

学 位 論 文 要 旨 (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	Dynamics of Myosin II Filaments during Wound Repair in Dividing Cells
氏 名 (Name)	Md. Istiaq Obaidi Tanvir

Cells are always subjected to wound by physical or chemical damages from the external environment. Wound repair of cell membranes is essential for cell survival. The study of wound repair has been conducted on large and small interphase cells of various organisms including *Xenopus* eggs, *Drosophila* embryos, mammalian cells, nematodes, amoebae, budding yeasts, and *Dictyostelium* cells. Myosin II contributes to wound pore closure by interacting with actin filaments in larger cells; however, its role in smaller cells is unclear. In this study, we observed wound repair in dividing cells for the first time. The cell membrane in the cleavage furrow, where myosin II localized, was wounded by laserporation. The wound was confirmed by observing the entry of PI dye through the wound pore from the external media. We observed after wounding, Ca^{2+} immediately entered the cytosol from the external medium, actin transiently accumulated, and myosin II transiently disappeared from the wound site. The initiation of actin and myosin II dynamics at the furrow occurred much later than at the cortexes of interphase and daughter cells which indicating different wound responses of dividing cells from those in interphase cells. However, Ca^{2+} influx from the external medium triggered both actin and myosin II dynamics and free Ca^{2+} concentration higher than 10^{-4} M in the external medium was required for the disappearance of myosin II filaments from the wound site. We also observed, immediately after wounding, calmodulin (a Ca^{2+} binding messenger protein) accumulated at the wound site, and inhibition of calmodulin reduced both actin and myosin II dynamics. These results indicate that both myosin II and actin dynamics are regulated by Ca^{2+} and calmodulin. We also observed, actin accumulated at the wound site normally in myosin II-null cells while myosin II disappearance was prolonged in the presence of actin filament stabilizing drug Jasplakinolide, suggesting that actin dynamics are independent of that of myosin II and the disappearance of myosin II depends on actin accumulation. However, the wound closure time in myosin II-null cells was the same as that in wild-type cells, suggesting that myosin II is not essential for wound repair. We also found that GFP-3ALA myosin II filaments and GFP-E476K (motorless) myosin II filaments disappeared in a manner similar to that of wild-type myosin II, suggesting that the disassembly of myosin II filaments by phosphorylation and the motor activity did not contribute to their disappearance, therefore indicating a novel mechanism for myosin II delocalization from the cortex.

Furthermore, we observed that several furrow-localizing proteins such as GAPA, PakA, myosin heavy chain kinase C, PTEN, and dynamin disappeared upon wounding and among the mutant cells deficient in individual proteins expressing GFP-myosin II, only the initiation time of GAPA-null cells was significantly earlier than that of wild-type cells, suggesting that GAPA was responsible for the delay in the initiation time of myosin II dynamics at the furrow. We also observed that upon inhibition of calmodulin, GFP-GAPA dynamics was significantly affected at the wound site indicating that calmodulin regulates myosin II dynamics via the regulation of GAPA activity at the wound site. Together, we proposed possible mechanisms of myosin dynamics during wound repair.

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. Istiaq Obaidi Tanvir
審 査 委 員	主 査： 祐村 恵彦
	副 査： 村上 柳太郎
	副 査： 堀 学
	副 査： 山中 明
	副 査： 明石 真
論 文 題 目	Dynamics of Myosin II Filaments during Wound Repair in Dividing Cells (分裂細胞における創傷修復時のミオシン II フィラメントのダイナミクス)
<p>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</p> <p>細胞は、常に物理的・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。特に活発に収縮を繰り返す筋肉細胞では常に細胞膜が損傷している。ヒトの場合、細胞膜修復に関与するタンパク質の欠損は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、糖尿病、ビタミン欠乏症、炎症性筋疾患の原因になることがこれまでに報告されている。大きなカエルの卵などの場合、損傷部位にアクチンとミオシンからなる収縮環様構造が形成され、その収縮が損傷穴を閉じると考えられている。しかし、哺乳類の細胞や細胞性粘菌などの小さな細胞ではアクチンのみが損傷部位に集積し、ミオシンは集積しない。よって、小さな細胞の損傷修復の分子機構は、大きな細胞とは異なっていることが予想される。本研究では、独自の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、特にミオシンに注目して調べた。また、本研究では初めて分裂細胞の修復機構について調べた。分裂期の細胞のくびれ部分にはミオシン II フィラメントが集積することが知られている。この部位の細胞膜に穴を開けたところ、アクチンは集積したが、ミオシンはその部位から消失した。ミオシンの消失は、細胞外からの Ca^{2+} の流入がトリガーになっていた。また、Ca^{2+} 結合タンパク質のカルモジュリンがミオシン消失に必要であった。ミオシンの消失には、ミオシンのリン酸化は必要なかったため、従来ミオシンが表層から解離するために必要と考えられていたリン酸化による脱重合モデルに依らない方法で表層から解離しており、新規なモデルを提案した。また、分裂のくびれ部分に集合する他のタンパク質も、ミオシンと同様に損傷部位から消失した。これらのタンパク質のうち、低分子量 G タンパク質</p>	

(様式 9 号)

の制御をする GAPA がミオシンより早く消失し、欠損細胞はミオシンの動態に変化を与えることが分かった。以上の結果から、分裂細胞の分裂面の細胞膜では、損傷時に細胞外からの Ca^{2+} の流入がトリガーとなり、カルモジュリンを経由して GAPA がミオシンの消失を制御していることが明らかになった。

公聴会における主な質問内容は、ミオシンフィラメントが損傷部位から排除されるメカニズムは分子サイズに依存するという可能性はないか、分裂細胞を使う優位性は何か、蛍光タンパク質は過剰発現されていないか、ミオシンフィラメントが損傷部から除かれるのは、損傷修復にとって必須なのか、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）

Md. Istiaq Obaidi Tanvir, Go Itoh, Hiroyuki Adachi and Shigehiko Yumura (2021).
Dynamics of Myosin II Filaments during Wound Repair in Dividing Cells
Cells, 10, 1229; doi:10.3390/cells10051229