

肝脂肪酸合成系酵素の mRNA 量に及ぼす食餌たん白質の影響

EFFECTS OF DIETARY PROTEINS ON ENZYME AND mRNA LEVELS OF LIPOGENIC ENZYMES IN RAT LIVER

入谷信子・西本真美・福田ひとみ・桂田昭彦・松村羊子（帝塚山学院短期大学）田中武彦（大阪大学医学部）

Nobuko IRITANI¹, Naomi NISHIMOTO¹, Hitomi FUKUDA¹, Akihiko KATSURADA¹, Yohko MATSUMURA¹ and Takehiko TANAKA²

¹Tezukayama Gakuin College, Sakai 590-01

²Osaka University Medical School, Osaka 530

ABSTRACT

1. After refeeding fat-free diets containing various sources of protein to fasted rats, the enzyme induction of hepatic malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) was significantly lower in soybean protein, gluten and zein groups than in casein group. 2. The mRNA concentrations of G6PDH were about parallel to the enzyme induction. However, the mRNA concentrations of malic enzyme were similar among all the groups. It is suggested that different amino acid compositions affected the steps before translation of G6PDH, while the different compositions affected the translation of malic enzyme. 3. The addition of lysine and tryptophan to the zein diet increased both mRNA and enzyme levels of G6PDH and malic enzyme. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **10**, 36-38, 1989.

先に、食餌たん白質の種類を変えてラットに投与して、肝脂肪酸合成系酵素の誘導に対する影響を研究した^{1,2)}。一連の脂肪酸合成系酵素である acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, malic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase の酵素誘導が、カゼインや魚たん白群に比べて、グルテンや大豆たん白群では有意に低いことを見出した¹⁾。その動物の血漿や肝臓トリグリセリド値も連動して低下した。また、ラットにトリチウム水を注射して、脂肪酸やトリグリセリドへのとりこみを調べたところ、大豆たん白群はカゼイン群より低く、分解速度には差がないことを見出した²⁾。即ち、大豆たん白質によるトリグリセリドの低下は分解よりは合成に起因することが示唆された。その機構を明らかにすることを目的として、今回は glucose-6-phosphate dehydrogenase と malic enzyme について cDNA のクローニングに成功した

ので、それを用いて mRNA 量に対する食餌たん白質の影響を調べた。

実験方法

5 週齢 Wistar 系雄ラットを 2 日絶食した後、無脂肪高糖食を投与し、mRNA 量の測定には 16 時間後に、酵素活性の測定には 3 日後に屠殺した。

酵素活性の測定

肝ホモジネート 105,000 g 上清液を用いて malic enzyme (EC 1.1.1.40) は、Ochoa³⁾ の方法で、glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) は Glock と McLean⁴⁾ の方法で測定した。

mRNA の定量

急冷凍したラット肝より Chirgwin ら⁵⁾ の方法で mRNA を調製し、formamide 処理で変性させ、20 µg を nylon filter に固定した。³²P でラベルした cDNA

を用いて dot-blot hybridization 法により mRNA 量を定量した⁶⁾。

転写速度の測定

転写速度の測定と核の調製は主として Lamers ら⁷⁾の方法によった。核 (30 units at 260 nm) を 100–200 μ Ci の [α -³²P]UTP とともに incubate し、ラベルされた RNA を抽出した。これを cDNA を固定した filter と hybridize させ、洗浄後 autoradiography を行い densitometer で測定した。

結 果

Malic enzyme の mRNA 量と酵素誘導に対する食餌たん白質の影響

ラットを 2 日絶食後、無脂肪高糖食を投与した時、malic enzyme mRNA 量は 16 時間後に最高値に達した。そこで、16 時間後のカゼイン、魚たん白質、ゼイン、グルテン、大豆たん白質の各群における mRNA 量を比較したところ、各群で有意差がみられなかった。(Table 1) しかし、酵素活性 (3 日後) は大豆たん白群とグルテン群はカゼイン群の約 70%、ゼイン群は約 40% であった。

Glucose-6-phosphate dehydrogenase の mRNA 量と酵素誘導に対する食餌たん白質の影響

Glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA 量は大豆たん白群やグルテン群ではカゼイン群の約 60%、ゼイン群では 46% にすぎなかった。また、魚たん白群

でこの酵素の mRNA 量が極めて高いことが注目される。一方、酵素誘導は、カゼイン群に対して魚たん白群でより高く 126%、大豆たん白群とグルテン群で約 60%、ゼイン群ではわずか 46% と著しく低かった。即ち、たん白質の種類が glucose-6-phosphate dehydrogenase の mRNA と酵素レベルに大きく影響することがわかった。

Malic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase とともに immunochemical titration により、酵素活性の変動は酵素量の変動の指標になることを証明してある。

考 察

先に、ラットに糖質のみ (たん白質を含まない) の飼料を投与すると、malic enzyme mRNA 量は糖質 + たん白質食を pair-fed した群と同レベルに上昇したが、酵素誘導は糖質のみでは 60% にとどまることを報告した⁵⁾。即ち、malic enzyme mRNA の上昇は糖質だけで充分で、たん白質は翻訳に関与することが示唆された。したがって今回、mRNA の上昇がたん白質の種類により差がないことと一致する。そして malic enzyme の翻訳にたん白質の種類が関与すると考えられる。

一方、glucose-6-phosphate dehydrogenase は malic enzyme とは異なり、食餌性の糖質よりたん白質に依存することを報告した。したがって、glucose-

Table 1. Effects of dietary proteins on mRNA concentrations and enzyme induction of lipogenic enzymes in rat liver

Dietary protein	Glucose-6-phosphate dehydrogenase		Malic enzyme	
	Enzyme activity	mRNA concentration	Enzyme activity	mRNA concentration
	<i>fold change</i>			
Casein	1.00 \pm 0.08 * ^{1a}	1.00 \pm 0.21 ^a	1.00 \pm 0.14 * ^{2a}	1.00 \pm 0.15
Soybean protein	0.64 \pm 0.07 ^b	0.56 \pm 0.09 ^b	0.72 \pm 0.15 ^b	1.03 \pm 0.23
Zein	0.46 \pm 0.07 ^c	0.46 \pm 0.08 ^b	0.41 \pm 0.07 ^c	1.13 \pm 0.18
Gluten	0.58 \pm 0.11 ^{b c}	0.66 \pm 0.15 ^b	0.70 \pm 0.11 ^b	1.02 \pm 0.13
Fish protein	1.26 \pm 0.02 ^d	1.75 \pm 0.20 ^c	0.97 \pm 0.08 ^a	1.01 \pm 0.27

Rats were fasted for 2 days and then refed a fat-free diet (67% carbohydrate/18% protein) for 16 h or 3 days. The mRNA concentration was measured in 16 h after the refeeding and the enzyme activity, in 3 days. The enzyme activities in the 105,000 x g supernatant of liver homogenates were measured and normalized to the value for the casein group. *1382 \pm 43.5, *2335 \pm 32.2 (mU/mg protein, n=5) One mU is defined as 1 nmol substrate utilized per min at 37°C. The total cellular mRNA were quantified by dot-blot hybridization in duplicate. Means with different superscript letters in the same column are significantly different at p < 0.01 at least. Means \pm SD (n=5).

6-phosphate dehydrogenase の mRNA 量と酵素誘導は食餌たん白質の種類に大きく影響された。そして mRNA 量と酵素誘導が連動していることからたん白質の種類のちがいが翻訳以前に影響することが示唆された。

文 献

- 1) Iritani, N., Nagashima, K., Fukuda, H., Katsurada, A. and Tanaka, T. (1986) : Effects of dietary protein on lipogenic enzymes in rat liver. *J. Nutr.*, **116**, 190-197.
- 2) Iritani, N., Suga, A., Fukuda, H., Katsurada, A. and Tanaka, T. (1988) : Effects of dietary casein and soybean protein on triglyceride turnover in rat liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34**, 309-315.
- 3) Ochoa, S. (1955) : Malic enzyme. *Method Enzymol.*, **1**, 739-753.
- 4) Glock, G. E. and McLean, P. (1953) : Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.*, **55**, 400-408.
- 5) Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., McDonald, R. J. and Rutter, W. J. (1979) : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-5299.
- 6) Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Noguchi, T. and Tanaka, T. (1987) : Influence of diet on the transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme induction in the rat liver. *Eur. J. Biochem*, **168**, 487-491.
- 7) Lamers, W. H., Hanson, R. W. and Meisner, H. M. (1982) : cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**, 5137-5141.