

2024 年度年次報告書

細胞内現象の時空間ダイナミクス

2022 年度採択研究代表者

白水 美香子

理化学研究所 生命機能科学研究センター

チームリーダー

クライオ電顕による DOCK シグナルソームの動的構造の解明

主たる共同研究者:

ウォング リチャード (金沢大学 ナノ生命科学研究所 教授)

笠原 健人 (大阪大学 大学院基礎工学研究科 助教)

細谷 孝充 (東京科学大学 総合研究院 教授)

山内 淳司 (東京薬科大学 生命科学部 教授)

研究成果の概要

細胞形態変化を司る Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性化因子 DOCK (Dedicator of cytokinesis) は神経発生や免疫など様々なプロセスで重要な役割を果たしている。DOCK ファミリーの約半数は、ELMO(Engulfment of cell motility)と複合体を形成し、細胞質から細胞膜へ局在を変化させて G タンパク質 Rac を活性化すると考えられているが、その実態は捉えられていないため、シグナロソーム形成のメカニズム、情報伝達の実態、細胞形態変化への関与を分子レベルで解明することを目的として実験を行った。

本年度は、前年度に引き続き、本課題内で開発した脂質膜貼付グリッド DOCK5/ELMO1 および上下流の G タンパク質である RhoG、Rac1 との4者複合体のクライオ電顕構造を解析した。この解析によって明らかとなった脂質膜上の固有のコンフォメーションである extended-open form において観測された、ELMO1 の PH ドメインと脂質膜との相互作用について、生化学および細胞生物学的な検証を行い、この固有のコンフォメーションと PH ドメインと脂質膜との相互作用が、DOCK5 のグアニンヌクレオチド交換促進活性や下流のシグナル伝達に重要であることを明らかにした。さらに、DOCK シグナロソームと脂質膜との相互作用の詳細な理解に向けたクライオ電顕解析技術の高分解能化のため、本年度は、巨大な脂質ディスクを用いた DOCK5/ELMO1 複合体のクライオ電顕解析を実施し、脂質膜相当のマップを含んだ複合体構造の解析に成功した。脂質膜との相互作用様式の理解に至る分解能に到達するべく改良を進めている。

一方、cryo-ET 測定において細胞内での位置情報を得るための標的タンパク質の重原子での効率的な標識手法の確立を目指し、HaloTag リガンド、蛍光色素、細胞膜透過ペプチドを搭載した金ナノクラスターの合成に成功した。また、高次脳機能障害に起因した神経細胞の過剰な突起伸長や Rac1 の活性化が ELMO1 の DOCK5 結合ドメインで抑制でき、このドメインが PPI (protein-protein interaction) 阻害因子として機能することが判明した。さらに、高速 AFM や粗視化シミュレーションにより、シグナロソームの構造揺らぎとコンフォメーション変化の解析に成功した。

【代表的な原著論文情報】

- 1) "Red-light Emitting Orthogonally Trireactive Gold Nanoclusters for the Synthesis of Multifunctionalized Nanomaterials" Watanabe K, Uetake Y, Hata M, Kuwano A, Yamamoto R, Yamamoto Y, Kodera M, Kitagishi H, Niwa T, and Hosoya T. *Small* 21(17): 2408747 (2025)
- 2) "Spatiotemporal dynamics of protamine-DNA condensation revealed by high-speed atomic force microscopy" Nishide G, Lim K, Kobayashi A, Qiu Y, Hazawa M, Ando T, Okada Y, and Wong R W. *Nucleic Acids Research* 53(6): gkaf152 (2025).
- 3) "Flexible framework of computing binding free energy using the energy representation theory of solution" Okita K, Maruyama Y, Kasahara K, and Matubayasi N. *Journal of Chemical Physics* 162(3): 034103 (2025).
- 4) "RhoG facilitates a conformational transition in the guanine nucleotide exchange factor complex DOCK5/ELMO1 to an open state" Kukimoto-Niino M, Katsura K, Ishizuka-Katsura Y, Mishima-Tsumagari C, Yonemochi M, Inoue M, Nakagawa R, Kaushik R, Zhang K Y J, and Shirouzu M. *Journal of Biological Chemistry* 300(7): 107459 (2024).