一種の必須アミノ酸欠アミノ酸飼料摂取による白ネズミの トリプトファン代謝(Ⅱ)

Tryptophan Metabolism of Rats Fed an Amino Acid Diet devoid of one Essential Amino Acid (Ⅱ)

フェニルアラニン欠飼料投与実験と副腎摘出白ネズミへの
スレオニン欠飼料投与実験

Feeding Test on Rats with a Phenylalanine-free Diet and on
Adrenalectomized Rats with a Threonine-free Diet

(昭和 44 年 7 月 14 日 受理)

木村 利三* 岡田 貞子*
(Toshizo Kimura) (Sadako Okada)

西山 真木子* 村田 希久*
(Makiko Nishiyama) (Kiku Murata)

In an attempt to study on metabolic changes in rats fed an amino acid diet devoid of an essential amino acid, rats were force-fed a phenylalanine-free, phenylalanine and tyrosine-free or complete amino acid diet for 4 days and killed 3 hours after the feeding on day 5. The urinary nitrogen and N'-methylnicotinamide (MNA), the tryptophan pyrrolase (TPase) and tyrosine- α -ketoglutarate transaminase (TKase) activities of liver, and the fat content of liver were estimated. Beside, in order to clarify the effect of amino acid patterns of diets on the liver TPase and TKase activities, intact and adrenalectomized rats were administered a threonine-free or complete amino acid diet and sacrificed three hours later.

The results indicated that the urinary nitrogen and MNA, the TPase and TKase activities of liver, and the fat content in liver of rats fed the phenylalanine-free or phenylalanine and tyrosine-free diet were higher than those of rats fed the complete amino acid diet. Both of liver enzyme activities of adrenalectomized rats force-fed the threonine-free or complete amino acid diet were lower than those of intact rats fed the same diet respectively. Furthermore, the TPase activity of adrenalectomized rats fed the threonine-free diet was higher than that fed the complete amino acid diet, whereas, the liver TKase activities in both diet groups of adrenalectomized rats were almost the same level.

These results demonstrated that the TPase activity could be directly affected by the utilization of tryptophan in diets in this experimental condition, whereas changes in TKase activity depended on the function of adrenal gland in preference to the direct effect of amino acid patterns in diets.

一種類の必須アミノ酸を欠くアミノ酸混合飼料を白ネズミに投与することによって尿中 N'-Methylnicotinamide (以下 MNA とする) は完全アミノ酸飼料投与のそれに比し明らかに排泄量の増大をきたし¹⁾, スレオニンあるいはトリプトファンを欠くアミノ酸混合飼料投与時の MNA 量の変動はそれらの肝臓 Tryptophan pyrrolase (以下 TPase とする) 活性の変動とよく関連

することを報告した²⁾。またこれら必須アミノ酸を欠いたアミノ酸飼料投与における尿中窒素量の増大は、肝臓 Tyrosine- α -ketoglutarate transaminase (以下 TKase とする) 活性の増大と相対応する傾向を認めた²⁾。これらの事実は飼料中のアミノ酸組成が不均衡なとき、それを摂取した白ネズミのたんぱく質およびアミノ酸代謝が著しく分解の方向に傾き、トリプトファンは NAD を経て MNA として排泄するためと推定された。

* 大阪市立大学家政学部

そしてトリプトファン欠飼料を投与するときは、完全アミノ酸飼料群に比し明らかに肝臓 TPase 活性と尿中 MNA は低下するが、TKase 活性は増大した。またアミノ酸飼料投与前と投与後3時間の肝臓 TPase ならびに TKase 活性の差が、完全アミノ酸食群に比しスレオニン欠飼料投与においてより顕著であって、飼料中のアミノ酸組成が両酵素活性の変動の直接的な要因ともなるものと考えられた²⁾。

Knox ら³⁾⁴⁾ は生化学的研究において、TPase 活性は基質誘導とホルモン誘導を受けるが、TKase 活性は基質によるよりもホルモン依存がその機作の主因であることを明らかにしている。この機作が本実験のような飼料経口投与実験においても成立するならば、フェニルアラニン欠、フェニルアラニン・チロシン欠飼料投与でも肝臓 TKase 活性は上昇すべきである。この点を明らかにするため、フェニルアラニン・チロシン欠飼料を前報と同じく強制投与し、尿中 MNA 量、尿中窒素量、肝臓 TPase TKase 活性、肝臓脂肪量を調べた結果、フェニルアラニン欠、フェニルアラニン・チロシン欠飼料投与後も TKase 活性の著しい上昇がみられ、トリプトファン欠飼料投与後の肝臓 TPase 活性の低下とは全く趣を異にし、本実験条件においても TKase 活性は基質よりもホルモン依存性の大きいことを認めた。

そこで更に副腎摘出白ネズミにスレオニン欠アミノ酸飼料を投与し、Knox ら³⁾⁴⁾ の説が本実験のような不均衡アミノ酸飼料強制投与実験においても成立することを明らかにした。以下実験方法と結果について報告する。

実験方法

実験動物と飼料： ウィスター系雄白ネズミを用い、体重 200g 前後になるまで20%カゼイン飼料で飼育し試験に供した。飼料組成は Table 1 にしめすようで、完全アミノ酸飼料を対照群の飼料とし、試験群の飼料はこの完全アミノ酸混合飼料からフェニルアラニン、フェニルアラニン・チロシンあるいはスレオニンを除き、その補足として非必須アミノ酸混合物を同重量加えた。各飼料を70% (W/V) の懸濁液として胃管により強制投与した。

実験 I： 実験動物を1日絶食せしめた後、Table 1 にしめした完全アミノ酸飼料100g にニコチン酸を10mg 補足した70%懸濁液を午前9時30分、午後2時、6時30分の3回胃管によって強制投与した。各回の投与量は飼料重量でのおおの 3.5g, 3g, 3.5g で1日全量10g である。この投与を4日間おこない予備投与期間とした。その後、1群5〜6匹として完全飼料群、フェニルアラニン欠飼料群およびフェニルアラニン・チロシン欠飼料群の3群に分け、予備投与期間と同じく強制投与で飼育し、5

Table 1. Composition of complete amino acid diet and of amino acid mixture

Complete amino acid diet		Amino acid mixture*	
	%	g/100g of diet	
Amino acid mixture	10.0	L-Arginine-HCl	0.37
Sucrose	80.0	L-Histidine-HClH ₂ O	0.41
Corn oil	5.0	L-Isoleucine	0.53
Salt B **	4.0	L-Leucine	0.77
Niacin-free vitamin mixture***	1.0	L-Lysine-HCl	0.78
		L-Methionine	0.37
		L-Phenylalanine	0.66
		L-Threonine	0.56
		L-Tryptophan	0.17
		L-Valine	0.66
		L-Cystine	0.21
		L-Tyrosine	0.21
		L-Alanine	0.43
		L-Aspartic acid	0.88
		L-Glutamic acid	1.88
		Glycine	0.31
		L-Proline	0.43
		L-Serine	0.43

* Reported at the 31 st Meeting of the Essential Amino Acid Committee (1965) by M. Miyazaki

** Harper, A. E. : *J. Nutr.*, 68, 408 (1958)

*** The vitamin mixture was made with sucrose, and provided as mg/100g of diet: thiamine, 1; riboflavin, 1; pyridoxine, 1; vitamin B₁₂, 0.001; folic acid, 0.15; Ca pantothenate, 2.5; biotin, 0.01; choline chloride, 100; α -tocopherol, 2.5; vitamin K, 0.1; vitamin A, 2000 I.U.; vitamin D, 250 I.U.

日目1回目の投与後3時間に断頭屠殺し、肝臓をすみやかに採取し、酵素活性用のホモジネートとし、かつおのおの白ネズミの肝臓の一部を試験群ごとに集め、脂肪測定に用いた。採尿は予備投与期間の後半2日と試験投与期間の前半2日、後半2日間に分けておこなった。

実験 II： 実験動物を正常群と副腎摘出群に分け、後者は術後1週間にわたり20%カゼイン飼料と0.9%食塩水を自由に与え、その後実験 I と同様に両群ともニコチン酸を含む完全アミノ酸飼料懸濁液を2日間投与し、1日絶食ののち翌朝両群に完全アミノ酸飼料またはスレオニン欠飼料の各 3.5g を70%懸濁液として投与し、3時間後に断頭屠殺し、すみやかに肝臓を摘出し、酵素活性測定のためのホモジネートを調製した。

尿中窒素量および MNA 量はおおのセミマイクロエルダール法と Huff-Perlzweig のアセトン液合法⁵⁾を

改良した能勢・上田法⁶⁾により測定した。肝臓脂肪量は各動物の肝臓の一部を試験群ごとに集め、乾燥後、磨砕しエーテル抽出法によって測定した。TKase 活性は Knox と Auerbach の方法⁷⁾で測定した。

実験結果

実験 I : フェニルアラニン欠、フェニルアラニン・チロシン欠および完全アミノ酸飼料投与白ネズミの尿中窒素量 MNA 量および肝臓 TPase, TKase 活性と脂肪

Fig. 1. Body weight change in rats fed experimental amino acid diets

Table 2. Effect of phenylalanine-free diet, and phenylalanine and tyrosine-free diet on activities of enzymes and fat content of liver

Diet	Complete amino acid	Phenylalanine-free	Phenylalanine and tyrosine-free
Number of rats	6	6	5
Tryptophan pyrrolase *	5.30±0.75 **	8.17±0.99	7.96±1.45
Tyrosine- α -ketoglutarate transaminase ***	184±29	717±50	616±87
fat content ****	64	110	128

* As μ moles kynurenine/liver/hr.

** Mean $\pm$ SE

*** As μ moles p-hydroxyphenyl pyruvate/liver/hr.

**** Expressed as mg/g of dry tissue

さなかった。これは、これら必須アミノ酸欠飼料投与において、体たんぱく質の合成に利用されなかったトリプトファンの分解がより増大し、かつより多く MNA として排泄されたことをしめしている。

また肝臓脂肪量は Table 2 にしめすように、フェニルアラニン欠およびフェニルアラニン・チロシン欠飼料群ともに、完全アミノ酸飼料群のそれより著しく増加した。

実験 II : 正常あるいは副腎摘出白ネズミへのスレオ

量について

予備投与期間の後半 2 日と試験期間中の体重変化は Fig. 1 にしめた。完全アミノ酸飼料群は僅かながら体重が増加する傾向にあるのに反し、フェニルアラニン欠飼料群およびフェニルアラニン・チロシン欠飼料群のそれらはほとんど変化はなかった。

肝臓 TPase および TKase 活性の結果は Table 2 にしめすように、TPase 活性は完全アミノ酸飼料群に比し、フェニルアラニン欠飼料群は有意に高く、フェニルアラニン・チロシン欠飼料群では有意差はなかった高値をしめし、両群とも完全アミノ酸飼料群の TPase 活性の 1.5 倍であった。フェニルアラニン欠およびフェニルアラニン・チロシン欠飼料群の TKase 活性は完全アミノ酸飼料群のその 3~4 倍の上昇をしめた。

前述のように群間の体重は大差をしめさなかったが、Table 3 にしめたように全試験期間を通じフェニルアラニン欠あるいはフェニルアラニン・チロシン欠飼料群の尿中窒素量は完全アミノ酸飼料群のその約 2 倍であった。また尿中 MNA 量は完全アミノ酸飼料群において、予備投与期間における高値から、試験期に入り急激に低下したのに対し、フェニルアラニン欠およびフェニルアラニン・チロシン欠飼料群における MNA 量の低下は少なく、試験食投与期間を通じ対照群ほどの減少をしめ

ニン欠アミノ酸飼料と完全アミノ酸飼料投与による肝臓 TPase および TKase 活性について

正常あるいは副腎摘出白ネズミへの完全アミノ酸飼料と、スレオニン欠飼料投与後 3 時間における肝臓 TPase 活性と TKase 活性は Table 4 にしめす。TPase 活性については正常白ネズミにおいて完全アミノ酸群よりもスレオニン欠飼料群が明らかに高かった。副腎摘出白ネズミではいずれの飼料群も正常白ネズミの活性値より低かったが、スレオニン欠飼料と完全アミノ酸飼料群にお

Table 3. Changes in levels of urinary nitrogen and MNA in rats administered phenylalanine-free diet (P), phenylalanine and tyrosine-free diet (PT), and complete amino acid diet (C)

Diet No. of rats		Collection period of urine during experimental feeding	
		Day 1-2	Day 3-4
Urinary nitrogen* mg/day	C 6	37.8±10.2	43.1±5.5
	P 6	92.3±18.1	99.8±10.5
	PT 5	91.5±21.9	83.0±10.2
Urinary MNA** μg/day	C 6	68±12	35±11
	P 6	138±37	98±26
	PT 5	95±18	110±15

* Levels of urinary nitrogen and MNA in the preliminary feeding were 54.1±2.1 mg/day and 366±64 μg/day respectively

** Mean ± SE

る差は、正常白ネズミの場合と同じ傾向にあった。一方 TKase 活性は、正常白ネズミでは完全アミノ酸飼料群よりも、スレオニン欠飼料群では顕著に高かったが、副腎摘出白ネズミではいずれの飼料群も正常白ネズミの TKase 活性より低く、かつ両飼料群に差がみられなかった。かくして副腎摘出白ネズミにおける両酵素活性の飼料による影響は全く異なることが明らかとなった。

考 察

トリプトファン以外の必須アミノ酸 1 個を欠くアミノ酸混合飼料を投与する際のトリプトファン分解酵素 TPase 活性の誘導は完全アミノ酸飼料投与時より大で、尿中 MNA 量も大となる現象は、トリプトファン欠飼料投与においては認められず尿中 MNA 量も低下する。しかしチロシン分解酵素活性の増大（完全アミノ酸飼料投与時より大であること）はフェニルアラニン欠、フェニルアラニン・チロシン欠飼料投与においても著しく TKase 活性は尿中窒素排泄量の変動と関連する傾向がみられ、本実験条件における TPase 活性と TKase 活性誘導の機作の差異は、Knox ら³⁾⁴⁾がトリプトファンやチロシン注射投与による生化学的研究において立証している TPase 活

Table 4. Effect of administration of a threonine-free diet on liver enzyme activities in intact or adrenalectomized rats

Diet	Intact rats		Adrenalectomized rats	
	Complete amino acid	Thr-free	Complete amino acid	Thr-free
No. of rats	4	4	4	4
Tryptophan pyrrolase *	12.5±3.1 **	23.3±5.1	2.9±0.4	4.9±0.9
Tyrosine-α-ketoglutarate transaminase ***	544±50	931±174	245±50	259±47

* As μmoles kynurenine/liver/hr.

** Mean ± SE

*** As μmoles p-hydroxyphenyl pyruvate/liver/hr.

性と TKase 活性誘導機作の相異と類似の現象であろうとする可能性は今回の実験によって確実にされた。

すなわち TKase 活性はその基質あるいはその前駆体をも含まない、フェニルアラニン欠、フェニルアラニン・チロシン欠飼料のいずれの投与によっても完全アミノ酸飼料投与時の TKase 活性よりも明らかに高値をしめし、また尿中窒素量も同じ傾向をしめした。しかも飼料中のアミノ酸（チロシン、フェニルアラニンなど）が基質として直接的な影響をしめさないことは副腎摘出白ネズミによるスレオニン欠飼料投与による結果によってさらに支持された。

この場合飼料中にチロシンが存在するにもかかわらず副腎摘出によって肝臓 TKase 活性の上昇が全く見られず、肝臓 TKase 活性は、この種の栄養条件でも、Knox らがしめしたようにホルモン依存性の高いことが明らかとなった。すなわち TKase 活性は不均衡なアミノ酸組成の飼料摂取におけるアミノ酸分解による尿中窒素量の変動と関連するものであろう。

一方フェニルアラニン欠、フェニルアラニン・チロシン欠飼料投与において、いずれも尿中 MNA 量の増加とともに肝臓 TPase 活性は上昇し、前報²⁾のスレオニン欠飼料投与時の TPase 活性と尿中 MNA 量との関係

と類似の態度をしめし、さらに副腎摘出白ネズミにおいても、スレオニン欠飼料投与時の TPase 活性は完全アミノ酸飼料投与時のそれより高く、正常白ネズミにおける両飼料投与時の差異と同型であることは肝臓 TPase 活性がこの種の条件では基質すなわち飼料よりのトリプトファンの代謝を直接的に反映しているものと理解される。

しかし、副腎摘出白ネズミの両酵素活性が、いずれの飼料投与時でも正常白ネズミのそれらよりも低かったことは、正常白ネズミの両酵素活性は飼料中の基質となる物質による影響と、副腎皮質ホルモンによる影響が相乗的にあらわれるものと考えられる。

また一種類の必須アミノ酸を欠く飼料摂取時の尿中 MNA 量の変動が、その欠となったアミノ酸の種類によって特異的であるということは、スレオニン欠、トリプトファン欠、そしてフェニルアラニン欠飼料投与時の尿中 MNA 量と TPase 活性の変化が対応することによっても明らかである。また体重、尿中窒素、肝臓 TKase 活性そして肝臓脂肪量の変化が欠いたアミノ酸の種類によって異なるのは、各必須アミノ酸の栄養的特異性のあらわれであろう。これらの点を明らかにするため更に他の各必須アミノ酸を欠く飼料について検討中である。

要 約

一種類の必須アミノ酸を欠くアミノ酸混合飼料投与時の代謝変動を検討するために、本実験ではフェニルアラニン欠、フェニルアラニン・チロシン欠あるいは完全アミノ酸飼料を白ネズミに4日間強制投与し、その間の尿中窒素量、MNA 量を求め、更に第5日第1回目の投与3時間後の肝臓 TPase、TKase 活性および脂肪量を測定した。また副腎摘出白ネズミにスレオニン欠飼料あるいは完全アミノ酸飼料を投与し、3時間後の肝臓 TPase、

TKase 活性を測定した。

その結果、フェニルアラニン欠、あるいはフェニルアラニン・チロシン欠飼料投与白ネズミの尿中窒素量、MNA 量および肝臓 TPase、TKase 活性、脂肪量のいずれも完全アミノ酸飼料投与白ネズミのそれらより高かった。副腎摘出白ネズミへのスレオニン欠飼料投与時の肝臓 TPase 活性については正常白ネズミの場合と同じ傾向で、完全アミノ酸飼料投与時よりも上昇した。しかし肝臓 TKase 活性については完全アミノ酸飼料投与時とスレオニン欠飼料投与時に差がなく、本実験のような飼料経口投与実験においても TPase 活性の誘導と TKase 活性誘導の機構において Knox ら³⁾⁴⁾のしめたような特異性のあることを明らかにした。

そしてこの種の条件下での肝臓 TPase 活性の変動には、摂取した飼料よりトリプトファンの利用が直接的に反映するのに対し、肝臓 TKase 活性の変動は主にアミノ酸の分解代謝を介するホルモンの影響下にあることをしめた。

本研究費の一部は島菌順雄教授を委員長とする必須アミノ酸研究委員会研究費、ならびに田辺アミノ酸研究基金の研究費の助成によった。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) 村田希久, 池田秀夫, 加藤睦美, 鎌田陽子: ビタミン, **36**, 13 (1967)
- 2) Murata, K. & Kimura, T.: *J. Nutr.* (1969) (August Issue)
- 3) Knox, W.E.: *British J. Expt. Pathology*, **32**, 462 (1951)
- 4) Lin, E.C.C. & Knox, W. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 85 (1957)
- 5) Huff, J. W. & Perlzweig, W. A.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 157 (1947)
- 6) 能勢善嗣, 上田 潔: ビタミン, **2**, 247 (1950)
- 7) Knox, W. E. & Auerbach, V. H.: *J. Biol. Chem.*, **214**, 307 (1955)