



Title	An FH domain-containing Bnr 1 p is a multifunctional protein interacting with a variety of cytoskeletal proteins in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	桔梗, 充博
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41728">https://hdl.handle.net/11094/41728</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	橘 梗 充 博
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15227 号
学位授与年月日	平成12年3月24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	An FH domain-containing Bnr 1 p is a multifunctional protein interacting with a variety of cytoskeletal proteins in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における細胞骨格系のオーガナイザーとしての Rho 4 標的蛋白質 Bnr 1)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美  (副査) 教授 谷口 直之 教授 中村 敏一

### 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、空間的に制御していることにより、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。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し、その性質を解析することが、不可欠である。Rho の標的蛋白質はこれまでに動物細胞で複数見出されているが、その生理機能については動物細胞での遺伝学的解析が困難であるため、充分明らかにされていない。私共は、遺伝学的解析が容易である出芽酵母にもRho が存在していることに着目し、酵母 Rho のうち、Rho 1 の標的蛋白質として Bni 1 を、Rho 4 の標的蛋白質として Bnr 1 を単離している。Bni 1 と Bnr 1 は、フォルミンファミリーに属し、ともに 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、プロリンに富むFH1ドメインでプロフィリンと相互作用してアクチン細胞骨格の再編成を制御している。一方、最近私共は、Bnr 1 が、FH1ドメインでそのSH3ドメインを有する新規の蛋白質である Hof 1 と相互作用をし、細胞質分裂を制御していることを明らかにしているが、Bnr 1 の作用機構には不明な部分が多い。

そこで、本研究では、Bnr 1 の機能についてさらに解析するために遺伝学的、生化学的方法を用いて種々の検討を行った。

#### 【方法ならびに成績】

##### 1) Bnr 1 強発現による細胞質分裂異常とその表現型に必要な領域の同定

Bnr 1 の機能を明らかにする目的で、野生株型にガラクトース誘導プロモーターで Bnr 1 を過剰発現させ、その表現型を観察した。その結果、多数の細胞に細胞質分裂異常の形態を認めた。すなわち、複数の細胞が分裂できずにつながっており、多核で、通常は収縮輪に濃縮するキチンが細胞表層全体に広がっていた。この表現型は収縮輪に局在して細胞質分裂に必須な役割を果たすセプチンの変異株のものに非常によく似ていた。この表現型の発現に必要な Bnr 1 の領域を決定したところ、N末端領域の Rho 4 結合領域を含む35-500番目までのアミノ酸領域と一致した。一方C末端領域の過剰発現では細胞は丸く大きくなると同時にアクチン細胞骨格系の局在も異常となった。

##### 2) Bnr 1 の細胞質分裂部位への局在に必要な領域の同定

私の所属する研究室では、Bnr 1 がセプチン系と同様に細胞周期を通じて細胞質分裂部位に局在することを明らかにしている。今回、Bnr 1 の細胞質分裂部位への局在に必要な領域を検討するために HA epitope tag を Bnr 1 の N末

端に付加し、HA-Bnr 1 の様々な欠失変異体を作製した。この HA-Bnr 1 変異体の局在を観察した結果、Bnr 1 の N 末端領域が細胞質分裂部位への局在に必要十分であることが明らかとなった。この領域は 1) で示したセプチン破壊株様表現型を示す領域と同じであった。また、Bnr 1 がセプチンファミリーのメンバーと直接結合するか否かを酵母 Two hybrid 法により検討したが、結合は見い出されなかった。

### 3) bni 1 bnr 1 二重変異株の温度感受性増殖を回復させる Smy 1 の同定

次に私共は、Bni 1 および Bnr 1 と遺伝学的に相互作用する遺伝子を単離するために、bni 1 bnr 1 二重変異株の温度感受性を回復させる遺伝子のクローニングを行った。その結果、キネシン類似蛋白質である Smy 1 を得た。Smy 1 を多コピーベクター上で高発現させると、bni 1 bnr 1 二重変異株の 33°C での増殖欠損を部分的に回復した。さらに、Bnr 1 と Smy 1 が結合するか否かを酵母 Two hybrid 法により検討したところ、Smy 1 は Bnr 1 の FH 2 領域を含む 933-1283 アミノ酸領域に結合することが明らかとなった。次に、大腸菌で MBP-Smy 1 (Bnr 1 結合領域)、そして GST-Bnr 1 (Smy 1 結合領域) 融合蛋白質を発現させて精製し、Smy 1 と Bnr 1 が直接結合するか否かを Blot overlay 法により検討した。その結果、Smy 1 は Bnr 1 と直接かつ特異的に結合することが明らかとなった。

### 4) Bnr 1 と Bud 6 の直接結合

Bni 1 がその C 末端領域でアクチン結合蛋白質である Bud 6 と結合することが他のグループにより報告されていたので、Bnr 1 についても、Bud 6 と結合するか否かを酵母 Two hybrid 法および Blot overlay 法を用いて検討した。その結果、Bud 6 は、Bnr 1 の C 末端領域に相当する 757-1374 アミノ酸領域に直接結合することが明らかになった。

#### 【総括】

本研究で、Bnr 1 が、Rho 4 結合領域を含む N 末端領域で細胞質分裂部位へ局在することを明らかにした。また、その領域を強発現させると、セプチン変異株様の細胞質分裂異常を示すことから、Bnr 1 はセプチン系と相互作用して、細胞質分裂に関与している可能性が考えられる。しかし、Bnr 1 はセプチン系とは直接結合しなかったことから、この相互作用はなんらかの蛋白質を介しているものと考えられる。一方、Bnr 1 の C 末端領域を強発現させると、アクチン細胞骨格系が異常となる表現型を示し、さらに、Bnr 1 は Bni 1 と同様に C 末端部分でアクチン結合蛋白質である Bud 6 に特異的に結合することが明らかになった。以上の結果より、Bnr 1 は、セプチン系とアクチン系を結びリンカーとして働いている可能性が考えられる。

また、bni 1 bnr 1 二重変異株の温度感受性増殖を高発現状態で回復する遺伝子として、キネシンモーター類似蛋白質である Smy 1 をクローニングし、かつ、Smy 1 は Bnr 1 の FH 2 領域に特異的に結合することを明らかにした。これは、FH 2 領域の機能を示唆する最初の報告である。Smy 1 の生理的機能は明らかにされていないが、最近、私の所属する研究室は、Bni 1 が微小管系を制御することを明らかにしており、Bnr 1-Smy 1 相互作用は、フォルミン系と微小管系との機能的関係に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

このように Bnr 1 はアクチン細胞骨格系、セプチン系、モーター蛋白質を制御する多機能性蛋白質であると考えられ、今後 Bnr 1 がどのように制御され、細胞骨格系のオーガナイザーとして働いているのか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、本研究により、酵母 Rho 4 の標的蛋白質として単離された Bnr 1 の機能について解析を試みた。その結果、Bnr 1 の N 末端領域を過剰発現させると多数の細胞に細胞質分裂異常の形態が認められ、その領域で細胞質分裂部位に局在することを初めて明らかにした。また、Bnr 1 と遺伝学的に相互作用する遺伝子として Smy 1 をクローニングし、Smy 1 が Bnr 1 の FH 2 領域に結合する蛋白質であることを見出した。さらに Bnr 1 がアクチン結合蛋白質である Bud 6 にも結合することを証明した。以上の結果より、本申請者は Bnr 1 がアクチン細胞骨格系、セプチン系、モーター蛋白質を制御する多機能蛋白質であることを世界で初めて明らかにしている。

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いえる。したがって、学位授与に十分値するものと考えられる。