人唾液蛋白質の生化学的研究 (第 8 報¹⁾) 緩和な条件下での 人唾液からのパロチン様物質の分離

久保田幸穂, 植木 寛, 庄司ひろみ, 庄司省三
熊本大学薬学部²⁾

Biochemical Studies on Human Salivary Proteins. VIII.¹⁾ Separation of a Parotin-like Substance from Human Saliva under Mild Conditions

YUKIHO KUBOTA, HIROSHI UEKI, HIROMI SHOJI and SHOZO SHOJI
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University²⁾

(Received June 25, 1971)

A parotin-like substance, fraction 100-1, was separated in a highly purified form from mixed human saliva by mild procedures which comprised acetone fractionation, chromatography on ECTEOLA- and CM-cellulose, and Sephadex G-100 gel filtration. This substance produced hypocalcemia and leucocytosis preceded by transient leucopenia in rabbits with a single intravenous injection of 0.1 mg/kg. It also elicited depression of the serum acid phosphatase activity in a dose of 0.15 mg/kg. It has a molecular weight of 350000 and contains 21.6% galactose and 19.6% glucosamine. The relation of this substance to other parotin-like substances from human saliva is discussed.

人唾液中のパロチン様物質としては伊藤ら^{3a)} および岡部^{3b)} が分子量⁴⁾ 15900 の saliva-parotin-A (SPA) を、また植木ら⁵⁾ が人唾液粗製抽出物のプロナーゼ消化物から糖および脂質を含む分子量 55000 の複合蛋白質 E-3 を得ている。しかしこれらの物質は精製途中 60° での氷酢酸処理を行ない、また E-3 ではさらに酵素消化を加えているので、ペプチド鎖や水素結合の切断などによる分子形状や大きさの変化が起っていると考えられる。伊藤ら⁶⁾ は緩和な条件下で活性物質 saliva-parotin の抽出を試みているが、高純度を得ることは成功していない。本研究は分子性状の変化を防ぐためイオン交換クロマトグラフ、ゲル濾過など緩和な精製条件を用いて人唾液からパロチン様物質を分離する目的で行なった。

実 験 の 部

材料 唾液は健康な男女成人より採取した混合唾液を用いた。ECTEOLA-セルロースおよびCM-セルロースはミドリ十字製、Sephadex G-100 は Pharmacia 製、セルロースアセテート膜は常光産業製 (Separax)、シリカゲルは Merck 製 (Silicagel G) を使用した。

アセトン分画 唾液にアセトンを 80% (v/v) 濃度に加え、生ずる沈殿を 15000 rpm で 30 分遠沈して分離し、アセトンで洗った後減圧乾燥してプールした (S-ppt)。唾液 1 liter からの収量 4.5 g。S-ppt 10 g に脱イオン水 500 ml を加え、0.1N NaOH により pH 8.0 に調節し室温で 1 時間攪拌抽出した。ついで 4° で 15000 rpm, 30 分遠沈し、上清に NaCl を 0.1% に加え、さらに同容の冷アセトンを加えて 1 夜 0—5° に放置した。生ずる沈殿を上記同様遠沈で集め、少量の脱イオン水に溶かし凍結乾燥した (SA-50)。収量 1.8 g。以下の操作はすべて 0—5° で行なった。

ECTEOLA-セルロースクロマトグラフィー ECTEOLA-セルロースを脱イオン水に懸濁して傾斜する操作を数回くり返した後 0.5N HCl, 水, 0.5N NaOH の順に洗って Na 型とし、さらに水洗後 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で緩衝化しカラム (1.5×23 cm) につめた。30 mg の SA-50 を同じ緩衝液 1 ml に溶かしてカラムにのせ、0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.5), 0.5N NaOH の順で stepwise 法により 60

1) 第 7 報 : 久保田幸穂, 植木 寛, 市下浩子, 庄司省三, 薬誌, 92, 531 (1972).

2) Location: 5-1 Oe-honcho, Kumamoto.

3) a) Y. Ito, S. Okabe, *Endocrinol. Japon.*, 6, 166 (1959); b) S. Okabe, *ibid.*, 6, 277 (1959).

4) Y. Ito, Y. Kubota, *J. Biochem.*, 1960, 475.

5) 植木 寛, 久保田幸穂, 伊藤四十二, 薬誌, 89, 482 (1969).

6) Y. Ito, S. Okabe, *Endocrinol. Japon.*, 2, 195 (1955).

ml/hr の流速で溶出した。流出液は 5 ml ずつ分取し隔管毎に蛋白濃度を Cu-Folin 法⁷⁾ によって測定した。後出 Fig. 1a に示すように 3 ピーク (E-1—3) を得、各画分をコロジオンバッグ⁸⁾ 透過および透析によって脱塩し凍結乾燥した。活性は E-2 にあり、この画分をつぎの精製用にプールした。1.8 g SA-50 からの E-2 の収量 0.68 g。

CM-セルロースクロマトグラフィー CM-セルロースを前記と同様にして水洗活性化し、最後に 0.5N HCl で H 型とし水洗後 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で緩衝化しカラム (2×17 cm) につめた。20 mg の E-2 を同じ緩衝液 3 ml に溶かしてカラムにのせ、0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5.0), 0.5M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) の順で step-wise 法により 60 ml/hr の流速で溶出した。流出液は 3 ml ずつ分取し隔管毎に蛋白濃度を Cu-Folin 法で、糖濃度をアンスロン法⁹⁾ で測定した。2 つのピーク (C-1,2) を得 (Fig. 1b), いずれも脱塩後凍結乾燥した。活性は C-2 にあり、これをプールした。0.68 g E-2 からの C-2 の収量 0.16 g。

Sephadex G-100 ゲル¹⁰⁾ 透過 Sephadex G-100 を 1% NaCl 中で十分膨潤させた後水洗傾斜をくり返し、ついで 0.1M Na₂HPO₄ (pH 9.4) で緩衝化しカラム (1.6×69 cm) につめた。11 mg の C-2 を同じ溶媒 1 ml に溶かしてカラムにのせ、同じ溶媒により 20 ml/hr の流速で溶出した。流出液を 5 ml ずつ分取し隔管毎に蛋白および糖濃度を測定した。3 つの画分 (100-1—100-3) を得 (Fig. 1c), すべて脱塩後凍結乾燥した。活性は 100-1 画分にあり、これを精製標品として以下の分析を行なった。0.16 g C-2 からの 100-1 画分の収量 0.07 g。S-ppt および原唾液からの 100-1 画分の収率はそれぞれ 0.7% および 0.003% である。

生物検定 実験動物は 24 時間絶食させた体重 2.5—3.0 kg の雄家兎を使用した。パロチン作用の検定は従来から常用されている 2 種の方法、すなわち家兎血清カルシウム濃度低下作用および循環白血球数変動作用の測定によって行なった。⁹⁾ 血清カルシウム低下作用の検定はつぎのように行なった。耳静脈に検体を注射後 5.5 時間に採血してキレート滴定法によりカルシウムを定量し、この値の直前値に対する減少率を求め、これによって活性を表わした (Ca-活性)。検体は生理食塩水に溶かしその 0.1 ml が家兎体重 1 kg 当りの所要量を含むよう調製した。対照群には同容の生理食塩水を静注した。

循環白血球数変動作用は Ca-活性測定と同時に進めた。注射後 2, 4, 7 時間における総白血球を算定し、直前値に対する変化率を求め、これを時間に対してプロットして変動曲線を得た。活性のある場合は白血球数は 2 時間で減少し、7 時間で増加を示す (L-活性)。

部分的に精製した SPA は注射後 5.5 時間で家兎血清酸性ホスファターゼ活性を有意に低下させることが認められているので、¹⁰⁾ 本研究においても 100-1 画分についてこの作用を検定した。100-1 画分 0.15 mg/kg を家兎に静注後 5.5 時間で採血し、血清酸性ホスファターゼ活性を Na p-nitrophenylphosphate を基質とする Linhardt および Walter の方法¹¹⁾ により測定した。この値の直前値に対する変化率を求め、これによって酸性ホスファターゼに対する活性を表わした。¹⁰⁾

セルロースアセテート膜電気泳動 セルロースアセテート膜は幅 1—2 cm, 長さ 6 cm のものを使用し、0.05 M ペロナール緩衝液 (pH 8.6), 中、定電流 0.6 mA/cm で 45 分泳動を行なった。染色は 1% HgCl₂ を含む 2% 酢酸に 0.05% にニグロシンを溶かした溶液を用いて行なった。

超遠心分析 超遠心による純度検定および分子量測定は日立 UCA-1A 型超遠心機を用いて行なった。100-1 画分 5 mg を 0.1M NaCl 含有 0.036M リン酸緩衝液 (pH 7.6) 0.5 ml に溶かし、同じ緩衝液に対し 1 夜透析したものを試料とした。NaCl は荷電効果を打消すために加えた。沈降係数は 51200 rpm で、拡散係数は 14400 rpm で合成界面セルを用いて測定し、20° の純水中の値に換算してそれぞれを S_{20,w} および D_{20,w} とした。

糖の分析 ゲル¹⁰⁾ 透過溶出曲線から 100-1 画分は糖を含むと認められたので、薄層クロマトグラフィーによる糖の同定および比色法による定量を行なった。100-1 画分を真空封管中 3N HCl で 100°, 3 時間加水分解し、分解物に脱イオン水を加えて減圧下に HCl を除去する操作を数回くり返した。ついでこの加水分解物を Dowex 50×2 のカラム (0.7×16 cm) および 0.5N HCl を展開剤として用いるクロマトグラフィーにかけてヘキソース画分とヘキソサミン画分を分離し、¹²⁾ 各画分について薄層クロマトグラフィーによる同定を行なった。シリカゲル 20 g を 40 ml の脱イオン水に懸濁し、20×20 cm のプレート上 250 μ の薄層をつくり、20 分風乾後 120° に 30 分加熱して活性化した。展開は PrOH-H₂O (7:1) で、¹³⁾ 発色はアニリン水素フタレート試薬で行なった。

ヘキソースの定量は試料を加水分解せずそのままアンスロン法⁹⁾ で、ヘキソサミンの定量は上記条件による加水分解物について Elson-Morgan 変法¹⁴⁾ で行なった。比色標準物質としては薄層クロマトグラフィーで検出されたガラクトースおよびグルコサミンを用いた。

7) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

8) 阿武喜美子, 瀬野信子, “糖質実験法,” 生物化学実験法 XI (蛋白質核酸酵素別冊), 共立出版, 東京, 1968, pp. 13—26.

9) Y. Ito, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85**, 228 (1960).

10) Y. Kubota, H. Ueki, *Endocrinol. Japon.*, **15**, 105 (1968).

11) K. Linhardt, K. Walter, “Methods of Enzymatic Analysis,” ed. by H.-U. Bergmeyer, Academic Press, New York and London, 1963, p. 783.

12) N.E. Boas, *J. Biol. Chem.*, **204**, 553 (1953).

13) A.E. Gal, *Anal. Biochem.*, **24**, 452 (1968).

14) R. Belcher, A.T. Nutten, C.M. Samlorook, *Analyst*, **79**, 201 (1954).

結 果

精製と純度

クロマトグラフィおよびゲル濾過の溶出曲線を Fig. 1 に示す。活性のあるピークには斜線をほどいた。糖の測定を行なった。CM-セルロースクロマトグラフィおよびゲル濾過 (Fig. 1b,c) においては、活性をもつ蛋白ピークは常に糖のピークをとまっていた。ゲル濾過においては糖のピークを考慮して活性画分の分取を行なった。各活性画分の収量は実験の部に示した。Fig. 2 は各種画分のセルロースアセテート膜電気泳動像を示す。E-2, C-2, 100-1 と精製が進むに従い夾雑蛋白と考えられるバンドの数が減少ないしは染色がうすくなり、活性画分に該当するバンドの染色が強くなった。最終標品 100-1 画分では単一バンドを示したが、原線に向かってわずかな tailing が認められた。無効画分 100-2, 100-3 は E-2 および C-2 にみられる原線付近の蛋白を含むが、この蛋白は 100-1 画分では除去されている。Fig. 3 は 51200 rpm で 100-1 画分の沈降像を示す。単一ピークとして沈降しているが、メニスカス側にわずかの非対称性がみられるので、100-1 画分より低分子量の微量成分が混在する可能性が考えられる。しかしこのピークはセル底に到達するまで単一のまま沈降し第 2 のピークの分離は認められず、夾雑蛋白が存在するとしてもきわめて微量で、100-1 画分の純度は高いと推定される。

生物活性

各活性画分の家兎血清カルシウム濃度に対する影響を Table I に示す。5% 以上のカルシウム低下率を示す場

Fig. 1. Purification of Parotin-like Substance by Chromatography and Gel Filtration

- : Cu-folin, —○—: anthrone Active peaks are cross-hatched. Effluent was collected in 5 ml fractions in (a) and (c), and in 3 ml fractions in (b).
 (a) ECTEOLA-cellulose: sample, 30 mg SA-50; eluant, (1) 0.01M phosphate buffer (pH 7.0), (2) 0.1M phosphate buffer (pH 8.5), and (3) 0.5N NaOH
 (b) CM-cellulose: sample, 20 mg E-2; eluant, (1) 0.01M acetate buffer (pH 5.0), and (2) 8.5M acetate buffer (pH 6.0)
 (c) Sephadex G-100; sample, 11 mg C-2; eluant, 0.1M phosphate buffer (pH 9.4)

Fig. 2. Cellulose Acetate Paper Electrophoresis of Fractions Obtained by Chromatography and Gel Filtration.

buffer, 0.05M veronal buffer (pH 8.6); current, 0.6 mA/cm; time, 45 min; staining, 0.05% nigrosin

Fig. 3. Ultracentrifugal Pattern for Fraction 100-1

rotor speed, 51200 rpm; phase plate angle, 70°; time, 22 min
 Centrifugal force is from right to left.

TABLE I. Effect of Fractions of Various Purification Stages on Serum Calcium Levels in Rabbits

Fraction	Dose (mg/kg)	No. of rabbits	% decrease in serum Ca
SA-50	0.6	3	9.77 ± 1.59 ^{a)}
E-2	0.4	8	8.15 ± 0.58
C-2	0.15	4	8.45 ± 1.31
100-1	0.1	7	8.45 ± 0.93
Control	— ^{b)}	7	0.23 ± 0.43

a) mean ± S.E. b) physiological saline

合を有効とした.¹⁵⁾ 100-1 画分は 0.1 mg/kg の用量で明らかな Ca-活性を示した。

Fig. 4 は各画分の循環白血球数に対する影響を示す。各画分とも2時間で減少、7時間で増加というパロチン特有の白血球数の変動がみられた。100-1 画分は Ca-活性と同様 0.1 mg/kg の用量で明らかな L-活性を示した。

血清酸性ホスファターゼ活性の検定は対照群、投与群ともに家兎6匹を用いて行なった。100-1 画分 0.15 mg/kg の注射後 5.5 時間のホスファターゼ活性変動率の平均値 (Mean ± S.E.) は、対照群 $-5.28 \pm 2.20\%$ 、投与群 $-21.29 \pm 4.84\%$ で、両群の差は推計学的に有意 ($p < 0.02$) であった。なお Mean の一符号はホスファターゼ活性の低下を表わす。

分子量

超遠心分析によって得た $S_{20,w}$ は 9.2S, $D_{20,w}$ は 1.9×10^{-7} cm²/sec で、これから算出される分子量は 350000 である。分子量算出に用いる偏比容としては、100-1 画分と糖含量の近似する E-3 についての計算値 0.659 ml/g を使用した。⁵⁾

糖の同定と含量

Dowex 50×2 クロマトグラフィによって分離したヘキソース画分およびヘキササミン画分は、薄層クロマトグラム上それぞれ R_f 0.38 および R_f 0.16 のスポットを与えた。前者は同時に展開した各種糖標準品のうちガラクトース (R_f 0.39) に、後者はグルコサミン (R_f 0.15) に一致した。アンスロン法による 100-1 画分のガラクトース含量は 21.6%、Elson-Morgan 法によるグルコサミン含量は 19.6% で、両者の和は 41.2% であった。

考 察

本研究では、伊藤ら^{3a)} によって SPA の抽出に用いられた高温での氷酢酸処理をさけ、溶媒として水および冷アセトンを用い、低温でイオン交換クロマトグラフィ、ゲル濾過を行なう緩和な条件下で精製を試みた。最終標品 100-1 画分は native あるいはそれに近い状態で得られていると考えられる。セルロースアセテート膜電気泳動および超遠心分析で単一成分を与えるので、100-1 画分の純度はきわめて高いと推定される。

15) 緒方 章, 伊藤四十二, 薬誌, 64, 416 (1944).

Fig. 4. Effect of Fractions of Various Purification Stages on the Number of Leukocytes in Rabbits

dose: SA-50, 0.6 mg/kg; E-2, 0.4 mg/kg; C-2, 0.15 mg/kg; 100-1, 0.1 mg/kg; control, physiological saline

現在までに人唾液から均質に分離されたパロチン様物質としては SPA および E-3, 粗製段階のものとしては saliva-partoin がある. SPA および saliva-parotin に関する糖の分析の報告はないが, E-3 はガラクトース 33.58%, グルコサミン 12.51% を含み, 糖の種類が同じでまたそれらの含量の高い点 100-1 画分に類似する. E-3 の分子量は 55000 で 100-1 画分の 350000 と比較するとかなり小さい. E-3 は粗製段階で高温氷酢酸処理およびプロナーゼ消化を加えているので, それ自身が分子の大きい活性蛋白質の断片であると考えられる. SPA (分子量 15900) もその分子の大きさ, 化学試薬に対する高い安定性,¹⁶⁾ 活性の強さ^{3b)} などから, 氷酢酸処理中に遊離した活性断片である可能性が強い. E-3 が 100-1 画分から生じたと推定するのは実験的資料の得られていない現在困難であるが, 生物作用や糖含量などの共通点から両者が何らかの関係をもつことが考えられる. E-3 の Ca-活性, L-活性はともに 100-1 画分よりも強く,¹⁷⁾ 前者の用量 2.5—5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が後者の 0.1 mg/kg にほぼ匹敵する. これは前者の分子量が小さいこと, 標的組織への吸収移動が速やかなこと, 分子形状の変化により活性部位が表在化したことなどによると考えられる. 伊藤らの saliva-parotin も等電点沈殿やアセトン分画など緩和な条件下で分離されたものであるが, まだ部分的に精製されたのみで分子量も測定されておらず, 100-1 画分との比較は困難である. しかし粗製品をつくる段階での抽出条件が両者類似することから, これらが同一物である可能性が考えられる. 上記各パロチン様物質の相互関係の解明にはさらに研究が必要である.

CM-セルロースクロマトグラフィにおいては画分 C-2 に主として活性が見出されたが, C-1 にも弱い Ca-活性と L-活性の認められることがあった. これは活性物質の一部が共存不活性蛋白質と複合体をつくり C-1 画分に溶出されてきたものと考えられる. Sephadex G-100 によるゲル濾過においてはこのような活性の分散は見られなかった. また精製途上活性物質の Ca-活性と L-活性は常に平行し, 両活性が分離することはなかった.

100-1 画分は 0.15 mg/kg の静注後 5.5 時間で血清酸性ホスファターゼ活性を平均値で 21.29% 低下せしめた. 部分的に精製した SPA も 0.1 mg/kg の静注で同程度の低下をきたし, また同時に著明な Ca-活性と L-活性を示すことから,¹⁸⁾ SPA と 100-1 画分は同一の生物作用をもつと推定される. これらパロチン様物質による血清酸性ホスファターゼ活性低下の生物学的意義は現在明確でないが, 雌家兎においても低下がみられるので,¹⁰⁾ 前立腺酸性ホスファターゼの変動によるものではない. 酸性ホスファターゼは破骨細胞にも多く含まれ, また甲状腺機能亢進症など骨代謝の異常をきたす疾患においてその血清中の活性が上昇することから,¹⁸⁾ SPA や 100-1 画分が生体内において骨成長や骨吸収の調節に関与していることが推定される.

16) S. Okabe, *Endocrinol. Japon.*, **6**, 284 (1959).

17) 植木 寛, 薬誌, **89**, 492 (1969).

18) 平野井直英, 鈴木 宏, 五十嵐省吾, 織田敏次, 吉利 和, 医学のあゆみ, **67**, 589 (1968).