

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570218

研究課題名(和文)細胞質分裂におけるダイナミンファミリー分子の機能と分子機作

研究課題名(英文)Function and dynamics of dynamin family in cytokinesis

## 研究代表者

祐村 恵彦(yumura, shigehiko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70183986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ダイナミンは、細胞膜動態に関与する重要なタンパク質である。近年、ダイナミンは細胞質分裂にも関与することが示されてきており、その阻害剤は、細胞質分裂を標的とした新しいクラスの抗癌剤として注目されている。本研究では、細胞質分裂におけるダイナミンの役割を明らかにすることを目的にした。ダイナミン遺伝子を欠損する細胞では細胞質分裂が異常になり、ミオシンIIやアクチンが分裂面に正常に集合できなかった。また、これらのダイナミンは分裂面に集まった。さらにダイナミンが収縮環のアクチンの安定化に関与することが分かった。以上から、ダイナミンが細胞質分裂に関与する新たな分子機構を提案した。

研究成果の概要(英文)：Dynamin is an important protein to cut the vesicles from the cell membrane during endocytosis. Recently, dynamin has shown to play an important role on cytokinesis, which is a final stage of cell division. Inhibitors against dynamin, which can be used for targeting cytokinesis of cancer cells, are new potent and attractive anti-cancer reagents. This study clarified the function and dynamics of dynamin in cytokinesis of cellular slime mold cells, a model organism for cytokinesis. Dynamin null cells showed severe defects in cytokinesis, resulting in their multinucleation. Actin and myosin II could not recruit at the cleavage furrow properly. GFP-tagged dynamins accumulated to the cleavage furrow. We found that dynamins contribute to stabilization of actin in the contractile ring. Together, we proposed a new model for the role of dynamin in cytokinesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ダイナミン 細胞質分裂 アクチン ミオシン 細胞性粘菌

## 1. 研究開始当初の背景

ダイナミンファミリーは、その相同性からクラシカルダイナミンとダイナミン様タンパク質から成るタンパク質群で、膜からの小胞切り出し時にそのくびれ部分に集合し、らせん構造もしくはリング構造を形成し、ねじれの力を発生させる分子モーターである。ダイナミンは GTPase 活性を持っており、GTP の分解時にこの力が生じる。ダイナミンは、飲作用や食作用などのエンドサイトーシス、ゴルジ装置からの膜輸送だけでなく、細菌やウイルスのヒト細胞への侵入、神経シナプスでの情報伝達にも関与する。ダイナミンの細胞質分裂への関与は、ショウジョウバエ、線虫、動物培養細胞、植物細胞で報告があるが、その分子機作については、細胞骨格との関連が予想されるが不明な点が多い。

我々は、細胞質分裂時にミオシン II やアクチンがどのように分裂装置である収縮環を形成するかを従来研究してきた。細胞質分裂には細胞骨格だけでなく細胞膜の動態も重要な要素であるので、膜の動態に重要なダイナミンに焦点を当てて、細胞骨格との関連について研究を推進したいと考えた。

## 2. 研究の目的

我々のプレリミナリーな観察からダイナミン欠損細胞で、細胞質分裂異常がみられ、ミオシン II の集合異常が見られたことから、ダイナミンがミオシン II の集合の制御に関わっていると考えられた。この仮説のもと、まずミオシン II の集合異常が、どのような過程で起こるのかを生きた細胞内で明らかにする。また、ダイナミンが分裂面に集合する動態の観察を、1 分子観察を含めて行なう。さらに、ダイナミンが直接ミオシン II に結合するかを調べる。ミオシン II がダイナミン内のどのドメインに結合するか、またダイナミン分子内の各ドメインの役割について調べる。これらにより、ダイナミンがどのようにミオシン II を制御し、細胞質分裂に関与するのかを分子レベルで明らかにする。

細胞質分裂は、アクチンとミオシン II から成る収縮環による物理的な力を必要とするが、膜動態に関与するクラスリンなどの欠損細胞でも細胞質分裂欠損が起こることから、細胞質分裂には膜の動態も必要であると考えられる。分裂時の膜の動態については、分裂面でエクソサイトーシスが活発に起こって、膜成分が供給されており、一方それに伴うエンドサイトーシスも必要であることが示唆されてきている。両極から分裂面へ向けての膜の流動も膜供給に関与するという考えもある。本研究では、ダイナミン欠損細胞と正常細胞とで、新規のプロープを用いて細胞膜の脂質の動態を可視化して、その動態

にダイナミンがどのように関与するかについても明らかにする。

以上により、ダイナミンが細胞質分裂に関与する分子機作に細胞骨格と膜の両者から迫りたい。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、細胞質分裂や細胞運動のモデル生物である細胞性粘菌の細胞を用いた。細胞は HL5 培養液を用い、シャーレ内で培養する静置培養とフラスコ内での震盪培養のいずれかで行った。

(2) 細胞性粘菌の野生型 Ax2 とダイナミン欠損変位株を用いた。これらの細胞に GFP-ABD、GFP-DlpA、GFP-DlpB の expression vector を形質導入した。

(3) GFP-DlpA、GFP-DlpB の expression vector の作成は、cDNA ライブラリーからそれぞれの遺伝子を PCR で増幅し、GFP ベクターに連結させた。

(4) ダイナミンの阻害剤 Dynole、アクチンの阻害剤 Latrunculin B は、DMSO に溶解して指定の濃度で用いた。

(5) 蛍光抗体法のためには、ホルマリンを含むエタノール (-15 ) で細胞を固定し、リン酸緩衝液で洗った後、各ダイナミン特異的抗体、抗ミオシン抗体で蛍光染色した。また、同じ固定法で、蛍光ファロイジンでアクチン繊維を染色し蛍光顕微鏡で観察した。核数を調べるためには、細胞をホルマリンで固定後、DAPI で染色した。

(6) TRITC-DNase1 でアクチン繊維の末端を染色するためには、細胞をカバーガラスに接着させた後に Triton X100 含む緩衝液で処理して細胞骨格にした後、TRITC-DNase1 を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

(7) ライブイメージングのためには、共焦点レーザー顕微鏡もしくは、全反射蛍光顕微鏡を用いた。GFP の観察のためには、ブルーレーザーを用いた。

(8) 細胞の細胞骨格成分を得るために、細胞を Triton X100 を含む緩衝液で処理し、SDS PAGE を行い、さらに Western Blot をおこなった。各ダイナミン特異的抗体で染色し、バンドの定量を Image J で行った。

(9) 蛍光退色後の蛍光回復 (FRAP) 実験は、GFP-ABD (アクチン繊維のマーカー) を発現した細胞で、分裂面をレーザーで退色させ、その後の蛍光の回復時間を調べた。

(10) 電子顕微鏡試料作成のため、様々な

化学固定法、もしくは急速凍結法を行なった。化学固定としては、従来法のグルタルアルデヒド、オスミウム酸の2重固定をベースに様々な条件を調べた。急速凍結についても、アクチン繊維などが明瞭に観察できる条件設定を行なった。

#### 4. 研究成果

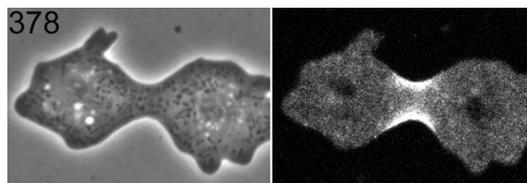
(1) 細胞性粘菌のゲノムには、ダイナミンもしくはダイナミン様タンパク質は5つあり、DymA, DymB, DlpA, DlpB, DlpCである。それらのすべての欠損変異体の増殖について調べた。その結果、DymA, DlpA, DlpB 欠損細胞では、懸濁培養では増殖異常が見られた。しかし、シャーレで静置培養した時にはすべての変異体で増殖は正常であった。

(2) 懸濁培養した、これら3つの細胞の核を DAPI で染色したところ、多核になっており、細胞質分裂に異常があることがわかった。

(3) 新規のダイナミン阻害剤 dynole の提供を受けて、この阻害剤の細胞増殖に対する効果を調べたところ、懸濁培養条件で、濃度依存的に増殖阻害がみられ、細胞が多核化していたことから、ダイナミンを阻害することで、細胞質分裂の阻害が起こったと考えられた。この阻害剤がダイナミンの特異的阻害剤として使用できることがわかった。

(4) DymA, DymB, DlpA, DlpB の抗体を用いて蛍光抗体法により、それらダイナミンの細胞内分布を調べたところ、DymA, DlpA, DlpB は、細胞分裂時、分裂溝に集合することが明らかになった。DlpB については、分裂溝に集合することはなく、細胞質に拡散して存在していた。

(5) 生きた細胞内での、これらのダイナミンの動態を観察するために、GFP-DymA, GFP-DlpA, GFP-DlpB 発現コンストラクトを作成し、細胞に形質導入した。分裂面に収縮環ができる時期から、GFP-DlpA と GFP-DlpB が分裂溝に集まる様子をとらえることができた。GFP-DymA については、今のところ、分裂面に集合するのは見られていない。



(上図は GFP-DlpA が分裂面に集合していることを示している。)

(6) ダイナミン欠損細胞のうち、DymA, DlpA で、分裂溝にミオシンが正常に集まらないことが分かった。

(7) ダイナミン欠損細胞で、ミオシンが正常に分裂面に集合できないことから、ダイナミンとミオシン II との相互作用が考えられたので、ミオシン欠損細胞へ GFP-DlpA を形質導入したところ、GFP-DlpA は正常に分裂面に集合することができたので、GFP-DlpA はミオシン非依存的に分裂面に集合すると考えられる。

(8) 次に、ミオシンと相互作用するアクチンとダイナミンの関連について調べた。細胞を界面活性剤である Triton X100 で処理して細胞骨格にし、ダイナミン特異的抗体で染色しても、DlpA, DymA は分裂面の局在が観察された。さらに、細胞を Triton X100 で処理して細胞骨格にし、SDS 電気泳動後、ダイナミン特異的抗体 (Anti-DlpA と Anti-DymA) で Western Blot を行なった。全細胞のうち、細胞骨格成分に DlpA は 87%, DymA は 41% 残ることが分かり、特に DlpA は細胞骨格に結合していることが示唆された。

(9) 分裂期に GFP-DlpA が分裂面に局在する時に、アクチン阻害剤である Latrunculin B を処理すると、GFP-DlpA の分裂面に局在は失われることが分かった。

(10) TRITC-DNase1 はアクチン繊維の末端に結合することが知られている。分裂期の細胞を染色すると、野生型細胞の分裂面が染色される。DlpA, DymA 欠損細胞で、同じように染色すると、染色の量が有意に増した。これは、野生型に比べ、ダイナミン欠損細胞ではアクチン繊維が断片化していることを示している。

(11) 上記可能性をさらに確かめるため、蛍光退色後の蛍光回復 (FRAP) 実験を行なった。GFP-ABD (アクチン繊維のマーカー) を発現した細胞で、分裂面をレーザーで退色させ、その後の蛍光の回復時間を調べた。野生型のハーフタイムは  $1.1 \pm 0.23$  に対して、DlpA 欠損細胞では  $0.88 \pm 0.17$  と有意に欠損細胞の方が早かった。

(12) 以上の結果から、ダイナミンは分裂面のアクチン繊維の安定化に寄与しているという新しい知見が得られた。

(13) 分裂時期の細胞膜の動態についても、細胞膜の脂質の蛍光プローブを用いて調べた。蛍光プローブは細胞膜の脂質2重層に挿入されると蛍光を発する。細胞膜が染色された後、分裂面に集まることが分かった。

(14) 間期の細胞でもこの蛍光脂質プローブで染色した。細胞膜からハーフタイム5分でエンドサイトーシスにより取り込まれることが分かった。ダイナミン欠損細胞では取り込みが抑制されることもわかった。

(15) 細胞運動速度と上記取り込み速度との関連を調べた結果、細胞運動速度が早いほど取り込みが早いことが示された。このことから細胞運動には膜のターンオーバーが重要であることが分かった。

(16) 膜の取り込みの実態を微細構造から研究するために、電子顕微鏡による観察を行った。この時点で問題になったのは、通常の化学固定では、細胞性粘菌の場合、細胞内の繊維構造がうまく保持できないことであった。そこで、急速凍結法を採用することを考え、その条件設定を行った。また、充分満足できる電子顕微鏡像は得られていないが、ある程度方法を確立することができた。今後、ダイナミンの免疫電子顕微鏡観察につなげたい。

(17) 以上得られた結果は、ダイナミンの細胞質分裂に関与する新たな分子機構を明らかにした。

#### 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 4件)

Yumura, S., S. Muranaka, and S. Hashima (2014).  
Myosin II does not contribute to wound repair in *Dictyostelium* cells.  
*Biology Open*, 3 : 966-973.  
doi:10.1242/bio.20149712 (査読あり)

Masud Rana AY, Tsujioka M,  
Miyagishima S, Ueda M, Yumura S. (2013).  
Dynammin contributes to cytokinesis by stabilizing actin filaments in the contractile ring.  
*Genes to Cells*, 18:621-635.  
doi: 10.1111/gtc.12060. (査読あり)

Yumura, S., G. Itoh, Y. Kikuta, T. Kikuchi, T. Kitanishi-Yumura, and M. Tsujioka (2013).  
Cell-scale dynamic recycling and cortical

flow of the actin-myosin cytoskeleton for rapid cell migration.

*Biology Open*, 2:200-209.

doi: 10.1242/bio.20122899. (査読あり)

Tsujioka M., Yumura S., Inouye K., Patel H., Ueda M., Yonemura S. (2012).  
Talin couples the actomyosin cortex to the plasma membrane during rear retraction and cytokinesis.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*: 109:12992-12997.  
doi:10.1073/pnas.1208296109. (査読あり)

[学会発表](計 23件)

藤本甲子郎・祐村恵彦  
細胞質分裂とエンドサイトーシスにおけるダイナミンの役割 日本分子生物学会 (2014.12.16)「パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市」

杉山達郎・祐村恵彦  
微小管とイノシトールリン脂質を介したBleb形成の制御機構 日本分子生物学会 (2014.12.16)「パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市」

Sarowar Jahan・Shigehiko Yumura  
Comparison of traction force among three modes of cytokinesis in *Dictyostelium*. 日本分子生物学会 (2014.12.16)「パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市」

藤本甲子郎・Masud Rana・祐村恵彦  
Role of dynammin in cytokinesis and endocytosis of *Dictyostelium discoideum*. 日本細胞生物学会 (2014.6.11)「奈良県新公会堂, 奈良県奈良市」

菊池武臣・桑山秀一・辻岡政経・祐村恵彦  
細胞性粘菌の細胞運動時における細胞膜動態の役割 日本細胞生物学会 (2014.6.11)「奈良県新公会堂, 奈良県奈良市」

杉山達郎・祐村恵彦  
Bleb形成の制御機構 日本細胞生物学会 (2014.6.11)「奈良県新公会堂, 奈良県奈良市」

祐村恵彦  
収縮環形成時のアクチン, ミオシンのダイナミクス 日本分子生物学会 (2013.12.6)「神

戸国際会議場，兵庫県神戸市」ワークショップ「細胞分裂の力学的特性を制御する分子機構」(招待講演)

藤本甲子郎・祐村恵彦  
細胞質分裂とエンドサイトーシスにおけるダイナミン様タンパク質 DlpA の動態 日本分子生物学会(2013.12.5)「神戸国際会議場，兵庫県神戸市」

菊池武臣・祐村恵彦  
Dynamics of cell membrane lipid and protein in Dictyostelium discoideum. 日本分子生物学会(2013.12.5)「神戸国際会議場，兵庫県神戸市」

杉山達郎・祐村恵彦  
Search for intracellular signaling for bleb formation. 日本分子生物学会(2013.12.5)「神戸国際会議場，兵庫県神戸市」

藤本甲子郎・祐村恵彦  
細胞質分裂とエンドサイトーシスにおけるダイナミン様タンパク質 DlpA の動態 日本細胞性粘菌学会(2013.10.13)「京都大学，京都府京都市」

杉山達郎・祐村恵彦  
Bleb 形成のシグナル探索 日本細胞性粘菌学会(2013.10.13)「京都大学，京都府京都市」

菊池武臣・祐村恵彦  
早い細胞運動時における細胞膜脂質と細胞膜タンパク質の動態 日本細胞性粘菌学会(2013.10.13)「京都大学，京都府京都市」

祐村恵彦  
収縮環アクチン，ミオシンの動的構築機構 日本動物学会(2013.9.28)「岡山大学，岡山県岡山市」シンポジウム「細胞分裂の最前線」(招待講演)

杉山達郎・祐村恵彦  
Bleb 形成のシグナル探索 日本細胞生物学会(2013.6.19)「名古屋国際会議場，愛知県名古屋市」

Masud Rana・Shigehiko Yumura  
Dynamins take apart in cytokinesis of Dictyostelium by associating with actin filaments. 日本細胞生物学会(2013.6.19)「名古屋国際会議場，愛知県名古屋市」

Masud Rana・Shigehiko Yumura  
Dynamins affect cytokinesis through actin polymerization in Dictyostelium cells. 細胞運動班会議(2013.1.12)「広島大学，広島県東広島市」

Masud Rana・Shigehiko Yumura  
Role of dynamins in Dictyostelium cytokinesis. 日本生化学会(2012.12.14)「福岡国際会議場，福岡県福岡市」

菊池武臣・祐村恵彦  
早い細胞運動における細胞膜の動態 日本生化学会(2012.12.14)「福岡国際会議場，福岡県福岡市」

菊池武臣・祐村恵彦  
細胞膜の動態は早い細胞運動に必要なか？ 細胞性粘菌学会(2012.11.17)「東京大学，東京都目黒区」

① 菊池武臣・祐村恵彦  
Dynamics of cell membrane during fast-cell migration. 日本細胞生物学会(2012.5.28)「神戸国際会議場，兵庫県神戸市」

② Masud Rana・Shigehiko Yumura  
Dynamins affect cytokinesis in Dictyostelium cells. 日本細胞生物学会(2012.5.28)「神戸国際会議場，兵庫県神戸市」

③ 藤本甲子郎・祐村恵彦  
Regulation of cell polarity by myosin II. 日本細胞生物学会(2012.5.28)「神戸国際会議場，兵庫県神戸市」

〔図書〕(計 1 件)  
細胞性粘菌：研究の新展開 阿部知顕・前田靖男編 アイピーシー 3.4 章 細胞運動，分裂の分子モーター：細胞運動，分裂の分子機械 祐村恵彦・上田太郎 p151-174. 2012 年，アイピーシー

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
祐村 恵彦 (YUMURA Shigehiko)  
山口大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：70183986

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
上田 太郎 (UYEDA Taro)  
産業総合研究所 バイオメディカル部門  
総括研究主幹  
研究者番号：90356551