無蛋白飼料並びにスレオニン欠乏飼料で飼育した シロネズミの筋肉および肝臓蛋白質の異同について

The Effect of Protein-free and Threonine Deficient Diets on Water Soluble Protein of Muscle and Liver of Rats

(昭和 41 年 3 月 23 日 受理)

藤 巻 正 生
(Masao Fujimaki)

鈴 木 敦 士
(Atsushi Suzuki)

宮 崎 基 嘉*
(Motoyoshi Miyazaki)

In this report, the properties of water soluble protein extracted from gastrocnemius muscle and liver of rats fed on protein-free and threonine deficient diets were investigated.

No significant differences in the amino acid composition were detected among the extracts from the rats fed on protein-free, threonine deficient and normal diets. The extracts from gastrocnemius muscle and liver were dialyzed against phosphate buffer at pH 5.0 and fractionated by chromatography on cellulose phosphate by stepwise elution with buffers ranging from pH 5.0 to 10.0.

From the effluent diagrams of water soluble protein of the muscle, no significant difference was recognized among the rats fed on above-mentioned diets. But the increase of protein fraction coming through with the buffer at pH 5.0 and the decrease of the fraction at pH 7.0 were recognized from the effluent diagrams of water soluble protein of the liver extracted from the rats fed on protein-free and threonine deficient diets.

Tryptophan content and aldolase activity of the fractionated protein were also assayed. No significant difference in the tryptophan content was recognized among the muscle extracts from the rats fed on different diets, but a slight decrease was found in the liver extracts from the rats fed on deficient diets. Aldolase activity of the muscle and liver protein of the rats fed on protein-free diet was slightly lower than that of the rats fed on normal diet, but no difference was observed between the rats fed on threonine deficient and normal diets.

No significant difference in the amino acid composition of the proteins eluted with the phosphate buffer at pH 7.0 was recognized between the rats fed on threonine deficient and normal diets.

緒 言

著者らは、前報¹⁾において、約 2 カ月間無蛋白飼料で飼ったシロネズミは、正常に比べると、その筋肉量や、筋肉中の繊維状並びに球状蛋白質の含量がかなり低く、また短時抽出によるアクトミオシンの粘度や、ATPase 活性などもいくらか差はみられたが、長時抽出によるアクトミオシンは殆んど差異のなかったことを報告した。

本報では、無蛋白飼料で 5 週間飼ったシロネズミおよびアミノ酸欠乏の代表としてスレオニン欠乏飼料で 4 週間飼ったシロネズミについてそれらの筋肉および肝臓の水溶性蛋白質の性質を調べた結果を報告する。

すなわち、筋肉および肝臓の水溶性蛋白質のアミノ酸組成を分析し、また、セルロースホスフェイトを用いるカラクムロマトグラフィーでそれらを分画し、各画分について蛋白質の量比、蛋白質中のトリプトファン含量やアルドラーゼ活性を測定した。一方、スレオニン欠乏飼

料並びにその対照区である完全アミノ酸飼料で飼育したシロネズミについて、pH 7.0 で溶出される画分の蛋白質のアミノ酸組成を分析した。

実 験 の 部

筋肉および肝臓抽出液の調製：供試シロネズミは、表 1 のごとき飼料を用い、正常区（カゼイン 15.2% 区）および無蛋白区においてはそれぞれ 5 週間、また正常区（混合アミノ酸 8.9% 区）およびスレオニン欠乏区においてはそれぞれ 4 週間飼育した。シロネズミの頭部を強打、頸動脈を切断、放血、屠殺後、下肢の筋肉並びに肝臓をとりだし、1 回の実験に各区 2 匹分を用い供試料とした。筋肉には、脂肪、結締組織の部分をできるかぎり取り除いた後、細切し、その重量の 1.5 倍の冷再溜水を加え、Waring blender で 2 分間ホモゲナイズして、10,000 rpm で 10 分間遠沈した。その上清をセルロース・チューブ（Visking Company 製）に入れて、pH 5.0

Table 1. Composition of the diets

	Normal	Protein free	Amino acid diet	
Casein*	15.2%	0%	Amino acid mixture**	8.9%
Wheat starch	47.8	63.0	Wheat starch	54.1
Sucrose	30.0	30.0	Sucrose	30.0
Salt mix.	5.0	5.0	Johnson salt	5.0
Fiber	1.0	1.0	Powdered cellulose	1.0
Soybean oil	1.0	1.0	Soybean oil	1.0
Vitamins	enough	enough	Vitamins	enough
N level	2.0	0	N level	0.98

*Casein, Added with 1% L-Cystine

**Amino Acid Mixture No. 14 (Miyazaki)

の 0.1 M phosphate buffer で一夜攪拌しながら透析し、その透析内液を 10,000 rpm で10分間遠沈し、その上清を試料液とした。また肝臓にその重量の2倍の冷再溜水を加え、Waring blender でホモダナイズし、以後上述の筋肉抽出液の場合と同様に行なって試料液とした。なお、筋肉、肝臓の試料液の一部を凍結して、アミノ酸分析に供した。

アミノ酸分析：凍結試料は、解凍後、試料 0.5 ml に対し 6 N-HCl 20 ml を加え、真空中封管し、110°C で24時間加水分解後、ロータリーエバポレーターを用い50°C 以下で HCl を除いた。ついで pH 2.2 のクエン酸緩衝液で 20 ml に定容後、その 1.0 ml をベックマン製アミノ酸アナライザーにかけた。なお、塩基性アミノ酸用のカラムとしては、0.9×15 cm、酸性、中性アミノ酸用のカラムとしては、0.9×50 cm を用いた。

抽出蛋白質の分画：抽出蛋白質の分画は Fujimaki & Deatherage の方法³⁾によって行なった。すなわち、波長 280 mμ の吸光値にして 100 となるように試料液をとり、これを Cellulose-Phosphate (1.12m·e·q/g Brown 製)を用いるカラム (2.2×13 cm) に吸着させ緩衝液の pH を 5.0 から 10.0 まで (pH 5.0~8.0 は 0.1 M phosphate, 9.0~10.0 は 0.1 M NH₄Cl-NH₄OH) 段階的にあげ最後に 0.5 M NaOH で溶出した。溶出液は 5 ml ずつ分取し、280 mμ の吸光値を測定し、また各画分のピークでは 260 mμ の吸光値も測定した。

蛋白質の定量：アミノ酸分析に供した試料およびカラムクロマトグラフィーによって分画した後の各画分の蛋白含量は、Lowry 法³⁾によって比色定量した。

トリプトファンの定量：カラムクロマトグラフィーによる分画を行なう前の試料は *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (DABA) を用いる比色法⁴⁾で、また分画後の各画分のピークは、紫外外部吸収法⁵⁾によって、トリプトファンを定量し、結果は μg/100 μg-protein で示した。

アルドラーゼ活性の測定：アルドラーゼ活性は、Sib-

ley et al. の方法⁶⁾によって測定した。反応時間は 38°C で30分とした。

なお、試料の調製およびカラムクロマトグラフィーは 0°~4°C の低温で行なった。

結果および考察

5週間正常飼料 (カゼイン15.2%)、無蛋白飼料で飼ったシロネズミおよび4週間正常飼料 (混合アミノ酸 8.9%)、スレオニン欠乏飼料で飼ったシロネズミの体重曲線は図1, 2に示してある。無蛋白飼料、スレオニン欠乏飼料の両欠乏区とも、前飼育として1週間正常飼料を与えた。なお、飼料はすべて自由投与である。

1. 透析水抽出液の蛋白質含量

クロマトグラフィーを行なった試料の波長280 mμ, 260 mμ における吸光値並びにその蛋白質含量は表2に示してある。筋肉、肝臓ともに欠乏区でその蛋白質含量は減少するが、特に無蛋白飼料区の肝臓では、その減少は大きい。

2. 筋肉・肝臓の水溶性蛋白質のアミノ酸組成

筋肉および肝臓の透析水抽出液中の蛋白質の構成アミノ酸を分析して、その百分率を算出した結果は図3, 4に示してある。Cys, Met は加水分解中に一部破壊されるので () をつけてある。

筋肉の水溶性蛋白質のアミノ酸組成は、無蛋白飼料区およびスレオニン欠乏区の両欠乏区の場合、ともに正常区に比べて差異がないようにみられ、このことは、無蛋白飼料区において Lys, Ileu, Try, Leu が減少し、特に Lys の減少が大きいとしている E. Cardi et al.⁷⁾ の報告とは若干異なる。また、カゼイン飼料区と完全アミノ酸飼料区との両正常区の間、無蛋白飼料区とスレオニン欠乏区の両欠乏区の間にも、そのアミノ酸組成に差異はみられなかった。肝臓の水溶性蛋白質のアミノ酸組成は、無蛋白飼料区、スレオニン欠乏区とも、正常区に比べて、Asp, Glu がやや多いようにみえるが、全般的に

Fig. 1. Growth of rats fed on normal and protein-free diet

Fig. 3. Amino acid composition of water soluble protein of muscle

Fig. 2. Growth of rats fed on normal and threonine free diet

Fig. 4. Amino acid composition of water soluble protein of liver

Table 2. Properties of dialyzed water-extractive solution of muscle and liver (Muscle)

	normal	protein free	normal	thr. free
O.D. 280 $m\mu^*$	0.152	0.150	0.166	0.157
O.D. 260 $m\mu^*$	0.102	0.100	0.120	0.106
protein content (mg/ml)	15.50	13.38	18.80	17.00

(Liver)

	normal	protein free	normal	thr. free
O.D. 280 $m\mu^*$	0.283	0.205	0.284	0.254
O.D. 260 $m\mu^*$	0.205	0.175	0.210	0.207
protein content (mg/ml)	17.88	9.50	22.50	17.00

* (1 : 100 dilution)

Fig. 5. Chromatogram of water soluble protein of skeletal muscles from rat fed on normal and protein free diet on cellulose phosphate

Fig. 6. Chromatogram of water soluble protein of muscles from rat fed on normal and threonine free diet

差はないと考えられる。カゼイン飼料区と完全アミノ酸飼料区の両正常区の間、無蛋白飼料区とスレオニン欠乏区の両欠乏区の間では、筋肉の場合と同様に差異はみられなかった。

3. 水溶性蛋白質のカラムクロマトグラフィー

得られたクロマトグラムは図5, 6, 7, 8, に示してある。筋肉については、正常区、無蛋白区およびスレオニン欠乏区に全く差異はみられなかった。肝臓では、無蛋白区、スレオニン欠乏区共に、正常区に比べてpH 5.0の緩衝液で吸着されない画分の蛋白質が増し、pH 7.0で溶出される画分の蛋白質が減少する傾向がみられた。筋肉、肝臓ともに、カゼイン飼料区と完全アミノ酸飼料区の両正常区の間、無蛋白飼料区とスレオニン欠乏区の両欠乏区に明確な差はみられなかった。

4. トリプトファン含量

表3に示してあるように、筋肉では、無蛋白飼料区、スレオニン欠乏区ともに正常区との差はみられなかったが肝臓では、両欠乏区の場合、正常区よりやや減少する傾向がみられた。

5. アルドラーゼ活性

Cellulose-Phosphate を用いるクロマトグラフィーにより筋肉、肝臓の水溶性蛋白質を分画した結果、アルドラーゼ活性は、pH 7.0の緩衝液で溶出される画分のみ認められた。表4に示してあるように、筋肉、肝臓ともに無蛋白飼料区の場合、正常区に比べてやや減少したが、スレオニン欠乏区では差は生じなかった。

6. pH 7.0の緩衝液で溶出される蛋白質のアミノ酸組成

スレオニン欠乏飼料および完全アミノ酸飼料で飼ったシロネズミの筋肉、および肝臓からの抽出液をカラムクロマトグラフィーにかけた場合、pH 7.0の緩衝液で溶出される蛋白質画分のアミノ酸組成を分析し、構成アミノ酸の百分率を算出した結果は、図9, 10に示してあるように、筋肉の場合、スレオニン欠乏区と正常区との間に全くその差はみられなかった。また肝臓の場合も、スレオニン欠乏区と正常区との間に、筋肉の場合と同様に全く差がみられなかった。カラムクロマトグラムから、スレオニン欠乏の場合にこの画分は減少する傾向がみられたが、その構成アミノ酸組成には差がなかった。すなわち、欠乏区の場合この画分に溶出されてくる蛋白質量

Fig. 7. Chromatogram of water soluble protein of liver from rat fed on normal and protein free diet on cellulose phosphate

Fig. 8. Chromatogram of water soluble protein of liver from rat fed on normal and threonine free diet

Table 3. Tryptophan contents ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ protein)
(Muscle)

	normal	thr. free	normal	protein free
dialyzed water-extract	1.77	1.76	2.13	2.02
fraction at pH 6.0	2.32	2.33		
at pH 7.0	1.61	1.60		
at pH 8.0	1.81	1.76		
at pH 9.0	1.15	1.19		

(Liver)

	normal	thr. free	normal	protein free
dialyzed water-extract	1.94	1.84	2.64	2.10
fraction at pH 6.0	2.04	1.88		
at pH 7.0	2.28	2.20		
at pH 9.0	1.58	1.23		

Table 4. Aldolase activity (fraction at pH 7.0) ΔE at $540 \text{ m}\mu/\text{mg}$ protein

	normal	thr. free	normal	protein free
Muscle	517	501	708	450
Liver	116	133	96	67

Fig. 9. Amino acid composition of the fraction eluted with pH 7.0 buffer (Muscle)

Fig. 10. Amino acid composition of the fraction eluted with pH 7.0 buffer (Liver)

は減少するがそのアミノ酸組成は変わっていないことがわかった。

要 約

無蛋白飼料で5週間飼ったシロネズミとスレオニン欠乏飼料で4週間飼ったシロネズミの筋肉並びに肝臓の水溶性蛋白質のアミノ酸組成は、それぞれの正常区に比べて明らかな差は認められず、またカゼイン飼料区と完全アミノ酸飼料区の両正常区間、あるいは無蛋白飼料区とスレオニン欠乏飼料区の両欠乏区の間にも差は認められなかった。

セルロースホスフェイトを用いるカラムクロマトグラフィーにより水溶性蛋白質を分画した結果、筋肉の場

合、各画分の量比、蛋白質中のトリプトファン含量には正常区、無蛋白区、スレオニン欠乏区の間で差はみられなかった。しかし、肝臓については、無蛋白区、スレオニン欠乏区ともに正常区に比べてpH 5.0の緩衝液で吸着されない蛋白質が増加し、pH 7.0で溶出される画分の蛋白質は減少し、各画分の蛋白質中のトリプトファン含量も正常区に比べてやや減少する傾向がみられた。

アルドラーゼ活性は、筋肉、肝臓ともに無蛋白区の場合は、正常区に比べてやや減少したが、スレオニン欠乏区の場合には、その差はみられなかった。

スレオニン欠乏飼料および完全アミノ酸飼料で飼ったシロネズミの場合、カラムクロマトグラフィーで分画後pH 7.0の緩衝液で溶出される蛋白質画分のアミノ酸組成を分析した結果、筋肉、肝臓ともにスレオニン欠乏区と正常区の間全く差はみられなかった。

終わりに、本研究に終始ご懇篤なご指導を賜った東京大学教授桜井芳人先生に厚くお礼申し上げます。

アミノ酸分析は、食糧研究所の田村真八郎氏、東京大学農学部農芸化学科栄養化学教室に依頼した。記して謝意を表する。

(本研究の一部は、第30回必須アミノ酸研究委員会および第19回日本栄養・食糧学会総会で発表した。)

文 献

- 1) 藤巻正生, 原田真知子: 栄養と食糧, **19**, 156(1966)
- 2) Masao Fujimaki & F. E. Deatherage: *J. Food Sci.*, **29**, 316 (1964)
- 3) Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 4) Spies, J. R. & Chambers, D. C.: *Anal. Chem.*, **20**, 30 (1948)
- 5) Goodwin, J. W. et al.: *Biochem. J.*, **40**, 628 (1946)
- 6) Sibley, J. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **177**, 859 (1949)
- 7) E. Cardi et al.: *Quaderni Nutr.*, **20**, 162 (1960)

(東京大学農学部農芸化学科)
(*農林省食糧研究所)