

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

2020年4月28日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
 職 名 准教授
 研究代表者名 山田 浩司

下記のとおり2019年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:191002)

1. 共同利用研究 課題名	エンドサイトーシス関連分子のアクチン細胞骨格と膜制御の機能関連			
2. 共同利用研究 目的	アクチン細胞骨格及び生体膜の動態研究が専門の伊藤研究室と共同研究を行い、エンドサイトーシス関連分子によるアクチン制御の詳細を調べるため。			
3. 共同利用研究 期間	2019年7月1日 ～ 2020年3月31日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(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	タンパク精製、活性測定、アクチン 線維束形成観察	
(分担研究者) 竹居 孝二	岡山大学大学院医歯薬学 総合研究科	教授	電子顕微鏡観察	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル機能制御研究 部門・生体膜機能研究分 野	氏 名	伊藤 俊樹

※ 次の6～9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6～9の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同利用研究計画

ダイナミン GTPase は、脂質膜上で重合し GTPase 活性と共役した構造変化で膜を変形し切断する。近年、ダイナミンは、その他アクチン制御にも関与することが報告されたが、その分子実態は不明であった。我々は、ダイナミンによるアクチン制御機構を解析し、ダイナミンがコルタクチンとリング状複合体を形成し、このリングがアクチン線維をクリップし束化することを発見した(Yamada et al., J.Neurosci., 2013)。さらに、in vitro の系を用いて、ダイナミンが直接アクチン線維に作用しアクチン線維を束化することを見出した。この新たに発見したダイナミン-アクチン線維複合体の構造を形態学的に精査すると共にダイナミンによる膜変形活性とアクチン線維束形成との相関を調べる。

7. 共同利用研究の成果

ダイナミンは、昆虫細胞大量発現系にて調製されることが多いが、精製途中で凝集する傾向が強い。この凝集を避けるために、野生型及び脂質結合部位に変異を持つダイナミンをコムギ無細胞タンパク合成系にて調製した。リコンビナントタンパクのアミノ末端にヒスチジンタグを融合し、このタグを用いて精製した(右図 A)。CBB 染色でシングルバンドにまで精製できた(右図 B)。調製されたタンパクは GTPase 活性を保持しており、機能的であることを確認した。

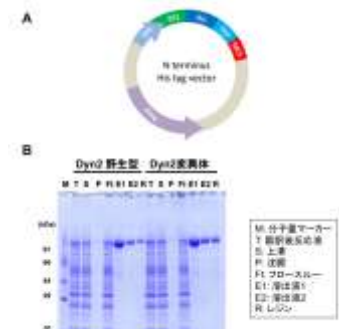


図 A 使用した発現ベクター
B ダイナミンタンパクの精製過程における SDS-PAGE

既報のとおり、変異体は、低イオン強度条件下及び脂質膜存在下の GTPase 活性が野生型と比較して顕著に低下していた。これらタンパクとアクチン線維を in vitro で反応させ、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡にて観察した。アクチン線維は、蛍光標識したファロイジンで可視化した。ダイナミンが存在すると、いくつかのアクチン線維が集まった像が観察された。このアクチン線維の集合体は、野生型及び変異体の双方の存在下で観察された。さらに、電子顕微鏡にて、このアクチン線維の集合体を負染色し観察した。複数のアクチン線維が同じ方向に束化されており、束化されたアクチン線維間には、ダイナミンと考えられるタンパク複合体が、規則的に配列している像が観察された。しかしながら、野生型と変異体との間に形態的な差は見られなかった。現在、この条件下で、脂質膜との連関を調べるべく、伊藤教授とディスカッションを重ね、電子顕微鏡を用いて解析中である。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

なし。

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

なし。