小麦蛋白質に対するDリジン補足の栄養化学的研究

Nutritional Chemical Studies on Supplement of D-Lysine to Flour Protein

(昭和41年3月29日受理)

中 村 延生蔵
(Nobuzo Nakamura)

西 宏
(Hiroshi Nishi)

秋 場 克 彦*
(Katsuhiko Akiba)

八下田 幸 雄**
(Yukio Yageta)

横 塚 博 夫***
(Hiroo Yokotsuka)

On the two diets containing 8.2% and 15% flour protein, additional D-lysine gave no effects for growth of young rats.

Nitrogenous components and basic amino acids in the urine of rats fed above two basal diets to which were supplemented with L-, DL- and D-lysine, respectively, were analysed.

In the urine of rats fed the 8.2% protein basal diet supplemented with L-lysine, the percentage of allantoin was higher than the other groups.

The amounts of lysine excreted into the urine were about 1/5~1/3 of D-lysine intake in all rats fed with D- and DL-lysine. It was found that an unknown substance which was colored by ninhydrin reagent was excreted into the urine of rats fed D-lysine. These facts show that a large portion of D-lysine are catabolized in the body and give certain effects on the nitrogen metabolism.

Dアミノ酸が動物にどの程度利用されるかは、単にアミノ酸の種類によるのみでなく、用いられる基本飼料の組成—とくに摂取窒素水準と飼料中のアミノ酸組成—により大いに異なることが明らかにされている¹⁾²⁾。しかし、Dリジンに関しては従来のどの実験結果もこれが成長に役立たないことを示している³⁾⁴⁾⁵⁾。

著者らは蛋白質含量が低く、しかもリジンが非常に不足しているという理由で小麦粉を主成分とする基本飼料を用い、これに対するDリジン補足の影響を研究する目的で本実験を行なった。一般にDアミノ酸の動物による利用は窒素摂取水準によっても異なるので、グルーテンを添加して蛋白質摂取水準を高めた群についてもあわせて検討した。

小麦蛋白質にLリジンを補足すればすぐれた栄養的効果を発揮することは広く知られているが、量的にどの程度補足すればいいかについては、数多くの報告があるが必ずしも一致していない⁶⁾⁷⁾⁸⁾。かつて中村⁹⁾は小麦粉90%の飼料に対し、0.4~0.5%のLリジン補足で、もっともすぐれた成長効果を認めているので、本実験でも小麦粉を主とする基本飼料に対しては0.4%のリジンを補足し、グルーテンを添加して蛋白質摂取水準を高めた場合

は、それに照応するようリジン補足量を高めることとした。

実 験

1. 飼料の配合と成長試験

体重40~50gのWistar系雄白鼠を5頭ずつ1群とし8群に分けた。はじめのI~IV群には小麦粉を主成分とする基本飼料を、他のV~VIII群には小麦粉に市販グルーテン粉末を加えて蛋白質含量を高めた飼料を与えた。基本飼料の配合と純蛋白質含量は第1表の通りである。

II, III, IV群およびVI, VII, VIII群の飼料にはそれぞれ第2表に示すように、L, DL およびDリジンを補足した。基本飼料としてグルーテン添加食を用いた群へのリジン補足量を0.73gとしたのは、蛋白質摂取水準に応じたりジン補足を行なうためである。

以上のような実験食を各群とも粉飼で自由に摂取させた。水も自由に与えた。体重は毎日秤量し、30日後に3日間採尿籠に入れて採尿した。

2. 尿中の窒素成分と塩基性アミノ酸の分析

あらかじめ1:3の稀硫酸1mlと防腐剤として少量のチモールを加えた採尿びんに3日間の白鼠の尿を集めた。

第 1 表 基本飼料 (乾物の%で示す)

	小麦粉食	グルーテン 添加食
小麦粉	90.5	79.3
グルーテン*	0.0	11.2
大豆油	5.5	5.0
塩混合物**	4.0	4.0
ビタミン混合物***	0.5	0.5
純蛋白質含量 (%)	8.20%	15.00%

* 市販グルーテン製品 (新進食品工業 K K 製 ハイプロ。純蛋白質含量 69.7%)

** Hegsted 氏塩

*** 市販総合ビタミン剤 (武田薬品工業 K K 製 パンピタン粉末)

第 2 表 補足したリジンの種類と量 (基本飼料 100 g に
つき添加した g)

群	基本飼料	リジンの種類	添加量 g
I	小麦粉食	—	0.00
II	小麦粉食	L	0.40
III	小麦粉食	DL	0.40
IV	小麦粉食	D	0.40
V	グルーテン添加食	—	0.00
VI	グルーテン添加食	L	0.73
VII	グルーテン添加食	DL	0.73
VIII	グルーテン添加食	D	0.73

集めた尿はアルカリで pH 4.0 付近に中和し, トリクロル酢酸で除蛋白し, 濾過洗滌し, 濾液と洗液を 100 ml に稀釈後, ポリエチレン製試験びんに入れ -20°C に凍結保存した。

かくしてえた保存尿からそれぞれ一定量を取り, 全窒素はマイクロケルダール法でアンモニア窒素を Conway の微量拡散分析法¹¹⁾で, アミノ窒素を Spies と Chamber 法¹²⁾で, アラントイン窒素を Young と Conway 法¹³⁾でクレアチニン窒素を Clark と Thompson 法¹⁴⁾でそれぞれ定量した。

尿中の塩基性アミノ酸の分析は各個体の尿については行なわず, 各群ごとに各個体の尿を等量ずつ混合してえた試料について行なった。すなわち, 各個体の保存尿から 10 ml ずつを取り, これを各群ごとに混合した。ただし I 群と IV 群は尿のアミノ窒素量が少なかったため, 各保存尿から 20 ml ずつ取り混合した。

このようにしてえた各群の混合尿試料に尿と等量の濃塩酸を加え, $120\sim 130^{\circ}\text{C}$ の油浴中で 20 時間加水分解した。加水分解液は減圧で蒸発乾涸後, 再び水にとかし, フミンを濾過, 洗滌した。濾液と洗液は合わせて減圧で蒸発乾涸をくりかえし塩酸をできるだけ除去した。最後に約 10 ml の水に溶かし, 等量の飽和炭酸カリ溶液を加

え, 1 ないし 2 時間, 25°C の恒温水槽中で通気し酸加水分解物中のアンモニアを完全に除去した。これは尿の酸加水分解物中の大量のアンモニアが, カラムクロマトグラフィーによる塩基性アミノ酸, とくにリジンとヒスチジンの定量を妨げるからである。アンモニアを除去した酸加水分解物は稀硫酸で pH 3.0 付近に中和後 50 ml に稀釈し, アミノ酸分析用試料とした。

塩基性アミノ酸の分析には, 粒子直径 $20\sim 40\ \mu$ のアンバーライト CG-120 型樹脂を充填した $1\text{ cm}\times 15\text{ cm}$ カラムを用い, Moore ら¹⁵⁾の用いた pH 5.28 のくえん酸ソーダ緩衝液を展開剤として, 液体クロマトグラフィー法を適用した。展開中の温度は 50°C , 流速は毎時間約 12 ml とした。溶出液を 2 ml ずつフラクションコレクターにとり, そのうち 0.5 ml ずつを取り Yemm と Cocking 法¹⁶⁾でアミノ酸を比色定量した。アミノ酸の存在が確かめられた部分の溶出液は Dowex 50- $\times 4$ を用いて Stein¹⁷⁾の報告に述べられている方法で脱塩し, フェノールと水を溶媒とする一次元ペーパークロマトグラフィーによりアミノ酸の同定を行なった。

結果と考察

1. 成長と尿中窒素成分

30 日間の体重増加量と尿中のアンモニア窒素, アミノ窒素, アラントイン窒素およびクレアチニン窒素の尿の全窒素に対するパーセントを一括して示せば第 3 表の通りである。

基本飼料として小麦粉食を与えた場合の I 群と IV 群, およびグルーテン添加食の場合の V 群と VIII 群はそれぞれ 30 日間の体重増加量がほとんど等しい。このことは基本飼料の蛋白質含量のいかにかわからず, D リジンが成長に全く影響を与えないことを示している。

小麦粉を基本飼料とした場合, L リジン補足した II 群と同量の DL リジンを補足した III 群の間に差は全くみられないが, グルーテン添加食区で同じ関係にある VI 群と VII 群の間には若干の差があるようにも思われる (10% の有意水準で差が認められる)。II 群は蛋白質 8.2% の小麦粉食に天然型リジンを 0.4% 補足しているのに対し, III 群は天然型は 0.2% しか補足していない。D リジンが成長に何らの影響も与えないとするなら, L リジンの補足量は 0.2% で十分であるということになる。これに対しグルーテン添加食の VI 群では, 天然型リジンは 0.72% 補足されているのに, VII 群では天然型はその半分の 0.36% しか補足されていない。本実験の結果では余り明白ではないが, 蛋白質摂取水準が 15% に高められたため, L リジンの補足量が 0.36% ではやや不足したと考えることもできる。しかし, ここに述べたリジン補足量について

第3表 体重増加量と尿中各成分窒素の全窒素に対するパーセント(平均値±標準誤差)

群	体重増加量 g/30日	アンモニア窒素%	アミノ窒素%	アラントイン窒素%	クレアチニン窒素%
I	38.1±2.6	22.7±2.0	1.0±0.6	1.9±0.1	0.3±0.02
II	111.3±3.0	24.5±1.1	2.7±0.5	3.1±0.2	0.5±0.05
III	112.7±1.2	27.9±1.9	5.2±0.2	2.2±0.1	0.4±0.02
IV	37.4±1.4	17.1±4.1	2.8±0.5	1.6±0.2	0.5±0.09
V	78.1±3.1	11.8±1.6	2.1±0.2	1.0±0.1	0.2±0.00
VI	146.7±3.4	20.6±3.7	2.7±1.3	1.9±0.3	0.2±0.02
VII	128.9±3.8	17.0±2.4	4.7±1.2	1.4±0.1	0.2±0.00
VIII	80.6±3.1	9.1±1.4	3.5±0.2	1.0±0.1	0.2±0.04

の考察は、前記中村⁹⁾の結果と一致しないので、今後さらに検討したい。

アンモニア窒素については、蛋白質摂取水準の等しい I～IV群間および V～VIII群間ではいずれも有意の差は認められなかった。

アミノ窒素については、I～IV群間の比較では、III群が他の何れの群より 5%の有意水準で高い値を示している。V～VIII群間の比較では群間に有意差は認められなかったが、平均値では同じ傾向を示している。与えた DL リジンのうち D リジンの一部が尿に排泄されたことも、III群と VII群のアミノ窒素が高い一つの原因であろう。しかし、倍量の D リジンを与えた IV群と VIII群がそれほど高くない点を考えると、これは D リジン排泄のためばかりとは考えられない。この点についての考察は塩基性アミノ酸についての項でさらに進めたい。

アラントイン窒素については、I～IV群間の比較では

II群が I, IV群より 5%の有意水準で高い。V～VIII群間では平均値では同じ傾向が認められるが、群間に有意差は認められなかった。一般に質的にすぐれた蛋白質を低い摂取水準で与えるとアラントイン窒素の比率は高まる¹⁸⁾¹⁹⁾。アラントインは核酸の代謝生産物であるから、比較的すぐれたアミノ酸組成の飼料を与えられた II群では、核酸代謝が相対的に盛んであったのであろう。

クレアチニン窒素については I～IV群間にも、V～VIII群間にも有意差は認められなかった。

2. 尿中の塩基性アミノ酸(遊離および結合型アミノ酸をふくむ)

尿の酸加水分解物中の塩基性アミノ酸(遊離および結合型アミノ酸をふくむ)分析の結果えられたリジンの排泄量と、摂取したリジンの関係を示せば第4表の通りである。

第4表 リジンの摂取量と尿への排泄量(mg/日)

群	基本食中の L リジン*	補足した L リジン	補足した D リジン	リジン摂取量の合計	尿中のリジン	尿中リジン 摂取 D リジン ×100
I	11.8	0.0	0.0	11.8	痕跡	—
II	18.3	55.8	0.0	74.1	2.1	—
III	19.2	29.2	29.2	77.6	10.1	34.5%
IV	11.8	0.0	35.9	47.7	7.8	21.8%
V	31.6	0.0	0.0	31.6	痕跡	—
VI	35.5	108.1	0.0	143.6	4.8	—
VII	33.9	51.6	51.6	137.1	11.9	23.0%
VIII	33.2	0.0	101.1	134.3	28.1	27.8%

* 小麦グルテンのリジン含量は1.6%²⁰⁾として計算した。

リジンを補足しなかった I, V群では尿中へのリジンの排泄はほとんど認められないが、L リジンを補足した II, VI群では若干のリジンの排泄がみられる。D リジンを与えた III, IVおよび VII, VIII群ではかなりのリジン排泄がみられる。これらの群では D リジンの一部が代謝されずに排泄されたと考えられる。しかし、これらの群の尿

中リジンが全部 D リジンであったとしても、排泄された量は与えた D リジンの 21.8%ないし 34.5%にすぎない(第4表の最右欄参照)。したがって、与えた D リジンの大部分は何らかの代謝をうけていると考えられる。Neuberger ら²¹⁾や Yoshimoto²²⁾は D リジンは D アミノ酸々化酵素の作用をうけないと述べているが、Ratner²³⁾

第 1 図 尿中塩基性アミノ酸のカラムクロマトグラフィー

らは同位元素を用いた実験でDリジンも脱アミノ反応をうけると述べている。Rose²⁴⁾ もバリンその他のアミノ酸をDL型でひとに投与した実験で、これらのDアミノ酸が不完全にしか利用されないとすると不思議なくらい尿へのアミノ酸排泄は増加しないと述べている。これらのことを考え合わせると、Dリジンは一般的なDアミノ酸々化酵素の作用は受けないとしても、他の何らかの酵素系の反応を受け、そのかなりの部分が分解されていると考えられる。なお、小麦粉食区の場合、DL型でDリジンを与えたⅢ群の方が、Dリジンの摂取量が少ないにもかかわらず、Dリジンのみを与えたⅣ群より、リジン

の尿への排泄量が多い。この点は説明が難かしいが、後にふれる未確認物質の問題とあわせて総括の項で若干の考察を行ないたい。

アルギニンほどの群にも痕跡程度しか見出されなかった。これに反し、Ⅱ、Ⅵ群を除く各群のヒスチジンの溶出位置に多量のニンヒドリン発色物質が認められた。この物質をフェノール、水を溶媒とするペーパクロマトグラフィーで同定すると、ヒスチジンの他にかなり多量の他の物質が混在していることが認められた。また、ヒスチジンの呈色反応であるジアゾ反応²⁵⁾を試みたが、呈色は極めて弱く、したがって、ここに認められたニンヒドリン発色物質の大部分はヒスチジン以外の物質であると考えられる。

この物質が何であるか確定できないので、YemmとCocking法¹⁶⁾で比色した場合の吸光度を用いてこの物質とリジンの消長を示すと第1図のようである。第1図は各群の比較を容易にするため、尿の全窒素5mgに相当する試料についての値に換算して示した。第1図の展開剤溶出容量64~76ml付近に現われる山がそれである。リジンを補足していないⅠ群でもかなりの量が認められるが、蛋白質摂取水準の高いⅤ群では若干減少する。ところが、Lリジンを補足したⅡ、Ⅵ群ではほとんど消失している。したがって、ここに現われる物質はアミノ酸のアンバランスに起因して生ずる物質ではないと思われる。ところが、この物質がDリジンを与えたⅢ、Ⅳ群とⅦ、Ⅷ群で再び、しかもより顕著に現われる。DLリジンを与えたⅢ群とⅦ群は特に多い。したがって、Lリジンを十分量近く与えておいて、さらにDリジンを与えてやると、この物質が著しく増大することになる。もちろん、Lリジンが不足しているⅣ群とⅧ群にもかなり多量の排泄がみられるから、Dリジンを与えることによりこの物質の排泄が増大し、しかも、Lリジンが十分量存在するときこの傾向が一層顕著になるということが出来る。

総 括

基本飼料として、小麦粉を主成分とする飼料(蛋白質8.2%)と、これにグルテンを添加して蛋白質を15.0%とした飼料を用い、これにそれぞれ、L、DLおよびDリジンを補足し、幼白鼠の成長、尿中窒素成分および尿の塩基性アミノ酸(遊離および結合型をふくむ)等を分析した。

1. Dリジンは蛋白質摂取水準のいかにかわらず成長に全く影響を与えなかった。

2. 小麦粉食に DL リジンを補足した群は尿中アミノ窒素の排泄が高まった。D リジンを補足した群もアミノ窒素の排泄が増大する傾向はみられるが、DL リジン補足の群ほど顕著でなかった。小麦粉食に L リジンを補足した群のアラントイン窒素の尿の全窒素に対する比率は最も高かった。このことは、低蛋白質食では摂取蛋白質の栄養価が高まるにともないアラントインの比率が高まることを示している。

3. 尿へ排泄されるリジンの量は、DL または D リジンを補足したすべての群を通じ、与えた D リジンの約 $\frac{1}{3}$ 、ないし $\frac{1}{2}$ であった。また、D リジン摂取により未確認物質ではあるがリジン以外のニンヒドリン発色物質が、かなり多量に尿に排泄されることが明らかとなった。したがって、D リジンはかなりの部分が体内で分解され、窒素代謝過程にある種の影響を与えていると考えられる。さらにこの物質は D リジンを与えた群より DL リジンを与えた群の方が多量である。尿へのリジン排泄についても、小麦粉食区の場合には同じ傾向があるようにみられる。これは、DL リジン補足により、ある程度 L リジンの必要が満たされている場合と L リジンが全く不足している場合とで、D リジンの代謝にも若干の変化があることを予測させるように思われる。

文 献

- 1) M. Rechcigl, Jr., J. K. Loosli, H. H. Williams: *J. Biol. Chem.*, **231**, 829 (1958)
- 2) M. Womack, B. B. Snyder, W. C. Rose: *ibid.*, **224**, 793 (1957)
- 3) C. P. Berg: *J. Nutrition*, **12**, 671 (1936)
- 4) C. P. Berg, J. L. Dalton: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **31**, 709 (1934)
- 5) W. C. Rose, A. Borman, M. J. Coon, C. F. Lambert: *J. Biol. Chem.*, **214**, 579 (1955)

- 6) H. R. Rosenberg, E. L. Rohdenburg: *Arch. Biochem. Biophys.*, **3**, 461 (1952)
- 7) H. R. Rosenberg, E. L. Rohdenburg, R. E. Eckert: *J. Nutrition*, **72**, 423 (1960)
- 8) J. B. Hutchinson, T. Moran, J. Pace: *Brit. J. Nutrition*, **13**, 151 (1959)
- 9) 中村延生蔵: 必須アミノ酸研究報告, **3**, 27, 29 (1959)
- 10) D. M. Hegsted, R. C. Mills, C. A. Elvehjem, E. B. Hart: *J. Biol. Chem.*, **138**, 495 (1941)
- 11) E. J. Conway (石坂音治訳): 微量拡散分析及び誤差論, 82頁 (南江堂) (1957)
- 12) J. R. Spies, D. C. Chambers: *J. Biol. Chem.*, **191**, 787 (1951)
- 13) E. G. Young, C. F. Conway: *ibid.*, **142**, 839 (1944)
- 14) L. C. Clark, H. L. Thompson: *Anal. Chem.*, **21**, 1218 (1949)
- 15) S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein: *Anal. Chem.*, **30**, 1185 (1958)
- 16) E. W. Yemm, E. C. Cocking: *Analyst*, **80**, 209 (1955)
- 17) W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, **201**, 45 (1953)
- 18) 西 宏: 日農化, **36**, 939 (1962)
- 19) 横塚博夫, 小嶺京子, 西 宏: 昭和40年度日本農芸化学会大会講演
- 20) R. J. Block, K. W. Weiss: *Amino Acid Handbook* (1956)
- 21) A. Neuberger, F. Sanger: *Biochem. J.*, **38**, 119 (1944)
- 22) S. Yoshimoto: *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 280 (1958)
- 23) S. Ratner, N. Weissman, R. Schoenheimer: *J. Biol. Chem.*, **147**, 549 (1943)
- 24) W. C. Rose: *Nutrition Abstracts and Reviews*, **27**, 631 (1957)
- 25) 日本化学会編: 実験化学講座, 23巻, 133頁, 丸善 (1957)

(宇 都 宮 大 学 農 学 部)
 *現在 関東ヤクルト K. K.
 **現在 昭和産業 K. K. 水戸工場
 *** (栃木県立烏山女子高校)