HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結晶鯨インシュリンに関する研究：第2報 アミノ酸組成
Author(s)	斎藤, 恒行; 石原, 義雄; 伊藤, 裕三; 藤野, 政彦
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 8(1), 54-58
Issue Date	1957-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/22985
Type	bulletin (article)
File Information	8(1)_P54-58.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

結晶鯨インシュリンに関する研究

第2報 アミノ酸組成

斎藤恒行・石原義雄・伊藤裕三・藤野政彦
(北海道大学水産学部水産化学教室)

Studies on Crystalline Whale Insulin

II. Amino acid composition

Tsuneyuki SAITÔ, Yoshio ISHIHARA, Yasuzo ITÔ and Masahiko FUJINO

Abstract

As reported in the previous paper, the authors were able to prepare sufficient quantity of crystalline whale insulin for the purpose, and therefore, the complete analysis of the protein was undertaken. The amino acid composition of hydrolysates of crystalline whale insulin has been determined by chromatography on columns of Dowex 50-X8. The corrected analytical values yield integral numbers of residues for most of the amino acids and account for 97.64 per cent of the nitrogen and 94.51 per cent of the weight of whale insulin.

The analyses indicate the following 48 amino acid residues in the whale insulin molecule (min. mol. wt. 5719 $C_{253}H_{375}N_{65}O_{75}S_6$): Asp_3 Glu_7 Gly_4 Ala_3 Val_4 Leu_5 $Ileu_2$ Ser_3 Thr_2 CyS_3 Pro_1 Phe_4 Tyr_3 His_2 Lys_1 Arg_1 $(-CONH_2)_6$.

緒言

今迄に牛・豚・羊並に各種硬骨魚の結晶インシュリンが単離され，之等の中牛・豚・羊インシュリンに就てはアミノ酸組成が定量せられて，元素組成・結晶形・生物活性・向流分配，並にアナフィラキシー反応・補体結合反応等の免疫学的見地からも種属特異性が認められないのに拘らず[1)2)]，Thr, Ser, Gly, Ala, Val, Ileu 等のアミノ酸含量に差異を示す事が明かにされている。[3—6)]

先にインシュリンの一般製法を各種比較し亜鉛塩添加の柴田法[8)]の優秀性を確認し，更に結晶鯨インシュリンの単離を報告[7)]したが，ここにその構成アミノ酸の完全分析を行つた結果，前記インシュリン同様に Met, Try, CySH を欠くも Asp, Glu, Pro, CyS, His, Lys, Arg 以外の含量に若干の種属差異を認めたので報告する。

実験の部

試料——前報[7)]のイワシ鯨（*Balaenoptera borearis Lesson*）の結晶インシュリンを2回再結を繰返した後アセトン洗滌，真空デシケーター内で乾燥供試した。

加水分解——結晶インシュリンを10倍量の6 N HCl と共に封管中 110°C に24時間及72時間加熱して加水分解した後減圧下過剰の塩酸除去後常法により Buffer で pH 調節定容後一定量を供試。

アミノ酸分析——Moore & Stein 法[9)]に従つて行い別に CyS の定量を Schram, Moore & Bigwood 法[10)]，Tyr の定量は紫外部吸収法を併用した。加水分解に於ける個々のアミノ酸の分解に対する補正は24時間及72時間両水解物の定量数値から外挿法に従つて行つた。

実験結果並に考察

実験結果は Fig. 1 及 Tab. 1, 2 に示す如くである。

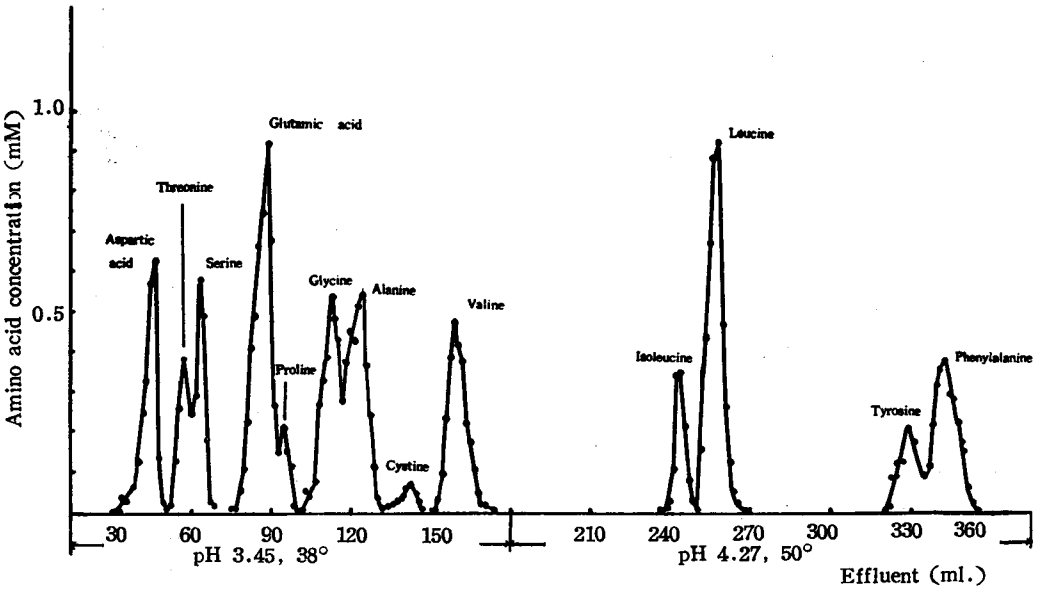

Fig. 1-a. Typical effluent curves for 24-hour hydrolysate of whale insulin (100cm. column of Dowex 50－X8)

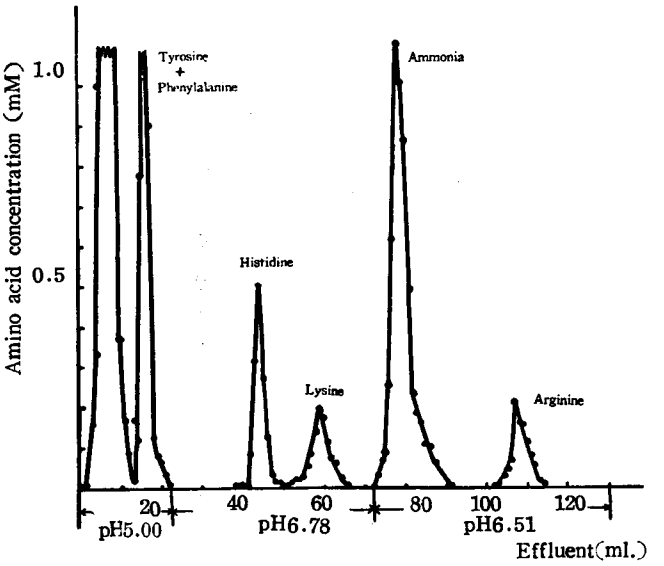

Fig. 1-b. Typical effluent curves for 24-hour hydrolysate of whale insulin (15cm. column of Dowex 50－X8)

定性的に見る時は Met, Try, CySH を欠き（別に Try に就ては Cole の反応，紫外部吸収の定性試験何れも negative, CySH に就ては Nitroprusside 反応等で negative）之迄のインシュリンと全く同一である。

先にペーパークロマトグラフイーで α- aminobutyric acid が認められたが今回は全く検出されず二次的分

Table 1. The Amino Acid Composition of Whale Insulin

Amino Acid	Amino acid per 100 g. protein	Amino acid residue per 100 g.protein	N as % of total N	No. of residues per mole of insulin
Aspartic acid	6.74 ± 0.09 g.	5.84 ± 0.08 g.	4.52 ± 0.06	3.04 ± 0.04
Threonine	3.34 ± 0.14	2.84 ± 0.12	2.49 ± 0.10	1.68 ± 0.07
Serine	4.97 ± 0.02	4.11 ± 0.02	4.22 ± 0.02	2.84 ± 0.01
Glutamic acid	16.29 ± 0.06	14.95 ± 0.05	10.32 ± 0.04	6.65 ± 0.02
Proline	1.46	1.23	1.13	0.76
Glycine	5.08 ± 0.02	3.86 ± 0.02	6.04 ± 0.02	4.05 ± 0.02
Alanine	5.03 ± 0.02	4.01 ± 0.02	5.04 ± 0.02	3.39 ± 0.01
Cystine *	11.09	9.43	8.23	2.77
Valine	7.56 ± 0.19	6.40 ± 0.16	5.76 ± 0.14	3.88 ± 0.09
Isoleucine	5.08 ± 0.20	4.38 ± 0.17	3.46 ± 0.14	2.33 ± 0.09
Leucine	11.55 ± 0.08	9.97 ± 0.07	7.87 ± 0.05	5.29 ± 0.03
Tyrosine	8.62 ± 0.04	7.76 ± 0.03	4.25 ± 0.02	2.86 ± 0.01
Phenylalanine	10.78 ± 0.11	9.59 ± 0.08	5.83 ± 0.06	3.92 ± 0.04
Histidine	5.10 ± 0.23	4.51 ± 0.20	8.80 ± 0.43	1.97 ± 0.09
Lysine	2.62 ± 0.30	2.30 ± 0.26	3.20 ± 0.37	1.08 ± 0.12
Arginine	3.72 ± 0.16	3.33 ± 0.14	7.62 ± 0.33	1.28 ± 0.05
Ammonia	……	……	8.86 ± 0.46	5.96 ± 0.31
Total	109.03	94.51	97.64	

* Measured as cysteic acid but calculated as cystine.

Table 2. Effect of Prolonged Hydrolysis Time on the Amino Acid Composition of the Whale Insulin

Amino acid	Number of residues		
	24 hr.	72 hr.	Average or extrapolated values
Aspartic acid	2.82	2.45	3.04 *
Threoine	1.63	1.52	1.68 *
Serine	2.59	2.09	2.84 *
Glutamic acid	6.13	6.54	6.65 **
Proline	0.74	0.71	0.76 *
Glycine	3.97	4.12	4.05
Alanine	3.39	3.39	3.39
Valine	3.34	3.77	3.88 **
Isoleucine	1.61	2.18	2.33 **
Leucine	5.28	5.31	5.29
Tyrosine	2.47	1.67	2.86 *
Phenylalanine	3.14	3.80	3.92 **

* Extrapolated to zero time of hydrolysis.

** Averages of the recoveries after 72- & 96-hour hydrolysates.

解生成物であつたものと考える。

定量的には之迄の牛・豚・羊三種インシュリンと比較して種属差が認められる。

アミノ酸含量の定量分析に於ては蛋白の水解時に於るアミノ酸の破壊（或いは逆に水解不充分の為の peptide 残存）に対する補正が難しい問題であるが水解時間を延長しての結果と外挿法で処理した。Tyr は紫外部吸収による定量結果と一致した。CyS は別に performic acid で酸化した蛋白内の Cysteic acid を Schram 等[10]の Dowex 2 を用ひてのこの定量法を併用した。水解時間を異にした場合の個々の分解程度は Tab. 2 に示す如くであるが，Harfenist の結果と傾向を同じくしているが Asp のみが逆である。之は Hirs, Stein & Moore 等[11] の場合が我々と同じ傾向を示している。N回収率及アミノ酸残基の含有率共に良好であるので以上の処理で充分と考える。

鯨インシュリン1モル当りの各アミノ酸残基数を見る為に N-末端の Gly 及 Phe の定量結果より Mmin. 平均 5900が得られるので（之は次回に報告の予定，尚アミノ酸残基からの best Mmin. も約 6,000 である）今 Mmin. 6,000 とした時の結果を Harfenist の測定値と比較すると Tab. 3 の如くである。（インシュリン

Table 3. Amino Acid Compositions of Insulins from Different Sources

Amino acid	Number of residues				
	Whale	Beef-A[5]	Beef-B[5]	Pork[5]	Sheep[5]
Aspartic acid	3	3	3	3	3
Threonine	2	1	1	2	1
Serine	3	3	3	3	2
Glutamic acid	7	7	7	7	7
Proline	1	1	1	1	1
Glycine	4	4	4	4	5
Alanine	3	3	3	2	3
Cystine	3	3	3	3	3
Valine	4	5	5	4	5
Isoleucine	2	1	1	2	1
Leucine	5	6	6	6	6
Tyrosine	3	4	4	4	4
Phenylalanine	4	3	3	3	3
Histidine	2	2	2	2	2
Lysine	1	1	1	1	1
Arginine	1	1	1	1	1
Ammonia	6	6	5	6	6

のアミノ酸含量に関しては前記 Sanger, Harfenist の他に最近も Grassmann 等[12]の報告があり Ileu 及 Val の含量に多少の問題がある様であるがここでは Harfenist の結果を取る）。

Tab. 3 により鯨・牛・豚・羊の4種インシュリンのアミノ酸含量を比較すると——4種インシュリン共同一含量のアミノ酸：Asp, Glu, Pro, CyS, His, Lys, Arg 及アミド基。モル当りの残基数も4種同一である。鯨のみが特異的に異るもの：Leu, Tyr, Phe に対し羊では Gly，豚では Ala が特異的に量を異にして存在するアミノ酸である。

この他鯨インシュリンは Thr が牛より1分子多く豚と同一，Val は牛より1分子少く豚と同一，Ileu が牛より1分子多く豚と同一で豚インシュリンに最も近い類似性を示す。但し豚より Ala と phe を各1分子多く Leu と Tyr を各1分子少く含有している。この様に4者共アミノ酸残基数は同一で且 Mmin. も極めて酷似しているも構成アミノ酸含量を相互に若干異にしている。

インシュリンのホルモン活性と構造との問題に於て，ACTH, Oxytocin, Vasopressin の如き小分子の

peptide fragment を酸，アルカリ，各種蛋白酵素による水解で得ようと Freudenberg[13)—16)]，Butler[17)18)]，Phillips[19)] 及 Harris[20)] 等多数の研究者が努力し来つたが，S-S 結合[13)] phenol 性 OH[21)]，若干の遊離 carboxyl 基[13)] 等が活性に関係ある事，C- 末端の Asp (NH_2)[20)] が或程度関係する事が判明したに止まる。同様の報告[22)] が昨年も出されたが矢張り negative work であつた。但し Rockefeller 研究所の Merrifield & Woolley[23)] の Strepogenin 活性の pentapeptide (Ser-His-Leu-Val-Glu——先に Sanger も取出している) を証明した事は注目に値する。近い将来新しい発展が期待される。4種インシュリンを比較する時若干の種属差が見られるが生物活性その他殆ど同一である事は之らの種属差を示すアミノ酸のインシュリンの性質に与える影響が小なる事を示し，従つてホルモン活性は之等アミノ酸とは関係が薄いものと考える。

要　　約

結晶鯨インシュリンのアミノ酸組成を Moore & Stein の Dowex 50 のイオン交換クロマトグラフ法により定量し豚・牛・羊等陸上動物のインシュリンとの種属特異性を見た。

(本実験遂行に当り本学村田研究室の各位及び久保周一郎講師に多大の御援助を頂いた。厚く謝意を表す。)

文　　献

1) Scott, D. A. (1931). *J. Biol. Chem.* 92, 281.
2) Wasserman, P. & Mirsky, I. A. (1942). *Endocrinol.* 31, 115.
3) Sanger, F. (1949). *Nature* 164, 529.
4) Lens, J. & Evertzen, A. (1952). *Biochim. Biophys. Acta* 8, 332.
5) Harfenist, E. J. (1953). *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5528.
6) Brown, H., Sanger, F. & Kitai, R. (1955). *Biochem. J.* 60, 556.
7) 斎藤・石原・伊藤・藤野 (1956). 北大水産彙報 7, 159.
8) 柴田 (1952). 福岡医誌 43, 41., 日本特許 No. 200,763
9) Moore, S. & Stein, W. H. (1951). *J. Biol. Chem.* 192, 663.
10) Schram, E., Moore, S. & Bigwood, E. J. (1954). *Biochem. J.* 57, 33.
11) Hirs, C. H. W., Stein, W. H. & Moore, S. (1954). *J. Biol. Chem.* 211, 941.
12) Grassmann, W., Strobel, R., Hannig, K & Deffner-Pröckl, M. (1956). *Z. physiol. Chem.* 305, 21.
13) Freudenberg, K., Dirscherl, W., & Hermann, E. (1931) *Ibid.* 202, 128.
14) ——— Dirscherl, W., & Weiss, E. (1931). *Ibid.* 202, 159.
15) ——— & Eyer, H. (1932). *Ibid.* 213, 226.
16) ——— & Wegmann, J. (1935). *Ibid.* 233, 159.
17) Butler, J. A. V., Dodds, E. C., Phillips, O. M. P. & Stephen, J. M. L. (1949). *Biochem. J.* 44, 224.
18) ——— Phillips, D. M. P., Stephen, J. M. L. & Creeth, J. M. (1950). *Biochem. J.* 46, 74.
19) Phillips, D. M. P. (1952). *Biochem. J.* 50, 479.
20) Harris, J. I. & Li. C. H. (1952). *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2945.
21) Harrington, C. R. & Neubauer, A. (1936). *Biochem. J.* 30, 809.
22) Nicol, D. S. H. W. & Smith, L. F. (1956). *Biochem. J.* 64, 17.
23) Merrifield, R. B. & Woolley, D. B. (1955). *Arch. Biochem. Biophys.* 56, 265.