

上皮バリア蛋白質による新規腸管 Na 代謝調節機構の解明

林 久由¹, 石塚 典子¹, 古瀬 幹夫²¹ 静岡県立大学・食品栄養科学部, ² 自然科学研究機構・生理学研究所

概要 腸管上皮は外界からの選択的な栄養素吸収機能と同時に、異物の侵入を防ぐバリア機能が必要である。上皮膜のバリア機能はタイト結合で担われており、クロージンがジッパーのように2枚の細胞膜を繋いで細胞間隙を閉じている。しかし、3枚の細胞膜が接する3細胞結合部では、特殊な3細胞タイト結合が必要である。近年、この3細胞タイト結合部に局在するタンパク質として Angulin-1 (別名: lipolysis-stimulated lipoprotein receptor, LSR) が同定された。培養上皮細胞で Ang-1 をノックダウンすると経上皮の電気抵抗が低下し、Ang-1 はバリア機能に関与することが示されている。しかし、Ang-1 全身ノックアウトマウスは胎生致死であるため、Ang-1 の腸管での生理機能については検討されていない。このため本研究では腸管特異的 Ang-1 欠損 (Ang-1 cKO) マウスを用い、消化管における Ang-1 の役割を解明することを目的とした。ユッシングチャンバー法を用い、経上皮のイオンおよびマンニトールの透過性を測定した。Ang-1 cKO マウスでは、マンニトールの透過性の増大は観察されなかった。しかし、細胞間隙の Na⁺ の選択的透過性の低下が観察された。更に、Ang-1 cKO マウスでは、Na⁺ 依存性栄養素吸収活性が抑制されていた。以上より、3細胞結合部に発現している Ang-1 は、2細胞タイト結合部のイオン透過性ならびに経細胞性の Na⁺ 依存性栄養素輸送を間接的に調節している可能性が示唆された。

1. 研究目的

腸管は外界から栄養素吸収を選択的かつ効率的に行うことと同時に、外界からの異物の侵入を防ぐ機能が必要である。腸管上皮における物理的なバリアは隣り合う上皮細胞同士が、さまざまな分子で構成されるタイト結合というベルト状の構造で密に結合し、物質の透過の制限または上皮細胞間のイオンなどの選択的透過性に寄与している。この上皮細胞間の結合に関しては、隣り合う2つの細胞で構成されるバリアはクロージンにより閉じられていることが明らかにされてきている^(1,2)。また、腸のタイト結合部の責任分子に関しては不明であったが、クロージン 15 を欠損させたマウスにおいては、小腸の経上皮の抵抗が増加し、それと同時に経上皮の陽イオン選択性が低下した⁽³⁾。このためクロージン 15 が、小腸の陽イオン選択性のポアをタイト結合に形成していると考えられる。しかし、クロージン 15 欠損マウスの小腸バリア機能は、正常であるため、バリア機能に関しては他の機構により制御されていると考えられ

る⁽³⁾。上皮のバリア機能に関しては、2細胞間のクロージンによるバリア機構以外にも、3細胞間で構成される部分に関しても、特殊な構造が観察されており⁽⁴⁾、3細胞間をシールするためには、クロージンファミリーとは別の機構が必要になる。3細胞間のタイト結合を構成するタンパク質としてはトリセルリンが世界で初めて同定された⁽⁵⁾。トリセルリンの全身のノックアウトマウスでは、難聴を示すが、消化管等の他の組織では大きな表現形の変化は観察されていない。3細胞タイト結合部に発現するタンパク質としては、トリセルリン以外に Angulin-1 (Ang-1, 別名 Lipolysis stimulated lipoprotein receptor; LSR) が最近同定された⁽⁶⁾。Ang-1 の全身性ノックアウトマウスは胎生致死になるが、その原因は不明であり、Ang-1 の腸管での生理機能は調べられてない⁽⁷⁾。また Ang-1 を細胞発現系でノックダウンすると経上皮性の抵抗が低下することが報告されている⁽⁶⁾。このため本研究では Ang-1 の腸管での役割を調べるために腸管特異的に Ang-1 を欠損させたマウスを用い、消化

管のバリア機能や栄養素吸収機構を評価した。

2. 研究方法

2.1 動物

Ang-1 はマウスでは第7染色体の Ang-1 遺伝子 (gene ID:54135) によりコードされている。本研究では Ang-1-floxed マウス (C57BL/6J) と腸上皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する villin-cre マウス (C57BL/6J) を交配することにより腸上皮細胞特異的な Ang-1 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し解析に用いた。

2.2 代謝実験

マウス単独飼育用代謝ケージにて野生型および Ang-1 cKO マウスを単独飼育した。飼育条件は照明時間 8:00~20:00, 室温 23±1°C, 湿度 55±5% とした。餌は粉末 MF を用い, 自由摂食, 自由飲水とした。毎日 8:00~9:30 に餌, 水の交換および体重, 摂食量, 飲水量, 尿量, 便量の測定を行った。

2.3 ユッシングチャンバー法による電氣的パラメーターの測定並びの経上皮フラックスの測定

マウス腹腔内に 10 μL/g 体重の 3 種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン, ミダゾラム, 酒石酸ブトルファンール) を投与し麻酔し小腸を摘出した。腸管は長軸に沿って切開し, 実体顕微鏡下にて, ピンセットで筋層を剥離し, 粘膜と粘膜下層からなる標本を作製した。粘膜標本を直径 5 mm の円形窓が開いた一対のユッシングチャンバーに装着した。短絡条件下 (short-circuit condition) にて, 短絡電流 (Isc) および経上皮コンダクタンス (Gt) を測定した。タイト結合部のイオン透過性の評価は, 希釈電位を測定し評価した。希釈電位は, 粘膜側の代用液中の NaCl 濃度が 1/2 となるように等浸透圧的にマンニトールで置換した際の変化を測定した。経上皮のイオン並びに有機溶質の透過性は放射性同位元素 (²²Na⁺) 並びにラベル体 (³H-Mannitol) を用いて行った。ユッシングチャンバーに標本を装着後, 一側にラベル体を添加し, 反対側の代用液を 20 分おきに採取

し, その変化量から経上皮フラックスを算出した。

2.4 Real-time RT PCR 法

上記の腸管内容物採取と同様に標本の採取を行い, 標本は 300mM Mannitol 溶液で洗浄後, RNA later solution (Ambion) に浸漬した。総 RNA 抽出には Nucleospin (MACHEREY-NAGEL) を用い, cDNA の合成には PrimeScript RT Master mix (TAKARA) を用い, マニュアルに従った。ハウスキーピング遺伝子として β-actin を用い, ΔΔCt 法で定量した。PCR は, 95°C30 秒を 1 サイクル, 95°C5 秒 60°C30 秒を 40 サイクル行った。

3. 研究結果

3.1 血液生化学データ

Ang-1 cKO マウスと野生型マウスの血液生化学データを比較した (Table.1)。Ang-1 cKO マウス血液中 Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ 濃度は野生型マウスと比較し変化は観察されなかった。また, Angulin-1 は脂肪代謝に関与するタンパク質 (Lipolysis stimulated lipoprotein receptor) として同定されているため血液中の脂質について調べたが, 野生型マウスと比較し変化は観察されなかった。

3.2 代謝ケージ実験

マウス単独飼育用代謝ケージにて野生型および Ang-1 cKO マウスを飼育し, 摂食量, 飲水量, 便量, 尿量を測定した (Figure.1)。摂食量では Ang-1 cKO マウスが, 野生型マウスと比較し, 有意に高い値を示した。飲水量, 便量, 尿量は野生型と比較し有意差は観察されなかった。

3.3 小腸各部位の経上皮コンダクタンスの測定

Ang-1 cKO マウスの血液脳関門ではビオチンの透過性が上昇すること⁽⁸⁾, 細胞発現系で Ang-1 をノックダウンすると経上皮性の抵抗が低下することから⁽⁶⁾, Ang-1 cKO マウスでは, 小腸上皮のバリア機能が低下していることが予期され, この可能性を検討した。最初に, バリア機能の評価指標である経上皮電気コンダクタンス (Gt) を, 小腸を 6 等分 (S1-S6) し, 各部位で測定した (Figure.2)。コントロール

Table1. Blood profiles in the wild-type and Ang 1 cKO mice

	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	Ca (mEq/l)	T-CHO (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)
WT	153 ± 1	4.1 ± 0.5	111 ± 1	8.5 ± 0.2	71 ± 5	19 ± 2	47 ± 4
Ang-1 cKO	155 ± 1	4.2 ± 0.4	113 ± 1	8.8 ± 0.2	57 ± 5	19 ± 2	37 ± 2

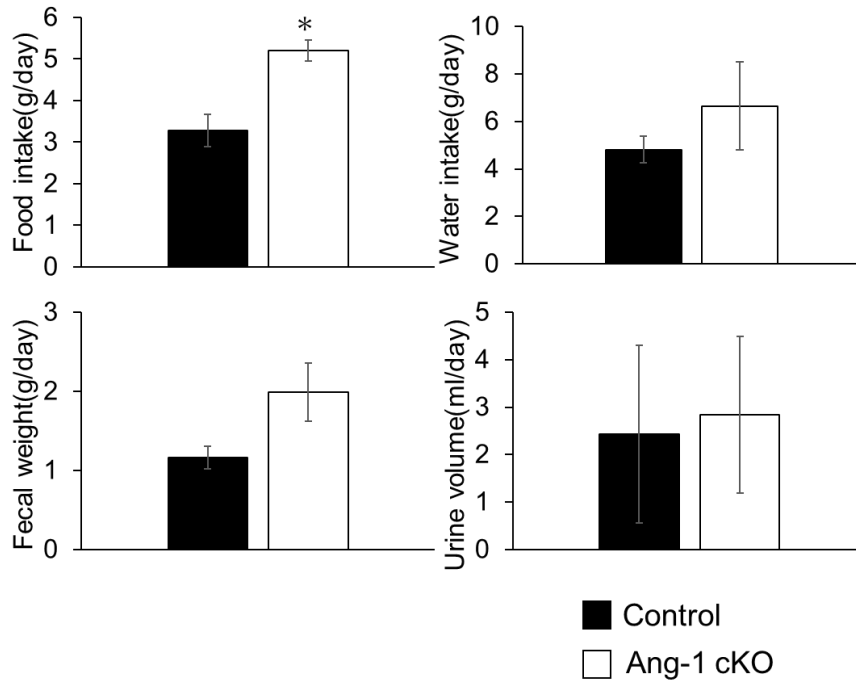


Figure.1 Physiologic parameters in the wild-type and Ang 1 cKO mice

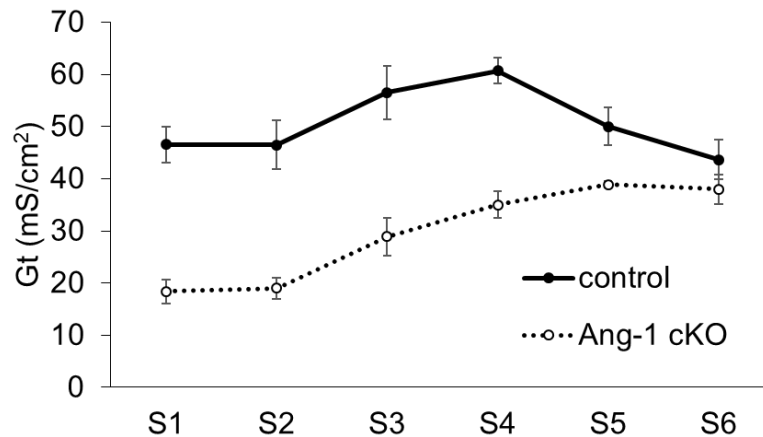


Figure.2 Basal transepithelial conductance in different intestinal segments from wild-type and Ang 1 cKO mice

マウスでは S1 では約 40 mS/cm² の経上皮電気コンダクタンスが観察され、その後下部にかけて上昇が観察され、S4 で約 60 mS/cm² のピークが観察された。一方、Ang-1 cKO マウスではコントロール群と比較し、経上皮電気コンダクタンスが低下し、特に S1 では約 20 mS/cm² とコントロール群の約半分まで低下していた。それ以下の下部小腸では野生型マウスとの差が小さくなる傾向が見られた。

3. 4 一方向性 ³H-Mannitol 経上皮フラックスの測定

経上皮電気コンダクタンスでの評価は、3 細胞タイト結合部と 2 細胞タイト結合部のイオン透過性の和として評価

される。Ang-1 は 3 細胞タイト結合部に発現しているが、小腸の主要な陽イオン透過性は、2 細胞タイト結合部発現しているクロージン 15 で担われていることが示されている。また上皮のイオンならびに物質の選択的透過性に関しては、クロージンなどにより形成されるポア透過路 (pore pathway) があり、これとは別に非選択的リーク透過路 (Nonselective leak pathway) が存在し、それは、輸送量は低いが、分子サイズによる透過制限は受けないと考えられている。このリーク透過路を通ることが想定される、³H-Mannitol (分子量 182.17) が Ang-1 欠損によって影響

を受けるか否か検討を行った (Figure.3)。野生型マウスでは粘膜側から漿膜側(M→S)の Mannitol の一方向性フラックスは約 3.5 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ 、漿膜側から粘膜側(S→M)の一方向性フラックスは約 2.5 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ であった。一方 Ang-1 cKO マウスではいずれの Mannitol の一方向性フラックスも約 1.5 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ と低下していた。

3.5 傍細胞経路の Na⁺透過性の評価

Ang-1 cKO マウスでは、経上皮電気コンダクタンスの低下が観察され (Figure.2)、傍細胞性経路の Na イオン透過性が変化していることが示唆された。Ang-1 の発現の有無が傍細胞経路のイオンの選択的透過性に影響するか否かを検討するために、NaCl 希釈電位測定を行った。非短絡条件下で、粘膜側の NaCl 濃度を、等浸透圧的にマンニトールを用いて 75 mM に希釈し、その際の傍細胞経路を介した NaCl の希釈電位を測定し、Goldman-Hodgkin-Katz の式を用いて、Na⁺と Cl⁻の透過比である $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ を求めた。野生型マウスでは、約 10 mV の粘膜側正電位の増大が観察され、 $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ は約 8 であり、陽イオン選択性であった。次に Ang-1 cKO マウスで同様の実験を行うと、粘膜側の NaCl 希釈による電位は約 2 mV に低下しており、 $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ は約 2 と陽イオン選択性は低下していた。次に実際に傍細胞経路の Na⁺輸送が変化しているか否かを、一方向性 ²²Na⁺フラックスを測定することで評価した (Figure.3A)。野生型マウスでは粘膜側から漿膜側への一方向性 ²²Na⁺フラックス(M→S)は約 40 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ であり、漿膜側から粘膜側への一方向性 ²²Na⁺フラックス

(S→M)は約 25 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ であり、その差である正味のフラックスは吸収性のフラックスが観察された。次に Ang-1 cKO マウスを用いて検討をおこなった。²²Na⁺ 一方向性フラックスは M→S が約 15 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ 、S→M が約 20 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ (Figure.3B)といずれも、野生型マウスと比較し低下しており、特に M→S 方向は有意に抑制されており、経上皮の吸収の抑制が示唆された。

3.6 Na⁺依存性栄養素吸収機構の検討

前述の結果では Ang-1 cKO マウスでは経上皮の Na⁺吸収の抑制が示唆された。このため Na⁺依存性栄養素吸収機構に影響が見られるか否かを検討した。Na⁺依存性グルコース吸収機構はグルコース誘発の短絡電流上昇 (ΔIsc)として評価した (Figure.4)。野生型マウスでは、上部小腸 S1では約 100 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ の ΔIsc が観察され、この

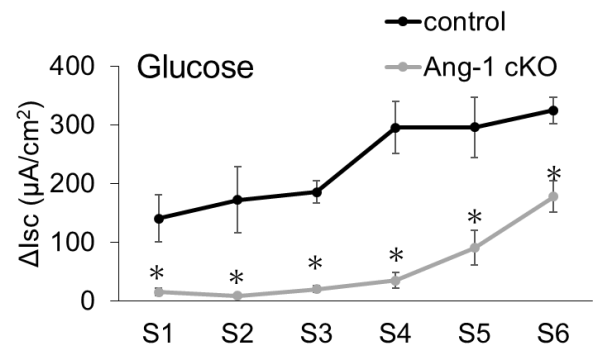


Figure.4 The impact of loss of ang-1 on Na⁺-dependent glucose absorption

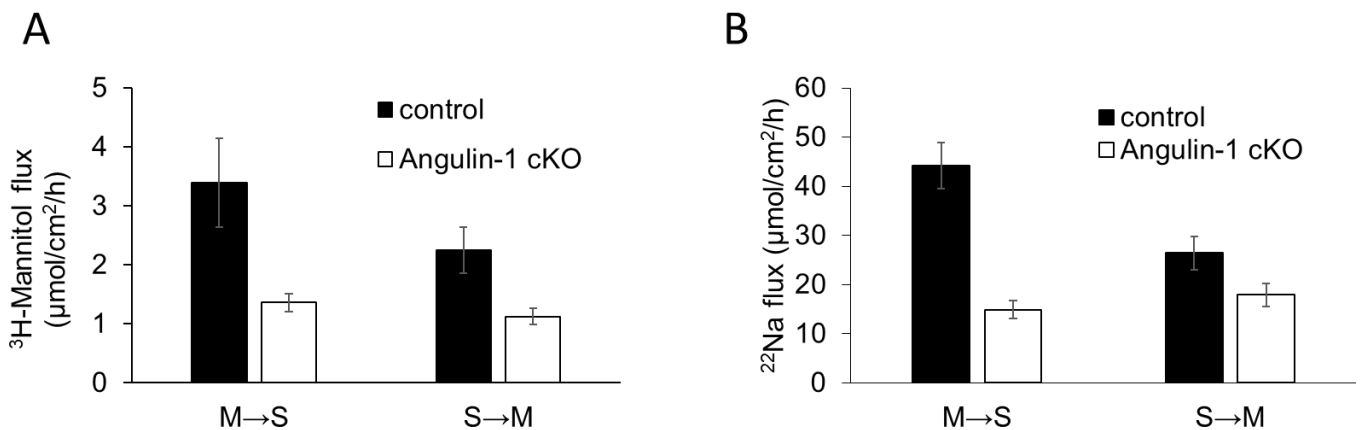


Figure.3 The impact of loss of ang-1 on transepithelial mannitol and Na fluxes

値は下部小腸に向かい大きくなり、S6では、約 300 A/cm^2 の ΔIsc が観察された。一方、LSR cKO マウスでは、上部小腸である S1～S4 でほとんど ΔIsc が確認されず、S5から S6では ΔIsc が増加し、S6では約 150 A/cm^2 の ΔIsc が観察された。 Na^+ 依存性グルコース吸収機構の抑制が輸送体の発現量の低下によるか否かを検討した。 Na^+ 依存性グルコース輸送体 SGLT-1 並びに小腸の主要な Na^+ 吸収輸送体 NHE3 の発現量を調べた (Figure.5)。いずれの遺伝子の発現も Ang-1 cKO マウスでは変化が観察されなかった。

4. 考察並びに今後の課題

本研究の目的は Ang-1 の消化管における役割の解明である。Ang-1 の欠損は小腸上皮の傍細胞性経路の機能の変化のみならず、経細胞性の機能の変化を惹起した。傍細胞性経路の機能評価では、当初の予想していた上皮バリア機能の欠損は観察されず、経上皮電気コンダクタンスの低下と、陽イオン選択性の低下が観察され、これはクロージン 15 欠損マウスの表現系と酷似していた。しかし、クロージン 15 欠損マウスで観察された、腸管腔内の著しい Na^+ 濃度の低下は観察されず、単なるクロージン 15 の機能不全ではないと考えられ、他の陰イオン選択性のクロージンの関与などが示唆された。これらは、三細胞結合部に発現する Ang-1 が何らかの機構を介して二細胞結合部に発現するクロージンの発現調節に関与していることを示唆している。

また、三細胞結合部に発現する Ang-1 は経細胞性の

栄養素・電解質輸送活性調節において重要な役割をしていることが示された。本研究では、 Na^+ 依存性グルコースと電解質である Na^+ で輸送活性の低下が観察された。これら輸送体のタンパク質は異なっており、機能不全の理由は、何か共通する機構が関与している可能性がある。その候補としては、刷子縁膜の輸送体全てが発現していないか、またはこれら輸送体の駆動力である Na^+ ポンプが機能していないことが考えられる。しかし、刷子縁膜に発現している CFTR による Cl^- 分泌機能の機能は保たれており、絨毛と陰窩での LSR 機能の違いによるのか今後の検討が必要である。

Ang-1cKO マウスでは、栄養素吸収障害が起きていると予想されるが、血液生化学的なデータや代謝データからは明らかな栄養障害は観察されなかった。これは、回腸末端では Ang-1 が欠損しているにも関わらず、上部小腸で観察されたような表現型の変化が少ないことに起因している可能性がある。またこのことは、LSR の機能は上部小腸で重要であり、部位特異的な機構が働いている可能性を示唆している。栄養素吸収機構に関しては、今後はパーテーションをかけた状態での栄養評価等の検討が必要である。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいた公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に御礼申し上げます。

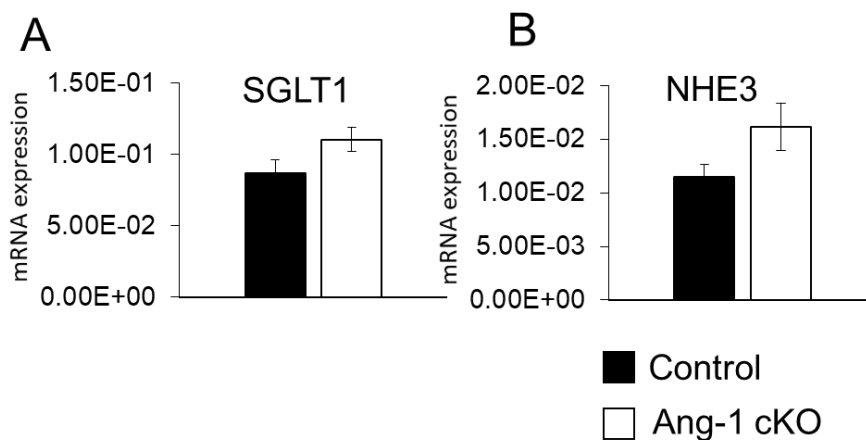


Figure.5 The impact of loss of ang-1 on mRNA expression

6. 文献

1. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2, novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141, 1539-50, 1998
2. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol.* 143, 391-401, 1998
3. Tamura A, Hayashi H, Imasato M, Yamazaki Y, Hagiwara A, Wada M, Noda T, Watanabe M, Suzuki Y, Tsukita S. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology.* 140, 913-923, 2011
4. Staehelin LA. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci.* 13, 763-86, 1973
5. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 171, 939-45, 2005
6. Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, Furuse M. LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci.* 124, 548-55, 2011
7. Mesli S, Javorschi S, Bérard AM, Landry M, Priddle H, Kivlichan D, Smith AJ, Yen FT, Bihain BE, Darmon M. Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR^{-/-} embryos at 12.5 to 14.5 days of gestation. *Eur J Biochem.* 271, 3103-14, 2004
8. Sohet F, Lin C, Munji RN, Lee SY, Ruderisch N, Soung A, Arnold TD, Derugin N, Vexler ZS, Yen FT, Daneman R. LSR/angulin-1 is a tricellular tight junction protein involved in blood-brain barrier formation. *J Cell Biol.* 208, 703-11, 2015

Elucidation of Novel Regulatory Mechanisms of Intestinal Na Metabolism by a Tricellular Tight Junction Protein

Hisayoshi Hayashi¹, Noriko Ishizuka¹, Mikio Furuse²

¹ Laboratory of Physiology School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

² Division of Cell Structure, National Institute for Physiological Sciences

Summary

The intestinal epithelium needs selective absorption mechanisms to take up nutrients from the luminal environment, technically a space outside the body, as well as a barrier function to prevent the entry of noxious luminal contents. The barrier function of the epithelia is responsible for tight junctions, and claudins connect two cell membranes like zippers and close the intercellular space. However, at the tricellular junctions, where three cells are in contact, a special tricellular tight junction mechanism is required. Recently, Angulin-1 has been identified as a protein that localizes only to tricellular tight junctions. Knockdown of Angulin-1 in epithelial cell lines resulted in reduction of transepithelial electrical resistance, suggesting that Angulin-1 is involved in epithelial barrier function. Since mice lacking Angulin-1 exhibits an embryonic lethal phenotype, the physiological function of Angulin-1 in the intestine has not been studied. We therefore aimed to elucidate the role of Angulin-1 in the small intestine using intestine-specific Angulin-1 deficient (Ang-1 cKO) mice. Transepithelial ion and mannitol permeability in the small intestine were measured using the Ussing chamber method. Unexpectedly, transepithelial mannitol and Na⁺ fluxes were decreased in Ang-1 cKO mice. In addition, a decrease in Na⁺ selectivity in the tight junctions was observed. Furthermore, Na⁺-dependent nutrient absorption activity was decreased in Ang-1 cKO mice. These results suggest that Angulin-1 which is expressed at the tricellular junctions may indirectly regulate the Na⁺ permeability of the bicellular tight junctions and transcellular Na⁺-dependent nutrient transport.