

学位論文題名

The cellular expression of SMCT2 and its comparison
with other transporters for monocarboxylates
in the mouse digestive tract

(マウス消化管における SMCT2 の細胞発現と
他のモノカルボン酸トランスポーターとの比較)

学位論文内容の要旨

【背景】

植物由来の食物繊維は、大腸の細菌叢によって分解され(発酵)、短鎖脂肪酸(SCFAs)に分類される酢酸、プロピオン酸および酪酸を産生する。SCFAs は大腸の粘膜上皮により吸収され、少なくとも大腸粘膜のエネルギー源になる。体全体から見るとそのエネルギー寄与率は低い、飢餓などグルコースを利用できない状況下にあつては、SCFAs の寄与率が増大する可能性がある。

大腸での SCFAs の吸収機構は長い間不明であったが、2003 年に同定された大腸がん抑制遺伝子の産物(slc5a8)は SCFAs, 乳酸, ピルビン酸などのモノカルボン酸に対する Na⁺共役型のトランスポーター(sodium-dependent monocarboxylate transporter; SMCT1)であることがわかった。SMCT1 は大腸粘膜と腎尿細管の刷子縁に特異的に発現する。その後、SMCT1 とアミノ酸レベルで 59% の相同性をもつ slc5a12 (SMCT2) が同定された。SMCT2 は、SMCT1 と比べるとモノカルボン酸に対する基質親和性が低いことが特徴である。SMCT2 は腎臓と小腸に発現しているが、大腸での発現がないことが注目された。しかし、SMCT2 の発現に関する詳細な報告はなく、消化管全体における分布と細胞内局在は不明のままである。

また、腸には SMCT の他に H⁺共輸送性の monocarboxylate transporter (MCT, slc16) が発現している。MCT は上皮細胞の側基底側 basolateral に存在するトランスポーターであり、上皮内に取り込まれたモノカルボン酸の血管側への移動に関与していると考えられる。

そこで本研究では、SMCT2 の消化管での発現様式を mRNA とタンパクレベルで調べ、SMCT1 や MCT ファミリーのそれらと比較した。

【材料と方法】

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麻酔した。*in situ* hybridization 法、Western blot 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灌流固定後に腸管と腎臓を得た。まず消化管における SMCT2 mRNA の発現を調べるために、RI 標識による *in situ* hybridization 法を行なった。ついで他のト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、SMCT1 と SMCT2, MCT1~MCT5 (網膜特異的な MCT3 は除く) の定量 PCR (quantitative-PCR : Q-PCR) を行なった。SMCT2 のタンパクレベルでの解析を行なうにあたり、SMCT2 のアミノ酸残基 567-619 を抗原とし、ウサギとモルモットでポリクローナル抗体を作成した。小腸および腎臓の Western Blot 解析を行ない、抗体の特異性を調べた。次に、消化管組織における SMCT2 のタンパク質発現を通常の免疫組織染色により検討した。また、包埋前金コロイド銀増感法により SMCT2 の細胞内局在を免疫電顕下にて観察した。

【結果】

in situ hybridization 法により、マウスの消化管全長で SMCT1 と SMCT2 の mRNA 発現を比較したところ、SMCT2 は近位空腸から回腸末端にかけて発現していた。最も強いシグナルは、十二指腸を除く小腸近位側半分、すなわち空腸に認められた。一方、SMCT1 の mRNA は下位空腸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。顕微鏡下では、SMCT2 mRNA のシグナルは絨毛上皮に限局し、陰窩では検出されなかった。また、絨毛でのシグナルは、その基部で弱く、中間部で強く、そして絨毛先端部で減弱した。

免疫組織化学による SMCT2 の発現解析を行なうため、マウスの SMCT2 のアミノ酸配列 567-619 を抗原とする抗体を作成した。Western blot による解析では、空腸のサンプルで 68kDa 付近に特異的なバンドが 1 本得られた。このバンドは、mRNA の発現がない十二指腸と結腸では観察されなかったことから、抗体は SMCT2 を特異的に認識していることが示された。この抗体を用いて空腸を免疫染色したところ、絨毛上皮の刷子縁が特異的に免疫活性を示した。絨毛の上半分に強い反応が見られたが、下半分では弱い反応であった。主要なナトリウム依存性グルコース輸送体である SGLT1 と SMCT2 との蛍光二重染色を行ない、二つの輸送体が刷子縁で共発現していることが確認できた。SMCT2 の免疫活性は十二指腸や大腸の刷子縁では観察されなかった。包埋前金コロイド銀増感法による免疫電顕法では、陽性反応が吸収上皮細胞の刷子縁に局在しており、杯細胞、パネート細胞、上皮内リンパ球は免疫活性を示さなかった。

胃から直腸までの 28 部位を採取し Q-PCR を行なった。SMCT1 (*slc5a8*) mRNA の発現は大腸において最大となり、これまでの報告を確認できた。SMCT1 の発現は空腸の遠位 1/3 から直腸に向かって段階的に強くなる傾向にあった。対照的に、SMCT2 の mRNA は十二指腸を除く小腸の近位部で有意に強く発現していたが、大腸では全く発現していなかった。MCT の主要なサブタイプである MCT1 は、消化管全域に発現しているが、大腸で特に強く発現していた。MCT2 と MCT5 の mRNA 発現は腺胃に限局されており、胃の壁細胞が MCT2 の主要な発現部位であるとするこれまでの所見と一致する。MCT4 に関しては、十二指腸にのみ発現し、他の部位での有意な発現は認められなかった。

【考察】

本研究の結果から、SMCT2 は小腸における SMCT の主要な発現型であると考えられる。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。小腸の上皮細胞は SMCT2 とともに SGLT1 と共発現していたことから、同じ機構で異なる基質を取り込むトランスポーターが同一細胞に備わっていることになる。

消化管における SMCT1 と SMCT2 の発現分布には、生物学的また栄養学的な意義がある。SMCT1 と SMCT2 は腎臓にも発現し、糸球体濾過液中の乳酸の再吸収に寄与している。近位尿細管では、基質親和性の低い SMCT2 は糸球体に近い S1 segment に、そして基質親和性の高い SMCT1 が S2 と S3 segments に発現している。この配置は、段階的に濃度が変化する乳酸の吸収に適しているといえる。消化管においては、高親和性の SMCT1 が大腸内の発酵によって産生される SCFAs に対応するが、少なくとも空腸では腸内発酵はないことから、SMCT2 は小腸での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。

今回、SMCT との関係が深いプロトン (H^+) 依存性のトランスポーターである MCT の発現パターンを SMCT のそれと詳細に比較した。MCT は SMCT とは異なり、基本的には細胞の basolateral membrane に発現する。MCT ファミリーには、これまでに 14 のサブタイプが同定されており、そのうち主要なサブタイプである MCT1~MCT5 の発現を Q-PCR 法により解析した。MCT1 は大腸で強い発現が認められるが、小腸でも広く分布していることが確認された。また MCT2 は、腺胃での発現が認められたことから、消化管における MCT は、MCT1 が主要なサブタイプであり、胃では MCT2 が特定の消化活動に関与していることが示された。

【結論】

マウスの消化管における SMCT2 の発現様式を明らかにし、他のモノカルボン酸トランスポーターとの比較を行なった。消化管の SMCT2 は、空腸型のモノカルボン酸トランスポーターであることが示され、食事性の乳酸や酢酸を取り込むことを示す形態学的所見が得られた。一方、高親和性の SMCT1 は大腸を中心に発現し、腸内発酵により生じる短鎖脂肪酸の取り込みを行う。basolateral 型の MCT は、胃に特異的な MCT2 を除いては消化管全域に MCT1 が発現しており、MCT1 が消化管における MCT の主要なサブタイプであることが確認された。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。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 神 谷 温 之
副 査 教 授 岩 永 敏 彦

学 位 論 文 題 名

The cellular expression of SMCT2 and its comparison with other transporters for monocarboxylates in the mouse digestive tract

(マウス消化管における SMCT2の細胞発現と
他のモノカルボン酸トランスポーターとの比較)

植物由来の食物繊維や未消化炭水化物は、大腸の細菌叢によって分解され、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸 (SCFAs) を産生する。そしてこれらを特異的に取り込むトランスポーター、SMCT1が大腸上皮に発現する。SCFAsのからだ全体から見た場合の栄養寄与率はそれほど高くないが、飢餓や糖尿病などグルコースを利用できない状態では、かなり高くなる。SMCT1は、SCFAs以外にも、乳酸、ケトン体をNa⁺とともに輸送するモノカルボン酸トランスポーターであることから、栄養素の吸収以外にも、代謝全体に関与する分子であるといえる。その後、SMCT1と構造類似のSMCT2が同定され、基質親和性がSMCT1よりも低い、輸送する基質は共通であることが示された。しかし、その発現様式や存在意義が不明であることから、申請者は、マウスの消化管でSMCT2の発現を解析し、他の関連トランスポーターとの比較を行った。用いた手法は、*in situ hybridization* 法、リコンビナント抗原による抗体作製とウエスタンブロッティング、光顕・電顕レベルの免疫組織化学、*real-time PCR* 法などであった。消化管から28部位を採取し、*in situ hybridization* 法と *real-time PCR* 法により遺伝子発現を詳細に検討した点が特徴である。その結果、消化管のSMCT2は、空腸型のモノカルボン酸トランスポーターであることが示され、食事性の乳酸や酢酸を取り込むことを示す形態学的所見が得られた。一方、基質高親和性のSMCT1は大腸を中心に発現し、腸内発酵により生じる短鎖脂肪酸の取り込みを行う。SMCTファミリーとペアを組むbasolateral型のMCTは、胃に特異的なMCT2を除いては消化管全域にMCT1が発現しており、MCT1が消化管におけるMCTの主要なサブタイプであることが確認された。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配置させることで、食事性および大腸発酵産物であるモノカルボン酸を栄養素として効果的に吸収していることが示されたといえよう。このように異なる手法を用いて、栄養素の輸送体を多方面から解析する手法は、ほかの栄養素に対しても応用できる好例を示したといえる。

学位論文の公開発表は、平成22年7月22日午後3時より医学部第3講堂において、

20数名の参加者を得て行われた。主査から紹介があった後、申請者はパワーポイントを用いながら約20分に渡って学位論文内容の発表を行った。イントロダクションを十分に言い、聴衆の理解を深める説明をしていたのが印象的であった。その後副査の神谷教授から、①2種類のSMCTの基質親和性は何倍程度異なるのか、②消化管における発現量(蛋白レベル)はどの程度異なるのか、③SMCT1とペアになるMCT1の小腸での発現は大腸と比較するとかなり低い、それでも対応できるのか、④MCTはH⁺とモノカルボン酸を共輸送するが、H⁺はどこに由来し、輸送の駆動力になるのか、などについて質問があった。

次いで主査(渡辺教授)から、①SGLTとの共存関係において、SMCT2の染色性にムラがあったが、意味のある現象なのか、②胃のMCT2の働きはなにか、などについて質問があった。さらに、副査の岩永教授と出席者からもコメントと質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は文献や関連研究の結果を引用し、おおむね良好な回答をした。ただし、周辺領域の調査はまだ不十分であり、完全な(質問者が満足する)回答をしたとは言えなかった。質疑応答の時間は、約10分であった。

この論文は、Na⁺とモノカルボン酸の共輸送を行うSMCT2の消化管での発現を明らかにし、空腸での乳酸や酢酸の吸収を担うことを示唆する基礎データを提出した点で高く評価され、今後のモノカルボン酸代謝の解明に大きく貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。