



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Involvement of Rho and Rac small G proteins and Rho GDI in Ca <sup>2+</sup> -dependent exocytosis from PC12 cells                                                                                                                                                    |
| Author(s)    | 小室, 竜太郎                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/40081">https://hdl.handle.net/11094/40081</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 小 室 竜 太 郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 13019 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

医学研究科内科系専攻

学 位 論 文 名 Involvement of Rho and Rac small G proteins and Rho GDI in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis from PC12 cells  
(PC12細胞からの  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスにおける低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho, Rac, および Rho GDI の関与)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 松澤 佑次

(副査)

教 授 高井 義美 教 授 谷口 直之

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

低分子量 GTP 結合蛋白質スーパーファミリーの中の Rho ファミリーは, Rho, Rac, Cdc42 サブファミリー (Rho, Rac, Cdc42) から構成されている。このうち, Rho は細胞形態や細胞運動, 細胞質分裂などに, Rac は細胞膜のラフリングやラメリポディアの形成に, Cdc42 はフィロポディアの形成に, それぞれ関与している。現在, Rho ファミリーのメンバーはアクチン細胞骨格系の再編成に関与した種々の細胞機能を制御していると考えられている。これらの Rho ファミリーの機能は, ボツリヌス菌の菌体外酵素である C3 や, Rho ファミリーの活性制御蛋白質である Rho GDI, およびそれぞれのメンバーの dominant active 変異体または dominant negative 変異体を用いることによって解析されている。このうち, C3 酵素は, Rho のエフェクター領域のアスパラギン残基を ADP-リボシル化して Rho の機能を阻害する。また, Rho GDI は Rho ファミリーのすべてのメンバーの活性化を抑制することによって, その機能を阻害する。

一方, エクソサイトーシスやエンドサイトーシスなどの細胞内小胞輸送にアクチン細胞骨格系が関与していることが示唆されている。例えば, クロマフィン細胞では, 細胞膜直下にアクチン繊維網が存在するが, 分泌刺激時に, カテコールアミン分泌が引き起こされるためには, このアクチン繊維網が破壊されることが必要である。したがって, Rho ファミリーのメンバーがアクチン細胞骨格系に作用してエクソサイトーシスやエンドサイトーシスをも制御する可能性がある。

そこで, 本研究では, ラット褐色細胞腫由来の細胞株 PC12 細胞を用いて,  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスにおける Rho ファミリーとその関連蛋白質の関与について検討した。

### 【方法ならびに成績】

#### 1) プラスミドの構築

myc epitope tag を付加した Rho GDI, C3 酵素, Rho A, Rac 1, Cdc42Hs の dominant active 変異体である Rho A (Val14), Rac 1 (Val12), Cdc42Hs (Val12) の cDNA を, 哺乳類の発現ベクター pEF-BOS に各々挿入したプラスミドを構築した。ヒト成長ホルモン (GH) の発現には, マウスメタロチオネイン-1 をプロモーターに有する pXGH を用いた。

## 2) GH 分泌の測定法

pXGH と目的蛋白質の遺伝子をリポフェクション法を用いて共に PC12 細胞内に導入し、その 48 時間後に分泌刺激を行った。その際、培養液中に分泌された GH と、細胞内に残った GH を抗 GH 抗体を用いた RIA 法で測定し、目的蛋白質の GH 分泌に対する影響を解析した。さらに、抗 myc モノクローナル抗体と抗 GH ポリクローナル抗体を用いて細胞を二重染色し、目的蛋白質と GH が同一の細胞で発現していることを確認した。

## 3) Rho GDI の GH 分泌に対する影響

最初に、Rho GDI の GH 分泌に対する影響を検討した。 $\text{Ca}^{2+}$  存在下で低  $\text{K}^+$  濃度溶液をコントロール溶液とし、分泌刺激としては、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下で高  $\text{K}^+$  濃度溶液、および C キナーゼを活性化するホルボールエステル溶液、 $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアであるイオノマイシン溶液、ニコチン性作用を示す DMPP 溶液を用いた。いずれの刺激においても、低  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激に比して GH の分泌は促進されたが、Rho GDI は、その GH 分泌の促進を抑制した。低  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激においても、わずかに GH は分泌されたが、その分泌は Rho GDI によって抑制されなかった。

## 4) C 3 酵素の GH 分泌に対する影響

C 3 酵素は、Rho GDI と同様に、高  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激による GH 分泌を抑制したが、低  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激による GH 分泌には影響を与えなかった。

## 5) Rho GDI による GH 分泌抑制に対する Rho, Rac, Cdc42 の影響

Rho GDI と共に RhoA (Val14), Rac 1 (Val12), あるいは Cdc42 Hs (Val12) を細胞内に導入すると、RhoA (Val14), Rac 1 (Val12) は高  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激時の Rho GDI による GH 分泌抑制を回復させたが、Cdc42 Hs (Val12) は回復させなかった。一方、これらの dominant active 変異体を単独で細胞内に導入しても、低  $\text{K}^+$  あるいは高  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激による GH 分泌には影響を与えなかった。

## 6) PC12 細胞のアクチン繊維に対する Rho GDI の影響

PC12 細胞を抗 myc 抗体とアクチン繊維を検出するファロイジンで二重染色し、Rho GDI を発現させた細胞におけるアクチン繊維の変化を検討した。低  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激時には、Rho GDI の発現の有無に関わらず、細胞膜直下には連続した厚いアクチン繊維が認められた。一方、高  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激時には、Rho GDI を発現させていない細胞では、アクチン繊維は一部を残してほとんど消失したが、Rho GDI を発現させた細胞では、低  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激時と同様に、細胞膜直下に連続した厚いアクチン繊維が認められた。

### 【総括】

本研究では、まず、Rho GDI が PC12 細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスを抑制することを明らかにした。さらに、C 3 酵素や Rho GDI, RhoA, Rac 1, Cdc42 の dominant active 変異体を用いた実験から、RhoA と Rac 1 が PC12 細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスの制御に関与していることを示した。しかし、RhoA と Rac 1 単独では  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスを引き起こさなかったことから、Rho GDI に感受性のある他の因子が RhoA や Rac 1 と協調して機能している可能性が考えられた。また、高  $\text{K}^+$  濃度溶液刺激によってエクソサイトーシスが引き起こされた時に、Rho GDI を発現させていない細胞では、細胞膜直下のアクチン繊維網は破壊されたが、Rho GDI を発現させた細胞では、アクチン繊維網は破壊されなかったことから、Rho GDI によるアクチン細胞骨格系の制御が  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスの抑制に関係していることが示唆された。本研究では、アクチン細胞骨格系と  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスとの因果関係を明らかにすることができなかったが、今後は、その因果関係を明らかにすると共に、Rho ファミリーとその関連蛋白質によるアクチン細胞骨格系の制御によって  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスが引き起こされる機構を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、本研究により低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho ファミリーと、その活性制御蛋白質 Rho GDI が、PC12 細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスにおいてどのような機能を有しているかについて解析した。その結果、Rho GDI は PC12 細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスを抑制すること、また、RhoA, Rac 1 は、PC12 細胞

胞における  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスに必要なが、Cdc42は必要でないことが明らかとなった。さらに、PC12細胞を  $\text{HighK}^{+}$  刺激した際に、細胞膜直下のアクチン繊維網はほとんど消失したが、Rho GDIはそのアクチン繊維網を維持することも明らかとなった。このことは、すでに見い出されている Rab 3 A – Rabphilin – 3 A系による小胞輸送の制御と共に、Rho – Rac – Rho GDI系によるアクチン細胞骨格系の制御が、PC12細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エクソサイトーシスにとって重要な機能を果たしている可能性を十分に示唆するものであった。

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。