

助成番号 0909

小腸  $\text{Na}^+$  代謝と栄養素吸収におけるタイト結合部の役割鈴木 裕一<sup>1</sup>, 月田 早智子<sup>2</sup>, 田村 淳<sup>2</sup><sup>1</sup>静岡県立大学食品栄養科学部生理学研究室, <sup>2</sup>大阪大学大学院生命機能研究科

**概要** [目的] 多くの栄養素は、 $\text{Na}^+$  の内向きの電気化学勾配を利用し、 $\text{Na}^+$  と共輸送されることにより、濃度勾配に逆い細胞内に上り坂輸送される。しかしながら小腸が如何に、この栄養素吸収に必要な多量の  $\text{Na}^+$  必要量を、どのような機構で供給しているのかは研究されていない。小腸のタイト結合部を構成する蛋白の一つであるクロージン 15 は、障壁的な役割のみならず、生体にとり必要なイオンの透過路としての役割があることが推測されている。このため本研究では、クロージン 15 欠損マウス並びに野生型マウスを比較し、小腸でのクロージン 15 によるイオン透過路のグルコース吸収に対する生理的役割を解明することを目的とした。

[方法] 10 - 17 週齢クロージン 15 欠損マウスと野生型マウスを実験に使用した。電位的パラメーターは摘出した下部空腸を、Ussing チャンバーに装着し、コンダクタンス並びに拡散電位を測定した。代謝ケージ実験では飼育期間は、尿、便を採取し、摂食量と飲水量を記録した。解剖後、血液、腸管内容物を採取し、その内容物のグルコースおよび電解質濃度を測定した。腸管灌流実験ではマウスを麻酔し、動物用恒温装置の上に仰臥位に固定した。上部空腸をペリスタポンプで灌流し、流出液は一定時間ごとに回収し、流入液と流出液のそれぞれの流速、グルコース濃度、 $\text{Na}^+$  濃度を測定し、流入量と流出量の差より吸収速度を求めた。

[結果・考察] 空腸のコンダクタンスを測定するとクロージン 15 欠損マウスでは野生型マウスに比較し、コンダクタンスが低下していた。またナトリウムイオンとクロライドイオンの透過性の比 ( $\text{PNa/PCl}$ ) は、クロージン 15 欠損マウスでは低下しており、小腸上皮の陽イオン透過性にはクロージン 15 が重要であることを示唆していた。小腸に貯留しているグルコース総量はクロージン 15 欠損マウスでコントロールマウスに比べ約 10 倍以上であった。さらに、小腸内容物中の  $\text{Na}^+$  濃度は約 5 mM と、コントロールマウスに比べ 1/10~1/20 と非常に低い濃度であった。このことは小腸上部でのグルコースの吸収に必要な  $\text{Na}^+$  濃度に達していないことを示し、この  $\text{Na}^+$  濃度低下がグルコース吸収が障害されている一つの原因であることが示唆された。腸管灌流実験では野生型マウスではグルコース吸収に伴う、 $\text{Na}^+$  吸収速度の増加は観察されなかったが、クロージン 15 欠損マウスでは  $\text{Na}^+$  吸収速度の増加が観察された。以上の結果は、栄養吸収に伴い吸収された  $\text{Na}^+$  はクロージン 15 により形成される陽イオン選択性のチャネル構造を介し、管腔側にリサイクルし  $\text{Na}^+$  依存性の栄養吸収を維持していることを示唆している。

## 1. 目的

摂取した蛋白質、糖質は消化酵素により分解され、アミノ酸、ペプチド、単糖として、それぞれ基質特異的な輸送体により認識され小腸上皮細胞で吸収されている。アミノ酸、単糖は二次性能動輸送体により吸収されている。これら二次性能動輸送体は細胞外液の  $\text{Na}^+$  に依存しており、小腸上皮細胞側底膜に存在する一次性能動輸送体であ

る  $\text{Na}^+$  ポンプ ( $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ ) により維持される内向きの  $\text{Na}^+$  の電気化学勾配を利用し、 $\text{Na}^+$  と栄養素が共輸送されることにより、栄養素は濃度勾配に逆い小腸上皮細胞内に上り坂輸送される。また  $\text{Na}^+$  依存性共輸送体はアミノ酸、単糖だけではなく、ビタミンやリン酸などの無機電解質も  $\text{Na}^+$  依存性共輸送体を介し吸収されている。このため食餌摂取に伴い、小腸内に負荷された栄養素を効率よ

く吸収する為には多量の  $\text{Na}^+$  が必要になることが容易に推測される。しかしながら小腸が如何に、この栄養素吸収に必要な  $\text{Na}^+$  必要量を、どのような機構で供給しているのかは研究されていない。

小腸上皮細胞の隣り合う細胞同士はタイト結合により密に接着しており、タイト結合は管腔と血液側を隔てる障壁としての役割をしていると考えられて来た。しかし近年、家族性低マグネシウム血症の患者の原因遺伝子はタイト結合構成タンパクの一つであるクロージン-16 であることが示された<sup>1)</sup>。更にクロージン-16をMDCK細胞に強制的に発現させると二価陽イオンに対するチャネルとして働くことが示された<sup>2)</sup>。これらのことよりクロージンにより形成されるタイト結合は障壁的な役割のみならず、生体にとり必要なイオンの透過路としての役割があることが推測される。

小腸上皮は他の上皮に比較し、細胞間の電気抵抗が低く(漏洩性上皮)、その細胞間隙であるタイト結合部は陽イオン選択性であることが知られている<sup>3)</sup>。しかし小腸上皮におけるタイト結合部の陽イオン選択性の生理的意義については研究されていない。このため本研究では、小腸上皮のタイト結合部の陽イオン選択性の生理的意義を明らかにする為に以下の実験を行った。クロージン-15 欠損マウスを用い、小腸の電気パラメーターの測定を行った。またマウスを代謝ケージで飼育し、電解質代謝を調べ、更に腸管内容物のグルコース濃度、 $\text{Na}^+$  イオン濃度を測定した。さらに小腸でのグルコース吸収速度と、 $\text{Na}^+$  吸収速度の関係を調べる為に、腸管灌流実験をおこなった。

## 2. 方法

### (1) 動物

クロージン 15 欠損マウスは、クロージン 15 ノックアウトアレルを持った *cldn15*<sup>+/-</sup> マウス<sup>4)</sup> を大阪大学(月田研究室)より入手し、*cldn15*<sup>+/-</sup> マウスを交配させ、クロージン 15 欠損マウスである *cldn15*<sup>-/-</sup> マウスを得、実験に使用した。

### (2) Ussing チャンバー法による小腸電気パラメーターの測定

摘出した下部空腸を、筋層を剥離後、Ussing チャンバーに装着した。コンダクタンスは外電圧負荷による電流の変化量より求めた。また拡散電位はチャンバーの一侧の代用液の  $\text{NaCl}$  濃度を半減(等浸透圧のマンニトールで置換)させた際に発生する電位差を測定した。

### (3) 代謝ケージ実験

動物は、代謝ケージに馴化させるために4日間飼育し、その後用いた。飼料はナトリウム、カリウム、クロライド並びに糖質を含まない飼料(船橋農場より購入)を用い、この飼料にグルコースを 60%、 $\text{NaCl}$  を 0.6%、カリウムはクエン酸三カリウムを 3.3% 添加した。また水は自由飲水とした。8日間代謝ケージで飼育し、尿、便を採取し、餌の摂食量と飲水量を記録した。

### (4) 腸内容物および血液採取

マウスは頸椎脱臼屠殺後、採血を行い、血液はポータブル血液分析器(FUSO: I-STAT300F)により測定した。胃噴門から肛門までの胃腸を摘出し、小腸は長さ測定後、幽門以下の小腸を 3 等分し、小腸上部、小腸中部、小腸下部とした。それぞれの境を鉗子で把持し、内容物が移行しないようにし、その後、各腸管内容物を採取した。

### (5) 腸管内容物の $\text{Na}^+$ 、グルコース濃度の測定

腸管内容物の上清の  $\text{Na}^+$  はイオンメーター(HORIBA COMPACT ION METER)により測定した。グルコース濃度は酵素法(グルコース C II-テストワコー 和光純薬)により、測定した。

### (6) 腸管灌流実験

灌流液は下記組成を用いた。

灌流用管腔液組成 (mM)

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7
NMDG-Cl	110
$\text{NaCl}$	15
$\text{CaCl}_2$	1.2
$\text{MgCl}_2$	1.2
Glucose	5

100%  $\text{O}_2$ , pH = 6.8

マウスをウレタンで麻酔し、動物用恒温装置の上に仰臥位に固定した。開腹後、空腸の一部(約 5 cm)を露出させ上端と下端にカニューレを接続し、ペリスタポンプ約 185  $\mu\text{l}/\text{min}$  の速度で灌流した。流出液は一定時間ごとに回収した。

流入液と流出液のそれぞれの流速、グルコース濃度、 $\text{Na}^+$  濃度を測定し、流入量と流出量の差より吸収速度を求め、実験終了後に測定した灌流部位の長さで割って、腸管の長さ当りの吸収速度として表した。グルコース濃度

は酵素法(グルコース C II-テストワコー 和光純薬)により、 $\text{Na}^+$  濃度はイオンメーター(コンパクトイオンメーター 堀場製作所)により求めた。

### (7)統計学的検討

測定値は、平均値  $\pm$  標準誤差で表した。n は動物数を示す。

統計学的解析には Unpaired t-test を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 3. 結果並びに考察

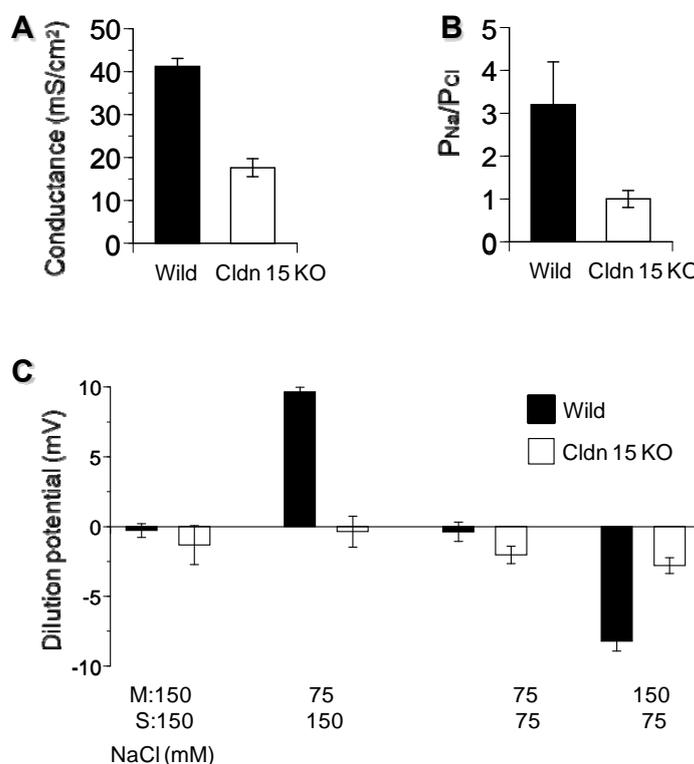
### (1)電気的パラメーターの測定

空腸のコンダクタンスを測定するとクロージン 15 欠損マウスでは野生型マウスに比較し、コンダクタンスが低下していた (Fig. 1 A)。また拡散電位は野生型マウスでは管腔側 NaCl 濃度を半減させると、粘膜側、正電位の増加が観察されたが、クロージン 15 欠損マウスでは、正電位の増加は観察されなかった (Fig. 1 C)。この結果より、ナトリウムイオンとクロライドイオンの透過性の比 (PNa/PCl) を算出す

ると、クロージン 15 欠損マウスでは PNa/PCl が低下していた。これらのことは小腸上皮の陽イオン透過性にはクロージン 15 が重要であること示唆している。

### (2)代謝ケージ実験

10 週齢のクロージン 15 欠損マウスとコントロールマウスの体重を比較するとクロージン 15 欠損マウスでは  $15.3 \pm 1.4 \text{ g}$  (n=4) であり、コントロールマウスでは  $20.2 \pm 2.2 \text{ g}$  (n=4) でクロージン 15 欠損マウスが有意に低い値を示した。それぞれ 2 匹を代謝ケージで飼育した。飼育期間での摂取量平均はコントロールマウス群で約 3 g、クロージン 15 欠損マウス群で約 1.4 g と、クロージン 15 欠損マウスではコントロールマウスの約半分であった。血中電解質濃度は Na、Cl では両群間に差はみられなかった。しかし、血中 K はコントロールマウスで  $6.3 \pm 0.3 \text{ mmol/L}$  なのに対し、クロージン 15 欠損マウスでは  $4.5 \pm 0.43 \text{ mmol/L}$  と有意ではなかったが ( $p = 0.07$ ) クロージン 15 欠損マウスで低カリウム血漿である傾向が観察された。クロージン 15 欠損マウスとコントロールマウスの腸管の長さを比較すると、コントロー



**Fig. 1.** クロージン15 欠損マウスと野生マウスの電気的パラメーターの比較。空腸下部を用いた。A: 電気的コンダクタンス。B: ナトリウムイオンとクロライドイオンの透過比。C の結果から算出した。C: 拡散電位の測定。粘膜側 (M) または漿膜側 (S) 代用液の NaCl を等浸透圧のマニトールに置換し、拡散電位を測定した。

ルマウスの小腸は  $33.4 \pm 0.9$  cm ( $n=4$ ) でクロージン 15 欠損マウスでは  $42.9 \pm 2.6$  cm ( $n=4$ ) でクロージン 15 欠損マウスが 1.3 倍長かった。クロージン 15 欠損マウスの腸管内内容物の分布を調べた (Fig. 2)。胃の内容量はクロージン 15 欠損マウスではコントロールマウスの約 1/2 であり、摂取量の違いを反映していると考えられた。しかし、小腸内容物の総量はクロージン 15 欠損マウスでは 1,223 mg であり、コントロールマウスでは 132 mg でありクロージン 15 欠損マウスが 9.3 倍あった。また小腸内での分布比を比較すると、クロージン 15 欠損マウスでは上部小腸に内容物が約 80% 存在していたが、コントロールマウスで小腸下部に 70% 存在していた (Fig. 2 B)。次に腸管各部位での内容物の  $\text{Na}^+$  濃度を比較した (Fig. 3)。胃での  $\text{Na}^+$  濃度を比較するとクロージン 15 欠損マウスでは約 40 mM であり、コントロールマウスでは約 30 mM であり、クロージン 15 欠損マウスが若干高め値を示した。上部小腸から盲腸まではクロージン 15 欠損マウスの  $\text{Na}^+$  濃度は約 5 mM であり、コントロールマウスの 60~100 mM に比べると非常に低い値を示した。クロージン 15 欠損マウスの上部小腸の  $\text{Na}^+$  濃度を更に詳細に検討する為、上部小腸を 4 等分して  $\text{Na}^+$  濃度を比較

した (Fig. 3 B)。幽門から 4 cm の小腸上部 1 では約 20 mM であったが、それより下部小腸では約 5 mM に低下していた。このことよりクロージン 15 欠損マウスでは幽門から 4 cm の小腸上部で急速に  $\text{Na}^+$  が吸収されていることが示唆された。クロージン 15 欠損マウスの近位結腸では  $\text{Na}^+$  濃度は約 20 mM でコントロールマウスの 1/2 の濃度であった。しかし、遠位結腸、便ではこの  $\text{Na}^+$  濃度差は観察されなかった。次に腸管各部位での内容物のグルコース濃度を比較した (Fig. 4)。小腸内容物中のグルコース濃度はコントロールマウスでは上部小腸では 1 匹が内容物が採取できなかったため、1 匹のデータしかないが 113 mM であり、クロージン 15 欠損マウスでは 73 mM であり、クロージン 15 欠損マウスが低値であった。しかし、小腸中部ではコントロールマウスではグルコースが測定できず、これに比べ、クロージン 15 欠損マウスでは 50 mM と非常に高い値を示した。消化管の主要なグルコース吸収は  $\text{Na}^+$  依存性グルコース共輸送体で吸収されている。前述の小腸上部 1 での急速な  $\text{Na}^+$  濃度の低下により、クロージン 15 欠損マウスでは小腸上部でのグルコース吸収が十分されず、このため小腸中部までグルコースが流れたと考えられる。

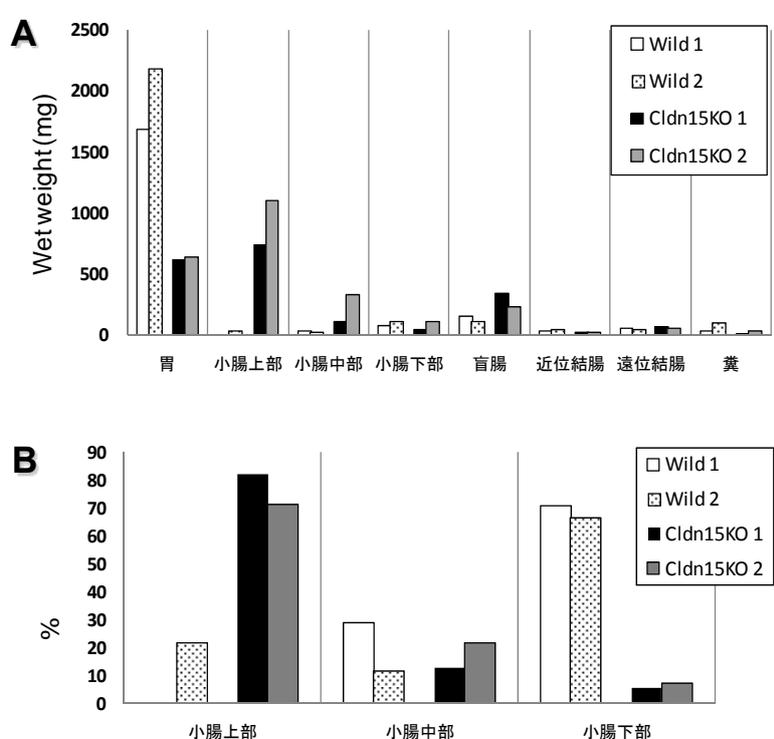
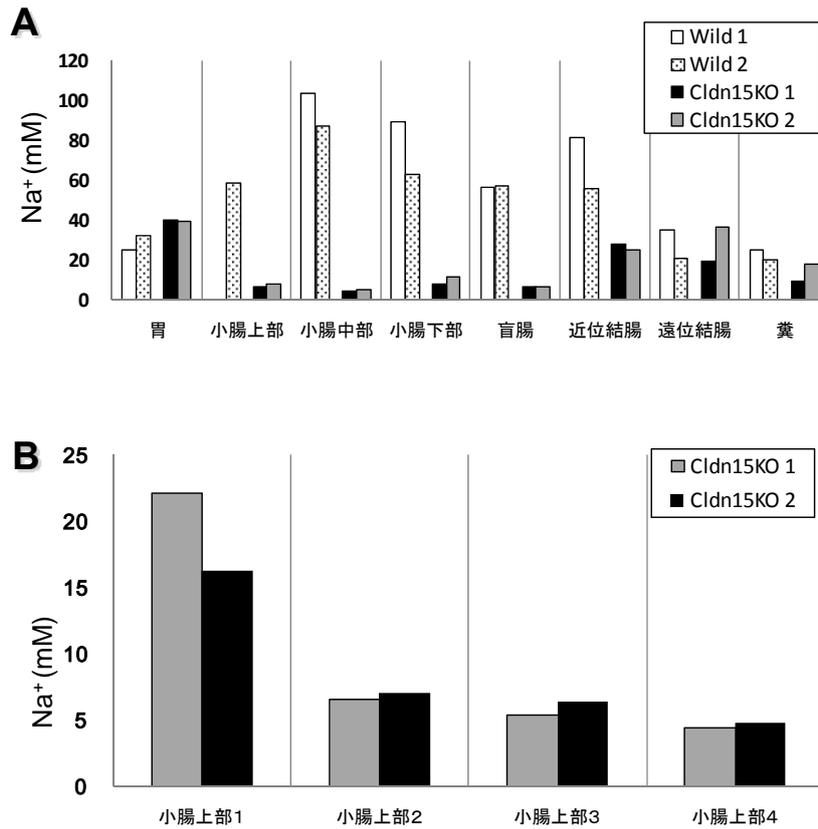
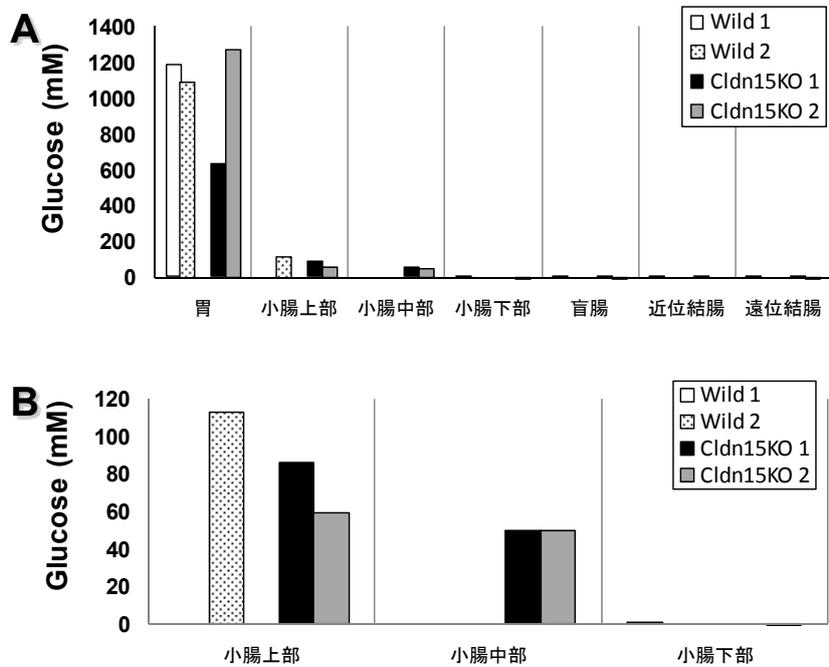


Fig. 2. 腸管各部位での内容物量と腸管各部位での内容物の分布割合の野生型マウスとクロージン15 欠損マウスでの比較。A. 各部位での回収した内容物の湿重量。B. 内容物の小腸での分布割合。



**Fig. 3.** 腸管各部位での内容物 Na 濃度の野生型マウスとクロージン15 欠損マウスでの比較。A. 腸管各部位における Na 濃度。B. クロージン15 欠損マウスの小腸上部を更に 4 等分し、内容物の Na 濃度を測定した。



**Fig. 4.** 腸管各部位での内容物のグルコース濃度の野生型マウスとクロージン15 欠損マウスでの比較。A. 腸管各部位でのグルコース濃度。B. 小腸各部位でのグルコース濃度。

(3) 腸管灌流実験

野生型マウスで最初に灌流実験を行った (Fig. 5)。グルコースを含まない mannitol 液で空腸を灌流した条件下 (Fig. 5, Man) では、血液側 (5 - 10 mM グルコース濃度) から管腔内へのグルコース流入はほとんど見られなかった。Na<sup>+</sup> に関しては分泌が観察された。この実験では管腔内を灌流する液の Na<sup>+</sup> 濃度は 15 mM のため、血液中の 140 mM との間の濃度勾配による管腔内への流入が、能動輸送による Na<sup>+</sup> 吸収量を上回ったと考えられる。実際灌流液の Na<sup>+</sup> 濃度を生理的な小腸内濃度の 80 mM まで上げると、正味の Na<sup>+</sup> 吸収が見られた。本実験で 80 mM を使わなかったのは、流出液の Na<sup>+</sup> 濃度変化が、低濃度の方が信号/ノイズ (S/N) 比の面からより正確に測定できると考えられたからである。空腸を灌流する液を mannitol 液からグルコースを含む液に変えたところ、一定のグルコース吸収が観察された (Fig. 5 A)。このことより本実験条件下で小腸は基本的に正常に働いていると考えられる。しかし Na<sup>+</sup> の分泌速度はグルコース吸収に伴い低下することなく、むしろ分泌がやや増大する傾向を示した。すなわち

Na<sup>+</sup> 吸収がグルコース吸収に伴い増大するという事は観察されなかった。

次にクロージン 15 が Na<sup>+</sup> 吸収にどのようにかかわっているか手がかりを得るため、同様の実験をクロージン 15 欠損マウスで行った (Fig. 6)。コントロールの mannitol 液を灌流した場合、野生型マウスと異なり、Na<sup>+</sup> 吸収が観察された。クロージン 15 欠損マウスにおいては、グルコース吸収速度は野生型マウスに比べ大きな差はなかった。クロージン 15 欠損マウスでは、空腸の絨毛が巨大化していることからグルコース吸収活性は増大していることが予想されたが、この結果は、吸収細胞あたりの吸収活性はむしろ低下していることを示唆している。クロージン 15 欠損マウスにおいては野生型マウスでは見られなかったグルコース吸収に伴う Na<sup>+</sup> 吸収活性の増加がみられた。この増大した Na<sup>+</sup> 吸収速度はグルコース吸収速度とほぼ見合う値であった (Fig. 6 C)。この結果は、野生型マウスでは、グルコース吸収に伴い吸収される Na<sup>+</sup> の大部分はクロージン 15 が関与する陽イオン選択性のタイト結合部を介して管腔内へリサイクルしていることを示していると考えられる。

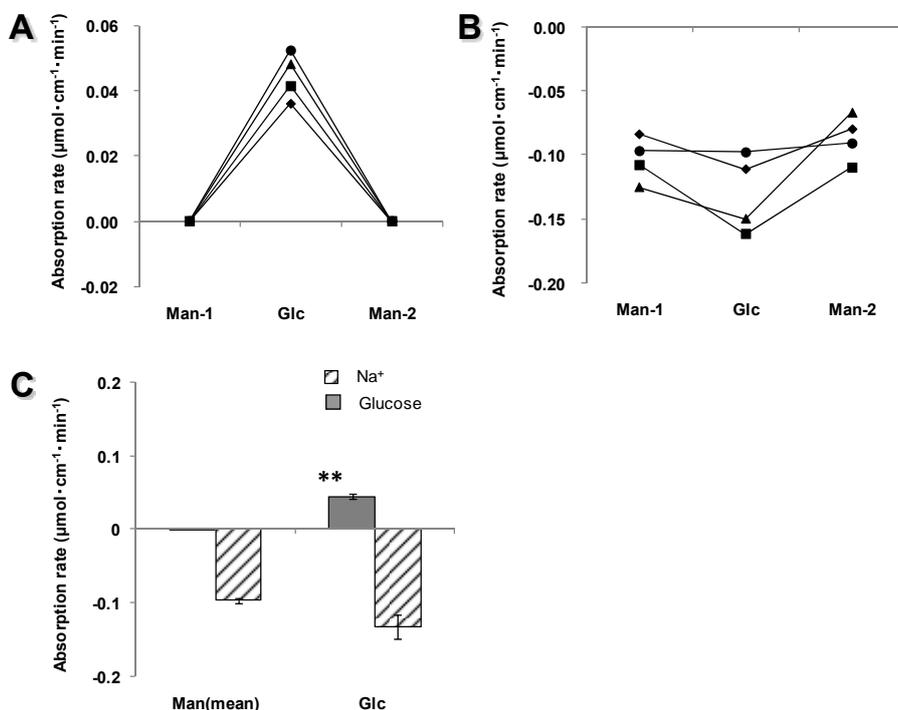
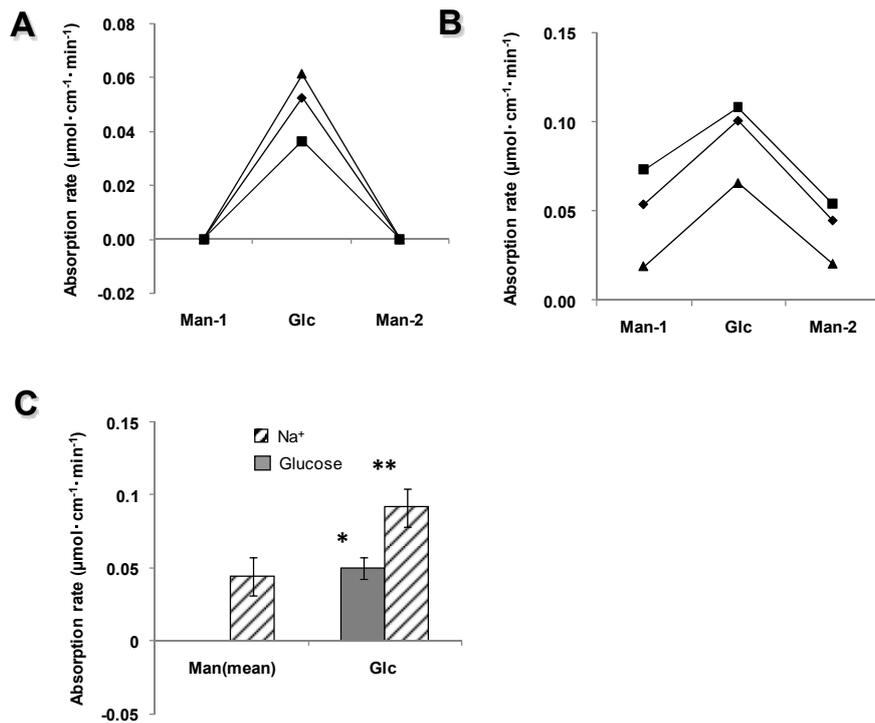


Fig. 5. 野生型マウスにおける Glucose 吸収に伴う Na<sup>+</sup> 吸収速度の変化。野生型マウスを用いて Mannitol 液→Glucose 液→Mannitol の順番で灌流し、Mannitol 液の平均値とグルコース存在下の Na<sup>+</sup> 吸収速度を比較した。A: Glucose 吸収速度。B: Na<sup>+</sup> 吸収速度。C: グルコース非存在下と存在下での比較。平均値 ± 標準誤差。■、▲、◆、●は、個々のマウスでの結果である。n = 4, \*\* p < 0.01。



**Fig. 6.** クロージン15 欠損マウスにおける Glucose 吸収に伴うNa<sup>+</sup> 吸収速度の変化。クロージン15 欠損マウスを用いて Mannitol 液→ Glucose 液 → Mannitol の順番で灌流し、Mannitol 液の平均値とグルコース存在下のNa<sup>+</sup> 吸収速度を比較した。A: Glucose 吸収速度。B: Na<sup>+</sup> 吸収速度。C: グルコース非存在下と存在下での比較。平均値 ± 標準誤差。■、▲、◆、●は、個々のマウスでの結果である。n = 3, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $0.01 < p < 0.05$ 。

#### 4. 結 語

生理的条件下では栄養素吸収に伴い、吸収された Na<sup>+</sup> はクロージン 15 により形成される陽イオン選択性のポア構造を介し、管腔側にリサイクルし、Na<sup>+</sup> 依存性の栄養素吸収を維持していることが示唆された。

#### 参考文献

- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP: Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption, *Science*, 285, 103-6 (1999)
- Ikari A, Hirai N, Shirome M, Harada H, Sakai H, Hayashi H, Suzuki Y, Degawa M, Takagi K: Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells, *J Biol Chem*. 279, 54826-32 (2004)
- Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 241: G275-288, 1981.
- Atushi Tamura, Yuki Kitano, Masaki Hata, Tatsuya Katsuno, Kazumasa Moriwaki, Hiroyuki Sasaki, Hisayoshi Hayashi, Yuichi Suzuki, Tetsuo Noda, Mikio Furuse, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita: Megaintestine in Claudin-15-Deficient Mice, *Gastroenterology*, 134, 523-34 (2008)

No. 0909

## Roles of Tight Junction in Na<sup>+</sup> Homeostasis and Glucose Absorption in the Small Intestine

Yuichi Suzuki, Atsushi Tamura and Sachiko Tsukita

Laboratory of Physiology, School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

### Summary

Many nutrients are absorbed by Na<sup>+</sup>-coupled transport mechanism in the intestine. Yet, how the intestine meet the requirement of Na<sup>+</sup> for nutrient absorption remains unknown. One possible mechanism is paracellular pathway. It is contemplated that Na<sup>+</sup> diffuses back into the lumen via its pathway because of the lumen-negative potential difference induced by Na<sup>+</sup>-coupled transport. The claudin family of transmembrane tight junction proteins is critical in determining the paracellular ionic permeability and selectivity. To investigate the role of paracellular Na<sup>+</sup> permeability for Na<sup>+</sup>-coupled glucose absorption, we used claudin-15 knockout (cldn15<sup>-/-</sup>) mice and measured the electric parameters in Ussing chambers. Moreover, we determined the absorption rate of glucose and Na<sup>+</sup> by intestinal perfusion *in vivo*. The electric conductance in cldn15<sup>-/-</sup> mice was decreased compared to that in the wild mice (18 vs. 41 mS/cm<sup>2</sup>). Dilution potential (DP) was measured while lowering apical NaCl concentration. DP was significantly decreased in cldn15<sup>-/-</sup> mice compared to that in wild mice (-0.5 vs 9.7 mV). From this results permeability ratio ( $P_{Na}/P_{Cl}$ ) between Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> for paracellular pathways was estimated to be decreased in cldn15<sup>-/-</sup> mice (1.0 vs. 3.2). When the jejunum was perfused with 15 mM Na<sup>+</sup> solution without glucose, Na<sup>+</sup> absorption was observed in cldn15<sup>-/-</sup> mice while Na<sup>+</sup> secretion in wild mice. Addition of glucose to the pefusate caused an increase of Na<sup>+</sup> absorption in cldn15<sup>-/-</sup> mice but not in wild mice. These results suggest that Na<sup>+</sup> is rapidly recycled from blood side to the lumen presumably through the cldn15-based, cation selective paracellular pore to maintain the Na<sup>+</sup>-dependent glucose absorption.