

韓国産キビタンパク質の血糖値
制御、脂質代謝及びアディポネクチン
レベルに及ぼす影響

Effects of dietary protein of Korean proso millet on
glycemic responses, lipid metabolism and levels of
adiponectin

2009

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(岩手大学)

朴 京玉

目次

第1章 緒論	1
第1節 食と健康の現状	1
第2節 脂肪細胞の機能—アディポサイトカインの作用	8
第3節 雑穀の重要性	17
第2章 材料の調製	24
第1節 キビの一般成分の定量	25
1. 方法	25
第2節 キビタンパク質濃縮物の調製および一般成分の定量	34
1. 方法	34
第3節 キビデンプン画分の調製	38
1. 方法	38
第4節 キビプロラミン画分の調製	40
1. 方法	40
2. 結果	41
3. 考察	46
第3章 キビタンパク質濃縮物(PMP)がC57BL/6J系マウスに及ぼす影響	49
第1節 高コレステロール食餌条件におけるPMP摂取がC57BL/6J系マウスの脂質代謝に及ぼす影響	49
1. 方法	51
2. 結果	57

3. 考察	66
第2節 高脂肪食餌投与のC57BL/6Jマウスにおけるキビタンパク質の血糖値制御および脂質代謝に及ぼす影響	69
1. 方法	71
2. 結果	75
3. 考察	84
第4章 キビタンパク質濃縮物(PMP)が肥満型2型糖尿病モデルKK-A ^y 系マウスに及ぼす影響	87
第1節 正常食餌条件におけるPMPが肥満型2型糖尿病モデルKK-A ^y 系マウスの血糖値制御、脂質代謝およびインスリン、アディポネクチン、脂肪組織での遺伝子発現に及ぼす影響	87
1. 方法	89
2. 結果	96
3. 考察	108
第2節 高脂肪食餌条件における2型糖尿病モデルKK-A ^y マウスにおけるキビタンパク質の血糖値制御、脂質代謝およびインスリン、アディポネクチン、脂肪組織での遺伝子発現に及ぼす影響	111
1. 方法	112
2. 結果	117
3. 考察	129
第5章 キビデンポン画分(PMS)が肥満型2型糖尿病モデルKK-A ^y 系マウスの血糖値制御、脂質代謝及びアディポネクチン、インスリンレベル、脂肪組織での遺	

伝子発現に及ぼす影響	132
1. 方法	134
2. 結果	138
3. 考察	149
第6章 高脂肪食餌条件におけるキビプロラミン(PMP _r)摂取が肥満2型糖尿病 モデルKK-A ^y 系マウスの 血糖値制御、脂質代謝及びアディポネクチン、 インスリンレベル、脂肪組織での遺伝子発現に及ぼす影響	152
1. 方法	153
2. 結果	157
3. 考察	167
第7章 総合考察	168
要約	181
謝辞	183
参考文献	184

第1章 緒論

第1節 食と健康の現状

1-1. 肥満の現状

欧米先進国のみだけでなく経済発展途上においても過剰摂取カロリー、特に高脂肪食事による肥満が広がっており、これら肥満と共に引き続くメタボリックシンドロームの患者が増加しているのが食と健康の世界的な現状である [1]。

これらの最新の食事因子と健康への影響の科学的背景や研究の成果を概説してみると、過剰の脂肪摂取と運動不足による遊離脂肪酸の利用低下により、余剰の遊離脂肪酸は、内臓脂肪で脂肪合成に関わる酵素群(リポジェニックエンザイム)を賦活化し、中性脂肪として蓄積される [2]。一方この時、内臓脂肪は、リポリシス(脂肪の分解により遊離脂肪酸の放出)活性が亢進しており、非脂肪細胞(肝臓、骨格筋、膵β細胞)に遊離脂肪酸を持続的に供給するソースとなる。従って、内臓肥満患者では、内臓周囲の脂肪細胞に過剰の遊離脂肪酸が中性脂肪として蓄積している。リポリシスは、インスリンが主にホルモン感受性リパーゼ活性を介して調節しているが、内臓脂肪、皮下脂肪、骨格筋脂肪でそれぞれ活性が異なり、内臓脂肪でリポリシスは最も亢進していることが知られている [3]。

かつて先進国に多く見られた肥満だが、最近では発展途上国においても肥満が急増している。世界保健機関(WHO)は、60億人余りの世界の人口のうち10億人以上が肥満となっており、このまま増加を続ければ2015年までに15億人に達するとの調査を発表した。経済協力開発機構(OECD)の資料によると、データのある加盟国すべてで肥満率が増加している (Table1-1) [4]。世界的に肥満が増加した大きな要因として、脂肪や糖分の多い高カロリー摂取の欧米型食生活が世界中に広まったことがあげられる。油脂分と糖分と一緒に摂取すると、糖分の影響でインスリンが分泌され、吸収された油脂分はエネルギーとして使われるよりも、体脂肪として蓄積される。肥満は、糖尿病、高脂血症、高血圧など生活習慣病の原因となり、健康寿命を脅かす最大の危険因子である。脂肪組織は、蓄積される部位によって、皮下脂肪と内臓脂肪とに分けられるが、特に内臓脂肪型肥満が生活習慣病に密接に関連している。最近では、内臓脂肪の蓄積によって様々な病気が引き起こされた状態を

メタボリックシンドローム (metabolic syndrome) と呼び、治療の対象となっている [5]。

韓国においても、食生活と生活習慣の変化などで肥満人口は増加しており、国民健康栄養調査によると、成人肥満人口が2001年30.6%で2005年32.0%に増加したと報告している。また、肥満有病率の増加を適用すると2020年には全人口の50%が肥満になると予想している [6]。2002年の韓国の統計省の調査によると、韓国人の死亡原因の順位は癌、脳血管、心臓、糖尿病および肝疾患の順であった。特に、心血管疾患、脳血管疾患、動脈硬化症などの循環器疾患が主要死亡原因で知られ、その中約42%が肥満であることが報告されている [7]。

Table 1-1. Obesity Rates in OECD Countries (% of population with BMI¹>30) [4]

	1980	1990	2003
Australia	8.3	10.8	21.7
Canada	-	-	14.3
France	-	5.8	9.4
Japan	2	2.3	3.2
Korea	-	-	3.2
New Zealand	-	11.1	20.9
Spain	-	6.8	13.1
United Kingdom	7	13.0	23.0
United States	15	23.3	30.6

¹BMI=Body Mass Index defined as weight in kgs divide by height meters squared.

1-2. 肥満によるインスリン抵抗性惹起メカニズム

肥満がインスリン抵抗性を基盤として糖尿病、高脂肪症、高血圧といった生活習慣病を惹起することは多くの研究からよく知られているが、肥満がインスリン抵抗性を惹起するメカニズムは、まだ充分明らかにされていない。

肥満は、インスリン抵抗性を増悪させ、糖尿病の発症を促進させる。Body mass index (BMI) 24kg/m² 程度からすでに糖尿病のリスクが存在し (BMI 25kg/m² 以上が

肥満と定義されている)、BMI 24.0-24.9kg/m² の群でもBMI 22kg/m² 以下に比べ糖尿病発症相対危険度は、約5倍とされる。また、日本人の2型糖尿病について、Homeostasis model assessment insulin resistance(HOMA-IR)を用いて、インスリン抵抗性に関連する因子を検討したところ、BMIと血清中性脂肪値(血清TG値)が重要な因子であり、その関与の程度はBMIが27.0kg/m² 以上、または21.5kg/m² 未満の群で、BMIが21.5kg/m² 以上27.0 kg/m² 未満の群ではTGがインスリン抵抗性に大きく関与していることが分かった [8]。

腹部脂肪を、皮下脂肪と腹腔内臓脂肪に分けて検討したAbateらの米国人の報告では、インスリン抵抗性の指標は皮下脂肪と内臓脂肪の和と最もよく相関していることが示されている [9]。

1-3. 内分泌器官としての脂肪組織

脂肪組織は余剰のエネルギーを中性脂肪の形で貯蔵するという従来から知られている機能に加えて、レプチンを筆頭に tumor necrosis factor- α (TNF- α)、レジスチン、free fatty acid(FFA)や plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)、アンジオテンシノーゲンなど種々の生理活性分子“アディポサイトカイン(adipocytokine)”を分泌する内分泌器官としての機能を有することが知られるようになり、非常に注目を集めている [10]。これらのアディポサイトカインの中でも、アディポネクチン(adiponectin)の機能は、最も注目されている [11-14]。肥満の研究の成果から、肥大した脂肪細胞からはTNF- α 、レジスチン、FFAが多量に産生・分泌され、骨格筋や肝臓でインスリンの情報伝達を阻害して、インスリン抵抗性を惹起することが明らかとなってきた [15,16]。

1-4. メタボリックシンドローム

最近、急速な経済成長と共に食生活の欧米化とライフスタイルの変化によって、疾病の状態も急激に変化している。肥満、動脈硬化症、糖尿病、癌などは栄養過剰または、栄養不均衡が原因となっている慢性疾患が増加する傾向にある。生活習慣の変化による肥満者の急増により、いわゆる生活習慣病である高血圧、糖尿病、高脂血症および動脈硬化

症の複合的状态はメタボリックシンドロームと云われる。メタボリックシンドロームは、血圧上昇や耐糖能の異常が、高血圧や糖尿病の基準に達しない、いわゆる“境界域”の状態であっても、それらの病態が重積すると心血管イベントのリスクが高くなることに注目した概念である (Fig.1-1) [17]。

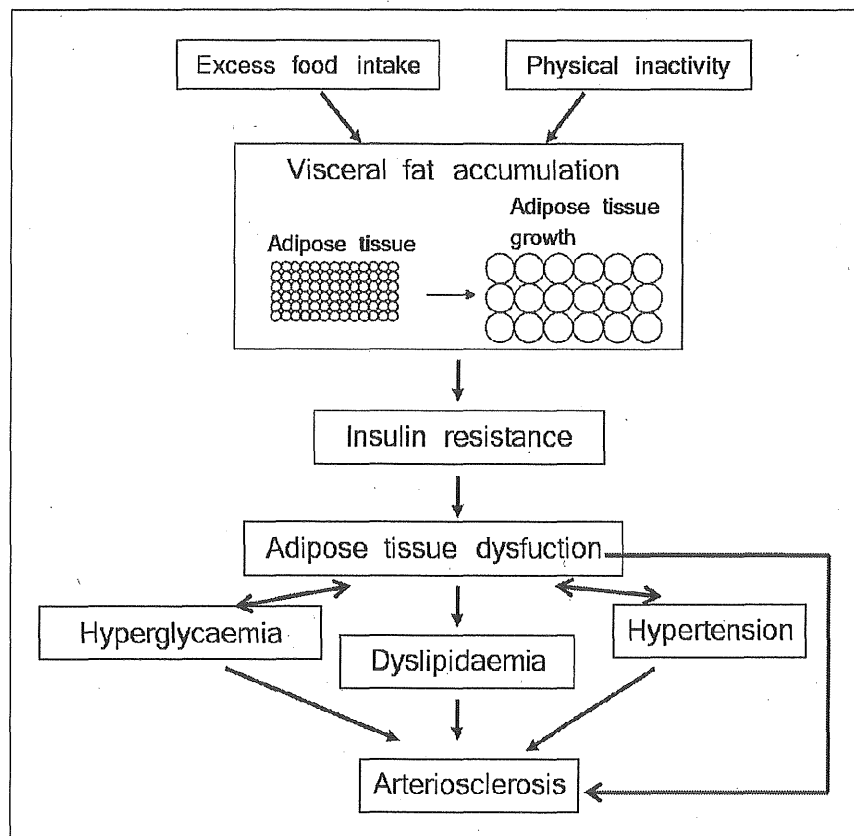


Fig. 1-1. Definition of Metabolic Syndrome [17].

心血管疾患の増加は、動脈硬化の増加を意味していることは疑いの余地はないが、その基盤には多様な要因がリスクファクターとして関わっていることが明らかとなっている。従来、最も強いリスクファクターとして一般に認識されているのは、高コレステロール血症であるが、実際、主要因と考えられるケースはそんなに多いものではなく、高トリグリセリド血症、高血糖、高血圧、肥満のうち三つ以上の因子が重複すると、危険因子を全くもたない群と比較して約36倍発症危険度が上昇することが明らかとなっている [18]。すなわち、多くのリスクファクターが重複する病態、いわゆるマルチプルリスクファクター症候群が動脈硬化性疾患の背景として大きな位置を占めていることが確認されている [19]。高コレステロール血症を代表とする単一のファクターに集点を絞った動脈硬化危険因子の概念の中に、スタンフォー

ド大学のReavenによって“シンドロームX”、テキサス大学のKaplanによって“死の四重奏”という症候群が新たに提唱された [20,21]。そして最近になって、米国では米国立衛生研究所のcardiovascular disease preventionのグループが、National Cholesterol Education Program’s Adult Treatment Panel III(NCEP-ATP III)において、高コレステロール血症の治療指針の中で、また、欧州ではWHO諮問会議が糖尿病の診断基準に盛り込む形でメタボリックシンドロームを、Table 1-2 のように定義している。

Table 1-2. Comparison of the various criteria for metabolic syndrome [22-24]

WHO consultation (1998)	NCEP-ATP III (2001)
Diabetes of impaired	
Glucose tolerance of IR	
+2 or more of the following	3 or more of the following
1. Obesity : BMI>30kg/m ² or waist/hip ration>0.9(M), >0.85(F)	1. Central obesity : Waist circumference>102cm(M), >88cm(F)
2. Dyslipidemia : TG>150mg/dL(1.7mmol/L) or HDL-C<0.35mg/dL(0.9mmol/L)(M) <0.39mg/dL(1.0mmol/L)(F)	2. Hypertriglyceridaemia : triglycerides>150mg/dL(1.7mmol/L)
3. Hypertension : BP>140/90mm Hg or medication	3. Low HDL-C <40mg/dL(1.03mmol/L)(M), <50mg/dL(1.29mmol/L)(F)
4. Microalbuminuria : albumin excretion>20μg/min or albumin: creatinine ratio>30mg/g	4. Hypertension : BP>130/85mm Hg or medication 5. FPG>110mg/dL(6.1mmol/L)

BMI: Body mass index; BP: blood pressure; DP: Diastolic blood pressure; FPG:Fasting plasma glucose; TG: Triglycerides; HDL-C: High density lipoprotein cholesterol, M:male, F:female.

NCEPでは、メタボリックシンドロームは、高コレステロール、高LDL-コレステロール血症以外、五つの因子のうち三つ以上が重なる病態と定義されており、一方WHOの基準は、まさに糖尿病・耐糖能異常の基盤の上に他の因子が重なる病態とされている (Table 1-2)。

これらの概念の確立は、これまで動脈硬化の危険因子のとらえ方として、コレステロールを中心とした個々の単一因子の評価に止まっていたものを、リスクの重複の観点に大きくシフトさせたことになり、その意味では高く評価できる。すなわち、メタボリックシンドロームは、Fig. 1-1に示したように、耐糖能異常、脂質代謝異常、高血圧、肥満が単に偶然、一個体に重なった状態ではなく、内臓脂肪というキープレイヤーがリスクの重複の上流に存在して発症すると考えられている。動脈硬化の発症も、リスクが重なることの単純な効果だけではなく、脂肪細胞の機能異常、特にアディポサイトカインの分泌異常が直接血管障害を引き起こすメカニズムが存在することにより、きわめて強い動脈硬化惹起性 (atherogenicity) を有する病態となる [22-24]。

1-5. メタボリックシンドロームと 糖尿病

メタボリックシンドロームでは、個々の危険因子は重症ではない場合においても、危険因子は重複することにより、従来と比較してコレステロールに富む、柔らかい動脈硬化プラークが形成されやすい。最近では、メタボリックシンドロームは、糖尿病発症の重大なリスクとされ、診療ターゲットは動脈硬化性疾患のみならず糖尿病発症予防も重要な因子になっている。報告によれば、メタボリックシンドロームにより心血管イベントのリスクは約3倍増加し、糖尿病発症は5-10倍増加することが分かっている (Table 1-3) [25]。

糖尿病では、高血糖のみならず危険因子が複数存在するケースが多く、動脈硬化症は早期から発症することが一般的であり、LDL蓄積を促進する因子が多いのみならず、しばしば各危険因子がより重篤な場合が多いことによる。危険因子が複数存在するメタボリックシンドロームは糖尿病発症、心血管病のハイリスク病態であることから、境界型高血糖の時期からのメタボリックシンドロームの管理が重要となる。境界型の段階から、食事療法や運動療法を開始するべきであると推奨されている。従って、メタボリックシンドローム、糖尿病を改善する食事因子の研究が強く望まれている [26]。

Table 1-3. Significance of metabolic syndrome [25]

Risk factor	Rate of hazard	
	Cardiovascular abnormality	Diabetes mellitus
0(10.8%)	1.00	1.00
1(32.2%)	1.79(1.11-2.89)	2.36(0.71-7.93)
2(30.8%)	2.25(1.40-3.60)	4.50(1.39-14.6)
3(20.8%)	3.19(1.95-5.12)	7.26(2.25-23.4)
4/5(5.4%)	3.65(2.11-6.33)	24.40(7.53-79.6)

第2節 脂肪細胞の機能 –アディポサイトカインの作用

脂肪細胞とアディポサイトカイン

脂肪細胞は、体内エネルギーの貯蔵源としての脂肪の産生、貯蔵、分解代謝を行うだけでなく、刺激に応じてサイトカイン、ホルモンを産生・分泌する組織として機能しており、それらの機能異常は肥満、糖尿病、高脂血症などの代謝患者の発症と密接に関連することから、脂肪細胞の機能が、特に注目されている。従って、脂肪細胞の多様な機能が明らかになるにつれて、脂肪細胞の分化あるいはその脂質、糖質代謝の制御における薬剤、食品の役割を解明することが望まれている [27]。

脂肪細胞は、様々な生理活性物質を分泌する内分泌細胞としての役割を果たしているが、脂肪細胞から分泌されるこれらの生理活性物質を総称して、アディポサイトカインという。アディポサイトカインは、脂肪細胞という意味の“adipo”と、細胞から分泌され、自分と他の細胞の機能に影響を与える物質を指称する“cytokine”の合成語で、“adipokine”ともいう。

アディポサイトカインには、善玉アディポサイトカイン(アディポネクチン(adiponectin)やレプチン(leptin)など)と悪玉アディポサイトカイン(PAI-1やTNF- α 、interleukin (IL)など)がある (Fig.1-2) [28]。健康な状態では、これら善玉-悪玉アディポサイトカインの分泌は、バランスよく保たれている。しかし、内臓脂肪が蓄積した状態では、そのバランスが崩れたり、善玉アディポサイトカインが本来の役割を果たせなくなったりしてしまうので、血栓ができやすくなったり、血圧が上昇する。この分泌の乱れが生活習慣病やその進展に大きく関わっていると考えられる [29]。

1) アディポネクチン

アディポネクチンは、ヒト脂肪組織遺伝子ライブラリーに高頻度に出現し、脂肪組織特異的に発見した遺伝子、adipose most abundant gene transcript (apM)-1の産物で、244アミノ酸からなる分泌タンパク質である [30]。アディポネクチンの発見は、同時にアディポネクチンのマウスホモログとしてACRP30、AdipoQが、独立した研究グループから報告された [31,32]。また、ゼラチンアフィニティークロマトグラフィーを用いてヒト血漿から単離さ

れたGBP28も、アディポネクチンと同一の分子であった [33]。

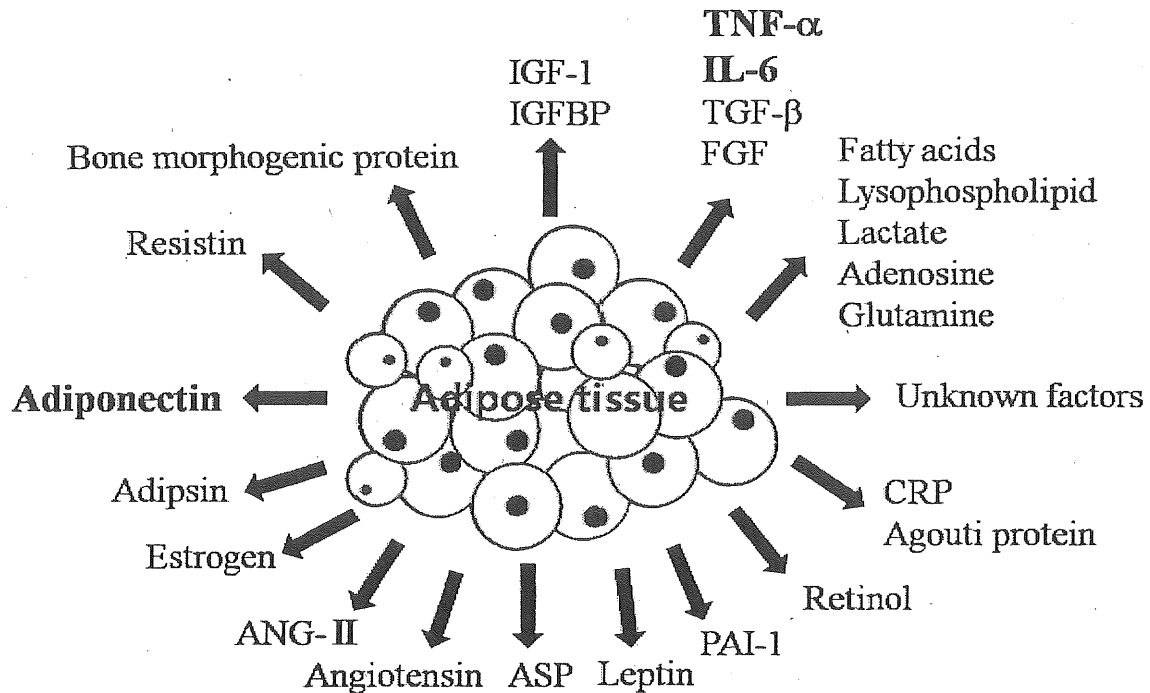


Fig. 1-2. Factors secreted by adipose tissue [28].

Adipose tissue is a source of many proinflammatory and proatherogenic factors. ANG-II = angiotensin II; ASP = acylation-stimulating protein; CRP = C-reactive protein; FGF = fibroblast growth factor; IGF = Insulin-like growth factor; IGFBP = insulin-like growth factor binding protein; IL-6 = interleukin 6; PAI = plasminogen activator inhibitor; TGF = transforming growth factor; TNF- α .

本分子の構造は、分泌タンパク質に共通してみられるシグナル配列に続き、N末端部は66アミノ酸からなるコラーゲン様繊維状ドメイン、C末端部は補体C1q様球状ドメインからなる。結晶構造解析からは、その生体構造は、TNF- α に相同性が高いことが報告されている。コラーゲンドメインを中心とした三量体を形成し、更に多量体を形成して血漿中に存在していることが、明らかになってきた。このような多量体を形成するにはコラーゲンドメイン内のシステイン残基(Cys39)が重要であることが示されている。また、コラーゲンドメインと球体ドメインとの間で切断されることが報告されているが、血中でどのような機序で切断させるのかはまだ明らかではない。アディポネクチンは糖鎖による修飾も受けていることが明らかとなり、タンパク質としての機能を考える上で興味深い。

アディポネクチンは、正常ヒト血中に5-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という高濃度で循環している。レプチン、PAI-1やTNF- α といったアディポサイトカインは、その血中濃度がBMIと正相関するのに対して、アディポネクチンは脂肪組織に特異的に発見しているにもかかわらず、BMIと逆相関することが大きな特徴である [34]。また、血中アディポネクチン濃度は内臓脂肪蓄積に伴って、低下することも明らかになっている。この現象は、ヒト及び肥満糖尿病モデルマウスでも確認されている。インスリン抵抗性惹起因子の一つであるTNF- α は、アディポネクチンの遺伝子発現を転写レベルで抑制しており、肥満における血中アディポネクチン低下の機序の一つとして、このTNF- α のアディポネクチン抑制作用を挙げることができる。しかし、他の因子の影響や肥大した脂肪細胞におけるアディポサイトカイン分泌の変化も考えられている [35]。

アディポネクチンの抗動脈硬化作用

アディポネクチンは正常血管内皮下にはその効果が認められないが、バルーン傷害数時間後のラット頸動脈血管内皮下には効果が強く認められ、血流中のアディポネクチンが障害血管内皮下に浸入すると考えられている [36]。アディポネクチンは、血管内皮細胞においてTNF- α 依存性に上昇する接着分子vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1、intercellular adhesion molecule (ICAM)-1、E-セレクチンの発現を抑制し、血管内皮細胞と単球との接着を阻害する [37]。またアディポネクチンは、マクロファージの泡沫化を抑制し [38]、更に、種々の増殖因子による血管平滑筋細胞の増殖を抑制する作用も持つことがわかった [39]。従って、アディポネクチンは、抗動脈硬化ホルモンであることは明らかである(Adipo-vascular axis) (Fig.1-3)。

アディポネクチンの抗糖尿病作用(インスリン感受性増強作用)

ヒト、サル、マウスにおいて、血中アディポネクチン濃度は、全身のインスリン感受性と強く相関し、アディポネクチンがインスリン感受性増強ホルモンであることが明白となっている [11-14]。アディポネクチンは、筋肉細胞に働いて、IRS-1シグナル伝達を介したPI3-キナーゼの活性および糖輸送を上昇させ、インスリン感受性を増強させる。更に、アディポネク

チンは、脂肪酸輸送タンパク質1型(fatty acid transport protein (FATP)-1)の遺伝子発現の増強を介して脂肪酸の酸化およびクリアランスを高め、インスリン感受性を高める[13]。また、脂肪蓄積で脂肪組織より過分泌されるアディポサイトカインであるTNF- α は、これら同じ経路に作用してアディポネクチンと逆の作用をする。一方、アディポネクチンとTNF- α は、お互いの作用を抑制しあうだけでなく、その産生場所である脂肪組織において転写レベルでの調節によりお互いの産生を抑制しあうことがわかった (Fig.1-4)。つまり、アディポネクチンは、インスリン抵抗性惹起因子であるTNF- α の産生と機能を抑制する。実際、糖尿病モデルマウスにアディポネクチンを補充すると血糖値が下がることが報告されている [40]。更にYamauchiらにより、これらアディポネクチンのインスリン抵抗性改善作用は、骨格筋、肝臓で脂肪酸酸化に重要な働きをしているAMPキナーゼ (AMP-activated protein kinase)を介したものであることが明らかにされた [41]。

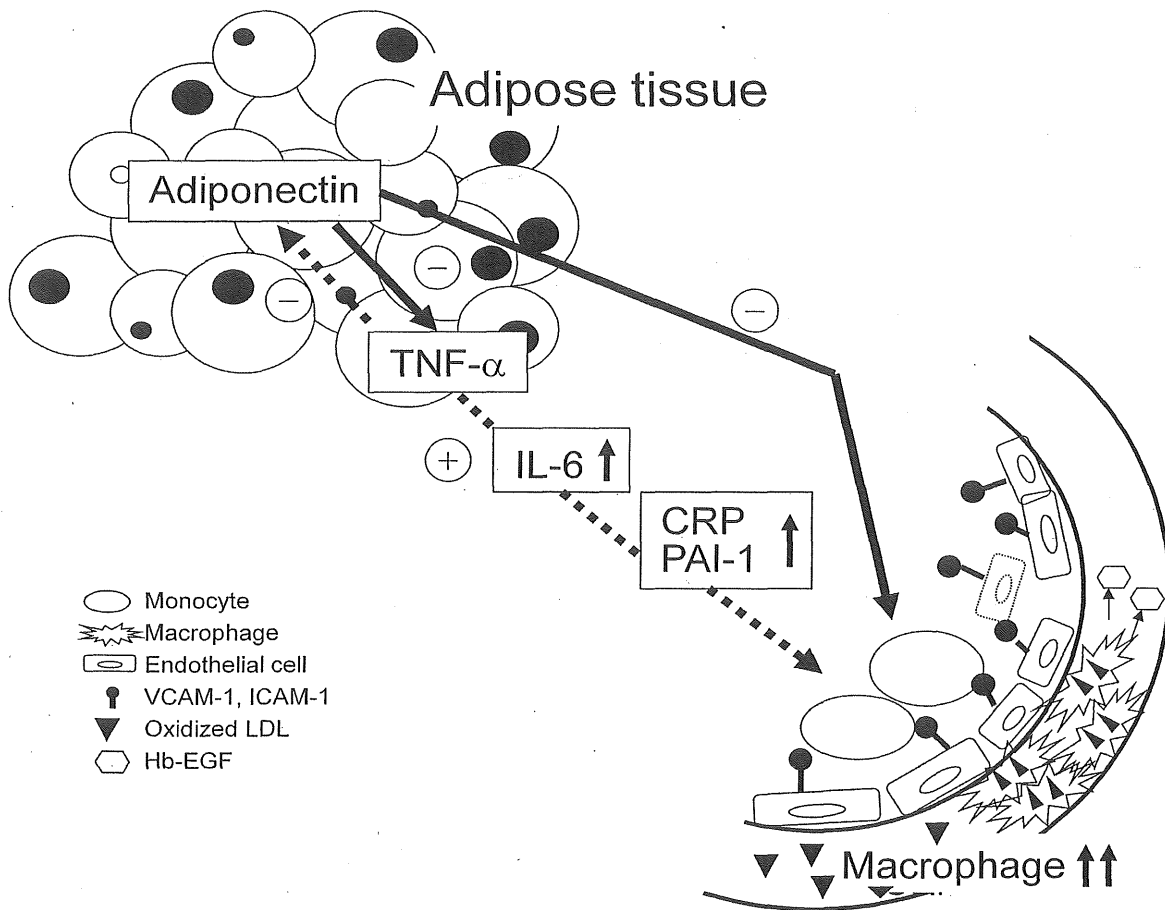


Fig. 1-3. Adipo-vascular axis and paracrine loop of the adipose tissue [37-39].

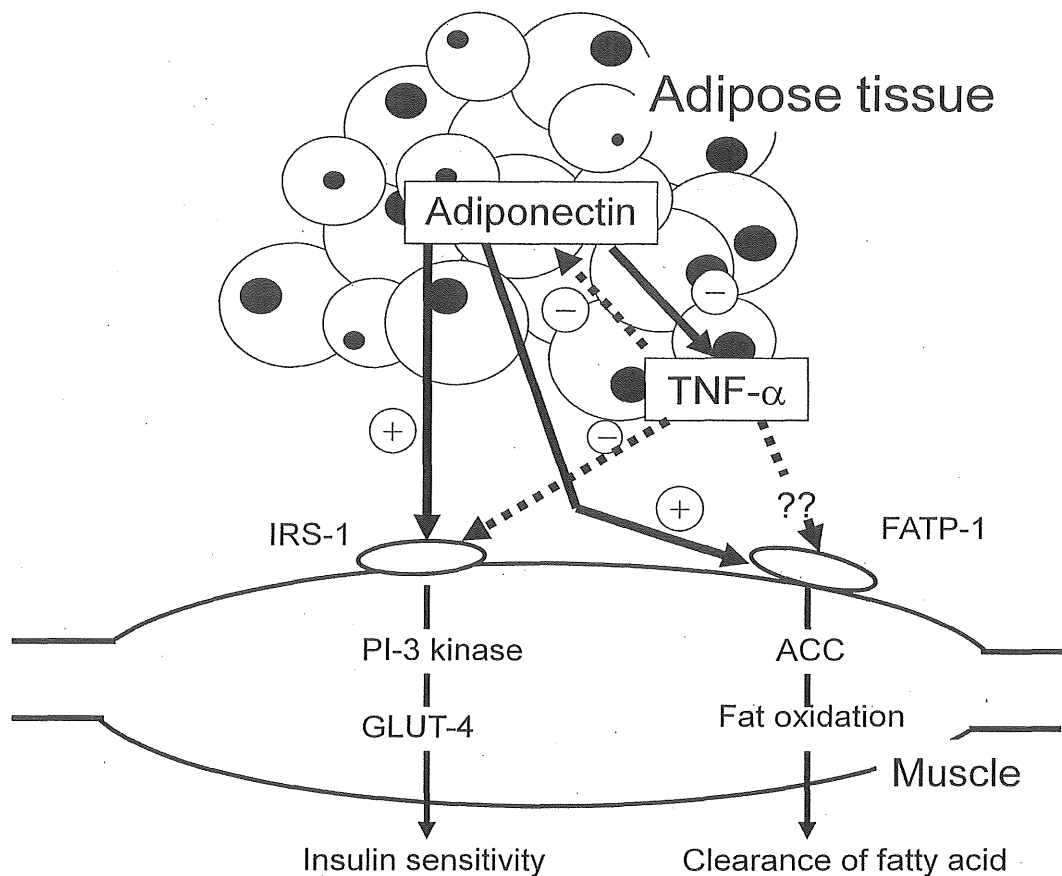


Fig. 1-4. Adipo-muscular axis [40].

アディポネクチン受容体 (AdipoR1, AdipoR2)

アディポネクチンによる細胞内情報伝達経路として、AMPキナーゼ、p38 mitogen activated protein kinase (MAPK)およびperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α が活性化されて、糖取り込みや脂肪酸燃焼が促進され、糖新生が抑制されることが報告されている (Fig.1-5)。これらアディポネクチン作用を、AdipoR1とAdipoR2が伝達しているかどうかを検討する目的に、AdipoR1とAdipoR2の過剰発現や遺伝子ノックダウンを行い、アディポネクチンとの結合や作用について検討を行った結果、AdipoR1もしくはAdipoR2の培養細胞への発現は、球状アディポネクチンおよび全長アディポネクチンの特異的結合を増加させ、アディポネクチンによるAMPK、p38 MAPKおよびPPAR α の活性化を増強し、脂肪酸燃焼および糖取り込みの促進を増強することが明らかにされた[42]。

アディポネクチンによるAdipoRを介した脂肪酸燃焼および糖取り込みの促進作用は、優性抑制型AMPKあるいはp38 MAPKの特異的阻害剤によって、部分的にはであるが抑制される。これらの結果より、アディポネクチンはAdipoRを介したAMPKおよびp38MAPKの活性化によって少なくとも一部、脂肪酸燃焼および糖取り込みを促進していることが示唆された [43]。

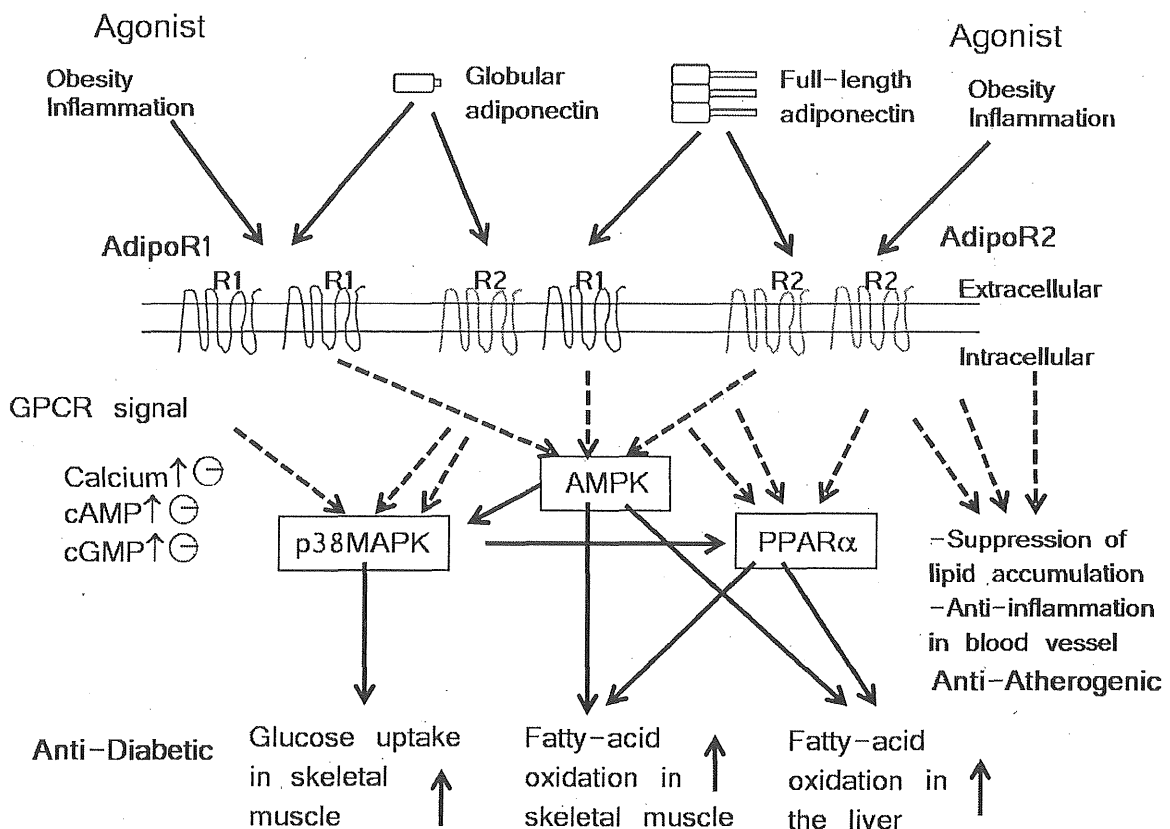


Fig. 1-5. The mechanisms by which adiponectin ameliorates diabetes and atherosclerosis via activation of adiponectin receptor and down-stream signaling [42].

2) TNF- α

TNF- α は、単球・マクロファージのほか、活性化Tリンパ球、好中球、繊維芽細胞、脂肪細胞などからも産生される分子量1.7万のサイトカインである。TNF- α は分子量と組織分布が異なる2つのTNF受容体(TNFR1とTNFR2)を介して、腫瘍細胞、血管内皮、繊維芽細胞、免疫系細胞、神経系細胞、肝細胞および脂肪細胞などに結合して細胞傷害、細胞増

殖、免疫制御、発熱、食欲抑制、糖新生抑制、脂肪分解など多彩な作用を表す [44]。

慢性炎症や肥満においては、TNF- α はインスリン抵抗性を惹起し、2型糖尿病のリスクを高めることが知られている。特に、肥満ではインスリン抵抗性、高血圧、脂質代謝異常などが併存しやすく、それらの誘導分子として、マクロファージが産生するTNF- α が注目されている。肥満に伴うインスリン抵抗性の起源も、炎症と同様にマクロファージ由来のTNF- α と考えられており、メタボリックシンドロームも広い意味で脂肪組織の炎症と考えることができる。TNF- α は、筋肉細胞や脂肪細胞に作用してインスリン抵抗性を誘導するが、その機序として、インスリン情報伝達の抑制、GLUT4遺伝子発現の抑制、血中遊離脂肪酸の増加、PPAR γ 遺伝子発現の抑制、アディポネクチン産生の抑制、レジスチン産生の促進など、複数の機序が報告されている (Fig. 1-4) [40]。

3) PPAR γ

リガンド応答性の核内受容体型の転写因子であるPPAR γ は、チアゾリジン誘導体をリガンドとする。臨床的には、チアゾリジン誘導体は、低下した血中アディポネクチンを上昇させる薬剤として重要視されている。PPAR γ アゴニストが、耐糖能異常患者の血中アディポネクチン濃度を上昇させ、このことが糖代謝異常の改善とリンクしていることが見出されている [45]。この説明として、動物実験、培養細胞、アディポネクチン遺伝子プロモーターを用いた実験で、PPAR γ アゴニストがアディポネクチンの産生・分泌を直接上昇させること、脂肪細胞におけるPPAR γ アゴニストによるアディポネクチン転写増強にはオーファン核内受容体の一つであるliver receptor homologue (LRH)-1が、アディポネクチンプロモーター上のLRH response element (LRHRE)を認識することが明らかにされている。同じく、核内受容体型転写因子であるretinoid X receptor (RXR)とヘテロダイマーを形成して、direct repeat (DR)-1タイプの認識配列であるperoxisome proliferator response element (PPRE)に結合する。このことから、PPAR/RXRヘテロダイマーにPPARもしくはRXRのアゴニストが結合すると、コリプレッサーの解離とCBPなどのコアクチベーターの会合が起こり、転写活性化能を有するようになり、かつ、PPAR γ の活性化機構に直接作用して、PPAR γ アゴニストによるアディポネクチン遺伝子転写を増強させることが証明されている (Fig.1-6) [45]。

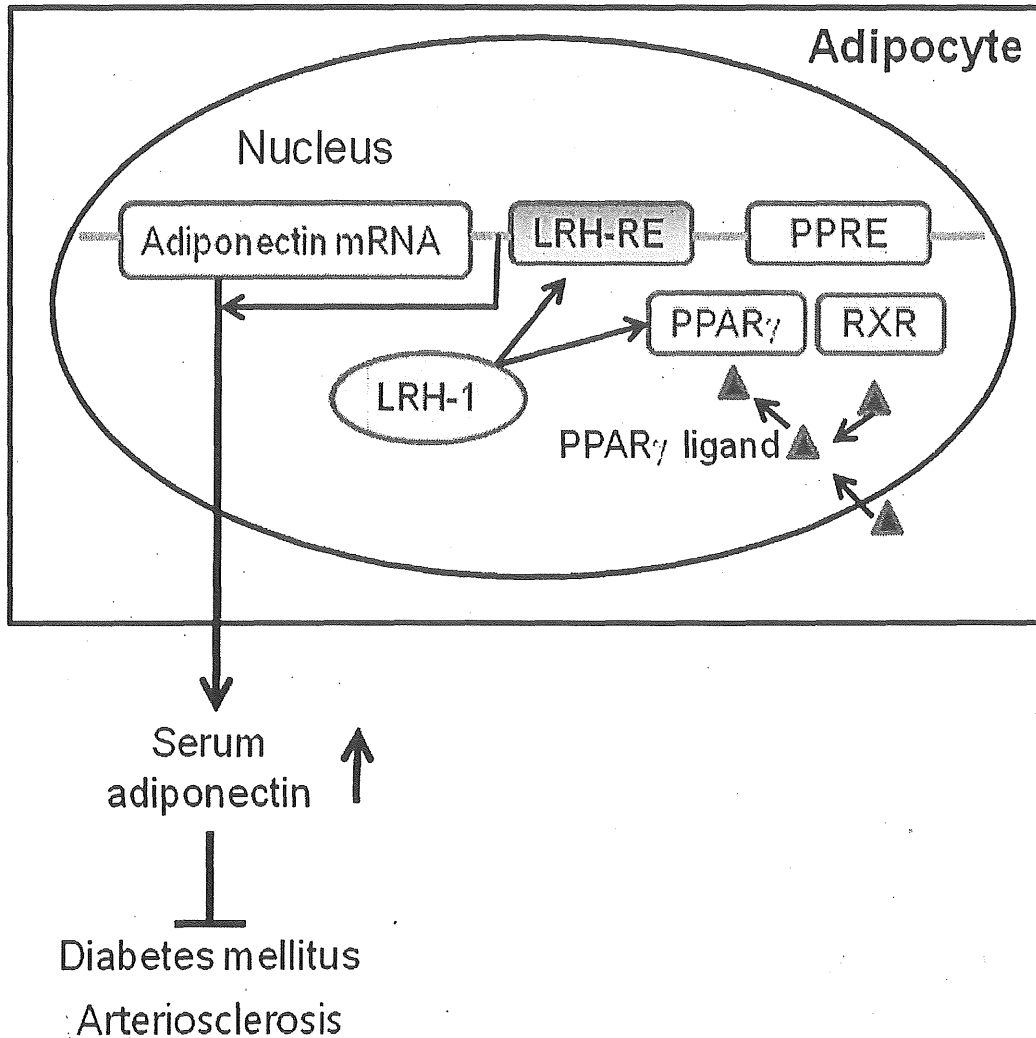


Fig.1-6. Transcription regulation of adiponectin by PPAR γ and LRH-1 [45]

4) IL-6

IL-6は、脂肪細胞はじめ多くの細胞で産生される炎症性サイトカインである。IL-6は、炎症の急性期反応に与る最も重要な因子の一つであるが、血中IL-6の30%が脂肪組織由来であるとされ、肝臓、筋肉からも分泌されて全身のエネルギー代謝に関わると考えられている。IL-6も、TNF- α と並んで代表的な炎症性サイトカインであり、肥満、インスリン抵抗性の惹起因子の候補として捉えられてきた。肥満、2型糖尿病などのインスリン抵抗性状態で血中IL-6が上昇していること、実際にIL-6が分子レベルでインスリン抵抗性を惹起することが報告されている [46]。IL-6の血中濃度は、肥満モデルマウス及び肥満・インスリン

抵抗性患者において上昇している [47,48]。また、IL-6による刺激は、マウス初代培養肝細胞およびヒト肝細胞系培養細胞においてIRS-1のチロシンリン酸化を減弱化させ、インスリン抵抗性を惹起するほか [49]、脂肪細胞系の培養細胞においてもIRS-1の発現を低下させることが報告されている [46]。このように、IL-6などの炎症性サイトカインがインスリン抵抗性を惹起するメカニズムとして、suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3の関与が提唱されている。Signal transducer and activator of transcription (STAT)-3は、IL-6により活性化される代表的な転写因子であり、STAT3によって発現が上昇するSOCS-3はIL-6受容体およびJanus kinase (JAK)-2に結合することで、負のフィードバック制御に与るが、SOCS-3はインスリン受容体の自己リン酸化を減弱化するとともに、IRSのユビキチン化を介してインスリン抵抗性を惹起しうることが報告されている [50]。また、IL-6欠損マウスは、肥満を呈することが報告されており、中枢においてIL-6がエネルギー代謝に促進的な役割を果たしている可能性が示唆されている [51]。またIL-6は、脂肪酸合成促進の鍵分子である転写因子sterol regulatory element binding protein (SREBP)1cの発現を低下させ、脂肪肝の形成を抑制することなどが最近相次いで報告されている [50]。アディポサイトカインとしてのIL-6が、単純にインスリン抵抗性の惹起因子と考えられるかどうかは、今後のさらなる検討が必要である。

第3節 雑穀の重要性

食品の成分特性から、機能へと発想の転換が行われ、この食品機能は三つに分類することができる。一次機能は身体に対する必須栄養素の働き、二次機能は感覚器官に対する香味成分の働きを意味する。私たちは、食品から栄養素と香味物質などの嗜好成分だけをとっているのではなく、食品中には、これらとは別の生理活性物質ともいべき種々の成分が存在していて、これらは摂取された後、私たちの体内の免疫系、内分泌系、神経系、循環系、消化系などといった生理システムを調節して、健康の維持(病気の予防)や健康回復(病気の治癒)に効果を及ぼしている実能が明らかにされてきている。そこで食品には一次、二次機能のほかに、第三の機能(三次機能、生体調節機能)が存在することになる。

最近、食事内容の変化に伴う疾病の多発など生体機能の低下が報告されるようになり、食品の生体恒常性の維持、生体調節、および増進の働きをする三次機能が、特に注目されている。生体の免疫系や消化機能、循環系などのいろいろなシステムを特異的に調節する食品成分の発見から調節メカニズムの分子レベルでの解明などの研究成果が報告されている。更に、何よりもこの生体調節機能を有効に発現させ、それによって病気の発症を未然に防ぐよう設計された新しい食品、すなわち機能性食品の創出に向けた開発研究、商品化がなされている。例えば、アレルギー低減化、カルシウム吸収促進、腸内細菌の調節(ビフィズス菌増強)、血圧降下、また、血中コレステロールレベルの低下などを目的とした機能性食品が商品化されている [52]。

食品タンパク質が、末梢組織のインスリン感受性に及ぼす影響について検討した研究はごく限られている。大豆タンパク質やタラタンパク質の摂取が血漿中グルコース、インスリン濃度を低下、また、アディポネクチン濃度を増加させインスリン感受性を高めることが報告されている [53,54]。また、大豆タンパク質の摂取は下肢灌流実験モデルラットの骨格筋におけるインスリン感受性を増加させることを示し [55]、大豆ペプチドはOLETFラットにおけるエネルギー消費率を増加させ、肥満の進展を軽減させる効果をもつことを明らかにしたが [56]、これには褐色脂肪組織における熱産生の亢進が関与している可能性があると思われる。一方原らは、Wistar系ラットを用いた研究で、大豆タンパク質は、高ショ糖食や対照食では肩甲間褐色脂肪組織の脱共役タンパク質含量を増加させたが、高脂肪食においては元々増加している脱共役タンパク質含量を相加的に増加させなかったことを報告してい

る [57]。しかし、食品タンパク質と血糖値制御やアディポネクチン濃度、また、アディポネクチン遺伝子発現に及ぼす影響については、まだ充分には、明らかにされていない。

コメ、コムギ、トウモロコシの重要穀物以外に、小粒の雑穀は、アジア、アフリカを中心として、人の食糧として多く消費されている。穀物の食品機能の観点から、最近注目されるのが雑穀である。

農業の分野では様々な雑穀をいくつかの類型に分けて取り扱う。古い分類では、主穀、雑穀、菽穀、擬穀に分けられる。主穀は、コメ(イネ)、ムギを指す。狭い意味の雑穀には、ヒエやアワなどの小粒の種子を付けるイネ科の作物が含まれる [58]。イネ科穀物では、主穀と雑穀、マメ科穀物ではマメと雑豆のように、対象物を“主”とそれ以外の“雑”とに類型する認識は、主食(ご飯)と副食(おかず)を識別するのと同じ行為である。中国の漢民族や韓国では、決して「ご飯」を「食事」の意味には使わない。肉や野菜が食事の中心である食文化では、コメや穀物は食事の主役ではなく、逆に副食的あるいは並列的存在である。アジアだけを見ても「ご飯」を主食とする地域は、稲作文化を主とするごく限られた国々にすぎない。

雑穀は、英語で、milletと言う。雑穀に含まれる穀類はその定義によるが、小さい穎果をつけ、主に夏雨型の気候、熱帯または亜熱帯のサバンナの生態条件や温帯モンスーン気候の地域で栽培化され、夏作物として栽培される一群のイネ科穀類と定義できる [58,59]。日本においては、雑穀とはイネ科作物やマメ科作物、ソバなどのうち主要作物であるコムギ、オオムギ、コメ、大豆、あずきなどを除いたものを意味し、農業統計では豆科を除いて雑穀類として分類されており、ソバその他の区分に含まれる [59,60]。

世界には種々多様な雑穀が知られているが、それらの主要な起源地域はユーラシアとアフリカである。ユーラシア起源の代表的な雑穀は、アワ、キビ、ヒエであり、アフリカ起源のものとしては、モロコシ、シコクビエ、トウジンビエおよびテフが挙げられる。雑穀の生産量は少ないと思われるが、世界の主要穀物であるコムギ、コメ、トウモロコシそれぞれ約6億トンに対して、雑穀はおよそ1億トン生産されている (Table 1-4) [61]。

雑穀類の歴史は非常に古い。ヌードルは、中国人、イタリア人またはアラビア人のどれがそれらを最初に発明したかどうか討論の余地があるが、2000年間、世界に普及された主食である [62]。最近、北西中国の新石器時代の遺跡の土器からヌードルが発見された。その分析の結果、4000年前のキビを材料として作ったものであることが分かったため、キビ

の栽培歴史は4000年以上前であると推測された。この論文の最後の記述には、人類が最初に食べた穀物食品は雑穀であると記している [63]。人類が現在の主要作物を世界規模で栽培し始めたのは人類の歴史から言えばごく最近のことである。世界における穀物は、600属、8000種とされているが、栽培の歴史のある作物は300種ほどであり、作物として定着しているものはわずか20属、35種とも言われている。雑穀類は世界の食用穀類生産の1%ほどである [64]。

Table 1-4. Cereal statistics; area, yield and production in 2000 [61]

Crop	Area		Yield		Production	
	(Million ha)		(kg/ha)		(Million tones)	
	World	Asia	World	Asia	World	Asia
Cereals	675.631	301.8	3049	3093	2059.8	983.8
Wheat	215.180	96.8	2706	2566	582.2	248.3
Rice(paddy)	153.458	137.3	3863	3930	592.9	540.0
Coarse grains	306.996	84.1	2882	2326	884.7	195.5
Barley	55.698	12.6	2440	1669	135.9	20.9
Maize	137.549	41.2	4336	3492	596.4	143.9
Rye	9.896	0.7	2075	1502	20.5	1.1
Oats	14.416	0.8	1811	1774	26.1	1.3
Millet	36.161	14.5	752	812	27.2	11.8
Sorghum	42.805	12.5	1391	1055	59.536	

キビ(proso millet; *Panicum miliaceum* L.)の野生種の起源ははっきりしていないが、栽培は中国東北部で始まったようである。現在でもキビは中国北西部のいくつかの場所での主要作物であり、ロシア、ボルガ沿い、カザフスタンなどでも栽培されている。インドにおいても栽培がみられ、東ヨーロッパから日本にかけてはわずかながら見られる。Fig. 1-7に、これらのイネ科作物としての分類上の位置を示した。これらはキビ族の一年生草木であり、キビはキビ属(*Panicum*) $2n=36$ の4倍体である [58,59]。

雑穀の特徴としては、土壌や気候条件の悪い地域でも栽培可能であることが挙げられ、土壌が肥沃でない場所や雨量が少ない極端に乾燥した気候でも抵抗性が強い。

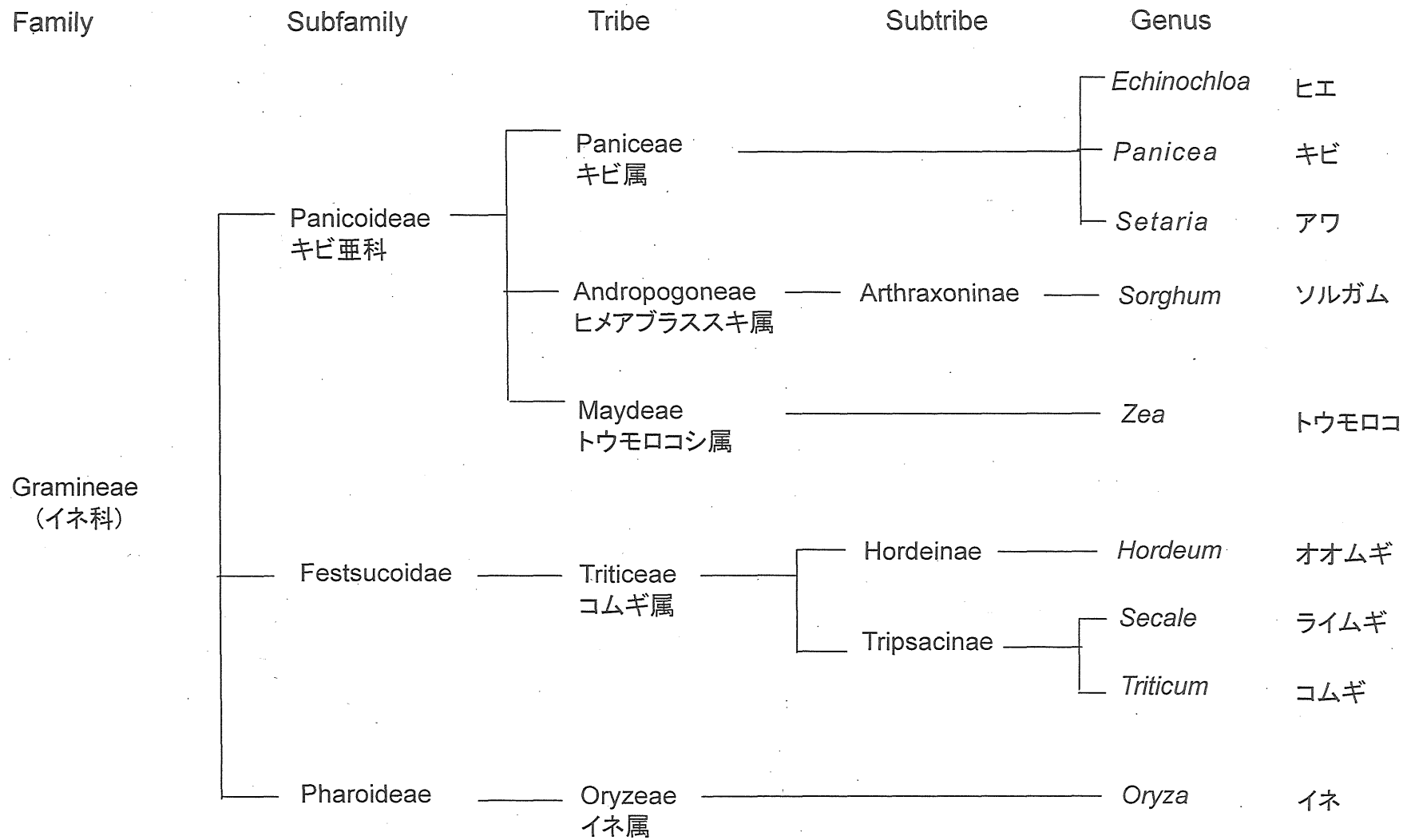


Fig. 1-7. Genetic relationships of cereal grains [58,59].

また、栽培期間中に病気や害虫によって害を受けることが比較的少なく、穂の状態で束ねて納屋に貯蔵しても害虫があまりつかずに長期間の保存がきく。更に、無農薬でも栽培可能ということが挙げられる。そのため現在でも、アジアやアフリカの重要な食糧源である。

雑穀は、栄養的な観点から見ると、コメ、コムギ、オオムギと比較して遜色なく、むしろミネラル、食物繊維含有量において雑穀のほうが優れているものが多い [64]。しかし、雑穀の健康機能を調べた研究は少ない。

雑穀の健康機能の研究として、Nishizawaらは、キビタンパク質をタンパク質源とした飼料を摂取させたラット及びマウスの血漿中の善玉コレステロール(HDL-コレステロール)濃度が、カゼインをタンパク質源とした飼料を摂取させたものと比較して有意に上昇することを報告している [65,66]。更にShimanukiらは、このHDL-コレステロール濃度の上昇が、主にHDLサブフラクションのHDL₂サブフラクションの増加によるものであることを示した [67]。このHDL₂サブフラクションが、主に動脈硬化症を防ぐ重要な働きがあることが分かっている。また、島貫はラットを用いてキビタンパク質濃縮物が、血漿中HDL-コレステロールのみならず、その主要構成アポリポタンパク質であるapo A-1濃度を上昇させることを報告している [68]。また、Nishizawaらは最近、ヒエタンパク質の摂取により、2型糖尿病モデルKK-A^yマウスで、血糖値の低下や、血漿中HDL-コレステロール及びアディポネクチンレベルが高まることを報告している [69]。

韓国における雑穀の栽培、消費についての情報は意外と知られていない。韓国では、雑穀が日本より生産され消費されており、古くからを雑穀が重要な穀物として栽培していることから、栽培歴史が古いと考えるが、伝来経緯は明らかではない。韓国の雑穀栽培面積は、1960年代は20.7万haが栽培されていたが、1970年代には10万ha、1990年代は3万ha、2001年には2万3千haまで減少し続けている [70]。しかし、最近では、主穀作物の補助作物としての価値、農業環境の多様性、機能性健康補助食品での活用度の増加などで、栽培面積が増えてきている。韓国人は菜食の伝統的な食習慣によって、西欧人に比べて食餌繊維を多く取っていると考えられるが、1969-1990年国民栄養調査報告書の“食品別1日1人当たり摂取量”の資料と日本人常用食品分析を土台とした結果によると、韓国国民の1人平均食物繊維摂取量は1969年では全国平均24.4gだったが小幅の増減を繰り返して漸次的に減少を見せていたが、20年間にわたり食物繊維の摂取量は、約30%もの減少を示している [71]。

Choiらは、韓国産アワタンパク質濃縮物をKK-A^yマウスに摂食させることによって、血漿中HDL-コレステロール及びアディポネクチンレベルの増加、また、インスリン濃度を低下することを示した [72]。現在韓国においては、アワ、キビ、豆などの雑穀は昔から庶民の食生活の責任を負う五穀として重要視されたが、最近健康への関心と栄養知識が深まることにより、その消費が増えてきている。従って、韓国の雑穀の機能性研究を行うことは、穀類を用いた機能性食品および健康補助食品の開発を促進する効果がある。しかし、韓国産キビの健康機能の研究は行われていない。

そこで本論文では、上述の1節、2節の食と健康の現状や現在メタボリックシンドロームの予防や改善、更にはその治療薬剤の開発で注目されているアディポサイトカイン、とりわけアディポネクチンの機能の研究成果の知見に注目して、韓国の南部の沿海部に位置する麗水が産地となっているキビの糖質、脂質代謝およびインスリン、アディポネクチン、遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

本論文は、次の内容で構成した。

第1章 緒論

第2章 キビ材料の調製

第3章 キビタンパク質濃縮物(PMP)がC57BL/6Jマウスの血糖値制御及び脂質代謝に及ぼす影響

第4章 キビタンパク質濃縮物(PMP)が肥満型2型糖尿病モデルKK-A^y系マウスの血糖値制御、脂質代謝、アディポネクチン、インスリンレベル及び脂肪組織での遺伝子発現に及ぼす影響

第5章 キビデンプン画分(PMS)が肥満型2型糖尿病モデルKK-A^y系マウスの血糖値制御、脂質代謝及びアディポネクチン、インスリンレベル、脂肪組織での遺伝子発現に及ぼす影響

第6章 高脂肪食餌条件におけるキビプロラミン(PMP_r)摂取が肥満2型糖尿病モデルKK-A^y系マウスの血糖値制御、脂質代謝及びアディポネクチン、インスリンレベル、脂肪組織での遺伝子発現に及ぼす影響

第7章 総合考察

なお、本論文中では、韓国産キビを、単にキビと称する。

第2章 材料の調製

キビは、イネ科キビ亜科キビ属の一年生草本で、アジア、北アフリカ、および南ヨーロッパにおいて、有史以前から栽培されていたものである [73]。韓国でのキビは種実が小さいため小粒雑穀類に含まれており、モチゴメ、小豆、ヒエ、アワなどとともに五穀ご飯で欠かせない雑穀である。

キビの主成分は炭水化物で、精白粒中に71.7%含まれている。タンパク質は全粒中に12%、精白粒中に10.6%含まれており米の含量のおよそ倍含まれているが [74]、品種によって8.56-17.94%と変動が大きい [64]。

そこで本研究では、精白キビ、キビタンパク質、キビデンプン画分およびキビプロラミン画分が糖質、脂質代謝改善機能の可能性を検討する前段階として、精白キビとキビタンパク質の濃縮、キビデンプン画分およびキビプロラミン画分の調製、またその成分分析の検討を行った。

しかし、タンパク質は全粒中に12%程度と低いため、キビを動物実験のタンパク質源として用いるために精白キビをアミラーゼとグルコアミラーゼによってデンプンを加水分解してタンパク質の濃縮を行った。

第1節 キビの一般成分の定量

1. 方法

キビ試料

キビは、2005年に韓国麗水市で生産された精白キビを用いた。精白キビを、穀物用粉砕機(「やまびこ号L型」、國光社(株);愛知)で粉砕してキビ粉末を得た。この粉末に、ヘキサン(一級、和光純薬工業(株);大阪)約10倍を加えて攪拌して脱脂し、3時間後に濾紙(500mm、ADVANTEC;東京)で濾過した。脱脂の操作を5回繰り返した後、粉末を風乾して試料とした。

一般成分の定量

脱脂してない精白キビを、以下に述べる方法によって、水分、粗タンパク質、粗脂肪、粗灰分、食物繊維を定量した。

1) 水分含量の測定

水分は常圧乾燥法によって測定した。

「方法」

アルミ秤量皿を、フタを取った状態で電気乾燥器(FC-410、ADVANTEC;東京)中に105°C、2時間乾燥した後、フタをしてデシケーター中で30分間放冷して精秤した。この操作を数回繰り返し、精秤値が±0.2mg以下になったときにこの値を秤量皿の恒量とした。恒量となった秤量皿に試料を約0.5g精秤して同様に恒量を測定し、試料重量の減少量から試料中の水分量を求めた。

2) 粗タンパク質の定量

粗タンパク質は、セミ-マイクロケルダール法によって試料中のN量を定量し、N定量値に窒素-タンパク質換算係数6.25を乗じて求めた。

「方法」

・ 窒素含量

試料約50mgをパラフィン紙に精秤して包み込み、パラフィン紙ごと50mlの分解ビンに入れた。混合触媒約200mgを濃硫酸約2mLに加え、分解ビンを軽く振り内容物を混ぜた後、電熱式マイクロケルダール窒素分解器(ELECTRIC HEATER ME-6、柴田科学器械工業(株);東京)で加熱した。内容物緑色透明になったことを確認した後、更に30分間沸騰させて加熱を終了した。放冷した分解液は、水蒸気蒸留装置中で30%水酸化ナトリウム約10mLを反応させた。遊離したアンモニアを、混合指示薬1滴を加えた2%ホウ酸約10mLでホウ酸アンモニウムとして補集した。このホウ酸アンモニウムはあらかじめ力価を求めておいた0.02N塩酸で中和滴定した。0.02N塩酸の力価、滴定量から窒素含量を算出した。

・ 粗タンパク質含量

窒素含量に窒素-タンパク質換算係数を乗じて粗タンパク質含量を求めた。キビ、カゼインの窒素-タンパク質換算係数は、それぞれ6.25、6.38として計算した。

3) 粗脂肪の定量

粗脂肪は、Soxhlet抽出器を用い、エーテル抽出法によって定量した。

「方法」

脂肪定量ビン(受器)を電気乾燥器中で105°C、2時間乾燥した後、フタをしたデシケータ-中で30分間放冷し、精秤した。これを数回繰り返し、精秤値が ± 0.2 mg以下になったときに、この値を受器の恒量とした。円筒濾紙(No.84)に試料約2gを精秤し、脱脂綿を円筒濾紙の上端に軽く3重につめ、そのまま電気乾燥機中で105°C、2時間乾燥した。放冷後、ソックスレー抽出器に入れ、恒量受器、抽出管にエーテルを入れ、冷却管、抽出管、受器を接続し、65°C湯浴(Constant Temperature Bath Type BA-62、ヤマト科学(株);東京)中に受器の底が浸る程度につけて加熱した。1分間80滴程度になるように更に温度を調節し、8時間抽出を続けた後、抽出管内の円筒濾紙を取り出した。受器中のエーテルを回収した後、更にエーテルを完全に気散させ、電気乾燥機の105°Cで乾燥させて恒量を求めた。恒量は、減少しつつある受器の重量が脂肪酸化のため再び増加し最低値を取るため、まず1時間乾燥させて重量を測定し、その後30分毎に重量を測定し、最低値を恒量とした。

4) 粗灰分の定量

粗灰分は、灰分による試料重量の減少量から定量した。

「方法」

ルツボを、フタを取った状態でマッフル炉中で550°C、2時間乾燥した後、フタをしてデシケータ-中で30分間放冷して精秤した。この操作を数回繰り返し、精秤値が ± 0.2 mg以下になった時にこの値をルツボの恒量とした。恒量となったルツボに試料を約1g 精秤して、105°Cで1時間予備乾燥した後、550°Cで乾燥して恒量を測定した。試料重量の減少量から試料中の粗灰分と求めた。

5) 食物繊維の定量

キビ精白中の食物繊維の定量は、日本食品分析センターに分析を依頼した。水溶性食物繊維と不溶性食物繊維に分画して定量するProsky変法 [75]により含有量を求めた。

6) 炭水化物の定量

炭水化物の定量は、水分、粗タンパク質、粗脂肪、粗灰分、食物繊維含有量の合計を100%から差し引きした値で示した。

アミノ酸分析

脱脂粉碎したキビ試料を塩酸によって加水分解し、ニンヒドリン比色法で定量した。しかし、この方法ではシステイン、メチオニン、トリプトファン分析はできない。従って、酸によって破壊されるシステインやトリプトファン、脱気が不十分だと酸化されるメチオニンは個別に定量した。

1) 酸加水分解によるアミノ酸の分析

タンパク質濃度200 μ g/mLの加水分解物試料を1mL以上調製した。試料10mgをパイレックス肉厚試験管(1.2 \times 16cm、肉厚2mm)に精秤した。これに6N塩酸1mL、また消泡剤としてn-オクタノールを1滴加えた。ドライアイスエタノールバス(EYELA ECS-80, 東京理化器械(株);東京)で凍結し、真空ポンプで脱気した後、試験管を封管した。これをアルミブロックバス内に入れ、110 $^{\circ}$ Cで24時間加水分解を行った。加水分解後に開管し、五酸化ニリンと水酸化ナトリウム存在下の真空デシケーターに試験管を2日間入れて塩酸を除いた。肉厚試験管中で乾固した試料を適当量のpH2.2のクエン酸緩衝液1mL溶解した後、6,200 \times gで10分間遠心分離(Himac CR-150, Hita-

chi Co., Ltd.;東京)した。上清をタンパク質濃度200 μ g/mL濃度で製造して、フィルター(0.45 μ m、ADVANTEC;東京)をつけたシリンジで濾過しアミノ酸分析用試料バイアルに入れ、分析を行った。

2) 加水分解物のアミノ酸分析 (アミノ酸自動分析機)

加水分解物のアミノ酸分析には、イオン交換クロマトグラフィーにより分離、溶出されたアミノ酸をニンヒドリン発色により比色定量するアミノ酸自動分析機(JEOL JLC-500、日本電子;東京)を用いた。

「方法」

・ アミノ酸基準試薬の製造

全分析のための標準試料はアミノ酸自動分析用アミノ酸標準液H型 (和光純薬工業(株);大阪)を希釈液で25倍に希釈し、100nmol/mLに製造したものをを用いた。含流アミノ酸分析のための標準試料は、アミノ酸標準液H型、システイン酸2.5mol/mL、メチオニンスルホン2.5mol/mLを1mLずつ25mLメスフラスコに取って希釈液でフィルアップし、アミノ酸濃度100nmol/mLとなるように調整し、これをアミノ酸標準試料とした。

・ 希釈液の調製

アミノ酸自動分析器で用いる第1緩衝液を濃塩酸でpH2.2に調整したものをを用いた。

3) 含硫アミノ酸の分析 [76]

塩酸によるタンパク質の加水分解を行った場合、システインは破壊されて定量できない。また、メチオニンも脱気が不十分な場合、一部がメチオニンスルホキシドやメチオニンスルホンに酸化され低くなる。そのためシステインやメチオニン等の含硫アミ

ノ酸の定量を行う場合、あらかじめシステインおよびメチオニンを過ギ酸で酸化して安定化した後、システイン酸、メチオニンスルホンに変化させ測定する必要がある。

(1) システインやメチオニン分析

「方法」

試料10mgをパイレックス肉厚試験管(1.2×16cm、肉厚2mm)に精秤した。これに水中で過ギ酸1mL加え、氷上で一晩インキュベーションし、含硫アミノ酸の過ギ酸酸化を行った。インキュベーション後、47%臭化水素酸0.15mL加え、過剰の過ギ酸を分解した。この反応が終了した後、試験管をタイゴンチューブでロータリーエバポレーター(EYELA、凍結理科器械(株);東京)に接続し反応液を濃縮、乾固し、五酸化ニリンと水酸化ナトリウム存在下の真空デシケーターに試験管を2日間入れて過ギ酸を除いた。過ギ酸酸化した試料に速やかに6N塩酸1mL加えて減圧封管後、アルミブロックバス内に入れ110°Cで24時間加水分解を行った。加水分解後に開管し、五酸化ニリンと水酸化ナトリウム存在下の真空デシケーターに試験管を2日間入れて塩酸を除いた。肉厚試験管中で乾固した試料を適量のpH2.2のクエン酸緩衝液1mLで溶解した後、6,200×gで10分間遠心分離(Himac CR-15D)した上清をタンパク質濃度200μg/mLの濃度で製造して、フィルター(0.45μm、ADVANTEC;東京)をつけたシリンジで濾過しアミノ酸分析用試料バイアルに入れ、分析を行った。

4) トリプトファンの測定 (p-ジメチルアミノベンズラウデヒド (p-DMBA)) [77]

塩酸によりタンパク質の加水分解を行った場合、トリプトファンは、そのほとんどが破壊されるため定量することが不可能である。そのため、タンパク質をアルカリで加水分解した後、p-ジメチルアミノベンズラウデヒド(p-DMBA)法により、トリプトファンの

濃度の測定を行った。

「方法」

・ 試料の調製

試料を10mgパイレックス肉厚試験管(1.2×16cm、肉厚2mm)に精秤した。これに5N水酸化ナトリウム2mLを少量ずつ加え、更に消泡剤としてn-オクタノールを1滴加えた。ドライアイスエタノールバスで凍結しない程度に冷却し、真空ポンプで脱気した後、封管し、アルミブロックバス内に入れ110℃で24時間加水分解した。開管してパスツールピペットを用いて8N塩酸を少量ずつ加えて中和した。pH試験紙で慎重に中和を確認し、中和点付近は4N塩酸で調整した。3,550 × gで10分間遠心分離(Himac CR-15D)した後、上清を10N水酸化ナトリウム1mLの入れた10mLメスフラスコに移した。同様の操作を計3回行った後、水で10mLにフィルアップした。これをトリプトファン分析用試料とし、p-DMBA法によりトリプトファン濃度を測定した。

・ p-DMBA法

上記の要領で調整したトリプトファン分析用試料1mLにp-DMBA15mgを含む21.4N硫酸を4.5mL加え、よく混合した後、25℃で90分間 光放置した。次に、0.045%亜硝酸ナトリウム50μL加えてよく攪拌した後、25℃で30分光放置した。分光光度計で波長590nmにおける吸光度を測定し、トリプトファン濃度を求めた。ブランクとして1N水酸化ナトリウムを用い、あらかじめ作成した検量線からトリプトファン濃度を求めた。トリプトファン検量線は、次のように作成した。トリプトファンを1N水酸化ナトリウムで溶解し、0-30μg/mLのトリプトファン溶液を調製した。この溶液を上記の方法で測定し、検量線を作成した。

タンパク質組成の分析

タンパク質の抽出

キビタンパク質のタンパク質の組成を調べるために、次のようにタンパク質を溶媒抽出した。脱脂粉碎したキビ試料はLandry-Moureaux [78]による溶媒分画に基づき、5画分のタンパク質として、次の様に抽出した。

1) アルブミン・グロブリン

試料の10倍量の0.5M NaClを加えて4°C、1時間攪拌抽出した後、15,600×gで遠心分離(LC-230、トミー精工(株);東京)して上層を得た。更に残渣に同量の水を加えて4°C、1時間攪拌抽出し、遠心分離により上清を回収した。以上で得られた水溶性画分を脱塩した後、凍結乾燥した。

2) プロラミン

アルブミン・グロブリンの抽出残渣に10倍量の70%(v/v)イソプロパノール(特級、和光純薬工業(株);大阪)を加えて室温で1時間攪拌抽出した後、遠心分離により上清を回収し、ロータリーエバポレーターに減圧乾固した。

3) プロラミン様タンパク質

プロラミンの抽出残渣に0.6%のメルカプトエタノール(2-ME)(和光純薬工業(株);大阪)を含む70%(v/v)イソプロパノールを同量の水を加えて室温で30分攪拌抽出した後、上清を減圧乾固した。

4) ゲルテリン様タンパク質

プロラミン様タンパク質の抽出残渣に0.6%の2-MEを含む0.1Mホウ酸緩衝液(pH 10)を同容量加えて室温で1時間抽出した後、遠心分離により上清を回収し、透析した後、凍結乾燥した。

5) グルテリン

グルテリン様タンパク質の抽出残渣に0.6%の2-MEを含む0.1Mホウ酸緩衝液(pH10)にSDSを0.5%となるように加えたものを抽出溶媒とし、室温でグルテリン様タンパク質の抽出残渣を1時間攪拌抽出した後、透析し、凍結乾燥した。

粗タンパク質の定量

タンパク質抽出物中の粗タンパク質の定量は、キビ精白粗タンパク質の定量と同様で行った。

第2節 キビタンパク質濃縮物の調製および一般成分の定量

1. 方法

キビタンパク質の調製

試料は、2005年に韓国麗水市で生産された精白キビを用いた。精白キビを超遠心粉砕機(「やまびこ号L型」)で粉砕して、キビ粉末と得た。キビ粉末400g当たり蒸留水4Lを加え、90°Cで1時間加熱して糊化した。試料の温度が60°Cまで下がった後、グルコアミラーゼ(エンチロン GA-4、洛東北成工業(株);滋賀)1.4mLと蒸留水に溶解させた α -アミラーゼ(ラクターゼ SR-40、エンチロン GA-4、洛東北成工業(株))340mgを同時に加えて攪拌した。60°Cで24時間保温し、デンプンの α -1,4、 α -1,6グリコシド結合を加水分解した。反応物を7,700×gで8分間遠心分離(LC-230)して得られた沈殿物を凍結乾燥機(RLE II-103、共和真空技術(株);埼玉)で凍結乾燥した。乾燥後の粉末にヘキサン約2.5Lを加えて攪拌して脱脂し、3時間後に濾紙(500mm、ADVANTEC;東京)で濾過した。脱脂の操作を5回繰り返した後、残渣を風乾して、キビタンパク質濃縮物を得た。このキビタンパク質濃縮物をproso millet protein concentrate (PMP)と表記する。

一般成分の定量

一般成分の定量は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

1) 水分含量の測定

水分含量の測定は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

2) 粗タンパク質の定量

粗タンパク質の定量は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

3) 粗脂肪の定量

粗脂肪の定量は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

4) 粗灰分の定量

粗灰分の定量は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

5) 食物繊維の定量

食物繊維の定量は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

6) 炭水化物の定量

炭水化物の定量は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

アミノ酸分析

アミノ酸分析は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

1) 酸加水分解によるアミノ酸の分析

酸加水分解によるアミノ酸の分析は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

2) 加水分解物のアミノ酸分析 (アミノ酸自動分析機)

加水分解物のアミノ酸分析には、第2章、第1節と同様の方法で行った。

3) 含硫アミノ酸の分析

塩酸による含硫アミノ酸の分析は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

(1) システインやメチオニン分析

システインやメチオニン分析は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

4) トリプトファン₁の測定 (p-ジメチルアミノベンズラウデヒド(p-DMBA)) [77]

トリプトファン₁の濃度の測定は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

タンパク質組成の分析

タンパク質の抽出

タンパク質の抽出は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

1) アルブミン・グロブリン

アルブミン・グロブリンの抽出は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

2) プロラミン

プロラミンの抽出は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

3) プロラミン様タンパク質

プロラミン様タンパク質の抽出は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

4) グルテリン様タンパク質

グルテリン様タンパク質の抽出は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

5) グルテリン

グルテリンの抽出は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

粗タンパク質の定量

タンパク質抽出物中の粗タンパク質の定量は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

第3節 キビデンプン画分の調製

1. 方法

キビの機能成分を調べるために、次のようにキビデンプン画分を調製した。試料は、第2章、第1節と同様のキビを用いた。キビデンプン画分は、人工消化率の測定法 [79] を応用して精白キビのタンパク質を酸性条件下でペプシンにより分解し、遠心分離して得られた沈殿物をキビデンプン画分とした。このキビデンプン画分を proso-millet starch preparation (PMS)と表記する。

「方法」

精白キビを穀物用粉砕機（「やまびこ号L型」）で粉砕してキビ粉末を得た。キビ粉末400g当たり0.075N HClを4L加え、ペプシンをキビ粉末のタンパク質含量の約1.0%となるように加え37°Cで24時間反応させた。上清を捨てた後、3,000×gで5分間遠心分離(LC-230)して得られた沈殿物をMQ水に洗浄するという作業を中性になるまで繰り返し、反応物を8,000×gで10分間遠心分離して得られた沈殿物を凍結乾燥(RLE II-103、共和真空技術(株); 埼玉)してキビデンプン画分を調製した。

キビデンプン画分のResistant starchの定量 [80]

Resistant starchはResistant starch assay kit (MEGAZYME; Wicklow, Ireland)を用いて測定を行った。これはα-アミラーゼとアミログルコシダーゼにより non resistant starchを分解、可溶化し、resistant starchを沈殿として回収し、これをKOHで可溶化させ、アミログルコシダーゼで加水分化して生成したグルコースを比色定量するものである。

「方法」

試料を50mg精秤し、 α -アミラーゼとアミログルコシダーゼを2mL加えて、37°Cで16時間インキュベートし、3,500×gで10分遠心した。上清を捨て50%エタノールを加えて再度、遠心し上清を捨てた後、沈殿に2M KOH 1mL加え再懸濁し、1.2M酢酸ナトリウム緩衝液4mLとアミログルコシダーゼ50mL加え、50°Cで30分インキュベーションした。3,500×gで10分遠心し、上清を試験管に50mL取り、グルコースオキシダーゼ／ペルオキシダーゼ試薬を1.5mL加え、50°Cで20分インキュベーションし、510nmの吸光度を測定した。スタンダードとしてキットの標準液を用い、ブランクにはMQ水を用いた。

粗タンパク質の定量

タンパク質抽出物中の粗タンパク質の定量は、第2章、第1節と同様の方法で行った。

第4節 キビプロラミン画分の調製 [81]

1. 方法

脱脂キビ粉100gに0.5M NaClを800mL加え、室温で2時間攪拌し、8,000×gで遠心分離して上清を除いた。次に蒸留水を250mL加えて室温で1時間攪拌し、同様に遠心分離して上清を除いた。もう一度蒸留水による洗浄を同様に実施した。得られた沈殿に対して70%イソプロパノールを500mL加えて60°Cで1時間、攪拌抽出した。同様にして遠心分離し、上清をエバポレーターの減圧下で溶媒を除去し、残った水分を除くために凍結乾燥したものをプロラミン試料とした。このキビプロラミン画分をproso-millet prolamin preparation (PMP_r)と表記する。抽出したプロラミン試料のタンパク質含量は第1節と同様に窒素量を測定して算出した。

2. 結果

一般成分

精白キビ粉末、キビタンパク質濃縮物の水分、粗タンパク質、粗脂肪、灰分、食物繊維を定量した結果はTable 2-1に示した。また、日本食品成分表に記載されているカゼインの値と比較した。

水分含量は、精白キビが11.2%、PMPが4.2%で約2倍減少したが、粗タンパク質含有量は精白キビで12.4%、PMPでは精白キビのタンパク質を濃縮することにより54.4%まで高まった。

灰分、粗脂質は精白キビで1.4%、4.4%、PMPで2.8%、6.7%とPMP群で高い値を示した。食物繊維は、ほとんど不溶性食物繊維であったが、その含有量は精白キビで3.7%、PMPで12.3%であった。精白キビとPMPはカゼインより、脂肪含量は3-4倍前後、食物繊維含量は3-12倍前後の値を示した。

アミノ酸組成

精白キビ粉末、キビタンパク質濃縮物のアミノ酸組成をTable 2-2に示した。また、比較のため、カゼインのアミノ酸組成を示した。

全体的に精白キビとPMP間のアミノ酸組成はほとんど差がなかった。精白キビとPMPの主要アミノ酸はグルタミン酸、ロイシン、アラニンであることが明白である。

グリシンとアラニンはカゼインと比べて2-4倍高い値を示したが、バリン、メチオニン、チロシン、リジンは低い値を示した。

Table 2-1. Composition of proso millet grain, protein concentrate and casein (%)

Component	PM ¹	PMP ²	Casein [*]
Moisture	11.2	4.2	10.6
Protein	12.4	54.4	86.2
Ash	1.4	2.8	1.7
Carbohydrate ³	70.6	31.9	-
Fat	4.4	6.7	1.5
Insoluble dietary fiber	3.0	11.6	-
Soluble dietary fiber	0.7	0.7	-
Total dietary fiber	3.7	12.3	-

Values of protein, ash, moisture, carbohydrate and fat show means for 4 measurements.

¹Milled grain

²Korean proso-millet protein concentrate

³Non-fibrous carbohydrate by difference

^{*}Standard tables of food composition in Japan, 5th ed. (2001) [82].

Table 2-2. Analysis of amino acid in proso millet, protein concentrate and casein (mg/Ng)

	Amino acid (mg/Ng)																
	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Cys	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro
PM ¹	443	245	320	1443	312	884	361	44	116	291	801	166	255	104	62	101	5
PMP ²	372	315	343	1465	236	911	268	51	127	208	682	158	269	130	54	123	6
Casein*	460	270	340	1400	120	200	440	32	200	360	620	370	340	530	200	240	750

Values of amino acid show means for 3 measurements.

¹Milled grain

²Korean proso-millet protein concentrate

*Standard tables of food composition in Japan, 5th ed.(2001) [82].

キビのタンパク質の組成

精白キビ粉末、キビタンパク質濃縮物のタンパク質の構成を溶媒抽出法によって調べた結果を、Table 2-3に示した。キビの主要構成タンパク質はグルテリンで、グルテリンとプロラミンを合わせて、その総量は精白キビで88.2%、PMPで85.2%であった。

Table 2-3. Analysis of protein fraction in proso millet grain, protein concentration (%)

Cereal	Protein content	Protein fraction (% of total protein)					Recovery
		Albumin-globulin	True prolamins	Prolamin-like	Glutelin-like	True glutelin	
PM ¹	12.4	3.8	10.6	3.8	59.3	14.5	92.1
PMP ²	54.4	4.2	14.9	1.3	58.8	10.2	88.8

Values of protein show means for 3 measurements.

¹Milled grain

²Korean proso-millet protein concentrate

キビデンプン画分の成分組成

キビデンプン画分の成分組成を調べた結果は、Table 2-4に示した。キビデンプン画分中総スターチ含量は64.1%で、その中レジスタントスターチは約2.5%の、タンパク質は2.7%が含まれていることを確認した。

Table 2-4. Composition of starch in proso millet (%)

Component	PMS ¹
Total starch	64.1
Resistant starch	2.5
Protein	2.7

Values of starch and protein show means for 3 measurements.

¹Proso millet starch concentrate

3. 考 察

本章では、今後動物実験に用いる精白キビ、キビタンパク質濃縮物、キビデンプン画分およびキビプロラミン画分の調製と一般成分の分析を行った。

精白キビの粗タンパク質は12.4%と低いため、動物実験ではタンパク質濃縮物を用いる必要がある。濃縮によって、キビタンパク質濃縮物中の粗タンパク質含量は54.4%で約4倍増加し、同条件で濃縮した韓国アワおよび黒ヒエタンパク質と同等であった [83,84]。しかし、二戸キビのタンパク質濃縮物のタンパク質含量が73%であったことと、韓国キビタンパク質濃縮物中31.9%の炭水化物が分解されずに残存していることから、レジスタントスターチが多くは含まれている可能性も少なくはないと思われる。レジスタントスターチは、2型糖尿病患者でのインスリン抵抗性を改善 [85]、小腸でのコレステロール吸収を抑制し、血清中のコレステロール濃度を低下させることが報告されている [86]。

キビタンパク質濃縮物には、食物繊維含有量は12.3%と高い含量であったが、ほとんどが不溶性食物繊維であった。水溶性食物繊維は、精白キビとキビタンパク質濃縮物間有意な差はなかった。

不溶性食物繊維の摂取は、糞中コレステロールと胆汁酸の排泄量を増加させることによるコレステロール低下効果が報告されている [87,88]。このことから、キビタンパク質濃縮物中の不溶性食物繊維が脂質代謝に何らかの影響を与える可能性もあると考えられる。

キビのアミノ酸組成では、グルタミン酸、アラニンおよびロイシン含量が、特に高い値であった。しかし、リジンの含量は非常に低い値であった。一般に、穀類の必須アミノ酸のうち、最も不足するアミノ酸 (制限アミノ酸)はリジンである。キビのアミノ酸組成は、リジン含量が低く、ロイシン、アラニンの含量が高い特色がある [89]。このア

ミノ酸組成は、アワのアミノ酸組成と類似している [72]。

必須アミノ酸のリジン含量について、ひとつの穀類の中で、タンパク質含量とタンパク質中のリジン含量との間に負の相関を示すことが知られており、雑穀についてもアワで同様の傾向が見られる。これはタンパク質の含量の増加に伴って、リジン含量の少ないプロラミンの比率が増加するからであると考えられている [89]。

従って、プロラミンを多く含むキビ型穀類においては、窒素施肥などによってタンパク質含量を高めても、そのアミノ酸組成を改善 (高リジン含量) できないことになる。

穀類のタンパク質は、その画分タンパク質として、アルブミン(水可溶性タンパク質)、グロブリン(中性塩可溶性タンパク質)、グルテリン(希酸・希アルカリ可溶性タンパク質)およびプロラミン(70-80%アルコール可溶性タンパク質)の4種類からなっている [90]。全タンパク質中の画分タンパク質の割合をみると、キビ型穀類ではグルテリンとプロラミンがそれぞれ70%、15%含まれ、この2つの画分タンパク質が全タンパク質の約80%を占めていた。

プロラミンは、アルブミン、グロブリンと比較して、リジン、アルギニン、グリシン含量が低く、アラニン、メチオニン、ロイシンに富んでいる [91]。アミノ酸は、インスリンおよびグルコースの恒常性に影響を与え、その内ロイシンとイソロイシンがインスリンとグルコースの恒常性を改善させることが報告されている [92,93]。しかし、カゼインとキビタンパク質のロイシン、イソロイシンにはほとんど差がなかったため、キビタンパク質濃縮物中のアミノ酸による血漿中のグルコース、またはインスリン抵抗性改善機能などは期待されにくい。

キビデンプン画分には約2.5%のレジスタントスターチと2.7%のレジスタントタンパク質が含まれていて、その量が微量でレジスタントスターチの影響なのかあるいはレジスタントタンパク質の可能性なのかについてのさらなる検討が必要だと考えられる。

以上の成分分析の結果を、第3章以後の動物実験に用いる飼料の組成に参考して、

キビタンパク質濃縮物の摂取が、高コレステロール血症を誘導した2型糖尿病モデルマウスにおける血糖値制御、脂質代謝およびインスリン、アディポネクチン、遺伝子発現に及ぼす効果を検討した。