

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590334

研究課題名(和文)イオン勾配に依存した栄養吸収

研究課題名(英文)Electrolytes gradient dependent nutritional absorption.

研究代表者

田村 淳(Tamura, Atsushi)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：00362525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物は、上皮細胞が互いに接着してできたシート構造である上皮細胞シートにより覆われる。上皮細胞シートは、皮膚のように体外表面を覆うばかりではなく、小腸や肝臓のような体内の表面も覆いつつ、個々の臓器として特定の機能を担う。本研究では、上皮細胞間接着装置であるタイトジャンクションが、如何に、臓器が適切に働くための微小環境を構築し、その破綻が、生体機能に及ぼす影響について、特に、小腸に焦点を当てた。小腸タイトジャンクションの透過性を担うクローディン2および15をノックアウトすると、小腸内の電解質ホメオスタシスが崩れ、栄養の吸収にさえ、大きな障害を導くことを示した。

研究成果の概要(英文)：Multicellular organism is surrounded by the epithelial cell sheets. Epithelial cell sheet is composed of epithelial cells which are adhered each other by cell-cell adhesion complex. Epithelial cell sheets cover inside and outside of our body and the play a biological specific role as organ like skin, intestine and so on. In this research, I analyzed the tight junction mechanism, by which biologically adequate microenvironment can be formed in our body. In this study, I focused especially on small intestine using claudin-2 and -15 knockout mice. The claudin-2 and -15 knockout mice showed imbalanced electrolytes of intestine induced malnutrition and infantile death.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タイトジャンクション クローディン イオンホメオスターシス

1. 研究開始当初の背景

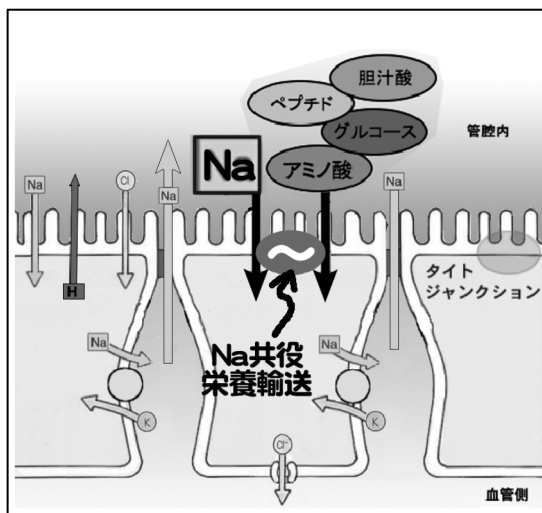
①イオン勾配に依存した物質輸送

細胞内外のイオン濃度、特にナトリウムとカリウムの値がほぼ逆であること（細胞内ナトリウム濃度 5mM カリウム濃度 150mM、細胞外ナトリウム濃度 150mM カリウム濃度 5mM）は良く知られている。この濃度差は、神経が活動電位を生じる時に利用されたり、心筋が収縮する時に利用され、生体の動的活動に欠くことのできない重要なシステムと考えられるが、興奮性細胞に限らず体内の全ての細胞でもこうした濃度差が存在する。

例えば腸管では、こうした細胞内外のナトリウム濃度勾配を利用してグルコースや一部のアミノ酸の吸収を行う。その一方で、腸管上皮シートは体内外の最初のバリアーでもあるので、腸管上皮細胞間にある接着装置タイトジャンクションによるバリアーが欠かせない。しかしもしもこのバリアーのイオン透過性が小さすぎると、細胞のバソラテラル側にある Na,K-pump で細胞外に排出されたナトリウムイオンは、上皮細胞の基底膜側すなわち腸管の粘膜下に蓄積し、腸管の管腔側には届かないことになってしまう。これでは腸管からのナトリウム依存的な栄養吸収が十分に行えない可能性が高い。

②クローディンノックアウトマウスにおけるイオン環境の攪乱

申請者らは、タイトジャンクションのイオン透過性が低下したクローディンノックアウトマウスを用いることで、こうしたタイトジャンクションを介した、粘膜下からアピカル側へのナトリウムの拡散が、腸管のイオンホメオスタシスにとって非常に重要であることを示すことができた(下図)(Tamura et al.,2010. Gastroenterology)。



クローディンは、タイトジャンクションのイオン透過性の特性を決める本質的な膜タンパク質である。クローディンは、ヒトやマウスでは少なくとも 27 種類のサブタイプからなり、臓器によりその発現パターンを変えることで、上皮細胞シートの電気

的な特性などを変化させている。腸管においても、小腸の上部から直腸にいたる領域でのクローディンの発現パターンは様々に変化する。例えば、12指腸や空腸などの上部腸管ではクローディン15の発現は多いが、大腸ではその発現は低下してしまう。クローディン15は、小腸では絨毛とクリプトの両方に発現するが、クローディン2はクリプトにしか発現しない。これらは具体的な例のごく一部であり、じっさいの生体では、発生過程での発現パターン変化も含まれ、より複雑に入り組んだ発現パターンを示す。しかし、こうした発現パターンの変化すなわち、腸管の各部位、各発生/成長過程での腸管バリアーの特性変化の違いが、生体にとって生物学的にどのような意味を持つかについては、十分には分かっていない。

③上皮細胞シートタイトジャンクションがつくるイオン濃度勾配と栄養吸収

こうした特性の違いが持つ本質的な意味の1つとして、栄養吸収の効率化が考えられる。ナトリウム勾配に直接依存したグルコース吸収はもちろんであるが、他に例えば、腸管内のイオン環境は、そこに直接接する上皮細胞の細胞膜電位を変化させる。このことは、膜を横切る電位勾配を変化させるので、例えばナトリウムの電位勾配を変化させることで、ナトリウム依存的な栄養素の輸送に影響を与える可能性がある。さらに、こうしたイオン濃度勾配はそのイオンがタイトジャンクションを横切るときに生じる拡散電位を介して、他のイオンの挙動に変化を与え得る。他に、膜電位の変化は、上皮細胞内でのエンドサイトーシスに変化を与えることが知られている。しかし、腸管のイオン環境を恒常的に変化させるシステムそのものの樹立は難しく、イオン環境の変化が栄養の吸収などの生体機能にどのような影響を、どの程度生じるかについては、正確な実験ができないでいた。

2. 研究の目的

グルコースやアミノ酸の吸収など、生体に必須な栄養素の多くが上皮細胞のアピカル側と細胞質内のナトリウムの濃度勾配を駆動力として体内に吸収される。こうした細胞内外のイオン濃度勾配を利用した生体での輸送システムは、腸管におけるグルコースやアミノ酸吸収のほかにも腸管におけるビリルビン吸収など多種類存在するが、イオン濃度の勾配が崩れた場合の生体に対する影響(逆にいえば、このイオン濃度勾配の重要度)に関する、基礎的解析がほとんどない。

本研究では、申請者が最近数年間解析を進めてきた、腸管内イオンホメオスタシスが崩れたマウスであるクローディン2、15ノックアウトマウスを中心に、特に「腸管内イオン環境の変化」と「グルコースや

アミノ酸など栄養吸収」について詳細に検討し、タイトジャンクションで規定される生体イオン環境ホメオスタシスの生体機能における重要性について検討した上で、さらにその応用を目指す。

### 3. 研究の方法

クローディン2、15ノックアウトマウスと野生型マウスにおける、腸管の各部位での栄養吸収とイオンホメオスタシスの関連について検討した。具体的には、以下の検討を進めた。

a. これまでの申請者らの解析により、クローディン15ノックアウトマウスでは、空腸や回腸でのナトリウム濃度がおおよそ8mMと細胞内のイオン濃度程度にまで低下していた。一方、12指腸での濃度はおおよそ30-40mMに留まった。SGLT1などグルコース吸収のみとの連動であれば、12指腸でのナトリウム濃度がもう少し低濃度になってよいようにも思われた。そこで、どうしてより低濃度にまで低下しないかについて、摘出腸管を用いた半生体環流実験や2-チャンバーを用いた電気生理学的な実験で検討する。クローディンの発現パターンの部位差から説明できるか否かも検討する。さらに、本マウスを用いて、アミノ酸吸収に対するナトリウム依存性吸収について検討する。アミノ酸は、ナトリウム依存性と非依存性の2つの経路で吸収されることが知られている。クローディン15ノックアウトマウスでは、腸管内のナトリウム濃度が大きく低下しているため、ナトリウム依存性のアミノ酸吸収の効率が大きく低下している可能性が高い。この点に付いて、アミノ酸吸収実験を行う。

b. クローディン2、15ノックアウトマウスでは、腸管内イオン環境ホメオスタシスの異常にともない、3大栄養素の吸収のバランスが大きく偏っている可能性が高い。クローディン15は、腸管内ナトリウムイオンの不足によりグルコースとアミノ酸の吸収が低下し、腸管内のナトリウム濃度には依存しない脂質の吸収は維持されると予想された。ダブルノックアウトでの解析も行い、栄養吸収と細胞間隙イオン透過性との関連を調べる。

c. 生体全体の電解質ホメオスタシス、水出納、フラックスを統合し、クロードベルナルの言う内部環境恒常性の大切さを理論的に、定量性を持って説明したい。イオン環境の重要性について、栄養の吸収から入り、最終的には、生体全体の機能にとっての「イオンホメオスタシスの重要性」について理解したい。

### 4. 研究成果

クローディン2、15ノックアウトマウスと野生型マウスにおける、栄養吸収とイオンホメオスタシスの関連について主に検討した。

a. 小腸に発現する2つのイオン透過型クローディン2、15の2重欠損マウスの作製と解析を進めた。本ノックアウトマウスを用いて、アミノ酸吸収に対するナトリウム依存性吸収について検討すると、大きく吸収が低下していることが確認された。アミノ酸は、ナトリウム依存性と非依存性の2つの経路で吸収されることが知られているので、ナトリウム依存性の吸収への依存度の高さが示唆された。

クローディン15ノックアウトマウスでは、その便をみると、野生型マウスに比べ、黒褐色状であった。そこで、便の内容物を調べると、脂肪酸の含有量が上昇していることが確認された。脂肪酸の吸収は、一般に、腸管内のナトリウムイオンなどの電解質には依存しないと考えられている。そのため、脂肪酸の吸収の低下を示唆する所見は、驚きであった。興味深いことに、脂肪酸の吸収に必要な胆汁酸は、回腸からナトリウムイオン依存性に吸収される。以上の結果から、クローディン2と15の2重欠損マウスでは、糖/アミノ酸/脂肪の3大栄養素すべての吸収が低下し、結果として、離乳期前後で致死となることが明らかとなった。このことは、これまで栄養の吸収には唾液や胃液などの液中電解質で十分に補われると考えられてきたが、上皮細胞間のイオン透過機構を介して、血中から供給されるナトリウムイオンが極めて大切であることが示された。

### 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8件)

- 1, Yano T, Matsui T, Tamura A, Uji M, Tsukita S. (2013) The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J Cell Biol.* 203:605-14. doi: 10.1083/jcb.201304194.
- 2, Wada M, Tamura A, Takahashi N, Tsukita S. (2013) Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na<sup>+</sup> flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology.* 144:369-80. doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.035.
- 3, Hayashi H, Tamura A, Krishnan D, Tsukita S, Suzuki Y, Kocinsky HS, Aronson PS, Orłowski J, Grinstein S, Alexander RT. (2013) Ezrin is required for the functional regulation of the epithelial sodium proton exchanger, NHE3. *PLoS One.* 8:e55623. doi: 10.1371/journal.pone.0055623.

- 4, Lei Z, Maeda T, Tamura A, Nakamura T, Yamazaki Y, Shiratori H, Yashiro K, Tsukita S, Hamada H. (2012) EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. *Dev Biol.* 371:136-45. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.07.005.
- 5, Tamura A, Yamazaki Y, Hayashi D, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Tsukita S. (2012) Claudin-based paracellular proton barrier in the stomach. *Ann N Y Acad Sci.* 1258:108-14. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06570.x.
- 6, Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, Yamazaki Y, Watanabe S, Suzuki K, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Rakugi H, Isaka Y, Tsukita S. (2012) Deficiency of claudin-18 causes paracellular H<sup>+</sup> leakage, up-regulation of interleukin-1 $\beta$ , and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology.* 142:292-304. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.040.
- 7, Kunimoto K, Yamazaki Y, Nishida T, Shinohara K, Ishikawa H, Hasegawa T, Okanou T, Hamada H, Noda T, Tamura A, Tsukita S, Tsukita S. (2012) Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal bodies via basal feet. *Cell.* 148:189-200. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.052.
- 8, Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, Tamura A, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Narita I, Yamamoto T. (2011) Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell Tissue Res.* 343:637-48. doi: 10.1007/s00441-010-1117-y.

[学会発表] (計 12 件)

- 1, Atsushi Tamura, and Sachiko Tsukita. (7/26/2013). Role of tight junction in biological systems—more than a simple paracellular barrier in inflammation and metabolism. IUPS. (Birmingham. England.)
- 2, 田村 淳、月田早智子 (6/6/2013) Biological function of paracellular barrier - forming claudins and claudin-deficiency-related inflammation. 日本病理学会総会 (札幌)
- 3, Koya Suzuki, Atsushi Tamura, Daisuke Hayashi, Yuji Yamazaki, and Sachiko Tsukita. (1/22/2013). Claudin-18 is according to structure tight junction not to leakage of gastric acid in mouse stomach. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology. (名古屋)
- 4, Hiroo Tanaka, Maki Takechi, Atsushi Tamura, Yuji Yamazaki, and Sachiko Tsukita. (1/22/2013). Intestine specific loss of Claudin-7 causes tight junction permeability change and intestinal

- inflammation. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology. (名古屋)
- 5, Masami Wada, Atsushi Tamura, Nobuyuki Takahashi, and Sachiko Tsukita. (1/22/2013). Loss of Claudin-2 and 15 from Mice Causes Defects in Paracellular Na<sup>+</sup> Flow and Nutritional Transport in Lumen and Leads to Death from Malnutrition. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology. (名古屋)
- 6, 月田早智子、矢野智樹、立石和博、田村淳、山崎裕自 (1/12/2013) 上皮細胞間接着を起としたアピカル細胞骨格構築 2013 生体運動研究合同班会議 (広島)
- 7, Tomoki Yano, Masahiko Ito, Takeshi Matsui, Atsushi Tamura, Katsushi Owaribe, Masami Uji, Yuji Yamazaki, and Sachiko Tsukita. ASCB 2012 annual meeting (Sanfrancisco)
- 8, 田中啓雄、武知真希、田村淳、山崎裕自、月田早智子 (12/14/2013) 腸管特異的 Claudin-7 欠損はタイトジャンクション透過性を変化させ、大腸炎を惹起する 第 85 回日本生化学会大会 (福岡)
- 9, 今里光伸、山崎裕自、田中啓雄、松本健吾、国本晃司、田村淳、渡辺光博、月田早智子 (12/14/2013) 肝・胆道系の胆汁フロー調節におけるクローデインの役割 第 85 回日本生化学会大会 (福岡)
- 10, 矢野智樹、立石和博、伊藤雅彦、小倉祐輝、田村淳、山崎裕自、月田早智子 (12/11/2012) 上皮細胞間タイトジャンクションを起点と下上皮細胞シートの高次構築 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡)
- 11, Yuji Yamazaki, Mitsunobu Imasato, Hiroo Tanaka, Kengo Matsumoto, Atsushi Tamura, Koshi Kunimoto, Mitsuhiro Watanabe, and Sachiko Tsukita (11/14/2012) The role of claudin in regulating the liver-biliary system International Conference Merida 2012, Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia (Mexico)
- 12, Koshi Kunimoto, Yuji Yamazaki, Tomoki Nishida, Kyosuke Shinohara, Hiroaki Ishikawa, Toshiaki Hasegawa, Takeshi Okanou Hiroshi Hamada, Tetsuo Noda, Atsushi Tamura, Shoichiro Tsukita and Sachiko Tsukita. (4/11/2012) Coordinated Ciliary Beating Requires Odf2-Mediated Polarization of Basal Bodies via Basal Feet 大阪バイオサイエンス研究所マンスリーレクチャー (大阪)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田村 淳 (Tamura Atsushi)

大阪大学・大学院生命機能研究科/医学系  
研究科・准教授

研究者番号：00362525