



Title	唾液腺ホルモン活性フラグメントの生理化学的研究
Author(s)	小宮山, 豊
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32553
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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)	小宮山 豊
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 4919 号
学位授与の日付	昭和55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	唾液腺ホルモン活性フラグメントの生理化学的研究

(主査)	教 授 青沼 繁
(副査)	教 授 近藤 雅臣 教 授 鎌田 皎 教 授 岩田平太郎

論文内容の要旨

緒論

唾液腺内分泌については緒方により実験病理学的見地から研究が始められ、唾液腺内分泌学説によると耳下腺から分離されたParotinは骨、歯などの硬組織の発育など広く間葉系組織の発育に関与するとされている。Parotinは化学的には分子量130,000の糖蛋白質であるが、最近青沼らはラウリル硫酸ナトリウム存在下Parotinが解離を起こし、低分子化することを認め、唾液腺ホルモン活性を有するParotin-Subunit (Subunit) を単離することに成功した。

著者はガストリン、成長ホルモンなど多くのペプチドホルモンにおいてその生理活性発現には全構造を必要とせず、いわゆる活性フラグメントが存在することに着目し、唾液腺ホルモンの活性本体を化学的に究明する目的でSubunitのtrypsin加水分解を行ない検討を加えた。その結果、家兎血清カルシウム低下効力(Ca効力)、家兎循環白血球数増加効力(白血球効力)およびParotinあるいはSubunitと免疫化学的交叉反応性(免疫活性)を示す活性フラグメントの存在を認めるとともにその単離に成功し、得られた活性フラグメントの全アミノ酸配列を決定することに成功した。また全身オートラジオグラフィーによる作用、代謝について検討を行ない、さらに唾液腺ホルモンの定量法についてimmunoassayを用いて検討を加えた。

本論

第一章 活性フラグメントの分離

唾液腺ホルモン活性フラグメントの存在の有無を検索する目的で、Subunitのtrypsin加水分解後Sephadex G-25により分画した8個の分画のCa効力、白血球効力および免疫活性を測定した。その

結果最初に溶出されるFr. AがCa効力、白血球効力および免疫活性のすべての生物学的効力を有することを認めたので、以後この分画について精製を行なった。すなわちFr. AをSephadex G-50およびQAE-Sephadex A-25により分画し、Table Iに示すように活性を有し、SDS-ゲル電気泳動ならびにディスク電気泳動的に単一なFr. AA-1を単離することに成功した。

Table I Biological Activities of Fr. AA-1

Ca decreasing activity (%) ^{a)}	7.34
Leucocyte increasing activity ^{a)}	+
Immunological activity ^{b)}	1600

a) dose : 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i. v.

b) relative activity in weight to weight when activity of Parotin-Subunit referred as 100 in radioimmunoassay

第二章 活性フラグメントの一次構造

蛋白質の構造解析の進歩に伴ない、現在までに数多くのペプチドホルモンのアミノ酸配列が明らかにされているが、このFr. AA-1の化学的本体を明らかにする目的でアミノ酸配列分析を行なった。まずWeberらの方法によるSDS-ゲル電気泳動により分子量を測定し、Fr. AA-1の分子量は9,100であることを認めた。次いでアミノ酸組成を決定した後、dansyl-Edman法およびcarboxypeptidase法により末端アミノ酸配列分析を行なった。その結果Table IIに示すようにN末端部分はLeu-Tyr-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Glx-であり、C末端部分は-Ile-Val-Leu-Leu-Lysであることを認めた。

Table II Amino Acid Sequence Analysis of Fr. AA-1

Peptide	No. of residues	Amino acid sequence and composition
Fr. AA-1	58	<p style="text-align: center;"> <u>1</u> <u>8</u> <u>Leu-Tyr-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Glx-</u> <u>Asp(7), Ala(3), Leu(3),</u> <u>Thr(3), Val(2), Lys(4),</u> <u>Ser(2), Met(1), Arg(2),</u> <u>Glu(12), Ile (1), Trp(2),</u> <u>Gly(2), carbohydrate (14.3%)</u> <u>54 58</u> <u>-Ile-Val-Leu-Leu-Lys</u> </p>

次にこのFr. AA-1の全アミノ酸配列を決定する目的で最初の断片化としてFr. AA-1にMetが1残基含まれることからBrCN分解を行なった。すなわちGrossらの方法に準じFr. AA-1をBrCN分解後Sephadex G-50により精製し、Table IIIに示すように得られた2個のBrCNフラグメントの末端アミノ酸配列をそれぞれ決定した。さらに各フラグメントについてKistlerらの方法に準じthermolysinで加水分解し、Sephadex G-15、Sephadex G-25およびペプチドマップなどの方法により精製を行ない、得られた各フラグメントについてdansyl-Edman法および直接Edman法によりN末端側から

Table III Sequence Analyses of AA-1-1 and AA-1-2

Peptide	No. of residues	Amino acid sequence and composition
AA-1-1	26	<p style="text-align: center;">33 37</p> <u>Asx-Gly-Ser-Ala-Leu-</u> <div style="text-align: center; margin-left: 150px;"> $\left[\begin{array}{l} \text{Asx(3), Thr(1), Glx(5),} \\ \text{Gly(1), Lys(2), Trp(2)} \end{array} \right]$ </div> <p style="text-align: center;">52 58</p> <u>-Thr-Ala-Ile-Val-Leu-Leu-Lys</u>
AA-1-2	32	<p style="text-align: center;">1 8</p> <u>Leu-Tyr-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Glx-</u> <div style="text-align: center; margin-left: 150px;"> $\left[\begin{array}{l} \text{Asx(3), Ser(1), Glx(5), Val(2),} \\ \text{Gly(1), Lys(2), Arg(1)} \end{array} \right]$ </div> <p style="text-align: center;">24 32</p> <u>-Glu-Glu-Arg-Ile-Thr-Ala-Leu-Leu-Hse</u>

Table IV Amino Acid Sequence of AA-1-1

AA-1-1	33	35	40	44
	<u>Asx-Gly-Ser-Ala-Leu</u> (Lys, Glx, Glx, Glx, Trp, Trp, Glx,			
T-1-2-c	Asx-Gly-Ser			
T-2-a	Ala			
T-1-1	Leu-Lys-Gln-Glu-Glu-Trp-Trp-Glu-			
T-1-2-a	Leu-Lys-Gln-Glu-Glu-Trp-Trp-Glu			
AA-1-1	45	50	55	58
	Gly, Lys, Glx, Asx, Thr, Asx, Asx)	<u>Thr-Ala-Ile-Val-Leu-Leu-Lys</u>		
T-1-1	Gly-Lys(Glx, Asx, Thr, Asx, Asx, Thr)			
T-1-2-b	Gly-Lys-Glu-Asp-Thr-Asp-Asp-Thr			
T-2-b	Ala-Ile-Val			
T-2-a	Ala			
T-2-d	Ile (Leu)			
T-2-c	Val			
T-2-e	Leu-Leu-Lys			
T-2-d	(Ile) Leu			
T-2-f	Leu-Lys			

順次アミノ酸配列分析し、Table IVおよびTable Vに示すように各thermolysinフラグメントのアミノ酸配列を決定した。また糖成分結合部位については糖成分含有thermolysinフラグメントのアミノ酸配列分析結果と、Fr. AA-1を直接pronase分解することにより得た糖成分結合部分のアミノ酸分析結果から決定した。このようにして得られた結果を総合し、Fr. AA-1の全アミノ酸配列をFig. 1に示すように決定した。

Table V Amino Acid Sequence of AA-1-2

AA-1-2	1	5	10	16	
	<u>Leu-Tyr-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-Glx</u> (Ser,Asx,Asx,Glx,Asx,Lys,Glx,Lys)				
T-5-d	Leu-Tyr				
T-5-c	Ile	(Phe)			
T-3-b		Leu-Tyr-Phe-Phe-Gln-Ser-Asp(Asx,Glx,Asx,Lys,Glx,Lys)			
T-5-d		Leu-Tyr			
T-5-c	(Ile)	Phe			
T-3-a		Phe-Gln-Ser-Asp-Asn-Glu-Asp-Lys-Glu-Lys			
AA-1-2	17	20	25	30	32
	Val,Val,Arg,Glx,Glx,Glx,Gly)	<u>Glu-Glu-Arg-Ile-Thr-Ala-Leu-Leu-Hse</u>			
T-5-b	Val				
T-3-c	Val-Arg-Gln-Glu-Glu-Gly-Glu-Glu-Arg				
T-4-b	Val-Arg-Gln-Glu-Glu				
T-4-a		Gly-Glu-Glu-Arg			
T-5-e			Ile-Thr		
T-5-a				Ala	
T-5-c				Leu	
T-5-f				Leu-Hse	

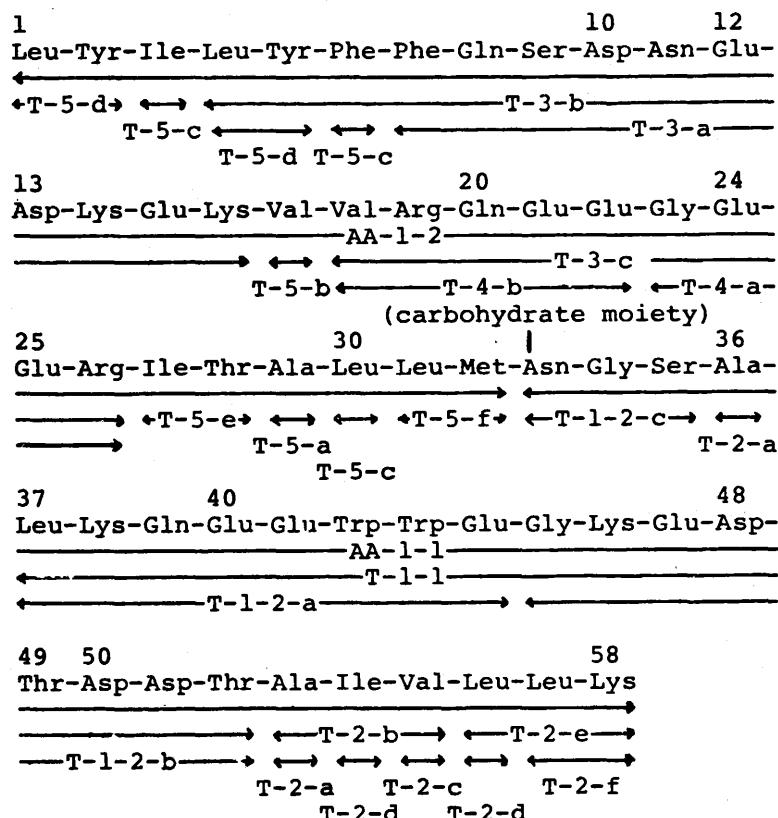


Fig. 1 Amino Acid Sequence of Fr. AA-1

The various peptides and amino acids are indicated by double-headed arrows.

第三章 活性フラグメントの全身オートラジオグラフィー

アミノ酸配列が明らかになった活性フラグメントFr. AA-1とSubunitの作用および代謝を比較検討する目的で、¹³¹Iにより標識した後マウスにおける全身オートラジオグラフィーを行なった。まずSubunitの全身オートラジオグラフィーを行なったところ、Fig. 2に示すように従来Parotinあるいはその関連物質の生体内分布実験で認めている肝臓、腎臓、甲状腺、頸下腺などの組織および尿中に高い放射活性の分布を認めるとともに、これまでの方法では明らかにできなかった組織にこの方法により新たにSubunitが分布することを見い出した。すなわち投与後20分において椎骨などの骨組織および歯髄に血中濃度より高い放射活性の分布を認め、また投与後60分においても骨組織および歯髄に血中濃度と同程度あるいは高い放射活性の分布を認めた。活性フラグメントFr. AA-1についてもFig. 3に示すように、投与後20分においてSubunitと同様に骨組織および歯髄に高い放射活性の分布を認め、投与後60分においても椎骨などの骨組織に血中濃度より高い放射活性の分布を認めた。このような骨組織および歯髄における放射活性の分布はカルシウム代謝に関与する他のペプチドホルモンの成長ホルモン、カルシトニンあるいはヨウ素などにおいては見られず、SubunitおよびFr. AA-1

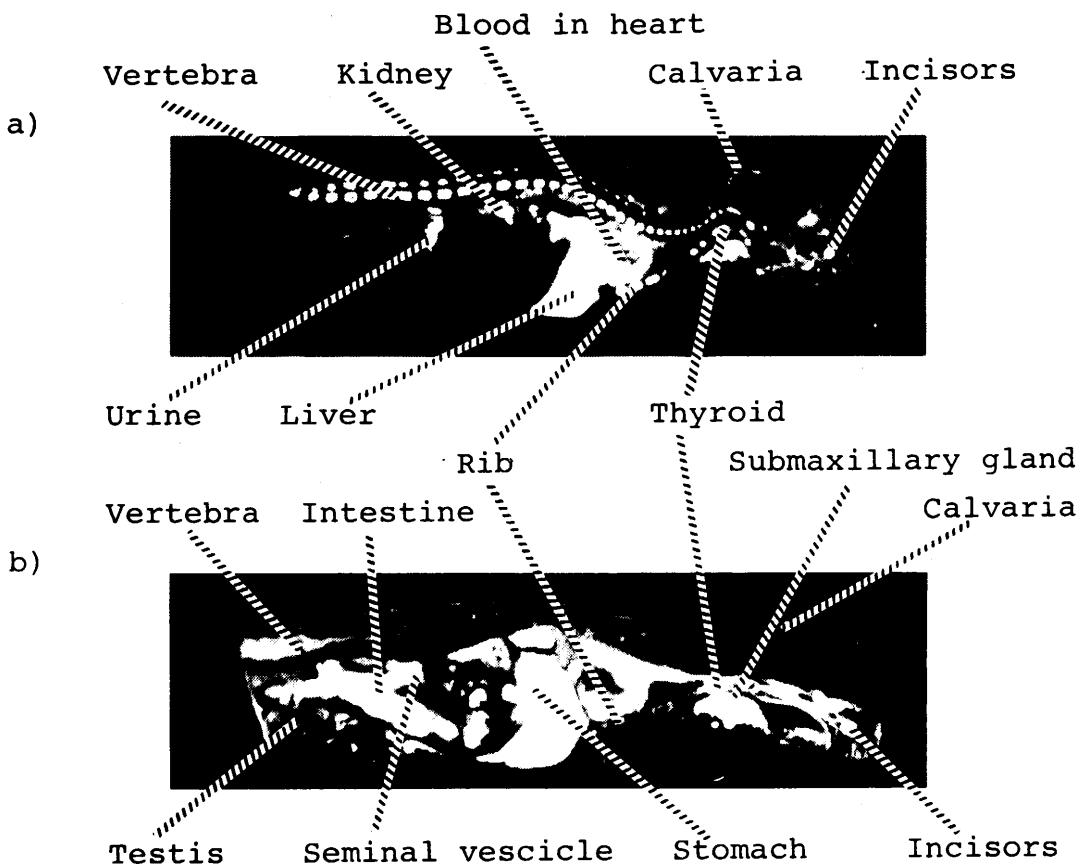


Fig. 2 Whole-body Autoradiograms of Male Mice Injected with ¹³¹I-Parotin-Subunit

a) 20 min after injection

b) 60 min after injection

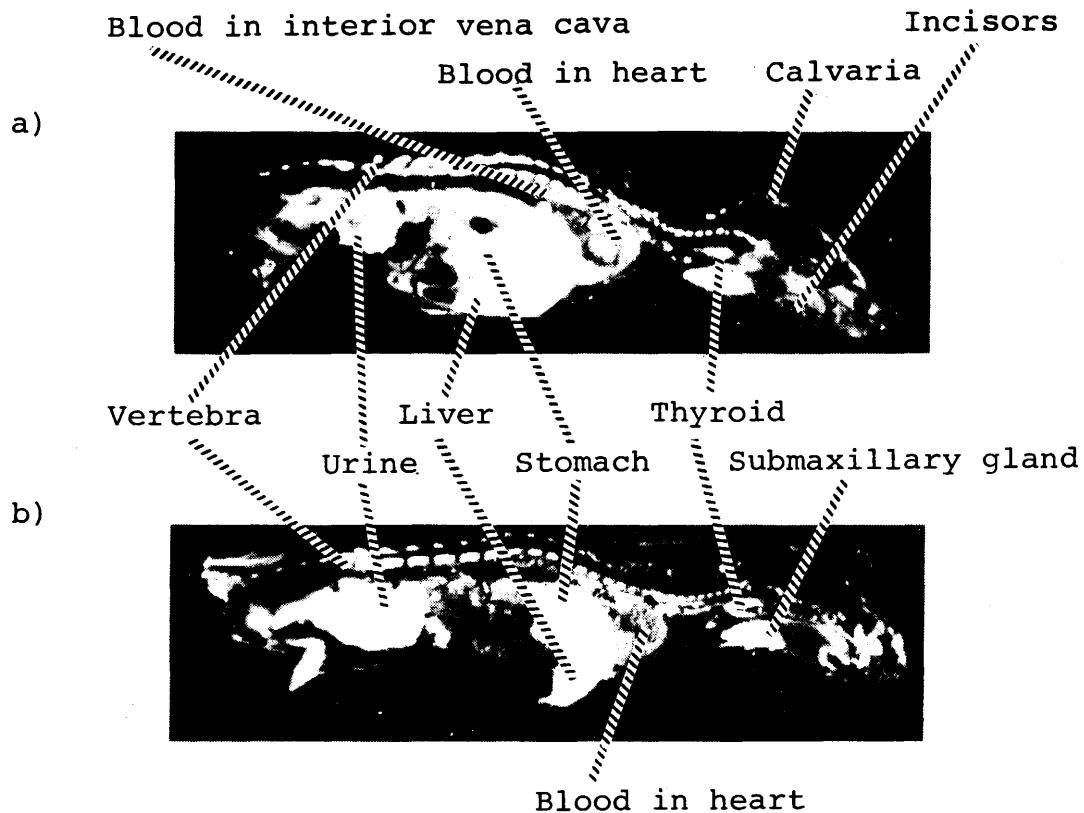


Fig. 3 Whole-body Autoradiograms of Male Mice Injected with ^{131}I -Fr. AA-1

- a) 20 min after injection
- b) 60 min after injection

に特異的であることを認めた。従ってこの全身オートラジオグラフィーが唾液腺ホルモンの特異性決定に有用であることを認めた。

第四章 Fr. AA-1のenzyme immunoassay

前章までにおいてFr. AA-1のアミノ酸配列を明らかにし、さらにこのものがマウスにおける全身オートラジオグラフィーにおいて唾液腺ホルモンの特異性を示すことを明らかにしてきたが、本章ではこのFr. AA-1を唾液腺ホルモンの定量法としてのimmunoassayに応用することについて検討を加えた。方法は標識酵素としてhorseradish peroxidase (HRPO) を用いたenzyme immunoassayで、Nakaneらの方法に従い調製したHRPO-Fr. AA-1結合物と抗Subunitモルモット γ -グロブリンを Sepharose 4Bに結合させたものを用い、25°Cで36時間反応を行ない、遠心分離後沈殿に残る酵素活性を測定することにより行なった。その結果感度は $10^{-12}\text{g}/200\mu\text{l}$ で、正常および唾液腺摘出処理を行なったラット血清中Fr. AA-1量を測定したところ、Fig. 4に示すようにラット正常血清中には血清1mLに平均0.16ngのFr. AA-1が含まれるのでに対して、唾液腺摘出群では著減していることを確認した。また応用例として種々病態時および正常時のヒト血清中Fr. AA-1量を測定したところ、Fig. 5に示

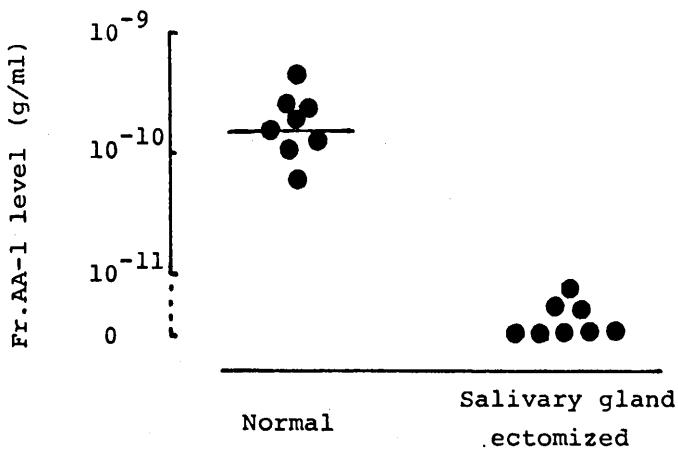


Fig. 4 Fr. AA-1 Levels in Normal and Salivary Gland Ectomized Rat Serum

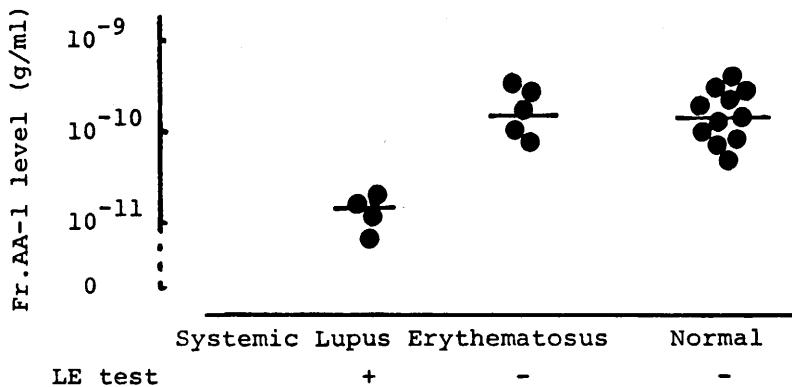


Fig. 5 Fr. AA-1 Levels in Serum of Patient with Systemic Lupus Erythematosus

すようにLEテスト陽性の全身性エリテマトーデス患者の血清中Fr. AA-1量が低値を示すことを認めた。

結論

- 1) Subunitのtrypsin加水分解物中よりCa効力、白血球効力および免疫活性を示す活性フラグメントFr. AA-1の単離に成功した。
- 2) Fr. AA-1をBrCN分解、thermolysin分解、ペプチドマップなどの方法で構造解析し、このものの全アミノ酸配列を明らかにした。
- 3) ^{131}I -Subunitおよび ^{131}I -Fr. AA-1がマウスにおける全身オートラジオグラフィーにおいて椎骨などの骨組織および歯髄に特異的に分布することを認め、この方法が唾液腺ホルモンの特異性決定に使用し得ることを認めた。
- 4) 唾液腺ホルモンの定量法としてFr. AA-1のenzyme immunoassayを確立した。

論文の審査結果の要旨

唾液腺ホルモンパロチン Subunit の trypsin 加水分解物中より Ca 効力、白血球効力および免疫活性を示す活性フラグメント Fr. AA-1 の単離に成功し、このものの全アミノ酸配列を明らかにした。また、マウスにおける全身オートラジオグラフィーにおいて椎骨および歯髄にパロチンが特異的に分布することを認め、この方法が唾液腺ホルモンの特異性決定に使用し得ることを詫めた。さらにこの構造の確立した物質を用い、その enzyme immunoassay を行なった。よって薬学博士の論文として価値あるものと認める。