

ラット肝カテプシン活性に及ぼす飼料変動の影響

田代 操・倉田明枝*・小川久美

Effect of Diet Change on Cathepsin Activities in Liver of Rats

MISAO TASHIRO, AKIE KURATA* and HISAMI OGAWA

Male weanling rats were fed a diet containing 20% casein for 14 days and divided into 6 groups. One group was starved for 2 days and the other 5 groups were fed either 0, 5, 10, 20, or 40% casein diets for 2 days.

During 2 days after a nutritional shift rats fed the 10 or 40% casein gained over 10 g of body weight corresponding to that gained by rats fed the 20% casein. In contrast, rats with starvation and rats fed the protein-free diet lost weight. In animals fed the 5, 10, or 40% casein diets, average liver weights were similar to that of rats given the 20% casein and higher than those of the starved rats and the rats consuming the 0% casein. Total activities of cathepsins B, H, and L in liver of rats fed the 10 or 40% casein were similar to those of rats fed the 20% casein and higher than those of rats fed the 0% casein. The total activities of the starved group tended to be higher than those of the 0 and 5% casein groups.

These results suggest that cathepsin activities in rat liver are rapidly affected by alterations in the protein content of the diet.

(Received August 10, 1993)

緒 論

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⁾。特に肝臓は他の器官に比べタンパク質やRNAの合成分解が活発であり、飼料中のタンパク質含量の変化によって肝タンパク質量やRNA量が著しく影響される²⁾。また近年の研究ではラット肝タンパク質プールのほぼ90%程度が1日で代謝回転するものと示唆されている³⁾。

ところで、肝臓におけるタンパク質分解系にはリソソーム経路と非リソソーム系路のあることが知られている⁴⁾。このうち、リソソーム系路で働くプロテアーゼ

はカテプシンと総称され、特にエンドペプチタ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、これらの酵素活性が食餌条件とどの様に関連するかを知ることは、リソソーム系とタンパク質代謝の関係を明らかにするうえで非常に重要である。

すでに我々はこのような観点より実験を進め、タンパク質の質の違いがラットの肝プロテアーゼ活性に大きな影響を与えることを示した⁵⁾。さらに、カゼインを食餌タンパク質源とし、その飼料中レベルを0~40%に変化させ、ラットに3週間与えた時の肝カテプシン活性についても検討し、活性が肝タンパク質や肝RNA量と類似の応答をしていることを認めた⁶⁾。本

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

研究では、この様な応答が短期間で生じるか否かを明らかにすべく、20%カゼイン飼料で飼育した幼ラットに2日間タンパク質含量の異なる飼料を与え、肝カテプシン活性の応答について検討を加えた。また、2日間絶食させたラットについても併せて検討した。

材料と方法

1) 動物実験

4週齢、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4日間市販の固型飼料で予備飼育した後、Table 1に示される20%カゼイン飼料を与えて14日間飼育した。その後さらにカゼイン含量が0, 5, 10, 20, 40%の飼料(Table 1)を与える群と絶食群とに分け2日間飼育した。各群については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⁶⁾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の間に解剖した。解剖の方法と肝臓の処理は前報⁵⁾と同様にして行った。

3) その他の方法

肝リソソーム画分のカテプシンB, H, L活性測定法⁷⁾、酸性ホスファターゼ活性測定法⁸⁾、さらに核酸及びタンパク質の定量法は前報⁶⁾で用いたものと同様であった。

なお、データの統計処理についても前報⁶⁾と同様に行った。

結 果

1) 体重増加量, 飼料摂取量

20%カゼイン飼料で飼育した14日間の間にラットは平均81.6gの体重を増加させた。これは1日当たり平均5.8gの体重増加に相当した。

ラットを6群に分け、1群は2日間の絶食、残りの5群には、それぞれ0, 5, 10, 20, 40%カゼイン飼料を2日間与えた。各群の平均体重増加量と飼料摂取量をTable 2に示す。飼料変動を行った場合でも、10%および40%カゼイン食群では、飼料変動を行っていない20%カゼイン食群とほとんど体重増加量に差は見られなかった。しかしながら、5%カゼイン食変動群では20%カゼイン食群に比べ有意に体重増加量が低下した。なお、飢餓群では著しい体重減少が見られ、無タンパク食群でも明らかに体重が減少した。これらの体重減少は、栄養条件の変動後1日目と2日目では様子を異にしていた。すなわち、飢餓群では1日目の方が2日目より体重減少が激しかったが、無タンパク食群ではその逆であった。飼料摂取量に関しては各群間に有意差は認められなかったが、40%カゼイン食と無タンパク食群で低下する傾向が見られた。

2) 肝臓の重量と肝タンパク質, DNA, RNA量

Table 3に各群の肝湿重量と肝タンパク質, DNA, RNA量を示す。肝湿重量については、5, 10, 40%カゼイン食変動群は20%カゼイン食群と類似の値をとり、飢餓及び無タンパク食群では低下していた。同様の傾向が肝タンパク質量やRNA量でも認められた。

Table 1. Composition of experimental diets

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

*¹ Mineral 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.

*² Vitamin 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.

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

	fasted	0%	5%	10%	20%	40%
Body-weight gain (g)	-28.8±1.2 ^a	-7.3±1.4 ^b	8.3±1.4 ^c	15.6±1.5 ^c	14.4±0.5 ^c	12.0±0.8 ^c
Food intake (g)	—	29.3±2.1	35.2±2.2	36.2±2.8	33.7±1.1	28.4±1.0

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 after nutritional shifts

	fasted	0%	5%	10%	20%	40%
Liver weight (g)	5.24±0.20 ^a	6.34±0.19 ^{ab}	7.27±0.41 ^{bc}	7.73±0.49 ^{bc}	7.48±0.29 ^{cd}	8.38±.60 ^c
Protein (mg)	995±76 ^a	931±18 ^a	1125±57 ^{ab}	1387±88 ^{bc}	1238±36 ^{ab}	1529±160 ^b
(mg/g liver)	190±12 ^a	147±3 ^b	155±4 ^{ab}	180±5 ^{ab}	166±4 ^{ab}	182±13 ^{ab}
DNA (mg)	21.9±0.5	18.9±0.4	20.7±2.0	22.4±2.3	18.5±1.1	21.2±2.4
(mg/g liver)	4.20±0.10 ^b	2.99±0.06 ^c	2.84±0.18 ^c	2.88±0.15 ^c	2.47±0.12 ^c	2.53±0.25 ^c
RNA (mg)	82.7±4.3 ^{ab}	73.4±3.8 ^a	101±2.7 ^{abc}	121±11.2 ^{cd}	112±5.6 ^{ab}	136±9.5 ^c
(mg/g liver)	15.8±0.4 ^a	11.6±0.5 ^b	14.0±0.4 ^{ab}	15.6±0.6 ^a	14.9±0.3 ^a	16.3±1.0 ^a

Values represent mean±SEM of 5 rats per group.

Values with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

が総 DNA 量に関しては各群ともほぼ同じ値を示した。

3) カテプシン活性

Z-Arg-Arg-MCA (*N*-Benzoyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginine 4-methylcoumaryl-7-amide) を基質に用いて測定した肝カテプシン B 活性を Fig.1 に示す。総活性で見ると、5、10、40%カゼイン食変動群の値は20%カゼイン食群とほとんど変らなかった。一方0%カゼイン食では有意に低下し、飢餓群においてもわずかに低下の傾向が見られた。なお、肝タンパク質 1mg 当りの活性は、0%カゼイン食群で低くなる傾向が見られたが、すべての群間に有意差は認められなかった。肝 DNA 1mg 当りの活性は、0%カゼイン食群、飢餓群、さらに5、10、20、40%カゼイン食群の順に高くなっていった。しかしながら、20%カゼイン食群と有意差を示したのは、飢餓群と無タンパク食群のみであった。

Fig.2 は Arg-MCA (L-Arginine 4-methylcoumaryl-7-amide) 分解活性で表される肝カテプシン B 活性を示している。総活性については、10、40%カ

ゼイン食変動群の値が20%カゼイン食群と類似していた。0、5%カゼイン食変動群は20%カゼイン食群より低い値を示した。一方、飢餓群の値は0、5%カゼイン食群の値より高くなる傾向を見せた。肝タンパク質 1mg 当りの活性と肝 DNA 1mg 当りの活性については、Fig.1 と同様の傾向を示した。

Fig.3 は肝の Z-Phe-Arg-MCA (*N*-Benzoyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginine 4-methylcoumaryl-7-amide) 分解活性を示したものである。本活性は前報²⁾でも述べたようにカテプシン B とし、合計活性と見なせる。本活性の場合、総活性において、20%カゼイン食群とほぼ変わらない値を示したのは、10、40%カゼイン食変動群と飢餓群であった。一方、0%カゼイン食変動群では値は20%カゼイン食群より有意に低下し、5%カゼイン食変動群でも低下の傾向を示した。肝タンパク質 1mg 当りの活性に関しては飢餓群のみが20%カゼイン食群と有意差を示した。また、肝 DNA 1mg 当りの活性に関しては Fig.2 と同様の結果であった。

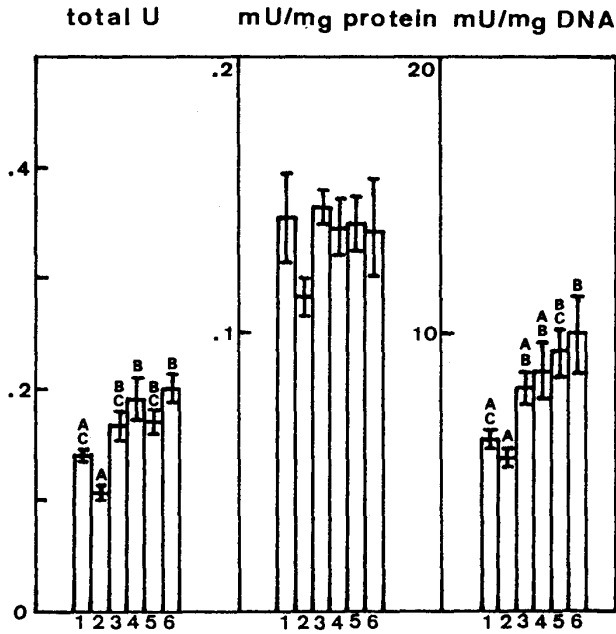


Fig.1. The level of Z-Arg-Arg-MCA hydrolytic (cathepsin B) activity in liver of rats after nutritional shifts. 1, fasted; 2, 0% casein; 3, 5% casein; 4, 10% casein; 5, 20% casein; 6, 40% casein. Values represent mean \pm SEM of 5 rats per group. Means with different capital letters are significantly different ($p < 0.05$).

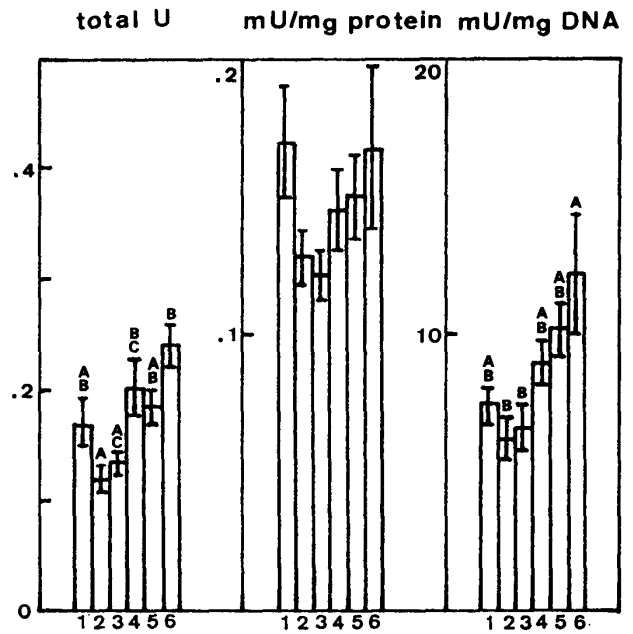


Fig.2. The level of Arg-MCA hydrolytic (cathepsin H) activity in liver of rats after nutritional shifts. 1, fasted; ; 2, 0% casein; 3, 5% casein; 4, 10% casein; 5, 20% casein; 6, 40% casein. Values represent mean \pm SEM of 5 rats per group. Means with different capital letters are significantly different ($p < 0.05$).

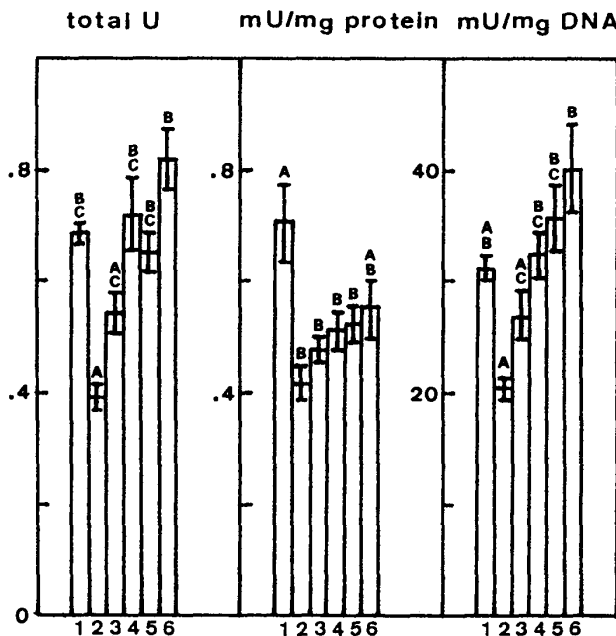


Fig.3. The level of Z-Phe-Arg-MCA hydrolytic (cathepsin B+L) activity in liver of rats after nutritional shifts. 1, fasted; 2, 0% casein; 3, 5% casein; 4, 10% casein; 5, 20% casein; 6, 40% casein. Values represent mean \pm SEM of 5 rats per group. Means with different capital letters are significantly different ($p < 0.05$).

考 察

我々は前報⁶⁾において、カゼイン含量を0~40%に変化させた飼料で3週間飼育したラットの肝カテプシン活性について報告し、肝カテプシン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%ではぼプラトーに達することを示している。この応答は肝タンパク質量の応答と類似してはいたが、肝タンパク質1mg当りの活性は必ずしも各群等しくはなかった。酵素活性を酵素タンパク質量と同義であると仮定すると、このことは異なる栄養条件下にある肝臓では、カテプシン酵素タンパク質の肝総タンパク質に占める割合はそれぞれ異なるということを表している。ところで、このような肝カテプシン活性の応答は飼料の変動が生じてからどのくらいで成立するものなのであろうか。

今回の実験においては、20%カゼイン飼料で2週間飼育したラットに対し飼料を変え2日間飼育した。そして、明らかにこの2日間で肝カテプシン活性に有意な変動が生じることが認められた。これは特に20%カゼイン食より0%カゼイン食や5%カゼイン食にした場合に明瞭に見られた結果である。しかしながら、今回得られた活性レベルは先の3週間飼育後の活性レ

ベルまでには到っていなかった。このことは肝タンパク質 1mg 当りの活性からも示された。すなわち、前報⁶⁾において 0%カゼイン食群の肝タンパク質 1mg 当りの活性は 20%カゼイン食群の値に比べ有意に低下していた。一方、今回は低下の傾向は認められたものの有意ではなかった。したがってカテプシン活性の変動はすみやかに生じるものの肝臓の大部分の他のタンパク質の変動より遅れることが考えられる。

今回の実験では、さらに 2 日間の飢餓群も加えてみた。0%カゼインである無タンパク食群と比較すると、体重の著しい減少が特徴的であり、肝タンパク質や RNA 量については差が認められなかった。ところで体重減少に加えてさらに興味深い点がカテプシン活性に見られた。すなわち、飢餓群の総カテプシン活性は無タンパク食群やさらに 5%カゼイン食群より高い傾向にあり、20%カゼイン食群とも有意差は認められなかったという点である。このことは、飢餓によっては少なくとも 2 日程度はカテプシンの酵素プールがあまり減少しないということを示唆する。飢餓時におけるカテプシンの代謝回転速度が著しく異なることも考えられよう。飢餓時と無タンパク食時の違いについては今後の興味ある点である。

要 約

幼ラットに 20%カゼイン飼料を与えて 14 日間飼育した。その後さらにカゼイン含量が 0, 5, 10, 20, 40% の飼料を与える群と飢餓群に分け 2 日間飼育した。

飼料変動後の 2 日間において、10%および 40%カゼイン食変動群は 10g 以上の体重を増したがこれは 20%カゼイン食群の値と同等であった。対照的に絶食群と無タンパク食群は体重を減少させた。平均肝湿重量に関しては、5, 10, 40%カゼイン食群は 20%カゼ

イン食群と同等の値を示し、飢餓群や無タンパク食群より高い値を示した。肝カテプシン B, H, L の総活性については、10%および 40%カゼイン食群が 20%カゼイン食群と類似の値を示し、無タンパク食群の値を上回っていた。また、飢餓群の総活性は 0%および 5%カゼイン食群より高くなる傾向を示した。

これらの結果より、ラットの肝カテプシン活性はタンパク質含量の異なる飼料変動によりすみやかに影響されることが示唆された。

引用文献

- 1) 内藤 博, 野口 忠: 栄養化学, p.99 (1989), 養賢堂, 東京
- 2) H.N. Munro, C. Hubert, and B.S. Baliga: Alcohol and Abnormal Protein Biosynthesis (ed. by M.A. Rothschild, M. Oratz, and S.S. Schreiber), p.33 (1975), Pergamon Press, New York.
- 3) P.J. Garlick, G.A. Clugston, M.A. McNurlan, V.R. Preddy and E.B. Fern: *Biochem. Soc. Trans.*, **10**, 290 (1982)
- 4) A.L. Goldberg and A.C. St. Jhon: *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 747 (1976).
- 5) 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).
- 6) 田代 操, 柴田三知子, 倉田明枝: 京府大学術報告 (理学・生活科学), 43 号, 45 (1992).
- 7) A.J. Barrett and H. Kirschke: *Methods in Enzymology* (ed. by L. Lorand), Vol.80, p.535 (1981), Academic Press, New York.
- 8) A. Torriani: *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 460 (1960).