構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
濡木　理（東京大学大学院 理学系研究科・教授）

高難度膜タンパク質等の調製と構造解析可能なグリッド調製の支援

補助事業分担者（所属・職名）
木瀬　孔明（東京大学 大学院理学系研究科・特任准教授）、志甫谷　渉（東京大学 大学院理学系研究科・助教、現在・慶應義塾大学 医学部・准教授）、
石谷　隆一郎（東京科学大学 難治疾患研究所・教授）

高度化における研究背景・目的

高度化内容：高難度タンパク質試料調製技術の高度化

100 kDa以下の小型試料や数百kDaを超える巨大複合体、ミリ秒スケールで状態変化する膜タンパク質、生細胞内の動的な超分子複合体などは、構造・動態解析が依然として困難である。そこで本BINDSの高度化研究では、これらの限界を克服する新たなクライオ電顕技術の開発に取り組むことを計画した。

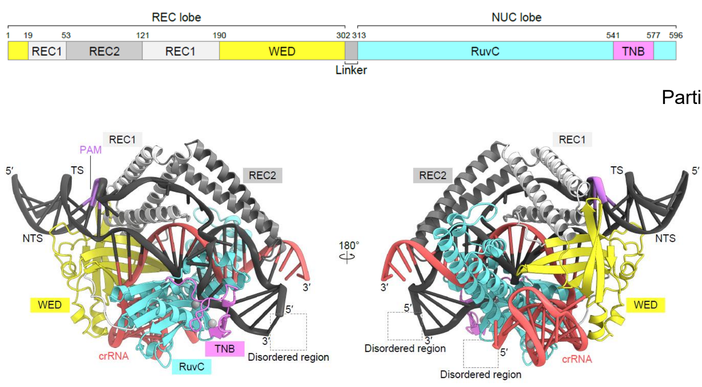
さらに、クライオ電顕では捉えることができない天然変性領域やドメイン間の動きといった構造的揺らぎをリアルタイムで可視化するために、高速AFMによるリアルタイム一分子ダイナミクス解析に取り組んだ。

高度化の成果

1. 粒子の方向性バイアスの改善

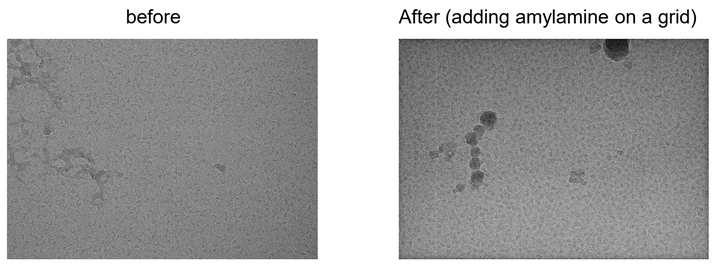
Naturally inactive MmuCas12m

- MmuCas12m consists of 596 amino acid residues and has unique RuvC triad (His-Asp-Asp)
- MmuCas12m cannot cleave dsDNA but still protect against MGEs through transcriptional silencing

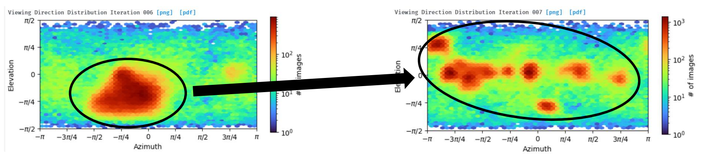


Omura *et al., Natue Struct Mol Biol, 2023*

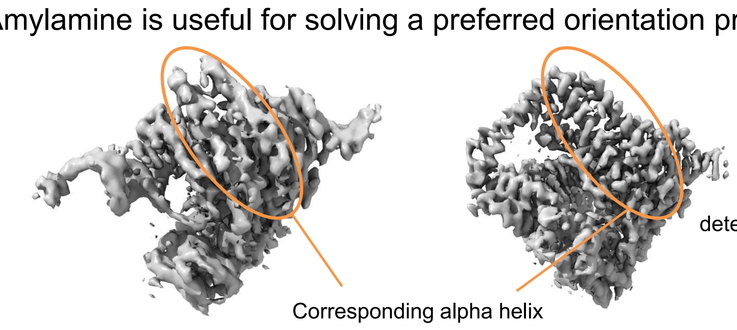
CryoEM micrograph



Particle distribution

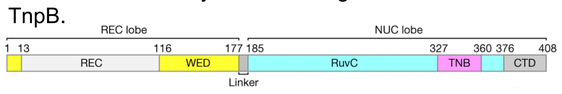


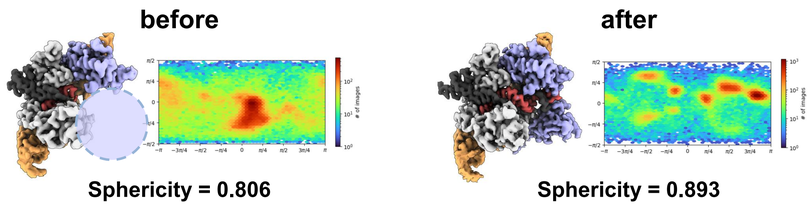
Amylamine is useful for solving a preferred orientation problem

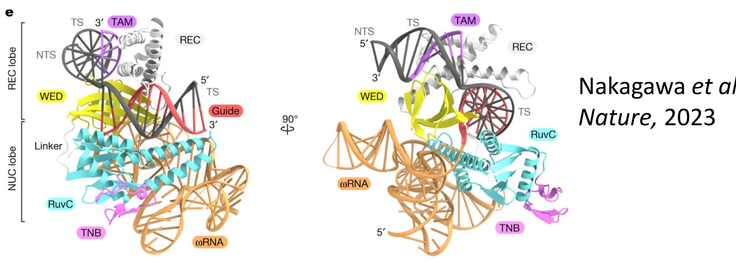


TnpB, Ancestor of CRISPR-Cas12

- TnpB is encoded by the IS200/IS605 transposon superfamily and is an RNA-guided DNA endonuclease.
- CRISPR-Cas12 enzymes are thought to have evolved from TnpB.





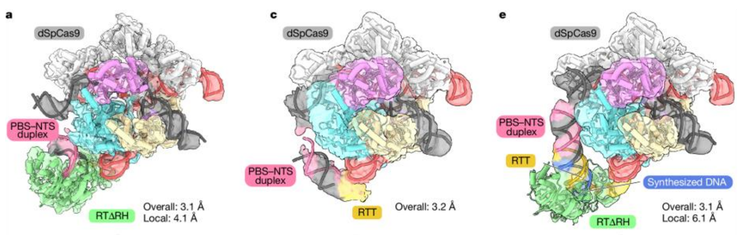


Nakagawa *et al., Nature,* 2023

2.構造ダイナミクス解析

「切らない」ゲノム編集ツールprime editorの複数状態構造解析

(Shuto *et al., Nature,* 2024)

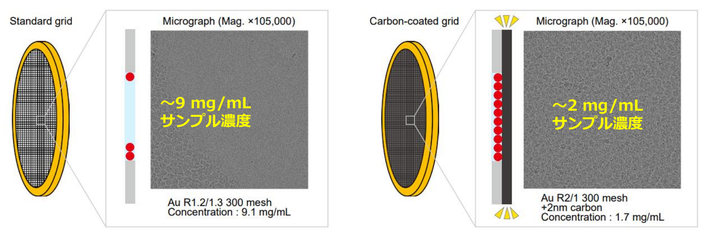


Initiation state **Pre-Initiation state** **elongation state**

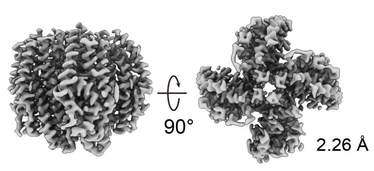
- Prime editor is composed of SpCas9 nickase fused to engineered M-MLV reverse transcriptase.

3.低収量標的のグリッド調製

タンパク質粒子がカーボン膜に吸着することで、低濃度でもホールに均一に分布



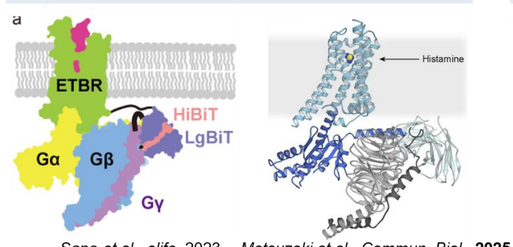
ボトルネックとされる低いS/N比も適切なデータ解析によって克服



Yamaguchi *et al., Nature, in review*

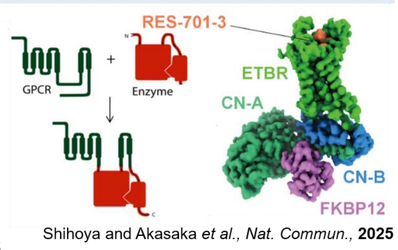
4. 高難度GPCRの構造解析

Co-expression(Fusion-G System)



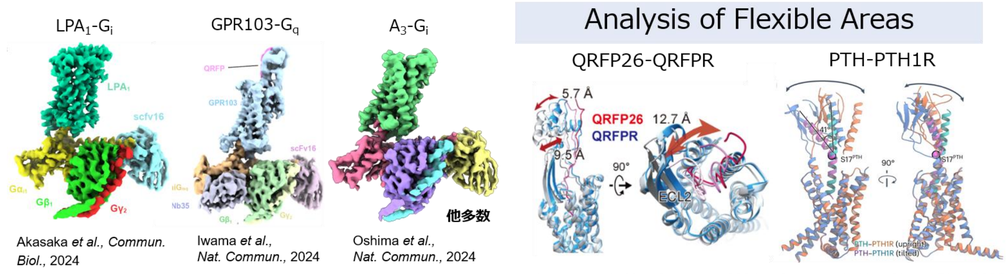
Sano *et al., elife,* 2023 *Matsuzaki et al., Commun. Biol.,* **2025**

CN-Fusion Strategy



Shihoya and Akasaka *et al., Nat. Commun.,* **2025**

Analysis of Flexible Areas



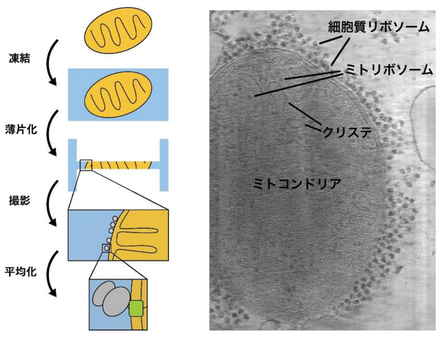
Akasaka *et al., Commun. Biol.,* 2024 Iwama *et al., Nat. Commun.,* 2024 Oshima *et al., Nat. Commun.,* 2024

Iwama *et al., Nat. Commun.,* 2024 Sano *et al., Nat. Chem. Biol.,* **2025**

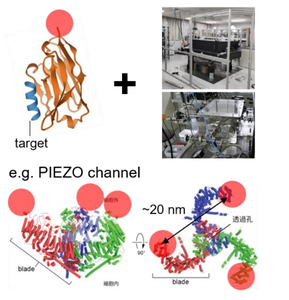
今後の発展

膜超分子複合体のin situ cryo-ET

Cryo-ET of mitochondria



Cryo-single-molecule imaging for cryo-nanoCLEM



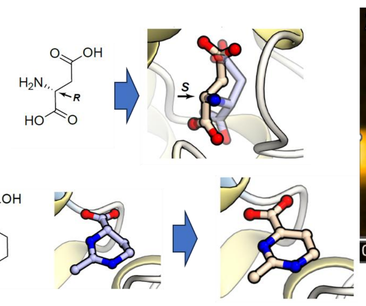
- The ribosome alone can be resolved at 5 Å resolution, but no density has been obtained for the associated membrane proteins.
- We are currently performing cryo-single-molecule imaging using fluorescently labeled NbALFA for cryo-nanoCLEM.

計算化学による化合物結合予測の改善

AF3構造予測における化合物の立体化学エラー問題を立体異性、結合長、結合角の制約を加えることによって解決

分担者：石谷隆一郎　科学大教授

- **Critical limitation of AF3**
  - Frequent stereochemical violations in ligands
    - **30-40% chirality error rate** (R/S configuration inversion)
    - High bond length/angle deviations
- **Apply stereochemical restraints**
  - Chirality restraints
  - Bond/angle restraints
- **Results and Impact**
  - Chirality Error Rate: 30-40% → 0%
  - Reduced Ring/bond geometry errors

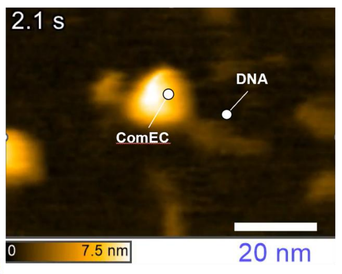


R Ishitani, **Y Moriwaki**, *ACS Omega*, DOI:10.1021/acsomega.5c07675, (2025).

Copyright 2023 Japan Agency for Medical Research and Development. All Rights Reserved

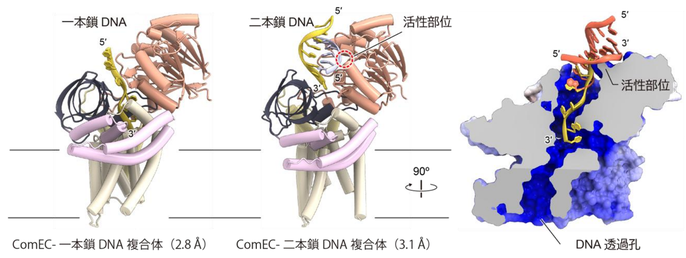
高速AFMによるリアルタイム一分子ダイナミクス解析

細菌の自然形質転換においてDNAを取り込むComECの高速AFM動的解析



ComECの単粒子構造解析

Hirano *et al., Science,* **2026**



✓ ComECはdsDNAの片方の鎖を切断し、もう片方を輸送する
✓ どのように透過孔を通過するか、またその駆動力は未解明である