助成番号　210667	５－２

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	RNA 代謝に関わる膜取り込み機構の解明		
研究テーマ（英文）	Elucidation of membrane uptake mechanisms involved in RNA metabolism		
研究期間	2021年 ～ 2025 年	研究機関名　横浜市立大学	
研究代表者	氏名（漢字）	西澤　知宏	
	氏名（カタカナ）	ニシザワ トモヒロ	
	氏名（英文）	Tomohiro Nishizawa	
	所属機関・職名	横浜市立大学・教授	
共同研究者（計＿＿＿名）＊２名をこえる場合は、【別紙追加用紙】(P3)に３人目以降を追記してください。	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		
	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関・職名		

概要 （600 字～800 字程度にまとめてください。）

線虫由来 SIDT2 のクライオ電子顕微鏡構造解析から、二量体の構造が明らかになった。さらに二重鎖 RNA との複合体の構造解析から、細胞外ドメインに核酸が結合することが明らかになった。また、この相互作用は、主に正荷電性アミノ酸と核酸の負電荷による静電相互作用を介して行われており、アミノ酸の配列上の厳密な位置は異なっているものの、細胞外ドメインにおける正電荷性アミノ酸残基は広い種で保存されていることが明らかになった。一定以上の長さを持つ核酸が結合した場合、SIDT2 分子が核酸の周辺に数珠のように集合することから、核酸の結合によって脂質膜中における SIDT2 の多量体化が引き起こされることで、膜のリモデリングにつながる可能性を示唆した。また、脂質膜中での多量体構造を明らかにすることを目指して、いくつかのアプローチを試みた。具体的には、脂質リポソームに精製タンパク質を再構成する方法の確立をめざし、条件を検討したところ、精製タンパク質と脂質を混合した後に、ゲル濾過カラムによって界面活性剤濃度を下げることで、均一なサイズの小胞を効率よく得られることを見出した。また、生体から小胞を調製する方法に関しても検討を行い、組織を破砕して得られた細胞を超音波で破砕した後に、抗体カラムを用いて目的膜タンパク質を多く含む小胞を高密度で得るための調製法を確立した。一方で、調製した小胞は、膜タンパク質に起因する電荷等が原因で、凝集する傾向があることが分かった。構造解析のためには、この凝集を避ける必要があるため、今後条件の検討を進めている。また、これらの材料を用いて、クライオ電子顕微鏡による観察を行い、撮影像からうまく粒子をピックアップするための方法を検討中である。これらの方法は、SIDT2 以外のタンパク質においても適用可能であることから、現在は技術の汎用化に向けた検討も進めている。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）

雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	

英文抄録（100 語～200 語程度にまとめてください。）
Cryo-electron microscopy analysis of *C.elegance* SIDT2 revealed its dimer structure. Furthermore, structural analysis of its complex with double-stranded RNA showed that nucleic acids bind to the extracellular domain, which is mainly mediated by electrostatic interactions between positively charged amino acids and the negatively charged nucleic acids. Although the precise positions of these amino acids differ in the sequence, it was found that the positively charged residues in the extracellular domain are conserved across a wide range of species. These results suggest that the binding of nucleic acids with a certain length induces SIDT2 oligomerization within the lipid membrane, potentially leading to membrane remodeling. To reveal the SIDT2 structure in lipid membrane, we established a method to reconstitute the purified protein into liposomes by diluting detergents on a gel filtration column. We also explored the preparation method of vesicles from biological sources, by utilizing an antibody-affinity column after the cell disruption. However, the isolated vesicles aggregate on the grids, probably due to the surface electric charges of reconstituted proteins. Further optimization of conditions is currently underway to enable .