ラット唾液腺によるアミノ糖の生合成

九州歯科大学学生化学教室 (主任 松下義雄教授)

大 田 康 男・松 下 義 雄

唾液腺、殊に顎下腺がムコ多糖体を生産する活潑な器官の一つであつて、血液型物質や所謂ムチンと呼ばれる粘質物を多量に生産することは周知の如くである。Blix¹⁾が顎下腺からムチンを分離しその性質を初めて明かにして以来、唾液腺は屢々粘質物の研究材料として用いられたが、これらの物質を合成する器官としての酵素学的研究は殆んど行われていない。

著者等は口腔領域の立場から、ムコ多糖体を分泌する唾液腺の機能について予備的研究を行い、唾液腺が酵素的研究の材料として適しているかどうかについて先発的研究を行つている。

今回はムコ多糖体生合成の one step として重要なアミノ糖の生合成について、既に知られている機構^{2-12), 15)}を、ネズミの唾液腺を材料として調べた。即ち、D-グルコース-6 磷酸と L-グルタミンから D-グルコサミン-6 磷酸を合成する反応を触媒する酵素 Aminotransferase の存在の有無及びその活性、性質についてしらべた。

実験材料及び方法

試 薬： L-グルタミン (L-Glu. NH₂) は市販の製品をペーパークロマト的に均一であることを確かめて使用した。

グルコース-6 磷酸 (G-6-p) は、市販のグルコースとポリ 磷酸から常法^{9), 14)}によつて合成し、Ba 塩として得た。これを分離製精し、ペーパークロマト的に均一であることを確かめて使用した。Ba は使用前に BaSO₄ として沈澱せしめ遠沈除去した。

緩衝液は、0.1M 磷酸緩衝液を使用した。

EDTA は、市販のエチレンジアミンテトラ酢酸を使用した。

酵素液の調製： ラットから肝臓及び舌下腺、顎下腺 (唾液腺はこの両者を合せて処理し、酵素液を調製した) を摘出し、Pogellらの方法^{4), 13)}を参考にして次の様に調製した。(第1図)

の様に調製した。(第1図)

第1図 酵素液の調製

酵素活性

調製した粗酵素の活性を測定するために、次のような Medium を用いた。即ち、

Glu・NH ₂	20 μmol
G-6-P	10 μmol
磷酸緩衝液	0.05 M
酵 素 液	0.2ml
合 計	1.0ml

上記の反応系を38°で1時間反応せしめて後、1N・HCl 1mlを加えて3分間煮沸し、反応を止める。この結果反応液中に生成したグルコサミン磷酸を、更に100°Cで1時間加水分解し、これを2N・NaOHで中和（フェノールフタレイン指示薬）後、Elson-Morgan反応を行つてアミノ糖を定量的に発色せしめ、530mμの波長に対する吸光度を測定した。Blankとして、上記と同じ反応組成のものを、反応時間零で対照として、この吸光度との差からアミノ糖量を求めた。

発色法^{1),4),8),17)}・(Elson-Morgan 反応)

第1液……アセチルアセトン 0.5mlに1.25 NのNa₂CO₃ 12.5mlを加えたもの。

第2液……P-ジメチルアミノベンツアルデハイド 1.6gにエタノール 30ml及び濃塩酸 30mlを加えた溶液。

反応液に第1液を1ml加えて密栓し、90°Cで1時間加熱し、冷後99%のエタノール8mlを加えて、更に第2液1mlを加えて15~20°Cで1時間放置後、発色した試験液の530mμの波長に対する吸光度を測定した。

実験結果及び考察

至適 pH : pH 6.5~9.0に調製した0.1Mの磷酸緩衝液0.5mlにGlu・NH₂ 20μml及びG-6-p10μmlを加えて全量0.8mlとしこれに酵素液0.2mlを加え

第2図 transaminoferase の至適 pH

て1mlとする。これを38°Cに保ち、1時間反応せしめた。その結果、夫々のpHに於ける反応系について生成したアミノ糖量を測定し、第2図に示すような結果を得た。

この図から明らかなように、唾液腺からの酵素の最大活性はpH 7.6にあり、これは肝臓からのものと近似な至適pHであつた。

ペーパークロマトグラフィー^{15),18)}:生成物の確認をする目的でペーパークロマトグラフィーを行つた。反応と前後の混液に夫々15%のトリクロル酢酸を0.5ml加えて除蛋白し、デシケーター中で減圧濃縮して試料とした。

展開液はCH₃OH : 2N・NH₄OH = 7 : 3の組成のものをを用い、室温で20cm前後、上昇法によつて展開した。濾紙はあらかじめ2N・CH₃COOH¹⁹⁾で洗つて、精製した東洋濾紙No.51を使用した。その結果を第3図に示す。

第3図 Gm-磷酸のペーパークロマトグラフィー (Me-NH₃系)

(2): (Aniline-Phthalate) (3),(4): Elson-Morgan 反応 (5),(6): Molybdate-H₂S

図中(1)は既知試料としてGlu・NH₂, G-6-Pを展開し、夫々ニンヒドリン及びアニンフタレートが発色剤

として呈色させたもので、 Glu.NH_2 の $R_f=0.53$, G-6-P の $R_f=0.38$ であつた。(2)以下は反応後の液を試料として展開したものである。(2)には $R_f=0.67$ にアニリンフタレートで呈色する物質が認められるが、この物質は Elson-Morgn 反応 (3)、(4) と、燐酸に対する呈色試薬である $\text{Molybdate-H}_2\text{S}^{(5)}$ の反応 (5)、(6) にも陽性であること、及び phosphatase 処理によつて、この両呈色が一層著明に現われる (3)、(5) ことからアミノ糖の燐酸化合物であることが推定出来る。

アミノ糖生成の時間的变化 : 至適 pH に於けるアミノ糖生成の時間的变化を調べた。その結果は第4図に示すように、唾液腺からの酵素の場合、2時間～2時間半ではほぼ一定値に達する。

第4図 ラット唾液腺によるアミノ糖生成の時間的变化

酵素活性 : ラットの舌下腺、顎下腺の混合物及びラット肝臓のホモジネートの硫安分画について、各分画の酵素活性を調べた。その結果を第1表に示す。

酵素活性の比較については、酵素自体の特異性よりも臓器の特異性を主体的に比較する立場から、湿量当りの酵素活性を求めた。

Pogell等⁽⁴⁾によればラット肝からのこの酵素の活性(組織の湿量当りの活性)は他の動物臓器に較べて最も高く、特に硫安1.7～2.3Mの分画に最も高い活性のあることを示している。しかし、上表に示すように、唾液腺では肝の2～2.5倍の酵素活性が認められた。そして硫安の1.7～2.5Mで沈澱して来る部分に最も高

第1表 各硫安分画の酵素活性

組織分画液	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の濃度 (M)	アミノ糖生成量 ($\mu\text{mol/g}$ 湿量)	
		舌下腺、 顎下腺	肝
F I	0 ~ 1.7	0.26	0.12
F II	1.7 ~ 2.3	1.27	0.61
	1.7 ~ 2.5	1.46	
F III	2.3 ~ 飽和	0.79	0.09
	2.5 ~ 飽和	0.37	

い活性が認められた。又、 G-6-P の代りに F-6-P で行つた結果も殆んど同様な活性を示した。

このように、唾液腺ではアミノ糖生合成に関するア

ミノ基転移酵素が、かなり高い活性で認められることは、唾液腺に於ける多糖体の合成が直接的のものであることを示唆するものと思われる。しかし、調製した酵素が粗酵素であるために、Roseman等⁽⁸⁾の指摘した様に、アミノ基の受容体が G-6-P か F-6-P かについては、まだ詳細に検討しなければならない。又 Becker等⁽⁷⁾が示したような代謝経路についても十分検討する必要がある。

本実験の酵素調製にあつては、酵素調製の際の通則である $4^\circ\text{C} \sim 0^\circ\text{C}$ 以下の条件が得難いために、殆んど室温に近い温度範囲 ($5^\circ \sim 15^\circ\text{C}$) で行つた。この場合、本酵素の基質の一つであると考えられる G-6-P を $10\mu\text{mol/l}$ 加えて行つたところ、上記のような比較的高い酵素活性を得た。このことは、この酵素が

G-6-P によつて、温度に対する安定性をかなり保ち得ることを示唆していると考えられる。

要 約

ラット唾液腺及び肝について Aminotransferase の活性を調べた。その結果、唾液腺からの酵素は肝臓からの酵素よりも約2倍高い活性を認めた。

至適 pH は 0.05M 、燐酸緩衝液で 7.6 であつた。又組織ホモジネートの硫安分画では、 $1.7 \sim 2.5\text{M}$ の濃度で沈澱する分画に最も高い活性が認められた。

この研究の一部は第36回日本生化学会総会で発表した。

主な参考文献

- 1) Blix, Svennerholm, Werner, : Acta chem. Scand., 6, 358 (1952)
- 2) Kohn, P., Winzler, R. J., Hoffmann, R. C.; J. Biol. chem, 234, 304 (1962)
- 3) Ghosih, S., Blumenthal, H. J., Davidson, E., Roseman, S.; J. Biol. Chem., 235, 1265 (1960)
- 4) Pogell, B. M., Gryder, R. M., : J. Biol. chem, 228, 701 (1957)
- 5) Lowther, D. A., Rogers, H. J.; Biochem. J., 62, 304 (1956)
- 6) Pogell, B. M., Kosing, D. F.; J. Biol. Chem., 234, 2504 (1959)
- 7) Becker, C. F., Day, H. G.; J. Biol. Chem., 201, 795 (1953)
- 8) Roseman, S., Moses, F. E., Ludowieg, L., Dorfman, A.; J. Biol. Chem, 203, 213 (1953)
- 9) Roseman, S.; Fed. Proc., 15, 340 (1956)
- 10) Kono, M., Quastel, J. H., ; Biochem. J., 85, 24 (1962)
- 11) Boas, N. F.; J. Biol. chem, 204, 553 (1953)
- 12) Distler, J. J., Merrick, S. M., Roseman, S.; J. Biol. chem., 230, 497 (1958)
- 13) 瀬野信子; 生化学, 34, 629 (1962)
- 14) 江上不二夫他編: 標準生化学実験、頁563. (昭和28年9月発行) 文光堂
- 15) Block, R. J., Durrum, E. L.; Paper chromatography, Paper Electrophoresis; Library of Congress. (1957)
- 16) 今永、草薙、山田、前田、安封、松島: 酵素化学シンポジウム、第12集、195頁 (1957)
- 17) Ressig, J. L., stominger, J. L., Leloir, L. F.; J. Biol. chem, 217, 959 (1955)
- 18) 柴田村治; ペーパークロマトグラフ法の実際、107頁 (昭和32年) 共立出版

BIOSYNTHESIS OF GLUCOSAMINE-6-PHOSPHATE IN THE RAT SALIVARY GLANDS.

by

Y. Oota and Y. Matsushita

Department of Biochemistry (Director Prof. Y. Matsushita)
Kyushu Dental College

Aminotransferase activity in the rat's salivary glands preparation has been studied and comparison was made with that of the liver preparation.

The results showed that the enzyme activity estimated on the basis of per gm. of wet weight of tissue was considerably higher in the salivary gland preparation than in the liver preparation. The pH optimum of the salivary gland enzyme was at 7.6. The enzyme fractions obtained at the concentrations between 1.7 and 2.5 M of ammonium sulfate showed the highest activity.