SDS-ポリアクリルアミドゲル, 等電点電 気泳動法および免疫化学的方法に よるラットの顎下腺唾液と血清 蛋白質成分の比較

内 藤 幸 雄 村 田 篤 彦
大 野 正 迪 船 曳 良 一

岐阜歯科大学 口腔生化学教室* (主任: 横田豊教授)

[受付: 昭和54年3月2日]

抄録: ラット顎下腺唾液の蛋白質成分の物理化学的性状およびその由来を検討するため, 電気泳動法または免疫化学的方法によって血清の蛋白質成分との異同を比較した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で, 唾液蛋白質は分子量 320,000~6,500 の範囲に 22 個に分画され, このうち6個の糖蛋白質成分のみが血清蛋白質成分と相似した。唾液の総蛋白質量の 71.4 % は分子量 51,000 以下 (血清: 27.4%) の低分子量な成分であった。

等電点電気泳動法で, 唾液蛋白質は等電点 3.00~9.20 の範囲に 25 個に分画され, このうち血清蛋白質成分と等電点が一致したものは 13 個であった。しかし, 唾液の総蛋白質量の 53.8% は等電点 3.80 以下 (血清: 19.6 %) の低い等電点の成分であった。

免疫化学的方法で, アルブミン, および未同定の 3 個の血清蛋白質が唾液から検出された。

緒 言

唾液中の蛋白濃度は生理的, あるいは実験的要因によって各種の変動を示すことが報告されている¹⁻⁵⁾。しかし, 横田ら(1974)⁶⁾, 阿部ら(1977)⁷⁾, および阿部ら(1978)⁸⁾によると, ラットの耳下腺, および顎下腺唾液の場合では分泌されてくる唾液量をそれぞれの唾液腺の湿重量当り, あるいは流出率 (min.) などで規制し, これに対する各蛋白質成分の相対濃度比を求めて比較すると, 変動幅はほとんど認められなくなることを明らかにした。このことは唾液蛋白分泌細胞の機能が唾液流量, その他の唾液成分, あるいは腺全体としての調節と密接に関連していることをうかがわせる。

唾液中の蛋白質成分は主として腺房細胞に由来し⁹⁾, その分泌の支配神経は交感神経性 β -受容器であるとみられている¹⁰⁾。しかし, 唾液腺は動物の種によって腺の構造に著しい差異があり, また, 腺房細胞以外における蛋白質の合成^{11,12)}, あるいは血清蛋白質の移行の状態などにも特殊性がみられ, 唾液蛋白質の由来に関する研究を複雑にしている。

最近, 阿部ら(1978)⁸⁾, および Abe ら(1978)¹³⁾などはラット顎下腺に交感神経性 β -受容器依存性とは別の α -受容器依存性の蛋白分泌系が存在すること, またこの系は耳下腺には存在しないことを報告している。

一方, 唾液中に血清蛋白質成分が移行する問題

Comparison of the protein components between the submandibular saliva and the serum of rats by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing and immunochemical analysis.

Yukio NAITO, Atsuhiko MURATA, Masamichi OHNO and Ryoichi FUNABIKI (Department of Oral Biochemistry, Gifu College of Dentistry, Gifu)

* 岐阜県本巣郡穂積町高野 1851 〒501-02

Jap. J. oral Biol., 21 : 377-390, 1979.

は未解決の部分が多いが、免疫化学的方法の進展により観察領域は拡大しつつある。ヒトの全唾液、耳下腺、および顎下腺唾液については Ellison (1966)¹⁴⁾、Brandtzaeg (1971)¹⁵⁾、あるいは Levine ら (1973)¹⁶⁾ などによりアルブミン、糖蛋白質、IgA、および IgG などが同定され、またオロソムコイド、セルロプラスミン、 β -リポプロテインが Stoffer ら (1962)¹⁷⁾ によって同定されている。

しかし、これら画分の本態については問題点も多く、Ellison ら (1968)¹⁸⁾ はヒト唾液の特定糖蛋白質に対してヤギとウサギでは抗体産生能に差異があることを示し、また McKean ら (1974)¹⁹⁾ はヒト全唾液中のアルブミンはウサギに対して抗原性を示さないと報告し、これに対して Brandtzaeg ら (1976)²⁰⁾ はこれを否定している。分泌された唾液はこのように種属間、あるいは遺伝的要因の影響を強く受ける外に、実験的要因との相関もあり、例えば Jungueira ら (1965)²¹⁾ によると分泌刺激薬としてのアドレナリンとカルバミルコリンでは分布する血管から腺への透過性に20倍の差異があるという。更に Brandtzaeg (1965)²²⁾、(1971)¹⁵⁾ および Strober ら (1970)²³⁾ などによるとアルブミンは受動的に、IgM と IgG は選択的に血液から唾液中に移行するという。

一方、電気泳動的な観察では阿部ら (1970)²⁾ が指摘したように、血清と唾液アルブミン画分はそれぞれ Brom phenol blue に対する染色性の異なることから、蛋白質成分を物理化学的な性状から比較することも重要である。現在まで報告は少ないが、Beeley (1969)²⁴⁾ は等電点電気泳動法でヒトの全唾液や、耳下腺、顎下腺唾液の蛋白質成分を分画し、18~20個の画分を得ている。Mayo ら (1974)²⁵⁾ は同様にヒト顎下腺唾液について観察し、血液型物質その他の等電点について報告している。Dale ら (1968)²⁶⁾ はヒト血清では40個以上の画分に分画できたことを示した。

しかし、血清蛋白質成分の唾液への移行という問題では一定条件下で採取した試料をそれぞれ分析し、その物理化学的な特性についての比較検討を併せて行うことが必要である。そこで今回はラット顎下腺についてイソプロテレノール刺激を行

い、採取した唾液を対照とし、各蛋白質成分をドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-ポリアクリルアミドゲルによる分子量測定と、等電点電気泳動法による各成分の特性比較を行った。また、これら成分の免疫化学的特性、およびゲル上に分画される糖蛋白質成分についても観察を行ったので報告する。

実験材料と方法

1. 実験動物

呑竜系成熟ラット (雌、体重250~300g) を使用し、固型飼料 (CE-2型) と水道水を自由に与えて飼育した。

2. 顎下腺唾液と血清の採取

実験動物の麻酔、および顎下腺唾液の採取方法は従来からの報告²⁷⁾ に従った。分泌刺激薬にはイソプロテレノール塩酸塩 (半井化学、京都) を使用し、1%溶液としたものを8mg/kg 体重の割合にラットの腹腔内に注射した。血清は麻酔した動物から外科的に露出させた下行大動脈から採血し、通例のごとく遠心分離を行って集めた。

3. 蛋白質の定量

蛋白質は Lowry ら (1951)²⁸⁾ の Folin phenol 試薬を用いる比色定量法に従った。

測定にはダブルビーム分光光度計 UV-200 を用いた。なお、標準蛋白質には牛血清アルブミン (Sigma 社, U. S. A.) を使用した。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (以下、SDS と略記) を含む5%ポリアクリルアミドゲルと、泳動用試料の調製、および電気泳動の条件などは Dunker ら (1969)²⁹⁾ の方法に従った。

a. 分画した蛋白質の確認

泳動終了後のゲルは Weber ら (1969)³⁰⁾ の方法に従って0.1% Coomassie brilliant blue R-250 で染色し、分画された蛋白質を判定した。

b. 各蛋白質成分の分子量の測定および画分の区分の仕方

各蛋白質成分の分子量を測定するために、次の通り分子量既知の標準蛋白質を選んだ。牛血清アルブミン (三量体、二量体および単量体)、カタラーゼ、卵白アルブミン、アルドラーゼ、キモトリ

プシノーゲン, チトクロム C (以上のものは Boehringer Mannheim 社, West Germany) および リゾチーム (生化学工業社, 東京)。これらはキモトリプシノーゲンを規準として, それぞれの易動度を下の式から算出した。

相対易動度 =

$$\frac{\text{各標準蛋白質の移動距離}}{\text{キモトリプシノーゲンの移動距離}}$$

Fig. 1 は各蛋白質成分の分子量の対数と相対易動度をプロットして得た検量線である。試料血

Fig. 1 Standard curve plotted by the logarithm of molecular weight of standard proteins from their relative mobilities on 0.1% SDS-polyacrylamide gels. 1: Bovine serum albumin (trimer); 2: Bovine serum albumin (dimer); 3: Bovine serum albumin (monomer); 4: catalase; 5: Ovalbumin; 6: Aldolase; 7: Chymotrypsinogen; 8: Lysozyme; 9: Cytochrome-C.

清, および唾液の各蛋白質成分の相対易動度を標準蛋白質の場合と同様の方法でもとめたのち, Fig. 1 の検量線から分子量を算出した。

ゲル上に分画された蛋白質成分の densitometric pattern から, 主要な画分の区分を陰極端から両試料とも全く同じ分子量範囲になるように, 順次画分 I ~ IV に 4 大別した。

画分 I は分子量 100,000 以上の, 画分 II は分子量 100,000~64,000 の, 画分 III は分子量 64,000~15,500 の, そして画分 IV は分子量 15,500 未満の蛋白質成分である。

さらに, 画分 I ~ IV に大別したそれぞれの画分中に含まれる各蛋白質成分に, 陰極側から陽極側にむかって大別した画分ごとに, その画分中に存在する蛋白質成分の数だけ順次 1 ~ 14 のごとく番号付けを行って細区分した。唾液の場合の細区分も血清の場合と同じ要領で行ったが, 番号付けは 1' ~ 11' のごとくにして血清と区別した。

なお, 電気泳動で添加するカラム当りの蛋白量は両試料ともに 80 μ g が最適であった。

c. 糖染色

血清および唾液成分の糖染色は Alcian blue 8GS を用いる Gifford ら (1965)³¹⁾の方法によって行った。

すなわち, 12.5% 三塩化酢酸 (以下, TCA と略記) 溶液で 24 時間, ゲル内の蛋白質の固定と SDS の除去を行ったのち, 15% 酢酸溶液に 0.2% の割合に溶解した Alcian blue 8GS で 2 時間染色した。ゲルの脱色は 15% 酢酸溶液で 2 日間行った。

染め出された糖成分がどの蛋白質成分に相当するかの決定は, それぞれの試料について定めた主要な画分の 4 大別法, および細区分の番号付けによって行った。

5. 等電点電気泳動法

Dale ら (1968)²⁶⁾の方法に従い, 1% (W/V) Ampholine を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。

a. Ampholine-ポリアクリルアミドゲルの調製

内径 0.4cm, 長さ 9cm のガラス管をゴム台に立て, 40% ショ糖液を 60 μ l 注入後, 8% (W/V), pH 3.5~10 用の Ampholine (LKB 社, Sweden), 0.004% リボフラビン溶液, 30% アクリルアミド溶液 (アクリルアミド 30g: N,N'-メチレンビスアクリルアミド 0.8g), および 20% ショ糖液を容積比で 1:1:2:4 に混合したものを 750 μ l 注入した。

次いで, 上記の容積比のうち 20% ショ糖液のかわりに蛋白試料 (蛋白量, 1mg) を用いた同じ容

積比の混液を130 μ l 重層した。さらに、蒸留水を50 μ l 重層したのち、蛍光燈を用いて光重合した。

b. 電極液と泳動条件

電極液としては0.2M リン酸溶液（陽極）と、モノエタノールアミン溶液（陰極）をそれぞれ用いた。

電気泳動は100Vの定電圧で4°C の氷室で15時間行った。

c. 蛋白質染色

蛋白質染色は5% TCA を用いて36時間ゲル内の蛋白質の固定と Ampholine の除去を行ったのち、7%酢酸溶液に溶解した1% Light green SF yellow で1時間染色した。ゲルの脱色は7%酢酸溶液を用いて2日間行った。

d. 等電点の測定および画分の区分の仕方

蛋白質の等電点の測定のためにまず最初に、Awdeh ら (1968)³²⁾の方法に従い、試料添加のゲルと同時泳動した試料未添加のゲルを泳動終了後のカラムから取り出し、陽極端から順次5mm 間隔に切り取りそれぞれに含まれているAmpholineを5mlの蒸留水を加えて溶出し、その溶液のpHを4°C で測定して基準となるpH 勾配曲線(Fig. 2)を得た。なお、溶存空気が溶出液のpHに及ぼす影響を防止するため、充分脱気した蒸留水を用いた。

Fig. 2 The pH gradient in the Ampholine-polyacrylamide gel after running.

用いた。

次いで、血清および唾液の各蛋白質成分がゲルの上端から移動した距離をもとめて、Fig. 2 から各蛋白質成分の等電点をもとめた。

得られた主要な蛋白質成分の画分の区別は、densitometric pattern の各ピークを陽極端から両試料とも全く同じ等電点範囲になるように、順次画分I~Vに5大別した。画分Iは等電点3.00~3.99の、画分IIは等電点4.00~4.89の、画分IIIは等電点4.90~5.19の、画分IVは等電点5.20~6.09の酸性蛋白質成分を大別した。画分Vは等電点6.10以上の中性または塩基性蛋白質成分を大別した。

さらに画分I~Vに大別したそれぞれの画分中に含まれる各蛋白質成分に、陽極端から陰極端にむかって大別した画分ごとに、その画分中に存在する蛋白質成分の数だけ順次1~8のごとくに番号付けを行って細区分した。唾液の場合の細区分も血清の場合と全く同じ要領で行ったが、番号付けは1'~7'のごとくに行って血清と区別した。

6. デンシトメトリー

血清および唾液の蛋白質成分のうち大別された主要な画分の相対濃度比の測定は明香工業社製SD-92型濃度計を用いた。Coomassie brilliant blue R-250で染色したSDS-ポリアクリルアミドゲルの場合は波長553nmで、Light green SF yellowで染色したAmpholineポリアクリルアミドゲルの場合は波長630nmで測定した。なお、スリット幅は0.2mm、運転速度は20mm/min.で行った。

7. ゲル内沈降反応

Ochterlony (1958)³³⁾の方法に従って行った。唾液中に移行する血清蛋白質成分を同定するため、標準蛋白質として、ラット血清IgG (Miles社, U. S. A.) と、Gambal (1971)³⁴⁾の方法に従って精製したラット血清アルブミンを使用した。抗体はウサギ抗ラット全血清 (医学生物学研究所, 名古屋) を使用した。採取した唾液に1Mエチレンジアミン四酢酸三ナトリウム溶液を終濃度0.8% (W/V) となるように添加したのち、凍結乾燥して濃縮した唾液 (蛋白濃度, 55 μ g/ μ l) を本実験に使用した。標準蛋白質溶液 (蛋白濃度, 2

μg/μl), 抗体および唾液をそれぞれ直径 4 mm の孔に20μl 添加したのち, 4°C で6日間免疫拡散した。

8. 免疫電気泳動法

Scheidegger (1955)³⁵⁾の微量法に従って行った。寒天平板 (25×75mm) は Special agar-noble (Difco 社, U.S.A.) を pH 8.8, イオン強度0.08のトリスーバルビタール緩衝液に1% (W/V) となるように溶解して作製した。直径1mmの孔にゲル内沈降反応に用いた濃縮唾液と、標準蛋白質溶液をそれぞれ5μl 添加したのち, 4°C の氷室で7mA/平板, 定電流の泳動条件で2時間電気泳動を行った。泳動終了後、寒天平板に設けた

抗体溝にウサギ抗ラット全血清を70μl 添加したのち, 4°C で2日間免疫拡散した。

実験結果

1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による血清と顎下腺唾液との蛋白質成分の比較

a. 蛋白質染色による比較

血清および顎下腺唾液の蛋白質成分の電気泳動像は Fig. 3 に示す通りである。図から明らかなように血清蛋白質は画分Ⅰに14個、画分Ⅱに3個、そして画分Ⅲに4個の合計21個の成分に分離した。唾液の蛋白質成分は画分Ⅰに11個、画分Ⅱ

Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms of rat serum and submandibular saliva proteins staining with coomassie brilliant blue R-250
A ; denotes rat serum proteins.
B ; denotes rat submandibular saliva proteins.

Table 1 Comparative study on molecular weight measured by SDS-polyacrylamide gel-electrophoresis of rat serum and submandibular saliva proteins.

Main fraction	Serum protein		Salivary protein	
	No. of bands	Molecular weight	No. of bands	Molecular weight
I	1	322,000	1'	320,000
	2	320,000	2'	280,000
	3	315,000	3'	275,000
	4	305,000	4'	270,000
	5	295,000	5'	220,000
	6	280,000	6'	200,000
	7	270,000	7'	190,000
	8	250,000	8'	160,000
	9	200,000	9'	140,000
	10	160,000	10'	115,000
	11	150,000	11'	104,000
	12	140,000		
	13	130,000	1'	92,000
	14	104,000	2'	79,000
II			3'	69,000
	1	86,000	4'	64,000
	2	69,000		
	3	64,000	1'	41,000
			2'	33,000
	1	51,000	3'	26,000
III	2	41,000	4'	22,000
	3	26,000	5'	19,000
	4	15,500	6'	15,500
IV	—	—	1'	6,500

に4個、画分Ⅲに6個、そして画分Ⅳに1個の合計22個の成分に分離した。

分離した血清および唾液の各蛋白質成分の分子量は Table 1 に示した。血清蛋白質成分の分子量は 322,000~15,500 の範囲に、唾液のそれは 320,000~6,500 の範囲であった。血清と唾液の各蛋白質成分の分子量を比較すると同じ分子量を示す成分は画分Ⅰでは2と1' (分子量320,000), 6と2' (分子量280,000), 7と4' (分子量270,000), 9と6' (分子量200,000), 10と8' (分子量160,000), 12と9' (分子量140,000) および14と11' (分子量104,000) であり、画分Ⅱでは2と3' (分子量69,000) および3と4' (分子量64,000), そして画分Ⅲでは2と1' (分子量41,000), 3と3'

(分子量26,000) および4と6' (分子量15,500) であった。なお、唾液画分Ⅳには分子量6,500の蛋白質成分が存在したが、血清にはなにも認められなかった。

さらに同じ分子量を示す成分でも血清と唾液とでは量的に大きな相違が認められる。すなわち、画分Ⅰの10は血清の主要な蛋白質成分であるのに、8'は唾液の微量な蛋白質成分であった。逆に、画分Ⅲの2は血清の微量な蛋白質成分であるのに、1'は唾液の主要な蛋白質成分であった。したがって両者のそれぞれの画分Ⅰ~Ⅳの相対濃度比を求めて比較すると Table 2 に示すような結果を得た。すなわち、血清の場合の画分Ⅰは全体の30.5%という比率を示すが、唾液の場合では8.2%に過ぎない。画分Ⅱも血清の方が約2倍以上存在している。しかし、分子量のさらに小さい画分Ⅲになると、逆に唾液側で57.5%と全体の半分以上の値を占めるようになり、これは血清の場合の27.0%よりも多い。さらに分子量の小さい画分Ⅳは唾液中のみに13.9%の出現をみたが、血清中からは分画されなかった。

b. 糖染色による比較

血清と唾液の糖蛋白質成分の電気泳動像は Fig. 4 に示した。図から明らかなように、血清蛋白質成分のうち、画分Ⅰの1, 3, 4および5の合計4個以外の17個の蛋白質成分が Alcian blue 8GS で染色された。しかし、唾液では画分Ⅰに3個、画分Ⅱに4個、そして画分Ⅲに5個と各画分にわたって合計12個の蛋白質成分が染色された。なお、画分Ⅳには蛋白質染色で染色されないX成分が、血清と唾液の両者に存在した。

これを先の Table 1 に示した結果と総合して比較すると、両者の糖蛋白質成分のうち、画分Ⅰでは9と6' (分子量200,000), 画分Ⅱでは2と3' (分子量69,000) および3と4' (分子量64,000), そして画分Ⅲでは2と1' (分子量41,000), 3と3' (分子量26,000), および4と6' (分子量15,500) の6成分が同じ蛋白質とみてよい結果である。特に画分ⅡとⅢに分画されるものは同じ分子量のものがいずれも糖染色は陽性であった。これに対して分子量の大きい画分Ⅰでは僅か1成分のみが共通性を示したに過ぎない。

Table 2. Percentage of rat serum and submandibular saliva proteins fractionated on SDS-polyacrylamide gel and Ampholine-polyacrylamide gel.

SDS-polyacrylamide gel			Ampholine-polyacrylamide gel		
Main fraction	Serum Protein	Salivary Protein	Main fraction	Serum protein	Salivary protein
	Mean±S.E.	Mean±S.E.		Mean±S.E.	Mean±E.S.
I	30.5±1.61	8.2±0.92	I	19.6±0.93	53.8±3.91
II	42.5±1.49	20.4±0.83	II	12.5±0.71	22.8±1.94
III	27.0±1.23	57.5±2.09	III	15.1±0.68	5.5±0.72
IV	—	13.9±1.62	IV	30.2±1.01	7.6±1.12
			V	22.6±0.76	10.3±1.53
Rat No.	10	10		7	7

Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms of rat serum and submandibular saliva proteins staining with alcian blue 8GS.
A ; denotes rat serum proteins.
B ; denotes rat submandibular saliva proteins.

Fig. 5 Ampholine-polyacrylamide gel electrophoretograms and densitometric patterns of rat serum submandibular saliva proteins staining with light green SF yellow.

A ; denotes rat serum proteins.

B ; denotes rat submandibular saliva proteins.

2. 等電点電気泳動法による血清と顎下腺唾液との蛋白質成分の比較

血清および顎下腺唾液の蛋白質成分の電気泳動像とその densitometric pattern を Fig. 5 に示した。血清蛋白質は画分 I に 5 個、画分 II に 8 個、画分 III に 3 個、画分 IV に 6 個、そして画分 V に 6 個の合計 28 個の成分に分離された。唾液蛋白質は画分 I に 5 個、画分 II に 7 個、画分 III に 3 個、画分 IV に 5 個、そして画分 V に 5 個の合計 25 個の成分に分離された。

分離された血清と唾液の各蛋白質成分の等電点分布は Table 3 に示した。血清の蛋白質成分の等電点は 3.00~8.55 の範囲に、唾液のそれは 3.00~9.20 の範囲であった。

等電点を同じくする両者の蛋白質成分は画分 I では 1 と 1' (等電点 3.00), 2 と 2' (等電点 3.30), 3 と 3' (等電点 3.48) および 4 と 5' (等電点 3.80) であり、画分 II では 3 と 2' (等電点 4.43), 7 と 6' (等電点 4.75) および 8 と 7' (等電点 4.78), 画分 III では 1 と 1' (等電点 4.90), 画分 IV では 1 と

1' (等電点 5.27) および 2 と 3' (等電点 5.48), そして画分 V では 1 と 1' (等電点 6.12), 3 と 2' (等電点 6.54) および 5 と 4' (等電点 7.24) であった。すなわち、28 個に分離された血清蛋白質成分のうち、13 個の成分が唾液中の蛋白質と同じ等電点を示していた。

それぞれの蛋白質成分を 5 大別した画分 I ~ V の相対濃度比は Table 2 に示す通りである。

分子量分布の場合と同様な特異性が認められる。唾液の画分 I では全体の 53.8% と、大半の蛋白質成分が 3.00~3.99 の値を示したのに対し、血清中のものは 19.6% であった。画分 II では唾液の場合、全体の 22.8% が分布し、この値は血清の約 2 倍に当る。しかし、等電点範囲が上昇するにつれて唾液蛋白群の比率は減少し、逆に血清蛋白群は増大していく。すなわち、画分 III では血清の場合が 15.1% に対し、唾液では 5.5% となり、画分 IV では血清が 30.2% と全蛋白量中、最も高い比率を占めるのに対して唾液では 7.6% である。等電点が 6.10 以上の画分 V では中性、あるいは塩基性

Table 3 Comparative study on isoelectric point measured by isoelectric focusing of rat serum and submandibular saliva proteins.

Main fraction	Serum protenin		Salivary protein	
	No. of bands	Isoelectric point	No. of bands	Isoelectric point
I	1	3.00	1'	3.00
	2	3.30	2'	3.30
	3	3.48	3'	3.48
	4	3.80	4'	3.73
	5	3.97	5'	3.80
II	1	4.20	1'	4.13
	2	4.40	2'	4.43
	3	4.43	3'	4.50
	4	4.65	4'	4.52
	5	4.68	5'	4.70
III	6	4.74	6'	4.75
	7	4.75	7'	4.78
	8	4.78		
	1	4.90	1'	4.90
	2	5.00	2'	5.03
IV	3	5.10	3'	5.15
	1	5.27	1'	5.27
	2	5.48	2'	5.36
	3	5.56	3'	5.48
	4	5.67	4'	5.70
V	5	5.75	5'	5.73
	6	5.88		
	1	6.12	1'	6.12
	2	6.34	2'	6.55
	3	6.55	3'	6.85
	4	6.77	4'	7.24
	5	7.24	5'	9.20
	6	8.55		

蛋白量が唾液でも僅かに上昇して10.3%となるが、これも血清の場合の半分以下の値であった。

3. 免疫化学的方法による 血清と顎下腺唾液の蛋白質成分の比較

a. ゲル内沈降反応

唾液中に移行する血清蛋白質成分の動態をゲル内沈降反応によって観察した。結果は Fig. 6 に示す通りである。

ウサギ抗ラット全血清 (C) とラット顎下腺唾液 (B) との間に2~3本の沈降線が出現したが、そのうちの1本はラット血清アルブミン (A) の沈降線と融合することが認められた (Fig. 6-A)。また、他の1本の沈降線はラット血清 IgG (D) の沈降線と融合した (Fig. 6-B)。

b. 免疫電気泳動法

同様の目的から、ウサギ抗ラット全血清に対する顎下腺唾液蛋白質成分の相関を免疫電気泳動法によって観察した。この結果は Fig. 7 に示す通りである。

唾液蛋白質成分のうち、5個の成分について明確な沈降線の出現することを認めた。Fig. 7のうち、沈降線Aはアルブミン領域、BとCは α_2 -グロブリン領域、Dは β_1 -グロブリン領域であり、Eは α_2 -グロブリン領域に相当している。また、これら沈降線のうち、AとEはそれぞれ血清アルブミン (F) と血清 IgG (G) の沈降線と同じ位置に形成された。

Fig. 6 Double radial immunodiffusion. A: rat serum albumin; B: rat submandibular saliva; C: rabbit anti-rat serum; D: rat serum IgG.

Fig. 7 Immunoelectrophoretogram of rat serum albumin and IgG (upper well), and rat submandibular saliva (lower well).

討 論

一般に外分泌液中に存在する各種成分の由来に関する研究は興味ある多くの問題を含んでいる。著者らは唾液について、そのうちの蛋白質成分の由来を各方面から追求している。

唾液の蛋白質成分の由来は常識的には腺を取り巻く毛細血管を介して、生合成に必要な素材が供給され、腺内で遺伝的に規制された過程によって生合成が行われ、生成物は濃縮空胞から分泌顆粒へと移行して、遂には腺腔内に排出されるものと考えられる。しかし、いきなり血中から高分子物質を取り込んで、そのまま、あるいは特定の化学的な修飾を行ってから唾液中に排出させるという考え方も多いようである。

Mandel (1974)³⁶⁾によればアルブミン、免疫グロブリン (Ig)、リポプロテインなどの他、オロソムコイドやセルプラスミンなどの蛋白質が血液からの「漏出」によって出現すると述べ、また、取り込みの機序はアルブミンは受動的に^{15,17)}、Igは選択的に移行するという^{15,23)}。したがって腺固有の蛋白質はアミラーゼと或種の糖蛋白質であると考えている³⁷⁾。

その他に、例えばリゾチーム、ホスファターゼ、エステラーゼ、 β -グルコニダーゼ、乳酸脱水酵素、リボヌクレアーゼなどの酵素は耳下腺、顎下腺ともに腺細胞以外の部分から排出される微量血液成分であるという^{10,36)}。しかし、パーオキシダーゼについてみると、顆粒管内で主として生合成されていることを細胞化学的に検索した報告が最近行われている^{38,39)}。齧歯類では腺房細胞の存在部と線条部との間に分泌機能を有する顆粒管が

存在することはよく知られている。

IgA の腺内通過と唾液中への排出機構は Tomasi (1973)⁴⁰⁾の詳細な解説にあるように、血流中のプラズマ細胞で作られた IgA が分泌細胞に取り込まれ、腺内において“Secretory component”を賦与されてから排出されるといい、2倍体の IgA 形成機序について述べている。しかし、その一部が血液由来であるとしても、96%はやはり腺内で生合成されるという報告⁴¹⁾も行われている。

免疫化学的手法の発展から、唾液中の蛋白質成分は常に血清のそれと比較されるようになり、おそらく最初に全唾液中、および濃縮された耳下腺唾液からアルブミンと Ig が同定され^{42,43)}、更に IgA や IgM などを含めて7種の蛋白質が同定された報告¹⁷⁾以来、前述の報告でも常に免疫学的な同一性の検討が行われてきた。その結果、同定された蛋白質についてはその由来を血液に求める傾向が多いように考えられる。しかし外分泌細胞において、水分や無機イオン、あるいは有機物質でも低分子のものは別として、説明に困難が付随する。また、これら細胞の活性が低いとは考えられない。

唾液中に出現する蛋白質成分の由来は順次明らかになっていくと考えられるが、今回の報告は以上のような観点にたって血清蛋白質と唾液蛋白質の物理化学的特性、および免疫化学的な特性の比較を行い、表現型としての両成分の差異を明確にすることに努めた。

通法に従うディスク電気泳動像について比較すると、分画される20以上の画分のうち、ヒトとラットでは泳動速度の一致する成分数はラットの方

が多いことが認められている²⁾。今回の観察で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によると、ラットの血清では分子量 100,000 以上のものが 30.5% 存在したのに対して、顎下腺唾液では 8.2% に過ぎない。これはフィブリノーゲン、 α_2 -マクログロブリン、あるいはリポプロテインその他の血清中における重要な蛋白質が含まれないことによるが、それ以外の分子量範囲ではプラスミノゲン、セルロプラスミン、あるいはその他の会合体に相当している。

一方、分子量 51,000 以上のものは顎下腺唾液で合計して 71.4% 出現したのに対し、血清では 27.0% であった。すなわち、唾液中の蛋白質は大部分が分子量の比較的小さい成分で占められており、またアルブミン系の分子量を有する成分 (画分 II) も血清の約半分量である。

次に両体液のうち同じ分子量を示す成分は 12 個であった。しかし、蛋白質に結合する糖質の存在を考慮して Alcian blue 8GS による糖質染色を行い比較すると、両者に共通する成分は 6 個であった。これら成分の分子量はそれぞれ 200,000, 69,000, 64,000, 41,000, 26,000, および 15,500 であった。染らない画分で共通するものは存在しなかった。

本来的な唾液蛋白質の組成については特定構造を有する core 蛋白質の存在が考えられている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。数種の core 蛋白質のアミノ酸組成はそれぞれが共通しており、分子量は 5,000~20,000 くらいであることから、腺房細胞では同一の遺伝子に支配された鋳型による蛋白生成が行われる可能性が想像されており、また、これら蛋白質には糖鎖が結合されて修飾を終ること、また、分泌刺激が加えられると、この core 蛋白質はそのまま唾液成分として排出されてくるという。更にサブユニット構造を有する蛋白質の場合は技術的な影響によって解離が起ることも考慮する必要がある^{29,30)}。以上のことが分子量分布の特性に大きい影響を与えたと考えられる。

唾液の蛋白質成分の等電点を検討した報告では 18~20 個の画分が得られ²⁴⁾、また、その pH 範囲は 2.3~10 といわれている²⁵⁾。著者らの成績も同様の結果であるが、先述の推論と関係の深い成績

である。すなわち、顎下腺唾液では総蛋白量の半数以上に当る 53.8% が等電点 4.00 以下であり、さらに、低分子量蛋白質のほとんどが pH 4.1~4.7 にある^{46,47)}ことからすると、分子量分布特性と大略同じ傾向が認められた。しかし、pH 4.7 付近の血清アルブミン系蛋白質は唾液では $1/3$ 前後となっている。pH 6.12 以上 9 前後の範囲では血清には 22.6% 存在するが、唾液では半分以下であり、謂所、塩基性蛋白質に属する成分は著しく少ない。

両成分のうち、等しい等電点を有する画分は 13 個で、これは全画分の約半数であり、分子量分布の場合と類似している。

次に、ウサギ抗ラット全血清を用いた今回の免疫化学的実験ではラット顎下腺唾液中に血清アルブミン、IgG、および未同定の 3 個の血清蛋白質成分と同一の要因が存在することを明らかにした。これらは先の成績からも充分肯定できる結果である。しかし、アルブミンと IgG 以外の 3 個の成分については、試料唾液に濃縮処理を行った場合だけに出現した。すなわち、イソプロテレノール刺激で得た試料中の総蛋白濃度は約 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ であり、この場合に確認できるのはアルブミンと IgG のみであった。

ヒト耳下腺唾液では存在する主要蛋白質の $3/4$ がプロリン、グリシン、および酸性アミノ酸から成る特性を有する。謂所、core 蛋白質で占められ、このものは糖鎖を有するものと、有しないものがある⁴⁸⁾。更に糖鎖は付加的な抗原決定基として作用するし、また分泌刺激条件によって糖鎖を欠くものが排出されるということ^{45,48)}から考察すると、抗原-抗体反応におけるゲル内沈降線の融合状態は試料唾液の濃縮操作^{16,24)}などと供に、刺激条件の差異によって数的変動の出現する可能性も考えられる。しかし、唾液蛋白質の由来については血清蛋白質のみを対照とするだけでは不充分で、むしろ唾液腺における独自の蛋白質合成機構について更に検討を進める必要がある。

最近、藤田ら (1978)⁴⁹⁾ はイソプレナリン連続投与によるラット唾液腺肥大の問題に関連して、腺房細胞の α -、および β -受容体依存性蛋白分泌系とカテコールアミン投与などの刺激条件との相関

について重要な指針を報告した。

また、このような糖蛋白質以外で、本来的に中性糖、ヘキソサミン、あるいは N-アセチルノイラミン酸などを含有しない特異的な低分子量蛋白質、例えば Proline-rich protein などの生化学的な特性についても今後、検討を進める予定である。

結 論

ラット腹腔内の唾液分泌刺激薬としてイソプロテレノール (8 mg/kg) を投与して、分泌される顎下腺唾液中の蛋白質の特性を物理化学的、あるいは免疫化学的方法によって検討した。また、同条件下に採取したラット血清についても同様の観察を行い、対照とした。

観察方法は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、等電点電気泳動法、ゲル内沈降反応、および免疫電気泳動法を用いた。その結果、次のような結論を得た。

1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分子量分析を行うと、ラット顎下腺唾液中の蛋白質成分は 320,000~6,500 の範囲に22個の成分が分画された。対照とした血清の場合では 322,000~15,500 の範囲で21個であった。

このうち顎下腺唾液の蛋白質は分子量 41,000 以下の成分が総蛋白量の 71.4 % を占める分布を示し、このうちの約14%は分子量 6,500 の成分であるという特性を認めた。これに対し、血清では分子量51,000以下を対照にしても、その分布は 27.4 % であった。

反対に分子量 100,000 以上の範囲は血清で総蛋白量の30.5%を占めるのに対し、唾液では 8.2 % しか存在しなかった。

両蛋白質成分のうち、12 個が同じ分子量を示す成分として同定された。

2. 前記の蛋白質成分のうち、Alcian blue 8GS で染色されるものは唾液で12個、血清には17個存在した。このうち、分子量の一致する蛋白質成分は 6 個であった。これらはそれぞれ分子量 200,000, 69,000, 64,000, 41,000, 26,000 および15,500の成分である。

3. 等電点電気泳動法によって唾液成分は pH

3.00~9.20 の範囲に 25 個、また血清では 3.00~8.55 の範囲に28個に分画された。

唾液総蛋白量の76.6%は等電点 4.78以下に分布し、そのうちの約54%は pH 3.00~3.80 の範囲であった。これに対し、血清の同じ分画では 32.1% しか存在しなかった。血清総蛋白量の77.9%は pH 4.90~8.55 の範囲に分布した。

両者のうち、等電点を等しくする成分は13個であった。

4. 免疫電気泳動法によると、5 個の唾液成分が血清蛋白質成分と一致した。そのうち、アルブミンと IgG を同定した。

5. 以上の成績から、唾液蛋白質の由来を唾液腺における独自の蛋白質合成機構という立場で討論した。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜った横田豊教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) ROBINOVITCH, M. R. and SREEBNY, L. M.: Separation and identification of some of the protein components of rat parotid saliva. *Arch. Biochem. Biophys.*, **14**: 935-949, 1969.
- 2) 阿部公生, 青野 公, 長谷川郁夫, 吉田 洋, 鈴木康夫, 岡 好甫: ラットの顎下腺唾液蛋白質に関する研究. 歯基礎誌, **12**: 383-395, 1970.
- 3) DAWES, C. and JENKINS, G. N.: The effect of different stimuli on the composition of saliva in man. *J. Physiol.*, **170**: 86-100, 1964.
- 4) SCHNEYER, C. A. and HALL, H. D.: Comparison of rat saliva evoked by auriculo-temporal and pilocarpine stimulation. *Amer. J. Physiol.*, **209**: 484-488, 1965.
- 5) ABE, K. and DAWES, C.: Circadian variations in pilocarpine and isoprenaline-induced protein secretion by rat parotid gland. *Archs oral Biol.*, **20**: 543-546, 1975.
- 6) 横田 豊, 阿部公生, 内藤幸雄, 勝川秀夫: 唾液採取条件と唾液蛋白の変動. 5. 各種条件下に採取したラット腺下顎唾液の Disc 電気泳動法的観察. 岐歯学誌, **1**: 73-81, 1974.
- 7) 阿部公生, 横田 豊, DAWES, C.: ラット耳下腺唾液の分泌蛋白量と蛋白質成分の日周期変動. 歯基礎誌, **19**: 128-134, 1977.
- 8) 阿部公生, 藤田良治, 横田 豊, DAWES, C.: ラット耳下腺と顎下腺の唾液蛋白質の分泌に及ぼす電気刺激および薬物刺激の影響. 歯基礎誌,

- 20 : 114-125, 1978.
- 9) SCHRAMM, M., ZVI, R. and BDOLACH, H.: Epinephrine-activated amylase secretion in parotid slices and leakage enzyme in the cold. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18** : 446-451, 1965.
 - 10) KRAUS, F. W. and MESTECKY, J.: Immunohistochemical localization of amylase, lysozyme and immunoglobulins in the human parotid gland. *Archs oral Biol.*, **16** : 781-789, 1971.
 - 11) SCHWAB, M. E., STOCKEL, K. and THOENEN, H.: Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy. *Cell Tissue Res.*, **169** : 289-300, 1976.
 - 12) WALLACE, L. J. and PARTLOW, L. M.: α -Adrenergic regulation of secretion of mouse saliva rich in nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73** : 4210-4214, 1976.
 - 13) ABE, K. and DAWES, C.: The effects of electrical and pharmacological stimulation on the types of proteins secreted by rat parotid and submandibular glands. *Archs oral Biol.*, **23** : 367-372, 1978.
 - 14) ELLISSON, S. E.: Salivary antigens. *J. Dent. Res.*, **45** : 644-654, 1966.
 - 15) BRANDTZAEG, P.: Human secretory immunoglobulins. VII. Concentrations of parotid IgA and other secretory proteins in relation to the rate of flow and duration of secretory stimulus. *Archs oral Biol.*, **16** : 1295-1310, 1971.
 - 16) LEVINE, M. J. and ELLISON, S. A.: Immuno-electrophoretic and chemical analyses of human parotid saliva. *ibid.*, **18** : 839-853, 1973.
 - 17) STOFFER, H. R., KRAUS, F. W. and HOLMES, A. C.: Immunochemical identification of salivary proteins. *Proc. Soc. exp. Biol.*, **N. Y.**, **111** : 467-471, 1962.
 - 18) ELLISON, S. E.: Protein and glycoproteins of saliva. In *Handbook of Physiology*, (Ed. Heider, W.), Vol. 2, p. 531-559, American Physiological Society, Washington, D. C., 1967.
 - 19) MCKEAN, F. J. and BEELEY, J. A.: Immunological studies on human salivary albumin. *Archs oral Biol.*, **19** : 103-106, 1974.
 - 20) BRANDTZAEG, P. and HENSTEN-PETERSEN, A.: Immunogenic properties of human salivary albumin. *ibid.*, **21** : 69-71, 1976.
 - 21) JUNGEIRA, L. C. U., TOLEDO, A. M. S. and FERRI, R. G.: Permeability of the stimulated rat submaxillary gland to its blood serum proteins. *ibid.*, **10** : 863-868, 1965.
 - 22) BRANDTZAEG, P.: Immunochemical comparison of proteins in human gingival pocket fluid, serum and saliva. *ibid.*, **10** : 795-803, 1965.
 - 23) STROBER, W., BLAESE, R. M. and WALDMAN, T. A.: The origin of salivary IgA. *J. Lab. Clin. Med.*, **75** : 856-862, 1970.
 - 24) BEELEY, J. A.: Separation of human salivary protein by isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Archs oral Biol.*, **14** : 559-561, 1969.
 - 25) MAYO, J. W. and CARLSON, D. M.: Protein composition of human submandibular secretions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **161** : 134-145, 1974.
 - 26) DALE, G. and LATER, A. L.: Isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Lancet.*, **20** : 847-848, 1968.
 - 27) YOSHIDA, Y., SPRECHER, C. A. and SCHNEIDER, L. H.: Role of β -receptors in sympathetic regulation of electrolytes in rat submaxillary saliva. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **126** : 912-916, 1967.
 - 28) LOWRY, O. H., RESENBOUGH, N. J. and FARR, A. L.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275, 1951.
 - 29) DUNKER, A. K. and RUECKERT, R.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *ibid.*, **244** : 5074-5080, 1969.
 - 30) WEBER, K. and OSBORN, M.: Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel. *ibid.*, **244** : 4406-4412, 1969.
 - 31) GIFFORD, G. T., YUKINS, L.: Protein patterns in human parotid saliva. *J. Chromatog.*, **20** : 150-153, 1965.
 - 32) AWDEH, Z. L., WILLAMSON, A. R., ASKOAS, B. A.: Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins. *Nature*, **219** : 66-67, 1968.
 - 33) OCHTERLONY, O.: In vitro methods for testing the toxin producing capacity for diphtheria bacteria. *Acta Path. microbiol. scand.*, **25** : 186-191, 1948.
 - 34) GAMBAL, D.: Simple rapid procedure for isolating serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, **251** : 54-56, 1971.
 - 35) SCHEIDEGGER, J. J.: Une micro-methode delimmuno-electrophorese. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **7** : 103-110, 1955.
 - 36) MANDEL, I. D.: Relation of saliva and plaque to caries. *J. Dent. Res.*, **53** : 246-266, 1974.

- 37) MANDEL, I. D. and ELLISON, S. A.: The proteins of human parotid and submaxillary saliva. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **106** : 271-277, 1963.
- 38) STRUM, J. M. and KARNOVSKY, M. J.: Ultrastructure localization of peroxidase in submaxillary acinar cells. *J. Ultrastruct. Res.*, **31** : 323-336, 1970.
- 39) 椋良 治: ハムスター顎下腺細胞における内因性 Peroxidase の局在性についての細胞化学的研究. 歯基礎誌, **20** : 488-506, 1978.
- 40) TOMASI, T. B.: Immunobiology: The gamma A globulins: First line of defence. Ed. Robert, A. Good and David, W. Fisher: p 76-83, Sinauer Assoc. Inc., Stanford. Connect., 1973.
- 41) STROBER, W., BLAESE, R. M. and WALDMAN, T. A.: The origin of salivary IgA. *J. Lab. clin. Med.*, **75** : 856-862, 1970.
- 42) ELLISON, S. A., MASHIMO, P. A. and MANDEL, I. D.: Immunochemical studies of human saliva. I. The demonstration of serum proteins in whole and parotid saliva. *J. Dent. Res.*, **39** : 892-898, 1960.
- 43) LEACH, L. B., WYSHAK, G. H. and WEISBERGER, D.: Human saliva: Its antigenic composition. *ibid.*, **42** : 568-574, 1963.
- 44) AMSTERDAM, A., SCHRAMM, M., OHAD, I., SALOMON, Y. and SELINGER, Z.: Concomitant synthesis of membrane protein and exportable protein of secretory granule in rat parotid gland. *J. Cell Biol.*, **50** : 187-200, 1971.
- 45) FRIEDMAN, R. D., MARRITT, A. D. and BIXLER, D.: Immunological chemical comparison of heterogenous basic glycoproteins in human parotid. saliva. *Biochem. Biophys. Acta*, **230** : 599-602, 1971.
- 46) HAY, D. I.: The isolation from human parotid saliva of tyrosine-rich acidic peptide which exhibits high affinity for hydroxyapatite surfaces. *Archs oral Biol.*, **18** : 1531-1541, 1973.
- 47) HAY, D. I. and OPPENHEIM, F. G.: The isolation from human parotid saliva of a further group of proline-rich proteins. *ibid.*, **19** : 627-632, 1974.
- 48) LEVINE, M. J., ELLISON, S. A. and Bahl, O. P.: The isolation from human parotid saliva and partial characterization of the protein core of a major parotid glycoprotein. *ibid.*, **18** : 827-837, 1973.
- 49) 藤田良治, 阿部公生, 横田 豊: 唾液腺肥大とカテコールアミン. 生化学, **50**(9) : 955, (第51回, 日本生化学会大会抄録), 1978.