Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Immunochemical study of β-glucuronidase inhibitor from porcine sublingual gland : interaction of β-glucuronidase inhibitor with α2-macroglobulin

坂本，亘

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
1976-03-10

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
乙0411

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000411

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・本籍　坂本　亘（北海道）

学位の種類　医学博士

学位記番号　医博ろ第343号

学位授与の要件　学位規則第5条第2項該当

学位授与の日付　昭和51年3月10日

学位論文題目　IMMUNOCHEMICAL STUDY OF β-GLUCURONIDASE INHIBITOR FROM PORCINE SUBLINGUAL GLAND: INTERACTION OF β-GLUCURONIDASE INHIBITOR WITH α_2-MACROGLOBULIN

（ブタ舌下腺よりのβ－グルクロニダーゼ阻害物質の免疫学的研究：β－グルクロニダーゼ阻害物質とα_2－マクログロブリンの相互作用）

審査委員　主査 教授 堀田　進
教授 木幡　陽　教授 西塚泰美

論文内容の要旨

はじめに

Lysosomal enzyme の一つであるβ－グルクロニダーゼ（EC 3.2.1.31，以下β－Gと略）は肝，胆道疾患，各種悪性腫瘍，糖尿病，動脈硬化症，甲状腺機能亢進症などのさいに血清中に上昇することが知られ，また本酵素阻害物質として高分子性物質が体液や組織中に存在することが指摘されている。西風らは種々の疾患におけるβ－G活性と同時にこのβ－G阻害物質量の動態を検索し，その特徴から動脈硬化症の診断に応用できることを報告している。著者らはヒト唾液中の本阻害物質が血液型，分泌型，う蝕罹患に関係があることを報告した。しかしながら，このendogeneous な高分子性物質の純化並びにその生化学的，生理学的特性は未だ明らかにされていないし，また唾液腺についてはその存在すら今日迄全く研究されていなかった。

著者はブタ舌下腺をhomogenize し，トリプシン処理して得られた可溶性画分をSephadex G-100，G-200，DEAE-cellulose column chromatography を行うことにより，column chromatography的，電気泳動的，超遠心的に単一なβ－G阻害物質標品を得ることに成功した。そして，この標品は分子量340,000で，17.5％ protein，20.8％ hexose，19.9％ hexosamine，21.8％ sialic acid，9.6％ fucose よりなる糖蛋白質であることも明らかにした。また，この抽出過程に準じて顎下腺より純化された阻害物質標品は舌下腺標品に比して，specific activity が著しく低く，両者の構成々分について比較検討してみると次の如くなる。舌下腺標品は顎下腺標品に比してfucose，

hexose 含量が多く，total amino acid 含量は少なかった。特に amino acid 組成では proline，alanine，glutamic acid，glycine，serine，threonine などは少く，これら以外では両者は殆んど同じであった。Total sialic acid，total hexosamine 含量はよく類似していたが，galactosamine に対する glucosamine のモル比は舌下腺標品では0.027，顎下腺では1.15 となり，著しい差異をみとめた。しかし，これら阻害物質の阻害様式はLineweaver－Burk's plot よりみて non-competitive であり，その阻害作用が33.33 mM Nacl，16.67 mM Na_2SO_4 等の無機イオン添加により，可逆的に回復することなどを明らかにしてきたが，今回引続きその作用機序，active siteをも明らかにすべく本研究を実施した。

即ち，ここに舌下腺より得られた糖蛋白質よりなるβ－G阻害物質の active siteを解析するために本阻害物質に対する特異抗血清を作製し，免疫学的解析を行なうと共に，ヒト血清より本阻害物質と相互作用を有する anti－β－G阻害物質，即ちα_2－マクログロブリンの純化を試み，その作用機序について研究した。

研究方法

β－G活性及びβ－G阻害活性の測定：β－G活性測定は基質p－ニトロフェニールグルクロナイドを用いるNobenaga の方法により行い，β－G阻害活性測定はSakamoto らの方法によった。

Anti－β－G阻害活性の測定：阻害物質50μg（12μg protein）存在下の阻害活性を100％阻害とし，その活性を50％減少させる anti－β－G阻害物質を1 unit とした。

特異抗血清の作製：純化された本阻害物質8mgを抗原とし，Freund's complete adjuvant を加え，白色雄性ウサギを用い10日毎に4回感作し，最終感作10日目に全採血した。得られた特異抗血清は56℃，30分で非働化した。

抗体の検出と免疫電気泳動：抗体の検出はOuchterlony 法，免疫電気泳動はKohn の方法によった。

ヒト血清より anti－β－G阻害物質の抽出：硫安分画後，DEAE－cellulose，Sephadex G－200，Sepharose 4B column chromatography 操作により抽出，純化した。

沈降係数の測定：沈降係数はSpinco model E超遠心機で39,460 rev／min，20℃で測定した。

実験成績及び考察

得られた特異抗血清はOuchterlony 法の二重免疫拡散法テストでβ－G阻害物質と一本の沈降線を生じ，本阻害物質の阻害作用を中和することを確認した。しかしながら，この中和作用は特異抗血清のみでなく，阻害物質と沈降反応を示さなかった正常ウサギ血清においてもみられた。すなわち特異抗体を含有する euglobulin 画分の anti－β－G阻害活性の specific activity は0.44 units／mg protein で，正常血清の場合には0.50となり，特異抗体による中和作用の特異性は認められなかった。この事実は本阻害物質の active site が antigenic determinant と同一でないことを示唆すると共に，正常血清中にも anti－β－G阻害物質が存在していることを示唆するものである。事実，本阻害物質に比して，阻害活性が著しく低い顎下腺標品はこの特異抗体を用いたOuchterlony test でも本阻害物質と共通抗原を保有していることを示した。

一方，正常ウサギ血清中に anti－β－G阻害物質が存在し，その total anti－β－C阻害活性の50～54％が pseudoglobulin 画分で占められていることが明らかになったので，この anti－β－G 阻害物質

を明らかにするため，ヒト血清を材料に，硫安分画後，1 st DEAE－cellulose，Sephadex G－200，2 nd DEAE－cellulose，Sepharose 4B column chromatography を行って得られた試料について，超遠心的，電気泳動的，免疫電気泳動的手法により，単一な標品を得ることに成功した。この純化されたanti－β－G阻害物質は沈降係数$S^{O}_{20,w}$ 20.7Sで，免疫電気泳動からα_2－マクログロブリン（以下α_2－Mと略）であることが同定できた。このα_2－Mのanti－β－G阻害活性のspecific activity は3.50 units／mg protein であった。

α_2－Mの本阻害物質に対する作用様式はα_2－Mが最大の抑制効果を発揮するためには少くとも20分間preincubate しなければならないが，α_2－M添加濃度と平行して，その抑制効果は直線的に増加し，完全抑制のためには本阻害物質1モルに対し，α_2－Mは4モル相当が結合しなければならなかった。しかもその抑制作用は拮抗的であり，α_2－Mは酵素β－Gに対して何ら直接的な影響を与えないことも想定できた。さらにα_2－M，β－Gは分子量こそ異るが共に糖蛋白質であり，それぞれpI 5.4，pI 6.17であるという事実からα_2－Mが非特異的に阻害物質と結合し，本阻害物質のactive site に立体障害を起し，その結果酵素に対する阻害作用を失活させたものと推定した。

結　語

(1) 舌下腺より純化されたβ－G阻害物質に対する特異抗血清をウサギで作製した。得られた特異抗体は本阻害物質と沈降反応を示すにもかかわらず，阻害活性の中和作用は特異的でなく，正常ウサギ血清の中和作用と大差がないことから，本阻害物質のactive site は antigenic determinant と同一でないと推定した。

(2) 正常血清中に存在するanti－β－G阻害物質はヒト血清を材料に，硫安分画後，DEAE－cellulose, Sephadex G－200，Sepharose 4B colum chromatography 操作により純化し，沈降係数，免疫電気泳動などの結果からα_2－Mであると同定した。

(3) 本阻害物質に対するα_2－Mの相互作用機序について解析した。

論文審査の結果の要旨

申請者並びに共同研究者は数年来β－グルクロニダーゼ（以下β－Gと略記）の阻害物質を研究し，とくにブタ舌下腺から強力な阻害物質を抽出して，その精製，化学特性の解明などを行ってきた。こゝに提出された論文は，上記研究の発展として，阻害物質の作用機作を究明する目的をもって，主として免疫化学的手法を用いてなされた実験を記述したものである。

実験材料と実験方法

まずブタ舌下腺ホモジネートをトリプシン処理して得られた可溶性画分を順次セファデックスG－100，G－200，DEAEセルローズのカラムクロマトグラフィーにかけて，電気泳動的，超遠心的に均一な阻害物質標品を得た。

これをフロイント完全アジュバントに混じたものを一定方式でウサギに皮下注射して免疫血清を作製した。これは56℃30分の加熱処理により非働化された。

一方，β－G阻害活性を減少させる因子（抗β－G阻害物質因子）をヒト血清から分離することを試みた。すなわち，プールされたヒト血清を硫安分画後，順次DEAEセルローズ（一次），セファデックスG－200，DEAEセルローズ（二次），セファローズ4Bのカラムクロマトグラフィーにかけて超遠心的，電気泳動的に単一な標品を得た。

β－G活性は基質p－ニトロフェニールグルクロナイドを用いる方法（Nobenaga法）によって測定し，β－G阻害活性の測定は申請者らの考案した方法によった。抗β－G阻害物質活性については，阻害物質50μg存在下の阻害活性を100％とし，その50％減少をもたらす活性度を1 unit としている。抗体の検出はOuchterlony 法によった。

実験成績と考察

(1) 抗血清はOuchterlony 二重免疫拡散法によってβ－G阻害物質との間に1本の沈降線を形成すると共に，阻害活性を中和することが証明された。対照正常ウサギ血清は沈降反応を示さないが，阻害活性を中和する能力を有した。この事実から，正常ウサギ血清中に抗β－G阻害物質因子の存在すること，及び阻害物質の活性部位と抗原決定基とは同一でないことが示唆された。

(2) 正常ウサギ血清中の抗β－G阻害因子はpseudoglobulin画分に最も多く含まれることが示された。ヒト血清から抽出・精製された抗β－G阻害因子は沈降係数20.7Sを示し，免疫電気泳動パターンからα_2－マクログロブリン（以下α_2－Mと略記）と同定された。

(3) α_2－Mのβ－G阻害物質に対する作用様式を詳細に検討した結果，① 最大抑制効果発揮のために37℃，20分のpreincubation が必要であること，② α_2－M濃度の一定範囲内において，添加濃度と抑制効果とは直線的な相関を示すこと，③完全抑制におけるβ－G阻害物質とα_2－Mのモル比は約1：4と計算されること，などが示された。また，α_2－Mはβ－Gに対し直接的な作用を与えなかった。

これらの事実から，α_2－Mはβ－G阻害物質に非特異的に結合して，その活性部位をブロックすることにより抗β－G阻害物質作用をあらわすものと推定された。

以上のごとく本研究は，lysosomal enzyme の一種であるβ－グルクロニダーゼを阻害する物質をブタ舌下腺から抽出・精製し，その阻害作用の機序を免疫化学的観点から究明して医学上有意義な新知見を提供したものである。よってこれに対し医学博士の学位を授与することは適切であると判定する。