血清中に存在するレンニン阻害物質について (第 2 報)*

α_2 -マクログロブリンの示すレンニン阻害作用

赤枝秀逸, 三浦弘之, 三上正幸

(帯広畜産大学酪農製造学)

昭和 46 年 3 月 23 日 受 理

Studies on the Rennin Inhibitor in Serum

Part II. Inhibiting Action on Rennin Coagulation by α_2 -Macroglobulin

By Hideitsu AKAEDA, Hiroyuki MIURA and Masayuki MIKAMI

Department of Dairy Science, Obihiro Zotechnical University, Obihiro, Hokkaido, Japan

In the previous paper, we suggested that rennin coagulation inhibitor was found in salts and peptides fraction (F-A), and in proteins fraction (F-B) in pig serum, and the inhibitor in F-B was α_2 -macroglobulin (α_2 -M).

The purpose of this paper was to study the inhibiting ability of α_2 -M and mammalian sera. Results were as follows ;

1) Purified α_2 -M inhibited enzymatic phase of rennin coagulation (rennin action on κ -casein). It was clear from the above results that the rennin coagulation inhibitor in serum proteins was α_2 -M.

2) When α_2 -M was brought into contact with rennin, its rennin did not coagulate κ -casein. When α_2 -M was brought into contact with κ -casein, however, rennin coagulated its κ -casein. This fact indicated that α_2 -M attacked rennin.

3) We studied the relation between rennin inhibiting ability of six mammalian sera and their α_2 -M, and it was found that rennin inhibiting ability of sera was chiefly related to amount of α_2 -M in sera.

(Received March 23, 1971)

緒 言

著者らは前報⁽¹⁾において、ブタ血清中に存在する牛乳のレンニン凝固作用を阻害する物質は、塩類画分とタンパク質画分の両方に存在することを認め、タンパク質画分に存在する阻害物質は、種々の生物学的性質⁽²⁻⁴⁾から α_2 -マクログロブリン (α_2 -M) であろうと推定した。その後 α_2 -M を単離することができたので、さらに詳細に検討したところ次のような結果を得た。

また動物の種によって、血清が示す阻害作用に強弱の差がみられるが、このことについても若干検討した。

実験方法

1. 血清の調製 ヒトの血液は健康な成人の腕静脈

* 本研究の一部は、昭和 46 年度日本農芸化学会大会において発表した。

より、その他の血液は成畜の頸動脈より採血し、1 昼夜低温で静置後血清を分離し、さらに遠心分離によって血球を除き実験に供した。

2. α_2 -マクログロブリンの調製

i) β -リボプロテイン、オイグロブリンの除去 : Oncley らの方法⁽⁵⁾にしたがって、血清 100 ml に 0.5 %デキストラン硫酸 5 ml を加え、2~4 時間低温で放置後、 β -リボプロテインの沈殿物を 0°C, 3000×g で遠心分離した。さらに、この血清を水で 2 日間透析してオイグロブリンを沈殿除去し、凍結乾燥を行ない F-B とした。

ii) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー : F-B の 4 g をリン酸塩緩衝液 (0.02 M, pH 6.3) で緩衝化した 18×4 cm の DEAE-セルロースカラムに吸着させ、Sober と Peterson の方法⁽⁶⁾にしたがい、次に示すリン酸塩緩衝液でステップワイズ法により流速 720 ml/

hr, 温度 20°C で溶出を行ない, 溶出液を 10 ml ずつ分取し, 280 m μ の吸光度を測定して得られた画分のうち, 緩衝液 III によって溶出されてくる画分 (F-3) を脱塩し, 凍結乾燥して次のゲル濾過のための試料とした。

リン酸塩緩衝液

- I 0.02 M, pH 6.3, 400 ml
- II 0.04 M, pH 5.9, 400 ml
- III 0.2 M, pH 5.8, 500 ml
- IV 0.4 M, pH 5.2, 400 ml
- V 0.4 M, pH 4.4, 400 ml

iii) Sephadex G-200 ゲル濾過法: F-3 の 0.3 g を 0.2 M NaCl を含むトリス塩酸緩衝液 (0.1 M, pH 8.6) の 5 ml に溶かし, 同緩衝液で緩衝化した 184 $\times$ 2.6 cm の Sephadex G-200 カラムで同緩衝液によって流速 11.4 ml/hr, 温度 10°C でゲル濾過を行ない, 流出液を 5 ml ずつ分取して 280 m μ の吸光度を測定し, 得られた画分のうち, 第 1 のピーク (P-1) に流出される α_2 -M を脱塩して凍結乾燥した。

3. 電気泳動 分離した α_2 -M の単一性を確認するため, セルロースアセテート膜 (Separax) を支持体とした電気泳動を行ない, ヴェロナル緩衝液 (pH 8.6, μ =0.05) で 0.8 mA/cm の定電流で 90 分泳動させ, ボンソー 3R で染色を行なった。

4. 超遠心分析 Beckman-Spinco E 型超遠心分離機を用いて回転数 52,000 rpm, 温度 20°C, タンパク質濃度 1%, ヴェロナル緩衝液 (pH 8.6, μ =0.1) で分析を行なった。

5. レニン凝固阻害力の測定

Lawrence と Creamer の方法⁽⁷⁾ を若干修正し, リン酸塩緩衝液 (0.02 M, pH 5.4) に溶かした 0.05% κ -カゼイン⁽⁸⁾ 5 ml を基質として 38°C に保持し, これに同緩衝液に溶かした一定濃度の α_2 -M を 0.1 ml 加え, 直ちに 1% NaCl を含む同緩衝液に溶かした前報⁽¹⁾ で用いたと同様の 0.001% レニン 0.1 ml を添加して生ずるパラ κ -カゼインの白色沈殿を, 日立 101 型分光光度計で 550 m μ における濁度の測定によって, 添加直後から 4 分間の阻害力を比較した。また, 0.5% α_2 -M

を κ -カゼインあるいはレニン溶液とあらかじめ一定時間接触させ, その場合の阻害の程度を測定した。

各々の動物の血清における阻害力は, その血清 0.1 ml を κ -カゼイン 5 ml に作用させて, レニン 0.1 ml を添加した場合に, 4 分間までに起こる凝固の有無を比濁することによって比較した。

6. 血清中の α_2 -M 含量の推定 ゲル濾過によって, F-3 中に P-1 が占める割合をもって推定した。

実験結果および考察

1. α_2 -M の単離

β -リボプロテイン, オイグロブリンを除いた血清タンパク質を DEAE-セルロースで分離すると, Fig. 1 に示すように F-1 から F-4 までの 4 画分に分離することができ, α_2 -M を含む F-3 を Sephadex G-200 によってゲル濾過すると, Fig. 2 に示すように P-1 から P-3 までの 3 つに分離され, α_2 -M は P-1 に流出される。この α_2 -M の単一性を知るために電気泳動および超遠心を行なうと, Fig. 3, Fig. 4 に示すごとく, それぞれ単一パターンを示すことから, α_2 -M が単離されたとみることができ, この α_2 -M を用いて, 次の実験結果を得た。

2. α_2 -M の示すレニン凝固阻害作用

κ -カゼインを基質として, 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 各 % の α_2 -M が示す阻害力を測定し, Fig. 5 のような結果を

Fig. 1. DEAE-Cellulose Column Chromatogram of F-B.

Sample, 4g of F-B; column, 18 $\times$ 4 cm; eluant, I 0.02 M Na-phosphate buffer, pH 6.3, 400 ml, II 0.04 M, pH 5.9, 400 ml, III 0.2 M, pH 5.8, 500 ml, IV 0.4 M, pH 5.2, 400 ml, V 0.4 M, pH 4.4, 400 ml; flow rate, 720 ml/hr; temp., 20°C; one fraction, 10 ml/tube.

Fig. 2. Gel-filtration on Sephadex G-200 of F-3.

Sample, 0.3g/5ml of F-3; column, 184×2.6 cm; eluant, 0.2M NaCl in 0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.6; flow rate, 11.6 ml/hr; temp., 10°C; one fraction, 5ml/tube.

Fig. 3. Zone Electrophoretic (cellulose acetate membrane) Patterns of Serum and α_2 -M.

Veronal buffer, pH 8.6, $\mu=0.05$, 0.8 mA/cm/90 min.

得た。0.1% α_2 -M ではさほど強い阻害を示さないが, 0.5% では明らかに阻害を示し, 2% では完全に阻害している。この結果から, 血清タンパク質画分に存在する牛乳のレンニン凝固を阻害する物質は, α_2 -M であることが明らかであり, α_2 -M はパラ κ -カゼインの生成を妨げることから, 牛乳のレンニン凝固機構のうち, 酵素的段階を阻害することが明らかである。

また, 0.5% α_2 -M を κ -カゼインあるいはレンニンとあらかじめ接触させておいた場合, Fig. 6 に示すように κ -カゼインとは阻害がみられないが, レンニンと接触させておくと阻害が強く現われ, かつ接触時間の経過とともに阻害の程度も強くなっている。このことから, α_2 -M

Fig. 4. Ultracentrifuge Pattern of α_2 -M.

Protein concentration, 1%; veronal buffer, pH 8.6, $\mu=0.1$; 52,000 rpm; 32 min.

はレンニンに作用してその酵素活性を阻害し, 結果的にはレンニン凝固が阻害されるものと思われる。血清におけるこれと同様の効果は Hedin^(9,10), 津郷ら⁽¹¹⁾ がすでに報告しているが, その阻害機構に関しては未だ不明である。

3. 血清の示す阻害力と α_2 -M との関係

レンニン阻害物質が明らかとなったので, 動物の種による血清の阻害力の差についても若干検討してみた。

動物の種による血清のレンニン阻害力の程度は Fig. 7 に示すように, ブタ, ウマ, ヒト, ヒツジ, ヤギ, ウサギの順に弱くなり, ブタ, ウマ血清は完全に阻害してい

Fig. 5. Comparison of Rennin Inhibiting Ability of α_2 -M.

—●— control, —×— α_2 -M 0.1%, —△— 0.5%, —○— 1.0%, —□— 2.0%.

Fig. 6. Comparison of Rennin Inhibiting Ability of 0.5% α_2 -M.

—●— control, —×— α_2 -M + κ -casein 0.5 min, —△— α_2 -M + κ -casein 2.0 min, —○— α_2 -M + rennin 2.0 min, —□— α_2 -M + rennin 8.0 min.

Fig. 7. Comparison of Rennin Inhibiting Ability of Several Sera.

—●— control, —×— rabbit protein 5.42%, —△— goat 8.00%, —▲— sheep 9.10%, —○— human 7.79%, —□— horse 8.44%, —■— pig 8.44%.

る。この順は Table I に示すように、従来の研究結果ともほぼ一致している。しかし Thaysen⁽¹²⁾ は、この差は個体差によって生ずるものであって、種間による差ではないと報告しているが、前野⁽¹³⁾、森本⁽¹⁴⁾ は個体差を認めながらも、なおかつ種間に明らかな差異があるとのべている。本実験における血清試料は、大部分が同種動物の混合血清を用いているために、個体差の検討はできなかったが、種間には明らかな差異が認められた。

また血清中のタンパク質含量、および F-3 中の α_2 -M

Table I. Comparison of Coagulation Inhibiting Ability of Sera

Maeno <i>et al.</i> ⁽¹³⁾ (1949)	Tsugo <i>et al.</i> ⁽¹¹⁾ (1955)	Morimoto ⁽¹⁴⁾ (1955)
pig	pig	pig
horse	horse	horse
ox	human	ox
human	cow	cat
rabbit	rabbit	dog
goat		human
		rabbit
		goat

Table II. Amount of Protein and α_2 -M in Sera

Serum	Protein % in serum	α_2 -M % in F-3
Pig	8.44	10.34
Horse	8.44	8.56
Human	7.79	8.85
Sheep	8.00	4.44
Goat	9.10	7.69
Rabbit	5.42	4.00

の含量は Table II に示すごとくで、ヤギの場合を除いては α_2 -M の含量は、血清が示す阻害力 (Fig. 7) の順に、ほぼ一致しているように思われる。

このことから、血清が示すレンニン凝固阻害作用の強さは、 α_2 -M の含量とある程度関係があるかもしれない。

要 約

前報の結果から、 α_2 -マクログロブリン (α_2 -M) を単離してレンニン

凝固阻害作用を検討し、以下の結果を得た。

(1) κ -カゼインを基質として、 α_2 -M の阻害作用を試験したところ、レンニンによるパラ κ -カゼインの生成がみられないことから、 α_2 -M がレンニン凝固阻害物質であり、酵素的段階に対する阻害であることが明らかとなった。

(2) α_2 -M を κ -カゼインあるいはレンニンとあらかじめ接触させて阻害の有無を観察すると、レンニンに接触させておいた場合に阻害が現われ、しかも接触時間

の経過とともに阻害力が強くなる。このことから α_2 -M は、レンニンの酵素活性を阻害するものと思われる。

(3) 6種の哺乳動物の血清について、レンニン阻害力を比較し、さらに血清中の α_2 -M 含量を調べると、阻害力の強さは α_2 -M の含量とある程度関係があるのではないかと思われた。

-
(1) 赤枝秀逸, 三浦弘之, 三上正幸: 農化, 45 , 184 (1971).	(5) J. L. Oncley, K. W. Walton and D. G. Cornwell: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 79 , 4666 (1957).
(2) B. J. Haverback, B. Dyce, H. F. Bundy, S. K. Wirtschafter and H. A. Edmondson: <i>J. Clin. Invest.</i> , 41 , 972 (1962).	(6) H. A. Sober and E. A. Peterson: <i>Fed. Proc.</i> , 17 , 1116 (1958).
(3) J. W. Mehl, W. O'Connell and J. DeGroot: <i>Science</i> , 145 , 821 (1964).	(7) R. C. Lawrence and L. K. Creamer: <i>J. Dairy Res.</i> , 36 , 11 (1970).
(4) P. O. Ganrot: <i>Scand. J. Clin. Lab. Invest.</i> , 12 , 177 (1968).	(8) C. A. Zittle and J. H. Custer: <i>J. Dairy Sci.</i> , 46 , 1183 (1963).
	(9) S. G. Hedin: <i>Z. Physiol. Chem.</i> , 60 , 85 (1909) cited from (14).
	(10) <i>idem</i> : <i>ibid.</i> , 60 , 364 (1909) cited from (13).
	(11) 津郷友吉, 山内邦男: 農化, 29 , 457 (1955).
	(12) A. C. Thaysen: <i>Biochem. J.</i> , 9 , 110 (1915) cited from (14).
	(13) 前野正久, 島村靖三: 日畜会報, 20 , 21 (1949).
	(14) 森本 明: (1961) 未発表.