



Title	Interaction of the Rho Family Small G Proteins with Kinectin, an Anchoring Protein of Kinesin Motor
Author(s)	堀田, 一彦
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40030">https://hdl.handle.net/11094/40030</a>
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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	ほっ 堀 田 かず 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 9 8 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Interaction of the Rho Family Small G Proteins with Kinectin, an Anchoring Protein of Kinesin Motor (Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質とキネシンモーター Anchoring 蛋白質キネクチンとの相互作用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高井 義美  (副査) 教 授 谷口 直之 教 授 米田 悦啓

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は, Rho, Rac, Cdc42 の三つのサブファミリーからなる。このうち Rho はアクチン細胞骨格の再編成を介して, 細胞の形態, 運動, 細胞質分裂, 平滑筋の収縮等, 種々の細胞機能を制御している。上流から何らかのシグナルが来ると, Rho は, GDP/GTP 交換反応促進蛋白質 (GEP) の作用を受けて, GTP 結合型の活性型に変換される。この GTP 結合型の Rho は, 標的蛋白質に作用して下流にシグナルを伝達し, その作用を発揮する。その後, GTPase 反応促進蛋白質 (GAP) の作用を受けて, Rho は再び GDP 結合型に変換される。

Rho の作用機構を明らかにするためには, Rho の標的蛋白質を単離することが不可欠であり, 私の所属する研究室では, 動物細胞や出芽酵母の Rho の標的蛋白質を単離することを試みている。私共を含むいくつかのグループによって, これまでに, 複数の Rho の標的蛋白質が報告されているが, Rho が多くの細胞機能を有することから, 新たな標的蛋白質を同定する必要がある。本研究では, Rho の新しい標的蛋白質の検索を試みた。

#### 【方法】

Two Hybrid 法の宿主として, 出芽酵母 L40 (*MATa trp1 leu2 his3 ade2 LYS2 : : lexA-HIS3 URA3 : : lexA-lacZ*) を用いた。酵母株は, YPD 培地で培養し, また形質転換は, 酢酸リチウム法にて行なった。プラスミドの作成, DNA シクencing 配列の決定, PCR 法は標準的な分子生物学的手法を用いて行った。変異遺伝子は, PCR を用いた変異導入法によって作成した。Two hybrid 法に用いるプラスミドを作製するために, RhoA, Rac1, Cdc42 を pBTM116 two hybrid vector にクローン化した。Two hybrid 法による RhoA の標的蛋白質のスクリーニングは以下のように行った。pBTM116-RhoA (G14V) を酵母 L40 株に形質転換し, pACT-ヒト B 細胞ライブラリーをさらに形質転換した。出現した形質転換体を, 5 mM の 3-Amino-1, 2, 4-triazole を含む SD 選択培地上で選別した。His<sup>+</sup>, lacZ<sup>+</sup> クローンについて, そのライブラリープラスミド DNA を, 大腸菌 DH5  $\alpha$  への形質転換により回収し, L40 に再形質転換した。さらに, これらの形質転換体の  $\beta$ -galactosidase 活性を測定し,  $\beta$ -galactosidase 活性陽性を与えたプラスミドのシクencing 配列を決定した。また, 形質転換体の  $\beta$ -galactosidase 活性の定量的測定には, ONPG 法を用いた。

### 【成績】

RhoA の新しい標的蛋白質を検索するため、Two hybrid 法を用いて、GTP 結合型の RhoA に特異的に結合する蛋白質の遺伝子を検索した。約  $7 \times 10^6$  個の形質転換体をスクリーニングして、2 個の陽性クローンを得た。このうち 1 クローンのヌクレオチド配列は、キネクチンの 630-935 番のアミノ酸配列と一致した。キネクチンの 1 次配列より、この領域は coiled coil 構造を形成すると推測される。キネクチンは、GTP 結合型に保持される優性活性化型の RhoA とは結合したが、野生型や GDP 結合型に保持される優性不活性化型の RhoA とは結合しなかった。次に、キネクチンが Rac1 および Cdc42 と結合するかどうか検討したところ、RhoA の場合と同様に、キネクチンは優性活性化型の Rac1, Cdc42 とは結合したが、野生型や優性不活性化型の Rac1, Cdc42 とは結合しなかった。

### 【総括】

本研究において、RhoA の標的蛋白質としてキネクチンを同定した。また、キネクチンは GTP 結合型の Rac1, Cdc42 とも結合したことから、Rho ファミリーの新しい標的蛋白質である可能性が明らかとなった。キネクチンは、キネシン ATPase モーターの結合蛋白質として単離され、キネシンを細胞内小胞につなぎとめる、Anchoring 蛋白質と考えられている。本研究の成果より、Rho ファミリーメンバーは、キネシン-キネクチン系やアクチン細胞骨格系の再編成を制御することにより、細胞内小胞輸送を制御していると考えられる。最近、私が所属している研究室では、Rho や Rac が細胞内小胞輸送に関与していることが細胞生物学的に明らかにされている。加えて、私が所属している研究室では、Rho ファミリーを活性化する蛋白質として Smg GDS が発見されているが、最近、Smg GDS に結合する蛋白質として SMAP が発見され、これがキネシン II の構成因子であることも明らかにされている。今後、Rho ファミリーの細胞内小胞輸送における役割がさらに注目されると考えられ、Rho ファミリーとキネシン-キネクチン系との相互作用機構をさらに明らかにしていく必要がある。

### 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、Two-hybrid 法を用いて、低分子量 G 蛋白質 Rho の新しい標的蛋白質を検索した。その結果、細胞内小胞を微小管に沿って輸送する、キネシン ATPase モーターの受容体と考えられているキネクチンを同定した。さらに、キネクチンが、Rho の他のサブファミリーである Rac1 と Cdc42 とも相互作用することを明らかにすることにより、キネクチンが、Rho ファミリーが細胞内小胞輸送を制御する際の標的蛋白質である可能性が高いことを明らかにした。

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。