



Title	結晶鯨Pepsin : 第3報 Paper Chromatographyによる構成アミノ酸組成の検索
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, 8(3), 220-223
Issue Date	1957-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23006
Type	departmental bulletin paper
File Information	8(3)_P220-223.pdf



結 晶 鯨 Pepsin

第3報 Paper Chromatography による構成アミノ酸組成の検索

斎藤恒行・石原義雄・伊藤裕三

(北海道大学水産学部水産化学教室)

佐々木 禎一

(札幌医科大学微生物学教室)

Studies on Crystalline Whale Pepsin

III. Analysis of amino acid by paper chromatography

Tsuneyuki SAITÔ, Yoshio ISHIHARA, Yasuzô ITO and Teiichi SASAKI

Abstract

The following amino acids were found as the constituents in the whale pepsin by means of paper chromatography of its acid- and alkali- hydrolysates: cystine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, serine, threonine, lysine, histidine, arginine, alanine, tyrosine, α -aminobutyric acid, proline, valine, methionine, tryptophane, phenylalanine, and leucines. The pepsin contains α -aminobutyric acid as a specific component.

Between the two whale and swine pepsin, some differences could be found in the relative contents of the constituent amino acids. Whale pepsin showed higher contents for basic amino acids (arginine, lysine, and histidine) in the case of acid hydrolysates and for S-containing amino acids than swine pepsin in the case of alkali hydrolysates.

緒 言

前報^{1,2)}に於て鯨 pepsin が豚 pepsin とは若干性質を異にする事を認めたが、特に至適 pH・等電点・電気泳動的挙動の相異なる事より構成アミノ酸組成の比較を試みた。paper chromatographyによるアミノ酸組成の種属特異性検索に関しては、先に Sanger³⁾(1949)が豚・牛・羊の insulin に就て serine, glycine, threonine, alanine 含量の相異なる事を認めた。(これは後に Lens and Evertzen—1952, Harfenist—1953等の完全分析により確認せられた。)又、安藤・石井⁴⁾(1952)は邦産鯨白子蛋白 clupein 中に北欧産のものに存在しない glycine を特異的に含有する事を示している。更に Tuppy and Palés⁵⁾(1955)は cytochrome C に就て牛・鮭・鶏間に alanine, serine 含量を異にする事を報告している。

ここに鯨・豚両 pepsin の構成アミノ酸を paper chromatography により検索した所、鯨 pepsin には α -amino butyric acid を特異成分として含有する他、塩基性アミノ酸・含 S アミノ酸の含量の大なる傾向が見られ、その元素組成に於て S-含量の大なる事、等電点の相異なる事などに合致する結果が示された。

Moore & Stein 法によるアミノ酸完全分析に就ては次の機会に報告する。

実 験 の 部

試料

鯨 pepsin・豚 pepsin 共に前報²⁾と同一結晶試料を用いた。

Paper chromatography

試料の酸分解・アルカリ分解液に就て二次元法で paper chromatography を行い、これを更に水解液の濃

紙泳動・一次元展開法により group separation を行い各 fraction の抽出液に就て特異反応・標準アミノ酸との対比を行つて個々のアミノ酸を同定した。

酸分解—上記結晶 pepsin 50mg に 6 N-HCl 0.8ml. 添加, 封管の下 110~115°C 油浴中 15~17 時間分解, 水解液を湯浴上濃縮, 蒸発乾固, 再蒸留水で溶解, 濾過して humin 質その他不溶性残渣を除去, 再び蒸発乾固, これを繰返して可及的酸を除去後中和・濾過・濃縮・蒸発乾固後 0.5ml. の蒸留水に溶解して供試。以下能う限り定量的に操作した。

アルカリ分解—結晶 pepsin 50mg に 10 倍量の飽和バリタ水を加え封管の下湯浴内 4 時間水解後稀 H_2SO_4 で中和してバリウムを除去, 濾液を湯浴上濃縮, 少量の再蒸留水で溶解, これを 3 回繰返して最後に 0.5ml. 蒸留水に溶解して供試, 以下前同様出来る限り定量的に操作した。

展開—東洋濾紙 No.50 (40cm×40cm) を用い一端より 5cm×5cm の所に試料 0.2ml. を附し 21~23°C の下で上昇法によつた。溶媒は一次に *n*-butanol:酢酸:水 (容量比 9:1:7 の上層), 二次に phenol:水 (容量比 4:1) を用いそれぞれ約 22 時間及 27 時間 (約 30cm) 展開後乾燥, 0.25% ninhydrin acetone 溶液を噴霧, 100°C に加熱発色した。

Group separation — 二次元法で検出せられた各アミノ酸を更に確認する為に次の様にして group separation を行い各 spot の抽出液に就て標準アミノ酸との対比及特異反応により同定した。即ち, 巾 15cm の前記濾紙片を用い前記 phenol:水を溶媒として一次元展開を行い一端を ninhydrin 溶液で呈色せしめた所大体 5 group に分離せられたので, 予想呈色部に対応する個所を切り取り各部を細刻, 水及微アルカリ液で抽出, この両抽出液に就て上記両溶媒を別々に用いて一次元展開を行い, 夫々に就て標準アミノ酸と対比同定した。この中第 2・3 group には酸性・中性・塩基性アミノ酸の混在が見られたので濾紙泳動により更に各 spot を分別した。即ち, 東洋濾紙 No. 50 (25cm×8cm) を用い citrate buffer (pH 4.5) を溶媒として 450volt 20mA 2 時間通電後気乾, 一端を切り取り ninhydrin で発色, spot の予想存在部位を見究めて更に 3 group に分ち各々を上と同様に溶出竝に再度両種溶媒による一次元展開により同定した。尙 valine と methionine 分別は phenol:*m*-cresol (容量比 1:1) を borate buffer (pH 9.3) で飽和したものを溶媒とした。又 leucine と isoleucine は分離せぬが達摩形の spot により両者を識別した。

特異反応—両溶媒につき一次元法による展開後乾燥し夫々の map に特異反応試薬の噴霧により発色, 標準アミノ酸と対比同定を行つた。即ち, tyrosine, tryptophane には phenol 試薬, proline 及 oxyproline には isatine 反応, arginine 竝に lysine には坂口反応, histidine には *p*-bromoanilin 反応, cystine 及 methionine には塩化白金酸試薬, arginine と lysine 竝に cystine には更に sod.nitroprusside 試薬, serine 及 threonine には sod.periodate 飽和の Nessler 試薬により同定した。

実験結果竝に考察

鯨 pepsin の HCl 及バリタ水解液の二次元展開 paper chromatogram はそれぞれ第 1 図及第 2 図に示す如くである。同様処理して得られた豚 pepsin の paper chromatogram と比較して定性的には α -amino butyric acid 以外には差が認められない。 α -amino butyric acid に就ては田中等⁶⁾ (1953) がアコヤ貝成分 conchiolin 中に同様 paper chromatography で存在を認め, これがバリタ水解液中に比較的顯著に存在し且つバリタ濃度を 40% 以上に上げるとその量が増大する傾向を示す事により水解による二次的分産物である事の可能性を見ており, 一般にアルカリ水解に際し threonine, glutamic acid より二次的生成が認められているものではあるが, 全く同様に処理した豚 pepsin 水解液には存在せず, 鯨 pepsin では酸, アルカリ両水解液に認められる事, 又鯨眼房水中⁷⁾ 及海綿の spongine 中⁸⁾ にもその存在が認められているので鯨 pepsin の特異成分として一応首肯される所と考える。

次に両 pepsin の paper chromatogram を比較して, spot の呈色度及呈色範囲より判断して第 2 表の如きアミノ酸含量の傾向が見られた。即ち, 酸分解液に就ては明かに塩基性アミノ酸含量が鯨 pepsin に多く,

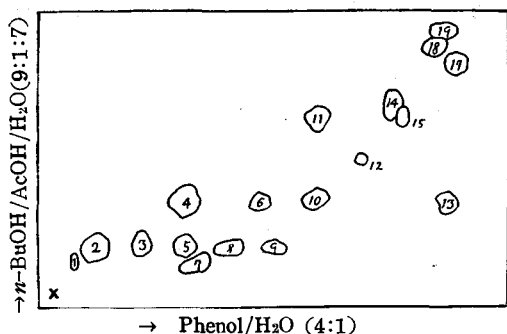


Fig. 1. Paper chromatogram of amino acids in acid hydrolysate of whale pepsin

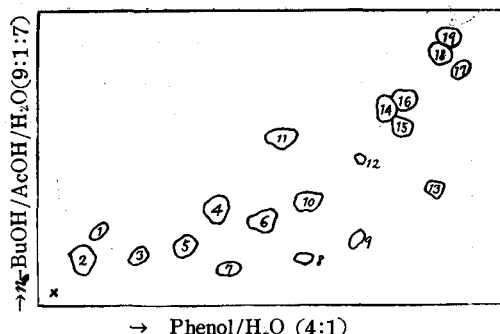


Fig. 2. Paper chromatogram of amino acids in alkali hydrolysate of whale pepsin

First phase: phenol/water (4:1). Second phase: *n*-butanol/acetic acid/water (9:1:7, upper layer).
 Ninhydrin development : 1, cystine; 2, aspartic acid; 3, glutamic acid; 4, glycine; 5, serine; 6, threonine; 7, lysine; 8, histidine; 9, arginine; 10, alanine; 11, tyrosine; 12, α -amino butyric acid; 13, proline; 14, valine; 15, methionine; 16, tryptophane; 17, phenylalanine; 18, leucine; 19, isoleucine.

Table 1. Amino acid constituents of whale and swine pepsin

Amino acid	Acid-hydrolysis		Alkali-hydrolysis		Methods of identification
	Whale pepsin	Swine pepsin	Whale pepsin	Swine pepsin	
1 Cystine	+	+	++	±	Reaction of hydrochloroplatinic acid & reaction of sod. nitroprusside
2 Aspartic acid	++(+)	+++	++(+)	+++	
3 Glutamic acid	++	++	++	++	Fractionation by ionophoresis & then Rechromatography
4 Glycine	+++	+++	++(+)	++(+)	
5 Serine	++	++	++	++	Fractation by ionophoresis
6 Threonine	++	++	+++	+++	
7 Lysine	++	+	+(+)	+	Reaction of sod. periodate
8 Histidine	++	+	+	±	
9 Arginine	+(+)	+	+	±	Fractation by ionophoresis Reaction of Sakaguchi & reaction of sod. nitroprusside for arginine & lysine
10 Alanine	++	+(+)	++	++	
11 Tyrosine	++	++	++	++	Reaction of <i>p</i> -bromo amilin for lysine
12 α -Amino-butyric acid	+	-	+	-	
13 Proline	++	++	++	++	Elution & rechromatography
14 Valine	++	++	++(+)	++(+)	
15 Methionine	+	+	+(+)	+	Reaction of sod. nitroprusside & reaction of hydrochloroplatinic acid
16 Tryptophane	-	-	++	++	
17 Phenylalanine	++	++	+(+)	++	Folin's reaction
18 Leucine	++	+++	++	++(+)	
19 Isoleucine	++	+++	++	++(+)	Elution & rechromatography

又アルカリ分解液に於ては含 S-アミノ酸含量の多い傾向を示している。一方、豚 pepsin は aspartic acid, valine, isoleucine 及 leucine 等が多い。cystine はアルカリ分解に不安定とされているが、この水解条件下ではアルカリ分解の方に強い呈色反応を示した。

ここに電気泳動的挙動並に元素組成と一致する傾向を示す結果を得たが、更に全アミノ酸の完全分析によりこれを確認する積りである。

要 約

結晶鯨 pepsin 及豚 pepsin のアミノ酸組成を paper chromatography で検索した所、鯨 pepsin には α -amino butyric acid が存在し、且つ塩基性アミノ酸及含 S-アミノ酸 (cystine, methionine) 含量が豚 pepsin に比し多い事が認められた。

(本論文の要旨は昭和29年10月日本農芸化学会北海道支部例会に於て発表した)

文 献

1. 斎藤・石原 (1956). 日農化 30, 426.
2. 斎藤・石原 (1956). 北大水産彙報 7, 147.
3. Sanger, F. (1949). *Nature* 164, 529.
4. 安藤・石井 (1952). *Bull. Chem. Soc. Japan* 25, 132.
5. Tuppy, H. & Paléns, H. (1955). *Acta Chem. Scand.* 9, 353.
6. 田中・渡多野・喜安・高木 (1953). 日化 74, 193.
7. 及川 (1925). *Jap. J. Med. Sc. Trans. Biochem.* 1, 61.
8. Low, M. (1951). *J. Marine Research* 10, 239.