

学 位 論 文 題 名

Molecular Cloning of cDNA Encoding
Human Rab3D Whose Expression Is
Up-regulated with Myeloid Differentiation

（顆粒球分化に伴う遺伝子ヒト Rab3D のクローニングに関する研究）

学位論文内容の要旨

成熟顆粒球は骨髓球系前駆細胞より多様な段階を経て分化し、細菌、真菌、寄生虫感染などに対する宿主反応の際に主要なエフェクター細胞として作用することが知られている。このような成熟顆粒球における機能の獲得には特異的な遺伝子の発現が不可欠であるといえる。他方、骨髓球性白血病細胞は、顆粒球分化に必須である遺伝子の発現が欠落しているために、幼若な段階で成熟が停止した状態であると推察される。

HT93A 細胞株は岸（新潟大）らにより樹立されたヒト前骨髓球性白血病患者由来の白血病細胞株であるが、レチノイン酸存在下において成熟顆粒球（好酸球および好中球）へ分化することが知られているので *in vitro* における骨髓球系前駆細胞からの顆粒球分化のモデルとして有用であると考えられた。この細胞株を用いて顆粒球分化途中に発現される遺伝子を単離するためにサブトラクション法およびディファレンシャルディスプレイ法を施行した。サブトラクション法では一部の転写産物の変化を捕らえるのみに留まったが、ディファレンシャルディスプレイ法は少量のサンプルよりクローニングを行うことが可能であり、多数の発現遺伝子の経時的変化を非常に捕らえやすいため単離の方法として後者を選択した。

我々がクローニングした新規遺伝子は分子量 24kD の低分子 GTP 結合タンパクをコードしており、そのモチーフ解析から Rab family に属することが判明した。Rab family は現在までに 30 種類以上が報告されている。特に Rab3 subfamily は種に関係なく認められ、4 種類のアイソタイプ-3A、-3B、-3C および-3D を有し、各アイソタイプ間ではアミノ酸配列上 77-85% のホモロジーである。また、アミノ酸配列の比較からこのタンパク質はマウス Rab3D に 93% のホモロジーを呈し、最も類似していたため Rab3D のヒトホモログとして判断した。

Rab family に属するタンパクは各組織に遍在的に発現されており、血液細胞においても顆粒球および単球に発現されていることが報告されている。我々の検討においてもヒト Rab3D は様々の血液細胞株に低レベルではあるが恒常的に発現されていた。また、ヒト末梢血では顆粒球における発現量が他系統の血球細胞に比較して多いことが示された。

我々はさらに顆粒球分化に伴い、ヒト Rab3D が mRNA レベルにおいて up-regulation されることを示した。この発現の変化は他の細胞株 (YJ11) を用いた検討では顆粒球に分化する際のみを確認された。また、レチノイン酸による刺激は細胞株 Jurkat、U937 において直接的に発現量に影響を与えなかった。したがって、ヒト Rab3D はその発現パターンから顆粒球において特異的な作用している可能性が推測された。

Rab3 subfamily は細胞内小胞輸送に関与していることが知られており、高井 (大阪大) らの報告では Rab3A は神経終末において神経伝達物質の小胞輸送に関与することが明らかにされている。また、exocytosis について様々の細胞で関与していることが多数の報告でなされている。本実験の結果から我々はヒト Rab3D が顆粒球においてその含有顆粒の exocytosis に関与するモデルを推測しているが、顆粒球における脱顆粒の現象を明らかにするために今後このクローニングされた新規遺伝子を発現ベクターに組み込み、好中球および好酸球における顆粒放出の変化を検討することで成熟顆粒球での Rab3D の役割を解明することができるものと期待される。また、Rab3D タンパクの過剰発現をしたトランスジェニックマウス、あるいはノックアウトマウスなどの *in vivo* においてその作用を支持できる結果が得られるかは興味深いところである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

Molecular Cloning of cDNA Encoding Human Rab3D Whose Expression Is Up-regulated with Myeloid Differentiation

(顆粒球分化に伴う遺伝子ヒト Rab3D のクローニングに関する研究)

申請者は白血病細胞が未熟な骨髄芽球の異常増殖および分化停止の状態であることと一部の白血病が分化誘導後に成熟顆粒球になることに着目した。本研究は骨髄球系前駆細胞より多様な段階を経て分化する正常の顆粒球分化と前述の現象を対比させ、この分化過程に発現される様々な遺伝子について検討したものである。

本研究に用いられた HT93A 細胞株は岸ら（新潟大）により樹立されたヒト急性前骨髄球性白血病患者由来の白血病細胞株であるが、レチノイン酸存在下において成熟顆粒球（好酸球および好中球）へ分化することが報告されている。実験に先立ちこの細胞について種々の検討をし、*in vitro* における骨髄球系前駆細胞からの顆粒球分化のモデルとして有用であると申請者らは考えた。単離の方法として多数の発現遺伝子の経時的変化の観察に優れていることからディフュゼンシャルディスプレイ法が用いられた。

今回クローニングされた新規遺伝子は分子量が 24kD の低分子 GTP 結合タンパクをコードしており、そのモチーフ解析から Rab family に属すると考えられた。また、アミノ酸配列の比較からマウス Rab3D と 93% の相同性を有しており、Rab3D のヒトホモログとして申請者により同定された。なお、Rab family は現在までに 30 種類以上が報告されているが、特に Rab3 subfamily は種を越えて存在し、高度の相同性を有する 4 種類のアイソタイプ（-3A、-3B、-3C および -3D）が報告されている。

Rab family に属するタンパクは各組織に遍在的に発現されており、血液細胞においても一部の Rab タンパクは顆粒球および単球に発現されていることが報告されている。申請者らの検討においても、ヒト Rab3D は様々な血液細胞株に

低レベルではあるが恒常的に発現されていた。また、ヒト末梢血では顆粒球における発現量が他系統の血球細胞に比較して多いことが示された。

申請者はさらに顆粒球分化に伴い、ヒト Rab3D が mRNA レベルで発現が増加することを示した。この発現の変化をさらに他の細胞株（YJ11）を用いて検討し、顆粒球分化に伴うことを再確認した。また、レチノイン酸による刺激に分化を示さない細胞株である Jurkat や U937 において、レチノイン酸は直接的に Rab3D の発現量には影響を与えないことを示した。以上から、申請者はヒト Rab3D が顆粒球分化に伴い発現が増加することと、成熟顆粒球において重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

Rab3 subfamily は細胞内小胞輸送に関与していることが知られている。高井ら（大阪大）の報告では Rab3A は神経終末において神経伝達物質の小胞輸送に関与することが明らかにされている。また、exocytosis について様々の細胞で関与していることも多数報告されている。本実験の結果と合わせて申請者はヒト Rab3D が顆粒球においてその含有顆粒の exocytosis に関与している可能性を想定しているが、今後、成熟顆粒球での Rab3D の役割をより詳細に解明することが望まれる。

学位公開発表に際して、主査および副査より Rab3D が発現する他の細胞における機能に関しての推察、具体的な臨床応用の可能性、実験動物における最近の知見ならびにそれを用いた場合の推測される結果など、多岐にわたる質問および指摘がなされた。申請者はそれらに対して Rab family に関する各分野での報告ならびに発表以外の実験結果を引用し、未施行の実験および応用例に関して推察される事象を明瞭に回答した。

この論文は低分子 GTP 結合タンパクの一つである Rab3D のヒトホモログを新規にクローニングしたものである。このタンパクが顆粒球分化の際に発現が増加することを初めて示し、成熟顆粒球における脱顆粒の現象に重要な役割を果たしている可能性を示唆した点で高く評価される。今後、脱顆粒と細胞内小胞輸送に関与するこのタンパクの活性機構および作用機構を解明することで特異的顆粒の放出制御への応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。