The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Regulation of intestinal epithelial cell polarity and non-vesicular lipid transport by Rab11 and its effectors
Author(s)	傍嶋, 智明
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61599
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　傍　嶋　智　明　）	
論文題名	Regulation of intestinal epithelial cell polarity and non-vesicular lipid transport by Rab11 and its effectors.（小腸上皮細胞極性と非小胞性脂質輸送におけるRab11の機能解析）

論文内容の要旨

〔　目　的　〕

細胞内では様々な機能をもった細胞内小器官が存在し、小胞輸送により絶えず物質のやりとりが行われている。その制御因子の1つとしてRab GTPaseがあり、このうちRab11（哺乳類ではRab11aとRab11bがパラログとして存在する）はリサイクリングエンドソーム（ERC, RE）と呼ばれる小器官に局在し、細胞内外への物質のリサイクリングや分泌に機能する。また、培養細胞を用いた実験によりRab11が様々な結合タンパク質を介して、神経細胞の突起形成や遊走、上皮管腔形成、一次線毛形成などに機能することが報告されている。本研究では、Rab11の更なる機能の解明を目的に、I. Rab11a knockout（KO）マウスの作製および細胞極性の観点からの形態学的な解析、II. Rab11新規結合タンパク質の同定とその機能解析を行った。

〔　方　法　・　結　果　〕

I.　全身でRab11a をKOしたマウスでは胎生致死となり発生過程においての重要性が示唆されたが、神経特異的KOマウスは正常に出生・発育し、脳の形態や神経細胞の突起形成などに異常は認められなかった。これは、Rab11のもう一方のパラログであるRab11bが相補的に働いたと考えられる。また一方で、腸上皮特異的KO（IKO）マウスでは明らかな発育不全と栄養飢餓（血中ケトン体の上昇）、生存率低下が見られ、細胞極性マーカーの分布を観察すると、IKOマウスの吸収上皮細胞では頂端面（apical）側の細胞膜に局在するタンパク質の局在異常と細胞内への蓄積が確認された。また電子顕微鏡による観察から、IKOマウスでは微絨毛の萎縮と微絨毛封入体が観察され、微絨毛萎縮症（MVID）様の表現型を示していることが分かった。更にRab8a KOマウスやMVID患者の小腸切片を用いた検討から、Rab11の局在は同じapical方向の輸送に関わるRab8やその結合分子MyosinVbに依存することが分かり、Rab11aは小腸においてapicalタンパク質の局在と微絨毛の形成に重要であることが明らかとなった。apical側の細胞膜すなわち微絨毛は主に栄養吸収を行う領域であり、Rab11a欠損によるapicalタンパク質の分布異常や微絨毛の萎縮が栄養吸収性障害を引き起こしたと考えられる。

II.　大腸菌より発現・精製したGST-Rab11aとマウス脳ライセートを用いて、GSTプルダウン法によりRab11新規結合分子を単離し、質量分析にてKIAA1468を同定した。KIAA1468は36種類のRabのうちRab11サブファミリーとのみ結合し、KIAA1468のRab11結合領域も決定した。KIAA1468はRab11と同様ERCに局在し、その局在はRab11依存的であったが、KIAA1468 knockdown（KD）細胞においてRab11の従来言われていた機能に異常は認められず、Rab11-KIAA1468複合体がRab11の従来の機能とは別の機能

をもつ可能性が示唆されたため、更にそれに結合する既知の分子を同定することにした。そこで抗KIAA1468抗体による免疫共沈降法を用いて、マウス脳ライセートよりKIAA1468結合分子としてOSBP1を同定した。ドメイン解析によりOSBP1はRab11とは異なる領域でKIAA1468と結合することが明らかとなった。OSBP1は細胞内のcholesterol量に応じてTGN (*trans*-Golgi network)に局在し、小胞非依存性にcholesterolをTGNに輸送する分子である。OSBP1をTGNに局在化する処理方法として25-hydroxycholesterol（25-OH）処理があるが、この25-OH処理によりRab11やKIAA1468が局在するERCがTGN近傍に集積するということが分かった。またKD細胞を用いた実験から、Rab11が局在するERCのTGN近傍への集積はOSBP1やKIAA1468依存的であった。OSBP1はcholesterol輸送分子であるため、次にKD細胞での細胞内cholesterol分布について検討した。細胞内cholesterol染色や密度勾配遠心法を用いた膜分画の実験から、KIAA1468, OSBP1, Rab11各々のKD細胞においてcholesterolのリソソームへの蓄積とTGNでのcholesterol量の減少が見られた。また、小胞輸送によりリソソームやERCからTGNに逆行性輸送されるタンパク質の輸送についてはKD細胞で異常が認められなかったことから、Rab11-KIAA1468-OSBP1複合体は非小胞性輸送（non-vesicular transport）に機能することが示唆された。更に人工リポソーム（liposome）と精製タンパク質を用いた再構成系の実験により、Rab11-KIAA1468-OSBP1複合体がERC-like liposomeとTGN-like liposome間のtetheringと、ERC-like liposomeからTGN-like liposomeへのcholesterol 輸送に機能することを明らかにした。

〔　総　括　〕

マウス個体を用いた検討により、小腸においてRab11aがapicalタンパク質の輸送および微絨毛の形成に重要であることが示唆された。また、Rab11の新規結合分子として同定したKIAA1468がOSBP1を介してERCからTGNへのnon-vesicular cholesterol transportに機能することが明らかとなった。今後、Rab11aだけではなくRab11b KOマウスも作製して様々な組織でのRab11 欠損による影響を検討することでRab11の個体での役割を明らかにすることや、Rab11-KIAA1468-OSBP1複合体によるERCからTGNへのcholesterol輸送が細胞にとってどのような生物学的意味をもつのかについて更に検討していく必要がある。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　傍嶋　智明　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	三善　英知
	副 査　教授	稲垣　忍
	副 査　教授	戸邉　亨

論文審査の結果の要旨

論文の概要は下記の通りである。

細胞内では様々な機能をもった細胞内小器官が存在し、小胞輸送により絶えず物質のやりとりが行われている。その制御因子の1つとしてRab GTPaseがあり、このうちRab11（哺乳類ではRab11aとRab11bがパラログとして存在する）はリサイクリングエンドソーム（ERC, RE）と呼ばれる小器官に局在し、細胞内外への物質のリサイクリングや分泌に機能する。また、培養細胞を用いた実験によりRab11が様々な結合タンパク質を介して、神経細胞の突起形成や遊走、上皮管腔形成、一次線毛形成などに機能することが報告されている。本研究では、Rab11の更なる機能の解明を目的に、I. Rab11a knockout（KO）マウスの作製および細胞極性の観点からの形態学的な解析、II. Rab11新規結合タンパク質の同定とその機能解析を行った。

I. 全身でRab11a をKOしたマウスでは胎生致死となり発生過程においての重要性が示唆されたが、神経特異的KOマウスは正常に出生・発育し、脳の形態や神経細胞の突起形成などに異常は認められなかった。これは、Rab11のもう一方のパラログであるRab11bが相補的に働いたと考えられる。また一方で、腸上皮特異的KO（IKO）マウスでは明らかな発育不全と栄養飢餓（血中ケトン体の上昇）、生存率低下が見られ、細胞極性マーカーの分布を観察すると、IKOマウスの吸収上皮細胞では頂端面（apical）側の細胞膜に局在するタンパク質の局在異常と細胞内への蓄積が確認された。また電子顕微鏡による観察から、IKOマウスでは微絨毛の萎縮と微絨毛封入体が観察され、微絨毛萎縮症（MVID）様の表現型を示していることが分かった。更にRab8a KOマウスやMVID患者の小腸切片を用いた検討から、Rab11の局在は同じapical方向の輸送に関わるRab8やその結合分子MyosinVbに依存することが分かり、Rab11aは小腸においてapicalタンパク質の局在と微絨毛の形成に重要であることが明らかとなった。apical側の細胞膜すなわち微絨毛は主に栄養吸収を行う領域であり、Rab11a欠損によるapicalタンパク質の分布異常や微絨毛の萎縮が栄養吸収性障害を引き起こしたと考えられる。

II. 大腸菌より発現・精製したGST-Rab11aとマウス脳ライセートを用いて、GSTプルダウン法によりRab11新規結合分子を単離し、質量分析にてKIAA1468を同定した。KIAA1468は36種類のRab

のうちRab11サブファミリーとのみ結合し、KIAA1468のRab11結合領域も決定した。KIAA1468はRab11と同様ERCに局在し、その局在はRab11依存的であったが、KIAA1468 knockdown（KD）細胞においてRab11の従来言われていた機能に異常は認められず、Rab11-KIAA1468複合体がRab11の従来の機能とは別の機能をもつ可能性が示唆されたため、更にそれに結合する既知の分子を同定することにした。そこで抗KIAA1468抗体による免疫共沈降法を用いて、マウス脳ライセートよりKIAA1468結合分子としてOSBP1を同定した。ドメイン解析によりOSBP1はRab11とは異なる領域でKIAA1468と結合することが明らかとなった。OSBP1は細胞内のcholesterol量に応じてTGN (*trans*-Golgi network)に局在し、小胞非依存性にcholesterolをTGNに輸送する分子である。OSBP1をTGNに局在化する処理方法として25-hydroxycholesterol（25-OH）処理があるが、この25-OH処理によりRab11やKIAA1468が局在するERCがTGN近傍に集積するということが分かった。またKD細胞を用いた実験から、Rab11が局在するERCのTGN近傍への集積はOSBP1やKIAA1468依存的であった。OSBP1はcholesterol輸送分子であるため、次にKD細胞での細胞内cholesterol分布について検討した。細胞内cholesterol染色や密度勾配遠心法を用いた膜分画の実験から、KIAA1468, OSBP1, Rab11各々のKD細胞においてcholesterolのリソソームへの蓄積とTGNでのcholesterol量の減少が見られた。また、小胞輸送によりリソソームやERCからTGNに逆行性輸送されるタンパク質の輸送についてはKD細胞で異常が認められなかったことから、Rab11-KIAA1468-OSBP1複合体は非小胞性輸送（non-vesicular transport）に機能することが示唆された。更に人工リポソーム（liposome）と精製タンパク質を用いた再構成系の実験により、Rab11-KIAA1468-OSBP1複合体がERC-like liposomeとTGN-like liposome間のtetheringと、ERC-like liposomeからTGN-like liposomeへのcholesterol 輸送に機能することを明らかにした。

マウス個体を用いた検討により、小腸においてRab11aがapicalタンパク質の輸送および微絨毛の形成に重要であることが示唆された。また、Rab11の新規結合分子として同定したKIAA1468がOSBP1を介してERCからTGNへのnon-vesicular cholesterol transportに機能することが明らかとなった。今後、Rab11aだけではなくRab11b KOマウスも作製して様々な組織でのRab11 欠損による影響を検討することでRab11の個体での役割を明らかにすることや、Rab11-KIAA1468-OSBP1複合体によるERCからTGNへのcholesterol輸送が細胞にとってどのような生物学的意味をもつのかについて更に検討していく必要がある。

以上のように本研究の科学的価値は高く、学位授与に値する内容であると認める。