

論文要旨等報告書

氏	石田 展久
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 乙 第 4 3 5 8 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	Dynamain 2 associates with microtubules at mitosis and regulates cell cycle progression(ダイナミン2は細胞分裂期において微小管と結合し、細胞周期の進展を調節する)
論文審査委員	教授 山本 敏男 教授 北山 滋雄 教授 竹居 孝二

学位論文内容の要旨

[緒言] Dynamain は分子量約 100kD の大型 GTPase で微小管タンパク質として発見されたが、現在はクラスリン依存性エンドサイトーシスに機能する蛋白と知られている。Dynamain は哺乳類で3つのアイソフォームを持つ。Dynamain 1 は神経特異的に発現し、Dynamain 2 は全ての体細胞において発現が認められ、Dynamain 3 は神経および精巣での特異的な発現が報告されている。Dynamain のドメイン構造は全てのアイソフォームで保存されており、N 末端側から GTPase ドメイン、Middle ドメイン、Pleckstrin・homology (PH) ドメイン、GTPase effector ドメイン(GED)、および C 末端の proline/arginine・rich (PR) ドメインの5つのドメインから構成されている。近年 Dynamain は細胞の中心体に局在することや微小管と結合して細胞分裂・細胞周期に関与するといった研究が報告されているが、詳しいメカニズムは解っていない。そこで本研究において Dynamain の細胞分裂期中における機能と動態について、主に微小管/チューブリンとの結合が報告されている Middle ドメインと PR ドメインに注目し、細胞分裂期の HeLa 細胞を用いて免疫蛍光染色、免疫電子顕微鏡による観察、Dynamain の欠損型変異体を使用した機能解析などを行った。

[材料と方法] 本研究では細胞分裂期の細胞を集めるため、S 期同調培養法にて HeLa 細胞を培養した。同調培養にはチミジン・ヒドロキシウレアの W ブロックによる S 期同調法を行った。分裂期における Dynamain の特異的な局在を明らかにするために、蛍光免疫染色法による形態観察を行った。また、特異的な微小管への結合を観察するため、TritonX-100 による界面活性剤処理による細胞内の可溶性蛋白質を除去後、蛍光免疫染色/免疫電子顕微鏡解析を行った。さらに微小管が重合、脱重合した状態における Dynamain への影響を調べるために、微小管脱重合阻害剤と微小管重合阻害剤を使用し、Dynamain の局在、動態変化を観察した。Dynamain と微小管の結合が細胞周期の進行に必要かどうかを調べるために、Dynamain の deletion mutant(欠損型変異体)発現ベクターを作製した。作製したプラスミドベクターを導入し、Dynamain のドメインを欠損させることなどのように細胞分裂と関わるか、その影響を調べた。

【結果】 細胞分裂期における Dynamin の局在を間期から細胞質分裂期の各ステージで観察した。間期では細胞質全体に、前期においては中心体にも認識され、中期・後期では分裂紡錘(微小管)に特異的に認められた。また細胞質分裂期には mid body にも確認された。TritonX-100 処理を行った形態観測では可溶性蛋白の除去により中期・後期ではさらに明確に分裂紡錘に局在を確認でき、細胞質分裂期でも mid body にシグナルを確認することが出来た。電子顕微鏡観察においても微小管周囲に Dynamin が確認された。一方、微小管重合阻害剤処理を施行した場合、分裂紡錘は形成されず Dynamin のシグナルも特定出来なかった。Dynamin の機能解析として作製した欠損型変異体では、PR ドメインを欠損した Δ PR ドメインでは分裂紡錘に Dynamin のシグナルは特定出来ず、Middle ドメインを欠損した Δ Middle ドメインでは中心体への局在が認められなかった。これらの変異体が細胞周期にいかに関与するかを観察するため Mitotic Index を調べた。その結果 Δ Middle ドメインでは分裂前期～終期の細胞数は減少し、 Δ PR ドメインと Dynamin のドミナントネガティブ変異体である K44A では細胞質分裂期の細胞数が増加していた。一方、 Δ PR ドメインが K44A と同様にエンドサイトーシスを阻害するかをトランスフェリンの取り込みで観察したが、エンドサイトーシスには影響していなかった。

【考察】 本研究から Dynamin が細胞分裂期において分裂紡錘および mid body に局在し、PR ドメインを介して微小管に結合していることがわかった。Dynamin が分裂紡錘または中心体に結合してどのように細胞周期に機能しているかを考察した。 Δ Middle ドメインでは中心体を認識できず Mitotic Index の結果より分裂前期～終期の細胞数が低下したことから、Dynamin の中心体への局在が細胞分裂期への進入に必要であると考えられた。 Δ PR ドメインでは分裂紡錘への局在が認められなかったが、Mitotic Index の結果から細胞分裂は途中で停止しておらず、細胞質分裂期で細胞周期を停止していると考えられた。このため、Dynamin は PR ドメインを介して微小管に結合することで細胞質分裂に寄与していると考えられる。エンドサイトーシスを阻害する Dynamin 変異体である K44A でも Δ PR ドメインと同様に細胞質分裂期の細胞数が増加していたが、 Δ PR ドメインではトランスフェリンの取り込みを停止していなかった。このことから、Dynamin は細胞質分裂期においてエンドサイトーシスと微小管という二つの側面から細胞質分裂を制御していると考えられた。