無蛋白食飼育時の筋肉 RNA の代謝回転*

斎藤 洋子, 神立 誠

(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 46 年 10 月 1 日 受 理

Effect of Protein-free Diet on the Turnover of Ribonucleic Acid of Rat Skeletal Muscle

(The Effect of Diet on Nucleic Acid Metabolism of Skeletal Muscle Part V)

By Yoko SAITO and Makoto KANDATSU

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

The effect of protein depletion on the turnover of skeletal muscle ribonucleic acid was examined in rats by observing the specific activity-time curve over a period of 25 days after injection of $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$.

The specific activity of ribonucleic acid in rats fed normal diet (control group) reached a maximum at 15 th day after labeling, whereas in rats fed protein-free diet a maximum was at 20 th day. The biological half life of ribonucleic acid in protein depleted group was 1.3 or 2 times as large as that in control group.

From above results it is suggested that ribonucleic acid turnover of muscle in protein depleted group is later than that in control group. (Received October 1, 1971)

筋肉 RNA 量が無蛋白食飼育時に漸減することは, Allison ら^(1,2), Mandel ら⁽³⁾ および著者ら^(4,5) により明らかにされてきたが, その際の RNA の代謝回転速度は, 肝臓 RNA の代謝回転に及ぼす食餌の影響⁽⁶⁻⁸⁾ からみて, 正常飼育時とは異なるものと予想される。しかし, 筋肉 RNA の代謝回転に及ぼす食餌の影響についての報告は見られない。

前報⁽⁶⁾ の無蛋白食飼育時における筋肉 RNA への ^{32}P 取込みの結果から, 筋肉 RNA を ^{32}P でパルスラベルすることができないため, ^{32}P 1 回投与法で, 筋肉 RNA の正確な代謝回転速度を測定することは困難であるが, Zilversmit⁽⁹⁾, 船引⁽¹⁰⁾, Hirsch and Hiatt⁽⁶⁾ の報告から, ^{32}P 1 回投与後の RNA, 酸溶性ヌクレオチド等の放射能の減衰経過を, 正常飼育時と無蛋白食飼育時とで比較検討することにより, 筋肉 RNA の代謝回転の無蛋白食摂取による変化を推測できるのではないかと考えられる。

前報に引き続いて本報では, 無蛋白食飼育時の筋肉

RNA の代謝回転の変化を明らかにする目的で, 無蛋白食飼育時の白ねずみに ^{32}P を腹腔内注射し, 酸溶性ヌクレオチド, RNA 等の放射能を経時的に測定するとともに, RNA 量を定量した。

実 験

1) 供試動物および飼育法 体重 350 g 前後の Wistar 系雄成熟白ねずみを, 普通飼料で 10 日間予備飼育後 2 群に分け, 対照区および無蛋白区とし, 屠殺する

Table I. Composition of Diets

Groups	Normal diet (control)	Protein-free diet (protein-free)
Starch	65%	85%
Casein	20	0
Soybean oil	5	5
Cellulose powder*	5	5
Salt mixture**	4	4
Vitamin mixture**	1	1

* Powder of filter paper (30 to 100 mesh) manufactured by Toyo Roshi Company, Ltd., Tokyo.

** Composition described previously.⁽¹¹⁾

* 筋肉の核酸代謝と食餌条件との関連 (第 5 報)。

まで、それぞれに普通飼料および無蛋白飼料を給与した。飼料組成は Table I に示したとおりで、飼料 1 日給与量は、体表面積 1m^2 当り約 1600kcal とし、1 日 1 回給与した。試験飼育開始 3 日後に、正リン酸態 ^{32}P を体重 100g 当り $150\mu\text{Ci}$ 腹腔内注射し、注射 5, 10, 15, 20 および 25 日後に、エーテル麻酔下で頸動脈より放血して殺した。

2) 臓器の採取 後肢筋肉をとり、脂肪をできるだけ除いて細かく切り、秤量、凍結して -20°C に保存した。肝臓は生理的食塩水で灌流して、血液を除去してから秤量、保存した。

3) 核酸の定量 筋肉の RNA, DNA を Schmidt and Thannhauser 法で定量した。定量法の詳細は、先に報告したとおりである⁽¹²⁾。

4) RNA, 酸溶性無機リン, 酸溶性ヌクレオチドの分離および放射能測定 RNA 画分は Munro らの方法⁽¹³⁾に従い、モノヌクレオチドとして分離し、酸溶性無機リンは、高橋法^(14,15)に従って分離した。これらの方法の詳細は、前報⁽⁵⁾に示した。

酸溶性ヌクレオチドは、酸溶性画分に $\text{Ba}(\text{OH})_2$ を加えて加熱し、ATP を AMP に分解してから⁽¹⁶⁾、中尾の方法⁽¹⁷⁾に従って活性炭に吸着し、 NH_4OH -エタノール混合溶液で溶出、分離した。

各画分の放射能は、一定量を直径 2.5cm のステンレス製試料皿にとり、赤外線ランプ下で乾燥して G-M 管で測定した。リンは、Fiske and Subbarow 法⁽¹⁸⁾に従

い湿式灰化後、中村法⁽¹⁹⁾を用いて定量した。

結果および考察

体重および筋肉、肝臓重量の変化は Table II に示したとおりで、対照区では体重はわずかに増加したが、筋肉および肝臓重量は変化しなかった。無蛋白区では、体重の減少が前報^(4,5)の結果より、やや少なかったが、筋肉および肝臓重量の減少経過は、前報^(4,5)の結果とはほぼ一致した。ただし、肝臓重量は ^{32}P 注射後 5~15 日の間は、ほとんど減少しなかった。

前報^(4,5)の無蛋白飼育時の RNA 量の変化を確認するため、筋肉の全 RNA-P 量と全窒素量を定量した。その結果は Fig. 1, 2 に示したとおりで、筋肉全 RNA-P 量の変化は、前報⁽⁵⁾の RNA-P/DNA-P の変化と同様に無蛋白飼育 20 日頃までは少しずつ減少し、無蛋白飼育 23 日間で 33% 減少した。無蛋白飼育時の筋肉全 RNA-P 量と全窒素量を、正常飼育時のそれぞれの値を 100 として、片対数グラフで表わすと Fig. 2 のようになり、23 日までは直線となり、全 RNA-P 量、全窒素量ともに 1 次反応型で減少することが再確認された。その減少速度定数は、RNA-P 0.018日^{-1} 、全窒素 0.011日^{-1} であり、RNA が全窒素より約 1.6 倍速く減少することが明らかになった。

各画分のリンの比放射能の変化は、Fig. 3 に示したとおりで、肝臓では無蛋白区の比放射能が、対照区のそれより全般に高くなっていたが、無蛋白区で重量が約 15%

Table II. Body Weight, Fresh Weight of Muscle of Hind Limb, and Liver in Rats Fed Normal (control group) and Protein-free Diets (protein-free group)

Groups Days of experiment	Control					Protein-free				
	8	13	18	23	28	8	13	18	23	28
Body weight										
{ initial (g)	346.7 ±28.1*	340.5 ±23.7	337.5 ±27.8	329.0 ±29.6	323.8 ±26.4	344.0 ±23.7	344.5 ±24.1	343.7 ±18.0	346.2 ±24.8	344.3 ±23.1
{ final (g)	350.2 ±33.4	349.7 ±24.9	349.2 ±18.1	344.7 ±28.6	335.0 ±21.3	322.0 ±16.3	317.2 ±24.8	307.3 ±21.5	303.7 ±23.6	295.3 ±19.9
Change (%)**	+1.0	+2.7	+3.5	+4.8	+3.5	-6.4	-7.9	-10.6	-12.3	-14.2
Weight of muscle***	4.22 ±0.09	4.16 ±0.11	4.22 ±0.34	4.42 ±0.30	4.23 ±0.36	3.89 ±0.46	3.70 ±0.26	3.51 ±0.29	3.29 ±0.10	3.25 ±0.16
Decrease (%)****	—	—	—	—	—	8.5	12.9	17.4	22.6	23.5
Weight of liver***	3.97 ±0.15	3.99 ±0.23	3.68 ±0.15	3.78 ±0.18	3.89 ±0.02	3.33 ±0.28	3.50 ±0.40	3.39 ±0.10	3.11 ±0.29	2.95 ±0.18
Decrease (%)****	—	—	—	—	—	13.7	9.3	12.2	19.4	23.6

* Mean ± standard deviation of 3 rats per group.

** Initial body weight-final body weight/initial body weight×100.

*** g Fresh weight per 100g of initial body weight.

**** % Decrease for average weight in control group.

Fig. 1. Total Amount of Ribonucleic Acid-P Per Muscle of Hind Limb of Rats Fed Normal (—●—) and Protein-free Diets (---○---).

Each point represents the mean from 3 rats.

Fig. 2. Change in the Proportion of the Amounts of Ribonucleic Acid-P (—●—) and Nitrogen (---○---) in Muscle of Hind Limb of Rats Fed Protein-free Diet to Those of Rats Fed Normal Diet.

The percentage of ribonucleic acid-P and nitrogen in muscle are plotted on a logarithmic scale. Each point represents the mean from 3 rats.

減少しているので、その割合で各画分リンのプールが減少し、放射能の希釈が少なかったとして、各画分の比放射能を補正すると、対照区と無蛋白区の無機リンおよび酸溶性ヌクレオチドの比放射能は、ほぼ一致する。しかし RNA は、無蛋白区の初期には、対照区よりやや高い値を示した。無機リン、酸溶性ヌクレオチドの代謝半減期は対照区、無蛋白区ともに、それぞれ約 7 日および

Fig. 3. Specific Activity-time Curves of Acid Soluble Inorganic P (Δ), Acid Soluble Nucleotide P ($\times$), and RNA-P ($\bullet$) of Muscle (A) and Liver (B) of Rats Fed Normal (—) and Protein-free Diets (---).

After 3 days on the diets the animals were injected with $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{P}_4$ and measurement of specific activity of the P fractions was made from 5 days after isotope administration. Each point represents the mean from 3 rats.

6~7 日で、両画分の代謝回転は、無蛋白食飼育により変化しないと推測された。また RNA の代謝半減期は対照区 11 日、無蛋白区 10 日で、無蛋白食飼育により RNA の代謝回転が、やや速くなるように認められた。しかし、Enwonwu and Munro⁽⁷⁾ の ^3H オロチン酸を用いて得たリボゾーム RNA の結果では、無蛋白食飼育 2 日以後の比放射能の減衰速度は、正常飼育時より遅く、無蛋白食飼育により、代謝回転が遅くなっていることを示している。このように、著者らの結果が Enwonwu and Munro の結果と相違するのは、使用したアイソトープの異なること、飼育期間の異なることなどに原因すると考えられる。

筋肉では、無蛋白区の各画分の比放射能が、肝臓のように対照区より高い値を示すことはなかった。この結果から、筋肉の無蛋白食飼育初期のプールの縮小は、無視し得る程度に少なく、筋肉への ^{32}P 移行速度は、正常飼育時と無蛋白食飼育時とで変わらないと考えられる。RNA および酸溶性ヌクレオチドの比放射能の最大値は、

それぞれ対照区 15 日, 11.5 日 (比放射能を片対数グラフに図示すると, 最大値前後ともに直線となるので, これらの線を延ばしてその交点を求めた. その交点の値は, 無機リンの比放射能値とほぼ一致した), 無蛋白区 20 日, 15 日であり, これらの最大値が無機リンと RNA および酸溶性ヌクレオチドとが対照区, 無蛋白区ともに交差した. この結果は, RNA および酸溶性ヌクレオチドと無機リンとの間に, 前駆体関係の存在を示すものと考えられるが, 対照区, 無蛋白区ともに, 酸溶性ヌクレオチドと RNA との間に, 前駆体関係は認められなかった. RNA の直接の前駆体は, 代謝経路からヌクレオチドであることは明らかであるから, この結果は RNA の前駆体であるヌクレオチドプールの比放射能は, RNA のそれとほぼ同様に变化し, すなわち, それは全酸溶性ヌクレオチドプールの比放射能の変化とは異なる変化をしており, 酸溶性ヌクレオチドプールが単一でないことを示唆し, またヌクレオチドから RNA は速やかに合成され, そのプールは小さいことを示唆していると考えられる. RNA および酸溶性ヌクレオチドの比放射能の減衰部分を片対数グラフで表わすと, ほぼ直線となるので定法により代謝半減期を求めた. その結果は RNA, 酸溶性ヌクレオチド, それぞれ対照区 46 日, 29 日; 無蛋白区 82 日, 46 日であった. 一方, 前述のように RNA と無機リンとの間に前駆体関係が認められ, その比放射能の経時的变化が, 船引の開放 2 区画連鎖系のカイネティクスモデルに類似しているため, 本実験ではそのモデルの前提条件のすべてを満たしてはいないが, 無機リンと RNA との交点の時間から, RNA の生成速度定数を下記の船引の式を用いて計算してみた.

2 区画連鎖系ラベル 1 回投与の場合の第 1 区画の比放射能の経時的变化

$$I_1 = I_0 e^{-K_1 t} \quad (1)$$

第 2 区画の比放射能の経時的变化

$$I_2 = \frac{K_2}{K_2 - K_1} I_0 (e^{-K_1 t} - e^{-K_2 t}) \quad (2)$$

第 2 区画の最大値の時間 $t_{\max}$ と速度定数 K_1, K_2 との関係

$$t_{\max} = \frac{\ln K_1 - \ln K_2}{K_1 - K_2} \quad (3)$$

無機リンを第 1 区画とすると I_0, I_1, t は対照区 3766, 1866, 10 日; 無蛋白区 3566, 1967, 10 日で, 式 (1) より K_1 を求めると対照区 0.070 日^{-1} , 無蛋白区 0.059 日^{-1}

となる. 式 (3) は平均値定理の式と等しいので, $y = \ln K$ のグラフより K_2 を求めると, 対照区 0.057 日^{-1} , 無蛋白区 0.044 日^{-1} となる. この K_2 より計算した代謝半減期は, 対照区 12 日, 無蛋白区 16 日であった. この値は, 減衰部分より求めた値よりきわめて小さく, Erdos and Bessada の兎に ^3H -オロチン酸を静脈注射して得られた値, すなわち筋肉約 10 日, 肝臓約 5 日に近かった. このように, 代謝半減期が求め方により著しく相違するのは, 減衰部分より求める方法では, 測定物質がパルスラベルされ, 再利用もない場合に用いられる式を, 全くパルスラベルとは考えられない場合に適用したのに対し, 船引の式は組織内で一度ラベルされた物質から, 測定物質への移行速度を求める式で, 測定物質がパルスラベルされない場合にも, 適用し得るためと考えられる. しかし, いずれの計算方法にしても, 無蛋白区の RNA の代謝半減期は, 対照区より長くなっており, また RNA および酸溶性ヌクレオチドの比放射能の最大値は, 無蛋白区では対照区より ^{32}P 注射後の時間が遅れて現われることから, 筋肉の RNA およびヌクレオチドの代謝回転は, 無蛋白食飼育により遅くなるであろうと推測される. 無蛋白食飼育により RNA の代謝回転が遅くなるのは, 前駆体と考えられる酸溶性ヌクレオチドの代謝回転が遅くなるので, その影響による可能性も考えられる.

船引の式より求めた代謝回転速度定数は, 無機リンから RNA へのラベルの移行速度であるから, それは RNA の生成速度と見なすことができると考えられるので, Hirsch and Hiatt^(6,21) と同様な方法で, 無蛋白区の筋肉 RNA の合成および分解速度定数を計算で求めた. すなわち, 無蛋白区の筋肉 RNA の合成速度定数は 0.044 日^{-1} であり, 無蛋白区での分解速度は RNA 量が減少するので, 合成速度より大きく, 分解速度定数は合成速度定数と RNA 量の減少速度定数との和である. 無蛋白区の筋肉 RNA 量の減少は, 先に記したように 1 次反応型で, その速度定数は 0.018 日^{-1} であった. 従って分解速度定数は, $0.044 \text{ 日}^{-1} + 0.018 \text{ 日}^{-1} = 0.062 \text{ 日}^{-1}$ となる. 一方, 対照区の筋肉 RNA の代謝回転速度定数は 0.057 日^{-1} であり, 対照区では定常状態であるから, この代謝回転速度定数は合成速度定数でもあり, また分解速度定数でもある. これらの結果から, 無蛋白食飼育により筋肉 RNA の合成速度は, 正常飼育時より遅くなるが, 分解速度は正常飼育時よりやや速くなる程度で, 普

通飼育時と大差ないのではないかと考えられる。

要 約

無蛋白食飼育時の筋肉 RNA の代謝回転の変化を明らかにするため、無蛋白食飼育時の成熟白ねずみに正リン酸態 ^{32}P を腹腔内注射し、筋肉の無機リン酸、酸溶性ヌクレオチド、および RNA の比放射能を経時的に測定した。

筋肉の RNA、および酸溶性ヌクレオチドへの ^{32}P 取込みはきわめて遅く、これらの比放射能が最大値に達したのは、正常飼育時では ^{32}P 注射後 RNA 15 日、酸溶性ヌクレオチド 11.5 日であり、無蛋白食飼育時では、それぞれ 20 日、15 日であった。比放射能の減衰部分より常法により求めた代謝半減期は、正常飼育時では RNA 46 日、酸溶性ヌクレオチド 29 日、無蛋白食飼育時には、それぞれ 82 日、46 日であった。RNA と無機リンとの間に前駆体関係が認められたので、RNA の最大値に達した時間から、RNA の代謝回転速度定数を求め、それより代謝半減期を計算した結果、正常飼育時 12 日、無蛋白食飼育時 16 日であった。いずれの計算方法にしても、筋肉 RNA の代謝回転は、無蛋白食飼育時には正常飼育時より遅くなっていると推測される。

(1) J. B. Allison, R. W. Wannemacher, Jr. and

W. L. Banks, Jr.: *Fed. Proc.*, **22**, 1126 (1963).

- (2) J. B. Allison and R. W. Wannemacher, Jr.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **16**, 445 (1965).
- (3) P. Mandel, M. Jacob and L. Mandel: *Cont. Red. Soc. Biol.*, **143**, 536 (1949).
- (4) 斎藤洋子, 神立 誠: 栄養と食糧, **25**, 8 (1972).
- (5) 斎藤洋子, 神立 誠: 農化, **46**, 477 (1972).
- (6) C. A. Hirsch and H. H. Hiatt: *J. Biol. Chem.*, **241**, 5936 (1966).
- (7) C. O. Enwonwu and H. N. Munro: *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 532 (1970).
- (8) C. O. Enwonwu, R. Stambaugh and L. Sreenbny: *J. Nutr.*, **101**, 337 (1971).
- (9) D. B. Zilvermit: *Am. J. Med.*, **29**, 832 (1960).
- (10) 船引龍平: 農化, **40**, R 67 (1966).
- (11) 斎藤洋子, 神立 誠: 農化, **45**, 398 (1971).
- (12) 神立 誠, 斎藤洋子: 農化, **42**, 479 (1968).
- (13) H. N. Munro, D. J. Naismith and T. W. Wikramanayake: *Biochem. J.*, **54**, 198 (1953).
- (14) 高橋泰常: 生化学, **26**, 690 (1955).
- (15) 大村京生: 実験化学講座, 第 23 巻, 生物化学 I, 丸善, 1957, p. 535.
- (16) S. E. Kerr: *J. Biol. Chem.*, **139**, 131 (1941).
- (17) 中尾 真, 蛋白質 核酸 酵素, **3**, 288 (1958).
- (18) C. H. Fiske and Y. Subbarow: *J. Biol. Chem.*, **81**, 629 (1929).
- (19) 中村道徳: 農化, **24**, 1 (1950).
- (20) T. Erdos and R. Bessada: *Biochim. Biophys. Acta*, **129**, 628 (1966).
- (21) A. L. Koch: *J. Theoret. Biol.*, **3**, 283 (1962).