

細胞内現象の時空間ダイナミクス
2020 年度採択研究者代表

2020 年度 年次報告書

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

§ 1. 研究成果の概要

クライオ電子顕微鏡の単粒子解析やトモグラフィーなど構造生物学的アプローチと、in vitro での蛍光一分子イメージング、細胞内での一分子計測・超解像イメージングを有機的に組合せ、内耳外有毛細胞の高速伸縮運動、オルガネラの RNA 輸送の細胞内での分子機構を解明する。内耳の蝸牛には外有毛細胞 (Outer Hair Cell, OHC) が存在し、音により鼓膜が振動するとリンパ液を通じて OHC の不動毛が揺れ、これを感知して TMC 機械刺激チャネルが開き、OHC が脱分極する。すると、OHC の側面に中間径繊維と結合し局在する Prestin モーターが伸縮し、これが集積して OHC の高速伸縮運動となり、TMC に正のフィードバックをかけて、さらに脱分極することで音感が増幅される。我々はヒト由来 Prestin に関して熱安定化変異体を作成し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により分解能 3.2 Å での構造決定に成功した。Prestin は二量体を形成し、各サブユニットは膜貫通ドメイン (トランスポータードメイン) と STAS ドメイン (細胞骨格にアンカーする) から構成されている。Prestin は膜貫通ドメインの傾きが異なる複数の構造状態を取り、この構造変化は、電位依存的な Cl⁻ の結合によって生じるトランスポータードメインの開閉と同調して起こることが示唆された。また、アスピリンとの複合体の構造解析から、その阻害機構を解明した。さらに、外界から dsRNA を取り込んで RNA 干渉に働く、線虫由来の SID-1 タンパク質および dsRNA との複合体を調製し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により構造決定を試みている。これまで SID-1 は、エンドサイトーシスを伴わず、直接 RNA を輸送するチャネルであると示唆されてきたが、本構造研究と超解像イメージングを組み合わせた解析により、そのダイナミクスを明らかにしていく。

§ 2. 研究実施体制

(1) 濡木グループ

- ① 研究代表者: 濡木理 (東京大学大学院理学系研究科 教授)
- ② 研究項目
 - 課題 1.1 プレスチンの単粒子解析
 - 課題 1.3 OHC の *in situ* 観察の準備
 - 課題 2.1 細胞内 RNA オートファジー解析系の構築の準備
 - 課題 2.2 RNA 輸送の 1 分子計測の準備
 - 課題 2.3 SIDT2・LAMP2C および SID-1 の単粒子解析の準備

(2) 岡田グループ

- ① 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)
- ② 研究項目
 - 課題 1.2 OHC の超解像イメージングの準備
 - 課題 1.3 OHC の *in situ* 観察: 超解像顕微鏡による Prestin の細胞内ダイナミクス観察の準備

課題 2.1 細胞内 RNA オートファジー解析系の構築

課題 2.2 RNA 輸送の1分子計測

(3) 藤芳グループ

① 主たる共同研究者: 藤芳 暁 (東京工業大学大学院 理学院 助教)

② 研究項目

課題 1.2 : 内耳外有毛細胞(OHC)の超解像イメージングの準備

- ・生細胞観察のための特殊レンズ (可変浸レンズ) の開発
- ・生細胞を凍結し、クライオ蛍光顕微鏡に導入するための試料交換機構の開発

課題 1.3 と 2.3 の準備 : Cryogenic superresolution correlative light and electron microscopy (クライオ SR-CLEM)の開発

- ・クライオ蛍光顕微鏡からクライオ電顕への試料交換機構の開発
- ・SR-CLEM用の光干渉型センサーの開発
- ・三次元ナノスコーピーに関する予備的な知見の取得

【代表的な原著論文情報】

- 1) “Consensus mutagenesis approach improves the thermal stability of system x_c transporter, xCT, and enables cryo-EM analyses” K. Oda, Y. Lee, P. Wiriyasermkul, Y. Tanaka, M. Takemoto, K. Yamashita, S. Nagamori, T. Nishizawa and O. Nureki. *Protein Sci.* 29, 2398-2407 (2020)
- 2) “NUDT21 Links Mitochondrial IPS-1 to RLR-Containing Stress Granules and Activates Host Antiviral Defense” Saeko Aoyama-Ishiwatari, Tomohiko Okazaki, Shun-Ichiro Iemura, Tohru Natsume, Yasushi Okada, Yukiko Gotoh ” *Journal of immunology* 206,154-163(2021)
- 3) “Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin” Oda K, Nomura T, Nakane T, Yamashita K, Inoue K, Ito S, Vierock J, Hirata K, Maturana AD, Katayama K, Ikuta T, Ishigami I, Izume T, Umeda R, Eguma R, Oishi S, Kasuya G, Kato T, Kusakizako T, Shihoya W, Shimada H, Takatsuji T, Takemoto M, Taniguchi R, Tomita A, Nakamura R, Fukuda M, Miyauchi H, Lee Y, Nango E, Tanaka R, Tanaka T, Sugahara M, Kimura T, Shimamura T, Fujiwara T, Yamanaka Y, Owada S, Joti Y, Tono K, Ishitani R, Hayashi S, Kandori H, Hegemann P, Iwata S, Kubo M, Nishizawa T and O. Nureki. *Elife* 10, e62389 (2021)

4) “Variable immersion microscopy with a high numerical aperture” Keita Ishida, Kanta Naruse, Yuta Mizouchi, Yoshihiro Ogawa, Michio Matsushita, Takeshi Shimi, Hiroshi Kimura, Satoru Fujiyoshi. *Optics Letters* 46,856-859(2021)