

運動トレーニング時における牛乳タンパク質の有用性に関する研究：分岐鎖アミノ酸代謝を中心に

名古屋工業大学 助教授 下村 吉治

研究目的

運動によりタンパク質代謝が高まり、タンパク質の必要量が増加することは良く知られた事実である。分岐鎖アミノ酸は栄養学的な必須アミノ酸であり、食餌中タンパク質に含まれる必須アミノ酸の約50%、筋タンパク質の約35%を占める。このように、分岐鎖アミノ酸はタンパク質に含まれる量が多いこともあり、運動中にエネルギー源及び糖新生の基質として利用されると考えられている。さらに、運動前に分岐鎖アミノ酸を摂取すると運動中の筋タンパク質分解を抑制することが人において報告されており(1)、運動中の筋肉の消耗の抑制や運動後の筋肉回復にも分岐鎖アミノ酸は有効に作用する可能性が考えられる。

食餌タンパク質の中でも牛乳タンパク質に含まれる分岐鎖アミノ酸量は21.4%であり、他の動物性タンパク質（豚肉、18.6%；牛肉、16.8%；鶏肉、18.3%）や植物性タンパク質（大豆、18.4%；米、16.3%；小麦粉、15.8%）と比べてその含量が高い。従って、激しくスポーツを行う人にとっては牛乳タンパク質は有利なタンパク質であると考えられる。

ラット肝臓中の分岐鎖アミノ酸代謝の律速酵素である分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素（branched-chain α -keto acid dehydrogenase : BCKDH）の活性は、体内の分岐鎖アミノ酸が過剰になると活性が高まり、不足すると活性が低下することが明らかにされている。その不活性化は酵素タンパクのリン酸化によるものであり、反対に活性化は脱リン酸化によるものである（Fig.1）。BCKDHをリン酸化しその活性調節をする酵素がBCKDHキナーゼであり、BCKDHの主要な活性調節因子であると考えられている（Fig.1）

本研究では、まず、食餌中の牛乳タンパク質の量を変動させ、それがラット肝臓中のBCKDHの活性状態に及ぼす影響を検討し、分岐鎖アミノ酸代謝調節に関する基礎的情報を得ると同時に、牛乳タンパク質の必要量と運動トレーニングの関係を明らかにすることを目的とした。さらに、これに引き続き、ラット血清の分岐鎖アミノ酸濃度および肝臓のBCKDH活性に及ぼす牛乳タンパク質と他の食餌タンパク質の影響をトレーニングラットにおいて比較し、牛乳タンパク質の有用性を明らかにすることを目的とした。

実験1：食餌タンパク量の変化に対するラット肝BCKDH活性の雌雄差の検討

ラットの成長は雌雄で著しく異なるので、分岐鎖アミノ酸代謝にも雌雄差の存在することが推察される。これまでに報告されたラット肝臓のBCKDHに関する研究では、全て雄のラットが使用されており、雌ラットに関する情報がない。そこで、本研究では、まずラット肝臓のBCKDHとBCKDHキ

ナーゼ活性に雌雄差が存在するか否かを、食餌タンパク（ミルクカゼイン）量を変動する条件で検討した。

実験方法

1. ラットの飼育条件

実験には、7週齢の Sprague-Dawley 系の雌と雄ラット（日本クレア，東京）を用いた。一般市販飼料である CE-2（日本クレア，東京）を与え1週間の予備飼育を行った後、雌雄のラットをそれぞれ30%タンパク食群（雌、6匹；雄、6匹）と50%タンパク食群（雌、7匹；雄、9匹）に分け、3週間飼育した。使用した飼料の組成を Table 1 に示す。実験開始時のラットの体重はそれぞれ雌が160g 前後、雄が200g 前後であった。飼育室の環境温度を 24 ± 2 ℃に設定し、明暗サイクルは5:00-17:00を明期、17:00-5:00を暗期とし、飼育ケージ内で個別飼育した。実験期間中の飼料および水は自由摂取とした。

2. 臓器の摘出

実験最終日の8:00に全てのラットの餌を除去し、7時間後に屠殺を開始し2時間以内に終了した。頸部脱臼法により屠殺し、即座に肝臓を摘出した。肝臓は速やかに液体窒素で冷却したアルミクランプにより凍結し、分析まで -80 ℃で保存した。BCKDHの活性型の割合が変化するのを避けるため、屠殺より肝臓の凍結までの所要時間は50秒以内とした。

3. 肝 BCKDH の抽出と活性測定

BCKDHの活性型の割合（activity state）は、生体内で活性型として存在する酵素の活性（actual activity）と不活性型を含む総酵素活性（total activity）を求め、総酵素活性に対する活性型酵素の割合（%）として算出した。

肝臓からの BCKDH の抽出は、Shimomura らの方法(2)に準じて行った。酵素抽出溶液中の BCKDH 活性は、Paxton らの方法(3)に従い分光光度計を用いて測定した。酵素活性は、1分間に $1 \mu\text{mol}$ の NADH を生成する活性量を1ユニットとした。総酵素活性は、予め全ての BCKDH を活性型にした後測定した。すなわち、ラットの肝臓より部分的に精製した広範囲に特異的なホスホプロテインホスファターゼと MgSO_4 （最終濃度： 15mM ）を添加し、 37 ℃で30分間のインキュベーションにより BCKDH の脱リン酸化を行った。

4. 肝 BCKDH キナーゼの活性測定

肝 BCKDH キナーゼの活性は、ATP 依存性の BCKDH の不活性化率を分析する Harris らの方法(4)を一部変更して測定した。

前述の要領で BCKDH 複合体とキナーゼを抽出し、活性測定のためのサンプルとした。ただし、抽出用緩衝液から、キナーゼを阻害する dichloroacetic acid および thiamin pyrophosphate を、懸濁用緩衝液からは thiamin pyrophosphate を除いた。

5. 統計処理

データを平均値±標準誤差 (SE) で表し、一元または二元配置の分散分析によって有意差検定し、F 値が有意な項目について、Scheffe の方法を用いて多重分析した。

結 果

1. ラットの摂食量、体重増加量、肝臓重量 (Table 2)

実験期間中の摂食量は、50%タンパク食群の方が30%タンパク食群より少ない傾向を示し、雌では有意な差も認められたが、体重増加量には雌雄ともにタンパク量の違いによる差は認められなかった。摂食量は、有意な差を示さなかったものの雌よりも雄の方が高い傾向にあった。体重増加量には雌雄間で有意な差が認められ、雄の体重増加量が雌の2倍以上であった。肝臓重量にも食餌による変動はなかったが、雄の方が明らかに高かった。しかし、雌雄ラットの体重あたりの肝臓重量の割合は、それぞれ30%タンパク食群で雄=3.7±0.1%、雌=3.4±0.1%、50%タンパク食群で雄=3.6±0.1%、雌=3.1±0.1%であり、顕著な差はみられなかったことから肝臓重量には雌雄差はなかったと言える。一方、摂食量は雄の方が高い傾向を示したが、体重100gあたりの摂取エネルギー量 (kcal/100gB.W.) は、30%タンパク食群で雄=29.4±1.7、雌=42.4±3.6、50%タンパク食群で雄=22.8±0.7、雌=31.1±2.5であり、体重当たりの摂取エネルギー量はむしろ雌の方が多かったことから、雌と雄のエネルギー代謝効率に明らかに違いのあることが認められた。

2. ラットの肝 BCKDH 複合体の総酵素活性および活性型の割合 (Fig. 2)

肝 BCKDH 複合体の総酵素活性は、30%タンパク食群で雌よりも雄の方が有意に高く、また、50%タンパク食群でも有意ではないが、雄の方が高い傾向が認められた。さらに、タンパク量の違いによる比較では、雌雄ともに50%タンパク食群でやや高くなる傾向にあった。

これに対して活性型の割合には顕著な雌雄差が認められ、両食餌群とも雌の方が雄よりかなり低い値を示した。食餌の違いによる変動については、雄では30%タンパク食群より50%タンパク食群で明らかな上昇が認められたのに対し、雌では有意な差は認められなかった。

3. 肝 BCKDH キナーゼの活性 (Fig. 3)

BCKDH キナーゼ活性は、30%ならびに50%タンパク食群で雌が雄より有意に高く、明らかな性差が認められた。また、雌雄ともに有意ではないものの、食餌タンパク量が増加するとキナーゼ活性は低下する傾向を示した。

考 察

雄ラットの肝 BCKDH 活性は、食餌中のタンパク量が適量 (25%) であれば、ほぼ100%が活性型として存在するという報告がある (5-7)。Harris ら (5) は、食餌中タンパク量に対応して変化する酵素の活性曲線を示し、雄ラットの肝 BCKDH 活性の変動は食餌中タンパク量に依存し、30%以上のタンパク量でほぼ完全に活性化されるとしている。これらの報告と比較すると本研究の雄の30%タンパク

食群の活性は、41%と低めであった。しかし、これまでに報告された一般実験飼料を用いた雄ラットの肝 BCKDH 活性には、ばらつきが報告されていることや、本研究の50%タンパク食群では90%以上が活性型であったことから、酵素の活性型の割合は、食餌中タンパク量だけではなく他の要素、すなわち食餌中のタンパク質以外の成分組成などによっても影響されることが示唆される。このことは、今回予備的に検討した一般動物飼料 (CE-2、日本クレア：タンパク含量約25%) を摂取した雄ラットの肝 BCKDH の活性型の割合が、100%近かったことから支持される。

雌雄ラットの肝 BCKDH の総酵素量には大きな差がないにもかかわらず、雄ラットに比べ雌ラットの活性型 BCKDH 量は著しく低かった。さらに、雄ラットにおいてはタンパク量が30%から50%になると明らかな活性の上昇がみられたのに対し、雌ラットでは活性型の割合が8%から13%と増加する傾向にはあったものの、タンパク含量による顕著な違いは認められなかった。このため、雌ラットにおいてはタンパク量に依存する本酵素の活性曲線が成り立たない可能性が示唆された。これらのことから、分岐鎖アミノ酸代謝の調節メカニズムは雌雄で異なることが明らかとなった。

肝 BCKDH キナーゼの活性は、雌雄ともに食餌中のタンパク量に依存して変化し、その活性は雄よりも雌の方が30%および50%タンパク食の両群で有意に高かった結果より、BCKDH 活性における雌雄差は少なくとも一部はキナーゼ活性により説明できることが示唆された。

ラットを一時的に極端な生理状態下におき、安静時には起こり得ない分岐鎖アミノ酸代謝の変化を生じさせることによって BCKDH 活性を検討することは、食餌の違いによる比較とは異なった角度から分岐鎖アミノ酸代謝の調節メカニズムを解明することができる可能性があり有用である。これまでにも、このような視点から絶食や運動などの負荷による影響が検討されているが、正常状態の雄ラットの肝 BCKDH はほぼ100%が活性型であることから、肝臓を用いた報告はほとんどない。本実験より、雌ラットの肝 BCKDH の活性型の割合は、正常状態においても非常に低いことが示された。したがって、絶食や運動による酵素の活性化を容易に測定することが可能である点で、雌ラットは優れたモデルであると考えられる。そこで次の実験では、雌ラットの肝臓を用いて運動および絶食により分岐鎖アミノ酸代謝を変化させ、その調節メカニズムをさらに検討した。

実験 2：雌ラットの肝 BCKDH 活性に及ぼす絶食の影響の検討

本実験では、肝 BCKDH の活性に影響を及ぼすと考えられている一過性の運動と絶食を雌ラットに負荷することにより、分岐鎖アミノ酸代謝の調節メカニズムについて検討した。食餌はコントロール食として、実験 1 で使用した30%タンパク食を用いた。これまでに、8%タンパク食を摂取した雄ラットに48時間の絶食を負荷したところ、肝 BCKDH の活性型の割合が上昇することが報告されている(5)。すなわち、8%という低タンパク食を摂取し、正常なラットに比べ安静時の分岐鎖アミノ酸の利用が少ない場合においても、絶食時のようにエネルギー源となる成分が摂取できないと、内在性タンパクを分解しそれにより遊離される分岐鎖アミノ酸を糖新生に利用すると考えられる。したがって、安静時の食餌による影響は雌雄で異なったが、一時的に大量のエネルギーが必要な状態におかれた場

合には、雄ラットに限らず雌ラットの肝臓においても BCKDH が活性化され、エネルギー源として分岐鎖アミノ酸の分解を促進する可能性が考えられる。このことを食餌中タンパク量の違いによる影響についても確認するために、コントロール食に対する低タンパク食として既報と同じ8%カゼイン食 (Table 1) を用いた。

運動や絶食による生体内での分岐鎖アミノ酸代謝は、分岐鎖アミノ酸の分解物で、BCKDH の基質でもある分岐鎖 α -ケト酸の濃度により影響を受けることが明らかにされている。したがって、組織中の分岐鎖 α -ケト酸の定量が重要と考えられる。しかし、肝臓中の分岐鎖 α -ケト酸量はごく微量であり、測定することが困難である。分岐鎖 α -ケト酸は筋肉などの組織から血液を介して肝臓へ運ばれるので、本研究では血中の分岐鎖 α -ケト酸濃度を測定することによって、肝 BCKDH 活性との関連性を検討した。

実験方法

1. ラットの飼育および運動条件

7週齢の Sprague-Dawley 系の雌ラット (48匹) を CE-2 による1週間の予備飼育の後、8%タンパク食群もしくは30%タンパク食群の2群に分け、それぞれの食餌を3週間自由摂取で与えた。実験開始時のラットの体重は、170~200gであった。実験最終日に、運動群にはほぼ疲労困憊に至る走行運動を負荷するため、走行運動に慣れさせる目的で、昇り勾配6°の小動物用トレッドミル (KN-73, 夏目製作所) を用いて全てのラットに3週間の実験期間中 (3日および4日に1日の休息日を含む) トレーニングを負荷した。トレーニング開始10日目までは走行速度を毎分15mから35mまで次第に高め、その後実験終了までの期間は毎分35mで30分間の走運動によりトレーニングを行った。

2. 臓器の摘出および採血

実験終了の1日前に、各食餌群のラットをさらに運動群 (9匹)、絶食群 (6匹) と安静群 (9匹) に分け、絶食群については、屠殺の24時間前に餌を除去した。運動群には、最終日の14:00より毎分30mでほぼ疲労困憊に至るまでの85分間の運動を負荷し、終了後ただちに屠殺した。屠殺および肝臓の採取と処理は、実験1で述べた方法に従って行った。肝臓採取後、血液を心臓から採取し遠心分離 (1600xg, 10min) により血清を得た後、-20°Cで保存した。

3. 肝 BCKDH の抽出と活性測定

実験1に述べた方法で行った。

4. 血中の分岐鎖 α -ケト酸の測定

ラットの血清中の分岐鎖 α -ケト酸濃度は、高速液体クロマトグラフィーを用いる Koike らの方法 (8) を一部改良し測定した。

結 果

1. ラットの摂食量、体重増加量、肝臓重量 (Table 3)

安静群、運動群、絶食群の摂食量および体重増加量には、タンパク量による差は認められなかった。絶食群が他の群と比べ摂食量、体重増加量ともに若干低めであったが、最終的な体重の絶対値の平均は235g前後で群間に差がみられなかった。肝臓重量においても食餌による違いはなかったが、運動群および絶食群で、安静群より減少する傾向にあり、8%タンパク食群の絶食群では有意に減少した。

2. ラットの肝 BCKDH の総酵素活性および活性型の割合 (Fig. 4)

肝 BCKDH の総酵素活性は、安静群、運動群、絶食群のいずれも30%タンパク食群より8%タンパク食群で顕著に低かった。しかし、安静群、運動群、絶食群の3群間に有意な差は認められなかった。

BCKDH の活性型の割合は、安静時には30%および8%タンパク食の両群で10%以下という低値を示したが、一過性の運動および絶食によりいずれの食餌群においても著しく上昇した。

3. 血中の分岐鎖 α -ケト酸の濃度 (Fig. 5)

分岐鎖 α -ケト酸は BCKDH の基質であると同時に BCKDH キナーゼの阻害剤でもあることが明らかにされている (Fig. 1)。そこで、血中の分岐鎖 α -ケト酸の濃度を測定した。

各ケト酸ともいずれのタンパク食においても一過性の運動および絶食により上昇傾向を示した。特に、8%タンパク食群では運動群において有意な増加が認められた。

食餌による有意な差は認められなかった。

考 察

ラットの筋肉だけでなく肝臓においても一過性の運動により BCKDH は活性化された。したがって、本実験で設定した分速30mで85分の運動は、ラットが分岐鎖アミノ酸をエネルギー源として使用するのに十分な負荷であったといえる。肝臓のグリコーゲン量も運動後には安静時の10分の1程度まで減少したことから、グリコーゲンの不足によって肝 BCKDH が活性化されたことも考えられる。しかし、運動強度や時間によってもグリコーゲン量と肝 BCKDH 活性との関係は異なることがあり得るため、肝臓中のグリコーゲン量が直接肝 BCKDH 活性に影響を及ぼすか否かについては、さらなる検討が必要である。

分岐鎖アミノ酸代謝には臓器特異性が存在すること、および第一段階の分解 (分岐鎖 α -ケト酸の生成) を触媒する分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素の活性が肝臓では非常に低いことから、BCKDH の基質である肝臓中の分岐鎖 α -ケト酸は、筋肉をはじめとする他の組織からの流入によるところが大きいと言われている。本実験において血中の分岐鎖 α -ケト酸量が運動により増加したことから、肝臓の分岐鎖 α -ケト酸の取り込みも増加することが考えられる。したがって、運動時には肝臓中の分岐鎖 α -ケト酸量が増加し、肝 BCKDH が活性化され、分岐鎖アミノ酸のエネルギー源としての利

用が促進された可能性が高いと推察される。

さらに、絶食により雄ラットと同様に雌ラットの肝 BCKDH の活性型の割合が増加したことから、絶食による雌ラットの分岐鎖アミノ酸代謝の変化は、雄ラットのそれと同様であることが示唆された。

8%タンパク食群の総酵素活性がコントロールの30%タンパク食群に比べ顕著に減少したのは、3週間の低タンパク食摂取に伴う酵素タンパクの減少によるものと推察される。8%タンパク食を摂取して4日後には BCKDH の総酵素活性が低下したという報告もあるため、3週間という長期の低タンパク食飼育ではその可能性が高い。

実験3：雌雄ラットの肝 BCKDH と BCKDH キナーゼ活性に対する去勢の影響の検討

実験1において、肝 BCKDH の活性は雌雄間でかなり異なることが明らかとなったので、性ホルモンがこの酵素活性の調節に強く作用することが示唆される。この性ホルモンの作用をさらに確かなものにするためには、それぞれのラットから性腺を摘出してその影響を検討することが一般的に行われる。そこで、本研究でも性腺摘出の影響が肝 BCKDH 活性に及ぼす影響を検討した。

実験方法

1. ラットの飼育条件

8週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット11匹と雌ラット11匹を任意に性腺摘出を行う群と疑似手術を行う群に分け、麻酔下にてそれぞれの手術を施した。手術後は、ペニシリンとストレプトマイシン（それぞれ100単位と100 μ g/日）を2日間投与し、一般市販飼料（CE-2、日本クレア）を3週間与えて飼育した。実験1で述べた通り、この市販飼料を与えた雄ラットの肝 BCKDH はほとんどが活性型で存在し、高い活性を示すことが認められている。その他の飼育条件は、実験1と同様である。

臓器の摘出、酵素活性の測定、およびデータの統計処理の方法は実験1と同様である。

結果

1. ラットの体重と食餌効率に対する性腺摘出の影響

雄ラットより睪丸を摘出した場合、そのラットの体重増加と食餌効率に変化は認められなかった。しかし、雌ラットより卵巣を摘出すると、3週間の体重増加量（疑似手術群は 55 ± 5 g に対し卵巣摘出群は 111 ± 8 g）は約2倍に増加し、食餌効率（疑似手術群は 0.09 ± 0.01 g 体重/g 食餌に対し卵巣摘出群は 0.19 ± 0.01 g 体重/g 食餌）も約2倍に増加した。これらの増加した値は、雄ラットの値と同様のレベルであった。

2. ラットの肝 BCKDH 活性に対する性腺摘出の影響 (Fig. 6)

肝 BCKDH の総酵素活性は、雌雄とも性腺摘出の影響を受けなかった。また、雄ラット肝 BCKDH の活性状態も、性腺摘出の影響を受けなかった。しかし、雌ラット肝 BCKDH の活性状態は性腺摘

出により著しく増加し、雄ラットのレベルに達した。

3. ラットの肝 BCKDH キナーゼ活性に対する性腺摘出の影響 (Fig. 7)

雄ラットの肝 BCKDH キナーゼ活性は、性腺摘出の影響を受けなかった。しかし、雌ラットでは、性腺摘出により有意に肝 BCKDH キナーゼ活性は低下し、雄ラットと同様のレベルになった。

考 察

本実験において、男性ホルモンはラット肝 BCKDH 活性の調節には関与していないが、女性ホルモンがその酵素活性を抑制する作用のあることが明らかになった。雌ラットの肝 BCKDH キナーゼ活性は、卵巣摘出によりかなり低下し雄ラットのレベルに至ったことより、女性ホルモンは BCKDH キナーゼの発現を促進して肝 BCKDH の活性を抑制することが示唆される。

さらに、肝 BCKDH 活性と類似した変動が体重増加量と食餌効率にも認められた結果より、肝 BCKDH 活性が高い状態は成長に有利な状態である可能性が示唆される。肝 BCKDH 活性は、分岐鎖アミノ酸が過剰に存在すると高く維持されることが報告されており、さらに分岐鎖アミノ酸はタンパク合成に必須のアミノ酸であること、また分岐鎖アミノ酸の一つであるロイシンはタンパク合成を促進する作用のあることが報告されているので、肝 BCKDH 活性は分岐鎖アミノ酸の存在量の指標となっている可能性が高い。

実験 4 : ラット血清の分岐鎖アミノ酸濃度と肝 BCKDH 活性に対する食餌タンパクと運動トレーニングの影響に関する検討

タンパク質のアミノ酸組成はタンパク質の種類によりかなり異なるので、タンパク質のアミノ酸代謝に及ぼす影響は摂取タンパク質の違いにより異なる可能性が考えられる。特に、運動トレーニングによりタンパク質の必要量が増加した場合には、その影響の違いは大きいと予想される。本実験では、運動トレーニングしたラットの血清中分岐鎖アミノ酸濃度に及ぼす動物性タンパク質（ミルクカゼイン）と植物性タンパク質（大豆タンパク）の影響の違いを比較検討した。実験 1 において、30%カゼイン食を与えた雄ラットの肝 BCKDH は、その40-50%が活性型で存在し、食餌タンパクの影響を検討するのに最も適した実験条件であると考えられるので、本実験では雄ラットを用い、30%タンパク食を与える条件を採用した。

実験方法

1. ラットの飼育及び運動条件

7週齢の Sprague-Dawley 系の雄ラット (24匹) を CE-2 による 1週間の予備飼育の後、トレーニング群と安静群に分け、さらにそれぞれの群を30%カゼイン食群と30%大豆タンパク食群に分け、それぞれの食餌を3週間自由摂取で与えた。30%カゼイン食は Table 1 の組成であり、30%大豆タンパク食は30%カゼイン食のタンパク質を大豆タンパクに置き換えた食餌を用いた。実験開始時の

ラットの体重は、230～265gであった。トレーニング群のラットには、実験2と同様のトレーニング計画で実験期間の3週間運動を負荷した。ただし、屠殺前の約48時間は運動を負荷しなかった。

2. 採血および肝臓採取方法と血清分岐鎖アミノ酸濃度の測定

実験最終日に頸部脱臼法によりラットを屠殺し、直ちに下大静脈より血液を採取し遠心分離により血清を得て、分析まで -80°C で保存した。採血の後、実験1の方法により肝臓を採取した。

血清分岐鎖アミノ酸濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いた方法により測定した。

3. 肝 BCKDH の抽出と活性測定

実験1に述べた方法で行った。

結 果

1. ラットの摂食量、体重、腓腹筋と肝臓の重量 (Table 4)

安静およびトレーニングラットの摂食量、体重、腓腹筋と肝臓の重量のいずれにおいても、カゼイン食群と大豆タンパク食群の間で差は認められなかった。

2. 血清アミノ酸濃度 (Table 5)

安静ラットの各アミノ酸濃度には、カゼイン食群と大豆タンパク食群の間で差は認められなかった。一方、トレーニングラットのアミノ酸濃度では、ロイシン、イソロイシンとバリンのいずれの分岐鎖アミノ酸ともカゼイン食群よりも大豆タンパク食群で低値を示す傾向にあり、特にイソロイシンとバリンでは有意差が認められた。トレーニングラットの3つの分岐鎖アミノ酸の合計でも、カゼイン食群で有意な高値を示した。

3. 肝 BCKDH 活性

全ての群のラットの総 BCKDH 活性はおおよそ $1500-1700\text{mU/g}$ 組織であり、差は認められなかった。活性型酵素の割合 (activity state) は、安静ラットの大豆タンパク食群で $15.4 \pm 5.8\%$ 、カゼイン食群で $18.0 \pm 10.3\%$ であり、差は認められなかった。しかし、トレーニングラットでは、大豆タンパク食群で $23.4 \pm 6.5\%$ 、カゼイン食群で $33.9 \pm 6.1\%$ と後者が有意な高値を示した。また、両食餌群ともトレーニングにより増加する傾向を示した。

考 察

実験1において、雄ラットに30%タンパク食を摂取させると、肝 BCKDH の数十%が活性型で存在することが判明した。従って、その食餌タンパク量では分岐鎖アミノ酸はほぼ必要十分量供給された状態であり、大きな過不足のある状態ではないことが示唆される。この所見より、30%の動物性タンパク質であるカゼインと植物性タンパク質である大豆タンパクを含む食餌を安静及びトレーニング雄ラットに3週間摂取させて、血清分岐鎖アミノ酸濃度と肝 BCKDH 活性に対する食餌タンパクの影響を比較検討したところ、安静ラットに対する食餌タンパクの影響は認められなかったが、トレーニングラットでは、カゼイン食群に比べて大豆タンパク食群の血清分岐鎖アミノ酸濃度が低値を示す傾向

が認められた。さらに、肝 BCKDH 活性は、カゼイン食群よりも大豆タンパク食群で低値を示し、血清分岐鎖アミノ酸濃度と対応した結果を示した。すなわち、運動により分岐鎖アミノ酸の消費が促進され、分岐鎖アミノ酸含量の低い大豆タンパク食を摂取したラットでは血清のその濃度が低下し、それに伴い肝 BCKDH 活性も低下したと考えられる。これらの結果は、大豆タンパクよりもカゼインの方がトレーニングラットの体内の分岐鎖アミノ酸量を高く保つために有利に作用することを示唆している。

まとめ

本研究において、ラット肝臓の BCKDH の活性調節には明確な雌雄差が存在することが明らかとなった。この所見は、ラットの分岐鎖アミノ酸代謝の調節が雌雄間でかなり異なることを示唆しており、ラットの成長率の雌雄差と考え合わせると興味深い。本研究の性腺摘出実験（実験 3）において、女性ホルモンは BCKDH キナーゼの発現を増加して肝 BCKDH 活性を抑制することが明かとなり、これが肝 BCKDH 活性の性差のメカニズムと考えられる。

雌ラットの肝 BCKDH 活性は、30%もしくは 8%タンパク食のいずれの食餌条件においても、運動負荷および絶食により著しく上昇した。この結果は、運動により分岐鎖アミノ酸の分解が促進されその必要量がかなり増加することを示唆している。このことは、Wolfe ら(9)による運動によりタンパク質分解が促進され血中尿素レベルが上昇する以前から体内のロイシン酸化が促進されるという報告によっても支持される。すなわち、運動時では食餌からのタンパク質の摂取が少ない条件でも分岐鎖アミノ酸の酸化がかなり亢進し、その必要量が増加することを意味しているので、運動時には十分な分岐鎖アミノ酸を摂取することが重要であろう。

血中のアミノ酸濃度の増加に伴って、筋タンパクの分解を抑制し合成を促進することが明らかにされている(10)。また、筋タンパクの分岐鎖アミノ酸含量は高く、さらに分岐鎖アミノ酸の一つであるロイシンはタンパク合成を促進する作用を持つことも知られている。本研究により、大豆タンパクよりも分岐鎖アミノ酸を多く含むカゼインの方がトレーニングラットの体内の分岐鎖アミノ酸量を高く保つために有利に作用することが示された。すなわち、トレーニングにより分岐鎖アミノ酸代謝の促進された状態では、分岐鎖アミノ酸を多く含むタンパク質を摂取することが筋肉づくりに有利に働くことを示唆している。牛乳タンパクは、動物性タンパクの中でも分岐鎖アミノ酸含量の高いタンパクであるため、運動を激しく行う人のタンパク源としては有用であると考えられる。

文献

1. MacLean, D.A., Graham, T.E., and Saltin, B. Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. *Am. J. Physiol.* 267: E1010-E1022, 1994.
2. Shimomura, Y., T. Suzuki, S. Saitoh, Y. Tasaki, R.A. Harris, and M. Suzuki. Activation of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex by exercise: effect of high-fat diet intake. *J. Appl. Physiol.* 68: 161-165, 1990.
3. Paxton, R., P.W.D. Scislawski, E.J. Davis, and R.A. Harris. Role of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase in 2-oxobutyrate metabolism. *Biochem. J.* 234: 295-303, 1986.
4. Harris, R.A., R. Paxton, S.M. Powell, G.W. Goodwin, M.J. Kuntz, and A.C. Han. Regulation of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex by covalent modification. *Advan. Enzyme Regul.* 25: 219-237, 1986.
5. Harris, R.A., S.M. Powell, R. Paxton, S.E. Gillim, and H. Nagae. Physiological covalent regulation of rat liver branched-chain α -keto acid dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 542-555, 1985.
6. Block, K.P., R.P. Afring, and M.G. Buse. Regulation of rat liver branched-chain α -keto acid dehydrogenase activity by meal frequency and dietary protein. *J. Nutr.* 120: 793-799, 1990.
7. Gillim, S.E., R. Paxton, G.A. Cook, and R.A. Harris. Activity state of the branched chain α -keto acid dehydrogenase complex in heart, liver, and kidney of normal, fasted, diabetic, and protein-starved rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 74-81, 1983.
8. Koike, K., and M. Koike. Fluorescent analysis of α -keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 141: 481-487, 1984.
9. Wolfe, R.R., Goodenough, R.D., Wolfe, M.H., Royle, G.T., and Nadel, E.R. Isotopic analysis of leucine and urea metabolism in exercising humans. *J. Appl. Physiol.* 52: 458-466, 1982.
10. Svanberg, E., Möller-Loswick, A.-C., Matthews, D.E., Körner, U., Andersson, M., and Lundholm, K. Effects of amino acids on synthesis and degradation of skeletal muscle proteins in humans. *Am. J. Physiol.* 271: E718-E724, 1996.

Table 1. Composition of experimental diets.

Ingredient	Diet		
	8 %-Protein	30 %-Protein	50 %-Protein
	(%)		
Casein, milk	8	30	50
Soybean oil	5.0	5.0	5.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Mineral mix, AIN 76	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix, AIN 76	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
Inositol	0.01	0.01	0.01
Cornstarch	62	40	20
Cellulose	5.0	5.0	5.0
Sucrose		to make 100%	

Table 2. Food intake, body weight gain and liver weight.

	30 % Protein		50 % Protein	
	Male	Female	Male	Female
n	6	7	9	7
Food intake (g/week)	196 ± 7	170 ± 14	166 ± 6	127 ± 9#
Body weight gain (g/3 weeks)	176 ± 7	58 ± 3*	148 ± 6	64 ± 4*
Liver (g)	13.6 ± 0.5	7.5 ± 0.1*	14.5 ± 0.6	7.0 ± 0.2*

Values are means ± SE for 6-9 rats.

*Significantly different from male rats in the same diet group (P<0.05).

#Significantly different from female rats fed 30 %protein diet (P<0.05).

Table 3. Food intake, body weight gain and liver weight.

Group	n	Food intake (g/week)	Body weight gain (g/3 weeks)	Liver (g)
30% Protein diet				
Rested	9	160.7 ± 12	56.3 ± 5.6	7.8 ± 0.1
Exercised	9	172.3 ± 7.7	50.9 ± 3.6	7.2 ± 0.2
Starved	6	146.8 ± 15	46.8 ± 5.7#	6.5 ± 0.4
8% Protein diet				
Rested	9	158.3 ± 8.5	46.7 ± 3.2	8.1 ± 0.2
Exercised	9	166.7 ± 9.5	49.9 ± 2.9	7.7 ± 0.3
Starved	6	147.0 ± 13	39.6 ± 8.7#	6.3 ± 0.3*

Values are means ± SE for 6 or 9 rats.

#Body weight gain in starved group was calculated from body weight obtained before starvation.

*Significantly different from rested and exercised rats (P<0.05).

Table 4. Food intake and weights of body , gastrocnemius muscle and liver of trained and sedentary rats fed the soybean protein diet or casein diet.

Group	n	Food intake (g/week)	Body weight	Gastrocnemius muscle (g)	Liver
Sedentary rats					
Soybean protein diet	8	198 ± 4	351 ± 7	1.97 ± 0.05	11.3 ± 0.2
Casein diet	8	198 ± 6	370 ± 10	2.00 ± 0.09	12.7 ± 0.7
Trained rats					
Soybean protein diet	7	203 ± 7	347 ± 10	1.95 ± 0.07	11.1 ± 0.3
Casein diet	6	210 ± 4	353 ± 3	1.94 ± 0.03	12.1 ± 0.4

Values are means ± SE.

Table 5. Branched-chain amino acid concentrations in serum of trained and sedentary rats fed the soybean protein diet or casein diet.

Group	Leucine	Isoleucine	Valine	Total BCAA
Sedentary rats				
Soybean protein diet	148 ± 5	80 ± 3	188 ± 5	416 ± 12
Casein diet	145 ± 4	81 ± 2	200 ± 5	426 ± 11
Trained rats				
Soybean protein diet	134 ± 5	73 ± 3	167 ± 6	374 ± 13
Casein diet	152 ± 4	86 ± 2*	202 ± 5*	440 ± 12*

Values are means ± SE. BCAA, branched-chain amino acids.

*Significantly different from soybean protein diet group ($P < 0.05$).

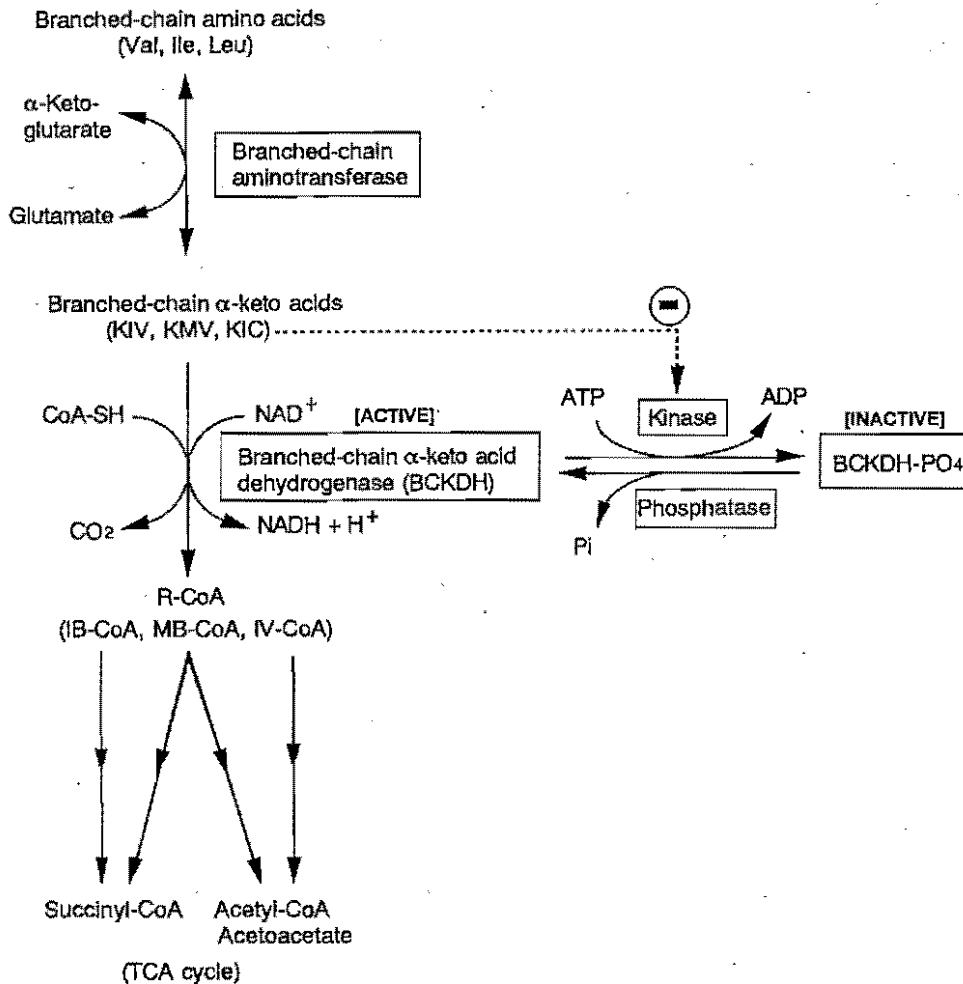


Fig. 1. Catabolism of branched-chain amino acids.

The bar ⊖ means that branched-chain α -keto acids, especially α -ketoisocaproate (KIC), are inhibitors of BCKDH kinase. Therefore, branched-chain amino acid catabolism are promoted, when branched chain α -keto acids are accumulated in the mitochondria.

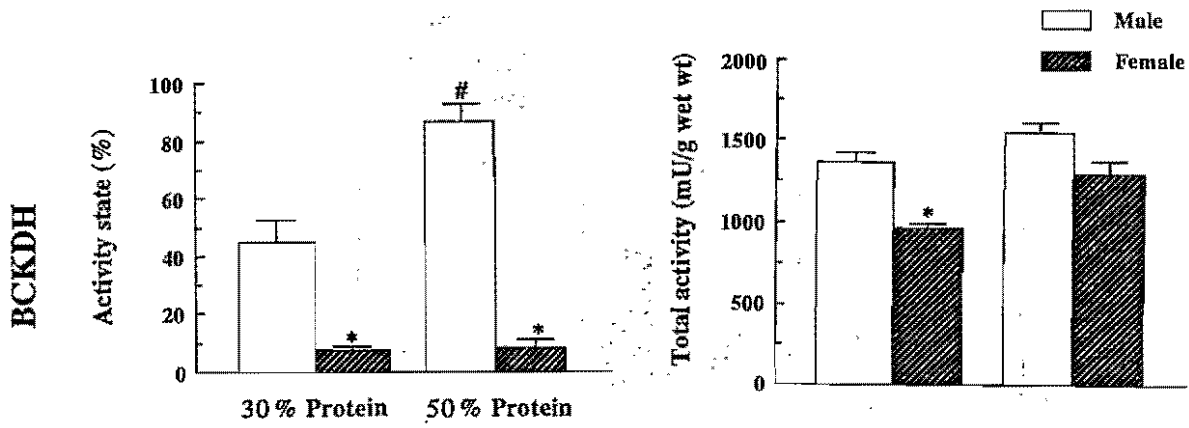


Fig. 2. Total activity and activity state of liver BCKDH in male and female rats.

Values are means \pm SE for 6 ~ 9 rats.

*Significantly different from male rats in the same diet group ($P < 0.05$). #Significantly different from 30% protein diet group ($P < 0.05$).

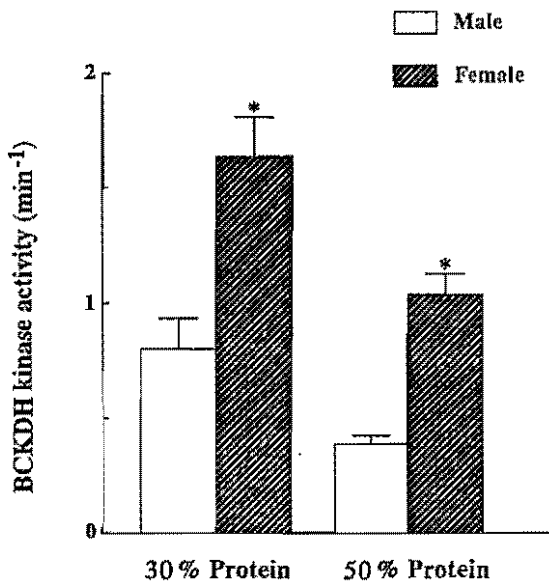


Fig. 3. Liver BCKDH kinase activity in male and female rats.

Values are means \pm SE for 6 ~ 9 rats.

*Significantly different from male rats in the same diet group ($P < 0.05$).

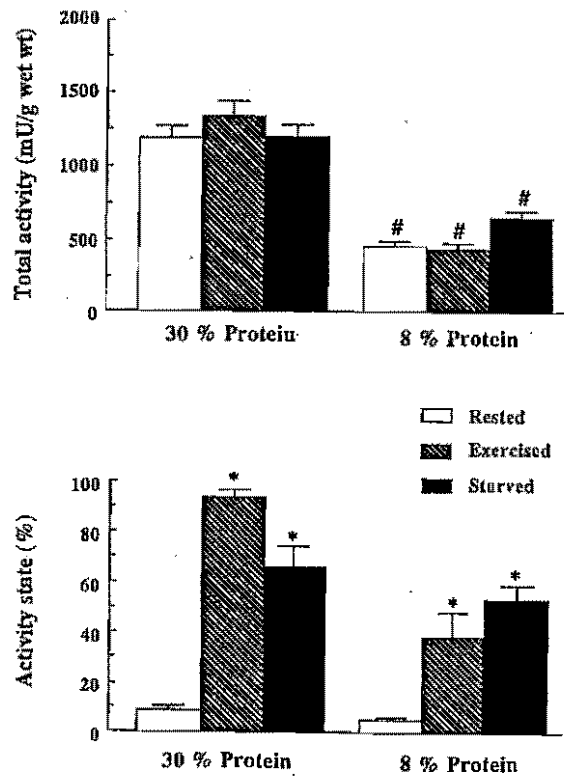


Fig. 4. Effects of exercise and starvation on total activity and activity state of liver BCKDH.

Values are means \pm SE for 6 or 9 rats.

*Significantly different from rested rats in the same diet ($P < 0.05$). # Significantly different from rats fed 30% protein diet ($P < 0.05$).

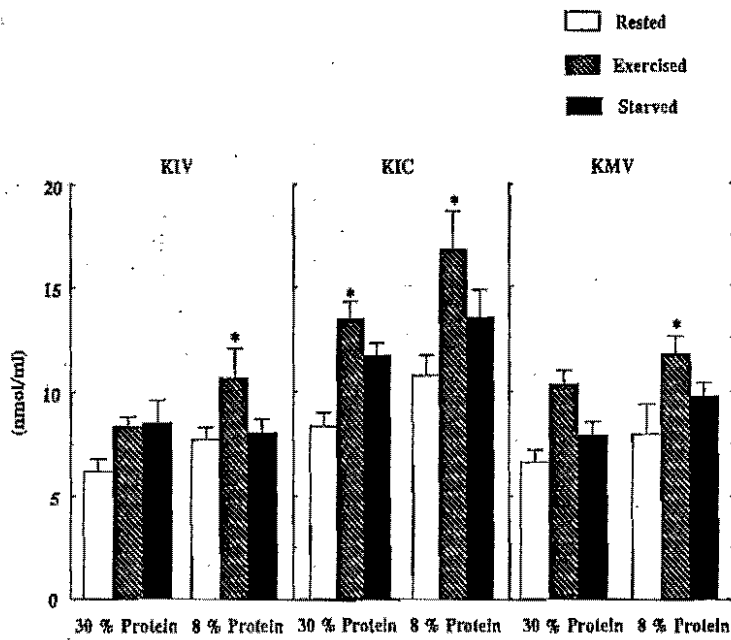


Fig. 5. Concentrations of branched-chain α -keto acids in serum of rested, exercised and starved rats fed 30% or 8% protein diet.

KIV, α -ketoisovalerate ; KIC, α -ketoisocaproate ; KMV, α -keto- β -methyl-valerate.

Values are means \pm SE for 6 or 9 rats.

*Significantly different from rested rats in the same diet group ($P < 0.05$).

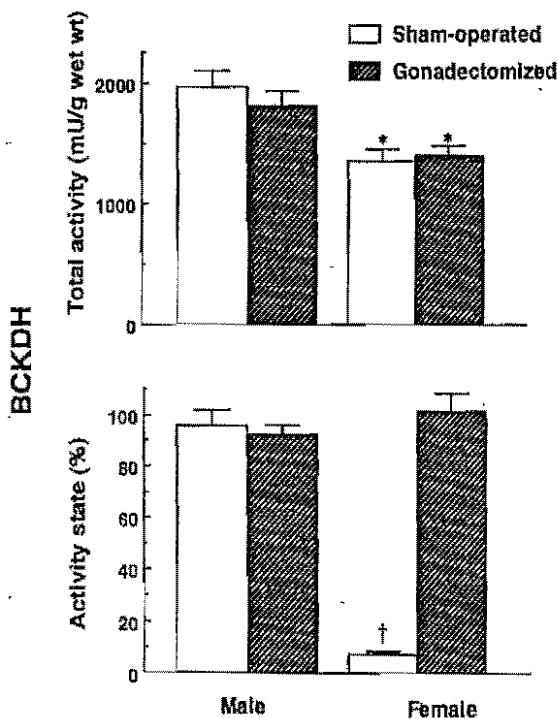


Fig. 6. Effects of gonadectomy on liver BCKDH activity in male and female rats. Rats were fed chow diet for 3 weeks after the surgery. Values are means \pm SE for 5-6 rats. *Significantly different from male rats in the same treatment group ($P < 0.05$). †Significantly different from the gonadectomized female rats ($P < 0.05$).

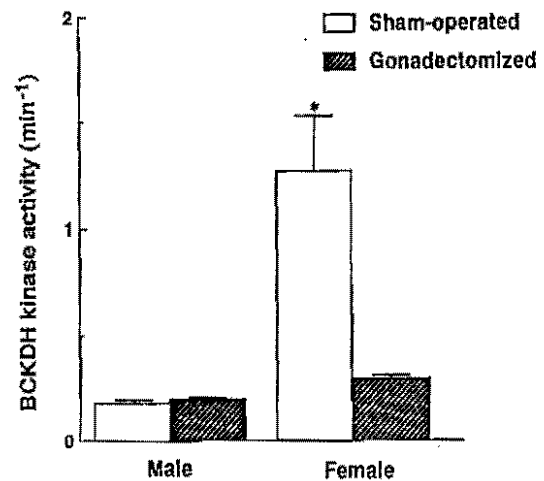


Fig. 7. Effects of gonadectomy on liver BCKDH kinase activity in male and female rats. Values are means \pm SE for 5 or 6 rats. *Significantly different from the gonadectomized female rats ($P < 0.05$).