白鼠の成長と代謝 (第3報)*

成長と酵素の活性度 (その2)

吉田 昭, 天野日出男, 芦田 淳 (名古屋大学農学部食品栄養化学教室)

昭和 31 年 5 月 12 日 受理

著者等は前報⁽¹⁾において白鼠の成長時期と肝臓中の xanthine oxidase, choline oxidase 及び succinic dehydrogenase の活性度の関係について調べ、前の 2 つの酵素の活性度は幼時から成長するにつれて増大し、雄鼠においては体重 160~170 g, 雌鼠では 120~130 g の時に最大に達し、後次第に減少するが succinic dehydrogenase の活性度は成長時期によつて変化しないことを認めた。このように酵素の種類によつてその活性度の変化の様相が異なるので、更にこの研究を進める為今回は次の諸酵素、即ちエネルギー代謝に重要な意義をもつと思われる adenosine triphosphatase (ATPase), 核酸の分解過程に関与するといわれる 5'-nucleotidase 及び蛋白質の合成或は細胞分裂との相関性がしばしば問題にされる alkaline phosphatase⁽²⁾ について、各育成段階にある白鼠の肝臓の homogenate でこれら諸酵素の活性度を測定した。

これら酵素の活性度と成長の関係を明かにすることは、成長時期による栄養素要求量の変化を決定するための一資料を提供すると同時に、外的条件により体内代謝を変えるための基礎的研究として必要である。

実 験

実験に使用した動物は Wistar 系の白鼠で 3~5 匹づつ 1 つの木箱に入れて飼い、飼料の組成は、小麦 25%, とうもろこし 15%, 大豆粕 10%, 米糠 10%, 糠 10%, 魚粉 15%, 蛹粉 1%, 育雛用配合飼料 12%, 食塩 1%, 炭酸石灰 1%, これに 3 倍に希釈した牛乳と少量の野菜を与えたものである。これらの白鼠の中から種種の育成段階にあるものを選び酵素の活性度測定に供した。最も小さなものは生後 10 日目であつた。鼠は撲殺後速かに肝臓を摘出し濾紙で血液を出来るだけ拭きとり、適当量をトーションバランスで秤りとり、氷冷しつつ蒸留水を加えて 30 秒 Waring blender にかけて homogenate を作り、これを酵素液として反応系に加えた。

測定は次のような反応組成で行つた。

ATPase : DU BOIS, POTTER^(3,4) の方法に準じ 0.05 M barbital acetate buffer (pH 7.4) 0.4 ml, 基質としては 0.020 M の ATP-Na₄ (Pabst Laboratory Wis 製) 0.2 ml, 賦活剤には 0.04 M CaCl₂ 0.05 ml, 水 0.05 ml, homogenate は 3% のもの 0.1 ml を加え、反応時間は 15 分とした。

5'-Nucleotidase : G. ASHWELL, J. HICKMAN の方法⁽⁵⁻⁷⁾に準じ、0.025 M barbital buffer (pH 8.9) 0.35 ml, 基質は 0.0035 M 5'-アデニール酸 (Nutritional Biochemicals Corp. Cleveland Ohio 製) 0.5 ml, 賦活剤には 0.04 M MgCl₂ 0.05 ml, homogenate は 2% のもの 0.1 ml を加え、反応時間は 30 分とした。

Alkaline phosphatase : O. ROSENTHAL 等の行つている方法⁽⁸⁾に準じ、0.1 M barbital buffer (pH 9.3) 0.2 ml, 基質は 0.1 M Na-β-glycerophosphate (片山化学製) 0.2 ml, 賦活剤には 0.04 M MgCl₂ 0.2 ml, homogenate は 10% のもの 0.4 ml を加え反応時間は 60 分とした。

上記反応はいずれも 37° の恒温槽で行い、温度平衡に達するまで即ち反応開始前 5 分間、homogenate とそれ以外の反応混液を別別に incubate した。それぞれの反応時間が経過した時、15% trichloroacetic acid 1 ml を注入して反応を止め、直ちに 3000 r.p.m. 10 分の遠心分離を行い、その上澄液について基質から遊離した無機磷酸を ALLEN⁽⁹⁾ 法で測定した。比色定量には島津製作所 AKA-50 型光電比色計でフィルター S72 を用いて吸光度を測定した。酵素の活性度はいずれも反応時間内に単位重量 (wet base) の肝臓が遊離させる磷酸を磷の量をもつて表わした。

なお体重 25 g 以下の仔鼠では肝臓の量が少いので 3~5 匹を一まとめにして測定した。

又窒素の定量は、白鼠の肝臓についてはその値が単位重量当りでほぼ一定していることがすでに知られている⁽¹⁾ので特に行わなかつた。

* Studies on Growth and Metabolism in Rat. Part III. Relationships between Growth and Enzyme Activities (2)

By Akira YOSHIDA, Hideo AMANO and Kiyoshi ASHIDA (Laboratory of Food and Nutrition, Faculty of Agriculture, Nagoya University.)

結 果 及 び 考 察

成長に伴う ATPase の活性度の変化は第 1 図に示す如くで、生れて直後はかなり高く体重 10g, 生後 10 日位のもので 4.2 mg P 位であるが、体重 39g 生後約 25 日のものでは 2.0 mg P と急激な減少を示し、それ以後は漸次増加の傾向をたどる。

B. GRAD 等⁽¹⁰⁾によると、鼠の成長と呼吸による酸素消費量の関係は生後急激に増加して、20 日位で極大に達し以後減少する。この際 25 日位で一度極少値になると述べているが、いずれにしても全体として減少の傾向にある。このことと ATPase 活性度を比較すると丁度逆の関係にあり、酸素消費量の極大になる頃に ATPase の活性度は極少値をとると思われる。

第 1 図 ATPase の活性度
×……♂ ●……♀ △……識別せず

第 2 図 5'-Nucleotidase の活性度
×……♂ ●……♀ △……識別せず

又体重増加率曲線即ち成長曲線の導函数は、生後次第に上昇し、ATPase 活性度の極小に達する頃に最大となり、以後かなりの間一定値をとつてからゆるやかに減少する。それ故体重増加率の大きい時は体蛋白質等の合成が盛んになるのであるから、それに使われる ATP の量が多くなり、そのまま分解される量が少くなる。そのための生理的調節の機能として ATPase 活性度が抑えられているのではないかと想像される。

この事については oxidative phosphorylation を測定し更に明かにしたいと考えている。

尚 ATPase の活性剤に関して SWANSON⁽¹¹⁾ は Ca^{++} によつて活性化されるものと Mg^{++} によるものがあると述べているが、KOCHAKIAN 等⁽¹²⁾及び TIPTON 等⁽¹³⁾の白鼠の肝臓 homogenate による実験では Ca^{++} でも Mg^{++} でも ATPase の活性度に殆ど差がないことを認めているので今回は一応 Ca^{++} を賦活剤として用いた。

5'-Nucleotidase の活性度の成長に伴う変化は第 2 図に示した。これによると活性度は或範囲内ではばらついてはいるが、成長に伴つて著しい変化のあることは認められない。この点は前述の xanthine oxidase の場合と異なるところであり、同じ核酸の分解過程に関与する酵素でも xanthine oxidase の如く末端近くで作用するものと、5'-nucleotidase のように上位で作用するものとは成長に伴う変化の様子が異なることが分る。

第 3 図 性週期と酵素の活性度

なお第 1 図及び第 2 図に示される如く体重 170~190g の雌鼠で活性度の著しく高くなるもののあることを認めた。成育段階でこれに対応する雄鼠は 230~250g であるが、この部分の雄ではかかるものは存在しない。そこでこの現象は鼠の性週期又は妊娠の経験の有無等の理由によるものではないかと考えて、別に性週期と 5'-nucleotidase 活性度及び ATPase 活性度 (ATPase では著しくはないがやはり 5'-nucleotidase の高い鼠は高い値を示したので) の関係を

第 4 図 Alkaline Phosphatase の活性度

x.....♂ ●.....♀ △.....識別せず

tase の活性度は出生後 10 日前後, 体重 10 g で 0.65 mgP 位であるが, 直に減少して 25 日前後体重 39 g になると 0.45 mgP 位にまで下りそれ以後は成長によつて大した変化はなく殆ど一定である。従来 alkaline phosphatase の活性度は蛋白合成或は細胞分裂と相関関係があると言われているが, 結果は必ずしも一致していない。この実験結果も蛋白合成との相関については否定的である。即ち体重増加 (蛋白合成) の最も盛な時期に最少の活性度を示し, それ以後変化していない。最近 KORNIGSBERG⁽¹⁴⁾ が鶏の胚の発生に際し精しく調べた結果, 蛋白質の増加と alkaline phosphatase の活性度は平行しないことを認めている。

要 約

白鼠の成長に伴う (生後 10 日以後) 肝臓の ATPase, 5'-nucleotidase, alkaline phosphatase の活性度の変化を測定した結果,

- (1) ATPase の活性度は生後 10 日頃より 25 日頃にかけて急激に減少し, 以後は漸次増加し元に戻る。
- (2) 5'-Nucleotidase の活性度は或る範囲内でばらついているが, 成長に伴つて著しい変化は認められない。
- (3) Alkaline phosphatase の活性度は生後 10 日頃より 25 日頃にかけて減少し以後は成長によつて変化なく一定である。

終に有益な助言を載いた名古屋大学農学部瓜谷郁三氏に厚く感謝の意を表する。又飼料に関して御配慮いただいた日本配合飼料株式会社名古屋工場, 日清製粉株式会社名古屋工場, 白鼠の飼育について援助をいただいた名古屋大学農学部畜産学科本間, 横山両氏に謝意を表する。

本報告は昭和 31 年 3 月 31 日の日本農芸化学会大会にて講演した。

(1) 吉田, 山崎, 芦田: 本誌, 29, 721(1955).	194, 299 (1952).
(2) J. N. DAVIDSON: <i>Ann. Rev. Biochem.</i> , 18, 155 (1949).	(9) 江上不二夫編: 標準生化学実験, 133 (1953).
(3) K. P. DU BOIS, V. R. POTTER: <i>J. Biol. Chem.</i> , 150, 185 (1943).	(10) B. GRAD et al.: <i>Am. J. Physiol.</i> , 174, 481 (1953).
(4) W. W. UMBREIT et al.: <i>Manometric Techniques and Tissue Metabolism</i> . 144 (1949).	(11) M. A. SWANSON: <i>J. Biol. Chem.</i> , 191, 577 (1951).
(5) G. ASHWELL, J. HICKMAN: <i>Proc. Soc. Expl. Biol. Med.</i> , 80, 407 (1952).	(12) C. D. KOCHAKIAN, B. A. REED, A. M. EISCHEID: <i>Am. J. Physiol.</i> , 177, 413 (1954).
(6) K. W. KOCHRAN et al.: <i>J. Pharmacol. & Expl. Therap.</i> , 102, 165 (1951).	(13) S. R. TIPTON, F. WELDEN, A. K. WEISS: <i>Am. J. Physiol.</i> , 180, 321 (1955).
(7) K. P. DU BOIS, D. F. PETERSON: <i>Am. J. Physiol.</i> , 176, 282 (1954).	(14) I. R. KONIGSBERG, H. HERRMANN: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 55, 534(1955).
(8) O. ROSENTHAL et al.: <i>J. Biol. Chem.</i> ,	