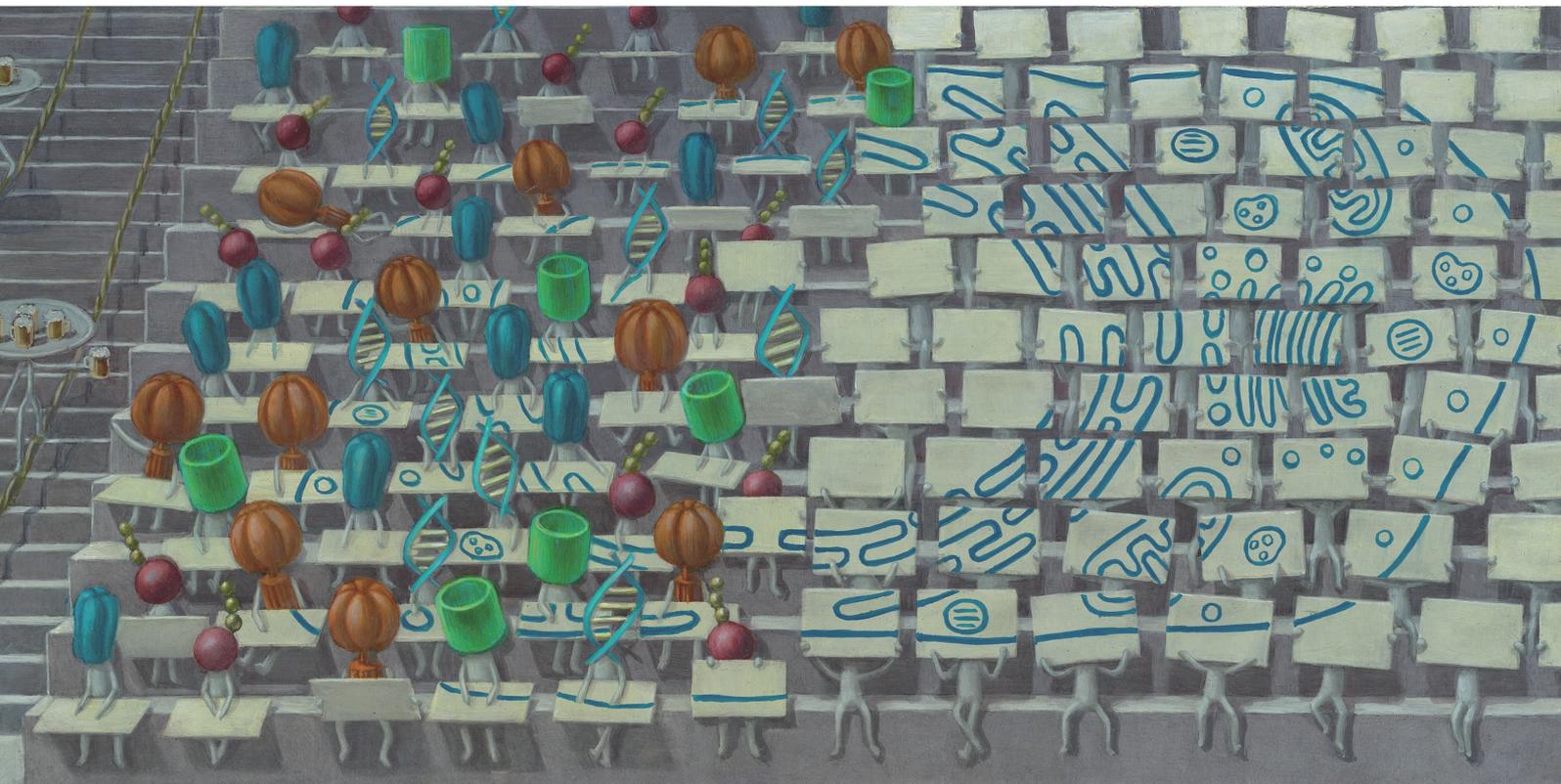


Spying Minority in Biological Phenomena

少数性生物学

— 個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求 —

(領域番号: 3306)



平成23年度～平成27年度

科学研究費助成事業(科学研究費補助金)

新学術領域研究(研究領域提案型)

研究成果報告書

平成29年3月

領域代表者 永井 健治

大阪大学産業科学研究所・教授

少数性生物学

—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—

(領域番号：3306)

平成23年度～平成27年度

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）
新学術領域研究（研究領域提案型）

研究成果報告書

平成29年3月

領域代表者 永井 健治
大阪大学産業科学研究所・教授

新学術領域研究「少数性生物学 - 個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求 -」は5年間の研究期間を終え平成27年度をもって終了いたしました。発足当初は「少数性」に目を向けて生命現象について考えることの重要性については理解されていたものの、それを研究としてどのように展開していけば良いのかについては計画班メンバーも含めて領域内で手探りの状態でのスタートでした。期間の前半では新しい概念を作り上げながら共有する作業の難しさを実感させられましたが、年2回の領域会議での熱いディスカッションに加え、少数性生物学デバイス研究会や少数性生物学データ討論会などの集まりを通して、生物学において少数性問題に取り組むために、何を対象として何を計測すれば良いのか？そのためにはどのような概念が必要であるのか？といった基本的な問いに対する議論を尽くし、少数性のコンセプトを領域内で共有することはできたかと思われまます。これらの活発な交流はまた、新学術領域研究の重要な役割の一つである領域内メンバー間での共同研究を多数生み出し、それらをまとめた研究成果として発表するまでに至っております。国内の各学会で常に会場を埋め尽くす聴衆を集めた領域主催のシンポジウム、台湾 Academia sinica での国際シンポジウム、PacifiChem2015 でのシンポジウム等を通して国内外の研究者に対して少数性生物学を発信することもできました。さらに、毎年夏の2週間にわたる少数性生物学トレーニングコースでは、学生を中心とした今後の研究を担う若手研究者に対し、技術的な講習を行うと共に、講師を交えた討論を通じて少数性生物学の概念を啓蒙することができました。領域会議への参加やトレーニングコース、或いは共同研究を通じお世話になった協賛企業の皆様とも、少数性に取り組むための技術的イノベーションの可能性を探ることができました。このように、新学術領域研究としては一定の成果を挙げてその研究期間を終えたわけですが、私共が提案した少数性生物学が学問領域として定着させるために、領域メンバーの皆様には、是非とも宇宙の果てまで突き抜ける研究を継続しながら少数性生物学を世界に向けて発信し続けていただきたいと思います。願っております。

最後になりましたが「少数性生物学」を支援していただきました全ての方々に心からお礼を申し上げます。

領域代表 永井 健治

目次

• はしがき	1
• 研究組織	3
総括班	4
A01 班	5
A02 班	8
A03 班	11
• 交付決定額（配分額）.....	13
• 研究領域の目的及び概要.....	15
• 研究成果	19
A01 班	20
A02 班	59
A03 班	104
• 主な研究発表一覧	132
雑誌論文	133
学会発表	144
図書	153
• 研究成果による産業財産権の出願・取得状況	155
• アドバイザーからのことば	158
• 技術支援班のことば	161
• 領域活動	165
領域会議の開催	166
「少数性生物学」トレーニングコース・研究会の開催.....	167
領域主催シンポジウムの開催	168
「少数性生物学」バイオナノフォトニクスコンソーシアム運営	170
書籍「少数性生物学」の出版	172
• 領域記録	173

研究組織

※所属機関・部局・職名は、研究期間終了時点のもの

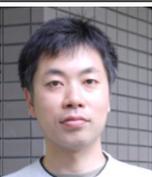
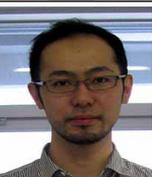
総括班

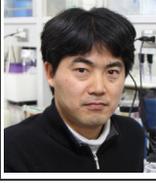
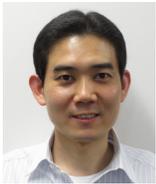
少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—

	氏名	機関	役割分担
研究代表者	永井 健治	大阪大学・産業科学研究所・教授	領域総括
連携研究者	石島 秋彦	大阪大学・生命機能研究科・教授	領域推進方針の策定
	今田 勝巳	大阪大学・理学研究科・教授	領域推進方針の策定
	前島 一博	国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授	企画担当（国際会議）
	野地 博行	東京大学・工学系研究科・教授	広報担当（ホームページ）
	上田 泰己	東京大学・医学系研究科・教授	広報担当（渉外、広報誌発行）
	富樫 祐一	広島大学・理学研究科・特任准教授	研究支援担当
	新井 由之	大阪大学・産業科学研究所・助教	事務担当（総務）
	松田 知己	大阪大学・産業科学研究所・准教授	事務担当（会計）
	吉村 成弘	京都大学・生命科学研究所・准教授	企画担当の補助
	堀川 一樹	徳島大学・医歯薬学研究部・教授	企画担当（国内学会）
	渡邊 朋信	理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー	研究支援担当
	藤田 克昌	大阪大学・工学研究科・准教授	研究支援担当
	金原 数	東京工業大学・生命理工学研究科・教授	研究支援担当
	山東 信介	東京大学・工学系研究科・教授	研究支援担当
	竹内 昌治	東京大学・生産技術研究所・教授	研究支援担当
小松崎 民樹	北海道大学・電子科学研究所・教授	研究支援担当	
アドバイザー	柳田 敏雄	大阪大学・理化学研究所・情報通信研究機構	評価委員
	神原 秀記	株式会社日立製作所	評価委員
	河田 聡	大阪大学・工学研究科	評価委員
	金子 邦彦	東京大学・複雑系生命システム研究センター	評価委員
海外 アドバイザー	Jie Xiao	Johns Hopkins University, USA	技術アドバイス
	Thomas Dertinger	SOFast GmbH, Germany	技術アドバイス
	Peilin Chen	Academia Sinica	技術アドバイス
技術支援班			

A01 班

少数性の生物学研究に必要な技術開発と整備

A01-1 班 細胞内分子数を定数解析するデバイスの開発—少数生体分子の計数化技術—	
 <p>研究代表者 野地 博行 東京大学・工学系研究科・教授</p>	 <p>研究分担者 渡邊 朋信 理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー</p>
 <p>研究分担者 市村 垂生 理化学研究所生命システム研究センター 研究員</p>	 <p>連携研究者 藤田 克昌 大阪大学・工学研究科・准教授</p>
A01-2 班 分子プローブと光摂動ツールの開発—少数生体分子の可視化・操作技術—	
 <p>研究代表者 永井 健治 大阪大学・産業科学研究所・教授</p>	 <p>研究分担者 金原 数 東京工業大学・生命理工学研究科・教授</p>
 <p>研究分担者 堀川 一樹 徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授</p>	 <p>連携研究者 山東 信介 東京大学・工学系研究科・教授</p>
 <p>連携研究者 浦野 泰照 東京大学・医学系研究科・教授</p>	 <p>連携研究者 小澤 岳昌 東京大学・理学系研究科・教授</p>
 <p>連携研究者 松田 知己 大阪大学・産業科学研究所・准教授</p>	 <p>連携研究者 新井 由之 大阪大学・産業科学研究所・助教</p>
A01 公募班（後期）	
 <p>研究代表者 茅 元司 東京大学・理学系研究科・助教 連携研究者 小林 琢也 東京大学・大学院総合文化研究科・研究員 鷲尾 巧 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授 ミオシン少数分子間の動態を可視化する 1 分子計測法に基づく協同性の検証</p>	
 <p>研究代表者 井上 圭一 名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教 連携研究者 須藤 雄気 岡山大学・大学院薬学研究科・教授 細菌の走性における数的多様性の解明</p>	

	<p>研究代表者 藤原 敬宏 京都大学・物質－細胞統合システム拠点・准教授</p> <p>動的少数分子複合体ユニット機構：3次元1分子超局在顕微鏡による解明</p>
	<p>研究代表者 原田 慶恵 京都大学・物質－細胞統合システム拠点・教授</p> <p>連携研究者 韓 龍雲 京都大学・物質－細胞統合システム拠点・助教</p> <p>DNA－タンパク質相互作用のデジタルカウンティング</p>
	<p>研究代表者 高森 茂雄 同志社大学・脳科学研究科・教授</p> <p>連携研究者 森 靖典 同志社大学・研究開発推進機構・准教授 江頭 良明 同志社大学・研究開発推進機構・助教</p> <p>少数のプロトンが駆動するシナプス小胞再充填の定量解析</p>
	<p>研究代表者 村越 秀治 生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授</p> <p>シナプス内状態揺らぎによる反応モジュレーションと機能連関</p>
	<p>研究代表者 城口 克之 理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員</p> <p>細胞集団中のマイノリティのジェノタイプを一細胞レベルで同定する方法の開発</p>
A01 公募班（前期）	
	<p>研究代表者 井上 圭一 名古屋工業大学・工学研究科・助教</p> <p>連携研究者 須藤 雄気 名古屋大学大学院理学研究科・教授</p> <p>「数」を視点とした走光性信号伝達過程における信号増幅機構の解明</p>
	<p>研究代表者 山下 高廣 京都大学・理学研究科・助教</p> <p>光によるGタンパク質シグナリング制御を可能にする受容体の開発</p>
	<p>研究代表者 藤原 敬宏 京都大学・物質－細胞統合システム拠点・講師</p> <p>動的カドヘリン複合体の機能：3次元1分子超追跡法の開発による解明</p>
	<p>研究代表者 水上 進 大阪大学・工学研究科・准教授</p> <p>光機能性プローブを用いた生体分子の少数活性化</p>



研究代表者

高橋 章 徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

腸炎ビブリオにおけるⅢ型分泌機能の数と病原性誘導



研究代表者

政池 知子 東京理科大学・理工学部・講師

リン酸結合蛋白の微小溶液チャンバーによる、少数個蛋白質からのリン酸検出系の構築



研究代表者

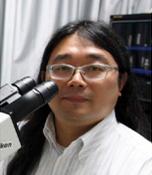
村越 秀治 生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

シナプス内分子数揺らぎが可塑性誘起に与える影響

A02 班

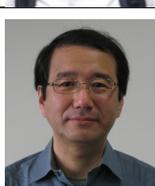
少数性の生物学

A02-1 班 細細胞内情報伝達の少数性生物学ー生命システムにおけるポアソン性の解析ー	
 <p>研究代表者 石島 秋彦 大阪大学・生命機能研究科・教授</p>	 <p>研究分担者 朽尾 豪人 京都大学・理学研究科・教授</p>
A02-2 班 遺伝子発現の少数性生物学ー少数分子による情報探索原理の解明ー	
 <p>研究代表者 前島 一博 国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授</p>	 <p>研究分担者 谷口 雄一 理化学研究所・生命システム研究センター・ユニットリーダー</p>
 <p>連携研究者 高橋 恒一 理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー</p>	 <p>連携研究者 吉村 成弘 京都大学・生命科学研究所・准教授</p>
A02-3 班 生体リズムの少数性生物学ー生命システムにおけるターンオーバー制御と分子少数性ー	
 <p>研究代表者 上田 泰己 東京大学・医学系研究科・教授</p>	 <p>研究分担者 大出 晃士 東京大学・医学系研究科・助教</p>
 <p>研究協力者 (研究分担者 2011 ~ 2012 年度) 鵜飼 英樹 理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員</p>	 <p>(研究分担者 2011 ~ 2012 年度) 中嶋 正人 理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員</p>
A02 公募班 (後期)	
 <p>研究代表者 大場 雄介 北海道大学・医学研究科・教授 連携研究者：南保 明日香 北海道大学・医学研究科・准教授 西出 真也 北海道大学・医学研究科・助教 藤岡 容一郎 北海道大学・医学研究科・助教</p> <p>バイオイメーjingによるウイルス感染と細胞応答の定量解析</p>	
 <p>研究代表者 小嶋 誠司 名古屋大学・理学研究科・准教授 連携研究者：本間 道夫 名古屋大学・理学研究科・教授 今田 勝巳 大阪大学・理学研究科・教授</p> <p>細菌べん毛本数を厳密に制御する分子機構</p>	
 <p>研究代表者 竹内 裕子 大阪大学・生命機能研究科・准教授</p> <p>情報伝達チャンネルの興奮と抑制を修飾する少数分子の機構解明</p>	

	<p>研究代表者 堀江 恭二 奈良県立医科大学・医学部・教授</p> <p>発現のオンとオフを繰り返す少数分子による ES 細胞の多能性の制御</p>
	<p>研究代表者 宮崎 牧人 早稲田大学・理工学術院・助教</p> <p>構成論的アプローチによる収縮環の収縮機構の解明</p>
	<p>研究代表者 森本 雄祐 理化学研究所・生命システム研究センター・研究員</p> <p>細胞内局所 pH 制御メカニズムの解明</p>
	<p>研究代表者 岡田 康志 理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー</p> <p>神経細胞の自発的形態形成における少数資源の奪い合いによる自己組織化機構の研究</p>

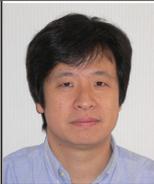
A02 公募班（前期）

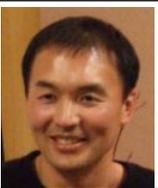
	<p>研究代表者 矢島 潤一郎 東京大学・総合文化研究科・准教授</p> <p>染色体分離を制御する動原体に働く力バランスの定量</p>
	<p>研究代表者 並木 繁行 東京大学・医学系研究科・助教</p> <p>連携研究者：藤田 克昌 大阪大学・工学研究科・准教授 渡邊 朋信 理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー 廣瀬 謙造 東京大学・医学系研究科・教授</p> <p>シナプス機能制御における少数分子の空間的コーディネートの意味の解明</p>
	<p>研究代表者 丹羽 達也 東京工業大学・生命理工学研究科・助教</p> <p>発現量の少ないタンパク質の凝集性とシャペロン要求性の解析</p>
	<p>研究代表者 小嶋 誠司 名古屋大学・理学研究科・准教授</p> <p>連携研究者：本間 道夫 名古屋大学・理学研究科・教授 今田 勝巳 大阪大学・理学研究科・教授</p> <p>細菌べん毛形成を 1 本に制御する仕組み</p>

	<p>研究代表者 小嶋 勝 大阪大学・基礎工学研究科・助教 少数分子時における生物時計の時計安定性評価</p>
	<p>研究代表者 笠井 倫志 京都大学・再生医科学研究所・助教 GPCRのシグナル伝達経路の分岐の仕組み：1分子観察法を用いた研究</p>
	<p>研究代表者 桑田 昌宏 京都大学・生命科学研究科・助教 核一細胞質間の物質輸送を制御する核膜孔複合体内の分子動態の解明</p>
	<p>研究代表者 曾和 義幸 法政大学・生命科学部・講師 生物回転ナノマシン構成素子の機能イメージング</p>
	<p>研究代表者 川岸 郁朗 法政大学・生命科学部・教授 連携研究者：曾和 義幸 法政大学・生命科学部・講師 分子イメージングによる異物排出ポンプ細胞内動態の解析</p>
	<p>研究代表者 広瀬 恵子 産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員 少数のダイニンと微小管から成る振動系の作成と構造・機能研究</p>

A03 班

少数性の生物学の理論構築と *in vitro* 再構成による検証

A03-1 班 少数分子反応ネットワーク理論の構築—少数性と階層性の観点からのモデリング—	
 <p>研究代表者 富樫 祐一 広島大学・理学研究科・特任准教授</p>	 <p>研究分担者 小松崎 民樹 北海道大学・電子科学研究所・教授</p>
 <p>連携研究者 李 振風 北海道大学・電子科学研究所・准教授</p>	 <p>連携研究者 寺本 央 北海道大学・電子科学研究所・助教</p>
 <p>連携研究者 新海 創也 広島大学・理学研究科・特任助教</p>	 <p>連携研究者 Holger Flechsig 広島大学・理学研究科・助教</p>
A03-2 班 少数分子生体システムの再構成—複合体構成分子の数の制御と理論検証—	
 <p>研究代表者 今田 勝巳 大阪大学・理学研究科・教授</p>	 <p>研究分担者 内橋 貴之 金沢大学・数物科学系研究科・准教授</p>
 <p>連携研究者 竹内 昌治 東京大学・生産技術研究所・教授</p>	 <p>連携研究者 南野 徹 大阪大学・生命機能研究科・准教授</p>
A03 公募班（後期）	
 <p>研究代表者 林 久美子 東北大学・工学研究科・助教 連携研究者：岡田 康志 理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー 少数のタンパク質モーターによる神経細胞オルガネラ輸送の協同的メカニズムの解明</p>	
 <p>研究代表者 斉藤 稔 東京大学・総合文化研究科・助教 少数性転移を起こすコア反応モチーフの解析とその探索</p>	
 <p>研究代表者 市川 正敏 京都大学・理学研究科・講師 連携研究者：西上 幸範 京都大学・理学研究科・研究員 生体高分子が化学反応ネットワークに与える微小空間効果の解明</p>	

	<p>研究代表者 鈴木 宏明 中央大学・理工学部・教授</p> <p>細胞分裂時のゲノム分配における 1 分子性のモデル研究</p>
	<p>研究代表者 柴田 達夫 理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー</p> <p>連携研究者：中村 直俊 理化学研究所・生命システム研究センター・研究員 Prabhat Shankar 理化学研究所・生命システム研究センター・リサーチアソシエート</p> <p>シグナル伝達系におけるゆらぎの生成と伝搬の少数性生物学</p>
A03 公募班（前期）	
	<p>研究代表者 石原 秀至 東京大学・総合文化研究科・助教</p> <p>少数分子世界の細胞情報伝達理論</p>
	<p>研究代表者 濱田 勉 北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・准教授</p> <p>ミクロ小胞内DNAの分子挙動と微小空間特性</p>
	<p>研究代表者 鈴木 宏明 中央大学・理工学部・准教授</p> <p>モデル生体膜の物質封入における 1 分子性の物理化学的基盤の解明</p>
	<p>研究代表者 栗津 暁紀 広島大学・理学研究科・准教授</p> <p>細胞内反応場の実効的分子数の少数性と状態・機能最適化の統計力学的研究</p>

交付決定額（配分額）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	236,200,000	70,860,000	307,060,000
平成 24 年度	228,000,000	68,400,000	296,400,000
平成 25 年度	239,200,000	71,760,000	310,960,000
平成 26 年度	223,300,000	66,990,000	290,290,000
平成 27 年度	221,800,000	66,540,000	288,340,000
総 計	1,148,500,000	344,550,000	1,493,050,000

研究領域の目的及び概要

研究領域の目的及び概要

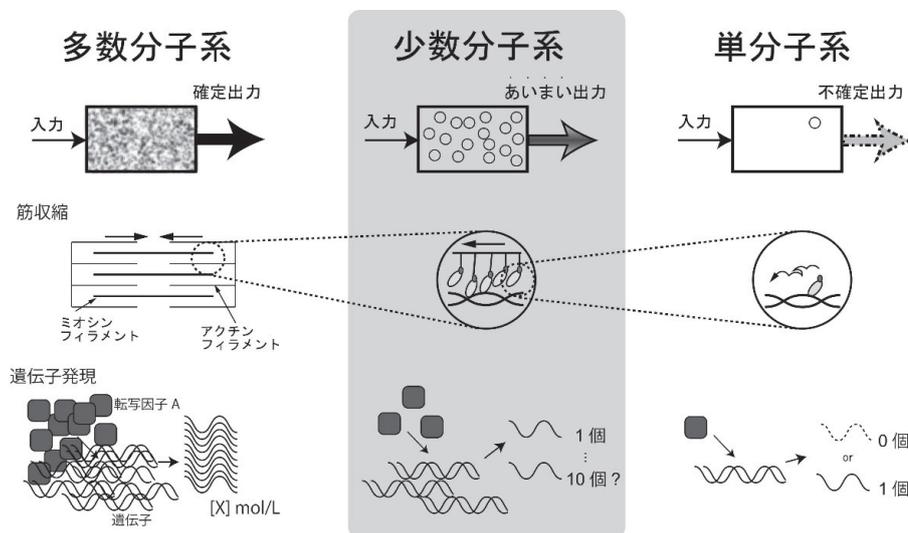
<領域の研究目的>

生命現象の本質の一つとして、“数個から数 10 個程度”の少数の要素分子から構成されるナノシステムが“協働的”に動作することが挙げられる (small number issue: 少数性問題)。例えば、筋収縮において複数のアクチンとミオシンが協働して滑りが起きることなどがこれに該当する。これまでアクチン-ミオシンを含め“単分子”の素過程を観察した例は数多く報告されているものの、“少数分子間”で生まれる協働性の素過程を生きた細胞内において解析した報告は“皆無”であり、少数の要素分子が如何にして極めて高い協働性を生み出すのかについては全く分かっていない。少数分子が協働的に反応することで、出力の安定化に寄与する一方、分子の少数性に起因する不安定な出力も起こり得る。この反応の曖昧さが、ひいては、階層を越えたマクロな生命システムの動作安定性と一部の動作不安定性に結びつく可能性があり、生命の動作原理を理解する上で、極めて重要な観点といえよう。しかしながら、細胞内における少数の分子反応を扱う理論が未整備であったことに加え、少数分子の細胞内挙動を操作し計測する技術も無かったため、これまでほとんどアプローチされてこなかった。そこで本研究領域では、このような少数分子からなる生体システムを実験に供し、理論を構築するために以下の研究を展開する。

A01 分子数の計測と制御を可能にする基盤技術開発研究

A02 モデル生命現象に A01 で開発した技術で切り込む解析研究

A03 A02 で得られたデータをもとに、1 分子系と多分子系のギャップを埋める少数分子系理論の構築、ならびにその理論を再構成系で検証する研究



<学術的背景・問題点>

分子生物学の進展により、様々な生命現象に関わる遺伝子が同定され、遺伝子産物（タンパク質）が形成する分子ネットワークがプロテオーム解析により網羅されつつある。また、タンパク質間の相互作用や酵素活性の強さなどは、生化学的解析により解離定数 (Kd) やミカエリス定数 (Km) などの濃度のパラメータで“確定的”に表記され、それらのパラメータを分子ネットワーク内にインプットすることで、コンピュータ上に分子ネットワークが

動作する様子を疑似計算できるようになってきた。

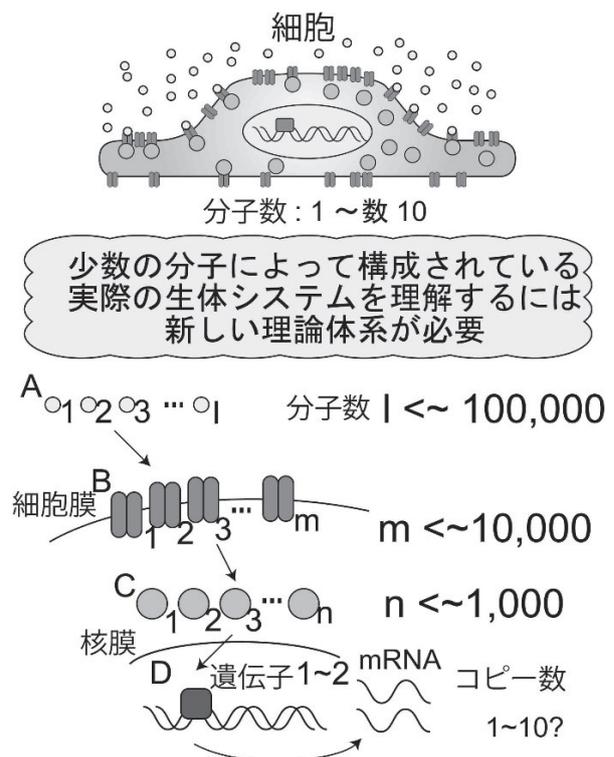
一方、生命現象を分子論的に理解するためには、生化学のような大多数分子の集合体（アンサンブル）の振る舞いではなく、現象の素過程である個々の分子の振る舞いを捉える事が重要である。この観点から1分子生物学が近年大いに発達し、様々な生体分子の素過程が1分子レベルで観察されてきた。そこで見えてきたものは、生体1分子が示す出力が測定毎に異なり“不確定”である、というものである。ところが、多くの1分子測定データを平均化すると、生化学的手法で得られた測定値と一致することから、生体分子の素反応が何万回と繰り返され、平均として捉えた場合には確定的な出力を産み、細胞というマクロレベルでの安定応答を引き起こすという描像を多くの研究者が持つに至っている。

他方、GFPテクノロジーを用いたバイオイメーjingによって、多くの生命現象が生きた細胞や個体内で観察されるようになったが、ここで見えてきたものは、生物が研究者のいわば恣意的な行為に対し、常に期待通りの安定した出力ではなく、時に予測不可能な不安定な挙動を示すというものである(Minority issue:マイノリティ問題)。この動作の曖昧さ、つまり大部分の安定さとともに一部の不安定性を許容できるところに生命システムの大きな特徴があるが、この描像は上述の生化学や1分子生物学からは見出す事は不可能である。このミッシングリンクを考える上で重要な鍵は、少数の要素分子が共存する細胞内環境下での分子反応の素過程を観察し、より現実的な生命システムの動作描像に迫ることである。

<新学問領域「少数性生物学」の提唱>

そこで本研究領域では「個と多数の狭間である少数個の要素分子が織りなす化学反応システム」に注目し、顕微光学、MEMS工学、蛍光物理化学、合成有機化学、タンパク質工学、細胞生物学、システム生物学、数理科学の諸分野を融合することにより「少数性生物学」と称する新学問領域を形成する。技術開発系と実験系、理論系の専門家が手を組み、従来とは異なる視点で生命現象にアプローチする。とくに、少数の生体分子からなる化学反応システムにおける分子間の協働性、超コヒーレンス、自己組織化、ポアソン性、エルゴード性、多階層間相互作用などの観点からのアプローチを進める。本領域で扱う生命現象は真核生物、原核生物を問わずあらゆる生物で見出される現象であることから生命現象一般を説明しうる統一的原理を提出できる可能性が高い。

本研究領域に計画研究として参加している研究者は国際的に誇れる高い水準を有しているが、本邦における研究のさらなる広がりとして一層の先端的研究の推進が望まれる。本研究領域における研究協力をもとに、新たな手法を用いて先に記載した重要な問題点について取



り組むことにより、従来なし得なかった先鋭的・独創的な研究成果が得られると見込まれる。その成果は従来の学問領域ではなし得なかった「生命とは何か？」の解明に寄与するのみならず、化学・物理学分野へもパラダイムの変革をもたらす可能性がある。本研究領域では比較的若いメンバーで計画研究が構成され（発足当時の構成メンバーの平均年齢は39歳）、若手育成にも力を入れるため、本領域の活動は将来にわたって我が国における当該分野・理工系分野の多大な発展に貢献できると考えられる。

研究成果

【A01班】

少数性の生物学研究に必要な技術開発と整備

細胞内分子数を定数解析するデバイスの開発 —少数生体分子の計数化技術—

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23115002

研究代表者名：野地 博行（東京大学工学系研究科 教授）

研究分担者名：渡邊 朋信（国立研究開発法人理化学研究所生命システム研究センター チームリーダー）

研究分担者名：市村 垂生（国立研究開発法人理化学研究所生命システム研究センター 研究員）

連携研究者名：藤田 克昌（大阪大学工学研究科 准教授）

1. 研究の目的

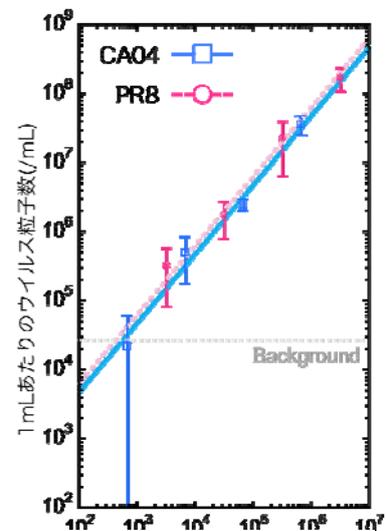
本プロジェクトでは、上記の技術的問題を克服することを目的とし、1細胞を解析する技術開発に取り組んだ。特に、1つの細胞中に存在するタンパク質分子の絶対定量に資する技術や、分子もしくは細胞状態を定量計測する技術を開発することで、small number issue, minority issueを解明しうる技術的基盤の確立を目指した。

2. 研究成果

①. 1分子デジタル計測技術を用いた少数分子計測技術の開発

まず、抗体を用いた蛋白質の絶対定量を可能とするために1分子単位のデジタルELISA法を確立した(Lab on a chip 2012)。また、1分子単位ではないが、ヒト細胞中に発言している蛋白質を1細胞単位で計測するデバイス技術も開発した(Lab on chip 2013)。さらに、これを1細胞計測に拡張し、するため、モデル酵素(βガラクトシダーゼ)の絶対数を大腸菌とヒトリンパ腫由来細胞(U937)に関して1細胞毎に計測した。その結果、大腸菌に関しては平均713個(非発現誘導時)、U937細胞に関しては平均60万分子という値を得ている。

公募班の大場らと共同で、インフルエンザ1粒子計測技術を確立した。その結果、1mLあたり10感染性ウイルス粒子程度しかない試料でもウイルスの有無を判別できる技術を確立した。このとき、感染性ウイルス数は並行して行った培養細胞を用いた系で決定したが、デジタル計数で検出されたウイルス数は常にその数十倍あった。当初、これは我々の試料の取り扱いに問題があり、ウイルスが失活したためと考えたが、調整直後のウイルス試料を一切凍結等の処理をしないで数時間以内で計測しても同様の結果を得た。これは、本来ウイルス粒子はすべてが感染性を持つわけではなく、ごく数%しか感染能を持たないことを意味する。大場らのグループは、細胞イメージングによってウイルス粒子は複数で1つの宿主細胞に結合し、共同で感染を確立するという観察結果を得ている。これらを合わせて考えると、インフルエンザウイルスは、細胞内では1粒子で感染を成立させる戦略ではなく、複数で強調して感染を成立させ



上図：感染性ウイルス数（横軸）とデジタル分析によるインフルエンザ粒子数（縦軸）。CA04, PR8はそれぞれインフルエンザの株名。

る戦略をとっているとうこれまでの常識を覆す仮説が導きだされた。

②. 非線形光学技術を用いた生細胞イメージング技術

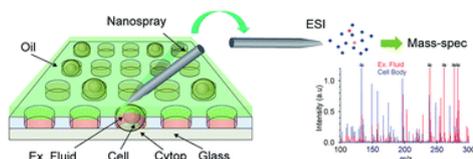
Qdot を用いて複数種類の分子を同時にナノ計測する技術を開発した(Biomedical Optics Express *accepted*)。また、第二次高調波顕微鏡を開発し、線維状蛋白質の構造状態を1本単位で検出する系を開発し、予想外の協同的構造変化の計測に成功した(投稿準備中)。その他、A01-2 班の永井グループと共同で蛍光タンパク質を用いた超解像イメージング技術の開発にも成功した。

③. 蛍光プローブを用いた細胞状態計測

野地グループは、バクテリア細胞に適した FRET に依存しない蛍光性 ATP プローブ蛋白質(BQueen)の開発に成功し、バクテリア細胞毎の ATP 分布計測に成功した(Sci. Rep. 2014)。その結果、合成培地中で連続培養時には ATP 濃度は 1mM から 10mM 近くまで分布していることに加え、その分布の形は正規分布ではなく非対称性を持つものであることを明らかとした。また、培養条件によってその分布の形状が変化することも明らかとなった。渡辺グループは、溶液の蛋白質濃度という非常に普遍的な細胞特徴を定量する蛍光プローブ蛋白質の開発に成功した(Sci. Rep. 2016)。これによって、細胞周期や細胞活動と連動した細胞内タンパク質濃度ダイナミクスの1細胞計測が可能となった。

④. 野地グループと渡辺グループの共同研究

野地グループが有する微小溶液チャンバー技術と、渡辺グループが有する微量サンプル質量分析技術を融合させた技術を開発した。その結果、免疫細胞が分泌するペプチド成分の1細胞計測に成功し、分泌性ペプチドの成分の時間変化や細胞毎の特性評価に成功した(RSC Adv. 2015)



野地 G と渡辺 G が共同で行った分泌ペプチド1細胞計測技術の模式図。一定時間毎に細胞を封入したチャンバー溶液を一部回収し質量分析を行う。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Kakizuka, T., Ikezaki, K., Kaneshiro, J., Fujita, H., Watanabe, T. M., and Ichimura, T. (2016). Simultaneous nano-tracking of multiple motor proteins via spectral discrimination of quantum dots. Biomedical Optics Express. accepted.
2. Morikawa, T. J., Fujita, H., Kitamura, A., Horio, T., Yamamoto, J., Kinjo, M., Sasaki, A., Machiyama, H., Yosizawa, K., Ichimura, T., Imada, K., Nagai, T., Watanabe, T. M. (2016). Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it. Scientific Reports 6, 22342.
3. Kaneshiro, J., Watanabe, T. M., Fujita, H., and Ichimura, T. (2016). Full control of polarization state with a pair of electro-optic modulators for polarization-resolved optical microscopy. Applied Optics. 55, 1082-1089.
4. Watanabe, R., Soga, N. and Noji, H. (2016). Novel nano-device to measure voltage-driven membrane transporter activity. IEEE Transactions on Nanotechnology. 15, 70-73.
5. Li, C. B., Ueno, H., Watanabe, R., Noji, H. and Komatsuzaki, T (2015). ATP hydrolysis assists phosphate release and promotes reaction ordering in F1-ATPase. Nature Communications. 6, 10223.
6. Obayashi Y, Iino R, Noji H (2015). A single-molecule digital enzyme assay using alkaline phosphatase with a

cumarin-based fluorogenic substrate, *Analyst*, 140, 5065-5073.

7. Soga N, Watanabe R and Noji H (2015). Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters, *Scientific Reports*, 5, 11025.
8. Watanabe R, Soga N, Yamanaka T and Noji H (2014). High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition. *Scientific Reports*, 4:7076, 1-6.
9. Yaginuma H, Kawai S, Tabata KV, Tomiyama K, Kakizuka A, Komatsuzaki T, Noji H and Imamura H, (2014). Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Scientific Reports*, 4:6522, 1-7.
10. Watanabe R, Soga N, Fujita D, Tabata KV, Yamauchi L, Kim SH, Asanuma D, Kamiya M, Urano Y, Suga H and Noji H, (2014). Arrayed Lipid Bilayer Chambers Allow Single-Molecule Analysis of Membrane Transporter Activity, *Nature Communications*, 5:4519, 1-8.
11. Ichimura, T., Jin, T., Fujita, H., Higuchi, H., and Watanabe, T. M. (2014). Nano-scale measurement of biomolecules by optical microscopy and semiconductor nanoparticles. *Frontiers in Physiology*. fphys.2014.00273, 10.3389.
12. Fujita, H., Esaki, T., Masujima, T., Hotta, A., Kim, S.-H., Noji, H., and Watanabe, T. M. (2015). Comprehensive chemical secretory measurement of single cells trapped in a micro-droplet array with mass spectrometry. *RSC Advances*. 5, 16968-16971.
13. Watanabe, T. M., Imada, K., Yoshizawa, K., Nishijima, M., Kato, C., Abe, F., Morikawa, T. J., Kinoshita, M., Fujita, H., and Yanagida, T. (2013). Glycine Insertion Makes Yellow Fluorescent Protein Sensitive to Hydrostatic Pressure. *PLoS ONE*. 8(8), e73212.
14. Watanabe, T. M., Fujii, F., Jin, T., Umemoto, E., Miyasaka, M., Fujita, H., and Yanagida, T. (2013). Four-Dimensional Spatial Nanometry of Single Particles in Living Cells Using Polarized Quantum Rods. *Biophysical Journal*. 105(3), 555-564.
15. Kim SH, He X, Kaneda S, Kawada J, Fourmy D, Noji H and *Fujii T (2013). Quantifying genetically inserted fluorescent protein in single iPS cells to monitor Nanog expression using electroactive microchamber arrays. *Lab on a Chip*, 14, 730-736.

(学会発表)

1. 渡邊朋信、散乱光を用いた生体計測、レーザー学会第36回年次大会、名古屋、2016年1月10日
2. Noji H, Single molecule analysis of transporter protein with arrayed lipid bilayer chamber, Pacific Chem, (Hawaii, US) 2015/12/18
3. Noji H, Redesigning of F1-ATPase, Pacific Chem, (Hawaii, US) 2015/12/15
4. Tomonobu M Watanabe, Single cell Non-invasive spectroscopy, 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Tokyo, 11/24/2015
5. Tomonobu M Watanabe, Development of imaging technology to detect intracellular physical parameters, THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY Joint Seminar, Hong Kong, 9/25/2015
6. Noji H, Single molecule biophysics of ATP synthase and digitalization revolution of bioassay, POSTECH seminar, POSTECH(Pohang University of Science and Technology, Korea) 2015/9/24
7. 市村垂生、垣塚太志、池崎圭吾、金城純一、藤田英明、渡邊朋信、波長分離による複数分子ナノ追跡、第56回応用物理学会年会、2015年9月13日～2015年9月16日、名古屋国際会議場

8. 渡邊朋信, 『単一』にこだわる計測技術開発、新学術領域 超高速バイオアセンブラ第 4 回若手シンポジウム、2015 年 7 月 3 日
9. 渡邊朋信、細胞と細胞集団との多層にまたがる状態遷移の定量解析、第 67 回日本細胞生物学会大会、東京、2015 年 7 月 1 日
10. 渡邊朋信、蛍光ゆらぎ相関計算に基づく超解像法、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、京都、2015 年 5 月 15 日
11. 市村垂生、Liang-da Chiu、藤田克昌、渡邊朋信、藤田英明、ラマン散乱顕微鏡による細胞状態遷移の一細胞計測、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、2015 年 5 月 13 日～2015 年 5 月 15 日、国立京都国際会館
12. Noji H., Single-molecule biophysics on ATP synthase, 2014 International Biophysics Congress (IUPAB2014), Brisbane Convention & Exhibition Centre(Brisbane, Australia), 2014/8/7. (Keynote lecture),
13. Noji H., Arrayed Lipid Bilayer Chamber for single-molecule analysis of transporters, European Bioenergetics Conference (EBEC2014), Faculdade de Ciências(Lisbon, Portugal), 2014/7/13.
14. Noji H., Single-Molecule Digital ELISA and Prospects of its Applications, World Lecture Series on Micro/Nanofluidics, Keio University (Kanagawa, Japana), 2014/7/2.
15. Noji H., Torque generation mechanism of F1-ATPase, Tokyo ATPase Workshop (TAW), The University of Tokyo (Tokyo, Japan), 2014/6/2
16. Noji H., Recent advances of Single molecule biophysics of ATP synthase, The 8th International Conference on Advanced Mateials and Device (ICAMD2013), Ramada Plaza Jeju Hotel (Korea), 2013/12/12
17. Noji H., Novel single-molecule systems to monitor the rotary dynamics and proton-pumping of FoF1-ATP synthase, ITALY IN JAPAN 2013 WORKSHOP (Methods for the investigation of ion transport machinery in biological Membranes), Istituto Italiano di Cultura (Tokyo JAPAN), 2013/10/16
18. Noji H., Single-molecule digital counting with femtoliter chamber array, International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013(NMMS2013), The University of Tokyo (JAPAN), 2013/10/9
19. Noji H., Torque-generation mechanism of F1-ATPase, The 13th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul (Korea), 2013/9/27
20. Noji H., Single-Molecule counting of biomolecules with femtoliter droplet chamber array, The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Barcelona International Convention Centre (Barcelona Spain), 2013/6/17.
21. Noji H., Single molecule biophysics of ATP synthase', Single Molecule Workshop. National Taicung University. 2013/4/12
22. Noji H., Single-Molecule Technology, Single-Molecule Biophysical Chemistry Workshop, Taipei (Taiwan), 2013/4/11.
23. Noji H., Single-Molecule Biophysics of ATP synthase, Single-Molecule Biophysical Chemistry Workshop, Taipei (Taiwan), 2013/4/11.
24. Noji H., Femtoliter chamber array for digital ELISA and single cell analysis. Workshop on Technologies for Single Cell Analysis. Hitachi Research Institute (Tokyo, Japan). 2013/4/4
25. Noji H., Design Principle of F1-ATPase Rotary Molecular Motor, France-Japan Seminar BioInspired Methods & Applications, Embassy of France in Japan, (Tokyo JAPAN), 2013/2/6
26. Noji H., Single-molecule digital counting of proteins, Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and

Thinking, Academia Sinica, (Taipei, Taiwan), 2012/10/17

27. Noji H, Single-Molecule Digital Bioassay with a Million Droplets Array, International Conference Session 5 (JASIS), (Chiba, Japan), 2012/9/7.
28. Noji H, Single Molecule ELISA. 分子細胞生物学会年会. パシフィコ横浜. 2011/12/14.

(図書)

1. 野地博行, 柳田敏雄, 永井健治, 林重彦 「<座談会>1 分子ナノバイオ 熱いユメを語る分子計測と計算化学のマッチングがもたらすパラダイムシフト」(2014) 化学フロンティア 1 分子ナノバイオ計野地博行 (編), 3~17, 化学同人
2. 野地博行 「1 分子ナノバイオ計測の歴史」(2014) 化学フロンティア 1 分子ナノバイオ計野地博行 (編), 18~30, 化学同人
3. 渡邊朋信, 市村垂生 (2012). 1 分子を見る光学顕微鏡 「1 分子生物学」 14 章, pp. 179-192, 化学同人. (分担執筆)
4. Mamoru Hashimoto, Ichimura, T., Fujita, K. (2012). CARS Microscopy: Implementation of Nonlinear Vibrational Spectroscopy for Far-Field and Near-Field Imaging. In Raman Imaging, Springer Series in Optical Sciences 168, (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), pp. 317-346.

分子プローブと光摂動ツールの開発 —少数生体分子の可視化・操作技術—

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23115003

研究代表者名：永井 健治（大阪大学産業科学研究所 教授）

研究分担者名：金原 数（東京工業大学生命理工学研究科 教授）
堀川 一樹（徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授）

連携研究者名：山東 信介（東京大学工学系研究科 教授）
浦野 泰照（東京大学医学系研究科 教授）
小澤 岳昌（東京大学理学系研究科 教授）
松田 知己（大阪大学産業科学研究所 准教授）
新井 由之（大阪大学産業科学研究所 助教）

1. 研究の目的

少数個の要素が支配的な働きをする少数ネットワークシステムを理解するためには、従来行われてきた薬剤などの過剰刺激、遺伝子やタンパク質の過剰発現・発現抑制という”極限状況下”における表現型の解析ではなく、”生理的環境と同等の状況”で、生理的変動程度の摂動を与え、高い時空間分解能で起きている現象を解析することが肝要である。そこで本研究では、少数分子間・少数細胞間における協同性の誘発機構にアプローチ可能にすることを目標に、”自発的”に生じる現象を分子レベルで超解像計数化・操作する技術を創出する。また、具体的な対象の1つとして、極微弱なシグナルによって誘発される細胞の走化性や走光性の頑健性に着目し、研究を展開した。

2. 研究成果

(1) 分子レベルでの可視化技術

① 光スイッチング蛍光タンパク質

従来の光スイッチング蛍光タンパク質 (Padron) に比べ、蛍光性オンの速度が4倍、蛍光性オフの速度が3倍速く、光スイッチング回数が25倍も長く続く、高い安定性を示す新規光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor の開発に成功した。Kohinoor を用いて、超解像法の一つである RESOLFT 法を行ったところ、観察時の光強度が 0.004 J/cm^2 と、従来法と比べて $1/10,000 \sim 1/375$ 倍も低い照射密度による超解像計測を実現することに成功した (Nature Methods, 2015)。

② 光スイッチング蛍光センサータンパク質

トロポニン C 由来の Ca^{2+} センシングドメインの両末端を PA-GFP と dimVenus と融合することで光活性化型蛍光 Ca^{2+} センサータンパク質 PA-TNXL を開発した (Sci Rep, 2013)。また、同様に rsEGFP と mCherry を融合することで、光スイッチング型 Ca^{2+} センサータンパク質を構築することにも成功した。

③ 各種生理活性分子などに対するセンサー蛍光タンパク質

大腸菌由来 Mg^{2+} トランスポーターの Mg^{2+} 結合ドメインの両端に蛍光タンパク質を融合させた

FRET 型蛍光 Mg^{2+} センサータンパク質 MARIO を開発し、A02 班前島班との共同研究により細胞分裂時に起こる Mg^{2+} 濃度上昇がクロマチンの凝集を引き起こす瞬間を捉えることに世界で初めて成功した。

温度感受性の異なる蛍光タンパク質を融合することでレシオメトリックな蛍光温度センサータンパク質 gTEMP を開発し、細胞内ミトコンドリアの脱共役による温度上昇を観察することに成功した。

微量の cAMP を可視化する蛍光 cAMP センサータンパク質 ($K_d=40$ nM) を開発した。また、これまでプローブ開発では考慮されてこなかったドナーアクセプター間の新たな配向パターンを検討した結果、既存のセンサーに比べシグナル変化量が5倍以上も大きな蛍光 cGMP センサータンパク質の開発にも成功した。

④ 高光度化学発光タンパク質

改変型 Rluc8 と Venus を連結した結果、従来よりも約 10 倍明るい化学発光タンパク質 (Nano-lantern, NL) の開発に成功した。この NL を用いて、自由行動下における体毛があるマウス体内の癌組織を実時間検出することに世界で初めて成功した(Nat Commun, 2012)。またシアン色とオレンジ色の NL の開発にも成功し、3 色の NL を用いて万能細胞の万能性維持に重要な 3 つの遺伝子の発現の様子を同時に観察することに世界で初めて成功した(PNAS, 2015)。

さらに NL を基に、 Ca^{2+} 、ATP、cAMP にそれぞれ反応する生理機能センサータンパク質を開発し、神経細胞の自発的な Ca^{2+} 振動、光刺激による植物細胞の ATP 動態、及び細胞性粘菌の cAMP 動態の可視化に成功した。

⑤ 顕微鏡

電子増倍型 CCD から露光時間のタイミング信号を取得し、その信号をトリガーとしてファンクションジェネレーターからパルス信号を生成した。生成したパルス信号を高輝度 LED 光源の変調信号として入力することで、ミリ〜サブミリ秒の時間分解能でデッドタイム中の光刺激を実現するシステムを構築した。本システムを用いて光摂動ツールである Channelrhodopsin2 を発現した細胞に、 Ca^{2+} 指示薬 R-GECO を共発現させた細胞を観察したところ、光刺激中の Ca^{2+} 上昇をリアルタイムに観察することに成功した (Neurosci Res, 2012)。さらに、本装置は微弱光計測である化学発光イメージングにおいても極めて有用であることが示された(Nat Commun, 2012)。

光スイッチング蛍光タンパク質を用いることで、蛍光性抑制用の光強度を劇的に下げることができると考えられた。そこで、光源として LED 光源を用いた SPoD/ExPAN 顕微鏡を構築し、光スイッチング蛍光タンパク質 Kohinoor を発現する培養細胞を長時間超解像観察が可能かどうかを検証した結果、 $1W/cm^2$ という極めて弱い照射強度で 50 nm 程度の解像度で超解像イメージングを行うことに成功した。

反射率 99.5% の高反射凹面鏡を向かい合わせに配置した光共振器を作成し、その中心に光を集光させ試料の吸光度を増幅し、スキャンさせることで、吸光度のイメージングが可能な吸収増幅顕微鏡 CREAM を構築した。光源としてはスーパーコンティニュームレーザーを用い、検出器側で分光することで吸収スペクトルの計測を行うことを可能とした。CREAM を用いることで、無染色の様々な培養固定細胞の吸収増幅像の計測に成功した。主成分分析を行った結果、吸収スペクトルから細胞種ごとの違いを計測することができた (PLoS ONE, 2015)。さらに、同一細胞種においても細胞間で有意に吸収スペクトルが異なることが見出された。

(2) 光摂動ツールの開発

① 光増感分子・タンパク質

総括班連携企業のプロメガ社との共同で Eosin-HaloTag リガンドを開発した (ACS Chem Biol, 2012)。これを利用して、光照射依存的に細胞分裂に関わる AuroraB タンパク質の時空間特異的機能破壊とそれに伴う細胞分裂の停止を引き起こすことに成功した。

単量体型光増感蛍光タンパク質 SuperNova を開発し、細胞内での分子機能破壊に成功した (Sci Rep, 2013)。

② 物質濃度を可逆的に制御する光摂動ツール

シグナル伝達物質の一つである環状アデノシンリン酸(cAMP)の関与する生体機能の光制御を目的として、cAMP 特異的加水分解酵素である光応答性 phosphodiesterase4(PDE4)を構築し、これと光応答性アデニル酸シクラーゼと組み合わせることで、光照射により cAMP 濃度を可逆的に変化させることに成功した。

光刺激により可逆的に Ca^{2+} を放出するケイジドカルシウム PACR を開発した。PACR を用いて細胞核内で特異的な Ca^{2+} 濃度の光操作や線虫神経細胞での光刺激による行動の制御を行うことに成功した。

(3) 多細胞社会の秩序形成をつかさどる細胞個性のマルチスケール定量と操作

細胞性粘菌の走化性応答に関与する分子の数を計測するために、簡便かつ安定に蛍光タンパク質遺伝子をノックインした株を作出可能な手法を確立した。これらを用いることで、cAMP シグナル伝達を制御する機能分子を蛍光タンパク質変異体群で多重標識したトリプルノックイン株を作出し、分子数の絶対定量ならびに時間変化を計測するための基盤整備を行った。

また、走化性集合流の自己組織化は数万個の細胞が関与するマクロ現象である。したがって、秩序化動態を完全に理解するには、1分子ひいては1細胞粒度を保持しつつ、数万個の細胞を対象にした大規模イメージングが必要になる。これを可能にするため、高速電動ステージを利用した、タイリングスキャンシステムを構築した。

以上の技術を用いることにより、cAMP による化学信号波の、周期・振幅・頻度と走化性応答に関与する各種タンパク質の発現数の定量化し、螺旋波というマクロな秩序構築に果たす、1細胞レベルならびに1分子レベルでの非対称化機構を解明した。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Ohta Y, Kamagata T, Mukai A, Takada S, Nagai T, and Horikawa K. Non-trivial effect of the color-exchange of a Donor/Acceptor pair in the engineering of Forster resonance energy transfer (FRET)-based indicators. *ACS Chem. Biol.* In press.
2. Morikawa, T.J., Fujita, H., Kitamura, A., Horio, T., Yamamoto, J., Kinjo, M., Sasaki, A., Machiyama, H., Yoshizawa, K., Ichimura, T., Imada, K., Nagai, T, and Watanabe, TM., Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement, *Sci Rep.*, 査読有, 6, 2016, 22342, DOI:10.1038/srep22342
3. Tiwari, DK., Arai, Y, Yamanaka, M., Matsuda, T, Agetsuma, M., Nakano, M., Fujita, K. and Nagai, T, A fast-and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy., *Nat. Methods*, 査読有, 12, 2015, 515-518, DOI:10.1038/nmeth.3362

4. [Arai, Y.](#), Yamamoto, T., Minamikawa, T., Takamatsu, T. and [Nagai, T.](#), Spectral fingerprinting of individual cells visualized by cavity-reflection-enhanced light-absorption microscopy., *PLoS ONE*, 査読有, 10, 2015, e0125733, DOI:10.1371/journal.pone.0125733
5. Yamanaka, M., Saito, K., Smith, IN., [Arai, Y.](#), Uegaki, K., Yonemaru, Y., Mochizuki, K., Kawata, S., [Nagai, T.](#) and Fujita, K., Visible-wavelength two-photon excitation microscopy for fluorescent protein imaging., *J. Biomed. Opt.*, 査読有, 20, 2015, 101202, DOI:10.1117/1.JBO.20.10.101202
6. Takai, A., Nakano, M., Saito, K., Haruno, R., Watanabe, T.M., Ohyanagi, T., Jin, T., Okada, Y., and [Nagai, T.](#), Expanded palette of Nano-lantern for real-time multi-color luminescence imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 112, 2015, 4352-4356, DOI:10.1073/pnas.1418468112
7. Sagawa, T., Kikuchi, Y., Inoue, Y., Takahashi, H., Muraoka, T., [Kinbara, K.](#), Ishijima, A., and Fukuoka, H., Single-Cell E. coli Response to an Instantaneously Applied Chemotactic Signal, *Biophysical Journal*, 査読有, 107, 2014, 730-739, DOI:10.1016/j.bpj.2014.06.017
8. Shima, T., Muraoka, T., Tabata, K.V., Noji, H., and [Kinbara, K.](#), Light-Triggered Vesicle Formation: Important Factors for Generation of Vesicles and Possible Applications, *Pure and Applied Chemistry*, 査読有, 86, 2014, 1259-1267, DOI:10.1515/pac-2014-0604
9. Ui, M., Harima, K., Takei, T., Tsumoto, K., Tabata, V.K., Noji, H., Endo, S., Akiyama, K., Muraoka, T., and [Kinbara, K.](#), Grafting Synthetic Transmembrane Units to the Engineered Low-Toxicity alpha-Hemolysin to Restore Its Hemolytic Activity, *Molecular Biosystems*, 査読有, 10, 2014, 3199-3206, DOI:10.1039/C4MB00405A
10. Chang, Y.F., [Arai, Y.](#), and [Nagai, T.](#), Optogenetic activation during detector "dead time" enables compatible real-time fluorescence imaging., *Neurosci Res.*, 査読有, 73, 2012, 341-347, DOI:10.1016/j.neures.2012.05.007
11. Saito, K., Chang, Y.F., [Horikawa, K.](#), Hatsugai, N., Higuchi, Y., Hashida, M., Yoshida, Y., [Matsuda, T.](#), [Arai, Y.](#), and [Nagai, T.](#), Luminescent protein for high-speed single-cell and whole-body imaging., *Nat Commun.*, 査読有, 3:1262, 2012, 1-9, DOI:10.1038/ncomms2248.
12. Hihara, S., Pack, C.G., Kaizu, K., Tani, T., Hanafusa, T., Nozaki, T., Takemoto, S., Yoshimi, T., Yokota, H., Imamoto, N., Sako, Y., Kinjo, M., Takahashi, K., [Nagai, T.](#), and Maeshima, K., Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells., *Cell Rep.*, 査読有, 2, 2012, 1645-1656, DOI:10.1016/j.celrep.2012.11.008.

(学会発表)

1. [Takeharu Nagai](#), Prospect of minority biology, Pacificchem 2015 (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), 2015/12/19, Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii)
2. [堀川一樹](#), Minority control of synchronized dynamics in biological oscillator, 第38回日本分子生物学会, 2015年12月01日~2015年12月04日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
3. [Tomoki Matsuda](#), Fluorescent and bioluminescent sensors for imaging biological events, Roundtable Discussion Photoreceptors, DFG-Rundgespräch (招待講演), 2015/10/10, Benedictine abbey of Frauenworth (Chiemsee, Germany)
4. [Takeharu Nagai](#), Genetically-encoded tools to optically control and image neuronal activity, 4th International Frontiers in Neurophotonics Symposium (招待講演), 2015/10/04, the Musee de la civilisation (Quebec city, Canada)
5. [Takeharu Nagai](#), A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laserpower RESOLFT nanoscopy, ABA2015 (招待講演), 2015/05/11, Shangyu International Hotel (Shangyu, China)
6. [永井健治](#), 少数性生物学概説および少数性分子の可視化・操作技術の開発, 第14回名古屋大学・遺伝

子実験施設 公開セミナー (招待講演), 2014/12/17, 名古屋大学 坂田・平田ホール (愛知県名古屋市)

7. 堀川一樹, 生理機能を可視化する FRET プローブの開発, 第 55 回 日本生化学会 中国・四国支部例会 (招待講演), 2014/06/06, 愛媛大学 (愛媛県松山市)
8. 永井健治, 少数性生物学って何?, 静岡県立大学 市民勉強会 「環境・生命・宇宙 ーわたしたちの星、地球、月そして太陽ー」 (招待講演), 2014/03/15, 静岡県立大学 (静岡県静岡市)
9. 永井健治, Manipulation and visualization of biological function with genetically encoded molecular spies., 2013 ASCB Annual Meeting (招待講演), 2013/12/14, Morial Convention Center (New Orleans, USA)
10. 堀川一樹, 2 個の細胞で多細胞生物は作れるか: 細胞性粘菌の多細胞化を可能にする細胞の数, 第 36 回 日本分子生物学会年会, 2013/12/04, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
11. Kazushi Kinbara, Design of Engineered α -Hemolysins for Regulation of Hemolytic Activity by External Stimuli, Tenth International Conference on Flow Dynamics (招待講演), 2013/11/26, 仙台国際センター (宮城県仙台市)
12. Yoshiyuki Arai, Realtime fluorescence and chemiluminescence imaging with optogenetic activation in living cells., International Workshop on Quantitative Biology 2013 (招待講演), 2013/11/25, ICHO-Kaikan, Osaka University (大阪府吹田市)
13. 金原数, 環状ヌクレオチド cGMP, cAMP シグナル伝達の可視化, 生理学研究所研究会 「超階層シグナル伝達研究の新展開」 (招待講演), 2012/10/01, 自然科学研究機構・生理学研究所 (愛知県岡崎市)
14. 永井健治, 少数性生物学って何?, 新学術領域「秩序形成ロジック」2012 年度班会議 (招待講演), 2012/06/19, ルスツ・リゾート (北海道虻田郡)
15. Kazushi Kinbara, Development of molecular tools for controlling activity of proteins, BIT's 2nd Annual World Congress of Nanomedicine-2011 (招待講演), 2011/11/03, Shenzhen Convention & Exhibition Center (China, Shenzhen)
16. Nagai Takeharu, Spying biological events in living cells by genetically-encoded functional indicators, The third RIES-CIS international symposium (招待講演), 2011/10/28, NCTU (Sinchu, Taiwan)

(図書)

1. 永井健治, 朝倉書店, 発光の事典・蛍光イメージング/蛍光タンパク質 (7.1.3), 2015, 12(536-547)
2. 新井由之, 朝倉書店, 発光の事典・蛍光イメージング/蛍光イメージング技術/画像処理 (7.2.1.3), 2015, 6(594-599)
3. 永井健治, 松田知己, 化学同人, 化学フロンティア 1 分子ナノバイオ計測 15 章, 2014, 10(190-199)
4. 堀川一樹, 永井健治, (株) エヌ・ティー・エス, 生物の科学、遺伝 65 細胞性粘菌の集合流形成における細胞間シグナル伝達, 2012, 5(87-91)
5. 金原 数, 日本光学会, 光学 41 光で駆動する分子機械, 2012, 6(78-83)

ミオシン少数分子間の動態を可視化する 1 分子計測法に基づく協同性の検証

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26115703

研究代表者名：茅 元司（東京大学 大学院理学系研究科 物理学専攻 助教）

連携研究者名：小林 琢也（東京大学 大学院総合文化研究科 研究員）

鷲尾 巧（東京大学 大学院新領域創成科学研究科 特任准教授）

1. 研究の目的

生命が多様性に満ちた高度な機能を有する要因のひとつとして、タンパク質分子間における協同的な現象が挙げられる。本研究における協同現象とは、タンパク質分子同士が同調して力を出す現象を意味する。しかし、その理論的な検証はされていても、実態を直接捉えた実験的証拠は極めて乏しい。そこで、本研究では骨格筋ミオシンとアクチンを対象とし、ミオシン分子集合体とその構成分子であるミオシン分子の挙動を同時に計測する実験系を開発し、「分子集合体における分子間の協同的な力発生に、どのように分子の特性が寄与しているか？」という疑問点に着目し、協同性の分子機構を紐解いていく。その目的遂行のため、本研究では i) ミオシン分子動態を直接捉えるイメージング手法を確立し、ii) ミオシンフィラメント上の回折限界内に位置するミオシン複数分子の動態を同時観察できる超解像イメージング法の開発にも挑戦し、分子間の協同現象の直接解明を目指す。

2. 研究成果

本研究では、アビジン化金ナノ粒子を骨格筋ミオシン制御軽鎖に入れたビオチンタグに結合させることでミオシン頭部を標識し、その散乱像を高速度カメラで撮影した。その結果、アクチンと相互作用中のミオシン頭部の動態を捉えることに成功し、アクチンと結合時の金ナノ粒子の移動距離（相互作用距離）は 15nm 前後であった（図 1）。ミオシンがアクチンと相互作用し始めてから解離するまでに移動する距離は、過去の研究では筋線維を用いた X 線実験において平均像として推定されてきたが、本研究では 1 分子レベルで直接計測することに成功した。相互作用距離が 15nm 前後であることは、これまで筋線維実験から推定された距離より大きく、筋収縮の分子メカニズムを再検討する必要性を示唆しており大変興味深い結果であった。

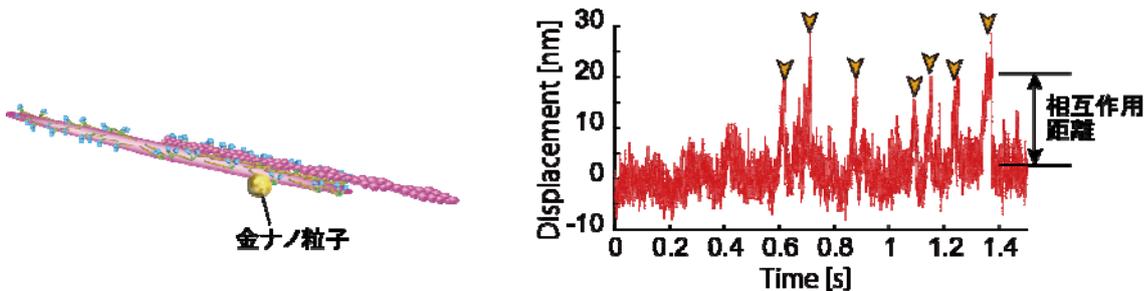


図 1 金ナノ粒子を用いて計測したアクチンと相互作用中のミオシン頭部の変位波形の例

当初の計画ではナノロッドを用いて散乱パターンの変化からミオシン頭部の回転と並進運動を見て

いくことを考えていたが、研究目的である協同現象の検証を行うためには、ミオシンフィラメント上に位置するミオシン複数分子の動態を個別に、かつ同時にみる必要性があり、そのためには回折限界内における粒子の動態を検出する超解像技術が必要であると考えた。そこで、東京大学理学系研究科物理学専攻の上田正仁教授グループが開発したMulti-Emitter Localization法という超解像イメージングアルゴリズムを用いることにした。この方法では、ベイズ推定法を使って回折限界内に位置する粒子数ならびに個々の位置を推定する (Ashida and Ueda, Optical Express 2016)。この方法を用いることで、200nmの間隔でDNAオリガミ上に標識した量子ドット2粒子の位置を正確に推定することに成功し、その平均距離は201nm (N=50)となった。しかし、これを金ナノ粒子の散乱像に応用すると、金ナノ粒子間の干渉作用により正確に推定できないことが判明し、金粒子に対する照明方法の検討や、その他新たな解析手法を検討する必要性が出て来た。

現時点では、ミオシン1分子の動態を直接計測する方法は確立した。今後は、様々なATP濃度やアクチンに結合させたビーズをトラップさせることで、ミオシンフィラメントに作用する負荷を検出し、負荷の変化に対してミオシン1分子動態がどのように変化していくか検証していく。一方、分子間の協同性を直接検証するために、Multi-Emitter localization法を応用し、回折限界内における2粒子以上の動態を高時間・空間分解能 (1, 2 nm、50-100 μ s オーダー) で検出する超解像イメージング法の確立を、照明系の工夫や解析手法の開発を進めてながら目指していく。

3. 主な研究発表

1. 茅 元司 (2014) 1分子レーザートラップ顕微鏡によるアクチンとミオシンの物理化学的ダイナミクスの解析. 特集「生化学に新たな視点を与える技術の開発と応用」生化学 86, pp.174-183.

細菌の走性における数的多様性の解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26234567

研究代表者名：井上 圭一（名古屋工業大学大学院工学研究科 助教）

連携研究者名：須藤 雄気（岡山大学大学院薬学研究科 教授）

1. 研究の目的

細菌や高度好塩古細菌、真核藻類など様々な生物は光を感知して、より生存に適した環境を選ぶ「走光性」を示し、その研究は生物の環境への適応を理解する上で重要である。そしてその時に中心的な役割を果たすのが、光を吸収し、そのシグナルを細胞内へと伝達する光受容タンパク質である。この時多くの走光性に関連するシグナル伝達過程では、一つの受容体が多くの下流分子を活性化し、シグナルの増幅を行う。しかしそれらについてどの程度の数の分子がシグナル伝達に関わり、高い光応答性を達成しているのかはほとんど明らかとなっていない。またそれらが各生物種間でどの様に異なっているのか、その多様性についても強い興味を持たれる。そこで本研究では様々な生物種ごとの微生物の走光性に関わる細胞内信号伝達・増幅過程を分子レベルで解明するため、一分子観察を用いたタンパク質間相互作用の研究を行うことを目的とした。

そして本研究において、具体的な研究対象としたのが細菌の光センサーであるセンサリーロドプシン（SR）とトランスデューサー（Htr）、さらに信号を下流へと伝達する Che タンパク質群である。センサリーロドプシンは、微生物の持つ光受容型の膜タンパク質の一つで、タンパク質内に発色団としてレチナールを結合する。SR/Htr 複合体が光を吸収すると、レチナールが *all-trans* 型から *13-cis* 型へと光異性化し、その信号が細胞質中の CheY に伝わるが、その際に多数の CheY が活性化されることで、大きな信号の増幅が行われる。しかし活性化される CheY の分子数など数的な理解は全くなされていない。そこで本研究ではこの増幅機構を一分子レベルで定量的に明らかにすることを目指した。また SR には長波長光に対する正の走光性を担う SRI と、短波長光に対する負の走光性を担う SRII の二種類が存在することから、それぞれについての増幅過程についても比較し、さらに生物種間での違いについても調べることを目的とした。そのためその多様な吸収波長に対応するため、新たに多波長レーザー励起一分子蛍光顕微鏡を構築し、蛍光色素間のフェルスター型エネルギー移動（FRET）効率から分子間相互作用を観察することで、微生物の走光性について詳細な理解を目指した。

2. 研究成果

多様な SR と Htr の CheY との相互作用ダイナミクスを調べるためには、それぞれに適した波長の活性化光を用いる必要がある。またそれに伴い、FRET 観察に用いる色素についてもそれぞれのタンパク質に応じて、適切な吸収/発光波長の組み合わせのものを選ぶ必要があることから、タンパク質の活性化および蛍光の励起観察光をこれまでに用いて単波長のものから、複数のものへと拡張する必要が求められた。そこで新たに 488、561、647 nm の三波長でロドプシンの光励起および蛍光観察が可能な「多波長レーザー励起一分子蛍光顕微鏡」の構築を行った。その際に通常の単レンズ系を用いた導入系では、完全な全反射条件を達成することができず、レーザーの散乱光が観察の問題となったため、投光管を組み込むことで非常に明瞭な一分子蛍光像を得ることに成功した（**図 1**）。これにより多様な

吸収波長を持つ SR ファミリーについて、全ての分子種の一分子観察が可能な系が実現され、本装置については 日本生化学会誌「生化学」において、その詳細について報告を行った。

一方で本研究において、連携研究者の須藤らと共に、SR に近縁のロドプシンである、光駆動型の H⁺ポンプ Archearhodopsin 3 (AR3) について調べたところ、このロドプシンはレチナール周辺のアミノ酸を変化することで、吸収波長を大きく短波長化させられることが明らかになった。またレチナールの先端付近にあるβ-イオン環周辺のアミノ酸残基を変異することで、反対側に位置し、イオンの透過経路上にある Schiff 塩基周辺の構造が変化することで、新たに光開閉式の H⁺ポンプチャネル機能が発現されることが示された (Inoue et al., *J. Am Chem. Soc.* (2015))。これまで報告されているチャネル型のロドプシンは真核生物由来のため、大腸菌での発現が困難であった。しかし AR3 は古細菌由来であり、容易に大腸菌で発現可能なことから、今後さらなる変異導入による機能向上が容易に可能であり、新たなオプトジェネティクスツールの送出手が期待される。また本研究については、化学工業日報においてその成果が取り上げられた。

本研究の成果により、今後あらゆる吸収波長を持つ SR と Htr、CheY の系について、そのシグナル伝達過程および増幅に関わる観察系の構築に成功した。今後は多様な生物種に対し、これらの分子の間でのシグナル伝達過程について、関わる分子の数的なバラエティがどの様になっているか、またそれが生み出すシグナル増幅率の違いについて、詳細な理解や比較が可能になると期待される。

また新たに作製された H⁺チャネル型ロドプシンについては、大腸菌を用いたアミノ酸改変を容易に行うことが可能であり、これを基盤としたより優れたオプトジェネティクスツールの構築が期待される。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. [Inoue, K.](#), Nomura, Y., and Kandori, H.* (2016). Asymmetric functional conversion of eubacterial light-driven ion pumps. *The Journal of Biological Chemistry*. 291, 9883-9893.
2. [Inoue, K.](#), Konno, M., Abe-Yoshizumi, R., and Kandori, H. * (2015). The role of the NDQ-motif in sodium pump rhodopsin. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* . 54, 11536-11539.
3. Kato, H. E., [Inoue, K.](#), ..., Iino, Y., Yawo, H., Ishitani, R., Kandori, H.*, and Nureki, O.* (2015). Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump. *Nature*. 521, 48-53.
4. [Inoue, K.](#), Tsukamoto, T., Shimono, K., Suzuki, Y., Miyauchi, S., Hayashi, S., Kandori, H., and [Sudo, Y.*](#) (2015). Converting a light-driven proton pump into a light-gated proton channel. *Journal of the American Chemical Society*. 137, 3291-3299.
5. [Inoue, K.](#), Tsukamoto, T., and [Sudo, Y.*](#) (2014). Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1837, 2587-2597.

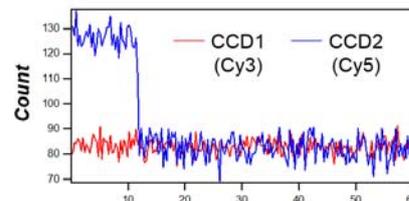
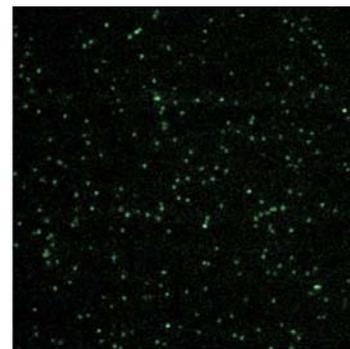


図 1. 本研究で構築した、多波長レーザー励起一分子蛍光顕微鏡

動的少数分子複合体ユニット機構：3次元1分子超局在顕微鏡による解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115707

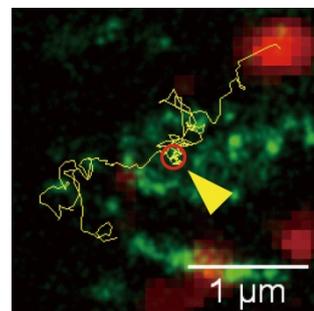
研究代表者名：藤原 敬宏（京都大学 物質-細胞統合システム拠点 准教授）

1. 研究の目的

細胞膜分子の運動、会合、ナノメートルスケールの複合体形成から、ミクロンスケールの膜ドメイン形成に至る過程とその制御機構の理解は、さまざまな細胞機能に関わる、最も基本的で重要な課題の一つである。私は、この基本的な問いに答えるため、細胞膜上の受容体や脂質の拡散運動を、1分子ごとに、サブミリ秒時間分解能で追跡する技術（1蛍光標識分子で10,000 Hz、数100個の分子を2種/3種同時、2次元/3次元）の開発と改善を進めてきた。本研究では、これらの技術を応用した「3次元1分子追跡-PALM超解像複合顕微鏡」を開発し、「フォーカルアドヒージョン（接着斑）」、「アドヒレンスジャンクション」、「シナプス」などのミクロンスケールの接着構造をPALM超解像観察しながら、同じ視野中で、構成分子群の1分子追跡をおこなう。それにより、ミクロンスケールの接着構造の形成/分解が、「少数の特定の構成分子からなる、短寿命の過渡的少数分子複合体がユニットとしておこなわれている」という作業仮説、すなわち、「少数分子複合体動的ユニット」仮説を検証することを目的とする。

2. 研究成果

主に接着斑を対象として、サブミリ秒時間分解能での1蛍光分子追跡（最高10,000 Hz、2種/3種同時、2次元/3次元）と、それを応用した生細胞超解像(PALM)観察を組み合わせた顕微鏡システムを開発した。その結果、細胞膜上のミクロンサイズの構造は、構造外の細胞膜と同様にその内部がアクチン膜骨格の網目によって仕切られていること、数10 nm程度の少数分子複合体をユニットとした群島構造を持つこと、ユニット構成分子は群島の隙間を拡散で移動して内部の島にも容易にアクセスできること、島への局在は1秒以下の短時間の場合も多く、接着構造内外の分子は常に交換していること、が明らかになった。これらは、ミクロンサイズの大きな接着構造を、環境の変化に応じて短時間で急速に再編成するのに適した分子機構であると考えられる。



本研究期間内では接着斑構成分子を研究対象としたが、他の細胞接着構造、アドヒレンスジャンクションやシナプスも、接着斑と同様な群島構造を持ち、少数分子からなる動的複合体をユニットとして集合/分解をおこなっている可能性が高い。本研究で開発した装置と知見をもとにこれらの接着構造の研究を進め、ミクロンスケールの膜ドメイン形成に至る過程とその制御における共通原理を解明したい。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Sotoma S, Iimura J, Igarashi R, Hirosawa KM, Ohnishi H, Mizukami S, Kikuchi K, Fujiwara TK, Shirakawa M*

and Tochio H*. Selective labeling of proteins on living cell membranes using fluorescent nanodiamond probes. *Nanomaterials*, 6, 56, (2016)

2. Fujiwara TK, Iwasawa K, Kalay Z, Tsunoyama TA, Watanabe Y, Umemura YM, Murakoshi H, Suzuki KGN, Nemoto YL, Morone N and Kusumi A*. Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell*, 27, 1101-1119, (2016)

(総説)

1. Kusumi A*, Tsunoyama TA, Hirosawa KM, Kasai RS and Fujiwara TK. Tracking single molecules at work in living cells. *Nat. Chem. Biol.*, 10, 524-532, (2014)
2. 楠見明弘, 藤原敬宏*. 超高速・超解像 1 蛍光分子局在顕微鏡法, 日本免疫学会ニュースレター, 23, 12, (2014)

(学会発表)

1. Fujiwara T. Dynamic regulation of molecular diffusion in compartmentalized plasma membrane as revealed by ultrafast single-molecule imaging. Institute for Protein Research Seminar: Molecular Crowding and Macromolecular Association (招待講演), 2015年2月5日, 大阪大学
2. Fujiwara T. Mesoscopic organization of the plasma membrane as revealed by the development of ultrafast single-fluorescent molecule imaging. 15th International Membrane Research Forum (招待講演), 2015年3月2日, 京都大学
3. Fujiwara T. Revealing plasma membrane compartmentalization and function by developing ultrafast single-molecule imaging techniques. The 9th Asian Biophysics Association Symposium (招待講演), 2015年5月10日, Hangzhou, China
4. 藤原敬宏. 1 分子局在超解像法による細胞内動態の理解に向けて. 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会 (招待講演), 2015年5月15日, 京都国際会館
5. Fujiwara T. Plasma membrane compartmentalization and function as revealed by ultrafast single fluorescent-molecule imaging. Cold Spring Harbor Asia Conferences on New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms (招待講演), 2015年12月9日, Suzhou, China

DNA-タンパク質相互作用のデジタルカウンティング

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26115708

研究代表者名：原田 慶恵（京都大学物質-細胞統合システム拠点 教授）

連携研究者名：韓 龍雲（京都大学物質-細胞統合システム拠点 助教）

1. 研究の目的

蛍光 1 分子イメージングには個々の分子の動きの観察を可能にすること以外に、数を数えることができるというメリットがある。ナノ開口は、我々が開発した全反射照明による蛍光 1 分子イメージング法では困難な高濃度（数 μM 程度まで）の蛍光色素存在下で、蛍光標識生体分子の 1 分子イメージングを可能とする技術である。この技術を使うことで、少数性生物学の研究に重要な少数の生体分子の可視化、計数化ができる。これまでに報告されているナノ開口作製法では、時間とコストがかかり、歩留まりも悪いため、実験を効率よく行うことができなかった。そこで本研究では従来の作製法を改良し、効率よくナノ開口を作製する方法を確立することを研究目標の 1 つとする。また、作製したナノ開口を使って、DNA 組換えの中間体の十字型構造をした Holliday 構造 DNA の分岐点移動を行うモータータンパク質である RuvB の機能解析を行うことをもう一つの目的とする。

2. 研究成果

「少数性生物学」では数を知ることが重要である。分子の数を数える方法として、蛍光 1 分子イメージング技術がある。現在用いられている全反射照明による蛍光 1 分子イメージング法では、蛍光色素分子の濃度がおよそ 50 nM を越える高濃度条件下では、個々の分子の観察が非常に困難になる。そのため、解析できるのは、基質との親和性が十分高い酵素に限られていた。ナノ開口はガラス基板上の厚さ 100 nm 程度のアルミフィルムに作製した直径 80~100 nm の穴である。穴の直径に比べて、励起光の波長が大きいので、ガラス基板の下から励起光を照射すると、励起光は穴の外には出ることができず、穴の底面ごく近傍に近接場光が生じる。全反射照明法より、さらに微小領域を励起するこの方法を用いることで、数 μM でも 1 分子観察が可能になる。ガラス基板上にナノメートルサイズの加工を施す技術は確立されておらず、ナノ開口の作製は容易ではなかった。そこで我々は Metal Lift-off 法を用い条件検討を繰り返し、直径 4 インチの石英ウェハを使って、1 回の作業で 60 枚のナノ開口を作製する方法を確立した。このナノ開口を用いて、DNA 相同組換え中間体である Holliday 構造の分岐点移動をおこす、RuvB タンパク質の Holliday 構造への複合体形成の解析を行った（Scientific Reports 2015）。

ナノ開口を使って、RNA ポリメラーゼがヌクレオソーム上で個々の塩基を転写する様子を可視化し、そのメカニズムの詳細を明らかにする。1 塩基の転写過程を可視化するためには、基質として数十 μM の蛍光標識ヌクレオチド存在下での観察が必要である。そこで、より小さな直径のナノ開口の作製に挑戦する。最終目標として直径 50 nm のナノ開口基板作製法を確立する。直径 50 nm のナノ開口基板を、効率よく安定的かつ安価に作製するため、これまでに我々が確立した方法を基に新たにナノ開口作製法を開発する。直径を半分にするのは一見簡単なようであるが、ナノ加工技術の限界に近い大きさであり、かなりの試行錯誤が必要である。直径 50 nm のナノ開口基板の作製法を確立した後、それ

を使って RNA ポリメラーゼによるヌクレオソーム上での転写制御および、1 塩基レベルでの転写過程の実時間で観察する。ナノ開口底部に RNA ポリメラーゼを固定し、そこに鋳型となる DNA またはヒストンタンパク質が結合したヌクレオソームを加えて、転写開始複合体を作製する。4 種の異なる蛍光標識ヌクレオチドを使用することで、どのヌクレオチドがいつ RNA に取り込まれたのかを検出する系を確立し、1 塩基レベルでの転写過程を可視化する予定である。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Iwasa, T, Han Y-W, Hiramatsu, R, Yokota, H, Nakao, K, Yokokawa, R, Ono T, and Harada, Y*. Synergistic effect of ATP for RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation. Scientific Reports, 5, Article number: 18177. (2015)

(総説)

1. 韓龍雲、原田慶恵 ナノ開口基板を用いた DNA メチル化パターン維持機構に関する生体分子の機能解析. 生体の科学 65, 553-558, (2014)

少数のプロトンが駆動するシナプス小胞再充填の定量解析

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26115716

研究代表者名：高森 茂雄（同志社大学 脳科学研究科 教授）

連携研究者名：森 靖典（同志社大学 研究開発推進機構 准教授）

江頭 良明（同志社大学 研究開発推進機構 助教）

1. 研究の目的

我々の脳高次機能を支えているのは、神経細胞間のシグナル伝達である。神経間のシグナル伝達は、シナプスと呼ばれる微小空間で行われる。出力側の神経終末には神経伝達物質が貯蔵されたシナプス小胞が存在し、活動電位という形で神経細胞内を伝搬された電気信号が神経伝達物質の放出を惹起する。放出された神経伝達物質は、隣接した神経細胞表面に存在する多様な受容体に結合することで信号を伝える。したがって、神経伝達物質がシナプス小胞に充填される過程は、シナプスにおけるシグナル伝達に必須の素過程であるにも関わらず、その仕組みの詳細は未解明である。

神経伝達物質のシナプス小胞への充填過程は、小胞膜に存在する液胞型プロトン ATPアーゼによって形成されるプロトン電気化学勾配によって駆動されている。ここで、シナプス小胞の大きさ（直径約 40 ナノメートル）を考慮すると、シナプス小胞内（pH 5.6）に存在する遊離プロトンの数は 1 を大きく下回る。一方、濃縮された神経伝達物質の個数は 1000 個に及ぶ。すなわち、実質 1 つも存在しないプロトンが最終的に 1000 個もの伝達物質を濃縮するエネルギーを供給する計算になる。本研究では、神経伝達物質のシナプス小胞への充填過程を定量的に理解するために、その輸送駆動力を提供するプロトンの小胞内動態を時空間的に定量することを目的とした。次に、哺乳類脳内の興奮性伝達物質であるグルタミン酸と抑制性伝達物質である GABA の充填過程におけるプロトン動態を定量することにより、神経伝達物質再充填の仕組みの一端を明らかにする。

2. 研究成果

- (1) エンドサイトーシスによって新たに作られたシナプス小胞の再酸性化過程は、pHluorin をプローブとした実験から速い時定数が報告されていた（0.5–5 秒）。しかしながら、pHluorin の測定可能 pH 領域はシナプス小胞内 pH を全てカバーしていない。我々は、pH 6 以下の領域までカバーできる小胞内 pH 測定プローブ(Syp-mOr)を作成し、海馬由来初代培養神経細胞におけるシナプス小胞再酸性化過程の定量解析を行った。その結果、酸性化過程の時定数は約 15 秒と、従来の報告に比べて顕著に遅い反応であることが明らかとなった。また、小胞内緩衝能を考慮すると、再酸性化過程では約 1200 個のプロトンが蓄積することがわかった。以上の解析から得られたプロトン流入の時定数と総数は、プロトン勾配によって充填されるグルタミン酸の時定数や個数と類似していることから、グルタミン酸の充填は、駆動力であるプロトンの流入と時間的に共役していることが示唆された。
- (2) 抑制性伝達物質である GABA を含む小胞のプロトン動態を測定するために、VGAT-Venus マウス海馬由来の神経培養細胞に Syp-mOr を導入し、GABA 性ニューロンのシナプス小胞内 pH を定量した。興味深いことに GABA 性小胞の定常状態における pH は顕著に高い(pH~6.5)ことが明らかと

なった。また、刺激に伴う pH の変化は、単純な指数関数的減少を示すグルタミン酸性ニューロンと異なり、GABA 性ニューロンでは一過性の過剰酸性化に引き続き緩慢なアルカリ化を経て定常状態に回復した。この GABA 性小胞の特長は、GABA 輸送を欠損したマウス(VGAT 欠損マウス)由来の神経培養細胞では見られないこと等から、GABA 充填はプロトンとの交換輸送で行われること、GABA の充填速度はグルタミン酸の充填速度に比べて顕著に遅いこと等が明らかになった。

今後の研究の展開に関する計画

同様の解析をグルタミン酸輸送体(VGLUT)欠損マウスで行うことで、グルタミン酸の再充填機構について詳細に検討する。また、本研究では、比較的強い刺激条件を用いて多数のシナプス小胞が再生される過程でのプロトン動態を明らかにした。今後、更に優れた pH センサーを用いて、より生理条件に近い環境における一小胞内プロトン動態の検出法を開発する必要がある。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Egashira Y, Takase M, Watanabe S, Ishida J, Fukamizu A, Kaneko R, Yanagawa Y, Takamori S*. Unique pH dynamics in GABAergic synaptic vesicles illuminates the mechanism and kinetics of GABA loading. Proc Natl Acad Sci U S A., 113(38), 10702-7, (2016).
2. Egashira Y, Takase M, Takamori S*. Monitoring of vacuolar-type H⁺ ATPase-mediated proton influx into synaptic vesicles. J Neurosci, 35, 3701-10, (2015).
3. Tsujimura K, Irie K, Nakashima H, Egashira Y, Fukao Y, Fujiwara M, Itoh M, Uesaka M, Imamura T, Nakahata Y, Yamashita Y, Abe T, Takamori S, Nakashima K*. miR-199a links MeCP2 with mTOR signaling and its dysregulation leads to Rett Syndrome phenotypes. Cell Rep, 12, 1887-1901, (2015).
4. Kumamaru E, Egashira Y, Takenaka R, Takamori S*. Valproic acid selectively suppresses the formation of inhibitory synapses in cultured cortical neuron. Neurosci Lett, 569, 142-7, (2014).

シナプス内状態揺らぎによる反応モジュレーションと機能連関

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115718

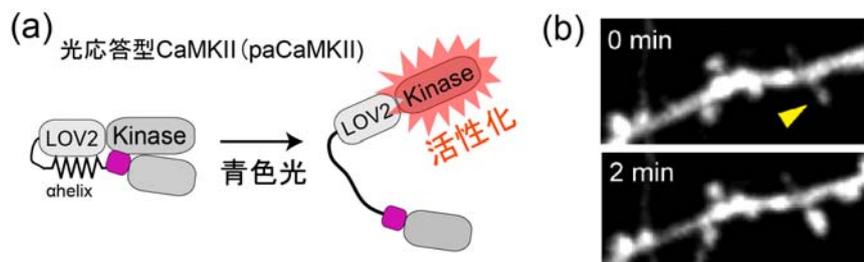
研究代表者名：村越 秀治（生理学研究所 脳機能計測・支援センター 准教授）

1. 研究の目的

記憶形成の最小単位であるシナプスの後端を形成するスパインの大きさは 0.1 フェムトリッター程度の容積しかない。これは、ある分子が細胞に 100 nM の濃度で発現しているとする、1 個のスパインには 5 分子程度しか存在しないことを意味する。このような微小領域では、各種分子数のゆらぎが機能に大きく影響する筈である。本研究では、シナプス長期増強にとって重要な働きをしていると考えられるキナーゼに着目する。キナーゼ活性を青色光照射で、“ミリ秒レベルの時間分解能”と“マイクロメートルの空間分解能”で制御できるように遺伝子改変することで光応答性キナーゼを開発する。

2. 研究成果

シナプス（スパイン）に定量的な入力を与えることができる光応答型 CaMKII 分子の開発を行った。これによって、入力に対するスパイン内の各種少数分子の活性揺らぎと出力（機能）の関係を定量的に調べることができる。これまでに、LOV2 を用いたプロトタイプ的光応答型 CaMKII において、光照射によって構造変化が起こることを FRET イメージングにより確認し、構造変化がキナーゼ活性とカップルしていることを生化学的に確かめた。また、海馬神経細胞において、2 光子励起によりスパインに可塑的变化を誘起することに成功した。また、これらの計測の基盤となる各種プローブ、蛍光タンパク質の開発にも成功した (Shibata et al. PLoS ONE 2015, Murakoshi et al. Scientific Reports 2015, Hedrick et al. Nature 2016, Nakahata et al. Scientific Reports 2016)。



図、(a)光応答型 CaMKII (paCaMKII) の模式図。(b)海馬スライス中の神経細胞の単一スパイン内で2光子励起を用いて paCaMKII を活性化させるとスパイン体積の可塑的な変化を惹起することができる。

今後は、開発した光応答性 CaMKII を用いて、シナプス可塑性の惹起に必要な分子数や時間窓を定量的に調べていく。これによって、各種シグナル分子が 10 個程度ずつしか存在しない微小コンパートメントであるシナプス内におけるシグナル伝達の動作原理の解明を目指す。また、CaMKII のみならず、

PKC や PKA といった様々な分子についても光応答性分子の開発を行う予定である。これによって、各種シグナル分子が 10 個程度ずつしか存在しない微小コンパートメントであるシナプス内における情報伝達機構の解明を目指す。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Shibata AC, Maebashi KH, Nakahata Y, Nabekura J, and Murakoshi H* Development of a molecularly evolved, highly sensitive CaMKII FRET sensor with improved expression pattern. *PLoS ONE* 10, e0121109 (2015).
2. Murakoshi H*, Shibata AC, Nakahata Y, and Nabekura J. A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Scientific Reports* 5, 15334 (2015).
3. Hedrick NG, Harward SC, Hall CE, Murakoshi H, McNamara JO, and Yasuda R. Rho GTPase complementation underlies BDNF-dependent homo- and heterosynaptic plasticity. *Nature* 538, 104-108 (2016).
4. Nakahata Y, Nabekura J, and Murakoshi H* Dual observation of the ATP-evoked small GTPase activation and Ca²⁺ transient in astrocytes using a dark red fluorescent protein. *Scientific Reports* 6, 39564 (2016).
5. Murakoshi H*, Shin M, Parra-Bueno P, Szatmari EM, Shibata AC, and Yasuda R. Kinetics of endogenous CaMKII required for synaptic plasticity revealed by optogenetic kinase inhibitor. *Neuron* (2017). pii: S0896-6273(17)30144-7.

細胞集団中のマイノリティのジェノタイプを一細胞レベルで同定する 方法の開発

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115719

研究代表者名：城口克之（理化学研究所 統合生命医科学研究センター 上級研究員）

1. 研究の目的

少数の細胞が生体に大きく影響するシステムがある。例えば腫瘍中には、様々な変異を含んだ癌細胞が存在するが、癌幹細胞とも呼ばれる少数の細胞の変異の種類や性質が、腫瘍全体の性質や転移に影響すると考えられている。免疫システムにおいては、免疫反応の中核を担うT細胞のうち、全体の数万分の一にも満たない少数の細胞が、抗原を認識してウイルスなどの混入物から生体を守っている。T細胞はほぼすべての細胞が異なる受容体を発現しており、混入物由来の抗原（ペプチドなど）を結合・認識する受容体をもつ細胞が活性化して、免疫反応を開始する。また、腸内に存在する様々な菌が宿主と相互作用していると考えられているが、この菌叢中の少数の細菌が、菌叢ネットワークや、宿主の状態に大きく影響している可能性もある。このようなマイノリティ細胞が重要な役割を担う生体システムを理解するためには、マイノリティも計測できるハイスループットかつ、一細胞の分解能をもつ計測法が必要である。本研究では、数万、数十万の細胞を対象に、次世代シーケンサを用い、ゲノムやRNAの配列（T細胞受容体配列や、細菌の同定に使われる16S rRNA配列など）を1塩基の違いで同定し、一細胞レベルで定量する技術を開発することを目的とした。

2. 研究成果

（1）菌叢解析

1塩基の違いで細胞を区別し、1細胞レベルで定量する方法の開発にあたり、まず細菌叢の解析を対象とした。開発する測定システムの有効性を示すために、複数種類の既知の細菌を準備し、既知の濃度で混ぜた溶液を作り、これをテストサンプルとした。ドロプレットジェネレータを用いて細菌1つ1つをドロプレット内に封入し、菌の同定によく用いられている16S rRNAの配列（ゲノム配列）をPCRで増幅した。この時、各細胞を区別するためのDNA配列（細胞バーコード）を同時にドロプレットに封入して増幅し、細胞バーコードを16S rRNAの増幅産物に結合させることを試みた。通常のチューブ内での反応とは異なり微小体積からの増幅反応になるため、様々な条件の検討が必要であったが、最終的に16S rRNAの増幅を確認できた。増幅後にドロプレットを壊して増幅DNAを回収し、電気泳動で増幅産物の長さを確認した。さらにサンガーシーケンサも行い、バーコード配列がドロプレット内で16S rRNAの増幅産物に付加していることを確認できた。バーコード配列が付加していないものもあり、これを取り除く必要が生じたため、増幅に用いたプライマーを工夫し、目的以外のものをワンステップで取り除ける方法を確立した（ワンステップかつ短時間で行えるこの方法は、ハイスループット化を目指す際に有効である）。その後、この増幅産物を次世代シーケンサで解析した。その結果、シーケンシングによる菌数の定量値が、テストサンプルの菌の混合比と強い相関を示すことが分かった。これにより、複数の菌が混在している状況でも、それぞれの菌数について、高精度な定量ができることを示すことができた。これらの方法を用いることにより、マイノリティ細

胞を同定すると同時に、細胞集団の数分布を得られる計測系の基礎を構築することができたと考えている。

(2) T細胞受容体の増幅法の開発

たくさんのT細胞の受容体配列を、各細胞を区別しながらハイスループットに計測する方法の開発を試みた。その結果、T細胞から精製したRNAをテンプレートとし、ワンステップでT細胞受容体のβ鎖の5'端側を増幅することに成功した(特許申請準備中)。安定して増幅させるために様々な条件を検討しており、また、細胞から直接増幅できる方法も開発中である。この方法は、マイノリティ細胞を同定するためのハイスループット計測に有効である。

今後の研究の展開に関する計画として、菌叢用の解析パイプラインを構築し、シーケンシング結果からすばやく菌を同定し、菌数を解析できるようにする。その後、本方法を用いてマウスの菌叢を解析し、未知の菌においても、一塩基の分解能で菌を同定できることを示していく。さらに、ハイスループットに菌数を測定できる本方法を用いて、宿主と相互作用している菌叢内のネットワークの詳細を理解し、マイノリティな菌がどのようにシステムに影響を与えているかを解明していく。また、病態モデルマウスの菌叢を計測することにより、菌叢ネットワークの変化と病態の相関を調べていく。

3. 主な研究発表

1. 城口克之, デジタル RNA シーケンシング: ゲノムワイドな1分子定量法, 生物と化学. 54, 787-788 (2016)

「数」を視点とした走光性信号伝達過程における信号増幅機構の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115508

研究代表者名：井上 圭一（名古屋工業大学大学院工学研究科 助教）

連携研究者名：須藤 雄気（名古屋大学大学院理学研究科 教授）

1. 研究の目的

多くの生物は自然環境中において、光を感知することで外界に対する情報を取り込み、さらにそれをもとにより生存に適した環境を選ぶ「走光性」を示すことが知られている。そしてこの走光性を調べることは生物の環境への適応を理解する上で重要である。この時、細胞内のシグナル伝達過程で中心的な役割を果たすのが、光を吸収し、そのシグナルを細胞内へと伝達する光受容タンパク質である。この時多くの走光性に関連するシグナル伝達過程では、一つの受容体が多くの下流分子を活性化し、シグナルの増幅を行う。これによって非常に弱い光であっても、非常に高感度でその変化を捉えることができる。しかし、この時どの程度の数の分子がシグナル伝達に関わり、高い光応答性を達成しているのかはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では微生物の細胞内で行われる、光シグナルの細胞内信号伝達および増幅過程を分子レベルで解明することを目的とした

本研究では走光性のモデル系として、細菌が光に向かって遊泳する際に使われる光受容タンパク質であるセンサリーロドプシン I (SRI) とトランスデューサー (HtrI) を研究対象とした。SRI は微生物型ロドプシンと呼ばれる光受容膜タンパク質の一種であり、発色団としてレチナールをタンパク質内部に結合する。そしてレチナールが光を吸収し、異性化を起こすとそのシグナルが HtrI に伝達し、さらに HtrI が細胞内に存在する複数の CheY タンパクを活性化することで、シグナルの増幅が行えると考えられている。この時何分子の CheY が SRI-HtrI 複合体と相互作用するのか、本研究では一分子フェルスター型エネルギー移動 (FRET) 観察により、その様子を直接観察することで、シグナル増幅過程の詳細を明らかにすることを目指した。

2. 研究成果

SRI からのシグナル伝達過程を一分子蛍光顕微鏡によって観察する上で、問題となるのが観察光による不要な SRI の光活性化である。これについて SRI は 500-620 nm の波長域の光によって活性化されるため、一般的な FRET 観察で用いる観察光では容易に光活性化が起こってしまう。そこで本研究では SRI の光活性化がほぼ無視できる 647 nm を観察光として用い、また観察用の蛍光色素として DyLight650 および DyLigh680 をそれぞれ FRET の蛍光ドナーおよびアクセプターとして用いた。

このようにして得られた脂質二重膜中に再構成した SRI からの一分子蛍光像を **図 1** に示す。この時 DyLight650 と DyLight680 の二種類の異なる蛍光色素で染色された SRI が多量体を作っていると考えられ、それぞれ同一の輝点上に観察されているが、観察を開始した段階では Acceptor 蛍光が強く光っているが、

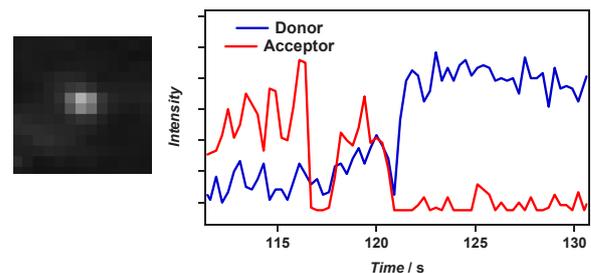


図 1. SRI の一分子蛍光画像 (左) と FRET シグナル

Acceptor が消光すると同時に Donor 型の蛍光が大きく増大していることがわかる (図 1)。このことは Acceptor が消光する前の時間においては、光励起された Donor のエネルギーが、FRET によって、Acceptor 側に移動していることを示している。これにより、今回構築した全反射型一分子顕微鏡と Dylight 色素を用いることで、SRI の一分子観察が可能である事が示された。

一方で近年微生物のゲノム解析の進展により、様々な細菌などから多くの微生物型ロドプシンの遺伝子が報告されている。しかしそれらの多くは分子機能についての研究が行われておらず、光によってどのような機能が発現されるのかはわからない。そこで新たに東京湾に棲む海洋性細菌である、*Krokinobacter eikastus* の持つロドプシン (KR2) についてその機能を調べたところ、光で Na⁺を一方方向的に細胞外側へ輸送する、世界初の光駆動型 Na⁺ポンプであることが明らかになった (Inoue et al., *Nature Commun.* (2013))

本研究で構築を行った全反射型一分子顕微鏡と新たな長波長域に吸収/発光を示す蛍光色素の組み合わせにより、SRI のように比較的長波長で駆動される分子についても、FRET による観察が可能である事が示された。今後はさらに SRI の光活性化に伴う構造変化を検出し、さらに HtrI や CheY タンパク質との相互作用を観察することで、細菌の走光性におけるシグナル伝達・増幅過程について、それに関わる分子数を含めた詳細なメカニズムの解明が期待される。また本手法では SRI/HtrI 複合体と相互作用する CheY タンパク質の計数だけでなく、同一分子内にラベルを導入することで、光反応に伴うタンパク質の構造変化についても調べることができ、信号伝達過程で重要な構造変化過程についても知見を得ることが期待される。

一方 Na⁺ポンプ型ロドプシン KR2 については、その後の研究において、マウス神経細胞や線虫を用いた実験によりオプトジェネティクスツールとしての有用性が示された。そして一方で、X 線結晶構造解析にも成功し (Kato et al. *Nature* (2015))、今後はそれを基盤としたより高機能な分子デザインとオプトジェネティクスへの更なる応用を目指す。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Yamashita, H., Inoue, K., Shibata, M., Uchihashi, T., Sasaki, J., Kandori, H., and Ando, T.* (2013). Role of trimer-trimer interaction of bacteriorhodopsin studied by optical spectroscopy and high-speed atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology.** 184, 2–11.
2. Tsukamoto, T., Inoue, K., Kandori, H., and Sudo, Y.* (2013). Thermal and spectroscopic characterization of a proton pumping rhodopsin from an extreme thermophile. **The Journal of Biological Chemistry.** 288, 21581-21592.
3. Sudo, H.*, Okazaki, A., Ono, H., Yagasaki, J., Sugo, S., Kamiya, M., Reissig, L., Inoue, K., Ihara, K., Kandori, H., Takagi, S., and Hayashi, S. (2013). A blue-shifted light-driven proton pump for neural silencing. **The Journal of Biological Chemistry.** 288, 20624–20632.
4. Inoue, K., Ono, H., Abe-Yoshizumi, R., Yoshizawa, S., Ito, H., Kogure, K., and Kandori, H.* (2013). A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. **Nature Communications.** 4, 1678.
5. Inoue, K., Reissig, L., Sakai, M., Kobayashi, S., Homma, M., Fujii, M., Kandori, H., and Sudo, Y.* (2012). Absorption spectra and photochemical reactions in a unique photoactive protein, middle rhodopsin MR. **Journal of Physical Chemistry B.** 116, 5888-5899.

光によるGタンパク質シグナリング制御を可能にする受容体の開発

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115509

研究代表者名：山下 高廣（京都大学大学院理学研究科 助教）

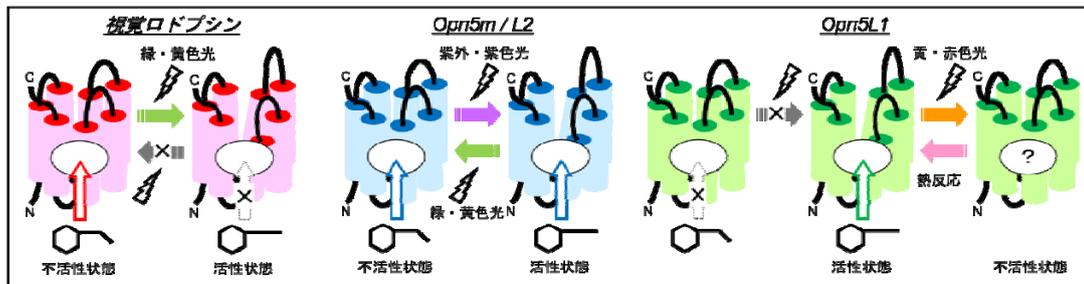
1. 研究の目的

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は市販薬約30%のターゲットになっているとも言われ、Gタンパク質シグナリングは多くの細胞で重要な働きをしている。このGタンパク質シグナリングによるcAMPやカルシウムイオンなどの細胞内濃度変化を光により非侵襲的に制御するため、ウシロドプシンの改変タンパク質を用いる試みが最近始まっている。しかし、ウシロドプシンは発色団として11シス型レチナールしか結合せず、網膜など一部の組織以外ではその供給メカニズムが見いだされていないため、種々の細胞への汎用性に乏しいと考えられる。一方、全トランス型レチナールを発色団とする古細菌やクラミドモナスのポンプ・チャンネル型のロドプシン類は、多くの細胞・組織で機能することが確認されている。そこで本研究では、全トランス型レチナールを結合する動物のオプシン類（Opn5など）の分子特性を解析し、その特性を利用してcAMPやカルシウムイオンなどの数を光で制御するツールを提供することを目的とする。

2. 研究成果

- ① 脊椎動物のOpn5グループは4つのサブタイプに分類できる。このうち、Opn5mとOpn5L2は紫外光を受容して活性化だけでなく、その後に可視光を受容して不活性化するフォトクロミズム型の性質を示すことがわかった。これらの受容体は、刺激する光波長を選択することにより、活性化・不活性化を光で制御できると考えられる。またOpn5nは紫外光ではなく可視光を受容して活性化することがわかった。この受容体は、上記の2つのサブタイプとは異なる光波長で活性を制御できると考えられる。さらに、Opn5L1は11シス型レチナールを結合せず、全トランス型レチナールのみを結合し活性化した。そして、可視光刺激で不活性化した後、熱的に元の状態に戻ることがわかった。この受容体は、フォトサイクル型の性質を示す動物オプシンの初めての報告であり、繰り返しの光刺激で活性化を制御できると考えられる。

図 視覚ロドプシンとOpn5の分子特性の違い



- ② 分子特性が多様化している脊椎動物のOpn5を用いることにより、細胞内のGタンパク質シグナリングを実際に光で制御できるのか検討した。その結果、Opn5L1やOpn5L2を強制発現した培養細胞において、細胞内のcAMP量の変化を光により制御できることがわかった。

今後の展開として、Opn5 グループの分子特性を以下のようにさらに改変することを計画している。

- ① 既にタンパク質部分の変異によって吸収する光波長を変化させることに成功している。さらに、発色団レチナールのアナログを組み合わせることで、より大きく波長を変化させたものを作製する。
- ② GPCR の中には、Gタンパク質以外の分子を結合・活性化することがわかっているものがある。それらの結合に関わるドメインを Opn5 グループに導入することにより、広範な細胞内シグナリングに関わる低分子の数を光で制御できるツールを作製する。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Sato, K., Yamashita, T., Haruki, Y., Ohuchi, H., Kinoshita, M., and *Shichida, Y. (2016) Two UV-Sensitive Photoreceptor Proteins, Opn5m and Opn5m2 in Ray-Finned Fish with Distinct Molecular Properties and Broad Distribution in the Retina and Brain. PLoS One. 11, e0155339.
2. Sasaki, K., Yamashita, T., Yoshida, K., Inoue, K., Shichida, Y., and *Kandori, H. Chimeric proton-pumping rhodopsins containing the cytoplasmic loop of bovine rhodopsin. PLoS One 9, e91323, (2014).
3. Yamashita, T., Ono, K., Ohuchi, H., Yumoto, A., Gotoh, H., Tomonari, S., Sakai, K., Fujita, H., Imamoto, Y., Noji, S., Nakamura, K., and *Shichida, Y. Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. Journal of Biological Chemistry 289, 3991-4000, (2014).
4. Yamashita, T., Nakamura, S., Tsutsui, K., Morizumi, T., and *Shichida, Y. Chloride-dependent spectral tuning mechanism of L-group cone visual pigments. Biochemistry 52, 1192-1197, (2013).

(総説)

1. Yamashita, T., and Shichida, Y. Molecular aspect of evolution and diversity of animal photoreception. In "Evolution and Senses" pp.1-22, Springer (2013).

(学会発表：招待講演)

1. Yamashita, T. : 「Molecular properties of vertebrate UV-sensitive opsin Opn5」 Gordon Research Conference (2016年、アメリカ・ヒューストン)
2. 山下高廣 : 「視覚以外の機能に関わるロドプシン類の分子特性」 第11回 GPCR 研究会 (2014年、東京都)
3. Yamashita, T. : 「Diversity of molecular properties of vertebrate non-visual opsin group, Opn5」 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology (2013年、オーストラリア・シドニー)

動的カドヘリン複合体の機能：3次元1分子超追跡法の開発による解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115510

研究代表者名：藤原 敬宏（京都大学 物質-細胞統合システム拠点 講師）

1. 研究の目的

アドヒューレンスジャンクション (AJ) をはじめとする細胞接着構造は、細胞が集合して組織を作るための非常に重要な構造体である。申請者は、サブミリ秒時間分解能で生細胞上の1蛍光分子を追跡できる、高感度・高速カメラ顕微鏡システム、および、蛍光2色/3色同時1分子追跡顕微鏡システムを開発してきた。本研究では、これらの装置と技術をさらに発展させ、多数の蛍光標識分子を同時に、1分子毎に、ビデオレートで追跡できる、3次元1分子イメージング顕微鏡を開発する。さらにその顕微鏡を使って、少数/短寿命のタンパク質複合体 (AJ の場合は動的少数 E-カドヘリン複合体) を単位とした、細胞間接着構造の形成/分解機構を解明する。

2. 研究成果

サブミリ秒時間分解能の1蛍光分子追跡技術を発展させた、3次元1分子イメージング顕微鏡を開発した。対物レンズの焦点を30 Hz、深さ方向5ミクロンの正弦波で走査し、1ミクロンおきに1ミリ秒の露光で撮像をおこなった。試料中の焦点面を0.7ミクロンずらした2台のカメラによる同時撮像でz座標の位置決めをおこなうことにより、深さ方向5ミクロンにわたる多数分子を、ビデオレート(30 Hz)で3次元追跡できる。

開発した顕微鏡システムにより、細胞膜上の受容体 (鉄イオン輸送分子トランスフェリン受容体、細胞間接着分子 E-カドヘリン) 1分子像の、30 x 30 x 5 ミクロン体積中のビデオレートでの繰り返し撮影に成功した。ただし、z座標の高精度の位置決めと、数秒以上の3次元1分子運動追跡のためには、1分子蛍光像のシグナル/ノイズ比、および、観察可能時間が不十分 (褪色までが1秒以下) であり、使用する蛍光プローブとターゲット分子の標識法、観察条件のさらなる改善を要することが明らかとなった。

本研究で開発した装置を今後さらに改善し、褪色するまでの追跡時間を数倍に長くする (数秒以上にする) ことにより、動的少数 E-カドヘリン複合体の理解を進めるだけでなく、領域メンバーとの共同研究を通じて、さまざまな少数性生物学研究の発展に寄与することが期待できる。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Shibata ACE, Chen LH, Nagai R, Ishidate F, Chadda R, Miwa Y, Naruse K, Shirai YM, [Fujiwara TK](#) and Kusumi A*. Rac1 recruitment to the archipelago structure of the focal adhesion through the fluid membrane as revealed by single-molecule analysis. Cytoskeleton, 70, 161-177, (2013)
2. Nishimura H, Ritchie K, Kasai RS, Goto M, Morone N, Sugimura H, Tanaka K, Sase I, Yoshimura A, Nakano Y, [Fujiwara TK](#) and Kusumi A*. Biocompatible fluorescent silicon nanocrystals for single-molecule tracking and fluorescence imaging. J. Cell Biol., 202, 967-983, (2013)
3. Hiramoto-Yamaki N, Tanaka KA, Suzuki KG, Hirosawa KM, Miyahara MS, Kalay Z, Tanaka K, Kasai RS, Kusumi A* and [Fujiwara TK](#)*. Ultrafast diffusion of a fluorescent cholesterol analog in compartmentalized

plasma membranes. *Traffic*, 15, 583-612, (2014)

(総説)

1. Kusumi A*, Fujiwara TK, Chadda R, Xie M, Tsunoyama TA, Kalay Z, Kasai RS and Suzuki KGN. Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: Commemorating the 40th anniversary of the Singer-Nicolson's fluid mosaic model. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 28, 215-250, (2012)
2. Suzuki KG, Kasai RS, Fujiwara TK and Kusumi A*. Single-molecule imaging of receptor-receptor interactions. *Methods Cell Biol.*, 117, 373-390, (2013)
3. 藤原敬宏, 笠井倫志, 楠見明弘*. 超高速・超解像 1 蛍光分子顕微鏡, 超解像顕微鏡の世界: 波長の壁を超えて見る (第 6 回) 現代化学, 508, 50-51, (2013)

(学会発表)

1. 藤原敬宏 Hop diffusion in the plasma membrane as revealed by ultrafast camera for single fluorescent-molecule localization. 日本バイオイメーjing学会 第 21 回学術集会 (招待講演), 2012 年 08 月 27 日, 京都国際会館
2. Fujiwara T. Hop diffusion in the plasma membrane as detected by ultrafast single-molecule localization] 14th International Membrane Research Forum (招待講演), 2013 年 3 月 16 日, 京都大学
3. Fujiwara T. Mesoscopic organization and function of the plasma membrane as revealed by ultrafast singlefluorescent molecule localization microscopy. University System of Taiwan-Kyoto University iCeMS International Symposium (招待講演), 2013 年 11 月 18 日, Hsinchu, Taiwan

光機能性プローブを用いた生体分子の少数活性化

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115513

研究代表者名：水上 進（大阪大学大学院工学研究科 准教授）

1. 研究の目的

細胞内に存在する少数分子は通常の生化学実験法では検出困難であり、その解析は極めて困難である。一方、細胞は非平衡のシステムであり、細胞内の特定分子の数を時空間的に精密に制御することで、細胞応答に及ぼす生体分子の“数”の意義が明らかになる。そこで本研究では、細胞内外の蛋白質を定量的に活性化させ、その活性分子数を制御する技術の開発に取り組む。申請者がこれまでに開発してきた「蛋白質の機能性分子ラベル化技術」と「生体分子の光活性化技術」を融合させることで、光によって同種あるいは異種の蛋白質を接着あるいは解離させる。細胞に照射する光の強度を調節することで、細胞表面あるいは細胞内の少数の標的蛋白質を定量的に活性化させる。この技術は、活性化させる蛋白質数を自在に操作することを可能とし、蛋白質の少数性の概念を調べるための強力なツールになると期待できる。

2. 研究成果

本研究課題では、光を用いて蛋白質を定量的に活性化する技術開発を行った。その為のアプローチとして、研究代表者らが独自に開発した蛋白質を機能性化合物で特異的に修飾する「蛋白質ラベル化技術」(BL-tag 技術)を用いた。本研究では、生細胞の内外に発現させた異なる二つのタグ (BL-tag および市販の HaloTag) をを共有結合でクロスリンクするリンカー化合物を開発した。また、光によって BL-tag にラベル化されるリガンドを新たに開発し、光照射した部位のタグ蛋白質のみに機能性分子をラベル化することを可能にした。

また、この光応答性タグリガンドを片側に有する光二量化リンカーを開発した。このリンカー化合物は一方の末端に HaloTag リガンド、他方の末端に光応答性のケージド BL-tag リガンドを有している。それゆえ、本プローブを溶液中に添加すると速やかに HaloTag に結合する。ここに、光を照射すると BL-tag リガンドが活性化され、BL-tag と共有結合を形成する。これにより、HaloTag 融合蛋白質と BL-tag 融合蛋白質が連結される、このプローブを用いて、膜蛋白質 EGFR（上皮成長因子受容体）の光二量化実験を行った。生細胞の細胞膜上に BL-EGFR および Halo-EGFR を共発現させ、そこ光二量化プローブを添加し、光照射を行ったところ、EGFR の二量化、リン酸化、細胞内への内在化が惹起された。また、光照射後に細胞遊走活性が亢進していることも確認された。以上、新規化学プローブを合理的に設計することにより、蛋白質間相互作用を光によって活性化し、細胞機能を制御する技術を開発した。

今後の展開として、開発技術をより信頼性の高い実用技術に高めていく必要がある。現在は光非照射下においても若干の二量化が観察されており、このバックグラウンドを完全に無くすことが喫緊の課題である。また、本技術が一般的な技術として認められるには、他の生命現象への応用と、そこから新たな生命原理の解明につながる事例が必要である。現在、TGF- β 受容体の二量化を光で制御する

ことを目的として、実験系の構築を開始しており、TGF- β 受容体が介在する細胞内シグナル伝達経路を解明することを目指して研究を継続している。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Zeng, Z., Mizukami, S., Fujita, K., *Kikuchi, K. (2015). An enzyme-responsive metal-enhanced near-infrared fluorescence sensor based on functionalized gold nanoparticles. **Chemical Science** 6, 4934–4939.
2. Nakamura, T., Sugihara, F., Matsushita, H., Yoshioka, Y., Mizukami, S., *Kikuchi, K. (2015). Mesoporous silica nanoparticles for ^{19}F magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery. **Chemical Science** 6, 1986–1990.
3. Nakamura, T., Matsushita, H., Sugihara, F., Yoshioka, Y., Mizukami, S., *Kikuchi, K. (2015). Activatable ^{19}F MRI nanoparticle probes for the detection of reducing environments. **Angewandte Chemie International Edition** 54, 1007–1010.
4. Okada, S., Mizukami, S., Sakata, T., Matsumura, Y., Yoshioka, Y., *Kikuchi, K. (2014). Ratiometric MRI sensors based on core-shell nanoparticles for quantitative pH imaging. **Advanced Materials** 26, 2989–2992.
5. Matsushita, H., Mizukami, S., Sugihara, F., Nakanishi, Y., Yoshioka, Y., *Kikuchi, K. (2014). Multifunctional core-shell silica nanoparticles for highly sensitive ^{19}F magnetic resonance imaging. **Angewandte Chemie International Edition** 53, 1008–1011.
6. Yoshimura, A., Mizukami, S., Mori, Y., Yoshioka, Y., *Kikuchi, K. (2014). ^1H MRI detection of gene expression in living cells by using protein tag and biotinylation probe. **Chemistry Letters** 43, 219–221.
7. Lindberg, E., Mizukami, S., Ibata, K., Fukano, T., Miyawaki, A., *Kikuchi, K. (2013). Development of cell-impermeable coelenterazine derivatives. **Chemical Science** 4, 4395–4400.
8. Lindberg, E., Mizukami, S., Ibata, K., Miyawaki, A., *Kikuchi, K. (2013). Development of luminescent coelenterazine derivatives activatable by β -galactosidase for monitoring dual gene expression. **Chemistry—A European Journal** 19, 14970–14976.
9. Nakamura T., Mizukami, S., Tanaka, M., *Kikuchi K. (2013). Efficient development of luminescent lanthanide(III) complexes by solid-phase synthesis and on-resin screening. **Chemistry—An Asian Journal** 8, 2685–2690.

腸炎ビブリオにおけるⅢ型分泌機構の数と病原性誘導

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115516

研究代表者名：高橋 章（徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

1. 研究の目的

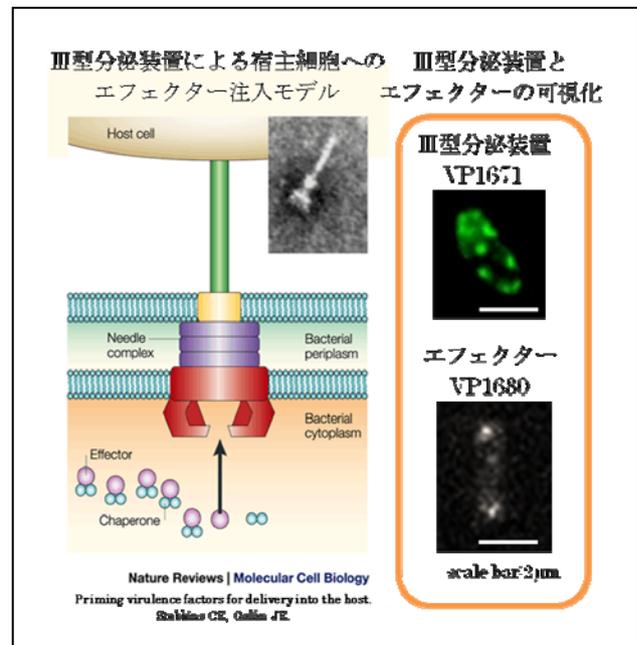
細菌の病原性発揮機構の中で、細菌内の病原因子蛋白を宿主細胞内し病原性を発揮する機構（Ⅲ型分泌機構：TTSS）が注目されている。食中毒原因菌である腸炎ビブリオではTTSSが2組存在しており、TTSS1は細胞毒性に関与しTTSS2は腸管毒性にそれぞれ関与する。このTTSSは一つの細菌に約10～50個存在していると考えられており、その数と活性が変化することで病原性が変化すると考えられるが、その制御機構は不明である。

腸炎ビブリオの病原性発揮機構に関する研究を行い、VP1680などの病原因子がTTSS1を介して宿主細胞に注入され宿主細胞に炎症反応を引き起こすことを報告してきた。しかしTTSS1やVP1680の細胞あたりの数は非常に少なく、TTSS1数とVP1680分泌能が病原性誘導活性にどの様に関与しているのか、従来からある濃度依存的な反応速度論のみで説明することは難しい。そのため少数の蛋白質とその機能に制御される反応（マクロ的な病原性）を理解するためには、少数分子の挙動を厳密に測定したうえでマクロ的な挙動を説明する理論を構築することが必要である。

本研究では、TTSS1に焦点を当てる。細菌の状態に対応したTTSS1数と病原因子（VP1680）数の厳密な測定をもとに、宿主細胞への炎症反応誘導機構の新たな説明法を考案することを目的とした。

2. 研究成果

腸炎ビブリオの病原性に関与するⅢ型分泌機構により分泌される病原因子（エフェクター）は、その少数性ゆえに可視化が困難であった。今回、腸炎ビブリオに適したEGFP変異体を作製し、菌体内で初めてエフェクターの可視化に成功した。加えて、この病原因子が分泌可能で細胞毒性を示すことも確認している。さらにⅢ型分泌機構とエフェクターの数の計測およびその挙動を検討した。



今後の研究の展開に関する計画として、腸炎ビブリオのⅢ型分泌機構形成の調製機構を明確にすることか必要であると考えられる。さらに病原性細菌と宿主間における反応の新しい反応機構モデルを提唱し、細菌の病原性発揮機構の完全な理解につなげていく必要がある。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Takaaki Shimohata, Kazuaki Mawatari, Hitomi Iba, Masakazu Hamano, Sachie Negoro, Shoko Asada, Mutsumi Aihara, Akiko Hirata, Zehong Su and Akira Takahashi, VopB1 and VopD1 are essential for translocation of type III secretion system 1 effectors of *Vibrio parahaemolyticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58(8): 1002-1007.
2. Thanh Tam Thi Le, Kazuaki Mawatari, Miki Maetani, Tomomi Yamamoto, Sayaka Hayashida, Hitomi Iba, Mutsumi Aihara, Akiko Hirata, Takaaki Shimohata, Takashi Uebansou and Akira Takahashi. VP2118 has major roles in *Vibrio parahaemolyticus* response to oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, 1820(10): 1686-1692.
3. Takafumi Yakabe, Takaaki Shimohata, Akira Takahashi. *Lactobacillus brevis* KB290 enhances IL-8 secretion by *Vibrio parahaemolyticus*-infected Caco-2 cells . *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 23(1):118-124.
4. Akihiro Shirai, Mutsumi Aihara, Akira Takahashi, Hideaki Maseda, and Takeshi Omasa. Synergistic antimicrobial activity based on the combined use of a gemini-quaternary ammonium compound and ultraviolet A light. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2014, 130:226-233
5. Mutsumi Nakahashi, Kazuaki Mawatari, Akiko Hirata, Miki Maetani, Takaaki Shimohata, Takashi Uebansou, Yasuhiro Hamada, Masatake Akutagawa, Yousuke Kinouchi, Akira Takahashi. Simultaneous irradiation with different wavelengths of ultraviolet light has synergistic bactericidal effect on *Vibrio parahaemolyticus*. *Photochemistry and Photobiology* 90(6):1397-1403 2014

(学会発表)

1. Takashi Uebansou, Takaaki Shimohata, Iba Hitomi, Nishimura Kazuya, Taniguchi Yuichi, Kazuki Horikawa, Mutsumi Nakahashi, Kazuaki Mawatari and Akira Takahashi: Combination between a few T2SS injectisome and a lot effector for killing host cells on *Vibrio parahaemolyticus*, *6th FEMS Microbiology Congress*, Jun. 2015.
2. Takashi Uebansou, Hitomi Iba, Shoko Asada, Takaaki Shimohata, Mutsumi Aihara, Kazuaki Mawatari and Akira Takahashi: Regulation and effects of VP1671 (VscQ) on virulence of *Vibrio parahaemolyticus*, *5th FEMS Microbiology Congress*, Jul. 2013.

リン酸結合蛋白の微小溶液チャンバーによる、少数個蛋白質からのリン酸検出系の構築

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115517

研究代表者名：政池 知子（東京理科大学理工学部 講師）

1. 研究の目的

細胞内にはリン酸が関与する化学反応を触媒する蛋白質が多数存在する。ATP加水分解の自由エネルギーを利用して動くモーター蛋白質やシグナル伝達に関与するGTPase蛋白質のほか、時計蛋白質など蛋白質のリン酸化により反応のスイッチングを行う蛋白質の例が挙げられる。これらの蛋白質が細胞内において少数個で高濃度を実現し働くときの分子協同性や分子個性、エルゴード性を明らかにしたいと考えた。そこでまず、細胞内環境を模した比較的小さな体積を用意し、その微小空間でのリン酸検出を試みることを目標とした。次に、このシステムを用いて、少数個のタンパク質が放出するリン酸を定量化することを目指した。

2. 研究成果

蛍光標識リン酸結合蛋白を微小体積のチャンバーアレイに閉じ込めるシステムの構築を行った。まず64フェムトリットルのPDMSでできたチャンバーに上記蛋白を閉じ込め、 F_1 -ATPaseがATPを加水分解して放出するリン酸濃度の増加を実時間で検出する事に成功した。チャンバー間で溶液に漏れないように、チャンバーをガラス面に抑える方法を検討し、漏れを調べる実験も確立した。蛍光強度が増加したチャンバーの特定の穴にレーザーを照射し、退色させたあとの蛍光の回復が無いことから隣のウェルからの漏れ込みがないことを確かめることができた。また、リン酸の定量のために既知濃度のリン酸をチャンバーに閉じ込め、蛍光強度からキャリブレーションを行う方法を確立した。

今後は更に体積が小さいチャンバーを作る別の技術も応用し、 P_i の検出限界を下げ、究極的には1個のリン酸の生成を実時間で検出できる実験系の構築を目指す。その際、チャンバー内に封入される目的のタンパク質の個数がポアソン分布に従うことを示す必要がある。また、最終的な1分子のリン酸検出のためには、リン酸結合蛋白1分子が1個のリン酸を結合して蛍光強度を増加させるシグナルを捉えることが必要になるため、高感度の蛍光強度検出系の構築が必要となる。これらの実験系を構築するためには、溶液交換のシステムも導入することが必要になると考えられる。

3. 主な研究発表

(学会発表)

1. [Masaike, T.](#) Imaging Motions, Functions, and Reactions of Single Molecules. OIST workshop Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses Okinawa Institute of Science and Technology Graduate School, April 21st (2014) Invited
2. [Masaike, T.](#) Conformational changes and chemical events of ATPase enzymes. Tokyo ATPase Workshop, Tokyo University, June 2nd (2014) Invited

3. Masaïke, T. Conformational changes and chemistry of single-molecule enzymes revealed under the optical microscope. Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, Miraikan, June 8-11, (2014) Invited
4. Masaïke, T. Observation of Single-Molecule Enzymes through Probes under the Optical Microscope. Taiwan-Japan Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences, National Tsing Hua University, Taiwan, September 13th (2014) Invited
5. Higuchi, M., Tabata, K. V., Noji, H., Masaïke, T. Detection of inorganic phosphate by phosphate binding protein encapsulated in femtoliter droplet arrays, The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, November 25-27 (2017) Poster presentation

シナプス内分子数揺らぎが可塑性誘起に与える影響

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115520

研究代表者名：村越 秀治（生理学研究所 脳機能計測・支援センター 准教授）

1. 研究の目的

記憶形成の最小単位であるシナプスの後端を形成するスパインの大きさは 0.1 フェムトリッター程度の容積しかない。これは、ある分子が細胞に 100 nM の濃度で発現しているとする、1 個のスパインには 5 分子程度しか存在しないことを意味する。このような微小領域では、各種分子数の揺らぎが機能に大きく影響する筈である。本研究では、シナプス長期増強にとって重要な働きをしていると考えられる CaMKII, PKC, PKA に着目し、これらの活性を青色光照射で制御できるように遺伝子改変する。次に、開発した光感受性分子を用いて、シグナル伝達系に摂動を与えながらスパインを刺激し他時の機能発現の変化を、スパイン体積の変化を指標にして測定する。このようにして、シナプス内の分子数揺らぎが長期増強発現に与える影響を調べる。

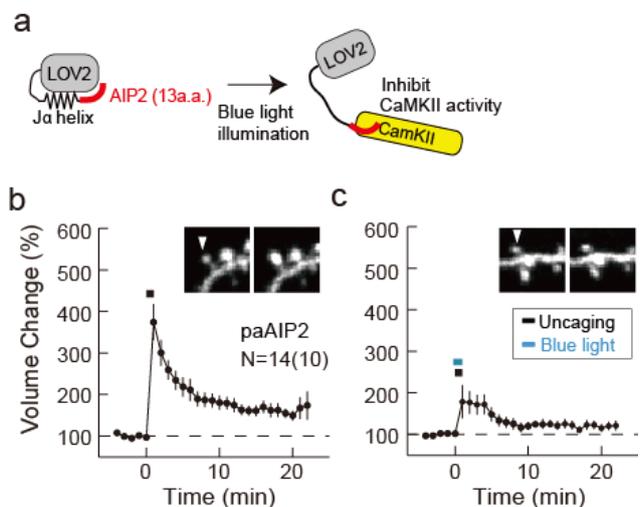
2. 研究成果

遺伝子工学を用いた光活性型 CaMKII 阻害分子の開発

CaMKII の活性を細胞内で 1 ミクロンの空間分解能、秒レベルの時間分解能で活性を制御できるようにするため、植物の光受容タンパク質キナーゼである Phototropin1 の LOV2 ドメインを用いた。Phototropin1 は植物の光受容タンパク質キナーゼであり、青色光照射によって、LOV2 ドメインに結合していた α ヘリックスが解離し、分子構造が変化する。この変化は可逆的である。そこで、本研究では、CaMKII の阻害ペプチドである Autocamtide Inhibitory Peptide 2 (AIP2) に LOV2 を遺伝子工学的に融合させ、光照射依存的に AIP2 の活性が変化するようにし、paAIP2 (photo-activatable AIP2) と名付けた (図 a)。

この光応答性分子を用いて、CaMKII 阻害がケイジドグルタミン酸刺激により誘起されるスパイン体積の可塑的な変化を阻害するかどうかを調べた (図 b,c)。具体的には、ケイジドグルタミン酸刺激と同時に青色光(100 mW/cm²)により CaMKII の活性を 1 分間阻害したところ、一過的な体積変化が劇的に阻害され、さらに、持続的な体積変化が完全に阻害された (図 c)。このことは、初期の CaMKII の活性がスパイン体積の変化にとって極めて重要であることを示している (Murakoshi et al. Neuron 2017)。

また研究期間内に、これらの計測の基盤となる各種プローブ、蛍光タンパク質の開発にも成功した (Shibata et al. PLoS ONE 2015, Murakoshi et al. Scientific Reports 2015, Hedrick et al. Nature 2016, Nakahata et al. Scientific Reports 2016)。



今後は、光操作可能な阻害ペプチドを CaMKII のみならず、PKC や PKA といった様々な分子に展開していく。これによって、各種シグナル分子が 10 個程度ずつしか存在しない微小コンパートメントであるシナプス内における情報伝達機構の解明を目指す。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Shibata AC, Maebashi KH, Nakahata Y, Nabekura J, and Murakoshi H*, Development of a molecularly evolved, highly sensitive CaMKII FRET sensor with improved expression pattern. *PLoS ONE* 10, e0121109 (2015).
2. Murakoshi H*, Shibata AC, Nakahata Y, and Nabekura J. A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Scientific Reports* 5, 15334 (2015).
3. Hedrick NG, Harward SC, Hall CE, Murakoshi H, McNamara JO, and Yasuda R. Rho GTPase complementation underlies BDNF-dependent homo- and heterosynaptic plasticity. *Nature* 538, 104-108 (2016).
4. Nakahata Y, Nabekura J, and Murakoshi H* Dual observation of the ATP-evoked small GTPase activation and Ca²⁺ transient in astrocytes using a dark red fluorescent protein. *Scientific Reports* 6, 39564 (2016).
5. Murakoshi H*, Shin M, Parra-Bueno P, Szatmari EM, Shibata AC, and Yasuda R. Kinetics of endogenous CaMKII required for synaptic plasticity revealed by optogenetic kinase inhibitor. *Neuron* (2017). pii: S0896-6273(17)30144-7.

【A02班】
少数性の生物学

細胞内情報伝達の少数性生物学

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23115004

研究代表者名：石島 秋彦（大阪大学大学院生命機能研究科 教授）

研究分担者名：朽尾 豪人（京都大学理学研究科 教授）

1. 研究の目的

本計画では、細胞への外部刺激によるサブミリ秒での制御（caged化合物）、細胞表面受容体の構造変化の直接計測（ダイヤモンドナノ粒子）、細胞内情報伝達機構の直接計測（マルチモーターの同時計測、ラマン分光法）を用いた多角的な同時計測システムを構築し、細胞外部からの誘因・忌避物質刺激に対する受容体応答の高ダイナミックレンジ検出機構及び細胞内情報伝達系を統合的に理解することを目的とする。

2. 研究成果

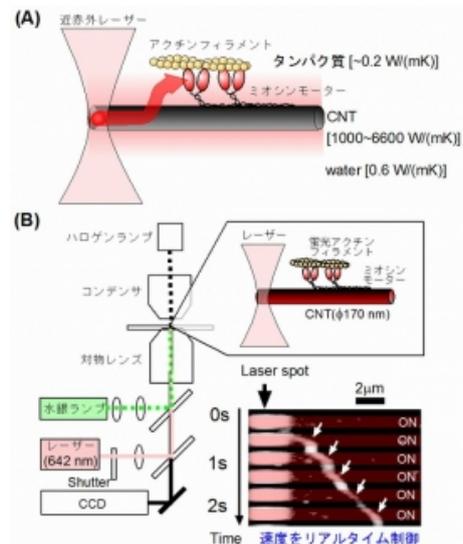
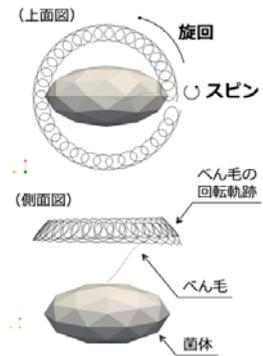
① コマのような新しいべん毛運動の発見、およびその解明

細菌のべん毛（細菌の表面から生えている細長い繊維）が「スピン+旋回運動」というコマのような回転挙動をしていることを実験により見出しました。また独自の理論により、その回転メカニズムは、べん毛が作り出す流れで説明できることを明らかにしました。

本研究の成果は、細菌のべん毛運動の裏に潜む物理法則をあぶり出すものであり、べん毛モーターの理解と制御に向けた重要な一歩となることが期待されます。（Scientific Reports, 5, 18488 (2015)）

② カーボンナノチューブで生体分子活性を制御することに成功

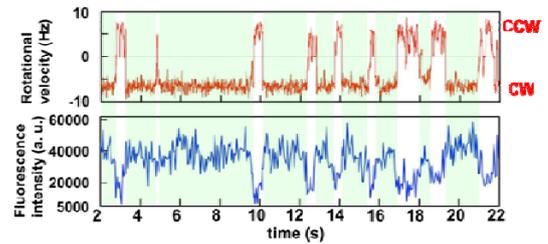
カーボンナノチューブ1本上で生体分子モーターの運動活性を観察し、レーザー照射によって運動速度を制御する新技术を開発した。カーボンナノチューブは、炭素原子からなる筒状の物質であり、導電性や弾性など優れた特性を持っている。その中でも熱伝導性は特出しており、金や銅より高い熱伝導率が報告されている。今回の研究では、ウサギ骨格筋から精製したミオシンをカーボンナノチューブ上に失活しないように吸着させ、カーボンナノチューブ自体もガラス上に固定した。そして、ATPと蛍光ラベルしたアクチンフィラメントを与えると、ミオシンラベルしたカーボンナノチューブに沿ってアクチンフィラメントが滑り運動するのが蛍光観察された。さらに、滑り運動中に、カーボンナノチューブの片端だけを、レーザー照射によって加熱したところ、アクチンフィラメントがカーボンナノチューブに沿って滑り運動する速度が、レーザー照射時だけ高速化することが分かった。今後は、より細く微小なカーボンナノチューブなどを用いて、細胞内の狙った分子1個だけの生きた活性を自由自在に操ることができるようになると期待されている。



(ACSnano, 9, 3677-3684, 2015)

③ 細菌走化性を制御する細胞内シグナル伝達構成要素の直接的イメージング

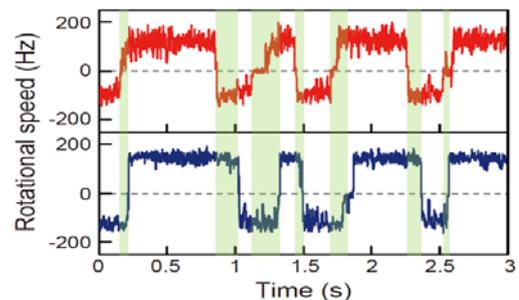
緑色蛍光タンパク質による CheY の蛍光イメージング (CheY-GFP) と、モーターの回転方向転換 (明視野観察) を同時に計測しました。その結果、モーターの回転方向転換が CheY-P の結合・解離によって直接制御されることを実証することができました。CheY-P 分子は必ずしもモーター基部体の



のすべての結合部位 (34 箇所) に結合する必要はなく、 13 ± 7 個の結合で時計回りの回転を誘導すること、回転方向転換時に CheY-P 分子は ~ 100 ms 以内にモーターと結合・解離すること、時計回転型のモーターの方が CheY-P に対する親和性が高いことなどが分かってきました。(Science Signaling, 319, ra32, 2014)

④ 細胞内情報伝達の新しい計測方法の開発

細胞内情報伝達を明らかにするために我々は、複数のモーターの回転を同時に計測することにより、細胞内の情報伝達を明らかにしようと試みました。その結果、複数のモーター間には回転転換に相関がある、その相関には時間遅れがあり、極に近い方のモーターが早く転換する、その時間遅れは、サブ秒オーダーで、モーター間の距離が長くなると長くなる、ことがわかりました。この結果は、細胞内情報伝達は極から波のように伝わる、極の受容体はあたかも 1 分子のように非常に強い協同性を有することを意味します。さらに、拡散で情報伝達するためには、脱リン酸化を行う CheZ の局在、機能が非常に重要であることを強く示唆することができました。この結果は、原核細胞のみならず、真核細胞にも非常に重要な知見を与えるものです。今後、さらなる計測手法の開発を行い、より詳細を明らかにする予定です。(Biophysical Journal, 100, 2193-2200.2011)



ことがわかりました。この結果は、細胞内情報伝達は極から波のように伝わる、極の受容体はあたかも 1 分子のように非常に強い協同性を有することを意味します。さらに、拡散で情報伝達するためには、脱リン酸化を行う CheZ の局在、機能が非常に重要であることを強く示唆することができました。この結果は、原核細胞のみならず、真核細胞にも非常に重要な知見を与えるものです。今後、さらなる計測手法の開発を行い、より詳細を明らかにする予定です。(Biophysical Journal, 100, 2193-2200.2011)

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima, Local heating of molecular motors using single carbon nanotubes, Biophysical Reviews, 1-8 (2016), 査読有
2. Yuji Shimogonya, Yoichiro Sawano, Hiromichi Wakebe, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima & Takuji Ishikawa, Torque-induced precession of bacterial flagella, Scientific Reports, 5, 18488 (2015), 査読有
3. Yuichi Inoue, Mitsunori Nagata, Hiroshi Matsutaka, Takeru Okada, Masaaki K. Sato, and Akihiko Ishijima, Single Carbon Nanotube-Based Reversible Regulation of Biological Motor Activity, ACSnano, 9, 3677-3684 (2015), 査読有

(学会発表)

1. Yong-SukChe, Hiroto Takahashi, Akihiko Ishijima, Hajime Fukuoka, Importance of receptor cooperativity on the switching coordination of flagellar motors on a single Escherichia coli cell, 日本生物物理学会例会, 2016年11月27日, つくば国際会議場 (茨城県 つくば市)

2. Hajime fukuoka, Hiroto Takahasi, AkiHiko Ishijima, 走化性タンパク質の細胞動態と細胞応答の同時計測, 日本生物物理学会例会, 2016年11月26日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

(図書)

1. 石島秋彦, 福岡創, 蔡栄淑 (永井健治, 富樫祐一), 少数性生物学, 第16章, 178(139-152), 2017, 日本評論社
2. 井上裕一, 石島秋彦 (原田慶恵, 石渡信一編), 1分子生物学, 18章, 292(228-237), 2014, 化学同人
3. 福岡創, 石島秋彦 (野地博行編), 1分子ナノバイオ計測 -分子から生命システムを探る革新的技術-, 222(41-49), 2014, 化学同人

細胞内情報伝達の少数性生物学

研究期間：平成 23 年度～平成 27 年度

研究課題番号：23115005

研究代表者名：前島 一博（国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター 教授）

研究分担者名：谷口 雄一（国立研究開発法人理化学研究所生命システム研究センター
ユニットリーダー）

連携研究者名：高橋 恒一（国立研究開発法人理化学研究所生命システム研究センター
チームリーダー）

吉村 成弘（京大大学生命科学研究科 准教授）

1. 研究の目的

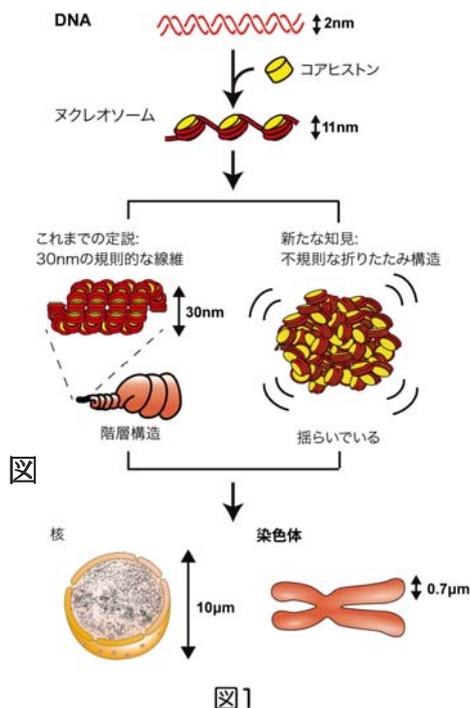
本研究計画では少数分子による情報検索原理を「ゲノムの足場の構造と動き」と、ターゲットを探す「転写因子の動き」の両面から明らかにすることを目的とした。具体的には、生細胞内の個々のヌクレオソーム（ゲノムの足場）と転写因子の動きを 1 分子レベルで直接イメージングする技術を開発し検証する。さらに、計算機シミュレーションを組み合わせ、核内の動的な環境をモデル化し、既存データを加えて、今までほとんど研究がなされてこなかったゲノムの情報検索の原理の解明にアプローチした。

2. 研究成果

まず、ヒトゲノム DNA は一体どのように折り畳まれて、細胞核や染色体に収納されているのだろうか？教科書などでは、まず DNA はヒストンに巻かれ、ヌクレオソームと呼ばれる構造体になり、さらに折り畳まれて直径約 30nm のクロマチン線維になるとされてきた (図 1 左)。しかしながら、代表者前島らのクライオ電子顕微鏡や X 線構造解析を用いた研究によって、ヒトの間期核・分裂期染色体体内には 30nm 線維を含めて階層構造が存在せず、直径 11nm のヌクレオソームの線維が不規則に折り畳まれているという、「ゲノムの足場の構造」に関して、従来のモデルをくつがえす知見が得られた(図 1 右) (論文 1,2,10,11)。研究分担者谷口らの新しいゲノム解析手法による結果もこの知見を支持している。

次に「ゲノムの足場の動き」を調べるため、領域代表永井らと 1 分子イメージングを用いて、ヌクレオソームの 1 個 1 個の動態を解析した。

コアヒストン H4 と光活性化型緑色蛍光タンパク質 PAGFP を融合させ、HeLa 細胞に内在性の H4 の 5% 以下の量を発現させた。PAGFP はごく少数のタンパク質が自発的に活性化する性質をもつ。代表者らは、この自発的に活性化した PAGFP-H4 を斜光照明顕微鏡で観察した (図 2A,B)。



斜光照明顕微鏡を用いて、自発的に活性化した PAGFP-H4 を観察することで、一度に発光する H4 を一細胞あたり数十~百個程度というごく限られた数に減らし、ヌクレオソーム一つ一つを区別して見ることに成功した (図 2C)。

代表者らは、自発的に活性化したヌクレオソームを光褪色するまで検出し、その後、画像処理により 1 分子由来の輝点の重心座標を検出した。この自発的な活性化と検出の過程を、全ての PAGFP-H4 分子を測定するまで繰り返し、全ての画像の輝点の重心画像を重ね合わせると、顕微鏡システムの位置決定精度を見かけの空間分解能とする超解像顕微鏡 (この場合は PALM) 像を得ることができた。同一分子の輝点の重心座標を時間フレーム間でつなげると単一ヌクレオソームの運動軌跡となる (図 2D)。運動軌跡から、ヌクレオソームの単位時間当たりの移動距離の分布 (図 3A) や平均二乗変位 (MSD) (図 3B) を算出することができた。これらの解析により、ヌクレオソームの空間分布とそのゆらぎをゲノムワイドで計測することが可能となった。

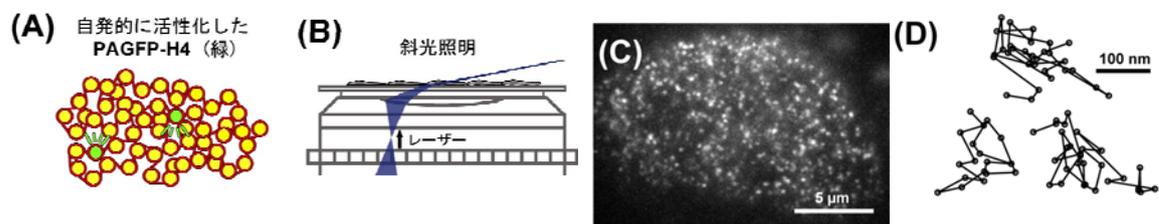


図 2

興味深いことに、ヌクレオソームのゆらぎは、間期クロマチンでも分裂期染色体でも同じようにみられた (~50 nm/30 ms)。一方、ガラス表面に固定した GFP の見かけ上のゆらぎは $12.8 \pm 0.2 \text{ nm}/30 \text{ ms}$ であり、生細胞で観察した PAGFP-H4 の動きに比べて非常に小さい。顕微鏡システムに起因する動きは、ヌクレオソームの動きと比較してごくわずかであった。ヌクレオソームのゆらぎをさらに解析するため、PAGFP-H4 の MSD を指数関数で近似すると $\text{MSD} = 0.022t^{0.36}$ という異常拡散モデルで説明できた (図 3B)。これは、ヌクレオソームの運動はある領域内に制限されていることを示唆している。ヌクレオソームのゆらぎは、生物学的にどんな意味をもつのであろうか? 連携研究者高橋らとの共同研究によって、ヌクレオソームダイナミクスのモンテカルロシミュレーションは、このヌクレオソームのゆらぎが転写因子などのタンパク質の運動を促進していることが示唆された (図 3C) (論文 3,6,8,9)。本研究計画において、ヌクレオソームの「揺らぎ」がタンパク質分子によるゲノム DNA の情報検索を助けていることが明らかになり、少数のゲノム DNA の情報検索原理の理解が進んだ。

さらに取得したデータから多数の輝点の中心を決定し、ヌクレオソームの分布を算出した。その結果、これまで困難であった生細胞におけるクロマチン超解像図の作成に成功した。これによ

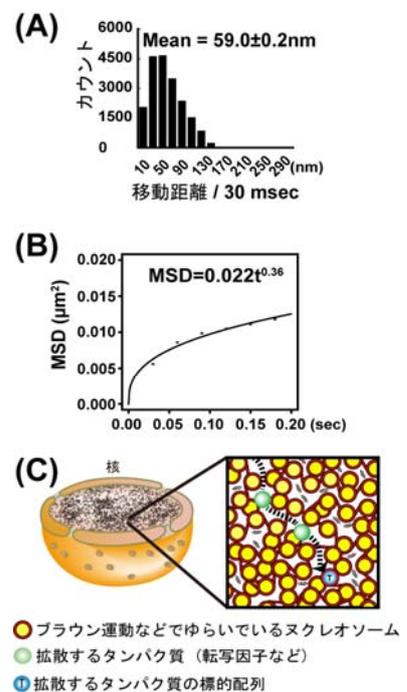


図 3

って、回折限界 (200 nm) を超えるクロマチン像の観察が可能となった (図 4 左). 得られたクロマチンの超解像図は、ヌクレオソームが一様ではなく、偏って存在していた (図 4 左). 得られたヌクレオソームの空間的偏りを統計的に示すために、Radial distribution function と呼ばれる統計手法を用いることを用いた. その結果、ヌクレオソームは核内において、一様 (ランダム) ではなく、偏った分布を持つことが示された. これらのことから、ヌクレオソームの塊であるクロマチンドメインが生細胞においても存在することが明らかになった (図 4 右).

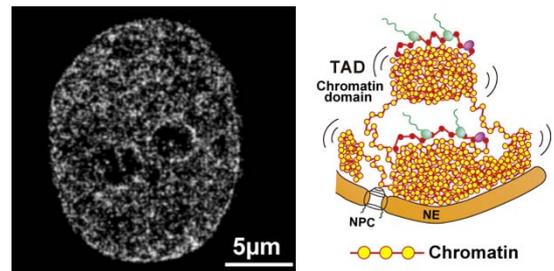


図 4

巨大な転写因子はクロマチンドメインの内部に入っていくことができないと考えられるので、表面におしだされたゲノムの標的配列のみと結合することができると予想される (論文 4) (図 4 右). ゲノムの足場のダイナミックな性質は、転写プロセスの原動力になっていると思われる. ゲノムの DNA の情報読み出し機構に対する新たな知見が得られた.

さらにターゲットを探す「転写因子の動き」を明らかにするため、数種の転写因子を蛍光ラベルした HeLa 細胞を樹立した. そして斜照明顕微鏡 (図 2B) を用いて可視化し、転写因子の動態を観察できるようになった.

また分担研究者谷口らは新規顕微鏡を開発し、酵母の 1 細胞レベルの遺伝子発現の揺らぎを観察した (論文 5, 特許出願).

本研究計画の遂行中、少数ゲノムの新たな分離メカニズムも明らかになった. 細胞は分裂する際、複製された 2 コピーのゲノム DNA を姉妹染色体として凝縮させ、厳密に娘細胞に分配する必要がある. 本領域の終盤、この過程が不連続に起こることを明らかにした (論文 3).

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. [Maeshima, K.](#), Rogge, R., Tamura, S., Joti, Y., Hikima, T., Szerlong, H., Krause, C., Herman, J., DeLuca, J., Ishikawa, T., Hansen, J.C. (2016) "Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers." *EMBO Journal* 35, 1115–1132. DOI: 10.15252/embj.201592660 査読有り
2. [Maeshima, K.](#), Ide, S., Hibino, K., Sasai, M. (2016) "Liquid-like behavior of chromatin." *Current Opinion in Genetics and Development.*, 37:36-45. DOI: 10.1016/j.gde.2015.11.006 査読有り
3. Liang, Z., Zickler, D., Prentiss, M., Chang, F.S., Witz, G., [Maeshima, K.](#), Kleckner, N. (2015) "Chromosomes progress to metaphase in multiple discrete steps via global compaction/expansion (stress) cycles." *Cell*, DOI:161:1124-1137. 査読有り
4. [Maeshima, K.](#), Kaizu, K., Tamura, S., Nozaki, T., Kokubo, T., [Takahashi, K.](#) (2015) "The physical size of transcription factors is key to transcriptional regulation in the chromatin domains." *Journal of Physics: condensed matters*, 27, 064116 (10pp) DOI:10.1088/0953-8984/27/6/064116 査読有り
5. [Taniguchi, Y.](#) (2015) Genome-wide analysis on protein and mRNA copy numbers in single Escherichia coli cells with single-molecule sensitivity. *Methods in Molecular Biology* 1346, 55-67 DOI:10.1007/978-1-4939-2987-0_5 査読有り
6. [Maeshima, K.](#), Imai, R., Tamura, S., and Nozaki, T. (2014) "Chromatin as dynamic 10-nm fibers." *Chromosoma*,

123:225-237. DOI: 10.1007/s00412-014-0460-2 査読有り

7. Kawamoto, Y., Bando, T., Kamada, F., Li, Y., Hashiya, K., Maeshima, K., and Sugiyama, H. (2013) "Development of a New Method for Synthesis of Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes Targeting Human Telomeres." *Journal of the American Chemical Society*, 135:16468-16477. DOI : 10.1021/ja406737n 査読有り
8. Nozaki, T., Kaizu, K., Pack, C.G., Tamura, S., Tani, T., Hihara, S., Nagai, T., Takahashi, K., Maeshima, K. (2013) "Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells." *Nucleus*, 4:349 – 356. DOI : 10.4161/nucl.26053 査読有り
9. Hihara, S., Pack, C.G., Kaizu, K., Tani, T., Hanafusa, T., Nozaki, T., Takemoto, S., Yoshimi, T., Yokota, H., Imamoto, N., Sako, Y., Kinjo, M., Takahashi, K., Nagai, T., Maeshima, K. (2012) "Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells." *Cell Reports*, 2:1645-1656. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.008> 査読有り
10. Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., Maeshima, K. (2012) "Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure." *EMBO Journal*, 31:1644-53. DOI: 10.1038/emboj.2012.35 査読有り
11. Maeshima, K., Hihara, S., Takata, H. (2011) "New insight into the mitotic chromosome structure : irregular folding of nucleosome fibres?" *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75:439-444. DOI:10.1101/sqb.2010.75.034 査読有り

(学会発表)

1. Kazuhiro Maeshima, "Chromatin Structure and Dynamics in Live Mammalian Cells", 2nd Symposium on Complex Biodynamics & Networks, Tsuruoka, Yamagata, May 11-13, 2015
2. Kazuhiro Maeshima, "Chromatin fluctuation in live mammalian cells" Royal Society workshop "Chromosome Dynamics: Computational Models and Experimental Data", Chicheley Hall, UK, Nov. 18-20, 2014
3. Kazuhiro Maeshima, "Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells", Workshop on the 4D Nucleome: Functional Nuclear Organization in Space and Time, Mainz, Germany, June, 12-15, 2013
4. Kazuhiro Maeshima, "How is a long strand of DNA organized in the cells?", Lorentz Center Workshop "Genome Mechanics at the Nuclear Scale", Leiden, Netherlands, Dec. 10-14, 2012
5. Kazuhiro Maeshima, "How is a Long Strand of DNA Compacted into a Chromosome?", Albany 2011: 17th Conversation, SUNY, NY, USA, June 14-19, 2011

(図書)

1. 前島一博, 教科書の染色体構造が変わる?! , はっきりわかる現代サイエンスの常識事典, pp.80-81, 成美堂出版(2014). (分担執筆)
2. 前島一博, DNA 収納のなぞ : DNA は細胞内でどのように折り畳まれているのか?, 遺伝子が語る生命 38 億年の謎——なぜ, ゴウはネズミより長生きか? pp.134-144, 悠書館(2014). (分担執筆)
3. 前島一博, 不規則な収納が生む自由—DNA 収納の基本を問い直す—, 生命誌年刊号 「変わる」, pp.111-117, 新曜社(2014). (分担執筆)

生体リズムの少数性生物学 —生命システムにおけるターンオーバー制御と分子少数性—

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23115006

研究代表者名：上田 泰己（東京大学医学系研究科 教授）

研究分担者名：大出 晃士（東京大学医学系研究科 助教）H25–H27年度

鵜飼 英樹（理化学研究所・生命システム研究センター 上級研究員）H23–H24年度

中嶋 正人（近畿大学医学部 助教）H23–H24年度

研究協力者名：鵜飼 英樹（理化学研究所・生命システム研究センター 上級研究員）H25–H27年度

1. 研究の目的

生命における計時機構である概日時計により生み出されるリズム（概日リズム）の周期は、構成分子の少数性に比して正確です。また外部環境の温度変化に対して頑健である一方で、外部環境の照度変化や急激な温度変化に対しては柔軟に適応します。概日時計の構成分子（遺伝子、タンパク質）についての多くの分子生物学および細胞生物学的知見の蓄積にもかかわらず、概日時計の正確性・頑健性・適応性をもたらす分子・ネットワーク機構については完全には理解されていません。本提案ではこれまでのシステム科学的研究を踏まえて、未解明である哺乳類概日時計の正確性・頑健性・適応性をもたらす分子機構・ネットワーク機構について、ネットワーク構成要素の少数性に着目し、1) ターンオーバー制御による周期の正確性、2) 時計タンパク質間相互作用および酵素反応特性による周期の頑健性・適応性の2つの問題に対するアプローチを通じて解明することを目指します。

2. 研究成果

① 少数分子の取り合いによる自律的時空間パターン生成機構の数理的解明

分子間の協同的状態遷移を考えるモデルケースとして、ミカエリス-メンテン型の酵素反応のみで記述される可逆的リン酸化過程が時空間パターンを自律的に生成する条件を数理的に探索し、分子状態遷移を担う複数の連続したリン酸化が時間振動の周期長を決め、少数分子との相互作用が分子状態の同期を担うことが明らかになった(発表論文(6))。分子の量変動によらない、修飾状態変動を基盤とするこの機構は、分子数を減らした場合でも比較的安定に時空間パターン形成が可能であることを確率的シミュレーションから見出した。さらに、同様のメカニズムによって、可逆的リン酸化反応のみから空間パターンの自律的形成も可能であることを明らかにしたリン酸化振動子モデルは、ミカエリスメンテン式で記述される可逆的なタンパク質修飾反応であればどのような系にも適用可能であり、概日時計を超えて広く数理生物学分野への訴求力を持っている。

② 概日時計タンパク質の絶対定量の成功

質量分析計による超高感度分子絶対定量に必須となる、濃度既知の同位体ラベルペプチドを多種並列的に作成する新規手法を開発した。これにより、哺乳類概日時計発振子を構成する主要な因子のほぼ全ての継時的な絶対定量に成功した。その結果、概日時計振動体の中核を担う転写因子群が一細胞あたり1,000~20,000分子の範囲で概日変動することが明らかとなった(発表

論文(1))。この数は、真核生物の細胞サイズを考慮に入れば少数分子といえる範囲と考えている。

③ 少数発現タンパク質機能解析のための発牛工学基盤技術の開発

少数分子の振る舞いを観測するための遺伝学的ツールを導入するために、ひいてはその振る舞いが階層を超えて個体レベルの生理機能に与える影響を検証するために、TALEN や CRISPR/Cas9 を用いた高効率なゲノム編集技術や(発表論文(2), (3))、組織透明化を用いた全身・一細胞レベルでの蛍光分子観察系を確立した(発表論文(4), (5))

④ 少数発現概日時計因子による周期長・振幅制御機構の解明

絶対定量によって少数発現分子であることが測定され、かつ、哺乳類概日時計発振子の中核をなす CRY および PER タンパク質について、概日周期制御機構を解析した。開発した発牛工学技術を用いて CRY の連続したリン酸化サイトが CRY 分子の安定性制御とは異なる機構で周期長の決定に重要であること、および、CRY と PER の相互作用が個体レベルでの安定した周期長維持に重要であることを見出した(投稿準備中)。これは、安定した振動周期長を担保するためには分子の量的変動(ターンオーバー制御)よりも、むしろ分子(リン酸化)状態の変動が重要であることを示唆している。これまで哺乳類概日時計研究は、生理学あるいは神経科学に端を発し、近年遺伝学的な解析が精力的になされてきた。本研究では、生体分子振動子としての原理的な特性、すなわち分子の協同的振る舞いを担う生化学的特性の厳密な理解を志向し、生化学的・構造生物学的に哺乳類概日時計タンパク質中に周期長決定ドメインを見出し、その機能をマウス個体行動レベルで評価するとともに、分子状態遷移とその同期機構についての予測と解釈を数理的に行う、分野横断的な研究を展開した。その結果、哺乳類概日時計は細胞内に少量しか存在せず、正確な概日周期長は、それらの量変動(ターンオーバー)制御だけではなく、分子状態(リン酸化修飾)変動が重要であることを提唱するに至った。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Narumi, R., *Shimizu, Y., Ukai-Tadenuma, M., Ode, K.L., Kanda, G.N., Shinohara Y., Sato A., Matsumoto K., and Ueda, H.R. Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, advanced online publication, doi: 10.1073/pnas.1603799113 査読有
2. Tatsuki, F., Sunagawa, G.A., Shi, S., Susaki, E.A., Yukinaga, H., Perrin, D., Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Fujishima, H., Ohno, R., Tone, D., Ode, K.L., Matsumoto, K., and Ueda, H.R. Involvement of Ca²⁺-dependent hyperpolarization in sleep duration in mammals. *Neuron* **90**, 70-85 (2016) doi:10.1016/j.neuron.2016.02.032 査読有
3. Sunagawa, G.A., Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Perrin, D., Fujishima, H., Ukai, H., Nishimura, O., Shi, S., Ohno, R., Narumi, R., Shimizu, Y., Tone, D., Ode, K.L., Kuraku, S., and Ueda, H.R. Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene. *Cell Reports* **14**, 662-677 (2016) doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.052 査読有
4. Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., and Ueda, H.R. Whole-Body Imaging with Single-Cell Resolution by Tissue Decolorization. *Cell* **159**, 911-924 (2014) doi: 10.1016/j.cell.2014.10.034. 査読有
5. Susaki E.A., Tainaka K., Perrin D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Shimizu, Y., Miyawaki, A., Yokota, H., and Ueda, H.R. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* **157**, 726-739

(2014) doi: 10.1016/j.cell.2014.03.042 査読有

6. Jolley, C.C., Ode, K.L., and Ueda, H.R. A design principle for a posttranslational biochemical oscillator. *Cell Reports* **2**, 938-950 (2012) doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.006 査読有

(学会発表)

1. Ueda H.R., Towards Organism-level Systems Biology Pacificchem2015, 2015年12月14日-21日, Hawaii (USA)
2. Ode K.L. Mammalian cryptochrome I regulates circadian period through its co-factor pocket, XIV EBRS and IV WCC, 2015年8月2日-8月6日, Manchester (UK)
3. Ueda H.R. Systems biology of circadian clocks 16th IGIS Symposium, 2015年4月9日-12日, Nice (France)
4. Ode K.L., Autonomous Spatio-Temporal Pattern Arising from Reversible Multisite Phosphorylation JSMB/SMB 2014, 2014年7月31日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
5. Ueda H.R. Systems and Synthetic Biology of Circadian Clocks, Belstein Bozen Symposium 2014, 2014年5月19日, Prien (Germany)
6. Ueda H.R. Biological Timekeeping by Circadian Clocks: Systems and Synthetic Biology of Mammals Analytica Conference 2014, 2014年4月2日, Munich (Germany)
7. Ueda H.R., Systems and synthetic biology of biological timings, EMBO conference series: from functional genomics to systems biology, 2012年11月9日, Heidelberg (Germany)
8. Ueda H.R., Systems and synthetic biology of mammalian circadian clocks, The 2012 Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms, 2012年6月23日, Destin (USA)

バイオイメージングによるウイルス感染と細胞応答の定量解析

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26115701

研究代表者名：大場 雄介（北海道大学大学院医学研究科 教授）

連携研究者名：南保 明日香（北海道大学大学院医学研究科 准教授）

西出 真也（北海道大学大学院医学研究科 助教）

藤岡 容一郎（北海道大学大学院医学研究科 助教）

1. 研究の目的

細胞へのインフルエンザウイルスの感染の際に、「何個のウイルス粒子が細胞応答と感染成立に必要なか?」という命題を解くために研究を行った。そのため、蛍光ラベルしたウイルス粒子あるいはウイルス様粒子と、FRET の原理を利用した各種バイオセンサーによるバイオイメージングを用いて、ウイルス粒子が細胞内侵入する際に重要なシグナル伝達経路の解析を行った。また、ウイルス粒子の精密計測により粒子数とその経路の関係性を検討した。

2. 研究成果

インフルエンザウイルス粒子取込の分子機構：蛍光色素 DiD で標識ウイルス粒子と FRET バイオセンサーを用いた同時観察により、ウイルス吸着部位で生じる一過性のカルシウム上昇を検出した。ウイルス粒子と直接結合し、カルシウム上昇に関与する膜タンパク質をスクリーニングしたところ、シアル化依存的にウイルス HA タンパク質に結合する因子を同定した。この因子を阻害薬による機能抑制とノックダウンによる発現抑制すると、インフルエンザウイルス粒子の細胞内取り込みとウイルス感染が抑制されてことから、インフルエンザ感染に重要な分子であることが示された。

細胞応答を発動させるウイルス粒子数の決定：マイクロチャンバーを用いたデジタルカウントで決定したウイルス粒子数に基づき、粒子数依存的な細胞応答の変化を解析した。粒子数が 20 個以上の時にはカルシウムシグナルを介したブースト機構を介して多くの粒子が細胞内に取り込まれるが、それより少ない時にはカルシウム非依存的経路によりゆっくりと感染が進行することが明らかになった（領域内共同研究）。興味深いことに、ウイルス感染効率はこれまで考えられていた *multiplicity of infection (MOI)* よりも、粒子数に依存することが明らかになった。さらに、カルシウム依存性のブースト機構が機能し、複製が盛んな細胞では上述のカルシウムシグナル責任因子が多く発現していた。一方で、複製が盛んではない（0 ではない）細胞においては上記の責任因子の発現量が低く、カルシウム応答も見られなかった。

今後の研究の展開に関する計画として、カルシウムシグナル責任因子に関する研究は現在論文投稿中である。ウイルス粒子数の精密測定に関する研究は論文投稿準備中である。粒子数と感染効率の関係については、カルシウムシグナルとの関連性を詳細に検討し今年度中に学術論文に投稿したい。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Okumura R, Kurakawa T, Nakano T, Kayama H, Kinoshita M, Motooka D, Gotoh K, Kimura T, Kamiyama N, Kusu T, Ueda Y, Wu H, Iijima H, Barman S, Osawa H, Matsuno H, Nishimura J, Ohba Y, Nakamura S, Iida T, Yamamoto M, Umemoto E, Sano K and Takeda K*. Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature*, 532, 117–121, (2016)
2. Yamada T, Tsuda M, Wagatsuma T, Fujioka Y, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Totsuka Y, Haga H, Tanaka S, Shindoh M and Ohba Y*. Receptor activator of NF- κ B ligand induces cell adhesion and integrin α 2 expression via NF- κ B in head and neck cancers. **Scientific Reports** 6, 23545, (2016)
3. Inuzuka T, Fujioka Y, Tsuda M., Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Tanaka S and Ohba Y*. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. **Scientific Reports**, 6, 21613, (2016).
4. Yamamoto S, Yako Y, Fujioka Y, Kajita M, Kameyama T, Kon S, Ishikawa S, Ohba Y, Ohno Y, Kihara A and Fujita Y*. A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)-S1P receptor 2 pathway in Epithelial Defense Against Cancer (EDAC). **Molecular Biology of the Cell**, 27, 491–499, (2016)
5. Tsukiyama T, Fukui A, Terai S, Fujioka Y, Shinada K, Takahashi H, Yamaguchi TP, Ohba Y and Hatakeyama, S*. Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. **Molecular and Cellular Biology**, 35, 2007–2023 (2015).
6. Terada K, Horinouchi T, Fujioka Y, Higashi T, Nepal P, Horiguchi M, Karki S, Hatate C, Hoshi A, Harada T, Mai Y, Ohba Y and Miwa S*. Agonist-promoted ubiquitination differentially regulates receptor trafficking of endothelin type A and type B receptors. **Journal of Biological Chemistry**, 289, 35283–35295, (2014).

(総説)

1. Fujioka Y, Nanbo A, Nishide SY and Ohba Y*. Fluorescent protein- based biosensors to visualize signal transduction beneath the plasma membrane. *Analytical Sciences*, 31, 267–274, (2015)

細菌べん毛本数を厳密に制御する分子機構

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115705

研究代表者名：小嶋 誠司（名古屋大学理学研究科 准教授）

連携研究者名：本間 道夫（名古屋大学理学研究科 教授）

今田 勝巳（大阪大学理学研究科 教授）

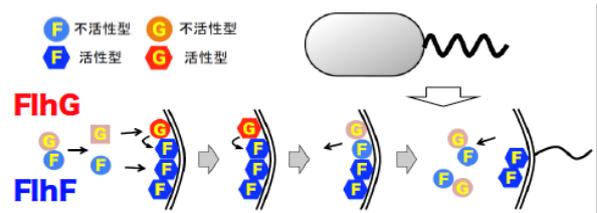
1. 研究の目的

細菌は効率良く運動するために、運動超分子であるべん毛の形成位置と本数を厳密に制御している。ビブリオ菌は細胞の極に1本だけべん毛を形成するため、細胞における超分子の位置と数の制御機構の解析に適している。極べん毛の位置と本数は、GTPaseのFlhFが正に、ATPaseであるFlhGが負に制御し、この二つはべん毛遺伝子クラスター内でオペロンを組んでいる。本研究では、「FlhFとFlhGの細胞極における分子数のバランスがべん毛数を決める仕組み」を明らかにすることを目的とし、FlhGのATPase活性とFlhFの極局在の関係、およびFlhFのGTPase活性が自身の極局在にどう関連するかに着目する。更に、GFPを融合させ蛍光標識したFlhFまたはFlhGを、分裂中の細胞内において実時間観察し、細胞内でいつFlhFが極へ移動するのか、また極局在分子数はべん毛形成過程においてどう変化するのか、さらにFlhGは各段階でどう関与するのかを明らかにする。

2. 研究成果

初年度は、これまで進めてきたFlhG ATPaseモチーフ変異体の解析を完了した。まとめると、ATP結合に必要なとされる残基に変異(K31A、K36Q)が入ると、FlhGの機能は失われ、運動能は低下して極に多べん毛が形成された。またFlhGの極局在は失われ、代わってFlhFの強い極局在が観察された。一方、ATPase活性化に重要とされる残基に変異(D171A)を導入すると、ATPase活性が野生型の7倍程度上昇した。この変異体はほぼ無べん毛だけでなく運動能が強く阻害された。またFlhGの極局在が増加する一方で、FlhF極局在は低下していた。以上の結果は、ATPase活性の高いFlhGは極に移行し、FlhFを極から解離させている可能性を示唆している。ところが、触媒部位の変異(D60A)では、ATPase活性は失われるにもかかわらず、べん毛本数制御に関わる形質は野生型よりやや低下するに留まり、ある程度維持されていた。つまりFlhGのべん毛本数を負に制御する機能は、自身のATPase活性よりもATP結合能に依存していると考えられる。ATPの加水分解は、べん毛形成を1本のみ厳密に制御するために必要であり、ファインチューニングの役割を果たしているのではないかと考えている。ここまでの結果をまとめて論文に発表した(文献1)。また、FlhFの細胞内挙動の実時間観察のため、染色体の*flhF*遺伝子を*flhF-gfp*遺伝子に置換したビブリオ菌株を作製し、FlhF-GFPの染色体レベルで発現する株の構築系を確立した。

2年目は、FlhGのATP結合能を生化学的に検証することを目的として、精製したFlhGがアイソトープで標識されたATPに結合するかどうか検証を試みた。ところが、FlhG自身の凝集しやすい性



質が解析を阻み、ATP 結合を評価できなかった。次に FlhG が凝集する条件を検討したところ、ATPase 活性が高くべん毛本数を強く負に制御する D171A 変異体は野生型に比べて凝集しやすく、ATP を加えるとその凝集性が増すことがわかった。ATPase 活性と凝集性には構造を介した相関があると考えられる。精製した FlhG の動的散乱解析、及び細胞破碎液を分画して得た可溶性画分のゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、同じファミリーに属する MinD とは異なり、FlhG は細胞質において ATP 存在下でも単量体として存在する可能性が示唆された。FlhG は ATP 依存的に極に移行すると構造変化し、べん毛本数を負に制御する機能を発現している可能性を考えている。また、FlhF の細胞極における分子数の計測を、作成した FlhF-Venus 融合タンパク質発現株を材料として、共同研究先の一分子観察が可能な顕微システムを用いて行った。10 数個の FlhF が極に存在する様子が見え始めている。

今後の研究の展開に関する計画として、本研究により、FlhG が ATP を結合し極へ移行し、極の FlhF を解離または不活性化することで、極における機能的な FlhF 分子数を制御していることがわかってきた。しかし、我々が提案したモデルの基盤となっている、単離した FlhF, FlhG の変異体（活性型・不活性型）のヌクレオチド結合状態は証明されていない。今後は精製した FlhF, FlhG を用いて、ヌクレオチド結合状態と細胞内局在、極べん毛形成促進能と阻害能との関係を明らかにする必要がある。また、実際何分子の FlhF が極に存在すれば 1 本になるのか、分子数の計測も更に進めて、極における FlhF の数に対する知見を得ることが次の目標となる。

一方、FlhG は HubP という極のマーカー膜タンパク質に結合することで、極局在することが最近わかってきた（文献 2）。FlhG は ATP 結合能が欠損すると極局在できないことから、ATP を結合し極へ移行して HubP に作用することで ATPase 活性化が起こる可能性が考えられる。こうした背景のもと、FlhF, FlhG の生化学的性質（活性化）の機構を明らかにする必要がある。今後は、適切な変異体を用いた生化学・結晶構造解析・一分子蛍光観察により、極べん毛が正確に 1 本だけ形成される仕組みの解明を行いたい。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Ono H, Takashima A, Hirata H, Homma M, Kojima S*. The MinD homolog FlhG regulates the synthesis of the single polar flagellum of *Vibrio alginolyticus*. Mol. Microbiol.. 98, 130-141. (2015)
2. Takekawa N, Kwon S, Nishioka N, Kojima S, Homma M*. HubP, a polar landmark protein, regulates flagellar number by assisting in the proper polar localization of FlhG in *Vibrio alginolyticus*. J. Bacteriol., 198, 3091-3098. (2016)

情報伝達チャネルの興奮と抑制を修飾する少数分子の機構

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115710

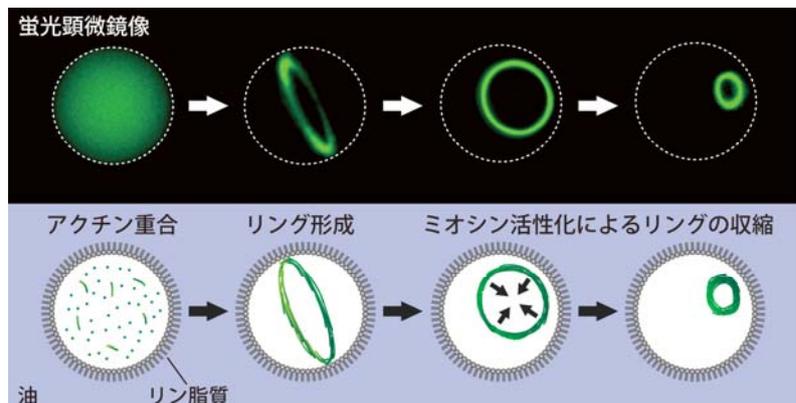
研究代表者名：竹内 裕子（大阪大学生命機能研究科 准教授）

1. 研究の目的

嗅覚情報変換は、脳で匂い情報を知覚する際に、嗅覚感度を調節する重要なポイントであるが、その第一段階である嗅覚神経細胞（嗅細胞）における化学-電気信号変換の分子メカニズムに関しては未知の部分が残されている。その中でも、嗅覚感度の修飾メカニズム解明は嗅覚疾患の原因解明や様々な匂い環境下における嗅覚受容の制御・改善につながることから重要な課題である。さらに、医療分野にとどまらず、産業界においても国内外問わず「香り受容メカニズム」に注目が集まっている。その理由として、嗅覚は視覚や聴覚などとは異なり、認識・知覚前に情動に影響するシステムを持つことから、無意識下でプリファレンスを左右するという性質を持つからである。実際に嗅覚情報変換の場である線毛は直径 100 nm というナノスケール構造体という特殊な形態を持つ。本研究では、情報変換の場である嗅線毛に焦点をあて、電気生理学的・光学的アプローチを同時併用して、線毛内の情報伝達因子(cAMP・Ca²⁺)の実時間挙動を定量的に解析し、線毛における嗅覚情報変換機構の実時間挙動・機構解明を目的とする。嗅覚応答中の線毛内での分子挙動を追い、微細構造体内で実時間の分子挙動を知ること、最終的にはヒトが「匂い」を感じる実感覚を神経細胞の分子システムで解明することを目的とする。

2. 研究成果

本研究において、嗅細胞の線毛内でセカンドメッセンジャーとして働く cAMP および Ca 分子が一般的な細胞内における挙動とは異なり、拡散速度が減少することを検証した。線毛は微細構造を有するため、実際の物質濃度コントロールにはケージド cAMP/Ca を用いることで、線毛内の濃度を定量的にコントロールすることが可能となり、情報変換チャネルを通る電流をリアルタイムで測定した。ケージド cAMP を導入した際には、CNG チャネル・Cl(Ca)チャネルが連続的に開口するが、ケージド Ca を導入した際には、Cl(Ca)チャネル電流のみを記録した。UV 光で乖離するケージド化合物により、光刺激を 2 回連続で行った場合に生じる adaptation が線毛内の分子の動向を示唆した。2 回目の光刺激による応答電流の現象は線毛全体を UV 光で刺激したときにも、線毛の一部を刺激したときでも回復までのタイムコースに有意な差はなかった。線毛 1 部分での挙動と全体での挙動が直線的な傾向にあることが示唆された。その結果、線毛内ではチャネルを開口させる分子の拡散が遅くなることが示唆された。



今後の研究の展開に関する計画として、引き続き線毛内の因子の動態をパッチクランプ法をベースとして、リアルタイムで測定し、線毛上に発現している情報変換チャネルのキネティクスを詳細に調査する。更に、線毛内の細胞内因子の長軸方向への拡散、分子の挙動を明らかにする。

3. 主な研究発表

(学会発表)

1. 平成 26 年 10 月 【学会発表】近畿生理学談話会 (兵庫)
2. 平成 26 年 11 月 【学会発表】国立生理学研究所 国際シンポジウム (愛知)
3. 平成 27 年 3 月 【招待講演】大阪大学国際シンポジウム (大阪)
4. 平成 27 年 7 月 【学会発表】Physiological Society (カーディフ、イギリス)
5. 平成 27 年 10 月 【学会発表】近畿生理学談話会 (大阪)
6. 平成 28 年 2 月 【学会発表】Biophysical Society (ロサンゼルス、アメリカ)
7. 平成 28 年 3 月 【学会発表】日本生理学会 (札幌)

(その他)

1. 平成 27 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰受賞
2. 平成 27 年度 大阪大学総長奨励賞受賞
3. 竹内裕子 (2015). 嗅覚. *Clinical Neuroscience* Vol.33 (2015 年) 05 月号 感覚とその異常. p516-519.

発現のオンとオフを繰り返す少数分子による ES 細胞の多能性の制御

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115712

研究代表者名：堀江 恭二（奈良県立医科大学医学部 教授）

1. 研究の目的

幹細胞の多能性は、学術的にも臨床応用の点でも重要性が高いが、多能性に特有の動的かつ精巧にプログラムされた現象を説明するためのモデルは、未だ確立していない。我々はこれまでに、蛍光タンパクや化学発光用レポーターを用いた遺伝子トラップ法により、未分化マウス ES 細胞において、発現が On と Off を繰り返す遺伝子が存在するとの知見を得てきた。遺伝子発現の周期的変動が ES 細胞の多能性を規定するとの知見は、Hes1 などの極一部の遺伝子で報告があるのみであり、多能性の体系的理解に繋げるには、より多くのデータが必要である。そこで本研究では、「少数分子の発現の変動が ES 細胞の多能性を規定する」との仮説のもとに、発現が On と Off を繰り返す遺伝子を、遺伝子トラップ法を大規模に行って系統的に同定することを試みた。同定した遺伝子の中から ES 細胞の多能性の揺らぎを反映する遺伝子を特定し、その遺伝子と発現が相関する遺伝子群を特定することにより、ES 細胞の多能性の揺らぎの制御機構の解明を目指した。

2. 研究成果

(1) ES 細胞への遺伝子トラップベクターの導入と、未分化状態において発現が On と Off の 2 つの状態をとる遺伝子のスクリーニング

Venus、または、その誘導體（ユビキチン化シグナルの導入、Luciferase との融合など）をレポーターに用いた遺伝子トラップベクターを、マウス ES 細胞へ導入した。ES 細胞の培養には、ES 細胞を均一な未分化状態に保つと考えられている 2i/LIF 培地（N2B27 無血清培地 + Mek/Gsk3 inhibitors）を用いた。Venus の上流には splice acceptor を配置しているため、ベクターが遺伝子内へ挿入すれば、その遺伝子発現の On と Off に応じて、細胞の蛍光も On または Off になるはずである。そのような細胞株では、1 細胞由来のコロニーを形成した際に、すべての細胞が同期しない限りはモザイク状の蛍光が観察されるはずである。スクリーニングの結果、ベクターが挿入した細胞株の約 1%において、モザイク状の蛍光を発すコロニーが出現した。これらのコロニーを単離後、株化した。

(2) 遺伝子発現の On/Off が ES 細胞の未分化性と相関する遺伝子の特定

上記の細胞株に対して、cell sorter を用いて Venus 陽性細胞と陰性細胞を分離し、翌日の細胞集塊の形態を観察した。その結果、Venus 陽性細胞ではドーム状の未分化細胞特有の形態を示し、Venus 陰性細胞では分化傾向と想定される平坦な形態を示す細胞株を特定した。興味深いことに、ES 細胞の未分化性の指標として汎用されている Nanog は、抗体染色により均一な発現を示した。これより、従来考えられていた未分化状態の中に不均一性が存在することがわかった。この細胞株における遺伝子トラップベクターの挿入部位を決定したところ、少なくとも 3 つのベクター挿入部位が存在していた。その中で、Venus 陽性細胞において Venus との chimeric transcript を高頻度に検出した挿入部位は 1 つのみであった。そこで、この遺伝子座へ gene targeting 法により Venus を 1 コピーのみ導

入したところ、ES 細胞の遺伝子発現が On/Off を繰り返すことを確認した。さらに、遺伝子発現と細胞集塊の形態との対応関係も再現され、本遺伝子の発現が ES 細胞の未分化性の揺らぎを反映することがわかった。

(3) 未分化状態の揺らぎと相関する遺伝子群の特定

ES 細胞の未分化性の揺らぎの原因を特定するために、Venus 陽性細胞と陰性細胞の RNAseq を行い、Venus と発現が相関する遺伝子を同定した。その結果、Venus 陽性細胞では、陰性細胞と比べて、マウスの着床前胚に特異的な遺伝子の発現が高く、かつ、胎盤系の分化マーカーの発現が低かった。これより、Venus 陽性細胞は陰性細胞に比べて未分化性が高いことが示唆された。また、core pluripotency factor と呼ばれる ES 細胞の未分化性制御に重要な既知の遺伝子群 (Oct3/4, Sox2, Nanog, Klf4 等) は、Venus 陽性細胞と陰性細胞で発現レベルにほとんど差を認めなかった。これより、我々が同定した未分化性の揺らぎは、未知の遺伝子ネットワークにより制御されている可能性が強く示唆された。

(4) ES 細胞の未分化性の揺らぎの長期時系列解析

Venus をレポーターとした未分化性の揺らぎを 1 細胞レベルで定量するために、灌流による培地の持続的注入が可能なマイクロ流体デバイスを用いて、約 1 週間に渡って Venus の発現を観察することに成功した。それに際して、未分化性が保たれていることを示すレポーターとして、H2B-mCherry を Nanog 遺伝子座へ、あらかじめ knock-in した。その結果、Nanog の発現はほぼ変動しないのに対して、Venus の発現は、一見すると stochastic とも思われる変動を示した。変動の規則性の有無の解析は、今後の課題である。

本研究で我々は、2i/LIF 培地においても ES 細胞の未分化性が揺らいでいることを明らかにし、さらに、揺らぎと相関する遺伝子群を特定した。今後は、これらの揺らぎを示す遺伝子群の中から、未分化性を制御している遺伝子を特定する。また、本研究の過程で、ES 細胞の蛍光の約 1 週間に渡る計測にも成功した。今後、これらの画像から Venus の発現レベルの変動を、時系列に沿って定量する画像解析法を確立し、我々が同定した ES 細胞の未分化性の揺らぎの特徴を明らかにしたい。これらの解析を統合して、ES 細胞の未分化性の揺らぎに関する、新たなモデルを提唱したい。

3. 主な研究発表

(その他)

1. 一般向けアウトリーチ活動

堀江恭二 市民講座「細胞の不思議な力と再生医療」2014 年 9 月 14 日奈良県橿原市橿原文化会館ホール

構成論的アプローチによる収縮環の収縮機構の解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115715

研究代表者名：宮崎 牧人（早稲田大学理工学術院 助教）

1. 研究の目的

動物細胞の多くは分裂期になると細胞の形を丸く変化させ、赤道面に収縮環と呼ばれるリング構造を形成させる。収縮環は主にアクチン線維とミオシン分子モーターから構成されており、アクトミオシンの収縮力で細胞膜をくびれさせることで細胞は分裂すると考えられている。収縮環はどのような仕組みで形成されるのか、自己組織化の仕組みは未だに未解明な部分が多い。また、収縮環は筋肉に見られる秩序立ったサルコメア構造とは対照的に、長さも極性も不揃いなアクチン線維が束化した無秩序な構造であり、なぜ無秩序なアクトミオシンバンドルが収縮できるのかは物理的に非自明な問題であり、仮説はいくつかあるものの、未だにその仕組みは充分理解されたとは言えない。

そこで本研究では、アクトミオシンなどの精製タンパク質を封入した油中液滴及びリポソームを細胞の最小構成要素モデル系として用い、収縮環様のリング構造が自発的に形成され収縮する条件を探ることで、収縮環動態の構成的理解を目的とした。

2. 研究成果

精製したアクトミオシンとアクチン線維の束化因子を細胞サイズの油中液滴に閉じ込めた *in vitro* モデル系を構築し（*Protoc. Exch.* 2015）、収縮環様の構造を自発的に形成・収縮させることに成功した（図：*Nat. Cell Biol.* 2015）。本研究によって、①細胞サイズの球状閉鎖空間ではアクチン線維は硬い棒として振舞うため、空間制御シグナルがなくても、曲率が最小になる赤道面にアクチン線維が集積・バンドル化することでリングが自発的に形成されること（微小閉鎖空間の効果） ②ミオシンによるアクチン線維の滑り運動がアクチンバンドルネットワークを動的に組み替え、リング形成を促進すること ③アクチン線維上のミオシンの密度（ミオシンの濃度だけでなくミオシンフィラメント中のモーターヘッド数にも依存）がある閾値を超えるとリングは収縮を開始し、アクトミオシンとアクチン線維の束化因子のみから構成される単純な系でも、収縮速度がリングの大きさに比例するという収縮環の基本的性質を再現すること、などを明らかにした。本研究は収縮環の形成機構の解明に貢献したとして日経産業新聞、時事通信、*Newton* などで紹介された。本研究によって収縮環の形成・収縮機構を構成的アプローチで研究することが初めて可能になった。

本研究ではアクチンとミオシン、アクチニン（アクチン線維の束化タンパク質）の3種類のタンパク質を用いて収縮環の収縮機構を調べた。一方、実際の動物細胞の収縮環形成・収縮には6種類のタンパク質（アクチン、ミオシン、アニリン、フォルミン、プロフィリン、コフィリン）が必須であることが明らかになっている。そこで、今後は6種類のタンパク質分子の酵素反応の外力依存性を顕微計測しつつ、我々が構築した収縮環再構成系を用いて人工細胞が自発的に分裂する条件を実験的に探ることで、細胞質分裂の仕組みを「分子集合体+膜」の力学プロセスとして理解することが目標である。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Miyazaki M., Chiba M, Eguchi H, Ohki T, Ishiwata S*. Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings *in vitro*. *Nature Cell Biology*, 17, 480-489 (2015).
2. Miyazaki M*, Chiba M, Ishiwata S. Preparation of cell-sized water-in-oil droplets for *in vitro* reconstitution of biological processes in cellular compartments. *Protocol Exchange*, doi:10.1038/protex.2015.029 (2015).

(総説)

1. 宮崎牧人, 石渡信一 *In vitro* 再構成による収縮環の形成機構の解明. *生物物理*. 56(3), 174-176 (2016).

(その他)

1. 馬淵一誠、石渡信一、宮崎牧人、村田隆（協力）、松田壮一郎（執筆）、細胞はいかにして二つに分裂するのか：細胞をちぎる不思議なリングのしくみ, *Newton*, 1月号, pp.82-95, ニュートンプレス (2017).
2. アレキサンダー・ダン, アンドリュー・プライス (著), 宮崎牧人, 石渡信一 (訳), 細胞に働く力とエネルギー論, *パリティ*, 第31巻第2号, pp.32-40, 丸善出版 (2016).

細胞内局所 pH 制御メカニズムの解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115720

研究代表者名：森本 雄祐（理化学研究所生命システム研究センター 研究員）

1. 研究の目的

細胞性粘菌などで見られるアメーバ運動は、特異的な pH 領域が細胞内で局所的に形成されることによって、効率よく指向性を持った運動をすることができているものと考えられている。しかし、実際にはアメーバ運動における細胞内局所 pH の制御機構および詳細な役割は明らかではない。本課題では、蛍光イメージングを中心とした手法により、高時空間分解能での細胞内 pH 測定および細胞内 pH の局所的な制御を行うことにより、細胞内局所 pH 変化によるアメーバ運動などの細胞のダイナミクスを制御するメカニズムを明らかにすることを旨とした。

2. 研究成果

本課題の研究成果として、励起光の波長切り替えを必要としない1波長励起2波長蛍光での計測が可能な新規 FRET 型 pH 感受性蛍光タンパク質を開発することができた。このプローブは高時間分解能での pH 計測を可能とするだけでなく、非常に高感度な pH プローブとして機能することが明らかとなった。開発したプローブを用いて細胞性粘菌の細胞運動と細胞質 pH の同時計測を行った結果、cAMP に対する走化性運動と相関して局所的に高い pH を保った細胞質領域が1細胞内局所で形成されることが明らかになった。また、細胞性粘菌の発生段階における細胞質 pH の変化を1細胞レベルで高感度にタイムラプス計測することが可能となり、細胞分化と細胞質 pH の明確な関連性が明らかとなった。さらに、cAMP に対して細胞が集合する際のシグナルリレーにおいて、細胞質 pH 変化よりも大きな膜電位変化が起こっていることも明らかとなった。本研究により、細胞内の局所的な pH 変化と細胞運動に高い相関があることが明らかになっただけでなく、pH 変化以上に膜電位の変化が起こっていることが明らかになったことは、プロトンだけではなく他のイオンの重要性も示唆しており、今後の研究へとつながる知見が得られたことは有益な成果である。

本課題で開発したレシオメトリック型高感度 pH プローブタンパク質を用いて、細胞性粘菌の細胞運動と細胞質 pH 変化に高い相関性があることが示された。また、同プローブを用いて細胞性粘菌の発生段階における細胞質 pH の変化を1細胞レベルで計測することにより、発生過程においても細胞運動と細胞質 pH に明確な相関があることが明らかとなった。これらの細胞内 pH と細胞ダイナミクスの関係をより明確にするために、光遺伝学的手法を用いて細胞内の局所 pH を人為的に制御する手法を検討しており、細胞性粘菌において効率的にチャンネルロドプシン等を発現する細胞株の構築を進めている。シグナルの制御ができるようになることにより、細胞質 pH 変化をともなうダイナミクスの分子メカニズムを明らかにしていく。また、本課題により開発した高感度 pH イメージング手法をバクテリアからヒト細胞に至るまで広く応用した研究を進めることにより、細胞内 pH の一般的重要性を示す研究を展開していく。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Minamino, T.* , Kinoshita, M., Inoue, Y., Morimoto, Y.V., Ihara, K., Koya, S., Hara, N., Nishioka, N., Kojima, S., Homma, M. and *Namba, K. (2016) FliH and FliI ensure efficient energy coupling of flagellar type III protein export in *Salmonella*. **Microbiologyopen**. *in press*
2. Minamino, T.* , Morimoto, Y.V., Hara, N., Aldridge, P.D. and *Namba, K. (2016) The bacterial flagellar type III export gate complex is a dual-fuel engine that can use both H⁺ and Na⁺ for flagellar protein export. **PLOS Pathogens**, 12, e1005495.
3. Baker, M.A., Hynson, R.M., Ganuelas, L.A., Mohammadi, N.S., Liew, C.W., Rey, A.A., Duff, A.P., Whitten, A.E., Jeffries, C.M., Delalez, N.J., Morimoto, Y.V., Stock, D., Armitage, J.P., Turberfield, A.J., Namba, K., Berry, R.M., and Lee, L.K.* (2016) Domain-swap polymerization drives the self-assembly of the bacterial flagellar motor. **Nature Structural & Molecular Biology**, 23, 197-203.
4. Md. Islam, S., Morimoto, Y.V., Kudo, S. and Nakamura S.* (2015) H⁺ and Na⁺ are involved in flagellar rotation of the spirochete *Leptospira*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 466, 196-200.
5. Nakamura, S.* , Morimoto, Y.V., and Kudo, S. (2015) A lactose fermentation product produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, acetate, inhibits the motility of flagellated pathogenic bacteria. **Microbiology**, 161, 701-707.
6. Minamino, T.* , Morimoto, Y.V., Kinoshita, M., Aldridge, P.D., and *Namba, K. (2014) The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis. **Scientific Reports**, 4, 7579.
7. #Bai, F., #Morimoto, Y.V., Yoshimura, S.D.J., Hara, N., Kami-ike, N., *Namba, K. and Minamino, T.* (2014) Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. **Scientific Reports**, 4, 6528. (#equal contribution)

神経細胞の自発的形態形成における少数資源の奪い合いによる自己組織化機構の研究

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115721

研究代表者名：岡田 康志（理化学研究所・生命システム研究センター チームリーダー）

1. 研究の目的

発生過程においては、さまざまな自己組織化現象がみられる。その理論的枠組みとして、チューリング型の反応拡散系がよく知られているが、系に関与する分子数が少数である場合には、少数資源の奪い合いによる自己組織化という形でチューリング型の反応拡散系を実装することが可能である。申請者らは、幼若神経細胞の形態形成過程における細胞内輸送の制御機構の研究を通じて、細胞内輸送がランダムに選択された突起に集中することにより神経細胞の自発的な形態形成が行われるという結果を得た。このことは、神経細胞の自発的形態形成・極性形成が、細胞内輸送という少数資源の奪い合いによる自己組織化の好適なモデル系であることを示唆している。本研究では、*in vitro* 再構成系と培養神経細胞を用いた実験を組み合わせることで、少数資源の奪い合いによる自己組織化モデルの前提となる「細胞内輸送の自己活性化」の検証および分子機構の解明と「細胞内輸送を担うモーター分子の個数の細胞内分布計測」を行う。

2. 研究成果

本研究によって、キネシン型分子モーターによる細胞内輸送が、正の協同性と少数資源の奪い合いの効果によって、自己組織化されることを実証した。まず、*in vitro* 再構成系で、微小管とキネシンだけからなる系で、キネシン濃度依存的にキネシンと微小管の相互作用に協同的自己組織化現象が生じることを示した。さらに、その機構を一分子計測と構造解析を組み合わせることによって解明した。一方、細胞内でキネシンと微小管の結合速度定数を直接計測するために、細胞内でのモーター分子個数の計測を可能とする一分子顕微鏡システムを構築し、これを利用することで細胞内でのキネシンと微小管の結合制御を微小管1本、キネシン1分子のレベルで明らかにした。その結果、細胞内には、キネシンとの親和性が異なる微小管が少なくとも4種類存在し、キネシンとの結合や微小管自身のダイナミクス、翻訳後修飾など様々な系によって複雑に制御されていることが示唆された。

上記知見を更に発展させるために、正の共同性を産む分子機構および細胞内での微小管のキネシン親和性を調節する因子を同定し、細胞内輸送調節の実体の解明を進める。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Minegishi K, Hashimoto M, Ajima R, Takaoka K, Shinohara K, Ikawa Y, Nishimura H, McMahon AP, Willert K, Okada Y, Sasaki H, Shi D, Fujimori T, Ohtsuka T, Igarashi Y, Yamaguchi TP, Shimono A, Shiratori H, Hamada H. A Wnt5 Activity Asymmetry and Intercellular Signaling via PCP Proteins Polarize Node Cells for Left-Right Symmetry Breaking. *Dev Cell*. 40:439-452.e4, (2017)
2. Chinen T, Liu P, Shioda S, Pagel J, Cerikan B, Lin TC, Gruss O, Hayashi Y, Takeno H, Shima T,

Okada Y, Hayakawa I, Hayashi Y, Kigoshi H, Usui T, Schiebel E. The γ -tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle. *Nat Commun.* 6:8722, 2015

- Hayashi S, *Okada Y. Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics. *Mol. Biol. Cell.*, 26:1743-51, 2015
- Takai A, Nakano M, Saito K, Haruno R, Watanabe TM, Ohyanagi T, Jin T, *Okada Y, *Nagai T. Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 112:4352-6. 2015
- Ohyanagi T, Shima T, Okada Y, Tsukasaki Y, Komatsuzaki A, Tsuboi S, Jin T. Compact and stable SNAP ligand-conjugated quantum dots as a fluorescent probe for single-molecule imaging of dynein motor protein. *Chem. Commun.*, 51(80):14836-9. 2015
- Okada Y, Nakagawa S. Super-Resolution Imaging of Nuclear Bodies by STED Microscopy in Nuclear Bodies and Noncoding RNAs (Nakagawa S, Hirose T ed), *Methods in Molecular Biology* 1262: 21-35, 2015
- Uno S, Kamiya M, Yoshihara T, Sugawara K, Okabe K, Tarhan MC, Fujita H, Funatsu T, Okada Y, Tobita S and Urano Y. A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. *Nat Chem* 6: 681-689, 2014
- Chiba K, Araseki M, Nozawa K, Furukori K, Araki Y, Matsushima T, Nakaya T, Hata S, Saito Y, Uchida S, Okada Y, Nairn AC, Davis RJ, Yamamoto T, Kinjo M, Taru H, Suzuki T. Quantitative analysis of APP axonal transport in neurons- Role of JIP1 in enhanced APP anterograde transport. *Mol Biol Cell* 25: 3569-3580, 2014

(総説)

- 高井啓、岡田康志 3色の高輝度発光タンパク質プローブの開発と応用、*Journal of Japanese Biochemical Society* 88:669-673, 2016
- 岡田康志 超解像蛍光顕微鏡法の現状と生体イメージングへの応用、*レーザー研究* 44:643-647, 2016
- 岡田康志、「超解像蛍光顕微鏡」、*Clinical Neuroscience* 34(6): 638-642, 2016
- 岡田康志 シャッター速度世界一の超解像蛍光顕微鏡 *OplusE* 2015年8月号
- 岡田康志 はじめての超解像イメージング *実験医学* 32:2623-2629, 2014

(その他)

- 岡田康志[編・著]「初めてでもできる！超解像イメージング」羊土社 2016年7月1日

染色体分離を制御する動原体に働くカバランスの定量

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115501

研究代表者名：矢島 潤一郎（東京大学総合文化研究科 准教授）

1. 研究の目的

モータータンパク質のキネシンやダイニンは細胞分裂に関与する。これらのモータータンパク質は、ヌクレオチドの加水分解の化学エネルギーを直接運動に変換可能のようで、現行の人工モーターとは異なる作動原理で働く、生命独自のエンジンを搭載している。このキネシンやダイニンは ATP の加水分解を伴い微小管のプラス端方向、もしくは、マイナス端方向に並進運動をする(並進モーター)とともに、微小管の長軸の周りに左回転、もしくは、右回転方向に運動をする(回転モーター)。さらに、いくつかのキネシンやダイニンでは、微小管上に沿って拡散運動をすることも報告されている(拡散モーター)。このように多様な運動特性を示すが、ATP の加水分解のエネルギーがどのように利用されているのか、運動方向がどのように決定されるのかについては、いまだによくわかっていない。そこで本研究では、紡錘体の形成に関与するキネシン14や細胞質ダイニン、及び染色体の運搬を担うキネシン10が、微小管上を並進・回転・拡散運動する様子を定量し、モータータンパク質が運動方向を決定する仕組みの解明を目指した。

2. 研究成果

i) 細胞分裂に必須な分裂期キネシン 14 の並進運動方向を決定する分子機構の解明を試みた。複数のキネシン14分子が協同して運動する場合、ビーズに固定する部位によって、微小管上での運動方向が変わることが分かった。さらに、1分子でのキネシン14の運動方向は、ブラウン運動を変調することで決定される可能性を示した。この1分子での運動方向は、複数のキネシン14分子をそのアミノ酸C末端側で固定した場合の運動方向とは逆であり、キネシン10分子の運動方向と同じ方向であった。

ii) 酵母の分裂期モーター細胞質ダイニンの回転運動方向を決定する分子機構の解明を試みた。3次元位置検出顕微鏡による運動定量により、1分子で運動をするダイニン分子は、回転運動特性を示さず、微小管の長軸に垂直な方向にランダム運動となる。少数ダイニン分子が協同して運動する場合、微小管の長軸の周りを右方向にも左方向にも回転運動することが分かった。運動にかかわる分子の数に応じて、異なる運動特性が現れる可能性を提示した。

今後の研究の展開に関する計画として、紡錘体極の形成過程で、結合タンパク質など外部からの相互作用や働く分子の数、外部からの負荷の有無などの状況に応じ、機能する方向を変える機構の実体の解明を進める。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Yamagishi M, Shigematsu H, Yokoyama T, Kikkawa M, Sugawa M, Aoki M, Shirouzu M, Yajima J*, and Nitta R*. Structural Basis of Backwards Motion in Kinesin-1-Kinesin-14 Chimera: Implication for Kinesin-14 Motility. *Structure*. **24**:1322-1334 (2016)

2. Uehara R*, Kamasaki T, Hiruma S, Poser I, Yoda K, Yajima J, Gerlich DW, Goshima G. Augmin shapes the anaphase spindle for efficient cytokinetic furrow ingression and abscission. *Molecular Biology of the Cell* **27**: 812-827 (2016)
3. Yamaguchi S, Saito K, Sutoh M, Nishizaka T, Toyoshima YY, Yajima J*. Torque generation by axonemal outer-arm dynein. *Biophysical Journal* **108**: 872-879 (2015)

(総説)

1. 西坂崇之, 藤村章子, 加藤孝信, 矢島潤一郎. 細胞骨格の in vitro での運動を 3 次元的に追跡する. (2013). *生体の科学*. **64**, 558-563.

(学会発表)

1. 第 68 回日本物理学会・シンポジウム, 生体分子機械・キネシンの運動方向決定機構, 矢島潤一郎, 2013年3月26日 広島大学 (広島県)
2. 第 50 回日本生物物理学会・シンポジウム, Microtubule corkscrewing motion driven by multiple non-processive motors, 矢島潤一郎, 2012年9月22日 名古屋大学 (愛知県)
3. Mechanochemical Cell Biology symposium, Microtubule corkscrewing motion driven by multiple non-processive motors, Ncd, 矢島潤一郎, 2012年8月24日 英国 (Coventry) Warwick 大

(その他)

1. 矢島潤一郎, (2017). 少数性生物学 12 章「少数の動き：少数のバイオナノマシンがチームで創発する振る舞い」, pp., **日本評論社** (分担執筆)
2. 矢島潤一郎, (2017). 演習で学ぶ生命科学 第 2 版, **羊土社** (分担執筆)
3. 矢島潤一郎, (2016). 演習で学ぶ生命科学 第 1 版, **羊土社** (分担執筆)
4. 矢島潤一郎, (2014). 1 分子ナノバイオ計測 「リニアモーター：キネシン」, pp.59-68, **化学同人**. (分担執筆)

シナプス機能制御における少数分子の空間的コーディネートの意義の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115502

研究代表者名：並木 繁行（東京大学大学院医学系研究科 助教）

連携研究者名：藤田 克昌（大阪大学大学院工学研究科 准教授）

渡邊 朋信（理化学研究所生命システム研究センター チームリーダー）

廣瀬 謙造（東京大学大学院医学系研究科 教授）

1. 研究の目的

神経回路機能の調節ではシナプス前終末のアクティブゾーンからのグルタミン酸などの神経伝達物質の放出パターンが重要な役割を担っている。アクティブゾーンに存在している少数の分子が適切な空間的なコーディネートをすることでシナプス小胞の放出部位の個数や放出確率は制御されていると考えられているが未だその証明はなされていない。本研究では放出部位の形成に必要な分子を同定し、同定した分子がナノドメインでどのような空間的コーディネートを受けて放出部位の個数や放出確率を変化させているのかを明らかにする。加えて、神経入力のパターンに応じてシナプス可塑性を実現するためのシナプス小胞放出部位の個数や放出確率の制御が、ナノドメインにおける制御分子のどのような空間的コーディネートによってなされているのかを明らかにする。以上の成果を基に、シナプス機能制御が少数の制御分子で行われることの重要性や意義について解明する。

2. 研究成果

個々のシナプス前終末でのシナプス小胞の放出確率及びアクティブゾーンでのシナプス小胞の放出部位の数を見積もるための方法論の確立を行った。細胞外カルシウム濃度を変化させることによってグルタミン酸の放出量と放出確率を変動させながら、単一シナプスグルタミン酸イメージングを行った。グルタミン酸イメージングには本研究室で開発に成功している蛍光性のグルタミン酸プローブを用いた。グルタミン酸放出に伴うグルタミン酸プローブの蛍光変化の平均と分散との関係を基に量子解析を行い、放出確率、放出部位の数を見積もった。次に、RNAiライブラリーを用いた遺伝子ノックダウンや過剰発現系によってシナプスに局在する遺伝子群を増減させた培養神経細胞での放出確率、放出部位の数への影響を調べた。シナプス小胞の輸送に関与することが指摘されている **Munc13-1** をノックダウンした海馬の分散培養標本作製し、グルタミン酸イメージングデータを基にした量子解析によって標本内の個々のシナプスについて放出確率、放出部位の数を見積もり、コントロール標本との差異を調べた。その結果、**Munc13-1** がアクティブゾーンのシナプス小胞の放出部位の数の制御に関与していることを明らかにした。

STORM 顕微鏡を用いてシナプスのアクティブゾーン内に存在する機能分子の超解像イメージングを行った。あらかじめグルタミン酸イメージングによって、シナプス毎にグルタミン酸の放出部位の数や放出確率を見積もっておいた海馬培養神経細胞標本を超解像イメージングの対象とする抗体を用いた蛍光免疫染色を行いサンプルの作製を行い、超解像イメージングを実施した。グルタミン酸放出への関与が報告されていたシナプス分子群 **S** の超解像イメージングを行った。その結果、**Munc13-1** 分子がアクティブゾーン内でクラスターを形成することを見出した。**Munc13-1** クラスターは **Pair**

correlation 関数解析によって数 10nm 以内と近い位置に存在することが分かった。さらに、Munc13-1 分子のクラスターがグルタミン酸放出部位の数とアクティブゾーン内に形成される Munc13-1 分子のクラスターの数に非常に強い相関で一致することを見出した。また、Munc13-1 のノックダウン細胞では Syntaxin のアクティブゾーンへの局在が見られなくなることを明らかにした。これらの結果は、アクティブゾーンでの機能分子の少数の超分子構造体が興奮性シナプスでのグルタミン酸放出を制御している分子メカニズムとして重要であることを示すものである。

今後の研究の展開に関する計画として、生きた神経細胞のシナプスにおいて本研究で見出されたシナプス分子のナノスケールの微細構造がどのような時空間動態を示すのかをライブセルでの超解像イメージングによって解析を進める。また、見出された微細な分子配置についてどのような分子との相互作用が寄与しているのかを明らかにする。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Isa M, Namiki S, Asanuma D, and Hirose K*. Spatiotemporal Control of Receptor Tyrosine Kinase Activity by Caged Ligands. *Chem Lett*, 44, 150-151 (2015)
2. Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N & Hirose K*. High-throughput development of hybrid-type fluorescent glutamate sensor for analysis of synaptic transmission. *Angew Chem Int Ed Engl.* 53, 13439-13443 (2014)
3. Isa M, Asanuma D, Namiki S, Kumagai K, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Hirose K*. High-Throughput Screening System To Identify Small Molecules That Induce Internalization and Degradation of HER2. *ACS Chem Biol.*, 9, 2237-2241 (2014)
4. Asanuma D, Takaoka Y, Namiki S, Takikawa K, Kamiya M, Nagano T, Urano Y, Hirose K*. Acidic-pH-Activatable Fluorescence Probes for Visualizing Exocytosis Dynamics. *Angew Chem Int Ed Engl.* 53, 6085-6089. (2014)
5. Tokunaga T, Namiki S, Yamada K, Imaishi T, Nonaka H, Hirose K, Sando S*. Cell surface-anchored fluorescent aptamer sensor enables imaging of chemical transmitter dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 9561-9564 (2012)

発現量の少ないタンパク質の凝集性とシャペロン要求性の解析

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：50588530

研究代表者名：丹羽 達也（東京工業大学 大学院生命理工学研究科 助教）

1. 研究の目的

タンパク質は細胞内で様々な機能を発揮しており、その存在量も少ないものから多いものまで様々なものが存在する。私達は過去に大腸菌の全タンパク質の凝集性を調べた結果、細胞内での発現量が少ないタンパク質はフォールディングしづらい性質を持つことを見いだした。そこでこのような微量タンパク質と種々の分子シャペロン及びプロテアーゼとの関係を調べるために、再構築型の無細胞タンパク質合成系を用いて微量タンパク質のシャペロン依存性及びプロテアーゼ感受性について調べる。このようなアプローチによって、今まで知られていなかった微量タンパク質のフォールディングに関する性質を明らかにし、生体内における微量タンパク質の制御機構ならびに生物学的な意義についての理解を深めたい。

2. 研究成果

再構築型の無細胞タンパク質合成系を用いて、微量タンパク質を含んだ約100種類のタンパク質に対する細胞内プロテアーゼ（大腸菌の主要なプロテアーゼである Lon を用いた）の感受性を調べたところ、微量タンパク質とそうでないタンパク質の間で感受性に有意な差はみられなかった。またシャペロンのフォールディング補助効果についても、微量タンパク質に特に強く効果が発揮されるという傾向はみられなかった（但し、微量タンパク質がシャペロンによって別段助けられにくい、というわけでもなく、実際に発現量が少ないタンパク質でもシャペロンの基質になりうることは確認されている (Niwa T *et. al. FEBS lett.* 2016)）。これらの結果から考えると、多くの微量タンパク質の細胞内での発現制御に関してシャペロンやプロテアーゼは特別な制御を行っているわけではないことが示唆された。フォールディングしづらいという性質は細胞内における発現量に不利に働くと考えられるため、この性質自体が細胞内での発現量を低く保つことに寄与しているということを示唆しているのではないかと考えている。

上記のような考えを証明するためには、シャペロンやプロテアーゼの存在状況に何らかの摂動を加えることが重要であると考えている。加えて、上記の研究はあくまで *in vitro* における性質を調べたに過ぎず、実際に細胞内で微量タンパク質の振る舞いを観察することが重要となってくる。これらを併せて考えると、例えばシャペロンやプロテアーゼの欠損株や条件発現株を用いるなどして、シャペロン/プロテアーゼのバランスを意図的に崩した際に細胞内の微量タンパク質の発現量がどのように変化するかを調べることが、微量タンパク質を微量タンパク質たらしめている要因を調べる良いアプローチになると考えている。細胞内で微量タンパク質の発現量を調べることは容易ではないが、高感度の蛍光顕微鏡を用いて検出できるという報告はすでにされているので (Taniguchi Y. *et al, Science*, 2010)、この実験系に倣って検出系を構築すれば、ごく微量のタンパク質の量の変化について調べることができると期待される。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Niwa T, Fujiwara K, and Taguchi H*. Identification of novel in vivo obligate GroEL/ES substrates based on data from a cell-free proteomics approach. *FEBS Letters*, 590 (2), 251-257. (2016)

細菌べん毛形成を1本に制御する仕組み

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115506

研究代表者名：小嶋 誠司（名古屋大学理学研究科 准教授）

連携研究者名：本間 道夫（名古屋大学理学研究科 教授）

今田 勝巳（大阪大学理学研究科 教授）

1. 研究の目的

細胞の機能を担う超分子複合体は、細胞内の指定された場所に必要な数の分子が自己集合して機能している。海洋性細菌であるビブリオ菌は、細胞の極に1本だけ運動器官のべん毛を形成するため、べん毛をモデル系として細胞における超分子の位置と数の制御機構に迫ることが出来る。べん毛形成位置と数の制御には、GTPaseのFlhFとATP結合モチーフを持つFlhGが関与している。FlhFは極に局在しべん毛数を正に制御する。一方FlhGはFlhFに作用し極局在を阻害することで負に制御している。なぜ極に1本だけべん毛を形成できるのかその詳細はまだ分かっていない。本研究では、FlhFとFlhGの生化学的性質を詳細に調べる。また、FlhF/FlhG以外の因子が本数・位置制御機構へ関与するかどうかを検討するため、これらと結合する因子の免疫沈降と質量分析による同定、及び欠失変異体からの抑圧変異の取得を行うことで、FlhFとFlhGの関わるネットワークを調べる。さらに蛍光標識したFlhFの細胞内動態観察を行い、何分子のFlhFが極に集合することで1個の基部体形成を開始するのかを調べる。

2. 研究成果

本研究では、なぜ極に1本だけべん毛を形成できるのかを明らかにするため、FlhFとFlhGの生化学的性質、FlhFとFlhGと作用する因子のネットワーク、細胞の極に局在するFlhFの分子数とべん毛本数の関係に着目した。残念ながらFlhFの分子数計測やネットワークの解析は2年間で進まなかったが、FlhGの生化学的性質とべん毛形成制御との関連について、明らかにすることが出来た。

FlhGは細菌細胞の分裂面形成を制御するATPaseであるMinDにホモロジーを示すことから、初年度はFlhGのATP結合モチーフやATPase活性に重要とされる保存されたアミノ酸残基に着目し、それらとFlhG機能の関係を明らかにすることを目的として、これらの残基の変異体について運動能・極べん毛数・FlhGの極局在を調べ、変異による影響を解析した。Deviant Walker A motifの変異(K31A, K36Q)によってFlhGの極局在は顕著に減少し、また極べん毛数を負に制御することができなかった。一方で、MinDにおいてMinEによる活性化を阻害する変異(D171A)によって、逆にFlhGの極局在が野生型より顕著に高まり、べん毛形成が強く阻害された。このことからFlhGの極局在がべん毛数を負に制御し、その過程にはFlhGのATPase活性が関与すると考えられた。しかし、ATP加水分解の推定触媒残基への変異(D60A)では、野生型と同じ表現型を示し、極べん毛形成制御には変化がみられなかった。以上の結果から、FlhGのATPaseモチーフは機能に重要であり、FlhGの極局在がべん毛形成阻害に関与すると考えられた。

2年目にはFlhGを精製し、実際にATPase活性を測定して、べん毛数制御との関係を探った。FlhGを大腸菌内で大量発現させると凝集が起り、半数が沈殿してしまった。様々な条件を試して、可溶

性画分に残ったものを、グリセロールを含み比較的高い塩濃度の緩衝液を用いることで精製に成功した。精製した FlhG は 4°C で 3 日間は安定に保たれ、2 mg/ml 以上濃縮すると沈殿してしまう。精製後すぐに ATPase 活性を測定することで、確かに FlhG は ATP 加水分解活性を示し、べん毛数を減少させる変異体(D171A)ではその活性が非常に高いことが明らかとなった。従って、FlhG の ATPase 活性を適切に制御することで、極にある FlhF の分子数が制御され、その結果べん毛の形成が 1 本に制御されていると考えられた。

ところで、*flhFG* 二重欠損株ではべん毛形成が適切に制御されない。そのため、ほとんどの菌でべん毛を持たず、ごくわずかな割合で菌体周囲に複数本のべん毛を持つという表現型を示す。我々はこの二重欠損株から軟寒天培地上の運動能を回復した抑圧変異体($\Delta flhFG$ -sup 株)を単離したところ、半数以上の割合で菌体周囲に複数本のべん毛を持ち、運動能が親株 ($\Delta flhFG$ 株) より上昇していた。全ゲノムシーケンスにより原因遺伝子を特定した。この遺伝子(*sflA* と命名)は、ビブリオ属に特異的で、C 末端に DnaJ ドメインを持った一回膜貫通タンパク質をコードしており、極べん毛が菌体周囲に形成されるのを抑制する働きを持つことがわかった。この結果を論文にまとめて発表した(文献 1)。

本研究により、これまで注目していなかった FlhG の極局在が実はべん毛数の負の制御に関係し、その過程には FlhG の ATPase 活性が関与することがわかってきた。既知の事実と合わせて整理すると、決まった数の FlhF が極に局在することでべん毛形成が 1 本に制御され、その過程には FlhG の極局在が関与することになる。FlhF の GTPase 活性と FlhG の ATPase 活性は、べん毛本数・位置制御機構にどう関わるのだろうか？ また、細胞の生育段階およびべん毛の形成過程において、いつ、何分子の FlhF や FlhG が極局在するのだろうか？ 極局在する分子数は最初から決まっているのだろうか？ それとも変化しながら最終的に適切な数に落ち着くのだろうか？ FlhF と FlhG の生化学的性質や細胞内の挙動のリアルタイム観察を進めることで、これらの課題に答えることができると考えている。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Kitaoka M, Nishigaki T, Ihara K, Nishioka N, Kojima S, Homma M*. A novel *dnaJ* family gene, *sflA*, encodes an inhibitor of flagellation in marine *Vibrio* species. J. Bacteriol., 195, 816-822. (2013)

少数分子時における生物時計の時計安定性評価

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115507

研究代表者名：小嶋 勝（大阪大学 基礎工学研究科 助教）

1. 研究の目的

高等動植物から原核生物に至る自然界で広く見られる、約24時間周期の生物リズムは生物時計により制御されている。シアノバクテリアは光合成を行う細菌で、生物時計を備える。その一番の特徴は、生物時計の発振機構が、わずか3種類のタンパク質KaiA, KaiB, KaiCとATP(アデノシン三リン酸)による生化学反応によって、試験管内再構成することができることである。

本研究では、唯一、試験管内再構成が可能なシアノバクテリア由来の生物時計タンパク質を脂質二重膜小胞による微小空間、またはマイクロ・ナノ微細加工技術に基づいて作製した微小空間（容積サブフェムトリットルの微小チャンバ）内に封入し、分子数を制御した上で生物時計活性の評価を行う。さらに、環境条件を変化させ、外乱に対する生物時計活性の正確性、それらの分子数との関係を明らかにし、外環境の揺らぎに対する対応機構とその限界に迫ることを目的とする。

2. 研究成果

生物時計タンパク質を脂質二重膜小胞による微小空間、またはマイクロ・ナノ微細加工技術に基づいて作製した微小空間に封入することで、生物時計タンパク質の外環境への頑強性と分子数との関係を明らかにすることを目指した。まずは油中ドロップレット中における時計の再構成実験系を発展させた、油中水滴法を用いた人工膜小胞への生物時計タンパク質再構成系の確立・発展を試みた。その結果、膜小胞中に再構成を行うと、再構成された時計の周期が長周期化することが明らかとなった。また、この長周期化の原因が生物時計タンパク質の膜内における局在によって引き起こされている可能性が蛍光観察によって示唆された。これらの結果は、単一細胞という微小空間内で生物時計がなぜ正確に時を刻むことが可能であるのかという謎に迫る新たな知見である。

次に、生物時計の正確性の維持において同期現象が重要であることが報告されているため、この同期現象における安定性の評価を試みることにした。この実験では、24時間のリズムを刻んでいる生物時計タンパク質の一定量のある状態の生物時計タンパク質と定期的に交換し、リズムがどのように変化するかを確認する。まずは分子数が十分にある条件において実験を行ったところ、交換する生物時計タンパク質がある一定量を越えるとリズムが消失することが確認された。この結果は、同期現象の限界を考える上で重要となる新たな知見である。

今後は、MEMS技術を利用して作製した微小チャンバの他に、MEMS技術・ロボット技術を用いた微量作業用マイクロツールの作製も行う。これらのツールを組み合わせることで、微小空間内（マイクロチャンバー内）での分子数を制限された条件下における時計活性の評価を行う。また、微小空間内での生物時計活性を直接計測する手法にも取り組む。これらを組み合わせることにより、微小空間内での交換実験を行い、生物時計タンパク質の外環境への頑強性と分子数との関係をより詳細に明らかにすることを試みる。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Kojima, M., Zhang, Z., Nakajima, M., Ooe, K., Fukuda, T., (2013) Construction and evaluation of bacteria-driven liposome, **Sensors and Actuators B**, 183, pp. 395-400

GPCRのシグナル伝達経路の分岐の仕組み：1分子観察法を用いた研究

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115511

研究代表者名：笠井 倫志（京都大学・再生医科学研究所 助教）

1. 研究の目的

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、800種類もの分子が属しており、多様な働きを担う極めて重要なタンパク質ファミリーである。シグナル伝達経路は多岐に渡るが、シグナル分子は、細胞膜上で、数種類かつ数分子の小複合体の形態をとりながらシグナルの経路毎に存在しており、シグナル伝達を担う機能単位として働くと考えられている。一方で、こうした多様なシグナル経路がどのようにして個別に活性化され、シグナルの分岐や調整が行われるのかはよくわかっていない。本研究では、活性化したGPCRが、少数個の分子からなるシグナル分子複合体に結合してから解離するまでという、シグナル分子複合体の生成消滅過程の一部始終を1分子レベルで直接観察することで、シグナル経路の分岐と調整の仕組みを明らかにすることを目指した。

2. 研究成果

本研究では、 β 2アドレナリン受容体（GPCR）と、細胞膜近傍に存在する下流シグナル分子である、アレスチンとEBP50を取り上げ、活性化前後での膜への集積などの振る舞いの変化と、GPCRとの相互作用の様子に注目した。このため、蛍光1分子観察の手法を発展させ、3つの異なる分子を同時に1分子ずつ観察する3色同時蛍光1分子観察法を用いた。これにより、GPCR、アレスチン、EBP50のうち、経路に分けて、GPCRとアレスチン、あるいは、GPCRとEBP50との相互作用を順番に1分子レベルで調べた。GPCRが下流の2つの異なるシグナル分子複合体とどの様に相互作用をしているかを、GPCRが、1) 2つのシグナル分子EBP50とアレスチンの間を飛び移りつつシグナルを伝えるのか、2) どちらかにとどまり続けるのか、あるいは、3) 両方のモデルを合わせたような複雑な相互作用をするのか、に注目して観察を行った。

輝点の共局在から、結合時間と結合の順序を調べ、分子同士の相互作用を経路ごとに比較した。その結果、アゴニスト添加前に、多くのEBP50はすでに細胞膜上で拡散せず停留しているが、GPCRは拡散によってEBP50と相互作用し、寿命100ミリ秒程度だけ結合するということが分かった。これは、従来の知見とは異なり、シグナル伝達の足場を与える分子複合体が極めて動的に生成消滅しており、刺激前のGPCRは相手となるシグナル分子を替えながら膜上を渡り歩いている事を示唆している。また、アゴニスト添加後も、刺激前と同様に、GPCRとEBP50との一時的な結合が観察されたが、刺激による大きな変化は見られなかった。このことから、GPCRは、EBP50を介して入力場所を特定しないシグナルを生じているらしい事、および、拡散によって相互作用する相手を替えるGPCRはシグナルの分岐や調整を担っている可能性が示唆された。

一方で、GPCRとアレスチンは、100ミリ秒以上結合して停留するという、比較的安定な複合体を形成する様子が、アゴニスト添加後だけに見られた。すなわち、刺激後には、GPCRはアレスチン分子と相手を替えずに結合しつづけて停留するため、限局したシグナル入力をする事、および、アレスチンと安定結合し停留するGPCRはシグナル分岐や調整への寄与が小さい可能性が示唆された。さ

らに、アゴニスト添加後には、GPCR、EBP50、アレスチンの3つが、100ミリ秒以下という極めて短時間だけ結合し、停留する様子も捉えることができた。この一過的な分子複合体は、従来報告されていないだけでなく、GPCRのシグナル分岐と調整に関わり、動的に構成分子を組み換え続ける、新しいシグナル分子複合体である可能性が示された。

以上の結果から、刺激後に形成される、GPCR、EBP50、アレスチンの3種からなるシグナル分子複合体では、構成するシグナル分子が素早く交換しており、シグナルの分岐と調整を担う機構の一つであることが示唆された。今後は、シグナル分子との結合を増強・阻害したときの downstream シグナルを調べ、シグナル分岐が実際に制御されることを実証する。

また、本研究では、細胞内に、蛍光色素でラベルされていない内在性分子が存在しているため、分子複合体を形成する分子の個数の定量ができなかった。そこで、内在するシグナル分子をロックアウトし、分子複合体の大きさを調べる必要がある。さらに、入力シグナル強度(=アゴニスト濃度)を変えたときに、GPCRがそれぞれのシグナル経路にかかわる分子と相互作用する頻度や時間の比率を調べ、シグナル分子複合体がシグナル変調に関わる様子を明らかにする。

その後、他のGPCRやシグナル分子でも同様に、3種分子からなる動的なシグナル複合体が生じるかを調べ、シグナル分岐や調整を担う仕組みの一般側を見出す。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Kasai, R.S., and *Kusumi, A. (2014). Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization. **Current Opinion in Cell Biology**. 27, 78-86.
2. Nagata, K.O., Nakada, C., Kasai, R.S., *Kusumi, A., and *Ueda, K. (2013). ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 110, 5034-5039.
3. Nishimura, H., Ritchie, K., Kasai, R.S., Goto, M., Morone, N., Sugimura, H., Tanaka, K., Sase, I., Yoshimura, A., Nakano, Y., Fujiwara, T.K., and *Kusumi, A. (2013) Biocompatible fluorescent silicon nanocrystals for single-molecule tracking and fluorescence imaging. **Journal of Cell Biology**. 202, 967-983.
4. Suzuki, K.G.N., Kasai, R.S., Hirose, K.M., Nemoto, Y.L., Ishibashi, M., Miwa, Y., Fujiwara, T.K., and *Kusumi, A. (2012). Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. **Nature Chemical Biology**. 8, 774-783.
5. Cho, K.J., Kasai, R.S., Park, J.H., Chigurupati, S., Heidorn, S.J., van der Hoeven, D., Plowman, S.J., Kusumi, A., *Marais, R., and *Hancock, J.F. (2012). Raf inhibitors target ras spatiotemporal dynamics. **Current Biology**. 22, 945-955.

核一細胞質間の物質輸送を制御する核膜孔複合体内の分子動態の解明

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115512

研究代表者名：桑田 昌宏（京都大学生命科学研究科 助教）

1. 研究の目的

全ての真核生物にとって、核膜孔複合体（NPC）を介して核質と細胞質とを物質的・機能的に結び付けることは、生命維持のために根本的に重要なシステムである。これまでの研究では、「極小空間に数個～数十個の因子が 200 μ M 程度の高密度で存在して疎水的相互作用をしている」という NPC 内部の特殊環境を反映した実験・理論系を構築できておらず、その物質輸送の詳細は未だ明らかになっていない。本研究では、①NPC 内部の生理的極限環境下での分子数依存的な相互作用を明らかにすること、②NPC 内部の生理的極限環境下での分子動態を明らかにすること、を目的とし、*in vitro*/*in vivo*/*in silico* の様々な手法を用いて、NPC 内部の生理的極限環境下での分子のふるまいを解析した。これらの解析から得られた結果を元に、NPC を介した物質輸送メカニズムの本質的理解を得ることを目指した。

2. 研究成果

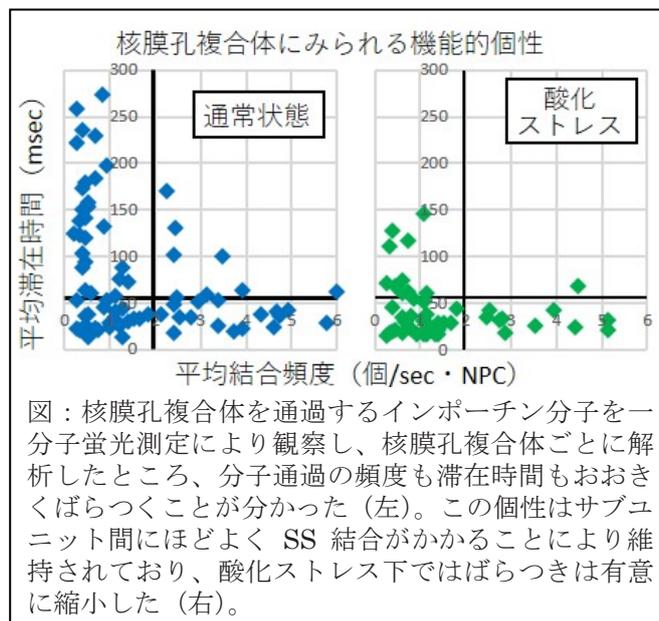
NPC を介した分子輸送メカニズムの根本原理の解明のため、以下のアプローチからなる研究を実施し、記載の成果を得た。

①NPC 通過分子の性質と NPC 内部でのふるまいの理解

インポーチンなどの両親媒性分子がいかにして疎水的バリアである NPC の内部を通過するのかを、その構造的柔軟性と、NPC サブユニットとの相互作用に着目して明らかにした。構造的柔軟性は、さまざまな溶媒中における分子の表面疎水領域測定と、分子シミュレーションにより行った。特に、疎水的クラウディング環境の *in vitro* 解析系の確立に注力し、トリフルオロエタノールなどの疎水溶媒を用いた構造解析を行ったほか、この環境における分子構造動態を *in silico* の分子動態シミュレーションにより行った。この結果、NPC 内部の極限環境下におけるインポーチンなどの通過分子は、迅速に柔軟な構造変化を起こして疎水環境対応型へと起こすことを証明した。また、酸化ストレスによって NPC サブユニット間に SS 結合が形成されること、それに伴って分子通過が抑制されることを定量的に示し、NPC 内部の分子協調の様式がその機能をダイレクトに制御していることを発見・報告した。

②NPC ごとの機能的個性の解明

細胞核あたり約 4,000 個存在する NPC の機能的個性を明らかにするため、一分子蛍光による *in vitro* の分子動態解析を行った。全反射型蛍光顕



微鏡を斜方照明にして用いる観察系と、細胞膜を取り去った細胞核に対して蛍光分子の集積を解析する実験系を組み合わせ、インポーチンの NPC における通過頻度と滞在時間を NPC ごとに解析する系を構築した。データ解析の結果、NPC ごとに分子結合頻度にも分子滞在時間にも 10 倍程度の大きなばらつきがあることが分かり、NPC は機能的にヘテロな個性を持った集団であることが明らかになった (図)。酸化ストレスによってこのばらつきは縮小することから、このメカニズムは生理的意味を持って維持されていることが予想される。

本研究では、NPC 内部の生理的極限環境下にみられるユニークな分子動態を少数的側面から明らかにするとともに、少数分子複合体である NPC がその少数性に起因する不安定なアウトプットをもつ機構であることを見出し、この分野における新たな発展の基礎を築くことができた。今後、少数分子の協調がいかにして分子の構造動態を制御しているか、NPC の機能的個性がどのように総体としての細胞機能維持に関与しているか、を明らかにすることで、この分野における少数性の意義を追究していく計画である。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. *Kumeta M, Yoshimura SH, Hejna J, Takeyasu K. "Nucleocytoplasmic shuttling of cytoskeletal proteins: molecular mechanism and biological significance." *Int. J. Cell Biol.*, (2012) 494902 (doi: 10.1155/2012/494902)
2. *Yoshimura SH, Otsuka S, Kumeta M, Taga M, Takeyasu K. "Intermolecular disulfide bonds among nucleoporins regulate karyopherin- dependent nuclear transport" *J. Cell Sci.*, (2013) 126: 3141-3150
3. Hirai Y, Louvet E, Oda T, Kumeta M, Watanabe Y, Horigome T, *Takeyasu K. "A nucleolar scaffold protein, WDR46, determines the granular compartmental localization of nucleolin and DDX21" *Genes to Cells*, (2013) 18(9): 780-797
4. *Kumeta M, Hirai Y, Yoshimura SH, Horigome T, Takeyasu K. "Antibody-based analysis reveals "filamentous vs. non-filamentous" and "cytoplasmic vs. nuclear" crosstalk of cytoskeletal proteins" *Experimental Cell Research*, (2013) 319(20): 3226-3237
5. *Kumeta M, Gilmore JL, Umeshima H, Ishikawa M, Kitajiri SI, Horigome T, Kengaku M, Takeyasu K. "Caprice/MISP is a novel F-actin bundling protein critical for actin-based cytoskeletal reorganizations" *Genes to Cells*, (2014) 19(4):338-49
6. *Yoshimura SH, Kumeta M, Takeyasu K. "Structural mechanism of nuclear transport mediated by importin β and flexible amphiphilic proteins" *Structure*, (2014) 22(12):1699-710
7. Lolodi O, Yamazaki H, Otsuka S, Kumeta M, *Yoshimura SH. "Dissecting in vivo steady-state dynamics of karyopherin-dependent nuclear transport." *Mol Biol Cell*, (2016) 27(1):167-76

生物回転ナノマシン構成素子の機能イメージング

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115518

研究代表者名：曾和 義幸（法政大学生命科学部 講師）

1. 研究の目的

細菌べん毛モーターは、(1) 1秒間に100回転を越える安定な高速駆動、(2) 回転方向を瞬時に切り替えるスイッチ機構などの多くの優れた特徴を備える。モーターの主要部は、リング状に分子が重合した回転子とその周囲に配置された1~10個の固定子複合体から構成される。モーター回転に最も重要な回転子タンパク質であるFliGは26個の分子がリング状に配置しており、その構造周期性と回転機能の相関が見え始めている。一方で、回転子リングには34の構造周期性を持つFliM, FliNの回転力発生への関与も示されており、回転子内にみられる26と34の構造周期性ミスマッチの協同的作用によりモーターが回転するモデルも提唱されている。また、モーター固定子の動的な振る舞いとモーター発生トルクの相関も興味深い。本研究では、1分子観察によりモーター構成素子である固定子または回転子の動きを直接的に観察し、モーター内のダイナミックで協同的な作用機序の解明を目的とする。

2. 研究成果

細菌べん毛本研究では、回転駆動に重要な少数個のモーター素子間における協同性の可視化を目標とした。まず、生きている大腸菌内で機能するモーター固定子を有機蛍光色素で標識し、その分子1個の動きを構築した顕微鏡を用いてナノメートル程度の精度で追跡した。その結果、モーター回転に伴って、モーター構成素子が回転移動する様子を捉えることができた。また、モーターの入力エネルギーの変化に伴って、モーター構成素子が柔軟に入れ替わり、出力を最適化する協同的な振る舞いを見出すことができた。分子の挙動を高精度に検出できる手法は、他の生命現象への応用もできる。領域内共同研究として、比較的少数個の分子から構成される大腸菌異物排出ポンプ複合体の細胞膜内移動を解析し、構成素子が機能的に交換するモデルを提唱することができた。

本研究をさらに発展させるために、分子追跡法の多色化を含めた高精度化をおこない、少数分子の振る舞いが鍵となる生命現象に応用する。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Yamamoto K, Tamai R, Yamazaki M, Inaba T, Sowa Y and Kawagishi I*. Substrate-dependent dynamics of the multidrug efflux transporter AcrB of *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 6, 21909 (2016)
2. Sowa Y*, Homma M, Ishijima A and Berry RM*. Hybrid-fuel bacterial flagellar motors in *Escherichia coli*. *PNAS* 111, 3436-41 (2014)
3. Bai F*, Che Y-S, Kami-ike N, Ma Q, Minamino T, Sowa Y* and Namba K*. Populational Heterogeneity vs. Temporal Fluctuation in *Escherichia coli* Flagellar Motor Switching. *Biophys. J.* 105, 2123-2129 (2013)

4. Lo C-J, Sowa Y, Pilizota T and Berry RM*. Mechanism and kinetics of a sodium-driven bacterial flagellar motor. *PNAS* 110, E2544-E2551 (2013)
5. Nishiyama M*, Sowa Y, Kimura Y, Homma M, Ishijima A and Terazima M. High Hydrostatic Pressure Induces Counterclockwise to Clockwise Reversals of the *Escherichia coli* Flagellar Motor. *J. Bacteriol.* 195, 1809-1814 (2013)
6. Nishiyama M* and Sowa Y*. Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. *Biophys. J.* 102, 1872-1880 (2012)

(総説)

1. 曾和義幸. バクテリアべん毛モーター. 1 分子生物学, 原田慶恵・石渡信一編, 化学同人, 6 章, 75-86 (2014)
2. 西山雅祥, 曾和義幸. 細胞内の水で生命活動を操る！－高圧力下で観るタンパク質水和変調イメージング. 化学 68(9), 33-38 (2013)
3. Sowa Y and Berry RM. The Rotary Bacterial Flagellar Motor. *Comprehensive Biophysics* vol. 8, pp.50-71, Academic Press (2012).

分子イメージングによる異物排出ポンプ細胞内動態の解析

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115519

研究代表者名：川岸 郁朗（法政大学生命科学部 教授）

連携研究者名：曾和 義幸（法政大学生命科学部 講師）

1. 研究の目的

大腸菌の多剤耐性に関わる主要な異物排出ポンプ（RND型）は、内膜トランスポーターAcrB、外膜チャンネル TolC、膜融合蛋白質 AcrA からなる複合体である。前二者はそれぞれ3分子、後者はおそらく6分子、合計わずか12分子ほどの蛋白質が協同的に働くことで機能している。ただし、TolCは他のトランスポーターにも共有される。それらのトランスポーターの発現は環境刺激によって誘導されるが、新たに合成されたトランスポーターは、既存の複合体中のものと置き換わるのか（TolCリサイクルモデル）、それとも新たに合成された TolC と複合体を形成するのだろうか（*de novo* 構築モデル）。また、基質薬剤の存在はポンプ複合体の会合・解離に影響するのだろうか。本研究では、この RND 型異物排出ポンプの構築・解離過程を明らかにすることを目的とした。具体的には、各コンポーネントに蛍光蛋白質を融合させ、蛍光イメージングによる細胞内動態解析を行う。このような観点からのポンプ研究はこれまでになく、細菌の生存戦略を理解するうえでも、感染症治療の効率化を図るうえでも重要である。

2. 研究成果

大腸菌の RND 型異物排出システムにおいて、外膜チャンネル TolC は共有されている。しかし、内膜トランスポーターと膜融合蛋白質で構成的に発現しているのは AcrB のみで、ほとんどは細菌の環境応答システムである二成分制御系によって発現が誘導される。本研究では、新たに合成されたトランスポーターが、すでに TolC と複合体を形成しているトランスポーターと置き換わり、新規複合体を構築するのか（トランスポーター交換モデル）という点を中心に解析を行った。

- ① AcrB-GFP 発現株の構築と動態の解析： AcrB と緑色蛍光タンパク質 GFP の融合体を染色体上から発現する株を構築し、さらに *tolC* 遺伝子欠失変異体も構築した。これらの菌株を全反射型蛍光顕微鏡で観察した結果、AcrB-GFP が TolC 存在下ではほぼ動かないのに対して、TolC 非存在下では激しく動いていた。これは、強固な籠状分子であるペプチドグリカン層（細胞壁）を貫く TolC と複合体を形成すると、AcrB が固定されることを示唆している。
- ② AcrB-GFP の動態に対する AcrD 強制発現の影響：内膜トランスポーターAcrD は、AcrA, TolC を AcrB と共有する。AcrB-GFP 発現株に AcrD をプラスミド上から強制的に発現させると、固定されていた AcrB-GFP が動き出すこと、この交換は AcrB 特異的輸送基質の添加により抑制される、すなわち基質を輸送している三者複合体は安定化されることを見出した。
- ③ AcrD-GFP 発現株の構築と動態の解析： TolC だけでなく、膜融合蛋白質 AcrA も AcrB と共有する AcrD について、緑色蛍光蛋白質 GFP との融合体を構築し、AcrD-GFP 誘導条件を検討した上で、野生型および *acrA*, *tolC* 遺伝子欠失のバックグラウンドで発現させた。これらの菌株を全反射型蛍光顕微鏡で観察した結果、AcrD-GFP が AcrA, TolC 存在下ではほぼ動かないのに対して、

AcrA または TolC が存在しないと激しく動いていた。これは、膜融合タンパク質 AcrA が RND 型異物排出複合体の安定化に必要であることを示唆している。

- ④ AcrB-GFP 発現株の分子数解析：AcrB-GFP が三量体を形成しているかについて調べた。具体的には、膜中で固定されている輝点の蛍光褪色過程を解析し、確かに三量体を形成していることが示唆された。

以上の結果は、トランスポーター交換モデルを支持するものである。これは、有害な物質を速やかに除去するためのシステムとして優れた特徴であると言える。

さらに、トランスポーター三量体形成と外膜チャネル TolC との複合体形成過程についても解析を行った。

- ⑤ MdtB と MdtC の三量体形成：内膜トランスポーター MdtB と MdtC は、2 分子の MdtB と 1 分子の MdtC が会合したヘテロ三量体として TolC、MdtA と複合体を構築することで最も高い排出活性を発揮する。この特徴を利用して、トランスポーター三量体形成過程の可視化を目指した。その結果、MdtB は細胞膜中で単量体・二量体・三量体それぞれの状態で存在できること、少なくとも MdtB ホモ三量体は MdtA 存在下で TolC と結合すること、しかし単量体・二量体でも MdtA 存在下で TolC と結合する可能性が考えられた。

今後の研究の展開に関する計画

- ① トランスポーター交換モデルの検証：AcrB-GFP 発現株において、AcrD と赤色蛋白質との融合体を発現させ、トランスポーター交換の過程を可視化する。
- ② 1 細胞における内膜トランスポーター、外膜チャネル、膜融合蛋白質の分子数とその変動を定量的ウエスタンブロッティング、超解像顕微鏡解析で計測する。
- ③ トランスポーター三量体形成と三者複合体形成過程に関する解析：内膜トランスポーター MdtB と MdtC のヘテロ三量体形成に関する解析を発展させる。また、内膜トランスポーター、外膜チャネル、膜融合蛋白質を別々の蛍光蛋白質と融合させ、共発現させることで、三者複合体形成過程を解析する。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. K. Yamamoto, R. Tamai, M. Yamazaki, T. Inaba, Y. Sowa, and I. Kawagishi: Substrate-dependent dynamics of the multidrug efflux transporter AcrB of *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **6**: 21909 (2016).

(その他)

【報道発表】学校法人法政大学「薬剤排出ポンプの主要部品を組み換えることで大腸菌が多剤耐性を獲得する仕組みを解明」2016年2月24日(2016年3月18日付「科学新聞」、2月29日付「化学工業日報」、2月29日付「日刊工業新聞」で報道)

少数のダイニンと微小管から成る振動系の作成と構造・機能研究

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115522

研究代表者名：広瀬 恵子（産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 主任研究員）

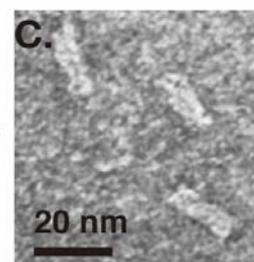
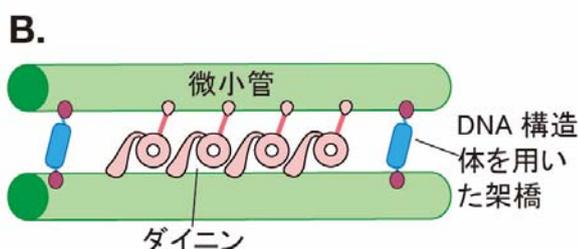
1. 研究の目的

繊毛・鞭毛の運動はダイニンの力発生によって駆動されるが、その周期的波打ち運動は、一方向に運動するダイニンの機能の足し合わせでは説明できない。軸系ダイニンは微小管上に密に配列し、隣接するダイニンとの相互作用による影響を受ける。また、微小管同士がネキシリンクと呼ばれる構造で架橋されることにより、ダイニンは微小管を介して他のダイニンが発生する力による制御を受け、振動運動能が生まれると考えられる。

本研究では、生体内で分子が規則的に配列し、協同的に機能するメカニズムを理解するためのモデル系として、数個～数十個のダイニン、2本の微小管、微小管同士を架橋する構造体から成る複合体の作成を目指す。微小管同士を架橋する構造を付加することにより、ATPを加えた時に複合体が解離することを防ぎ、運動中の構造観察が可能になる。クライオ電顕観察およびコンピュータ画像解析によって、運動中のダイニンの高分解能構造を解析する。個々の分子の構造を、隣接する分子の有無、それらの構造と関連づけて解析することにより、軸系ダイニン分子が協同的に働くことの意味とそのメカニズムを明らかにすることを目指す。

2. 研究成果

緑藻クラミドモナスから抽出した軸系外腕ダイニンを、*in vitro*で重合した微小管に加えて複合体を作成した。微小管の長さを1マイクロメートル程度に短くすることにより、2本の微小管の間に十～数十個のダイニン分子が規則的に並んだ複合体を作成することができた（図A）。ATPを加えた時、微小管同士が滑り合って複合体が解離すること



を防ぐため、DNA構造体を用いて微小管同士を架橋した（図B）。DNA構造体は、多田隈尚史博士（東大）の提供を受けた。DNA構造体を用いることの利点は、形状を比較的容易にデザインできること、架橋の有無を電子顕微鏡で観察できることである。DNA構造体の微小管への結合は、ビオチン化したチューブリンを含む微小管を用いてダイニン・微小管複合体を作成し、DNA構造体の両端をビオチン化してストレプトアビジンを介して結合させることによっておこなった。

まず、直径約6 nm、長さ17 nmのDNA構造体を用いて架橋を試みた。この構造体は、単独ではネガ

タイプ染色電顕法で観察できたが（図 C）、複合体に結合した時には、ダイニンなどの構造と区別して観察することが難しかった。従って、より大きな架橋構造を用いる必要があることがわかった。

研究期間終了後、DNA 折り紙架橋のデザインを工夫することにより、複合体を架橋する構造を電顕ではっきりと観察できるようになった。また、微小管への結合方法に改良を重ねることにより、架橋の効率を上げ、運動中のダイニンの構造観察に適した複合体を作成することができた。今後、この複合体の運動計測を行い、同時に高分解能構造解析を進める予定である。

3. 主な研究発表

(学会発表)

1. Hirose K, Yan K and Tadakuka H. Cross-linking the dynein-microtubule complex by DNA origami, 日本生物物理学会第 5 2 回年会発表 (2014)

【A03班】

少数性の生物学の理論構築と *in vitro*再構成による検証

少数分子反応ネットワーク理論の構築 —少数性と階層性の観点からのモデリング—

研究期間：平成23年度～平成27年度

研究課題番号：23115007

研究代表者名：富樫 祐一（広島大学理学研究科 特任准教授）

研究分担者名：小松崎 民樹（北海道大学電子科学研究所 教授）

連携研究者名：李 振風（北海道大学電子科学研究所 准教授）

寺本 央（北海道大学電子科学研究所 助教）

新海 創也（広島大学大学院理学研究科 特任助教）

Holger Flechsig（広島大学大学院理学研究科 助教）

1. 研究の目的

生命システムには、遺伝子をその代表として、細胞当たり少数個の分子で重要な役割を持つ成分が多数存在する。本研究課題では、1個から数万個と多種多様な成分が階層的に関与しあい、空間的にも複雑な構造を持つ生命システムに対して、その機能の高い動作安定性（＝頑健性）と適度な動作不安定性（＝可塑性・適応性）の両立をもたらすメカニズムを「細胞環境における分子の少数性・離散性」、「数ゆらぎ」、および「構成要素のターンオーバーと高次反応ネットワークの構造安定性」の視点から考察し、定量的に予測・検証することが可能な新しい理論と汎用な解析基盤技術を開発することを目的とした。実際に観測される1分子データなどから、背後の高次反応ネットワーク・階層的エネルギー地形、および、階層間の情報伝達の強さ・方向性、分子の少数性・離散性を定量化し、生命システムが頑健性と可塑性・適応性とを両立するメカニズムを検証することを目指した。

2. 研究成果

(1) 少数分子反応系の理論構築

分子の少数性が化学反応系の振舞いに非自明な影響、例えば濃度分布の変化や反応ネットワークの実効的組み替えを引き起こす可能性は、以前より示されていた。しかし、その多くは単純な、もしくはランダムに構成されたモデル反応ネットワークを用いて議論されていた。実際の細胞における反応ネットワークは多成分かつ著しく不均一である。そこで、少数分子成分を多数含む複雑な反応ネットワークの振舞いの定量的予言を目指した。

まず、上記のような性質を持つ触媒ネットワークモデルを構成し、シミュレーションによる考察を進めた。例えば、多機能な（多種の基質と反応できる）触媒と単機能な触媒とが混在したネットワークにおいて、系が小さい（分子が少ない）場合に、成分の平均濃度が、その触媒としての多機能性と系の大きさに依存して変化（条件により多機能触媒の濃度が上昇・下降）することなどを見出した。

次いで、数理的側面から少数分子の影響の考察を進め、できる限り一般の触媒反応ネットワークに対して、シミュレーションによらずその性質を予言できる理論の構築を目指した。「全体エルゴード性」などいくつかの条件を満たす2体触媒反応のネットワーク一般に対して、各成分の

濃度の平均・分散といった量を求める解析的枠組みを開発した。これらの量と系の大きさとの関係、すなわち、少数性の効果を予言する関係式が得られた。

また、細胞のように成分を再生産することにより成長・分裂する条件を課した高分子反応系モデルにおいて、系が大きすぎるとあらゆる雑多な反応が起こる一方で、小さすぎると再生産が不可能になる、即ち、分子が適度に少数であることが、反応ネットワークの再生産に重要であることが示唆された。

ここまでの研究は、単純な2体反応を基盤としたものであった。実際の生化学反応においては、個々の反応もまた複雑なダイナミクスを示すことがある。特に、酵素反応は一般に酵素分子の構造ダイナミクスと密接に関係（構造変化に依存した「状態」が存在）しており、その過程は大きな熱ゆらぎ・流体力学的ゆらぎにさらされる。こうした分子自体の動作のゆらぎと少数分子間の反応の確率的ゆらぎとが反応拡散系の振舞いに及ぼす影響を、新たな解析法を構築して検討し、両者の影響が質的に異なることを示した。

また、酵素をはじめ、多くの分子機械や分子複合体においては、内部の少数個の分子・サブユニット間での協調動作が重要である。その基盤となる構造変化・動力学的特性を、粗視化モデルを用いた動力学シミュレーションにより解析した。特に、協調動作に重要な、構造変化を介した力学的情報伝達の向きと強さを、外力を加えたシミュレーションにより評価する手法を構築し、ミオシン、アクチンなどのタンパク分子に適用して検証したほか、1分子 FRET によるアクチンの構造計測実験の結果とあわせた解析も行った。

この手法は様々なタンパク分子に用いることができる。領域内の実験対象である分子モーターなどに適用した（A03-2 今田班、公募 A02 曾和班・矢島班と連携）ほか、情報伝達の順序性の観点から、環状・らせん状の繰り返し構造を持つタンパクを対象として解析を行った。また、情報伝達が可能な人工構造モデルを進化的最適化により構成することにより、その一般的設計原理を考察した。加えて、多種の構造に対して、伝達特性を半自動的に評価する簡便な手法を開発した。

(2) 空間階層の異なる分子反応の連関を評価する解析理論構築

少数性生物学に関する計測は、シグナル／ノイズ（S/N）比が一般に悪く、かつ有限長のケースがほとんどである。データ駆動型アプローチにおいては、データの解釈に解析上のアーティファクトが現れる危険性があるため、ノイズ存在下での分子個性の評価、分子がもつ反応ネットワーク、エネルギー地形の構成法を開発した。

1分子酵素反応では、各素過程の反応速度定数は酵素分子がもつ多様な構造ごとに異なり、基質濃度が高くなると、ゆっくりと変化する酵素分子の多型構造に由来して、反応は多様な時間スケールのゆらぎを持つと解釈されている（dynamic disorder と呼ばれる）。この現象について、閾値を設定してレベルの変化を評価する従来法と情報理論に依拠する変化点解析法とを系統的に比較・解析した。S/N 比が無視できない場合ならびにバックグラウンドノイズが一定でない場合は、従来法は誤った解釈を導く可能性が極めて高いこと、従来法により dynamic disorder が存在すると考えられてきた α -キモトリプシンにおいて、その存在は実は認められないことなどを見出した。一方で、変化点解析法には、一般に背後の確率過程（尤度関数）を事前に定める必要があり汎用性が低いという問題が残されていた。そこで、尤度関数を前提としない変化点解析法も新たに開発し、領域内共同研究に活かした。

S/N 比が悪いデータの解釈を客観的に行うためには、有限のサンプル数および計測に由来する

実験誤差を定量化し、誤差が許容する範囲内でできるだけ詳細な分子の個性を読み取る必要がある。我々は、ブートストラップ法を用いることで、誤差の評価、誤差存在下での確実性の定量化が可能であることに注目した。情報理論における rate distortion 理論によるソフトクラスタリングを併用し、観測データから分子状態数・分子状態の安定性・自由エネルギー地形を読み解くアルゴリズムを開発した。この手法を AMPA 受容体の 1 分子計測時系列データに適用し、分子状態のネットワークやエネルギー地形とイオン透過活性との関係を明らかにした。

現実の実験では、蛍光強度と色素分子間距離の Förster 関係式のように、観測量と計測したい物理量の間には一般に非線形関係が存在する。そこで、観測量のばらつき（ノイズ）の非線形性を考慮に入れ、観測量から背後に存在する物理量の任意の関数を不偏推定する解析理論を開発した。本手法には、推定量の評価においてバイアス（推定値の期待値と真値との差）とリスク（推定値の平均 2 乗誤差）のどちらを優先するかをパラメタで設定でき、目的やデータの性質に応じて自由に調整できる特徴がある。1 分子 FRET のシミュレーションと実データを用いて評価した結果、従来の最尤推定法よりも真の物理量（距離）と良く一致することが確認された。

また、結合しているか離れているかといった、有限個で離散的な値をもつ分子の時系列データから、分子の状態を表現するネットワークを抽出し、将来取りうるデータ出力を予想する新しい解析手法を開発した。このような時系列データは、1 次元の非常に限定された情報であるため、その評価には恣意性が入り込む余地が大きい。そこで、観測データが保証していない情報を定量化する新しい指標（過剰情報量）を考案し、それを最小化することで、最もデータに忠実かつ客観的なネットワークを得ることを可能とした。この手法を酵素反応の 1 分子計測データに適用し、基質濃度に依存してネットワークが動的に変化することなどを明らかにした。

この他、少数性生物学において要素間の超コヒーレンスを定量化する方法論が必要とされていたことから、複数の少数個の輝点動態の集団挙動から背後に存在する階層的相関（2 体相関、3 体相関、……）を評価することを可能とする、多変量データ間の高次相関を定量化し、既約できないモジュール構造を抽出する情報理論的枠組みを開発した。また、細胞シグナル伝達における EGFR と Grb2 の分子間相互作用の 1 分子計測の理論解析を行い、背後に存在する階層的な反応ネットワークを抽出し、記憶を保持する状態（反応経路）と記憶を忘れる状態（反応経路）の存在を明らかにした。

(3) 領域内の実験対象に即した理論構築ならびに実験的実証

様々な系を対象とする「少数性生物学」研究の集結した新学術領域の特色を活かすべく、本研究では、領域内の共同研究、特に実験との連携を重視した。これにより新たに下記の研究が企画・実施された。

領域内の実験、特に 1 分子計測と関係した新たな試みとして、細胞内などにおける分子・粒子の拡散時系列から、化学反応と関係した非熱的ゆらぎを評価する手法を構成し、計測・解析に課される条件（時間分解能の上限）を明らかにした。べん毛モーターのサブユニット間、粒子に結合した複数のリニア分子モーター間の協調動作について、本手法を用いた時系列解析と、前述した粗視化モデルによるシミュレーションとの両面から検討を行った（A03-2 今田班、公募 A02 曾和班・矢島班と共同）。また、細胞など非一様環境下での拡散過程に対するエネルギー論的な観点からの考察も行った。

また、A02-2 前島班と共同で、転写因子による遺伝子探索過程のモデル化を進めた。遺伝子の

構造ゆらぎがその隙間での分子の拡散に強く影響することが示されていたこと (A02-2 前島班の成果) から、少数分子による探索では、分子の結合・反応が遺伝子構造を変化させる一方、遺伝子構造が探索・結合を変調する、相互の干渉が起こりうることが予想された。そこで、反応に伴う遺伝子構造変化を取り込んだ粗視化モデルを構築し、探索・結合の時空間パターンの解析を通じて、構造とそのゆらぎの影響の評価を進めた。この過程で、現実即したモデル構築のためには、局所的・動的な遺伝子構造情報を得ることの重要性が認識された。そこで、細胞核内でのヌクレオソームの1分子拡散時系列から局所的な構造情報 (ドメインの大きさやフラクタル次元) を推定する手法を開発し、実際の計測データを用いて評価した。

一方、データ駆動型のアプローチとして、マイクロ秒時間分解能での F_1 -ATPase 1 分子の非定常な回転時系列データ (A01-1 野地班) に対して、尤度関数を前提としない変化点解析法を応用した解析を行った。従来の手法では検出不可能であった、結合 ATP の加水分解反応に伴って起こる僅か (約 20°) の回転角度変化を検出し、それが反応順序の維持に果たす役割を明らかにすることができた。また、大腸菌における ATP 濃度の多様性を定量化する研究 (A01-1 野地班) に対して、蛍光スペクトルのピーク比と ATP 濃度の非線形関係を考慮に入れた不偏推定法を適用し、対数正規性の原因を検討した。

さらに、細胞状態・個性の問題に迫るべく、A01-1 野地班 (藤田克昌氏) と共同で、1細胞ラマンスペクトルに基づき細胞個性を分子階層で定量化する解析手法を開発した。また、植物細胞において、分子レベルの動態が細胞特性にどのように影響しているのかを明らかにするため、画像から細胞内の局所的微小管配向を誤差評価込みで推定する手法を構築した。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Satoru Tsugawa, Nathan Hervieux, Oliver Hamant, Arezki Boudaoud, Richard S. Smith, [Chun-Biu Li](#), [Tamiki Komatsuzaki](#), Extracting Subcellular Fibrillar Alignment with Error Estimation: Application to Microtubules, *Biophysical Journal* 110, 1836-1844 (2016). 査読有
DOI:10.1016/j.bpj.2016.03.011
2. Masaki Nakagawa, [Yuichi Togashi](#), An Analytical Framework for Studying Small-Number Effects in Catalytic Reaction Networks: A Probability Generating Function Approach to Chemical Master Equations, *Frontiers in Physiology* 7, 89 (2016). 査読有 DOI:10.3389/fphys.2016.00089
3. [Chun-Biu Li](#), Hiroshi Ueno, Rikiya Watanabe, Hiroyuki Noji, [Tamiki Komatsuzaki](#), ATP Hydrolysis Assists Phosphate Release and Promotes Reaction Ordering in F_1 -ATPase, *Nature Communications* 6, 10223 (2015). 査読有 DOI:10.1038/ncomms10223
4. J. Nicholas Taylor, [Chun-Biu Li](#), David R. Cooper, Christy F. Landes, [Tamiki Komatsuzaki](#), Error-based Extraction of States and Energy Landscapes from Experimental Single-Molecule Time-Series, *Scientific Reports* 5, 9174 (2015). 査読有 DOI:10.1038/srep09174
5. [Yuichi Togashi](#), Vanessa Casagrande, Spatiotemporal Patterns Enhanced by Intra- and Inter-Molecular Fluctuations in Arrays of Allosterically Regulated Enzymes, *New Journal of Physics* 17, 033024 (2015). 査読有 DOI:10.1088/1367-2630/17/3/033024
6. [Holger Flechsig](#), TALEs from a Spring — Superelasticity of Tal Effector Protein Structures, *PLoS ONE* 9, e109919 (2014). 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0109919

7. Hideyuki Yaginuma, Shinnosuke Kawai, Kazuhito V. Tabata, Keisuke Tomiyama, Akira Kakizuka, Tamiki Komatsuzaki, Hiroyuki Noji, Hiromi Imamura, Diversity in ATP Concentrations in a Single Bacterial Cell Population Revealed by Quantitative Single-Cell Imaging, *Scientific Reports* 4, 6522 (2014). 査読有 DOI:10.1038/srep06522
8. Soya Shinkai, Yuichi Togashi, Energetics of Single Active Diffusion Trajectories, *Europhysics Letters* 105, 30002 (2014). 査読有 DOI:10.1209/0295-5075/105/30002
9. Chun-Biu Li, Tamiki Komatsuzaki, Aggregated Markov Model Using Time Series of Single Molecule Dwell Times with Minimum Excessive Information, *Physical Review Letters* 111, 058301 (2013). 査読有 DOI:10.1103/PhysRevLett.111.058301
10. Tatyana G. Terentyeva, Hans Engelkamp, Alan E. Rowan, Tamiki Komatsuzaki, Johan Hofkens, Chun-Biu Li, Kerstin Blank, Dynamic Disorder in Single-Enzyme Experiments: Facts and Artifacts, *ACS Nano* 6, 346-354 (2011). 査読有 DOI:10.1021/nn203669r

(学会発表)

1. Tamiki Komatsuzaki, Toward Deciphering Cell Individuality in Systems Biology, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Symposium “Life at Small Copy Numbers”, 2015年12月20日, Honolulu, USA.
2. Tuichi Togashi, Reaction Networks with Small Copy Numbers of Molecules: Fluctuations and Beyond, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Symposium “Life at Small Copy Numbers”, 2015年12月19日, Honolulu, USA.
3. Tamiki Komatsuzaki, Single Molecule Biophysics: How Can One Dig the Underlying Network from Noisy and Short Time Series?, International Conference on “Challenges in Data Science: a Complex Systems Perspective”, 2015年10月14日, Torino, Italy.
4. Chun-Biu Li, The Key and Unlock Mechanisms in F₁-ATPase Unveiled by Single Molecule Time Series Analysis, The 4th Workshop on Molecular & Chemical Kinetics, 2015年9月7日, Berlin, Germany.
5. Tamiki Komatsuzaki, Energy Landscapes Constructed from Single-Molecule Time Series and Reaction Networks, The 2014 Les Houches - TSRC Protein Dynamics Workshop, 2014年5月21日, Les Houches, France.
6. Chun-Biu Li, When Computational Mechanics Meets Single Molecule Time Series, 2013 International Symposium on Nonlinear Theory and its Applications, 2013年9月11日, Santa Fe, USA.
7. Tamiki Komatsuzaki, Theories Should Meet Measurements: What Can We Extract from Data?, Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking, 2012年10月17日, Taipei, Taiwan.
8. Yuichi Togashi, Toward a Theoretical Framework for Reaction Networks in the Cell: Modeling in Consideration of “Minority” and Beyond, Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking, 2012年10月17日, Taipei, Taiwan.

(図書)

1. 小松崎 民樹, 1分子実験を読み解くための新しい実践型分子理論を目指して, 公益社団法人日本化学会 学術研究活性化委員会編, 第二次先端ウォッチング調査: 融合領域の創生「高次分子システムのための分子科学: 実験と理論の挑戦」(2012), pp. 31-34
2. Tamiki Komatsuzaki, Masaru Kawakami, Satoshi Takahashi, Haw Yang, Robert J. Silbey 編, John Wiley & Sons, “Single Molecule Biophysics: Experiment and Theory”, *Advances in Chemical Physics* 146 (2011), 512 ページ

少数分子生体システムの再構成 — 複合体構成分子の数の制御と理論検証 —

研究期間：平成 23 年度～平成 27 年度

研究課題番号：23115008

研究代表者名：今田 勝巳（大阪大学理学研究科 教授）

研究分担者名：内橋 貴之（金沢大学数物科学系研究科 准教授）

連携研究者名：南野 徹（大阪大学大学院生命機能研究科 准教授）

竹内 昌治（東京大学生産技術研究所 教授）

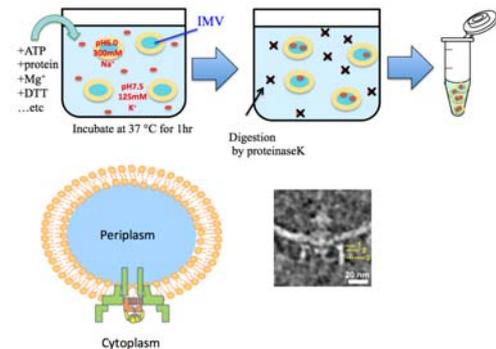
1. 研究の目的

本研究では、*in vitro* 輸送系を用いた輸送計測、*in vivo* での 1 分子計測、高度化した高速 AFM を用いた輸送装置構成蛋白質の構造変化計測などを組み合わせ、少数の分子のターンオーバーによって機能するべん毛輸送システムの分子機構を中心にべん毛形成の分子機構の解明を目指した。

2. 研究成果

(1) *in vitro* 輸送アッセイ系の構築

外部から様々な条件の変更や制御が可能な、III 型蛋白質輸送を計測するシステムをスフェロプラスト化したサルモネラから作成した反転膜を用いることで構築することに成功した。この系が輸送能を保持することを反転膜外に加えたフックキャップ蛋白質の反転膜内への輸送により確認した。また、この系が細胞内と同様の機能を保持することを、べん毛フックの反転膜内構築、輸送基質特異性の切替え、べん毛全体構造の反転膜内構築を行うことで実証した。

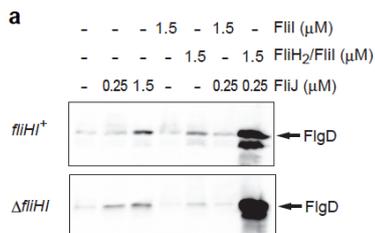


反転膜 *in vitro* 輸送アッセイ系の模式図と反転膜中の輸送装置の電子顕微鏡写真

(2) *in vitro* 輸送アッセイ系による輸送計測

反転膜系を用いて外部条件を制御した輸送計測を行い以下のような従来の説を覆す知見が数多く得られた。

① 溶液中に分散する輸送 ATPase 蛋白質により爆発的に輸送が促進される。



輸送 ATPase 蛋白質 (FliH, I, J) の添加による輸送促進効果

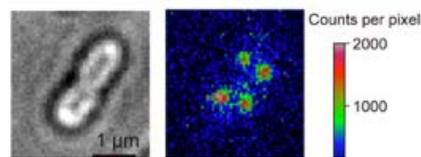
② ATP 加水分解エネルギーのみでも輸送が起こる。

③ クラス II 蛋白質の輸送に順序があり、輸送装置に輸送順序が決めるしくみが存在すること。

④ フックの長さ分布は添加する FliK の量のみで制御され、他の成分は不要なこと。

(3) 輸送装置蛋白質のストイキオメトリーとターンオーバーの計測

in vivo での 1 分子計測を行い、輸送ゲート中の FliF、FlhA 蛋白質のストイキオメトリーとターンオーバー(Mol. Microbiol. 2014)、輸送 ATPase のストイキオメトリーとターンオーバーの直接測定に成功し、輸送 ATPase 分子の入替わりは 1 分間に数回と少ないことが分かり (Sci. Rep. 2014)、効率的な輸送には輸送装置に組込まれない輸送 ATPase が細胞質中にある数存在することが必須であると判明した。



蛍光ラベルした輸送 ATPase の分布

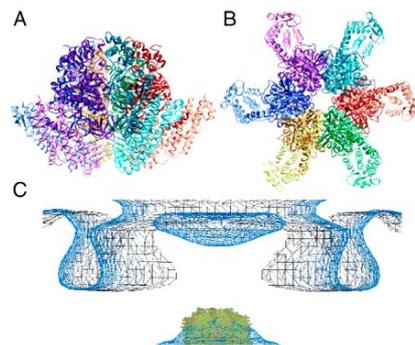
輸送 ATPase が細胞質中にある数存在することが必須であると判明した。

(4) 輸送エネルギー

輸送装置が H⁺ と Na⁺ のどちらもエネルギー源として作動すること(PLoS Path 2016)、FliI の ATP 加水分解速度はべん毛蛋白質輸送の律速にはならず、間欠的な ATP 加水分解が起これば H⁺ により連続輸送が可能となること(Sci. Rep. 2014)など、エネルギー変換に関する新知見を得た。

(5) 輸送装置部分複合体の構造と再構成

① 輸送ゲート構成蛋白質 FliP が 4 量体を形成することを示し、FliP ペリプラズム領域の結晶構造を明らかにした。
 ② 輸送 ATPase 複合体を形成する FliH-I 複合体の結晶構造を明らかにし、FliH が V-ATPase の peripheral stalk と同様の構造を持つこと、電子線トモグラフィー像との比較から輸送 ATPase 複合体の向きを明らかにした (Imada et al., Proc Natl Acad Sci USA 2016)。



輸送 ATPase 複合体の構造モデル

(6) タンパク質輸送システム構成要素の相互作用

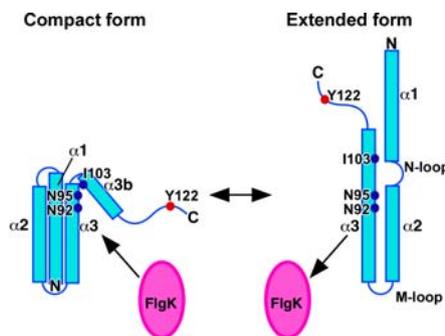
多機能性の少数分子である輸送シャペロンと輸送ゲート蛋白質との相互作用を中心に輸送に伴うシステム構成要素間の相互作用変化を明らかにした。

① 輸送 ATPase FliI は輸送段階に応じて 2 カ所ある輸送シャペロン FliT 結合サイトを変えること、FliT の C 末領域が FliI との結合を制御することを明らかにし、FliT による輸送制御の機構を解明した (Minamino et al., Mol. Microbiol. 2011)。

② 輸送シャペロン FlgN が FlhA の D1-D2 間の疎水くぼみと相互作用し、FlgN の C 末領域が相互作用を制御することを明らかにした (Minamino et al., Mol. Microbiol. 2011B)。

③ 輸送シャペロン FlgN の構造を解明し、alpha1 と alpha2 の間のループの構造変化により大きく形状を変えることで輸送基質、輸送装置蛋白質との親和性を大きく変え、輸送基質のゲートへの受け渡しを行うことを明らかにした (Kinoshita et al., Mol Microbiol., 2016)

④ シャペロン・輸送基質複合体の FlhAc に対する結合親和性の測定から、FlhAc への結合親和性の違いがべん毛形成順序と一致しており、べん毛繊維の輸送順序は基質複合体のゲートへの親和性の違いにより決定されることが



FlgN の構造変化が輸送基質の結合・解離を起こす様子を描いたモデル

示唆された。

⑤ FlhA を中心とした相互作用ネットワーク解析から、輸送装置タンパク質 FliJ と FlhA の相互作用を見だし、その部位を同定した(Ibuki et al., J. Bacteriol. 2013)。また、輸送装置蛋白質 FliH の N 端と FlhA の相互作用が輸送効率に大きく影響することがわかった(Hara et al., J. Bacteriol. 2012)。

⑥ FlhA の温度感受性変異体の解析から温度感受性の原因が D2 の可逆変性であることを明らかにした(Shimada et al., JMB, 2011)。

⑦ FliJ が V-ATPase の AB サブユニットと複合体を形成し、機能することを明らかにした(Kishikawa et al., PLoS One, 2013)。

⑧ ビブリオ菌べん毛基部体タンパク質 FlgT の構造解析から、ビブリオ菌べん毛形成メカニズムの一端が明らかになった(Terashima et al., PNAS, 2013)。

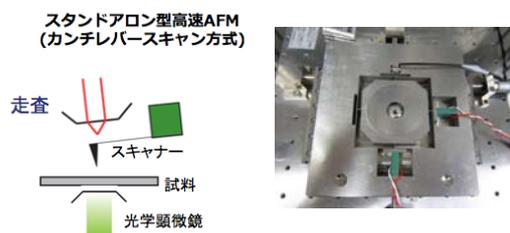
(7) 高速 AFM の高度化

高速 AFM の機能拡張や光学顕微鏡技術を融合することにより AFM を高度化した。

① テコの原理に基づく変位拡大機構と逆伝達関数法による振動制御を導入し、 $60\mu\text{m}\times 60\mu\text{m}$ を 10 秒以下で高速イメージングする AFM を開発した(Watanabe et al., Rev. Sci. Inst., 2013)。この装置で枯草菌の溶菌過程や磁性細菌のポーリンの観察を行い(Yamashita et al., J. Mol. Biol. 2012)、バクテリアの観察が可能であることを実証した。

② 蛍光観察用 CCD カメラと青色 LED を組み込み、GFP を発現細胞に対する AFM 探針の位置決め、アクチンフローや Exocytosis などの細胞表面形態変化が観察できることを実証した(Watanabe et al., Rev. Sci. Inst., 2013)。

③ ミラー駆動による光学トラッキングを導入して高速 AFM の独立走査ができる高速 AFM/ 蛍光顕微鏡複合装置を開発し、AFM と蛍光像を同視野・同時観察によりミオシン V の歩行運動やキナーゼのキチン結晶上での連続運動の同時観察に成功した(Uchihashi et al., Methods Enzymol., 2012; Fukuda et al., Rev. Sci. Inst., 2013)。

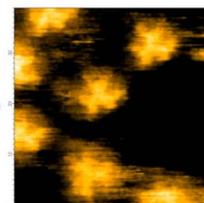


高速 AFM/ 蛍光顕微鏡複合機

④ 探針に金コロイドを付着させて増強蛍光により AFM イメージング領域のみ蛍光像増強を行うシステムを構築した。

(8) 輸送装置の高速 AFM による観測

輸送 ATPase 複合体は F1-ATPase と同様の構造を持ち、ATPase 活性を有する複合体を形成する。高速 AFM を用いて輸送 ATPase 複合体を観察し、Fli6 量体リング構造の観察に成功した。その結果、FliI 複合体リングは 6 回回転対称ではなく、2 量体が 3 つ配置したリングであること、添加ヌクレオチドと塩濃度により形態が大きく変化することを見いだした。



Fli6 量体リングの AFM 像

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Kinoshita M, Nakanishi Y, Furukawa Y, Namba K, Imada K, *Minamino T. (2016). Rearrangements of α -helical structures of FlgN chaperone control the binding affinity for its cognate substrates during flagellar type III export, *Mol Microbiol.* 93, in press.
2. *Imada K, Minamino T, Uchida Y, Kinoshita M, Namba K. (2016). Insight into the flagella type III export revealed by the complex structure of the type III ATPase and its regulator, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3633-3638
3. Uchihashi, T., Watanabe, H., Fukuda, S., Shibata, M., and *Ando, T. (2016). Functional extension of high-speed atomic force microscopy, *Ultramicroscopy* 160, 182-196.
4. *Shibata, M., Uchihashi, T., Ando, T., and *Yasuda, R., (2015). Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells, *Scientific Reports* 5, 8724 (7 pp).
5. *Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M, Aldridge PD, Namba K. (2014) The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis. *Scientific Reports* 4:7579.
6. *Ando, T., Uchihashi, T., and Scheuring, S. (2014). Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy, *Chemical Reviews* 114, 3120-3188.
7. Bai F, Morimoto YV, Yoshimura SD, Hara N, Kami-Ike N, Namba K, *Minamino T. (2014). Assembly dynamics and the roles of FlhI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. *Scientific Reports* 4, 6528.
8. Zhu S, Takao M, Li N, Sakuma M, Nishino Y, Homma M, Kojima S, *Imada K. (2014). Conformational change in the periplamic region of the flagellar stator coupled with the assembly around the rotor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 13523-13528.
9. Morimoto YV, Ito M, Hiraoka KD, Che YS, Bai F, Kami-Ike N, Namba K, *Minamino T. (2014). Assembly and stoichiometry of FlhF and FlhA in Salmonella flagellar basal body. *Mol Microbiol.* 91, 1214-1226.
10. *Igarashi, K., Uchihashi, T., Uchiyama, T., Sugimoto, H., Wada, M., Suzuki, K., Sakuda, S., Ando, T., Watanabe, T., and Samejima, M. (2014). Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin", *Nature Communications* 5, 3975.
11. Kinoshita M, Hara N, Imada K, Namba K, *Minamino T. (2013). Interactions of bacterial flagellar chaperone-substrate complexes with FlhA contribute to co-ordinating assembly of the flagellar filament. *Mol Microbiol.* 90, 1249-1261
12. Terashima H, Li N, Sakuma M, Koike M, Kojima S, Homma M, *Imada K. (2013). Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven Vibrio flagellar motor from the structure of FlgT. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110, 6133-6138.

(学会発表)

1. Uchihashi T. Visualization of single molecular dynamics at work with high-speed atomic force microscopy. The 7th Biennial Australian colloid & interface symposium. Hobart, Tasmania Australia. Feb. 3, 2015.
2. 寺島浩行, 川本晃大, 巽千夏, 南野徹, 難波啓一, 今田勝巳. 細菌鞭毛の III 型分泌装置の再構築. 第 88 回日本細菌学会総会. 長良川国際会議場(岐阜), Mar. 26, 2015

(図書)

1. Uchihashi T, Kodera N., Ando T. (2015) Noncontact Atomic Force Microscopy. Chapter 22: High-speed Atomic Force Microscopy., Springer., pp481-518.,

少数のタンパク質モーターによる神経細胞オルガネラ輸送の解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115702

研究代表者名：林 久美子（東北大学工学研究科 助教）

連携研究者名：岡田 康志（理化学研究所生命システム研究センター チームリーダー）

1. 研究の目的

神経細胞の細胞体からシナプスのある末端まで、ミトコンドリアなどのオルガネラ（細胞小器官）は微小管に沿ってタンパク質モーターに輸送されている。軸索中の大多数のタンパク質は細胞体で作られ軸索に沿って末端のシナプスまで輸送される。このため軸索輸送は神経細胞の成長と生存に不可欠である。本研究ではオルガネラを協同輸送するタンパク質モーター分子数を数えることを目的とする。少数のタンパク質モーターが協同で1つのオルガネラを輸送することで迅速で効率的な輸送が実現する。モーター分子数を数えるために、オルガネラに働く力を非平衡統計力学を用いて計測する技術を開発する。タンパク質モーターが力発生ユニットであるため、オルガネラに働く力の大きさから力発生ユニットの数が計測できる。

2. 研究成果

細胞小器官エンドソームを DiI を用いて蛍光イメージングした。タンパク質モーターに輸送されるエンドソームの重心位置を測定した。エンドソームの重心位置はタンパク質モーターに輸送され一方向に移動しながらも、熱ノイズ・周囲のベシクルとの衝突・タンパク質モーターの柔らかさなどが原因でゆらぐ。この非平衡ゆらぎを非平衡統計力学的手法で解析し、エンドソームに働く力の情報を得る。多数のエンドソームについて解析を行い、力の分布を作成した。その結果、力の分布は離散的であり、少数の力発生ユニットがあることが分かった。力を出すのはタンパク質モーターであるため、力発生ユニットの正体はタンパク質モーターである。力発生ユニットの数として1つのエンドソームを協同輸送するタンパク質モーター分子の数を数えることが可能になった。一方、光ピンセットを用いたキネシンモーターの1分子実験を行い、細胞内の実験をサポートする結果を得た。これらの実験から新規の力測定及び分子数測定法は成功していると考えられる。

神経細胞の軸索輸送障害は、アルツハイマー病を含む神経変性疾患と深く関連する。神経変性疾患の軸索輸送障害の分子メカニズムは分かっていない。そこで将来は、非平衡統計力学を用いた新規の分子数測定法でオルガネラ輸送を担うタンパク質モーター分子数を調べ、疾患による輸送機能低下と分子数の関係を探りたい。実際、本研究で開発した測定法の医療応用研究が日本医療研究開発機構の研究課題として採択された。測定法が神経科学分野の新しいツールとして定着するように社会に普及し、臨床研究に役立てたい。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. *[Hayashi, K.](#), Hasegawa, S., and Tsunoda, S. P. (2016). Giant enhancement of fluctuation in small biological

systems. **Journal of Statistical Mechanics**. *In press*

2. Hayashi, R., Sasaki, K., Nakamura, S., Kudo, S., Inoue, Y., Noji, H., and *[Hayashi, K.](#) (2015). Giant acceleration of diffusion observed in a single-molecule experiment on F1-ATPase. **Physical Review Letters**. *114*, 248101.
3. Kishikawa, J., Seino, A., Nakanishi, A., Tirtom, N. E., Noji, H., *Yokoyama, K., and *[Hayashi, K.](#) (2014). F-subunit reinforces torque generation in V-ATPase. **European Biophysics Journal**. *43*, 415-422.

(書籍)

1. [林久美子](#) (2014). 揺らぎ解析を使った出力計測「1分子ナノバイオ計測」, pp.213-215, 化学同人.
(分担執筆)

少数性転移を起こすコア反応モチーフの解析とその探索

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115704

研究代表者名：斉藤 稔（東京大学 総合文化研究科 助教）

1. 研究の目的

細胞小器官などの非常に微小な体積で起こる化学反応では、しばしば反応に寄与する分子の数が非常に少数になるといった状況が起こり得る。多くの場合、こういった分子の少数性は決定論的な濃度ダイナミクスのまわりの“ノイズ”として現れるにすぎないが、特定の化学反応系においては、少数性の効果が系の性質を質的に変えてしまう現象(双安定性の出現など)が起こりうると、理論的に示唆されて来た。しかしこの現象のはっきりとした定義や数理的表現はこれまで存在せず、どのような構造が大きな少数性効果を生むのかも不明瞭なままであった。またこのような非自明な少数性効果が生体内で起こり得るか、なんらかの生体機能に関連があるか、などは全く明らかになっていない。

本研究では、少数性現象の数理的基盤の構築と、生体内における少数性現象の発見および生体機能との関係を明らかにすることを目的として、少数性現象を引き起こす必要最低限の反応ネットワークモチーフがどのようなものかを理論的に解析し、少数性現象の基礎理論の構築を目指す。

2. 研究成果

我々は化学反応系における濃度の定常状態に注目し、このような少数性効果を数理的に特徴付ける手法を提案し、少数性現象における基礎理論を構築した[2]。この手法を用いると、与えられた化学反応系に少数性効果が起きるかどうかが、どのような効果が起きるのか、いくつからが“少数”であるのかに答えることが出来る。この手法を応用し、少数性効果を持ちうる化学反応モチーフの解析を行った結果、正のフィードバックを含むような化学反応系において少数性効果が容易に出現することを報告した。また少数性効果を引き起こす化学反応モチーフを組み合わせることにより、分子が少数のときと多数の時で化学反応フローが逆流するような新奇の少数性効果を発見し報告した[1]。

また生体機能に関連する少数性効果として、kinesin5 の一種である cin8 というキネシン分子が分子の数に応じて進む方向性を逆転させる現象に注目した。この現象は近年実験的に発見され、各分子モーターは固有の運動方向を持ち方向性が逆転することはない、という従来の基本概念を覆したため注目を集めたが、そのメカニズムも生体機能との関連もまったく不明であった。我々は数理モデルを用いた解析により、少数性効果によりキネシンの進む方向性が逆転するメカニズムを明らかにし、また紡錘体形成におけるこの方向性のスイッチの役割を議論した[3]。

今後の研究の展開に関する計画として、化学反応の少数性効果については、[1, 2]で報告した研究では扱いきれなかった、“分子の拡散を考慮した”反応拡散系における少数性効果”について考察やシミュレーションを行っている。生体膜状の化学反応など、遅い拡散に支配されている生体内化学反応では新奇の少数性現象が起こるのではないかと考え、生体機能との関連も合わせて研究を継続していく予定である。

またキネシンにおける少数性効果については、現在、cin8 の持つ方向性がスイッチする少数性効果の

生体機能を明らかにするため、紡錘体形成のシミュレーションを行うといった研究を継続している。このキネシンは文脈に応じて進む方向性を変化させ、かなり巧妙に紡錘体形成を制御しているのではないかと目論んでいる。また *in vitro* 再構成実験の専門家との共同研究を進め、提唱した理論の確認やさらなる理解に向けての研究を発展させている段階である。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. N. Saito* and K. Kaneko, "Theoretical Analysis of Discreteness-Induced Transition in Autocatalytic Reaction Dynamics" PHYSICAL REVIEW E, Vol. 91, 022707, pp.1 – 7, (2015)
2. N. Saito*, Y. Sughiyama and K. Kaneko "Motif Analysis for Small-Number Effects in Chemical Reaction Dynamics" The Journal of Chemical Physics, Vol.145, 094111, pp1-7, (2016)
3. N. Saito*, and K. Kaneko. "Embedding dual function into molecular motors through collective motion." *Scientific Reports* 7, pp1-8, (2017).

生体高分子が化学反応ネットワークに与える微小空間効果の解明

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：24123456

研究代表者名：市川 正敏（京都大学理学研究科 講師）

連携研究者名：西上 幸範（京都大学理学研究科 研究員）

1. 研究の目的

細胞が持つ微小空間で起こる生化学反応は生命現象の根幹を担っている重要な系である。最近、膜小胞や微小水滴、マイクロ流路などを利用した微小反応場において、生化学反応が試験管サイズのバルク溶液条件と異なっているという報告がなされている。反応の種類も条件も様々である事から、その機構を統一的に断じる事はできないが、マイクロサイズの容器で相対的に広がる表面の効果や、溶液を封入する時の分子の少数性が関わっている事を強く示唆する結果が多い。本研究では、“微小空間特異的に形成される構造と、それが化学反応に与える物理的效果”とその様な系が自発的に形成される経路として“DNA分子が微小空間に取り込まれる時の特異性”の2つの課題にフォーカスして、微小空間効果のあらわれとその機構の解明を目指した。

2. 研究成果

まず、生体分子が微小空間に自発的に封入されるプロセスの開発とその物理化学を解明する為に、代表的な生体分子であるDNAと脂質膜小胞を用いて実験を行った。自発的な封入が起き得るものとして、乾燥・再水和におけるDNA封入効率をリアルタイム蛍光観察し、種々の条件を検討した結果、乾燥膜内に取り込まれたDNAを核としてリポソームの成長が起きる事を確認した(図1)。ここで乾燥膜内のDNAは相分離構造を示しており、絡まり合うと封入効率が激減する。この性質を高分子のダイナミクスや粘弾性相分離といったソフトマター物理の枠組みで説明する事ができた。更に、この知見を生かして、特に長いDNAの封入効率を劇的に高める事に成功した。しかし、再水和時の詳細な過程はミリ秒で終わる高速現象であったため、実際のプロセスは不明であった。これを明らかにする為に、放射光施設においてX線小角散乱実験を行い、封入直前の脂質膜層挙動を観察した。これによりDNAの長さに応じた粘弾性挙動が明らかになり、絡まり合い等の物性がダイナミクスに大きく関与する事が確認できた。

一方、微小空間の効果に関して、空間が直接的に関与すると思われる構造形成に着目し、運動タンパク質を用いる事で小胞形状などの動態を直接観察して評価する事を試みた。まず、液滴の内部にアクチンとミオシンからなる運動タンパク質を封入し、膜界面との引力相互作用を通じて、自発的な変形運動が顕れる実験系を確立した。このとき、短時間領域では液滴表面に激しいゆらぎが観察された。これは、大きなスケールで既に報告されていたアクチンミオシンゲル内部の非平衡ゆらぎが、界面を持つ事でゆらぎ変形運動へと変換されたものであり、微小液滴によってゆらぎが運動へと変換された一種の微小空間効果であると推定している。更に、長時間領域では液滴表面にアクチンとミオシンのコルテックス(殻)が形成されてゆき、その状態で駆動する事で液滴へこみ挙動が顕れる事を発見した(図2)。これら実験画像からへこみの特徴的な大きさを解析する事で、液滴サイズ依存的なへこみ変形となっている事を確認した。

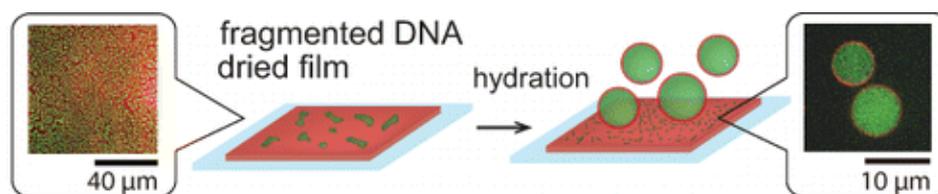


図1. DNAが膜小胞に取り込まれた様子。

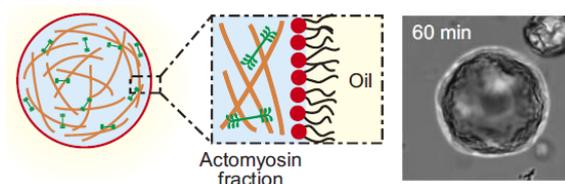


図2. 液滴模式図と座屈変形した液滴。

本研究課題の直接的な発展としては、研究期間中に明らかに出来なかったアクチンミオシンゲルの非平衡ゆらぎと界面のゆらぎ運動との相関を明らかにすることを計画している。また、DNAの膜小胞への封入に関しても、得られた成果から少数性につながる仮説を立てる事が出来たので、その検証に取り組む計画である。これら微小空間での物理化学の知見を重ねる事で、本課題で取り組んだ限られた事例から更に拡張していき、微小空間効果やそれに伴う少数性の生物学的な意義を物理化学として明らかにしていく事を目指す。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. *Shimobayashi, S. F., Ichikawa, M., and *Taniguchi T. (2016). Direct observations of transition dynamics from macro- to micro-phase separation in asymmetric lipid bilayers induced by externally added glycolipids. **Europhysics Letters** 113, 56005/1-6.
2. Nishigami, Y., *Ito, H., Sonobe, S., and *Ichikawa, M. (2016). Non-periodic oscillatory deformation of an actomyosin microdroplet encapsulated within a lipid interface. **Scientific Reports** 6, 18964/1-11.
3. *Ito, H., Nishigami, Y., Sonobe, S., and *Ichikawa, M. (2015). Wrinkling of a spherical lipid interface induced by actomyosin cortex. **Physical Review E** 92, 062711/1-8.
4. *Hamada, T., Fujimoto, R., Shimobayashi, S. F., Ichikawa, M., and Takagi, M. (2015). Molecular behavior of DNA in a cell-sized compartment coated by lipids. **Physical Review E** 91, 062717/1-5.
5. *Shimobayashi S. F., and *Ichikawa, M. (2014). Emergence of DNA-Encapsulating Liposomes from a DNA-Lipid Blend Film. **Journal of Physical Chemistry B** 118, 10688-10694.

(書籍)

1. 西上幸範, 伊藤弘明, 市川正敏, (2015). 試験管内再構築系を用いたブレブ駆動型アメーバ運動機構の研究, 植物科学最前線 6, 82-91
2. 市川正敏, (2014). 原生生物をより深く理解するための物理「原生生物フロンティア 洲崎敏伸 編」(DOJIN BIOSCIENCE SERIES), ISBN: 9784759815177, 化学同人。(分担執筆)
3. 濱田勉, 市川正敏, (2014). 人工細胞システムの創成と構造制御, 生化学第 8 6 巻第 2 号, pp. 209-213

細胞分裂時のゲノム分配における 1 分子性のモデル研究

研究期間：平成 26 年度～平成 27 年度

研究課題番号：26115713

研究代表者名：鈴木 宏明（中央大学理工学部 教授）

1. 研究の目的

細胞内におけるゲノムの「数」は、真核細胞であれば有糸分裂において様々なモータータンパク質等の協同的作業により制御されている。大腸菌などの原核細胞では、高度な制御機構がないものの、成長・分裂過程において 1 細胞あたり 1 ゲノム DNA がうまく入っている。Jun と Mulder は、大腸菌の細胞膜・壁内の非常に小さな領域に押し込められたゲノム DNA のモンテカルロシミュレーションを行い、DNA がエントロピー的に自己排除する効果で DNA の分配が遂行されるという説を提唱した。また、Errington の研究グループは、細胞壁や分裂に必要なタンパク質を持たないバクテリア（枯草菌）でも、増加した膜がちぎれるように分裂し、増殖することが可能なことを示した。これらの報告は、原始的な細胞またはモデル細胞が成長して分裂する際に、特別な機構を持たずとも倍加した DNA が均等に分配され得ることを示唆している。

2. 研究成果

本研究では、モデル細胞膜としてジャイアントユニラメラリポソーム(GUV)を用い、それが細胞分裂様に変形する際に、中に封入したゲノムサイズの DNA がどのように分配されるかを検証した。具体的には、長さが約 1.6×10^5 塩基対、回転半径が約 $1 \mu\text{m}$ である T4 ファージ由来のゲノム DNA を直径 $5 \sim 20 \mu\text{m}$ 程度の GUV に封入し、浸透圧ショックを加えることで分裂様の変形を誘起した。また、細胞内の混雑環境を模擬するため、分子量 20k Da のポリエチレングリコール(PEG)を 0~8wt% の濃度で共封入し、その影響を調べた。その結果、DNA が変形した娘細胞膜に比較的均一に分配されるには、膜変形の手がかりが影響すること、また、GUV 内が混雑環境にある場合、速い膜変形においても DNA の分配が実現されることを明らかにした。

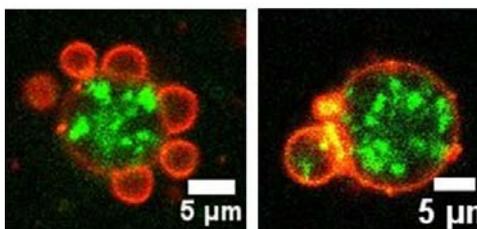


図 1 外部刺激によりさまざまな形状または形態に変化するジャイアントユニラメラリポソームの蛍光顕微鏡像。

本研究では、ゲノムサイズの DNA を内封したジャイアントリポソームが様々な内的・外的要因により多様な形態や状態の変化を見せること、そして、その統計的な傾向を明らかにすることができた。リポソームの分裂や脂質ナノチューブ形成など、生細胞の形態や挙動に類似の現象が起きる領域を明らかにすることができ、原始的生命の議論や産業用人工細胞の創生に向けた基礎的な知見を得た。膜

と DNA の相互作用において新奇な現象も観察されており、今後は系の要素を増やした際の挙動を調べていくことで、原始的な細胞の挙動のレパートリーを開拓していく。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Tsuda S, Fujii S, Suzuki H, Yomo T*. Shape transformations of lipid vesicles by insertion of bulky-head lipids. Plos One, 10, e0132963, (2015).
2. Shiomi H, Tsuda S, Suzuki H, Yomo T*. Liposome-based liquid handling platform featuring addition, mixing, and aliquoting of femtoliter volumes. Plos One, 9, e101820, (2014).
3. Tsuda S, Suzuki H, Yomo T*. Statistical analysis of vesicle morphology dynamics based on free energy landscape. Soft Matter, 10, 6038-6046, (2014).
4. Suzuki H*, Mitsuno K, Shiroguchi K, Tsugane M, Okano T, Dohi T, Tsuji T. One-step micromolding of complex 3D microchambers for single-cell analysis. Lab Chip, 17, 647-652, (2017).

(学会発表)

1. Okano T, Suzuki H, Yomo T*. Liposome-based Liquid Handling for Biochemical Reactions. Proc. μ TAS 2015, 2032-2034, Gyeongju, Korea (2015).
2. Takahashi K, Okano T, Suzuki H*. Liquid Handling of Minute Volume Using the Hydrogel Encapsulating Liposomes. Proc. μ TAS 2015, 478-480, Gyeongju, Korea (2015).
3. Mitsuno K, Ikeda H, Tsugane M, Okano T, Shiroguchi K, Suzuki H*. 3D-shaped microchamber for the Single-cell Analysis,” Proc. μ TAS 2015, 522-524, Gyeongju, Korea (2015).
4. 7. H. Suzuki*. Distribution of genome-size DNA in the dividing model cell membrane. Pacificchem 2015, Hawaii, USA, (2015).
5. Okano T, Suzuki H, Yomo T*. Liposome-based liquid handling for biochemical reactions. Pacificchem 2015, Hawaii, USA, (2015).

シグナル伝達系におけるゆらぎの生成と伝搬の少数性生物学

研究期間：平成26年度～平成27年度

研究課題番号：26115722

研究代表者名：柴田達夫（理化学研究所 生命システム研究センター チームリーダー）

連携研究者名：中村 直俊（理化学研究所 生命システム研究センター 研究員）

Prabhat Shankar（理化学研究所 生命システム研究センター リサーチアソシエート）

1. 研究の目的

細胞の走化性シグナル伝達系は、外部の誘引物質のきわめてゆるやかな濃度勾配を検出し、適切に応答することができるが、微弱でノイズに満ちたシグナルからどのように適切に情報を取り出せるかは生物学が取り組むべき大きな課題である。本研究では、走化性情報処理の鍵となるイノシトールリン脂質反応において生成されるノイズと、その上流から伝搬してきたノイズを解析する。このため、2重レポーターイメージングを用いた新しいノイズ計測法を確立する。シグナルとノイズの関係を示す式として以前に提案した **gain-fluctuation relation** を拡張し、適応反応などの複雑な反応や、その時間空間的なふるまいを記述できる理論を構築する。これにより走化性シグナル伝達系がノイズにどのように対処し、また利用しているのかを明らかにするとともに、他のシグナル伝達系にもあてはまる、確率的な情報処理システムの動作原理を解明する。

2. 研究成果

適応現象におけるノイズと応答の関係の解明：適応は、環境の刺激に応答を示した後に、元の状態に戻る現象で、大腸菌の走化性や酵母の浸透圧応答などに見られる。完全な適応は、incoherent feedforward loop (iFFL) と negative feedback loop (nFBL) の2種類のネットワーク回路によって実現される。2つの回路において、理論により次のことがわかった (Shankar et al., 2015)。1) iFFL と nFBL の両方で、応答の大きさは内在ノイズの大きさに制限される。2) 多くのパラメータ条件に対して、nFBLの方が一般に大きな応答を示す。一方、完全な適応を実現する上では、iFFLの方がよりロバストである。3) 適応に内在するノイズに比べて、環境刺激に含まれるノイズの影響は小さい。今回得た結果は、適応現象を示す実際の細胞のシグナル回路に iFFL よりも nFBL が多いことの1つの説明になるかもしれない。

シグナル伝達系におけるノイズ伝搬の定量：細胞性粘菌を用いて、走化性に重要な役割を果たすイノシトールリン脂質シグナルのノイズの可視化に取り組んだ。このために、2重レポーターイメージングという新しいノイズの可視化手法を開発した。これを PTEN の反応にともなう intrinsic noise と、PTEN の上流のシグナルで生成し伝搬するノイズを精密に分けて定量することができた。

今後の研究の展開に関する計画として、上記の知見をさらに発展させるために、理論と実験の両面から、intrinsic noise と伝搬するノイズの動態の解析を進めていく。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Naotoshi Nakamura, Tatsuo Shibata, (2015) Bifurcation analysis of a self-organizing signaling system for eukaryotic chemotaxis, *Japan Journal of Industrial and Applied Mathematics*, 32, 807-828
2. Katsuhiko Sato, Tetsuya Hiraiwa, Tatsuo Shibata, (2015) Cell chirality induces collective cell migration in epithelial sheet, *Physical Review Letters*, 115, 188102
3. Prabhat Shankar, Masatoshi Nishikawa, Tatsuo Shibata, (2015) Adaptive responses limited by Intrinsic Noise. *PLoS ONE*, 10(8): e0136095.
4. 柴田達夫, 西川正俊, 上田昌宏 (2014) ゆらぎの伴うシグナル伝達系による走化性細胞のロバストな勾配センシング *細胞工学* 33: 5. 592-597.

少数分子世界の細胞情報伝達理論

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：12904513

研究代表者名：石原 秀至（東京大学総合文化研究科 助教）

1. 研究の目的

外界のシグナル分子の濃度情報を読み取ることは、単細胞の走化性から、個体発生で起きるような細胞集団の移動まで、重要な生体機能の基盤となる。この過程では、細胞表面のレセプター分子への結合が、細胞内シグナル伝達系をへて処理されるが、リガンド結合や化学反応の過程が確率的であることから、特に外界のシグナル分子数が少ない場合には相対的にゆらぎが大きくなり、外界のシグナルを読み取るという情報処理が難しくなる。実際には、細胞はゆらぎが大きい中でも正しく濃度勾配を読み取ることが示唆されている。本研究では、細胞内の情報処理機構について、理論モデルについて調べた。

2. 研究成果

① 信号の時間的変化と空間的変化の使い分け：一般に、真核細胞はシグナル濃度の空間的勾配を読み取る、空間勾配センシングだと考えられてきた。しかしながら、細胞性粘菌の集合期ではシグナルは螺旋波をなし、個々の細胞にとっては勾配が時間的に正負に変化するので、空間勾配センシングでは細胞の方向性のある運動は説明できなかった（走化性のパラドックス）。中島昭彦博士（東京大学澤井研究室特任助教）がマイクロ流路で動的なシグナル波を作るデバイスを用い、様々な速度や濃度プロファイルでシグナルを細胞に与え、同時に一細胞の動きと Ras 応答を調べた所、細胞は空間勾配だけでなく時間的変化の正負も同時に読み取っていることを見出した。この観察結果は、先行研究で提案された Local excitation global inhibition (LEGI) モデルでは説明できなかった。そこで、LEGI モデルを拡張する形で新規モデルを提案し (ultrasensitive-LEGI モデル)、現象を説明することに成功した。このモデルの数理解析を通じて、実験結果を定量的に解釈できることを示した (Nakajima et al., 2014, Nat. Comm. 5, 5367 1-14)。

② 分子のバラツキ（分子間の「個性」）がシグナル伝達に寄与するのではないかという可能性を検討した。N 個のレセプターがある系を数値計算、解析計算をすることにより、全く同じ素子があるより、少しずつ異なったものが存在している方が、(i) ダイナミックレンジが上がり、(ii) SN 比 (Signal to Noise ratio) もあがるので、全体としてよいパフォーマンスを示すということを示した。単一のレセプターで Berg-Percell 限界というものが知られていたが、一つのレセプターあたりでは、この限界よりよい働きが可能なことも示すことが出来る。ただし、情報論的には、特徴づける量によって逆の結論もしめされることもわかってきて、より注意深く詰める必要がある。

今後の研究の展開に関する計画

上記①について、モデルは細胞性粘菌の集合期前期と一致するが、後期では、細胞内の極性が強く現れていることが分かってきている。この極性形成が、細胞の情報処理能力と運動にどのように影響を

与えるかを調べている。また、情報論的観点から

上記②について、時間的な変動を支配するパラメータ（リガンドの乖離レート）のバラツキが情報能力をあげることが示唆されており、シミュレーションと解析をすすめている。また、解析手法（情報論的アプローチとゆらぎの解析）によって矛盾する結果が得られている。この結果が理論的形式の不備なのか、問題設定の不良性に設定するのか、検討中である。もし前者の場合、理論的立場からは、既存手法の見直しにつながる。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Nakajima A, Ishihara S, Imoto D and Sawai S* (2014) Rectified directional sensing in long-range cell migration. Nat. Comm. 5, 5367 1-14
2. Saito N*, Ishihara S and Kaneko K. (2014) Evolution of Genetic Redundancy: The Relevance of Complexity in Genotype-Phenotype Mapping. New J. Phys. 16, 063013
3. Saito N*, Ishihara S, and Kaneko K (2013) The Baldwin effect under multi-peaked fitness landscapes: Phenotypic fluctuation accelerates evolutionary rate. Phys. Rev. E, 87, 052701
4. Kondo, Y., Kaneko, K. and Ishihara, S. (2013) Identifying dynamical systems with bifurcations from noisy partial observation Phys. Rev. E 87, 042716
5. Taniguchi D, Ishihara S, Ohnuki T, Honda-Kitahara M, Kaneko K. and *Sawai S (2013) Phase geometries of two-dimensional excitable waves govern self-organized morphodynamics of amoeboid cells. PNAS 110, 5016-5021

(総説)

1. 中島昭彦, 石原秀至, 澤井 哲 「動く細胞が読み取る時間と空間：走化性のパラドクスと整流作用」 生物物理 56(2), pp98-101
2. 石原 秀至, 澤井 哲 「反応-拡散-駆動系として理解する細胞の形態変化」 日本物理学会誌 第 70 巻第 1 号 pp. 25-30
3. 澤井 哲, 石原 秀至, 中島 昭彦 (2013) 1 細胞イメージングから見る細胞内シグナルの自己組織化現象, 実験医学 31 1217-1223

マイクロ小胞内DNAの分子挙動と微小空間特性

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115505

研究代表者名：濱田 勉（北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科 准教授）

1. 研究の目的

DNA 分子を内部に含む細胞サイズ膜小胞を構築し、分子複合システムの微小空間特性（分子少数性および膜表面効果）を解明することを目的とする。従来行われてきた試験管内での生化学実験では、細胞がおかれている境界条件（マイクロメートルの微小空間）は無視されてきた。しかし、細胞サイズの微小空間になると、試験管サイズでは現れてこなかった特異性（細胞内の分子数が少ない事による揺らぎの効果やサイズが小さい事による表面効果など）が顕在化する。そこで、遺伝子 DNA の高次構造転移に着目し、膜小胞内における分子挙動を観察する。DNA は細胞内の代表的な少数分子であり、その高次構造は遺伝子発現反応と密接に関わっている。DNA 高次構造変化の微小空間特性を明らかにすることで、細胞内の少数分子システムの特性を理解する。

2. 研究成果

細胞内に存在する長鎖の DNA 分子は、イオン濃度などの水溶液条件に応じて、fold 状態（密に折れ畳まれた構造）と unfold 状態（ランダムコイル構造）を転移する事が知られている。細胞サイズの単分子膜油中液滴（膜小胞）を用いて、細胞モデル空間を作り出し、小胞内での T4 ファージ DNA 分子挙動を解析した。実験の結果、小胞の空間サイズに依存して、DNA が膜に特異的に吸着することを見出した。また、fold 状態の DNA 分子が膜面に吸着した後 unfold 状態に変化する現象を発見し、この unfolding 転移の確率もまた小胞空間サイズに依存した。これらの DNA 分子挙動を決定づける膜小胞サイズは、典型的な細胞サイズである $10\sim 100\ \mu\text{m}$ と等しかった。さらに、小胞内の DNA 分子および多価カチオンの自由エネルギーを定式化し、物理メカニズムを明らかにした。これは、微小空間に閉じ込められた有限個数の分子システムの挙動が、小胞空間サイズに依存して変化することを示している。成果は、Phys. Rev. E 誌に掲載された。

また、細胞の再構成実験の器となる細胞サイズリポソームの形成メカニズムの解明に取り組んだ。油中液滴がリポソームへ移行するダイナミクスの詳細を検討し、実験と理論の両面から移行メカニズムを明らかにした。細胞サイズの約 $10\ \mu\text{m}$ という大きさが、液滴からリポソームへの移行に最も効率が良いという興味深い知見が得られた。この成果は、Soft Matter 誌の表紙を飾った。

細胞サイズ膜小胞の微小空間特性をさらに調べるため、DNA 以外の分子系を小胞に封入する実験に取り組む予定である。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Hamada T*, Fujimoto R, Shimobayashi S, Ichikawa M. and Takagi M*. Molecular behavior of DNA in a cell-sized compartment coated by lipids. Phys. Rev. E, 91,62717-1-062717-5, (2015)
2. Ito H*, Yamanaka T, Kato S, Hamada T, Takagi M, Ichikawa M*. and Yoshikawa K*.. Dynamical formation of lipid bilayer vesicles from lipid-coated droplets across a planar monolayer at an oil/water interface. Soft Matter 9, 9539-9547, (2013)

(その他)

1. 下林俊典、濱田勉、ベシクルの複合化による人工細胞構築の新展開、人工細胞の創製とその応用、シーエムシー出版、第2章/第4節、67-74(2017)
2. 濱田勉、市川正敏、人工細胞システムの創成と構造制御、生化学, 86(2), 209-213 (2014).

モデル生体膜の物質封入における 1 分子性の物理化学的基盤の解明

研究期間：平成 24 年度～平成 25 年度

研究課題番号：24115514

研究代表者名：鈴木 宏明（中央大学理工学部 准教授）

1. 研究の目的

細胞は細胞質成分を含む膜の袋であり、ゲノムに代表される内封少数物質がその細胞の表現型を決定する。そのためには、細胞分裂時にゲノムの 1 分子性が保たれている必要がある。本研究では、人工のモデル細胞膜を用い、有糸分裂にみられるタンパク質の高度な制御がなくともゲノムと同程度のサイズの物質の等分配が起こり得るとする仮説の検証を行った。

2. 研究成果

モデル細胞膜の分裂変形を誘起するために、浸透圧法と PEG 修飾脂質の添加する方法の 2 種類を試した。その結果、後者で高効率の分裂様変形が観察されたので、この方法を採用した。24 年度は、ゲノムのモデル物質として、直径が 1～3 マイクロメートルのポリスチレンビーズの分配を統計的に検証し、ビーズの大きさがリポソームの大きさに近づくと等分配確率が有意に上昇することを確認した。25 年度は、実際の巨大 DNA であるラムダファージ DNA を用い、この仮説を検証した。ラムダファージ DNA はその回転半径が約 1 マイクロメートルであるが、その分配確率は直径 1 マイクロメートルのポリスチレンビーズとほぼ同様の値を示し、モデル膜の大きさが内封物質の大きさに近いほど等分配となる確率が上昇することを示した。この成果により、細胞分裂時のゲノム分配制御機構がない非常に原始的な細胞においても、ゲノムの分子が大きい（すなわち細胞膜のサイズに近い）ことでゲノムの 1 分子性が担保されることが確認された。

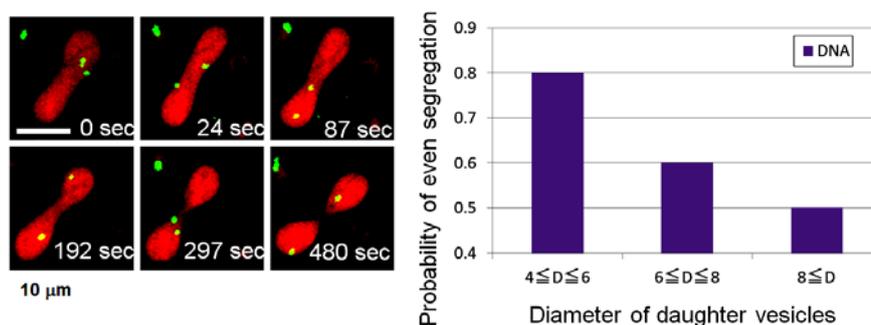


図 1 (左) 分裂様変形を起こすジャイアントリポソーム中に封入された 2 個の λ DNA 分子が、娘細胞に等分配される連続画像。Scale Bar: 10 μm . (右) 同実験により明らかにした、娘細胞のサイズと分配確率の関係 (単位は μm)。娘細胞のサイズが小さいほど、すなわちベシクルサイズが DNA のサイズに近接するほど、等分配となる確率が上昇する。

本研究では、脂質膜(GUV)と内封した巨大分子の相互作用を扱い、細胞質の体積と同程度の体積を持つ分子は自身の排除体積により娘細胞に等分配されやすいことを示した。しかし、実際の細胞質内には、タンパク質や小器官などさまざまな混雑分子が高濃度で存在している。より生細胞に近い条件において起こる現象を確認する必要がある、その内容が本領域後期の公募課題申請につながった。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. Sakakura T, Nishimura K, Suzuki H, Yomo T*. Statistical analysis of discrete encapsulation of nanomaterials in colloidal capsules. *Analytical Methods*, 4, 1648-1655 (2012).

(総説)

1. 鈴木宏明*, 「脂質膜ダイナミクスからみる原始細胞の起源」, *生物物理*, 53, 134-139, 2012.

(学会発表)

1. Sakakura S, Nishimura K, Suzuki H, Yomo T*. Statistical Analysis of the discrete encapsulation of nanomaterials in colloidal capsules. 244th ACS National Meeting, Philadelphia, PA (2012).
2. Tsuda S, Suzuki H, Yomo T*. Statistical Analysis of Liposome Budding Dynamics Based on Free Energy Landscape. 13th Int. Conf. Simulation & Synthesis of Living Systems (Afile 13), 623-624, Michigan, USA (2012).
3. Shiomi H, Tsuda S, Suzuki H, Yomo T*. Manipulation of liposome-based bioreactor featuring adding, mixing, and aliquoting femtoliter volumes. *Proc. μ TAS 2013*, 1048-1050, Freiburg, Germany (2013).

細胞内反応場の実効的分子数の少数性と状態・機能最適化の統計力学的研究

研究期間：平成24年度～平成25年度

研究課題番号：24115515

研究代表者名：栗津 暁紀（広島大学理学研究科 准教授）

1. 研究の目的

細胞を構成する多様な化学成分の中には、その「数が少ない」ものが少なくない割合存在していると言われている。確かにアボガドロ数との比較やDNAの数などに注目すれば、一見その通りとも思われる。しかしその一方で、以下のような疑問も浮かび上がる。

- 1) 化学反応系において、分子の「少なさ」「多さ」の基準は何であるのか？
- 2) 細胞は実効的にどのような分子数的状況におかれ、活動しているのか？

本研究では、細胞内反応過程の統計力学的取り扱いを通じ、上記の疑問を明らかにする。

1)、2)はそれぞれ、化学反応系の統計力学の基盤にも関わる問題、生物学の基礎的問題であり、同時に、物理・化学・生物学をまたいで密接に関連した問題でもある。

本研究では以下の典型的な細胞内反応場の挙動を、統計力学的に考察する。

- I) 膜内・膜上など、空間的制約を受けた2次元場での反応
- II) DNAの変形や膜との相互作用による、立体的拘束下で進む核内での反応

これらミクロな反応場では、分子数が多い時でさえ、の排除体積による分子同士の出会いの阻害によって、反応に必要な分子が「実効的に不足した」状況が実現されると予想される。更にこの「実効的な分子数」は、同一反応ネットワーク・同一分子数であっても、分子や場の形状に依って変化する事も予想される。そこで細胞内の典型的なシグナル伝達過程や転写過程に対する、分子動力学法、確率過程解析に基づく統計力学的考察によって、各場の時空間的制約下、各反応がどのように進行し、細胞内でどのような状態が実現されているのか、考察する。

2. 研究成果

まず細胞膜上シグナル伝達系の数理モデルにおいて、膜上のシグナルタンパク質群間の相互作用が分子組み合わせによる排除体積効果によって少数に制限され、そのことが生化学反応ネットワークに従ったシグナル伝達効率を向上させる構造を自発的に形成する可能性を見出した（原著論文1）。またこのような組み合わせが、少数分子系において顕著になる分子の個性の影響をより増幅し、その結果として、分裂酵母減数分裂時の対合形成が促進される可能性を見出した（原著論文4）。

また転写活性状態の異なる核内染色体部位間の相分離のメカニズムと、その構造変化の制御機構について考察し、これにおいても少数分子系において顕著になる分子及び境界の個性の影響が、排除体積効果や染色体が「ひも状」であることによって増幅され、実現されている可能性を見出した（原著論文2, 3）。

上記研究の成果をベースに、核内染色体の更なる動態の解析とモデル化、及びそれらの転写制御やゲノム損傷修復に対する役割についての考察を進める。さらにこのような視点から、遺伝子発現の揺らぎの起源に関する考察を進める。また細胞膜上や網膜 rod cell 外節に存在する円盤膜上などヘテロ

な2次元平面上で実現する、混み合いによる実効的な分子少数性の影響のより詳細な考察も進めていく。

3. 主な研究発表

(原著論文)

1. M. Fujii, H. Nishimori and A. Awazu : “Influences of Excluded Volume of Molecules on Signaling Processes on the Biomembrane” PLOS ONE 8, (2013) e62218.
2. A. Awazu: “Segregation and phase inversion of strongly and weakly fluctuating Brownian particle mixtures and a chain of such particle mixtures in spherical containers” Phys. Rev. E 90 (2014) 042308.
3. A. Awazu: “Nuclear dynamical deformation-induced hetero- and euchromatin positioning” Phys. Rev. E 92, (2015) 032709.
4. K. Takamiya, K. Yamamoto, S. Isami, H. Nishimori, and A. Awazu: “Excluded volume effect enhances the homology pairing of model chromosomes” NOLTA IEICE 7, (2016) 66-75.

(総説)

1. 栗津暁紀 : 「生体高分子の排除体積と混み合いが生化学反応に及ぼす影響」, 生体の科学・特集「生命動態システム科学」 65, 448-449 (2014)
2. 坂本尚昭, 栗津暁紀 : 「インスレーターとクロマチン構造」, 生体の科学・特集「生命動態システム科学」 65, 412-413 (2014)

主な研究発表一覧

雑誌論文
学会発表
図書

● A01 計画班 【研究代表：野地 博行】

- Kim SH, Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules, Lab on a Chip, 査読あり, 12, 4986-4991, (2012)
- Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Tkafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y and Takashima S, Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation, PNAS, 査読あり, 111, 273-278, (2013)
- Watanabe R, Tabata KV, Iino R, Ueno H, Iwamoto M, Oiki S, Noji H, Biased Brownian stepping rotation of FoF1-ATP synthase driven by proton motive force, Nature Communications, 査読あり, 4, 1-6, (2013)
- Tsuyama T, Kishikawa J, Han YW, Harada Y, Tsubouchi A, Noji H, Kakizuka A, Yokoyama K, Uemura T, Imamura H, In vivo fluorescent ATP imaging of Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans by using a genetically encoded fluorescent ATPbiosensor optimized for low temperatures, Anal Chem, 査読あり, 85, 7889-7896, (2013)
- Watanabe R and Noji H, Characterization of the temperature-sensitive reaction of F1-ATPase by using single molecule manipulation, Scientific Reports, 査読あり, 4, 4962_1-6, (2014)
- Watanabe R and Noji H, Timing of inorganic phosphate release modulates the catalytic activity of ATP-driven rotary motor protein, Nature Communications, 査読あり, 5, 3486, (2014)
- Ikeda T, Iino R and Noji H, Real-Time Fluorescence Visualization of Slow Tautomerization of Single Free-Base Phthalocyanines under Ambient Conditions, Chem. Commun, 査読あり, 50, 9443-9446, (2014)
- Ikeda T, Tsukahara T, Iino R, Takeuchi M and Noji H, Motion Capture and Manipulation of Single Synthetic Molecular Rotors by Optical Microscopy, Angew.Chem.Int.Ed, 査読あり, 53, 10082-10085, (2014)
- Watanabe R, Soga N, Fujita D, Tabata KV, Yamauchi L, Kim SH, Asanuma D, Kamiya M, Urano Y, Suga H and Noji H, Arrayed Lipid Bilayer Chambers Allow Single-Molecule Analysis of Membrane Transporter Activity, Nature Communications, 査読あり, 5, 4519, (2014)
- Hideyuki Yaginuma, Shinnosuke Kawai, Kazuhito V. Tabata, Keisuke Tomiyama, Akira Kakizuka, Tamiki Komatsuzaki, Hiroyuki Noji, and Hiromi Imamura, Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging, Scientific Reports, 査読あり, 4, 6522_1-7, (2014)
- Rikiya Watanabe, Naoki Soga, Tomoko Yamanaka, & Hiroyuki Noji, High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition, Scientific Reports, 査読あり, 4, 7076_1-6, (2014)
- R Watanabe, N Soga, and H Noji,, Novel Nano-Device to Measure Voltage-Driven Membrane Transporter Activity, IEEE TRANSACTIONS ON NANOTECHNOLOGY, 査読あり, 15, 70-73, (2015)
- Hayashi R, Sasaki K, Nakamura S, Kudo S, Inoue Y, Noji H, Hayashi K, Giant Acceleration of diffusion observed in a single-molecule experiment on F1-ATPase, Physical Review letters, 査読あり, 114, 248101, (2015)
- Soga N, Watanabe R and Noji H, Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters, Scientific Reports, 査読あり, 5, 11025, (2015)
- Fujita H, Esaki T, Masujima T, Soo H Kim, Noji H and Watanabe MT, Comprehensive chemical secretory measurement of single cell trapped in micro-droplet array with mass spectrometry, RSC Adv, 査読あり, 5, 16968-16971, (2015)
- Enoki S, Iino R, Niitani Y, Minagawa Y, Tomishige M and Noji H, High-speed angle-resolved imaging of single gold nanorod with microsecond temporal resolution and one-degree angle precision, Analytical Chemistry, 査読あり, 87, 2079-2086, (2015)
- Gonda K, Miyashita M, Higuchi H, Tada H, Watanabe TM, Watanabe M, Ishida T, Ohuchi N., Predictive diagnosis of the risk of breast cancer recurrence after surgery by single-particle quantum dot imaging., Scientific Reports., 査読あり, 5, 14322, (2015)
- Taro Ichimura, Liang-da Chiu, Katsumasa Fujita, Hiroaki Machiyama, Satoshi Kawata, Tomonobu M. Watanabe, Hideaki Fujita, Visualizing the appearance and disappearance of the attractor of differentiation using Raman spectral imaging., Scientific Reports, 査読あり, 5, 11358, (2015)
- 藤田英明、市村垂生、渡邊朋信, 細胞状態を示す指紋 細胞からのラマンスペクトル, 現代化学, 査読あり, 11, 36-40, (2015)
- Hideaki Fujita, Tsuyoshi Esaki, Tsutomu Masujima, Akitsu Hotta, Soo Hyeon Kim, Hiroyuki Noji, Tomonobu M. Watanabe, Comprehensive chemical secretory measurement of single cells trapped in a micro-droplet array with mass spectrometry, RSC Adv., 査読あり, 5, 16968-16971, (2015)
- Morikawa TJ, Fujita H, Kitamura A, Horio T, Yamamoto J, Kinjo M, Sasaki A, Machiyama H, Yoshizawa K, Ichimura T, Imada K, Nagai T, Watanabe TM., Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it., Scientific Reports, 査読あり, 6, 22342, (2016)
- Junichi Kaneshiro, Tomonobu. M. Watanabe, Hideaki Fujita, Taro Ichimura, Full control of polarization state with a pair of electro-optic modulators for polarization-resolved optical microscopy, Applied Optics, 査読あり, 55, 1082-1089, (2016)

- Kakizuka T, Ikezaki K, Kaneshiro J, Fujita H, Watanabe TM, Ichimura T., Simultaneous nano-tracking of multiple motor proteins via spectral discrimination of quantum dots, *Biomed Opt Express.*, 査読あり, 7, 2475-93, (2016)

● A01 計画班 【研究代表：永井 健治】

- Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang YF, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE., An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca²⁺ Indicators., *Science.*, 査読あり, 333, 1888-1891, (2011)
- Mihoko Ui, et al., Application of photoactive yellow protein as a photoresponsive module for controlling hemolytic activity of staphylococcal α -hemolysin, *Chemical Communications*, 査読あり, 48, 4937-4739, (2012)
- Iwano M, Ngo QA, Entani T, Shiba H, Nagai T, Miyawaki A, Isogai A, Grossniklaus U, Takayama S., Cytoplasmic Ca²⁺ changes dynamically during the interaction of the pollen tube with synergid cells., *Development.*, 査読あり, 139, 4202-4209, (2012)
- Saito K, Chang YF, Horikawa K, Hatsugai N, Higuchi Y, Hashida M, Yoshida Y, Matsuda T, Arai Y, Nagai T., Luminescent protein for high-speed single-cell and whole-body imaging, *Nat Commun.*, 査読あり, 3:1262, 1-9, (2012)
- Hihara S, Pack CG, Kaizu K, Tani T, Hanafusa T, Nozaki T, Takemoto S, Yoshimi T, Yokota H, Imamoto N, Sako Y, Kinjo M, Takahashi K, Nagai T, Maeshima K., Local nucleosome dynamics facilitate chromatin accessibility in living mammalian cells., *Cell Rep.*, 査読あり, 2, 1645-1656, (2012)
- Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, Kanemaki MT., Mcm8 and Mcm9 form a complex that functions in homologous recombination repair induced by DNA interstrand crosslinks., *Mol Cell.*, 査読あり, 47, 511-522, (2012)
- Muraoka T, Shima T, Hamada T, Morita M, Takagi M, Tabata KV, Noji H, Kinbara K., Ion Permeation by a Folded Multiblock Amphiphilic Oligomer Achieved by Hierarchical Construction of Self-Assembled Nanopores, *Journal of the American Chemical Society*, 査読あり, 134, 19788-19794, (2012)
- Wu J, Liu L, Matsuda T, Zhao Y, Rebane A, Drobizhev M, Chang YF, Araki S, Arai Y, March K, Hughes TE, Sagou K, Miyata T, Nagai T, Li WH, Campbell RE., Improved orange and red Ca²⁺ indicators and photophysical considerations for optogenetic applications., *ACS Chem Neurosci.*, 査読あり, 4, 963-972, (2013)
- Yamada M, Kumamoto K, Mikuni S, Arai Y, Kinjo M, Nagai T, Tsukasaki Y, Watanabe TM, Fukui M, Jin M, Toba S, Hirotsune S., Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement., *Nat Commun.*, 査読あり, 4:2033, -, (2013)
- Yamanaka M, Saito K, Smith NI, Kawata S, Nagai T, Fujita K., Saturated excitation of fluorescent proteins for subdiffraction-limited imaging of living cells in three dimensions., *Interface Focus.*, 査読あり, 3, 20130007, (2013)
- Nozaki T, Kaizu K, Pack CG, Tamura S, Tani T, Hihara S, Nagai T, Takahashi K, Maeshima K., Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells., *Nucleus.*, 査読あり, 4, 349-356, (2013)
- Takemoto K, Matsuda T, Sakai N, Fu D, Noda M, Uchiyama S, Kotera I, Arai Y, Horiuchi M, Fukui K, Ayabe T, Inagaki F, Suzuki H, Nagai T., SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation., *Sci Rep.*, 査読あり, 3:2629, -, (2013)
- Biswas S, Kinbara K, Niwa T, Taguchi H, Ishii N, Watanabe S, Miyata K, Kataoka K, Aida T., Biomolecular robotics for chemomechanically driven guest delivery fuelled by intracellular ATP., *Nature Chemistry*, 査読あり, 5, 613-620, (2013)
- Hoi H, Matsuda T, Nagai T, Campbell RE., Highlightable Ca²⁺ Indicators for Live Cell Imaging., *J Am Chem Soc.*, 査読あり, 135, 46-49, (2013)
- Matsuda T, Horikawa K, Saito K, Nagai T., Highlighted Ca²⁺ imaging with a genetically encoded 'caged' indicator., *Sci Rep.*, 査読あり, 3:1398, 1-10, (2013)
- Muraoka T, Adachi K, Ui M, Kawasaki S, Sadhukhan N, Obara H, Tochio H, Shirakawa M, Kinbara K., A Structured Monodisperse PEG for the Effective Suppression of Protein Aggregation, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読あり, 52, 2430-2434, (2013)
- Fukuda N, Matsuda T, Nagai T, Optical control of the Ca²⁺ concentration in a live specimen with a genetically encoded Ca²⁺-releasing molecular tool., *ACS Chemical biology*, 査読あり, 9, 1197-1203, (2014)
- 松田知己, 永井健治, 光スイッチング機能プローブで挑む細胞の個性, *生体の科学*, 65, 101-106, (2014)
- Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, Satoh K, Kitajima N, Yoshida K, Okubo Y, Sasaki T, Moritoh S, Hasuwa H, Mimura M, Horikawa K, Matsui K, Nagai T, Iino M, Tanaka KF, In vivo visualization of subtle, transient and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca²⁺ indicator., *Cell Rep*, 査読あり, 8(1), 311, 311-318, (2014)
- 永井健治, 回折限界を超えた超解像蛍光顕微鏡, *化学*, 69, 21-26, (2014)
- Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka, Daisuke Abe, Yuji Sasanuma, Dwiky Rendra Graha Subekti and Kazushi Kinbara, Thermoresponsive Self-assembly and Conformational Changes of Amphiphilic Monodisperse Short Poly(ethylene glycol)s in Water, *Chemistry Letters*, 査読あり, 43, 1055-1057, (2014)
- Tatsuya Shima, Takahiro Muraoka, Norihisa Hoshino, Tomoyuki Akutagawa, Yuka Kobayashi and Kazushi Kinbara, Thermally Driven Polymorphic Transition Prompting a Naked-Eye-Detectable Bending and Straightening Motion of Single Crystals, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読あり, 53, 7173-7178, (2014)

- Takahiro Muraoka, Nabanita Sadhukhan, Rui Li and Kazushi Kinbara, 複数回膜貫通型タンパク質の構造模倣と機能開発, *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 査読あり, 27, 557-567, (2014)
- Takahiro Muraoka, Takahiro Endo, Kazuhito V. Tabata, Hiroyuki Noji, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Rui Li and Kazushi Kinbara, Reversible Ion Transportation Switch by a Ligand-Gated Synthetic Supramolecular Ion Channel, *Journal of the American Chemical Society*, 査読あり, 136, 15584-15595, (2014)
- Tiwari, DK., Arai, Y., Yamanaka, M., Matsuda, T., Agetsuma, M., Nakano, M., Fujita, K. and Nagai, T, A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy., *Nat. Methods*, 査読あり, 12, 515-518, (2015)
- Arai, Y., Yamamoto, T., Minamikawa, T., Takamatsu, T. and Nagai, T., Spectral fingerprinting of individual cells visualized by cavity-reflection-enhanced light-absorption microscopy., *PLoS ONE*, 査読あり, 10, e0125733, (2015)
- Yamanaka, M., Saito, K., Smith, IN., Arai, Y., Uegaki, K., Yonemaru, Y., Mochizuki, K., Kawata, S., Nagai, T. and Fujita, K., Visible-wavelength two-photon excitation microscopy for fluorescent protein imaging., *J. Biomed. Opt.*, 査読あり, 20, 101202, (2015)
- Koldenkova VP., Matsuda, T. and Nagai, T., MagIC, a genetically encoded fluorescent indicator for monitoring cellular Mg²⁺ using a non-FRET ratiometric imaging approach., *J. Biomed. Opt.*, 査読あり, 20, 101203, (2015)
- Iwano, M., Ito, K., Fujii, S., Kakita, M., Asano-Shimosato, H., Igarashi, M., Kaothien-Nakayama, P., Entani, T., Kanatani, A., Takahisa, M., Tanaka, M., Komatsu, K., Shiba, H., Nagai, T., Miyawaki, A., Isogai, A. and Takayama, S., Calcium signalling mediates self-incompatibility response in the Brassicaceae., *Nature Plants*, 査読あり, 1, 15128, (2015)
- Nakamura M, Hayashi K, Nakano M, Kanadani T, Miyamoto K, Kori T, Horikawa K., Identification of polyethylene glycol-resistant macrophages on stealth imaging in vitro using fluorescent organosilica nanoparticles, *ACS Nano*, 査読あり, 9, 1058-1071, (2015)
- Takai A, Nakano M, Saito K, Haruno R, Watanabe TM, Ohyanagi T, Jin T, Okada Y, Nagai T, Expanded palette of Nano-lantern for real-time multi-color luminescence imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読あり, 112, 4352-4356, (2015)
- Takahiro Muraoka and Kazushi Kinbara, Bioinspired Multi-block Molecules, *Chemical Communications*, 査読あり, 52, 2667-2678, (2016)
- Morikawa T.J., Fujita H., Kitamura A., Horio T., Yamamoto J., Kinjo M., Sasaki A., Machiyama H., Yoshizawa K., Ichimura T., Imada K., Nagai T., Watanabe TM., Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it., *Sci Rep.*, 査読あり, 6, 22342, (2016)
- Pandey K., Ferreira PE., Ishikawa T., Nagai T., Kaneko O., Yahata K., Ca²⁺ monitoring in *Plasmodium falciparum* using the yellowameleon-Nano biosensor., *Sci Rep.*, 査読あり, 6, 23454, (2016)
- Ohta Y, Kamagata T, Mukai A, Takada S, Nagai T, Horikawa K, Nontrivial Effect of the Color-Exchange of a Donor/Acceptor Pair in the Engineering of Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-Based Indicators, *ACS Chem Biol.*, 査読あり, 11, 1816-1822, (2016)
- A01 公募班 【研究代表：井上 圭一】
- Keiichi Inoue, Hikaru Ono, Rei Abe-Yoshizumi., A light-driven sodium ion pump in marine bacteria Susumu Yoshizawa, Hiroyasu Ito, Kazuhiro Kogure, Hideki Kandori, *Nature Communications*, 査読あり, 4, Number:1678, (2013)
- Keiichi Inoue, Takashi Tsukamoto, Yuki Sudo, Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 査読あり, 1837, 562-577, (2014)
- Keiichi Inoue, Hikaru Ono, Hideki Kandori, Na⁺ Transport by Sodium Ion Pump Rhodopsin is Resistant to Environmental Change -A Comparison of Photocycles of Na⁺ and Li⁺ Transport Processes, *Chemistry Letters*, 査読あり, 44, 294-296, (2014)
- Keiichi Inoue, Takashi Tsukamoto, Yuki Sudo, Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 査読あり, 87, 2587-2597, (2014)
- Y. Kato, K. Inoue, H. Kandori*, Kinetic analysis of H⁺-Na⁺ selectivity in a light-driven Na⁺-pumping rhodopsin, *J. Phys. Chem. Lett.*, 査読あり, 6, 5111-5115, (2015)
- Harris, M. Ljumovic, A. N. Bondar, Y. Shibata, S. Ito, K. Inoue, H. Kandori, L. S. Brown*, A new group of eubacterial light-driven retinal-binding proton pumps with an unusual cytoplasmic proton donor, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読あり, 1847, 1518-1529, (2015)
- K. Inoue, M. Konno, R. Abe-Yoshizumi, H. Kandori*, The role of the NDQ motif in sodium-pumping rhodopsins, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読あり, 54, 11536-11539, (2015)
- H. E. Kato, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, Y. Kato, H. Ono, M. Konno, S. Hososhima, T. Ishizuka, M. R. Hoque, H. Kunitomo, J. Ito, S. Yoshizawa, K. Yamashita, M. Takemoto, T. Nishizawa, R. Taniguchi, K. Kogure, A. D. Maturana, Y. Iino, H. Yawo, R. Ishitani, H. Kandori*, O. Nureki*, Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump, *Nature*, 査読あり, 521, 48-53, (2015)
- K. Inoue, Y. Kato, H. Kandori*, Light-driven ion-translocating rhodopsins in marine bacteria, *Trends Microbiol.*,

23, 91-98, (2015)

- Keiichi Inoue, Takashi Tsukamoto, Kazumi Shimono, Yuto Suzuki, Seiji Miyauchi, Shigehiko Hayashi, Hideki Kandori, Yuki Sudo, Converting a Light-driven Proton Pump into a Light-gated Proton Channel, *Journal of the American Chemical Society*, 査読あり, 137, 3291-3299, (2015)

● A01 公募班 【研究代表：藤原 敬宏】

- A. Kusumi, T. K. Fujiwara, R. Chadda, M. Xie, T.A. Tsunoyama, Z. Kalay, R. S. Kasai, and K. G.N. Suzuki, Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: Commemorating the 40th anniversary of the Singer-Nicolson's fluid mosaic model, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 査読あり, 28, 215-250, (2012)
- K. G. Suzuki, R. S. Kasai, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi, Single-molecule imaging of receptor-receptor interactions, *Methods Cell Biol.*, 査読あり, 117, 373-390, (2013)
- 藤原敬宏, 笠井倫志, 楠見明弘, 超解像顕微鏡の世界：波長の壁を超えて見る（第6回）超高速・超解像1蛍光分子顕微鏡, *現代化学*, 508, (2013)

● A01 公募班 【研究代表：藤原 敬宏】

- A. Kusumi, T.A. Tsunoyama, K.M. Hirose, R.S. Kasai, and T.K. Fujiwara, Tracking single molecules at work in living cells, *Nature Chemical Biology*, 査読あり, 10, 524-532, (2014)
- Fujiwara, T.K., Iwasawa, K., Kalay, Z., Tsunoyama, T.A., Watanabe, Y., Umemura, Y.M., Murakoshi, H., Suzuki, K.G.N., Nemoto, Y.L., Morone, N, and Kusumi, A., Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane, *Mol. Biol. Cell*, 査読あり, 27, 1101-1119, (2016)

● A01 公募班 【研究代表：原田 慶恵】

- Yasuko Osakada, Guillem Pratx, Conroy Sun, Masanori Sakamoto, Moiz Ahmad, Olga Volotskova, Qunxiang Ong, Toshiharu Teranishi, Yoshie Harada, Lei Xing and Bianxiao Cui, Hard X-ray-induced optical luminescence via biomolecule-directed metal clusters, *Chemical Communications*, 査読あり, 50, 3549-3551, (2014)
- Yoshitaka Shirasaki, Mai Yamagishi, Nobutake Suzuki, Kazushi Izawa, Asahi Nakahara, Jun Mizuno, Shuichi Shoji, Toshio Heike, Yoshie Harada, Ryuta Nishikomori, Osamu Ohara, Real-time single-cell imaging of protein secretion, *Scientific Reports*, 査読あり, 4, 4736, (2014)
- Ikumi Oomoto, Asuka Suzuki-Hirano, Hiroki Umeshima, Yong-Woon Han, Hiroyuki, ECHO-liveFISH: in vivo RNA labeling reveals dynamic regulation of nuclear RNA foci in living tissues, *Nucl. Acids Res.*, 査読あり, 43, e126, (2015)
- Shingo Sotoma, Ryuji Igarashi, Jun Imura, Yuta Kumiya, Hidehito Tochio, Yoshie Harada and Masahiro Shirakawa, Suppression of Nonspecific Protein-Nanodiamond Adsorption Enabling Specific Targeting of Nanodiamonds to Biomolecules of Interest, *Chemistry Letters*, 査読あり, 44, 354-356, (2015)
- Takuma Iwasa, Yong-Woon Han, Ryo Hiramatsu, Hiroaki Yokota, Kimiko Nakao, Ryuji Yokokawa, Teruo Ono and Yoshie Harada, Synergistic effect of ATP for RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation, *Scientific Reports*, 査読あり, 14, 5:18177, (2015)
- Yong-Woon Han, Hiroshi Sugiyama and Yoshie Harada, The application of Fluorescence-Conjugated Pyrrole/Imidazole Polyamides in the Characterization of Protein-DNA Complex Formation, *Biomaterials Science*, 査読あり, 4, 391-399, (2015)
- Sotoma, S., Akagi, K., Hosokawa, S., Igarashi, R., Tochio, H., Harada, Y., and Shirakawa, Comprehensive and quantitative analysis for controlling the physical/chemical states and particle properties of nanodiamonds for biological applications, *RSC Advances*, 査読あり, 5, 13818-13827, (2015)

● A01 公募班 【研究代表：高森 茂雄】

- Tsujimura K, Irie K, Nakashima H, Egashira Y, Fukao Y, Fujiwara M, Itoh M, Uesaka M, Imamura T, Nakahata Y, Yamashita Y, Abe T, Takamori S, Nakashima K., miR-199a links MeCP2 with mTOR signaling and its dysregulation leads to Rett Syndrome phenotypes., *Cell Rep*, 査読あり, 12, 1887-1901, (2015)

● A01 公募班 【研究代表：村越 秀治】

- Murakoshi H, Shibata AC, Nakahata Y, and Nabekura J, A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging microscopy., *Scientific Reports*, 査読あり, 5, 1-11, (2015)
- 村越秀治, 二光子蛍光寿命イメージング顕微鏡によるシグナル分子活性計測, 顕微鏡, 査読あり, 50, 106-110, (2015)

● A01 公募班 【研究代表：城口 克之】

- 城口克之, デジタル RNA シークエンシング：ゲノムワイドな1分子定量法, *生物と化学*, 査読あり, 54, 787-788, (2016)

● A01 公募班 【研究代表：山下 高廣】

- Yanagawa M, Kojima K, Yamashita T, Imamoto Y, Matsuyama T, Nakanishi K, Yamano Y, Wada A, Sako Y, Shichida

Y., Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore., *Sci Rep.*, 査読あり, 10, 11081, (2015)

● A01 公募班 【研究代表：水上 進】

- Hisashi Matsushita, Shin Mizukami, Yuki Mori, Fuminori Sugihara, Masahiro Shirakawa, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi, 19F MRI Monitoring of Gene Expression in Living Cells via Cell Surface β -Lactamase Activity, *ChemBioChem*, 査読あり, 12, 1579-1583, (2012)
- Zhanghua Zeng, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Simple and Real-time Colorimetric Assay for Glycosidases Activity Using Functionalized Gold Nanoparticles and its Application for Inhibitor Screening, *Anal. Chem.*, 査読あり, 84, 9089-9095, (2012)
- 水上進, ナノ粒子設計に基づく機能性 1H MRI プローブの開発, *薬学雑誌*, 査読あり, 133, 351-354, (2013)
- Akimasa Yoshimura, Shin Mizukami, Yuki Mori, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi, 1H MRI Detection of Gene Expression in Living Cells by Using Protein Tag and Biotinylation Probe, *Chem. Lett.*, 査読あり, 43, 219-221, (2014)
- Hisashi Matsushita, Shin Mizukami, Fuminori Sugihara, Yosuke Nakanishi, Yoshichika Yoshioka, Kazuya Kikuchi, Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive 19F Magnetic Resonance Imaging, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読あり, 53, 1008-1011, (2014)
- Shin Mizukami, Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi, Small-Molecule Based Protein-Labeling Technology in Live Cell Studies: Probe-Design Concepts and Applications, *Acc. Chem. Res.*, 査読あり, 47, 247-256, (2014)
- Nakamura, T., Matsushita, H., Sugihara, F., Yoshioka, Y., Mizukami, S., Kikuchi, K., Activatable 19F MRI nanoparticle probes for the detection of reducing environments., *Angewandte Chemie International Edition*, 査読あり, 54, 1007-1010, (2014)
- Okada, S., Mizukami, S., Sakata, T., Matsumura, Y., Yoshioka, Y., Kikuchi, K., Ratiometric MRI sensors based on core-shell nanoparticles for quantitative pH imaging., *Advanced Materials*, 査読あり, 26, 2989-2992, (2014)
- Matsushita, H., Mizukami, S., Sugihara, F., Nakanishi, Y., Yoshioka, Y., Kikuchi, K., Multifunctional core-shell silica nanoparticles for highly sensitive 19F magnetic resonance imaging., *Angewandte Chemie International Edition*, 査読あり, 53, 1008-1011, (2014)
- Yoshimura, A., Mizukami, S., Mori, Y., Yoshioka, Y., Kikuchi, K., 1H MRI detection of gene expression in living cells by using protein tag and biotinylation probe., *Chemistry Letters*, 査読あり, 43, 219-221, (2014)

● A01 公募班 【研究代表：高橋 章】

- Le TT, VP2118 has major roles in *Vibrio parahaemolyticus* response to oxidative stress., *Biochim Biophys Acta*, 査読あり, 1820, 1686-1692, (2012)

● A01 公募班 【研究代表：政池 知子】

- Kikuchi, Y., Naka, Y., Osakabe, H., Okamoto, T., Masaike, T., Ueno, H., Toyabe, S., Muneyuki, E., Thermodynamic analyses of nucleotide binding to an isolated monomeric β subunit and the $\alpha 3\beta 3\gamma$ subcomplex of F1-ATPase., *Biophysical Journal*, 査読あり, 105, 2541-2548, (2013)
- Sugawa, M., Okazaki K., Kobayashi M., Matsui T., Hummer, G., Masaike, T., Nishizaka, T., F1-ATPase conformational cycle from simultaneous single-molecule FRET and rotation measurements, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 査読あり, 113, E2916-24, (2016)

● A02 計画班 【研究代表：石島 秋彦】

- Yamada H, Mizusawa K, Igarashi R, Tochio H, Shirakawa M, Tabata Y, Kimura Y, Kondo T, Aoyama Y, Sando S., Substrate/Product-targeted NMR monitoring of pyrimidine catabolism and its inhibition by a clinical drug., *ACS Chemical Biology*, 査読あり, 7, 535-542, (2011)
- Masaaki K. Sato, Takashi Ishihara, Hiroto Tanaka, Akihiko Ishijima and Yuichi Inoue, Velocity-Dependent Actomyosin ATPase Cycle Revealed by In Vitro Motility Assay with Kinetic Analysis, *Biophysical Journal*, 査読あり, 103, 711-718, (2012)
- Danielsson J, Inomata K, Murayama S, Tochio H, Lang L, Shirakawa M, Oliveberg M., Pruning the ALS-associated protein SOD1 for in-cell NMR., *J Am Chem Soc*, 査読あり, 135(28), 10266-9, (2013)
- Hajime Fukuoka, Takashi Sagawa, Yuichi Inoue, Hiroto Takahashi, and Akihiko Ishijima, Direct Imaging of Intracellular Signaling Components That Regulate Bacterial Chemotaxis, *Science Signaling*, 査読あり, 319, ra32, (2014)
- Yoshiyuki Sowa, Michio Homma, Akihiko Ishijima, and Richard M. Berry, Hybrid-fuel bacterial flagellar motors in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 査読あり, 111, 3436-41, (2014)
- Yuichi Inoue, Mitsunori Nagata, Hiroshi Matsutaka, Takeru Okada, Masaaki K. Sato, and Akihiko Ishijima, Single Carbon Nanotube-Based Reversible Regulation of Biological Motor Activity, *ACS Nano*, 査読あり, 9, 3677-3684, (2015)
- Yuji Shimogonya, Yoichiro Sawano, Hiromichi Wakebe, Yuichi Inoue, Akihiko Ishijima & Takuji Ishikawa, Torque-induced precession of bacterial flagella, *Scientific Reports*, 査読あり, 5, 18488, (2015)

● A02 計画班 【研究代表：前島 一博】

- Maeshima, K, Nuclear Size, Nuclear pore number, and Cell Cycle., *Nucleus*, 査読あり, 2(2), 113-118, (2011)
- Takata, H, Irregular folding of nucleosomes in the cell (Commentary)., *Physics of Life Reviews*, 査読あり, 8, 51-52, (2011)
- Nishino, Y, Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure., *EMBO J.*, 査読あり, 31(7), 1644-1653, (2012)
- Takata, H, The integrator complex is required for the integrity of Cajal bodies., *Journal of Cell Science*, 査読あり, 125, 166-175, (2012)
- Shang, W.H, Chromosome Engineering Allows the Efficient Isolation of Vertebrate Neocentromeres., *Dev Cell*, 査読あり, 24, 635-648, (2012)
- Saera Hihara, Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells, *Cell Reports*, 査読あり, 2, 1645-1656, (2012)
- Yasumasa Joti, Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber., *Nucleus*, 査読あり, 3(5), 404-410, (2012)
- Nozaki, T., Kaizu, K., Pack, C.G., Tamura, S., Tani, T., Hihara, S., Nagai, T., Takahashi, K., Maeshima, K., Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells., *Nucleus*, 査読あり, 4, 349 - 356, (2013)
- Kawamoto, Y., Bando, T., Kamada, F., Li, Y., Hashiya, K., Maeshima, K., and Sugiyama, H, Development of a New Method for Synthesis of Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes Targeting Human Telomeres, *Journal of the American Chemical Society*, 査読あり, 135, 16468-16477, (2013)
- Yoshimura, S.H., Otsuka, S., Kumeta, M., Taga, M. and Takeyasu, K., Intermolecular disulfide bonds among nucleoporins regulate karyopherin-dependent nuclear transport, *J. Cell Sci*, 査読あり, 126(Pt14), 3141-50, (2013)
- Akiyoshi Hirata, Kiyoshi Nokihara, Yusuke Kawamoto, Toshikazu Bando, Asuka Sasaki, Satoru Ide, Kazuhiro Maeshima, Takeshi Kasama, and Hiroshi Sugiyama, Structural Evaluation of Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamides Recognizing Human Telomeres., *Journal of the American Chemical Society*, 査読あり, 136, 11546-11554, (2014)
- Kazuhiro Maeshima, Tomoko Funakoshi, and Naoko Imamoto, Cell-fusion method to visualize interphase nuclear pore (NPC) formation., *Methods in Cell Biology*, 査読あり, 122, 239-254, (2014)
- Ohno, M., Karagiannis, P., Taniguchi, Y., Protein expression analyses at the single cell level, *Molecules*, 査読あり, 19, 13932-13947, (2014)
- Zhangyi Liang, Denise Zickler, Mara Prentiss, Frederick S. Chang, Guillaume Witz, Kazuhiro Maeshima, Nancy Kleckner, Chromosomes progress to metaphase in multiple discrete steps via global compaction/expansion (stress) cycles., *Cell.*, 査読あり, 161, 1124-1137, (2015)
- Kazuhiro Maeshima, Kazunari Kaizu, Sachiko Tamura, Tadasu Nozak, Tetsuro Kokubo, Koichi Takahashi, The physical size of transcription factors is key to transcriptional regulation in the chromatin domains., *Journal of Physics: condensed matters*, 査読あり, 27, 064116 (10 pp), (2015)
- Kazuhiro Maeshima, Ryan Rogge, Sachiko Tamura, Yasumasa Joti, Takaaki Hikima, Heather Szerlong, Christine Krause, Jake Herman, Jennifer DeLuca, Tetsuya Ishikawa, Jeffrey C. Hansen, Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers., *EMBO J.*, 査読あり, 35, 1115-1132, (2016)
- Kazuhiro Maeshima, Satoru Ide, Kayo Hibino, Masaki Sasai, Liquid-like behavior of chromatin., *Current Opinion in Genetics and Development.*, 査読あり, 37, 36-45, (2016)
- Imai, R., Komeda, S., Shimura, M., Tamura, S., Matsuyama, S., Nishimura, K., Rogge, R., Matsunaga, A., Hiratani, I., Takata, H., Uemura, M., Iida, Y., Yoshikawa, Y., Hansen, J.C., Yamauchi, K., Kanemaki, M.T., Maeshima, K., Chromatin folding and DNA replication inhibition mediated by a highly antitumor-active tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complex, *Scientific Reports*, 査読あり, 6, 24712, (2016)
- Lolodi, O., Yamazaki, H., Otsuka, S., Kumeta, M. and Yoshimura, S.,H, Dissecting in vivo steady-state dynamics of karyopherin-dependent nuclear transport, *Mol. Biol. Cell*, 査読あり, 27, 167-176, (2016)

● A02 計画班 【研究代表：上田 泰己】

- Craig C. Jolley, A design principle for a posttranslational biochemical oscillator, *Cell Reports*, 査読あり, 2, 938-950, (2012)
- Takeya Kasukawa, Human blood metabolite timetable indicates internal body time, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 査読あり, 109, 15036-15041, (2012)
- Kenjiro Adachi, Itoshi Nikaido, Hiroshi Ohta, Satoshi Ohtsuka, Hiroki Ura, Mitsutaka Kadota, Teruhiko Wakayama, Hiroki R. Ueda, Hitoshi Niwa, Context-Dependent Wiring of Sox2 Regulatory Networks for Self-Renewal of Embryonic and Trophoblast Stem Cells, *Molecular Cell*, 査読あり, 52, 380-392, (2013)
- Nobuo Yoshimoto, Akiko Kida, Xu Jie, Masaya Kurokawa, Masumi Iijima, Tomoaki Niimi, Andrés D. Maturana, Itoshi Nikaido, Hiroki R. Ueda, Kenji Tatematsu, Katsuyuki Tanizawa, Akihiko Kondo, Ikuo Fujii, Shun'ichi Kuroda, An automated system for high-throughput single cell-based breeding, *Scientific Reports*, 査読あり, 3, 1191, (2013)

- Etsuo A. Susaki, Kazuki Tainaka, Dimitri Perrin, Fumiaki Kishino, Takehiro Tawara, Tomonobu M. Watanabe, Chihiro Yokoyama, Hirota Onoe, Megumi Eguchi, Shun Yamaguchi, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yoshihiro Shimizu, Atsushi Miyawaki, Hideo Yokota and Hiroki R. Ueda, Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis, *Cell*, 査読あり, 157, 726-739, (2014)
- Kazuki Tainaka, Shimpei I. Kubota, Takeru Q. Suyama, Etsuo A. Susaki, Dimitri Perrin, Maki Ukai-Tadenuma, Hideki Ukai and Hiroki R. Ueda, Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization, *Cell*, 査読あり, 159, 911-924, (2014)
- Etsuo A. Susaki, Kazuki Tainaka, Dimitri Perrin, Hiroko Yukinaga, Akihiro Kuno, Hiroki R. Ueda, Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging, *Nature protocols*, 査読あり, 10, 1709-1727, (2015)
- Genshiro A. Sunagawa, Kenta Sumiyama, Maki Ukai-Tadenuma, Dimitri Perrin, Hiroshi Fujishima, Hideki Ukai, Osamu Nishimura, Shoi Shi, Rei-ichiro Ohno, Ryohei Narumi, Yoshihiro Shimizu, Daisuke Tone, Koji L. Ode, Shigehiro Kuraku, Hiroki R. Ueda, Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene, *Cell Reports*, 査読あり, 14, 662-677, (2016)
- Narumi R, Shimizu Y, Ukai-Tadenuma M, Ode KL, Kanda GN, Shinohara Y, Sato A, Matsumoto K, Ueda HR, Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 査読あり, 113, E3461-3467, (2016)
- **A02 公募班 【研究代表：大場 雄介】**
 - Y. Fujioka, A. Nanbo, S.Y. Nishide and Y. Ohba., Fluorescent protein-based biosensors to visualize signal transduction beneath the plasma membrane., *Anal. Sci.*, 査読あり, 31, 267-274, (2015)
 - Fujioka YI, Nanbo A, Nishide SY, Ohba Y., Fluorescent protein-based biosensors to visualize signal transduction beneath the plasma membrane, *Anal. Sci.*, 査読あり, 31, 267-274, (2015)
 - R. Okumura, T. Kurakawa, T. Nakano, H. Kayama, M. Kinoshita, D. Motooka, K. Gotoh, T. Kimura, N. Kamiyama, T. Kusu, Y. Ueda, H. Wu, H. Iijima, S. Barman, H. Osawa, H. Matsuno, J. Nishimura, Y. Ohba, S. Nakamura, T. Iida, M. Yamamoto, E. Umemoto, K. Sano and K. Takeda., Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia., *Nature*, 査読あり, 532, 117-121, (2016)
 - T. Yamada, M. Tsuda, T. Wagatsuma, Y. Fujioka, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, Y. Totsuka, H. Haga, S. Tanaka, M. Shindoh and Y. Ohba., Receptor activator of NF- κ B ligand induces cell adhesion and integrin α 2 expression via NF- κ B in head and neck cancers., *Sci. Rep.*, 査読あり, 6, 23545, (2016)
 - T. Inuzuka, Y. Fujioka, M. Tsuda, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, S. Tanaka and Y. Ohba., Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C., *Sci. Rep.*, 査読あり, 6, 21613, (2016)
- **A02 公募班 【研究代表：小嶋 誠司】**
 - Hiroki Ono, Akari Takashima, Hikaru Hirata, Michio Homma and Seiji Kojima, The MinD homolog FlhG regulates the synthesis of the single polar flagellum of *Vibrio alginolyticus*, *Molecular Microbiology*, 査読あり, 98, 130-141, (2015)
- **A02 公募班 【研究代表：宮崎 牧人】**
 - Makito Miyazaki, Masataka Chiba, Hiroki Eguchi, Takashi Ohki, and Shin'ichi Ishiwata, Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings in vitro, *Nature Cell Biology*, 査読あり, 17, 480-489, (2015)
 - 宮崎牧人、石渡信一, In vitro 再構成による収縮環の形成機構の解明, *生物物理*, 査読あり, 56, 174-176, (2016)
- **A02 公募班 【研究代表：森本 雄祐】**
 - Fan Bai, Yusuke V. Morimoto, Shinsuke D. J. Yoshimura, Noritaka Hara, Nobunori Kami-ike, Keiichi Namba, Tohru Minamino, Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus, *Scientific Reports*, 査読あり, 4, 6528, (2014)
 - Tohru Minamino, Yusuke V. Morimoto, Miki Kinoshita, Phillip D. Aldridge, Keiichi Namba, The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis, *Scientific Reports*, 査読あり, 4, 7579, (2014)
 - Matthew A.B. Baker, Robert M.G. Hynson, Lorraine A. Ganuelas, Nasim Shah Mohammadi, Chu Wai Liew, Anthony A. Rey, Anthony P. Duff, Andrew E. Whitten, Cy M. Jeffries, Nicolas J. Delalez, Yusuke V. Morimoto, Daniela Stock, Judith P. Armitage, Andrew J. Turberfield, Keiichi Namba, Richard M. Berry and Lawrence K. Lee, Domain-swap polymerization drives the self-assembly of the bacterial flagellar motor, *Nature Structural & Molecular Biology*, 査読あり, 23, 197-203, (2016)
- **A02 公募班 【研究代表：岡田 康志】**
 - Uno SN, Kamiya M, Yoshihara T, Sugawara K, Okabe K, Tarhan MC, Fujita H, Funatsu T, Okada Y, Tobita S, Urano Y., A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging., *Nature Chemistry*, 査読あり, 6, 681-689, (2014)
 - Chinen T, Liu P, Shioda S, Pagel J, Cerikan B, Lin TC, Gruss O, Hayashi Y, Takeno H, Shima T, Okada Y, Hayakawa

- I, Hayashi Y, Kigoshi H, Usui T, Schiebel E, The γ -tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle., *Nature Communications*, 査読あり, 6, 8722, (2015)
- Takai A, Nakano M, Saito K, Haruno R, Watanabe TM, Ohyanagi T, Jin T, *Okada Y, *Nagai T, Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging., *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 査読あり, 112, 4352-4356, (2015)
 - Ohyanagi T, Shima T, Okada Y, Tsukasaki Y, Komatsuzaki A, Tsuboi S, Jin T., Compact and stable SNAP ligand-conjugated quantum dots as a fluorescent probe for single-molecule imaging of dynein motor protein., *Chemical Communications*, 査読あり, 51, 14836-14839, (2015)
 - Takai A, Nakano M, Saito K, Haruno R, Watanabe TM, Ohyanagi T, Jin T, Okada Y, Nagai T., Expanded palette of Nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging., *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読あり, 112, 4352-4356, (2015)
 - Okada Y, Nakagawa S., Super-resolution imaging of nuclear bodies by STEDmicroscopy., *Meth Mol Biol*, 査読あり, 1262, 21-35, (2015)
 - Hayashi S, Okada Y., Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics., *Mol Biol Cell*, 査読あり, 26, 1743-1751, (2015)
- **A02 公募班 【研究代表：矢島 潤一郎】**
- Yamaguchi S, Saito K, Sutoh M, Nishizaka T, Toyoshima YY, Yajima J., Torque generation by axonemal outer-arm dynein., *Biophysical Journal*, 査読あり, 108, 872-879, (2015)
- **A02 公募班 【研究代表：並木 繁行】**
- Tokunaga T, Namiki S, Yamada K, Imaishi T, Nonaka H, Hirose K, Sando S, Cell surface-anchored fluorescent aptamer sensor enables imaging of chemical transmitter dynamics, *J Am Chem Soc*, 査読あり, 134, 9561-9564, (2012)
 - Asanuma D, Takaoka Y, Namiki S, Takikawa K, Kamiya M, Nagano T, Urano Y, Hirose K, Acidic-pH-Activatable Fluorescence Probes for Visualizing Exocytosis Dynamics, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 査読あり, 53, 6085-6089, (2014)
 - Isa M, Asanuma D, Namiki S, Kumagai K, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Hirose K., High-Throughput Screening System To Identify Small Molecules That Induce Internalization and Degradation of HER2, *ACS Chem Biol.*, 査読あり, 9, 2237-2241, (2014)
 - Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N & Hirose K, High-throughput development of hybrid-type fluorescent glutamate sensor for analysis of synaptic transmission, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 査読あり, 53, 13439-13443, (2014)
- **A02 公募班 【研究代表：丹羽達也】**
- Tatsuya Niwa, Takashi Kanamori, Takuya Ueda, and Hideki Taguchi, Global analysis of chaperone effects using a reconstituted cell-free translation system, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, , 109, 8937-8942, (2012)
 - Niwa T, Sugimoto R, Watanabe L, Nakamura S, Ueda T, and *Taguchi H, Large-scale analysis of macromolecular crowding effects on protein aggregation using a reconstituted cell-free translation system., *Frontiers in Microbiology*, 査読あり, 0, 1113, (2015)
- **A02 公募班 【研究代表：小嶋 勝】**
- Masaru Kojima, Zhenhai Zhang, Masahiro Nakajima, Katsutoshi Ooe, Toshio Fukuda, Construction and evaluation of bacteria-driven liposome, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 査読あり, 183, 395,400, (2013)
- **A02 公募班 【研究代表：笠井 倫志】**
- Suzuki KGN, Kasai RS, Hirose KM, Nemoto YL, Ishibashi M, Miwa Y, Fujiwara TK, Kusumi A, Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function, *Nat. Chem. Biol*, 査読あり, 8, 774-783, (2012)
 - Nagata KO, Nakada C, Kasai RS, Kusumi A, Ueda, ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 査読あり, 110, 5034-5039, (2013)
 - Kasai RS, Kusumi A, Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 査読あり, 27, 78-86, (2014)
- **A02 公募班 【研究代表：桑田 昌宏】**
- Yoshimura SH, Kumeta M, Takeyasu K, Structural mechanism of nuclear transport mediated by importin β and flexible amphiphilic proteins, *Structure*, 査読あり, 22, 1693-1694, (2014)
 - Lolodi O, Yamazaki H, Otsuka S, Kumeta M, Yoshimura SH, Dissecting in vivo steady-state dynamics of karyopherin-dependent nuclear transport., *Mol Biol Cell*, 査読あり, 27, 167-76, (2016)
- **A02 公募班 【研究代表：曾和 義幸】**

- Bai, F., Che, Y-S., Kami-ike, N., Ma, Q., Minamino, T., Sowa, Y. & Namba, K., Populational Heterogeneity vs. Temporal Fluctuation in Escherichia coli Flagellar Motor Switching., *Biophys. J.*, 査読あり, 105, 2123-2129, (2013)
- Lo, C-J., Sowa, Y., Pilizota, T., Berry, R. M., Mechanism and kinetics of a sodium-driven bacterial flagellar motor., *PNAS*, 査読あり, 110, E2544-E2551, (2013)
- Sowa, Y., Homma, M., Ishijima, A. & Berry, R. M., Hybrid-fuel bacterial flagellar motors in Escherichia coli., *PNAS*, 査読あり, 111, 3436-3441, (2014)
- **A02 公募班 【研究代表：川岸 郁朗】**
 - So-ichiro Nishiyama, Yohei Takahashi, Kentaro Yamamoto, Daisuke Suzuki, Yasuaki Itoh, Kazumasa Sumita, Yumiko Uchida, Michio Homma, Katsumi Imada, and Ikuro Kawagishi, Identification of a *Vibrio cholerae* chemoreceptor that senses taurine and amino acids as attractants, *Scientific Reports*, 査読あり, 6, 20866, (2016)
- **A03 計画班 【研究代表：富樫 祐一】**
 - Tatyana G.Terentyeva, Hans Engelkamp, Alan E.Rowan, Tamiki Komatsuzaki, Johan Hofkens, Chun-Biu Li, Kerstin Blank, Dynamic Disorder in Single-Enzyme Experiments : Facts and Artifacts, *ACS Nano*, 査読あり, 6, 346-354, (2011)
 - Kiyoto Kamagata, Toshifumi Kawaguchi, Yoshitomo Iwahashi, Akinori Baba, Kazuya Fujimoto, Tamiki Komatsuzaki, Yoshihiro Sambongi, Yuji Goto, Satoshi Takahashi, Long-Term Observation of Fluorescence of Free Single Molecules To Explore Protein-Folding Energy Landscapes, *Journal of the American Chemical Society*, 査読あり, 134 (28), 11525-11532, (2012)
 - Shinnosuke Kawai, David Cooper, Christy F. Landes, Henning D. Mootz, Haw Yang, Tamiki Komatsuzaki, Numerical Construction of Estimators for Single-Molecule Fluorescence Measurements, *The Journal of Physical Chemistry B*, 査読あり, 117, 8061-8074, (2013)
 - Chun-Biu Li, Tamiki Komatsuzaki, Aggregated Markov Model Using Time Series of Single Molecule Dwell Times with Minimum Excessive Information, *Physical Review Letters*, 査読あり, 111, 058301, (2013)
 - Yasuhiro Matsunaga, Akinori Baba, Chun Biu Li, John Straub, Mikito Toda, Tamiki Komatsuzaki, R. Berry, Spatio-temporal Hierarchy in the Dynamics of a Minimalist Protein Model, *The Journal of Chemical Physics*, 査読あり, 139, 215101, (2013)
 - Tahmina Sultana, Hiroaki Takagi, Miki Morimatsu, Hiroshi Teramoto, Chun-Biu Li, Yasushi Sako, Tamiki Komatsuzaki, Non-Markovian Properties and Multiscale Hidden Markovian Network Buried in Single Molecule Time Series, *The Journal of Chemical Physics*, 査読あり, 139, 245101, (2013)
 - Tatyana Terentyeva, Johan Hofkens, Tamiki Komatsuzaki, Kerstin Blank, Chun-Biu Li, Time-Resolved Single Molecule Fluorescence Spectroscopy of an α -Chymotrypsin Catalyzed Reaction, *Journal of Physical Chemistry B*, 査読あり, 117 (5), 1252-1260, (2013)
 - Bo Shuang, David Cooper, J. Nick Taylor, Lydia Kisley, Jixin Chen, Wenxiao Wang, Chun Biu Li, Tamiki Komatsuzaki, Christy F. Landes, Fast Step Transition and State Identification (STaSI) for Discrete Single-Molecule Data Analysis, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 査読あり, 5, 3157-3161, (2014)
 - Hideyuki Yaginuma, Shinnosuke Kawai, Kazuhito V. Tabata, Keisuke Tomiyama, Akira Kakizuka, Tamiki Komatsuzaki, Hiroyuki Noji, Hiromi Imamura, Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging, *Scientific Reports*, 査読あり, 4, 6522, (2014)
 - 富樫 祐一, 少数分子反応系理論・少数性生物学, *生体の科学*, 65, 450-451, (2014)
 - Chun-Biu Li, Hiroshi Ueno, Rikiya Watanabe, Hiroyuki Noji, Tamiki Komatsuzaki, ATP hydrolysis assists phosphate release and promotes reaction ordering in F1-ATPase, *Nature Communications*, 査読あり, 6, 10223, (2015)
 - J. Nicholas Taylor, Chun-Biu Li, David R. Cooper, Christy F. Landes, Tamiki Komatsuzaki, Error-based Extraction of States and Energy Landscapes from Experimental Single-Molecule Time-Series, *Scientific Reports*, 査読あり, 5, 9174, (2015)
 - 中川 正基, 大仲 修平, 羅 志偉, 富樫 祐一, 非一様な多機能触媒反応系における少数分子成分効果, *京都大学数理解析研究所講義録 (研究集会「ランダム力学系理論とその応用 2015」)*, -, -, (2016)
- **A03 計画班 【研究代表：今田 勝巳】**
 - T.Uchihashi, R.Iino, T.Ando, H.Noji, High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F₁-ATPase, *Science*, 査読あり, 333, 755-758, (2011)
 - K.Igarashi, T.Uchihashi, A.Koivula, M.Wada, S.Kimura, T.Okamoto, M.Penttila, T.Ando, M.Samiejima, Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface, *Science*, 査読あり, 333, 1279-1282, (2011)
 - T.Uchihashi, N.Kodera, T.Ando, Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy, *Nature Protocols*, 査読あり, 7, 1193-1206, (2012)
 - Terashima H, Li N, Sakuma M, Koike M, Kojima S, Homma M, Imada K., Insight into the assembly mechanism in the supramolecular rings of the sodium-driven *Vibrio* flagellar motor from the structure of FlgT., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 査読あり, 110, 6133-6138, (2013)

- Zhu S, Takao M, Li N, Sakuma M, Nishino Y, Homma M, Kojima S, Imada K, Conformational change in the periplasmic region of the flagellar stator coupled with the assembly around the rotor, Proc Natl Acad Sci U S A, 査読あり, 111, 13523-13528, (2014)
- K. Igarashi, T. Uchihashi, T. Uchiyama, H. Sugimoto, M. Wada, K. Suzuki, S. Sakuda, T. Ando, T. Watanabe, and M. Samejima, Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin, Nature Communications, 査読あり, 5, 3975, (2014)
- Nakamura, H. Watanabe, T. Ishida, T. Uchihashi, M. Wada, T. Ando, K. Igarashi, M. Samejima, Trade-off between processivity and hydrolytic velocity of cellobiohydrolases at the surface of crystalline cellulose, Journal of the American Chemical Society, 査読あり, 136, 4584-4592, (2014)
- Minamino T, Morimoto YV, Kinoshita M, Aldridge PD, Namba K., The bacterial flagellar protein export apparatus processively transports flagellar proteins even with extremely infrequent ATP hydrolysis., Sci Rep., 査読あり, 4, 7579, (2014)
- Bai F, Morimoto YV, Yoshimura SD, Hara N, Kami-Ike N, Namba K, Minamino T., Assembly dynamics and the roles of FliI ATPase of the bacterial flagellar export apparatus., Sci Rep. , 査読あり, 4, 6528, (2014)
- M. Shibata, T. Uchihashi, T. Ando and R. Yasuda, Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells, Scientific Reports, 査読あり, 5, 8724, (2015)
- M. Imamura, T. Uchihashi, T. Ando, A. Leifert, U. Simon, A. D. Malay and J. G. Heddl, Probing structural dynamics of an artificial protein cage using high-speed atomic force microscopy, Nano Letters, 査読あり, 15, 1331-1335, (2015)
- Nishiyama S, Takahashi Y, Yamamoto K, Suzuki D, Itoh Y, Sumita K, Uchida Y, Homma M, Imada K, Kawagishi I., Identification of a Vibrio cholerae chemoreceptor that senses taurine and amino acids as attractants., Sci Rep., 査読あり, 6, 20866, (2016)
- Morikawa TJ, Fujita H, Kitamura A, Horio T, Yamamoto J, Kinjo M, Sasaki A, Machiyama H, Yoshizawa K, Ichimura T, Imada K, Nagai T, Watanabe TM., Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it., Sci Rep., 査読あり, 6, 22342, (2016)
- Katsumi Imada, Tohru Minamino, Yumiko Uchida, Miki Kinoshita, and Keiichi Namba, nsight into the flagella type III export revealed by the complex structure of the type III ATPase and its regulator, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読あり, 113, 3633-3638, (2016)
- Minamino T, Morimoto YV, Hara N, Aldridge PD, Namba K., The Bacterial Flagellar Type III Export Gate Complex Is a Dual Fuel Engine That Can Use Both H⁺ and Na⁺ for Flagellar Protein Export., PLoS Pathog., 査読あり, 12, e1005495, (2016)
- A03 公募班 【研究代表：林 久美子】
 - R. Hayashi, K. Sasaki, S. Nakamura, S. Kudo, Y. Inoue, H. Noji and K. Hayashi, Giant acceleration of diffusion observed in a single-molecule experiment on F1-ATPase, Phys. Rev. Lett., 査読あり, 114, 248101, (2015)
- A03 公募班 【研究代表：斉藤 稔】
 - Saito N, Kaneko K, Theoretical analysis of discreteness-induced transition in autocatalytic reaction dynamics, PHYSICAL REVIEW E, 査読あり, 91, 022707, 1-7, (2015)
- A03 公募班 【研究代表：市川 正敏】
 - Yukinori Nishigami, Hiroaki Ito, Seiji Sonobe & Masatoshi Ichikawa, Non-periodic oscillatory deformation of an actomyosin microdroplet encapsulated within a lipid interface, Scientific Reports, 査読あり, 6, 18964/1-11, (2016)
- A03 公募班 【研究代表：鈴木 宏明】
 - K. Nishimura, T. Matsuura, T. Sunami, S. Fujii, K. Nishimura, H. Suzuki, T. Yomo, Identification of Giant Unilamellar Vesicles with Permeability to Small Charged Molecules, RSC Advances, 査読あり, 4, 35224-35232, (2014)
 - Kz. Nishimura, T. Matsuura, T. Sunami, S. Tsuru, H. Suzuki, T. Yomo, Stochasticity in Gene Expression in a Cell-Sized Compartment, ACS Synthetic Biology, 査読あり, 4, 566-576, (2015)
- A03 公募班 【研究代表：柴田 達夫】
 - Katsuhiko Sato, Tetsuya Hiraiwa, and Tatsuo Shibata, Cell Chirality Induces Collective Cell Migration in Epithelial Sheets, Physical Review Letters, 査読あり, 115, 188102, (2015)
- A03 公募班 【研究代表：石原 秀至】
 - 澤井哲, 石原秀至, 中島昭彦, 1 細胞イメージングから見る細胞内シグナルの自己組織化現象, 実験医学, , 31, , (2013)
 - D. Taniguchi, S. Ishihara, T. Ohnuki, M. Honda-Kitahara, K. Kaneko and S. Sawai, Phase geometries of two-dimensional excitable waves governs self-organized morphodynamics of amoeboid cells, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 査読あり, 110, 5016-5021, (2013)
- A03 公募班 【研究代表：濱田 勉】

- Hamada T, Fujimoto R, Shimobayashi SF, Ichikawa M, Takagi M, Molecular behavior of DNA in a cell-sized compartment coated by lipids., *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.*, 査読あり, 91, 062717, (2015)
- A03 公募班 【研究代表：栗津 暁紀】
 - Takamiya, K., Yamamoto, k., Isami, S., Nishimori, H., and Awazu, A, Excluded volume effect enhances the homology pairing of model chromosomes., *Nonlinear Theory and Its Applications, IEICE*, 査読あり, 7, 66-75, (2016)

主な研究発表一覧

学会発表

● A01 計画班 【研究代表：野地 博行】

- Hiroyuki Noji, Single-Molecule ELISA, 日本分子細胞生物学会, 2011/12/13-2011/12/16, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- Hiroyuki Noji, Single-Molecule Digital Bioassay with a Million Droplets Array, International Conference Session 5, 2012/09/07, 幕張メッセ (千葉県)
- Hiroyuki Noji, Single-molecule digital counting of proteins, Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking, 2012/10/17, 中央科学院 (Taipei) (Taiwan)
- Hiroyuki Noji, Femtoliter chamber array for digital ELISA and single cell analysis, Workshop on Technologies for Single Cell Analysis, 2013/04/04, Hitachi Research Institute (東京都)
- Hiroyuki Noji, Single-Molecule Technology, Single-Molecule Biophysical Chemistry Workshop, 2013/04/11, National Taiwan University (Taiwan, Taipei)
- Hiroyuki Noji, Single-Molecule counting of biomolecules with femtoliter droplet chamber array, The 17th International Conference on Solid-State Sensors, 2013/06/17, Barcelona International Convention Centre (Spain, Barcelona)
- Hiroyuki Noji, Single-molecule digital counting with femtoliter chamber array, International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013, 2013/10/09, 東京大学 (東京都)
- Hiroyuki Noji, Single-Molecule Digital ELISA and Prospects of its Applications, World Lecture Series on Micro/Nanofluidics, 2014/07/02, Keio University(Kanagawa, Japan)
- 渡邊朋信, 蛍光ゆらぎ相関計算に基づく超解像法, 日本顕微鏡学会第71回学術講演会, 2015/05/15-2015/05/15, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
- 渡邊朋信, 『単一』にこだわる計測技術開発, 新学術領域 超高速バイオアセンブラ第4回若手シンポジウム, 2015/07/03-2015/07/03, 大阪大学 (大阪府豊中市)
- Tomonobu M Watanabe, Development of imaging technology to detect intracellular physical parameters, THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY Joint Seminar, 2015/09/24-2015/09/24, The HK University of Science & Technology(中国、香港)
- Tomonobu M Watanabe, Single cell Non-invasive spectroscopy, 3rd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, 2015/11/26-2015/11/26, 東京大学 (東京都文京区)

● A01 計画班 【研究代表：永井 健治】

- 金原数, 高分子の超分子化学を利用した機能物質の開拓, 第28回有機合成化学セミナー, 2011/09/02, 滝の湯(天童市)
- Nagai Takeharu, Spying biological events in living cells by genetically-encoded functional indicators, The third RIES-CIS international symposium, 2011/10/28, NCTU(Sinchu, Taiwan)
- Kazushi Kinbara, Development of molecular tools for controlling activity of proteins, BIT's 2nd Annual World Congress of Nanomedicine-2011, 2011/11/03, Shenzhen Convention & Exhibition Center (China, Shenzhen)
- 金原数, 高分子の超分子化学と機能物質設計, 第14回生命化学研究会, 2011/12/03, ラフォーレ南紀白浜(西牟婁郡白浜町)
- Nagai Takeharu, Auto-luminescent genetically encoded indicators for real time in vivo imaging, SPIE 2011 Smart Nano+Micro material and Devices, 2011/12/05, Swainburne University of Technology (Melbourne, Australia)
- Nagai Takeharu, Auto-luminescent functional probes applicable in conjunction with photo-manipulation technology including optogenetic tools, Promega Dynamic Connection, 2011/12/14, パシフィコ横浜(横浜市)
- Nagai Takeharu, Genetically-encoded technologies to quantitatively visualize and manipulate biomolecule in living cells, 第34回日本分子生物学会, 2011/12/14, パシフィコ横浜(横浜市)
- 永井健治, 光遺伝学ツールを含む光操作技術と組み合わせて利用可能な自動発光型機能プローブ, 第14回未来創薬・医療イノベーションセミナー, 2012/01/17, 北海道大学医学部(札幌市)
- Nagai Takeharu, Genetically-encoded technologies to quantitatively visualize and control bio-function in living cells, International symposium on molecular imaging and systems biology, 2012/01/30, 東京大学弥生講堂(東京都)
- 永井健治, 超高輝度発光タンパク質による革命的バイオイメージング, 第59回応用物理学会関係連合講演会, 2012/03/15, 早稲田大学(東京都)
- 永井健治, 改変蛍光タンパク質を利用した生理機能の可視化, ナノプローブテクノロジー第167委員会 第66回研究会, 2012/04/19, 産業技術総合研究所 臨海副都心センター別館
- 永井健治, 生理機能の光操作と可視化技術, 九州大学先端物質科学研究所セミナー, 2012/05/24, 九州大学先端物質化学研究所(春日市)
- 永井健治, バイオイメージングで何を観るのか?, 第45回日本発生物学会、第64回日本細胞生物学会合同大会, 2012/05/30, Kobe International Conference Center(神戸市)
- 永井健治, LEDを利用したバイオサイエンス技術, 第1回「レーザーバイオ医療」技術専門委員会, 2012/06/08, 北

北海道大学 大学院地球環境科学研究所(札幌市)

- 永井健治, 少数性生物学って何?, 新学術領域「秩序形成ロジック」2012年度班会議, 2012/06/19, ルスツ・リゾート(北海道虻田郡)
- Kazushi Kinbara, Amplification of Light-induced Molecular-Shape Change by Supramolecular Machines, 29th International Conference of Photopolymer Science and Technology, 2012/06/29, Convention Hall, Chiba University(千葉市)
- 永井健治, 遺伝子にコードされた分子スパイによる生命現象の解明に向けて, 超高速バイオアセンブラ第1回若手研究者シンポジウム, 2012/07/04, 京都大学 iPS細胞研究所(CiRA)(京都市)
- Kazushi Kinbara, Development of Supramolecular Tools for Manipulation of Proteins, The Second Asian Chemical Biology Conference, 2012/07/04, Southern Beach Hotel & Resort OKINAWA(Okinawa, Itoman, Japan)
- 永井健治, Revolutionary bioimaging with super-duper luminescent proteins., Department of Chemistry, Alberta University, Canada (, 2012/07/16, University of Alberta(Edmonton, Alberta, Canada)
- Kazushi Kinbara, et al., Photoresponsive Yellow Protein as a Module for Controlling Protein Functions, 第24回 IUPAC 光化学国際シンポジウム, 2012/07/17, The University of Coimbra(コインブラ, ポルトガル)
- 永井健治, 遺伝子にコードされた分子スパイによる生命現象の解明に向けて, 第24回高遠シンポジウム 生命の制御系の進化を探る, 2012/08/23, 高遠さくらホテル(伊那市)
- 永井健治, 最先端バイオイメージング技術で何を解き明かすのか?, 第52回生命科学夏の学校, 2012/08/25, 西浦温泉ホテルたつき(蒲郡市)
- 永井健治, Genetically-encoded functional probes applicable in conjunction with photo-manipulation technologies, The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2012), 2012/08/27, Kyoto International Conference Center (京都市)
- 永井 健治, Genetically-encoded tools for chromophore-assisted light inactivation of biomolecule functions, The 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2012), 2012/08/27, Kyoto International Conference Center (京都市)
- 永井健治, Revolutionary bioimaging with super-duper luminescent proteins, 4th International Symposium on Photonic Bioimaging 2012, 2012/09/17, 北海道大学学術交流会館(札幌市)
- 永井健治, 遺伝子にコードされた発光型プローブ, 第50回日本生物物理学会年会(オーガナイザー), 2012/09/22, 名古屋大学 東山キャンパス(名古屋市)
- 松田知己, Genetically-endoded photoactivatable functional indicator, 第4回光操作研究会, 2012/09/28, 自然科学研究機構 岡崎カンファレンスセンター(岡崎市)
- 鎌形貴範ら, 環状スクレオチド cGMP, cAMP シグナル伝達の可視化, 生理学研究所研究会「超階層シグナル伝達研究の新展開」, 2012/10/01, 自然科学研究機構・生理学研究所(岡崎市)
- 永井健治, 生体組織内の任意の細胞での機能イメージングを可能にする光活性化型 Ca²⁺センサーの開発, 生理学研究所研究会「超階層シグナル伝達研究の新展開」, 2012/10/02, 自然科学研究機構・生理学研究所(岡崎市)
- 永井健治, Revolutionary bioimaging with super-duper luminescent proteins, Fluorescent Proteins and Biological Sensors III, 2012/11/05, Janelia Farm (Ashburn, アメリカ)
- 永井健治, 遺伝子にコードされた分子スパイによる生命現象の解明に向けて, 33回日本レーザー医学会総会, 2012/11/11, 大阪大学吹田キャンパス (コンベンションセンター、銀杏会館)
- 永井健治, オワンクラゲの研究から, 北三瓶小学校、中学校 講演会, 2012/11/16, 北三瓶小学校、中学校
- 永井健治, Revolutionary Bioimaging with Super-Duper Luminescent Proteins, International Joint Symposium on Single-Cell Analysis (The 6th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis & The 8th International Forum on Post-Genome Technologies), 2012/11/27, Kyoto Research Park(京都市)
- 永井健治, Genetically-encodable functional indicator and manipulator for deciphering biological events, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012), 2012/11/28, the Nagoya Congress Center(名古屋市)
- 永井健治, Revolutionary bioimaging with super-duper luminescent proteins, オックスフォード大学特別ワークショップ, 2012/12/21, 大阪大学産業科学研究所(茨木市)
- 永井健治, 蛍光から化学発光へ: バイオイメージングの新潮流, 神戸バイオメディカル学術交流会, 2013/02/20, 理研 CDB(神戸市)
- 永井健治, Revolutionary bioimaging with super-duper luminescent proteins, The Fourteenth International Membrane Research Forum, 2013/03/17, iCeMS Main Building, Kyoto University(京都市)
- 永井健治, 蛍光から化学発光へ: バイオイメージングの新潮流, 先端的光イメージング拠点形成プロジェクト・成果報告シンポジウム, 2013/03/18, 北海道大学医学部学友会館(札幌市)
- 永井健治, 超高輝度発光タンパク質による革命的バイオイメージング, 第90回日本生理学会年会, 2013/03/27, タワーホール船堀(東京都)
- 永井 健治 (オーガナイザー), 蛍光から化学発光へ: バイオイメージングの新潮流, 蛋白研セミナー「光の、光

- による、光のための蛋白質科学」, 2013/04/20, 大阪大学 蛋白質研究所 (吹田市)
- 永井 健治, 蛍光から化学発光へ ～バイオイメージングの新潮流～, 木原記念財団学術賞 応用科学賞記念講演会, 2013/05/15, 横浜市立大学木原生物学研究所 (横浜市)
 - 永井 健治 (オーガナイザー), 超高輝度発光タンパク質による革命的バイオイメージング, 日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会, 2013/05/22, ホテル阪急エキスポパーク (吹田市)
 - 永井 健治, 蛍光から化学発光へ: バイオイメージングの新潮流, CRSET・さきがけ 光科学技術合同シンポジウム, 2013/06/20, 東京大学 弥生講堂・一条ホール (東京都)
 - 永井 健治, 光で拓く生命科学, 上宮高等学校講演会, 2013/07/18, 上宮高等学校 (大阪市)
 - K. Kinbara, Amplification of molecular motions in supramolecular machines, SYMMETRY FESTIVAL, 2013/08/05, Unesco IHE Institute for Water Education (デルフト、オランダ)
 - 永井 健治, Revolutionary bioimaging with super-duper luminescent proteins, Special Lecture, 2013/08/13, Department of Pharmacology, University of Oxford (Oxford, United Kingdom)
 - Dharmendra K Tiwari, Yoshiyuki Arai, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai, Beyond the diffraction limit with an advanced photoswitching fluorescent protein, XXIII ISMS 2013, 2013/09/13, Toki Messe Niigata Convention center (Niigata, Japan)
 - 永井 健治, 高輝度発光タンパク質の医学応用, 化学工学会 第 45 回秋季大会, 2013/09/16, 岡山大学 津島(東)キャンパス (岡山市)
 - 永井 健治, バイオナノフォトンクスによる少数性生物学, 特別講義, 2013/09/18, 京都府立医科大学 (京都市)
 - 永井 健治, Superstrong luminescent protein for high speed imaging at single cell and whole body level, JSAP-OSA Joint Symposia 2013, the 74th JSAP Autumn Meeting 2013, 2013/09/19, Kyotanabe Campus, Doshisha University (京田辺市)
 - 永井 健治, 高輝度化学発光タンパク質によるリアルタイムバイオイメージング, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013/09/20, 広島国際会議場 (広島市)
 - 永井 健治, 蛍光から化学発光へ – バイオイメージングの新潮流 –, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013/09/21, 岡山コンベンションセンター (岡山市)
 - 永井 健治, Genetically-encoded functional probes applicable in conjunction with photo-manipulation technologies, Optogenetics2013, 2013/09/27, Keio University, Mita Campus (東京都)
 - K. Kinbara, Structured PEGs for manipulation of biological macromolecules, 2nd International Conference and Exhibition on Materials Science & Engineering, 2013/10/08, Hampton Inn Tropicana (ラスベガス、アメリカ)
 - Tomoki Matsuda, Photo-manipulation of intracellular Ca(2+) by Genetically encoded caged Ca(2+), Joined GDRE CNRS /European Calcium Society workshops Calcium signaling as a hub for translational medicine and a starting point to model life, 2013/10/20, Logonna Daoulas (Brittany, France)
 - 永井 健治, Genetically-encoded functional probes applicable in conjunction with photo-manipulation technologies, 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2013), 2013/11/08, Nakamura Centenary Hall of Kyushu Institute of Technology (北九州市)
 - 永井 健治, ぼっばらばーになって、科学革命を起こしませんか?, 遠賀中間歯科医師会学術講演会, 2013/11/08, 中間市ハーモニーホール (中間市)
 - 永井 健治, 生物発光を利用した未来産業, 大阪大学産業科学研究所 第 69 回学術講演会 シンポジウム「産業科学の未来戦略」, 2013/11/15, 大阪大学産業科学研究所 (茨木市)
 - Yoshiyuki Arai, Realtime fluorescence and chemiluminescence imaging with optogenetic activation in living cells, International Workshop on Quantitative Biology 2013, 2013/11/25, ICHO-Kaikan, Osaka University (吹田市)
 - 永井 健治, 細胞機能操って観る技術の開発, シンポジウム「細胞を創る操る」, 2013/11/28, 奈良先端科学技術大学院大学 ミレニアムホール (生駒市)
 - N. Sadhukhan ら, Monodisperse Amphiphilic PEG Macromonomer Refolds Protein Effectively, NATCOSEB, 2013/11/30, CSIR-CLRI (チェンナイ、インド)
 - 永井 健治, Luminescent protein able to high speed imaging at single cell and whole body level, First Osaka University-EPFL International Symposium, 2013/12/02, Icho-Kaikan (吹田市)
 - 永井 健治, SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation, 第 36 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「分子イメージングと光操作による動的細胞内分子解剖」, 2013/12/03, 神戸国際会議場 (神戸市)
 - 永井 健治, 少数性生物学～タンパク質分子に個性はあるのか, 日本分子生物学会 公開プレゼンテーション「生命世界を問う」, 2013/12/06, 神戸国際会議場 ポートピアホール (神戸市)
 - 永井 健治, Manipulation and visualization of biological function with genetically encoded molecular spies, 2013 ASCB Annual Meeting, 2013/12/14, Morial Convention Center (New Orleans, USA)
 - 松田 知己、永井 健治, 蛍光タンパク質プローブによる生理機能のイメージングと操作, 日本生体エネルギー研究会 第 39 回討論会 「蛍光タンパク質プローブによる生理機能のイメージングと操作」, 2013/12/18, 静岡県コンベ

ンションアーツセンター（静岡市）

- 永井 健治, 蛍光・化学発光タンパク質エンジニアリングによる生理機能の操作と可視化, 応用物理学会・量子エレクトロニクス研究会「バイオ・メディカルフォトンクス:基礎と応用の最前線」, 2013/12/20, 上智大学軽井沢セミナーハウス（北佐久郡軽井沢町）
- 永井 健治, 発光性タンパク質を利用した様々な技術開発, 特許庁平成25年度技術研修, 2014/01/28, 独立行政法人工業所有権情報・研修館（東京都）
- 永井 健治, 蛍光から化学発光へーバイオイメージングの新潮流ー, 平成25年度第2回次世代バイオナノ研究会, 2014/01/30, 東京ビッグサイト（東京都）
- 永井 健治, 少数性生物学概説および少数生体分子の可視化・操作技術の開発, 生体システム専攻バイオサイエンスシンポジウム, 2014/02/18, 東京工業大学すずかけ台キャンパス（横浜市）
- 永井 健治, 少数性生物学って何?, 静岡県立大学市民勉強会「環境・生命・宇宙ーわたしたちの星、地球、月そして太陽ー」, 2014/03/15, 静岡県立大学（静岡市）
- 永井 健治, 今にのめり込むー超オモロいサイエンス術ー, 超異分野若手シンポジウム2014@関西, 2014/03/22, 大阪大学コンベンションセンター（吹田市）
- 永井 健治, in vivo ライブイメージングによる高次生命現象の可視化と応用, 日本実験動物科学技術さっぽろ2014, 2014/05/16, 札幌コンベンションセンター（札幌市）
- Takeharu Nagai, Genetically-encoded tools to optically control and image calcium dynamics, the 2014 FASEB SRC on Calcium and Cell Function, 2014/06/02, Melia Nassau Beach (Nassau, Bahamas)
- 堀川一樹, 生理機能を可視化する FRET プローブの開発, 第55回日本生化学会中国・四国支部例会, 2014/06/06, 愛媛大学（愛媛県松山市）
- Takeharu Nagai, Genetically-encoded photosensitizer for light-dependent perturbation of biological function, iCeMS International Symposium: "Light Control in Cell Biology", 2014/06/13, Kyoto University iCeMS (Kyoto, Japan)
- 永井 健治, Genetically-encoded tools to optically control and image cellular events, 京大生命動態システム科学推進拠点:発生・細胞生物学・システム生物学コース講演会, 2014/06/27, 京都大学医学部記念講堂（京都市）
- 松田 知己, 蛍光タンパク質プローブによる生理機能のイメージングと操作, 第3回蛍光イメージング・ミニシンポジウム, 2014/09/24, 北海道大学電子科学研究所（札幌市）
- Takeharu Nagai, Genetically-encoded tools to optically control and image Ca²⁺ dynamics, the 16th International Conference on Retinal Proteins (ICRP2014), 2014/10/09, Nagahama Royal Hotel (Nagahama, Japan)
- 永井 健治, 生命現象を光で見て弄る技術の開発, 大学院講義基礎研究方法論講演会, 2014/10/28, 愛媛大学大学院医学系研究科（愛媛県東温市）
- 永井 健治, センサーデバイス開発学, 名古屋市立大学大学院薬学研究科講義「センサーデバイス開発学」, 2014/11/14, 名古屋市立大学（名古屋市）
- Takeharu Nagai, Bioimaging by means of engineered fluorescent/chemiluminescent proteins, Special Lecture, 2014/12/01, Indian Institute of Technology Madras (Chennai, India)
- 永井 健治, 遺伝子にコードされた分子スパイによる生命現象の解明に向けて, 奈良先端大学院大学物質創成科学研究科「光ナノサイエンス特講」特別講義, 2014/12/08, 奈良先端大学院大学物質創成科学研究科（奈良県生駒市）
- 永井 健治, 少数性生物学概説および少数性分子の可視化・操作技術の開発, 第14回名古屋大学・遺伝子実験施設公開セミナー, 2014/12/17, 名古屋大学坂田・平田ホール（名古屋市）
- 永井 健治, 遺伝子にコードされた分子スパイによる最先端バイオイメージングー蛍光 vs 化学発光ー, 特別講演会, 2015/01/23, 筑波大学（つくば市）
- 永井 健治, Ca²⁺動態を光で操作し可視化するための遺伝子ツール, 新学術領域柔らかな分子系第8回ワークショップ, 2015/01/24, 岡山いこいの村（岡山県瀬戸内市）
- Takeharu Nagai, Genetically-encoded tools to optically control and image Ca²⁺ dynamics, International Symposium on Bio-imaging and Gene Targeting Sciences in Okayama, 2015/02/15, the 50th Anniversary Hall, Okayama University (Okayama, Japan)
- Takeharu Nagai, Toward long term single molecule imaging in live cells with luminescent probes, The 15th International Membrane Research Forum, 2015/03/02, iCeMS, Kyoto University (Kyoto, Japan)
- 永井 健治, Ca²⁺動態を光で制御し可視化するタンパク質ツール, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会合同大会, 2015/03/21, 神戸国際会議場（神戸市）
- Takeharu Nagai, A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laserpower RESOLFT nanoscopy, ABA2015, 2015/05/11, Shangyu International Hotel (Shangyu, China)
- 永井 健治, 超解像蛍光イメージングに最適な蛍光タンパク質の選び方, 日本顕微鏡学会第71回学術講演会, 2015/05/15, 国立京都国際会館（京都府京都市）
- 永井 健治, Revolutionary bioimaging with bright luminescent proteins -Comparing pros and cons of fluorescence and luminescence-, 第1回感染症イメージングシンポジウム, 2015/06/04, 長崎大学（長崎県長崎市）

- 永井 健治, 高光度発光タンパク質を利用したバイオイメーキング, 日本ケミカルバイオロジー学会 第10回年会, 2015/06/11, 東北大学百周年記念会館 (宮城県仙台市)
- 永井 健治, 蛍光・化学発光によるバイオイメーキングの現状と展望, 2015年先端光科学若手研究会, 2015/06/14, 早稲田大学 (東京都新宿区)
- Takeharu Nagai, Revolutionary Bioimaging with Bright Luminescent Proteins - Comparing Pros and Cons of Fluorescence and Luminescence, Biophysical Society Thematic Meeting, New Biological Frontiers Illuminated by Molecular Sensors and Actuators, 2015/06/29, GIS Convention Center, National Taiwan University (Taipei, Taiwan)
- 永井 健治, 蛍光から発光へ: バイオイメーキングの新潮流, 第77回バイオメクフォーラム21, 2015/07/04, 大阪大学基礎工学部 (大阪府豊中市)
- Takeharu Nagai, Genetically-encoded tools to optically control and image cellular functions, The 4th Hsinchu Summer Course and Workshop Single Molecule/Nanoparticle Spectroscopy and Imaging, 2015/07/09, The Department of Applied Chemistry, National Chiao Tung University (Hsinchu, Taiwan)
- 永井 健治, 細胞の構造・動態・機能を可視化するための遺伝子ツール, 第31回分析電子顕微鏡討論会, 2015/09/01, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県千葉市)
- 永井 健治, 蛍光・化学発光イメーキングに相応しいカメラの選び方, 第53回日本生物物理学会年会, 2015/09/13, 金沢大学角間キャンパス 自然科学本館 (石川県金沢市)
- 和沢鉄一, 新井由之, 永井健治, 光スイッチング蛍光タンパク質が実現する次世代超解像イメーキング, 第53回日本生物物理学会年会, 2015/09/15, 金沢大学角間キャンパス 自然科学本館 (石川県金沢市)
- Takeharu Nagai, Genetically-encoded tools to optically control and image physiological events, PRESTO-Harvard Joint Symposium, 2015/09/21, Harvard University (Cambridge, USA)
- 永井 健治, 生物発光が拓く未来の生活, 第24回日本バイオイメーキング学会 学術集会 公開講座 「私たちの暮らしとバイオイメーキング～見えるからわかるバイオの世界～」, 2015/09/26, 東京理科大学 葛飾キャンパス (東京都葛飾区)
- Takeharu Nagai, Genetically-encoded tools to optically control and image neuronal activity, 4th International Frontiers in Neurophotonics Symposium, 2015/10/04, the Musee de la civilisation (Quebec city, Canada)
- Tomiki Matsuda, Takeharu Nagai, Fluorescent and bioluminescent sensors for imaging biological events, Roundtable Discussion Photoreceptors, DFG-Rundgespräch, 2015/10/10, Benedictine abbey of Frauenworth (Chiemsee, Germany)
- Adam M. Wawro, Takahiro Muraoka, Kazushi Kinbara, Monodisperse PEG derivatives: straightforward synthesis and analysis revisited, 16th Tetrahedron Symposium Asia Edition, 2015/11/11, Shanghai Institute of Organic Chemistry (Shanghai, China)
- 永井 健治, Bioimaging with genetically-encoded fluorescent and chemiluminescent proteins, 北海道大学ニコイメーキングセンター学術講演会, 2015/11/20, 北海道大学電子科学研究所 (北海道札幌市)
- 新井 由之, 全反射照明蛍光顕微鏡による生体分子観察, 顕微鏡学会 様々な極微イメーキング技術若手研究会 第3回研究会, 2015/11/23, 志んぐ荘 (兵庫県たつの市)
- Takeharu Nagai, Genetically-Encoded Tools to Optically Control and Image Ca²⁺ Dynamics, the 2nd EastAsia Microscopy Conference (EAMC2), 2015/11/27, The Himeji Chamber of Commerce and Industry (HCCI) (Himeji, Hyogo, JAPAN)
- Takeharu Nagai, Bioimaging with bright luminescent proteins: Comparing pros and cons of fluorescence and luminescence, Pacificchem 2015 (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), 2015/12/15, Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii)
- **A01 公募班 【研究代表: 茅 元司】**
 - 茅 元司, 1分子計測技術を用いて効率的な筋収縮の仕組みを紐解く, 第87回日本生化学会大会シンポジウム「次世代型筋研究の夜明け」, 2014/10/15-2014/10/18, 国立京都国際会館
 - 茅 元司, 1分子顕微鏡を用いて見えてきた筋肉の効率的な収縮メカニズム, 日本光学会年次学術講演会シンポジウム「バイオフィotonicsの展望」, 2014/11/05-2014/11/07, 筑波大学東京キャンパス文京校舎
 - Motoshi Kaya, Molecular mechanism of efficient muscle contraction revealed by single molecule approach, 5th Asian and Pacific-Rim Symposium on Biophotonics, 2015/04/22-2015/04/24, パシフィック横浜 (神奈川県・横浜)
 - 茅元司, 効率的な骨格筋収縮を担うミオシン分子の仕組みを紐解く. 日本体育学会, バイオメカニクス領域キーノートレクチャー, 2015/08/25-2015/08/27, 国土館大学 (東京都・世田谷区)
 - 茅元司, 鷲尾巧, 久田俊明, 樋口秀男, 効率的な筋収縮を実現するミオシン分子間の協同的な分子メカニズム, 日本生理学会シンポジウム, 2016/03/22-2016/03/24, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- **A01 公募班 【研究代表: 井上 圭一】**
 - 井上圭一, 海から見つかった新駆動ナトリウムポンプ型ロドプシンについて, 日本分光学会平成24年度中部支部東海・信州ブロック分子科学研究所講演会, 2013/03/21-2013/03/21, 岡崎
 - 井上圭一, 海洋性細菌から発見された光駆動ナトリウムポンプ型ロドプシン, 日本生体エネルギー研究会 第39回

討論会, 2013/12/19-2013/12/19, 静岡

- Keiichi Inoue, Spectroscopic study on the dynamics and structure of sodium pump rhodopsin, 日本化学会第 94 春季年会(2014), 2015/03/27-2015/03/27, Funabashi, Japan
- K. Inoue, Microbial rhodopsins: Light-driven biological proton, chloride and sodium transporters, BIT's 4th Annual World Congress of Advanced Materials-2015, 2015/05/27-2015/05/29, Chongqing, China

● **A01 公募班 【研究代表：藤原 敬宏】**

- 藤原敬宏, 1 分子局在超解像法による細胞内動態の理解に向けて, 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会, 2015/05/13-2015/05/15, 国立京都国際会館
- Takahiro Fujiwara, Plasma membrane compartmentalization and function as revealed by ultrafast single fluorescent-molecule imaging, Cold Spring Harbor Asia Conferences on New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms, 2015/12/07-2015/12/11, Suzhou, China

● **A01 公募班 【研究代表：原田 慶恵】**

- Yoshie Harada, Studies on biomolecules using single-molecule imaging techniques, The 19th Annual Conference of the Biophysical Society of ROC, 2014/05/08, Cheng Kung University, Tainan, Taiwan
- Yoshie Harada, Application of fluorescent diamond nanoparticles to bio-imaging, Diamond Quantum Sensing Workshop 2015, 2015/08/07, 香川国際会議場
- Ryuji Igarashi, Shingo Sotoma, Masahiro Shirakawa and Yoshie Harada, Application of fluorescent diamond nanoparticles to bio-imaging, JSAP-OSA Joint Symposia 2015, 2015/09/16, 名古屋国際会議場

● **A01 公募班 【研究代表：高森 茂雄】**

- Takamori S., Distinct proton dynamics in GABAergic synaptic vesicles., JSPS Core-to-Core Symposium 'Mechanism of Synaptic Transmission', 2015/09/17-2015/09/18, Paris (フランス)

● **A01 公募班 【研究代表：村越 秀治】**

- 村越秀治, 2 光子励起技術による単一スパイン内生化学反応の可視化と操作, 第 37 回日本神経科学学会, 2014/09/11-2014/09/13, 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

● **A01 公募班 【研究代表：城口 克之】**

- 城口克之, 細胞集団中のマイノリティのジェノタイプを一細胞レベルで同定する方法の開発, 日本生物物理学会年会, 2015/09/14, 金沢大学 (石川県金沢市)

● **A01 公募班 【研究代表：山下 高廣】**

- 山下高廣, Molecular properties of vertebrate non-visual opsins, Opn5 and Opn5-like protein, 15th International Conference on Retinal Proteins, 2012/10/03, スイス、アスコナ

● **A01 公募班 【研究代表：水上 進】**

- 水上進, ナノバイオプローブ設計を基盤とする 分子イメージング技術開発, 日本化学会 生体機能関連化学部会 若手の会 サマースクール, 2012/07/27, 休暇村志賀島 (福岡県福岡市)
- 水上進, 蛋白質ラベル化技術に基づく生体分子の少数活性化へのアプローチ, 日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会, 2013/05/22, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市)

● **A01 公募班 【研究代表：政池 知子】**

- 政池知子, 池上浩司, 瀬藤光利, 鈴木裕, 西坂崇之, 蛋白質 1 分子の構造変化と化学反応を可視化する, 2013 年度 若手イメージング研究会, 2013/09/07-2013/09/07, 東京理科大学
- 政池知子, 池上浩司, 瀬藤光利, 鈴木裕, 西坂崇之, 1 個から数個の分子が引き起こす運動と酵素反応のイメージング, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013/10/29-2013/10/29, 京都国際会議場
- 政池知子, 鈴木裕, 西坂崇之, プローブの向きと位置から蛋白質の局所構造変化を検出する, 日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム, 2013/11/16-2013/11/16, ウィンクあいち
- 政池知子, Imaging Motions, Functions, and Reactions of Single Molecules, OIST workshop Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses Okinawa Institute of Science and Technology Graduate School, 2014/04/21, 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県)

● **A02 計画班 【研究代表：石島 秋彦】**

- 石島 秋彦, 単一バクテリア上の複数モーター回転の同時計測による情報伝達機構の解明, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12/11-2012/12/14, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)
- 佐川 貴志, 福岡 創, 井上 裕一, 高橋 泰人, 石島 秋彦, ケージドセリン光分解とべん毛モーター回転計測を用いた大腸菌走化性応答の高時間分解 能計測 (Response of flagellar motor rotation to photoreleased serine from caged-compound in an E. coli cell), 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013/08/25-2013/09/27, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

- **A02 計画班 【研究代表：前島 一博】**
 - Taniguchi, Y, Single molecules meet systems biology - Quantifying the E. coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells., Bio-IT World Expo 2011, 2011/04/13-2011/04/13, World Trade Center (Boston, USA)
 - Kazuhiro Maeshima, How is a Long Strand of DNA Compacted into a Chromosome?, Albany 2011: 17th Conversation, 2011/06/14-2011/06/19, Albany, SUNY, NY, USA,
 - 谷口 雄一, 遺伝子発現のノイズ性の起源, 超階層シグナル伝達研究の新展開, 2012/10/01-2012/10/01, 生理学研究所
 - 谷口 雄一, 1細胞スケールでの遺伝子発現の複雑性を理解する, 日本分子生物学会, 2012/12/11-2012/12/11, 福岡国際会議場
 - 谷口 雄一, 単一細胞レベルでの遺伝子発現のばらつき法則性, 定量オミックスワークショップ, 2013/01/22-2013/01/22, 大阪大学
 - 前島一博, 少数の遺伝子が、転写因子によって、一体どのように 検索されるのか? 細胞のなかの「ゆらぐ」クロマチン, 第二回少数性生物学トレーニングコース セミナー, 2014/08/01-2014/08/01, 大阪大学産業科学研究所 (大阪府茨木市)
 - Kazuhiro Maeshima, How are the two sets of genomic DNA organized in the cells?, Pacificchem2015 Symposium#137*Life at Small Copy Numbers, 2015/12/19-2015/12/19, Sheraton Waikiki (Honolulu, Hawaii)
- **A02 計画班 【研究代表：上田 泰己】**
 - 鶴飼英樹, 哺乳類概日時計の頑健性・適応性をもたらす分子機構, 第 84 回日本生化学会大会, 2011/09/21, 京都国際会館
 - 上田泰己, 「時間」の生命科学, 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 2012/04/20, 名古屋国際会議場、愛知
 - 上田泰己, 個体レベルのシステム生物学：全脳・全身透明化の先に見えること, 第 4 回 マーモセット研究会, 2015/01/22-2015/01/23, 犬山国際観光センター 「フロイデ」(愛知県犬山市)
 - Hiroki R. Ueda, Whole-body and whole-brain imaging with single-cell resolution by CUBIC, 2015 Society for Neuroscience, 2015/10/16-2015/10/26, Chicago (USA)
- **A02 公募班 【研究代表：大場 雄介】**
 - 大場雄介, 癌細胞におけるシグナル伝達イメージングとその応用, 第 87 回日本生化学会大会 (招待講演), 2014/10/17, 国立京都国際会館 (京都府京都市)
 - 大場雄介, イメージング技術を用いた分子標的治療薬効果判定法の開発と応用, 第 4 回北海道探索病理学研究シンポジウム (招待講演), 2014/10/25, 京王プラザホテル札幌 (北海道札幌市)
- **A02 公募班 【研究代表：小嶋 誠司】**
 - 小嶋誠司, 細菌べん毛の構築と機能を制御するしくみ, 第 86 回日本細菌学会総会, 2013/03/19-2013/03/19, 幕張メッセ 国際会議場
- **A02 公募班 【研究代表：竹内 裕子】**
 - 竹内裕子, Limited spread of second messenger molecules in the olfactory cilium, 大阪大学国際シンポジウム, 2015/03/20-2015/03/20, 大阪大学 (大阪府豊中市)
- **A02 公募班 【研究代表：堀江 恭二】**
 - 堀江恭二、吉田純子, ホモ変異体マウス ES 細胞バンクを用いた包括的遺伝子機能解析, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014/11/25-2014/11/27, 横浜
- **A02 公募班 【研究代表：宮崎 牧人】**
 - 宮崎牧人, 構成論的アプローチによるアクチン細胞骨格の形成機構の解明, 理研セミナー, 2015/03/24-2015/03/24, 東京大学、東京
 - 宮崎牧人, 細胞サイズ閉鎖空間内でのアクトミオシンリングの自発形成と収縮, 第 5 回分子モーター討論会, 2015/06/13-2015/06/14, 東京
- **A02 公募班 【研究代表：森本 雄祐】**
 - 森本雄祐、上田昌宏, High-sensitivity fluorescence imaging of membrane potential in Dictyostelium, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015/09/15, 金沢、金沢大学
- **A02 公募班 【研究代表：岡田 康志】**
 - 岡田康志, Ultrafast superresolution fluorescence imaging with spinning disk confocal microscope optics, 9th Asian Biophysics Association Symposium, 2015/05/09-2015/05/12, 杭州・中国
 - 岡田康志, 超解像・1分子イメージングで探る細胞内物質輸送の制御機構, 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会シンポジウム, 2015/05/14, 京都国際会議場 (京都府・京都市)

- 岡田康志, 1 分子イメージングによる細胞質内での反応速度定数の直接計測, ナノメディシン分子科学公開シンポジウム, 2015/07/01, 東京大学 (東京都文京区)
- 岡田康志, 細胞極性制御における自発的対称性の破れと秩序形成, 山田研究会, 2015/11/17, ラフォーレ修善寺 (静岡県・伊豆市)
- 岡田康志, 細胞の中で分子モーターが迷子にならない機構, 膜生物学・医学学術講演会, 2016/02/26, 神戸大学医学部(兵庫県・神戸市)
- **A02 公募班 【研究代表: 矢島 潤一郎】**
 - 矢島潤一郎, 生体分子機械・キネシンの運動方向決定機構, 第 68 回日本物理学会, 2013/03/26, 広島大学 (広島県、広島市)
- **A02 公募班 【研究代表: 並木 繁行】**
 - 坂本寛和、並木繁行、廣瀬謙造, 超解像イメージングで見えたシナプス小胞開口放出が起こる場所, 2013 年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ, 2013/08/29-2013/08/31, 名古屋国際会議場
- **A02 公募班 【研究代表: 丹羽達也】**
 - 丹羽達也, 再構築型生体外タンパク質合成系を用いた分子シャペロンによる凝集抑制効果の大規模解析, 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012/09/22-2012/09/24, 名古屋大学 東山キャンパス
- **A02 公募班 【研究代表: 小嶋 勝】**
 - Masaru Kojima, Control of Biological Clock Activity Capsulated by Lipid-mono-layer, IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA), 2012, 2012/05/14-2012/05/18, St. Paul, MN, USA
- **A02 公募班 【研究代表: 笠井 倫志】**
 - Kasai RS, Transient GPCR dimers trigger signaling as revealed by single-molecule imaging, The 2013 Cold Spring Harbor Asia Conference "NEW ADVANCES IN OPTICAL IMAGING OF LIVE CELLS & ORGANISMS", 2013/08/20-2013/08/23, 中国, 蘇州
- **A02 公募班 【研究代表: 桑田 昌宏】**
 - 桑田昌宏, 核-細胞質間の物質輸送を制御する核膜孔複合体内の分子動態, 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013/06/19-2013/06/21, 名古屋
- **A02 公募班 【研究代表: 曾和 義幸】**
 - Sowa, Y., Imaging of fluorescently-tagged motor components of bacterial flagella., 第 50 回生物物理学会年会, 2012/09/23, 名古屋大学 (愛知県)
- **A02 公募班 【研究代表: 川岸 郁朗】**
 - 川岸郁朗, 分子イメージングによる異物排出タンパク質細胞内動態の解析, 【少数性生物学】第 2 回領域会議, 2012/06/11-2012/06/12, びわこクラブ (滋賀県)
 - 川岸郁朗, Molecular imaging of the xenobiotic efflux proteins in Escherichia coli, 【少数性生物学】第 1 回国際会議「Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking」, 2012/10/16-2012/10/19, 中央研究院 (台湾)
- **A02 公募班 【研究代表: 広瀬 恵子】**
 - 広瀬恵子, Approaches to understand cooperative systems of small numbers of molecules, 日本生物物理学会, 2013/10/29, 京都国際会館 (京都)
- **A03 計画班 【研究代表: 富樫 祐一】**
 - 小松崎民樹, 階層的な相関関係を定量化する情報理論について, 「理論と実験」研究会 2011, 2011/10/07, 広島大学 (広島県)
 - 小松崎民樹, 1 分子実験を読み解くための新しい実践型分子理論を目指して, 日本化学会第 92 春季年会"第 2 次先端ウォッチング高次分子システムのための分子科学:実験と理論の挑戦", 2012/03/26, 慶應義塾大学(神奈川県)
- **A03 計画班 【研究代表: 今田 勝巳】**
 - Imada K., Structural insight into the molecular mechanism of the bacterial flagellar type III secretion system and its evolutionary relation to F₁-ATPase, XIII International congress of bacteriology and applied microbiology, 2011/09/07, Sapporo Convention Center (Sapporo)
 - 森本雄祐, 細菌べん毛タンパク質輸送装置近傍の局所 pH の測定, 日本生物物理学会第 49 回年会, 2011/09/16, 兵庫県立大学・姫路書写キャンパス(兵庫県)
 - 内橋貴之, High-Speed Atomic Force Microscopy : a tool for elucidating structural dynamics of membrane proteins, 第 49 回日本生物物理学会年会シンポジウム, New experimental tools for structural changes of membrane proteins : Beyond X-ray structure, 2011/09/17, 兵庫県立大学・姫路書写キャンパス(兵庫県)
 - 南野徹, バクテリアべん毛 III 型蛋白質輸送のエネルギー共役機構, 第 84 回日本生化学会大会, 2011/09/21, 京都国際会館(京都)

- 内橋貴之, 高速原子間力顕微鏡で明らかにするタンパク質のダイナミクス, 先端的共通技術部門平成 23 年度オープンセミナー日本顕微鏡学会走査型プローブ顕微鏡(SPM)分科会平成 23 年度オープン研究会走査型プローブ顕微鏡における最先端技術～イノベーションのキーテクノロジー～, 2011/12/12, 独立行政法人物質・材料研究機構千現地区(茨城県)
- 南野徹, バクテリアペニ毛蛋白質輸送におけるエネルギー産生機構, 第 7 回トランスポーター研究会年会, 2012/06/10, 京都大学農学部 (京都府)
- Imada K, Molecular Mechanism of bacterial flagellar construction and its regulation., 日本生物物理学会第 50 回年会, 2012/09/22, 名古屋大学 (愛知県)
- 田中のみか, 慶澤景子, 渡邊朋信, 川口辰也, 今田勝巳., YFP の 1 残基挿入変異が引き起こす構造変化と蛍光特性, 第 86 回日本生化学会大会, 2013/09/11, パシフィコ横浜 (横浜)
- 内橋貴之, 高速原子間力顕微鏡による生体試料の動的構造解析 一分子から細胞まで, 第 1 回新学術領域「植物環境感覚」「少数性生物学」ジョイントシンポジウム, 2013/12/17, 大阪大学中之島センター
- **A03 公募班 【研究代表: 林 久美子】**
 - 林 龍之介, 中村 修一, 工藤 成史, 佐々木 一夫, 野地 博行, 林 久美子, 回転電場を用いた F1-ATPase の一分子計測による 拡散の Giant acceleration の観察 II, 第 52 回日本生物物理学会年会, 2014/09/27, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌)
- **A03 公募班 【研究代表: 齊藤 稔】**
 - 齊藤稔, 杉山友規, 金子邦彦, 化学反応における少数性効果, 生命ダイナミクスの数理とその応用: 異分野とのさらなる融合, 2014/12/02-2014/12/04, 東京大学駒場キャンパス (東京)
 - 齊藤稔, 化学反応における少数性効果の解析, ランダム力学系理論とその応用 (2015), 2015/09/27-2015/09/30, 京都大学数理解析研究所 (京都府・京都市)
- **A03 公募班 【研究代表: 市川 正敏】**
 - 市川正敏, 西上幸範, 伊藤弘明, 園部誠司, 非平衡界面のダイナミクス: コーヒーの湯気から細胞まで, 第 14 回光科学若手研究会, 2015/04/18-2015/04/18, 京都大学吉田キャンパス
- **A03 公募班 【研究代表: 鈴木 宏明】**
 - 鈴木宏明, 細胞機能の再構築を目指すマイクロ技術, 第 86 回日本生化学会年会, 2013/09/11-2013/09/13, パシフィコ横浜
- **A03 公募班 【研究代表: 柴田 達夫】**
 - 柴田達夫, Bifurcation analysis of spontaneous cell asymmetry formation for eukaryotic chemotaxis, International Conference on Mathematical Modeling and Applications 2015, 2015/10/26-2015/10/29, 明治大学中野キャンパス・東京都・中野
- **A03 公募班 【研究代表: 石原 秀至】**
 - 石原秀至, Estimating reaction diffusion equations for signaling dynamics in Dictyostelium, 次世代情報処理における揺らぎと確率 2, 2012/06/19-2012/06/20, 理化学研究所 和光キャンパス 大河内記念ホール 埼玉県和光市
- **A03 公募班 【研究代表: 濱田 勉】**
 - 濱田勉, 膜の動態システムを設計する, サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所 シンポジウム「生体膜における生命現象解明の新展開」, 2013/07/17-2013/07/17, サントリー生物有機科学研究所 (大阪府)
- **A03 公募班 【研究代表: 粟津 暁紀】**
 - 粟津暁紀, 生体分子の局所的物性変化が運動-機能に及ぼす影響の粗視化モデル による解析, 生命科学に取り組む異分野融合と交流の推進、スーパーコンピュータ「京」と生命科学, 2013/07/19-2013/07/19, 岡山大学

主な研究発表一覧

図書

● 総括班

- 永井健治、村越秀治、大場雄介、富樫祐一、小松崎民樹、城口克之、城口克之、前島一博、栗津暁紀、鈴木宏明、茅元司、矢島潤一郎、谷口雄一、小嶋誠司、今田勝巳、石島秋彦、福岡 創、蔡 榮淑、堀川一樹、大出晃士、上田泰己、日本評論社、少数性生物学, (2017), 178

● A01 計画班 【研究代表：永井 健治】

- 永井健治、松田知己、化学同人、1 分子ナノバイオ計測, 15 章 蛍光タンパク質が拓く超解像技術, (2014), 190-199
- 永井健治、朝倉書店、発光の事典、蛍光イメージング/蛍光タンパク質 (7.1.3), (2015), 12
- 永井健治、朝倉書店、発光の事典、蛍光イメージング/タグ法 (7.1.8), (2015), 7
- 新井由之、朝倉書店、発光の事典、蛍光イメージング/蛍光イメージング技術/画像処理 (7.2.1.3), (2015), 6
- 新井由之、朝倉書店、発光の事典、蛍光イメージング/蛍光イメージング技術/応用例 (7.2.1.4), (2015), 7
- 永井健治、朝倉書店、発光の事典、蛍光イメージング/イメージングの対象/蛍光タンパク質を利用した機能イメージング (7.2.2.2.1), (2015), 6
- 永井健治、松田知己、朝倉書店、発光の事典、蛍光イメージング/光退色/光活性化を利用したイメージング (7.3.6), (2015), 8
- 永井健治、松田知己、共立出版、新・生細胞蛍光イメージング、蛍光タンパク質の利用(第 13 章), (2015), 13
- 永井健治、小寺一平、共立出版、新・生細胞蛍光イメージング、共鳴エネルギー移動(FRET)の基礎(第 19 章), (2015), 8
- 永井健治、齊藤健太、共立出版、新・生細胞蛍光イメージング、FRET の測定法と評価(第 20 章), (2015), 11
- 山中真仁、谷知己・藤田克昌、永井健治、共立出版、新・生細胞蛍光イメージング、光学顕微鏡の組み立て(実習 2), (2015), 6
- 原口徳子、永井健治、松田知己、共立出版、新・生細胞蛍光イメージング、スペクトルイメージングによる FRET の検出(実習編・実習 7-1), (2015), 4
- 永井健治、共立出版、新・生細胞蛍光イメージング、アクセプターブリーチングによる FRET の検出(実習編・実習 7-2), (2015), 7
- 小寺一平、谷知己、永井健治、共立出版、新・生細胞蛍光イメージング、分光光度計でのスペクトル測定と 1 分子 FRET(実習編・実習 10-2), (2015), 3
- 新井由之、学研メディカル秀潤社、ImageJ ではじめる生物画像解析、プラグインによる自分専用解析ツールの作成：自動追跡ツール PTA を例に(第 5 章②), (2016), 13

● A01 公募班 【研究代表：茅 元司】

- 茅 元司、化学同人、1 分子生物学, 2 章筋肉ミオシン, (2014), 292

● A01 公募班 【研究代表：井上 圭一】

- 井上圭一、朝倉書店、光と生命の事典、キサントロドブシン, (2016), 60-61

● A01 公募班 【研究代表：高森 茂雄】

- Takamori S., Springer Publishing, Transport of amino acid neurotransmitters into synaptic vesicles. In 'Presynaptic Terminals' edited by Mochida S., , (2015), 20
- 高森茂雄、文光堂、脳神経外科医が知っておくべきニューロサイエンスの知識 I-8 レセプター, , (2015), 2
- 高森茂雄、文光堂、脳神経外科医が知っておくべきニューロサイエンスの知識 I-10 トランスポーター, , (2015), 3

● A01 公募班 【研究代表：政池 知子】

- 西坂崇之、朝倉書店、発光の辞典、蛍光偏光イメージング , (2012), 2
- 木下佳昭、政池知子、西坂崇之、化学同人、1 分子生物学、蛍光偏向イメージング, (2014), 193-194

● A02 計画班 【研究代表：石島 秋彦】

- 福岡 創、石島 秋彦、化学同人、1 分子ナノバイオ計測、光学顕微鏡を用いた大腸菌べん毛モーターの機能計測および蛍光イメージング , (2014), 41-49
- 石島 秋彦、井上 裕一、化学同人、1 分子生物学, 18 章 ナノ計測, (2014), 304

● A02 計画班 【研究代表：前島 一博】

- 谷口雄一、化学同人、1 分子ナノバイオ計測、転写翻訳 1 細胞定量測定, (2014), 170-179

● A02 公募班 【研究代表：大場 雄介】

- 大場雄介、南江堂（日本臨床腫瘍学会編）、新臨床腫瘍学[第 4 版]（シグナル伝達系）, , (2015), 738 (14- 22)

- **A02 公募班 【研究代表：竹内 裕子】**
 - 竹内 裕子, 中外医学社, *Clinical Neuroscience* (05月号 感覚とその異常), 嗅覚, (2015), 516-519
- **A02 公募班 【研究代表：宮崎 牧人】**
 - 宮崎牧人、石渡信一 (訳), 丸善出版, *パリティ*, 細胞に働く力とエネルギー論, (2016), 32-40
- **A02 公募班 【研究代表：矢島 潤一郎】**
 - 矢島潤一郎, 化学同人, *1分子ナノバイオ計測*, *リニアモーター：キネシン*, (2014), 59-68
- **A02 公募班 【研究代表：曾和 義幸】**
 - 西山雅祥, 曾和義幸, 化学同人, *月刊化学* 2013年9月号, , (2013), 80(33-38)
 - 曾和義幸, 化学同人, *1分子生物学* (原田慶恵・石渡信一編), *バクテリアべん毛モーター*, (2014), 75-86
- **A03 計画班 【研究代表：富樫 祐一】**
 - Akinori Baba, Tamiki, Komatsuzaki, John-Wiley & Sons, *Advances in Chemical Physics, Volume 146: Single Molecule Biophysics: Experiments and Theory*, , (2011), 29
 - T. Komatsuzaki, S. Takahashi, M. Kawakami, Haw Yang, Robert Silbey, John-Wiley & Sons, "Single Molecule Biophysics: Experiment and Theory", *Advances in Chemical Physics 146 (Eds.)*, , (2011), 512
 - 小松崎 民樹, 公益社団法人日本化学会 学術研究活性化委員会編, 第二次先端ウォッチング調査：融合領域の創生「高次分子システムのための分子科学：実験と理論の挑戦」, "1分子実験を読み解くための新しい実践型分子理論を目指して", , (2012), 4
 - Thomas Peacock, George Haller; 小松崎民樹 訳, 丸善出版, 「ラグランジュ協同構造一流体の流れに隠れた骨格」(*パリティ* 2013年11月号内), , (2013), 9
- **A03 計画班 【研究代表：今田 勝巳】**
 - T. Uchihashi and T. Ando, Springer, *Single-molecule Studies of Proteins. Biophysics for the Life Sciences*, , (2013), 269
 - 内橋貴之、安藤敏夫, 化学同人, *膜タンパク質構造研究*(岩田想編), , (2013), 8
 - T. Ando, T. Uchihashi, Pan Stanford Publishing, *Nanoscale Liquid Interfaces: Wetting, Patterning, and Force Microscopy at the Molecular Scale*, , (2013), 30
 - T. Uchihashi, N. Kodera and T. Ando, Pan Stanford Publishing, "Development of high-speed AFM and its biological applications", Chapter 8 in *Atomic Force Microscopy in Nanobiology*, , (2014), 34
 - Takayuyki Uchihashi, Noriyuki Kodera, and Toshio Ando, Springer, *Noncontact Atomic Force Microscopy, Chapter 22: High-speed Atomic Force Microscopy*, (2015), 481-518
 - 内橋貴之, 朝倉書店, *光と生命の事典*, 第5章 「光による生命現象の計測」177節 高速原子間力顕微鏡, (2016),
- **A03 公募班 【研究代表：市川 正敏】**
 - 市川 正敏, 化学同人, *原生物フロンティア*, 第2章 "原生物をより深く理解するための物理", (2014), 12
- **A03 公募班 【研究代表：濱田 勉】**
 - Mun'delanji C. Vestergaard, Masamune Morita, Tsutomu Hamada, and Masahiro Takagi, Wiley, *Metabolic syndrome and neurological disorders* 2013, , (2013), 576(451-455)

研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【取得】

● A01 計画班 【研究代表：永井 健治】

➤ 知的財産権の名称：蛍光蛋白質

国内・外国の別： 国内

発明者名： 永井健治、ティバリ・クマール・ダーメンドラ、新井由之

権利者： 大阪大学

登録番号： 特許第 6115923 号

取得年月日： 2017 年 03 月 31 日

出願番号： 特願 2015-536629

出願年月日： 2014 年 09 月 11 日

【出願】

● A01 計画班 【研究代表：野地 博行】

➤ 知的財産権の名称：高密度微小チャンバーアレイおよびその製造方法

国内・外国の別： 国内

発明者名： 野地博行, 渡邊力也, 菅裕明, 藤田大士

権利者： 東京大学

出願番号： 特願 2013-171493

出願年月日： 2013 年 08 月 21 日

➤ 知的財産権の名称：検出装置及び検出方法

国内・外国の別： 外国(PCT 出願)

発明者名： 野地博行、金秀炫、飯野亮太、太田淳、徳田崇、笹川清隆、野田俊彦

権利者： 東京大学

出願番号： PCT/JP2013/073147

出願年月日： 2013 年 08 月 29 日

● A01 計画班 【研究代表：永井 健治】

➤ 知的財産権の名称：蛍光観察方法及び蛍光観察装置

国内・外国の別： 国内

発明者名： 藤田克昌、永井健治、齊藤健太、山中真仁、瀧本真一

権利者： オリパス株式会社

出願番号： 特願 2012-068686

出願年月日： 2012 年 03 月 26 日

➤ 知的財産権の名称：蛍光蛋白質

国内・外国の別： 外国(PCT 出願、各国移行)

発明者名： 永井健治、ティバリ・クマール・ダーメンドラ、新井由之

権利者： 大阪大学

出願番号： PCT/JP2014/074121

15/021371 (PCT 出願アメリカ移行)

14843850.0 (PCT 出願 EPO 移行)

出願年月日： 2014 年 09 月 11 日

- **知的財産権の名称**：蛍光蛋白質
国内・外国の別：国内
発明者名：永井健治、高内大貴、新井由之、中野雅裕
権利者：大阪大学
出願番号：特願 2015-097655
出願年月日：2015年05月12日
- **知的財産権の名称**：タンパク質の凝集抑制剤及びタンパク質の凝集抑制方法
国内・外国の別：国内
発明者名：金原数、村岡貴博、栗之丸隆章
権利者：東京工業大学
出願番号：特願 2016-036136
出願年月日：2016年02月26日
- **知的財産権の名称**：蛍光蛋白質
国内・外国の別：国内
発明者名：永井健治、篠田肇、Yuanqing Ma、松田知己
権利者：大阪大学
出願番号：特願 2016-046953
出願年月日：2016年03月10日
- **A01 公募班 【研究代表：城口 克之】**
 - **知的財産権の名称**：マイクロウェルプレート、マイクロウェル装置、細胞解析方法及びマイクロウェルプレートの製造方法
国内・外国の別：国内
発明者名：鈴木宏明、岡野太治、城口克之
権利者：中央大学、理化学研究所
出願番号：特願 2015-044934
出願年月日：2015年03月06日
- **A02 計画班 【研究代表：前島 一博】**
 - **知的財産権の名称**：顕微鏡、焦準器具、流体保持器具、及び光学ユニット
国内・外国の別：外国(PCT出願)・国内
発明者名：谷口雄一、西村和哉
権利者：独立行政法人理化学研究所
出願番号：特願 2013-079956
PCT/JP2014/059883
出願年月日：2013年04月05日
2014年04月03日
- **A02 公募班 【研究代表：大場 雄介】**
 - **知的財産権の名称**：フェルスター共鳴エネルギー移動用ポリペプチド
国内・外国の別：外国(PCT出願)
発明者名：大場雄介
権利者：北海道大学
出願番号：PCT/JP2014/060185
出願年月日：2014年04月08日

アドバイザーからのことば

柳田 敏雄 (評価委員 大阪大学・理化学研究所・情報通信研究機構)

少数というのは戦略なのか、仕方ないのかという私の問いに対して、本領域がどのように考え、取り組んできたのか見せて頂いてきた。これまでいくつも特定領域や新学術領域を見てきたが、この領域の特徴的な点は領域内共同研究が非常に活発だったことである。領域代表の永井さんが領域メンバーの交流促進に熱心だったことが功を奏したのだと思う。たとえば、野地班が開発したデジタル ELISA を用いて大場班と研究を進め、インフルエンザウイルス単体での感染力は実は低く、多数のウイルス粒子が存在する中でわずかな「少数の」粒子のみが感染を引き起こしているという結果を示していたが、これはまさに少数性領域ならではの共同研究で、おもしろいと感じた。このことが、ほかのウイルスはたださぼっているだけなのか、それともそういう集団も含めてシステムとして働くことが大事であることを意味するのかを知るにはさらなる解析が必要である。しかし、こういった構図はほかの階層・生物においても観察されてきている。例えば、働きアリには必ずある一定の割合でさぼっているアリが存在し、働きアリが働けなくなった時にバッファーとしての役割を果たしている。また、アクトミオシンの筋収縮においても、すべてのミオシンが同時に働いているわけではなく、ブラウン運動で適度にゆらぎつつ、システムとして協同的な働きをしている。本領域に参加しているメンバーは、日本でもトップクラスの研究者が多いため、論文が出ることは心配してはなかったが、アウトリーチ活動にも精力的に取り組んでいたことは評価したい。特に、私も参加したが、2週間の長期にわたるトレーニングコースで実習のみならず毎日議論をするという試みは、学生や若手に大きな刺激になったのではないかと思う。本領域でも、他の領域でも見られるような領域のシンボルとなる「絵」が掲げられていた。他の領域の場合は、抽象的・概念的な絵が多いように思うが、本領域の絵の中では、ある分子は働いていると思いきや、別の分子は寝そべってさぼっている。そして、シグナルが来た時にはみな一致団結して働いている。こういった考えは、生物物理においても一部の人にしか共有されていなかったように思うが、現在では、生物物理のみならず、他の分野領域においても共有されつつある概念となってきたように思う。本領域の貢献のみがすべてではないとは思いますが、少なくとも大きな担い手として活躍してきたことは間違いないだろう。しかしながら、本領域出身のメンバーは、生命科学研究の主流になるのではなく、常に「少数」の立場で、新しい研究を展開し続けていくことを望む。

新学術領域「少数製生物学」終了にあたって

神原 秀記 (評価委員 日立製作所・早稲田大学)

本新学術領域は生命活動に関与している種々分子あるいは細胞の中には数は少ないが重要な働きをしているものがあるに違いないのでそれらを探求しようという趣旨で始まったと了解している。最初は生物活動の少数成分は揺らぎの範疇であり、本当に重要なものが発見されるか興味があった。この領域が終了するころになると種々重要な少数分子あるいは細胞が見つかったことは大変うれしいことである。多くの個性ある細胞が集まり、調和を取りながら種々機能しているのが生命体である。一つ一つの細胞を一人一人の人間に置き換えてみるとその仕組みがわかるような気がする。人間集団は個性のある(様々な揺らぎのある)集団である。刺激があると数は少ないが大きく応答する人間が出てくる。それらの応答(主張)が周りに受け入れられて人数が増えてくると全体としての応答に繋がる。この場合も最初のトリガーになるのは少数である。細胞集団もこのような変化をするに違いない。刺激に対して様々な応答をする細胞群の中でさらに周りに影響を与えていく少数の細胞が全体の流れを決めてゆくのだろう。そのリーダー格の細胞はあらかじめ決まっているのではなく、最初のリーダー細胞がいなくなると新たなリーダーが出てくるに違いない。人間社会のように。このように考えるとこの新学術領域で注目した少数のリーダー格の分子や細胞の解明こそが今後生物関連分野のキーになるように思えてくる。この分野を切り開いたのはこの新学術領域を一生懸命進めた皆さんであり、ぜひ大きな分野へと発展させてほしい。

物理屋としての個人的な嗜好ですが、物事が1、2、3つぐらいまでは、問題が解けてしまってあまり面白くないんです。1次、2次、3次方程式だとか1次、2次、3次微分とか、1次元、2次元、3次元とか。一方、個数があまりたくさんになると統計量として扱うことになり、結晶だとかアモルファスだとか液体とか固体とかとして定義されてしまって、また面白くない。10個とか20個ぐらいの多体問題は解くには手に負えなくて、多様性が示されて面白い。それぐらいの分子数あるいは原子数を扱った科学が、いわゆるナノテクノロジーあるいはナノマテリアルと呼ばれる研究領域でしょうか。微妙な数の多体問題で、複雑系を構成します。新学術創成のメンバーに入れていただきながら、会議にはまるで参加できず申し訳なく思っています。その進展も混乱も分かっていないのですが、このチームは10人、20人ぐらいのメンバーで構成されていて、互いに反発や協調をしながら相互作用を繰り返して、新しい科学を創出されたのだろうと想像しています。まさに少数性生物学ですね。研究対象が少数性の生物学ではなく、研究者の皆さん自身が少数性生物学そのものであり、研究対象だったかもしれません。個々の研究の展開と少数精鋭のメンバーのネットワークの今後の益々の発展をお祈りします。

少数性生物学の多数化へ

スタート、中間、最終の報告会に参加させていただいた。1年目の会では、少数性といっても結局、1分子計測と揺らぎで、「少数性」と名づけるだけのものがあるのだろうか、と憎まれ口をたたいたりもした。計測技術は、それはそうそうたるメンバーが集まっているので、その驚異をみせていただくと、測定技術の刷新なくして科学の進歩なしと言うのももっともと説得させられかけられたのだけれども、一方で理論家としては、新しい概念なくして科学の革新はないとも信じているので、そこはどうなるだろうかという思いもあった。

ところが3年目の会では、特に公募班に、少数性の「意識高い」系が多数見られてきた。以前、書いたように、少数性が生物学に意味を持つようになるには、私見では (i) 少数性による制御 (ii) 少数性に起因する状態の多様化、分化 (iii) 少数性による固有時間生成、記憶 (iv) 少数性が働くための適度な空間、区画化 (v) 少数性ゆらぎのマクロ状態への増幅による機能発現、といった概念化が必要であると思われる。この会では、そうした問題意識を刺激する研究が多く見られるようになってきて、興奮を覚えた。

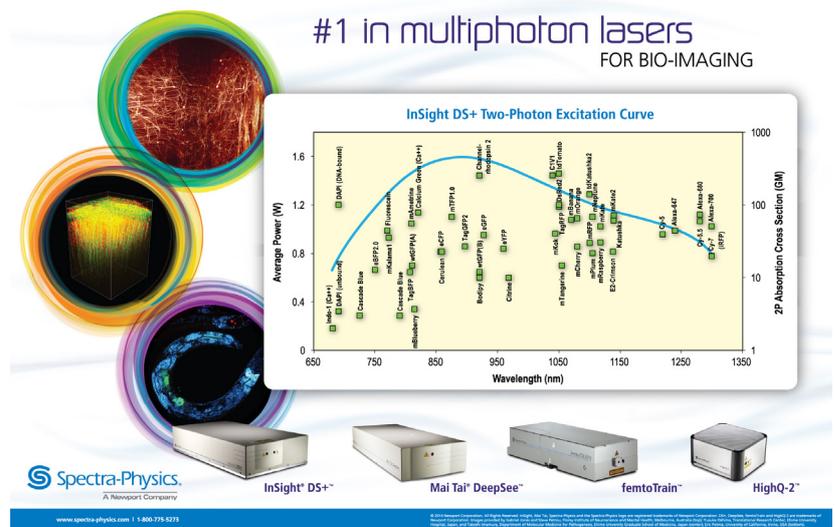
今回の成果報告会では、そうした研究と高度な測定技術があいまって、生物機能につながる道が見え始めてきたように思う。これは理論グループを緯糸にした計画班が公募班と密な連絡をとって、この5年間、進めてきた成果にちがいない。あと一步で、生命の普遍的原理としての少数性が確立されるのではという期待を十分感じさせられた。今後、こうした分野の研究がさらに進展して多数となっていくことを心から祈っている。

技術支援班のことば

スペクトラ・フィジックス株式会社

ジェネラル・マネジャー 高橋 伴明

永井先生はじめ『少数性生物学』研究メンバーの方々、この度は大きな成果を取められ、本領域を終了されます事、大変おめでとうございます。こころよりお喜び申し上げます。私どもスペクトラ・フィジックスを技術支援班にお誘いいただき、誠にありがとうございました。微力ながら、領域研究にご協力させていただきました事は、この上ない財産でありました喜びでもあります。私たちは、研究者のかたにレーザー機器をストレスなく使用していただき、本業の研究に専念していただくことをミッションとして掲げております。今後も本領域で得られた経験を基に、バイオ・イメージング分野において最先端かつ安定した製品を供給すべく、日々努力をしていきたいと思っております。皆様のご活躍を祈念しております。



ソーラボジャパン株式会社

技術部 佐藤 文則

私自身は2013年頃よりこの領域会議に参加をさせていただいております。個人的に印象に残っているのは、少数性トレーニングコースで行われたTIRF顕微鏡組み立て実習です。ハードウェア部分では既存の顕微鏡に弊社部品をアドオンして組み立てられていて、当時ソーラボに入社一年未満だった私には大変参考になりました。現在、蛍光顕微鏡の自作をサポートすることもあります。この時の経験のおかげと感謝しております。

また少数性と言えばジンパという文化は外せません。個人的にはジンパという名前も文化も初めてでとても新鮮でしたが、少数性でのジンパを通じてその神髄は、おいしく、楽しく、仲良くと理解しました。ジンパには先生方のプロジェクトへの思いを見ることができるようです。

改めまして5年間のプロジェクト本当にお疲れ様でした。弊社も技術支援班の一員としてお役に立てたのでしたら幸いです。また、ジンパに限らず各イベントでは、それを支える方々が大変な努力をされたことと想像します。関係者の皆様本当にありがとうございました。皆様のご活躍を心よりお祈り申し上げます。

株式会社オプトライン

代表取締役社長 石井 淳一

新学術領域「少数性生物学」の終了に当たり、一言ご挨拶申し上げます。

技術支援班の1社としてこの5年間皆様の真摯で熱い科学論議に触れたことは光栄の極みでございました。

但し、この5年は技術支援班として本領域へどれだけ貢献できたかに関しての確固たる自信を持ってない5年間であったのは正直な感想でございますが、ここで得たアカデミアの方々との知己・又参画企業同士のつながりは弊社にとって貴重な財産となりました。特に企業同士のつながりは互いの斬新な考えなどから、何かこれを機に新しい展開やタイアップなども期待できるのではないか、そう感じさせてくれるものでございました。今後このような機会が再びあるとすればその時には何らかの参画・支援を喜んでいただきたいと思っております。

末筆ではございますが領域代表の永井教授には深く御礼申し上げると共に、本領域に関わった全てのアカデミアの方々のご健勝とご活躍そして今後の研究の成功、又各企業におかれてはその発展を祈念いたしてご挨拶の最後とさせていただきます。

株式会社ニコン

ニコンでは、生命科学分野の最先端研究のニーズに応えるために、顕微鏡を中心とした幅広い製品ラインアップを提供しています。近年では、光学分解能を超える2種類の超解像顕微鏡を提供することで、生命メカニズムの解明に貢献しています。さらに、細胞培養世界最大手のLonza社（スイス）と業務提携し、再生医療用細胞等の受託生産事業を通じて日本の再生医療の発展に貢献していきます。今後も研究の現場のニーズに耳をかたむけ、新しい価値を提案していきたいと思えます。

新学術領域「少数性生物学」は、国内の著名な先生の強力なリーダーシップと、参加者全員の積極的なフォロワーシップがおりなす躍動感と一体感が印象的でした。産学連携を促進するためのメーカー対決など、メーカーが研究者のニーズに触れる良い機会をいただけたこと感謝しております。

中央精機株式会社

ライフサイエンス部 部長 山田 洋平

このたびは最終記念号発行にあたり、協賛企業として、ご挨拶の機会を与您いただき感謝申し上げます。当社は永井教授のプロジェクトに協賛し10年、創業61年になります。



本領域研究では、各研究者の方々は勿論、代表の永井教授による強力なリーダーシップのもと、多くの関係者が参画され、「有機的な化学反応」により、多数の成果が生み出されたとのこと、お慶び申し上げます。永井教授が掲げる「新しい技術無くして科学の発展は無い」「新しい技術の開発無くしてメーカーの将来は無い」という研究者と企業の存在意義を念頭に置き、当社もこの領域内でバイオイメージング装置の研究開発に携わることができました。また、本領域の特長として、水平展開・交流が盛んなことから、ご紹介いただき、当社が得意とする新たな研究用特注製品開発へと発展していった案件もいくつかございました。当社が期待する「研究者・業界関係者に活用いただき、医療・科学の発展を通じて、人類及び社会に貢献すること」は、徐々に実現しつつあります。

今後も皆様の研究のご発展を祈念すると共に、皆様と一緒に、社会貢献を実施すべく協力させていただきたいと存じますので、益々ご要望・お声掛けをいただければと存じます。

浜松ホトニクス株式会社

「少数性生物学」に参加して

伊東 克秀

本当に早いものでこの領域に参加してあっという間に5年が経ってしまいました。今までこういった会議に参加することが無く、何もかもが非常に新鮮でした。多くの先生方の発表を聞かせていただき、そして多くの先生方とディスカッションさせていただきました。最も印象に残っているのは、沖縄での「メーカー逆指名討論会」と金沢での「産学アライアンス討論会」です。最終目的が違う研究者とメーカーが本音を出しながら、時には相手の立場に立って考え、とことんディスカッションするという機会はなかなか経験できるものではなかったと思います。お互いがそれぞれの考えを示し、それらを聞いたことで、少なくとも相互理解が進んだことは間違いないと思います。これらの相互理解は関係性の構築において基礎となる部分で、直ぐに役立つ結果として現れるものではないのですが、研究者とメーカーとが相互理解を深め、そして本音でディスカッションできる信頼関係を作っていくことで、もっと効率的にもっとスピーディーにお互いが成長していけると信じています。

領域活動

領域活動

領域会議の開催

1. キックオフミーティング, 2011/09/21, 京都大学 (京都府京都市)
2. 第1回領域会議, 2012/02/18 ~ 2012/02/20, ヒルトンニセコビレッジ (北海道虻田郡ニセコ町)
3. 第2回領域会議, 2012/06/11 ~ 2012/06/12, 湖邸滋びわこクラブ (滋賀県大津市)
4. 第3回領域会議 (第1回国際会議同時開催), 2012/10/16 ~ 2012/10/19, Academia Sinica Activity center(台北, 台湾)
5. 第4回領域会議, 2013/02/27 ~ 2013/03/02, ヒルトンニセコビレッジ (北海道虻田郡ニセコ町)
6. 第5回領域会議, 2013/06/15 ~ 2013/06/16, 湖邸滋びわこクラブ (滋賀県大津市)
7. 第6回領域会議, 2014/02/20 ~ 2014/02/23, ヒルトンニセコビレッジ (北海道虻田郡ニセコ町)
8. 第7回領域会議, 2014/06/21 ~ 2014/06/22, 湖邸滋びわこクラブ (滋賀県大津市)
9. 第8回領域会議, 2015/01/29 ~ 2015/01/31, ルスツリゾート (北海道虻田郡留寿都村)
10. 第9回領域会議, 2015/06/05 ~ 2015/06/07, 万国津梁館 (沖縄県名護市)
11. 第9回領域会議・サテライトミーティング, 2015/06/07, 沖縄県市町村自治会館 (沖縄県那覇市)

◆ 少数性生物学トレーニングコース

少数性生物学の概念及び方法論を一通り学ぶことが可能な2週間に渡るトレーニングコースを研究期間中3回開催し、博士後期課程学生・ポスドク研究者・助教等を中心とした、総計73名の若手研究者に対して教育・訓練を行った。

1. 第1回少数性生物学トレーニングコース, 2013/07/28 ~ 2016/08/10, 大阪大学産業科学研究所 (大阪府茨木市), 受講者 24名
2. 第2回少数性生物学トレーニングコース, 2014/07/20 ~ 2014/08/02, 大阪大学産業科学研究所 (大阪府茨木市), 受講者 26名
3. 第3回少数性生物学トレーニングコース, 2015/07/27 ~ 2015/08/09, 大阪大学産業科学研究所 (大阪府茨木市), 受講者 23名

◆ 研究会

領域内外の研究者との意見交換、ディスカッションを通じ、少数性生物学の深化を図ることを目的とする以下の研究会の開催を支援した。

1. 第1回少数性生物学研究会, 2013/07/11, 東京大学本郷キャンパス (東京都文京区)
2. 第1回少数性生物学データ検討会, 2014/02/21, ヒルトンニセコビレッジ (北海道虻田郡ニセコ町), 世話人: 富樫祐一 (広島大)
3. 第1回少数性生物学デバイス研究会, 2014/06/15 ~ 2014/06/16, ラフォーレ那須 / ニコン黒羽工場 (栃木県那須郡那須町)
4. 第2回少数性生物学研究会, 2014/10/21 ~ 2014/10/22, 和みの宿いい田 (北海道積丹郡積丹町), 世話人: 永井健治 (阪大)、石島秋彦 (東北大)
5. 第2回少数性生物学データ検討会, 2014/10/31, 広島パシフィックホテル (広島県広島市), 世話人: 富樫祐一 (広島大)
6. 第3回少数性生物学討論会, 2014/12/20, 大阪大学産業科学研究所 (大阪府茨木市), 世話人: 永井健治 (阪大)
7. 第3回少数性生物学データ検討会, 2015/01/30, ルスツリゾート (北海道虻田郡留寿都村), 世話人: 富樫祐一 (広島大)
8. 第2回少数性生物学デバイス研究会, 2015/03/25 ~ 2015/03/26, ホテル紫苑 / 盛岡セイコー工業株式会社 (岩手県盛岡市), 世話人: 原田慶恵 (京大)
9. 第4回少数性生物学討論会, 2015/04/18, 北海道大学電子科学研究所 (北海道札幌市), 世話人: 小松崎民樹 (北大)
10. 第5回少数性生物学討論会, 2015/05/24 ~ 2015/05/25, 民宿いかだや (兵庫県淡路市), 世話人: 永井健治 (阪大)、石島秋彦 (東北大)
11. 第3回少数性生物学デバイス研究会, 2015/09/09, ヘルツ株式会社 / 岡本光学加工所 (神奈川県横浜市), 世話人: 石島秋彦 (阪大)
12. 第1回産学アライアンス討論会, 2015/09/11, にしやま旅館 (石川県白山市), 世話人: 田端和仁 (東大)
13. 少数性生物学研究会 2016 ~ 少数性生物学の未来を語る~, 2016/02/14 ~ 2016/02/16, ホテルミリオーネ (北海道札幌市), 世話人: 小松崎民樹 (北大)

領域活動

領域主催シンポジウムの開催

1. 第84回日本生化学会大会・シンポジウム「1分子生物学と生化学の狭間に潜むナノシステム動作力学の理解を目指して」, 2011/09/21, 京都国際会議場(京都府京都市), オーガナイザー: 原田慶恵(京大)、永井健治(北大)
2. 第50回日本生物物理学会年会・シンポジウム「1分子生物学と生化学の狭間に潜むナノシステム動作力学の理解を目指して」, 2012/09/22, 名古屋大学東山キャンパス(愛知県名古屋市), オーガナイザー: 石島秋彦(東北大)、永井健治(阪大)
3. 生理研研究会 シグナル伝達研究の新展開(協賛), 2012/10/01 ~ 2012/10/02, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)
4. 第1回国際会議「Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking」, 2012/10/16 ~ 2012/10/19, Academia Sinica Activity center(台北, 台湾), オーガナイザー: Peilin Chen(Academia Sinica)、前島一博(遺伝研)
5. 新学術領域「少数性生物学」「超高速バイオアセンブラ」ジョイント研究会, 2012/11/19, 東大生産研(東京都目黒区)
6. International Joint Symposium on Single-Cell Analysis(共催), 2012/11/27 ~ 2012/11/28, 京都リサーチパーク(京都府京都市)
7. 第35回日本分子生物学会年会・ワークショップ「分子生物学と生化学の狭間に潜むナノシステム動作力学の理解を目指して」, 2012/12/11, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), オーガナイザー: 永井健治(阪大)、原田慶恵(京大)
8. 第85回日本生化学会大会・シンポジウム「少数性: 生化学の新たな視点」, 2012/12/16, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), オーガナイザー: 今田勝巳(阪大)、野地博行(東大)
9. 日本生体エネルギー研究会第38回討論会(協賛), 2012/12/22 ~ 2012/12/24, 岡山大学薬学部大講義室(岡山県岡山市)
10. 14th International Membrane Research Forum(共催), 2013/03/15 ~ 2013/03/17, 京都大学 iCeMS 本館(京都府京都市)
11. 日本顕微鏡学会 第69回学術講演会・シンポジウム「最先端バイオイメージングによる生命システムの動作原理解明にむけて」, 2013/05/22, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市), オーガナイザー: 永井健治(阪大)、上田昌宏(阪大)、岡田康志(理研)
12. 第65回日本細胞生物学会大会・シンポジウム「少数要素の分子反応的視点から細胞生物学的現象を理解する試み」, 2013/06/20, ウィンクあいち(愛知県名古屋市), オーガナイザー: 原田慶恵(京大)、永井健治(阪大)
13. 第86回日本生化学会大会・シンポジウム「使える! マイクロデバイス」, 2013/09/11, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), オーガナイザー: 野地博行(東大)、竹内昌治(東大)
14. 第51回日本生物物理学会年会・シンポジウム「少数個分子の協同が生み出す生命機能のメカニズム」, 2013/10/29, 国立京都国際会館(京都府京都市), オーガナイザー: 政池知子(東京理科大)、広瀬恵子(産総研)
15. 定量生物学の会 第六回年会(協賛), 2013/11/22 ~ 2013/11/24, 大阪大学銀杏会館(大阪府吹田市)
16. 第36回日本分子生物学会年会・ワークショップ「遺伝子発現のゆらぎ・学習の動作原理を測る・導く」, 2013/12/04, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市), オーガナイザー: 前島一博(遺伝研)、上田泰己(東大・理研)
17. 第36回日本分子生物学会年会・日本分子生物学会 公開プレゼンテーション「生命世界を問う」, 2013/12/06, 神戸国際会議場 ポートピアホール(兵庫県神戸市)

18. 第1回 新学術領域「植物環境感覚」「少数性生物学」ジョイントシンポジウム, 2013/12/17, 大阪大学中之島センター (大阪府大阪市)
19. Tokyo ATPase Workshop(協賛), 2014/06/02 ~ 2014/06/03, 東京大学弥生キャンパス武田ホール (東京都文京区)
20. 第66回日本細胞生物学会大会・シンポジウム「遺伝情報を司るDNAのふるまい」, 2014/06/12, 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市), オーガナイザー: 前島一博 (遺伝研)、原田慶恵 (京大)
21. 日本物理学会 2014年秋季大会・シンポジウム「 $N=1$ と ∞ の狭間の生命現象の物理」, 2014/09/09, 中部大学春日井キャンパス (愛知県春日井市), オーガナイザー: 富樫祐一 (広島大)
22. 第52回日本生物物理学会・シンポジウム「少数性、数揺らぎが創出する機能のシナリオ」, 2014/09/26, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), オーガナイザー: 小松崎民樹 (北大)、永井健治 (阪大)
23. 第87回日本生化学会大会・シンポジウム「疾患克服を目指したケミカルバイオフォトニクス技術」, 2014/10/17, 国立京都国際会館 (京都府京都市), オーガナイザー: 浦野泰照 (東大)、永井健治 (阪大)
24. 新学術領域「少数性生物学」・さきがけ「細胞機能の構成的な理解と制御」合同シンポジウム, 2015/02/01, ルスツリゾート (北海道虻田郡留寿都村)
25. 2014年度べん毛研究交流会 (協賛), 2015/03/02 ~ 2015/03/03, 合歓の郷ホテル&リゾート (三重県志摩市)
26. 第53回日本生物物理学会年会・シンポジウム「少数分子が担う生命現象」, 2015/09/15, 金沢大学自然科学本館 (石川県金沢市), オーガナイザー: 永井健治 (阪大)、石島秋彦 (阪大)
27. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会・合同大会 (BMB2015)・ワークショップ「生命を司る少数分子のふるまい」, 2015/12/02, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市), オーガナイザー: 前島一博 (遺伝研)、上田泰己 (東大・理研)
28. PacifiChem2015・シンポジウム「Life at Small Copy Numbers」, 2015/12/19 ~ 2015/12/20, Sheraton Waikiki(Honolulu, Hawaii), オーガナイザー: 吉村成弘 (京大)、Jie Xiao(Johns Hopkins Univ., USA)、Peilin Chen (Academia Sinica, Taiwan)
29. 2015年度べん毛研究交流会 (協賛), 2016/03/06 ~ 2016/03/08, 山形県天童温泉 滝の湯 (山形県天童市)
30. 新学術領域「少数性生物学」研究成果報告会, 2016/03/15, 東京大学伊藤謝恩ホール (東京都文京区)

領域活動

「少数性生物学」 バイオナノフォトニクスコンソーシアム運営

<設立の概要と目的>

新学術領域「少数性生物学」バイオナノフォトニクスコンソーシアム（以下、BNPC）は、日本発の学術領域「少数性生物学」の推進、普及に欠かせないバイオフォトニクス技術の共通利用施設および新技術開発のための産学連携活動の場として、2012年10月1日にアンドール・テクノロジー PLC、オプトライン、システムブレイン、スペクトラ・フィジックス、ソーラボジャパン、中央精機、東海ヒット、ニコンインステック、日本ローパー、浜松ホトニクス、モレキュラーデバイスジャパン、という複数の企業の御協力により設立されました。BNPCの主な運営目的は以下の通り。

- ◆少数性生物学についての議論の場
- ◆少数性生物学に係るバイオフォトニクス実験の場
- ◆少数性生物学トレーニングコース（年1回）の場
- ◆協賛企業主催のワークショップ・デモンストレーションの場

少数性生物学に興味があるものの自身の研究にどのように取り込めば良いか分からない方、細胞内の生理機能を操作し、バイオイメージングを行うバイオフォトニクス実験のための設備が全くない、設備はあっても使い方がわからない、或いは単にバイオイメージングに適した対物レンズや光学フィルターがない、設備が老朽化して思うような操作や観察ができないなどの問題を抱える、領域内外の研究者、技術者への研究支援を行なった。

< BNPC のスタッフ >

代表	永井 健治（阪大・産研）
管理者	中野 雅裕・和沢 鉄一（阪大・産研）
技術アドバイザー	
非線形光学	藤田 克昌（阪大・工学研究科）
バイオイメージング	岡田 康志（理研 QBIC）
超解像顕微鏡	渡邊 朋信（理研 QBIC）
超解像画像解析	Thomas Destinger（SOFast GmbH, Germany）
顕微鏡シミュレーター	高橋 恒一（理研 QBIC）
1分子解析	谷口 雄一（理研 QBIC）
画像解析	新井 由之（阪大・産研）
タンパク質動態解析	松田 知己（阪大・産研）

< BNPC の機材 >

Station-1:高速共焦点顕微鏡

ニコン製の共焦点レーザー顕微鏡。高速スキャナも搭載されたため、超高速画像取得や、光刺激（405nm）と蛍光イメージングの同時実行が可能。顕微鏡上での長時間培養も可能（東海ヒット製,station2,3,4,5にも搭載）

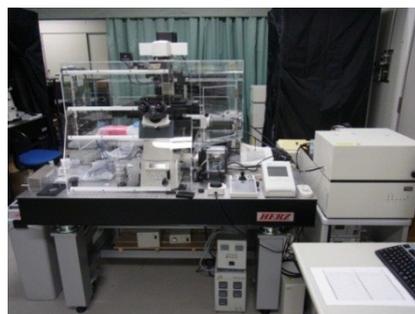
ニコン：倒立顕微鏡Ti-E,
スペクトル共焦点システム,A1R



Station-2: 超解像顕微鏡

ニコン製の最新の超解像顕微鏡。空間分解能を従来の光学顕微鏡の約2倍（約100nm）まで向上させ、生細胞内の微細構造の超解像による可視化

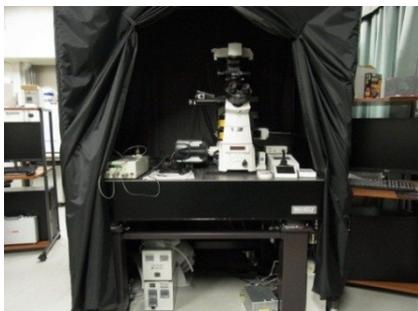
ニコン：倒立顕微鏡,Ti-E
超解像顕微鏡システム,N-SIM



Station-3: 多点・多色・共焦点顕微鏡

全視野蛍光観察に加えてニポウディスク式共焦点システムも搭載可能。また細胞の長時間観察や多点観察も可能。

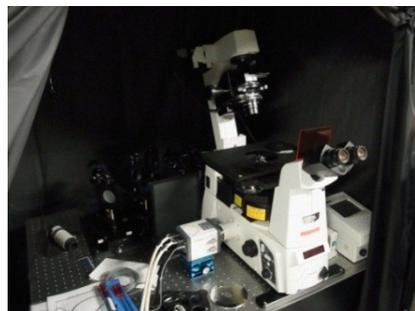
オプトライン：MESSIA,
中央精機：XYステージ,BIXYステージSTD,
日本ローパー：Zピエゾ,NanoScanZ,
アンドール：EM-CCDカメラ,ixon3,
モレキュラーデバイス：制御ソフトウェア,MetaMorph



Station-4：全反射蛍光顕微鏡(TIRF)

1分子蛍光を観察可能なTIRF顕微鏡。405nmの光刺激も可能。最新のCMOSカメラを搭載。ビデオレート以上の高速イメージングも可能。

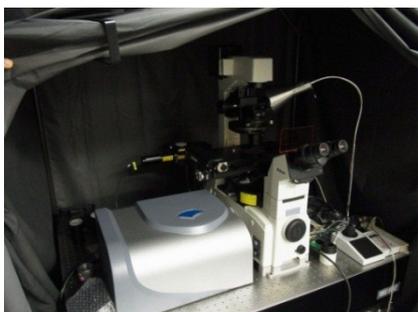
SP:CW laser,405nm,488nm,561nm
浜松ホトニクス：CMOSカメラ,ORCAFlash4.0
制御ソフトウェア,HCIImage Analysis
ソーラボジャパン:全反射照明光学系セット



Station-5：白色光源共焦点顕微鏡

白色光源を用いた共焦点ユニットを搭載した顕微鏡。多点同時光刺激可能なMosaicシステムも搭載。

アンドール：白色光源共焦点ユニット,Revolution DSD
多点同時光刺激ユニット,Mosaic
モレキュラーデバイス：制御ソフトウェア,MetaMorph



Station-6:インビボイメージングシステム

生物化学発光を用いたイメージングに特化したシステム。in vivo観察により、極力、生体環境を変えずに、個体の標本にストレスをかけない状態で、経過をモニターする事が可能。高感度EM-CCDカメラを搭載。

日本ローパー:Lumazone CMS



光学フィルター

オプトライン：Semrock社製フィルター各種

解析用パソコン：2台（MetaMorph）

安全キャビネット、細胞培養用CO₂インキュベーター

領域活動

書籍「少数性生物学」の出版

領域研究にて得た研究成果をまとめた書籍「少数性生物学」2017/3/25 に出版した。書籍編集にあたっては、単に領域の顕著な成果を取りまとめた内容とするのではなく、「少数性生物学」という学問を俯瞰的にまとめたストーリー展開とするよう、計画班員を中心としたメンバーで、編集会議にて検討を重ね、18のテーマに絞込んだ内容とした。



永井 健治 / 富樫 祐一 編

出版社： 日本評論社 (2017/3/17)
発刊年月： 2017.03
I S B N： 978-4-535-78816-9
判 型： A5 判
ページ数： 192 ページ

<目 次>

はじめに

- 第1章 少数が創発する機能を見る …… 永井健治
 - 第2章 少数分子が担う神経シナプス機能 …… 村越秀治
 - 第3章 少数の侵入—インフルエンザはウイルス何個で感染するか …… 大場雄介
 - 第4章 少数の反乱—紙とコンピュータの上の分子たちが予言したこと …… 富樫祐一
 - 第5章 少数の個性—分子にも個性? …… 小松崎民樹
 - 第6章 少数細胞を見分ける・探し出す—少数だけど影響力がある細胞に注目してみよう …… 城口克之
 - 第7章 デジタルバイオ計測 …… 野地博行
 - 第8章 少数のゲノム DNA が細胞の中に一収納される仕組み …… 前島一博
 - 第9章 少数が形づくる—核内染色体の構造・動態・機能相関 …… 粟津暁紀
 - 第10章 少数を分ける—細胞膜中の分子の離散性と分配 …… 鈴木宏明
 - 第11章 少数の機能を知る …… 茅元司
 - 第12章 少数での動き—少数のバイオナノマシンがチームで創発する振る舞い …… 矢島潤一郎
 - 第13章 少数により成り立つ細胞社会—細胞の中の分子はいつどこに何個あるのか …… 谷口雄一
 - 第14章 少数を決める—べん毛の本数を決める仕組み …… 小嶋誠司
 - 第15章 少数で製造をコントロール—タンパク質でできた細菌中ではたらく精密装置 …… 今田勝巳
 - 第16章 少数の分子で機能する生物 …… 石島秋彦・福岡 創・蔡 栄淑
 - 第17章 少数で作れるか? 体を作る細胞数—大きな数と小さい数 …… 堀川一樹
 - 第18章 細胞の中に流れる時間—分子が数える1日の時刻と概日時計 …… 大出晃士・上田泰己
- おわりに

活動記録

活動記録

領域会議・研究成果報告会

第1回領域会議

2012/02/18 ~ 2012/02/20, ヒルトンニセコビレッジ (北海道虻田郡ニセコ町)



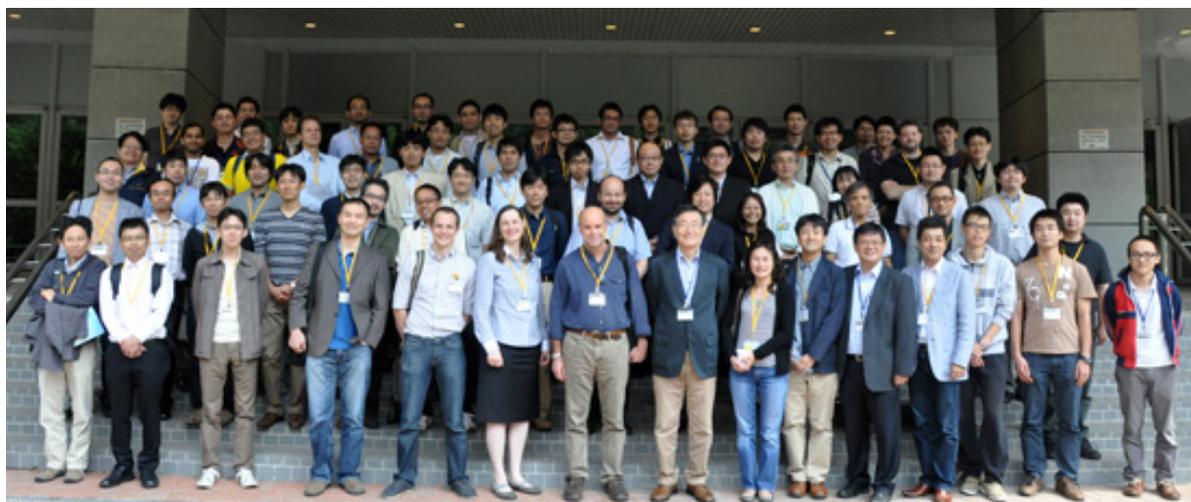
第2回領域会議

2012/06/11 ~ 2012/06/12, 湖邸滋びわこクラブ (滋賀県大津市)



第3回領域会議 (第1回国際会議同時開催),

2012/10/16 ~ 2012/10/19, Academia Sinica Activity center (台北, 台湾)



第4回領域会議

2013/02/27 ~ 2013/03/02, ヒルトンニセコビレッジ (北海道虻田郡ニセコ町)



第5回領域会議

2013/06/15 ~ 2013/06/16, 湖邸滋びわこクラブ (滋賀県大津市)



第6回領域会議

2014/02/20 ~ 2014/02/23, ヒルトンニセコビレッジ (北海道虻田郡ニセコ町)



第7回領域会議

2014/06/21 ~ 2014/06/22, 湖邸滋びわこクラブ (滋賀県大津市)



第8回領域会議

2015/01/29 ~ 2015/01/31, ルスツリゾート (北海道虻田郡留寿都村)



第9回領域会議

2015/06/05 ~ 2015/06/07, 万国津梁館 (沖縄県名護市)



新学術領域「少数性生物学」研究成果報告会
2016/03/15, 東京大学伊藤謝恩ホール (東京都文京区)



活動記録

第1回少数性生物学トレーニングコース

期間： 2013年7月28日（日）～2013年8月10日（土）

場所： 大阪大学産業科学研究所

受講生： 17名（応募総数29名） オブザーバー参加：7名

講師陣： 24名 TA：7名

企業からの参加者：19名

期間中総参加者数： 82名

協賛企業： 株式会社オプトライン オリンパス株式会社 スペクトラフィジックス株式会社
ソーラボジャパン株式会社 日本ナショナルインスツルメンツ株式会社
株式会社ナノフォトン 浜松ホトニクス株式会社

 株式会社 **オプトライン**

 OLYMPUS

 Spectra-Physics
A Newport Corporation Brand

 THORLABS

 NATIONAL
INSTRUMENTS

 nano photon

 HAMAMATSU
PHOTON IS OUR BUSINESS

生物における少数性問題に取り組む際に、どのような実験・解析が必要かを包括的に学ぶコースとして、第1回を大阪大学産業科学研究所にて開催致しました。最大の特徴としてはその実施期間の長さで、実習内容を深く理解するためには十分な期間が必要とのことから、本コースは2週間という長期間で実施されました。また、生物学における少数性問題に様々な切り口から議論するために、毎晩「アイデアセミナー」と称し、第一線で活躍されている先生方にセミナーをして頂きました。セミナー終了後も、永井研究室に深夜まで様々な議論を行いました。実習生は応募倍率約2倍を勝ち取った17名であり、下は学部2年生から上はPIまで応募・参加がありました。実習期間中に関与した人数は80名を超え、多数の講師及び企業の協力のもと開催することが出来ました。

実習プログラム (IS: アイデアセミナー)

7/28 開会式

7/29 講義：幾何光学・光学顕微鏡の基礎（藤田@阪大） 実習：単レンズによる顕微鏡作成（藤田@阪大） IS：複雑システムを制御する生命原理（柳田@阪大）

7/30 講義：蛍光プローブ（永井@阪大） 実習：1分子蛍光顕微観察（岡田@QBiC） IS：少数・離散・状態・階層の理論へ（冨樫@神戸大）

7/31 講義・実習：LabView 基礎・実習（石島@東北大） IS：遺伝子発現の分布性（谷口@QBiC）

8/1 講義・実習：全反射照明顕微鏡の基礎・組立（新井@阪大） IS：少数の遺伝子が、少数の転写因子によって、一体どのように検索されるのか？（前島@遺伝研）

8/2 講義：検出器（伊東@浜松ホトニクス） 実習：1分子蛍光観察のためのカメラ比較（伊東@浜松ホトニクス） IS：分野越境型1分子ナノバイオ研究（野地@東大）

- 8/3 講義：超解像顕微鏡（渡邊@ QBiC） 実習：PALM による超解像イメージング（市村@ QBiC） IS：1 分子から生物学へ（岡田@ QBiC）
- 8/4 ジンギスカンパーティー
- 8/5 講義・実習：画像解析（三浦@ EMBL）
IS：概日時計システムにおける少数性生物学（鵜飼@理研）
- 8/6 講義・実習：1 分子画像解析（新井@阪大）
IS：確率の起源：偶然と必然の原理（小松崎@北大）
- 8/7 講義・実習：1 分子時系列データ解析（小松崎@北大）
IS：超分子複合体形成における数の調節（今田@阪大）
- 8/8 講義・実習：1 分子データシミュレーション（高橋@ QBiC）
IS：拡散と情報伝達（石島@東北大）
- 8/9 IS：small number issue ? minority issue ?（永井@阪大）
- 8/10 修了式



単レンズを組み合わせた透過・蛍光顕微鏡作製



TIRF 顕微鏡の自作と一分子 / 超解像イメージング



分子・細胞レベルのモデリングとシミュレーション

LabView を用いた機器制御
ImageJ による画像処理
イメージングデータからの
データマイニング等



少数性生物学に関連した
アイデアセミナー



ジンギスカンパーティー



第2回少数性生物学トレーニングコース

期間： 2014年7月20日（日）～8月2日（土）
場所： 大阪大学産業科学研究所
受講生： 15名 オブザーバー参加：11名
講師陣： 24名 TA：7名

協賛企業： 株式会社オプトライン オリンパス株式会社 株式会社ニコン スペクトラ
フィジックス株式会社 ソーラボジャパン株式会社 日本ナショナルインス
ツルメンツ株式会社 株式会社ナノフォトン 浜松ホトニクス株式会社

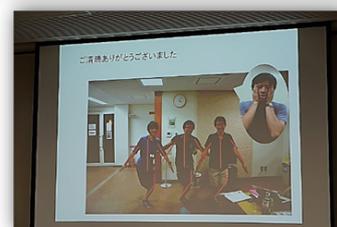
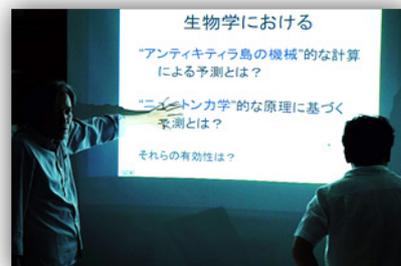


第1回少数性生物学トレーニングに引き続き、第2回トレーニングコースを同時期・同期間（2週間）、大阪大学産業科学研究所にて開催致しました。顕微鏡の基礎から超解像計測まで実習できる実験編に加え、データ解析・シミュレーションまで行う理論編まで一貫して行いました。また、本コースの特色であるジンギスカンパーティ、アイデアセミナーも実施し、受講生・講師陣ともに深い交流を行うことが出来ました。今回のトレーニングコースも、永井研メンバーをはじめ、講師陣、協賛企業といった、多数の協力のもと開催することができました。

実習プログラム

- 7/20 開会式
- 7/21 講義：幾何光学・光学顕微鏡の基礎（藤田@阪大）
実習：単レンズによる顕微鏡作成（藤田@阪大）
- 7/22 講義：蛍光プローブ（永井@阪大）
実習：1分子蛍光顕微観察（岡田@QBiC）
- 7/23 講義・実習：LabView 基礎・実習（石島@東北大）
- 7/24 講義・実習：全反射照明顕微鏡の基礎・組立（新井@阪大）
- 7/25 講義：検出器（伊東@浜松ホトニクス）
実習：1分子蛍光観察のためのカメラ比較（伊東@浜松ホトニクス）
- 7/26 講義：超解像顕微鏡（渡邊@QBiC）
実習：PALMによる超解像イメージング（市村@QBiC）
夜：ジンギスカンパーティ
- 7/28 講義・実習：画像解析（三浦@EMBL）

- 7/29 講義・実習：1 分子時系列データ解析（小松崎@北大）
- 7/30 講義・実習：1 分子拡散シミュレーション（富樫@広大）
- 7/31 アイデアセミナー 1：「少数の少数たる条件」（富樫@広大）
 アイデアセミナー 2：「シグナル伝達系を構築する分子の個数～絶対数と細胞間ヘテロ性～」（堀川@徳島大）
 アイデアセミナー 3：「細胞におけるゆらぎの階層化」（上田昌弘@阪大理）
- 8/1 アイデアセミナー 4：「超分子複合体形成における数の調節」（今田@阪大理）
 アイデアセミナー 5：「少数の遺伝子が一体どのように検索されるのか？」（前島@遺伝研）
- 8/2 成果発表会、閉会式



LabView を用いた機器制御
 ImageJ による画像処理
 イメージングデータからのデータマイニング等

第2回少数性生物学トレーニングコース

期間： 2015年7月27日（月）～8月9日（日）
場所： 大阪大学産業科学研究所
受講生： 16名 オブザーバー参加：8名
講師陣： スタッフ：29名 TA：10名

協賛企業： 株式会社オプトライン オリンパス株式会社 株式会社ニコン スペクトラ
フィジックス株式会社 ソーラボジャパン株式会社 日本ナショナルインス
ツルメンツ株式会社 株式会社ナノフォトン 浜松ホトニクス株式会社



PHOTON IS OUR BUSINESS

第3回となる本トレーニングコースでは、募集16名のところ29名もの応募がありました。前回・前々回までの改良点を踏まえ、実習の時間を多くとりつつ、本コースの特色であるアイデアセミナーを隔日で行うことで、実習技術のみならず、サイエンスのディスカッションを充分に行うことのできる内容としました。

今回のトレーニングコースも、少数性生物学領域のメンバーの協力や外部からの識者の協力、多くの講師陣・協賛企業の協力の元開催することができました。平成27年度で少数性生物学領域が終了するため、本コースの次回移行の開催は未定ですが、大変好評なコースでしたので、何らかの形で今後も開催を行うことが出来ることを期待したいと思います。ありがとうございました。

実習プログラム

- 7/27 開会式 アイデアセミナー（永井@阪大）
- 7/28 アイデアセミナー（前島@国立遺伝学研究所）
講義：幾何光学・光学顕微鏡の基礎（藤田@阪大）
実習：単レンズによる顕微鏡作成（藤田@阪大）
- 7/29 講義：蛍光プローブ（永井@阪大）
実習：1分子蛍光顕微観察（岡田@QBiC）
- 7/30 講義・実習：LabView 基礎・実習（石島@阪大）
アイデアセミナー（堀川@徳島大）
- 7/31 講義：全反射照明顕微鏡の基礎（新井@阪大）
実習：全反射照明顕微鏡の組立（新井@阪大）

- 8/1 アイデアセミナー（佐甲@理研和光）
アイデアセミナー（茅@東京大学）
講義：検出器（伊東@浜松ホトニクス）
実習：1分子蛍光観察のためのカメラ比較（伊東@浜松ホトニクス）
夜：ジンギスカンパーティ
- 8/3 超解像顕微鏡（渡邊@ QBiC）
講義・実習：PALM による超解像イメージング（市村@理研 QBiC）
- 8/4 アイデアセミナー（大場@理研 QBiC）
アイデアセミナー（野路@東大）
講義・実習：画像解析（三浦@ EMBL）
- 8/5 講義・実習：画像解析（三浦@ EMBL）
講義・実習：画像解析（三浦@ EMBL）
- 8/6 アイデアセミナー（石島@阪大）
講義・実習：1分子時系列データ解析（李@北大、新海@広大）
- 8/7 9:00~ 講義：1分子拡散シミュレーション（富樫@広大）
実習：1分子拡散シミュレーション（富樫@広大）
- 8/8 アイデアセミナー（上田@阪大）
- 8/9 成果発表
閉会式

