

(様式 1-2)

提出日：2021 年 5 月 21 日

2020 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<br>(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                     |                   |
| <p>本課題の研究目的は、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「繊毛ダイニン」—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 X 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。</p> <p>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 種類の繊毛ダイニンについては、それらの高分解能構造はようやく 1 つだけの報告があるのみで、それ以外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。</p> <p>繊毛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、繊毛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。本研究課題では、このダイニン複合体の新奇構造・ダイニン中核領域の構造・ルールである微小管の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。</p> <p>本年度の研究では、クライオグリッド作成条件の網羅的スクリーニングと、予備的なクライオ電子顕微鏡像撮影を行った。得られた画像内のダイニン分子の単分散性と粒子密度は良好であったが、予備的な単粒子解析では低空間分解能の構造しか得られなかった。いくつかの状況証拠から判断して、その主原因はカーボン支持膜によるタンパク質サンプルのコントラスト低下にあると推測された。そこで現在、カーボン支持膜なしでのクライオグリッド作成を可能とする高濃度での繊毛ダイニン精製方法の確立・より高いコントラストが期待できる酸化グラフェン膜およびその誘導体膜の導入・表面変性を抑えるクライオグリッド作製法の導入など、タンパク質標品とクライオグリッド作成法の両面からの問題解決を試みている。</p> <p>これと並行して、ダイニンモーター中核領域のクライオ電子顕微鏡像単粒子解析も進めている。本研究チームは、これまでに論文報告されたことのないヌクレオチド結合状態での安定試料調製に成功しており、本年度の研究により近原子分解能の三次元構造を得ることに成功している。現在、本研究成果を研究論文として投稿する準備を進めている。</p> |                             |                   |