OUKA
Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in Saccharomyces cerevisiae |
| Author(s) | 野中, 秀太郎 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| oaire:version | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/39862 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

| | |
|---|---|
| 氏名 | 野中秀太郎 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） |
| 学位記番号 | 第 12363 号 |
| 学位授与年月日 | 平成8年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学研究科生理系専攻 |
| 学位論文名 | A downstream target of *RHO*1 small GTP−binding protein is *PKC*1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*<br>（出芽酵母における，*RHO*1低分子量G蛋白質の標的蛋白質は，Cキナーゼのホモログであり，MAPキナーゼカスケードを制御する*PKC*1である。） |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授 高井 義美<br>（副査）<br>教授 谷口 直之　教授 平野 俊夫 |


## 論文内容の要旨

［目的］

低分子量G蛋白質Rhoはアクチン系を介して，細胞運動，細胞形態，細胞質分裂などの種々の細胞骨格系依存性の細胞機能を制御していることが明らかにされている。しかし，Rhoの作用機構についてはまだ明らかにされていない。その理由の1つは，動物細胞においては遺伝学的解析が容易でないからである。一方，遺伝学的解析が比較的容易に行える出芽酵母においても，動物細胞のRhoに相同なRho 1が見出されている。私どもは現在までに，Rho 1の変異株が出芽できずに死んでしまうことを明らかにしている。また，出芽の際に，Rho 1とアクチンがともに出芽の部位に局在し出芽を制御することや，細胞質分裂の際に，Rho 1とアクチンがその収縮輪にともに局在することを明らかにしている。しかし，今までのところ，出芽酵母においてもRhoからアクチンへ至る経路は明らかにされていない。

そこで，本研究では，Rhoからアクチンへ至るシグナル伝達経路を明らかにする目的で，出芽酵母のRho 1の標的蛋白質遺伝子のクローニングを試みた。

［方法ならびに結果］

1）*RhoA*温度感受性変異株の作成

582bpの*RhoA*遺伝子の翻訳領域，140bpの*TDH*3遺伝子の転写翻訳終末領域，および，1.1kbpの*URA*3遺伝子を含む1.8kbpの遺伝子断片を，野性株の*RHO*1遺伝子の遺伝子座に置き換えた株を作成した。同様に，*URA*3遺伝子を*HIS*3遺伝子に置き換えた反対接合型の株を作成した。これらの2つの株を接合させることで2倍体の*RhoA*温度感受性変異株の作成に成功した。この株は，24℃では成長できたが，35℃では成長することができなかった。

2）*RhoA*温度感受性変異株の優性復帰変異株の単離

上述の方法により得た*RhoA*温度感受性変異株約$5 \times 10^8$個を培地に撒き，10%の生存率の条件下でUVを照射した。そして35℃で4日間培養し，3つの独立したクローンを単離した。そのうちの1つについて解析したところ，この優性復帰変異株の変異が，一遺伝子変異であることが明らかとなった。また，他の2つについても遺伝学的解析より同一の遺伝子に変異が生じていることが明らかとなった。この変異株から染色体*DNA*を抽出し，染色体*DNA*ライブラリーを作成した。そして，このライブラリーを用いて抑圧変異遺伝子の単離を行った。

3）抑圧変異遺伝子の同定

上述のライブラリーから単離した抑圧変異遺伝子の制限酵素地図解析および，塩基配列の解析から，この遺伝子が動物細胞のCキナーゼのホモログである*PKC*1遺伝子を含むものであることが明らかとなった。そこで，この抑圧変異遺伝子が*PKC*1遺伝子そのものであることを確かめるため，ＰＣＲ法を用いて上流562bpをおよび下流175bpを含む約4.2kbpの変異*PKC*1遺伝子を単離した。この遺伝子断片は*RhoA*温度感受性変異株の温度感受性を抑圧した。この結果から，抑圧変異遺伝子が*PKC*1遺伝子であることが明らかとなった。

4）*PKC*1遺伝子における変異部位の同定

この変異が優性活性型の変異であることから，変異の生じた部位を同定することが重要である。塩基配列の解析から1193番目の塩基がＣＧＴからＣＣＴへ置換されていた。この変異は，Pkc1の偽基質配列内の398番目のアミノ酸をアルギニンからプロリンへの置換を引き起こしていることが明らかとなった。偽基質配列はすべてのＰＫＣにおいて保存された領域で，活性化のシグナルがない時には触媒領域に結合して不活性型に維持する機能を有しており，この配列に変異を持つPkc1は構成的に活性型となる。このことから，Rho1の機能はPkc1を活性化することであることが示唆された。

5）Two－hybrid systemによるRho1とPkc1の結合

前の結果から，Rho1がPkc1を活性化することが示唆された。そこで，Rho1とPkc1が直接結合するか否かについてTwo－hybrid systemを用いて検討した。その結果，Pkc1はＧＴＰ結合型と考えられる優性活性型変異Rho1とのみ特異的に結合した。したがって，Pkc1が，Rho1の標的蛋白質であることが明らかとなった。また，Rho1はPkc1の377番目から640番目のアミノ酸領域と結合することが明らかとなった。

6）*RhoA*変異株とPkc1を介するＭＡＰキナーゼ系との関係

現在まで，Pkc1はＭＡＰキナーゼ系を介して細胞壁形成を制御していることが明らかになっている。そこで，*RhoA*変異株の温度感受性が，ＭＡＰキナーゼ系を構築する遺伝子によって抑圧されるかを検討した。その結果，*MKK*1遺伝子の優性活性型変異や*MPK*1遺伝子の高発現により抑圧されることが明らかとなった。このことから，Rho1がPkc1を介してＭＡＰキナーゼ系を制御して，細胞壁形成に関与していることが明らかとなった。

7）Rho1の標的蛋白質の多様性

上述の結果から，Pkc1がRho1の標的蛋白質であることが明らかとなったが，*PKC*1遺伝子破壊株の致死性が浸透圧安定剤である1Ｍソルビトールで抑圧される一方，*RHO*1遺伝子破壊株の致死性が抑圧されないことから，Rho1がPkc1を介する経路とは別のシグナル伝達経路も制御していることが示唆された。そこで，Rho1の標的蛋白質との相互作用領域に変異の生じた3種類の温度感受性変異株を作成した。そして，活性型変異*PKC*1遺伝子による35℃における抑圧を検討したところ，*rho*1（Ｖ43Ｔ）株の温度感受性は抑圧されなかった。このことから，Pkc1を介する経路とは別の経路が少なくとも1つ，Rho1の下流に存在することが明らかとなった。

［総括］

本研究では，出芽酵母の遺伝学的解析を用いてRho1がPkc1を介してＭＡＰキナーゼ系を制御して，細胞壁形成に関与していることを明らかにした。さらに，Rho1は下流において2つ以上のシグナル伝達経路を制御し，多様な細胞機能を制御している可能性が明らかとなった。しかし，Rho1によるPkc1のプロテインキナーゼ活性の活性化についてはまだ成功していない。Rho1がPkc1を直接活性化するのか作用部位へのトランスロケーションに関与しているのかをさらに明らかにしていかなくてはならない。また，Pkc1とは別のRho1の標的蛋白質遺伝子をクローニングすることで，Rhoからアクチンへ至るシグナル伝達経路を明らかにしていかなくてはならない。今後は，この出芽酵母で得られた結果をもとに，動物細胞におけるRhoの標的蛋白質遺伝子をクローニングすることで，Rhoを介する種々のシグナル伝達機構の解明や，アクチン系を介する細胞機能の分子制御機構が明らかにできるものと考えている。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は，本研究により出芽酵母のRho1の標的蛋白質の1つがPkc1であることを明らかにするとともに，

Rho１がPkc１を介してＭＡＰキナーゼカスケードを制御して，出芽酵母の細胞壁形成に関与していることを明らかにした。さらに，Rho１はPkc１を介する経路とは別のシグナル伝達経路を少なくとも１つ制御していることを明らかにした。この結果は，動物細胞においてもRhoがプロテインキナーゼ型標的蛋白質を介して，ＭＡＰキナーゼカスケードを制御しているとともに，いま一つの新しいシグナル伝達経路を制御していることを強く示唆するものである。

本研究は，実験結果自体の意義もさることながら，今後の発展性にも期待できるものがあり，生命科学への貢献度が極めて高い研究といえる。したがって，学位授与に十分値すると考えられる。