

家畜におけるメチオニン-S-オキシドレダクターゼの
栄養学的意義

長峰孝文

1992

①

家畜におけるメチオニン-S-オキシドレダクターゼの栄養学的意義

Nutritional significance of methionine-S-oxide reductase
in livestock animals

鹿児島大学大学院連合農学研究科 生物生産科学専攻

動物生産学連合講座

長峰 孝文

1992

目次

第1章 緒論	- 1 -
第2章 牛、豚、鶏のメチオニンスルホキシド還元活性の比較	- 17 -
第1節 目的	- 17 -
第2節 メチオニンスルホキシド還元活性の測定法	- 17 -
第3節 牛のメチオニンスルホキシド還元系の性質およびその活性	- 22 -
第4節 豚のメチオニンスルホキシド還元系の性質およびその活性	- 32 -
第5節 ブロイラーのメチオニンスルホキシド還元活性	- 35 -
第6節 産卵鶏のメチオニンスルホキシド還元系の性質およびその活性	- 45 -
第7節 考察	- 59 -
第3章 牛のメチオニンスルホキシド還元活性にみられた個体差の原因	- 67 -
第1節 目的	- 67 -
第2節 供試牛および方法	- 71 -
第3節 メチオニンスルホキシド還元活性に影響を及ぼす要因	- 71 -
第4節 考察	- 86 -
第4章 緬羊の成長に及ぼすメチオニンスルホキシド給与の影響	- 92 -
第1節 目的	- 92 -
第2節 材料と方法	- 92 -
第3節 結果	- 99 -
第4節 考察	- 115 -

第5章	メチオニンスルホキシド還元機構の解明	-118-
第1節	目的	-118-
第2節	材料および活性の測定法	-119-
第3節	牛肝臓の粗酵素抽出液の保存法の確立	-122-
第4節	メチオニンスルホキシドレダクターゼの粗酵素レベルでの pH 安定性 および液体クロマトグラフィーによる分画	-136-
第5節	チオレドキシシンおよびチオレドキシシンレダクターゼの液体クロマト グラフィーによる分画	-154-
第6節	メチオニンスルホキシドレダクターゼの精製	-159-
第7節	チオレドキシシンおよびチオレドキシシンレダクターゼの部分精製	-166-
第8節	メチオニンスルホキシドレダクターゼの性質メチオニンスルホキシド レダクターゼの性質	-167-
第9節	考察	-176-
第6章	総合考察	-180-
第7章	要約	-188-
	謝辞	-196-
	参考文献	-198-

略語対応表

2-ME	2-メルカプトエタノール
BSA	牛血清アルブミン
DTT	ジチオトレイトール
DTNB	5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)
EDTA	エチレンジアミン四酢酸(本研究では Na 塩を用いた)
FD-1	牛肝臓の凍結乾燥粉末タイプ 1(第5章, 第3節, 3.)
FD-2	牛肝臓の凍結乾燥粉末タイプ 2(第5章, 第3節, 6.)
FD-3	牛肝臓の凍結乾燥粉末タイプ 3(第5章, 第3節, 8.)
GSH	還元型グルタチオン
GSSG	酸化型グルタチオン
MSO	メチオニンスルホキシド
MSO レダクターゼ	Methionine-S-oxide reductase
MSO ペプチドレダクターゼ	Methioninesulfoxide-peptide-reductase
PMET	脂質などによりルーメンでの分解から保護したメチオニン

第1章 緒論

生物は主に、水、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、無機質から成っている。これらはいずれも重要な成分であるが、生命現象の中心的な役割を担っているのはタンパク質である。かつて、ENGELS (1878) は「生命は蛋白体の存在様式である」¹⁾ と述べている。存在様式とは合成・分解のことを意味している。つまり、ENGELS はタンパク質の代謝 = 生命であると言いたかったものと思われる。生命体内でタンパク質を含めた数多くの物質の代謝を行っているのは主に酵素である。しかし、酵素の役割はそれだけではない。例えば、神経の伝達は酵素の働きなしには起こらないし、筋肉が収縮するのも酵素反応の結果である²⁾。このような酵素のほとんどを構成しているのがタンパク質である。酵素によっては無機質やタンパク質の成分以外のものを含んでいたりするものもあるが、RNA の酵素作用を別にすれば、酵素はタンパク質なしにはあり得ない。つまり生物も存在し得ない。

さて、このタンパク質は、約 20 種類のアミノ酸から構成されている。そのため、アミノ酸は栄養学的にもきわめて重要な物質とされている。一般に植物や細菌などは、これらのアミノ酸をすべて自分で合成できる。しかし、家畜などの高等動物は、20 種類のアミノ酸の内約半分のアミノ酸を、まったく合成できないか、または自分に必要な量を合成することができない。この点は、家畜を飼育する者にとっては、大変重要な点である。これらのアミノ酸（必須アミノ酸）は、飼料中に必ず含まれていなければならないからである。

ところが、家畜の中には、そういうことを気にしなくてもよい動物がいる。それは、牛などの反芻動物である。反芻動物は 4 つの胃を持っている。これらの胃の中で、食道に続く 1 番目の胃がこの反芻動物を特異な動物にしてい

る。この胃はルーメン（第一胃）と呼ばれる袋であり、大きさは牛で 160～235 l、山羊で 10～22 l もある³⁾。ルーメンの中には、反芻動物の食べたものが一時的に蓄えられており、そこに細菌類、繊毛虫類、真菌類などの微生物が多数棲息している。そしてこれらの微生物は、反芻動物の食べた飼料の大部分を分解し、そして様々な物質を合成している。反芻動物は、このようにして微生物が分解または合成したものを消化吸収して自分の栄養源としている。これによって反芻動物は、すべてのアミノ酸を得ることができるのである。

ルーメンを持つことによって得られる利点はアミノ酸だけに限ったものではない。ビタミン B 複合体とビタミン K を得ることができる上に、高等動物自身では消化できない草などに含まれる繊維質を微生物が分解してくれるので、それを反芻動物が利用することができるという利点もある。さらには、家畜が有害な物質を食べたとしても、そのいくつかはルーメンで解毒されるのである。なんともうまい仕組である。

この利用価値の高いルーメンは、世界中で盛んに研究が行われてきているが、未だに不明な点が多いままであり、ルーメンのさらに深い研究が必要である。ところで、このようなルーメンの大きなナゾの 1 つに、ルーメン繊毛虫類がある。繊毛虫は、単細胞動物であるが、原核細胞である細菌と違って高等動物と同じ真核細胞である。また、大きさも細菌が 0.2～10 μm であるのに対して、繊毛虫は 40～200 μm とかなり大きい^{4a)}。そして、繊毛虫は複雑な外見をしており、その名の通り繊毛を多数持っている。さて、この繊毛虫類のナゾというのは、ルーメンに繊毛虫類が存在することの意義である。繊毛虫類は、ルーメン内容物 1 g 当たり $10^5\sim 10^6$ 個体くらい棲息している^{4b)} が、細菌の $10^{10}\sim 10^{11}$ 個体^{4b)} と比較するとはるかに少ない。しかし、体積で比較するとほぼ同じである^{4c)} ことから、バイオマスはほぼ同じであると考えられてい

る。しかしながら、ルーメン内に繊毛虫類が棲息している方が、反芻動物自身にとってよいという決定的な報告はなされていない。そのため、ルーメンに繊毛虫類がいた方がよいという研究者と、繊毛虫類をルーメンから駆逐するべきだという研究者との間で論争が繰り広げられており、ルーメン繊毛虫類についての研究は数多くなされている。

1970年、小野寺・神立⁵⁾は、繊毛虫を培養した後の培養液に含まれる窒素化合物の40%がアミノ酸であることを明らかにし、その中に6つの未知のニンヒドリン陽性物質(US-1~US-6)を発見した。そして、US-1がピペコリン酸であることを同定した⁶⁾。次いでT_{SUTSUMI} and O_{NODERA} (1975)⁷⁾がUS-2を5-アミノ吉草酸、三浦(1971)⁸⁾がUS-3を2-アミノ-n-酪酸と同定した。そして1982年、O_{NODERA} and T_{AKEI}⁹⁾は、US-4がメチオニンスルホキシド(MSO)であることを同定した。

MSOは、メチオニンの硫黄原子に酸素原子が1つ結合した化合物である(図1-1)。MSOが、さらに酸化されるとメチオニンスルホンになる。メ

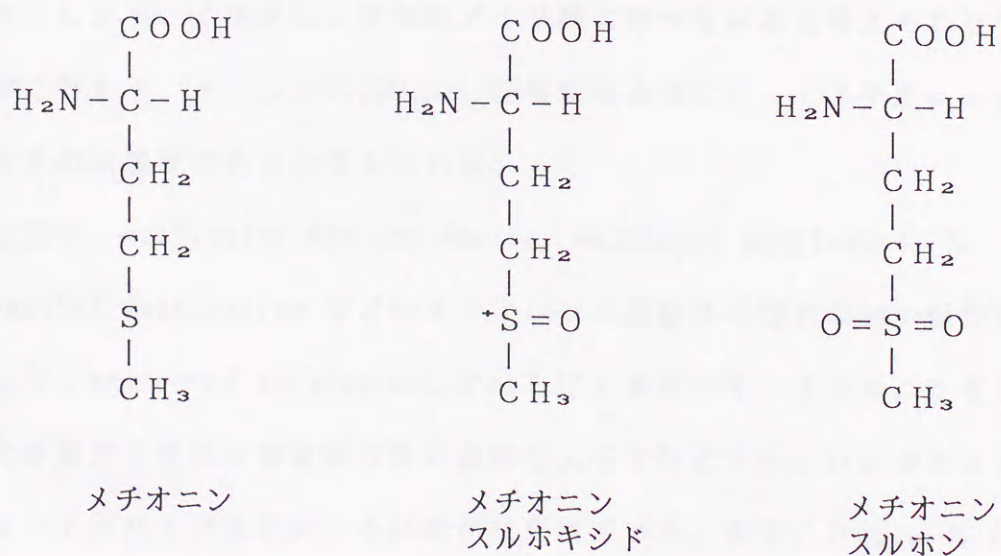


図 1-1 メチオニンおよびその酸化化合物

チオニンから MSO への酸化は、比較的容易に起こるが、MSO からメチオニンスルホンへの酸化は、かなり強い酸化条件でないと起こらないことが知られている。

さて、メチオニンは必須アミノ酸の1つであるが、家畜に与える植物性飼料の多くで特に不足しがちなアミノ酸である。もし、必須アミノ酸の1つが体内に不足した場合、いくら他のアミノ酸が多くあってもタンパク質は合成されない。つまり、不足している必須アミノ酸の摂取量によって、合成されるタンパク質の量が制限されるのである。このようなアミノ酸を制限アミノ酸というが、メチオニンはその制限アミノ酸になりやすい。したがって、メチオニンは家畜のタンパク質の栄養上、特に注意を払わなくてはならない物質である。

前に述べたように必須アミノ酸のことは、反芻家畜では特に問題にならないとされてきた。ところが近年、成長期の反芻家畜の第四胃にメチオニンを注入すると、家畜の体内におけるタンパク質合成が高まることが分かったのである⁴⁴⁾。また、十二指腸内容物と牛肉とを、それに含まれている必須アミノ酸の割合で比較した結果、牛肉よりも十二指腸内容物のメチオニン割合が低い傾向を示したことから、メチオニンが制限アミノ酸になっていると考えられた⁴⁴⁾。これらのことから、ルーメン内容物は、反芻家畜自身にとってメチオニンがやや不足ぎみの栄養源であると考えられる。

そこで近年、methionine hydroxy analog、methionyl methionine、N-hydroxymethyl methionine などのメチオニンの前駆体や脂質などで保護したメチオニン (protected methionine, PMET) を用いて、メチオニンをルーメン内で分解させずに反芻家畜自身に直接与えるようにする、いわゆるメチオニンのルーメンバイパスに関する研究がなされている。まず、BLAKE ら (1986)¹⁰⁾ が牛のルーメン液から調製した人工ルーメンを用いて、メチオニンの

前駆体および P M E T がルーメン発酵に及ぼす影響について検討している。それによると、methionine hydroxy analog が人工ルーメンから流下した液中の成分のプロピオン酸が増加して酢酸が減少した以外に、ルーメン発酵に影響はなかったことを報告している。*in vivo* でのメチオニン前駆体の給与による生産（成長、産乳など）に対する効果についての研究はほとんど行われていないが、P M E T ではいくつかの研究がなされている。S M I T H and B O L I N G (1984)¹¹⁾ は成長中の緬羊に遊離のメチオニンまたは P M E T を与えた結果、P M E T を与えた区は、何も与えなかった区よりも窒素出納が改善されたが、遊離のメチオニンを与えた区は、逆に対照区よりも窒素出納が低下したことを報告している。また、C A N A L E ら (1990)¹²⁾ は、高泌乳牛に P M E T を与えた結果、乳中のタンパク質が増加し、乳脂肪酸の炭素鎖が短いものの比率が増加したことを報告している。しかしながら一方では、W R I G H T and L O E R C H (1988)¹³⁾ の、成長中の緬羊および去勢牛に P M E T を与えた結果、血液中の遊離アミノ酸濃度には影響が見られたが、増体等には効果が見られなかったという報告もある。また、C H O W ら (1990)¹⁴⁾ の、高脂肪飼料または高濃厚飼料を給与している泌乳牛に P M E T を与えた結果、乳成分に対しては P M E T 給与よりも高脂肪飼料給与の影響の方が大きく、P M E T 給与による劇的な効果はみられなかったという報告もある。すでにいくつかの P M E T が開発されて販売されているが、このように生産に対する P M E T 給与の効果は、まだ明らかにはなっていない。P M E T 給与による効果が見られない原因としては、メチオニン以外の栄養素（他の必須アミノ酸、ビタミン、エネルギー等）が不足していること、メチオニンがうまく保護されていないこと、ルーメン以降での脂質とメチオニンの分離ができていないこと、保護に用いている脂質が反芻家畜自身の代謝やメチオニンの吸収などに影響しているこ

となどが考えられる。また、SULLU ら (1989) ¹⁵⁾ の、牛のルーメンからの遊離のアミノ酸の流下速度は、飼料の内容の影響を受けるという報告から、実験の条件や用いた個体によっては、給与した P M E T が長期間ルーメンに滞留している可能性も考えられる。P M E T に関して明らかでない点は、生産に及ぼす P M E T 給与の影響だけではない。それは、遊離のメチオニンの給与に比べて P M E T の給与がどの程度効果を高めるのか、つまり給与するメチオニンを保護することの効果はどの程度なのかという点である。なぜならば、メチオニンは、ルーメン内で比較的分解されにくいアミノ酸であると考えられているからである⁴⁰⁾。また、最近の報告でも、ルーメン内に投与されたメチオニンの多くが、そのまま下部消化管へ流下することが示されている¹⁶⁾。

このように、反芻家畜への P M E T 給与の効果の是非は、研究者によって必ずしも一致していない。しかし、C ANALE ら (1990) ¹²⁾ の高泌乳牛に P M E T を与えた実験では、乳成分への効果が見られていることから、農家で飼育される家畜にこれから増加すると思われる、高い生産能力を持つ個体に対して効果があるのではないかと考えられる。また、メチオニンを保護する必要性については、保護するために必要なコストと、その保護効果による経済的収入の増加という部分での問題になると考えられる。ただし、遊離のメチオニンからルーメン内で生成される物質がルーメン発酵、腸内発酵および家畜自身に及ぼす影響、P M E T に用いられる脂質がルーメン発酵、腸内発酵および家畜自身に及ぼす影響、そして高濃度のメチオニンが腸内発酵に及ぼす影響などの検討が必要ではないかと考えられる。

さて、先に述べた O N O D E R A and T A K E I (1989) ⁹⁾ の研究によって、ルーメン繊維毛虫類が M S O を生成することが明らかになったわけだが、ルーメン内の M S O に関する研究は、他にもいくつか報告されている。C O O K (1965)

18) は、山羊にメチオニンを給与すると、ルーメン静脈血中に MSO がみられたことを報告している。また、SALSURY ら (1971) 19) は、放射性同位元素の ^{14}C で標識したメチオニンをルーメン液に添加すると、放射性を持つ MSO が生成されることを報告している。1985 年、竹井²⁰⁾ は、これらの研究結果から MSO はルーメン内でメチオニンが酸化されることによって生成されるのではないかと考え、ルーメン内微生物によるメチオニンの酸化について検討した結果、ルーメン内微生物がメチオニンを酸化して MSO を生成することを明らかにした。さらに竹井²⁰⁾ は、ルーメン内微生物懸濁液に遊離のメチオニンまたは MSO を添加した時、メチオニンが 60 分で最初の濃度の 45.3% に低下する条件で、遊離の MSO は 74.9% までにしか低下しないことも明らかにした。そしてこれらのことから竹井は、ルーメン内で生成された MSO が、いくらか下部消化管へ流れ込んでいるのではないかと考察した。

反芻家畜における MSO の利用に関する研究は見当たらないが、ラットにおける MSO の利用に関する研究はいくつかなされている。MILLER and SAMUWL (1970) 21) は、ラットにタンパク質源としてカゼインを与えている時に、MSO を与えた時の NPU (正味のタンパク質利用率、生物価×消化率) の変化を検討している。その結果、カゼインだけの時の NPU は 76% であったのに対して、それに DL-メチオニンを加えた時は 95%、MSO を与えた時は 81% となり、メチオニンよりは効力は低いが、MSO も NPU を向上させる効果が見られた。ANDERSON ら (1976) 22) は、離乳して間もないラットにメチオニンとシステインを含まない飼料を与え、それにメチオニン、MSO またはメチオニンスルホンを加えた時の増体を比較した結果、やはりメチオニンよりは効力は低いが MSO も増体を向上させる効果があった。それに対してメチオニンスルホンを与えた区は、逆に増体が減少した。ま

た、MSO を与えた区で、血漿中の MSO 濃度が上昇し、高濃度の MSO を与えると、メチオニンおよびシスチンの濃度も上昇した。Cua ら (1978)²³⁾ は、成長期のラットに、タンパク質源としてカゼインまたはそれを酸化してカゼインに含まれるメチオニンを MSO にしたものを与えた。その結果、酸化したカゼインを与えられた区は、酸化していない区よりもラットの成長が悪かったが、酸化したカゼインにメチオニンを加えると、酸化していないカゼインとほぼ同じ増体を示した。また、酸化したカゼインを与えられた区は、血漿中 MSO 濃度が上昇し、試験終了後に筋肉中に多量の遊離の MSO が見られた。NJAA and AKSNES (1982)²⁴⁾ は、ラットに半精製飼料を与え、含硫アミノ酸としてメチオニン、MSO、ホモシスチンまたはシスチンを用いた時の窒素保留を測定した。その結果、L-メチオニン、D-メチオニン、L-MSO、DL-ホモシスチンおよび L-シスチンは同等の窒素保留を示した。しかし、D-MSO は L-MSO よりも窒素保留が低かった。IWAMI ら (1983)²⁵⁾ は、3 週間カゼインを与えたラットの腹腔内に MSO 溶液を注入し、メチオニンからも合成されるグルタチオン (グルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチド) の肝臓内の濃度を測定することにより MSO のメチオニンとしての利用度を検討した結果、MSO 注入区のグルタチオン濃度は、対照区よりも上昇したが、メチオニン溶液を注入した区よりも低かったことを報告している。

一方、鶏における MSO の利用に関する研究もいくつかなされている。KUZMICKY ら (1977)²⁷⁾ は、若い雄の白色ロック種 (肉用種) にタンパク質源として大豆を与えている時に、遊離の MSO を与えると成長が促進されたことを報告している。また、HAALAND ら (1989)²⁹⁾ は、若い雄の白色レグホーン種 (卵用種) に遊離の MSO のを与えると、遊離のメチオニンを与え

た時と同等の増体が見られたが、産卵鶏にメチオニンがかなり酸化した魚肉を与えると、酸化していないもしくは少し酸化している魚肉を与えた時よりも増体が下がること、そして、酸化した魚肉を与えると筋肉中に高濃度のMSOが見られたことを報告している。

以上の報告をまとめると、ラットおよび鶏は、MSOをメチオニンとして利用することができるが、その能力はメチオニン要求量を満たすのに十分ではないと考えられる。またI_{WAMI}ら(1983)²⁵⁾の結果から、MSOの還元は腸内細菌によるものではなく、ラット自身によるものであり、そしてC_{UQ}ら(1978)²³⁾とH_{AALAND}ら(1989)²⁹⁾の結果から、還元しきれなかったMSOは筋肉中に蓄積されると考えられる。

さて、高等動物によるMSOの利用について、以上のようなMSOを給与することによる生産への影響を検討することだけでは、MSOをメチオニンとして利用しているのかどうかについて明らかにする上で十分とは言えない。そのため、高等動物におけるMSO利用の機構(MSOの吸収および還元)に関する研究もなされている。

高等動物がMSOを利用するためには、まずそれを体内に吸収しなくてはならない。高等動物における物質の輸送は、近年の生体膜の研究の進歩によってその概要が明らかにされつつある。物質の輸送は、主に輸送系と呼ばれる膜上のタンパク質によって行われている。約20種類あるアミノ酸の輸送は、いくつかの輸送系で行われていて、1つの輸送系が複数のアミノ酸を輸送していることが分かっている。そのため、あるアミノ酸と同じ輸送系で輸送されている物質(アミノ酸とは限らない)が存在すると、そのアミノ酸の単位時間当たりの輸送が減少するという競合阻害の現象が見られる。

MSOの吸収に関する研究は、ラットでいくつか検討されている。

HIGUCHI ら (1982)³⁰⁾ は、ラットの小腸が MSO をメチオニンと同程度吸収でき、MSO の輸送はエネルギー依存性の能動輸送であることを報告している。また彼らは、MSO の輸送に対する他のアミノ酸の競合阻害についても検討しており、それによると MSO の輸送はグルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、リジンでは阻害されないが、メチオニンとロイシンでは阻害されたことから、MSO の一部はメチオニンやロイシンと同じ輸送系を通っていると考察している。しかしながら、AKSNES and NJAA³¹⁾ (1983) は、ラット小腸の MSO 輸送系はメチオニンの約半分の輸送能しかなく、メチオニンと MSO は競合しないという実験結果から、メチオニンと MSO は異なる輸送系ではないかと報告している。さらに彼らは、輸送の際にグルタチオン (GSH) とアミノ酸が結合するという説があることに関連して、GSH があると MSO の輸送能が高まったことから、MSO 輸送系でも、輸送の際に GSH と結合するという説があてはまるのではないかと考察している。一方、SUGAWA ら (1960)³²⁾ は、ラットの腸に十二指腸から盲腸にかけてラベルしたメチオニンを灌流した結果、吸収された画分 (絨毛膜、小腸壁、門脈血) にはラベルしたメチオニンだけでなく、放射性の MSO もみられ、しかも放射性の MSO は小腸壁にはみられたが絨毛膜にはほとんどないことから、メチオニンは吸収される時に一部酸化されて MSO となると考察している。また彼らは、小腸壁に比べて門脈血中の放射性の MSO / メチオニン比が低くなっていたことから、吸収された MSO は門脈に到達するまでに還元されると考察している。しかし、その考察に対して HIGUCHI ら (1982)³⁰⁾ は、吸収の実験の中で小腸自身からのメチオニンの流出が見られたことから、門脈中で増えた分のメチオニンは小腸の内部由来のものであり MSO の一部が門脈に到達するまでに還元されたとは考えない方が無難であると述べている。

M S O の輸送系は細菌でも検討されているが、その中には、*Salmonella typhimurium* で M S O の輸送はメチオニン（ほぼ 100%）またはグルタミン（約 70%）で阻害されるという報告³³⁾ があることから、メチオニンと M S O の両方を輸送できる輸送系が存在すると考えられる。メチオニンによる M S O 輸送の競合阻害について H I G U C H I ら（1982）³⁰⁾ と A K S N E S and N J A A （1983）³¹⁾ の結果は異なっているが、その原因としては、M S O がいくつかの輸送系を通過して輸送されており、それぞれの輸送系が輸送に必要なもの（エネルギー、G S H、イオン勾配など）が異なっていて、実験条件の違いから差が生じたのではないかと考えられる。ラット以外に、兎の小腸および腎臓の刷子縁でも M S O が吸収されることが報告されている³⁴⁾。

さて、反芻動物における M S O の吸収に関する報告は、残念ながら見当たらないが、各アミノ酸の吸収に関する報告はいくつかなされている。それらの結果をまとめると、牛の小腸には少なくとも、リジンやシスチンを輸送する Y⁺ 系、アラニン、グリシンおよびプロリンを輸送する A 系、アラニン、セリン、チロシンおよびシスチンを輸送する A S C 系、ロイシン、メチオニン、シスチン、イソロイシン、フェニールアラニンおよびバリンを輸送する L 系があると考えられ、メチオニンとリジンは生理的濃度で競合阻害を受けない³⁵⁾ ことや、牛の小腸には十分なメチオニンとリジンの吸収能があり正常な状態では飽和することはない³⁶⁾ こと、牛の小腸では遊離よりもペプチド態のアミノ酸の方が速く吸収される³⁷⁾ ことなどが明らかにされている。反芻動物が M S O を吸収できることを直接的に証明した報告はないが、先に述べた C o o k ら（1965）¹⁸⁾ の山羊にメチオニンを給与すると血液中に M S O の増加がみられたという結果と、竹井（1985）²⁰⁾ のメチオニンがルーメン内微生物によって M S O に酸化されるという結果を合わせて考えると、反芻動物も

M S O を吸収できるのではないかと考えられる。また、メチオニンを給与後、小腸の静脈よりも先にルーメンの静脈の血液中の M S O 濃度が上昇したという C o o k ら (1965) ¹⁸⁾ の結果は、M S O はルーメン壁からも吸収されることを示唆している。

以上のことから、反芻家畜はルーメンで生成された M S O を体内に取り込んでいると考えられた。しかし、M S O の転移 R N A が見つかっていないことから分かるように、M S O をそのままタンパク質の合成に利用することはできない。そのため、体内で M S O を還元してメチオニンにする必要がある。

M S O を還元してメチオニンを生成する酵素は Methionine-S-oxide reductase (E C 1. 8. 4. 5, M S O レダクターゼ) ³⁸⁾ である。この M S O レダクターゼによる M S O の還元に関する研究はいくつかなされている。植物については D o n e y and T h o m p s o n (1966) ³⁹⁾ が、カブおよび大豆の葉に M S O 還元活性があることを報告している。微生物の M S O 還元活性についての報告もいくつかある。W a g n e r and M a l l e t t e (1982) ⁴⁰⁾ は *Pseudomonas putida* の M S O 還元活性について報告している。B l a c k ら (1960) ⁴¹⁾ は、酵母に M S O 還元活性があることに加えて、酵母からの抽出液を D E A E cellulose カラムで分画したところ、M S O 還元活性を得るためには分画して得られた画分の内の 3 つの画分が必要であったことから、M S O 還元活性には 3 つの酵素が関与していることを報告している。また E j i r i ら (1979) ⁴²⁾ は、大腸菌に M S O 還元活性があり、M S O 還元活性には N A D P H および N A D P H 再生経路 (グルコース-6-リン酸とグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ) が必要であることを報告している。さらに、E j i r i ら (1980) ⁴³⁾ は、大腸菌の M S O レダクターゼの精製を行

い、MSO レダクターゼは分子量が約 21,000 で、ジチオトレイトールでも MSO を還元できることを示した。

PORQUE ら (1970)⁴⁴⁾ は、BLACK ら (1960)⁴¹⁾ が報告した酵母から得られた 3 つの画分の内の 1 つに、大腸菌から精製されたチオレドキシンおよびチオレドキシンレダクターゼを加えると、高い MSO 還元活性を示したことから、MSO レダクターゼが MSO を還元するためにはチオレドキシン系 (NADPH、チオレドキシン、チオレドキシンレダクターゼ) が必要であると考察している。チオレドキシンは、リボヌクレオチドレダクターゼがリボヌクレオチドニリン酸をデオキシリボヌクレオチドニリン酸に還元する直接の電子供与体として、LAURENT ら (1964)⁴⁵⁾ が大腸菌から発見した分子量 10,000~13,000 の電子伝達タンパク質である。大腸菌のチオレドキシンは、HOLMGREN and REICHARD (1967)⁴⁷⁾ によって精製され、一次構造が検討されている。また、チオレドキシンレダクターゼは、NADPH とともに酸化型チオレドキシンを還元型にする酵素として、MOORE ら (1964)⁴⁶⁾ が大腸菌から発見した。現在、チオレドキシンおよびチオレドキシンレダクターゼはラットの肝臓^{48, 49)} および牛の肝臓^{50, 51)} と胸腺⁵¹⁾ から精製されている。チオレドキシンについては、広範な調査がなされており、還元型のチオレドキシンは 1 対のシステインのチオール基 (SH 基) を持っており、そこが直接基質を還元して S-S 結合を作ること、チオレドキシンは様々な種や部位に存在していて、アミノ酸配列の種による差は少ないこと、還元型のチオレドキシンは基質特異性が低く MSO を含めて多くの物質を直接還元することなどが分かっている⁵²⁾。さらに、チオレドキシンを電子供与体として要求する酵素は、リボヌクレオチドレダクターゼおよび MSO レダクターゼ以外にもいくつか見つかっている⁵³⁻⁵⁶⁾。このことから、チオレドキシン系は還元反応の

電子供与体として生物体内で広く利用されていると考えられている。

さて、MSO の還元活性は高等動物でも見られている。EJIRI ら (1979)⁵⁷⁾ は、ラットの肝臓と腎臓で MSO 還元活性が見られたが、心臓、肺、脳には見られなかったことを報告している。また、AYMARD ら (1979)⁵⁸⁾ も、ラットの肝臓と腎臓で MSO 還元活性を認めている。さらに彼らは、ラットの肝臓と腎臓の MSO 還元活性は NADH で促進されたこと、肝臓は細胞質ゾル (cytosol) 画分に、腎臓は細胞破片 (膜、核など) 画分に多くの MSO 還元活性が見られたことを報告している。一方、GANAPATHY and LEIBACH (1982)³⁴⁾ は、兎の肝臓、腎臓および小腸に MSO 還元活性が認められ、それは NADH、NADPH、GSH で促進されたことを報告している。しかし、これらの報告に反して、AKSNES (1984)⁵⁹⁾ は、ラットの肝臓に MSO 還元活性が認められなかったことを報告している。そして彼は、ラットに MSO を給与した時の増体などへの効果は腸内細菌によって MSO が還元されたためであると考察している。

ところで、メチオニンは酸化されやすいことが知られているが、生体内の酵素やその他の機能性タンパク質中のメチオニンが酸化されて、そのタンパク質の生物活性が失活する例が多く見られている⁶⁰⁻⁶⁶⁾。また、生体内のタンパク質の酸化が、タンパク質の代謝回転速度や、老化と関係があるという報告が見られる^{26, 28, 67-77)}。そのため、ペプチド中の MSO を還元する酵素である Methioninesulfoxide-peptide-reductase (MSO ペプチドレダクターゼ) に関する報告も比較的多い。ペプチド中の MSO の還元活性は、ミドリムシ⁷⁸⁾、テトラヒメーナ⁷⁸⁾、ほうれん草^{78, 79)}、ラットの肝臓、腎臓、心臓、肺、脳⁷⁸⁾、Hela 細胞⁷⁸⁾、牛と人のレンズ⁸⁰⁾ および人の好中球⁸¹⁾ と白血球⁸²⁾ に見られている。大腸菌の MSO ペプチドレダクターゼは精製されている

⁸²⁾。大腸菌の M S O ペプチドレダクターゼは、分子量が 23,000~24,000 で、遊離の M S O は還元できないが、数個のアミノ酸から成るペプチドからタンパク質までの幅広い基質特異性を持っている。また、N-acetyl methionine sulfoxide も還元する⁸³⁾。大腸菌の M S O ペプチドレダクターゼは、M S O を還元するためにはチオレドキシン系を必要とするようである^{80, 84)} が、D T T でも M S O を還元する⁷⁸⁾。一方、人の白血球の M S O ペプチドレダクターゼも部分精製されていて、分子量は約 18,000 であった⁸²⁾。以上のように、M S O ペプチドレダクターゼについては広範な研究が行われつつある。

M S O ペプチドレダクターゼは、生理的な観点から重要であると考えられる。一方、栄養学的観点から見ると、M S O レダクターゼの方が重要であると思われる。

1986 年、竹井・小野寺⁸⁵⁾ は牛の肝臓に M S O 還元活性があることを確認した。そして竹井・小野寺は、ルーメン内で生成された M S O が常に下部消化管へ流れ込んでいると考えられることから、反芻家畜の M S O 還元活性が単胃家畜のそれよりも高いのではないかと考えた。また、もし反芻家畜の M S O 還元活性が十分に高ければ、ルーメンで分解されにくい M S O をメチオニンのルーメンバイパスに利用できるかもしれないと考えた。ついで 1988 年、堀川⁸⁶⁾ は、牛の肝臓、腎臓、小腸、筋肉および血液、並びに山羊の筋肉および血液の M S O 還元系の性質およびその活性を詳しく検討した。その結果、牛の肝臓および腎臓には高い M S O 還元活性が見られた。しかし、牛および山羊の血液には低い M S O 還元活性しか見られず、牛の小腸と筋肉および山羊の筋肉には M S O 還元活性が見られなかった。ただし、牛の小腸と筋肉および山羊の筋肉は、D T T が存在する条件で低い M S O 還元活性

が見られた。また、堀川⁸⁶⁾は、測定した牛の肝臓と腎臓のMSO還元活性値から、牛の1日のメチオニン要求量に対して、1日にMSOを還元して生成することができるメチオニンの量がどのくらいかを算出した。その結果、600 kgの牛を想定した場合、肝臓ではメチオニンの要求量の40.4%、腎臓では2.4%にあたる量を還元できることを示した。しかしながら、牛の肝臓と腎臓のMSO還元活性には、大きな個体差が見られるなど、いくつかの問題点が残った。1989年、筆者⁸⁷⁾は、豚の肝臓および腎臓にMSO還元活性が存在することを確認し、そのMSO還元系の性質と活性を検討した。そして、その活性値と堀川の測定した牛の肝臓と腎臓のMSO還元活性値と比較した結果、腎臓では同等であったが、肝臓では牛は豚の約3.5倍のMSO還元活性があることを示した⁸⁸⁾。

以上のような経緯から、MSO還元系について以下の点について検討を行う必要があると考えられた。

- 1) 牛、豚、鶏のメチオニンスルホキシド(MSO)還元活性の比較
- 2) 牛のMSO還元活性にみられた個体差の原因
- 3) 綿羊の成長に及ぼすMSO給与の影響
- 4) MSO還元機構の解明

本研究は、これらの検討結果から、家畜におけるMSOレダクターゼの栄養学的意義について考察することを目的とした。

第2章 牛、豚、鶏のメチオニンスルホキシド還元活性の比較

第1節 目的

緒論でも述べたように、ルーメン内で生成されたメチオニンスルホキシド (MSO) がいくらか下部消化管へ流れ込んでいると考えられる反芻家畜は、MSO還元活性が単胃家畜よりも高いのではないかと考えられた。そして、筆者らは、牛および豚の肝臓と腎臓のMSO還元活性を測定して比較した結果、腎臓では差が見られなかったが、肝臓では牛が豚よりもMSO還元活性が高いという結果を得た^{86, 87, 88)}。しかし、測定されたMSO還元活性には、大きな個体差が見られるなどのいくつかの問題点が残った。

本章では、特に個体差が大きかった牛の肝臓および腎臓についてMSO還元活性測定の数個体を増やすことによってその事実の確認を行い、さらに、反芻家畜は他の家畜よりも高いMSO還元能を持つという事実を一層明確にするために、鶏のMSO還元活性をも測定して比較を行うことを目的とした。

第2節 メチオニンスルホキシド還元活性の測定法

酵素活性の測定方法の概要は図 2-2-1 に示した。また、各操作の詳細は以下の項目に記した。

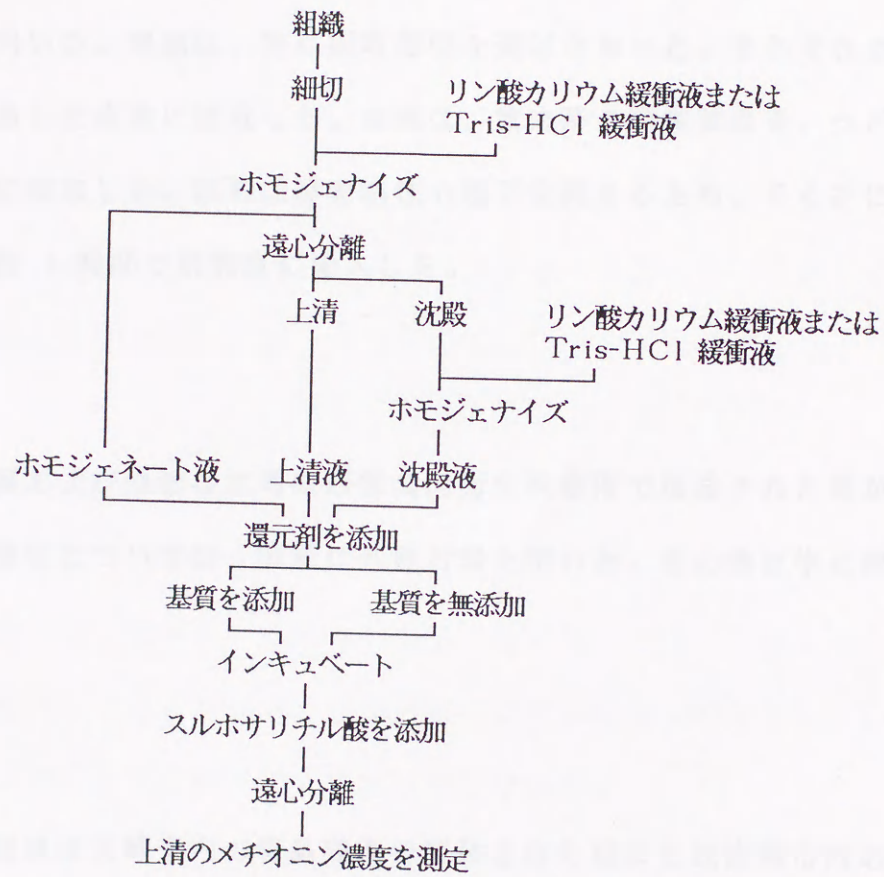


図 2-2-1 メチオニンスルホキシド還元活性測定の手順

1. 供試動物、試料採取部位および搬入

(1) 牛

牛の肝臓、腎臓および血液は宮崎県西部食肉衛生検査所または宮崎県食肉衛生検査所高崎支部で屠殺された牛から得た。そのため、実験に用いた牛の品種、年齢、体重、性別、飼養条件などは一定しなかった。試料採取部位については、肝臓は尾状葉を用いた。腎臓は、特に採取部位を選ばなかった。それぞれの組織は、屠殺し放血した直後に採取した。血液は、放血時の頸動脈血を、ヘパリンを入れた容器に採取した。試料は酵素活性の低下を抑えるため、そくぎに保冷剤で冷やし、約 1 時間で研究室に搬入した。

(2) 豚

豚の肝臓、腎臓および血液は宮崎県西部食肉衛生検査所で屠殺された豚から得た。試料採取部位については、肝臓は外側右葉を用いた。その他は牛と同様である。

(3) 鶏

ブロイラーの組織は宮崎市内の青島鶏肉で解体された鶏または宮崎市内の渡辺ブロイラーから購入した鶏から採取した。また、産卵鶏の組織は宮崎郡田野町の(有)戸高養鶏、前田養鶏および旭農場から購入した産卵鶏から採取した。試料採取部位については、筋肉は右肢の大腿二頭筋を用いた。それ以外の組織については、特に採取部位を選ばなかった。それぞれの組織は、青島鶏肉で解体された鶏以外は、研究室内で屠殺して放血した直後に採取した。試料は酵素活性の低下を抑えるため、直ちに保冷剤で冷やした。なお、青島鶏肉で解体された鶏の組織は、採取後約 30 分で研究室に搬入した。

2. 粗酵素液の調製

(1) 肝臓および腎臓

牛および豚の肝臓は、表面の被膜を取り、できるだけ血管と胆管（肝臓内で生成した肝胆汁を胆嚢および十二指腸へ送る管）を取り除いた。鶏の肝臓は、表面の被膜を取ることはできなかったが、被膜に付着した脂肪および太い血管と肝管は取り除いた。

牛および豚の腎臓は、皮質と髓質に分けた。鶏の腎臓は、前・中・後の三葉に分かれているが、組織自体が小さいため、三葉すべてを用いた。また、鶏は皮質と髓質の明確な区別はないため、皮質と髓質には分けられなかった。

(2) 鶏のその他の組織

嚙嚢は、切り開いた後、よく洗い、脂肪をできるだけ取り除いた。腺胃、筋胃は、粘膜をはぎ、よく洗った。小腸と盲腸は、切り開いてよく洗浄した後、脂肪と結合膜を取り除いた。脾臓および筋肉は、表面の被膜を取り除いた。肺は、太い気管、血管および皮膜をできるだけ取り除いた。

小腸および盲腸の洗浄には、0.9% の生理食塩水を用いた。

(3) 組織（血液を除く）からの粗酵素液の調製

前述した方法で準備した組織を細切し、 $16 \times g : 100 \text{ ml}$ の割合になるように 0.1 M リン酸カリウム緩衝液（0.1 M KH_2PO_4 溶液と 0.1 M K_2HPO_4 溶液を混合することにより任意の pH に調整）または 0.05 M Tris-HCl 緩衝液を加え、氷冷したワーリングブレンダー（佐久間製作所）でホモジェナイズし、これをホモジェネート液とした。さらに、このホモジェ

ネート液を高速遠心分離機（クボタ KR-200B）で遠心分離（ $27,000 \times g$, 4°C , 30 分）し、その上清を上清液とした。また、残った沈殿物に上清と同量のホモジェネート調製時に用いたリン酸緩衝液を加え、ホモジェネート液を調製した時と同様の方法でホモジェナイズし、これを沈殿液とした。

3. 血液からの粗酵素液の調製

ヘパリンにより凝固阻止をした血液をそのまま全血の粗酵素液とし、それを遠心分離（ $1,000 \times g$, 4°C , 30 分）した上清を血漿の粗酵素液とした。

4. インキュベーション

ホモジェネート調製時に用いた緩衝液（血液の場合はイオン交換水）に基質（L-メチオニン-dl-スルホキシド, SIGMA）をインキュベーション時の濃度の 2 倍になるように添加した溶液、または添加しない溶液を 1 ml 入れた試験管に、還元剤を 2 mM（インキュベーション時には 1 mM）となるように添加した粗酵素液を 1 ml（インキュベーション時の組織の濃度 $8 \text{ g}/100 \text{ ml}$ ）加え、密栓し、攪拌して恒温槽で 3 時間インキュベートした。

インキュベーション終了後、冷却した 10% スルホサリチル酸溶液を 1 ml 加え、攪拌して酵素反応を止めた。

ただし、鶏については、組織が少量であるため、基質溶液、粗酵素液およびスルホサリチル酸溶液の液量をそれぞれ 0.3 ml にした。

5. 試料処理および定量法

スルホサリチル酸溶液を加えた試料を、冷暗所で 3 時間以上静置してタンパク質を凝固させた後、遠心分離（ $27,000 \times g$, 4°C , 30 分）した。その上清

のメチオニン濃度を高速アミノ酸分析装置 (MLC-203, ATTO) およびインテグレーター (Sic-chromatogram processor 7000B, System Instruments Corp.) で分析定量した。また、粗酵素液のタンパク質量は LOWRY らの方法⁹⁶⁾ で測定した。なお、MSO レダクターゼ活性は、基質添加区のメチオニン濃度から無添加区のメチオニン濃度を差し引き、インキュベーション時の濃度に換算 (スルホサリチル酸溶液を加えているので 1.5 倍) した値を、窒素量、タンパク質量または組織重量当たりにして示した。

第3節 牛のメチオニンスルホキシド還元系の性質およびその活性

1. 肝臓および腎臓

緒論および本章の目的 (第1節) で述べたように、牛の肝臓および腎臓のMSO還元系の粗酵素レベルでの性質および活性の大きさは、堀川⁸⁶⁾ によって詳細に調べられている。しかし、検討を要する点がまだいくつかあったので、それらの点について筆者が検討した結果を以下に述べる。

(1) 腎臓の皮質と髄質のメチオニンスルホキシド還元活性

堀川⁸⁶⁾ は、牛の腎臓の皮質および髄質の両方にMSO還元活性を認めている。そのため、皮質と髄質を分けずに還元活性を測定している。しかし、筆者が、2個体の牛を用いて、腎臓の皮質と髄質のそれぞれの還元活性を測定した結果、図2-3-1に示したように、髄質にはほとんど還元活性がみられなかった。牛腎臓を皮質と髄質に分けてMSO還元活性を検討した時に、堀川⁸⁶⁾ が髄質にも還元活性をみとめた原因は、皮質と髄質の分離が不十分であった

ためではないかと思われる。

(nmol/h/mgタンパク質)

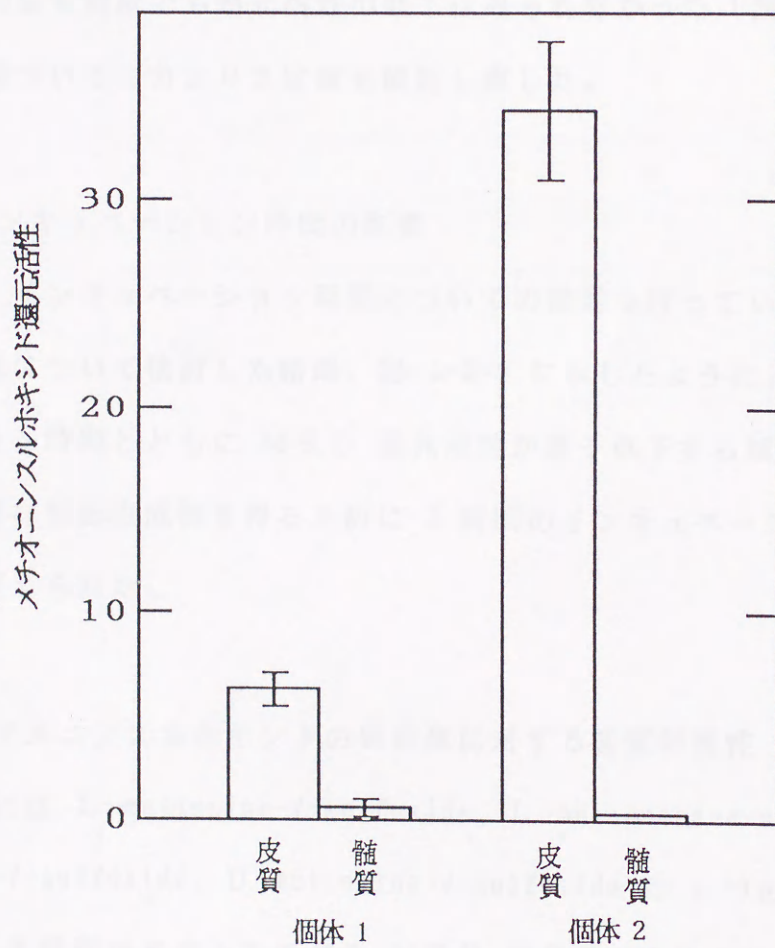


図 2-3-1 牛腎臓の皮質と髄質のメチオニンスルホキシド還元活性

(2) 基質濃度の影響

牛腎臓の MSO 還元活性に及ぼす基質濃度の影響について、堀川⁸⁶⁾ は、基質濃度が 0.6 mM までは基質濃度の増加にしたがって還元活性も上昇するが、それ以上の基質濃度では還元活性が低下すると述べている。しかし、筆者⁸⁷⁾ が検討した豚ではそのような現象は見られなかったため、その点について確認するために、牛腎臓の MSO 還元活性に及ぼす基質濃度の影響について再度検討した。また、同時に牛肝臓についても検討を行った。その結果、0.6 mM 以上の基質濃度でも還元活性の低下はみられなかった (図 2-3-2)。筆者の結果に基づいてミカエリス定数も検討し直した。

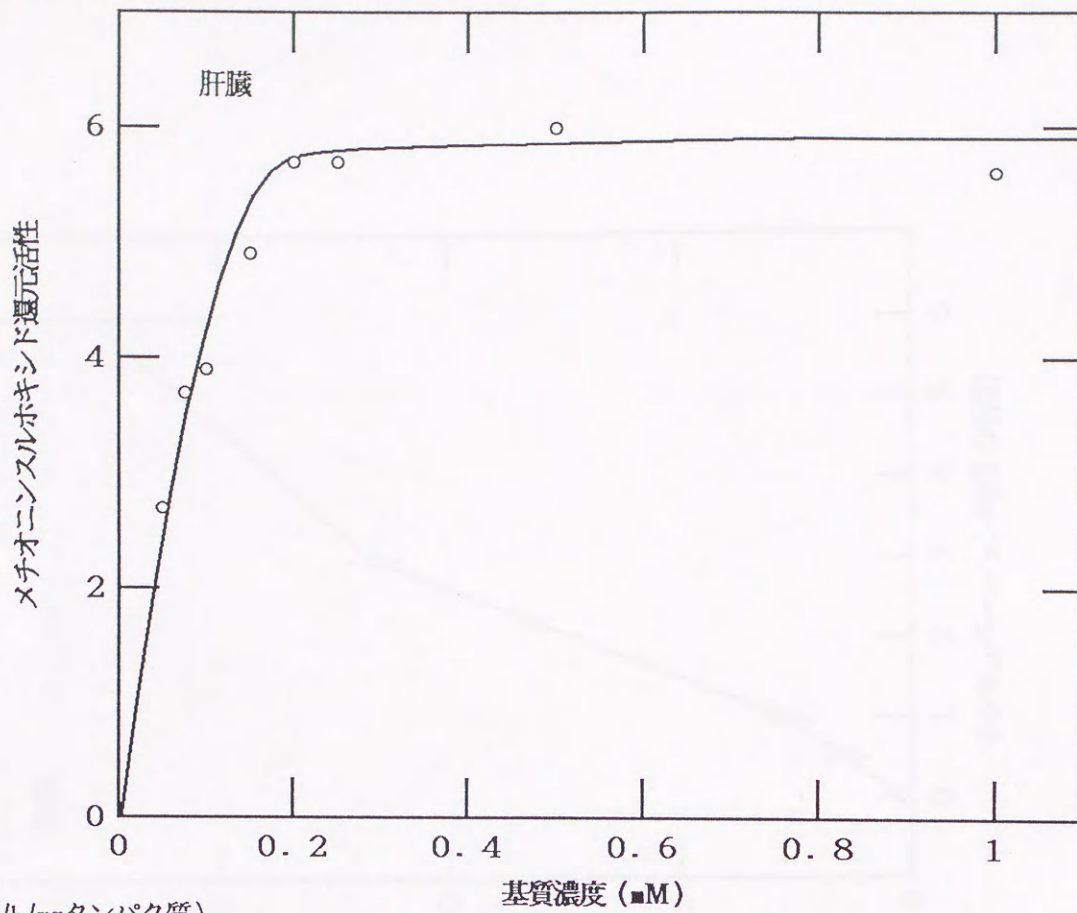
(3) インキュベーション時間の影響

堀川は、インキュベーション時間についての検討を行っていなかった。そこで、その点について検討した結果、図 2-3-3 に示したように、肝臓でインキュベーション時間とともに MSO 還元活性が若干低下する傾向がみられたが、測定に十分な反応生成物を得るために 3 時間のインキュベーション時間は必要である考えられた。

(4) メチオニンスルホキシドの異性体に対する基質特異性

MSO には L-metionine-*l*-sulfoxide、L-metionine-*d*-sulfoxide、D-metionine-*l*-sulfoxide、D-metionine-*d*-sulfoxide の 4 つの異性体が考えられるが、牛肝臓がそのうちのどの MSO を還元できるのかについては検討していない。そこで、異性体に対する MSO 還元系の基質特異性を検討した。しかし、L-metionine-*d*-sulfoxide および DL-metionine-*dl*-sulfoxide 以外の MSO を入手することは困難であったので、この 2 種類の MSO

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/mgタンパク質)

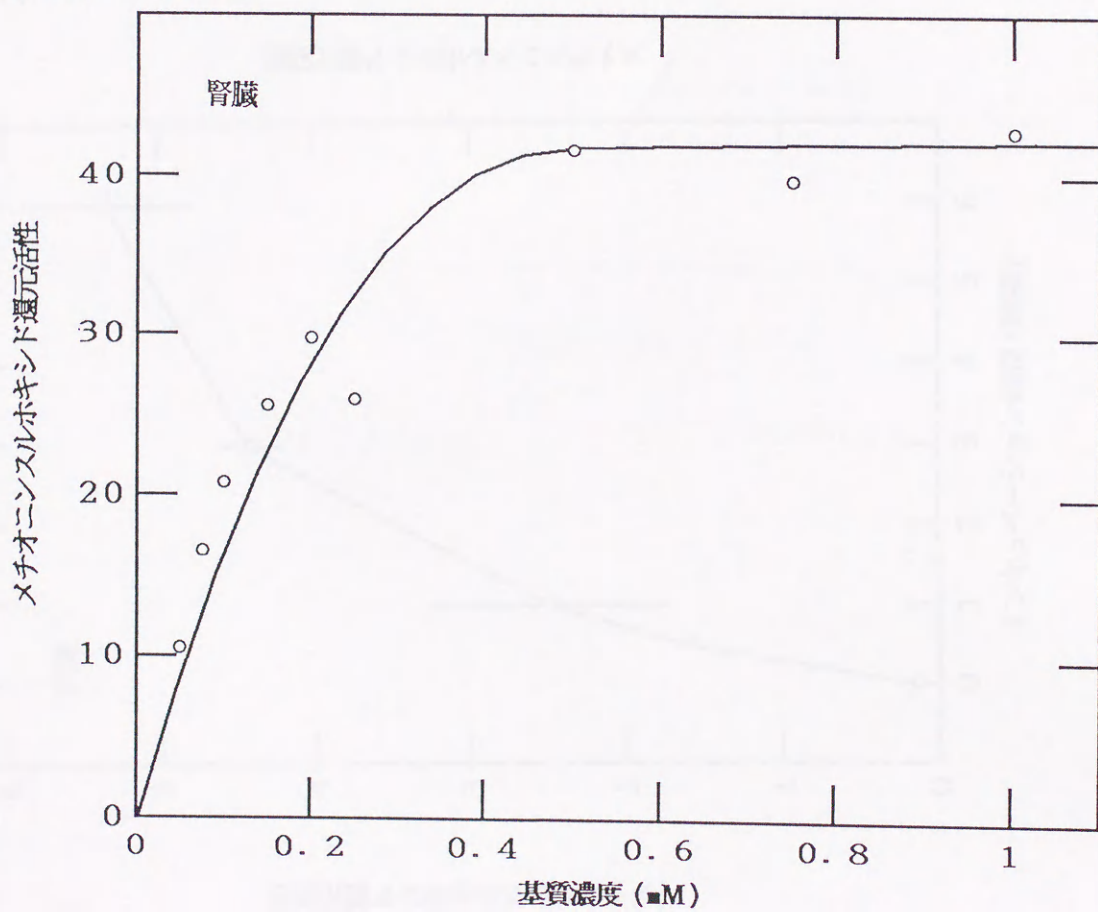


図 2-3-2 牛の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす基質濃度の影響

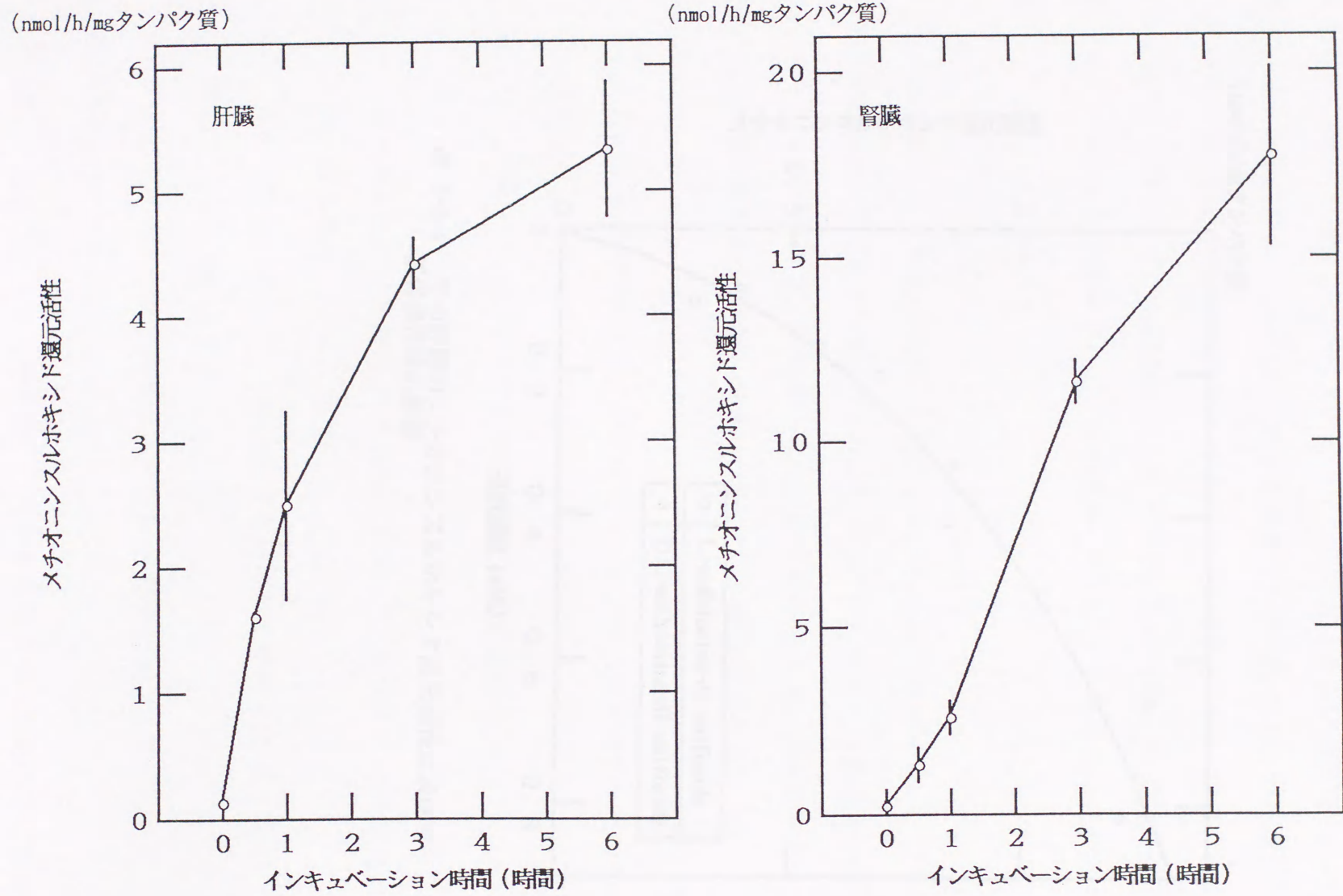


図 2-3-3 牛の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼすインキュベーション時間の影響

(nmol/h/mgタンパク質)

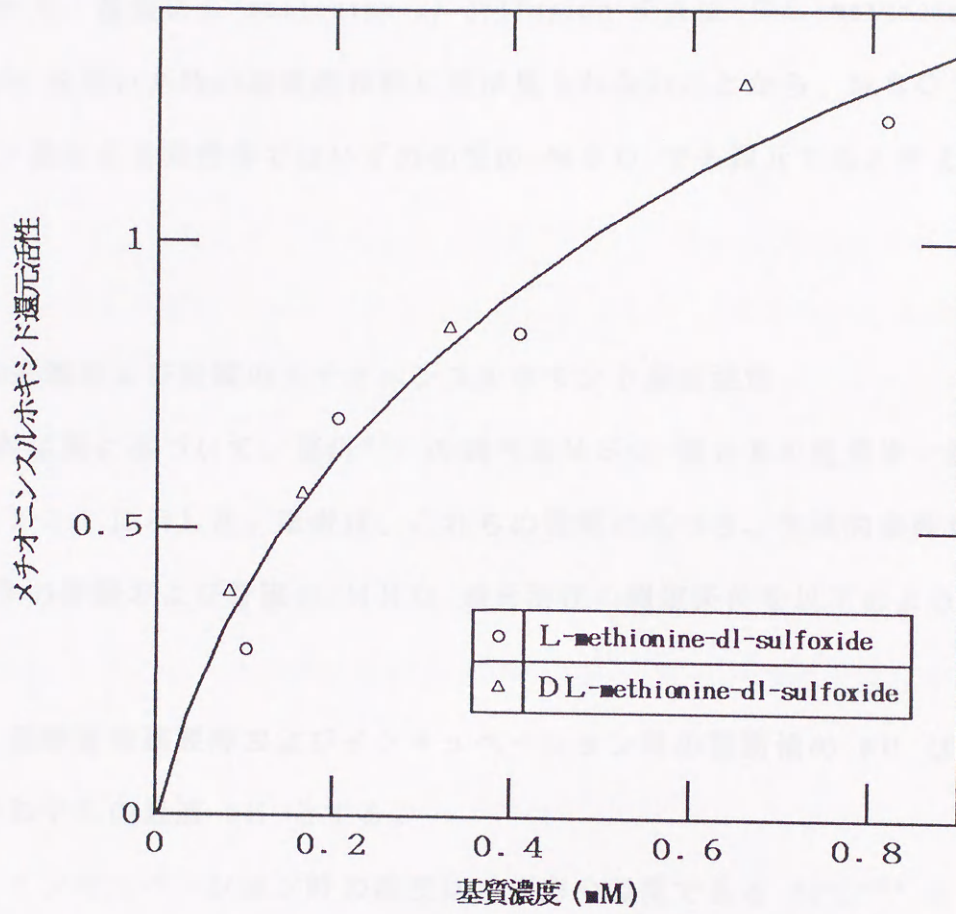


図 2-3-4 牛の肝臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす基質異性体の影響

を用いて、アミノ基による異性体の基質特異性について検討を行った。図 2-3-4 は、この 2 種類の MSO でいくつかの濃度の基質溶液を調製し、それを用いた時の牛肝臓の MSO 還元活性を測定した結果をまとめたものである。この図から、基質に L-metionine-*dl*-sulfoxide または DL-metionine-*dl*-sulfoxide を用いた時の基質親和性に差が見られないことから、MSO 還元系はアミノ基による異性体ではいずれの型の MSO でも還元すると考えられた。

(5) 牛の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性

以上の検討結果に基づいて、堀川⁸⁶⁾の調べた MSO 還元系の性質を一部修正し、表 2-3-1 に示した。筆者は、これらの性質に基づき、生理的条件も考慮して、牛の肝臓および腎臓の MSO 還元活性の測定条件を以下のように決定した。

- 1) 粗酵素液調製時およびインキュベーション時の緩衝液の pH は、それぞれの最適 pH とする。
- 2) インキュベーション時の温度は、体内の温度である 39°C⁸⁹⁾ とする。
- 3) 還元剤として、肝臓は NADH、腎臓は NADPH をそれぞれ 1 mM 添加する。
- 4) 基質濃度は、堀川⁸⁶⁾の測定条件と同様に、肝臓では 0.8 mM、腎臓では 0.6 mM とする。
- 5) インキュベーション時間はいずれも 3 時間とする。

以上の測定条件は表 2-3-2 にまとめた。

この測定条件は、肝臓については堀川⁸⁶⁾の測定条件と同じであるが、腎臓

では異なっているので、再度、牛腎臓の MSO 還元活性をこの測定条件で測定し直した。また、次章の牛における MSO 還元活性にみられた個体差の原因の検討を行うために、腎臓の MSO 還元活性の測定を行った個体の肝臓についても MSO 還元活性を測定した。これらの測定結果をまとめると、表 2-3-3 のようになった。筆者の測定した MSO 還元活性の平均値と堀川⁸⁶⁾の平均値を比較すると、肝臓では筆者の値は堀川⁸⁶⁾の値の約 3 分の 2 に減少したが、腎臓では 2 倍以上に増加した。腎臓については、皮質のみを測定に用いたことが増加の原因であると考えられた。しかし、肝臓については測定条件が変わっていないので、MSO 還元活性の平均値が減少した原因ははっきりとは分からないが、MSO 還元活性には大きな個体差が見られたことに加え、堀川⁸⁶⁾の測定した個体数が少ないことから、堀川⁸⁶⁾の測定した個体に、たまたま MSO 還元活性が高い個体が多かったためではないかと考えられる。この点については、個体差の原因の考察とともに次章の考察（第 3 章，第 4 節）で述べる。

2. 血液

堀川⁸⁶⁾は、牛の頸静脈血を用いて牛の血液についても MSO 還元活性を検討している。その結果によると、全血に還元剤として NADH、NADPH または DTT を加えると MSO の還元がみられが、肝臓や腎臓に比べるとかなり低い（約 1000 分の 1）ことが示されている。

筆者は、屠殺された 2 個体の牛から採取した頸動脈血を用いて、全血と血漿に NADH を加えて還元活性を測定した。その結果、全血および血漿のいずれでも低い値しか得られなかった（表 2-3-4）。これらの結果から、血液にはほとんど還元活性はないと考えられた。

表 2-3-1 牛の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元系の粗酵素レベルでの性質 (堀川 (1988) ⁸⁶⁾ より一部引用)

性質	肝臓	腎臓
活性部位	遠心上清	皮質の遠心上清
最適pH	6.0	6.7
最適温度 (°C)	33	39
還元剤の影響 ^a	DTT ^b >NADPH=NADH >GSH ^c =無添加	DTT ^b >NADPH>NADH =GSH ^c =無添加
ミカエリス定数 (mM)	0.158	0.064
最大活性が得られる 基質濃度 (mM)	0.50以上	0.50以上

^a それぞれの還元剤を 1 mM 添加した時のメチオニンスルホキシド還元活性。

^b ジチオトレイトール。

^c グルタチオン。

表 2-3-2 牛の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性の測定条件

測定条件	肝臓	腎臓
測定画分	遠心上清	皮質の遠心上清
pH	6.0	6.7
温度 (°C)	39	39
還元剤 (1 mM)	NADH	NADPH
基質濃度 (mM)	0.8	0.6

表 2-3-3 牛の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性

	肝臓 ±SE	腎臓 ±SE
頭数	37	37
nmol/h/mgタンパク質	2.18 ±0.85	8.80 ±2.79
nmol/h/g組織	220 ±75	586 ±177
堀川の測定値 ^a		
頭数	17	12
nmol/h/mgタンパク質	3.09 ±1.70	3.05 ±2.95
nmol/h/g組織	349 ±196	309 ±305

^a 堀川 (1988) ⁸⁶⁾ より引用.

表 2-3-4 牛の血液のメチオニンスルホキシド還元活性

	(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/ml) ^a
全血 個体 1	0.02 ±0.02	1.53 ±1.45
個体 2	0.01 ±0.01	1.27 ±0.71
血漿 個体 1	0.01 ±0.00	0.42 ±0.18
個体 2	-0.01 ±0.03	-0.32 ±1.25

^a インキュベーション溶液 1 ml 当たりの活性.

第4節 豚のメチオニンスルホキシド還元系の性質およびその性質

1. 肝臓および腎臓

豚の肝臓および腎臓のMSO還元活性の、粗酵素レベルでの性質および活性の大きさは、筆者が修士論文⁸⁷⁾で詳細に調べた。その際に得られたMSO還元活性の性質は、表2-4-1に示した通りである。

筆者⁸⁷⁾は、これらの性質から、豚の肝臓および腎臓のMSO還元活性の測定条件を以下のように決定した。

- 1) 粗酵素液調製時およびインキュベーション時の緩衝液のpHは、それぞれの最適pHとする。
- 2) インキュベーション時の温度は、体内の温度である39℃⁸⁹⁾とする。
- 3) 還元剤として、肝臓はNADH、腎臓はNADPHをそれぞれ1mM添加する。
- 4) 基質濃度は、肝臓では0.25mM、腎臓では1.00mMとする。
- 5) インキュベーション時間はいずれも3時間とする。

以上の測定条件は表2-4-2にまとめた。また、その測定結果は表2-4-3に示した。豚のMSO還元系の性質および活性と、牛並びにその他の動物との比較は考察(本章, 第7節)で述べる。

2. 血液

筆者は、屠殺された2個体の豚から採取した頸動脈血を用いて、全血と血漿にNADHを加えて還元活性を測定したが、いずれもアミノ酸分析機の限界以下の値しか得られなかった(表2-4-4)。この結果から、牛と同様に豚で

も血液にはほとんど M S O 還元活性はないと考えられた。

表 2-4-1 豚の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元系の粗酵素レベルでの性質 (長峰 (1989) ⁸⁷⁾ より引用)

性質	肝臓	腎臓
活性部位	遠心上清	皮質の遠心上清
最適pH	7.0	7.0
最適温度 (°C)	37	37
還元剤の影響 ^a	DTT ^b >NADPH=NADH >GSH ^c =無添加	DTT ^b >NADPH>NADH =無添加>GSH ^c
ミカエリス定数 (mM)	0.049	0.116
最大活性が得られる 基質濃度 (mM)	0.25以上	0.50以上

^a それぞれの還元剤を 1 mM 添加した時のメチオニンスルホキシド還元活性。

^b ジチオトレイトール。

^c グルタチオン。

表 2-4-2 豚の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性の測定条件 (長峰 (1989) ⁸⁷⁾ より引用)

測定条件	肝臓	腎臓
測定画分	遠心上清	皮質の遠心上清
pH	7.0	7.0
温度 (°C)	39	39
還元剤 (1 mM)	NADH	NADPH
基質濃度 (mM)	0.25	1.00

表 2-4-3 豚の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性
(長峰 (1989) ⁸⁷⁾ より引用)

	肝臓 ±SE	腎臓 ±SE
頭数	10	10
nmol/h/mgタンパク質	0.87 ±0.67	3.17 ±0.98
nmol/h/g組織	97 ± 77	269 ± 62

表 2-4-4 豚の血液のメチオニンスルホキシド還元活性

	(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/ml) ^a
全血 個体 1	0.01 ±0.00	1.42 ±0.42
個体 2	0.01 ±0.00	0.93 ±0.29
血漿 個体 1	0.00 ±0.00	0.22 ±0.20
個体 2	0.01 ±0.01	0.38 ±0.45

^a インキュベーション溶液 1 ml 当たりの活性.

第5節 プロイラーのメチオニンスルホキシド還元活性

1. 各組織のメチオニンスルホキシド還元活性

まず、プロイラーのいくつかの組織から調製したホモジェネート液を用いて、pH 7.0、NADPH 1 mM 添加、基質濃度 0.25 mM、インキュベーション温度 42°C（内蔵温度⁸⁹）の条件で、それぞれのMSO還元活性を測定した。その結果、肝臓と腎臓に低い活性が認められた以外にMSO還元活性は見られなかった（表 2-5-1）。

表 2-5-1 プロイラーの各組織から調製したホモジェネート液のメチオニンスルホキシド還元活性

組織	メチオニンスルホキシド還元活性 ±SE	
	(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/g組織)
嚙嚢	0.03 ±0.14	1 ± 4
筋胃	0.29 ±0.50	9 ±16
腺胃	-0.13 ±0.81	1 ± 5
小腸	0.16 ±0.35	6 ±13
盲腸	0.21 ±0.03	11 ± 1
肝臓	0.12 ±0.05	20 ± 8
脾臓	0.05 ±0.05	7 ± 6
腎臓	0.38 ±0.02	37 ± 2
肺	0.01 ±0.05	1 ± 4
筋肉	0.00 ±0.17	0 ±20

2. 肝臓

まず、上清液を用いて、pH 7.0、基質濃度 0.25 mM、インキュベーション温度 42°C の条件で、還元剤 (1 mM) の影響を検討した。その結果、表 2-5-2 に示したように DTT 区および無添加区のみで、低い MSO 還元活性が見られた。

次に、pH 7.0、基質濃度 0.25 mM、インキュベーション温度 42°C、還元剤無添加の条件で、ホモジェネート液およびその遠心分離画分 (27,000×g, 4°C, 30 分並びに 100,000×g, 4°C, 60 分) の MSO 還元活性を検討した。しかし、どの画分にもはっきりとした MSO 還元活性は見られなかった (表 2-5-3)。

高い MSO 還元活性が見られない原因は、プロイラー肝臓の MSO 還元活性の最適 pH が 7.0 からかなり離れたところにあるためではないかと筆者は考えた。そこで、ホモジェネート液および上清液を用いて基質濃度 0.25 mM、インキュベーション温度 42°C、還元剤無添加の条件で pH の影響を検討した。また、ホモジェネート液については、インキュベーション 0 時間についても検討した。その結果、どの pH でもはっきりとした MSO 還元活性は見られなかった (表 2-5-4)。また、ホモジェネート液のインキュベーション 0 時間および 3 時間の MSO 還元活性は、図 2-5-1 に示したようにインキュベーション 0 時間ではどの pH でもほぼ 0 になった。しかし、インキュベーション 3 時間では、MSO 還元活性は見られないものの大きな誤差が見られた。また、酸性側では特に誤差が大きくなる傾向が見られた。そこで、基質の添加区と無添加区を別々に整理した結果、図 2-5-1 に示したように、pH 5.0 および 6.0 ではプロテアーゼなどの作用によって生成されたと考えられるメチオニンが多いことが分かった。牛および豚で pH の影響を検討

表 2-5-2 プロイラー肝臓から調製した上清液のメチオニン
スルホキシド還元活性に及ぼす還元剤の影響

還元剤	メチオニンスルホキシド還元活性 \pm SE	
	(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/g組織)
NADH	-0.12 \pm 0.10	-11 \pm 9
NADPH	-0.12 \pm 0.12	-11 \pm 11
DTT ^a	0.59 \pm 0.23	56 \pm 22
グルタチオン	-0.02 \pm 0.11	- 2 \pm 10
無添加	0.27 \pm 0.02	26 \pm 2

^a ジチオトレイトール。

表 2-5-3 プロイラー肝臓から調製したホモジェネート液、上清液および
沈殿液のメチオニンスルホキシド還元活性

	メチオニンスルホキシド還元活性 \pm SE	
	(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/g組織)
ホモジェネート液	0.01 \pm 0.12	2 \pm 23
100,000 g, 60 分遠心画分		
上清液	-0.11 \pm 0.11	-11 \pm 11
沈殿液	0.09 \pm 0.02	8 \pm 1
ホモジェネート液	-0.00 \pm 0.04	- 1 \pm 6
27,000 g, 60 分遠心画分		
上清液	0.05 \pm 0.13	5 \pm 14
沈殿液	0.02 \pm 0.10	2 \pm 8

表 2-5-4 プロイラー肝臓から調製したホモジェネート液および上清液の
メチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす pH の影響

	pH	メチオニンスルホキシド還元活性 ±SE	
		(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/g組織)
ホモジェネート液	5.0	-0.04 ±0.18	- 6 ±31
	6.0	-0.28 ±0.29	-49 ±52
	7.0	0.06 ±0.05	11 ± 9
	8.0	0.05 ±0.02	4 ± 4
	9.0	-0.07 ±0.09	-12 ±16
上清液	5.0	0.11 ±0.59	8 ±45
	6.0	0.36 ±0.45	31 ±38
	7.0	0.03 ±0.16	3 ±15
	8.0	0.26 ±0.01	25 ± 1
	9.0	0.08 ±0.01	9 ± 1

(nmol/h/mgタンパク質)

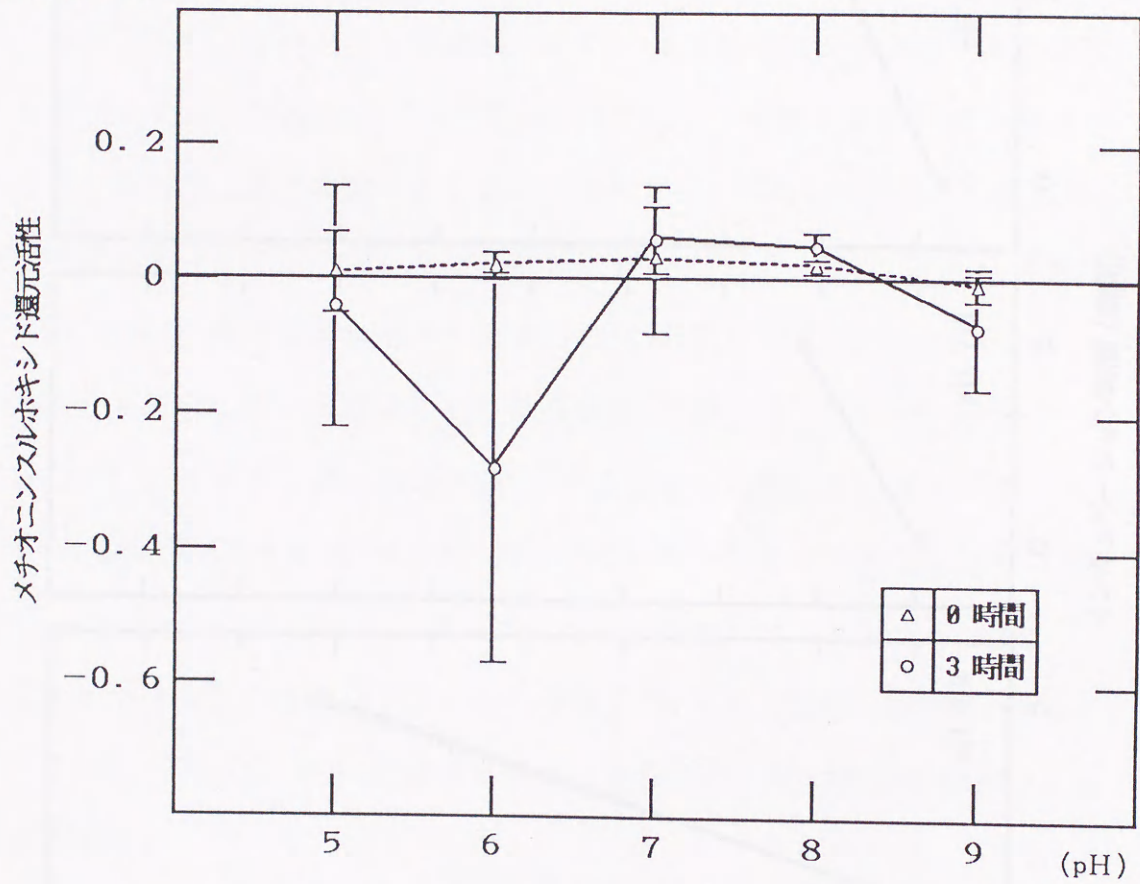


図 2-5-1 プロイラーの肝臓から調製したホモジェネート液のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす pH の影響

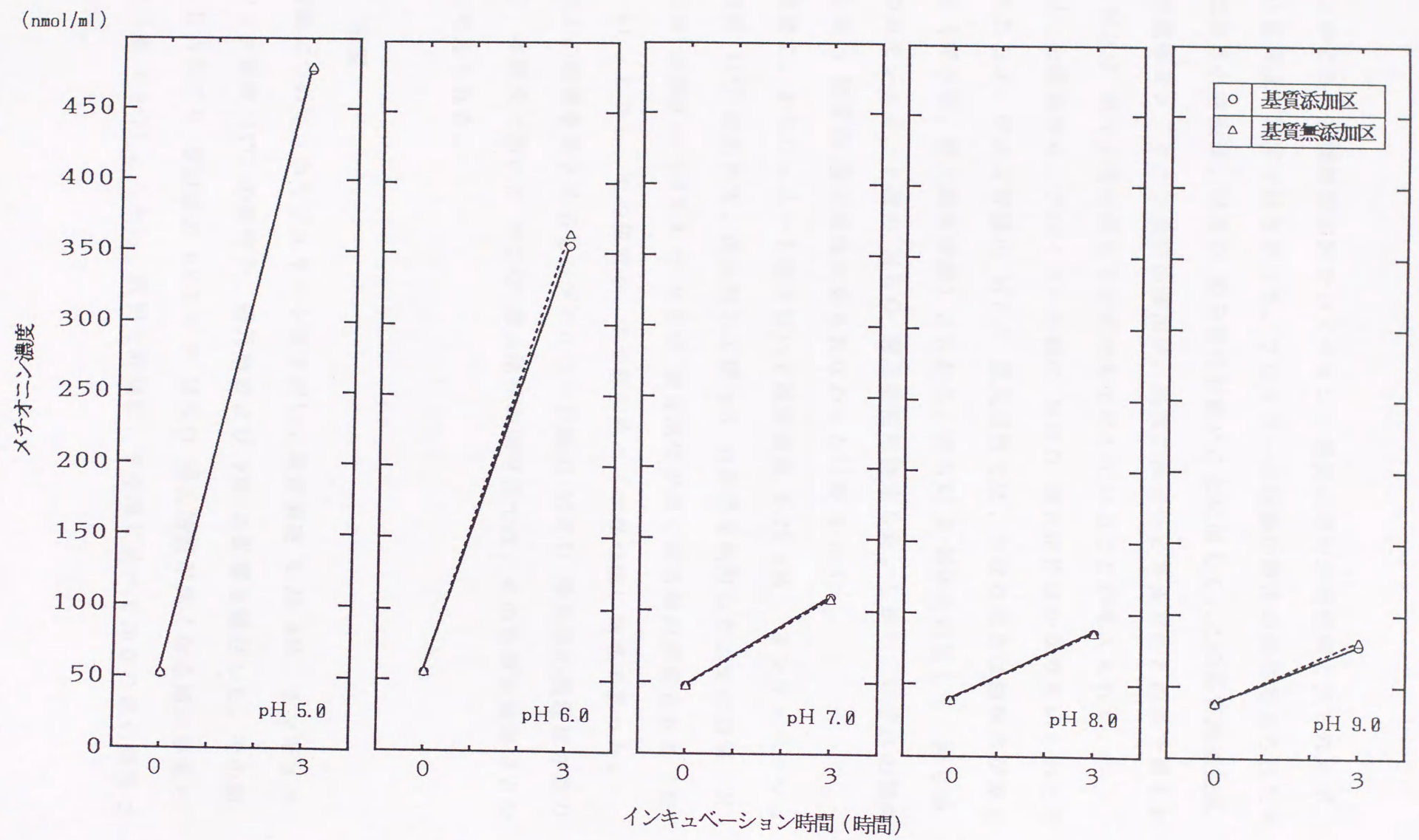


図 2-5-2 プロイラーの肝臓から調製したホモジェネート液の基質添加区および無添加区のメチオニン濃度に及ぼす pH の影響

した時にも、基質無添加区でのメチオニン濃度の増加が酸性側で見られたが、この結果ほど顕著ではなかった。プロイラーの肝臓の酸性の条件で見られた大きな誤差の原因は、MSO還元活性が低いことに加えて、この基質無添加区での顕著なメチオニン濃度の増加が、基質の添加区と無添加区との差で得られるMSO還元活性の値を不安定なものにしていることが考えられた。

以上の結果から、プロイラー肝臓のMSO還元活性はかなり低いものと考えられたが、牛および豚のMSO還元活性では、かなり大きな個体差が見られた（第3章，第1節を参照）ことから、さらに2個体を追加して、同じ条件でホモジェネート液のMSO還元活性を測定した。しかし、いずれの個体でも高いMSO還元活性は見られなかった（表2-5-5）。

最後に、ホモジェネート液を用いて基質濃度0.25 mM、インキュベーション温度42°Cの条件で、還元剤およびpHの影響を検討した。その結果、NADH添加区のpH8.0でMSO還元活性が高くなる傾向が見られた（表2-5-6）。しかし、その値でも、牛や豚に比べてかなり低い活性であった。

以上の結果をまとめると、プロイラー肝臓のMSO還元系の活性はかなり低く、本研究で用いたMSO還元活性の測定法では、その性質を検討できないと考えられた。

3. 腎臓

腎臓について、ホモジェネート液を用いて基質濃度0.25 mM、インキュベーション温度42°Cの条件で、還元剤およびpHの影響を検討した。その結果、NADPH添加区のpH7.0でMSO還元活性が高くなる傾向が見られた（表2-5-7）。しかし、肝臓と同様に、牛や豚に比べてかなり低い活性であった。

この結果から、プロイラー腎臓のMSO還元系の活性もかなり低く、肝臓と同様に、本研究で用いたMSO還元活性の測定法では、その性質を検討できないと考えられた。

表 2-5-5 プロイラー肝臓から調製したホモジェネート液のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす pH の影響

pH	メチオニンスルホキシド還元活性 \pm SE	
	(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/g組織)
個体 1	6.0	0.07 \pm 0.79 4 \pm 45
	7.0	-0.01 \pm 0.21 - 1 \pm 12
	8.0	0.08 \pm 0.55 5 \pm 31
個体 2	6.0	0.34 \pm 0.54 19 \pm 31
	7.0	-0.12 \pm 0.24 - 7 \pm 13
	8.0	0.53 \pm 0.50 31 \pm 28

表 2-5-6 プロイラー肝臓から調製したホモジェネート液のメチオニン
スルホキシド還元活性に及ぼす還元剤および pH の影響

還元剤	pH	メチオニンスルホキシド還元活性 \pm SE	
		(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/g組織)
NADH	6.0	-0.03 \pm 0.10	- 5 \pm 19
	7.0	0.02 \pm 0.03	3 \pm 5
	8.0	0.21 \pm 0.05	41 \pm 11
NADPH	6.0	-0.20 \pm 0.57	-38 \pm 111
	7.0	0.09 \pm 0.12	17 \pm 23
	8.0	0.10 \pm 0.05	20 \pm 10
グルタチオン	6.0	0.02 \pm 0.24	4 \pm 46
	7.0	0.01 \pm 0.11	1 \pm 21
	8.0	0.02 \pm 0.02	5 \pm 3
無添加	6.0	0.04 \pm 0.10	8 \pm 19
	7.0	0.07 \pm 0.12	13 \pm 22
	8.0	0.03 \pm 0.07	6 \pm 14

表 2-5-7 プロイラー腎臓から調製したホモジェネート液のメチオニン
スルホキシド還元活性に及ぼす還元剤および pH の影響

還元剤	pH	メチオニンスルホキシド還元活性 \pm S E	
		(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/g組織)
NADH	6.0	0.10 \pm 0.07	15 \pm 11
	7.0	0.13 \pm 0.04	22 \pm 7
	8.0	0.11 \pm 0.04	17 \pm 6
NADPH	6.0	0.11 \pm 0.04	17 \pm 5
	7.0	0.29 \pm 0.06	47 \pm 10
	8.0	0.15 \pm 0.04	23 \pm 7
グルタチオン	6.0	0.16 \pm 0.02	24 \pm 3
	7.0	0.10 \pm 0.15	16 \pm 24
	8.0	0.09 \pm 0.08	14 \pm 12
無添加	6.0	0.10 \pm 0.06	15 \pm 8
	7.0	0.07 \pm 0.07	11 \pm 11
	8.0	0.05 \pm 0.02	7 \pm 3

第6節 産卵鶏のメチオニンスルホキシド還元系の性質およびその活性

1. 肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性

ブロイラーでは高いMSO還元活性が見られなかった。そこで、次に産卵鶏の肝臓および腎臓に高いMSO還元活性が見られるかどうかの確認を行った。MSO還元活性の測定は、ホモジェネート液を用いてpH6.0、7.0または8.0、基質濃度0.25 mM、インキュベーション温度42°C（直腸温度⁸⁹）、還元剤（NADHまたはNADPH）1 mM添加の条件で行った。

その結果、ブロイラーとは異なり、pH8.0のNADPH添加区で、腎臓に比較的高いMSO還元活性が認められた（表2-6-1）。このことから、産卵鶏の腎臓のMSO還元系については、その性質と活性が検討できると考えられた。そこで、腎臓のMSO還元系の性質および活性の検討を行うことにした。また、産卵鶏は研究室内で屠殺するので、腎臓と同時に、必要に応じて他の組織も採取できた。その中でホモジェネートの調製が容易な肝臓と脾臓についても、腎臓と同時にMSO還元系の性質および活性の検討を試みた。肝臓および腎臓については次項で、脾臓についてはその次の項で述べる。

2. 肝臓および腎臓

(1) ホモジェネート液および遠心分離画分のメチオニンスルホキシド還元活性

まず、pH7.0、基質濃度0.25 mM、インキュベーション温度42°C、還元剤（NADHまたはNADPH）1 mMの条件で、ホモジェネート液およびその遠心分離画分（27,000×g, 4°C, 30分）のMSO還元活性を検討した。

表 2-6-1 産卵鶏の肝臓および腎臓から調製したホモジェネート液のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす還元剤および pH の影響

還元剤	pH	メチオニンスルホキシド還元活性 \pm SE		
		(nmol/h/mgタンパク質)	(nmol/h/g組織)	
肝臓	NADH	6.0	0.03 \pm 0.11	5 \pm 17
		7.0	0.11 \pm 0.01	18 \pm 2
		8.0	0.15 \pm 0.02	25 \pm 3
	NADPH	6.0	-0.12 \pm 0.12	-18 \pm 19
		7.0	0.15 \pm 0.07	24 \pm 11
		8.0	0.25 \pm 0.09	42 \pm 14
腎臓	NADH	6.0	0.09 \pm 0.09	13 \pm 14
		7.0	0.21 \pm 0.05	30 \pm 7
		8.0	0.15 \pm 0.05	24 \pm 8
	NADPH	6.0	0.14 \pm 0.05	21 \pm 7
		7.0	0.53 \pm 0.16	75 \pm 23
		8.0	1.09 \pm 0.20	169 \pm 31

その結果、肝臓と腎臓のいずれでも、上清液に MSO 還元活性がみられ、沈殿液には見られなかった (図 2-6-1)。また、いずれの組織でも NADH よりも NADPH で高い MSO 還元活性が得られた。このことから、以下の検討では上清液を、そして還元剤としては NADPH を用いることにした。

(2) pH の影響

次に、基質濃度 0.25 mM、インキュベーション温度 42°C、NADPH 1 mM の条件で最適 pH の検討をした。先の検討 (本節, 1. (1)) で、pH 6.0 および 7.0 よりも pH 8.0 の方で高い MSO 還元活性が得られているので、pH 7.5 から 9.0 の間を検討した。また、pH 8.0 以上は 50 mM Tris-HCl 緩衝液を用いた。

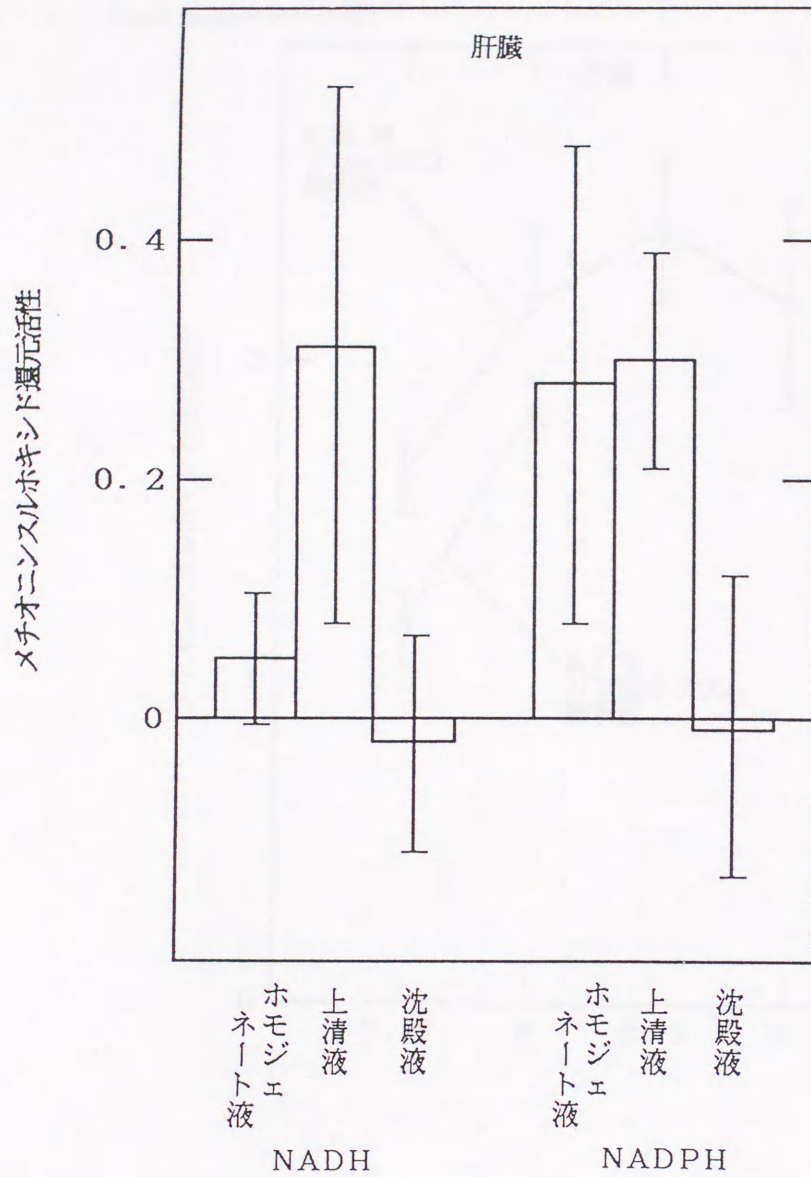
その結果、肝臓では pH 8.5 で最も高い MSO 還元活性が得られ (図 2-6-2) たことから、最適 pH を 8.5 とした。腎臓では、いずれの緩衝液でもピークを形成していない (図 2-6-2) ため、最も高い MSO 還元活性が得られる pH が不明確であるが、Tris-HCl 緩衝液の pH 7.5 よりもリン酸カリウム緩衝液の pH 8.0 の平均値が高いことから、リン酸カリウム緩衝液の pH 8.0 を最適 pH とした。

(3) 還元剤の影響

次に、最適 pH、基質濃度 0.25 mM、インキュベーション温度 42°C、還元剤 1 mM の条件で還元剤の影響の検討をした。

その結果、図 2-6-3 のようになった。肝臓では DTT が MSO 還元活性をもっとも高め、次いで NADPH が高めた。しかし、NADH と GSH は MSO 還元活性を高めなかった。一方、腎臓では NADPH がもっ

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/mgタンパク質)

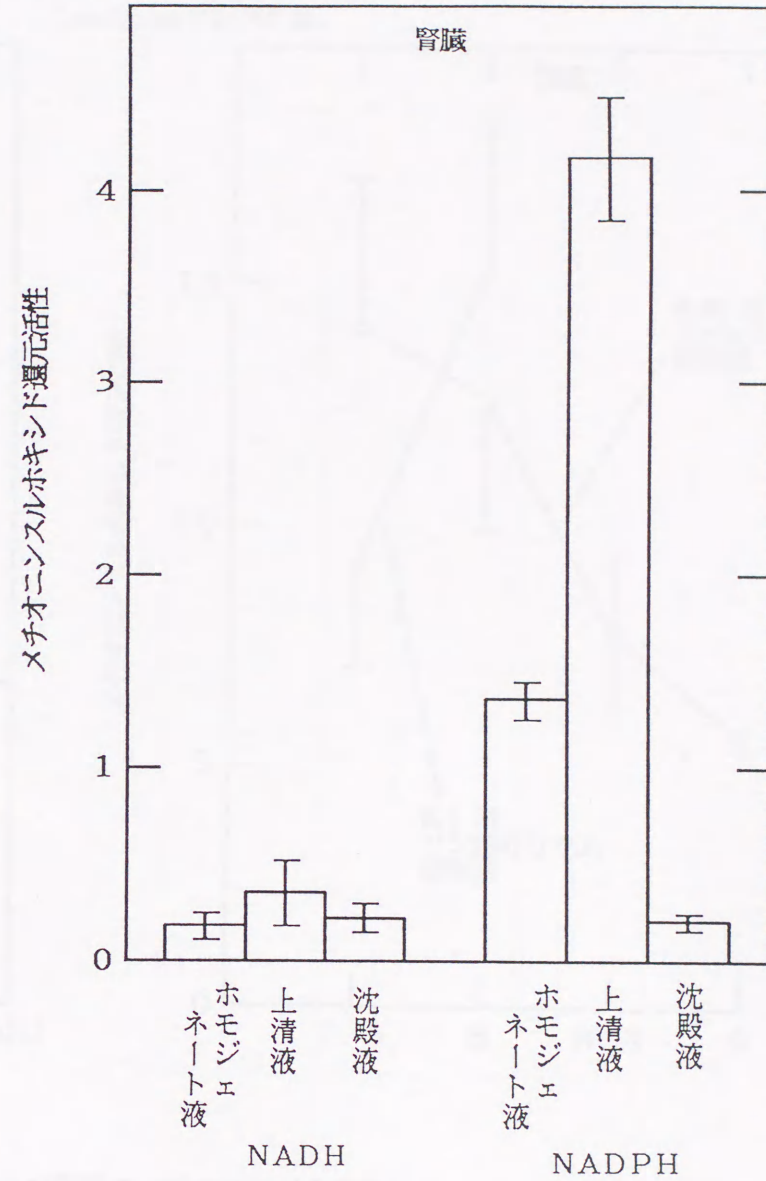
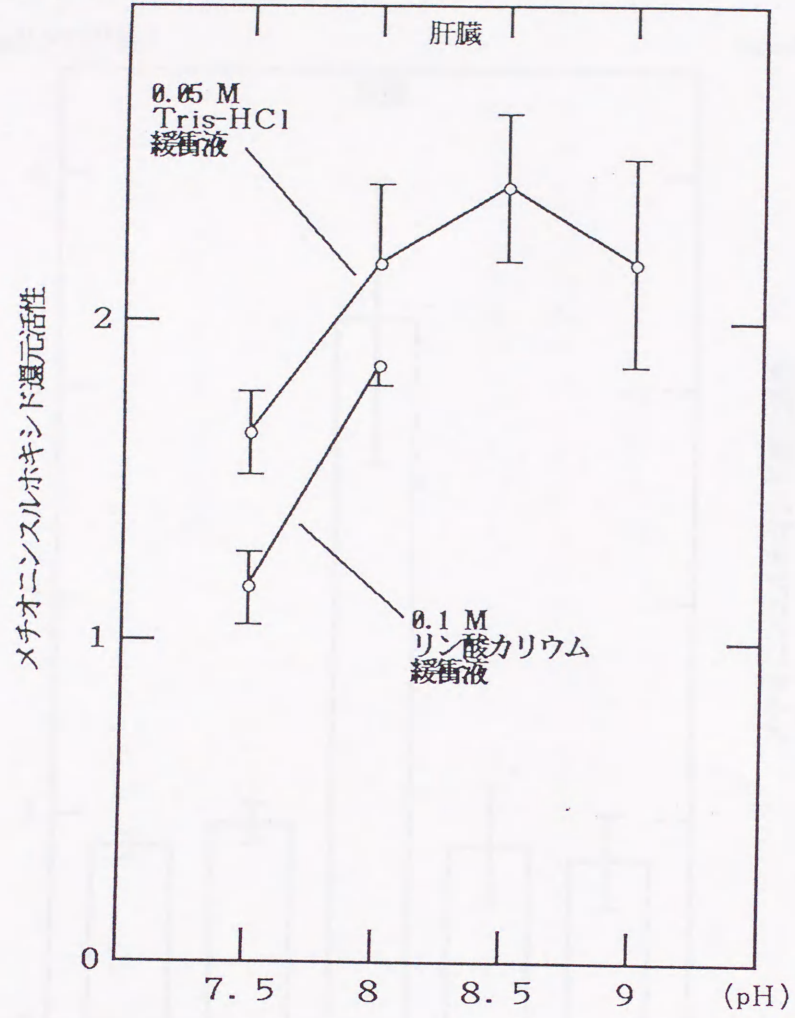


図 2-6-1 産卵鶏の肝臓および腎臓のホモジェネート液およびその遠心画分のメチオニンスルホキシド還元活性

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/mgタンパク質)

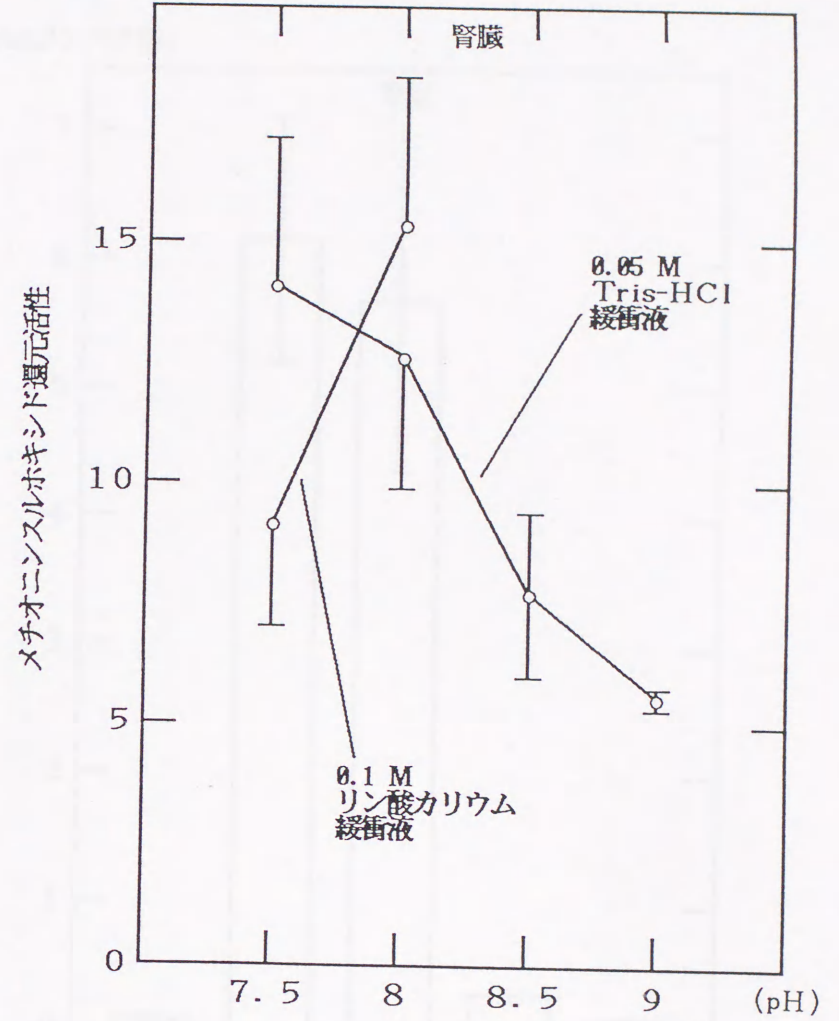
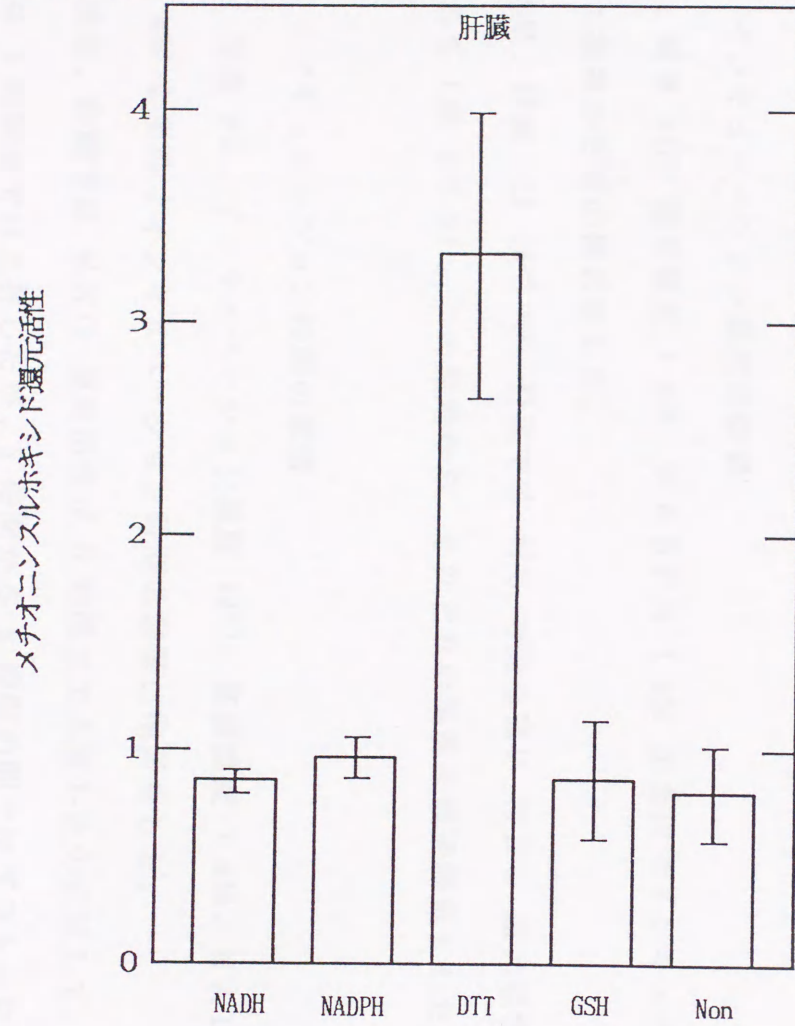


図 2-6-2 産卵鶏の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす pH の影響

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/mgタンパク質)

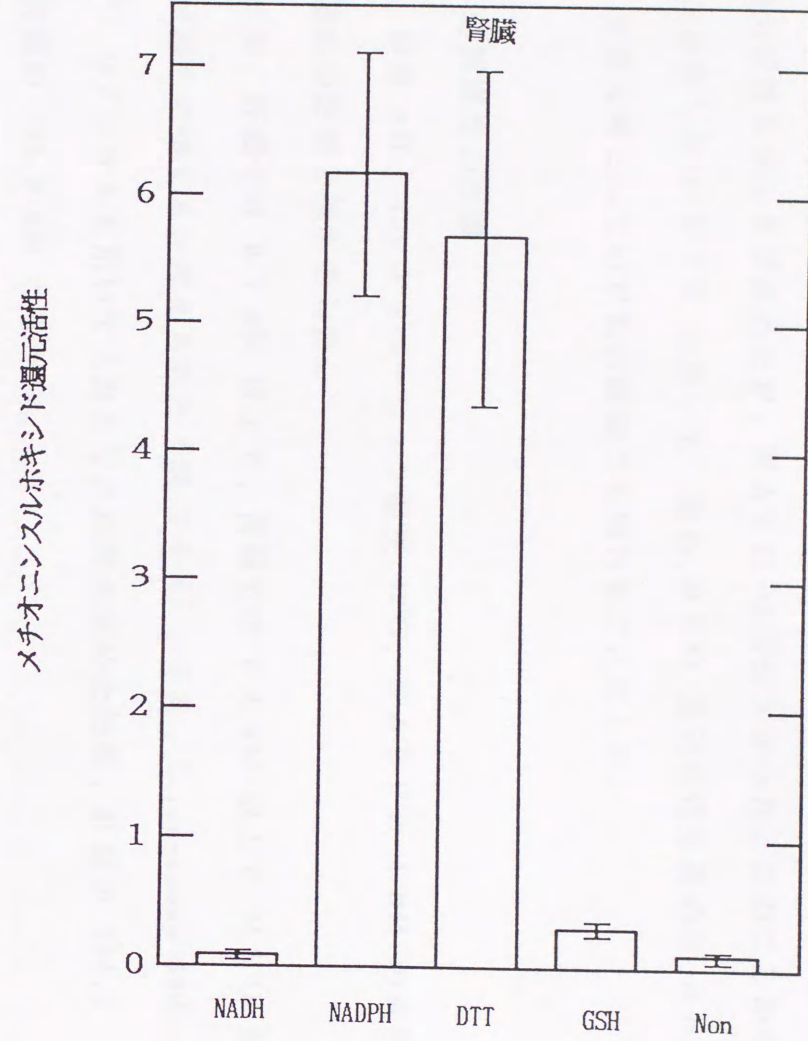


図 2-6-3 産卵鶏の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす還元剤の影響

DTT: ジチオトレイトール
GSH: グルタチオン
Non: 還元剤無添加

とも MSO 還元活性を高め、次いで DTT が高めた。また、GSH も MSO 還元活性を少しだけ高めたが、NADH は高めなかった。このことから、生体内に存在しない DTT を除いて、最も MSO 還元活性を高めた NADPH を還元剤としていずれの臓器でも用いることにした。

(4) 基質濃度の影響

次に、最適 pH、インキュベーション温度 42°C、NADPH 1 mM の条件で基質濃度の影響の検討をした。

その結果、肝臓では 0.7 mM 以上で、腎臓では 0.4 mM 以上で MSO 還元活性が最大に達すると考えられた (図 2-6-4)。また、L I N E W E A V E R and B U R K⁹⁰⁾ のプロットを用いてミカエリス定数を求めた結果、肝臓が 304.1 mM、腎臓が 181.0 mM となった。

(5) インキュベーション温度の影響

次に、最適 pH、基質濃度 1 mM、NADPH 1 mM の条件でインキュベーション温度の影響の検討をした。

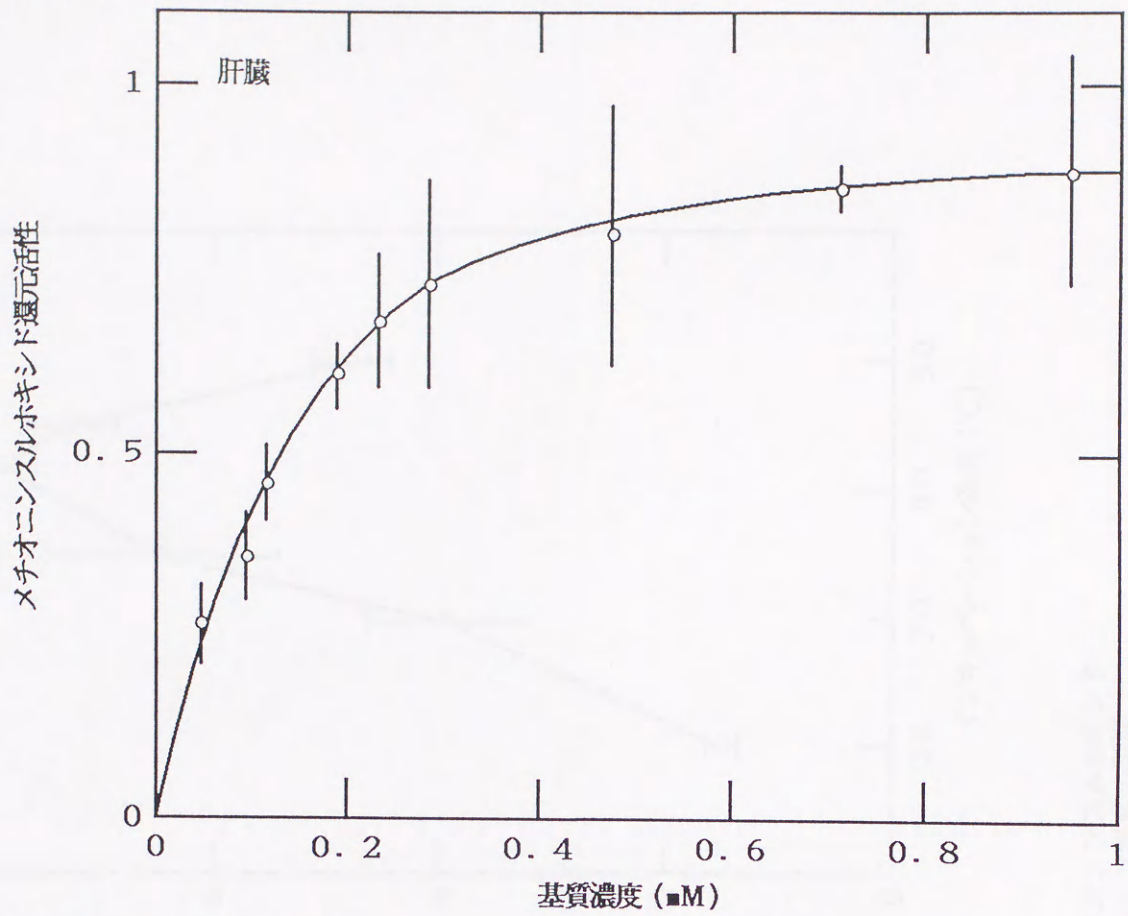
その結果、肝臓では 45°C で、腎臓では 42°C で最も高い MSO 還元活性が得られた (図 2-6-5)。この結果から、それぞれの温度を最適温度とした。

(6) インキュベーション時間の影響

次に、最適 pH、インキュベーション温度 42°C、基質濃度 1 mM、NADPH 1 mM の条件でインキュベーション時間の影響の検討をした。

その結果、肝臓では MSO 還元活性が 6 時間まで上昇したのに対して、腎臓では 3 時間までは上昇したが、3 時間から 6 時間の間ではプラトーにな

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/mgタンパク質)

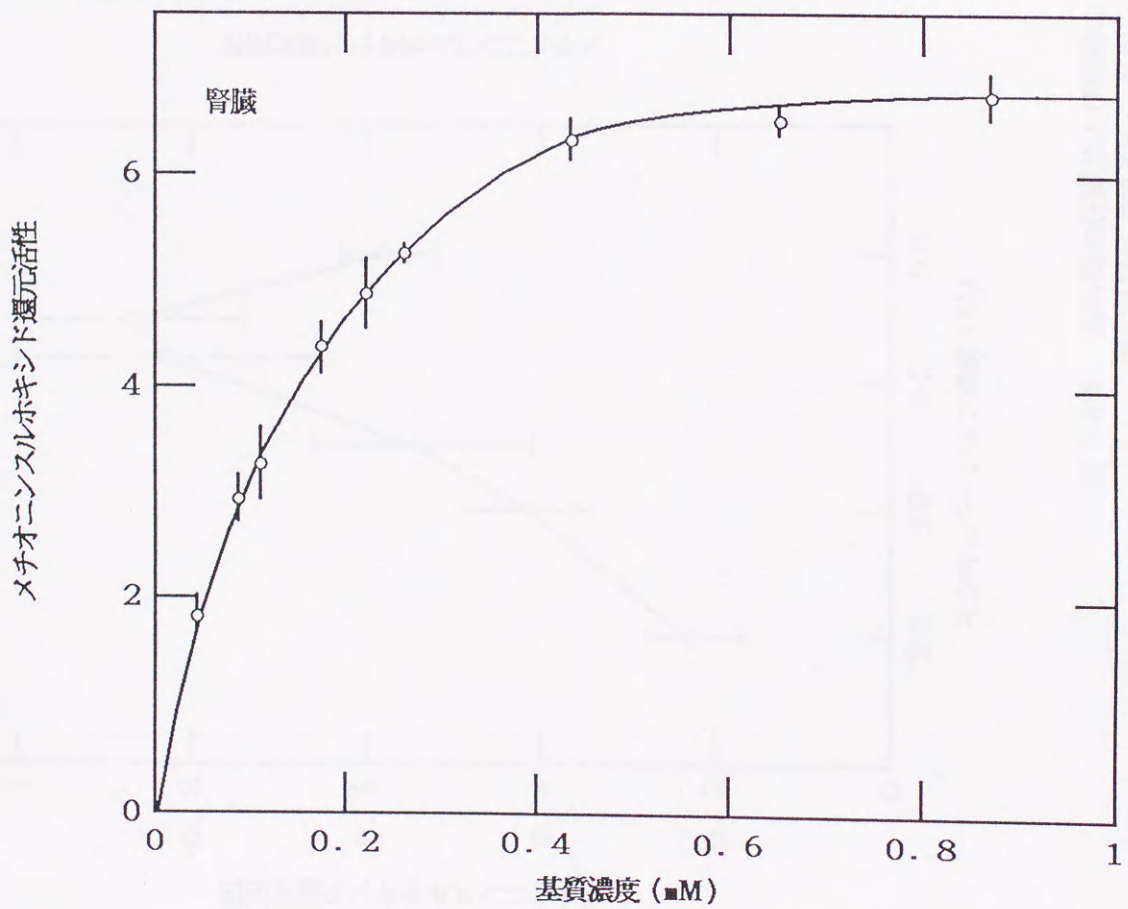
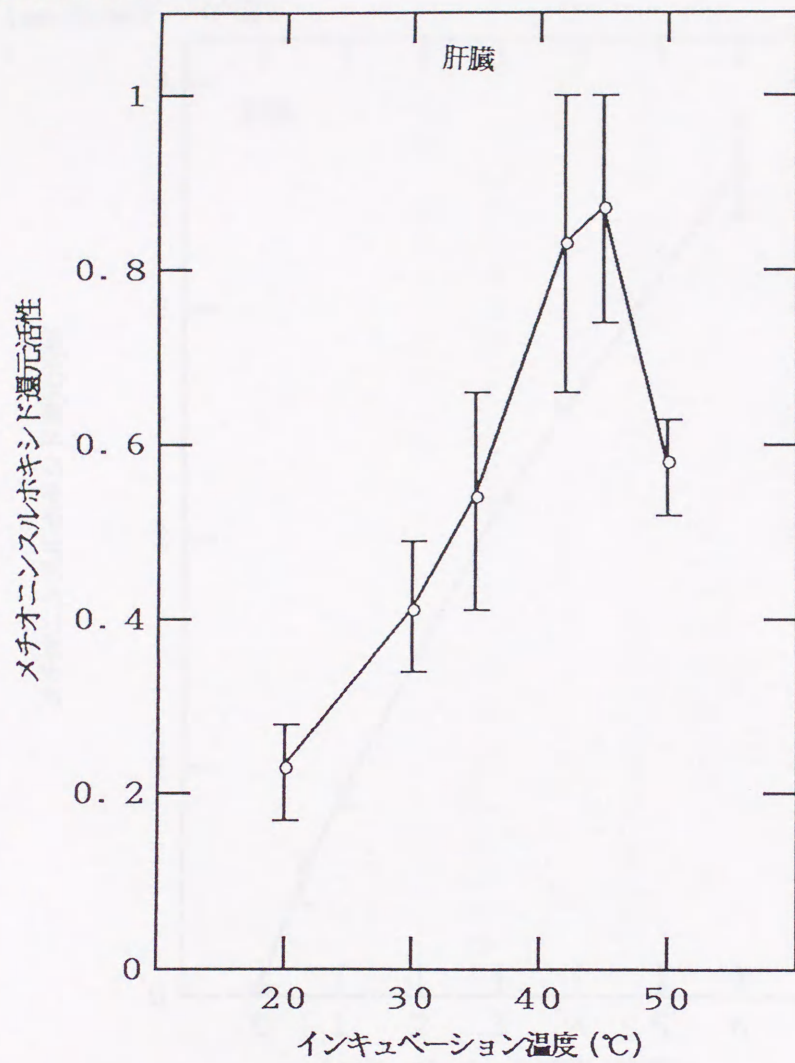


図 2-6-4 産卵鶏の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす基質濃度の影響

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/mgタンパク質)

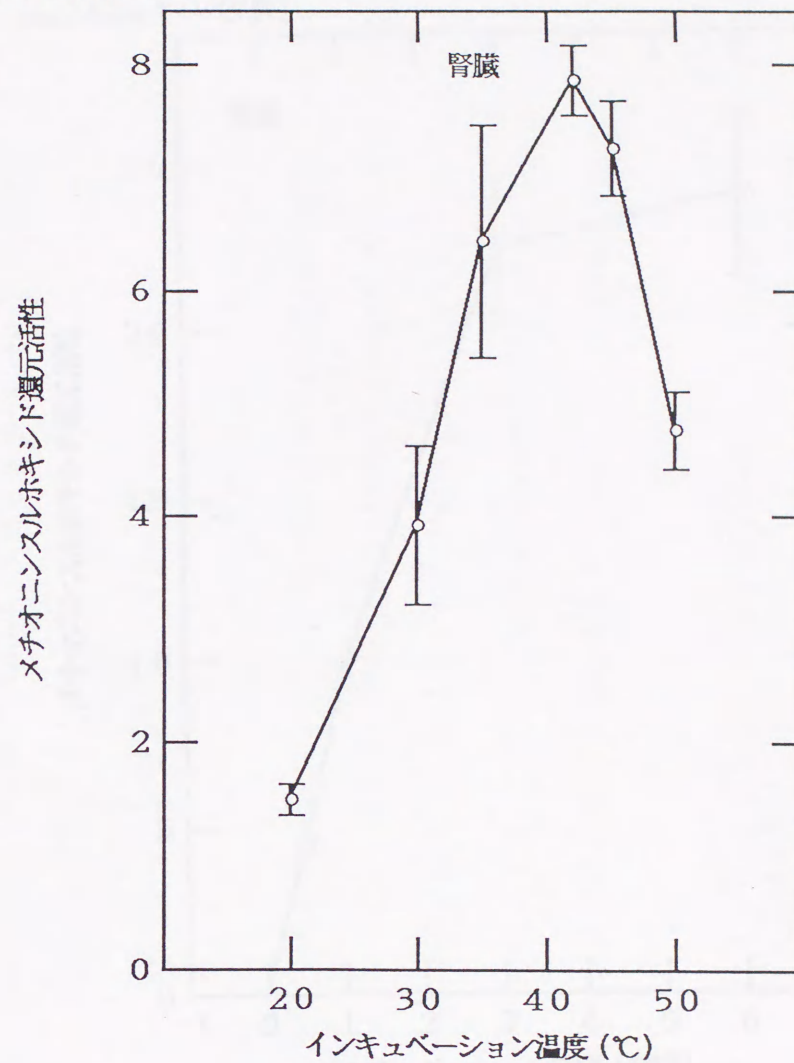
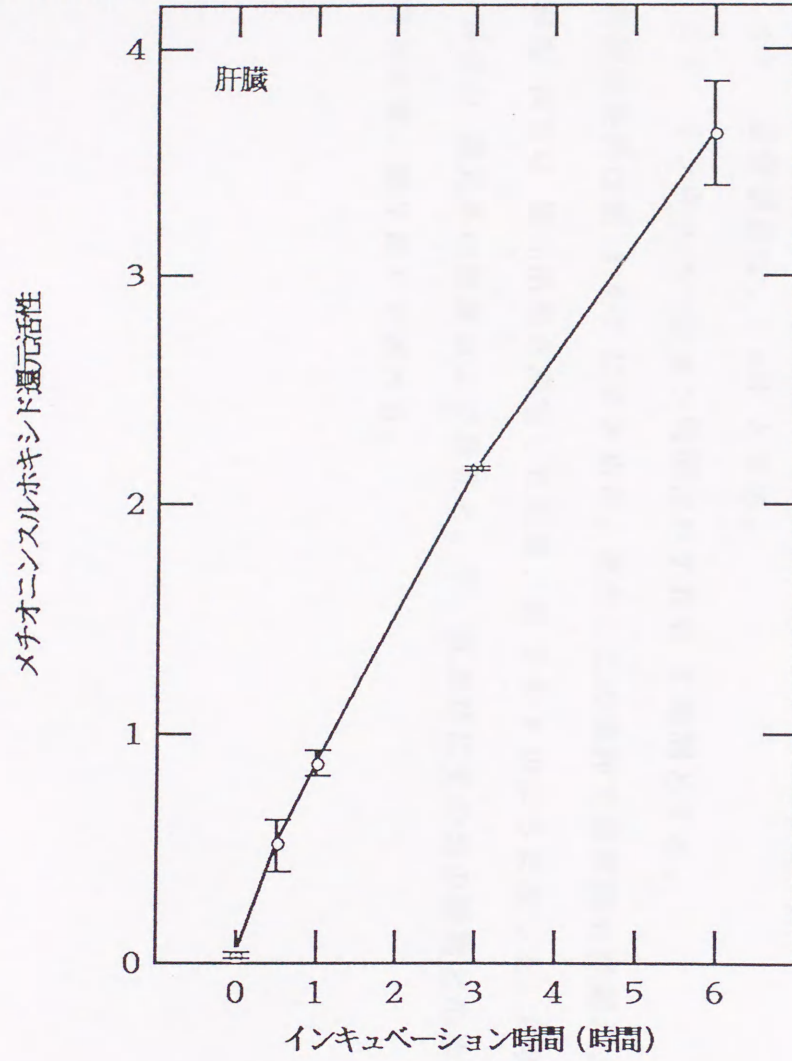


図 2-6-5 産卵鶏の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼすインキュベーション温度の影響

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/mgタンパク質)

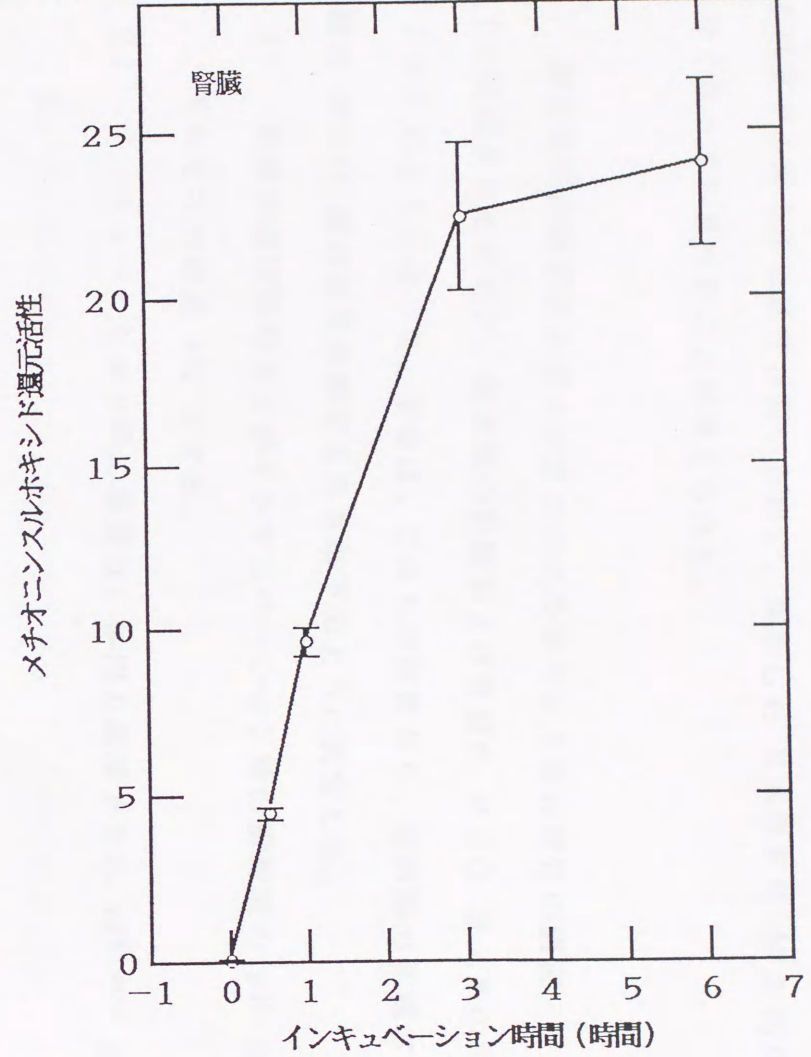


図 2-6-6 産卵鶏の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼすインキュベーション時間の影響

った(図 2-6-6)。この原因としては、腎臓から調製した上清液に NADPH を消費する何らかの活性が高いために、添加した NADPH が 3 時間以降になくなってしまったことが考えられた。

(7) 測定条件の決定およびメチオニンスルホキシド還元活性の測定

以上の結果をまとめると、産卵鶏の肝臓および腎臓の MSO 還元系の性質は表 2-6-2 のようになった。筆者は、これらの性質から、産卵鶏の肝臓および腎臓の MSO 還元活性の測定条件を以下のように決定した。

- 1) 粗酵素液調製時およびインキュベーション時の緩衝液の pH は、それぞれの最適 pH とする。
- 2) インキュベーション時の温度は、体内の温度である 42°C⁸⁹⁾ とする。
- 3) 還元剤として、NADPH 1 mM 添加する。
- 4) 基質濃度は、1 mM とする。
- 5) インキュベーション時間はいずれも 3 時間とする。

以上の測定条件は表 2-6-3 にまとめた。また、この条件で産卵鶏の肝臓および腎臓の MSO 還元活性を測定した結果、表 2-6-4 のようになった。産卵鶏の MSO 還元系の性質および活性と、牛、豚並びにその他の動物との比較は考察(本章, 第7節)で述べる。

表 2-6-2 産卵鶏の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元系の粗酵素レベルでの性質

性質	肝臓	腎臓
活性画分	遠心上清	遠心上清
最適pH	8.5 ^a	8.0 ^b
最適温度 (°C)	45	42
還元剤の影響 ^c	DTT ^d >NADPH=NADH =GSH ^e =無添加	DTT ^d =NADPH>GSH ^e >NADH=無添加
ミカエリス定数 (mM)	0.304	0.181
最大活性が得られる 基質濃度 (mM)	0.70以上	0.40以上

^a 0.05 M Tris-HCl 緩衝液.

^b 0.1 M リン酸カリウム緩衝液.

^c それぞれの還元剤を 1 mM 添加した時のメチオニンスルホキシド還元活性.

^d ジチオトレイトール.

^e グルタチオン.

表 2-6-3 産卵鶏の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性の測定条件

測定条件	肝臓	腎臓
測定画分位	遠心上清	遠心上清
pH	8.5 ^a	8.0 ^b
温度 (°C)	42	42
還元剤 (1 mM)	NADPH	NADPH
基質濃度 (mM)	1.0	1.0

^a 0.05 M Tris-HCl 緩衝液.

^b 0.1 M リン酸カリウム緩衝液.

表 2-6-4 産卵鶏の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性

	肝臓 ±SE	腎臓 ±SE
羽数	5	5
nmol/h/mgタンパク質	0.90 ±0.17	8.04 ±2.46
nmol/h/g組織	88 ± 15	630 ±211

3. 脾臓

まず、pH 7.0、基質濃度 0.25 mM、インキュベーション温度 42°C、NADPH 1 mM の条件で、ホモジネート液およびその遠心分離画分 (27,000 × g, 4°C, 30 分) の MSO 還元活性を検討した。その結果、いずれの画分にも MSO 還元活性は見られなかった (表 2-6-4)。

次に、肝臓および腎臓の最適 pH がアルカリ側であったことから、MSO 還元活性が見られなかった原因は、pH が低かったためである可能性が考えられた。そこで、pH 8.0、基質濃度 0.25 mM、インキュベーション温度 42°C、NADPH 1 mM の条件で、ホモジネート液の MSO 還元活性を検討したが、やはり MSO 還元活性は見られなかった (表 2-6-5)。

これらのことから、産卵鶏の脾臓に MSO 還元活性はないと考えられた。

表 2-6-5 産卵鶏の脾臓から調製したホモジネート液およびその遠心分離画分のメチオニンスルホキシド還元活性

pH	メチオニンスルホキシド還元活性 ±SE			
	(nmol/h/mgタンパク質)		(nmol/h/g組織)	
7.0	ホモジネート液	0.01 ±0.02	1	± 3
	上清液	-0.01 ±0.09	- 1	± 8
	沈殿液	-0.03 ±0.06	- 2	± 4
8.0	ホモジネート液	0.04 ±0.14	5	±19

第7節 考察

本節では、本章で検討した各動物のMSO還元系の性質および活性の比較を行い、各動物におけるMSO還元系の意義について考察した。ただし、ブロイラーについては、MSO還元活性が低いために、性質およびその活性を検討できなかったため、各動物との比較は行わなかった。

1. メチオニンスルホキシド還元系の性質の比較

牛、豚および産卵鶏のMSO還元系の性質を表2-7-1にまとめた。

まず、活性画分について見ると、MSO還元系は、検討したどの動物のどの組織でも、細胞破碎後の遠心上清にあることがわかった。この結果は、ラットにおいて肝臓では細胞質ゾル(cytosol)画分に、腎臓では沈殿画分(細胞破片、膜、核など)に多くのMSO還元活性が見られたというAYMARDら(1979)⁵⁸⁾の結果と、肝臓では一致するが腎臓では一致しない。AYMARDら⁵⁸⁾は、ポッター-エルページェムホモジナイザーで組織をホモジェナイズしているため、それが結果に差を生じさせているのかも知れないが、腎臓では、ラットと筆者らが測定した動物とでは、細胞内でのMSO還元系の存在している部位が異なっていることも考えられる。さて、牛と豚の腎臓では、皮質と髄質に分けた場合、皮質のみにMSO還元活性は見られた。腎臓の機能を果たす実質的な部位は皮質であり、髄質は皮質で分離された尿成分を収集する部分であることから、このような活性が皮質のみにあるというのは妥当な結果と思われる。また、このことは体のどの器官にもMSO還元系が存在するわけではないということの証明にもなると考えられる。産卵鶏の腎臓については、皮質と髄質の区別がはっきりとしないため、皮質と髄質の比較は行っていない。

表 2-7-1 牛、豚および産卵鶏の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元系の性質

		活性画分	最適pH	最適温度 (°C)	還元剤の影響 ^a
牛	肝臓	遠心上清	6.0 ^b	33	DTT ^d >NADPH=NADH>GSH ^e =無添加
	腎臓	皮質の遠心上清	6.7 ^b	39	DTT ^d >NADPH>NADH=GSH ^e =無添加
豚	肝臓	遠心上清	7.0 ^b	37	DTT ^d >NADPH=NADH>GSH ^e =無添加
	腎臓	皮質の遠心上清	7.0 ^b	37	DTT ^d >NADPH>NADH=無添加>GSH ^e
産卵鶏	肝臓	遠心上清	8.5 ^c	45	DTT ^d >NADPH=NADH=GSH ^e =無添加
	腎臓	遠心上清	8.0 ^b	42	DTT ^d =NADPH>GSH ^e >NADH=無添加

		ミカエリス定数 (mM)	最大活性が得られる基質濃度 (mM)
牛	肝臓	0.158	0.50 以上
	腎臓	0.064	0.50 以上
豚	肝臓	0.049	0.25 以上
	腎臓	0.116	0.50 以上
産卵鶏	肝臓	0.304	0.70 以上
	腎臓	0.181	0.40 以上

^a それぞれの還元剤を 1 mM 添加した時のメチオニンスルホキシド還元活性.

^b 0.1 M リン酸カリウム緩衝液.

^c 0.05 M Tris-HCl 緩衝液.

^d ジチオトレイトール.

^e グルタチオン.

次に、最適 pH について見ると、牛が酸性側、豚が中性、産卵鶏がアルカリ側と、種によって異なる傾向が見られた。したがって、種によって異なる酵素が働いていることが考えられる。また、MSO 還元系が細胞のどの部位で働いているのかについては不明であるが、もし、最適 pH が異なっているのは酵素がその環境に適応しているためだとすると、MSO 還元系は種によって異なる pH 環境で機能していることが考えられた。

次に、最適温度について見ると、どの種もその内臓温度（牛および豚 39℃、鶏 42℃）⁸⁹⁾ に近い値になっている。したがって、この酵素はその環境に適応しているものと考えられる。また、本論文には記載されていないが、牛^{86, 95)}および豚^{87, 95)}の肝臓および腎臓ではインキュベーション温度が 40℃ を越えると急速にMSO 還元活性が低下したことから、最適温度が 40℃ 以上である産卵鶏のMSO 還元系は、牛および豚に比べて耐熱性に優れた酵素で構成されていると考えられた。

次に、還元剤の影響について見ると、産卵鶏の腎臓を除くいずれの組織でも DTT でもっとも MSO 還元活性が高められた。そして、いずれの臓器でも NADPH は MSO 還元活性を高めたが、NADH は肝臓でのみ高めた。表 2-7-2 は、牛、豚、産卵鶏、AYMARD ら⁵⁸⁾ のラットおよび GANAPATHY and LEIBACH (1982) ³⁴⁾ の兎の MSO 還元活性に及ぼす各還元剤の影響をまとめたものである。この表から、NADH は産卵鶏を除くと、肝臓では NADPH とほぼ同程度に MSO 還元活性を高め、腎臓では少し高めることが分かる。また NADPH は、産卵鶏を除くと、いずれの臓器でも MSO 還元活性を高める傾向があるが、一方、産卵鶏を除かずに兎を除くと、肝臓よりも腎臓で促進効果が顕著であることが分かる。しかし、GSH は、兎ではどの臓器でも MSO 還元活性を高めたが、筆者らの検討した組織

表 2-7-2 牛、豚、産卵鶏、ラットおよび兎のメチオニン
スルホキシド還元活性に及ぼす還元剤の影響

		各還元剤が促進した倍率 ^e		
		NADH	NADPH	グルタチオン
牛 ^a	肝臓	6.07	5.93	1.17
	腎臓	1.81	16.39	1.81
豚 ^b	肝臓	3.50	3.67	1.17
	腎臓	1.27	9.73	0.00
産卵鶏	肝臓	1.06	1.20	1.08
	腎臓	0.90	61.70	3.00
ラット ^c	肝臓	4.00	-	-
	腎臓	2.13	-	-
兎 ^d	肝臓	2.19	4.22	3.40
	腎臓	1.75	4.43	3.23
	小腸	2.08	5.08	4.67

^a 堀川 (1988) ⁸⁶⁾ のデータより算出した。

^b 長峰 (1989) ⁸⁷⁾ のデータより算出した。

^c AYMARD ら (1979) ⁵⁸⁾ のデータより算出した。

^d GANAPATHY and LEIBACH (1982) ³⁴⁾ のデータより算出した。

^e 還元剤無添加の時のメチオニンスルホキシド還元活性に対する各還元剤を 1 mM 添加した時のメチオニンスルホキシド還元活性の倍率 (還元剤添加区と無添加区の比)。

では、産卵鶏の腎臓以外は M S O 還元活性をほとんど高めないか、または豚の肝臓のように阻害する傾向が見られた。還元剤による M S O 還元系への作用については、第 5 章の検討結果から直接的に作用しているのではないことが考えられたが、その点については総合考察（第 6 章）で述べる。

次に、ミカエリス定数について見ると、牛および産卵鶏では肝臓よりも腎臓で基質親和性が高いのに対して、豚では肝臓で高いことが分かる。もし、M S O 還元系がその臓器内部の環境に適応しているとすれば、牛および産卵鶏は肝臓で、豚は腎臓で M S O 濃度が高いと考えられる。このことから、牛と産卵鶏では小腸で吸収されて肝門脈を通過して肝臓に入り込む M S O 量が多いのではないかと考えると、このミカエリス定数の結果は大変興味深い。

2. メチオニンスルホキシド還元活性の比較

表 2-7-3 は、牛、豚、産卵鶏、A Y M A R D ら⁵⁸⁾ の測定したラットおよび G A N A P A T H Y and L E I B A C H³⁴⁾ の測定した兎の M S O 還元活性をまとめたものである。まず、臓器間に注目して見ると、腎臓の M S O 還元活性が他の臓器よりも高いことが分かる。このことから見ると M S O の多くは腎臓で還元されているように思えるが、実際には牛、豚および産卵鶏の臓器重量当たりの M S O 還元活性に、それぞれの臓器の重量をかけることで臓器当たりの M S O 還元活性を算出すると、産卵鶏では腎臓の方が高くなるが、牛と豚では肝臓の方が高くなった（次項の表 2-7-4 の生成可能なメチオニン量を参照）。このことから、一概に腎臓の M S O 還元活性が高いとは言えないと思われた。次に、動物間に注目して見ると、産卵鶏の腎臓を除くと、明らかに牛の M S O 還元活性が高いことが分かる。この結果は、反芻家畜の M S O 還元活性が単胃家畜のそれよりも高いのではないかという筆者らの仮説を裏付けるもの

表 2-7-3 牛、豚、産卵鶏、ラットおよび兎のメチオニンスルホキシド還元活性

		<u>(nmol/h/mgタンパク質)</u>			<u>(nmol/h/g組織)</u>		
		活性	±SE	牛との比 ^a	活性	±SE	牛との比 ^a
牛	肝臓	2.18	±0.85		220	± 75	
	腎臓	8.80	±2.79		586	±177	
豚 ^b	肝臓	0.87	±0.67	0.39	97	± 77	0.44
	腎臓	3.17	±0.98	0.36	269	± 62	0.46
産卵鶏	肝臓	0.90	±0.17	0.41	88	± 15	0.40
	腎臓	8.04	±2.46	0.91	630	±211	1.08
ラット ^c	肝臓	1.10		0.50			
	腎臓	1.65		0.19			
兎 ^d	肝臓	0.67	±0.06	0.31			
	腎臓	2.20	±0.42	0.25			
	小腸	0.20	±0.01				

^a 牛の各臓器のメチオニンスルホキシド還元活性に対する比。

^b 長峰 (1989) ⁸⁷⁾ より抜粋した。

^c AYMARD ら (1979) ⁵⁸⁾ のデータより算出した。

^d GANAPATHY and LEIBACH (1982) ³⁴⁾ のデータより算出した。

となった。

3. メチオニン要求量に対する MSO 還元活性の比較

表 2-7-3 は、牛、豚および産卵鶏の臓器重量当たりの MSO 還元活性から算出した、各臓器が 1 日に MSO を還元して生成することができるメチオニン量、およびそれがそれぞれの家畜のメチオニン要求量に占める割合をまとめたものである。ただしこのデータは、MSO 還元系が機能している環境が最適 pH であり、NADH または NADPH、および MSO が豊富に存在していると仮定している。牛と豚の腎臓は、皮質のみの MSO 還元活性を測定したが、臓器重量については皮質と髄質を分けて測定したデータが見当たらなかったため、皮質と髄質を合わせた重量を用いたため、牛と豚の腎臓の生成可能なメチオニン量の実際の値は、この表の値の 70% 前後の値ではないかと考えられる。これに加えて、メチオニン要求量および臓器重量に一般的な値を使用しているため、やや不正確なデータとなっている。しかし、同時に真の値をある程度反映しているのではないかとも思われる。この表の結果から、牛の MSO 還元系はメチオニン要求量の約 20% を、豚は約 10% を、産卵鶏は約 4% を補うことができると考えられる。この結果も、反芻家畜の MSO 還元活性が単胃家畜のそれよりも高いのではないかという筆者らの仮説を裏付けるものとなっている。しかし、この結果は、同時に MSO 還元系が牛においてもメチオニン要求量の約 20% しか補えないことを意味している。しかしながら、緒論で述べた MILLER and SAMUWL (1970)²¹⁾、ANDERSON ら (1976)²²⁾ および NJAA and AKSNES (1982)²⁴⁾ によるラットにおける MSO の利用に関する研究の結果では、いずれも MSO の給与がメチオニン給与と無給与のほぼ中間もしくは同等の効果が見られたこと、そして AYMARD

ら⁵⁸⁾ の測定したラットの MSO 還元活性が牛の半分以下しかなかったことを合わせて考えると、ルーメンでの分解を考えなければ、ラットの 2 倍以上の MSO 還元活性を持つ牛では MSO の給与がメチオニン給与と同程度の効果があるのかも知れないとも考えられた。

表 2-7-4 牛、豚および産卵鶏の肝臓および腎臓がメチオニンスルホキドから生成可能なメチオニン量がメチオニン要求量を充足する割合

	メチオニン 要求量 (g)	臓器重量 ^d (g)	生成可能な メチオニン量 ^e (g)	要求量に 対する比 (%)	
牛	28.6 ^a	肝臓	5000	3.94	13.8
		腎臓	1300	2.73	9.5
豚	9.0 ^b	肝臓	2000	0.694	7.7
		腎臓	450	0.433	4.8
産卵鶏	0.6 ^c	肝臓	35	0.0110	1.8
		腎臓	5.5	0.0124	2.1

^a BUTTRY and FOULDS (1985)⁹¹⁾ のデータを参考に体重 600 kg の牛を想定して算出した。

^b NRC (1979)⁹²⁾ の飼養標準から抜粋した。

^c NRC (1984)⁹³⁾ の飼養標準から抜粋した。

^d 家畜比較解剖図説⁹⁴⁾ から抜粋した。

^e $\text{メチオニンスルホキド還元活性} \times \text{臓器重量} \times \text{時間} \times \text{メチオニンの分子量}$
 $(\text{nmol/h/g組織}) \quad (\text{g}) \quad (24) \quad (149.21)$

の式から算出した。

第3章 牛のメチオニンスルホキシド還元活性にみられた個体差の原因

第1節 目的

堀川^{86, 88)}が測定した牛の肝臓と腎臓および筆者^{87, 88)}が測定した豚の肝臓と腎臓のメチオニンスルホキシド(MSO)還元活性には、大きな個体差がみられた(図 3-1-1)。筆者は修士論文(1989)⁸⁷⁾の中でも、この個体差の原因について若干の検討を行なった。そして、その原因を以下のように考察した。堀川および筆者は、肝臓のMSO還元活性を測定した牛の品種と、肝臓の測定に用いた豚を飼育した農家(以後生産農家と略す)を調査した。そのデータをもとにMSO還元活性を整理すると、図 3-1-2 および図 3-1-3 のようになった。この2つの図から筆者は、MSO還元活性は、生産農家ごとにまとまりを見せているので、品種よりも飼養環境に影響されるのではないかと考察した。ただし、牛はルーメンの作用によって飼料の影響を受けにくいとされているにもかかわらず、牛のMSO還元活性に大きな個体差がでた点については、ルーメン内微生物の内容(微生物の種類、その構成比など)に個体差があり、それが影響しているためではないかと考えた。しかし、個体差の原因について、そのような考察をするにはあまりにも例数および要因のデータ量が少ないと考えられた。そこで本章は、牛の肝臓および腎臓の個体差の原因について、さらに例数および要因のデータ量を増やすことにより、いくつかの検討を行なった。

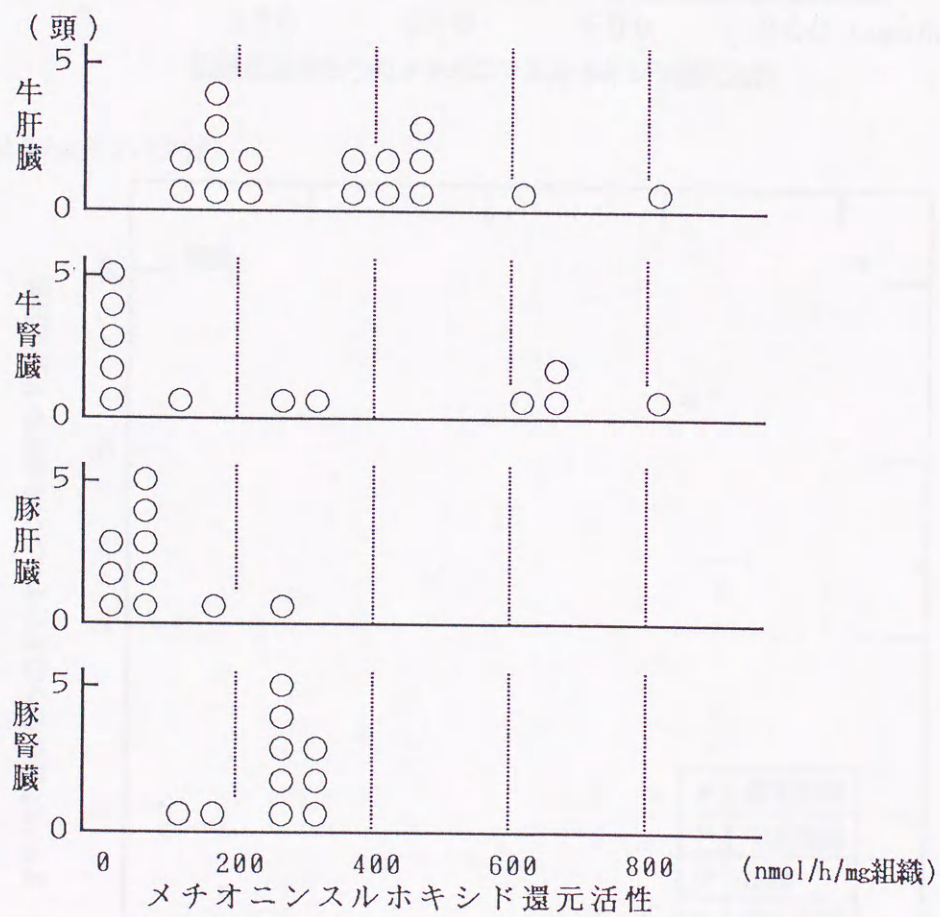
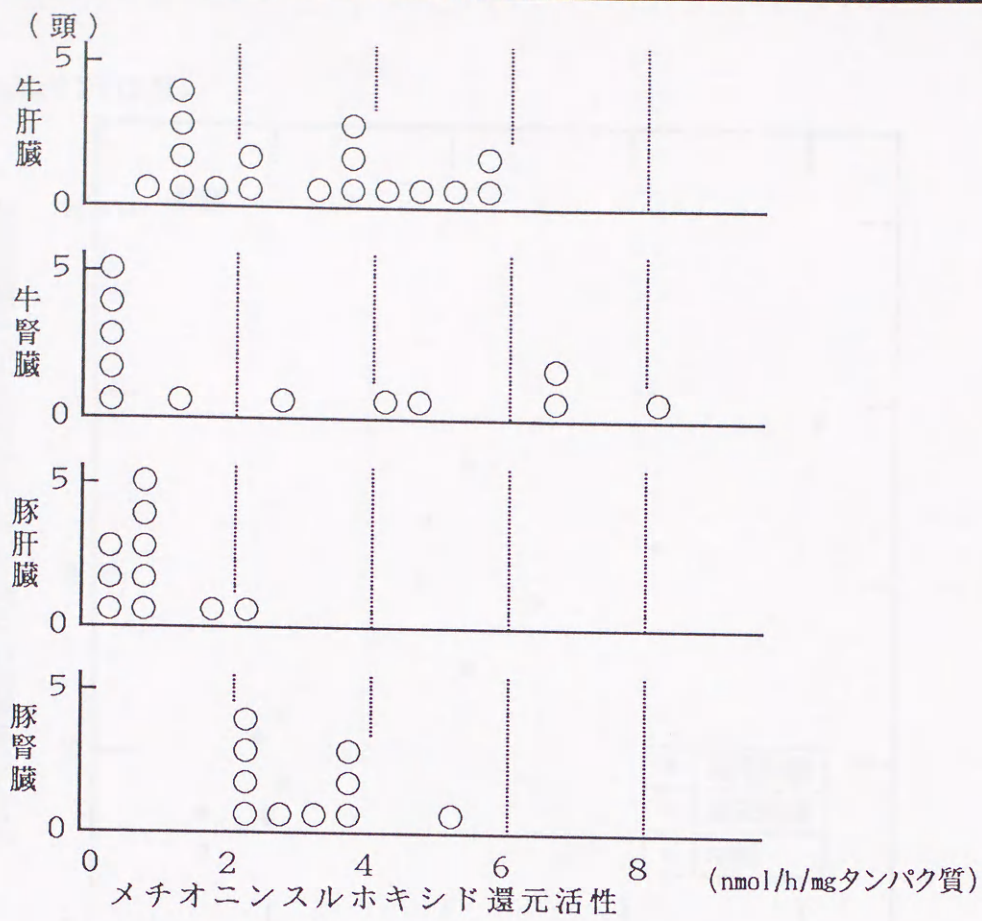
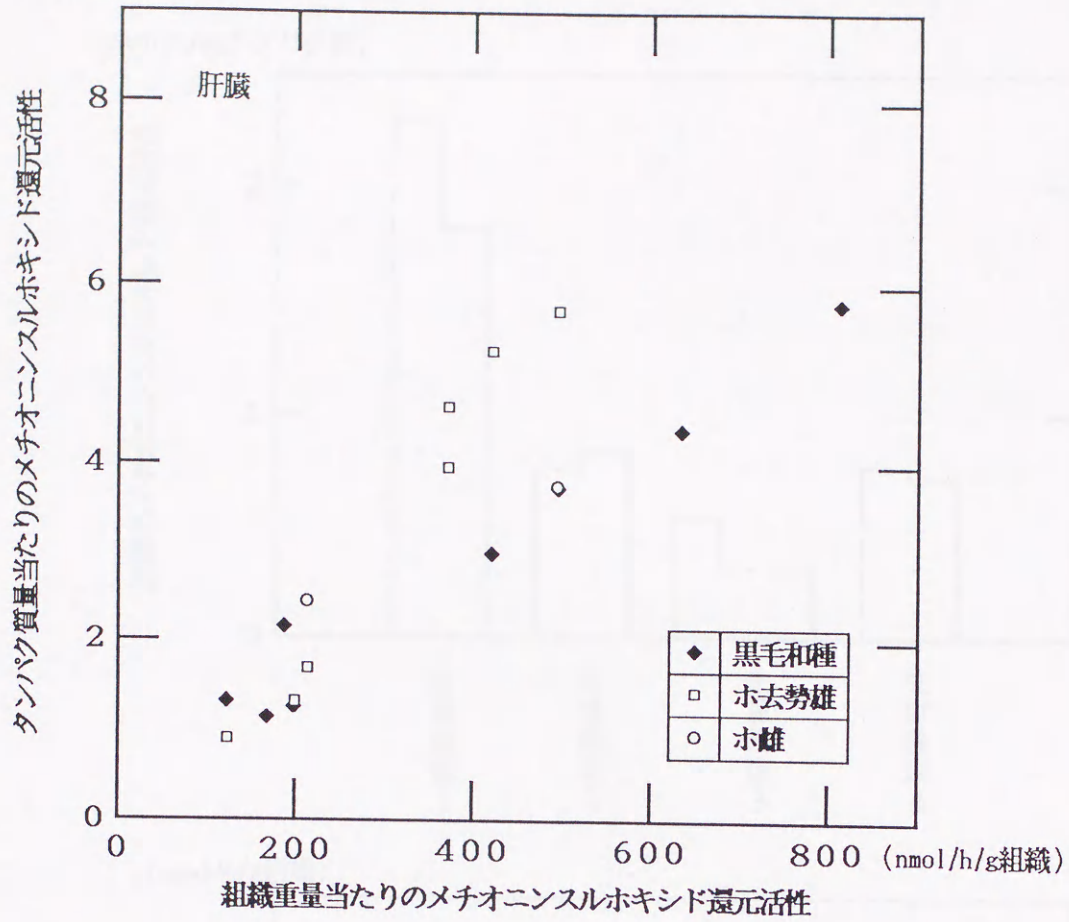


図 3-1-1 牛および豚の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性のヒストグラム (堀川⁸⁶⁾、長峰⁸⁷⁾ のデータより作製)

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/mgタンパク質)

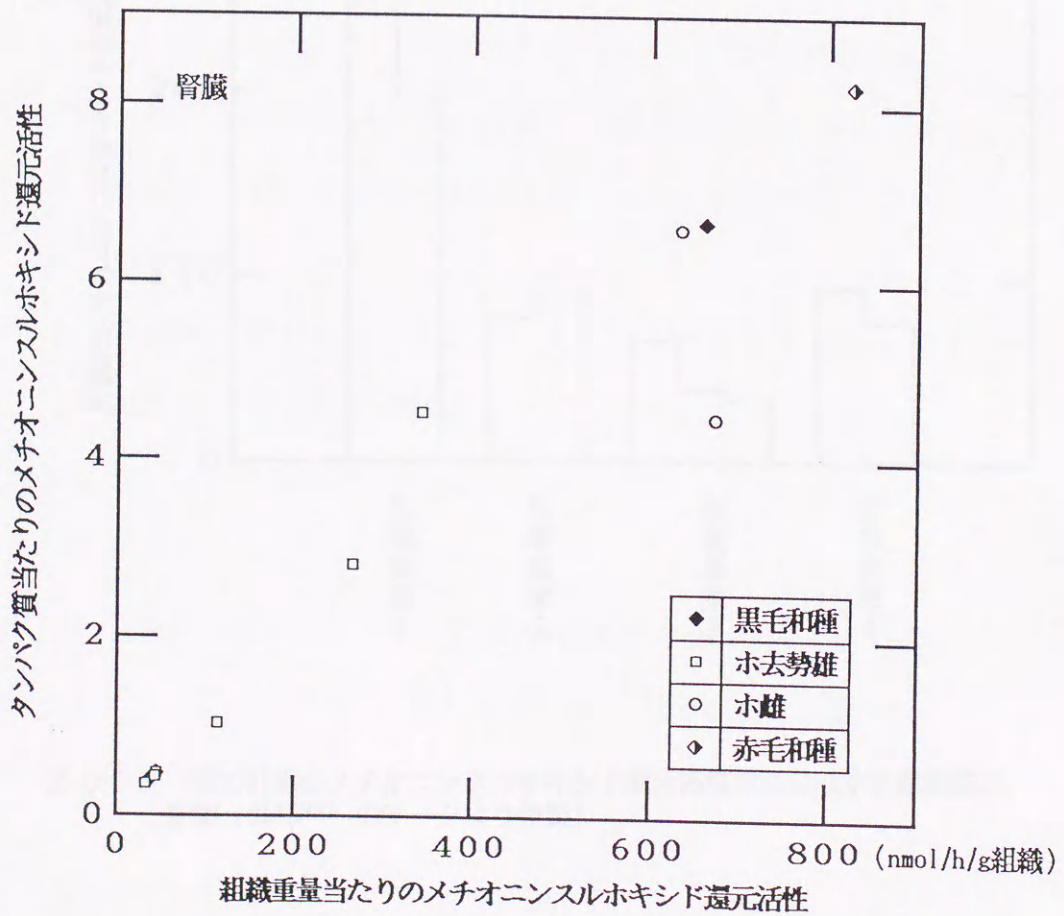
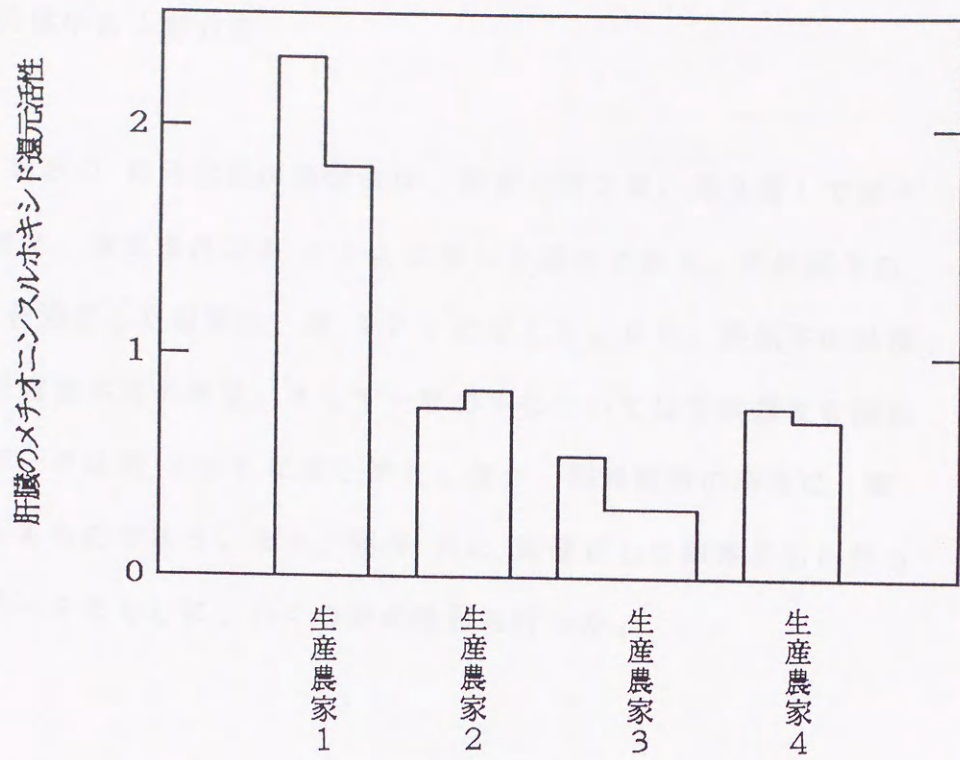


図 3-1-2 牛の肝臓のメチオニンスルホキシド還元活性のに及ぼす品種の影響 (堀川⁸⁶⁾ のデータより作製)

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/g組織)

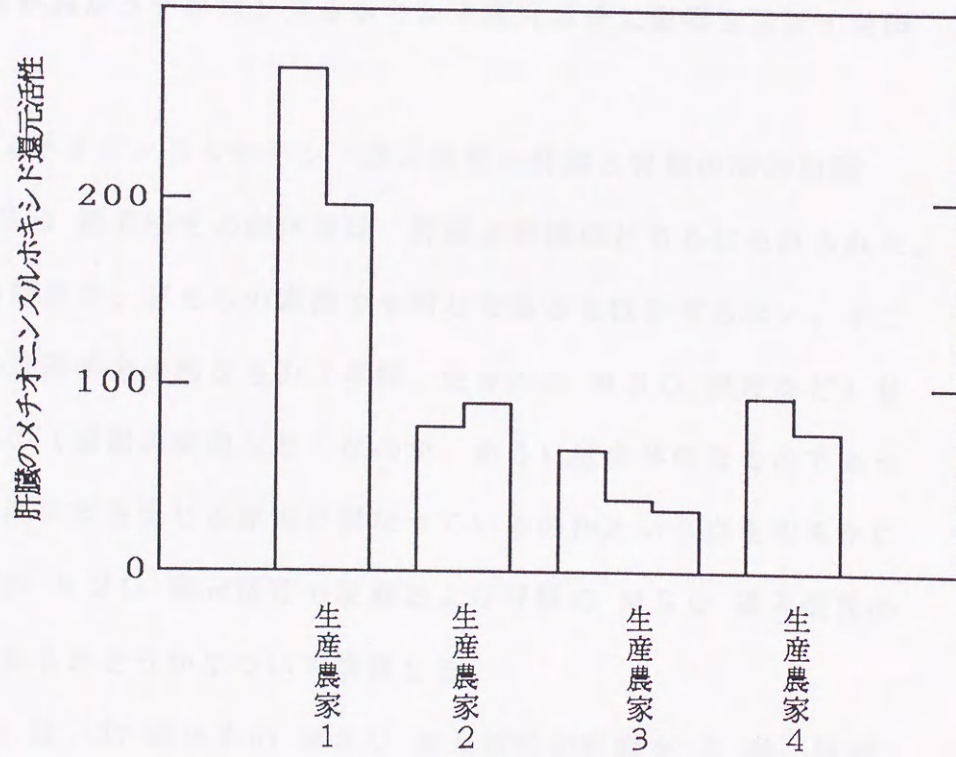


図 3-1-3 豚の肝臓のメチオニンスルホキシド還元活性のに及ぼす生産農家の影響 (長峰⁸⁷⁾ のデータより作製)

第2節 供試牛および方法

供試牛およびMSO還元活性の測定法は、前章（第2章，第2節）で述べた通りである。また、測定条件は表2-3-2に示した通りである。各供試牛のMSO還元活性を測定した結果は、表3-2-1に示した。また、供試牛の品種、性別、年齢および臓器疾患の所見、そして一部の牛については生産農家を調査した。これらのデータは表3-2-2にまとめた。なお、臓器疾患の所見は、家畜衛生管理官によるものである。また、個体No.は測定した順番にしたがった。以下、このデータをもとに、いくつかの検討を行った。

第3節 各要因がメチオニンスルホキシド還元活性に影響を及ぼす要因

1. 牛におけるメチオニンスルホキシド還元活性の肝臓と腎臓の間の相関

牛におけるMSO還元活性の個体差は、肝臓と腎臓のどちらにもみられた。しかし、個体差の原因が、どちらの臓器でも同じであるとはかぎらない。そこで本節では、その原因が全体的なもの（年齢、生体内のMSO濃度など）なのか、局部的なもの（臓器の疾患など）なのか、あるいは全体的なものであっても臓器によって個体差を生じる原因が異なっているのかという点を明らかにするために、肝臓のMSO還元活性の変動および腎臓のMSO還元活性の変動の間に関係があるかどうかについて検討した。

図3-3-1(a, b)は、37頭の牛のMSO還元活性の肝臓をX軸、腎臓をY軸にプロットして、肝臓と腎臓の間の相関をみたものである。同時に、肝臓と腎臓の間の一次回帰直線も示した。この図からタンパク質量あたりおよ

表 3-2-1 供試牛の肝臓と腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性

個体No. ^a	メチオニンスルホキシド還元活性 ±SE			
	(nmol/h/mgタンパク質)		(nmol/h/g組織)	
	肝臓	腎臓	肝臓	腎臓
1	1.36 ±0.14	5.32 ±0.51	167 ±18	348 ±33
2	3.65 ±0.07	12.36 ±0.39	320 ±6	685 ±22
3	2.37 ±0.24	12.83 ±0.58	191 ±19	668 ±30
4	2.06 ±0.13	9.14 ±0.04	219 ±14	626 ±3
5	2.09 ±0.02	10.68 ±0.10	218 ±2	621 ±6
6	2.96 ±0.15	10.77 ±1.30	317 ±17	698 ±84
7	2.35 ±0.14	11.20 ±0.69	237 ±14	600 ±37
8	2.20 ±0.16	9.37 ±0.63	230 ±17	647 ±44
9	3.21 ±0.15	10.07 ±0.83	355 ±16	641 ±53
10	0.46 ±0.00	2.92 ±0.11	46 ±0	169 ±6
11	0.91 ±0.05	6.04 ±0.35	96 ±5	324 ±19
12	2.17 ±0.16	9.27 ±0.00	192 ±14	582 ±0
13	3.74 ±0.19	10.38 ±0.44	371 ±19	666 ±28
14	3.15 ±0.17	10.86 ±0.61	304 ±16	719 ±41
15	3.30 ±0.24	11.34 ±0.25	292 ±22	665 ±15
16	2.27 ±0.17	8.13 ±0.38	232 ±18	521 ±25
17	2.05 ±0.21	6.99 ±1.01	161 ±16	408 ±59
18	0.67 ±0.13	8.55 ±0.43	57 ±11	503 ±25
19	2.58 ±0.32	5.74 ±0.60	217 ±27	347 ±36
20	2.39 ±0.33	6.37 ±0.25	236 ±33	354 ±14
21	2.44 ±0.27	5.46 ±0.25	241 ±27	334 ±15
22	2.38 ±0.31	12.42 ±0.90	199 ±26	776 ±56
23	2.06 ±0.56	13.43 ±1.23	174 ±47	774 ±71
24	3.48 ±0.14	11.76 ±0.24	294 ±12	758 ±16
25	3.44 ±0.12	13.27 ±0.90	300 ±11	793 ±54
26	1.47 ±0.14	2.35 ±0.12	151 ±15	137 ±7
27	2.31 ±0.07	10.20 ±0.15	245 ±8	665 ±10
28	2.96 ±0.12	10.93 ±0.24	287 ±12	696 ±15
29	2.04 ±0.07	7.76 ±0.13	196 ±7	534 ±9
30	2.22 ±0.20	8.36 ±0.33	255 ±23	797 ±31
31	2.14 ±0.23	6.88 ±0.23	251 ±27	596 ±20
32	1.45 ±0.11	9.84 ±0.40	165 ±13	804 ±33
33	1.50 ±0.10	6.37 ±0.27	200 ±14	534 ±23
34	1.12 ±0.03	7.19 ±0.18	176 ±5	695 ±17
35	1.56 ±0.08	8.47 ±0.33	223 ±11	836 ±33
36	0.70 ±0.03	5.92 ±0.21	92 ±5	521 ±18
37	1.50 ±0.08	6.80 ±0.30	226 ±12	651 ±29

^a 測定した順に示した。

表 3-2-2 供試牛の品種、性別、年齢、臓器疾患の所見および生産農家

個体No. ^a	品種	性別	年齢	生産農家 ^b	臓器疾患の所見など ^c
1	ホルスタイン	去勢雄	—	—	なし
2	黒毛和種	去勢雄	3才	—	なし
3	黒毛和種	去勢雄	3才	—	なし
4	黒毛和種	雌	4才	—	なし
5	黒毛和種	去勢雄	3才	—	なし
6	黒毛和種	去勢雄	3才	—	なし
7	黒毛和種	去勢雄	3才	—	なし
8	黒毛和種	去勢雄	3才	—	なし
9	黒毛和種	去勢雄	3才	—	なし
10	ホルスタイン	雌	3才	—	肝富脈斑
11	ホルスタイン	雌	3才	—	肝富脈斑
12	黒毛和種	雌	3才	—	腎臓に壊死
13	黒毛和種	去勢雄	3才	—	肝膿傷
14	黒毛和種	去勢雄	3才	—	のこくず肝
15	黒毛和種	去勢雄	3才	—	なし
16	交雑種 ^d	雌	3才	永山畜産	なし
17	ホルスタイン	去勢雄	3才	乳肥組合	腎に壊死
18	ホルスタイン	雌	6才	松原考一	なし
19	ホルスタイン	雌	6才	松原考一	黒色腎
20	ホルスタイン	雌	6才	松下公男	肝濃傷
21	ホルスタイン	雌	6才	松下公男	なし
22	ホルスタイン	雌	3才	上条原牧場	妊娠8ヶ月
23	ホルスタイン	去勢雄	3才	上条原牧場	なし
24	ホルスタイン	去勢雄	3才	上条原牧場	なし
25	ホルスタイン	去勢雄	3才	上条原牧場	なし
26	黒毛和種	雌	3才	永山畜産	肝炎、強度の黒色腎
27	黒毛和種	雌	3才	永山畜産	なし
28	黒毛和種	去勢雄	3才	永山畜産	なし
29	交雑種 ^d	去勢雄	3才	永山畜産	なし
30	ホルスタイン	去勢雄	3才	大山和夫	なし
31	ホルスタイン	去勢雄	3才	大山和夫	なし
32	ホルスタイン	去勢雄	3才	大山和夫	のこくず肝
33	ホルスタイン	去勢雄	3才	大山和夫	なし
34	黒毛和種	去勢雄	3才	迫間輝昭	なし
35	黒毛和種	去勢雄	3才	迫間輝昭	のこくず肝
36	黒毛和種	雌	3才	迫間輝昭	強度のこくず肝
37	黒毛和種	去勢雄	3才	迫間輝昭	なし

^a 測定した順に示した。

^b その牛を飼育した農家。

^c 家畜衛生管理官による所見。

^d 黒毛和種とホルスタインの交雑種。

(nmol/h/mgタンパク質)

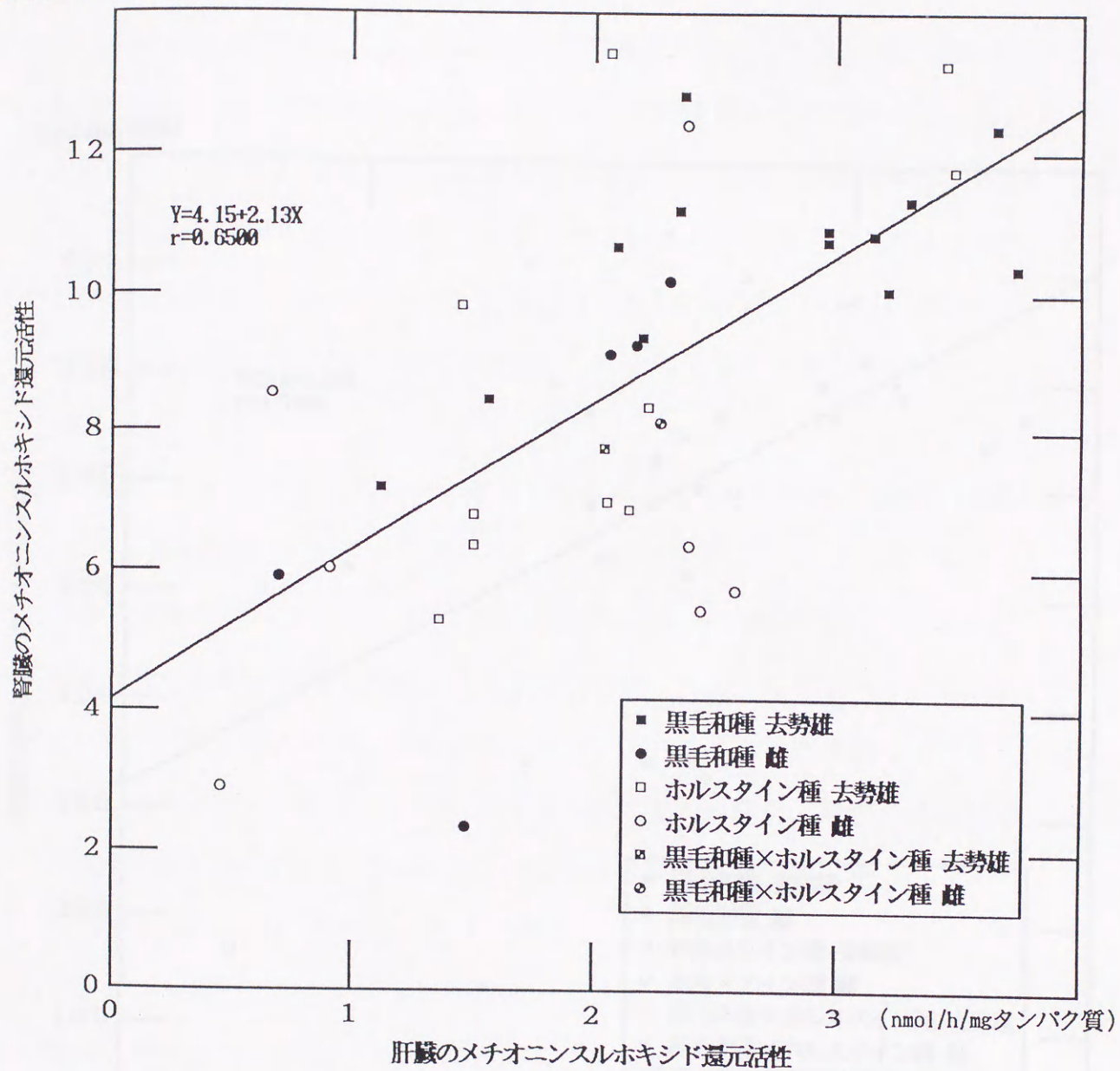


図 3-3-1 (a) 牛のメチオニンスルホキシド還元活性の肝臓と腎臓の間の相関 (nmol/h/mgタンパク質)

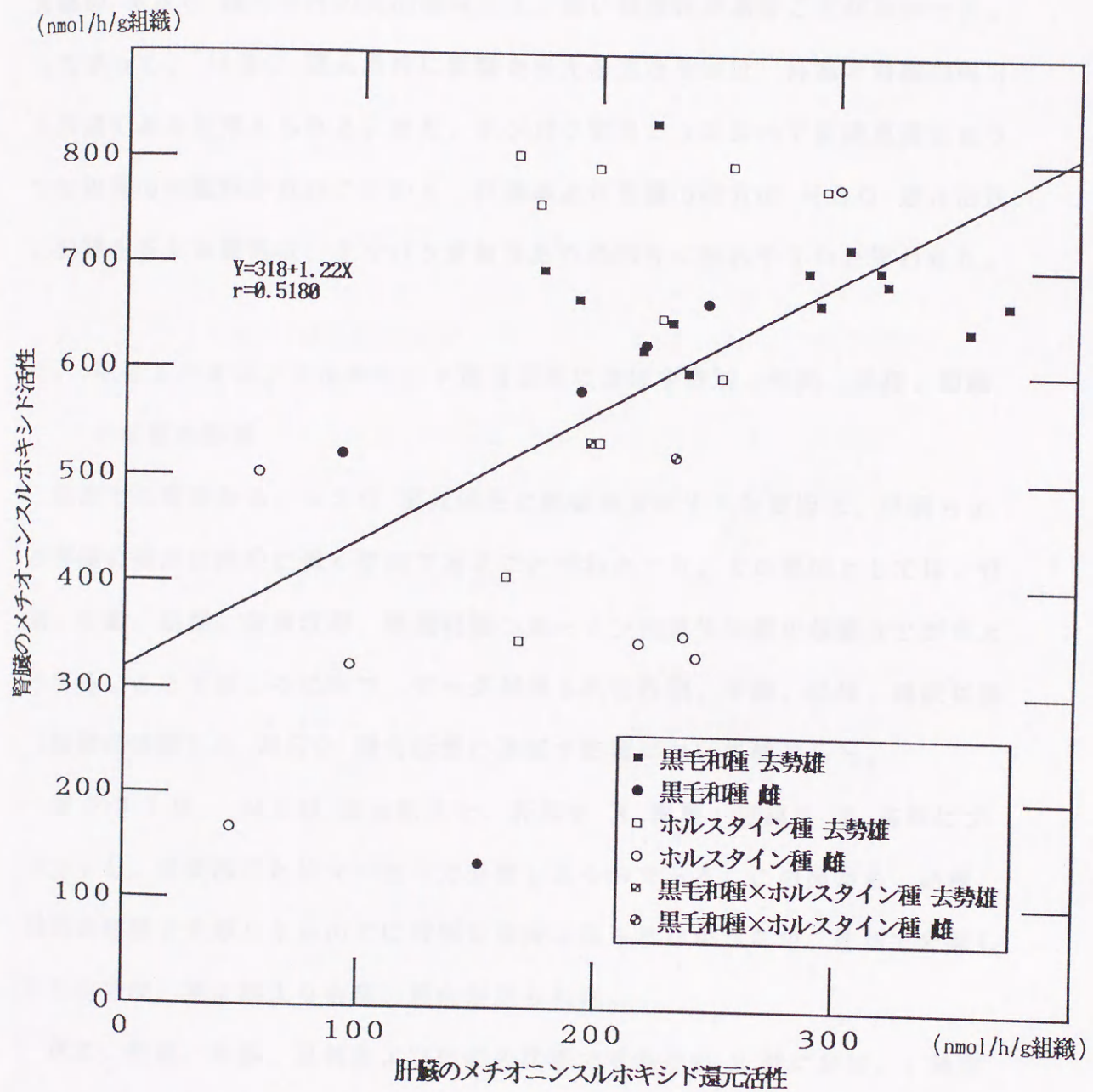


図 3-3-1 (b) 牛のメチオニンスルホキシド還元活性の肝臓と腎臓の間の相関 (nmol/h/g組織)

び組織重量当たりのいずれの活性でも、全体的に肝臓の活性が高い牛は腎臓でも高い傾向にあることがわかる。表 3-3-1 (a, b) は、相関係数、一次回帰直線および相関の t 検定による有意性の検討結果である。この表から、肝臓と腎臓の MSO 還元活性の間の相関には、高い有意性があることがわかった。したがって、MSO 還元活性に影響を与える主な要因は、肝臓と腎臓の両方に共通であると考えられる。また、タンパク質当たりに比べて組織重量当たりでは相関の有意性が低いことから、肝臓および腎臓の両方の MSO 還元活性に影響を与える要因は、タンパク質量当たりの活性に現れやすいと思われた。

2. 牛のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす性別、年齢、品種、組織の状態の影響

前節での検討から、MSO 還元活性に影響を及ぼす主な要因は、肝臓および腎臓の両方に同時に働く要因であることがわかった。その要因としては、性別、年齢、品種、健康状態、飼養状態、ルーメン内微生物叢の状態などが考えられる。ここでは、その中で、データが得られた性別、年齢、品種、健康状態（組織の状態）の MSO 還元活性に及ぼす影響について検討した。

図 3-3-2 は、MSO 還元活性を、肝臓を X 座標、腎臓を Y 座標にプロットし、各要因ごとにマーカーで分類したものである。この図から、品種、組織の状態で分類したものでは特別な傾向は見られなかったが、性別で分類したものでは、雄は雌よりも高い傾向が見られた。

次に、性別、年齢、品種および組織の状態でそれぞれ 2 群に分け、 t 検定によってその有意差を検討した。有意差の検定は、肝臓および腎臓のタンパク質当たりおよび組織重量当たりの MSO 還元活性のそれぞれについて行った。また、有意差の検討には表 3-2-1 および表 3-2-2 に示されている 37 頭を用

表 3-3-1 (a) 牛のメチオニンスルホキシド還元活性の肝臓と腎臓の間の
相関係数 (nmol/h/mgタンパク質)

	頭数	傾き	切片	相関係数
全体	37	2.13	4.15	0.6500***
性別				
去勢雄	24	1.98	4.93	0.6805***
雌	13	1.55	4.39	0.431
品種別				
黒毛和種	19	2.12	4.48	0.7281***
ホルスタイン	16	1.99	4.19	0.5487*
品種性別				
黒毛和種去勢雄	14	1.50	6.35	0.7079**
黒毛和種雌	5	3.32	1.60	0.6809
ホルスタイン去勢雄	9	2.60	3.44	0.6693*
ホルスタイン雌	7	0.95	5.19	0.3031

臓器等に異常の認められない個体のみでの肝臓と腎臓の間の相関係数

全体	22	1.84	5.15	0.5659**
性別				
去勢雄	17	2.34	4.13	0.6846**
雌	5	-0.47	9.21	-0.1939*
品種別				
黒毛和種	13	1.81	5.77	0.6964**
ホルスタイン	7	0.25	7.33	0.0557
品種性別				
黒毛和種去勢雄	11	1.81	5.77	0.7418**
ホルスタイン去勢雄	5	4.49	-0.27	0.5638

* 5%, ** 1%, *** 0.1% レベルで有意性あり.

表 3-3-1 (b) 牛のメチオニンスルホキシド還元活性の肝臓と腎臓の間の
相関係数 (nmol/h/g組織)

		頭数	傾き	切片	相関係数
全体		37	1.22	318	0.5180**
性別	去勢雄	24	0.48	543	0.2543
	雌	13	1.17	242	0.4984
品種別	黒毛和種	19	0.86	422	0.4524
	ホルスタイン	16	1.46	260	0.5054*
品種性別	黒毛和種去勢雄	14	-0.04	688	-0.0429
	黒毛和種雌	5	1.74	193	0.4904
	ホルスタイン去勢雄	9	1.53	328	0.4103
	ホルスタイン雌	7	0.99	233	0.5241
臓器等に異常の認められない個体のみでの肝臓と腎臓の間の相関係数					
全体		22	0.62	470	0.3395
性別	去勢雄	17	0.60	493	0.3338
	雌	5	0.14	503	0.0833
品種別	黒毛和種	13	0.06	644	0.0973
	ホルスタイン	7	0.51	457	0.1944
品種性別	黒毛和種去勢雄	11	0.10	635	0.1779
	ホルスタイン去勢雄	5	2.00	192	0.4526

* 5%, ** 1%, *** 0.1% レベルで有意性あり.

(nmol/h/mgタンパク質)

(nmol/h/g組織)

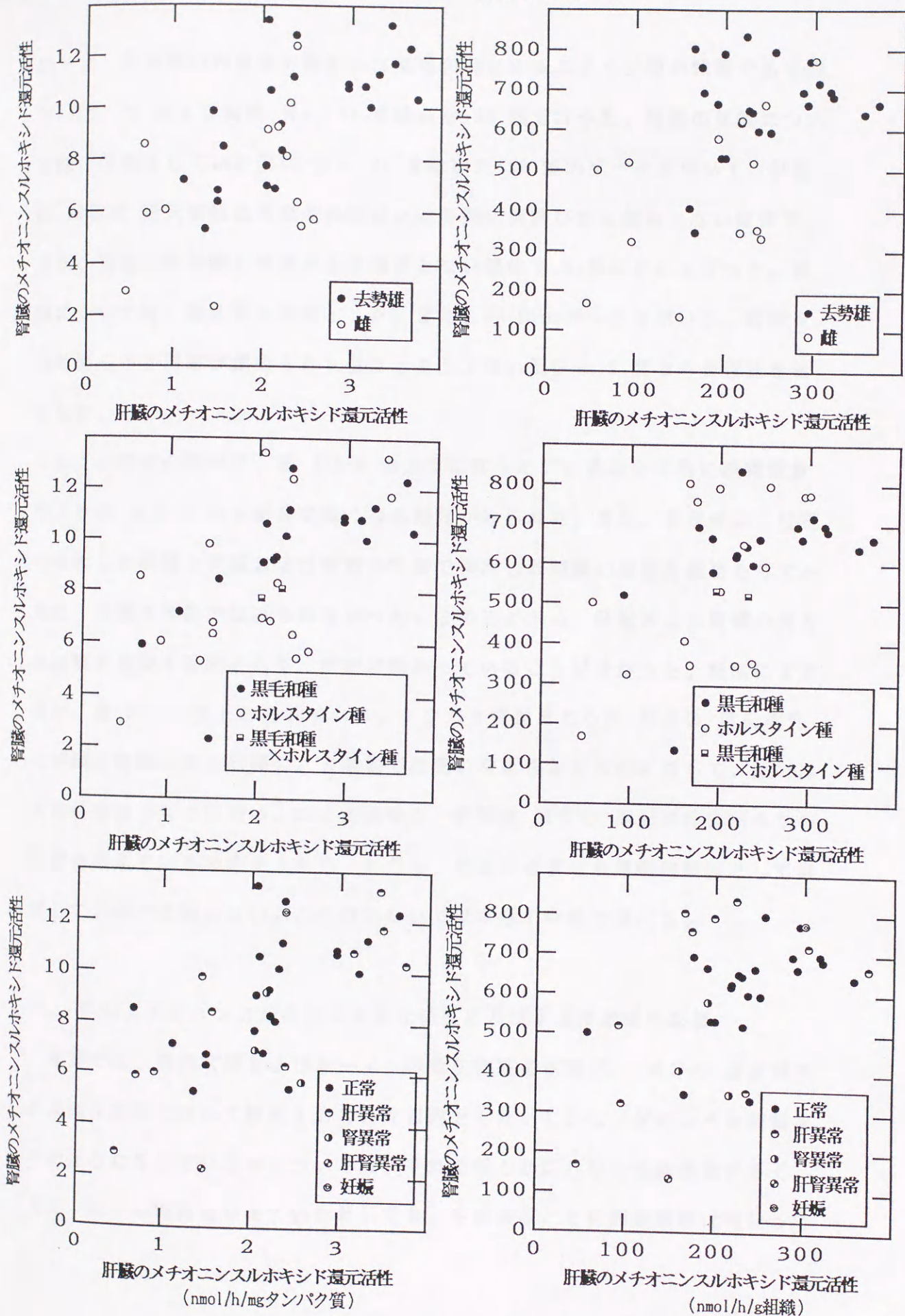


図 3-3-2 牛のメチオニンシルホキシド還元活性の肝臓と腎臓のプロット

いたが、品種間の有意差の検討には黒毛和種とホルスタイン種の雑種である個体 No. 16 および個体 No. 29 を除いた 35 頭で行った。組織の状態については、妊娠をしていた個体 No. 22 を除いた 36 頭のデータを用いて、肝臓の MSO 還元活性の有意差の検討には肝臓に異常がある個体とない個体で、また、腎臓では腎臓に異常がある個体とない個体で 2 群に分けて行った。腎臓については、黒色腎も異常とした。また、37 頭のデータを用いて、妊娠を含め何らかの異常が認められた個体とそうでない個体の 2 群でも有意差を検討した。

以上の検定の結果は、表 3-3-2 のようになった。t 値は全体的に組織重量当たりの MSO 還元活性で高くなる傾向がみられた。また、有意差は、性別で検討した肝臓と腎臓および組織の状態で検討した腎臓の組織重量当たりでみられ、品種や年齢ではみられなかった。このことから、肝臓および腎臓の両方に影響を及ぼす要因として、性別が関わっていることが分かった。性別による差は、表 3-3-1 でもみられている。タンパク質量当たりの MSO 還元活性の肝臓と腎臓の間の相関に、去勢雄では高い有意性があるのに対して、雌では有意性がみられていない。以上の点から、性別は MSO 還元活性に何らかの影響を与えていると考えられた。ただし、性別が必ずしも遺伝的要因として影響しているとは限らない。この点については本章の考察で述べる。

3. 牛のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす生産農家の影響

本節では、飼養状態およびルーメン内微生物叢の状態が、MSO 還元活性に及ぼす影響について検討することを目的とした。しかし、どのような飼料をどのように与えているかについては、それを明らかにしない生産農家が多く、また、同一の飼料を与えていたとしても、生産農家ごとに飼養環境は異なって

表 3-3-2 牛のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす性別、年齢、
品種および組織の状態の影響の t 検定による有意差の検定

	タンパク質量当たりの活性		組織重量当たりの活性 (t値)	
	肝臓	腎臓	肝臓	腎臓
性別 ^a	2.388*	2.990**	3.281**	4.114***
年齢 ^b	0.428	1.537	0.823	2.189
品種 ^c	1.387	1.149	2.034	1.206
組織の状態 ^d	0.206	2.107*	0.375	2.787**
何らかの異常 ^e	0.311	1.140	1.122	1.140

^a 去勢雄と雌で分けた。

^b 3才とそれ以上(4, 6才)で分けた。

^c 雑種である個体 No. 16 および個体No29は除いて、黒毛和種とホルスタイン種で分けた。

^d 妊娠をしていた個体 No. 22 は除き、肝臓の検定は肝臓の異常があるものとなないもの、腎臓の検定は腎臓に異常があるものとなないもの
とで分けた。黒色腎は異常とした。

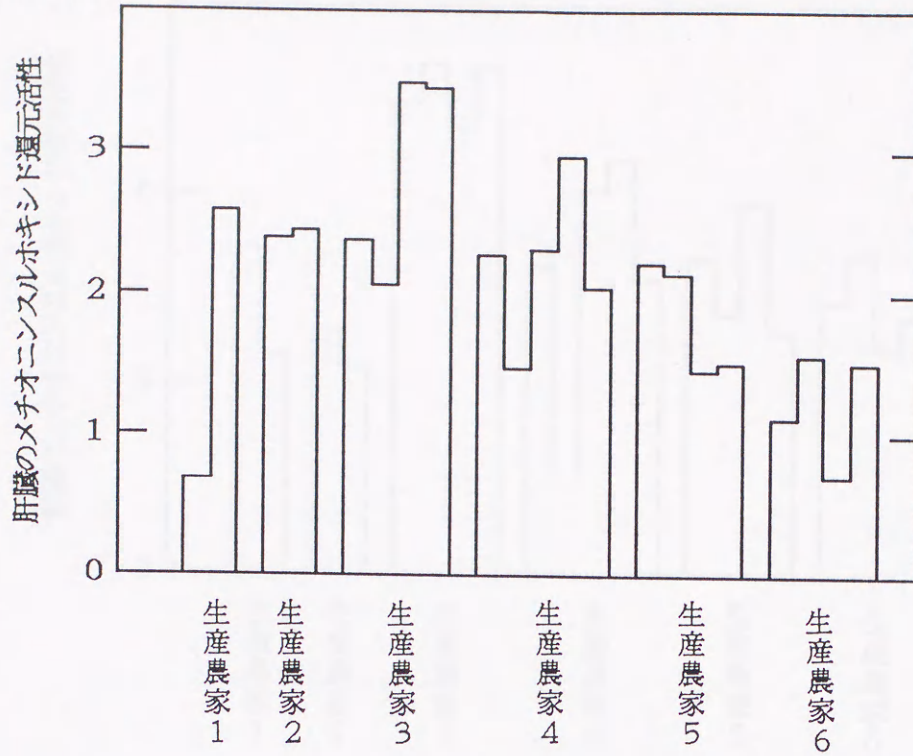
^e 何らかの異常が認められた個体とそうでないもの
とで分けた。妊娠および黒色腎は異常のあるものとした。

* 5%, ** 1%, *** 0.1% レベルで有意差あり。

いることが考えられる。一方、ルーメン内微生物叢についても、それを分類する手法は確立されていない。以上のことから、これらの要因については、直接それらによるMSO還元活性への影響を検討することは困難であると考えられる。しかし、生産農家が同じであり、出荷時期も同じであれば、飼養状態はほぼ同じであると考えられる。また、ルーメン内微生物のほとんどが接触感染であると考えられていることと、飼養環境がほぼ同じであることから、同一の生産農家内であればルーメン内微生物叢は似かよった構成になると考えられる。そこで、筆者は、生産農家ごとのMSO還元活性を比較することにより、これらの要因の影響を間接的にではあるが検討できると考えた。

図 3-3-3 および図 3-3-4 は、生産農家の分かっている牛の肝臓および腎臓のMSO還元活性を、生産農家別にまとめたグラフである。このグラフからは、生産農家間に明らかな差は見られない。そこで、図 3-3-3 および図 3-3-4 の生産農家 3, 4, 5, 6 のデータを用いて分散分析による検定を行った。ただし、生産農家 3 の個体 No. 16 は、他の 4 頭と測定時期が異なるため、この個体を除いた 4 頭を用いた。その結果、表 3-3-3 に示したように、タンパク質量当たりの活性で、肝臓および腎臓の両方で生産農家による有意な変動がみられた。

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/g組織)

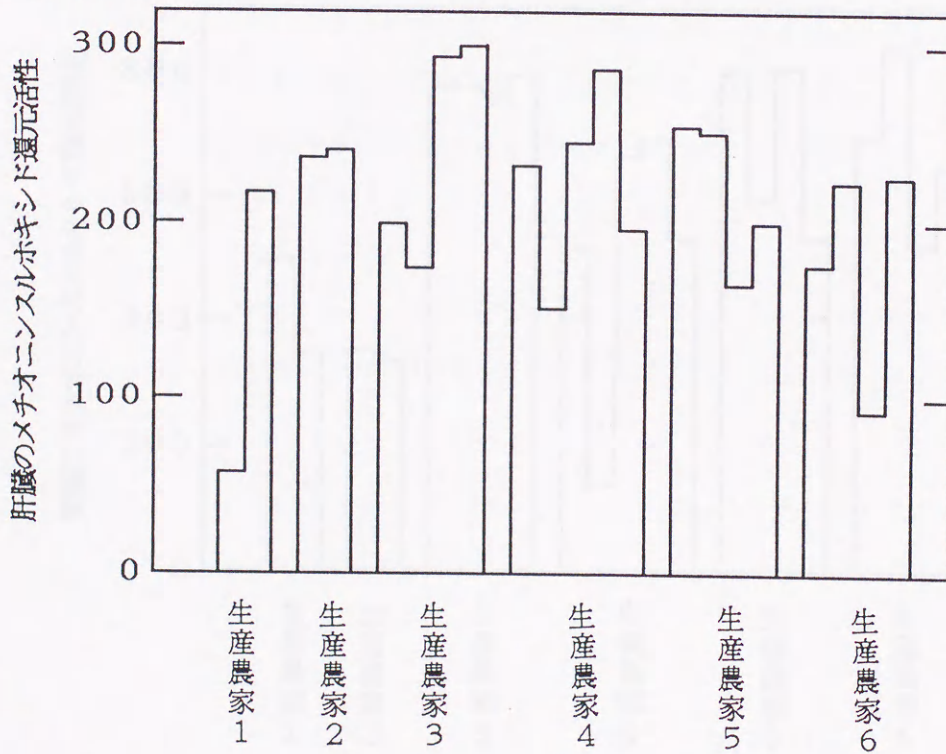
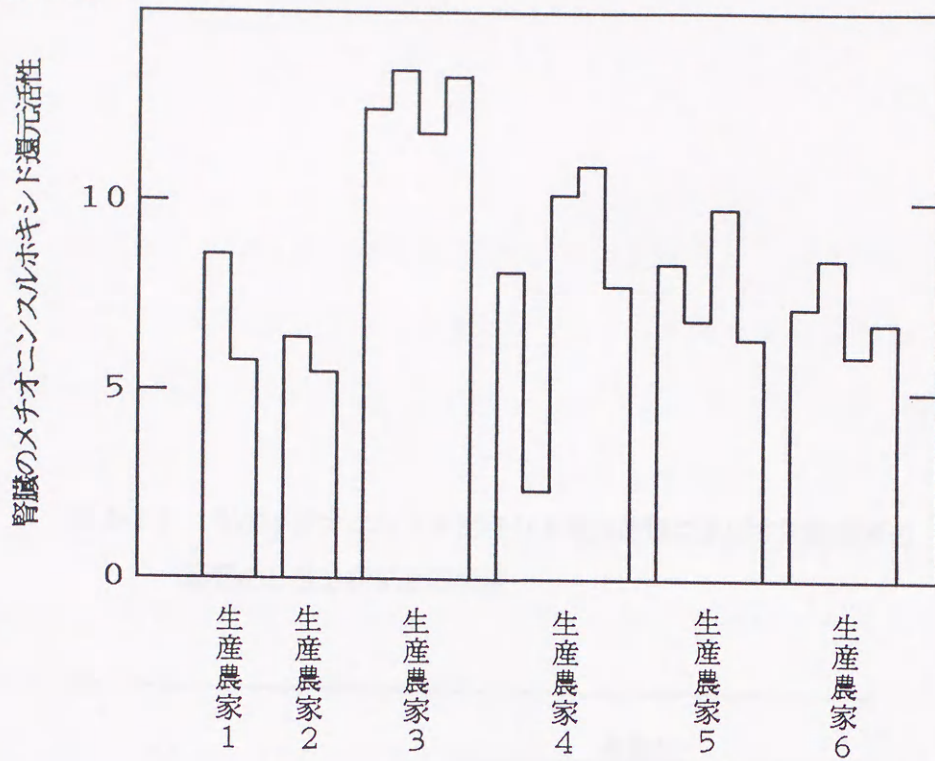


図 3-3-3 牛肝臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす生産農家の影響

(nmol/h/mgタンパク質)



(nmol/h/g組織)

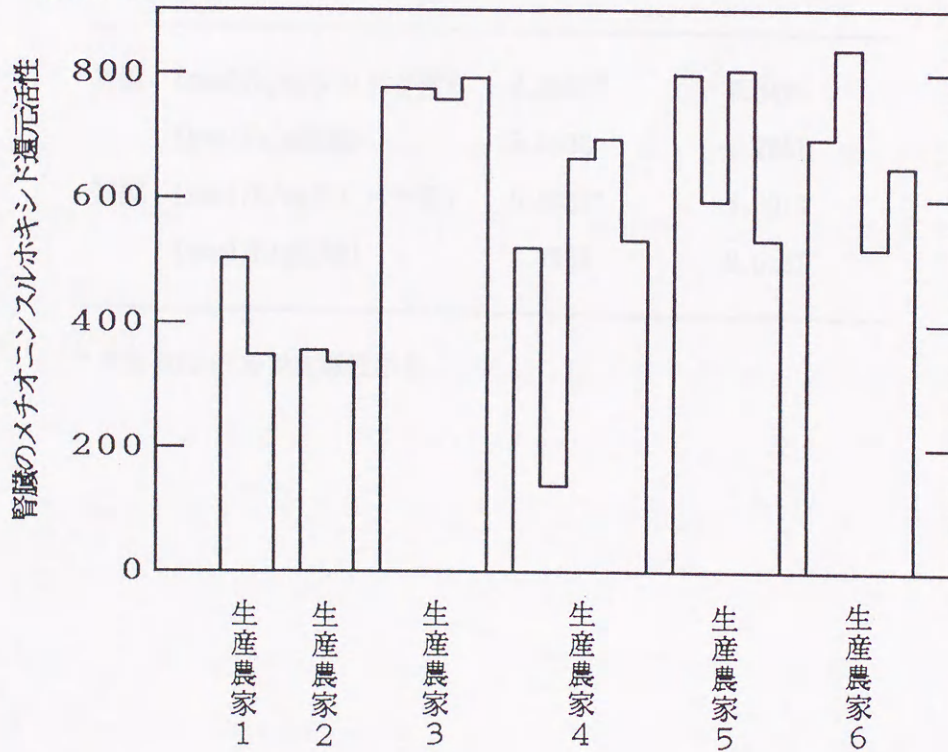


図 3-3-4 牛腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす生産農家の影響

表 3-3-3 牛のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす生産農家の影響の分散分析による検定

	分散比	
	農家間変動	個体間変動
肝臓 (nmol/h/mgタンパク質)	4.9605*	0.3408
(nmol/h/g組織)	0.6603	0.2961
腎臓 (nmol/h/mgタンパク質)	5.6863*	1.0915
(nmol/h/g組織)	1.7023	0.5161

* 5% のレベルで有意性あり。

第4節 考察

牛のMSO還元活性の個体差の原因を検討するにあたって、まず初めに筆者は、堀川(1988)⁸⁶⁾の測定した牛の腎臓のMSO還元活性の個体差(SE)が特に大きいことに着目した(表2-3-3を参照)。前章(第2章,第3節,1.(1))で述べたように、堀川⁸⁶⁾は、牛の腎臓を測定した時に、皮質と髓質を一緒にホモジェナイズしていた。これは、堀川⁸⁶⁾が皮質と腎臓の活性を検討した時に、皮質より低いが髓質でもMSO還元活性がみられたためである。このことから筆者は、測定した個体ごとに、ホモジェネートに含まれる皮質と髓質の割合が異なっていたために個体差が大きくなったのではないかと考えた。そこで、皮質と髓質のそれぞれのMSO還元活性を検討した結果、堀川⁸⁶⁾の結果とは異なり、髓質にはほとんどMSO還元活性はみられないことが分かった(図2-3-1)。また、筆者が37頭の牛の腎臓の皮質についてMSO還元活性を測定した結果、平均値が堀川の測定値の約2倍になったのに対して、逆に誤差(SE)は小さくなった(表2-3-3)。このことから、堀川⁸⁶⁾の測定した牛の腎臓のMSO還元活性の個体差の原因の1つは、皮質と髓質を一緒にホモジェナイズしていたことにあると考えられた。

図3-4-1は、筆者が測定した牛37頭の肝臓および腎臓皮質のMSO還元活性をヒストグラムにしたものである。まず肝臓についてみると、そのMSO還元活性は、2nmol/h/mgタンパク質または200nmol/h/g組織の周辺のMSO還元活性を持つ牛が多かった。また、筆者の肝臓のMSO還元活性を測定した測定条件は、堀川⁸⁶⁾と同じであるが、筆者の平均値は堀川の測定値の約3分の2になったのに対し、誤差(SE)は約半分になった。この原因は、図3-4-1と図3-1-1を比較すると分かるように、筆者の測定した牛

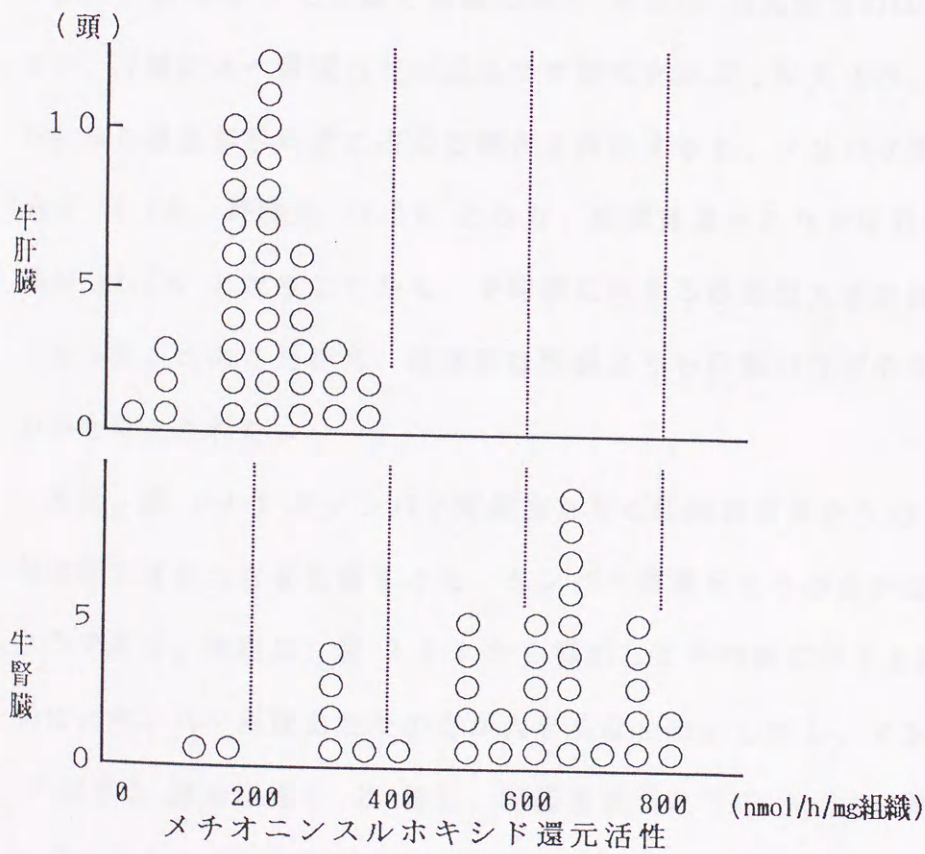
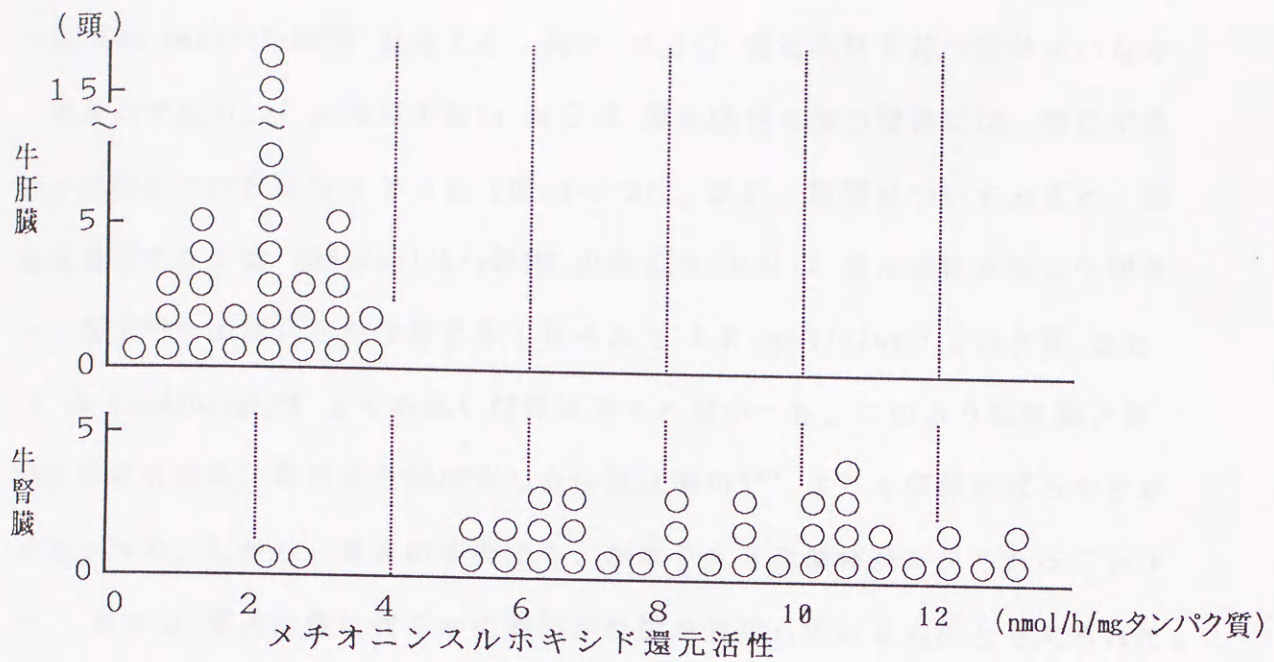


図 3-3-5 牛の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性のヒストグラム

群の中には、堀川⁸⁶⁾の測定した牛群にみられた 4 nmol/h/mgタンパク質 または 400 nmol/h/g組織 を越える、高い MSO 還元活性を持つ個体がいなかったためである。この堀川の高い MSO 還元活性を持つ個体には、特に定まった品種または性別はなかった(図 3-1-2)。次に、腎臓についてみると、組織重量当たりでは 600 nmol/h/g組織 の周辺の MSO 還元活性を持つ牛が多く、堀川⁸⁶⁾の測定した牛群に多く見られた 0.5 nmol/h/mgタンパク質 または 50 nmol/h/g組織 よりも低い個体は見られなかった。このように肝臓と腎臓のいずれでも、筆者が今回測定した牛群は堀川⁸⁶⁾よりも個体のばらつきが小さかった。しかし、筆者の牛群でも、かなり大きな個体差が見られることから、MSO 還元活性に何らかの要因が影響を及ぼしているものと考えられた。

次に、図 3-4-1 で肝臓と腎臓の間の MSO 還元活性のばらつきを比較すると、肝臓に比べ腎臓の方がばらつきが大きいように見える。しかし、表 2-3-3 から誤差が平均値に占める割合を算出すると、タンパク質量当たりでは肝臓が 34.1%、腎臓が 30.2% となり、組織重量当たりでは肝臓が 39.0%、腎臓が 31.7% となることから、平均値に対する誤差の大きさは肝臓の方が大きくなった。このことから、個体差は腎臓よりも肝臓の方がやや大きいのではないかと考えられた。

次に、図 3-4-1 でタンパク質量当たりと組織重量当たりの MSO 還元活性の間でばらつきを比較すると、タンパク質量当たりの方がばらつきが大きいようである。実際に、表 2-3-3 から算出した平均値に対する誤差の大きさの値は、タンパク質量当たりの方が大きくなった。しかし、タンパク質量当たりの MSO 還元活性を X 軸に、組織重量当たりの MSO 還元活性を Y 軸にプロットすると、腎臓のタンパク質量当たりの MSO 還元活性にばらつきが見られるが、全体的にはタンパク質量当たりで MSO 還元活性が高い個体

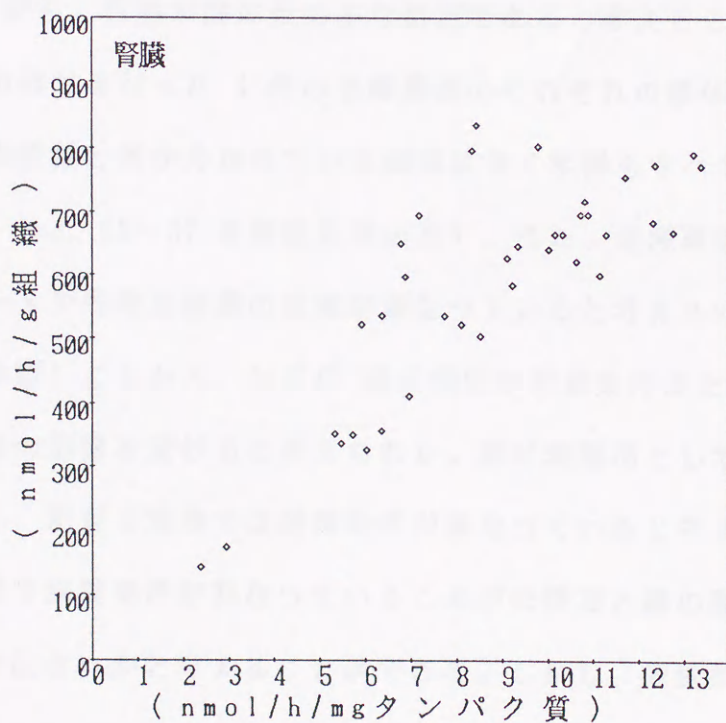
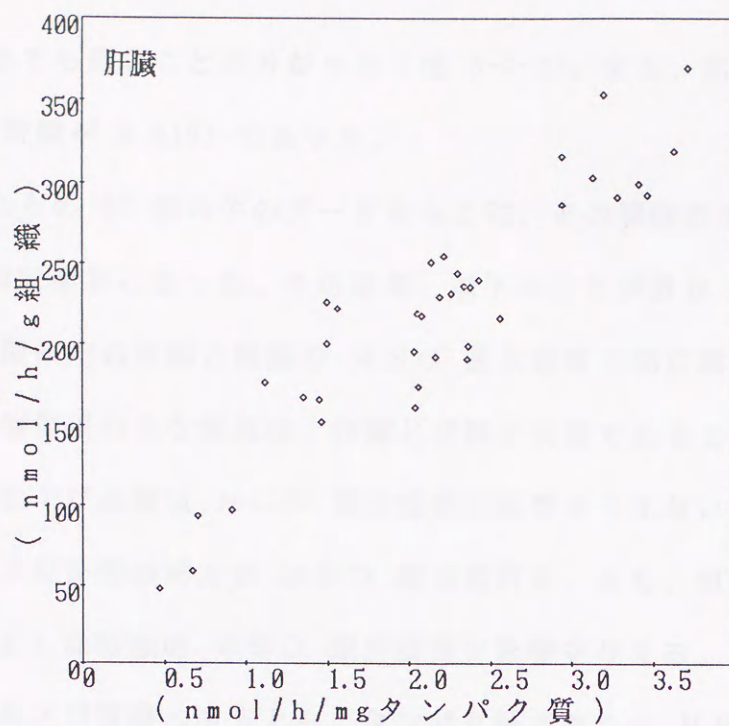


図 3-3-6 牛の肝臓および腎臓のメチオニンスルホキシド還元活性のタンパク質当たりと組織重量当たりのプロット

は組織重量当たりでも高いことが分かった（図 3-4-2）。また、相関係数は、肝臓が 0.9178、腎臓が 0.8191 であった。

本章では、これらの 37 頭の牛のデータをもとに、その個体差の原因についてのいくつかの検討をおこなった。その結果、以下のことが分かった。

- 1) 同一個体内の肝臓と腎臓の MSO 還元活性の間に高い相関がみられ、個体差の主な原因は、肝臓と腎臓に共通であると考えられる。
- 2) 年齢および品種は MSO 還元活性に影響を与えないが、性別は肝臓および腎臓の両方の MSO 還元活性に、また、組織の状態（疾患など）は腎臓の MSO 還元活性に影響を与える。
- 3) 肝臓および腎臓の両方とも、タンパク質当たりの MSO 還元活性は生産農家により有意な相違がみられる。

1) および 2) から、性別が個体差の主な原因であることができた。3) からは、その検討を行った 4 件の生産農家のそれぞれの個体は、生産農家によって特に去勢雄と雌が分かれている傾向はなく年齢もすべて 3 才であり（表 3-2-2 の No. 22~37 を検定に用いた）、また、生産農家によって飼養条件またはルーメン内微生物叢の状態が異なっていると考えられる（本章、第 3 節、3. を参照）ことから、MSO 還元活性が飼養条件またはルーメン内微生物叢の状態の影響を受けると考えられた。雌は繁殖用として飼育されていた可能性が高く、肥育と繁殖では飼養条件が異なっていると考えられることから、去勢雄と雌で飼養条件が異なっていることが去勢雄と雌の間に有意な差が見られた要因ではないかと考えることができる。しかし、飼養条件とは別に、去勢雄と雌のホルモンの分泌の違いが MSO 還元活性に影響を及ぼしていることも考えられた。以上の考察から、飼養条件と性別が MSO 還元活性に影響を及ぼすものと考えられる。飼養条件と性別がどの様にして MSO 還元活

性に影響を及ぼしているかについては、以下のように考えられた。

- 1) 飼養条件がルーメン内微生物叢に影響を与えてルーメンからの MSO の流下量が増加することにより、体内の MSO 濃度が増加することが影響する。
- 2) 牛が飼育されていた環境からのストレスによって、ホルモンや消化液（唾液がルーメン内微生物叢に影響しているかも知れない）などの分泌が増加することが影響する。
- 3) 牛に与えた何らかの添加剤が影響する。
- 4) 性別による飼養条件の違いが影響する。
- 5) 性別によるホルモンなどの分泌の違いが影響する。

今後、ホルモンや体内の MSO 濃度が MSO 還元活性に影響を及ぼすかどうかという点について明らかにしていく必要があると考えられる。

第4章 緬羊の成長に及ぼすメチオニンスルホキシド給与の影響

第1節 目的

緒論で述べたように、成長に及ぼすメチオニンスルホキシド(MSO)給与の影響に関する研究は、ラット²¹⁻²⁶⁾ および鶏²⁷⁻²⁹⁾ では行われているが、反芻家畜では行われていない。そこで本章では、成長中の反芻家畜に対するメチオニンスルホキシド(MSO)給与が、増体、並びに血液中のメチオニン濃度およびMSO濃度に及ぼす影響を検討することを目的とした。

第2節 材料と方法

1. 供試動物

宮崎大学付属住吉牧場で生まれた約7ヶ月齢の6頭の緬羊(コリデール種)を供試動物とした。緬羊は、試験開始2週間前に1頭ごとにパドックに入れ、体重を測定して2つの群に分けた。この時の各個体の性別、生年月日および体重を表4-2-1に示した。

2. メチオニンスルホキシドの調製

MSOは、メチオニンを過酸化水素水で酸化することにより調製した。また、牛肝臓のMSO還元活性は、L-MSOとD-MSOのいずれも還元した(第2章, 第3節, 1.(4))ので、高価なL-メチオニンの代わりにDL-メチオニンを用いることにした。DL-メチオニンはNacalai Tesque,

表 4-2-1 メチオニンスルホキシド給与試験に用いた緬羊の性別、
生年月日および試験開始前の体重

	個体No.	性別	生年月日	体重 (kg) ^a
第 1 群	1 (26) ^b	♀	1990.10.26	22.1
	2 (32)	♀	1990.11.14	27.2
	3 (27)	♂	1990.10.29	28.0
				平均 25.8
第 2 群	4 (29)	♀	1990.11. 6	23.0
	5 (31)	♀	1990.11. 9	19.1
	6 (28)	♂	1990.11. 5	34.0
				平均 25.4

^a 1991 年 5 月 7 日に測定.

^b 括弧内は宮崎大学付属住吉牧場での認識番号.

Inc. から、過酸化水素水 (30%、特級) は Santoku Chemical Industries Co., Ltd. から、カタラーゼは SIGMA から、それぞれ購入した。

まず、0.1 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.6) 500 ml に 110.7 g の DL-メチオニンを加え、スターラーで攪拌しながら、30% 過酸化水素水 100 ml をペリスタティックポンプで約 6 時間かけて徐々に加えた。この時、急激な反応を避けるため、約 4°C に保ちながら行った。メチオニンは溶解度が低いため、この濃度では溶解しないが、MSO は溶解度が高いので溶解するようになる。溶解していないメチオニンがなくなった後、この溶液を高速アミノ酸分析機 (MLC-203, ATTO) およびインテグレーター (Sic-chromatogram processor 7000B, System Instruments Corp.) で分析してメチオニンがないことを確認した。そして、残った過酸化水素水を取り除くためにカタラーゼ 0.05 g を加えて、スターラーで攪拌しながら 4°C で一晩放置した。この溶液を再び高速アミノ酸分析機で分析して、MSO 以外のアミノ酸がないことを確認し、測定された MSO 濃度から算出して、この溶液が 1 g MSO / 10 ml となるように蒸留水で希釈した。最後に、この溶液 10 ml と、pH 7.0 にするための水酸化ナトリウム溶液 (0.13 g NaOH / 500 ml) 10 ml とを容器に入れて混合した後に、封をして 4°C で保存した。

最終的な溶液 (20 ml) の内容は、DL-methionine-*d*/-sulfoxide 1 g (6.05 mmol)、 CH_3COO^- 約 0.5 mmol、 Na^+ 約 0.7 mmol、カタラーゼ約 0.5 mg であった。溶液中の MSO には L-methionine-*l*-sulfoxide、L-methionine-*d*-sulfoxide、D-methionine-*l*-sulfoxide、D-methionine-*d*-sulfoxide の 4 つの異性体が含まれていると考えられるが、その比率は確認しなかった。

3. 飼養条件

供試動物は、1頭ごとにパドックに入れ飼養管理した。飼料およびMSO溶液は、1日に1回、朝9時に与えた。水は自由摂取とした。

飼料は、宮崎大学附属住吉牧場で栽培し、調製されたイタリアンライグラスのロールサイレージおよび南宮崎農協から購入したトウモロコシ圧片を用いた。それぞれの飼料成分を表4-2-2に示した。また、飼料は、表4-2-3に示した量を給与量した。しかし、給与試験を行っている間の飼料の喰い込みが悪かったために、実際に採食した量はこの表の数値よりも少なかった。したがって、実質的には自由採食となった。また、表4-2-3に示した給与量では、NRC(1985)の飼養標準⁹⁷⁾と比較すると、粗タンパク質量が少なくなっている。試験開始前の飼養条件では、この粗タンパク質量が不足している分だけ尿素を与える予定であった。しかし、飼料の摂取量が少ないために相対的に尿素摂取量が増えてアンモニア中毒を起こす危険性があるため(飼料の乾物重量当たりで1%程度与えるのがよい⁹⁸⁾とされている)尿素は与えなかった。また、トウモロコシ圧片は、給与量を全部食べる日もあったので、完全な自由採食とはならなかった。採食の状況については次節(本章、第3節、1.)で述べる。

4. メチオニンスルホキシド給与量および給与方法

MSOの給与量は、それをすべて還元した時にメチオニンの要求量を満たす量になるように給与した。メチオニンの要求量は、BUTTERY and FOULDS(1985)⁹¹⁾の緬羊のメチオニン要求量を参考にした。これによると、成長している緬羊のメチオニンの要求量は、 $0.063 \sim 0.198 \text{ g/kg}^{0.75}/\text{day}$ なので、 $0.2 \text{ g/kg}^{0.75}/\text{day}$ を与えれば要求量を満たすのに十分であると考えられた。

表 4-2-2 メチオニンスルホキシド給与試験に用いた
飼料の成分

	DM	TDN	CP (%)
イタリアンライグラス ^a	26.5	19.2	4.1
トウモロコシ圧片 ^b	90.0	83.1	9.2

^a 日本標準飼料成分表 (1987) ¹⁰²⁾ より.

^b 5% の魚粉を含有.

表 4-2-3 メチオニンスルホキシド給与試験の飼料の給与量

生体重 (kg)		20	30	40
給与量 (g/day)	イタリアンライグラス ^a	2000	2500	2800
	とうもろこし ^a	500	600	700
飼養標準 ^b	TDN	800	1000	1160
	CP	167	191	202
	DM	1000	1300	1500
飼養標準に対する給与飼料の割合 (%)				
	TDN	100	98	97
	CP	77	82	89
	DM	98	93	91

^a 給与しても食べなかった分があるため実際の採食量はこれよりも少なかった.

^b NRC 飼養標準 (1985) ⁹⁷⁾ の TABLE 1: Early weaned lambs - Moderate growth potential より.

この値を用いて、次式からメチオニン要求量を算出した。

$$0.2 (\text{要求量}) \times 10 (\text{体重})^{0.75} \doteq 1.12 \text{ g/day}$$

この数値よりもやや少なめの 1 g/day の MSO を給与することにした。これは、メチオニンに換算すると 0.903 g/day に相当する。MSO の給与量をメチオニン要求量よりも少なめに設定した理由は、SALSURY AND MERRICKS (1972)⁹⁹⁾ が、ルーメン内で MSO からメタンチオールが生成されたことを報告しているためである。

MSO の給与は、ルーメンでの作用を受けずに小腸へ流下するように、MSO 溶液を哺乳瓶を用いて給与した。(哺乳瓶で与えると食道溝反射によってルーメンを通らずに食道溝経由で下部消化管へ流下する^{4f)}) ただし、普通の哺乳瓶ではうまく給与できなかつたため、差し口が金属製の油差しを改良した用具を用いて給与した。MSO 自体がやや甘味を呈することもあり、緬羊の嗜好性は良く、給与は比較的楽に行えた。

5. 給与試験の内容

給与試験は、1 週間 (1991 年 5 月 14 日～5 月 20 日) の予備飼育期間の後に、前期試験を 6 週間 (5 月 21 日～7 月 1 日) 行った後、再び予備飼育期間を 1 週間 (7 月 2 日～7 月 8 日) 設け、続いて後期試験を 6 週間 (7 月 9 日～8 月 19 日) 行った。前期試験は第 1 群を試験区、第 2 群を対照区とし、後期試験は反転して第 1 群を対照区、第 2 群を試験区とした。

体重は、1 週間おきに飼料を与える前に測定した。血液は、前期と後期それ

その、開始日、開始 2 週間後および最終日に、それぞれ、MSO 給与直前と給与 1 時間後の計 12 回採取した。以上の給与試験の日程は、図 4-2-1 に示した。

1991 年	日	月	火	水	木	金	土	
5 月	5	6	7	8	9	10	11	
								↑ 綿羊をパドックに移す
	12	13	14	15	16	17	18	
								↑ 飼養管理開始
	19	20	<u>21</u>	22	23	24	25	
								↑ MSO 給与 (前期) 開始
6 月	26	27	<u>28</u>	29	30	31	1	
	2	3	<u>4</u>	5	6	7	8	
	9	10	<u>11</u>	12	13	14	15	
	16	17	<u>18</u>	19	20	21	22	
	23	24	<u>25</u>	26	27	28	29	
7 月	30	<u>1</u>	2	3	4	5	6	
								↑ 前期終了
	7	8	<u>9</u>	10	11	12	13	
								↑ MSO 給与 (後期) 開始
	14	15	<u>16</u>	17	18	19	20	
	21	22	<u>23</u>	24	25	26	27	
8 月	28	29	30	31	<u>1</u>	2	3	斜体のところで採血
	4	5	<u>6</u>	7	8	9	10	下線のところで体重測定
	11	12	<u>13</u>	14	15	16	17	
	18	19	<u>20</u>	21	22			
								↑ 後期終了

図 4-2-1 給与試験の日程

6. 採血、血液の処理および分析

血液は、ヘパリンを入れた真空採血管を用いて、緬羊の頸静脈から約 5 ml を採取した。採取した血液から 0.8 ml を取り、0.6 ml の 7% スルホサリチル酸溶液を加え、全血用の試料とした。また、残りの血液を遠心分離 (900×g, 室温, 20 分) し、その上清から 0.8 ml を取り、0.6 ml の 7% スルホサリチル酸溶液を加え、血漿用の試料とした。それぞれの試料は、よく攪拌した後に 4°C に冷やして研究室に持ち帰った。これらの試料を、再び遠心分離 (15, 000×g, 室温, 10 分) した上清のメチオニンおよび MSO の濃度を、高速アミノ酸分析機で分析した。

第3節 結果

1. 採食量

前節 (本章, 第2節, 4.) で述べたように、緬羊の飼料の喰い込みが悪かったために、MSO 給与試験の飼養条件は自由採食となった。ただし、濃厚飼料については、給与量のすべてを摂取することもあったので、表 4-2-3 にしたがった上限を設けた自由採食となった。

図 4-3-1 および図 4-3-2 は、給与試験前期および後期の、粗飼料および濃厚飼料の採食量をグラフにしたものである。この図から、採食量が一定せず、特に粗飼料は多くても 800 g しか食べていないことが分かる。ただし、最後の約 2 週間はやや安定する傾向がみられた。また、図 4-3-3 は、給与試験中の粗飼料および濃厚飼料の採食量を 1 週間ごとに平均したグラフである。このグラフから、いずれの個体も試験が進むにつれて採食量が増加していること

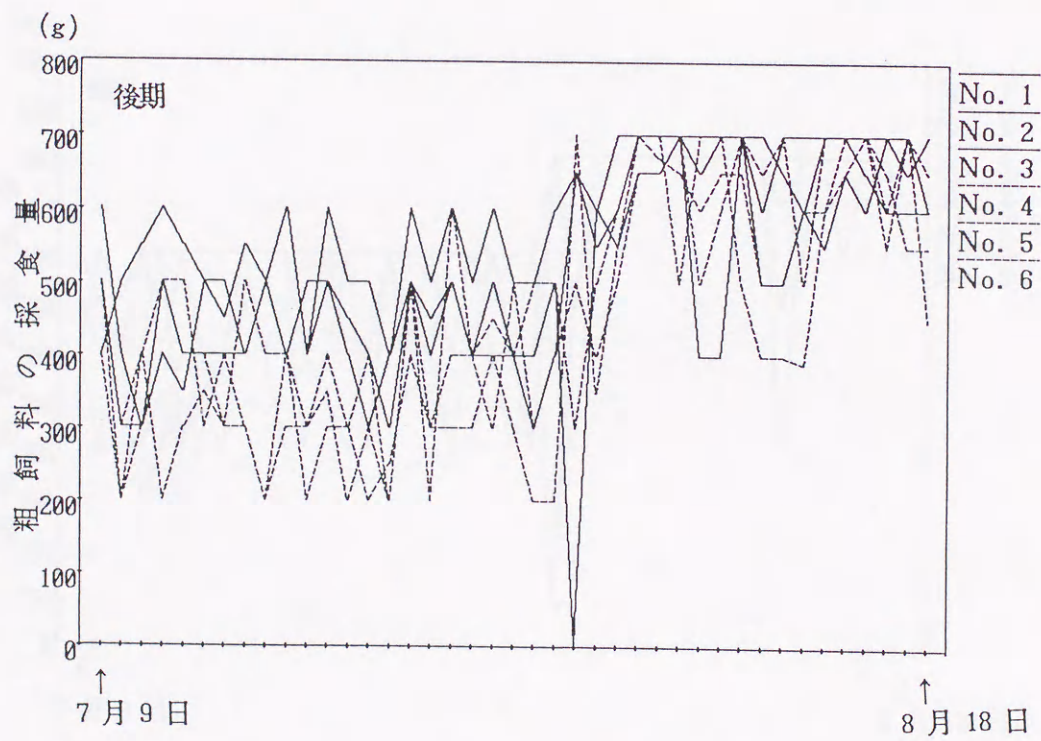
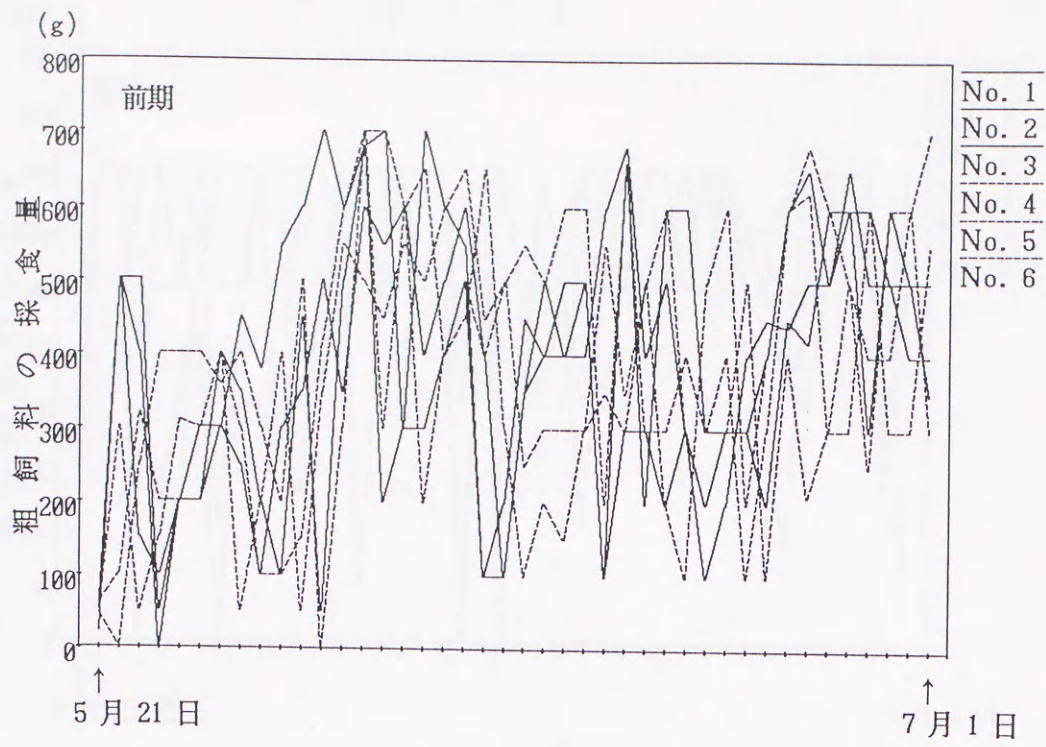


図 4-3-1 給与試験中の粗飼料の採食量

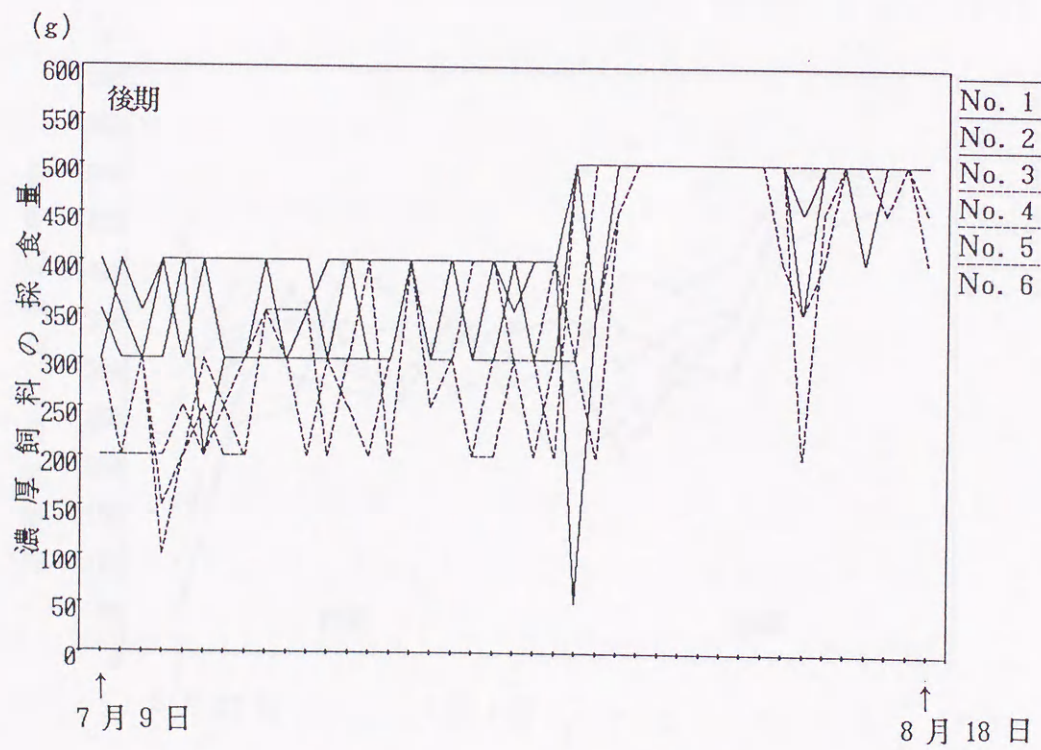
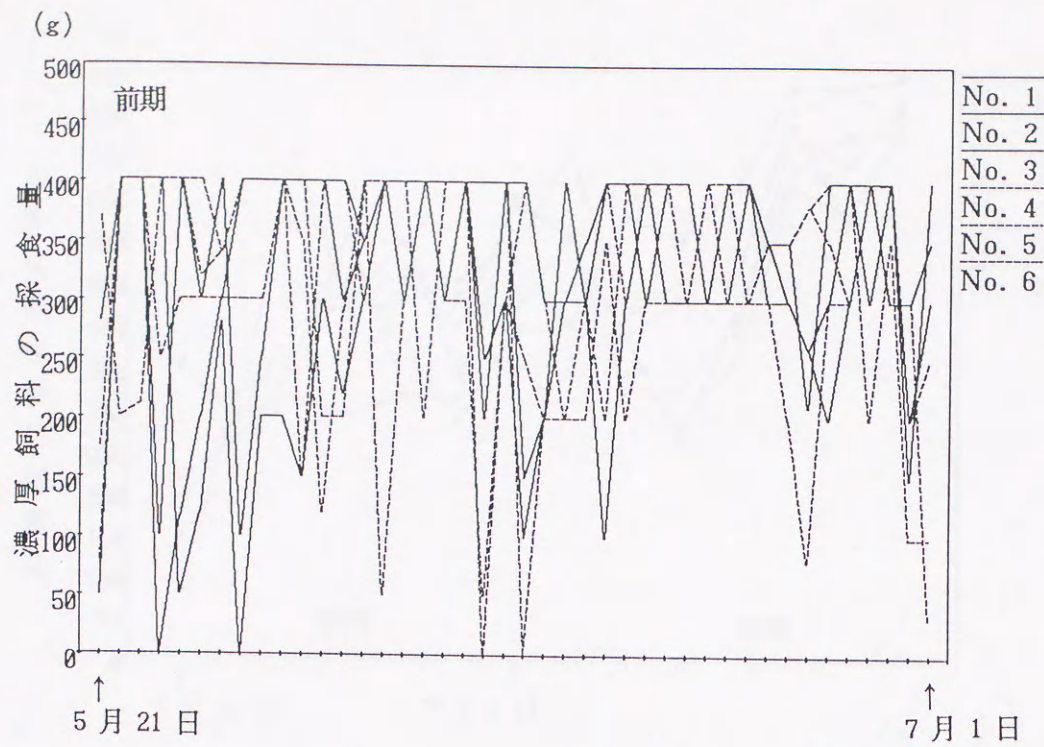


図 4-3-2 給与試験中の濃厚飼料の採食量

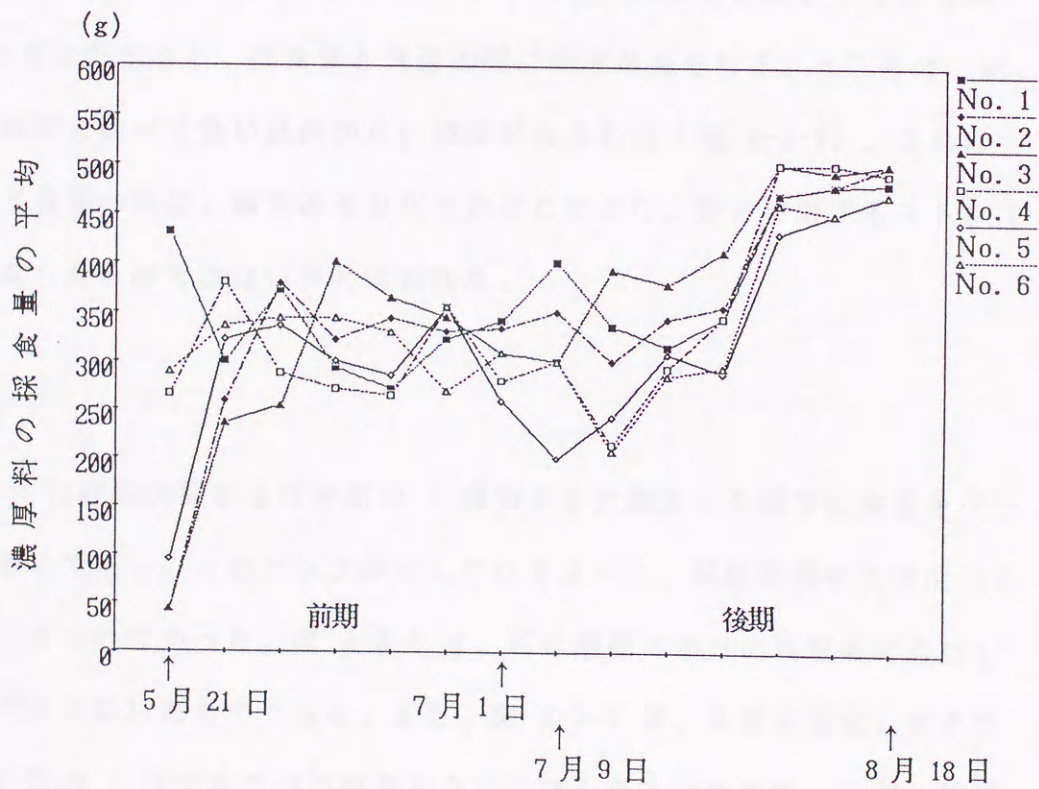
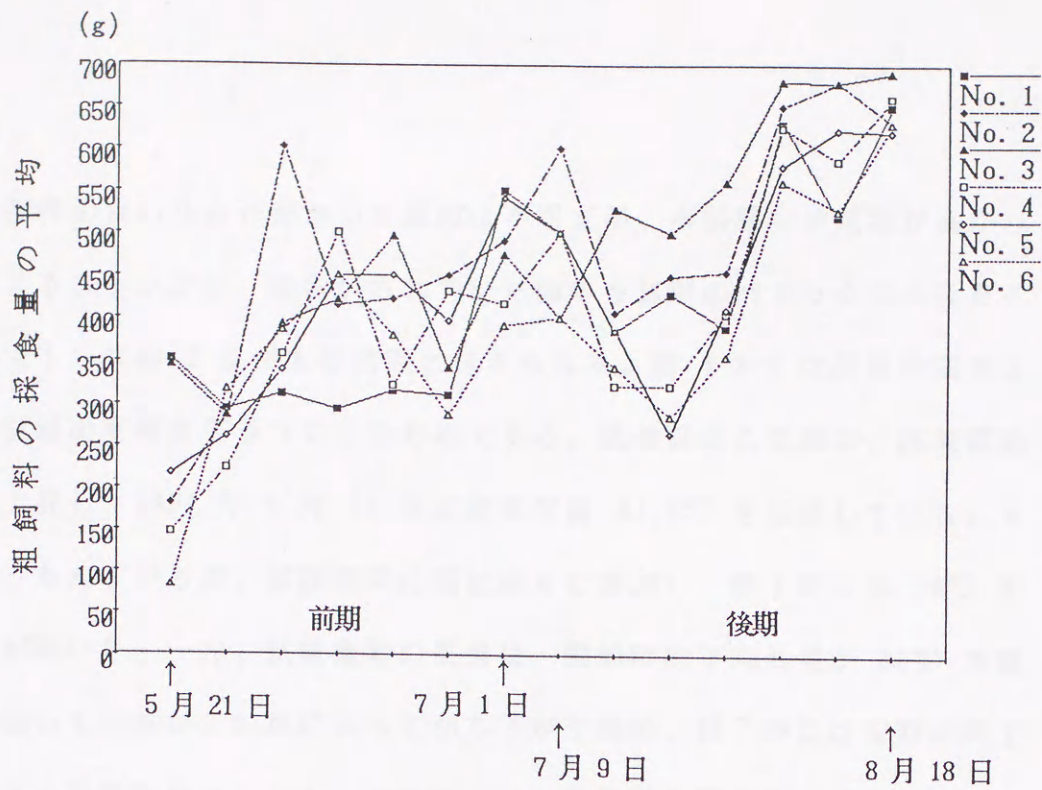


図 4-3-3 給与試験中の粗飼料および濃厚飼料の 1 週間ごとに平均した採食量

がわかる。

綿羊の飼料の食い込みが悪かった原因は不明だが、本試験中の気温が高かったことによるストレスと、群飼いされていた綿羊を個別のパドックに入れたことによるストレスの 2 点が主な原因と考えられる。図 4-3-4 は試験前期および後期の気温の変動をグラフにしたものである。試験前期の気温は、試験開始とともに上昇し、1991 年 5 月 26 日に最高気温 33.3℃ を記録している。それからいったん下がるが、試験期間の間に徐々に増加し、終了前には 30℃ を越える日が続いた。一方、試験後期の気温は、開始時は平均気温が 30℃ を越える日が続いているが、8 月に入ってから下がり始め、終了時には前期の終了時よりも低い気温になっている。このグラフと粗飼料の採食量のグラフ（図 4-3-1）とを比較すると、採食量と気温の間に関連が見られる。ところで、試験後期は前期に比べて食い込みが良い傾向がみられる（図 4-3-3）。これは、試験前期と後期の間、綿羊の毛を刈ったことにより、暑さに対するストレスが少なくなったためではないかと思われた。

2. 増体

図 4-3-5 は試験前期および後期の 1 週間おきに測定した綿羊の体重をグラフにしたものである。このグラフが示しているように、試験期間中に体重の大きな変動はみられなかった。図 4-3-6 は、各試験期の初日の体重を起点にした増体をグラフにしたものである。また、図 4-3-7 は、体重を測定したそれぞれの週の間、1 日当たりの増体量をグラフにしたものである。まず、前期について見ると、個体 No. 1 と個体 No. 5 の体重がほとんど増加していないことがわかる（図 4-3-6）。また、他の個体も 1991 年 5 月 28 日以降はほとんど増加していないことがわかる（図 4-3-7）。しかし、全体的には、

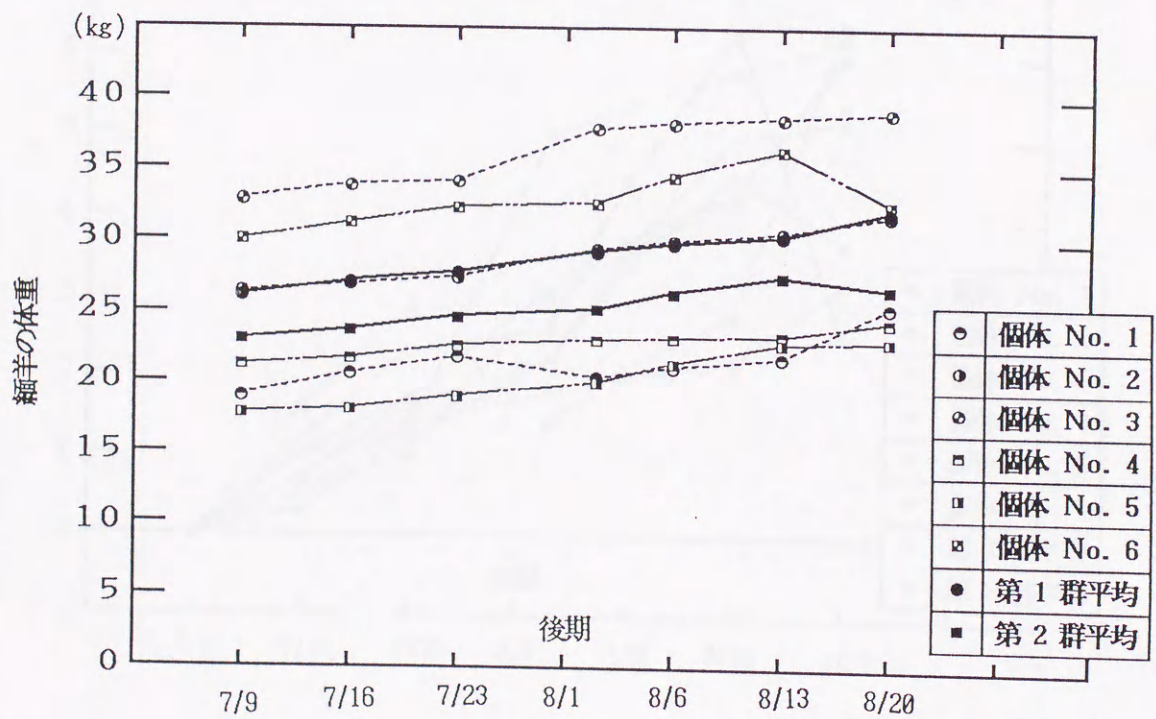
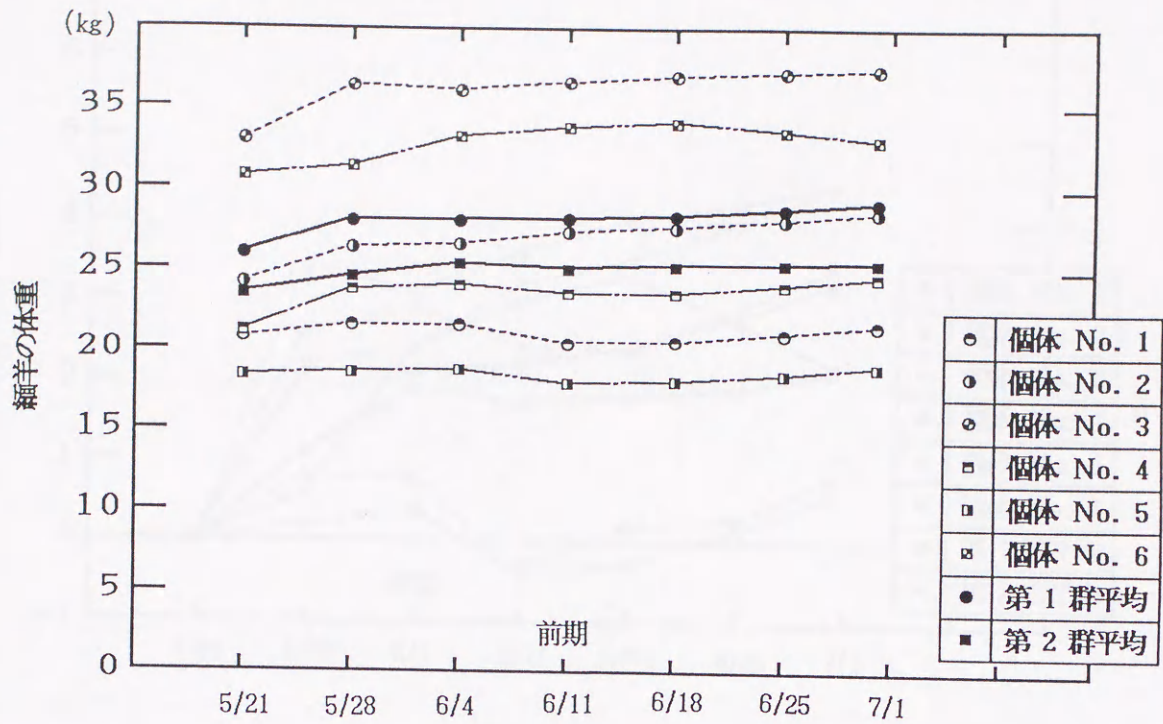


図 4-3-5 緬羊の体重

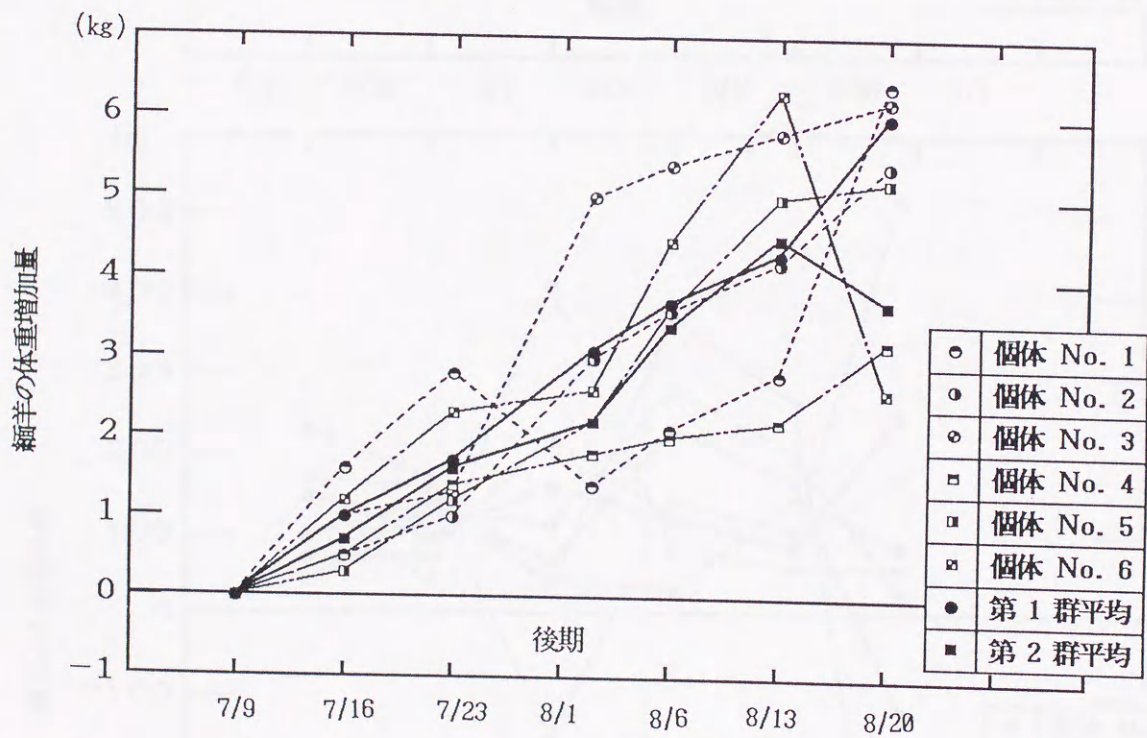
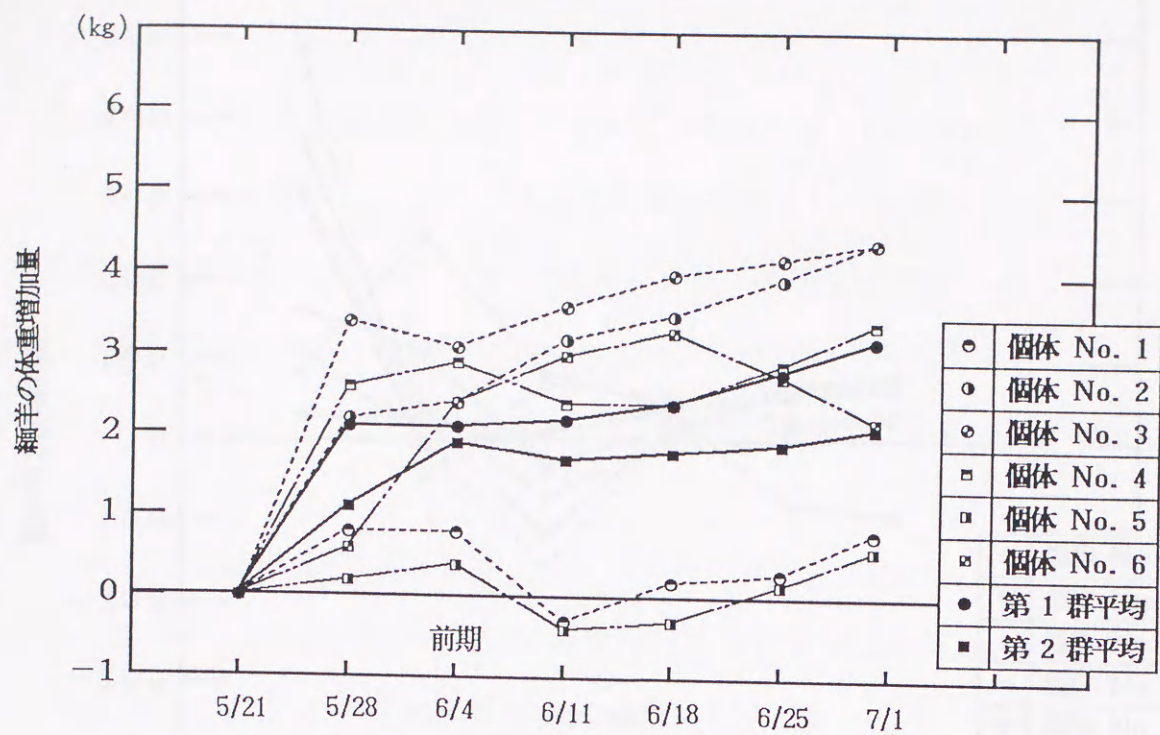


図 4-3-6 綿羊の体重の増加量

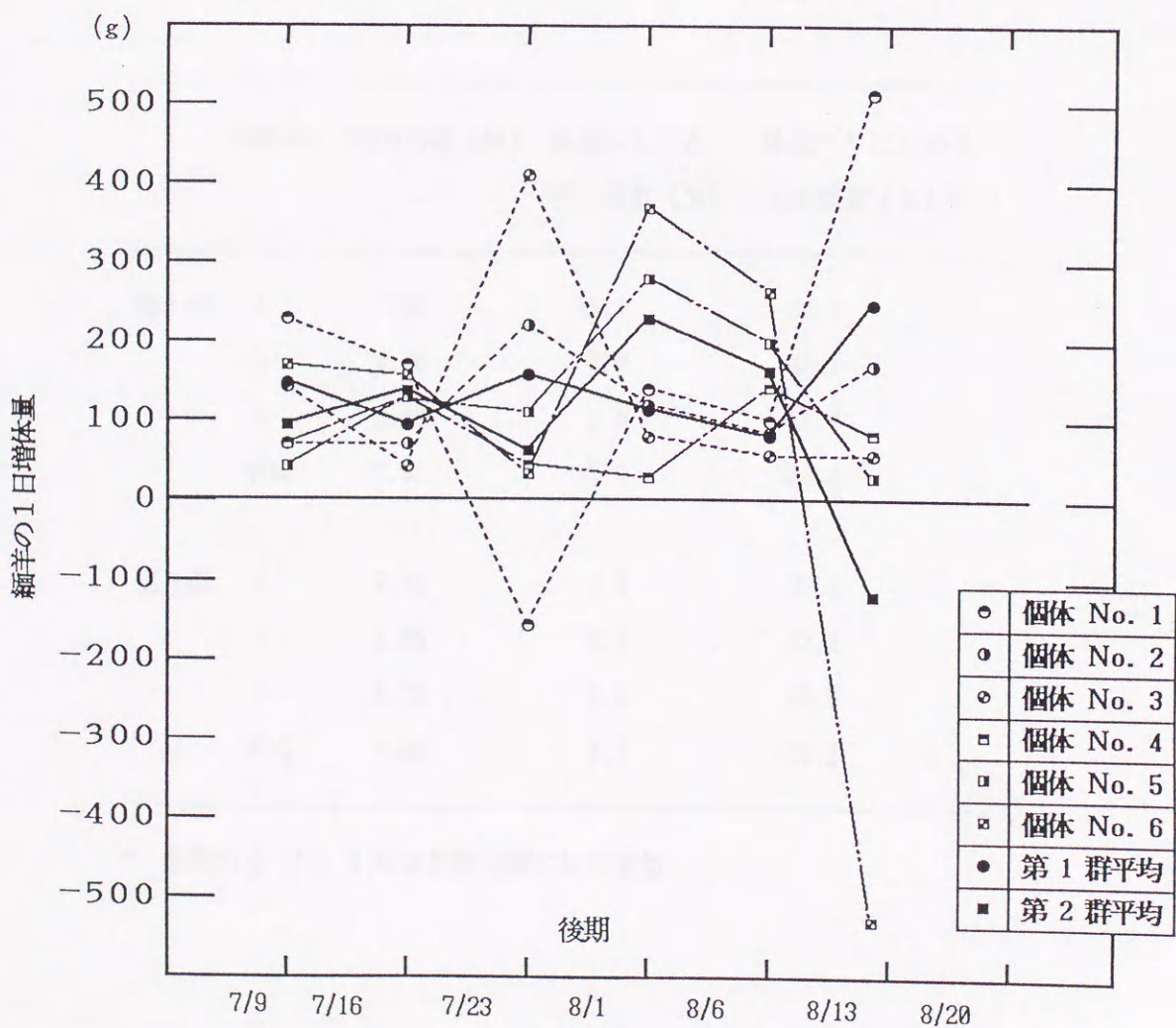
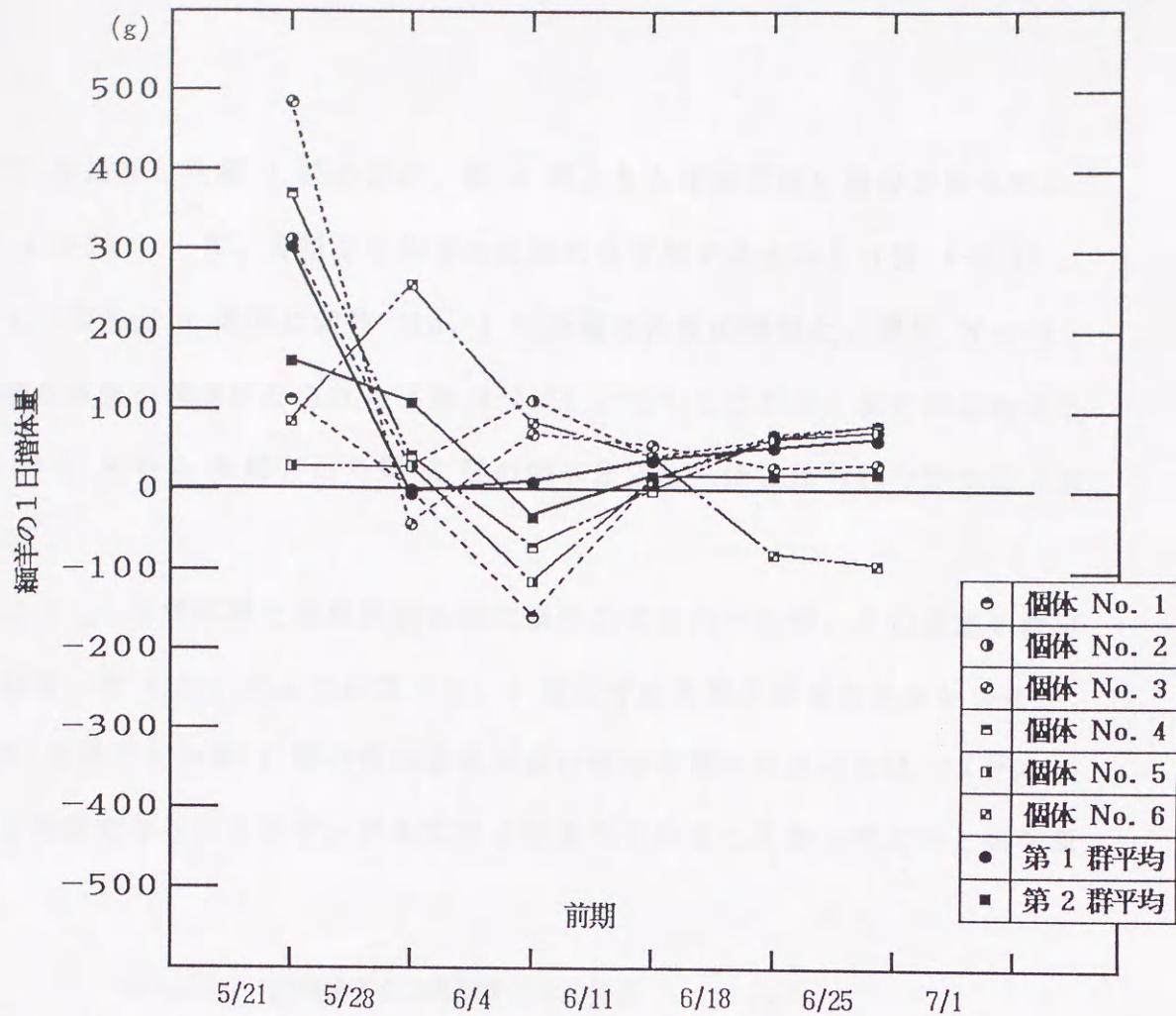


図 4-3-7 緬羊の1日当たりの増体

MSO を給与した第 1 群の方が、第 2 群よりも増体が高い傾向がみられた (図 4-3-6)。一方、後期では体重の直線的な増加が見られた (図 4-3-6)。しかし、最後の 1 週間に個体 No. 1 に極端な体重の増加と、個体 No. 6 に極端な体重の減少がみられた (図 4-3-7)。しかしながら、全体的にみると、第 1 群と MSO を給与した第 2 群の間に目立った差は見られなかった (図 4-3-6)。

ところで、前期試験と後期試験の間に緬羊の毛を刈ったが、その重量を測定した結果、表 4-3-1 のようになった。t 検定では有意差が見られなかったが、MSO を給与した第 1 群の毛の重量が重い傾向が見られたことは、メチオニンから合成できるシステチンが毛に多く含まれていることから考えると興味深い。

表 4-3-1 前期終了後の各緬羊の毛の重量

		個体No. 毛の重量 (kg)	体重にしめる 毛の重量 (%)	体重 ^{2/3} にしめる 毛の重量 (%) ^a
第1群	1	2.65	12.3	34.2
	2	2.35	8.2	25.1
	3	3.55	9.5	31.7
	平均	2.85	10.0	30.4
第2群	4	2.35	9.6	27.8
	5	1.65	8.7	23.2
	6	3.15	9.5	30.6
	平均	2.38	9.3	27.2

^a 体重の 3 分の 2 乗は体表面積に比例する。

3. 血液中のメチオニンおよびメチオニンスルホキシドの濃度

濃度の測定に高速アミノ酸分析機を用いたが、全血では、MSO と分離できない物質があったために MSO 濃度を測定できなかった。また、血漿でも 1 回目 (5 月 21 日) の採血で得た試料の MSO 濃度は、分析条件が整っていなかったために測定できなかった。そのため、MSO については、血漿の 2 回目以降の試料のみについて検討した。図 4-3-8 は全血のメチオニン濃度、図 4-3-9 は血漿のメチオニン濃度、図 4-3-10 は血漿の MSO 濃度をグラフにしたものである。全体的に、MSO 給与区と対照区との間には大きな差は見られなかった。しかし、平均値に注目すると、メチオニンと MSO のいずれでも、前期では第 1 群 (前期の MSO 給与区) の、後期では第 2 群 (後期の MSO 給与区) の濃度が高くなる傾向が見られた。また、前期と後期のいずれでも試験開始時 (5 月 21 日, 7 月 9 日) および試験の中間 (6 月 11 日, 8 月 1 日) は MSO 給与区が高くなっているが、試験終了時 (7 月 1 日, 8 月 20 日) は対照区の方が高くなった。

次に、MSO 給与前と MSO 給与後のメチオニン濃度および MSO 濃度の差をグラフにした結果、それぞれ図 4-3-11 および図 4-3-12 のようになった。この図から、MSO 給与前と MSO 給与後のメチオニン濃度には特に目立った変動はないと考えられた。しかし、MSO 濃度については、前期では第 1 群 (前期の MSO 給与区) の、後期では第 2 群 (後期の MSO 給与区) の MSO 濃度の増加量が多くなる傾向が見られた。

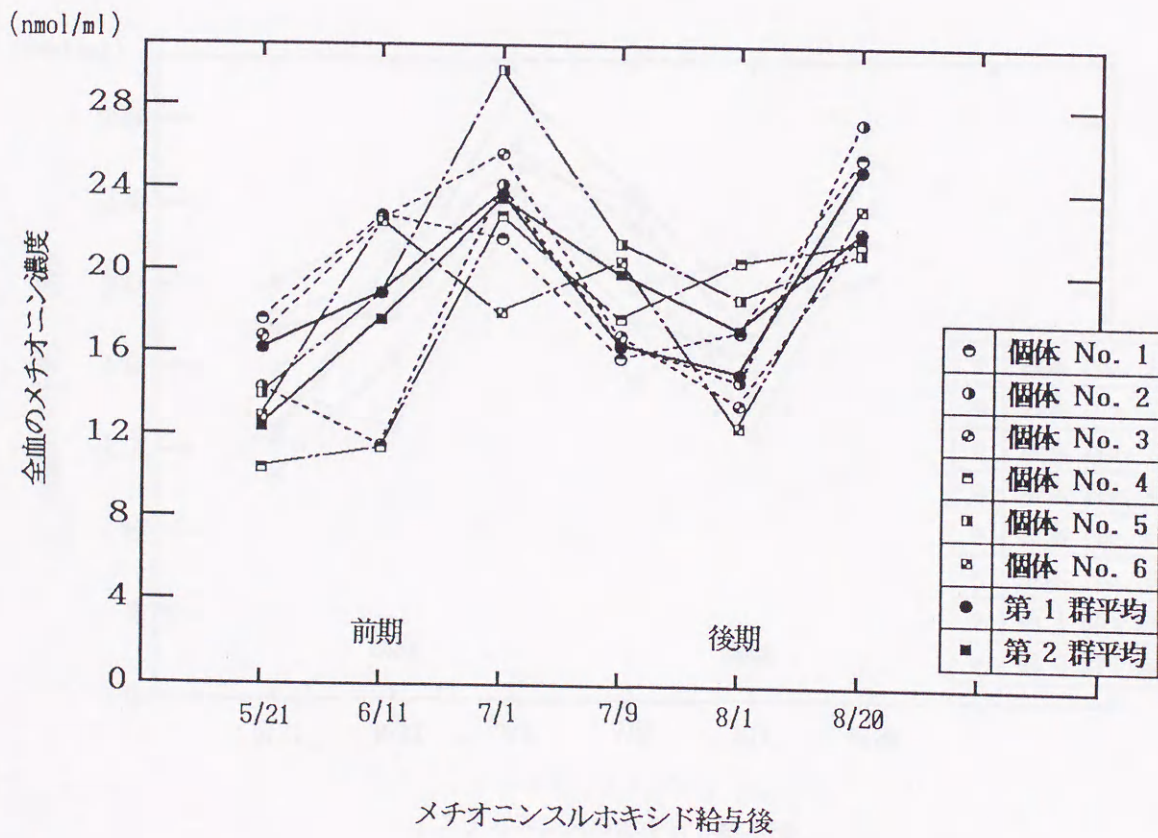
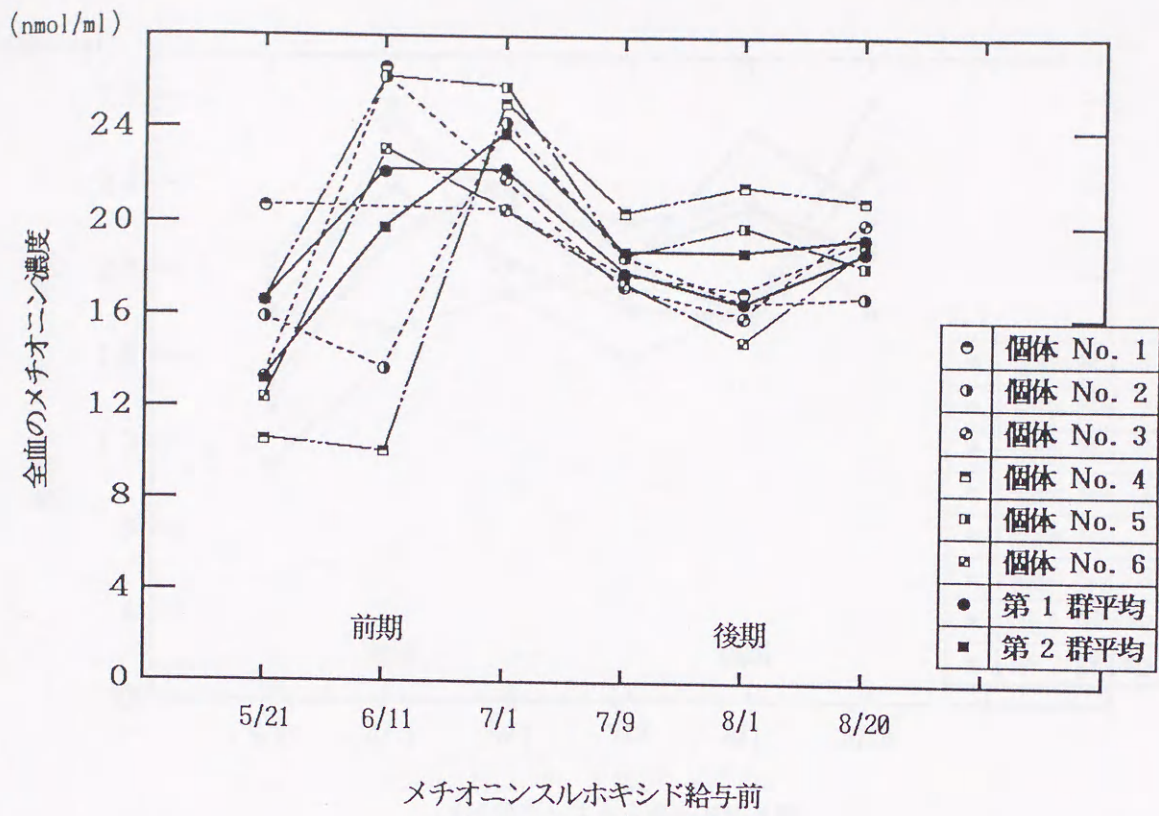


図 4-3-8 メチオニンスルホキシド給与の前および 1 時間後の全血のメチオニン濃度

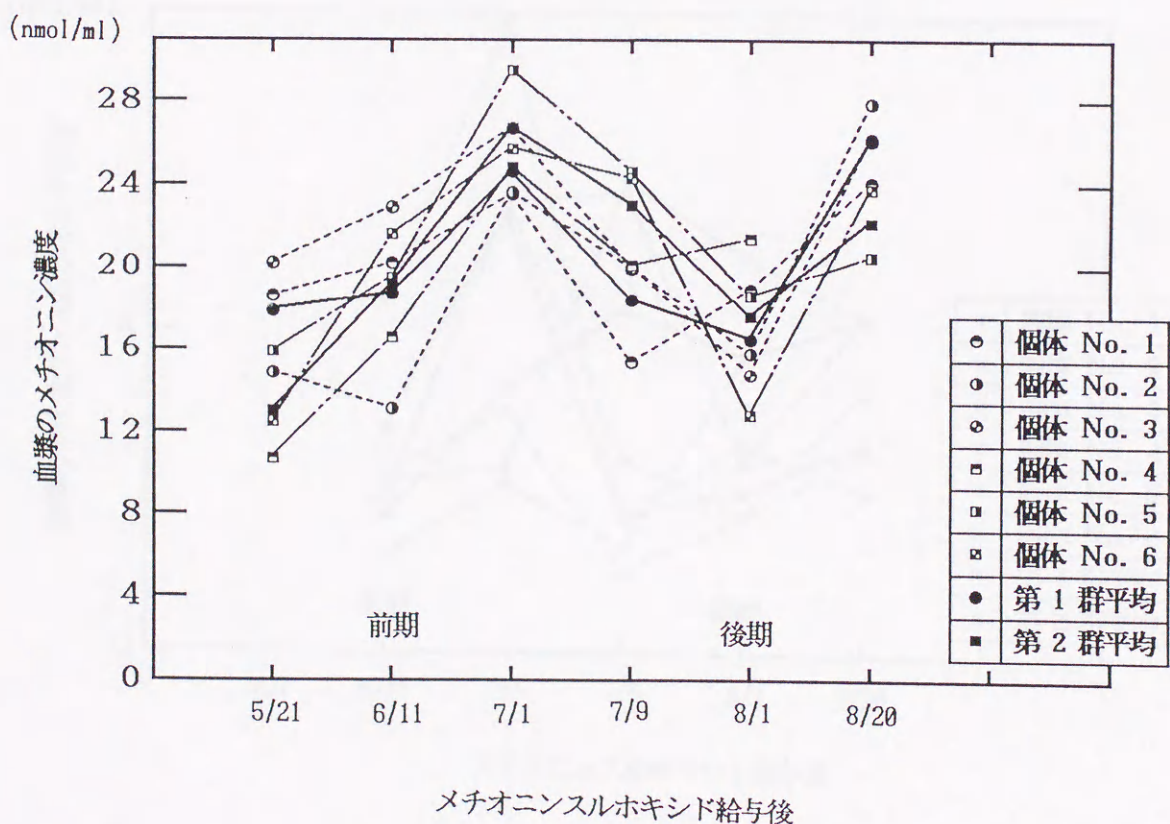
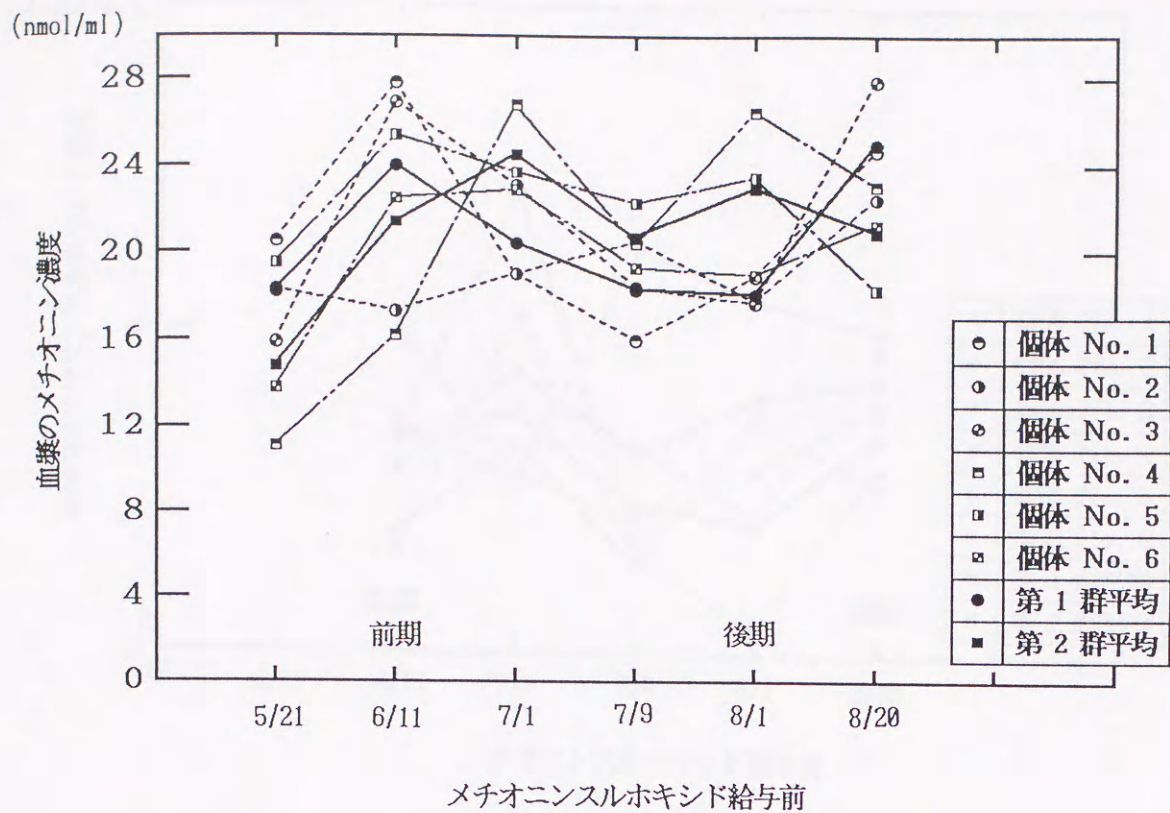


図 4-3-9 メチオニンスルホキシド給与の前および 1 時間後の血漿のメチオニン濃度

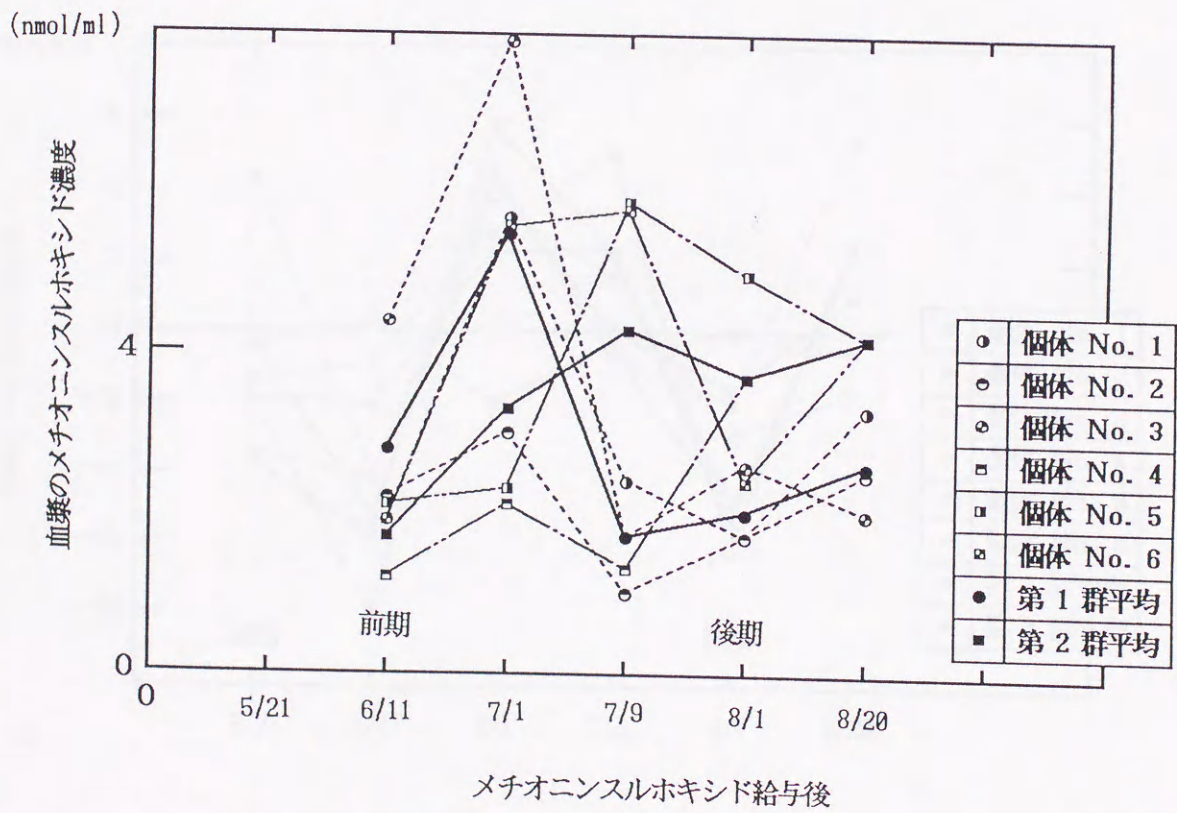
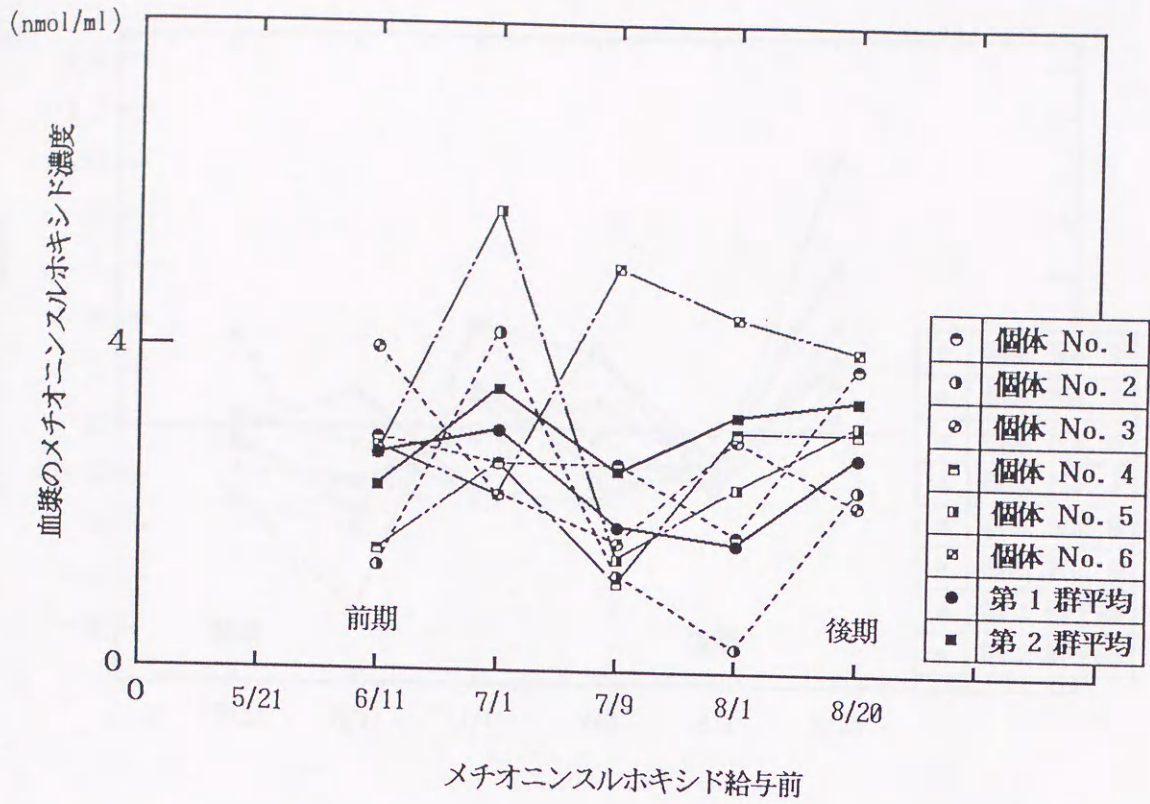


図 4-3-10 メチオニンスルホキシド給与前および 1 時間後の
血漿のメチオニンスルホキシド濃度

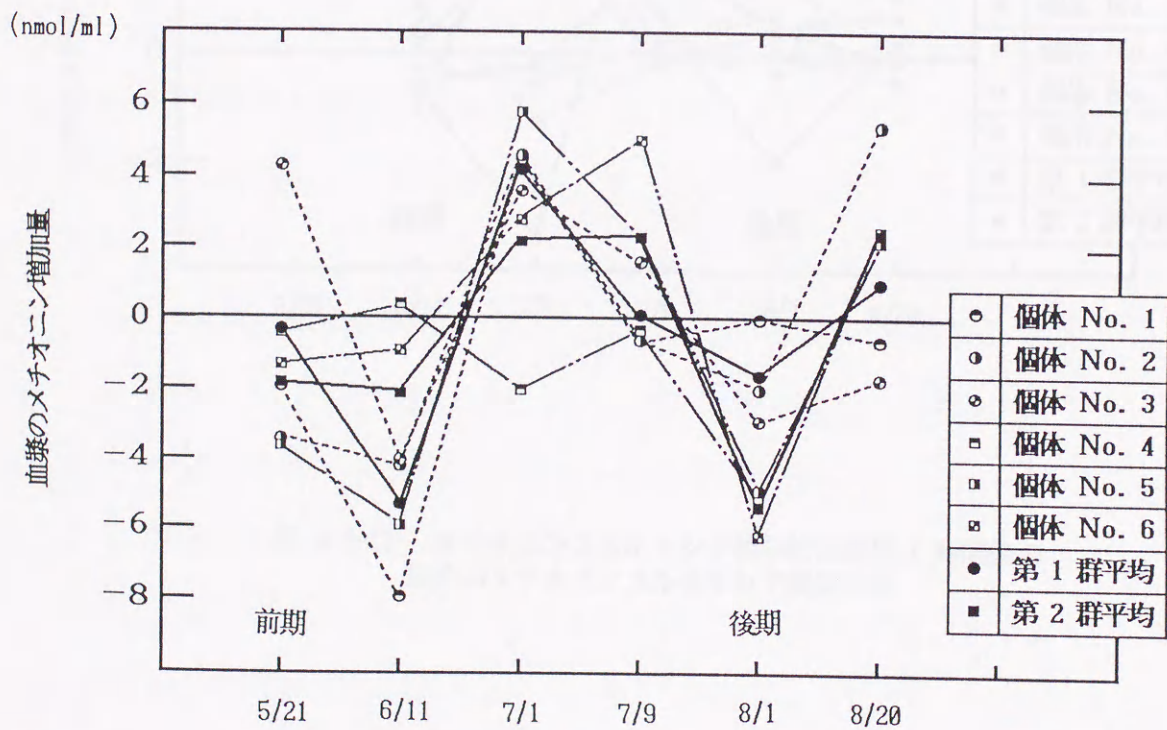
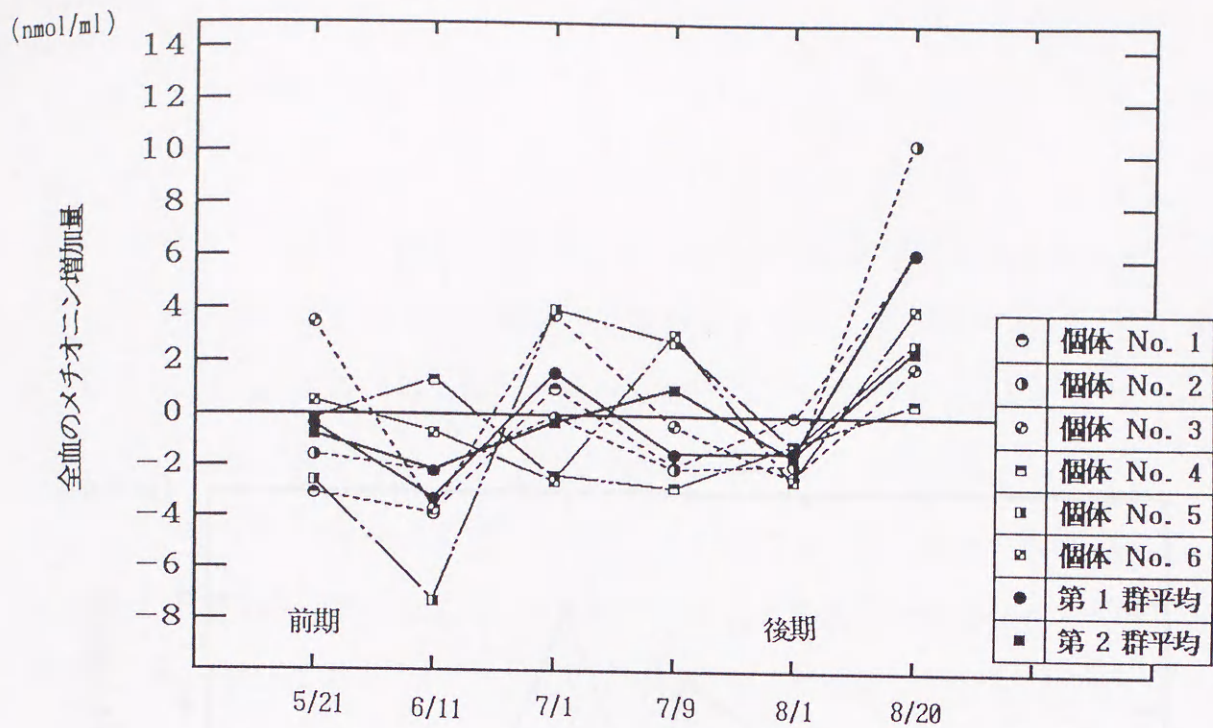


図 4-3-11 メチオニンスルホキシド給与前と給与 1 時間後の全血および血漿のメチオニン濃度の差

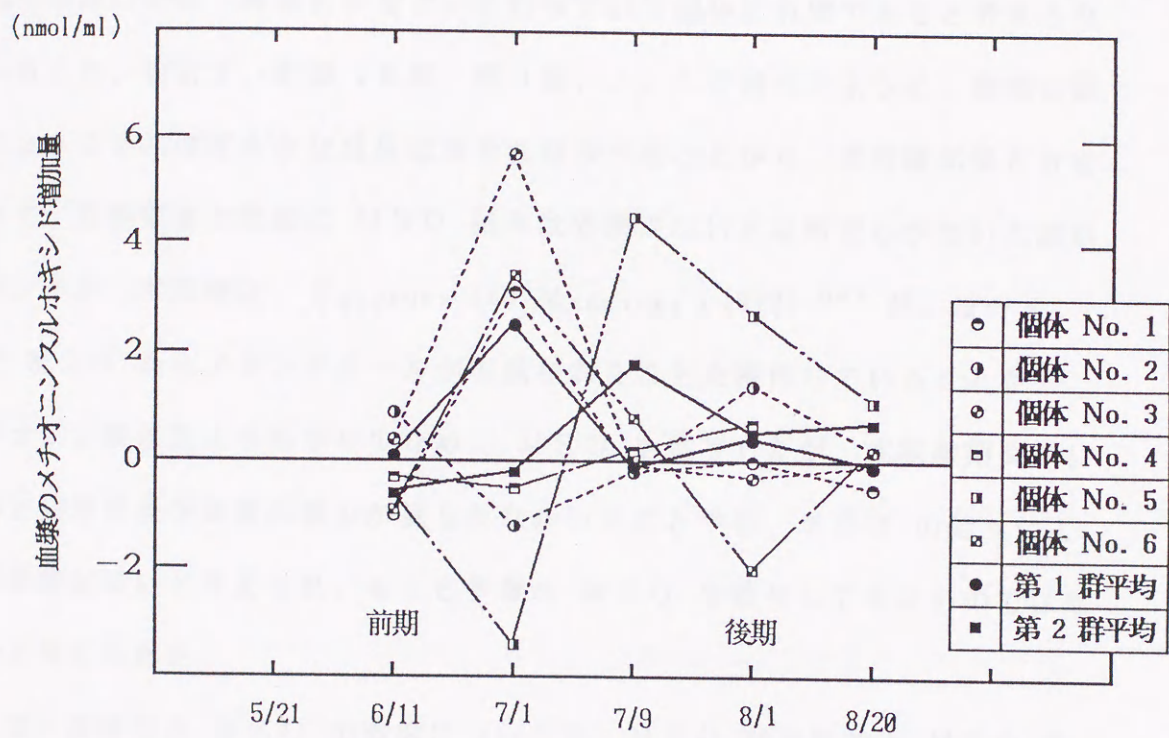


図 4-3-12 メチオニンスルホキシド給与前と給与 1 時間後の
血漿のメチオニンスルホキシド濃度の差

第4節 考察

まず、増体については、MSO 給与区に特に立った増加は見られなかった。したがって本試験では、緬羊の成長に対するMSO 給与の効果はなかったと思われる。しかし、緒論（第1章）で述べたように、反芻家畜へのメチオニンの給与は高い生産（高泌乳牛など）を行っている個体に有効であると考えられていること、および、前節（本章，第3節，1.）で述べたように、環境の影響によってそれほど大きな成長は見られなかったことから、本実験結果だけをもって、反芻家畜の生産に MSO 給与は効果がないとは断定しがたいと思われた。また、本実験は、SALSURY and MERRICKS (1972)⁹⁹⁾ が、ルーメン内で MSO からメタンチオールが生成されたことを報告していることから、メチオニン要求量よりもやや少なめに MSO を給与したが、本試験期間中に緬羊に異常および体重の減少が見られなかったことから、MSO の給与による悪影響はないと考えられ、もっと多量の MSO を給与してもよいのではないかと考えられた。

次に、血液中の MSO の濃度については、MSO 給与区でも MSO 給与前と1時間後の MSO 濃度の間にそれほど大きな差は見られなかった。Cook ら¹⁸⁾ が山羊のルーメンにメチオニンを投与した実験では、メチオニンを投与後2時間から3時間にかけて頸静脈中の MSO 濃度の増加が見られたとしている。本実験では、MSO の水溶液を哺乳瓶で給与することによりルーメンを経由せずに直接下部消化管へ MSO が流下しているはずであるから、給与後1時間後には血液中の MSO の濃度が上昇すると予測された。しかし、MSO 給与区の血液中の MSO 濃度にはほとんど増加が見られなかった。この原因としては以下のことが考えられた。

- 1) 食道溝反射が起こらずに M S O 溶液がルーメンに流れ込んだために M S O の下部消化管への流下が遅れた。
- 2) 小腸に十分な M S O 吸収能力があると考えられているラットとは異なって、緬羊の小腸での M S O 吸収能力が低いために M S O の吸収が遅い。
- 3) 吸収された M S O が直ちに処理 (メチオニンへの還元など) または蓄積 (ラット²³⁾ や鶏²⁹⁾ では筋肉中に遊離の状態に蓄積される) され、給与後 1 時間後には血液中濃度が下がっている。

反芻家畜に M S O を給与した報告は見当たらないため、M S O を給与した時の血液中の M S O 濃度がどのように変化するかという点については分かっていない。今後、反芻家畜に M S O を給与した時の血液中の M S O 濃度の経時的变化についての検討が必要ではないかと考えられた。

最後に、血液中のメチオニンおよび M S O の濃度については、M S O 給与区は対照区よりも高い傾向が見られた。このことから、M S O は吸収され、メチオニンに還元されていると考えられた。しかし、試験終了時 (7 月 1 日、8 月 20 日) は、前期と後期の両方で対照区の方が高くなった。このことから、ある一定の期間、M S O を給与し続けると、血液中のメチオニンおよび M S O の濃度が低下することを意味しているのではないかと考えられる。この原因は、M S O を給与し続けると M S O の吸収が悪くなるとも考えられるが、逆に、M S O を給与し続けると M S O の還元能力が高まると同時に、体内のメチオニン濃度が高まったためにタンパク質の合成が促進されたために血液中のアミノ酸濃度が減少したとも考えられる。もし、後者が原因であるとすれば、本実験よりもさらに長期にわたって M S O を給与すれば、生産に対して効果が見られるかもしれないことが考えられた。

反芻動物へのMSOの給与の効果については、より生産性の高い個体を用いて、高い生産を行える環境で、より長期にわたる実験が必要であると考えられる。また、このことは、MSOだけでなく他のメチオニンの前駆体や脂質などでルーメンでの分解から保護したメチオニン(PMET)、さらには他のアミノ酸などの反芻動物への給与についても同様のことが言えるのではないかと考えられた。

第5章 メチオニンスルホキシド還元機構の解明

第1節 目的

メチオニンスルホキシド (MSO) に関するいくつかの報告^{34, 39-43, 57, 58, 88)} から、MSO レダクターゼは生物界に広く分布していると考えられる。しかしながら、粗酵素レベルでの MSO 還元活性や、栄養素としての MSO の利用に関する研究はいくつかなされているが、MSO 還元系を酵素レベルで調査した報告は少ない。緒論でも述べたように、methionine-S-oxide reductase (MSO レダクターゼ) の精製は酵母⁴¹⁾ および大腸菌⁴³⁾ では行われているが、高等動物では行われていない。

ところで、生体内の還元反応のいくつかにチオレドキシニン系 (チオレドキシニン、チオレドキシニンレダクターゼ、NADPH) が関与していることが示されている^{44, 45, 53-56)}。緒論でも述べたが、チオレドキシニンは、リボヌクレオチドレダクターゼがリボヌクレオチドニリン酸をデオキシリボヌクレオチドニリン酸に還元する時の直接の電子供与体として、L AURENT ら (1964)⁴⁵⁾ が大腸菌から発見した分子量 10,000~13,000 の電子伝達タンパク質である。先に述べた酵母⁴¹⁾ から精製された MSO レダクターゼにも、チオレドキシニン系が関与していることが示されている⁴⁴⁾。

本章では、牛の肝臓の MSO レダクターゼを精製し、その性質およびチオレドキシニン系との関係を明らかにすることを目的とした。

第2節 材料および活性の測定法

1. 材料

牛の肝臓は、宮崎県食肉衛生検査所高崎支部で屠殺された牛（黒毛和種、雄去勢、3才）から得た。採取した肝臓は、氷冷して約1時間で研究室内に運び入れた。

Sephadex G-100 は生化学工業（株）から、Butyl-Toyopearl 650S と DEAE-Toyopearl 650M は東ソー（株）から、CM-cellulofine A-500 M は生化学工業（株）から、Hydroxylapatite は Bio-Rad Laboratories, USA から、Ultrafree-20 は日本ミリポア・リミテッドから、NADPH は（株）興人から、ジチオトレイトール（DTT）、2-メルカプトエタノール（2-ME）、牛血清アルブミン（F-V）（BSA）、グアニジン酸、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（二水和物，特級）（EDTA）、dihydrate 5,5'-dithiobis（DTNB）はナカライテスク（株）から、インシュリン（牛血清）は和光純薬工業（株）から、L-メチオニン-dl-スルホキシド（MSO）はSIGMA, USA からそれぞれ購入した。

2. メチオニンスルホキシドレダクターゼ活性の測定法

MSO 還元活性を測定する試料 0.2 ml に基質液（MSO 2 mM、DTT 1 mM、10 mM リン酸緩衝液 pH7.0）を 0.2 ml を加え、恒温槽で3時間インキュベートした。インキュベーション終了後、冷却した10% スルホサリチル酸溶液を 0.2 ml 加え、攪拌して酵素反応を止めた。冷暗所で3時間以上静置してタンパク質を凝固させた後、遠心分離（ $27,000 \times g$, 4°C , 30分）し、その上清液中のメチオニン濃度を高速アミノ酸分析装置（MLC-203,

ATTO) およびインテグレーター (Sic-chromatogram processor 7000B, System Instruments Corp.) で分析定量した。MSO レダクターゼ活性は、3 時間で生成されたメチオニン量を単位反応液量もしくはそれをタンパク質量あたりに換算して示した。タンパク質量の測定法は本節, 4. で述べる。

3. チオレドキシン活性およびチオレドキシンレダクターゼ活性の測定法

チオレドキシンの活性およびチオレドキシンレダクターゼの活性は、HOLMGREN (1977)⁵¹⁾ の方法を基礎にして、以下に述べるように多少手直した方法で測定した。

(1) チオレドキシン活性の測定法

チオレドキシンの活性は、チオレドキシン系 (チオレドキシン、チオレドキシンレダクターゼ、NADPH) がインシュリンを還元する性質を利用して測定した。還元されたインシュリンの量は DTNB を用いて測定した。

まず、チオレドキシン活性を測定する試料 0.1 ml に、部分精製したチオレドキシンレダクターゼ溶液 (本章, 第7章, 1. を参照) 0.1 ml および基質溶液 0.72 ml (インシュリン 1.5 mg、EDTA 0.6 μ mol、NADPH 0.11 μ mol、HEPES-NaOH 10 μ mol, pH7.6) を加え、37°C で 15 分間インキュベートした。インキュベーション終了後、直ちに氷冷して 6 M グアニジン塩酸溶液 (Tris-HCl 50 mM, pH8.0) 2.5 ml を加えて反応を停止させた。次に、還元されたインシュリンの量を測定するために、10 mM DTNB 0.5 ml を加えて 5 分間放置した後に 412 nm の吸光度を分光光度計 (UV-200S, 島津製作所) で測定し、レコーダ (U-135, 島津製作所) で記録した。活性は 412 nm の吸光度で示した。

(2) チオレドキシシンレダクターゼ活性の測定法

チオレドキシシンレダクターゼの活性は、チオレドキシシンレダクターゼが D T N B を還元する性質を利用して測定した。

まず、試料 0.5 ml、B S A 溶液 (0.8 mg/ml) 1 ml および N A D P H 溶液 (N A D P H 0.4 mM、E D T A 20 mM、リン酸カリウム緩衝液 200 mM、pH 7.0) 2 ml を試験管に入れ攪拌した。室温が 25°C の条件下で、この試験管に D T N B 溶液 (49.5 mg/ml エタノール) を 0.04 ml 加えて直ちに攪拌して混合液をキュベットに移し、D T N B 溶液を加えてから 1 分後と 2 分後の 412 nm の吸光度を分光光度計で測定し、レコーダで記録した。活性は 1 分後と 2 分後の 412 nm の吸光度の差で示した。

4. タンパク質量の測定法

カラムクロマトグラフィーによる各画分のタンパク質量は、280 nm の吸光度で測定した。その他のタンパク質量は L O W R Y ら (1965)⁹⁶⁾ の方法で B S A を標準として測定した。また、タンパク質量が少ない試料のタンパク質量は、3.3% になるようにスルホサリチル酸を加え、遠心分離 (27,000×g, 4°C, 30 分) して得られた沈殿のタンパク質量を、沈殿にアルカリ溶液を直接加えることによって L O W R Y ら (1965)⁹⁶⁾ の方法で測定した。この時も B S A を標準として用いたが、試料と同様にスルホサリチル酸で沈殿させた後に測定を行った。

5. 電気泳動法

電気泳動は、スラブ型電気泳動装置 (A E -6200, A T T O) および 8% ポリアクリルアミドゲルを用い、約 20 mA の電流で約 4 時間行った。電気泳

動後、ゲル内のタンパク質を Coomassie Brilliantblue R 250 (Fluka AG, Switzerland) で染色したが、発色が薄かったため、さらに銀染色法で染色した。

第3節 牛肝臓の粗酵素抽出液の保存法の確立

本研究では、まず牛の肝臓からの粗酵素抽出液の保存法を検討することにした。同時に保存前に大量の粗酵素抽出液の分画処理ができる硫酸分画と等電点沈殿法の検討も行った。

1. 牛の肝臓からの粗酵素抽出液の調製

牛の肝臓からの粗酵素抽出液の調製法は、第2章、第2節で述べた牛肝臓の上清液の調製法とほぼ同様である。まず、肝臓の表面の被膜を取り、できるだけ血管と肝管を取り除き、約1 cm 角に細切し、20 g:100 ml の割合になるように0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) を加え、氷冷したワーリングブレンダー (佐久間製作所) でホモジェネートを調製した。これを高速遠心分離機 (Model KR-200B, KUBOTA) で遠心分離 ($27,000 \times g$, 4°C , 30分) し、その上清を粗酵素抽出液とし、本節の以下の実験に用いた。

2. 粗酵素抽出液のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす凍結、凍結乾燥、アセトン処理の影響

まず、粗酵素抽出液の凍結、凍結乾燥またはアセトン処理による保存について検討した。

まず、それぞれの処理法を以下に述べる。

<凍結区>

粗酵素抽出液を試験管に密閉して -20°C のフリーザーに入れて凍結した。この時、粗酵素抽出液の膨張で試験管が割れないように試験管を傾けて凍結した。そのまま一定期間保存した後に、室温で解凍して MSO 還元活性測定に用いた。

<凍結乾燥区>

粗酵素抽出液を試験管に密閉して -20°C のフリーザーに約12時間入れて凍結した後、試験管の栓を開けて凍結乾燥機 (freeze-dryer, Labconco FD-5, USA) により 3 日間で凍結乾燥した。この凍結乾燥粉末の入った試験管を、再び密封して冷蔵保存 (4°C) した。この状態で一定期間保存した後に、蒸留水で再溶解して MSO 還元活性測定に用いた。

<アセトン処理区>

粗酵素抽出液に約 15 倍量の -20°C に冷やしたアセトンを加えて攪拌して静置した後、遠心分離 ($10,000\times g$, 4°C , 10 分) して上清を捨て、沈殿のアセトンを室温で自然蒸発させた。このアセトン粉末を試験管に入れ、密栓して冷蔵保存 (4°C) した。この状態で一定期間保存した後に、 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 ($\text{pH} 6.0$) で再溶解して MSO 還元活性測定に用いた。

上記の各処理を行った後、それぞれの MSO 還元活性を測定した。凍結区と凍結乾燥区については、3 日目および 10 日目の MSO 還元活性を測定した。また、測定された MSO 還元活性が酵素によるものかどうかを確認するため、10 日目の粗酵素液を 95°C 15 分で熱処理し、ワーリングブレンダーでホモジェネートにしたものの活性も検討した。ただし、この日数は処理を開始した日からのものなので、凍結乾燥区の 3 日目は実質的には凍結乾燥粉末が

できた日である。アセトン処理区については、3 日目のみの M S O 還元活性を測定した。以上の結果は図 5-3-1 に示した。この図から、凍結区は保存期間が長くなると M S O 還元活性が低下していく傾向があり、アセトン処理区は 3 日目でほとんど失活していることが分かった。しかし、凍結乾燥区についてみると、凍結乾燥処理が終了した段階で M S O 還元活性がもとの約半分になっているが、それから 1 週間が経過しても M S O 還元活性の低下は起こっていないことが分かった。このことから、凍結乾燥による粗酵素抽出液の保存が可能であると考えられた。

(nmol/h/mgタンパク質)

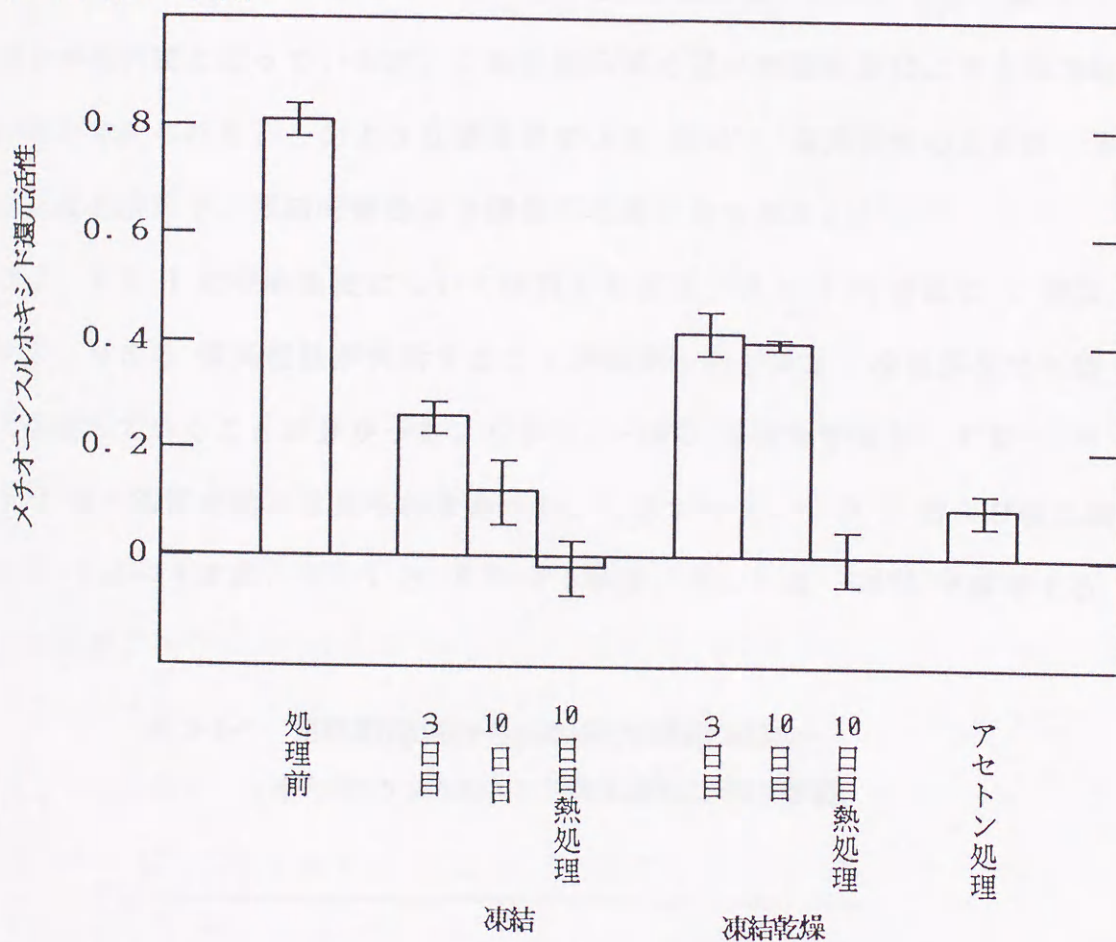


図 5-3-1 粗抽出液の保存法の違いがメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす影響

3. 粗酵素抽出液からの凍結乾燥粉末タイプ 1 の調製およびその保存

前項の検討結果から、凍結乾燥による粗酵素抽出液の保存が可能であることが分かったが、凍結乾燥処理の間に約半分の MSO 還元活性が失われた。筆者は、凍結区で保存している間に MSO 還元活性が低下したことから、凍結するのに時間がかかりすぎたことがその原因ではないかと考えた。そこで、 -80°C のフリーザーを用いて約 1 時間で凍結した後、凍結乾燥し、その MSO 還元活性を測定した。その結果、タンパク質当たりの活性で、MSO 還元活性の低下なしに凍結乾燥粉末を調製することに成功した (表 5-3-1)。筆者はこれを凍結乾燥粉末タイプ 1 (FD-1) と名付けた。ところで、表 5-3-1 の MSO 還元活性と、図 5-3-1 の MSO 還元活性を比較すると、表 5-3-1 の方が高い値となっているが、これは第 3 章で述べた個体差によるものではないかと考えられた。このような個体差による MSO 還元活性の変動は、本章の以後の検討で、凍結乾燥粉末を調製する度に見られた。

次に、FD-1 の保存温度について検討した結果、FD-1 を室温に 1 週間おくと、MSO 還元活性が失活することが分かった。また、冷蔵保存でも徐々に失活していくことが分かった。しかし、 -20°C で保存すると、FD-1 の MSO 還元活性の低下は見られなかった。したがって、FD-1 および後に調製した FD-2 (本節, 6.) と FD-3 (本節, 8.) は -20°C で保存することにした。

表 5-3-1 粗酵素抽出液からの凍結乾燥粉末の調製が
メチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす影響

	nmol/h/mgタンパク質 \pm SE	
粗酵素抽出液	1.36	± 0.14
凍結乾燥粉末タイプ 1 溶液	1.38	± 0.04

4. 硫安分画の検討

本項では大量の粗酵素液の分画を行うことのできる硫安分画の検討を行った。硫安分画は以下の手順で行った。

まず、前項で述べた方法で得た F D -1 に 1 g : 20 ml の割合で蒸留水を加え、よく攪拌した後に遠心分離 (27,000×g, 4℃, 30 分) した。その上清に目的の濃度となるように硫酸アンモニウムをよく攪拌しながら徐々に加えた。硫酸アンモニウムが完全に溶解した後、30 分間静置し、遠心分離 (10,000×g, 4℃, 20 分) して上清と沈殿に分けた。沈殿は、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) に再溶解した。上清は、そのまま上清区とするか、もしくはさらに硫酸アンモニウムを加えて同様の操作を繰り返した。次に、分画されたそれぞれの溶液を、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) に対して透析し、硫酸アンモニウムを除去した。最後に、硫酸アンモニウムが添加された時の液量にそれぞれの画分をメスアップして (例えば、10 ml の粗酵素液に硫酸アンモニウムを加えた時の沈殿は、5 ml の緩衝液に溶解し、透析した後に 10 ml にメスアップした) それぞれの M S O 還元活性を測定した。

以上の方法で行った硫安分画の検討結果を図 5-3-2 にまとめた。この図から M S O 還元活性を持つ画分は、30~50%飽和の間にあることが分かった。しかし、この硫安分画の検討中に、M S O 還元活性のかなりの低下が見られた。この硫安分画中の M S O 還元活性の低下は、粗酵素液に D T T を添加することで解決することができた (本節, 5. を参照)。図 5-3-2 の左側の図の 0~80%飽和の間の硫安分画は D T T のない状態で、右側の図の 30~50%飽和の間の硫安分画では D T T を添加した状態で分画を行った結果である。右側の図に比べて左側の図の M S O 還元活性はかなり低いことが分かる。右側の図の 30~50%飽和の間の硫安分画の検討を行った時の値をもとに、

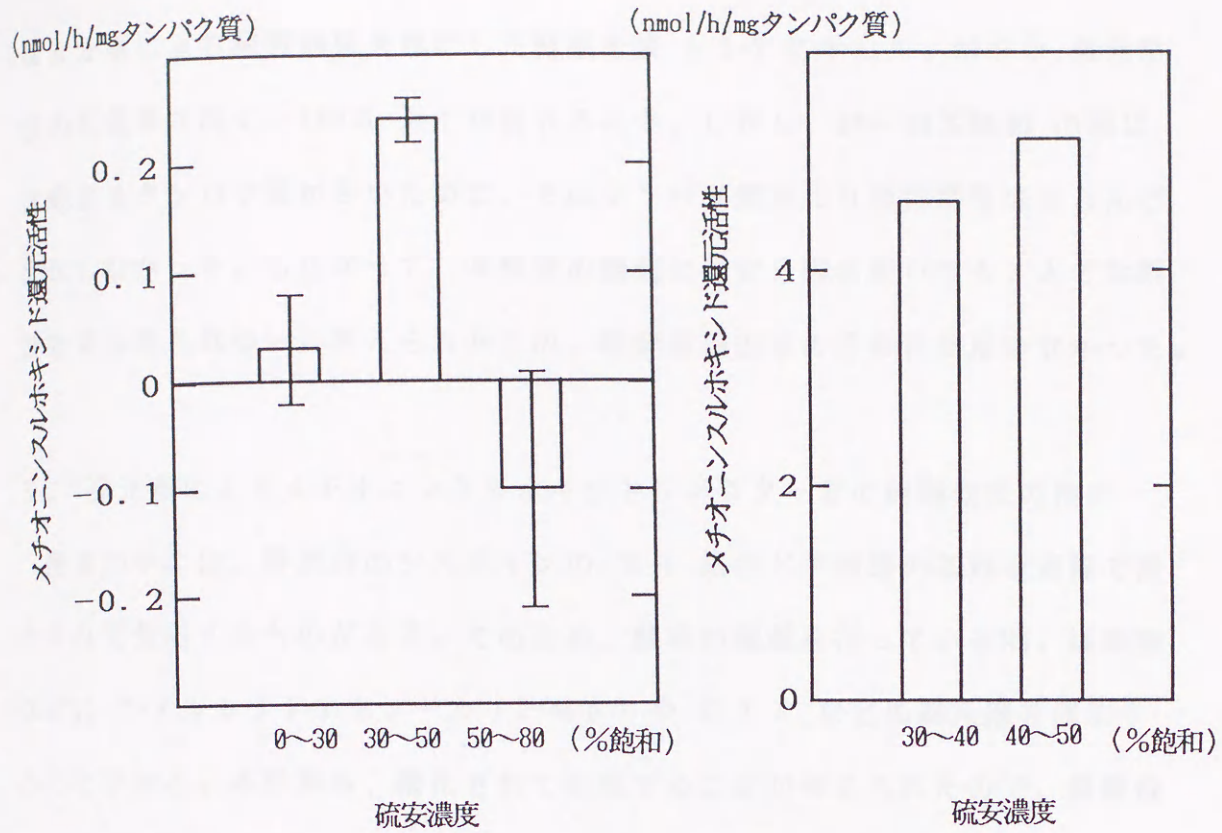


図 5-3-2 硫酸分画の検討

表 5-3-2 硫酸分画による精製効果

	比活性 (nmol/h/mgタンパク質)	全活性 (nmol/h)	精製倍率	回収率 (%)
凍結乾燥粉末タイプ 1 溶液	4.37	1167		
30~50%飽和 画分	4.90	1122	1.12	96

硫安分画による精製効果を算出した結果を表 5-3-2 に示した。MSO 還元活性の回収率は高く、100% 近くが回収された。しかし、30~50% 飽和 の間に沈殿するタンパク質が多いために、そのタンパク質当たりの比活性はほとんど変化しなかった。したがって、本酵素の精製に硫安分画を用いても、大きな精製効果は得られないと考えられたため、粗酵素抽出液の分画には用いなかった。

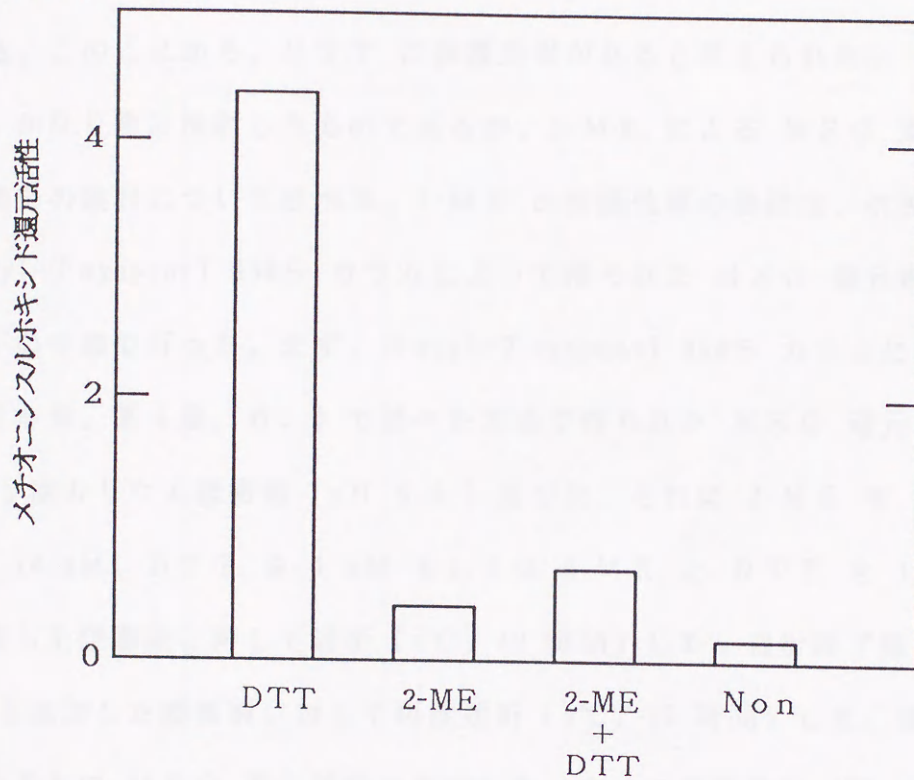
5. 還元剤によるメチオニンスルホキシドレダクターゼの保護効果の検討

酵素の中には、酵素内のシステインの SH 基などが精製の各処理過程で酸化されて失活するものがある。そのため、酵素の精製を行っている間、緩衝液などに 2-メルカプトエタノール (2-ME) や DTT などの還元剤を添加することがある。本酵素も、酸化されて失活することが考えられたので、緩衝液に還元剤を添加することによる失活からの保護効果を検討した。

牛肝臓の MSO 還元活性に及ぼす DTT の影響については、堀川ら⁸⁶⁾ の検討によって MSO 還元活性を促進することが分かっている。そこで、まず 2-ME が MSO 還元活性に及ぼす影響を検討した。2-ME が MSO 還元活性に及ぼす影響の検討は以下の手順で行った。FD-1 に 1 g/10 ml の割合で蒸留水を加え、よく攪拌した後に、還元剤として 2-ME を 1 mM、DTT を 1 mM もしくは 2-ME と DTT を 1 mM ずつを添加、または還元剤を添加しない区の MSO 還元活性を測定した。その結果、DTT を添加しても 2-ME が存在すると MSO 還元活性がほとんどなくなることから、2-ME は MSO 還元活性を阻害することが分かった (図 5-3-3)。

次に、DTT による MSO 還元活性の保護効果の検討をした。DTT の保護効果の検討は以下の手順で行った。FD-1 に 1 g:10 ml の割合で蒸留水を加え、よく攪拌した後に、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) また

(nmol/h/mgタンパク質)



DTT: ジチオトレイトール (1 mM)
2-ME: 2-メルカプトエタノール (1 mM)
Non: 還元剤無添加

図 5-3-3 2-メルカプトエタノールがメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす影響

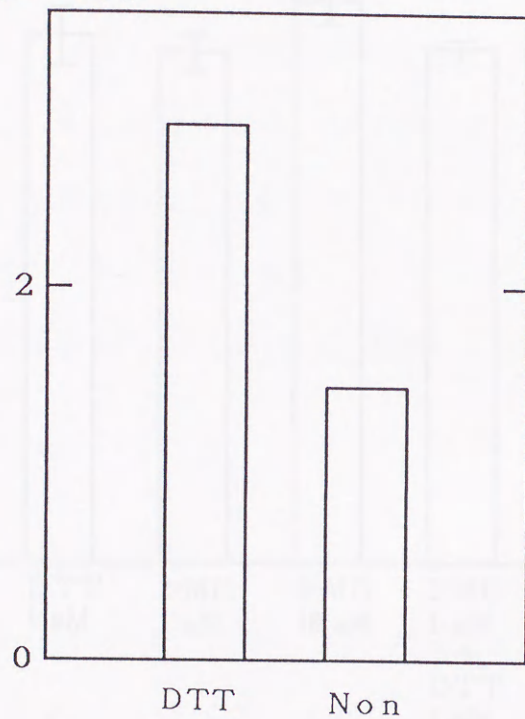
はそれに 2 mM となるように D T T を添加した緩衝液に対して透析 (4°C, 24 時間) した。透析終了後、D T T を添加していない区には 2 mM の D T T を添加した基質溶液を、D T T を添加した区には D T T を添加していない基質溶液を加えて M S O 還元活性を測定した。その結果、図 5-3-4 に示したように D T T を添加した緩衝液で透析した区の方が高い M S O 還元活性を示した。このことから、D T T に保護効果があると考えられた。

最後に、かなり後に検討したものであるが、2-ME による M S O 還元活性の保護効果の検討について述べる。2-ME の保護効果の検討は、次節で述べる Butyl-Toyoparl 650S カラムによって得られた M S O 還元画分を用いて以下の手順で行った。まず、Butyl-Toyoparl 650S カラムによる分画の検討 (本章, 第 4 節, 6.) で述べた方法で得られた M S O 還元画分を、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 並びに、それに 2-ME を 1 mM、2-ME を 10 mM、D T T を 1 mM もしくは 2-ME と D T T を 1 mM ずつを添加した緩衝液に対して透析 (4°C, 48 時間) した。透析終了後、D T T 1 mM を添加した緩衝液に対して再度透析 (4°C, 12 時間) した。透析終了後、それぞれの M S O 還元活性を測定した。すべての操作は 4°C で行った。その結果、図 5-3-5 に示したように、2-ME 添加区だけでなく無添加区でも D T T 添加区と差がなかった。そのため、この結果から 2-ME の効果は確認できなかった。しかし、還元剤を添加していない緩衝液に対して透析をすると失活する (図 5-3-4) ことから、1 度失活した酵素でも D T T が存在する状態でしばらく放置すると M S O 還元活性が戻るのではないかと考えられた。

以上の検討結果から、酵素を酸化から保護するためには、精製を行っている間、粗酵素液に D T T を添加することが必要であると考えられた。

(nmol/h/mgタンパク質)

メチオニンスルホキシド還元活性

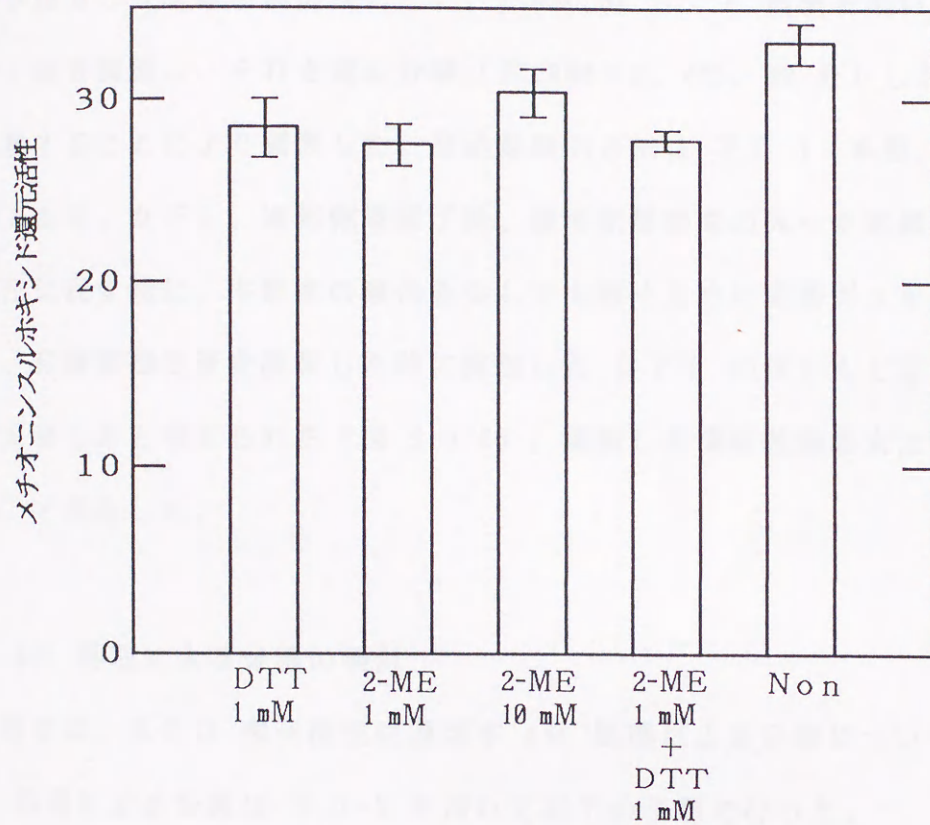


(透析の条件)

DTT: ジチオトレイトール (1 mM)
Non: 還元剤無添加

図 5-3-4 ジチオトレイトールによるメチオニンスルホキシド還元活性の保護効果

(nmol/h/mgタンパク質)



(透析の条件)

DTT: ジチオトレイトール
2-ME: 2-メルカプトエタノール (1 mM)
Non: 還元剤無添加

図 5-3-5 2-メルカプトエタノールによるメチオニンスルホキシド還元活性の保護効果

6. 粗酵素抽出液からの凍結乾燥粉末タイプ 2 の調製

前項の結果から D T T を用いて凍結乾燥粉末タイプ 2 (F D -2) を以下の手順で調製した。

F D -2 は、牛の肝臓からの粗酵素抽出液の調製 (本節, 1.) の時に加えたリン酸カリウム緩衝液の代わりに、1 mM の D T T 溶液を用いてホモジエネート液を調製し、それを遠心分離 (27,000×g, 4°C, 30 分) した上清を凍結乾燥することにより調製した。凍結乾燥の方法は F D -1 (本節, 3.) と同様である。ただし、凍結乾燥終了後、凍結乾燥粉末の入った容器内の気圧を外気圧に戻す時に、本酵素の酸化を少しでも防ぐために窒素ガスを吸気させた。また、粗酵素抽出液を調製した時に添加した D T T のほとんどは、凍結乾燥中に昇華したと考えられた (図 5-3-6)。調製した凍結乾燥粉末は密栓して -20°C で保存した。

7. pH 処理による分画の検討

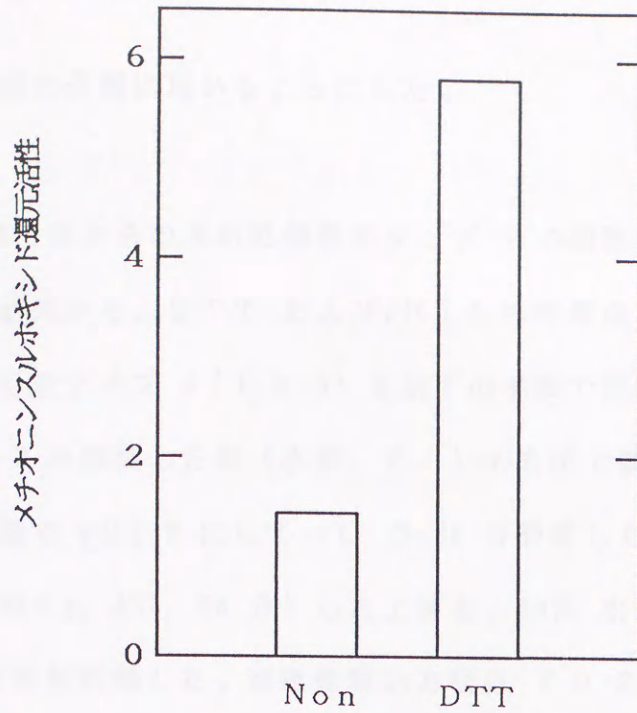
本項では、M S O 還元活性に及ぼす pH 処理による分画について検討した。

pH 処理による分画は F D -2 を用いて以下の手順で行った。

まず、F D -2 に 1 g : 10 ml の割合で蒸留水を加え、よく攪拌した後に濃塩酸で目的の pH に調製し、30 分静置 (4°C) した後に遠心分離 (27,000×g, 4°C, 30 分) した。その上清を 30% 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 に調製した後に M S O 還元活性を測定した。

以上の方法で pH 4.0 および pH 5.0 の処理を検討した結果、pH 4.0 で処理したものには M S O 還元活性がまったく見られなかった。しかし、pH 5.0 で処理したものには M S O 還元活性がみられ、その精製効果は表 5-3-3 のように良好であった。この結果から、pH 5.0 の処理による分画を凍結乾燥前

(nmol/h/mgタンパク質)



Non:還元剤無添加
DTT:ジチオトレイトール (1 mM)

図 5-3-6 凍結乾燥粉末タイプ 2 のメチオニンスルホキシド還元活性

表 5-3-3 凍結乾燥粉末タイプ 2 の pH5.0 の処理による精製効果

	比活性 (nmol/h/mgタンパク質)	タンパク質量 (mg)	全活性 (nmol/h)	精製倍率	回収率 (%)
凍結乾燥粉末タイプ 2 溶液	3.61	22.1	80		
pH5.0 処理画分	29.20	14.6	82	1.60	98.4

の粗酵素抽出液の分画に用いることにした。

8. 粗酵素抽出液からの凍結乾燥粉末タイプ 3 の調製

前項の検討結果から、D T T および pH 5.0 の等電点沈殿法による分画を用いて凍結乾燥粉末タイプ 3 (FD-3) を以下の手順で調製した。

まず、FD-2 を調製した時 (本節, 6.) の方法で調製したホモジェネート液を、濃塩酸で pH 5.0 にして 4°C で 30 分静置した。そして、それを遠心分離 (27,000×g, 4°C, 30 分) した上清を、30% 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.0 にして凍結乾燥した。凍結乾燥の方法は FD-2 (本節, 6.) と同様である。調製したそれぞれの凍結乾燥粉末は、密栓して -20°C で保存した。

以上の FD-1、FD-2、FD-3 の調整手順の概要は 図 5-3-7 に示した。

以上の方法で調製した FD-3 を後に述べる MSO レダクターゼの精製およびチオレドキシソとチオレドキシソレダクターゼの部分精製に用いた。FD-3 の MSO 還元活性および FD-3 調製による精製効果は、本章, 第 8 節, 2. で他の分画法とともにまとめて述べる (表 5-6-1 を参照)。

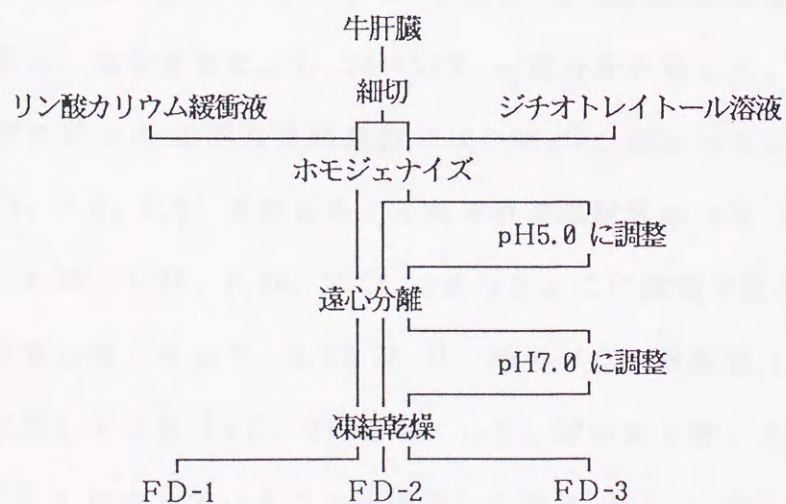


図 5-3-7 凍結乾燥粉末の調製の手順

第4節 メチオニンスルホキシドレダクターゼの粗酵素レベルでの pH 安定性およびカラムクロマトグラフィーによる分画

本節は、精製の方法を検討するために、いくつかのカラムクロマトグラフィーを用いた分画を試みることを目的とした。ただし、本節の検討は、前節の牛肝臓の粗酵素抽出液の保存法の検討と並行して行ったため、各カラムクロマトグラフィーの検討ごとに用いた凍結乾燥粉末 (FD-1、FD-2 および FD-3) はまちまちになった。

1. メチオニンスルホキシドレダクターゼの粗酵素レベルでの pH 安定性

カラムクロマトグラフィーには、目的の酵素を効率良く分離するために、任意の pH の緩衝液を用いる必要がある。しかし、酵素によっては、ある pH にさらすと失活することがあるので、まず本酵素にどのような pH の緩衝液を用いてよいかどうかについて検討する必要がある。そこで、MSO レダクターゼの粗酵素レベルでの pH 安定性を以下の手順で検討した。

前節で述べた方法で調製した 3 g の FD-1 に 30 ml の蒸留水を加え、よく攪拌した後に、硫酸分画により 30~50% の画分を分離した。これを 5 等分し、それぞれに pH の異なる同量の 0.04 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0) を加えた。それぞれの試験区の pH を確認したところ、5.74、6.28、6.78、7.20、7.54 であった。この状態で密栓して、4°C で 24 時間放置した。そして、0.02 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0, DTT 1 mM) に対して透析 (4°C, 24 時間) した。透析終了後、それぞれの試験区の pH が 6.0 になっていることを確認した後に MSO 還元活性を測定した。

(nmol/h/mgタンパク質)

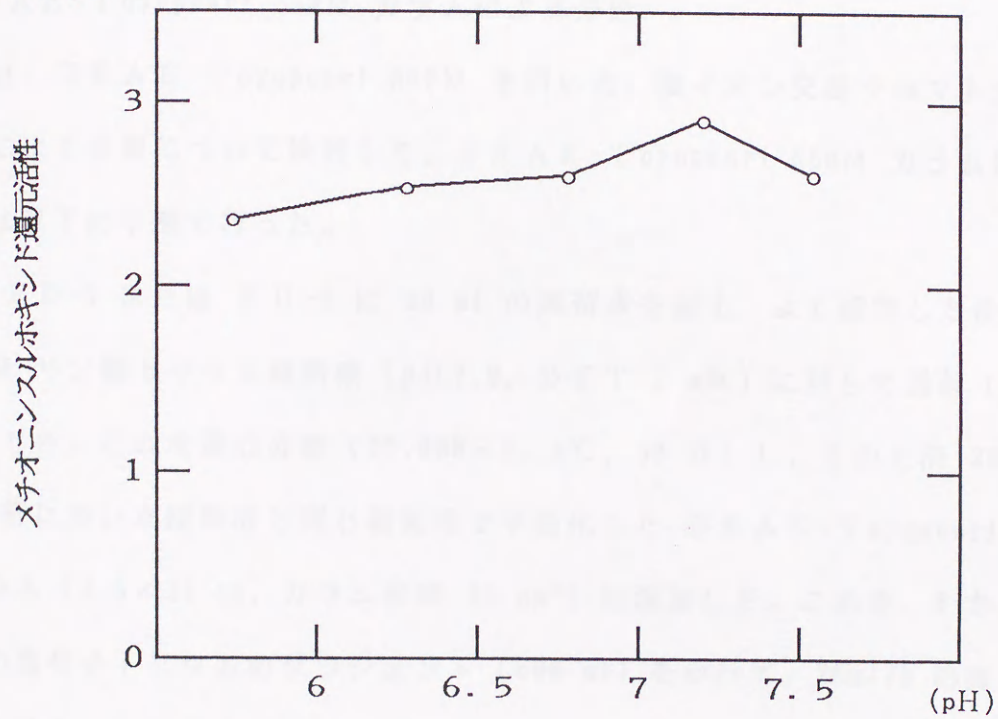


図 5-4-1 メチオニンスルホキシド還元酵素の粗酵素レベルでの pH 安定性

以上の実験の結果、pH 7.20 で最も安定しており、pH が低くなるにつれて M S O 還元活性が低下する傾向が見られた (図 5-4-1)。このことから、本酵素の精製は、なるべく中性に近い条件で行うのがよいと考えられた。しかし、pH 5.74 でも M S O 還元活性の大きな低下は見られないので、本酵素は、少なくとも pH 5.74~7.54 の間では安定していると考えられた。

2. D E A E - T o y o p e a r l 6 5 0 M カラムによる分画

ここでは、D E A E - T o y o p e a r l 6 5 0 M を用いた、陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画について検討した。D E A E - T o y o p e a r l 6 5 0 M カラムによる分画は以下の手順で行った。

2 g の F D - 1 または F D - 2 に 20 ml の蒸留水を加え、よく攪拌した後、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, D T T 1 mM) に対して透析 (12 時間) した。これを遠心分離 (27,000×g, 4°C, 30 分) し、その上清 20 ml を、透析に用いた緩衝液と同じ緩衝液で平衡化した D E A E - T o y o p e a r l 6 5 0 M カラム (1.5×15 cm, カラム体積 26 cm³) に添加した。これを、0 から 1 M の塩化ナトリウムのグラジエント (600 ml) をかけて、25ml/h の流速で溶出させた。1 画分を約 4.5 ml ずつ回収し、それぞれの M S O 還元活性および 280 nm 吸光度を測定した。

まず、F D - 1 を分画した結果、図 5-4-2 (a) に示したように、M S O 還元活性の溶出パターンに 3 つのピークが見られた。このことから、牛の肝臓には、D T T 存在下で M S O 還元活性を示す物質が、少なくとも 3 つあることが分かった。しかし、F D - 2 (D T T を添加して調製した凍結乾燥粉末) を分画した結果、図 5-4-2 (b) に示したように 3 つ目のピークは見られなかった。したがって 3 つ目のピークを示す物質は、D T T を添加して凍結乾燥

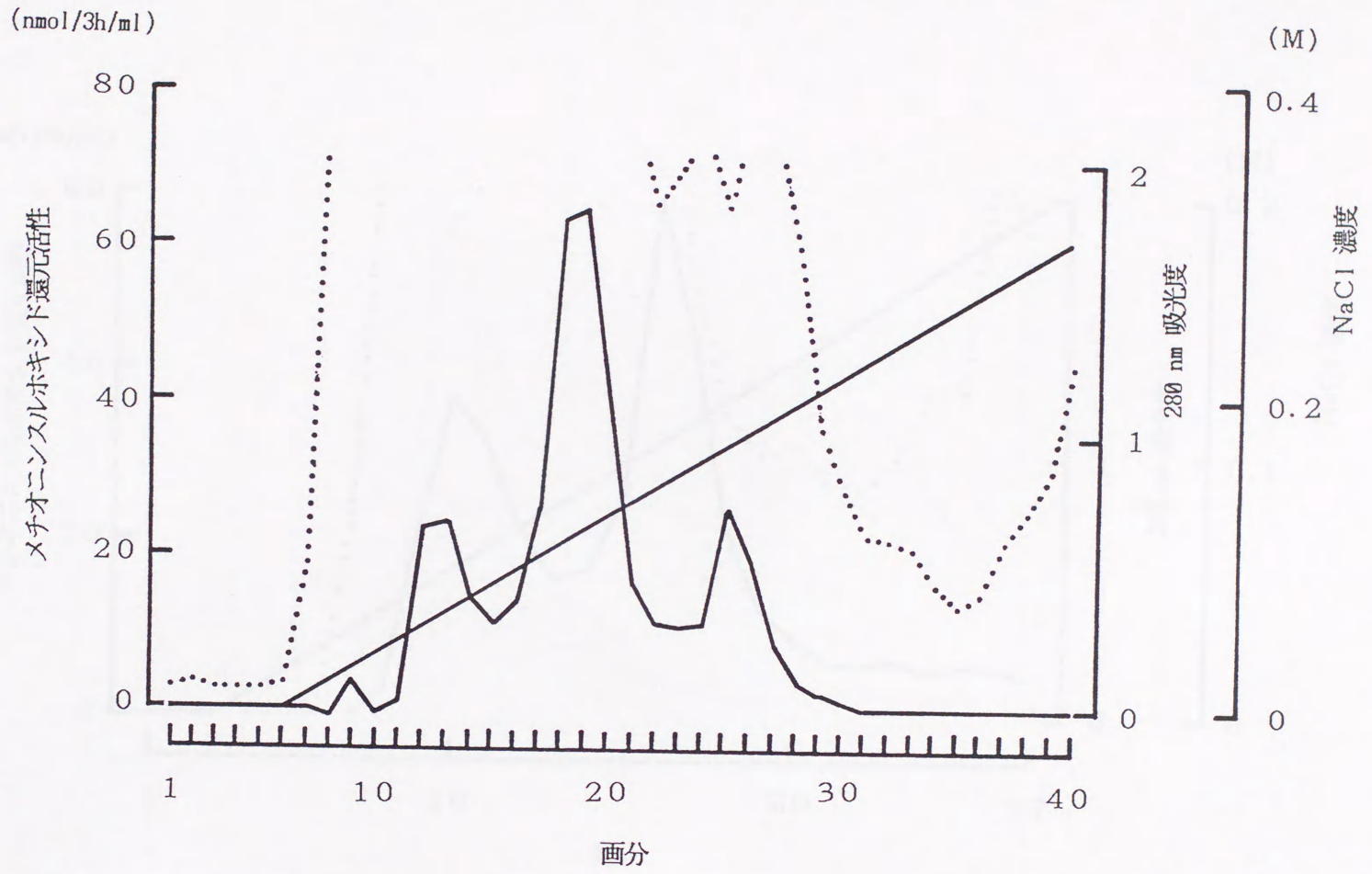


図 5-4-2 (a) 凍結乾燥粉末タイプ 1 の DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画

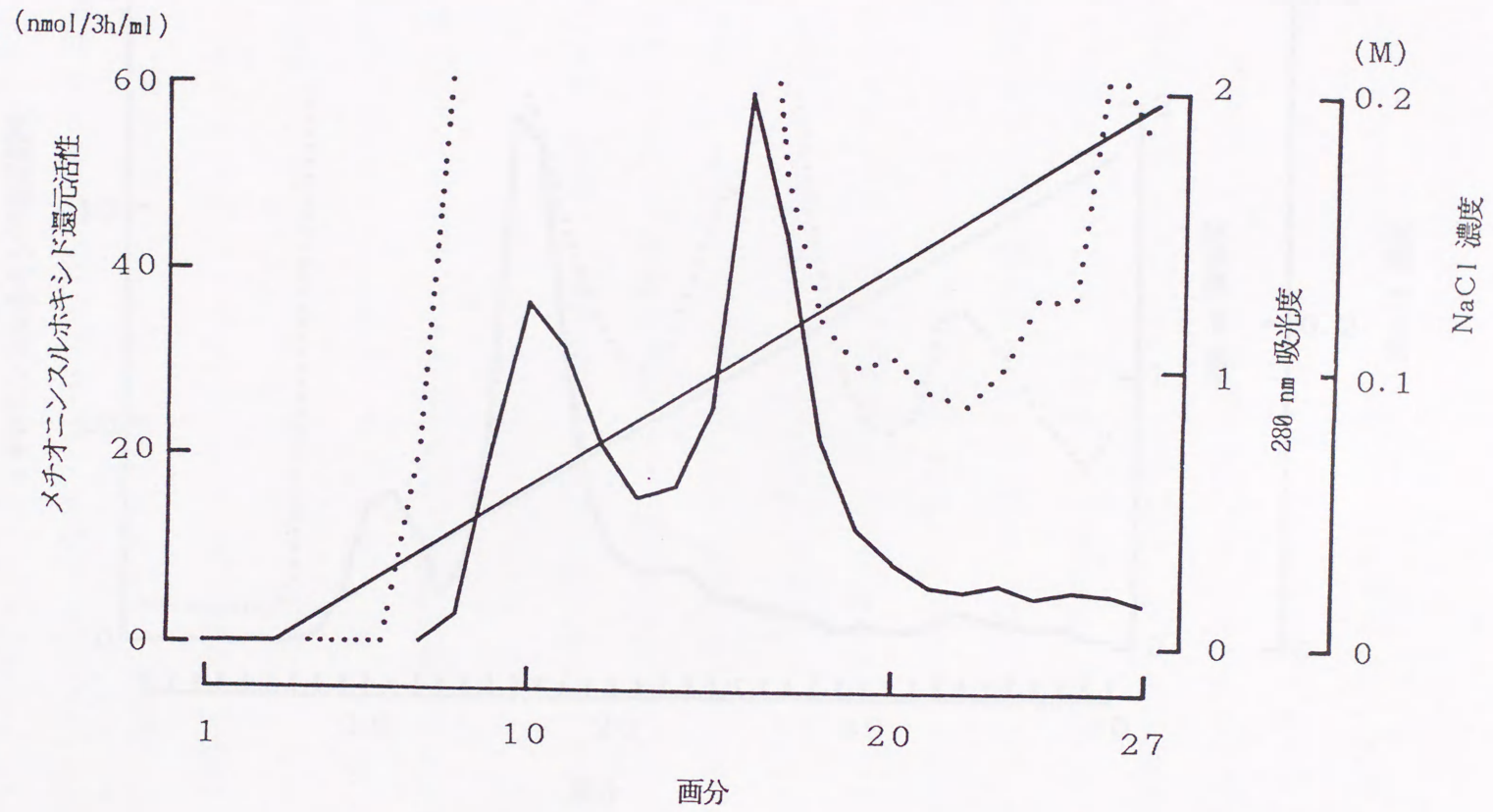


図 5-4-2 (b) 凍結乾燥粉末タイプ 2 の DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画

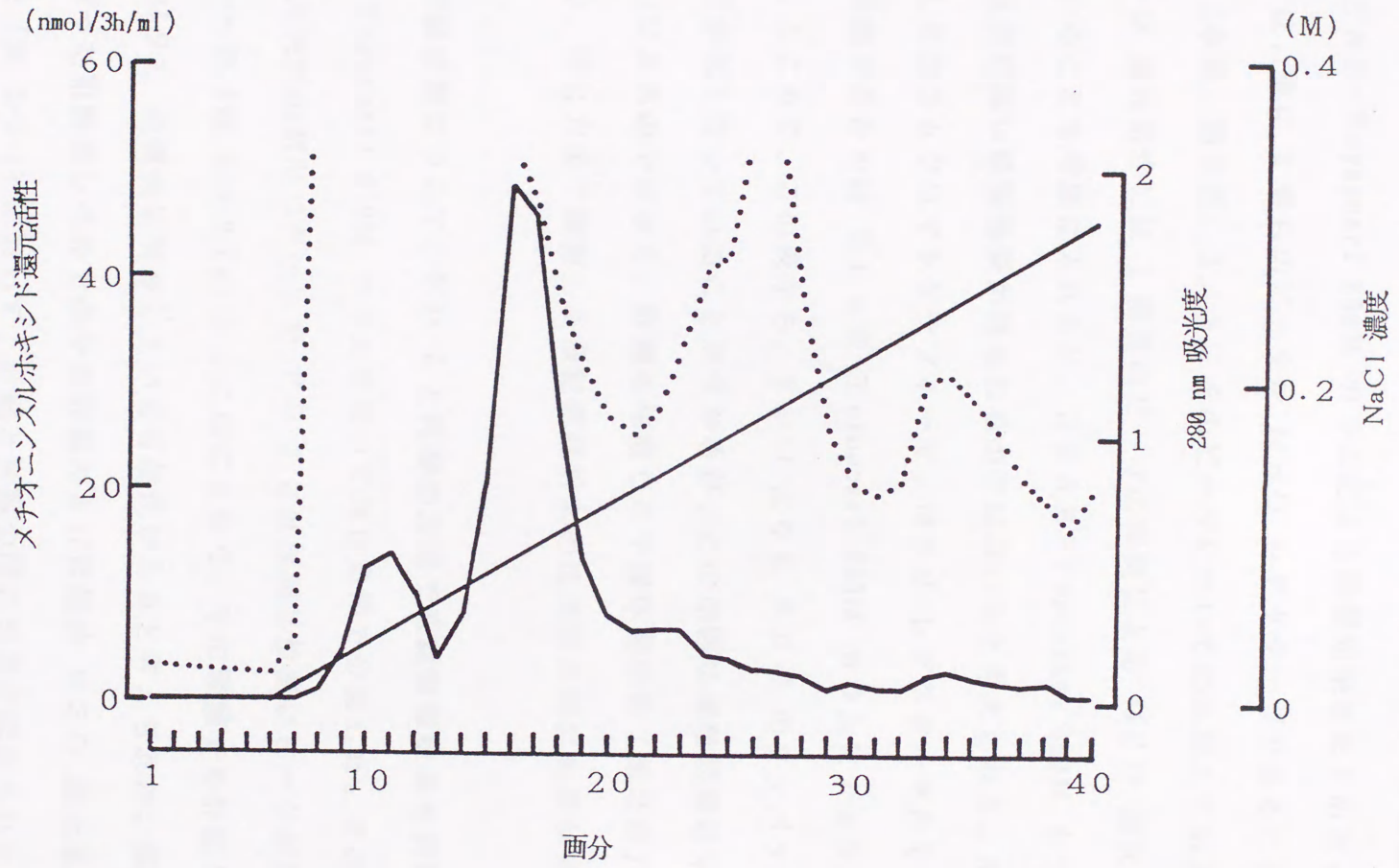


図 5-4-2 (c) 牛腎臓の凍結乾燥粉末の DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画

処理をすると失活するか、溶出位置が変化すると考えられた。また、FD-3 を分画した時も FD-2 と同様の結果であった。表 5-4-1 に FD-1 および FD-3 の DEAE-Toyopearl 650M カラムによる精製効果をまとめた。FD-3 については、後に 2 番目のピークが MSO レダクターゼであることが分かったので（本章，第 5 節，1.）、そのピークについてのみ記してある。分画前の MSO 還元活性には 1 番目のピークの物質による MSO 還元活性が含まれていることを考慮に入れると、DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画で比較的高い精製効果が得られるのではないかと考えられた。また、本研究で検討したカラムクロマトグラフィーで、MSO レダクターゼとその他のピークが分離できたのは DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画のみであった。ところで、この表から、FD-1 よりも FD-3 のタンパク質当たりの比活性が低くなっていることが分かるが、この原因は凍結乾燥粉末調製の方法の違いにあるのではなく、肝臓を採取した牛個体間の差（第 3 章）によるものであり、同じ方法で調製した凍結乾燥粉末の比活性の間にも差が見られた。

次に、牛の腎臓皮質について、FD-2 と同様の方法で凍結乾燥粉末を調製し、DEAE-Toyopearl 650M カラムを用いて同じ条件で分画した。その結果、MSO 還元活性の溶出パターンで FD-2 とほぼ同じ位置にピークが現れることが分かった（図 5-4-2 (c)）。このことから、牛の腎臓でも肝臓と類似の酵素が MSO の還元に関与している可能性があると考えられた。第 2 章，第 3 節で行った粗酵素レベルでの牛の肝臓および腎臓の MSO 還元系の性質の検討結果（表 2-3-1）において、肝臓と腎臓の間に相違が認められたことから異なる酵素が作用していると考えられたことは異なる結果となった。この点については総合考察（第 6 章）で述べる。

表 5-4-1 凍結乾燥粉末タイプ 1 および凍結乾燥粉末タイプ 3 のDEAE-Toyopearl 650M
カラムによる分画の精製効果

	比活性 (nmol/h/mgタンパク質)	タンパク質量 (mg)	全活性 (nmol/h)	精製倍率	回収率 (%)
凍結乾燥粉末タイプ 1 溶液	2.78	132.4	369		
DEAE-Toyopearl 650M カラム画分					
P1 ^a	4.82	13.4	65	1.73	18.6
P2 ^b	5.74	32.3	186	2.06	50.3
P3 ^c	1.61	12.5	20	0.58	5.4
P1 + P2 + P3	2.78	58.2	271	4.37	73.4
凍結乾燥粉末タイプ 3 溶液	1.02	479.0	487		
DEAE-Toyopearl 650M カラム画分					
P2 ^b	4.11	91.0	411	4.00	84.4

^a メチオニンスルホキシド還元活性溶出パターン of 1 番目のピーク。

^b メチオニンスルホキシド還元活性溶出パターン of 2 番目のピーク。

^c メチオニンスルホキシド還元活性溶出パターン of 3 番目のピーク。

3. Sephadex G-100 カラムによる分画

ここでは、Sephadex G-100 を用いた分子篩クロマトグラフィーによる分画について検討した。始めに、Sephadex G-150 カラムによる分画について検討したが、本酵素の分子量が小さすぎるためにうまく分画されなかったので、Sephadex G-100 を用いることにした。Sephadex G-100 カラムによる分画は以下の手順で行った。

まず、1.2 g の FD-2 に 6 ml の 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, DTT 1 mM) を加え、よく攪拌した後に遠心分離 (27,000×g, 4°C, 30 分) した。その上清 5 ml を、FD-2 を溶解した緩衝液と同じ緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラム (1.9×50 cm, カラム体積 142 cm³) に添加し、同じ緩衝液を用いて、10 ml/h の流速で溶出させた。1 画分を約 4.5 ml ずつ回収し、それぞれの MSO 還元活性および 280 nm 吸光度を測定した。

その結果、MSO 還元活性の溶出パターンは図 5-4-3 のようになり、1 つのピークが得られた。BSA (分子量約 67,000)、オボアルブミン (分子量約 43,000) およびキモトリプシノーゲン A (分子量約 25,000) の溶出位置から推定して、MSO レダクターゼの分子量は 20,000 前後と考えられた。また、前項の結果から、FD-1 には、FD-2 にはない 3 つ目のピークを示す物質があることが分かっているので、牛肝臓から 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, DTT 1 mM) を用いて調製した粗酵素抽出液を、直接 Sephadex G-100 カラムに添加して分画したが、やはり 1 つのピークしか得られなかった。このことから、MSO 還元活性を示す物質は、いずれも分子量が 20,000 前後であると考えられた。表 5-4-2 は、FD-2 の分子篩クロマトグラフィーによる分画の精製効果を示したものである。この表から、精製倍率は比較的高いが、回収率が悪いことが分かった。ゲルろ過は、タンパク質とゲル

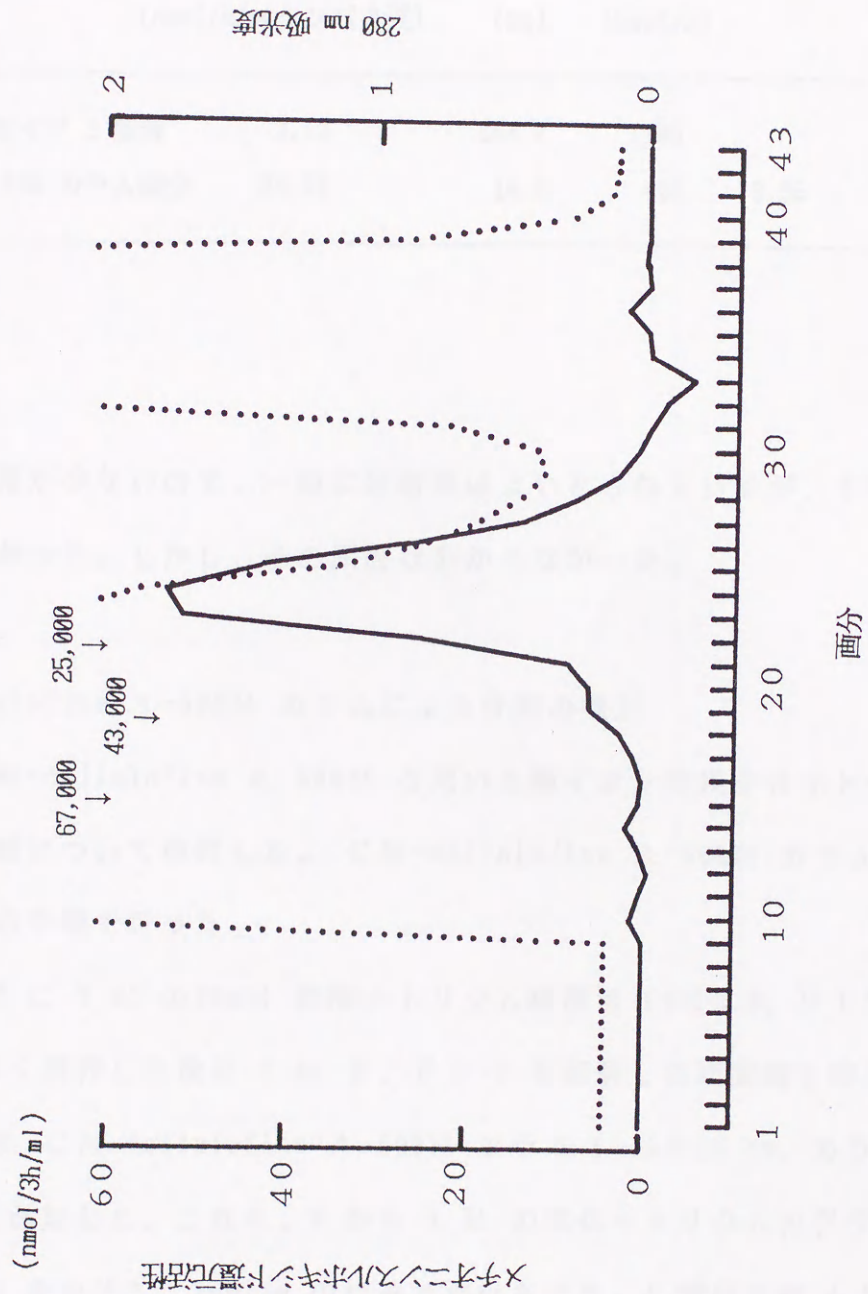


図 5-4-3 凍結乾燥粉末タイプ 2 の Sephadex G-100 カラムによる分画

表 5-4-2 凍結乾燥粉末タイプ 2 の Sephadex G-100 カラムによる分画の精製効果

	比活性 (nmol/h/mgタンパク質)	タンパク質量 (mg)	全活性 (nmol/h)	精製倍率	回収率 (%)
凍結乾燥粉末タイプ 2 溶液	3.12	354.7	1108		
Sephadex G-100 カラム画分	29.20	14.6	425	9.35	38.4

との間の相互作用が少ないので、一般に回収率はよいとされているが、本実験では回収率が悪かった。しかし、その原因は分からなかった。

4. CM-cellulofine A-500M カラムによる分画の検討

ここでは、CM-cellulofine A-500M を用いた陽イオン交換クロマトグラフィによる分画について検討した。CM-cellulofine A-500M カラムによる分画は以下の手順で行った。

7g の FD-2 に 7 ml の 20mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0, DTT 1 mM) を加え、よく攪拌した後に 5 ml を、FD-2 を溶解した緩衝液と同じ緩衝液で平衡化した CM-cellulofine A-500M カラム (1.5×15 cm, カラム体積 26 cm³) に添加した。これを、0 から 1 M の塩化ナトリウムのグラジエント (600 ml) をかけて、25ml/h の流速で溶出させた。1 画分を約 4.5 ml づつ回収し、それぞれの MSO 還元活性および 280 nm 吸光度を測定した。

その結果、MSO 還元活性は最初に溶出され、ほとんどカラムに保持され

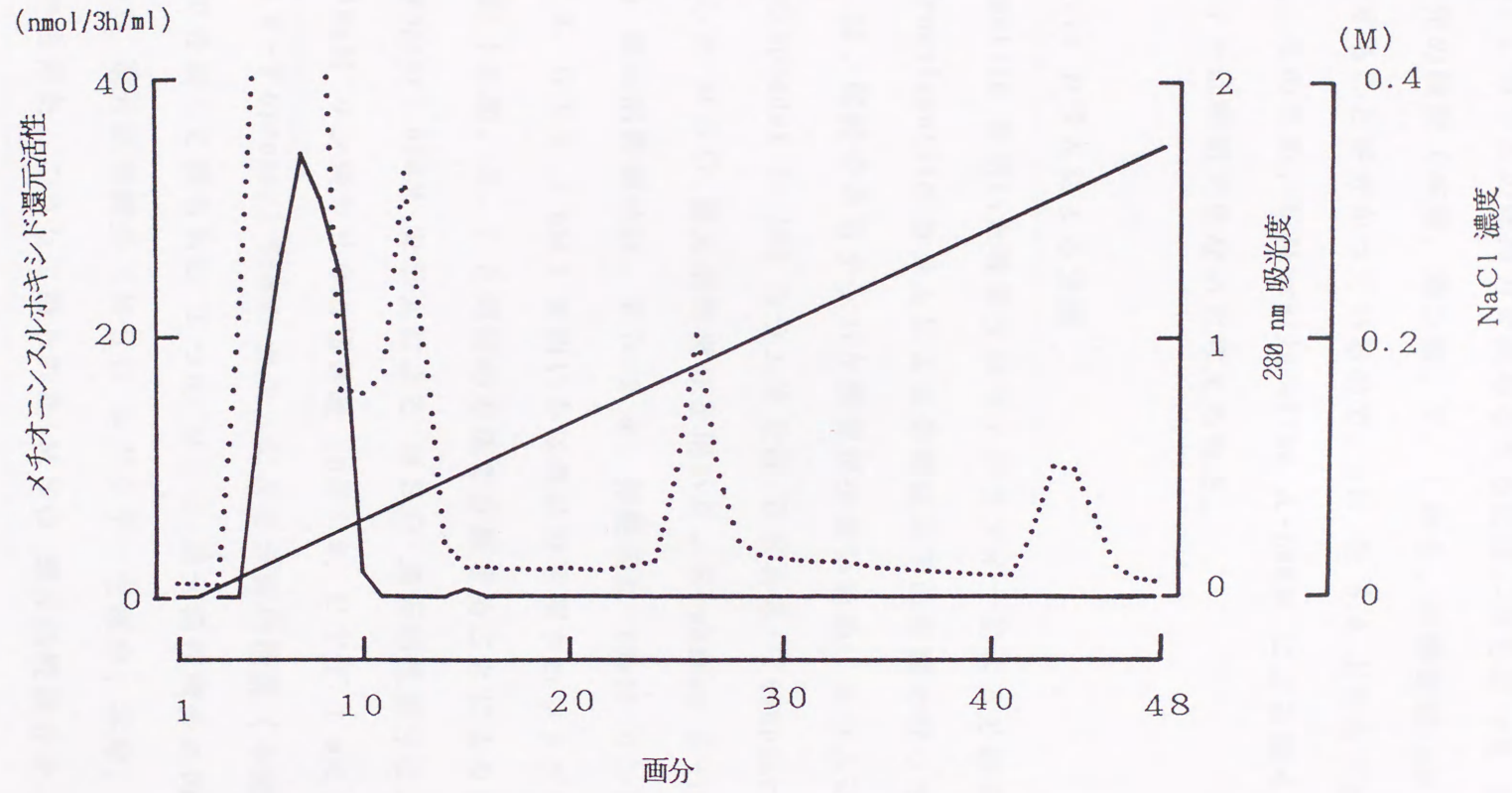


図 5-4-4 凍結乾燥粉末タイプ 2 の CM-cellulofine A-500M カラムによる分画

なかった(図 5-4-4)。カラムの保持力を高めるためには、さらに pH を下げる必要があるが、先の検討(本章, 第3節, 7.)から、本酵素は pH 4.0 で失活もしくは沈殿することが分かっているので、pH を 5.0 よりも下げることはできなかった。そのため、CM-cellulofine A-500M による陽イオン交換クロマトグラフィーは利用できないと考えられた。

5. Hydroxylapatite カラムによる分画

次に、Hydroxylapatite を用いた吸着クロマトグラフィーによる分画について検討した。Hydroxylapatite カラムによる分画は以下の手順で行った。

Hydroxylapatite は、保持できるタンパク質量が少ないため、カラムに添加する粗酵素液に、Sephadex G-100 カラムまたは DEAE-Toyopearl 650M カラムで分画した MSO 還元活性画分を用いた。Sephadex G-100 カラムによる MSO 還元活性画分は、FD-2 を、移動相に 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, DTT 1 mM) を用いた以外は分子篩クロマトグラフィーによる分画の検討(本節, 3.)と同様の方法で分画することにより得た。また、DEAE-Toyopearl 650M カラムによる MSO 還元活性画分は、FD-3 を、緩衝液に 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, DTT 1 mM) を用いた以外は DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画の検討(本節, 2.)と同様の方法で分画して得られた 2 つの MSO 還元活性画分の内、2 番目のピークの MSO 還元活性画分 (MSO レダクターゼ画分、本章, 第5節, 1. を参照) から得た。こうして得られた MSO 還元活性画分を、Sephadex G-100 カラムからの MSO 還元活性画分の際は 10 ml を、DEAE-Toyopearl 650M カラムからの MSO 還元活性画分の際は 15 ml を、同じ緩衝液で平衡化した Hydroxylapatite カラム (1.0×20 cm, カラム体積

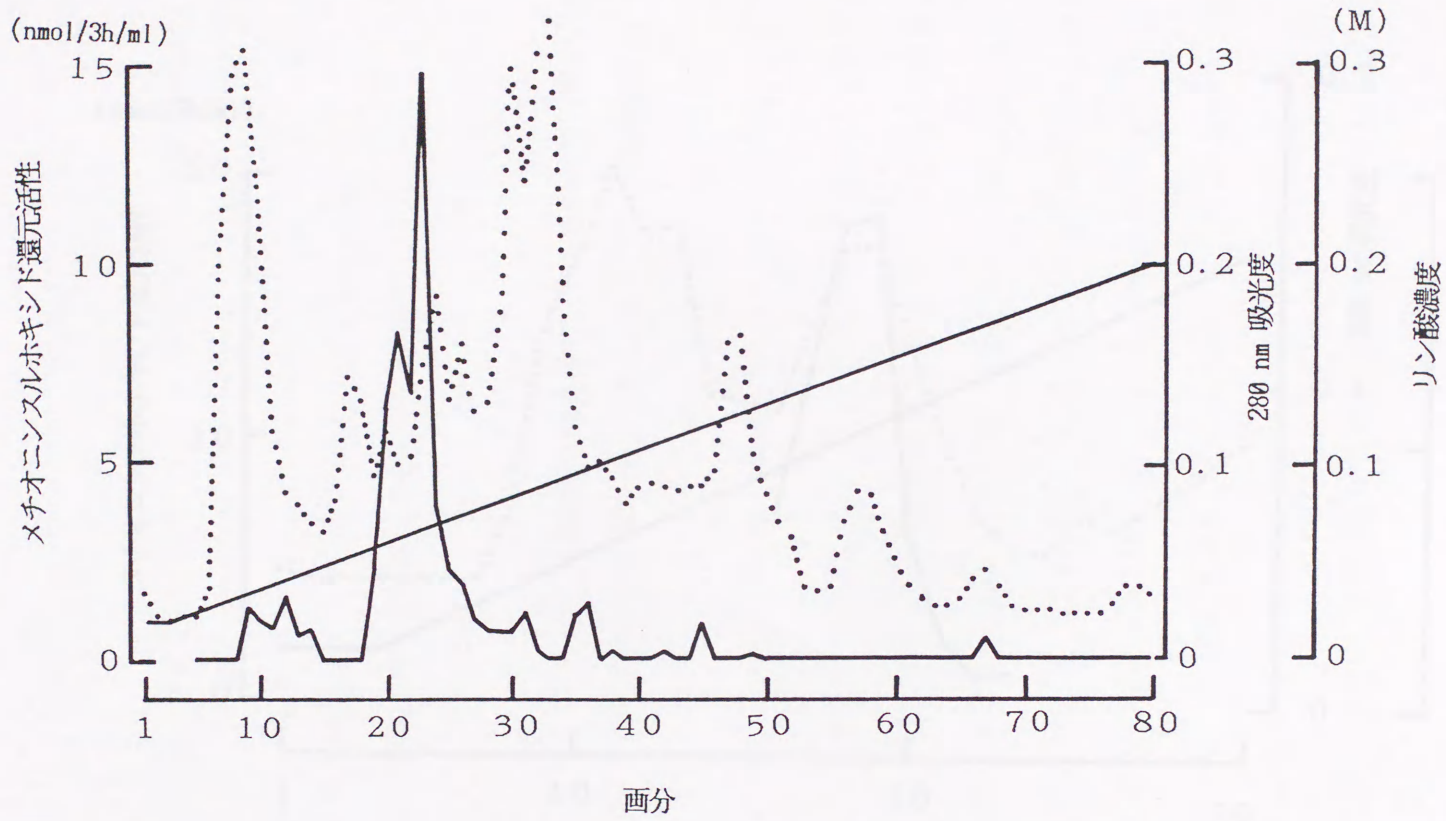


図 5-4-5 (a) 凍結乾燥粉末タイプ 2 からの Sephadex G-100 カラムによるメチオニンスルホキシド還元活性画分の Hydroxylapatite カラムによる分画

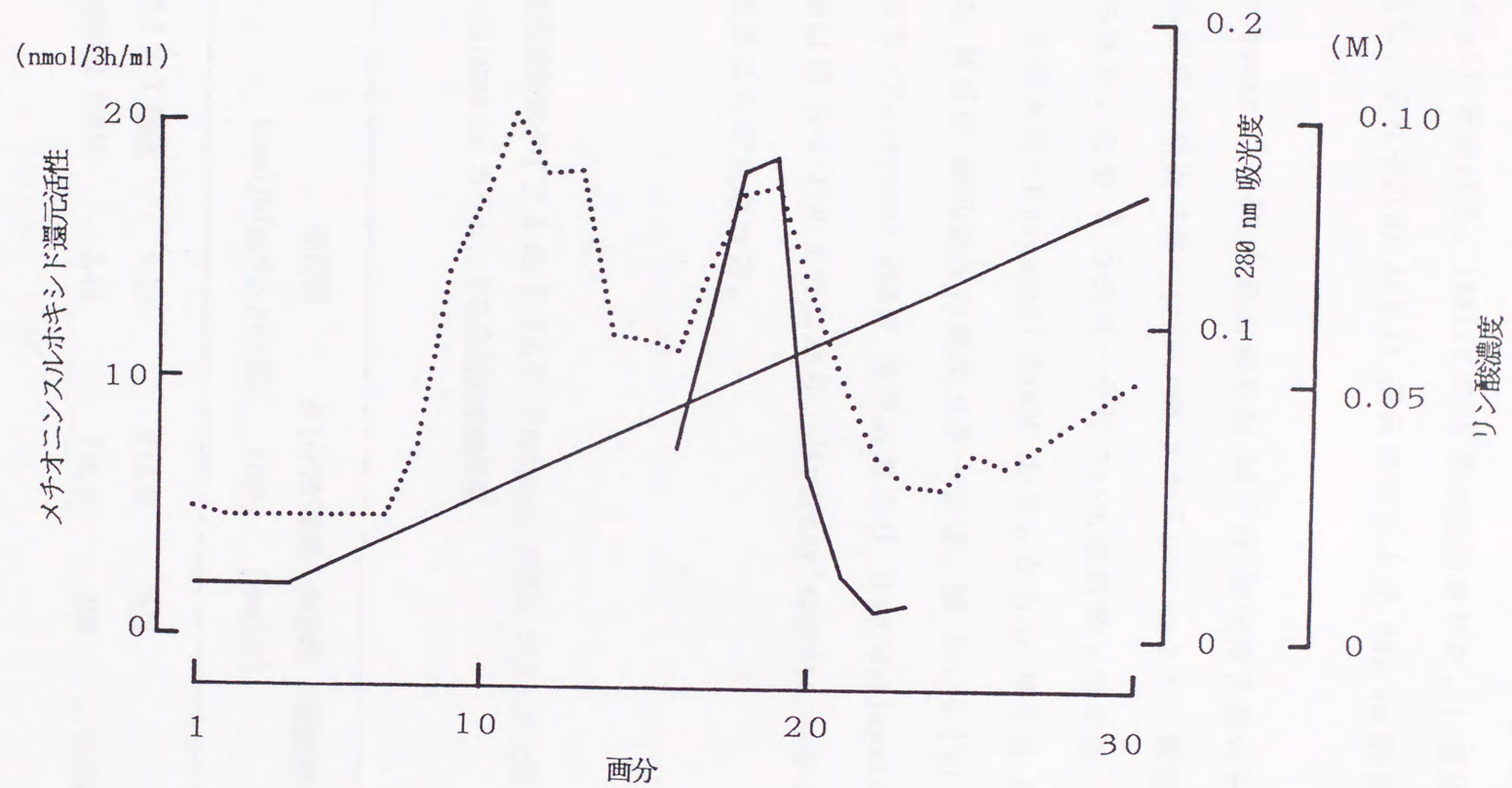


図 5-4-5 (b) 凍結乾燥粉末タイプ 3 からの DEAE-Toyopearl 650M カラムによるメチオニンスルホキシド還元活性画分の Hydroxylapatite カラムによる分画

16 cm³) に添加した。これを、10 から 400 mM のリン酸カリウム緩衝液のグラジェント (600 ml) をかけて、10ml/h の流速で溶出させた。1 画分を約 4.5 ml ずつ回収し、それぞれの M S O 還元活性および 280 nm 吸光度を測定した。

その結果、Sephadex G-100 カラムからの M S O 還元活性画分を用いた時の M S O 還元活性の溶出パターンは、図 5-4-5 (a) のように隣接する 2 つのピークが見られた。この 2 つのピークについては次節 (第 5 節, 2.) で述べる。一方、D E A E - T o y o p e a r l 650M カラムからの M S O 還元活性画分を用いた時の M S O 還元活性の溶出パターンは、図 5-4-5 (b) のようになった。D E A E - T o y o p e a r l 650M カラムおよび Hydroxylapatite カラムによる精製効果は表 5-4-3 のようになり、Hydroxylapatite カラムで高い精製効果が得られることが分かった。

表 5-4-3 凍結乾燥粉末タイプ 3 の D E A E - T o y o p e a r l 650M カラムおよび Hydroxylapatite カラムによる分画の精製効果

	比活性 (nmol/h/mgタンパク質)	タンパク質量 (mg)	全活性 (nmol/h)	精製倍率	回収率 (%)
凍結乾燥粉末タイプ 3 溶液	5.13	213.0	1094		
D E A E - T o y o p e a r l 650M カラム画分	3.48	114.2	398	0.68	36.4
Hydroxylapatite カラム カラム画分	90.88	1.27	115	17.70	10.6

6. Butyl-Toyopearl 650S カラムによる分画

ここでは、Butyl-Toyopearl 650S を用いた疎水クロマトグラフィーによる分画について検討した。Butyl-Toyopearl 650S カラムによる分画は以下の手順で行った。

2 g の FD-3 に 10 ml の 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, D T T 1 mM, 硫酸アンモニウム 1.3 M) を加え、よく攪拌して放置 (4°C, 30 分) した。これを遠心分離 (27,000×g, 4°C, 30 分) し、その上清 7 ml を、FD-3 を溶解した緩衝液と同じ緩衝液で平衡化した Butyl-Toyopearl 650S カラム (1.5×15 cm, カラム体積 26 cm³) に添加した。これを、1.3 から 0 M の 硫酸アンモニウム のグラジエント (600 ml) をかけて、25 ml/h の流速で溶出させた。1 画分を約 4.5 ml ずつ回収し、それぞれの M S O 還元活性および 280 nm 吸光度を測定した。

その結果、M S O 還元活性の溶出パターンは図 5-4-6 のようになった。この図から、Butyl-Toyopearl 650S カラムによる分画でも 1 つのピークしか得られないことが分かった。表 5-4-4 は Butyl-Toyopearl 650S カラムによる分画の精製効果である。この表から、D E A E -Toyopearl 650M カラムと同程度の精製効果があると考えられた。

表 5-4-4 凍結乾燥粉末タイプ 3 の Butyl-Toyopearl 650S カラムによる分画の精製効果

	比活性 (nmol/h/mgタンパク質)	タンパク質量 (mg)	全活性 (nmol/h)	精製倍率	回収率 (%)
凍結乾燥粉末タイプ 3 溶液	1.02	479.0	487		
Butyl-Toyopearl 650S カラム画分	4.11	91.0	411	4.04	84.4

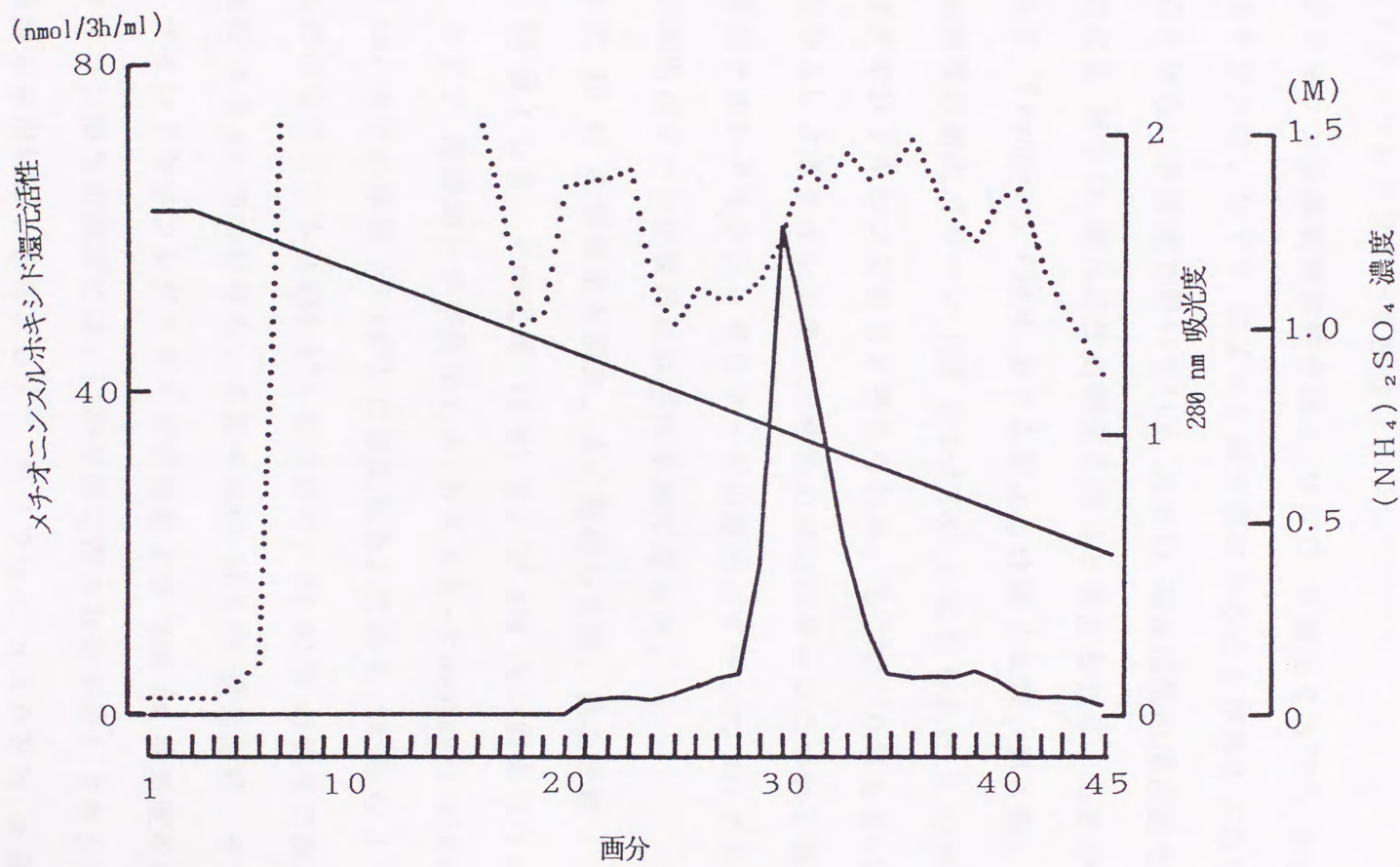


図 5-4-6 凍結乾燥粉末タイプ 3 のButyl-Toyopearl 650S カラムによる分画

第5節 チオレドキシシンおよびチオレドキシシンレダクターゼのカラムクロマトグラフィーによる分画

1. DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画のチオレドキシシン活性およびチオレドキシシンレダクターゼ活性

還元型のチオレドキシシンは基質特異性が低く MSO も還元する⁵²⁾。また、酸化型のチオレドキシシンは、DTT によって還元型になることが報告されている¹⁰⁰⁾。このことから、本研究で用いている MSO 還元活性の測定法では、チオレドキシシンのよる MSO 還元活性も測定されると考えられる。したがって、前節の DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画 (本章, 第4節, 2.) の MSO 還元活性の溶出パターン (図 5-4-2 (a)) に見られた 3 つのピークの内、1 つはチオレドキシシンであると考えられる。そこで、DEAE-Toyopearl 650M カラムによるチオレドキシシン活性の溶出パターンについて検討した。また、同時にチオレドキシシンレダクターゼの溶出パターンについても検討した。これらの溶出パターンの検討は以下の手順で行った。

1 g の FD-3 に 15 ml の蒸留水を加え、よく攪拌した後、遠心分離 (27,000×g, 4°C, 30 分) した。その上清 10 ml を、10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, DTT 無添加) で平衡化した DEAE-Toyopearl 650M カラム (1.5×15 cm, カラム体積 26 cm³) に添加した。これを、0 から 1 M の塩化ナトリウムのグラジエント (600 ml) をかけて、25 ml/h の流速で溶出させた。1 画分を約 4.5 ml ずつ回収し、それぞれの MSO 還元活性、チオレドキシシン活性、チオレドキシシンレダクターゼ活性および 280 nm 吸光度を測定した。チオレドキシシン活性の測定には、この分画で得られたチオレドキシシンレダクターゼ活性画分を用いた。また、DTT だけでなく NADPH を還

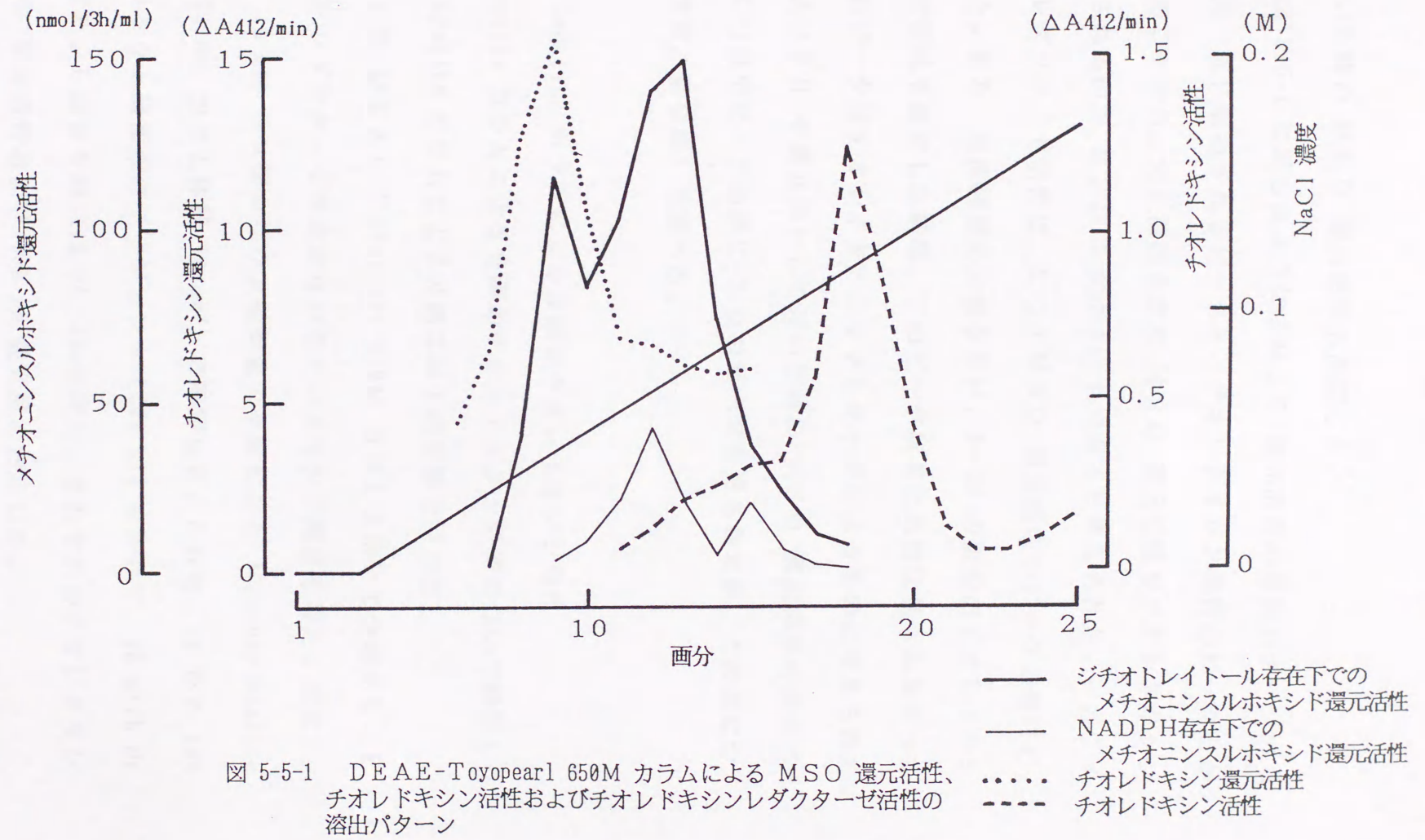


図 5-5-1 DEAE-Toyopearl 650M カラムによる MSO 還元活性、チオレドキシン活性およびチオレドキシンレダクターゼ活性の溶出パターン

元剤として用いた時の MSO 還元活性も測定した。

その結果、図 5-5-1 に示したように、MSO 還元活性の溶出パターンの 2 つのピークの内、先に溶出されるピークと、チオレドキシン活性のピークとが重なった。このことから、先に溶出される MSO 還元活性がチオレドキシンで、後に溶出されるのが MSO レダクターゼであると考えられた。一方、チオレドキシンレダクターゼ活性は、2 つの MSO 還元活性のピークの後にピークが見られた。また、再度同様の分画を行い、6~30 の画分のチオレドキシンレダクターゼ活性を測定した結果、このピーク以外に活性は見られなかったことから、このピークはチオレドキシンレダクターゼによるものと考えられた。ところで、NADPH を還元剤として用いた時の MSO 還元活性の溶出パターンでは、2 つ目のピークの所に 2 つのピークが見られたが、この点については考察（本章，第 9 節）で述べる。

2. Hydroxylapatite カラムによる分画のチオレドキシン活性

Hydroxylapatite カラムによる分画のチオレドキシン活性について検討した。Hydroxylapatite カラムによる分画は以下の手順で行った。

まず、FD-3 を DEAE-Toyopearl 650M カラムを用いて分画することにより、MSO レダクターゼを含まないチオレドキシン画分を得た。次に、その 6 ml を、10 mM リン酸カリウム緩衝液で平衡化した Hydroxylapatite カラム (1.0×20 cm, カラム体積 16 cm³) に添加した。これを、10 から 400 mM のリン酸カリウム緩衝液のグラジエント (600 ml) をかけて、10 ml/h の流速で溶出させた。1 画分を約 4.5 ml ずつ回収し、それぞれのチオレドキシンによる MSO 還元活性および 280 nm 吸光度を測定した。

その結果、チオレドキシンによる MSO 還元活性の溶出パターンは、図

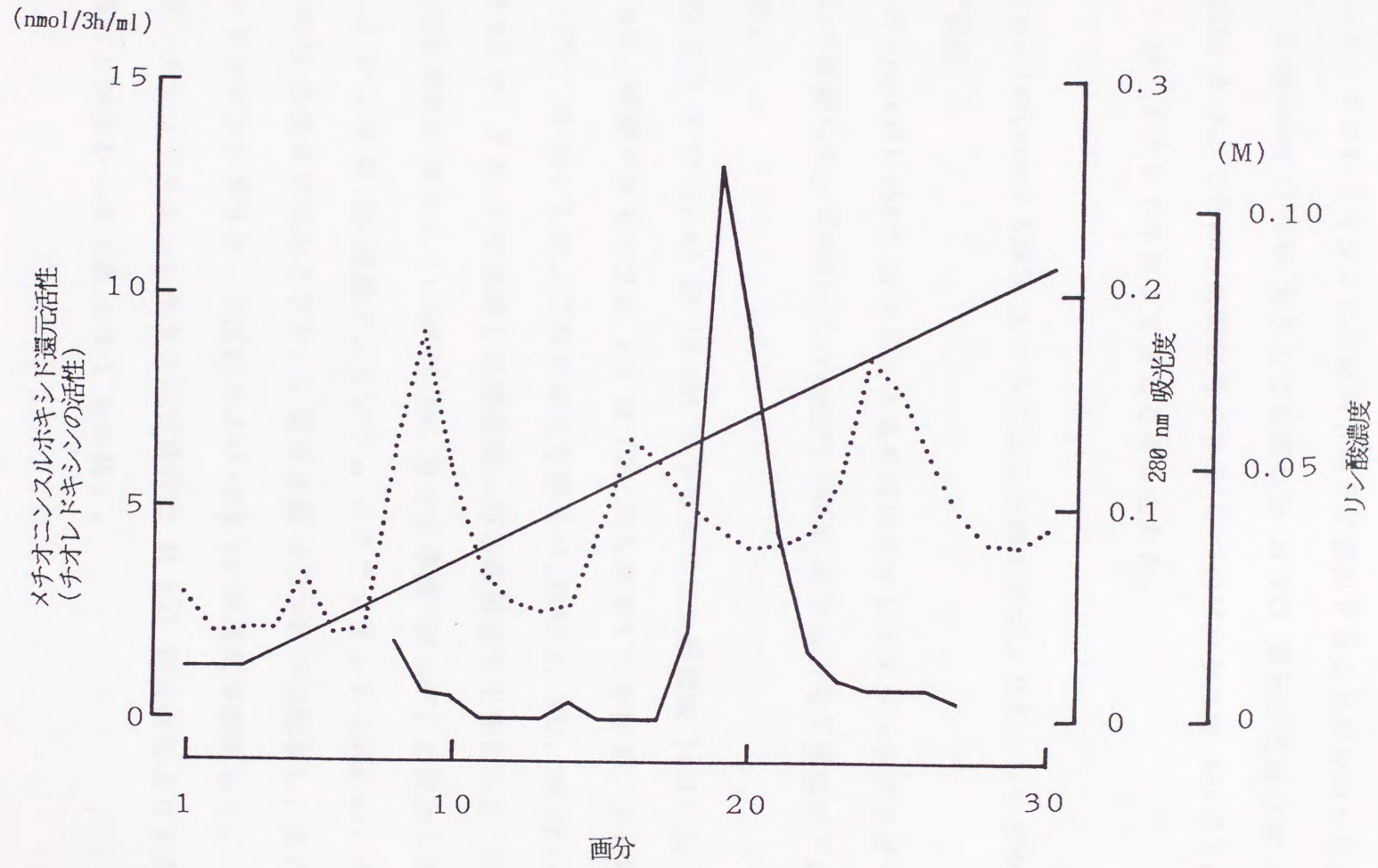


図 5-5-2 凍結乾燥粉末タイプ 3 を DEAE-Toyopearl 650M カラムで分画した粗酵素液の Hydroxylapatite カラムによる分画

5-5-2 のようになった。この図から、Hydroxylapatite カラムでは、MSO レダクターゼとチオレドキシンはほぼ同じ画分に溶出することが分かった。したがって、Sephadex G-100 カラムで分画した MSO 還元活性画分を Hydroxylapatite カラムで分画した時に見られた 2 つのピーク (図 5-4-5 (a)) の内の 1 つは、チオレドキシンであると考えられた。

3. Butyl-Toyopearl 650S カラムによる分画のチオレドキシンレダクターゼ活性

Butyl-Toyopearl 650S カラムによる分画のチオレドキシンレダクターゼ活性について検討した。Butyl-Toyopearl 650S カラムによる分画は以下の手順で行った。

1.5 g の FD-3 に 15 ml の 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, EDTA 1 mM, 硫酸アンモニウム 1.3 M (約 30% 飽和)) を加え、よく攪拌して放置 (4°C, 30 分) した。これを遠心分離 (27,000×g, 4°C, 30 分) した上清 10 ml を、FD-3 を溶解した緩衝液と同じ緩衝液で平衡化した Butyl-Toyopearl 650S カラム (1.5×15 cm, カラム体積 26 cm³) に添加した。これを、1.3 から 0 M の硫酸アンモニウムのグラジエント (600 ml) をかけて、25 ml/h の流速で溶出させた。1 画分を約 4.5 ml ずつ回収し、それぞれのチオレドキシンレダクターゼ活性および 280 nm 吸光度を測定した。

その結果、チオレドキシンレダクターゼ活性は MSO 還元活性よりも遅く溶出されることが分かった (図 5-6-1 を参照)。

第6節 メチオニンスルホキシドレダクターゼの精製

本節では、第4節で検討したカラムクロマトグラフィーを用いてFD-3を分画し、MSOレダクターゼの精製を行った。

1. 凍結乾燥粉末タイプ3からのMSOレダクターゼの精製の手順

第4節および第5節の検討結果から、MSOレダクターゼとチオレドキシンを分離するためにはDEAE-Toyopearl 650Mカラムによる分画が必要なことおよびHydroxylapatiteカラムによる分画によって高い精製効果が得られることが分かった。これらのことを考慮に入れて、第4節で検討したカラムクロマトグラフィーを組み合わせ、いくつかの検討を行った結果、最終的に以下の手順でMSOレダクターゼを精製することができた。

まず、2gのFD-3に10mlの10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0, EDTA 1mM, 硫酸アンモニウム 1.3M)を加え、よく攪拌した後、遠心分離(27,000×g, 4°C, 30分)した上清10mlを、FD-3を溶解した緩衝液と同じ緩衝液で平衡化したButyl-Toyopearl 650Sカラム(1.5×15cm, カラム体積26cm³)に添加した。これを、1.3から0Mの硫酸アンモニウムのグラジエント(300ml)をかけて、25ml/hの流速で溶出させた。1画分を約4.5mlずつ回収した。この分画でMSO還元活性画分(MSOレダクターゼおよびチオレドキシンを含む)およびチオレドキシレダクターゼ画分が得られた(図5-6-1)。チオレドキシレダクターゼ画分は、次節で述べるチオレドキシレダクターゼの部分精製に用いた。次に、得られたMSO還元画分を、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0, DTT 1mM)に対して透析(12時間)し、28mlの粗酵素液を透析に用いた緩衝液と同じ緩衝

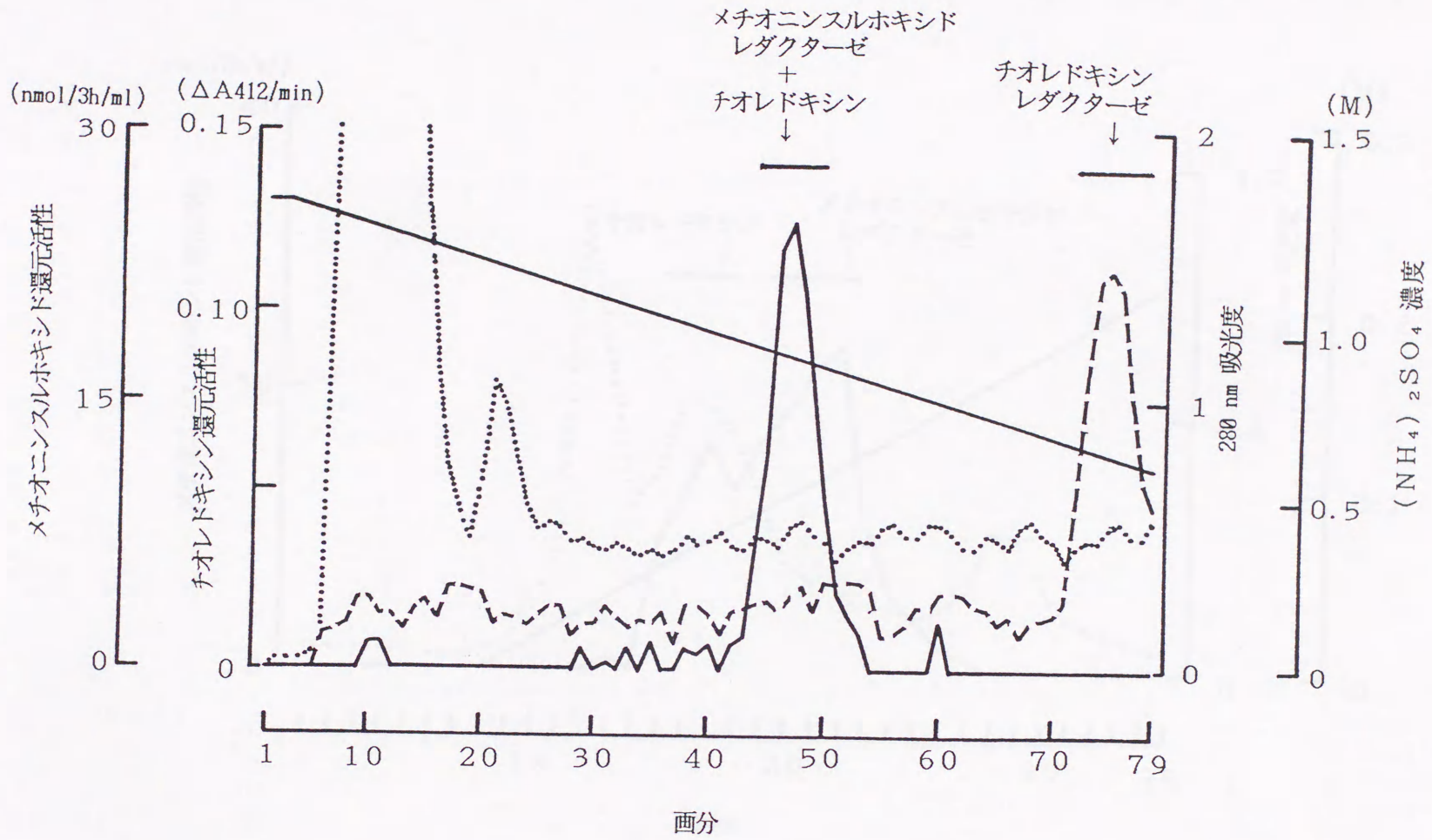


図 5-6-1 凍結乾燥粉末タイプ 3 の Butyl-Toyopearl 650S カラムによるメチオニンスルホキシド還元活性およびチオレドキシンレダクターゼ活性の溶出パターン

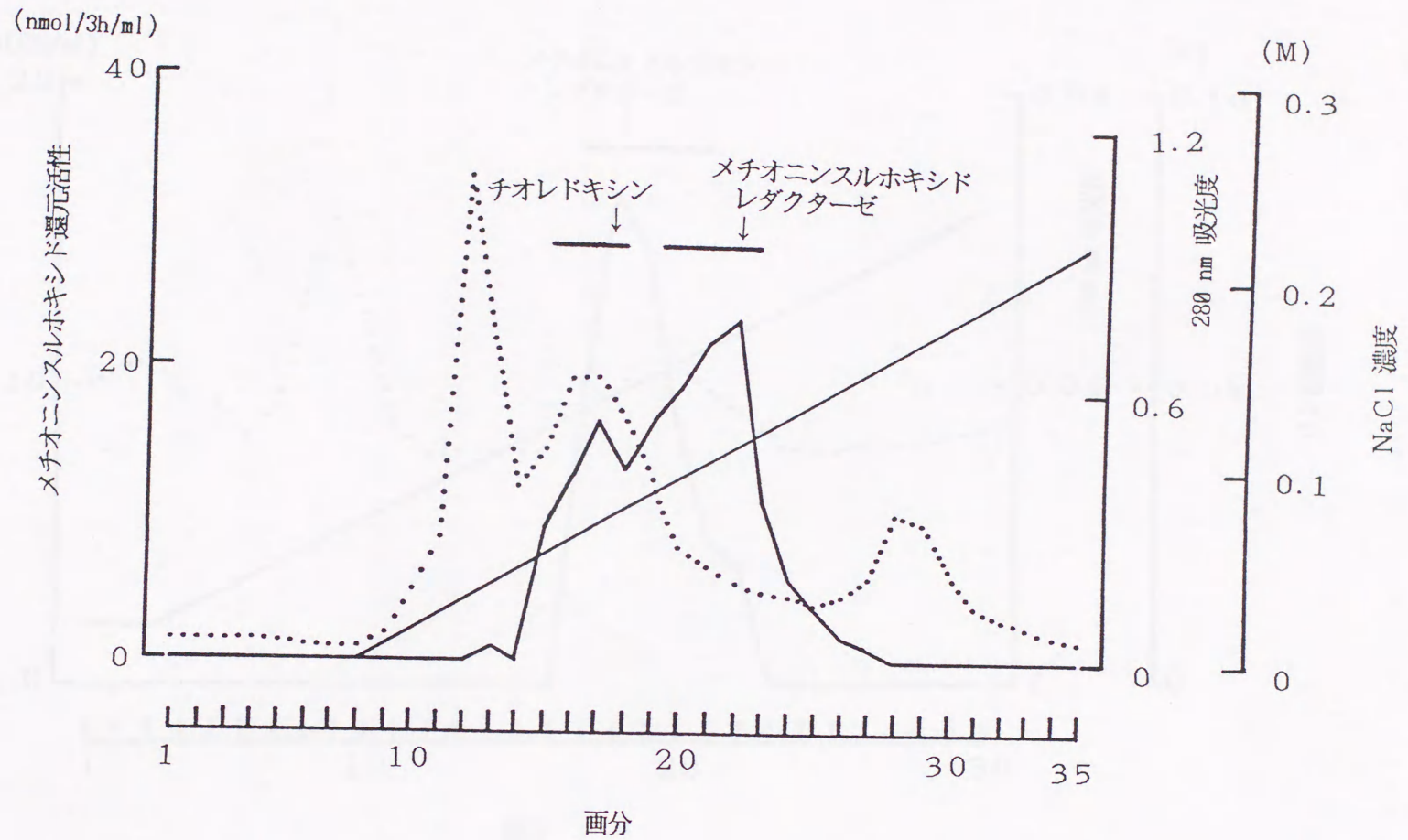


図 5-6-2 Butyl-Toyopearl 650S カラムによるメチオニンスルホキシド還元活性画分の DEAE-Toyopearl 650M カラムによるメチオニンスルホキシド還元活性の溶出パターン

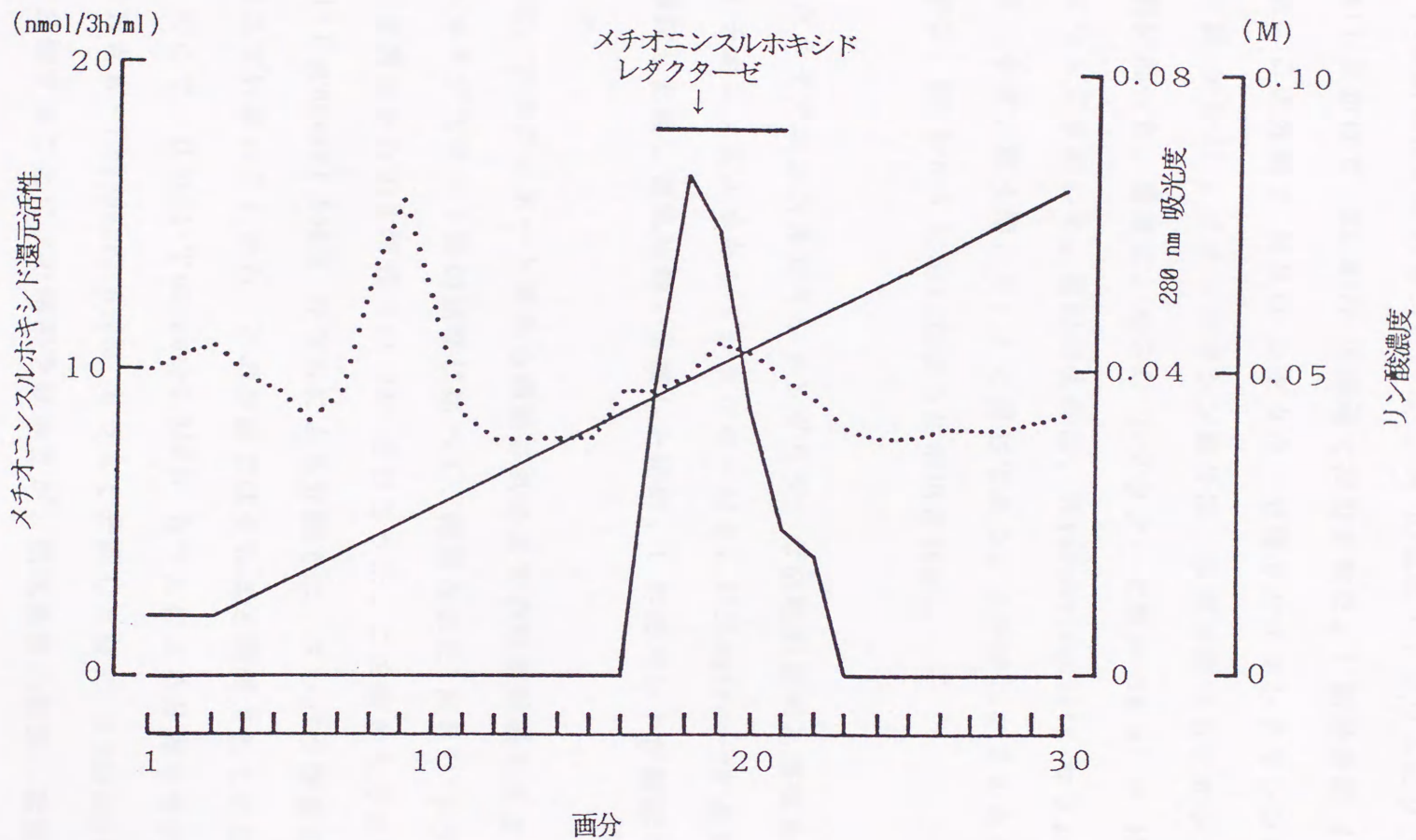


図 5-6-3 DEAE-Toyopearl 650M カラムによるメチオニンスルホキシド還元活性画分のHydroxylapatite カラムによるメチオニンスルホキシドレダクターゼ活性の溶出パターン

液で平衡化した D E A E - T o y o p e a r l 6 5 0 M カラム (1.5×15 cm, カラム体積 26 cm³) に添加した。これを、0 から 1 M の塩化ナトリウムのグラジエント (600 ml) をかけて、25 ml/h の流速で溶出させた。1 画分を約 4.5 ml づつ回収した。この分画で M S O レダクターゼ画分とチオレドキシシン画分が分離された (図 5-6-2)。チオレドキシシン画分は、次節で述べるチオレドキシシンの部分精製に用いた。最後に、M S O レダクターゼ画分 10 ml を H y d r o x y l a p a t i t e カラムに添加した。溶出の条件は、H y d r o x y l a p a t i t e カラムによる分画の検討 (本章, 第 4 節, 5.) と同じである。メチオニンスルホキシドレダクターゼは、図 5-6-3 に示したように溶出された。

2. 精製したメチオニンスルホキシドレダクターゼの精製倍率と電気泳動

精製したメチオニンスルホキシドレダクターゼを、U l t r a f r e e - 2 0 を用いた限外ろ過で濃縮した後、電気泳動で分離した結果、1 本のバンドが確認できた (図 5-6-4)。

表 5-6-1 は、ホモジェネート液から精製されるまでの精製効果をまとめたものである。ホモジェネート液の活性に比べて、精製された M S O レダクターゼのタンパク質当たりの比活性は約 307 倍になった。この表から分かるように、B u t y l - T o y o p e a r l 6 5 0 S カラムによる分画では、タンパク質量当たりの比活性が増えていないことから、この分画ではそれほど精製されていないことが分かる。そこで、B u t y l - T o y o p e a r l 6 5 0 S カラムによる分画をせずに、F D - 3 を D E A E - T o y o p e a r l 6 5 0 M カラムで分画した後に H y d r o x y l a p a t i t e カラムで分画することにより精製を試みたが、電気泳動の結果、複数のバンドがみられ、B u t y l - T o y o p e a r l 6 5 0 S カラムによる分画は必要であると考えられた。

表 5-6-1 精製の各段階のメチオニンスルホキシド還元活性

	比活性 (nmol/h/mgタンパク質)	タンパク質量 (mg)	全活性 (nmol/h)	精製倍率	回収率 (%)
ホモジェネート液	0.34	31110	1103		
pH 処理	1.05	949.0	1026	3.05	93.0
1.3 M 硫酸上清	2.87	339.7	975	8.33	88.4
Butyl-Toyopearl 650S	2.78	266.5	740	8.06	67.1
DEAE-Toyopearl 650M	12.72	11.68	148.6	36.91	13.47
Hydroxylapatite	105.7	0.188	19.92	306.8	1.806



図 5-6-4 メチオニンスルホキシドレダクターゼの電気泳動

第7節 チオレドキシンおよびチオレドキシンレダクターゼの部分精製

本節では、MSO還元活性へのチオレドキシン系の関与を確認するために必要なチオレドキシンおよびチオレドキシンレダクターゼの部分精製を行った。チオレドキシンおよびチオレドキシンレダクターゼの部分精製は、MSOレダクターゼの精製と同時に以下の手順で行った。

1. チオレドキシンレダクターゼの部分精製

チオレドキシンレダクターゼは、MSOレダクターゼの精製のButyl-Toyopearl 650Sカラムによる分画の時に得られたチオレドキシンレダクターゼ画分をDEAE-Toyopearl 650Mカラムで分画することにより得た。Butyl-Toyopearl 650Sカラムによる分画で得られたチオレドキシンレダクターゼ画分を、10 mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0, EDTA 1 mM)に対して透析(12時間)し、35 mlを透析に用いた緩衝液と同じ緩衝液で平衡化したDEAE-Toyopearl 650Mカラム(1.5×15 cm, カラム体積 26 cm³)に添加した。これを、0から1 Mの塩化ナトリウムのグラジエント(600 ml)をかけて、25 ml/hの流速で溶出させた。1画分を約4.5 mlずつ回収した。こうして得られたチオレドキシンレダクターゼ画分は、-20℃で保存した。実験に使用する際には室温で解凍した。

2. チオレドキシンの部分精製

チオレドキシンは、MSOレダクターゼの精製のDEAE-Toyopearl 650Mカラムによる分画の際に得られたチオレドキシン画分を、Hydroxylapatiteカラムで分画することにより得た。分画の条件は、Hydroxylapatiteカ

ラムによる分画の検討（本章，第4節，5.）の項で述べたものと同じである。また、チオレドキシン活性は、インシュリンを用いたチオレドキシンの活性測定法（本章，第2節，3.（1））が、D T T によって阻害されるため、M S O 還元活性で測定した。Hydroxylapatite カラムによる分画で、チオレドキシン画分は、M S O レダクターゼ画分よりもやや遅くなる傾向はあったが、ほぼ同じ位置に溶出された。

チオレドキシンは、本研究で用いたカラムクロマトグラフィーではいずれも M S O レダクターゼに近い位置に溶出された。しかし、部分精製されたチオレドキシンを電気泳動で分離した結果、M S O レダクターゼのバンドは見られなかったことから、部分精製されたチオレドキシンには M S O レダクターゼは含まれていないと考えられた。

第8節 メチオニンスルホキシドレダクターゼの性質

1. ジチオトレイトール存在下でのメチオニンスルホキシドレダクターゼの性質

精製した M S O レダクターゼに含まれるジチオトレイトール（D T T）を透析によって取り除き、N A D P H または N A D H による M S O 還元活性を検討した。その結果、表 5-8-1 に示したように、N A D P H または N A D H を添加した区には M S O 還元活性は見られなかった。しかし、再び D T T を添加した区には M S O 還元活性が見られた。このことから、M S O レダクターゼは D T T のない緩衝液で透析をすると失活し、D T T を添加すると M S O の還元活性を取り戻すのか、あるいは M S O レダクターゼ

だけでは NADPH または NADH による MSO の還元は起こらないと
考えられた。そのため、MSO レダクターゼの性質の検討は 1 mM の D T
T が存在する条件で行った。

表 5-8-1 メチオニンスルホキシドレダクターゼのメチオニン
スルホキシド還元活性に及ぼす還元剤の影響

メチオニンスルホキシド還元活性 ±SE (nmol/3h/ml)		
NADH	0.00	±0.00
NADPH	0.00	±0.00
ジチオトレイトール	7.92	±3.12

(1) pH 安定性

MSO レダクターゼの pH 安定性は以下の手順で検討した。

まず、MSO レダクターゼ溶液 (約 100 mM リン酸カリウム緩衝液, pH
7.0, D T T 1 mM) 0.1 ml に、任意の pH に調製した緩衝液 (D T T 1
mM) 0.1 ml を加えて、39°C で 3 時間インキュベートした。この時のそれ
ぞれの溶液の pH を測定した。次に、基質溶液 (MSO 2 mM, 400 mM リ
ン酸カリウム緩衝液, pH 7.0, D T T 1 mM) 0.2 ml を加えて、再び 39°C
で 3 時間インキュベトした。この時のそれぞれの溶液の pH は、6.66 から
7.12 の間にあった。インキュベーション終了後、27% スルホサリチル酸溶液

0.05 ml を加えて反応を停止し、そのメチオニン濃度を測定した。

その結果、MSO レダクターゼは、酸性側で安定する傾向が見られた (図 5-8-1)。

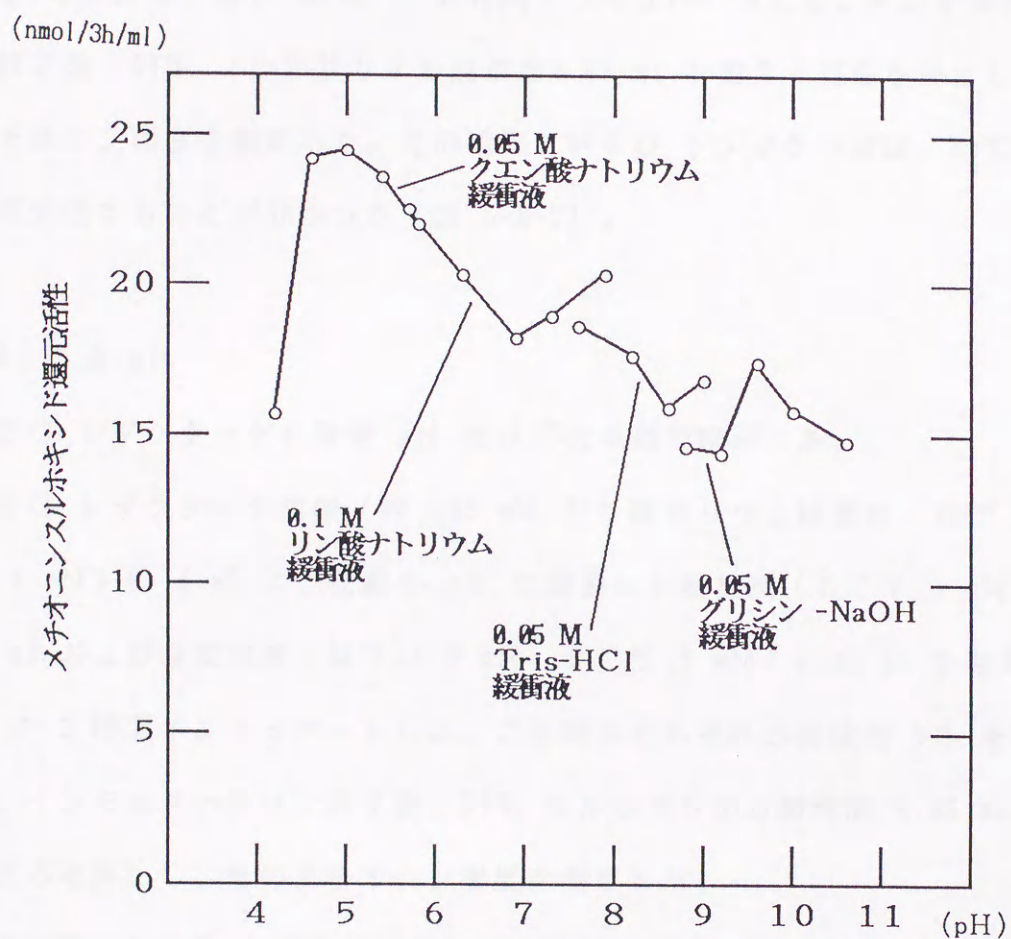


図 5-8-1 メチオニンスルホキシドレダクターゼのジチオスレイトール存在下の pH 安定性

(2) 温度安定性

M S O レダクターゼの温度安定性は以下の手順で検討した。

M S O レダクターゼ溶液 (10 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.0, D T T 1 mM) 0.2 ml を任意の温度で 1 時間インキュベートした後に氷冷し、基質溶液 (M S O 2 mM, 100 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.0, D T T 1 mM) 0.2 ml を加えて、再び 39°C で 3 時間インキュベートした。インキュベーション終了後、27% スルホサリチル酸溶液 0.05 ml を加えて反応を停止し、そのメチオニン濃度を測定した。その結果、M S O レダクターゼは、60°C 以上でほぼ失活することが分かった (図 5-8-2)。

(3) 最適 pH

M S O レダクターゼの最適 pH は以下の手順で検討した。

M S O レダクターゼ溶液 (約 100 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.0, D T T 1 mM) 0.15 ml に、任意の pH に調製した緩衝液 (D T T 1 mM) 0.15 ml および基質溶液 (M S O 8 mM, D T T 1 mM) 0.05 ml を加えて、39°C で 3 時間インキュベートした。この時のそれぞれの溶液の pH を測定した。インキュベーション終了後、27% スルホサリチル酸溶液 0.05 ml を加えて反応を停止し、そのメチオニン濃度を測定した。

その結果、M S O レダクターゼは、pH 8.8 付近で最も高い M S O 還元活性を示した (図 5-8-3)。

(4) 金属イオンの影響

M S O レダクターゼに及ぼす金属イオンの影響は以下の手順で検討した。

M S O レダクターゼ溶液 (約 100 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.0, D

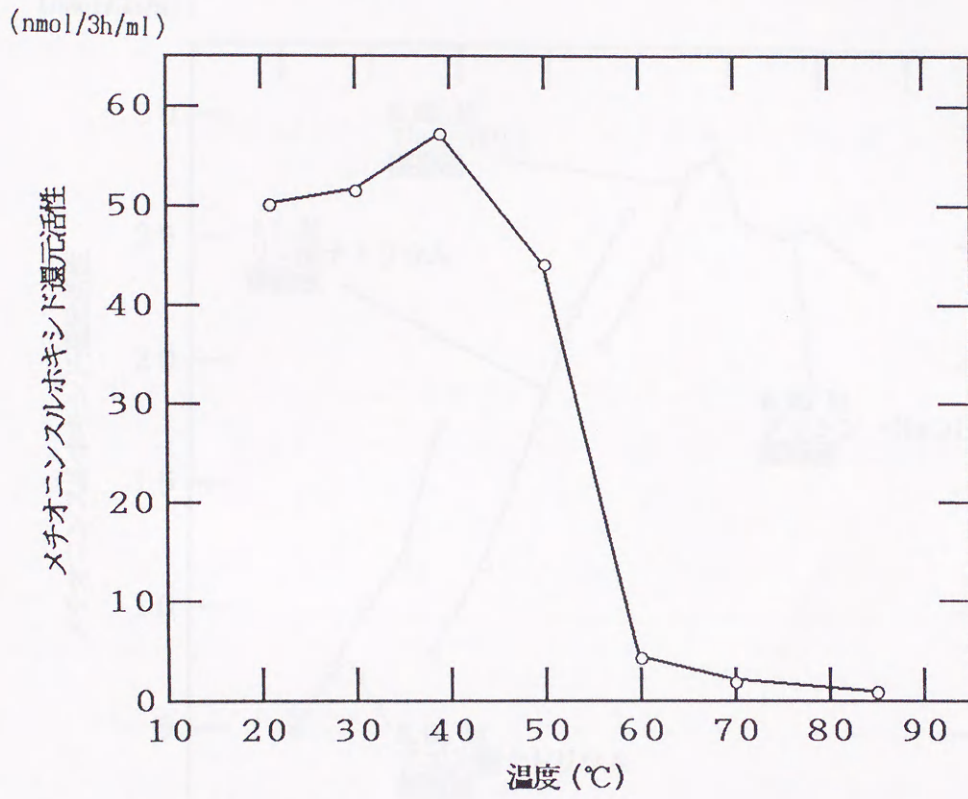


図 5-8-2 メチオニンスルホキシドレダクターゼのジチオスレイトール存在下の温度安定性

(nmol/3h/ml)

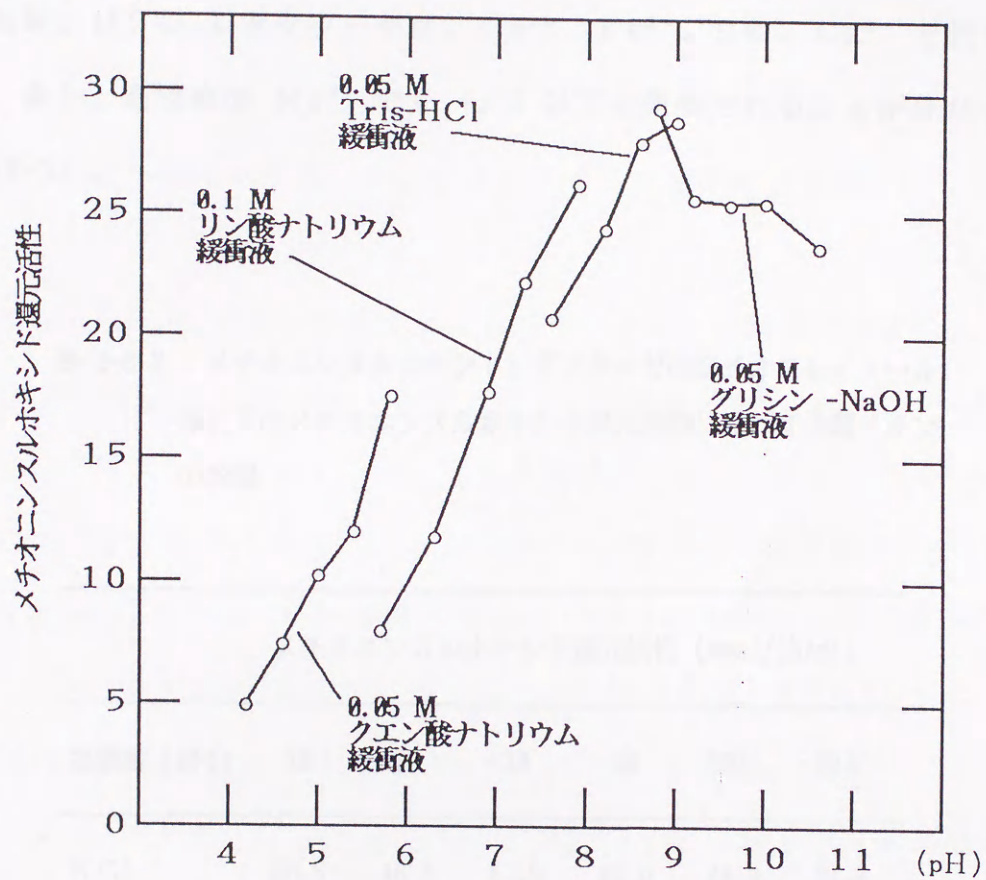


図 5-8-3 メチオニンスルホキシドレダクターゼのジチオスレイトール存在下のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす pH の影響

TT 1 mM) 0.2 ml に、目的の 4 倍の濃度の塩溶液 0.1 ml および基質溶液 (MSO 4 mM, DTT 2 mM) 0.1 ml を加えて、39°C で 3 時間インキュベートした。インキュベーション終了後、27% スルホサリチル酸溶液 0.05 ml を加えて反応を停止し、そのメチオニン濃度を測定した。

その結果、MSO レダクターゼは、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Bu^- 、 Ca^{2+} で強く阻害され、また、高濃度の Mg^{2+} でも 1/3 以下に阻害されることが分かった (表 5-8-2)。

表 5-8-2 メチオニンスルホキシドレダクターゼのジチオスレイトール存在下のメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼす金属イオンの影響

メチオニンスルホキシド還元活性 (nmol/3h/ml)						
塩濃度 (mM)	10	20	30	50	100	200
KCl	50.5	48.3	51.9	49.6	44.0	34.8
NaCl	50.8	46.8	49.8	47.1	44.1	42.2
CaCl_2	12.1	6.2	3.7	3.7	4.1	3.9
CuCl_2^a	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NaSO_4	39.7	39.2	38.0	38.6	35.1	36.8
CuSO_4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MgSO_4	47.6	37.8	35.1	26.2	25.0	15.3
FeSO_4^a	3.8	3.4	3.5	3.8	3.3	3.3

^a インキュベーション終了後、沈殿物が見られた。

2. メチオニンスルホキシドレダクターゼのメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼすチオレドキシンの添加の影響

ここでは、MSO レダクターゼの MSO 還元活性に及ぼすチオレドキシ系（チオレドキシ、チオレドキシレダクターゼ、NADPH）の添加の影響について検討した。チオレドキシおよびチオレドキシレダクターゼは、チオレドキシおよびチオレドキシレダクターゼの部分精製（本章、第7節）に述べた方法で得たものを用いた。チオレドキシ系添加の影響は、以下の手順で検討した。

まず、MSO レダクターゼ溶液およびチオレドキシ溶液に含まれる DTT を取り除くために、10 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0, EDTA 1 mM）に対して透析（12 時間）した。これらの溶液 0.1 ml と、チオレドキシレダクターゼ溶液 0.1 ml または 10 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0, EDTA 1 mM）0.1 ml を表 5-8-3 に示したように組み合わせて全 0.3 ml にし、これらに基質溶液（10 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.0, MSO 4 mM, EDTA 1 mM, NADPH 4 mM）0.1 ml を添加して、39°C で 3 時間インキュベートした。インキュベーション後、27% スルホサリチル酸溶液 0.05 ml を加えて反応を停止し、メチオニン濃度を測定した。

その結果、3 つのそれぞれの溶液だけの時は、チオレドキシのみに MSO 還元活性が見られ、MSO レダクターゼとチオレドキシレダクターゼには MSO 還元活性が見られなかった。しかし、MSO レダクターゼとチオレドキシレダクターゼを組み合わせると、MSO 還元活性が見られた。一方、チオレドキシと MSO レダクターゼまたはチオレドキシとチオレドキシレダクターゼを含んでいる時はチオレドキシのみの時とほとんど同程度の MSO 還元活性しか見られなかった。また、3 つの溶液を合わせると、

チオレドキシンのみの時の約 16.7 倍の M S O 還元活性が見られた。この結果から、M S O レダクターゼは、M S O 還元活性を示すためにはチオレドキシン系を必要とすると考えられた。

表 5-8-3 メチオニンスルホキシドレダクターゼのメチオニンスルホキシド還元活性に及ぼすチオレドキシン系添加の影響

反応液の構成*	メチオニンスルホキシド還元活性 (nmol/3h/ml)	buf + Th + buf に対する活性 (%)
Mr + buf + buf	0.0	0
buf + Th + buf	1.7	100
buf + buf + Tr	0.0	0
Mr + Th + buf	1.6	96
buf + Th + Tr	1.3	76
Mr + buf + Tr	2.9	171
Mr + Th + Tr	28.3	1665

- * Mr: メチオニンスルホキシドレダクターゼ溶液 0.1 ml.
 Th: チオレドキシン溶液 0.1 ml.
 Tr: チオレドキシンレダクターゼ溶液 0.1 ml.
 buf: 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) 0.1 ml.
 0.4 ml のインキュベーション液は 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0), 1 mM メチオニンスルホキシド, 1 mM NADPH, 1 mM EDTA を含んでいた。DTT は含んでいない。

第9節 考察

まず、DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画の検討(本章, 第4節, 2.)で、MSO還元活性の溶出パターンに3つのピークが見られたことから、牛肝臓にはDTT存在下でMSO還元活性を示す物質が少なくとも3つあることが分かった。一方、他のカラムクロマトグラフィーでは、この3つの物質以外にMSO還元活性を示す画分は見られていないことから、牛肝臓にはMSO還元活性を示す物質はこの3つ以外にはないと考えられた。そして、この3つの物質の内、1番目のピークの物質はチオレドキシンであり、2番目のピークの物質はMSOレダクターゼであることが分かった(本章, 第5節, 1.)。しかし、3番目のピークの物質については、FD-2およびFD-3では認められなかったため検討しなかった。しかしながら、DEAE-Toyopearl 650M カラムによる分画で3番目のピークが見られたFD-1と見られなかったFD-2の調製法の相違点は、FD-2で粗酵素抽出液調製時にDTTを用いたこと、チオレドキシンはDTTで還元される¹⁰⁰⁾こと、およびチオレドキシンには還元型と酸化型がありそれぞれの構造が異なっている⁵²⁾ことを総合すると、3番目のピークの物質は酸化型のチオレドキシンではないかと考えられた。したがって、牛肝臓においてDTT存在下でMSO還元活性を示す物質は、MSOレダクターゼとチオレドキシンの2つのタンパク質だけと考えられた。

筆者は、本章, 第6節で述べたように、牛肝臓のMSOレダクターゼを電気泳動でバンド1本になるまで精製することができた。そして、精製したMSOレダクターゼのいくつかの性質を検討したが、その中で最も特徴的なのは、粗酵素レベルで活性を高めたNADHおよびNADPH(表2-3-1)

では、精製した MSO レダクターゼが MSO 還元活性をまったく示さなかったことである (表 5-8-1)。このことから、MSO レダクターゼは DTT のない条件では失活するが DTT を添加すると MSO の還元活性を取り戻すのか、あるいは NADPH または NADH だけでは MSO の還元は起こらないのかのいずれかであると考えられた。一方、表 5-8-3 の結果から、DTT のない条件で透析した MSO レダクターゼをチオレドキシン系に加えると、チオレドキシン系だけよりも MSO 還元活性が著しく高まったことから、DTT のない条件で透析しても MSO レダクターゼのすべてが失活するわけではないと考えられた。したがって、MSO レダクターゼは、NADPH または NADH 存在下だけでは MSO の還元作用は示さないと考えられた。また、MSO レダクターゼは、DTT のない条件でもチオレドキシン系を加えると MSO を還元したことから、チオレドキシン系を要求する酵素であると考えられた。また、表 5-8-3 の結果では、MSO レダクターゼとチオレドキシンレダクターゼを含みチオレドキシンを含んでいない条件でも MSO の還元が見られた。このことから、MSO レダクターゼはチオレドキシンを介さなくてもチオレドキシンレダクターゼによって直接 NADPH から電子を受け取ることができると考えられた。チオレドキシンレダクターゼは基質特異性が低く、酸化型チオレドキシン以外にアロキサン、メナジオンおよび Cu^{2+} とも反応することが報告されている⁵²⁾。

ところで、本章、第5節、1. で検討した DTT のない条件で行った DEAE-Toyopearl 650M カラムによる画分には、NADPH で MSO 還元活性を持つ画分があり、その溶出パターンには 2 つのピークが見られた (図 5-5-1)。この原因として、この分画を行った時にチオレドキシンと MSO レダクターゼの分離が悪かったために、1 番目のピークはチオレドキシン、

MSO レダクターゼおよび少量のチオレドキシンレダクターゼが混在し、MSO 還元活性が現れたのではないかと考えられた。また、2 番目のピークは、前に述べたように、MSO レダクターゼはチオレドキシンがなくてもチオレドキシンレダクターゼだけで MSO を還元できることから、MSO レダクターゼにチオレドキシンレダクターゼが混入したことによるものではないかと考えられた。

本章、第 8 節、1. (3) での検討結果から精製した MSO レダクターゼの最適 pH は 8.8 付近と考えられたが、この値は粗酵素レベルで検討された最適 pH (表 2-3-1) の 6.0 とは異なっていた。この原因としては、DTT 存在下 (精製した MSO レダクターゼの性質は DTT 存在下で検討した) とそうでない条件では MSO レダクターゼの最適 pH が変化するのか、チオレドキシン系が供給する還元型チオレドキシンが不足しているために MSO レダクターゼでなくチオレドキシンレダクターゼの性質が粗酵素レベルでは現れたのかのいずれかであると考えられた。一方、粗酵素レベルで牛肝臓の性質を検討した時には還元剤として NADH を添加していた。チオレドキシン系は NADPH を要求することから、NAD(P)⁺ トランスヒドロゲナーゼで NADH を NADPH に変換して NADPH をチオレドキシン系に供給することにより、MSO を還元できていたと考えられる。したがって、NAD(P)⁺ トランスヒドロゲナーゼの NADH を NADPH に変換する活性が律速段階にある時は、NAD(P)⁺ トランスヒドロゲナーゼの性質が現れていたことも考えられる。しかし、還元剤の影響を検討した結果で、牛肝臓では NADH は NADPH と同程度に MSO 還元活性を高めていたことから、NAD(P)⁺ トランスヒドロゲナーゼの活性が律速段階になる可能性は低いと考えられた。また、腎臓では NADH が MSO 還元活性を高

めなかった原因は、腎臓に NAD(P)⁺ トランスヒドロゲナーゼ活性がなかったためではないかと考えられた。

本章、第4節、3. の検討から MSO レダクターゼの分子量は約 20,000 であることが分かった。大腸菌から精製された MSO レダクターゼ⁴³⁾ の分子量も約 21,000 と近い値であった。一方、チオレドキシンの分子量は 10,000~13,000 で、MSO レダクターゼよりも低い。しかし、MSO レダクターゼは、失活(たぶん酸化によって)しても DTT で容易に MSO 還元活性が戻ること、チオレドキシンと同様に DTT で MSO 還元活性を示すこと、およびチオレドキシンレダクターゼによって直接 NADPH から電子を受け取ることができることから、MSO レダクターゼの活性部位は、チオレドキシンと似ているのではないかと考えられた。

第6章 総合考察

本研究では、家畜の体内におけるメチオニンスルホキシド (MSO) の還元に関して、以下の4つの観点から検討を試みた。

- 1) MSO還元系の粗酵素レベルの性質と活性 (第2章)
- 2) MSO還元活性の変動の要因 (第3章)
- 3) 綿羊に対するMSOの給与が増体および血液中メチオニン濃度とMSO濃度に及ぼす影響 (第4章)
- 4) MSOの還元機構の解明 (第5章)

本章では、これらの検討結果に基づいて、家畜におけるMSO還元活性の意義について総合的に考察する。

始めに、MSOの還元に関与する酵素系について考察する。まず、第5章の結果から、methionine-S-oxide reductase (EC 1.8.4.5)³⁸⁾ (MSOレダクターゼ)は、MSOを還元するためにチオレドキシニン系 (チオレドキシニン、チオレドキシニンレダクターゼ、NADPH)を必要とすることが分かった。チオレドキシニンレダクターゼが酸化型のチオレドキシニンを還元するためにはNADPHが必要であることが報告されている⁵²⁾。しかし、第2章の粗酵素レベルでの実験において、牛および豚の肝臓ではNADHを添加した際にも、MSO還元活性は促進された。このことから、牛および豚の肝臓には、NADHをNADPHに変換するNAD(P)⁺トランスヒドロゲナーゼが存在するのではないかと考えられた。NAD(P)⁺トランスヒドロゲナーゼは、牛の心筋のミトコンドリアから精製され、その存在が確認されている¹⁰³⁾。以上の関係をまとめて図6-1に示した。この図のように、MSOを還元するためには、複数の酵素が関係していることが分かる。また、還元型チ

オレドキシンは、MSOレダクターゼ以外の還元酵素にも電子を与えていることが知られている^{45, 53-56}。したがって、還元型チオレドキシンが不足している場合は、還元型チオレドキシンを消費する酵素群の活性の増減がMSOの還元量に影響している可能性が考えられる。

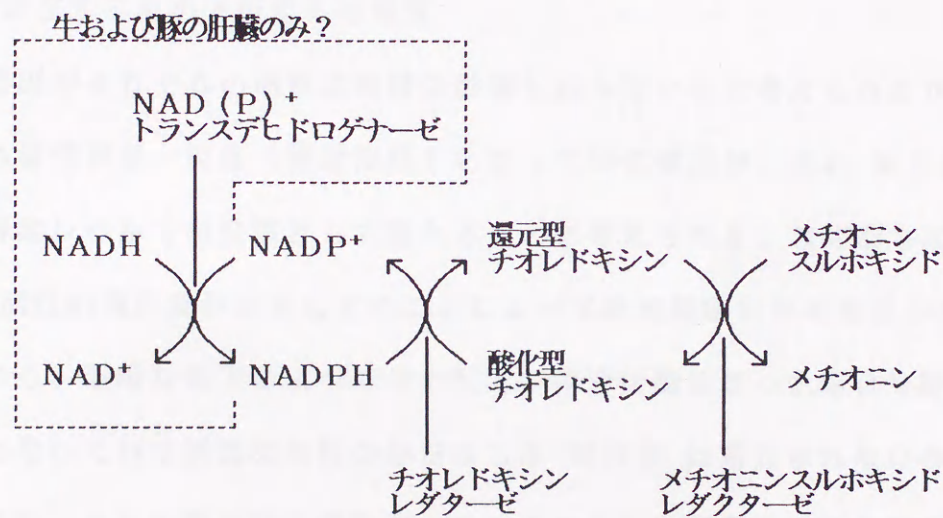


図 6-1 メチオニンスルホキシド還元系の概略

次に、第2章の検討結果から得られたMSO還元系の粗酵素レベルでの諸性質（表2-7-2）について考察する。先の考察から、MSO還元系の粗酵素レベルでの性質は、かなり複雑な要因が重なりあった結果として得られた性質であると考えられる。それらの要因としては以下のものが考えられる。

- 1) MSOレダクターゼの性質
- 2) チオレドキシンレダクターゼの性質
- 3) 還元型チオレドキシンを消費する酵素群の総合的な性質
- 4) 牛および豚の肝臓ではNAD(P)⁺トランスヒドロゲナーゼ（存在するものと仮定）の性質

これらの要因がそれぞれの活性に複雑に影響しあっていると考えられるが、その中で最も活性が低い反応（律速段階）となっている要因が、主にMSO還元系の粗酵素レベルでの性質として現れるものと考えられる。なぜならば、MSO還元活性の測定条件が変化することによって律速段階以外の要因の活性が変化しても、極端な低下によってその反応が律速段階となった場合を除けば、律速段階となっている要因の活性の分だけしかMSOは還元されないからである。ただし、3)の要因は、還元型チオレドキシンを消費することによってMSO還元活性に影響するため、チオレドキシンレダクターゼの活性が律速段階となっている時にのみ、チオレドキシンレダクターゼの見掛け上の活性（還元型チオレドキシンの生成量からMSOレダクターゼ以外の酵素群が消費する量を差し引いた量）としてMSO還元活性に影響を与えたと考えられる。この4つの要因の内、4)のNAD(P)⁺トランスヒドロゲナーゼの活性については、最適条件でNADHまたはNADPHを還元剤として用いた時のMSO還元活性に差が見られなかった⁸⁶⁻⁸⁸⁾ことから、これが律速段階とはなっていないと考えられる。また、筆者⁸⁷⁾が豚の肝臓および腎臓の

M S O 還元系の性質を検討した際に、最適 pH、最適温度および基質濃度の影響に関する実験を何頭かの個体を用いて行ったが、個体間に M S O 還元系の性質の差は見られなかったことから、M S O 還元系の性質は安定していると考えられる。したがって、3) のように多くの酵素活性が総合的に関与して M S O 還元活性に影響を与えるという要因が M S O 還元系の性質に大きな影響を与えているとは考えられない。以上のことから、M S O レダクターゼもしくはチオレドキシソレダクターゼが律速段階となっていて、どちらかの酵素の性質が M S O 還元系の性質として現れているものと考えられる。

ところで、M S O 還元系の粗酵素レベルの性質(表 2-7-1) が肝臓と腎臓で異なっていることから、臓器ごとに異なる酵素が働いていると考えられたのに対して、牛の肝臓および腎臓の粗酵素液を D E A E - T o y o p e a r l 6 5 0 M カラムで分画した結果(第 5 章, 第 4 節, 2.) からは、どちらの臓器でも同じ酵素が働いているのではないかと考えられ、一見矛盾した 2 つの結果が得られた。表 2-7-1 から、肝臓と腎臓の間で特に異なっている性質は、M S O 還元活性を促進した還元剤の種類とミカエリス定数である。しかし、M S O 還元活性を促進した還元剤の種類については、N A D H が肝臓の M S O 還元活性を促進するのに対して腎臓では促進しない理由が、先に述べたように、肝臓には N A D (P) + トランスヒドロゲナーゼの十分な活性があるが腎臓にはないためであると考え、M S O 還元活性を促進した還元剤の種類による臓器間の差は見られなくなる。ただし、産卵鶏の腎臓のみでグルタチオン(G S H) による M S O 還元活性の促進が見られているが、N A D P H と比較すると、その促進効果は比較にならないほど低いものである(図 2-6-3)。G S H による M S O 還元活性の促進は、兎³⁴⁾でも報告しているが、この点については後で触れる。一方、ミカエリス定数が異なることについても、臓

器によって律速段階になっている反応が異なっているためであると考えられることができる。また、どちらの臓器でもチオレドキシソレダクターゼの反応が律速段階である場合には、チオレドキシソレダクターゼの活性がMSOレダクターゼが還元できるMSOの最大量を制限するために基質親和性（ミカエリス定数）が変化することが考えられる。例えば、還元型チオレドキシソが豊富にある条件でMSOレダクターゼがMSO濃度が1,000 mM以上になると飽和（最大活性に達する）すると仮定した時、3時間のインキュベーション時間でチオレドキシソレダクターゼによってMSOレダクターゼに供給される還元型チオレドキシソの総量が50 mMであれば、MSOレダクターゼは3時間のインキュベーション時間で50 mMのMSOしか還元できない。したがって、MSOレダクターゼが50 mMのMSOを還元できるMSO濃度（1,000 mMよりも低い）で、見掛け上MSO還元活性は飽和することとなり、基質親和性が見掛け上高くなってミカエリス定数は低い値となる。よって、チオレドキシソレダクターゼによってMSOレダクターゼに供給される還元型チオレドキシソの総量がミカエリス定数を決定することとなると考えることができる。以上のように考えると、肝臓と腎臓の間でMSO還元系の性質が違っていても、どちらの臓器でも同じ酵素系が働いていると考えられることができる。もしそうであるならば、最適pHと最適温度が、肝臓と腎臓の両方でほぼ同じであることから、どちらの臓器でも同じ酵素が律速段階になっている可能性が高いと考えられる。そして、ミカエリス定数が肝臓と腎臓とは異なっていることから、チオレドキシソレダクターゼが律速段階になっていると考えられることができる。

次に、MSO還元活性に見られた大きな個体差について考察する。先の考察から、チオレドキシソレダクターゼが律速段階となっていることが考えられ

たが、MSO還元系の律速段階になっているということは、その酵素の活性の大きさ（つまりその酵素の量）がMSO還元活性の値を決定していると考えられる。最近、ラットの肝臓のチオレドキシシンとチオレドキシシンレダクターゼの量が、ラットの妊娠の段階が進むと増加すること、およびチオレドキシシンレダクターゼは下垂体を除去すると妊娠の段階が進んでも増加しなくなるが、酢酸ヒドロコルチゾンと投与すると増加することが報告されている¹⁰¹⁾。このことから、チオレドキシシン系は、ホルモンによって誘導されることが考えられる。第3章の検討結果から、MSO還元活性に、飼養条件と性別が影響を与えることが分かったが、これらがホルモンの分泌量に影響を与えることによりチオレドキシシン系を誘導し、MSO還元活性に影響しているかもしれないと考えられる。しかしながら、MSO還元活性の個体差は大きく、MSO還元活性が最も低い個体の値に対して、MSO還元活性が最も高い個体の値が何倍であるかを算出すると、牛肝臓が約8倍、牛腎臓が約6倍、豚肝臓が約8倍、豚腎臓が約2倍、産卵鶏肝臓が約1.5倍、そして産卵鶏腎臓が約2倍となっている。多くの還元活性に利用されるチオレドキシシン系の活性がこれほど大きく変動することは考えにくい。したがって、MSO還元活性の個体差の原因は、MSOレダクターゼが律速段階となっており、その量が増加するためであると考えた方が妥当ではないかと考えられる。ルーメンでMSOが生成されると考えられる反芻動物が、単胃動物よりもMSO還元活性が高い（第2章）こと、および緬羊にMSOを給与するとMSO還元活性が高まるかもしれないと考えられた（第3章）ことなどから、MSOレダクターゼは体内のMSO濃度によって誘導を受けるのではないかと考えられる。

最後に、兎ではグルタチオン（GSH）の添加が、NADPHと同程度にMSO還元活性を促進する³⁴⁾（表2-7-2）という点について考察する。筆者

らの検討結果から、G S H の添加は、牛、豚および産卵鶏では、産卵鶏腎臓で少し促進する傾向が見られた（図 2-6-3）以外は促進しなかった。また、豚腎臓では阻害する傾向が見られた。兎の M S O 還元活性が G S H で促進されるためには、G S H を用いて N A D P H が生成できるか、またはチオレドキシソレダクターゼが G S H を利用できるかのどちらかであると考えられる。ところで、チオレドキシソ以外にも、グルタレドキシソという電子伝達タンパク質が発見されている。グルタレドキシソにも酸化型と還元型があり、何らかの作用で酸化されて酸化型となったグルタレドキシソは、G S H によって直接還元されて還元型になる。グルタレドキシソが生体内でどのように利用されているかについてはまだ不明であるが、チオレドキシソ系を発見するものとなったりボヌクレオチドレダクターゼが、グルタレドキシソからも電子を受け取ることができることが示されている⁵²⁾。このことから、兎の M S O レダクターゼは、グルタレドキシソも利用できるのではないかと考えられた。

以上の考察から、M S O 還元活性は必要（体内の M S O 濃度の変化）に応じて増減するのではないかと考えられる。第 2 章の検討結果から牛は、豚、ブイラー、産卵鶏、ラットおよび兎よりも高い M S O 還元活性を持つと考えられた。しかし、M S O 還元活性の値が、体内の M S O 濃度による誘導を受けた結果であるとするれば、牛が体内に取り込んでいる M S O の量から単胃動物が体内に取り込んでいる M S O 量を差し引いた分だけ、牛の M S O 還元活性が高いのかも知れない。したがって、単胃動物でも体内に取り込む M S O の量が多ければ、高い M S O 還元活性を持つ個体に成ることが考えられる。しかし、ラットは M S O を利用できるが、メチオニンほどは高くないという研究報告²¹⁻²³⁾が多いことから、M S O 還元活性の誘導には上限があり、それはメチオニン要求量を満たせるほど高いものではないのかもしれない。

い。筆者が検討した産卵鶏の腎臓では、測定したMSO還元活性の値は高いものであった(表2-7-3)ことから、かなりMSO還元活性が高まっていることが考えられたが、メチオニン要求量に対するMSO還元能はかなり低いものであった(表2-7-4)。また、ブロイラーについては、特にMSO含量が少ない飼料を与えられているとは考えられないにもかかわらず、MSO還元活性は測定できないほど低かった。これらのことから、鶏は、MSO還元能が特に低い(誘導によって高まる分を考慮しても)と考えられた。このことは、過度に酸化した飼料を与えると、生産(成長、泌乳など)に影響する可能性を示唆している。

MSO還元活性は、メチオニン要求量を満たすほど高いものではなかった(表2-7-4)。しかしながら、飼料に含まれているメチオニンがどの程度MSOになっているかについての報告は見当たらないが、ブロイラーを除けば、飼料に含まれるMSOを還元するのに十分な活性なのではないかと考えられた。また、MSO還元活性は、個体によって8倍もの変動を示し、それによって飼養条件に適応しているものと考えられた。これらのことはMSO還元活性が、家畜の栄養において重要な意義を持っており、家畜の生産に密接な関係があることを示唆しているものと考えられた。

第7章 要約

メチオニンおよびメチオニンスルホキシド (MSO) の家畜栄養学上の問題を整理すると以下の点が上げられる。

- 1) メチオニンは、飼料中で第一制限アミノ酸になりやすい。
- 2) メチオニンは、酸化されて MSO になりやすい。
- 3) MSO は、そのままではタンパク質合成に利用されない。
- 4) MSO の還元に関する研究は、牛、豚、鶏では行われていない。

これらのことから、家畜の体内におけるメチオニンスルホキシド (MSO) の有効利用の機構としての methionine-S-oxide reductase (EC 1.8.4.5)³⁸⁾ (MSO レダクターゼ) に関する研究を行う必要があると考えられた。そこで本研究では、MSO レダクターゼの生理的条件下における家畜種間の活性の比較を行うとともに、牛肝臓における同酵素の精製およびその性質の検討を行った。

1. 牛、豚、鶏のメチオニンスルホキシド還元活性の比較 (第2章)

これまでに、牛については、堀川 (1988, 修士論文)⁸⁶⁾ が肝臓および腎臓の MSO 還元系の粗酵素レベルでの性質を検討した。しかし、堀川⁸⁶⁾ が検討した性質には、いくつかの疑問点があったため、本研究において筆者は、それらの点について再検討を行い、牛の肝臓および腎臓の MSO 還元系の粗酵素レベルでの性質に修正を加えた。そして、修正した諸性質に基づいて、生理的条件を加味して MSO 還元活性の測定条件を決定し、牛の肝臓および腎臓の MSO 還元活性を再度測定した。その結果、肝臓の MSO 還元活性は、粗酵素液中のタンパク質当たりで、堀川⁸⁶⁾ の測定値の約 70% に減少したが、

腎臓の M S O 還元活性は、堀川⁸⁶⁾ の約 2 倍に増加した (表 2-7-3)。

次に、豚については、筆者 (1989, 修士論文)^{87, 88)} が肝臓および腎臓の M S O 還元系の粗酵素レベルでの性質を検討し、その活性を測定した。本論文ではその結果を引用した。牛の活性と比較すると、粗酵素液中のタンパク質当たりで、どちらの臓器でも豚は牛の約 40% の M S O 還元活性であった。

次に、本研究ではブイラーについても検討した。その結果、肝臓および腎臓にはかなり低い M S O 還元活性しか認められなかった。また、嚙嚢、筋胃、腺胃、小腸、盲腸、脾臓、肺および筋肉についても検討したが、M S O 還元活性は認められなかった。

続いて、本研究では産卵鶏についても検討した結果、肝臓および腎臓は M S O 還元活性が認められたが、脾臓では認められなかった。肝臓および腎臓については、M S O 還元系の粗酵素レベルでの性質を検討し、その活性を測定した。その結果、粗酵素液中のタンパク質当たりで、産卵鶏は、肝臓では牛の約 40% の M S O 還元活性であったが、腎臓では牛とほぼ同じ M S O 還元活性であった。

以上の結果から得られた、牛、豚および産卵鶏の M S O 還元系の粗酵素レベルでの性質を比較した結果、最適温度と最適 pH は動物種間では異なったが、肝臓と腎臓の間では近い値となった。しかし、牛および豚の肝臓では N A D H の添加が M S O 還元活性を促進したが、腎臓では促進されなかった。産卵鶏はどちらの臓器でも促進されなかった。また、ミカエリス定数も、肝臓と腎臓の間で異なった値が得られた。

次に、本研究で得られた牛、豚および産卵鶏の結果に加えて、A Y M A R D ら (1979)⁵⁸⁾ の測定したラットおよび G A N A P A T H Y and L E I B A C H (1982)³⁴⁾ の測定した兎の M S O 還元活性の結果をまとめて表 2-7-3 に示した。この表

の結果から、一般に腎臓のMSO還元活性が他の臓器よりも高いことが分かった。この点から見るとMSOの多くは腎臓で還元されているように思えるが、実際には臓器全体のMSO還元活性が問題であるから、牛、豚および産卵鶏の臓器重量当たりのMSO還元活性に、それぞれの臓器の重量をかけることにより臓器当たりのMSO還元活性を算出すると、産卵鶏では腎臓の方が高くなるが、牛と豚では肝臓の方が高くなった(表2-7-4の生成可能なメチオニン量の欄を参照)。このことから、一概に腎臓のMSO還元活性が高いとは言えないと思われた。次に、動物間に注目して見ると、産卵鶏の腎臓を除くと、明らかに牛のMSO還元活性が高いことが分かった。これらの結果は、反芻家畜のMSO還元活性が単胃家畜のそれよりも高いのではないかという筆者らの仮説を裏付けるものとなった。

2. 牛のメチオニンスルホキシド還元活性にみられた個体差の原因(第3章)

筆者ら⁸⁸⁾が測定した牛および豚の肝臓および腎臓のMSO還元活性には、大きな個体差がみられた(図3-1-1)。そこで、第2章で37頭の牛の肝臓および腎臓から測定した牛のMSO還元活性を用いて、その個体差の原因を検討した。肝臓および腎臓は、それぞれ同一の個体から得た。また、肝臓および腎臓のMSO還元活性を測定した牛の品種、性別、年齢および臓器疾患の所見、そして一部の牛については生産農家(測定した牛を出荷した農家)を調査した。

これらのデータを用いて、それぞれの要因がMSO還元活性の変動に関係があるかどうかという点について検討した結果から以下のことが分かった。

- 1) 同一個体内の肝臓と腎臓のMSO還元活性の間に高い相関がみられ、個体差の主な原因は、肝臓と腎臓に共通であると考えられる。

2) 年齢および品種はMSO還元活性に影響を与えないが、性別は肝臓および腎臓の両方のMSO還元活性に、また、組織の状態（疾患など）は腎臓のMSO還元活性に影響を与える。

3) 肝臓および腎臓の両方とも、タンパク質当たりのMSO還元活性は生産農家により有意な相違がみられる。

これらの結果から、性別と生産農家の違いが個体差の主な原因であると考えることができた。飼養条件と性別がどの様にしてMSO還元活性に影響を及ぼしているかについては、以下のように考えられた。

1) 飼養条件がルーメン内微生物叢に影響を与えてルーメンからのMSOの流下量が増加することにより、体内のMSO濃度が増加することが影響する。

2) 牛が飼育されていた環境からのストレスによって、ホルモンや消化液（唾液がルーメン内微生物叢に影響しているかも知れない）などの分泌が増加することが影響する。

3) 牛に与えた何らかの添加剤が影響する。

4) 性別による飼養条件の違いが影響する。

5) 性別によるホルモンなどの分泌の違いが影響する。

今後、ホルモンや体内のMSO濃度がMSO還元活性に影響を及ぼすかどうかという点について明らかにしていく必要があると考えられた。

3. 緬羊の成長に及ぼすメチオニンスルホキシド給与の影響（第4章）

成長に及ぼすMSO給与の影響に関する研究は、ラット²¹⁻²⁶⁾および鶏²⁷⁻²⁹⁾では行われているが、反芻家畜では行われていない。そこで、成長中の緬羊に対するメチオニンスルホキシド（MSO）給与が、増体、並びに血液

中のメチオニン濃度および M S O 濃度に及ぼす影響を検討した。

緬羊 6 頭を用い、3 頭ずつの 2 群に分けた。給与試験は、前期試験と後期試験をそれぞれ 6 週間ずつ行い、前期試験は第 1 群を試験区、第 2 群を対照区とし、後期試験は反転して第 1 群を対照区、第 2 群を試験区とした。試験区には 1 g/日 の M S O を給与した。給与試験の間、体重を 1 週間おきに測定し、血液を前期と後期それぞれの、開始日、開始 3 週間目および最終日に採取した。血液は、全血および血漿のメチオニンおよび M S O の濃度を測定した。

まず、緬羊の増体については、試験区と対照区との間に差は見られなかった（図 4-3-5、図 4-3-6、図 4-3-7）。しかし、試験の前期と後期の間に刈った毛の重量が、試験前期に M S O を給与した区の方が高い傾向が見られた（表 4-3-1）。

次に、全血と血漿のメチオニン濃度および血漿の M S O 濃度についても、試験区と対照区との間に大きな差は見られなかった（図 4-3-8、図 4-3-9、図 4-3-10）。しかし、平均値に注目すると、メチオニンと M S O のいずれでも、前期では第 1 群（前期の M S O 給与区）の、後期では第 2 群（後期の M S O 給与区）の濃度が高くなる傾向が見られた。このことから、M S O は吸収され、メチオニンに還元されていると考えられた。しかし、前期と後期のいずれでも試験開始時（5 月 21 日、7 月 9 日）および試験の中間（6 月 11 日、8 月 1 日）は M S O 給与区が高くなっているが、試験終了時（7 月 1 日、8 月 20 日）は対照区の方が高くなる傾向が見られた。このことから、M S O を給与し続けると M S O の還元能力が高まると同時にタンパク質の合成が高まったために血液中のアミノ酸濃度が減少したことが考えられた。そして、もしそうならば、本実験よりもさらに長期にわたって M S O を給与すれ

ば、増体に差が見られるかもしれないと考えられた。

4. メチオニンスルホキシド還元機構の解明 (第5章)

M S O 還元系を酵素レベルで調査した報告は少ない。そこで、牛の肝臓の M S O レダクターゼを精製し、その性質を検討した。また、最近、いくつかの還元反応にチオレドキシン系 (チオレドキシン、チオレドキシンレダクターゼ、N A D P H) が関与していることが示されている^{44, 45, 53-56)} ので、M S O 還元系とチオレドキシン系との関係についても検討した。

まず、牛肝臓からの粗酵素抽出液の保存法および硫酸分画と pH 処理の検討を行った。その結果、凍結乾燥粉末を調製することにより粗酵素抽出液を保存することができること、および、pH 5.0 で処理を行うことにより比較的高い精製効果を得ることができると分かった。また、粗酵素抽出液に D T T を添加すると、M S O 還元活性の失活が少なくなることも分かった。こうして、D T T 存在下で粗酵素抽出液を調製し、pH 5.0 等電点沈殿処理を行った後に凍結乾燥することにより、凍結乾燥粉末タイプ 3 (F D -3) を作製することができた。この F D -3 を M S O レダクターゼの精製およびチオレドキシンとチオレドキシンレダクターゼの部分精製に用いた。

次に、いくつかの液体クロマトグラフィーを用いた検討を行った結果、Butyl-Toyopearl 650 S カラムで分画した後に、D E A E -T oyopearl 650 M カラムで分画し、最後に Hydroxylapatite カラムで分画することにより M S O レダクターゼを、電気泳動で 1 本のバンドになるまで精製することができた。最終的な精製倍率は、ホモジェネート液の約 307 倍であった。また、この精製と同時にチオレドキシンおよびチオレドキシンレダクターゼの部分精製も行うことができた。

こうして得られた MSO レダクターゼは、NADPHのみが存在する時には MSO 還元活性を示さないが、それに加えてチオレドキシンレダクターゼが存在すると MSO 還元活性を示した。また、さらにチオレドキシンを加えると、高い MSO 還元活性を示した。したがって、MSO レダクターゼが MSO を還元するためには、チオレドキシン系が必要ではないかと考えられた。

5. 総合考察

始めに、MSO の還元に関与する酵素系について考察した。まず、第5章の結果から MSO レダクターゼは、MSO を還元するためにチオレドキシン系（チオレドキシン、チオレドキシンレダクターゼ、NADPH）を必要とすることが分かった。したがって、第2章の検討結果から得られた MSO 還元系の粗酵素レベルでの諸性質（表 2-7-2）は、いくつかの要因が重なりあった結果として得られた性質であると考えられた。しかし、MSO 還元系の粗酵素レベルでの性質を主に決定している要因は、MSO レダクターゼとチオレドキシンレダクターゼのどちらかだと考えられた。また、MSO 還元系の粗酵素レベルの最適温度と最適 pH が動物種内では肝臓と腎臓で似通っていること、牛の肝臓および腎臓の粗酵素液を DEAE-Toyopearl 650M カラムで分画した結果（第5章，第4節，2.）が肝臓と腎臓で似通っていたことから、どちらの臓器でも同じ酵素系が働いているのではないかと考えられた。

次に、MSO 還元活性の誘導性について考察した。まず、第3章の結果から、MSO 還元活性は飼養条件と性別の影響を受けることが分かった。最近、チオレドキシンレダクターゼの量がホルモンによって誘導されることが報告された¹⁰¹⁾。このことから、MSO 還元活性はホルモンの影響を受けていると

考えられた。しかし、ホルモンによる誘導によって増加するチオレドキシニン量に比較して、牛および豚で見られた個体差はかなり大きく、チオレドキシニンだけでなく MSO レダクターゼも何らかの要因によって誘導を受けているものと考えられた。また、第4章の検討結果から、緬羊に MSO 給与すると MSO 還元活性が増加する可能性が考えられた。

最後に、MSO 還元活性は、メチオニン要求量を満たすほど高いものではなかった(表 2-7-4)。しかしながら、飼料に含まれているメチオニンがどの程度 MSO になっているかについての報告は見当たらないが、ブロイラーを除けば、飼料に含まれる MSO を還元するのに十分な活性なのではないかと考えられた。また、MSO 還元活性は、個体によって 8 倍もの変動を示し、それによって飼養条件に適応しているものと考えられた。これらのことは MSO 還元活性が、家畜の栄養において重要な意義を持っており、家畜の生産に密接な関係があることを示唆しているものと考えられた。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、終始多大なご指導、御鞭撻を賜った小野寺良次教授（主指導教官，宮崎大学農学部家畜機能開発学講座栄養生化学分野）に厚く御礼を申し上げます。

本研究を行う間、数々のご指導をしていただきました三浦道雄教授（1989～1990年度第一副指導教官，宮崎大学農学部生物資源利用化学講座）並びに長澤孝志助教授（1991年度第一副指導教官，宮崎大学農学部家畜機能開発学講座栄養生化学分野）に御礼を申し上げます。また、本研究の遂行に当たり、多くの御助言をいただきました橋口勉教授（第二副指導教官，鹿児島大学農学部）に御礼を申し上げます。

第2章の研究を行うに当たって、牛の組織を提供して下さいました宮崎県西部食肉衛生検査所高崎支部の方々、豚の組織を提供して下さいました宮崎県西部食肉衛生検査所の方々、ブロイラーの組織を提供して下さいました宮崎青島鶏肉、産卵鶏を提供して下さいました宮崎県田野町の（有）戸高養鶏、前田養鶏ならびに旭農場の方々に御礼を申し上げます。

第3章の研究を行うに当たって、統計に関する数々の助言をして下さいました守屋和幸博士（前補助教官，現京都大学農学部助教授）に御礼を申し上げます。

第4章の研究を行うに当たって、数々のご指導をしていただきました片山英美助教授（宮崎大学住吉牧場）に御礼を申し上げます。また、メチオニンスルホキシドの調製に関する助言をして下さいました西山和夫博士（宮崎大学農学部生物資源利用化学講座）に御礼を申し上げます。さらに、緬羊の世話をして

参考文献

- 1) ENGELS, F., 反デユーリング論. 村田陽一訳. 1: 124. 大月書店. 1878.
- 2) 中村隆雄, 酵素のはなし. 17-20. 学会出版センター. 1986.
- 3) 梅津元昌, 乳牛の科学. 44. 農文協. 1961.
- 4) 神立誠・須藤恒二, ルーメンの世界. 農文協. 1985.
 - 4a) 52-59.
 - 4b) 57.
 - 4c) 141.
 - 4d) 346-348.
 - 4e) 203-208.
 - 4f) 34.
- 5) 小野寺良次・神立誠, 反芻胃内繊毛虫類のアミノ酸および蛋白質代謝. VI. 繊毛虫類の内因性N化合物. 日本畜産学会報, 41(7): 349-357. 1970.
- 6) ONODERA, R. and M. KANDATU, Conversion of lysine to pipercolic acid by rumen ciliate protozoa. Agric. Biol. Chem., 36: 1989-1993. 1972.
- 7) TSUTSUMI, W. and R. ONODERA, Occurrence of γ -aminovaleric acid in the culture medium of rumen ciliate protozoa. Agric. Biol. Chem., 39(3): 711-714. 1975.
- 8) 三浦和也, 反芻胃内繊毛虫類の内因性アミノ酸に関する研究. 宮崎大学修士論文, 1971.
- 9) ONODERA, R. and K. TAKEI, Methionine sulfoxide in the incubation medium of mixed rumen ciliate protozoa. Agric. Biol. Chem., 50(3): 767-769. 1989.
- 10) BLAKE, W.L., M.D. STERA and S.M. HANNAH, Effect of supplementing methionine in various forms on bacterial degradation of methionine in continuous culture. Nutr. Rep. Int., 33: 729-738. 1986.

- protecting free methionine from ruminal degradation. *J. Anim. Sci.*, 58(1): 187-193. 1984.
- 12) CANALE, C.J., L.D. MULLER, H.A. MCCAHOON, T.J. WHITSEL, G.A. VARGA and M.J. LORMOPE, Dietary fat and ruminally protected amino acids for high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 73: 135-141. 1990.
 - 13) WRIGHT, M.D. and S.C. LOERCH, Effect of rumen-protected amino acids on ruminant nitrogen balance, plasma amino acid concentrations and performance. *J. Anim. Sci.*, 66: 2014-2027. 1988.
 - 14) CHOW, J.M., E.J. DEPETERS and R.L. BALDWIN, Effect of rumen-protected methionine and lysine on casein in milk when diets high in fat or concentrate are fed. *J. Dairy Sci.*, 73: 1051-1061. 1990.
 - 15) SULU, N., K. BJORNSTAD, D. GRONSETH and W. VELLE, Ruminal degradation and outflow of amino acids in cows. *J. Vet. Med., A* 36(1): 55-63. 1989.
 - 16) COTTLE, D.J. and W. VELLE, Degradation and outflow of amino acids from the rumen of sheep. *Br. J. Nutr.*, 61: 397-408. 1989.
 - 17) BIRD, P.R. and R.J. MOIR, Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. VIII. Methionine degradation and utilization in sheep when infused into the rumen or abomasum. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 835-848. 1972.
 - 18) COOK, R.M., R.E. BROWN and C.L. DAVIS, Protein metabolism in the rumen: I. Absorption of glycine and other amino acids. *J. Dairy Sci.*, 48: 475-483. 1965.
 - 19) SALSURY, R.L., D.K. MARVIL, C.W. WOODMANSEE and G.F. HAENLEIN, Utilization of methionine and methionine hydroxy analog by rumen microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.*, 54: 390-396. 1971.
 - 20) 竹井謙一郎, ルーメン繊毛虫によるメチオニンの酸化及びメチオニンス

- ルホキシドの還元に関する研究. 宮崎大学修士論文. 1985.
- 21) MILLER, D.S. and P.D. SAMUWL, Effect of the addition of sulphur compounds to the diet on utilisation of protein in young growing rats. *J. Sci. Food Agric.*, **21**: 616-618. 1970.
 - 22) ANDERSON, G.H., D.V.M. ASHLEY and J.D. JONES, Utilization of L-methionine sulfoxide, L-methionine sulfone and cysteic acid by the weanling rat. *J. Nutr.*, **106**: 1108-1114. 1976.
 - 23) CUQ, J.L., P. BESANCON, L. CHARTIER and C. CHEFTEL, Oxidation of methionine residues of food proteins and nutritional availability of protein-bound methionine sulphoxide. *Food Chem.*, **3**: 85-102. 1978.
 - 24) NJAA, L.R. and A. AKSNES, The nitrogen-sparing effect of methionine sulphoxide and some other sulphur-containing amino acids. *Br. J. Nutr.*, **48**: 565-570. 1982.
 - 25) IWAMI, K., A. NAKAMURA, M. HIGUCHI, K. YASUMOTO and K. IWAI, Evaluation of L-methionine sulfoxide bioavailability by sulfur incorporation into liver glutathione and urinary excretion as inorganic sulfate. *Agric. Biol. Chem.*, **47** (11) : 2555-2559. 1983.
 - 26) DAVIES, K.J.A. and M.E. DELSIGNORE, Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9908-9913. 1987.
 - 27) KUZMICKY, D.D., G.O. KOHLER, H.G. WALKER, JR. and B. E. MACKAY, Availability of oxidized sulfur amino acids for the growing chick. *Poultry Sci.*, **56**: 1560-1565. 1977.
 - 28) DAVIES, K.J.A., S.W. LIN and R.E. PACIFICI, Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9914-9920. 1987.
 - 29) HAALAND, H., E. AENESEN and L.R. NJAA, Utilisation of free and protein-bound methionine sulfoxide by the chicken. *J. Sci. Food Agric.*, **48**: 37-47. 1989.

- 30) HIGUCHI, M., K. IWATI, A. NAKAMURA, K. YASUMOTO and K. IWAI, *In vitro* and *in situ* absorption of methionine sulfoxide in rat small intestine. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 2533-2538. 1982.
- 31) AKSNES, A. and L.R. NJAA, Absorption of methionine and methionine sulfoxide in rat intestine and the effect of glutathione. *Br. J. Nutr.*, **50**: 583-588. 1983.
- 32) SUGAWA, T., H. AKEDO and M. SUDA, Intestinal absorption of amino acids. II. Isotopic studies on the amino acids absorption from the intestine using S³⁵ DL-methionine and C¹⁴ DL-valine. *J. Biochem.*, **47**(1): 131-138. 1960.
- 33) AYLING, P.D., Methionine sulfoxide is transported by high-affinity methionine and glutamine transport systems in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **148**(2): 514-520. 1981.
- 34) GANAPATHY, V. and F.H. LEIBACH, Transport and utilization of methionine sulfoxide in the rabbit. *Biochim. Biophys. Acta.*, **693**: 305-314. 1982.
- 35) GUERINO, F. and C.R. BAUMRUCKER, Identification of methionine and lysine transport systems in cattle small intestine. *J. Anim. Sci.*, **65**: 630-640. 1987.
- 36) GUERINO, F. and C.R. BAUMRUCKER, Methionine and lysine uptake by cattle small intestine in vitro. *J. Anim. Sci.*, **65**: 619-629. 1987.
- 37) WEBB, K.E. JR., Amino acid and peptide absorption from the gastrointestinal tract. *Fed. Proc.*, **45**: 2268-2271. 1986.
- 38) WEBB, E.C., Enzyme nomenclature. Academic Press, Inc. 1984.
- 39) DONEY, P.C. and J.F. THOMPSON, The reduction of S-methyl-L-cysteine sulfoxide and L-methionine sulfoxide in turnip and bean leaves. *Biochim. Biophys. Acta.*, **124**: 39-49. 1966.
- 40) WAGNER, R.M. and M.F. MALLETT, Reduction of L-methionine sulfoxide by *P. putida*. *Fed. Proc.*, **41**: 638. 1982.

- 41) BLACK, S., E.M. HARTE, B. HUDSON and L. WARTOFSKY, A specific enzymatic reduction of L-methionine sulfoxide and related nonspecific reduction of disulfides. J. Biol. Chem., 235(10): 2910-2916. 1960.
- 42) EJIRI, S., H. WEISSBACH and N. BROTH, Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 139(1): 161-164. 1979.
- 43) EJIRI, S., H. WEISSBACH and N. BROTH, The purification of methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. Anal. Biochem., 102: 393-398. 1980.
- 44) PORQUE, P.G., A. BALDESTEN and P. REICHARD, The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. J. Biol. Chem., 245(9): 2371-2374. 1970.
- 45) LAURENT, T.C., E.C. MOORE and P. REICHARD, Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. J. Biol. Chem., 239(10): 3436-3444. 1964.
- 46) MOORE, E.C., P. REICHARD and L. THELANDER, Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. J. Biol. Chem., 239(10): 3445-3452. 1964.
- 47) HOLMGREN, A. and P. REICHARD, Thioredoxin 2: Cleavage with cyanogen bromide. Eur. J. Biochem., 2: 187-196. 1967.
- 48) LARSON, G. and A. LARSSON, Purification and properties of rat-liver thioredoxin. Eur. J. Biochem., 26: 119-124. 1972.
- 49) LUTHMAN, M. and A. HOLMGREN, Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: Purification and characterization. Biochemistry, 21: 6628-6633. 1982.
- 50) ENGSTROM, N.E., A. HOLMGREN, A. LARSSON and S. SODERHALL, Isolation and characterization of calf liver thioredoxin. J.

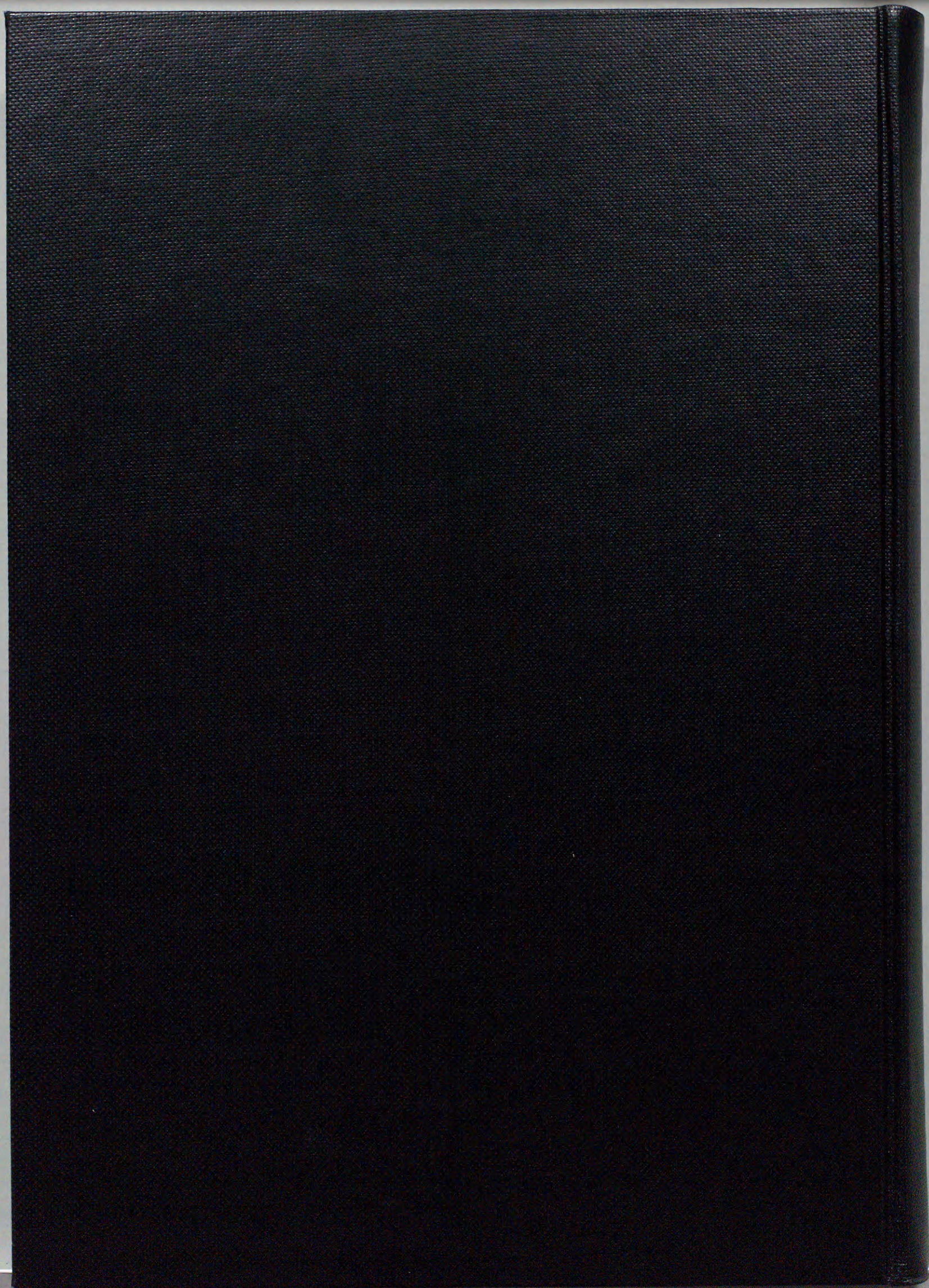
- Biol. Chem., 249(1): 205-210. 1974.
- 51) HOLMGREN, A., Bovine thioredoxin system. J. Biol. Chem., 252(13): 4600-4606. 1977.
- 52) HOLMGREN, A., Thioredoxin and glutaredoxin systems. J. Biol. Chem., 264(24): 13963-13966. 1989.
- 53) ANDERS, M.W., J.H. RATNAYAKE, P.E. HANNA and J.A. FUCHS, Involvement of thioredoxin in sulfoxide reduction by mammalian tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 97(3): 846-851. 1980.
- 54) ANDERS, M.W., J.H. RATNAYAKE, P.E. HANNA and J.A. FUCHS, Thioredoxin-dependent sulfoxide reduction by rat renal cytosol. Drug Metab. Disposition, 9(4): 307-310. 1981.
- 55) FLAMIGNI, F., S. MARMIROLI, C.M. CALDARERA and C. GUARNIERI, Involvement of thiol transferase- and thioredoxin-dependent systems protection 'essential' thiol group ornithine decarboxylase. Biochem. J., 259(1): 111-115. 1989.
- 56) BHAT, G.B., K. IWASE, B.C.W. HUMMEL and P.G. WALFISH, Kinetic characteristics of a thioredoxin-activated rat hepatic low- K_m iodothyronine 5'-deiodinase. Biochem. J., 258(3): 785-792. 1989.
- 57) EJIRI, S., H. WEISSBACH and N. BROTH, The conversion of methionine sulfoxide to methionine in Escherichia coli and rat tissue. Fed. Proc., 38: 829. 1979.
- 58) AYMARD, C., L. SEYER and J. CHEFTEL, Enzymatic reduction of methionine sulfoxide. *In vitro* experiments with rat liver and kidney. Agric. Biol. Chem., 43(3): 1869-1872. 1979.
- 59) AKSNES, A., Studies on the *in vivo* utilisation and the *in vitro* enzymatic reduction of methionine sulfoxide in rats and rat tissues. Ann. Nutr. Metab., 28: 288-296. 1984.
- 60) FLIS, H., H. WEISSBACH and N. BROTH, Oxidation of methionine residues in proteins of activated human neutrophils.

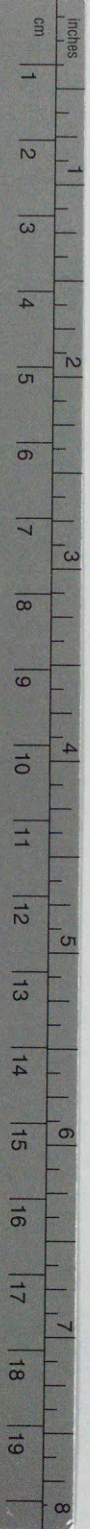
- Proc. Natl. Acad. Sci. U S A , 80, 7160-7164. 1983.
- 61) C ARP, H., F. M ILLER, J.R. H OI DAL and A. J ANOFF,
Potential mechanism of emphysem: α_1 -proteinase inhibitor
recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized
methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. Proc.
Natl. Acad. Sci. U S A , 79, 2041-2045. 1982.
- 62) R OSENBERG, S., P.J. B ARR, R.C. N AJARIAN and R.A.
H ALLEWELL, Synthesis in yeast of functional oxidation-resistant
mutant of human α_1 -antitrypsin. Nature, 312, 77-80. 1984.
- 63) C LARK, R.A., P.J. S TONE, A.L. H AG, J.D. C ALORE and
C. F RANZBLAU, Myeloperoxidase-catalyzed inactivation of α_1 -
protease inhibitor by human neutrophils. J. Biol. Chem., 256:
3348-3353. 1981.
- 64) M ATHESON, N.R., P.S. W ONG, M. S HUYLER and J. T RAVIS,
Interaction of human α_1 -proteinase inhibitor with neutrophil
myeloperoxidase. Biochemistry, 20, 331-336. 1981.
- 65) R APOPORT, S., B. H AERTEL and G. H AUSDORF, Methionine
sulfoxide formation: the cause of self-inactivation of
reticulocyte lipoxygenase. Eur. J. Biochem., 139, 573-576.
1984.
- 66) K UEHN, H., H.G. H O L Z H E T T E R, T. S C H E W E, C. H I E B S C H and
S. R APOPORT, The mechanism of inactivation of lipoxygenases by
acetylenic fatty acids. Eur. J. Biochem., 139, 577-583. 1984.
- 67) L EVINE, R.L., C.N. O L I V E R, R.M. F U L K S and E.R.
S T A D T M A N, Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative
inactivation precedes proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci.
U S A , 78: 2120-2124. 1981.
- 68) L EVINE, R.L., Oxidative modification of glutamine synthetase.
J. Biol. Chem., 258: 11823-11827. 1983.
- 69) L EVINE, R.L., Oxidative modification of glutamine synthetase.
J. Biol. Chem., 258: 11828-11833. 1983.
- 70) R I V E T T, A.J., Preferential degradation of the oxidatively

- modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. *J. Biol. Chem.*, **260**: 300-305. 1985.
- 71) S TADTMAN, E.R., Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function. *T I B S*, **11**: 11-12. 1986.
- 72) WOLF, S.P., A. GARNER and R.T. DEAN, Free radicals, lipids and protein degradation. *T I B S*, **11**: 27-31. 1986.
- 73) O L I V E R, C.N., B.W. A H N, E.J. M O E R M A N and S. G O L D S T E I N, Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.*, **262**: 5488-5491. 1987.
- 74) DAVIES, K.J.A. and A.L. G O L D B E R G, Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **262**: 8220-8226. 1987.
- 75) DAVIES, K.J.A. and A.L. G O L D B E R G, Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.*, **262**: 8227-8234. 1987.
- 76) DAVIES, K.J.A., Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General asp w c t s. *J. Biol. Chem.*, **262**: 9895-9901. 1987.
- 77) DAVIES, K.J.A., M.E. D E L S I G N O R E and S.W. L I N, Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.*, **262**: 9902-9907. 1987.
- 78) BROT, N., L. W E I S S B A C H, J. W E R T H and H. W E I S S B A C H, Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **78**: 2155-2158. 1981.
- 79) SANCHEZ, J., B.J. N I K O L A U and P.K. S T U M P F, Reduction of N-acetyl methionine sulfoxide plants. *Plant Physiol.*, **73**: 619-623. 1983.
- 80) SPECTOR, A., R. S C O T T O, H. W E I S S B A C H and N. BROT, Lens methionine sulfoxide reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**(1): 429-434. 1982.

- 81) F L I S S, H., G. V A S A N T H A K U M A R, E. S C H I F F M A N N, H. W E I S S B A C H and N. B R O T, Enzymatic reduction of oxidized chemotactic peptide N-formyl-L-methionyl-sulfoxide-L-leucyl-L-phenylalanine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**(1): 194-201. 1982.
- 82) B R O T, N., H. F L I S S, T. C O L E M A N and H. W E I S S B A C H, Enzymatic reduction of methionine sulfoxide residues in proteins and peptides. *Methods in Enzymology*, **107**: 352-360. 1984.
- 83) B R O T, N., J. W E R T H, D. K O S T E R and H. W E I S S B A C H, Reduction of N-acetyl methionine sulfoxide: A simple assay for peptide methionine sulfoxide reductase. *Anal. Biochem.*, **122**: 291-294. 1982.
- 84) B R O T, N., H. F L I S S, and H. W E I S S B A C H, The biochemistry and enzymatic reduction of methionine sulfoxide residues in proteins. in *Thioredoxin and glutaredoxin systems: Structure and Function.* (HOLMGREN, A., eds.) 141-153. Raven Press. New York. 1986.
- 85) 竹井謙一郎・小野寺良次, 牛肝臓におけるメチオニン-S-オキシドレダクターゼ活性の測定法の検討. 第78回日本畜産学会大会要旨, 102. 1986.
- 86) 堀川由美, 牛におけるメチオニン-S-オキシドレダクターゼ活性に関する研究. 宮崎大学修士論文. 1988.
- 87) 長峰孝文, 牛及び豚の肝臓及び腎臓のメチオニン-S-オキシドレダクターゼ活性に関する研究. 宮崎大学修士論文. 1989.
- 88) N A G A M I N E, T., Y. H O R I K A W A and R. O N O D E R A, A comparison of methionine-S-oxide reductase activities in liver and kidney between cattle and swine. *A. J. A. S.*, **2**(3): 251-253. 1989.
- 89) 津田恒之, 家畜生理学. 211. 養賢堂. 1983.
- 90) L I N E W E A V E R, H. and D. B U R K, Determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**: 658. 1934.
- 91) B U T T E R Y, P. J. and A. N. F O U L D S, Amino acid requirements of ruminants. in *Recent advances in animal nutrition-1985.* (

- HARESIGN, W. and D. COLE, eds.) 14: 257-271. Butterworth, London. 1985.
- 92) N R C, Nutrient requirements of swine. 23. National Academy Press. Washiongton. D.C.. 1979.
- 93) N R C, Nutrient requirements of poultry. 12. National Academy Press. Washiongton. D.C.. 1984.
- 94) 加藤嘉太郎, 家畜比較解剖図説. 260, 274, 348, 358. 養賢堂. 1983.
- 95) NAGAMINE, T., Y. HORIKAWA, K. TAKEI, T. NAGASAWA and R. ONODERA, Apparent characteristics and activity of methionine-S-oxide reductase in the liver and kidneys of cattle and swine. Anim. Sci. Technol., 62(11): 1035-1042. 1991.
- 96) LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275. 1951.
- 97) N R C, Nutrient requirements of sheep. National Academy Press. Washington. D.C.. 1985.
- 98) 小野寺良次・星野貞夫・板橋久雄・日野常雄・秋葉征夫・長谷川信, 家畜栄養学. 248. 川島書店. 1989.
- 99) SALSURY, R.L. and D.L. MERRICKS, Susceptibility of methionine analogs to dethiomethylation by rumen microorganisms in vitro. J. Dairy Sci., 55: 710-711. 1972.
- 100) HOLMGREN, A., Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. J. Biol. Chem., 254(19): 9914-9920. 1979.
- 101) DEMARQUOY, J., A. FAIRAND, R. VAILLANT and C. GAUTIER, Development and hormonal control of thioredoxin and thioredoxin-reductase system in the rat liver during the perinatal period. Experientia, 47: 497-500. 1991.
- 102) 農林水産省農林水産技術会議事務局, 日本標準飼料成分表(1987年版).
- 103) 今堀和友・山川民夫 監修, 生化学辞典. 東京化学同人. 179. 1984.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

