



Regulation of Morphology by Rho p21 and its Inhibitory GDP/GTP Exchange Protein(Rho GDI) in Swiss 3T3 Cells

三浦, 靖史

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1288

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001288>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	三 浦 靖 史 (大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第896号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成6年3月31日
学位論文題目	Regulation of Morphology by Rho p21 and its Inhibitory GDP/GTP Exchange Protein (Rho GDI) in Swiss 3T3 Cells (Rho p21とそのGDP解離抑制蛋白質 (Rho GDI) による Swiss 3T3 細胞の形態制御)
審査委員	主査 教授 高 井 義 美 教授 河 野 通 雄 教授 水 野 耕 作

論 文 内 容 の 要 旨

序 文

Rho p21は Ras p21と同じく低分子量GTP結合蛋白質（G蛋白質）スーパーファミリーのひとつであり、細胞骨格の制御に関与していることが明らかになりつつある。Rho p21は、ボツリヌス菌の菌体外酵素であるC₃によりADPリボシル化される。その部位はエフェクター領域に位置する41番目のアミノ酸であるアスパラギンであり、Rho p21がADPリボシル化されるとその機能が阻害される。Rho p21には、GDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型があり、GTP結合型が標的蛋白質に作用してその機能を遂行する。GDP結合型からGTP結合型へはGDP/GTP交換反応により転換され、GDP/GTP交換蛋白質（GEP）によって制御されている。一方、GTP結合型からGDP結合型へは内在性のGTPase反応により転換され、GTPase活性促進蛋白質（GAP）によって制御されている。GEPには、Rho p21の活性化に促進的に働くGDP解離促進蛋白質（GDS）と、抑制的に働くGDP解離抑制蛋白質（GDI）がある。本研究室では、Rho p21に対するGDSとしてSmg GDSを、GDIとしてRho GDIを同定している。最近、Rho p21の機能を阻害するC₃を用いて、Rho p21が細胞形態の維持に働いている可能性が示唆されている。そこで、本研究では、C₃のみではなく、Rho GDIも用いて、Swiss 3T3細胞の形態制御におけるRho p21とRho GDIの作用機構を検討した。

方 法

1) 実験材料

RhoA p21, RhoA^{H⁴¹}p21, Rac1 p21, Smg p21BおよびKi-Ras^{V⁶¹L¹²}p21はそれぞれを発現したSf9細胞から精製した。C末端の3つのアミノ酸を欠いたRhoA p21 (RhoA p21^{ΔLVL})とSmg GDSはそれぞれを発現した大腸菌から精製した。Rho GDIとG25Kは、Glutathione S-transferase fusion蛋白質としてそれぞれを発現した大腸菌から精製した。なお、すべての蛋白質は2-20mg/mlに濃縮して実験に用いた。

2) 細胞培養

Swiss 3T3 細胞は2.5mlの10% FCS DMEMで培養した。1.4 x 10⁴個を35mm径の培養皿で37°C、10% CO₂で5日間培養し、ほぼコンフルエントになった状態で解析に用いた。

3) マイクロインジェクション

直径1 μm以下に引き伸ばされた毛細ガラス管を用いて、Swiss 3T3 細胞に各試料をマイクロインジェクションした。約5 x 10⁻¹⁴lの試料が1回のマイクロインジェクションによって細胞内に注入され、各低分子量G蛋白質の細胞内濃度は約3.5 μMになった。また、C₃の細胞内濃度は約0.57 μMになった。

4) 細胞形態とストレスファイバーの解析

細胞形態は位相差顕微鏡で解析した。一方、ストレスファイバーは、FITCファロイジンで染色し、蛍光顕微鏡を用いて解析した。

結 果

1) Swiss 3T3 細胞の形態とストレスファイバーにたいする Rho GDI の作用

Swiss 3T3 細胞に Rho GDI をマイクロインジェクションすると、細胞は1時間以内に丸く収縮した。この形態変化はマイクロインジェクション後6時間継続し、その後、徐々に細胞は元の形態に戻った。マイクロインジェクションしない細胞では発達したストレスファイバーが観察されたが、Rho GDI をマイクロインジェクションした細胞ではストレスファイバーが消失していた。この Rho GDI による形態変化は、Rho GDI と活性型である GTP γ S 結合型 RhoA p21 を共にマイクロインジェクションすることにより抑制された。しかし、RhoA p21 と同様に Rho GDI の基質である GTP γ S 結合型 Rac1 p21 や G25K を Rho GDI と共にマイクロインジェクションしても Rho GDI の作用は抑制されなかった。さらに、GTP γ S 結合型 Smg p21 B と Ki-Ras^{val12} p21 によっても Rho GDI の作用は抑制されなかった。

2) 細胞形態への RhoA p21 と Smg GDS の作用

活性型である GTP γ S 結合型 RhoA p21 を単独でマイクロインジェクションしても形態に変化は認められなかった。さらに、RhoA p21 を活性化する Smg GDS を単独でマイクロインジェクションしても形態に変化は認められなかった。さらに、Smg GDS を Rho GDI と共にマイクロインジェクションしても Rho GDI の作用は抑制されなかった。

3) Rho GDI の作用における RhoA p21 の C 末端の翻訳後修飾の必要性

RhoA p21 の C 末端は Cys-Leu-Val-Leu であるが、この Cysteine がゼラニルゼラニル化され、次に、Leu-Val-Leu の部位がプロテアーゼによって除去され、最後に、露出した Cysteine のカルボキシル基がメチル化される。この C 末端の翻訳後修飾が Rho GDI の作用に必要なであるが、この修飾を受けない変異型である GTP γ S 結合型 RhoA^{ΔLVL} p21 を Rho GDI と共にマイクロインジェクションしたところ、Rho GDI の作用は抑制されなかった。

4) Swiss 3T3 細胞の形態とストレスファイバーへの C₃ の作用

C を Swiss 3T3 細胞にマイクロインジェクションすると、従来の報告と同様に、形態とストレスファイバーに変化が認められた。Rho GDI の作用が6時間しか続かなかったのに対して、C による形態変化は少なくとも24時間継続した。また、C₃ で ADP リボシル化されない変異型である GTP γ S 結合型 RhoA⁷⁰⁴¹ p21 により C₃ の作用は抑制された。

考 察

本研究では、まず、Rho p21とその活性制御蛋白質である Rho G D I が、細胞形態の維持に働いていることを明らかにした。本研究室では、欠陥平滑筋において、静止時には、不活性型である G D P 結合型 Rho p21が Rho G D I と複合体を形成していることを明らかにしている。Swiss 3T3 細胞にも Rho G D I が存在しており、Rho p21 の一部は G D P 結合型として Rho G D I と複合体を形成していると考えられる。しかし、Swiss 3T3 細胞の場合、血清中の増殖因子からシグナルが常に入っているため、Rho p21の一部が常に活性化しており、Rho G D I と複合体を形成した不活性型 Rho p21と平衡状態にあり、この活性化されている Rho p21が正常な細胞形態を維持していると推定される。したがって、大量の Rho G D I をマイクロインジェクションすることによりこの平衡状態が変化し、Rho G D I と複合体を形成した不活性型 Rho p21が増加し、その結果、活性型 Rho p21が減少して正常な細胞形態を維持できなくなったと解釈できる。一方、本研究室では、Smg G D S と Rho G D I が共存した時、無細胞実験系において Rho G D I の作用の方が Smg G D S の作用より強いことを明らかにしているが、Smg G D S をマイクロインジェクションしても Rho G D I の作用を阻害できないことから、生体内でも Rho G D I の方が Smg G D S より作用が強いことが確認できた。以上の結果から、増殖因子のシグナルによる Rho p21の活性化機構では、シグナルは Rho p21あるいは Rho G D I に入り、Rho p21が Rho G D I より解離することによって初めて Smg G D S が作用して活性化されると考えられる。今後は、Swiss 3T3 細胞において、どのような細胞内シグナルが Rho p21ー複合体に作用するのかを明らかにしていく必要がある。

本研究では、次に Rho p21がアクトミオシン系を介して細胞形態の維持に働いていることを示した。すなわち、Rho G D I や C_3 をマイクロインジェクションするとストレスファイバーが消失することから、Rho p21は直接的あるいは間接的にアクトミオシン系を介してその作用を発現していると考えられる。本研究室では、Rho p21が細胞形態の維持だけでなく、平滑筋の収縮や細胞運動、細胞質分裂、細胞膜のラフリングなどのアクトミオシン系の関与した細胞機能を制御していることを明らかにしている。したがって、Rho p21によるこれらの種々の細胞機能の制御機構を明らかにするためには、今後、Rho p21の作用点を明らかにすることが重要であると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Rho p21は、Ras p21と同様に分子量21,000の低分子量G T P 結合蛋白質（G 蛋白質）で、G D P 結合型の不活性型とG T P 結合型の活性型があり、G T P 結合型が標的蛋白質に作用してその機能を遂行すると考えられている。G D P 結合型からG T P 結合型へはG D P / G T P 交換反応により転換され、G D P / G T P 交換蛋白質（G E P）によって制御されている。一方、G T P 結合型からG D P 結合型へは内在性のG T P ase 反応により転換され、G T P ase 活性促進蛋白質（G A P）によって制御されている。G E P には、交換反応に促進的に働くG D P 解離促進蛋白質（G D S）と、抑制的に働くG D P 解離抑制蛋白質（G D I）の2種類がある。また、Rho p21は、低分子量G 蛋白質のうちで唯一、ボツリヌス菌の菌体外酵素である C_3 によりA D P ソボシル化され、その機能が阻害されることが知られている。最近、 C_3 を用いて、Rho p21が細胞形態の維持に働いている可能性が報告されているが、詳細は未だ明らかではなかった。

本研究者は、Rho p21と Rho G D I を Swiss 3T3 細胞にマイクロインジェクションし、その形態変化を解析することによって、Rho p21と Rho G D I がアクトミオシン系を介して細胞形態の維持

に働いていることを明らかにし、その作用機構について解析している。また、これまで無細胞系実験で示されてきた、Rho G D I と Sing G D S が同時に存在するとき、Rho G D I の作用が Sing G D S より強いこと、および、Rho G D I の作用に Rho p21 の C 末端の翻訳後修飾が必要であることを、生体内において初めて実証している。

Swiss 3T3 細胞に C あるいは Rho G D I をマイクロインジェクションすると、細胞は 1 時間以内に丸く収縮する。その時、ストレスファイバーは消失している。C による形態変化は非可逆性で、少なくとも 24 時間継続するのに対して、Rho G D I による形態変化は 6 時間しか継続せず、その後、徐々に細胞が元の形態に戻る。さらに、この Rho G D I による形態変化は、活性型である G T P γ S 結合型 RhoA p21 により抑制されるが、Smg G D S や、C 末端の翻訳後修飾を受けない変異型である G T P γ S 結合型 Rho p21^{ΔLVL} によっては抑制されない。これらの結果により、増殖因子のシグナルによる Rho p21 の活性化機構では、シグナルは Rho p21 あるいは Rho G D I に入り、Rho p21 が Rho G D I より解離することによって初めて Smg G D S が作用して活性化されと考えられる。

以上のように本研究者は、Rho p21 と Rho G D I がアクトミオシン系を介して細胞形態の維持に働いていることを明らかにし、さらに、その作用機構も明らかにしている。本研究は、低分子量 G 蛋白質について、その細胞形態の制御機構を、独創的な手法を用いて研究したものであり、従来ほとんど行われなかった低分子量 G 蛋白質 (Rho p21) の細胞形態の維持における役割について重要な知見を得たものとして価値のある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) 学位を得る資格があると認める。