

# 反芻動物の成長に伴う栄養素吸収特性に関する研究

(研究課題番号 10660264)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金 (基盤研究C (2))

## 研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 小田伸一

(岩手大学農学部助教授)

## はしがき

反芻家畜は、本来ヒトをはじめとする単胃動物がほとんど栄養分として利用出来ない構造的炭水化物、すなわち飼料に含まれるセルロースやヘミセルロースなどの炭水化物をルーメン内微生物の発酵作用により揮発性脂肪酸（VFA）などに変換し、動物体の維持や種々の生産活動のエネルギーに利用している。また、飼料に含まれる栄養分のうち、単胃動物が自ら消化吸収することのできるような良質な炭水化物やタンパク質にいたっては易発酵性であり、その大半がルーメン微生物によって発酵され VFA などに変換されてしまう。そのため、十二指腸以降に流入する糖質はほとんどないとされてきた。しかし、濃厚飼料を多給した場合には、かなりの量の糖基質が第一胃内発酵を逃れて腸管へ流入するとの報告もある。このような飼養法は、ヒトが利用できる栄養素をわざわざ家畜に、しかも大量に与えるということで、一般に無駄が多く、動物にとっても消化生理機能を無視したものとなっている。

そこで、反芻動物の消化生理機能を踏まえた上で、基本的には粗飼料で飼い、高能力、高生産の部分を良質なタンパク質やデンプンをルーメンバイパスさせ、下部消化管から直接吸収させることでまかなおうと考えた。このような視点に立ち、高能力家畜の様々な栄養要求に見合った効率の良い飼養法の確立に寄与することを目的として、平成10年度から2年間の研究成果が得られたので、ここに報告する。

平成12年3月

研究代表者 小田伸一

## 研究組織

研究代表者： 小田伸一 (岩手大学農学部助教授)  
研究分担者： 伊藤菊一 (岩手大学農学部講師)  
研究分担者： 佐藤 淳 (岩手大学農学部助手)

## 研究経費

|        |         |
|--------|---------|
| 平成10年度 | 2,100千円 |
| 平成11年度 | 700千円   |
| 計      | 2,800千円 |

## 研究発表

- (1) 小田伸一、西田ゆり子、蓬田真由美、池田亜季、金子詠美、中川翠、中嶋芳也  
ヒツジのインスリン分泌に及ぼす十二指腸へのグルコースとカゼイン投与の影響  
第94回日本畜産学会大会、平成10年 3月 30～31日
- (2) 坂水信哉、佐藤聡美、島あかね、小田伸一、中嶋芳也  
子ウシの離乳前後における $\alpha$ -グルコシダーゼおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性について  
第49回東北畜産学会大会、平成11年8月19～20日
- (3) S. Oda, M. Satoh, H. Saitoh, A. Shima and Y. Nakashima  
Insulin and glucose responses to feeding in suckling and weaned calves  
AAAP-ASAP 2000, Australia (発表予定)

## 目次

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 緒論                          | 1  |
| 第一章 仔ウシの離乳前後におけるグルコース吸収能の比較 | 5  |
| 1 SGLT-1 の mRNA 定量法の検討      | 7  |
| 2 仔ウシの離乳前後における SGLT-1 の発現   | 12 |
| 3 仔ウシの成長に伴うグルコース吸収能の比較      | 13 |
| 4 仔ウシの離乳前後における消化酵素活性の比較     | 14 |
| 第二章 総括および今後の課題              | 17 |
| 謝辞                          | 19 |
| 参考文献                        | 19 |
| 図表                          |    |

## 緒 論

### 1 反芻動物の下部消化管におけるグルコースの吸収

反芻動物の栄養的特徴として、単胃動物がほとんど養分として利用することのできないセルロースやヘミセルロースなどの構造的炭水化物を、ルーメン内微生物の作用により少糖や単糖にまで分解し、さらに発酵作用により揮発性脂肪酸 (VFA) を産生することが挙げられる。そのために十二指腸に到達するヘキソースはほとんどみられず (Bassett, 1975)、反芻動物は、ルーメンで産生される VFA を種々の生産活動や体の維持に利用しているのである。

しかしながら、濃厚飼料を給与した時などのように飼料の質と量の違いによりルーメン発酵を逃れて小腸に流入するデンプンの量はかなり変動することが知られている (Waldo, 1973)。生草と濃厚飼料を与えた牛の小腸では、 $\alpha$ -グルコースポリマーの消化量が生草のみの場合には約 10g/day であったのに対し、濃厚飼料を給与した時には約 330g/day に増加したという報告もある (Gaillard et al., 1973)。Orskov (1986) は、濃厚飼料を給与したヒツジにおいて飼料に含まれるデンプンがルーメンをバイパスする割合は、動物によって 5~40% の変動が見られると報告している。また、給与したトウモロコシ、ソルガム、穀実デンプンの 18~42% がウシの小腸内に流入し、その約 47~88% が小腸で消化され、さらに 33~62% が大腸内で消化される (Owens et al., 1986)。一方、当研究室では、粗飼料区あるいは濃厚飼料区において維持量を給与したヒツジを供試し、給餌後 12 時間に十二指腸に流入する糖質 (デンプン+グルコース) 量を調べたところ、4.3g と 10.2g となり、これは給与した糖質量の 12.5% と 4.4% であり、どちらの区でもきわめて少ないことを報告した (飯倉, 1996)。したがって、飼料に含まれるデンプンのルーメンバイパス割合や下部消化管での消化割合は実験条件、特に飼養条件や動物の個体により変動の大きいことがわかる。

このように濃厚飼料の給与条件によっては、反芻動物でもかなりの量の糖質が下部消化管に流入することもある。しかしながら、十二指腸に注入したデンプンおよびグルコースの消長に関する実験から、小腸内でのこれらの養分の消化、吸収には限界があることを認めている (Owens et al.,1986)。この限界はアミラーゼ、マルターゼなどの酵素活性の制約によるものではなく、飼料の消化管内滞留時間や接触面積の不足などの要因が関与するものと推定している。また、消化管からグルコースが吸収されるとき、消化管組織でグルコースがエネルギーとして大量に消費されることに加え、腸内微生物の活性が腸管内デンプン消失に影響を与えている (Harmon,1992)。これらのことより、反芻動物では下部消化管からのグルコース吸収量は少ないと考えられている。

## 2 幼反芻動物との比較

単胃動物や哺乳中の幼反芻動物では、炭水化物の消化と吸収が主に行われるのは小腸である。しかし、反芻動物では、哺乳している幼反芻動物から離乳を経て反芻動物になるときに、小腸の有する単糖類吸収能が劇的に減少してしまうことが知られている (Shirazi-Beechey et al.,1989)。ただし、ここで言う単糖吸収能とはナトリウム依存性グルコース共輸送担体を指していて、幼反芻動物と比較して 100~500 倍も減少するという。また、この過程に付随して、血糖レベルとグルコース利用率が減少する一方で糖新生の活性は増加することも知られている (Shirazi-Beechey et al., 1995)。

糖類の消化酵素活性についても、幼反芻動物では小腸でのラクターゼ活性が生後 1 日齢で最も高く、その後わずかずつ減少してゆき、離乳を境に著しく低下する。マルターゼ活性は幼反芻動物の場合ラクターゼ活性に比べて低く、成長につれて高くなるが、その変化は比較的小さいことが示されている (Siddons,1968, Toofanian et al., 1973)。

### 3 膜消化酵素活性について

反芻動物においても第四胃以降の消化管の機能は、基本的に単胃動物と同じであると考えられている。すなわち、腸管から実際に体内に吸収されるのは主としてグルコースやガラクトースなどの単糖である。ルーメンをバイパスして下部消化管に流入するデンプンなどの多糖類は、膵液に含まれる $\alpha$ -アミラーゼの働きにより少糖や二糖類にまで消化される。これはさらに小腸上皮細胞の刷子縁膜に結合しているグリコシダーゼ群の作用により、膜消化、終末消化を受け、単糖として吸収される。以前は、終末消化を行うのは腸液のグリコシダーゼであるといわれていたが、これは腸液に観察される糖水解酵素活性が上皮細胞の崩壊などによって膜から遊離した酵素によるものであって、膜消化の中での役割は小さいことが証明されている。

この刷子縁膜グリコシダーゼ活性は小腸内に一様に分布しているわけではない。一般に、グリコシダーゼ活性は十二指腸で低く、空腸前半において最も高くなり、回腸へと向かうにつれて次第に低くなる（藤田道也,1988、Harmon,1992）。また、同じ小腸部位でも絨毛上の位置によって活性の強さは異なり、細胞分裂の盛んな陰窩部ではどの活性も非常に低い。上皮細胞の分化が終了する部位あたりから次第に活性が強くなり、スクラーゼやマルターゼ活性は絨毛の中ほどから先端部付近にかけて最大になる。一方、ラクターゼ活性は先端部で最大になる（武居能樹、1990）。

これらは主に実験小動物を中心に明らかにされてきた。反芻動物では先にも述べたように、下部消化管に流入する糖質が少ないために、刷子縁膜グリコシダーゼ活性は相対的に低いことが知られている。

### 4 ナトリウム依存性グルコース共輸送担体 (SGLT1) について

SGLT1 はこれまで、魚から哺乳類に至るまでの脊椎動物の小腸や腎臓をはじめ、無脊椎動物の消化管などに見い出されていて (Pajor et al., 1992)、その DNA 情報とタ

ンパク質構造はかなりよく保存されている (Shirazi-Beechey et al., 1995)。

その機能は、ナトリウムと共役して天然の糖のうち D-グルコースと D-ガラクトースのみを輸送する担体であり、その他に非代謝性の糖である 3-o-methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside と methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside も輸送することが知られている (Semenza et al., 1984)。興味深いことに SGLT1 は 2-deoxy-D-glucose を輸送しないことが示されている (Hopfer, 1987)。

反芻動物の SGLT1 の cDNA 塩基配列は、最近になってはじめてヒツジの腸で解読された (Wood et al., 1994)。この cDNA は 664 個のアミノ酸残基をコードしており、小腸の場合、刷子縁膜に位置している。

2 で述べたように、反芻動物は離乳を境にこの SGLT1 がほとんど検出されなくなる。しかし、Shirazi-Beechy ら (1991) によれば、D-グルコースあるいは methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside をヒツジの十二指腸に注入すると、幼反芻動物の SGLT1 レベルにまで増加したという。

## 5 本研究の目的

反芻動物の栄養生理的特徴は、ルーメンの存在と窒素の再循環機構によるところが大きく、一般に十二指腸以降の消化・吸収の仕組みは基本的には単胃動物の場合と同じと考えられている。また、生後まもない哺乳反芻動物の有する消化・吸収能は、ルーメンの発達に伴い大きく変化することがよく知られている。しかしながら、この成長・発育に伴う栄養素吸収能（刷子縁膜消化酵素活性や輸送担体量など）の変動に関しては今だ十分に調べられているわけではなく、不明な点が多々残されている。

そこで申請研究では、まず、初年度に反芻家畜の離乳前後におけるグルコース吸収能の変動について、消化管の部位別にそれぞれの刷子縁膜消化酵素活性と輸送担体を分子生物学的手法により定量し、成反芻動物のものと比較する。ついで次年度には、子



ウシの成長に伴うグルコース吸収能の比較を行い、得られたデータにもとづき成反芻動物の栄養素吸収能を上昇させることができるか検討し、ルーメンバイパス飼料などへの応用の可能性を検討することを目的とした。

## 6 特色・独創的な点及び予想される結果と意義

栄養生理学や分子栄養学の観点から、反芻動物における炭水化物ならびにタンパク質の消化・吸収能を明確にすることで、高能力家畜の様々な栄養要求に見合った効率の良い飼養法の確立に寄与することができるものとする。換言すれば飼料の量、質のコントロールに加えて、動物自らの吸収能率も増してやることで、生産効率の上昇を図る。また、ウシの脂肪肝など特定疾患の予防にもつながる可能性がある。

世界的な穀物生産の動向を踏まえ、飼料資源の節約や有効利用の観点から、来たるべき21世紀の日本の食糧生産を考えるに当たって、粗飼料を利用できる反芻家畜の消化・吸収特性を活かしつつ、高品質、かつ、高生産を達成し得る技術開発は極めて重要な課題である。また濃厚飼料多給を行う日本においてこそ意義深い研究であるとする。

## 第一章 仔ウシの離乳前後におけるグルコース吸収能の比較

反芻動物の栄養的特徴のひとつに、飼料中の炭水化物が第一胃内で微生物による発酵を受け、揮発性脂肪酸に変換されることが挙げられる。したがって、下部消化管に到達する糖質で消化酵素が直接作用できるものは、通常ほとんど見られないか、濃厚飼料の多給によりルーメン発酵を免れた糖質に限られる。そのため、反芻動物は体内で利用するグルコースを主に肝臓、筋肉、腎臓などでの糖新生に依存しており、小腸

からグルコースを吸収して利用する形態は、反芻動物の場合、特殊な場合を除いて、哺乳時以外見受けられない。

一方、哺乳仔ウシでは、第二胃溝反射によりミルクがルーメンに入るのを回避し、直接三胃を経由して四胃へと流入する。したがって、哺乳反芻動物は、反芻動物でありながら栄養素吸収形態は単胃動物とほとんど同じである。

このように、反芻動物は離乳を境に、摂取する食物の変化と体の仕組みが変化することで、糖質の消化吸収形態が大きく変わると考えられる。

しかしながら、動物の遺伝的能力として、成反芻動物も哺乳反芻動物と同様にグルコースを小腸より吸収する能力は持っており、小腸に到達する消化内容に適応して、その特徴が存在するものと考えられる。

その観点から今の高能力反芻家畜の飼養形態を考えると、高生産を維持するために濃厚飼料の多給を行い、ルーメン発酵の異常やルーメン発酵を免れ下部消化管に到達した糖質を利用するなど、動物にとって負担（飼料からみれば無駄）が多く、その生産効率は悪い。

そこで、動物への負担を軽減し、無駄を見直す飼養法として、粗飼料をベースに、その他必要な糖質やタンパク質はルーメンをバイパスさせ、直接小腸より吸収させる方法が考えられる。これらは、ヒツジの肝門脈にカテーテルを装着し、肝門脈へのグルコース吸収量を検討したところグルコース吸収量がラットの1/3から1/2程度であり、成ヒツジでは小腸に流入する糖質が少ないばかりか、グルコースの吸収能自体も低いという実験結果からも推測される。更に、ヒツジの十二指腸への継続的なグルコース投与によって肝門脈へのグルコース正味吸収量が増加するという結果（平成7～8年度、基盤研究（C）研究代表者、小田伸一）からも、飼養法を考案できれば、動物の持つグルコース吸収能をコントロールすることが充分期待できるものと考えられる。

## 1. SGLT1 の mRNA 定量法の検討

まず、はじめに下部消化管粘膜細胞の刷子縁膜に存在する SGLT1 の mRNA 発現量を測定するため、定量法の検討を行った。

### 材料および方法

#### 1) SGLT1 プロープの作製

2ヶ月齢の子ウシにペントバルビタールの過剰投与を行い放血屠殺した後、十二指腸および空腸の粘膜細胞を約 10cm ずつ速やかに切り取り、氷冷した生理食塩水で洗浄し、スライドガラスを用いて腸粘膜を剥離した。これを速やかにアルミホイルにくるんでドライアイスで凍らせ、測定に供するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### ホモゲナイズ

ホモゲナイズ用バッファーとして、3M 塩化リチウム（無水塩化リチウム、和光純薬工業（株））、6M 尿素（和光純薬工業（株））、10mM 酢酸ナトリウム溶液（pH5.0 に酢酸で調節する、和光純薬工業（株））を H<sub>2</sub>O でメスアップした。これを 2.2 $\mu\text{m}$ のフィルターでろ過滅菌した。さらにホモゲナイズ直前に 0.1%になるよう SDS (sodium dodecyl sulfate、20%SDS 溶液を H<sub>2</sub>O で作成する) とヘパリンを 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で添加し、軽く攪拌する。Wash バッファーは、4M 塩化リチウム、8M 尿素を H<sub>2</sub>O で調整し、ホモゲナイズ用バッファーと同様にろ過滅菌しておいた。

サンプル重量をホモゲナイズする直前に測定し、サンプルを遠沈管（50 ml、ポリプロピレン製）に入れ、バッファーをサンプル 1 本当たり約 20 ml ずつ加えた。素早くポリトロンホモゲナイザーにて約 30 秒ホモゲナイズを行い、氷中で冷やしながら 4 $^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫で1晩から数日置いた。

### TotalRNA の抽出

冷蔵庫に放置したサンプルを 10,000rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離して、上清を取り除き、沈殿物を得た。沈殿物に 5 ml の Wash バッファーを入れ、ピペッティングによ

り攪拌し、同じく 10,000rpm、4℃で 10 分間遠心分離して、上清を取り除き、沈殿物を洗浄した。この作業を 3 回繰り返した。ただし、3 回目は室温で遠心分離した。洗浄した沈殿物にサンプル 1 本につき 50mM 酢酸ナトリウム・1%SDS 溶液(最終濃度がそれぞれ 50mM、1%になるように滅菌した H<sub>2</sub>O で調節する)を 5 ml 加え、ピペティングで沈殿物を可溶化させ、5 ml を別の 50 ml 遠沈管に取り分けた。これにフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 溶液を 5 ml 加え、激しく攪拌し、12,000rpm 室温で 5 分間遠心分離すると、上層 (水層)、中間層、有機層に分離した。このうち、上層を取り分けた。この作業を上層が透明になるまで (2 回) 繰り返した。透明になった上層を、4 ml を遠沈管 (ポリスチレン製) に取り分け、最終濃度が 0.3M 酢酸ナトリウム、×2.5 溶エタノールを加えた。この状態で -80℃にて 30 分以上静置した。その後、3,000rpm 4℃で 30 分間遠心分離した。上清を捨て、エタノール (99.5%エタノール (和光純薬工業 (株)) 5 ml を加え、再び 3,000rpm、4℃で 5 分間遠心分離した。この上清を捨て、沈殿物を乾燥させた。遠沈管の底に白く totalRNA がペレット状に残るので、滅菌した H<sub>2</sub>O 100 μl で溶かし、スピッツチューブに取り分け、さらに 50 μl で共洗いを行った。RNA は壊れやすいので、取り分けたサンプルはすぐに氷冷保存した。このサンプルから、1 μl および 3 μl を別のスピッツチューブに取り分け、滅菌した純水 100 μl を加え、分光光度計により 260nm の波長で吸光度を測定した。この結果を以下の計算式に代入し、RNA 量を算出した。

$$1 \text{ O.D.} = 40 \mu\text{g} / \text{ml RNA}$$

1 O.D. : 260nm の吸光度が 1 になるような濃度の RNA 溶液 1 ml に含まれる RNA の量

さらに、RNA が壊れていないことを確認するため、サンプルを電気泳動にかけた。

### mRNA の精製

前述のようにして抽出した totalRNA を mRNA 濃縮用カラム(ファルマシア、origo

dT カラムキット)を用いて mRNA の精製を行った。

#### 逆転写酵素による cDNA の作製 (RT-PCR 法)

mRNA(3.65  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、Primer (origo dT プライマー、20 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、dNTP 2  $\mu\text{l}$ 、H<sub>2</sub>O(RNase free) 13  $\mu\text{l}$  をスピッツチューブに取り、ピペッティングで攪拌し 94°C で 3 分、4°C で 5 分間 cool down した。次いで 10×PCR Buffer 2  $\mu\text{l}$ 、逆転写酵素 1  $\mu\text{l}$  を加えた。この溶液を 30°C で 10 分、37°C で 30 分、99°C で 5 分間インキュベートした後、4°C で cool down し、cDNA を作製した。

#### PCR による cDNA の増幅 (テンプレート DNA の作製)

作製した cDNA 20  $\mu\text{l}$ 、10×PCR Buffer 10  $\mu\text{l}$ 、Forward プライマー (F-プライマー、20 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、Reverse プライマー (R-プライマー、20 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ 、さらに H<sub>2</sub>O 59.5  $\mu\text{l}$ 、dNTP 8  $\mu\text{l}$  および Taq (耐熱性 DNA ポリメラーゼ) 0.5  $\mu\text{l}$  を加え、Total で 100  $\mu\text{l}$  とした。PCR 条件は下に示した 1~3 の過程を 30 および 40 サイクル行い、増幅した。

1. 94°C 1 分 (denature)

2. 51°C 1 分 (annealing)

3. 72°C 1 分 (extension)

これに 0.3M 酢酸 (3M 酢酸 11  $\mu\text{l}$ ) と、×2.5 溶のエタノール (99.5%エタノール、330  $\mu\text{l}$ ) を加え、5~10 分 -80°C で静置し、10,000rpm 15 分間遠心分離した (エタ沈)。上清を捨て沈渣を乾燥させた。この沈殿を TE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mMEDTA (pH8.0)) 10  $\mu\text{l}$  に溶かし、発色試薬 2  $\mu\text{l}$  を加え、電気泳動にかけた (図 26 参照)。分離した目的のバンドをメスで切り取り、ゲル抽出用キットで DNA を抽出し、精製した。このテンプレート DNA は、-80°C で保管した。

#### SGLT1 プローブの作製 (テンプレートの標識)

テンプレート DNA 8  $\mu\text{l}$ 、Random Primer 2  $\mu\text{l}$ 、H<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{l}$  を合わせ、Total

で  $16\mu\text{l}$  とし、 $95^{\circ}\text{C}$  で 3 分、 $4^{\circ}\text{C}$  で 5 分間インキュベートした後、これに  $10\times\text{Buffer } 2.5\mu\text{l}$ 、 $\text{dNTP mixture } 2.5\mu\text{l}$ 、 $[\text{32P}] \text{ dCTP } 3\mu\text{l}$  および標識用酵素 (Nenow Frag)  $1\mu\text{l}$  を加えた。さらに  $37^{\circ}\text{C}$  30 分、 $65^{\circ}\text{C}$  5 分、 $95^{\circ}\text{C}$  3 分間インキュベートした後、 $4^{\circ}\text{C}$  で cool down させた。 $^{32}\text{P}$  がうまく DNA の中に取り込まれていることの確認はペーパークロマトにより検査した。

## 2) テンプレート DNA の検証

### SGLT1 cDNA のサブクローニング

まず、mRNA を RT-PCR で逆転写して cDNA を合成し、これを PCR で増やして電気泳動にかけた後、ゲル抽出を行い、この DNA 断片 (インサート) をプラスミドに組み込んで (ライゲーション) クローニングを行った。このプラスミドを増幅させるための宿主として、大腸菌を使用した。

前述の RT-PCR 法および PCR 法を行い、インサート用の DNA を合成する。インサート用の DNA  $5\mu\text{l}$ 、ベクターの DNA  $1\mu\text{l}$ 、 $\times 10$  Ligation Buffer (LB)  $1\mu\text{l}$ 、 $\text{H}_2\text{O } 2\mu\text{l}$ 、Ligase  $1\mu\text{l}$  を添加して、 $16^{\circ}\text{C}$  で約 6 時間インキュベートした。これを大腸菌の入った溶液  $100\mu\text{l}$  に加え、氷中で 30 分静置した。さらに  $49^{\circ}\text{C}$  で 90 秒インキュベートし、再び氷中で 2 分静置した。これに LB  $500\mu\text{l}$  を加え、さらに  $37^{\circ}\text{C}$  で 45 分インキュベートした後、予め作製しておいた LB 寒天培地にまいた。これに Xgal 試薬  $50\mu\text{l}$ 、IPTG 試薬  $25\mu\text{l}$  を添加してスプレッダーで伸ばし、乾燥させた後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 晩インキュベートした。これによりコロニーが形成されるが、これは、アンピシリン薬剤耐性とブルー・ホワイトセレクションにより、目的のコロニーを選別する。電気泳動により、SGLT1 が発現していると考えられるサンプル選別し、液体培養によりさらに増殖させた。

### 制限酵素による切断

液体培地で増殖した大腸菌を  $3\text{ ml}$  取り、 $5,000\text{ rpm}$  室温で 5 分遠心分離した。この

上清を捨て、沈殿物にプラスミド精製用キットを用いて精製した。このプラスミド DNA を  $20\mu\text{l}$  の TE Buffer に溶解し、このうち  $1\mu\text{l}$  と  $\times 10$  Buffer  $2\mu\text{l}$ 、制限酵素として EcoRI、XhoI を  $0.8\mu\text{l}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートした。この工程により、プラスミドは EcoRI、XhoI の位置で切断された。確認のため、マーカールと共に全量を電気泳動にかけた。

### SGLT1 cDNA 塩基配列シーケンスの解析

ここではヌクレオチドアナログと Bca BEST DNA ポリメラーゼを用いたダイデオキシ法によった。プライマーは、市販の T3 と T7 Primer の 2 種類を使用し、両側からシーケンス反応を行った。また DNA 断片の検出は  $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  および  $[^{35}\text{S}]\text{dCTP}$  によるオートラジオグラフィーで行った。

この塩基配列の解析にはホモロジー検索ソフトである BLASTN を用いた。

### 3) 結果および考察

SGLT1 · cDNA の塩基配列の一部を図 2 に示した。これはラット、およびヒツジとのホモロジー検索の結果を示している。図の中でアスタリスクはホモロジーがあった部位を示しており、赤は Forward primer ( $5'$  側) を、青は Reverse primer ( $3'$  側) をそれぞれ示している。この間の塩基数はヒツジで 791 bp である。

図 1 に SGLT1 cDNA の電気泳動の結果を示した。サンプルはウシの十二指腸と空腸をそれぞれ RT-PCR 法により 30 あるいは 40 cycle 増幅させたものであるが、部位が異なっても検出されたバンドは同一であった。本実験においては、ウシの mRNA の定量を行ったため、ヒツジの 791bp に近似した値となることが予測された。実際に図 1 から塩基の長さを計算すると約 730 bp となり、ヒツジの 791bp に近似した値であった。

cDNA のうち、バンドがはっきり出ている空腸の cDNA を大腸菌のプラスミドの中に挿入し、サブクローニングを行ない、電気泳動にかけた。マーカールとしては左から

ウシ空腸の mRNA および totalRNA から合成した cDNA を用いた。合計で 15 サンプルを流したが、その中でマーカー と同じ長さの DNA がクローニングされたのは No.4、5、9、15 であった。そこでこの 4 つの大腸菌を、液体培養でさらに増殖し、制限酵素である EcoR I、Xho I により切断した。電気泳動では、マーカー としてウシ回腸の cDNA を使用した。サンプルはそれぞれインサートとベクターのバンドが検出された。このうち、インサートは EcoR I から Xho I までの領域で SGLT1 を含むバンドであった。これは SGLT1 の 730 bp と制限酵素の塩基配列を合わせた約 761 bp のバンドと推測された。ベクターはインサート以外のプラスミド部位を示している。インサートを比較すると、サンプル No.4、5 および No.9、15 はそれぞれ同じ長さであった。No.4、5 と No.9、15 の 2 つは異なったバンドであり、2 種類の SGLT1 様の塩基配列が検出された。また No.4、5 に比較して No.9、15 のインサートのバンドはやや薄く、PCR で増幅された量が少なかったものと考えられた。

これら 4 つの塩基配列をそれぞれ T3 および T7 primer 側の両方から解析したところ、それぞれ同一の配列を示したことより、2 種類の塩基配列が検出された。BLASTN により SGLT1 とのホモロジー検索を行ったところ、ヒツジの SGLT1cDNA 配列と 97% が一致した。

以上の結果より、作製したプローブは、ヒツジの SGLT1 の塩基配列とホモロジーがあり、SGLT1 を増幅するプローブとして使用できるものと考えられた。

## 2. 仔ウシの離乳前後における SGLT-1 の発現

### 実験方法

#### 供試動物

離乳前の 22、24 日齢、および離乳後の 38、40 日齢の子ウシ 4 頭を供試した。離乳は 30



～35日の間に行った。実験当日、頸静脈よりペントバルビタールを過剰投与後、放血屠殺した。その後速やかに第4胃幽門部を起点として30、70、150、200および250cmの部位を10cm程度切り出し、生理食塩水で洗浄後、スライドガラスで腸粘膜上皮細胞を採取した。サンプルはアッセイまで-80℃で冷凍保存した。このサンプルをホモゲナイズした後、塩化リチウム・フェノール処理とエタノール沈殿によりゲノムDNA・タンパク質分画を除き、total RNAを得た。それをRT-PCRによりクローニングしたSGLT-1cDNAをプローブとして、ノーザンブロットを行った。

## 結果

図3にtotal RNAの泳動図とノーザンブロットの結果を示した。それを数値化して図4に示した。腸管による比較では、離乳前の22、24日齢において、30、70cmでSGLT-1の発現が弱く、150cm以下の部位で徐々に強い発現が見られた。一方、離乳後の38、40日齢では30cm以降のどの腸管の部位においてもほぼ一定量の比較的高いSGLT-1が検出された。

したがって、離乳直後の38、40日齢では十二指腸においてもSGLT-1の発現が見られることがわかった。

## 3. 仔ウシの成長に伴うグルコース吸収能の比較

### 供試動物

離乳前の2および3週齢、離乳後の11、12週齢の子ウシを各1頭づつ、計4頭を供試した。その他の方法は2)と同様である。

### 結果

<sup>32</sup>Pで標識したプローブを用い、total RNAをサンプルとしてハイブリダイゼーションを行ったところ、4頭全てのサンプルでSGLT-1 mRNAが検出できた(図5)。しかしながら、部位別にみると、30、70、150cmでやや発現が低い動物と、全体に強い発現

が見られる動物とがあり、離乳前、離乳後の比較では顕著な傾向が見られなかった。これらの発現を数値化した結果を表1に示した。

表1 子ウシの腸管粘膜上皮における SGLT-1 mRNA の発現

| 部位   | 30 cm | 70 cm | 150 cm | 200 cm | 250 cm |
|------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 2週齢  | 156   | 83    | 196    | 1827   | 2045   |
| 3週齢  | 1417  | 1632  | 1523   | 1787   | 1275   |
| 11週齢 | -     | 655   | 1677   | 2092   | 1687   |
| 12週齢 | 2109  | 2453  | 2270   | 2313   | 2280   |

これらから、SGLT-1 の発現には成長というよりも個体差が大きいと考えられた。

#### 4. 仔ウシの離乳前後における消化酵素活性の比較

##### 1) 材料

子牛の腸粘膜細胞 (幽門部を起点として30, 70, 150, 200, 250 cmの小腸各部位)

子牛 ホルスタイン種雄子牛

離乳前 5頭 (2週齢)

離乳後 5頭 (12~17週齢)

##### 2) サンプルの採取および保存

供試動物を屠殺後、小腸各部位を速やかに摘出し生理食塩水で管腔内を洗浄後、スライドガラスで腸粘膜上皮細胞を剥離し、酵素活性測定時までアルミホイルに包んで-80度で保存した。

##### 3) 測定項目および測定方法

ホモゲナイズ

pH6.2に調節した0.5Mマレイン酸バッファー (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) をホモゲナイズバッ

ファーとして使用。サンプルは凍った状態のまま遠沈管に入れ、バッファーを5 ml加え、ポリトロンホモゲナイザーで約45秒ホモゲナイズした。ただちに10,000rpm、4℃で5分間遠心分離を行い、上清をスピッツチューブに取り分けた。その後、膜消化酵素活性に供するまで-80℃で冷凍保存した。

#### 膜消化酵素活性測定用基質の作成

膜消化酵素活性の測定はDahlqvist(1964)の方法に従い、活性を測定した。の基質溶液は、0.1Mマレイン酸バッファー（マレイン酸、和光純薬工業（株））を用い、100mMマルトース（マルトース一水和物、和光純薬工業（株））溶液を作成し、pH6.2に調節した。

#### グルコース測定用発色試薬の調整

0.5Mトリスバッファー（2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール、生化学用、和光純薬工業（株））を作成してpH7.0に調節した。これにグルコースオキシダーゼ（生化学用、和光純薬工業（株））5000U U/l、パーオキシダーゼ（わさび製、生化学用、和光純薬工業（株））を1000U/lになるよう溶解した。さらにオージアニシジン溶液（和光純薬工業（株）、99.5%エタノールで0.5%(W/V)に溶解したものを1%(V/V)になるよう、またデタージェント溶液（トリトンX100を99.5%エタノールで25%(W/V)に溶解したものを1%(V/V)になるよう添加し、溶解後に吸引ろ過を行い発色試薬（以下TGO試薬）とした。

#### スタンダードの作成

無水グルコース（D(+)-グルコース、和光純薬工業（株））を純水で希釈し、最終濃度が0、25、50、100、200 mg/100mlになるように標準液を作成した。

#### マルターゼ活性のアッセイ

純水0.1mlと基質溶液0.1mlを入れたものをブランク1とした。サンプル0.1mlと基質溶

液0.1mlを合わせたものをブランク1とともに37℃のウォーターバスで1時間インキュベートし、終了後直ちに沸騰水中に1分間入れ酵素を失活させた後、それぞれに純水を0.8mlずつ加えた。このとき、インキュベートを行わないですぐに失活させたものをブランク2とした。

#### グルコースアッセイ

ブランク1、2とサンプルをそれぞれ試験管に0.5mlずつ取り分け、スタンダードと共にTGO試薬を3mlずつ加えて攪拌し、37℃のウォーターバスで1時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー（セントラル科学貿易）を用いて420nmの波長で吸光度を測定した。

$$\text{Disaccharidase Activity(Units)} = \frac{(a-b) \cdot d}{n \cdot t \cdot 180}$$

a: グルコース量 ( $\mu\text{g}$ ) / タンパク量

b: ブランクのグルコース量 ( $\mu\text{g}$ ) / タンパク量

d: 希釈率

n: 2糖類1分子の加水分解によって生じるグルコース分子量

t: インキュベートした時間

尚、タンパク量はタンパク測定用キット（ESLキット）を用いて測定した。

#### 結果

個々の $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の比較を図6に示した。

離乳前、離乳後の $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は、離乳前の子牛の方が低く、部位間の大きな違いも見られなかった。離乳後では、離乳前に比べておよそ2倍の活性が認め

られた。また、消化管を部位別に比較すると十二指腸に比べ下部になるに従い高い活性を示した。

図7には個々の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を離乳前と離乳後で比較した。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性については、離乳前、離乳後ともに大きな違いは見られなかった。部位別に比較した場合、顕著な変動は見られなかったが、下部になるにつれて、僅かながら高くなる傾向が見られた。

5頭の平均をとり、離乳前及び離乳後の比較を図8に示した。

離乳前後では膜消化酵素活性が変動することが確認された。変動の大きさは酵素によって異なることが示唆された。また、離乳後において $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が離乳前より高い値を示したことは、離乳後においてもガラクトースを分解・吸収する能力が、ある程度高くなると考えられた。

## 第二章 総括および今後の課題

### 1、子ウシの成長に伴うグルコース吸収能の変動

離乳前の子ウシ4頭、離乳直後2頭(38、40日齢)および生後12週齢2頭を供試した。常法に則って速やかに、第四胃幽門部を起点として30、70、150、200、250cmの各腸管粘膜上皮細胞を採取した。

前年度に確認した方法に従い total RNA を抽出し、RT-PCR によりサブクローニングした SGLT-1・cDNA をプローブとしてノーザンブロットを行った。

その結果、離乳前の子ウシでは、30、70cm のサンプルで SGLT-1・mRNA の発現が弱く、幽門部より遠位になるに従い徐々に発現が強くなった。一方、離乳後では30、70cm に限らず、30~250cm の間で、ほぼ同様の SGLT-1・mRNA の発現が見ら

れた。しかし、この発現には個体による変動も大きい可能性が示唆された。子ウシの場合、消化吸収能の発育には12週齢ではまだ充分ではなく、もう少し成育の進んだ状態まで検討する必要があるものと思われた。

## 2、子ウシの離乳前後における $\alpha$ -グルコシダーゼおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性は、離乳前の子ウシの方が低く、部位による顕著な違いも見られなかった。一方、離乳後では、離乳前に比べておよそ2倍の活性が認められた。また、消化管を部位別に比較すると、十二指腸に比べ下部になるに従い高い活性を示した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性については、離乳前、離乳後ともに大きな違いは見られなかった。

## 3、ルーメンバイパス飼料

ルーメンバイパス飼料を米粉を基質に作製した。現在、その物理的性質を調べているところである。反芻動物の場合、誇張症になる可能性もあるので、動物実験に先だって、十分なデータを得る必要がある。

このように本研究は、まず、栄養素吸収能の評価法を分子生物学的手法により具現化しようとしたものであり、手法的には見直しは必要であるが、ほぼ確立できたものとする。しかしながら、子ウシの場合、離乳という栄養素の大きな変革にもかかわらず、その栄養素吸収能の評価には明確な差が得られなかった。さらに、12週齢（離乳後7週齢）では、まだ消化吸収能は発育途上にあり、週齢の進んだ動物を供試して検討する必要があるものと思われた。また、ルーメンバイパス飼料の効果が確認されれば、その他の有為な栄養素を添加することも可能であり、期待される場所である。

今後の検討課題は多々残されているものの、本研究結果が、反芻動物の生理的特徴を踏まえつつ、健康な動物による食糧生産の一助になれば幸いである。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、岩手大学大学院農学研究科 中川翠、佐藤聡美氏をはじめ応用生物学科動物栄養学講座の学生諸氏の協力を得た。記して謝意を表する。

## 参考文献

- Bassett, J.M. (1975) Dietary and gastro-intestinal control of hormones regulating carbohydrate metabolism in ruminants. In: Digestion and Metabolism in the Ruminant. eds. McDonald, I.W., & A.C. Warner, A.C. 383-398. University of New England Publishing Unit, Armidale, NSW, Australia.
- Gaillard, B.D.E. & Klooster, A.T. Van 't (1973) Observations on the fermentation of carbohydrate along the gastrointestinal tract of fistulated cow. Neth. J. Agric. Sci., 21: 217.
- Harmon, D.J. (1992) Dietary influences on carbohydrases and small intestinal capacity for starch hydrolysis in ruminants. J. Nutr., 122: 203-210.
- Hopfer, U. (1987) Membrane transport mechanisms for hexose and amino acid in the small intestine. Physiology of the Gastrointestinal Tract., 1499-1526.
- 藤田 道也 (1988) 小腸吸収上皮における膜結合酵素の分布と生成 新生理科学大系第十八巻 医学書院、東京 130-139.
- 飯倉 豪 (1996) メン羊の腸管におけるグルコースならびに澱粉の消化吸収、修士論文、岩手大学
- Orskov, E.R. (1986) Starch digestion and utilization in ruminants. J. Anim. Sci., 63: 1624-1633.
- Owens, F.N., Zinn, R.A. & Kim, Y.K. (1986) Limits of starch digestion in the ruminant small intestine. J. Anim. Sci., 63: 1634-1648.

- Pajor,A.M.,Hirayama,B.A., & Wright,E.M.(1992) Molecular biology approaches to comparative study of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter. *Am. J. Physiol.* 263,R489-R495.
- Semenza,G., Kessler,M., Hosang.M. & Schmidt,U. (1984) Biochemistry of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter of the intestinal brush border membrane. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 779: 343-370.
- Shirazi-Beechey,S.P., Kemp,R.B., Dyer,J. & Beechey,R.B.(1989) Changes in the functions of the intestinal brush border membrane during the development of ruminant habit in lambs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B:801-806.
- Shirazi-Beechey,S.P., Hirayama,B.A., Wang,Y., Scott,D., Smith,M.W. & Wright, E.M.(1991) Ontogenic development of lamb intestinal sodium-glucose cotransporter is regulated by diet. *J. Physiol.*, 437, 699-708.
- Shirazi-Beechey,S.P.,Wood, I.S., Dyer,J., Scott,D., and King,T.P., (1995) Intestinal sugar transport in ruminants.In: *Ruminant Physiology : Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction.* eds. Engelhardt,W.v., Leonhard-Marek,S., Breves,G., and Giesecke,D., 117-133. Stuttgart : Enke, 1995
- Siddons,R.C.(1968) Carbohydrase activity in the bovine digestive tract. *Biochem.J.*,108:839
- 武居 能樹(1990) 臨床生理学シリーズ⑥「腸」、星 猛 監修、南江堂 22-26
- Toofanian,F., Hill,F.W.G. & Kidder,D.E.(1973) The mucosal disaccharidases in the small intestine of the calf. *Ann. Rech. Vet.*, 4: 57.
- Wardo,D.R. & Goering,H.K. (1979) Insolubility of proteins in ruminant feed by four methods. *J.Anim.Sci.*, 49, 1560-1568.
- Wood,I.S., Scott,D., Beechey,R.B., & Shirazi-Beechey,S.P.(1994) Cloning and sequencing of the ovine intestinal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter (SGLT1). *Biochem. Society Transactions*, 22: 266s.



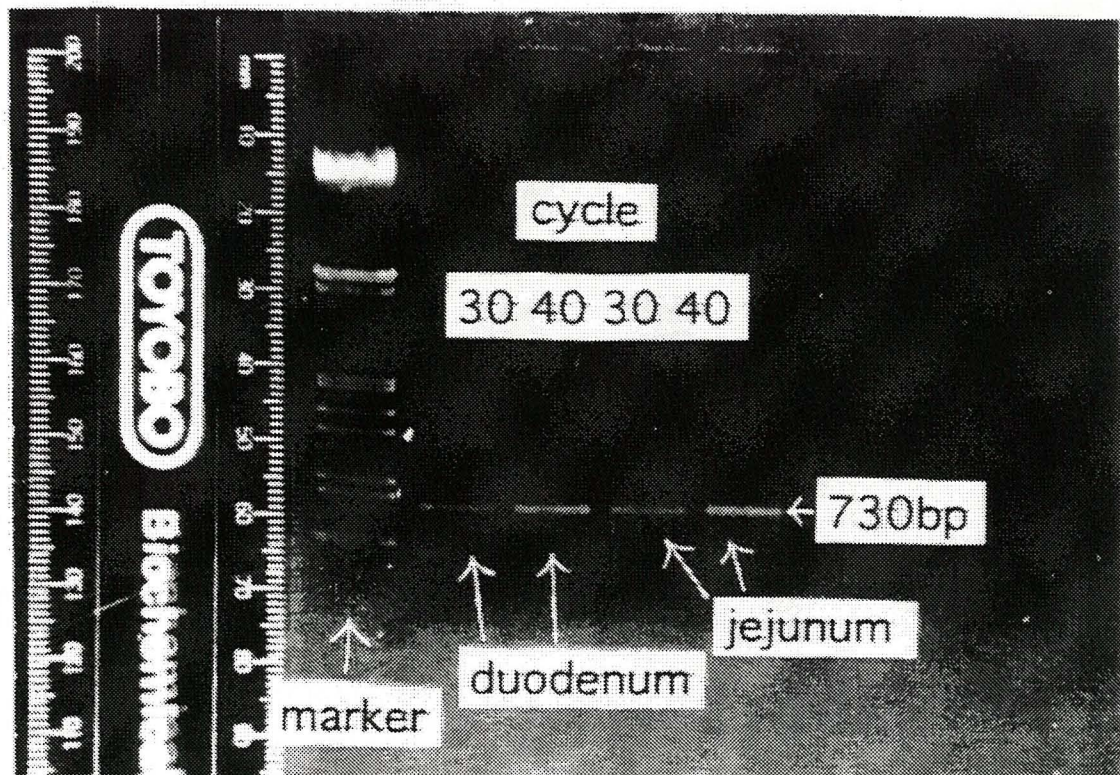


Fig.26 Amplification of calf SGLT1 cDNA by RT-PCR

☒ 1 Amplification of calf SGLT-1 cDNA by RT-PCR

were subjected to RT-PCR using specific primers

(F and R primers) under different conditions (30 cycle

and 40 cycle). Poly(A+) RNAs prepared from calf duodenum and jejunum were subjected to RT-PCR using specific primers (F and R primers) under different conditions (30 cycle and 40 cycle). Amplified products of calf SGLT-1 (730 bp) were indicated by arrows. Size markers were also given.

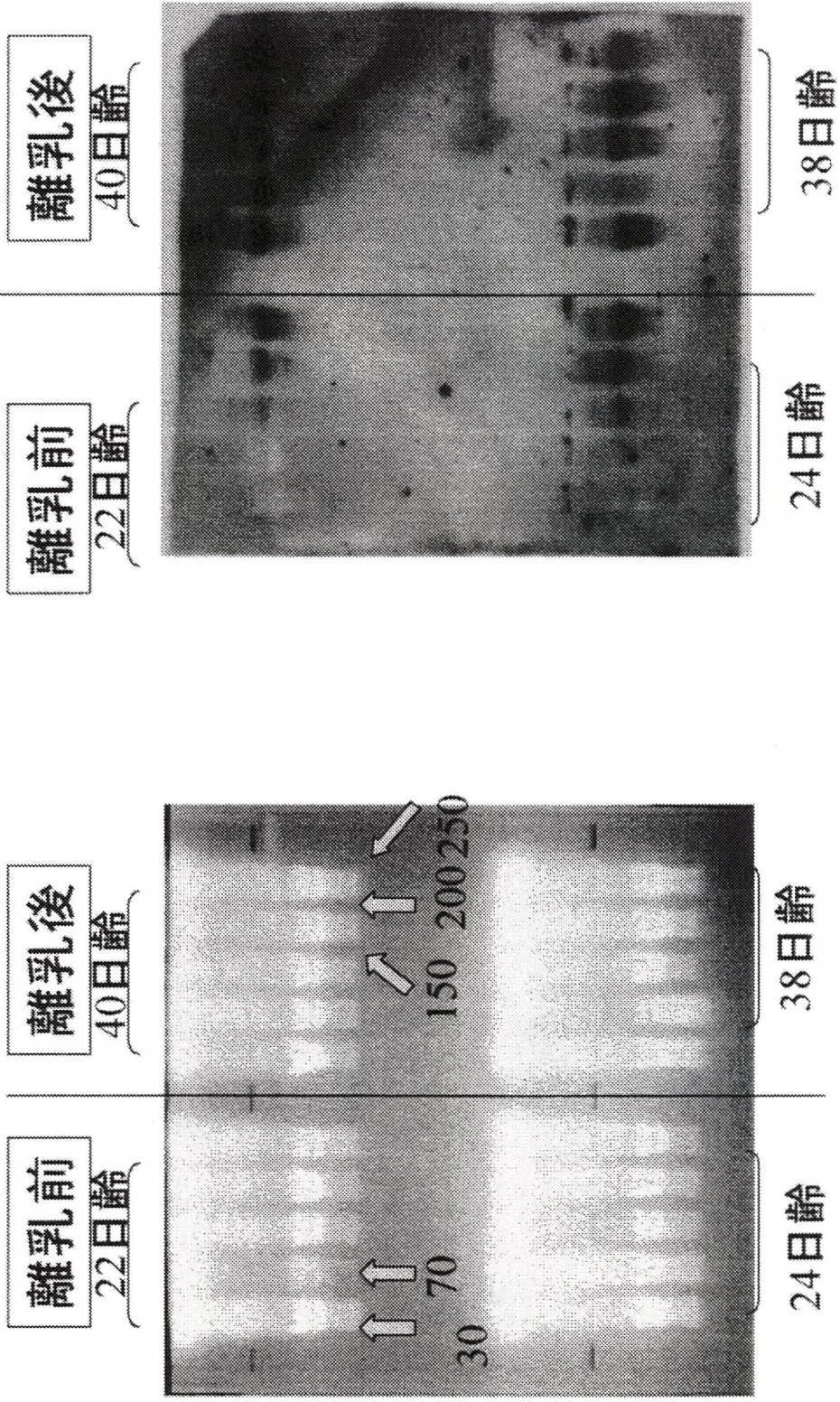


|             |  |
|-------------|--|
| rat SGLT1   | 241:CAATGCGGCTGACATATCAGTCATCGTCATCTACTT <b>CGTGGTGGTATGGCTGT</b> CGGGCT             |
| sheep SGLT1 | 241:CAATGCAGCTGACATCTCTGTCATCGTCATCTACTT <b>CGTGGTGGTATGGCTGT</b> CGGGCT<br>***** ** |
| rat SGLT1   | 301:GTGGGCCATGTTTTCCAATAATCGTGGGACTGTTGGAGGCTTCTTCTGGCAGGCCGAAG                      |
| sheep SGLT1 | 301:GTGGGCCATGTTTTCCAATAACCGTGGGACTGTTGGAGGCTTCTTCTGGCAGGTCCAAG<br>***** **          |
| rat SGLT1   | 361:TATGGTGTGGTGGCCGATTGGAGCCTCTCTCTTTGCCAGTAACATCGGAAGTGGTCACTT                     |
| sheep SGLT1 | 361:TATGGTGTGGTGGCCGATTGGAGCCTCTCTGTTGCCAGTAACATTGGAAGCGGCCACTT<br>***** **          |
| rat SGLT1   | 421:TGTGGGGCTGGCGGGCACAGGAGCAGCCGAGGCATTGCCATGGGTGGCTTCCAATGGAA                      |
| sheep SGLT1 | 421:TGTGGGACTGGCAGGGACCGGAGCAGCTGCAGGAATTGCCACCGGGGGCTTTGAATGGAA<br>***** **         |
| rat SGLT1   | 481:CGCCTTGGTGTTCGTGGTCTGCTGCTGGGGTGGCTTTTTGTCCCTATTTACATCAAGGCTGG                   |
| sheep SGLT1 | 481:TGCCCTGATTTGGTGGTTTTGCTGGGCTGGGTGTTTGTCCCATTTACATTAAGGCTGG<br>*** **             |
| rat SGLT1   | 541:GGTGGTGACGATGCCGGAGTATCTGCGGAAGCGATTTGGAGGCAAGCGGATCCAGATCTA                     |
| sheep SGLT1 | 541:GGTGGTGACGATGCCGGAGTACCTGCGGAAGCGATTTGGAGGCCAGCGGATCCAGGTCTA<br>***** **         |
| rat SGLT1   | 601:CCTTTCCGTTCTGTCCCTGCTCCTCTACATCTTTACCAAGATCTCAGCAGACATCTTCTC                     |
| sheep SGLT1 | 601:CCTGTCTGCCTGTCCCTGGTGTGACATTTTACCAAGATCTCGGCAGACATCTTTCTC<br>*** **              |
| rat SGLT1   | 661:TGGGGCTATATTCATCAATC-TGGCCTTGGGCCTGGATATATACCTGGCCATTTTCATCC                     |
| sheep SGLT1 | 661:TGGGGCCATATTCATCAA-CTTGGCCTTGGGCCTGGATCTCTATCTGGCCATCTTTATCT<br>***** **         |
| rat SGLT1   | 721:TGCTGGCCATCACCGCCCTTTACACCATCACAGGGGGACTGGCAGCAGTAATTTACACAG                     |
| sheep SGLT1 | 721:TATTGGCAATCACCGCCCTTTACACAATCACAGGGGGCCTGGCAGCTGTGATTTACACAG<br>* **** **        |
| rat SGLT1   | 781:ACACCTTGACAGACTGCGATCATGCTGGTGGGATCTTTTATCCTGACTGGGTTTGCTTTCC                    |
| sheep SGLT1 | 781:ACACCTTGACAGACGGTGATTATGCTCCTGGGGTCTTTATCCTGACTGGGTTTGCTTTCC<br>***** **         |
| rat SGLT1   | 841:GAGAAGTAGGAGGGTATGAGGCCTTCATGGATAAGTACATGAAAGCTATTCCAACCTTGG                     |
| sheep SGLT1 | 841:ATGAAGTGGGAGGGTACAGTGCCTTCGTGACAAAATACATGAATGCCATTCCAACCTGTA<br>***** **         |
| rat SGLT1   | 901:TTTCTGATGGAACATAACCGTCAAAGAAGAATGTTACACACCC-AGGGCCGACTCGTTC                      |
| sheep SGLT1 | 901:CCTCTTATGGAACACCACCGTCAAAGAAGAGTGCTACAC-CCCAGGGGCTGACTCCTTC<br>*** ***** **      |
| rat SGLT1   | 961:CACATATTCCGAGA-CCCCATTACGGGGGACATGCCATGGCCTGGGCTCATCTTCCGCCT                     |
| sheep SGLT1 | 961:CACATCTTCCGCGATCCTCTCAA-GGGAGACCTGCCCTGGCCTGGGCTCATCTTGGGCT<br>***** **          |
| rat SGLT1   | 1021:GTCCATCCTCGCCCTGTGGTACTGGTGTACGGATCAGGTCATTGTGCAGCGATGCCTCTC                    |
| sheep SGLT1 | 1021:GACCATCATCTCCCTGTGGTACTGGTGCACAGACCAGGTCATTGTGCAGCGCTGCCTCTC<br>* ***** **      |

**Figure 2 Comparison of cDNA sequences between rat and sheep SGLT1s and locations of selected primers**

Identical sequences were indicated by asterisks. Chosed forward and reverse primers were shown as red and blue sequences, respectively.





total RNAの泳動図

ノ-ザンブロツティング

図3 total RNAの泳動図およびノ-ザンブロツティング



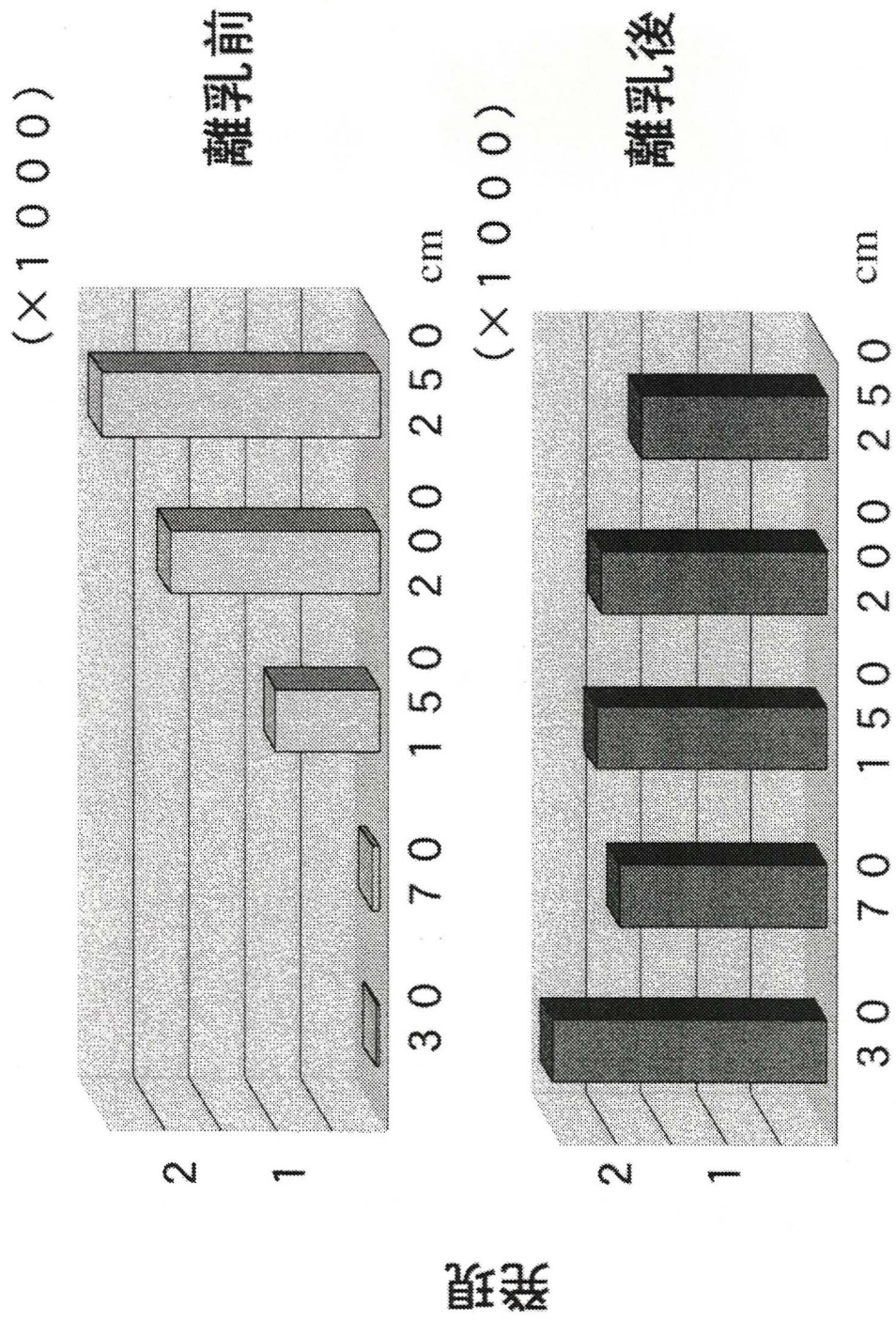


図4 SGLT-1 mRNAの発現

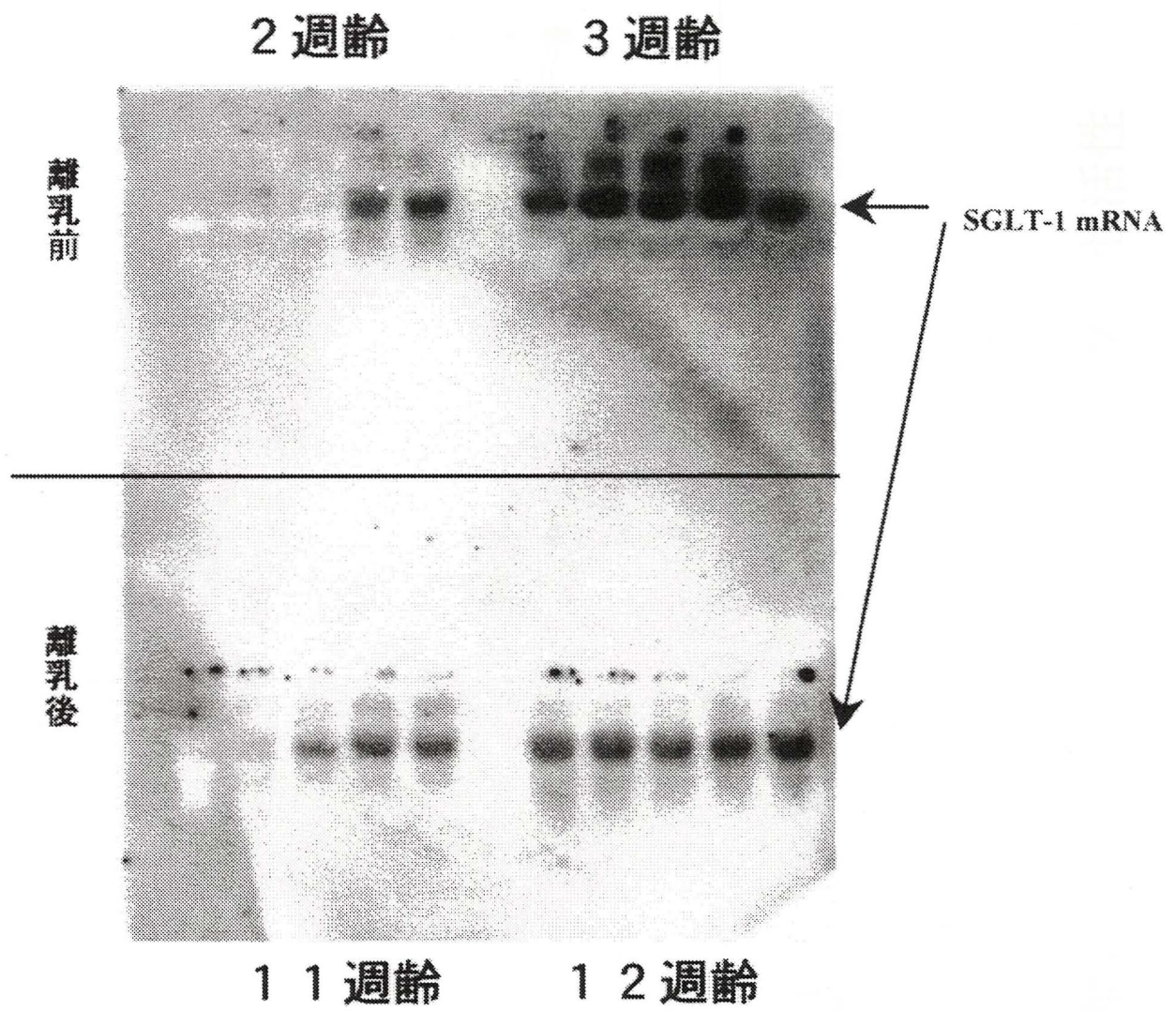
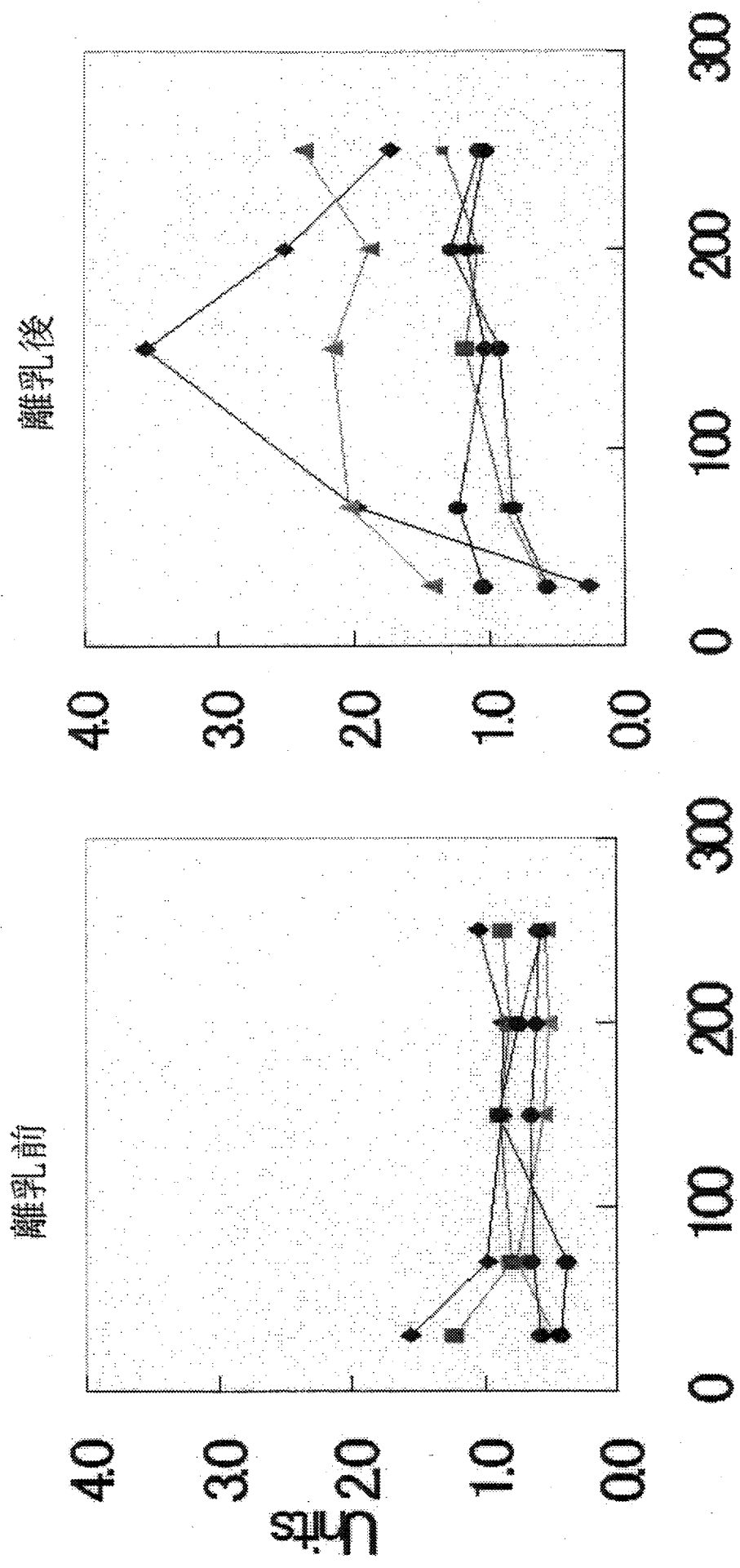
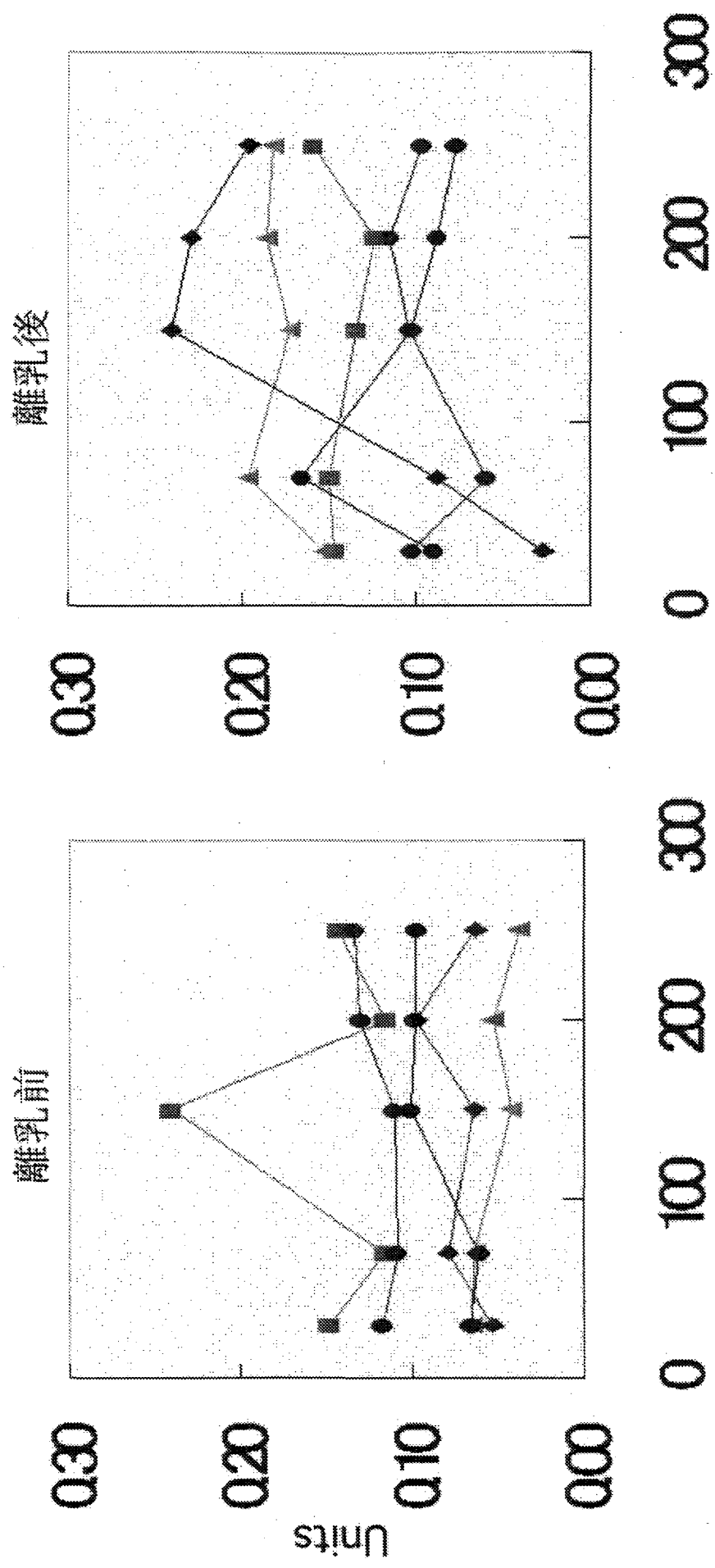


図5 オートラジオグラフィ後のSGLT-1 mRNAの発現



腸管部位 (幽門部以降の距離、cm)

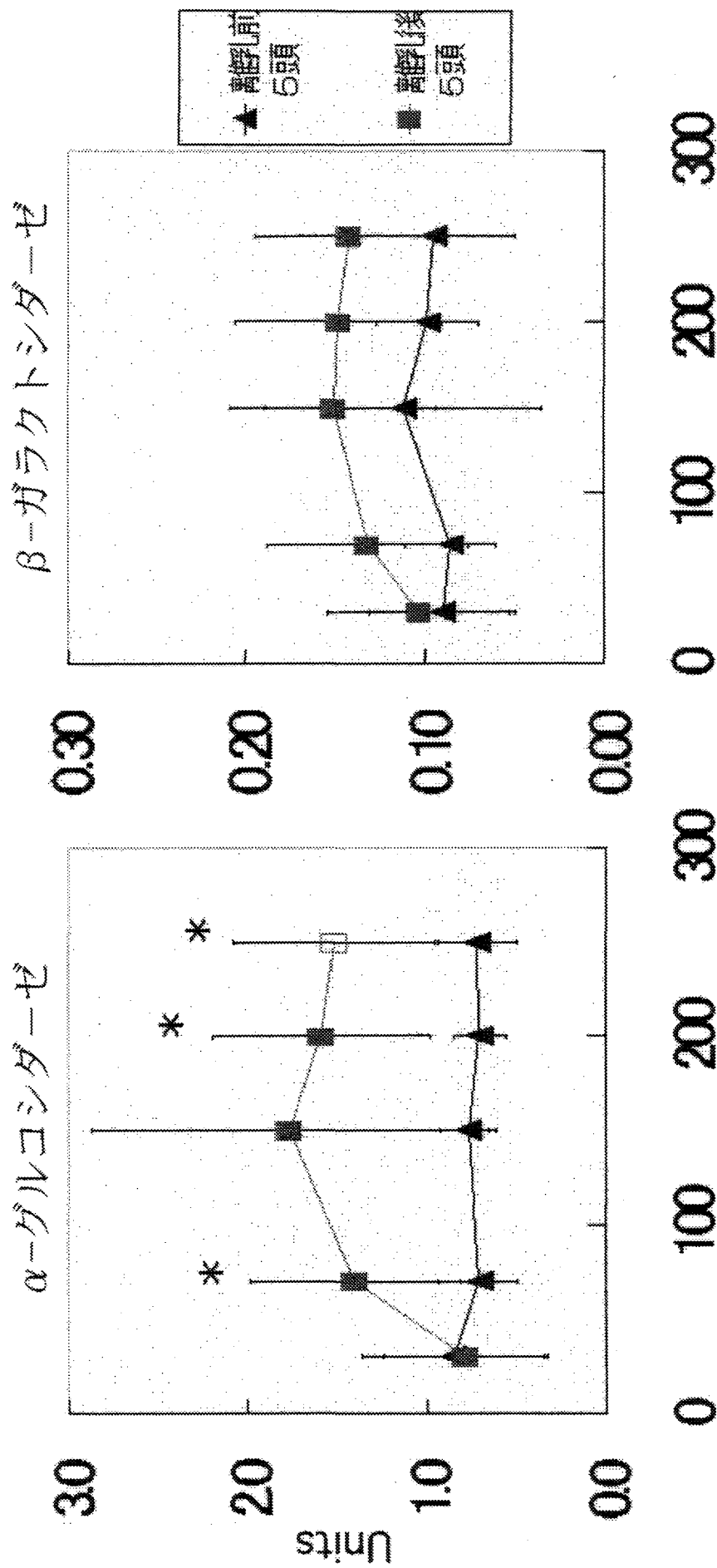
図6 離乳前、離乳後における $\alpha$ -グルコシダーゼ活性



腸管部位 (幽門部以降の距離、cm)

図7 離乳前、離乳後におけるβ-ガラクトシダーゼ活性(個体別)





腸管部位 (幽門部以降の距離、cm)

図8 離乳前、離乳後における酵素活性(5頭平均)