OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Purification and Structural Determination of Urinary NH2 — terminal Big Gastrin Fragments
Author(s)	東本, 好文
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36896
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

【80】

氏名・(本籍)	東本好文
学位の種類	医学博士
学位記番号	第8908号
学位授与の日付	平成元年12月13日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Purification and Structural Determination of Urinary NH_2-terminal Big Gastrin Fragments (ヒト尿中ビッグガストリンN端フラグメントの精製および構造決定)
論文審査委員	(主査) 教授 垂井清一郎 (副査) 教授 鎌田 武信　教授 矢内原千鶴子

論文内容の要旨

〔目　的〕

私共は，最近，ヒト尿中にBig Gastrin（G－34）N端フラグメントが，生理活性を有するC端ペプチドに比し数百倍も多量に排泄されていることを見いだした。また，G－34N端フラグメントの大部分は再吸収を受けないことを明らかにした。したがって，その尿中レベルは，ガストリンの血中動態を良く反映することより，G細胞からのガストリン分泌の指標になり得ることを報告した。本研究の目的は，ヒト尿中に多量見いだされるこのG－34N端フラグメントを精製し，アミノ酸構造を決定することである。

〔方法ならびに結果〕

無酸症の結果高ガストリン尿症を示した患者の尿3.2ℓ（143nmol）を材料とした。すべての精製段階において，G－34端に特異的なラジオイムノアッセイ系（抗血清R2702）を用いた。また，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による精製では，214nmの紫外線（UV）吸収スペクトルでもモニターした。なお，以下に示す精製過程における各段階での回収率は，72－103%であった。

1．抽出および精製

毎日の尿（0.4～1.2ℓ）を，5日間，Sep－Pak C_{18} cartridgesを用いて，80%methanol／0.05Mammonium acetateで抽出し（102nmol），脱アルコール後，Sephadex G－25 superfine column（2.5×80cm）にてゲル濾過した。1峰性のピークが得られ（100nmol），さらにこれを3段階の逆相系HPLCにて精製した。まず，Chemcopak Nucleosil 5C 18column（7.5×300mm）を用い，0.05M Tris-HCl, pH7.0を初期溶出液とし，9－30%acetonitrile（ACN）の直線勾配にて分離した（In71.4nmol，Out

65.7nmol)。2つのピーク（疎水性の小さい順にⅠ，Ⅱ）が得られ，さらに，Shim-pak ＣＬＣ－ＯＤＳ column（6×150㎜）を用い，0.1%trifluoroacetic acid を初期溶出液とし，ピークⅠについては9.2－19.6%ＡＣＮ，ピークⅡについては15－26.4%ＡＣＮによる直線勾配により精製した。これにより，ピークⅠは2つのピーク（$Ⅰ_a$，$Ⅰ_b$）に分かれ，計3つのピークが得られた。最後に，各ピークをもう一度同じ方法で精製し，ＵＶ214nm によるモニターにて，それぞれ完全に精製されたことが確認された（$Ⅰ_a$，4.6nmol；$Ⅰ_b$，24.5nmol；Ⅱ，6.2nmol)。

2．アミノ酸組成分析

精製された各ピーク$Ⅰ_a$，$Ⅰ_b$，Ⅱ（2.5-3.2nmol）を6NHCl，300μℓに溶解し，110℃，24時間減圧下で加水分解した。凍結乾燥後，0.02NHCl，200μℓに溶解し，アミノ酸分析計（ＪＥＯＬ ＪＬＣ－300）にてアミノ酸を定量分析し，次の結果を得た。

$Ⅰ_a$ ：Glu，1.92(2)；Pro，2.83(3)；Gly，2.38(2)；
Leu，0.84(1)；His，1.04(1)

$Ⅰ_b$ ：Glu，2.02(2)；Pro，2.80(3)；Gly，2.21(2)；
Leu，0.96(1)

Ⅱ ：Glu，1.94(2)；Pro，2.89(3)；Gly，2.32(2)；
Leu，1.84(2)；His，1.01(1)

（括弧内は予想されるアミノ酸数を示す）

3．質量分析

精製された各ピークを，各2μℓグリセロールに溶解し，高速原子衝撃によりイオン化させ，質量分析した（Finnigan ＭＡＴ ＴＳＱ－70mass spectrometer)。得られた分子量は，912.6（$Ⅰ_a$），775.4（$Ⅰ_b$），1025.6（Ⅱ），であり，それぞれ，Ｇ－34のＮ端9個（912.46），8個（775.40），10個（1025.54）の分子量にほぼ完全に一致した。

4．アミノ酸配列分析

精製された各ペプチドのＮ末端の pyroglutamic acid を，pyroglutamyl aminopeptidase（ＰＡＰ）により切断した。ＰＡＰ処理した各ペプチド（0.5－2nmol）は，最終段階の精製を用いた方法により再精製し，アミノ酸配列分析装置（Applied Biosystems470Ａ）にて，下記の如く決定した。

$Ⅰ_a$ ：<Glu－Leu－Gly－Pro－Gln－Gly－Pro－Pro－His

$Ⅰ_b$ ：<Glu－Leu－Gly－Pro－Gln－Gly－Pro－Pro

Ⅱ ：<Glu－Leu－Gly－Pro－Gln－Gly－Pro－Pro－His－Leu

（矢印で示したアミノ酸は，アミノ酸配列分析で確認されたことを示す）

以上，無酸症の患者尿から，3つのＧ－34Ｎ端フラグメントを精製し，それぞれＧ－34の8，9，10個のＮ端フラグメントであることを明らかにした。

〔総　括〕

ヒト尿中に極めて多量に排泄され，ガストリン分泌の指標となり得るＧ－34Ｎ端フラグメントを，無酸症の患者尿より精製し，そのアミノ酸構造を次の如く決定した。

G－34（1－8）：＜Glu－Leu－Gly－Pro－Gln－Gly－Pro－Pro

G－34（1－9）：＜Glu－Leu－Gly－Pro－Gln－Gly－Pro－Pro－His

G－34（1－10）：＜Glu－Leu－Gly－Pro－Gln－Gly－Pro－Pro－His－Leu

論文の審査結果の要旨

本研究者は，ビッグガストリンN端免疫活性がガストリンC端免疫活性の数百倍も多量に尿中に排泄されていることを見いだし，さらに，この尿中に多量に排泄されるビッグガストリンN端免疫活性を無酸症の患者尿より精製して，そのアミノ酸配列を決定した。その結果，尿中ビッグガストリンN酸免疫活性は主に，アミノ酸8，9，10個から成るビッグガストリンN端フラグメントから成り，その主要分子型はアミノ酸8個から成るフラグメントであることが明らかになった。この成果は，ガストリンの代謝，分解過程の解明に関し新たな知見を加えたものであり，学位に値すると考えられる。