唾液腺の胃酸分泌抑制物質 (その 2¹⁾) マウス顎下腺の抗胃酸分泌活性物質の抽出精製²⁾

小林正義, 山元正昭

帝国臓器製薬株式会社化学研究部³⁾

Studies on the Inhibitory Substances of Gastric Secretion in Salivary Glands. (2¹⁾).
Extraction and Purification of the Inhibitory Substance of Gastric
Secretion from Mouse Submaxillary Glands²⁾

MASAYOSHI KOBAYASHI and MASAOKI YAMAMOTO

Chemical Research Laboratory, Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.³⁾

(Received June 8, 1971)

Since a specific inhibitory activity against gastric secretion was found in the submaxillary glands of mice, an attempt was made to extract and purify the active substance. An aqueous extract of the submaxillary glands of adult male mice was purified by a successive process in the order of gel filtration on Sephadex G-100, column chromatography on DEAE-cellulose, and a second gel filtration on Sephadex G-100. This process resulted in a higher purified fraction (Frac. 4B), which exhibited an enhanced activity 100 times that of the crude extract. This fraction was still proved to contain a small amount of contamination by electrophoresis, but the activities of protease, histaminase, and kallikrein were negligible. However, this fraction showed esterase activity 3.2 times that of trypsin. The antisecretory activity was lost by proteolysis or heat treatment. The active substance was assumed to be a protein having a molecular weight of about 50000 from the result of gel filtration.

In the antisecretory activity of the active substance obtained from the submaxillary glands, definite sexual dimorphism like the case of nerve growth factor (NGF) and esterase was not recognized.

前報¹⁾に述べたごとく, マウス顎下腺の抽出分画に発熱性物質と区別し得る特異的な抗分泌活性物質の存在が認められたので, 本物質の精製を行ない, 同時にその性状について一部検討した. また, マウス顎下腺に雌雄 dimorphism があり, 内分泌腺支配を受けていることは, Lacassagne⁴⁾以来, 多くの報告があり,⁵⁾ 神経成長因子 (NGF),⁶⁾ 上皮成長因子 (EGF),⁷⁾ エステラーゼ⁸⁾ などマウス顎下腺に知られている活性物質も, その含量に著しい性差があり, 男性ホルモンの支配下にあることがすでに明らかにされている. そこで本物質についても性差の有無を検討するため雌顎下腺からも一部抽出精製を行なった.

実 験 の 部

1. 実験材料 ICR 系の成熟雄および雌マウスを麻酔死させ, 可及的無菌下で採取した顎下腺を抽出材料とした.

- 1) その 1: 小林正義, 森本武男, 山元正昭, 薬誌, 92, 221 (1972).
- 2) 日本薬学会第 90 年会で発表, 札幌, 1970 年.
- 3) Location: Shimosakunobe, Kawasaki.
- 4) A. Lacassagne, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 133, 180 (1940).
- 5) J. Raynaud, P. Rebeyrotte, *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 228, 433 (1949); B. Grad, C.P. Leblond, *Endocrinology*, 45, 250 (1949); W.G. Schaffer, J.C.M. Muhler, *J. Dental. Res.*, 32, 262 (1953); L.M. Sreenbny, J. Meyer, E. Bachen, J.P. Weimann, *Growth*, 19, 57 (1955); J. Raynaud, *Bull. Biol. France Belg.*, 94, 400 (1960).
- 6) F. Caramia, P.U. Angeletti, R. Levi-Montalcini, *Endocrinology*, 70, 915 (1962).
- 7) S. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 237, 1555 (1962).
- 8) L.C.U. Junquera, A. Fajer, A. Ribinovitch, L. Frankenthal, *J. Cellular Compt. Physiol.*, 34, 129 (1949); R.A. Angeletti, P.U. Angeletti, P. Callissano, *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 372 (1967).

TABLE I. Purification Procedure of the Inhibitory Substance of Gastric Secretion from Mouse Submaxillary Glands

submaxillary glands (ICR strain, adult)	
homogenized, stirred for 1 hr and centrifuged	
supernatant	
lyophilized	(step 1)
Sephadex G-100 gel filtration (pH 7.4, 0.05M tris-HCl buffer)	(step 2)
DEAE-cellulose column chromatography (pH 7.4, 0.05M tris-HCl buffer, 0—0.5M NaCl)	(step 3)
Sephadex G-100 gel filtration (pH 7.4, 0.05M tris-HCl buffer)	(step 4)

2. 抽出精製 Table I に示す方法で抽出精製を行なった。各ステップは 4° で操作し、また細菌汚染については十分配慮した。

水抽出 (step 1)——顎下腺に 15 倍量の水を加え、10 分間ホモジナイズしたのち、1 時間冷却下攪拌抽出した。25000×g で 30 分間遠心分離し、上清を凍結乾燥した (Frac. A)。

セファデックス G-100 ゲルろ過 (step 2)——pH 7.4, 0.05M トリス-塩酸緩衝液を溶媒としたセファデックス G-100 ゲルカラム (95×5 cm) に Frac. A 1.5 g を同緩衝液に溶解、添加し、ゲルろ過を行なった。280 mμ 吸収ピークを示す各溶出分画を透析後、凍結乾燥した。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー (step 3)——pH 7.4, 0.05M トリス-塩酸緩衝液で緩衝化した DEAE-セルロースカラム (23×3.8 cm) に step 2 の活性分画 Frac. (2B+2C) 500 mg を添加したのち、0—0.5M 塩化ナトリウム濃度の段階的溶出を行ない、得られた各分画を透析後、凍結乾燥した。

セファデックス G-100 再ゲルろ過 (step 4)——step 3 の活性分画 Frac. 3C および 3E, 各 200 mg および 400 mg を step 2 と同じセファデックス G-100 ゲルカラム (95×2.5 cm) に添加し、ゲルろ過を行ない、得られた各分画を透析後、凍結乾燥した。

3. 雌マウス顎下腺からの抽出 雄マウスと同じ方法で step 2 までの精製を行なった。

4. 抗胃酸分泌活性の測定 Shay rat を用い、前報¹⁾と同様の方法で行なった。

5. 電気泳動 Step 3, 4 の活性分画について pH 8.4, 0.05M トリスクエン酸緩衝液を溶媒としたポリアクリルアミド薄層ゲル泳動を行ない、アミドブラック 10B で染色した。

6. 熱およびプロテアーゼに対する安定性 熱処理-Frac. 4B の 1% 溶液 (pH 7.4, 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液) を 80° で 2 時間加熱後、凍結乾燥したものについて抗分泌活性を測定した。

細菌プロテアーゼ処理——Frac. 4B と 1/20 量のプロナーゼ⁹⁾ (45000 p.u.k/g) とを pH 8.0, 0.05M トリス塩酸緩衝液 (0.01M 酢酸カルシウムを含む) 中で 37° でインキュベイト後、凍結乾燥したものについて抗分泌活性を測定した。

パペイン処理——Frac. 4B とパペイン¹⁰⁾ (1:350) 1/20 量を pH 5.0, 0.05M 酢酸緩衝液中で 39° でインキュベイト後、凍結乾燥したものについて抗分泌活性を測定した。

7. 各酵素活性の測定 エステラーゼ活性の測定——BAEE¹¹⁾ を基質とし、Kabakoff らの方法¹²⁾により比色定量した。標準品として 2 回結晶トリプシン¹³⁾ (180 TAME¹⁴⁾ unit/mg) を用いた。

プロテアーゼ活性の測定——カゼインを基質とし、Kunitz 法の萩原改良法¹⁵⁾で測定した。標準品としては上

9) 科研化学製。

10) 和光純薬製。

11) α-N-Benzoyl-L-arginine ethyl ester.

12) B.L. Kabakoff, M. Umhey, A. Wohlman, *J. Pharm. Sci.*, **52**, 1188 (1963).

13) Worthington Biochemical 社製。

14) p-Toluene sulfonyl-L-arginine methyl ester.

15) 萩原文二, 米谷 隆, 山本武彦, 小巻利意, “酵素研究法 2 巻” 赤堀四郎編, 朝倉書店, 東京, 1956 年 pp 237—246; M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79 (1938).

記と同じトリプシンを用いた。

ヒスタミナーゼ活性の測定——佐竹らの方法¹⁶⁾を一部改良して行なった。すなわち、pH 7.2, 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 0.6 ml にニワトリオキシヘモグロビン溶液 (23 mg/ml) 0.2 ml, 蒸留水 4.5 ml を加え、酸素を1分間吹きこんだのち、標準ヒスタミナーゼ液または、検液 0.5 ml, 0.08% インジゴカルミン 0.2 ml, 0.01M 塩酸ヒスタミン 0.4 ml を加え、37° で1時間インキュベイトののち、40% TCA 0.8 ml を添加し、遠心分離後、上清について 615 mμ で比色定量した。標準ヒスタミナーゼとして豚腎臓より Mondovi らの方法¹⁷⁾により step 4 までの部分的精製を行なったものを用いた。

8. 血管拡張作用の測定 体重 10 kg のイヌをフェノバルビタールソーダ 150 mg/kg 静注で麻酔し、肢動脈を露出し、カニューレを挿入し、電磁流量計に接続し、肢動脈血流量をポリグラフ上に描かせ、流量計末端部より検体を投与した際の血流量増加作用より測定した。標準品として純化カリクレイン (1000 kallikrein unit/mg¹⁸⁾) を用いた。

結 果

1. 各精製段階の収率および活性

Step 2 のゲルろ過で Frac. 2B, 2C は、0.5 mg/kg の等しい抗分泌活性を持ち、発熱性は同用量で (—) であった。Frac. 2A にもわずかの活性の溶出が見られるが Frac. 2B のオーバーラップであろうと考えられる (Fig. 1)。

Frac. 2B および 2C を混合し、DEAE ステップワイズカラムにかけると、Fig. 2 に示すごとく Frac. 3C お

Fig. 1. Gel Filtration of Frac. A on Sephadex G-100

Frac. A (1.5 g) was applied to a 95 × 5 cm of column and developed with pH 7.4, 0.05M tris-HCl buffer.

Activity (mg/kg)	1.25	0.5	0.5	2.0	2.0	2.0	2.0
	(+)	(+)	(+)	(—)	(—)	(—)	(—)
Pyrogenicity (mg/kg)	1.25	0.5	0.5	2.0	2.0	2.0	2.0
	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)

Fig. 3a. Gel Filtration of Frac. 3C on Sephadex G-100

Frac. 3c (200 mg) was applied on a 95 × 2.5 cm of column and developed with pH 7.4, 0.05M tris-HCl buffer.

Activity (mg/kg)	0.5	0.025	1.0	1.0
	(+)	(+)	(—)	(—)
Pyrogenicity (mg/kg)	0.5	0.025	1.0	1.0
	(—)	(—)	(—)	(—)

Fig. 2. Chromatography of Frac. (2B+2C) on DEAE-cellulose

Frac. (2B+2C) (5000 mg) was applied to a 23 × 3.8 cm of column. Elution was carried out with (1) pH 7.4, 0.05M tris-HCl buffer, (2) +0.05M NaCl, (3) +0.075M NaCl (4) +0.1M NaCl, (5) +0.25M NaCl, (6) +0.5M NaCl.

Activity (mg/kg)	1.0	1.0	0.075	1.0	0.25	1.0
	(—)	(—)	(+)	(—)	(+)	(—)
Pyrogenicity (mg/kg)	1.0	1.0	0.075	1.0	0.25	1.0
	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)

Fig. 3b. Gel Filtration of Frac. 3E on Sephadex G-100

Frac. 3E (400 mg) was applied on a 95 × 2.5 cm of column and developed with pH 7.4, 0.05M tris-HCl buffer.

Activity (mg/kg)	0.25	0.5
	(+)	(+)
Pyrogenicity (mg/kg)	0.25	0.5
	(—)	(—)

16) 安里 竜, 奥山典生, 佐竹一夫, 日化, **88**, 772 (1967).

17) B. Mondovi, G. Rotilio, M.T. Costa, A. Finazi-Agro, E. Chiancone, R.E. Hansen, H. Beinert, *J. Biol. Chem.*, **242**, 1160 (1967).

18) E.K. Fray, H. Kraut, E. Werle, "Kallikrein Paudutin" Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1950, p. 5.

よび 3E にそれぞれ 0.075 mg/kg, 0.25 mg/kg で活性をもつ分画が得られる。これら分画にも発熱性はまったく認められなかった。次に Frac. 3C と 3E を別々に再ゲルろ過にかけると Frac. 3C については Frac. 4A, 4B (Fig. 3a) に, Frac. 3E については Frac. 4E, 4F (Fig. 3b) にそれぞれ 0.5, 0.025, 0.25, 0.5 mg/kg で活性をもつ分画が溶出した。発熱性はいずれの分画も同用量で (-) であった。

各精製段階の収率, 活性および活性収率は Table II に示すごとくである。最強活性は, Frac. 4B に見られ, Frac. A の 100 倍に活性が上昇し, 活性収率も 13% と最も多かった。Frac. 4E にも Frac. 4B の 1/10 の弱い活性が認められ, 活性収率は 6.7% と Frac. 4B についている。Frac. 4A, 4F の活性は, それぞれ Frac. 4B, Frac. 4E のオーバーラップ部分と考えられる。

TABLE II. Yield and Antisecretory Activity at Each Purification Step

Step	Frac.	Yield mg/g gland	Activity mg/kg (M.E.D)	Recovery of total activity (%)
1	A	135	2.5	100
2	2B	12.9	0.50	48
	2C	13.0	0.50	48
3	3C	1.57	0.075	39
	3E	4.01	0.25	30
4	4A	0.50	0.50	0.6
	4B	0.18	0.025	13
	4E	0.91	0.25	6.7
	4F	0.45	0.50	1.7

2. 雌マウス顎下腺の抗分泌活性

雌マウス顎下腺からの Frac. A を雌マウスの場合と同様にセファデックス G-100 ゲルろ過にかけると, Fig. 4 に示すゲルろ過パターンが得られる。雌マウスのパターンに類似するが, Frac. 2E のピークがいちじるしく小さい。抗分泌活性は雄の場合と同様, Frac. 2B, 2C に溶出するが, その活性は $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ とやや弱い。これらの分画に発熱性はまったく認められなかった。

3. 電気泳動

Step 3, 4 の活性分画の泳動像は Fig. 5 に示すとおりである。Frac. 4B はまだ単一ではないが, その主成分は α -グロブリン近似の移動度を示し, この成分が活性主成分と推定される。Frac. 4A はほぼ単一に近い泳動像を示すものの,

Fig. 4. Gel Filtration of Frac. A from Female Mouse Submaxillary Glands

Frac. A (1.5 g) was applied to a 95×5 cm of column of Sephadex G-100.

— : female

--- : male

Yield (mg/kg)	24.8	9.0	6.4	4.5	2.7	3.6	0.1	0.03
Activity (mg/kg)	5.0	1.25	1.0	5.0	5.0	5.0	1.0	1.0
Pyrogenicity (mg/kg)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Pyrogenicity (mg/kg)	5.0	1.25	1.0	5.0	5.0	5.0	1.0	1.0
Pyrogenicity (mg/kg)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Fig. 5. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Active Fractions

Electrophoresis was carried out in pH 8.4, 0.05M tris-citrate buffer and the gel was stained with amide black 10B.

活性の弱いことから、この主成分が活性部分が明らかでない。Frac. 4E, 4F は主に酸性タンパクからなる、いくつかの成分のほかに、Frac. 4B の主成分に相当する微成分を含む。

4. 熱およびプロテアーゼに対する安定性

Frac. 4B は 80°, 2 時間処理で完全に失活し、プロナーゼとの 2 時間インキュベイトで明らかに活性の減少が見られ、16 時間インキュベイトでは完全に失活した (Table III)。また、パペインとのインキュベイトでは若干の活性減少の傾向が見られたが、明らかな差ではなく、パペインのごとき SH 酵素にかなり抵抗性のあることを示した。

TABLE III. Effect of Heating and Proteolysis on Antisecretory Activity of Frac. 4B

Treatment	Dose μg/kg	Antisecretory activity ^{a)} (%)		
		Volume	Free acidity	Total acidity
Heating (80°, 2 hr pH 7.4)	25	-10	+6	+13
Control (20°, 2 hr pH 7.4)	25	-80	-100	-44
Pronase (2 hr)	25	-37	-35	-7
Control ^{b)} (2 hr)	25	-70	-86	-23
Pronase (16 hr)	25	+13	-4	-2
Control ^{b)} (16 hr)	25	-92	-100	-58
Papain (16 hr)	25	-61	-63	-9
Control ^{b)} (16 hr)	25	-77	-90	-21

a) percent decrease against to assay control

b) incubated without enzymes

5. 各酵素活性

Frac. 4B のプロテアーゼ活性はトリプシンの 1/300 以下、ヒスタミナーゼ活性はヒスタミナーゼ標準品の 1/30 以下で、共に活性はこん跡程度であった。一方エステラーゼ活性はトリプシンの 3.2 倍の値を示した (Table IV)。しかし、マウス顎下腺はもともとかなり強いエステラーゼ活性を含んでおり、抽出各ステップでの回収をみると Table V に示すように、その大部分はまず step 2 の Frac. 2D として除かれ、step 3 の Frac. 3A, 3B で残りの大部分が除かれており、Frac. 4B のエステラーゼ活性収率は 0.1% にすぎない。

6. 血管拡張作用

Frac. 4B の血管拡張作用は Table IV に示すごとく、カリクレインにくらべ、はるかに微弱で、ほとんど無視することができる。

考 察

マウス顎下腺の抗分泌活性物質を抽出精製した結果、最終的に強活性分画 (Frac. 4B) と弱活性分画 (Frac. 4E) を得ることができた。Frac. 4B は 0.025 mg/kg の抗分泌活性を持ち、発熱性をまったく示さない。共に抽出される sub-フラクション (Frac. 4A) は単一に近い band を示すものの、活性が弱いことから活性本体はこの band になく、この活性は Frac. 4B のわずかの混入によるものと思われる。Frac. 4E は収量もやや多く、活性収率も 6.7% を示すうえ、酸性タンパク成分を多く含んでいる。しかし泳動像を見ると、Frac. 4B に相当する band をわずかに含んでいるので、この弱い活性は同様に Frac. 4B の混在によるものと思われる。

TABLE IV. Enzymatic Properties of Frac. 4B

Activity	Frac. 4B	Standard
Esterase (μmoles BAEE/min/mg)	218	64 (trypsin)
Protease ([PU] ^{cas. 275. B} / _{μg. 17r.} /mg)	9	2632 (trypsin)
Histaminase (μmoles histamine/hr/mg)	<0.05	1.7 (histaminase extract)
Increase in blood flow rete (kallikrein unit/mg)	0.032	1000 (kallikrein)

TABLE V. Esterase Activity at Each Purification Step

Step	Frac.	Activity (BAEE μ moles/min/mg)	Recovery of total activity %
1	A	283	100
2	2A	38.6	2.5
	2B	70.8	2.4
	2C	425	14.4
	2D	1063	50.4
	3A	741	10.6
3	3B	489	4.2
	3C	245	1.0
	3D	—	—
	3E	38.6	0.4
	3F	32.2	0.08
4	4A	245	0.1
	4B	219	0.1
	4C	309	0.04
	4D	—	—
	4E	3.2	0.008
	4F	23.2	0.03

Frac. 4B の活性本体は、その安定性からタンパク質と推定され、ゲルろ過の溶出パターンから、分子量 50000 前後と算定される。プロテアーゼ、カリクレイン、ヒスタミナーゼ活性はこん跡かまたは無視し得るから、これら既知物質による活性でないと考えてよい、ただ、トリプシンの 3.2 倍のエステラーゼ活性を持つ点は、これが本物質の持つ固有な性状か、あるいはエステラーゼの混在によるものか、完全に純化が行なわれていない現在不明であり、今後の検討にまたねばならない。

本物質の雌雄差も一部検討したが、雌顎下腺からも単位活性はやや低いものの、かなりの活性が見い出されており、たとえば NGF の場合のような雌顎下腺抽出液が雄の 1/10—1/20 という値^{5,19)}にくらべられる程の雌雄間の差は認められない。したがって、抗分泌活性物質に関するかぎり雌雄性差はそれほど顕著といえないようである。

謝辞 本研究に当たり、終始御鞭撻をいただいた当化学研究部宮田部門長、沢井部長に謹謝し、Assay その他を担当された樽谷主任研究員、飯塚和雄ほか当社薬理研究部の諸氏に深謝いたします。

19) R. Levi-Montalcini, P. U. Angeletti, "Salivary Glands and their Secretion" ed, by L.M. Sreenbny and J. Meyer, Pergamon, New York, N.Y., 1963.