

学 位 論 文 題 名

ラット膵外分泌応答を指標とした消化管における
食品タンパク質の認識機構に関する研究

学位論文内容の要旨

生体が栄養素を自己の構成成分、エネルギー源として利用するには摂取した食品の消化、吸収という過程が必須である。栄養素を消化するための酵素が膵臓から小腸管腔内へ供給されるが、この膵外分泌という生理現象は栄養素の中でもタンパク質摂取により強く刺激される。これは消化管がタンパク質を何らかの機構で認識していることを示している。ラットにおいては消化管に入った食品タンパク質が胆膵液由来の膵プロテアーゼ活性をマスクすることにより、膵プロテアーゼによる分解を逃れた内因性の消化管ホルモン放出因子が、小腸粘膜上のホルモン産生細胞に作用して膵臓へと情報を伝えるとされている。この食品タンパク質が間接的に認識される機構は、上部小腸管腔内の膵プロテアーゼが必須であり、胆膵液に依存した調節系と言える。当研究室では外科的手術により無麻酔、無拘束下でカテーテルから任意に胆膵液を採取できるラットを作製し、膵外分泌を観察できる実験系を確立している。この中で胆膵液を上部小腸に流さず、回腸部位へ戻した胆膵液除去ラットでも食品タンパク質摂取により膵外分泌が刺激されることが見出され、胆膵液に依存しない膵外分泌調節機構の存在、即ち小腸粘膜上で食品タンパク質が直接認識される可能性が考えられた。本研究では膵外分泌応答を指標として、新たな食品タンパク質認識機構（膵外分泌調節機構）の存在を証明し、その機構の解明を目的とした。

1. 胆膵液除去ラットにおける食品タンパク質摂取に対する膵外分泌応答が、胆膵液に依存しない調節系によるものであることを確かめるため、胆膵液依存性の機構の刺激因子である、トリプシンインヒビター投与と消化管腔内からの胆膵液の完全除去に対する膵外分泌応答を調べた。胆膵液除去ラットの十二指腸に同濃度の大豆トリプシンインヒビター（SBTI）または合成トリプシンインヒビター FOY 305 (camostat) [N, N-Dimethylcarbamoylmethyl 4-(4-guanidinobenzoyloxy) phenylacetate methanesulfonate]を投与したところ、SBTI 投与群でのみ膵外分泌が刺激された。ト

トリプシン阻害能は FOY 305 の方が強力であることから、SBTI による膵外分泌刺激はトリプシン阻害能に関係せず、タンパク質としての性質によるものであることが示唆された。これらを胆膵液の存在する回腸部位に投与しても膵外分泌は刺激されず、回腸部位の胆膵液を体外へ排除しても膵外分泌は刺激されなかった。これにより胆膵液除去ラットにおいて下部小腸の胆膵液に依存した膵外分泌調節は起きないことが確かめられ、食品タンパク質や SBTI は胆膵液の存在しない上部小腸で認識され、膵外分泌を調節することが明らかとなった。

2. 胆膵液除去ラットでの存在が確認された胆膵液非依存性の膵外分泌調節が、上部小腸管腔内に胆膵液が存在する正常ラットでも存在するのかを検討するため、*in vitro* で同程度のトリプシン阻害能を持つ食品タンパク質（カゼイン加水分解物）と合成トリプシンインヒビター（FOY 305）を正常ラットに投与して膵外分泌の応答を調べた。ラット小腸内容物をトリプシン源として、トリプシンの合成基質分解に対するカゼイン加水分解物と FOY 305 の阻害活性を検討したところ、10 $\mu\text{g/ml}$ の FOY 305 と 200 mg/ml のカゼイン加水分解物がほぼ同程度の値を示した。小腸内容物中のトリプシン濃度に設定した精製トリプシンに対しては、200 mg/ml のカゼイン加水分解物よりも 10 $\mu\text{g/ml}$ の FOY 305 の方が強力な阻害活性を示した。小腸内容物中のトリプシン活性に対してほぼ同程度の阻害活性を示した 10 $\mu\text{g/ml}$ の FOY 305 と 200 mg/ml のカゼイン加水分解物、これらよりわずかに低い阻害活性を示した 100 mg/ml のカゼイン加水分解物を正常ラットの十二指腸に投与したところ、カゼイン加水分解物は濃度依存的に膵外分泌を刺激したが、FOY 305 は膵外分泌を刺激しなかった。このことから正常ラットにおけるカゼイン加水分解物による膵外分泌刺激は、トリプシン阻害能に依存しないことが示され、正常ラットにおいても胆膵液非依存性の機構が食品タンパク質に対する膵外分泌応答を調節していることが示唆された。この新たな調節系にタンパク質中のどのような構造が関与しているのかを調べることを目的として以後の実験を行った。
3. 以前の実験により、カゼイン中のリジンをホモアルギニンに修飾したグアニジル化カゼインがインタクトなカゼインよりも強力に膵外分泌を刺激したことから、タンパク質中のグアニジル基が膵外分泌調節に関与している可能性が考えられた。そこでグアニジル基を有するアミノ酸であるホモアルギニンを正常ラット、胆膵液除去ラットに投与して膵外分泌の応答を調べた。正常ラットでは管腔、腹腔いずれに投与しても膵外分泌に変化は見られなかった。一方胆膵液除去ラットでは管腔内に投与した場合には有意な変化は見られなかったが、腹腔内に投与すると

膵外分泌を抑制した。この結果からホモアルギニンが消化管ホルモンコレシストキニン（CCK）のアンタゴニスト、あるいは副交感神経系のブロッカーとしての作用を持つ可能性が考えられたが、膵外分泌を刺激する作用はないことが明らかとなった。これにより胆膵液非依存性の膵外分泌調節には遊離ホモアルギニンのグアニジル基ではなく、タンパク質としての構造とグアニジル基が伴って関与することが示唆された。

4. 胆膵液非依存性の膵外分泌調節におけるタンパク質中のグアニジル基の関与を検討するため、サケの白子に含まれる高アルギニン含有の天然タンパク質であるプロタミンを用いて膵外分泌応答を調べた。プロタミンを正常ラット、胆膵液除去ラットの十二指腸に投与すると、いずれにおいても膵外分泌は亢進した。次に、ヒドラジン処理により脱グアニジル化プロタミンを調整してネイティブなプロタミンとの膵外分泌を比較した。アミノ酸組成を分析すると、プロタミンはアルギニンを 60 mol%含有しており、脱グアニジル化によりアルギニンはオルニチンに変換され、アルギニン含量は約 1/8 に低下していた。ネイティブなプロタミン、脱グアニジル化プロタミンを正常ラットおよび胆膵液除去ラットに投与すると、プロタミンは両ラットの膵外分泌を刺激したが、脱グアニジル化プロタミンはいずれのラットにおいても膵外分泌を刺激しなかった。また、プロタミンに含まれる量のアルギニンを正常ラット、胆膵液除去ラットに投与しても膵外分泌は刺激されなかった。これらの結果からプロタミンの膵外分泌刺激作用には小腸管腔内の胆膵液の有無に関わらず、グアニジル基が関与していることが示された。

以上のように、胆膵液に依存しない新たな膵外分泌調節系の存在が胆膵液除去ラットにおいて確かめられ、正常ラットにおいてもこの機構による調節を受けることが示された。この新たな膵外分泌調節機構の存在は食品タンパク質が小腸粘膜で直接認識されることを示しており、その機構にはタンパク質中のグアニジル基が関与することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	青山	頼孝
副査	教授	本間	守
副査	教授	葛西	隆則
副査	助教授	原	博

学位論文題名

ラット膵外分泌応答を指標とした消化管における 食品タンパク質の認識機構に関する研究

生体が栄養素を自己の構成成分、エネルギー源として利用するには摂取した食品の消化、吸収という過程が必須である。栄養素を消化するための酵素が膵臓から小腸腔内へ供給されるが、この膵外分泌という生理現象は栄養素の中でもタンパク質摂取により強く刺激される。これは消化管がタンパク質を何らかの機構で認識していることを示しており、ラットにおいては消化管腔内の膵プロテアーゼの基質特異性を利用した機構により説明されている。この機構は消化管腔内の胆膵液に依存しており、食品タンパク質は消化管上皮に直接は作用しないと考えられている。

当研究室では胆膵液を上部小腸に流さず、回腸部位へ戻した胆膵液除去ラットを作製し、無麻酔、無拘束下でカテーテルから任意に胆膵液を採取でき、膵外分泌を観察できる実験系を確立している。このラットにおいても食品タンパク質摂取により膵外分泌が刺激されることが見出され、胆膵液に依存しない膵外分泌調節機構の存在、即ち小腸粘膜上で食品タンパク質が直接認識される可能性が考えられた。本研究では膵外分泌応答を指標として、新たな食品タンパク質認識機構（膵外分泌調節機構）の存在を証明し、その機構の解明を目的とした。

1. 胆膵液除去ラットにおける食品タンパク質摂取に対する膵外分泌応答が、胆膵液に依存しない調節系によるものであることを確かめるため、胆膵液依存性の機構の刺激因子である、トリプシンインヒビター投与と消化管腔内からの胆膵液の完全除去に対する膵外分泌応答を調べた。胆膵液除去ラットの十二指腸に同濃度の大豆トリプシンインヒビター (SBTI) または合成トリプシンインヒビター FOY 305 (camostat) [N, N-Dimethylcarbamoylmethyl 4-(4-guanidinobenzoyloxy) phenylacetate methanesulfonate] を投与したところ、SBTI 投与群でのみ膵外分泌が刺激された。トリプシン阻害能は FOY 305 の方が強力であることから、SBTI による膵外分泌刺激はトリプシン阻害能に関係せず、タンパク質としての性質によるものであることが

示唆された。次にこれらを胆膵液の存在する回腸部位に直接投与しても膵外分泌は刺激されず、回腸部位の胆膵液を体外へ排除しても膵外分泌は刺激されなかった。これにより胆膵液除去ラットの膵外分泌調節に下部小腸の胆膵液は寄与しないことが確かめられ、食品タンパク質や SBTI は胆膵液の存在しない上部小腸で認識され、膵外分泌を調節することが明らかとなった。

2. 胆膵液除去ラットでの存在が確認された胆膵液非依存性の膵外分泌調節が、上部小腸管腔内に胆膵液が存在する正常ラットでも作動するのかを検討するため、*in vitro* で同程度のトリプシン阻害能を持つ食品タンパク質（カゼイン加水分解物）と合成トリプシンインヒビター（FOY 305）を正常ラットに投与して膵外分泌の応答を調べた。小腸内容物中のトリプシン活性に対してほぼ同程度の阻害活性を示した 10 $\mu\text{g/ml}$ の FOY 305 と 200 mg/ml のカゼイン加水分解物、これらよりわずかに低い阻害活性を示した 100 mg/ml のカゼイン加水分解物を正常ラットの十二指腸に投与したところ、カゼイン加水分解物は濃度依存的に膵外分泌を刺激したが、FOY 305 は膵外分泌を刺激しなかった。このことから正常ラットにおけるカゼイン加水分解物による膵外分泌刺激は、トリプシン阻害能に依存しないことが示され、正常ラットにおいても胆膵液非依存性の機構が食品タンパク質に対する膵外分泌応答を調節していることが示唆された。
3. 以前の実験により、カゼイン中のリジンをホモアルギニンに修飾したグアニジル化カゼインがインタクトなカゼインよりも強力に膵外分泌を刺激したことから、タンパク質中のグアニジル基が膵外分泌刺激作用に関与している可能性が考えられた。そこでグアニジル基を有するアミノ酸であるホモアルギニンを正常ラット、胆膵液除去ラットの管腔内または腹腔内に投与して膵外分泌の応答を調べた。いずれも膵外分泌を刺激する作用は見られず、胆膵液除去ラットの腹腔内に投与したときにのみ膵外分泌の抑制が見られた。これにより胆膵液非依存性の膵外分泌刺激には遊離ホモアルギニンのグアニジル基ではなく、タンパク質としての構造とグアニジル基が伴って関与することが示唆された。
4. 胆膵液非依存性の膵外分泌調節におけるタンパク質中のグアニジル基の関与を検討するため、サケの白子に含まれる高アルギニン含有（約 60 mol%）の天然タンパク質であるプロタミンを用いて膵外分泌応答を調べた。プロタミンを正常ラット、胆膵液除去ラットの十二指腸に投与すると、いずれにおいても膵外分泌は亢進した。次に、ヒドラジン処理により脱グアニジル化プロタミン（Arg 含量は約 1/8 に減少）を調整してネイティブなプロタミンとの膵外分泌を比較した。プロタミンの正常ラットおよび胆膵液除去ラットへの投与は膵外分泌を刺激したが、脱グアニジル化プロタミンはいずれのラットにおいても膵外分泌を刺激しなかった。また、プロタミンに含まれる量のアルギニンを正常ラット、胆膵液除去ラットに投与しても膵外分泌は刺激されなかった。これらの結果からプロタミンの膵外分泌刺激作用には小腸管腔内の胆膵液の有無に関わらず、タンパク質中のグアニジル基が関与していることが示された。

以上により、胆膵液に依存しない新たな膵外分泌調節系の存在が胆膵液除去ラットにおいて確かめられ、正常ラットにおいてもこの機構が存在することが示された。この新たな膵外分泌調節機構の存在は食品タンパク質が小腸粘膜で直接認識されることを示しており、消化管がタンパク質中のグアニジル基を認識することが明らかとなった。

よって審査委員一同は、比良徹が博士（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。