

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		新規アクチン束化蛋白が創り出す組みひも状アクチンナノブレイドの機能構造解析			
研究テーマ (欧文) AZ		Structural analysis of actin-nanobraid assembled by a novel actin-bundling protein			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓) シノハラ	名) キョウスケ	研究期間 B	2016～ 2017年
	漢字 CB	篠原	恭介	報告年度 YR	2017年
	ローマ字 CZ	Shinohara	Kyosuke	研究機関名	東京農工大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門・テニュアトラック特任准教授			
概要 EA (600字～800字程度にまとめてください。)					
<p>本研究を開始する前の段階において、マウスの運動繊毛細胞特異的に発現する Dpcd(Deleted in Primary CiliaryDyskinesia)が新規のアクチン束化蛋白質である事を見出していた。本研究課題では X 線結晶構造解析とクライオ電子線トモグラフィーにより Dpcd がアクチンを束化する機構の解明を目指した。まず X 線結晶構造解析によりマウス由来の大腸菌組み換え体 Dpcd 蛋白質を用いて結晶化と構造解析を行った。結果、Dpcd 蛋白質を構成する中央に領域の構造を 2.0Å の分解能で決定する事に成功した。ここで得られた構造から Dpcd は塩基性アミノ酸残基の集中するクラスター領域を持つ事が分かった。アクチンフィラメントの表面は負電荷を帯びているため正電荷を帯びたクラスターがアクチンフィラメントに対する結合部位である可能性がある。この可能性を検証するために 4 つの塩基性のアミノ酸残基のなかで真核生物全体に保存されている 138 番目のリジンを酸性アミノ酸であるグルタミン酸に置換した変異体 K138E を作製しアクチン束化活性と結合を調べた。アクチンの束化活性はローダミン標識したファロイジンで修飾したアクチンフィラメントの蛍光観察、結合能は超遠心機によるアクチンフィラメントと Dpcd の共沈実験によりそれぞれ評価した。その結果、K138E 変異体は野生型と比べてアクチン束化活性、アクチン結合能ともに著しく減少していた。この事から Dpcd が中央に持つ塩基性アミノ酸残基の集中領域がアクチンとの結合部位である事が示唆された。次に Dpcd がアクチンフィラメント上のどの部位に結合しているかを検証するためアクチン束のクライオ電子線トモグラフィー解析を試みた。現在、電子顕微鏡観察のため薄い氷の膜が形成されるアクチン束の試料作製の条件検討を行っている最中である。今後アクチン束の 3 次元構造を決定しアクチンフィラメント上の結合部位の決定と密接した組みひも状の束の形成機構の解明を目指す。</p>					
キーワード FA	アクチン束化蛋白質	運動繊毛	静電相互作用	X 線結晶構造解析	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

欧文概要 EZ

In this project, we have examined mechanism of actin-bundling by a novel actin bundling protein Dpcd. We have obtained X-ray crystal structure of Dpcd at 2.0Å resolution. In the surface charge distribution, Dpcd has positive-charge rich region at the middle. Since surface of actin filament has negative charge, the positive-charge rich region is candidate of actin-binding domain. To validate this hypothesis, we made two kinds of mutant protein, R130E & K138E and examine actin-binding of each protein using co-precipitation. The co-precipitation assay and observation of actin-bundling indicate that both the positive-charge rich region (Cluster of 4 Lysin) and the opposite Arginine is critical for actin-bundling and binding. In future work, we will determine structure of actin-bundle using cryoEM and position of Dpcd proteins on actin filament.