

氏 名 (本籍)	おお 大 ほり 堀 ひとし 均 (福島県)
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 1 0 8 号
学位授与年月日	昭和 4 7 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学位論文題目	結合組織の加齢変化に関する栄養 学的研究

(主 査)

論文審査委員	教授 木 村 修 一	教授 柴 崎 一 雄
		教授 金 田 尚 志

# 論文内容要旨

## 序

古くから、摂取する食物によって老化を予防しようという考えがある。一定の食事パターンを示す地域において、長命であったり、短命であったりすることは、この考えが正しいことを意味し、摂取する栄養が生物の老化に影響をおよぼすことはたしかである。

生物の年齢に応じて、どのような栄養をどのくらい摂取すれば健康で長生きできるかの至適栄養要求の研究は、栄養学の大きな命題である。それには、生物の老化現象を栄養生理学的面から研究する必要がある。

しかし、このような栄養学的立場に立って生物の老化現象を追求した研究は、わずかに散見するに過ぎず、ほとんどが医学、病理学的興味、発想からなされたものである。

生物の老化現象を栄養生理学的面から研究するには、加齢にもなって変化する最も典型的な組織を選ぶ必要がある。現在、生物の加齢にもなってみられる退行性変化の一般的な現象の1つに、実質細胞が減少し、それにかわって結合組織由来の細胞間質の量が増加し、また、質的にも変化してくることが指摘されている。

本研究は、加齢変化が最も著しいこの結合組織をとりあげ、栄養生理学的面から加齢変化を追求しようと試みたものである。まず、各年齢のシロネズミを用いて、結合組織成分の加齢による変化を追求した。またそれと同時に、ビタミンAが結合組織の形成に影響をおよぼすことが知られていることから、その欠乏が結合組織成分におよぼす影響についても検討した。

さらに、細胞間質成分であるムコ多糖類の量が加齢にもなって増加してくることが明らかになったので、その構成成分であるヘキソサミンの代謝が加齢とともにどのように変化するかについて、主に、その合成面から追求した。すなわち、糖からヘキソサミンの合成系路の鍵酵素と考えられる *L-Glutamine D-Fructose-6-Phosphate Amidotransferase* についてその量的あるいは質的な面から検討を行なった。その結果、この酵素は加齢によって著明な変化のあることが明らかになり、加齢による結合組織成分の変化を説明する有力な手がかりを得ることができた。

## (1) 加齢にもなう結合組織成分の変化に関する基礎的研究

### (その1) 加齢にもなうシロネズミ皮膚ムコ多糖類の変化について

現在ネズミの皮膚に存在するムコ多糖類は約8種類が知られ、このうち本研究では、ヒアルロン酸、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、およびヘパリンをとりあげ、量的、質的な面から加齢による変化を追求した。その結果、① 加齢にもなう総ムコ多糖類が増加する。② 含硫ムコ多糖類である、コンドロイチン硫酸、ヘパリンは減少する。③ ヒアルロン酸、ヘパリン硫酸

は増加する。④、これらの変化はネズミの成長期から成熟期にかけて顕著である。⑤、組織の固型成分（脱脂乾燥成分）は、成熟期以後において減少が認められた。このことは、加齢にもなって実質細胞が減少し、ムコ多糖類等の細胞間質が増加することを示唆している。

#### （その2） 加齢にもなるシロネズミ皮膚および尾腱コラーゲンの変化について

ムコ多糖類と同じ細胞間質成分であるコラーゲンについても同様の目的のもとに研究を行った。コラーゲンの熱収縮、酸可溶、酸不溶コラーゲンの比率を指標に加齢による変化を追求したところ、① 加齢にもなってコラーゲンは熱収縮に対して抵抗性を増す。② 加齢にもなって酸不溶コラーゲンが増加して、逆に酸可溶コラーゲンが減少する。③ 加齢にもなって、総コラーゲンの量が増加してくることが認められた。このことは、加齢にもなって、コラーゲンが量的に増加するばかりでなく質的にも変化し、特に、コラーゲンの分子内および分子間の架橋結合が増加してくることが明らかになった。

#### （その3） 加齢にもなるシロネズミ皮膚の繊維化について

加齢にもなって、ムコ多糖類および、コラーゲンが量的に変化することから、細胞間質が加齢にもなってどのように変化するかを全体的に把握する必要がある。そこで、本研究では、細胞間質の全体的な変化をみる指標として、ムコ多糖類の量に対するコラーゲンの量の比をとりこれを細胞間質の繊維密度として、加齢にもなって繊維化がどのようにになっているかを検討した。その結果、加齢にもなって繊維化が進行していくことが明らかになった。このことは、ムコ多糖類よりも、コラーゲン繊維の方が代謝されにくいために、結果的に細胞間質の繊維化が加齢にもなって増加してくることを示唆している。

#### （その4） ビタミンA欠乏による細胞間質の変化

ビタミンAが結合組織の形成に影響をおよぼすことは知られているが、その内容に関して不明なところが多い。本研究は、ビタミンA欠乏によって細胞間質成分がどのように変化するかを明らかに加齢による変化と比較検討した。その結果、ビタミンA欠乏により、ムコ多糖類およびコラーゲンの質的な面、および、皮膚の線維化などで加齢と同じような変化がみられたが、量的面では、ビタミンA欠乏はこれらの成分に影響をおよぼさないことが明らかになった。このことからビタミンAによる変化は、加齢による変化とは本質的に異なることが判明した。栄養条件が動物の加齢変化に対してどのような影響をおよぼすかについては、今後さらに種々検討されなければならないと考えられる。

## （2）加齢にもなるヘキシサミンの代謝変動に関する研究（1）

### ヘキシサミン合成酵素について

細胞間質が加齢にもなって増加してくることは、結合組織成分の加齢変化を追求することで明

らかになった。従来、この現象についての研究は、主に、ムコ多糖類および、コラーゲンの代謝回転を老若動物間で比較したものが多し。しかし、このような研究は結合組織の全体的な動きを指摘しているが、その内容の説明に欠けるものである。そこで本研究は結合組織間質成分であるムコ多糖類が加齢にともなって増加してくる点に着目し、その構成成分である、*N*-アセチルヘキソサミン (HexNAc) のムコ多糖類への供給が、加齢にともなって変化しているのではないかと推測のもとに、HexNAc 合成の初発段階を触媒する、*L*-Glutamine *D*-Fructose-6-Phosphate Amidotransferase を老若ネズミの肝臓から抽出しその性質の加齢変化から、ヘキソサミンの代謝変動を追求した。

(その1) ヘキソサミン合成酵素 (Amidotransferase) の生体内分布の検討

Amidotransferase はネズミでは肝臓がもっとも高い活性を有し、脳、腎臓では肝臓のそれぞれ、 $1/5$ ,  $1/50$  である。しかし、ヘキソサミンの含量は腎臓でもっとも高い値を示し、肝臓の約3倍、脳の1.5倍である。特に腎臓で酵素活性が低いことから、ヘキソサミンは肝臓で合成されてから腎臓へ移行するのではないかということが示唆される。

(その2) 肝臓ヘキソサミン合成酵素の抽出および諸性質の検討

Amidotransferase は1957年 Pogellらによつてはじめてネズミの肝臓から抽出されたが、抽出ならびに、活性の測定法に問題があり、本研究ではこの点を検討し、抽出・精製を可能にした。すなわち、抽出の際、大量のG-6-P (12mM) を使用しないと其後の精製が困難であること、また、硫酸分画酵素標品はG-6-P  $\longleftrightarrow$  F-6-P 転移酵素が混在するが、これを除去するのに、脱塩しないでDEAE-セファデックスにより精製が収率よくできることを可能にした。また、表1に示したような性質をもつことが明らかになった。

Table 1. Some properties of Amidotransferase of Rat Liver

Optimum pH	pH7.0-8.0 (in phosphate buffer)
Stabilizing Reagent	Fructose-6-phosphate, L-glutamine, Glucose-6-phosphate
Activator (-SH Reagent)	Dithiothreitol, Glutathione, Mercapto-ethanol, Cysteine
Km (for fructose-6-phosphate)	$1.2 \times 10^{-3}$ M (ammonium sulfate fraction) $2.4 \times 10^{-4}$ M (purified enzyme)
(for L-glutamine)	$6.0 \times 10^{-4}$ M (purified enzyme)
Feedback Inhibitor	UDP-N-acetylglucosamine
Inhibitor	Glucose-6-phosphate

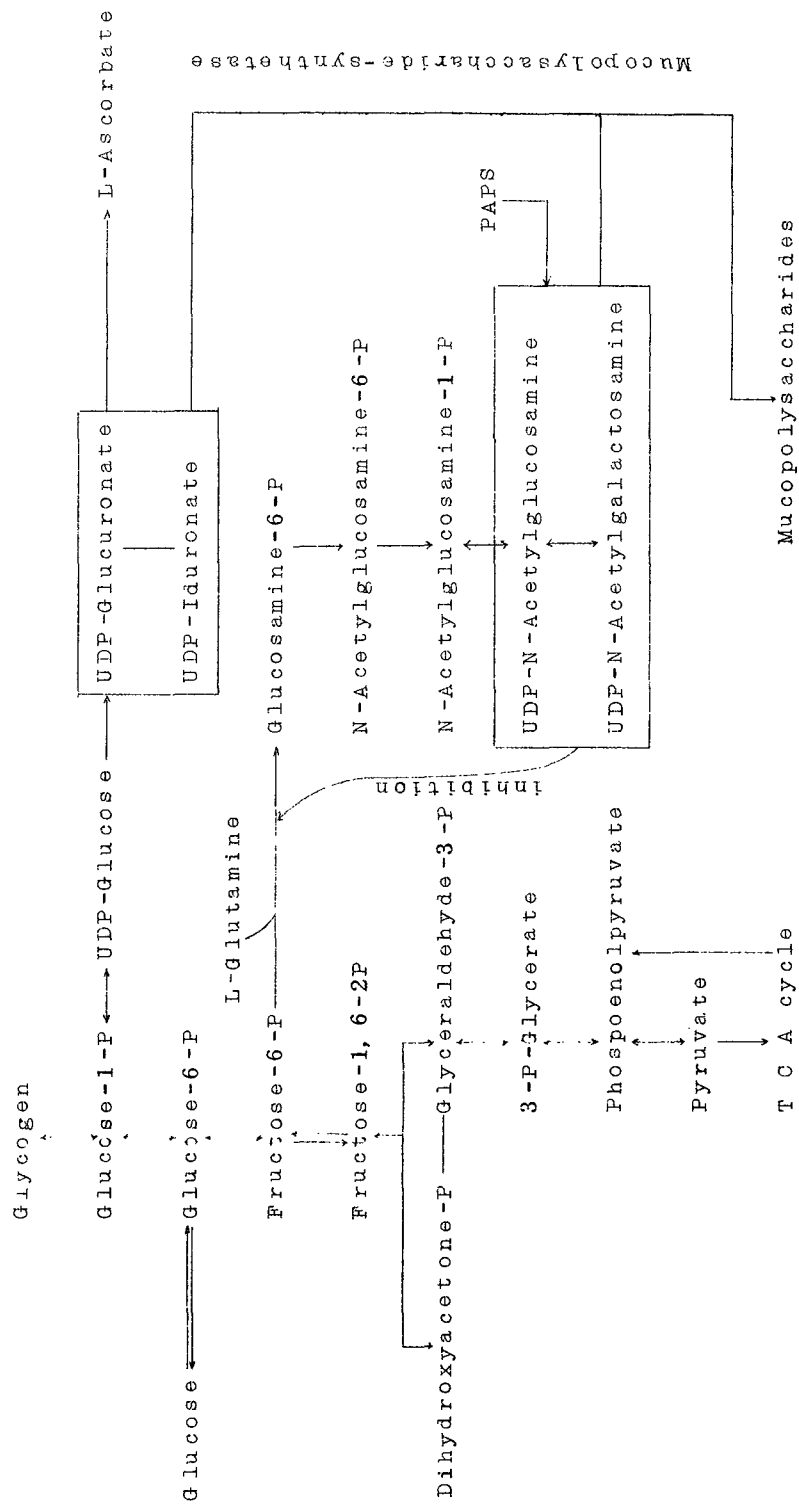


Fig. 1 The Metabolic Pathway of Sugar related to Mucopolysaccharides

### (3) 加齢にともなうヘキソサミンの代謝変動に関する研究(II)

ヘキソサミン合成酵素の加齢変化について

生後1~2日, 30日, 40日, 55日, 3か月, 21か月の雄シロネズミの肝臓から Amidotransferase を抽出し, 活性をしらべてみると, ① 組織あたりの酵素活性は加齢にともなって低下する。② タンパク質あたりの活性も低下する。③ 肝臓あたりでは変化がみられないことが判明した。このことは, 加齢にともなって酵素が質的に変化している可能性を示している。一方, 図1に示したように, 本酵素は, ヘキソサミンの最終生成物である。UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)でフィードバック阻害されることが知られている。

そこで本研究ではUDP-GlcNAcによるフィードバック阻害に対する Amidotransferase の感受性を指標にして, 老若間における酵素の変化を追求した。

(その1) *in vivo*による検討(オロチン酸投与のシロネズミ肝臓ヘキソサミン合成酵素の活性におよぼす影響)

生後1か月と9か月のシロネズミにオロチン酸を投与することにより, 肝臓内に酵素の阻害物質であるUDP-GlcNAcの量を対照群の3倍に増加させた場合の Amidotransferase の活性を測定した。その結果は, 図2に示すように, 1か月ネズミでは48%阻害されるが, 9か月ネズミでは8%しか阻害されない。

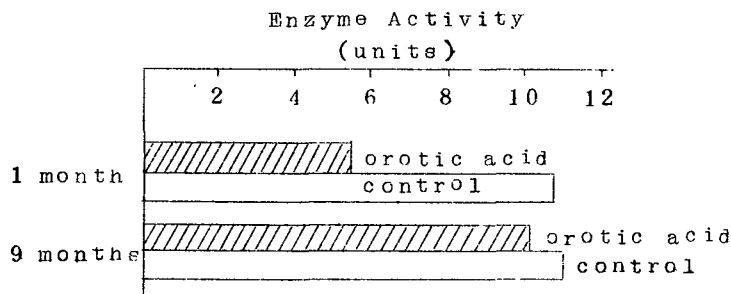


Fig.2 Effect of orotic acid administration on the activity of amidotransferase in young and old rats.

このことは, 若い動物の Amidotransferase ほど UDP-GlcNAc に対して感受性をもつことを示している。

(その2) *in vitro*による検討(加齢によるUDP-GlcNAcの酵素阻害効果の変化に関する検討)

生後4~5日, 40日, 4か月ネズミの肝臓から Amidotransferase を抽出, 部分精製したもの

について、UDP-GlcNAcの阻害効果を検討したところ図3に示すように、ネズミの年齢が進むにつれて、UDP-GlcNAc阻害に対して感受性がなくなることが確認された。*in vivo*の結果とあわせて考えると、加齢とともに酵素が質的に異なるのではないかということが示唆された。

(その3) 加齢によるヘキソサミン合成酵素の変化に関する生化学的検討

Amidotransferaseが加齢ともなって質的变化がみられることをさらに酵素の分子レベルで検討した。

(i) DEAE-セアデックスA-50による検討。

生後9日と20カ月ネズミのAmidotransferaseをDEAE-セアデックスA-50, KCl濃度、0-0.5Mまでの連続濃度勾配でクロマトグラフを行なったところ、若い酵素は単一のピークを持つが、老酵素は、2つのピークを持つ複合体であることが確認された。

(ii) ショ糖密度勾配沈降超遠心による検討

生後9日、1カ月、20カ月ネズミについて、検討を行なったところ、若い酵素は単一で、1カ月、20カ月ネズミの酵素にくらべて分子量が小さいことが判明し、1カ月と20カ月の酵素は主ピークの位置は同じであるが20カ月酵素は、より高分子側にさらにもう一つのピークを持つことが確認された。

以上のことから、加齢とともに、Amidotransferaseは質的に変化し、また酵素のもつ調節機能も変化していることが明らかになった。

(4) 糖のエネルギー代謝とヘキソサミン代謝の関連に関する研究

図1に示したように、ヘキソサミンの合成系は糖のエネルギー代謝に対して側経路あたる。したがって、ヘキソサミン代謝はエネルギー代謝と不可分の関係にあることは容易に考えられる。生物が摂取した栄養の一部は本構成成分として利用され、一部は生体を維持するのに必要なエネルギーとして利用されることはいうまでもない。本研究は、このような観点に立ち、主にエネルギーを変

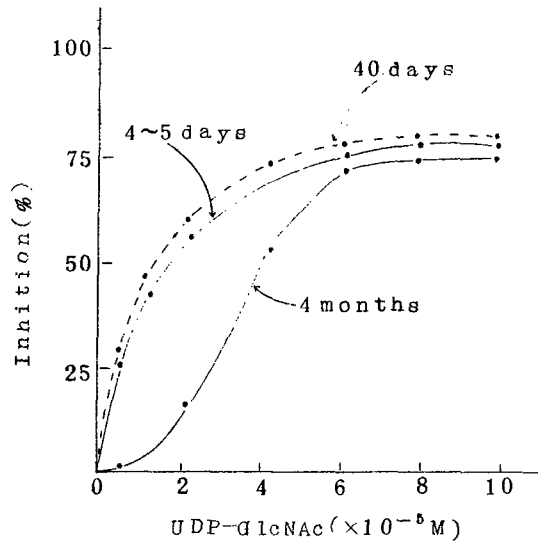


Fig 3. Inhibition of Amidotransferase of Rat Liver by UDP-N-acetylglucosamine.

化させた場合ヘキソサミンの代謝はどのように影響されるかについて検討を加えたものである。

(その1) ネズミの胎児および、新生児の肝臓におけるヘキソサミン合成酵素とエネルギー代謝酵素活性との関連について

ネズミの胎児には一般に糖新生系酵素が存在せず、したがって、エネルギー代謝は解糖系のみが存在することが知られている。糖新生系の鍵酵素の1つ、Phosphoenol pyruvate carboxykinaseは、生後数時間後に誘導されることが明らかになった。一方、Amido-transferaseは胎児の年齢と並行して活性が増大するが、出生前2日目から出生時にかけて胎児期の最大活性の1/3に低下し、その後徐々に活性が高まることを観察した。出生前2日目から出生時にかけて酵素活性が低下するのは、この時期からエネルギー代謝、特に糖新生が活発になるために、糖がヘキソサミン代謝に向わなくなるためであろうと推察した。

(その2) 継続的絶食時および、アロキサン糖尿におけるヘキソサミン合成酵素活性の検討

生後1カ月のシロネズミを4日間継続的に絶食にした場合、絶食開始後24時間まではAmido-transferaseの活性に低下はみられないが、その後徐々に低下して96時間では75%の低下がみられた。さらに生後1カ月および、4カ月ネズミに、48時間絶食とアロキサン糖尿を同時に負荷してみると、1カ月ネズミにおいて50%活性が失われるのに対して4カ月の成熟ネズミでは、5~7%しか低下しない。以上のことから、糖新生が活発に行なわれるような条件では、Amido-transferaseの基質であるF-6-Pの供給が潤渇しないうちは活性は保たれるが、本実験条件のようにF-6-Pの濃度が低下するような場合は、F-6-Pはヘキソサミンの前駆体よりはエネルギー中間体の性格が強いためAmido-transferaseの活性低下が起るのだからと考えられる。

(その3) UDP-glcNacのAmido-transferase阻害効果におよぼすG-6-Pの影響の検討

生後1.5カ月ネズミのAmido-transferaseを用いて、G-6-PのUDP-glcNacによる酵素活性阻害効果に対する影響を検討してみると、図4に示したように、UDP-glcNacを添加しない酵素は、0.25mM以上のG-6-Pで20%阻害

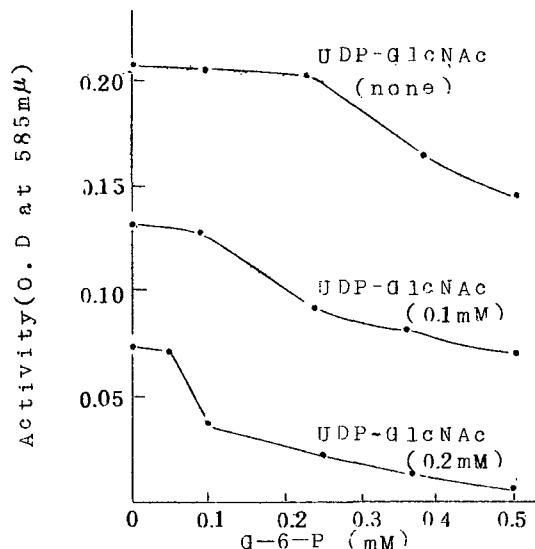


Fig 4. Effect of G-6-P on the activity in absence and presence of UDP-glcNac with both substrate saturating.



を受けることが明らかになった。一方、UDP-GlcNAcの濃度を上げて徐々に酵素を阻害していくと、同じ阻害効果を引き出すのに必要な、G-6-PはUDP-GlcNAcの濃度が高いほど少なくて済むことが確認された。このことは、エネルギー代謝中間生成物であるG-6-PがUDP-GlcNAcの酵素阻害をさらに強化することを意味している。この現象は絶食でみられたような基質の過剰とは逆に、大量のエネルギー中間代謝物が生成された場合に過剰にヘキソサミン合成が起らないようにするための調節機構と考えられる。

## 結 語

結合組織が加齢にもなって量的、質的に変化することを明らかにした。

さらに、結合組織成分のうちムコ多糖類が加齢にもなって増加してくることに着目し、この構成成分であるヘキソサミンの加齢にもなる代謝変動について、主に、ヘキソサミン合成酵素 (Amidotransferase) の活性を追求することで明らかにした。すなわち、加齢にもなって、AmidotransferaseはUDP-GlcNAcによるフィードバック阻害をうけにくくなることを、*in vivo*、および、*in vitro*で証明し、この変化は酵素が質的に加齢にもなって変化するためであることを生化学的手段を用いて明らかにした。このことから、老化した動物は常に若い動物にくらべて、UDP-GlcNAcが合成されやすい状態にあることが考えられ、ムコ多糖類が加齢にもなって増加してくることに、1つの説明になると考えられる。

またヘキソサミン代謝はエネルギー代謝と密接に関係していることを、解糖および糖新生系を動かすことで明らかにした。なお、加齢によるエネルギー代謝とヘキソサミン代謝との関連については今後の問題として残された。

## 審査結果の要旨

加齢変化のもつとも著しくあらわれる組織として、結合組織があげられ、その間質成分の増加することが、古くから知られている。

このように、加齢による変化を、生体成分の変化として現象的にとらえた研究は比較的多いが、これらの現象の裏にある、生体における代謝調節のゆがみとしてとらえようとする試みは、数少ない現状といえる。

本研究は、白ネズミを用いて、加齢によるこの間成分の量的、そして質的变化の実態を詳細に検討するとともに、このような生物のもつ恒常性をくずすに至った機作をとらえ、生物の加齢現象の解明の糸口をつかもうという立場から行われたものである。

著者はまず、①加齢にともなう結合組織成分の変化に関する基礎的実験を行ない、加齢にともなう、総ムコ多糖類が増加するとともに、その構成パターンが変化すること。これらの変化は、成長期から成熟期にかけて顕著であることをたしかめた。また、コラーゲンにもこれと同じような変化がみられることを示した。ついで、加齢にともなうムコ多糖類の増加の現象に着目し、②その構成成分であるN-アセチルヘキソサミン (HexNAc) の生合成が、加齢にともなう変化しているのではないかという推測のもとに、グルコース代謝の中で、HexNAc合成の Key enzyme と考えられるL- glutamine, D- Fructose-6- Phosphate Amidotransferaseをネズミ臓器から抽出し、その活性および性質を検討した。そして、この酵素は臓器のヘキソサミン含量とは無関係に、肝でもっとも高い活性を有していることから、ヘキソサミンは肝で合成されてから他へ移行することが示唆された。この酵素は極めて不安定な酵素であり、抽出や活性測定法などに問題があったので、さらにその点を検討し、定量的に論ずることのできる程度まで抽出精製法を改良し、この酵素の一般的性質を明らかにした。③このようにしてえられる Amidotransferase の加齢変化を検討したところ、比活性が加齢によって低下していることがわかり、ヘキソサミンの最終生産物であるUDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) によるフィードバック阻害に対する感受性も低下していることが明らかになった。すなわち、酵素そのものが加齢によって質的に変化している可能性が示され、セフデックスによるクロマトグラフィおよび蔗糖密度勾配沈降超遠心による検討でそれが確認された。さて、Amidotransferase の基質であるFructose-6-phosphateは解糖系 (および糖新生系) の中間物質であるため、これらの代謝系の変動によって、著しく影響されることが考えられるので、④解糖系、糖新生系の代謝を著しく強めたり弱めたりする種々の条件下で、Amidotransferase 活性の変動を検討し、糖新生系が活発に動いているような場合に、この酵素活性の低下がみられることがわかった。すなわちこの酵素がエネルギー代謝の影響をうけていることが示唆された。以上のように、本研究は加齢によるムコ多糖類の増加という現象を、Amidotransferase という Key enzymeの動態を通して説明を試み、いくつかの新知見を含むものであり、農学博士の学位を授与するに充分価値あるものと認める。