

(様式 1-2)

提出日：2020 年 5 月 18 日

2019 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名		クライオ電子顕微鏡・単粒子解析によるダイニンの構造解析	
研究代表者	氏名	昆 隆英	
	所属機関名・部局名	大阪大学・大学院理学研究科	
	職名	教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)		☐	共同研究員
		☐	超高磁場NMR 共同利用研究課題
		☐	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題
		☐	客員フェロー
蛋白研受入担当教員名		加藤 貴之教授	
本研究の目的は、真核生物に普遍的に存在する巨大モーター蛋白質複合体「ダイニン」(分子質量 1~3 MDa) の高分解能構造解析である。ダイニンは、真核生物が生じた初期段階から存在するとされる普遍的な分子モーターであり、細胞内物質輸送・細胞分裂・細胞移動・繊毛運動などの基本的生命活動を駆動する重要な蛋白質複合体である。その細胞内局在と細胞機能から、ダイニンは二種類—「細胞質ダイニン」と「軸糸ダイニン」—に大別される。細胞質ダイニンは、細胞中心方向の物質輸送を一手に担うモーターであり、近年の；線単結晶構造解析法やクライオ電子顕微鏡像単粒子解析法の技術革新に伴い、その全体構造が近原子分解能で明らかにされるに至っている。 一方で、精緻な運動性細胞小器官「繊毛」内に配置され、その波打ち運動を駆動する約 10 種類の軸糸ダイニンについては、それらの高分解能構造は一つも明らかになっていないのが現状であり、本研究ではそれらの構造解析を目指している。 軸糸ダイニンの構造解析を困難にしてきた要因の一つは、その構造的柔軟性である。しかし、申請者らは単離精製条件と電顕グリッド作成条件を徹底的に検討することで、これまで報告されたことのない、軸糸ダイニンの新奇安定構造をネガティブ染色電子顕微鏡法により発見するに至っている。この新奇安定構造をクライオ電子顕微鏡法により明らかにすることを目指している。 4 月から年度末までの期間で、私たちが独自に開発した精製方法で得られた軸糸ダイニンの新奇安定構造をクライオ電子顕微鏡で撮影することができた。しかし、画像解析したところ、壊れた粒子が多かったことが判明した。これまで、生物試料から生化学的に精製しただけであったが、新たに分子遺伝学的に、目的の蛋白質複合体に、アフィニティタグを導入した。そして、そのタグを利用してインタクトな蛋白質複合体を精製する方法に切り替えた。この方法で精製した蛋白質複合体の撮影を行っている。 これと並行して、ダイニンのモータードメインのみの構造解析（尾部を含まない構造）を行っている。私たちは、論文に報告のない新しい条件で、ダイニンのモータードメインを凍結し、Tallos Arctica のクライオ電子顕微鏡で撮影して、画像解析したところ、6 Å 分解能の 3 次元構造を得た。さらに、Titan Krios のクライオ電子顕微鏡で、K3 カメラを利用して、撮影を行ったところ、3・4 Å の分解能で、3 次元構造を得た。そして、この原子モデルを構築した。この結果を、現在、研究論文として、投稿する準備を行っている。			