

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460286

研究課題名(和文)小腸上皮機能構築におけるPKRの分子形態学的解析

研究課題名(英文)Molecular and morphological analysis of PKR on functional organization in small intestinal epithelium

研究代表者

森本 景之(Morimoto, Hiroyuki)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：30335806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：PKRは直接的抗ウイルス作用の他、gelsolinとの結合を介して細胞膜の安定性を高め、ウイルス等の侵入を防御する。本申請はPKRの正常な細胞膜構造維持への関与を明らかにする目的で、発達した微絨毛を持つ小腸吸収上皮細胞に着目し、分子形態学的解析を行った。その結果、PKRとgelsolinが細胞質で結合していること、両者は広範囲の小腸上皮に発現し、絨毛と陰窩で発現量に差があることを明らかとした。また、PKRノックアウトマウスで絨毛の形態およびvillinの発現に差が見られ、PKRが絨毛形成に重要であることが示された。さらに、変異PKR導入用ウイルス作製と小腸器官培養系の樹立を行った。

研究成果の概要(英文)：We showed that PKR inhibited the key actin-modifying protein gelsolin which regulate actin dynamics and control its functions. Through this mechanism, PKR counteracted viral entry into the cell. The epithelial cells of small intestine extend microvilli which are closely related to function. Actin filaments play important role in the microvilli, however, the regulation by PKR is not revealed. In this study, we examined an association of PKR and actin-related proteins, and effects of PKR mutation on intestinal epithelium. We morphologically found that PKR and gelsolin bind in cytosol using BiFC method. Both PKR and gelsolin were widely expressed in the intestinal epithelial cells. The expression level differed between the cells from villi and crypt. In the PKR-knockout mice, the shape of villi and expression of villin protein differed from normal mice. These data showed a possibility of important role of PKR on villi and microvilli maintenance.

研究分野：組織学

キーワード：PKR gelsolin actin villin BiFC法 小腸吸収上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫関連因子 PKR (double-stranded RNA dependent protein kinases) は actin を分解する gelsolin との結合を介し、細胞膜の安定性を高め、ウイルス等の侵入に対する防御に参与することが明らかとなった。

2. 研究の目的

本申請は、PKR と actin 結合タンパク質による細胞膜の機能調節解明を目的とし、特に、機能的な細胞膜構造である微絨毛を持つ小腸吸収上皮細胞に着目し、分子形態学および超微形態学的解析を行う。

具体的には、1. 小腸吸収上皮細胞における PKR と actin 結合タンパク質との相互作用、2. PKR 変異に伴う小腸吸収上皮細胞の機能への影響、3. 器官培養小腸を用いた PKR の変異による微絨毛への影響、の3点について解析を行う。

3. 研究の方法

(1)小腸吸収上皮細胞における PKR および gelsolin, actin, villin の相互作用の検討

BiFC 法を用いたタンパク質相互作用の検討

PKR および gelsolin, villin, actin 細胞内局在の超微形態学的解析

(2)PKR 変異細胞を用いた小腸吸収上皮細胞の機能変化

PKR 変異細胞を用いた小腸吸収上皮細胞の機能変化

(3)PKR 遺伝子変異が小腸吸収上皮細胞の形態に及ぼす影響

PKR 変異細胞、PKR 変異培養小腸の形態的变化の検討

PKR ノックアウトマウス小腸の形態学的解析

4. 研究成果

(1)小腸吸収上皮細胞における PKR および gelsolin, actin, villin の相互作用の検討

BiFC 法を用いたタンパク質相互作用の検討

マウス小腸組織における PKR および gelsolin, villin の相互作用を検討する目的で、BiFC 法を用いたタンパク質相互作用の検出系を樹立した。

PKR および gelsolin, villin, actin 細胞内局在の超微形態学的解析

免疫組織化学および *in-situ* hybridization を行い、各タンパク質と mRNA の組織上の局在について検討した。

(2)PKR 変異細胞を用いた小腸吸収上皮細胞の機能変化

PKR 変異細胞を用いた小腸吸収上皮細胞の機能変化

PKR の変異による小腸吸収上皮細胞の変

化を解析するための小腸器官培養系の樹立を行った。得られた培養小腸は形態のみならず、機能的にも生体における小腸と同様の特徴を現しており、*in vitro* において小腸上皮を再現できる系であることが分かった。

培養小腸において、PKR および gelsolin, villin の局在について、免疫組織化学的に検討した。

(3)PKR 遺伝子変異が小腸吸収上皮細胞の形態に及ぼす影響

PKR 変異細胞、PKR 変異培養小腸の形態的变化の検討

細胞及び培養小腸に変異 PKR を導入するためのウイルス作製を行った。

PKR ノックアウトマウス小腸の形態学的解析

変異 PKR 遺伝子導入マウスの腸管組織を入手し、PKR と gelsolin, villin の局在および微絨毛の形成について、免疫組織化学的に検討した。

これらの結果の一部は日本解剖学会、日本臨床分子形態学会、日本解剖学会九州支部学術集会、日本顕微鏡学会九州支部学術講演会において報告を行った。PKR とその結合タンパク質が小腸上皮において果たす役割の検討を重ねており、微絨毛形成と PKR が関連する可能性を示す結果を得ている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件)

Teramachi J, Inagaki Y, Shinohara H, Okamura H, Yang D, Ochiai K, Baba R, Morimoto H, Nagata T, Haneji T:

PKR regulates LPS-induced osteoclast formation and bone destruction *in vitro* and *in vivo*. *Oral Dis.* 査読有 23(2):181-188 (2017)
doi: 10.1111/odi.12592.

Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, Teramachi J, Ochiai K, Haneji T, Yamamoto A:

Role of protein phosphatase 2A in osteoblast differentiation and function. *J Clin Med.* 査読有 6(3): 23(2017)
doi: 10.3390/jcm6030023.

Ishimatsu N, Miyamoto T, Ueno H, Hasegawa E, Kuma A, Fujimoto Y, Bando K, Nakamata J, Furuno Y, Serino R, Baba R, Morimoto H, Doi Y, Tamura M, Otsuji Y: High glucose concentration-induced expression of pentraxin-3 in a rat model of continuous peritoneal dialysis.

Histol Histopathol. 査読有
31(11):1251-8 (2016)

doi: 10.14670/HH-11-756.

Sakuma Y, Arita K, Baba R, Kumagai N, Fujita M:

Morphological study: Application to breastfeeding nursing, influence of supplemental feeding at the early neonatal stage - Application to breastfeeding nursing -. Keimyung Journal of Nursing Science. 査読有 19(3): 63-69 (2016)

Miyagawa K, Oe S, Homma Y, Izumi H, Baba R, Harada M:

Lipid-induced endoplasmic reticulum stress impairs selective autophagy at the step of autophagosome-lysosome fusion in hepatocytes. The American Journal of Pathology. 査読有 186(7): 1861-73 (2016)
doi: 10.1016/j.ajpath.2016.03.003.

Yang D, Okamura H, Morimoto H, Teramachi J, Haneji T:

Protein phosphatase 2A C regulates proliferation, migration, and metastasis of osteosarcoma cells. Lab Invest. 査読有 96(10): 1050-62 (2016)
doi: 10.1038/labinvest.2016.82.

Takahashi H, Baba R, Ishimatsu N, Morimoto H, Fujita M:

Morphological analysis of small intestinal organoids. The Journal of Physiological Sciences. 査読無 65(Supplement 1): S164 (2015)

Teramachi J, Morimoto H, Okamura H, Haneji T:

Critical role of PKR in TNF- α -induced osteoclastogenesis. The Journal of Physiological Sciences. 査読無 65(Supplement 1): S186 (2015)

Ishimatsu N, Miyamoto T, Morimoto H, Nakamata J, Baba R, Otsuji Y, Tamura M:

Pentraxin3 expression in a rat model of peritoneal dialysis. The Journal of Physiological Sciences. 査読無 65(Supplement 1): S218 (2015)

Nguyen KH, Suzuki H, Ohbuchi T, Wakasugi T, Koizumi H, Hashida K, Baba R, Morimoto H, Doi Y:

Possible participation of acidic pH in bone resorption in middle ear cholesteatoma. 査読有 Laryngoscope. 124(1):245-50 (2014)

doi: 10.1002/lary.23883.

Sakuma Y, Baba R, Arita K, Morimoto H, Fujita M:

Food allergens are transferred intact across the rat blood-placental barrier in vivo. Med Mol Morphol. 査読有 47(1):14-20 (2014)
doi: 10.1007/s00795-013-0029-9.

Fukudome I, Kobayashi M, Dabanaka K, Maeda H, Okamoto K, Okabayashi T, Baba R, Kumagai N, Oba K, Fujita M, Hanazaki K:

Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats. 査読有 Med Mol Morphol. 47(2):100-7 (2014)
doi: 10.1007/s00795-013-0055-7.

Liu MS, Wang D, Morimoto H, Yim HC, Irving AT, Williams BR, Sadler AJ:

Molecular dynamics reveal a novel kinase-substrate interface that regulates protein translation. J Mol Cell Biol. 査読有 6(6):473-85 (2014)
doi: 10.1093/jmcb/mju044.

[学会発表](計24件)

馬場良子、國分啓司、森本景之、藤田 守:
乳飲期マウス回腸上皮におけるヒストン修飾解析 第122回日本解剖学会 総会・全国学術集会 2017年3月28-30日 長崎大学(長崎県・長崎市)

國分啓司、佐藤永洋、馬場良子、森本景之:
小腸上皮細胞における二本鎖RNA誘導性細胞死機構の解明 第122回日本解剖学会 総会・全国学術集会 2017年3月28-30日 長崎大学(長崎県・長崎市)

金丸孝昭、小坂光二、近藤照義、森本景之、中村桂一郎、高洲信一、磯部信一郎:
自動試料装填関連顕微鏡「New FL-SEM」の評価 日本顕微鏡学会 第72回学術講演会 2016年6月14-16日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

馬場良子、國分啓司、森本景之、藤田 守:
乳飲期由来オルガノイドの形態学的解析 第121回日本解剖学会 総会・全国学術集会 2016年3月28-30日 ビッグパレット ぶくしま(福島県・郡山市)

高橋宏典、馬場良子、國分啓司、森本景之:
培養小腸オルガノイドの形態学的解析 第57回日本顕微鏡学会 九州支部総会・

学術講演会 2015年11月21日 九州大学
(福岡県・春日市)

金丸孝昭、小坂光二、大江 隆、西 健太郎、柏 裕樹、八住 京、高洲信一、近藤照義、森本景之、中村桂一郎、磯部信一郎：
次世代型‘FL-SEM’の開発 第57回 日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会
2015年11月21日 九州大学(福岡県・春日市)

馬場良子、國分啓司、森本景之、藤田 守：
乳飲期空腸由来オルガノイドの形態学的解析 日本解剖学会 第71回九州支部学術集会 2015年10月31日 熊本大学(熊本県・熊本市)

森本景之、馬場良子、國分啓司、石松菜那、宮本 哲：
腹膜透析に関連する腹膜線維化と Matrix Metalloproteinase (MMP)の発現 第47回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2015年9月18-19日 長崎大学(長崎県・長崎市)

金丸孝昭、小坂光二、大江 隆、西 健太郎、柏 裕樹、矢住 京、高洲信一、近藤照義、森本景之、中村桂一郎、磯部信一郎：
次世代型相関顕微鏡の開発 第47回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2015年9月18-19日長崎大学(長崎県・長崎市)

宮川恒一郎、大江晋司、本間雄一、馬場良子、原田 大：
肝におけるオートファジーは脂肪酸流入による小胞体ストレスで障害される 第47回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2015年9月18-19日 長崎大学(長崎県・長崎市)

石松菜那、宮本 哲、中俣潤一、國分啓司、馬場良子、芹野良太、尾辻 豊、森本景之、田村雅仁：
腹膜透析モデルラットにおける腹膜炎マーカー(Pentraxin3)の検討 第47回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2015年9月18-19日 長崎大学(長崎県・長崎市)

馬場良子、國分啓司、石松菜那、森本景之、藤田 守：
乳飲期回腸由来オルガノイドの形態学的解析 第47回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2015年9月18-19日 長崎大学(長崎県・長崎市)

藤田 守、熊谷奈々、馬場良子、森本景之、小林道也、中村桂一郎：
胎内低栄養環境における消化管のエピゲノム変化 第47回 日本臨床分子形態学会

総会・学術集会 2015年9月18-19日 長崎大学(長崎県・長崎市)

Takahashi H, Baba R, Ishimatsu N, Morimoto H, Fujita M:
小腸の部位特異的オルガノイドの形態学的解析 Morphological analysis of small intestinal organoids. 第120回 日本解剖学会 総会・全国学術集会、第92回 日本生理学会大会合同大会(The 120th Annual Meeting of The Japanese Society of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan) 2015年3月21-23日 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

Teramachi Jumpei, Morimoto Hiroyuki, Okamura Hirohiko, Haneji Tatsuji:
TNF-誘導破骨細胞形成におけるPKRの役割 Critical role of PKR in TNF- α -induced osteoclastogenesis. 第120回 日本解剖学会 総会・全国学術集会、第92回 日本生理学会大会合同大会(The 120th Annual Meeting of The Japanese Society of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan) 2015年3月21-23日 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

Ishimatsu Nana, Miyamoto Tetsu, Morimoto Hiroyuki, Nakamata Junichi, Baba Ryoko, Otsuji Yutaka, Tamura Masahiro:
腹膜透析モデルラットにおけるペントラキシン3の発現 Pentraxin3 expression in a rat model of peritoneal dialysis. 第120回 日本解剖学会 総会・全国学術集会、第92回 日本生理学会大会合同大会(The 120th Annual Meeting of The Japanese Society of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan) 2015年3月21-23日 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

森本景之、馬場良子、石松菜那：
腹膜の線維化と Matrix Metalloproteinase (MMP)の関連 第56回 日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会 2014年12月6日 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

馬場良子、森本景之、熊谷奈々、石松菜那、藤田 守：
小腸絨毛の再生過程における細胞動態 第56回 日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会 2014年12月6日 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

熊谷奈々、馬場良子、森本景之、藤田 守：
妊娠初期の低栄養が出生後の大腸に及ぼす影響に関する超微形態学的研究 第56

回 日本顕微鏡学会 九州支部総会・学術講演会 2014年12月6日 宮崎市民プラザ (宮崎県・宮崎市)

熊谷奈々、馬場良子、森本景之、藤田 守：妊娠初期の低栄養が新生児(仔)の小腸に及ぼす影響に関する形態学的研究 日本解剖学会 第70回 九州支部学術集会 2014年10月25日 産業医科大学(福岡県・北九州市)

21 石松菜那、宮本 哲、中俣潤一、馬場良子、芹野良太、尾辻 豊、森本景之、田村雅仁：腹膜透析モデルラットにおける新規腹膜炎炎症マーカー(Pentraxin3)の検討 日本解剖学会 第70回 九州支部学術集会 2014年10月25日 産業医科大学(福岡県・北九州市)

22 森本景之、馬場良子:(シンポジウム) 分割蛍光法を用いたタンパク質相互作用および翻訳後修飾の可視化 第46回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2014年10月17-18日 TKP市ヶ谷カンファレンスセンター(東京都・新宿区)

23 寺町順平、森本景之、岡村裕彦、羽地達次：PKRは歯周病におけるLPSおよびTNF-による破骨細胞形成促進の重要な因子である 第56回 歯科基礎医学会学術大会・総会 2014年9月25-27日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

24 石松菜那、宮本 哲、中俣潤一、馬場良子、芹野良太、尾辻 豊、森本景之、田村雅仁：腹膜透析モデルラットにおける新規腹膜炎炎症マーカー(Pentraxin3)の検討 第59回 日本透析医学会 学術集会・総会 2014年6月12-15日 神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル・ワールド記念ホール・クオリティホテル神戸(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計4件)

馬場良子、國分啓司、横山 満、森本景之、藤田 守：超薄切片法 第27回 電顕サマースクール 2016 超明解 電子顕微鏡法入門講座「1枚の写真に尽くす基礎原理と方法論」(286頁)p. 57-66、日本顕微鏡学会(2016)

藤田 守、馬場良子、熊谷奈々、森本景之：あなたの知らない透過型電子顕微鏡TEMの世界 ~生命の秘密を暴こう~ 第25回 電顕サマースクール 2014 テキスト(218頁)p. 2-19、日本顕微鏡学会(2014)

横山 満、馬場良子、森本景之：一般的なSEM試料作製法と観察 第25回 電

顕サマースクール 2014 実習用テキスト (42頁)p. 25-33、日本顕微鏡学会(2014)

森本景之、馬場良子：灌流固定法 第25回 電顕サマースクール 2014 実習用テキスト(42頁)p. 34-38、日本顕微鏡学会(2014)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.uoeh-u.ac.jp/University/dept/medicine/2kaibo.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 景之(MORIMOTO, Hiroyuki)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：30335806

(2) 研究分担者

馬場 良子(BABA, Ryoko)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：90271436

(3) 連携研究者

國分 啓司(KOKUBU, Keiji)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：00432740