琉球大学学術リポジトリ

ギンネムの飼料的利用に関する基礎的研究：第２報牛第一胃内容物中に存在するミモシン分解酵素の検索(畜産学科)

メタデータ	言語:
	出版者: 琉球大学農学部
	公開日: 2008-02-14
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 本郷, 富士弥, 城間, 定夫, Hongo, Fujiya, Shiroma, Sadao
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4170

ギンネムの飼料的利用に関する基礎的研究

第2報　牛第一胃内容物中に存在する ミモシン分解酵素の検索*

本　郷　富士弥**・　城　間　定　夫**

Fujiya HONGO and Sadao SHIROMA : Studies on the utilization of *Leucaena leucocephala* as a feed stuff II. On mimosine degradation-enzyme in bovine rumen contents

I　緒　言

琉球列島の島々に自生しているギンネム（*Leucaena leucocephala*）は，熱帯性のマメ科の多年性植物でアルファルファに匹敵するタンパク質含量を有していることから[6]，最近，新しい飼料資源として注目されている。しかし，大部分はほとんど未利用のまま放置されているので，これを牧草化あるいは豊富なタンパク質粗飼料源として家畜に有効に利用することは，有益なことであると考えられる。これまでの知見によれば，単胃家畜がこれを継続的に摂取すると，含有されるアミノ酸，ミモシン（mimosine），β－〔N－（3－hydroxy－4－pyridone）〕－α－aminopionic acid によって，発育阻害，脱毛および繁殖障害などの病的症状を発現するが，反芻家畜には長期間多給しない限り，このような症状はほとんど認められないと云われている。[5,8] しかし，これらの抑制機序に関する詳細な報告は，ほとんど見受けられず，反芻胃内容液による分解が指摘されているのにとどまっている。[2,9]

本研究は，ギンネムの牧草化あるいは飼料化にあたっての基礎的なデーターを提供するための一端として，牛第一胃内容物中に存在するルーメン液，プロトゾアおよびバクテリアの各画分のミモシン分解を調査し，いわゆるミモシン分解酵素が存在するかどうかを検索した。また，ミモシン分解生成物を知るために，各種溶液中におけるミモシンの分解についても検討した。

II　実験材料および方法

1　実験材料

牛第一胃内容物は，沖縄畜産加工株式会社屠畜場で屠殺された黒毛和種牛の第一胃を切開して採取し，ただちに研究室に搬入して実験に供した。ミモシンは，当研究室による精製法[3]に従って得られた純結

* 本論文の概要は，昭和52年9月，第67回日本畜産学会において発表した。また，本研究の一部は，昭和51年度文部省科学研究費（No. 176195）の補助によって行なわれた。

** 琉球大学農学部畜産学科

晶ミモシンを用いた。

2. 実験方法

(1) 牛第一胃内微生物群の分画

第一胃より採取した内容物は，第1図に示した方法に従って，それぞれルーメン液（RF），プロトゾア（PF）およびバクテリア（BF）の3画分を得た。

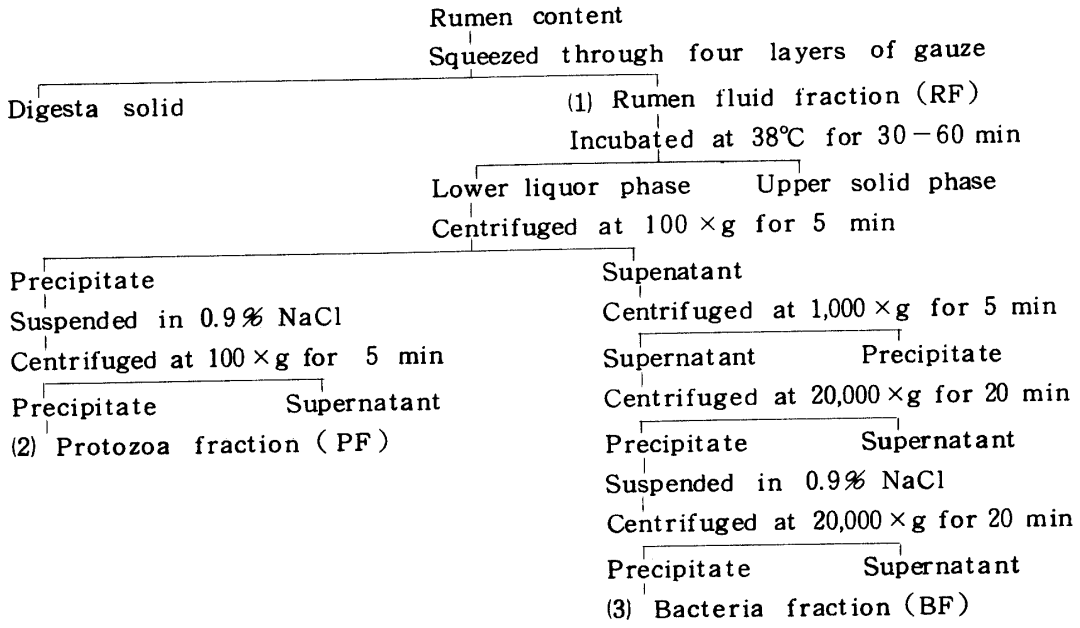
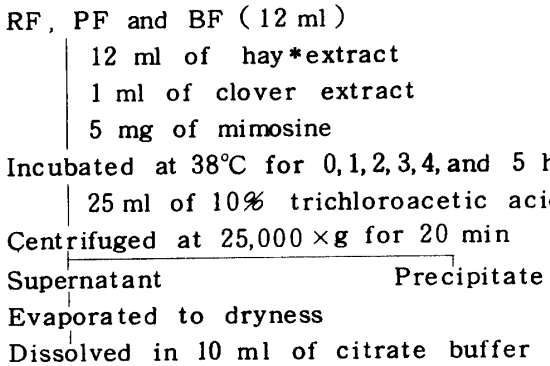


Fig. 1. Fractionation of rumen content

(2) ミモシン含量の測定

(1)で得られた3画分（RF, PFおよびBF）をミモシンに作用させ，*in vitro* におけるミモシン量の経時的な変化を第2図に示した方法に従って測定した。



*Hay was extracted in a solution consisting of KCl, 0.2g; NaCl, 5.6g; $CaCl_2$, 0.1g; $CaCO_3$, 0.1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1g; $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 1.2g; KH_2PO_4 0.4g; K-citrate, 0.5g/ℓ

Fig. 2. Incubation of mimosine and its liquid chromatographic analysis

(3) ミモシン分解生成物の検索

ミモシン分解生成物は，0.1N HCl，0.1 NaOH，citrate buffer（pH 2.2）および水などのそれぞれに溶解した0.5％ミモシン溶液を100℃で，1～5時間密封加熱した。この試料は，濃縮してペーパークロマトグラフィー（東洋沪紙No.51）により調査した。展開溶媒として，ブタノール：酢酸：水＝4：1：2（v/v）を使用し，上昇法で展開後，塩化第2鉄を用いて発色させスポットを検出した。

Ⅲ 実験結果

1 牛第一胃内容物中のルーメン液（RF），プロトゾア（PF）およびバクテリア（BF）画分によるミモシンの分解

第1図に示した調製法に従って得られたRF，PF および BF の3画分をミモシン（0.5mg/mℓ）に作（38℃，pH 6.8）させ，一定時間インキュベート後の残存ミモシン量を測定した結果は，第3図に示すとおりである。

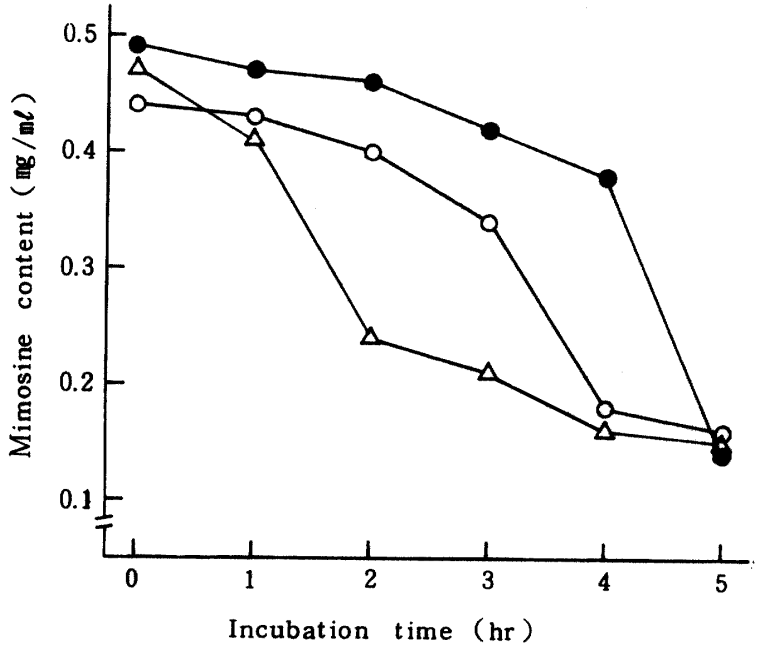


Fig. 3. Changes of mimosine content affected by rumen fluid, protozoa and bacteria fractions
○——○ Rumen fluid fraction (RF)
●——● Protozoa fraction (PF)
△——△ Bacteria fraction (BF)

各画分を作用させたときのミモシン量は，いずれもインキュベートした時間の経過に伴なって減少し，5時間後，各画分いずれも0.14～0.16mg/mℓとほぼ同じ値を示した。この図から，各画分のミモシン分解能の高低を比較することはできないが，あらかじめ各画分の調製直後のタンパク質濃度を測定し，タンパク質1％当りに換算した場合のミモシン分解性を比較した結果は，第4図に示すとおりである。RF，

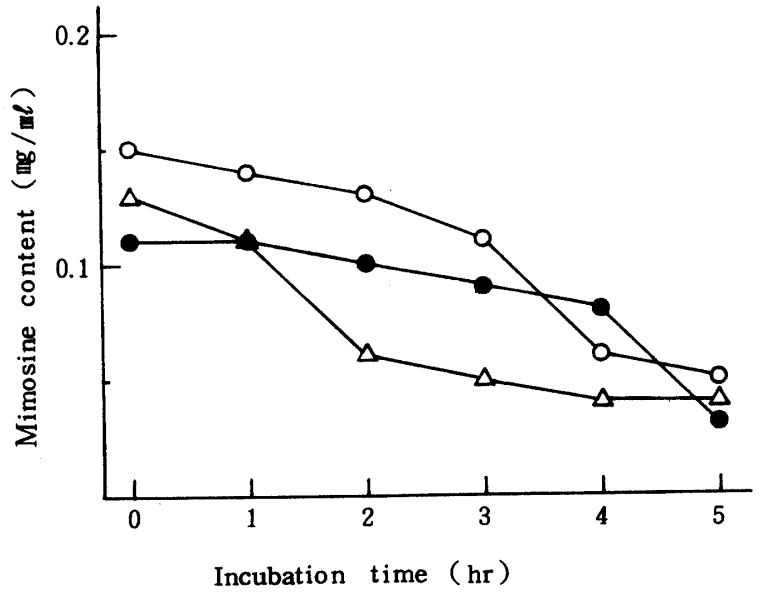


Fig. 4. Changes of mimosine content affected by rumen fluid, protozoa and bacteria fractions adjusted to 1% protein content

○——○ Rumen fluid fraction (RF)
●——● Protozoa fraction (PF)
△——△ Bacteria fraction (BF)

PFおよびBFの各画分中のタンパク質含量は，それぞれ2.9，4.3および3.7％であり，ミモシンの減少率は，インキュベーション4時間後までは，BFが高い値を示していた。5時間後，各画分中の残存ミモシン量は，RF；0.05，PF；0.03およびBF；0.04（mg/mℓ）とほとんど同じ値を示し，0時間を100とした場合，5時間後の各画分の減少率は，約70％であった。

2　各種溶液中におけるミモシン分解生成物の検索

酵素的分解以外で，種々の溶液〔0.1N HCl，citrate buffer（pH2.2），0.1N NaOHおよび水〕中におけるミモシン分解生成物をペーパークロマトグラフィーによって調査した結果は，第5図に示すとおりである。0.1N HCl溶液と共に加熱した場合，反応開始1時間で，Rf値，0.48～0.60の範囲にほぼ4成分，またRf値，0.82を有する1成分の生成が認められ，5時間後においてもスポットの新らたな生成はみられなかった。しかし，反応時間の経過に伴なって，ミモシンのスポットは次第に消失し，4および5時間後，完全に消失分解し，代って分解生成物の量的な増加が著しかった。クエン酸緩衝液の場合，反応開始後2時間で，Rf値0.30，0.63～0.72および0.77を有するスポットが出現した。反応時間に伴ない新らたな成分の出現は認められず，分解生成物の量的な増加がみられ，ミモシンのスポットは5時間後完全に消失した。0.1N NaOH溶液では，1時間の反応後，Rf値0.65および0.78を有するスポットが認められたが，反応時間に伴なうミモシン量の減少および分解生成物の増加もほとんど見受けられなかった。ミモシンの水溶液では，反応時間に伴なってRf値0.63を有するスポットの増加がみられたが，ミモシンの著しい減少はみられなかった。

以上の結果，ミモシンを酸，アルカリおよび水などと共に加熱した場合，塩化第2鉄で呈色できる種々の分解生成物の存在を確認することができた。ここで，参考までに水と加熱して得られた1成分と思

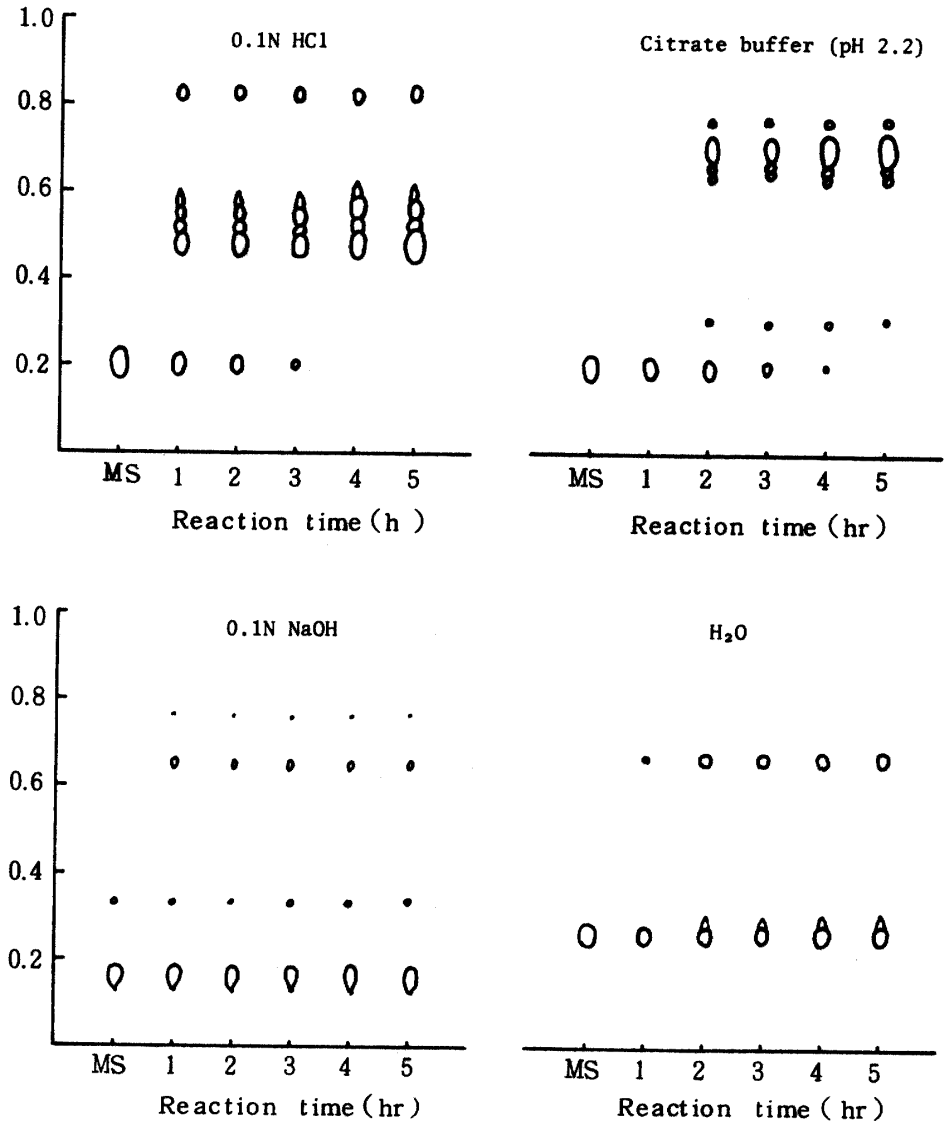


Fig. 5. Paper chromatograms of the products from mimosine (MS) heated with various solutions, Solvent system : n-BuOH : AcOH : H_2O (4 : 1 : 2). Detection : 0.5% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

われる生成物のスポットを水抽出して，濃縮後，一定量に希釈して紫外部吸収スペクトルを測定した。その結果は，第6図に示したとおり，195，216および279 nmに特性吸収がみられ，ピリジン系化合物の可能性が考えられた。今回は，これら種々の溶液および牛第一胃微生物群によるミモシン分解生成物の分離同定は行なわなかったが，今後検討する予定にしている。

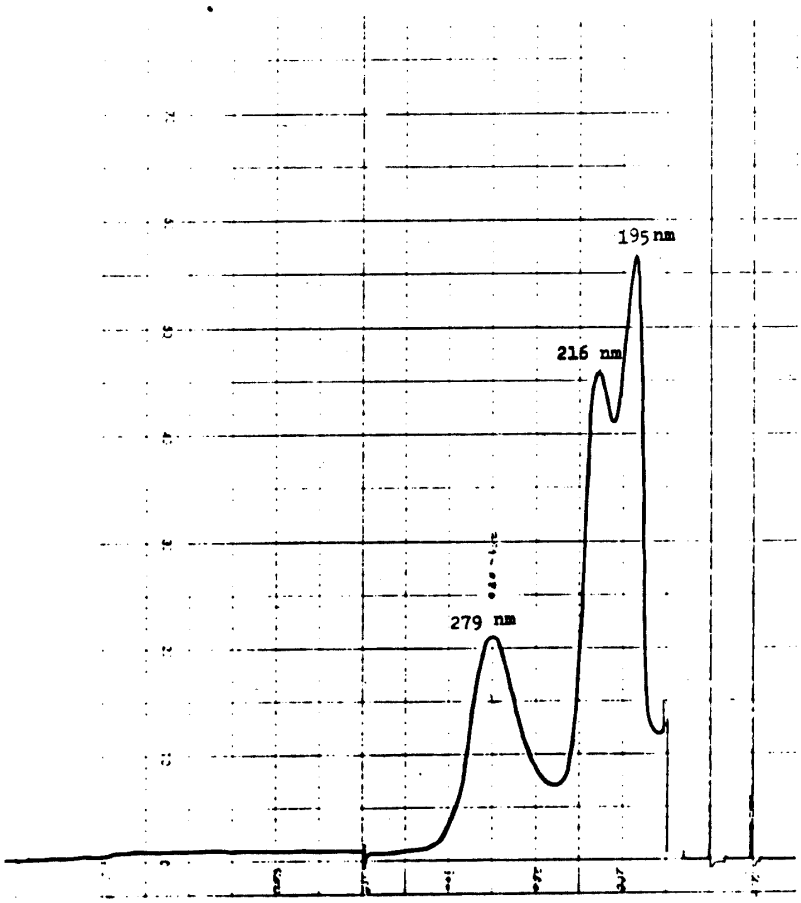


Fig. 6.　Absorption spectrum of unknown products

Ⅳ　考　　察

現在ギンネムは，一部の地域において反芻家畜の粗飼料源として利用されている。これまでに反芻類に対するミモシン中毒の抑制機序を詳細に調査した報告は，ほとんど見当らない。Hegarty ら[2]は，メン羊第一胃内に投与されたミモシンが，ここで3,4－dihyroxypyridine（3,4－DHP）に分解され，その原因が第一胃内微生物群によることを示唆した。さらに最近著者の一人である城間ら[9]も，ヤギルーメン微生物群によって，ミモシンは，3,4－DHPに分解されることを報告している。

本実験では，これらを更に詳細に調査するために，牛第一胃内容物より得られたルーメン液（RF），プロトゾア（PF）およびバクテリア（BF）のそれぞれの画分によるミモシンの消長を調査し，酵素作用との関係を検索した。その結果，第3図に示したように各画分とも，反応時間に伴なってミモシン量の減少がみられ，5時間後，約70％の減少率を示した。このことは，微生物群によって多量のミモシンが分解あるいは取り込まれているものと考えられ，これまでの報告[2,9]とよく一致している。3画分したもののタンパク質量を一定にした場合の反応時間に対する各画分によるミモシンの減少率は，BF画分が相対的に高い値を示した。しかし，最も高いミモシン分解能を有する画分が，いずれであるかは，各画分が粗画分であることや反応条件などの差異が考えられるので，ここでは明確にすることはできなかった。このような，各画分によるミモシン分解能の原因として，プロトゾアおよびバクテリアなどの

産生する酵素による脱アミノ反応やトランスアミネーションを伴なう作用が考えられるであろう。そこで，著者らはミモシン分解酵素が存在するかどうかを検索するために，ミモシン分解能の高いと考えられたBFをアセント粉末となし，リン酸緩衝液（pH6.9)によって粗酵素液を調製した。この液にミモシンを基質として，酵素活性を求めた所，pH9.0附近に最も高い酵素の存在を認め，目下，本酵素の分離精製などについての実験を進めている。しかし，本実験では，PFおよびBFを遠心分離することによって除去した上澄画分（Protozoa and bacteria free fraction）によるミモシン分解については追求しなかったが，この画分をアセトン粉末となし，前記同様にミモシンを基質とし，pH6.9,280 nmにおける吸光度を測定した所，吸光度は経時的に減少した。[4] 従って，この上澄画分にも菌体外に産生されたミモシン分解酵素の存在が考えられた。

ギンネムの茎葉を加熱することによって，ミモシン含量を軽減させる試みは，Matsumotoら[7]やCarangalら[1]によって報告されている。本実験においても，ギンネム若葉を用いて，60, 80, 100および120℃の各温度で，72時間熱風乾燥後，Matsumotoら[6]の方法に従って，12時間毎にミモシン含量の変化を調査した。その結果，ミモシン量は，高温で乾燥するほど減少し，12時間後の減少率はそれぞれ，2.7, 5.6, 17.1および17.6％であった。しかし，各温度とも，12時間以降の変化はほとんど認められず，ほぼ一定の値を示していた。このことは,ミモシン自体の融点が227℃であることと，加熱時間に伴なって分解生成物が次第に増加し，本測定法ではミモシンと共に測定されることが考えられた。そこで，ミモシンの結晶粉末を各種溶液（0.1N HCl, citrate buffer：pH2.2, 0.1N NaOHおよび水）と共に加熱した後（100℃, 1～5 hr），生成する物質について，塩化第2鉄を発色剤としてペーパークロマトグラフィーによる検討を試みた結果は，第5図に示したとおりである。その結果，酸（0.1N HCl, citrate buffer），水およびアルカリ（0.1N NaOH）の順にミモシンの分解が著しく，同時に分解生成物の増加が認められた。このことから，ミモシンを各種溶液中で加水分解すると，溶液の種類によって，Rf値の異なる数種の成分の生成がみられた。前述の如く反芻胃内微生物群によって，ミモシンは，3,4－DHPに分解されることが報告[2,9]されているが，RF,PFおよびBFの各画分では，数種の成分に分解されることも考えられる。しかし，3,4－DHPの生成機構に関しては十分に解明されていないし，その他の分解生成物についての報告はみられない。ギンネムの飼料化などを目的とした場合，加熱のみによるミモシン含量の低下の試みは，高温処理や長時間を要することと，有効成分の損失や分解生成物の有害性の可能性などから必ずしも効果的であるとは云えないかも知れない。以上の結果から，酸類処理によるミモシンの分解のみが，比較的大きかったことから，今後，家畜に対する栄養価や嗜好性を考慮し，その他の有機酸類を利用したミモシンの低減法を検討する必要があると考えられた。

V 要　約

本報は，反芻家畜によるミモシン中毒抑制機序を知るために，牛第一胃内容物より得られたルーメン液，プロトゾアおよびバクテリアのそれぞれの画分によるミモシンの消長を調査し，ミモシン分解酵素の存在を検索した。また，各種溶液〔0.1N HCl, citrate buffer（pH 2.2), 0.1N NaOHおよび水〕中でのミモシン分解生成物について検討した。その結果を要約すると次のとおりである。

1. ルーメン液，プロトゾアおよびバクテリアのそれぞの3画分を，pH 6.8, 38℃の条件下で，ミモシン（0.5mg/ml）に5時間作用させた場合の残存ミモシン量は，0.16, 0.14および0.15mg/mlといずれも減少することが認められた。また，タンパク質1％当りの5時間後の各画分の低下率は，約70％を示した。これらのことから，牛第一胃微生物群によるミモシンの分解が認められた。

2. 酵素的分解以外で，種々の溶液中におけるミモシン分解生成物をペーパークロマトグラフィーで分

離後，UVスペクトルによって調査した結果，ピリジン類似物質以外に2,3の未知物質の存在が認められた。また，ミモシン分解生成物は，酸類，水およびアルカリの順に分解が著しかった。

本実験にさいし，終始懇切なる御助言を戴き，本報告の原稿のご校閲をしていただいた本学農学部教授，高橋宏先生に厚く御礼申し上げます。また，本実験に多大なる御協力をいただいた本学農学部，新嘉喜朋子技官に心から感謝の意を表します。

文　　献

1. Carangal, A. R. and Catindig, A. D. 1955 The mimosine content of locally grown ipil-ipil (*Leucaena glauca*), Philippine Agr., **39**：249～254
2. Hegarty, M. P., Schinckel, P. G. and Court, R. D. 1964 Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca benth.* and to its toxic principle mimosine, Aust. J. Agr. Res., **15**：153～167
3. 本郷富士弥　1977　ギンネム中のmimosineの分離精製とマウスに対する生物活性，第67回日本畜産学会大会講演要旨，**48**：101
4. 本郷富士弥　未発表データ
5. Letts, G. A. 1963 *Leucaena glauca* and ruminants, Aust. Vet. J., **39**：287～288
6. Matsumoto, H. and Sherman, G. D. 1951 A rapid colorimetric method for determination of mimosine, Arch. Biophys., **35**：195～196
7. Matsumoto, H., Smith, E. G. and Sherman, G. D. 1951 The effect of elevated temperatures on the mimosine content and toxicity of Koa Haole, Arch. Biochem. Biophys., **33**：201～211
8. Owen, L. N. 1958 Hair loss and other toxic effects of *Leucaena glauca* Vet. Record, **70**：454～457
9. Shiroma, S. and Akashi, A. 1976 Degradation of mimosine in *Leucaena leucocephala de wit* by goat rumen microorganisms, Jap. J. Zootech. Sci., **47**：739～747

Summary

Studying mimosine degradation of rumen fluid, protozoa and bacteria fractions obtained from bovine rumen, presence of mimosine degradation-enzyme in these fractions was investigated to determine mimosine detoxicating mechanisms of ruminants. Examinations for degraded substances in solutions such as 0.1N HC1, citrate buffer (pH 2.2), 0.1N NaOH and H_2O were conducted. The results were summarized as follows:

1. Incubation of mimosine (0.5 mg/ml) with fractions of rumen fluid, protozoa and bacteria at pH 6.8 and 38°C resulted in reduction of this substance to 0.16, 0.14 and 0.15 mg/mℓ, respectively. Degradation of mimosine per 1% protein for each fraction was approximately 70%. These results suggest degradation of mimosine by bovine rumen microorganisms.

2. As a result of analysis by UV spectrum after paper chromatographic separation of degraded substances in various solutions, in addition to enzymatic degradation of mimosine, some unidentified substances other than pyridine analogue were detected. The degree of mimosine degradation was highest in acidic solutions beeing followed by H_2O and basic solution.