離乳期ラットの肝臓リソソームアリルスルファターゼ活性 に及ぼす低含硫アミノ酸飼料の影響

木下千鶴*, 広井祐三*, 岡達三**

名取靖朗**, 谷口巳佐子*

* 中村学園大学食物栄養学科栄養生化学教室

** 徳島大学医学部栄養学科栄養化学講座

Effect of a Low-Sulphur-Containing Diet on Lysosomal Arylsulfatase Activity in Weanling Rats

Chizuru KINOSHITA,* Yuzo HIROI,* Tatsuzo OKA,**

Yasuo NATORI** and Misako TANIGUCHI*

* Department of Nutritional Chemistry, School of Food and Nutrition,
Nakamura Gakuen College, Fukuoka 814-01

** Department of Nutritional Chemistry, School of Medicine,
the University of Tokushima, Tokushima 770

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 46, 401~407 (1993)

The effect of a low-sulphur-containing diet on the hepatic level of lysosomal arylsulfatase activity was studied in weanling rats. Weanling rats fed on a 10% soybean-protein-isolate diet, which has a low sulphur amino acid content (cystine and methionine, 1.3 g and 1.4 g/kg diet, respectively) about 75% that of a 10% casein diet, showed 2.0-fold increased hepatic lysosomal arylsulfatase activity (total combined activities of arylsulfatases A and B) at 3 weeks and 2.8-fold at 5 weeks, compared with those of rats maintained on an ordinary laboratory chow diet. Weanling rats fed on the casein diet showed a 1.6-fold increased in the total combined activities of arylsulfatases A and B at 5 weeks, compared with those of rats fed on the laboratory chow diet. These increases were suppressed by addition of cystine or methionine to the soybean-protein-isolate diet. On the other hand, liver lysosomal arylamidase activities were not altered significantly by either diet. Therefore, the elevated lysosomal arylsulfatase activities in liver of rats fed on the soybean-protein-isolate diet might be attributable to insufficiency of sulphur-containing amino acids in the diet. The elevation of arylsulfatase activities was not due to changes in arylsulfatase-specific mRNA, as revealed by Northern blot and slot-blot hybridization analysis, since the changes in mRNA content were only marginal. We conclude that induction of lysosomal arylsulfatase activity by a soybean-protein-isolate diet is brought about by an increase in the amount of translation of arylsulfatase mRNA.

Key Words soybean protein isolate, arylsulfatase, rat, sulphur metabolism.

(Received January 22, 1993)

分離大豆タンパク質 (soybean protein isolate, SPI) は高コレステロール血症者の血漿コレステロールの低下作用や正常域者の血漿コレステロールの LDL/HDL 比の改善作用¹⁾²⁾, さらに中性脂肪の低下作用³⁾⁴⁾ など脂質代謝の改善作用を示すことから近年注目されているタンパク質である。

SPI は含硫アミノ酸のメチオニン含量が低いため, SPI を 10% 含む低タンパク質飼料で飼育した幼若ラットではシステインの貯蔵庫といわれる肝メタロチオネインや肝グルタチオンのレベルが低下し⁵⁾⁶⁾, その代謝に関わる γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 活性が上昇することが見いだされている⁵⁾. このことは低含硫アミノ酸飼料により細胞内の硫酸塩の供与体が減少し, 硫酸塩代謝に関わる酵素の活性が代償的に上昇している

* 〒814-01 福岡市城南区別府 5-7-1

** 〒770 徳島市蔵本町 3-18-15

Table 1. Composition of the soybean protein isolate and casein diet.

Ingredient	(g/kg)
Soybean protein isolate or Casein	100
Dextrin	768.5
Cellulose powder	20
Mineral mixture	50
Vitamin mixture	10
Choline chloride	1.5
Mize oil	50

ことを示している。

本研究は 10% SPI を含む低タンパク質飼料で離乳直後のラットを数週間飼育すると、肝臓のリソソームに局在し硫酸塩代謝に関わるアシルスルファターゼ活性が上昇することを見いだしたので、そのメカニズムについて検討を行ったものである。

実験方法

1. 試 薬

分離大豆タンパク質 (SPI) は不二製油^(株)よりの恵与による。固形飼料 (CE-2) は日本クレア^(株)より購入した。ビタミン・フリー・カゼインは ICN Biomedicals, Inc., Cleveland より、ミネラル混合 (AIN-76), およびビタミン混合 (AIN-76) はオリエンタル酵母^(株)より購入した。*p*-nitrocatechol sulfate は Sigma 社より購入した。全 RNA および mRNA 調製用試薬である ISOGEN 試薬は^(株)ニッポンジーンより購入した。試薬はすべて特級のものを用いた。

2. ラットの飼育条件

離乳直後のウイスター系雄性ラットを 10% SPI 飼料, 10% カゼイン飼料, または固形飼料で 3 週間, あるいは 5 週間自由摂取させて飼育した。10% SPI 飼料および 10% カゼイン飼料の組成は Table 1 に示した。朝 7 時から夜 7 時を明時間とし明暗のサイクルは 12 時間として, 20~22°C の条件で管理し個別のケージで飼育した。ラットはエーテル麻酔して屠殺した。午前 9~12 時の間に実験を行った。

3. 酵素活性の測定

肝重量の 10 倍量の 0.25 M スクロースでホモゲナイズし, そのホモジネートを酵素液として用い, リソソームアシルスルファターゼ活性およびリソソームアリアルミダーゼ活性を測定した。リソソームアシルスルファターゼ活性は *p*-nitrocatechol sulfate を基質として, A と B のコンバインドアッセイ⁷⁾, または B 単独活性⁷⁾ を測定した。リソソームアリアルミダーゼ活性⁸⁾ の測定は

Little らの方法⁹⁾ で測定した。すなわち, 1.25 ml の 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 0.15 ml の 10 mM EDTA, および 0.1 ml の酵素液を加え, 37°C で 10 分間予備加温した後, 15 μ l の 75 mM バリン β -ナフチルアミドを基質として加え反応を開始し 10 分間インキュベートした。遊離する β -ナフチルアミンはアゾ色素にして Goldberg と Rutenburg の方法¹⁰⁾ を用いて測定した。酵素活性は 1 分間に 1 μ mol の β -ナフチルアミン, または *p*-nitrocatechol を遊離する酵素量を 1 unit とした。

4. 全 RNA およびメッセンジャー RNA (mRNA) の調製

各種飼料で 5 週間飼育したラット肝臓から McDonald ら¹¹⁾ の方法により全 RNA を調製した。全 RNA はオリゴ dT セルロースカラムを用いてポリ (A)⁺RNA を分画し mRNA 画分とした。

5. ハイブリダイゼーションプローブの合成

本実験で用いたハイブリダイゼーションプローブはヒト, 微生物, およびウニのアシルスルファターゼの間で保存されている領域について, +364~+381 の塩基配列を選択し¹²⁾¹³⁾, 5'-CCCCAAGGTGCCACTTG-CC-3' のオリゴマーを Applied Biosystems 社の Model 392 DNA Synthesizer を用いて合成した。得られたオリゴマーは (γ -³²P) ATP を用いてラベルしプローブとして供試した。

6. ノーザンプロットおよびスロットプロット

ノーザンプロットおよびスロットプロットは常法どおり行った¹⁴⁾。すなわち, 約 5 μ g のポリ (A)⁺RNA を 1.0% アガロースゲルにアプライし 70 V で 3 時間電気泳動した。さらにニトロセルロース膜にトランスファーした後, 先に述べたオリゴマープローブを用いて 37°C で 2 時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを 6XSSC, 0.05% SDS において 47°C で 1 回洗浄した後, X-フィルム (Kodak X-Omat AR) に -70°C で 22 時間感光させた。また, スロットプロットは LKB Ultrascan XL Enhancer Leaser Densitometer を用いてスキャンし, おのおののスロットを定量した。

7. タンパク質の定量

タンパク質の定量はローリー法¹⁵⁾で牛血清アルブミンを標準として測定した。

実験結果

1. カゼインおよび分離大豆タンパク質 (SPI) 飼料の配合組成およびアミノ酸組成

10% カゼイン飼料 (カゼイン飼料) および 10% 分離大豆タンパク質飼料 (SPI 飼料) の配合組成を Table 1 に示した。アミノ酸組成を SPI 飼料とカゼイン飼料で比

Table 2. Food intake, body weight, liver weight, and activities of lysosomal arylsulfatase (A & B) and arylamidase in rats fed on semipurified diets for 5 weeks.

Diet	Body weight (g)	Liver weight (g)	Food intake (g)	Arylsulfatase activity (A & B) (mU/mg protein)	Lysosomal arylamidase activity (mU/mg protein)
SPI	94.6±1.5	4.6±0.3	306.6±34.1	87.8±10.0 ^a	13.4±3.4
Casein	132.7±9.0	5.4±0.4	349.0±23.2	49.7±5.4 ^b	14.3±1.3
Laboratory chow	390.6±13.1	17.5±0.6	706.6±45.0	31.3±4.1 ^c	21.4±4.6

Values are means±SD; $n=4$ rats/group. Values not sharing the same superscript letter within a column are significantly different when tested by ANOVA and Duncan's multiple-range test ($p<0.05$).

較すると, Taniguchi と Cherian⁶⁾ の報告があるが, SPI 飼料中のメチオニンは約 0.14% の割合で含まれカゼイン飼料の約半分であるが, シスチンは約 0.13% の割合で含まれたカゼイン飼料の約 2 倍含まれており, 含硫アミノ酸の総量としては SPI 飼料はカゼイン飼料の約 75% である。また, SPI 飼料中のトリプトファンとプロリンの含量はカゼイン飼料の約 50%, アルギニンおよびアスパラギン含量は約 2 倍である。その他のアミノ酸はほぼ同量含まれていた。

2. SPI 飼料飼育によるアリルスルファターゼ活性の上昇

離乳直後のラットを固形飼料, カゼイン飼料, あるいは SPI 飼料で 5 週間飼育したときの体重および肝臓のリソソームアリルスルファターゼ活性 (A と B コンバインド活性) の測定の結果を Table 2 に示した。おのおのの飼料で飼育したラットの体重は固形飼料群に比較すると, カゼイン飼料群で約 33%, SPI 飼料群では約 25% でありともに低タンパク質の影響がみられた。一方, アリルスルファターゼ活性は固形飼料群に比べると体重で減少していたのとは逆にカゼイン飼料群で約 1.6 倍 (A と B コンバインド活性), SPI 飼料群では約 2.8 倍 (A と B コンバインド活性) にそれぞれ増加していた。一方, 対照実験としてリソソームアリアルミダーゼ活性を測定した (Table 2)。アリアルミダーゼ活性については, 固形飼料群に比べると逆にカゼイン飼料群, SPI 飼料群ともに減少傾向を示した。このようにアリルスルファターゼ活性 (A と B コンバインド活性) は固形飼料群に比べると, カゼイン飼料群よりも含硫アミノ酸の少ない SPI 飼料群でより高い活性を示すことから, 肝臓のリソソームに局在するアリルスルファターゼは硫酸塩の代謝に関与しており, 肝臓内での硫酸塩の濃度が活性の変動に影響を及ぼすものと思われる。そこで次に SPI 飼料で飼育したラット肝臓のアリルスルファターゼ活性に及ぼすメチオニンおよびシスチン供給の効果を検討した。さらにアリルスルファターゼは A と B が存在し⁷⁾, 量的にはラット肝臓内では A が 5% 弱, B が 95% 強を占め

る¹⁶⁾ので活性上昇によりその量比に変化があるかどうかを調べた。

3. SPI 飼料で飼育したラット肝臓のアリルスルファターゼ活性に及ぼす含硫アミノ酸の効果

SPI 100 g 当りメチオニン, またはシスチンをそれぞれ 0.3 g 加えて, 離乳直後のラットを 3 週間飼育し肝アリルスルファターゼ活性の A と B のコンバインド活性, また B 単独の活性について検討した (Table 3)。この添加の割合は 10% カゼイン飼料の総含硫アミノ酸量と同じになる割合である。3 週間飼育後のラットの体重は固形飼料群に比べ, カゼイン飼料群で約 45%, SPI 飼料群では約 35% であり低タンパク質の影響がみられた。一方, アリルスルファターゼ活性については, A と B のコンバインド活性, および B 単独の活性ともに同程度上昇し, B 活性の量比は 95% 以上を占めた。つまり, アリルスルファターゼ活性は, カゼイン飼料群と固形飼料群の間では有意差はなかったが, SPI 飼料群では A と B コンバインド活性が固形飼料群の約 1.9 倍, B 活性は約 2.3 倍に上昇していた。カゼイン飼料で 5 週間飼育したラットでは肝アリルスルファターゼ活性は約 1.6 倍 (A と B コンバインド活性) に増加していたにもかかわらず 3 週間飼育では活性の上昇は観察されなかった。このことは, SPI 飼料群におけるアリルスルファターゼ活性の上昇とカゼイン飼料群における上昇の機構が異なっていることを示唆していて, 低タンパク質飼料に加え低含硫アミノ酸によるアリルスルファターゼ活性の上昇はより短期間の内に起こると思われる。さらに, SPI 飼料にシスチンまたはメチオニンを加えるとアリルスルファターゼ活性 (A と B コンバインド活性, および B 活性) は, メチオニンの抑制効果は劣るけれど, シスチンはカゼイン飼料および固形飼料群における活性と同じレベルにまで抑制された。このことから, SPI 飼料によるアリルスルファターゼ活性の上昇は低含硫アミノ酸組成による硫酸塩の濃度の低下に起因することが確かめられた。一方, 対照実験としてリソソームアリアルミダーゼ活性を測定した (Table 3)。アリアルミダーゼ活性について

Table 3. Food intake, body weight, liver weight, and activities of lysosomal arylsulfatase and arylamidase in rats fed on semipurified diets for 3 weeks.

Diet	Body weight (g)	Liver weight (g)	Food intake (g)	Arylsulfatase activity (mU/mg protein)		Lysosomal arylamidase activity (mU/mg protein)
				(A & B)	B	
SPI (<i>n</i> =8)	100.0±3.5	3.4±0.3	231.9±18.9	63.7±3.8 ^a	73.2±13.9 ^a	17.6±3.9
SPI (Met) (<i>n</i> =8)	146.3±15.0	5.5±0.8	296.4±13.4	44.2±6.5 ^b	46.6±4.5 ^b	ND
SPI (Cys) (<i>n</i> =8)	88.9±14.9	3.6±0.6	162.1±15.0	33.0±2.7 ^c	34.6±2.3 ^c	ND
Casein (<i>n</i> =8)	123.3±9.2	4.5±0.5	242.3±37.7	37.4±6.2 ^c	32.6±10.6 ^c	18.3±1.9
Laboratory chow (<i>n</i> =4)	222.6±6.2	11.2±0.5	361.0±30.7	32.8±3.7 ^c	32.0±4.8 ^c	21.5±0.5

Values are means±SD. Values not sharing the same superscript letter within a column are significantly different when tested by ANOVA and Duncan's multiple-range test (^{a/b}, ^{a/c} $p<0.01$, ^{b/c} $p<0.05$). ND, not determined. Cys, cystine.

Fig. 1. (A) Northern blot analysis of liver arylsulfatase (AS) mRNA from rats fed on 10% SPI diet for 5 weeks.

Five μ g of poly (A)⁺ RNA was electrophoresed on a 1.0% formaldehyde-agarose gel, blotted to nitrocellulose membrane and hybridized to the arylsulfatase oligomer probe. Exposure time was 22 h at -70°C . Arrows indicate arylsulfatase mRNAs: the upper, 3.5 kb; the lower, 0.8 kb.

(B) Slot-blot analysis of liver arylsulfatase mRNA.

Total RNA was isolated from livers of rats fed on laboratory chow (1), 10% casein diet (2), and 10% SPI diet (3) for 5 weeks after weanling. Fifty μ g of total RNA was applied with a manifold onto nitrocellulose membrane, hybridized to liver arylsulfatase oligomer probe, and autoradiographed.

は、固形飼料群に比べると逆にカゼイン飼料群、SPI 飼料群ともに減少傾向を示し 5 週間飼育実験と同じ結果を

Table 4. Effect of dietary casein and soybean protein isolate (SPI) on relative amounts of arylsulfatase (AS) mRNA in rat liver.

Diet	Arylsulfatase		Relative amounts of AS mRNA
	Activity (mU/mg protein)	Relative activity	
Laboratory	31.3	1.0	1.0 (<i>n</i> =2)
Casein	49.7	1.5	1.2 (<i>n</i> =2)
SPI	87.8	2.8	1.1 (<i>n</i> =2)

得た。

4. ノーザンブロットおよびスロットブロットによるアリスルファターゼ mRNA の定量

カゼイン飼料および SPI 飼料によるアリスルファターゼの酵素活性上昇の機構を詳細に検討するためにアリスルファターゼ mRNA のノーザンブロットを行った。種間で保存されたアミノ酸配列を選択して、オリゴマーを合成し、(γ -³²P) ATP でラベルしてプローブとした。Fig. 1A に示したように、アリスルファターゼ mRNA は 0.8 kb と 3.5 kb の二つの位置に観察された。各飼料で 5 週間飼育したラット肝臓より調製した 50 μ g の全 RNA を用いてスロットブロットを行いアリスルファターゼ mRNA の定量をした (Fig. 1B)。Table 4 にその結果を酵素活性と比較して示した。固形飼料群の mRNA 量を 1.0 とした場合、カゼイン飼料群で 1.2 倍、SPI 飼料群で 1.1 倍となり、酵素活性の増加と一致しないことがわかった。すなわちカゼインおよび SPI 飼料によるアリスルファターゼ活性の上昇は mRNA の合成増加を伴わないことを示すものである。

考 察

SPI は低含硫アミノ酸組成をもつタンパク質で、必須アミノ酸含量 (g/16 gN)⁶⁾ は次のとおりである。括弧内に対照としてカゼインのものをあげた。メチオニン 1.4 (2.9), シスチン 1.3 (0.65), バリン 5.1 (6.3), ロイシン 8.0 (9.1), イソロイシン 5.1 (5.2), リジン 6.5 (7.9), スレオニン 3.8 (4.1), トリプトファン 1.4 (2.5), フェニルアラニン 5.3 (4.7), ヒスチジン 2.6 (2.3), およびアルギニン 8.1 (3.7) となり, SPI の含硫アミノ酸の総量はカゼインの 75% である。

このような低含硫アミノ酸組成をもつ SPI 飼料で離乳直後のラットを数週間飼育すると, リソソームに局在し硫酸塩の代謝に関わるアリルスルファターゼ活性が上昇することを見いだした。この酵素はリソソーム内に A と B が存在し, その相違は, 等電点が異なり A は 3.4, B は 8.3 であり, また A は酵素反応速度論的に異常を示し, B 単独の測定は可能であるが, A 活性測定時には B 活性が重なってくるので両者を別々に測定するのは不可能である⁷⁾。量的にはラット肝臓内では A が 5% 弱, B が 95% 強を占める¹⁷⁾。このために低含硫アミノ酸組成の SPI 飼料で 3 週間飼育したラット肝臓で A と B のコンバインド活性と, B 単独の活性を測定してみると, 固形飼料またはカゼイン飼料に比べ A と B のコンバインド活性と, B 単独の活性ともに同じように増加しその量比は B 活性が 95% 強を占めた。この活性の上昇はカゼイン飼料で 5 週間飼育しても約 1.6 倍 (A と B コンバインド活性) に上昇し, SPI 飼料の 5 週間飼育でより顕著になり両飼料による活性上昇の機構に違いがみられるが, SPI 飼料にシスチンあるいはメチオニンを加えると 3 週間飼育で活性の上昇が押えられることより, 本酵素が細胞内での硫酸塩の代謝に関与し, その濃度により変動することが示唆される。

それでは, その変動のメカニズムとしてはどうなっているのだろう。

低タンパク質飼料であるカゼイン飼料で 3 週間飼育した場合, アリルスルファターゼ活性は固形飼料と同じレベルで活性の上昇はみられないが, 5 週間で約 1.6 倍 (A と B コンバインド活性) になった。発育期には数週間低タンパク質飼育を行うと, 含硫アミノ酸が第一制限アミノ酸となり, これから代謝される硫酸塩の不足が顕著になりこれを効果的に補うために, アリルスルファターゼ活性が代償的に上昇したと推定される。

SPI 飼料はカゼイン飼料に比べメチオニンが 50% 弱と低く, シスチンは約 2.0 倍と多いが, 全体でなお, 含硫アミノ酸は約 75% の充足率である。SPI 飼料飼育によりシステインの貯蔵タンパク質であるメタロチオネイ

ンおよびトリペプチドであるグルタチオンとともに著しく減少し⁵⁾⁸⁾, 硫酸塩の不足が顕著になっていることを示唆する。これらのことと肝臓システイン量は生後 3 週間で出生時期に比べ約 1/10 に激減する¹⁸⁾ことが重なりあうことが重要な活性上昇因子になり, アリルスルファターゼ活性の上昇が誘発されると思われる。これは SPI 飼料にシスチンを添加するとアリルスルファターゼ活性の上昇が抑えられることから推測される。この場合, 添加されたシスチンはタンパク質合成に回される以上に十分存在し, システインから硫酸塩の供給が十分に賄われるためと思われる。このときシスチン添加群は, 餌の摂取量が SPI 群の 70% に落ち込むが, タンパク質効率 (PER) の値は SPI のものと同じで約 2.2 となる。このためアリルスルファターゼ活性の低下はシスチン添加 SPI 飼料の摂取量の低下に起因する可能性は少ないと考えられる。

低タンパク質飼育時は, ホモシステインからメチオニンへの合成型へ, またグルタチオンが分解型に傾きシステインへの合成型へと代謝が進む。10% SPI 飼料は低タンパク質でさらにメチオニン含量が少ないのでこのアミノ酸のシステインへの供給は少なく, 硫酸塩への寄与率はさらに少なくなると考えられる。一方, システインはグルタチオンから補給されるが, システインは生後 3 週間で肝臓から激減しさらに, 総含硫アミノ酸はカゼインの 75% と低いので, 細胞内硫酸塩濃度の上昇への寄与率も少ないと考えられる。

メチオニンからシステインへの代謝の律速段階の酵素の一つであるシスタチオナーゼ活性は, ラット肝臓では生後 4 週間で成熟ラットのレベルに達する¹⁶⁾が, 低タンパク質飼育時はこの活性は著しく低下する。このため SPI 飼料へのメチオニンとシスチンの添加効果の差はこの酵素活性の変動に起因するとは考えにくい。

メチオニンの添加は, このアミノ酸が低タンパク質飼料による長期の飼育のため第一制限アミノ酸となっているので, タンパク質合成により多く使われ, シスチンの添加ほど細胞内の硫酸塩の増加に至らず, アリルスルファターゼ活性の上昇の抑制がシスチン添加よりも劣るものと思われる。

両アミノ酸の添加効果, つまり本酵素活性に影響するのは, シスチンまたはメチオニンにかかわらず, 細胞内総硫酸塩濃度だと考えられる。これは (1) シスチン添加でもメチオニン添加でもアリルスルファターゼ活性は低下すること, (2) SPI 飼料とカゼイン飼料のアミノ酸組成の比較からシスチンの割合だけが高くても, 総含硫アミノ酸の含量が低いと本酵素活性が低下すること, この 2 点から理解できる。メチオニン添加もシスチン添加もどちらも硫酸塩の補給には差はないと考えられる。しかし,

量的な問題としてメチオニン添加の場合は、タンパク質効率が増し細胞内総硫酸塩濃度の増加に対する寄与率は、シスチン添加よりも少ないと考えられる。

含硫アミノ酸の少ない SPI 飼料で離乳期より数週間ラットを飼育すると、肝臓グルタチオンが対照のレベルの 20% に減少する一方、この代謝酵素である肝臓 GGT 活性が約 5 倍に増加することが報告されている⁵⁾がこの上昇の詳しいメカニズムはいまだわかっていない。一方、SPI 飼料による脂肪酸合成系の酵素活性の減少が報告されているが、mRNA の量に変化を与えず、翻訳の過程の減少として報告されている⁴⁾。SPI 飼料による本アリルスルファターゼ活性の上昇はドットプロット法で mRNA の合成増加を伴わないことが示された。つまりアリルスルファターゼ活性の上昇の機構は酵素の活性化、または阻害剤の有無による可逆的調節、さらに翻訳の過程によるタンパク質合成量の増加か、分解量の減少か、または、両者のバランスによる。一般にアリルスルファターゼ活性はリン酸イオンと硫酸イオンに強く阻害される¹⁸⁾。含硫アミノ酸の添加により肝臓内の硫酸塩濃度が上昇して活性が抑えられる可能性も考えられることから、予備実験として各サンプルを透析してその活性を測定したが、活性が変わることはなかった。このことから低分子による直接の酵素の活性化、または阻害はないと考えられる。対照実験として測定したリソソームアリルアミダーゼ活性は各飼料群間で差はなくむしろ減少した。このことからリソソーム自身の分解の遅れによるアリルスルファターゼ活性の上昇の可能性は否定される。これらの事実から、アリルスルファターゼ活性の上昇の機構は、硫酸塩の不足がシグナルとなり何らかの形で mRNA の翻訳の過程の増加によるタンパク質合成量の増加を伴うことが示唆される。

細胞内での硫酸塩の重要さはウニ胚の発生の胚胞期以降は硫酸イオンが不可欠であることからわかる¹⁹⁾。本実験からも推測されるがその不足は種々の硫酸塩の代謝に関する酵素の変動を引き起こす。低含硫アミノ酸組成をもつ SPI 飼料によるリソソームアリルスルファターゼ活性の上昇の生理的意味としては、発育期の動物に顕著に現れる硫酸塩の不足を効果的に補うための代償作用と思われる。アリルスルファターゼの生理的な役割として種々の報告があり^{20)~22)}、生理的な変動ではエイジングに関する報告があるが²³⁾、本実験により栄養条件の差によるアリルスルファターゼ活性の変動が確認された。

要 約

離乳直後のウイスター系雄性ラットを固形飼料、10% カゼイン飼料、あるいは 10% SPI 飼料で 5 週間飼育して、低含硫アミノ酸飼料の肝臓アリルスルファターゼ活

性に及ぼす影響について調べた。

1) A と B のコンバインド活性でみると、固形飼料群は 3、5 週間ともに約 32 mU/mg protein で差がなく、カゼイン飼料群では 3 週間飼育のものは固形飼料群と差がないが、5 週間飼育すると、活性は約 50 mU/mg protein となり固形飼料群のものより約 1.6 倍に上昇した。一方、SPI 飼料群のものは、3 週間で約 64 mU/mg protein となり固形飼料群の約 1.9 倍、5 週間で約 88 mU/mg protein となり約 2.8 倍に活性が上昇した。アリルスルファターゼ B 活性についても同じ増加の結果を得た。この活性上昇はシスチンまたはメチオニンの SPI 飼料への添加で抑制された。

一方、同じリソソーム内酵素であるアリルアミダーゼ活性は 3 週間、および 5 週間飼育では固形飼料群に比べ、カゼイン飼料群および SPI 飼料群の活性は低下した。

2) ノーザンプロットおよびスロットプロットの結果、5 週間飼育ラット肝臓から得られた固形飼料群の mRNA の量は、これを 1 とすると、カゼイン飼料群で約 1.2 倍、SPI 飼料群で約 1.1 倍となり差はなかった。

文 献

- 1) 菅野道廣：栄養誌，40，93 (1987)
- 2) 山本孝史，井上五郎：栄養誌，44，155 (1991)
- 3) Shinjo, S., Asato, L., Arakaki, S., Kina, T., Kohrin, T., Mori, M. and Yamamoto, S.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38, 247 (1992)
- 4) Iritani, N., Nagashima, K., Fukuda, H., Katsurada, A. and Tanaka, T.: *J. Nutr.*, 116, 190 (1986)
- 5) Taniguchi, M. and Inoue, M.: *J. Biochem.*, 100, 1457 (1986)
- 6) Taniguchi, M. and Cherian, M.G.: *Br. J. Nutr.*, 63, 97 (1990)
- 7) Worwood, M., Dodgson, K.S., Hook, G.E.R. and Rose, F.A.: *Biochem. J.*, 134, 183 (1973)
- 8) Mahadevan, S. and Tappel, A.L.: *J. Biol. Chem.*, 242, 2369 (1967)
- 9) Little, G.H., Starnes, W.L. and Behal, F.J.: *Methods Enzymol.*, 45, 495 (1976)
- 10) Goldbarg, J.A. and Rutenburg, A.M.: *Cancer*, 11, 283 (1958)
- 11) McDonald, R.J., Swift, G.H., Przybyla, A.E. and Chirgwin, J.M.: *Methods Enzymol.*, 152, 224 (1987)
- 12) Sasaki, H., Yamada, K., Akasaka, K., Kawasaki, H., Suzuki, K., Saito, A., Sato, M. and Shimada, H.: *Eur. J. Biochem.*, 177, 9 (1988)
- 13) Yamada, K., Akasaka, K. and Shimada, H.: *Eur. J. Biochem.*, 186, 405 (1989)
- 14) Sambrook, D., Fritsch, E. and Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), Cold Spring Harbor Lab. (Cold Spring Harbor)
- 15) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Ranball, R.J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 16) 安房田司郎，中山和子，三笠洋明，児玉裕敬：含

- 硫アミノ酸, 7, 407 (1984)
- 17) Hook, G.E.R., Dodgson, K.S., Rose, F.A. and Worwood, M.: *Biochem. J.*, 134, 191 (1973)
 - 18) Carlson, R.W., Downwing, M. and Tolbert, B.M.: *Biochemistry*, 16, 5221 (1977)
 - 19) 赤坂甲治, 山田一美, 嶋田 拓: 生化学, 64, 485 (1992)
 - 20) Thompson, D.B. and Daniel, W.L.: *Enzyme*, 37, 134 (1987)
 - 21) Mumma, R.O. and Verlangieri, A.J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 273, 249 (1972)
 - 22) Uchida, T., Egami, F. and Roy, A.B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 657, 356 (1981)
 - 23) Ferland, G., Perea, A., Audet, M. and Tuchweber, B.: *Mech. Aging Dev.*, 56, 143 (1990)

(1993 年 1 月 22 日受理)