

2024 年度年次報告書
細胞内現象の時空間ダイナミクス
2020 年度採択研究代表者

濡木 理

東京大学 大学院理学系研究科
教授

細胞機能を担う超分子複合体の原子分解能ダイナミクス

主たる共同研究者:

岡田 康志 (東京大学 大学院医学系研究科 教授)

野澤 佳世 (東京科学大学 生命理工学院 准教授)

藤芳 暁 (東京科学大学 理学院 助教)

研究成果の概要

濡木 G は、膜と核酸のクロストークに着目し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析と岡田 G の1分子ライブイメージング技術を駆使して、真核生物の SID1 が新規のエンドサイトーシス機構により巨大な dsRNA を細胞内に輸送するメカニズムを解明した。加えて、原核生物の ComEC が直接膜を貫通させて DNA を細胞内に輸送するメカニズムを解明した。聴覚に関して、高等真核生物では初めての機械刺激感受性 TMC チャンネルの構造決定に成功した。また Prime editor のダイナミクスを明らかにし(業績 1)、8 種類以上の GPCR の構造解析に成功した(業績 2, 他多数)。

岡田 G は、超耐光性蛍光プローブの開発と超解像ライブセルイメージング法への応用を進める一方、蛍光寿命型バイオセンサー作製のための汎用的プラットフォームの開発と実証を行った。蛍光色素の褪色や光毒性の問題を解決するため、蛍光を用いない超解像顕微鏡技術の開発に取り組んだ。さらに、これらの技術応用を推進し、濡木 G との共同研究により、SID1 による dsRNA の細胞内への取込機構を詳細に解析した。

藤芳 G は、研究目的であるクライオ光電子相関顕微鏡を実証し、観察に至るまでのプロトコルを確立した。クライオ蛍光顕微鏡の機械的安定性は Å スケールに達しており、nm 分解能の1分子観察まであと少しである。カーボングリッド上で HeLa 細胞を培養、凍結後、リソソームマーカ発現量が最適な場所を 300 nm の薄膜に加工し、我々が開発したクライオ蛍光顕微鏡で観察した。結果、クライオ透過電子顕微鏡でリソソームが存在している空間に蛍光の輝点が重なって見えた。今後この手法を用い濡木 G と共に聴覚に働く有毛細胞のチップリンクの研究を進める。

野澤 G は、細胞抽出液からの過渡的複合体の精製と直接観察が可能なアフィニティグリッド(SA grid)作製の再現性向上検討を行った。SA grid が細胞抽出液中でも機能できるか検証するために、SA と親和性のある Strep-tag II 融合タンパク質を発現させた大腸菌の破碎液を用いて grid の洗浄条件を検討した。またプレートリーダーを導入し grid と標的タンパク質の結合能を評価できるシステムを構築した。

【代表的な原著論文情報】

- 1) “Structural basis for pegRNA-guided reverse transcription by a prime editor” Y. Shuto, R. Nakagawa, S. Zhu, M. Hoki, S. N. Omura, H. Hirano, Y. Itoh, F. Zhang, O. Nureki *Nature* **631**, 224-231 (2024).
- 2) “Structure and dynamics of the pyroglutamylated RF-amide peptide QRFP receptor GPR103” A. Iwama, R. Kise, H. Akasaka, F. K. Sano, H. S. Oshima, A. Inoue, W. Shihoya, O. Nureki *Nat. Commun.* **15**, 4769 (2024).
- 3) “Dimeric transport mechanism of human vitamin C transporter SVCT1” T. A. Kobayashi, H. Shimada, F. K. Sano, Y. Itoh, S. Enoki, Y. Okada, T. Kusakizako, O. Nureki *Nat. Commun.* **15**, 5569 (2024).
- 4) “Development of fluorescence lifetime biosensors for ATP, cAMP, citrate, and glucose using the mTurquoise2-based platform” Zhong C, Arai S, Okada Y. *Cell Rep Methods.* **4**:100902 (2024).
- 5) “Cryo-EM Analysis of a Unique Subnucleosome Containing Centromere-Specific Histone Variant CENP-A” O, Kawasaki., Y, Takizawa., I, Kiyokawa., H, Kurumizaka., K, Nozawa. *Genes Cells*, (2):e70016, (2025)