



Title	結晶鯨インシュリンに関する研究：第1報 分離及び結晶化
Author(s)	斎藤, 恒行; SAITÔ, Tsuneyuki; 石原, 義雄 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 7(2), 159-164
Issue Date	1956-08
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/22961">https://hdl.handle.net/2115/22961</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(2)_P159-164.pdf



# 結晶鯨インシュリンに関する研究

## 第1報 分離及び結晶化

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

#### I. Isolation and crystallization

Tsuneyuki SAITÔ, Yoshio ISHIHARA, Yasuzô ITÔ

and Masahiko FUJINO

#### Abstract

Various purification procedures were examined for chemical and clinical studies of whale insulin. It was ascertained that the method of extraction with dilute acetone and then precipitation by zinc sulfate was most suitable for the preparation of the crude whale insulin. For the crystallization of insulin, Scott's method was improved to give a good yield from the crude insulin preparation. The procedure used by the present writers differs from Scott's one in respect to requiring the addition of a small amount of acetone.

The crystals of whale insulin prepared by this method have the same microscopic appearance and the same physiological properties as those of cattle insulin.

陸上動物のインシュリンに就ては、古くより多くの研究がなされている。就中牛のインシュリンに就ては1926年 Abel が結晶として取り出す事に成功して以来、結晶化の方法も種々改良され1935年 Scott<sup>1)</sup>の考案による方法が今日広く用いられるに至り工業的な実施も行われている。又硬骨魚類<sup>2)3)4)</sup>のインシュリンに就ても結晶化が成功している。

著者等<sup>5)6)</sup>は Scott の方法により鯨インシュリンの結晶化を行い、更にこれ等、牛、魚、鯨三種のインシュリンの生理学的活性を比較して最高作用発現時間に多少のずれを生ずるが、其の効力は殆んど差のないことを明らかにしている。

du Vigneaud 等<sup>7)</sup>は牛、豚の脳下垂体後葉ホルモン Vasopressin に就て、その構成アミノ酸を調べ、豚 Vasopressin には Arginine が存在せずに Lysine が入れ替っている事を示し、動物の種特異性がホルモンのアミノ酸組成に見られる事を明らかにしているが、インシュリンに於ける種特異性の有無も興味をひく所である。

結晶インシュリンの蛋白質化学的研究も1946年来 Sanger 一派の研究によつて、牛、豚、羊等の結晶インシュリンの構成アミノ酸、N末端、C末端等が明かにされ、1951年に Sanger<sup>8)</sup>により牛インシュリン、更に1955年に Brown<sup>9)</sup>等によつて、豚、羊のインシュリンの構造が決定されるに至つた。これ等の結果によると、牛、豚、羊相互間にその構成アミノ酸に若干の差を示し種特異性が認められた。即ち1949年に Sanger<sup>10)</sup>の定性的な結果、1952年に Harfenist 及び Craig 等<sup>11)</sup>の定量的な結果によると第一表に示した如く、Serine, Glycine, Threonine, Alanine, Valine, Isoleucine の含量に差のある事が明らかにされた。

N末端は三者共 Phenylalanine, Glycine であり、C末端は Sanger の行なつた Carboxypeptidase 法によると Alanine, Asparagine が検出され、Hydrazine 法によると Alanine, Glycine であるとされている。この

Table 1. Amino acid composition of insulin from different sources. (Harfenist *et al.* 1952)<sup>11)</sup>  
(number of residues/mole of insulin)

Amino acid	Beef I.	Pork I.	Sheep I.
	mol. wt. 5734	mol. wt. 5778	mol. wt. 5704
Serine	2.89	2.79	2.07
Threonine	0.97	1.77	0.96
Glycine	3.94	3.94	4.76
Alanine	2.91	2.17	2.99
Valine	4.68	3.68	4.80
Isoleucine	0.66	1.54	0.69

結果三者の構造は Phenylalanine 鎖に於ては全く同一であるが、Glycyl 鎖では、その一部に相違が認められたのである。魚インシュリンに就てはC末端に Lysine が特異的に検出されている<sup>12)</sup>。鯨インシュリンに関しては著者等の定性的な研究によると構成アミノ酸は牛等のインシュリンと殆んど同じであるが、鯨には  $\alpha$ -Aminobutyric acid が特異的に検出され、又 N 末端は牛等と全く同様 Phenylalanine, Glycine を、C 末端では Glycine, Alanine の他に  $\alpha$ -Aminobutyric acid を特異的に検出した。

著者等は以上の結果に基づき鯨インシュリンの構成アミノ酸の完全分析、末端基、其の他理化学的研究を定量的に行う考へのもとに、其の第一段階として大量の結晶を得る為、従来の Scott の結晶化の方法を検討しこれに改良を加え良好な結果を得る事が出来たので、こゝに報告する。

## 実験の部

I 試料, 1955年5月29日金華山沖にて捕獲されたイワシ鯨 (*Balaenoptera borealis* LESSON) 体長43呎, ♀の臍臓を凍結貯蔵したものをを用いた。

II 力価の測定, Marks 法及び Toronto II 法に準じ、血糖定量は常法通り Hagedorn-Jensen 法に従つた。

III 実験経過並に考察

### 1 粗インシュリン製造

#### A Alcohol 抽出法

##### i) Scott 法

臍臓磨碎物 1 kg を 2 l の塩酸性アルコール (pH2.2, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH : CH<sub>3</sub>OH, 9 : 1 vol) にて、常温 5 時間抽出し、濾過後其の濾液に 10% アンモニヤ水を加え pH 8 とし、不純蛋白質を沈澱除去する。得られた濾液に 3 N 硫酸を加え pH 3 以下とし、濾液の 1/2 量になる迄 35°C 以下で減圧濃縮後直ちに温度を 50°C に上げ約 5 分間保つた後急冷し脂肪を遊離せしめて除去。かくして得られた濾液に食塩を 25% 加えて塩析を行い、一夜放置後、沈澱を取り N/100 塩酸に溶かし再び食塩にて 15% 塩析を行つた。こゝに得られた塩析物をアセトンで脱水洗滌後、硫酸デシケーター中で減圧下乾燥した。

##### ii) 硫酸亜鉛、酢酸亜鉛添加法

上記方法の中濃縮を 1/2 量に止め、脂肪除去後の濾液に飽和硫酸亜鉛溶液、飽和酢酸亜鉛溶液を夫々濾液 1 l 当り 50 ml の割に加え、直ちに N/2 苛性ソーダにて pH5.6 とし、一夜放置後得られた沈澱を集め N/100 塩酸に溶かし 25% 塩析、15% 塩析を行い、上述の操作と同様にして乾燥した。

#### B Acetone 抽出法

臍臓磨碎物 1 kg を 1.5 l の塩酸性アセトンにて室温 5 時間抽出を行い、pH 8 沈澱を行なつた後、約 1/2 量迄減圧濃縮を行い、脂肪を除去し得られた濾液に飽和亜鉛液、飽和酢酸亜鉛溶液を濾液 1 l に対し 50 ml ずつ加え pH5.6 とし、一夜放置後得られた沈澱を N/100 塩酸に溶かし、食塩にて 25%、15% 塩析を行なつた後、アルコール法と同様の操作によつて乾燥した。

上述の種々の方法で得られた粗インシュリンの収量は第二表に示す如くである。

Table 2. Insulin yields by various methods

Methods		Crude Insulin		
		g per kg of pancreas	I. U. per mg of preparation	I. U. per kg of preparation
Extraction with alcohol	Scott's method	0.586	2.5	1465
	Ppt. by zinc sulfate	0.152	3	456
	Ppt. by zinc acetate	0.146	2	292
Extraction with acetone	Ppt. by zinc sulfate	0.730	2	1460
	Ppt. by zinc acetate	0.234	2	468

この結果 Scott 法並にアセトン抽出硫酸亜鉛法が良い結果を示す事がわかつた。しかしながら Scott 法は後段の精製段階に於て共存不純物の除去が困難で多量の損失を見た。この点アセトン法に於ては柴田<sup>13)</sup>の詳細な研究にも明らかな様に鯨インシュリン製造には最も適当な方法と考えられる。柴田の結果では、この方法で大体膵臓kg当り700単位であつて著者等の場合に於ても本標品の等電点沈澱2回繰返すことによりmg当り約10単位のものとする事が出来大体近似した値が得られた。

## 2 結晶化

インシュリンの結晶化には Abel法<sup>14)</sup>, Scott法<sup>1)</sup>, Harington法<sup>15)</sup>, Stallman法<sup>16)</sup>等があるが、最も広く用いられているのは Scott 法であつて、鯨インシュリンについては、著者等<sup>5)</sup>も Scott 法で結晶化を行なつてゐる。しかしながら、この方法を鯨インシュリンに其のまま適用するときは、pH5.9に近づけると相当量が Amorphous に移行し結晶化が仲々困難であつた。其の上収量の面でも常に一定の値を示さず、良い時で60%、悪い時には10%前後であつた。そこで著者等は Stallman の鉄イオンと亜鉛イオンを共に加えて晶出せしめる方法を行なつて見たが収量は一定となつたが非常に悪かつた。次に Scott 法でアセトンを含む母液より結晶の晶出する事が認められたので、アセトン溶液より溶解度の差により晶出する可能性があるものと考え第一図に示す様に処理した所極めて良好な結果が得られたのである。その結果は第三表に示す。

Table 3. Yields of crystal insulin from crude insulin

Methods	Crude Insulin	Yield of Crystals	Recovery
Authors' method	1. 1.000 I.U.	910 I.U.	91%
	2. 1.000	866	86
	3. 1.000	800	80
mean		858	85
Scott's method	1.000	550	55
Stallman's method	1.000	300	30

第三表に示す如く著者等の方法は平均約85%の収量を得る事が出来、Scott 法、その他の方法に比し鯨インシュリンの結晶化には適当であると考えられる。

第二図に示す鯨インシュリン activity 測定結果から考察すると、鯨結晶インシュリンの効力は、牛の標準インシュリンに比しなら劣つていない事が認められる。尙対照の意味で牛及び魚の結晶インシュリンの大体同単位の血糖降下曲線を測定したが、その結果鯨インシュリンは魚インシュリンよりは牛インシュリン

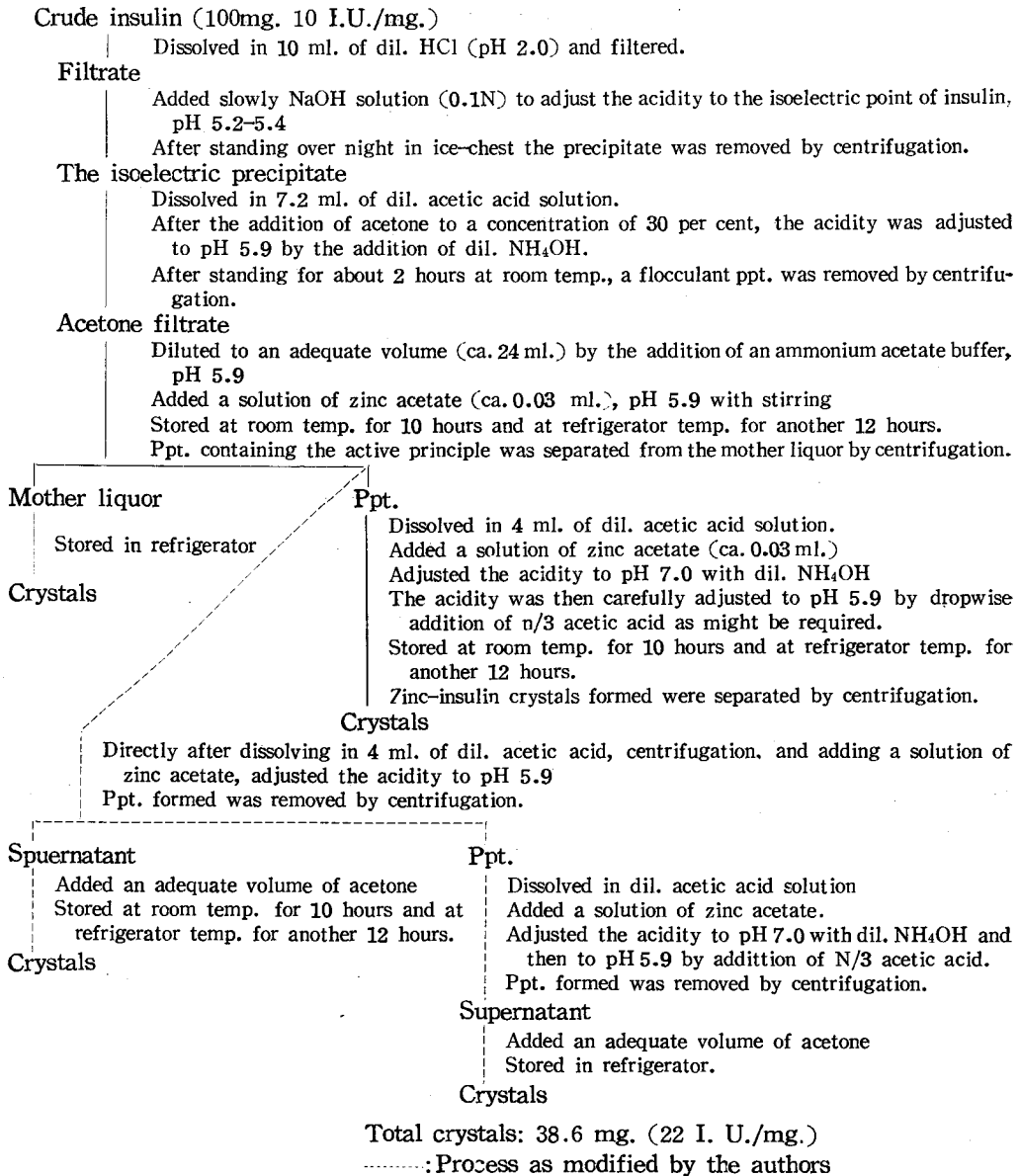


Fig. 1. Scheme for crystallization of whale insulin

に似た作用を示す事が認められた。

次に得られた鯨インシュリンの結晶の形状を第三図に示す。牛の場合では Abel の方法では斜方六面体, Harington の方法では立方体又はこれに近い斜方六面体である。鯨の場合でも大体六面体である事は同様であるが、その形は各種条件、即ち水素イオン濃度、亜鉛含量等のわずかの差によつて変化が見られる。しかし図に示す如く楔形、斜方六面体等が主である。この他或る条件下六角錐双晶の 'cut-form' が得られる。

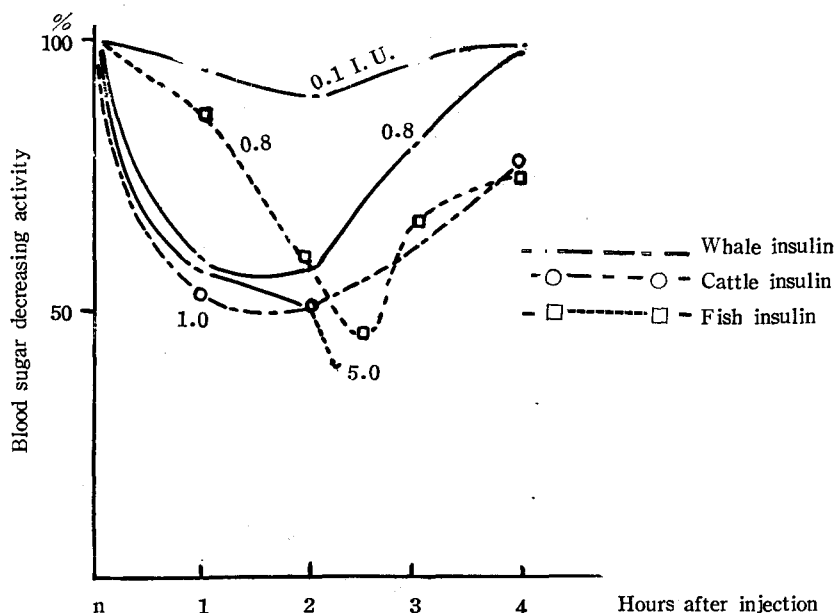


Fig. 2. Blood sugar curves following the injection of various insulin

尙本研究の遂行に当り試料の採取に多くの御便宜を計られた、日本水産女川捕鯨場研究室、後藤賢二氏に深謝する。

#### 文 献

- 1) Scott, D. A. (1934). *Biochem. J.* 28, 1592.  
Scott, D. A. & Fisher, A. M. (1935). *ibid.* 29, 105.  
Romans, R. G., Fisher, A. M. & Scott, D. A. (1940). *Ind. Eng. Chem.* 32, 908.
- 2) Jensen, H., Winterstein, O. & Geiling, E. M. K. (1929). *J. Pharm. exp. Therap.* 36, 116.
- 3) Scott, D. A. (1931). *J. Biol. Chem.* 92, 281.
- 4) 佐藤・谷野. (1948). 化領 2, 132.
- 5) 斎藤・石原・横山. (1954). 日本水産学会北海道支部例会 (於余市 10月19日) 講演.
- 6) 斎藤・石原・横山. (1955). 日本水産学会年会講演会 (於東京 4月4日) 講演.
- 7) du Vigneaud, V. (1953). *J. Biol. Chem.* 205, 249.
- 8) Sanger, F. (1951 a). *Biochem. J.* 49, 463.  
——— (1951 b). *ibid.* 49, 481.
- 9) Brown, H. Sanger, F. & Kitai, R. (1955). *Biochem. J.* 60, 556.
- 10) Sanger, F. (1949). *Nature* 24, 529.
- 11) Harfenist, E. T. & Craig, L. C. (1952). *J. Am. Chem. Soc.* 74, 4216  
——— (1953). *ibid.* 75, 5528.
- 12) 赤堀. (1954). 蛋白質化学 II, 177p.
- 13) 柴田. (1952). 福岡医誌 43, 41.
- 14) Abel, J. J. (1925). *Science* 47, 169.  
——— (1927). *J. Pharmacol.* 31, 65.
- 15) Harington, C. R. & Scott, D. A. (1929). *Biochem J.* 23, 393.
- 16) Stallman, B. (1937). *Arch. exp. Path. und Pharm.* 185, 77.

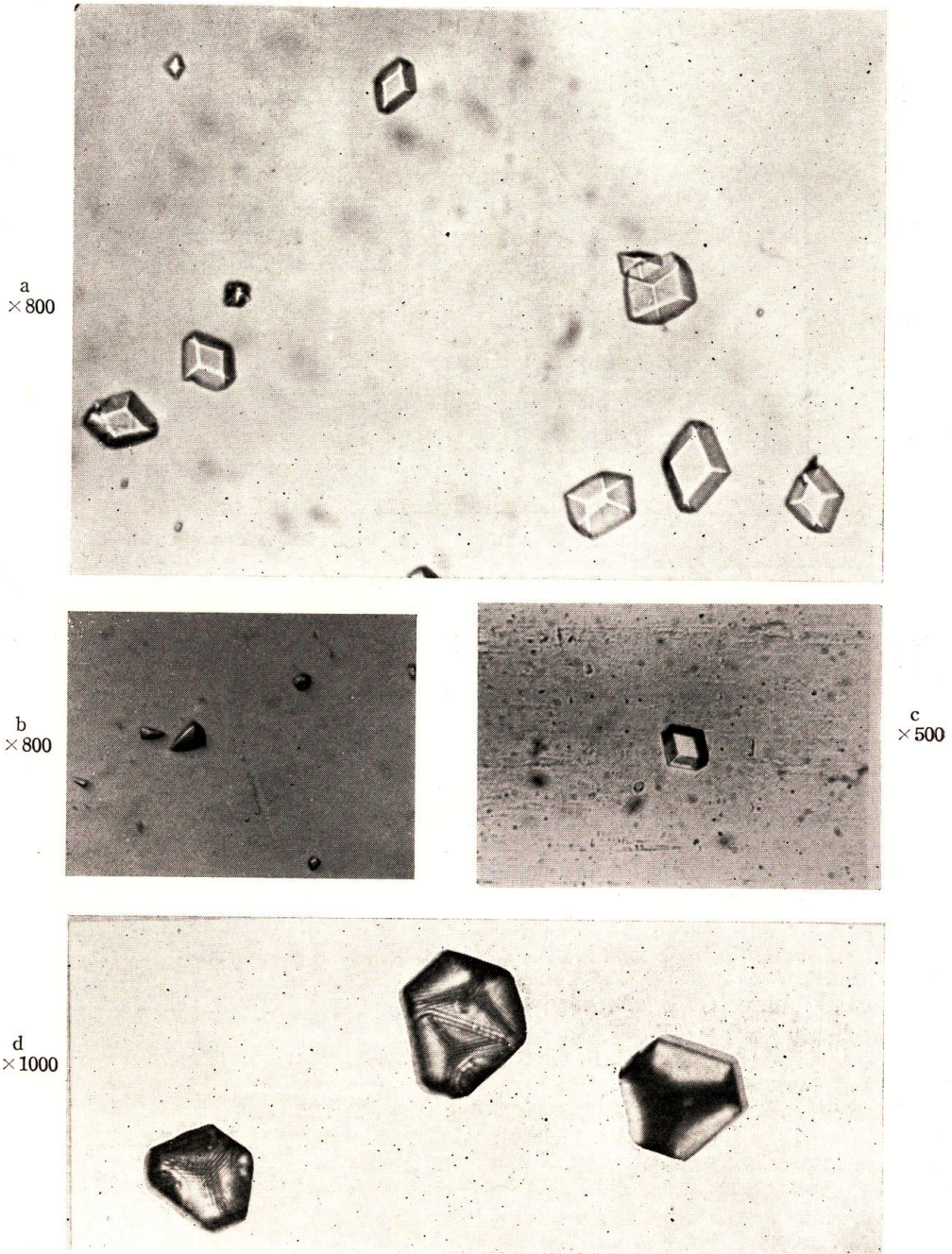


Fig. 3. Crystals of whale insulin