小腸におけるアミノ酸輸送とその調節

川 崎 尚

広島大学医学部生化学第一教室 〒734 広島市南区霞 1-2-3

Specificity of amino acid transport in small intestine and its regulation

Takashi Kawasaki

Department of Biochemistry, Hiroshima University, School of Medicine, Hiroshima 734

Amino acid transport in small intestine has been briefly reviewed. The specificity of the transport systems has not been conclusively classified yet. Simple diffusion, sodium-dependent and -independent transports are generally involved in amino acid transport. Experimental materials and methods used are very important to deduce any definitive conclusion regarding the specificity. Membrane vesicles prepared either from brush border or basal lateral membrane are assumed to be best to analyze the specificity, energy coupling and regulation of the transport. Regulation of amino acid transport has been noticed in semistarved state, diabetic condition and developing process. In these cases, changes in kinetic parameters conflict each other. Therefore, amino acid transport in small intestine requires much more detailed studies on the kinetics.

Key words: Amino acid transport, Small intestine, Specificity, Regulation, Membrane Vesicles

はじめに

1. 研究方法とアミノ酸輸送解析との関連
 - 1.1 反転腸管嚢および反転腸管リング
 - 1.2 単離腸細胞
 - 1.3 刷子縁膜小胞または側基底膜小胞
2. アミノ酸輸送系の特異性
 - 2.1 小腸粘膜を用いる解析
 - 2.2 腸細胞を用いる解析
 - 2.3 刷子縁膜小胞における輸送特異性
 - 2.4 側基底膜小胞におけるアミノ酸輸送
3. 調 節
 - 3.1 栄養, 代謝変化
 - 3.2 発 育

おわりに

註) 本論文ではアミノ酸の一般略号以外に次の略号を用いる。AIB, 2-aminoisobutyric acid; MeAIB, methyl-AIB; BCH, 2-aminobicyclo-(2, 2, 1)-heptane-2-carboxylic acid; cycloleucine, 1-amino-cyclopentane-2-carboxylic acid

はじめに

動物の小腸上皮を通るアミノ酸吸収は2段階を経て行われる。第1段階は腸管腔から刷子縁膜 (brush border membrane: BBM) を通る輸送過程であり、第2段階は細胞内からの側基底膜 (basal lateral membrane: BLM) を通る血管への排出過程である。この小腸アミノ酸輸送機構はこれまでくわしく研究されてきた^{1,2)} が、今なお多くの互いに矛盾する結果が存在する。その理由の多くは使用実験材料および方法の違いに基づくと考えられる。もちろんいくつかのアミノ酸能動輸送が Na^+ の電気化学ポテンシャルを直接駆動力とするエネルギー共役機構は明確になっている³⁾。しかし輸送現象の最も基本的性質の1つである特異性についてさえも、BBM に存在する輸送系の数も含めて十分な解析がされていない。

動物細胞におけるアミノ酸輸送の特異性については、Christensen—派のエールリッヒ腹水ガン細胞⁴⁾ および最近のラット肝細胞⁵⁾ を用いた研究により、いずれもいくつかの輸送系が存在し、かつ同一輸送基質に対して複数の系が重複して関与することが知られている。これらの

解析は、ある基質の輸送キネティクスに対する他のアミノ酸および特異的モデル基質による阻害様式の解析に基づく。同様な特異性に関する解析が小腸におけるアミノ酸輸送についてもなされているが、用いる実験材料と方法の違いによる不統一な結果が報告されている現状である。

われわれは最近モルモット小腸 BBM 小胞による中性アミノ酸輸送の性質を報告し⁶⁾、さらに発育に伴う輸送キネティクスの変化を見出した⁷⁾。これらの研究過程でも常に輸送の特異性が他の動物細胞との比較においても問題であったことから、本論文では小腸における中性アミノ酸輸送系を中心にした特異性に焦点をしばり、実験方法と結果の問題点を BBM 小胞による輸送解析を中心に述べ、最後に輸送の調節に関する知見も紹介する。動物細胞のアミノ酸輸送の一般的性質、エネルギー共役、キネティクスの取扱いなどについてはこれまでに解説した^{8~11)}。

1. 研究方法和アミノ酸輸送解析との関連

ほぼ1972年までの研究では小腸の全粘膜層を輸送機能単位として取扱ったため、輸送機構に関して矛盾する考え方が成立しにくく、したがって方法論にも議論が少ない状態であった。その後遊離腸細胞 (enterocyte) が用いられるに至って BBM と BLM の輸送上の役割を区別することが必要となり、さらに BBM と BLM をそれぞれ小胞状態に分離、精製出来る方法論の確立により局在の異なる膜部分の輸送がそれぞれ独立して測定可能となった。そこでまず簡単に生化学領域で主として用いられる実験系の特徴を述べる。

1.1 反転腸管嚢および反転腸管リング

反転腸管嚢は腸管吸収の研究を進展させるのに役立った非常に便利な材料であり、初めて能動輸送の証明や輸送特異性に関する研究によく使用されてきた。また BBM を通過する輸送キネティクスを調べる目的にも 30~60分保温条件下に反転腸管嚢が用いられた。しかしこれらのキネティクス測定は、BBM のみの輸送過程を示さず、BLM を通る輸送も含むこと、粘膜側への逆流入の影響を受けること、長時間保温のために代謝過程が関与し正確な初速度測定とはいえない点などが問題である。

反転腸管リングも反転嚢と同様の目的で用いられ、その使用が容易であり、かつ統計学的に満足のいく結果を与える。しかし短い断片 (0.2~0.5 cm) の腸管壁の筋層が収縮して粘膜上皮下空間が縮小するために通常の細

胞外空間測定用試薬の移行が定量的でないこと、したがって BBM による輸送における拡散現象の占める割合が過剰定量されることが欠点としてあげられる。その他に反転嚢と同じ問題を含む。

1.2 単離腸細胞

小腸微絨毛を覆っている上皮細胞を選別的に分離し、アミノ酸輸送を観察しうるに足る細胞集団として純化することが可能である¹²⁾。他の単離動物細胞と同様腸細胞標品は輸送キネティクス測定には反転腸管系より適当であるが、アミノ酸輸送に関する結果はすべて腸細胞の viability が保温 10 分で急速に低下することを示している¹³⁾。したがって腸細胞標品の輸送機能測定にあたっては viability による機能変化の有無に十分注意する必要がある。

1.3 刷子縁膜小胞または側基底膜小胞

1972年頃より、腎尿管および小腸微絨毛から BBM 小胞の調製、精製が可能となり、これを用いて多くのアミノ酸と糖輸送の研究が行われるようになった。まず腎標品を用いた研究が進み、小腸の場合は糖輸送が初めて報告され¹⁴⁾、ついでアミノ酸輸送に関する研究が続く。

この糖、アミノ酸輸送の研究における膜小胞使用の有用性、問題点などに関しては多くの総説^{15~17)}がある。このうち長所と考えられる点は次の通りである。1) BBM と BLM を別々に分離しうることで、それぞれの輸送過程を独立して研究し得る。したがって上皮細胞における輸送の方向性を説明し得る。2) 細胞質内成分を除去し得るので、上皮細胞内代謝を受けることなく膜輸送過程を追跡し得る。3) 小胞内外の溶液組成を自由に調節し得る結果、ある輸送系に対する駆動力を分析し得るし、輸送に関与する諸因子に関して至適作用条件を設定し得る。4) 諸条件を考慮する必要はあるが、輸送キネティクスや輸送系の生化学的諸性質を解析し得る。5) 輸送系が *in vivo* の駆動力から分離されているために、輸送の調節の場を明らかにし得る。すなわち輸送系自体の変化なのか、駆動力または膜外因子の変化によるのかを区別し得る。

他方膜小胞を使用する際に留意すべき点を以下にあげる。1) 調製時に完全人工溶液中で長時間処理されるため、小胞の膜透過性に変化ないしは輸送系の不活性化がおこる可能性がある。2) Na^+ との共輸送系では BBM を介する Na^+ の電気化学ポテンシャル差の消失が短時間で起こる。3) 精製標品でも膜の由来や小胞内腔容積の不均一性、膜の leakiness を考慮する必要がある。さらに 4) 小胞といえども輸送系に関してなお複雑である

Table 1 ラット単離肝細胞のアミノ酸輸送系^a

系	基質特異性	選択的基質	Na ⁺ 依存性	調節
A	小さい直側鎖をもつ中性アミノ酸の大部分	MeAIB	有	適応調節 内分泌調節
ASC	小側鎖で、特に -OH, -SH をもつ中性アミノ酸	Cys	有	無
Anionic	net で -1 電荷をもつ酸性アミノ酸	無	有	未知
Gly	Gly, サルコシン	無	有	未知
L	大きい分岐または芳香族側鎖をもつ中性アミノ酸	無	無	無
N	His, gln, asn	His	有	適応調節

a) 文献5より改変

ため、適当な対照をとること、および結果についての厳密な説明が必要である。

2. アミノ酸輸送系の特異性

動物細胞のアミノ酸輸送系は、ラットの遊離肝細胞を用いた分析⁹⁾によると、A, ASC, anionic, Gly, L, N系に分類されている (Table 1)。小腸アミノ酸輸送系の特異性について、この肝細胞またはエールリッヒ細胞の輸送系に関連づけようとする試みはあるが、同様な系の分類ならびにその存在は報告されていない。現在小腸アミノ酸単一輸送系の単離、確認が不成功に終わっているため、この輸送特異性の研究はある基質の輸送キネティクス解析および *cis*-inhibition および *trans*-stimulation の解析により行われている。

2.1 小腸粘膜を用いる解析

Schultz ら¹⁸⁾ の方法に基づき、摘出した小腸粘膜をマウントし、その表面を標識アミノ酸を含む適当な組成 (140mM Na⁺ を含む) の溶液で短時間 (45~60 秒) 灌流した後、組織内に取り込まれたカウントを測定して influx 速度を調べるのが基本的操作である。同溶液に加えた標識イソリンの取り込みを同時に測定して細胞外空間を補正する。

この方法を用いてウサギ回腸の中性アミノ酸輸送機構についてくわしく Preston ら¹⁹⁾ が報告し、中性アミノ酸に対する単一輸送系の関与を示した。その根拠は、輸送アミノ酸の K_t と K_i が近似値をとること (Table 2), $1/1-R$ ($R=J_i/J_o$; J_o =対照 influx; J_i =阻害剤存在下の influx) を阻害剤濃度の逆数に対してプロットすれば縦軸との交点が1を示す直線が得られる (単一輸送系を介する2つのアミノ酸輸送に当てはまる) ことによる¹⁹⁾。このキネティクス解析は Curran ら²⁰⁾ のアミノ酸と Na⁺ の共輸送モデル (Fig. 1) に基づくもので、詳

Table 2 ウサギ回腸粘膜による中性アミノ酸輸送の K_t と K_i ^{a)}

アミノ酸	K_t (mM)	K_i ^{b)} (mM)
Ala	9.1±1.0	16.0 (met) 12.7 (phe)
Val	5.0±1.0	6.8 (met) 3.9 (ala)
Leu	4.2±0.9	3.4 (met) 3.9 (ala)
Met	1.4±0.2	1.2 (ala) 2.7 (leu) 1.3 (phe)
Phe	2.7±0.7	3.3 (ala) 3.5 (met)
	17.6±1.2 ^c	14.5 ^c (met)

a) 文献19より改変; b) () 内アミノ酸による K_i 値c) アミノ酸非存在下に測定, 他は Na⁺ 140mM 存在下で測定。

A, アミノ酸; X, キャリアタンパク; $k_{\pm 1} \sim k_{\pm 4}$, 反応速度係数; $P_1 \sim P_3$, 転移速度係数。

Fig. 1 小腸刷子縁膜を介するアミノ酸と Na⁺ の共輸送モデル²⁰⁾

Table 3 ウサギ回腸粘膜による中性アミノ酸輸送の K_m , J_{max} ^{a)}

	コンピュータ解析 ^{a)}				Ser 阻害実験 ^{b)}	
	系 1		系 2		系 1	
	K_m	J_{max}	K_m	J_{max}	K_m	J_{max}
Ser	6.3	53	(2931)	(4090)	3.2	44
Ala	4.6	52	91	247	0.7	18
Met	0.4	14	22	115	0.3	13

a) 文献23より改変

b) 文献21より引用; K_m =mM; J_{max} =nmol/cm²/min; (), 正確な測定不能なほど高値を示す。

細は解説した¹¹⁾。

一方同じ手法¹⁸⁾によるウサギ回腸粘膜を用いた Smith らのグループ²¹⁾の実験によれば、140mM Na⁺ 存在下の中性アミノ酸輸送には2つの異なる系が区別される。

1つは ser^{註)}に阻害される輸送系(系1), 他は ser に阻害されない系(系2)である。上記同様、1/1-R vs 1/[阻害アミノ酸]の解析に基づき得られた結果であり、さらに ser 存在下の 1/1-R 値(縦軸との交点)から系1と系2により輸送される割合が各アミノ酸について計算されている。これらの結果が Preston ら¹⁹⁾の結果と異なる理由について著者ら²¹⁾は何も述べていない。この短鎖アミノ酸に親和性を示す系1が従来のA系(Table 1)と異なることは、A系基質で ala 誘導体である McAIB で阻害がかからないことで示される。また長鎖アミノ酸に特異性を示す系2の比較的な Na⁺ 非依存性は Table 1 の L系に類似するが、その異同について不明とされている。その理由として L系基質 BCH による阻害の未検討があげられている²¹⁾が、BCH は 100% L系の基質ではなく⁴⁾、後述の報告²²⁾でも BCH は Na⁺ 依存性、非依存性アミノ酸輸送の両方を阻害することが示されているので、この理由はあまり意味がない。

Smith らのグループ²³⁾はひきつづき同じウサギ回腸粘膜と方法を用いて ser, ala, met 輸送を測定し、コンピュータ解析を併用してこれら Na⁺ 依存性輸送基質の輸送系が1つであるかどうかを分析した。まず使用基質濃度範囲が異なると、いずれも Michaelis-Menten 型キネティクスから求めた K_m 値が同一基質について異なる結果を得た。この事実に基づきコンピュータ解析によって高親和性で低 J_{max} の系1と、低親和性で高 J_{max} の系2の2つの輸送系が区別されるとした (Table 3)。いずれも 140mM Na⁺ 存在下でアミノ酸と45秒保温下に測定されたものであり、系1と系2はそれぞれ前報²¹⁾における ser により阻害される系と阻害されない系に相

当すると考えられている²³⁾が、この考えは系1の K_m , J_{max} 値の近似 (Table 3) に由来する。ただし ala の系1の両値にかなり差があるが、その理由は不明である。

さらに同一著者ら²⁴⁾が Na⁺ 非存在下の ser, ala, met 輸送キネティクスを測定し、それぞれの K_m 値 89.2, 74.9 および 22.7mM を得た。これらの数値は Table 3 に示す低親和性輸送系と近似するので、系2と実質上同一ではないかと考えている。また Na⁺ 非存在下の ser, ala, met (いずれも 5mM) 輸送初速度に対する他のアミノ酸 (0-70mM) の阻害から求めた各 K_i 値がそれぞれの K_m 値と全く一致するところから、この3つのアミノ酸は Na⁺ 非存在下に単一輸送系により輸送されると結論している。

これらの結果より Smith ら^{21,23,24)}は、中性アミノ酸輸送は2つの系を介してすすみ、低親和性輸送系(系2)キネティクスは Na⁺ 存在で変わらず、Na⁺ 存在下でみられるアミノ酸に対する親和性の増加は高親和性輸送系の作動によらし、Curran ら²⁰⁾、Preston ら¹⁹⁾とは異なる結果を示している。この両者間の相違の理由として、Lineweaver-Burk プロットにより解析した Curran ら²⁰⁾の J_{max} に信頼性が乏しいことをあげている²⁴⁾。しかしこの低親和性系が Na⁺ 存在、非存在にかかわらず同一の極めて高い K_m 値を示す(それぞれの血清中アミノ酸濃度より 100 倍高値)ことを考えると、この低親和性輸送系の生理的意義について疑問が残る。もちろん多量のタンパク質消化の結果として高濃度アミノ酸が一時的に腸管内腔に存在する場合にこの低親和性系が作動するとすれば説明はつく。

いずれにせよ小腸粘膜を用いた中性アミノ酸輸送系の解析では、基質濃度範囲を大きくとった場合に Na⁺ 依存性と非依存性の2輸送系が存在するとする結果が妥当であるようにみえる。しかし Na⁺ 非依存性系は相互の

阻害実験から ser, ala, met に対し単一輸送系であるとしながらも²⁴⁾, Na^+ 依存性輸送の場合には基質相互間の阻害キネティクスが解析されておらず、したがって Na^+ 依存系が上記の3アミノ酸に対し単一輸送系であるかどうか不明であり、またこの Na^+ 依存、非依存の2輸送系の同一性、不均一性についても結論は得られていない。

以上の中性アミノ酸輸送系以外に、塩基性および酸性アミノ酸輸送系が小腸粘膜レベルで Schultz ら¹⁸⁾ の方法およびその変法を用いて調べられている²⁾。

塩基性アミノ酸輸送の性質として、lys に対する K_m はラット小腸で 3mM、ニワトリ小腸で 1.1mM と報告されている。しかし初期の報告⁵²⁾ 以外に lys 輸送が能動的である証拠はみられない。このことは後述する小腸 BBM 小胞において lys 輸送²²⁾ が Na^+ 非依存性であることにより支持される。しかもこの小腸粘膜レベルでの研究では、調べた中性アミノ酸はすべて lys 輸送を拮抗的に阻害し、塩基性アミノ酸輸送系はこれらの中性アミノ酸の第2輸送系として働く可能性が示唆されている⁵³⁾。

酸性アミノ酸輸送は、ウサギ回腸粘膜を用いた場合、強い Na^+ 依存性と輸送基質による飽和を示し、120–140mM Na^+ 存在下の K_m 値は glu 7mM, asp 5mM で、両者は互いに拮抗的である⁵⁴⁾。このことは比較的特異性の高い酸性アミノ酸輸送系の存在を示す。また後述のように、ラット小腸 BBM 小胞では電氣的に中性な Na^+ -glu (asp) 共輸送が確認されている³³⁾。

2.2 腸細胞 (enterocyte) を用いる解析

前述の如く単離腸細胞を用いたアミノ酸輸送については細胞の viability に留意する必要がある。Krebs ら²⁵⁾ の腸細胞分離改良法を使用せずに分離した肝細胞では gln と ala が異なる系で輸送されると報告し²⁶⁾、同じ著者らが Krebs らの方法で分離した肝細胞では gln と ala が共通キアリアにより輸送されると報告している¹³⁾。その根拠として、ala 輸送は gln により拮抗阻害を受けること (K_i 値は K_m 値に近似)、ser, leu, MeAIB は ala 輸送と gln 輸送を平行して阻害すること、細胞内に負荷した ala は細胞外 gln と対向輸送を示すことをあげている¹³⁾。これらの結果は Krebs らの方法²⁵⁾ で分離した腸細胞標品の有用性を示唆するが、一方問題は BBM と BLM を通る輸送が区別出来ないことである。もっともニワトリ腸細胞における糖輸送¹²⁾ では、その輸送がフロリジンにより強く阻害されることから主として BBM を介すると考えられている。

2.3 刷子縁膜における輸送特異性

前述のように小腸 BBM 小胞が Hopfer ら¹⁴⁾ により糖輸送研究に初めて使用され、ついでアミノ酸については ala 輸送が electrogenic な Na^+ との共輸送によることが初めて報告された²⁷⁾。以来アミノ酸輸送に関し報告は増加しつつあるが、その特異性に関する研究は少ない。

われわれはモルモット回腸の BBM 小胞を Fujita らの方法²⁸⁾ により調製し、主に pro 輸送について、また関連して cys, MeAIB 輸送について調べた⁶⁾。用いた標品は、BBM 局在酵素であるスクラーゼ、アルカリホスファターゼについてともに15倍精製されているが、BLM 酵素である Na^+ , K^+ -ATPase については比活性がホモジネートに比べ1/5に低下しているものである。当時、pro 輸送についての報告がなく、また肝細胞によるアミノ酸輸送の特異性 (ASC 系) と Li^+ の関係が報告された²⁸⁾ ことに基づき、この3アミノ酸の輸送を BBM 小胞を用いて調べた。得られた結果は特異性解析に関しては部分的なものにすぎないが、BBM 小胞を用いたアミノ酸輸送に関する一般的性質の紹介も兼ね、簡単に結果を述べる。

Fig. 2 に示すように、100mM Na^+ 勾配 (外 > 内) 存在下の pro 輸送は30秒で最大となり、以後減少して30分後には Na^+ 勾配非存在下の定常状態に一致した。この典型的な輸送の overshoot は、 Na^+ の電気化学ポテンシャル差の生成と Na^+ -pro 共輸送に伴って起こるこのポテンシャル差の消失によりみられる現象であり、pro 能動輸送過程を示す。さらにこのエネルギー共役関係は、 K^+ を小胞内に予め負荷した ($[\text{K}^+]_{in} > [\text{K}^+]_{out}$) 後に小胞外に K^+ イオノフォアであるバリノマイシンを加えて一過性の K^+ の拡散電位を生成させ、 Na^+ 由来の電気化学ポテンシャル差を増大させるとき、pro 輸送の overshoot が増大することで確認された。また図から明らかなように、一定の Na^+ 電気化学ポテンシャル差が小胞内外に存在する時間は短かい。したがって Na^+ との共輸送系における初速度測定は数秒以内に行なう必要がある。

また組織、細胞レベルでの輸送量測定の場合、表面結合量と内部への輸送量を区別する必要があるが、BBM 小胞ではこの区別が容易である。すなわち、反応液の浸透圧を上げて小胞内容積を縮小させたときの輸送量を測定し、浸透圧の逆数に対して輸送量をプロットすればよく、このプロットを結ぶ直線の縦軸との交点が表面結合量を示す。上記の BBM 小胞を用いた pro 輸送ではこの交点が原点と一致し、pro は小胞内腔へ輸送されたこ

左図：●—●, 100mM NaCl; ○—○, 200mM D-マニトール; $[^{14}\text{C}]$ プロリン終濃度 $20\mu\text{M}$; 保温温度 25°C . 右図：●—●, K^+ 負荷+バリノマイシン; ○—○, 対照 (K^+ 負荷のみ); 他の条件は左図の 100 mM NaCl 存在下に同じ.

Fig. 2 プロリン輸送の時間経過と Na^+ 電気化学ポテンシャルの効果 (モルモット回腸 BBM 小胞)⁶⁾

とがわかる.

完全な初速度測定とはいえないが, 15 秒の pro 輸送速度は対照 (300mM マニトール), 100mM KCl 存在下で同じであるが, 100mM Li^+ , 100mM Na^+ 存在下でそれぞれ 1.7 倍, 8.9 倍促進された.

そこで Li^+ による特異性分類を肝細胞^{5,29)} 同様試みると, cys 輸送に対し Li^+ は Na^+ と完全に置換し得るが, pro 輸送に対し Li^+ はごく部分的 (約 10%) な Na^+ 代用効果を示し, MeAIB 輸送に対する Li^+ - Na^+ 代用効果はほとんどみられなかった. この Na^+ 依存性を示す MeAIB は pro 輸送を 90% 阻害するがその Li^+ 置換部分は阻害せず, cys 輸送は Na^+ , Li^+ 存在下ともに MeAIB により全く阻害されないことがわかった (Table 4). したがって少なくとも Na^+ 依存性 MeAIB, pro 輸送系と Li^+ (Na^+) 依存性 cys 輸送系の 2 つが区別されるが, pro の Na^+ 依存性部分と Li^+ 依存性部分の異同について, また pro と cys のともに Li^+ 依存性輸送の同一性については不明である. この cys 輸送の Li^+ 勾配依存性と MeAIB により阻害されない性

質は肝細胞でも認められ^{5,29)}, その ASC 系に相当する (Table 1).

最近 Wright ら²²⁾ がウサギ空腸から Ca^{2+} 沈殿法により調製した BBM 小胞を用いて比較的系統的に中性アミノ酸輸送を調べている. 輸送基質として pro, phe, ala, gly, MeAIB, lys を用い, Na^+ 存在, 非存在下における輸送初速度 (5 秒以内) を主として pro, phe, ala について測定し, コンピュータ解析後に各 K_t , $J_{\max}$ 値を得ている (Table 5). この場合すべてのアミノ酸輸送に単純拡散が関与するが, これは除外して以下考える.

まず pro 輸送は厳密に Na^+ 依存性であって系 2 により触媒されるのに対し, phe と ala 輸送は Na^+ 存在下では系 1 と系 2 により触媒され, Na^+ 非存在下での phe 輸送は (恐らくは ala 輸送も) 系 1 による. この結果に関して理解しにくい点は, phe, ala の系 2 が低親和性で Na^+ 依存性であり, 系 1 が高親和性で Na^+ 非依存性と考えられる点である. この著者らはキャリアに仲介された influx (J) を次式で示している.

Table 4 モルモット回腸 BBM 小胞によるアミノ酸輸送におけるカチオンの効果と MeAIB による阻害^{a)}

基 質 (20 μ M)	カチオン (100mM)	阻害アミノ酸 (10mM)	輸 送 量 (pmol/mg/15sec)
Pro	Na ⁺	—	71.1 $\pm$ 12.4
Pro	Na ⁺	MeAIB	7.5 $\pm$ 1.9
Pro	Li ⁺	—	6.2 $\pm$ 0.3
Pro	Li ⁺	MeAIB	5.2 $\pm$ 0.2
MeAIB	Na ⁺	—	21.9 $\pm$ 6.2
MeAIB	Li ⁺	—	1.0 $\pm$ 0.4
Cys	Na ⁺	—	39.5 $\pm$ 16.6
Cys	Na ⁺	MeAIB	38.1 $\pm$ 1.2
Cys	Li ⁺	—	49.9 $\pm$ 15.1
Cys	Li ⁺	MeAIB	55.5 $\pm$ 31.4

a)文献6より改変

Table 5 ウサギ空腸 BBM 小胞による中性アミノ酸輸送の K_t と $J_{\max}$ ^{a)}

100mM NaCl 中で測定				
	K_t^1	$J^1_{\max}$	K_t^2	$J^2_{\max}$
Pro	—	—	0.55	166
Phe	0.23	68	8.8	622
Ala	0.32	29	9	100
100mM KCl 中で測定				
Phe	0.27	30		

a)文献22より改変； K_t =mM； $J_{\max}$ =pmol/mg/sec
(数字は系1または系2を示す)**Table 6** ウサギ空腸刷子縁におけるアミノ酸輸送経路^{a)}

A. 単純拡散			
B. Na 非依存性経路			
主 基 質	阻 害 剤		
	完 全 阻 害	部 分 阻 害	最 小 阻 害
1) Phe, ala, gly	Leu, BCH, met	Pro	MeAIB, pro, β -ala, lys
2) 塩基性アミノ酸	—	—	—
C. Na 依存性経路			
1) 中性アミノ酸 (phe, pro, ala, gly)	—	—	MeAIB, β -ala, lys
2) Phe	Met		MeAIB, pro, BCH, ala
3) Pro, MeAIB	OH-pro, phe	Met, ala	β -ala, gly, lys

a) 文献22より改変

$$J = \frac{J_{\max} [S]}{K_t + [S]} \quad (1)$$

これは Curran ら²⁰⁾ の小腸における中性アミノ酸輸送モデル (Fig. 1) から導かれている (図中 $P_1=P_2=P_3$ とみなす) もので、

$$K_t = \frac{K_1 K_2}{[Na] + K_2} \quad (2)$$

で規定される。ただし $K_1=k_{-1}/k_1$, $K_2=k_{-2}/k_2$ 。したがって $[Na]$ が大となれば K_t は小となるはずである。また生理的条件下では細胞外 $[Na]>$ 細胞内 $[Na]$ である点からも、 Na^+ 非存在下で phe の高親和性輸送系 (系1) が機能する結果 (Table 5) に疑問が残る。

つぎに Wright ら²²⁾ は Na^+ 存在下、非存在下におけ

る pro, phe, ala などの輸送キネティクスに及ぼすアミノ酸の交叉阻害を調べた。その結果、ウサギ空腸刷子縁における中性アミノ酸輸送は複数の経路により行われ、1) 単純拡散、2) Na^+ 非依存性 2 経路、3) Na^+ 依存性 3 経路が存在すると報告した (Table 6)。

このうち Na^+ 非依存性系について、phe の系1 (J^1 : Table 5) は L-phe, leu, ala, BCH, met にも作動するとされ、それは phe 輸送に対するこれらのアミノ酸輸送の K_t が 0.27—0.44 mM で、 K_t^1 (0.23mM) と近似することに基づく。一方この phe が Na^+ 依存性の pro により 40% 阻害を受けることは、この phe 輸送系に複数経路の存在を示唆する。またこの経路により MeAIB, pro, β -ala は輸送されないとされている²²⁾ が、

Table 7 Na 依存性中性アミノ酸輸送の阻害 (ウサギ空腸 BBM 小胞)^{a)}

基 質 (50 μ M)	J^2 (pmol/mg/sec)	100mM 阻害剤による%阻害					
		Pro	Ala	Phe	MeAIB	Gly	β -ala
Pro	17.2 $\pm$ 1.2	100	49	94	96	21	0
Phe	13.5 $\pm$ 0.3	33	77	100	4	32	11
Ala	3.2 $\pm$ 0.1	58	100	100	6	73	22
MeAIB	1.6 $\pm$ 0.02	100	76	100	100	15	+8 ^{b)}
Gly	0.13 $\pm$ 0.07	15	81	100	+42 ^{b)}	59	10

a) 文献22より改変； b) %促進を示す。

前述の pro による部分的阻害との関係には触れられていない。

次に phe とは別の Na⁺ 非依存性経路により塩基性アミノ酸 lys が輸送される (Table 6)。これは lys 輸送を阻害する arg, his, オルニチンの K_i が 0.7—1.0mM で, lys の K_i =1.0mM と近似することと, lys が Na⁺ 非依存性 phe 輸送を阻害しないことによる分類である。

また Na⁺ 依存性経路はさらに 3 つに区別される (Table 6)。この区別は輸送に対する交叉阻害の結果 (Table 7) に基づく。第1の中性アミノ酸 (phe, pro, ala, gly) 共通輸送系はアミノ酸による交叉阻害が部分的であるもの (例えば pro/ala, ala/gly など) である。第2は phe に特異性の強い系で, met が強い阻害 (K_i =0.3mM) を示す。第3は pro/MeAIB に特異性の強い系で, MeAIB は pro または MeAIB のみ完全に阻害し, その逆も真であることによる。この系をさらに oxy-L-pro (K_i =0.43mM), phe (K_i =1.5mM) が共有するが, この第3経路は phe の主輸送系とは考えられていない。というのは, この系による phe の J^2_{max} は全 Na⁺ 依存性輸送の 20% にすぎない (Table 5) からである。

この Table 5, 7 を中心にした Wright らの結果からみても, 中性アミノ酸輸送系の特異性に関してすっきりした結論は得られていないことがわかる。Table 1 に示す肝細胞を中心にした各輸送系と同様, BBM 小胞においても同一基質に対する輸送系の重複が Na⁺ 依存性系についてみられる。また中性アミノ酸の共通輸送系 (phe, ala, gly) が Na⁺ 非依存系にも依存系にもみられるが, これが2つの別輸送系なのか, Na⁺ 勾配の有無により親和性を変える単一輸送系なのか不明である。

ごく最近 Wright ら³⁰⁾ は, ウサギ空腸 BBM 小胞を用い, Na⁺ 依存性中性アミノ酸輸送 (phe, ser, ala, pro) の K_i が反応液中の Na⁺ 濃度の増加に伴い減少するが,

J_{max} は変化しないこと, またアミノ酸以外に Na⁺ 依存性グルコース, コハク酸輸送も同じ傾向を示すことを報告した。この事実は, 式 (2) に一致して, これら中性アミノ酸輸送が単一輸送系により Na⁺ の存在, 非存在にかかわらず行われる可能性を示唆する。

またウサギ空腸 BBM 小胞による Na⁺ 依存性輸送系において Li⁺ 置換が全く認められないことと, pro/MeAIB 輸送が完全に Na⁺ 依存であることから, Wright ら²²⁾ は BBM に ASC 系 (Table 1) は存在しないと結論している。一方モルモット標品⁶⁾ では cys 輸送は完全に, pro 輸送は部分的に Li⁺-Na⁺ 置換効果が認められ (Table 4), またラット小腸 BBM 小胞による ala 輸送²⁷⁾ およびマウス小腸 BBM 小胞による phe 輸送³¹⁾ においても Li⁺ は Na⁺ の代用効果を示す。このウサギとラットまたはマウス標品における Li⁺ 効果の相違の理由は, Li⁺ にもっとも反応する cys 輸送がウサギ標品で未検定であるため不明であるが, 種特異性による可能性は残る。

このマウスにおける BBM 小胞を用いた研究で Ramaswamy ら³¹⁾ は 0.1mM 以下の低濃度の phe 輸送が K⁺ 勾配 (外>内) 存在により Na⁺ 勾配存在の場合と同様能動的におこること, および leu 輸送も phe と同様 K⁺ 勾配存在下で overshoot を示すことを報告した。この phe 輸送がともに leu および ala により阻害されることから, マウス小腸におけるこれら中性アミノ酸共通キャリアの存在が示唆されている³²⁾。しかしこのマウス小腸の場合でも phe, ala, leu を輸送する経路の特異性はなお不明確である。

前述のように, 膜小胞系を用いる利点は膜小胞内外の輸送反応液組成を自由に選択し得ることと, その結果輸送と共役する一価カチオンの役割¹⁰⁾ も明らかにし得る。この点を利用し, ラット小腸 BBM 小胞における酸性アミノ酸輸送が電氣的に中性な Na⁺ との共輸送によるこ

とが最近報告された³³⁾。asp, glu とともにその輸送初速度 (20秒) は 100mM Na⁺ 勾配存在下に 4 倍増加したが, Na⁺ 勾配はなくとも小胞内外の 100mM Na⁺ の存在により初速度はともに 2 倍増加した。さらに Fig. 2 の場合と同様, K⁺ を内部に負荷した BBM 小胞を用いてバリノマイシン添加による K⁺ の拡散電位 (内部負) 生成の効果を調べたが, Na⁺ 依存性 asp, glu 輸送ともにその影響を受けず, したがってこれらの結果は両酸性アミノ酸の電氣的に中性な Na⁺ 共輸送を示している。また交叉阻害効果より asp と glu は単一キャリアにより輸送されると考えられている。

2.4 側基底膜小胞におけるアミノ酸輸送

最初に述べたように, アミノ酸腸管吸収の第 2 段階である細胞内から BLM を通過する過程を腸上皮組織を用いて直接調べることは不可能に近い。最近 BBM から分離された BLM を小胞状態に得ることが可能となったことにより, この BLM 小胞を用いて BLM 通過過程を調べた結果が報告されている。BLM 小胞の調製は小腸微絨毛をホモジナイズした後, 分画遠沈と適当な密度勾配遠心法 (最近では Parcoll の使用³⁴⁾ が多い) を組み合わせて行う。BBM とは密度勾配遠心の過程で互いに比較的重複することなく分離され, BLM に局在する Na⁺, K⁺-ATPase の比活性上昇がホモジネートに比べ 10 倍以上みられる。

ラット小腸 BLM 小胞におけるアミノ酸輸送の最初の報告³⁵⁾によれば, val は促進拡散により輸送され, Na⁺ 依存性はみられない。グルコース輸送も同じ促進拡散による。これに対し同じ動物の BBM 小胞は Na⁺ 勾配依存性の val およびグルコース能動輸送を示した。

ついで Wright ら³⁶⁾ は, ラット BLM 小胞における ala 輸送とそのアミノ酸による阻害についてやや系統的に調べている。ala 輸送は Na⁺ 非存在下では $K_m = 0.73\text{mM}$, $V_{\max} = 5.3\text{nmol/mg protein/min}$ を示し, Na⁺ 存在下では $K_m = 0.04\text{mM}$, $V_{\max} = 0.21\text{nmol/mg protein/min}$ を示した。この Na⁺ 非依存性輸送は, 腸管吸収過程における細胞内高濃度のアミノ酸の上皮細胞より血管への排出を意味し, 他方 Na⁺ 依存性輸送過程は腸管腔にアミノ酸が存在しないような条件下における上皮細胞へのアミノ酸供給という役割を果たすと考えられている。

3. 調 節

小腸におけるアミノ酸輸送の調節に関する報告はどの実験材料のレベルでも少ない。また研究方法の項で述べ

たように, これまで得られている結果を判断するについても実験材料および方法を吟味して検討する必要があると考えられる。一般的な意味での動物細胞におけるアミノ酸輸送の調節に関しては, ホルモンによる調節およびいわゆる adaptive regulation (適応調節) といわれるアミノ酸飢餓条件下での調節に関する Guidotti らの詳細な総説³⁷⁾ および肝細胞に関する同様な総説⁵⁾ を参照していただきたい。

3.1 栄養, 代謝変化

摂取カロリー制限が *in vitro* でのアミノ酸輸送を増加することはよく知られている。ラット小腸の反転腸管を用いた実験系で, 半飢餓 (semistarvation) 状態が Na⁺, K⁺-ATPase 活性, BBM を通過する Na⁺ 存在下の leu 輸送の $V_{\max}$ および粘膜側より漿膜側への leu 輸送速度を著明に増大させるが, leu に対する K_m は変化せず, また leu の蓄積定常レベルはわずかに増加するにすぎないことが認められている³⁸⁾。この半飢餓によるアミノ酸輸送の増加は BBM 小胞でも認められ, 輸送キャリアの増加で説明されている³⁹⁾。

代謝変化のアミノ酸輸送に及ぼす影響としてよく研究されているのは糖尿病状態である。アロキサンおよびストレプトゾトシン投与で誘導した実験糖尿ラットの反転腸管リングを用い, 60 分保温による AIB, cycloleucine, lys およびグルコース輸送が増加したと報告されている⁴⁰⁾。また, このような糖尿動物における輸送上昇が, Na⁺ 勾配保持能上昇 (Na⁺ コンダクタンス低下) を含めた小腸 BBM レベルでの変化に起因することが, ラット BBM 小胞を用いたグルコース輸送について報告されている⁴¹⁾。

一方ヒト糖尿病において *in vivo* の腸管灌流による血清への糖吸収増加が認められないとの報告⁴²⁾がある。このような実験糖尿動物と糖尿病患者での結果の相違を調べるために, 遺伝的糖尿マウス (C57BL/KsJ-db/m) 小腸から BBM 小胞が調製された。この小胞による Na⁺ 勾配依存性 leu 輸送およびグルコース輸送の性質, ならびに BBM 小胞のスクラーゼ活性および形態学的観察の結果はいずれも正常ラットの結果と同一であり, したがって遺伝的糖尿ラットにおける小腸 BBM 輸送には変化がなかったと結論されている⁴³⁾。またこのような結果から, 薬剤投与による実験糖尿動物でみられるアミノ酸輸送の上昇という現象はヒト糖尿病患者に対しては生理的意味を持つとは考えにくいとしている⁴³⁾。さらに実験糖尿ラット小腸からジペプチド吸収を調べた結果⁴⁴⁾によると, 実験糖尿誘導初期の吸収増加は動物の摂取食

Table 8 発育に伴うプロリン輸送キネティクスの変化 (モルモット回腸 BBM 小胞)^{a)}

	K_m (mM)		V_{max} (nmol/mg/2 sec)	
	50 mM NaCl	100 mM NaCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl
授乳期 (生後10日目)	3.40±0.09	2.96±0.15	8.16±0.56	8.89±0.50
成熟期 (生後60日目)	2.02±0.04	1.63±0.05	7.27±0.38	8.16±0.23

a) 文献7より引用.

餌量減少による半飢餓の結果として説明できるという。これらの結果は、糖尿状態における小腸からのアミノ酸輸送変化が特異的現象であるかどうかについての今後さらに検討を要することを示している。

3.2 発 育

アミノ酸輸送系の発育に関する1972年までの研究が小腸を含めた種々の臓器組織についてまとめられている⁴⁵⁾が、腸管吸収との関連ではこれらの結果につき、実験条件の妥当性を含め再検討を要すると考える。

発育に伴う糖の小腸輸送活性の変化については、最近ニワトリ空腸のBBM小胞を用いたNa⁺依存性輸送初速度測定(2秒)の結果、フ化2日目と21日目の比較で、基質に対する K_m は変化せず、 V_{max} は2日目の方が21日目の1.4倍大きいことが認められた⁴⁶⁾。糖輸送の発育に伴う変化がBBM小胞レベルで報告されたのはこれが最初であるが、 V_{max} の変化は一般にBBMキャリア数の変化と解されるものの、それ以上の解釈は難しい。

アミノ酸輸送の発育による変化についてもBBM小胞レベルでは初めてわれわれが報告した⁷⁾。授乳期(生後10日目)と成熟期(60日目)のモルモット回腸よりBBM小胞を調製し、proおよびleu輸送をそれぞれ初速度(2秒および4秒)で測定した。その結果、Na⁺依存性pro輸送は成熟期小胞が授乳期小胞より2倍高い初速度を示し、かつproに対する K_m 値が発育に伴い低下したが、 V_{max} 値には変化を認めなかった(Table 8)。一方、Na⁺勾配存在下のleu輸送キネティクスには、 K_m 、 V_{max} ともに発育に伴う変化を認めなかった。このpro輸送の K_m 値変化は調製BBM小胞の純度の差では説明されない。

そこでBBM小胞の膜脂質組成を分析した結果、リン脂質組成には発育による変化を認めず、コレステロール含量は授乳期より成熟期の方がわずかに多い。著明な変化は膜脂肪酸組成にみられ、不飽和脂肪酸含量(%)が授乳期小胞では53.36±1.56、成熟期では60.83±2.64と有意に後者に高く、ことにリノレイン酸(18:2)含量が著明に高い。これらの結果から小胞膜流動性変化が

期待されたので、蛍光偏光解消法により膜流動性測定を行い両BBM小胞について比較した。その結果、測定各温度(10-35°C)において成熟期膜小胞がいずれも授乳期膜小胞より小さい蛍光偏光値 P を示し、かつ温度上昇に伴い両膜小胞はともに P 値の減少を示した。このことは授乳期BBMより成熟期BBMの方がより流動的であることを示唆する。

以上の結果に基づき膜流動性測定と同じ温度範囲でNa⁺依存性pro輸送初速度を測定すると、成熟期小胞がいずれも授乳期小胞より高い輸送活性を示し、膜流動性増大に伴い輸送初速度が増加することがわかった。これらの結果は、モルモット発育に伴うpro輸送の K_m の変化は少なくとも一部は膜流動性変化により説明されること、この変化は膜脂質組成により調節されることを示す。

膜の輸送活性が周囲の脂質環境により調節される例は多い。ユーリリッヒ細胞によるNa⁺依存性AIB輸送は細胞膜脂肪酸組成変化により影響を受け、 V_{max} は変化せず K_m が変化する⁴⁷⁾。また脂肪細胞から調製した細胞膜小胞の不飽和脂肪酸含量増加に伴う膜流動性増大はグルコース輸送を増加させる⁴⁸⁾ことが知られている。

このような膜輸送系の発育による変化との関連において、最近ウサギの発育に伴う小腸微絨毛膜構造上の変化が報告されている⁴⁹⁾。ウサギ成獣(体重3kg)と生後12-24時間の新生獣のそれぞれの小腸より微絨毛膜を部分精製(スクラーゼ活性12-20倍上昇)した後、5-ドキシルステアリン酸をプローブとしてラベルした膜を電子スピン共鳴(ESR)で調べている。測定したhyperfine splitting parameter ($2T_{H'}$)もorder parameter (S')もともに膜脂質二重層のオーダー変化を鋭敏に反映することが知られているが、この2つのパラメータはともに成獣の膜で新生獣のそれより高く、このことは新生獣の膜中のスピンプローブは成獣の膜中のプローブよりもはるかにdisordered environmentにあることを強く示唆する。このような膜構造上の差が新生獣期にみられるタンパク質のような高分子物質の微絨毛膜通過増大を説明す

ると考えられている⁴⁹⁾。

おわりに

小腸アミノ酸輸送の特異性についてはまだ十分解明されていないといえる。その最も基本的な問題は、輸送初速度が正確に測定されているかにあると考えられる。何故なら特異性解析がキネティクス測定とそれに及ぼす阻害剤の影響に基づいているからである。Kelley ら⁵⁰⁾は初代培養肝細胞による Na^+ 依存性 AIB 輸送のキネティクスをくわしく調べているが、1分間保温では $1 \sim 2 \text{ mM}$ の $1 K_m$ 値を与え、4分間保温では $1 \sim 2 \text{ mM}$ と 20 mM 以上の2つの K_m 値を与える。そこで1分間の輸送量を初速度とする限り、基質 $0 \sim 30 \text{ mM}$ 範囲で、Line-weaver-Burk プロットでも Eadie-Hofstee プロットでも同じ単一な輸送キネティクスしか得られず、他の報告にみられる Na^+ 依存性 AIB 輸送系の高 K_m 値 ($> 20 \text{ mM}$) 成分の存在に否定的である。したがってこの著者らは実験材料、条件の違いによる初速度測定の重要性を強調している。

以上のようなキネティクス解析上の問題を含みながら、小腸アミノ酸輸送についての他の問題は、これまで Na^+ 依存性と非依存性輸送系が異なる系としてきた点である。前述のように、Wright ら³⁰⁾は、反応液中の Na^+ 増加が中性アミノ酸の輸送キャリアに対する親和性を増大させることを報告し、 Na^+ 依存、非依存性輸送が単一キャリアで触媒される可能性を示唆した。この結果は Fig. 1 に示す Curran ら²⁰⁾のモデル (mobile carrier model) に適合するものである。一方 Semenza ら⁵¹⁾が提唱している小腸の Na^+ -グルコース共輸送系に対するモデル (gated channel model) によれば、 Na^+ -糖共輸送タンパクが形づくる pore または channel の可動部分 (gate) に存在する COO^- グループへの Na^+ の結合が隣接する基質結合部位の親和性と方向性を著しく変化させる結果、輸送が開始される。このモデルは Na^+ -糖共輸送機構に対するものであるが、 Na^+ の役割に関し部分的に Curran ら²⁰⁾のモデルとも適合する。しかし Semenza ら⁵¹⁾は Na^+ の存在と適当なポテンシャル差の存在を必須と考えているので、上記の Na^+ 依存性、非依存性アミノ酸輸送に対する単一キャリアの関与とは適合しない可能性はある。

このように小腸におけるアミノ酸輸送の基本的性質を実験材料と方法の厳密な検討により明らかにすることが、今後のアミノ酸輸送系の特異性を明確にする上で必要と考えられる。そのために制約はあるものの BBM 小胞な

どの膜小胞の使用が現在では最も適当な実験系と考える。

さらに小腸アミノ酸輸送特異性の研究は、輸送の調節とその生理的意義および病態との関係を明らかにするためにも必要である。しかし前述のようにこの輸送調節についてはほとんど明らかでない。実験系の選択の上で今後の重要な課題と考える。

文 献

- 1) S. G. Schultz, P. F. Curran: *Physiol. Rev.*, **50**, 637 (1970)
- 2) B. G. Munck: In "Physiology of the Gastrointestinal Tract" (L. R. Johnson, ed), p.1097, Raven Press (1981)
- 3) R. K. Crane: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **78**, 101 (1977)
- 4) H. N. Christensen: *Adv. Enzymol.*, **49**, 41 (1979)
- 5) M. S. Kilberg: *J. Membrane Biol.*, **69**, 1 (1982)
- 6) K. Hayashi, S. Yamamoto, K. Ohe, A. Miyoshi, T. Kawasaki: *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 654 (1980)
- 7) K. Hayashi, T. Kawasaki: *Biochim. Biophys. Acta*, **691**, 83 (1982)
- 8) 川崎 尚: 代謝, **13**, 751 (1976)
- 9) 川崎 尚: 生化学, **50**, 563 (1978)
- 10) 川崎 尚: 生化学, **53**, 1165 (1981)
- 11) 林 幸三, 川崎 尚: 代謝, **19**, 661 (1982)
- 12) G. A. Kimmich: In "Methods in Membrane Biology", Vol. 5 (E. D. Korn ed), p. 51, Plenum Press (1975)
- 13) N. M. Bradford, J. D. McGivan: *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 55 (1982)
- 14) U. Hopfer, K. Nelson, J. Pennotto, K. J. Isselbacher: *J. Biol. Chem.*, **248**, 25 (1973)
- 15) U. Hopfer: *Am. J. Physiol.*, **234**, F89 (1978)
- 16) H. Murer, R. Kinne: *J. Membrane Biol.*, **55**, 81 (1980)
- 17) G. Sachs, R. J. Jackson, E. C. Rabon: *Am. J. Physiol.*, **238**, G151 (1980)
- 18) S. G. Schultz, P. F. Curran, R. A. Chez, R. E. Fuisz: *J. Gen. Physiol.*, **50**, 1241 (1967)
- 19) R. L. Preston, J. F. Schaeffer, P. F. Curran: *J. Physiol.*, **64**, 443 (1974)
- 20) P. F. Curran, S. G. Schultz, R. A. Chez, R. E. Fuisz: *J. Gen. Physiol.*, **50**, 1261 (1967)
- 21) F. V. Sepúlveda, M. W. Smith: *J. Physiol.*, **282**, 73 (1978)
- 22) B. R. Stevens, H. J. Ross, E. M. Wright: *J. Membrane Biol.*, **66**, 213 (1982)
- 23) J. Y. F. Paterson, F. V. Sepúlveda, M. W. Smith: *J. Physiol.*, **292**, 339 (1979)
- 24) J. Y. F. Paterson, F. V. Sepúlveda, M. W. Smith: *J. Physiol.*, **298**, 333 (1980)
- 25) M. Watford, P. Lund, H. A. Krebs: *Biochem. J.*, **178**, 589 (1979)

- 26) S. K. Joseph, M. M. Bradford, J. D. McGivan: *Biochem. J.*, **176**, 827 (1978)
- 27) K. Sigrist-Nelson, H. Murer, U. Hopfer: *J. Biol. Chem.*, **250**, 5674 (1975)
- 28) M. Fujita, H. Ohta, K. Kawai, H. Matsui, M. Nakao: *Biochim. Biophys. Acta*, **274**, 336 (1972)
- 29) J. W. Edmondson, L. Lumeng, T. Li: *J. Biol. Chem.*, **254**, 1653 (1979)
- 30) R. E. Schell, B. R. Stevens, E. M. Wright: *J. Physiol.*, **335**, 307 (1983)
- 31) A. Berteloot, A. H. Khan, K. Ramaswamy: *Biochim. Biophys. Acta*, **691**, 321 (1982)
- 32) A. Berteloot, R. W., Bennetts, K. Ramaswamy: *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 592 (1980)
- 33) A. Corcelli, G. Preziso, F. Palmieri, C. Storelli: *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 97 (1982)
- 34) V. Scalera, C. Storelli, C. Storelli-Joss, W. Haase, H. Murer: *Biochem. J.*, **186**, 177 (1980)
- 35) U. Hopfer, K. Sigrist-Nelson, E. Ammann, H. Murer: *J. Cell. Physiol.*, **89**, 805 (1976)
- 36) A. K. Mircheff, C. H. van Os, E. M. Wright: *J. Membrane Biol.*, **52**, 83 (1980)
- 37) G. G. Guidotti, A. F. Borghetti, G. G. Gazzola: *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 329 (1978)
- 38) K. Yasumoto, K. Sugiyama, H. Mitsuda: *Agr. Biol. Chem.*, **41**, 1961; 1969 (1977)
- 39) R. Groseclose, U. Hopfer: *Membrane Biochem.*, **2**, 135 (1978)
- 40) W. A. Olsen, I. A. Rosenberg: *J. Clin. Invest.*, **49**, 96 (1970)
- 41) U. Hopfer: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 2027 (1975)
- 42) N. V. Costrini, K. P. Ganeshappa, W. Wu, G. E. Whalen, K. H. Soergel: *Am. J. Physiol.*, **233**, E181 (1977)
- 43) R. Bennetts, K. Ramaswamy: *Am. J. Physiol.*, **238**, G419 (1980)
- 44) H. P. Schedl, J. Wenger, S. A. Adibi: *Am. J. Physiol.*, **235**, E457 (1978)
- 45) H. N. Christensen: *Federation Proc.*, **32**, 19 (1973)
- 46) A. T. Shehata, J. Lerner, D. S. Miller: *Am. J. Physiol.*, **240**, G102 (1981)
- 47) T. L. Kaduce, A. B. Awad, L. J. Fontenelle, A. A. Spector: *J. Biol. Chem.*, **252**, 6624 (1977)
- 48) P. F. Pilch, P. A. Thompson, M. P. Czeck: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 915 (1980)
- 49) K. Y. Pang, J. L. Bresson, W. A. Walker: *Biochim. Biophys. Acta*, **727**, 201 (1983)
- 50) D. S. Kelley, H. A. Campbell, V. R. Potter: *J. Cell. Physiol.*, **112**, 67 (1982)
- 51) G. Toggenburger, M. Kessler, G. Semenza: *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 557 (1982)
- 52) H. Hagihira, T. H. Wilson, E. C. C. Lin: *Am. J. Physiol.*, **203**, 637 (1962)
- 53) B. G. Munck: *J. Membrane Biol.*, **53**, 45 (1980)
- 54) S. G. Schultz, L. Yu-Tu, O. O. Alvarez, P. F. Curran: *J. Gen. Physiol.*, **56**, 621 (1970)

文献抄録

ラットネフロンにおけるコルチコステロン結合部位

Corticosterone Binding Sites along the Rat Nephron

S-M, K. Lee, M. A. Chekal, A. L. Katz: Department of Medicine, University of Chicago Pritzker School of Medicine, Chicago, 11, USA
Am. J. Physiol., **224**, F504-F509(1983)

Aldosterone の腎における作用機序については、かなり明らかになってきているが、corticosteroneのそれに関してはまだ十分に解明されていない。著者らは、まず受容体の部位について明らかにしようとした。

ラット腎から尿細管を単離し、2-6mm の長さに相当する量を集め、 ^3H -corticosterone を加えて incubate し、受容体がどの部に存在するかをみた。

最も結合能の高かったのは皮質集合管で、 9.69 ± 0.77 f mol/cm (mean $\pm$ SE, $n=11$) であった。あとは遠位

尿細管、髓質部集合管、近位曲部尿細管の順で結合能は低下した。前二者は皮質集合管の $1/3$ くらいの結合能を示したが、後二者は更にその $1/3$ 以下となった。ヘンレ係蹄での結合能は特に低値を示した。corticosterone に対する受容体の分布は、aldosterone に対するその分布とほぼ同様のネフロン部位と思われた。しかし皮質集合管でのcorticosterone の最大結合能はaldosterone のそれより約100倍と考えられた。(丸茂文昭)