

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 渡 邊 清 高

本研究はヒト肝細胞において増殖，分化，発癌，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 PKC(protein kinase C)活性化によって誘導される遺伝子の一つである低分子量 G 蛋白に着目し，その同定と機能の検討を試みたものであり，下記の結果を得ている。

1. 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.
2. 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 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。Rab3B が細胞内面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。

3. 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。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。

以上，本論文はヒト肝細胞由来株 HepG2 細胞において，PKC 活性化物質である TPA 刺激により誘導される遺伝子の解析から，小胞形成や融合に関連する蛋白群の一つである Rab3B を同定し，その機能と局在について検討した。Rab3B についてヒト肝細胞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されていなかった。本研究はこれまで未知に等しかった，肝細胞に特徴的な分泌や物質輸送，極性関連分子の制御を行う調節機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ，学位の授与に値するものと考えられる。