



Title	唾液腺ホルモンのSubunitに関する生理化学的研究
Author(s)	中陳, 静男
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31477
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【2】

氏 名・(本籍)	なか 中	じん 陳	しず 静	お 男
学 位 の 種 類	薬	学	博	士
学 位 記 番 号	第	3 5 8 3	号	
学位授与の日付	昭和 51 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学 位 論 文 題 目	唾液腺ホルモンの Subunit に関する 生理化学的研究			
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 青 沼 繁			
	(副査) 教 授 上原喜八郎 教 授 岩田平太郎 教 授 近藤 雅臣			

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

唾液腺内分泌学説によれば耳下腺と顎下腺は協力して唾液腺の内分泌機能に重要な役割を持ち、硬組織の発育に関与する物質を内分泌している。その本態は Parotin と命名され、耳下腺より Parotin、顎下腺より S-Parotin、唾液より Saliva-Parotin・A が分離されており、また血清および尿よりそれぞれ Serum-Parotin、Uro-Parotin が分離されている。Parotin については広くその生理化学的研究が成されており、化学的には分子量130,000の糖を含む蛋白質であることが明らかにされているが、その化学構造の詳細については明らかではない。著者は Parotin が Subunit 構成であることを認め、その分離を行なった。その結果、生物学的効力を有しさらに免疫化学的特異性において Parotin と共通の抗原特異性を有する Subunit を単離することに成功し、この Subunit について物理化学的諸性質を明らかにするとともに、この Subunit が唾液腺ホルモンの作用本態と考え、その生理作用の面から血清 Ca 代謝調節に対する影響、生体内分布および Adenyl cyclase-Cyclic AMP 系に対する影響等について検討を加えた。

本 論

第一章 Parotin-Subunit の分画、精製

Parotin が Sodium dodecyl sulfate(SDS) 存在下解離を起こすことから MP-Parotin を Mercaptoethanol 存在下、SDS と conjugation を行ない Sephadex G-100によりゲル濾過を行ない 3 つの分画を得た。

得られた分画を脱塩後 Parotin の生物学的効力検定の 1 つである家兎血清 Ca 低下効力および循環

白血球一時減少後増加効力を検定すると Fr. II に効力を認め、さらに rechromatography および Preparative SDS polyacrylamide gel electrophoresis により精製を行ない単一の Fr. II-3 を得た。以後この Fr. II-3 を Parotin-Subunit と命名した。Parotin-Subunit は原料として用いた MP-Parotin と比較し家兔血清 Ca 低下効力において約25倍精製されたが、循環白血球一時減少反応は示さなかった。さらにゲル内沈降反応により Parotin-Subunit は Parotin と共通な抗原特異性を示すことを認め、SDS 処理により生物活性および抗原特異性は失われなかった。

第二章 Parotin-Subunit の物理化学的性質

Parotin-Subunit の物理化学的性質を明らかにするため分子量、等電点、アミノ酸組成、N 末端、C 末端アミノ酸および糖成分について検討を加え、さらに Parotin-Subunit の Trypsin 加水分解により得られるペプチドの生物活性、免疫化学的特異性および一次構造分析について検討を加えた。

分子量：Table I に示す如く

Table I Molecular Weight of Parotin-Subunit by Various Method

Method	Molecular weight
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	40,000
Disc electrophoresis [by Hedrik-Smith method]	major 45,300 minor 92,000
Sedimentation-diffusion	89,000
Sedimentation equilibrium [by Archbald method]	45,300

SDS Polyacrylamide gel electrophoresis により40,000であり、Hedrik-Smith 法による disc electrophoresis により45,300の主成分および92,000の微量成分を認めた。また超遠心分析による沈降常数および拡散常数からの算出により89,000および Archbald 法を用いた沈降平衡法により45,300の値を得た。以上分子量については種々の方法を用い測定した結果、最少分子量は45,000でありその他測定方法により分子量90,000の二量体として測定されることを認めた。

等電点：pH 領域4-6の Carrier ampholyte のカラムを用い電気泳動的等電点分画を行なった。その結果 Fig. 1 に示す如く pH 4.5 に明瞭の単一のピークを生じ単一性を確認したと同時にこのものの等電点は pH 4.5 であることを認めた。

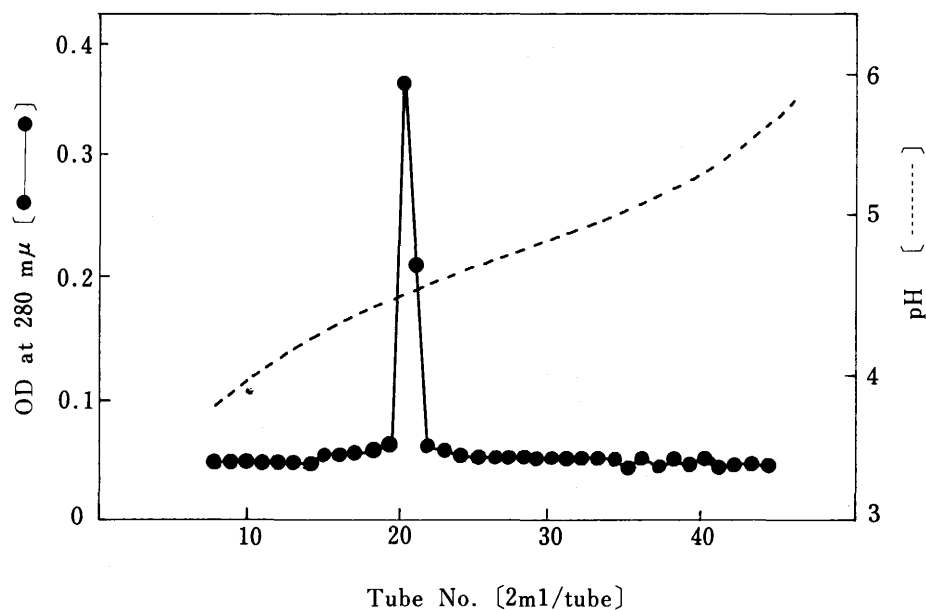


Fig. 1 Measurement of Isoelectric Point by Electrofocusing on Carrier Ampholyte Column

アミノ酸組成：Table II に示す如く Glu, Asp および Leu の含量が比較的多く認められたが Cys は検出されなかった。

Table II Amino Acid Composition of Parotin-Subunit

Amino acid	Mole%	No. of residues	Amino acid	Mole%	No. of residues
Asp	10.35	38	Ile	4.49	16
Thr	4.45	16	Leu	9.76	35
Ser	6.52	23	Tyr	2.13	8
Glu	20.77	74	Phe	1.98	7
Pro	3.62	13	Trp ^{a)}	0.99	4
Gly	6.28	23	Lys	4.88	18
Ala	8.46	30	His	1.26	5
Val	4.20	15	Arg	7.44	27
Met	2.22	8			

a) By ultraviolet absorption method

N末端およびC末端アミノ酸：N末端アミノ酸は Dansyl 法により Glyであることを認めた。C末端アミノ酸は Carboxypeptidase Aにより経時的に遊離してくるアミノ酸を定量した結果 Leuであることを明らかにし、そのC末端配列は -Val-Ser-Ala-Thr-Leuであることを認めた。

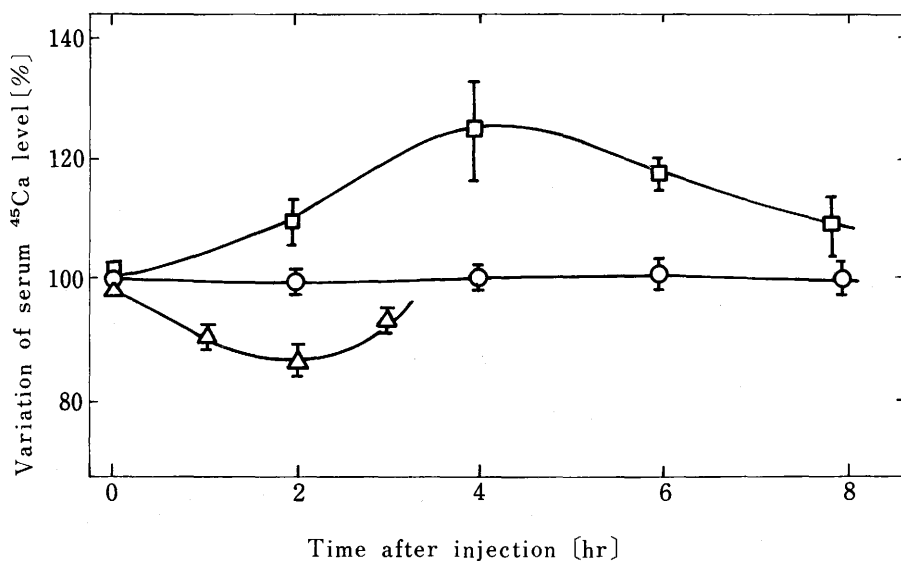


Fig. 4 Effect of Parotin-Subunit and Calcitonin on Rabbit Serum ^{45}Ca Levels
Administered with ^{45}Ca 3 days Prior

○—○ : Control [saline], □—□ : Parotin-Subunit [20 µg/kg]
△—△ : Calcitonin [0.3 MRC/kg]

Parotin-Subunit の体内分布を検討する目的で ^{131}I -Parotin-Subunit を調製し、ラットを用い生体内分布を測定した。その結果、Table III に示す如く肝臓、腎臓、脾臓に多く分布し、耳下腺、顎下腺、睪丸、副性器に長時間 retention することを認めた。

Cyclic AMP が多くのホルモンの second mediator として働いていることが知られ、この Cyclic

Table III Distribution of Radioactivity into Various Tissues of Rat
Administrated with ^{131}I -Parotin-Subunit

Tissue	Time after injection a) [min]			
	5	20	60	180
Hypophysis	0.0070 ± 0.0005^b	0.0059 ± 0.0003	0.0049 ± 0.0003	0.0039 ± 0.0001
Parotid gland	0.062 ± 0.006	0.071 ± 0.021	0.136 ± 0.010	0.142 ± 0.005
Submaxillary gland	0.081 ± 0.007	0.075 ± 0.009	0.105 ± 0.014	0.082 ± 0.003
Thyroid	0.013 ± 0.017	0.053 ± 0.014	0.357 ± 0.149	2.100 ± 0.213
Heart	0.202 ± 0.028	0.160 ± 0.016	0.172 ± 0.029	0.113 ± 0.003
Thymus	0.037 ± 0.004	0.063 ± 0.017	0.105 ± 0.018	0.081 ± 0.013
Liver	57.650 ± 4.900	54.530 ± 5.870	10.090 ± 0.560	5.940 ± 0.470
Spleen	1.530 ± 0.090	1.530 ± 0.120	0.540 ± 0.030	0.210 ± 0.020
Kidney	6.560 ± 0.460	6.090 ± 0.440	2.440 ± 0.080	1.400 ± 0.050
Adrenal	0.037 ± 0.004	0.062 ± 0.017	0.105 ± 0.018	0.081 ± 0.013
Testis	0.121 ± 0.005	0.192 ± 0.035	0.493 ± 0.033	0.541 ± 0.031
Seminal vesicle				
Prostate	0.018 ± 0.001	0.025 ± 0.001	0.028 ± 0.006	0.038 ± 0.002

a) Rat was injected intravenously with $100\mu\text{g}$ of ^{131}I -Parotin-Subunit [$9.7 \times 10^6\text{cpm}$] / 100g rat.

b) The percentage of radioactivity which localized in each tissue to the total administrated ^{131}I -Parotin-Subunit. [mean $\pm$ S.E.]

AMP はホルモンによって細胞膜に結合した酵素である Adenyl cyclase の賦活化によって濃度を増し、それに引き続き Cyclic AMP dependent protein Kinase が活性化されるというホルモン細胞内作用機作が明らかにされている。そこで Parotin-Subunit が Adenyl cyclase-Cyclic AMP 系に対してどのような影響を与えるかラットにおいて検討を加えた。その結果 in vivo において Parotin-Subunit 投与後、各臓器中の Cyclic AMP レベルは Table IV に示す如く骨端部骨と顎下腺において有意に増加し、また血漿中のレベルも有意に増加を示した。そこで唾液腺内分泌が硬組織に関係あることから骨端部骨を取り上げ in vitro で無細胞系を用い Parotin-Subunit による Adenyl cyclase の賦活化を検討した。その結果 Table V に示す如く $2,200 \times \text{g}$ フラクシオンに NaF により賦活化される Adenyl cyclase 分画を得、その活性が Parotin-Subunit により直接賦活化されることを認めた。

Table IV Effect of Parotin—Subunit on Cyclic AMP Level of Rat Tissues

Group	Cyclic AMP level ($\mu\mu$ mole/mg wet tissue) Time after injection ^{a)} (min)			
	0	5	20	180
Parotid gland	0.44 $\pm$ 0.09 ^{b)}	0.49 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.10
Submaxillary gland	1.02 $\pm$ 0.10	1.34 $\pm$ 0.12 [*]	0.88 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.04
Liver	0.36 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.16	0.20 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.03
Kidney	0.72 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.06
Spleen	0.52 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.07	0.29 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.07
Testis	0.14 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.06
Metaphyseal bone	0.62 $\pm$ 0.01	1.22 $\pm$ 0.28 [*]	1.02 $\pm$ 0.10 ^{**}	0.77 $\pm$ 0.02
Plasma	0.65 $\pm$ 0.09 ^{c)}	1.50 $\pm$ 0.22 [*]	1.90 $\pm$ 0.52 [*]	0.42 $\pm$ 0.05

a) Rat was injected intravenously with 100 μ g of Parotin—Subunit / 100g rat

b) Mean $\pm$ S.E. [n=4] c) Mean $\pm$ S.E. [n=8], $\mu\mu$ mole/50 μ l plasma

*_p<0.05, **_p<0.01 significant difference from 0 min value

Tabl V Effect of Parotin—Subunit on Adenyl Cyclase in Bone

Addition	Cyclic AMP formed [$\mu\mu$ mole/mg protein / 15 min]				
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5
None	15.6	28.8	23.0	33.0	30.0
Parotin—Subunit					
100	30.0	40.8	36.0	72.6	67.5
50	30.0	36.0	32.0	75.9	67.5
25	31.2	38.4	30.0	66.0	58.5
12	25.2	37.2	26.0	46.2	52.5
6	22.8	33.6	24.0	49.5	27.9
NaF [10 ⁻² M]	74.4	43.2	64.0	85.8	87.0

Parotin が蛋白代謝に関与して同化作用いわゆる anabolic 作用を有することが報告されているが、Parotin—Subunit についてもマウス肛門挙筋重量増加法により anabolic 作用の検討を行なった。その結果有意な挙筋重量の増加を認め明らかに anabolic 作用を有することを認めた。

結 論

1) 分子量45,000の Parotin—Subunit を単離した。このものは家兔血清 Ca 低下効力および循環白血球増加効力を示し、さらに免疫化学的に Parotin と共通な抗原特異性を有することを認めた。

2) Parotin—Subunit の等電点は pH4.5 を示し、N末端アミノ酸は Gly, C末端アミノ酸配列は -Val-Ser-Ala-Thr-Leu であった。またこのものは3.3%の糖を含み、その構成糖はアミノ糖とウロロン酸であった。

3) Parotin—Subunit の Trypsin 加水分解物中より免疫化学的に Parotin および Parotin—Subunit と共通な抗原特異性を有し、また循環白血球増加効力を有する分子量9,100の糖ペプチド、および血清 Ca 低下効力を有するペプチド Asp-Tyr-Glu-Trp-Lys を分離した。

4) Parotin—Subunitの有する家兔血清 Ca 低下作用は骨安定分画の Ca の移動に関与していることを認め Calcitonin とは作用態度の異なることを認めた。

5) ^{131}I —Parotin—Subunit を用いラット生体内分布を検討した結果、肝臓、腎臓、脾臓に多く分布し、耳下腺、顎下腺、睪丸、副性器等に長時間 retention することを認めた。

6) Parotin—Subunit はラットにおいて in vivo で骨端部骨、顎下腺および血漿中の Cyclic AMP レベルを投与 5～20分後に有意に増加させた。また in vitro で骨端部骨 Adenyl cyclase 活性を直接賦活化させた。

7) Parotin—Subunit はマウス肛門挙筋重量増加法により anabolic 作用を有することを認めた。

論文の審査結果の要旨

唾液腺ホルモンの分子量130,000の蛋白質 (Parotin) から分子量45,000の Parotin—Subunit を単離した。このものは家兔血清 Ca 低下効力および循環白血球増加効力を示し、さらに免疫化学的に Parotin と共通な抗原特異性を有することを認めた。よってこの仕事が薬学博士と与えるに価するものと信ずる。