

## ブリ *Seriola quinqueradiata* の筋肉組織における 分枝鎖アミノ酸代謝

森 井 秀 昭

### Metabolic Fate of Branched-Chain Amino Acids in Muscles of Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*

Hedeaki MORII

In order to discuss the indispensable amino acid requirements of fish, the production of  $^{14}\text{CO}_2$  from L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Leu, L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Ile, and L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Val and the incorporation of the  $^{14}\text{C}$ -amino acids into protein and lipids in dorsal and ventral muscles of yellowtail, *Seriola quinqueradiata* were studied by using tissue culture method. The production of  $^{14}\text{CO}_2$  and the incorporation into lipids decreased in the order of [ $^{14}\text{C}$ ]Ile, [ $^{14}\text{C}$ ]Leu, and [ $^{14}\text{C}$ ]Val and the incorporation into protein in the order of [ $^{14}\text{C}$ ]Leu, [ $^{14}\text{C}$ ]Ile, and [ $^{14}\text{C}$ ]Val in both tissues. The production of  $^{14}\text{CO}_2$  and the incorporation into protein were larger in ventral muscle than in dorsal muscle being contrary in the incorporation into lipids. In all experiments, the incorporation into protein was extremely larger than that into lipids, and this trend was especially remarkable in ventral muscle. In comparison between the incorporations into protein and lipids and the production of  $^{14}\text{CO}_2$ , the incorporations were larger than the production of  $^{14}\text{CO}_2$  even that into lipids. All  $^{14}\text{C}$ -amino acids were incorporated into both fatty acids and unsaponifiable matter in both tissues. The incorporated amounts in both tissues were more in fatty acids than in saponifiable matter. The majority of the  $^{14}\text{C}$ -amino acids incorporated into lipids are some other substances than the fatty acids and unsaponifiable matter.

魚類（例えばニジマス）の栄養に必要な必須アミノ酸量は陸上動物（例えばマウス）に比べ大きい（1），このうちでもロイシン（Leu），イソロイシン（Ile）およびバリン（Val）などの要求量は特に高い（1，2）。また，Leu と Ile の間には適当な均衡が必要であることがマスノスケで明らかにされた（3）。このように，魚類の必須アミノ酸要求量を高めている原因の1つとして，魚類栄養の必須アミノ酸パターンの著しい特徴が考えられる。一方，能勢（4）が指摘したように，これら要求量が高い必須アミノ酸が，エネルギー源に使用されている部分であることも考えられる。そこで著者は，L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Leu，L-[U-

$^{14}\text{C}$ ]Ile および L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Val の各放射性アミノ酸からの  $^{14}\text{CO}_2$  の生成量と蛋白質および脂質へのこれら  $^{14}\text{C}$ -アミノ酸の取り込み量を調べ，魚類における必須アミノ酸要求量が高い理由を知ろうとした。

#### 材料および方法

**供試魚** 12月中旬に，長崎県協岬で得た体長約60 cm，体重約3.5kgの養殖ブリ *Seriola quinqueradiata* を，生きた状態で研究室に持ち帰り，実験に供した。

**供試組織** 背部および腹部の，出来る限り同質の筋肉組織を用いた。

**組織培養** 即殺直後の魚体から得た各組織は直ちに氷冷した Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液（グルコース 0.02 M を含む）の中に入れ、Stadie-Riggs 型スライサーで厚さ約 0.3mm の組織片とした。次に、その  $2,000 \pm 50 \text{ mg}$  と  $^{14}\text{C}$ -分枝鎖アミノ酸 ( $\text{L-}[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Leu} \cdot \text{L-}[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Ile}$ :  $348 \text{ mCi/mmol}$ ,  $\text{L-}[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Val}$ :  $270 \text{ mCi/mmol}$ ) の  $2.5 \mu\text{Ci}$  を含む Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 20ml を大型試験管 ( $30 \times 200 \text{ mm}$ ) 型の培養器に入れ、95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$  の気相で、 $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、6 時間振とう培養した。培養後、培養試験管を直ちに氷冷水中に入れ反応を停止した。また、発生する  $^{14}\text{CO}_2$  はハイアミン 10X-ヒドロキシド 2 ml に吸収させた。

なお、一つの実験項目について、6 検体を用いた。

**放射能測定用試料の分析** 反応停止後の培養液は直ちにろ過し、ろ紙上の脂質を含む組織は十分に水洗後、クロロホルム・メタノール (1:1) 混液で脂質を抽出した〔なお、脂質含量は背肉で 5.7~13.1% (平均 9.0%)、腹肉で 15.6%~34.2% (平均 24.7%) の範囲で変動していた〕。一方、脂質抽出残渣は蛋白質試料とした。また、脂質はけん化後常法により脂肪酸と不けん化物とに分離した〔なお、不けん化物含量は背肉脂質では 2.9~6.3% (平均 3.9%)、腹肉脂質では 0.5~1.0% (平均 0.8%) であった〕。

**水分量および蛋白質量の測定** 常法により測定した水分量は背肉で平均 72.4%、腹肉で平均 62.7%、またケルダール法で測定した蛋白質含量は背肉で平均 16.6%、腹肉で平均 17.9% であった。

**放射能量の測定**  $^{14}\text{CO}_2$  はこれを吸収したハイアミン 10X-ビドロキシド 2 ml に、トルエンシンチレーター 8 ml を加え、また、各脂質は石油エーテル溶液の 1 ml に同シンチレーター 8 ml を加え、また蛋白質は乾物約 50mg にプロトゾール 1 ml を加えた後、 $55^\circ\text{C}$  で 20 時間分解したものに同シンチレーター 8 ml を加え、液体シンチレーションカウンタで放射能量を測定した。

## 結 果

背肉および腹肉により、 $^{14}\text{C}$ -分枝鎖アミノ酸から生成された  $^{14}\text{CO}_2$  の生成量を Table 1 に示す。

$^{14}\text{CO}_2$  の生成量は、背肉および腹肉とも Ile, Leu, Val の順に減少したが、いずれのアミノ酸の場合とも腹肉は背肉の約 2 倍の  $^{14}\text{CO}_2$  の生成量を示した。すなわち、腹肉は背肉に比べ、これら必須アミノ酸の完全酸化能が大きいことがわかる。

背肉および腹肉の蛋白質への  $^{14}\text{C}$ -分枝鎖アミノ酸の取り込み結果を Table 2 に示す。

蛋白質への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量は、背肉および腹肉の場合とも Leu, Ile, Val の順に減少したが、いずれのアミノ酸の場合とも、腹肉は背肉よりその取り込み量は大きく、すなわち、Leu では腹肉は背肉の 5.6 倍、Ile では 5.3 倍、Val では 3.9 倍であった。

蛋白質への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量と  $^{14}\text{CO}_2$  の生成量を比較すると、背肉および腹肉とも蛋白質への取り込み量の方が  $^{14}\text{CO}_2$  の生成量より極めて大きく、すなわち背肉の Leu では前者は後者の 74.1 倍、Ile では 44.3 倍、Val では 65.8 倍、また腹肉の Leu では 188.2 倍、Ile では 102.2 倍、Val では 108.7 倍であった。

背肉および腹肉の脂質への  $^{14}\text{C}$ -分枝鎖アミノ酸の取り込み結果を Table 3 に示す。

脂質への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量は、背肉および腹肉の場合とも Ile, Leu, Val の順に減少し、 $^{14}\text{CO}_2$  の生成量と同一傾向を示した。すなわち、各分枝鎖アミノ酸の完全酸化の度合は、各分枝鎖アミノ酸の間で大きな差がないことがわかる。また、いずれのアミノ酸の場合とも、背肉が腹肉より脂質への取り込み量が大きかった。これは、前述したように、背肉が腹肉に比べ完全酸化の度合が小さいことが、その理由の一つと考えられる。

単位脂質重量に対する  $^{14}\text{C}$  の取り込み量を見ると、

Table 1. Production of  $^{14}\text{CO}_2$  from  $^{14}\text{C}$ -branched-chain amino acids in dorsal and ventral muscles of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*.

Substrate	Dorsal muscle (cpm/2g wet tissue)	Ventral muscle (cpm/2g wet tissue)
L- $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Leu}$	957	2,095
L- $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Ile}$	1,133	2,585
L- $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Val}$	631	1,498

2,000  $\pm$  50 mg of tissue slices were incubated in 20 ml of Krebs-Ringer bicarbonate medium containing 0.02 M glucose and 2.5  $\mu\text{Ci}$  of each  $^{14}\text{C}$ -branched-chain amino acid (L- $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Leu} \cdot \text{L-}[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Ile}$ : 348 mCi/mmol, L- $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{Val}$ : 270 mCi/mmol) for 6 hours at  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . The incubation medium was equilibrated with 95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$ . The evolved  $^{14}\text{CO}_2$  from  $^{14}\text{C}$ -branched-chain amino acids was absorbed with 2.0 ml of hyamine 10X-hydroxide. The values are the result of the mean of 6 experiments.

Table 2. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -branched-chain amino acids into protein in dorsal and ventral muscles of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*.

Substrate	Dorsal muscle			Ventral muscle		
	cpm/2g wet tissue	cpm/g dry tissue	cpm/g protein	cpm/2g wet tissue	cpm/g dry tissue	cpm/g protein
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Leu	70,879	254,916	213,545	394,214	1,760,788	1,192,253
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Ile	50,172	183,581	151,120	264,083	1,200,763	798,800
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Val	41,518	164,474	125,056	162,804	738,797	500,024

The incubation method is the same as Table 1. To measure the incorporated amount into tissue protein, tissue slices after extracting lipids were digested with protozol. The values are the result of the mean of 6 experiments. The values per gram dry weight and per gram protein are the result against the mean of dry weight (dorsal muscle: 27.6%, ventral muscle: 37.3%) and protein content (dorsal muscle: 16.6%, ventral muscle: 17.9%) determined by samples other than those for radioactive determination.

Table 3. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -branched-chain amino acids into lipids in dorsal and ventral muscles of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*.

Substrate	Dorsal muscle		Ventral muscle	
	cpm/2g wet tissue	cpm/g lipids	cpm/2g wet tissue	cpm/g lipids
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Leu	6,504	33,084	2,778	5,054
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Ile	7,463	38,833	2,998	5,913
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Val	2,628	12,811	841	2,041

The incubation method is the same as Table 1. Petroleum ether was used as solvent in measure of radioactivity of lipids. The values are the result of the mean of 6 experiments.

いずれのアミノ酸の場合とも、背肉が腹肉より脂質への取り込み量が大きく、すなわち Leu では背肉が腹肉の6.5倍、Ile では6.6倍、Val では6.3倍であった。

脂質への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量と  $^{14}\text{CO}_2$  の生成量を比較すると、背肉では脂質への取り込み量が  $^{14}\text{CO}_2$  の生成量より大きく、すなわち Leu では前者は後者の6.8倍、Ile では6.6倍、Val では4.2倍であった。一方、腹肉では脂質への取り込み量と  $^{14}\text{CO}_2$  の生成量の間には著しい差異は見られず、すなわち Leu では前者は後者の1.3倍、Ile では1.2倍、および Val では0.6倍で脂質への取り込み量より  $^{14}\text{CO}_2$  の生成量の方が大きかった。

また、脂質への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量と蛋白質への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量を比較すると、背肉および腹肉とも、いずれのアミノ酸も蛋白質への取り込み量の方が極めて大きかった。すなわち、背肉の Leu では蛋白質への取り込み量は脂質への取り込み量の21.9倍、Ile では

6.7倍、Val では15.8倍、また腹肉の Leu では141.9倍、Ile では88.1倍、Val では193.6倍であった。

背肉および腹肉の脂肪酸および不けん化物への  $^{14}\text{C}$ -分枝鎖アミノ酸の取り込みを Table 4 および 5 に示す。

背肉および腹肉とも、いずれの  $^{14}\text{C}$ -アミノ酸とも脂肪酸と不けん化物の双方に取り込まれた。また、その取り込み量は不けん化物より脂肪酸の方が著しく大きかった。なお、脂肪酸と不けん化物への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量の合計は、脂質への  $^{14}\text{C}$  の取り込み量に比べ、背肉および腹肉のいずれのアミノ酸の場合とも極めて小さかった。すなわち、脂肪酸および不けん化物以外の脂質構成成分への取り込みが考えられる。

脂肪酸および不けん化物とも、背肉および腹肉の双方で Leu, Ile, Val の順に取り込み量を減じた。これは、脂質の取り込み傾向と異なる。したがって脂質で見られた傾向は、脂肪酸および不けん化物以外の脂

Table 4. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -branched-chain amino acids into fatty acids in dorsal and ventral muscles of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*.

Substrate	Dorsal muscle		Ventral muscle	
	cpm/2g wet tissue	cpm/g fatty acids	cpm/2g wet tissue	cpm/g fatty acids
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Leu	353	2,772	319	664
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Ile	201	1,703	152	368
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Val	92	776	65	155

The incubation method is the same as Table 1. Petroleum ether was used as solvent in measure of radioactivity of fatty acids. The values are the result of the mean of 6 experiments.

Table 5. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -branched-chain amino acids into unsaponifiable matter in dorsal and ventral muscles of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*.

Substrate	Dorsal muscle		Ventral muscle	
	cpm/2g wet tissue	cpm/g unsaponifiable matter	cpm/2g wet tissue	cpm/g unsaponifiable matter
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Leu	23	3,902	47	13,735
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Ile	17	2,940	42	8,036
L-[U- $^{14}\text{C}$ ]Val	17	2,142	35	5,317

The incubation method is the same as Table 1. The incubation medium was equilibrated with 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$ . Petroleum ether was used as solvent in measure of radioactivity of fatty acids. The values are the result of the mean of 6 experiments.

質構成成分に取り込まれた  $^{14}\text{C}$  の取り込み結果を示すと言える。また、いずれのアミノ酸の場合とも、脂肪酸では腹肉より背肉の方が、不けん化物では背肉より腹肉の方がその取り込み量が大きかった。これらの傾向は単位重量に対して見た場合も同様で、とくに背肉と腹肉の間で見られた取り込み量の差が、脂肪酸および不けん化物とも顕著であった。

## 考 察

陸上哺乳動物（ラット）では、Leu は肝臓では蛋白質および脂肪組織では脂質の合成に用いられるが、筋肉では完全酸化され、すなわち筋肉での完全酸化量と蛋白質への取り込み量は同程度であることが知られている（5）。

今回、ブリの背肉および腹肉の双方で、いずれの分枝鎖アミノ酸も完全酸化がなされた。しかし、 $^{14}\text{C}$ -分枝鎖アミノ酸の完全酸化量は蛋白質への  $^{14}\text{C}$ -分枝鎖アミノ酸の取り込み量に比べ、いずれのアミノ酸の場合も極めて小さく、したがって、魚類の必須アミノ酸

を多量に必要とする理由として考えられる“エネルギー源としての利用”は考えにくい。

ペニマスでは、栄養素として Leu は Ile の 1.48 倍が必要であると報告されているが（2）、今回、ブリの背肉では  $^{14}\text{C}$ Leu は  $^{14}\text{C}$ Ile の 1.41 倍、また腹肉では 1.48 倍の取り込み量を示した。したがって、Chance ら（3）がマスノスケで示したように、魚の生長には Leu と Ile の間に適当な均衡が必要であることが示唆された訳で、このような必須アミノ酸のパターンが魚類の必須アミノ酸要求量を高めていることは十分に有り得よう。

ラットの筋肉組織では、 $^{14}\text{C}$ Leu の蛋白質への取り込み量は脂質への取り込み量の 8 倍程度であるが（5）、今回、ブリの背肉での  $^{14}\text{C}$ Leu の蛋白質への取り込み量は脂質への取り込み量の約 22 倍、腹肉では約 142 倍で、ラットの場合に比べ蛋白質への取り込み量が極めて大きかった。すなわち、このような必須アミノ酸代謝の特異性が必須アミノ酸要求量を高めている理由かも知れない。

## 要 約

魚類における必須アミノ酸の栄養要求性を検討するため、ブリの背肉および腹肉における  $L-[U-^{14}C]Leu$ ,  $L-[U-^{14}C]Ile$ ,  $L-[U-^{14}C]Val$  からの  $^{14}CO_2$  の生成量、蛋白質および脂質へのこれら各  $^{14}C$ -分枝鎖アミノ酸の取り込み量を調べ、次の結果を得た。

1)  $^{14}CO_2$  の生成量および脂質への  $^{14}C$  の取り込み量は、背肉および腹肉とも  $Ile$ ,  $Leu$ ,  $Val$  の順に減少した。 $^{14}CO_2$  の生成量は、いずれのアミノ酸とも腹肉が背肉より大きかったが、脂質への  $^{14}C$  の取り込み量はこれとは逆の傾向を示した。

2) 蛋白質への  $^{14}C$  の取り込み量は、背肉および腹肉とも  $Leu$ ,  $Ile$ ,  $Val$  の順に減少した。また、いずれのアミノ酸とも、腹肉は背肉よりその取り込み量が大きかった。

3) いずれの場合とも、蛋白質への  $^{14}C$  の取り込み量は脂質への  $^{14}C$  の取り込み量より極めて大きく、またこの傾向は腹肉でとくに顕著であった。また、蛋白質および脂質への  $^{14}C$  の取り込み量と  $^{14}CO_2$  の生成量を比較すると、脂質への  $^{14}C$  の取り込み量でさえ、通

常 $^{14}CO_2$  の生成量より大きかった。

4) 背肉および腹肉とも、脂肪酸と不けん化物への  $^{14}C$  の取り込み量は  $Leu$ ,  $Ile$ ,  $Val$  の順に減少した。しかしながら、いずれの場合とも、脂肪酸への  $^{14}C$  の取り込み量は不けん化物への  $^{14}C$  の取り込み量より大きかった。また、いずれのアミノ酸とも、腹肉より背肉の方がその取り込み量が大きく、不けん化物ではこれとは逆の傾向を示した。

## 引 用 文 献

- 1) 橋本芳郎・岡市友利 (1968). 魚類の栄養と養魚飼料 I (魚類の栄養), 日本水産資源保護協会, pp. 37-38.
- 2) Halver, J. E. and Shanks, W. E. (1960). *J. Nutr.*, 72, 340-346.
- 3) Chance, R. E., Mertz, E. T., and Halver, J. E. (1964). *J. Nutr.*, 83, 177-185.
- 4) 能勢健嗣 (1960). 淡水研報, 11(2), 29-42.
- 5) Rosenthal, J., Angel, A., and Farkas, J. (1974). *Am. J. Physiol.*, 226, 411-418.