博士論文

消化管における細胞骨格関連タンパク質エズリンの生理的な役割に関する研究

(Physiological roles of the cytoskeletal protein ezrin in the gastrointestinal tract)

2016 年 3 月

立命館大学大学院理工学研究科

総合理工学専攻博士課程後期課程

吉田　沙織

立命館大学審査博士論文

消化管における細胞骨格関連タンパク質エズリンの生理的な役割に関する研究

(Physiological roles of the cytoskeletal protein ezrin in the gastrointestinal tract)

2016 年 3 月

March 2016

立命館大学大学院理工学研究科

総合理工学専攻博士課程後期課程

Doctoral Program in Integrated Science and Engineering

Graduate School of Science and Engineering

Ritsumeikan University

吉田　沙織

YOSHIDA Saori

研究指導教員：浅野　真司　教授

Supervisor : Professor ASANO Shinji

【目次】

緒論　・・・

【緒論】

アクチン結合タンパク質であるエズリンは、主に消化管（胃・小腸）や腎尿細管の刷子縁膜（Brush border membrane: BBM）に集積し、細胞膜上のタンパク質とアクチン細胞骨格とを架橋する働きを有する。エズリンはアミノ酸相同性が高いラディキシン、モエシンとともに ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) ファミリーを構成しており、共通の生理機能を持つと考えられているが、発現は組織によって異なることが知られている。ERM タンパク質は、N 末端側に存在する four-point-one, ezrin, radixin, moesin (FERM) ドメインを介して直接的に、または足場タンパク質を介して間接的に膜タンパク質と結合する（Fig. 1A）。一方、C 末端側はアクチン細胞骨格と結合することで両者を架橋し、微絨毛や糸状突起、糸状仮足、ラッフル膜形成など、細胞の形態維持や構造変化に関与する [1-4]。この ERM タンパク質は、リン酸化などの活性化シグナルが働かない条件下では、分子内または別の ERM タンパク質との間で N 末端側と C 末端側のドメインが結合し、FERM ドメインやアクチン結合ドメインがマスクされた不活性化型で存在する（Fig. 1B）[5,6]。これに対して、C 末端側のスレオニン残基（エズリンの Thr^{567}、ラディキシンの Thr^{564}、モエシンの Thr^{558}）が Rho kinase や protein kinase C (PKC) によってリン酸化される、またはホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸（PIP_2）が FERM ドメインに結合することで、N 末端側と C 末端側との結合が解離し、活性化型へと構造が変化する。この過程において、ERM タンパク質は細胞質から膜表面へとリクルートされる。

生体内でのエズリンの働きを調べるために、Saotome らはエズリンノックアウトマウスを作製し、新生仔の小腸において絨毛の融合や微絨毛の形成障害などの異常が起こることを報告した [7]。しかしながら、エズリンノックアウトマウスは生後 10 日以内に死滅することから、成体におけるエズリンの機能解析は不可

能であった。そこで、Tamura らはエズリンの発現を野生型の 5%以下にまで抑制したエズリンノックダウン（*Vil2*$^{kd/kd}$）マウスを作製した [8]。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいても、著しい成長障害が起こり、離乳期（生後 3 週間程度）までの致死率が 90%以上と高かったが、離乳期を越えて成長した約 7%のマウスを用いてエズリンの機能解析が可能となった。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスは、胃粘膜の肥厚や壁細胞でのプロトンポンプ（H^+/K^+-ATPase）を含む細管小胞と管腔側膜との融合が行えないことによる胃酸分泌障害（無酸症）を起こすことが報告された。これらの報告から、エズリンの胃や小腸における役割は重要であると考えられる。

エズリンをノックダウンすると胃において無酸症を示すことが報告されたが、胃粘膜の構造に対して与える影響については、詳細な検討がなされていなかった。そこで、第一部では、野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃の組織切片を作製し、免疫染色などの組織学的な手法を用いて胃粘膜の構造におけるエズリンノックダウンの影響について検討を行った。

一方、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの小腸においてはノックアウトマウスの場合とは異なり、絨毛や微絨毛が形成されることが報告されている [8]。小腸において、活性化したエズリンは吸収上皮細胞の BBM に局在し、溶質輸送に関わる膜輸送タンパク質を含む様々な膜タンパク質とアクチン細胞骨格とを架橋することで膜表面での発現や機能を制御すると考えられているが、相互作用する膜タンパク質の全容は明らかにされていない。そこで、第二部では *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸刷子縁膜における網羅的なプロテオーム解析を行い、エズリンと相互作用する膜タンパク質を同定することで、小腸での溶質輸送におけるエズリンの役割について検討を行った。

第一部

胃粘膜の構造におけるエズリンノックダウンの影響

【背景】

胃は食道に続く袋状の器官で、摂取した食物を貯留し、胃液と混合して粥状にしたり、食物と共に入ってきた細菌を殺菌し、タンパク質をある程度まで消化する機能がある。これらの過程において胃酸は重要な役割を果たしている。胃酸（塩酸）は、胃底腺に存在する壁細胞から分泌され、胃内を強酸性条件下にすることで殺菌を行うと共に、主細胞から分泌されたペプシノゲンを活性化型のペプシンへと変化させタンパク質分解酵素として働くことを助ける（Fig. 2）。このように、胃内には食物を消化するための塩酸やペプシンが存在するが、胃内を覆う胃粘膜が消化されることはない。これは、粘液細胞から分泌される粘液が胃粘膜を保護することに加え、傷つきやすい表層の粘液細胞を数日という短い周期で更新することによってバリア機能を保持しているからである。胃がその機能を果たすためには、胃粘膜が正常に形成され、構成する細胞がそれぞれの機能を果たすことが必要不可欠である。

正常な胃粘膜において、胃腺の岐部に存在する幹細胞は主に 4 種類の上皮細胞（表層粘液細胞、副細胞、主細胞、壁細胞）に分化する（Fig. 2）。幹細胞が岐部から表層に向けて移動する際は、pre-pit cells から pit cells（表層粘液細胞）へと分化し、胃腺底部に向けて移動する際は、pre-neck cells から neck cells（副細胞）へと分化する（Fig. 3）。分化した表層粘液細胞と副細胞からは中性粘液と酸性粘液がそれぞれ分泌され、胃酸やペプシンから胃粘膜を保護している。また、副細胞はさらに下方へ移行する過程でペプシノゲンを分泌する chief cells（主細

胞）へと再分化する。一方で、胃酸を分泌する壁細胞は、岐部で幹細胞が pre-parietal cells から parietal cells（壁細胞）に分化し、表層と胃腺底部の両方向に移動する[9,10]。表層粘液細胞の平均寿命は 3-5 日と細胞回転が速いのに対して、主細胞や壁細胞の寿命は 6 ヶ月程度と長いことが知られている[11]。

胃においてエズリンは主に壁細胞の管腔側膜に発現し、胃酸分泌に伴う管腔側膜の再構成に関与している[12,13]。この壁細胞は、酸分泌休止期と酸分泌活動期で劇的な構造変化を起こすことが知られている（Fig. 4）。酸分泌休止期には細胞質内に存在する多数の細管小胞が、酸分泌刺激を受けると管腔側膜と融合して微絨毛を発達させ、H^+/K^+-ATPase による酸分泌を活性化させる。一方で、酸分泌刺激が除かれると、管腔側膜から細管小胞が再構成される。従って、胃酸分泌にはアクチン細胞骨格系の再構築に関わるタンパク質の関与が重要である。実際に、ヒスタミンを用いて胃酸分泌刺激をすると、H2 受容体の下流に位置する cAMP-依存性の protein kinase A (PKA) が活性化されることにより、エズリンの N 末端側の Ser^{66} がリン酸化され、不活性化型から活性化型へと構造が変化する[14]。リン酸化されたエズリンは、GTPase 活性化タンパク質（GAP）である ACAP4 と相互作用し、ACAP4 を細管小胞から管腔側膜へと動員する[15]。続いて ACAP4 は壁細胞内でのエンドサイトーシスやエキソサイトーシスに伴うアクチン細胞骨格系の再構築に関わる ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) を活性化し、細管小胞と管腔側膜との融合を促すと考えられている[16]。

壁細胞の管腔側膜に発現する H^+/K^+-ATPase の α-subunit[17,18]や β-subunit[19,20]、K^+チャネルを構成する KCNQ1[21,22]や KCNE2[23]、基底側膜側に発現する Cl^-/HCO_3^- 交換輸送体である anion exchanger 2 (AE2) [24]は酸分泌に関与しており、それぞれのノックアウトマウスは無酸症や低酸症を示すことが報告されている（Fig. 4）。これらのノックアウトマウスにおいては、胃内の pH が上昇するのに対応して血清中のガストリン濃度が上昇し（高ガストリン血症）、胃粘膜の肥厚が起こる一

方で、壁細胞や主細胞が減少するなど胃腺の構造に変化が見られる。このことから、正常な胃粘膜の構築には胃酸分泌が重要であると考えられている。また、壁細胞は胃酸分泌を行う他に、EGF ファミリー増殖因子に属するヘパリン結合性 EGF-like growth factor (HB-EGF)、transforming growth factor α (TGF-α)、amphiregulin (AR) の他、Sonic hedgehog などの増殖因子を分泌することが知られている（Fig. 5）。これらの増殖因子は岐部に存在する前駆細胞の増殖や、副細胞から主細胞への分化を促すと考えられており、胃粘膜の構築において重要な役割を果たしている [25-29]。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの胃では、酸分泌刺激による細管小胞と管腔側膜との膜融合が障害されることにより無酸症を示すと共に、胃粘膜の肥厚が報告されている [8]。しかしながら、エズリンが胃粘膜の構造に対して与える影響については、これまでに検討されていない。そこで、本研究においては、胃におけるエズリンの局在を調べると共に、野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃粘膜の構造を比較することで、エズリンが胃粘膜の構造に対して与える影響について検討を行った。

【実験方法】

１．実験動物

Vil2$^{kd/kd}$ マウスは、エズリン遺伝子のエクソン 2 と 3 の間のイントロン領域に En2 (Homeobox protein engrailed-2)、SA (splicing acceptor)、IRES (Internal ribosome entry site)、lacZ、neo (neomycin resistance)、PA (polyadenylation site) を含む変異カセットが挿入されており（Fig. 6）、エズリンの発現が野生型と比較して 5%以下に抑制されることが報告されている [8]。大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学講座の月田早智子教授より譲り受けた *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの雄と C57BL/6J Jcl の雌の体外受精卵を親マウスとなる ICR マウスに着床させ、生まれたマウスを繁殖させて実験に使用した。

マウスは室温が一定に管理され、12 時間おきに照明が点灯・消灯する施設で自由に飲食可能な状態で飼育した。全ての動物実験は、立命館大学 BKC 動物実験委員会の承認のもとで、倫理指針に従って行った。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスは出生時から、野生型やヘテロマウス（*Vil2*$^{kd/+}$）と比べて明らかに体が小さく、その違いは離乳期を過ぎるとより顕著になり、著しい成長障害が見られた。本研究に用いた 8 週齢のマウスにおいても、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの体重は同腹仔の野生型マウスの 80%程度だった（野生型マウス : 17.8 ± 0.5 g (N=3), *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス：14.3 ± 0.7 g (N=3), $P < 0.05$）（Fig. 7A,B）。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスは離乳期までの死亡率が高く、離乳期以降まで成長したマウスは全体の 7%程度と少ないことが報告されているが [8]、飼育方法を改善することにより、離乳期以降までの生存率を 70～80%まで高められた。しかしながら、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの雄の多くは出生時から重篤な症状を示し、成体までに死亡する確率が高かった。そのため、本研究においては安定して実験に使用することができる雌の *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスを全ての実験に用いた。

２．ジェノタイピング

マウスの尾を約 3 mm 切断し、50 mM 水酸化ナトリウム溶液を加えた後、95℃で 10 分間、熱処理をした。続いて、1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加えてボルテックスミキサーで混和した後、12,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を PCR の鋳型として使用した。

PCR は鋳型と 0.1 units KOD FX (TOYOBO)、KOD PCR buffer (TOYOBO)、400 μM dNTPs、0.3 μM Forward primer（EK29: 5’-GTGTGGCACTCTGCCTTCAAG-3’）、Reverse primer（Geno-A1: 5’-CATGGTGCCACACAGGACTC-3’ または En2-A: 5’-AGCGGATCTCAAACTCTCCTC-3’）を含む全量 10 μL の反応溶液で行った。PCR のサイクル条件は、3 step（95℃, 30 秒; 65℃, 30 秒; 72℃, 1 分）、35 サイクルで行った。PCR 産物は野生型アレルでは 380 bp、エズリンノックダウンアレルでは 290 bp であり、アガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子型を確認した（Fig. 8）。

３．組織の固定および切片作製

胃を切り出し、大彎側から開いた状態で、4% パラホルムアルデヒド溶液に浸け、4℃で 3 時間固定した。続いて、70% エタノールに置換し、4℃で一晩脱水した。翌日、各組織をカセットに入れ、包埋機（サクラファインテックジャパン）にかけた。包埋後の組織は縦に切った断面が切り出されるように型に入れ、パラフィンを流し込み、パラフィン包埋ブロックを作製した。作製したパラフィン包埋ブロックを滑走式ミクロトーム（Leica、SM2000-R）にセットして 1〜2 μm の厚さに薄切し、スライドガラス（松浪硝子工業）に貼り付けパラフィン切片を作製した。

４．免疫組織染色

パラフィン包埋されたマウス組織切片を脱パラフィンした後、水洗した。続いて抗原賦活剤であるイムノセイバー（日新 EM 社）を 0.5%含む溶液に浸し、98℃で 45 分間処理した。その後、3%過酸化水素溶液（3%過酸化水素メタノール溶液）に室温で 30 分間浸し、ブロッキングした。PBS ですすいだ後、一次抗体（Table 1）を 4℃で一晩反応させた。翌日、PBS ですすいだ後、一次抗体に対応した二次抗体（HRP 標識抗マウス IgG または抗ウサギ IgG 抗体（Nichirei Bioscience））を用いて 37℃で 30 分間反応させた後、PBS ですすいだ。続いて、ジアミノベンジジン（DAB）ベースのペルオキシダーゼ基質であるシンプルステイン DAB 溶液を滴下し、抗原を検出した。対比染色（核染色）を行うために、ヘマトキシリンに 30 秒間浸した後、15 分間水洗し、アルコールによる脱水とキシレンによる透徹を行った。最後に非水溶性封入剤を用いて封入し、観察を行った。

副細胞型粘液に含まれる糖鎖と特異的に結合するレクチン *Griffonia simplicifolia* lectin (GS-Ⅱ) の染色は、一次抗体の代わりにビオチン標識 GS-Ⅱ（EY Laboratories; 1:100 (IHC-P)）を室温で 30 分間反応させた。PBS ですすいだ後、HRP 標識ストレプトアビジンを用いて室温で 30 分間反応させた。PBS ですすいだ後、DAB 溶液を滴下し、レクチンを検出した。

５．ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色

パラフィン包埋されたマウス組織切片を脱パラフィンした後、水洗した。ヘマトキシリンに 1 分間浸し、15 分間水洗した後、エオジンに 1 分間浸した。続いて、アルコールによる脱水とキシレンによる透徹を行った後、非水溶性封入剤を用いて封入し、観察を行った。

６．Periodic acid / Schiff reaction (PAS) 染色

パラフィン包埋されたマウス組織切片を脱パラフィン処理した後、水洗した。1%過ヨウ素酸水溶液に 30 分間浸し酸化させた後、流水で 5 分間洗浄し、イオン交換水で軽くすすいだ。次に、Schiff 試薬に浸して 10 分間染色した後、亜硫酸水に浸し 6 分間洗浄した。続いて、流水で 5 分間洗浄しながら色出しを行った後、ヘマトキシリンに 30 秒間浸し、水洗を 15 分間行った。続いて、アルコールによる脱水とキシレンによる透徹を行った後、非水溶性封入剤を用いて封入し、観察を行った。

７．免疫蛍光染色

パラフィン包埋されたマウス組織切片を脱パラフィン処理した後、水洗した。続いて抗原賦活剤であるイムノセイバー（日新 EM 社）を 0.5%含む溶液に浸し、98℃で 45 分間処理した。その後、10%ヤギ正常血清を滴下し、室温で 30 分間ブロッキングした。PBS ですすいだ後、一次抗体（Table 1）を 4℃で一晩反応させた。翌日、0.03% Tween 20 を含む PBS-T ですすいだ後、二次抗体（Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体（Invitrogen）および Alexa Fluor 594 標識抗ウサギ IgG 抗体（Invitrogen））と、核染色のための DAPI（Wako）を混合させた溶液を用いて室温で 1 時間反応させた。PBS-T ですすいだ後、ProLong Diamond Antifade Mountant（Life Technologies）を用いて封入し、共焦点顕微鏡（FV-1000D IX-81, Olympus）を用いて観察を行った。

８．血清ガストリン値の測定

血清サンプルを株式会社 メディックへ委託し、Radioimmunoassay (RIA) により血清ガストリン値を測定した。

９．組織からの RNA 抽出

切り出した胃を大彎側から開き、胃体部と幽門部を切り分けた後、ISOGEN（ニッポンジーン）を加え、ホモジナイザーペッスルを用いてホモジナイズした。クロロホルムを加えて遠心分離後、RNA を含む水相を回収し、イソプロパノール加えて更に遠心することで RNA を沈殿させた。沈殿させた RNA は DEPC 水に溶解し、ナノドロップ（NanoDrop 2000, Thermo）を用いて、260 nm の吸光度を測定することで RNA 濃度を算出した。

１０．逆転写反応

逆転写反応は Omniscript Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて行った。鋳型 RNA は終量 20 μL 中に 2 μg 含まれるように調製し、Gene Amp PCR system 9700（Applied Biosystems）を用いて 37℃で 60 分間反応させた。

１１．Quantitative Real-time PCR

mRNA の定量は、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)を用いて行った。20 倍希釈した逆転写サンプル（cDNA）と Master Mix および特異的に反応するプライマー（Table 2）を含む反応液を ABI PRISM7000（Applied Biosystems）にかけて PCR を行い、得られた増幅曲線から Ct 値を求めて定量した。遺伝子産物量の標準化には Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の結果を用いた。

１２．電子顕微鏡観察

切り出した胃を大彎側から開き、胃体部を切り分けた後、2%パラホルムアルデヒドと 2%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液（PB）（pH 7.4）に浸け、4℃で一晩前固定した。0.1 M PB ですすいだ後、2%四酸化オスミウムを含む 0.1 M PB に浸け、4℃で 2 時間後固定した。エタノールを用いて脱水後、酸

化プロピレンに置換し、最終的にレジンに浸かった状態で 60℃のオーブンに入れ熱重合によって包埋した。包埋ブロックは 70 nm の厚さに超薄切し、グリッドに乗せた後、2%酢酸ウラニルに浸け 15 分間室温で染色した。蒸留水ですすいだ後、lead stain solution（Sigma）を用いて 3 分間室温で二次染色後、透過型電子顕微鏡（JEM-1400Plus, Jeol）を用いて観察を行った。

電子顕微鏡観察は前固定後のサンプルを株式会社 東海電子顕微鏡解析に委託して行った。

１３．有意差検定

結果は平均 ± 標準誤差として示した。2 群間の比較は Student’s t-test により検定した。$P < 0.05$ の場合を有意とした。

【結果】

１．*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃

8 週齢の *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスは野生型マウスの 80%程度と小さいにも関わらず、胃は肥大化しており、質量を比較すると、野生型マウスの 1.6 倍もあることが明らかとなった（野生型マウス：0.16 ± 0.03 g (N=3), *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス：0.25 ± 0.02 g (N=3), $P < 0.05$）（Fig. 7A-D）。体重に占める胃の質量の割合を算出すると、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃は野生型マウスよりも 2 倍も大きく、H^+/K^+-ATPase α-subunit のノックアウトマウスで 2 倍、KCNQ1 のノックアウトマウスで 3 倍に胃が肥大化したという報告と一致した [18,21]。

２．胃粘膜におけるエズリンの発現分布

胃粘膜におけるエズリンの発現分布を調べるために、野生型マウスの胃粘膜を用いて免疫組織染色を行った。その結果、エズリンは胃体部のほか、壁細胞が見られない幽門部にも発現することが明らかとなった（Fig. 9）。胃体部におけるエズリンの局在をさらに詳しく調べるために、抗エズリン抗体と、壁細胞のマーカーである抗 H^+/K^+-ATPase α-subunit 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。胃体部のエズリンは H^+/K^+-ATPase α-subunit と共染色されたことから、主に壁細胞に局在することが確かめられた。また、エズリンは壁細胞に比べると発現レベルが低いものの、表層粘液細胞の管腔側表面や胃腺底部の管腔側にも発現することが確かめられた（Fig. 10）。胃腺底部に見られたエズリンは、部分的に主細胞のマーカーである抗 pepsin C 抗体で染色された細胞の管腔側と一致したことから、エズリンが主細胞にも発現することが示唆された（Fig. 11）。

３．胃粘膜におけるモエシンの発現分布

ERM タンパク質はアミノ酸相同性が高く、ドメイン構造が共通であることから、in vitro 条件では機能的な重複が報告されている [3]。野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃においては、エズリンに次いでモエシンが高発現しているため [8]、胃体部におけるモエシンの発現分布を調べた。その結果、モエシンはエズリンの発現分布とは異なり、血管内皮や間質細胞に局在した（Fig. 12）。また、野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスを比較しても、モエシンの局在に違いは見られなかった。

４．*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおける胃粘膜の肥厚と胃底腺の拡張

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの胃の肥大化の原因を調べるために、野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部の組織切片を H.E.染色し、胃粘膜の構造を比較した（Fig. 13A, B）。その結果、胃粘膜が野生型と比べて *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで肥厚していることが確認された（野生型マウス : 320 ± 4 μm (N=3 個体), *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス : 471 ± 14 μm (N=4 個体), $P < 0.01$）。また、胃粘膜を構成する細胞の中でも、特に表層粘液細胞の著しい増加が観察された。確認のため、表層粘液細胞から分泌される中性ムチンを PAS 染色した結果、染色の範囲が *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいて著しく増加していた（Fig. 13C, D）。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスにおいては、H.E.染色の結果から胃底腺の拡張も観察され、腺を構成する細胞数の増加が見られた（野生型マウス：47 ± 3 個 (N=3 個体), *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス：67 ± 4 個 (N=3 個体), $P < 0.01$）。そこで、抗 Ki67 抗体を用いて増殖細胞数に違いが見られるのかを調べた。その結果、野生型、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスとも幹細胞や前駆細胞が存在する岐部で Ki67 陽性細胞が観察されたが、その数は野生型に比べて *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで明らかに増加していた（Fig. 14）。また、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいては、胃底腺の底でも Ki67 陽性細胞が散発的に見られた。これらの結果から、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスは表層粘液細胞の増加と前駆細胞の増殖を伴う腺窩

上皮の過形成を起こしていることが明らかとなった。

５．*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの血清ガストリン値

ペプチドホルモンであるガストリンは、胃酸分泌の促進作用だけでなく（Fig. 15）、胃粘膜を構成する細胞の増殖や分化においても重要な役割を果たすことが知られている（Fig. 5）[26-28]。また、未成熟な壁細胞においては、ガストリンがエズリンの発現や壁細胞内での分布を制御することによって最終分化に導くことが報告されている [30]。H^+/K^+-ATPase α-subunit[17,18]や β-subunit[19]、KCNQ1[21]、KCNE2[23]のノックアウトマウスにおいては、無酸症とともに高ガストリン血症を示すことが報告されていることから、野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの血清ガストリン値を測定し比較を行った。その結果、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの血清ガストリン値は野生型マウスより 2.8 倍も高いことが明らかとなった（野生型マウス：98 ± 48 pg/ml (N=4), *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス：277 ± 103 pg/ml (N=5)）。従って、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいても無酸症とともに高ガストリン血症を示すことが確認された。

６．*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおける胃底腺構成細胞の割合の変化

胃底腺は主に壁細胞や主細胞、副細胞で構成される（Fig. 2）。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃底腺が拡張し、腺を構成する細胞数が増加していたことから、胃底腺を構成する細胞の割合に変化が見られるのかを調べた。壁細胞は抗 H^+/K^+-ATPase α-subunit 抗体、主細胞は抗 pepsin C 抗体、副細胞は副細胞型粘液に含まれる糖鎖と特異的に結合するレクチン [31]、GSⅡを用いてそれぞれ染色した（Fig. 16）。胃底腺を構成する 3 種類の細胞を染め分け、一つの胃底腺を構成する全細胞に占める割合を算出した。その結果、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいて壁細胞と主細胞の割合が減少し、副細胞の割合が増加した（Table 3）。細胞構成の変化に加えて、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞は野生型に比べて小さく、凝縮するなど不規則な形のも

のが多く観察された（Fig. 16A, B）。

次に、胃底腺を構成する細胞のマーカーとなるタンパク質をコードするmRNA 発現レベルを野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで比較した（Fig. 17）。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部において、壁細胞のマーカーである H^+/K^+-ATPase α, β-subunit のmRNA 発現レベルは、野生型と比べて有意に減少した（α-subunit : 57 ± 10 %, β-subunit : 45 ± 11 %）。壁細胞の別のマーカーである AE2 の mRNA 発現レベルも野生型と比べて有意に減少した（48 ± 11 %）。続いて、主細胞のマーカーであるpepsinogen Ⅰと gastric intrinsic factor（GIF）の mRNA 発現レベルも野生型と比べて有意に減少した（pepsinogen Ⅰ：25 ± 3 %, GIF : 43 ± 7 %）。これらの結果は、胃底腺において壁細胞や主細胞の占める割合が減少した結果と一致した（Table 3）。

機能的な壁細胞の欠損は、腺窩上皮の過形成に加え、粘膜細胞の異形成や偽幽門化生である SPEM (spasmolytic polypeptide expressing metaplasia) を起こすことが報告されている [21, 32]。SPEM では spasmolytic polypeptide / trefoil factor family 2 (SP / TFF2) や mucin glycoprotein 6 (MUC6) が発現する粘液細胞が腺底部に増加することから、これらのタンパク質が SPEM のマーカーとされている [29,33]。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいても腺窩上皮の過形成に加え、壁細胞や主細胞の割合が減少し、副細胞が腺底部に向かって増加していたことから、SPEM を生じた可能性を考え、マーカーとなるタンパク質をコードする mRNA 発現レベルを野生型と比較した。しかしながら、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部において、TFF2 や MUC6 のmRNA 発現レベルに変化は見られず、SPEM は起きていないことが示された（TFF2 : 89 ± 10 %, MUC6 : 93 ± 17 %）（Fig. 17）。

７．*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞におけるアポトーシス

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの胃底腺において壁細胞や主細胞の占める割合が減少したこと

から、アポトーシスを起こした可能性について検討した。アポトーシスのマーカーである抗 cleaved caspase-3 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果、陽性細胞が *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスでのみ検出された（Fig. 18）。また、caspase-3 と H^+/K^+-ATPase α-subunit が共染色されたことから、壁細胞の一部がアポトーシスを起こしていることを確認した。

８．*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃における炎症

胃内は胃酸によって強酸性条件下になることで、食物などと一緒に取り込まれた細菌を殺菌する場でもある。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスは無酸症を示すことから、胃内を強酸性状態にすることができず細菌の感染による炎症を起こす可能性が考えられた。そこで、胃底腺の構造変化が炎症によるものかどうかを調べるために、炎症マーカーである COX-2 や TNF-α、IL1-β の mRNA 発現レベルを野生型と比較した（Fig. 19）。その結果、COX-2 や TNF-α、IL1-β の mRNA 発現レベルはいずれも *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで有意に減少しており（COX-2 : 35 ± 15 %, TNF-α: 49 ± 10 %, IL1-β: 38 ± 19 %）、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部において炎症は起きていないと考えられた。炎症マーカーの mRNA 発現レベルの減少が見られた原因については不明である。

９．*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞における微細構造の変化

Vil2$^{kd/kd}$ マウスでは、胃酸分泌刺激による細管小胞と管腔側膜との膜融合が障害されるため、野生型と比べると壁細胞内の微細構造に違いが見られると考えられた。そこで、電子顕微鏡を用いて野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞内の微細構造を観察し、比較した。その結果、野生型マウスの壁細胞内には多数のミトコンドリアや管腔側膜に隣接する細管小胞が観察されたが、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞内には典型的な細管小胞や管腔側膜が見られなかった（Fig. 20A-D）。また、

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞内にはクリステ構造が見られない異常な形態のミトコンドリアや空胞化が観察された（Fig. 20C-F）。これらの構造変化に加えて、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞内には野生型マウスには見られない多重膜に囲まれたオートファゴソーム様の小胞が観察された（Fig. 20G, H）。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいて、ミトコンドリアの形態異常が観察されたため、ミトコンドリアの活性に違いがあるのかを調べるために、抗 OxPhos Complex Ⅳ subunit Ⅰ抗体を用いて活性化ミトコンドリアを染色した [34]。その結果、野生型に比べて、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおける染色が薄く、ミトコンドリアの活性が下がっていることが示唆された（Fig. 21）。

【考察】

エズリンの発現部位

野生型マウスの胃において、エズリンは胃体部の壁細胞だけでなく、幽門部にも発現していることが確認された（Fig. 9）。野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃を比較すると、胃体部の粘膜における変化が顕著であったことから、本研究では胃体部の粘膜の構造におけるエズリンノックダウンの影響を検討した。

胃体部において、エズリンは壁細胞のマーカーである H^+/K^+-ATPase α-subunit と共染色されたことから、主に壁細胞に発現することを確認した（Fig. 10）。また、発現レベルは低いものの、表層粘液細胞の管腔側表面や胃腺底部の管腔側においてもエズリンの発現を確認した。胃腺底部に見られたエズリンは、部分的に pepsin C で染色された主細胞の管腔側と一致したことから、主細胞にもエズリンが発現していることが示唆された（Fig. 11）。このことは、エズリンがマウスの壁細胞や表層粘液細胞の他、主細胞にも発現するという以前の報告と一致する [35]。表層粘液細胞の管腔側表面や主細胞の管腔側表面には微絨毛が形成されるため、そこにエズリンが発現していると考えられた。

モエシンはエズリンの機能を代償しない

ERM タンパク質はアミノ酸相同性が高く、ドメイン構造が共通であることから、in vitro 条件では機能的な重複が報告されている [3]。野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃におけるラディキシンの発現は低いが、モエシンの発現はエズリンに次いで高いことが報告されている [8]。また、ウサギの主細胞の管腔側表面にはモエシンが発現している [36]という報告があることからモエシンがエズリンの機能を代償する可能性について調べた。免疫組織染色によってモエシンの局在を調べた結果、モエシンはエズリンとは異なり血管内皮や間質細胞に局在し、主細胞に

おける発現も認められなかった（Fig. 12）。また、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞においてエズリンが大部分欠損し、胃粘膜の構造に変化をきたしても、代償的なモエシンの発現は見られなかった。このことから、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃粘膜の構造における変化はエズリンをノックダウンしたことによる影響であると考えられる。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスは高ガストリン血症を示す

ガストリンは食物摂取による刺激や胃内の pH の上昇を感知すると、幽門部の G 細胞から分泌され、基底側膜にガストリン受容体（CCK-2）を発現する壁細胞や、ヒスタミンを分泌する Enterochromaffin-like cells (ECL) 細胞に作用し、胃酸分泌を促進させる（Fig. 15）。そのため、無酸症を示す H^+/K^+-ATPase α-subunit[17,18] や β-subunit[19]、KCNE2[23]のノックアウトマウスでは、胃内の pH が 6.5～7.0 に上昇することにより高ガストリン血症を示すことが報告されている。無酸症を示す *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃内容物の pH も 6.5（Fig. 7E）と他の無酸症モデルマウスと同様に上昇していたことから、血清ガストリン値を測定した結果、野生型と比べて 2.8 倍に上昇していた。高ガストリン血症を示す H^+/K^+-ATPase α-subunit のノックアウトマウスでは野生型マウスの約 2 倍 [18]、胃酸分泌に関わるアクチン結合タンパク質である Huntingtin interacting protein 1 related (Hip1r) のノックアウトマウスでは野生型マウスの 2.7 倍 [37]に血清ガストリン値が上昇したという報告があり、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおける血清ガストリン値の上昇もこれらに相当するものであった。このように、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスは無酸症に伴う高ガストリン血症を示すことを確認した。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの岐部における前駆細胞の増加

ガストリンには胃酸分泌促進作用（Fig. 15）の他に、細胞増殖作用があることが知られている。ガストリンが壁細胞に作用した際には、EGF ファミリー増殖

因子に属する HB-EGF や TGF-α、AR の分泌を、ECL 細胞に作用した際には胃粘膜増殖因子である Reg-1 の分泌を促し、これらの増殖因子が岐部の前駆細胞に働くことで細胞の増殖分化が促進されることが報告されている（Fig. 5）[25-28]。実際に、高ガストリン血症を示す *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの岐部において Ki67 で染色される増殖細胞（前駆細胞）の有意な増加を確認した（Fig. 14）。このことから、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスはガストリンを過剰に分泌することにより、胃粘膜を構成する細胞の異常な増殖を起こし、胃粘膜が肥厚したと考えられた（Fig. 13A, B）。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスにおける腺窩上皮の過形成

Vil2$^{kd/kd}$ マウスにおいて、前駆細胞の増殖と表層粘液細胞の著しい増加による腺窩上皮の過形成が観察された（Fig. 13, 14）。腺窩上皮の過形成は、無酸症と共に高ガストリン血症を示す KCNQ1[21]や Hip1r[37,38]のノックアウトマウスでも観察されている。また、壁細胞から分泌された H^+を管腔から細胞内に逆流させるプロトノフォア作用によって細胞を傷害する DMP-777 を投与し、壁細胞を欠損させたラットは低酸症と高ガストリン血症を示すと共に、前駆細胞の増加と腺窩上皮の過形成を示すことが報告されている [39]。

一方、ガストリンノックアウトマウスに DMP-777 を投与し、胃粘膜の構造を比較した報告では、野生型マウスで見られる前駆細胞の増加と腺窩上皮の過形成が観察されなかった [32]。この結果から、前駆細胞の増加や腺窩上皮の過形成にはガストリンが必要であると言える。このことは、無酸症と共に高ガストリン血症を示す Hip1r のノックアウトマウスで観察された腺窩上皮の過形成が、Hip1r とガストリンのダブルノックアウトマウスでは観察されなかったという報告からも支持される [37]。このことから、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで観察された前駆細胞の増加と腺窩上皮の過形成は、無酸症に伴う高ガストリン血症によるものであると考えられた。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスにおける胃底腺の拡張

Vil2$^{kd/kd}$ マウスにおいて胃底腺の拡張が観察された（Fig. 13A, B）。胃底腺を構成する細胞数を比較すると、野生型マウスに比べて 1.4 倍に増加していた。野生型マウスの胃底腺には体積の大きい壁細胞が目立つのに対して、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞は小さく、また壁細胞と壁細胞の間に他の小さな細胞が多く観察された（Fig. 16A, B）。このことは、無酸症と高ガストリン血症を示す H^+/K^+-ATPase β-subunit のノックアウトマウスにおいて、胃腺を構成する細胞が増加し、空胞を含む壁細胞や胃底腺における未熟な細胞の増加に伴う胃粘膜の肥厚（つまりは胃底腺の拡張）が観察された報告と一致する [20]。また、ガストリンノックアウトマウスや、H^+/K^+-ATPase β-subunit とガストリンのダブルノックアウトマウスでは、このような未熟な細胞の増加による胃粘膜の肥厚は見られなかったことから、胃底腺の拡張は高ガストリン血症の影響であると報告されている。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおける胃底腺の拡張もまた、高ガストリン血症の影響であるのかも知れない。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの胃底腺を構成する細胞組成の変化

胃底腺の細胞構成に対するエズリンノックダウンの影響を調べるために、主な構成細胞である壁細胞、副細胞、主細胞をそれぞれのマーカーとなるタンパク質で染め分け個数を数えた。その結果、野生型マウスと比べて、壁細胞と主細胞の個数に違いは見られなかったが、副細胞の個数が *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで 2.4 倍に増加していた（Fig. 16）。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃底腺においては、構成する細胞数が野生型の 1.4 倍に増加していたことから、胃底腺を構成する全細胞数に占めるそれぞれの細胞数の割合を算出した。その結果、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスでは壁細胞と主細胞の割合が減少し、副細胞の割合が増加していることが確認された（Table 3）。同様な細胞構成の変化は、無酸症を示す H^+/K^+-ATPase β-subunit[19,20]や KCNQ1[22]、

KCNE2[23]、Hip1r[37]、AE2[24]のノックアウトマウスでも観察されている。

また、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで観察された壁細胞や主細胞の減少と副細胞の増加という細胞構成の変化は、SPEM の場合にも見られる[29]。SPEM は、慢性的なピロリ菌感染や[40]、壁細胞への cholera toxin A1 subunit の遺伝子導入[41]、DMP-777 投与[39]によって壁細胞を欠損させた後に発生し、主細胞が SP/TFF2 と MUC6 を共発現する粘液細胞に分化転換する。しかしながら、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃底腺において SP/TFF2 や MUC6 の mRNA 発現レベルの増加は見られず、SPEM は発生していなかった（Fig. 17）。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞におけるアポトーシス

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞は酸分泌機能を有さず、野生型に比べて形態が小さくなっていた（Fig. 16A, B）。壁細胞の平均寿命は 6 ヵ月程度と長いため[11]、野生型マウスの胃底腺においてアポトーシスのマーカーである caspase-3 陽性細胞は見られないが、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃底腺では所々で観察された（Fig. 18）。また、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの caspase-3 陽性細胞は H^+/K^+-ATPase α-subunit と共染色されたことから、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞が頻繁にアポトーシスを起こしている可能性が示唆された。壁細胞のアポトーシス増加は、無酸症を示す Hip1r のノックアウトマウスでも観察されている[37]。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいては、ガストリンの過剰分泌による前駆細胞の増加により、胃底腺を構成する壁細胞や副細胞が増加したと考えられる。過剰に産生された壁細胞は完全には成熟・分化できずにアポトーシスを起こすことで通常より早く消失し、増加と消失のバランスによって壁細胞の数には違いが見られなかったと考えられる。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスにおける副細胞から主細胞への分化異常

正常な分泌機能を有する壁細胞は、胃酸の他に副細胞から主細胞への再分化を促す増殖因子を分泌しており、この分泌もガストリンによって促進される（Fig. 5）[25]。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスは高ガストリン血症を示し、副細胞が過剰に産生されるが、壁細胞から増殖因子が正常に分泌されないため、主細胞へと分化できずに割合が減少し、逆に副細胞は蓄積して割合が増加したと考える。しかしながら、主細胞の数自体には変化が見られなかった。これは、主細胞が自ら脱分化することでリニューアルする機構が働いたからかもしれない[42]。実際に、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃底腺の底では Ki67 陽性細胞が散発的に観察された（Fig. 14）。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞における微細構造の変化

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞においては、典型的な細管小胞の欠損や空胞化が観察された（Fig. 20A-D）。また、野生型では色の濃い（電子密度の高い）ミトコンドリアが多く観察されたが、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスのミトコンドリアは色が薄い（電子密度が低い）だけでなく、クリステ構造も見られず、形が小さいものが観察された（Fig. 20A-F）。壁細胞内における微細構造の異常は、無酸症を起こす H^+/K^+-ATPase α-subunit[17]や β-subunit[19]、KCNE2[23]のノックアウトマウスでも報告されているが、これらのマウスの壁細胞内は分泌細管（canaliculi）が拡張する一方でその管腔側膜には微絨毛がほとんど存在せず、壁細胞の面積の半分以上が空胞化するなど、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで観察された構造変化とは異なる。また、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞内においては、オートファゴソームに似た、多重膜の構造を持つ小胞がいくつか観察された（Fig. 20G, H）。オートファゴソームはオートファジー（マクロオートファジー）の過程で現れる小胞であり、このオートファジーは栄養飢餓状態において細胞が必要とする栄養を細胞内から生み出す時や、ダメージを受けた細胞質成分を取り除く際に増加する[43]。実際に、小胞体スト

レスを促進する薬剤で処理した場合に小胞体膜のオートファジーが誘発される[44]。また、クロフィブラート処理したラットから単離した肝細胞において、オートファジーによるペルオキシソームの選択的な分解が観察される[45]。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞においては、異常な小胞の構造物やミトコンドリアを取り除くためにオートファジーが発生した可能性が考えられるが、この点については更に詳細な検討を行う必要がある。

以上、本研究により、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃において、腺窩上皮の過形成や胃底腺の拡張、壁細胞と主細胞の割合の減少と副細胞の割合の増加が観察された。これらの変化は、無酸症の二次的な影響であるとも考えられる。一方で、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞において観察された微細構造の変化はエズリンをノックダウンしたことによる直接的な影響であると考えられた。エズリンは胃酸分泌のための管腔側膜の形成だけでなく、胃腺上皮の正常な構造維持にも関与することが明らかとなった。

第二部

エズリンノックダウンマウスの回腸刷子縁膜における網羅的なプロテオーム解析

【背景】

摂取した栄養素の約 90%は小腸で吸収されることから、生命維持にとって小腸の機能は重要である。小腸の内腔粘膜は、管腔に突出した絨毛と陥没した crypt（陰窩）の構造をとることで、表面積を拡大している。この粘膜の表面は一層の上皮細胞で覆われており、陰窩の底に存在する幹細胞から産生される（Fig. 22）。産生された未分化な細胞（Transit amplifying cells）は増殖・分裂をしながら陰窩を上行し、陰窩と絨毛の境界領域に達すると増殖を停止して成熟・分化する。絨毛部分は分化した吸収上皮細胞や杯細胞、内分泌細胞で構成されるが、大部分を占めるのは吸収上皮細胞である。吸収上皮細胞は極性を持ち、細胞膜は頂端側（apical 側）と側底側（basolateral 側）に分けられる。管腔に面する apical 膜側は突起構造である微絨毛が多数存在することから刷子縁膜（Brush border membrane: BBM）と呼ばれる。BBM の膜表面には消化や吸収に関わる酵素や膜輸送タンパク質が存在し、栄養吸収の主要な場として機能する。小腸においてエズリンは、この BBM に集積していることが知られている [35]。

エズリンノックアウトマウスでは、小腸絨毛の融合や微絨毛の形態形成異常が見られ、生後 10 日以内に死滅する [7]。また、発生段階から小腸特異的にエズリンを破壊したコンディショナルノックアウトマウスも、生後 10 日以内に死滅することから [46]、小腸におけるエズリンの役割は生命維持に関わるほど重要である。

エズリンはN末端側に存在するFERMドメインを介して直接に、または足場タンパク質を介して間接的に細胞膜に存在する膜輸送タンパク質や接着分子と結合する。一方、C末端側がアクチン細胞骨格と結合することで、細胞膜上のタンパク質と細胞骨格とを架橋して、それらの細胞膜での発現や機能を制御することが報告されている（Fig. 1B）[1,3]。小腸特異的にエズリンを破壊した成体のコンディショナルノックアウトマウスでは、前述した微絨毛の形態形成異常に加え、PSD-95/Discs-large/ZO-1 (PDZ) ドメインとERM結合ドメインを持つ足場タンパク質である Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 1 (NHERF1)（Fig. 23）のBBM fractionでの発現低下が報告されている[46]。NHERF1のPDZドメインにはC末端にPDZ結合モチーフを持つ様々な膜輸送タンパク質が結合することが知られており[47]、エズリンはNHERF1と結合する膜輸送タンパク質の発現や機能に対しても間接的に影響を与えると考えられる。実際に、NHERF1 ノックアウトマウスの小腸から BBM fraction を調製し、プロテオーム解析を行った報告では、エズリンの他に、足場タンパク質であるNHERF3や、細胞内クロライドチャネルと考えられているCLIC1、CLIC5の発現低下が観察された[48]。また、我々の研究室では、腎近位尿細管や胆管細胞において、エズリンがNHERF1を介してリン酸輸送体であるsodium-dependent phosphate transport protein 2A (Npt2a) や Cl^- チャネルであるcystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) と相互作用し、輸送体のapical膜表面での発現や機能に影響を与えることを見出してきた[49,50]。これらの報告から、エズリンは直接に結合する膜輸送タンパク質に加えて、NHERF1 などの足場タンパク質を介して間接的に結合する膜輸送タンパク質のapical膜表面での発現や機能にも影響を与えると考えられる。しかし、その全容については明らかにされていない。

そこで本研究では、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスと野生型マウスの小腸の BBM fraction を調製し、プロテオーム解析による網羅的な発現比較を行うことで、エズリンと相

互作用する膜タンパク質の全容について検討を行った。

【実験方法】

１．実験動物

第一部の実験方法 1 に記した方法で飼育した、8 週齢の野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの雌を全ての実験に用いた。

２．組織の固定および切片作製

胃直下から盲腸の直上までを小腸として切り出した。腸管膜を取り除いて 1 本に伸ばした後、管腔内を冷 PBS で洗浄した。小腸は更に、十二指腸（胃直下から 5 cm)、空腸（十二指腸に続く 10 cm)、回腸（盲腸の直上から 10 cm）の 3 つのセグメントに切り分けた後、腸管を縦に切り開き、第一部の材料・実験方法の 3 と同様の方法で固定し、パラフィン切片を作製した。

３．免疫組織染色

第一部の実験方法の 4 と同様の方法で行った。

４．ヘマトキシリン・エオジン **(HE)** 染色

第一部の実験方法の 5 と同様の方法で行った。

５．免疫蛍光染色

第一部の実験方法の 7 と同様の方法で行った。

６．組織からの **RNA** 抽出

第二部の材料・実験方法の 2 と同様に小腸を 3 つのセグメントに分けた後、十二指腸と空腸は上端 1 cm を、回腸は下端 1 cm を更に切り分け、ISOGEN（ニ

ッポンジーン）を用いて、第一部の実験方法の 9 と同様の方法で RNA を抽出した。

７．逆転写反応

第一部の実験方法の 10 と同様の方法で行った。

８．マイクロアレイ解析

第二部の実験方法の 6 で抽出した回腸の RNA サンプルと SurePrint G3 Mouse Gene Expression Microarray（Agilent）を用いたマイクロアレイ解析は、タカラバイオ株式会社に委託して行った。

９．**BBM fraction** の調製

BBM fraction の調製は Sugiura らの方法を参考に、改良を加えて行った[51]。第二部の材料・実験方法の 2 と同様に小腸を 3 つのセグメントに分けた後、管腔内を冷 PBS で洗浄し内容物を取り除き、縦に切開した。続いて、スライドガラスを用いて粘膜層を回収し、100 mg あたり 1 ml の homogenizing buffer (300 mM D-mannitol、12 mM Tris-HCl (pH 7.1)、5 mM EGTA、protease inhibitors) を加え、ポリトロンホモジナイザー（KINEMATICA 社）を用いてホモジナイズした。そのホモジネートを 4℃、3,000×g で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。回収した上清の一部は total tissue lysate として用いた。残りの上清は更に 4℃、8,000×g で 15 分間遠心分離し、その上清を超遠心機（Himac CP120GXZ、rotor S120AT2、日立工機株式会社）を用いて 4℃、100,000×g で 90 分間超遠心した。遠心後、上清を除去し、得られた沈殿を氷冷した 1 ml の suspending buffer (150 mM D-mannitol、6 mM Tris-HCl (pH 7.1)、2.5 mM EGTA) に懸濁し、25 G の注射針がついた 1 ml シリンジ（テルモ株式会社）を用いて注射針内を通すことでホモジ

ナイズした。この懸濁液に終濃度が 10 mM になるように 1 M $CaCl_2$ 溶液を加え、ときどき混ぜながら 15 分間氷上に静置させた。その後、4℃、3,000×g で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。残った沈殿は basolateral membrane-rich fraction（BLM-rich fraction）として suspending buffer に懸濁した。回収した上清は、4℃、100,000×g で 30 分間超遠心し、上清を取り除いた後に残った沈殿を BBM fraction として suspending buffer に懸濁した。質量分析とウェスタンブロッティングによる確認を同じサンプルで行うために、調製した 3-5 匹分の BBM fraction を混合して 1 サンプルとし、使用した。

１０．BBM fraction 溶液の消化と質量分析のための TMT 標識

質量分析とタンパク質の同定は杏林大学医学部薬理学教室の福富俊之先生に依頼した。BBM fraction は可溶化液（100 mM ammonium bicarbonate solution、 12 mM sodium deoxycholate (SDC)、 12 mM sodium N-lauroyl sarcosinate (SLS)）中で可溶化した。膜タンパク質は、10 mM dithiothreitol (DTT) で 55℃、30 分間還元した後、60 mM iodoacetamide で室温、30 分間アルキル化した。続いて、サンプルに対して 1:20 (w/w) になるようにトリプシン（Proteomics grade、Roche Life Science）を加え、37℃で 16 時間消化した。トリプシン消化したサンプルに等量の酢酸エチルを加えた混合液に trifluoroacetic acid (TFA) を 1%加えて酸性化し、ボルテックスミキサーで混和することで界面活性剤を有機相に移行させた [52]。続いて遠心を行い、ペプチドを含む水相を採取後、C18-Stage Tips[53]を使用して脱塩した。得られたトリプシンペプチドを Tandem Mass TagTM (TMT) Reagents（Thermo Fischer Scientific）の説明書に従ってラベル化した。塩基性 pH でのペプチド分画が行える SDB-StageTips[53]を用いて分画したラベル化ペプチドサンプルを、C18-Stage Tips で脱塩し、濃縮した。

１１．逆相カラムを用いた NanoLC-MS/MS によるタンパク質の同定と定量

上述の実験方法 10 によって分画したそれぞれのペプチドを、trap column（C18、0.3 × 5 mm、L-column、化学物質評価研究機構）にインジェクションし、トラップカラムに保持させた。その後、分析用カラム（C18、0.075 × 120 mm、日京テクノス株式会社）を通してグラジエント溶出することでペプチドを分離し、質量分析計に導入した。

NanoLC-MS/MS 解析は nanoLC interface（株式会社ケーワイエーテクノロジーズ）と nanoHPLC system DiNaTM（株式会社ケーワイエーテクノロジーズ）を備えた LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer（Thermo Fisher Scientific）を用いて行った。精製したペプチドは NanoLC からハイブリッドイオントラップ型フーリエ変換質量分析計である LTQ-Orbitrap Velos へ導入した。フルスキャン MS やフルスキャン MS/MS は高エネルギー衝突誘起解離（higher energy collisionally activated dissociation : HCD）によって行った。MS や MS/MS、ペプチドのレポーターイオンスペクトルからのタンパク質の同定と定量は、データーベース検索エンジンである Proteome Discoverer^{TM} 1.4（Thermo Scientific）と MASCOT 2.4（Matrix Science）を使用して行った。ペプチドの質量データは UniprotKB/Swiss-prot（2015 年 7 月 24 日発表）データーベースを検索することで得た。False discovery rate (FDR)[54]は parcolator[55]を使用したペプチド配列解析によって算出し、FDR が 1%未満のペプチドを高信頼度のペプチドとして同定した。

１２．網羅的な発現比較後の絞込み条件

同定したタンパク質について、野生型の発現量を 1.0 とした場合の *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの発現量を相対比で求め、相対比が 2.0 以上を「増加」、0.6 以下を「減少」とみなした。そして、3 回行った質量分析の全てで同じ傾向（増加または減少）を示し、かつ、それぞれの回で得られたデータのばらつき（variability）が 30%

以下のものを有意な増減が見られたタンパク質とみなした。

１３．タンパク定量

タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準として、BCA protein Assay Kit (PIERCE) を用いて定量した。

１４．ウェスタンブロッティング

得られたタンパク質試料に SDS サンプルバッファー（50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS、2% 2-mercaptoethanol、20% glycerol、0.01% SDS）を加えて、65℃で 15 分間変性させた。次に、SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写し、5%スキムミルク溶液、室温で 60 分間ブロッキングした。一次抗体（Table 1）を 4℃で一晩反応させた後、二次抗体である HRP 標識抗マウス IgG 抗体（Millipore）、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体（Millipore）、HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体（ZYMED）を用いて室温で 1 時間、反応させた。そして、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) で化学発光させ、LAS-3000 (Fujifilm) で検出した。検出したバンドは ImageJ ソフトウェアを用いて定量した。

１５．有意差検定

第一部の実験方法の 13 と同様の方法で行った。

【結果】

１．*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの小腸

Vil2$^{kd/kd}$ マウスは、野生型マウスと比べて体格が小さいことに加え、著しい腹部膨満が観察された。野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの小腸（胃直下から盲腸の直上）の長さに差は見られなかったが（野生型マウス：29.3 ± 0.9 cm (N=3), *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス：31.5 ± 0.9 cm (N=3)）、腸管自体が太く膨張していた。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの小腸の質量（内容物は除去後）は野生型マウスの 1.3 倍に増加しており（野生型マウス：0.92 ± 0.03 g (N=3), *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス：1.23 ± 0.15 g (N=3), $P < 0.01$）、体重に占める小腸の質量の割合を算出すると、野生型マウスより 1.7 倍も大きかった（Fig. 24）。

２．小腸各セグメントにおける粘膜構造の比較

エズリンノックアウトマウスの小腸では絨毛同士が融合するなど形態形成に異常が見られることが報告されている [7,46]。その一方で、本研究に用いた *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスは完全にエズリンの発現を欠損させているわけではないため、正常に絨毛や微絨毛が形成されることが報告されている [8]。しかしながら、十二指腸、空腸、回腸に分けての検討はされていなかったため、各セグメントで構造比較を行った。

野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの各セグメントの組織切片を H.E.染色し（Fig. 25）、絨毛の形態や長さ、1 視野あたりの本数、陰窩の深さについて測定を行った（Table 4）。十二指腸においては、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで絨毛の融合や、異様に長く折れ曲がって伸びる絨毛が観察され、野生型マウスと比べて絨毛の形態に違いが見られた。空腸においては、両方のマウスで垂直に伸びた絨毛が並ぶ様子が観察されたが、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいて、絨毛の本数が野生型マウスの半分程度に減少していた。続く回腸においては、両マウスの間で絨毛の形態や長さ、本数につい

て差が見られなかった。また、陰窩の深さについては、野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの各セグメントにおいて差は見られなかった。

そこで、両マウスの間で粘膜構造上の違いが見られなかった回腸の BBM fraction をそれぞれのマウスから調製し、発現するタンパク質の網羅的な比較を行った。

３．回腸における ERM タンパク質の発現

回腸における ERM タンパク質の発現量と局在をウェスタンブロッティングと免疫蛍光染色によって比較した（Fig. 26）。野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸から調製した total tissue lysate に含まれる ERM タンパク質の発現量を、抗 ERM 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって比較した（Fig. 26A）。野生型マウスでは、エズリンがモエシンやラディキシンよりも高発現していることが確認された。また、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいては野生型と比べてエズリンの著しい発現低下がみられたが、モエシンやラディキシンの発現量には変化が見られず、代償的な発現増加は見られなかった。

続いて、免疫蛍光染色の結果から、野生型マウスの回腸において ERM タンパク質全ての発現が確認されたが、それらの局在は大きく異なっていた。エズリンは、絨毛の大部分を占める吸収上皮細胞の刷子縁（brush border : BB）に高発現したが、モエシンとラディキシンは粘膜固有層の血管内皮細胞に発現した（Fig. 26B, C）。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいては、BB の所々でエズリンの発現が見られるものの、発現量は著しく低下していることが確認された。また、エズリンの発現低下に伴う、モエシンやラディキシンの代償的な発現増加や局在の変化は見られなかった。

４．BBM fraction の純度の確認

野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸から Total tissue lysate と BBM fraction を調製した。BBM fraction の純度は、各細胞小器官や膜ドメインに特異的に局在するタンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングによって確認した（Fig. 27）。

BBM のマーカーである Villin は BBM fraction で濃縮された。一方で、小胞体のマーカーである PDI と細胞質のマーカーである GAPDH はそれぞれ BBM fraction において検出できなかった。基底側膜（basorateral membrane : BLM）のマーカーである Na^+/K^+-ATPase α-subunit は両マウスの total tissue lysate と比較すると BBM fraction で取り除けていたが、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスではわずかにバンドが検出された。Na^+/K^+-ATPase α-subunit については、これとは別に BLM-rich fraction に大部分が濃縮されていることを確認した。これらの結果から、マウスの回腸から調製した BBM fraction には、BBM に局在するタンパク質が濃縮されたことを確認した。

５．質量分析

野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸の BBM fraction を質量分析にかけ、発現するタンパク質の網羅的な解析を行い、結果を比較することで apical 膜表面におけるエズリンの役割を検討した。

1 匹分のマウス回腸（10 cm）から約 100 mg の粘膜が得られ、調製すると約 50 μg の BBM fraction が得られた。BBM fraction の回収量に野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで差は見られなかった。

野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの両方で同定されたタンパク質の総数は約 580 種類（3 回の平均値）であり、この数は以前にマウス空腸の BBM fraction を使って行われた質量分析で同定された 570 種類に匹敵した [56]。野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの両

方で同定され、かつ 3 回行った質量分析の全てで検出されたタンパク質は 313 種類であった。この 313 種類のタンパク質を機能ごとに分類すると、膜輸送タンパク質（32 種類）、細胞骨格関連タンパク質（54 種類）、小胞輸送関連タンパク質（22 種類）、シグナルタンパク質（23 種類）、核タンパク質（18 種類）、酵素（87 種類）、その他または機能未知のタンパク質（77 種類）となった。本研究では、小腸での溶質輸送に関わる膜タンパク質に注目するため、膜輸送タンパク質の他、それらの apical 膜表面での安定化に関わる細胞骨格関連タンパク質や、発現に関わる小胞輸送関連タンパク質に注目し、分類されたタンパク質を Table 5-7 に示した。

同定した 313 種類のタンパク質のうち 19 種類のタンパク質は野生型と比べて *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで有意な増減がみられた。これらのタンパク質を機能ごとに分類すると、膜輸送タンパク質が 4 種類、細胞骨格関連タンパク質が 6 種類、小胞輸送関連タンパク質が 2 種類、酵素が 3 種類、その他が 4 種類であった（Table 8）。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの回腸 BBM fraction において有意に減少していた膜輸送タンパク質の中には、sodium monocarboxylate transporter 1 (SMCT1) や transmembrane channel-like protein 4 (TMC4)、chloride intracellular channel protein 5 (CLIC5) が含まれていた。SMCT1 は、乳酸やピルビン酸、短鎖脂肪酸（酢酸、酪酸、プロピオン酸）と Na^+を細胞内に共輸送するトランスポーターである [57,58]。TMC4 は 6 回膜貫通のイオンチャネルとして機能すると考えられている [59]。CLIC5 は細胞内クロライドチャネル（CLICs）のメンバーで、上皮細胞の apical 膜表面に発現していることが報告されている [60,61]。一方、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸 BBM fraction において有意に増加していた膜輸送タンパク質としては、亜鉛やマンガンを細胞質から細胞外や細胞小器官内へ輸送する zinc transporter 10 (SLC30A10) が同定された [62,63]。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの回腸 BBM fraction において有意に減少していた細胞骨格関連

タンパク質として、エズリンの他、PDZ ドメインを持つ足場タンパク質である NHERF1 が同定された。一方で、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸 BBM fraction において有意に増加していた細胞骨格関連タンパク質として、Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) や INAD-like (inactivation no after-potential D) protein、adseverin、claudin-3 が同定された。EpCAM は 1 回膜貫通型のアクチン結合糖タンパク質で、ホモタイプの細胞接着分子として機能する [64]。INAD-like protein は 10 個の PDZ ドメインを有する足場タンパク質で、主に上皮細胞の apical 膜表面やタイトジャンクションに局在する [65,66]。Adseverin (scinderin) は Ca^{2+}依存性のアクチン切断タンパク質で、アクチンフィラメントの切断やキャッピングをすることで細胞骨格の構造を制御する [67,68]。Claudin-3 はタイトジャンクション形成に必須の膜タンパク質の一つである [69]。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの回腸 BBM fraction において有意に増加していた小胞輸送関連タンパク質として、Protein S100-A10 と Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) が同定された。Protein S100-A10 は Annexin A2 と複合体を形成し、細胞質から細胞膜へ移行する過程で、Annexin A2 と結合する標的タンパク質の細胞膜への輸送を制御する [70]。VAMP8 は小胞膜にある v-SNARE タンパク質の一つで、外分泌組織に発現し、外分泌の制御に関与している [71]。

その他に *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸 BBM fraction において有意に増加していた酵素として、Putative adenosylhomocysteinase 2 と Glutathione S-transferase A1、Intestinal-type alkaline phosphatase が同定された。

６．*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの BBM fraction における SMCT1、CLIC5、NHERF1 の発現低下の確認

質量分析を行った結果、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸 BBM fraction において、SMCT1 や TMC4、CLIC5、NHERF1 の発現が有意に減少していることが示された。これ

らの 4 つのタンパク質の中で特異的な抗体が入手可能な、SMCT1、CLIC5、NHERF1 の発現量をウェスタンブロッティングによって確かめた（Fig. 28）。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウス回腸の total tissue lysate と BBM fraction における SMCT1 と NHERF1 の発現量は、野生型マウスと比べてそれぞれ減少していた。CLIC5 は選択的なスプライシングにより、CLIC5A（251 アミノ酸、32 kDa）と CLIC5B（410 アミノ酸、49 kDa）という二つのバリアントが存在するが、C 末端側の 238 アミノ酸は同じであることが知られている [61]。本研究に用いた抗 CLIC5 抗体のエピトープは C 末端側にあるため、CLIC5A と CLIC5B の両方を認識すると考えられるが、ウェスタンブロッティングによる発現確認では、CLIC5A と考えられる 32 kDa 付近にのみバンドが検出された。この結果から、マウス回腸の total tissue lysate と BBM fraction では CLIC5A のみ発現し、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスでの発現量は、いずれの画分でも減少した。

免疫蛍光染色によって NHERF1 の局在を確認した結果、野生型マウスの回腸においては吸収上皮細胞の apical 膜表面でエズリンと共局在することが確認された（Fig. 29）。一方で、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸においては、吸収上皮細胞の apical 膜表面に NHERF1 が集積して局在する様子は観察されなかった。この結果は、エズリンをノックダウンすることによって apical 膜表面における NHERF1 の発現が障害されたことを示唆しており、以前に報告されたエズリンノックアウトマウスの小腸 total cell lysate と BB において NHERF1 の発現が有意に減少した結果と一致した [46]。

次に、免疫蛍光染色によって CLIC5 の局在を確認した結果、野生型マウスの回腸においては絨毛部分にのみ発現し、特に吸収上皮細胞の apical 膜表面でエズリンと共局在することが確認された（Fig. 30）。一方で、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸においては、吸収上皮細胞の apical 膜表面に CLIC5 が集積して局在する様子は観察されなかった。SMCT1 でも免疫蛍光染色による確認を試みたが、本研究で用

いた抗体では染色できなかった。

７．野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸における mRNA 発現レベルの比較

野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸における SMCT1、TMC4、CLIC5、NHERF1 の mRNA 発現レベルを SurePrint G3 Mouse Gene Expression Microarray（Agilent）を用いて比較した。それぞれ野生型マウスでの mRNA 発現レベルを 100%とした場合の *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスでの mRNA 発現レベルは、SMCT1 が 80%、TMC4 が 86%、CLIC5 が 80%、NHERF1 が 98%で有意な変化は見られなかった。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウス回腸におけるエズリンの mRNA 発現レベルは、野生型に対して 11%であった。一方で、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウス回腸における SLC30A10 の mRNA 発現レベルは、野生型に対して 283%と有意な増加が見られた。このことから、BBM fraction における SLC30A10 の有意な増加は、mRNA 発現レベルの増加によるものと見られた。

【考察】

粘膜構造に差が見られない回腸を用いてプロテオーム解析を行った

野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの小腸から精製した BBM fraction を用いてプロテオーム解析を行い網羅的な発現比較を行うことは、吸収上皮細胞の apical 膜表面でエズリンと相互作用する膜タンパク質を同定する方法として有効である。一方で、エズリンは絨毛や微絨毛の形態形成に関与することが報告されており [7,46]、ノックダウンすることでそれらの形態形成に異常が見られると、プロテオーム解析の結果を正しく評価することができない。そこで、最初に野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの小腸を十二指腸、空腸、回腸の 3 つのセグメントに分け、セグメントごとに粘膜構造を比較した（Fig. 25）。

十二指腸では、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで絨毛の融合や、異様に長く折れ曲がって伸びる絨毛が観察された。十二指腸粘膜は、胃から送り込まれる強酸性の胃酸や食物で傷害を受けやすいが、アルカリ性の胆汁や膵液、十二指腸粘液を分泌し、瞬時に中和することで粘膜を保護している。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの絨毛が融合した原因はわからないが、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスは無酸症を示すことから [8]、胃から送り込まれる食物の pH が既に中性に近いことで、絨毛の形態形成に差が見られたのかもしれない（Table 9）。空腸では、両マウス間で絨毛構造に違いは見られなかったが、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスでは 1 mm あたりの絨毛の本数が野生型の半分程度に減少していた（Table 4）。一方、回腸では、両マウス間で絨毛の本数や長さ、陰窩の深さに違いは見られなかった。また、腸管内の pH の変化はそれ自身が遺伝子発現などに影響を与えることが想定されるが、各セグメントに含まれる内容物の pH を測定した結果、野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで差はなかった（Table 9）。このことから、本研究では粘膜構造に変化が見られない野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸の BBM fraction を用いてプロテオーム解析を行い、網羅的な発現比較を行った。ま

た、発現に有意な差が見られたタンパク質で、抗体が入手可能なものについては、ウェスタンブロッティングや免疫蛍光染色によって発現の確認を行った。

19 種類のタンパク質で有意な発現変化が見られた

Table 8 に示した発現増加や減少が見られた 19 種類のタンパク質の中で、本研究では特に足場タンパク質と膜輸送タンパク質に注目した。

***Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの BBM fraction において NHERF1 の発現が減少した**

NHERF1 は 2 つの PDZ ドメインと、ERM 結合ドメインを持つ足場タンパク質である（Fig. 23）。PDZ ドメインには同じファミリーの NHERF3（PDZK1）や、PDZ 結合モチーフを持つ膜輸送タンパク質が結合することが知られている [72]。本研究では、ウェスタンブロッティングによって *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス回腸の BBM fraction における NHERF1 の発現が減少することや、免疫蛍光染色によって吸収上皮細胞の apical 膜表面における NHERF1 の発現が障害されることを確認した（Fig. 28, 29）。この結果は、エズリンノックアウトマウスの小腸において、NHERF1 が apical 膜表面に局在できなくなるという報告と一致する [46]。一方、NHERF1 は小腸や腎臓の上皮細胞の apical 膜表面で、リン酸化された活性化型 ERM の安定化に必要であることが報告されている [73]。また、NHERF1 ノックアウトマウスの空腸 BBM fraction を用いたプロテオーム解析において、エズリンの発現が有意に減少したことから、NHERF1 とエズリンは相互作用することでそれぞれが apical 膜表面に安定して発現することができると言える [48]。これらの報告から、エズリンを欠損させると、NHERF1 の apical 膜表面での発現が減少し、NHERF1 と結合する膜輸送タンパク質の発現にも影響を与えると考えられた。

NHERF3 の発現に対するエズリンノックダウンの影響

NHERF1 ノックアウトマウス空腸の BBM fraction のプロテオーム解析では、NHERF3 の発現低下も報告されている [6]。NHERF3 は 4 つの PDZ ドメインを持つことから（Fig. 23）、PDZ 結合モチーフを持つ多くの膜輸送タンパク質と相互作用することが報告されている [47]。また、NHERF3 の C 末端は NHERF1 の PDZ ドメインに結合できることが知られており、NHERF1 を介してエズリンと相互作用することも報告されている [74]。こうしたことから、今回のプロテオーム解析においても NHERF3 の発現に注目した。その結果、3 回行ったプロテオーム解析のうちの 2 回で、NHERF3 は *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの BBM fraction における発現が減少していた。このことから、エズリンは NHERF1 を介して NHERF3 の apical 膜表面での発現に影響を与えることが示唆された。また、NHERF3 の apical 膜表面での発現低下は、これと相互作用する膜輸送タンパク質の発現や機能に影響を与えると考えられた。

***Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの BBM fraction における膜輸送タンパク質の発現変化**

今回のプロテオーム解析により、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウス回腸の BBM fraction において SMCT1 や TMC4、CLIC5 といった膜輸送タンパク質の発現が有意に減少していることを明らかにした。

SMCT1 は、乳酸やピルビン酸、短鎖脂肪酸（酢酸、酪酸、プロピオン酸）の輸送に関与する他 [57,58]、マウスやヒトではニコチン酸（ビタミン B3）の輸送にも関与する [75]。SMCT1 は C 末端の PDZ 結合モチーフ（GTRL 配列）を介して PDZ ドメインを持つ NHERF3 と相互作用することが報告されている [76]。NHERF3 は NHERF1 と相互作用する [74]ことから、エズリンは NHERF1 と NHERF3 を介して間接的に SMCT1 と結合しているものと思われる。実際に、ウェスタンブロッティングによって、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウス回腸の BBM fraction における SMCT1 の発

現が減少した（Fig. 28）。エズリンを欠損させると、NHERF1 や NHERF3 の apical 膜表面での発現が減少し、NHERF3 と相互作用する SMCT1 の apical 膜表面での発現にも影響を与えたと考えられた。SMCT1 が apical 膜表面で正常に機能できないことによるモノカルボン酸の取り込み障害は、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいて観察された成長障害の原因の一つかもしれない。

NHERF1 ノックアウトマウス空腸の BBM fraction では、細胞内クロライドチャネルと考えられている CLIC ファミリータンパク質のメンバーである、CLIC1 と CLIC5 の発現も減少していた。CLIC ファミリータンパク質は、細胞膜表面で ERM タンパク質や NHERF ファミリータンパク質、Rho GTPase、その他の膜タンパク質と複合体を形成して存在することが示唆されている [77]。また、CLIC5 は、細胞内クロライドチャネルとしての機能が報告されている一方で、Na^+や K^+など他のイオンチャネルとして機能する可能性も報告されている [61,78]。CLIC5A は胎盤の微絨毛においてエズリンを含むいくつかの細胞骨格関連タンパク質で構成された複合体から単離され、エズリンを介してアクチン細胞骨格と相互作用することが報告されている [60,61]。また、CLIC5A 欠損マウスの腎糸球体ではエズリンの発現も減少したことから、CLIC5A がエズリンの apical 膜表面での発現に影響を与えることが報告されており [79]、CLIC5A とエズリンは相互作用すると考えられる。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸では apical 膜表面におけるエズリンの発現が減少したことにより、細胞骨格と結合することができずに CLIC5 の apical 膜表面での発現が障害されたと考えられる（Fig. 28）。小腸における CLIC5 の局在やエズリンとの関連を調べた報告はこれまでになく、本研究において初めて、エズリンと CLIC5 が野生型マウスの回腸の apical 膜表面で共局在することを免疫蛍光染色によって示した（Fig. 30）。回腸の apical 膜表面における CLIC5 の発現低下が溶質輸送にどのような影響を及ぼすかについては今後検討する必要がある。

一方、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの BBM fraction において膜輸送タンパク質の SLC30A10 の発現が有意に増加していた。SLC30A10 は SLC30A ファミリーに属し、このファミリータンパク質は、細胞質から細胞外や細胞小器官内に Zn^{2+}を排出し H^{+}を取り込む交換輸送体と考えられている [62]。一方で、SLC30A10 は基質特異性を決定する配列の一部が他の SLC30A ファミリーメンバーとは異なり、マンガン（Mn^{2+}）トランスポーターとしての機能も報告されている [63]。SLC30A10 は肝臓や脳に高発現し、細胞内のゴルジ体やリサイクリングエンドソームに局在することが報告されているが [80]、小腸での発現や詳細な機能についての報告はこれまでにない。本研究では、SLC30A10 については抗体を使ったウェスタンブロッティングや免疫蛍光染色などの検討を行うことはできなかった。一方、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸を用いたマイクロアレイ解析の結果では、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの SLC30A10 の mRNA 発現レベルが野生型と比べて 3 倍近く増加していた。このことから、SLC30A10 では mRNA 発現レベルの増加に伴い、タンパク質レベルでも発現が増加し apical 膜表面でのタンパク質の発現上昇が見られた可能性が示唆された。回腸における SLC30A10 の発現やエズリンとの関連については今後更に検討する必要がある。

Vil2$^{kd/kd}$ **マウスの BBM fraction におけるタイトジャンクション関連タンパク質の増加**

Vil2$^{kd/kd}$ マウス回腸の BBM fraction においていくつかの細胞骨格関連タンパク質の発現が増加していた（Table 8）。Claudin-3 や INAD-like 、EpCAM はタイトジャンクションの形成に関わるタンパク質であり、マウスの小腸において claudin-3 と EpCAM が相互作用することが報告されている [81]。また、claudin の C 末端側には PDZ 結合モチーフがあり、直接または PDZ ドメインを持つ膜裏打ちタンパク質である ZO-1、ZO-2、ZO-3 などを介して INAD-like と相互作用する

ことも報告されている。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスにおいては、apical 膜表面のエズリンが欠損することにより、細胞骨格系の再構成が起こり、タイトジャンクションの形成に影響を与えているのかもしれない。関連する 3 種類のタンパク質が同様に増加していることは興味深く、エズリンの欠損がタイトジャンクションの形成に与える影響ついては今後検討する必要がある。

Vil2$^{kd/kd}$ マウスの BBM fraction おける Protein S100-A10 の発現変化

小胞輸送関連タンパク質である Protein S100-A10 は Annexin A2 と複合体を形成し細胞質から細胞膜へ移行することが知られている [70]。Annexin A2 は variability の条件をクリアできなかったために Table 8 には載せなかったが、3 回全てで *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸 BBM fraction における発現が増加していた。このことから、Protein S100-A10 は Annexin A2 と複合体を形成して apical 膜表面へ移行したと考えられる。しかしながら、エズリンを欠損させたこととの関連については今後検討する必要がある。

以上、本研究により、初めて SMCT1 や TMC4、CLIC5 の発現が *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸 BBM fraction において減少することを示した。また、エズリンが NHERF1 や NHERF3 を介して、複数の膜輸送タンパク質の apical 膜表面での発現に関与する可能性を示した。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで見られる高い致死率や成長障害は、小腸において複数の膜輸送タンパク質の apical 膜表面での発現が減少したことによる累積的な影響である可能性が示唆された。

【結論】

本研究では以下の知見を得た。

1. 胃体部においてエズリンは主に壁細胞に発現し、エズリンをノックダウンすると無酸症と共に高ガストリン血症を示すことがわかった。また、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスでは腺窩上皮の過形成と胃底腺の拡張を伴う胃粘膜の肥厚が観察され、これらの構造変化は高ガストリン血症の影響であると考えられた。また、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃底腺では、壁細胞と主細胞の割合が減少し、副細胞の割合が増加する構造変化も観察された。これらの変化は、壁細胞が障害されることにより副細胞から主細胞への分化を促す増殖因子の分泌ができなくっているためではないかと考えられた。一方、壁細胞内のエズリンは細管小胞と管腔側膜との融合に関わるだけでなく、壁細胞内の微細構造の維持に必要であることを明らかにした。

2. *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス回腸の BBM fraction を用いたプロテオーム解析により、エズリンが SMCT1 や TMC4、CLIC5 を含む膜輸送タンパク質、NHERF1 や EpCAM を含む細胞骨格関連タンパク質、Protein S100-A10 や VAMP8 を含む小胞輸送関連タンパク質の apical 膜表面での発現に関与する可能性を示した。また、ウェスタンブロッティングや免疫蛍光染色により、エズリンが SMCT1 や CLIC5、NHERF1 の apical 膜表面での発現に影響を与えることを明らかにし、小腸における溶質輸送に関与する可能性を示した。

以上、著者は消化管におけるエズリンの生理的な役割について検討を行い、胃では胃酸分泌に関わるだけでなく、壁細胞の構造維持や胃粘膜の構造維持に

関わることを、回腸では溶質輸送に関わる膜タンパク質の apical 膜表面での発現に関わることを明らかにした。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

1. Yoshida S, Yamamoto H, Tetsui T, Kobayakawa Y, Hatano R, Mukaisho K, Hattori T, Sugihara H, Asano S (2016) Effects of ezrin knockdown on the structure of gastric glandular epithelia. J Physiol Sci 66: 53-65
2. Yoshida S, Fukutomi T, Kimura T, Sakurai H, Hatano R, Yamamoto H, Mukaisho K, Hattori T, Sugihara H, Asano S (2016) Comprehensive proteome analysis of brush border membrane fraction of ileum of ezrin knockdown mouse. Biomed Res 37: 127-139

【謝辞】

終わりに臨み、本研究の機会を与えていただき、多くのご指導、ご鞭撻を賜りました立命館大学薬学部分子生理学研究室、浅野真司教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスを供与いただきました、大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学講座の月田早智子教授、田村淳准教授に感謝申し上げます。また、プロテオーム解析や学術論文の執筆に際し、ご協力、ご指導賜りました杏林大学医学部薬理学教室の櫻井裕之教授、木村徹講師、福富俊之助教に感謝申し上げます。また、組織学的な手法や本稿の執筆に際し、ご指導、ご鞭撻を賜りました滋賀医科大学医学部病理学講座の服部隆則名誉教授、杉原洋行教授、向所賢一准教授、山本裕人博士ならびに病理学講座の皆様に感謝申し上げます。そして、本研究を遂行するにあたり多大なご協力を賜りました、立命館大学薬学部分子生理学研究室の平山佳伸教授、波多野亮助教、研究室の皆様をはじめ、お世話になりました多くの方々にこの場を借りて深く感謝申し上げます。

最後に、博士課程修了まで長年にわたって支え、励ましてくれた家族、友人に心より感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. Nat Rev Mol Cell Biol 3: 586-599
2. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A (2010) Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. Nat Rev Mol Cell Biol 11: 276-287
3. Tsukita S, Yonemura S (1999) Cortical actin organization: lessons from ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) proteins. J Biol Chem 274: 34507-34510
4. Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1992) A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. J Cell Sci 103: 131-143
5. Andréoli C, Martin M, Le Borgne R, Reggio H, Mangeat P (1994) Ezrin has properties to self-associate at the plasma membrane. J Cell Biol 107: 2509-2521
6. Gary R, Bretscher A (1995) Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. Mol Biol Cell 6: 1061-1075
7. Saotome I Curto M, McClatchey AI (2004) Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. Dev Cell 6: 855-864
8. Tamura A, Kikuchi S, Hata M, Katsuno T, Matsui T, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S (2005) Achlorhydria by ezrin knockdown: defects in the formation/expansion of apical canaliculi in gastric parietal cells. J Cell Biol 169: 21-28
9. Karam SM, Stratton T, Hassan WM, Leblond CP (2003) Defining epithelial cell progenitors in the human oxyntic mucosa. Stem Cells 21: 322-336.

10. Mills JC, Andersson N, Stappenbeck TS, Chen CC, Gordon JI (2003) Molecular characterization of mouse gastric zymogenic cells. J Biol Chem 278: 46138-46145
11. Magami Y, Azuma T, Inokuchi H, Moriyasu F, Kawai K, Hattori T (2002) Cell kinetics of slow renewing cell populations in mice stomach. J Gastroenterol Hepatol 17: 262-269
12. Hanzel DK, Urushidani T, Usinger WR, Smolka A, Forte JG (1989) Immunolocalization of an 80-kDa phosphoprotein to the apical membrane of gastric parietal cells. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 256: G1082-G1089
13. Hanzel D, Reggio H, Bretscher A, Forte JG, Mangeat P (1991) The secretion-stimulated 80K phosphoprotein of parietal cells is ezrin, and has properties of a membrane cytoskeletal linker in the induced apical microvilli. EMBO J 10: 2363-2373
14. Zhou R, Cao X, Watson C, Miao Y, Guo Z, Forte JG, Yao X (2003) Characterization of protein kinase A-mediated phosphorylation of ezrin in gastric parietal cell activation. J Biol Chem 278: 35651-35659
15. Ding X, Deng H, Wang D, Zhou J, Huang Y, Zhao X, Yu X, Wang M, Wang F, Ward T, Aikhionbare F, Yao X (2010) Phospho-regulated ACAP4-Ezrin interaction is essential for histamine-stimulated parietal cell secretion. J Biol Chem 285: 18769-18780
16. Fang Z, Miao Y, Ding X, Deng H, Liu S, Wang F, Zhou R, Watson C, Fu C, Hu Q, Lillard JW Jr, Powell M, Chen Y, Forte JG, Yao X (2006) Proteomic identification and functional characterization of a novel ARF6 GTPase-activating protein, ACAP4. Mol Cell Proteomics 5: 1437-1449

17. Spicer Z, Miller ML, Andringa A, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Shull GE (2000) Stomachs of mice lacking the gastric H,K-ATPase α-subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia. J Biol Chem 275: 21555-21565

18. Judd LM, Andringa A, Rubio CA, Spicer Z, Shull GE, Miller ML (2005) Gastric achlorhydria in H/K-ATPase-deficient (*Atp4a*(-/-)) mice causes severe hyperplasia, mucocystic metaplasia and upregulation of growth factors. J Gastroenterol Hepatol 20: 1266-1278

19. Scarff KL, Judd LM, Toh B-H, Gleeson PA, van Driel IR (1999) Gastric H^+, K^+-adenosine triphosphatase β subunit is required for normal function, development, and membrane structure of mouse parietal cells. Gastroenterology 117: 605-618

20. Franic TV, Judd LM, Robinson D, Barrett SP, Scarff KL, Gleeson PA, Samuelson LC, Van Driel IR (2001) Regulation of gastric epithelial cell development revealed in H^+/K^+-ATPase β-subunit- and gastrin-deficient mice. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 281: G1502-1511

21. Lee MP, Ravenel JD, Hu RJ, Lustig LR, Tomaselli G, Berger RD, Brandenburg SA, Litzi TJ, Bunton TE, Limb C, Francis H, Gorelikow M, Gu H, Washington K, Argani P, Goldenring JR, Coffey RJ, Feinberg AP (2000) Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. J Clin Invest 106: 1447-1455

22. Song P, Groos S, Riederer B, Feng Z, Krabbehöft A, Smolka A, Seidler U (2009) KCNQ1 is the luminal K^+ recycling channel during stimulation of gastric acid secretion. J Physiol 587: 3955-3965

23. Roepke TK, Anantharam A, Kirchhoff P, Busque SM, Young JB, Geibel JP, Lerner

DJ, Abbott GW (2006) The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion. J Biol Chem 281: 23740-23747

24. Gawenis LR, Ledoussal C, Judd LM, Prasad V, Alper SL, Stuart-Tilley A, Woo AL, Grisham C, Sanford LP, Doetschman T, Miller ML, Shull GE (2004) Mice with a targeted disruption of the AE2 Cl^-/HCO_3^- exchanger are achlorhydric. J Biol Chem 279: 30531-30539
25. Tsutsui S, Shinomura Y, Higashiyama S, Higashimoto Y, Miyazaki Y, Kanayama S, Hiraoka S, Minami T, Kitamura S, Murayama Y, Miyagawa J, Taniguchi N,Matsuzawa Y (1997) Induction of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor and amphiregulin mRNAs by gastrin in the rat stomach. Biochem Biophys Res Commun 235: 520-523
26. Kinoshita Y, Ishihara S (2000) Mechanism of gastric mucosal proliferation induced by gastrin. J Gastroenterol Hepatol 15: (Suppl.) D7-11
27. Dockray GJ, Varro A, Dimaline R, Wang T (2001) The gastrins: their production and biological activities. Annu Rev Physiol 63: 119-139
28. Jain RN, Samuelson LC (2006) Differentiation of the gastric mucosa. II. Role of gastrin in gastric epithelial cell proliferation and maturation. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 291: G762-765
29. Goldenring JR, Nomura S (2006) Differentiation of the gastric mucosa III. Animal models of oxytic atrophy and metaplasia. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 291: G999-G1004
30. Pagliocca A, Hegyi P, Venglovecz V, Rackstraw SA, Khan Z, Burdyga G, Wang TC, Dimaline R, Verro A, Dockray GJ (2008) Identification of ezrin as a target of gastrin in immature mouse gastric parietal cells. Exp Physiol 93: 1174-1189
31. Falk P, Roth, KA, Gordon JI (1994) Lectins are sensitive tools for defining the

differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 266: G987-G1003

32. Nomura S, Yamaguchi H, Ogawa M, Wang TC, Lee JR, Goldenring JR (2005) Alterations in gastric mucosal lineages induced by acute oxyntic atrophy in wild-type and gastrin-deficient mice. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 288: G362-G375.

33. Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulsom R, Corfield AP, Thomas MG, Wright NA (2000) Coordinated localization of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. Gut 47: 792-800

34. Fujisawa S, Romin Y, Barlas A, Petrovic LM, Turkekul M, Fan N, Xu K, Garcia AR, Monette S, Klimstra DS, Erinjeri JP, Solomon SB, Manova-Todorova K, Sofocleous CT (2014) Evaluation of YO-PRO-1 as an early marker of apoptosis following radiofrequency ablation of colon cancer liver metastasis. Cytotechnology 66: 259-273

35. Berryman M, Franck Z, Bretascher A (1993) Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. J Cell Sci 105: 1025-1043

36. Zhu L, Hatakeyama J, Zhang B, Makdisi J, Ender C, Forte JG (2009) Novel insights of the gastric gland organization revealed by chief cell specific expression of moesin. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 296: G185-G195

37. Jain RN, Al-Menhali AA, Keeley TM, Ren J, El-Zaatari M, Chen X, Merchant JL, Ross TS, Chew CS, Samuelson LC (2008) Hip1r is expressed in gastric parietal cells and is required for tubulovesicle formation and cell survival in mice. J Clin Invest 118: 2459-2470

38. Keeley TM, Samuelson LC (2010) Cytodifferentiation of the postnatal mouse

stomach in normal and Huntingtin-interacting protein 1-related-deficient mice. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 299: G1241-1251

39. Goldenring JR, Ray GS, Coffey RJ, Meunier PC, Haley PJ, Barnes TB, Car BD (2000) Reversible drug-induced oxyntic atrophy in rats. Gastroenterology 118: 1080-1093

40. Wang TC, Goldenring JR, Dangler C, Ito S, Mueller A, Jeon WK, Koh TJ, Fox JG (1998) Mice lacking secretory phospholipase A2 show altered apoptosis and differentiation with Helicobacter felis infection. Gastroenterology 114: 675-689

41. Lopez-Diaz L, Hinkle KL, Jain RN, Zavros Y, Brunkan CS, Keeley T, Eaton KA, Merchant JL, Chew CS, Samuelson LC (2006) Parietal cell hyperstimulation and autoimmune gastritis in cholera toxin transgenic mice. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 290: G970-G979

42. Hattori T (1987) Cell kinetics of the gastric mucosa with special reference to acute and chronic gastritis. Gastrointestinal Function (Regulation and Disturbance) 5: 69-87

43. Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 132: 27-42

44. Klionsky DJ (2007) Autophagy: form phenomenology to molecular understanding in less than a decade. Nat Rev Mol Cell Biol 8: 931-937

45. Nardacci R, Sartori C, Stefanini S (2000) Selective autophagy of clofibrate-induced rat liver peroxisomes. Cytochemistry and immunocytochemistry on tissue specimens and on fractions obtained by Nycodenz density gradient centrifugation. Cell Mol Biol 46: 1277-1290

46. Casaletto JB, Saotome I, Curto M, McClatchey AI (2011) Ezrin-mediated apical integrity is required for intestinal homeostasis. Proc Natl Acad Sci USA 108:

11924-11929

47. Kato Y, Watanabe C, Tsuji A (2006) Regulation of drug transporters by PDZ adaptor proteins and nuclear receptors. Eur J Pharm Sci 27: 487-500

48. Donowitz M, Singh S, Singh P, Salahuddin FF, Chen Y, Chakraborty M, Murtazina R, Gucek M, Cole RN, Zachos NC, Kovbasnjuk O, Broere N, Smalley-Freed WG, Reynolds AB, Hubbard AL, Seidler U, Weinman E, de Jonge HR, Hogema BM, Li X (2010) Alterations in the proteome of the NHERF1 knockout mouse jejunal brush border membrane vesicles. Physiol Genomics 42A: 200-210

49. Hatano R, Fujii E, Segawa H, Mukaisho K, Matsubara M, Miyamoto K, Hattori T, Sugihara H, Asano S (2013) Ezrin, a membrane cytoskeletal cross-linker, is essential for the regulation of phosphate and calcium homeostasis. Kidney Int 83: 41-49

50. Hatano R, Akiyama K, Tamura A, Hosogi S, Marunaka Y, Caplan MJ, Ueno Y, Tsukita S, Asano S (2015) Knockdown of ezrin causes intrahepatic cholestasis by the dysregulation of bile fluidity in the bile duct epithelium. Hepatology 61: 1660-1671

51. Sugiura T, Kato Y, Wakayama T, Silver DL, Kubo Y, Iseki S, Tsuji A (2008) PDZK1 Regulates Two Intestinal Solute Carriers (Slc15a1 and Slc22a5) in Mice. Drug Metabol Dis 36: 1181-1188

52. Masuda T, Tomita M, Ishihama Y (2008) Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. J Proteome Res 7: 731-740

53. Rappsilber J, Mann M, Ishikawa Y (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Nat Protoc 2: 1896-1906

54. Wang G, Wu WW, Zhang Z, Masilamani S, Shen R-F (2009) Decoy methods for assessing false positives and false discovery rates in shotgun proteomics. Anal Chem 81: 146-159

55. Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. Nat Methods 4: 923-925

56. Donowitz M, Singh S, Salahuddin FF, Hogema BM, Chen Y, Gucek M, Cole RN, Ham A, Zachos NC, Kovbasnjuk O, Lapierre LA, Broere N, Goldenring J, deJonge H, Li X (2007) Proteome of Murine Jejunal Brush Border Membrane Vesicles. J Proteome Res 6: 4068-4079

57. Coady MJ, Chang M-H, Charron FM, Plata C, Wallendorff B, Sah JF, Markowitz SD, Romero MF, Japointe J-Y (2004) The human tumor suppressor gene *SLC5A8* expresses a Na^+-monocarboxylate cotransporter. J Physiol 557: 719-731

58. Miyauchi S, Gopal E, Fei Y-J, Ganapathy V (2004) Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na^+-coupled transporter for short-chain fatty acids. J Biol Chem 279: 13293-13296

59. Kurima K, Yang Y, Sorber K, Griffith AJ (2003) Characterization of the transmembrane channel-like (TMC) gene family: functional clues from hearing loss and epidermodysplasia verruciformis. Genomics 82: 300-308

60. Berryman M, Bretscher A (2000) Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placental microvilli. Mol Biol Cell 11: 1509-1521

61. Berryman M, Bruno J, Price J, Edwards JC (2004) CLIC-5A functions as a chloride channel in vitro and associates with the cortical actin cytoskeleton in vitro and in vivo. J Biol Chem 279: 34794-34801

62. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N (2015) The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. Physiol Rev 95: 749-784

63. Leyva-Illades D, Chen P, Zoqzas CE, Hutchens S, Mercado JM, Swaim CD, Morrisett RA, Bowman AB, Aschner M, Mukhopadhyay S (2014) SLC30A10 is a cell surface-localized manganese efflux transporter, and parkinsonism-causing mutations block its intracellular trafficking and efflux activity. J Neurosci 34: 14079-14095

64. Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV (1999) The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). J Mol Med 77: 699-712

65. Lemmers C, Médina E, Delgrossi M-H, Michel D, Arsanto J-P, Le Bivic A (2002) hINADl/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. J Biol Chem 277: 25408-25415

66. Assemat E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D (2008) Polarity complex proteins. Biochim Biophys Acta 1778: 614-630

67. Schafer DA, Cooper JA (1995) Control of actin assembly at filament ends. Annu Rev Dev Biol 11: 497-518

68. Lueck A, Brown D, Kwiatkowski DJ (1998) The actin-binding proteins adseverin and gelsolin are both highly expressed but differentially localized in kidney and intestine. J Cell Sci 111: 3633-3643

69. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proc Natl Acad Sci USA 96: 511-516

70. Rescher U, Gerke V (2008) S100A10/p11: family, friends and functions. Pflugrrs Arch 455: 575-582

71. Wang C-C, Shi H, Guo K, Ng CP, Li J, Gan BQ, Liew HC, Leinonen J, Rajaniemi H, Zhou ZH, Zeng Q, Hong W (2007) VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system. Mol Biol Cell 18: 1056-1063

72. Donowitz M, Li X (2007) Regulatory binding partners and complexes of NHE3. Physiol Rev 87: 825-872

73. Molares FC, Takahashi Y, Kreimann EL, Georgescu M-M (2004) Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. Proc Natl Acad Sci USA 101: 17705-17710

74. LaLonde DP, Garbett D, Bretscher A (2010) A regulated complex of the scaffolding proteins PZDK1 and EBP50 with ezrin contribute to microvillar organization. Mol Biol Cell 21: 1519-1529

75. Gopal E, Miyauchi S, Martin PM, Ananth S, Roon P, Smith SB, Ganapathy V (2007) Transport of nicotinate and structurally related compounds by human SCMT1 (SLC5A8) and its relevance to drug transport in the mammalian intestinal tract. Pharmaceu Res 24: 575-584

76. Anzai N, Kanai Y, Endou H (2007) New insights into renal transport of urate. Curr Opin Rheumatol 19: 151-157

77. Jiang L, Phang JM, Yu J, Harrop SJ, Sokolova AV, Duff AP, Wilk KE, Alkhamici H, Breit SN, Valenzuela SM, Brown LJ, Curmi PM (2014) CLIC proteins, ezrin, radixin, moesin and the coupling of membranes to the actin cytoskeleton: a smoking gun? Biochim Biophys Acta 1838: 643-657

78. Singh H, Cousin MA, Ashley RH (2007) Functional reconstitution of mammalian 'chloride intracellular channels' CLIC1, CLIC4 and CLIC5 reveals differential

regulation by cytoskeletal actin. FEBS J 274: 6306-6316

79. Wegner B, AI-Momany A, Kulak SC, Kozlowski K, Obeidat M, Jahroudi N, Paes J, Berryman M, Ballermann BJ (2010) CLIC5A, a component of the ezrin-podocalyxin complex in glomeruli, is a determinant of podocyte integrity. Am J Physiol (Renal Physiol) 298: F1492-F1503

80. Patrushev N, Seidel-Rogol B, Salazar G (2012) Angiotensin II requires zinc and downregulation of the zinc transporters ZnT3 and ZnT10 to induce senescence of vascular smooth muscle cells. PloS One 7: e33211

81. Lei Z, Maeda T, Tamura A, Nakamura T, Yamazaki Y, Shiratori H, Yashiro K, Tsukita S, Hamada H (2012) EpCAM contributes to formation of functional tight junction in the intestinal epithelium by recruiting claudin proteins. Dev Biol 371: 136-145

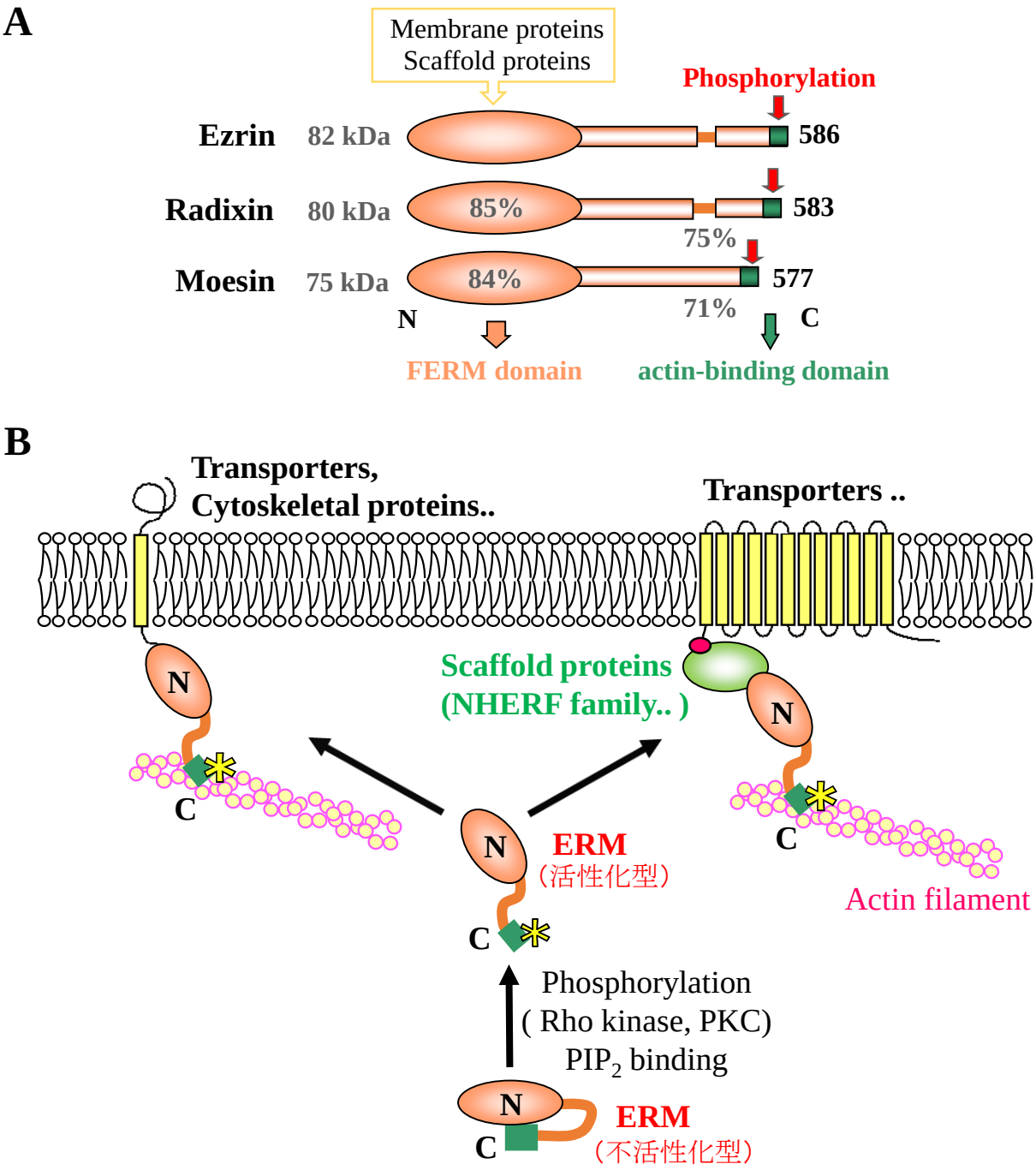


Fig. 1 ERMタンパク質の構造 (A)と活性化様式 (B)

(A) エズリンは586個、ラディキシンは583個、モエシンは577個のアミノ酸からなる。N末端側のFERMドメインはファミリー間で約85%、C末端側のアクチン結合ドメインはファミリー間で約70%の相同性をもつ。
(B) ERMタンパク質は、活性化シグナルが働かない条件下では、N末端側とC末端側のドメインが結合した不活性型で存在する。これに対して、C末端側のスレオニン残基がRho kinaseやPKCによってリン酸化される、またはPIP_2がFERMドメインに結合することで、N末端側とC末端側との結合が解離し、活性化型へと構造が変化する。この過程において、ERMタンパク質は細胞質から膜表面へとリクルートされ、膜タンパク質やアクチン細胞骨格と結合することで、それらを架橋する。

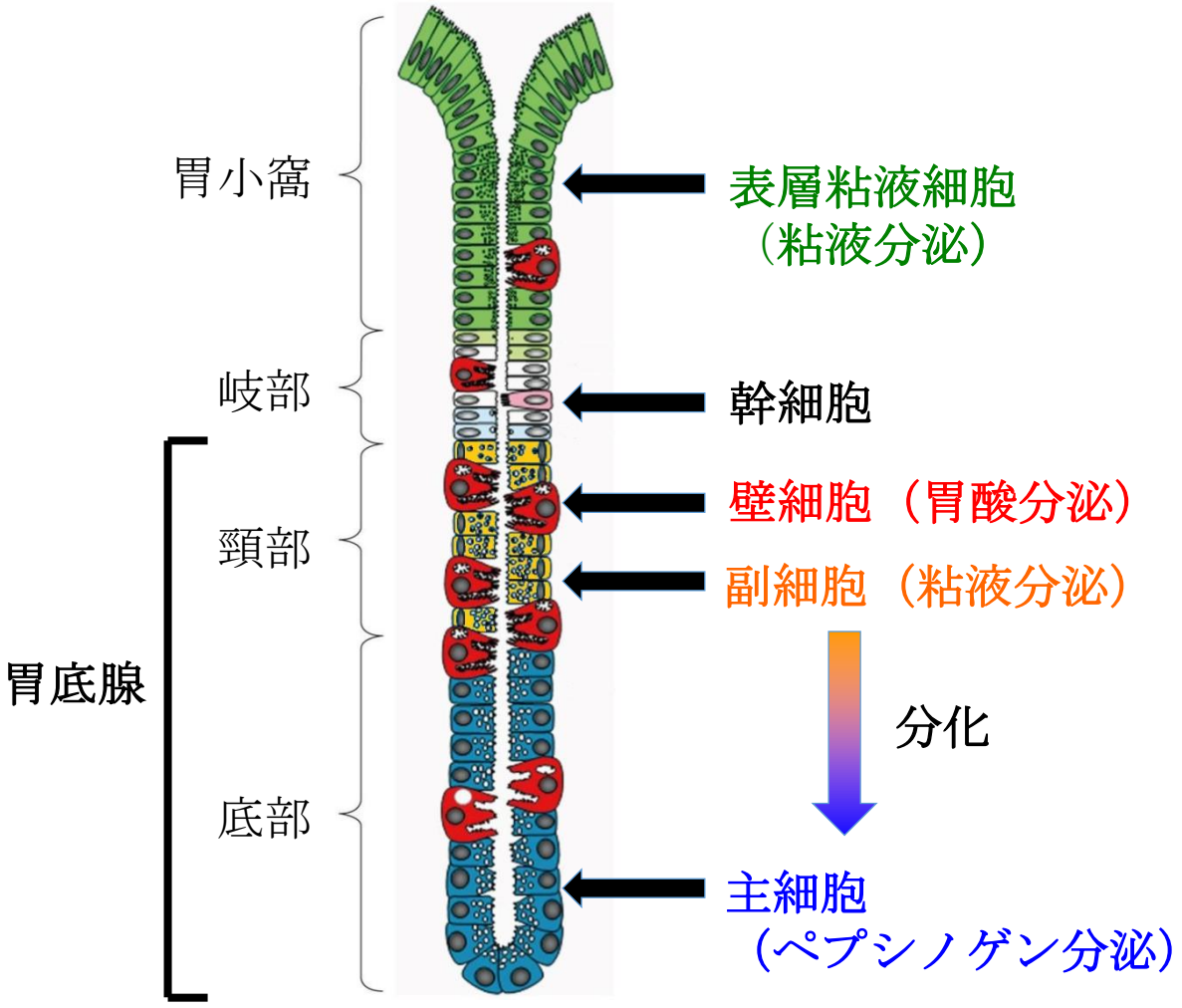


Fig. 2 胃腺の構造と構成細胞

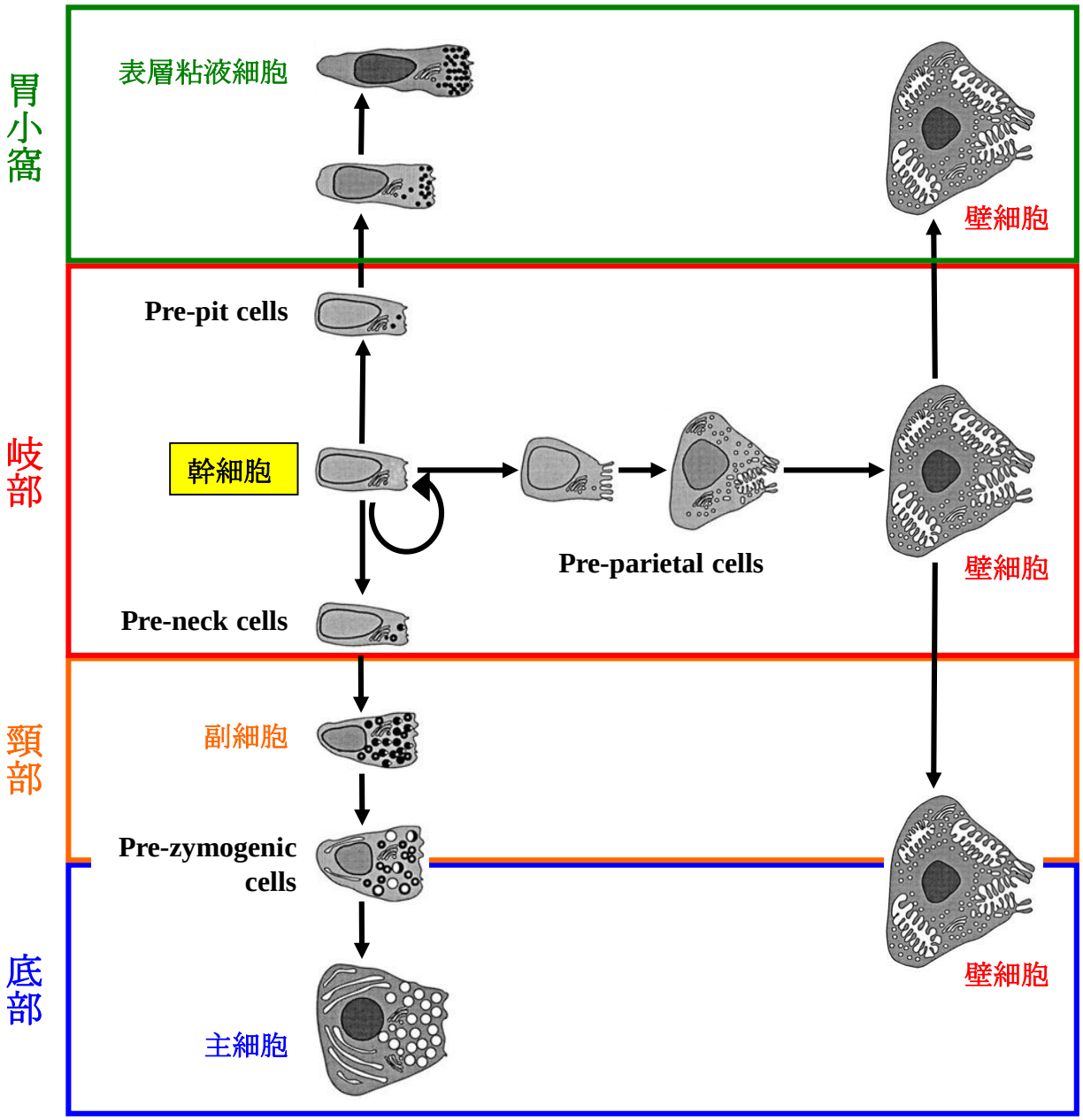


Fig. 3 胃腺構成細胞の分化の流れ

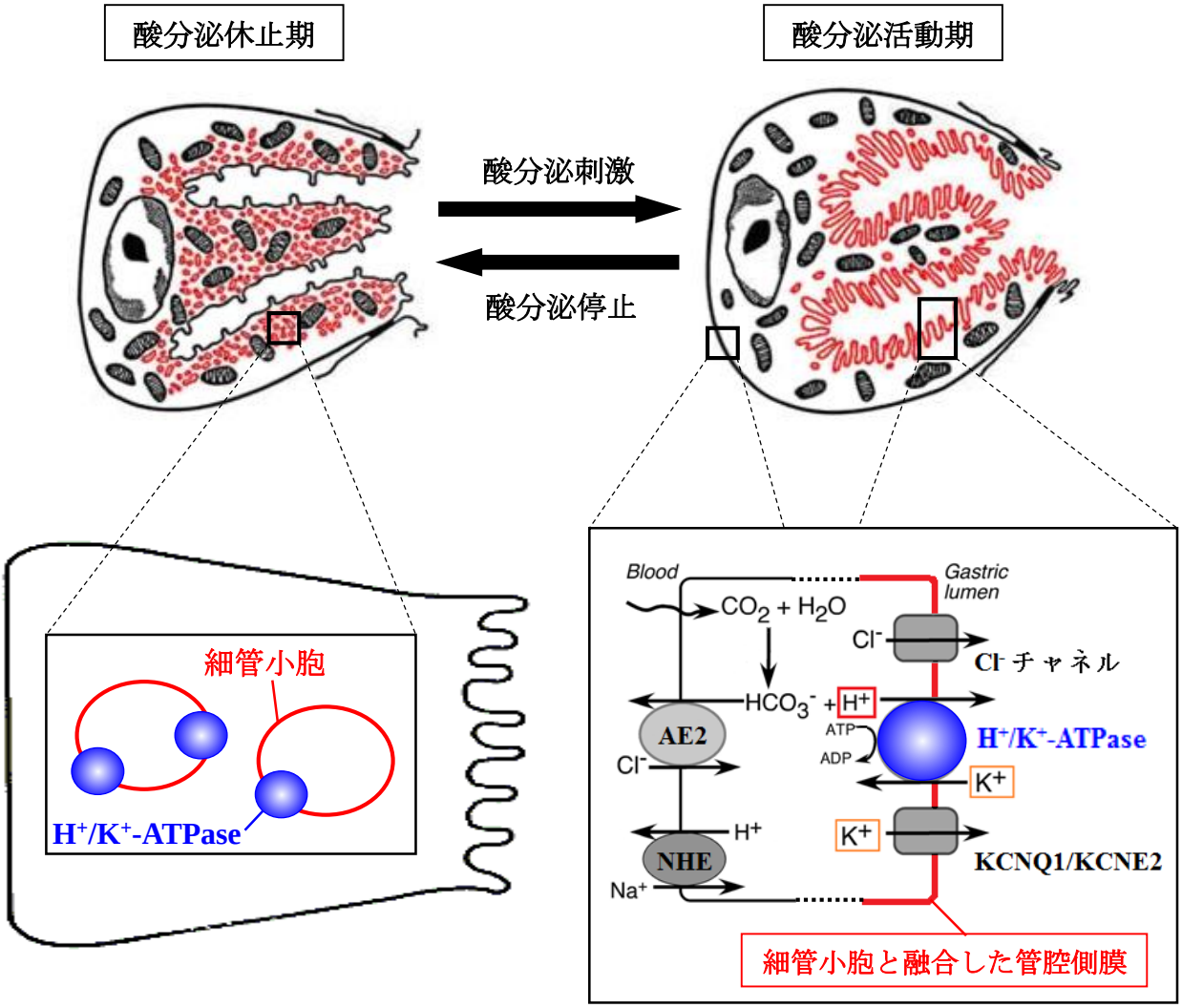


Fig. 4 胃酸分泌に伴う壁細胞の構造変化と関連するトランスポーター

壁細胞は、酸分泌休止期と酸分泌活動期で劇的な構造変化を起こす。酸分泌休止期には細胞質内に存在する多数の細管小胞が、酸分泌刺激を受けると管腔側膜と融合して微絨毛を発達させ、H^+/K^+-ATPaseによる酸分泌を活性化させる。一方で、酸分泌刺激が除かれると、管腔側膜から細管小胞が再構成される。

胃壁細胞内では炭酸脱水酵素の働きによって、炭酸ガスと水から炭酸が形成される。この炭酸はプロトン（H^+）と重炭酸イオン（HCO_3^-）とに開裂し、HCO_3^-は基底側膜に存在するCl^-/HCO_3^-交換輸送体であるAE2によって血液中に輸送される。一方、H^+は管腔側膜に移行したH^+/K^+-ATPaseによって、管腔のK^+を細胞内に輸送するのと交換に細胞内から管腔へ分泌される。これが酸分泌にあたる。酸分泌が持続的に行われるには、管腔へのK^+の供給が必要であり、K^+のリサイクリングに関わる経路としてKCNQ1と補助サブユニットであるKCNE2から成るK^+チャネルが管腔側膜に存在する。

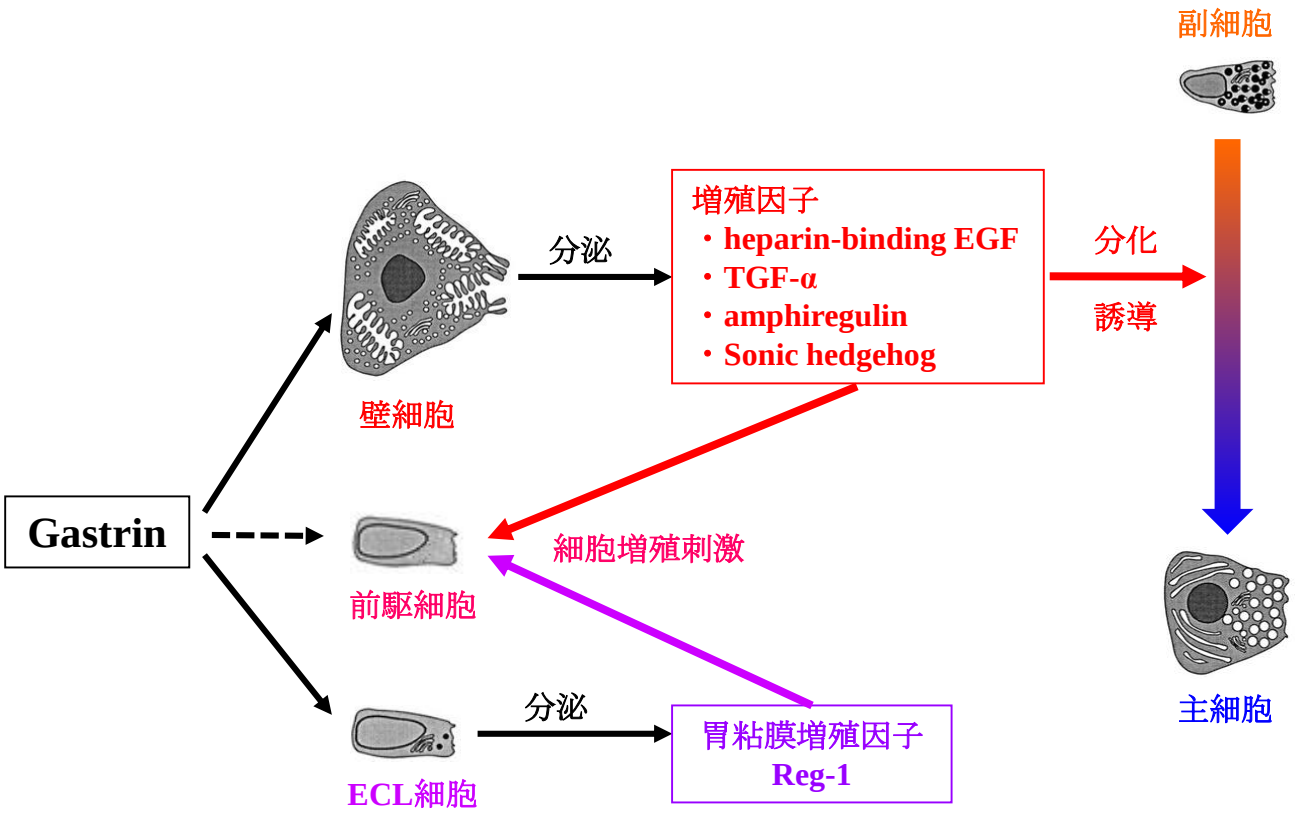


Fig. 5 細胞増殖と副細胞から主細胞への分化誘導に対するガストリンの作用

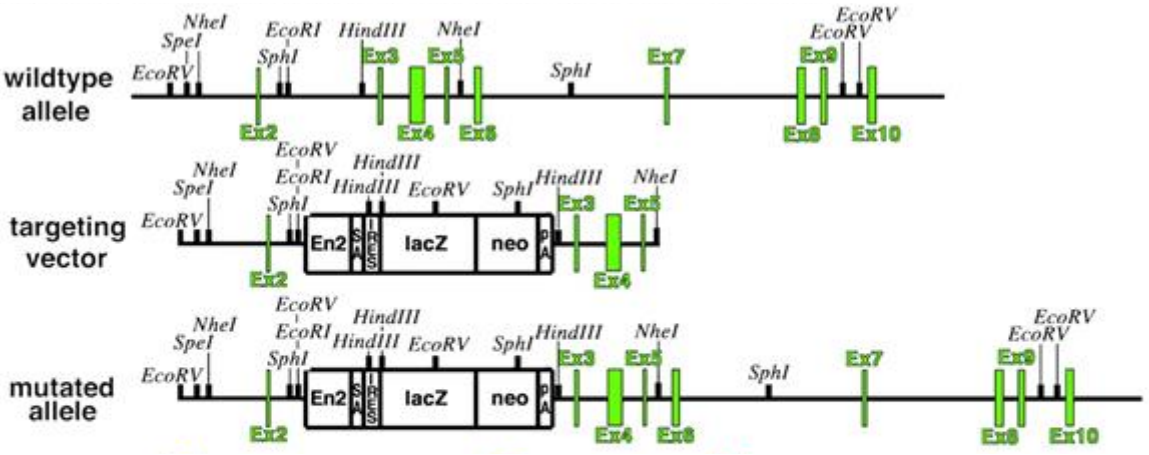


Fig. 6 エズリンノックダウンマウスの作製（Tamura *et al.*, *J Cell Biol* 2005）

En2 : Homeobox protein engrailed-2, SA : splicing acceptor, IRES : Internal ribosome entry site, neo : neomycin resistance, PA : polyadenylation site.

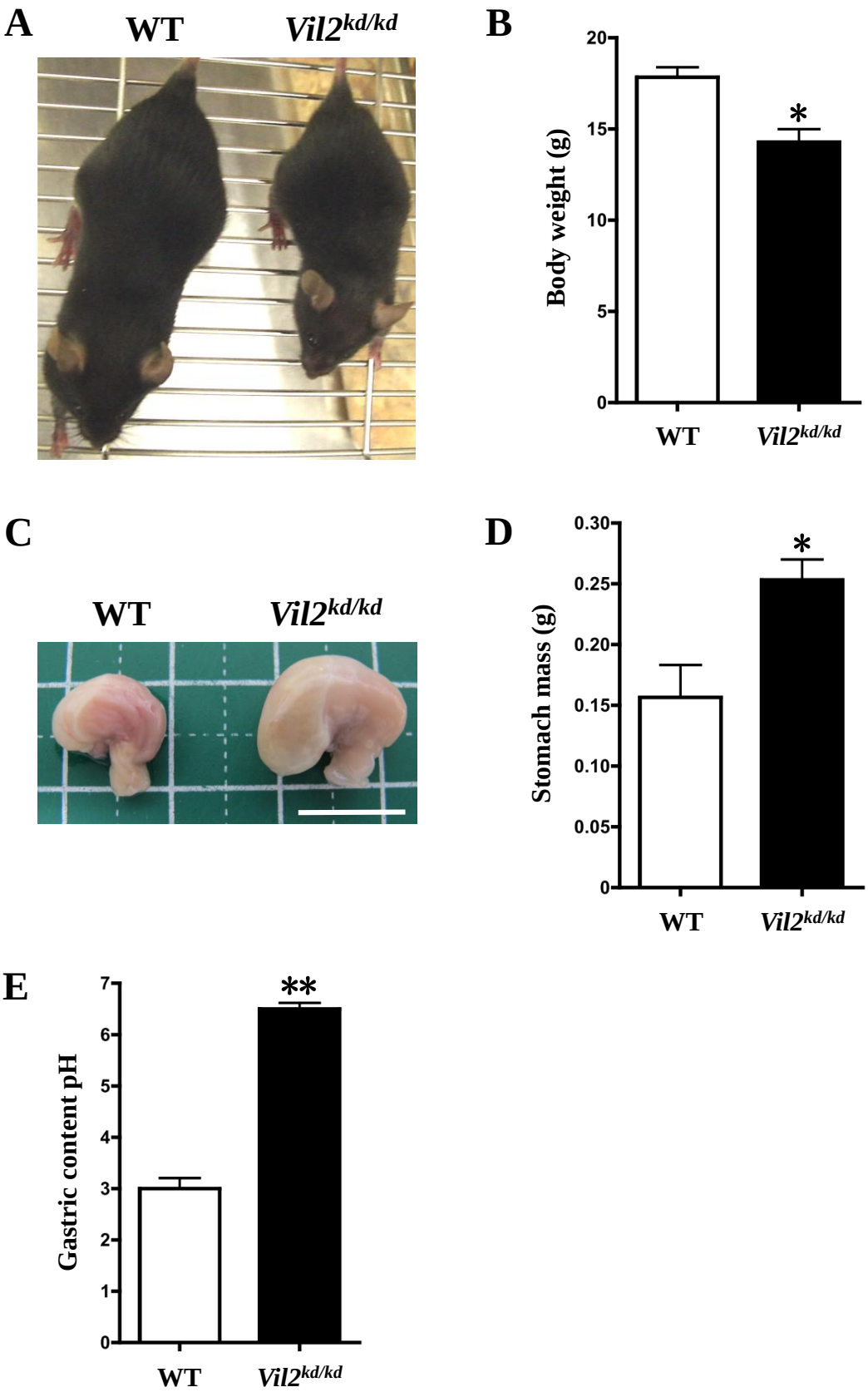


Fig. 7 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの表現型の比較

(A)体格、(B)体重、(C)胃の形態、(D)胃の質量、(E)胃内容物のpH を野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで比較した。(C) Scale bar, 1 cm。
野生型, *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス : N = 3, * : P < 0.05, ** : P < 0.01, mean ± S.E.

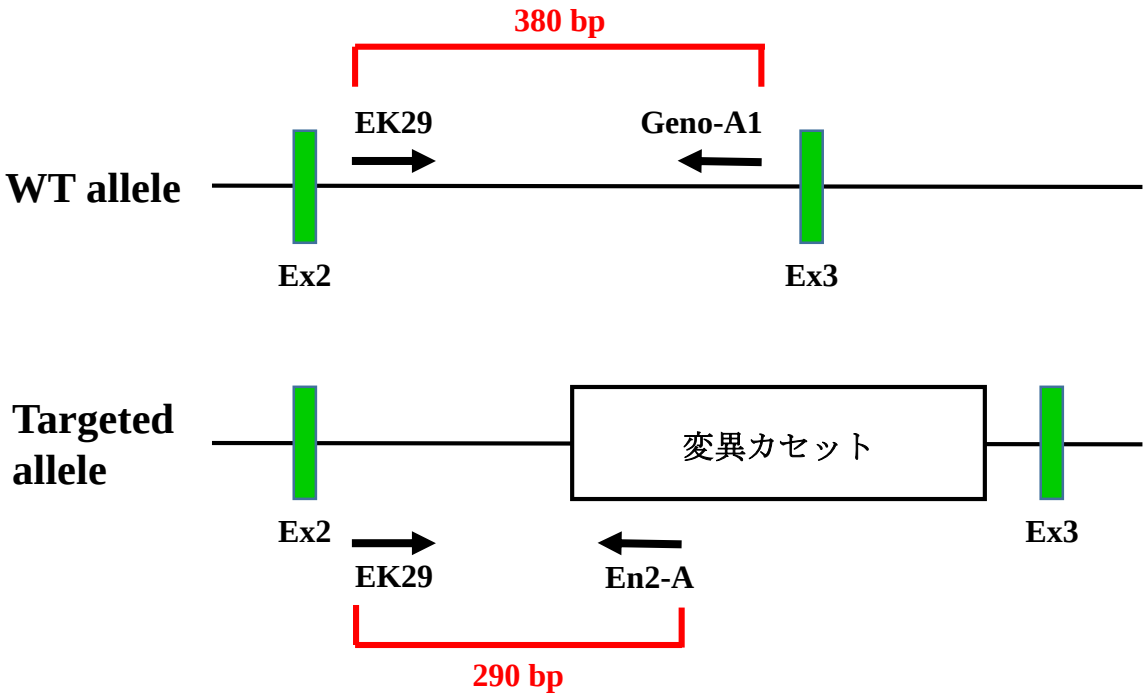


Fig. 8 ジェノタイピングのためのプライマー設計図

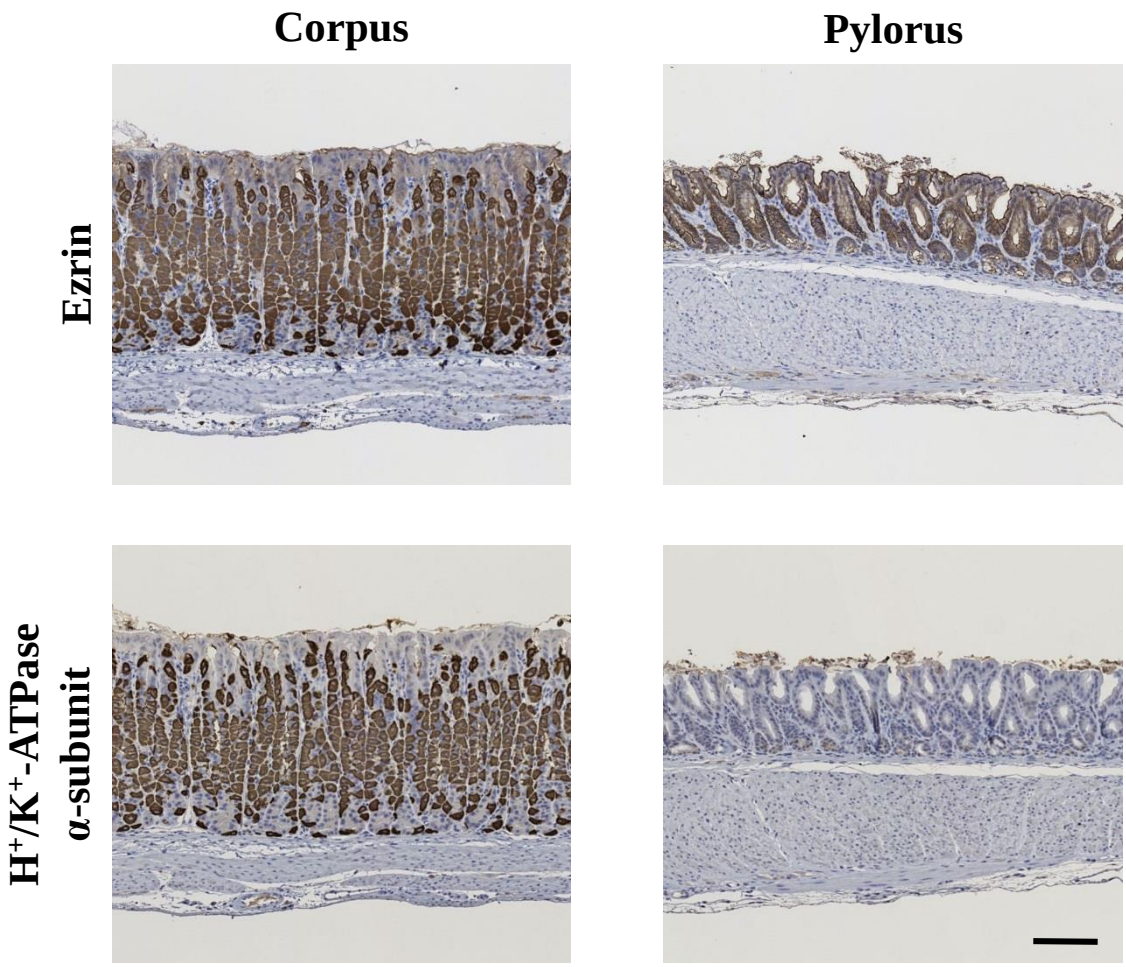


Fig. 9 野生型マウスの胃体部と幽門部におけるエズリンとH^+/K^+-ATPase α-subunitの発現分布

野生型マウスの胃体部と幽門部の組織切片について、抗エズリン抗体と抗H^+/K^+-ATPase α-subunit抗体を用いてそれぞれDAB染色した。
Scale bar, 100 μm。

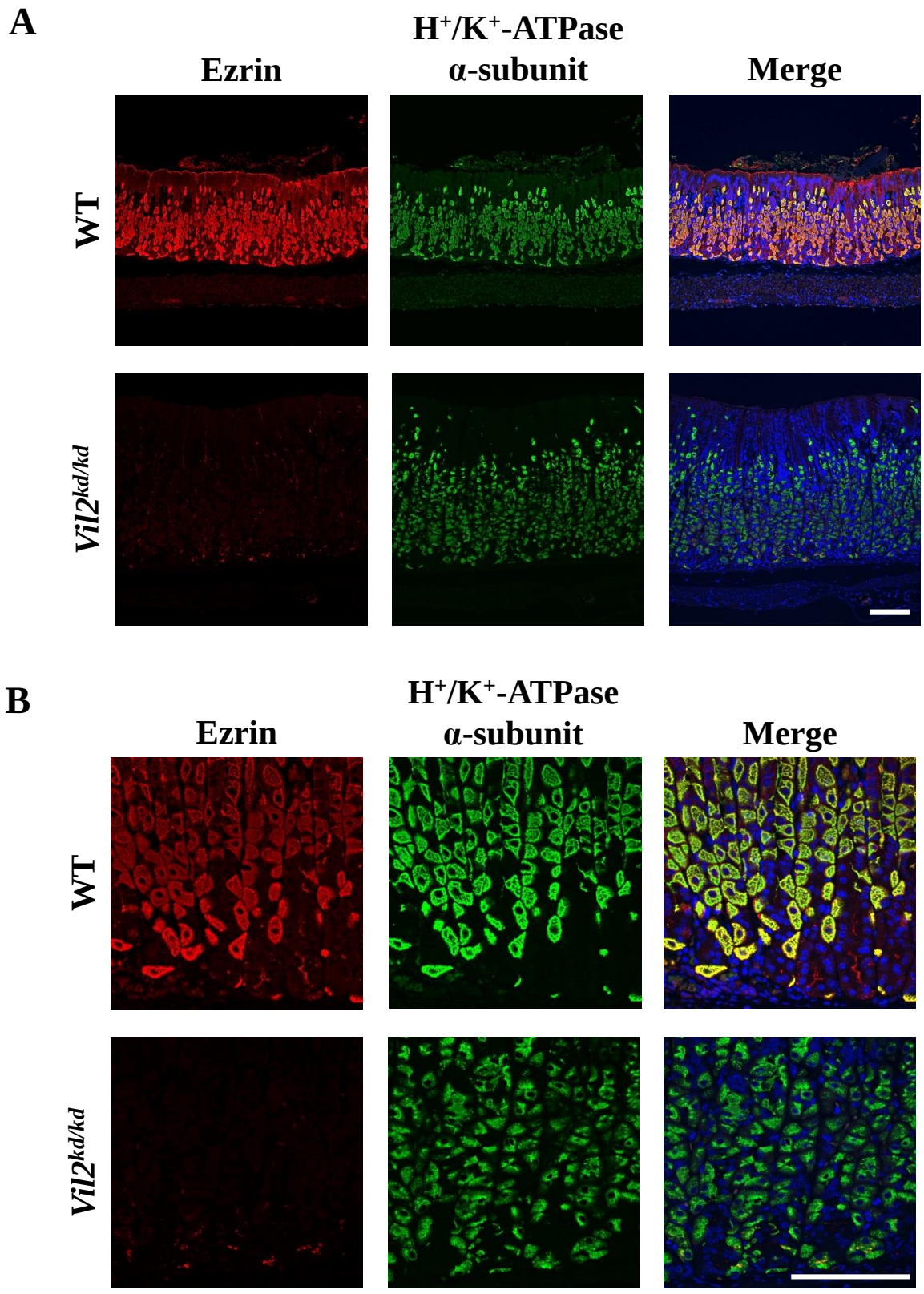


Fig. 10 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの壁細胞におけるエズリンの発現確認

(A, B) 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの胃体部の組織切片について、抗エズリン抗体（赤）と抗H^+/K^+-ATPase α-subunit抗体（緑）を用いて免疫蛍光染色した。核はDAPI（青）を用いて染色した。 (A)胃腺全体像（弱拡大）、 (B)胃腺底部像（強拡大）。 Scale bars, 100 μm。

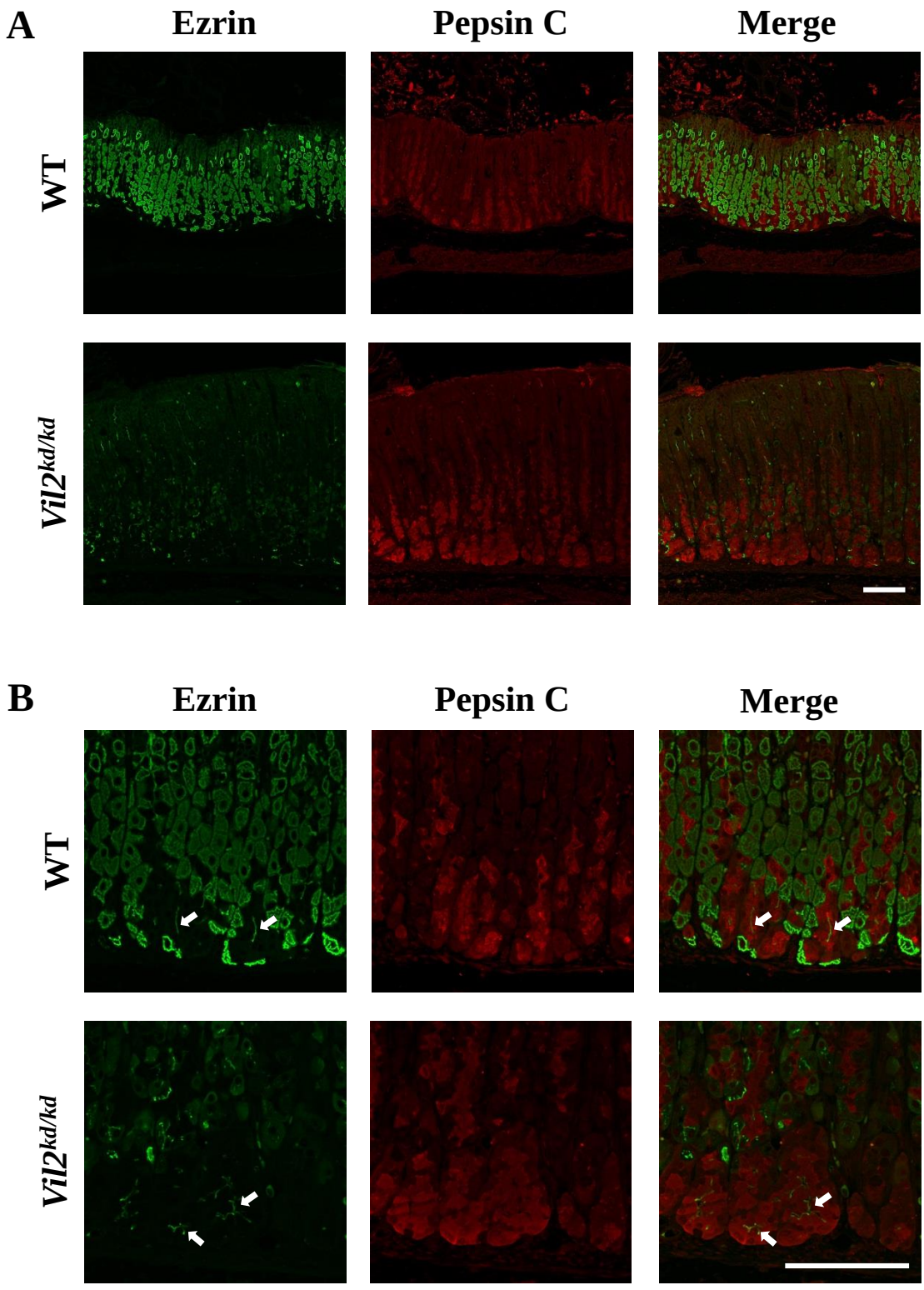


Fig. 11 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの主細胞におけるエズリンの発現確認

(A, B) 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの胃体部の組織切片について、抗エズリン抗体（緑）と抗pepsin C抗体（赤）を用いて免疫蛍光染色した。胃腺底部のエズリンは部分的にpepsin Cで染色される細胞（主細胞）の管腔側と一致した（B : 矢印）。 (A) 胃腺全体像（弱拡大）、 (B) 胃腺底部像（強拡大）。 Scale bars, 100 μm。

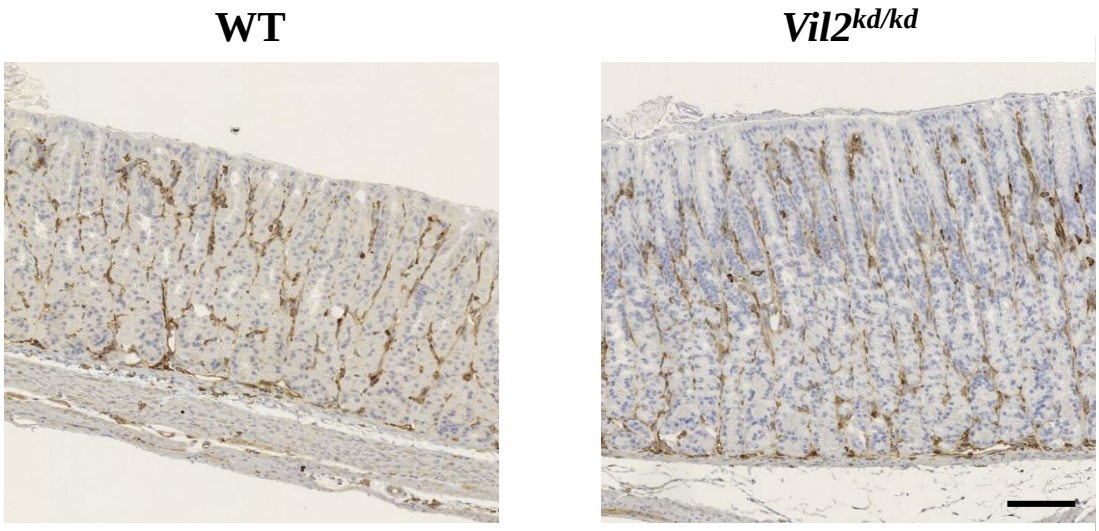


Fig. 12 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの胃体部におけるモエシンの発現分布

野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部の組織切片について、抗モエシン抗体を用いてDAB染色した。Scale bar, 100 μm。

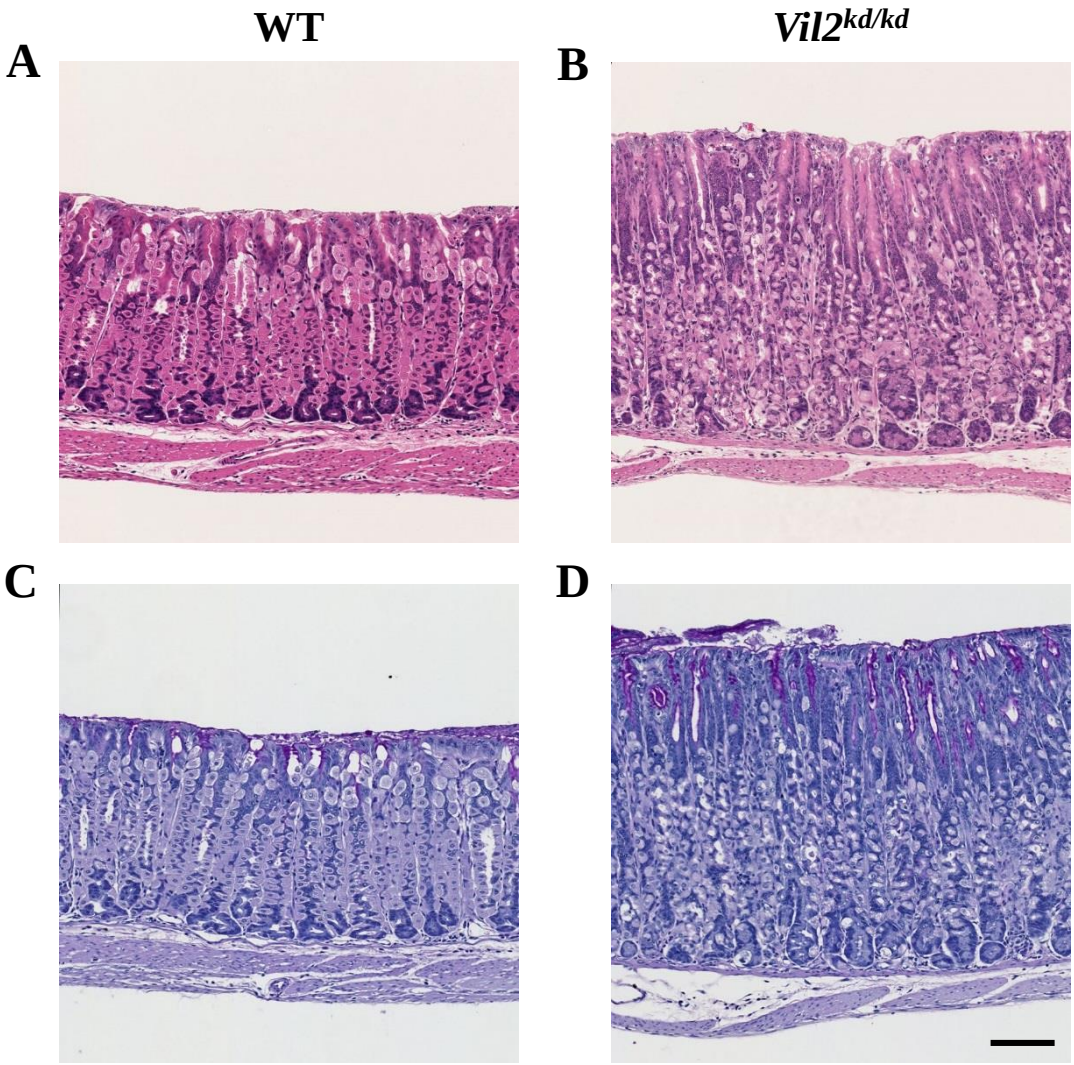


Fig. 13 *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部における胃粘膜の肥厚と腺窩上皮の過形成

野生型(A, C) と*Vil2*$^{kd/kd}$ (B, D)マウスの胃体部の組織切片について、H.E.染色 (A, B) とPAS染色 (C, D)を行った。表層粘液細胞が分泌する中性粘液はPAS染色によって赤紫色に染色された(C, D) 。Scale bar, 100 μm。

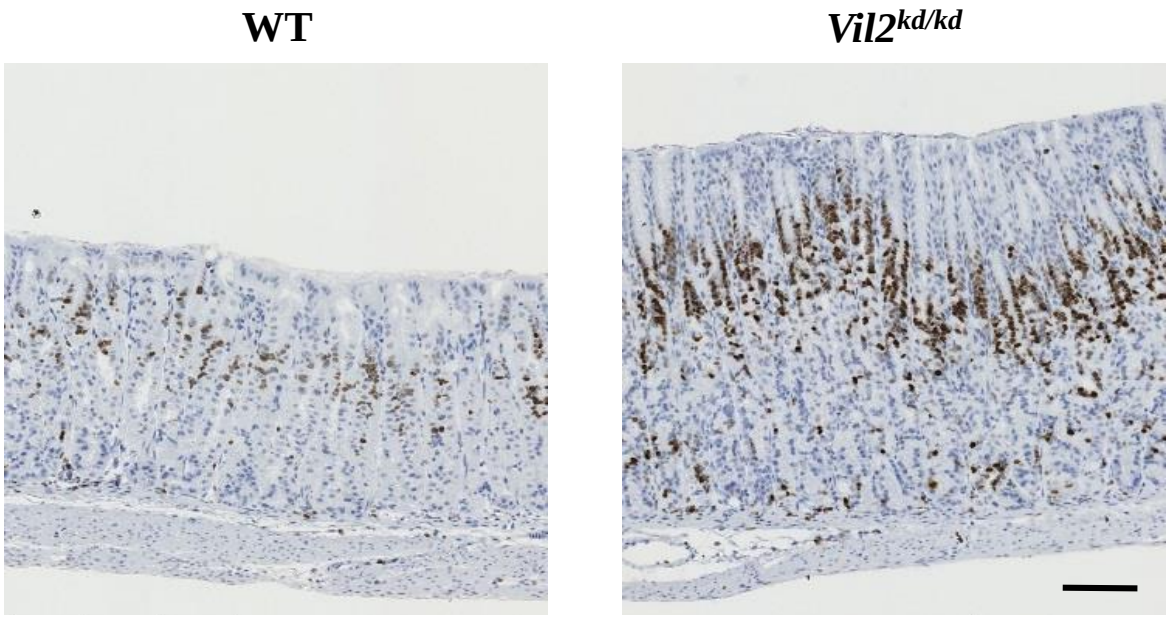


Fig. 14 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの胃体部における増殖細胞の発現分布

野生型と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部の組織切片について、抗 Ki67抗体を用いて DAB染色した。Scale bar, 100 μm。

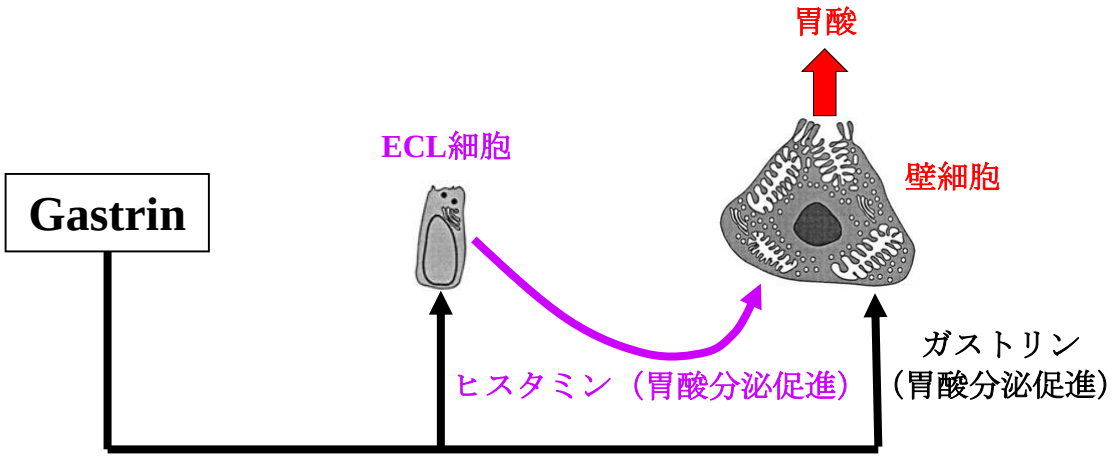


Fig. 15 胃酸分泌に対するガストリンの作用

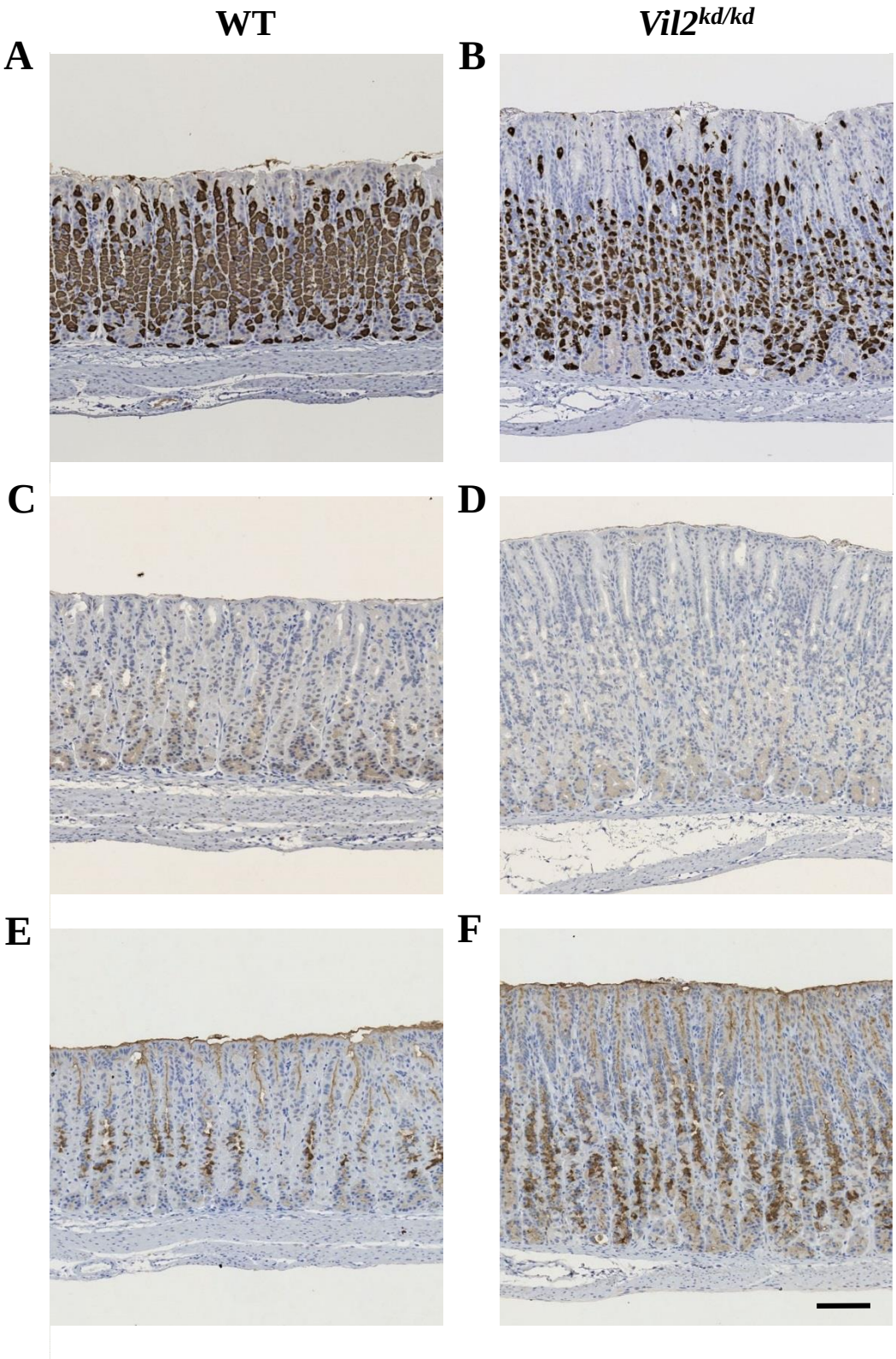


Fig. 16 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの胃体部における各細胞マーカータンパク質の発現分布

野生型 (A, C, E) と*Vil2*$^{kd/kd}$ (B, D, F) マウスの胃体部の組織切片について、 抗H^+/K^+-ATPase α-subunit抗体は壁細胞(A, B)、抗pepsin C抗体は主細胞(C, D)、GS-II lectinは副細胞を染色するために用い、DAB染色 を行った。
Scale bar, 100 μm。

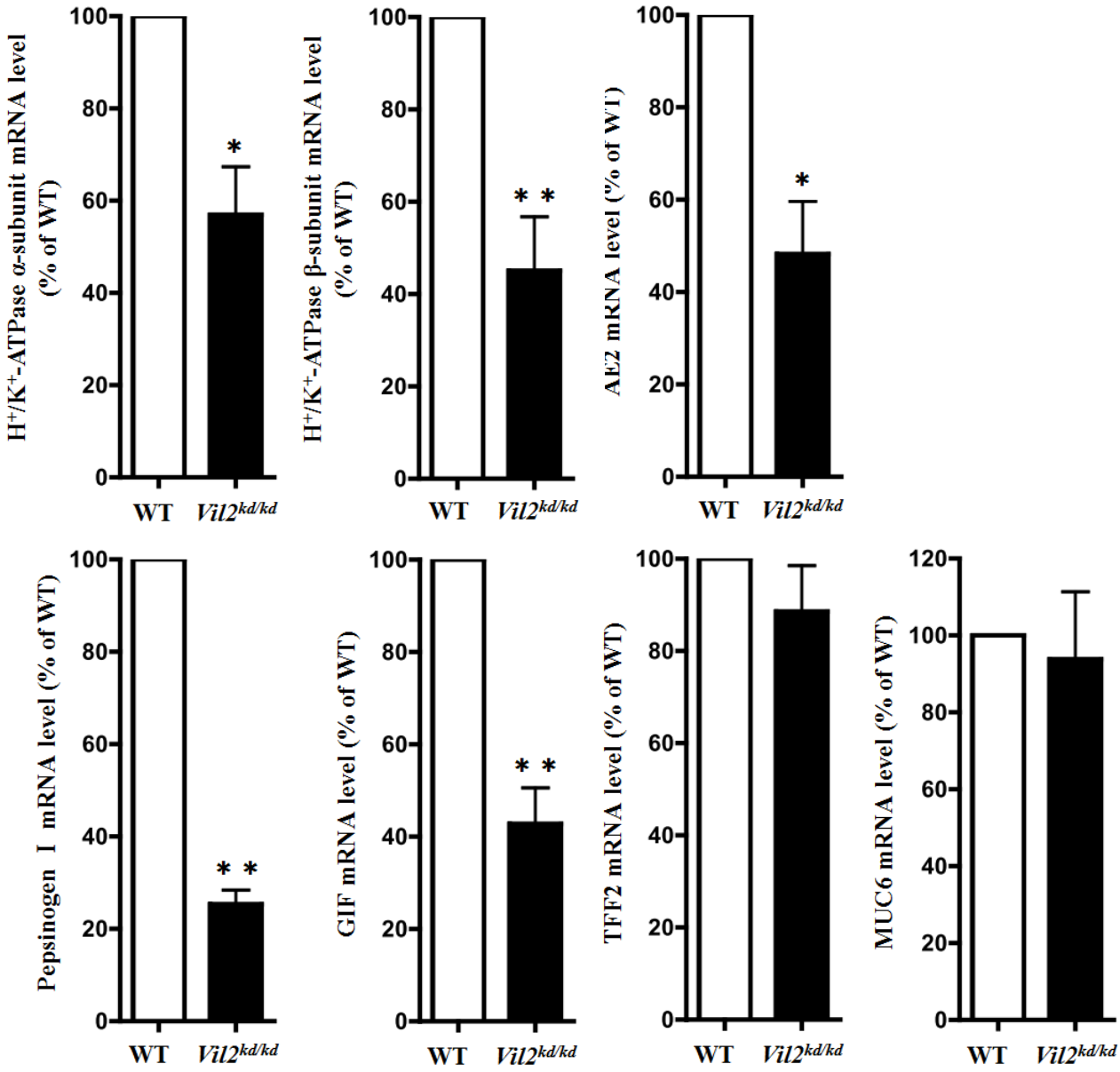


Fig. 17 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部における各細胞マーカータンパク質をコードするmRNA発現レベルの比較

H^+/K^+-ATPase α-, β-subunits, AE2は壁細胞、pepsinogen I, GIFは主細胞、TFF2, MUC6 はSPEMのマーカータンパク質としてmRNA発現レベルを比較した。遺伝子産物量の標準化にはGAPDHの結果を用いた。 *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスのmRNA発現レベルは、野生型マウスのmRNA発現レベルを100 %とした場合の相対値で示した。
野生型, *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス : N=3, * : P < 0.05, ** : P < 0.01, mean ± S.E.

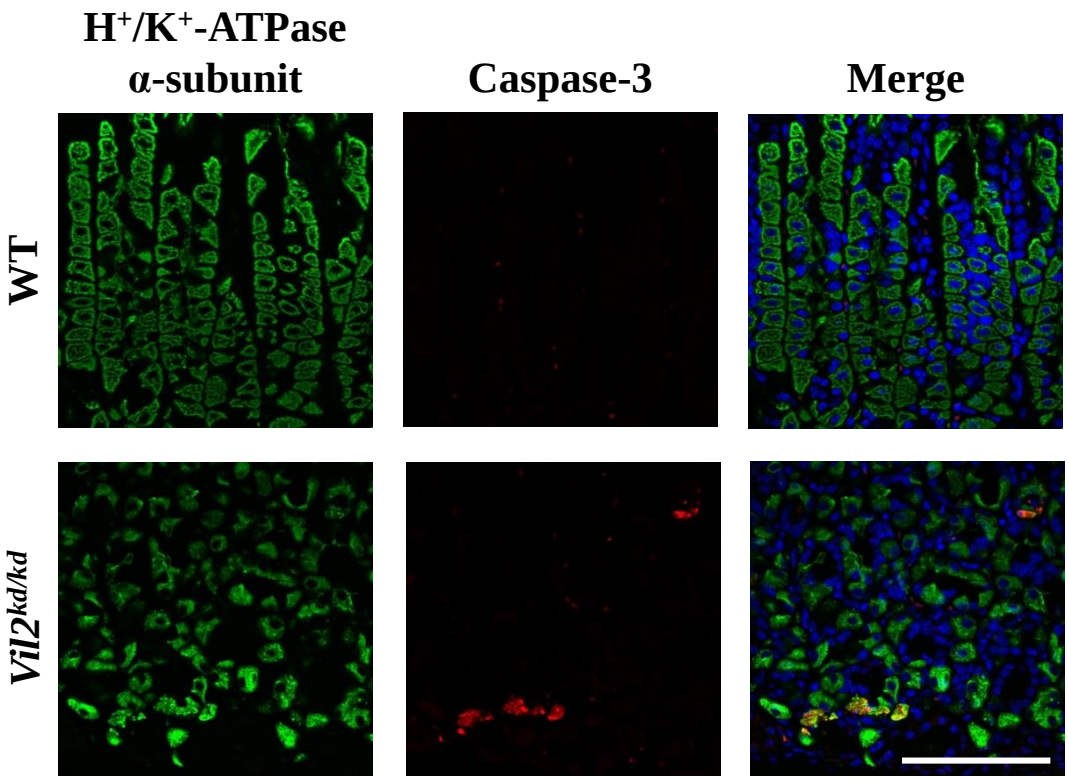


Fig. 18 *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞においてアポトーシスが観察された

野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部の組織切片について、抗H^+/K^+-ATPase α-subunit抗体（緑）と抗cleaved caspase-3抗体（赤）を用いて免疫蛍光染色した。核はDAPI（青）を用いて染色した。 Scale bar, 100 μm。

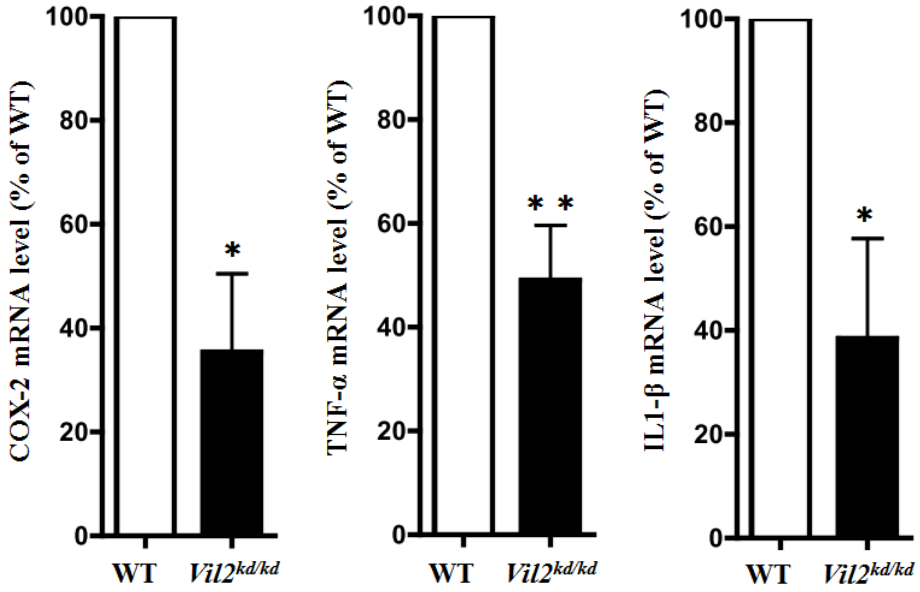


Fig. 19 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部における炎症マーカータンパク質をコードするmRNA発現レベルの比較

遺伝子産物量の標準化にはGAPDHの結果を用いた。 *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスのmRNA発現レベルは、野生型マウスのmRNA発現レベルを100 %とした場合の相対値で示した。
野生型, *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス : N=3, * : P < 0.05, ** : P < 0.01, mean ± S.E.

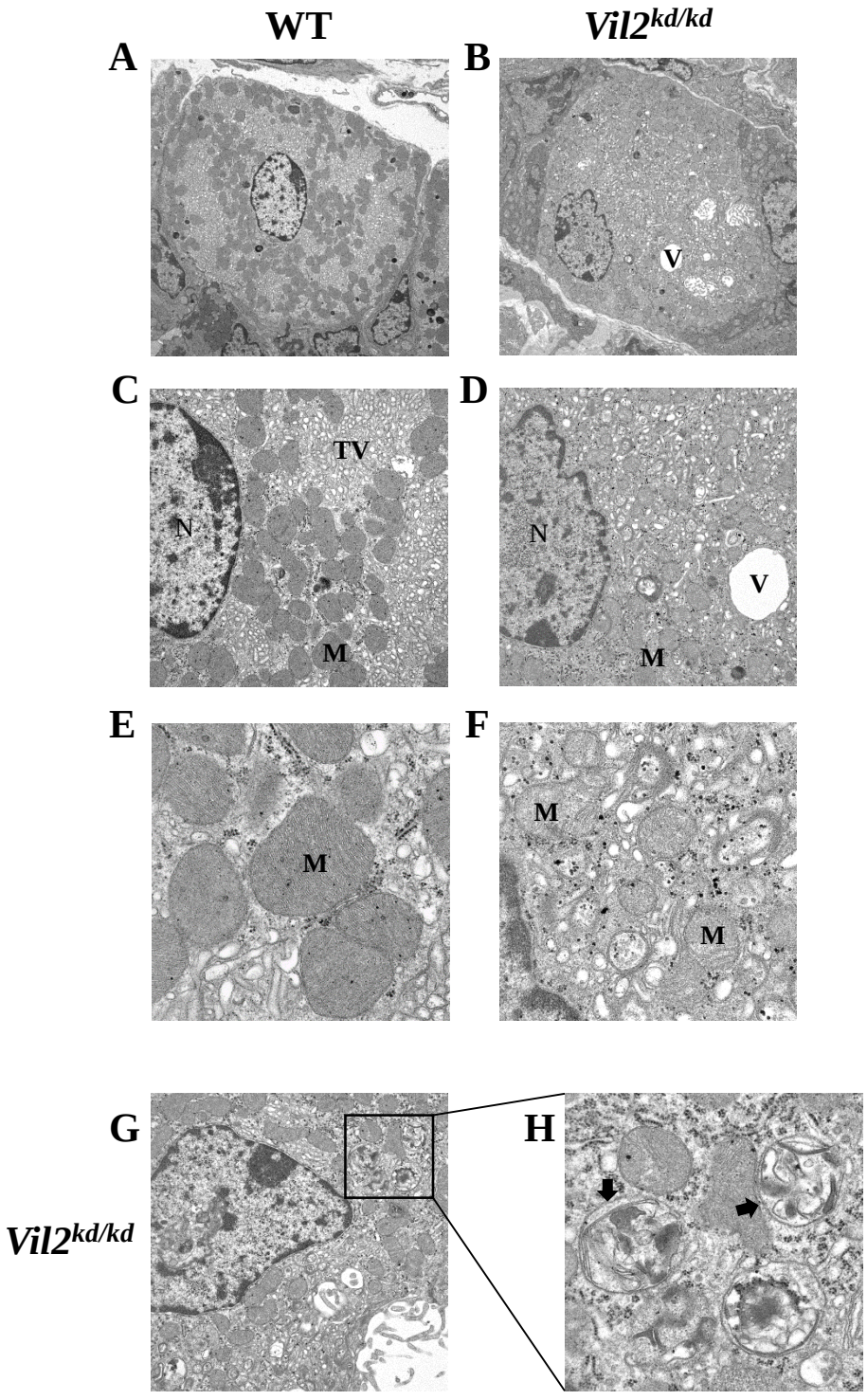


Fig. 20 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞における微細構造の比較

野生型 (A, C, E) と*Vil2*$^{kd/kd}$ (B, D, F, G, H) マウスの壁細胞内の微細構造を電子顕微鏡を用いて観察した。
壁細胞の弱拡大像 (A, B: x 3,610) 、壁細胞の強拡大像 (C, D: x 9,300; E, F: x 31,800)。*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの壁細胞内で観察された多重膜に囲まれた小胞の弱拡大像 (G: x 9,300) と強拡大像 (H: x 31,800) 。
N: nucleus, M: mitochondrion, TV: tubulovesicle, V: vacuolar structure。

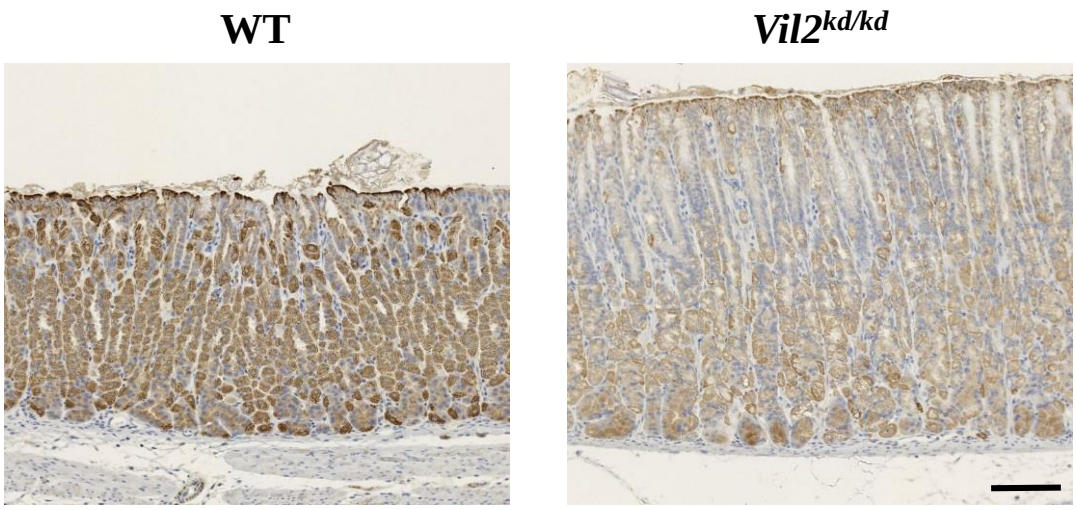
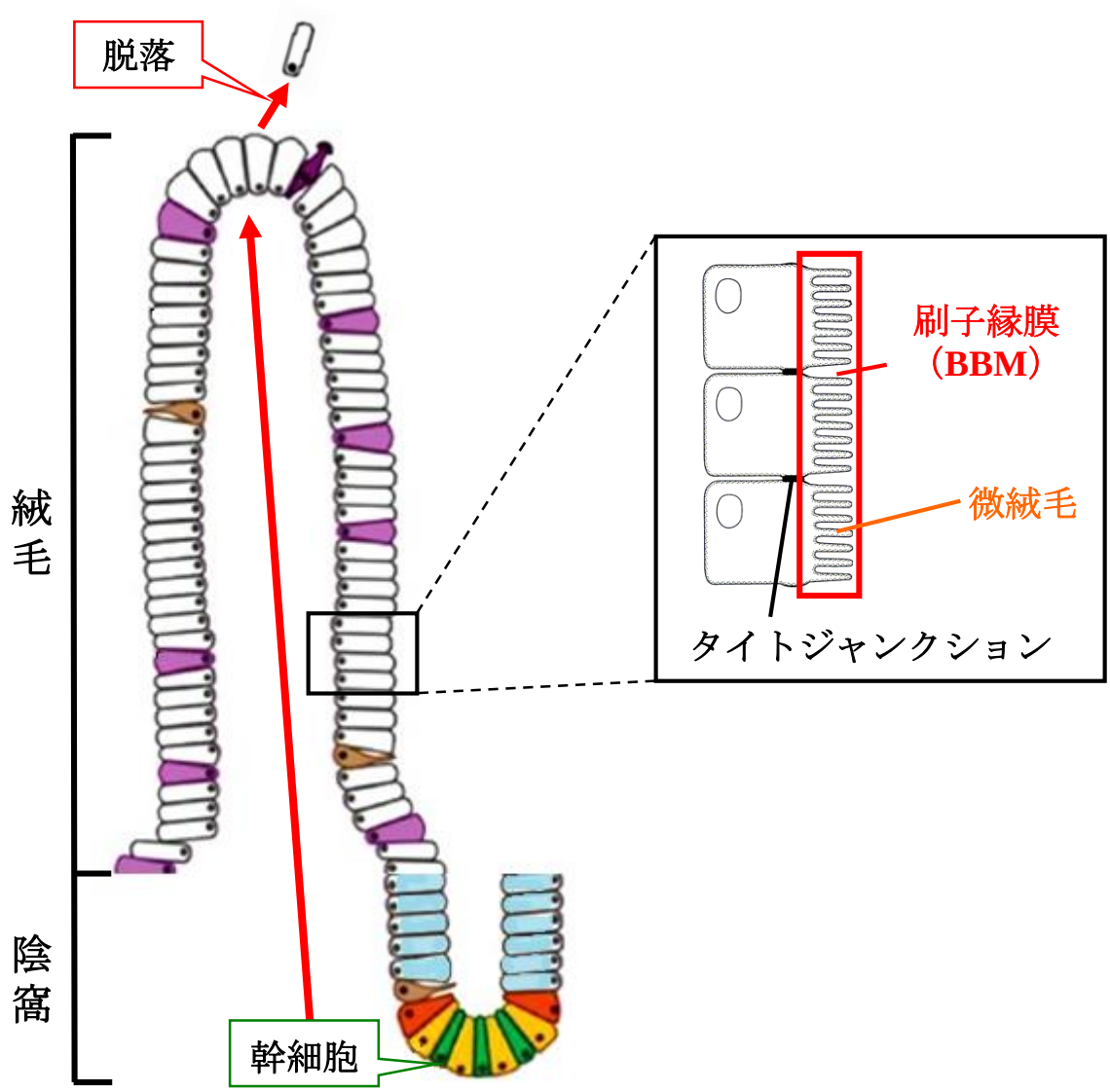


Fig. 21 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの胃体部における活性化ミトコンドリアの発現分布

野生型 と *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの胃体部の組織切片について、抗OxPhos Complex IV subunit I 抗体を用いてDAB染色した。Scale bar, 100 μm。



吸収上皮細胞
水分・栄養分の吸収
管腔側の表面には微絨毛を形成

Transit amplifying cells (TA細胞)
全ての腸管上皮細胞に分化

内分泌細胞
セクレチンなどのホルモンを分泌

パネート細胞
リゾチームなどの抗菌物質を分泌

杯細胞
ムチンを含む粘液を分泌
粘膜防御、免疫調節

幹細胞
自己複製
TA細胞の産生

Fig. 22 小腸の粘膜構造と構成する細胞

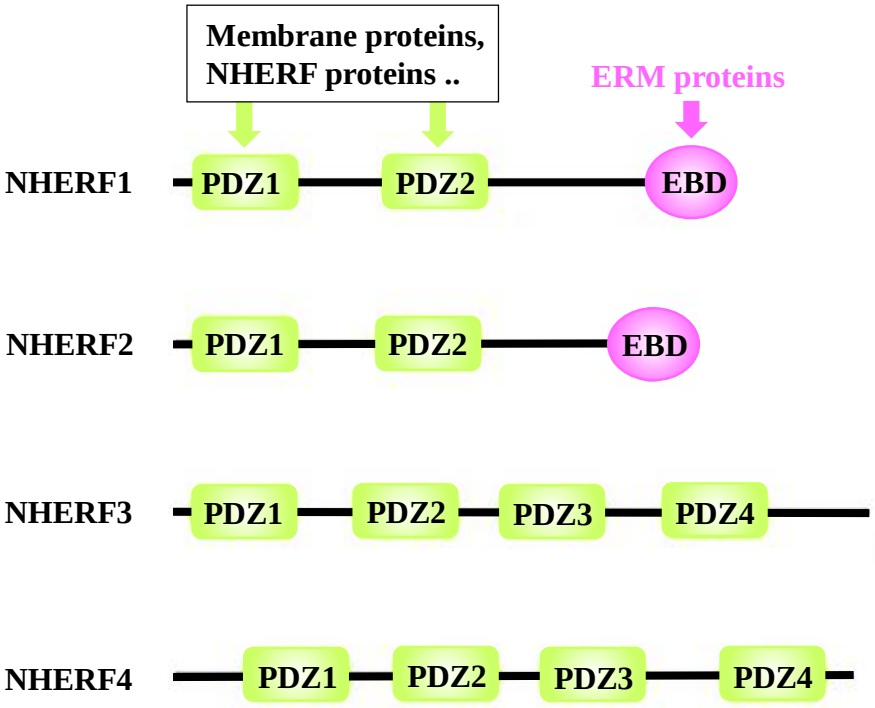


Fig. 23 NHERFファミリータンパク質の構造

PDZ : PSD-95/Discs-large/ZO-1（PDZ）ドメイン, EBD : ERM binding domain

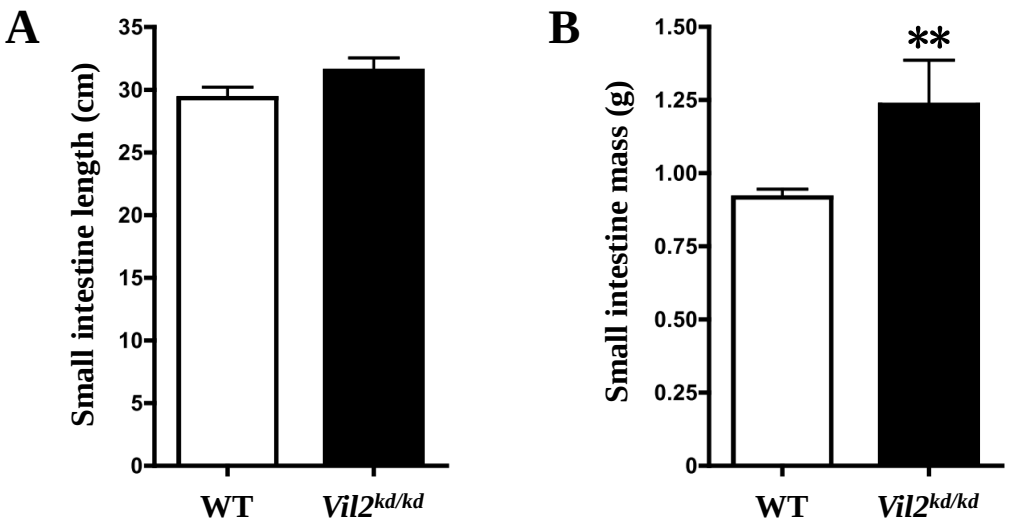


Fig. 24 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの小腸の長さと質量の比較

(A)小腸の長さ、(B)小腸の質量（内容物除去後）を野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスで比較した。野生型, *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス : N = 3, ** : P < 0.01, mean ± S.E.

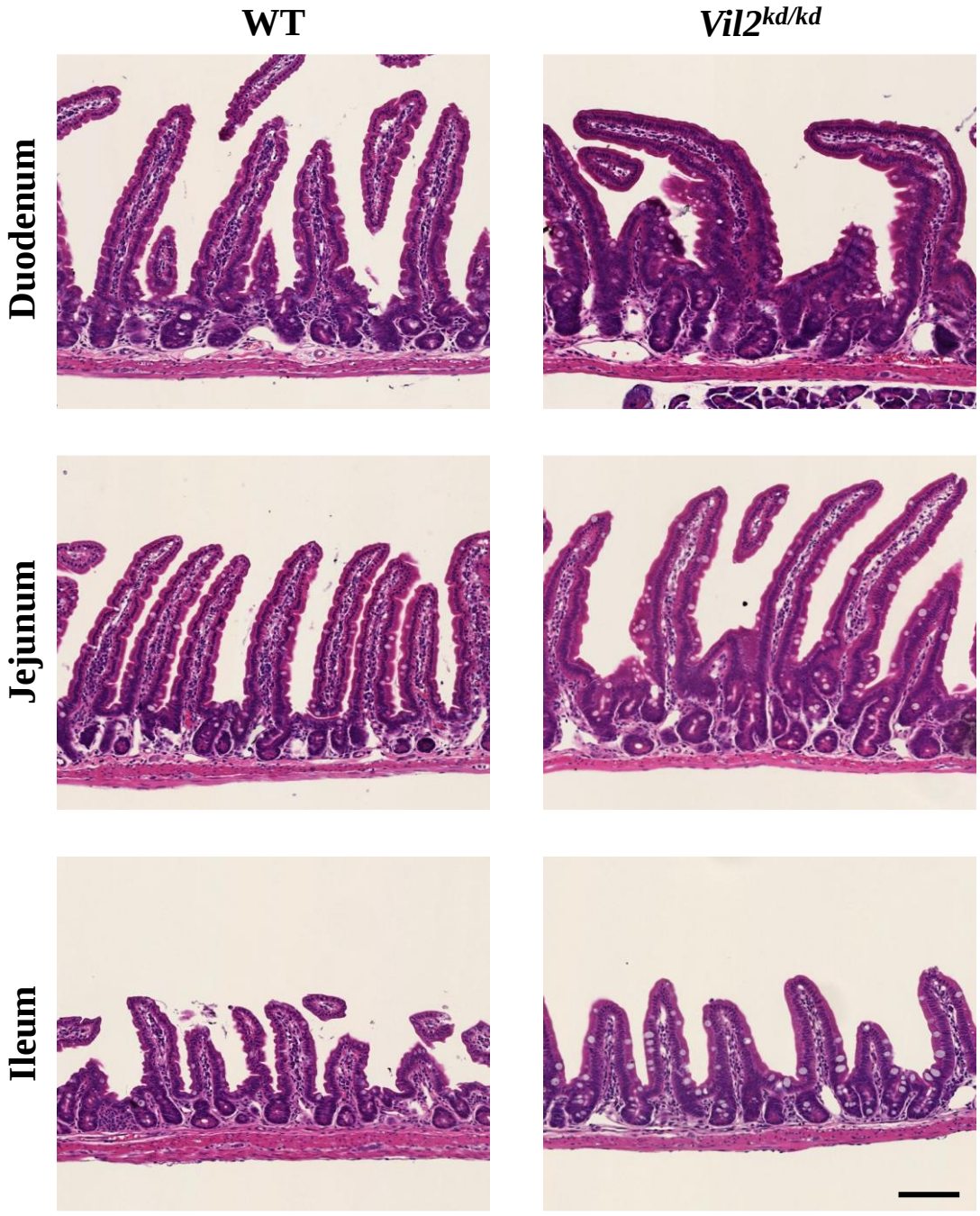


Fig. 25 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの小腸各セグメントにおける粘膜構造の比較

野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの十二指腸、空腸、回腸の組織切片をH.E.染色した。Scale bar, 100 μm。

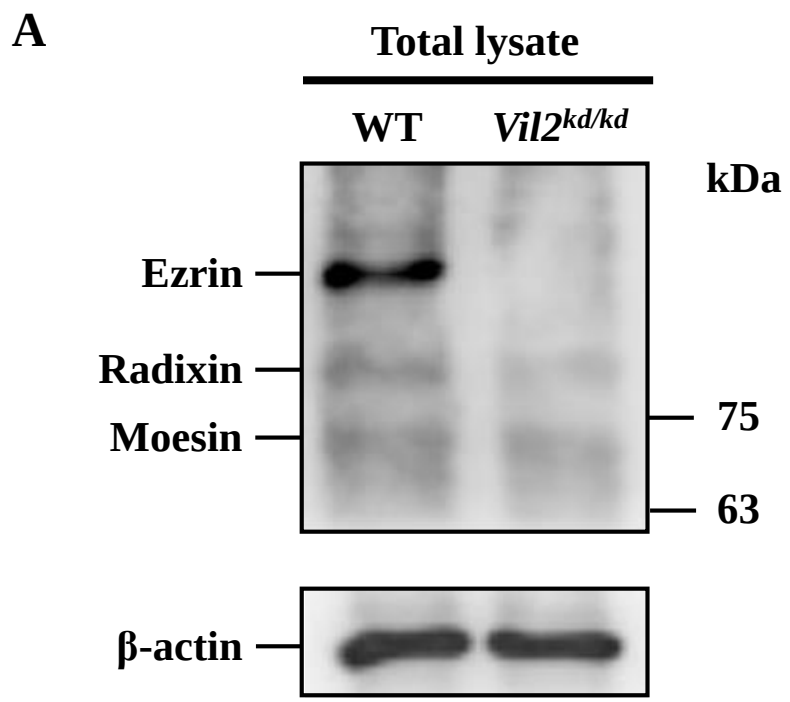


Fig. 26 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの回腸におけるERMタンパク質の発現確認

(A) 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの回腸から調製したtotal tissue lysate (10 μg) について、抗ERM抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。β-actinは内部標準として用いた。

(B, C) 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの回腸の組織切片について、抗エズリン抗体（赤）と抗モエシン抗体（緑）を用いて (B)、また、抗エズリン抗体（緑）と抗ラディキシン抗体（赤）を用いて (C) それぞれ免疫蛍光染色した。Scale bars, 100 μm。

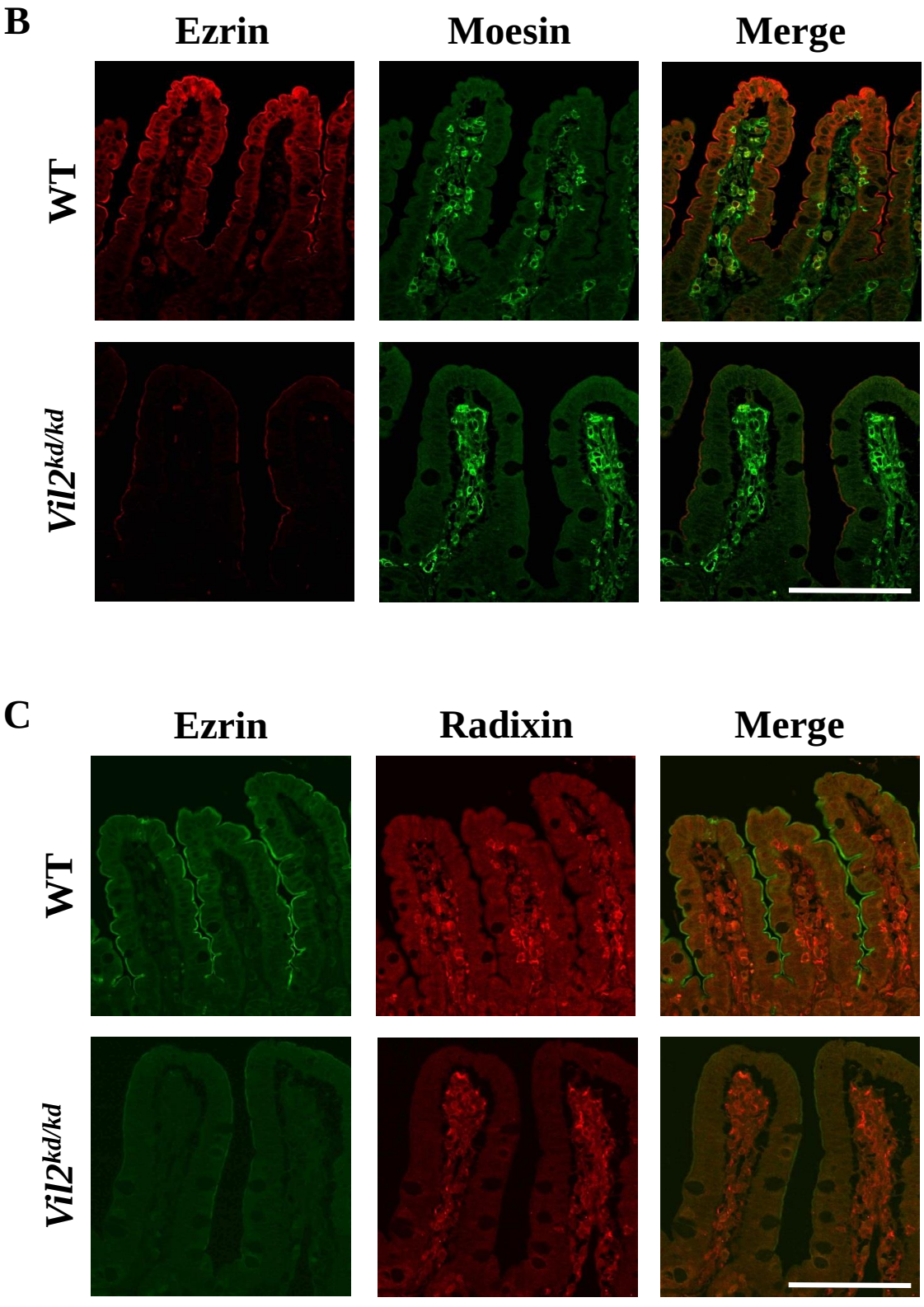


Fig. 26 野生型と***Vil2*$^{kd/kd}$** マウスの回腸における**ERM**タンパク質の発現確認
continued

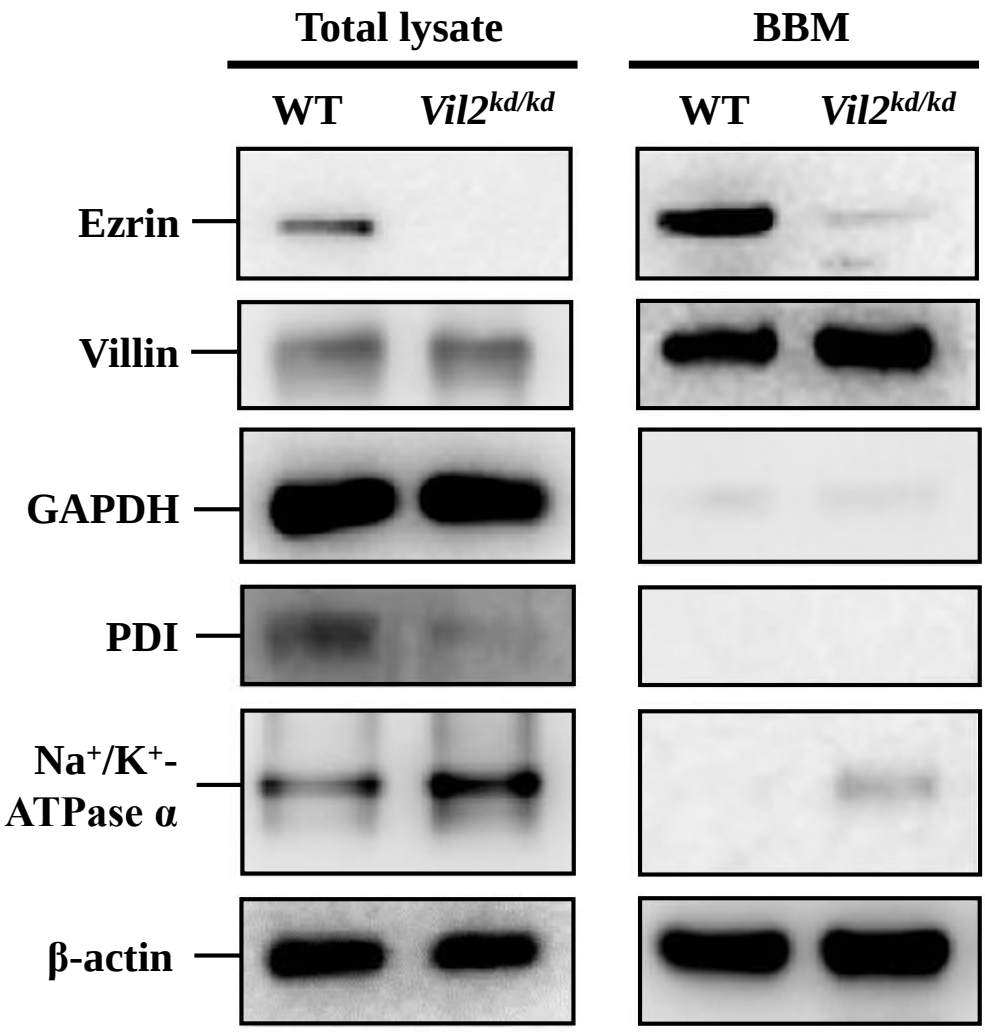


Fig. 27 BBM fractionの純度の確認

野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸から調製したtotal tissue lysate (1 μg) とBBM fraction (1 μg) における各細胞小器官や膜ドメインに特異的に局在するタンパク質の発現を、それぞれに特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティングによって比較した。VillinはBBM、GAPDHは細胞質、PDIは小胞体、 Na^+/K^+-ATPase α-subunitは基底側膜のマーカーとして用いた。β-actinは内部標準として用いた。

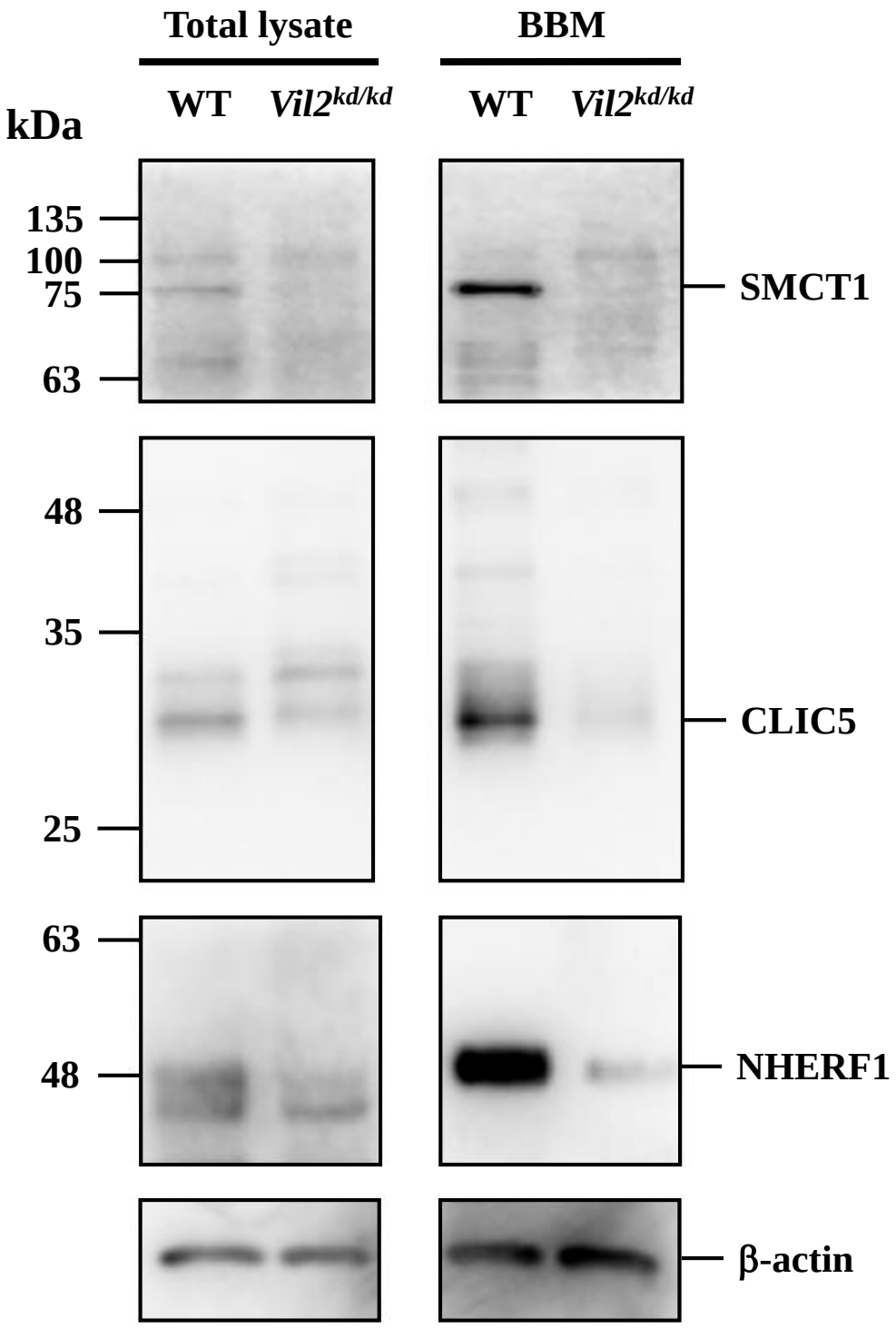


Fig. 28 *Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸BBM fractionにおけるSMCT1, CLIC5, NHERF1の発現低下の確認

野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$ マウスの回腸から調製したtotal tissue lysate (5 μg : CLIC5, NHERF1, β-actin; 10 μg : SMCT1) とBBM fraction (1 μg : NHERF1; 5 μg : CLIC5, β-actin; 10 μg : SMCT1) におけるSMCT1, CLIC5, NHERF1の発現を、それぞれに特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティングによって比較した。β-actinは内部標準として用いた。

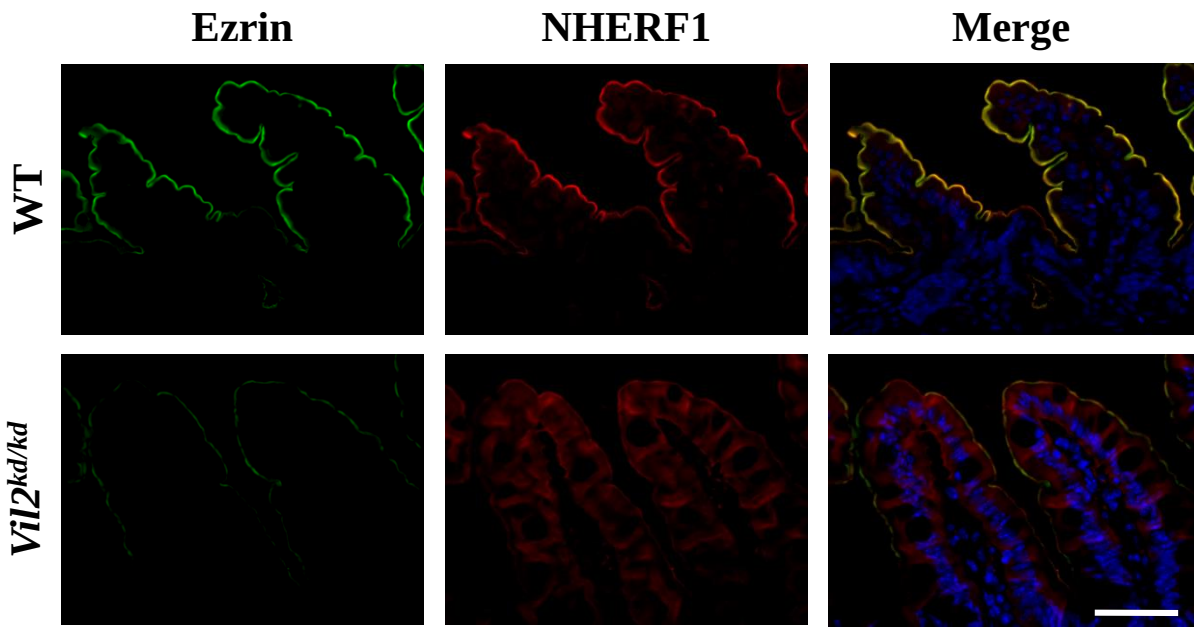


Fig. 29 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの回腸におけるNHERF1の発現分布

野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの回腸組織切片について、抗エズリン抗体（緑）と抗NHERF1抗体（赤）を用いて免疫蛍光染色した。核はDAPI（青）を用いて染色した。Scale bar, 100 μm。

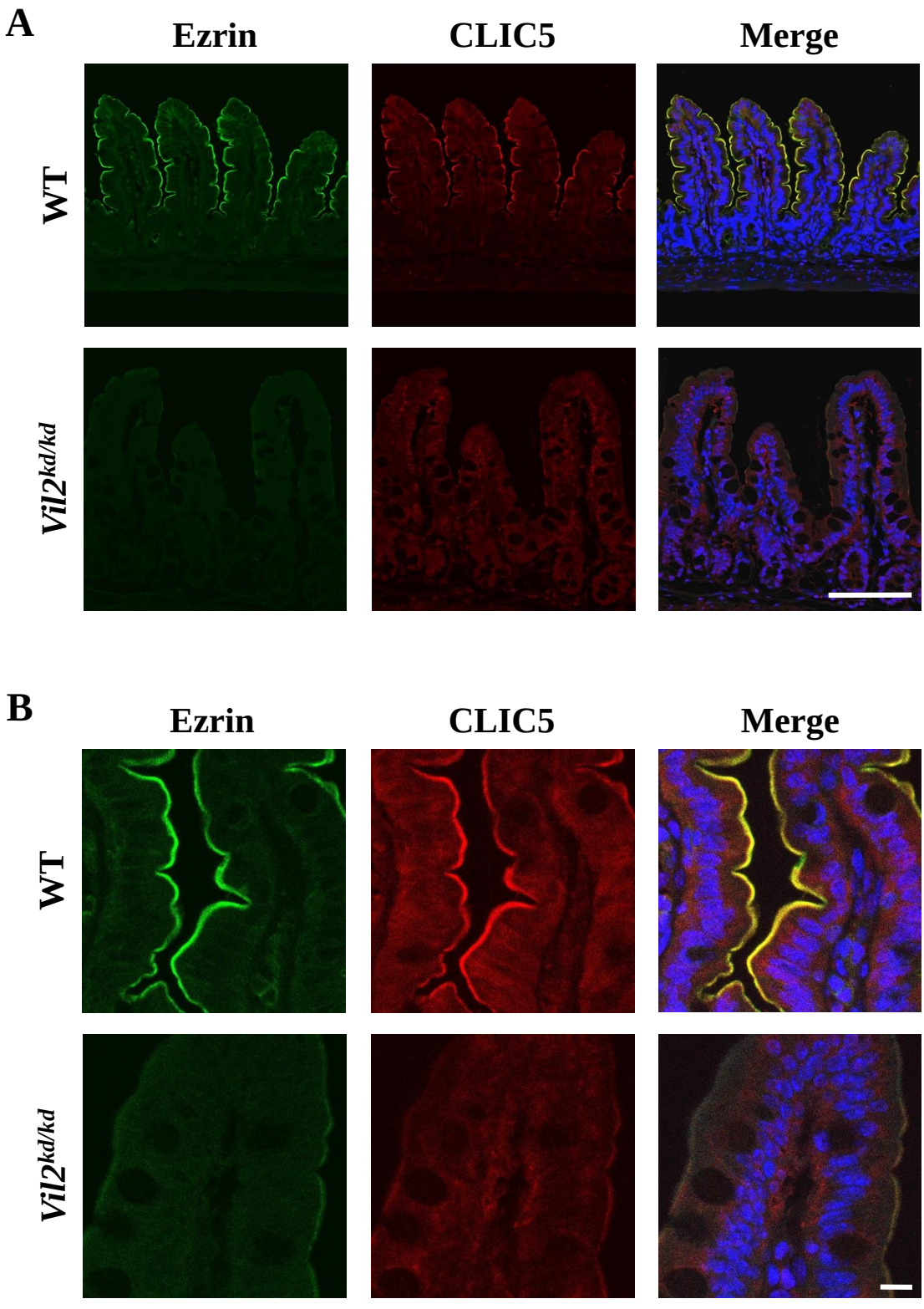


Fig. 30 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの回腸におけるCLIC5の発現分布

(A, B) 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの回腸組織切片について、抗エズリン抗（緑）と抗CLIC5抗体（赤）を用いて免疫蛍光染色した。核はDAPI（青）を用いて染色した。(A) 粘膜全体像、(B) 絨毛の強拡大像。
Scale bars, 100 μm (A), 10 μm (B)。

Table 1 使用した抗体一覧

Antigen	Source	Species (Clone)	Dilution (Application)
Ezrin	Acris	Mouse (3C12)	1:1000 (WB) 1:100 (IF, IHC-P)
Ezrin	Cell Signaling Technology	Rabbit	1:100 (IF)
Radixin	Abcam	Rabbit	1:100 (IF)
Moesin	Gift from Dr.Tsukita	Mouse (2287)	1:100 (IF)
ERM	Cell Signaling Technology	Rabbit	1:1000 (WB)
GAPDH	Cell Signaling Technology	Rabbit (14C10)	1:1000 (WB)
β-actin	Santa Cruz Biotechnology	Mouse (AC-15)	1:1000 (WB)
H^+/K^+-ATPase α-subunit	Medical and Biological Laboratories	Mouse (1H9)	1:100 (IF, IHC-P)
Ki67	Abcam	Mouse	1:100 (IHC-P)
cleaved caspase-3	Biocare Medical	Rabbit	1:100 (IF)
Pepsin C	Santa Cruz Biotechnology	Mouse (H-56)	1:500 (IF, IHC-P)
OxPhos Complex Ⅳ subunit Ⅰ	Invitrogen	Mouse (1D6E1A8)	1:100 (IHC-P)
Villin	Santa Cruz Biotechnology	Goat (C-19)	1:200 (WB)
PDI	Enzo Life Sciences	Mouse (1D3)	1:1000 (WB)
Na^+/K^+-ATPase α1	Santa Cruz Biotechnology	Mouse (C464.6)	1:1000 (WB)
SLC5A8 (SMCT1)	Biorbyt	Rabbit	1:1000 (WB)
CLIC5	Alomone	Rabbit	1:500 (WB) 1:100 (IF)
EBP50 (NHERF1)	Abcam	Rabbit	1:1000 (WB) 1:100 (IF)

Table 2 Quantitative RT-PCRに使用したプライマー配列

Ezrin
Forward primer, 5’-AGGAACAGACCTTTGGCTTGGA-3’
Reverse primer, 5’-TTGTCGATGGGCTTAATGACAAAC-3’

H^+/K^+-ATPase α-subunit
Forward primer, 5’-AGATGTCCTCATCCGCAAGACAC-3’
Reverse primer, 5’-CAGCCAATGCAGACCTGGAA-3’

H^+/K^+-ATPase β-subunit
Forward primer, 5’-TGGCACCTTCAGTCTCCACTATTTC-3’
Reverse primer, 5’-ATCTTGCACACGATGCTGACTTG-3’

Anion exchanger 2 (AE2)
Forward primer, 5’-CACCACCCAGATGTCACCTATGTC -3’
Reverse primer, 5’-CCAGGCAGAGCAACTGCAAG -3’

Pepsinogen I
Forward primer, 5’-ACCCAGGAGCTTTACTGGCAGA-3’
Reverse primer, 5’-CAGGTACTGGGCAGGCATGA-3’

Gastric intrinsic factor (GIF)
Forward primer, 5’-CATCCTGATTGCCATGAACCTG-3’
Reverse primer, 5’-GCCATAACGGTGAGGGCAAG-3’

TFF2
Forward primer, 5’-TTGATCTTGGATGCTGCTTTGAC-3’
Reverse primer, 5’-GCGAGCTGACACTTCCATGAC-3’

Mucin 6 (MUC6)
Forward primer, 5’-TTCCTGAGCCGCAGCACTT-3’
Reverse primer, 5’-CAGAAACCCTGGCAACGAGTTAG-3’

COX-2
Forward primer, 5’-TGGTTACAAAAGCTGGGAAGC-3’
Reverse primer, 5’-ATGGGAGTTGGGCAGTCATC-3’

TNF-α
Forward primer, 5’-GACTAGCCAGGAGGGAGAACAGA -3’
Reverse primer, 5’-CCTGGTTGGCTGCTTGCTT -3’

IL1-β
Forward primer, 5’-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3’
Reverse primer, 5’-GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3’

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
Forward primer, 5’-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3’
Reverse primer, 5’-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3’

Table 3 胃底腺を構成する細胞の割合

	WT	*Vil2*$^{kd/kd}$
壁細胞 (%)	40 ± 2	29 ± 1
主細胞 (%)	23 ± 2	14 ± 2
副細胞 (%)	19 ± 2	35 ± 3
その他の細胞 (%)	18 ± 2	22 ± 2

1つの胃底腺に含まれるH^+/K^+-ATPase α-subunit, pepsin C, GS-II 陽性細胞を数え、胃底腺を構成する全細胞数に対する割合 (%) を示した。野生型マウス : N = 7, *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス : N = 8, mean ± S.E.

Table 4 野生型と*Vil2*$^{kd/kd}$マウスの絨毛と陰窩の形態比較

	WT	*Vil2*$^{kd/kd}$
Number of villus		
duodenum	7.7 ± 0.3	7.0 ± 1.2
jejunum	12.2 ± 0.5	6.7 ± 0.5**
ileum	9.8 ± 1.0	9.4 ± 0.7
Length of villus (μm)		
duodenum	303 ± 17	427 ± 13**
jejunum	325 ± 46	359 ± 24
ileum	152 ± 14	188 ± 6
Depth of crypts (μm)		
duodenum	74 ± 6	96 ± 7
jejunum	73 ± 7	84 ± 13
ileum	59 ± 5	66 ± 1

野生型, *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス : N=3, ** : P < 0.01, mean ± S.E.

Table 5 transport proteins

	Protein
1.	Anoctamin-6
2.	Aquaporin 1
3.	ATP-binding cassette sub-family G member 2
4.	ATP-binding cassette sub-family G member 5
5.	ATP-binding cassette sub-family G member 8
6.	Canalicular multispecific organic anion transporter 1 (MRP2)
7.	Chloride intracellular channel protein 1
8.	Chloride intracellular channel protein 5
9.	Choline transporter-like protein 4 (SLC44A4)
10.	Cysteine-rich protein 1
11.	Ileal sodium / bile acid cotransporter (ASBT)
12.	MFS-type transporter (SLC18B1)
13.	Multidrug resistance protein 1 (P-glycoprotein 1)
14.	Neutral and basic amino acid transport protein rBAT (SLC3A1)
15.	Niemann-Pick C1-like protein 1
16.	Potential phospholipid-transporting ATPase IC
17.	Protein tweety homolog 3
18.	Sodium/glucose cotransporter 1 (SGLT1)
19.	Sodium/myo-inositol cotransporter 2 (SLC5A11)
20.	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
21.	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1
22.	Sodium monocarboxylate transporter 1 (SMCT1)
23.	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT1 (SLC6A19)
24.	Sodium-dependent phosphate transport protein 2B (Npt2b)
25.	Solute carrier family 13 member 2 (SLC13A2)
26.	Solute carrier family 15 member 1 (PEPT1)
27.	Solute carrier family 26 member 6 (SLC26A6)
28.	Solute carrier family 52 (riboflavin transporter) member 3 (SLC52A3)
29.	Transmembrane channel-like protein 4 (TMC4)
30.	Transmembrane channel-like protein 5 (TMC5)
31.	Zinc transporter 10 (SLC30A10)
32.	Zinc transporter ZIP4 (SLC39A4)

Table 6 Cytoskeleton-associated proteins

	Protein
1.	Actin, alpha cardiac muscle 1
2.	Actin, cytoplasmic 1
3.	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B
4.	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4
5.	Actin-related protein 3
6.	Adseverin
7.	Alpha-actinin-4
8.	Band 4.1-like protein 3
9.	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1
10.	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 2
11.	Cadherin-related family member 5
12.	Claudin-3
13.	Cofilin 1
14.	Coronin-1B
15.	Coronin-1C
16.	Coronin-2A
17.	Destrin
18.	Epithelial cell adhesion molecule
19.	Ezrin
20.	F-actin-capping protein alpha subunit
21.	Filamin-B
22.	Harmonin
23.	INAD-like protein
24.	Keratin, type I cytoskeletal 19
25.	Keratin, type II cytoskeletal 8
26.	LIM and SH3 domain protein 1
27.	Mucin-13
28.	Myosin light polypeptide 6
29.	Myosin-14
30.	Na^+/H^+ exchange regulatory factor1 (NHERF1)
31.	Na^+/H^+ exchange regulatory factor3 (NHERF3)

Table 6 (continued) Cytoskeleton-associated proteins

	Protein
32.	Plastin-1
33.	Profilin 1
34.	Protein cordon-bleu
35.	Protein crumbs homolog 3
36.	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP 1
37.	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
38.	Syntenin-1
39.	Transforming protein RhoA
40.	Tubulin alpha-1C chain
41.	Tubulin beta-5 chain
42.	Myosin Ia
43.	Myosin Id
44.	Myosin-5B
45.	Myosin-6
46.	Myosin-7A
47.	Myosin-7B
48.	Villin-1
49.	14-3-3 protein beta/alpha
50.	14-3-3 protein epsilon
51.	14-3-3 protein eta
52.	14-3-3 protein sigma
53.	14-3-3 protein theta
54.	14-3-3 protein zeta/delta

Table 7 trafficking proteins

	Protein
1.	ADP-ribosylation factor 3
2.	ADP-ribosylation factor 5
3.	Annexin A2
4.	Annexin A4
5.	Annexin A5
6.	Annexin A6
7.	Annexin A7
8.	Annexin A11
9.	Annexin A13
10.	Copine-3
11.	Protein S100-A10
12.	Ras-related protein Rab-1A
13.	Ras-related protein Rab-2A
14.	Ras-related protein Rab-6A
15.	Ras-related protein Rab-7A
16.	Ras-related protein Rab-8A
17.	Ras-related protein Rab-11A
18.	Ras-related protein Rab-5C
19.	Ras-related protein Rab-10
20.	Ras-related protein Rab-35
21.	Syntaxin-binding protein 2
22.	Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8)

Table 8 Up- and down-regulated proteins

Protein	Avg. Ratio (*Vil2*$^{kd/kd}$: WT)
1) Transport protein (4 proteins)	
Up-regulated	
Zinc transporter 10 (SLC30A10)	2.71 ± 0.52
Down-regulated	
Sodium monocarboxylate transporter 1 (SMCT1) (SLC5A8)	0.57 ± 0.06
Transmembrane channel-like protein 4 (TMC4)	0.46 ± 0.11
Chloride intracellular channel protein 5	0.35 ± 0.05
2) Cytoskeleton-associated proteins (6 proteins)	
Up-regulated	
Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)	3.99 ± 1.25
INAD-like protein	2.52 ± 0.42
Adseverin	2.24 ± 0.28
Claudin-3	2.02 ± 0.41
Down-regulated	
Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 1 (NHERF1)	0.53 ± 0.05
Ezrin	0.17 ± 0.03
3) Trafficking proteins (2 proteins)	
Up-regulated	
Protein S100-A10	3.08 ± 0.53
Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8)	2.21 ± 0.38
4) Enzyme (3 proteins)	
Up-regulated	
Putative adenosylhomocysteinase 2	3.73 ± 1.18
Glutathione S-transferase A1	2.40 ± 0.39
Intestinal-type alkaline phosphatase	2.24 ± 0.35
5) Others (4 proteins)	
Up-regulated	
Guanine nucleotide-binding protein G(κ) subunit alpha	2.39 ± 0.28
Sushi domain-containing protein 2	2.23 ± 0.60
Down-regulated	
Calcium and integrin-binding protein 1	0.55 ± 0.02
Alpha-defensin 20	0.40 ± 0.14

Table 9 小腸の各セグメントに含まれた内容物の **pH**

	WT	*Vil2*$^{kd/kd}$
Duodenum	6.5 ± 0.2	6.6 ± 0.1
Jejunum	6.7 ± 0.1	6.8 ± 0.1
Ileum	7.9 ± 0.1	7.7 ± 0.2

野生型, *Vil2*$^{kd/kd}$ マウス : N=4, mean ± S.E.