

学位論文内容の要旨	
学位論文題目	Study on the role of dynamin-like protein B in cytokinesis of <i>Dictyostelium</i> cells (細胞性粘菌のダイナミン様タンパク質 B の細胞質分裂における役割に関する研究)
氏名	藤本 甲子郎
<p>ダイナミンは、エンドサイトーシス、細胞小器官の分裂、細胞間接着、細胞質分裂など多くの細胞の機能に関与する高分子量GTPaseである。これまで、酵母、ショウジョウバエ、線虫、哺乳類動物培養細胞、植物などいくつかのモデル生物で、ダイナミンの機能に関する研究が行われてきている。細胞性粘菌<i>Dictyostelium discoideum</i>は、5つのダイナミン様タンパク質dymA, dymB, dlpA, dlpB, dlpCをもっている。dymAはエンドサイトーシスに関与すること、dymBは細胞基質間接着、細胞-細胞間接着、浸透圧に対する抵抗性、脂肪酸代謝に関与することが知られている。一方、本研究室で、dlpA, dymAは分裂細胞の分裂溝に局在することを報告してきた。しかし、ダイナミンがどのように細胞質分裂を制御しているかについての分子機構はほとんど分かっていなかった。</p> <p>本研究では、細胞性粘菌の5つのダイナミン様タンパク質の全ての遺伝子欠損細胞の多核率を調べた。細胞質分裂による多核化がdymA, dlpA, dlpB欠損細胞で観察されることから、これら3種のダイナミン様タンパク質が細胞質分裂に関与すると考えた。dlpAとdlpB2重欠損細胞も作成したが多核率は、dlpA, dlpB単独の欠損細胞と同程度であった。このことは、dlpAとdlpBは協調して細胞質分裂に機能していることを示唆している。</p> <p>次に、これら3つのダイナミン様タンパク質のGFP融合タンパク質を細胞に発現させ、分裂時の細胞内局在を観察した。その結果、dlpAとdlpBは分裂の初期の段階から分裂溝に共局在し、dymAは2つの娘細胞をつなぐ細胞質ブリッジに局在した。</p> <p>分裂溝でのdlpAとdlpBの分布を、全反射照明蛍光顕微鏡で観察したところ、いずれも多数の点状蛍光として観察され、両者の位置は一致していた。しかし、これらの点状蛍光はクラスリンと共局在しなかったことから、dlpAとdlpBはクラスリン仲介エンドサイトーシスには関与しないことが示唆された。GFP-dlpAをdlpB欠損細胞で発現させたところ、GFP-dlpAは分裂溝に局在しなかった。逆に、GFP-dlpBをdlpA欠損細胞で発現させたところ、GFP-dlpBは分裂溝に局在しなかった。ダイナミンは一般的にオリゴマーを形成するので、dlpAとdlpBは機能上の単位としてヘテロオリゴマーを形成しており、ヘテロオリゴマーができなければ、それぞれのダイナミン様タンパク質は分裂溝に局在できないと考えた。</p> <p>次にこの可能性をさらに調べるために、免疫共沈降分析を行った。抗-dlpB抗体結合磁気ビーズを分裂期細胞溶解物と混ぜ、共沈降したタンパク質を抗-dlpA抗体と抗-dlpB抗体を使用してウエスタンブロットを行うと、共沈降したフラクション内でdlpBに加えて、dlpAも検出された。しかし、間期細胞溶解物で同じ実験を行ってもdlpAは検出されなかった。これらのことから、dlpAとdlpBは分裂期特異的に複合体を作っていることが分かった。</p> <p>本研究室の以前の研究で、dlpAは収縮環構成要素のアクチン繊維と結合しており、繊維のターンオーバーに関与することが示唆されていた。そこで、dlpBが分裂溝のアクチン繊維と結合しているかを調べるために、GFP-dlpBとアクチン繊維のマーカーであるGFP-lifeactと同時に発現した細胞にアクチン重合阻害剤、ラトランキュリンを加えたところ、アクチン繊維の消失に伴って、GFP-dlpBの局在は失われた。このことから、dlpBはアクチン繊維と結合していることが示唆された。さらに、この結合を確認するために、トリトンX-100を含むバッファーで細胞を処理し、抗dlpB抗体を使用したウエスタンブロットを行なった結果、dlpBは不溶性細胞骨格に</p>	

残っていた。以上の結果から、**dlpA**と**dlpB**は分裂溝でアクチン繊維と直接もしくは間接的に結合していることが分かった。

次に、**dlpB**も**dlpA**同様収縮環アクチン繊維のターンオーバーに関与すると考え、**GFP-lifeact**を**dlpB**欠損細胞に発現させ、分裂溝での蛍光退色後蛍光回復実験を行なった。野生型細胞に比べ、**dlpB**欠損細胞ではターンオーバーが**dlpA**欠損細胞同様早くなっていることが分かった。さらに、**TRITC-DNaseI**で染色の結果から、**dlpA**と**dlpB**欠損細胞の分裂溝ではアクチン繊維は断片化されていることが分かった。**dlpA**と**dlpB**はアクチン繊維の断片化を抑制することで安定化させていると考えられる。

以上の結果から、**dlpA**と**dlpB**は、分裂期特異的にヘテロオリゴマーを形成し、収縮環アクチン繊維に結合し、繊維の断片化を防ぐことで収縮環構造の安定化に寄与しており、**dymA**は分裂の最終切断に寄与することが分かった。このように複数のダイナミン様タンパク質が協調することで、細胞質分裂が保証されていると考えられる。

学位論文審査の結果及び試験、試問の結果報告書

(論文博士用)

山口大学大学院医学系研究科

報告番号	医博乙 第1094号	氏名	藤本 甲子郎
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】 Study on the role of dynamin-like protein B in cytokinesis of <i>Dictyostelium</i> cells (細胞性粘菌のダイナミン様タンパク質 B の細胞質分裂における役割に関する研究)			
【論文審査の結果及び最終試験の結果】 ダイナミンは、エンドサイトーシス、細胞小器官の分裂、細胞間接着、細胞質分裂など多くの細胞の機能に関与する高分子量GTPaseである。ダイナミンの細胞質分裂における役割についての分子機構はほとんど分かっていない。本研究では、モデル生物である細胞性粘菌を用いて、ダイナミン様タンパク質 B の細胞質分裂における役割について研究を進めた。 細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> は、5つのダイナミン様タンパク質 dymA, dymB, dlpA, dlpB, dlpC をもっている。それぞれの遺伝子欠損細胞のうち、dymA, dlpA, dlpB 欠損細胞で多核化が観察されることから、これら3種のダイナミン様タンパク質が細胞質分裂に関与すると考えた。dlpA と dlpB 2重欠損細胞も作成したが、多核率は、dlpA, dlpB 単独の欠損細胞と同程度の多核率であった。このことは、dlpA と dlpB は協調して細胞質分裂に機能していることを示唆している。 次に、これら3つのダイナミン様タンパク質のGFP融合タンパク質を細胞に発現させ、分裂時の細胞内局在を観察した。その結果、dlpAとdlpBは分裂の初期の段階から分裂溝に共局在し、dymAは2つの娘細胞をつなぐ細胞質ブリッジに局在した。これらのダイナミンの欠損細胞が細胞質分裂を欠損することと考え合わせると、dlpAとdlpBは収縮環の収縮制御に関与し、dymAは細胞質ブリッジの切断に関与していると考えられる。 分裂溝でのdlpAとdlpBの分布を、全反射照明蛍光顕微鏡で観察したところ、いずれも多数の点状蛍光として観察され、両者の位置は一致していた。また、GFP-dlpAをdlpB欠損細胞で発現させたところ、GFP-dlpAは分裂溝に局在しなかった。逆に、GFP-dlpBをdlpA欠損細胞で発現させたところ、GFP-dlpBは分裂溝に局在しなかった。ダイナミンは一般的にオリゴマーを形成するので、dlpAとdlpBは機能上の単位としてヘテロオリゴマーを形成しており、ヘテロオリゴマーができなければ、それぞれのダイナミン様タンパク質は分裂溝に局在できないと考えられた。これをさらに確かめるため、免疫共沈降分析を行った。抗dlpB抗体結合磁気ビーズを分裂期細胞溶解物と混ぜ、共沈降したタンパク質を抗dlpA抗体と抗dlpB抗体を使用してウエスタンブロットを行うと、共沈降したフラクション内でdlpBに加えて、dlpAも検出された。しかし、間期細胞溶解物で同じ実験を行ってもdlpAは検出されなかった。これらのことから、dlpAとdlpBは分裂期特異的に複合体を作っていることが分かった。 収縮環構成要素のアクチン繊維とdlpBとの関連を明らかにするため、GFP-dlpBとアクチン繊維のマーカーであるGFP-lifeactを発現した細胞にアクチン重合阻害剤のラトランキュリンを加えたところ、アクチン繊維の消失に伴って、GFP-dlpBの局在は失われた。このことから、dlpBはアクチン繊維と結合していることが示唆された。さらに、この結合を確認するために、トリトンX-100を含むバッファーで細胞を処理し、抗dlpB抗体を使用したウエスタンブロットを行なった結果、dlpBは不溶性細胞骨格に残っていた。同じ結果はdlpAでも得られている。以上の結果から、dlpAとdlpBは分裂溝で			

アクチン繊維と直接もしくは間接的に結合していることが分かった。

次にGFP-lifeactをdlpB欠損細胞に発現させ、分裂溝での蛍光退色後蛍光回復実験を行なった。野生型細胞に比べ、dlpB欠損細胞ではターンオーバーがdlpA欠損細胞と同様速くなっていることが分かった。さらに、TRITC-DNaseI染色の結果から、dlpAとdlpB欠損細胞の分裂溝ではアクチン繊維は断片化されていることが分かった。dlpAとdlpBは、アクチン繊維の断片化を抑制することで安定化させていると考えられる。

以上の結果から、dlpAとdlpBは、分裂期特異的にヘテロオリゴマーを形成し、収縮環アクチン繊維に結合し、繊維の断片化を防ぐことで収縮環構造の安定化に寄与しており、dymAは分裂の最終切断に寄与することが分かった。このように複数のダイナミン様タンパク質が協調することで、細胞質分裂が保証されていると考えられる。

公聴会における主な質問内容は、原核生物でもダイナミンが存在するので、生物の進化からdlpAの進化的な位置を考察できないか、endocytosisの場合ダイナミンは細胞膜の外側から巻き付くことで機能するが収縮環の場合膜の内側になるのでそのメカニズムは異なるのではないかと、endocytosisの場合にアクチンはどのように関与するのか、リン酸化以外の制御について考察はないかと、dlpAとdlpBのアミノ酸配列からendocytosisに必要な配列を調べられないかと、欠損細胞が顕微鏡観察で黒く見える理由は何かと、細胞が球形化する時にすでに黒くなっているので、dlpAはこの時点で何か機能しているのではないかと、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)

Fujimoto, K., M. Tanaka, A. Y. K. M. M. Rana, M. G. S. Jahan, G. Itoh, M. Tsujioka, T. Q. P. Uyeda, S. Miyagishima, S. Yumura
Dynammin-like protein B of *Dictyostelium* contributes to cytokinesis cooperatively with other dynammins.
Cells, 8: 781. doi:10.3390/cells8080781 (2019)