



Title	耳下腺Protein kinaseに関する研究
Author(s)	近藤, 繁
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32079">https://hdl.handle.net/11094/32079</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	近藤繁
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第4244号
学位授与の日付	昭和53年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科 歯学基礎系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	耳下腺 Protein kinase に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 山本巖 (副査) 教授 常光旭 助教授 大工原恭 助教授 作田正義

### 論文内容の要旨

蛋白質の構造を修飾してその蛋白質の生理化学的性質を変化させる機構の存在は広く動植物界において知られている。この一つとして蛋白質のりん酸化反応は細胞の生理機能の調節上極めて重要視されており、この反応に関与する Protein kinase (ATP: Protein phosphotransferase EC 2.7.1.37) に関する研究はその焦点となっている。Protein kinase は  $Mg^{2+}$  の存在下、ATP の  $\gamma$  位のりん酸基を基質蛋白質に転移する反応を触媒する酵素であり、Cyclic AMP 等の 3', 5'-環状ヌクレオチドによって著明に活性化されることが明らかにされている。一方、齧歯類の耳下腺は、交感、副交感両自律神経の二重支配を受けており、分泌唾液の主成分である Amylase はこの腺房細胞内で合成され Exocytosis によって管腔へ分泌される。この Amylase の分泌を惹起する濃度の Norepinephrine あるいは Carbamylcholine は耳下腺細胞内 Cyclic AMP あるいは Cyclic GMP 濃度をそれぞれ上昇させることも知られている。

そこで、本研究はラット耳下腺を用いて細胞上清に存在する Protein kinase の部分精製を試みてその酵素的諸性質を検討するとともに、その生理的役割を Amylase の分泌との関連において検索を加え、以下の結果を得た。

#### 1. Protein kinase の部分精製とその諸性質

SD 系雄性ラット (体重 250~300g) の耳下腺ホモジネートの  $100,000 \times g$  上清には Protein kinase 活性が存在しており、この上清に存在する大部分の本酵素活性は 20~50% 飽和硫酸画分に回収された。この画分を DEAE - セルロースカラムに吸着させ  $NaCl$  (100~400 mM) 溶液で溶出すると、3 つの蛋白画分 (ピーク I, II, III) が得られ、この画分に一致して Protein kinase 活性が認められた。こ

これらの Protein kinase はいずれも Histone や Protamine 等の塩基性蛋白質を有効な基質として、至適 pH は 7.4 付近にあり、しかも SH 依存性であった。また、これらの活性は 5'-ADP によって強く阻害され、5'-AMP や Adenine によっては全く影響を受けなかった。ピーク II 及び III は Cyclic AMP または Cyclic GMP によって著明な活性化を受けたが、ピーク I は全く活性化を受けなかった。これらの 3', 5'-環状ヌクレオチドは ATP あるいは Histone に対する  $K_m$  にはあまり影響を与えず、 $V_{max}$  を著明に増大させた。

## 2. Amylase の分泌と Protein kinase 活性の変動

ラット耳下腺切片からの Amylase の分泌は、Norepinephrine, Isoproterenol あるいは Acetylcholine によって惹起され、この際、耳下腺切片から得た  $100,000 \times g$  上清中に存在する Protein kinase 活性は対照に比して著明に上昇していた。Norepinephrine あるいは Isoproterenol による Amylase の分泌は  $\alpha$  遮断薬である Tolazoline や Phenoxybenzamine によって全く影響を受けず、 $\beta$  遮断薬である Propranolol や Dichloroisoproterenol によって完全に抑制された。また、Acetylcholine による Amylase の分泌は Atropine によって同様に抑制された。この切片上清中の Protein kinase 活性の変動もこれと同様の傾向を示した。Tolbutamide によって、細胞内 3', 5'-環状ヌクレオチドレベルの変動には全く影響を与えず、このヌクレオチドによる Protein kinase の活性化のみを抑制すると、上記カテコールアミンあるいは Acetylcholine による Amylase の分泌は全く認められなかった。

## 3. Amylase の分泌と 3', 5'-環状ヌクレオチドレベルの変動

耳下腺切片からの Amylase の分泌を惹起する濃度の上記 Norepinephrine あるいは Isoproterenol は耳下腺細胞内 Cyclic AMP 及び Cyclic GMP レベルを上昇させた。特に、この Cyclic AMP レベルの上昇は対照に比して極めて著明で、しかも時間的にやや Amylase の分泌に先行しており、この分泌を抑制する各種  $\beta$  遮断薬の存在下では認められなかった。Norepinephrine あるいは Isoproterenol によって Cyclic GMP レベルの上昇も認められたが、この上昇は Amylase の分泌とは無関係に各種  $\alpha$  遮断薬によって抑制された。一方、Ammylase の分泌を惹起する濃度の Acetylcholine は耳下腺細胞内 Cyclic GMP レベルのみを対照に比して約 2 倍上昇させた。この上昇は Acetylcholine による Amylase の分泌を抑制する濃度の Atropine の存在下では認められなかった。さらに、Dibutyryl cyclic AMP あるいは Dibutyryl cyclic GMP は、耳下腺切片からの Amylase の分泌を上記カテコールアミンあるいは Acetylcholine の場合と同様に惹起した。

以上の結果から、耳下腺細胞上清から硫安分画、DEAE-セルロースクロマトグラフィーによって、主に塩基性蛋白質を有効にりん酸化する Protein kinase ピーク I, II, III が得られ、ピーク II, III は Cyclic AMP あるいは Cyclic GMP によって著明に活性化された。カテコールアミンや Acetylcholine による Amylase の分泌惹起時には、この Protein kinase の活性上昇を認め、Ammylase の分泌を抑制する諸種薬物の存在下では、この上昇は認められなかった。さらに、Protein kinase 活性の変動は耳下腺細胞内 Cyclic AMP あるいは Cyclic GMP の変動によって説明された。したがって、耳下腺上清に存在する 3', 5'-環状ヌクレオチド依存性 Protein kinase は Amylase の分泌と密接な関連性を有することが明らかにされた。

## 論文の審査結果の要旨

この研究は、ラット耳下腺に存在する環状ヌクレオチド依存性 Protein kinase の部分精製を行ってその諸性質を明らかにするとともに、本酵素が耳下腺細胞内環状ヌクレオチド濃度の変動とも連関して耳下腺アミラーゼの分泌機構において極めて重要な役割を果していることを明らかにした価値ある業績である。

よって、本研究者は歯学博士の学位を得る資格があると認める。