時間抽出して脂質を除去してもなお生物活性が認められることから、²⁹⁾ 脂質は生物活性には直接的に関係しないと考えられる。

分画精製にさきだち Pronase 消化を行なっているの、本活性物質は人唾液に含まれる native な活性物質そのものではないが、Pronase P はプロリンを含むペプチド結合をほとんどば水解しないこと、³⁰⁾ また E-3 のプロリン、糖、脂質の含量が高いことを考慮すると、切断を受けたとしてもきわめてわずかであり、活性中心は native な分子と同じ構造であると考えられる。

本パロチン活性物質と、牛耳下腺から分離されたパロチンあるいは人唾液から得られた精製 SPA など他のパロチン様物質との関連は現在まだ明らかではない。おそらく Pronase 消化を受ける前の本活性物質の母体複合蛋白質が唾液腺から唾液に分泌される形であり、分子量 15900 の低分子精製 SPA はこの複合蛋白質のペプチド部の一部が遊離して生じたものとも考えられる。

謝辞 アミノ酸自動分析をお願いした 熊本大学薬学部江藤祥子講師、ガスクロマトグラフィーをお願いした 北原一太助教授、原料および各種標準品の提供を頂いた帝国臓器製薬株式会社岡部佐七博士、山元正昭博士、難波脩一博士に深く感謝いたします。

26) S. Okabe, *Endocrinol. Japon.*, **6**, 284 (1959).27) S. Namba, *Endocrinol. Japon.*, **12**, 268 (1965).28) Y. Ito, Y. Kubota, *J. Biochem.* (Tokyo), **47**, 475 (1960).29) Y. Kubota, H. Ueki, H. Araki, *Endocrinol. Japon.*, 投稿中.30) M. Nomoto, Y. Narahashi, M. Murakami, *J. Biochem.* (Tokyo), **48**, 906 (1960).