The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Distinct Actions and Cooperative Roles of ROCK and mDia in Rho Small G Protein-induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton in Madin-Darby Canine Kidney Cells
Author(s)	中野, 克俊
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41763
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

【104】

氏　　名	中　野　克　俊（なか の かつ とし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15309　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 医学系研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	Distinct Actions and Cooperative Roles of ROCK and mDia in Rho Small G Protein-induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton in Madin-Darby Canine Kidney Cells （MDCK細胞におけるRho低分子量G蛋白質によるアクチン細胞骨格の制御機構－ROCKとmDiaの特異的作用と協調作用）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　門田　守人 （副査） 教　授　高井　義美　　教　授　宮坂　昌之

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

Rho低分子量G蛋白質は、多くの培養細胞でストレスファイバー（SF）と接着斑（FA）の形成を制御していることが明らかにされている。私共は、イヌの腎上皮細胞であるMDCK細胞を用いて、RhoがSFとFAの形成の他に、細胞形態や細胞運動、さらに間接的に細胞間接着を制御していることを明らかにしている。Rhoの作用機構については、Rhoには多くの標的蛋白質が見出されているが、そのうちROCKがSFとFAの形成に関与していることが明らかにされている。SFとFAの形成に関与している標的蛋白質のもう1つの候補としてmDiaがある。私共は、mDiaのyeastホモログであるBNI1やBNR1が、Rhoの下流でアクチン細胞骨格制御に関与していることを明らかにしている。そこで、本研究では、ROCKとmDiaの活性型および不活性型のmutantを用いて、MDCK細胞におけるRhoの作用機構を検討した。

【方法】

N末側にmyc tagのついたRho、ROCKおよびmDiaのmutantやC3のexpression plasmidをMDCK細胞にマイクロインジェクションした。10時間後に細胞を固定し、F－アクチン、ビンキュリンおよびE－カドヘリンとmyc tagの二重免疫蛍光染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【成績】

1）活性型Rho，ROCKおよびmDiaによるアクチン細胞骨格の変化

活性型Rhoは主に平行に走るSF（parallel type）とFAの形成を引き起こした。活性型ROCKは放射状に走るSF（radial type）とFAの形成を引き起こした。一方、活性型mDiaはparallel typeのSFの形成とびまん性のF－アクチンの増加を引き起こしたが、FAの形成には影響を与えなかった。RhoのinhibitorであるC3の存在下でも、活性型ROCKはradial typeのSFとFAの形成を引き起こしたのに対して、活性型mDiaはびまん性のF－アクチンの増加のみ引き起こした。これらの結果から、ROCKおよびmDiaのphenotypeはいずれもRhoとは異なり、ROCKはradial typeのSFとFAの形成を、mDiaはF－アクチンの形成を制御していることが明らかになった。

2）C3，不活性型ROCKおよびmDiaによるアクチン細胞骨格の変化

C3、不活性型ROCKおよびmDiaは、いずれもSFとFAの消失を引き起こした。C3および不活性型ROCKは細胞間接着の破壊も引き起こしたが、不活性型mDiaでは細胞間接着には変化が認められなかった。これらの結果か

ら、SF と FA の形成には ROCK と mDia 両方の活性が必要であることが明らかになった。さらに Rho は ROCK を介して間接的に細胞間接着を制御していることが明らかになった。

3）活性型 ROCK および mDia の共発現によるアクチン細胞骨格の変化

活性型 ROCK および mDia を共発現させると、それぞれを単独に発現させた場合よりも SF と FA の形成は増強したが、SF の形態は活性型 Rho とは異なっていた。この結果から、Rho による SF と FA の形成にはさらに他の標的蛋白質が関与している可能性が示唆された。

4）TPA によるアクチン細胞骨格の再編成における ROCK と mDia の協調作用

MDCK 細胞に TPA を作用させると SF と FA は一旦消失し、その後再編成される。TPA による SF と FA の消失と再編成には、それぞれ、ROCK と mDia 両方の不活性化と再活性化が必要であった。さらに、TPA 刺激前は parallet type の SF が認められるのに対して、再編成されると radial type の SF が形成される。しかし、活性型 mDia では parallel type の SF が再編成された。この結果から、mDia は F－アクチンの形成だけでなく、SF の形態を parallel に保つ作用を有していることが明らかになった。

【総括】

本研究では、ROCK と mDia の活性型および不活性型の mutant を用いて、ROCK と mDia が異なる作用を有し、Rho の下流で協調的に作用して SF と FA の形成を制御していることを初めて明らかにした。ROCK は radial type の SF と FA の形成を、mDia は F－アクチンの形成と parallel type の SF の形成を制御していた。さらに Rho は ROCK を介して間接的に細胞間接着を制御していた。今後、ROCK と mDia の作用機構および SF と FA の形成に関与している他の Rho の標的蛋白質の解明が必要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、ROCK と mDia の活性型および不活性型の mutant を用いて、MDCK 細胞における Rho の作用機構の解析を試みた。その結果、ROCK と mDia が異なる作用を有し、Rho の下流で協調的に作用し、ストレスファイバーと接着斑の形成を制御していることを初めて明らかにした。ROCK は radial type のストレスファイバーと接着斑の形成を、mDia は F－アクチンの形成と parallel type のストレスファイバーの形成を制御していた。さらに Rho は ROCK を介して間接的に細胞間接着の形成を制御していた。

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。