

酵母におけるシグナル活性化因子遺伝子の網羅的破壊によるシグナルネットワークの解析

●宮本昌明

神戸大学大学院自然科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

各生物のゲノムプロジェクトが進み、種々の解析が行われるにしたがって、シグナル伝達に関わる因子は構造上保存されているばかりでなく、制御の方法も共通の仕組みを使っていることがわかってきた。ヒトをはじめとする高等動物では構造上似かよった遺伝子が多く、産物がどのように機能分担して働き、下流因子にシグナルを伝えているのかを解析することは多くの困難を伴う。それに対して酵母はシグナル伝達の基本的な制御機構は保存されているながら遺伝子の数も少なく遺伝学的手法を用いた種々の解析が容易である。外界からのシグナルを細胞内に伝え始める因子として guanine nucleotide exchange factor (GEF) に注目し、分裂酵母の GEF 遺伝子を網羅的に破壊して解析を行うことにより GEF を介した細胞内のシグナルネットワークがどのように制御されているのかについて明らかにする。

〈研究開始時の研究計画〉

- ・ゲノムプロジェクト完了後の分裂酵母染色体遺伝子配列データベースより、DH・PHドメイン配列を指標に Rho 活性化因子(GEF)遺伝子を同定する
- ・同定した遺伝子の cDNA および染色体遺伝子を単離して、全ての遺伝子について分裂酵母内で発現させて細胞形態における働きを解析する。
- ・単離した染色体遺伝子を用いてすべての GEF 遺伝子について遺伝子破壊株を作製し、細胞形態における働きを解析する。
- ・細胞形態制御におけるシグナル伝達経路について同定した GEF が役割を担うのか、活性化シグナルの共有があるのか、あるとすればどのようなになっているのか、遺伝学的・生化学的に解析を行う。

〈研究期間の成果〉

DH/PHドメイン配列を指標に分裂酵母のゲノムデータベースの検索を行い、7つの GEF を同定し、命名した (SPAC1006.6: *rgf2+*, SPAC16E8.09: *scd1+*, SPAC24H6.09: *gef1+*, SPAC31A2.16: *gef2+*, SPBC29A3.17: *gef3+*, SPCC645.05C: *rgf3+*, SPCC645.07: *rgf1+*)。これらは GEF 活性を担うドメインの他、ショウジョウバエや動物細胞でシグナル伝達に関わる因子と相同性をもつ領域を複数持っていた。これら7つの遺伝子の染色体遺伝子クローンおよび cDNA クローンを取得・単離した。それぞれの遺伝子を分裂酵母細胞内で発現させると、細胞の形態の異常や細胞骨格を規定しているアクチンの配向性、存在様式の異常をきたすことが分かった。しかもそれらの異常は遺伝子によって異なっており、遺伝子によって細胞の形態の制御における働きが異なることが示唆された。また、染色体遺伝子クローンからターゲットングベクターを構築し、それぞれの遺伝子破壊株を作製した。遺伝子破壊株についても細胞の形態異常、アクチン骨格系の異常をきたし、今回同定した遺伝子産物が実際に細胞の形態の制御に重要な役割を果たしていることが明らか

となった。しかも、2重変異株の作製と解析、生化学的な解析などから Rho 活性化には GEF から 1 対 1 の関係でシグナルが来ているわけではなく、特定の複数の GEF が特定の Rho を活性化しているという、シグナルの共有が存在することが分かった。例えば Cdc42 を活性化するのは *Gef1* と *Scd1* という GEF であり、その他の Rho もそれぞれ複数 (多くは 3 つ以上) の GEF からシグナルを受けていることが明らかとなった。

以上のことから今回の研究により、分裂酵母の Rho ファミリーの活性化において、細胞形態制御に関わる異なる働きを持った活性化因子 (GEF) が共同してシグナルネットワークを形成していることが明らかとなった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

今回の成果の発表 (2003) 後、分裂酵母の Rho ファミリー活性化について 4 つの文献において引用されている (Tajadura et al. *Journal of Cell Science* (2004), Palmer et al. *Biochemical Journal* (2005), Morrell-Falvey et al. *Journal Cell Science* (2005), Mutoh et al. *Genes to Cells* (2005))。また、今回の研究で作製した遺伝子破壊株、ベクターの分与依頼、研究内容についての問い合わせ、ディスカッションが国内外から寄せられている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

今回の申請で計画していたことは、時間はかかったものの全て達成できたと考える。

〈今後の課題〉

今回網羅的に遺伝子破壊を行うことによって、GEF を介した Rho 活性化シグナルの一端が明らかにされた。今後、今回の成果をもとにさらに詳細に解析を進めることが求められる。特に Cdc42 の活性化因子として *Gef1* と *Scd1* を同定したが、この 2 つの因子がどのような場合に、細胞のどこで、どのように Cdc42 を活性化しているのか、またその時に Cdc42 の標的となる因子はどのようなものなのかを調べていくことはシグナルネットワークを解析していくうえでのモデルケースとなると思われ、このことを調べることは極めて重要であると考えられた。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

Role of guanine nucleotide exchange factors for Rho family GTPases in the regulation of cell morphology and actin cytoskeleton in fission yeast.
Iwaki N, Karatsu K, Miyamoto M.
Biochem Biophys Res Commun. 312(2): 414-20. (2003)