

植物性および動物性たん白質へのメチオニン添加 と血漿コレステロール濃度

EFFECT OF PLANT AND ANIMAL PROTEINS SUPPLEMENTED
WITH METHIONINE ON PLASMA CHOLESTEROL LEVEL IN RATS

村松敬一郎・杉山公男・大石章夫（静岡大学農学部）

Keiichiro MURAMATSU, Kimio SUGIYAMA and Akio OHISHI

Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422

ABSTRACT

The effect of methionine supplementation to high cholesterol diets containing one of casein, lactalbumin, SPI and wheat gluten at a 25% level on plasma and liver lipid levels and fecal steroid excretion was investigated in growing rats. The plasma cholesterol level was casein > SPI > lactalbumin ≥ wheat gluten in rats fed diets unsupplemented with methionine. Dietary addition of 0.8% methionine resulted in about 2-fold concentration of plasma cholesterol in rats fed casein and lactalbumin diets, whereas methionine addition rather decreased and did not affect plasma cholesterol level in rats fed SPI and wheat gluten diets, respectively. Although addition of 0.8% choline chloride also increased plasma cholesterol level of rats fed a casein diet, it did not affect plasma cholesterol level of rats fed a SPI diet. Addition of methionine to SPI diet significantly increased fecal excretion of bile acids. There was a correlation between fecal excretion of cholesterol and plasma cholesterol level, but there was also a significant correlation between cystine content of proteins and plasma cholesterol level. It is suggested that the differential response of dietary proteins to methionine addition is ascribed to different glycine content of proteins.

血漿コレステロール（CHOL）濃度は食餌中のたん白質やアミノ酸の影響を受けて変化することが知られている¹⁻³⁾。著者らは先に CHOL 添加カゼイン食投与ラットの血漿 CHOL 濃度に及ぼす飼料添加アミノ酸の影響を検討し、含硫アミノ酸の効果が最も顕著であり、Cys は CHOL 上昇抑制作用を示すのに対し、Met は逆に上昇促進作用を示すことを認めた^{4,5)}。Met の効果は食餌中のたん白質含量⁶⁾や Gly 含量⁶⁾、さらには脂質の種類⁷⁾などにより異なり、低たん白食や Gly 添加食などでは Met はむしろ CHOL 上昇抑制作用を示す。しかし、たん白質の種類と Met の効果との関係は必ずしも明確でなく、この点を明らかにすることはたん白個々の性質を理解するうえで有意義と考えられる。

本研究では、SPI をはじめとする 4 種類のたん白質

を用い、血漿、肝臓および糞中脂質に及ぼす飼料添加 Met の影響を比較検討した。また、Met と関連深いコリンの影響も検討した。

実験方法

体重約 100 g のウィスター系雄ラットを用い、実験食を 3 または 2 週間自由摂取させた。飼料の組成は Table 1 に示す。実験 1 では 1% CHOL と 0.25% コール酸ナトリウムを含む飼料を用い、Met あるいは塩化コリンの効果を調べた。実験 2 では胆汁酸を含まず 1.5% CHOL のみを含む飼料を用い、この場合は Met やコリンの添加は行わなかった。たん白質はカゼイン（半井化学）、ラクトアルブミン（東京化成）、SPI（フジプロ R、不二製油）および小麦グルテン（新進食糧）

を用い、25%カゼイン相当のたん白質食とした。小麦グルテン食には0.7%のリジン塩酸塩を添加した。飼育終了後、約11時間の絶食のち血液および肝臓を採取し脂質の分析に供した。また、解剖前3日間の糞を集め脂質の分析に供した。血漿の各脂質は酵素法によるキット（和光純薬）を用い、肝臓および糞中脂質（CHOL, TG, PL）は化学的発色法で測定した。糞中胆汁酸は酵素法で測定した。実験2の糞中中性ステロイドはガスクロ分析により測定した。

結果と考察

Table 2～5 および Fig. 1 に実験1の結果を示す。

Table 1. Composition of basal diets (%)

Ingredient	Exp. 1	Exp. 2
Test protein	25	25
Casein		
Lactalbumin		
SPI		
Wheat gluten		
α -Starch	33.55	33.30
Sucrose	15	15
Corn oil	2	2
Lard	15	15
Salt mixture	5	5
Vitamin mixture	1	1
Choline chloride	0.2	0.2
Cellulose	2	2
Cholesterol	1	1.5
Sodium cholate	0.25	0

0.8% Met 添加によりカゼインおよびラクトアルブミン食では成長がやや抑制された。たん白質の見掛けの消化率は全体として91～96%で、ラクトアルブミンはやや低い値を示した。肝臓 CHOL 濃度はラクトアルブミン食で最も低く、Met やコリン添加により低下する傾向を示した。肝臓 TG 濃度は SPI 食で顕著に低く、グルテン食で最も高い値を示した。Met やコリン添加は肝臓 TG を低下させる傾向にあった。血漿総 CHOL 濃度はカゼイン食で最も高く、グルテン食で最も低下した。Met 添加によりカゼインおよびラクトアルブミン食では血漿 CHOL 濃度は約2倍に上昇したが、SPI 食ではむしろやや低下し、グルテン食では低値のままであった。コリン添加によってもカゼイン食では顕著に上昇したが、SPI 食では上昇しなかった。カゼインおよびラクトアルブミン食への Met 添加は HDL-CHOL の比率を減少させるのに対し、SPI およびグルテン食では比率を増加させた。血漿 TG 濃度は SPI およびグルテン食で低い傾向を示した。血漿 PL 濃度は血漿 CHOL 濃度と類似の変化を示した。Table 4 に糞中への脂質排泄を示す。胆汁酸添加飼料を用いた場合、糞中の中性ステロイドは大部分が CHOL であるので CHOL 排泄量を求めた。カゼインおよびラクトアルブミン食では CHOL の排泄率は植物性たん白質に比べてやや低い傾向にあり、また、Met やコリンの添加は CHOL 排泄にほとんど影響を及ぼさなかった。胆汁酸の排泄率はカゼイン食で最も低く、Met 添加により各群とも増加し、特に SPI 食では顕著であった。糞中への TG や PL の排泄量は僅かであるが、カゼイン食では他群に比べて低い値を示した。

Table 2. Body weight gain, food intake, apparent digestibility and liver lipid content of experimental animals (Exp. 1)

Diet	Body wt gain (g/21 d)	Food intake (g/21 d)	Apparent digestibility (%)	Liver lipid (mg/g)		
				CHOL	TG	PL
25% Casein (25C)	106±3 ^{a,1}	256±7 ^{ab}	95.5±0.2 ^a	92.6±1.9 ^a	88±4 ^{ab}	22.6±0.2 ^{abc}
25% Lactalbumin (25L)	116±2 ^a	258±5 ^{ab}	90.8±0.3 ^b	71.8±1.8 ^b	94±6 ^{ac}	22.7±0.3 ^{abc}
25% SPI (25S)	111±3 ^a	286±5 ^c	93.3±0.3 ^{cd}	88.3±2.5 ^{ac}	67±5 ^{de}	23.5±0.3 ^{bcd}
25% Wheat gluten (25W)	129±4 ^b	287±5 ^c	92.9±0.3 ^c	83.6±1.7 ^c	122±8 ^f	21.6±0.7 ^a
25C+0.8% Met	91±4 ^c	237±5 ^a	94.1±0.6 ^{de}	83.0±2.0 ^c	92±3 ^{ac}	22.4±0.6 ^{ab}
25L+0.8% Met	92±5 ^c	238±8 ^a	91.5±0.2 ^b	59.7±1.5 ^d	76±6 ^d	25.1±0.5 ^{ef}
25S+0.8% Met	117±6 ^a	255±8 ^{ab}	92.7±0.2 ^c	62.5±1.9 ^d	55±4 ^e	24.9±0.3 ^{efg}
25W+0.8% Met	113±4 ^a	268±6 ^{bcd}	93.4±0.1 ^{cd}	60.2±1.0 ^d	104±6 ^c	24.3±0.3 ^{efg}
25C+0.8% Cho・Cl	113±4 ^a	266±5 ^{bd}	94.6±0.5 ^a	90.5±1.9 ^a	71±2 ^d	23.8±0.3 ^{efg}
25S+0.8% Cho・Cl	111±6 ^a	282±10 ^{cd}	92.9±0.4 ^c	76.6±2.0 ^b	38±3 ^g	25.8±0.4 ^f

¹ Values are mean±SE for 6 rats; values in a column not sharing the same superscript letter are significantly different at p<0.05.

Table 3. Plasma lipid concentration of experimental animals (Exp. 1)

Diet	Plasma lipid concentration (mg/100 ml)				
	Total CHOL	HDL-CHOL	HDL-CHOL (%)	TG	PL
25% Casein (25C)	253±18 ^{a,1}	26±1 ^{ab}	10.8±1.4 ^{ab}	179±11 ^{ab}	181±9 ^a
25% Lactalbumin (25L)	118±5 ^{bc}	37±1 ^c	31.7±1.6 ^c	137±10 ^{cd}	149±3 ^b
25% SPI (25S)	179±9 ^d	21±1 ^a	12.1±1.6 ^a	88±3 ^e	131±3 ^b
25% Wheat gluten (25W)	106±4 ^b	31±1 ^{bde}	29.3±0.8 ^{cd}	92±7 ^e	129±3 ^b
25C+0.8% Met	555±33 ^e	32±2 ^{de}	6.1±1.0 ^b	132±11 ^c	253±9 ^c
25L+0.8% Met	255±17 ^a	44±3 ^f	18.6±2.7 ^e	189±12 ^a	206±7 ^d
25S+0.8% Met	130±9 ^{bc}	29±2 ^{bd}	24.5±2.9 ^{df}	127±8 ^c	140±3 ^b
25W+0.8% Met	99±10 ^b	38±2 ^c	39.4±2.0 ^g	100±6 ^e	139±4 ^d
25C+0.8% Cho·Cl	460±26 ^f	45±2 ^f	9.9±0.5 ^{ab}	158±6 ^{bd}	245±10 ^c
25S+0.8% Cho·Cl	164±4 ^{cd}	35±1 ^{ce}	21.1±0.8 ^{ef}	77±7 ^e	138±3 ^b

¹ Values are mean±SE for 6 rats; values in a column not sharing the same superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

Table 4. Weight of feces and fecal lipid excretion in experimental animals (Exp. 1)

Diet	Weight of dry feces (g/3 d)	Fecal lipid excretion			
		CHOL (% of intake)	Bile acid (% of intake)	TG (mg/3 d)	PL (mg/3 d)
25% Casein (25C)	2.31±0.06 ^{a,1}	47.3±0.5 ^a	130±3 ^a	1.5±0.2 ^a	3.8±0.4 ^a
25% Lactalbumin (25L)	3.21±0.07 ^{bc}	51.7±0.9 ^{abc}	179±3 ^{bc}	3.5±0.3 ^{bc}	16.1±0.9 ^b
25% SPI (25S)	3.40±0.14 ^{bcd}	57.3±2.4 ^{de}	158±7 ^{de}	11.2±0.9 ^d	13.8±0.4 ^b
25% Wheat gluten (25W)	3.75±0.12 ^d	60.9±1.4 ^{df}	159±6 ^{de}	5.4±0.7 ^e	25.8±1.9 ^c
25C+0.8% Met	2.52±0.11 ^a	49.8±1.6 ^{ab}	168±7 ^{cd}	2.2±0.4 ^{ab}	4.5±0.3 ^a
25L+0.8% Met	3.00±0.18 ^{be}	54.0±1.7 ^{bce}	194±7 ^b	5.1±0.2 ^e	14.3±0.4 ^b
25S+0.8% Met	3.20±0.18 ^{bc}	55.4±1.9 ^{ce}	227±7 ^f	7.2±0.4 ^f	15.1±0.8 ^b
25W+0.8% Met	3.27±0.10 ^{bc}	62.3±0.6 ^f	194±5 ^b	3.8±0.4 ^c	29.9±1.7 ^d
25C+0.8% Cho·Cl	2.65±0.07 ^{ae}	47.5±1.1 ^a	142±7 ^{ae}	1.8±0.2 ^a	4.3±0.5 ^a
25S+0.8% Cho·Cl	3.49±0.25 ^{cd}	61.8±1.6 ^f	184±6 ^{bc}	9.7±0.4 ^g	16.9±1.8 ^b

¹ Values are mean±SE for 6 rats; values in a column not sharing the same superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

Table 5. Correlation coefficients among lipid levels of plasma, liver, and feces (Exp. 1)

		Plasma			Liver			Feces	
		Total CHOL	TG	PL	CHOL	TG	PL	CHOL	Bile acids
Plasma	Total CHOL	—	0.43	0.95*	0.44	−0.06	−0.18	−0.69*	−0.41
	TG		—	0.64*	−0.01	0.07	−0.05	−0.79*	−0.19
	PL			—	0.26	0.01	−0.12	−0.75*	−0.33
Liver	CHOL				—	0.06	−0.56	−0.44	−0.90*
	TG					—	−0.78*	0.00	−0.29
	PL						—	0.32	0.60
Feces	CHOL							—	0.47
	Bile acids								—

* $p<0.05$.

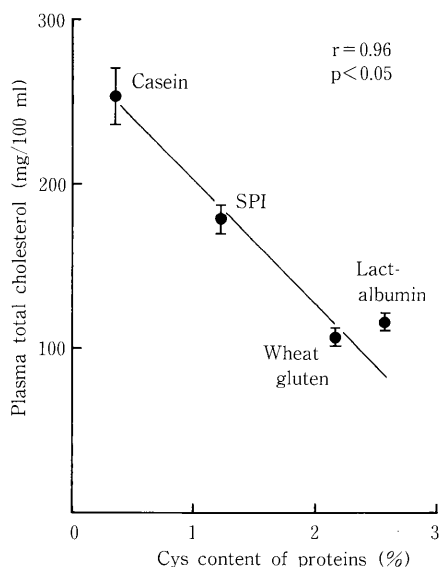


Fig. 1. Relationship between cystine content of proteins and plasma cholesterol levels (Exp. 1).

Table 5に10群における血漿、肝臓および糞中脂質間の相関係数を示した。特に高い相関の見られるのは血漿 CHOL 濃度と血漿 PL 濃度、および胆汁酸排泄率と肝臓 CHOL 濃度との間である。血漿 CHOL 濃度と CHOL 排泄率との間にも有意な相関がみられたが、胆汁酸排泄率との間に相関はなかった。Met 添加、無添加ごとの相関をみると、血漿 CHOL 濃度と胆汁酸排泄率あるいは CHOL 排泄率との間に相関の傾向は見られるものの、有意ではなかった。

CHOL 無添加食の場合によく観察される植物性たん白質の血漿 CHOL 低下効果と糞中ステロイド排泄効果との相関⁸⁻¹⁰⁾は、本実験のように CHOL 添加系ではそれ程顕著ではないように思われる。外因性と内因性の CHOL あるいは胆汁酸に対する食餌たん白質の作用サイトの相異が考えられ、また CHOL 添加系と無添加系では CHOL 代謝の律速過程の異なることの影響なども考えられる。一方、著者らは先に、7種類の動物性および植物性たん白質を用い、たん白質のアミノ酸組成と血漿 CHOL 濃度との関係を検討し、たん白質の Cys 含量と血漿 CHOL 濃度との間に負の相関のあることを認めた¹¹⁾。本実験においても Fig. 1に示すように、Met あるいはコリン無添加での4種類のたん白質の Cys 含量と血漿 CHOL 濃度との間には有意な相関が見られた。

CHOL 添加系においては CHOL の胆汁酸への代謝

が重要な位置を占めるが、Tau やグルタチオン^{12,13)}など Cys 由来の化合物がこの代謝に関与することが知られているので、たん白質の Cys 含量が CHOL 代謝に影響するのは理解出来ることである。一方、Met は Cys に代謝されるものの、メチル基を有する点が異なる。Met の血漿 CHOL 上昇効果はそのメチル基に起因するものと考えられる^{5,14)}。SPI やグルテン食に Met を添加しても血漿 CHOL 上昇効果が見られない理由の一つに、Table 6に示すように、両たん白質の Gly 含量の高いことがあげられよう。カゼインは Gly 含量が最も低く、ついでラクトアルブミンが低く、この両者に Met を添加すると血漿 CHOL 濃度が上昇することから、Met 添加に対する tolerance にはたん白質の Gly 含量が関与している可能性が強いと思われる。カゼイン食に Met を添加しても、Gly を同時に添加した場合には血漿 CHOL 濃度の上昇は抑制されるという知見⁶⁾もこの考え方を支持している。

著者らは先に、アミノ酸混合食を用いて SPI の CHOL 上昇抑制作用を SPI のアミノ酸組成との関連で検討し、SPI 類似のアミノ酸混合から Gly を除くと血漿 CHOL は顕著に上昇することから、SPI の CHOL 上昇抑制作用における Gly 関与の可能性を示唆した¹⁵⁾。本実験でも見られるように、Met の添加はカゼイン食の場合でもむしろ胆汁酸の糞中排泄を増加させる。カゼイン食への Met+Gly の添加は血漿 CHOL 濃度を低下させるとともに胆汁酸の糞中排泄を顕著に増加させる¹⁴⁾。本実験において、SPI 食への Met 添加は血漿 CHOL 濃度を低下させるとともに胆汁酸排泄を増加させる点は、カゼイン食への Met+Gly 添加の場合と類似性がある。このことも SPI の Gly 含量が高いことの反映と考えられる。

Table 7 と 8 に実験 2 の結果を示す。CHOL 添加系でも胆汁酸を添加しない場合には、カゼイン食でも血漿 CHOL 濃度の上昇の程度は低く、他のたん白質食ではともに低い値を示した。糞中へのステロイド排泄は中性、酸性ステロイドともカゼイン食では他群に比べて低い傾向を示した。SPI の血漿 CHOL 上昇抑制効果は CHOL 無添加系>CHOL 単独添加系>CHOL+胆汁酸添加系の順で明瞭に現われるように思われる。食物繊維やリン脂質の CHOL 上昇抑制効果は消化管における CHOL や胆汁酸の吸収阻害が主たる原因であり、従ってこれらの効果は CHOL や胆汁酸添加系の方がより明瞭に現われる。SPI の CHOL 上昇抑制効果がステロイドの吸収阻害に主としてあるならば、むしろ CHOL+胆汁酸添加系で最も強い効果が見られるはずであるとの考え方も成り立つ。たん白質の

Table 6. Content of sulfur amino acids and glycine in proteins

Protein	Amino acid content (g/100 g)				
	Met	Cys	Met + Cys	Gly	Gly/Met
Casein	2.87	0.35	3.21	1.82	0.63
Lactalbumin	1.81	2.57	4.37	2.38	1.31
SPI	1.33	1.23	2.56	4.17	3.14
Wheat gluten	1.69	2.14	3.84	4.23	2.50

Table 7. Effect of dietary proteins on plasma and liver lipid levels of rats fed a high cholesterol diet without cholate (Exp. 2)

Diet	Plasma lipid (mg/100 ml)				Liver lipid (mg/g)	
	Total CHOL	HDL-CHOL	TG	PL	CHOL	TG
25% Casein	151±11 ^{a,1}	31±1 ^a	163±8 ^a	148±4 ^a	46±1 ^a	60±3 ^{ab}
25% Lactalbumin	93±3 ^b	38±1 ^b	118±9 ^b	130±4 ^b	36±1 ^b	55±4 ^a
25% SPI	89±3 ^b	30±1 ^a	67±3 ^c	108±1 ^c	35±1 ^b	34±2 ^c
25% Wheat gluten	90±5 ^b	33±1 ^a	90±6 ^d	115±2 ^c	42±1 ^c	68±5 ^b

¹ Values are mean±SE for 6 rats; values in a column not sharing the same superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

Table 8. Weight of feces and fecal steroid excretion in rats fed a high cholesterol diet without cholate (Exp. 2)

Diet	Weight of dry feces (g/3 d)	Neutral sterols (%) ²			Bile acids (%) ²
		CHOL	Coprostanol	Total	
25% Casein	2.62±0.07 ^{a,1}	61.7±0.7 ^a	7.6±1.7 ^{ab}	69.3±1.7 ^a	12.2±0.4 ^a
25% Lactalbumin	3.55±0.13 ^b	69.1±1.8 ^a	2.9±1.5 ^a	71.9±1.0 ^a	17.9±0.5 ^b
25% SPI	3.64±0.10 ^b	67.0±5.4 ^a	11.3±4.5 ^b	78.3±1.9 ^b	16.4±1.3 ^{bc}
25 % Wheat gluten	2.54±0.09 ^a	71.1±2.6 ^a	2.2±1.2 ^a	73.3±2.4 ^{ab}	14.3±1.0 ^{ac}

¹ Values are mean±SE for 6 rats; values in a column not sharing the same superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

² Percentage of the amount of CHOL ingested.

アミノ酸組成ならびにたん白質によるステロイド吸収阻害の CHOL 代謝における寄与の程度については、なお検討する必要がある。

文 献

- Carroll, K. K. and Hamilton, R. M. G. (1975): Effect of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol in relation to atherosclerosis. *J. Food Sci.*, **40**, 18-23.
- Kritchevsky, D. (1979): Vegetable protein and atherosclerosis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 135-140.
- Sugano, M. (1983): Hypocholesterolemic effect of plant protein in relation to animal protein: mechanism of action, in "Animal and Vegetable Proteins in Lipid Metabolism and Atherosclerosis", ed. by Gibney, M. J. and Kritchevsky, D., Alan R. Liss Inc., New York, pp. 51-84.
- Sugiyama, K., Kushima, Y. and Muramatsu, K. (1984): Effect of methionine, cystine and taurine on plasma cholesterol level in rats fed a high cholesterol diet. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2897-2899.
- Sugiyama, K., Mizuno, M. and Muramatsu, K. (1986): Effect of individual amino acids on plasma cholesterol level in rats fed a high

- cholesterol diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 623-633.
- 6) Sugiyama, K., Kushima, Y. and Muramatsu, K. (1985): Effect of sulfur-containing amino acids and glycine on plasma cholesterol level in rats fed on a high cholesterol diet. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3455-3461.
 - 7) 杉山公男, 大石章夫, 村松敬一郎 (1987): メチオニンおよびコリンの血漿コレステロール濃度上昇作用. 必須アミノ酸研究, No. 113, 24-27.
 - 8) Nagata, Y., Imaizumi, K. and Sugano, M. (1980): Effect of soya-bean protein and casein on serum cholesterol levels in rats. *Br. J. Nutr.*, **44**, 113-121.
 - 9) Kuyvenhoven, M. W., West, C. E., van der Meer, R. and Beynen, A. C. (1986): Fecal steroid excretion in relation to the development of casein-induced hypercholesterolemia in rabbits. *J. Nutr.*, **116**, 1395-1404.
 - 10) 伊吹文男, 岩見公和 (1986): 食品たん白質 (SPI, グルテン, オボアルブミン, カゼイン) 及びその消化産物の胆汁酸再吸収に及ぼす影響. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **7**, 68-75.
 - 11) Sugiyama, K., Ohkawa, S. and Muramatsu, K. (1986): Relationship between amino acid composition of diet and plasma cholesterol level in growing rats fed a high cholesterol diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 413-423.
 - 12) Danielsson, H., Kalles, I. and Wikvall, K. (1984): Regulation of hydroxylations in biosynthesis of bile acids. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4258-4262.
 - 13) Hassan, A. S., Hackley, J. J. and Jeffery, E. (1984): Role of glutathione in the regulation of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase, the rate-limiting enzyme of bile acid biosynthesis. *Steroids*, **44**, 373-380.
 - 14) Sugiyama, K., Suzuki, H. and Muramatsu, K. (1987): Effect of dietary choline on plasma and liver lipid levels in rats fed on a high cholesterol diet. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, in press.
 - 15) 杉山公男, 村松敬一郎 (1986): 分離大豆たん白質のアミノ酸組成と血漿コレステロール濃度との関係. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **7**, 80-85.