



Title	結晶鯨インシュリンに関する研究：第3報 アミノ末端並びにカルボキシル末端
Author(s)	伊藤, 裕三
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 8(3), 238-241
Issue Date	1957-11
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/23009">http://hdl.handle.net/2115/23009</a>
Type	bulletin (article)
File Information	8(3)_P238-241.pdf



[Instructions for use](#)

# 結晶鯨インシュリンに関する研究

## 第3報 アミノ末端並びにカルボキシル末端

伊藤 裕三

(北海道大学水産学部水産化学教室)

### Studies on Crystalline Whale Insulin

#### III. N- and C-terminal residues

Yasuzô IIÔ

#### Abstract

The dinitrofluorobenzene method and the hydrazine method have been applied to the identification and quantitative determination of N- and C-terminal residues of whale insulin respectively. Alike as in other insulins (ox, sheep, and pig), phenylalanine and glycine were found to be N-terminal residues, and alanine and asparagine to be C-terminal residues.

From quantitative studies, the minimum molecular weight of whale insulin was estimated as 5,900.

#### 緒言

牛インシュリンのアミノ末端に就ては、1935年 Jensen<sup>1)</sup> がヒダントイン法で Phenylalanine であると報告しているが、定量的でなく且つ又 Phenylalanine だけと云う事に疑問があつた。次いで1945年来、Sanger<sup>2)3)4)</sup> が DNFB を用い牛、豚、羊のインシュリンのアミノ末端として Phenylalanine と Glycine とを定量した。当教室では、先に DNFB を用いて結晶鯨インシュリンのアミノ末端を Paper chromatography により定性試験を行い、牛、豚、羊等と同じく Phenylalanine と Glycine である事を認めたが<sup>5)</sup>、今回充分量の試料を調製し得たので、更にこれを定量的に検討した。

DNP-アミノ酸の定量には従来 Sanger の行つた Silica gel chromatography が広く用いられているが、種々の見地より著者は Amberlite IR-112 を用いる方法<sup>6,7)</sup> に従つて行つた。

カルボキシル末端に就ては、酵素的及び化学的の二方法があるが、酵素法では牛インシュリンについて、Lens (1949)<sup>8)</sup> がカルボキシペプチダーゼを作用させ Alanine を見い出したが、他に Glycine, Valine, Leucine, Tyrosine, などの痕跡を認めている。其の後、Harris (1952)<sup>9)</sup> は同一方法で Alanine, Asparagine, Aspartic acid を検出し、更に Sanger (1953)<sup>4)</sup> ちもこの酵素をアセチルインシュリンに作用させ、Alanine, Asparagine, Aspartic acid を認めた。其の後鯨インシュリンに就ても同一の結果を報告した(1956)<sup>10)</sup>。一方化学的方法として Fromageot (1950)<sup>11)</sup> ちは  $\text{LiAlH}_4$  で Glycine と Alanine を、又 Chibnall と Rees (1951)<sup>12)</sup> は  $\text{LiBH}_4$  で Glycine と Alanine とを検出した。更に赤堀等 (1952)<sup>13)</sup> はヒドラジン法で Glycine と Alanine とを検出している。当教室では先に結晶鯨インシュリンのカルボキシル末端を赤堀等と同様ヒドラジン法にて定性試験を行い Alanine, Asparagine, 及び  $\alpha$ -Aminobutyric acid を検出した<sup>5)</sup>。今回著者はヒドラジン法と DNFB 法を併用し Amberlite IRC-50 にて定量を行い Alanine, Asparagine を C-末端基として確認した。

鯨インシュリンに就て末端基の定量的な報告が未だないのでここに報告する。

#### 実験の部

試料、前報<sup>14)</sup>の当教室調製イワシ鯨 (*Balaenoptera borealis* LEBSON) の結晶インシュリンを2回再結を

繰返した。

**【A】アミノ末端及び遊離アミノ基**

DNP-インシュリンの調製

100mgの再結晶インシュリンと100mgのNaHCO<sub>3</sub>を5mlの水に溶かし、10mlのC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OHと0.5mlのDNFBを加え、2時間振盪し、生じたDNP-インシュリンの黄色沈澱を遠心分離後、水、エタノール、及びエーテルで洗滌し乾燥した。このもののAmido-Nは0.96%であり、同様操作で行なつた結晶鯨インシュリンでは1.34%であつたので、100mgのDNP-インシュリンは71.5mgのインシュリンに相当する。

末端基の定性

10mgのDNP-インシュリンを10mlの20% HClで8時間煮沸し、冷却後、エーテルで3回抽出、エーテル区分を水で洗滌し、洗液は水溶液区分に合した。エーテル区分はエーテル除去後、極く微量のエーテルに再び溶かしPaper chromatographyにより(溶媒、ブタノール：酢酸・水、9：1：7混合物上層、とフェノール・水、4：1混合物)、DNP-GlycineとDNP-Phenylalanineを確認した。水溶液区分は乾固後、更に8時間20% HClで加水分解し、常法に従い、HClを除去し、少量の水に溶かし上記溶媒を用いてPaper chromatographyを行い、ε-DNP-Lysineを確認した。

末端基の定量

各20mgのDNP-インシュリンを10mlの20% HClで8時間、4時間煮沸し、冷却後、各々エーテルで3回抽出し、エーテル区分は水で洗滌し、洗液は水溶液区分に合した。エーテル区分はエーテル除去後1% HCl・酢酸(8：2)の混液を溶媒としてAmberlite IR-112(H-型0.9cm×15cm)カラムにて溶出分析を行つた。又水溶液区分は濃縮乾固後、更に20% HClにて8時間加水分解を行ひ、Amberlite IR-112(Na-型0.9cm×15cm)カラムにてM/40クエン酸緩衝液を溶媒として溶出分析を行つた。それぞれの定量結果は第1表に示す通りである。

Table 1. The contents of N-terminal amino acids and lysine of whale insulin

Time of hydrolysis	DNP-amino acid	Estimated values No. of DNP-amino acids per mole of insulin	Recovery factor	Corrected values No. of DNP-amino acids per mole of insulin
8	DNP-Gly	0.43	40%	1.07
	DNP-Phe	0.75	74	1.01
	ε-DNP-Lys	0.75	89	0.84
4	DNP-Gly	0.46	57	0.81
	DNP-Phe	0.65	87	0.75
Average	DNP-Gly			0.94
	DNP-Phe			0.88

**【B】カルボキシル末端及び酸性アミノ酸**

末端基の定性

10mgの結晶インシュリンに0.5mlの無水ヒドラジンを加え、10時間煮沸、冷却後、硫酸デシケーター中で濃縮乾固、5mlの水に溶かし、これに0.3mlのベンズアルデヒドを加え過剰のヒドラジンを除き、濃液を濃縮しこれを極く微量の水に溶かしPaper chromatographyによりAspasagine, Alanine, α-Aminobutyric acidの3つを認めた。

末端基の定量及び酸性アミノ酸の定量

カルボキシル末端並びに酸性アミノ酸の定量<sup>10)17)</sup>にはアルデヒド処理をしてヒドラジッドを除去する方法

とアルデヒド処理をしない方法とがあり、前者は Tyrosine, Tryptophane, 及び Histidine が末端にある場合、後者は特に酸性アミノ酸のペプチド中の結合状態を調べるのに適している。鯨インシュリンの末端は定性試験で上記3種のアミノ酸を認めているので後者の方法に従って定量を行った。即ち 10mg の再結晶インシュリンに 0.5ml の無水ヒドラジンを加え、10時間煮沸後、DNP 化及びアルカリ抽出を行い、C末端区分を得、これを Amberlite IRC-50 (H型 0.9cm×30cm) にて分別し、各 Band を切り取りアセトン・水 (1:1) の混合液にて溶出し 360m $\mu$  にて比色定量した。次にヒドラジッド区分即ち 2% 重曹に抽出されずに残った酢酸エチル層を減圧で乾固し、6N HCl で 5時間加水分解して生じた DNP-アミノ酸を酢酸エチルで抽出し、Amberlite IRC-50 (H型 0.9cm×30cm) で分離して、DNP-Aspartic acid, DNP-Glutamic acid を定量した。測定結果は第 2 表に示す。

Table 2. The contents of C-terminal and acidic amino acids of whale insulin

Amino acid residues	State of combination	Estimated values No. of amino acid residues per mole of insulin	Recovery factor	Corrected values No. of amino acid residues per mole of insulin	Total number <sup>(14)</sup> of moles
Ala	C-terminal	0.86	90 %	0.92	3
Asp(NH <sub>2</sub> )	C-terminal	1.04	93	1.11	
Asp(NH <sub>2</sub> )	peptide form	1.46	78	1.88	
Glu(NH <sub>2</sub> )	peptide form	2.25	78	2.89	7
Glu					
Amide					6

考 察

第 1 表に示す通り鯨インシュリンのアミノ末端としては Glycine 及び Phenylalanine を各 1 箇持ち、分子中に Lysine が 1 箇含まれている事が確認された。この結果は従来の牛、豚、羊等の結果と全く同一である。

第 2 表に示す通り鯨インシュリンのカルボキシル末端としては Alanine 及び Asparagine を各 1 箇持ち、インシュリン分子中には Asparagine 2 箇と Glutamic acid 7 箇のうち 3 箇がアマイドとして存在し、4 箇が -COOH をもって存在していることが確認された。これらの結果は牛、豚、羊等と全く同一である。なお定性試験で検出された  $\alpha$ -Amino butyric acid が定量的な操作で認められなかつたのは第 2 報に於て報告した

Table 3. Minimum molecular weight of whale insulin calculated from terminal amino acid residues

Terminal amino acids	Minimum molecular weight
Gly	5,869
Rhe	6,183
Ala	6,590
Asp (NN <sub>2</sub> )	5,260
Average	5,975

アミノ酸分析でも認められなかつた事から考えて二次的生成物であると考え。既往に於て化学的方法を用いた場合<sup>(11),(12),(13)</sup> Glycine が Alanine, Asparagine の他にカルボキシル末端として報告され、酵素を用いる場合<sup>(4,8,9,10)</sup> には、これが認められないことから問題となつて居るが今回の場合も DNP-Glycine 区分の痕跡を Amberlite

IRC-50 のカラム上で認めたので、この部分を溶出しアンモニヤにより DNP を分離し、Paper chromatography にて再び確認した。反応の際に Glycine を C-末端にするような特別に切れやすい場所があるのかもしれないが詳細は明らかでない。

これら両末端基の定量値より鯨インシュリンの最少分子量を求めると第 3 表に示す通りである。

即ち、鯨インシュリンの最少分子量は約 6,000 である。なお過去に於て牛、豚、羊等のインシュリンに就いて Harfenist & Craig (1952)<sup>17)</sup>, Sanger (1955)<sup>18)</sup>, Sluyterman (1955)<sup>19)</sup>, Fredericq (1956)<sup>20)</sup>, (1957)<sup>21)</sup> 等が得られた結果も約 6,000 であつた。

#### 要 約

結晶鯨インシュリンのアミノ末端並びにカルボキシル末端を Amberlite IR-112 及び IRC-50 によるクロマトグラフィで定量し豚、牛、羊等陸上動物のインシュリンと全く同一である事を認めた。

本実験遂行に当り御指導を賜つた斎藤匡行教授、石原義雄助教授に対し深甚の謝意を表す。

#### 文 献

- 1) Jensen, H. & Evxns, E. A. (1935). *J. Biol. Chem.* 108, 1.
- 2) Sanger, F. (1945). *Biochem. J.* 39, 507.
- 3) Brown, H. Sanger, F. & Kitai, R. (1955). *Biochem. J.* 60, 556.
- 4) Sanger, F. & Thompson, E. O. P. (1953). *Biochem. J.* 53, 366.
- 5) 斎藤・石原・横山 (1955). 日本水産学会年會講演會 (於東京 4 月 4 日).
- 6) 関 (1954). 日化, 75, 1267.
- 7) 関 (1956). 赤堀・水島編 蛋白質化学 IV, 229p. 東京; 共立出版.
- 8) Lens, J. (1949). *Biochim. Biophys. Acta.* 3, 367.
- 9) Harris, J. I. (1952). *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2944.
- 10) Harris, J. I. Sanger, F., & Naughton, M. A. (1956). *Arch. Biochem. Biophys.* 65, 427.
- 11) Fromageot, C. Jutisz, M., Meyer, O. & Penasse, L. (1952). *Biochim. Biophys. Acta.* 6, 283.
- 12) Chibnall, A. C. & Rees, M. W. (1951). *Biochem. J.* 48, Xvii.
- 13) 赤堀・成田・大野 (1952). *Bull. Chem. Soc. Japan.* 25, 213.
- 14) 斎藤・石原・伊藤・藤野 (1957). 北大水産彙報. 8, 54.
- 15) 大野 (1956). 赤堀・水島編・蛋白質化学 IV, 250p. 東京; 共立出版.
- 16) 大野 (1953). *J. Biochem.* 40, 621.
- 17) Harfenist, E. J. & Craig, L. C. (1952). *J. Am. Chem. Soc.* 74, 3087.
- 18) Sanger, F. (1955). *Biochem. J.* 60, 541.
- 19) Sluyterman, L. A. E. (1955). *Biochim. Biophys. Acta.* 17, 169.
- 20) Fredericq, E. (1956). *Arch. Biochem. Biophys.* 65, 218.
- 21) Fredericq, E. (1957). *J. Am. Chem. Soc.* 79, 599.