



Growth Site Localization of Rho1 Small GTP-binding Protein and Its Involvement in Bud Formation in *Saccharomyces cerevisiae*

矢持, 亘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1479

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001479>

※ 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)	矢持 宣 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1005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8年3月31日
学位論文題目	Growth Site Localization of Rho 1 Small GTP-binding Protein and Its Involvement in Bud Formation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母RHO1低分子量GTP結合蛋白質の出芽形成における機能と局在)
審査委員	主査 教授 山村博平 教授 横山光宏 教授 片岡 徹

論文内容の要旨

低分子量GTP結合蛋白質は生体内で種々の重要な働きをしていることが解明されつつある。これらのうちRhoファミリーに属するRhoはアクチン系を介して、細胞形態の維持や細胞運動、細胞質分裂、細胞接着、細胞膜のラッフリング、および平滑筋の収縮などを制御していることが明らかにされている。Rhoは細胞膜受容体を介するシグナルによって活性化され、細胞骨格系の制御を行っている可能性が高いが、その作用機構はなお不明である。出芽酵母では、出芽の過程において決まった方向に細胞の成長が行われる。出芽形成時には、芽に向かってアクチン系を主とした細胞骨格が形成され、それに沿って分泌小胞や細胞質蛋白質が運ばれて、さらに核の移動が生じる。出芽の過程に低分子量GTP結合蛋白質が関与していることが示唆されており、Rhoファミリーに属するCDC42は出芽の開始に重要な働きをしていることが明らかにされている。今回、Rhoの作用点を明らかにする目的で、哺乳動物のRhoAのホモログであるRHO1の温度感受性変異株を単離し機能解析を行った。また、HA (influenza hemagglutinin) epitopeを付けたRHO1蛋白質を発現させて、HAに対するモノクローナル抗体を用いて免疫蛍光染色法を行い、RHO1蛋白質の細胞内局在を調べた。

[方法]

1. RHO1温度感受性変異株の単離

出芽酵母の染色体上のRHO1の一部(460塩基)をHIS3に置き換えることで(rho1::HIS3)、RHO1を破壊した酵母株(TM2-1A)を作成した。また、野生型のRHO1を持つプラスミドpWTにハイドロキシルアミン処理を行い、RHO1に変異を導入した。このプラスミドをTM2-1Aにトランスフォームし、生育許容温度下(24°C)と非許容温度下(37°C)で培養してクローンをスクリーニングした。約10,000個のクローンを検索し、候補となりうるクローンからプラスミドを回収した。それらの中から温度感受性の発育に関与している変異RHO1(rho1-104)を得た。DNAシーケンスによりrho1-104の変異箇所を調べ、次に酵母の染色体上のRHO1をrho1-104で置き換えることで1倍体のRHO1温度感受性変異株を作成した。さらに、その2倍体の酵母株を作成した。

2. RHO1 温度感受性変異株の解析

(1) RHO1 温度感受性変異株の成長および生存曲線

野生株およびRHO1 温度感受性変異株をそれぞれ生育許容温度下 (24°C) と非許容温度下 (37°C) にて培養し、経時的に細胞数を計測した。

また、生育許容温度下 (24°C) と非許容温度下 (37°C) にて経時的に培養後、各々から一定数の細胞取り出して再び許容温度下 (24°C) にて培養し、形成されるコロニー数を計測した。

(2) RHO1 温度感受性変異株の形態

1 ; 野生株およびRHO1 温度感受性変異株をそれぞれ生育許容温度下 (24°C) と非許容温度下 (37°C) にて培養し、ホルマリン固定後ローダミン・ファロイジンにてアクチンを、4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) にて核DNAを染色し、位相差および蛍光顕微鏡にて観察を行い細胞の表現型を解析した。またこの時同時に、RHO1 を破壊した酵母株の生育許容条件下と非許容条件下での細胞形態も観察した。

2 ; RHO1 温度感受性変異株の生育非許容温度下での核DNAの合成および核の分裂の状態をフロー・サイトメトリー解析にて検討した。

3 ; アルカリフォスファターゼ活性を調べる実験により、RHO1 温度感受性変異株の生育非許容温度下で生じる細胞融解について調べた。また、この細胞融解が浸透圧保護剤であるソルビトールによって保護されるかどうか調べた。

4 ; 哺乳動物のRhoAをRHO1 を破壊した酵母株にトランスフォームし、RhoAがRHO1 の機能を代用しうるかどうか調べた。

3. RHO1 蛋白質の細胞内局在

HA (influenza hemagglutinin) epitopeをつけたRHO1 をRHO1 温度感受性変異株およびRHO1 を破壊した酵母株にトランスフォームあるいはインテグレーションさせて発現させ、HAに対するモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色法にてHA-RHO1 蛋白質の細胞内局在を調べた。また、蛋白質の翻訳後修飾をうける部分に変異を入れたRHO1 蛋白質を同様に発現させて、翻訳後修飾の細胞内局在に及ぼす影響について検討した。さらにRHO1 蛋白質を過剰発現させた場合の細胞内局在の変化についても検討した。次にウエスタン・ブロット法にて、これらの発現させたPHO1蛋白質の細胞膜画分と細胞質画分における存在の割合について調べた。

[結果]

1. RHO1 温度感受性変異株の単離

方法に従ってRHO1 の温度感受性変異 (rho1-104) を得た。DNAシーケンスよりrho1-104 は、72番目のアスパラギン酸がアスパラギンに (D72N)、164番目のシステインがチロシンに (C164Y) 変異していた。D72Nは2箇所保存されているリン酸/マグネシウム結合ループの1箇所から5アミノ酸下流に位置しており、C164Yはグアニン塩基結合ループに位置していた。

2. RHO1 温度感受性変異株の解析

(1) RHO1 温度感受性変異株の成長および生存曲線

RHO1 温度感受性変異株は生育許容温度下においても成長が抑制されており、非許容温度下では成長が阻害されていた。また、成長を停止した細胞は死滅していくことが明らかにされた。

(2) RHO1 温度感受性変異株の形態

1 ; RHO1 温度感受性変異株およびRHO1 を破壊した酵母株は生育非許容条件下においては、小

さい芽が出た状態で成長を停止した。この時、corticalなアクチンは野生株と同様に芽の先端に集中しており、また核は1個であった。

2 ; フロー・サイトメトリー解析より、24°C, 33°C, 37°Cの条件下で培養時に野生株では、それぞれ65%, 45%, 40%が4nのピークを示しており、RHO1温度感受性変異株では各々、70%, 95%, 65%であった。この結果より、RHO1温度感受性変異株では核の合成は37°Cでは細胞周期特異的には停止しないが、33°CではG2/M期で停止することが明らかとなった。

3 ; アルカリフォスファターゼ活性を調べる実験から、RHO1温度感受性変異株は生育非許容温度下で細胞融解を起こしていることが明らかとなった。また、この細胞融解は浸透圧保護剤であるソルビトールにより保護された。

4 ; 哺乳動物のRhoAはRHO1の機能を代用し得た。

3. RHO1蛋白質の細胞内局在

HA-RHO1蛋白質は出芽予定部位、成長する芽の先端、および細胞分裂時の収縮輪にcorticalなアクチンと共に局在した。また、翻訳後修飾を受けないRHO1蛋白質ではこのような局在は認められず、細胞質に存在していた。HA-RHO1蛋白質を過剰発現させた細胞では、アクチンの局在にはあまり変化は見られなかったが、HA-RHO1蛋白質は細胞質のみならず細胞膜のほぼ全体に均一に存在していた。ウェスタン・プロット法から、RHO1蛋白質はその70%が細胞質画分に、30%が細胞膜画分に存在していた。翻訳後修飾を受けないRHO1蛋白質はそのほとんどが細胞質画分に存在していた。HA-RHO1蛋白質を過剰発現させた細胞では、細胞質画分および細胞膜画分共に3倍から5倍に増加していた。

[考察]

本研究から、RHO1蛋白質が出芽酵母においてアクチンとともに出芽形成の制御に関与していることが明らかとなった。また、RHO1蛋白質が収縮輪にも局在することから細胞質分裂にも関与している可能性が考えられた。RHO1蛋白質の標的蛋白質は現在のところ明らかではないが、RHO1温度感受性変異株の表現型がCDC1およびPKC1の変異株の表現型と、成長停止時の細胞形態、核の分裂阻害、および成長停止後の細胞融解、浸透圧保護剤による細胞融解の抑制などの特徴から相似しており、これらの遺伝子がRHO1蛋白質と相互作用をする蛋白質をコードしている可能性がある。免疫蛍光染色法を用いた実験より、出芽形成時には翻訳後修飾を受けたRHO1蛋白質が細胞膜に存在していると考えられる。RHO1蛋白質はそのGDP結合型でRho GDIと複合体を形成して細胞質に存在しており、何らかの機序でRho GDIから離れてGTP結合型として細胞膜に存在し標的蛋白質を活性化していると考えられている。翻訳後修飾をうけたGTP結合型のRHO1蛋白質が出芽部位に存在していると考えられることから、標的蛋白質も同じ部位に存在している可能性が高い。

RHO1蛋白質の上流の情報伝達も明らかには解明されていない。CDC42の温度感受性変異株では核の合成・分裂は生じるが出芽形成は行われぬ。この変異株にHA-RHO1蛋白質を発現させても細胞膜に何ら特異的な局在を示さない。このことから、RHO1蛋白質の上流でCDC42が働いている可能性が考えられる。

以上、RHO1が出芽酵母の出芽形成に関与していることが明らかとなった。さらに、その標的蛋白質が出芽部位でRHO1蛋白質により活性化されてそこに局在し、アクチン細胞骨格の再編成を制御している可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

低分子量GTP結合蛋白質のRhoファミリーに属するRhoはアクチン系を介して、細胞形態の維持や細胞運動、細胞質分裂、細胞接着、細胞膜のラッフリング、および平滑筋の収縮などを制御していることが明らかにされている。Rhoは細胞膜受容体を介するシグナルによって活性化され、細胞骨格系の制御を行っている可能性が高いが、その作用機構はなお不明である。RhoにはGDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型があり、GTP結合型のRho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。また、RhoはそのC末端側が脂質による翻訳後修飾をうけることが機能の活性化や標的蛋白質との相互作用に重要であると考えられている。本申請者を含むグループによってRhoの作用機構を明らかにするために、出芽酵母における哺乳動物のRhoAのホモログであるRHO1の温度感受性変異株が単離され機能解析が行われた。

RHO1温度感受性変異株は生育非許容条件下においては、小さい芽が出た状態で成長を停止し、また成長を停止した細胞は細胞融解を起こして死滅していくことが明らかにされた。この時、アクチンは野生株と同様に芽の先端に集中しており、また、核のDNA合成は37℃では細胞周期特異的には停止しないが、33℃ではG2/M期で停止することが明らかとなった。本研究者はHA (influenza hemagglutinin) epitopeをつけたRHO1を酵母細胞に発現させ、HAに対するモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色法にてRHO1蛋白質の細胞内局在を調べている。その結果、RHO1蛋白質は出芽予定部位、成長する芽の先端、および細胞分裂時の収縮輪にアクチンと共に局在することが見出された。また、翻訳後修飾を受けないRHO1蛋白質ではこのような局在は認められず、細胞質に存在することが明らかとなった。次にウェスタン・ブロット法にて、発現させたRHO1蛋白質の細胞膜画分と細胞質画分における存在の割合を検討した結果、RHO1蛋白質はその70%が細胞質画分に、30%が細胞膜画分に存在することが示された。また、翻訳後修飾を受けないRHO1蛋白質ではそのほとんどが細胞質画分に存在していることが明らかとなった。

本研究から、RHO1蛋白質が出芽酵母においてアクチンとともに出芽形成の制御に関与していることが明らかとされた。また、RHO1蛋白質が収縮輪にも局在することから細胞質分裂にも関与している可能性が考えられた。RHO1蛋白質はそのGDP結合型でRho GDIと複合体を形成して細胞質に存在しており、何らかの機序でRho GDIから離れてGTP結合型として細胞膜に存在し標的蛋白質を活性化していると考えられている。翻訳後修飾をうけたGTP結合型のRHO1蛋白質が出芽部位に存在していると考えられることから、標的蛋白質も同じ部位に存在している可能性が高いことを示している。

本研究はRhoの機能とその標的蛋白質の解明につながる重要な知見を得たものとして価値のある業績と認める。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。