- (14) MALY: *Monatsh.*, 11, 828 (1890).
 (15) CHAPMANN & MACKAY: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 26, 360 (1949).

Summary

To discover new, useful antioxidants for fats and oils, we selected the sulfur-containing compounds as antioxidants and methyl oleate as the substrate. To compare the effectiveness of used reagents, we examined the quantities of oxygen uptake using the Warburg respirometer's at 30°.

As sulfur-containing compounds, thiourea and its related substances were used such as *S*-methylisothiurea sulfate, phenylthiourea, *N,N*-diphenylthiourea, *sym.*-diphenylthiourea, tetraphenylthiourea, rubeanic acid, thioanilide, rhodamine, mercaptobenzothiazole, thiophenol, cysteine, cystine, thioglycolic acid, thioacetic acid, anhydrous sodium sulfite and sodium thiosulfate.

The following results were obtained:

- 1) Among these sulfur-containing compounds, *sym.*-diphenylthiourea, *S*-methylisothiurea sulfate and anhydrous sodium sulfite inhibited the autoxidation almost completely, while thiourea, *N*-phenylthiourea and thioanilide showed rather remarkable acceleration for autoxidation.
- 2) Comparing the action of *sym.*-diphenylthiourea with that of hydroquinone, the normal antioxidant, the former showed higher effectiveness under our experimental conditions.
- 3) Although thiourea promoted the autoxidation markedly, urea inhibited the autoxidation distinctly.
- 4) In these experiments, no general relations were found between the effectiveness of antioxidants and the chemical constitutions of sulfur-containing compounds beyond expectation.

體肉蛋白質の生成に関する生化學的研究

(第1報) トリプトファン缺乏と筋肉蛋白質アミノ酸組成との關係

神 立 誠, 有 吉 修 二 郎 (東京大學農藝化學教室)

昭和 26 年 2 月 10 日 受理

Biochemical Studies on the Formation of Muscle Protein. Part 1. Amino

Acid Content of Muscle Protein of Tryptophan-deficient Rats.

By Makoto KANDACHI and Syujiro ARIYOSI (Department of

Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

體内の生成、就中蛋白質の生成する機作を明かにすることは、食肉の生産に重大な關係を有するので、先ず飼料のアミノ酸組成と體肉蛋白質アミノ酸組成との關係から問題をとりあげた。飼料と筋肉蛋白質のアミノ酸組成の關係については、E. G. SCHENCK and H. WOLLSHITT⁽¹⁾が飢餓によつて筋肉蛋白質のトリプトファン含量が減少する事を白鼠について實驗しているが、W. C. LEE⁽²⁾は飼料をかえて飼育しても、筋肉蛋白質中のチロジン、トリプトファン、シスチン量に變化がないことを示し McCOLLUM⁽³⁾はこの見解を支持している。A. ROCHE⁽⁴⁾は飢餓及び蛋白質飢餓の白鼠の筋肉蛋白質の窒素分布をしらべ、蛋白質飢餓により、デアミノ酸、トリプトファン、チロジンが減少することを報告している。トリプトファン缺乏と筋肉蛋白質のアミノ酸組成との關係については記載が見當らない。そこで蛋白質飢餓の場合と、トリプトファン缺乏とを同時に實驗した。

實 驗 の 部

1. 動物飼育 飼料は第2表

Table 1. Tryptopan Content of Muscle Protein

Author	Normal	Treated
E. G. SCHENCK <i>et al.</i> ⁽¹⁾	0.81~0.84	0.16~0.67 (Hunger)
W. C. LEE <i>et al.</i> ⁽²⁾	1.14	1.16 (Fasting)
A. ROCHE ⁽⁴⁾	1.77	1.39 (Fasting)
Authors	1.45	1.35 (Protein deficient)

に示す配合とした。澱粉は市販の精製品。バター脂はバターを熔融後遠心分離し、熱蒸溜水で1回洗滌したものを用いた。カゼイン加水分解物はカゼインを常法により硫酸で加水分解し、バリタで硫酸を除き、更に硫酸でバリタを精密に除去した液を減壓濃縮し、餅狀となつたものを用いた。このものはトリプトファンの反應を示さな

い、動物は教室保存の白鼠を用い、2代前より飼料の蛋白質量が適当であるように注意した。試験には離乳後主として粉乳及び澱粉で飼育した雄を用いた。生後178~188日のものを4頭1区として試験を開始し、第2表の飼料に約3倍量の水を加えて加熱糊化させたものを、水と共に無制限に與へた。第2区及び第3区では期間中15~20gの體重減少を示し、對照区は10~15gの體重増加を示した。

第2区では試験末期に食欲の不振を示した。23~24日目に屠殺した。方法はエーテルクロホルムで麻酔し、頸動脈を切斷し、放血し死に致らしめた。

2. 筋肉蛋白質の調製 先ず頸動脈を切斷した後直ちに皮をはぎ、放血完了後後肢及び背の筋肉をはずした。この中には内股筋、外股筋、二頭股筋、大臀筋の一部、長背筋その他を含み、腓腸部以下の小さい筋肉はとらなかつた。以下大要 JANNEY⁽⁶⁾ に従つて次の操作を行つたが、この操作によつて水溶性の窒素は事實上なくなる。即ちはずした筋肉は直ちに細片として96%アルコール中に投入して置き、全部の解剖が終つてから、更に細かく切り、アセトンで處理して大部分の脂肪を去り、蒸留水で3回洗滌後アセトンで脱水し、風乾した後アルコール5%を含むエーテルで48時間抽出する。抽出の終つたものを風乾して乳鉢でよく碎いて粉狀にして分析に供した。

3. アミノ酸の定量 全窒素はキエルダール法、全磷は FISKE and SUBBAROW 法⁽⁷⁾、全硫黄は R. J. BLOCK⁽⁷⁾ の記述によつてそれぞれ定量した。別に試料を6N H₂SO₄で24時間加水分解した液につき VAN SLYKE 法に従つて各態窒素を定量した。但しアミノ態窒素は POPE and STEVANS⁽⁸⁾ 法により、ヒスチヂンは KAPPELLER-ADLER⁽⁹⁾ により定量し、デアミノ酸區の全窒素より、ヒスチヂン、アルギニン、シスチン(1部)の窒素を差引いてリジン算出した。他にチロジン、トリプトファン、フェニルアラニンは R. J. BLOCK⁽⁷⁾ に従つてそれぞれ FOLIN and MARENZI⁽¹⁰⁾ 改良法及び KAPPELLER-ADLER⁽¹¹⁾ 改良法を用いて定量した。シスチンは B. KASSEL⁽¹²⁾ に従い、メチオニンは A. A. ALBANESE⁽¹³⁾ に従つて定量した。各の値を蛋白質に對する百分率(第3表)及び全窒素に對する窒素の百分率(第4表)で示す。

各區の値を平均値と比較し、F分布を利用して檢定した結果を第5表に示す。尙0区は全然別の時期に同腹の鼠について分析した値である。

實驗結果及び考察

實驗の結果をまとめると次の如くである。

(1) 動物飼育の結果については、第2区、及び第3区では體重の減少が著明であり、それぞれトリプトファン缺乏及び蛋白質缺乏の影響が表れたと考えられる。解剖から、蛋白質の調製に至る操作は均一の條件で行つたから、分析の値に表われた各試験區による差は榮養條件によるものとして考える。

(2) 白鼠の筋肉蛋白質の全窒素は從來數頭分の平均値のみが記載されているので、個體間の變動、或いは蛋白質調製の操作による變動がどのくらいあるのかは不明であつた。A. ROCHE⁽⁴⁾は10頭平均で16.31、個々の値の上限及び下限15.09~17.38と云う値を出しており、相當の變動がある事が推測されるが、著者等の實驗によつても大きな變動があることがわかつた。これは同腹の鼠についても同様である。この事は從來何等の説明がなされていないが、生體自身と蛋白質の調製過程の兩方に變動の原因があるように思われる。フミン態窒素、アンモニア態窒素に意外に大きな變動がある事と共に、今後更に確かめるつもりである。

(3) 蛋白質缺乏區では對照區に比してモノアミノ酸が増加し、デアミノ酸が減少している。デアミノ酸ではヒスチヂン、リジンが減少し、モノアミノ酸ではチロジン、トリプトファンが減少した。これらは A. ROCHE⁽⁴⁾の實驗結果に表われた傾向とよく一致している。但し、値の絶對値については相當の差がある。

(4) トリプトファン缺乏區の分析値で目立つ事は、筋肉蛋白質のトリプトファン含量が對照區及び蛋白質缺乏區に比べて低い事である。モノアミノ酸：デアミノ酸比が、對照區に比し高くなつてゐる事は、蛋白質缺乏區と同様であるが、トリプトファンの値とは逆に、その程度は、蛋白質缺乏區より少い。

Table 2. Composition of Diet (%)

Group No.	1	2	3
Starch	65	65	75
Protein	20	20	0
	(Casein)	(Casein Hydrolysate)	
Butter Fat	10	10	20
Mc COLLUM Salt Mix. No. 185	5	5	5
Per head per day	Thiamin 50γ, Riboflavin 75γ, Niacin 75γ, Pyridoxin 10γ, Panthothenic acid 100γ		

Table 3. Amino Acid Content of the Muscle Protein. (In dry matter per cent)

Group No.	Animal No.	At the beginning	At the time of dissection	Dry Matter	Total N	Total P	Total S	Acid-insoluble Humin N	Humin N	Ammonia N	Monosaccharide Total N	Monosaccharide α -Amino N	Diamino acid Total N	Diamino acid α -Amino N	Arginine	Histidine	Lysine	Tyrosine	Tryptophan	Phenylalanine	Cysteine	Methionine
0-02	—	255	—	89.73	16.09	0.22	1.13	0.17	1.42	1.36	8.19	7.94	4.52	1.67	6.47	1.67	10.31	3.85	1.41	4.05	1.24	3.49
0-04	—	250	—	89.60	16.53	0.23	1.07	0.17	1.28	0.70	9.13	8.39	4.99	2.04	6.78	1.70	12.22	3.82	1.50	4.15	1.18	3.26
0-2	—	195	—	88.08	16.03	0.23	1.16	0.11	1.55	0.76	8.62	7.90	4.76	1.92	6.74	1.69	11.15	3.77	1.49	3.91	1.26	3.67
0-4	—	193	—	88.31	16.27	0.25	1.13	0.11	1.32	0.91	8.55	7.65	4.67	1.78	6.58	1.67	10.96	3.69	1.45	4.08	1.19	3.58
Av.				88.93	16.23	0.23	1.12	0.14	1.39	0.93	8.62	7.97	4.74	1.85	6.64	1.68	11.16	3.78	1.46	4.05	1.22	3.50
1-23	246	252		88.27	15.96	0.22	1.16	0.04	1.00	1.31	8.60	8.12	4.54	1.97	6.01	1.68	11.27	3.65	1.43	3.86	1.23	3.67
1-15	243	256		88.12	15.58	0.22	1.15	0.06	0.89	0.89	8.42	8.02	4.62	1.77	5.81	1.67	11.97	3.55	1.45	4.12	1.13	3.28
1-8	215	238		88.00	16.32	0.26	1.10	0.05	1.26	0.98	9.21	8.26	4.97	2.08	6.49	1.67	12.59	3.94	1.46	3.89	1.15	3.35
1-9	246	255		88.25	16.45	0.28	1.11	0.05	0.86	1.04	9.18	8.16	4.99	2.14	6.49	1.72	12.70	3.44	1.44	4.14	1.18	3.48
Av.	238	250		88.16	16.08	0.24	1.11	0.05	1.00	1.06	8.85	8.14	4.78	1.99	6.12	1.69	12.13	3.65	1.45	4.00	1.17	3.45
2-13	229	214		88.20	16.25	0.20	1.07	0.05	1.01	0.87	9.35	8.22	4.65	1.65	6.97	1.72	10.35	3.78	1.23	3.69	1.21	3.21
2-24	248	233		88.73	16.26	0.22	1.17	0.18	1.04	0.95	9.01	8.32	4.41	1.57	6.03	1.64	10.59	3.82	1.24	4.12	1.14	3.71
2-25	252	235		88.67	16.22	0.19	1.12	0.16	1.10	0.97	9.43	8.61	4.67	1.57	6.66	1.69	11.08	3.68	1.22	3.93	1.19	3.50
2-17	215	190		89.50	16.13	0.24	1.09	—	0.90	0.81	9.49	8.41	4.87	1.61	6.96	1.69	11.49	3.58	1.17	4.19	1.15	3.45
Av.	236	218		88.78	16.22	0.21	1.11	0.13	1.01	0.90	9.32	8.39	4.65	1.60	6.66	1.66	10.88	3.77	1.22	3.99	1.17	3.47
3-14	246	215		87.81	16.29	0.19	1.10	0.10	1.19	0.68	9.57	8.49	4.33	1.58	6.00	1.45	8.76	3.50	1.37	4.01	1.14	3.45
3-7	235	206		88.11	16.21	0.17	1.05	0.16	1.48	0.77	9.34	8.33	4.30	1.57	6.87	1.40	8.82	3.60	1.39	3.97	1.13	3.22
3-26	223	195		88.67	16.45	0.18	1.11	0.11	1.01	1.01	9.24	7.81	4.16	1.53	5.99	1.39	8.62	3.45	1.27	3.57	1.27	3.38
3-16	210	189		87.43	16.11	0.19	1.16	0.12	1.31	0.92	9.62	8.62	4.39	1.67	6.90	1.25	9.54	3.50	1.35	4.00	1.31	3.66
Av.	229	201		88.01	16.27	0.18	1.11	0.12	1.22	0.85	9.44	8.31	4.30	1.59	6.44	1.37	8.66	3.51	1.35	3.89	1.21	3.43

Table 4. The Nitrogen Distribution of the Muscle Protein. (Per cent in total nitrogen)

Group No.	Animal No.	Total P	Total S	Acid-insoluble Humin N	Humin N	Ammonia N	Monosaccharide Total N	Monosaccharide α -Amino N	Diamino acid Total N	Diamino acid α -Amino N	Arginine N	Histidine N	Lysine N	Tyrosine N	Tryptophan N	Phenylalanine N	Cysteine N	Methionine N
0	02	1.35	7.02	0.94	7.91	7.34	50.87	10.36	1.85	4.5	12.93	2.85	12.28	1.85	1.20	2.14	0.90	2.04
0	04	1.39	6.47	0.85	6.99	3.80	55.21	50.73	30.17	12.34	1.83	4.1	13.20	2.79	14.17	1.79	0.83	1.85

0	2	1.45	7.24	0.58	8.50	4.20	53.79	49.27	29.72	11.98	1.81	4.1	13.52	2.86	13.33	1.82	1.28	2.07	0.92	2.15
0	4	1.55	6.95	0.58	7.14	4.93	52.54	47.00	28.71	10.93	1.83	4.3	13.01	2.78	12.91	1.75	1.22	2.13	0.85	2.07
	Av.	1.44	6.92	0.74	7.64	5.07	53.10	48.39	29.17	11.40	1.83	4.3	13.17	2.82	13.17	1.81	1.24	2.12	0.87	2.03
1	23	1.37	7.27	0.22	6.35	8.27	54.48	51.43	28.88	12.34	1.89	4.2	12.25	2.89	13.74	1.77	1.26	2.05	0.96	2.16
1	15	1.39	7.38	0.35	5.71	5.34	53.93	51.34	29.57	11.38	1.82	4.6	12.11	2.90	14.56	1.76	1.27	2.25	0.85	1.98
1	8	1.59	6.74	0.74	7.63	5.94	55.94	50.07	30.18	12.76	1.86	3.9	12.80	2.75	14.63	1.87	1.22	2.02	0.82	1.93
1	9	1.68	6.75	0.29	5.25	6.33	55.78	49.45	30.31	12.98	1.84	3.8	12.69	2.83	14.79	1.79	1.20	2.13	0.84	1.99
	Av.	1.51	7.04	0.40	6.24	6.47	55.03	50.57	29.74	12.37	1.85	4.1	12.46	2.84	14.43	1.80	1.24	2.11	0.87	2.02
2	13	1.25	6.58	0.30	6.19	5.34	57.57	50.61	28.64	10.05	2.01	5.0	13.81	2.62	12.21	1.77	1.03	1.93	0.87	1.85
2	24	1.34	7.20	1.12	6.40	5.87	55.44	51.18	27.15	9.58	2.04	5.4	11.93	2.73	12.49	1.82	1.04	2.15	0.82	2.14
2	25	1.19	6.91	0.95	6.75	5.95	58.19	53.04	29.14	9.67	2.00	5.5	13.22	2.83	13.09	1.81	1.03	2.06	0.86	2.02
2	17	1.48	6.76	—	6.80	5.03	58.86	52.11	30.18	9.97	1.95	5.2	13.88	2.84	13.66	1.73	1.00	2.21	0.83	2.00
	Av.	1.32	6.86	0.79	6.54	5.55	57.57	51.76	28.78	9.82	2.00	5.3	13.21	2.76	12.86	1.78	1.03	2.09	0.85	2.00
3	14	1.16	6.75	0.61	7.31	5.00	58.74	52.18	26.57	9.68	2.21	5.4	13.85	2.41	10.31	1.66	1.15	2.09	0.95	2.01
3	7	1.04	6.48	0.97	9.13	3.73	57.65	51.33	26.57	9.69	2.17	5.3	13.79	2.35	10.43	1.72	1.18	2.08	0.82	1.87
3	26	1.08	6.75	0.72	6.65	6.71	56.17	51.70	25.30	9.28	2.22	5.6	12.77	2.49	10.05	1.62	1.06	1.84	1.02	1.93
3	16	1.20	7.20	0.75	8.14	5.70	59.68	53.50	27.25	10.36	2.19	5.2	13.79	2.11	11.35	1.68	1.15	2.11	0.95	2.11
	Av.	1.12	6.80	0.76	7.81	5.29	58.06	52.18	26.32	9.75	2.20	5.4	13.55	2.34	10.54	1.67	1.14	2.03	0.94	1.98

Table 5 Examination of the Differences between the Mean Values of Each group.

Values	Groups			Values	Groups		
	0 & 1	1 & 2	1 & 3 2 & 3		0 & 1	1 & 2	1 & 3 2 & 3
Total N							
Total P							
Total S							
Acid-Insoluble Humin N							
Humin N							
Ammonia N							
Monocamino acid, Total N							
Monocamino acid, α -Amino N							
Diamino acid, Total N							
Diamino acid, α -Amino N							
Monocamino acid Total N/ Diamino acid Total N							

○ ○ : The differences of these two groups are significant.

(Level of significance = 1%)

(5) 全硫黄及び含硫アミノ酸は各區で差がない。全磷は蛋白質缺乏區で減少しているらしいが明瞭ではない。以上の實驗結果より次の事が考えられる。

(1) 上記の如くして調製固定された蛋白質は、生活細胞としての筋肉細胞が、蛋白質を合成し、分解する過程の一断面であり、各アミノ酸の増加又は減少は、それ等の代謝の總決算として考える事ができる。そこでトリプトファン缺乏という點では第2區及び第3區は同じ條件であるにも拘らず、アミノ酸組成の變化の様相が異なる事實から、A. ROCHE⁽⁴⁾の考えを次のように擴張する事ができよう。A. ROCHE⁽⁴⁾は蛋白質缺乏による筋肉蛋白質のアミノ酸組成の變化に對して、「蛋白質飢餓に際して筋肉から取り去られた蛋白質のアミノ酸組成が、筋肉に残った蛋白質のアミノ酸組成と異なるか、又は筋肉蛋白質のペプチド連鎖が切れて特定のアミノ酸がとり出される可能性もある。」と述べているが、以上の事實によれば、缺乏に際してとり出される蛋白質には何種類かあつて、缺乏するアミノ酸の種類に従つて、それ等が異なる割合で分解した事が、總計としては考えられる。家兎の筋肉の分析例でトリプトファン及びリジン含量がそれぞれミオゲン 1.51% 及び 11.3%, ミオシン 0.82% 及び 10.3%と云う例は以上の推測の可能性を示している。なお A. ROCHE⁽⁴⁾の二番目の推測についても、いろいろな場合におけるリジンの特別な役割、例えば營養失調症等に對する效果などを考えれば、以上の實驗結果と矛盾するものではない。

(2) この實驗ではトリプトファン缺乏及び蛋白質缺乏によつて、筋肉が不可逆的な質的變化を來している疑もあるが、動物の狀態及び筋肉の外観等より見て、その可能性は少いものとする。

(3) 筋肉蛋白質の既往の分析成績が研究者によつて著しく異なる原因の一部として、試料を採取した動物の營養狀態の相違が考えられるが、本實驗の如き極端な場合でもその組成の變動はごくわずかであり、實際には殆ど起り得ないような條件であるので、分析値の研究者による不一致の原因は他に求められなければならない事が明かとなつた。

附記：本研究費の一部は文部省科學研究費によつた。記して謝意を表する。

- (1) E. G. SCHENCK and H. WOLLSCHITT : *Arch. exp. Path. u. Pharm.*, 170, 151 (1933) ; E. G. SCHENCK : *Biochem. Z.*, 211, 111 (1932).
- (2) W. C. LEE, H. B. LEWIS : *J. Biol. Chem.*, 107, 649 (1934).
- (3) MC COLLUM : *Newer Knowledge of Nutrition*, 1941.
- (4) A. ROCHE : *Compt. Rend.*, 197, 279 (1933) ; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 15, 1920 (1933) ; 16, 257, 270 (1934).
- (5) N. W. JANNEY : *J. Biol. Chem.*, 25, 177 (1916).
- (6) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW : *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925).
- (7) R. J. BLOCK : *The determination of amino acids*. 1940.
- (8) C. G. POPE and M. F. STEVANS : *Biochem J.*, 33, 1070 (1939).
- (9) R. KAPPELLER-ADLER : *Biochem. Z.*, 264, 131 (1933).
- (10) O. FOLIN and A. D. MARENZI : *J. Biol. Chem.*, 83, 89 (1929).
- (11) R. KAPPELLER-ADLER : *Biochem. Z.*, 252, 185 (1932).
- (12) B. KASSEL and E. BRAND : *J. Biol. Chem.*, 125, 115 (1938).
- (13) A. A. ALBANESE, J. B. FRANKSTON, and V. IRBY : *J. Biol. Chem.*, 156, 293 (1944).

Summary

(1) The amino acid content of muscle protein prepared from protein-deficient and tryptophan-deficient rat was determined.

(2) The tryptophane content of the muscle protein was lower in tryptophane-deficient rats than in protein-deficient rats, and it was lower in protein-deficient rats than in control animals.

(3) Diamino acids : monoamino acids ratio and lysine content of muscle protein were lower in protein-deficient rats than in tryptophane-deficient rats, and they were lower in tryptophane deficient rats than in control animals.

(4) Tyrosine and histidine contents of muscle protein were lower in protein-deficient rats than in the control. The protein deficiency affected the muscle protein of rats in the same manner as stated by A. ROCHE⁽⁴⁾.