

(様式 1-2)

提出日：2021 年 5 月 14 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構造解析で紐解く膜リモデリング分子の作動原理とその破綻に起因する難治性疾患の発症機序		
研究代表者	氏名	竹田哲也	
	所属機関名・部局名	岡山大学学術研究院医歯薬学域（医）	
	職名	助教	
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（研究室名：電子線構造生物学研究室）		
<p>エンドサイトーシスは、細胞膜の形態が顕著に変化するプロセスで、神経伝達や細胞内シグナル伝達、栄養摂取などの多様な細胞現象に関わる。エンドサイトーシスでは、細胞膜の限られた領域が細胞質側に陥入し、くびれ部分が切断されて小胞が分離する。この一連の膜形態変化には、“膜を切る”ダイナミンや、“膜を曲げる”BAR ドメイン蛋白質などの、膜リモデリング分子の協調的な作用が必要である。しかし、ダイナミンや BAR ドメイン蛋白質による膜リモデリングの作動原理は未だに未解明な点が多い。また近年、様々な難治性疾患の発症に、ダイナミンや BAR ドメイン蛋白質の変異が強くリンクすることが明らかになって来た。しかし、疾患型変異がダイナミンや BAR ドメイン蛋白質の膜リモデリング機能に及ぼす影響も不明である。そこで、ダイナミンによる膜切断機構および BAR ドメイン蛋白質によるその制御機構、さらにダイナミンおよび BAR ドメイン蛋白質の異常に起因する難治性疾患の発症機序を、クライオ電子顕微鏡を用いた構造生物学的なアプローチで明らかにすることを目的とし、本研究を計画した。</p> <p>今年度は、ヒト由来ダイナミン2の正常型および先天性ミオパチー変異型（15種）の発現コンストラクトを作成し、大腸菌細胞を用いて発現・精製を行なった。精製した疾患型ダイナミン2についてその性状を <i>in vitro</i> で解析したところ、疾患型ダイナミン2は正常型と比較して、GTP アーゼが恒常的に活性化し GTP 加水分解を介した膜切断機能が亢進していることが明らかになった (Fujise et al JBC 2020)。これらの疾患型ダイナミン2について、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を行うための実験条件を現在検討している。一方、ヒト由来の BAR ドメイン蛋白質 BIN1 の正常型および先天性ミオパチー型変異体についても、大腸菌細胞を用いて発現・精製を行なった。 <i>In vitro</i> 再構成系を用いて膜リモデリング機能を解析したところ、疾患型 BIN1 は膜との親和性が高まり、膜の変形能が亢進することが明らかになった。現在、疾患型 BIN1 についても、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を進めている。</p> <p>新型コロナウイルスの影響により、当初の研究計画の変更を余儀なくされた。そこで今後は、膜リモデリング分子であるダイナミン及び BAR ドメイン蛋白質の単体、リング状複合体、リポソームとの複合体それぞれの構造を、クライオ電子顕微鏡を用いて高分解能で解析する。また、膜リモデリング過程のダイナミン、BAR ドメイン蛋白質のコンフォメーション変化を解析し、膜の変形および切断の作動原理を解明する。さらに、先天性ミオパチーや難治性てんかんなどの神経筋疾患で起こるダイナミンおよび BAR ドメイン蛋白質の変異が、分子構造やコンフォメーション変化に及ぼす影響を解析し、膜リモデリング異常疾患の発症機序をナノスケールで解明する。</p>			
参考文献			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Nishino, I., Noguchi, S., *Takei, K., and *Takeda, T. Mutant BIN1-Dynamin 2 complexes dysregulate membrane remodeling in the pathogenesis of centronuclear myopathy. <i>J. Biol. Chem.</i> 2021; 296: 100077. 2. Fujise, K., Okubo, M., Abe, T., Yamada, H., Takei, K., Nishino, I., Takeda, T. and Noguchi, S. Imaging-based evaluation of <i>DNM2</i> pathogenicity associated with centronuclear myopathy. <i>bioRxiv</i>, doi: https://doi.org/10.1101/2021.03.01.433478, Mar, 2021 			