

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：22702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K00925

研究課題名(和文) 食生活の西洋化は体内システイン量への影響を介して生体機能を左右するか？

研究課題名(英文) The influence of westernization of the dietary habits on the biological function via the change of body cysteine status.

研究代表者

山西 倫太郎 (Yamanishi, Rintaro)

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：30253206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：低たんぱく食はマウス腎細胞等のグルタチオン(GSH)量を低下させ、低ビタミンB6条件が加わるとさらに低下した。そこにシステイン(Cys)を供するとGSH量は回復したが、メチオニン(Met)を供した場合は低下した。Cys合成しにくい食餌条件での「Cys添加(和食モデル)」と「ラード&Met添加(西洋食モデル)」では、後者で血糖値が有意に高く脂質過酸化度も高い傾向が見られた。ビタミンAの影響を単球・マクロファージ系培養細胞で検討したところ、レチノールや β -カロテンが細胞内GSH量を増加させたがレチノイン酸は増加させなかった。細胞内GSH量が多いと、細胞内酸化還元状態は還元側にシフトした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品成分が、主に生体内の抗酸化物質グルタチオン(GSH)量に及ぼす影響について検討した。西洋化食は、植物たんぱく質の摂取割合が高い和食と比べ、畜肉たんぱく質の摂取割合が高く含硫アミノ酸が不足しやすい。後者では脂肪の摂取量も多くなる。本研究において、含硫アミノ酸の一種であるシステインの摂取不足がGSH不足をもたらした。また、西洋化食モデルが血糖値や生体酸化還元に悪影響をもたらした。試験管レベルでは、ビタミンA不足が細胞内GSH量不足を招くことを示した。生体の酸化は、様々な疾患や老化をもたらす危険性があるため、健康を維持するには、たんぱく質の質やビタミンA摂取に留意する必要があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Low-protein diets decreased glutathione (GSH) levels in mouse kidney cells and other organs, and these levels were further decreased under the low-protein and low vitamin B6 condition. When cysteine (Cys) was added to the diet, GSH levels recovered, but when methionine (Met) was added, GSH levels declined. Under conditions that prevented Cys synthesis, between the addition of Cys (Japanese diet model) and that of lard and Met (Western diet model), blood glucose levels were significantly higher and lipid peroxidation levels were higher in the latter. When the effects of vitamin A were examined in cultured monocyte-macrophage cells, addition of retinol or β -carotene to the culture medium increased the amount of intracellular GSH, but addition of retinoic acid did not. The intracellular redox state shifted toward the reduction side when the amount of intracellular GSH was higher.

研究分野：食品栄養科学

キーワード：栄養 食品成分 抗酸化 グルタチオン システイン メチオニン ビタミンA 単球・マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 科学的な背景:日本の鼻アレルギー患者は国民の47.2%にまで及び(平成23年厚労省報告)、その代表例であるスギ花粉症の患者数は爆発的に増加してきた。アレルギー患者が増加した原因については一般に、右囲み内のような事項が疑われている。この中で、我々の研究グループでは“食生活の変化”に注目している。太平洋戦争後に日本の食生活は劇的な変化を遂げており、その変化の特徴を端的に表すと、「食生活の西洋化により、畜産物消費が活発化し、こめ消費は著しく減退した」となる。図1に国民健康栄養調査の結果から算出した「摂取総たんぱく質に占める動物性たんぱく質の割合」、図2に農水省食糧需給表における「一日ひとりあたりのこめ消費量」のそれぞれの変遷を示した(いずれの図も5年ごとのデータでグラフ化した)が、見事に逆相関の関係にある。

- ・環境中のアレルゲンの増加
- ・過度な衛生環境(⇒“衛生仮説”)
- ・大気汚染など公害の影響
- ・精神的ストレスの増加
- ・食生活の変化(西洋化)

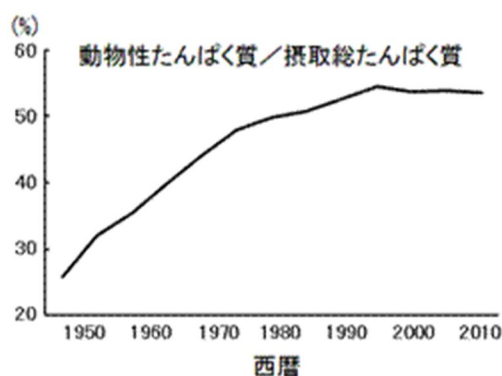


図1 動物性たんぱく質摂取割合の変遷

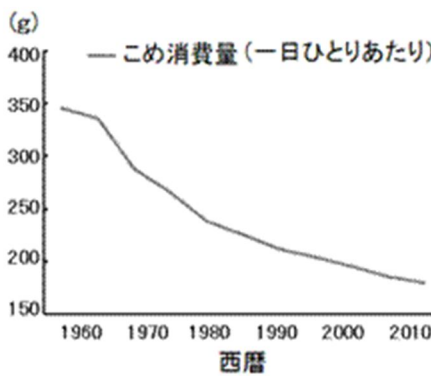


図2 こめ消費量の変遷

動物性たんぱく質は、植物性たんぱく質には少ないリシンを多く含むが、含硫アミノ酸の一つであるシステイン(Cys)含量が少ないという“弱点”もある。Cysはヒトの体内で合成できない必須アミノ酸ではないが、準必須アミノ酸に位置付けられている。

畜産物消費増は、動物性脂肪摂取量の増加も伴い、脂肪摂取量の増加は、メチオニン(Met)からのCys合成を阻害する。さらに、動物性食品が摂取源であるビタミンB12(V.B12)は、葉酸と連携し、MetからCys合成途上で生成するホモシステインを再びMetに戻す“Met合成”を触媒する酵素の補酵素であり、Cys合成の立場から見ると、やはり阻害的な物質である。本研究では、畜産物の消費が増加する際に摂取が増加する動物性たんぱく質・脂肪・V.B12のいずれもが、体内Cysに対して負のベクトルを持つ(図3)ことに着目した。

Cysはそれ自体が還元性物質であるが、細胞内での抗酸化酵素反応の基質となるグルタチオン(GSH)に組み込まれることでその抗酸化性が有効に活用される。生体にとってはGSHの方が遊離Cysより安全なSH化合物である¹⁾ことから、通常の細胞内GSH濃度はCys濃度より高く、GSHは生体内Cysリザーバーとしての意味も持つ物質である²⁾。なお、生体内のGSH量に関しては、その原料であるCys量のみならず、合成酵素であるグルタミン酸システインリガーゼ(GCL)量も影響する。

(2) 関連する国内外の研究との関連性:本研究で研究対象とした成分であるGSHについては、それが生体の機能維持・調節に重要であることがこれまでの多くの研究において示されてきた。例えば、抗原提示細胞内のGSHの量ならびに酸化還元状態が、生体内の免疫状態の指標であるTh1/Th2バランスに影響することも示されている³⁾。

2. 研究の目的

本申請の一連の研究で検証したい仮説は、「食生活の西洋化に伴う体内Cys量の低下が、ある種の疾患増加の根本的要因となっている。」であった。

食生活と疾患の関係を明らかにするには、実験動物を用いた摂食実験により、

(1) 中間指標(指標物質の体内動態、細胞の酸化還元状態や酵素の活性)に対する食餌の影響

(2) 最終指標(疾患モデル動物の罹患リスク)に対する食餌の影響

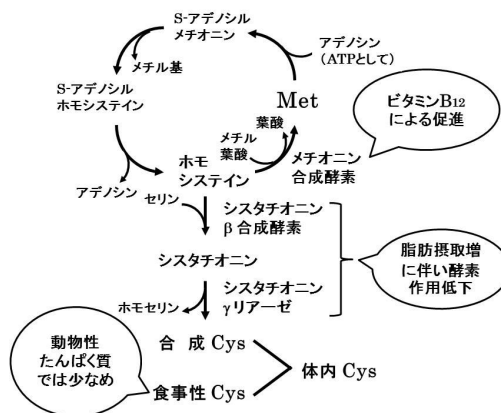


図3 体内Cysの供給

を評価する解析手順が考えられる。本研究期間中には、食生活因子が上記の(1)に及ぼす影響について、明らかにしたいと考えて研究を進めていた。しかし、助成期間の途中にコロナ禍が到来し、研究代表者らの所属機関では動物飼育を要する実験の継続が困難となった。そこで、食生活の西洋化や Cys とは関係が希薄であるものの、より省力化が可能で、「生体内の酸化還元状態に対する食品成分の影響を検討する」という点において、予定されていた研究と中間指標を共有する「ビタミン A が複数種類の単球・マクロファージ系培養細胞の GSH 量に与える影響」を代替研究として検討することに切り替えたので、本研究はやむを得ず二本立ての構成になっている。

3. 研究の方法

本研究は、神奈川県立保健福祉大学動物実験専門部会（承認番号：1772）の審議及び承認を得て、すべて「神奈川県立保健福祉大学動物実験等に関する指針」に従って実施された。

(1) 食餌中のたんぱく質およびビタミン B6 (V.B6) の多寡が組織 GSH 量にもたらす影響

マウスに 1 から 3 週間にわたり AIN-93G 食 (C 食; カゼイン 20% 含) またはたんぱく質含有量を低減した低たんぱく食 (LP 食; カゼイン 7.5%) または、さらに V.B6 含有量も通常の 1/7 に低減した低たんぱく低 V.B6 食 (LPB 食) で飼育した。また、低たんぱく低 V.B6 食に対して、含硫アミノ酸である Cys または Met を添加した場合 (LPB+Cys 食または LPB+Met 食) の影響についても検討した。なお、すべての摂食実験で、Cys は二量体であるシスチンとして添加した。

飼育終了後、解剖して脾細胞を採取し、界面活性剤 NP-40 の 0.5% 水溶液で溶解し細胞溶解液とした。その溶解液にスルホサリチル酸を加えて除たんぱくした後、得られた上清に含まれる細胞質由来の総 GSH 量 (GSH とその酸化物である GSSG の総量) を発色基質 5,5'-ジチオビス 2-ニトロ安息香酸 (DTNB) とグルタチオン還元酵素 (GR) および補酵素 NADPH を用いて、生じた TNB の吸光の変化をカイネティック測定する分光分析法 (測定波長 570 nm) により定量した。総 GSH 量は除たんぱく前にピシニコニン酸法により測定したたんぱく質量あたりの値 (GSH nmol/mg たんぱく質) で評価した。

食餌中の含硫アミノ酸と脂肪含有量との組み合わせの影響

組成中のたんぱく質をカゼイン 8% + ゼラチン 12% として含硫アミノ酸を添加せず、かつ V.B6 含有量を低減した一方で、葉酸と V.B12 を過剰添加した食餌をコントロール (Cont) 食とし、それにシスチンを添加した Cys 食 (和食モデル)、Cont 食の炭水化物をラードで置換しさらにメチオニンを添加した FMet 食 (西洋化食モデル) を給餌して飼育した。

飼育終了後、解剖して採血ならびに各種臓器等を採取した。血液中の総コレステロール値・血糖値・脂質酸化度ならびに組織の総 GSH 量を測定した。なお、脂質過酸化度はチオバルピツール酸反応物 (TBARS) 値により評価した。

(2) ビタミン A (V.A) 含有量が単球・マクロファージ系培養細胞中の GSH 量に及ぼす影響

単球・マクロファージ系培養細胞各種 (RAW264 細胞・RAW264.7 細胞・J774.1 細胞・THP-1 細胞) の培地 (ペニシリンストレプトマイシン含有 MEM 培地に 10% 牛胎児血清および MEM 非必須アミノ酸液を添加したもの) にプロ V.A である β -カロテンや V.A であるレチノールやレチノイン酸または溶媒 (テトラヒドロフラン) を添加した試験培地で一晚培養し、細胞を回収し、総 GSH 量を測定し、GSH 産生律速酵素である GCL 調節サブユニットを検出・半定量した。また、細胞膜を透過して細胞内に侵入後酸化されると蛍光を発する酸化検出プローブ分子ジクロロフルオレシンジアセテートを用いて、フローサイトメトリーにより細胞内の酸化還元状態を検討した。

図 4 異なる文字間に有意差あり (p<0.05)

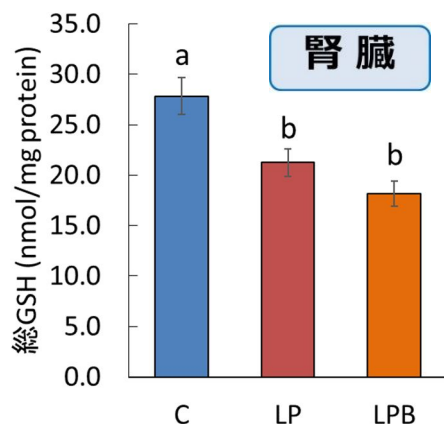
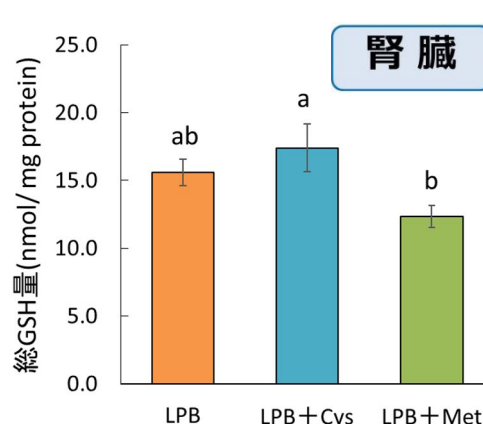


図 5 異なる文字間に有意差あり (p<0.05)



4. 研究成果

(1) 食餌中のたんぱく質および V.B6 の多寡が組織 GSH 量にもたらす影響

a. 食餌中のたんぱく質および V.B6 含有量の影響

腎細胞において、C群に対して、LP群、LPB食群の順でGSH量が少なくなった(図4)

b. 低P低V.B6食に対する含硫アミノ酸添加の影響

腎細胞においてCys添加(LP+B+Cys)によるGSH量増加傾向、Met添加(LP+B+Met)では逆に減少傾向があり、Cys添加群とMet添加群の間ではGSH量の差は有意であった(図5)

食餌中の含硫アミノ酸と脂肪含有量との組み合わせの影響

a. 血中総コレステロール濃度

血中総コレステロール濃度は、AIN-93M食群と比較して、V.B6を削減する一方で葉酸とV.B12を過剰添加してCys合成に不利なビタミン状況としたCont食の条件に、脂肪(ラード)とMetを添加した食餌を供給したFMet食群において有意に高値を示した(図6)

b. 血糖値

血糖値は、Cys食群(Cont食にCysを添加)と比較しFMet食群で有意に高値を示した(図7)

図6 異なる文字間に有意差あり(p<0.05)

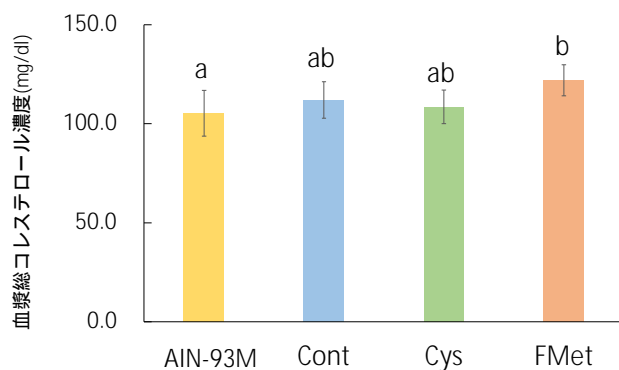
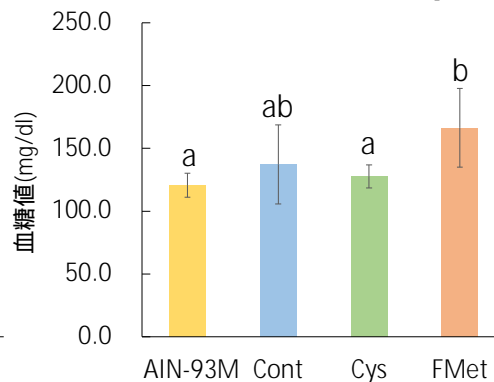


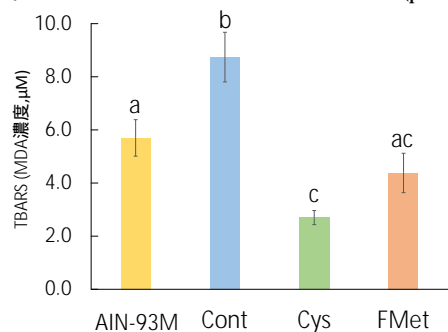
図7 異なる文字間に有意差あり(p<0.05)



c. 脂質の過酸化

脂質酸化度の指標である血中TBARS値は、AIN-93M食群と比較しCont食群で有意に高値を示した。一方、Cont食群と比較しCys食群は顕著に低値であった。また、Cys食群と比較しFMet食群では有意ではないものの高くなる傾向があった(図8)

図8 異なる文字間に有意差あり(p<0.05)

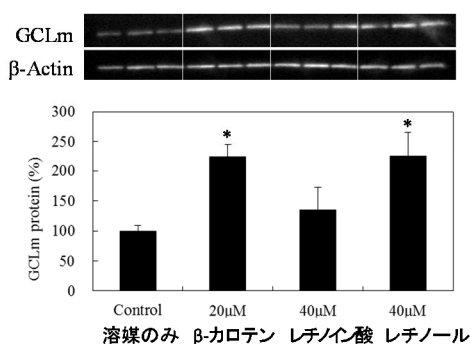


(2) 培地中のビタミンA(V.A)含有量が単球・マクロファージ系培養細胞中のGSH量に及ぼす影響

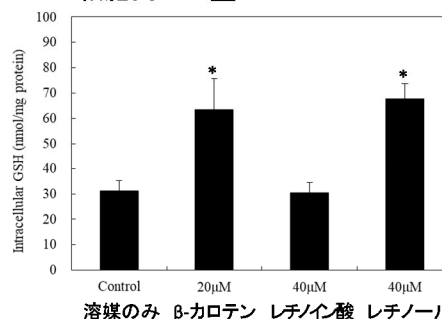
マウスマクロファージ系のRAW264細胞において、培地へのβ-カロテンやレチノールの添加によりGCL調節サブユニットのたんぱく質発現量が増加すると共に、GSH量が増加したが、レチノイン酸添加にはそのような効果は無かった(図9)。RAW264細胞とは供給元の細胞バンクが異なるRAW264.7細胞においても培地へのβ-カロテンやレチノール添加によりGSH量が増加し、同じくマウスマクロファージ系であるが異なる細胞株であるJ774.1細胞やヒト単球系細胞株のTHP-1細胞においても培地へのβ-カロテンやレチノール添加によりGSH量が増加したが、レチノイン酸にはやはりそのような効果は無かった(データは省略)

図9

A. 細胞内のGCL調節サブユニット発現量



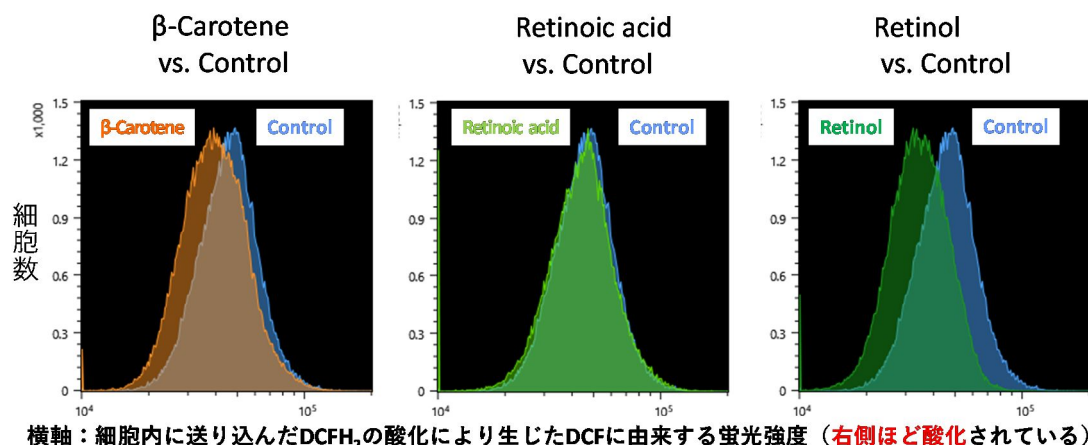
B. 細胞内GSH量



以上 Food Sci Nutr, 6巻(6), pp.1650-1656, 2018. のデータより

-カロテンやレチノールを培地に添加し GSH 量を増加させた場合には、THP-1 細胞に対する抗酸化効果が見られることが判明した。一方で、細胞内 GSH 量を増加させないレチノイン酸を添加した場合には、抗酸化性への影響も検出されなかった (図 10)。

図 10



(3) 考察

食餌に含まれる栄養成分量が生体の組織 GSH 値やその他の値に及ぼす影響について検討した。低たんぱく食は Cys や Cys 原料の Met の供給を減少させることから、生体内の GSH 合成にはマイナス要因であると予想された。また、V.B6 は Met を原料とする Cys 合成には必須のビタミンであるので、低たんぱく条件に低 V.B6 条件を加えると生体内の GSH 合成にはさらにマイナス要因になると予想された。結果として、腎細胞において、標準食群に対して、低たんぱく食群、低たんぱく低 V.B6 食群の順で GSH 量が少なくなったことは、予想通りであった。

腎細胞においては低たんぱく低 V.B6 食に対して Cys 添加することにより GSH 量増加傾向が検出され、Met 添加では逆に減少傾向であった。このことは、畜肉食では Cys が不足しがちであるが、サプリメントとして Cys を摂取することで適正化される可能性を示している。一方で、低 V.B6 状態では、含硫アミノ酸としての必須アミノ酸である Met をサプリメントとして摂取することの危険性も示している。

続いて、食餌中の脂肪量の多寡と含硫アミノ酸含有量の組み合わせ食の影響について検討し、各種血液指標・肝臓 GSH 量に対する影響を評価したところ、血中総コレステロール濃度は、コントロール (Cont) 食 (標準食である AIN-93M に比して低 V.B6 でかつ高葉酸・高 V.B12) に脂肪とメチオニンを加えた FMet 食 (西洋化食モデル) 群では、AIN-93M 食群と比較して有意に高値を示した。FMet 食群は Cont 食にシステチンを加えた Cys 食 (和食モデル) 群に比して高い血糖値を示した。さらに、血中 TBARS 値は、AIN-93M 食群と比較し Cont 食群で有意に高値を示した。一方、Cont 食群と比較し Cys 食群は顕著に低値であった。また、Cys 食群と比較し FMet 食群では高くなる傾向が見られた。以上のように、西洋化食のモデルである FMet 食にコレステロール値や血糖値等の生活習慣病の指標を悪化させる傾向が観察された。脂質酸化の指標である TBARS 値も同様であり、対極にあり和食モデルである Cys 食とは差があった。

最後に、数種類の単球・マクロファージ系培養細胞を使った研究において培地中の V.A 前駆物質である -カロテンや V.A であるレチノールは細胞内の合成系酵素 GCL の発現量を増加させることにより GSH レベルを増加させ、GSH の増加と相関して細胞内酸化還元状態を還元側にシフトさせる (= 抗酸化効果がある) ことが判明した。V.A は RAW264 細胞においてのみ GSH 量増加効果を発揮するのではなく、少なくとも単球・マクロファージ系細胞においては種の壁を越えて、ヒト細胞に対しても効果を持つことが新たに判明した。そして、レチノール誘導性のこの細胞内 GSH 量増加は、細胞内の抗酸化性を亢進することで、各種の細胞機能の維持に貢献する可能性がある。

以上のことを総括すると、低脂肪で十分な量の (動物性に偏りすぎない) たんぱく質を摂取した上で、V.B6 と V.A をしっかり取り入れた食事をすれば、体内の GSH レベルが比較的高い水準で維持され、健康維持に寄与する可能性がある。しかし、GSH 産生の律速酵素である GCL は GSH によりフィードバック制御されていることから、これらは、低 GSH レベルを防ぐ方策にはなるかもしれないが、一定の GSH レベルが既に達成されている個人において、それ以上の効果を得られるものではないと予想される。また、これらのことを断言するには、今後の研究においてヒト in vivo での効果を観察する必要がある。

引用文献

- 1) 渡辺 & 平竹, *化学と生物* **53**, pp.354-361, 2015
- 2) Tateishi N. et al., *J. Nutr.* **107**, pp. 51-60, 1977
- 3) Y. Murata et al., *Int. Immunol.* **14**, 201-212, 2002

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuuka Mukai, Rintaro Yamanishi	4. 巻 6
2. 論文標題 Retinol but not retinoic acid can enhance the glutathione level in a murine cultured macrophage cell line as well as β -carotene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food Science and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1650-1656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/fsn3.726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 向井友花、山西倫太郎
2. 発表標題 飼料の含硫アミノ酸の違いがマウスの酸化ストレスに及ぼす影響
3. 学会等名 第67回 日本栄養改善学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rintaro Yamanishi, Yuuka Mukai
2. 発表標題 Retinol as well as β -carotene can enhance glutathione level in cultured murine RAW264 macrophages independent of retinoic acid signaling pathway
3. 学会等名 ICoFF 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山西倫太郎
2. 発表標題 特定のビタミンB群摂取条件下において実験食に添加される含硫アミノ酸と脂肪量の変化がマウス免疫系に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第72回 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向井 友花、山西 倫太郎
2. 発表標題 食餌の栄養組成や成分量の違いが生体組織のGSH量に及ぼす影響
3. 学会等名 第71回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	向井 友花 (Mukai Yuuka) (60331211)	神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・教授 (22702)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------