シロネズミの組織蛋白質への ^{14}C -アミノ酸のとりこみ, 特に組織培養液の条件と食餌蛋白質の影響

後藤明彦, 亀高正夫

(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 47 年 7 月 20 日 受理

Incorporation of ^{14}C -Amino Acids into Tissue Proteins of Rats with Special Reference to the Medium Conditions of Tissue Incubation and Influence of Dietary Protein

By Akihiko GOTO and Masao KAMETAKA

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

By measuring the incorporation of ^{14}C -amino acids into tissue protein with the isolated soleus muscle and liver slices of rats, the influence of concentration of amino acids mixture in the medium and of the diet with or without protein on the protein synthetic ability in tissue were investigated.

Both radioactivity incorporated into protein and specific radioactivity of intracellular amino acids were increased, with increasing amino acids concentration in the medium. Of liver slices, the increasing rate of the latter was less than that of the former, hence it was considered that the protein synthetic rate in liver slices was increased.

Male rats of about 400g body weight were fed a protein-free diet for 0, 7 and 16 days, and afterwards they were refed a normal diet for 1, 2, 4 and 10 days. In the muscle, little effect of the protein-free diet was observed, but at the first day of refeeding the normal diet, the incorporation of ^{14}C -amino acids was increased temporarily and soon immediately, lowered to the control level. In liver slices of rats fed the protein-free diet, the incorporation was increased. Since the second day of refeeding, the incorporation fell quickly to be lowered to the control level at the 4th day.

(Received July 20, 1972)

哺乳動物においては、食餌蛋白質欠乏時に窒素排泄の低下が見られ、また諸組織の蛋白質含量は減少するが、その減少のしかたは筋肉、肝臓など組織によって異なる⁽¹⁾。このような生体の反応を、組織蛋白質の合成と分解の両面から明らかにするため、その一環としてまず合成の面をとりあげた。

組織蛋白質の合成速度に及ぼす食餌蛋白質欠乏の影響を *in vivo* で調べた従来の報告では、一致した成績が得られていない⁽²⁻⁶⁾。

生体では組織蛋白質の合成速度は、(1) 組織へのアミノ酸の供給、(2) 組織自身の蛋白質合成能、によって決

まると考えられる。Waterlow ら⁽⁷⁾は、食餌蛋白質欠乏時における肝臓蛋白質の減少を、「合成の速度はアミノ酸の供給が制限されるため、分解の速度に比べて遅れをとり、その結果蛋白質の絶対量は減少する」と説明している。一方、組織自身の蛋白質合成能に与える食餌蛋白質欠乏の影響については、肝臓の無細胞系でリボソーム活性、酵素活性など調べられているが、まだ一致した結果は見られず⁽⁸⁻²²⁾、筋肉での研究はきわめて少ない^(8,9,23-25)。

組織の蛋白質合成能はリボソーム含量、リボソーム自身の活性、酵素活性など、その他多くの要因が総合され

て決まると考えられる。この報告は、これらが総合された組織としての蛋白質合成能を調べるために、単離した soleus 筋 (*M. Soleus*) と肝臓切片を用いて、組織蛋白質への ^{14}C -アミノ酸のとりこみを測定し、培養液アミノ酸濃度の影響と食餌蛋白質の効果を調べたものである。

実 験

計 画

培養液アミノ酸濃度が、組織の蛋白質合成速度に与える影響を調べるために実験1を、組織の蛋白質合成能に対する食餌蛋白質の効果を調べるために実験2を、それぞれ次のように計画した。

実験1： 通常飼育飼料（小麦，74%；魚粉，15%；アルファルファミール，5%；黒ゴマ，3%；酵母，2%；塩類混合物，1%を含む）で飼育したウイスター系雄シロネズミ8頭（体重100～110g）の後肢から soleus 筋（30～40mg）をとり出し、また体重約220gのシロネズミ2頭から、肝臓切片を調製した。培養液として使用した ^{14}C -アミノ酸混合の濃度は、soleus 筋では1, 4, 10, 50mM、肝臓切片では1, 4, 10, 25, 50mM とした。このときの比放射能は一定とした。

実験2： この実験で給与された飼料の組成は Table I のとおりで、無蛋白質飼料は普通飼料のカゼイン20%を澱粉に置き換え調製された。飼料は1日1回午後6時に、体表面積 1m^2 当り1400kcalに相当する量として与えられた。体重約400gのウイスター系雄シロネズミ

を普通飼料で10日間予備飼育後、1区3頭ずつ7区に分け、無蛋白質飼料を16日間与え、4区はその後普通飼料に切り換えた。無蛋白質飼料給与後0, 7, 16日目、普通飼料に切り換えてから1, 2, 4, 10日目に動物を殺し、soleus 筋（約150mg）と肝臓をとり出し、肝臓から切片をつくり、それぞれを ^{14}C -アミノ酸等モル混合4mMを含む培養液で培養した。動物を午後2時に殺し、4時から培養を開始した。

方 法

1. Soleus 筋および肝臓切片の培養 動物はエーテル麻酔下で、頸動脈放血により殺された。soleus 筋は傷をつけないように、腱をつけたまま骨格から切り離され、脂肪組織を除いて、そのまま培養に供された。肝臓切片は井阪、柴田の方法⁽²⁸⁾によりフリーハンドで調製された。切片を切りとる肝臓の部位はつねに一定とし、組織の一番外側は除外した。フラスコ1個につき、厚さ約0.5mmの切片2枚約100mgを培養に用いた。培養液には、クロレラ蛋白質酸水解物- ^{14}C (U) (8mCi/mMC) を加えてラベルした20種アミノ酸混合を含む Krebs-Ringer リン酸緩衝液 (pH 7.4)⁽²⁷⁾ 2.0ml (10ml 容三角フラスコ中)、または5.0ml (30ml 容三角フラスコ中) を用い、培養フラスコは100% O_2 ガスで満たして密栓された。以上の操作は、すべて4°Cの低温室で行なわれた。培養は37°Cで、soleus 筋は2時間15分、肝臓切片は4時間15分、70回転/分の割合で振盪培養され、蛋白質への放射能のとりこみの値は、15分間培養したときの値を差し引いて求められた。細胞内総放射能の濃度は、15分間の培養で、ほぼ一定の値に達することが認められたからである。蛋白質への放射能のとりこ

Table I. Composition of Diets

Diet	Normal	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.

** A. E. Harper [*J. Nutr.*, 68, 408 (1958)].

*** Prepared by adding wheat starch in order that each 100g of diet contains the following amount of vitamin: vitamin A, 500 IU; vitamin D, 40 IU; thiamin, 0.2mg; riboflavin, 0.3mg; pyridoxine hydrochloride, 0.25mg; folic acid, 0.1mg; nicotin amide, 2mg; calcium pantothenate, 0.5mg; choline chloride, 0.1g.

Fig. 1. Time Course of Incorporation of ^{14}C -Amino Acids into Tissue Protein by Soleus Muscle (A) and Liver Slices (B).

Tissues from rats weighing 200 to 300g were incubated with the medium containing 4mM of 20 amino acids mixture and 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ of ^{14}C -chlorella protein hydrolysate.

みは soleus 筋, 肝臓切片で, それぞれ少なくとも 2, 4 時間までは直線的に増加することが, 予備実験で確認された (Fig. 1). また, アミノ酸混合 50mM を含む培養液 1.0ml で培養したとき, 蛋白質へとりこまれた総放射能は, soleus 筋, 肝臓切片とも 200mg までは組織重量に比例して増加した (Fig. 2).

2. 蛋白質への放射能のとりこみ 培養後組織を培養液からとり出し, 氷冷した緩衝液で 2 回すばやく洗い, ろ紙で軽く水分を吸いとり, soleus 筋は腱の部分を除去してからテフロン-ガラス製の Potter-Elvehjem 型ホモゲナイザーを用いて, 5% トリクロル酢酸 (TCA) 溶液中で磨砕し, 遠沈して TCA 不溶性画分と上澄に分け, 上澄は α -アミノ態窒素と放射能濃度の測定に供した. TCA 不溶性画分は 5% TCA で 2 回洗い, 次に 5% TCA のまま 95°C , 15 分間, 核酸を抽出し, エタノール-エーテル (3:1) で 2 回脂質を抽出し, 残渣をギ酸に溶かし, あらかじめ秤量した試料皿に 6~8mg をとり, 赤外線ランプで乾燥, 秤量したのち, ガスフローカウンターで放射能を測定した. このときの試料の重量を, 蛋白質量とした. 測定は, 自己吸収のない範囲で行なわれた.

3. 細胞内アミノ酸の比放射能 培養液アミノ酸濃度によって影響される細胞内アミノ酸濃度の増減は, 細胞内 α -アミノ態窒素の増減によって調べられた. 組織の 5% TCA 可溶性画分の α -アミノ態窒素を, H. Rosen のニンヒドリン法⁽²⁸⁾ によって比色定量し, 放射能濃度

Fig. 2. Influence of Amount of Tissue on Incorporation of ^{14}C -Amino Acids into Tissue Protein by Soleus Muscle (O-O) and Liver Slices (●-●).

Soleus muscle and liver slices from rats weighing 110 to 140g were incubated for 2hr and 4hr respectively, with 1.0ml of the medium containing 50mM of 20 amino acids mixture and $2.5\mu\text{Ci/ml}$ of ^{14}C -chlorella protein hydrolysate.

をガスフローカウンターで測定した. Kipnis ら⁽²⁹⁾ の方法によって, 組織水分の細胞外と細胞内プールの割合^(30,31) から, α -アミノ態窒素と放射能の細胞内濃度を計算し, 放射能/ α -アミノ態窒素を細胞内アミノ酸の比放射能とした.

結 果

1. 組織蛋白質への ^{14}C -アミノ酸のとりこみに及ぼす培養液アミノ酸濃度の影響

血漿アミノ酸濃度は食餌蛋白質含量や, 食餌摂取後の時間によって変化を受けることが知られている^(32,33), そこで培養液アミノ酸濃度が, soleus 筋と肝臓切片による蛋白質への ^{14}C -アミノ酸のとりこみに対して与える影響を調べた (Fig. 3, 4).

Soleus 筋, 肝臓切片ともに, 培養液アミノ酸濃度が高くなるに従って, 蛋白質への ^{14}C -アミノ酸のとりこみは増加したが, 同時に細胞内 ^{14}C 濃度も細胞内アミノ酸比放射能も高くなった. このことは, 培養液アミノ酸濃度が高いほど, 培養液アミノ酸の細胞内への侵入, または細胞内アミノ酸との交換が多くなることを示している.

Soleus 筋の場合, 細胞内 ^{14}C 濃度は培養液アミノ酸濃度にほぼ比例して増加し, 一方細胞内アミノ酸濃度

Fig. 3. ^{14}C -Amino Acids Incorporation into Protein (●-●) Intracellular Radioactivity (x-x) and Specific Radioactivity of Intracellular Amino Acids (O-O) of Isolated Soleus Muscles Incubated with the Medium Containing Various Concentrations of Amino Acids.

$0.25\mu\text{Ci}$ of ^{14}C -chlorella protein hydrolysate (U) per μmole amino acids mixture was added in the medium. Each point is the mean of three experiments. The vertical bars indicate standard error.

Fig. 4. ¹⁴C-Amino Acids Incorporation into Protein (●-●), Intracellular Radioactivity (x-x) and Specific Radioactivity of Intracellular Amino Acids (○-○) of Liver Slices Incubated with the Medium Containing Various Concentrations of Amino Acids.

0.02 μ Ci of ¹⁴C-chlorella protein hydrolysate (U) per μ mole amino acids mixture was added in the medium. Each point is the mean of three experiments.

Fig. 5. Intracellular α -Amino Nitrogen Concentration of Isolated Soleus Muscles (○-○) and Liver Slices (●-●) Incubated with the Medium Containing Various Concentrations of Amino Acids.

Each point is the mean of three experiments.

(α -アミノ態窒素濃度)は、培養液アミノ酸濃度が1, 4, 10mMのときは、それほど大きな変化はなく30mM前後を示したが、50mMでは56mMを示した(Fig. 5)。その結果、細胞内アミノ酸の比放射能は、Fig. 3のような曲線となる。培養液アミノ酸濃度による蛋白質への¹⁴C-アミノ酸のとりこみの増加率は、培養液アミノ酸濃度が高くなるにつれて低下し、また細胞内遊離アミノ酸の比放射の増加率と比べると、かなり小さい。筋肉における蛋白質合成の基質としてのアミノ酸プールについては、細胞外にある^(30,34)、細胞内にある⁽³⁵⁾、細胞内プー

ルは不均一である⁽³⁶⁾、などの報告があつて明らかでなく、Fig. 3における蛋白質への放射能のとりこみの増加が、細胞内アミノ酸の比放射能の上昇によるものか、その他のアミノ酸プールの比放射能の増加によるものか、それとも蛋白質にとりこまれたアミノ酸量の増加を示しているのかは明らかでない。しかし、もしFig. 3の放射能のとりこみの曲線が、蛋白質合成量の少なくとも一部を反映しているとすれば、培養液アミノ酸濃度が10mMより高いときには、蛋白質合成量はそれほど大きな変化はないが、血漿レベルである2~4mMの前後で大きな変化を示していることは興味深い。

肝臓切片の場合、蛋白質への放射能のとりこみは筋肉の場合と異なり、培養液アミノ酸が高濃度のときでも、増加の割合が急激に小さくなるということは認められなかった。培養液アミノ酸濃度が増加するとともに、細胞内¹⁴C濃度も高くなり、細胞内アミノ酸濃度(α -アミノ態窒素濃度)もFig. 5のように増加した。その結果、細胞内アミノ酸の比放射能は、Fig. 4に示したようになる。肝臓については、蛋白質合成のためのアミノ酸プールは、細胞内で均一であることを支持する報告がある⁽³⁷⁾。しかし、培養液アミノ酸濃度が4から50mMにかけての細胞内アミノ酸の比放射能の増加率は、蛋白質へのとりこみの増加率に及ばない。従つて、培養液アミノ酸濃度の上昇による蛋白質への¹⁴C-アミノ酸のとりこみの増加量の大部分は、アミノ酸プールの比放射能の増加によるが、それだけでなく一部には蛋白質にとりこまれたアミノ酸量そのものの増加によるものと考えられる。蛋白質への放射能のとりこみ値を、遊離アミノ酸の比放射能の値で除して、蛋白質1mg当りにとりこまれたアミノ酸量を計算すると、培養液アミノ酸濃度が4, 10, 25, 50mMのとき、それぞれ18.2, 20.3, 23.4, 29.0 μ molesとなった。この数値は、蛋白質合成量を表わしていると考えられ、培養液アミノ酸濃度が10, 25, 50mMのとき、蛋白質合成量は4mMのときのそれぞれ約1.1, 1.3, 1.6倍に増加したことを示している。

2. 組織蛋白質への¹⁴C-アミノ酸のとりこみに及ぼす食餌蛋白質の影響

無蛋白質飼料摂取時と、その後普通飼料を再摂取させたときのシロネズミの体重の経過と、蛋白質への¹⁴C-アミノ酸のとりこみは、Fig. 6に示されている。

Soleus 筋の場合、無蛋白質飼料摂取の影響はほとんど見られなかった。無蛋白質飼料16日間給与の後、普

Fig. 6. ^{14}C -Amino Acids Incorporation into Protein by Isolated Soleus Muscle (○) and Liver Slices (●) and Body Weight (●) of Rats Fed the Protein-free Diet (---) and Refed the Normal Diet (—).

Soleus muscle and liver slices were incubated for 2 hr and 4 hr respectively with the medium containing 4mM of 20 amino acids mixture. 0.4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ for soleus muscle or 0.2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ of ^{14}C -chlorella protein hydrolysate (U) for liver slices was added to the medium. Each point was the mean of three rats. The vertical bars indicate standard error.

通飼料に切り換えると蛋白質への ^{14}C -アミノ酸のとりこみは、その1日目では対照区（無蛋白質飼料0日目）の20~30%の増加を示したが、2日目からは減少しはじめ、4日目には対照区とはほぼ同じレベルまで低下した。

肝臓切片では、無蛋白質飼料給与により ^{14}C -アミノ酸のとりこみは増加した。7日目には、対照区より約60%増加し、16日目の値は7日目より低下したが、対照区よりなお30%高かった。その後、普通飼料再摂取1日目で無蛋白質飼料16日目より、わずかに増加する傾向が見られたが、2日目からは急激に減少し、4日目以降は対照区レベルまでに低下した。

食餌蛋白質欠乏時に、組織の遊離アミノ酸パターンは変化するが、全アミノ酸濃度としては、それほど大きな変化はない⁽⁸⁸⁾。本実験では、 ^{14}C -アミノ酸としてクロレラ蛋白質酸水解物を使っており、遊離アミノ酸全体としての比放射能には、対照区と試験区とそれほど大きな差

はないと考えられる。従って、上に述べた蛋白質への放射能のとりこみは、組織の蛋白質合成能をおおむね反映しているものと考えられる。

考 察

一般に生体では、組織へのアミノ酸の供給量の多少が、組織の蛋白質合成速度に影響を与えていることは予想される。D. H. Elwyn⁽³⁹⁾ は、犬の肝臓で、食餌摂取後アミノ酸が多く供給されるときに、蛋白質合成の正味の増加が見られることを示した。しかし、アミノ酸の供給量が組織の蛋白質合成速度に直接に影響を与えているという実験的証拠は少ない。

シロネズミの肝臓の灌流実験で、灌流液のアミノ酸濃度を血漿レベルより高くするに従って、肝臓蛋白質および血漿蛋白質への灌流液 ^{14}C -アミノ酸のとりこみは多くなる^(39,40)。しかし、このときの組織中遊離アミノ酸の比放射能は、調べられていない。肝臓切片を用いた本実験でも、培養液アミノ酸濃度が高くなるに従って、蛋白質への ^{14}C -アミノ酸のとりこみは増加し、このときの細胞内アミノ酸の比放射能も、同時に増加した (Fig. 4)。従って、上述の灌流実験でのとりこみの増加は、少なくとも一部には遊離アミノ酸の比放射能の増加による可能性がある。著者らの実験では、細胞内遊離アミノ酸の比放射能の増加を考慮に入れても、蛋白質への ^{14}C -アミノ酸のとりこみは増加しているの、肝臓の蛋白質合成速度が培養液アミノ酸濃度の上昇によって、いく分増加したものと考えられる。

Soleus 筋の場合には、蛋白質への ^{14}C -アミノ酸のとりこみも、細胞内遊離アミノ酸の比放射能も、ともに培養液アミノ酸濃度の増加とともに増加したが、前者の増加割合は、後者のそれよりもむしろ小さく、培養液アミノ酸濃度の増加によって、蛋白質合成速度が高まるという証拠は得られなかった。Morgan ら⁽³⁵⁾ は、心筋の灌流実験で ^{14}C -フェニルアラニンを使い、培養液アミノ酸濃度を血漿レベルから5倍に高めたときの心筋の蛋白質合成量の変化を調べた。それによれば、心筋の蛋白質合成のためのアミノ酸プールは細胞内にあり、組織の遊離フェニルアラニンの比放射能は、灌流液アミノ酸濃度の影響をあまり受けず、また蛋白質合成量は、灌流時間が90分ではほとんど変わらず、180分で灌流液アミノ酸濃度が高いとき、やや増加した。

アミノ酸供給量の増加による蛋白質合成速度の増加に

ついては, (1) 単なる蛋白質合成反応の制限因子としての基質アミノ酸の濃度の上昇による, (2) リボソームなどの蛋白質合成系自身の活性の増加による, という2つの要因が考えられる。

Clemens ら⁽⁴¹⁾ は, 肝臓切片を血漿レベルあるいはその6倍のアミノ酸濃度で1時間培養した後, 無細胞系で蛋白質合成活性を調べると, アミノ酸レベルの高い方が約50% 活性が高く, その原因はリボソームではなく, 細胞質画分にあることを示した。また肝臓の灌流実験で, 灌流液のアミノ酸濃度を高くすると, 低いときに比べてポリソームは増加し, *in vitro* でのリボソームの蛋白質合成活性も上昇する⁽⁴⁰⁾。筋肉の場合でも, 心筋を血漿レベルの5倍のアミノ酸濃度で180分間灌流すると, 血漿レベルのときに比べてポリソームが少し増加した⁽⁴²⁾。これらの事実は, 蛋白質合成速度に及ぼすアミノ酸濃度の影響の少なくとも一部には, (2) が関与している可能性を示している。

肝臓切片レベルでの蛋白質合成能力は, 食餌蛋白質欠乏時に増加し, 正常食の再摂取で対照区レベルまでに低下した (Fig. 6)。蛋白質欠乏時における肝臓切片レベルでのとりこみの増加は, 緒方ら^(20,43)の結果と一致するが, 堀江ら⁽⁴⁴⁾の結果とは一致しなかった。堀江らの報告では, 蛋白質欠乏後の正常食再摂取1日目で, 正常食区よりとりこみは増加する。著者らの実験でも, 再摂取1日目には対照区 (無蛋白質飼料0日目) よりもとりこみは高く, 無蛋白質飼料16日目よりも増加する傾向にあるが, その後急速に対照区レベルまでに低下した。食餌蛋白質欠乏が, 肝臓の蛋白質合成速度に及ぼす影響について, *in vivo* での一致した成績は得られていないが^(2,3,5,6), 生体での肝臓の蛋白質合成量は, 肝臓の蛋白質合成能そのものの他に, 供給されるアミノ酸の量によっても影響されると考えられる。

Soleus 筋では, 蛋白質合成能に対する無蛋白質飼料の影響は見られなかった。しかし筋肉の切片で, 蛋白質への¹⁴C-ロイシンのとりこみは減少したという報告もある^(43,45)。また無細胞系でも, ミクロソームまたはリボソームの活性は低下するという報告がある^(24,26)。これらの実験では, いずれも幼若シロネズミを使っている。著者らの実験では, 成熟シロネズミを使っており, 幼若シロネズミが受けるような大きな影響は受けないものと考えられる。このことは, 蛋白質摂取量の不十分な地域での蛋白質栄養障害が成長中の子供に多く, 成人に

はまれであることと考え合わせると興味深い。食餌蛋白質欠乏の後, 蛋白質を再摂取させたときの実験では, 筋肉リボソームの活性は蛋白質欠乏時に比べて上昇し⁽²⁵⁾, *in vivo* でも筋肉の蛋白質合成速度は増加する⁽⁴⁶⁾, という成績がある。著者らの結果では, 蛋白質欠乏時に大きな変化がないにもかかわらず, 普通飼料再摂取後1日目で, 一時的な蛋白質合成能の増加が見られた。これは筋肉組織が, 栄養条件の変化に適応して, その蛋白質合成能を変え得ることを示している。

飼料蛋白質欠乏によって肝臓蛋白質が減少するときに, 肝臓の蛋白質合成能は高まり, また普通飼料再摂取後の体重回復は10日後まで続くのに, 筋肉および肝臓の蛋白質合成能の増加が1日目にしか見られない事実 (Fig. 6) は, 組織の蛋白質含量の増減が蛋白質合成能だけでなく, アミノ酸の供給量, 蛋白質分解速度など, 多くの要因によって決められていることを暗示している。

要 約

シロネズミの単離した soleus 筋と肝臓切片を用いて, 蛋白質への¹⁴C-アミノ酸のとりこみを測定し, 培養液アミノ酸濃度の影響と食餌蛋白質の効果調べた。

培養液アミノ酸濃度 (1, 4, 10, 25, 50 mM) が高くなるに従って, 蛋白質への放射能のとりこみも, 細胞内アミノ酸の比放射能も増加した。肝臓切片では, 後者の増加割合が前者のそれに及ばないので, 蛋白質合成速度も増加していると考えられた。

成熟シロネズミに無蛋白質飼料を0, 7, 16日間給与し, その後普通飼料 (20% カゼイン) を1, 2, 4, 10日間再摂取させた。筋肉では, 無蛋白質飼料摂取の影響はほとんど見られなかったが, 普通飼料再摂取後1日目で, 一時的なとりこみの増加が認められ, その後まもなく対照区 (無蛋白質飼料0日目) レベルまで低下した。肝臓切片でのとりこみでは, 無蛋白質飼料給与7, 16日目でのそれぞれの値は, 対照区のその60%, 30% 増加した。その後, 普通飼料の再摂取1日目で, 無蛋白質飼料16日目よりわずかに増加する傾向が見られたが, 2日目から急激に減少し, 4日目以降では対照区レベルまで低下した。

終りにのぞみ, 終始ご援助をいただいた麻布獣医科大学, 神立誠教授, および実験動物の一部を提供していただいた斉藤洋子博士に感謝する。

- (1) H. N. Munro: "Mammalian Protein Metabolism," Vol. I, ed. by H. N. Munro and J. B. Allison, Academic Press Inc., New York and London, 1964, p. 381.
- (2) R. T. Schimke: *J. Biol. Chem.*, **239**, 3808 (1964).
- (3) J. C. Waterlow and J. M. L. Stephen: *Clin. Sci.*, **35**, 287 (1968).
- (4) D. Picou and T. Taylor-Roberts: *ibid.*, **36**, 283 (1969).
- (5) M. Haider and H. Tarver: *J. Nutr.*, **99**, 433 (1970).
- (6) D. J. Millward: *Clin. Sci.*, **39**, 591 (1970).
- (7) J. C. Waterlow, J. Cravioto and J. M. L. Stephen: *Adv. in Protein Chem.*, **15**, 214 (1960).
- (8) J. M. L. Stephen: *Brit. J. Nutr.*, **22**, 153 (1968).
- (9) S. Gaetani, A. M. Paolucci, M. A. Spadoni and G. T. Tomassi: *J. Nutr.*, **84**, 173 (1964).
- (10) A. Mariani, M. A. Spadoni and G. T. Tomassi: *Nature*, **199**, 378 (1963).
- (11) P. Mandel, C. Quirin, M. Bloch and M. Jacob: *Life Sci.*, **5**, 325 (1966).
- (12) A. Dicken: *J. Cell. Biol.*, **33**, 657 (1967).
- (13) C. Chaw and L. C. Fillios: *J. Nutr.*, **96**, 327 (1968).
- (14) H. Sidransky and E. Verney: *ibid.*, **101**, 1153 (1971).
- (15) R. W. Wannemacher, M. K. Cooper and M. B. Yatvin: *Biochem. J.*, **107**, 615 (1968).
- (16) R. W. Wannemacher, Jr., C. F. Wannemacher and M. B. Yatvin: *ibid.*, **124**, 385 (1971).
- (17) C. O. Enwonwu and L. M. Speebny: *J. Nutr.*, **101**, 501 (1971).
- (18) 緒方規矩雄, 佐野久子: 必須アミノ酸研究, **26**, 12 (1965).
- (19) 緒方規矩雄, 佐野久子: 同上, **28**, 56 (1965).
- (20) 緒方規矩雄, 木藤半平, 佐野久子: 同上, **29**, 73 (1966).
- (21) 緒方規矩雄, 木藤半平, 佐野久子: 同上, **32**, 14 (1966).
- (22) 村松敦一郎: 同上, **42**, 13 (1970).
- (23) V. R. Young, S. C. Chenand and J. MacDonald: *Biochem. J.*, **106**, 913 (1968).
- (24) V. R. Young and S. D. Alexis: *J. Nutr.*, **96**, 255 (1968).
- (25) A. Dicken and P. T. Omstedt: *ibid.*, **100**, 623 (1970).
- (26) 井阪三郎, 柴田章夫: 化学の領域, 増刊 13, ヲールブルグ検圧計 (吉川春寿ら編), 南江堂, 1954, p. 164.
- (27) W. W. Umbreit, R. H. Burris and J. F. Stauffer: "Manometric Techniques and Tissue Metabolism," 2nd ed., Burgess Publishing Co., Mineapolis, 1949, p. 119.
- (28) H. Rosen: *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 10 (1957).
- (29) D. M. Kipnis and C. F. Cori: *J. Biol. Chem.*, **224**, 681 (1957).
- (30) R. C. Hider, E. B. Fern and D. R. London: *Biochem. J.*, **114**, 171 (1969).
- (31) G. E. Mortimore and C. E. Mondon: *J. Biol. Chem.*, **245**, 2375 (1970).
- (32) L. E. Holt, Jr., S. E. Snyderman, P. M. Morton and E. Roitman: "Protein Nutrition and Free Amino Acid Patterns," ed. by J. H. Leatham, University of Tokyo Press, Tokyo, 1969, p. 32.
- (33) D. H. Elwyn: *ibid.*, p. 88.
- (34) R. C. Hider, E. B. Fern and D. R. London: *Biochem. J.*, **121**, 817 (1971).
- (35) H. E. Morgan, D. C. N. Earl, A. Broadus, E. B. Wolpert, K. E. Giger and L. S. Jefferson: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2152 (1971).
- (36) D. M. Kipnis, E. Reiss and E. Helmerch: *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 519 (1961).
- (37) K. Tsukada, T. Moriyama and I. E. Lieberman: *J. Biochem.*, **70**, 173 (1971).
- (38) R. W. Wannemacher, Jr., and J. B. Allison: "Protein Nutrition and Free Amino Acid Patterns," ed. by J. H. Leatham, University of Tokyo Press, Tokyo, 1969, p. 206.
- (39) L. L. Miller, C. G. Bly, M. L. Watson and W. F. Bole: *J. Exptl. Med.*, **94**, 431 (1951).
- (40) L. S. Jefferson and A. Korner: *Biochem. J.*, **111**, 703 (1969).
- (41) M. J. Clemens and A. Korner: *Nature, New Biology*, **232**, 252 (1971).
- (42) H. E. Morgan, L. S. Jefferson, E. B. Wolpert and D. E. Rannels: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2163 (1971).
- (43) 緒方規矩雄, 木藤半平, 黒田チエ: 必須アミノ酸研究, **33**, 6 (1968).
- (44) Y. Horie and K. Ashida: *J. Nutr.*, **101**, 1319 (1971).
- (45) 緒方規矩雄, 木藤半平, 黒田チエ, 小島光恵: 必須アミノ酸研究, **37**, 11 (1968).