

## 論文内容の要旨

論文題目 分裂酵母の Rho1-GEF、Rgf タンパク質の機能解析  
(Functional analysis of fission yeast Rho1-GEFs, Rgf proteins)

氏名 武藤 悌

細胞の形態形成・維持は細胞の機能に密接に関係がある。また、細胞分裂は増殖、分化の過程で厳密に制御され、増殖期の細胞において細胞周期依存的に制御されている。これらのことから、細胞形態と細胞分裂の制御機構の解明は現代の生物学における中心的な問題のひとつになっている。アクチン細胞骨格は真核生物において、細胞増殖と細胞形態の制御に重要な役割を果たしている。低分子量 G タンパク質 Rho は下流の標的タンパク質を介してアクチン細胞骨格を制御することが知られている。従って、Rho の活性は時間的、空間的に厳密に規定されなければならない。

Rho ファミリータンパク質は、内在性 GTPase 活性をもち、GTP を結合した活性化状態と GDP を結合した不活性化状態とに変換する分子スイッチである。Rho ファミリータンパク質の活性化は結合した GDP を解離し、新たに GTP を結合する交換反応によっておこり、この反応はグアニンヌクレオチド交換因子 GEF (guanine nucleotide exchange factor) によって触媒される。GTP 結合型の Rho はイソプレニル基などを介して細胞膜に結合していると考えられている。一方、不活性化は GTPase 活性化タンパク質 GAP (GTPase activating protein) により、Rho の内在性 GTPase 活性の促進によりおこる。また、GDP を結合した Rho は、グアニンヌクレオチド解離抑制因子 GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) が結合し、GDP の解離を抑制することで不活性化状態を維持し、GDI との結合により GDP 結

合型 Rho は細胞膜から遊離する。これらの Rho 調節因子により、Rho は時空間的に活性が制御され、その結果、細胞運動、細胞形態の決定・維持、細胞分裂を適宜おこなうことができると考えられる。

分裂酵母には Cdc42、Rho1、Rho2、Rho3、Rho4、Rho5 の 6 つの Rho ファミリー GTPase が存在することが知られており、それぞれ細胞の極性成長、形態形成、細胞分裂に関与している。これらのうち、Cdc42 と Rho1 は細胞の生育に必須である。Cdc42 は Pak1/Shk1/Orb2 を介した細胞極性の決定に関与し、一方、Rho1 は 1,3- $\beta$ -D-グルカン合成酵素の調節因子として働き、また C-kinase 様タンパク質である Pck1 と Pck2/Pkc1 を介した細胞壁合成、細胞壁の統合、細胞の分離、アクチン細胞骨格の極性制御に関与している。一方、Rho2、Rho3、Rho4、Rho5 は細胞の増殖に必須ではないことが知られている。Rho2 は細胞形態の維持、細胞の分離、Pck2 を介した 1,3- $\beta$ -D-glucan 合成酵素である Mok1/Ags1 の活性制御をおこない、Rho3 は formin 様タンパク質である For3 を介した極性成長と細胞質分裂、exocyst complex を介した細胞分離に関与し、Rho4 は細胞形態の維持と隔壁形成に関与し、Rho5 は Rho1 のホモログとして細胞壁合成とアクチン細胞骨格の極性制御に関与している。

分裂酵母の Rho 調節因子として、不活性化因子である 9 種の GAP (Rga1、Rga2、Rga3、Rga4、Rga5、Rga6、Rga7、Rga8、Rga9)、少なくとも 1 種の GDI (Rdi1)、活性化因子である 7 種の GEF が存在することが知られている (Scd1/Ral1、Gef1、Rgf1、Rgf2、Rgf3、Gef2、Gef3)。これらの GEF のうち Scd1/Ral1 と Gef1 は Cdc42 の GEF であり、いずれも細胞の増殖に必須ではないが、これらの二重変異株は合成致死を示し、Cdc42 に対する活性化の役割を分担している。Scd1/Ral1 は接合と細胞形態の維持に関与し、Gef1 は細胞極性の制御と細胞分裂に関与する。Rgf3 については分裂期に特異的に発現する Rho1 の GEF であり、隔壁形成時の細胞壁合成、細胞壁の統合に関与することがごく最近報告された。上記以外の GEF である Rgf1、Rgf2、Gef2 および Gef3 については、未だ詳細な報告がなされていない。

本研究では、細胞形態と細胞分裂を研究する上で優れたモデルであることに加え、分子遺伝学的、細胞生物学的な手法を用いた解析が可能である分裂酵母を用いて、Rho の活性化因子である GEF のうち分子のドメイン配置が類似した Rgf タンパク質の解析を通して、Rho1 の機能と活性化の時空間における制御の理解を目指した。

分裂酵母の RhoGEF である Rgf1 および Rgf2、Rgf3 は類似したドメイン配置をしており、いずれも Rho1 の GEF として機能することがわかった。*rgf1* および *rgf2* の遺伝子破壊株は細胞の生育にそれ程影響を与えなかったが、これらの二重変異株は合成致死を示した。*rgf1* 遺伝子破壊による細胞形態の異常と増殖の遅延は Rho1 あるいは Rgf2 のマルチコピー発現により完全に相補されたが、Rgf3 の発現では部分的にしか相補されなかった。Rgf1 と Rgf2 は間期に細胞の伸長端に局在し、分裂期では隔壁に局在した。この細胞内局在は Rho1 と一

致するものであった。以上のことから、Rgf1 と Rgf2 は機能的に重複し、間期と分裂期で Rho1 の活性化を担い、細胞壁合成と細胞壁の統合、隔壁形成、F-アクチンパッチの局在に関与すると考えられる。一方、*rgf3* の遺伝子破壊株は分裂期に重大な欠損を示し、収縮環形成、アクチンパッチの局在および隔壁形成に異常を示した。*rgf3* 遺伝子破壊による細胞質分裂の異常と増殖の遅延は Rho1 のマルチコピー発現により完全に相補されたが、Rgf1 あるいは Rgf2 の発現では部分的にしか相補されなかった。Rgf3 の局在は Rgf1 および Rgf2 とは異なり、分裂期中期に分裂面にリング状に集積し、細胞質分裂の進行とともに収縮環と隔壁の間に位置し収縮した。以上のことから、Rgf3 は Rgf1 および Rgf2 とは働きを異にし、分裂期に Rho1 を介した収縮環の形成・維持と隔壁形成を調節すると考えられる。本研究により得られた結果を下図にまとめた。

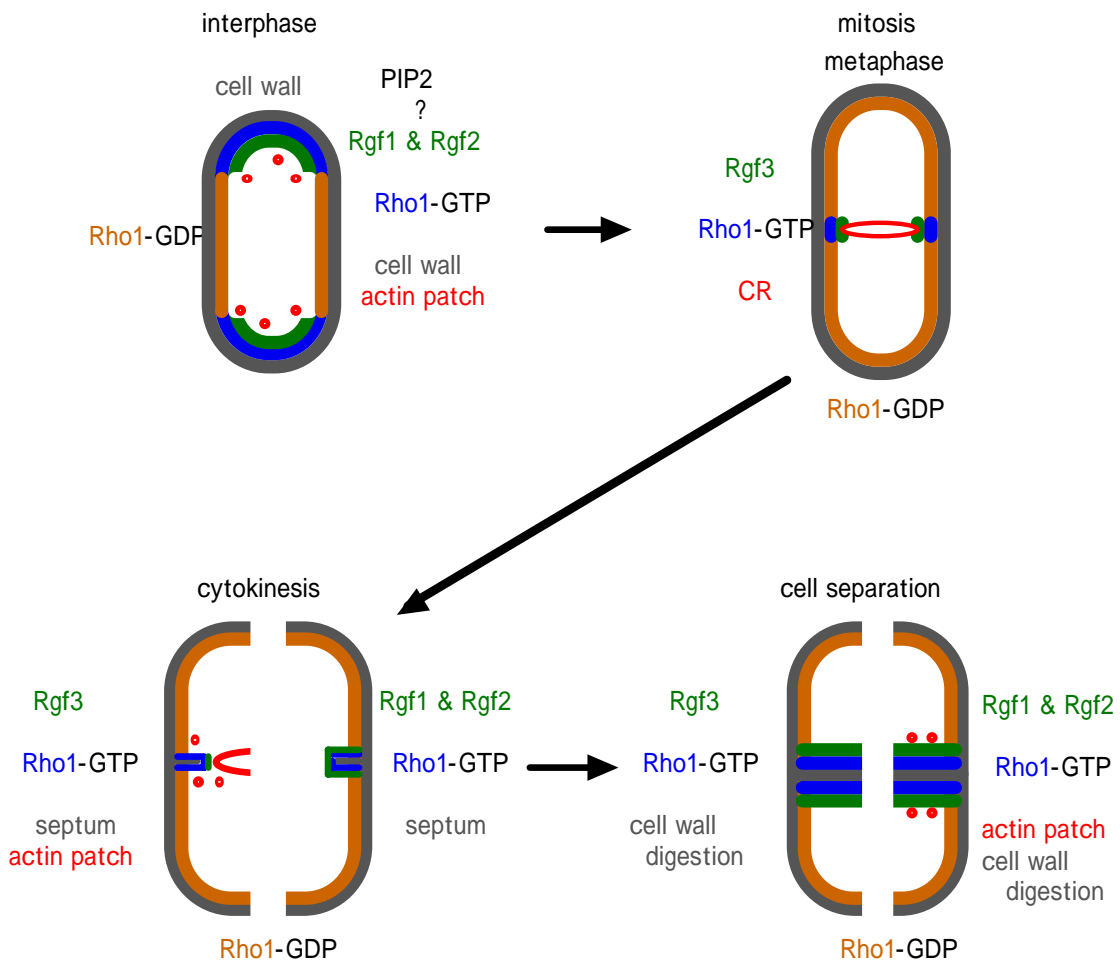


図 Rgf タンパク質による Rho1 の活性化と細胞形態および細胞分裂の制御