

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25282024

研究課題名(和文) 体液Na⁺恒常性を維持する腸管Na⁺リサイクリング制御システムの分子基盤の解明研究課題名(英文) Elucidation of Na⁺ recycling mechanisms induced by Na-dependent nutrient absorption in the small intestine

研究代表者

林 久由 (Hayashi, Hisayoshi)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：40238118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：多くの栄養素はNa依存性の栄養素吸収機構で小腸より吸収されている。しかし、消化管でこの栄養素吸収に必要な多量なNaがどのように供給されているかは十分に明らかにされていない。また、これは消化管での吸収されたNaの一部のみが体循環に入ることを示唆している。本研究ではNa依存性グルコース輸送体SGLT1により誘発される、経上皮性のNaフラックスの特性を明らかにすることを試みた。SGLT1により栄養素吸収細胞に取り込まれたNaは、細胞間隙に汲み出された後に、起電性のSGLT1により発生した粘膜側の負電位を駆動力とし、傍細胞経路を介し、管腔側に再循環している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Many nutrients are absorbed by Na-dependent transport mechanisms in the small intestine. However, little is known about how the intestine meet the needs of Na for nutrient absorption. It is thought that Na diffuses back into the lumen via paracellular pathways to support nutrient absorption. However, direct experimental evidence in support this idea has not been shown. To investigate whether paracellular pathways are involved in this Na recycling, we measured glucose-induced currents and ²²Na fluxes simultaneously in Ussing chambers. We found that Na which is absorbed into enterocytes is rapidly recycled back into the lumen via paracellular pathways which are driven by increased luminal negativity.

研究分野：消化管の生理学

キーワード：Na依存性栄養素吸収 タイト結合 クロージン 陽イオン透過性

1. 研究開始当初の背景

小腸タイト結合の構成タンパクであるクロージンを欠損させたマウスにおいては、タイト結合の Na^+ 透過性が減少し、 Na^+ 依存性のグルコース吸収が障害されていることを明らかにした。この結果をヒトに外挿し、栄養素吸収に必要な Na^+ 量を推計した。健常なヒトは1日で炭水化物として約300gを摂取しており、これは1.6モルのグルコースに相当する。グルコースはSGLT1で吸収されており、化学量論比は $\text{Na}:\text{グルコース}=2:1$ であるため、3.2モル(185gNaCl)の多量のNaClがグルコース吸収だけで必要となる。多くの栄養素は Na^+ 依存性の吸収機構により吸収されているため、実際は、これより更に多量のNaClが栄養素吸収に必要なとなると考えられる。この量は、教科書等でよく使用される、10Lの消化液により供給されるNaをはるかに凌ぐ量であり、これらの考察は炭水化物の吸収が体液 Na^+ 恒常性に大きく影響することが示唆される。しかし実際は多量の炭水化物を摂取しても、食後に体液の大きな変化は起きない。しかし現在までに、これら栄養素吸収に必要な多量の Na^+ については研究されてこなかった。この理由は、栄養素吸収に伴うタイト結合を介した Na^+ の移動を評価する手段が無かったことによる。

2. 研究の目的

栄養素(グルコース、アミノ酸等)により体循環に入る Na^+ 吸収量と、電気的中性の機構を介し体循環に入る Na^+ 吸収量を、クロージンノックアウトマウスを用い小腸各部位で測定し、その量的関係並びに相互作用を明らかにする。また病態時モデル等を用いタイト結合のイオン透過性を制御しているクロージンの分子実体を同定する。上記で同定されたクロージンを細胞発現系に発現させ、 Na^+ リサイクリングシステム制御機構の細胞内の情報伝達機構などの詳細な分子機構を明

らかにする。

3. 研究の方法

1. グルコースにより体循環に入る Na^+ 吸収量と、電気的中性の機構を介し体循環に入る Na^+ 吸収量を測定し、それらの相互作用を明らかにする。
2. クロージンを細胞発現系に発現させ、 Na^+ リサイクリングシステム制御機構の細胞内の情報伝達機構などの詳細な分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

Na^+ 依存性グルコース吸収機構における傍細胞経路の役割

Na依存性グルコース輸送体SGLT1により誘発される、経上皮性のNaフラックスの特性をクロージン15欠損マウスを用いて明らかにすることを試みた。マウスから小腸を摘出し、ユッシングチャンバーに装着し、グルコース添加に伴う経上皮性 ^{22}Na フラックス及び電気的パラメーターを短絡条件下と非短絡条件下測定した。短絡条件下ではグルコース添加により、短絡電流変化とほぼ一致する粘膜側から漿膜側への ^{22}Na フラックスの増加が観察された。非短絡条件下ではグルコース添加により、短絡電流変化は観察されたが、 ^{22}Na フラックスの増加は強く抑制された。クロージン15欠損マウスでは、非短絡条件下の ^{22}Na フラックスの抑制は野生型に比べ小さかった。以上より、SGLT1により栄養素吸収細胞に取り込まれたNaは、細胞間隙に汲み出された後に、起電性のSGLT1により発生した粘膜側の負電位を駆動力とし、傍細胞経路を介し、管腔側に再循環している可能性が示唆された。

小腸ペプチド吸収機構における傍細胞経路の役割

多くの栄養素は Na^+ 依存性の二次性の能動輸送機構を介し、濃度勾配に逆らい上り坂輸送

される。蛋白の分解産物であるペプチドは、プロトンの濃度勾配を駆動力とし、吸収されていると考えられている。ペプチド吸収の駆動力となるプロトンは、管腔側近傍に存在している酸性層から供給されていると考えられており、このプロトンの内向き勾配形成には、管腔側に存在する Na^+/H^+ 交換輸送体が重要であると考えられている。しかし、このペプチド吸収機構モデルの検証は動物レベルでは行われていない。このため小腸の Na^+ 代謝が大きく変化したクロージン 15 ノックアウトマウスを用いて、野生型マウスと比較し、小腸でのペプチド吸収機構の検討を行った。クロージン 15 ノックアウトマウスでは *in vitro* の条件ではペプチド吸収が抑制されていた。しかし、単離した小腸ではペプチド吸収の抑制は観察されず、クロージン 15 を介し管腔側に供給される Na^+ が重要であることが示された。

低 Na 摂食時の大腸における傍細胞経路の役割

低 Na 摂食時には大腸では Na の吸収亢進と K の分泌促進が惹起されるが、その詳細な細胞機序に関しては、よく知られていない。低 Na 摂食を摂取させたマウスにおいては、クロージン 2,7 の発現が上昇しており、アルドステロンにより調節されている可能性が示唆された。詳細なアルドステロンによる発現調節機序をマウス大腸細胞株を用いて調べた。クロージン 2 の発現はアルドステロン添加濃度依存的に増加し、またミネラルコルチコイド受容体の核内の発現も増加していた。クロマチン免疫沈降法ではミネラルコルチコイド受容体はクロージン 2 のプロモータに結合することが示された。以上より、低 Na 摂食時にはアルドステロンにより傍細胞経路のクロージン 2 の発現が増加していることが示された。

モデル動物を用いた食性と腸管 Na 代謝の検討

動物の消化管の形態・機能は、摂取した栄養素を、より効率的に消化・吸収するために適応進化してきたと考えられている。草食動物の Na^+ 摂取量は肉食動物に比較して少ないと考えられるが、より Na^+ を多く摂取する肉食動物との機能的な差異については十分に検討がされていない。このため同一個体で草食(オタマジャクシ)から肉食(エル)へと食性変化するカエルをモデル動物として用い、食性変化に伴う消化管の Na^+ 代謝と Na^+ 依存性栄養素吸収機構の機能的解析を行った。腸管管腔内 Na^+ 濃度はオタマジャクシ、カエルいずれも上部小腸では約 70mM と高い値が観察され、上部小腸ではクロージン 15 の mRNA の発現が高く、腸管 Na 代謝にクロージンが重要な役割をしている可能性が示唆された。また、オタマジャクシにおいても摂取機会が少ないと考えられるグルコース吸収機構が発現していた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 14 件)

Functional assessment of intestinal morphological changes during metamorphosis in frog. Ishizuka N, Nagahashi M, Mochida Y and Hayashi H 第 94 回日本生理学会(浜松) 2017 年 3 月

Na-dependent glucose absorption and Na recirculation via paracellular pathways in mouse small intestine. Nakayama M, Ishizuka N and Hayashi H 第 94 回日本生理学会(浜松) 2017 年 3 月

腸管 Na 代謝と Na 依存性栄養素吸収機構
林久由, 中山美智子, 長橋美奈, 石塚典子:
生理学研究所研究会「上皮膜輸送調節蛋白の
異常と病態生理学の融合」(岡崎)2016年11
月

小腸 Na⁺依存性グルコース吸収機構における
傍細胞経路を介した Na⁺再循環機構の検討 .石
塚典子, 中山美智子, 林久由 第 47 回日本消
化吸収学会総会 (神戸)2016年11月

Loss of the Tight Junction Protein Claudin
15 Causes Malabsorption of Peptide in
Murine Intestine. H. Hayashi, H. Tajima, M.
Watanabe, N. Ishizuka. : Experimental
Biology 2016 (San Diego), 2016年4月

Relevance of intestinal paracellular
pathways to Na homeostasis and linked
nutrient absorption mechanisms in mouse
small intestine. M. Nakayama, N. Ishizuka
and H. Hayashi 第3回 薬食国際カンファレ
ンス(静岡), 2016年11月

Deletion of the tight junction protein
claudin 15 causes malabsorption of
oligopeptide in murine intestine. 林久
由 第92回日本生理学会大会(神戸)2015年
3月

Regional distribution of NaCl absorption
transporter mRNAs along the mouse
intestine and adaptation to low-Na diet.
石塚典子, 山内百合, 林久由第38回日本
分子生物学会年会第88回日本生化学会大会

合同大会(神戸)2015年12月

クロージン 15 ノックアウトマウスにおける
ペプチド吸収機構の検討 林久由 第45回
日本消化吸収学会総会(東京)2014年12月

タイト結合を介した H⁺リサイクルが H⁺-依存
性ペプチド吸収を支えている可能性の検討
林久由糧食研究会(東京)2014年12月

小腸タイト結合におけるイオン透過性の急
速な調節機構 矢野かおり、林久由 第86
回日本生化学会(横浜)2013年9月

Changes in Na⁺ metabolism and their
effects on nutrient absorption in claudin
15 knockout mice, Hayashi H, Komatsu
Y, Watanabe M and Suzuki Y. The 37th
International Congress of Physiology
Sciences (Birmingham UK)2013年7月

クロージン 15 ノックアウトマウスにおける
腸管電解質代謝の変化と栄養素吸収 林久
由 第67回 日本栄養・食糧学会(名古屋)
2013年5月

Changes in Na⁺ metabolism and its effect
on nutrition absorption in claudin 15
knockout mice. 林久由 第90回日本生理学
会(東京)2013年3月

{図書}(計 件)

{産業財産権}

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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・
准教授 研究者番号：40238118

(2)研究分担者
五十里 彰 (Alira Ikari)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：(50315850)

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()