The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by Bordetella dermonecrotizing toxin
Author(s)	増田, 美奈子
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42704
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　増田　美奈子（ますだ　みなこ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　15655　号

学位授与年月日　平成12年6月30日

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学位論文名　Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin
（*Bordetella* 壊死毒による Rho の活性化機構の解析）

論文審査委員　（主査）
教　授　本田　武司

（副査）
教　授　高井　義美　　教　授　杉本　　央

論文内容の要旨

【目的】

Bordetella 壊死毒（Dermonecrotizing toxin）は百日咳菌に代表される *Bordetella* 属細菌に共通の病原因子のひとつである。DNT を標的細胞に作用させると、細胞のアクチン線維束や細胞基質間接着斑の過形成が認められる。このようなアクチン系細胞骨格の構築の制御に低分子量 GTPase の Rho が関与していることが知られている。これまでに、DNT は Rho の63位のグルタミン（Gln）を脱アミド化してグルタミン酸（Glu）に変換すること、さらに脱アミド化された Rho は優性活性型として作用して、アクチン線維束の形成を促進することが明らかとなっている。しかし、DNT 作用によるアクチン線維束の過形成と脱アミド化の発現時間が一致しないことや、DNT 処理細胞から、野生型 Rho や脱アミド化 Rho とは明らかに性状の異なる Rho が検出されることから、DNT には脱アミド化作用とは別の未知の作用があると考えられてきた。

本研究では DNT の作用の全容を解明するために、脱アミド化とは別の DNT 作用の本態を解析した。

【方法ならびに成績】

大腸菌で DNT と共発現させ、菌体内で DNT の作用を受けた FLAG-RhoA を抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトで回収し、一次構造を質量分析計で解析した。その結果、63位の Gln が脱アミド化された Rho の他に、同じ位置の Gln にプトレシン（put）あるいはスペルミジン（spd）が結合した RhoA が検出された。Spd や put はスペルミン（spm）とともに、生細胞に普遍的に存在するポリアミンであることが知られている。

RhoA を [^{14}C]-put、-spd、-spm の存在下で *in vitro* で DNT と反応させると、RhoA はそれぞれのポリアミンで標識された。同様のポリアミン化は Rho ファミリータンパクの Rac 1 と Cdc42Hs でも認められたが、ファミリーの異なる Ras では認められなかった。[^{14}C]-put で内在性のポリアミンを標識した C3H10T1/2細胞に DNT を作用させると、低分子量 GTPase に相当する分子サイズの細胞内タンパク質が [^{14}C] で標識された。免疫沈降法により、これらのうち少なくとも Rho が [^{14}C] ポリアミン化されていることが解った。

ポリアミン化 Rho の GTP 結合活性と GTPase 活性を調べた。*In vitro* で spd 化した RhoA の GTP γ [^{35}S]の結合性は、野生型の Rho および脱アミド化 Rho とほぼ同程度であったのに対し、spd 化 Rho の内在性あるいは GTPase 活性促進因子（GAP）依存性の GTPase 活性は、脱アミド化 Rho と同様に著しく低下していた。このことから、脱アミド化 Rho と同じくポリアミン化 Rho も細胞内で優性活性型化していることが示唆された。そこで、それぞれの

修飾を受けたRho（400μg/ml）を細胞に微小注入し、アクチン線維束形成に対する影響を調べた。脱アミド化Rhoは野生型Rhoと同様にGTPを結合した活性型のみがアクチン線維束の形成を促進した。一方、ポリアミン化Rhoでは、本来不活性なGDP結合型でもアクチン線維束の形成を促進した。

このようなポリアミン化Rhoと脱アミド化Rhoのアクチン線維束形成能の違いを明らかにするため、Rhoとそのエフェクター分子であるROCKとの相互作用をBIACOREシステムを用いて解析した。野生型のRhoではGTP結合型のみがROCKと結合したのに対し、ポリアミン化RhoではGDP結合型、GTP結合型ともに野生型RhoのGTP結合型の3倍量がROCKと結合した。ROCKのキナーゼ活性に対するそれぞれのRhoの影響を調べたところ、GTP、GDP結合型にかかわらず、野生型Rho、脱アミド化Rho、ポリアミン化Rhoによるキナーゼの活性化の程度に大きな変化はなかった。

【総括】

DNTは本質的にRhoファミリータンパク質のGlnにput、spd、spmなどの生体ポリアミンを付加するトランスグルタミナーゼであることが明らかとなった。通常DNTは優先的にRhoをポリアミン化するが、作用環境においてポリアミンが充分に存在しない場合に脱アミド化反応が起こると思われる。本研究の結果から、DNTの作用を受けた細胞内のRhoはポリアミン化あるいは脱アミド化され、あるものはGTPase活性を失って優性活性型化し、あるものはGTP非依存的に下流のエフェクターと相互作用することによって優性活性型化することが解った。その結果、Rho依存性のシグナル伝達系路が異常に活性化され、下流にある細胞現象の種々の局面でDNTの毒作用が現れると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Bordetella 壊死毒（DNT）は百日咳菌（*Bordetella pertussis*）などの *Bordetella* 属細菌に共通の病原因子である。本研究は、DNTがRhoファミリータンパクを基質に持つ極めて特異性の高いトランスグルタミナーゼであり、この活性によってRhoを優性活性型化することを明らかにした論文である。

DNTはこれまでにRhoの特定位のGln残基を脱アミド化することが解っていた。本研究ではさらに、質量分析計を用いた構造解析の結果、DNTには脱アミド化以外に生体内に普遍的に存在するポリアミンを付加する作用があることが明らかとなった。DNTの作用によりポリアミン化されたRhoは、内在性およびGTPase活性化因子依存性のGTPase活性を失い、かつGTP非依存的に下流のエフェクターと相互作用することによって優性活性型化することが明らかとなった。

本研究は、病原因子であるDNTの作用機構の分子背景を明らかにした事に意義があり、学位の授与に値すると考えられる。