

栄養素トランスポーターの消化管全長における発現解析

岩 永 敏 彦

北海道大学大学院医学研究科 教授

緒 言

摂取された食品由来の栄養素が消化管のどの部位で、どういうメカニズムで取り込まれるかは、消化生理および栄養学では重要な研究課題のひとつである。しかし、消化活動により消化管腔内で生産された栄養素の動きを生体において追跡するのは容易ではない。一方、トランスポーターの発現解析から、栄養素の取り込み部位を特定し、その特性や取り込み能力を解明する手だてがある。栄養素の輸送体についての遺伝子情報は、ゲノム解析が終了しているので、構造に関するすべての情報が手に入る時代になったという背景がある。

我々は、これまでに食物繊維の発酵によって生じる短鎖脂肪酸（プロピオン酸や酪酸など）の取り込み輸送体の解析を行い、回腸末端から大腸において、 Na^+ との共輸送のかたちでこれらを取り込む輸送体の発現様式を解明した¹⁾。この輸送体（SMCT1）は結腸下位での発現が強く、そこでは上皮の管腔側に存在する。SMCT1 は短鎖脂肪酸とともに水を吸収するので、糞塊（固形便）の形成にも寄与する。また、この輸送体はがん抑制遺伝子の産物でもあるので、以前から言われていた「食物繊維が大腸がんの予防になる」ことをある程度説明できる²⁾。この例が示すように、輸送体の研究から、栄養素の吸収部位や生体に及ぼす影響を解明できる状況にある。そこで、本研究では、これまで取り組んできた短鎖脂肪酸輸送体の解析で確立した手法を使って、グルコース、コレステロールや脂肪酸など、さまざまな輸送体の発現をマウスの消化管全長にわたって解析し、輸送体の分布地図を作成すること目標に開始した。

8 週齢の雄性 BALB/c マウスを 15 ～ 16 時間絶食にした後、ペントバルビタールで深麻酔した。*in situ* hybridization 法ならびに PCR 用には瀉血後に新鮮組織を採取、免疫組織化学用には 4% paraformaldehyde で灌流固定後に腸管と腎臓を得た。*in situ* hybridization 法には、図 1 に示すように十二指腸 (D)、空腸前部 (J1)、空腸後部 (J2)、回腸前部 (I1)、回腸末端 (I2)、盲腸 (Ce)、結腸 (Co)、そして直腸 (R) を採取した。消化管における輸送体の mRNA の発現を調べるために、アイソトープ標識による *in situ* hybridization 法を行なった。各ト

方 法

図 1 サンプルングの場所を示す模式図

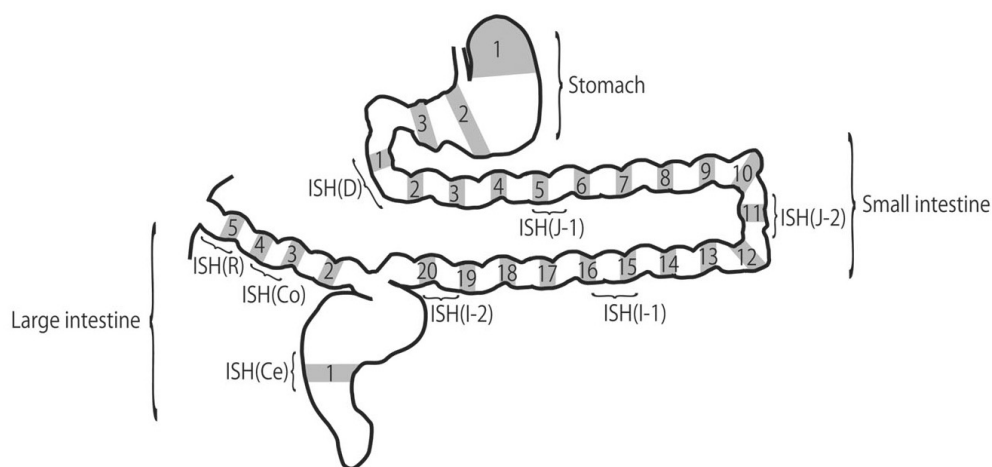


図 1 サンプルングの場所を示す模式図

ランスポーターサブタイプの mRNA に相補的なアンチセンス DNA プローブ (45 塩基) を合成し、 ^{33}P で標識したものをハイブリダイズに用いた。ハイブリダイズ後、スライドガラスを直接 X 線フィルムに密着し、1 週間露光した。また、一部の切片は乳剤に浸漬し、45 日後にオートラジオグラフにより可視化した。

PCR 解析用には、全部で 28 ケ所の部位から組織を採取した (図 1)。他のランスポーターとの発現を比較するために同一組織を使って、定量 PCR (quantitative-PCR : Q-PCR) を行なった。定量 PCR 法は、lightCycler

480 を用い、 β -actin を housekeeping gene として数値化した。

結 果

1. 小腸型 SMCT

乳酸などモノカルボン酸の輸送体として高親和性 SMCT1 が同定され、ついで低親和性の SMCT2 が同定された。本研究では、SMCT2 が小腸に発現することを *in situ* hybridization 法と PCR 法により明らかにした。SMCT2 は近位空腸 (J1) から回腸末端 (I-2) にかけて

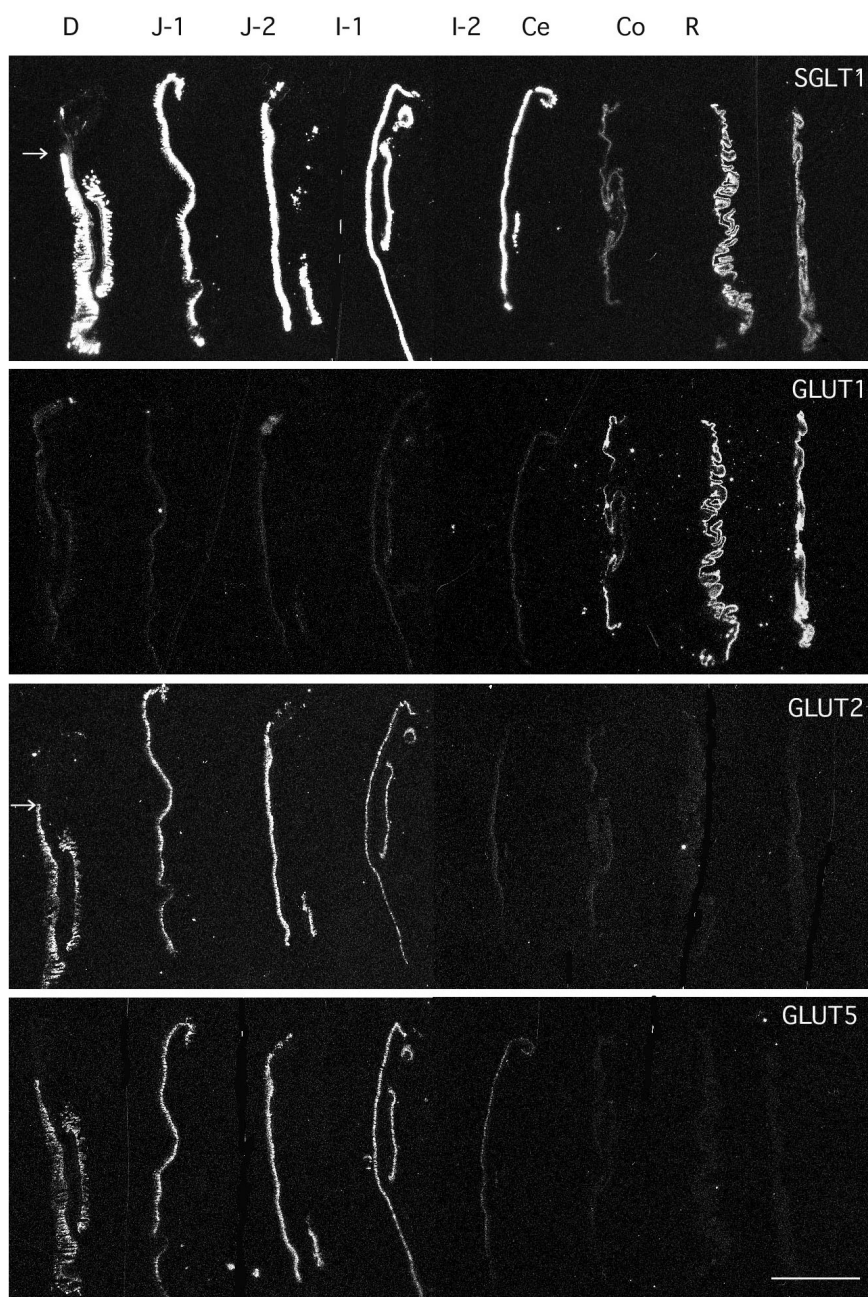


図 2 腸管でのグルコース輸送体の遺伝子発現 (*in situ* hybridization 法)

発現していた。最も強いシグナルは、十二指腸 (D) を除く小腸近位側半分、すなわち空腸 (J-1 と J-2) に認められた。一方、高親和性の SMCT1 の mRNA は下位空腸 (J-2) から大腸にかけて発現しており、小腸前半部では SMCT2 のみが、大腸では SMCT1 のみが発現していることがわかった。

2. グルコース関連輸送体 (図 2)

グルコースおよびフルクトースの輸送体としては、GLUT ファミリーと SGLT ファミリーが消化管には発現している。消化管では、管腔側からの取り込みに関与する SGLT1 が十二指腸から回腸末端部まで連続して強く発現するほかに、大腸でも有意な発現が見られた。免疫組織化学により、SGLT1 は大腸上皮の管腔側の刷子縁に存在することが示された。腸上皮細胞に発現し、血管側への受動的な輸送を担う GLUT2 は、回腸末端部を除いて小腸に局限して発現した。フルクトースの取り込みに関与する GLUT5 も GLUT2 と類似の発現パターンであった。一方、腸粘膜には発現しないとされていた GLUT1 が大腸と胃に発現していた。

3. 脂肪酸関連輸送体

脂肪酸やコレステロール関係では、FATP (fatty acid transporter)-4 と Niemann-Pick type C1-like 1 (NPC1-like 1) が十二指腸から回腸末端部まで強く発現していた。大腸の FATP4 の発現は弱くなるものの直腸を除く大腸でも有意なレベルにあった。NPC1-like 1 の発現は小腸の始まり (D と J1) で発現がやや低かったが、それ以降は小腸全域で強い発現域をもっていた。Scarb (scavenger receptor class B)-1 は十二指腸を中心に発現しており、空腸や回腸での発現は弱かった。Scarb2 および Scarb3 (CD36, FAT) の発現は消化管を通して低かった。

4. その他

胆汁酸関係の輸送体として ASBT (apical sodium-dependent bile acid transporter) と I-BABP (ileal bile acid-binding protein) の発現を調べた。ともに回腸末端部 (I-2) で最も強い発現を示した。ASBT-1 はさらに、大腸でも弱いながら発現が見られた。一方、I-BABP は回腸全域でかなり強く発現していたが、小腸の前半部 (D-J-2) での有意な発現はなかった。

考 察

本研究では、消化管の栄養素がどこで取り込まれるかを明らかにするために、各栄養素に特異的な輸送体の発

現を調べることにした。蛋白レベルでの発現解析には特異抗体が必要であるが、サブタイプが多数存在する輸送体に関しては、すべての抗体が作成 (取得) できるわけではない。そこで、遺伝子レベルの解析をすることにし、*in situ* hybridizaion 法と Q-PCR 法を用いた。現在のところ、両方法の結果はかなりよく相関しており、手技的には問題ないことを確信した。この方法で、消化管におけるすべての栄養素、ミネラル、イオンチャネルなどの発現地図を作成するという方針を立て、今回は短鎖脂肪酸、グルコースおよび脂肪の輸送体を調べた。

短鎖脂肪酸は大腸で産生され、大腸上皮の管腔側に発現する SMCT1 (slc5a8) で吸収される¹⁾。本研究は、SMCT1 のサブタイプである SMCT2 (slc5a12) が小腸における SMCT の主要な発現型であることを強く示唆した。SMCT2 の発現は小腸の刷子縁に特異的であり、Na⁺ の濃度勾配を利用してモノカルボン酸を取り込むことの形態学的裏付けがとれた。空腸での腸内発酵はないことから、SMCT2 は小腸における乳製品中の乳酸や酢酸の吸収に関与しているのであろう。これらは食物とともに大量に小腸に流入するので、ここに低親和性の SMCT2 を配置することは理にかなっている。これまで、小腸内の乳酸 (食事性のもの、乳酸菌が産生したもの) は細菌が利用するだけで、生体の栄養素になり得ないと考えられてきた。SMCT2 の発現はこのことを否定するものである。消化管は、基質親和性と細胞内局在が異なるモノカルボン酸トランスポーター群を発現させることで、効果的な吸収を行っていると考えられる。

グルコースは小腸上皮の管腔側に発現する SGLT1 で取り込まれ、血管側へは GLUT2 を使って輸送される。2つの異なる性質の輸送体による取り込み機構が小腸で構築されていることを今回確認した。しかし、大腸にも SGLT1 と GLUT1 のペアからなる輸送機構が存在することが明らかになった。大腸には栄養素になるべきグルコースは正常状態ではほとんど存在しないと思われるが、わずかに存在するグルコースあるいは下痢などの異常事態で大腸に到達するグルコースの取り込みに、大腸の SGLT1/GLUT1 輸送体が寄与していると思われる。

脂肪酸やコレステロールを吸収する輸送体分子としてさまざまなものが知られているが、今回の発現解析から、FATP4 と NPC1-like 1 が主要な取り込み分子であり、ほかに十二指腸では Scarb1 が関与していることが判明した。FATP4 と NPC1-like 1 は空腸と回腸に主要な発現域をもち、小腸での脂肪酸の取り込みを担うと考えられる。

ただし、まだ検索していない ABCG ファミリーや FATP のその他のサブタイプの関与を否定はできない。

胆汁酸の輸送体は、回腸のとくに末端部に最も強く発現し、胆汁酸の取り込みがここに限局していることを示した。

要 約

本研究では、消化管における栄養素の取り込み機構の全貌を明らかにする目的で、栄養素輸送体の発現様式を遺伝子レベルで検索した。短鎖脂肪酸、グルコース、脂肪・コレステロールの輸送体に関して調べた。その結果、サブタイプの種類が多い輸送体の発現を遺伝子レベルで調べることの有用性・確実性が示され、この手法による

検索範囲を広げることで、近い将来の取り込み機構の発現地図づくりが現実的なものになったといえよう。

謝 辞

本研究の遂行にあたっては、財団法人三島海雲記念財団からの研究助成に負うところが大きい。心から感謝いたしますとともに、貴財団の益々の発展をお祈り申し上げます。

文 献

- 1) K. Takebe, et al. : *Biomed. Res.*, **26**, 213-221, 2005.
- 2) H. Li, et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8412-8417, 2003.