

# タンパク質制限下での成長期ラットの含硫アミノ酸代謝の変化 [その2]

出海みどり, 高橋ルミ子  
(平成9年10月2日受理)

## The Change of Sulfur Amino Acid Metabolism of Growing Rats under the Protein Restricted Condition [Part II]

Midori IZUMI and Rumiko TAKAHASHI  
(Received on October 2, 1997)

### 緒 言

前報<sup>1)</sup>に引続き成長期ラットの低タンパク質条件下での含硫アミノ酸代謝の変化について検討した。生体におけるアミノ酸代謝では脱アミノ化されたアミノ基は大部分が尿素として排泄される。したがって含硫アミノ酸以外のアミノ酸は最終的に尿素レベルの代謝で推定される。一方ラットにおける含硫アミノ酸の硫黄は、一部コンドロイチン硫酸などに利用されるが最終的にタウリンや硫酸に代謝され尿中に排泄される<sup>2)</sup>。タウリンの生合成はシステインに由来するがタウリンに至る経路は多様であり、その主な経路はシステインからシステインスルフィン酸へ酸化されていくシステインジオキシゲナーゼ(肝CDO)経路である<sup>3)</sup>。このシステイン代謝の特徴である合成的代謝産物としてのグルタチオンは細胞内含量が多く全身のほとんどの組織に高濃度に存在している。又容易にシステインに変換することができるのでその細胞内レベルを維持するのに他のアミノ酸のように体タンパク質たとえばアルブミンなどを分解することなくグルタチオンを分解して補給することができる。つまりシステインは他のアミノ酸にない特異的な貯蔵型を持っていることである。第2の特徴はタウリンの生合成である。一般のアミノ酸が分解すると炭酸ガスとアンモニアが生成するがこれらは大部分尿素に生合成され尿中に排泄される。しかしシステインが他のアミノ酸と同様に分解すると硫化水素が生成してくる。哺乳動物では硫化水素を酸化してスルフェイトとして代謝する能力が低いので

大量の硫化水素の生成は生体にとりきわめて危険である。そこでS原子は炭素骨格から脱離する前に亜硫酸基とか硫酸基に酸化されることが必要でタウリンに生合成されるとSとNが同時に処理されることとなる。つまり含硫アミノ酸のタウリンは一般アミノ酸の尿素と同じ生理的意義を持っていると考えることができる<sup>4)</sup>。含硫アミノ酸の代謝量は尿素ではなく尿中タウリンで推定できることになる。このことはタンパク質の利用効率や生物価の指標として肝グルタチオン量や尿中タウリン排泄量が利用できることを示唆している<sup>3)</sup>。

前報<sup>1)</sup>での成長期ラットを用いての無タンパク食飼育では体重が減少し尿中タウリン排泄量は急激な減少後増加して安定した。このことは無タンパク食では利用できるタンパク質が入ってこないため含硫アミノ酸代謝においては貯蔵グルタチオンの変換によって生命維持代謝を確保した結果尿中タウリン排泄量が増加したと考えられる。今回は無タンパク食飼育前後での肝グルタチオンの保有量の変動を検索したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 実験動物

生後4週齢(28日齢, 体重90~100g)のSprague-Dawley系雄ラット22匹を日本クレア株式会社より2度に分けて購入した。規定食飼料(タンパク質としてカゼイン20%)により5日間予備飼育を行い、本実験開始前の平均体重から偏差の大きいもの4匹を除き18匹を実験に用いた。ほぼ体重が等しくなるよう考慮して各群を6匹ずつとした。

## 2. 飼料調整および飼育方法

Table 1に示すように1群は飼料にタンパク質を含まない無タンパク食を与え、2群は対照としてタンパク質(カゼインタンパク)20%を含む規定食(予備飼育時と同じ配合のもの)を与えた。無タンパク食のエネルギーの調整は $\alpha$ -コーンスターチで補った。3群は本実験開始前の肝グルタチオン保有量測定のため予備飼育終了時に屠殺し肝臓を摘出した。

予備飼育、本実験ともに飼料は水と自由摂取させ飼育環境は室内温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の飼育室個別ケージで飼育した。

Table 1 Composition of experimental diets

Composition	(g / kg.)	
	Protein free	Control (20%)
Protein source	0	250
Corn starch	568	318
Sucrose	300	300
Cellulose powder		20
Soybean oil		50
Mineral mixture*		50
Vitamin mixture*		10
Choline chloride		2

\*AIN-76 mineral and vitamin mixture.

J. Nutr., 107:1340(1977)

## 3. 試料の調整

3群共に予備飼育5日間行い第3群はその時点で屠殺し肝臓の摘出を行った。本実験では1群は無タンパク食飼育を7日間行い終了時に屠殺、肝臓の摘出を行った。第2群(対照群)はカゼイン・タンパク質20%含有飼料で7日間飼育し終了後に同じく屠殺、肝臓の摘出を行った。

飼育期間中は予備飼育期間も毎日体重測定、飼料摂取量の計量を行った。本実験開始3日前より24時間尿の採取を始め本実験7日目まで個別に代謝ケージにて採尿し尿中タウリン排泄量測定に用いた。

## 4. 測定方法

①タウリンの定量は高速液体クロマトグラフィー(日立製655A-52形カラムオープン、655-A13形反応ポンプAS-4000形インテリジェントオートサンプラー、F-1050形分光蛍光光度計、D-2500形クロマトデータ処理装置の構成)を使用。移動層はリチウム緩衝液A液(pH3.22)・B液(pH5.33)・C液(pH9.45)、反応層としてニンヒドリン溶液(和光製835形日立アミノ酸分析計用)を使用。カラム温度 $37^\circ\text{C}$ で分析した。タウ

リンのピークの同定はアミノ酸混合標準液(和光製アミノ酸自動分析用)との比較により行った。

②肝グルタチオン量測定はDTNB-グルタチオンレダクターゼ法(DTNB法にグルタチオンレダクターゼ法を共役させる方法)<sup>5)</sup>で測定した。還元型グルタチオン(GSH)はDTNBと反応し還元してP-ニトロチオフェノールを生成しGSHは酸化されてGSSGとなる。GSSGはグルタチオンレダクターゼと $\text{NADPH}_2$ の存在下でGSHとなり、再びDTNBと反応するサイクルが形成される。従って過剰の $\text{NADPH}_2$ とDTNB、一定量の酵素を入れると総グルタチオン(GSH+GSSG)に比例してDTNBは還元され発色する。その発色を412nmの吸収増加で測定した。

## 結果および考察

4週齢のS.D.系成長期雄ラットを用い、無タンパク食群とコントロール食(カゼインタンパク20%食)群に分け、7日間飼育し、含硫アミノ酸代謝の変化と肝グルタチオン含有量を測定した。

Table 2に示したように平均体重の変化と飼料摂取量の関係については両群共に前報<sup>1)</sup>とほぼ同じ傾向を示した。すなわち無タンパク食群は実験開始時に $127.43\text{g} \pm 3.32\text{g}$ であったが1日目から4~5g/dayずつ減少していき7日目には $103.76\text{g} \pm 3.76\text{g}$ となり19%減となった。これに対しコントロール食群では実験開始時に $129.18\text{g} \pm 4.79\text{g}$ であったが毎日4~5g/dayずつ増加していき7日目には $189.10\text{g} \pm 5.20\text{g}$ となり46%増となった。飼料摂取量の変動では予備飼育終了時には両群共に平均16g/台であったが無タンパク食群は1日目から減少し7日目には $6.78\text{g} \pm 0.95\text{g/day}$ 、一方コントロール食群では少しづつ増加し7日目には $19.33\text{g} \pm 0.51\text{g/day}$ となった。実験食7日間の総飼料摂取量平均は無タンパク食群が $51.85\text{g}/7\text{days}$ 、コントロール食群は $122.84\text{g}/7\text{days}$ となり、これらの結果から飼育効率を求めると無タンパク食群は-0.465、コントロール食群では0.488となり、コントロール食群は順調な成長が認められた。

Table 2に示すように尿中タウリン排泄量の群別平均は、無タンパク食群では実験開始時 $15.99 \pm 12.74\text{nmol/day} \cdot \text{g b.w.}$ が1日目 $11.59 \pm 7.49\text{nmol/day} \cdot \text{g b.w.}$ 、2日目 $8.73 \pm 8.61\text{nmol/day} \cdot \text{g b.w.}$ と急激に減少後3日目より増加し始め $24.61 \pm 12.82\text{nmol/day} \cdot \text{g b.w.}$ にも達した。コントロール食群では実験開始時 $24.27 \pm$

Table 2 Urinary taurine excretion

	Proteine free diet					Control (Casein 20% diet)					
	day	b. w. (g)	±S. D.	nmol/day	nmol/d.b.w.	±S. D.	b. w. (g)	±S. D.	nmol/day	nmol/d.b.w.	±S. D.
Pre.	3	111.8	±2.91	3036.25	27.36	±14.87	113.1	±3.31	2893.75	25.46	± 5.77
	4	120.0	±2.19	2812.50	23.41	±19.52	122.3	±3.20	3670.00	30.09	±13.43
	5	127.4	±3.32	2046.25	15.99	±12.74	129.2	±4.79	3146.25	24.27	± 5.19
Exp.	1	123.9	±3.11	1435.00	11.59	± 7.49	139.0	±5.34	2275.00	16.35	± 6.13
	2	118.6	±3.87	970.00	8.37	± 8.61	147.4	±4.28	1711.25	11.69	± 5.62
	3	114.4	±3.43	1093.75	9.70	± 8.56	156.1	±4.08	953.75	6.09	± 1.01
	4	111.4	±3.23	2736.25	24.61	±12.82	165.0	±5.46	636.25	3.89	± 1.71
	5	107.8	±3.39	2584.25	24.01	± 4.11	173.5	±5.86	463.75	2.70	± 0.93
	6	105.4	±3.80	2635.00	24.99	± 2.80	181.6	±6.03	433.75	2.39	± 0.15
	7	103.4	±3.76	2063.75	19.96	±17.90	189.1	±5.20	366.25	1.94	± 0.49

5.19nmol/day・g b.w.であったが、3日目までに急激に減少し6.09±1.01nmol/day・g b.w.となり、その後も減少が続き7日目には1.94±0.49nmol/day・g b.w.となった。今回の実験でコントロール食にはタンパク質として含硫アミノ酸が制限アミノ酸であるカゼインを使用した。山口ら<sup>3)</sup>によるとタウリンの生成材料である含硫アミノ酸が必要に対して不足するときは、肝臓におけるタウリンの生合成を抑制し幾つかの組織ではその貯蔵を増し、尿中への排泄を減少させて欠乏を代償しようとする。また過剰の場合肝CDO活性が上昇しタウリンへの代謝を促進するため尿中タウリン量は増加

すると報告している。細川ら<sup>6)</sup>によると4週齢の成長期ラットの尿中タウリン排泄量はカゼイン含量16%では15.8±3.9nmol/day・g b.w.、カゼイン含量24%では515.0±246.7nmol/day・g b.w.であった。従ってカゼインタンパク質16%では需要量以下であったため尿中タウリン量は減少、24%では需要量以上で尿中タウリン量が増加したとしている。今回の結果においてもコントロール食群では著しい成長にタンパク質が使われカゼインタンパク20%食では尿中タウリンの減少を示している。無タンパク食においては、タンパク質が供給されないためタンパク質の代謝は制限され1日目、2日目と急激に尿中タウリン量を減少させたが、3日目から増加していったのは体組織に貯蔵されているグルタチオンをシステインに変換して代謝に用いていると考えられ、その裏づけとして肝臓中のグルタチオン含有量を測定したTable 3。予備実験終了時は肝重量平均6.80g±0.67g、グルタ

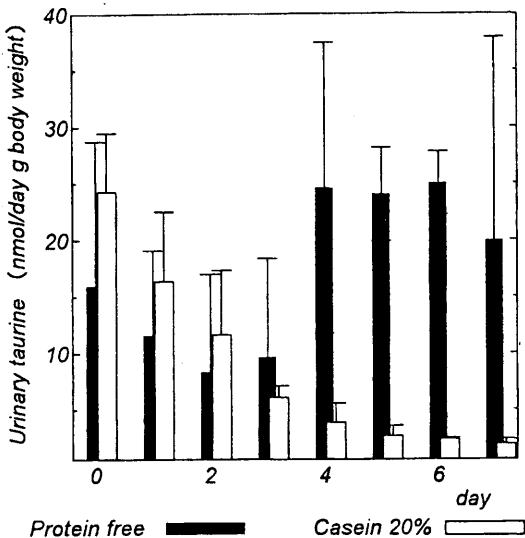


Fig. 1 Urinary taurine excretion of rats fed Casein 20% diet or Protein free diet

Table 3 Glutation in liver

	liver (g)	±S. D.	glutation (mg)	±S. D.	mg/1.100g (mg)	±S. D.
Pre-exp.	6.80	±0.67	112.94	±17.44	1660.21	±176.1
Pro. f. d.	4.05	±0.24	21.77	± 0.67	539.32	± 26.6
Cont. d.	8.62	±0.44	93.89	±18.29	1085.86	±178.7

チオン濃度は1660.21mg±176.13mg/肝100gであったが、無タンパク食群では7日後には肝重量4.05g±0.24g、グルタチオン濃度は539.32mg±26.62mg/肝100gで約1/3となっている。無タンパク食群では尿中タウリン排泄量が著しい増加を見せたが、肝グルタチオンの保有量を変換させて生命維持代謝を保持していることが裏付

けられた。一方コントロール食群は肝重量 $8.62\text{g}\pm 0.44\text{g}$ 、グルタチオン濃度は $1085.85\text{mg}\pm 178.79\text{mg}/\text{肝}100\text{g}$ であった。著しい成長に各アミノ酸が費やされ実験開始時より肝グルタチオンの保有量も減少していた。

### 要 約

4週齢Sprague-Dawley系雄ラットを用い無タンパク食群とカゼインタンパク質20%を含むコントロール食群に分け予備飼育5日間後7日間飼育して、含硫アミノ酸代謝の変化と今回は各実験食開始前と終了時の肝臓中のグルタチオン含有量を測定した。

- ①無タンパク食群の7日後の平均体重は19%減の $103.76\text{g}\pm 3.76\text{g}$ で飼育効率は一0.465となった。コントロール食群の7日後の平均体重は46%増の $189.10\text{g}\pm 5.20\text{g}$ で飼料効率は0.488となり順調な成長が認められる。
- ②無タンパク食群の尿中タウリン排泄量の変動は実験開始2日目まで急激に減少しほぼ半減したが、3日目より増加し始め $24.61\pm 12.82\text{nmol}/\text{day}\cdot\text{g b.w.}$ にも達した。コントロール食群では1日目、2日目と徐々に減り始め体重の増加に従い激減し7日目には $1.94\pm 0.49\text{nmol}/\text{day}\cdot\text{g b.w.}$ となった。

③各実験食開始前の肝臓中のグルタチオン濃度は $1660.21\text{mg}\pm 176.13\text{mg}/\text{肝}100\text{g}$ であったが、無タンパク食群の実験7日後には $539.32\text{mg}\pm 26.62\text{mg}/\text{肝}100\text{g}$ に減少した。成長の著しいコントロール食群では同じく7日後には $1085.85\text{mg}\pm 178.79\text{mg}/\text{肝}100\text{g}$ に減少した。

④無タンパク食群における尿中タウリン排泄量の増加は肝グルタチオン保有量を減らすことにつながる事が示唆された。

### 参考文献

- 1) 出海みどり, 高橋ルミ子: 東京家政大学研究紀要 36: 25~28 (1996)
- 2) 東条仁美他: 神奈川栄養短大紀要 25: 11~16 (1993)
- 3) 山口賢次: 化学と生物 23: 299~307 (1984)
- 4) 山口賢次: 含硫アミノ酸 4: 25~41 (1981)
- 5) 生化学実験講座11アミノ酸代謝と生体アミン(中) p.691~695(1976) 東京化学同人
- 6) Y. Hosokawa他: The Journal of Nutrition Vol. 118-4 (1988)