

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07004

研究課題名(和文)ダイナミンによる微小管ダイナミクスの新しい制御機構の解明

研究課題名(英文)The novel mechanism of regulation of microtubule dynamics by dynamin

研究代表者

濱生 こずえ (Hamao, Kozue)

広島大学・理学研究科・准教授

研究者番号：10403578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダイナミンは微小管結合タンパク質として発見されたが、微小管に結合したダイナミンの機能は不明である。本研究はダイナミンによる微小管制御機構の解明を目的とした。ダイナミン発現抑制は微小管を安定化すること、ダイナミンによる微小管制御にPR領域は必要でないが、GTPase, middle, PH, GEの4つの領域は必要であることを明らかにした。また、微小管安定化ダイナミン変異体の過剰発現は微小管伸長端結合タンパク質CLIP170やCLASP2を変化させず、EB1の染色強度を増加させることを明らかにした。本研究により、ダイナミンは自身のGTPase活性やEB1を介して微小管を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dynamin has been firstly identified as a microtubule-associated protein. However, the function of dynamin bound to microtubules is still unknown. This study aimed to elucidate the molecular mechanism of microtubule regulation by dynamin. It was revealed that depletion of dynamin stabilizes microtubules and the stabilized microtubules in dynamin-depleted cells are decreased by overexpression of GFP-dynamin-wild type or proline rich-deleted dynamin. On the other hand, overexpression of each GFP-dynamin mutant without GTPase, middle, plekstrin homology or GTPase effector did not decrease the stabilized microtubules. In addition, it was showed that overexpression of dynamin mutant capable of stabilizing microtubules increases the staining of EB1, one of microtubule plus-end tracking proteins, without changing the CLIP-170 or CLASP2. This study suggests that dynamin could regulate microtubules through its own GTPase activity and EB1.

研究分野：細胞生物学, 生化学

キーワード：ダイナミン 微小管 ダイナミクス

## 1. 研究開始当初の背景

ダイナミンは微小管結合蛋白質としてウシ脳から初めて精製され (Shpetner and Vallee, 1989, Cell, 59(3):421-32), プロリンリッチドメイン (PRD) で微小管と結合することが *in vitro* で明らかにされていた (Herskovits *et al.*, 1993, Proc Natl Acad Sci U S A, 90(24): 11468-72)。しかし、微小管と結合したダイナミンの機能については、不明のままであった。ダイナミンと微小管の相互作用について明らかにされていた事項を次の(1)~(6)で示す。

### (1) ダイナミンは分裂期微小管と共局在する。

間期のダイナミンは微小管との共局在が観察されない (Damke *et al.*, 1994, J Cell Biol, 127(4):915-34) が、分裂期のダイナミンが中央微小管と共局在する (Hamao *et al.*, 2009, Exp Cell Res, 315(7): 1336-45)。

### (2) ダイナミン PRD の N 末領域が微小管結合必須部位であり C 末領域が微小管結合阻害部位である。

我々は、ダイナミン PRD の C 末側の欠失変異体 (I-786) が間期の微小管と共局在すること、野生型ダイナミンやダイナミンの PRD 全領域の欠失変異体 (I-745) では、間期の微小管と共局在しないことを明らかにした (図 1)。このことから、「ダイナミン PRD の N 末領域が微小管結合部位であり、C 末領域は微小管阻害部位である」ことを初めて見出した (Hamao *et al.*, 2009, Exp Cell Res, 315(7): 1336-45)。

### (3) 分裂期中期のダイナミンは微小管結合能が低い。

申請者らは、間期と分裂期でダイナミンへのリン酸化能を比較し、分裂期でダイナミンのリン酸化活性が高いことを明らかにした。また、分裂期のリン酸化活性の大部分は *cdc2* キナーゼによるものであり、*cdc2* によりリン酸化されたダイナミンは微小管結合能が低くなることを明らかにした。 (Morita *et al.*, 2010, J Biochem, 148(5):533-8)。

### (4) ダイナミンは CMT 病の原因遺伝子である。

CMT 病 (シャルコー・マリー・トゥース病) は末梢神経障害を示す遺伝性の難病である。その原因遺伝子の一つとしてダイナミンが同定された。CMT 病のダイナミン変異体は、培養細胞内で微小管を安定化した (Züchner *et al.*, 2005, Nat Genet, 37(3): 289-94)。

### (5) ダイナミンの発現抑制は間期微小管を安定化する。

ダイナミンを siRNA により発現抑制すると、間期微小管から微小管伸長端マーカーである EBs の局在が減少した。また、間期微小

管の伸長速度、伸長頻度が減少した (Tanabe, 2009, J Cell Biol, 185(6): 939-48)。

### (6) ダイナミンは微小管伸長端結合タンパク質である。

申請者らは、微小管結合型変異体であるダイナミン-(I-786) を用いて、ライブセルイメージングを行った。その結果、ダイナミンが微小管伸長端マーカーである EBs と同様の動きをすること、ダイナミン GTPase 活性阻害剤により微小管の伸長が阻害されることを明らかにした (申請者ら、投稿準備中)。この結果は、「ダイナミンが微小管の伸長端に結合する」という申請者の新しい発見である。

## 2. 研究の目的

背景 1~6 から、「ダイナミンが微小管伸長端結合タンパク質として微小管伸長を制御する」可能性を考え、本研究では、ダイナミンによる微小管ダイナミクスの制御機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内でのダイナミンによる微小管ダイナミクスの実態解析

#### A. ダイナミン発現抑制による微小管ダイナミクスへの影響

HeLa 細胞でダイナミンを発現抑制させ、微小管安定化マーカーであるアセチル化チューブリンと脱チロシン化チューブリンの量を測定した。また、新しく重合された微小管のマーカーであるチロシン化チューブリンの量も測定した。さらに、オフターゲット効果を否定するために、ダイナミン発現抑制細胞に GFP-ダイナミン-野生型を発現させ、アセチル化チューブリンの量の測定を行った。

#### B. ダイナミン変異体を用いた微小管ダイナミクスの解析

ダイナミンの微小管制御における機能ドメインを明らかにするために、ダイナミン発現抑制細胞にダイナミンの各機能ドメインを欠失させた GFP-ダイナミン変異体を発現させ、アセチル化チューブリンの量を測定した。本研究で使用した GFP-ダイナミン変異体は図 1 の通りである。

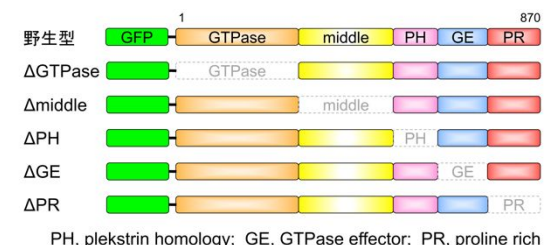


図 1 本研究で使用した GFP-ダイナミンコンストラクト

## (2) ダイナミンによる微小管ダイナミクス制御の分子メカニズムの解明

ダイナミンによる局在が制御される微小管伸長端結合タンパク質を同定するために、微小管安定化ダイナミン変異体(GFP-ダイナミン-555 $\Delta$ 3)を過剰発現させた細胞を、微小管伸長端結合タンパク質 EB1, CLIP-170, CLASP2 の抗体を用いて間接免疫蛍光抗体染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞内でのダイナミンによる微小管ダイナミクスの実態解析

##### A. ダイナミン発現抑制による微小管ダイナミクスへの影響

ダイナミンによる微小管制御を明らかにするために、ダイナミンを発現抑制させた HeLa 細胞の安定化微小管の量を解析した。安定化微小管マーカーとしてアセチル化チューブリン, 脱チロシン化チューブリンを、新たに重合した微小管のマーカーとしてチロシン化チューブリンを解析した。その結果、ダイナミン発現抑制はチロシン化チューブリンを変化させないが、アセチル化チューブリンと脱チロシン化チューブリンを増加させた。また、ダイナミン発現抑制により増加したアセチル化チューブリンは、GFP-ダイナミン野生型の発現により減少した。この結果から、ダイナミンの発現抑制は微小管を安定化させること、つまりダイナミンは通常微小管を不安定化(ダイナミックに)することが明らかになった。

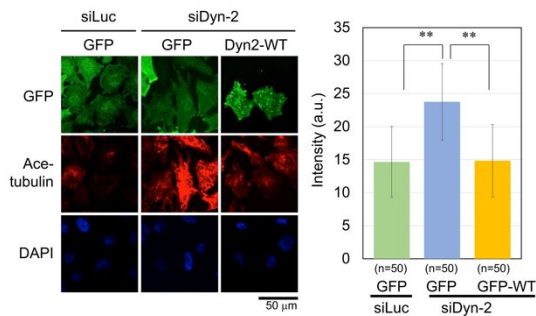


図2 ダイナミン発現抑制による安定化微小管への影響

ダイナミン siRNA (siDyn)またはルシフェラーゼ siRNA (siLuc)と同時に GFP または GFP-ダイナミン野生型 (Dyn-WT)を導入した細胞でのアセチル化チューブリン(Ace-tubulin)を染色した。アセチル化チューブリンの蛍光強度を測定した。グラフは平均値  $\pm$  標準偏差で示す。\*\*P<0.01 (Student's t-test)

##### B. ダイナミン変異体を用いた微小管ダイナミクスの解析

ダイナミンによる微小管制御に必要なダイナミンの機能ドメインを同定するために、

ダイナミン発現抑制細胞に各ドメインを欠失させた GFP-ダイナミン変異体を発現させ、アセチル化チューブリンを解析した。その結果、ダイナミンの GTPase, middle, plekstrin homology (PH), GTPase effector (GE)の4つのドメインをそれぞれ欠失させた変異体は、ダイナミン発現抑制により増加したアセチル化チューブリンを減少させなかった。一方、プロリンリッチ(PR)ドメインを欠失させた GFP-ダイナミン- $\Delta$ PR は、ダイナミン発現抑制により増加したアセチル化チューブリンを約50%減少させた。以上の結果から、ダイナミンによる微小管制御に PR ドメインは重要でないこと、GTPase, middle PH, GE の4つのドメインは必要であることが明らかになった。

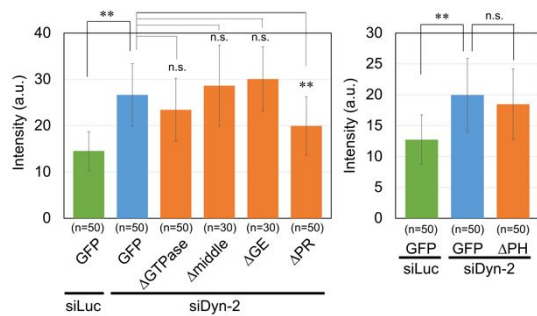


図3 ダイナミン変異体によるレスキュー実験

ダイナミン siRNA (siDyn)またはルシフェラーゼ siRNA (siLuc)と同時に GFP または GFP-ダイナミン変異体を導入した細胞を用いてアセチル化チューブリン(Ace-tubulin)を染色し、アセチル化チューブリンの蛍光強度を測定した。グラフは平均値  $\pm$  標準偏差で示す。\*\*P<0.01 (Student's t-test)

middle ドメインと GE ドメインはダイナミンが立体構造を構築するために必要であること、ダイナミンのオリゴマー形成がダイナミンの GTPase 活性を上昇させることから、ダイナミンは微小管制御にダイナミンの GTPase 活性が必要である可能性が示唆された。この仮説を明らかにするために、ダイナミンの GTPase 活性阻害剤により安定化微小管が増加するかを調査した。その結果、ダイナミン阻害剤を72時間作用させた HeLa 細胞では、DMSO 処理72時間の HeLa 細胞と比較してアセチル化チューブリンが増加した。このことから、ダイナミンの GTPase 活性が微小管制御に必要であることが明らかになった。

## (2) ダイナミンによる微小管ダイナミクス制御の分子メカニズムの解明

ダイナミンによる微小管制御に関与する微小管伸長端結合タンパク質を同定するために、微小管を安定化するダイナミン変異体(555 $\Delta$ 3)を HeLa 細胞で過剰発現させ、微小管

伸長端結合タンパク質 (EB1, CLIP170, CLASP2)への影響を解析した。CLIP170 や CLASP2 の局在や染色強度は野生型ダイナミン発現細胞とダイナミン-555Δ3 発現細胞で変化しなかったが, EB1 の染色強度はダイナミン-555Δ3 発現細胞において野生型ダイナミン発現細胞より増加した。以上の結果から, ダイナミンは EB1 を介して微小管を制御している可能性が示唆された。

以上のように, 本研究はダイナミンが自身の GTPase 活性や EB1 を介して微小管を制御する可能性を見出した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1) Tomo Kondo, Morihiko Okada, Kayo Kunihiro, Masayuki Takahashi, Yoshio Yaoita, Hiroshi Hosoya, Kozue Hamao, Characterization of myosin II regulatory light chain isoforms in HeLa cells. Cytoskeleton (Hoboken), 72 巻 12 号, 査読有, 2015, pp609-620

[学会発表](計8件)

1) Taichiro Ono, Masaya Matsushita, Kozue Hamao, ROCK regulates cytokinesis through phosphorylation of ZIP kinase, ASCB|EMBO meeting 2017, December 2-6, 2017, Philadelphia, PA, Pennsylvania convention center, USA

2) 小野太一郎, 松下将也, 濱生こずえ, ZIPK のリン酸化はROCKによる細胞質分裂の制御に必要である, 日本動物学会第88回大会, 2017年9月21日~23日, 富山, 富山県民会館

3) 小野太一郎, 松下将也, 濱生こずえ, Rho キナーゼと ZIP キナーゼによる細胞質分裂の制御機構, 2017 年度 生物系三学会中国四国支部 高知大会, 2017 年 5 月 13 日~14 日, 高知, 高知大学朝倉キャンパス

4) 小野太一郎, 松下将也, 濱生こずえ, ZIP kinase と Rho kinase による収縮環収縮の制御機構の解析, 2017 年度 日本動物学会中国四国支部 広島県例会, 2017 年 3 月 9 日, 東広島, 広島大学東広島キャンパス

5) Mikiko Nakagushi, Kozue Hamao, Regulation of microtubules by dynamin-2 in HeLa cells, ASCB meeting 2016, December 3-7, 2016, San Francisco, CA, Moscone center, USA

6) 近藤興, 寺井はるひ, 細谷浩史, 濱生こずえ,

え, HeLa 細胞におけるミオシン II 調節軽鎖アイソフォームの機能解析, 第 68 回日本細胞生物学会大会 2016 年 6 月 15 日~17 日, 京都, 京都テルサ

7) 中串実姫子, 濱生こずえ, HeLa 細胞におけるダイナミンによる微小管ダイナミクス制御の解析, 2016 年度 日本動物学会中国四国支部 広島県例会, 2016 年 3 月 2 日, 東広島, 広島大学東広島キャンパス

8) 寺井はるひ, 濱生こずえ, 細胞伸展におけるヒト MRLC アイソフォームの機能解析, 2016 年度 日本動物学会中国四国支部 広島県例会, 2016 年 3 月 2 日, 東広島, 広島大学東広島キャンパス

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

広島大学大学院理学研究科生物科学専攻  
細胞生物学研究室(千原研究室)  
<http://chihara-lab.hiroshima-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

濱生 こずえ (HAMAOKOZUE)  
広島大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 10403578

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )