

氏名	はた なか たか ひろ 畠 中 貴 弘
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2443号
学位授与の日付	平成14年11月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies of Transport of Neutral / basic Amino Acids and Amino Acid- derivative Drugs Using Intestinal Brush Border Membrane Vesicles and the ATB ⁰⁺ Clone. (腸管刷子縁膜小胞及び ATB ⁰⁺ クローンをを用いた中性 / 塩基性アミノ酸及びアミノ酸誘導体薬物の輸送に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 矢野 秀雄 教授 宮本 元 教授 佐々木義之

論文内容の要旨

食物中のタンパク質は消化管内で消化酵素によりアミノ酸及びジペプチドもしくはトリペプチドに分解されて、腸管刷子縁膜上の複数のトランスポータ分子により消化管上皮内へ取り込まれることが知られている。また、近年、トランスポータの生体内基質の類似構造を持つ薬物もトランスポータによって輸送されることが明らかになってきた。

本論文は、腸管刷子縁膜での中性 / 塩基性アミノ酸及びその誘導体薬物の輸送における、アミノ酸トランスポータの関与を明らかにすることを目的としている。実験系には、小腸刷子縁膜小胞とトランスポータ分子発現系を用いている。

第一章では、まず中性 / 塩基性アミノ酸輸送系 B⁰⁺ の活性が、イヌ小腸刷子縁膜で高いことを見出している。また、そのような性質を持つイヌ小腸刷子縁膜小胞輸送系を用いることにより、正常食動物の小腸刷子縁膜小胞で初めて Na⁺ 依存性塩基性アミノ酸輸送を確認している。更に、腸管刷子縁膜での中性塩基性アミノ酸の輸送に関する、B⁰⁺ 輸送系を含む複数の中性及び塩基性アミノ酸輸送系の寄与を明らかにしている。

第二章では、アルギニン類似体である一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤 N^G-nitro-L-arginine (L-NNA) の腸管膜透過機構を、イヌ小腸刷子縁膜小胞を用いて初めて解明している。生理的 pH で中性の L-NNA は、中性アミノ酸と同じく B⁰, B⁰⁺, b⁰⁺ 輸送系を介して消化管腔から吸収されることを示唆している。

第三章では、中性アミノ酸輸送系について、Na⁺ 依存性 (B⁰, B⁰⁺) と Na⁺ 非依存性 (b⁰⁺) 輸送系の基質特異性に対して異なる影響を及ぼす化学構造を見つけるために、まず10種のアラニン類似体を用いてアラニン輸送の阻害実験を行っている。その結果、天然アミノ酸ではない L-phenylglycine が Na⁺ 依存性アミノ酸輸送系への特異性の強い化合物であることを見出している。続いて行った [¹⁴C]-L-phenylglycine の輸送実験においても、類似の L-alanine や L-phenylalanine に比較し、L-phenylglycine の Na⁺ 依存性輸送系への親和性は強く、Na⁺ 非依存性輸送系への親和性は弱いことを報告している。これは α 炭素にフェニル環のようなかさ高い置換基を直接付与することがもたらす影響である可能性を示唆している。

第四章では、B⁰⁺ 輸送系の機能を担う ATB⁰⁺ をマウス結腸からクローニングし、分子生物学的手法で中性 / 塩基性アミノ酸やその誘導体薬物である NOS 阻害剤の輸送と ATB⁰⁺ の消化管における発現を検討している。その結果、ATB⁰⁺ の輸送力が他のアミノ酸トランスポータに比べ非常に強いことと、他のアミノ酸トランスポータの発現の少ない小腸下部及び大腸での発現が多いことを明らかにしている。これより ATB⁰⁺ は大腸で腸内細菌の産生する物質を輸送する可能性を挙げている。また、ATB⁰⁺ は中性 / 塩基性アミノ酸誘導体タイプの NOS 阻害剤を能動輸送する唯一のトランスポータであることを見出し、腸管管腔から上皮細胞への NOS 阻害剤の輸送における ATB⁰⁺ の寄与が大きいことを示唆している。

第五章では、大腸で腸内細菌が産生し、かつ ATB⁰⁺ に輸送され体内で利用され得る物質の一例として D-アミノ酸を挙げ、トランスポータ発現系を用いて輸送を実証している。ATB⁰⁺ は neuromodulator である D-serine を始め、いくつかの D-アミノ酸を L-アミノ酸と同程度に輸送する。これは、D-アミノ酸を能動輸送するトランスポータを初めて示したものである。すなわち、腸管からの D-アミノ酸輸送における ATB⁰⁺ の寄与が大きいことを示唆している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、腸管刷子縁膜での中性/塩基性アミノ酸及びその誘導体薬物の輸送における、アミノ酸トランスポータの関与を明らかにすることを目的としており、主な評価すべき点は以下のとおりである。

1. 中性/塩基性アミノ酸輸送系 B^{0+} の活性が、イヌ小腸刷子縁膜で高いことを見出し、正常食動物の腸管刷子縁膜小胞で初めて Na^+ 依存性塩基性アミノ酸輸送を確認している。更に、腸管刷子縁膜での中性/塩基性アミノ酸の輸送に関する、 B^{0+} 輸送系を含む複数のアミノ酸輸送系の寄与を明らかにしている。

2. アルギニン類似体薬物である一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤 N^G -nitro-L-arginine (L-NNA) の腸管膜透過機構をイヌ小腸刷子縁膜小胞を用いて初めて解明している。即ち、生理的 pH で中性の L-NNA は、中性アミノ酸と同じく B^0 , B^{0+} , b^{0+} 輸送系を介して消化管腔から吸収されることを示唆している。

3. 中性アミノ酸輸送系について、天然アミノ酸ではない L-phenylglycine が、類似の L-alanine や L-phenylalanine に比較し Na^+ 依存性アミノ酸輸送系への特異性が強い化合物であることを見出している。

4. B^{0+} 輸送系の機能を担う ATB^{0+} をマウス結腸からクローニングし、 ATB^{0+} の輸送力が他のアミノ酸トランスポータに比べ非常に強いことと、他のアミノ酸トランスポータの発現の少ない小腸下部及び大腸で発現が多いことを明らかにしている。これより ATB^{0+} は大腸で腸内細菌の産生する物質を効率良く輸送する可能性を挙げている。また、 ATB^{0+} は中性/塩基性アミノ酸誘導体タイプの NOS 阻害剤を能動輸送する唯一のトランスポータであることを見出し、腸管管腔から上皮細胞への NOS 阻害剤の輸送における ATB^{0+} の寄与が大きいことを示唆している。

5. 腸内細菌の産生する物質で ATB^{0+} の基質となり得る一例として D-アミノ酸を挙げ、その能動輸送を初めて示している。即ち、腸管からの D-アミノ酸輸送における ATB^{0+} の寄与が大きいことを示唆している。

以上のように本論文は、腸管刷子縁膜における中性/塩基性アミノ酸輸送に関与する複数のアミノ酸輸送系の寄与を明らかにすると共に、中性/塩基性アミノ酸誘導体薬物の輸送機構においてもアミノ酸輸送トランスポータが大きく関与することを明らかにしている。従って、動物栄養学と生物薬剤学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年9月19日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。