

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

学位論文題目	A study of wound repair in <i>Dictyostelium</i> cells by using novel laserporation (新規レーザーポレーション法を用いた細胞性粘菌の怪我修復機構の研究)
--------	--

氏 名	Mst. Shaela Pervin
-----	--------------------

We examined the mechanism of cell membrane repair in *Dictyostelium* cells by using a novel laser-based cell poration method. The dynamics of wound pores opening and closing were characterized by live imaging of fluorescent cell membrane proteins, influx of fluorescent dye, and Ca²⁺ imaging. The wound closed within 2-4 sec, depending on the wound size. Cells could tolerate a wound size of less than 2.0 μm. In the absence of Ca²⁺ in the external medium, the wound pore did not close and cells ruptured. The release of Ca²⁺ from intracellular stores also contributed to the elevation of cytoplasmic Ca²⁺ but not to wound repair. Annexin C1 immediately accumulated at the wound site depending on the external Ca²⁺ concentration, and annexin C1 knockout cells had a defect in wound repair, but it was not essential. *Dictyostelium* cells were able to respond to multiple repeated wounds with the same time courses, in contrast to previous reports showing that the first wound accelerates the second wound repair in fibroblasts.

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	号	氏 名	Mst. Shaela Pervin
			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
最 終 試 験 担 当 者				
【論文題目】				
A study of wound repair in <i>Dictyostelium</i> cells by using novel laserporation (新規レーザーポレーション法を用いた細胞性粘菌の怪我修復機構の研究)				
【論文審査の結果及び最終試験の結果】				
<p>細胞は、外界から常に物理的・化学的ストレスにさらされており、細胞膜が損傷することがしばしばある。特に、活発に動く筋肉の細胞では常に細胞膜が損傷している。また、寿命の長い神経細胞では、損傷の修復は特に重要である。Dysfelin という膜修復に関与するタンパク質の欠損が、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因であることも分かっている。ほかにも修復の欠損によって、糖尿病、ビタミン欠乏症、炎症性筋疾患が引き起こされることが示されている。植物細胞でも、膜損傷を修復する機構が存在しており、冬場の凍結で細胞膜が損傷を受けた場合に、これを修復することができる。また、細胞内への物質導入に用いられるマイクロインジェクション、エレクトロポレーション法なども、細胞が持つ自立的な細胞膜修復機構に依存しており、細胞膜修復は、DNA の修復と同じように生物にとって必須の現象である。以上のことから、細胞膜修復の分子機構の解明は、細胞生物学だけでなく、細胞工学、医学においても重要である。</p> <p>本研究では、細胞膜だけにピンポイントでレーザー光を照射することで任意の場所に任意の大きさの穴をあける技術を新規開発し、この方法を用いて細胞性粘菌細胞の細胞膜に穴を開け、その穴がどのように閉じるかを調べた。この目的のために、蛍光標識した細胞膜タンパク質を発現させ、細胞膜に穴が開いたときの穴の開閉の動態を調べた。また、細胞外に蛍光色素を入れて、細胞膜に穴が開いた時に細胞内に流入する蛍光色素の量を経時的に定量化した。さらに、Ca イオンセンサーを細胞に発現させることで、細胞外からの Ca イオンの流入について調べた。蛍光色素と Ca センサーを用いた損傷実験から確かに損傷した穴から、蛍光色素や Ca イオンが流入していることが確かめられた。さらに、これらの実験から、穴の大きさに依存して穴が開いてから 2-4 秒で閉じることが分かった。また、2 μm 以上の大きな穴では細胞は耐えられずに破裂した。怪我を修復するためには、細胞外の Ca イオン濃度は少なくとも 100 μM 以上は必要であることが分かった。Ca イオン流入に伴い細胞内 Ca イオンストアからの Ca イオンの放出も起きていることも分かったが、この放出は怪我修復には必須でない。</p> <p>アネキシンという細胞膜足場タンパク質が細胞膜の損傷部位に集まることが知られているが、細胞性粘菌の相同遺伝子アネキシン C1 も損傷部位に損傷後 1 秒以内に集まることが分かった。しかし、アネキシン C1 欠損細胞で修復の異常が見られたが、最終的には修復されたので、アネキシンは修復に部分的に関与するが必須ではないと考えられる。繊維芽細胞では複数の怪我を与えると、2 回目の怪我の修復は早く治ることが知られている。細胞性粘菌では繰り返しの損傷に対して同じ時間経過で修復が見られたので、そのような修復を早める機構は無いようである。</p> <p>以上から、本論文では、新規レーザーポレーション法を用いて細胞性粘菌で初めて細胞膜損傷の穴</p>				

の開閉の動態を明らかにし、さらに Ca イオン依存的な制御機構の一部を明らかにすることができた。

公聴会における主な質問内容は、annexin が怪我の部位に集まる分子メカニズムについての考察すること、他の細胞に本研究で用いられたレーザーポレーションを利用することができるか、怪我のサイズは 2 μm が限界でそれ以上では細胞は破裂したが、この限界は何に由来するのか、他の細胞での限界はどのくらいなのか、phagocytosis での取り込みの限界と関係はないか、などであった。いずれの質問に対しても発表者からの的確な回答がなされた。

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)

M.S. Pervin, G. Itoh, M. S. U. Talukder, K. Fujimoto, Y. V. Morimoto, M. Tanaka, M. Ueda, and S. Yumura (2018).

A study of wound repair in *Dictyostelium* cells by using novel laserporation.

Scientific Reports, 8: 7969, doi: 10.1038/s41598-018-26337-0.