

学位論文題名

消化管における食品タンパク質の認識と膵外分泌の調節機構

学位論文内容の要旨

摂取した食事成分は消化管を通過する際に様々な生理作用を引き起こす。膵酵素分泌亢進作用もその一種である。最も研究のさかんなラットの場合、タンパク質に強い分泌亢進作用が認められている。従来の説では食餌タンパク質による膵酵素分泌亢進は消化管腔内プロテアーゼ活性、特にトリプシン活性に依存した負のフィードバック機構により調節されていると考えられていた。これに対して当研究室でのこれまでの研究から、既存の調節系以外の、食餌タンパク質が直接消化管を刺激して膵酵素分泌を調節する機構が存在する可能性が見いだされた。これは、消化管が栄養成分を直接認識するといった消化管の未知なる機能の発見につながる極めて重要な発見である。本研究ではタンパク質の消化管への直接作用を証明することを主たる目的とした。そこで、グアニジル化カゼインのペプシン分解物 (HGC) をモデルタンパク質とし、HGC と小腸細胞との反応によって生じる膵酵素放出因子、中でも特にその役割の大きな Cholecystokinin (CCK) の放出について検討した。グアニジル化カゼインはカゼイン中のリジン残基をホモアルギニンに修飾したタンパク質で、顕著な膵酵素分泌亢進作用を示すことを既に確認している。

1、HGCによる小腸細胞からの膵酵素放出因子の分泌刺激効果の検討

ラット小腸より単離した粘膜細胞を用いて細胞カラムを作成した。これに大豆トリプシンインヒビター (SBTI) を灌流して残存トリプシンを除去した後、HGC を灌流した。灌流液をラット膵腺房細胞と反応させたところ、膵腺房細胞からのアミラーゼ放出増加が認められた。これより、灌流時に生じるHGCと小腸細胞との反応により、小腸細胞からの膵酵素放出因子の分泌が刺激されることが示された。この現象は高濃度のSBTIでも認められた。そこで、SBTIと同程度のトリプシン阻害能を有するアオイマメトリプシンインヒビター (LBTI) による灌流を行った。しかし、LBTIでは小腸細胞からの膵酵素放出因子の有意な分泌増加は確認されなかった。インタクトカゼインペプシン分解物 (HIC) についても同様の検討を行ったが、膵酵素放出因子の分泌は認められなかった。これらの結果より、HGCやSBTIは残存トリプシン活性に非依存的に小腸細胞を直接刺激して膵酵素放出因子の分泌を亢進させることが明らかとなった。アミノ酸分析の結果、HGC及びSBTIにはグアニジル基含有アミノ酸が多量に含まれていることが判明した。これより、HGCやSBTIの小腸細胞刺激効果にはペプチド鎖中のグアニ

シル基が関与することが示唆された。

2、胆膵液空腸除去ラットでのHGCによる神経系非依存型のCCK放出刺激効果

カテーテル留置により上部消化管より胆膵液を除去したラットに副交感神経遮断薬（アトロピン）を経時的に投薬して神経系を遮断した。この条件下で十二指腸にHGCを投与したところ、膵酵素分泌の有意な亢進と血中CCK濃度の有意な増加が観察された。この結果より、HGCの小腸細胞直接刺激による膵酵素放出因子（CCK）の分泌亢進と、それによって生じる膵酵素分泌調節が全動物レベルにおいて作用していることが明らかとなった。HICではHGCで見られたこれらの増加は観察されず、この実験からもHGCの小腸細胞直接刺激におけるグアニジル基の関与が示唆された。

3、CCK放出活性を有するHGC中の活性ペプチドの検索

HGC中のペプチドを極性及び分子量を指標として分画した。これらをそれぞれラット小腸細胞と反応させ、放出するCCK量を測定した。その結果、複数の画分でCCK放出が刺激される傾向が認められた。これらの結果から、HGC中には複数のCCK放出活性ペプチドが存在することが明らかとなった。グアニジル化カゼインのアミノ酸配列を検索したところ、内因性CCK放出ペプチド（monitor peptide）のCCK産生細胞結合部位と類似した構造が各所に認められた。これらの構造中にはグアニジル基が含有されており、この様な構造を有するHGC中のペプチドがCCK産生細胞と結合することでCCK放出活性を示すものと推察した。又、数種の食品タンパク質（カゼイン、分離大豆タンパク質、卵白、小麦グルテン）のペプシン分解物をそれぞれ小腸細胞と反応させたところ、いずれのタンパク質でも有意なCCK放出が観察された。特にアルギニン含量の高い分離大豆タンパク質で強いCCK放出効果が認められた。

以上のことから、HGCの膵酵素分泌調節機構について、HGCが直接小腸細胞に作用してCCKの放出を刺激し、これが調節因子として働き膵酵素分泌が亢進することが明らかとなった。この効果は通常の食品タンパク質にも存在することが示されると共に、これらの作用にはペプチド鎖中のグアニジル基が関与することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 西 隆 則
副 査 教 授 青 山 頼 孝
副 査 教 授 本 間 守
副 査 助 教 授 原 博

学位論文題名

消化管における食品タンパク質の認識と膵外分泌の調節機構

本論文は総頁数117ページの論文で、表17、図35、引用文献106を含み、6章で構成されている。別に参考論文3編が添えられている。

摂取した食事成分は消化管を通過する際に様々な生理作用を引き起こす。膵酵素分泌亢進作用もその一種である。最も研究のさかんなラットの場合、タンパク質に強い分泌亢進作用が認められている。従来の説では食餌タンパク質による膵酵素分泌亢進は消化管腔内プロテアーゼ活性、特にトリプシン活性に依存した負のフィードバック機構により調節されていると考えられていた。これに対して当研究室でのこれまでの研究から、既存の調節系以外の、食餌タンパク質が直接消化管を刺激して膵酵素分泌を調節する機構が存在する可能性が見いだされた。これは、消化管が栄養成分を直接認識するといった消化管の未知なる機能の発見につながる極めて重要な発見である。本研究ではタンパク質の消化管への直接作用を証明することを主たる目的とした。そこで、グアニジル化カゼインのペプシン分解物(HGC)をモデルタンパク質とし、HGCと小腸細胞との反応によって生じる膵酵素放出因子、中でも特にその役割の大きなCholecystokinin(CCK)の放出について検討した。グアニジル化カゼインはカゼイン中のリジン残基をホモアルギニンに修飾したタンパク質で、顕著な膵酵素分泌亢進作用を示すことを既に確認している。

1、HGCによる小腸細胞からの膵酵素放出因子の分泌刺激効果の検討

ラット小腸より単離した粘膜細胞を用いて細胞カラムを作成した。これに大豆トリプシンインヒビター(SBTI)を灌流して残存トリプシンを除去した後、HGCを灌流した。灌流液をラット膵腺房細胞と反応させたところ、膵腺房細胞からのアミラーゼ放出増加が認められた。これより、灌流時に生じるHGCと小腸細胞との反応により、小腸細胞からの膵酵素放出因子の分泌が刺激されることが示された。この現象は高濃度のSBTIでも認められた。そこで、SBTIと同程度のトリプシン阻害能を有するアオイマメ

トリプシンインヒビター(LBTI)による灌流を行った。しかし、LBTIでは小腸細胞からの膵酵素放出因子の有意な分泌増加は確認されなかった。インタクトカゼインペプシン分解物(HIC)についても同様の検討を行ったが、膵酵素放出因子の分泌は認められなかった。これらの結果より、HGCやSBTIは残存トリプシン活性に非依存的に小腸細胞を直接刺激して膵酵素放出因子の分泌を亢進させることが明らかとなった。アミノ酸分析の結果、HGC及びSBTIにはグアニジル基含有アミノ酸が多量に含まれていることが判明した。これより、HGCやSBTIの小腸細胞刺激効果にはペプチド鎖中のグアニジル基が関与することが示唆された。

2、胆膵液空腸除去ラットでのHGCによる神経系非依存型のCCK放出刺激効果

カテーテル留置により上部消化管より胆膵液を除去したラットに副交感神経遮断薬(アトロピン)を経時的に投薬して神経系を遮断した。この条件下で十二指腸にHGCを投与したところ、膵酵素分泌の有意な亢進と血中CCK濃度の有意な増加が観察された。この結果より、HGCの小腸細胞直接刺激による膵酵素放出因子(CCK)の分泌亢進と、それによって生じる膵酵素分泌調節が全動物レベルにおいて作用していることが明らかとなった。HICではHGCで見られたこれらの増加は観察されず、この実験からもHGCの小腸細胞直接刺激におけるグアニジル基の関与が示唆された。

3、CCK放出活性を有するHGC中の活性ペプチドの検索

HGC中のペプチドを極性及び分子量を指標として分画した。これらをそれぞれラット小腸細胞と反応させ、放出するCCK量を測定した。その結果、複数の画分でCCK放出が刺激される傾向が認められた。これらの結果から、HGC中には複数のCCK放出活性ペプチドが存在することが明らかとなった。グアニジル化カゼインのアミノ酸配列を検索したところ、内因性CCK放出ペプチド(monitor peptide)のCCK産生細胞結合部位と類似した構造が各所に認められた。これらの構造中にはグアニジル基が含有されており、この様な構造を有するHGC中のペプチドがCCK産生細胞と結合することでCCK放出活性を示すものと推察した。又、数種の食品タンパク質(カゼイン、分離大豆タンパク質、卵白、小麦グルテン)のペプシン分解物をそれぞれ小腸細胞と反応させたところ、いずれのタンパク質でも有意なCCK放出が観察された。特にアルギニン含量の高い分離大豆タンパク質で強いCCK放出効果が認められた。

以上のことから、HGCの膵酵素分泌調節機構について、HGCが直接小腸細胞に作用してCCKの放出を刺激し、これが調節因子として働き膵酵素分泌が亢進することを明らかにした。この効果は通常の食品タンパク質にも存在することが示された。この様に、外因性タンパク質の消化管への直接刺激による生理作用発現を報告した例はほとんど無い。本研究でその一端を明らかにしたことは高く評価される。よって審査員一同は、西 隆司が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。