

氏名（本籍）	エー・ワイ・ケー・エム・ディー・マスド・ラナ A. Y. K. MD. Masud Rana (バングラデシュ)
生年月日	昭和50年 2月 4日
授与学位	博士(学術)
学位記番号	医博甲第1328号
学位授与年月日	平成25年 9月27日
学位授与の要件	学位規則第4条1項
研究科，専攻の名称	医学系研究科(博士後期課程)応用分子生命科学系専攻
学位論文題目	Study on the role of dynamin in cytokinesis of <i>Dictyostelium discoideum</i> (細胞性粘菌の細胞質分裂におけるダイナミンの役割に関する研究)
論文審査委員	主査 山口大学 教授 祐村 恵彦 山口大学 教授 岩尾 康宏 山口大学 教授 村上 柳太郎 山口大学 准教授 山中 明 山口大学 准教授 三角 修巳

## 【学位論文内容の要旨】

細胞質分裂は、細胞質を2分する細胞分裂の最終段階であり、細胞の増殖にとって必須である。細胞質分裂時には、細胞の赤道面にアクチンとミオシンからなる収縮環が形成され、その収縮力により細胞は分裂できる。しかし、収縮環がどのように形成、維持されるのかについては、まだ十分分かっていない。ダイナミンは膜のダイナミクスに関わるタンパク質として同定されてきたが、この遺伝子の欠損細胞では細胞質分裂ができないことがいくつかの生物で報告されてきている。本研究では、細胞性粘菌をモデル生物として、ダイナミンの細胞質分裂における役割を調べた。細胞性粘菌にはダイナミン様タンパク質の遺伝子が5つある。そこで、それぞれのダイナミン様タンパク質（以降ダイナミンと呼ぶ）の欠損細胞を作成した。5つの欠損細胞のうち、3つで細胞質分裂欠損が観察された。これらの細胞内分布を蛍光抗体法によって調べたところ、DlpAとDymAは分裂面に局在がみられた。また、GFP-DlpAを細胞に発現させたところ、ライブイメージングにおいても、DlpAは分裂後期から分裂面に集合し、細胞質分裂の完了まで局在した。これらの欠損細胞では、ミオシンが分裂面に集まれるものの、パッチ状になって正常に集まることができなかった。アクチンも分裂面に集まるものの、繊維が断片化していることが分かった。FRAP実験、DNase I結合実験などからもアクチン繊維の断片化が明らかになり、これらが細胞質分裂欠損を引き起こしている原因と考えられた。また、DlpAとDymAに関しては、トリトン処理によって細胞骨格にしても局在が見られたことから、アクチン繊維に結合していることが示唆された。以上から、ダイナミンは収縮環のアクチン繊維を安定化させることで、細胞質分裂に寄与していることが分かった。

## 【論文審査結果の要旨】

本研究では、細胞性粘菌をモデル生物として、ダイナミンの細胞質分裂における役割を調べた。細胞質分裂は、細胞質を2分する細胞分裂の最終段階であり、細胞の増殖にとって必須である。細胞質分裂時には、細胞の赤道面にアクチンとミオシンからなる収縮環が形成され、その収縮力により細胞は分裂できる。しかし、収縮環がどのように形成、維持されるのかについては、まだ十分分かっていない。ダイナミンは膜のダイナミクスに関わるタンパク質として同定されてきたが、この遺伝子の欠損細胞では細胞質分裂ができないことがいくつかの生物で報告されてきている。

細胞性粘菌にはダイナミン様タンパク質の遺伝子が5つ (*dymA*, *dymB*, *d1pA*, *d1pB*, *d1pC*) がある。そこで、それぞれのダイナミン様タンパク質 (以降ダイナミンと呼ぶ) の欠損細胞を作成した。5つの欠損細胞のうち、3つ (*dymA*-, *d1pA*-, *d1pB*-) で細胞質分裂欠損が観察された。これらの細胞を DAPI 染色すると、多核化が観察された。この細胞質分裂の欠損は、細胞を懸濁培養した場合にのみ観察され、基質上で培養した場合には、単核のままで正常に分裂増殖した。

次に、DymA, DymB, D1pA に対する抗体を用いて、細胞内分布を蛍光抗体法によって調べた。DymB は細胞内局在が見られなかったが、D1pA と DymA は分裂面に明瞭な局在がみられた。また、D1pA-GFP を細胞に発現させたところ、ライブイメージングにおいても、D1pA は分裂後期から分裂面に集合し、細胞質分裂の完了まで局在した。

上記のように、変異細胞は懸濁培養した場合にのみ、細胞質分裂欠損が起こった。この現象はミオシン II 欠損細胞でよく知られており、変異細胞ではミオシン II になんらかの問題があることを示唆している。そこで、DymA と D1pA の欠損細胞の分裂時のミオシン II の細胞内分布を蛍光抗体法によって詳細に調べた。その結果、ミオシン II は分裂面に集まれるものの、パッチ状になって正常に集まることができなかった。

次に、これらの欠損細胞の分裂時のアクチン繊維の分布についても調べた。アクチン繊維は分裂面に集まるものの、繊維が短く断片化していることが分かった。さらに、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 実験、DNase I 結合実験を行い、分裂面でのアクチン繊維の断片化が明らかになった。アクチン繊維の断片化が細胞質分裂欠損を引き起こしている原因と考えられた。

また、D1pA と DymA に関しては、トリトン処理によって細胞膜を除去して細胞骨格にしても局在が見られたことから、アクチン繊維に結合していることが示唆された。

以上から、ダイナミンは収縮環のアクチン繊維を安定化させることで、細胞質分裂に寄与していることが分かった。

公聴会における主な質問内容は、複数あるダイナミンのこの生物における機能の違いについて、またそれぞれのダイナミンが copolymer を形成している可能性とそれを確かめる実験、ダイナミン欠損細胞が細胞性粘菌の発生に影響を与えるか、などについてであった。いずれの質問に対しても発表者からの的確な解答がなされた。

以上より、本研究は独創性、信頼性、有効性ともに優れ、博士 (学術) の論文に十分値するものと判断した。

論文内容及び審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。(関連論文 計1編)

A. Y. K. Md. Masud Rana, Masatsune Tsujioka, Shinya Miyagishima, Masahiro Ueda and Shigehiko Yumura (2013).

Dynamnin contributes to cytokinesis by stabilizing actin filaments in the contractile ring. *Genes to Cells*, 18(8): 621-635.