

氏 名 (本 國 籍)	劉 軼 群 (中華人民共和國)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 5 8 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 4 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Interactive Effects of Choline and Methionine on the Metabolism of Homocysteine (ホモシステイン代謝におけるコリンとメチオニンの相互作用的效果に関する研究)
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 森 誠 副査 静岡大学 教授 杉 山 公 男 副査 岐阜大学 教授 早 川 享 志

論 文 の 内 容 の 要 旨

ホモシステイン(Hcy)はメチオニン(Met)代謝の一中間体であり、血漿 Hcy 濃度の過度の上昇は動脈硬化の独立した危険因子となることが認識されている。Met は Hcy の唯一の前駆体なので、Met 摂取量の増加は血漿 Hcy 濃度を上昇させると考えられ、事実、食餌への Met 添加が高 Hcy 血症を引き起こすことが観察されている。Met とコリンはともにホスファチジルコリン(PC)合成を促進する抗脂肪肝因子として知られ、両栄養素は代謝的に密接な関係にある。劉軼群さんの所属する研究室では、25%大豆タンパク質食(25S)からコリンを除くとベタイン(Bet)欠乏に起因する高 Hcy 血症をもたらすが、それに少量の Met を添加すると高 Hcy 血症は効果的に抑制されることを観察している。これは Met が血漿 Hcy 上昇作用と低下作用の両方を有していることを示している。また、10%カゼイン食(10C)や 25S 食からコリンを除くと高 Hcy 血症と脂肪肝が生じるが、25%カゼイン食からコリンを除去しても高 Hcy 血症は引き起こされないことも観察している。コリン欠食が高 Hcy 血症を引き起こすかどうかは、食餌中の Met 含量に依存しているが、それに加えて、セリン(Ser)やグリシン(Gly)のような Met や Hcy 代謝を促進するアミノ酸の摂取量なども無視できないと思われる。本研究は、Hcy 代謝に及ぼすコリンと Met の相互作用的な効果を検討し、Hcy 代謝における両栄養素の役割を明らかにしようとしたものである。

本論文の第一章では、10C 投与ラットを用い、コリン欠と 0.5%グアニジノ酢酸(GAA)添加による高 Hcy 血症に及ぼす食餌への 0.5%Met, 2.5%Ser あるいは両者の添加効果を検討した実験結果について述べている。実験 1:コリン欠による高 Hcy 血症は Met 単独添加では抑制されなかったが、Met + Ser 添加で完全に抑制された。コリン欠による脂肪肝も Met + Ser で完

全に抑制された。Met 添加で Hcy の生成が増加するので、シスタチオン合成も亢進しなければならないが、Met 単独の添加では肝臓 Ser 濃度が低下してシスタチオン合成が円滑に進まないのに対し、Met + Ser 添加では肝臓 Ser 濃度はシスタチオン合成を進めるのに十分な濃度と考えられた。実験 2 : GAA 添加による高 Hcy 血症は Met あるいは Ser の単独添加で部分的に抑制されたが、両者の効果の大きさに差は見られなかった。第一章での実験結果は、Met と Ser の組み合わせはコリン欠による高 Hcy 血症を相乗的に抑制し、高 Hcy 血症の抑制には極めて効果的であることを示している。一方、GAA 添加による高 Hcy 血症に対してはそのような効果は見られず、このタイプの高 Hcy 血症に対しては Met と Ser の組み合わせが限定的な効果しかを示さないことが明らかにされた。

第二章では、ラットにおいて比較的高レベルのカゼイン食がコリン欠による高 Hcy 血症に対して抵抗性を示す機構を検討した結果について述べている。実験 1 : 血漿 Hcy 濃度は 30% カゼイン食 (30C) 投与ラットでは 10C 投与ラットに比べて有意に低かった。また、30C からコリンを除いても血漿 Hcy 濃度は上昇しなかったが、10C からコリンを除くと血漿 Hcy 濃度は有意に上昇した。その理由として、次の三つの機構を推定された。1) 30C では Met 含量が高いため肝臓 S-アデノシルメチオニン濃度が高く維持されており、ホスファチジルエタノールアミン (PE) から PC へのメチル化が進みコリン (および Bet) が十分に供給される。2) Gly や Ser の摂取量も多く、これらのアミノ酸が Hcy 代謝を円滑に進める。3) 総アミノ酸摂取量が多いと Hcy 代謝に関わる酵素の活性が高まる、などである。実験 2 : コリン欠の 10C (10CCD) に Met を添加すると 0.1-0.3% の範囲では用量依存的に血漿 Hcy 濃度の上昇は抑制されたが、0.3-0.5% の範囲では Met 添加量に応じて抑制効果は減少し、0.5% Met 添加ではコリン欠による高 Hcy 血症を全く抑制しなかった。Met 添加はメチル化経路での PC 合成を促進しコリン欠乏を抑制するが、これは Met を比較的低レベル添加した時の効果の原因と考えられる。一方、Met 添加は Hcy の生成を増加させるので、再メチル化反応の亢進により Bet の消費も増加させることになる。Met から合成される PC よりも Met 添加で消費される Bet の方が多ければ、高 Hcy 血症は改善されないと考えられた。いずれにしても、10C に 30C と同等になるように Met を添加 (0.5%) しても 30C と同じようなコリン欠に対する抵抗性が見られないことが明確にされた。実験 3 : 10C に各種アミノ酸を 30C と同等になるように添加し、その効果を検討した。10CCD + 0.5% Met に 0.32% Gly + 0.94% Ser を添加すると高 Hcy 血症は有意に抑制された。また、10CCD + 0.5% Met + 0.32% Gly + 0.94% Ser に 3.61% BCAA (分岐鎖アミノ酸) + 4.5% AAA (酸性アミノ酸) を添加して食餌アミノ酸含量を高めると、血漿 Hcy 濃度は 10C 投与ラットのレベルよりも有意に低い値を示した。10CCD + 0.5% Met 投与による肝臓の S-アデノシルホモシステインおよび Hcy 濃度の上昇は Gly + Ser 添加で有意に抑制され、BCAA + AAA 添加でさらに抑制された。肝臓シスタチオン β -シンターゼ (CBS) 活性と CBS mRNA レベルは BCAA + AAA 添加で有意に上昇した。BCAA + AAA 添加によりアミノ酸の摂取量の増加が CBS を誘導し、Hcy 代謝を円滑にさせて血漿 Hcy 濃度の低下に寄与していると考えられた。Gly+Ser、BCAA+AAA を加えたとき、Bet 濃度がやや上昇するのは、Ser が十分に供給されるために、シスタチオン合成が亢進し、再メチル化が減少したことを示してと考えられた。これは、基質の供給が、血漿ホモシステイン濃度の上昇抑制に関与していることを示唆している。30C のような比較的高レベルのカゼイン食がコリン欠による高 Hcy 血症に対して抵抗性を示す要因が少なくとも 3 つ存在することが示された。すなわち、Met 摂取量が多いこと、Gly + Ser 摂取量が多いこと、総アミノ酸摂取量が多いことである。第二章での実験結果は、比較的高レベルのカゼイン食のコリン欠に対する抵抗性は従来考えられていたような Met 含量が高いことだけでは

ないことを明確に示している。

以上のように本論文は、種々の動物試験を行い、コリン欠(Bet 欠)による高 Hcy 血症に対して Met が抑制的な効果を発揮するためには他の要因、例えば Gly + Ser、BCAA + AAA などの同時摂取が必要であり、他のアミノ酸との代謝的な相互作用も必要であることを明らかにした。

審 査 結 果 の 要 旨

ホモシステイン(Hcy)はメチオニン(Met)代謝の一中間体であり、血漿 Hcy 濃度の過度の上昇は動脈硬化の独立した危険因子となることが認識されている。Met とコリンはともにホスファチジルコリン(PC)合成を促進する抗脂肪肝因子として知られ、両栄養素は代謝的に密接な関係にある。コリン欠乏が体内のベタイン(Bet)濃度の低下を介して高 Hcy 血症を引き起こすかどうかは、食餌中の Met 含量に依存しているが、それに加えて、セリン(Ser)やグリシン(Gly)のような Met や Hcy 代謝を促進するアミノ酸の摂取量なども無視できないと思われるが、十分な研究がなされていない。本研究は、Hcy 代謝に及ぼすコリンと Met の相互作用的な効果を検討し、Hcy 代謝における両栄養素の役割を明らかにしようとしたものである。

本論文の第一章では、10C 投与ラットを用い、コリン欠と 0.5%グアニジノ酢酸(GAA)添加による高 Hcy 血症に及ぼす食餌への 0.5%Met、2.5%Ser あるいは両者の添加効果を検討した実験結果について述べている。実験 1：コリン欠による高 Hcy 血症は Met 単独添加では抑制されなかったが、Met + Ser 添加で完全に抑制された。コリン欠による脂肪肝も Met + Ser で完全に抑制された。Met 添加で Hcy の生成が増加するので、シスタチオニン合成も亢進しなければならないが、Met 単独の添加では肝臓 Ser 濃度が低下してシスタチオニン合成が円滑に進まないのに対し、Met + Ser 添加では肝臓 Ser 濃度はシスタチオニン合成を進めるのに十分な濃度と考えられた。実験 2：GAA 添加による高 Hcy 血症は Met あるいは Ser の単独添加で部分的に抑制されたが、両者の効果の大きさに差は見られなかった。第一章での実験結果は、Met と Ser の組み合わせはコリン欠による高 Hcy 血症を相乗的に抑制し、高 Hcy 血症の抑制には極めて効果的であることを示している。一方、GAA 添加による高 Hcy 血症に対してはそのような効果は見られず、このタイプの高 Hcy 血症に対しては Met と Ser の組み合わせが限定的な効果しかを示さないことが明らかにされた。

第二章では、ラットにおいて比較的高レベルのカゼイン食がコリン欠による高 Hcy 血症に対して抵抗性を示す機構を検討した結果について述べている。実験 1：血漿 Hcy 濃度は 30%カゼイン食(30C)投与ラットでは 10C 投与ラットに比べて有意に低かった。また、30C からコリンを除いても血漿 Hcy 濃度は上昇しなかったが、10C からコリンを除くと血漿 Hcy 濃度は有意に上昇した。その理由として、三つの機構を推定している。実験 2：コリン欠の 10C(10CCD)に Met を添加すると 0.1-0.3%の範囲では用量依存的に血漿 Hcy 濃度の上昇は抑制されたが、0.3-0.5%の範囲では Met 添加量に応じて抑制効果は減少し、0.5%Met 添加ではコリン欠による高 Hcy 血症を全く抑制しなかった。Met 添加はメチル化経路での PC 合成を促進しコリン欠乏を抑制するが、これは Met を比較的低レベル添加した時の効果の原因と考えられる。一方、Met 添加は Hcy の生成を増加させるので、再メチル化反応の亢進により Bet の消費も増加させることになる。Met から合成される PC よりも Met 添加で消費される Bet の方が多ければ、高 Hcy 血症は改善されないと考えられた。10C に 30C と同等になるように Met を添加(0.5%)しても 30C と同じようなコリン欠に対する抵抗性が見られないことが明確にされた。実験 3：10C に各種アミノ酸を 30C と同等になるように添加し、その

効果を検討した。10CCD + 0.5%Met に 0.32%Gly + 0.94%Ser を添加すると高 Hcy 血症は有意に抑制された。また、10CCD + 0.5%Met + 0.32%Gly + 0.94%Ser に 3.61%BCAA(分岐鎖アミノ酸) + 4.5%AAA(酸性アミノ酸)を添加して食餌アミノ酸含量を高めると、血漿 Hcy 濃度は 10C 投与ラットのレベルよりも有意に低い値を示した。10CCD + 0.5%Met 投与による肝臓の S-アデノシルホモシステインおよび Hcy 濃度の上昇は Gly + Ser 添加で有意に抑制され、BCAA + AAA 添加でさらに抑制された。肝臓シスタチオニンβ-シターゼ(CBS)活性と CBS mRNA レベルは BCAA + AAA 添加で有意に上昇した。BCAA + AAA 添加によりアミノ酸の摂取量の増加が CBS を誘導し、Hcy 代謝を円滑にさせて血漿 Hcy 濃度の低下に寄与していると考えられた。Gly + Ser、BCAA+AAA を加えたとき、Bet 濃度がやや上昇するのは、Ser が十分に供給されるために、シスタチオニン合成が亢進し、再メチル化が減少したことを示してと考えられた。これは、基質の供給が、血漿ホモシステイン濃度の上昇抑制に関与していることを示唆している。30C のような比較的高レベルのカゼイン食がコリン欠による高 Hcy 血症に対して抵抗性を示す要因が少なくとも 3 つ存在することが示された。すなわち、Met 摂取量が多いこと、Gly + Ser 摂取量が多いこと、総アミノ酸摂取量が多いことである。第二章での実験結果は、比較的高レベルのカゼイン食のコリン欠に対する抵抗性は従来考えられていたような Met 含量が高いことだけではないことを明確に示している。

以上のように本論文は、種々の動物試験を行い、コリン欠(Bet 欠)による高 Hcy 血症に対して Met が抑制的な効果を発揮するためには他の要因、例えば Gly + Ser、BCAA + AAA などの同時摂取が必要であり、他のアミノ酸との代謝的な相互作用も必要であることを明らかにした。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

<基礎となる学術論文>

1. Yi-qun LIU, Ying LIU, Tatsuya MORITA, and Kimio SUGIYAMA: Methionine and Serine Synergistically Suppress Hyperhomocysteinemia Induced by Choline Deficiency, but Not by Guanidinoacetic Acid, in Rats Fed a Low Casein Diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 2333-2339 (2011).
2. Yi-qun LIU, Ying LIU, Tatsuya MORITA, and Kimio SUGIYAMA: Factors Contributing to the Resistivity of Higher Casein Diet against Choline Deficiency-Induced Hyperhomocysteinemia in Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 58, in press (2012).