

学 位 論 文 内 容 の 要 旨	
学位論文題目	Traction force and its regulation during cytokinesis in <i>Dictyostelium</i> cells
氏 名	Md. Golam Sarowar Jahan
<p>Cytokinesis is the final stage of cell division, which physically divides the cytoplasm of a parental cell into two daughter cells. The proper development and maintenance of the tissue architecture depend on successful cell division. Moreover, failure in cytokinesis results in abnormal polyploidy, which may promote tumorigenesis. Although furrow ingression through constriction of the actomyosin contractile ring has long been known to be a leading way to divide the cell, other parallel mechanisms also exist in <i>Dictyostelium discoideum</i>, including cytokinesis A, B and C. Cytokinesis A is a conventional mode, which depends on myosin II in the contractile ring. Myosin II null (HS1) cells divide depending on substratum-attachment (cytokinesis B) or in a multi-polar fashion independent of the cell cycle (cytokinesis C). It has been proposed that movement of daughter cells in opposite directions by applying traction force is crucial for cytokinesis B and C. Wild type cells may use either cytokinesis A or B. However, there has been no direct observation of the traction force of these cells. We investigated the traction stress exerted by dividing cells in the three different modes using traction force microscopy. Here, the traction stress is the unit force per unit area. In all cases, the traction forces were directed inward from both poles. The distribution of actin filaments in both polar regions partially co-localized with the area of the higher traction stress. Latrunculin B, an inhibitor of actin polymerization, completely diminished the traction stress of dividing cells, which suggests that actin polymerization plays a major role in the generation of traction force. But, blebbistatin, an inhibitor of myosin II ATPase, increased the traction stress in wild type cells to a level comparable to that of the myosin II null cells, which indicates that the power by actin polymerization in the polar pseudopods mainly contributes to the traction force. Myosin II has two functions; motor and cross linking activities. The experiments using blebbistatin and the results of the HS1 cells indicate that the increase in the traction stress is not a result of the loss of the actin-crosslinking activities but is a result of the loss of the motor activities of myosin II. Interestingly, the traction stress of cytokinesis A was the smallest of the three modes.</p> <p>Previously myosin II null cell was reported to strongly adhere to the substratum and migrate substantially slower on a poly-lysine coated substratum than wild type cells. Therefore, myosin II is proposed to contribute to the detachment of cell body from the substratum. During cell division, daughter cells movement in opposite direction involve repeating the detachment and attachment to the substrate. In wild type cells, a part of the traction stress may be cancelled by these frequent detachments. Detachment may be deficient in myosin II null cells. In myosin II null cells, the traction will be accumulated as each half advances in the opposite directions. This may cause higher traction forces than wild type cells. We hypothesize that on adhesive substrate, wild type cells may exert larger stress than myosin II null cells. To check this, cell-substratum adhesive strength was increased by coating the substratum with various concentrations of poly-lysine. Wild type cells increased their traction stress in contrast to myosin II null and other cytokinesis-deficient mutant cells, which suggests that wild type cells may increase their own power to conduct their cytokinesis, which likely occurs by sensing the cell-substratum attachment strength and their own force by their mechanosensing. Myosin II is important for this regulation.</p> <p>The HS1 cells performing cytokinesis B failed to divide on substratum more frequently than the wild type cells. Even if the HS1 cells succeeded in cell division, they frequently divided unequally. In the case of failed cytokinesis B, a daughter half was pulled by another half and fused into one cell; the fused cell eventually migrated to one direction. On the other hand, the wild type cells always divided equally. The force imbalance between the two halves may cause the failure of cytokinesis or unequal cytokinesis. To clarify this point, the integrated traction stresses were examined in two halves of dividing HS1 cells during equal cytokinesis, unequal cytokinesis, and failed cytokinesis. The traction stresses were almost evenly exerted in both halves in the successfully dividing cells. Moreover, in unequal cytokinesis, the small and large halves exerted equal integrated traction stresses. In contrast, in the failed cases, the integrated stress of the losing half declined, and the remaining half maintained a high level of traction stress. Therefore, the balance of the traction stress between both daughter halves is essential for the success of cytokinesis. Taken together, myosin II must contribute to the equal division of the cytoplasm. We discuss the regulation of cell shape changes during cell division through mechanosensing.</p>	

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

(博士後期課程博士用)

山口大学大学院医学系研究科

報告番号	医博甲 第1495号	氏名	Md. Golam Sarowar Jahan
最終試験担当者	主 査	祐村 恵彦	
	審査委員	宮川 勇	
	審査委員	岩尾 康宏	
	審査委員	村上 柳太郎	
	審査委員	山中 明	
【論文題目】			
Traction force and its regulation during cytokinesis in <i>Dictyostelium</i> cells (細胞性粘菌の細胞質分裂時のトラクションフォースとその制御機構)			
【論文審査の結果及び最終試験の結果】			
<p>細胞質分裂は、細胞分裂過程の最終段階である。生物の増殖、形態形成や組織形態の維持にとって、正常な細胞質分裂は必須である。また、細胞質分裂の失敗は多核化を引き起こし、ガン化の原因にもなる。細胞性粘菌の細胞質分裂の様式には、細胞質分裂A、B、Cが報告されている。細胞質分裂Aは、動物細胞一般の様式として知られていて、細胞分裂終期に分裂面に一時的に形成されるアクチンとミオシンからなる収縮環の収縮に依存する様式である。細胞質分裂BとCは、ミオシンを欠損する細胞で見いだされた。これらは、収縮環に非依存で、基質依存的に分裂する様式である。分裂する娘細胞が極方向に運動することで、細胞質を物理的に分断する様式である。細胞質分裂Bは、細胞周期依存的であるが、細胞質分裂Cは、細胞周期非依存的に起こる。細胞質分裂BやCについて、最近の研究から動物細胞にも広く存在することが分かっている。細胞が基質に接着して2極に分裂する場合、2つの娘細胞は基質に対してトラクション力を互いに反対方向に発生させることで分裂していると考えられている。しかし、実際に細胞分裂時のそのようなトラクション力を測定された例はほとんどない。また、トラクション力の発生と細胞質分裂との関連についても明らかになっていない。</p> <p>本研究では、トラクション顕微鏡法を用いて、細胞質分裂A、B、Cを行なっている細胞のトラクション力を測定した。表面に蛍光ビーズを付着させた弾性基盤上に細胞を載せ、セクショニング顕微鏡により、分裂を観察した。蛍光ビーズの動きから細胞が出すトラクション力とベクトルを測定した。その結果、3つの分裂様式のいずれにおいても、トラクション力のベクトルは細胞両極から分裂面の方向を向いていた。すなわち、各娘細胞は、分裂時に両極方向に分かれるようにトラクション力を発生させていることが明らかになった。ミオシンは力を発生するモータータンパク質であるが、興味深いことに、ミオシン欠損細胞の方が野生型に比べてトラクション力が高かった。ミオシンATPase活性阻害剤Blebbistatinとアクチンの阻害剤Latrunculin Aの実験から、ミオシンよりアクチンの重合が細胞の出すトラクション力の主な原動力であることが分かった。</p> <p>ミオシンは、細胞運動時に細胞の基質接着をはがす力を発生していることも知られている。基質をポリリジンでコートすることで、細胞と基質の接着力を人為的に上げると、野生型細胞は分裂時トラクション力を増大することが分かった。一方、ミオシン欠損細胞やミオシン制御の上位シグナルであるPTENを欠損させた細胞では、基質の接着力を上げてもトラクション力は増大しなかった。この結果は、ミオシンやPTENが細胞の出すトラクション力をメカノセンシングできることを意味する。ミオシンやPTEN欠損細胞では、しばしば不等分裂や分裂の失敗が観察されるが、これは2つの娘細胞のトラクション力のバランス制御がうまく出来ていない結果であると考えられる。</p>			

以上から、本論文では、ミオシン II と PTEN は細胞自体が出すトラクション力をメカノセンシングして、娘細胞のサイズを均等にするようにバランス制御することで適切な細胞質分裂に寄与していると結論づけた。

公聴会における主な質問内容は、他の生物の細胞でも分裂時のトラクション力は同じように起こるのか、細胞の背腹で違いはあるか、メカノセンシングと基質接着との関係はどのようになっているか、トラクション力とアクチン構造との関係はあるのか、ATP 消費を測定することでトラクション力との関係を調べられないか、などであった。いずれの質問に対しても発表者からの確かな回答がなされた。

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)

Md. Golam Sarowar Jahan and Shigehiko Yumura (2017).
Traction force and its regulation during cytokinesis in *Dictyostelium* cells
European Journal of Cell Biology 印刷中 DOI: 10.1016/j.ejcb.2017.06.004.