

「博士論文」合否査定資料

申請者 同志社女子大学大学院 薬学研究科医療薬学専攻
職・氏名 瀧本 亜耶

学位の名称 博士（薬学）

論文名 乳児期マウス小腸吸収上皮細胞における Rab7 タンパク質の
機能解析

審査委員 主 査 高橋 玲




副 査 桑原 淳

副 査 和田 戈虹

審査結果 合




博士学位論文審査結果報告書

2022年 2月 10日

学位申請者	瀧本 亜耶	
審査委員	主査	高橋 玲 
	副査	桑原 淳 
	副査	和田 戈虹 
<p>本報告書は、申請者（瀧本亜耶）の博士論文を審査した結果をまとめたものである。本学大学院薬学研究科医療薬学専攻在学中の申請者から必要書類を添えて論文「乳児期マウス小腸吸収上皮細胞における Rab7 タンパク質の機能解析」が2022年1月6日提出された。申請者の指導教授（和田戈虹）は研究分野の専門性から博士論文審査委員を依頼した（主査：高橋玲教授、副査：桑原淳教授）。和田教授も副査として博士論文審査に参加した。本研究科は2022年1月13日に公開で博士論文発表会を開催し、申請者の博士論文に関する発表が約30分、質疑応答が約20分行われた。本論文は、エンドサイトーシス経路における低分子量Gタンパク質 Rab7 の機能に関する論文である。申請者は、腸特異的遺伝子欠損マウスを用いて、出生直後の小腸吸収上皮細胞における Rab7 の機能について細胞および個体レベルで解析を行ない、Rab7 依存性のエンドサイトーシス経路が離乳前の成長過程における栄養吸収に重要な役割を担うことを明らかにした。新生仔小腸のエンドサイトーシスは、母体からの免疫賦与、腸内細菌叢の確立と破綻、あるいは病原性細菌やウイルスの感染、などに深く関わっている。本論文で得られた知見は、医学分野においても重要な意義を持つと考えている。審査過程を通じて審査委員は申請者の研究科での研究活動がディプロマポリシー（学位授与の方針）の各基準を満たしていることを確認した。そして、提出論文の水準が当該研究科で定めた「学位論文審査基準」の評価項目を十分に満たすものであることを確認した。</p> <p>以上のことから、審査委員は全員一致して瀧本亜耶氏に対して博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。</p>		

博士学位論文審査結果要旨

2022年 2月 10日

学位申請者	瀧本 亜耶	
審査委員	主査	高橋 玲 
	副査	桑原 淳 
	副査	和田 戈虹 
論文題名	乳児期マウス小腸吸収上皮細胞における Rab7 タンパク質の機能解析	
(要旨)	<p>本論文は序章と第1章～6章から構成される。</p> <p>序章では、小胞輸送の基本的メカニズム、エンドサイトーシス経路の制御因子、小胞輸送制御における低分子量 G タンパク質 Rab の機能、エンドサイトーシス経路の膜動態を制御する Rab タンパク質の機能、マウス初期胚臓側内胚葉における Rab7 の役割、哺乳動物の乳飲期小腸吸収上皮細胞の特徴およびマウス初期胚臓側内胚葉細胞との共通点など、本研究の目的や背景を明確に記している。</p> <p>第1章では、腸上皮特異的 Rab7 遺伝子破壊マウスの作製について記している。<i>Rab7^{lox/lox}</i> マウスと腸上皮特異的に Cre リコンビナーゼを発現する <i>Villin-Cre</i> マウスを交配させることで、<i>Rab7^{lox/+}Villin-Cre^{Tg+}</i> マウスを作製した。樹立した腸上皮特異的 Rab7 遺伝子破壊マウスの Rab7 欠損効率を腸管 whole mount 蛍光免疫染色およびウエスタンブロット法で解析し、Rab7 タンパク質が野生型に比べて検出限界レベル以下に減少したことを確認した。複数の独立した手法を用いて、腸上皮特異的 Rab7 遺伝子破壊マウスを樹立できたことを明確に示した。</p> <p>第2章では、新生仔（生後二日目、P2）マウスの野生型および Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞における形態学的解析の結果について記している。腸管の長さの違いは観察されなかったが、小腸吸収上皮細胞の表現型の違いが観察された。P2 マウスの野生型小腸吸収上皮細胞 apical 側には、核上に電子密度の高い大きな Apical Vacuole (AV) が発達していたが、cKO 小腸吸収上皮細胞には AV よりも電子密度の低い異常に大きな空胞が形成されていた。これは新奇で興味深い発見であり、高く評価できる。</p>	

第3章では、P2 野生型および Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞におけるエンドサイトーシス経路関連分子マーカーを用いた蛍光免疫染色の結果結果について記している。Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞では、全てのマーカーのシグナルが検出限界以下となった。Rab7 の欠損がエンドサイトーシス経路の初期のステップに影響を及ぼしており、エンドサイトーシス経路が阻害されている可能性が示唆された。

第4章では、新生仔期野生型および Rab7 欠損マウスの腸管を用いた取り込み実験の結果について記している。P2 野生型小腸吸収上皮細胞ではエンドサイトーシスが活発で、エンドサイトーシスで取り込まれた高分子物質はエンドソームによって最終的に AV へ輸送されることが分かった。Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞では野生型よりもエンドサイトーシス活性が顕著に低下した。結果の新規性と手法のオリジナリティの面において高く評価できる。

第5章では、P2 Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞で観察された異常に大きな空胞の形成過程について詳細に解析している。細胞の成長により巨大な空胞を形成すること、また、出生後の小腸吸収上皮細胞で形成されることが明らかとなった。

第6章では、乳仔期 Rab7 欠損マウスにおける成長遅延について解析している。P2 野生型および Rab7 欠損マウスは両者とも、摂食行動に問題はなかったが、Rab7 欠損マウスは雌雄ともに成長遅延の傾向を示した。腸管における Rab7 の生理機能を個体レベルで解析した結果である。

「総括」では、全体の内容がまとめられている。ここまでの内容から本研究論文が学術的に新規性を有しかつ独創性の高いものであることが十分に示された。「実験材料と方法」、「謝辞」に続く「参考文献」で引用されている論文等も適切であると判断された。「図」は大変わかりやすく適切なものであった。本論文は、腸上皮特異的 Rab7 遺伝子破壊マウスの表現型を詳細に解析し、貴重な基礎データとして生物学・医学分野においても重要な意義を持つと考えている。

これらの研究成果は、下記の論文として公表されている。

Takimoto A. 2021 Rab7-Dependent Endocytic Pathways Play an Important Role in Nutrient Absorption during Pre-Weaning Growth. BPP Report 4: 27-35.

以上の審査結果から、審査委員は全員一致で、本論文が博士論文の水準に十分達していると結論した。

博士学位論文要旨

2022 年 1 月 6 日

学位申請者名 瀧本 亜耶

論文題目：

乳児期マウス小腸吸収上皮細胞における Rab7 タンパク質の機能解析

小腸は食物を栄養に変換する重要な組織である。管腔内を覆う無数の絨毛突起を構成する一層の上皮細胞の約 8 割以上は小腸吸収上皮細胞で、消化吸収の役割を担うのみならず、有害な物質や微生物を防御する効果的なバリアとしても重要である。哺乳動物は、離乳を境に食の形態が母乳から固形食へと変化する。この栄養摂取形態の移行に伴って、小腸吸収上皮細胞の消化吸収機構が大きく変化する。離乳後の栄養素は、消化管管腔内の様々な消化酵素により低分子に変換され、小腸吸収上皮細胞の刷子縁膜に発現するトランスポーターを介して細胞内へ輸送される。一方、乳児の消化管は未発達であるため、管腔内で母乳は高分子の状態でエンドサイトーシス機構を介して細胞内に取り込まれ、細胞内小器官で分解された後、利用される。さらに、母乳には様々な生体防御因子が豊富に含まれており、母親から新生児に免疫を賦与する大切な伝達メカニズムの中心をなしている。授乳期の栄養不良は、発育不良 (FTT, failure to thrive) を引き起こし、子供の体や脳の発達に重大な影響を及ぼす。

エンドサイトーシスは細胞外の高分子物質を細胞内に取り込む機構である。エンドサイトーシスで取り込まれた物質は初期エンドソームへ輸送された後、後期エンドソームを経由して、最終的に加水分解酵素を多く含むリソソームで分解される (図 1)。低分子量 GTP 結合タンパク質の Rab7 はエンドサイトーシス経路の後期エンドソームとリソソームの膜融合に必要な制御機能を担う (図 1)。これまで、所属ラボの研究から、Rab7 はマウス初期胚発生に必須であることは示された。マウス着床直後の初期胚では、胎盤形成しておらず、母体側からの栄養は、活発なエンドサイトーシスを行う「臓側内胚葉」(visceral endoderm, VE) とよばれる

上皮系組織を介して供給される。VE 細胞には大きなリソソーム様オルガネラ apical vacuole (AV) が存在する。AV は母体から供給される高分子物質の分解のみならず、発生に必要な様々なシグナル分子のプロセッシングにも重要な役割を果たしている。Rab7 欠損マウスでは AV が形成されず、中胚葉が形成できない状態で胎生致死となることが明らかとなった

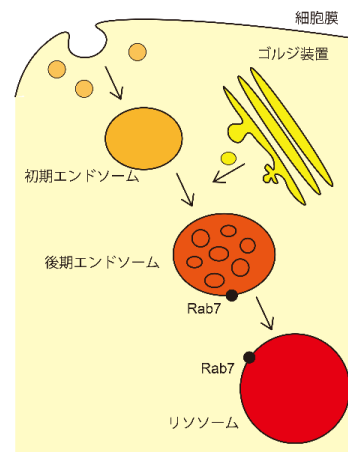


図 1 エンドサイトーシス経路の模式図

(1,2)。乳児期小腸吸収上皮細胞は、①高いエンドサイトーシス活性と②大きな apical vacuole の存在において、VE 細胞と共通の特徴を有する。

乳児期小腸吸収上皮細胞ではエンドサイトーシス経路を介した消化吸收機構が非常に発達していることは報告されているが、その詳細な膜動態や制御機構については未解明である。本研究は、腸特異的 Rab7 欠損マウスを用いて、出生直後の新生仔期 (Postnatal day2, P2) に着目し、小腸吸収上皮細胞における Rab7 依存のエンドサイトーシス経路の機能について細胞および個体レベルで解析を行なった。

1. 腸特異的 Rab7 コンディショナル・ノックアウトマウスの作製

Rab7 の機能を全身で欠損させると胎生致死となるため、Cre/loxP システムを用いて腸上皮特異的に Rab7 が欠損するコンディショナル・ノックアウトマウスを作製した。腸上皮特異的に Cre が発現する *Villin-Cre^{Tg/+}* マウスと *Rab7^{lox/lox}* マウスとの交配で、[*Villin-Cre^{Tg/+}*, *Rab7^{lox/lox}*] マウスを作製した。*Rab7^{lox/lox}* は Cre 存在下で Rab7 遺伝子のエクソン 2 (ATG 開始コドンを含む) とエクソンが削除された Rab7 欠損アレルが生成されるコンストラクトとなっている。

[*Villin-Cre^{Tg/+}*, *Rab7^{lox/lox}*] マウスの小腸上皮の Rab7 タンパク質の欠損は、抗 Rab7 抗体を用いた小腸 whole mount 蛍光免疫染色および小腸粘膜溶解液を用いたウェスタンブロットで確認した。蛍光免疫染色では、小腸吸収上皮細胞頂端側に観察される Rab7 シグナルが、[*Villin-Cre^{Tg/+}*, *Rab7^{lox/lox}*] の小腸吸収上皮細胞では検出限界以下であった。ウェスタンブロットの Rab7 バンドのシグナル強度についても [*Villin-Cre^{Tg/+}*, *Rab7^{lox/lox}*] の小腸粘膜溶解液で顕著に低下した。さらに、Cre 依存的に発現する *LacZ* reporter transgene を用いた X-gal 染色アッセイでも、[*Villin-Cre^{Tg/+}*, *Rab7^{lox/lox}*] 小腸吸収上皮細胞がほぼ全て青く染色され、小腸上皮での Cre の発現効率が確認できた。以降、野生型である *Rab7^{lox/lox}* は Ctrl、*Villin-Cre^{Tg/+}*, *Rab7^{lox/lox}* は cKO と表記する。

2. P2 Ctrl および cKO マウス小腸吸収上皮細胞における形態学的解析

HE 染色および電子顕微鏡法を用いた組織学的解析の結果、Ctrl 小腸吸収上皮細胞では頂端側に、エオシン陽性の内容物を含む電子密度の高いリソソーム様オルガネラ apical vacuole (AV) が観察された (図 2、矢頭)。一方、cKO 細胞ではエオシン陽性の内容物をほとんど含まない電子密度の低い異常に大きな空胞が観察された (図 2、矢印&*)。

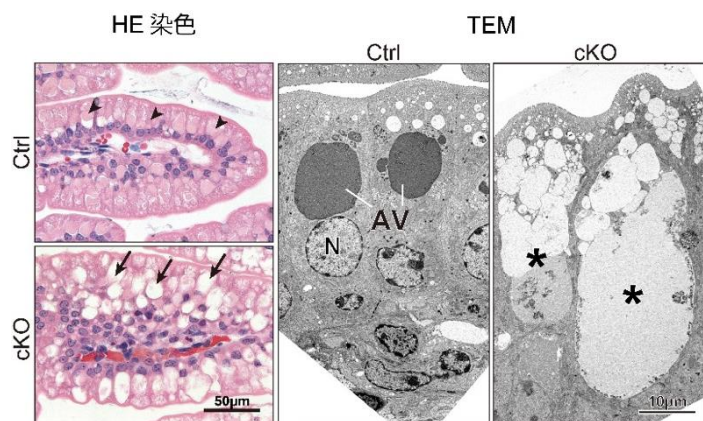


図 2 P2 Ctrl および cKO マウス小腸吸収上皮細胞の形態学的解析

3. P2 Ctrl および cKO 小腸吸収上皮細胞におけるエンドサイトーシス経路関連マーカーを用いた蛍光免疫染色

Ctrl 細胞では、AV がリソソームマーカーの Lamp2 に対して陽性であった(図 3、緑色矢印)。初期エンドソームマーカーの SNX1 および後期エンドソームマーカーの Rab7 の両シグナルはやや重なるように頂端側に局在したが(図 3、矢頭)、大半の Rab7 は SNX1 の発現領域と Lamp2 陽性 apical vacuole の間の細胞質に局在していた(図 3)。さらに Rab7 はリソソーム陽性オルガネラ膜にもドット状で存在していた(図 3、青色矢印)。cKO 細胞に出現した異常に大きな空胞は染色に用いた全てのマーカーに対して陰性であることが明らかとなった(図 3)。

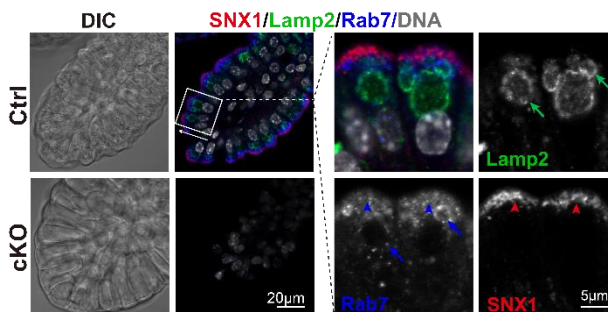


図 3 P2 Ctrl および cKO マウス小腸吸収上皮細胞におけるエンドサイトーシス経路関連マーカーを用いた蛍光免疫染色

4. P2 Ctrl および cKO 腸管試料を用いた *in vitro* uptake assay

Rhodamine-dextran (RD、赤) と FITC-dextran (FD、緑) を用いた pulse-chase による *in vitro* の小腸の取り込み実験を行い、Ctrl と cKO 腸管の液相エンドサイトーシス活性を比較した。本実験では RD を先に取り込ませて chase した後、FD を取り込ませて、0 分、15 分、30 分と chase した。腸管試料を whole mount で観察した結果、Ctrl では 2 色の色素が細胞内に十分に取り込まれ、取り込み開始から 30 分後には両色素がリソソーム内で混合した(図 4)。cKO では細胞内に取り込まれた色素のシグナルが Ctrl よりも顕著に低下した(図 4)。

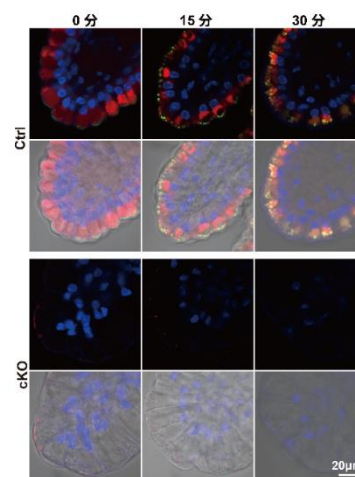


図 4 P2 Ctrl および cKO 腸管を用いた uptake 実験

5. P2 Ctrl および cKO 小腸絨毛基部、基部周辺、先端の小腸吸収上皮細胞に存在するオルガネラの形態の比較

P2 cKO 絨毛先端部の細胞で発達する異常に大きな空胞は絨毛基部周辺の細胞に存在する空胞よりも大きかった。よって、絨毛基部に近い、増殖幹細胞から分化した若い小腸吸収上皮細胞には比較的小さな小胞が存在するが、この細胞は成熟とともに絨毛の先端へ移動し、大きな空胞を持つように

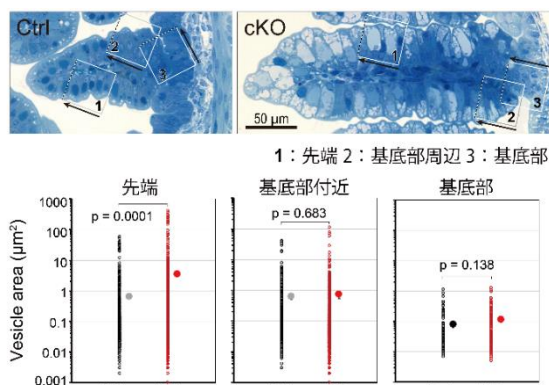


図 5 P2 Ctrl および cKO の小腸絨毛基部、基部付近、先端の小腸吸収上皮細胞に存在するオルガネラサイズの比較

なるのではないのかと考えた。そこで、絨毛基底部、基底部周辺、先端の小腸吸収上皮細胞内の小胞の大きさを測定したところ、Ctrl および cKO どちらの細胞も基底部より先端の方がオルガネラのサイズが大きくなったが、先端では Ctrl 細胞の apical vacuole よりも cKO 細胞で発達する異常に大きな空胞の方が大きかった (図 5)。この異常に大きな空胞は E18.5 の cKO 細胞にはなく、深刻な空胞化は出生後のエンドサイトーシスのトラフィッキング欠陥によることが示唆された。さらに E18.5 小腸のエンドサイトーシス活性について uptake 実験で確認したところ、cKO 細胞では RD や FD を含むオルガネラが断片化しており、Rab7 欠損初期胚 VE 細胞と似たような表現型を示した (1,2)。

6. Ctrl および cKO マウスの出生直前から離乳までの体重の比較

cKO マウスの体重を出生直前 (E18.5)、乳児期 (P1、P8、P14)、離乳 (P21) で Ctrl と比較すると、cKO では雄雌ともに乳児期の間で有意な体重減少を示した。

総括

乳児期マウスの小腸吸収上皮細胞はエンドサイトーシスによる栄養の吸収消化が活発で、頂端側には大きなリソソーム、apical vacuole (AV) が存在した。Rab7 は AV へのエンドソームの送達に不可欠で、Rab7 欠損小腸吸収上皮細胞は異常に大きな空胞で満たされた。この空胞は細胞が絨毛基底部から絨毛先端部へ移動するにつれて巨大化し、高分子の栄養の取り込みを阻害した。絨毛先端部の細胞内の空胞肥大化は長期的な Rab7 欠損の影響による終末的な形態を反映したと考えている。さらに、Rab7 欠損マウスは成長遅延の傾向を示し、Rab7 依存のエンドサイトーシス経路が乳児期の生育に直接影響することが明らかとなった。

受精から 2 歳までの“人生最初の 1000 日間” (“The first 1000 days”) の栄養摂取の重要性は国際的にも強調されており、子供たちの命を守るための大きな課題となっている。新生仔小腸のエンドサイトーシスは、母体からの免疫賦与、腸内細菌叢の確立と破綻、あるいは病原性細菌やウイルスの感染成立の入り口、などに深く関わっている。このような組織でのエンドサイトーシス経路の実態とメカニズムを明らかにすることは、医学分野においても重要な意義を持つと考えている。

参考文献

1. Kawamura, N., G.H. Sun-Wada, M. Aoyama, A. Harada, S. Takasuga, T. Sasaki, and Y. Wada. 2012. Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nat Commun.* 3:1071.
2. Kawamura, N., K. Takaoka, H. Hamada, A.K. Hadjantonakis, G.H. Sun-Wada, and Y. Wada. 2020. Rab7-Mediated Endocytosis Establishes Patterning of Wnt Activity through Inactivation of Dkk Antagonism. *Cell Rep.* 31:107733.
3. Takimoto, A. 2021. Rab7-Dependent Endocytic Pathways Play an Important Role in Nutrient Absorption during Pre-Weaning Growth. *BPB Reports.* 4:27-35.

試問結果の要旨

2022年 2月 10日

学位申請者	瀧本 亜耶	
審査委員	主査	高橋 玲 
	副査	桑原 淳 
	副査	和田 戈虹 

(要旨)

博士論文発表会を公開で実施し、審査委員3名ならびに教員、大学院生、学部生が多数参加し、学位申請者に対する質疑応答が行われた。その結果、研究の独自性、新規性が認められ、申請者が博士の学位を授与されるに十分に値すると判断した。以下、試問の内容をまとめる。

質問1「本研究で明らかにした内容とこれまで Rab7 の機能との関連についてどう考えるか」。回答1「Rab7 の細胞内での機能は示唆されているが、個体レベルで特に小腸上皮細胞における機能に関してはわかっていない、本研究は小腸特異的に Rab7 を欠損させて、Rab7 依存エンドサイトーシスの生理機能を明らかにした。」

質問2「細胞が死滅するとき、ストレスを受けて変性空胞が形成されるが、観察された異常な空胞はエンドソーム由来の空胞と解釈してもよいか。電子密度が低いので、中に何が溜まっているか」回答2「乳仔期の腸上皮細胞はミルクに接触した時に初めてできる空胞で、Rab7 が欠損すると、膜融合が阻害され、空胞が肥大化したと考えられる。また、カチオンチャネルの Mucolipin 欠損小腸上皮細胞も同様な表現型を示している。カチオンチャネルの活性化と Rab7 との関連を示唆する研究があるが、詳細は明らかではない。イオン濃度勾配や浸透圧の関係で電子密度の低い巨大空胞が形成される可能性が考えられる。」

質問3「エンドサイトーシスのどのステップで障害があるのか？ Rab7 を欠損させた場合、Rab5 にも影響があるのか、それとも後期エンドソーム特異的な障害なのか」。回答3「Rab5 を用いた抗体で蛍光免疫染色を行って観察していたが、Rab5 のシグナルは検出限界以下であった。しかし、免疫ブロットでは Rab5 タンパク質が検出できている。可能性として Rab5 の膜への局在が Rab7 欠損の影響を受けている可能性が考えられる。」

質問4「体重の差がそれほど大きくないので、Rab7 が欠損しても代替の経路が存在することについてどう考えるか」回答4「その可能性が十分考えられる。」

質問5「オルガネラマーカの染色に関して、Rab7を欠損させた場合ほとんど検出されていない結果となっているが、エンドサイトーシスのどこかのステップが止まっていると、その前のステップのマーカが蓄積することが予想されるが、なぜ逆に検出されないか」。回答5「WBではタンパク質の量は検出できている。蛍光免疫染色で検出できていない可能性として、膜への局在が影響されている。細胞質に存在した場合、蛍光免疫染色ではシグナルは検出しにくいと考える。」

質問6「エンドサイトーシスについてコート形成のカベオリンやクラスリンまた脂質ラフトなどについて観察したか」回答6「カベオリンやクラスリンについてはまだ観察していないが、胎仔期の小腸を用いた取り込みの結果から、初期の取り込みに関しては影響されていないと考える。」

質問7「FITC-デキストランを用いて取り込み観察を行なっているが、受容体介在エンドサイトーシスというよりもピノサイトーシスを見ていると思う。受容体介在エンドサイトーシスはどうなるのか」回答7「Rab7を欠損させた腸上皮細胞では免疫グロブリンのFcRnを介したエンドサイトーシスが低下している。したがって受容体介在エンドサイトーシスも影響されている。」

質問8「体重評価はエンドサイトーシスに依存する乳仔期で評価すべきではないか」回答8「離乳までの乳仔期で解析を行なって、エンドサイトーシス欠損が体重減少を引き起こすことを示している。」

質問9「Rab7を欠損させた場合、変異マウスの水分の代謝やミネラル成分が変化していないか」回答9「腎臓機能がメインに関わる電解質生理に関しては詳細に解析していない。」

質問10「授乳前のマウスの小腸上皮細胞はStx7やSNX1などは検出されているか？」回答10「授乳前（出生前E18.5）の野生型マウスの小腸上皮細胞では後期エンドソームマーカStx7や初期エンドソームマーカSNX1が検出される。変異マウスも、これらのマーカは蛍光免疫染色で検出されている。免疫プロットでは、授乳前も授乳後も野生型と変異小腸上皮細胞では差がない。したがって、授乳後に、変異小腸上皮細胞では小胞のサイズが小さい、もしくはマーカタンパク質が膜に付着できない、などの量的質的な差を生じていると考える。」