唾液腺ホルモンの Subunit に関する生理化学的研究(その2)

大阪大学薬学部

青沼 繁, 小浜 靖弘, 中陳 静男, 屋敷 伸治

江川 宏, 和田 昌師, 小宮山 豊

The Study of Physiological Chemistry on a Subunit of Salivary Gland Hormone (2)

Shigeru AONUMA, Yasuhiro KOHAMA, Shizuo NAKAJIN, Shinji YASHIKI,
Hiroshi EGAWA, Masanori WADA and Yutaka KOMIYAMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

It had been reported by authors that salivary gland hormone, parotin, was composed with subunit (parotin-subunit) which showed molecular weight of 45,000, and that parotin-subunit had rabbit serum calcium decreasing activity and the cross reactivity with rabbit anti parotin serum. In the present report, in order to study physiological chemistry of parotin-subunit, the influence of parotin-subunit on serum Ca and ^{45}Ca levels relating to calcium metabolism, the distribution of ^{131}I -parotin-subunit, the effect of parotin-subunit on adenyl cyclase-cyclicAMP system, the anabolic action, C-terminal amino acid sequence and sugar component of parotin-subunit were investigated. The results are summarized as follows:

1) The decrease of rabbit serum Ca after injection of parotin-subunit was related to change of Ca in stable bone, but not to inhibition of bone resorption.

2) A high concentrated localization of radioactivity of ^{131}I -parotin-subunit was found in liver, kidney and spleen, and as much as 60% of administrated radioactivity was localized in liver at 5 min after the injection. The retention of radioactivity was found in testis, seminal vesicle, prostate, parotid gland and submaxillary gland.

3) Cyclic AMP level increased significantly in metaphysial bone, submaxillary gland and plasma after administration of parotin-subunit but in other organs with localized much radioactivities, the level did not changed. Parotin-subunit activated adenyl cyclase of particular fraction of metaphysial bone.

4) The C-terminal amino acid of parotin-subunit was Leu, and its C-terminal amino acid sequence was -Val-Ser-Ala-Thr- Leu-OH by digestion of carboxypeptidase A.

5) Parotin-subunit included 3.3% of sugar which consisted of amino sugar and uronic acid.

緒 言

牛耳下腺より抽出精製した唾液腺ホルモン活性分画であるいわゆる MP-Parotin から, 著者らは分子量 45,000 の Parotin-Subunit の精製, 単離に成功しすでに報告した¹⁾. この Parotin-Subunit は原料として用いた MP-Parotin 同様家兎血清 Ca 低下作用を有し, 免疫化学的にも Parotin と交叉することから¹⁾, 本報では Parotin-Subunit が唾液腺ホルモン作用本態ではないかと考え, その生理化学的性質について種々検討を加えた. すなわち作用機作解明の一端として Ca 代謝調節に対する影響および ¹³¹I-Parotin-Subunit の生体内分布を調べるとともに, 多くのホルモンにみられるように Adenyl cyclase-Cyclic AMP 系を介してのホルモン作用発現の可能性を考え, Adenyl cyclase-Cyclic AMP 系に対してどのような影響を与えるか検討を加えた. さらに Parotin Subunit の anabolic 作用並びに C 末端アミノ酸配列, 構成糖成分などの化学的諸性質についても知見を得たので報告する.

実 験 方 法

MP-Parotin および Subunit の調製

既報¹⁾ に従い分離精製した.

家兎血清 Ca および ⁴⁵Ca レベルの測定

既報¹⁾ に従って行なった.

¹³¹I-Parotin-Subunit のラット生体内分布の測定

i) Parotin-Subunit のヨウ素化

クロラミン T 法¹⁰⁾ により Parotin-Subunit をヨウ素化した. すなわち Na¹³¹I (11 mCi/ml) 1 mCi を用いバイアル中で Parotin-Subunit 3 mg をヨウ素化し Sephadex G-25 のカラムを用い ¹³¹I-Parotin-Subunit を反応混合液から分離精製した. なお得られた ¹³¹I-Parotin-Subunit の比放射能は 9.7×10^7 cpm/mg protein であった.

ii) 生体内分布の測定

正常雄性ウィスター系ラット (体重 90~100 g) を 1 群 4 匹とし, ¹³¹I-Parotin-Subunit をペントバルビタール麻酔下に股間静脈より $100 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ (9.7×10^6 cpm/100 g) の投与量で注射した. 所定時間後に撲殺漏血させた後, 下垂体, 耳下腺, 顎下腺, 甲状腺, 心臓, 胸腺, 肝臓, 脾臓, 副腎, 腎臓, 睪丸, 副性器 (精のう腺および前立腺) および血液を採取し, 各臓器を秤量後, 肝臓, 腎臓, 睪丸はその一部を, 他の臓器は全量を 10 N-NaOH に溶解し, ウエルタイプシンチレーションカウンターにてその放射能の測定を行なった.

Cyclic AMP の測定

Cyclic AMP の測定は competitive protein binding assay に基づく Cyclic AMP assay kit (The Radiochemical Centre Amersham 製) を用いて行なった.

i) 各臓器中の Cyclic AMP の測定

正常雄性ウィスター系ラット (体重 90~100 g) を 1 群 4 匹とし, ペントバルビタール麻酔下に股間静脈より Parotin-Subunit を $100 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ の投与量で注射し, 生理食塩水のみを投与した正常群と投与後 5, 20, 180 分の群を測定した. 所定時間後に撲殺漏血させた後すばやく各臓器を採取し, ドライアイスにより急速に凍結し酵素活性を止めた臓器 (湿重量 250~500 mg, それ以下の臓器は全量) を冷 6% TCA 2 ml 中でホモジナイズし, ホモジネートを 4,000 rpm で 20 分遠心分離し, 上清を 2 倍量のエーテルを用い 6 回抽出操作を行ない TCA を除去した後, 残存するエーテルを 60°C で蒸発除去しその一部を測定試料とした.

ii) 血中 Cyclic AMP の定量

撲殺漏血させた血液を 0.5 M EDTA (血液に対して 1%) を含む冷試験管に採取し, 酵素活性を止め遠心分離後血漿を得, その 50 μl を測定試料とした.

Adenyl cyclase 活性の測定

賦活化された Adenyl cyclase により ATP から転換される Cyclic AMP 量を Cyclic AMP assay kit を用い competitive protein binding assay により測定した。

i) Adenyl cyclase 活性分画の調製

雄性ウィスター系ラット (100~120 g) を撲殺瀉血後ただちに脳、骨組織 (大腿骨骨端から 5~7 mm, 脛骨骨端から 5~7 mm の関節腔を含む組織, 以下骨端部骨と略す) を取り出し, 氷冷下 8 倍量の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を用いホモジナイズし, グラスウールにて濾過後濾液を $2,200 \times g$ にて 4°C, 10 分間遠心分離を行なった。^{9), 17)} 沈澱を再び 8 倍量の上記の Tris buffer にてホモジナイズし, 同様な操作を 2 回行なった後 2~4 ml の Tris buffer に懸濁したものを酵素液とし, ただちに活性測定に用いた。なお酵素液の蛋白量は酵素液の一部を Lowry 法¹⁶⁾ により測定し Bovine serum albumin (BSA) 換算量とした。

ii) 酵素活性の測定

3.2 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Theophylline, 0.02% BSA, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) から成る incubation medium 400 μ l に氷冷下酵素液 50 μ l (300~500 μ g 蛋白量) を加え, 更に Parotin-Subunit, MP-Parotin 6~100 μ g/ml (終濃度) の溶液 50 μ l を加え, 37°C, 15 分間振とうしながら incubation を行なった。incubation 終了後沸とう水浴中で 3 分間煮沸し反応を停止させた後 3,000 rpm, 10 分間遠心分離後上清中の ATP から転換された Cyclic AMP 量を測定した。なお対照として酵素液のみを加えたものと, Adenyl cyclase 賦活剤として 10 mM NaF (終濃度)⁹⁾ を添加したものを同様に incubation し活性測定を行なった。

マウス肛門挙筋法による Parotin-Subunit の Anabolic 作用の検定

正常雄性 DD 系マウス (体重 20~30 g) を去勢し, Hershberg, Shipley & Meyer 法¹⁹⁾ に準じ 7 日後検体を毎日 7 日間皮下投与を行なった。検体は Parotin-Subunit および MP-Parotin を生理食塩水に溶解し, 投与量は 10 μ g/mouse/day とした。なお対照群として去勢しない正常群と去勢して生理食塩水のみを投与した去勢群を用いた。検体最終投与後 24 時間目に肛門挙筋を摘出しその重量を測定した。

C 末端アミノ酸配列の同定

既報²⁾ に従いカルボキシペプチダーゼ A 法により行なった。すなわち, カルボキシペプチダーゼ A (シグマ製) を氷冷下 1% Na_2CO_3 溶液および 0.1 N NaOH 溶液で溶解後ただちに 0.1 N HCl で pH 8.2 に調製したものを酵素液とし, 検体 30 mg (約 0.7 μ mole) を 4 ml の再蒸留水に溶解し 0.1 N NaOH 溶液で pH 8.2 に調製後 mole 比で基質の 1/50 量の酵素液を加え 25°C で反応させた。反応開始後 1 時間, 3 時間および 6 時間後に 1/3 量の反応液を分取し, 10% TCA を等量加え反応停止後遠心分離した上清をアミノ酸自動分析計を用い経時的に遊離してくるアミノ酸を定量した。

糖質成分の定性と定量反応²³⁾

糖質に共通な呈色反応としてアンスロン-硫酸反応およびフェノール硫酸反応, アルドヘキソースの呈色反応としてクロモトロープ酸-硫酸反応, ケトースの呈色反応としてカルバゾール硫酸反応, ペントースの呈色反応としてオルシン-塩化鉄-塩酸法, ウロン酸の呈色反応としてカルバゾール硫酸反応およびオルシン-第二鉄塩-塩酸反応, アミノ糖の呈色反応として 4N-HCl により 100°C, 6 時間加水分解した試料について Blix 変法を用いた。またシアル酸の呈色反応としてレゾルシン試薬による定量法を用いた。

沈降平衡法による分子量の測定

Parotin-Subunit の分子量について既にディスク電気泳動法および沈降, 拡散定数を用いた方法による結果を報告しているが¹⁾, 今回さらに沈降平衡法により測定を行なった。すなわち日立 202 型分析用超遠心機を用い 1/15 M Phosphate buffer (pH 8.0, $\mu=0.192$, $\rho=1.0094$ at 20°C) の溶媒にて 2 日間透析を行なった Parotin-Subunit の 1% 濃度の試料を用い Archbald 法¹¹⁾ により測定した。回転数は 6,500 rpm を用い phase angle 70°C, 温度 20°C で定速到達後 30 分間隔で写真撮影し解析を行なった。なお偏比容はアミノ

酸分析値より算出し 0.72 であった.

実 験 結 果

MP-Parotin および Parotin-Subunit の血清 Ca および ^{45}Ca に及ぼす影響

Parotin-Subunit が家兎血清 Ca 低下作用を有していること¹⁾ から, 家兎をとり上げ血清 Ca 量の変動が骨の不安定分画の Ca および安定分画の Ca のいずれに関与するのかを MP-Parotin および Parotin-Subunit を用い検討を加えた. すなわち Johnston らの方法¹⁵⁾に準じ, 5時間前に ^{45}Ca を投与し骨の不安定分画をラベルした家兎と2週間前に ^{45}Ca を投与して骨の安定分画をラベルした家兎において MP-Parotin 投与後5時間目に血清総 Ca と ^{45}Ca 量の変動を調べた. その結果 Table 1 に示す如く骨の不安

Table 1. Effect of MP-Parotin on Serum Calcium and ^{45}Ca Levels of Rabbit Administrated with ^{45}Ca 5 Hours or 2 Weeks Prior

Group		Serum Ca ^{a)} (mg/dl)	Serum ^{45}Ca ^{a)} (change%) ^{b)}
5 Hours	Control	12.64 $\pm$ 0.12	31.2 $\pm$ 5.2
	MP-Parotin	11.58 $\pm$ 0.16**	32.6 $\pm$ 5.4
2 Weeks	Control	12.76 $\pm$ 0.04	95.8 $\pm$ 1.5
	MP-Parotin	11.64 $\pm$ 0.08**	142.5 $\pm$ 17.4*

a) value of 5 hr after MP-Parotin injection (2 mg/kg)

b) expressed as the change percentage of radioactivity at 0 hr to 5 hr

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significant difference from control

定分画をラベルした家兎においては血清総 Ca 量には有意な変動を認めたが ^{45}Ca 量にはなんら変化は認められなかった. それに対して骨の安定分画をラベルした家兎において血清総 Ca 量が有意な変動を示すことを認めるとともに ^{45}Ca の有意な増加を認めた. MP-Parotin により骨安定分画の Ca の変動が認められたので, 次に骨安定分画への ^{45}Ca が取り込まれるまでの時間について検討を加えた結果, 既報¹⁾ の Fig. 7 に示すように3日目以降から血清 ^{45}Ca レベルが平衡に達することから, ^{45}Ca 投与後3日目以降の家兎を用い, Parotin-Subunit および MP-Parotin について同様に検討を加えた. その結果 Table 2 に示すよう

Table 2. Effect of MP-Parotin and Parotin-Subunit on Serum Calcium and ^{45}Ca Levels of Rabbit Administrated with ^{45}Ca 3 Days Prior

Exp.	Group	Dose	Serum Ca ^{a)} (mg/dl)	Serum ^{45}Ca ^{a)} (change %) ^{b)}
Exp. 1	Control	0	12.74 $\pm$ 0.12	95.8 $\pm$ 1.5
	MP-Parotin	2 mg/kg	11.40 $\pm$ 0.13**	121.5 $\pm$ 9.2
Exp. 2	Control	0	12.89 $\pm$ 0.20	96.8 $\pm$ 1.4
	Parotin-Subunit	20 $\mu\text{g/kg}$	11.48 $\pm$ 0.25**	122.6 $\pm$ 9.6

a) value of 5 hr after sample injection

b) expressed as the percentage of radioactivity at 0 hr to 5 hr

** $p < 0.01$ significant difference from control

に Parotin-Subunit を $20 \mu\text{g/kg}$ の投与量で投与した場合 MP-Parotin と同様血清総 Ca 量の有意な減少と ^{45}Ca の増加を認めた. 以上のことから MP-Parotin および Parotin-Subunit の有する血清 Ca 量の低下作用は骨安定分画の Ca の移動に関与することを認めた.

^{131}I -Parotin-Subunit のラット生体内分布

Parotin-Subunit の生体内分布を調べる目的で ^{131}I -Parotin-Subunit を用いラットにおいてその分布さ

Table 3. Distribution of Radioactivity into Various Tissues of Rat
Administrated with ^{131}I -Parotin-Subunit (1)

Tissues	Time after injection ^{a)} (min)			
	5	20	60	180
Blood	427.9 $\pm$ 18.2 ^{b)}	176.0 $\pm$ 31.9	171.7 $\pm$ 3.7	108.7 $\pm$ 6.5
Hypophysis	180.9 $\pm$ 17.1	183.7 $\pm$ 14.1	129.0 $\pm$ 2.5	125.7 $\pm$ 4.6
Parotid gland	25.4 $\pm$ 1.2	26.7 $\pm$ 6.5	52.4 $\pm$ 2.0	47.5 $\pm$ 0.7
Submaxillary gland	35.0 $\pm$ 1.9	40.9 $\pm$ 7.2	60.7 $\pm$ 5.5	40.4 $\pm$ 2.2
Thyroid	131.6 $\pm$ 22.2	645.4 $\pm$ 182.6	3859.3 $\pm$ 1686.0	25010.8 $\pm$ 1417.8
Heart	48.7 $\pm$ 4.6	43.6 $\pm$ 8.2	46.5 $\pm$ 3.4	32.7 $\pm$ 1.8
Thymus	15.4 $\pm$ 0.6	26.5 $\pm$ 4.1	40.7 $\pm$ 4.2	34.7 $\pm$ 3.4
Liver	1571.7 $\pm$ 173.6	1323.9 $\pm$ 119.6	232.3 $\pm$ 3.2	41.5 $\pm$ 7.7
Spleen	548.5 $\pm$ 73.2	538.9 $\pm$ 3.7	179.2 $\pm$ 13.6	68.4 $\pm$ 6.8
Kidney	576.3 $\pm$ 27.2	618.4 $\pm$ 39.0	244.7 $\pm$ 11.7	132.2 $\pm$ 4.7
Adrenal	120.3 $\pm$ 7.1	133.8 $\pm$ 4.6	66.4 $\pm$ 6.4	42.4 $\pm$ 1.0
Testis	9.7 $\pm$ 0.4	17.8 $\pm$ 2.6	44.4 $\pm$ 2.5	48.2 $\pm$ 0.7
Seminal vesicle Prostate	23.1 $\pm$ 2.6	37.6 $\pm$ 4.1	58.4 $\pm$ 2.1	51.9 $\pm$ 2.2

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

b) cpm/mg wet tissue (mean $\pm$ S.E.)

Table 4. Distribution of Radioactivity into Various Tissues of Rat
Administrated with ^{131}I -Parotin-Subunit (2)

Tissues	Time after injection ^{a)} (min)			
	5	20	60	180
Hypophysis	0.0070 $\pm$ 0.0005 ^{b)}	0.0059 $\pm$ 0.0003	0.0049 $\pm$ 0.0003	0.0039 $\pm$ 0.0001
Parotid gland	0.062 $\pm$ 0.006	0.071 $\pm$ 0.021	0.136 $\pm$ 0.010	0.142 $\pm$ 0.005
Submaxillary gland	0.081 $\pm$ 0.007	0.075 $\pm$ 0.009	0.105 $\pm$ 0.014	0.082 $\pm$ 0.003
Thyroid	0.013 $\pm$ 0.017	0.053 $\pm$ 0.014	0.357 $\pm$ 0.149	2.10 $\pm$ 0.213
Heart	0.202 $\pm$ 0.028	0.160 $\pm$ 0.016	0.172 $\pm$ 0.029	0.113 $\pm$ 0.003
Thymus	0.037 $\pm$ 0.004	0.063 $\pm$ 0.017	0.105 $\pm$ 0.018	0.081 $\pm$ 0.013
Liver	57.65 $\pm$ 4.90	54.53 $\pm$ 5.87	10.09 $\pm$ 0.56	5.94 $\pm$ 0.47
Spleen	1.53 $\pm$ 0.09	1.53 $\pm$ 0.12	0.54 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.02
Kidney	6.56 $\pm$ 0.46	6.09 $\pm$ 0.44	2.44 $\pm$ 0.08	1.40 $\pm$ 0.05
Adrenal	0.037 $\pm$ 0.004	0.062 $\pm$ 0.017	0.105 $\pm$ 0.018	0.081 $\pm$ 0.013
Testis	0.121 $\pm$ 0.005	0.192 $\pm$ 0.035	0.493 $\pm$ 0.033	0.541 $\pm$ 0.031
Seminal vesicle Prostate	0.018 $\pm$ 0.001	0.025 $\pm$ 0.001	0.028 $\pm$ 0.006	0.038 $\pm$ 0.002

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

b) the percentage of ^{131}I which localized in each tissue to the total administrated

^{131}I -Parotin-Subunit(mean $\pm$ S.E.)

れた放射活性を測定した. その結果 Table 3 に示す如く組織湿重量 (mg) 当りの放射能で表わした各組織の濃度分布では投与5分の群で肝臓に最も高濃度に分布し続いて腎臓, 脾臓に高濃度に分布することを認めた. また時間の経過とともに甲状腺に非常に多くの放射活性が分布し, その他耳下腺, 顎下腺, 睪丸および副性器(性のう腺および前立腺) などでは放射活性が長時間 retention することを認めた. 一方組織当りの分布百分率で表わすと Table 4 に示す如く投与5分では全投与量の約60%が肝臓に分布した. また甲状腺, 睪丸および副性器で時間の経過とともに分布の増加を認めた.

Parotin-Subunit 投与ラットにおける各臓器および血漿中の Cyclic AMP レベルの変動

Parotin-Subunit の生理作用機序解明の一端として多くのホルモンの second mediator と考えられている Cyclic AMP を取り上げ, ^{131}I -Parotin-Subunit の分布が多く認められた肝臓, 腎臓, 脾臓およびこれまで知られている唾液腺ホルモン関連臓器中の Cyclic AMP レベルに及ぼす影響を *in vivo* にて検討した. その結果, 臓器中の Cyclic AMP レベルは Table 5 に示す如く骨端部骨および顎下腺において投与5分ないし20分後に有意な増加を示した. しかし ^{131}I -Parotin-Subunit の分布が多く認められた肝臓, 腎臓および脾臓においては何ら有意な変動は認められなかった. また血漿中の Cyclic AMP レベルは Table 6 に示す如く投与5分および20分の群において有意な増加を示した.

Table 5. Effect of Parotin-Subunit on Cyclic AMP level of Rat Tissues

Group	Cyclic AMP level ($\mu\mu$ mole/mg wet tissues) 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 $\pm$ 0.01	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

a) Rat was injected intravenously with 100 μg of Parotin-Subunit/100 g rat.

b) mean $\pm$ S.E. (n=4)

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

Table 6. Effect of Parotin-Subunit on Cyclic AMP level of Rat Plasma

Group	Cyclic AMP level ($\mu\mu$ mole/50 μl plasma) Time after injection ^{a)} (min.)				
	0	5	20	60	180
Plasma	0.65 $\pm$ 0.09 ^{b)}	1.50 $\pm$ 0.22*	1.61 $\pm$ 0.52*	0.93 $\pm$ 0.47	0.42 $\pm$ 0.05

a) Rat was injected intravenously with 100 μg of Parotin-Subunit/100 g rat.

b) mean $\pm$ S.E. (n=8)

* p<0.05 significant difference from 0 min value

Parotin-Subunit および MP-Parotin の Adenyl cyclase 活性に及ぼす影響

in vivo において Parotin-Subunit 投与によりラットの骨端部骨で投与後5~20分後に Cyclic AMP レベルの有意な上昇が認められていることから, 骨端部骨の無細胞系において Parotin-Subunit および MP-Parotin の Adenyl cyclase 活性に及ぼす影響を検討した. その結果 Table 7 に示すように骨端部骨において NaF により賦活化される Adenyl cyclase 分画を見出し, その活性が Parotin-Subunit の添加に

Table 7 Effects of Parotin-Subunit and MP-Parotin on Adenyl Cyclase in Bone

Tissue	Addition	Cyclic AMP formed ($\mu\mu$ mole per mg protein per 15 min)				
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
Bone	None	15.6	28.8	23.0	33.0	30.0
	Parotin-Subunit					
	100(μ g/ml)	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
	MP-Parotin					
	50	26.4	—	—	62.7	58.5
	12	16.8	—	—	49.5	42.0
	NaF(10^{-2} M)	74.4	43.2	64.0	85.8	87.0
Brain	None	—	—	52.8	25.9	29.6
	NaF(10^{-2} M)	—	—	561.0	814.6	740.6

より 1.5~2倍に上昇することを認めた. また Parotin-Subunit の原料である MP-Parotin にも弱い Adenyl cyclase を賦活化することを認めた. さらに同時に行なった脳から調製した Adenyl cyclase 分画にも, Chase ら⁹⁾の報告通り NaF により賦活化される強い Adenyl cyclase 活性を認めた.

Parotin-Subunit および MP-Parotin の Anabolic 作用

¹³¹I-Parotin-Subunit が投与後肝臓に高濃度に分布することおよび睪丸, 副性器に長時間 retention されることから Parotin-Subunit が蛋白代謝に関与しているのではないかと考え, まず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 Table 8 に示す如く, 去勢して Parotin-Subunit を投与した群は去勢して生理食塩水のみを投与した群に対して有意な増加を示し Parotin-Subunit が anabolic 作用を有することを認めた. また MP-Parotin も弱いながら挙筋重量を増加させた.

Table 8. Anabolic Action of MP-Parotin and Parotin-Subunit by Increase of M. levator ani Weight

Group	M. levator ani weight (mg/25 g mouse)
Normal	14.72 $\pm$ 0.76 ^{a)}
Castrated	8.02 $\pm$ 0.62
Castrated + MP-Parotin	9.74 $\pm$ 0.75
Castrated + Parotin-Subunit	11.71 $\pm$ 1.12*

a) mean $\pm$ S.E. (n=7)

* p<0.05 significant difference from castrated group

Parotin-Subunit の C 末端アミノ酸配列の同定

各種 Parotin との化学的異同を検討するため Parotin-Subunit の C 末端アミノ酸の同定を行なった. Fig. 1 に示したように Parotin-Subunit からカルボキシペプチダーゼ A により経時的に遊離してくるアミ

Fig. 1. Time Course of Amino Acids Liberated from Parotin-Subunit by Carboxypeptidase A

ノ酸を定量した結果, 最初に Leu が, 続いて Thr, Ala, Ser, Val が遊離してくることから Parotin-Subunit の C 末端アミノ酸は遊離のカルボキシル基を持つ Leu であり, その C 末端側のアミノ酸配列は -Val-Ser-Ala-Thr-Leu-OH であることを認めた。

Parotin-Subunit の糖成分の同定

Parotin-Subunit について各種糖の呈色反応を行なった結果, フェノール硫酸法, オルシン-塩化鉄-塩酸法, オルシン-第二鉄塩-塩酸法, カルバゾール硫酸法, Blix 変法による呈色反応が陽性で, Parotin-Subunit の構成糖としてウロン酸とアミノ糖の存在を認めたが, しかしヘキソースとシアル酸はまったく検出されなかった。そこでグルクロン酸を標準としてフェノール硫酸法, オルシン-第二鉄塩-塩酸法およびカルバゾール硫酸法によりウロン酸の定量を行なった。その結果それぞれ 1.66%, 1.53% および 1.73% の値を得, いずれの方法により定量してもほぼ一定の値となり Table 9 に示す如く平均 1.64% であった。またアミノ糖はグルコサミンを標準として定量を行ない 1.65% の値を得た。

Table 9. Sugar Component of Parotin-Subunit

Component	Residue(%)	g/45,000	Approximate residue/45,000
Pentose	Non		
Hexose	Non		
Uronic acid (as glucuronic acid)	1.64	738.0	3.8 (4)
Amino sugar (as glucosamine)	1.65	742.5	4.1 (4)
Sialic acid	Non

Fig. 2. Sedimentation Equilibrium Data of Parotin-Subunit
1%, in 1/15 M Phosphate Buffer (pH 8.0),
at 20°C, at 6,500 rpm, Phase angle : 70°

沈降平衡法による分子量の測定

Archbald 法¹¹⁾に従って初濃度を 1.0 とおき C'_{ik} と $(dn/dx)/x$ のプロットから Δx の値の傾斜を求

め, Fig 2 に示すようにボトムへの外挿値を求めると, 0.235 となり

$$M = \frac{\left(\frac{1}{x} \frac{dc}{dx} \right)_{ik} - \left(\frac{1}{x} \frac{dc}{dx} \right)_{jk}}{C_{ik} - C_{jk}} \left(\frac{RT}{(1 - \nu\rho)\omega^2} \right)$$

の式から分子量を求めると45,300となることを認めた. なおこの値は既に報告したディスク電気泳動法による分子量測定結果と一致した.

考 察

Parotin-Subunit が MP-Parotin と同様家兎において血清 Ca 低下作用を示すが, その作用機作は現在不明である. Calcitonin の Ca 低下作用について Johnston ら¹⁵⁾は Calcitonin が骨安定分画に対して骨吸収を抑制することにより血清 Ca 低下作用を引き起こすことを報告しているが, 著者らも今回家兎を用い Parotin-Subunit および MP-Parotin が骨安定分画の Ca を上昇させることを見出し, Calcitonin とは異なり骨吸収抑制には何ら関与していないことを認めた. また Calcitonin とは Ca 変動の time course がまったく異なること¹⁾を報告しており, 従って Parotin-Subunit および MP-Parotin による家兎血清 Ca 低下作用は骨安定分画の Ca の移動に直接関与していることを認めた.

Parotin-Subunit の体内分布を Parotin 関連物質と比較検討する目的でラットにおいて ¹³¹I-Parotin-Subunitを用い所定時間後の各臓器中の放射能分布を調べた. その結果 Parotin^{12),20),21)}, S-Parotin, 血清 Parotinについては著者ら⁸⁾によりその ¹³¹I-標識物のラットにおける分布が報告されているが, ¹³¹I-Parotin-Subunit の場合, 肝臓, 腎臓, 脾臓に比較的多量に分布し, Parotin-Subunit, 血清 Parotin と類似した分布を認めた. また甲状腺では時間の経過とともに急速に分布を増し, 他の唾液腺ホルモン関連物質の挙動と一致した. また ¹³¹I-Parotin-Subunit が肝臓において短時間に多くの分布を示すこと, 性生殖器への retention がみられることおよび肛門挙筋法による anabolic 作用がみられることより, S-Parotin および Parotin でみられるように^{4),5),6),13)}性機能との関連も考えられ興味深い.

Sutherland¹⁸⁾により発見された Cyclic AMP がある種のホルモンの second mediator として働いていることが知られ, この Cyclic 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 の賦活化によって細胞内濃度を増し, それに引き続き Cyclic AMP dependent protein kinase を活性化する²²⁾というホルモン細胞内作用機作が明らかになってきた. 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検討を加えた結果, ラットにおいて in vivo で Parotin-Subunit 投与後の各臓器中の Cyclic AMP レベルは骨端部骨と顎下腺において投与 5~20 分後に有意な増加を示し, また血漿中の Cyclic AMP レベルも有意な増加を示した. そこで唾液腺内分泌が硬組織に関係すること¹⁴⁾から骨端部骨を取り上げ無細胞系において Parotin-Subunit および MP-Parotin による Adenyl cyclase の賦活化を検討した. 骨組織の Adenyl cyclase は Chase ら⁹⁾によりその活性が見い出されており Parathyroid hormone により賦活化されることが報告されているが, 著者らも骨端部骨のホモジネートの 2,200 × g フラクションに NaF により賦活化される Adenyl cyclase 分画を得, その活性が Parotin-Subunit および MP-Parotin により直接賦活化されることを認めた. 従って骨端部骨の Adenyl cyclase の賦活化により濃度を増した Cyclic AMP がなんらかのホルモン作用を発現している可能性が認められた. 一般に骨を形成する細胞は3種あり, 骨の基質形成および石灰化沈着に関与する造骨細胞 (osteoblast), 骨中に多量に分布し時には骨吸収に関与する骨細胞 (osteocyte) および主として骨基質および無機質の吸収および破壊に関与する破骨細胞 (osteoclast) があげられるが, 家兎およびラットにおいて Parotin の石灰化促進作用が認められていること¹⁴⁾, および今回得られた家兎において血清 Ca 低下作用が骨吸収には関与していないことから, Parotin-Subunit および MP-Parotin は主に造骨細胞の Adenyl Cyclase を賦活している可能性が示唆された.

Parotin-Subunit および Parotin 関連物質の化学的異同については Parotin-Subunit の C 末端アミノ酸

は Parotin および S-Parotin の C 末端アミノ酸 Ala, Gly, Leu⁸¹ のうち Leu であり, カルボキシペプチダーゼにより遊離してくることから Leu は遊離のカルボキシル基を持つことが判明した。

結 論

1) 唾液腺ホルモン Subunit の有する血清 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, その生体内分布は ¹³¹I-Parotin-Subunit を用いて, 肝臓, 腎臓, 脾臓に多く, 耳下腺, 顎下腺, 睪丸, 副性器等で長時間 retention することを認めた。

2) 本物質はラットにおいて in vivo で骨端部骨, 顎下腺および血漿中の Cyclic AMP レベルを 5~20 分後に有意に増加させた。

3) 本物質はラット骨端部骨の Adenyl cyclase 活性を増加させた。

4) 本物質は肛門挙筋重量増加法により anabolic 作用の有することを認めた。

5) 本物質の C 末端アミノ酸配列は -Val-Ser-Ala-Thr-Leu-OH である。

6) 本物質は 3.3% の糖を含み, その構成糖はアミノ糖とウロン酸から成る。

謝辞 最後に実験試料の一部を提供された帝国臓器製薬株式会社に心から感謝する。

文 献

- 1) 青沼繁, 小浜靖弘, 中陳静男, 屋敷伸治, 江川宏: 唾液腺ホルモンの Subunit に関する生理化学的研究, 日内分泌会誌, 50: 1468-1476, 1974.
- 2) 青沼繁, 三村務, 金在萬, 乾容子: *Bacillus* 属細菌の産生する生理活性物質の研究 (第 3 報) *B. subtilis* K により産生され家兎血清カルシウム低下性物質の単離とその性質, 薬学雑誌, 92: 539-545, 1972.
- 3) 青沼繁, 三村務: ¹³¹I 標識血清パロチンの研究, 生化学, 32: 528-530, 1960.
- 4) Aonuma, S., Hama, T. and Mayumi, T.: The distribution of ¹³¹I-labelled parotin into the muscle tissue of normal and ovariectomized guinea pig sensitised with parotin, *Endocrinol. Japon.*, 11: 177-184, 1964.
- 5) Aonuma, S., Mayumi, T. and Tanaka, T.: Relationship between salivary gland hormone and sexual function (3) The effect of parotin, S-parotin and serum-parotin on progesterone metabolism, *Yakugaku Kenkyu*, 38: 3-12, 1967.
- 6) 青沼繁, 真弓忠範, 中島敏彦, 鈴木宏治: 唾液腺ホルモンと性機能 (第 4 報) モルモット精液に対するパロチンの作用, 日内分泌会誌, 46: 127-138, 1970.
- 7) 青沼繁, 真弓忠範, 中島敏彦, 鈴木宏治: 唾液ホルモンの下垂体前葉 FSH, LH 活性に対する作用および下垂体剔除, 去勢などによる唾液腺ホルモンの変動, 日内分泌会誌, 46: 139-147, 1970.
- 8) 青沼繁, 浜堯夫, 真弓忠範: 顎下腺の研究 (第 13 報) S-parotin の分子量とその構成アミノ酸, 唾液腺シンポジウム, 9: 57-60, 1967.
- 9) Chase, L.R., Fedak, S.A. and Aurbach, G.D.: Activation of skeletal adenyl cyclase by parathyroid hormone in vitro, *Endocrinology*, 84: 761-68, 1969.
- 10) Greenwood, F.C., Hunter, W. M. and Glover, J.S.: The preparation of ¹³¹I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity, *Biochem. J.*, 89: 114-123, 1963.
- 11) 林勝哉: 蛋白質の分子量・分子形, 東京大学出版会, 東京, 1971, p.31~47.
- 12) Ito, Y., Kim, Y.E. and Tanaka, S.: Study on the salivary gland hormones labeled with ¹³¹I, 3: Effect of ligation of several blood vessels on the degradation and distribution of ¹³¹I-labeled parotin in vitro, *Endocrinol. Japon.*, 5: 201-207, 1958.
- 13) 伊藤四十二, 青沼繁, 篠田雅人: 顎下腺の研究, 顎下腺と睪丸の關係に就いて, 内分泌, 1: 79-88, 1954.
- 14) Ito, Y.: Parotin: A salivary gland hormone, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 85: 228-310, 1960.
- 15) Johnston, C.C.Jr. and Davis, W.P.Jr., An inhibitory effect of thyrocalcitonin on calcium release in vivo and on bone metabolism in vitro, *Endocrinology*, 78: 1139-1143, 1966.
- 16) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J.Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 17) Sutherland, E.W., Rall, T.W.

- and Menon, T. : Adenyl cyclase I. Distribution, preparation, and properties, *J. Biol. Chem.*, 237 : 1220-1227, 1962.
- 18) Sutherland, E.W. and Rall, T.W. : Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles *J. Biol. Chem.*, 232 : 1077-1091, 1958.
- 19) 高木敬次郎, 小澤光 : 薬物学実験, 南山堂, 東京, 1973, p.168~170.
- 20) Tanaka, S. and Ito, Y. : Studies on the salivary gland hormones labeled with ^{131}I , 1 : Localization of radioactivity after administration of ^{131}I -labeled parotin to rats, *Endocrinol. Japon.*, 5 : 55-64, 1958.
- 21) Tanaka, S., Kim, Y.E. and Ito, Y. : Studies on the salivary gland hormones labeled with ^{131}I , 2 : Studies on the localization and degradation of parotin in vivo with ^{131}I -labeled parotin, *Endocrinol. Japon.*, 5 : 65-69, 1958.
- 22) Walsh, D.A., Perkins, J.P. and Krebs, E.G. : An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, 243 : 3763-3765, 1968.
- 23) 山川民夫 : 生体構成成分 2, 中山書店, 東京, 1972, p.102~110.