

学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目 (Dissertation Title)	Ca ²⁺ -Calmodulin Dependent Wound Repair in <i>Dictyostelium</i> Cell Membrane (細胞性粘菌における Ca ²⁺ -calmodulin 依存的細胞膜修復機構)
氏 名 (Name)	Md. Shahabe Uddin Talukder

Wound repair of cell membrane is a vital physiological phenomenon. In our body, defects in cell membrane repair may cause muscular dystrophy, diabetes, vitamin deficiencies and inflammatory myopathy. We examined wound repair in *Dictyostelium* cells by using a laserporation, which we recently invented. We examined the dynamics of wound repair using influx of fluorescent dyes such as propidium iodide (PI) and FM1-43 in presence and absence of extracellular Ca²⁺. After wounding, the influx of both dyes did not cease in presence of EGTA, a chelating agent of Ca²⁺, whereas it ceased within a short time in the presence of Ca²⁺. We also observed the influx of Ca²⁺ from the external medium by using the cytosolic Ca²⁺ sensor after wounding. We found that the influx of Ca²⁺ through the wound pore was essential for wound repair. Annexin and ESCRT components accumulated at the wound site upon wounding as previously described in animal cells. Influx of fluorescent dyes finally ceased in mutant cells deficient in annexin and ESCRT components. Therefore, we concluded that annexin and ESCRT are not essential for wound repair in *Dictyostelium* cells. We discovered that calmodulin accumulated at the wound site upon wounding, depending on the influx of Ca²⁺. Influx of fluorescent dyes did not cease in presence of W7, an inhibitor of calmodulin. W7 also inhibited the accumulation of annexin and actin at the wound site. Therefore, we concluded that calmodulin is essential for wound repair. From the FM dye influx experiments, we found that some membrane accumulated at the wound site to plug the wound pore, depending on Ca²⁺ influx and calmodulin. We searched for the source of this membrane using markers of Golgi-derived vesicles, lysosome, endoplasmic reticulum, and recycling endosomes, but none of them accumulated at the wound site. Therefore, it is unlikely that preexisting vesicles are the source of the membrane plug. In the PI and FM dye influx experiments, PI and FM fluorescence accumulated at the wound site, suggesting that the cytoplasm including PI dye was entrapped in newly enclosed (de novo generated)

vesicles. Together, we proposed a Ca^{2+} and calmodulin-dependent two-step model for the membrane plug formation: after wounding, vesicles are de novo generated to form an urgent membrane plug, which is then completed by actin accumulation.

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	Md. Shahabe Uddin Talukder
審 査 委 員	主 査： 祐村 恵彦
	副 査： 岩尾 康宏
	副 査： 村上 柳太郎
	副 査： 山中 明
	副 査： 明石 真
論 文 題 目	Ca ²⁺ -Calmodulin Dependent Wound Repair in <i>Dictyostelium</i> Cell Membrane (細胞性粘菌における Ca ²⁺ -calmodulin 依存的細胞膜修復機構)
<p>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</p> <p>細胞は、外界から物理的・化学的ストレスにさらされており、常に細胞膜が損傷している。特に活発に動く筋肉細胞では常に細胞膜が損傷している。筋肉細胞の場合、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となる。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これまで報告されている。細胞膜に損傷を受けた場合、細胞外からのイオンの流入や細胞質が漏れ出ること防ぐために、細胞は速やかに損傷を修復することが知られているが、その分子機構については、十分理解されていない。本研究では、独自に開発したレーザーポレーション法を用いて、細胞性粘菌の細胞膜に小さな穴を開けて、その修復機構について調べた。細胞外に蛍光色素を入れ、細胞膜を損傷させると、蛍光色素は損傷穴から流入するが、2-3 秒で止まった。このことは損傷穴が短時間で閉じたことを示唆する。細胞外の Ca²⁺を除いて損傷実験を行うと、蛍光色素の流入が止まらず、細胞は死に至る。これらの結果から、細胞外からの Ca²⁺の流入が修復に必須であると結論づけた。また、本研究で新たに Ca²⁺結合タンパク質の calmodulin が損傷部位に速やかに集積することを見出した。calmodulin 阻害剤存在下や外液 Ca²⁺非存在下では、calmodulin は損傷部位に集積せず、蛍光色素の流入が止まらなかった。これらのことから、Ca²⁺-calmodulin 依存的な修復機構が存在することが明らかになった。損傷後少し遅れて、細胞骨格のアクチン繊維が損傷部位に集積した。アクチンの阻害剤存在下ではアクチンは損傷部位に集積しなかった。また、この阻害剤存在下では蛍光色素の流入は止まらず、修復ができなかった。さらに、アクチンの上流シグナルが Ca²⁺-calmodulin であることがわかった。損傷穴を塞ぐような膜 (membrane plug) が、Ca²⁺依存的に新たに形成されることも明らかになった。以上の結果を総合して、Ca²⁺-calmodulin 依存</p>	

(様式 9 号)

的な修復機構が緊急の membrane plug を形成し (第 1 ステップ), その後アクチン重合に伴う完全な membrane plug 形成 (第 2 ステップ) が起こるという 2-ステップモデルを新規に提案した。

公聴会における主な質問内容は, 損傷穴の大きさに依存して修復機構が異なる可能性はないか, カエル卵のような大きな細胞の傷修復の機構が粘菌細胞で大きな傷をつけた場合現れることはないか, step1 の緊急 membrane plug 形成は calmodulin に依存しないのか, de novo 小胞形成の証拠は何か, 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)

M. S. U. Talukder, M. S. Pervin, M. I. O. Tanvir, K. Fujimoto, M. Tanaka, G. Itoh, and S. Yumura (2020).

Ca²⁺-calmodulin dependent wound repair in *Dictyostelium* cell membrane
Cells, 9: 1058. doi:10.3390/cells9041058.