

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、 〈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	うみ かわ まさ と 海 川 正 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 4 4 4 8 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 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十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 RHO1 の標的蛋白質として BNI1 が単離されている。BNI1 は FH1, FH2 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、FH1 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、BNI1 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、RHO1-BNI1 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、BNI1 に結合する蛋白質を生化学的手法を用い探索し、その蛋白質分子の性状を解析した。

【方法ならびに成績】

1) BNI1 結合蛋白質の単離

BNI1 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-BNI1 を固相化したアフィニティーカラムを用いて酵母の細胞質画分より BNI1 に特異的に結合する蛋白質を検索し、BNI1 の機能領域と考えられる FH1 および FH2 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 (EF1 α) であることが明らかになった。

2) EF1 α 結合領域の決定

BNI1 の FH1 ドメインあるいは FH2 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-BNI1 断片を固相化したアフィニティー

カラムを作成し、大腸菌に発現させ、精製した His6-EF1 α との結合性を検討した。その結果、His6-EF1 α は BNI1 の FH1 ドメインと FH2 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) BNI1 の EF1 α のアクチン繊維結合活性と 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、BNI1 が EF1 α のアクチン繊維 bundling 活性に及ぼす影響を検討した。アクチン溶液に EF1 α を加えると、EF1 α のアクチン繊維 bundling 活性により粘度が上昇した。一方、EF1 α 結合領域を含む GST-BNI1 存在下では、EF1 α による粘度の上昇は GST-BNI1 の用量に依存して阻害された。また、GST-BNI1 単独ではアクチン溶液の粘度には影響を与えなかった。次に、アクチンとの cosedimentation 法を用いて、BNI1 が EF1 α のアクチン繊維結合活性と bundling 活性に及ぼす影響につき検討した。アクチン溶液に EF1 α を加えると、アクチンは EF1 α により bundling されて EF1 α と共に 20,000xg 遠心の沈殿画分として回収された。一方、EF1 α と共に EF1 α 結合領域を含む GST-BNI1 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、EF1 α はアクチン画分ではなく、BNI1 とともに 100,000xg 遠心上清に回収された。以上の結果より、BNI1 は、EF1 α に結合しアクチン繊維結合活性を阻害し、その結果、EF1 α のアクチン繊維 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、RHO1 の標的蛋白質である BNI1 に結合する蛋白質を同定し、これが EF1 α であることを明らかにした。さらに、BNI1 はその FH1 ドメインと FH2 ドメインの間の領域で EF1 α に結合し、EF1 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。BNI1 はプロフィリン、EF1 α と三者複合体を形成しうることから、アクチン繊維は、まず BNI1 とプロフィリンの相互作用により形成され、その後、EF1 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 BUD6 が BNI1 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 BNI1 およびこれら BNI1 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-BNI1 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 Rho1 の標的蛋白質 Bni1 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、Bni1 に結合する蛋白質を同定し、これがアクチン繊維結合蛋白質 EF1 α であることを明らかにした。さらに、Bni1 はその FH1 ドメインと FH2 ドメインの間の領域で EF1 α に結合し、EF1 α の有するアクチン繊維結合活性と 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 Bni1 の機能に、Bni1 への EF1 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。