

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

2022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

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)

藤芳 暁 (東京工業大学 理学院 助教)

## 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、ニューロンの高次機能に働くイオンチャネルの(過渡的)超複合体の分子機構、小分子 RNA の biogenesis に働く(過渡的)超複合体の分子機構の解明を推進している。電位依存性膜内モーターであり音感の増幅に働く、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、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、阻害剤であるアスピリンとの複合体の構造を、それぞれ分解能 3.2 Å での構造決定に成功し、電位依存性モーター活性およびアスピリンによる阻害活性の構造基盤を明らかにした(*Nat. Commun.*,2022)。また、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 との複合体に関して、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により 2.9 Å 分解能での構造決定に成功した。本構造研究と超解像ライブイメージングを組み合わせた解析の結果、これまで SID-1 は直接 dsRNA を輸送するチャンネルであると予測されてきたのに反して、SID-1 は細胞表面で dsRNA を補足するとエンドサイトーシスを惹起し、エンドソームから細胞内へ dsRNA を放出することを明らかにした。さらに、SID-1 は Dynamin を ADP リボシル化により活性化する ARF6 と直接結合し、エンドサイトーシスを引き起こすことを明らかにした(論文準備中)。また我々は、RNA 干渉において、二本鎖 siRNA を産生して Ago2 に受け渡すことで、遺伝子の発現制御に働く Dicer-2-R2D2 と二本鎖 siRNA 複合体の立体構造を決定することに成功し、Dicer-2-R2D2 による二本鎖 siRNA の産生および受け渡しの分子機構を明らかにした(*Nature*, 2022)。

### 東大 濡木グループ

本年度は、Prestin の電位依存性モーター活性およびアスピリンによる阻害活性の分子機構を世界で初めて解明し、*Nat. Commun.*に発表した。また、RNA チャンネルと考えられてきた SID-1 が、ARF6 と直接結合し Dynamin を活性化してエンドソームを生成することで、エンドサイトーシスを惹起する機構を明らかにした(論文準備中)。また、RNA 干渉において、二本鎖 siRNA を産生して Ago2 に受け渡すことで、遺伝子の発現制御に働く Dicer-2-R2D2 と二本鎖 siRNA 複合体の立体構造を決定することに成功し、Dicer-2-R2D2 による二本鎖 siRNA の産生および受け渡しの分子機構を明らかにした(*Nature*, 2022)。

### 東大 岡田グループ

本年度は、SID-1 が dsRNA を細胞内にとりこむメカニズムについて、ライブセルイメージングと細胞生物学的解析および再構成系でのイメージングを行い、従来の輸送チャンネル説では説明できない結果を得た。また、超解像ライブセルイメージングの技術基盤として、新規蛍光タンパク質 StayGold の評価を実施した。細胞レベルの 3 次元超解像イメージングの応用として、線毛表面の力学受容体タンパク質の 3 次元分布の可視化を行った。

### 東工大 藤芳グループ

本年度は、ナノレベル安定性のクライオ蛍光顕微鏡を開発した。その技術的な核となる光センサーを用いた試料安定化に成功し、原著論文を報告した[9]。

【代表的な原著論文情報】

- 1) “The long  $\beta$ 2,3-sheets encoded by redundant sequences play an integral role in the channel function of P2X7 receptors.” X. F. Ma, T. T. Wang, W. H. Wang, L. Guan, C. R. Guo, X. H. Li, Y. T. Lei, Y. Z. Fan, X. N. Yang, M. Hattori, O. Nureki, M. X. Zhu, Y. Yu, Y. Tian and J. Wang. *J. Biol. Chem.* 30, 102002 (2022), DOI:10.1016/j.jbc.2022.102002.
- 2) “Cryo-EM structures of thylakoid-located voltage-dependent chloride channel VCCN1.” T. Hagino, T. Kato, G. Kasuya, K. Kobayashi, T. Kusakizako, S. Hamamoto, T. Sobajima, Y. Fujiwara, K. Yamashita, H. Kawasaki, A. D. Maturana, T. Nishizawa and O. Nureki. *Nat. Commun.* 13, 2505 (2022), DOI:10.1038/s41467-022-30292-w.
- 3) “Structure of the Dicer-2–R2D2 heterodimer bound to a small RNA duplex” S. Yamaguchi, N. Naganuma, T. Nishizawa, T. Kusakizako, Y. Tomari, H. Nishimasu and O. Nureki. *Nature* 607, 393-398 (2022), DOI:10.1038/s41586-022-04790-2.
- 4) “Endogenous ligand recognition and structural transition of a human PTH receptor” K. Kobayashi, K. Kawakami, T. Kusakizako, H. Miyauchi, A. Tomita, K. Kobayashi, W. Shihoya, K. Yamashita, T. Nishizawa, H. E. Kato, A. Inoue and O. Nureki. *Mol. Cell* 82, 3468-3483 (2022), DOI:10.1016/j.molcel.2022.07.003.
- 5) “Structural insights into inhibitory mechanism of human excitatory amino acid transporter EAAT2” T. Kato, T. Kusakizako, C. Jin, X. Zhou, R. Ohgaki, L. Quan, M. Xu, S. Okuda, K. Kobayashi, K. Yamashita, T. Nishizawa, Y. Kanai and O. Nureki. *Nat. Commun.* 13, 4714 (2022), DOI:10.1038/s41467-022-32442-6.
- 6) “Mechanistic insights into intramembrane proteolysis by E. coli site-2 protease homolog RseP” Y. Imaizumi, K. Takanuki, T. Miyake, M. Takemoto, K. Hirata, M. Hirose, R. Oi, T. Kobayashi, K. Miyoshi, R. Aruga, T. Yokoyama, S. Katagiri, H. Matsuura, K. Iwasaki, T. Kato, M. K. Kaneko, Y. Kato, M. Tajiri, S. Akashi, O. Nureki, Y. Hizukuri, Y. Akiyama, T. Nogi. *Sci. Adv.* 8, eabp9011 (2022), DOI:10.1126/sciadv.abp9011.
- 7) “Cryo-EM structures of thermostabilized prestin provide mechanistic insights underlying outer hair cell electromotility” H. Futamata, M. Fukuda, R. Umeda, K. Yamashita, A. Tomita, S. Takahashi, T. Shikakura, S. Hayashi, T. Kusakizako, T. Nishizawa, K. Homma and O. Nureki. *Nat. Commun.* 13, 6208 (2022), DOI:10.1038/s41467-022-34017-x.
- 8) “Phototrophy by antenna-containing rhodopsin pumps in aquatic environments” A. Chazan, I. Das, T. Fujiwara, S. Murakoshi, A. Rozenberg, A. Molina-Márquez, F. K. Sano, T. Tanaka, P. Gómez-Villegas, S. Larom, A. Pushkarev, P. Malakar, M. Hasegawa, Y. Tsukamoto, T. Ishizuka, M. Konno, T.

Nagata, Y. Mizuno, K. Katayama, R. Abe-Yoshizumi, S. Ruhman, K. Inoue, H. Kandori, R. León, W. Shihoya, S. Yoshizawa, M. Sheves, O. Nureki\* and O. Béjà\* *Nature* 615, 535-540 (2023), DOI:10.1038/s41586-023-05774-6.

9) N. Kamiya, K. Kuramoto, K. Takishima, T. Yumoto, H. Oda, T. Shimi, H. Kimura, M. Matsushita, and S. Fujiyoshi. “Superfluid helium nanoscope insert with millimeter working range” *Rev. Sci. Instrum.* **93**: 103703 (2023).