

ラット肝臓カテプシン活性に及ぼす 食餌タンパク質レベルの影響

田代 操・柴田 三知子・倉田 明枝*

Effects of Dietary Protein Level on Cathepsin Activities in Liver of Rats

MISAO TASHIRO, MICHIKO SHIBATA and AKIE KURATA*

Male weanling rats were fed diets containing various levels of casein for 21 days and liver cathepsin activities in addition to body-weight gain and hepatic DNA, RNA, and protein contents were measured.

After three weeks of feeding, maximum growth was observed in animals fed diets containing 20% or more casein. Total activities of liver cathepsin B, H, and L increased to nearly maximal values as the level of casein increased from 0 to 20% in the diet and the values did not change greatly with further increases of dietary protein level.

This response was similar to those of liver weight, liver protein, and liver RNA.

(Received August 10, 1992)

緒 言

食餌条件の違いが動物の代謝に著しい変動を及ぼすことは良く知られている¹⁾。食餌条件とは、食餌中の栄養素のバランス、食べる回数などを総合したものをいうが、ある食餌条件に対応した代謝の変動とは、まさに生物のホメオスタシスの一環にほかならない。したがって、この食餌条件に対応する代謝変動を明らかにすることは、逆に動物の適応のメカニズム、すなわち代謝のメカニズムを知るうえで非常に重要なこととなる。

ところで、体タンパク質の異化代謝、すなわち細胞内のタンパク質分解には、リソソームの関与するリソソーム系路とリソソームの関与しない非リソソーム系路のあることが知られている²⁾。このうち、リソソーム系路は、細胞内の遊離アミノ酸の維持に主要な役割を

演ずるものと主張されており³⁾、そこに局在するエンドペプチダーゼであるカテプシン B, H, L に注目が集められている。したがって、これらプロテアーゼの活性や酵素量が食餌条件とどの様に関連するかを知ること、リソソーム系路のメカニズム解明にとって大切なことと考えられる。

そこで、前報⁴⁾において、我々は食餌中におけるタンパク質源を変え、タンパク質の質の違いがラットの肝臓細胞中のプロテアーゼ活性に及ぼす影響を及ぼすかについて検討した。本研究では、食餌タンパク質源をカゼインとし、そのレベルを0~40%に変え、食餌タンパク質レベルの違いがラット肝臓カテプシン活性にどのような影響を与えるかについて検討した。

材料と方法

1) 動物実験

京都府立大学生活科学部食物学科栄養学講座

Laboratory of Nutritional-Physiology and Biochemistry, Department of Food Science and Nutrition, Kyoto Prefectural University

*光華女子短期大学

Koka Women's Junior College

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	Groups					
	0%	5%	10%	20%	30%	40%
	(g/1000g food)					
Casein	0	50	100	200	300	400
Corn starch	850	800	750	650	550	450
Corn oil	50	50	50	50	50	50
Mineral mixture* ¹	50	50	50	50	50	50
Vitamin mixture* ²	10	10	10	10	10	10
Cellulose powder	40	40	40	40	40	40

*¹Mineral mixture (g/100 g mixture) CaHPO₄ · 2H₂O, 14.56: KH₂PO₄, 25.72: NaH₂PO₄, 9.35: NaCl, 4.66: Ca-lactate, 35.09: Fe-citrate, 3.18: MgSO₄, 7.17: ZnCO₃, 0.11: MnSO₄ · 4~6H₂O, 0.12: CuSO₄ · 5H₂O, 0.03: KI, 0.01.

*²Vitamin mixture (mg/100 g mixture) retinol acetate (500,000 IU), 100: calciferol (40,000,000 IU), 0.25: tocopherol acetate, 500: menadione, 520: thiamine HCl, 120 riboflavin, 400: pyridoxine HCl, 80.0: cobalamine, 0.05: ascorbic acid, 3000: biotin, 2.0: folic acid, 20.0: calcium pantothenate, 500: paraaminobenzoic acid, 500: nicotinic acid, 600: inositol, 600: choline chloride, 20,000.

4週令、平均体重約60gのウイスター系雄ラット(清水実験材料K.K.より購入)を7日間市販の固型飼料で予備飼育した後、Table 1に示す飼料を与えて21日間飼育した。各飼料区については5頭のラットを無作為に割り当てた。なお、飼料成分および飼育条件は前報⁴⁾と同様であった。

2) 解剖と肝臓の処理

飼育最終日の10:00に飼料を取り除き、体重測定を行った後、12:00~14:00の間にラットを解剖した。解剖の方法と肝臓の処理は前報⁴⁾と同様にして行った。

3) 酵素活性の測定

肝リソソーム画分のカテプシンB, H, L活性は、基質としてそれぞれ *N*-Benzyloxycarbonyl-L-argininyl-L-arginine 4-methylcoumaryl-7-amide (Z-Arg-Arg-MCA), L-Arginine 4-methylcoumaryl-7-amide (Arg-MCA), *N*-Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginine 4-methylcoumaryl-7-amide (Z-Phe-Arg-MCA) (ペプチド研究所K.K.より購入)を用いる蛍光光度法⁵⁾を使用し、前報⁴⁾と同様にして測定した。また、サイトソールとリソソーム両画分の酸性ホスファターゼ活性⁶⁾も測定し、カテプシン活性の補正に使用した。

4) 核酸、タンパク質の定量

肝ホモジネートの調製は前報⁴⁾と同様にして行ない、RNA, DNAの分離には、Schmidt-Thannhauser-Schneider法⁷⁾、RNAの定量にはオルシノール法⁸⁾、DNAの定量にはバートンの変法⁹⁾を用いた。また、タンパク質は前報⁴⁾と同様にLowryらの方法¹⁰⁾を用いて定量した。

5) 統計処理

データは、一元配置の分散分析法によって分析し、

各区の平均値間の差をDuncanの検定法¹¹⁾で調べた。5%以下の危険率で有意となるものを有意差ありと判定した。

結果

1) 体重増加量, 飼料摂取量

21日間の飼育におけるラットの平均体重増加曲線をFig. 1に示す。20, 30および40%カゼイン食区では

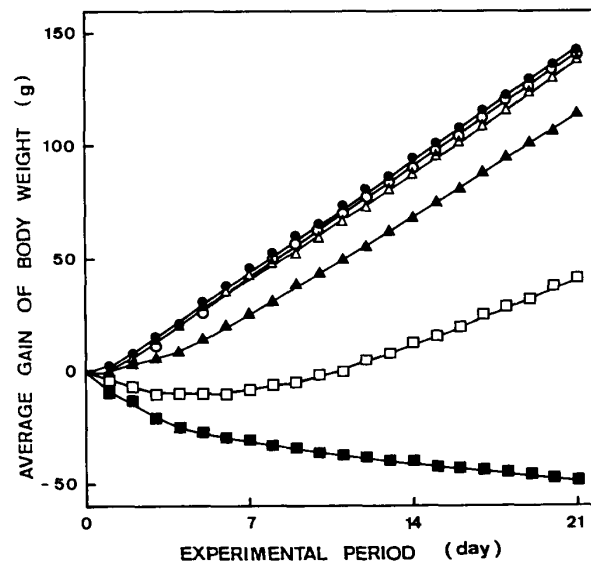


Fig. 1. Growth curves of rats fed the experimental diets.

■—■, 0% casein-diet group; □—□, 5% casein-diet group; ▲—▲, 10% casein-diet group; △—△, 20% casein-diet group; ●—●, 30% casein-diet group; ○—○, 40% casein-diet group.

Table 2. Body-weight gain and food intake of rats fed experimental diets for 21 days

	0%	5%	10%	20%	30%	40%
Body-weight gain(g)	-48.2±1.6 ^a	41.4±5.6 ^b	114±6 ^c	138±10 ^c	142±9 ^c	142±6 ^c
Food intake (g)	137±9 ^a	262±13 ^b	325±14 ^c	338±19 ^c	337±15 ^c	324±13 ^c

Values represent mean ± SEM of 5 rats per group.
 Values with different superscripts are significantly different (p<0.05).

Table 3. Liver weight and hepatic protein, DNA, and RNA contents of rats fed experimental diets

	0%	5%	10%	20%	30%	40%
Liver weight (g)	3.68±0.33 ^a	5.81±0.21 ^b	8.76±0.46 ^c	10.33±0.58 ^{cd}	11.16±0.52 ^d	11.50±0.59 ^d
Protein (mg)	384±26 ^a	894±16 ^b	1440±64 ^c	1740±87 ^{cd}	1930±80 ^{de}	2160±118
(mg/g liver)	110±15 ^a	155±5 ^b	165±6 ^{bc}	168±3 ^{bc}	173±3 ^{bc}	188±6 ^c
DNA (mg)	12.7±0.7 ^a	15.9±0.7 ^a	24.3±2.0 ^b	27.6±2.2 ^b	25.9±1.7 ^b	26.5±2.2 ^b
(mg/g liver)	3.55±0.26 ^a	2.76±0.18 ^{ab}	2.76±0.15 ^{ab}	2.70±0.27 ^{ab}	2.34±0.17 ^b	2.30±0.13 ^b
RNA (mg)	25.4±2.8 ^a	66.4±1.7 ^b	96.7±3.3 ^{bd}	129.2±6.7 ^c	112.6±5.1 ^{cd}	121.6±14.2 ^{cd}
(mg/g liver)	7.4±1.4 ^a	11.4±0.2 ^b	11.1±0.5 ^b	12.5±0.4 ^b	10.1±0.5 ^{ab}	10.5±1.1 ^{ab}

Values represent mean ± SEM of rats per group.
 Values with different superscripts are significantly different (p<0.05).

ほぼ同様の順調な成長を示した。10%カゼイン食区は、先と比べるとやや劣るものの比較的順調な成長であった。5%カゼイン食区では、最初の10日間ぐらいは体重を維持しているのみであったが、それ以降はゆるやかな成長を示した。一方、0%カゼイン食区のラットは飼育期間をとおして体重を減少させた。

各飼料区の21日間の体重増加量と飼料摂取量についてはTable 2に示してある。体重増加量は、食餌中のカゼイン含量が高くなるにつれて増加し、20%カゼイン含量でほぼプラトーとなった。また飼料摂取量は、0%カゼイン食区が一番低く、つづいて5%カゼイン食区、10%カゼイン食区の順に増加した。なお、20%以上のカゼイン含量を有する飼料区の摂取量は、10%カゼイン食区とほとんど変らなかった。

2) 肝臓の重量とタンパク質, DNA, RNA 量

Table 3に各食餌区の肝湿重量と肝タンパク質, DNA, RNA 量を示す。肝湿重量は、飼料中のカゼイン含量が高くなるにつれて増加し、20%カゼイン含量でほぼプラトーとなった。この傾向は肝総タンパク質量と総RNA量にも見られた。肝総DNA量については、0%, 5%カゼイン食区が低く、10%以上のカゼイン含量を有する飼料区は高いという両極性が認められた。

3) カテプシン活性

Z-Arg-Arg-MCA を基質に用いて測定した肝カテプ

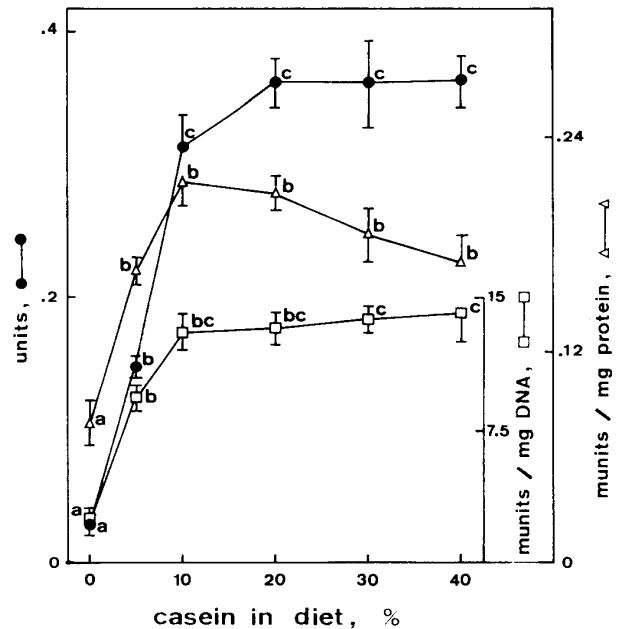


Fig 2. The level of Z-Arg-Arg-MCA hydrolytic (cathepsin B) activity in liver lysosomal fraction of rats fed the diets differing in protein level.

Values represent mean ± SEM of 5 rats per group. Means with different letters are significantly different (p<0.05).

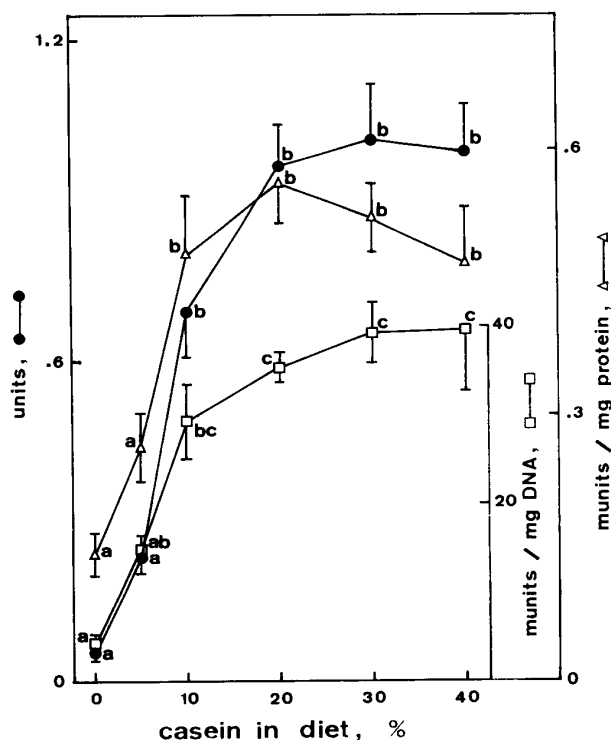


Fig 3. The level of Arg-MCA hydrolytic (cathepsin H) activity in liver lysosomal fraction of rats fed the diets differing in protein level.

Values represent mean \pm SEM of 5 rats per group. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

シ B 活性を Fig. 2 に示す。総活性で見ると、値は飼料中のカゼイン含量の上昇と共に高くなり、20%カゼイン含量でほぼプラトーとなった。この傾向は肝総タンパク質量と同様であったが、肝タンパク質 1 mg 当りの活性は一定とならず、10%カゼイン含量で極大を示した。一方、肝 DNA 1 mg 当りの活性は、飼料中のカゼインレベルが 10%以上ではほぼ一定の値を示した。

Fig. 3 は Arg-MCA 分解活性で表される肝カテプシン H 活性を示している。Fig. 2 と同様、総活性は飼料中のカゼイン含量の上昇と共に高くなり、20%カゼイン含量でほぼプラトーとなった。しかしながら、肝タンパク質 1 mg 当りの活性は Fig. 2 の場合とは異なり 20%カゼインレベルで極大を示した。肝 DNA 1 mg 当りの活性は Fig. 2 と同様の傾向を示した。

Fig. 4 は肝の Z-Phe-Arg-MCA 分解活性を示したものである。Z-Phe-Arg-MCA はカテプシン L のみならずカテプシン B の良好な基質でもあるので⁹⁾、本活性は肝カテプシン L 活性にカテプシン B 活性を加えたものとして評価する必要がある。この場合、総活性、肝タンパク質 1 mg 当りの活性そして肝 DNA 1 mg 当りの活性いずれもが Fig. 2 に示されるカテプシン B 活性と類似の傾向を示した。

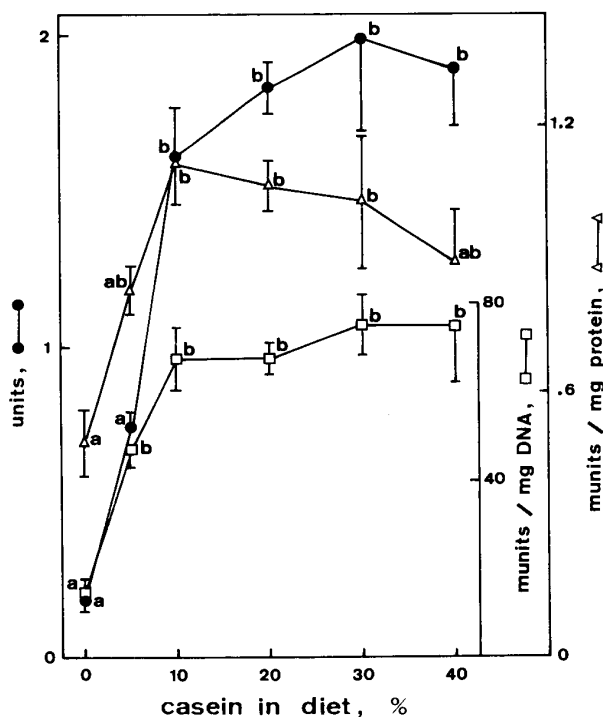


Fig 4. The level of Z-Phe-Arg-MCA hydrolytic (cathepsin B+L) activity in liver lysosomal fraction of rats fed the diets differing in protein level.

Values represent mean \pm SEM of 5 rats per group. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

考 察

飼料中のカゼイン含量を 0~40%に変化させたとき、幼ラットの生育はカゼインレベル 20%でほぼプラトーとなった。この結果は、幼ラットの最大成長を与える飼料中カゼイン含量が約 25%であるという報告¹²⁾と良く一致していた。また、肝湿重量や肝タンパク質の挙動も今までの報告¹²⁾と一致していた。したがって本実験で得られたラットの生育に関する各種のパラメーターは正当に評価できる値と考えられる。

肝臓のカテプシン活性に関しては、B, H, L いずれもその総活性は、飼料中カゼインレベルの上昇に伴い増加し、カゼインレベル 20%でほぼプラトーに達するという結果を示した。本酵素活性は in vitro の測定であるため、活性の高低は酵素タンパク質量の大小と同義と考えられる。したがって、カテプシン酵素量も肝総タンパク質量と同様の挙動をとるものと考えられる。しかしながら、肝タンパク質 1 mg 当りの酵素活性は、有意差は認められなかったものの、カゼインレベル 10%か 20%で極大値を示していた。これより、両者は必ずしも同一の挙動をとるものでないとも考えられよう。この点に関してはさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

要 約

幼ラットにカゼイン含量の異なる飼料を与え、21日間飼育し、体重増加量、肝DNA、RNA、タンパク質含量に加えて肝カテプシン活性を測定した。

3週間の飼育において、最大成長は20%およびそれ以上のカゼイン含量の飼料を与えられたラットに認められた。肝カテプシンB、H、Lの総活性は、飼料中のカゼインレベルが0%から20%に増加すると共に増加してほぼ最大値となった。この値は、飼料中のカゼインレベルがそれ以上増加してもあまり変らなかった。

このカテプシン活性の飼料中カゼインレベルに対する応答は、肝重量、肝タンパク質、肝RNAの応答と類似していた。

(1992年8月10日受付)

引用文献

- 1) 内藤 博, 野口 忠 : 栄養化学, p. 99 (1989), 養賢堂, 東京.
- 2) A. L. Goldberg and A. C. St. John : *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 747 (1976).
- 3) 田中啓二 : 蛋白質核酸酵素, **32**, 956 (1987).
- 4) 田代 操, 倉田明枝, 溝端真理子 : 京府大学術報告 (理学・生活科学), 42号, 17 (1991).
- 5) A. J. Barrett and H. Kirschke : *Methods in Enzymology* (ed. by L. Lorand), vol. 80, p. 535 (1981), Academic Press, New York.
- 6) A. Torriani : *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 460 (1960).
- 7) W. C. Schneider : *J. Biol. Chem.*, **164**, 747 (1946).
- 8) W. Mejbaum : *Z. Physiol. Chem.*, **258**, 117 (1939).
- 9) K. Burton : *Biochem. J.*, **62**, 315 (1956).
- 10) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 11) 石居 進 : BASICによる統計処理, p. 133 (1983), 培風館, 東京.
- 12) K. Muramatsu and K. Ashida : *J. Nutr.*, **76**, 143 (1962).