— 原 著 —

ラット小腸粘膜細胞全顆粒成分における 鉄依存性 ATPase について*

平井 幸彦

日本医科大学第2生化学教室 (主任: 吉野芳夫教授)

Identification of Fe^{2+} dependent ATPase in whole particulate suspension of the rat intestinal mucosa

Yukihiko Hirai

The Second Department of Biochemistry (Chief: Prof. Yoshio Yoshino), Nippon Medical School

Intestinal iron absorption is recognized to be supported mainly by an active transport system, which requires energy consumption. Accordingly, it is reasonable to consider that Fe^{2+} or Fe^{3+} dependent ATPase activity may participate in intestinal iron absorption, as well as in the case of Ca^{2+} absorption, in which Ca^{2+} dependent ATPase plays an important role in the process. An attempt was made to identify the presence of Fe^{2+} or Fe^{3+} dependent ATPase in the rat intestinal mucosa.

Whole particulate suspension (WPS), from rat intestinal mucosa was used as the enzyme source. Eight mM ascorbic acid (Asc) or 1 mM citric acid (Cit) was added to the incubation mixture so as to prevent spontaneous oxidation of Fe^{2+} or hydroxylation of Fe^{3+} respectively. The increase of ATPase activities were apparently observed as the function of Fe^{2+} concentrations. The increase of Fe^{2+} dependent ATPase activities was higher in the presence of Asc than in no Asc condition.

Km values of Fe^{2+} ATPase activity were 0.4 mM or 5.3 mM [in the case of Asc (+) or Asc (-) respectively, and there was statistical difference between these values ($p < 0.001$). However, Fe^{3+} dependent ATPase activity was not observed in the presence of Cit in this system. The activities of Fe^{2+} dependent ATPase in the presence of Asc was approximately a half of Mg^{2+} - or Ca^{2+} -ATPase activities in WPS. But the dependency on metal ions was dominant for Fe^{2+} comparing to Ca^{2+} or Mg^{2+} . Fe^{2+} dependent ATPase activity was not sensitive to Ouabain, theophylline and L-phenylalanine at the concentrations showing inhibitory effects. ^{32}P -phosphorylated protein was identified from WPS in the presence of [γ - ^{32}P] ATP and Fe^{2+} , and the molecular weight of the protein was estimated as 97,000 by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. These results suggested the presence of Fe^{2+} dependent ATPase in the intestinal mucosa.

Key words: Fe^{2+} dependent ATPase, rat intestinal mucosa, whole particulate suspension

結 言

生体内に存在する鉄は他の体構成元素に比して微量であり、その約 70% が hemoglobin, myoglobin な

どのヘム蛋白質, catalase, peroxidase, cytochrome oxidase などのヘム含有酵素, および succinate dehydrogenase, aldehyde oxidase などの非ヘム・鉄活性酵素などに含まれており¹⁾, これらの蛋白質の生理

Present address: The Second Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

* 本論文は学位論文である。

活性発現機構に鉄原子が直接的に関与するため、鉄は生体にとって必須金属であると考えられている。鉄の吸収は上部小腸において主として行われ、その腸管吸収機構も他の必須金属と同様に²⁻⁶⁾、能動輸送系の関与のもとに行われると報告されているが⁶⁻⁸⁾、能動輸送系はエネルギー消費反応と共役することにより、輸送物質を急速に、しかも濃度勾配に逆行する方向に輸送するシステムであるため、鉄腸管吸収系においても同様なエネルギー供給が必要であると考えられる。したがって、能動輸送に関与する酵素が小腸粘膜細胞内に存在することは容易に想像される。しかし、鉄腸管吸収機構に関する今までの研究は、細胞内鉄輸送蛋白質および鉄貯蔵蛋白質についての生化学的性質や生理的条件の変動に伴うこれらの動態に関するものが多く⁸⁻¹¹⁾、その能動輸送の本体である酵素系についての研究は、ほとんど見出せない。そこで、著者は本報告で Ca^{2+} イオンの腸管吸収において報告されているように⁹⁾、小腸粘膜細胞の ATPase 活性が金属イオンの小腸粘膜能動輸送系に機能的に関連するという仮定に立ち、鉄イオンによって活性化されるラット小腸粘膜細胞内の ATPase 系の存在、およびその生化学的性質について検討した。

実験材料および方法

(1) 実験材料

1) 実験動物

Wistar 系雄ラットを購入し、体重が 250~300 g となるまでオリエンタル酵母製普通食 (NMF) にて飼育し、実験開始 18 時間前より絶食させたものを使用した。

2) ATP-トリス塩の調製

ATP (adenosine triphosphate) はナトリウム塩もしくはバリウム塩にて購入した。バリウム塩は硫酸ナトリウムにてナトリウム塩とした後、Dowex 50 W×8 イオン交換樹脂 (トリスタイプ) を通過させ、流出される ATP を分取した¹²⁾。その後、流出液を凍結乾燥し、その一部を pH 7.5 の 40 mM トリス-塩酸緩衝液に溶解して、260 nm の吸光度より ATP の含有量を算出した¹³⁾。

3) [γ - ^{32}P] ATP

日本アイソトープ協会より、New England Nuclear (米国) 社製・比活性 3,000 Ci/mmol のものを購入した。

4) その他の試薬

Insta-gel および Soluen-350 は Packard 社 (イリノイ, 米国) のものを、鉄標準液として和光純薬製の原子吸光用鉄標準液を用いた。他の試薬はすべて市販の特級を用いた。

(2) 実験方法

1) 蛋白質量の測定

蛋白質量はウシ血清アルブミンを基準として、Lowry らの方法¹⁴⁾に従って実施した。

2) Fe^{2+} 量および総鉄量の測定

Fe^{2+} 量および総鉄量は α, α' -ジ・ピリジル法¹⁵⁾によって測定した。総鉄量は系内にチオグリコール酸を一滴添加した後に α, α' -ジ・ピリジル法にて定量し、 Fe^{2+} 量は総鉄量より Fe^{2+} 量を差し引いた値とした。

3) 酵素懸濁液の調製

Kowarski らの方法¹⁶⁾に基づき、酵素溶液を調製した。エーテル麻醉下で腹部大動脈より瀉血致死させたラットから、十二指腸を含む上部小腸 (幽門部より約 20 cm) を摘出した。腸管を縦断し、管内の内容物を 145 mM 塩化ナトリウムおよび 4 mM 塩化カリウムを含む溶液にて洗浄後、余分の水分を除去し氷冷却下で粘膜を削り取った。得られた粘膜に 75 倍 (W/V) 量の 5 mM EDTA・ナトリウム (pH 7.4) 溶液を加え、10,000 rpm にて 25 秒間、ワーリングブレンダーにて磨砕した。ホモジネートをナイロン布でろ過した後、105,000 g, 60 分間、4°C にて超遠心分離して上清を除去した。得られた沈渣を同上溶液にて、さらに遠心洗浄後、40 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) にて懸濁化させ、粗酵素溶液とした。以下、この方法で調製した酵素溶液を whole particulate suspension (粘膜細胞全顆粒成分懸濁液) とした (以下 WPS と略す)。

4) 基質溶液の調製

以下に述べる基質溶液と WPS とを孵置させることにより、WPS 内 ATPase 活性を測定した。

i. 混合鉄イオン系

40 mM トリス, 40 mM マンノースおよび 5 mM ATP・トリス塩を含む溶液に、硫酸第 1 鉄を 0.00, 0.625, 1.25, 2.50 および 5.00 mM となるように添加し、液性を 1 N 塩酸にて pH 7.4 とした。以下に述べる他の基質溶液は、この溶液組成を基本として、キレート剤、他金属イオンおよび酵素阻害剤などを添加し調製した。

ii. アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系

混合鉄イオン系の基質溶液に、10 mM アスコルビン酸を添加し、 Fe^{2+} の自然酸化を防止した。液性は1 N 塩酸にて pH 7.4 とした。

iii. クエン酸添加 Fe^{3+} 系

混合鉄イオン系の基質溶液に、1.25 mM クエン酸を添加し、鉄イオンとして塩化第2鉄を 0.00, 1.25, 2.50, 5.00 および 10.00 mM 添加後、液性を pH 7.4 とした。

iv. Ca^{2+} および Mg^{2+} 系

WPS 内に存在する Ca^{2+} -ATPase および Mg^{2+} -ATPase 活性を測定するため、混合鉄イオン系の基質溶液に、硫酸第1鉄の代わりに塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムをそれぞれ 0.00, 1.25, 2.50 および 5.00 mM 添加し、液性を pH 7.4 とした。

v. 酵素阻害剤添加系

Na^+ , K^+ -ATPase 阻害剤として 1.25 mM Ouabain¹⁷⁾、小腸粘膜アルカリ・フォスファターゼ（以下 AL-P と略す）の阻害剤として 2.50 mM theophylline¹⁸⁾ および小腸粘膜 AL-P と Ca^{2+} -ATPase の阻害剤として 12.50 mM L-phenylalanine^{16,19)} をそれぞれアスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系へ添加し、液性を pH 7.4 とした。各阻害剤の濃度は完全阻害濃度に調製して添加し、WPS 内 ATPase 活性に与える影響を検討した。

5) ATPase 活性の測定法

基質溶液 1.6 ml を5本の小試験管に取り、37°C にて5分間予備振盪した。WPS も同様に予備振盪した後、その 0.4 ml を基質溶液の入った3本の小試験管内に添加後攪拌し、37°C にて20分間振盪解置した。試験管を直ちに氷冷し、 Fe^{2+} 量および総鉄量を測定するため 0.2 ml を採取した後、20% トリクロロ酢酸 (TCA) 液 0.8 ml を小試験管内に加えて反応を停止させた。残りの基質溶液を含んだ2本の小試験管も同様に振盪解置した後、WPS 0.4 ml を各々に添加し直ちに TCA 溶液を加えて反応を停止させ、対照とした。攪拌後、氷冷下にて15分間放置し、4°C にて30分間 4,500 g にて遠心分離して得た上清の無機リン酸量を測定した。ATPase 活性は20分間振盪解置して生成した無機リン酸量から対照で生じた無機リン酸量を差し引き、WPS 1 mg が1分間あたりに生成する無機リン酸の μmol 数として表現した。また各基質溶液での活性測定において、鉄イオンおよび他の金属イオン (Ca^{2+} , Mg^{2+}) を含まない基質溶液も作成し、ATP が WPS 存在下で振盪解置期間内に金属イ

オンと独立に加水分解された量を求め、これを活性から差し引いた。

6) ATP 存在下の無機リン酸の定量

ATP 存在下での無機リン酸の定量法として、Gomori の方法²⁰⁾を用いた。しかし、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系の活性測定に際し、アスコルビン酸の還元性が呈色反応を亢進させ、系内のアスコルビン酸残存量に比例して吸光度も上昇する結果を得た。そこで、0.5 N ヨウ化カリウム・ヨウ素溶液 0.1 ml を反応液上清 2.0 ml に添加し、アスコルビン酸の還元性を消失させた後、Gomori 法にて無機リン酸量を定量することとした。

7) [γ - ^{32}P] ATP による ATPase・リン酸化中間体の調製

Knauf らの方法²¹⁾に基づき、ATPase のリン酸化中間体を調製した。アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系基質溶液に、0.00 および 1.25 mM の硫酸第1鉄を添加し、液性を pH 7.4 とした基質溶液 1.6 ml に、それぞれ WPS 0.4 ml を加え、[γ - ^{32}P] ATP 20 μCi と 0°C にて15秒間反応させた。0.8 ml の反応停止液 (17.5% (W/V) TCA, 3.5 mM リン酸および 0.35 mM ATP・ナトリウム塩を含有) を添加することにより、反応を停止させ、4°C, 4,500 g にて20分間遠心分離して沈澱を得た。この沈澱を反応停止液の3.5倍希釈液 4.0 ml にて洗浄し、遠心分離を行う操作を都合4回実施して、酵素のリン酸化中間体を得た。

8) ATPase・リン酸化中間体の分子量推定

ATPase のリン酸化中間体を含む沈澱に、1% SDS, 10 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA および 1% β -メルカプトエタノール含有 20 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.4) 0.2 ml を添加し、95°C にて3分間加熱処理することにより可溶化した。可溶化試料を 5.6% polyacrylamide gel (1% SDS, 28 mM 酢酸ナトリウム, 2.8 mM EDTA および 56 mM トリス・酢酸緩衝液 pH 7.4 を含む) に負荷し、電極槽用緩衝液として 0.1% SDS, 20 mM 酢酸ナトリウム, 2 mM EDTA 含有トリス・酢酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて電気泳動を実施した²²⁾。指標色素としてピロニン Y を使い、ゲル当たり 8 mA の定電流を負荷した。泳動終了後、ゲルを 2 mm 厚の連続切片とし、その各切片の内容物を 1.0 ml の Soluen-350 にて、50°C, 180 分間振盪解置することにより抽出した。この抽出液に Insta-gel 3.0 ml を加え、液体シンチレーション計数機にて、その ^{32}P 放射活性を各々測定した。また同一

条件にて可溶化した耐熱性 RNA polymerase B を同時泳動し、その coomassie brilliant blue による蛋白質染色像より求めた相対移動度より、 ^{32}P 放射活性を有する ATPase のリン酸化中間体の分子量を推定した。

結 果

1. 基質溶液と鉄イオンの決定

Fe^{2+} の溶解度は比較的高いが、生理的 pH において自然酸化され、溶解度の低い Fe^{3+} となり、容易にコロイドを形成して沈殿となる²⁸⁾。したがって、 Fe^{2+} のみに対する影響を検討する際には、酸化防止のための還元剤を必要とし、また Fe^{2+} の最大溶解濃度 10^{-18} M 以上の濃度での影響を検討する際にも、キレート剤の添加が必要であると考えられる。そこで、生理的に存在する還元剤およびキレート剤として、アスコルビン酸およびクエン酸などを取り上げ、その必要最少限の濃度を決定することを試みた。

(1) アスコルビン酸濃度

5 mM 硫酸第 1 鉄、40 mM マンノースおよび 40 mM アスコルビン酸含有 40 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.4) をアスコルビン酸を含まない同上緩衝液にて希釈し、アスコルビン酸濃度が、30, 25, 20, 15, 10, 5, 2.5 および 1.25 mM となる溶液を調製した。WPS を各溶液の 1/4 量添加し、37°C にて 30 分間振盪解置した。解置開始より 10 分間隔にて一定量の試料を分取し、その溶液内の Fe^{2+} 量を測定した。解置開始時には、終濃度 2 mM アスコルビン酸存在下でも、80% 以上の Fe^{2+} が認められたが、解置時間の延長に伴って、アスコルビン酸濃度とかわりなく Fe^{2+} 量の減少が認められた。またアスコルビン酸濃度の増加に依存して、各時点での Fe^{2+} 残存率も上昇したが、終濃度 8 mM を境界として、アスコルビン酸濃度の増加による効果は明らかに減少した。そこで、 Fe^{2+} のみの WPS に対する酵素活性を検討する際、終濃度 8 mM のアスコルビン酸を添加することとした。

(2) α -D-マンノースの添加

Fe^{3+} に対して、糖および多価アルコールがキレート作用を有することが知られている²⁹⁾。しかし、グルコースやガラクトースなどは小腸粘膜細胞内に能動輸送されるため²⁹⁾、これらの糖を基質溶液に添加することは、測定系を複雑化させる。そこで、非代謝性糖として α -D-マンノース²⁹⁾ の添加を検討した。40 mM トリス水溶液、32 mM マンノース含有 40 mM トリス水溶液および 32 mM マンノース、8 mM アスコルビ

Fig. 1 The preservation of Fe^{2+} ions in the presence of mannose and ascorbic acid during incubation
 ▲-▲: 40 mM Tris-Cl pH 7.4 only, ○-○: 40 mM Tris-Cl, 32 mM mannose pH 7.4, ●-●: 40 mM Tris-Cl, 32 mM mannose, 8 mM ascorbic acid pH 7.4

ン酸含有 40 mM トリス水溶液のそれぞれに、硫酸第 1 鉄を 1 mM となるように添加し、塩酸にて液性を pH 7.4 とした緩衝液を調製した。これらの溶液を 37°C にて、120 分間振盪し、各溶液内の Fe^{2+} 残存率を経時的に観察した (Fig. 1)。 Fe^{2+} は 8 mM アスコルビン酸を添加することにより、120 分間ほぼ完全に維持された。トリス緩衝液のみでは、振盪開始時において半分以上の Fe^{2+} が酸化され、40 分後には水酸化鉄コロイドが生成し、溶液内の Fe^{3+} 濃度も低下していると想像された。120 分後の Fe^{2+} 残存率は約 30% となった。一方、マンノースを含む緩衝液では 120 分までコロイドの生成は認められず、各時点での Fe^{2+} 濃度も、トリス緩衝液のみの溶液に比し僅少であるが高値を示した。これらの結果より、マンノース添加が Fe^{2+} および Fe^{3+} を安定化することが認められたため、すべての基質溶液に添加することとした。またマンノース含有トリス緩衝液内では、硫酸第 1 鉄よりの Fe^{2+} は解置中に自然酸化を受けて Fe^{3+} となるため、 Fe^{2+} と Fe^{3+} の共存状態となる。このため、この溶液を用いた基質溶液を混合鉄イオン系と呼ぶこととした。

(3) クエン酸濃度

生理的 pH において、 Fe^{3+} は水酸化鉄コロイドを生成しやすいため、基質溶液内にマンノースを添加したが、 Fe^{3+} 濃度が上昇した際には、コロイド生成を防止しきれなかった。このため生理的キレート剤としてクエン酸を用い、その濃度を検討した。40 mM トリス、32 mM マンノース、10 mM 塩化第 2 鉄を含む溶液

Table 1 Ratio of Fe^{2+} ions remained in the complete reaction mixtures at the end of incubation

Fe concentration	FeSO_4	FeSO_4 ascorbic acid	FeCl_2 citric acid
8.0 mM	19.0%	86.8%	1.1%
4.0	5.0	94.5	0.5
3.0	4.2	96.6	—
2.5	2.7	98.5	—
2.0	0.2	98.2	—
1.0	—	96.2	—
0.5	—	91.4	—
0.25	—	75.2	—

に、クエン酸をそれぞれ、0, 1, 2, 4 および 8 mM となるよう添加し、その液性を塩酸にて pH 7.4 とした緩衝液を調製した。これらの溶液を 37°C にて 20 分間振盪し、コロイドの形成状態を観察した。クエン酸無添加溶液は振盪後 10 分ほどでコロイド形成が認められたが、1 mM 添加溶液では 20 分間振盪後にごく少量の褐色沈殿を認めたのみであった。また、2 mM 以上の添加溶液ではコロイド形成は見られなかった。ATPase 活性の測定に用いた Fe^{2+} 濃度は 8 mM 以下としたため、基質溶液に添加するクエン酸は終濃度 1 mM とした。

以上のごとく決定した基質溶液に ATP を添加し、WPS と 37°C, 20 分間振盪解置した後の Fe^{2+} 残存率を Table 1 に示した。アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系では Fe^{2+} 残存率が 75~98% とほぼ完全に近い形で Fe^{2+} を維持した。アスコルビン酸を欠く混合鉄イオン系では、 Fe^{2+} 残存率が 20% 以下となったが、クエン酸添加 Fe^{2+} 系と同様に水酸化鉄コロイドの形成は認めなかった。これらの組成を有する基質溶液により、 Fe^{2+} および Fe^{3+} の安定性に関して、十分に満足のものを得たため、 Fe^{2+} および Fe^{3+} 単独または混合状態に対する WPS 内 ATPase 活性の測定を実施した。

2. Gomori 法に及ぼすアスコルビン酸の影響

Gomori 法²⁰⁾はリン・モリブデン酸を酸性条件下で p-methylaminophenol sulfate によって還元し、モリブデンブルー色を呈するモリブデンの低級酸化物を生成させる方法である。したがって、試料内にアスコルビン酸などの還元性物質が存在すると、呈色反応を亢進させる可能性が考えられた。そこで、アスコルビン酸を 0, 8, 16, 32 および 64 mM 含むリン酸標準液を調製し、Gomori 法にて定量し、その結果を Fig. 2 に示した。Gomori 法は試料内のアスコルビン酸濃度

Fig. 2 Relationship between Pi color development by "Gomori" method and ascorbic acid concentration

●-● : no ascorbic acid, ○-○ : 8 mM ascorbic acid, ▲-▲ : 16 mM ascorbic acid, △-△ : 32 mM ascorbic acid, ■-■ : 64 mM ascorbic acid

が高いほど呈色反応が亢進され、検量線の傾きも増大した。一方、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系において、 Fe^{2+} 量に依存してアスコルビン酸が消費されるとの結果を得た。このことは、 Fe^{2+} 濃度が相違すると残存アスコルビン酸濃度も相違することであり、単一の検量線を用いた定量が不可能であることを意味する。そこで、試料内に存在するアスコルビン酸をヨウ素にて還元性のないジヒドロ・アスコルビン酸とした後、Gomori 法にて無機リン酸を定量しようと試みた。

Fig.3 は以下に述べる 4 種類のリン酸標準液について、Gomori 法で定量した結果を示した。①アスコルビン酸無添加リン酸標準液、② 8 mM アスコルビン酸含有リン酸標準液、③ 8 mM アスコルビン酸含有リン酸標準液 2.0 ml に 0.5 N ヨウ化カリウム・ヨウ素液 0.1 ml を添加したもの (9 μmol ヨウ素過剰)、④ 9 μmol 過剰添加されたヨウ素を含むリン酸標準液 (③液) 2.0 ml よりクロロホルムにてヨウ素を抽出した標準液の 4 種である。②液は①液に比し傾きの大きな検量線を与えたが、③および④液においてはいずれ

Fig. 3 The effect of KI+I₂ solution for the correction of Pi-color-increase by ascorbic acid
●-●: 8 mM ascorbic acid, ▲-▲: equimole of I₂ to ascorbic acid, ○-○: slightly excess of I₂, △-△: no ascorbic acid

も①液と同一の検量線を示した (Fig. 3). 過剰ヨウ素の除去の有無にかかわらず、同一の検量線を示したことより、アスコルビン酸添加 Fe²⁺系 ATPase 活性は、TCA 除蛋白後の上清 2.0 ml に 0.5 N ヨウ化カリウム・ヨウ素液 0.1 ml を添加し、過剰ヨウ素存在下で Gomori 法にて測定することとした。また、40 mM トリス、32 mM マンノースおよび 1 mM クエン酸は Gomori 法に影響を及ぼさなかった。

3. 粘膜細胞全顆粒成分懸濁液 (WPS) に存在する鉄依存 ATPase 活性

混合鉄イオン系、アスコルビン酸添加 Fe²⁺系およびクエン酸添加 Fe³⁺系の各基質溶液と WPS とを、37°C にて 20 分間振盪解置することにより求めた ATPase 活性と、各鉄イオン濃度との関係を Fig. 4 に示した。ここで、混合鉄イオン系については、総鉄量を横軸に取った。アスコルビン酸添加 Fe²⁺系 ATPase 活性の見掛け上の V_{max} 値 (最大反応速度) は、混合鉄イオン系およびクエン酸添加 Fe³⁺系のそれに対して、約 6:4:1 の比率となり、最も高い活性を示した。このように、鉄イオンを含んだ 3 種の基質溶液における ATPase 活性が、それぞれ異なった Km 値

Fig. 4 Increase of Fe²⁺ dependent ATPase activities in whole particulate suspension as the function of Fe²⁺ concentrations
▲-▲: FeCl₃ with citric acid, ○-○: FeSO₄, ●-●: FeSO₄ with ascorbic acid

Table 2 Fe²⁺ or Fe³⁺ dependent increase of ATPase in whole-particulate suspension derived from rat duodenal mucosa

Cation	Group	Km mean± S.D.(mM)	V _{max} mean±S.D. (μmol/min/mg)	No.
Fe ²⁺ +Fe ³⁺		5.3±1.6*	0.27±0.08	6
Fe ²⁺	ascorbic acid	0.4±0.2	0.26±0.12	6
Fe ³⁺	citric acid	1.3±1.0	0.03±0.01	4

The asterisk denoted the significant difference against the ascorbic acid group in the level of 0.001.

(ミカエリス定数) および V_{max} 値を有していることが示唆されたため、Lineweaver and Burk²⁷⁾のプロットを行い、その典型的なものを Fig. 5 に示した。Km 値および V_{max} 値は各測定値より最少自乗法にて直線回帰を行い、得られた直線式より算出した。Table 2 に各鉄イオン依存 ATPase の Km 値および V_{max} 値を要約した。アスコルビン酸添加 Fe²⁺系 ATPase の Km 値は 0.4 mM となり、混合鉄イオン系での 5.3 mM に対して、統計学的に有意 (p<0.001) な低値を示した。しかし、V_{max} 値は両者とも 0.26~0.27 μmol/min/mg と、ほぼ同一な値を示した。また、クエン酸添加 Fe³⁺系 ATPase 活性の Km 値は 1.3 mM と混合鉄イオン系 ATPase のそれよりも低値を示したが、V_{max} 値はアスコルビン酸添加 Fe²⁺系および混合鉄イオン系 ATPase のその約 1/10 程度の低値であった。そこで、Fe³⁺安定化のため添加した 1 mM クエン酸が鉄イオンによる ATPase 活性

Fig. 5 Lineweaver-Burk plot for Fe^{2+} dependent ATPase in whole particulate suspension prepared from rat duodenal mucosa
●-● : FeSO_4 with ascorbic acid, ○-○ : FeSO_4 , ▲-▲ : FeCl_3 with citric acid

Fig. 6 The effect of citric acid for Fe^{2+} dependent ATPase activities recognized by whole particulate suspension of rat mucosa in the presence of ascorbic acid
●-● : control, ▲-▲ : 1 mM citric acid

を阻害している可能性も考えられたため、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系基質溶液に終濃度 1 mM クエン酸を添加し、その影響を検討した。Fig. 6 に示したように、1 mM クエン酸はアスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase 活性に阻害効果を示さなかった。

4. WPS 内の鉄依存 ATPase 活性と Mg^{2+} および Ca^{2+} の影響

WPS 内に Mg^{2+} -ATPase および Ca^{2+} -ATPase が存在することが報告されている¹⁶⁾。そこで、これらの ATPase 活性と鉄依存 ATPase 活性との相対的比較を行った。WPS を Mg^{2+} 系、 Ca^{2+} 系および 3 種類の鉄イオン系基質溶液にそれぞれ添加し、各種イオン濃度の変化に伴う ATPase 活性を測定し Fig. 7 に示した。 Mg^{2+} -ATPase 活性はアスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase 活性に対して約 2 倍、混合鉄イオン系 ATPase 活性に対して約 3 倍の活性を示した。また、 Ca^{2+} -ATPase 活性は Mg^{2+} -ATPase 活性とほぼ等しい値を示したが、4 mM においても活性の増加が認められた。そこで、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系、 Mg^{2+} または Ca^{2+} を添加することにより、ATPase 活性がどのような影響を受けるかも検討し、その結果を Fig. 8 および Fig. 9 に示した。2 mM Mg^{2+} 存在下では、 Fe^{2+} 濃度の増加に伴って全活性は低下した。1 mM Mg^{2+} 存在下では、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 (対照) の活性に比し、 Fe^{2+} 濃度上昇による活性の亢進はわずかである。また、 Mg^{2+} 濃度とかかわりなく、 Fe^{2+} 濃度がそれぞれ 2 mM になると、それぞれの全活性は対照のアスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系のそれとほぼ等しくなった (Fig. 8)。一方、 Ca^{2+} による影響も、

Fig. 7 Activation of ATPase activities in whole particulate suspension with divalent ions

▲-▲ : FeCl_3 with citric acid, ○-○ : FeSO_4 ,
●-● : FeSO_4 with ascorbic acid, □-□ :
 CaCl_2 , ■-■ : MgCl_2

Fig. 8 Interrelation of Fe^{2+} dependent ATPase activities against Mg^{2+} ions present in the reaction mixture

●-● : no Mg^{2+} , ▲-▲ : 1 mM Mg^{2+} , ■-■ :
2 mM Mg^{2+}

Mg^{2+} によるものと同様の結果を示した (Fig. 9)。これらの現象は、アスコルビン酸存在下の Fe^{2+} が、 Mg^{2+} および Ca^{2+} に対して優先的に WPS 内 ATPase 系の基質となることを示し、これは ATP に対する親和性に関して、 Fe^{2+} が最も高く、選択的に ATP と Fe^{2+} が結合することに帰因するものと推定される²⁹⁾。

Fig. 9 Interrelation of Fe^{2+} dependent ATPase activities against Ca^{2+} ions present in the reaction mixture

●-● : no Ca^{2+} , ▲-▲ : 1 mM Ca^{2+} , ■-■ : 2 mM Ca^{2+}

Fig. 10 The effects of enzyme inhibitors for Fe^{2+} dependent ATPase activities in whole particulate suspension prepared from rat duodenal mucosa. ATPase activities in the presence of inhibitors were expressed as percentages for the control.

●-● : 1 mM Ouabain, ▲-▲ : 10 mM L-phenylalanine, ○-○ : 2.5 mM theophylline

5. アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase 活性への酵素阻害剤による影響

アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系基質溶液内に、各酵素阻害剤をそれぞれの完全阻害濃度で添加し、ATPase 活性に及ぼす影響を検討した。Fig. 10 は阻害剤を含まないアスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase 活性（対照）を 100% とした際の各阻害剤添加系の活性を示している。各阻害剤とも、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase 活性に、ほとんど影響を与えておらず、この酵素系は Na^+ , K^+ -ATPase, 小腸粘膜 AL-P または Ca^{2+} -ATPase と共通しないものと示唆された。

6. アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase の分子量の推定

アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系基質溶液に終濃度 0.00 および 1.25 mM 硫酸第 1 鉄を添加し、ATP として $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を 20 μCi 加えた基質溶液を調製した。これらに WPS を添加後、 0°C にて 15 秒間振盪解置し、ATPase のリン酸化中間体を作製した。反応停

Fig. 11 SDS electrophoresis of ^{32}P -phosphorylated complex in whole particulate suspension of rat duodenal mucosa in the presence of Fe^{2+} ions and $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. The above denotes a densitometric tracing at 600 nm after Coomassie blue staining, and the below shows ^{32}P -labelling within the specimen.

Fig. 12 Molecular weight of ^{32}P -phosphorylated complex detected in the presence of Fe^{2+} ions and $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP from rat duodenal mucosa, determined with SDS electrophoresis. The arrow denotes the relative mobility of the intermediate of ATPase, and RNA polymerase B were used as a standard protein.

1: α subunit 39,000, 2: α subunit 42,000, 3: α subunit 100,000, 4: β subunit 140,000, 5: β' subunit 180,000

止液による除蛋白後、酵素リン酸化中間体の分子量を SDS 電気泳動にて推定した。蛋白染色後の WPS のデンストメトリーを Fig. 11 の上部に示した。WPS は十数本のバンドを認め、種々の膜蛋白質の混合物であることを確認した。しかし、 ^{32}P 放射活性は対照である鉄無添加のアスコルビン酸添加系においては観察されなかった位置に単峰として出現した (Fig. 11 下図)。したがって、この単峰は Fe^{2+} に依存して形成されたもので、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} -ATPase のリン酸化中間体であると思われる。このアスコルビン酸添加 Fe^{2+} -ATPase 系のリン酸化中間体はその相対移動度より、デンストメトリー上の波線部分に存在すると思われる。そこで、耐熱性 RNA polymerase B を分子量マーカーとして用い、この ^{32}P 放射活性を有する蛋白質の分子量を推定したところ 97,000 daltons という値を得た。

考 察

鉄吸収は能動輸送系の関与のもとに、上部小腸にて行われている⁸⁾。そこで、 Ca^{2+} 腸管吸収機構における Ca^{2+} -ATPase の機能⁴⁾と同様に、ATPase 活性が金属イオンの粘膜能動輸送系と機能的に関連するという仮定に立ち、鉄イオンにより活性化されるラット小腸粘膜 ATPase の存否を検討した。

刷子縁膜の酵素は *in vitro* において、剪断応力による fragmentation や細胞成分分析法にて用いられる ETDA 処理により非特異的な損傷を受けやすく、生理的条件の変化に伴って刷子縁膜の脆弱性も変化するため、細胞成分分析法にて正常ラットと 48 時間絶食ラットの刷子縁膜を同条件で分離しても、得られた分画の組成が相違すると Kowarski ら¹⁶⁾ は報告している。そこで、彼らは生理的条件の変動に影響されない酵素溶液として、粘膜細胞ホモジネイトの高速遠心分離によって得た沈渣を粘膜細胞全顆粒成分 (whole particulate) と呼び、これを懸濁化した溶液を用いている。著者も操作が安易で調製時間が短く、内存酵素の変性も僅少であろうと考えられること、および鉄能動輸送酵素の存在場所にかかわりなく、その検出が可能であることなどを考慮し、小腸粘膜細胞全顆粒成分懸濁液 (WPS) を酵素溶液として用いた。

腸管より吸収される鉄は Fe^{2+} と Fe^{3+} の混合状態であると想像される。 Fe^{2+} の最大溶解濃度は pH 8.0 において $1.6 \times 10^{-2} \text{M}$ であるのに対し、鉄の存在形態の主体である Fe^{3+} はその最大溶解濃度が 10^{-18}M と極めて低く²³⁾、水酸化物を形成して沈殿を生じるため、鉄の生物学的有効性を低下させている。また Fe^{2+} は速やかに酸化されて Fe^{3+} となる (Fig. 1 および Table 1)。このような Fe^{2+} の酸化、 Fe^{3+} の水酸化現象は実験系を複雑にするため、これらを最少限にする最大の努力を払った。鉄イオンの中性安定剤として、アルコール性水酸基を持つ糖類が知られている²⁴⁾。このうち腸管吸収を受けない非代謝性糖として、マンノース²⁵⁾を基質溶液に添加した。また基質溶液は糖の吸収阻害剤であるトリス²⁶⁾を用いた緩衝液として作成し、糖の粘膜能動輸送系の関与を最小限に止めた。マンノースを含む混合鉄イオン系基質溶液は、37°C、120 分間の振盪解置によっても水酸化鉄コロイドの形成を認めず僅少であるが、残存 Fe^{3+} 量も無添加緩衝液に比べ高値を示した (Fig. 1)。この理由は糖の還元性に由来するかもしれない。また Fe^{2+} および Fe^{3+} の安定化のため、生理的還元剤およびキレート剤としてアスコルビン酸およびクエン酸を混合鉄イオン系基質溶液に添加することとし、その濃度を検討した。終濃度 8 mM アスコルビン酸添加により、振盪解置終了時に平均 92% の Fe^{2+} が残存し、また終濃度 1 mM クエン酸添加により、8 mM Fe^{3+} 存在下でのコロイドも認めなかった (Table 1)。上記の基質溶液を用いることにより、 Fe^{2+} と Fe^{3+} の影響を共存下および別個に測

定することが可能となった。

アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase の K_m 値は 0.4 mM で、混合鉄イオン系の約 1/13、クエン酸添加 Fe^{3+} 系の約 1/3 の値となった。一般に、 K_m 値の低い酵素は基質に対する親和性が高いことを意味し、低濃度の基質溶液においても $V_{\max}$ に達することが可能であるため、 K_m 値の高い酵素に比べて生理的に重要であると理解される。 K_m 値より見た場合、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase が混合鉄イオン系およびクエン酸添加 Fe^{3+} 系 ATPase に比べ、より生理的に重要であり、鉄吸収機構に関与している可能性が最も高いことを示唆する。

Manis ら⁹⁾ は鉄吸収機構が initial mucosal uptake と、それに続いて起きる blood への輸送という 2-step mechanism よりなる能動輸送系であると報告し、広く受け入れられている。この見解は刷子縁膜と側基底膜とは異なった機能を有し、この両膜において鉄吸収の調節が行われていることを意味している。このうち刷子縁膜の機能に関して、Marx ら³⁰⁾ は家兎小腸粘膜より刷子縁膜小胞を調製し、クエン酸添加 Fe^{3+} 溶液およびアスコルビン酸添加 Fe^{2+} 溶液と解置することにより、小胞への取り込みを検討している。 Fe^{2+} は Fe^{3+} の数百倍量の取り込みを示し、 Fe^{3+} には見られなかった小胞内への輸送も行われていたと報告している。彼らの結果は刷子縁膜が Fe^{2+} の選択的な結合もしくは取り込みを行っていることを示唆しており、 Fe^{2+} を漿膜側へ輸送する能動輸送系も Fe^{3+} に比し Fe^{2+} に親和性が高いことが合目的であると考えられる。この点に関して、アスコルビン酸添加 ATPase の K_m 値が混合鉄イオン系およびクエン酸添加 Fe^{3+} 系 ATPase の K_m 値の 1/13~1/3 であることは興味深い。また Halliday ら³¹⁾ はラット小腸粘膜より生きた粘膜細胞を分離し、解置溶液として著者が用いた基質溶液とほぼ同一組成である 8 mM アスコルビン酸および 0.1 mM 硫酸第 1 鉄などを含むトリス緩衝液 (pH 7.4) を用いて、粘膜細胞への取り込みを観察している。その結果、アスコルビン酸が粘膜細胞内への鉄吸収を亢進させること、およびアスコルビン酸自体が ferritin への鉄イオン導入に必要であるとし、単なる還元因子以外の鉄吸収に関する何らかの役割を担っていることを示唆している。このことは、 Fe^{2+} 安定化のために添加したアスコルビン酸が、鉄能動輸送系の賦活剤であり、ひいては Fe^{2+} -ATPase の賦活剤である可能性も示唆すると思われる。一方、最大反応速度 ($V_{\max}$) は

アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase では $0.26 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ となったが、混合鉄イオン系 ATPase においてもほぼ同一の値となった (Table 2)。このことより、 Fe^{3+} が Fe^{2+} に対して競合的に阻害する可能性が存在する。 Fe^{3+} による活性の $V_{\max}$ 値は Fe^{2+} 系の $V_{\max}$ 値の約 1/10 であるため、 Fe^{3+} が Fe^{2+} と競合し、 Fe^{3+} が選択された際には見掛け上の活性はほぼ Fe^{2+} のみに由来すると思われる。しかしこの推論は基質である Fe^{2+} 濃度を一定に保ちつつ、阻害剤と考えられる Fe^{3+} 濃度を単独に変化させることが不可能であるために実証しがたい。また Fe^{3+} 安定化のため添加したクエン酸が ATPase 活性にどのような影響を及ぼすかを検討するため、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系基質溶液に終濃度 1 mM を添加したが著明な変化は認められなかった (Fig. 6)。

Helback ら³²⁾は、クエン酸存在下では腸管腔から漿膜側への鉄の全輸送は大幅に増加すると報告しており、この結果はこれと矛盾するものではなかった。

小腸粘膜細胞には ATP を基質とすることが可能な酵素が幾つか知られている。このうち AL-P はその至適 pH により生体中での作用に疑問が持たれ、生理的機能も不明である。しかし生理的 pH でも十分な活性を有し、基質濃度を低下させると至適 pH も中性へ移動することが知られている^{33,34)}。また AL-P は Zn^{2+} を含む金属酵素で、 Mg^{2+} が酵素活性発現に必要な構造的変化を起こさせると報告されている³⁵⁾。さらに酵素上の Mg^{2+} 結合部位は Co^{2+} 、 Mn^{2+} および Fe^{2+} などの二価金属と交換可能であるとの報告があり³⁶⁾、 Fe^{2+} による活性亢進も十分予想された。このため、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系基質溶液に Na^+ 、 K^+ -ATPase の阻害剤として Ouabain、小腸 AL-P の阻害剤として theophylline および小腸 AL-P と Ca^{2+} -ATPase の阻害剤として L-phenylalanine をそれぞれの完全阻害濃度にて添加し、その影響を検討したが、著明な変化は認めなかった (Fig. 10)。したがって、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase 活性はこれらの酵素系とは異なるものであると思われた。Schaefer ら²⁹⁾はラットの脳・粗ミクロゾーム分画に存在する Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性について、アスコルビン酸存在下での Fe^{2+} の影響を検討した。 Fe^{2+} が Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性に対し強い阻害効果を有し、0.1 mM Fe^{2+} 存在下では無添加対照群活性の 20% 程度の活性となったと報告している。また Inagaki³⁷⁾もラットの脳 Na^+ 、 K^+ -ATPase および Mg^{2+} -ATPase 活

は、アスコルビン酸により強く阻害されるとしており、これらの報告はアスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系基質溶液そのものが、 Na^+ 、 K^+ -ATPase および Mg^{2+} -ATPase 活性の発現を阻害するものであったことを示唆している。

アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase の分子量を酵素の ^{32}P -リン酸化中間体を用いて、SDS 電気泳動法にて求めると 97,000 daltons であった。ほぼ同様な方法により Harms ら³⁸⁾は、ラット小腸粘膜細胞の側基底膜に存在する Na^+ 、 K^+ -ATPase の分子量を 100,000 であるとし、また Dejonge ら³⁹⁾は、ラット小腸粘膜上皮の Ca^{2+} -ATPase の分子量を 115,000、同 AL-P を 64,000 および 84,000 であると推定している。したがって、アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase は阻害剤に対する挙動で示した結果と同様に、分子量においても Na^+ 、 K^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase および AL-P とは異なったものであることが示唆された。Malik ら⁴⁰⁾はラット小腸 AL-P をイオン交換樹脂などを用いて分離精製し、その分子量を SDS 電気泳動にて 64,000、79,000 および 92,000 であると報告しており、これらの値は Dejonge らの結果と良く一致している。したがって、このアスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase の分子量を推定した方法は、かなり信頼性の高い方法であると考えられる。

貧血や鉄過剰症に対する有効な治療を行うためには、鉄腸管吸収機構を明らかにすることが必要である。しかし、これまでの研究は粘膜細胞内の鉄運搬および貯蔵蛋白質に関するものが多く、能動輸送系の酵素に関するものはほとんど見当たらない。著者の研究は鉄能動輸送系を酵素の観点より考察する上で一助となるものとする。

結 論

1) Fe^{2+} の自然酸化および Fe^{3+} の水酸化によるコロイド形成を基質溶液内に終濃度 8 mM アスコルビン酸および 1 mM クエン酸をそれぞれ添加することにより防止し、 Fe^{2+} と Fe^{3+} の個別の影響を検討することが可能となった。

2) ラット上部小腸粘膜ホジネイトの超遠心分離後の沈渣である粘膜細胞全顆粒成分には、鉄イオンに活性化される ATPase が存在する。

3) Fe^{2+} 添加による活性亢進はアスコルビン酸添加の有無によって相異し、その K_m 値はそれぞれ 0.4 および 5.3 mM と明らかに異なった ($p < 0.001$)。

また Fe^{3+} 添加による著明な活性の亢進は認めなかった。

4) Ca^{2+} もしくは Mg^{2+} 存在下でのアスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系での ATPase 活性は, Fe^{2+} 濃度に選択的に変動した。

5) アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 系 ATPase は Ouabain 非感受性であり, 小腸粘膜アルカリ・フォスファターゼの阻害剤 theophylline および小腸粘膜 Ca^{2+} -ATPase とアルカリ・フォスファターゼの阻害剤 L-phenylalanine に対しても非感受性を示した。

6) アスコルビン酸添加 Fe^{2+} 存在下で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP と短時間振盪置させた顆粒成分は, SDS 電気泳動にて, ^{32}P 放射活性が単峰として認められ, これより Fe^{2+} -ATPase の分子量は 97,000 daltons と推定された。

なお, 本論文の要旨は昭和 57 年, 第 44 回日本血液学会総会において報告した。

文 献

- 吉川春寿: “鉄” 研究の動向. 医のあゆみ, **87**, 651~655, 1973.
- Skou, C.J.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Physiol. Rev.*, **45**, 596~617, 1965.
- Post, R.L., Albright, C.D., and Dayanis, K.: Resolution of pump and leak components of sodium and potassium ion transport. *J. Gen. Physiol.*, **50**, 1201~1212, 1967.
- Schachter, D., Dowdle, E.B., and Schenker, H.: Active transport of calcium by the small intestine of the rat. *Am. J. Physiol.*, **198**, 263~268, 1960.
- Omdahl, J.L., and DeLuca, H.F.: Regulation of Vitamin D metabolism and function. *Physiol. Rev.*, **53**, 327~372, 1973.
- Manis, J., and Schachter, D.: Active transport of iron by intestine; Effect of erythropoiesis stimulated by phenylhydrazine. *Nature*, **209**, 1356, 1966.
- Manis, J., and Schachter, D.: Active transport of iron by intestine; Mucosal iron pools. *Am. J. Physiol.*, **207**, 893~900, 1964.
- Manis, J.G., and Schachter, D.: Active transport of iron by intestine; Features of the two-step mechanism. *Am. J. Physiol.*, **203**, 73~80, 1962.
- Halliday, J.W., Powell, L.W., and Mack, U.: Iron absorption in the rat; The search for possible intestinal mucosal carriers. *Br. J. Haematol.*, **34**, 237~250, 1976.
- Huebers, H., Huebers, E., Rummel, W., and Crichton, R.R.: Isolation and characterization of iron binding proteins from rat intestinal mucosa. *Eur. J. Biochem.*, **66**, 447~455, 1976.
- Pollack, S., Campana, T., and Arcario, A.: A search for a mucosal iron carrier; Identification of mucosal fractions with rapid turnover of ^{59}Fe . *J. Lab. Clin. Med.*, **80**, 322~332, 1972.
- Post, R.L., and Sen, A.K.: Sodium and potassium-stimulated ATPase. “Methods in Enzymology” (Estabrook, R.W., and Pullman, M.E. eds.), Vol. 10, p. 762~768, Academic Press, New York, 1976.
- Hurlbert, R.B.: Preparation of nucleoside diphosphates and triphosphates. “Methods in Enzymology” (Colowick, S.P., and Kaplan, N.O. eds.), Vol. 3, p. 785~805, Academic Press, New York, 1957.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275, 1951.
- Elvehjem, C.A.E., Hart, E.B., and Sherman, W.C.: Availability of iron from different sources for hemoglobin formation. *J. Biol. Chem.*, **103**, 61~70, 1933.
- Kowarski, S., and Schachter, D.: Vitamin D and adenosine triphosphatase dependent on divalent cations in rat intestinal mucosa. *J. Clin. Invest.*, **52**, 2765~2773, 1973.
- Ridderstap, A.S., and Bonting, S.L.: Na-K-activated adenosine triphosphatase and pancreatic secretion in the dog. *Am. J. Physiol.*, **216**, 547~553, 1969.
- Ghijsen, W.E.J.M., Dejong, M.D., and Vanos, C.H.: Dissociation between Ca^{2+} -ATPase and alkaline phosphatase activities in plasma membranes of rat duodenum. *Biochim. Biophys. Acta*, **599**, 538~551, 1980.
- Brahmacupta, P., and Melnykovich, G.: Similarities between alkaline phosphatase and Ca^{2+} -ATPase activities in HeLa cells. *J. Cell. Physiol.*, **105**, 227~233, 1980.
- Gomori, G.: A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 955~960, 1941.
- Knauf, P.A., Proverbio, F., and Hoffman, J.F.: Chemical characterization and pronase susceptibility of the Na:K pump associated phosphoprotein of human red blood cell. *J. Gen. Physiol.*, **63**, 305~323, 1974.
- 池原征夫, 加藤敬太郎: SDS-ゲル電気泳動による膜蛋白の分析法. “蛋白質核酸酵素”, 別冊 5 号, 共立出版, 東京, 1974.
- Charley, P.J., Stitt, C., Shore, E., and Saltman, P.: Studies in the regulation of intestinal iron absorption. *J. Lab. Clin. Med.*, **61**, 397~410, 1963.
- Forth, W., and Rummel, W.: Iron absorption. *Physiol. Rev.*, **53**, 724~792, 1973.
- Bihler, I., Hawkins, K.A., and Crane, R.K.: Studies on the mechanism of intestinal absorption of sugar. VI. The specificity and other properties of Na^+ -dependent entrance of sugars into intestinal tissue under anaerobic condition, in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 94~102, 1962.
- Schultz, S.G., and Zalusky, R.: Ion transport in isolated rabbit ileum. II. The interaction between active sodium active sugar transport. *J. Gen.*

- Physiol., **47**, 1043~1059, 1964.
- 27) Lineweaver, H., and Burk, D. : The determination of enzyme dissociation constant. *J. Biol. Chem.*, **56**, 658~666, 1943.
- 28) Schaefer, A., Seregi, A., and Komlos, M. : Ascorbic acid-like effect of the soluble fraction of rat brain on adenosine triphosphatases and its relation to catecholamines and chelating agents. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2257~2271, 1974.
- 29) Bihler, I., and Crane, R.K. : Studies on the mechanism of intestinal absorption of sugars. V. The influence of several cations and anions on the active transport of sugars, in vitro, by various preparations of hamster small intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 78~93, 1962.
- 30) Marx, J.J.M., and Aisen, P. : Iron uptake by rabbit intestinal mucosal membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 297~304, 1981.
- 31) Halliday, J.W., and Powell, L.W. : The use of suspensions of isolated rat mucosal cells to study mechanisms of iron absorption. *Clin. Chim. Acta*, **43**, 267~276, 1973.
- 32) Helback, H., and Saltman, P. : The transport of iron by rat intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 979~990, 1967.
- 33) Moss, D. W., Campbell, D.M., Anagnostan-Kakaras, E., and King, E.J. : Characterization of tissue alkaline phosphatases and their partial purification by starch-gel electrophoresis. *Biochem. J.*, **81**, 441~447, 1961.
- 34) Woeltgens, J.H.M., and Bonting, S.L. : Inorganic pyrophosphatase in mineralizing hamster molars. II. Effects of pH and bivalent cations. *Calcif. Tissue Res.*, **13**, 143~150, 1973.
- 35) Fishman, W.H., and Ghosh, N.K. : Influence of reacting metal, thiol and amino sites on catalytic activity and L-phenylalanine inhibition of rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochem. J.*, **105**, 1163~1170, 1967.
- 36) LeVine, H., Tsong, T.Y., and Hollis, D.P. : Binding of metal ions to apokaline phosphatase from *E.coli*; Effect of ionic radius. *Life Sci.*, **19**, 859~865, 1976.
- 37) Inagaki, C. : Inhibition of Mg- and Na, K-activated adenosine triphosphatase activity by L-ascorbic acid and L-cystein. *Jpn. J. Pharmacol.*, **20**, 52~60, 1970.
- 38) Harms, V., and Wright, E.M. : Some characteristics of Na/K-ATPase from rat intestinal basal lateral membrane. *J. Membrane Biol.*, **53**, 119~128, 1980.
- 39) Dejonge, H.R., Ghijsen, W.E.J.M., and Vanos, C.H. : Phosphorylated intermediates of Ca^{++} -ATPase and alkaline phosphatase in plasma membrane from rat duodenal epithelium. *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 140~149, 1981.
- 40) Malik, N., and Butterworth, P.J. : Molecular properties of rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, **446**, 105~114, 1976.

(受付: 1983 年 11 月 12 日)