

2007福井大学SPP

「子供の頃に牛乳を飲めたのに大人になると  
飲めなくなるのはどうしてか」  
から生物の分化と進化を考える

福井県立武生高等学校  
伊部・帰山・進士・林・山本

# ラクターゼ遺伝子転写調節部のSNP解析

ラクターゼ遺伝子転写調節部の転写を抑制する部分に1個の塩基置換(SNP)があると、大人になっても転写が継続して起こり、ラクターゼ活性があるので牛乳を飲むことができる。日本人にもその変異を持つ者がいるか？ 表現型との相関は？

## SNP解析

### DNAサンプルの抽出・精製

(血液サンプルから採取)

### PCR反応

(ラクターゼ遺伝子のサイレンサー領域の増幅・PCR産物確認)

### シーケンス反応

### 塩基配列解析

## 牛乳負荷試験

各自が牛乳を200ml～600ml飲み、その後のおなかの調子を観察する。

## 結果と考察

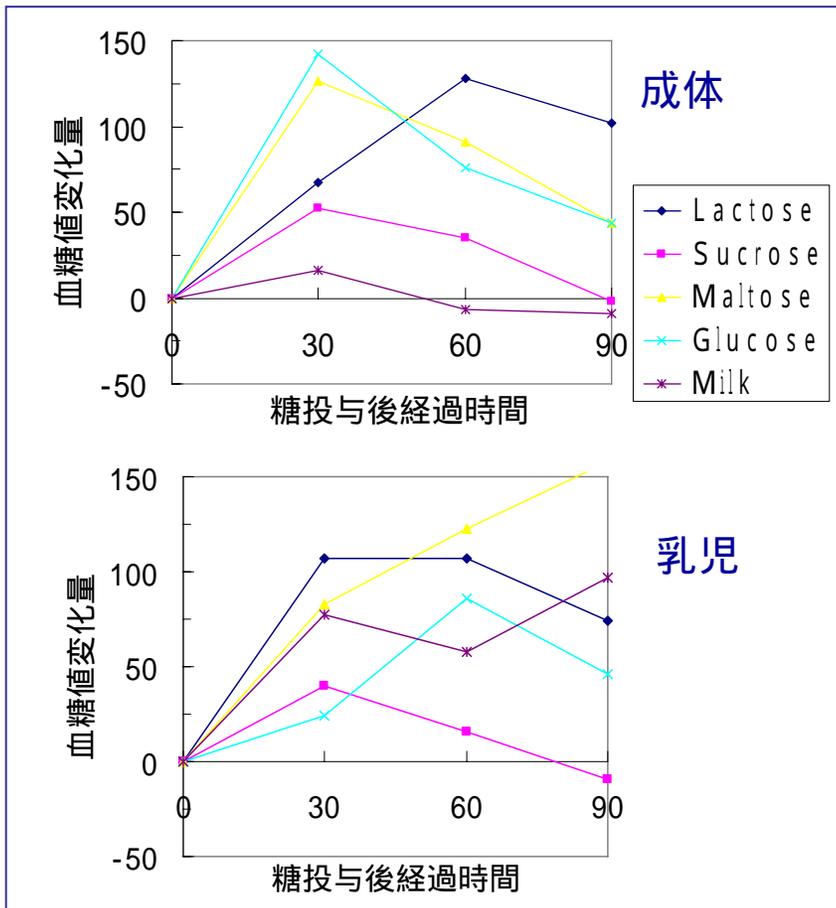
塩基配列解析の結果、サイレンサー領域に変異を持っているものはいなかった。負荷試験では、2名がお腹が張った感じがあり、他の2名は変化がなかった。

DNAに変異が見られなかったことから、ラクターゼの活性は低下していると考えられる。しかし、負荷試験で特に強い症状が出なかったのは、中学校までの給食の経験がある者、日ごろからの飲み慣れている者にとって600ml程度では、たとえラクトースを消化できなくても、腸にラクトースがたまっただけの反応に対する耐性ができているからだと考えられる。

## 2 糖類負荷試験

マウスはどの糖を利用できるか？ 成体と乳児のマウスにミルクに多く含まれるラクトースやその他の糖を与え、その後の血糖値の変化を糖投与後30分、60分、90分後に測定する。腸では単糖類に分解された糖が吸収され血糖となる。成体はラクトースを分解し利用することができるか？

### 結果



### 考察

マウスの成体は穀物食であるので、デンプン分解産物であるマルトースがよく分解され吸収されていることがわかる。しかし、ラクトースでも血糖値が上昇していることから、このマウスでは麻酔や、環境からのストレスで、血糖値が上がった可能性がある。ミルクを飲ませたマウスでは血糖値の変化がほとんどなかったことから、成体マウスはラクトースを分解できないことがわかる。

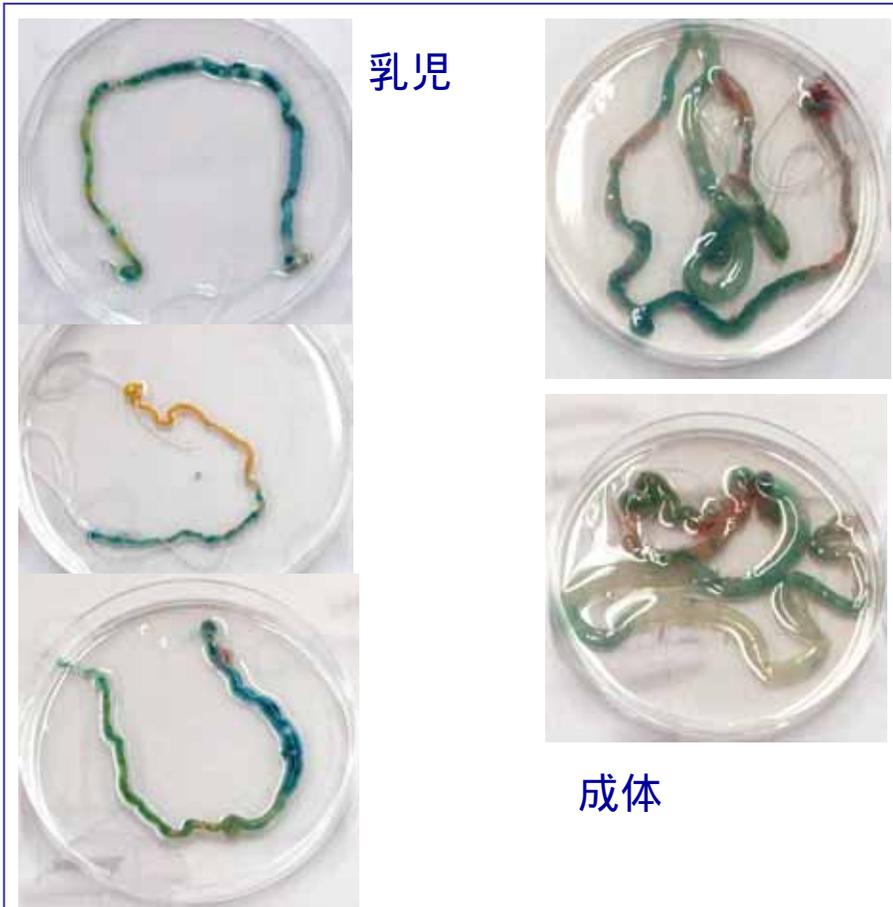
乳児ではラクトースに対する反応が大変よく、母乳に含まれるラクトースがよく分解され、吸収されていることがわかった。

### 3 ラクターゼの小腸における分布の観察

マウスの小腸のどの部分が最もラクターゼ活性が高いか？ 成体と乳児のマウスを解剖し、小腸を取り出してラクターゼ活性をX-galを用いて観察した。X-galはラクトースによく似た物質で、 $\beta$ -ガラクトシダーゼによりラクトースと側鎖部分に加水分解され、側鎖部分が青色を呈する。染色されるのは十二指腸、回腸、空腸のどの部分か？

#### 結果

#### 考察



乳児のマウス(左の列)では回腸の部分がよく青色に染色されており、回腸のラクターゼ活性が高いことがわかる。特に中央の腸では顕著である。

成体では、乳児に比べ全体に青色は薄い。したがって、ラクターゼ活性は低いと考えられる。

薄く緑色に染色されている部分は、腸上皮細胞で分泌される酵素による活性ではなく、各細胞内に存在するリソソーム内にある、消化酵素の活性によるものと考えられる。

## 4 小腸各部の組織抽出液に含まれる総タンパク質量の測定

小腸の各組織では細胞の量に差があるのか？ この後、小腸の各部域における酵素活性を測定するが、小腸組織から抽出した酵素の活性を比較する際、抽出した組織における細胞の量が一定でなければ、酵素活性の大きさを比較することができない。細胞の数を定量的に測定するのは困難であるため、細胞に一定の割合で含まれているタンパク質の量を定量し、細胞の量として考える。

### 方法

腸組織のホモジェネート

遠心分離で画分核を除去

抽出液に反応液を加えマイクロプレートのウェルに入れOD値を測定  
(タンパク質に結合して発色した物質の吸光度を測定する)

検量線から総タンパク量を求める

### 結果(各校の測定値を平均)

		タンパク質濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
乳児	十二指腸	5.74
	空腸	10.95
	回腸	9.72
成体	十二指腸	7.54
	空腸	6.58
	回腸	5.90

### 考察

Double assayによって平均を求めたが、二つの測定結果は大変近い値であり、精密な定量ができたと考えられる。

## 5 マウス小腸の二糖類分解酵素の活性測定

成体のマウス小腸の各組織では本当にラクターゼ活性が小さいか？ 乳児・成体マウスから採取した小腸各部位の二糖類分解酵素(ラクターゼ, スクララーゼ, マルターゼ)の酵素活性を測定し, 比較する。(武生高校はスクラーゼを担当)

### 方法

小腸各組織抽出液に各基質を加え, それらが分解されてできる単糖類の反応前後の増加量から, 酵素の活性を測定する。

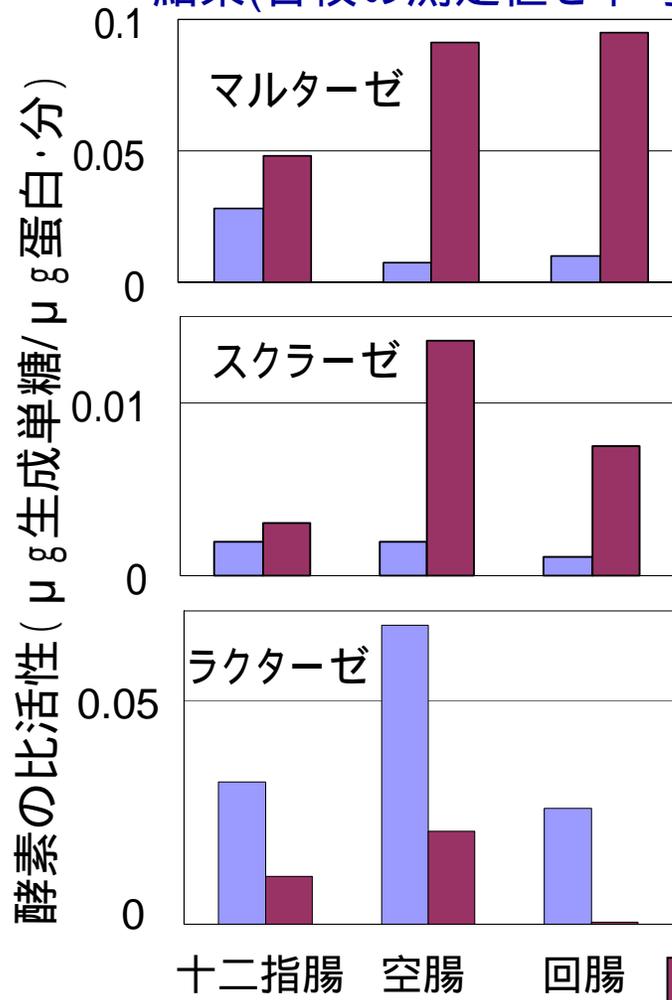
ラクターゼ: ガラクトース

スクラーゼ: フルクトース

マルターゼ: グルコース

測定値は, 実験4で求めた各組織のタンパク質濃度で除することにより, 各組織の細胞あたりの酵素活性(比活性)が求められる。

### 結果(各校の測定値を平均)



### 考察

予想どおり, 成体でのラクターゼ活性は低く, 乳児では大変高かった。一方, 穀物を主食とする成体では, デンプンの分解産物であるマルトースを分解するマルターゼ活性が大きかった。スクラーゼは成体でも活性が低く(縦軸の単位が違う)乳児ではほとんど無いと言える。砂糖は乳児には栄養にならないことがわかった。

## 6 ラクターゼ活性の観察

ラクターゼは、基質のどのような構造を識別しているのか？ ラクターゼの活性を目で見て観察できるONPGを用い、様々な糖を阻害剤として加え、ラクターゼ活性の高さを比較する。

### 方法

5種類の糖と蒸留水を、ガラクトシダーゼの働きにより分解されると黄色に呈色するONPGと混合し、酵素の反応条件を満たしている試験官に酵素を加えて、呈色の具合を比較する。黄色になったものほど、ONPGがより多く分解された(酵素反応が高かった)と判断される。

### 結果

阻害剤	構成成分	呈色の度合い
D.W.		黄
ラクトース	Glu+Gal	透明
マルトース	Glu+Glu	やや薄い黄
スクロース	Gal+Fru	ごく薄い黄
ガラクトース (Gal)		やや薄い黄
グルコース (Glu)		やや薄い黄

Fru:フルクトース

### 考察

本来の基質とよく似た構造を持つ物質は酵素の活性中心と結合し、酵素活性を阻害する(競争阻害)。ラクトースは本来の基質であるので、ONPGの分解を阻害。ラクトースと同じガラクトースを構成成分とする2糖類であるスクロースも酵素活性をわずかに阻害していることから、酵素は2糖類のガラクトースの部分を識別していると考察できる。

## 実験を終えて

何匹ものネズミを殺してしまった。実験の結果(乳児と成体では、分解される糖がちがうなど)いろいろなことがわかったけど、その他にも、命の大切さを学んだと思う。2日間でいろいろな実験をしたので実験器具の使い方など今まで以上に腕をみかけた気がする。参加できてよかった。楽しかった。(遥)

普通にできない実験ができて楽しかったし、大学の先生やティーチングアシスタントの人たちも優しかった。何より、自分の受け持ったマウスは親も子も死ななかつたのでよかった。(は)

今回、はじめてマウスを用いた実験を経験しました。実験中、3～4匹死んでしまったのは残念でしたが、動物実験の難しさなどを感じました。実験内容は少し難しかったですが、高校の知識で補える部分もあり、また、大学の先生やサポートしてくださった学生の方のおかげで理解することができました。今回の価値のある実験の経験を何らかの形で自分の学習に生かしたいと思います。(達)

成体はラクトースを分解できないのに乳児はラクトースを分解できることなど、初めて知ってびっくりしました。実験がどれも興味深いもので面白かったです。(円)

二日間の実験を終えて、大変だった部分も多かったけれど今まで知らなかったことに触れることができたのでよかったと思う。高校ではできないような実験にも参加させてもらいとても有意義だった。また、自分の塩基配列を調べることで牛乳への耐性の有無を知ることができて楽しかった。改めて身体のしくみは複雑だと思った。(恵)