Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

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（みうらやすし）　（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C_3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示唆されている。そこで、本研究では、C_3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^{Ile41}p21，Rac1 p21，Smg p21BおよびKi－Ras^{val12}p21はそれぞれを発現したSf 9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$^{\Delta LVL}$）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 10^4個を35mm径の培養皿で37℃、10%ＣO_2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^{-14}l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、C_3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ＧＴＰγＳ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ＧＴＰγＳ結合型Racl 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、ＧＴＰγＳ結合型Smg p21Ｂ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ＧＴＰγＳ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がゲラニルゲラニル化され、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の作用に必要であるが、この修飾を受けない変異型であるＧＴＰγＳ結合型$RhoA^{4LVL}$ 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C_3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、C_3でＡＤＰリボシル化されない変異型であるＧＴＰγＳ結合型$RhoA^{Ile41}$p21によりC_3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 ＧＤＩ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ＧＤＰ結合型Rho p21がRho ＧＤＩ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 ＧＤＩが存在しており、Rho p21　の一部はＧＤＰ結合型としてRho ＧＤＩ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 ＧＤＩ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 ＧＤＩ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 ＧＤＩ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 ＧＤＳとRho ＧＤＩが共存した時、無細胞実験系においてRho ＧＤＩの作用の方がSmg ＧＤＳの作用より強いことを明らかにしているが、Smg ＧＤＳをマイクロインジェクションしてもRho ＧＤＩの作用を阻害できないことから、生体内でもRho ＧＤＩの方がSmg ＧＤＳ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 ＧＤＩに入り、Rho p21がRho ＧＤＩより解離することによって初めてSmg ＧＤＳ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－り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 ＧＤＩ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、細胞膜のラッ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ＧＴＰ結合蛋白質（Ｇ蛋白質）で、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と考えられている。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、交換反応に促進的に働く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）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ＡＤＰ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 ＧＤＩ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 ＧＤＩ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 ＧＤＩと Sing ＧＤＳが同時に存在するとき、Rho ＧＤＩの作用が Sing ＧＤＳより強いこと、および、Rho ＧＤＩ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 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 ＧＤＩ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 ＧＤＩによる形態変化は、活性型であるＧＴＰγＳ結合型 RhoA p21により抑制されるが、Smg ＧＤＳや、Ｃ末端の翻訳後修飾を受けない変異型であるＧＴＰγＳ結合型 Rho $p21^{\Delta LVL}$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 ＧＤＩに入り、Rho p21が Rho ＧＤＩより解離することによって初めて Smg ＧＤＳが作用して活性化されると考えられる。

以上のように本研究者は、Rho p21と Rho ＧＤＩ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。