

徳久 美都子 論文内容の要旨

主 論 文

Expression and localisation of Rab44 in immune-related cells change during cell differentiation and stimulation
(免疫関連細胞における Rab44 の発現分布は細胞の分化と刺激によって変化する)

徳久 美都子、門脇 知子、小川 晃平、山口 優、城戸 瑞穂、Weiqi Gao、
梅田 正博、筑波 隆幸

(Scientific Reports 2020年 印刷中)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：梅田 正博 教授)

緒 言

Rab タンパク質は様々な細胞内オルガネラの分子スイッチとして、細胞内小胞輸送を特異的に制御している。従来の Rab1~43 遺伝子は分子量約 20kDa 程度の低分子量 G タンパク質に分類されている。最近我々の研究室では、破骨細胞から新規遺伝子として Rab44 を同定した。Rab44 は EF ハンドドメインやコイルドコイルドメインを持つ分子量約 100kDa の高分子量 G タンパク質であり、リソソームからのカルシウム流入とそれに続く、NFATc1 の転写調節を変化させることで破骨細胞分化を負に制御する。しかしながら、Rab44 が破骨細胞以外の細胞や組織でどの程度発現し、分布するのかという基本的な事については明らかとなっていなかった。本研究では、マウスにおける Rab44 の組織分布および免疫関連細胞での発現量の変動について解析を行った。

対象と方法

組織はマウス (C57BL/6) 8 週齢から採取し、骨髄細胞はマウス脛骨、大腿骨より骨髄を採取し使用した。初代培養としてマウス由来骨髄細胞を用い、マクロファージへの分化には M-CSF を、樹状細胞への分化には GM-CSF を用いた。好中球は 4%チオグリコレートをマウスの腹腔内に注射し、14 時間後に回収、2 時間インキュベーションし、非接着細胞を好中球として使用した。細胞株培養では THP-1 細胞 (ヒト単球由来細胞株) を用い、マクロファージ分化のため PMA で刺激し

た。解析方法は定量性 real-time PCR (QPCR) 法、Western blot 法、免疫組織化学染色法、蛍光免疫染色法を行った。

結 果

マウス Rab44 は 2 つのアイソフォームを持つ事が明らかとなった。すなわち、N 末端に EF ハンドドメインを含む Rab44 をロングフォーム (L 型)、含まないものをショートフォーム (S 型) と名付けた。

マウスの各組織における Rab44 の発現量を比較するため、real-time PCR 法で解析したところ、mRNA レベルでは、L 型および S 型ともに骨髄で高度に発現し、精巣上体、肺、脾臓、胸腺、卵巣、皮膚でおよび肝臓でわずかに発現していた。Rab44 の発現に関して組織分布を解析するため、免疫組織化学染色を行った。Rab44 陽性細胞はいずれの組織でも一部の細胞で検出された。骨髄における Rab44 陽性細胞をさらに詳しく解析するため、造血幹細胞マーカーである CD117、Sca-1 を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、Rab44 の発現は CD117 陽性細胞と一致したが、Sca-1 陽性細胞では検出できなかった。

次に、免疫関連細胞における Rab44 発現レベルを real-time PCR 法で解析した。骨髄細胞と比較して、マクロファージ、好中球、樹状細胞では Rab44 の発現は低下していることが分かった。さらに LPS によってマクロファージでの Rab44 の局在が変化するかを調べたところ、無刺激では Rab44 は初期エンドソームに一部局在していた。LPS で処理すると、Rab44 の一部は形質膜やリソソームに局在するようになった。これらの結果は、Rab44 の局在が LPS 処理によって変化することを示している。

Rab44 の発現量が免疫調節薬によって変動するかについて調べた。ラパマイシン、デキサメタゾン、エトポシドなどの免疫抑制薬、およびインターフェロニンなどの免疫活性薬を用いて Rab44 の発現量を調べたところ、2 時間や 4 時間での短時間と 15 時間での長時間の処理に対して、骨髄細胞とマクロファージにおける L 型と S 型の変動はそれぞれ異なっていることが分かった。

考 察

Rab44 はマウスの組織において骨髄に高度に発現していることが明らかとなり、その中でも CD117 陽性細胞に発現しているが、Sca-1 陽性細胞には発現を認めなかった。Rab44 は免疫細胞に分化すると発現量が減少することが分かった。さらに Rab44 は免疫調整薬を添加することで発現量及び局在が変動することが分かった。

これらの結果より、Rab44 は免疫関連細胞の細胞分化と免疫調整薬などの刺激によって、発現量と細胞内局在が変化する事が明らかとなった。