アミノ酸の補足と蛋白代謝に関する研究 (第3報) Studies on the Amino Acid Supplementation and Protein Metabolism (Ⅲ)

リジンインバランス食白鼠の血清、肝及び尿中遊離アミノ酸高電圧濾紙電気泳動像について

On the Free Amino Acid Pattern of Serum, Liver and Urine of Lysine Imbalance Diet Fed Rat by High Voltage Paperelectrophoresis

(昭和 35 年 9 月 14 日受理)

田 村 敦
(Atsushi Tamura)

High voltage paperelectrophoresis was used for the separation of the free amino acid pattern of serum, liver and urine of lysine imbalanced diet fed rat.

Electrophoresis was performed at a potential gradient of 2,000 & 4,000 volt/57 cm and in acetic—pyridine buffer (pH 3.6) for 15 and 30 minutes.

The free amino acid pattern of serum and liver of lysine imbalanced group showed no difference against that of normal rat, but the pattern of urine showed paticular difference.

On the pattern of urine of lysine imbalanced group, the increase of α -amino adipic acid, which is an unusual amino acid in normal urine and a product from lysine metabolism, was indicated by electro-phoresis and paper chromatography.

緒 言

蛋白に、その制限アミノ酸を補足すると栄養価が向上することは、古く Osborne, Mendel の実験以来よく知られている。しかし、アミノ酸はビタミンなどと異なり、ある種のアミノ酸を必要量以上に、あるいは他のアミノ酸との量的比率を悪くするような過剰を投与すると、予期以上の機能の低下、すなわち、アミノ酸インバランスの現象を生ずる。例えば、食欲を減退させ、生長や窒素保留を低下させ¹⁾²⁾、また、肝脂肪の蓄積³⁾⁴⁾⁵⁾、肝酵素活性系の変動⁶⁾⁷⁾⁸⁾、繁殖率の減退ならびに病気にに対する抵抗性の減少⁹⁾などの代謝欠陥の生ずることが観察されている。これらの原因は主として制限アミノ酸必要量の増加、toxicity と antagonism に分けて考えられているが¹⁰⁾、このようなアミノ酸インバランス時における蛋白、アミノ酸代謝がいかに変動しているかについては、更に検討すべき問題点が多いと考えられる。また、これら代謝の変動の様相を知ることにより、アミノ酸インバランスの機構を追究出来、また、これを早期にすることも可能と考えられる。

これらの観点より、リジンインバランスとこれらが動物の蛋白・アミノ酸代謝に及ぼす影響を検討するため、本実験では、まず、リジンインバランス食白鼠の血清、肝及び尿中遊離アミノ酸の高電圧濾紙電気泳動像を求

め、同時に、尿中リジン代謝中間体の α -アミノアジピン酸の検索ならびに同定を行なった。

実 験 方 法

1) 実験動物及び飼育方法

Wistar 系の同腹雄白鼠、体重 115g 前後のもの 20匹を用いた。5 匹宛 4 群に分け、すなわちカゼイン 12%、絶食、カゼイン 10%+L-リジン HCl 2%及びカゼイン 8%+L-リジン HCl 4%とし、1 匹宛メタボリックケージに入れ、第 1 表の飼料を自由摂取させた。期間中各

第 1 表 飼 料 組 成

組 成	群			
	I	II	III	IV
カ ゼ イ ン	12%	-	10%	8%
L- リ ジ ン HCl	-	-	2	4
蔗 糖	38	-	38	38
デ キ ス ト リ ン	40	-	40	40
コ ー ン オ イ ル	5	-	5	5
混 合 無 機 塩 ①	4	-	4	4
ビ タ ミ ン 混 合 ②	1	-	1	1

① マツカラム塩 No. 185

② 総合ビタミン剤 (パンピタン末) 20g と塩化コリン 10g を混合し、デキストリンにて 100g とした。

群毎に1日尿を採取した。飼育1週間後に心臓採血で殺して血清と肝を得た。

2) 血清、肝及び尿中遊離アミノ酸の高電圧濾紙電気泳動法

a) 装置

医歯大式(冷却水平方式)高電圧濾紙電気泳動装置¹¹⁾を用いた。

b) 操作

東洋濾紙 No. 51(57×2cm)を使用し、試料は陽極より20cmのところに、毛細管ピペットで定量的に線状に塗布した。これを氷酢酸-ピリジン-水緩衝液(10:1:89) pH3.6¹²⁾及び氷酢酸-蟻酸-水緩衝液(15:5:80) pH1.5¹³⁾を用い、高電圧(2000ボルト、15分及び4000ボルト30分)のもとで泳動した。泳動後、0.2%ニンヒドリン-ア

セトン溶液を噴霧し、加熱発色、パラフィンにて固定して、デンストメーターで泳動図を求めた。

c) アミノ酸の同定方法

アミノ酸の同定は平行同定法、すなわち、同一濾紙上で試料、試料及び純アミノ酸及び純アミノ酸を同時に泳動する方法をとった。

また、泳動像より同定すべきスポットを切り取り、50%アルコールにて抽出、濃縮後一次元ペーパークロマトグラフ(上昇法、n-ブタノール-氷酢酸-水、4:1:2)でも同定を行なった。

d) 試料処理

血清: メタノール-アセトン混液(3:1)を血清に6倍容加えて¹³⁾、30分静置、後遠沈せる上清を60°C以下で蒸発乾固し、蒸留水で元の血清の $1/10$ 量とした。

肝: 2倍量のアセトンで肝ホモジネイトし¹⁴⁾、後遠沈せる上清を60°C以下で蒸発乾固し、蒸留水で定容(生肝0.05g/cc)とした。

尿: 1日尿を濃縮乾固後全容1ccとし、これに6倍容のメタノール-アセトン混液(3:1)を加え¹³⁾、以下血清と同様処理して、蒸留水にて1日尿分を0.5ccとした。

実験結果

1) 血清及び肝遊離アミノ酸泳動像

本実験に用いた pH3.6 の緩衝液は塩基性、酸性及び中性アミノ酸群の3群に短時間で分離することが出来るので、この方法によりアミノ酸パターンを比較した。

その泳動結果は第1及び第2図にみられるように、リジン添加群の血清において、リジン濃度の増加の傾向をみとめた他は、血清及び肝ともに四群の間に大きな変動は認められない。

血清の泳動像において、中性アミノ酸群は一团となりグルタミン酸と明確に分離しているが、しかし、肝の場合はこれら両者間が連続している。これらは、肝ホモジネイトの遊離アミノ酸泳動法に関する伊藤¹⁴⁾の詳細な研究よりみて

第1図 血清遊離アミノ酸泳動図

第2図 肝遊離アミノ酸泳動図

第3図 尿中遊離アミノ酸泳動図(第7日尿)

も、ペプチドの存在のためと考えられる。

2) 尿中遊離アミノ酸泳動像

泳動結果は、第3図に示すように、リジンインバランス群の尿中遊離アミノ酸の変動は顕著で、中でも、リジンとグルタミン酸の排泄増加の傾向が認められた。同時に、絶食及びカゼイン8%+リジン4%群の泳動像において、グルタミン酸と中性アミノ酸群との間に、他の群

第4図 尿中α-アミノアジピン酸とグルタミン酸の分離同定

第5図 α-アミノアジピン酸とタウリンの分離

ではみられない新しいスポットを認めた。

■この新しいスポットは平行同定法により、第4及び第5図に示す通り、絶食群のはタウリン、カゼイン8%+リジン4%群のはリジン代謝中間体のα-アミノアジピン酸であることを想定した。

なお、絶食時のタウリン排泄について Wu¹⁵⁾ の報告より、絶食日数に比例して排泄が多くなり、9日後には正常時の10倍量を排泄することが知られている。しかし、リジンインバランス食白鼠の尿中タウリン排泄については、pH1.5の緩衝液による泳動で、正常尿と同じく、その排泄はごく微量で、ほとんどその泳動像は現われなかった。

3) 尿中α-アミノアジピン酸の同定

pH3.6における泳動ではα-アミノアジピン酸とタウリン、pH1.5の泳動ではα-アミノアジピン酸とグルタミン酸とが近接しているため、両者の濃度が高い場合には重なる恐れが十分ある。そのため、更に、尿中α-アミノアジピン酸の排泄を確かめるため、pH3.6の泳動像より、α-アミノアジピン酸とグルタミン酸の部位を切り取り、抽出後、一次元ペーパークロマトグラフを行なった。その結果、第6図に示すように、両スポットはそれぞれα-アミノアジピン酸とグルタミン酸であることを同定した。

第6図 尿中α-アミノアジピン酸の同定

考 察

各種リジンを過剰投与した白鼠の血清、肝及び尿中排泄アミノ酸パターンを比較検討したが、白鼠の食餌蛋白レベルが異なるから、4群の比較は出来ないが、リジンインバランス食白鼠の血清及び肝の泳動像において、血清中リジン量の増加の傾向の他は、特に顕著な差を認めなかった。

リジン代謝中間体の α -アミノアジピン酸の尿中排泄については、正常尿ではほとんどその存在は認められていない。しかし、Boulanger等¹⁶⁾はモルモットにL-リジン1gを投与した場合、その尿中に α -アミノアジピン酸の排泄を認めている。また、Stein¹⁷⁾は成人正常尿中1日約10mgの α -アミノアジピン酸の存在を報告し、Tallan等¹⁸⁾は猫の正常尿100cc中 α -アミノアジピン酸は0.1mg以下であると報告している。しかし、本実験でリジンインバランス食群において、カゼイン10%+リジン2%群では α -アミノアジピン酸のスポットを認めなかったが、カゼイン8%+リジン4%群において認められたことは非常に興味があり、リジンインバランスの程度の大きな程、リジン代謝中間体の尿中排泄増加の傾向が考えられる。

要 約

リジンインバランス食白鼠の血清、肝及び尿中遊離アミノ酸の高電圧濾紙電気泳動像を求め、同時に、尿中リジン代謝中間体の α -アミノアジピン酸の検索ならびに同定を行なった。

その結果、リジンインバランス群の血清リジン量の増加の傾向を認めた他は、血清と肝の泳動像には大きな変動を認めなかった。しかし、尿中遊離アミノ酸の泳動像の変動は著しく、リジンインバランス群において、リジン及びグルタミン酸の尿中排泄増加の傾向を認め、同時に、正常尿ではその存在がほとんど認められていないリジン代謝中間体の α -アミノアジピン酸の尿中排泄を認めた。

終わりに臨み、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った国立栄養研究所田村盈之輔部長に厚く感謝致します。同時に、 α -アミノアジピン酸の御恵与を受けた日本医科大学島田教授に感謝致します。また、本研究は厚生科学研究費の補助を受けた。

文 献

- 1) Deshpande, P. D., Harper, A. E., and Elvehjem, C. A.: J. Biol. Chem. **230**, 335 (1958)
- 2) Kumta, U. S., Harper, A. E., and Elvehjem, C. A.: J. Biol. Chem. **233**, 1505 (1958)
- 3) Singal, S. A., Hazan, S. J., Sydenstricker, V. P., and Littlejohn, J. M.: J. Biol. Chem. **200**, 867 (1953)
- 4) Harper, A. E., Monson, W. J., Benton, D. A., and Elvehjem, C. A.: J. Nutrition, **50**, 383 (1953)
- 5) Elvehjem, C. A.: Federation Proc., **15**, 965 (1956)
- 6) Harper, A. E., Monson, W. J., Litwack, G., Benton, D. A., Williams, J. N., and Elvehjem, C. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **84**, 414 (1953)
- 7) Arata, D. A., Harper, A. E., Svehnevly, G., Williams, J. N., and Elvehjem, C. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **87**, 544 (1954)
- 8) Carroll, C., and Arata, D.: Federation Proc., **18**, 520 (1959)
- 9) Lang, K., and Kieckebusch, W.: Klin. Wochenschr., **35**, 905 (1957); Nutrition Rev., **16**, 313 (1958)
- 10) Harper, A. E.: Nutrition Rev., **14**, 225 (1956)
- 11) 宮本璋他: 生化学, **29**, 731 (1958)
- 12) 伊藤泰正: お茶の水医誌, **6**, 961 (1958)
- 13) 佐野 勇: 日本医事新報, **1610**, 1140 (1955)
- 14) 伊藤泰正: お茶の水医誌, **7**, 618 (1959)
- 15) Wu, C.: J. Biol. Chem., **207**, 775 (1954)
- 16) Boulanger, P., and Biserte, G.: Compt. rend. Acad., **232**, 1451 (1951)
- 17) Stein, W. H.: J. Biol. Chem., **201**, 45 (1953)
- 18) Tallan, H. H., Moore, S., and Stein, W. H.: J. Biol. Chem., **211**, 927 (1954)

(国立栄養研究所栄養化学部)