

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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	なかの かつとし 中野 克俊
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 BNI 1 や BNR 1 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、ピンキュリンおよび 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parallel 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。