

分裂酵母を用いた Rho の研究

KIM HYOMIN (筑波大学 生物学類)

指導教員：中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境学系)

背景と目的

生きるために細胞は正しい形をとり、方向性を持って動き、そして分裂する。そのために、細胞内のタンパク質が適切な時期に然るべき場所に分布するためのしくみが必要である。細胞極性の形成には、細胞骨格が大きな役割を担う。真核生物の主要な細胞骨格は、アクチン繊維と微小管である。これらの細胞骨格は、細胞極性に関わるタンパク質分子の輸送や足場となる。それでは、細胞骨格の分布や配向性はどのように制御されるのだろうか？

その制御に中心的な役割を担うのは、Rho ファミリーの低分子量 GTP 結合タンパク質である。Rho ファミリータンパク質は、幅広く真核生物で保存されており、主にアクチン細胞骨格の形成を調節している。Rho は GTP と結合している状態が活性型であり、Rho 標的タンパク質と結合して、アクチンの重合量を増やしたり、ミオシンの脱リン酸化を介してアクチン-ミオシンの相互作用を活性化する。Rho は分子自身が結合している GTP を GDP とリン酸に加水分解する活性をもつ。Rho は、GEF 及び GAP などの別のタンパク質の作用により、その活性を変える。GEF は、Rho と GTP の結合を促す。一方、GAP は Rho に作用して、その GTP 加水分解活性を高める。細胞内では、これらの分子の相互作用により、Rho の活性が適切に制御されている。この制御は、細胞極性を正しく形成して維持するために、時間的かつ空間的に調節されなければならない。Rho の活性制御や標的タンパク質との結合性が異常になると、細胞の形が壊れ、細胞運動がおかしくなり、正しく細胞が分裂できなくなる。

ヒトは十数種類の Rho タンパク質を有する。その中でも、最も初期に細胞機能が研究されたのが RHOA である。最近、悪性の癌患者では、RHOA に点突然変異が生じていることが報告された (Kakiuchi et al., 2014)。点突然変異が発見された位置は、合計で 11 箇所ある (図 1)。これらの変異が生じた位置は、Rho ファミリーで広く保存されていたアミノ酸残基のコドンに変化を及ぼす。しかし、それらの変異が起きたことで、RHOA の活性状態がどのような影響を受けたのかはよく分かっていない。これが分からないと、ガン細胞の悪性化における RHOA の作用の因果関係は理解できない。私は、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は用いて、この問題に取り組むことにした。

分裂酵母は単純な細長い円筒形の細胞で、モデル生物として変異の導入などの実験操作がスピーディーで容易である。分裂酵母は、ヒトの RHOA と相同遺伝子である Rho1 をもつ。先行研究により、分裂細胞で Rho1 を欠損させると細胞は死滅し、過剰発現すると細胞の形が異常になり、細胞壁が厚くなるなどの異常が見られた。さらに、機能的にも分裂酵母や出芽酵母の Rho1 とヒト RHOA には機能的保存性があることが確認されている。私は、上述したヒトの RHOA の変異と同じアミノ酸変異が起こす Rho1 変異遺伝子 (R6Q, R6W, G18E, L23R, V39G, Y43C, E55K, W59S, R69P, L70R, Y75D) を作製し、それらを発現した際の細胞に及ぼす影響を調べることにした。

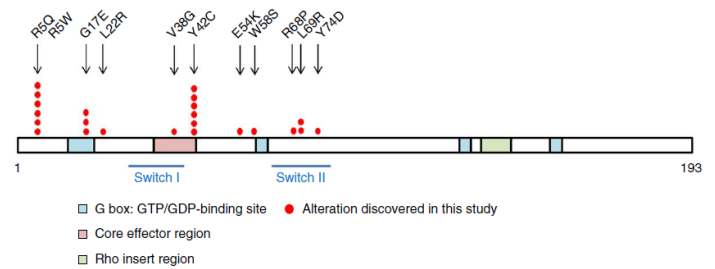


図 1. ヒト RhoA の変異 (Kakiuchi et al., 2014 から転載)

方法

分裂酵母の遺伝子発現プラスミド pREP1rho1 に、inverse PCR 法を用いて、目的の変異を導入した。作製したプラスミドを用いて、*leu1-32* 栄養要求性変異株を形質転換した。
<アルカリ法によるプラスミドの抽出>

1. 37°C で一晩培養した大腸菌を 1.5ml のチューブに移した。
 2. 9,000 rpm で 2 分間遠心し、集菌した。
 3. 培養上清を除き、試薬 solution1 を入れ、懸濁した。
 4. solution2 を加え溶菌し、直ちに solution3 を加え懸濁した。
 5. フェノール/クロロホルム溶液と混合し、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した。
 6. 水層を別の 1.5ml のチューブに移し、等量のエタノールと混合し、-20°C で 1 時間以上静置した。
 7. 15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、核酸を沈殿した。
 8. 沈殿を 70% エタノールで洗浄し、風乾した。
 9. TE に懸濁し、RNaseA を加えて RNA を分解した。
- <分裂酵母の形質転換>

1. SD 培地中で培養した細胞を、1,000 rpm で 5 分間遠心した。
2. 集菌した細胞を滅菌水及び酢酸リチウム液で洗浄した。
3. 細胞を酢酸リチウム液に懸濁し、25°C で 30 分間置いた。
4. 目的のプラスミドを加え、さらに 25°C で 1 時間置いた。
5. 50% のポリエチレングリコール液を加え、1 時間置いた。
6. 43°C で 15 分間熱処理し、常温で 10 分間置いた。
7. 3,000 rpm で 1 分間遠心して細胞を集菌した。
8. 滅菌水で洗浄した細胞を、SD 寒天プレートにまいた。
9. 25°C で数日培養し、形成されたコロニーを拾った。

結果と考察

作製したプラスミドについて DNA シーケンスを行い、目的の変異が導入されているか調べた。変異が正しく導入されたプラスミドを用いて分裂酵母を形質転換した。今後、形質転換株の細胞増殖能や細胞形態などの表現型について調べる予定である。

引用文献

Kakiuchi, M. et al. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nature Genetics* 46, 583-589 (2014).