[農化 第 39 卷, 第 3 号, p. 109~113, 1965]

筋肉蛋白質の代謝回転 (第1報)*

DL-フェニルアラニン-3-C¹⁴ 注射後の白ネズミ筋肉
蛋白質分画の比放射能の経時的变化

船引 龍平**, 神立 誠 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 39 年 9 月 25 日 受理

緒 言

Mitchell⁽¹⁾は食餌に無関係に内因性尿中窒素排泄は一定であり, それは代謝回転率の低い体蛋白質の代謝の反映であるとのべている. Schönheimer⁽²⁾は筋肉蛋白質の代謝回転率*** は低いが, 体の大半を占めているので代謝回転量率**** としては大きなものであるとのべている. これらを併せ考えると, 筋肉蛋白質がその特徴ある蛋白質ごとにいかなる代謝回転型式と代謝回転率をもち, また食餌条件が代謝回転にいかに関与するか等を明らかにすることは, 蛋白質栄養の問題を体内代謝の面から追求する立場より重要なことと考えられる.

Shemin ら⁽³⁾は白ネズミに N¹⁵-グリシンを投与して尿および肝臓の N¹⁵ を測定した結果, 尿中の N¹⁵ 量は肝臓から失なわれる N¹⁵ の量のみでは説明できないところから, 尿中窒素の主要な源泉を carcass と考えた. しかし carcass の平均 N¹⁵ 濃度が尿中 N¹⁵ 濃度より低いので, carcass は代謝回転率の高い成分と低い成分から成っており, 高い成分が尿素形成に用いられるのではないかと

推論した. Bidinost⁽⁴⁾は標識したグリシンを用い, ミオシン及びアクチンの代謝回転率が全筋肉蛋白質より低いことを示した. Velick⁽⁵⁾は間接的方法で, ウサギ骨格筋蛋白質分画の代謝半減期を測定した. Neuberger⁽⁶⁾はミオシン, アクチンのように構造をもった蛋白質は, ヘモグロビンのように chronologically に分解する代謝回転型式をとるものと予想し, Dreyfus ら⁽⁷⁾は白ネズミ骨格筋のミオシンが 30 日の寿命をもつと結論している. 一方, Schapira ら⁽⁸⁾は筋肉アルドラーゼが分子レベルの代謝回転をするという結果を得た. 村松ら⁽⁹⁾は食餌カゼインレベルの変化が全筋肉蛋白質の代謝回転率には影響を与えないという結論を得た. 本報告では筋肉蛋白質分画の DL-フェニルアラニン-3-C¹⁴ 注射後の比放射能の変化についてしらべたので報告する.

実験方法

1. DL-フェニルアラニン-3-C¹⁴ の合成

蛋白質からの分離精製が容易であり, 生体内での稀釈度合の比較的小さいこと, 生体内で酸化してチロシンを生ずるので 2 種類の標識アミノ酸を用いた効果が期待されるところから, 標識アミノ酸として DL-フェニルアラニン-3-C¹⁴ を用いた. 本物質の炭酸バリウムからの合成はすでに Reid⁽¹⁰⁾により行なわれているが, 反応条件を再検討し, 一部精製過程の省略と改良を行なって比較的高収率で DL-フェニルアラニン-3-C¹⁴ を得ることができた.

炭酸バリウム-C¹⁴ より二酸化炭素-C¹⁴ を発生させ, グリニヤール反応を行なう方法及び装置は大部分東大理学部島村研究室で行なわれている方法に従った. また反応混合物から安息香酸-C¹⁴ の抽出は普通に行なわれている方法で行なった. 炭酸バリウム 580 mg (炭酸バリウム-C¹⁴ 20.654 mg : 2 mc を瑪瑙乳鉢中で非ラベル炭酸バリウム 559.340 mg と混和) とフェニルマグネシウムブROMIDE

* Studies on the Metabolic Turnover of Muscle Proteins. Part I. Changes in Specific Activities of Muscle Protein Fractions of Rats injected with DL-Phenylalanine-3-C¹⁴.

By Ryūhei FUNABIKI and Makoto KANDATSU (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, the University of Tokyo)

** 現在岩手大学農学部農芸化学科

*** "Turnover rate" M. Keiber : *Nature*, **175**, 342 (1955); "Fractional Turnover rate" D. B. Zilversmit : *Nature*, **175**, 863 (1955) の訳語.

**** "Turnover rate" D. B. Zilversmit : *Nature*, **175**, 863 (1955); "Replacement rate" H. Neurath, K. Bailey : "The Proteins II B", Academic Press, p. 1265 (1954); "Flux rate" A. Mawson : *Nature*, **176**, 317 (1955); "Neubildungs rate" A. Niklas, E. Quinke, W. Mauer, H. Neuyen : *Biochem. Z.*, **330**, 1 (1958) の訳語.

イド 3.2 mM (濃度 0.22 M) より安息香酸を合成した。収量 310 mg. 安息香酸- C^{14} を水素化リチウムアルミニウムで還元しベンジルアルコールとした。エーテル層を食塩飽和 5% 炭酸ナトリウムで洗い硫酸ナトリウム上に乾燥しエーテルを蒸発し残留液を次の反応に用いた。残留液に塩化チオニル 240 mg とピリジン 1 滴を加え還流下煮沸し塩化ベンジル- C^{14} とした。煮沸後過剰の塩化チオニルは少量のベンゼンを加え湯浴上常圧で留去し、残留液にアセトマロン酸エステル 440 mg をナトリウムエチラート 2 mM で溶解して加え封管とし、2 時間半湯浴中に加熱して縮合反応を行なわしめた後開封し、そのまま遠心分離して上澄液をツンベルグ管に移し水流ポンプでアルコールを追いだし、残留液を次の反応に用いた。縮合物に臭化水素酸を加えて加水分解後ベンゼンで洗い、水層を減圧濃縮した。濃縮液を 6×0.5 cm の Dowex 1-X-1 のカラム (50~100 メッシュ, 酢酸型) にかけた。5% 酢酸による溶出液は 30×1.5 cm の濾紙粉末 (東洋濾紙粉末 100~200 メッシュ) カラムにかけ、ブタノール: 酢酸: 水 (5:1:1 v/v/v) で展開した。 R_F は有色物質 1, フェニルアラニン 0.8, グリシン 0.4 でフェニルアラニンを他の物質より完全に分離できた。収量 175 mg, 収率 32% (炭酸バリウムより), 比放射能 0.5 mc/mmM.

2. DL-フェニルアラニン-3- C^{14} の注射

実験開始時の体重 250~300 g の雄のウイスター系白ネズミ 18 頭を用いた。12 頭は生後 6 か月で、6 頭は 5 か月であった。6 頭ずつを同一の飼育籠に入れ 3 群として群飼した。それぞれの群に対し精製飼料 (第 1 表) を自由摂取法により給与した。精製飼料を 1 週間給与後、18 頭の白ネズミに 0.9% 食塩水に溶解した DL-フェニルアラニン-3- C^{14} (比放射能 0.5 mc/mmM) を体重 100 g

当たり $1.42 \mu\text{C}$ 腹腔内に注射した。注射後 16 時間, 11 日, 21 日に 6 頭ずつ撲殺して次の蛋白質を調製した。

3. 蛋白質の調製

以下にのべる全操作は 0° の低温実験室で行なった。6 頭の後肢及び脊部の筋肉をとり、鉋で細かく切り、肉挽器 (穴の直径 5 mm) で挽肉とし、その一部に 10 倍量の 10% トリクロル酢酸を加えワーリングブレンダーで 15 分間ホモジナイズして遠沈した。この操作を 3 回くり返し全筋肉蛋白質とした。肝臓も同様に処理して肝臓蛋白質とした。ミオシンは主として Rapp ら⁽¹¹⁾の方法により調製した。アクチンは主として Tsao ら⁽¹²⁾の方法に従って調製した。両者ともチゼリウス電気泳動装置による電気泳動図は単一のピークを示した。Robinson ら⁽¹³⁾に従ってサルコプラスム蛋白質と筋肉コラーゲンを調製した。各蛋白質分画は 3 倍量の 10% トリクロル酢酸を加えて乳鉢中で磨細し遠沈した。この操作を 4 回くり返した。

4. 蛋白質よりフェニルアラニンの分離

トリクロル酢酸で処理した蛋白質試料 1 g に 10 ml の 20% 塩酸を加え封管中で 110° , 18 時間加水分解後濾過し、濾液に 3 回水を加えては減圧濃縮して塩酸を除いた。残渣を 2 ml の水に溶解し 10×1 cm の活性炭 (ツルミコール 40~100 メッシュ, シアン化水素酸ソーダにより前処理) カラムにかけ、硫化水素飽和 5% 酢酸で展開した。溶出液がニンヒドリン反応陰性となったとき受器をかえて 5% 酢酸エチルで展開した。溶出液はフェニルアラニンとチロシンのみから成ることをペーパークロマトグラフィーで確認した。フェニルアラニンとチロシンの分離は 6×1 cm のセルロース (東洋濾紙粉末 A 100~200 メッシュ) カラムで水飽和ベンジルアルコールを展開剤として行なった。水飽和ベンジルアルコールによる溶出液はフェニルアラニンのみを含んでいた。次いで 77% エタノールを展開剤としてチロシンを含む溶出液を得たが、この溶液中にはときによるとフェニルアラニンを含むこともあった。

5. 放射能測定

中性洗剤でよく洗って油気を除き、ケイ素樹脂を縁辺に塗布してクリーピングを防止した市販の鉄製試料皿 (直径 25 mm) の中央にポリエチレングリコール (カーボワックス 6000) の 0.1% 水溶液を 1 滴滴下し、それにフェニルアラニン濃縮液を少量ずつ加えて湯煎上で蒸発乾涸した。同一の濃縮液は 2 分して 2 つの試料皿に入

第 1 表 実験飼料組成 (%)

小麦でんぷん	70	塩類混合物*	4
カゼイン	20	ビタミン混合物**	1
大豆油	5		

* Hegsted 氏塩⁽²¹⁾

** 1% 配合した場合の実験飼料 100g 中各種ビタミン含有量

ビタミン A	1,250 I. U.	パントテン酸	4.0 mg
ビタミン D ₂	100 I. U.	カルシウム	
ビタミン B ₁ -HNO ₃	0.5 mg	イノシトール	10.0 mg
ビタミン B ₂	0.75 mg	パラアミノ安息香酸	10.0 mg
ビタミン B ₆	0.5 mg	コリン-HCl	100.0 mg
ニコチン酸アミド	5.0 mg	ビタミン B ₁₂	0.5 mg
葉酸	0.25 mg	ビタミン C	18.75 mg
ビオチン	0.04 mg	ビタミン E	0.5 mg
		ビタミン K	0.1 mg

れた。試料皿中のフェニルアラニンの量は放射能測定後、カプラー・アドラーの比色法⁽¹⁴⁾により定量した。放射能測定には薄膜ガスフロー・カウンターを用い、確率誤差 1% 以下で測定し、自己吸収を補正した。

結 果 と 考 察

注射後の各時間におけるそれぞれの蛋白質試料のフェニルアラニンの比放射能を第 1 図及び第 2 表に示す。Neuberger ら⁽¹⁵⁾によると C^{14} -グリシン投与後 21 日までは肝臓蛋白質のグリシンの比放射能の経時変化は指数函数曲線を示し、その代謝半減期は 4 日～5 日である。本報においても肝臓蛋白質のフェニルアラニンの比放射能の経時変化は 21 日までは指数函数曲線を示し、その代謝半減期は 8 日になる。実験期間を 21 日としたの

第 1 図 筋肉蛋白質及び肝臓蛋白質のフェニルアラニンの比放射能-時間曲線

○——○ 肝臓蛋白質 ●-----● 筋肉蛋白質

第 2 表 DL-フェニルアラニン- $3-C^{14}$ 白ネズミ腹腔内注射後各蛋白質試料から分離されたフェニルアラニンの比放射能

注射後の時間	比 放 射 能* (cpm/μM)					
	肝臓	筋肉	ミオシン	アクチン	サルコプラスム	筋肉コラーゲン
16時間	a	45.6	22.4	18.6	11.3	29.4
	b	44.8	23.1	16.7	—	—
	平均	45.2	22.7	17.7	11.3	29.4 (4.5)
11日	a	19.7	15.1	23.1	20.4	23.8
	b	18.6	20.1	25.2	—	23.7
	平均	19.2	17.6	24.2	20.4	23.7 7.90
21日	a	8.22	11.0	12.4	—	10.8
	b	7.58	10.4	13.0	—	10.6
	平均	7.90	10.7	12.7	—	10.7 10.8

* 自然計数, 自己吸収補正

—: 測定せず (): 外挿値

は、それ以上の長期間にわたると臓器間でのラベルの移動、ラベルの再利用、単一蛋白質でない場合は代謝回転率の低い成分の混在により指数函数曲線を示さなくなるという報告⁽¹⁵⁾に基づいている。

筋肉蛋白質は指数函数的減少を示していないが、時間の経過と共に比放射能は常に減少している(第 1 図)。前年より代謝半減期 30 日、後半より 14 日と計算される。前半が後半より代謝半減期が長いのは、注射後 16 時間では比放射能が最高値に達していなかったからと解釈することができる。Neuberger ら⁽¹⁵⁾によると、全筋肉蛋白質の比放射能減衰曲線はほぼ指数函数をなし、その代謝半減期は 20～30 日である。Niklas ら⁽¹⁶⁾は血清遊離メチオニンの比放射能と組織にとりこまれた S^{35} -メチオニンの比放射能から筋肉蛋白質の代謝半減期を 22 日と計算している。

筋肉と肝臓との比放射能-時間曲線の相対的位置関係については Neuberger ら⁽¹⁵⁾の成績とよく一致している。すなわち 11 日と 21 日の間で筋肉と肝臓の曲線は交叉し 21 日には筋肉の方が肝臓より比放射能が高い。筋肉の比放射能を 100 とすると肝臓は 63 であり⁽¹⁵⁾、本報では 74 である。

Neuberger ら⁽¹⁵⁾は生長中のネズミの腱コラーゲンのグリシンの比放射能が時間の経過と共に定常的に増加することを認め、これは腱コラーゲンの代謝回転的不活性に基づくもので、一度とりこまれた後分解がなければ前駆体の比放射能レベルまでは増加し続けるものであるという見解をとっている。本報においても筋肉コラーゲンは 11 日から 21 日にかけて比放射能の増加を示している。21 日の比放射能は筋肉蛋白質の値と一致し肝臓よりやや高い。Neuberger ら⁽¹⁵⁾の場合は腱コラーゲンについてであるが、筋肉蛋白質の半分以下で肝臓とほぼ等しい。

サルコプラスム蛋白質は 21 日まで比放射能の減少を示す。前半が後半より比放射能の減少が緩徐であるのは比放射能の最高値が 16 時間後にあるからと考えられる。後半より代謝半減期を求めると 9 日となり肝臓の代謝半減期よりもわずかに長い程度である。注射後 16 時間の比放射能も筋肉蛋白質分画中最高で、肝臓を 100 とすると 65 であり、全筋肉蛋白質の約 1.3 倍を示している。21 日目には全筋肉蛋白質と等しく肝臓よりやや高い。

Sprinson ら⁽¹⁷⁾が carcass protein 中に肝臓蛋白質にほぼ等しい代謝半減期をもつ分画を仮定して、carcass

protein 中に含まれる代謝回転率の高い分画と低い分画の存在割合を推定しているが、本報の結果は筋肉蛋白質中に肝臓蛋白質に似た代謝半減期をもった分画の存在を示すものである。

Simpson ら⁽¹⁸⁾は S^{35} -メチオニンをウサギに注射し、38 時間後の筋肉蛋白質中で最高の比放射能を示すものはミオシンで、最低のデヒドロゲナーゼの約 2 倍であり、2 倍以上開きがないことは Bidinost⁽⁴⁾ のネズミの実験結果と一致すると論じている。しかし Bidinost⁽⁴⁾ の場合、ミオシンとアクチンは全筋肉蛋白質より低い比放射能を示しており、そのことは筋肉蛋白質中にミオシンより高い比放射能を示す分画が含まれることを示すものである。その意味では両者の結果は一致せず、Bidinost⁽⁴⁾ の結果はサルコプラスム分画が高い比放射能を示す本報の結果と一致している。Bidinost⁽⁴⁾ も Simpson⁽¹⁸⁾ も筋肉コラーゲンに言及していないが、当然筋肉蛋白質の成分である筋肉コラーゲンを考慮する必要があるように思われる。本報においては筋肉コラーゲンを測定したが、11 日および 21 日の筋肉コラーゲンの比放射能の値を 16 時間に外挿すると、筋肉蛋白中で最高の代謝回転率を示すものと、最低の代謝回転率を示すものとは 2 倍以上の開きをもっていると考えられる。

Heimberg ら⁽¹⁹⁾はフェニルアラニン- $3-C^{14}$ をウサギに注射後、筋肉アルドラーゼ中のフェニルアラニンの比放射能が 2 時間と 38 時間とではほとんど変らなかったことから、標識アミノ酸のとりこみが 2 時間以内で完了し 2 時間と 38 時間の間で定常状態が成立するとして、次式より一定時間後の各蛋白質のアミノ酸の比放射能の大小が代謝回転率の大小を示すとした。

$$A = \frac{Rt}{p} a^* \quad A' = \frac{R't}{p'} a^*$$

A, A' …蛋白質の比放射能

a^* …前駆体の比放射能

R/p …代謝回転率

R …代謝回転量率

p …代謝プールの量

t …測定時間

この式を基にして代謝回転率を論ずるには、前駆体が等しく、測定時間 t の間で比放射能が定常状態をとることを前提としている。ウサギの筋肉アルドラーゼ、ホスホリラーゼ、デヒドロゲナーゼについては、これらの条件が満足されているところから代謝回転率の大小が示された。

Velick⁽⁵⁾ はウサギにおいて、アクチン及びミオシンの Subunit についても定常状態が成立するものと考え、また肝臓内遊離アミノ酸と筋肉内遊離アミノ酸の比放射能が等しいという仮定をたてて、血清アルブミンの比放射能と半減期から、注射後一定時間の各蛋白質分画のアミノ酸の比放射能の大小をそのまま代謝半減期の大小と比例させて代謝半減期を算出した。

本報においてはネズミではあるが、注射後 16 時間にはウサギの場合から考えて定常状態が成立していると予想したのであるが、ミオシンは 16 時間より 11 日の比放射能が約 1.5 倍高く、アクチンでは約 1.8 倍高い。このことはミオシン、アクチンにおいては、注射 16 時間以後に比放射能の最高値があることを示すものであり、定常状態にないと考えられる。注射 16 時間後の筋肉蛋白質分画の比放射能の大小はサルコプラスム蛋白質 > 全筋肉蛋白質 > ミオシン > アクチン > 筋肉コラーゲンの順序であるが、16 時間には定常状態にないこと、前駆体が不明であることから上の順序が代謝回転率の大小の順序と一致するとは考えられない。全筋肉蛋白質 > ミオシン、アクチンの順序は Bidinost⁽⁴⁾ の結果と一致しているが、Bidinost⁽⁴⁾ の場合、 N^{15} -グリシンを 2 日間連続投与しているので 1 回投与方法より継続投与方法⁽²⁰⁾ に近い方法であり、直接結果を比較することはむずかしい。Bidinost⁽⁴⁾ の方法は比較する分画のラベル濃度に関しての平衡値が同一になり、代謝回転型式も同一であるという仮定のもとに成立するものであると考えられる。

要 約

白ネズミに DL-フェニルアラニン- $3-C^{14}$ を腹腔内注射後、16 時間、11 日、21 日に肝臓蛋白質、筋肉蛋白質、ミオシン、アクチン、サルコプラスム蛋白質、筋肉コラーゲンをとり、フェニルアラニンの比放射能を測定した。

(1) 代謝回転率が肝臓に近い分画が筋肉蛋白質中に含まれる。

(2) 筋肉コラーゲンの代謝回転率は極めて低い。

(3) ミオシン、アクチンの比放射能-時間曲線は単純な指数函数曲線で示されない。

(4) 筋肉蛋白質分画の代謝回転率を算出するには、前駆体と代謝回転の型が考慮される必要がある。

本報告は東京大学大学院化学系研究科に提出した博士論文の一部である。

(1) H. H. Mitchell: *J. Nutrition*, 55, 193 (1955)

- (2) R. Schönheimer : "The Dynamic State of Body Constituents", Harvard University Press (1942).
 - (3) D. Shemin, D. Rittenberg : *J. Biol. Chem.*, **153**, 401 (1944).
 - (4) L. B. Bidinost : *ibid.*, **190**, 423 (1951).
 - (5) S. F. Velick : *Biochim. et. Biophys. Acta*, **20**, 228 (1956).
 - (6) A. Neuberger : *Brit. med. Bull.*, **8**, 210 (1952).
 - (7) J. C. Dreyfus, J. Kruh, G. Schapira : *Biochem. J.*, **75**, 574 (1960).
 - (8) G. Schapira, J. Kruh, J. C. Dreyfus, F. Schapira : *J. Biol. Chem.*, **235**, 1735 (1960).
 - (9) K. Muramatsu, T. Sato, K. Ashida : *J. Nutrition*, **81**, 427 (1963).
 - (10) J. C. Reid : AECU-216 (UCRL-330).
 - (11) J. C. Rupp, W. F. H. M. Mommaerts : *J. Biol. Chem.*, **224**, 277 (1957).
 - (12) T-C. Tsao, K. Bailey : *Biochim. et. Biophys. Acta*, **11**, 102 (1953).
 - (13) D. S. Robinson : *Biochem. J.*, **52**, 621 (1952).
 - (14) R. J. Block, D. Boling : "The Amino Acids: Composition of Proteins and Foods", Thomas, p. 138 (1951).
 - (15) A. Neuberger, J. C. Derrone, H. G. B. Slack : *Biochem. J.*, **49**, 199 (1951).
 - (16) A. Niklas, E. Quincke, W. Mauer, H. Neuyen : *Biochem. Z.*, **330**, 1 (1958).
 - (17) D. B. Sprinson, D. Rittenberg : *J. Biol. Chem.*, **180**, 715 (1949).
 - (18) N. V. Simpson, S. F. Velick : *ibid.*, **208**, 61 (1954).
 - (19) M. Heimberg, S. F. Velick : *ibid.*, **208**, 725 (1954).
 - (20) H. Neurath, K. Bailey : "The Proteins II B", Academic Press, p. 1266 (1954).
 - (21) D. M. Hegsted, R. C. Milles, C. A. E. Elvehjem, E. B. Hart : *J. Biol. Chem.*, **138**, 459 (1941).
-