バランスされたアミノ酸混合飼料投与後のシロネズミの組織遊離アミノ酸濃度の変動および C^{14} -スレオニンの体タンパク質へのとりこみ (第 2 報)

Studies on the Time Course of Free Amino Acid Concentration and of the Incorporation of C^{14} -Threonine into Tissue Proteins of Rats fed on a Diet containing a Balanced Amino Acid Mixture (Part 2)

C^{14} -スレオニンの体タンパク質へのとりこみ
Incorporation of Orally Administrated C^{14} -Threonine

(昭和 44 年 2 月 4 日 受理)

野 田 克 彦* 山 本 茂* 吉 田 昭*
(Katsuhiko Noda) (Shigeru Yamamoto) (Akira Yoshida)

Rats were fed on a balanced amino acid diet which contained threonine- $U-C^{14}$ as a tracer. At 24 hours after one meal feeding, distribution of ingested C^{14} in expired CO_2 , urine, muscle, intestinal tracts, liver, and plasma were about 40, 5, 20, 10, 5, and 2 %, respectively. In liver and plasma, distribution of C^{14} in protein fraction was greater than that in free amino acid (FAA) fraction. In muscle, on the other hand, amount of C^{14} in protein fraction was the same as that in FAA fraction till 12 hours after feeding, and then the counts of C^{14} in FAA decreased, while that in protein continuously increased. Total maximum counts in organs were obtained at 12 hours after a meal, and the counts in muscle, intestine, and liver decreased afterward. The decrease of C^{14} in muscle and plasma was disappearance of FAA fraction and that in liver was due to decrease of both FAA and liver weight.

The amount of protein synthesized was calculated on the basis of some assumptions. During 12 hours, about 100 and 40mg protein were synthesized in muscle and liver, respectively, from dietary amino acids.

緒 言

バランスされたアミノ酸が摂取された際、その代謝と体内への分布はどのようになるのであろうか。経口的に摂取されたアミノ酸は消化管から吸収され門脈を通過してまず肝臓に入り、次いで血流を流れて体内各臓器へと供給され、また代謝されてゆく。著者らは前報¹⁾においてバランスされたアミノ酸混合物を含む飼料を摂取させた後の血中および組織中の遊離アミノ酸濃度の経時変化について報告したが、このような遊離アミノ酸濃度の変動に対応した C^{14} -アミノ酸の体タンパク質への取込み状態をしらべることが遊離アミノ酸の栄養的意義の理解のためにも重要であると考えたので、その一つとして前報¹⁾の実験の際に飼料中に同時に C^{14} -スレオニンを加

えて、その経時的な分布をしらべた。

実 験 方 法

C^{14} -スレオニンの投与方法：食餌 10 g を熱水 14ml, 寒天 0.2 g, スレオニン- $U-C^{14}$ 溶液 1.0ml と混合し冷却固化させ放射性スレオニンを食餌中に均一に分布させる。これを一匹分として投与した。用いたスレオニン- C^{14} (Thr- C^{14}) は第一化学薬品製で、52.8mC/mM の比放射能を持つもの 0.1mC を蒸留水に溶かして全容を 25ml とし、そこから 1 匹に対して 1.0ml ずつを用いた。

動物は前報¹⁾のものであり、条件は全て既述してある通りである。

食餌中の C^{14} の測定：食餌は寒天ゲルの形にして与えたが、その際ゲルを作製した容器、撈拌棒に付着した

* 徳島大学医学部栄養学科

食餌および1時間投与後回収した食べ残しは全て一四分ずつ集め1N塩酸25ml中に加えて加熱し、多糖類を加水分解し溶解したのち水にて100mlとし残存 C^{14} を測定した。この食餌10gは略 $4\mu C$ (6.7×10^6 d. p. m.) の C^{14} を含む。胃および小腸内容物は洗い出して水にて胃内容は100mlに、小腸内容は50mlに定容した。

それぞれ定容とした水溶液中より2mlずつを取ってシンチレーター³⁾ 15mlを加えて、パッカード液体シンチレーションカウンターにて C^{14} を測定した。内部標準としてはトルエン- C^{14} (1.748×10^4 d. p. m./ml)を用い、この0.5mlを試料測定容器へ試料の放射能測定後添加して、ふたたび測定し、測定システムの効率を求めた。この操作は各処理区の試料についておのおの数個ずつ行ない、その平均値をその区の効率とし、バックグラウンドとともにこの効率による補正を行なった。

尿および呼気の捕集と測定：代謝ケージに白鼠を入れ真空ポンプにて呼気を吸引し、メチルセロソルブ：エタノールアミン (2:1) 混合液40ml中を通して炭酸ガスを捕集した²⁾ (第1図参照)。この捕集カラムで捕えられず通過する炭酸ガス量は実測により放出される呼気炭酸ガス量の0.2%以下であった。呼気は1本のカラムで2時間ずつ捕集し、それ以上は2時間毎に液を切りかえ捕集した。それぞれの捕集区は50mlに定容し、その2mlを取りシンチレーション溶液15mlを加えて測定した。尿は温水にて代謝ケージ内を洗い受器へ洗い込んで集め100mlとし、その2mlを取って測定した。

臓器中の C^{14} の測定：血漿2mlを取り10% TCA溶液3.5mlを加えて混合後遠心分離して上澄2mlをシンチレーション溶液15mlを加えて測定。沈澱部分はタン

Tab. 1. Composition of the scintillation solution

1 part of xylene
3 parts of dioxane
3 parts of methylcellosolve
1 % PPO
0.05% POPOP
8.0% naphthalene
(maximum water miscible : 16.1%)

Fig. 1. Metabolic cage

パク質と考え、ギ酸を4mlに加え加温溶解させる。溶液は茶褐色となるので30%過酸化水素1~2滴を加えてふたたび加温し脱色する。この2mlとシンチレーション溶液で測定を行なう。肝臓は0.5gを秤取し0.25Mショ糖溶液4.5mlとホモジネートし、その1mlに10% TCA溶液5mlを加えて遠心分離し上澄を遊離アミノ酸区分 (FAA) として C^{14} を測定。沈澱は温アルコール：エーテル (3:1) 5mlを加えて脂質を抽出。遠心分離後沈

Fig. 2. Method of separation of tissue fraction for C^{14} analysis

澱に1 N過塩素酸を加え核酸を抽出する。最後に残った沈澱は5 ml のギ酸と加温溶解させ、過酸化水素で脱色し、タンパク質区分として測定した。処理方法は第2図にまとめて示す。筋肉、腸管などは10% TCA 可溶部と不溶部に分けてそれぞれ FAA とタンパク質と考えて測定した。また組織ホモジネートをそのままギ酸とともに加温し溶解したものを測定し、各区分に分割し測定したものの総和と比較して両者間の差が小さく満足できる値が得られるまで分析をくりかえし行なった。

アルコール：エーテル抽出区中にはたとえばプロラミンのようなアルコール可溶性タンパク質が入ってきているおそれがあるため、抽出液を減圧下蒸発乾固させ残渣をヘキサンで抽出し、前後を比較した。この際ヘキサンの代りにクロロホルムを用いるとクロロホルムの比重が大きいため不溶性物質が遠心分離の際浮上して沈澱とならず用いられない。この結果では肝臓においてはアルコール：エーテル可溶の C^{14} のうち41%がヘキサン可溶であった。他方筋肉などにおいてはすべてヘキサン可溶であったが、 C^{14} 量自身が組織中に存在する C^{14} 量の数%程度しか占めておらずこのため筋肉、腸管、体全体などでは10% TCA 可溶部と不溶部との結果にまとめた。

結 果

Thr- C^{14} を含む飼料投与後の消化管内の C^{14} 量の変化を第3図に示す。摂食後2時間ではまだ胃内に約75%が存在しており、ややシグモイド的であるがほぼ直線的に減少してゆき12時間後には胃は空になり、摂取された食餌は腸へ全て移行している。小腸内のカウント数は8時間目が最も高い値を示すが、常に摂食量の2~3%程度が存在していて変動は小さい。体内へ入った C^{14} は代謝されて短時間のうちに呼気、尿中にあらわれる。その結果は第4図に示す。投与された Thr- C^{14} の排泄形の大部分は炭酸ガスであり、24時間中に投与 C^{14} の約40%が呼気中へ排泄されている。それに比して尿中へはわずか5%であった。糞中への排泄は測定を行なわなかったが、予備実験の結果では全体の1%程度であった。

肝臓中の C^{14} は第2表に示す。単位重量当たりの C^{14} 量はきわめて高く、筋肉の3倍、血液の約4倍であった。 C^{14} 量は食餌の消化・吸収が完了する12時間まで増加し以降はほぼ一定値を保っている。その中で最初の2~4時間ごろまでは FAA が多く、FAA は12時間まで増加するが、24時間後にはずっと減少していて、タンパク質区分への取込みが大きくなっていた。肝脂質中へは単位肝臓当たりの全アイソトープの10%程度が入っており、高い変換率であった。核酸区分への取込みはきわめてわずかでしかなかった。

Fig. 3. Time course change of the amount of orally administrated Thr-U- C^{14} in GI-tracts of rats fed on a balanced amino acid diet

Fig. 4. Excretion rate of orally administrated Thr-U- C^{14} in a balanced amino acid diet

血中のアイソトープ値は第5図のごとくで投与されたもののわずか1.5%しか存在せず、そのうちでも大部分がタンパク質区分に存在し FAA はきわめてわずかしかなかった。血中の絶対量としての FAA のピークは8~12時間目であった¹⁾が、 C^{14} 量もやはり8時間が最も高

Tab. 2. Distribution of Thr-U-C¹⁴ in liver compounds of rats fed on a balanced amino acid diet containing Thr-U-C¹⁴

hr	0	2	4	8	12	24
	x10 ⁴ d. p. m. /g liver					
Whole Liver	—	1.93	2.96	4.39	5.67	5.90
TCA soluble Fraction	—	0.92	1.25	1.35	1.87	0.91
Lipids	—	0.17	0.24	0.49	0.40	0.40
Nucreates	—	0.09	0.11	0.13	0.15	0.15
Proteins	—	0.83	1.30	2.34	2.80	3.91
Total	—	2.01	2.90	4.31	5.22	5.37

Fig. 5. Time course change of ingested Thr-C¹⁴ in plasma of rats fed on a balanced amino acid diet

く次いで12時間目が高い値を示した。

筋肉の値は第6図に示す。筋肉中では血中とことなり遊離の状態での Thr-C¹⁴ 量が多く、12時間までタンパク質区分と同程度の放射能を示しており、24時間目でも筋肉内全カウントの1/3程度は遊離の形で存在していた。小腸、屍体は筋肉と類似の傾向を示しており、タンパク質中と FAA との放射能の比もやはり12時間目まで近接した値であった。これら臓器中の全 C¹⁴ 量を摂取 C¹⁴ に対する比率で表わし第7図にまとめた。筋肉および血

Fig. 6. Time course change of Thr-C¹⁴ in muscle of rats fed on a balanced amino acid diet

液の全量は文献値を引用⁴⁾し筋肉は体重の45%、血漿は3.5%として計算した。ただし肝臓は実測値を用いた。

筋肉は単位重量当たりへの取込みは低いが、投与量の約20%が入っており高い値であった。次いで消化管の10%、肝臓の5%で、血中にはわずか2%以下しか見出されなかった。大部分の臓器で C¹⁴ 量は12時間目が最高値を示し、24時間後では既に減少しており、肝、消化器など代謝回転の早いところでは低下も大きかった。肝臓では単位重量当たりのアイソトープ量は12~24時間の間で変化しなかったが、肝重量の減少によって全肝臓当たりでは大きく減少していることになった。

Fig. 7. Distribution percentage of Thr-C¹⁴ in organs of rats fed on a balanced amino acid diet

考 察

経口的に投与された Thr-C¹⁴ は消化、吸収に伴って消化器から消失し、小腸中に存在する C¹⁴ 量は胃からの消失量の大きさに比して比較的低く、ほぼ一定で高くならなかった(第3図)。このことは胃から腸へは栄養素がかなり一定の速度で送られ(第3図中胃内残留 Thr-C¹⁴ 量の推移参照)、また小腸での吸収のすみやかなことを物語っている。一方吸収された Thr-C¹⁴ は一部はただちに肝臓で分解され呼吸中へ炭酸ガスとして出てくる。本実験では24時間内に投与スレオニン中の炭素の40%までもが炭酸ガスにまで分解、代謝されており、尿中への排泄、脂質中への移行等も併わせて考えれば約半分の Thr-C¹⁴ 中の炭素骨格が分解されていることになる。この値は同様な飼料の投与方法で低タンパク食を与えた場合の Thr-C¹⁴ の分解代謝⁵⁾ と比して、かなり分解の割合が高かった。これは短時間に多量の食餌をつめ込むために脂肪合成および糖新生がともに促進しているであろう。特に肝臓においては肝臓中の C¹⁴ の10%ぐらいが脂質として存在している。しかし肝グリコーゲン中への移行はきわめて少なかった。また肝単位重量当たりの C¹⁴ 量が12時間で最高値に達し、以降24時間後までほと

んど低下していない。にもかかわらず摂取 C¹⁴ に対する肝中 C¹⁴ の割合では24時間目には大きく低下している(第2表, 第7図)。これは肝全体の縮少によるもので、肝重量の日間変動の大きなためである。肝臓は筋肉、血中などに比して C¹⁴ の取込み量が高く、それぞれの2倍以上となっていて、食餌など外から入ってくるものに対してきわめて大きく影響され変動している。

体内へ保留された C¹⁴ 量から食餌として摂取されたアミノ酸がどの程度体タンパク質となっているかをいくつかの仮定に立って計算してみた。仮定としては、1) 体内に入った C¹⁴ は全て Thr-C¹⁴ の形で体タンパク質(TCA 不溶区分)中へ取込まれており、2) 摂取されたアミノ酸混合物は効率よく利用され、3) 一度合成された Thr-C¹⁴ を含む体タンパク質は短時間内(12時間程度まで)はまだ分解が起っておらず、4) 体タンパク質中のスレオニン含量は5%⁶⁾ であるとする。

投与した食餌10g中のアミノ酸混合物に含まれるスレオニン含量は50mg(前報¹⁾ 食餌組成表より)であり、その中に添加した Thr-C¹⁴ の全カウント数は 6.7×10^8 d. p. m. (前出の実験方法の項に記してある実測値)であったから

(A) スレオニン1mg 当たりの C¹⁴ 量 = 6.7×10^8 d. p. m./50(mg)

(B) 体タンパク質中のスレオニン量 = 5/100 (仮定4) より)

(C) 組織中のタンパク質区分の d. p. m. = 単位組織中の TCA 不溶部の d. p. m. $\times$ 組織重量 (肝臓においては組織重量は実測値、筋肉においては体重の45%という値を使用した)
組織タンパク質合成量(mg) = C / (A $\times$ B)

以上のような計算式を用いて試算を行なったところ、筋肉では12時間に約100mg、また肝臓では12時間で約40mgのタンパク質が合成されたことになる。

上式では24時間というように時間が長くなると、肝臓のように組織中の C¹⁴ 量が12時間目よりも24時間後の方が減少している組織では12時間よりも24時間の方がタンパク質合成量が少ないという結果となり、もはや上式は用いられないことがわかる。これは仮定の3) がもはや当てはまらないことによるのである。

このような計算は種々の仮定に立って行なったものであり、特に Thr が他のアミノ酸と同様に平均的行動をすると考えての計算であり、今後は他のアミノ酸のラベルされたものを用いて得られる結果と比較検討することによって、より正確な知識が得られると思う。

要 約

1. スレオニン-U- C^{14} を含む食餌を1時間白鼠に摂取させ、 C^{14} の分布を経時的に追跡した。
2. 投与24時間後の C^{14} の分布は呼気炭酸ガス、尿、筋肉、消化管、肝臓、血中にそれぞれ約40, 5, 20, 10, 5, 2%となっていた。
3. 体内の C^{14} 量は消化・吸収の進行とともに12時間まで増加した。各臓器では肝・血中はタンパク質区分への取込みが大きかったが、筋肉、屍体、消化管などでは最初12時間まで遊離アミノ酸として C^{14} が多くタンパク質区分と同程度であり、24時間後になってタンパク質区分が相対的に高い C^{14} を含むようになった。
4. 24時間後には総 C^{14} 量は肝・消化管において既に減

少していた。

5. Thr- C^{14} の体内保留量から体タンパク合成量を試算したところ筋肉および肝臓で12時間後にそれぞれ100および40mgの体タンパク合成量となった。

文 献

- 1) 野田, 守時, 吉田: 栄養と食糧, **22**, 102 (1969)
- 2) H. Teffay and T. Alvarez: *Anal. Chem.*, **33**, 612 (1961).
- 3) G. A. Bruno and J. E. Christion: *Anal. Chem.*, **33**, 1216 (1961).
- 4) 藤井, 小山著: 「動物実験手技」改訂判 協同医書出版 昭和39年 p. 642
- 5) A. Yoshida, P. M. B. Leung, Q. R. Rogers, and A. E. Harper: *J. Nutr.*, **89**, 80 (1966).
- 6) R. J. Block and K. W. Weiss: *Amino Acid Handbook*, Springfield, Ill. (1956).