

# 論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	大隅 縁里子
論文審査 委員氏名	主査  副査	下郷 和雄  金森 孝雄 戸苺 彰史 栗田 賢一	
論文題名	ラット耳下腺デストリンキナーゼの部分精製 および酵素学的解析		

インターネットの利用による公表用

( 論文審査の要旨 )

No. .... 1 .....

(2000 字以内のこと)

愛知学院大学

唾液は、抗菌作用や潤滑作用を有するため口腔粘膜疾患や嚥下障害とも密接な関係にあり、近年では口腔がんや乳がんなどの診断材料としても注目されている。しかしながら、その分泌機序については不明な点が多い。唾液タンパク質の分泌については、 $\beta$  受容体刺激によって cAMP 依存性プロテインキナーゼが活性化され、内在性タンパク質のリン酸化を介して開口分泌の起こることが知られている。このため、 $\beta$  受容体刺激によりリン酸化される内在性タンパク質が検索され、その過程で、デストリンとコフィリンと呼ばれるアクチン結合タンパク質が非刺激下でリン酸化され、 $\beta$  受容体刺激下で逆に脱リン酸化される現象が見いだされた。デストリンとコフィリンは脱リン酸化型が F アクチン切断・脱重合活性を持ち、 $\beta$  受容体刺激下で起こる開口分泌時のアクチン動態の制御に関与している可能性が示唆されている。耳下腺組織におけるコフィリンとデストリンの生理的機能を正しく理解するにあたり、これらのリン酸化および脱リン酸化機構の解明は不可欠であり、先行研究では、ラット耳下腺にコフィリンより多量に存在するデストリンについて、そのリン酸化酵素が検索された。その結果、ラット耳下腺抽出液中にデストリンキナーゼ活性が検出され、その酵素学的性質が他の組織で見いだされているデストリンキナーゼの性質と異なっていることが報告されているが、本酵素の同定にあたって必要とされる酵素の精製については難航し、有効な精製法が見いだされていない。学位申請者は、このデストリンキナーゼの精製法について検討し、再現性の

( 論文審査の要旨 )

No. ....2.....

(2000 字以内のこと)

愛知学院大学

ある部分精製法と得られた酵素の酵素学的解析結果を報告している。申請者は、精製法の検討に先立ち、精製過程で使用する活性測定法の改良に取り組んだ。その結果、既報の測定法で使用されたウェスタンブロット法をドットブロット法に切り換え、多検体を簡便かつ迅速に測定でき、感度も5倍程度高めた改良法を開発した。その定量性も検討しており、良好な結果を得ている。デストリンキナーゼの精製については、DEAE セルロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを順次行うことにより、ラット耳下腺の100,000 × g 上清画分からデストリンキナーゼを、再現性よく速やかに部分精製する方法を確立した。各クロマトグラフィーでカラムに保持された酵素活性を回収するにあたり、精製効率を上げるために溶出力を緩徐に増加させた場合には回収率が低下し、急激に溶出力を増加させるステップワイズ溶出によって効率よく回収されることを見だし報告している。全体の回収率は約 3.6%と低いものの、100,000 × g 上清画分に多量に含まれる主要なタンパク質から酵素を分離し、活性を保持した状態でデストリンキナーゼを部分精製することに成功した。さらに、本酵素の精製が困難な要因として、本酵素が何らかの細胞構成成分と複合体を形成しており、酵素精製の過程で一部の因子が脱落することで回収率が低下する可能性を示唆している。学位申請者は、上記の部分精製の過程で酵素の性質の変化が起きている可能性もあることからこの点についても検討しており、得られ

( 論 文 審 査 の 要 旨 )

No. ....3.....

(2000 字以内のこと)

愛知学院大学

た部分精製酵素について至適 pH、 $Mg^{2+}$ 依存性、NaCl の影響、デストリンおよび ATP に対する  $K_m$  値、プロテインキナーゼ阻害薬の効果を調べ、上清画分中の本酵素の性質と比較検討することにより、回収された部分精製酵素については性質の変化は起きていないと結論している。さらに精製を進めるため、申請者は、1次元目に native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) を、2次元目に SDS-PAGE を用いる二次元電気泳動法の利用を検討している。この過程で、native PAGE で分離されたゲル上のデストリンキナーゼの活性測定法を新たに導入し、使用した native PAGE によりデストリンキナーゼが他の多くのタンパク質から分離されると同時に、活性が2本のバンドに分離されることを報告している。さらに、二次元電気泳動後のゲル上でデストリンキナーゼ由来のタンパク質スポットを将来検出する方法を提案しており、今回得られた実験結果を MALDI-TOF 質量分析法を用いて分析し、提案した方法が有効に機能する可能性の高いことを報告している。

本研究は、ラット耳下腺デストリンキナーゼ同定の基礎を築くと共に、耳下腺におけるアクチン細胞骨格ならびに開口放出の調節機構解明の基盤を形成するものであり、口腔外科学、口腔生化学、歯科薬理学ならびに関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。

平成26年 1 月 15日