

2. 食用蛙小腸粘膜における糖・アミノ酸吸収と輸送電位

A. 目的

小腸上皮細胞の刷子縁 brush border での溶質の吸収機構には、受動的な輸送 passive transport の他、濃度勾配に逆らった上り坂輸送 uphill transport が存在する。小腸上皮細胞での糖・アミノ酸の輸送は、 Na^+ 依存性の共輸送機構 (Na^+ -sugar symport) であり、糖やアミノ酸が輸送されるのに共役して Na^+ が移動する。こうした糖の移動に伴う電荷を持ったイオンの移動は、小腸壁電位差 (Transmural potential difference, PD_t) の変化 PD_t 、すなわち、糖・アミノ酸誘発電位 (sugar-, amino acid-evoked potential) の発生につながる。この電位変化を測定することにより、糖・アミノ酸の Na^+ 依存性共輸送の動態を間接的に知ることができる。

本実験では、食用蛙 (bull frog, *Rana catesbeiana*) 小腸の反転嚢 (everted sac) を用いて、糖の種類による誘発電位の発生の有無、phloridzin による糖共輸送の阻害、アミノ酸共輸送の速度論的扱いについて学ぶ。

B. 器具・試薬

食用蛙、電位差計 (DC 記録計)、寒天塩橋 (細いガラス管に 3 M KCl 溶液に 2 % Agar を溶かしたものを充填したもの)、電極、飽和 KCl 槽、カニューレ、通気用エアープンプ、bath 保持用スタンド、500 mM の糖類溶液 (D-Glucose, D-Galactose, D-Fructose, Sucrose)、 10^{-3} M Phloridzin、1 M Glycine、1 M Alanine。

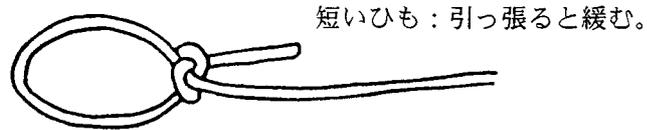
表 1 各種リンゲル液の組成

Ringer solns.	Na_2SO_4	Mannitol	KHCO_3	CaSO_4	Tris- SO_4
Na free-Mannitol Ringer	0	220	2.5	1.0	5.0
23.0 Na-Ringer	11.5	187.7	2.5	1.0	5.0
57.5 Na-Ringer	28.8	139.2	2.5	1.0	5.0 (mM)

C. 方法

1. 食用蛙小腸反転嚢 (everted sac) の作製

- 1) ウシカエルを流水でよく洗う。体重を測定したあと、冷血動物用麻酔剤 MS-222 の 5% 溶液を 体重 100 g あたり 0.5 ml を皮下注射する。蛙の皮膚はルーズなので、注射した麻酔液が針跡から漏れてしまう。この為、鼠径部から注射針を刺入し、結合組織を通して腹部皮下に麻酔液を注入する。数分後、麻酔がかかったら、前、後肢を緊縛し、手術台上に固定する。



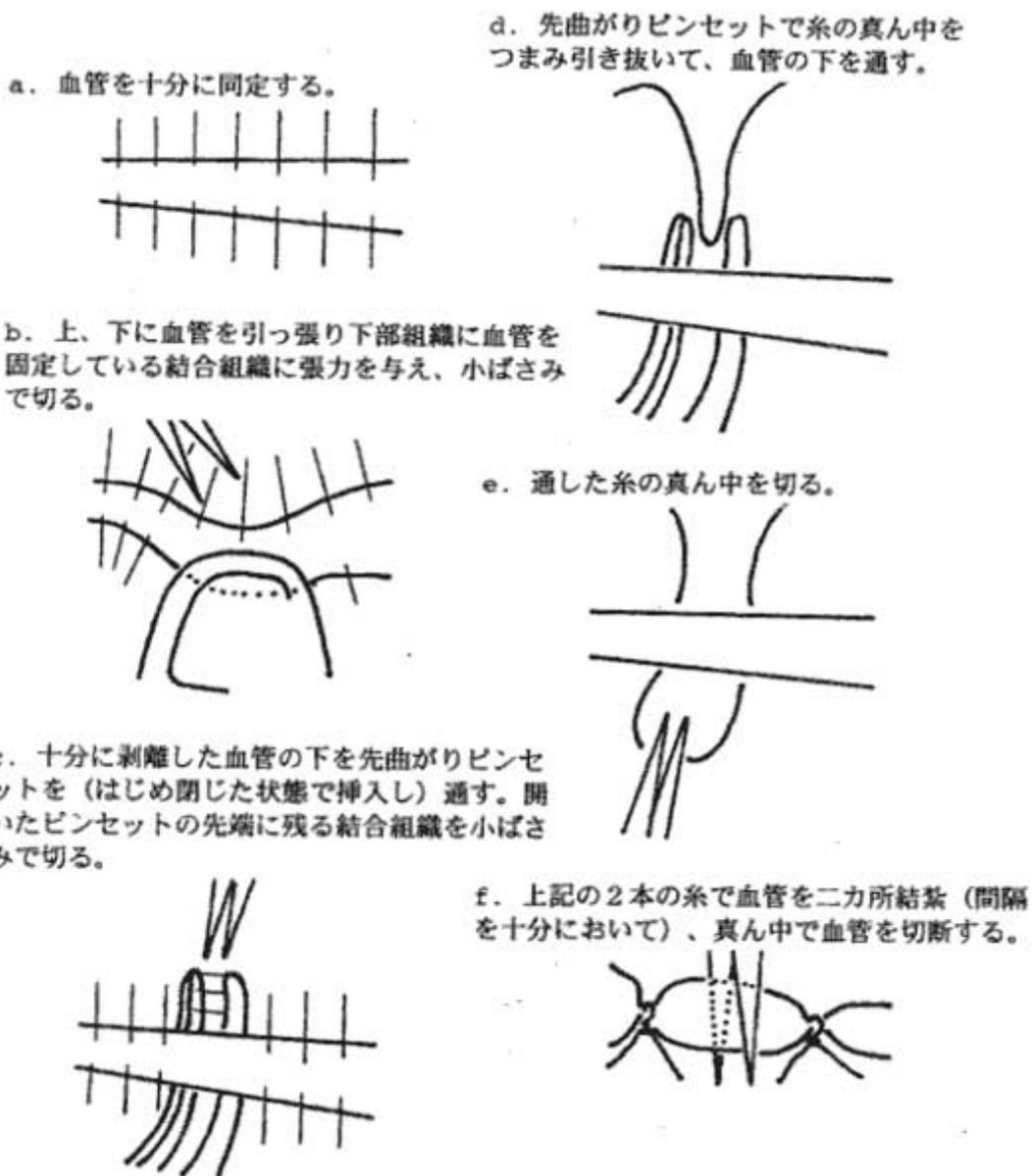
このループに四肢を通し、その長いひもを引っ張って関節部で締める。

長いひも：引っ張ると締まる。



蛙緊縛固定法

皮膚切開を腹から下顎にかけて正中線に沿って行ない、さらに左右に切開を加え、皮膚を左右に十分に反転する。腹壁に小切開を加える（正中線を走る血管を傷つけないよう、下にのこすように注意）。次に、腹壁を小ばさみで正中線を走る血管に平行して切開する。これを血管の両側で行い、遊離させた血管を以下の要領で2カ所結紮し、結紮した部分の中央で血管を切断する。



血管の結紮と切断法

- 2) 上部小腸(十二指腸)を露出し、総胆管開口部を確認した上で、その直下で腸を結紮し、糸を持って軽く腸を引き上げながら小バサミで腸間膜をできるだけ腸管の根元で切り離す。胆管開口部より、下方へ約3 cmを実験標本とし、それより下方のもう一片(約9 cm)を練習用標本として切取り、Na free Ringerに入れ洗う。
- 3) 練習用標本の一端を結紮し、ポリチューブまたは細いガラス棒の先と指で反転する。反転した盲端をさらに結紮する(粘膜をなるべく損傷しないように行う)。
- 4) この開放端にカニユーレを挿入する練習をするが、実験標本は最後にまわし、練習用標本を用いて練習をする。練習に用いた標本は予備として、通気した bath中に保存する。
- 5) 実験標本を同様に反転し、カニユーレに装着し、しっかり結紮する。
- 6) 粘膜面と囊(sac)内を、ポリチューブ付の注射筒で良く洗った後、図1に示すように bath 内にセットし、sac 内外 57.5 mM Na-Ringer を画線まで(約20 ml) 充たし、bath 内に通気する。sac 内に Ringer を満たす際は、ポリチューブ付の注射筒または、ピペットを用いて、気泡が中に入らないように行う。

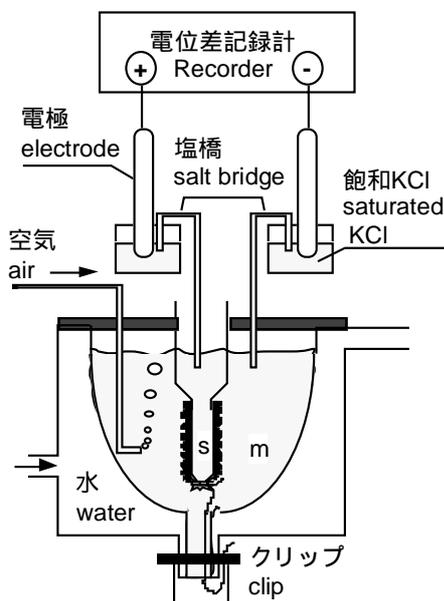


図1 実験のセットアップ

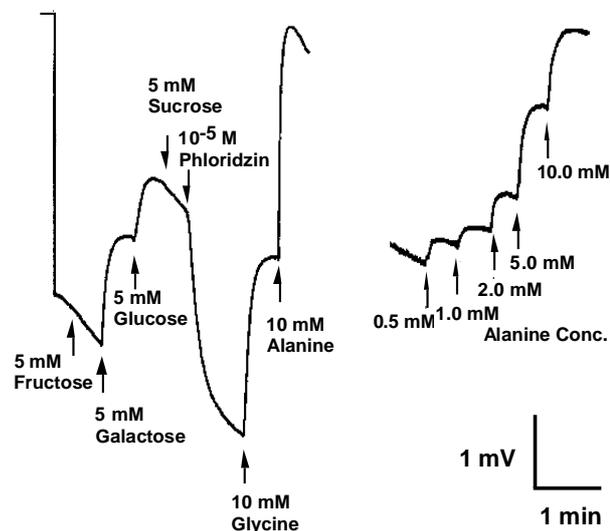


図2 23.0 Na-Ringerでの測定例

2. 粘膜側—漿膜側電位差 (transmural potential difference, PD_t) の記録

- 1) 電位差計の操作について説明を聞く。
- 2) 飽和 KCl 槽に浸した電極を電位差計の十、一端子に接続する。
- 3) 寒天ブリッジで十、一の電極を互いに連結し (ショート) ゼロ電位を記録する (zero ツマミでペンを適当な位置に合わせる ADJ に戻す)。
記録中以外のは、つねに端子をショートさせておく!

サンプルのテスト

- 1) 塩橋 salt bridge (3 m KCl - 2% Agar) の表面を清拭後、図 1 の様に serosal 側 (s 側) 液および mucosal 側 (m 側) 液と電極とを塩橋で連結する。
- 2) 57.5 Na-Ringer 中での transmural potential difference (PD_t) を測定する。
5 mm/min のチャート速度、0.5 mV/cm あるいは 1 mV/cm の range で記録。
- 3) 数分間放置し、 PD_t が比較的安定してから、1 M Glycine 溶液を m 側液に m 側液量の 1/100 量 (0.2 ml、最終濃度 10 mM) をマイクロピペットでいっきに加え、 PD_t を測定する。十分大きな電位変化 (1 ~ 5 mV) の起こることを確認する。不十分な場合は、予備の囊を使って、再度同じことを行い、最も良く電位変化が測定できるサンプルを見つける。
- 4) 良いサンプルが得られたら、両側の液を 57.5 Na-Ringer で 2 回以上更新し、数分間放置。 PD_t の安定を待つ。

D. 実験

1. 糖およびアミノ酸輸送電位の測定

- 1) PD_t が比較的安定してから、500 mM D-Fructose 溶液を m 側液に m 側液量の 1/100 量 (0.2 ml、最終濃度 5 mM) マイクロピペットでいっきに加え、 PD_t (sugar evoked potential) を測定する。
- 2) 更に順次 D-Galactose, D-Glucose, Sucrose 等各種の糖を final 5 mM になるように m 側液に加え、各々の PD_t をみる。
- 3) 更に phloridzin を final 10^{-5} M m 側液に加え効果をみる。但し、phloridzin を一度作用させると、洗っても除去できず効果が残ってしまう。この点に留意して実験計画をたてること (図 2 を参考にする)。
- 4) 更に Glycine または Alanine 等のアミノ酸 を final 10 mM になるように加え PD_t をみる。

このとき、グラフ上に添加した時点と加えた溶液の名前を忘れずに記録すること。

2. 輸送電位に対する基質濃度の影響

- 1) 両液を (s 側液はポリ tube 付注射器を用いて) 57.5 Na-Ringer で 2 回以上更新し、 PD_t が安定するのを待つ。
- 2) 適当な糖、またはアミノ酸を m 側液に final 0.5, 1.0, 2, 5, 10 mM になる様段階的に追加し、それぞれの濃度に対する PD_t (積算値!) を測定する

3. 輸送電位に対する Na^+ の影響

内外両液を共に Na^+ 濃度の異なる Ringer (Na free や 23.0 Na-Ringer) で置換えて 2. と同様の実験を行ない、糖やアミノ酸の輸送に対する Na^+ の効果を調べる。

上記の 実験 2 と実験 3 の data について、 PD_t (mV) と用いた糖またはアミノ酸の濃度 (mM) の関係を plot せよ (図 3, 4, 左)。また、 $1/PD_t$ を濃度の逆数に対して plot (Line weaver-Burk plot) し、それぞれの K_m 値を求めよ (図 3, 4, 右)。

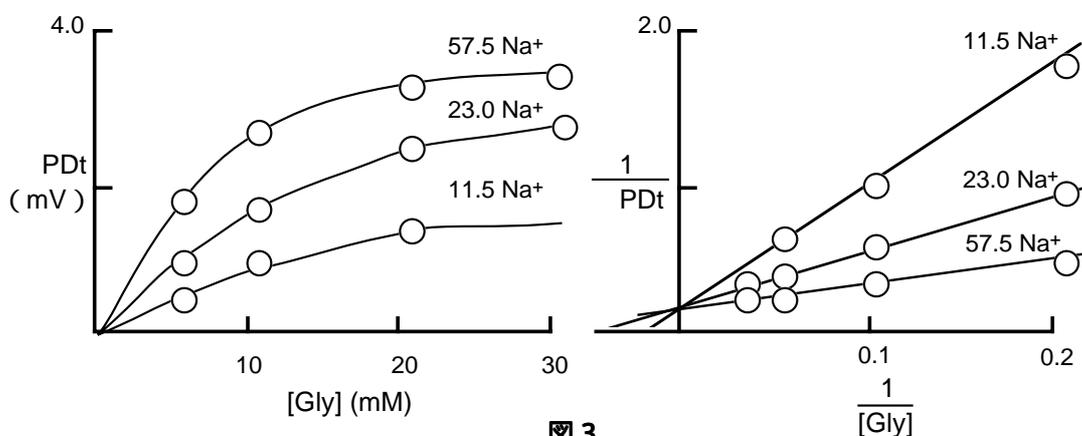


図 3

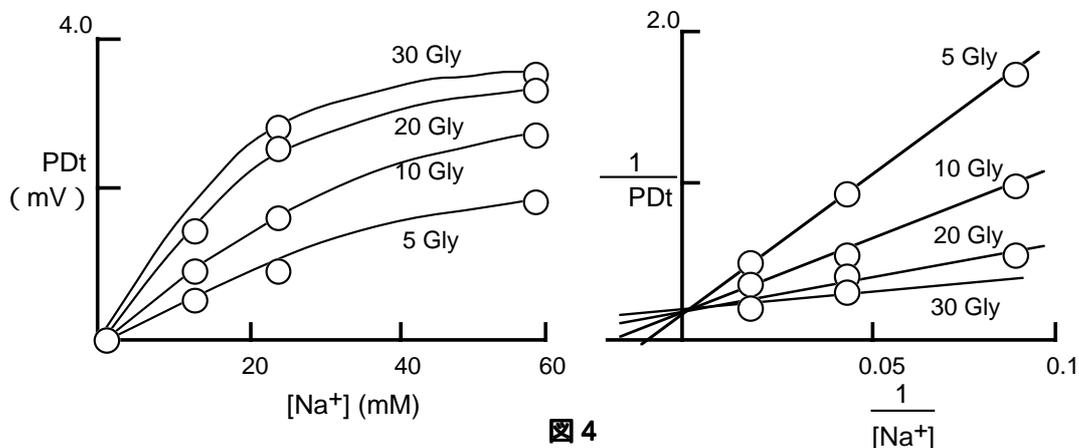


図 4

E. 考察

- ・ 上の結果を要約し、蛙小腸の糖輸送系（アミノ酸輸送系）について考察せよ。
これらが secondary active transport とよばれる理由は？
- ・ 腎近位尿細管での糖、アミノ酸の再吸収の機構は小腸での吸収機構とよく似ている。
この異常（各種のアミノ酸尿症、腎性糖尿病）についてしらべてみよ。

付1：膜における substrate-carrier complex 形成およびその輸送



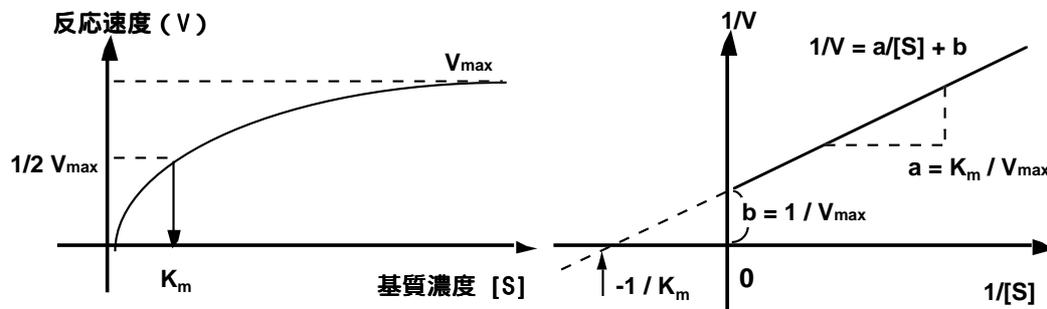
についての Michaelis-Menten の式は

[C] : carrier 濃度、[S] : substrate 濃度として

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{但し} \begin{cases} [S] = K_m \text{ の時} & V = V_{\max} = K_3 [C] \\ V = \frac{1}{2} V_{\max} \text{ の時} & [S] = K_m = \frac{K_2 + K_3}{K_1} \end{cases}$$

よって

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} [S]} \quad (\text{Lineweaver-Burk の式})$$



付2：細胞膜を横切る輸送の種類

1. 単純拡散 Simple diffusion
2. 促進拡散 Facilitated diffusion
 - a) channel mediated diffusion
 - b) carrier mediated diffusion
 - uniport
 - coupled transport
 - symport
 - antiport
3. 能動輸送 Active transport : require energy to drive
 - a) primary

