

Title	Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions : Implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	藤原, 武志
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41689">https://hdl.handle.net/11094/41689</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"〉</a> 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	藤原 武志
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14447 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions : Implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における Rho の標的蛋白質 Bni1 のアクチン細胞骨格の再編成部位への局在化機構)
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 低分子量G蛋白質は、アクチン細胞骨格の再編成を時間的・空間的に制御することにより、細胞の形態、接着、運動、極性の形成等の種々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 によるこのアクチン細胞骨格の再編成の制御機構には未だ不明な点が多い。私共は、出芽酵母にも Rho が存在し、酵母 Rho のうち、Rho 1 がアクチン細胞骨格の再編成が活発に行われている出芽の先端部位に局在することから、出芽酵母における Rho 1 のアクチン細胞骨格制御の分子機構を解析した。その結果、Rho 1 の標的蛋白質として Bni 1 を見出した。Bni 1 は FH 1, FH 2 と呼ばれる広く保存されたドメインを持ち、FH 1 ドメインでアクチン結合蛋白質であるプロフィリンに結合してアクチン細胞骨格の再編成を制御する。一方、アクチン細胞骨格の再編成の時間的・空間的な制御機構を明らかにするためには、Bni 1 がどのようにして細胞膜に局在化されるのかを明らかにすることが必須である。

そこで、本研究では、Rho 1 の標的蛋白質である Bni 1 の芽の先端部位への局在化機構を解明する目的で、Bni 1 に結合する蛋白質分子の遺伝子クローニングとその性状解析を行った。

## 【方法ならびに成績】

## 1) Bni 1 結合蛋白質遺伝子のクローニング

Bni 1 に結合する蛋白質遺伝子を単離する目的で、酵母 Two hybrid 法によるスクリーニングを行った。2 X 10<sup>6</sup> 個の形質転換体をスクリーニングした結果、Spa 2 蛋白質の C 末端領域 (Bni 1 結合領域) をクローニングした。Spa 2 は、Bni 1 同様に細胞の極性形成に関与していることが示唆されていたことから、この結合には生理的意味があると考え、さらに Bni 1 の Spa 2 結合領域を酵母 Two hybrid 法により決定した。その結果、Spa 2 は Bni 1 の Rho 1 結合領域とプロフィリン結合領域の間の領域に結合することが明らかとなった。次に、大腸菌で MBP-Spa 2 (Bni 1 結合領域)、そして GST-Bni 1 (Spa 2 結合領域) 融合蛋白質を発現させて精製し、Spa 2 と Bni 1 が直接結合するか否かを検討した。結果、Spa 2 は Bni 1 と直接結合することが明らかとなった。

## 2) Bni 1, Spa 2 変異株の性状解析

私共は、すでに Bni 1 が遺伝学的に PKC1 と相互作用し、アクチン細胞骨格系の制御をしていることを明らかにしている。そこで、Bni 1 あるいは Spa 2 変異と、MAP キナーゼカスケードの各々の遺伝子の変異を掛け合わせて、

各々の二重変異株の細胞増殖における影響を検討した。その結果、各々の二重変異株は致死性を示し、その細胞は極性を失い、多核の表現型を示した。したがって Spa 2 は Bni 1 と同様に遺伝学的に MAP キナーゼカスケードと相互作用し、アクチン細胞骨格を介して細胞質分裂や細胞の極性形成を制御していることが明らかとなった。

### 3) Spa 2 による Bni 1 の芽の先端部位への局在化

Bni 1 の細胞内局在を検討するために myc epitope tag を Bni 1 の N 末端に付加した myc-Bni 1 のプラスミドを複製した。この myc-Bni 1 を野生型細胞と Spa 2 変異株に発現させ、Spa 2 が Bni 1 の芽の先端部位への局在に必要であるか否かを検討した。その結果、野生型細胞では myc-Bni 1 は芽の先端部位に局在するのに対し、Spa 2 変異株においては、myc-Bni 1 は細胞質に一様に存在していることが明らかとなった。この結果から、Spa 2 は Bni 1 の芽の先端部位への局在に必要であることが明らかとなった。

### 4) Rho による Bni 1 の芽の先端部位への局在化

Bni 1 の芽の先端部位への局在に Rho 1 が必要であるか否かを検討する目的で、Rho 1 結合領域を欠失した myc- $\Delta N$ -Bni 1 プラスミドを作製した。myc- $\Delta N$ -Bni 1 を野生型細胞において発現させた結果、この Bni 1 変異体も細胞質に一様に存在していることが明らかとなった。この結果から、Rho 1 も Spa 2 同様に Bni 1 の芽の先端部位への局在に必要であることが明らかとなった。

## 【総括】

本研究では、まず、酵母 Two hybrid 法を用いることで Bni 1 結合蛋白質として Spa 2 を単離し、さらに、in vitro の系においても Bni 1 と Spa 2 蛋白質が直接結合することを明らかにした。私共は、Bni 1 の変異株が、細胞質分裂や細胞の極性形成の異常といった表現型を示すことを明らかにしており、Spa 2 の変異株についても Bni 1 と同様の表現型を示すことが報告されている。本研究では、Bni 1 と Spa 2 のそれぞれが、MAP キナーゼカスケードと遺伝学的に相互作用し、アクチン細胞骨格を介して細胞質分裂や細胞の極性形成を制御していることを明らかにした。この結果から、Bni 1 と Spa 2 は細胞質分裂や細胞の極性形成において、類似した機能をもつことが明らかとなった。また、Spa 2 変異株において、Bni 1 の芽の先端部位への局在化が阻害されること、さらに、Rho 1 の結合領域を欠失した Bni 1 が芽の先端部位に局在しないことを明らかにした。これらの結果から、Spa 2 は Rho 1 とともに Bni 1 の芽の先端部位への局在化に重要であることが示唆された。最近、Bni 1 の C 末端領域に結合する蛋白質として Bud 6 が報告されている。Bud 6 は、Bni 1 や Spa 2 と同様に細胞質分裂や細胞の極性形成を制御していることが明らかにされている。この Bni 1 と Spa 2、そして Bni 1 と Bud 6 の結合が、細胞質分裂や細胞の極性形成に及ぼす影響については明らかにされておらず、今後の解明されるべき課題であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により、酵母 Rho 1 の標的蛋白質 Bni 1 のアクチン細胞骨格の再編成が行われている出芽部位への局在化機構について解析した。Bni 1 に結合する蛋白質を酵母 Two hybrid 法を用いてスクリーニングした結果、Spa 2 を単離し、in vitro の系においても Bni 1 と Spa 2 蛋白質が直接結合することを明らかにした。また、Spa 2 が Bni 1 と同様に MAP キナーゼカスケードと遺伝学的に相互作用し、アクチン細胞骨格を介して細胞質分裂や細胞の極性形成を制御していることを明らかにした。さらに、Bni 1 の出芽部位への局在化に Spa 2 と Rho 1 がともに必要である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であると言える。したがって、学位授与に十分値すると思われる。