

唾液腺ホルモン(パロチン)の構造安定性

飯山, 悟
九州大学農学部食糧化学教室

大村, 浩久
九州大学農学部食糧化学教室

<https://doi.org/10.15017/22288>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 36 (2/3), pp.83-88, 1982-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

唾液腺ホルモン(パロチン)の構造安定性

飯山 悟・大村 浩久*

九州大学農学部食糧化学教室

(1982年1月16日 受理)

Structural Stability of Salivary Gland Hormone (Parotin)

SATORU IYAMA and HIROHISA OMURA*

Food Chemistry Laboratory, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-09, Fukuoka 812

唾液腺ホルモンは最初、唾液腺を構成する耳下腺 (parotis) に見い出されたことからパロチンとも呼ばれている。腺細胞から他の唾液成分とともに管腔内に分泌され、排出管から口腔内に流出される前に排出管の一部である条紋部で唾液が再吸収されるときに同時に吸収されて血中に入り、内分泌的に作用し以下の如き薬理作用が知られている (滝川, 1964)。

- (1) 歯牙および骨の石灰化を促進する。
- (2) 軟骨組織を増殖させる。
- (3) 胃の運動を亢進し、排出機能を改善する。
- (4) 血清カルシウム量を減少させる。

こうしてパロチンはとくに歯牙組織の形成を支配し、ひいては口腔における食物消化においても不可欠な因子である。

このホルモンは0.5%の糖を含む分子量48,000の糖蛋白質であり (Mizutani *et al.*, 1974), 凍結乾燥標品は安定であるが、水溶液では非常に不安定とされている。パロチンの安定性の判定は、通常は、水溶液をウサギ等に注射したときの血清カルシウムの低下量を指標にしている (伊藤・水谷, 1952)。この種のホルモン活性の評価は容易ではないのでそのような方法に頼らざるを得ないのであるが、調べられた安定性に関しては矛盾していると考えられるところが多い。たとえば水溶液の場合には pH 8.0 で 60°C・5時間処理ではカルシウム濃度低下作用に変化がないのに対し 37°C・24時間処理では完全に失活するとされているが、一般的に考えれば前者の方が厳しい処理と思われるのに反対になっている。また経験的にはパロチン水溶液は酸性で不安定といわれているにもかかわらず、

熱処理ならびに時間 (40°C・2時間) を同じにして pH 2.0 と 7.6 という異なる pH 処理を行なっても活性はどちらも 50% 近く保持されたとなつている。

これらの矛盾は活性測定法に基因すると考えられる。上述の活性測定法ではホルモンに化学的あるいは物理的処理を行なっても、ウサギに投与したときには処理したときの条件というものが維持されていないはずであり、パロチンという蛋白質に対する pH や熱の本当の効果を知ることはできないであろう。もつとも治療の際にはパロチン水溶液を注射しているのであるから、実用面においては上記のデータは有用である。ところで蛋白質の高次構造と活性には相関があるとする多くの証拠があることから (Mansour, 1963; 岩田・井上, 1972; 田中, 1972), ここではパロチンの高次構造に対する pH や熱の影響を円二色性 (circular dichroism, CD) でもつて検討した。溶液中の生体高分子の構造を探るには CD は最も信頼すべき方法のひとつとされている (Greenfield and Fasman, 1969)。

また多くのホルモンのうち神経系のホルモン (伝達物質) の受容体は蛋白質であろうと考えられており、すでにアセチルコリンの受容体については分子量40,000の蛋白質サブユニットが5~6個でひとつの分子を形成していることが確認されている (Meunier *et al.*, 1974)。さらにこれら受容体の機作としては、伝達物質との相互作用の結果構造変化をきたし神経興奮に導くと推測されているものの、受容体が微量しか得られない現段階ではこの方面の研究は全くなされていない。そこでモデル系として蛋白質ホルモン、パロ

* 別刷請求先 (Reprint request should be addressed to this author)

チンを受容体とみなし神経伝達物質の効果も調べた。

材料および方法

1. 試薬

パロチンは帝国臓器製薬株式会社のものを用いた。また注射用の溶解液は 0.6% NaCl (=0.1 M) となつているので溶媒は同じものを使用した。各種神経ホルモンは市販特級品を使用した。

2. 円二色性測定

凍結乾燥パロチンを 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように 0.1 M NaCl に溶解し、0°C に保存した。試料調製後できるだけ短時間に実験を終えるように務めた。蛋白質の高次構造は JASCO J-40 AS recording spectropolarimeter で CD 測定することにより評価した。測定条件は sensitivity, 2 m°/cm; time constant, 4 sec; セル長, 10 mm であつた。スペクトルから得られる分子楕円係数 $[\theta]_{208}$ を次式に代入することにより α -ヘリックス含量を求めた。

$$\alpha\text{-ヘリックス含量 (\%)} = \frac{[\theta]_{208} - (-4,000)}{-33,000 - (-4,000)} \times 100$$

一般に未変性の蛋白質の特徴は α -ヘリックスや β 構造であり、変性するとこれらはランダムコイルになる。それゆえヘリックス \rightarrow コイルの変化はタンパク質の変性に対応している。そこで処理区のパロチンのヘリックス含量 (B) と無処理区のそれ (A) とから、 $\left(\frac{A-B}{A}\right)$ を変性率とした。

パロチンの pH 変性の速度は JASCO stopped flow, model SFC-5 で調べた。測定条件は N₂ ガス圧, 2.5 kg/cm²; time constant, 2.5 msec; flow time, 30 msec; sensitivity, 5 m°/cm; scanning wavelength, 214 nm であつた。以上の測定は 20°C の室温で行なつた。

結果および考察

1. pH 依存性

0.1 M NaCl に溶解したパロチン (pH 5.9) の CD スペクトルを Fig. 1 に示した。平均残基分子量を 115 とすると、native なパロチンの 208 nm における分子楕円率 $[\theta]_{208}$ は $-11 \times 10^3 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2/\text{decimole}$ と計算され、またその値よりヘリックス含量は 24% となる。

このようなパロチンに HCl あるいは NaOH を徐々に添加することにより pH を変え、各 pH 溶液の CD 測定を行なうことにより構造変化を調べた。Fig.

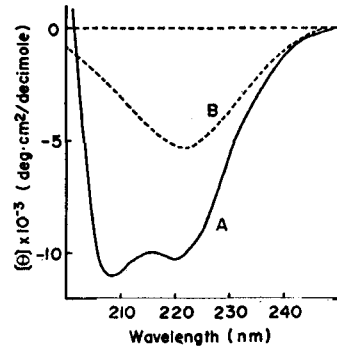


Fig. 1. CD spectra of parotin. The sample was dissolved at a concentration of 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0.1 M NaCl (pH 5.9) and CD spectra were obtained with JASCO recording spectropolarimeter, model J-40 AS with 10 mm cell at 20°C. Mean residue ellipticities were calculated using the mean residue mol wt 115. A, native parotin (pH 5.9); B, pH treated parotin (pH 4.0).

2 から分かるようにパロチンの pH 依存性は特異であり、pH 4~5 で変性するがそれよりも酸性側あるいはアルカリ性側では安定である。変性したときの一例を Fig. 1 に示したが pH 4.0 にしても完全な変性、つまりすべてランダムコイル状態になつていない。物理的・化学的処理でもつて蛋白質を変性させても、一般には α -ヘリックスが必ずしもコイルになるとは限らず β 構造へと転移することもあるので $[\theta]_{208}$ が零になることは少なく、構造的にみた変性率が 100% に達するのは稀である。それゆえ構造的にみた変性率と生物学的な失活率には相関があるもの一致することはない。pH 処理区では $[\theta]_{208}$ の減少率は著しいのに $[\theta]_{222}$ はそれほどでもない。このことは pH 処理により α -ヘリックスは優先的に破壊されたが β 構造はかなり保持されていることを示している。

pH に依存して蛋白質の構造が変わるのは主として蛋白質表面あるいは内部の静電的環境の変化に基づいている。それゆえパロチンの pH 依存性が Fig. 2 のようになるのは少なくとも二個のアミノ酸の解離・非解離が関係していることになる。pH 4~5 といえばヒスチジンとかあるいは酸性アミノ酸 (アスパラギン酸, グルタミン酸) であろうが、遊離状態と異なり蛋白質中では pK はずれているのでどれとは断定できない。中性から酸性にする途中で pH 5 付近で変性するのはある種のアミノ酸のプロトン化であり正電荷の増加であろう。しかし pH 3 で回復しているのはその正電場が中和されたからではない。なぜなら

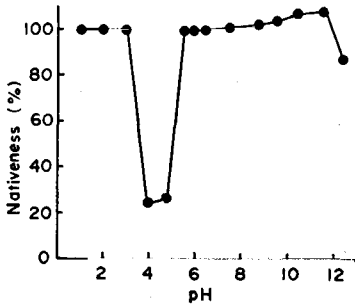


Fig. 2. Effect of pH treatment on the conformation of parotin. Hydrochloric acid or sodium hydroxide was added to parotin (15 μg/ml) in 0.1 M NaCl, and CD spectra were measured. α-Helical content of parotin was estimated with next equation.

$$\alpha\text{-helix (\%)} = \frac{[\theta]_{208} - (-4,000)}{-33,000 - (-4,000)} \times 100$$

Complete denaturation was assumed to correspond to 0% of α-helix and the ratio of nativeness was plotted against pH.

pH 3 はより低い pH なのでさらに正電荷が増加したはずである。それゆえここでもプロトン化が起こり、局所的再配置を経ることにより高次構造が維持されているものと考えられ、中性状態のパロチンと pH 1~3 でのパロチンでは CD 測定では検出できないような構造変化が起こっているに違いない。

2. 再生

Fig. 3 は pH 5.9 のパロチン溶液を一度、pH 1.0 の強酸性までもつて行き、10 分後に中性に戻したときの CD スペクトルである。このように HCl を加え

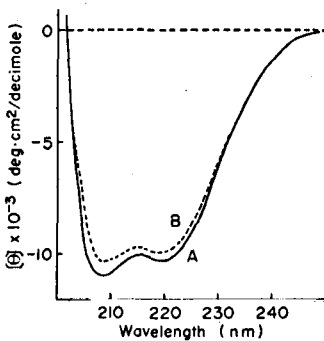


Fig. 3. Renaturation of parotin. The sample solution was made acid (pH 1.0) with hydrochloric acid, and 10 min later it was neutralized with sodium hydroxide. The same as in Fig. 1. A, control (pH 5.9); B, test (pH 5.9→1.0→6.0).

て酸性にしました NaOH を加えて中性に戻すと、その時点での NaCl 濃度は約 0.2 M と対照区の 2 倍になっている。しかも HCl 溶液や NaOH 溶液を添加することにより蛋白質は少し希釈されているので、構造は完全にもとに戻っても CD ではそのようには測定されないであろう。

このテストでは酸性にするときに一度、そしてまた中和するときにも pH 4~5 領域を通過しているので二回変性させられたことになるが、中性に戻したときには大部分再生している。このようなわけでパロチン活性の pH 依存性をみるためにこのホルモンを酸あるいはアルカリ処理したのち動物に投与したとしてもそのほとんどは血液中で容易に再生するものと考えられる。pH 処理したことで生物的活性が低下したかのよう受けとめられるデータがあつても、実際には他に原因があることになる(後述するように熱に対する不安定性)。

3. 熱安定性

パロチン溶液を密閉セルに入れて所定の温度にし、平衡に達したのち CD 測定を行なつた。Fig. 4 にみられるようにこの蛋白質は熱に非常に不安定である。普通の蛋白質ならば点線で示すような立ち上がりがつと急峻なシグモイド曲線になるはずなのに (McDonald *et al.*, 1971), パロチンはかなり低い温度からでも変性が始まっている。すなわち構造の協同性に乏しい。この実験では試料溶液調製後 0°C に約 1 時間静置していたものを 20°C に 30 分間保温してから測定を開始したので、基準にした 20°C の標品もすでに何パーセントかは変性していたかも知れない。いずれにしても熱に対する不安定さがパロチンの失活

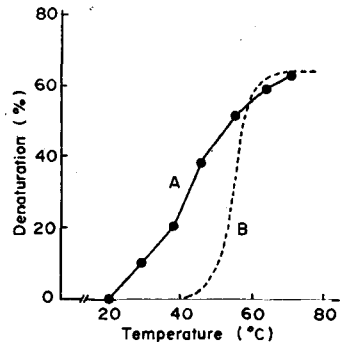


Fig. 4. Thermal stability of parotin. The sample was put in the sealed cell. The cell was maintained at a fixed temperature, and CD spectra was measured after equilibrium was reached. A, parotin; B, ordinary proteins.

しやすさの要因と考えられる。熱処理ならびに時間(40°C, 2時間)を同じにして、pH 2.0 と7.6という異なる pH 処理を施したパロチンをウサギに投与したときの残存活性はともに約50%であつたという理解し難い観察(伊藤・水谷, 1952)も以上の結果から説明できよう。異なる pH 処理を行なつても静脈注射すれば血液中で中和されるのでこの処理効果は消失し、両処理で同程度に活性が低下したのは40°Cに2時間放置したのが原因である。

熱変性させた場合の再生も調べるつもりであつたが、72°Cまで加熱したものは白濁が認められたのでCD測定しても無意味である。pH処理では容易に再生し得るものがなぜ熱処理では白濁しやすいのか理解に苦しむが、このようなこともあり得よう。蛋白質の変性すなわち構造変化と、白濁つまり溶媒への親和性の低下とは関連はあるものの別の現象である。ある種の蛋白質は構造変化が起こつても溶媒への親和性がそれほど変化しないため溶解状態のままのものがあるし、別の種では構造変化が引き金となつて親和性の低下、沈澱という過程をたどるものもあろう。変性しても溶解状態にあれば再生しやすいが白濁まで進むと再生しにくくなる。さらに同じ蛋白質でも変性のさせ方によつて異なるであろう。pH処理では静電的な力によつて蛋白質を変性させるのに対し熱処理では分子の衝突エネルギーによつて構造を変化させるのであるから、両者が全く同じ効果をひき起こすと期待するのが無理である。リゾチームなどでは加熱変性させても冷却すれば完全に再生するが(McDonald *et al.*, 1971), パロチンはそうではない。パロチン水溶液を30分間煮沸したのちウサギに投与したものは完全に失活していた(伊藤・水谷, 1952)というのはこのことを反映しているであろう。

4. 変性速度

パロチンの終濃度を30 µg/mlとし、pHを5.9から4.0にしたときの変性速度をストップフロー法で調べた。Fig. 5は4回行なつたテストの一例であり、2~3分で変性が完了している。実際は208nmで走査するのが好ましいが吸収量が多すぎてフォトマル電圧が600Vを越え、これでは信頼できないので214nmとした。ゆらぎが大きいのは時間的感度を良くするためにtime constantを2.5 msecと短くしたからである。

種々の蛋白質や合成ポリペプチドのヘリックス・コイル転移の緩和時間は1ミリ秒あるいはそれよりも短いものもある(Hamori and Scheraga, 1967;

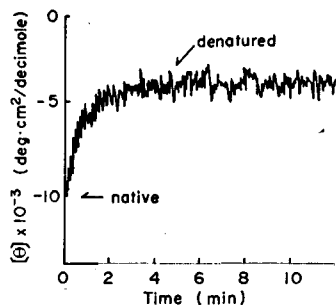


Fig. 5. Denaturation velocity. Only this test, the final concentration of parotin was 30 µg/ml. The pH of sample solution was made 4.0 from 5.9 with JASCO stopped flow, model SFC-5 and it was scanned at 214 nm with spectropolarimeter.

Schwarz and Seelig, 1968) のに対し、この唾液腺ホルモンの変性速度は非常に遅い。ヘリックス・コイル転移に関する Zimm-Bragg 理論(Zimm and Bragg, 1959)では変性速度は協同性の関数となつていますが、熱変性の所でみたようにパロチンは協同性に乏しいので、これが変性速度が遅い原因であろう。またパロチンは不安定なのに変性速度が遅いというのは矛盾すると思われるかも知れないが、不安定な蛋白質が速く変性するとは限らない。なぜなら安定性はギブスの自由エネルギー(ΔG)に依存するのに対し、反応速度は活性化自由エネルギー(ΔG^*)によつて決まるからである。

5. 神経伝達物質の影響

終濃度 15 µg/ml のパロチンに種々の神経伝達物質を添加してその構造を調べ、Table 1のような結果を得た。溶媒は 0.1 M NaCl とした。CDメーターでは直接差スペクトルを測定することはできないので、吸収がある物質の場合には個々のスペクトルを付属のコンピューターに入れておき、それによつて差スペクトルを得た。

パロチンは酸性において変性を起こすので予想通り中性の物質(γ -アミノ酪酸、 β -アラニン)や弱アルカリ性のヒスタミンなどには変性力はなかつた。ノルアドレナリンは本来塩基なのでパロチンを変性させる能力はなからう。このノルアドレナリンは水溶液では急速に酸化されてしまうためここでは塩酸塩を用いたが、おそらく酸性度が強すぎてパロチンの変性領域にあてはまらなかつたようであるが、低濃度ではわずかに変性させている。アセチルコリンは弱酸性物質であり 10 mM でほんの少し構造変化を起こさせている。

Table 1. Effect of neurotransmitters on the conformation of parotin. Each substance was added to parotin solution, and CD spectra were measured at 20°C. The solvent was 0.1 M NaCl. Subtraction of absorbance of transmitter was performed with computer. The ratio of denaturation was determined with α -helical content which was obtained with mean residue ellipticity.

Substance	Concn. (mM)	Denaturation (%)	Substance	Concn. (mM)	Denaturation (%)
Histamine	0.1	0	β -Alanine	1	0
	1	0		10	0
	10	0		100	0
Acetylcholine	0.1	0	Noradrenaline	0.1	17
	1	0		1	0
	10	8	Glutamic acid	0.1	70
GABA*	1	0		1	59
	10	0	Aspartic acid	0.1	70
	100	0		1	40

* γ -Aminobutyric Acid.

100 mM 濃度では吸収が大きすぎて測定できなかつたが、溶液の pH を調べたところ 4.7 だつたので少なくとも 50 % 前後変性させていると考えられる。酸性アミノ酸であるアスパラギン酸やグルタミン酸は効率よく変性を起こさせている。しかし低濃度の方が変性率が高いところをみると pH 効果が主役であろう。

構造の複雑な蛋白質が容易に変性したり再生したりするのは驚くべきことでもある。蛋白質の働きは多岐にわたり、酵素作用、物質輸送、情報伝達、さらには筋肉やべん毛の運動などがあるが、おそらくこれらの諸機能は構造の変換を通して発揮されているものと考えられる。

要 約

唾液腺ホルモン、パロチンの構造安定性を CD スペクトルで調べた。この蛋白質は pH 4~5 の領域で変性し、それよりも酸性側あるいはアルカリ性側では安定であつた。変性の緩和時間は数分であり、pH 変性させたものは中和によつて容易に再生した。このホルモンはとくに熱に弱く、比較的低い温度からでも変性が始まり、しかも熱処理したものは再生しにくかつた。パロチンを受容体蛋白質とみなしたモデル実験では、数種の神経伝達物質がこの蛋白質の構造を変化させることを認めた。

文 献

Greenfield, N. and G. D. Fasman 1969 Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, **8**: 4108-4116

Hamori, E. and H. A. Scheraga 1967 pH-jump measurements on the helix-coil transition of poly-L-tyrosine. *J. Phys. Chem.*, **71**: 4147-4150

伊藤四十二・水谷 彰 1952 唾液腺ホルモンの研究 (第 18 報) パロチンの物理化学的性質ならびに安定性について. *薬学雑誌*, **72**: 1499-1502

岩田平太郎・井上 章 1972 ポーター: 薬物の分子作用機構. 地人書館, 東京, 61-72 頁

Mansour, T. E. 1963 Studies on heart phosphofructokinase: Purification, inhibition, and activation. *J. Biol. Chem.*, **238**: 2285-2292

McDonald, C. C., W. D. Phillips and J. D. Glickson 1971 Nuclear magnetic resonance study of the mechanism of reversible denaturation of lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**: 235-246

Meunier, J. C., R. Sealock, R. Olsen and J. P. Changeux 1974 Purification and properties of the cholinergic receptor protein from *Electrophorus electricus* electric tissues. *Eur. J. Biochem.*, **45**: 371-394

Mizutani, A., T. Kitamura, N. Yamada, H. Inaba, Y. Naito and T. Mizutani 1974 Isolation of a hypocalcemic substance in bovine parotid gland, and some properties of this substance. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **22**: 1955-1962

Schwarz, G. and J. Seelig 1968 Kinetic properties and the electric field effect of the helix-coil transition of poly (γ -benzyl L-glutamate) determined from dielectric relaxation measurements. *Biopolymers*, **6**: 1263-1277

滝川決男 1964 唾液腺ホルモン. 三宅 儀・山本 清

編：内分泌学Ⅱ. 朝倉書店, 東京, 1464-1475頁
田中豊一訳 1972 ポルケンシュタイン：酵素の物理
学. みすず書房, 東京, 73-81頁
Zimm, B. H. and J. K. Bragg 1959 Theory

of the phase transition between helix and
random coil in polypeptide chain. *J.*
Chem. Phys., 31: 526-535

Summary

The structural stability of salivary gland hormone, parotin was investigated by circular dichroism (CD) measurement. The protein was denatured between pH 4 and 5, but it was stable at other pH regions. The relaxation time of denaturation was few minutes and the pH denaturation was readily regenerated by neutralization. This protein was particularly unstable to heat; it began to denature even at a low temperature and the reproduction from thermal denaturation was difficult. In the model experiment where parotin was presumed as receptor protein, several neurotransmitters altered the conformation of it.