ムチンの栄養学的研究(第3報)

Nutritional Studies on Mucin (Part 3)

アミノ酸活性化酵素に及ぼすムチンの影響について

Effect of mucin on the activity of amino acid activating enzyme

(昭和43年3月8日受理)

長 沢 太 郎 清 沢 功 鈴 木 隆
(Tarô Nagasawa) (Isao Kiyosawa) (Takashi Suzuki)

The present investigation was undertaken to clarify the effect of mucin, mucopolysaccharide and sugar components in mucin on the activity of amino acid activating enzyme, which was measured in the system containing tris buffer, $MgCl_2$, ATP, P^{32} -pyrophosphate, NaF and amino acids. The activity of amino acid activating enzyme was considerably increased by mucin, mucopolysaccharide and hexosamine, but not by hexose and hexuronic acid.

緒 言

蛋白質合成の第一段階は、アミノ酸が ATP と反応して、Amino acyl adenylate を生成し、ピロリン酸を遊離する酵素依存反応であり、アミノ酸活性化酵素により触媒されていることが一般に知られている¹⁾²⁾。Kessler らはこの事実を $P-32$ を用いて確認した³⁾。

一方生体内におけるムチンの生理的意義についてはなお不明な点も多いが、Tomarelli⁴⁾、棚橋⁵⁾、宮原⁶⁾、長沢⁷⁾⁸⁾ による成長実験、運動能力測定および腸管におけるアミノ酸吸収実験などの結果から豚胃ムチンが栄養学的にまた生理学的に秀れた作用を有することは明らかである。さらにムチンの構成成分であるムコ多糖類⁹⁾ ¹⁰⁾ (コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸など) もムチンと同様な効果があるという¹¹⁾¹²⁾。一方ムチンが動物の成長促進に著しい好影響を与える点から、ムチンそのものまたはムチンの構成成分が蛋白質合成系に何らかの寄与をなすと推察される。本報では豚胃ムチンのみならず、ムコ多糖類およびその構成糖であるヘキソース、ヘキソサミンなどがアミノ酸活性化酵素にどのような影響を与えるかについて検討を行なったので、その結果を報告する。

実験材料および実験方法

A 実験材料

1) ラット

生後50～60日のウィスター系雄ラット (230～240 g) を用いた。

2) 酵素液の調製

酵素液は Kessler³⁾ らの方法により、次のように調製した。上記ラットを一晩絶食させた後、小腸全体を摘出し、小腸上皮細胞 1 g 当たり 9 ml の 0.125 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて均質化し、105,000×g で1時間遠心分離後、その上澄液を前述の緩衝液に対して16時間透析し、酵素溶液とした。これらの全ての操作は0°C で行なった。

3) 試 薬

ムチンは Wilson Lab. 製 Glanular Gastric Mucin を精製したもの、コンドロイチン硫酸 C は生化学工業、ヘパリンは和光純薬、ヒアルロン酸は Worthington Biochemical Corporation Freehold, シアル酸は SIGMA およびフコースは The British Drug Houses, Ltd. のものをそれぞれ使用した。その他のヘキソース、ヘキソサミン、ヘキスロン酸は、市販品を再結晶して使用した。また、 P^{32} -ピロリン酸ナトリウム (以下 PP^{32} と略す) は、The Radiochemical Centre のものを用いた。

B アミノ酸活性化酵素の活性度の測定

Tris 緩衝液 (pH 7.4 50 μ moles), $MgCl_2$ (5 μ moles), ATP (2 μ moles), P^{32} -ピロリン酸ナトリウム (2 μ moles), NaF (20 μ moles) および 5×10^{-4} M のアミノ酸 (2 種以上のアミノ酸を用いる場合には、それらの合計の濃度) を含む混合溶液に上記酵素液を 0.3 ml 添加

し、37°C で30分間反応させた。その後さらに5 %TCA 溶液を添加し、遠心分離後、上澄液中の ATP を活性炭に吸着させる。次に 1ml 当たり 10 μ moles のピロリン酸ナトリウムを含む酢酸緩衝液 (pH 4.5) で5回、蒸留水で1回洗滌し、ATP の消費に基づく P³²-ピロリン酸ナトリウムの ATP への取込みの状態を Kessler^{1), 3)} の方法により放射能を測定し、アミノ酸活性化酵素 (以下 AAAE と略す) の活性度を求めた。

すなわち活性度は

(ATP へ取り込まれた P-32 の毎分当たりのカウント数/添加した PP³² の毎分当たりのカウント数) × 100 により算出した。

本報に使用したラットから得た酵素蛋白質 1mg 当たりの、P³²-ピロリン酸ナトリウム (PP³²)-ATP 交換は、第1表の通りであった。すなわちアミノ酸、ATP および Mg⁺⁺ を反応系から除去すると、PP³²-ATP 交換は著しく減少するので、これらの物質は本反応系では必須成分であるといえよう。なお反応系からこれらの物質を除いても PP³²-ATP 交換が若干認められたのは、酵素溶液中に透析しても除去し得ない内因性のアミノ酸、ATP および Mg⁺⁺ が存在するのに起因するものと考えられる³⁾。また、予備実験においてこの酵素は、5°C 以下に保存すれば3日および1週間後の活性度は調製直後 (第1表) の約90%および80%を維持し、かなり安定であることが確認されたが、本報ではすべて酵素溶液は調製後直ちに使用することにした。

Table 1. PP³²-ATP exchange in AAAE from small intestinal epithelium of rat

Substrate	% exchange/mg protein in the enzyme
Amino acid mix*	33.7 ± 4.1
Tryptophan	23.1 ± 1.6
No amino acid	10.4 ± 0.7
No ATP	0.8 ± 0.1
No Mg ⁺⁺	1.2 ± 0.1

* Arg, Asp, Gly, His, Ser, Leu, Ileu, Lys, Phe, Thr, Val, Glu, Met, Try, Cys, Tyr, Pro

実験結果

[I] ムチンおよびムコ多糖類がアミノ酸活性化酵素に及ぼす影響について

ムチンおよびムコ多糖類の種類およびそれらの濃度が各アミノ酸系における AAAE 活性に及ぼす影響を及ぼすかについて検討した。結果は対照としてこれらを添加しない場合の AAAE 活性を 100 として表わすこととした。

1. 単一アミノ酸系

トリプトファンの場合、ムチン、ムコ多糖類の別なく適当濃度で用いれば、ATP への放射能の取り込みが大きくなり、AAAE 活性が高められることは第1図に示す通りである。すなわちこの活性度は 10⁻²~10⁻¹% の濃度で最も高くなり、逆に 10⁻¹% と 10⁻⁵% においてはムチンの場合を除き、活性の増加が認められなかった。濃度と活性増加との間の相関関係は後述する混合アミノ酸系の場合と同様に一定の関係が認められなかった。

Fig. 1 The effect of mucin and mucopolysaccharide on AAAE activity

2. 酸性、中性および塩基性アミノ酸系

トリプトファンを除く単一アミノ酸系の予備実験では Lipmann²⁾ および Kessler³⁾ の場合と同様に、ほとんど AAAE 活性を示さなかったがアミノ酸の種類を増すと AAAE 活性は増加した。従ってこの AAAE の作用はアミノ酸の性質とその種類によって影響を受けることが推測される。

そこでムチン添加による AAAE 活性の増加もアミノ酸の性質によりその程度が異なるものと考え、アミノ酸を酸性 (Glu, Asp)、中性 (Ser, Thr, Try, Val, Gly, Leu, Ileu, Tyr, Met, Phe, Cys) および塩基性 (Arg, Lys, His) アミノ酸系に分類して活性度を測定し、第2図に示すような結果を得た。適当なムチン濃度では、中性アミノ酸系と塩基性アミノ酸系において比較的 AAAE 活性は増加したが、酸性アミノ酸系ではほとんど増加が認められなかった。アミノ酸がほぼ同数存在する酸性アミノ酸系と塩基性アミノ酸系における結果から、ムチンは酸性アミノ酸系より塩基性アミノ酸系で一層有効に作用するものと言えよう。

2. 混合アミノ酸系

第3図は酸性、中性、塩基性アミノ酸の混合系 (前(2)項の各アミノ酸を混合したもの) における結果を示す。ヘパリンはトリプトファン系において顕著な AAAE 活性増加作用を示したにもかかわらず、混合アミノ酸系で

Fig. 2 The effect of mucin on AAAE activity

はその作用はほとんど認められなかった。これは他のアミノ酸との相互作用によるものと思われる。ムチン、コンドロイチン硫酸およびヒアルロン酸の場合 AAAE 活性増加は、トリプトファン系に比べて、全般的に低くなったが、AAAE 活性と濃度との相関性は前記(1), (2)項と同様な傾向を示した。

Fig. 3 The effect of mucin and mucopolysaccharide on AAAE Activity

〔Ⅱ〕 ムチン構成糖のアミノ酸活性化酵素に及ぼす影響について

AAAE 活性がムチンおよびムコ多糖類によって高められることは栄養学的観点から極めて興味深いが生体内における蛋白質の合成は、細胞内で行なわれ、ムチンそのものが蛋白質の合成系に入り込む可能性は考えられない。しかし前述のようにムチンの構成成分と考えられているムコ多糖類も、AAAE 活性を高めるという事実から生体の細胞膜を通過して蛋白質合成系に関与し得る低分子のムチン糖成分があるとも推定される。そこでムチンの糖成分以外のものをも含めた D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトロン酸および D-グルクロン酸などをそれぞれ単独で前記混合アミノ酸系に添加し、AAAE 活性におよぼす影響を調べた。その結果を一括して第 4～7 図に示す。

D-グルコース、D-ガラクトースおよびシアル酸系では AAAE 活性はほとんど影響が認められなかった。しかし D-マンノース系 (第 4 図)、D-グルクロン酸および D-ガラクトロン酸系においては全般的に AAAE 活性は抑制される傾向にあった (第 5 図)。L-フコースは適当な濃度においてわずかに AAAE 活性の増加がみられた (第 6 図)。

一方 D-グルコサミン、N-アセチルグルコサミンおよび D-ガラクトサミン系においては、AAAE 活性は顕著な増加を示した (第 7 図)。第 3 図に示したようにムチンおよびムコ多糖類を添加した混合アミノ酸系では 10⁻¹ % の濃度において活性の低下を認めたが、ヘキサミン

Fig. 4 The effect of hexose on AAAE activity

Fig. 5 The effect of hexuronic on AAAE activity

Fig. 6 The effect of L-fucose and sialic acid on AAAE activity

Fig. 7 The effect of hexosamine on AAAE activity

の場合には、このような傾向が認められず濃度の増加と共に AAAE 活性は増大した。

考 察

前報⁷⁾⁹⁾で報告したようにムチンが栄養学的に極めて有効であることは明らかであるが、このような事実は人乳および牛乳のアミノ糖の種類、含量およびビフィズス因子としての効果¹⁾、あるいはムコ多糖類などに関する知見と合せて考慮すれば、乳児の人工栄養の改良上極めて興味深いことである。本報においてはムチン、ムコ多糖類およびムチンを構成する糖類が蛋白質合成の第一段階において、アミノ酸活性化酵素にいかなる影響をおよぼすかについて検討した。これまでアミノ糖を有するムコ多糖類が種々の酵素に対して“activator”あるいは“inhibitor”になり得ることが知られており²⁾、これはそれらの物質がポリアニオンないしポリカチオンと酵素との相互作用によるものと考えられている。しかしアミノ酸活性化酵素に対するムチン、ムコ多糖類およびアミノ糖の影響に関する知見は、現在まで得られていない。ムチン、ムコ多糖類およびヘキシサミンが真にアミノ酸活性化酵素の作用を促進し、蛋白質合成の次の段階へ進み得るか否かについては酵素の精製、アミノ酸の消費量を測定し得るような蛋白質合成系の改良などさらに検討を要する。しかしムチン、ムコ多糖類およびヘキシサミンを添加することにより、アミノ酸活性化反応が促進されることは前述の一連の結果から明らかであり、しかもこれらの物質がいずれも $-\text{NH}_2$ 基または $-\text{NHCOCH}_3$ 基を有しているので、これらの radical が AAAE 活性になんらかの関係があることが推察される。特にムチンはヘキシサミンを約20%含有し、またムコ多糖類はヘキシロン酸とN-アセチルヘキシサミンの重合体であることから¹⁷⁾

¹⁸⁾この酵素の活性基に $-\text{NH}_2$ 基または $-\text{NHCOCH}_3$ 基が作用して酵素と基質との結合を促進するのではないか

と推察される。しかしながら、ヘキシサミンは AAAE 活性を高めるが、シアル酸は AAAE 活性を高めないのでから単に分子内に $-\text{NH}_2$ 基または $-\text{NHCOCH}_3$ 基を含むのみならずその構造にも影響されるものと考えるのが妥当であろう。現在のところ高分子物質であるムチンあるいはムコ多糖類と低分子物質であるヘキシサミンがどのような機構でアミノ酸活性化酵素の活性に関与しているかの詳細については不明であり、今後の研究に待たなければならない。

要 約

ムチン、ムコ多糖類およびムチン構成糖のアミノ酸活性化酵素 (AAAE) に及ぼす影響について検討し次の結果を得た。

1. ムチンおよびムコ多糖類 (コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸) は種々のアミノ酸系において AAAE 活性を増加させた。
2. ムチン構成糖中ヘキシサミン および N-アセチルヘキシサミンは著しく AAAE 活性を増加させた。しかしヘキシロン酸は阻害の傾向を示した。

本研究結果の概要は第21回、日本栄養・食糧学会 (1967年) において発表した。

文 献

- 1) Hoagland, M. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 288 (1955)
- 2) Lipmann, F., Hülsmann, W. C., Hartmann, G., Boman, H. G. & Acs, G.: *J. Cellular Comp. Physiol.*, **54**, 75 (1959)
- 3) Kessler, J. I., Eisler, L. & Janowitz, H. D.: *Canad. J. Biochem.*, **43**, 1543 (1965)
- 4) Tomarelli, R. M., Linden, E., Durbin, G. T. & Bernhand, F. W.: *J. Nutr.*, **51**, 251 (1953)
- 5) Miyahara, H. & Tanahashi, Y.: *Kyushu J. Med. Sci.*, **15**, 159 (1964)
- 6) Miyahara, H.: *Studies of Seinan Jogakuin Junior College*, **9**, 45 (1963)
- 7) 長沢太郎, 清沢功, 前田正躬, 饒村護: 栄養と食糧, **20**, 323 (1967)
- 8) 長沢太郎, 清沢功, 前田正躬, 饒村護: 栄養と食糧, **20**, 328 (1967)
- 9) 立木蔚: 化学の領域, **16**, 51 (1962)
- 10) 木村篤, 渡部禎子, 長井靖: 生化学, **36**, 28 (1964)
- 11) 大島良雄: 岡山大医温泉研報告, **6**, 51 (1952)
- 12) Jeanloz Balazs: "The Amino Sugars," Vol. II B, p. 200, Academic Press, New York (1966)
- 13) Roberts, H. R. et al.: *J. Dairy Sci.*, **37**, 538 (1954)
- 14) 佐々木林治郎, 谷口宏吉: 農化, **30**, 809 (1956)
- 15) Kuhn, R.: *Angew. Chem.*, **69**, 23 (1957)
- 16) Jeanloz Balazs: "The Amino Sugars," Vol. II B, p. 200, Academic Press, New York (1966)
- 17) 三坂亮雄, 他: 東京医科大学雑誌, **23**, 211 (1965)
- 18) 山川民夫: 科学, **30**, 561 (1960)

(森永乳業中央研究所)
(経 費 著 者 負 担)