

Title	ROM7/BEM4 encodes a novel protein that interacts with the Rho1p small GTP-binding protein in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	平野, 尚伸
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42947
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	平野尚伸
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 15074 号
学位授与年月日	平成 12 年 2 月 15 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	<i>ROM7/BEM4</i> encodes a novel protein that interacts with the Rho1p small GTP-binding protein in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ROM7/BEM4 遺伝子は、出芽酵母の低分子量 G 蛋白質 Rho1p と相互作用する新規の蛋白質をコードする)
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]

アクチン細胞骨格の再編成は、細胞の運動や接着、形態の維持や変化等を制御しており、その異常は、がん細胞の浸潤や転移をはじめ、種々の病態に関与している可能性が示唆されている。私共を含めたいくつかの研究グループは、低分子量 G 蛋白質 Rho が、アクチン細胞骨格系を介して、種々の細胞骨格系依存性の細胞機能を制御していることを明らかにしている。私共は、出芽酵母をモデル系に用いることによってもこの Rho の活性制御機構と作用機構の解析を行っている。活性制御機構については、私共は、酵母 Rho1p の GDP/GTP 交換反応を促進して活性化する蛋白質 (GEP: GDP/GTP exchange protein) として Rom1p と Rom2p を、Rho1p からの GDP 解離反応を抑制する蛋白質 (GDI: GDP dissociation inhibitor) として Rdi1p を単離して解析している。また、作用機構については、私共は、Rho1p が、その標的蛋白質である Pkc1p プロテインキナーゼ、Bni1p、グルカン合成酵素を介して酵母細胞の極性形成、すなわち出芽過程を制御していることを明らかにしている。特に、私共は、Bni1p が、プロフィリン、EF1 α 、Bud6p といったアクチン結合蛋白質と相互作用し、アクチン細胞骨格系の再編成を制御していることを明らかにしている。この Bni1p 様の標的蛋白質は、動物細胞でも mDia として見い出されて酵母と同様の機構でアクチン細胞骨格系を制御していることが明らかにされている。一方、Rho は時間的、空間的に制御されて細胞膜の特定の位置に局在してアクチン細胞骨格系を制御するが、その分子機構にはまだ不明な点が多い。Rho の時間的、空間的な制御機構を明らかにするためには、Rho と相互作用する因子群をさらに単離して解析することが重要である。そこで、本研究では、出芽酵母の遺伝学的手法により、Rho1p と機能的に相互作用する因子を単離し、解析することを試みた。

[方法ならびに成績]

1) ROM (RHO1 Multicopy suppressor) の単離 Rho1p と機能的に関連する因子の同定を行うために、RHO1 の優性温度感受性変異株 (RHO1 (G22S, D125N)) を高発現状態で抑圧する遺伝子群を酵母ゲノムライブラリーより単離し、ROM (RHO1 Multicopy suppressor) と名付けた。ROM 遺伝子のうち、ROM1 と ROM2 は上述したように Rho1p の GEP である Rom1p と Rom2p をコードする。本研究では、同様に単離された新規遺伝子 ROM7 の生理機能

の解析を行った。

2) 新規遺伝子 ROM7 の遺伝学的性状 ROM7 は、Gen Bank に登録されていた BEM4 と同一の遺伝子であったが、その生理機能は不明であった。Bem4p は、634 アミノ酸からなり、その配列は既知の蛋白質とは相同性を示さなかった。BEM4 の破壊株を作製したところ、温度感受性の増殖と細胞の極性形成の異常を示した。この BEM4 の破壊株の温度感受性増殖は、ROM2、RHO1、そして RHO1 の標的蛋白質をコードする PKC1 の高発現によって部分的に抑圧されたことより、BEM4 が RHO1 と機能的に関連していることが明らかとなった。この結論は BEM4 破壊株では Rho1p の今一つの標的蛋白質であるグルカン合成酵素の活性が著しく減少していることから裏付けられた。

3) 新規遺伝子 ROM7 の生化学的性状 組換え蛋白質 GST-Bem4p を大腸菌で発現させて精製し、Rho1p と直接結合するか否かを検討した。その結果、Bem4p は、Rho1p の GDP 結合型、GTP 結合型、およびヌクレオチド非結合型のいずれとも直接結合した。しかし、Bem4p には、Rho1p に対する GEP 活性、GDI 活性および Rho1p の GTPase 活性を促進する GAP (GTPase activating protein) 活性のいずれも見い出せなかった。さらに、Bem4p は、Rom2p の GEP 活性および Rdi1p の GDI 活性には影響を与えなかった。

[総括]

本研究において、私共は、RHO1 と遺伝的に相互作用する遺伝子群 (ROM1-ROM7) を単離し、その中でも ROM7/BEM4 に焦点をあてて解析した。私共の解析より、Bem4p は Rho1p にヌクレオチド非依存性に結合し、GEP、GAP および GDI のいずれの活性も示さないユニークな特徴を有する蛋白質であることが明らかとなった。また、他のグループの結果より、Bem4p は Rho ファミリーの他のメンバーである Cdc42p と直接相互作用することが明らかにされている。現在のところ、Bem4p が Rho1p の上流で作用しているのか下流で作用しているのかは不明である。しかし、これまでに Bem4p に似た生化学的性状を示す蛋白質は低分子量 G 蛋白質の研究領域では見い出されておらず、今後、Bem4p の生理機能がさらに明らかにされることにより、低分子量 G 蛋白質の研究領域に新しい展開がもたらされることが期待される。特に、Rho は細胞内で時間的、空間的に制御されてアクチン細胞骨格の再編成を介して様々な細胞機能を制御するが、その分子機構において Bem4p が重要な役割を果たしている可能性が十分に考えられる。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により、酵母 Rho1 と機能的に関連する因子の同定を目的として、Rho1 変異株の温度感受性を抑圧する遺伝子群 (Roms) を単離し、そのなかで Rom7/Bem4 の性状について解析を試みた。Bem4 破壊株を用いた解析により、Bem4 が Rho1 と機能的に関連することを明らかにした。また、酵母 Two-hybrid 法ならびにリコンビナント蛋白質を用いた解析から、Bem4 が Rho1 にヌクレオチド非依存的に直接結合することを明らかにした。さらに、Bem4 は、Rho1 の制御因子である GDI、GEP、GAP のいずれの活性も示さず、低分子量 G 蛋白質の研究領域でこれまで見出されたことのないまったく新しい蛋白質であることを示した。

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、学位授与に十分値すると考えられる。