

氏 名（本籍）	かめ 亀	い 井	たかし 尚
学位の種類	博 士（医 学）		
学位記番号	医 博 第 1 5 6 0 号		
学位授与年月日	平 成 1 1 年 3 月 2 5 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻		
学位論文題目	Interactions of Bnrlp with a Novel SH3 Domain- containing Hoflp – Implication in Cytokinesis in <i>Saccharomyces cerevisial</i> . (Rho 標的タンパク質 BNRI に結合し細胞質分裂 に関与する新規タンパク質 HOF1 の単離とその解 析)		
	(主 査)		
論文審査委員	教授 里 見	進	教授 田 村 眞 理
	教授 岡 本	宏	

論文内容要旨

研究目的

低分子量 GTP 結合タンパク質は細胞内シグナル伝達において分子スイッチとして様々な細胞機能を制御している。そのなかで Rho family はアクチン細胞骨格の再編成を通して細胞質分裂、細胞接着、細胞運動などをコントロールしていることが明らかとなってきたが、その詳細は未だ不明な点が多い。動物細胞での現象は複雑で解析が困難なため、真核生物のモデルとしての出芽酵母にも Rho- アクチン系が保存されていることを利用して生化学的、遺伝学的解析により、Rho の作用機構の基本的な細胞機能の解明を目的とした。

研究結果

私共は出芽酵母の Rho の Potential Target として既に BNI1, BNR1 を単離しているが、それらはその機能ドメインであるプロリンに富む FH1 領域において、アクチン結合タンパク質プロフィリンと相互作用してアクチン細胞骨格を制御していることを明らかにしている。一般にプロリンに富む領域はプロフィリンと結合する他、SH3 (Src homology 3) ドメインを持つシグナル分子と結合することから、BNI1, BNR1 の FH1 領域に SH3 ドメインをもつ他の分子が作用し、細胞機能を制御する可能性が予想された。その候補としていくつかのアクチン結合タンパク質あるいは細胞質分裂に関与する分子が考えられたが、Two-Hybrid system にて一つの遺伝子を単離した。この遺伝子は分裂酵母の細胞質分裂に関与する CDC15 とホモロジーを有していたため HOF1 (homolog of CDC15) と命名した。HOF1 はその C 末に SH3 ドメインを有していた。BNR1 と HOF1 がどの領域で結合するのかを様々な Fragment を作成し Two-hybrid で検討した結果、BNR1 の FH1 領域と HOF1 の SH3 ドメインが特異的に結合した。一方、HOH1 は BNI1 には弱くしか結合しなかった。また BNR1 の全長と HOF1 の結合は認められなかったため BNR1 は何らかの因子によって構造変化を受けて HOF1 と結合するものと考えられた。

in vitro における BNR1 と HOF1 の結合を Recombinant タンパクを作成して検討した。BNR1 の FH1 領域と HOF1 の SH3 ドメインは 1:1 のモル比で直接結合した。

BNR1 は GTP 型の Rho4 に特異的に結合するためその標的分子と考えられるが、BNR1 と HOF1 の結合に Rho4 がどのような影響を及ぼすかを Two-Hybrid で検討した。全長の BNR1 は HOF1 と結合しないが、その株に第 3 のプラスミドとして Rho4 の GTP 型、GDP 型、Wild Type のそれぞれの Mutant を作成し導入したところ、GTP 型 Rho4 を導入したものだけが結合を示した。以上より、Rho4 が作用することで BNR1 の分子内構造が変化し、HOF1 にシグナルを伝えるこ

とができるようになると考えられた。

次に HOF1 をノックアウトした株を作成した。この株の表現形は細胞質分裂に異常を来たしており、HOF1 が細胞質分裂に関与する遺伝子であることが判明した。

さらに BNR1, HOF1 の局在を HA-tag を付した各タンパクを蛍光染色することで明らかにした。両者とも細胞周期を通じて Bud-Neck に局在しておりその相互作用および細胞質分裂への関与が強く示唆された。

以上の結果から Rho-BNR1-HOF1 なるシグナル経路の存在が示され、Rho による細胞質分裂の制御機構の一端が明らかとなった。

研究の意義, 独創的な点

HOF1 の動物細胞ホモログが存在することが報告されており、上述の細胞質分裂のシグナル伝達モデルは高等動物細胞にもあてはめて考えることができる点で意義深い。

審査結果の要旨

低分子量 GTP 結合タンパク質は細胞内シグナル伝達において分子スイッチとして様々な細胞機能を制御している。そのなかでも Rho family はアクチン細胞骨格の再編成を通して細胞質分裂、細胞接着、細胞運動などをコントロールしていることが明らかとなってきた。この Rho による細胞の様々な機能の制御は癌細胞の浸潤や転移に直接関連すると考えられているが、その詳細は未だ不明な点が多い。本研究は動物細胞での現象は複雑で解析が困難なため、真核生物のモデルとしての出芽酵母にも Rho アクチン系が保存されていることを利用して生化学的、遺伝学的解析により、Rho の作用機構の基本的な細胞機能の解明を目的とした。

既に出芽酵母の Rho の Potential Target として BNI1, BNR1 を単離して報告しているが、それらはその機能ドメインである FH1 領域において、アクチン結合タンパク質プロフィリンと相互作用してアクチン細胞骨格を制御していることを明らかにしている。この BNI1, BNR1 は共通するシグナルを司る他、それぞれ異なる細胞機能を制御する可能性が予想されたことにより BNR1 に特異的に作用する分子を検索した。この候補となる分子を Data Base から見出し、Two-Hybrid System を用いて BNR1 との結合を検討したところ、分裂酵母の CDC15 とホモロジーを有する分子が BNR1 との結合を示した。これを HOF1 (homolog of CDC15) と命名した。

次に BNR1 と HOF1 がどの領域で結合するのかを様々な Fragment を作成し Two-hybrid で検討した結果、BNR1 の FH1 領域と HOF1 の SH3 ドメインが特異的に結合したが HOF1 は BNI1 には弱くしか結合しないことが明らかになった。

また、*in vitro* における BNR1 と HOF1 の結合を Recombinant タンパクを作成して検討した結果、BNR1 の FH1 領域と HOF1 の SH3 ドメインは約 1 : 1 のモル比で直接結合することを明らかにした。

さらに、BNR1 は活性型の Rho4 に特異的に結合するためその標的分子と考えられるが、BNR1 と HOF1 の結合に Rho4 がどのような影響を及ぼすかを Two-Hybrid で検討した。全長の BNR1 は HOF1 と結合しないが、その株に第 3 のプラスミドとして Rho4 の活性型、不活性型、Wild Type のそれぞれの Mutant を作成し導入したところ、活性型 Rho4 を導入したものだけが結合を示した。このことより、Rho4 が作用することで BNR1 の分子内構造が変化し、HOF1 にシグナルを伝えることができるようになる結論づけている。

さらに HOF1 をロックアウトした株を作成し、HOF1 が細胞質分裂に関与する遺伝子であることを明らかにした。これは、Rho-BNR1 系が HOF1 の上流でアクチンを主体とした細胞質分裂を制御していることを示している。

本研究は、Rho-BNR1-HOF1 なる新規のシグナル経路の存在を明らかにし、Rho による細胞質分裂の制御機構の一端を明かにした。HOF1 の動物細胞ホモログが存在することが報告されており、上述の細胞質分裂のシグナル伝達モデルは高等動物細胞にもあてはめて考えることができる。動物細胞での詳細なシグナル経路の解明および異常の解析は癌を中心に様々な病態で興味深い。以上の理由により本研究は十分学位に値すると考えられる。