

論文の内容の要旨

論文題目

肝細胞で発現誘導を受ける低分子量 G 蛋白 **Rab3** の同定と機能の検討

指導教官 小俣 政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 渡邊 清高

PKC(protein kinase C)は増殖, 分化, 分泌, 形態制御をはじめとした多様な細胞機能を担っている. ヒト肝細胞由来株 HepG2 細胞において PKC 活性化物質である TPA(12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate)によって発現が増強する低分子量 G 蛋白である Rab3B をディファレンシャルディスプレイ法により同定し, 100nM 16 時間の刺激により RT-PCR 法によって mRNA レベルにおいてその誘導を確認した. PKC 阻害薬を用いた検討では Rab3B の誘導は staurosporine により完全に抑制され, PD98059 を前処理に用いることにより mRNA レベルで 1/2 以下に阻害され, MEK/ERK カスケード経路を介していると考えられた. ラットなどで肝に発現が報告されている Rab3D と Rab3B について RNase プロテクションアッセイを行ったところ, Rab3D の誘導は

ほとんど見られなかったのに対し、Rab3B はコントロールと比較し 28 倍もの発現の増強が見られた。非上皮細胞である Jurkat 細胞では既に報告されているように TPA による IL-2 受容体 mRNA の誘導を認めたものの、Rab3B の誘導は認められなかった。このため、肝細胞において PKC 依存性の Rab3B 活性化機構が存在することが示唆された。蛋白レベルでも時間依存性に発現の増強を認め、ポリクローナル抗体を用いた蛍光免疫染色では 100nM 4 時間の TPA 刺激により細胞質内に顆粒状の構造物の出現を認めた。さらにテトラサイクリンによる発現ベクターに Rab3B と Xpress タグを導入したプラスミドを、テトラサイクリン調節領域を安定して発現している HepG2 細胞由来の HY-Toff 細胞に一過性に発現させ、テトラサイクリンオフにより発現を増強させた細胞を用いて、Xpress に対する特異的なモノクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、細胞質内の形質膜近傍に多数の顆粒状の構造の局在を認めた。

Rab 蛋白は SNARE 蛋白などの小胞形成や融合に関連する蛋白群の調節蛋白として、様々な細胞内器官において膜輸送を司っている。さらに junctional complex やアピカル膜メンブレンへの蛋白の局在調節を司っている可能性がある。上皮細胞の極性発現に伴い ZO-1 等のジャンクション蛋白やアピカル蛋白は細胞内プールから細胞表面へ移動する。Rab3B が細胞内画分から細胞接着面へ再分布することはこの低分子量 G 蛋白が極性発現の過程で細胞内と細胞表面との間での輸送を制御している可能性を示している。

既に知られているヒト以外の肝細胞も含めた他の上皮細胞における Rab3B の機能の多様性を考慮すると、肝細胞に特徴的な役割を担っている可能性が示唆された。Rab3B についてヒトにおいてその機能を検討した報告はこれまでほとんどなく、マウス肝における局在、ラット肝細胞における発現は示されているものの、肝における誘導調節、機能の検討もこれまでなされていなかった。今回の検討において PKC 活性

化物質によるヒト肝細胞での Rab3B の発現誘導が mRNA レベルおよび蛋白レベルで示された。これまでの Rab3B に対する特異的な抗体で有用なものはまだなく、その局在および機能の検討には強制発現系を用いる必要があると考えられた。Rab3B は多くの上皮細胞において分泌に加え、極性関連分子の制御を行うことによって細胞の形態変化の調節を行っていることが知られている。オルガネラの特定は今回の検討では行っていないが、発現誘導を受けた Rab3B が細胞内のオルガネラ膜にまず分布することが示され、分泌や骨格調節蛋白の物質輸送調節に関与している可能性が示唆された。特異的な蛍光抗体による局在と時間的な変化を追跡することが可能になれば、Rab3B の細胞内局在の変化をリアルタイムに解析することができると考えられる。

テトラサイクリンにより発現の誘導、抑止を制御できる安定株 YT-Toff-Rab3B を樹立した。遺伝子発現をオンにした後、経時的に RNA を回収し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現の比較を行うことにより、二次的に誘導される遺伝子の同定や機能を検討が可能になる。Rab3B の下流でどのような遺伝子が動くかを解析することで、この低分子量 G 蛋白の機能と誘導のもつ生理的意義を予測することができる。今後は得られた安定発現株を用いてより生理的に近い条件で Rab3B の挙動の解析が可能になると期待される。