

## 授乳期および成獣期のラット小腸アルカリ性

## フォスファターゼの相違とその分布\*

上里 忠良\*\*・伊藤 武司\*\*\*

アルカリ性フォスファターゼ (ALP) については、いろんな臓器特異性が知られているが、小腸アルカリ性フォスファターゼに限ってもいくつかのタイプの ALP が報告されている。<sup>1-4)</sup> われわれは Wistar ラット小腸アルカリ性フォスファターゼの aging に伴う変化を調べ、その結果、生後 22~23 日ころに膜結合型 ALP は胎児型から adult 型に変わること、<sup>5)</sup> さらに離乳期前までのラット小腸粘膜には膜結合型とは異なった soluble の ALP が存在すること、および長軸にそって酵素の分布が異なることがわかったので報告する。また、成獣ラットでも ALP の分布に変化がみられたので合わせて報告する。

## 材料および実験方法

## 1. 動物

用いた動物は Wistar ラット (Std: Wistar, 静動協), 授乳期のラットは、生後 15~19 日で、いずれの実験の場合も同一腹から生まれたものを用いた。通常の飼育用エサで育てた。

## 2. 粘膜層の剥離

胎児の腸管は細く小さいので、そのものをまずポッター type homogenizer でつぶし、ガーゼで濾過した濾液を homogenate として用いた。Suckling ラットおよび adult ラットの場合は腸管をまず長軸にそって等分、または 8 等分し、管腔内を冷 0.9% 生理食塩水で十分に洗い、ハサミで濾紙上に切り開き、スライドグラスで粘膜層をかき集め、sucrose 0.32 M を含む 2.5 mm イミダゾール、pH 7.4 に移し homogenization を行った。

## 3. 膜標品の調製

粘膜層からの小腸上皮細胞の微絨毛膜およびほかの膜画分の調製法は Fujita et al.<sup>6,7)</sup> による。

## 4. SDS-PAGE

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法は、基本的には Laemmli<sup>8)</sup> の方法に準じたが若干の修正を加えた系を用いた。<sup>7,9)</sup> 分離用ゲルを 5% とし、Bis と acrylamide の比が 0.046 の系を用いた。

5. ゲルの活性染色<sup>9)</sup>

基本的には Gomori らの方法に準ずる。泳動後ゲルを Tris 10 mM,  $Mg^{++}$  5 mM, pH 7.4 の buffer で 5 分程 37°C で preincubation を行う。次に活性 medium, 0.5~1.0 mg/10 ml の naphthol AS-MX phosphoric acid (Sigma) と 0.5~1.0 mg/10 ml の fast BB (Sigma) を含む Tris 0.2 M,  $Mg^{++}$  10 mM, pH 9.2 の溶液に置き換えて 37°C で incubation を続ける。5~10 分間程で ALP の活性バンドが出現する。反応停止は 7%  $CH_3COOH$ -5% MeOH 溶液に換える。バックグラウンドの黄色を除いた後、必要あらば 570 または 600 nm の波長で densitometry を行い活性の大きさを調べることも可能である。

## 6. ALP の活性測定

3 mM の p-nitrophenylphosphate を基質とし、0.25 M アメジオール pH 9.5, 5 mM の  $Mg^{++}$ , 0.5 mM の Zn を含む溶液中で反応を行い、反応液 200  $\mu$ l あたり 20  $\mu$ l の 0.3 N PCA を加えて反応を停止させ、さらに 0.4 N の NaOH を 1.0 ml 加えて黄色に発色させ、日立 701 型分光計で測定した。

## 実験結果

Fig. 1 は Wistar ラットの生前および生後の週齢に伴う膜結合 (型) の ALP の SDS-PAGE パターンである。胎児期から生後 3 週目までは  $F_1$  のみがみられ、4 週目

\* Different types of alkaline phosphatase in suckling and adult Wistar rat small intestine and their longitudinal distribution along the intestine.

\*\* Tadayoshi Uezato, 浜松医科大学学生化学第 2 教室。

\*\*\* Takeshi Ito, 浜松医科大学微生物、免疫系共同。

(受付 1981 年 9 月 20 日)

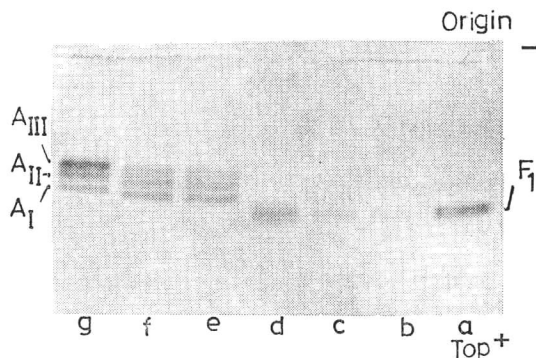


Fig. 1. 週齢に伴う ALP の変化.

a : -1b (生まれる直前). b : 1 週目.  
c : 2 週目. d : 3 週目. e : 4 週目.  
f : 9 週目. g : 14 週目.

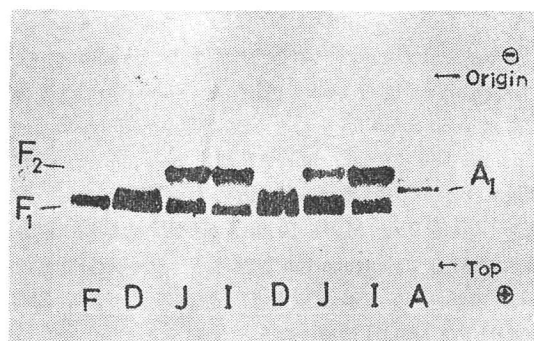


Fig. 2. Suckling ラット小腸における ALP の部位特異性.

F : reference (fetus type, membrane bound form), D : duodenum, J : jejunum, I : ileum, A : reference (adult type).

から adult 型 ( $A_I$ ,  $A_{II}$ ,  $A_{III}$ ) が検出される. Fig. 2 および Fig. 3 はそれぞれ 3 週目以前 (授乳期) と離乳後 (4 週目以後) の ALP を前実験同様 SDS-PAGE で調べたものである. 検出に用いた試料は小腸上皮粘膜の homogenate で Fig. 2 はあらかじめ腸管を 3 等分し, 各部位の ALP を調べた. 2 つの活性バンド  $F_1$  と  $F_2$  がみられるが,  $F_2$  は  $100,000 \text{ g} \times 1 \text{ h}$ , supernatante 画分にしか検出されず, ほかの膜画分には見られない. これに対し  $F_1$  は supernatante にはごく少量 (おそらくコンタミネーション) しかみられず, 膜画分にそのほとんどが回収される. 見かけ上の分子量は  $F_1$  が約 92,000,  $F_2$  が約 130,000~140,000 である. さらに Fig. 2 は  $F_1$  および  $F_2$  の分布が長軸にそって異なることを示す.  $F_2$  は十二指腸部位では全く検出されず, 空腸, 回腸にしたが

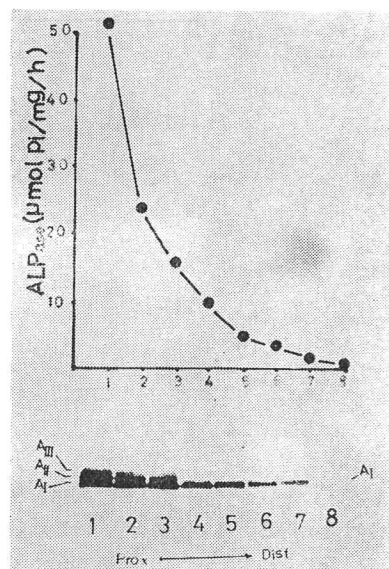


Fig. 3. Adult ラット小腸における ALP.

上 : 各 segment における ALP の比活性.  
下 : 各 segment における ALP の SDS-PAGE パターン.

ってその含量は高くなる.

Fig. 3 は adult の小腸における ALP の分布を suckling ラットの場合と同様に調べたもので, 小腸管を 8 等分し, proximal 側から distal 側にそった ALP の SDS-PAGE パターンを調べたものである. Distal 側に向って酵素の比活性は減少し, ALP のタイプも  $A_{II}$ ,  $A_{III}$  が消失し,  $A_I$  のみが観察される.

## 考 察

このように ALP の F から A への変化は離乳期を境にして急速に起こると思われるが, 興味あることは suckling ラットに見られる可溶性 ALPase  $F_2$  が proximal segments には全くみられず, 回腸部位に行くにしたがってその比が高くなることである. 胎児期 (生まれる直前) にも 2~3% 程度の  $F_2$  が検出されるが, 生後 3 週目ころ最も高くなる. しかも ileum ではその時期には全 ALP の 50% 近くにもなる. Adult では  $F_2$  に相当する活性バンドは小腸管のどの部位にも検出されない.

Adult の小腸粘膜においては, proximal segments では  $A_I$ ,  $A_{II}$ ,  $A_{III}$  の 3 つのバンドが明確に検出されるが, distal segments にしたがって  $A_{II}$ ,  $A_{III}$  は消失し,  $A_I$  のみが検出される.

以上, SDS-PAGE の系で調べる限り, Wistar ラットの small intestine ALP は suckling でも adult 期でも, 少なくとも

2種以上のタイプの ALP が存在し、またそれらは小腸の部位に特異性があることがわかった。

なお、本小論文投稿中、suckling ラットにおける小腸の可溶性 ALP と膜結合性 ALP についての関連論文がでたので参照されたい。<sup>10)</sup>

# 文 献

- 1) Dempsey, E. W. et al. : J. Comp. Cell. Physiol., **27** : 159, 1946.
- 2) Moog, F. et al. : Biochem. Biophys. Acta, **274** : 336, 1972.
- 3) Hugon, J. S. and Borgers, M. : Histochemie,

- 19** : 13, 1969.
- 4) Shields, H. M. : et al. : Gastroenterology, **78** : 1258, 1980.
- 5) Uezato, T. et al. : Biochem. Int., **2** : 561, 1981.
- 6) Fujita, M. et al. : Biochem. Biophys. Acta, **274** : 336, 1972.
- 7) Fujita, M. et al. : Biochem. J., **196** : 669, 1981.
- 8) Laemmli, U. K. : Nature, **227** : 680, 1970.
- 9) 上里忠良 : 生体の科学, **31** : 149, 1980.
- 10) Yedline, S. T. et al : J. Biol. Chem., **256** : 5620, 1981.