



Title	Interaction of Rho1p target Bni1p with F-actin-binding elongation factor1 α : implication in Rho1p-regulated reorganization of the actin cytoskeleton in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	海川, 正人
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41702
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	海川正人 うみかわまさと
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14448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	Interaction of Rho1p target Bni1p with F-actin-binding elongation factor 1 α : implication in Rho1p-regulated reorganization of the actin cytoskeleton in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Rho 1の標的蛋白質 BNI 1とF-アクチン結合蛋白質 Elongation factor 1 α の相互作用:出芽酵母におけるRho低分子量G蛋白質によるアクチン細胞骨格の再編成における役割)
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 悅啓

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構築を介して細胞接着や、細胞の形態、細胞の運動、細胞質分裂、平滑筋の収縮などを時間的、空間的に制御していることが知られている。しかし、Rhoによるアクチン細胞骨格制御の分子機構は充分に明らかにされていない。動物細胞と同様に、出芽酵母にもRhoが存在し、Rhoが出芽の先端部位に局在してアクチン細胞骨格の再編成を介して酵母の出芽過程を制御していることが明らかにされている。さらに、酵母 RHO 1 の標的蛋白質として BNI 1 が単離されている。BNI 1 は FH 1, FH 2 と呼ばれる酵母から動物細胞まで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する。プロフィリンはアクチンの重合過程に関与していると考えられており、BNI 1 はプロフィリンを介してアクチンの重合過程を制御すると考えられる。一方、生成されたアクチン繊維は何らかの機序により再編成されると考えられるが、その分子機構は全く不明である。

そこで、本研究では、RHO 1 - BNI 1 系によるアクチン細胞骨格の再構成の機序をさらに明らかにする目的で、BNI 1 に結合する蛋白質を生化学的手法を用い探し、その蛋白質分子の性状を解析した。

【方法ならびに成績】

1) BNI 1 結合蛋白質の単離

BNI 1 の種々の領域をマルトース結合蛋白質 MBP との融合蛋白質として大腸菌で発現させ、精製した。この MBP-BNI 1 を固相化したアフィニティカラムを用いて酵母の細胞質画分より BNI 1 に特異的に結合する蛋白質を検索し、BNI 1 の機能領域と考えられる FH 1 および FH 2 ドメインに特異的に結合する 47KDa の蛋白質を同定した。この蛋白質を精製し、そのアミノ酸配列を決定した結果、この蛋白質は蛋白質の翻訳過程の伸長因子であり、アクチン繊維との結合活性やアクチン繊維を束ねる活性を有する蛋白質として知られる Elongation factor 1 α (EF 1 α) であることが明らかになった。

2) EF 1 α 結合領域の決定

BNI 1 の FH 1 ドメインあるいは FH 2 ドメイン部分を含む種々の長さの断片をグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白質として大腸菌に発現させ、精製した。これらの GST-BNI 1 断片を固相化したアフィニティ

カラムを作成し、大腸菌に発現させ、精製した His 6-EF 1 α との結合性を検討した。その結果、His 6-EF 1 α は BNI 1 の FH 1 ドメインと FH 2 ドメインの間の領域（アミノ酸1328-1513）に特異的に結合した。

3) BNI 1 の EF 1 α のアクチン纖維結合活性と bundling 活性に及ぼす影響

アクチン溶液の粘度を計測する Falling ball 法を用いて、BNI 1 が EF 1 α のアクチン纖維 bundling 活性に及ぼす影響を検討した。アクチン溶液に EF 1 α を加えると、EF 1 α のアクチン纖維 bundling 活性により粘度が上昇した。一方、EF 1 α 結合領域を含む GST-BNI 1 存在下では、EF 1 α による粘度の上昇は GST-BNI 1 の用量に依存して阻害された。また、GST-BNI 1 単独ではアクチン溶液の粘度には影響を与えたなかった。次に、アクチンとの cosedimentation 法を用いて、BNI 1 が EF 1 α のアクチン纖維結合活性と bundling 活性に及ぼす影響につき検討した。アクチン溶液に EF 1 α を加えると、アクチンは EF 1 α により bundling されて EF 1 α と共に 20,000xg 遠心の沈殿画分として回収された。一方、EF 1 α と共に EF 1 α 結合領域を含む GST-BNI 1 が存在する場合には、アクチンは 20,000xg では沈殿せず、100,000xg 遠心の沈殿画分に回収された。この際、EF 1 α はアクチン画分ではなく、BNI 1 とともに 100,000xg 遠心上清に回収された。以上の結果より、BNI 1 は、EF 1 α に結合しアクチン纖維結合活性を阻害し、その結果、EF 1 α のアクチン纖維 bundling 活性も阻害するものと結論した。

【総括】

本研究では、酵母の細胞質画分から、RHO 1 の標的蛋白質である BNI 1 に結合する蛋白質を同定し、これが EF 1 α であることを明らかにした。さらに、BNI 1 はその FH 1 ドメインと FH 2 ドメインの間の領域で EF 1 α に結合し、EF 1 α の有するアクチン結合活性と bundling 活性の両方を阻害することを明らかにした。BNI 1 はプロフィリン、EF 1 α と三者複合体を形成しうることから、アクチン纖維は、まず BNI 1 とプロフィリンの相互作用により形成され、その後、EF 1 α により、再編成されるものと考えられる。最近、アクチン結合蛋白質である BUD 6 が BNI 1 の C 末端側に結合することが報告されている。今後は、Rho が BNI 1 およびこれら BNI 1 結合蛋白質を介してどのようにアクチン細胞骨格の再編成を制御しているのかについて明らかにするとともに、本研究で明らかにした Rho-BNI 1 系の作用機構を基礎として、動物細胞における Rho の作用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、本研究において、酵母 Rho 1 の標的蛋白質 Bni 1 によるアクチン細胞骨格の再構成の機序を解析した。本研究では、酵母の細胞質画分から、Bni 1 に結合する蛋白質を同定し、これがアクチン纖維結合蛋白質 EF 1 α であることを明らかにした。さらに、Bni 1 はその FH 1 ドメインと FH 2 ドメインの間の領域で EF 1 α に結合し、EF 1 α の有するアクチン纖維結合活性と bundling 活性の両方を阻害することを明らかにした。また、出芽酵母を用いた遺伝学的な解析により Bni 1 の機能に、Bni 1 への EF 1 α の結合が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、学位の授与に十分値すると考えられる。