

様式3

令和元年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和3年2月5日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者
所属機関：岡山大学
部局・職名：医歯薬学総合研究科・准教授
氏名：山田浩司

1. 研究課題

ダイナミンによる細胞骨格制御機構とその破綻に関わる病態解明

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 山田 浩司	岡山大学大学院 医歯薬学総合研 究科	准教授	研究全般
研究分担者 竹居 孝二	岡山大学大学院 医歯薬学総合研 究科	教授	電子顕微鏡観察
高島 英造	愛媛大学プロテオ サイエンスセンター	准教授	ダイナミンタンパクの調製

3. 研究成果

別紙のとおり

研究課題名

ダイナミンによる細胞骨格制御機構とその破綻に関わる病態解明

研究者所属 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授 山田 浩司

共同研究者 愛媛大学プロテオサイエンスセンター・准教授 高島 英造

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授 竹居 孝二

研究目的

ほ乳類のダイナミンは、分子量約 100kDa の GTPase であり、細胞膜やアクチン線維上で重合し、自身の GTPase 活性と共役してダイナミックに構造を変化し、細胞膜やアクチン線維を「曲げ」「絞り」「切り」「束ねる」、いわゆるメカノエンザイムとして働くことが知られている。ダイナミンの変異は、シャルコー・マリー・トゥース (CMT) 病を含む一部の遺伝性疾患の原因となっている。本共同研究は、腎臓系球体ポドサイト細胞に発現しているダイナミン1及びダイナミン2の細胞内機能を調べることを目的とした。

研究成果

①ダイナミン1は、腎ポドサイトの微小管束と共局在する。

ダイナミン1は、当初微小管と共に精製されることから微小管結合タンパクとして報告された。しかし、*in vitro* でダイナミン1と微小管の結合は観察されるものの、細胞内でのダイナミン1の微小管への機能は長らく不明であった。

我々は、腎ポドサイト細胞株を用いダイナミン1の局在を精査し、ポドサイトでは、微小管は核から細胞辺縁部に向かって放射状に分布し、多くの微小管は束を形成していることが判明した。この束には、ダイナミン1が局在していた (図1)。

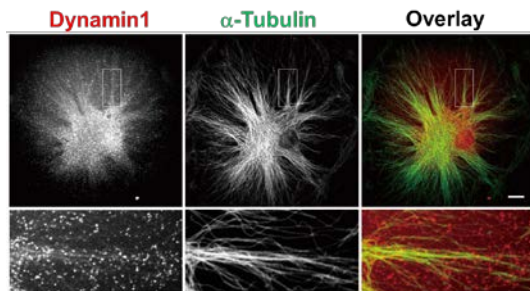


図1. マウスポドサイト細胞株 (MPC) におけるダイナミン1 (左) と微小管 (α チューブリン、中) の局在。免疫蛍光2重染色法を行った。スケール: 20 μ m

②ダイナミン1の発現低下は、微小管束の減少を引き起こす。

ポドサイト細胞株 (MPC) でダイナミン1の発現を RNAi 法で減少させると、微小管束が減少し、微小管が細胞内に散在した (図2)。

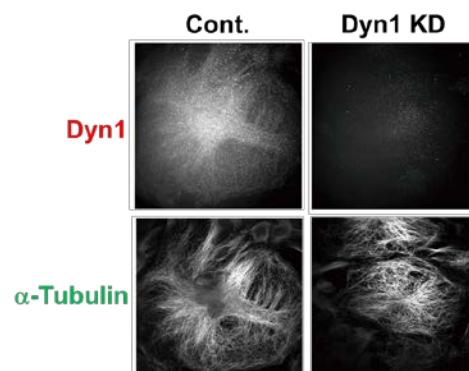


図2. マウスポドサイト細胞株 (MPC) におけるダイナミン1 (上) と微小管 (下) の局在。ダイナミン1に特異的な siRNA を細胞にトランスフェクションした後、ダイナミン1と α チューブリンの抗体を用いて、免疫蛍光2重染色法を行った。コントロール細胞は左 (Cont)、ダイナミン1のノックダウン細胞は右 (Dyn1 KD) に示す。スケール: 20 μ m

③ダイナミン1の細胞内発現量の変化は微小管の安定性に影響する。

ダイナミン1の細胞内発現量を、ダイナミン1の発現プラスミド導入による過剰発現もしくは、RNAi法による発現量の低下にて変化させた。この細胞で、微小管の脱重合剤であるノコダゾールへの感受性を評価した。ダイナミン1を過剰発現した細胞では、ノコダゾール処理による脱重合に耐性をもち残存した微小管束が多数観察され、逆にRNAi法によりダイナミン1の発現が減少した細胞では、ほとんど微小管の束は観察されなかった。これらの結果から、ダイナミン1は、微小管を束ねることで微小管を安定化させ、ポドサイトの形態、機能維持に働いている可能性が示唆された。

成果発表

1. Kohji Takei, The Mon La, Hiromi Tachibana, Shun-AI Li, Tadashi Abe, Sayaka Seiriki, Hikaru Nagaoka, Eizo Takashima, Tetsuya Takeda, Daisuke Ogawa, Katsuhiko Asanuma, Masami Watanabe, Jun Wada, Hiroshi Yamada

第4回ポドサイト研究会「Dynamin 1 is implicated in organisation and stabilisation of microtubules in podocyte」口頭発表予定であったが、コロナ禍のため、中止になった。本発表は、抄録集に掲載されている。

2. 第92回日本生化学会大会 ポスター発表「腎系球体ポドサイトにおけるダイナミンイソフォームの局在と機能」阿部匡史、The Mon La、橘洋美、竹田哲也、竹居孝二、山田浩司

今後の課題

本研究では、ダイナミン1及び2の細胞骨格制御機構の解析を行っている。細胞レベルでダイナミン1の微小管制御の可能性が見出された。なお、本関連研究は、報告書作成時、論文投稿前であったため、2019年度報告書の提出の延期願いを申請した。さらに、本報告書に記載していないがダイナミン2によるアクチン制御機構の解析も並行して進めている。高島博士とともに、ダイナミン2-アクチン線維の構造も明らかにされつつある。今後、議論を進めつつ、さらに研究を遂行する予定である。