[農化 第 41 卷, 第 11 号, p. 623~627, 1967]

必須アミノ酸欠乏と蛋白質栄養 (第2報)

シロネズミ組織蛋白質の代謝回転におよぼすトリプトファン欠乏の影響

内 藤 博, 神 立 誠

(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 42 年 6 月 26 日 受 理

Effect of Essential Amino Acid-Deficiency on Protein Nutrition.

Part II. Effect of Tryptophan-Deficiency on Turnover of Tissue Proteins in Rat

By Hiroshi NAITO and Makoto KANDATSU

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo

Adult male rats were fed a tryptophan-deficient diet containing 20% oxidized casein, and specific activity in the total protein of liver, serum and skeletal muscle was measured after 2, 8, 15, and 22 days of intraperitoneal injection of ^{35}S methionine. The amount of total liver protein from tryptophan-deficient rats seemed not to be significantly altered as compared with that from the paired-fed controls, whereas total protein concentration of serum decreased. The specific activity of liver as well as serum protein from tryptophan-deficient rats was higher than that from controls throughout the experimental period. These phenomena seem partly due to some increase in the values of apparent half-life which might be reflected from slower catabolic rate and/or from augmented reutilization of label in tryptophan-deficiency.

(Received June 26, 1967)

食餌中の蛋白質水準が組織蛋白質の代謝回転 (turnover) に影響をおよぼすことは Tarver ら⁽¹⁾の研究をはじめ多くの報告から明らかにされ、とくに血清や肝臓蛋白質についてよく検討されている。Steinbock および Tarver⁽²⁾, Jeffay および Winzler⁽³⁾ はこれらの蛋白質の代謝回転率 (turnover rate) は摂取蛋白質水準の高低に相関すると報告し、Muramatsu ら⁽⁴⁾はこのような関係はカゼイン水準 25% あるいは 40% 以下のみであてはまると述べている。

これらの結果から考えると、必須アミノ酸欠乏食も蛋白質欠乏食と同様に代謝回転率を低下させる効果を示すことが予想される。しかし最近明らかにされた結果では、必須アミノ酸欠乏食を完全食群と等摂取量の条件であてて比較すると、欠除アミノ酸の種類とは比較的關係に、肝臓その他の臓器蛋白質量がよく維持されている傾向を示している^(5,6)。著者らもメチオニン欠乏食をあたえたシロネズミの肝臓蛋白質量は paired-feeding した

20% カゼイン群と差がないことを明らかにした⁽⁷⁾。

組織蛋白質の代謝回転率 (replacement rate) が蛋白質プールの大きさおよび turnover time によって規定される Tarver の定義⁽⁸⁾にしたがえば、無蛋白食および必須アミノ酸欠乏食による 2 種の蛋白欠乏の型は代謝回転にことなつた影響をあたえることが期待される。しかし、必須アミノ酸欠乏がどのような効果を示すかについては現在まで明らかな報告が少ないので、本実験では酸化カゼイン 20% 水準のトリプトファン欠乏食を成熟白鼠に 30 日間あたえ、そのうち 2~22 日間の組織蛋白質中の ^{35}S -メチオニンの減衰率を 20% カゼイン paired-feeding 群と比較した。

実 験 法

1. 動物飼育

前報⁽⁷⁾と同様に Toennies⁽⁹⁾の方法にしたがって過ギ酸酸化カゼインを調製しメチオニンとシスチンを添加してトリプトファン欠乏飼料とした。Wister 系雄成熟白

TABLE I. COMPOSITION OF EXPERIMENTAL DIETS

	Control (U)	Tryptophan deficient (T)
Casein	20%	—%
Oxidized casein*	—	20
Wheat starch	70	70
Salt IV**	4	4
Soybean oil	5	5
Vitamin mixture***	1	1

* Supplemented with 0.45% DL-methionine and 0.05% of L-cystine.

** Phillips-Hart's salt mixture.

*** 100 g wheat starch-vitamin mixture contained 20 g of commercial vitamin premix (Panvitan, Takeda pharmaceutical Co., Ltd., Osaka), 10 g of choline chloride, 150 mg of calcium pantothenate and 6 mg of pyridoxine. A few drops of corn oil was weekly added.

鼠を Table I に示す基礎飼料 (U) で 7 日間予備飼育したのち U 区およびトリプトファン欠乏区 (T 区) に分けて飼育をおこなった。T 区では摂取量が低下するので摂取状態の同様な 2 頭ずつを選び、paired-feeding を実施した。第 1 日目の食餌摂取 8 ないし 12 時間後にトルラ酵母の培養により調製した L-³⁵S メチオニンのトレーサー量を 0.9 % NaCl 1 ml に溶解して腹腔内に注射し、2 日、8 日、15 日および 22 日後に殺して試料蛋白質を調製した。

2. 試料蛋白質の調製

シロネズミは最終食餌の投与約 12 時間後にエーテル麻酔下放血によって殺し、血清、肝臓および大腿部筋肉をとり、組織は 10% トリクロル酢酸 (TCA) 中でホモゲナイズし、遠沈したのち冷 5% TCA で 2 回、熱 TCA で 1 回洗い、さらにエタノール: エーテル (3:1) で洗い供試蛋白質試

Fig. 1. Change in the Body Weight of Rats During 30 Day Paired-feeding.

●—● Control
○—○ Tryptophan-deficient
▲—▲ Tryptophan-deficient + 0.28% tryptophan

TABLE II. EFFECT OF TRYPTOPHAN-DEFICIENCY ON BODY WEIGHT, LIVER PROTEIN AND SERUM PROTEIN AS COMPARED WITH RATS PAIRED-FED A 20% CASEIN DIET

Diet and rat No.*	Days on diet	Average daily food intake g/100 g	Body weight			Liver		Serum protein g/100 ml
			Initial g	Final g	Change %	Wet weight % initial body weight	Total protein %	
U 1-1	2	6.2	196	206	+4.9	4.3	0.90	
1-2			195	202				
U 2-1	8	6.2	201	207	+2.8	3.8	0.81	
2-2			206	217				
U 3-1	15	5.5	210	219	+1.7	3.6	0.74	7.15
3-2			205	201				
U 4-1	22	5.0	240	250	+4.2	3.2	0.66	7.80
4-2			230	240				
4-3			242	231				
U 5-1	30	4.8	247	240	+1.4	3.6	0.74	7.74
5-2			241	254				
5-3			248	254				
T 1-1	2	6.2	204	205	+0.7	3.7	0.76	
1-2			200	203				
T 2-1	8	6.2	211	201	-5.6	3.4	0.68	
2-2			208	195				
T 3-1	15	5.5	211	200	-12.4	3.6	0.73	6.84
3-2			211	184				
3-2 A			219	177				
T 4-1	22	5.0	226	206	-6.2	3.0	0.62	6.48
4-2			223	203				
4-3			226	217				
T 5-1	30	4.8	234	189	-7.7	2.6	0.52	5.82
5-2			255	211				
5-3			231	189				
S 5-1	15	5.4	240	237	-1.5	3.8	0.70	6.93
5-2			234	230				

U: 20% casein, T: tryptophan-deficient, S: T+0.28% tryptophan.

* Rats given the same number among the different groups were designated as corresponding paired-animals each other. In the "22 day" experiment two deficient rats (3-2 and 3-2 A) were allotted against one control.

料とした。血清は等容 10% TCA で沈殿させたのち、前記と同様に調製した。

3. 比放射能測定

TCA 沈殿蛋白質は 6N HCl-80% ギ酸 (1:1) で 110°, 12 時間水解し、前報⁽¹⁰⁾にしたがって活性炭カラム上 5% 酢酸で溶出したメチオニン分画をステンレス試料皿中に蒸発乾固し、G-M 計数管で計数したのち、熱水で抽出し Lavine 法⁽¹¹⁾によって 0.1~1.0 mg のメチオニンを定量して比放射能を算出した。比放射能は注射後の ³⁵S の減衰に対して補正し、また Tarver⁽¹⁾にしたがって体重差を補正し、standard specific activity (SSA) として表現した。

$$SSA = \frac{\text{c.p.m./mg メチオニン}}{\text{c.p.m. } ^{35}\text{S dose/体重g} \times 10^2}$$

またプロットした曲線の一部を 1 次反応型とみなして Tarver⁽⁸⁾ の記載にしたがってみかけ上の半減期 ($t_{1/2}$) を算出した。肝臓では 2 日と 8 日の比放射能から、また血清では extra vascular pool の影響のない 8 日、15 日の値から計算した。

蛋白質はマイクロケルダール法でえた全窒素量に係数 6.25 を乗じて算出した。

結 果

食餌摂取量は実験日数とともに次第に減少したが、Fig. 1 に示すように対照区 (U) の体重は 30 日間ほぼ一定の範囲に維持され、この点では定常状態 (steady state) に近いものとみなすことができる。また同時に 15 日間 paired-feeding した 0.28% トリプトファン添加区 (S5-1, S5-2 の 2 頭) でも体重がよく維持されているので T 区の体重減少はトリプトファンの欠除に直接原因することが明らかである。

また Table II に示すように、肝臓蛋白質は両群間で差がなく、T 区では 30 日後に僅かに減少した。この傾向はトリプトファン欠乏に関する Cole および Scott⁽¹²⁾ あるいは Williams および Elvehjem⁽¹³⁾ の結果と一致し、蛋白質欠乏とは対照的に肝臓蛋

白質量は維持されるものと思われる。いっぽう血清蛋白質量 (g/100 ml) はトリプトファン欠乏では減少した。しかし、これが血液の希釈化 (hemodilution) によるものか否か明らかでない。

Fig. 2. Disappearance of ³⁵S Methionine.

Labelled methionine (7.8×10^4 c.p.m.) was given 8 to 12 hrs. after the withdrawal of food on the first day of feeding.

○, △: Control
●, ▲: Tryptophan-deficient

TABLE III. APPARENT HALF-LIFE OF LIVER AND SERUM PROTEIN FROM RATS FED A 20% CASEIN DIET AD LIBITUM

Exp. No. (1)	Body wt. change	Average daily food intake	³⁵ S dose (2)	Days after injection (3)	Half life (4)	
					Liver	Serum
					per 100 g weight	per 100 g weight
	%	g	c.p.m.	t1 t2	day	day
1	+27	8.6	6.2×10^4	4(2) 8(2)	5.0(4.5~5.4)	3.7(2.8~5.1)
2	+18	9.8	4.0 "	2(3) 6(3)	4.1(2.6~5.0)	2.3(1.6~2.7)
3	+21	9.8	4.0 "	4(3) 10(3)	4.4(3.8~5.0)	4.1(2.9~6.0)
4	+14	10.5	1.5 "	3(4) 8(4)	4.5(3.0~6.0)	2.9(1.6~4.2)
4A	+2.4	6.2	2.3 "	3(4) 8(4)	6.1(4.6~7.2)	8.9(5.2~12.8)

(1) Diet U was fed to adult male rats (150~200 g) *ad libitum* except to those in exp. 4A which were on a restricted amount of diet in the same manner like in the previous paired-fed experiment.

(2) Rats were injected ³⁵S methionine 8 to 12 hours after withdrawal of the diet on the 8th day of feeding.

(3) Values express days after injection and number of rats used in parenthesis respectively.

(4) Values were calculated from standard specific activities on t1 and t2 (see in the text).

Figures in parenthesis represent the calculated range of half-life.

Fig. 2 に組織蛋白質中のメチオニン比放射能の減衰曲線 (フリーハンドで作成) を半対数表で示した。

肝臓および血清ではトリプトファン欠乏によって常に高い比放射能を示した。筋肉では両群間に差がみとめられなかった。また減衰初期のみかけの半減期は対照区とトリプトファン欠乏区でそれぞれ肝臓, 7 日; 18 日, 血清, 12 日; 24 日といずれも欠乏区で高い値がえられた。これらの値は対照区についても実験例数やプロットによる誤差を考慮してもなお従来の文献値^(4,8)より高いと思われるので, べつに成熟雄シロネズミ (150~200 g) 数頭をえらび 20% カゼイン飼料を 7 日間自由摂取させ, ³⁵S-メチオニン注射後 4~8 日間の減衰から半減期を算出した結果, 肝臓で 4~5 日, 血清で 2~4 日をえた (Table III)。これらの結果は, 食餌摂取量が半減期に影響することを示唆するものである。

考 察

前述のように, トリプトファン欠乏によって見かけ上の半減期はとくに血清蛋白質で長くなっており, 代謝回転が緩慢になっていることが示唆される。このような傾向は従来報告されている低蛋白食餌の効果とも一致している。

トリプトファン欠乏区の高い比放射能値は初期の ³⁵S-メチオニンの高いとりこみにも影響されるものと思われ, その後の著者らの実験⁽¹⁴⁾で注射後 3~9 時間のとりこみは肝臓蛋白質ではトリプトファン欠乏によって増加することを確認している。また Nimni および Bavetta⁽¹⁶⁾もトリプトファン欠乏時に L-C¹⁴-グリシンのとりこみが増加すると報告しており, このような現象がその後の catabolic rate に影響をおよぼすことが十分に予想される。

一般に比放射能の減衰が真の半減期と一致しない要因の一つは体組織蛋白質の分解による再利用によるものとされ, 第 2 図の減衰曲線が指数型よりずれてゆくのは主としてこの効果によるものと理解される。Waterlow⁽¹⁶⁾は低蛋白食の摂取によって体組織蛋白質から臓器 (viscera) への補償的な再利用性が高まると報告しているが, トリプトファン欠乏時でもこのような効果によって半減期がみかけ上長くなる可能性が考えられる。

アミノ酸の再利用による影響に関しては種々の論議がなされているが, McFarlane⁽¹⁷⁾は血しょう蛋白質に関して再利用の寄与を重視し, 食餌蛋白質の水準による catabolic rate の変動性は大きくないものと推定してい

る。Stirpe および Schwarz⁽¹⁸⁾はトルラ酵母 (メチオニン不足) をあたえたシロネズミの肝臓と血清蛋白質中の ¹⁴C バリンのとりこみと減衰を測定した結果, 本実験と同様な傾向を報告している。合成系の活性に関しては著者ら⁽¹⁹⁾はトリプトファン欠乏時 ³⁵S-メチオニンのとりこみが肝臓蛋白質中増加することを報告したが, これは実際に蛋白合成系の活性が蛋白質欠乏時と同様に⁽²⁰⁾トリプトファン欠乏においても高まることが Paolucci ら⁽²¹⁾のアミノ酸活性化酵素の測定結果から示唆されている。

いっぽう, このような欠乏時に体組織蛋白質の分解による ³⁵S-メチオニンの再利用の影響が考慮されなければならない。しかし Table III に示したように蛋白質の摂取量 (あるいはカロリー摂取量) が半減期に影響している事実などから実際に蛋白質の分解を抑制するような因子の存在性も考えられる。必須アミノ酸欠乏やインバランス食餌の摂取によって生じる過剰の血清中のアミノ酸が, 蛋白質の分解性を抑制するような可能性も考えられる⁽²²⁾。

要 約

成熟シロネズミをトリプトファン欠乏食 (20% 酸化カゼイン) で飼育し ³⁵S-メチオニン注射後 2, 8, 15 および 22 日後の肝臓, 血清および筋肉蛋白質中の比放射能変化を paired-feeding した 20% カゼイン群と比較した。

トリプトファン欠乏 22 日間肝臓蛋白質量は対照区との間に差がなく, 血清蛋白質濃度は減少した。

肝臓および血清中の比放射能値はトリプトファン欠乏区で常に高く, また見かけ上の半減期は長くなる傾向を示した。

本研究の概要は昭和 34 年 4 月, 本学会大会で発表した。

- (1) G. Solomon, H. Tarver : *J. Biol. Chem.*, **195**, 447 (1952).
- (2) H. Steinbock, H. Tarver : *ibid.*, **209**, 127 (1954).
- (3) H. Jeffay, R. J. Winzler : *ibid.*, **231**, 111 (1958).
- (4) K. Muramatsu, T. Sato, K. Ashida : *J. Nutrition*, **81**, 427 (1963).
- (5) H. Sidransky, E. Farber : *Arch. Pathol.*, **66**, 119, 135 (1958).
- (6) H. Sidransky, T. Baba : *J. Nutrition*, **70**, 463 (1960).
- (7) 内藤 博, 神立 誠 : 本誌, **41**, 338 (1967).
- (8) H. Tarver : H. Neurath, K. Bailay 編, "The

- Protein", 2, Academic Press, N. Y., 1954, p. 1199.
- (9) G. Toennies : *J. Biol. Chem.*, **145**, 667 (1942).
- (10) 内藤 博, 神立 誠 : 本誌, **41**, 406 (1967).
- (11) T. F. Lavine : *J. Biol. Chem.*, **151**, 281 (1943).
- (12) A. S. Cole, P. P. Scott : *Brit. J. Nutrition*, **8**, 125 (1954).
- (13) R. B. Williams Jr., C. A. Elvehjem : *J. Biol. Chem.*, **183**, 539 (1950).
- (14) 内藤 博, 神立 誠 : 本学会大会報告 (昭和 36 年 4 月, 九州大学).
- (15) M. E. Nimni, L. A. Bavetta : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**, 38 (1961).
- (16) J. C. Waterlow : *Nature*, **184**, 1875 (1959).
- (17) A. S. McFarlane : H. N. Munro, J. B. Allison 編 *Mammalian Protein Metabolism*, **1**, Academic Press, N. Y., 1964, p. 297.
- (18) F. Stirpe, K. Schwarz : *J. Nutrition*, **79**, 151 (1963).
- (19) 内藤 博, 神立 誠 : 本学会大会シンポジウム報告 (昭和 37 年 4 月, 東北大学).
- (20) A. Mariani, M. A. Spadoni, G. Tomassi : *Nature*, **199**, 378 (1963).
- (21) A. A. Paolucci, M. A. Spadoni : *Quad. Nutrizione*, **24**, 99 (1964), (*Nut. Abst. Rev.*, **35**, 1027 (1965) より引用).
- (22) A. E. Harper, Q. R. Rogers : *Proc. Nutr. Soc.*, **24**, 173 (1965).
-