

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350141

研究課題名(和文) 唾液アミラーゼのコピー数多型は児童の食事・栄養素摂取や健全な発育に影響を及ぼすか

研究課題名(英文) Does copy number variation of AMY1 gene affect dietary intake and development in children?

研究代表者

鈴木 良雄 (Yoshio, Suzuki)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・准教授

研究者番号：30612395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト唾液アミラーゼ遺伝子(AMY1)にはコピー数(CN)多型があり、成人ではCNがアミラーゼ活性と相関する。唾液アミラーゼは出生時には発現がなく、思春期までに発達する。食習慣が影響するとの報告もある。本研究の目的は唾液アミラーゼの発達と、AMY1 CNや食生活との関連を明らかにすることであった。長野市内にて調査を実施し、保育園児234名、小学生945名より検体および調査票への回答を得た。保育園児(204名)のAMY1のCNを確認し、小学生(943名)はゲノムDNAの調製まで行った。保育園児では、男子の唾液アミラーゼ活性は、就寝時刻が遅いと低い、AMY1 CNが多いと高いとの結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Human salivary amylase gene (AMY1) has copy number (CN) variation. The CN is reported to correlate with amount and activity of salivary amylase in adults. Salivary amylase activity is not present at birth and rises to reach maximum levels by puberty. Dietary habit is also reported to affect the activity. This study aimed to clarify how AMY1 CN and dietary habit affect the development of salivary amylase activity in children. A survey was conducted at Nagano city to collect saliva and questionnaires from 234 nursery and 945 preliminary school children. AMY1 CN was assessed in 204 nursery school children, and DNA was prepared in 943 preliminary school children. Salivary amylase activity before breakfast was associated with AMY1 CN and bedtime in nursery school boys. In addition to above, the human saliva was suggested to have protease activated at acidic condition. Analysis of questionnaire gave some associations of children and maternal health with lifestyles.

研究分野：食生活学

キーワード：amylase saliva AMY1 development protease copy number variation lifestyle

1. 研究開始当初の背景

ヒトの唾液アミラーゼ遺伝子 (AMY1) は1番染色体 (1p.13.3-1p21.3) に存在し、GeneBank には、AMY1A、AMY1B、AMY1C の3つの遺伝子が登録されているが、この領域は、大規模コピー数多型のある部位であり、唾液アミラーゼ遺伝子の増幅が起こっている。そのため個体 (2倍体=2n) 当たりの AMY1 のコピー数には2~15個という大きな個人差がある。唾液アミラーゼ遺伝子はヒトと近縁のボノボにはなく、チンパンジーには1個 (2nあたり2個) しかないので、AMY1 の増幅はデンプンを食べるようになったことが選択圧になり起こったと考えられている。

ところで、成人の個体 (2n) 当たりの AMY1 のコピー数が、唾液中のアミラーゼ量や活性と相関するとの報告があるが、コピー数が9以上の少数例を除外すると必ずしも相関は明確ではない。一方、既報では唾液の分泌の日内変動や女性の性周期による変動が考慮されていないので、その影響も考えられる。

そこで、日内変動と性周期の影響を除くため、男子大学生 (19~22歳: 25名) を対象に一定時刻 (14:00) に唾液アミラーゼ活性を測定するとともに、口腔粘膜より採取したゲノムについて AMY1 のコピー数を調べ、両者の関係を検討した結果、個体あたりのコピー数とアミラーゼ活性との相関はやはり明確ではなかった。

このように、唾液のアミラーゼ活性と AMY1 のコピー数との相関は必ずしも明確ではない。唾液アミラーゼ活性は出生時にはみられず成長に伴って発現され、5~6歳で最大レベルになるとされている。ただし、8~9歳児で成熟状態や年齢と相関するとの報告や、8~13歳児で男子では思春期の発達と関連があるが女子ではないとの報告もある。1950年代の報告だが、唾液アミラーゼは高糖質食により上方制御されるとの報告もある。また経験上からも、保育園児や小学生では朝食を食べる (食べさせる) のに苦労する児童が相当数いるが、中学生ではあまりいない。上記より、唾液アミラーゼ活性は成長に伴い成熟し、食生活による影響も受けている可能性が示唆されるが、AMY1 コピー数との関連は明確でない。

2. 研究の目的

食事習慣に対する適応が成立していない幼少期では、唾液アミラーゼ活性と AMY1 のコピー数とは相関しているのだろうか。また、もしそうであるとしたら、食生活による適応は何歳ぐらいまでに起こるのだろうか。そして、適応を促す食習慣というのはあるのだろうか。一方、AMY1 のコピー数がアミラーゼ活性に影響しているのなら、それは食生活にどのような影響を及ぼしているのだろうか。そしてそれにより、身体的・知的発育にも影響があるのだろうか。

上記の疑問を解明し、児童の健全な発育のための基礎データを提供するのが本研究の目的

である。そのために研究期間内には保育園児 (4~6歳児) 及び小学生を対象に以下を調査し、それぞれの関連を検討する。

- a. 早朝
- b. 空腹時の唾液のアミラーゼ活性とタンパク濃度
- b. アミラーゼ遺伝子 AMY1 のコピー数
- c. 食物・栄養素の摂取状況
- d. 身長・体重
- e. 生活・運動習慣

3. 研究の方法

本研究では、保育園児 (4~6歳児) 及び小学生を対象に、アミラーゼ遺伝子 (AMY1) のコピー数、早朝空腹時の唾液のアミラーゼ活性とタンパク濃度、食物・栄養素摂取量などを調査し、それぞれの関連を検討した。

被験者およびその保護者からは下記を収集した。

- a. 早朝空腹時の唾液のアミラーゼ活性とタンパク濃度
唾液の採取は朝食前にサリキッズ (ザルスタット) を用いて行い、採取した唾液のタンパク濃度、アミラーゼ活性は臨床検査会社 (SRL) にて測定した。
- b. アミラーゼ遺伝子 (AMY1) のコピー数
口腔粘膜細胞は、唾液採取時に、綿棒で口腔をこすって採取する。得られた口腔粘膜細胞から ISOHAIR (ニッポンジーン) を用いてゲノムの抽出を行い、得られたゲノムについて、SYBR Green ER qPCR Super Mix Universel (ライフ・テクノロジー) を用いて qRT-PCR を行い AMY1A のコピー数を測定した。対照として AMY1 遺伝子が1個であるチンパンジーゲノムを用いるが、これは、京都大学霊長類研究所より入手した。
AMY1 コピー数の算出は、FOXP2 を対照とした相対定量法で行った。測定は3連で行い、データの CV 値が5%未満であることと、かつ検量線については、回帰直線の寄与率が0.9以上であること、そして被験者の AMY1 の相対値が検量線の範囲内であることの3点を満たした場合のみをデータとして採用した。
- c. 食物・栄養素の摂取状況
東京大学佐々木敏教授が開発した小学生用の簡易型自記式食事歴法質問票 (B-DHQ10y) を用いた。調査票は児童の保護者に回答してもらい、結果の解析は、DHQサポートセンター (ジェンダーメディカルリサーチ) に依頼した。
- d. 年齢、性別、身長、体重
調査紙調査により保護者に回答してもらった。
- e. 生活・運動習慣
調査紙調査により保護者に回答してもら

った。質問紙は下記の設問により構成した。

- ① 子供の成育歴
- ② 子どもの運動習慣
- ③ 子供の生活習慣（起床時間等）
- ④ 子供の食事状況
- ⑤ 保護者の身体活動
 - i. IPAQ-SF
 - ii. 過去の運動習慣
 - iii. 現在の運動習慣
- ⑥ 保護者の生活習慣と属性

4. 研究成果

(1) 保育園調査

長野市内の4つの保育園に通う園児645名を対象に調査を行い、290名の園児・保護者（45%）より試料提供・調査票回収を得た。

(2) 小学校調査

長野市内の3つの小学校に通う小学生名を対象に調査を行い、2,099名の小学生・保護者945名（45%）より試料提供・調査票回収を得た。

(3) 保育園児のAMY1コピー数

保育園児190名分（男子106名、女子84名）のAMY1コピー数を分析した。AMY1コピー数は、2~16の範囲に分布し、男子 5.9 ± 3.1 、女子 5.3 ± 2.5 であった（図1）。

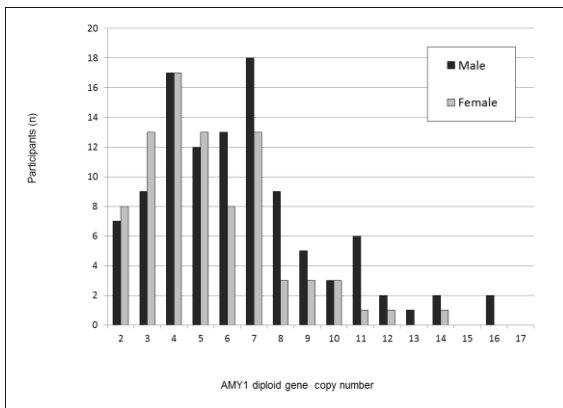


図1 AMY1コピー数の分布

(4) 保育園児の唾液アミラーゼ活性

保育園児の唾液アミラーゼ活性は、男子 41.7 ± 26.3 U/mg protein、女子 40.1 ± 25.5 U/mg proteinだった。アミラーゼ活性と日齢との相関係数は男子 $r=-0.056$ ($P=0.569$)、女子 $r=0.046$ ($P=0.678$)であり、有意な相関は認められなかった。

(5) 保育園児の唾液アミラーゼ活性とAMY1コピー数

日齢で調整した唾液アミラーゼ活性とAMY1コピー数との相関係数は、男子は $r=0.259$ ($P=0.007$)と有意な相関を認められた（図2a）が、女子では $r=0.092$ ($P=0.407$)であり、有意な相関を認めなかった（図2b）。

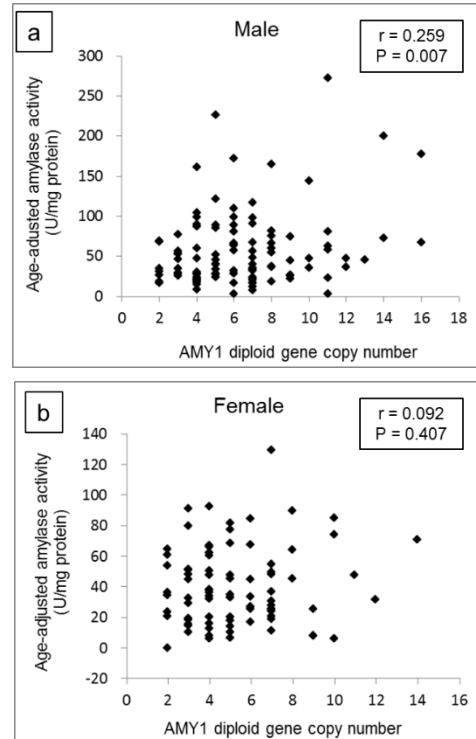


図2 保育園児の唾液アミラーゼ活性とAMY1コピー数 a. 男子、b. 女子

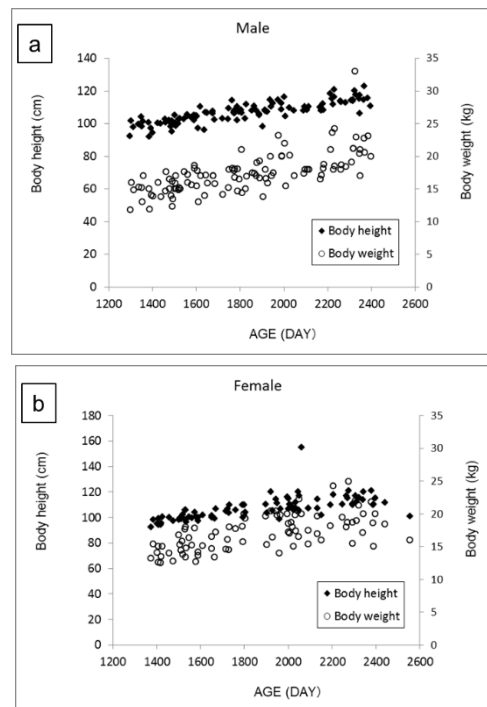


図3 保育園児の日齢と身長、体重. a. 男子、b. 女子

(6) 保育園児の身長・体重

身長、体重は男女とも日齢と強く相関していた (図 3)。

身長・体重を未就学児の成長調査の該当する日齢の平均値を 1 としたときの比率を成長率としたとき、成長率は男子では、身長 1.00 ± 0.03 、体重 1.01 ± 0.12 であり、女子では身長 0.99 ± 0.06 、体重 0.98 ± 0.12 であった (図 4)。

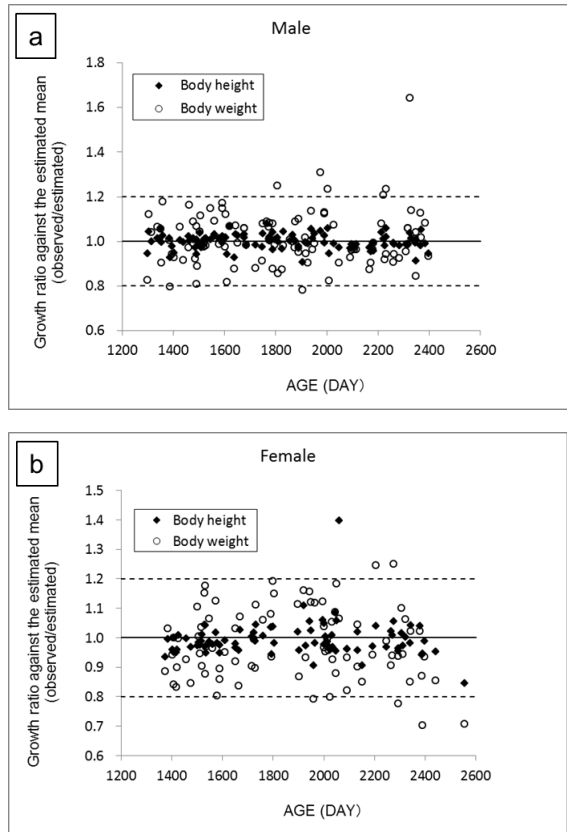


図 4 保育園児の成長率. a. 男子、b. 女子

(7) 保育園児の成長率と唾液アミラーゼ活性

保育園児の成長率と、日齢で調整した唾液アミラーゼ活性との間には、男女とも有意な相関関係は認められなかった (図 5)。

(8) 保育園児の成長率と AMY1 コピー数

保育園児の成長率と、AMY1 コピー数との間には、男女とも有意な相関関係は認められなかった (図 6)。

以上の (1)~(8) の結果より、下記が明らかとなった。

- ① 長野市内の保育園児の、AMY1 コピー数は、2~16 の範囲に分布し、男子 5.9 ± 3.1 、女子 5.3 ± 2.5 である。
- ② 唾液アミラーゼ活性と AMY1 コピー数が関与する可能性が示唆された。
- ③ 唾液アミラーゼ活性および AMY1 コピー数

は、保育園児の成長とは関連していない。

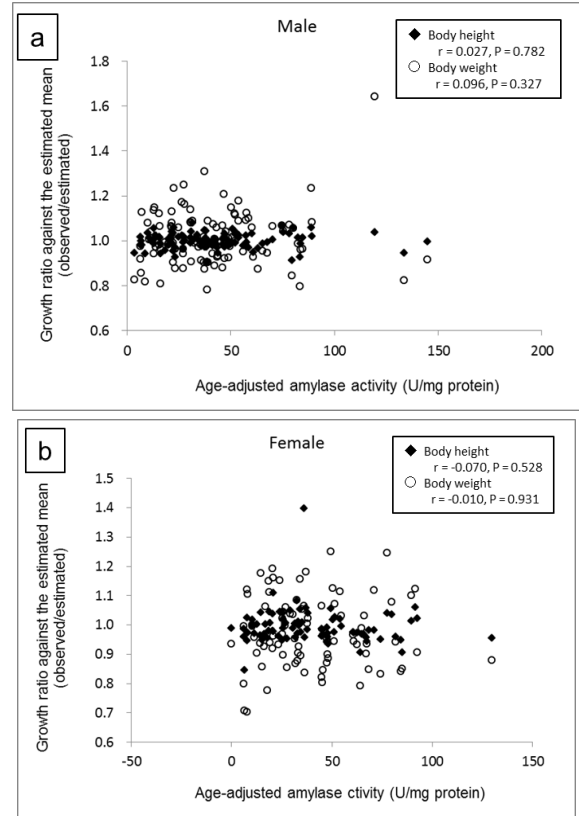


図 5 保育園児の成長率と唾液アミラーゼ活性. a. 男子、b. 女子

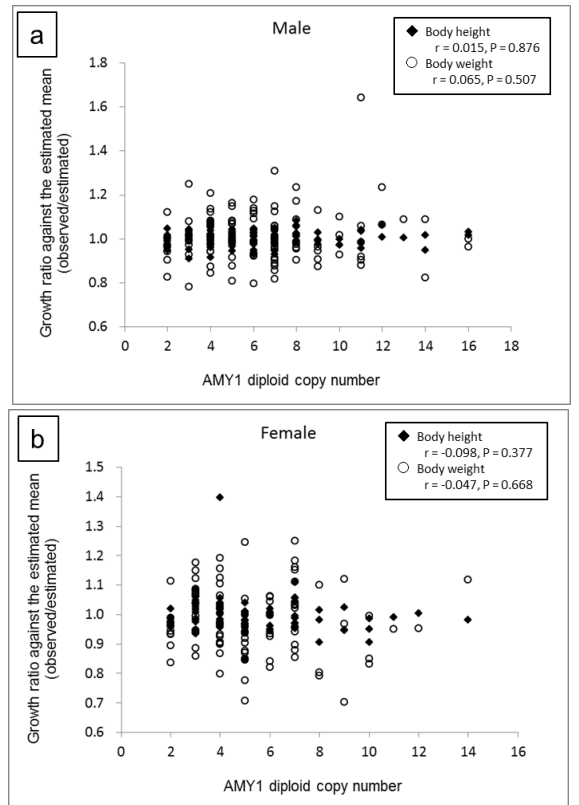


図 6 保育園児の成長率と AMY1 コピー数. a. 男子、b. 女子

(9) 保育園児の唾液アミラーゼ活性と、AMY1 コピー数および生活習慣

唾液アミラーゼ活性を応答変数、AMY1 コピー数および就寝時間を予測変数として、一般化線形モデルで解析した結果、男子では、就寝時刻が遅いと amylase 活性が低く (P=0.043)、AMY1 コピー数が多いと amylase 活性は高い (P=0.009) かった。

以上より、唾液アミラーゼ活性には、AMY1 コピー数と生活習慣の両者が影響を及ぼしていることが示唆された。

(10) 長野市内調査から得られたその他の成果

小学生の AMY1 コピー数の解析はまだ終わっていない。

質問紙調査や得られた検体の解析結果から、下記の成果が得られた。

① 保育園児の生活習慣と摂取エネルギー量

保育園児の食生活について保護者が BDHQ10y に回答した時の摂取エネルギー量と推定エネルギー必要量の比 (EN/EER) は 1.3 ± 0.3 であった。対象園児の成長率は全国平均と比較して大きいわけではないので、より多くのエネルギー摂取をおこなっているとは考えにくい。回答者が保護者であったため、全体的に過剰申告となった可能性がある。

以上より、保護者が保育園児の食生活について BDHQ10y に回答した場合には、過剰申告する傾向があることが示唆された。

② 保育園児の生活習慣と朝食摂取

保育園児 289 名の就寝起床時間と朝食摂取時の様子を比較した結果、朝食を毎日食べる子は、就寝時間が早く (P<0.01)、朝食を食べる量が多くなるにつれ、就寝時間が早った (P<0.05)。

以上より、保育園児では早寝する方が朝食をしっかりと食べることに繋がると示唆された。

③ 保育園児の毛髪中有害元素濃度と食品群摂取量

保育園児 213 名 (男子 112 名、女子 101 名) の毛髪中の宇鵜飼金属濃度と、保護者により回答された BDHQ10y で BDHQ10y により推定された保育園児の食事摂取量 (1000kcal あたりの密度法で評価) を比較した。

男女間で比較すると、女子は男子より菓子類の摂取量と毛髪中 Pb 濃度が有意に高かった。

有害金属と食品群の関連を検討した結果、男子では、毛髪中 Hg 濃度は砂糖・甘味料類、

豆類、緑黄色野菜類、その他の野菜類および肉類摂取量との間に有意な正の相関が認められた。また、Co 濃度は豆類摂取量、Mo 濃度は菓子類摂取量、Se 濃度は油脂類摂取量との間に有意な負の相関が認められた。女子では、Hg 濃度は肉類摂取量、Co および Pb 濃度は菓子類摂取量との間に有意な正の相関が、Mo 濃度と年齢に有意な負の相関が認められた。

④ 小学生 (低学年) の生活習慣

長野市内の小学生 (低学年) 493 名 (回収率 48.1%) について、運動習慣による生活習慣の違いを男女別に検討した。

運動クラブに参加する割合は、女子に比べ男子の方が高かった。男子の運動クラブ参加群は、非参加群に比べ、休日の起床時刻が早く (6 時 46 分 vs 6 時 59 分)、休日の睡眠時間が短く (9 時間 14 分 vs 9 時間 26 分)、寝起きの状況が良く、朝食を摂取する頻度が高い結果となった。帰宅後外遊びが非常に多い群は、室内遊びが非常に多い群に比べ、女子では平日の就寝時刻が早く (21 時 5 分 vs 21 時 22 分)、男子では休日の就寝時刻が早かった (21 時 23 分 vs 21 時 40 分)。

以上より、運動クラブ参加の有無、帰宅後の過ごし方は児童の睡眠状況、朝食の摂取頻度と関連することが示唆された。

⑤ 保育園児の母親の生活習慣病リスクと身体活動

保育園児の母親 182 名のうち、直近の健康診断で異常所見あり (Yes 群; 36 名) は、異常所見なし (No 群) より、年齢が高かった (P = 0.043)。IPAQ-SF による身体活動には両群で差はなかったが、Yes 群は、No 群よりも 1 日の座位の時間が有意に長かった (P = 0.028)。社会経済的屬性では、Yes 群は最終学歴が高く (P = 0.040)、フルタイム雇用の頻度が高く (P = 0.005)、家庭の年間収入が (P = 0.000) 高かった。

以上より、保育園児の母親では、座位時間で示される不活動が、検診時の異常所見で示される生活習慣病のリスクと関連していることが示唆された。

⑥ ヒト唾液中の酸性で活性化するプロテアーゼ活性

小学生よりコットンにクエン酸を含む唾液採取用チューブを用いて採取した唾液のうち、pH3 以下のものは活性を測定することができなかった。

活性が測定できなかった唾液を中性としても活性は測定できず、抗アミラーゼ抗体を用いた ELISA Kit でもアミラーゼは検出されなかった。そこで SDS-PAGE により確

認を行ったところ、活性の測定できなかつた唾液では、タンパク分解が生じていた。

一般成人男性を対象に比較したところ、クエン酸含有チューブで採取した唾液では、アミラーゼの分解が確認された。

唾液に、50 mMとなるようにクエン酸を添加して30°Cでインキュベートすると、60分でアミラーゼの分解物が確認できたが、唾液を95°C、30分間熱処理同様にしても、アミラーゼの分解は確認できなかった。

以上より、唾液中には酸性で活性化するプロテアーゼが存在する可能性が示唆された。

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 2 件)

1. Koibuchi E, Suzuki Y. Exercise up-regulates salivary amylase in humans (Review). *Exp Ther Med*, 7(4): 773-777, 2014 (査読有)
2. Yaginuma S, Sakuraba K, Kadoya H, Koibuchi E, Matsukawa T, Ito H, Yokoyama K, Suzuki Y. Early bedtime associated with the salutary breakfast intake in Japanese nursery school children. *Int Med J*, 22(1): 30-32, 2015 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 柳沼志帆、門屋悠香、櫻庭景植、鈴木良雄. 保育園児の生活習慣と摂取エネルギー量に関する研究. 第7回日本食育学会・学術大会. 2013年5月18-19日. 演題番号:D-5, 東京・東京聖栄大学
2. 柳沼志帆, 櫻庭景植, 門屋悠香, 松川岳久, 横山和仁, 鈴木良雄. 長野市内の保育園児の亜鉛摂取状況と生活・運動習慣等との関係. 第60回日本栄養改善学会学術総会. 2013年9月12~14日. 演題番号: 2Dp-01. 神戸・神戸国際会議場
3. 鯉淵絵里、鈴木良雄、小林唯. 唾液アミラーゼ遺伝子 (AMY1) のコピー数とアミラーゼ活性との関係. 第60回日本栄養改善学会学術総会. 2013年9月12~14日. 演題番号: 2Ea-09. 神戸・神戸国際会議場
4. 鯉淵絵理、鈴木良雄. アミラーゼ活性と幼児の成育状況および生活習慣との関係. 第68回日本体力医学会大会. 2013年9月21~23日. 演題番号: 1F3-1. 東京・日本教育会館
5. 柳沼志帆, 門屋悠香, 櫻庭景植, 鈴木良雄. 幼児の運動習慣に関係のある因子に関する研究. 第68回日本体力医学会大会. 2013年9月21~23日. 演題番号: 1F2-1. 東京・日本教育会館
6. 大森由紀、横山和仁、松川岳久、角田弘子、宮田美恵子、鈴木良雄、櫻庭景植、門屋悠香、柳沼志帆、鯉淵絵理. 幼児の毛髪中

有害元素濃度とBDHQから推定された食事摂取量との関係. 第84回日本衛生学会学術総会. 2014年5月25日~5月27日. 岡山・岡山コンベンションセンター

7. 柳沼志帆、門屋悠香、櫻庭景植、鈴木良雄. 小学校低学年児童の運動習慣と生活習慣の関連. 第69回日本体力医学会. 2014年9月19日~9月21日. 演題番号: 0-13-1E-20. 長崎・長崎大学文教キャンパス
8. Suzuki Y, Sakuraba K, Kadoya H, Maruyama-Nagao A, Yaginuma S, Koibuchi E, Matsukawa T, Ito H, Yokoyama K. Physical activity and health in nursery and preliminary school children and their parents at City of Nagano. International Symposium on Children and Adolescents: Fitness Levels and Active Lifestyles. 2015年11月21日. 印西・順天堂大学さくらキャンパス
9. 鈴木雄大, 鈴木良雄. ヒト唾液中には酸性で活性化するプロテアーゼがある. 日本農芸化学会2016年度大会. 2016年3月27日~30日. 演題番号: 2G012. 札幌・札幌コンベンションセンター

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
○取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木良雄 (SUZUKI, Yoshio)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・准教授
研究者番号: 30612395

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

門屋悠香 (KADOYA, Haruka)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・准教授
研究者番号: 10420879