

2024 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除してください。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：竹田哲也

所属機関名・部局名・職名：岡山大学・学術研究院医歯薬学域・助教

(3) 研究課題名

クライオ電子顕微鏡解析で紐解くダイナミンおよび BAR ドメイン蛋白質の膜リモデリング機構とその破綻に起因する難治性疾患の発症機序

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：加藤貴之 (研究室名：電子線構造生物学研究室)

(5) 研究成果の概要

背景および目的

エンドサイトーシスは、神経伝達やシグナル伝達、栄養摂取などの多様な細胞現象を司る。エンドサイトーシスの際には、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による協調的な作用が必要である。しかし、ダイナミンによる膜切断機構や BAR ドメイン蛋白質によるその制御メカニズムについて、構造生物学的な解明は十分になされていない。さらにダイナミンや BAR ドメイン蛋白質の変異は、難治性の神経筋疾患の発症と強くリンクしているが、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についても明らかになっていない。

本研究の目的は、クライオ電子顕微鏡を用いた構造生物学的アプローチにより、ダイナミンと BAR ドメイン蛋白質による膜リモデリングの作動原理を明らかにすると共に、その異常によって発症する難治性疾患の発症機序をナノスケールレベルで明らかにしようとする点である。この目的達成に向け、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、先天性のミオパチーやてんかんなど、難治性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。

方法と結果

CNM 変異型 BIN1 やダイナミン 2 のクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析に向け、これらの膜リモデリング分子の機能異常について、① *in vitro* 再構成系による分子レベルの解析と、② 筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析を行った。研究代表者はこれまでに、(1) *in vitro* および細胞内の T 管様構造再構成系を用い、ダイナミン 2 の膜リモデリング機能を定量的に評価することに成功した。またこの解析系を用いて、(2) CNM 変異型ダイナミン 2 では、膜切断に必要な GTP アーゼ活性が亢進していること、(3) 国立精神・神経医療研究センター (NCNP) の筋レポジトリから同定された CNM 患者由来の新規 DNM2 バリエーションから、病理性バリエーションを同定することに成功した。これらの成果は、原著論文 2 報 (Fujise et al., *JBC* 2021 ; Fujise et al., *Hum Mutat* 2021) と総説 1 報 (Fujise et al., *IJMS* 2022)、著書 1 報 (竹田、医学のあゆみ 2022) として発表した。今年度は、T 管様構造再構成系を用いて、(1) T 管様構造のメカニカルストレス耐性にダイナミン 2 が必要であること、(2) SH3 ドメインを部分的に欠失した CNM 変異型 BIN1 が、*in vitro* および細胞内において、異常に凝集した T 管様構造を形成することを明らかにした (論文準備中)。クライオ電子顕微鏡を用いた CNM 変異型 BIN1 の構造解明に向けた精製条件について検討し、正常型および CNM 変異型 BIN1 のクライオ電顕サンプルの調製を行い解析を進めている。-----