

肝臓の糖質代謝リズムに関する研究 (2)

～食餌蛋白質量の影響について～

出口佳奈絵*1・保手濱由基*1・国信 清香*2・中田 麻衣*1
佐野 尚美*1・加藤 秀夫*1・西田 由香*1

緒 言

先行研究では、「食と健康」を考えるうえで、いつ、何を食べるかという時間栄養学の観点から、肝臓を中心とした糖質代謝リズムの発現に対する摂食時刻の大切さを明らかにした¹⁾。

高等動物は、生活環境の変化に適応するシステムとして、生まれながらにして生体リズムが備わっており、自律神経や内分泌などの生体調節系を介して生命活動を維持している。生体リズムの発現には規則正しい食生活の他に、栄養の質と量の影響も検討する必要がある。

生体の構成成分として重要な蛋白質は、様々な働きに関わっており生命活動に不可欠であるが、蛋白質の過剰摂取から生じた余分なアミノ酸の多くが、肝臓でグルコースに合成されて、各臓器の糖質エネルギー源として利用される。糖質代謝を補助するうえで蛋白質は欠かせない栄養素成分の一つである。これまで、肝臓における糖質代謝リズムの形成に食餌蛋白質が重要であることは間接的に知られているが、直接的に観察された研究はほとんどない。

本研究では、食餌蛋白質の量的な違いによる肝臓での代謝動態への影響を調べるために門脈と肝静脈から採血を行い、糖質代謝のリズム発現における食餌蛋白質の生理的役割を検討した。また、糖質代謝に関わるアディポサイトカインと体脂肪量との関係についても併せて検討した。

方 法

1. 実験動物の飼育条件と採血方法

Wistar系9週齢の雄ラットを低蛋白質食群、普通蛋白質食群、高蛋白質食群の3群に分け、それぞれの蛋白質エネルギー比を5%、20%、35%とした。実験食のエネルギー組成比を図1に示した。食餌は暗期(9:00～21:00)の10:00～16:00に摂食させ、約1ヶ月間飼育した後、8:00、13:00、18:00、23:00の各時刻に各群5匹ずつ解剖を行った。解剖時には、門脈と肝静脈より同時採血を行い、肝臓および筋肉と4種類の内臓脂肪(腎臓周囲、副睾丸、後腹壁、腸間膜)を採取した。血液と肝臓および筋肉は、分析に用いるまで-80℃で凍結保存した。

	蛋白質 (%)		
低蛋白質食	5	20	75
普通蛋白質食	20	20	60
高蛋白質食	35	20	45

注: 脂肪と糖質の組成比は、蛋白質の割合が5%、20%、35%の場合それぞれ20%、20%、20%である。

図1. 実験食のエネルギー組成比

*1 県立広島大学

*2 安田女子大学

2. 測定方法

1) 血中アルブミン

BCG法に基づいて、A/G B-テストワコー（和光純薬工業）で測定した。

2) 血中尿素

ウレアーゼ・インドフェノール法に基づいて、尿素窒素B-テストワコー（和光純薬工業）で測定した。

3) 血糖

酵素法に基づいて、グルコースC II-テストワコー（和光純薬工業）で測定した。

4) 肝臓グリコーゲン

グリコーゲン以外の肝臓成分を強アルカリで加水分解し、残ったグリコーゲンを塩酸に溶かして沸騰湯中で加水分解した後、生成されたグルコースをグルコースC II-テストワコー（和光純薬工業）を用いて測定した。

5) 筋肉グリコーゲン

グリコーゲン以外の筋肉成分を強アルカリで加水分解し、残ったグリコーゲンはフェノール硫酸法で測定した。

6) 血中レプチン

EIAサンドイッチ法に基づいて、ラットレプチン測定キット（森永生科学研究所）を用いて測定した。

7) 血中アディポネクチン

ELISA法に基づいて、ラット・アディポネクチンELISAキット（医学生物学研究所）を用いて測定した。

3. 統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。同時刻における群間比較と同食餌条件下における経時変化の比較には一元配置分散分析を行い、有意差を認めた場合にはTukey HSD法による多重比較検定を行った。統計解析には統計用ソフトウェア（PASW Statistics 18 for Windows；SPSS Japan Inc.）を用い、有意水準を5%未満とした。

結 果

ラットに5%、20%、35%の蛋白質を一定時刻に与えて、食餌蛋白質量の違いによる体重への影響を調べた（図2）。高蛋白質食群と普通蛋白質食群では同レベルの体重増加を示したが、低蛋白質食群では実験開始時の体重を維持したままで、他の2群に比べるとほとんど増加しなかった。低蛋白質食群の摂取量は他の2群と比べて低かった。実験開始時からこの差があったので食餌蛋白質量の違いによる味覚の差が考えられた。しかし、飼育期間の後半になると、摂食量の差が少なくなり同レベルまで上昇し安定した（図3）。

血液生化学成分の日内リズム

蛋白質の栄養状態を示す指標である血中アルブミンは、低蛋白質食群で他の2群に比べ有意に($p<0.05$)低下した（図4）。いずれの群も摂食による血中アルブミンの増加と日内変動はなかった。蛋白質・アミノ酸の最終代謝産物である血中尿素は、摂食前の空腹時に低く、摂食によって増加する日内変動が認められた（図5）。すべての時間帯において血中尿素は蛋白質の摂取量に比例して高く

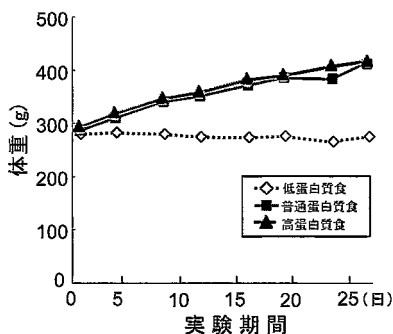


図2. 食餌蛋白質量の違いによる体重への影響

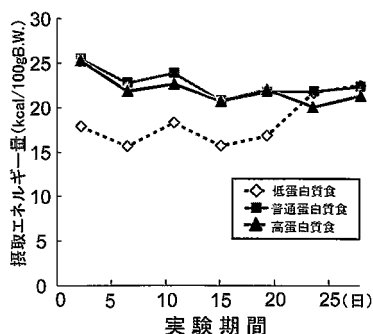


図3. 食餌蛋白質量の違いによる摂取エネルギーへの影響

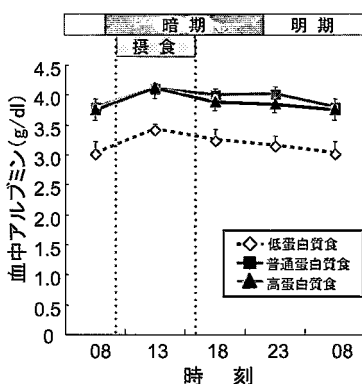


図4. 食餌蛋白質量の違いによる血中アルブミンの日内リズムへの影響

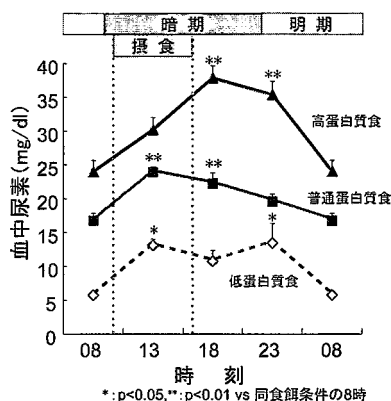


図5. 食餌蛋白質量の違いによる血中尿素の日内リズムへの影響

なり ($p<0.05$)、特に高蛋白質食群は常に尿素合成が持続しており、翌朝の空腹時(8時)においても血中尿素が高いレベルのままであった。

肝臓における糖質代謝リズム

食餌蛋白質の違いによる門脈と肝静脈中の血糖リズムは図6に示した。低蛋白質食群における門脈の血糖は、摂食により著しく上昇し、その後下降する日内変動がみられた。一方、肝臓から放出された肝静脈の血糖は、すべての群で正常範囲内に調節されていた。図7は、肝臓に入る前の門脈血糖から肝静脈血糖を差し引いた血糖値差、つまり肝臓での糖質代謝の動態を示した。摂食直後は、いずれの群も正の値を示し、常に肝臓に糖が取り込まれていた。逆に、摂食開始から13時間後の23時と空腹時の8時には、血糖値差が負の値を示す日内リズムが認められた。食後8時間に相当する18時には、普通蛋白質食群と低蛋白質食群で正の値(糖質の利用)を示したのに対し、高蛋白質食群では負の値(糖新生)を示したことから、高蛋白質食群のみ余剰な蛋白質を処理するために肝臓での糖新生が促進されていた。

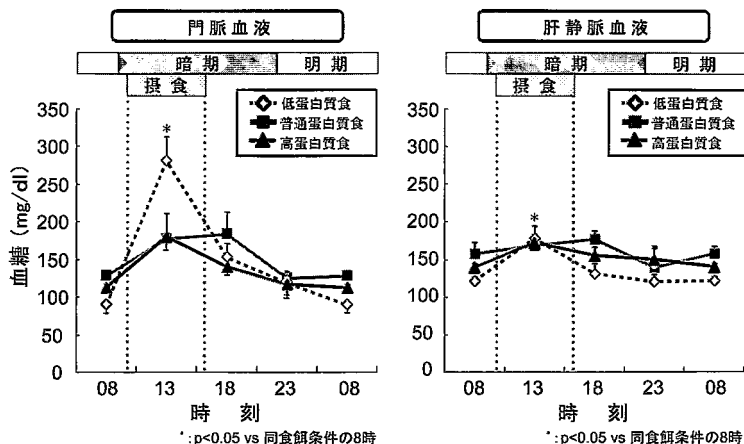


図6. 食餌蛋白質量の違いによる血糖の日内リズムへの影響

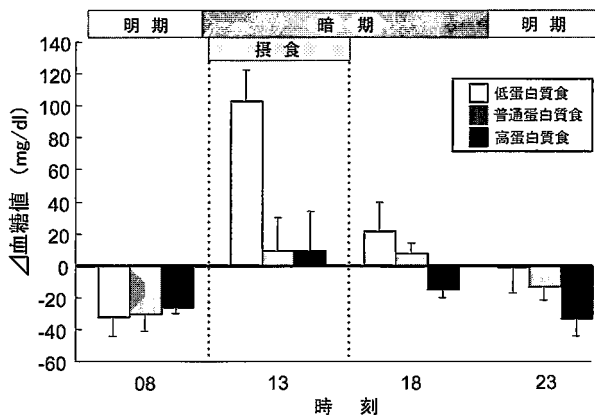


図7. 肝臓における糖質代謝リズム
△(門脈-肝静脈)

肝臓と筋肉グリコーゲンの代謝リズム形成

食餌蛋白質含量の違いによる肝臓グリコーゲンの日内リズムは図8に示した。肝臓グリコーゲンは空腹時と摂食直後に低く、18時から23時に上昇し、翌朝8時にかけて低下する日内変動が認められた。低蛋白質食群の肝臓グリコーゲンは、すべての時間帯で高蛋白質食群に比べて高値を示した ($p<0.05$)。空腹時の肝臓グリコーゲン量は、蛋白質含量の増加に伴って低くなる傾向があっても、有意差はなかった。

図9は、食餌蛋白質含量の違いによる赤筋（ヒラメ筋）と白筋（長指伸筋）のグリコーゲンの日内リズムを示した。空腹時（8時）の筋肉グリコーゲンは、赤筋・白筋ともに食餌蛋白質量に関係なく、どの群も同レベルを示した。摂食3時間後（13時）と摂食8時間後（18時）の赤筋グリコーゲンは、すべての群で空腹時（8時）に比べて有意に増加し、その後減少する典型的な日内リズムが認められた。一方、白筋グリコーゲンは、低蛋白質食群の食後のみわずかに増加しただけで、明らかな日内変

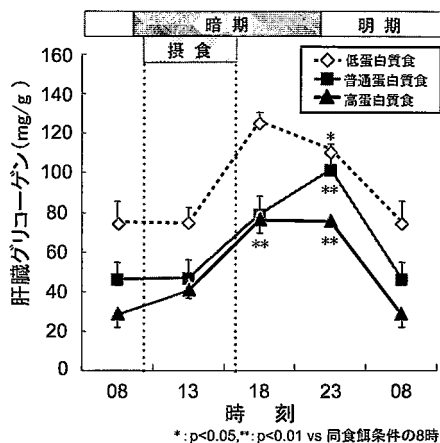


図8. 食餌蛋白質量の違いによる肝臓グリコーゲンの日内リズムへの影響

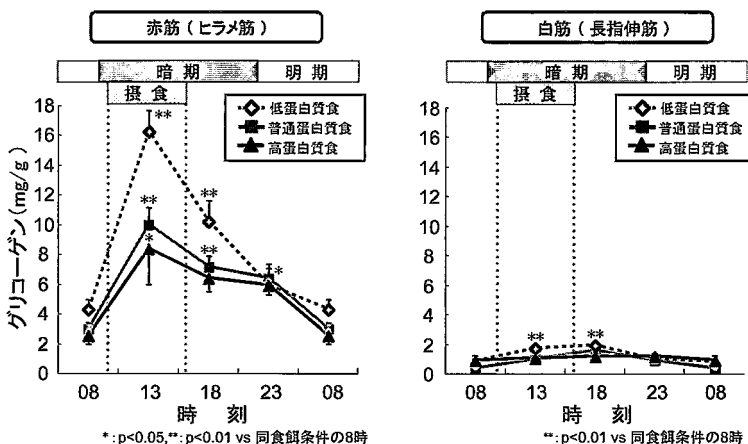


図9. 食餌蛋白質量の違いによる筋肉グリコーゲンの日内リズムへの影響

動はなかった。また、食餌蛋白質量の違いによる摂食後の赤筋グリコーゲンを調べてみると、低蛋白質食群では他の2群に比較して高く、普通蛋白質食群と高蛋白質食群との間に差がなかった。

アディポサイトカインの日内リズム

図10は、食欲調節ホルモンである血中レプチンの日内リズムを示した。いずれの群においても空腹時(8時)に低く、摂食によって増加する日内リズムが認められた。低蛋白質食群では、すべての時間帯で他の2群に比べて低値を示したことから、低蛋白質食では十分に食欲が満たされていないことが考えられる。図11は、血中レプチンと体重100gあたりの体脂肪量の関係を示した。体脂肪量は、腎臓周囲、副睾丸、後腹壁、腸間膜の4種類の内臓脂肪量の合計で表した。血中レプチン濃度は、脂肪組織量との有意な正相関が認められ、低蛋白質食群の血中レプチン低下には、体脂肪量の減少が関与していると考えられる。

図12は、血中アディポネクチンの日内リズムを示した結果である。いずれの群においても、摂食に

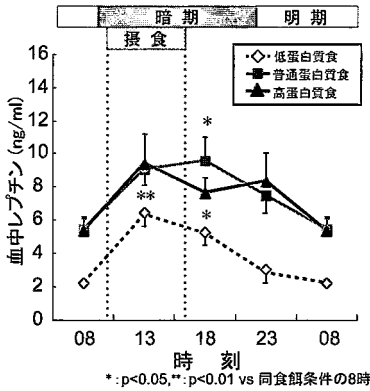


図10. 食餌蛋白質量の違いによる血中レプチンの日内リズムへの影響

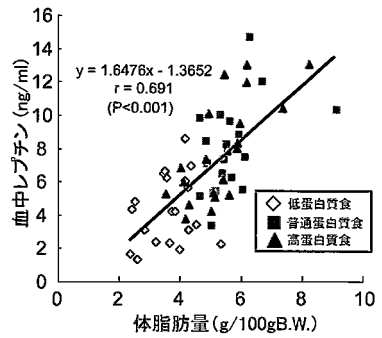


図11. 血中レプチンと体脂肪量の相関

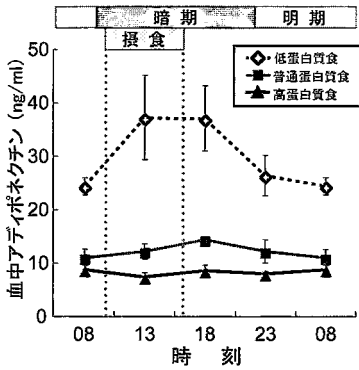


図12. 食餌蛋白質量の違いによる血中アディポネクチンの日内リズムへの影響

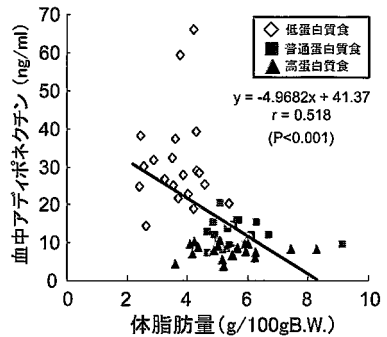


図13. 血中アディポネクチンと体脂肪量の相関

伴う明確な日内リズムは認められなかった。低蛋白質食群の血中アディポネクチン濃度は、すべての時間帯において普通蛋白質食・高蛋白質食群よりも有意に高いレベルを持続していた ($p < 0.01$)。図13に、血中アディポネクチン濃度と体重100gあたりの体脂肪量との相関関係を示した。体脂肪量が多くなるほど、アディポネクチン濃度は低下する有意な負の相関が認められた。

考 察

本研究は、食餌蛋白質の量的な違いによる肝臓での糖質代謝リズムへの影響について調べるために、門脈と肝静脈中の血糖値差を数値化し、肝臓の糖代謝動態を検討した。摂食直後は食餌蛋白質の割合に関係なく肝臓に糖が取り込まれるが、摂食前の空腹時は肝臓での糖新生が確認され、先行研究と類似した結果が得られた¹⁾。食餌蛋白質含量の違いによる糖質代謝への影響は糖質摂取量とも関連しており、摂食後の時間経過に伴う糖新生への切り替わり時刻に違いが認められた。糖質含量の少ない高蛋白質食では、食後2時間の早い段階(18時)から糖新生に切り替わっていた。また、食後7時間頃(23

時)には、蛋白質エネルギー比の増加に伴って肝臓での糖新生の割合が大きくなった。高蛋白質食では、摂食後の肝臓グリコーゲン蓄積量が少ないことから、糖原性アミノ酸による糖新生が亢進したと考えられる。摂取したアミノ酸が体タンパク質の合成素材として利用されるか、エネルギー源として異化されるかは、生体内における蛋白質の必要性によって決まる。過剰なアミノ酸は体内に蓄積されないため、炭素骨格の多くが糖質になり、残りのアンモニアは尿素として処理されていた。

高蛋白質食群と普通蛋白質食群における体重と血中アルブミン値に差がなかった。血中尿素から見ると、高蛋白質食群は、摂食後だけでなく空腹時も含めてすべての時間帯において蛋白質の異化作用が高かった。このことから、高蛋白質食を摂取したラットは、余分なアミノ酸を異化し、アンモニア窒素から毒性のない尿素を合成したことで、窒素平衡が維持されていたと考えられる。

低蛋白質食を与えたラットでは、肝臓グリコーゲンは増加したが、体重や血中アルブミンは、普通蛋白質食群や高蛋白質食群よりも有意に低値を示した。栄養状態の指標であるアルブミンは、肝臓で合成された後に他の組織への有力な蛋白質源として供給される。低蛋白質食群の血中アルブミン値の低下には、アルブミンの合成材料である蛋白質の摂取不足が関連していると考えられる。実験前半に低かった低蛋白質食群の摂取量は、実験後半に他群と同レベルまで回復したが、アルブミンの半減期は2~3週間であるため、解剖時の血中濃度は未回復のままであったと考えられる。

私共は、摂食と密接に連動するグリコーゲン合成は、肝臓よりも筋肉においてピークが先行する日内リズムを形成することを報告した¹⁾²⁾。このことを明らかにする目的で、短期的な実験でなく約3週間の実験期間で、食餌蛋白質量の違いによるグリコーゲンの日内リズムへの影響を検討した。赤筋へのグリコーゲン貯蔵は、白筋と異なり食餌蛋白質量に関係なく摂食直後に増加するのに対し、肝臓グリコーゲン貯蔵量は赤筋のピークより約5時間遅い18時以降にピークが認められた。このことから、食餌蛋白質の量的な違いが直接的にはグリコーゲン代謝のリズム形成にほとんど影響しないことが明白となった。今回の結果では、糖質の摂取割合が高い低蛋白質食群で肝臓および赤筋グリコーゲン貯蔵量は高い傾向を示した。この差が単なる糖質摂取量によるものかを調べるために、1匹あたりの糖質摂取量で換算してみると、低蛋白質食群10.9g/日、普通蛋白質食群で13.2g/日、高蛋白質食群で9.4g/日と、3群間に大きな差は認められなかった。このことから、摂取した糖質の「絶対量」よりも、糖質のエネルギー比が食後のグリコーゲン貯蔵量に大きく左右したと考えられる。この結果は、単なる栄養素の量ではなく、三大栄養素の割合(バランス)や質を考慮する必要性を示唆している。

レプチンは、間脳の視床下部を介して摂食の抑制だけでなく、交感神経を活性化して骨格筋でのグルコースや脂肪酸の酸化・分解を促進する作用も保持している³⁾⁴⁾。今回、血中レプチンは、食餌蛋白質量に関係なく、摂食後に高く空腹時に低い日内リズムを示した。レプチンは、脂肪組織から分泌される代表的なアディポサイトカインで、体脂肪量のフィードバック調節を行っているが、図11に示したように、血中レプチンと体脂肪量に正の相関が認められた。低蛋白質食群の血中レプチンが他群より著しく低かったことには、体脂肪量の低下と著しい血糖上昇の双方が関与していると考えられる。また、低蛋白質食群の血中レプチン低値は、実験初期から食餌量が減少した原因が食欲の低下によるものではないことを裏付けている。実験後半で食餌量が回復したことは、低蛋白質食に適応した結果であると考えられる。

肝臓や骨格筋で脂肪燃焼やインスリン抵抗性改善作用のあるアディポネクチンは、体脂肪の増大とともに分泌が低下すると考えられている⁵⁾。低蛋白質食群の血中アディポネクチンが他群より高いレベルを示したのは、体脂肪量の低下が要因の一つであると考えられる。これまでアディポネクチンの

分泌と食餌蛋白質量に関する報告がほとんどなく、今回の知見から、アディポネクチンは体脂肪量やインスリン感受性の調節の他に、蛋白質の栄養状態を調節する指標になる可能性を示唆している。今回の結果では、血中アディポネクチンの摂食による日内変動が観察されなかったため、レプチンとアディポネクチンは短期的あるいは長期的なエネルギー代謝の調節において、相互に関連しながら肥満と生活習慣病の予防に関与していると考えられる。

以上の結果から、肝臓は血糖値を一定に調節する重要な役割を果たしているが、肝臓でのグリコーゲン合成量や糖新生の日内リズムは蛋白質の摂取量により影響を受けることが明白となった。みかけの血糖値が一時的に調節されていても、低蛋白質食群では栄養状態の低下、高蛋白質食群では余分なアミノ酸異化による尿素の増加が認められ、身体づくりや臓器への負担が少なくないと考えられる。

今後、食餌蛋白質の「量」だけでなく、蛋白質の「質」の違いによる生体リズムへの影響についても検討する。今回の研究結果は、肝臓に限定した代謝動態を直接観察することの重要性を明確にすると共に、いつ、何を、どのように食べると効果的なのかを探る時間栄養学の健康科学への応用だけでなく、実用的な栄養アセスメントの開発も期待できる。

要 約

本研究は、食餌蛋白質の量的な違いによる肝臓での糖質代謝の日内リズムへの影響を調べるために、ラットの門脈と肝静脈から同時に採血した。門脈と肝静脈中の血糖値差から、空腹時には糖新生が活発で、特に、高蛋白質食群で持続的に高いことが判明した。糖質代謝に関わるアディポネクチンは、いずれの群でも明確な日内リズムは認められず、低蛋白質食群で高いレベルを維持した。これらの結果から、食餌蛋白質の量的な違いによる肝臓での代謝動態と生体への影響を明らかにした。いつ、何を、どのくらい食べるかという時間栄養学の観点から、肝臓での代謝リズムの発現における食餌蛋白質の重要性を浮き彫りにした。

文 献

- 1) 出口佳奈絵ほか：肝臓の糖質代謝リズムに関する研究(1) ～特に摂食時刻に関して～, 県立広島大学人間文化学部紀要, 6, 25-33 (2011)
- 2) 中村亜紀ほか：摂食パターンの違いによる肝臓および筋肉グリコーゲンの日内リズム, 県立広島女子大学生生活科学部紀要, 9, 55-63 (2003)
- 3) Minokoshi Y, et al : Leptin stimulates fatty acid oxidation by activation of AMP-activated protein kinase, *Nature*, 415, 339-343 (2002)
- 4) Minokoshi Y, et al : Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats, *Diabetes*, 48, 287-291 (1999)
- 5) Arita Y, et al : Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity, *Biochem Biophys Res Commun*, 257, 79-83 (1999)

Abstract

**Study on circadian rhythm of carbohydrate metabolism
in the liver of rats.
~ effect of dietary protein contents ~**

Kanae IDEGUCHI^{*1}, Yuuki HOTEHAMA^{*1}, Kiyoka KUNINOBU^{*2}, Mai NAKATA^{*1}
Naomi SANO^{*1}, Hideo KATO^{*1}, Yuka NISHIDA^{*1}

In this study, we examined to difference in dietary protein contents on circadian rhythm of carbohydrate metabolism in the liver of rats. Blood sample were obtained at same time with a portal vein to the liver from the intestinal tract and a hepatic vein.

From difference between blood glucose level in a portal vein and a hepatic vein, it was found that there was active gluconeogenesis in the fasting, especially in the group of high-protein diet. In fact, high-protein diet group was shift to the gluconeogenesis earlier than the other protein diet groups.

The amplitude of the carbohydrate rhythm decreased with increase in dietary protein (casein) content. The plasma adiponectin involved in carbohydrate metabolism disappeared clear daily changes in all groups, but maintained elevated levels in rats fed low-protein diet.

Therefore, it is clarified the effects of dietary protein intake on the various metabolic changes in the rats liver. From the perspective of the chrononutrition, we showed the importance of dietary protein intake for generation of the circadian rhythm of carbohydrate metabolism in the rats liver.

*1 Prefectural University of Hiroshima

*2 Yasuda Women's University