

平成21年 6月 5日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580135
 研究課題名(和文) タンパク質およびアミノ酸による血漿ホモシステイン濃度の制御に関する研究
 研究課題名(英文) Studies on the regulation of plasma homocysteine concentration by protein and amino acid
 研究代表者
 杉山 公男 (SUGIYAMA KIMIO)
 静岡大学・農学部・教授
 研究者番号：00126781

研究成果の概要：血漿ホモシステイン (Hcy) 濃度は動脈硬化の危険因子として知られている。本研究では、血漿 Hcy 濃度に及ぼす食事タンパク質およびアミノ酸の影響をラットを用いて検討した。血漿 Hcy 濃度は食事タンパク質の種類や量の影響を受けること、ある種のアミノ酸 (Gly, Ser, Cys) は血漿 Hcy 濃度を低下させることなどを明らかにするとともに作用機構の解析を行った。これらの研究結果から、血漿 Hcy 濃度は食事タンパク質やアミノ酸により制御できることが明確になった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食品栄養化学

科研費の分科・細目：(分科) 農芸化学 (細目) 食品科学

キーワード：タンパク質、アミノ酸、ホモシステイン、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

ホモシステイン (Hcy) はメチオニン (Met) 代謝の中間体であるが、近年、疫学的および実験的な調査結果から血漿 Hcy 濃度の上昇は血漿コレステロール濃度の上昇とは独立した動脈硬化の危険因子として広く認識されるようになった。Hcy はシステインなど他の SH 化合物とは異なり、動脈壁細胞に対して直接・間接的に働き掛けて動脈硬化を促進することが実験的に示されており、動脈硬化に関して血漿コレステロール濃度よりもむしろ

Hcy 濃度に注目が集まりつつある。ヒトの血漿 Hcy 濃度は通常5～15 μ Mの範囲内にあり、5 μ Mの上昇は動脈硬化の危険率を60～80%高めると推定されている。

これまでに種々の疾病やホルモン、ビタミン欠乏などと血漿 Hcy 濃度との関係について多くの研究がなされているが、血漿 Hcy 濃度を低値に維持するための栄養・食餌条件についてはあまり知られていない。これらは栄養学上の重要な検討課題であると考えられる。

2. 研究の目的

Hcy はアミノ酸であることから、血漿 Hcy 濃度を制御するには同種のタンパク質やアミノ酸によるのが有効であると推定される。そこで本研究では、血漿 Hcy 濃度は摂取するタンパク質やアミノ酸の種類や量により効果的に制御しうるかどうかを明らかにしようとした。

3. 研究の方法

ラットを実験動物として用い、実験栄養学の立場から以下の項目について検討を行った。

(1)血漿 Hcy 濃度に及ぼす食餌タンパク質の量の影響と作用機構：Met は通常タンパク質の形で摂取するので、Met の代謝産物である Hcy の濃度と摂取タンパク質量との関係に大きな興味を持たれる。そこで、ラット(7週齢の Wistar 系雄ラット、以下同様)を用いこの問題について詳細な検討を行い、決定的な結論を得ようとした。代表的なタンパク質としてカゼインを用い、食餌中のカゼイン含量を 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 30, 50%と細かく変化させた食餌をラットに2週間投与した(各群8匹、以下同様)。解剖後、血漿 Hcy, Cys, GSH 濃度、肝臓 S-アデノシルメチオニン(SAM), S-アデノシルホモシステイン(SAH), Hcy などの Met 代謝中間体濃度、肝臓および腎臓のシスタチオン合成酵素(CBS), ベタイン-Hcy メチル転移酵素(BHMT)などの Hcy 代謝に関わる酵素の活性を測定した。

(2)血漿 Hcy 濃度に及ぼす Met と Gly+Ser 摂取量の効果：タンパク質に含まれる Gly や Ser は Met 代謝を促進するアミノ酸なので、高タンパク質食ではこれらのアミノ酸の摂取も多くなり、血漿 Hcy 濃度上昇抑制因子として機能していることが考えられる。これを検証するため、10C, 10C+1.0%Met, 10C+1.0M+0.73%Gly+2.3%Ser (この食餌は Met, Gly, Ser 含量が 50C と同じ), 50C の各食餌をラットに2週間投与した。各実験とも(1)の項で記した血漿、肝臓、腎臓の各パラメータを測定した。なお、CBS の酵素量はウエスタン・ブロット法で、また、CBS の mRNA も RT-PCR を用いて測定した。

(3)食事タンパク質レベルと高 Hcy 血症：食事へのグアニジノ酢酸(GAA)添加は高 Hcy 血症をもたらす。そこで、10%カゼイン食と 40%カゼイン食に GAA を 0.5%添加して血漿

Hcy 濃度に及ぼす影響を調べ、高 Hcy 血症の発症に食事タンパク質レベルがどのような影響を及ぼすかを検討した。分析項目は(1)に記したものとほぼ同様である。また、10%カゼイン食と 40%カゼイン食に 0.75%Met+2.5%Ser を添加し、Ser の高 Hcy 血症抑制効果と食事タンパク質レベルとの関係も検討した。

(4)血漿 Hcy 濃度に及ぼす食餌タンパク質の種類の影響とその作用機構：申請者らは小麦グルテンが血漿 Hcy 濃度を低下させることを見いだしているが、より多くのタンパク質を用いて検討し、タンパク質のアミノ酸組成と血漿 Hcy 濃度との関係を明らかにする必要がある。そこで、25%カゼインあるいはこれと同タンパク質レベルの乳清タンパク質、卵アルブミン、大豆タンパク質、小麦グルテンを含む食餌を10日間あるいは2週間投与した。この実験結果から、小麦グルテンのみならず他のタンパク質でも血漿 Hcy 低下効果が見られるか、小麦グルテンの栄養価を改善しても血漿 Hcy 低下効果は維持されるか、などを明らかにしようとした。分析項目は(1)に記したものとほぼ同様である。また、小麦グルテンが明確な血漿 Hcy 低下作用を示したので、食事時のグルテン含量を変化させてカゼインの効果と比較した実験やグルテン食の投与期間の影響なども検討した。申請者らは、小麦グルテンはシスチンを多く含みかつ栄養価が低いのでシスチンはタンパク質合成にあまり利用されず、その結果、血漿システイン濃度が上昇し、これが血漿 Hcy 濃度低下に関与しているとの作業仮説を持っており、いくつかの実験を通してこれを検証しようとした。

(5)血漿 Hcy 濃度に及ぼす Cys の効果の機構解明：Cys の効果や作用機構に関する情報は少ない。そこで本研究では、各種高 Hcy 血症モデルを用いて Cys の効果を検討するとともに、Cys の作用機構を明らかにしようとした。①Met 誘導性高 Hcy 血症(25%カゼイン食+0.75%Met)、GAA 誘導性高 Hcy 血症(25%カゼイン食+0.5%GAA)、コリン欠乏食誘導性高 Hcy 血症(25%大豆タンパク質食-コリン)、および低タンパク質食誘導性高 Hcy 血症(10%カゼイン食または 15%大豆タンパク質食)の各モデルで、食餌に 0.5%Cys を添加してラットに2週間投与した。分析項目は(1)に記したものとほぼ同様である。この実験結果から、どん

なタイプの高 Hcy 血症に対して Cys が有効であるかを明らかにする。また、②強い効果の見られたモデルを用い、L-Cys, D-Cys, L-Cysteic acid, Cysteamine の効果を比較検討し、Cys の構造と活性との関係を明らかにしようとした。得られた実験結果を、主に Hcy と Cys の拮抗という見地から解析し、Cys の作用機構を考察した。

4. 研究成果

(1) 血漿 Hcy 濃度に及ぼす食餌タンパク質の量の影響と作用機構：食事カゼイン含量を変化させると血漿 Hcy 濃度はカゼイン含量に依存して2つの応答を示した。すなわち、5～10%のカゼイン含量では血漿 Hcy 濃度はカゼイン含量に比例して上昇したが、10～50%のカゼイン含量では血漿 Hcy 濃度はカゼイン含量に反比例して低下した。血漿 Hcy 濃度は10%カゼイン食投与で最も高くなり、それ以上のカゼイン食ではむしろ低下することが確認された。肝臓の CBS と BHMT 活性は食事カゼイン含量に比例して上昇した。高タンパク質食投与が血漿 Hcy 濃度を上昇させない原因の一つは Hcy 代謝酵素の活性を上昇させることにあると考えられた。

(2) 血漿 Hcy 濃度に及ぼす Met と Gly+Ser 摂取量の効果：高タンパク質食投与が血漿 Hcy 濃度を上昇させないもう一つの原因として、Hcy 代謝を促進しうるアミノ酸(Gly, Ser) の摂取量の増加が考えられる。10%カゼイン食に 50%カゼイン食と同等になるように Met を添加すると血漿 Hcy 濃度は顕著に上昇したが、Met と一緒に Gly+Ser を添加すると血漿 Hcy 濃度の上昇は有意に抑制された。しかし、50%カゼイン食投与群のレベルまでは低下しなかった。このことは、高タンパク質食の摂取で Met とともに Gly+Ser の摂取が増加することが高タンパク質食の効果に関与しているが、それは一部に過ぎないことを示している。また、高タンパク質の血漿 Hcy 低下作用には CBS 活性の上昇を考える必要があることを示唆するものである。事実、10%カゼイン食に Met を添加すると BHMT 活性は上昇したが、CBS 活性の上昇は見られなかった。これらの結果から、高タンパク質食の投与は血漿 Hcy 濃度を上昇させずむしろ低下させる効果の原因には、(i) Gly+Ser の供給、(ii) CBS 活性の上昇、の2つが関与していると結論した。また、血漿 Hcy 濃度の上昇抑制という観点からは、タンパク質の摂取は比較的多めが好ましいことが強く示唆された。

(3) 食事タンパク質レベルと高 Hcy 血症：10%カゼイン食に 0.5%GAA を添加すると血漿 Hcy 濃度は顕著に上昇したが、40%カゼイン食に 0.5%GAA を添加しても有意な上昇は見られ

ず、高カゼイン食は GAA による高 Hcy 血症を抑制することが分かった。また、0.75%Met 添加による高 Hcy 血症も高カゼイン食では抑制された。さらに、Ser の血漿 Hcy 低下作用も高カゼイン食の場合で大きかった。これらの結果は、高タンパク質食は高 Hcy 血症の発症を抑制すること、また、Ser のような血漿 Hcy 低下作用を有するアミノ酸の効果も高タンパク質食を投与した場合の方が強いことを示している。

(4) 血漿 Hcy 濃度に及ぼす食餌タンパク質の種類の影響とその作用機構：25%カゼイン食ならびにこれと同等のタンパク質を含むラクトアルブミン食、卵アルブミン食、大豆タンパク質食、小麦グルテン食をラットに投与すると、ラクトアルブミン食と小麦グルテン食は他のタンパク質食に比べて血漿 Hcy 濃度を有意に低下させた。特に小麦グルテンの効果は強かった。小麦グルテンの効果の詳細を調べた結果、小麦グルテンの血漿 Hcy 低下効果には血漿 Cys 濃度の上昇が関与していることが示唆された。このグルテンの効果には、(i) グルテン中の Cys 含量が高いこと、(ii) グルテン中の Met 含量が低いこと、(iii) グルテン中の Lys 含量が低いこと、などが関与していると考えられた。ラクトアルブミン食の血漿 Hcy 低下作用にも (i) グルテン中の Cys 含量が高いこと、(ii) グルテン中の Met 含量が低いこと、などが関与していると考えられた。Met が少なく Cys が多いタンパク質は血漿 Hcy を低下させるのに有利なタンパク質であると結論した。

(5) 血漿 Hcy 濃度に及ぼす Cys の効果の機構解明：食事への Cys 添加がどのような条件下で血漿 Hcy 低下効果を発揮するのか、またどのような機構で作用を發揮するのかを検討した。Cys の血漿 Hcy 低下作用は低タンパク質食の条件下でのみ見られること、これは食事の Met 含量が低いことに起因することが分かった。低タンパク質食に Cys を添加すると血漿 Hcy 濃度は低下するが、この効果には血漿中で Hcy と Cys が拮抗しタンパク質結合型の Hcy が低分子型になり Hcy 代謝が亢進するからであると推定された。これらの結果は、Met が少なく Cys が多いタンパク質（例えば小麦グルテンやラクトアルブミン）が血漿 Hcy 濃度を低下させる現象をかなりの程度説明できるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Ohuchi S., Morita T., Mori M., and Sugiyama K.: Hepatic cystathionine β -synthase activity

does not increase in response to methionine supplementation in rats fed a low casein diet: association with plasma homocysteine concentrations. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 178-185 (2009). (査読あり)

② Kawakami Y., Ohuchi S., Morita T., and Sugiyama K.: Hypohomocysteinemic effect of cysteine is associated with increased plasma cysteine concentration in rats fed diets low in protein and methionine levels. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 66-74 (2009). (査読あり)

③ Ohuchi S., Matsumoto Y., Morita T., and Sugiyama K.: High casein diet decreases plasma homocysteine concentration in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 22-30 (2009). (査読あり)

④ Setoue M., Ohuchi S., Morita T., and Sugiyama K.: Choline deprivation induces hyperhomocysteinemia in rats fed low methionine diets. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 54, 483-490 (2008). (査読あり)

⑤ Ohuchi S., Matsumoto Y., Morita T., and Sugiyama K.: High-casein diet suppresses guanidinoacetic acid-induced hyperhomocysteinemia and potentiates the hypohomocysteinemic effect of serine in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 3258-3264 (2008). (査読あり)

⑥ Fukada S., Morita T., and Sugiyama K.: Effects of various amino acids on methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1940-1943 (2008). (査読あり)

⑦ Setoue M., Ohuchi S., Morita T., and Sugiyama K.: Hyperhomocysteinemia induced by guanidinoacetic acid is effectively suppressed by choline and betaine in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1696-1703 (2008). (査読あり)

⑧ Okawa H., Morita T., and Sugiyama K.: Effect of dietary soybean protein level on the plasma homocysteine concentration in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1607-1610 (2008). (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

① 劉 軼群(発表者)他：ベタイン欠乏を伴う高ホモシステイン血症に及ぼすメチオニンとセリンの影響。第 63 回日本栄養・食糧学会大会, 2009 年 5 月 21 日(長崎新聞文化ホール)。

② 呉 育如(発表者)他：血漿ホモシステイン濃度に及ぼす食餌タンパク質の種類と量の影響。第 63 回日本栄養・食糧学会大会, 2009 年 5 月 21 日(長崎新聞文化ホール)。

③ 杉山公男(発表者)他：タンパク質およびアミノ酸摂取量とラット肝臓 CBS 活性との関係。第 63 回日本栄養・食糧学会大会, 2009 年 5 月 21 日(長崎新聞文化ホール)。

④ 呉 育如(発表者)他：小麦グルテンの血漿ホモシステイン濃度低下作用。第 62 回日本栄養・食糧学会大会, 2008 年 5 月 4 日(女子栄養大学坂戸キャンパス)。

⑤ 大内誠也(発表者)他：高カゼイン食による血漿ホモシステイン濃度の低下とその機構。第 62 回日本栄養・食糧学会大会, 2008 年 5 月 4 日(女子栄養大学坂戸キャンパス)。

⑥ 杉山公男(発表者)他：D-システイン投与は血漿ホモシステイン濃度を効果的に低下させる。第 62 回日本栄養・食糧学会大会, 2008 年 5 月 4 日(女子栄養大学坂戸キャンパス)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山公男 (SUGIYAMA KIMIO)
静岡大学・農学部・教授
研究者番号：00126781

(2) 研究分担者

森田達也 (MORITA TATSUYA)
静岡大学・農学部・教授
研究者番号：90332692

(3) 連携研究者

なし