

高アミノ酸食による膵酵素活性調節機構の解析

学位論文内容の要旨

小腸内での消化を担う膵酵素は栄養素により膵臓内での活性の調節を受ける。すなわち、ラットでは高アミノ酸食によりキモトリプシン等の膵プロテアーゼが誘導され、膵臓中のアミラーゼ活性は抑制される。

膵プロテアーゼ誘導因子としては消化管ホルモンであるコレシストキニン（cholecystokinin、CCK）が知られているが、高アミノ酸食による膵プロテアーゼ誘導は CCK に依存せず、その機構は不明である。一方、膵アミラーゼの誘導因子としてはインスリンが知られている。膵アミラーゼ活性が低下する糖尿病ラットにインスリンを投与することで正常ラットと同程度までアミラーゼ活性が回復し、また、高アミノ酸食、すなわち低炭水化物食によるアミラーゼ活性の抑制は、食餌によるインスリン分泌刺激が小さいために引き起こされると推察されてきた。一方、食餌中のアミノ酸組成もアミラーゼ活性に影響を与えることが報告されているが、その機構は不明であり、中心的に作用するアミノ酸の種類も不明である。本研究では、膵プロテアーゼとアミラーゼの活性調節に関して、これら不明な点を明らかにする目的で実験を行った。

1. 膵酵素活性調節因子の検索

筋肉等の組織において、分岐差アミノ酸（BCAA）はタンパク質合成における翻訳の開始段階を活性化させることにより体タンパク質合成を促進する事が知られている。そこで、高アミノ酸食による膵プロテアーゼ誘導における BCAA の役割を調べた。ラットに 20%アミノ酸（AA）食、20%AA 食に BCAA または BCAA 以外の AA を添加した食餌及び 60%AA 食を自由摂取させ、7 日間飼育した。その結果、20%AA 食群と比較し、BCAA 添加食群で部分的にはキモトリプシンは誘導されたものの、血中 BCAA 濃度とキモトリプシン活性との相関は見られず、血中スレオニン（Thr）濃度とキモトリプシン活性との間に有意な負の相関が見られた。一方、20%AA 食に対し BCAA 添加食は膵アミラーゼ活性を 60%AA 食と同程度まで低下させた。そこで、次に、血中 Thr 濃度とキモトリプシン誘導の関連を調べた。ラットに 20%AA 食、60%AA 食及び 20%AA 食に Thr を添加した食餌を 7 日間自由摂取させた。その結果、20%AA 食群と比較し、60%AA 食群で有意にプロテアーゼ活性が高値となり、血中 Thr 濃度は低値となったのに対し、Thr 添加食群ではキモトリプシン活性は低値となり、血中 Thr 濃度は高値となった。以上の結果より、血中 Thr 濃度の低下は高アミノ酸食によるキモトリプシンの誘導因子となることが示唆され、食餌中の BCAA は膵アミラーゼ活性の抑制因子となることが示唆された。

2. 高アミノ酸食によるキモトリプシン誘導機構の解析

次に高アミノ酸食によるキモトリプシン誘導の細胞内の機構解析を行った。ラットに 20%AA 食及び

60%AA 食を自由摂取させ、7 日目飼育した。キモトリプシンについて、20%AA 食群と比較して 60%AA 食群での酵素活性、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンの取り込み量を指標とした合成速度が亢進したのに対し、mRNA レベルは群間での差が見られなかったことから、高アミノ酸食によるキモトリプシンの誘導は翻訳段階での調節であることが示唆された。ある種のアミノ酸は翻訳開始段階を活性化するが、その活性は摂食開始からの数十分で高値となり、その後低下するという報告があることから、次にキモトリプシン活性と翻訳開始活性を摂食開始から経時的に測定した。ラットに 20%AA 食及び 60%AA 食を暗期にのみ与え、7 日目の再給餌後、0、1、3 時間目にサンプリングを行った。キモトリプシン活性は 20%AA 食群では経時的な変化が見られなかったのに対し、60%AA 食群では経時的に増加した。キモトリプシン mRNA レベルに関しては、群間差および経時的な変化は見られなかった。翻訳開始活性の指標の一つである eukaryotic initiation factor 4E-binding protein1 (4E-BP1) のリン酸化 (γ -form) の程度に関しては、20%AA 食群では、0 時間目と比較し、1 時間目には増加したが、3 時間目で減少し、0 時間目との有意差が無くなったのに対し、60%AA 食群では 0 時間目と比較し、1、3 時間目で有意な上昇が見られた。この翻訳開始活性の動向は他の指標においても同様な傾向が見られた。また、4E-BP1 の γ -form の割合と脾臓中の遊離 BCAA 濃度、キモトリプシン活性との間にそれぞれ有意な正の相関が見られた。以上のことから、高アミノ酸食摂取により、主に食餌中の BCAA が翻訳開始段階を活性化させ、摂食開始後 3 時間目までのキモトリプシン活性の亢進に寄与したことが示唆された。

3. 高アミノ酸食による膵アミラーゼ活性抑制機構の解析

先の実験で食餌中の BCAA がアミラーゼ活性を抑制することが示唆されたため、食餌中の BCAA によるアミラーゼ活性抑制機構を解析し、既知の膵アミラーゼ誘導因子であるインスリンとの関連を調べた。ラットに 20%AA 食、20%AA 食に BCAA または BCAA 以外の AA を添加した食餌及び 60%AA 食を与え、7 日間飼育した。その結果、20%AA 食と比較し、BCAA 添加食は 60%AA 食と同程度までアミラーゼの酵素活性及び mRNA レベルを低下させたのに対し、BCAA 以外の AA を添加した食餌は、炭水化物含量が 20%AA 食の約半分であるにも関わらず、これらの指標を低下させなかった。さらに、血中インスリン濃度に群間の差は見られず、インスリン濃度とアミラーゼ活性との間に相関は見られなかった。しかし、インスリン濃度は摂食開始直後に大きく変動し、それがアミラーゼ発現に影響を与えた可能性があるため、これら 4 種類の食餌の摂取開始後 1 時間目と 3 時間目のインスリン濃度も測定したが、それぞれアミラーゼ活性とは相関しなかった。以上のことから、高アミノ酸食による膵アミラーゼ活性抑制は主に食餌中の BCAA 含量に依存した mRNA レベルでの調節で、食餌中の炭水化物含量及びインスリンの寄与は小さいことが示唆された。

以上の結果をまとめると、高アミノ酸食による膵プロテアーゼ誘導には血中 Thr 濃度の低下が関与し、また、高アミノ酸食摂取開始後、数時間のプロテアーゼ誘導は BCAA 等のアミノ酸による翻訳開始段階の活性化が寄与していることが示唆された。

また、高アミノ酸食による膵アミラーゼ活性の抑制に関しては、食餌中の BCAA 含量に依存した、mRNA レベルでの調節であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	原	博
副査	教授	川端	潤
副査	助教授	園山	慶
副査	講師	石塚	敏

学位論文題名

高アミノ酸食による膵酵素活性調節機構の解析

本論文は110頁からなる和論文であり、図29、表31を含む。

タンパク質構成要素以外のアミノ酸の生理作用は多数知られており、近年、脚光を浴びている栄養素である。高アミノ酸食は、膵プロテアーゼ誘導因子であるコレシストキニンに非依存的にキモトリプシン等の膵プロテアーゼを誘導する。また、膵アミラーゼ活性は高アミノ酸食摂取により低下するが、インスリン等のホルモンや食餌中のアミノ酸組成によっても調節を受けるという報告がある。しかし、高アミノ酸食による膵酵素活性調節に中心的に作用するアミノ酸及びその機構は不明であることから、本研究はこれらの点を解明する目的で行われた。まず、タンパク質合成の翻訳開始段階を活性化させることでタンパク質合成を促進する分岐鎖アミノ酸（BCAA）に注目して、BCAA添加食をラットに与えることで膵酵素活性の調節におけるBCAAの役割を評価し、さらに、アミノ酸によるタンパク質合成促進効果は摂食開始直後で最も強いことから、摂取開始直後からの高アミノ酸食摂取の経時的な影響も調べた。また、アミノ酸によるアミラーゼ活性調節へのインスリンの関与についても調べ、以下の知見を得た。

1. 膵酵素活性調節因子の検索

20%アミノ酸（AA）食と比較し、BCAA添加食は、キモトリプシン活性を部分的に亢進させ、アミラーゼ活性を60%AA食と同程度まで低下させた。この時、血中BCAA濃度とキモトリプシン活性との相関は見られず、血中スレオニン（Thr）濃度とキモトリプシン活性との間に有意な負の相関が見られた。そこで、血中Thr濃度とキモトリプシン誘導の関連を調べた。20%AA食群と比較し、60%AA食群で有意にプロテアーゼ活性が高値となり、血中Thr濃度は低値となったのに対し、Thr添加食群ではキモトリプシン活性は低値となり、血中Thr濃度は高値となった。以上の結果より、血中Thr濃度の低下が高アミノ酸食によるキモトリプシンの誘導に関与することを示した。

2. 高アミノ酸食によるキモトリプシン誘導機構の解析

次に高アミノ酸食によるキモトリプシン誘導の細胞内の機構解析を行った。20%AA 食群と比較して、60%AA 食群でのキモトリプシンの酵素活性と合成速度が亢進したのに対し、mRNA レベルは差が見られなかったことから、高アミノ酸食によるキモトリプシンの誘導は翻訳段階での調節であることを示した。次に、キモトリプシン活性と翻訳開始段階の活性を表わす指標を摂食開始から経時的に測定した結果、キモトリプシン活性は 20%AA 食群では経時的な変化が見られなかったのに対し、60%AA 食群では mRNA レベルに非依存的で経時的な増加が見られた。また、翻訳開始活性に関しては、20%AA 食群では一時的な活性化しか見られなかったのに対し、60%AA 食群では 3 時間目まで活性化が持続した。この時、翻訳開始段階の活性化を表わす指標と腓臓中の遊離 BCAA 濃度、キモトリプシン活性との間にそれぞれ有意な正の相関が見られたことから、高アミノ酸食中の、主に BCAA が翻訳開始段階を活性化させ、摂食開始後におけるキモトリプシン活性の亢進に寄与することが示唆された。

3. 高アミノ酸食による腓アミラーゼ活性抑制機構の解析

先の実験で食餌中の BCAA がアミラーゼ活性を抑制することが示唆されたため、食餌中の BCAA によるアミラーゼ活性抑制とインスリンとの関連を調べた。20%AA 食と比較し、BCAA 添加食は 60%AA 食と同程度までアミラーゼの酵素活性及び mRNA レベルを低下させたのに対し、BCAA 以外の AA を添加した食餌は、これらの指標を低下させなかった。さらに、血中インスリン濃度とアミラーゼ活性との間に相関が見られなかったことから、高アミノ酸食による腓アミラーゼ活性抑制は主に食餌中の BCAA 含量に依存した mRNA レベルでの調節で、このアミラーゼ活性抑制へのインスリンの寄与は小さいことが示唆された。

以上、本研究は、アミノ酸の新たな生理作用として、分岐鎖アミノ酸が翻訳開始段階を活性化させることにより摂食開始直後の腓プロテアーゼ合成に関与することを示唆し、腓アミラーゼの遺伝子発現の調節因子としての作用を有することを明らかにした。また、生理作用がほとんど不明であった必須アミノ酸であるスレオニンの血中濃度の低下が高アミノ酸食摂取による腓プロテアーゼ誘導の要因であることを示唆した。本研究で見られたアミノ酸の生理作用は新規の発見であり、腓臓以外の組織におけるアミノ酸の生理作用を解明する上でも重要な示唆を与えるものと考えられる。

よって、審査員一同は、橋本 直人が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。