

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

8. 魚類における 3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ／アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性比からのトリプトファン-ニコチンアミド変換率の推定

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

コイとフナのトリプトファン-NiA-NH₂ 転換率を 3-HAO／ACMSD 活性比から推定した結果、効率良く利用できるラットと比較して、数十分の一程度であった。肝臓においてのみナイアシン活性を示すキノリン酸という中間代謝産物をユニバーサルにナイアシン活性を有する化合物に転換する酵素である QPRT 活性もコイとフナには検出されなかった。以上のことから、魚においては、NiA-NH₂ はトリプトファンからきわめて合成されにくいことが、はじめて明らかとなった。

A. 目的

ヒトにおいて、B-群ビタミンの一つである NiA-NH₂ が必須アミノ酸の一つであるトリプトファンから生合成されることはよく知られている。トリプトファン-NiA-NH₂ 転換率は、摂取トリプトファン量と尿中に排泄される NiA-NH₂ 異化代謝産物量との比較から求めるのが、通常の方法である。しかしながら、尿の採取が困難である動物においては、他の方法の考案が必要である。田口らは¹⁾、家畜類の飼料を考案する上で、トリプトファンからどの程度 NiA-NH₂ が生合成されているかが重要であるという認識から、トリプトファン-NiA-NH₂ 転換経路で鍵中間代謝物質であるキノリン酸の生成量を支配する二つの酵素、すなわち、キノリン酸生成酵素である 3-ヒドロキシアンスラニル酸 3,4-ジオキシゲナーゼ(3-HAO)とキノリン酸の生成量を抑制する酵素アミノカルボキシムコン酸-セミアルデヒド脱炭酸酵素(ACMSD)の活性比率から、トリプトファン-NiA-NH₂ 転換率を推定する方法を報告した。今回は、その方法を使用して、琵琶湖の固有種であり、近年生息数が激減しているニゴロブナの本転換率を推定したので報告する。合わせて、コイについても調べた。

B. 研究方法

生後 1 年 6 ヶ月、体長 15~20cm、体重 30~40g のニゴロブナ(*Car. auratus grandoculis* Temminck et Schlegel)とコイ (*Cyprinus carpio* Linnaeus)を滋賀県水産試験場から入手した。Table 1 に飼育用飼料の組成を示した。哺乳動物ではトリプトファン-NiA-NH₂ 代謝経路は肝臓のみに局在している。そこ

で、魚においても肝臓を用いた。ニゴロブナの肝臓の量は非常に少ないため、5 匹から得られた肝臓を一まとめにして処理した。コイからは肝臓を得、5 匹から得られたものを一まとめにして処理した。各々得た臓器は 5 倍量の 50mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)を加え、ガラス-テフロンホモゲナイザーで均一化した。ホモジネートは 10,500×g で 20 分間遠心分離した後の上清を 3-hydroxyanthranilate

3,4-dioxygenase(3-HAO, EC 1.13.11.6)活性, aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase (ACMSD, EC 4.1.1.45)活性, 及び Quinolate phosphoribosyltransferase (QPRT, EC 2.4.2.19)測定のための酵素源とした。また、肝臓と筋肉中の総 NiA-NH₂ 含量を測定した。

対照データを得るために、トリプトファンから NiA-NH₂ を効率よく合成できる動物として、ラットを使用した。ラットは雄 Wistar 系で、ナイアシン欠-20%カゼイン食(ラットは 20%カゼインを含む飼料を与えれば、すでにビタミン体となっているナイアシンを全く含まない飼料を与えなくても、正常に生育する²⁾)で飼育した 7 週齢の肝臓を用いた。酵素源の調製方法は、魚の場合と同じである。

3-HAO 活性は Decker ら³⁾の方法により、ACMSD 活性は Ichiyama ら⁴⁾の方法により、QPRT は Shibata らの⁵⁾方法により測定を行った。

総 NiA-NH₂ 含量の測定は Shibata ら⁶⁾の方法に従って行った。

C. 結果と考察

Table 2 にコイとニゴロブナの 3-HAO 活

性, ACMSD 活性, および 3-HAO/ACMSD の活性比を示した. トリプトファンから効率よく NiA-NH₂ を生合成できるラットの値と比較して, コイもフナも 3-HAO 活性は顕著な差異は認められなかった. しかしながら, ACMSD 活性は, ラットと比較して, 数十倍も高く, その結果, この二つの活性比はラットと比較して, 数十分の一という値であった. 以前に報告¹⁾したように, 鳥類においても, 3-HAO 活性の種による差異は 2-3 倍程度であったが, ACMSD 活性 (μmol/h/g) 肝臓には顕著な差異が認められ, ニワトリでは 5.5, ハトは 9.0, スズメは 32.7, カラスは 52.2 であった. 哺乳動物でも, トリプトファンを NiA-NH₂ の前駆体として利用できないネコ⁷⁾では, ACMSD 活性が 50μmol/h/g 肝臓と高くこの活性比は 4.75 と報告されている⁸⁾.

さらに, トリプトファン-NiA-NH₂ 転換経路の鍵物質であるキノリン酸をユニバーサルにナイアシン活性を有する物質に転換する酵素である QPRT 活性を測定したが, コイにおいても, フナにおいても, 検出限界以下であった(Table 3).

結論として, コイとフナは NiA-NH₂ の前駆体としてトリプトファンを利用できないと推測された.

さらに, トリプトファンから NiA-NH₂ が合成できないと推定されるコイ・フナと合成できるラットの筋肉中と肝臓中の総 NiA-NH₂ 含量を調べた結果(Table 3), 魚の含量が低かった. このことと, トリプトファン-NiA-NH₂ 生合成経路の強弱との関係についてはさらなる検討を有するが, 興味あることである.

NiA-NH₂ の補酵素である NAD・NADP は

代謝に関わっている全酵素の約 20%が必要としている. トリプトファンからの生合成経路は, この補酵素が必要な時に, 必要な量だけ速やかに供給するために存在していると考えている. 従って, 本経路が作動していない魚の飼育においては, NiA-NH₂ の供給を適切に行うことが, 養殖において一つの重要なポイントになるものと思われる.

D. 健康危機情報

特記する情報なし

E 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G 参考文献

1. 田口寛, 早野元日子, 柴田克己(1991) 鳥類における 3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ/アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性比からのトリプトファン-NiA-NH₂ 変換率の推定. ビタミン, **65**, 459-460
2. Shibata K, Mushiage T, Kondo T, Hayakawa T, Tsuge H (1995) Effects of

- vitamin B6 deficiency on the conversion ratio of tryptophan to niacin. *Biosci Biotechnol Biochem*, **59**, 2060-2063
3. Decker RH, Kang HH, Leach FR, Henderson LM (1961) Purification and properties of 3-hydroxyanthranilic acid oxidase. *J Biol Chem* **236**, 3076-3082
 4. Ichiyama A, Nakamura S, Kawai H, Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O, Senoh S (1965) Studies on the metabolism of the benzene ring of tryptophan in mammalian tissues. II. Enzymic formation of α -aminomuconic acid from 3-hydroxyanthranilic acid. *J Biol Chem* **240**, 740-749
 5. Shibata K, Fukuwatari T, Sugimoto E (2000) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of nicotinic acid mononucleotide for measurement of quinolinate phosphoribosyltransferase. *J Chromatogr* **749**, 281-285
 6. Shibata K, Kawada T, Iwai K (1987) High-performance liquid chromatographic determination of nicotinamide in rat tissue samples and blood after extraction with diethyl ether. *J Chromatogr* **422**, 257-262
 7. Da Silva AC, Fried R, De Angelis RC (1952) The domestic cat as a laboratory animal for experimental nutrition studies. *J Nutr* **46**, 399-409
 8. Ikeda M, Tsuji H, Nakamura S, Ichiyama A, Nishizuka Y, Hayaishi O (1965) Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. II. A role of picolinic carboxylase in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide from tryptophan in mammals. *J Bio Chem* **240**, 1395-1401

Table 1. Composition of the Diet for Fishes.

Materials	%
Fish powders	50
Wheat flour	21
Vegetable oil cake	14
Rice bran	9
Food yeast	6

The food contains 43.0% crude protein, 3.0% crude fat, 3.0% crude ash, 2.0% Ca, and 1.5% P.

Table 2. The Activities of 3-HAO, ACMSD, and the Ratio of 3-HAO/ACMSD in the Livers of Fishes.

	3-HAO ($\mu\text{mol/h/g}$)	ACMSD ($\mu\text{mol/h/g}$)	3-HAO/ACMSD
Carp	324	64	5.06
Crucian	430	69	6.23
Rat	481	0.74	650

The values are the mean of the separate three experiments.

Table 3. Comparison of the QPRT Activity and the Concentration of Total NiA-NH₂ in Liver and Muscle.

	QPRT ($\mu\text{mol/h/g}$)	Total NiA-NH ₂	
		Liver (nmol/g)	Muscle (nmol/g)
Carp	N.D.	1129	293
Crusian	N.D.	626	188
Rat	0.35	2093	647

The values are the mean of the separate three experiments.