

発育期ラットにおける含硫アミノ酸代謝からみた 必須アミノ酸の要求量について (II)

東 條 仁 美・笹 島 郁 美・新 関 嗣 郎
細 川 優・佐 藤 郁 雄・山 口 賢 次
(国立栄養研究所母子栄養部*)

Study of Essential Amino Acids Requirement on the Basis of Sulfur Amino Acid Metabolism in Young Rats (II)

Hitomi TOJO, Ikumi SASAJIMA, Shiro NIIZEKI
Yu HOSOKAWA, Ikuo SATO and Kenji YAMAGUCHI
Division of Maternal and Child Nutrition, National Institute of Nutrition

Requirement of essential amino acid for growing rats was examined on the basis of hepatic cysteine dioxygenase (CDO) activity and urinary taurine. Young male rats were fed on semipurified diets of 0.45% sulfur amino acids (Met + Cys, 7:5) and different level of threonine, tryptophan and histidine for 18 days. Levels of threonine, tryptophan and histidine in each experimental diet were adjusted to six levels (0.125, 0.250, 0.300, 0.350, 0.400, and 0.500%), five levels (0.050, 0.075, 0.100, 0.125, and 0.150%) and four levels (0.15, 0.20, 0.25 and 0.30%), respectively. Minimum requirement of threonine was resulted in 0.48% in CDO activity and 0.39% in urinary taurine and that of tryptophan was resulted in 0.13% in CDO activity and 0.13% in urinary taurine. Essentials of histidine was recognized in this experiment.

ラット肝臓における含硫アミノ酸代謝は摂取飼料蛋白質の含硫アミノ酸濃度により調節されること^{1,2)}や、制限アミノ酸量の変化によっても影響を受けること³⁾が示されている。よって飼料中の含硫アミノ酸 (SAA) が過剰でなくてもアミノ酸の体内利用が制限されると、Cysteine dioxygenase (CDO) 酵素活性を誘導し、Taurine 生成の増加をもたらす。著者らはアミノ酸混合飼料を用いて発育期ラットにおける必須アミノ酸の必要量を含硫アミノ酸代謝すなわち肝臓 CDO 酵素活性、尿中 taurine 排泄量を主な指標とし、測定する方法を検討しているが、前回含硫アミノ酸 (SAA) と Lysine について報告⁴⁾した。

*所在地：東京都新宿区戸山1-23-1 (〒162)

今回 Threonine (Thr), Tryptophan (Trp), Histidine (His) の要求量について検討した。

実 験 方 法

1. 実験動物および飼育条件

実験動物としては生後4週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット (日本クレア株) を用いた。5日間20% casein 飼料で予備飼育したのち, Table 1 に示した組成を基本とする実験飼料を自由摂取させた。アミ

Table 1. Composition of experimental diets

(g/kg)

Ingredients	Basal diet
AA mixture	108.9 ¹⁾
α -Corn starch	474.1
Sucrose	300
Soybean oil	50
Salt mixture ²⁾	35
Cellulose powder	20
Vitamin mixture ²⁾	10
Choline HCl	2

1) National Research Council (NRC) : Nutrient requirements of domestic animals, No.10, p.23 (1978).

2) AIN-76 mineral and vitamin mixture, J. Nutr., 107 : 1340, 1977.

ノ酸混合物は NRC⁵⁾ 組成に基づいたアミノ酸配合を基本として用いた。含硫アミノ酸量は前回の結果から最小必要量 (0.50%) よりやや低い0.45%とし, 各々の試験アミノ酸はそれぞれ数段階のレベルとして実験を行った。すなわち threonine 含量は6段階 (0.125, 0.250, 0.300, 0.350, 0.400, 0.500%), tryptophan 含量は5段階 (0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150%), histidine 含量は4段階 (0.15, 0.20, 0.25, 0.30%) とした。これらアミノ酸制限によるエネルギー減少分は sucrose で補った。これら実験飼料を18日間投与し, 実験期最後の3日間は採尿し, taurine 測定に供した。

2. 測定項目および方法

Glutathione は DTNB 法に Glutathione reductase 法を共役させる Owens & Belcher の方法⁶⁾ に準じて測定した。Cysteine は組織上清液について Gaitonde の酸性ニンヒドリン反応法⁷⁾ によって測定した。Taurine は Dowex 50W-X8 (200~400mesh) カラム (1~5 cm) を用い, 組織および尿サンプルの taurine を分離し, fluorescamine による蛍光法にて測定した。CDO 活性は解剖後ただちに肝臓を0.9% 食塩水にて灌流し, 脱血させた肝臓を0.25M sucrose 溶液により homogenize し, 105,000×g, 60分遠心して上清を分離し, 10% 酵素液を調製した。CDO 活性の測定は嫌氣的に L-cysteine で活性化させる山口らの方法⁸⁾ によった。

結果および考察

Thr 実験における飼料摂取量は0.250%で低く, 体重増加量は0.350%以下の群で顕著に低かった。肝

glutathione, cysteine は Thr レベルの増加に伴い、低くなる傾向を示した (Table 2)。CDO 活性, 尿中 taurine 排泄量を Fig. 1 に示した。CDO 活性は0.400%, 尿中 taurine 排泄量は0.350%以上の群で低値を示した。Thr の制限度が高いと含硫アミノ酸の蛋白合成などへの利用抑制が起こり, 結果的に SAA が CDO 誘導レベルに達していることによるものであると考えられる。次に Thr レベルと CDO 活性および尿中 taurine 排泄量の関係を Fig. 2 に示した。CDO 活性, 尿中 taurine 排泄量は0.350%以上の群で低値を示し, 殆ど差がなかったので, これらの平均値を基礎値として点線で示した。そしてこの基礎値と最小二乗法で求めた相関直線を外挿した交点の値を最小必要量とした。CDO 活性から0.436%, 尿中

Table 2. Food intake, body weight gain, hepatic total glutathione, cysteine and taurine contents of rats fed on 0.45% sulfur amino acids and different level of threonine diets

Thr level (%)	Food intake (g/18days)	BW gain (g/18days)	Total GSH (μ mol/gBW)	Cysteine (nmol/gBW)	Taurine (nmol/gBW)
0.125	162.9 \pm 3.60 ^{a)}	-3.7 \pm 0.76 ^{a)}	488 \pm 14.3 ^{a)}	3.1 \pm 0.25 ^{a)}	80.7 \pm 4.6
0.250	321.9 \pm 15.60 ^{a)}	73.2 \pm 5.44 ^{a)}	425 \pm 9.7 ^{a)}	2.8 \pm 0.17 ^{a)}	81.3 \pm 4.8
0.300	350.6 \pm 5.05	95.0 \pm 2.42 ^{a)}	372 \pm 17.8	2.6 \pm 0.20	82.0 \pm 8.2
0.350	354.3 \pm 11.18	112.5 \pm 4.94	361 \pm 8.0	2.5 \pm 0.05	106.6 \pm 12.5
0.400	361.0 \pm 4.91	113.0 \pm 2.29	295 \pm 24.9	2.2 \pm 0.13	79.7 \pm 6.4
0.500	374.7 \pm 10.28	122.3 \pm 4.69	276 \pm 17.4	1.7 \pm 0.07	81.5 \pm 11.6

Each value represents mean \pm SE (n=6)

a) Significantly different from 0.500% threonine group, p < 0.01

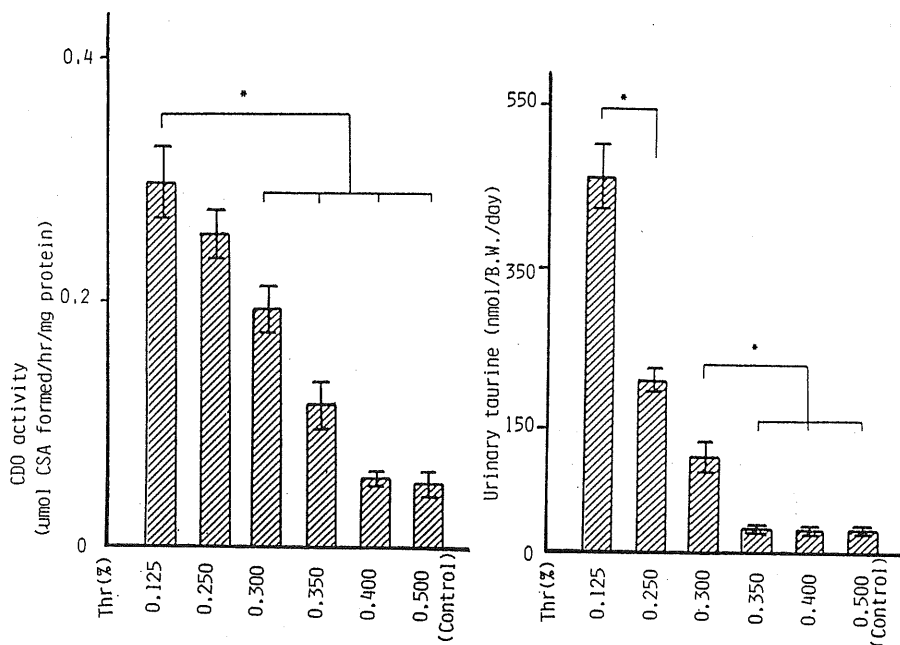


Fig. 1. Hepatic cysteine dioxygenase (CDO) activity and urinary taurine contents of rats fed on 0.45% sulfur amino acids and different level of threonine diets. (Mean \pm SE, n = 6) *p < 0.01.

taurine 排泄量から0.350%の値が得られた。この値は0.45%のSAAを用いた値であるのでSAAの最小必要量は前回の結果から0.50%であり、この値で補正すると、CDO活性の場合は $0.436 \times 0.50 / 0.45 = 0.484$ 、尿中タウリンの場合は $0.350 \times 0.50 / 0.45 = 0.389$ となる。

Trpについては飼料摂取量、体重増加量とも0.100%以下の群では低く、肝 glutathione は Trp レベルの増加に伴い低い傾向にあった。cysteine は0.050%と0.075%との間に差がみられ、taurine では各群よく似ていた (Table 3)。CDO活性、尿中 taurine 排泄量を Fig. 3 に示した。両値とも0.100%以上の群で著しい低下が認められた。Thr と同様に散布図を Fig. 4 に示した。0.125%、0.150%の2群の低い平均値を基礎値として相関直線との交点の値を検討した結果、CDO活性からは0.118%、尿中 taurine 排泄量からは0.115%となり、Thr 同様 SAA の制限値で補正すると CDO 活性では $0.118 \times 0.50 / 0.45 = 0.131$ 、尿 taurine では $0.115 \times 0.50 / 0.45 = 0.127$ と算出され、Trp の最小要求量は0.13%となった。

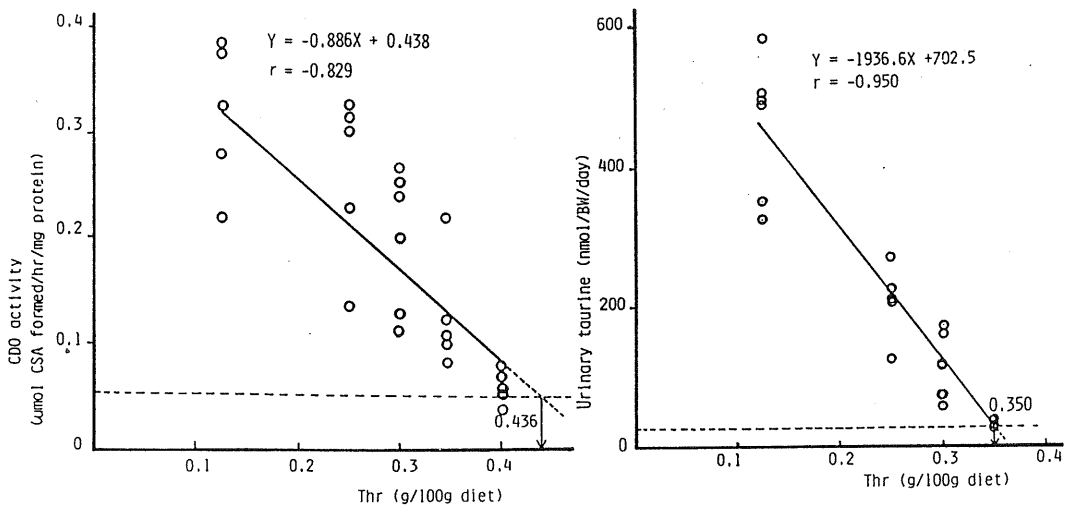


Fig. 2. Correlation between cysteine dioxygenase (CDO) activity and urinary taurine contents and threonine level of rats fed on 0.45% sulfur amino acids and different level of threonine diets.

Table 3. Food intake, body weight gain, hepatic total glutathione, cysteine and taurine contents of rats fed on 0.45% sulfur amino acids and different level of tryptophan diets

Thr level (%)	Food intake (g/18days)	BW gain (g/18days)	Total GSH (μ mol/gBW)	Cysteine (nmol/gBW)	Taurine (nmol/gBW)
0.050	178.5 \pm 6.80 ^{a)}	21.0 \pm 1.67 ^{a)}	299 \pm 21.5 ^{a)}	1.8 \pm 0.18 ^{a)}	78.5 \pm 3.2
0.075	285.6 \pm 7.88 ^{a)}	75.6 \pm 2.80 ^{a)}	308 \pm 14.1 ^{a)}	2.5 \pm 0.13	103.2 \pm 10.1
0.100	318.6 \pm 17.11	102.4 \pm 9.59	264 \pm 10.7	2.5 \pm 0.08	89.2 \pm 7.6
0.125	336.2 \pm 11.71	113.6 \pm 6.85	236 \pm 12.4	2.2 \pm 0.07	80.7 \pm 2.3
0.150	335.6 \pm 5.08	115.6 \pm 2.31	204 \pm 8.6	2.4 \pm 0.02	77.7 \pm 2.7

Each value represents mean \pm SE (n=5)

a) Significantly different from 0.150% tryptophan group, p < 0.01

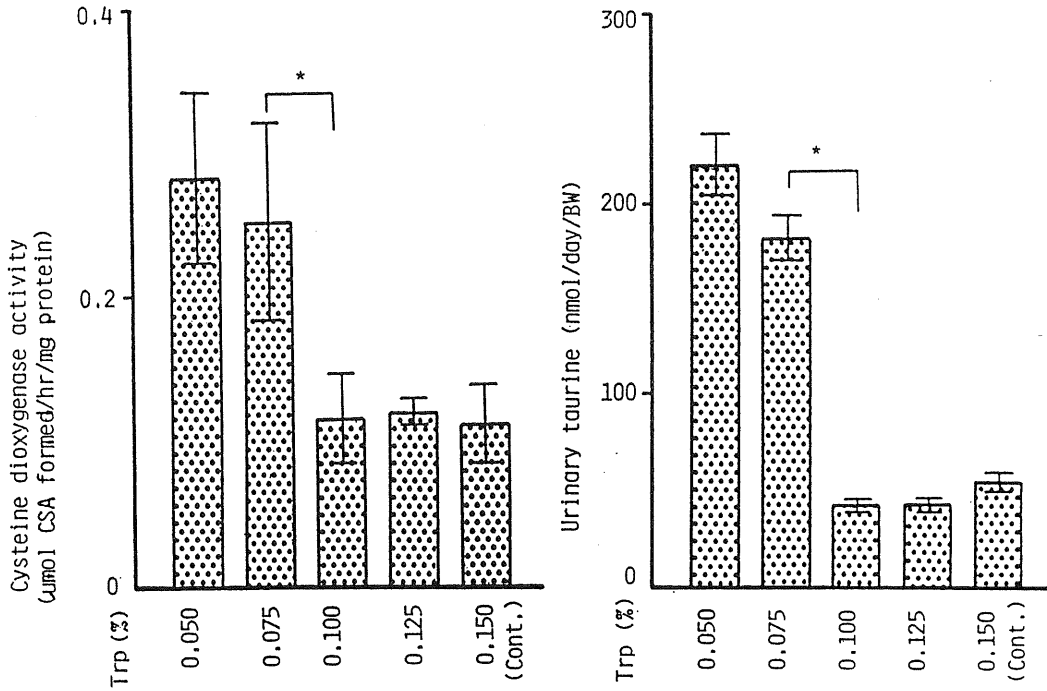


Fig. 3. Hepatic cysteine dioxygenase (CDO) activity and urinary taurine contents of rats fed on 0.45% sulfur amino acids and different level of tryptophan diet. (Mean \pm SE, n = 5) *p < 0.01.

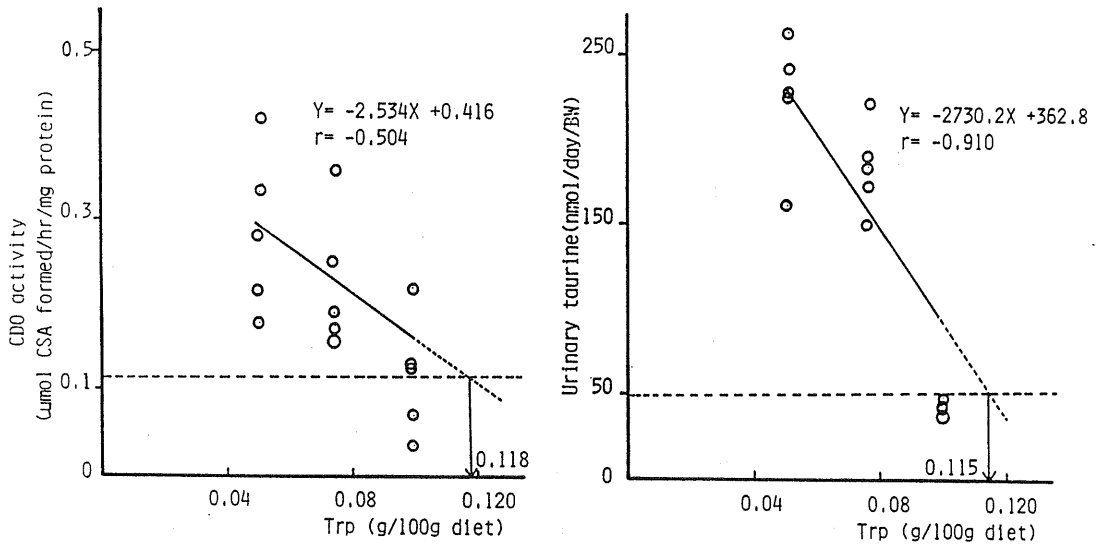


Fig. 4. Correlation between cysteine dioxygenase (CDO) activity and taurine contents and tryptophan level of rats fed on 0.45% sulfur amino acids and different level of tryptophan diets.

His においては飼料摂取量, 体重増加量とも0.15%群だけで低く, 肝 glutathione は0.25%と0.30%との間で, cysteine では0.15%と0.20%との間で差がみられたが, taurine では各群との間に差はみられなかった (Table 4)。CDO 活性および尿中 taurine 量を Fig. 5 に示した。CDO 活性は0.15%, 0.20%の低レベルで高い値を示し, 尿 taurine 量は0.15%で高い値を示した。CDO 活性および尿 taurine 量が His の低レベルで上昇することより, His の必須性は確認されたが, 最小必要量については添加量を更に下げ検討している。

Table 4. Food intake, body weight gain, hepatic total glutathione, cysteine and taurine contents of rats fed on 0.45% sulfur amino acids and different level of histidine diets

His level (%)	Food intake (g/18days)	BW gain (g/18days)	Total GSH (μ mol/gBW)	Cysteine (nmol/gBW)	Taurine (nmol/gBW)
0.15	278.9 \pm 21.14 ^{a)}	81.2 \pm 10.82 ^{a)}	336 \pm 20.6 ^{a)}	1.5 \pm 0.06	121.1 \pm 16.8
0.20	344.8 \pm 15.67	113.3 \pm 10.07	350 \pm 19.1 ^{a)}	2.0 \pm 0.10	175.8 \pm 29.0
0.25	332.6 \pm 8.51	111.3 \pm 4.76	348 \pm 12.2 ^{a)}	2.1 \pm 0.07	116.2 \pm 17.7
0.30	345.6 \pm 14.23	108.0 \pm 8.56	253 \pm 21.9	1.6 \pm 0.11	105.3 \pm 7.4

Each value represents mean \pm SE (n = 6)

a) Significantly different from 0.30% histidine group, p < 0.01

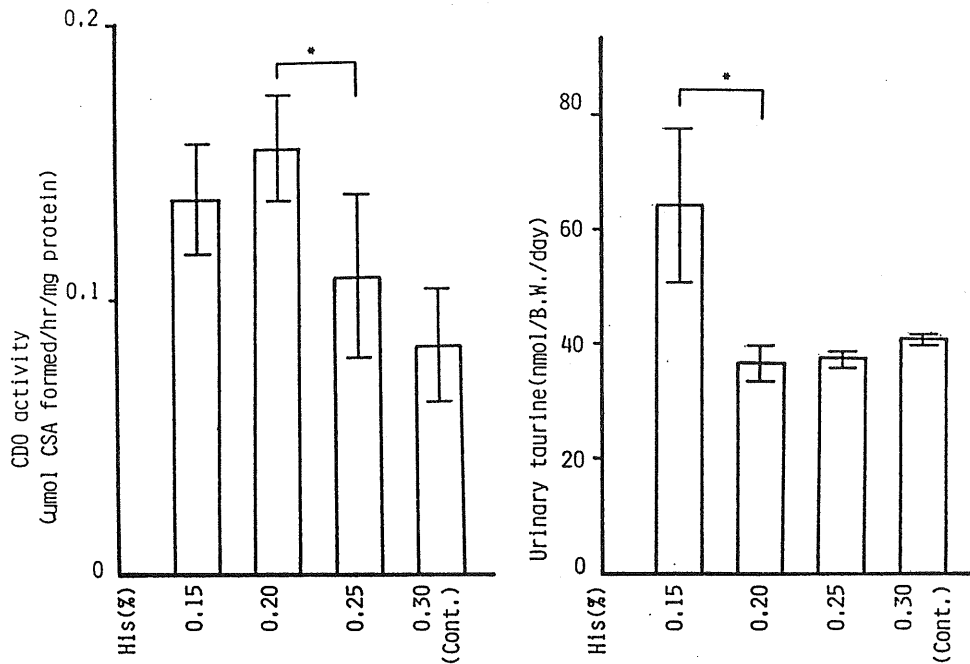


Fig. 5. Hepatic cysteine dioxygenase (CDO) activity and urinary taurine contents of rats fed on 0.45% sulfur amino acids and different level of histidine diets. (Mean \pm SE, n = 6) *p < 0.01.

文 献

- 1 . KOHASHI, N., K. YAMAGUCHI, Y. HOSOKAWA, Y. KORI, O. FUJII and I. UEDA (1978) J. Biochem. 84 : 159
- 2 . DANIELS, K. M. and M. H. STIPANUK (1982) J. Nutr. 112 : 2130
- 3 . YAMAGUCHI, K., Y. HOSOKAWA, S. NIIZEKI, H. TOJO and I. SATO (1985) Taurine; Biological action and clinical perspective, Alan R. Liss, Inc, New York : pp.23-32
- 4 . 東條仁美, 笹島郁美, 新関嗣郎, 細川 優, 山口賢次 (1987) 含硫アミノ酸 10 : 165
- 5 . Committee on animal nutrition board on agriculture and renewable resources, National Research Council (1978) Nutrient requirements of laboratory animals, No.10 : pp.13-23
- 6 . OWENS, C. W. I. and R. V. BELCHER (1965) Biochem. J. 94 : 705
- 7 . GAITONDE, M. K. (1967) Biochem. J. 104 : 627
- 8 . YAMAGUCHI, K., Y. HOSOKAWA, N. KOHASHI, Y. KORI, S. SAKAKIBARA and I. UEDA (1978) J. Biochem. 83 : 479