

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22500764  
 研究課題名（和文）フルクトース誘発高血圧における腸管でのクロライド吸収の役割の解明  
 研究課題名（英文）Elucidation of the role of intestinal Cl<sup>-</sup> absorption in the fructose-induced hypertention  
 研究代表者  
 林 久由 (HAYASHI HISAYOSHI)  
 静岡県立大学・食品栄養科学部・講師  
 研究者番号：40238118

## 研究成果の概要（和文）：

フルクトース摂取量増大に伴いメタボリックシンドロームの罹患率が増加することが知られている。またフルクトース摂取は小腸からの NaCl 吸収を亢進させ、その結果、高血圧になることが示されている。このためフルクトース誘発の高血圧に、小腸のクロライド吸収機構が関与するか検討するため、小腸のクロライド吸収機構を、高フルクトースを摂取させたラットで調べた。しかし、フルクトース摂取で大きな変化は観察されなかった。大腸でのクロライド吸収機構の関与も考えられたため、大腸でのクロライド吸収機構を検討した。大腸でのクロライド吸収機構には部位差があることが明らかになった。

## 研究成果の概要（英文）：

It has been shown that the increase in the incidence of metabolic syndrome correlates with increase in total fructose intake. It is also shown that increased fructose intake stimulates NaCl absorption and resulted in hypertension. To elucidate the role of intestinal Cl<sup>-</sup> absorption in the fructose-induced hypertension, we examined the effect of fructose on the Cl<sup>-</sup> absorption in the rat small intestine. However, no discernable change was observed in the high-fructose diet on the Cl<sup>-</sup> absorption. This implies that fructose may be stimulate the colonic Cl<sup>-</sup> absorption via unknown mechanism. Therefore, we examined the Cl<sup>-</sup> absorption mechanism in the murine colon. We found that segmental differences in Cl<sup>-</sup> transport mechanism in the colon.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：NaCl 吸収、大腸、SLC26A3、NHE3

## 1. 研究開始当初の背景

清涼飲料水や食品には、甘味料として安価であることから多量のフルクトースを含む異性化糖が含まれている。これら清涼飲料水や食品からのフルクトース摂取が増加しており、それに伴いメタボリックシンドロームの罹患率も上昇している。ラットを用いたフルクトース誘発性の高血圧に関する実験は多くなされており、長期に亘る多量のフルクトース摂取では、高血圧が誘発されることが示されている。しかしフルクトース摂取後、早期に上昇する血圧のメカニズムについては明らかにされていない。また健常なヒトにおいて、60g のフルクトース単回投与で急速に血圧が上昇することが示され (Am J Physiol, 2008)、これらのことはフルクトース誘発性の高血圧発症メカニズムには、二次性の慢性的な代謝変化が関与していないことを示している。また別の研究ではフルクトース摂取後の早期の血圧上昇のメカニズムとして、フルクトース摂取により消化管での NaCl 吸収が亢進し、同時に腎臓での NaCl 排泄が低下し、結果として体液量の増加により血圧上昇が惹起されることが示唆されている。またその研究においては、血圧上昇には小腸に発現しているクロライド吸収担体の一つである *slc26a6* ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交換輸送体) が関与することが示された (Kidney Int, 74, 438, 2008)。しかし *slc26a6* はノックアウト動物による解析では、クロライド吸収には重要な役割をしていなく、同じファミリーに属する別の輸送体である *slc26a3* ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交換輸送体) により担われていると考えられている。

## 2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの原因は食生活によるところが大きいことはよく知られている。食餌中の憎悪因子の一つとしては、フルクトース摂取量とメタボリックシンドロームのリスクファクター (耐糖能異常、脂質異常、血圧上昇) は正の相関関係があることが、疫学研究からも動物実験からも報告され注目されている。しかしそのメカニズムは十分に解明されていない。フルクトースによる高血圧の発症に小腸での NaCl 液吸収が関与している可能性が示唆されている。そこで本

研究ではフルクトース摂取が、腸管での NaCl 液吸収を増加させるか否か、増加させるとしたらそのメカニズムはどのようなものであるか、またどのクロライド輸送体が関与するか、を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### ① フルクトース摂取による小腸のクロライド吸収機構の変化の測定

ラットを馴化後、3 日間代謝ケージ飼育し、その後グルコース食とフルクトース食の 2 群にわけ 3 日間した。最終日には腸管各部位での電解質、糖質の吸収速度を求めるために、餌に非吸収性マーカーであるポリエチレングリコール (PEG) を加え、摂食開始後 4 時間で解剖を行った。解剖後、小腸を 7 等分し、腸管内容物を採取し、腸管内容物の PEG、電解質、グルコース、フルクトース濃度を測定した。

### ② フルクトース摂取による小腸の NaCl 輸送体並びに関連タンパクの発現変化の解析

フルクトース摂取により腸管のイオン輸送体並びに、その関連タンパク質が変化するか否かを網羅的に検討するためにマイクロアレイによる発現解析を行った。フルクトース 60% を含む食餌でマウスを 1 週間飼育し、コントロール食としては 60% のカゼイン食で飼育した。上部空腸より mRNA を単離し、マイクロアレイによる発現解析を行った。

### ③ 大腸におけるクロライド吸収機構の検討

上述の研究ではフルクトース摂取により、ラット小腸での実験、またマウス小腸でのクロライド輸送関連蛋白の発現はコントロール食群と比較して大きな変化は観察されなかった。しかしクロライドは下部消化管 (盲腸、大腸) でも吸収されていることが示されており、何らかの機構を介して大腸での吸収機構が変化していることが考えられた。しかし、大腸各部位でのクロライド吸収を担っている分子の実体やクロライド吸収機構は詳細には検討されていない。このため主要なクロライド吸収担体だと考えられている SLC26A3 のノックアウトマウスを用いて大腸各部位でのクロライド機構を検討した。

## 4. 研究成果

### ① フルクトース摂取による小腸のクロライド吸収機構の変化の測定

グルコース食群とフルクトース食群では  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  の電解質出納には差は観察されな

かった。また血液性状も両群間で顕著な差はなかった。腸管各部位での吸収速度を比較すると、グルコースは上部空腸でほとんど吸収されていた。しかしフルクトースは上部空腸での吸収に加え回腸でも吸収がみられた。Na<sup>+</sup>の吸収・分泌速度を比較すると、グルコース食群では十二指腸では大きな Na<sup>+</sup>分泌がみられ、空腸中部では大きな Na<sup>+</sup>吸収が観察された。フルクトース食群では Na<sup>+</sup>の吸収・分泌速度は、何れの部位でもグルコース食群より小さかった。K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>の吸収・分泌速度は、Na<sup>+</sup>とほぼ同様の傾向を示した。グルコース、フルクトース吸収に伴う腸管での電解質吸収・分泌は異なることが示唆されたが、フルクトース吸収に伴う液吸収の亢進は観察されなかった。

## ② フルクトース摂取による小腸の NaCl 輸送体並びに関連タンパクの発現変化の解析

フルクトース摂取により 329 の mRNA がコントロール食に比べ上昇し、また 307 の mRNA がコントロール食に比べ減少が観察された。フルクトース摂取により 9 つ輸送体の mRNA 発現が優位に上昇しており、Slc5a8 はヨウ素、短鎖脂肪酸を輸送することが示されているが、フルクトース輸送との関連は不明である。カリウムチャンネルが二つ (Kcnc1, Kctd) 発現が、亢進していた。Slc2a5 は発現が増加しており、フルクトースを主に輸送することが報告されており、多量のフルクトース摂取により亢進したものと考えられた。その他には Slc38a1 はアミノ酸、slc20a1 と slc17a4 はリン酸を輸送することが報告されており、当初予想されたクロライドを輸送する輸送体の発現の亢進は観察されなかった。高フルクトース摂取により、輸送体の発現が亢進したものより、低下したものが多く観察された。slc5a12, slc16a9, slc16a10 などのモノカルボン酸輸送体の発現の低下がみられたがフルクトース摂取との関連は不明である。興味深いことに、タンパクの加水分解産物であるオリゴペプチドを吸収する主要な輸送体である slc15a1 の減少が観察され、高フルクトース摂取ではペプチド吸収障害をおこすことが示唆された。

## ③ 大腸におけるクロライド吸収機構の検討

<sup>36</sup>Cl<sup>-</sup>を用いて、大腸の経上皮性の Cl<sup>-</sup>のフラックスを測定した。野生型マウスでは盲腸、中位結腸では粘膜側から漿膜側 (M to S) フラ

ックスが漿膜側から粘膜側への (S to M) フラックスに比べ大きく、盲腸、中位結腸では正味の Cl<sup>-</sup>の吸収があることが示唆された。しかし近位大腸では M to S フラックスと S to M フラックスの差は無く Cl<sup>-</sup>吸収が無いことが示唆された。同様な実験を SLC26A3 ノックアウトマウスで行うと盲腸、中位結腸では M to S フラックスが大きく抑制されており、SLC26A3 が主要な Cl<sup>-</sup>吸収輸送体であることが示唆された。次に <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>を用いて、経上皮性 Na<sup>+</sup>フラックスを測定した。全ての部位において、M to S フラックスが S to M フラックスに比べ大きく、正味の Na<sup>+</sup>の吸収があることが示唆された。経上皮性 Na<sup>+</sup>フラックスは NHE3 の特異的抑制剤である S3226 で抑制され、NHE3 を介して Na<sup>+</sup>吸収がされていることが示唆された。また Na<sup>+</sup>と Cl<sup>-</sup>吸収の相互作用を検討すると、中位結腸では盲腸より、Na<sup>+</sup>と Cl<sup>-</sup>吸収の関係が強いことが示唆された。以上本研究では Cl<sup>-</sup>吸収に主要な役割をしている SLC26A3 の盲腸、大腸内での機能が明らかにでき、NaCl 吸収機構は部位差があることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Hayashi H., and Yamashita Y. Role of N-glycosylation in cell surface expression and protection against proteolysis of the intestinal anion exchanger SLC26A3. *Am J Physiol.* 302, C781-795 (2012) (査読あり)
- ② 林 久由, 鈴木 裕一: 「消化管でのクロライドイオン吸収機構」膜, 36 (6), 293-299 (2011) (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 林 久由, 長井 宏樹, 鈴木 裕一 「マウス大腸の電気的中性の NaCl 吸収における slc26a3 の役割」第 89 回日本生理学会 (松本) 2012 年 3 月
- ② 林 久由 「フルクトース摂取に伴う腸管 NaCl 吸収機構の変化の検討」静岡県立大学 US フォーラム 2012 年 9 月
- ③ Hayashi H., Nagai H., Oba K., Schweinfest CW, Soleimani M., Suzuki Y.: Role of

SLC26A3 in electroneutral NaCl absorption and bicarbonate secretion and its segmental differences in the mouse colon, International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2012, 滋賀, 2012年9月

- ④ 林 久由, 長井 宏樹, 鈴木 裕一  
「マウス大腸における電気的中性の NaCl 吸収機構の部位差の検討」第 88 回 日本生理学会 (横浜) 2011年3月 (誌上開催)
- ⑤ Hayashi H, Yamashita Y and Suzuki Y:  
The role of N-glycosylation in the intestinal  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger SLC26A3., Experimental Biology 2011, Washington DC(USA), 2011年4月
- ⑥ 林 久由, 鈴木 裕一「小腸におけるフルクトース摂取に伴う NaCl 吸収の機序」第 65 回日本栄養・食糧学会 (東京) 2011年5月
- ⑦ Hayashi H and Suzuki Y :A role of slc26a3 in the colon and its regulatory mechanism of intracellular pH, International Joint Meeting of Cellular and Molecular Physiology in Epithelia, (東京) 2011年7月
- ⑧ 長井宏樹、林 久由、鈴木裕一「マウス大腸におけるクロライド吸収機構の検討」第 57 回中部日本生理学会 2010年10月 (愛知県豊明)
- ⑨ 榊原 礼、林 久由、鈴木 裕一「クロライド吸収担体 SLC26A3 とアクチン細胞骨格との相互作用の検討」第 83 回 日本生化学大会 (神戸) 2010年12月
- ⑩ 長井宏樹、林久由、鈴木裕一「マウス大腸における電気的中性の NaCl 吸収機構の検討」Hindgut Club Japan 2010 (東京) 2010年12月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 久由 (HAYASHI HISAYOSHI)

静岡県立大学・食品栄養科学部・講師

研究者番号：40238118