

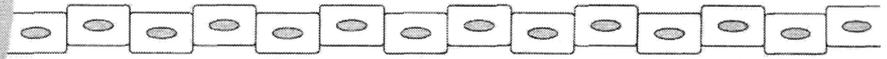
AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

分子消化器病 (2008.09) 5巻3号:280～288.

消化管上皮細胞の機能分子とその解析法
腸細胞の有機カチオントランスポーターとその解析法

藤谷幹浩、高後 裕



腸細胞の有機カチオントランスポーターと その解析法

藤谷幹浩* 高後 裕*

SUMMARY

主な有機カチオントランスポーターには、OCTファミリーとOCTNファミリーがあり、前者はおもに腎臓や肝臓に、後者は腎臓、小腸、骨格筋、脳、肺などに広く分布している。これらトランスポーターの役割は栄養素や薬剤、内因性物質の輸送にあるとされ、消化器疾患とのかかわりはあまり知られていなかった。しかし最近、MDR1やOCTN1/2に炎症性腸疾患高感受性の遺伝子多型が発見され、消化器疾患とトランスポーターとのかかわりが注目されるようになった。われわれは、腸管上皮細胞膜に存在するOCTN2が*B. subtilis*由来ペプチド“competence and sporulation factor (CSF)”を細胞内に輸送すること、それによって細胞防御蛋白であるHspが誘導され、酸化ストレスに対する抵抗性が飛躍的に向上することを見出した。これは、レセプターを介した細菌認識機構とは異なる、新しい宿主-腸内細菌の相互作用機構と考えられる。本稿では、一連の研究で用いた有機カチオントランスポーターの解析法とその輸送物質の同定法について解説した。

Key Words

novel organic cation transporter (OCTN)
プロバイオティクス
B. subtilis
competence and sporulation factor (CSF)
腸管保護作用

はじめに

有機カチオントランスポーターは、各種内因性物質や有機カチオン系薬物などの吸収に携るトランスポーターであり、その多くは細胞膜に発現している。主な有機カチオントランスポーターファミリーとして、organic cation transporter (OCT)ファミリーと novel organic cation transporter (OCTN)ファミリーが同定されており、前者はおもに腎臓や肝臓に発現しているのに対し、後者は腎臓、小腸、骨格筋、脳、肺などに広く分布していることが知られている^{1,2)}。OCTNファミリーには、OCTN1, 2, 3の3つのアイソタイプが同定されており、それぞれ発現部位や主な輸送物質が異なる。われわれはヒトおよびマウス腸管の免疫組織化学的検討から、小腸および大腸上皮細胞膜の管腔側にOCTN1およびOCTN2が発現していることを確認している³⁾。

以前から腸細胞における細胞膜トランスポーターの役割は、各種栄養素や薬剤、内因性物質の輸送にあるとされ、消化器疾患とのかかわりについてはあまり知られていなかった。ところが、疾患特異的遺伝子多型の解析から、multidrug resistance 1 (MDR1)やOCTN1およびOCTN2に炎症性腸疾患高感受性の遺伝子多型の存在が発見されたことを契機に、腸疾患と細胞膜トランスポーターとのかかわりがにわかに注目されるようになった^{4,5)}。これらの報告を受けて、最近、われわれは有機カ

*FUJIIA Mikihiro, KOHGO Yutaka/旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野

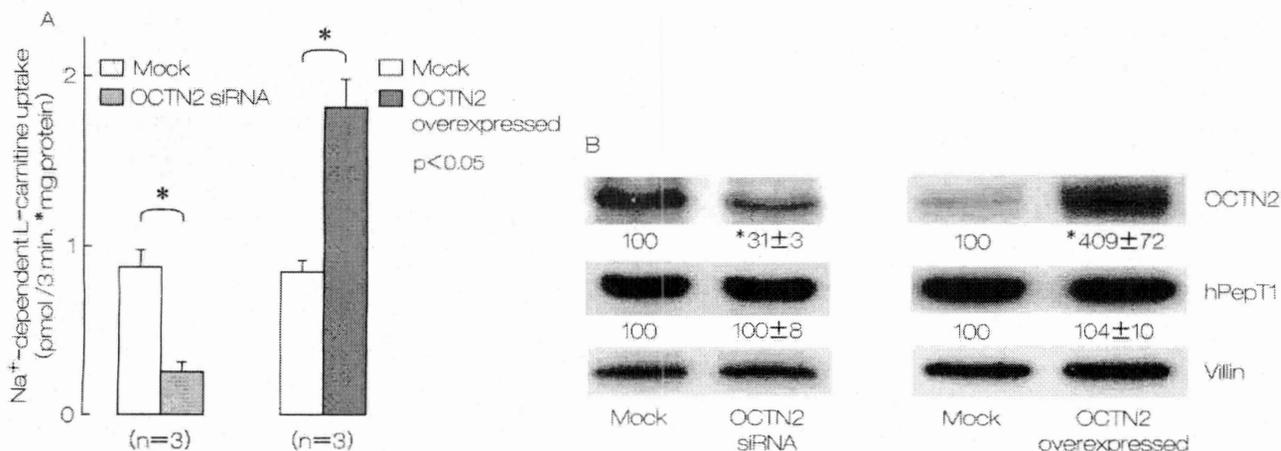


図1 Na⁺依存性 L-カルニチン取り込み試験 (Caco-2/bbe 細胞)

A) L-カルニチンの取り込みは OCTN2 過剰発現細胞にて増強し, OCTN2 siRNA にて減弱する。

B) OCTN2 のウェスタンブロット. OCTN2 過剰発現ベクターおよび siRNA は OCTN2 の蛋白発現を増加あるいは減少させる。

(Fujiya M et al. 2007³⁾より引用)

チオントランスポーターである OCTN2 が *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) 由来ペプチドを細胞内に輸送することで腸内環境を認識し, その結果, 熱ショック蛋白 (Hsp) 27 などの細胞防御蛋白が誘導され, 酸化ストレスに対する抵抗性が飛躍的に向上することを発見した³⁾. すなわち, 細胞膜トランスポーターは腸内環境をモニターする一種のセンサーとしての役割を果たすと推測され, 宿主腸内細菌相互作用の一翼を担うものと考えられる. 本稿では, 腸管上皮細胞膜の有機カチオントランスポーターである OCTN2 を対象としたわれわれの研究成果を通じて, 有機カチオントランスポーターの機能解析法と輸送物質の同定法について解説する。

有機カチオントランスポーターの機能解析の基本 (取り込み試験)

有機カチオントランスポーターは, それぞれが多数の物質の輸送にかかわっており, たがいに共通の物質の輸送もおこなっている. また, H⁺や Na⁺依存性に機能を発揮する場合もあり, 各トランスポーターが周囲環境に応じて複雑な機能連携をもつことが推測される. たとえば, われわれが研究対象として扱った OCTN2 は, Na⁺依存性に L-カルニチンを取り込むトランスポーターであるが, その他に Na⁺非依存性にベラバミルなどの薬剤を吸収するなど, 多彩な機能性を有している。

1) in vitro での解析方法

OCTN2 機能評価法の概略を以下に示す. ³H 標識 L-カルニチンを, Na⁺を含んだバッファ (140 mM NaCl) および含まないバッファとともに一定時間 Caco-2/bbe 細胞に反応させ, 3~4 回洗浄後に細胞を集めシンチレーション液で溶解し, シンチレーションカウンターで³Hの量を測定する. OCTN2 は Na⁺依存性に L-カルニチンを輸送するため, Na⁺存在下での L-カルニチン吸収量から Na⁺非存在下での吸収量を引くことで, Na⁺依存性の L-カルニチン吸収量を算出する. Caco-2/bbe 細胞に OCTN2 の siRNA あるいは過剰発現ベクターを遺伝子導入した結果, Na⁺依存性 L-カルニチン吸収能は低下あるいは増強したことから, 本実験系は OCTN2 の機能を反映すると考えられた (図1).

2) in vivo での解析方法

マウス摘出腸管およびヒト生検組織を用いた in vivo における OCTN2 の機能評価法を示す. 0.5 cm のマウス腸管あるいはヒト生検組織を 0.2 cm 程度の小片に切り分け, 36℃の酸素化した³H 標識 L-カルニチン含有バッファ内で一定時間反応させる. 十分に洗浄後, 組織片を粉碎し, 遠心して上清と蛋白成分を分離する. 上清内の³Hを測定すると同時に, ペレットの蛋白量を測定し, 蛋白 1 mg 中の L-カルニチン吸収量を計算し, 前記

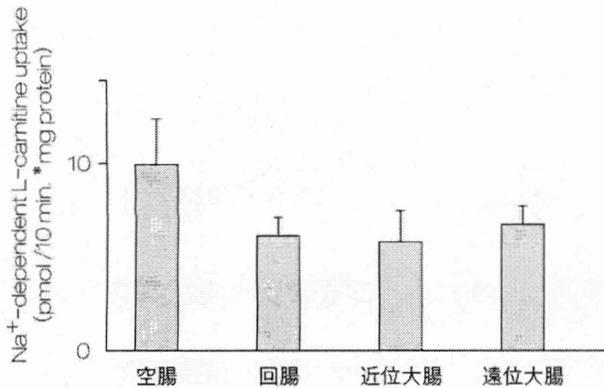


図2 Na⁺依存性 L-カルニチン取り込み試験(マウス腸管)
マウス腸管の全部位で Na⁺ 依存性に L-カルニチンの取り込みが認められる。

1) 同様に Na⁺ 依存性の L-カルニチン吸収量を算出する。
図2にマウス腸管の各部位における Na⁺ 依存性の L-カルニチン吸収量を示した。

有機カチオントランスポーター (OCTN2) で輸送される細菌由来物質は存在するか?

前述したように、OCTN2は炎症性腸疾患に高感受性の遺伝子多型を示すことが知られているが⁵⁾、OCTN2の機能異常と腸管炎症との因果関係についてはまったくわかっていなかった。われわれは、OCTN2がL-カルニチンやベラバミルなどを輸送するだけでなく、何らかの腸内細菌由来物質を腸管上皮細胞内へ輸送し、腸内環境の変化を伝えることで腸管の恒常性に関与していると推測した。

1) 腸内細菌培養上清による L-カルニチン取り込み阻害実験

³H 標識 L-カルニチン取り込み試験の際、バッファ中に OCTN2 によって輸送されるものが存在すると、L-カルニチン吸収が拮抗阻害される(図3)。そこで、腸内細菌を一定時間培養後、0.22μm のフィルターで菌体成分を取り除いて培養上清を作製し、この培養上清を取り込み試験のバッファに加え、Caco-2/bbe 細胞における Na⁺ 依存性の L-カルニチン吸収量の変化を調べた(図4)。その結果、*B. subtilis* (納豆菌が属する)、*Bifidobacterium breve* (ビフィズス菌)、*Lactobacillus GG* (ヨーグルト菌)、*Enterococcus faecalis* などのグラム陽性菌の

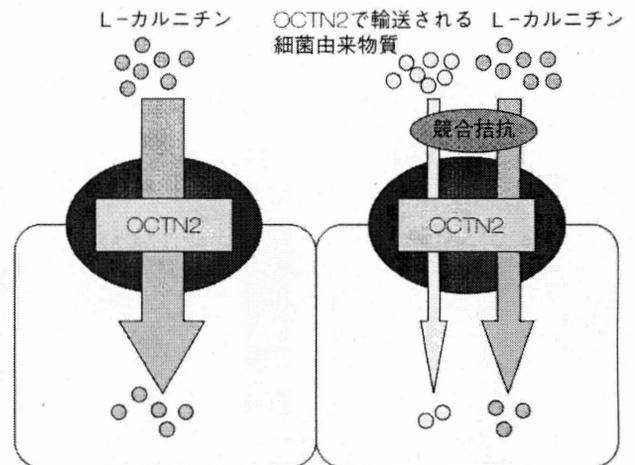


図3 L-カルニチン取り込みに対する拮抗阻害
L-カルニチンは OCTN2 に親和性の高い物質であるが、他の OCTN2 高親和性物質が存在する場合は、競合拮抗により取り込みが減少する。すなわち、L-カルニチンの取り込みを阻害する物質は OCTN2 によって輸送される可能性が高いといえる。

培養上清により、L-カルニチンの取り込みは有意に減少した。とくに、前三者はプロバイオティクスとよばれ、宿主の腸管恒常性の維持に有益とされる菌群である。したがって、OCTN2はおもにプロバイオティクスの由来成分を輸送し、その作用を仲介している可能性が示唆された。一方、*Escherichia coli* Nissle (大腸菌)、*Enterobacter aerogenes* (エンテロバクター)、*Proteus mirabilis* (プロテウス菌) などのグラム陰性菌では L-カルニチンの取り込み阻害は認められなかった。

2) ³⁵S 標識した細菌由来ペプチドの取り込み実験

本研究では、プロバイオティクス的一种である *B. subtilis* を対象として実験を進めた。³⁵S 標識メチオニンを含有した培養液を用いて *B. subtilis* を培養し、1) と同様に培養上清を作製した。これを、OCTN2 の過剰発現ベクターあるいは siRNA を導入した Caco-2/bbe 細胞に反応させ、細胞内の³⁵S量を測定し、細菌産生ペプチドの取り込みを調べた(図5)。

OCTN2 過剰発現細胞では標識ペプチドの取り込みが上昇し(図5A)、siRNA を導入した細胞では減少していた(図5B)。すなわち、何らかの細菌由来ペプチドが OCTN2 を介して腸管上皮細胞内に取り込まれることが示唆された。また、siRNA 導入細胞ではコントロールと

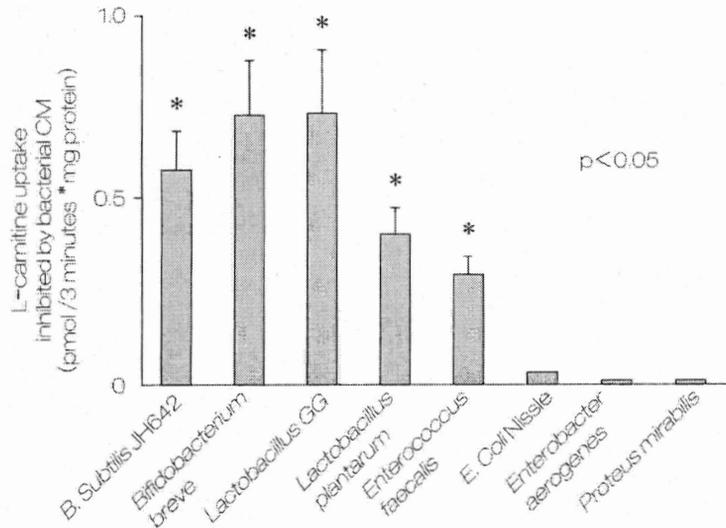


図4 腸内細菌の培養上清によるL-カルニチンの取り込み阻害
B. subtilis, *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus GG*, *Enterococcus faecalis* の培養上清は、L-カルニチンの取り込みを阻害した。一方、*Escherichia coli* Nissle, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* ではL-カルニチンの取り込み阻害は認められなかった。
 (Fujiya M et al. 2007³⁰ より引用)

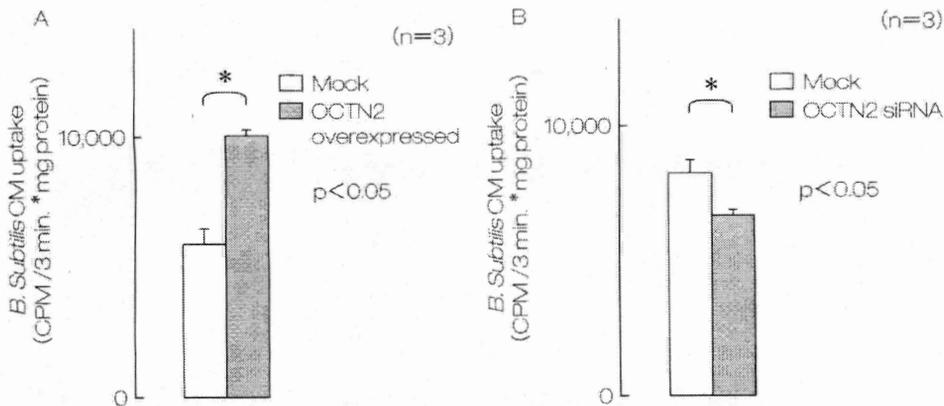


図5 ³⁵S 標識した *B. subtilis* 培養上清の取り込み試験
B. subtilis を対象として、³⁵S 標識メチオニンを用いて細菌が産生するペプチドや蛋白を標識し、培養上清を作製した。これを、OCTN2 の過剰発現ベクターあるいは siRNA を導入した Caco-2/bbe 細胞に反応させ、細胞内の³⁵S 量を測定した。
 A) OCTN2 過剰発現細胞では標識ペプチドの取り込みが上昇した。
 B) siRNA を導入した細胞では標識ペプチドの取り込みが減少していた。すなわち、何らかの細菌由来ペプチドが OCTN2 を介して上皮細胞内に取り込まれることが示唆された。

比較して劇的な取り込み低下は認めなかったが、これは、OCTN2 以外にも細菌由来ペプチドの輸送に関与するトランスポーターの存在を示すもので興味深い。

腸管上皮細胞の保護活性をもつ *B. subtilis* 由来活性物質の同定

プロバイオティクスには、宿主に対して有益な生理作用があることが知られているが、その作用機構について

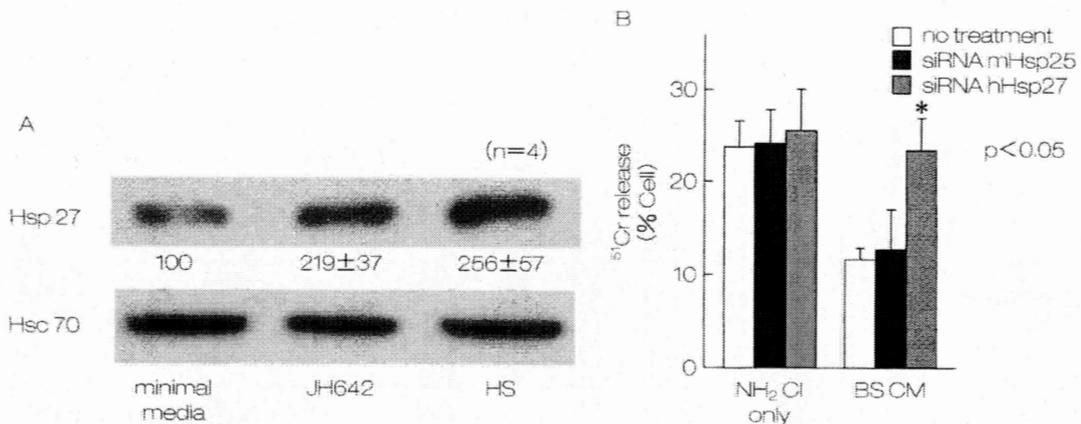


図6 *B. subtilis* の培養上清に含まれる活性物質による熱ショック蛋白の誘導作用および酸化ストレスからの腸管保護作用

A) 熱ショック蛋白のウエスタンブロット. *B. subtilis* (JH642, wild-type) の培養上清に分泌された活性物質が Hsp27 を誘導した. Hsc70 はローディングコントロール.

B) ⁵¹Cr リリースアッセイによる細胞傷害の評価. *B. subtilis* の培養上清に含まれる活性物質は, 酸化ストレスによる ⁵¹Cr の漏出を減少させた. マウスの Hsp25 の siRNA (siRNA mHsp25) はこの作用に変化を及ぼさないが, ヒトの Hsp27 の siRNA (siRNA hHsp27) は細胞保護作用を減弱させたことから, この作用は Hsp27 の発現を介して発揮されることが示唆された.

(Fujiya M *et al.* 2007³⁾より引用)

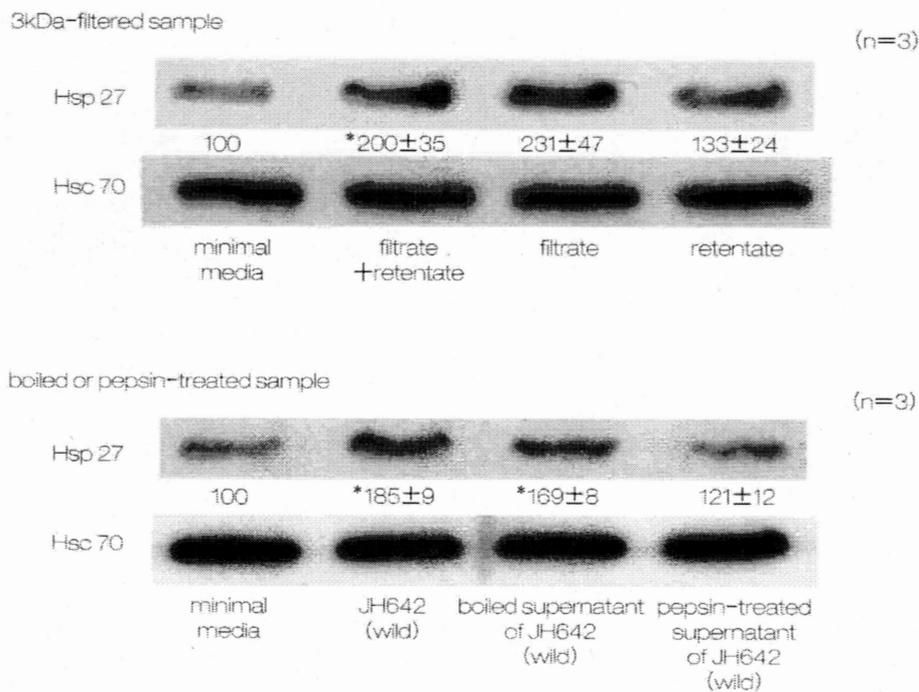


図7 *B. subtilis* 培養上清の分子量フィルター処理, 熱処理, 酸処理による熱ショック蛋白誘導能の変化

培養上清を 3 kDa の分子量フィルターで分離した結果, Hsp27 の誘導能に変化はなかった (上段). 100℃ の熱処理後も Hsp27 の誘導能に変化はなかったが, ペプシン処理後は作用が減弱した (下段).

(Fujiya M *et al.* 2007³⁾より引用)

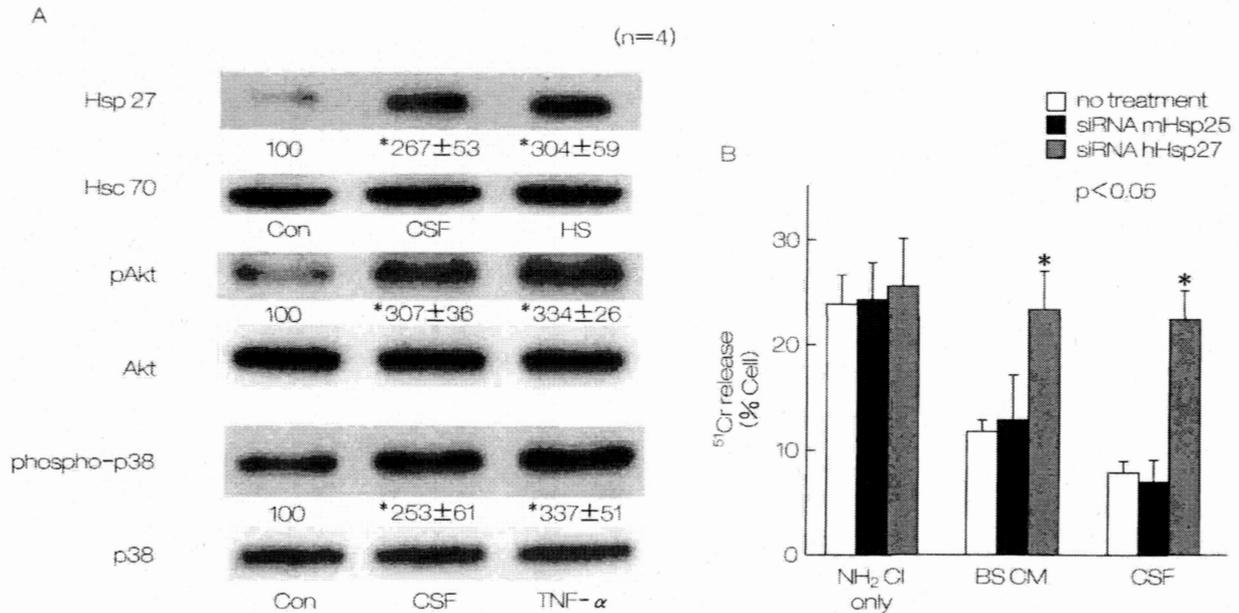


図3 B. subtilis 由来ペプチド CSF による Hsp27 誘導および細胞保護作用

- A) 熱ショック蛋白のウエスタンブロット。100 nM の CSF は Caco-2/bbe 細胞に Hsp27 を誘導した。
 B) ⁵¹Cr リリースアッセイによる細胞傷害の評価。CSF は、酸化ストレスによる ⁵¹Cr の漏出を減少させた。マウスの Hsp25 の siRNA (siRNA mHsp25) はこの作用に変化を及ぼさないが、ヒトの Hsp27 の siRNA (siRNA hHsp27) は細胞保護作用を減弱させたことから、この作用は Hsp27 の発現を介して発揮されることが示唆された。

(Fujiya M et al, 2007³⁾より引用)

は不明な点が多い⁶⁾。われわれは、*B. subtilis* の培養上清が Caco-2/bbe 細胞に対して細胞保護蛋白である Hsp 27 を誘導し、さらに酸化ストレスに対する細胞防御能を高めることを ⁵¹Cr リリースアッセイで明らかにした (図 6)。

さらに、培養上清を分子量フィルターで分離し Hsp 27 誘導能を検討した結果、上清中の活性物質は 3kDa の比較的 low molecular weight であることがわかった。また、この活性物質は 100℃ の高温に耐性であるが、ペプシンによって作用が減弱した (図 7)。

以上の結果をふまえ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて *B. subtilis* の培養上清を分離・精製し、Hsp 27 誘導能を目安にスクリーニングをくり返した後、質量分析器により活性物質のアミノ酸配列の候補を得た。さらに、*B. subtilis* のゲノム情報をもとに、活性物質である competence and sporulation factor (CSF) を同定した。これは、quorum sensing molecules という細菌間の情報伝達に関与する分子群の一種であり、そのアミ

ノ酸配列は ERGMT であった³⁾。

この *B. subtilis* 由来の活性物質である CSF の作用を検証するため、化学的に合成した CSF を Caco-2/bbe 細胞に反応させ Hsp 27 誘導能を検討した結果、100 μM の濃度で強い誘導を認め、酸化ストレスに対する細胞保護作用を発揮した。さらに Akt や p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MARK) 経路を活性化した。すなわち、CSF が *B. subtilis* 由来の細胞保護活性物質であることが証明された (図 3)。一方、CSF のアミノ酸配列を組み替えたペプチド (EMTRG) では細胞保護作用はほとんどなく、CSF の配列に特異的な作用であることが確認された³⁾。

OCTN2 による CSF の細胞内輸送

CSF が OCTN2 によって輸送されるか否か明らかにする目的で、¹⁴C 標識 CSF を作製し、OCTN2 過剰発現ベクターあるいは siRNA を導入した Caco-2/bbe 細胞に添加し、取り込み試験をおこなった。その結果、

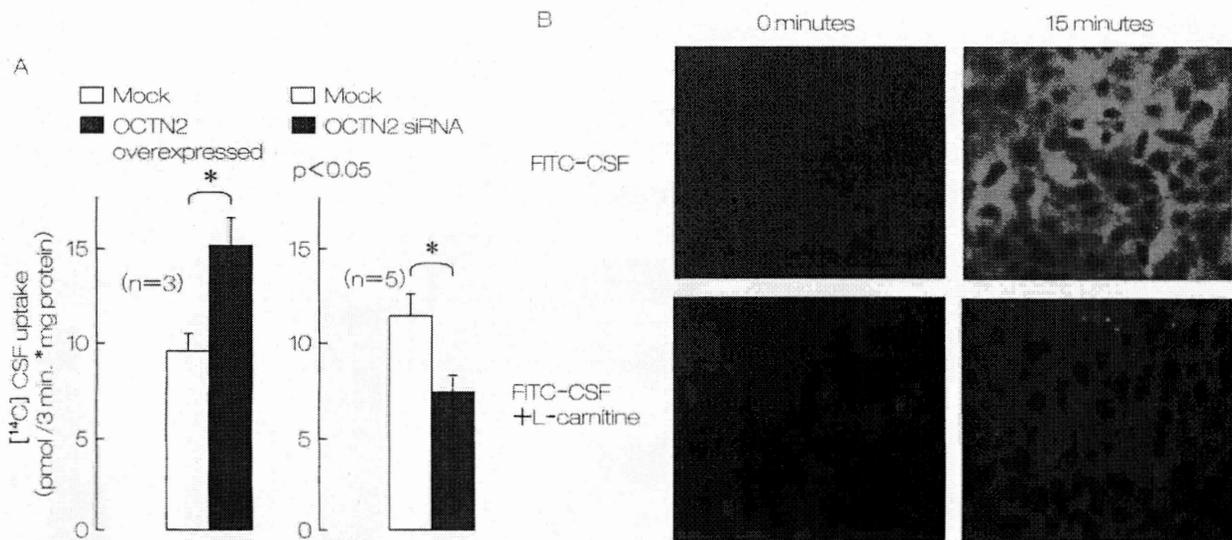


図9 OCTN2によるCSFの細胞内への取り込み

A) ¹⁴C 標識 CSF の取り込み試験. OCTN2 過剰発現細胞では¹⁴C 標識 CSF の取り込みが増加し, OCTN2 の siRNA で減少した.

B) FITC 標識 CSF の取り込み試験. FITC 標識 CSF を 15 分間 Caco-2/bbe 細胞に反応させ, 蛍光顕微鏡で観察した. Caco-2/bbe 細胞内への取り込みがみられ, これは OCTN2 に親和性の高い L-カルニチンの添加により著明に抑制された. 以上から, CSF は OCTN2 を介して腸管上皮細胞に取り込まれることが示唆された.

(Fujiya M et al. 2007²¹より引用)

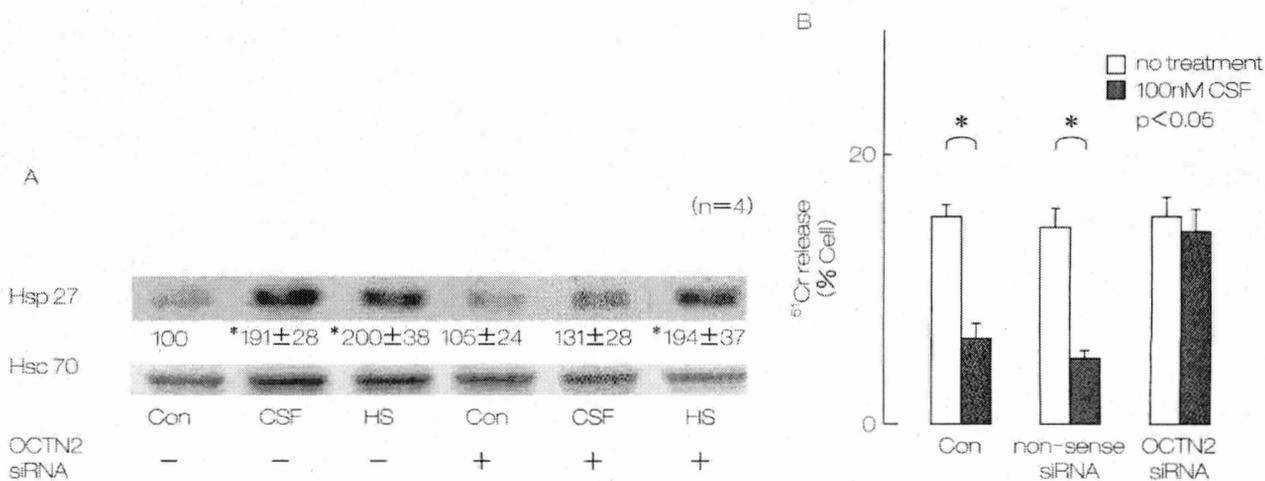


図10 CSFの生理活性におけるOCTN2の関与 (in vitro)

A) 熱ショック蛋白のウェスタンブロット. 100 nM の CSF は Caco-2/bbe 細胞に Hsp 27 を誘導し, その作用は OCTN2 の siRNA によって抑制された.

B) ⁵¹Cr リリースアッセイによる細胞傷害の評価. CSF は, 酸化ストレスによる⁵¹Cr の漏出を減少させた. この作用は OCTN2 の siRNA によって抑制された. したがって, CSF の生理作用は OCTN2 を介して発揮されることが示唆された.

(Fujiya M et al. 2007²¹より引用)

OCTN2 過剰発現細胞では¹⁴C 標識 CSF の取り込みが増加し, OCTN2 の siRNA で減少した (図9A). また, フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識 CSF を Caco-2/bbe 細胞に反応させたところ, 15 分後に Caco-

2/bbe 細胞内への取り込みがみられ, これは過剰量の L-カルニチン添加により抑制された. 以上から, *B. subtilis* の細胞保護活性物質である CSF は, OCTN2 を介して取り込まれることが示された (図9B).

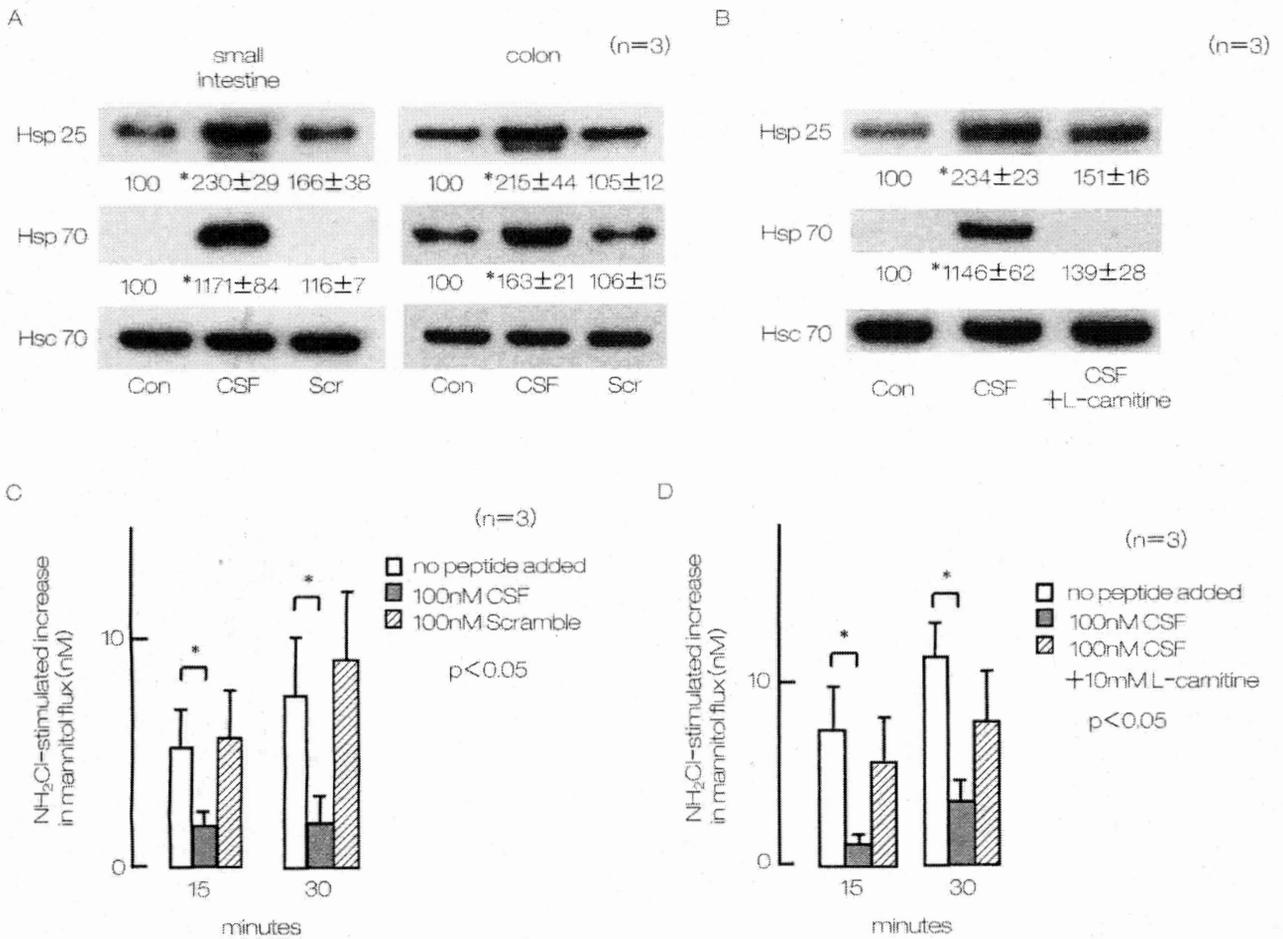


図10 CSFの生理活性におけるOCTN2の関与 (in vivo)

A) B) 熱ショック蛋白のウエスタンブロット、100 nMのCSFはマウス腸管にHsp 25および70を誘導した。この作用は過剰量のL-カルニチンによって阻害された。
 C) D) Mannitol fluxによる細胞傷害の評価。CSFは、酸化ストレスによる³H標識マンニトールの腸管外漏出を減少させた。この作用は過剰量のL-カルニチンによって抑制された。したがって、CSFの腸管組織に対する保護作用はOCTN2を介して発揮されることが示唆された。

(Fujiya M et al, 2007²⁰)より引用)

CSFの腸管保護活性はOCTN2を介して発揮される

CSFの腸管保護作用は、OCTN2による細胞内輸送を介しているか否か明らかにする目的で、OCTN2のsiRNAを導入したCaco-2/bbe細胞を用いてウエスタンブロットおよび⁵¹Cr リリースアッセイをおこなった。その結果、OCTN2のsiRNAはCSFのHsp 27誘導を減弱し、酸化ストレスからの細胞保護作用を打ち消した(図10)。

さらに、in vitroの系としてC57BL/6マウスの摘出腸管を用いて、CSFの生理作用を検討した。まず、マウス

小腸を摘出して約6cmの長さに切り、培養液に溶解したCSFを管腔内に注入した後、両側を結紮して2時間37°Cの培養液中に静置した。その後、腸管粘膜から蛋白を抽出してHspの発現を調べた(ウエスタンブロット)。また同様の前処理後に、腸管内に³H標識マンニトールを注入しモノクロラミンによる酸化ストレスを加えて、腸管外に漏出した³H標識マンニトールを経時的に測定し、腸管上皮の傷害程度を評価した(mannitol flux)。その結果、in vitroの実験と同様にCSFはマウス腸管にもHspを誘導し、酸化ストレスから腸管傷害を著しく軽減した。また、この生理作用は過剰のL-カルニチン投与でほぼ打ち消されたことから、L-カルニチントランス

ポーターである OCTN2 が CSF の作用機構に関係していることが示唆された (図⑩)。

以上の一連の実験から、OCTN2 は *B. subtilis* 由来ペプチドである CSF を腸管上皮細胞に取り込むことで、上皮細胞内に細胞防御蛋白である Hsp を誘導し、細胞防御能を高めるということが明らかになった。これは、細胞膜トランスポーターが細菌由来ペプチドを取り込むことで、腸管上皮細胞が腸管環境を認識し細胞態度を変化させるという、新しい宿主-腸内細菌の相互作用機構の存在を示すものである。

おわりに



本稿では、われわれの研究を通じて有機カチオントランスポーターの解析法と輸送物質の同定法について解説した。腸細胞における有機カチオントランスポーターの役割は、栄養素や内因性物質、薬剤の吸収が主なものとされ、疾患との関連性に関してはほとんど明らかになっていなかったが、本研究結果から、腸内細菌との相互作用に重要な位置を占めることが示された。しかし、細胞膜トランスポーターと腸内細菌、さらには腸管ホメオスターシスや消化管疾患との関係についての研究はまだはじまったばかりである。今後、さまざまな細胞膜トラン

スポーター、種々の腸内細菌をターゲットとした研究により、細菌由来物質の輸送を介した宿主-腸内細菌の相互作用機構の全容が明らかになっていくと期待される。



文 献

- 1) Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J *et al* : Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett* **419** : 107-111, 1997
- 2) Nezu J, Tamai I, Oku A *et al* : Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet* **21** : 91-94, 1999
- 3) Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y *et al* : The *Bacillus subtilis* quorum sensing molecule, CSF, contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* **1** : 299-308, 2007
- 4) Schwab M, Schaeffeler E, Marx C *et al* : Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* **124** : 26-33, 2003
- 5) Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA *et al* : Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* **36** : 471-475, 2004
- 6) Macdonald TT, Monteleone G : Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* **307** : 1920-1925, 2007