

論文審査結果の要旨

氏名 武藤 悌

本論文は主として、序、材料と方法、結果、考察、結論と展望、参考文献からなる。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と考えられている。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。

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 の機能解析を行うことにより、アクチン細胞骨格の制御機構の一端を解明した。

分裂酵母には Cdc42、Rho1、Rho2、Rho3、Rho4、Rho5 の 6 つの RhoGTPase 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、Rho1 は細胞の生育に必須である。分裂酵母の Rho 活性化因子として 7 種の GEF (Scd1/Ral1、Gef1、Rgf1、Rgf2、Rgf3、Gef2、Gef3) が存在することが知られている。これらのうち Rgf1、Rgf2、Rgf3、Gef2 および Gef3 については、未だ詳細な報告がなされていなかった。そこで申請者は、分裂酵母 RhoGEF 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行い、これを通して、Rho1 の機能と活性化の時間的・空間的制御の理解を目指した。本研究の遂行中にスペインのグループにより Rgf3 が研究され、これは分裂期特異的に発現される 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。本論文では、この論文で述べられていない新しい事実を明らかにしている。

まず、遺伝子の塩基配列の解析により、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いることがわかった。Yeast two-hybrid system の利用と遺伝学的相互作用の研究により、いずれの Rgf 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* 遺伝子破壊の場合は細胞形態の異常と増殖の遅延が見られた。これらの表現型は Rho1 あるいは Rgf2 の多コピー発現により完全に相補された。しかし Rgf3 の発現では部分的にしか相補されなかつ

た。一方、*rgf2* の遺伝子破壊では特別な表現型はみられなかった。しかしながら、*rgf1* および *rgf2* の遺伝子破壊株はいずれも、野生株に比べ、glucanase にたいする感受性が増していた。一方、Rgf1 と Rgf2 の過剰発現株では glucanase にたいする感受性が減少していた。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参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。本研究と同時期にアメリカのグループが *rgf3* 遺伝子破壊を行い、*rgf3* 遺伝子破壊は致死であると発表した。これは間違いであり、本研究が正しい。*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 の多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 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、分裂期に分裂位置で Rho1 を活性化することにより、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、間期、分裂期の分裂酵母細胞内で Rho1 がどのように活性化されるかが明らかになった。

なお、本論文は中野賢太郎、馬淵一誠との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。