

様式3

平成30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

平成31年2月26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：大学院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	ダイナミン2タンパクの性状解析と電顕 観察
研究分担者 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2野生型、変異体のコムギ胚 芽無細胞系にての発現、精製
竹田 哲也	岡山大学大学院 医歯薬学総合研 究科	助教	ダイナミン2タンパクの性状解析

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・助教 竹田 哲也

研究目的

ほ乳類のダイナミンは、分子量約 85-100kDa 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。エンドサイトーシス、小胞輸送、オルガネラの分裂や細胞移動に必須な分子である。また、その変異は、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。我々はダイナミンのアクチン制御機構を解析する過程で、ダイナミンの疾患変異が、アクチン線維束形成を阻害する現象を発見した。本研究は、ダイナミンによるアクチン線維束形成におけるダイナミン GTPase とその構造機能相関を解析することが目的である。

研究成果

① ダイナミン 2 野生型、K562E CMT 変異体タンパクの調製

従来、*in vitro* 実験に用いるダイナミンタンパクは、牛、豚または羊の脳から精製されたものか、もしくは、バキュロウイルスー昆虫細胞発現系で調製されたものが使用されてきた。大腸菌を用いた発現系では、GTPase 活性を持つタンパクが調製できない。ダイナミンの GTPase 活性発現には、自己重合体のダイナミックな構造変化を伴うことが知られている。この特性が影響しているものと考えられる。本研究では、コムギ胚芽無細胞タンパク発現系でダイナミンタンパクを調製した。高純度で比較的多量のダイナミンタンパクが得られるためである。

ダイナミン 2 野生型および K562E CMT 変異体タンパクは、共同研究者高島英造博士 (愛媛大学プロテオサイエンスセンター) の協力で、コムギ胚芽無細胞タンパク発現系を用いて調製した。6 個のヒスチジンタグをアミノ末端に付加したダイナミン 2 は、Ni カラムを用いてアフィニティ精製した。500 mM イミダゾールで溶出される E1、E2 画分では、ダイナミン 2 野生型および K562E CMT 変異体タンパクはともに約 100 kDa の位置に単一バンドにまで精製された (図 1)。以下、これらタンパクを用いて実験を行った。

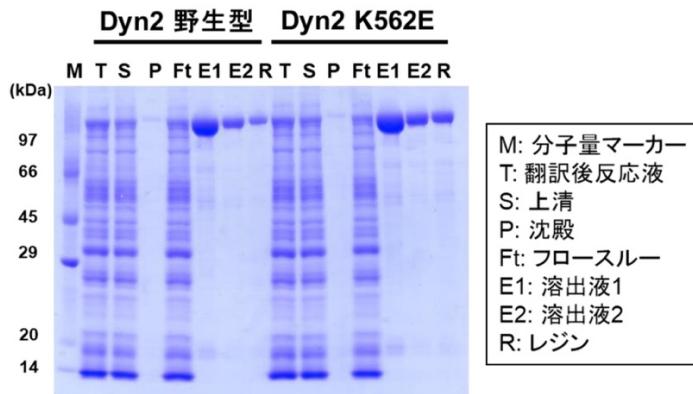


図1. コムギ胚芽無細胞タンパク発現系を用いたダイナミン2タンパクの調製

ラットダイナミン2野生型またはK562E変異体をpEU-E01-HIS-TEV-MCS-N2にクローニングした。このプラスミドを用い、コムギ胚芽無細胞タンパク発現系にてダイナミン2を発現した。E1、E2画分では、ダイナミン2野生型およびK562E変異体タンパクはともに約100 kDaの位置に単一バンドにまで精製された。

② コムギ胚芽無細胞タンパク発現系で調製したダイナミン2野生型は、ダイナミン特有のGTPase活性を持つ。

ダイナミンは、50 mM以下の濃度のNaClを含む低イオン強度緩衝液中では自己重合が促進されGTPase活性が上昇する。また、ダイナミンは膜リン脂質であるPI(4,5)P₂に結合し、膜上で自己重合しGTPase活性が上昇する。この特性によるダイナミン2野生型のGTPase活性を測定した。ダイナミン2野生型は、いずれの条件下でも顕著なGTPase活性を示した（結果はのせていない）。従って、コムギ胚芽無細胞タンパク発現系で、GTPase活性のあるダイナミン2が調製できることがわかった。

続いて、ダイナミン2によるアクチン線維への影響を調べるために、in vitroでアクチン線維とダイナミン2タンパクを混合した後、アクチン線維を蛍光標識し、その形態を蛍光顕微鏡で観察した。ダイナミン2野生型が存在するとアクチン線維束が多数観察されることが判明した（結果は示していない）。

これらの結果から、in vitroでダイナミンによるアクチン線維束形成が再現できたので、今後電子顕微鏡やクライオ電子顕微鏡観察を用いた詳細な構造解析を加えていく予定である。

成果発表

第70回日本生物工学会大会（関西大学、9月5-7日）にて口頭発表した。

「メカノエンザイム・ダイナミンGTPaseによるアクチン線維束化機構の解析」

山田浩司、阿部匡史、竹田哲也、高島英造、森田将之、竹居孝二

今後の課題

コムギ胚芽無細胞タンパク発現系にて調製したダイナミン2 K562E GMT 変異体は、タンパクの調製もしくは保存過程で高頻度で失活してしまうことが判明した。GTPase活

性、アクチン線維束形成活性ともに消失する。同時に調製したダイナミン2野生型については、このような現象は見られていない。立体構造の不安定さが原因の可能性がある。今後、原因の究明とともに調製方法についても、高島博士と議論を進めつつ、さらに研究を遂行する予定である。