

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。)

客員フェロー

(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（医）・研究准教授

(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

(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)

### 背景および目的

先天性ミオパチーは、筋力や筋緊張の低下を伴う筋疾患である。先天性ミオパチーの一つである中心核ミオパチー (Centronuclear Myopathy, 以下 CNM) の患者では、骨格筋の興奮-収縮連関に必要な細胞膜の陥入構造 (T 管) の形成異常により、筋収縮が正常に起こらない。先行研究で、膜リモデリング分子である BIN1 や Dynamin 2 の遺伝子に生じる SNV (一塩基変異) が、CNM 発症に関与することが示されている。しかし、膜リモデリング異常により CNM が発症するメカニズムは、未だに解明されていない。本研究では、Dynamin 2 と BIN1 の膜リモデリング機能異常に起因する CNM の発症メカニズムを、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解明することを目的とし、本研究を計画した。

### 方法と結果

クライオ電子顕微鏡を用いた CNM 変異型 BIN1 や Dynamin 2 の構造解析に向け、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。

#### ① *in vitro* 再構成系による分子レベルの解析

CNM 変異型 BIN1 および Dynamin 2 の、大腸菌および昆虫細胞での発現コンストラクトを作成した。そのうち、CNM 変異型 BIN1 (Q434X, K436X)、CNM 変異型 Dynamin 2 (E368K, R369Q, R369W, R465W, S619L, S619W)、さらにコホート解析で同定された CNM 患者由来の変異型 Dynamin 2 (P294L, G495R, V520G, G624V, R724H) の精製蛋白質を調製し、その機能異常を T 管様構造の *in vitro* 再構成系で解析した。その結果、CNM 変異型 BIN1 (Q434X, K436X) は正常型 BIN1 に比べて膜結合性が顕著に高く、膜チューブの凝集や小胞化など、膜リモデリング異常を示すことを明らかにした。また、正常型 BIN1 は Dynamin 2 に結合して GTP アーゼ活性を抑制し、その膜切断機能を制御するのに対し、CNM 変異型

Dynamin 2 は BIN1 の制御に抵抗性を示し、恒常的に GTP アーゼ活性が亢進することを明らかにした。

② 筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析

上記①でターゲットとした CNM 変異型 BIN1 と Dynamin 2 の、動物細胞用発現コンストラクトを作成し、マウス筋芽細胞 C2C12 における T 管様構造の形成異常を解析した。その結果、CNM 変異型 BIN1 (Q434X, K436X) は、細胞内で異常に凝集した T 管様構造を形成することが明らかになった。また、正常型 Dynamin 2 は T 管様構造を安定化する機能を持つのに対し、CNM 変異型 Dynamin 2 は、T 管様構造を切断することが明らかになった。さらに、T 管様構造の形成異常を定量化する解析法を確立し、CNM 症状の重篤度が *in cellulo* 再構成系の表現型から予測可能であることを明らかにした。以上の結果より、CNM 変異型 BIN1 および Dynamin 2 の膜リモデリング機能異常が、CNM 発症に深く関与することを明らかにした (Fujise et al., JBC 2021 ; Fujise et al., Human Mutation 2021)。