

2021 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、ほかは削除して下さい。)

共同研究員 ・クライオ電子顕微鏡

(2) 研究代表者

氏名：昆 隆英

所属機関名・部局名・職名：大阪大学・大学院理学研究科・教授

(3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

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

(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 (公開)

本研究は、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を目指すものである。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が、未解明な点も多い。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、ごく最近に外腕ダイニンの構造のみが報告され、それ以外は一つも明らかになっていないのが現状である。本研究では、細胞質ダイニンと繊毛ダイニンの構造解析を目指している。

本研究チームでは、細胞質ダイニン、及び、繊毛ダイニンの高度精製系を確立した。ネガティブ染色電子顕微鏡法により、蛋白質試料の単分散性および構造的均一性についても評価しており、クライオ電子顕微鏡法を試みる価値のある試料調製ができていると判断した。細胞質ダイニンの蛋白質試料濃度は、~8 mg/ml であり、通常のカリオ電子顕微鏡用のグリッドで観察した。一方、繊毛ダイニンの蛋白質試料濃度は~200 µg/mL であり、酸化グラフェン膜を利用したクライオ電子顕微鏡法を適用した。

クライオ電子顕微鏡で繊毛ダイニン、及び、細胞質ダイニンを撮影して、Relion/cryoSPARC により単粒子解析を試みたところ、両者ともに近原子分解能の構造を得た。また、サブプロジェクトとして、ダイニンが結合する細胞骨格である微小管についても、クライオ電子顕微鏡による撮影と構造解析を進め、近原子分解能の構造を得ている。現在、これらの原子座標モデルの構築及び、論文投稿の準備を行っている。