

原 著

マウスの体毛タンパク質合成における食餌タンパク質とシステイン補給の影響について

中村博範^{*1} 金澤健一郎^{*2} 松枝秀二^{*1}

要 約

我々は、タンパク質欠乏食を与えたマウスで体毛のケラチン付随タンパク質 (KAPs) の割合が減少することを以前に報告した。KAPs のシステイン含有率は、生体内の他のタンパク質と比較して非常に高いことから、KAPs の合成はシステイン供給によって影響を受ける可能性がある。そこで、本研究では、体毛タンパク質合成におけるシステイン供給量の影響について検討した。実験は、背中を除毛した8週齢の雄 C3H マウスを4群に分け、標準食として25%カゼイン食 (C25)、タンパク質欠乏食として1%カゼイン食 (C1) を与え、さらに、それらにN-アセチル-L-システイン (NAC) を添加した C25+NAC 添加食 (C25NAC)、C1+ NAC 添加食 (C1NAC) を与えて4週間行った。実験の結果、C1群およびC1NAC群では、体重が有意に減少し、血清総タンパク質濃度はC25群およびC25NAC群と比較して有意に低値となった。血漿中システイン濃度は、C25群と比較してC1群では有意に低値となり、C25NAC群とC1NAC群では有意に高値となった。体毛中システイン含有率は、C1群は他群と比較して有意に低値となった。また、C1群ではC25群と比較してKAPsに属する25.3kDaと21.1kDaのタンパク質合成に有意な低下がみられたが、この低下はC1NAC群ではなかった。これらの結果から、体毛形成におけるKAPs合成は、タンパク質欠乏によるシステイン供給量の減少によって低下することが示された。

1. 緒言

タンパク質・エネルギー栄養失調症では、毛髪が細くなり、脆弱化することが知られている¹⁾。そのため、毛髪の変化は栄養状態を反映すると考えられている²⁾。しかし、毛髪の変化と栄養状態との関係についての研究はほとんどない。

毛髪は、皮膚に埋まった毛包で作られ、毛包の膨らんだ部分を毛球と呼び、ここに存在する毛母細胞が細胞分裂を繰り返すことによって毛髪が成長する。毛母細胞の細胞分裂によって新しく作られた細胞は、いくつかの細胞へと分化し、毛髪の主成分であるタンパク質の合成を行う。

毛髪を構成するタンパク質は、50~100種あるとされ³⁾、主に2つのタイプに大別できる。1つは、中間径フィラメントを構成するケラチンタンパク質 (Keratin Proteins: KPs, 分子量40~60kDa)、

他方は、フィラメント周囲のマトリックスを構成するケラチン付随タンパク質 (Keratin-Associated Proteins: KAPs, 分子量10~30kDa) である^{4,5)}。毛包におけるタンパク質の合成は、まず、フィラメントの形成に関わるKPsのI型とII型が合成され、次にKAPsの超高硫黄タンパク質 (Ultra High Sulfur Proteins: UHSPs) や高硫黄タンパク質 (High Sulfur Proteins: HSPs) が合成される⁶⁾。毛髪を構成するタンパク質は、体を構成する他のタンパク質よりもシステイン含有率が高い特徴がある⁷⁾。システイン含有率は、KPsで約6%、KAPsのUHSPsは30%以上、HSPsは約20%である。

我々は、タンパク質欠乏症における毛髪の脆弱化が、毛髪のタンパク質合成の変化によって生じると考え、タンパク質欠乏食を与えたマウスの体毛中タンパク質を化学的手法を用いて評価した⁸⁾。タンパ

^{*1} 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科 ^{*2} 独立行政法人 国立病院機構 名古屋医療センター
(連絡先) 中村博範 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学
E-Mail: hironori@mw.kawasaki-m.ac.jp

ク質欠乏食を与えたマウスでは、体毛全体でのシステイン含有率が低下し、また、体毛抽出タンパク質の電気泳動によって、KAPsが減少していることが示された。このことから、タンパク質欠乏状態では、システイン含有率の高いKAPsが十分に合成されないまま体毛が形成されることを明らかにした。KAPsの合成低下は、タンパク質欠乏によるシステイン供給量の低下によって生じると考えられるが、その点を明らかにするためには、食餌中システイン量と血漿中システイン濃度、そして体毛タンパク質合成との関係についてさらに検討が必要である。

そこで、本研究では、マウスの体毛タンパク質合成とシステイン供給の関係を明らかにするため、システインの安全な前駆体として使用されているN-アセチル-L-システイン(NAC)⁹⁾を標準食およびタンパク質欠乏食に添加して、血漿中システイン濃度と体毛タンパク質の合成について評価した。

2. 方法

2.1 試薬

アミノ酸定量は、和光純薬工業のギ酸、30%過酸化水素水、塩酸、ニンヒドリン、メチルセロソルブ、シアン化カリウム、酢酸、システイン酸、ロイシン、水酸化ナトリウムを使用した。タンパク質定量は、和光純薬工業の炭酸ナトリウム(無水)、水酸化ナトリウム、硫酸銅(Ⅱ)五水和物、酒石

酸ナトリウムカリウム四水和物、Folin-Chiocalteuフェノール試薬、ウシ血清アルブミン(生化学用)を使用した。コレステロール定量は、和光純薬工業のコレステロールE-テストワコーを使用した。システイン定量は、同仁化学研究所の4-fluoro-7-sulfamoylbenzofrazan (ABD-F)とエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA-2Na)、バイオ・ラッド社のトリブチルホスフィン(200mM)、Sigma社のN-2-メルカプトプロピオニルグリシン(MPG)を使用した。ホウ酸、りん酸、りん酸二水素ナトリウム二水和物、L-システイン、アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用)は、和光純薬工業の製品を使用した。電気泳動は、バイオ・ラッド社のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、トリブチルホスフィン、アクリルアミド、ビスアクリルアミド、テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)、過硫酸アンモニウム、クマシーブリリアントブルー染色液(Bio-Safe™ Coomassie G250 Stain)、プロロフェノールブルー、分子量マーカー(プレシジョンPlusスタンダード)を使用した。モノプロモビマン(MBB)はメルク社、尿素はSigma社の製品を使用した。グリセロール、メタノール、酢酸、グリシン、トリスヒドロキシアミノメタンは、和光純薬工業の製品を使用した。

いずれも分析用またはそれに相当する純度の製品を使用した。また、水はミリポア超純水製造装置の

表1 実験に用いた飼料組成

原料 (g/kg)	C25 ^{a)}	C25NAC	C1 ^{b)}	C1NAC ^{c)}
カゼイン	250	250	10	10
コーンスターチ	380	380	380	380
α-コーンスターチ	100	90	340	330
シュクロース	50	50	50	50
大豆油	60	60	60	60
セルロースパウダー	80	80	80	80
ミネラル混合 ^{d)}	60	60	60	60
ビタミン混合 ^{d)}	20	20	20	20
N-アセチル-L-システイン(NAC)	-	10	-	10

^{a)}25%カゼイン食(C25)を標準食とし、オリエンタル酵母工業のオリエンタル配合に準じて調製した。^{b)}タンパク質欠乏食(C1)は、カゼインの配合割合を1%とし、熱量をα-コーンスターチで調整した。^{c)}NACの添加量は、25%カゼイン食に含まれる含硫アミノ酸(メチオニンとシステイン)量と等しくするため1%とした。^{d)}ミネラル混合およびビタミン混合は、オリエンタル酵母工業のオリエンタル配合を使用した。

純水を使用した。

2.2 実験動物及び飼料

7週齢の C3H マウス (雄・C3H/HeJYokSlc) を日本エスエルシーから購入して使用した。飼料は、粉末原料をオリエンタル酵母工業から購入して、オリエンタル配合に準じて調製した。それぞれの飼料組成を表1に示す。標準食は25%カゼイン食(C25)、タンパク質欠乏食は1%カゼイン食(C1)とした。また、それぞれにNACを添加したC25NACとC1NACを調製した。なお、NACの添加量は、25%カゼイン食に含まれる含硫アミノ酸(メチオニンとシステイン)量と等しくするため1%とした。

2.3 実験飼育

購入した7週齢の C3H マウスを標準食(C25)で1週間予備飼育した後、イソフルラン麻酔下で背部体毛をバリカンと市販の除毛クリーム(Veet:レキットベンキラー・ジャパン社)で処理して実験に使用した。

実験飼育は、C25群(7匹)、C25NAC群(7匹)、C1群(7匹)、C1NAC群(7匹)の4群に分けて4週間行った。飼育は、マウス用の小型ケージを用いて行い、1ケージに1匹とした。飼料と水は自由摂食として、体重と摂食量を毎日測定した。また、除毛部は除毛直後も含めて1週間毎にデジタルカメラで撮影した。飼育環境は、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗サイクル12時間(8:00-20:00)であった。

飼育終了後、一晩絶食させ、血液、臓器、体毛を採取した。採血は、イソフルラン麻酔下で、後大静脈から行った。採血後、血液を血清用と血漿用(EDTA・2Na含む)のマイクロチューブに分注し、血清は、室温に30分置いてから遠心分離し、一方、血漿は、採血後すみやかに遠心分離して採取した。臓器は、肝臓、腎臓、心臓、腓腹筋を採取し、それぞれ湿重量を測定した。採取した血清と血漿、および臓器は、分析まで冷凍保存(-50°C)した。体毛は、除毛部に新しく形成された体毛のみをバリカンで刈り取り、分析まで密閉式の袋に入れ室温暗所にて保存した。

本動物実験は、動物実験ガイドラインに従い、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号11-004)。

2.4 血清中総タンパク質濃度の測定

血清総タンパク質濃度はLowry法¹⁰⁾で定量した。タンパク質濃度はウシ血清アルブミンを用いて作成した検量線から求めた。

2.5 血清中総コレステロール濃度の測定

血清中総コレステロール濃度は、コレステロール測定キット(和光純薬工業)を用いて測定した。

2.6 血漿中システイン濃度の測定

血漿中システイン濃度は、Toyookaらの方法¹¹⁾を参考にして測定した。

マイクロチューブに血漿 $90 \mu\text{l}$ と4M過塩素酸 $10 \mu\text{l}$ (終濃度0.4M過塩素酸)を加えて攪拌し、遠心分離(4°C , 15000回転, 10分)して除タンパク処理を行った。この上清 $40 \mu\text{l}$ に、2M炭酸ナトリウム $5 \mu\text{l}$ を加え中和し、内部標準物質として $5 \mu\text{MMPG}$ (1mMEDTA/10mM塩酸で溶解) $5 \mu\text{l}$ 、さらに、2.0mMABD-F(0.2Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)で溶解)を $50 \mu\text{l}$ 加え、遮光下で加温(50°C , 10分間)した。プレラベル化反応後、反応液を水中で冷却し、1M塩酸 $5 \mu\text{l}$ 加えて、 $0.2 \mu\text{m}$ のクロマトディスクフィルター(Kurabo)でろ過し、逆相クロマトグラフィーで分離分析した。

逆相クロマトグラフィーは、日立LaChrom HPLCを使用し、分離カラムにTSK-Gel ODS-80Ts($4.6\text{mm} \times 150\text{mm}$)(東ソー)を使用した。移動相には、100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH2.1)とアセトニトリルを用い、流速 1.0ml/分 、カラム温度 40°C の条件で、アセトニトリルに濃度勾配をつけ(0-20分:5-25%)分離した。検出は、励起波長 380nm 、検出波長 510nm で行った。システイン濃度は、内部標準物質のMPGとシステイン標準液のモル比とピーク面積比から作成した標準曲線を用いて求めた。

2.7 体毛中システイン含有率の測定

体毛中システイン含有率は、既報の方法⁸⁾で求めた。

体毛のシステインを過ギ酸酸化して、6M塩酸でアミノ酸に加水分解(110°C , 24時間)した。システイン酸は強酸性陽イオン交換樹脂カラムを用いて分離した。総アミノ酸とシステイン酸はニンヒドリン法で定量した。総アミノ酸量はロイシン当量として求めた。また、システイン酸量はシステイン酸標準品を用いて求めた。システイン含有率は、総アミノ酸量に占めるシステイン量の割合として算出した。

2.8 体毛タンパク質のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)による評価

SDS-PAGEは、既報の方法⁸⁾により行った。

体毛をビーズ破砕機で細かく破砕してから、還元剤のトリブチルホスフィン(TBP)を含むタンパク質抽出液(組成:8M尿素, 2% SDS, 5mMTBP, 62.5mMTris-HCl, pH6.8)を用いて体毛タンパク質を抽出した。抽出した体毛タンパク質のシステイン残基をSH基ラベル化剤のモノプロモビマンで蛍光標識して、分子量マーカー(10~

250kDa) とともに電気泳動で分離した。

ゲルは、アクリルアミド濃度が分離ゲル15%、濃縮ゲル4%になるように作製した。SDS-PAGEは、泳動バッファーに25mM Tris-192mMグリシン-0.1% SDS溶液を使用し、200V定電圧で行った。電気泳動後、ゲルを固定、洗浄したあとUVトランスイルミネーター365nmでバンドを検出し、デジタルカメラで撮影した。撮影後、ゲルをクマシーブリリアントブルーで1時間染色し、純水で洗浄したあと、一晚脱色させ、スキャナで読み取り、画像解析に用いた。画像解析は、画像処理ソフトのImage Jを使用し、バンドのデンストメトリーと分子量の計算を行った。

各試料について電気泳動を2回ずつ行い、その平均値を評価に用いた。

2.9 統計処理

値は平均値±標準誤差で示し、統計学的有意水準は5%未満とした。検定は2群の場合にはStudent's t-testを用い、3群以上の場合には一元配置分散分析後、Tukey検定を用いた。統計処理ソフトは、PASW Statistics 18 (IBM)を使用した。

3. 結果

3.1 体重変化および総摂食量

各群の実験飼育開始時と終了時での体重変化を表2に示した。C25群とC25NAC群の終了時の体重は開始時と比較してわずかに増加した。一方、C1群とC1NAC群の終了時の体重は開始時と比較して有意に低下した。各群の総摂食量(g/28日)は、4群間に有意差はみられなかった。

表2 各群の体重変化および総摂食量

	C25	C25NAC	C1	C1NAC
体重 開始時 (g)	24.4 ± 0.8	24.2 ± 0.7	24.2 ± 0.7	23.9 ± 0.5
終了時 (g)	26.1 ± 1.2	25.7 ± 1.0	17.0 ± 0.3 *	18.7 ± 0.3 *
総摂食量 (g/28日)	113.3 ± 3.0	108.6 ± 2.8	110.6 ± 3.7	109.9 ± 2.3

マウスの背部を除毛したあと、各飼料条件で4週間飼育した。数値は、各群7匹の平均値±標準誤差を示す。* は、飼育開始時に対して有意差(p<0.05)あり。

表3 実験飼育終了時の各群の臓器重量

	C25	C25NAC	C1	C1NAC	参考値
肝臓 (mg)	935 ± 48 ^a	946 ± 34 ^a	535 ± 13 ^b	721 ± 22 ^c	953 ± 8
腎臓 (mg)	422 ± 18 ^a	426 ± 18 ^a	215 ± 7 ^b	237 ± 5 ^b	376 ± 6
心臓 (mg)	104 ± 4 ^a	99 ± 2 ^a	78 ± 2 ^b	83 ± 3 ^b	88 ± 3
腓腹筋 (mg)	238 ± 7 ^a	235 ± 6 ^a	155 ± 4 ^b	169 ± 4 ^b	215 ± 5

実験飼育終了後(12週齢)に解剖し、各臓器の湿重量を測定した。数値は、各群7匹の平均値±標準誤差を示す。参考値は、飼育開始時に相当する8週齢の雄C3Hマウス(6匹)の値を示す。異なる文字を有する群間に有意差(p<0.05)あり。

表4 各群の血清中総タンパク質濃度および総コレステロール濃度

	C25	C25NAC	C1	C1NAC
総タンパク質濃度 (g/dl)	6.5 ± 0.3 ^a	7.1 ± 0.3 ^a	4.9 ± 0.1 ^b	5.0 ± 0.1 ^b
総コレステロール濃度 (mg/dl)	116.5 ± 6.5 ^a	115.7 ± 4.7 ^a	93.5 ± 3.2 ^b	119.1 ± 6.4 ^a

実験飼育終了後に、一晚絶食させ後大静脈から採血して得た血清を各測定に用いた。数値は、各群7匹の平均値±標準誤差を示す。異なる文字を有する群間に有意差(p<0.05)あり。

3.2 臓器重量

実験飼育終了時における各群の臓器重量を表3に示した。4群間で比較すると、肝臓は、C25群、C25NAC群と比較してC1群、C1NAC群において有意に低値となった。また、C1NAC群はC1群よりも有意に高値であった。腎臓、心臓、腓腹筋はC25群、C25NAC群と比較してC1群、C1NAC群に

において有意に低値を示した。

3.3 血清中総タンパク質濃度および総コレステロール濃度

表4に実験飼育終了時での各群の血清中総タンパク質濃度および総コレステロール濃度を示した。総タンパク質濃度は、C1群とC1NAC群はC25群とC25NAC群と比較して有意に低値を示し、総コレ

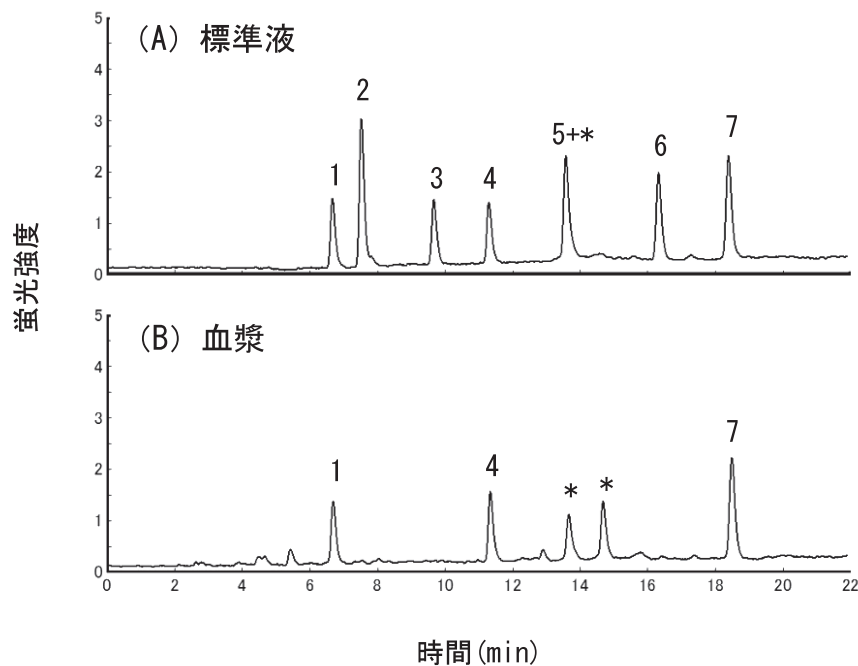


図1 標準物質および血漿中チオール化合物のクロマトグラム

標準物質および血漿中チオール化合物を ABD-F でラベル化し、逆相カラムを用いて分離検出した。検出は、励起波長380nm, 検出波長510nmで行った。1=システイン, 2=システアミン, 3=ホモシステイン, 4=グルタチオン, 5=コエンザイム A, 6= N-アセチル-L-システイン (NAC), 7=N-2-メルカプトプロピオグリシン (MPG: 内部標準物質), * = ABD-F の副産物

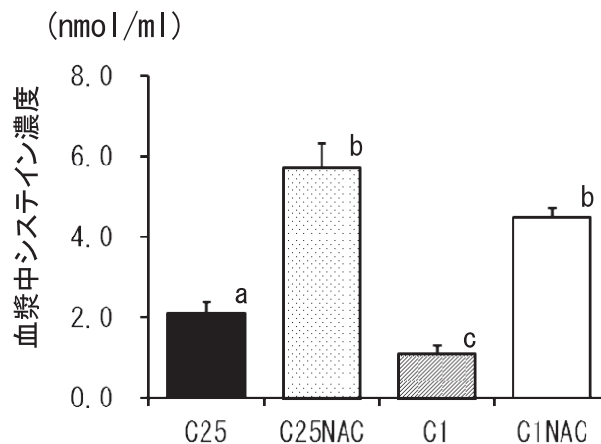


図2 各群の血漿中システイン濃度

各飼料条件で4週間飼育し、一晩絶食後に採血して得た血漿を用いて測定した。システイン濃度の測定は、逆相クロマトグラフィーで分析した。数値は各群7匹の平均値±標準誤差を示す。異なる文字を有する群間に有意差 ($p < 0.05$) あり。

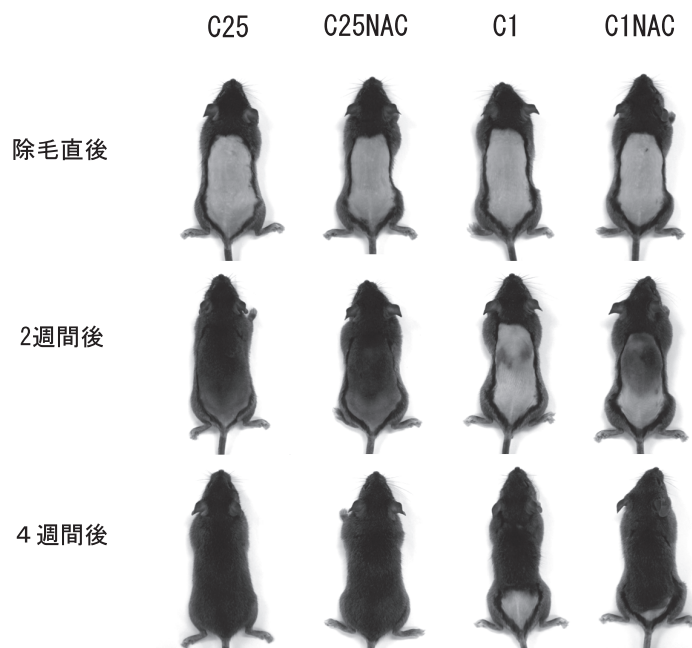


図3 各群の除毛部の変化

実験飼育開始前にマウスの背部体毛を市販の除毛クリームで処理した。撮影は、イソフルラン麻酔下で行った。

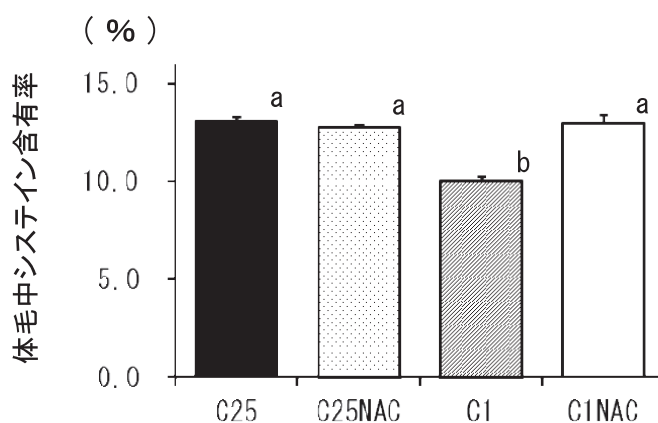


図4 各群の体毛中システイン含有率

実験飼育終了後、除毛部に新しく形成された体毛をバリカンで採取し、その一部を分析に用いた。体毛中システイン含有率は、体毛をアミノ酸に加水分解した際の総アミノ酸量に占めるシステインの割合を示す。数値は各群7匹の平均値±標準誤差を示す。異なる文字を有する群間に有意差 ($p < 0.05$) あり。

ステロール濃度は、C25群と比較して、C25NAC群とC1NAC群に有意差はなく、C1群は有意に低値を示した。

3.4 血漿中システイン濃度

図1に逆相クロマトグラフィーで得られた標準アミノ酸および血漿中チオール化合物のクロマトグラムを示す。システインは、6.67分に溶出され、内部標準物質のMPGは13.39分に溶出された。いずれも他のピークとの分離は良好であった。血漿では、システイン以外にグルタチオンが検出されたが、

NACは検出されなかった。実験飼育終了時での各群の血漿中システイン濃度 (nmol/mL) を図2に示した。血漿中システイン濃度は、それぞれC25群 2.11 ± 0.29 , C25NAC群 5.73 ± 0.60 , C1群 1.13 ± 0.20 , C1NAC群 4.48 ± 0.29 であった。C25群と比較して、C1群は有意に低値となり、C25NAC群とC1NAC群は有意に高値であった。

3.5 体毛の成長

各群の除毛部の変化を図3に示した。C25群とC25NAC群は同じペースで体毛が成長していき、

実験飼育終了時には除毛部の体毛はほぼ全て生え揃っていた。一方、C1群とC1NAC群はC25群とC25NAC群の両群と比較して体毛の成長に遅れがみられ、実験飼育終了時においても全て生え揃うことはなかった。C1群とC1NAC群を比較するとC1NAC群の方が体毛の成長が速かった。

3.6 体毛中システイン含有率

実験飼育期間中に除毛部に新しく生えた体毛を採取し、システイン含有率(%)を測定した。その結果を図4に示す。各群の値は、C25群 13.1 ± 0.2 、C25NAC群 12.8 ± 0.1 、C1群 10.1 ± 0.2 、C1NAC群 13.0 ± 0.4 であった。C25群とC25NAC群、C1NAC

群に有意差はなく、これらの群と比較してC1群でのみ有意に低下していた。

3.7 体毛抽出タンパク質の電気泳動

各群の体毛から抽出したタンパク質のSDS-PAGEの結果を図5に示した。KPsに属するタンパク質には、分子量53.5と43.0kDaの2つのバンドが検出され、KAPsに属するタンパク質には分子量25.3, 21.1, 16.3, 13.8, 12.3, 11.9, 11.1, 10.7kDaの8つのバンドが検出された。さらに、各バンドのデンストメトリー解析の結果を表5に示す。C25群と比較してC1群ではKPsの53.5と43.0kDaの2つが有意に高値となり、逆にKAPsの分子量25.3と

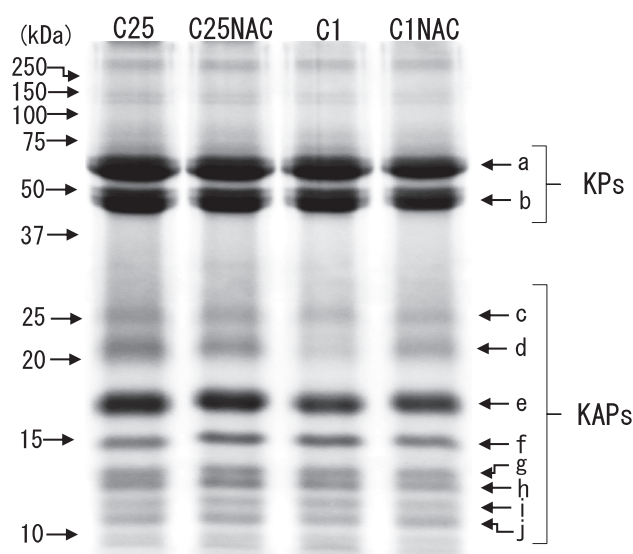


図5 各群の体毛抽出タンパク質の SDS-PAGE

体毛タンパク質を還元剤(TBP)を含む抽出液で抽出したあと、抽出されたタンパク質のシステイン残基(SH基)をMBBで蛍光標識しSDS-PAGEで分離した。検出は、UVトランスイルミネーター(365nm)で行った。数値は、分子量マーカーの位置を示し、アルファベットは検出されたバンドを示す。KPs: ケラチンタンパク質、KAPs: ケラチン付随タンパク質

表5 蛍光検出されたバンドのデンストメトリー解析による評価

	分子量 (kDa)	C25	C25NAC	C1	C1NAC
KPs	53.5	15.6 \pm 0.5 ^a	16.4 \pm 0.2 ^{a,b}	17.3 \pm 0.5 ^b	15.6 \pm 0.5 ^a
	43.0	15.9 \pm 0.3 ^a	16.4 \pm 0.3 ^{a,b}	17.5 \pm 0.3 ^b	15.8 \pm 0.3 ^a
KAPs	25.3	8.7 \pm 0.4 ^a	8.2 \pm 0.4 ^{a,b}	7.2 \pm 0.3 ^b	8.8 \pm 0.2 ^a
	21.1	7.3 \pm 0.5 ^a	7.1 \pm 0.4 ^a	5.5 \pm 0.2 ^b	8.4 \pm 0.4 ^a
	16.3	11.6 \pm 0.4	11.1 \pm 0.4	11.9 \pm 0.3	11.3 \pm 0.3
	13.8	4.6 \pm 0.2	4.5 \pm 0.3	5.0 \pm 0.3	4.5 \pm 0.2

画像解析ソフトのImageJを使用して蛍光検出されたバンドのデンストメトリー解析を行った。値は、全面積に対する各バンドのピーク面積の割合(%)を示し、各群7匹の平均値 \pm 標準誤差を示す。異なる文字を有する群間に有意差($p < 0.05$)あり。

21.1kDa の2つが有意に低値となった。C25NAC 群および C1NAC 群は、すべてにおいて C25 群と有意な差はなかった。

4. 考察

4.1 タンパク質栄養状態

タンパク質栄養状態は体重や臓器重量の変化から推定することができる¹²⁾。また、血清タンパク質のアルブミンの半減期は、ヒトでは約21日であるが、マウスでは約2日といわれている¹³⁾。そのため、血清総タンパク質濃度の変化はタンパク質代謝を反映する指標となる。

まず、25%カゼイン食を与えた C25 群では、有意な体重増加は認められなかった。この結果は、既報⁸⁾の結果と一致している。マウスの飼料中タンパク質の至適量はラットの半分で10~12%と報告されている¹⁴⁾。したがって、C25 群では、タンパク質供給量としては十分であったと考えられる。C25 群で体重増加が認められなかった理由として、除毛による影響が考えられる。マウスなどの小動物は、体熱放散が大きく熱を奪われやすい。体毛は、体温保持に関わることから、除毛によって体温保持が出来にくくなり、より多くの熱産生が必要であったと考えられる。そのため、C25 群では、エネルギー摂取量が成長のために十分でなかった可能性がある。次に、1%カゼイン食を与えた C1 群では、実験飼育開始時に相当する8週齢の値（参考値）と比較して臓器重量が低く、体重も有意な減少が認められた。また、血清総タンパク質濃度についても同様に、C25 群と比較して有意に低値であった。このことから、C1 群は、体タンパク質の分解が合成を上回った状態にあり、タンパク質欠乏状態にあったと考えられる。NAC の添加の影響については、C25NAC 群は C25 群と比較して、血清総タンパク質濃度はやや高い傾向にあったが、体重増加や臓器重量には有意な違いはなかった。そのため、標準食へ NAC を添加しても成長促進作用はほとんど無いと考えられた。一方、C1NAC 群では C1 群と同様に体重減少や血清総タンパク質濃度の低下がみられたが、C1 群と比較すると体重が重く、また、肝臓重量において有意な差が認められた。低タンパク食へ含硫アミノ酸の DL-メチオニンあるいは L-シスチンを添加した飼料をラットに与えた場合、肝臓に脂肪が蓄積し脂肪肝になることが報告されている^{15,16)}。したがって、C1NAC 群と C1 群での体重や肝臓重量の違いは脂肪の蓄積が影響している可能性がある。

なお、各群の総摂取量には差がなかったことから、摂取エネルギー量やビタミン、ミネラルは等しかっ

たと考えられる。

4.2 体毛成長

毛髪には毛周期と呼ばれる成長サイクルがある。毛周期は成長期、退行期、休止期の3期があり、成長期にのみ毛髪が形成される。ヒトの頭髪の毛周期は一本一本が独立しており、全体の85~90%が成長期となっている⁶⁾。一方、マウスやラットでは体毛の毛周期はヒトとは異なり全てが同調している。本実験で使用した C3H マウスは毛周期が明らかとされおり¹⁷⁾、また、休止期に除毛による刺激を加えると体毛の成長期が誘導されることが分かっている¹⁸⁾。そのため、本実験においては、実験食を与える前に背部体毛の除毛を行った。

体毛成長は、C25 群と C1 群を比較すると、C1 群では体毛成長に遅れがみられた。したがって、食餌タンパク質の制限は、毛包組織における細胞分裂やタンパク質合成に影響すると考えられた。Reis は、羊にメチオニンの拮抗剤であるエチオニンを投与すると、羊毛の成長が抑制されることを報告している¹⁹⁾。メチオニンは、毛髪の成分としてはほとんど含まれていないが、メチオニンの代謝物である S-アデノシル-L-メチオニンは、DNA のメチル基転移反応や細胞膜の成分であるリン脂質の合成に関わり、また、細胞増殖の促進作用を持つポリアミンの前駆体でもある²⁰⁾。C1 群では、食餌タンパク質の制限によってメチオニンが不足し、毛母細胞の細胞分裂に影響したと考えられる。また、メチオニンは、タンパク質合成における開始コドンに対応するアミノ酸であるため、メチオニンの欠乏によって毛包におけるタンパク質合成の合成が低下したと考えられる。その他、毛母細胞の細胞分裂には細胞増殖因子のインスリン様成長因子 (IGF-1) が深く関わっている²¹⁾。IGF-1 は食餌タンパク質の減少によって、肝臓での合成量や血中濃度が減少することが報告されている^{22,23)}。したがって、IGF-1 などの細胞増殖因子も関与している可能性がある。

体毛成長における NAC の添加の影響については、C25NAC 群は C25 群と比較してほとんど違いがなかった。そのため、タンパク質摂取が十分な条件でシステイン供給が増加しても体毛成長には影響しないと考えられた。一方、C1NAC 群においては、C1 群と比較して体毛成長が速かった。システイン（シスチン）にはメチオニンの節約効果があるといわれている²⁴⁾。したがって、C1NAC 群では、システイン供給が増加したことで、体毛成長におけるメチオニンの作用が増加した可能性がある。また、システイン供給の増加は、システイン含有率の高い体毛タンパク質の合成を高めたと考えられる。その他、

CINAC 群では、血清総コレステロール濃度が維持されており、C1群よりも高値であった。コレステロールはリン脂質とともに細胞膜の成分として重要であることから、CINAC 群ではC1群よりも細胞分裂が進行しやすい環境にあった可能性がある。

4.3 体毛タンパク質合成におけるシステイン供給の影響

体毛を構成するタンパク質は、他の体タンパク質と比較してシステイン含有率が高いという特徴がある。特にKAPsは非常に多くのシステインを含むことから、その合成においては多くのシステインが必要となる。我々は、体毛タンパク質合成とシステイン供給の関係について明らかとするため、血漿中システイン濃度と体毛タンパク質について評価した。

まず、血漿中システイン濃度は、C25群と比較してC1群では有意に低値となっていた。このことから、C1群では末梢組織へのシステインの供給レベルが低下していたと考えられる。一方、NACを添加したC25NAC群ならびにCINAC群の血漿中システイン濃度は、C25群と比較して有意に高値となっていた。このことから、末梢組織へのシステインの供給レベルは、非常に高い状態にあったと考えられる。次に、各群の体毛タンパク質を評価すると、体毛中システイン含有率は、C25群と比較してC1群は有意に低下していた。しかし、NACを添加したCINAC群はC1群よりも高値となり、C25群と

同等であった。また、C25 NAC 群についてはC25群と違いがなかった。システイン含有率は、体毛のKPsとKAPsの構成割合を反映し、その低下はシステイン含有率の高いKAPsの構成割合が低下していることを示す。したがって、C1群では、KAPsの構成割合が低下し、CINAC群ではKAPsの構成割合が保たれていた。この結果は、体毛タンパク質の電気泳動による評価とも一致しており、C1群ではKAPsの一部が減少していたが、CINAC群ではこの減少はなくC25群と違いがなかった。

これらの結果を踏まえると、タンパク質摂取の低下によって、血漿中システイン濃度が低下した場合、毛包組織へのシステイン供給が低下し、KAPsのUHSPsあるいはHSPsの合成に影響を及ぼすと考えられた。また、NACを添加したC25NAC群とCINAC群の血漿中システイン濃度は、C25群よりも高いレベルにあったが、体毛タンパク質の評価において違いがなかった。この結果は、システインが過剰に供給されたとしても、毛乳頭でのシステインの取り込みや毛包組織でのタンパク質合成に限界があることを示唆する。

5. 結語

本研究の結果は、体毛形成におけるKAPs合成が、タンパク質欠乏にともなうシステイン供給量の減少によって低下することを示した。

文 献

- 1) Andreas M and Finner MD : Nutrition and hair : deficiencies and supplements. *Dermatologic Clinics*, **31** (1), 167-72, 2013.
- 2) 谷 守 : 身体症状からみる栄養評価 5. 爪甲, 毛髪. 臨床栄養, **111** (5), 588-592, 2007.
- 3) Clarence RR : 毛髪の科学. 第4版, フレグランスジャーナル社, 東京, 1-119, 2000.
- 4) Powell BC and Rogers GE : Hard keratin IF and associated proteins. *Cellular and molecular biology of intermediate filaments*, Plenum Press, New York, 267-300, 1990.
- 5) Gillespie JM : The proteins of hair and other hard α -keratins. *Cellular and molecular biology of intermediate filaments*, Plenum Press, New York, 95-128, 1990.
- 6) Powell BC, Nesci A, and Rogers GE : Regulation of keratin gene expression in hair follicle differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **642**, 1-20, 1991.
- 7) Beach EF, Munk B and Robinson A : The amino acid composition of animal tissue protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **148**, 431-439, 1943.
- 8) 中村博範, 金澤健一郎, 松枝秀二 : マウスのタンパク質栄養状態と体毛タンパク質合成の関係について. 川崎医療福祉学会誌, **22** (2), 200-207, 2013.
- 9) Dilger RN and Baker DH : Oral N-acetyl-L-cysteine is safe and effective precursor of cysteine. *Journal of Animal Science*, **85**, 1712-1718, 2007.
- 10) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275, 1951.
- 11) Toyooka T, Uchiyama S and Saito Y : Simultaneous determination of thiols and disulfides by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, **205**, 29-41, 1988.
- 12) 岸恭一, 木戸康博 : タンパク質・アミノ酸の新栄養学. 講談社, 東京, 199-205, 2007.

- 13) 船引龍平：蛋白質代謝回転の意味 蛋白質代謝理論の史的展開（Ⅲ）. 化学と生物, **133** (5), 334–340, 1995.
- 14) 中田忍, 木村利二：タンパク質栄養研究におけるマウスの利用. 日本栄養・食糧学会誌, **40** (2), 111–116, 1987.
- 15) 青山頼孝, 吉田 昭：アミノ酸インバランスと肝脂質の異常蓄積. 化学と生物, **11** (3), 168–175, 1973.
- 16) Gregory S and Kelly ND : Pantethine : A review of its biochemistry and therapeutic applications. *Alternative Medicine Review*, **2** (5), 365–376, 1997.
- 17) 横山大三郎：男性型脱毛症と育毛有効成分. 油化学, **44** (4), 266–273, 1995.
- 18) Hamada K and Suzuki K : Evaluation of biochemical indices as a hair cycle marker in C3H mice. *Experimental Animals*, **45**, 251–256, 1996.
- 19) Reis PJ and Tunks DA : Inhibitory effects of ethionine, an analogue of methionine, on wool growth. *Australian Journal of Biological Sciences*, **35**, 49–62, 1982.
- 20) Hynd PI and Nancarrow MJ : Inhibition of polyamine synthesis alters hair follicle function and fiber composition. *Journal of Investigative Dermatology*, **106**, 249–253, 1996.
- 21) 坪井良治, 小川秀興：細胞増殖因子による毛成長の制御. 日本皮膚科学会雑誌, **107**, 1708–1710, 1997.
- 22) Takahashi S, Kajikawa M, Umezawa T, Takahashi SI, Kato H, Miura Y, Nam TJ, Noguchi T and Naito H : Effect of dietary proteins on the plasma immunoreactive insulin-like growth factor- I /somatomedin C concentration in the rat. *British Journal of Nutrition*, **63**, 521–534, 1990.
- 23) Miura Y, Kato H and Noguchi T : Effect of dietary proteins on insulin-like growth factor- I (IGF- I) messenger ribonucleic acid content in rat liver. *British Journal of Nutrition*, **67**, 257–265, 1992.
- 24) Finkelstein JD, Martin JJ and Harris BJ : Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 11750–11754, 1988.

(平成25年11月20日受理)

The Effect of Dietary Protein and Cysteine Supplementation on Hair Protein Synthesis in Mice

Hironori NAKAMURA, Kenichiro KANAZAWA and Shuji MATSUEDA

(Accepted Nov. 20, 2013)

Key words : cysteine, hair, keratin, malnutrition, mice

Abstract

We previously reported that the proportion of keratin-associated proteins (KAPs) in hair decreased in mice fed a protein-deficient diet. The cysteine content of KAPs is very high compared to other proteins found throughout the body. Therefore, the synthesis of KAPs may be affected by the supply of cysteine. In this study, we investigated the relationship between the dietary cysteine levels and hair protein synthesis in mice. Eight-week-old male C3H mice had back hair removed and were fed a 25% casein diet (C25; standard diet), 1% casein diet (C1; protein-deficient diet), C25 plus N-acetyl-L-cysteine (NAC) diet (C25NAC), or C1 plus NAC diet (C1NAC) for four weeks. Results of the experiment showed that in the C1 and C1NAC groups body weight was significantly decreased and the total serum protein levels were significantly lower than those in the C25 and C25NAC groups. Cysteine levels in the plasma were significantly decreased in the C1 group compared to the C25 group, but the cysteine levels in the C1NAC and C25NAC groups were significantly increased. The cysteine content rate in hair was significantly lower in the C1 group than in other groups. In addition, the synthesis of 25.3-kDa and 21.1-kDa proteins belonging to KAPs was significantly decreased in the C1 group compared to the C25 group and did not decrease in the C1NAC group. These results indicated that the synthesis of KAPs during hair formation decreased by the decrease in dietary cysteine levels due to protein deficiency.

Correspondence to : Hironori NAKAMURA

Department of Clinical Nutrition

Faculty of Health Science and Technology

Kawasaki University of Medical Welfare

Kurashiki, 701-0193, Japan

E-mail : hironori@mw.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.23, No.2, 2014 243 – 253)

