

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15547

研究課題名(和文)小腸上皮形成におけるRab6の機能解析

研究課題名(英文)The role of Rab6 in epithelial organization of the small intestine

研究代表者

森脇 健太 (Moriwaki, Kenta)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70778068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小腸は食事由来の栄養素を吸収する臓器である。また、腸内に侵入してきた病原菌に対する生体防御バリアーとしても働いている。これらの働きが悪くなると、栄養失調、慢性炎症、癌などを引き起こす。そのため小腸組織の構造・機能がどのようにして維持されているかを理解することは重要な課題となっている。本研究で対象にしているRab6は、細胞内でのタンパク質や脂質などの物質の輸送に関わる分子である。マウス小腸でこの分子を欠損させると、腸内での出血が見られ、マウスは生後数日で死亡した。このことからRab6が小腸の構造・機能の維持に必須の分子であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rab6を欠損させたマウスの小腸では組織傷害・炎症・脂質の異常蓄積が見られた。このことから、このことからRab6が小腸の構造・機能の維持に必須であること、また脂質の正常な吸収・代謝に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Intestinal epithelial cells (IECs) are responsible for digestion and absorption of dietary substrates. They also function as a first line of host defense against commensal and pathogenic luminal bacteria. Disruption of the epithelial layer causes malnutrition and enteritis. Rab6 is the highly conserved Rab protein that regulates anterograde and retrograde membrane trafficking at the level of the Golgi apparatus by interacting with various effector proteins. Here we generated mice with an IEC-specific deletion of Rab6a, a Rab6 isoform expressing in the intestine. Strikingly, all the mice were died by postnatal day 4 due to severe intestinal tissue damage. Severe inflammation and cell death were observed in the intestine of the knockout mice. Moreover, triglyceride was massively accumulated. These results indicate a crucial role of Rab6a in tissue integrity and lipid metabolism in the intestine.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小腸 上皮細胞 Rab

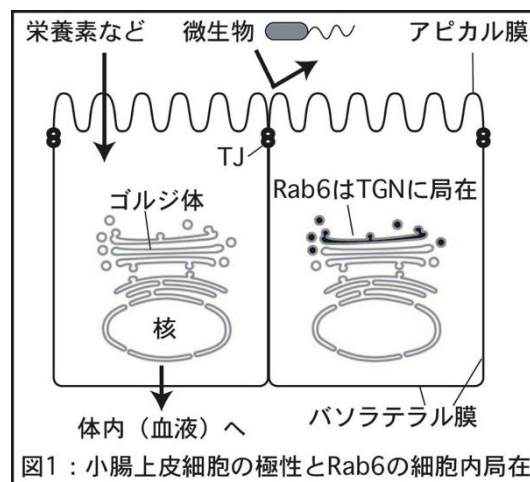
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小腸は栄養素等の吸収を担う臓器である。また、その管腔内部に存在する無数の腸内細菌と共存し、且つ常に外界に晒され、病原微生物・ウイルスの侵入に対しての最前線の生体防御組織となっている(図1)。上皮細胞の細胞膜は、内腔に面するアピカル膜、その逆側のバソラテラル膜という、機能・組成の異なる領域に分けられる。このような細胞内での方向性を極性と呼び、その方向性に沿った選択的輸送のことを極性輸送という。この小腸上皮の形成に異常が起きると、吸収障害による栄養失調や、腸内細菌に対する過剰な免疫反応による炎症・組織傷害が引き起こされる。

Rabは、細胞内小胞輸送を司る低分子量Gタンパク質である。申請者の所属研究室では、Rab8とRab11aのKOマウスを作成し、それぞれの分子が小腸上皮細胞内でのアピカル膜への極性輸送を制御することにより、小腸上皮の形成・維持や機能に深く関与していることを明らかとしてきた(Nature, 2007, 448:366-369, Biol Open, 2014, 4, 86-94)。しかし、極性輸送の分子機構及びその小腸上皮の形成と機能における役割には未だ不明な点が多い。

Rab6は、Rab8とRab11と同じく、酵母まで高度に保存されたRabタンパク質の一種である。これまでの酵母もしくは培養細胞を用いた研究により、トランスゴルジ網に局在し、ゴルジ体を中心とした細胞内小胞輸送を制御していることが分かっている(図1)。しかし、Rab6が個体内の各組織でどのような機能を持っているのかは未だ不明であった。



そこで、申請者らは独自に、小腸組織に発現している唯一のアイソフォームである Rab6a を Villin-Cre マウスを用いて小腸特異的にノックアウトした。この Rab6a 小腸特異的ノックアウトマウスは、メンデルの法則に則り生まれ、生後直後の体格差は認められないが、その後成長することなく、且つ4日以内に全てのマウスが死亡した(図2A)。生後2日目の Rab6a 小腸特異的ノックアウトマウスの腸は、コントロールマウスに比べ短く、腸管内出血が確認された(図2B)。HE染色の結果、Rab6a 小腸特異的ノックアウトマウスの小腸では、上皮細胞が整列しておらず、単層上皮が正常に形成されていないことが分かった(図2c)。これらの表現系は、生後数週間生存する Rab8 もしくは Rab11a の小腸特異的ノックアウトマウスよりも明らかに激しく、小腸上皮細胞に発現する Rab6a が、小腸上皮の形成、ひいては個体の生存に必須であることを示していた。

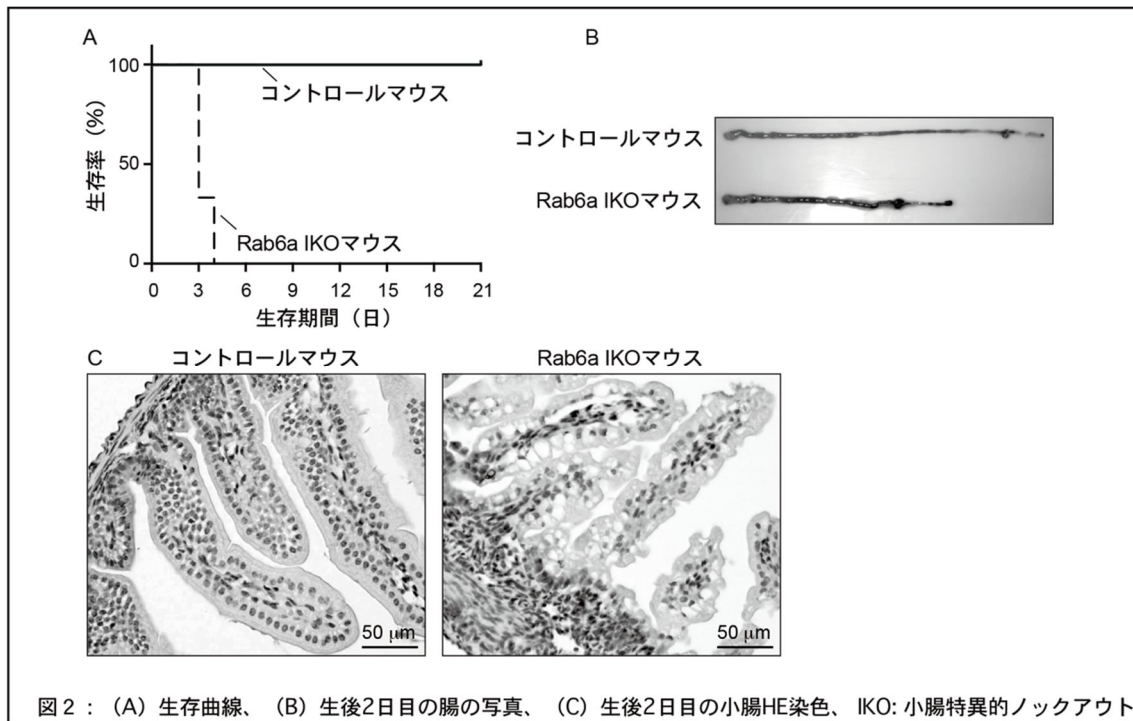


図2：(A) 生存曲線、(B) 生後2日目の腸の写真、(C) 生後2日目の小腸HE染色、IKO: 小腸特異的ノックアウト

2. 研究の目的

Rab6a がどのようにして小腸上皮の形成を制御し、個体の生存に寄与しているかを明らかにすること。

3. 研究の方法

- (1) 組織染色、免疫染色、電子顕微鏡解析などの種々の形態学的解析を行い、小腸組織形成におけるRab6a欠損の影響を明らかにする。
- (2) 生前のマウス胎児を帝王切開により回収し、その腸を(1)と同様に形態学的に詳細に解析する。
- (3) アピカルまたバソラテラル膜タンパク質の細胞内分布を免疫組織染色にて調べ、Rab6a欠損が極性輸送に与える影響を明らかにする。また、Rab6a欠損により細胞内オルガネラの分布、サイズなどに異常が見られないかを検討する。
- (4) Rab6aがどのようにして小腸組織形成を制御しているのかを生化学的、分子生物学的に解析する。

4. 研究成果

生後2日目のRab6a小腸特異的ノックアウトマウスの小腸の粘膜固有層では多数の免疫細胞浸潤が確認された。フローサイトメーターにて解析したところ、好中球の浸潤が亢進していることが分かった。また、Rab6a小腸特異的ノックアウトマウスの小腸でインターロイキン6やインターロイキン1 といった炎症性サイトカインの産生が亢進していることが分かった。炎症と細胞死には深い関係性があることから、死細胞を検出するTerminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)染色にてRab6a小腸特異的ノックアウトマウスの小腸を調べたところ、コントロールマウスに比べて細胞死が多く起きていることも明らかとなった。さらに、生後のRab6a小腸特異的ノックアウトマウスの小腸では脂質、特に中性脂肪が過剰に蓄積していることが分かった。一方で、小腸上皮での極性輸送、タイトジャンクション形成には大きな異常は認められなかった。興味深いことに組織形成異常、炎症、細胞死、脂質の蓄積といっ

た生後のRab6a小腸特異的ノックアウトマウスで見られたフェノタイプは、産まれる直前の胎児の小腸では確認されないことが明らかとなった。このことから、母乳由来の影響があることを考え、帝王切開で回収したノックアウトマウス胎児に里親の母乳を与えたところ、組織形成異常、炎症、細胞死、脂質の蓄積が観察された。一方で、母乳を与えなかったノックアウトマウス胎児ではやはりこれらのフェノタイプは観察されなかった。これらのことからRab6aがマウス小腸で母乳由来の脂質代謝を制御し、且つ個体の生存に必須であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Teoh JJ, Iwano T, Kunii M, Atik N, Avriyanti E, Yoshimura SI, Moriwaki K, Harada A., BIG1 is required for the survival of deep layer neurons, neuronal polarity, and the formation of axonal tracts between the thalamus and neocortex in developing brain. PLoS One. 2017;12(4):e0175888. doi: 10.1371/journal.pone.0175888. 査読有り

〔学会発表〕(計 3件)

Ayano Iwaki, Tomoaki Sobajima, Kenta Moriwaki, Manabu Taniguchi, Eiji Miyoshi, Akihiro Harada, Rab6a is crucial for tissue integrity and lipid metabolism in the intestine. 第91回日本生化学会大会、2018年

森脇健太、岩城彩乃、傍島智明、三善英知、原田彰宏、小腸上皮の形成・維持における Rab6a の役割について、第123回日本解剖学会総会・全国学術総会、2018年

岩城彩乃、傍島智明、森脇健太、三善英知、原田彰宏、小腸上皮細胞における Rab6a は小腸上皮の形成と個体の生存に必須である、第64回日本生化学会近畿支部例会、2017年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。