

領域略称名：動的構造生命

領域番号：4602

平成28年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る中間評価報告書

「(研究領域名) 動的構造生命科学を拓く新発想測定技術
-タンパク質が動作する姿を活写する-

(領域設定期間)

平成26年度～平成30年度

平成28年6月

領域代表者 (九州大学・生体防御医学研究所・教授・神田 大輔)

目 次

研究領域全体に係る事項

1. 研究領域の目的及び概要	6
2. 研究の進展状況	8
3. 審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況	11
4. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	13
5. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）	16
6. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況	21
7. 若手研究者の育成に関する取組状況	23
8. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	24
9. 総括班評価者による評価	25
10. 今後の研究領域の推進方策	27

研究組織 (総括：総括班，支援：国際活動支援班，計画：総括班及び国際活動支援班以外の計画研究，公募：公募研究)

研究項目	課題番号 研究課題名	研究期間	代表者氏名	所属機関 部局 職	構成員数
X00 総括	26119001 動的構造生命科学を拓く新発想測定技術-タンパク質が動作する姿を活写する-	平成 26 年度 ～ 平成 30 年度	神田 大輔	九州大学・生体防御医学研究所・教授	12
Y00 支援	15K21711 動的構造生命科学研究領域における海外ネットワーク形成を目指した支援活動	平成 27 年度 ～ 平成 30 年度	神田 大輔	九州大学・生体防御医学研究所・教授	12
A01 計画	26119002 タンパク質分子の動きを観るために結晶中に創り出した隙間を利用する新発想測定技術	平成 26 年度 ～ 平成 30 年度	神田 大輔	九州大学・生体防御医学研究所・教授	4
A01 計画	26119003 高速 AFM の高度化技術の開発とタンパク質の動作機序解析	平成 26 年度 ～ 平成 30 年度	安藤 敏夫	金沢大学・理工研究域バイオ AFM 先端研究センター・特任教授	5
A02 計画	26119004 ODMR と in-cell NMR による細胞内蛋白質間相互作用・動態の解析法の開発	平成 26 年度 ～ 平成 30 年度	白川 昌宏	京都大学・工学研究科・教授	2
A02 計画	26119005 生細胞内の生命反応をリアルタイムで捉える in-cell NMR 法の開発と応用	平成 26 年度 ～ 平成 30 年度	西田 紀貴	東京大学・薬学系研究科・准教授	3
A03 計画	26119006 マルチレゾリューション法を用いたタンパク質複合体の高解像度動的解析	平成 26 年度 ～ 平成 30 年度	杉田 有治	独立行政法人理化学研究所・主任研究員研究室等・主任研究員	7
A03 計画	26119007 タンパク質分泌システムの活写	平成 26 年度 ～ 平成 30 年度	塚崎 智也	奈良先端科技大・バイオサイエンス研究科・准教授	2
計画研究 計 8 件					

A01 公募	15H01624 NMR を主体としたタンパク質構造推移解析のための複合手法の開発と応用	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	齋尾 智英	北海道大学・理学研究院科学部門・助教	2
A01 公募	15H01625 蛋白質の構造変化を自在に操作する技術の創出-トランスポーターへの応用-	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	鎌形 清人	東北大学・多元物質科学研究所・助教	2
A01 公募	15H01626 分子認識による酸化的フォールディングの1分子観察	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	奥村 正樹	東北大学・多元物質科学研究所・助教	4
A01 公募	15H01629 細胞内小胞輸送を駆動するダイニン分子の活写	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	矢島 潤一郎	東京大学・総合文化研究科・准教授	3
A01 公募	15H01634 DNA 変換酵素のスライディングと共役した酵素活性機構の動的構造基盤の解明	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	永田 崇	京都大学・エネルギー理工学研究所・准教授	3
A01 公募	15H01639 タンパク質分子認識過程を活写する時間分解ラマン計測の光スイッチングによる超高速化	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	水野 操	大阪大学・理学研究科・助教	1
A01 公募	15H01642 時分割シリアルフェムト秒構造解析法の開発と光化学系 II 複合体への適用	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	菅 倫寛	岡山大学・自然科学研究科・助教	2
A01 公募	15H01644 クライオ電子顕微鏡法による個々のタンパク質複合体の構造揺らぎの検出方法の開発	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	安永 卓生	九州工業大学・情報工学部・教授	1
A01 公募	15H01646 ヘモグロビンの四次構造変化を許容する結晶を用いた時分割構造解析法の開拓	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	柴山 修哉	自治医科大学・医学部・教授	2

A01 公募	15H01648 過渡的に形成される DNA 結合タンパク質 多量体の動的構造の蛍 光1分子イメージング	平成27年度 ～ 平成28年度	横田 浩章	光産業創成大学院大学・光バイオ 分野・准教授	1
A01 公募	15H01651 オートファジー始動複 合体の動的構造解析	平成27年度 ～ 平成28年度	藤岡 優子	公益財団法人微生物化学研究所・ 研究員	3
A01 公募	15H01630 タンパク質複合体内部 の距離と角度の変化を リアルタイムで捉える 蛍光計測法の開発	平成27年度 ～ 平成28年度	須河 光弘	東京大学・大学院総合文化研究 科・助教	3
A02 公募	15H01631 リシール細胞技術を用 いた複数タンパク質の 細胞内導入法とその局 在化法の開発	平成27年度 ～ 平成28年度	村田 昌之	東京大学・総合文化研究科・教授	1
A02 公募	15H01632 擬似細胞アレイチップ を利用した膜タンパク 質の動的構造計測技術 の開発	平成27年度 ～ 平成28年度	渡邊 力也	東京大学・工学系研究科・講師	1
A02 公募	15H01635 細胞内でのタンパク質 複合体の多重染色超解 像イメージング	平成27年度 ～ 平成28年度	木内 泰	京都大学・医学研究科・准教授	2
A02 公募	15H01636 蛋白質ダイナミクスの in-cell NMR 解析	平成27年度 ～ 平成28年度	朽尾 豪人	京都大学・理学研究科・教授	1
A02 公募	15H01637 生細胞環境でのケミカ ルラベル化を用いたタ ンパク質の動的構造解 析	平成27年度 ～ 平成28年度	浜地 格	京都大学・工学研究科・教授	3
A02 公募	15H01645 In-cell NMR による細 胞内蛋白質のフォール ディング安定性と動的 平衡の解析	平成27年度 ～ 平成28年度	伊藤 隆	首都大学東京・理工学研究科・教 授	2
A02 公募	15H01654 生細胞深部の分子構造 変化ダイナミクスをと らえる1分子 FRET 計 測法の開発	平成27年度 ～ 平成28年度	岡本 憲二	独立行政法人理化学研究所・研究 員	2

A03 公募	15H01627 プロテアソームによる ポリユビキチン化タン パク質分解過程の過渡 的複合体の解析	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	奥野 貴士	山形大学・理学部・准教授	3
A03 公募	15H01633 in vitro と in cell の蛋白 質動態をつなぐ X 線 1 分子動態計測法の開発	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	清水 啓史	福井大学・医学部・講師	3
A03 公募	15H01638 分子内運動に着目した ヒト多剤排出トランス ポーターの輸送機構解 明	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	木村 泰久	京都大学・連合農学研究科・助教	1
A03 公募	15H01640 べん毛蛋白質輸送シス テムの動的機能構造解 析	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	南野 徹	大阪大学・生命機能研究科・准教 授	4
A03 公募	15H01641 タンパク質ポリマー形 成による動的膜形態形 成の直接可視化による 解明	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	末次 志郎	奈良先端科技大・バイオサイエン ス研究科・教授	1
A03 公募	15H01647 時間分解蛍光測定を軸 とする蛋白質水和と機 能発現の相関解析	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	中迫 雅由	慶應義塾大学・理工学部物理学 科・教授	2
A03 公募	15H01650 微小管内にある不均一 構造の動的変化の観察 と機能の解析	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	香月 美穂	福岡大学・理学部・助教	2
A03 公募	15H01653 インプリント遺伝子の DNA メチル化模様を 制御する Dnmt3a の過 渡的複合体	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	古川 亜矢子	横浜市立大学・生命医科学研究 科・特任助教	3
A03 公募	15H01655 ヘムトランスポーター の動的結晶構造解析	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	杉本 宏	独立行政法人理化学研究所・研究 員	4
A03 公募	15H01656 AMPA 型グルタミン酸 受容体の速くて複雑な 動的構造の活写	平成 27 年度 ～ 平成 28 年度	重松 秀樹	独立行政法人理化学研究所・研究 員	1
公募研究 計 29 件					

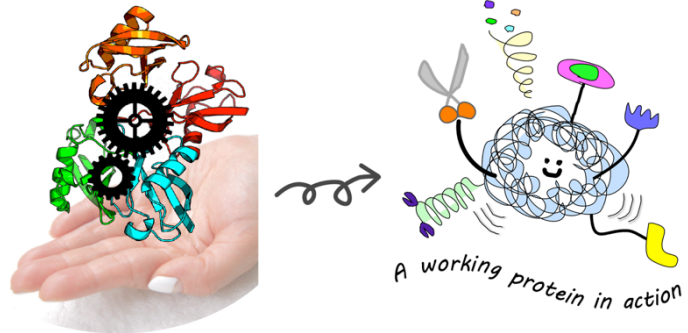
研究領域全体に係る事項

1. 研究領域の目的及び概要（2 ページ以内）

研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、応募時までの研究成果を進展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

▶ 本領域の目的と全体構想

タンパク質分子の精密な立体構造は、生体機能素子としてのタンパク質の機能を説明することに大きく貢献してきた。タンパク質分子をあたかも手のひらに乗るマクロサイズの機械とみなすことで多くの事実を説明できることが、構造生物学の成功の理由である。しかし、タンパク質分子の本当の姿はナノサイズの分子機械であり、マクロサイズの機械とは異なる原理に基づいて動作している。したがって、タンパク質分子が持つ柔軟性や形の3次元的な変化（コンホメーション変化）といった動的な性質を原子分解能レベルで詳細に知る必要がある。本領域研究では、タンパク質分子が“形を変えながら機能している姿”を活写することを可能にするために、独創的な発想に基づいた新しい測定手法の開発を進める。



静的構造生物学から動的構造生命科学へ

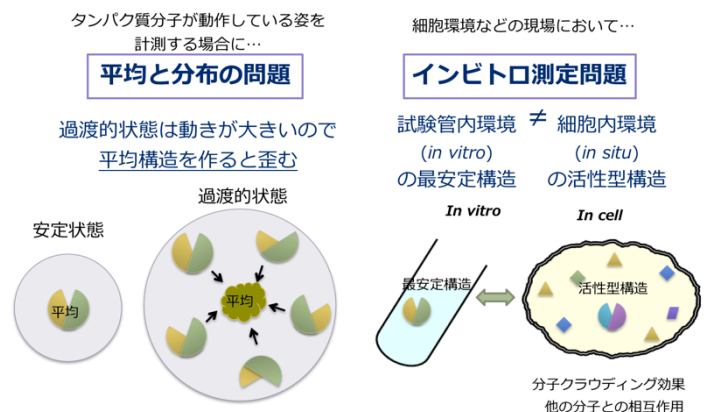
タンパク質分子の3次元的な形の時間変化を知るには、NMR（核磁気共鳴法）とAFM（原子間力顕微鏡）の2つが時間分解能と空間分解能のバランスがとれた実績のある測定法である。しかし、NMRとAFMにも技術的な弱点が存在する。これらの弱点を新発想のアイディアで克服して、NMRとAFMをさらに強力な計測手法へとバージョンアップすることを目指す。また、NMR法の原理的な欠点を補う技術として、タンパク質結晶内に隙間をつくって運動性解析を行うという萌芽的な課題にも挑戦する。これらの技術開発と並行して、新測定手法を遅滞なく生物学の諸問題に適用する。新学術領域全体として目的意識を共有して活動することで、測定手法の問題点や限界、潜在的な適用範囲を効率良く明らかにし、リスクの大きい革新的測定技術開発を短期間で達成する。そのために【研究項目 A01: 過渡的に形成されるタンパク質複合体の動的構造測定技術】、【研究項目 A02: 細胞環境下でのタンパク質分子の動的構造測定技術】、【研究項目 A03: 新規動的構造測定技術の検証と応用】を設定する。

静的構造生物学から動的構造生命科学へ

▶ 本領域の重要性・発展性

本領域では、既知の測定手法における問題点「タンパク質の形の時間変化に十分に対処できていない」を明確にしたうえで、共通目標として新発想に基づく測定方法の開発を設定している。日本における生物学研究は一部を除くと海外で開発された新しい技術を自らの研究対象に適用するスタイルが多いと思われる。新しい方法、たとえば次世代シーケンサーの登場がそれまでの研究スタイルを一変させてしまうような事例には事欠かない。したがって、日本発の真に新しい測定技術を生み出すことが我が国の学術の質を向上させることにつながる。

既存の多くの動的測定手段は試験管内における平均構造としての情報を与えるにすぎない。そのため、解決すべき課題として「平均と分布の問題」と「インビトロ測定問題」が残されている。研究項目 A01 において「平均と分布の問題」の解決を、研究項目 A02 において「インビトロ測定問題」の解決を目指す。平均と分布の問題とは、既存の方法による構造は分子集団の平均であるために、平均



操作を適切に行わないと無意味な構造を与えてしまうことを指す。一方、インビトロ測定問題とは、試験管内で測定を行った結果をそのまま生理的条件下に当てはめることが不適切であることを言う。これら2つの問題を解決する新しい計測技術を開発することで、長く研究されてきたタンパク質であっても、常識を覆す発見につながることを期待できる。具体的な対象を挙げると、モータータンパク質や化学力学エネルギー変換に関わるタンパク質の作動原理、タンパク質のリガンド認識、特に細胞内タンパク質輸送におけるシグナル配列の認識に関して、広い（promiscuous）特異性を実現する新しい認識原理の解明、細胞環境における受容体やチャネルの活性化、シグナル伝達タンパク質などの形の変化、安定性、相互作用の解析などである。試験管内で再現できない過渡的な複合体を対象とすることで、生理的条件下における創薬スクリーニング法が実現する可能性がある。

▶ 研究期間終了後に期待される成果等

日本は既存の技術の改良や普遍化を得意とするが、基本特許に相当する技術の根幹をなすような原理の発見や技術の発明には諸外国に遅れをとりがちであるという一般的な認識がある。日本の企業の開発では、開発者が作りたいものを作ってニーズを軽んじることが弱点であることもしばしば指摘される。技術立国の観点から見たときに見落とされがちな大事な視点は、トップレベルの装置を使って最先端の研究を行うユーザー研究者が国内に多数存在していることが、装置メーカーの技術力を伸ばすことに繋がるという事実である。構造生物学研究では大型装置を使うことが多いことを考慮すると、特にこの視点は重要である。

本領域の計画研究における実例を挙げると、安藤（金沢大学）が開発している**高速 AFM 装置**はすでにオリンパスや生体分子計測研究所が製造・販売している。高速 AFM ユーザーがもっと増えれば、世界の標準モデルとなり、技術立国日本に寄与できる。また、西田（東京大学）が開発を進めるバイオリアクター型の **in-cell NMR 装置**や、白川（京都大学）が開発をすすめる**ナノダイヤモンド蛍光検出磁気共鳴（ODMR）装置**なども製品化が期待できる。

▶ 応募時の研究成果と承継の経緯

本新学術領域は新学術領域研究「過渡的複合体に関わる生命現象の統合的理解—生理的準安定状態を捉える新技術—」（領域番号 4104、領域代表者：嶋田一夫、東京大学、平成 21-25 年）の成果を継承・発展させた研究領域である。「過渡的複合体」では、原子レベルから細胞レベルのいろいろな階層で生じる準安定状態を過渡的複合体という新しい概念でまとめることで、多様な分野の研究者の興味を集め、従来の構造生物学の範疇を越えた活発な研究グループを組織することができた。「過渡的複合体」は平成 23 年度に行われた中間評価では A+（研究領域の設定目的に照らして、期待以上の成果があった）、平成 26 年度に行われた事後評価でも A+ 評価を受けた。

これらの成果を受けて計画班員の神田と白川は、研究代表者の嶋田（東大）、総括班員の阿久津秀雄（阪大）、西村善文（横市大）、稲垣冬彦（北大）とともに、当該分野の発展を加速するための今後の課題を議論し、本提案が立案された。過渡的複合体は有用なコンセプトであることを確認するとともに、過渡的複合体が本質的に動的な性格をもち、しかも準安定で存在割合が少ないことから、観測対象として困難な対象であり、測定手法の改良や新しい発想に基づいた測定手法の開発が強く求められていることが結論された。そこで、さらなる発展を目指し、神田と白川が中心となり、公募班から杉田と塚崎の2名が参加し、さらに安藤と西田の2名を新たに加えた計画班の編成を行った。一連の重点・特定領域・新学術領域研究の流れのなかで、方法論を中心に据えた研究領域の提案は今回が初めてである。

2. 研究の進展状況〔設定目的に照らし、研究項目又は計画研究ごとに整理する〕（3ページ以内）

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、現在までにどこまで研究が進展しているのか記述してください。また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らして、どのように発展したかについて研究項目又は計画研究ごとに記述してください。

▶ 領域全体の進展状況

本領域の申請時にあらかじめ計画した新発想測定技術は、(1) 動きの解析に特化したX線結晶解析(神田)、(2) 高速原子間力顕微鏡 AFM の高度化(安藤)、(3) ナノダイヤモンド蛍光検出磁気共鳴(ODMR) 測定の開発と実用化(白川)、(4) バイオリクター型 in-cell NMR の高感度化(西田)である。X線結晶解析、AFM、蛍光測定、NMR はすでに広く使われている技術ながら、そこに新しい発想を付加することで新しい解析法としてバージョンアップを図ったものである。それぞれ、結晶内に動きを許す空間を創る、AFM 測定を極限まで高速化して一分子操作と組み合わせる、ナノダイヤモンドの電子スピン共鳴(ESR) と蛍光イメージング測定を組み合わせる、in-cell NMR の長時間測定を可能にする装置の工夫などの新発想に基づく。

この4つの新発想技術の中でも実用的な段階に達している高速 AFM 測定と in-cell NMR 測定については、新測定手法の説明と実習を兼ねた技術講習会を開催して、新学術領域内で普及を行った。一方、萌芽的な新結晶解析法と ODMR 法については、本新学術研究期間の後期に技術講習会を含めて

領域全体に普及を行う予定にしている。新発想測定技術の検証と応用については、分子動力学計算(効率の良いサンプリングと長時間シミュレーションによるエネルギー地形の取得)と生物学的に興味ある対象への応用を設定した。最近の計算機の高速化により、分子動力学計算が生物学研究の実用的なツールとなってきている。実際に実験結果との比較により、単に実験結果と計算結果が矛盾しないという従来の構図に留まらず、実験と計算の差異から、次の新たな実験や計算が示唆されるような例も出てきている。

▶ 領域内研究テーマの多様性と相補性

使用される測定技術の観点で領域内の研究(計画研究6件+公募研究29件)を分類すると、高速 AFM が12件と予想通り多かった。In-cell NMR 測定は3件で、それに深く関係する細胞リシール技術が5件あった。特別なX線結晶解析技術関連が4件、ODMR 測定が3件、計算シミュレーション関連が3件である。その他の実験技術として、電子顕微鏡観察が3件、ナノディスクの利用が2件、一分子計測が3件であった。領域内において技術の集中的使用とバランスがとれたかたちで、測定技術の多様性が確保されていると考える。

▶ 技術講習会の開催

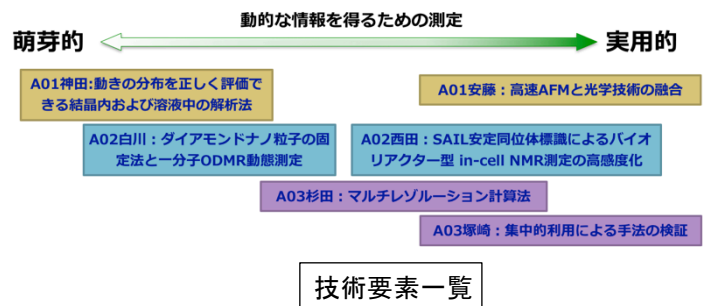
新発想技術を領域内に普及するためには実技指導を含めた技術講習会が核となる。各研究項目ごとに技術講習会やチュートリアルを開催した。

研究項目 A01 企画：バイオ AFM 夏の学校 (担当：安藤敏夫)

2015年8月1日～7日、金沢大学角間キャンパス、本領域の6名の班員の研究室から7名が参加し、MyD88、Endophilin-脂質膜、A3G-ssDNA、膜タンパク質複合体 MotPS、細胞質ダイニン-微小管、ダイナクチン複合体などの高速 AFM の試験観察を行った。安藤の開発による高速 AFM 装置は熊本大学、福岡大学などにも設置されていて、これらの装置を使った共同研究も行われている。

研究項目 A02 企画：セミインタクト細胞リシール法講習会 (担当：村田昌之 A02 公募、西田紀貴)

2015年9月2日、東京大学駒場キャンパス、セミインタクト細胞リシール技術を利用する方を対象とした実技講習会。主に in-cell NMR への応用を目的としている。すでに in-cell NMR を始めている研究者にとっては自らの実験の改善に役だった。新学術関係者11名が参加した。



研究項目 A03 企画：GENESIS 講習会（担当：杉田有治）

2015年9月4日、計算科学振興財団（神戸市）、研究項目 A03 の役割は、測定技術の検証と応用である。計算による生命現象の再現とメカニズムの推定を行うために、杉田が独自開発した分子動力学計算を行うソフトウェア GENESIS の概要説明と実習による講習を行った。多くの生物系の研究者にとって分子動力学計算は単にプログラムを動かしてみるだけに終わってしまう危険性がある。講習会を通して、真に意味のある分子動力学計算ができるようになる機会を提供できた。

▶ 技術講習会と全体班会議が契機となり始まった共同研究が多数ある

申請時において計画班内あるいは公募班員との間に既存の共同研究が存在し、本領域期間に進展が見られた。しかし、より重要なことは、上記の技術講習会や全体班会議参加を契機にして、多数の共同研究がスタートしたことにある。特筆すべきは、バイオ AFM 夏の学校を契機に AFM 測定を試みた事例が 7 件（A01 藤岡、A01 矢島、A01 永田、A03 香月、A03 末次、A03 南野、A03 木村）あったことを指摘したい。観察に適さない試料もあるので、すべてが今後の共同研究に繋がるとは言えないが、高速 AFM 使用経験を得たことで、関与したすべての研究者が将来的に他の試料に適用する機会を生み出した。もう一つの特記事項は、リシール細胞法講習会を契機に In cell NMR を核酸分子に適用する研究が始まったことである（A01 永田）。従来の方法がタンパク質が対象であったことを考えると、「新しい出会いが新しい応用」を産んだ好例となった。A01 矢島はダイニンタンパク質の一分子計測を行ってきた。リシール細胞技術を用いてダイニンを細胞内に導入して、細胞内での計測を試みる実験を始めた。これも「出会いから応用」の良い例となった。A03 計画研究分担者の Tama と A03 重松は、電子顕微鏡単粒子解析から得られた低分解能構造に高分解能構造をフレキシブルフィッティングすることに関して共同研究を始めた。これは A01 神田が A03 Tama と行っていた同様の試みを全体班会議で聞いたことが契機となった。A03 計画研究連携研究者の宮下（理研）は、タンパク質の結晶状態の分子動力学計算を行っていたが、このような特殊なシミュレーションが研究として意味をもつ対象を探しあぐねていた。今回、A01 神田の新発想結晶化法によって得られたタンパク質結晶の結晶状態の分子動力学シミュレーションについて共同研究を始めた。

▶ 領域内の共同研究が共同論文に結実した例

A01 神田-A01 杉田：タンパク質結晶内に創り出した結晶コンタクトが無い空間に Tom20 タンパク質に結合している状態のプレ配列ペプチドを配置した。X線結晶解析と分子動力学計算の結果を比較して、ほぼ一致することを示した（Prot Sci, 2016）。

A01 眞柳（神田の連携研究者）-A01 安永：電子線クライオ電子顕微鏡を用いて神経細胞の糸状仮足を観測し、アクチン束とファシンの構造とその形成メカニズムの提案した（Cytoskeleton, 2016）。

A01 稲垣-A01 齋尾：常磁性ランタニドイオンを用いた NMR 法によって、リガンド結合に誘起されるタンパク質の立体構造変化を定量的かつ迅速に解析する手法を確立した（Sci Rep, 2015）。

A02 白川-A02 朽尾：ダイヤモンドナノ粒子を生細胞膜上の膜タンパク質や細胞内のタンパク質に固定し、ODMR イメージングを行った（Nanomaterials, 2016; J Nanosci Nanotechnol, 2015）。

A03 杉田-A03 塚崎：Sec トランスロコンの新しい結晶構造に基づく構造変化と機能の関係を全原子分子動力学で解明した（Cell Rep, 2015）

A01 奥村-A01 鎌形：1 分子蛍光実験を行い、がん抑制蛋白質 p53 の DNA 上でのスライディング運動を観察して、2 価のカチオンによるスライディング運動の制御機構を発見した（J Mol Biol, 2015）。

なお、論文投稿中が 1 件ある。A01 矢島-A03 重松：微小管モーターの運動計測、結晶解析、クライオ電子顕微解析。

▶ 研究項目ごとの研究進捗状況

【研究項目 A01: 過渡的に形成されるタンパク質複合体の動的構造測定技術】

技術要素として、タンパク質複合体の解離会合平衡を会合側へシフトさせる技術、結晶コンタクトが

ない空間を結晶内に創り出すことでタンパク質分子の運動性を解析する技術、高速AFM 技術と光ピンセット技術および蛍光観察との統合、を設定している。神田は解離会合平衡を会合側へシフトさせる技術と結晶コンタクトフリー空間を使った技術を2つのタンパク質に適用して、従来の結晶解析法では電子密度が消失してしまう場合にも動いている部分を電子密度として可視化でき、実用的に使えることを示した (Prot Sci, 2016)。結晶コンタクトフリー空間を融合タンパク質としてデザインしなくても、通常の結晶解析においても結晶中に隙間ができるので、本法で使用したローパスフィルターやFreeRアーティファクトの抑制などの計算手法がそのまま適用できる。安藤は新たに開発した探針走査型高速AFM装置に光ピンセットを組み込んだ。また、局在プラズモンを利用した高速超解像蛍光顕微鏡の開発も進めた。両者ともに技術開発段階であるが、今後、領域内の共同研究に供することで、まったく新しいタンパク質の動態が得られる可能性がある。A01公募班員が開発している動的測定技術として、齋尾はランタニドイオンの常磁性効果のNMR解析により、タンパク質の立体構造変化を迅速に捉えることができることを示した (Sci Rep, 2015)。永田はNMR実時間計測法を使って一本鎖DNA上の位置情報を加味した新しい酵素反応解析ができることを示した (Front Microbiol, 2016)。

【研究項目 A02: 細胞環境下でのタンパク質分子の動的構造測定技術】

技術要素として、細胞環境におけるタンパク質の過渡的相互作用を解析できる in-cell NMR 測定とダイヤモンドナノ粒子を利用した光検出磁気共鳴 (ODMR) 法を用いた一分子生体計測を設定している。西田は接着細胞にも適用可能なバイオリクター型 in-cell NMR システムを構築した。また、灌流培地にプロテアソーム阻害剤 MG132 を添加することで細胞内タンパク質分解の抑制による測定感度の向上を達成した。分担研究者の甲斐荘は SAIL-Phe, Tyr 標識法を用いて、芳香環の回転運動を指標にタンパク質の内部運動を評価する手法を確立した (Biochemistry, 2015)。白川はダイヤモンドナノ粒子の化学修飾技術および *in situ* における分子標識技術を開発した (Chem Lett, 2015)。さらに計測時間の 40 倍の高速化にも成功し、三次元姿勢決定の時間分解能は現時点で一軸当たり 500 ミリ秒に達している。公募班員の村田は自らが開発したリシール細胞作成技術の改良を行い、大型分子の細胞内導入効率を飛躍的に増加させることに成功した。これは in-cell NMR 法の感度上昇につながる重要な成果である。In-cell NMR を使って朽尾は細胞内でジスルフィド結合の切断速度の測定に成功し、伊藤は細胞内タンパク質と細胞内高分子構造体との相互作用を示すデータの取得した。A02 公募班員が開発している動的測定技術として、渡邊は膜タンパク質の機能を 1 分子で計測できる生体膜マイクロチップの開発に成功した (Sci Rep, 2015; IEEE Trans Nanotech, 2016; Lab Chip, 2016)。岡本は 1 分子蛍光 FRET 計測を細胞内で行うための Alternative Laser EXcitation (ALEX) 計測装置を開発した。浜地は短鎖抗体に有機触媒をコンジュゲートした反応性抗体を新しく開発し、それが認識する膜受容体との結合状態を化学反応によってスナップショット的にマッピングする手法を開発した (J Am Chem Soc, 2015)。木内は標的タンパク質に結合解離する蛍光プローブを用いた高密度標識・多重染色超解像顕微鏡法 IRIS の開発に成功し (Nat Methods, 2015)、PCT 国際出願 (PCT/JP2016/057817) を行った。

【研究項目 A03: 新規動的構造測定技術の検証と応用】

技術要素として、低解像度情報処理・複数の状態間遷移・水素イオンの位置予測を可能にする新規理論計算手法を設定する。杉田は超並列計算機に適した分子動力学プログラム GENESIS の高速化 (WIREs Comp Mol Sci, 2015)、大きな構造変化の解析に適したモデルの開発 (J Phys Chem Lett, 2016; J Phys Chem B, 2015; Proteins, 2015)、複数の構造間を接続する最小自由エネルギー経路の探索手法の開発を行った (BBA, 2016)。A03 公募班員の技術開発では、清水は新材料を用いて金ナノ結晶を使った X 線 1 分子動態計測のための観測チャンバーの製作を行った。中迫は構造解析に関連して、多変量解析やマニフォールドによって得られる推定モデルの立体構造を検討する手法を考案した (J Sync Rad, 2016; Phys Rev E, 2015)。杉本は結晶の X 線回折と可視吸収スペクトルの同軸・同時観測システムを構築した (J Sync Rad, 2016)。

以上の技術開発は、タンパク質分子が“形を変えながら機能している姿”を活写することに繋がる。

3. 審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況（2ページ以内）

審査結果の所見において指摘を受けた事項があった場合には、当該コメント及びそれへの対応策等を記述してください。

科学研究費補助金審査部会における所見を掲載する。

本研究領域は、新学術領域研究「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解—生理的準安定状態を捉える新技術—」(平成 21～25 年度)の成果の上に立脚し、日本が世界に誇る分子の動的構造を捉える技術をさらに発展、応用させることで、生体内で過渡的にしか存在しないタンパク質の準安定状態を観察し、その動的構造を明らかにしようとする挑戦的提案である。また、世界的にもタンパク質の動的構造解析法確立の緊急性・重要性は明らかであり、本申請は学術的な意義からも高く評価される。

領域組織は、構造生物学、生物物理学、分子生物学、理論分子科学、計算科学など広い領域の実績のある研究者から構成され、なかでも In-cell NMR や高速 AFM など世界最先端に行く研究者を配置するなど、バランスがとれている。主に、計画研究が技術開発とその技術支援を行い、公募研究からは具体的な生物学的テーマを採用する体制により、日本が先導する新技術の応用範囲を更に広げる計画であり、成果が期待できる。一方で、これまでに例を見ない体制であることから、うまく機能するか危惧する意見もあり、問題点を十分認識した上で研究を推進する必要がある。

概ね高評価をいただいたと考える。ただし、最後に「これまでに例を見ない体制である」との指摘があった。多くの新学術領域が特定の生命現象を対象として設定し、その解明を目標に据えているのは異なり、本新学術研究が技術開発に重きをおいていることを指していると考え。そこで、総括班を仲立ちとした体制を確立し、技術開発とその適用を同時並行して効率良く進めることに留意した。総括班が中心となり、項目ごとに技術講習会を開催することで、多数の共同研究をスタートさせることができた。

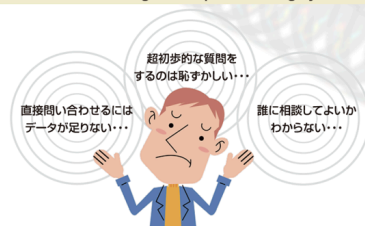


共同研究の開始は、班会議や技術講習会の場で、自然発生的に起こることを期待するのが普通である。共同研究の数をさらに上積みする工夫として、総括班に専用窓口を設置して、共同研究開始の障壁を下げる工夫を行った。これにより、技術的な問題の予備的な相談や、適用可能性などの質問、あるいは担当研究者に連絡する段階に至っていない場合などにも、共同研究に繋げるチャンスを増やすことができる。

総括よろず窓口相談口の御案内

領域内の共同研究の奨励します。計画班員・公募班員の連絡先と研究テーマ・研究技術については、ニュースレター2号(名簿号)とニュースレター4号(班会議要旨集号)を参考して下さい。当該研究者に直接連絡することを推奨しますが、技術的な問題の予備的な相談や、適用可能性などの質問、あるいは担当研究者に連絡する段階に至っていない場合など、気軽に相談したい場合には以下の総括班の専用窓口にお問い合わせ下さい。

総括班相談窓口 E-mail: ugoku-tanpaku@bioreg.kyushu-u.ac.jp



所見のつづき

領域代表者および主たる計画研究代表者は、専門学会でリーダー的なマネジメントの経験があり、適切な領域運営が期待できる。計画研究組織、公募研究組織ともに本研究推進に適切な規模となっている。また、技術トレーニングや公開セミナーなどで装置の普及を広める試みは評価できる。一方で、領域全体としての更なる研究の新規性、また、計画研究組織の更なる連携強化が望まれる。

現在までの研究期間では、当初の研究計画の確実な実行に重きを置いてきたために、研究の新規性と組織の連携強化については、未検討となっている。これから研究期間の後半が始まるので、総括班・国際連携班として検討していきたい。最近のクライオ電子顕微鏡による生体高分子の原子分解能の立体構造決定技術の進歩は目を見張るものがある。キャッチアップのため、クライオ電子顕微鏡技術講習会の開催(平成 28 年夏)を予定している。第 1 期の公募班にも電子顕微鏡関係者が 2 名(安永 A01, 重松 A03) いるが、第 2 期の公募班募集においてはさらに重点的に増員する必要があるだろう。

領域代表者のみに開示された所見に対する対応

それぞれの計画研究組織が、異なる技術、多様な条件下でタンパク質の動的構造を解明した結果を領域として統合することが重要であるが、実際の連携の具体性が見えづらいため、具体的な連携を構築すること。計画研究組織には、通常の個別研究との差別化が不十分な印象があり、領域目的の実現性が不透明な部分も見受けられることから、通常の個別研究との違いを明確にした上で領域研究を推進すること

さらに詳細を当時の学術調査官を通じて確認したところ、

「各計画班が異なる環境にあるタンパク質の動的構造変化を測定するため、各々異なる技術を開発する。いずれも魅力的で近い将来の重要な課題である。ただ、ここではそのための技術開発に重点が置かれており、それぞれの班が異なる技術でタンパク質の動的構造を多様な条件下で解明するときに、領域の統合をどのように取るのかが判り難い」という審査会での指摘でした。新学術領域研究では、領域内連携による研究推進が求められるという観点で、安藤先生の高速 AFM に関しては他の研究項目に寄与する技術であることが説明され、評価されることでしたが、in cell NMR、MD シミュレーション等に関しては各研究項目内での連携は問題ないが、他の計画研究との具体的な連携については要対応である。

In-cell NMR 技術は感度などの点で開発途上にあるために、汎用される段階まで至っていないという指摘はもっともであると考える。技術的な問題の 1 つに、タンパク質などの観測対象分子を細胞内に効率よく導入する方法の選択と条件の最適化がある。幸い公募班員の中に SLO 毒素を使った方法を開発した村田 (A02 班) がいる。In-cell NMR 研究者はこれまでそれぞれ独自な方法を模索してきたが、開発者である村田には SLO 法のノウハウの蓄積がある。リシール細胞法の技術講習会を開催して、ノウハウの共有を行った。この結果、A01 班の班員 (永田) が in-cell NMR を試すことにつながった。分子動力学 (MD) 計算の応用範囲は溶液中の生体高分子の MD シミュレーションだけに留まらない。電子顕微鏡から得られる低分解能構造に高分解能構造をフレキシブルフィッティングする方法や、結晶状態にあるタンパク質分子の MD 計算などの新しい応用 (いずれも A01 神田-A03 Tama) の検討が始まっている。今後、このような活動を通じて研究項目間の連携を着実に進めて行く。

「一部の計画研究で、他資金によるプロジェクトと内容の重複と思われるものが散見される。厳しい国家財政での公的資金であると重く認識し、社会や他分野の学術コミュニティに十分に説明できるように留意すること」

この点に関して指摘事項を重く受け止め、総括班会議等で常に認識を新たにするように努めた。

国際連携の審査結果の所見に対する対応

本研究課題は、動的構造生命科学領域における海外ネットワーク形成を主目的として、我が国が世界に誇る高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) 技術並びに細胞内核磁気共鳴法 (in-cell NMR) を主軸とする研究について国際活動を支援する提案である。国際的に著名な外国人研究者の短期招聘、研究者・博士研究員の相互派遣に加え、外国人博士研究員の長期受入、講習会の開催、国際広報活動などが計画されており、国際的な研究者コミュニティを牽引するために効果的な計画となっている。特に、平成 28 年度以降に実施する「新発想測定技術の普及のための講習会の開催」は、海外から受講生を募集する点で特徴のある活動であり、特にアジア諸国における高速 AFM 技術の向上に大きく貢献することが期待される。公募研究に関連する研究者の国際活動支援についても計画されており、評価できる。今後、本国際活動支援の成果を領域内に広く還元し、領域全体の国際活動が一層活性化していくことを期待する。

(留意事項) 特になし。

(参考意見) 若手を中心とした領域全体の国際活動の活性化につながるよう期待する。

実現可能な具体的な活動項目を計画班員全員で協力して企画したことが、高評価をいただいた理由と考える。今後も国際連携支援の趣旨に沿った活動を進めて行く。国際連携活動に公募班員を組み入れていくことに対して評価をいただいた。しかし現時点では、事務的な手続きを効率的に進める方法についてよくわかっていない。残りの期間で解決策を見いだして、国際連携関係の予算のなお一層の有効利用を図りたい。

4. 主な研究成果（発明及び特許を含む）【研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に整理する】 （3 ページ以内）

本研究課題（公募研究を含む）により得られた研究成果（発明及び特許を含む）について、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、図表などを用いて研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。記述に当たっては、本研究課題により得られたものに厳に限ることとします。

【研究項目 A01: 過渡的に形成されるタンパク質複合体の動的構造測定技術】

計画研究：神田はタンパク質の結晶内に結晶コンタクトフリーな“隙間”を意図的に作り出すという新発想のタンパク質結晶作成を行った。目的のタンパク質を融合タンパク質として発現し，両者を硬いリンカーを用いて接続する。分子全体を硬くすることで融合タンパク質が結晶内でどのような配置を取ったとしても，タグタンパク質と目的タンパク質の間に空間を確保できる（図 1）。結晶コンタクトフリー空間中にミトコンドリアプレ配列受容体 Tom20 タンパク質に結合した状態のプレ配列ペプチドと，オリゴ糖転移酵素中の可動性のセグメントを配置した。それらの動きを，ローパスフィルターを用いた差フリーエ電子密度マップ中にスミアした電子密度として可視化できた。また FreeR の使用による S/N 低下を防ぐ方法を提案した。以上を論文としてまとめた（Prot Sci, 2016）。オリゴ糖転移酵素について今後，基質との複合体形成に伴うセグメントの運動の変化を調べる予定である。そのために必要な古細菌酵素の基質の化学構造が未解明であったので，NMR と質量分析を用いて化学構造決定を行った（Carbohydr Res, 2014, 2015; J Biol Chem, 2016）。分担研究者の稲垣と A01 公募班員の齋尾は神田とともに，X 線小角散乱と重原子標識を組み合わせた溶液状態における新規の運動解析法の開発を目指している。モデル系として MurD タンパク質を選び，リガンド結合に伴う構造変化をランタニドイオン NMR 法で解析した（図 2, Sci Rep, 2015）。

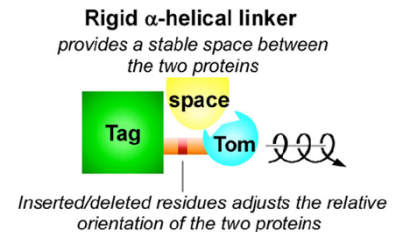


図 1 タンパク質結晶内に隙間をつくる方法の概念図(神田)

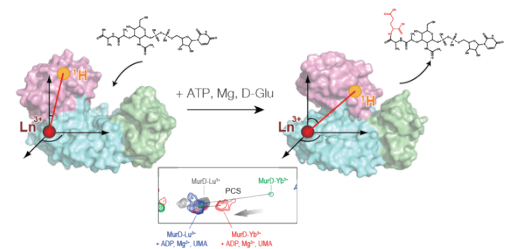


図 2 ランタニドイオン（赤い○）をタンパク質に固定し，その PCS 効果解析からリガンド結合に伴うドメイン間の相対配置の変化を解析できる（稲垣・齋尾）

安藤は探針走査型高速 AFM の開発を本新学術研究とは別のプロジェクトで進めてきた。従来の AFM 装置のように試料ステージを動かして走査すると種々の制約があるためである。この探針走査型 AFM 装置に光ピンセットを複合化した高速 AFM 装置を開発した（図 3A）。外力作用下にあるタンパク質分子の動態観察を行うことができる。ビーズとタンパク質分子をつなぐ長い λ DNA の調製，段差のある基板の製作，解放溶液系でビーズと λ DNA を連結させる手法の検討を行った。また，金属探針の周りに生ずる局在プラズモン（増強電磁波）を利用して高速超解像蛍光顕微鏡を実現し，高速 AFM 像と超解像蛍光像の同時取得を目指している（図 3B）。細い金属探針の作成法の検討に加え，極所プラズモンを生成，利用するための光学系の製作などを行った。

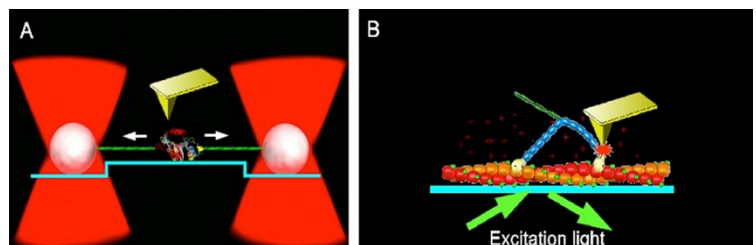


図 3 A 光ピンセットを利用した力作用下にあるタンパク質分子の動態観察。B 金属探針の周りに生じる局在プラズモンを利用した超解像蛍光顕微鏡像との同時取得（安藤）

公募研究（論文発表をピックアップ）：永田はシトシン脱アミノ化酵素 APOBEC3G の活性測定を NMR 実時間計測法により行い，pH 依存性に基いて一本鎖 DNA 上のスライディングには静電相互作用が重要であることを示した（Front Microbiol, 2016）。菅は植物の光化学系 I における励起エネルギーの移動経路や過剰な励起エネルギーを速やかに消光する仕組みを明らかにするために植物由来の光化学系 I-光集光アンテナ I 超複合体の結晶構造を 2.8Å 分解能で決定した（Cur Opin Struct Biol, 2016）。須河は 1 分子計測を用いて F₁-ATPase の構造遷移サイクルを解明した（PNAS, 2016）。

【研究項目 A02: 細胞環境下でのタンパク質分子の動的構造測定技術】

計画研究：細胞内のタンパク質や細胞小器官が受けている”分子クラウディング効果”や”Micro-compartmentalization 効果”を見積もるために、白川はダイヤモンドナノ粒子を使った光検出磁気共鳴 (ODMR) 法の、西田は白川とともに細胞内の特定のタンパク質の高次元 NMR 測定である in-cell NMR 法の開発に取り組んでいる。ODMR はダイヤモンドナノ粒子の蛍光検出と磁気共鳴技術を組み合わせて、ダイヤモンドナノ粒子の姿勢を高い角度精度で決定する手法である。細胞膜や細胞骨格などの運動性を計測することに使える。白川はダイヤモンドナノ粒子の化学修飾技術および *in situ* における分子標識技術を開発した (Chem Lett, 2015)。さらに計測時間の 40 倍の高速化にも成功し、三次元姿勢決定の時間分解能は現時点で一軸当たり 500 ミリ秒である。この分子標識技術と高速ナノジャイロスコープの手法を組み合わせることにより、F₁-ATPase をモデル系として一分子構造動態の三次元的な可視化に *in vitro* で成功した (図 4)。

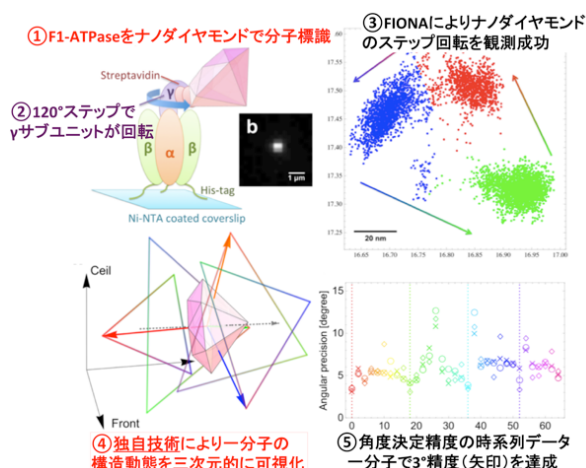


図 4 ダイヤモンドナノ粒子の姿勢(角度)を ODMR 法を用いて決定することができることを利用して、F₁-ATPase の回転運動を一分子観測した(白川)

In-cell NMR ではタンパク質の原子レベルの構造情報や運動性、他分子との相互作用を詳細に観察できる。白川はリジン側鎖の ¹³C ジメチル化と ¹³C-filtered DOSY-HSQC 法によりタンパク質拡散の定量計測に成功し、ヒト細胞 Lysate 中で拡散係数が 15%低下することを示した。西田は in-cell NMR の高度化を行った。細胞包埋に Matrigel を用いることで接着細胞にも適用可能なバイオリアクターシステムを構築した (図 5)。また、灌流培地にプロテアソーム阻害剤 MG132 を添加することで細胞内タンパク質分解の抑制による測定感度の向上を達成した。応用として、細胞内酸化ストレスに対する分子応答を抗酸化タンパク質であるチオレドキシンの酸化還元状態を指標に調べることに成功した。

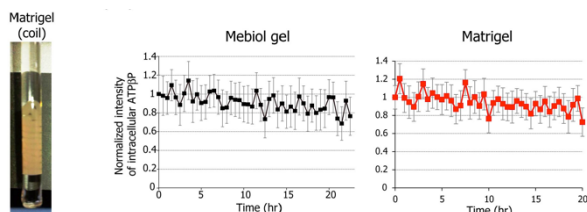


図 5 Mebiogel に代わり、細胞の 3 次元培養が可能な Matrigel を使っても、NMR チューブ内で細胞が長い間生存できる (西田)

分担研究者の甲斐荘は SAIL-Phe, Tyr 標識法を用いることで、芳香環の回転運動を指標にタンパク質の内部運動を評価する手法を確立した (Biochemistry, 2015)。

公募研究 (論文発表をピックアップ)：渡邊は疑似細胞アレイチップの基盤となる 3 種類の新規生体膜マイクロチップの開発に成功した (Sci Rep, 2015; IEEE Trans Nanotech, 2016; Lab Chip, 2016)。木内は標的タンパク質に結合解離する蛍光プローブを用いた高密度標識・多重染色超解像顕微鏡法 IRIS の開発 (図 6) に成功し (Nat Methods, 2015), 2016 年 3 月 11 日に PCT 国際出願 (PCT/JP2016/057817) を行った。浜地は短鎖抗体に有機触媒をコンジュゲートした反応性抗体を新しく開発し、それが認識する膜受容体との結合状態を化学反応によって snapshot 的にマッピングする手法の開発に成功した (J Am Chem Soc, 2015)。

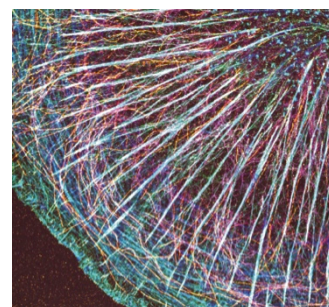


図 6 多重蛍光染色超解像 IRIS 法により、アクチン線維、微小管、中間系フィラメント、接着班を可視化した(木内)

【研究項目 A03: 新規動的構造測定技術の検証と応用】

計画研究：杉田は (1)超並列計算機に適した分子動力学プログラム GENESIS を高速化するとともに (WIREs Comp Mol Sci, 2015), (2)粗視化分子モデルの代表である郷モデルを修正し, 大規模構造変化の解析に適した DoME (Domain Motion Enhanced) モデルを開発した (J Phys Chem Lett, 2016; J Phys Chem B, 2015; Proteins, 2015). さらにこのモデルに生体膜の効果や複数の立体構造情報を含む形で拡張し, (3)複数の構造間を接続する最小自由エネルギー経路の探索手法を GENESIS に導入することで (図 7), 膜タンパク質の大規模構造変化を解析する手法を確立した (BBA, 2016).

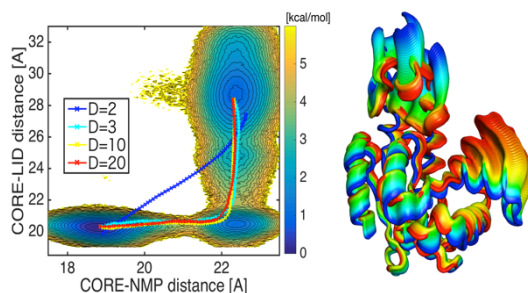


図 7 構造変化を示す最小自由エネルギー経路を記述する集団座標の次元数依存性. 左図で次元数が足りない青い系路は正しく表現できていない (杉田)

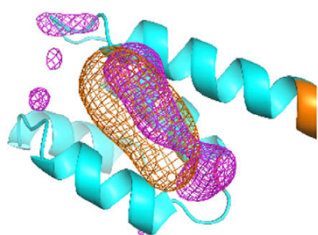


図 8 実験により決定したプレ配列ペプチドの電子密度 (マゼンタ) は計算の電子密度 (オレンジ) と重なるものの少しずれている. これは結晶の急速凍結に伴う運動分布の偏りを観測している可能性がある (神田・杉田)

A01 神田と A03 塚崎の実験と連携し, Tom20 の結晶中コンタクトフリー空間での動的構造 (図 8) や Sec トランスロコンの新しい結晶構造に基づく構造変化と機能の関係を全原子分子動力学で解明した (Prot Sci, 2016; Cell Rep, 2015). 研究分担者の Tama は低温電子顕微鏡によって得られる低解像度の密度マップを利用した原子構造モデルの新しい計算手法を開発し, A01 神田や A03 重松が行った電顕単粒子解析構造に高分解能結晶構造をフレキシブルフィッティングした (図 9).

塚崎は Sec タンパク質膜透過装置の時間依存的な 1 ユニットの動態解析を行うために, SecA と SecYEG を融合させた SecYAEG 複合体を調製し, サブユニットの構成比を一定にすることに成功した. これをナノディスクに埋め込めこんだ.

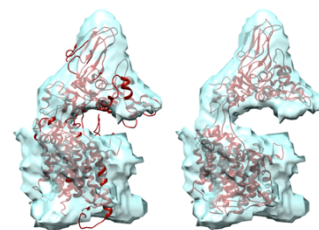


図 9 単粒子解析マップへの結晶構造のフィッティング前 (左) とフィッティング後 (右) (Tama)

さらにジスルフィド結合を用いた分泌過程の開始を制御する方法も開発した. これらの成果により 1 ユニット解析に向けた準備が整った. タンパク質分泌反応の理解のためには, 様々な状態の Sec 因子の”準安定状態の結晶構造”が必要である. SecYEG の解析について, 基質タンパク質が SecY に結合することで構造変化が起こることを示した (Cell Rep, 2015).

公募研究 (論文発表をピックアップ):

南野はバクテリアべん毛特異的 ATPase 複合体及び FlgN シャペロンの動的機能構造解析に成功した (PNAS, 2016; Mol Microbiol, 2016). 末次は BAR ドメインタンパク質の動態解析や超解像解析を行いタンパク質の多量体形成と生理機能の関連を解析した (J Cell Sci, 2015). 中迫はグルタミン酸脱水素酵素のドメイン運動と水和構造変化の相関を探るために分子動力学計算を行い, 活性クレフト周辺での水と水分子の脱吸着がドメイン運動を制御していることを見出した (Sci Rep, 2016). 重松は多剤排出ポンプ複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析を行った (Structure, 2016). また, クライオ電子顕微鏡単粒子解析に必要な画像処理について, 膜タンパク質の動的機能構造を膜小胞上で明らかにするための新しいアルゴリズムを開発した (J Struct Biol, 2016).

5. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5ページ以内）

本研究課題（公募研究を含む）により得られた研究成果の公表の状況（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。記述に当たっては、本研究課題により得られたものに厳に限ることとします。

- 論文の場合、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、研究項目ごとに計画研究・公募研究の順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に*印を付してください。
- 別添の「(2) 発表論文」の融合研究論文として整理した論文については、冒頭に◎を付してください。
- 補助条件に定められたとおり、本研究課題に係り交付を受けて行った研究の成果であることを表示したもの（論文等の場合は謝辞に課題番号を含め記載したもの）について記載したもののについては、冒頭に▲を付してください（前項と重複する場合は、「◎▲・・・」と記載してください）。
- 一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

(1) 論文など一覧

現在までの総論文数は101報（共著論文についてはダブルカウントされている）であった。うち impact factor（2014年の数値）が5以上の雑誌に掲載された論文は41報であった。

【研究項目 A01: 過渡的に形成されるタンパク質複合体の動的構造測定技術】

神田大輔（計画研究代表者）

- ▲Taguchi Y, Fujinami D, *Kohda D. Comparative analysis of archaeal lipid-linked oligosaccharides that serve as oligosaccharide donors for Asn-glycosylation. *J Biol Chem*, in press (2016)
- ▲*Shimada A, Yamaguchi A, Kohda D. Structural basis for the recognition of two consecutive mutually interacting DPF motifs by the SGIP1 m homology domain. *Sci Rep* **6**: 19565 (2016)
- ◎▲Matsuoka R, Shimada A, Komuro Y, Sugita Y, *Kohda D. Rational design of crystal contact-free space in protein crystals for analyzing spatial distribution of motions within protein molecules. *Protein Sci* **25**: 754-768 (2016)
- ▲Fujinami D, Nyirenda J, Matsumoto S, *Kohda D. Structural elucidation of an asparagine-linked oligosaccharide from the hyperthermophilic archaeon, *Archaeoglobus fulgidus*. *Carbohydr Res* **413**: 55-62 (2015)
- Ishiwata A, Taguchi Y, Lee YJ, Watanabe T, Kohda D, *Ito Y. N-Glycosylation with synthetic undecaprenyl pyrophosphate-Linked oligosaccharide to oligopeptides by PglB oligosaccharyltransferase from *Campylobacter jejuni*. *Chembiochem* **16**: 731-737 (2015)

稲垣冬彦（計画研究分担者）

- Yokogawa M, Tsushima T, Noda NN, Kumeta H, Enokizono Y, Yamashita K, Standley DM, Takeuchi O, Akira S, *Inagaki F. Structural basis for the regulation of enzymatic activity of Regnase-1 by domain-domain interactions. *Sci Rep* **6**: 22324 (2016)
- Kobashigawa Y, Amano S, Yoza K, Himeno R, Amemiya S, Morioka H, Yokogawa M, Kumeta H, Schlessinger J, *Inagaki F. Nuclear magnetic resonance analysis of the conformational state of cancer mutant of fibroblast growth factor receptor 1 tyrosine kinase domain. *Genes Cells* **21**: 350-357 (2016)
- Kobashigawa Y, Amano S, Yokogawa M, Kumeta H, Morioka H, Inouye M, Schlessinger J, *Inagaki F. Structural analysis of the mechanism of phosphorylation of a critical autoregulatory tyrosine residue in FGFR1 kinase domain. *Genes Cells* **20**: 860-870 (2015)
- ◎▲Saio T, Ogura K, Kumeta H, Kobashigawa Y, Shimizu K, Yokochi M, Kodama K, Yamaguchi H, Tsujishita H, *Inagaki F. Ligand-driven conformational changes of MurD visualized by paramagnetic NMR. *Sci Rep* **5**: 16685 (2015)

安藤敏夫（計画研究代表者）

- ◎▲Uchihashi T, Watanabe H, Fukuda S, Shibata M, *Ando T. Functional extension of high-speed atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **160**:182-196 (2016)
- ◎▲Fukuda S, Uchihashi T, *Ando T. Method of mechanical holding of cantilever chip for tip-scan high-speed atomic force microscopy. *Rev Sci Instrum* **86**:063703 (2015)

公募研究

齋尾智英

- ◎ Imai M, Saio T, Kumeta H, Uchida T, Inagaki F, *Ishimori K. Investigation of the redox-dependent modulation of structure and dynamics in human cytochrome c. *Biochem Biophys Res Commun* **469**: 978-84 (2015)
- ◎▲Saio T, Ogura K, Kumeta H, Kobashigawa Y, Shimizu K, Yokochi M, Kodama K, Yamaguchi H, Tsujishita H, *Inagaki F. Ligand-driven conformational changes of MurD visualized by paramagnetic NMR. *Sci Rep* **5**:16685 (2015)

鎌形清人

- ◎ *Takahashi S, Kamagata K, Oikawa H. Where the complex things are: single molecule and ensemble spectroscopic investigations of protein folding dynamics. *Curr Opin Struct Biol* **36**:1-9 (2016)
- ◎ Murata A, Ito Y, Kashima R, Kanbayashi S, Nanatani K, Igarashi C, Okumura M, Inaba K, Tokino T, *Takahashi S, *Kamagata K. One-dimensional sliding of p53 along DNA is accelerated in the presence of Ca²⁺ or Mg²⁺ at millimolar concentrations, *J Mol Biol* **427**: 2663-2678 (2015)
- ◎ Oikawa H, Kamagata K, Arai M, *Takahashi S. Complexity of the folding transition of the B domain of protein A revealed by the high-speed tracking of single-molecule fluorescence time series. *J Phys Chem B* **119**: 6081-6091 (2015)

奥村正樹

- ▲Ramming T, Kanemura S, Okumura M, *Inaba K, *Appenzeller-Herzog C. Cysteines 208 and 241 in Ero1α are required for maximal catalytic turnover, *Redox Biology* **7**: 14-20 (2016)
- *Saiki M, Shiba K, Okumura M. Structural Stability of Amyloid Fibrils Depends on the Existence of the Peripheral Sequence near the Core Cross-03B2 Region, *FEBS Lett*. **589**: 3541-3547 (2015)
- Ramming T, Okumura M, Kanemura S, Baday S, Birk J, Moes S, Jenö P, Bernèche S, Inaba K, *Appenzeller-Herzog C. A PDI-catalyzed thiol/disulfide switch regulates the production of hydrogen peroxide by human Ero1, *Free Radic Biol Med*. **83**: 361-372 (2015)
- ◎ Murata A, Ito Y, Kashima R, Kanbayashi S, Nanatani K, Igarashi C, Okumura M, Inaba K, Tokino T, *Takahashi S, *Kamagata K. One-dimensional sliding of p53 along DNA is accelerated in the presence of Ca²⁺ or Mg²⁺ at millimolar concentrations, *J. Mol Biol*. **427**: 2663-2678 (2015)

5. Okumura M, Kadokura H, *Inaba K. Structural and mechanistic basis of the PDI family members producing disulfides within the ER, *Free Radic Biol Med*. **83**: 314-322 (2015)

矢島潤一郎

1. *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)
2. Ichikawa M, Saito K, Yanagisawa H, Yagi T, Kamiya R, Yamaguchi S, Yajima J, Kushida Y, Nakano K, Numata O and *Toyoshima YY. Axonemal dynein light chain-1 locates at the microtubule-binding domain of the γ heavy chain. *Molecular Biology of the Cell* **26**: 4236-4247 (2015)

永田崇

1. ▲Yamaoki Y, Nagata T, Mashima T, *Katahira M. K^+ -responsive off-to-on switching of hammerhead ribozyme through dual G-quadruplex formation requiring no heating and cooling treatment. *Biochem Biophys Res Commun* **468**: 27-31 (2015)
2. ▲Yoneda R, Suzuki S, Mashima T, Kondo K, Nagata T, Katahira M, *Kurokawa R. The binding specificity of translocated in liposarcoma/fused in sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin D1. *Cell Biosci* **6**: 4 (2016)
3. ◎ ▲Kamba K, *Nagata T, *Katahira M. Characterization of the deamination coupled with sliding along DNA of anti-HIV factor APOBEC3G on the basis of the pH-dependence of deamination revealed by real-time NMR monitoring. *Front Microbiol* **7**: 587 (2016)

水野操

1. Chang S, Mizuno M, Ishikawa H, *Mizutani Y. Effect of the N-terminal residues on the quaternary dynamics of human adult hemoglobin. *Chem. Phys.* **469-470**: 31-37 (2016).
2. ◎ Higashino A, Mizuno M, *Mizutani Y. Chromophore structure of photochromic fluorescent protein dropna: acid-base equilibrium of two *cis* configurations. *J. Phys. Chem. B*. **120**: 3353-3359 (2016).
3. ◎ Mizuno M, *Mizutani Y. Protein response to chromophore isomerization in microbial rhodopsins revealed by picosecond time-resolved ultraviolet resonance Raman spectroscopy: a review. In *Recent Progress in Surface and Colloids Chemistry with Biological Applications (ACS Symposium Series)*, **1215**: 329-353 (2015).

菅倫寛

1. ▲Suga M, Qin X, *Kuang T, *Shen JR. Structure and energy transfer pathways of the plant photosystem I-LHCI supercomplex. *Current Opinion in Structural Biology*, **39**: 46-53 (2016)
2. Qin X, Suga M, *Kuang T, *Shen JR. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI super-complex. *Science*, **348**: 989-995 (2015)

安永卓生

1. ▲Aramaki S, Mayanagi K, Jin M, Aoyama K, *Yasunaga T. Filopodia Formation by Cross-linking of F-actin with Fascin in Two Different Binding Manners, *Cytoskeleton* in press (2016)
2. ▲Toba S, Koyasako K, Yasunaga T, Hirotsune S. Toba S, Koyasako K, Yasunaga T, Hirotsune S. Lis1 restricts the conformational changes in cytoplasmic dynein on microtubules, *Microscopy* **64**:419-427 (2015)

柴山修哉

Ohki M, Sugiyama K, Kawai F, Tanaka H, Nihei Y, Unzai S, Takebe M, Matsunaga S, Adachi S, Shibayama N, Zhou Z, Koyama R, Ikegaya Y, Takahashi T, Tame J, Iseki M, Park S-Y. Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press (2016)

横田浩章

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

藤岡優子

1. Wu F, Watanabe Y, Guo XY, Qi X, Wang P, Zhao HY, Wang Z, Fujioka Y, Zhang H, Ren JQ, Fang TC, Shen YX, Feng W, Hu JJ, *Noda NN, *Zhang H. Structural Basis of the Differential Function of the Two *C. elegans* Atg8 Homologs, LGG-1 and LGG-2, in Autophagy, *Mol. Cell* **60**: 914-929 (2015)
2. *Noda NN, Fujioka Y. Atg1 family kinases in autophagy initiation, *Cell. Mol. Life Sci.* **72**: 3083-3096 (2015)
3. ▲Yamamoto H, Fujioka Y, Suzuki SW, Nozshiro D, Suzuki H, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, Ando T, *Noda NN, *Ohsumi Y. The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes. *Dev Cell in press* (2016)

須河光弘

▲ ◎ *Sugawa M, Okazaki K, Kobayashi M, Matsui T, Hammer G, Masaie T, *Nishizaka T. F_1 -ATPase conformational cycle from simultaneous single-molecule FRET and rotation measurements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* in press (2016)

【研究項目 A02: 細胞環境下でのタンパク質分子の動的構造測定技術】

白川昌宏 (計画研究代表者)

1. Walinda E, Morimoto D, Nishizawa M, Shirakawa M. *Sugase K, Efficient identification and analysis of chemical exchange in biomolecules by R1 ρ relaxation dispersion with Amaterasu, *Bioinformatics*, in press (2016)
2. ◎ Sotoma S, *Igarashi R, *Shirakawa M. Moderate plasma treatment enhances the quality of optically detected magnetic resonance signals of nitrogen-vacancy centres in nanodiamonds, *Applied Physics A* **122** :522 (2016)
3. ◎ Sotoma S, Iimura J, Igarashi R, Hirosawa KM, Ohnishi H, Mizukami S, Kikuchi K, Fujiwara TK, *Shirakawa M, *Tochio H. Selective labeling of proteins on living cell membranes using fluorescent nanodiamond probes, *Nanomaterials* **6**: 56 (2016)
4. Mishima Y, Jayasinghe CD, Lu K, Otani J, Shirakawa M, Kawakami T, Kimura H, Hojo H, Carlton P, Tajima S, *Suetake I. Nucleosome compaction facilitates HP1 γ binding to methylated H3K9, *Nucleic Acids Res* **43**:10200-10212 (2015)
5. ◎ Sotoma S, Igarashi R, Iimura J, Kumiya Y, Tochio H, Harada Y, *Shirakawa M. Suppression of nonspecific protein-nanodiamond adsorption enabling specific targeting of nanodiamonds to biomolecules of interest, *Chem Lett* **44**: 354-356 (2015)
6. ◎ *Yoshinari Y, Mori S, Igarashi R, Sugi T, Yokota H, Ikeda K, Sumiya H, Mori I, Tochio H, *Harada Y, Shirakawa M. Optically detected magnetic resonance of nanodiamonds in vivo; implementation of selective imaging and fast sampling, *J Nanosci Nanotechnol* **15**:1014-21 (2015)
7. ◎ Sotoma S, Akagi K, Hosokawa S, Igarashi R, Tochio H, Harada Y, *Shirakawa M. Comprehensive and quantitative analysis for controlling the physical/chemical states and particle properties of nanodiamonds for biological applications, *RSC ADVANCES* **5** : 13818-13(2015)
8. Morimoto D, Walinda E, Fukada H, Sou YS, Kageyama S, Hoshino M, Fujii T, Tsuchiya H, Saeki Y, Arita K, Ariyoshi M, Tochio H, Iwai K, Namba K, Komatsu M, Tanaka K, *Shirakawa M. The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates, *Nat Commun* **6**:6116 (2015)
9. ◎ Yamada H, Hasegawa Y, Imai H, Takayama Y, Sugihara F, Matsuda T, Tochio H, Shirakawa M, Sando S, Kimura Y, Toshimitsu A,

*Aoyama Y, *Kondo T. Magnetic resonance imaging of tumor with a self-traceable phosphorylcholine polymer, *J Am Chem Soc.* **137**:799-806 (2015)

西田紀貴 (計画研究代表者)

1. Takarada O, Nishida N, Kikkawa M, *Shimada I. Backbone and side-chain ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments of the microtubule-binding domain of yeast cytoplasmic dynein in the high and low-affinity states. *Biomol NMR assign* **8**: 379-82 (2014)
2. Suzuki T, Suzuki S, Umemoto R, Ogino S, Nishida N, *Shimada I. Mechanical force effect on the two-state equilibrium of the hyaluronan-binding domain of CD44 in cell rolling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 6991-6 (2015)

甲斐荘正恒 (計画研究分担者)

1. ©Yang CJ, Takeda M, Terauchi T, Jee J, *Kainosho M. Differential Large-Amplitude Breathing Motions in the Interface of FKBP12-Drug Complexes. *Biochemistry* **54**: 6983-95 (2015)
2. Wang S, Parthasarathy S, Xiao Y, Nishiyama Y, Long F, Matsuda I, Endo Y, Nemoto T, Yamauchi K, Asakura T, Takeda M, Terauchi T, Kainosho M, *Ishii Y. Nano-mole scale sequential signal assignment by ¹H-detected protein solid-state NMR. *Chem Commun (Camb)* **51**:15055-8 (2015)
3. Wang S, Parthasarathy S, Nishiyama Y, Endo Y, Nemoto T, Yamauchi K, Asakura T, Takeda M, Terauchi T, Kainosho M, *Ishii Y. Nano-mole scale side-chain signal assignment by ¹H-detected protein solid-state NMR by ultra-fast magic-angle spinning and stereo-array isotope labeling. *PLoS One* **10**:e0122714 (2015)
4. Schmidt E, Ikeya T, Takeda M, Löhr F, Buchner L, Ito Y, Kainosho M, *Güntert P. Automated resonance assignment of the 21kDa stereo-array isotope labeled thioldisulfide oxidoreductase DsbA. *J Magn Reson.* **249C**: 88-93 (2014)

公募研究

村田昌之

Matsuto M, Kano F, *Murata M. Reconstitution of the targeting of Rab6A to the Golgi apparatus in semi-intact HeLa cells: A role of BICD2 in stabilizing Rab6A on Golgi membranes and a concerted role of Rab6A/BICD2 interactions in Golgi-to-ER retrograde transport. *Biochem. Biophys. Acta (Molecular Cell Research)*,**1853**:2592-2609 (2015)

渡邊力也

1. ©▲ *Watanabe R, Soga N, Hara M, Noji H. Arrayed water-in-oil droplet bilayers for membrane transport analysis, *Lab Chip* (2016)
2. ©▲ *Watanabe R, Soga N, Noji H. Novel Nano-Device to Measure Voltage-Driven Membrane Transporter Activity, *IEEE Trans Nanotech* **15**: 70-73 (2016)
3. ©▲ Soga N, *Watanabe R, *Noji H. Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters, *Sci Rep* **5**: 11025 (2015)

木内泰

©▲ *Kiuchi T, Higuchi M, Takamura A, Maruoka M, *Watanabe N. Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes, *Nature Methods* **12**: 743-746 (2015)

朽尾豪人

1. ©Sotoma S, Iimura J, Igarashi R, Hirosawa KM, Ohnishi H, Mizukami S, Kikuchi K, Fujiwara KT, *Shirakawa M, *Tochio H. Selective Labeling of Proteins on Living Cell Membranes Using Fluorescent Nanodiamond Probes. *Nanomaterials* **6**: 56-64 (2016)
2. ©Yoshinari Y, Mori S, Igarashi R, Sugi T, Yokota H, Ikeda K, Sumiya H, Mori I, Tochio H, *Harada Y, *Shirakawa M. Optically Detected Magnetic Resonance of Nanodiamonds In Vivo; Implementation of Selective Imaging and Fast Sampling. *J Nanosci Nanotechnol* **15**:1014-21(2015)

浜地格

1. © *Kiyonaka S, Kubota R, Michibata Y, Sakakura M, Takahashi H, Numata T, Inoue R, Yuzaki M, *Hamachi I. Allosteric activation of glutamate receptors by on-cell coordination chemistry. *Nat Chem.* in press (2016)
2. ©▲ Hayashi T, Yasueda Y, Tamura T, Takaoka Y, *Hamachi I. Analysis of cell-surface receptor dynamics through covalent labeling by catalyst-tethered antibody. *J. Am. Chem. Soc.* **137**: 5372-5380 (2015)

伊藤隆

©*Ikeya T, Ikeda S, Kigawa T, Ito Y Güntert P. Protein NMR Structure Refinement based on Bayesian Inference, *J Phys: Conf Ser* **699**, 012005: 1-14 (2016)

岡本憲二 該当無し

【研究項目 A03: 新規動的構造測定技術の検証と応用】

杉田有治 (計画研究代表者)

1. ©▲ Mori T, Miyashita N, Im W, Feig M, *Sugita Y. Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms, *BBA-biomembranes*, in press (2016)
2. ©▲ Matsuoka R, Shimada A, Komuro Y, Sugita Y, *Kohda D. Rational design of crystal contact-free space in protein crystals for analyzing spatial distribution of motions within protein molecules, *Protein Sci.* **25**, 754-768 (2016)
3. ©▲ Tanaka Y, Sugano Y, Takemoto M, Mori T, Furukawa A, Kusakizako T, Kumazaki K, Kashima A, Ishitani R, Sugita Y, Nureki O, *Tsukazaki Y. Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a Precise Resting and a Peptide-Bound State, *Cell Rep* **13**, 1561-1568 (2015)
4. ©▲ Matsunaga Y, Komuro Y, Kobayashi C, Jung J, Mori T, *Sugita Y. Dimensionality of Collective Variables for Describing Conformational Changes of a Multi-Domain Protein, *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 1446-1451 (2016)
5. ©▲ Matsunaga Y, Kidera A, *Sugita Y. Sequential data assimilation for single-molecule FRET photon-counting data, *J. Chem. Phys.* **142**, 214115 (2015)
6. ©▲ Kobayashi C, Matsunaga Y, Koike R, Ota M, *Sugita Y. Domain motion enhanced (DoME) model for efficient conformational sampling of multidomain proteins, *J. Phys. Chem. B* **119**, 14584-14593 (2015)
7. ©▲ Kobayashi C, Koike R, Ota M, *Sugita Y. Hierarchical domain-motion analysis of conformational changes in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, *Proteins* **83**, 746-756 (2015)
8. ©▲ Jung J, Mori T, Kobayashi C, Matsunaga Y, Yoda, Feig M, *Sugita Y. GENESIS: A hybrid-parallel and multi-scale molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms for biomolecular and cellular simulations, *WIREs Comp. Mole. Sci.* **5**, 310-323 (2015)

Florence Tama (計画研究分担者)

©▲ Nakano M, Tateishi-Karimata H, Tanaka S, Tama F, Miyashita O, Nakano S, *Sugimoto N. Thermodynamic properties of water molecules in the presence of cosolute depend on DNA structure: a study using grid inhomogeneous solvation theory, *Nucleic Acids. Res.* **43**, 10114-10125 (2015)

塚崎智也 (計画研究代表者)

1. ▲ Tanaka Y, Sugano Y, Takemoto M, Mori T, Furukawa A, Kusakizako T, Kumazaki K, Kashima A, Ishitani R, Sugita Y, *Nureki

- O, *[Tsukazaki T](#). Crystal structures of SecYEG in lipidic cubic phase elucidate a precise resting and a peptide-bound states. *Cell Rep.* **13**: 1561-1568 (2015)
2. ▲[Shimokawa N](#), [Kumazaki K](#), [Tsukazaki T](#), [Nureki O](#), [Ito K](#), *[Chiba S](#). Hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**: 5063-5068 (2015)
3. ▲[Kumazaki K](#), [Kishimoto T](#), [Furukawa A](#), [Mori H](#), [Tanaka Y](#), [Dohmae N](#), [Ishitani R](#), *[Tsukazaki T](#), *[Nureki O](#). Crystal structure of *Escherichia coli* YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Sci. Rep.* **4**: 7299 (2014)

公募研究
奥野貴士

[Wallen JR](#), [Mallett TC](#), [Okuno T](#), [Parsonage D](#), [Sakai H](#), [Tsukihara T](#), *[Claiborne A](#). Structural Analysis of *Streptococcus pyogenes* NADH Oxidase: Conformational Dynamics Involved in Formation of the C(4a)-Peroxyflavin Intermediate. *Biochemistry*, **54**: 6815-29 (2015)

清水啓史

1. ◎*[Yamakata A](#), [Shimizu H](#), *[Oiki S](#). Surface-enhanced IR absorption spectroscopy of the KcsA potassium channel upon application of an electric field. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17(33)**:21104-11(2015)
2. [Furutani Y](#), [Shimizu H](#), [Asai Y](#), *[Oiki S](#), *[H. Kandori](#). Specific interactions between alkali metal cations and the KcsA channel studied using ATR-FTIR spectroscopy. *Biophys. Physicobiol.* **12**: 37-45 (2015)
3. [Nakao H](#), [Ikeda K](#), [Iwamoto M](#), [Shimizu H](#), [Oiki S](#), [Ishihama Y](#), *[Nakano M](#). pH-Dependent promotion of phospholipid flip-flop by the KcsA potassium channel. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1848**:145-150 (2015)

木村泰久 該当無し

南野徹

1. ▲[Kinoshita M](#), [Nakanishi Y](#), [Furukawa Y](#), [Namba K](#), *[Imada K](#), *[Minamino T](#). Rearrangements of α -helical structures of FlgN chaperone control the binding affinity for its cognate substrates during flagellar type III export. *Mol. Microbiol.* in press (2016)
2. ▲*[Imada K](#), [Minamino T](#), [Uchida Y](#), [Kinoshita M](#), [Namba K](#). Insight into the flagellar type III protein export revealed by the complex structure of the type III ATPase and its regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**: 3633-3638 (2016)
3. ▲*[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.* **12**: e1005495 (2016)
4. ▲*[Minamino T](#), [Kinoshita M](#), [Inoue Y](#), [Morimoto YV](#), [Ihara K](#), [Koya S](#), [Hara N](#), [Nishioka N](#), [Kojima S](#), [Homma M](#), *[Namba K](#). FliH and FliI ensure efficient energy coupling of flagellar type III protein export in *Salmonella*. *MicrobiologyOpen* in press (2016)
5. *[McMurry JL](#), [Minamino T](#), [Furukawa Y](#), [Francis JW](#), [Hill SA](#), [Helms KA](#), [Namba K](#). Weak interactions between *Salmonella enterica* FlhB and other flagellar export apparatus proteins govern type III secretion dynamics. *PLoS One* **10**: e0134884 (2015)
6. *[Minamino T](#), [Imada K](#). The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends Microbiol.* **23**: 267-274 (2015).

末次志郎

1. ▲*[Suetsugu S](#). Higher-order assemblies of BAR domain proteins for shaping membranes. *Microscopy*, in press (2016)
2. [Itoh Y](#), [Kida K](#), [Hanawa-Suetsugu K](#), *[Suetsugu S](#). Yeast Iy1p Is a Putative I-BAR-domain Protein with pH-sensitive Filament Forming Ability in vitro. *Cell Struct Funct.* **41**:1-11 (2016)
3. ▲[Senju Y](#), *[Suetsugu S](#). Possible regulation of caveolar endocytosis and flattening by phosphorylation of F-BAR domain protein PACSIN2/Syndapin II. *Bioarchitecture.* **5**:70-77 (2015)
4. ▲[Senju Y](#), [Rosenbaum E](#), [Shah C](#), [Hamada-Nakahara S](#), [Itoh Y](#), [Yamamoto K](#), [Hanawa-Suetsugu K](#), [Daumke O](#), *[Suetsugu S](#). Phosphorylation of PACSIN2 by protein kinase C triggers the removal of caveolae from the plasma membrane. *J Cell Sci* **128**:2766-71 (2015)

中迫雅由

1. ◎▲[Oroguchi T](#), *[Nakasako M](#). Changes in hydration structure regulate collective motions of a multi-domain protein. *Sci Rep*, in press (2016)
2. ◎[Sekiguchi Y](#), [Oroguchi T](#), *[Nakasako M](#). Classification and assessment of retrieved electron density maps in coherent X-ray diffraction imaging using multivariate statistics. *J. Synchrotron Rad.* **23**: 312-323 (2016)
3. ◎*[Yoshidome T](#), [Oroguchi T](#), [Nakasako M](#), *[Ikeguchi M](#). Classification of projection images of proteins with structural polymorphism by manifold: A simulation study for X-ray free-electron laser diffraction imaging. *Phys. Rev. E* **92**: 032710 (2015)
4. *[Shirakihara Y](#), [Shiratori A](#), [Tanikawa H](#), [Nakasako M](#), [Yoshida M](#), [Suzuki T](#). Structure of a thermophilic F₁-ATPase inhibited by an γ -subunit: deeper insight into the γ -inhibition mechanism. *FEBS Journal* **282**: 2895-2913 (2015)

香月美穂 該当無し

古川亜矢子

[Furukawa A](#), [Konuma T](#), [Yanaka S](#), [Sugase K](#). Quantitative analysis of protein-ligand interactions by NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **96**: 47-57 (2016)

杉本宏

1. [Sakaguchi M](#), [Kimura T](#), [Nishida T](#), [Tosha T](#), [Sugimoto H](#), [Yamaguchi Y](#), [Yanagisawa S](#), [Ueno G](#), [Murakami H](#), [Ago H](#), [Yamamoto M](#), [Ogura T](#), [Shiro Y](#), *[Kubo M](#). A nearly on-axis spectroscopic system for simultaneously measuring UV-visible absorption and X-ray diffraction in the SPring-8 structural genomics beamline. *J. Synchrotron Rad* **23**: 334-338 (2016)
2. [Doi A](#), [Nakamura H](#), [Shiro Y](#), *[Sugimoto H](#). Structure of the response regulator ChrA in the haem-sensing two-component system of *Corynebacterium diphtheriae*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **71**: 966-71 (2015)

重松秀樹

1. [Qu G](#), [Kaushal PS](#), [Wang J](#), [Shigematsu H](#), [Piazza CL](#), *[Agrawal RK](#), *[Marlene B](#), *[Wang H-W](#). Structure of a group II intron in complex with its reverse transcriptase. *Nature Structural & Molecular Biology* (2016)
2. [Yang Y](#), [Wang J](#), [Shigematsu H](#), [Xu W](#), *[Shih WM](#), *[Rothman JE](#), *[Lin C](#). Self-assembly of size-controlled liposomes on DNA nanotemplates. *Nature Chemistry* **8**: 476-483 (2016)
3. ◎▲*[Jensen KH](#), [Brandt SS](#), [Shigematsu H](#), [Sigworth FJ](#). Statistical modeling and removal of lipid membrane projections for cryo-EM structure determination of reconstituted membrane proteins. *Journal of Structural Biology* **194**: 49-60 (2016)
4. ▲[Jeong H](#), [Kim J-S](#), [Song S](#), [Shigematsu H](#), [Yokoyama T](#), *[Hyun J](#), *[Ha N-C](#). Pseudoatomic Structure of the Tripartite Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC Reveals the Intermeshing Cogwheel-like Interaction between AcrA and TolC. *Structure* **24**: 272-276 (2016)

(2) ホームページ (URL : <http://ugoku-tanpaku.jp/>)

ホームページには班会議や領域主催・共催のシンポジウムの開催案内を随時アップしており、領域から出され

た成果（論文リスト）を公開している。そのほか、領域の研究概要、研究組織、公募要領、研究成果、ニューズレター発行案内などを掲載し、班員の意味統一および外部への情報発信を行っている。

（3）公開発表

領域の紹介と領域としての成果の公開の場として、多くの研究者が集まる規模の大きな学会の年会において、シンポジウムやワークショップの企画の提案を行った。

- **新学術領域研究「動的構造生命」キックオフミーティング**
2014年10月3日、九州大学病院キャンパス、計画研究紹介と公募要領説明
- **生命分子ダイナミクスの探求を目指す次世代NMR研究会**
2015年1月13日、岡崎総合バイオサイエンスセンター、新学術領域研究「動的秩序と機能」とのジョイントミーティング、8人が講演者のうち計画班員が1件
- **日本蛋白質科学会年会 第15回年会**
2015年6月26日（金）15:00~17:30、Workshop 3WB、あわぎんホール（徳島市）
動的構造生命科学を拓く新発想測定技術（オーガナイザー：神田大輔、西田紀貴）、計画班員発表5件
- **国際ホットスプリングハーバーシンポジウム 第25回**、九州大学生体防御医学研究所主催
2015年11月13日（金）~14日（土）、九州大学馬出病院キャンパス（福岡市）
テーマ：Cutting Edge of Technical Innovations in Structural and Systems Biology（オーガナイザー：神田大輔）。概要：4人の海外招待講演者：James C. Gumbart（米国）、Peter Hinterdorfer（オーストリア）、Ilme Schlichting（ドイツ）、Yifan Cheng（米国）と、国内より構造生物学およびシステム生物学研究者13人の講演。この中に、本学術の計画研究代表研究者6人、計画研究分担研究者1人、計画研究連携研究者1人、公募班研究者1人が含まれている。森川耿右（総括班評価者）が参加し、座長と結語の挨拶を行った。
- **日本生物物理学会年会（年会長：安藤敏夫）第53回年会**
日時：2015年9月14日（月）8:45-11:15、金沢大学角間キャンパス（金沢市）
シンポジウム「動的構造生命科学を拓く新発想測定技術」（オーガナイザー：西田紀貴、神田大輔）
計画班員発表3件（連携研究者1名を含む）、公募班員発表3件（すべて英語口演）
- **シンポジウム「細胞環境における蛋白質の動態解析のためのNMRおよび計算科学的アプローチ」**
2016年3月28日（月）、京都大学吉田キャンパス（京都市）、オーガナイザー：白川昌宏
5名の講演者のうち、計画班員3件（連携研究者2名を含む）、公募班員1件
- **日本蛋白質科学会年会 第16回年会（年会長：神田大輔）**
2016年6月7日（火）9:00~11:30、メインシンポジウム、福岡国際会議場（福岡市）
技術開発が牽引する新しいライフサイエンス研究（オーガナイザー：塚崎智也、神田大輔）
5名の講演者の内、公募班員の発表2件

（4）アウトリーチ活動

- **一般向け講演会・セミナー**
 - ▶ 奈良先端大公開講座2014「タンパク質のかたちを知ること」（担当：塚崎、2014年10月25日）
 - ▶ 飯塚市教員（校長・教頭）向けに研究内容と専門と大学での学び方について講演（担当：安永）
- **小・中・高向け授業・実験・実習**
 - ▶ 西大和学園 SSH School の学生を2名受け入れて一週間実習（担当：塚崎、2015年8月）
 - ▶ 30名の高校生を対象に伸縮するDNAの蛍光顕微鏡（担当：A01 鎌形）
 - ▶ 向日市立第五向陽小学校6年生を対象に生物学の授業（担当：A02 栴尾、2016年1月20日）
 - ▶ 東京都立南多摩中等教育学校物理科のフィールド活動（担当：A02 渡邊）
 - ▶ SSH School 活動として岩手県立釜石高校2年生180名に講義（担当：A03 奥野、2015年11月）
 - ▶ 福井大学生命医科学フューチャーグローバルサイエンティスト育成プログラムにて高校生に講義（担当：A03 清水）
- **サイエンスカフェ**
 - ▶ 日本科学未来館「柔らかな分子を観察しよう」（担当：塚崎、2015年7月11日）
 - ▶ NAIST（奈良先端大）Cafe（Cafe FLEUR、大阪市）（担当：塚崎）「タンパク質の分子構造を知る」（2015年3月19日）
- **イベント参加・出展**
 - ▶ 東京大学のオープンキャンパス（担当：西田、2015年8月6日）
 - ▶ 京都大学のオープンキャンパス（担当：白川、2015年8月28日）
 - ▶ 理化学研究所（和光キャンパス）のオープンキャンパス（担当：杉田、2015年4月18日、2016年4月23日）
 - ▶ 奈良先端大のオープンキャンパス（担当：塚崎、2014年11月、2015年11月）
 - ▶ 九州工業大学のオープンキャンパス（担当：A01 安永）
 - ▶ 放射光施設スプリングエイトの施設の一般公開（担当：杉本）「生命の源-タンパク質の世界」と題した展示会場にて説明
- **プレスリリース**
 - ▶ 理化学研究所からのプレスリリース（担当：A03 杉田）
新聞等に関連記事が掲載された。超並列分子動力学計算ソフトウェア GENESIS を開発 - 「京」を活用し 巨大生体分子システムのシミュレーションを実現 -（2015年5月8日）
 - ▶ 奈良先端科学技術大学院大学からプレスリリース（担当：A03 塚崎）
 1. 細胞膜を越えるたんぱく質輸送の新たな機構を解明 SecYEG タンパク質（2015年11月13日）
 2. タンパク質膜組込装置 YidC の機能に重要な性質を発見（2015年4月15日）
 - ▶ 北海道大学からのプレスリリース（担当：A01 齋尾）
MurD タンパク質のランタニド NMR 解析についてプレスリリースを行い、日本産経新聞などで紹介
 - ▶ 岡山大学からのプレスリリース（担当：A01 菅）
光化学系 I の構造解析についてプレス発表を行った（2015年5月29日）
 - ▶ 京都大学からのプレスリリース（担当：A02 木内）
IRIS 超解像顕微鏡法に関して日刊工業新聞、京都新聞、朝日新聞に取り上げられた（2015年5月7日）
 - ▶ 大阪大学からのプレスリリース（担当：A03 南野）
フラジェリントイプ3タンパク質輸送複合体の構造決定についてプレスリリース

6. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2 ページ以内）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、研究組織間の連携状況について組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

本領域は3つの研究項目から構成されている。

【研究項目 A01: 過渡的に形成されるタンパク質複合体の動的構造測定技術】

計画研究2名（神田大輔，安藤敏夫）と公募研究12名（内，女性1名）からなる。

【研究項目 A02: 細胞環境下でのタンパク質分子の動的構造測定技術】

計画研究2名（白川昌宏，西田紀貴）と公募研究7名からなる。

【研究項目 A03: 新規動的構造測定技術の検証と応用】

計画研究2名（杉田有治，塚崎智也）と公募研究10名（内，女性2名）からなる。公募研究者1名（古川）は産休のために，研究計画を1年間延期中。

研究項目内および研究項目間の連携活動（共同研究）の推進を図るために，全体班会議での発表と討論，総括班での相談受付を行った。班会議は研究項目ごとに行うのではなく，全員が集まる全体会議を開催し，すべての班員が研究発表を行い，議論に参加した。研究者同士が余裕をもって会談できるように，特別な時間をプログラム中に設定する工夫を行った。その結果，下記のリストに示すように43件の共同研究が進行あるいは計画中である。



全体班会議の2日目午後15時から17時までの時間を設定して，共同研究推進のための意見交換の貴重な機会とした

現在進行中および計画中の領域内共同研究のリスト

計画—計画間	テーマ・内容	備考
A01 神田 — A01 安藤	ナノディスクに埋め込んだ膜タンパク質の動態観察	
A01 神田 — A03 杉田	結晶内コンタクトフリー空間効果の評価のためのMD計算	共著論文
A01 神田 — A03 Tama	電顕単粒子構造への結晶構造のフレキシブルフィッティング計算	
A02 安藤 — A03 塚崎	Sec タンパク質の高速 AFM 解析	
A02 西田 — A02 白川	バイオリアクター型 in-cell NMR 法を用いたユビキチンの動的観測	
A03 塚崎 — A03 杉田	SecYEG の X 線結晶構造解析に基づくダイナミクスと機能解析	共著論文
A03 塚崎 — A03 杉田	SecDF の X 線結晶構造解析に基づくプロトン化状態の予測	
A03 塚崎 — A01 神田	Nanodisc の調製法について技術協力	
	計 8 件	
計画—公募間		
A01 神田 — A01 齊尾	ランタニドイオンを結合させたタンパク質の X 線小角散乱測定	共著論文
A01 神田 — A01 安永	アクチン構造のクライオ電子顕微鏡トモグラフィ観察	共著論文
A01 神田 — A03 末次	BAR ドメインタンパク質の X 線結晶解析	
A01 神田 — A03 中迫	植物タンパク質とヘム結合タンパク質の X 線小角散乱測定	
A01 安藤 — A01 矢島	ダイニンおよびダイナクチンの高速 AFM 像の取得	
A01 安藤 — A01 永田	一本鎖 DNA 上のシトシン脱アミノ化酵素の滑り運動高速 AFM 観察	計画中
A01 安藤 — A01 藤岡	高速 AFM を用いたオートファジー関連タンパク質 Atg1 複合体観察	
A01 安藤 — A01 奥野	高速 AFM 観察における技術的な指導および観察条件の助言	
A01 安藤 — A03 木村	高速 AFM による多剤排出トランスポーターの動き解析	
A01 安藤 — A03 南野	高速 AFM による輸送装置構成蛋白質 FliA の動的機能構造解析	
A01 安藤 — A03 末次	BAR タンパク質の高速 AFM 解析	
A02 白川 — A01 横田	ODMR 顕微鏡の構築とダイヤモンドナノ粒子の表面修飾	
A02 白川 — A02 朽尾	ナノダイヤモンドの蛍光を使った 1 分子イメージング	共著論文
A02 白川 — A02 伊藤	in-cell NMR による細胞内タンパク質のダイナミクス解析	

A02	西田	—	A01	永田	in-cell NMR 法による核酸の立体構造, 分子運動, 相互作用の解析	
A02	西田	—	A02	村田	改良型リシール細胞調製法の in-cell NMR 法への適用	計画中
A02	西田	—	A02	伊藤	バイオリクター型 in-cell NMR 法による昆虫細胞内タンパク質構造決定	
A02	甲斐荘	—	A02	伊藤	in-cell NMR 測定のための安定同位体標識法の高度化	
A03	Tama	—	A03	重松	Potassium voltage-gated channel Kv1.2 の電顕データへの当てはめ	
A03	杉田	—	A03	清水	X 線 1 分子動態計測データの解析	計画中
A03	杉田	—	A03	中迫	蛋白質水和構造データベースを活用した水和構造予測 WEB サイト	計画中
A03	杉田	—	A03	杉本	ヘムトランスポーターの分子動力学計算	
A03	Tama	—	A01	柴山	ヘモグロビン結晶の構造変化許容メカニズムの理論的解析	計画中
A03	塚崎	—	A01	須河	1 分子蛍光イメージングによる Sec 複合体の構造ダイナミクス検出	
A03	塚崎	—	A02	渡邊	生体膜マイクロチップを利用した SecDF のプロトン透過計測	
計 25 件						

公募—公募間

A01	鎌形	—	A01	奥村	がん抑制蛋白質 p53 のスライディング運動の単分子測定	共著論文
A01	鎌形	—	A01	横田	基質 DNA の規則的な配列固定に関わる連携	
A01	齋尾	—	A01	奥村	基質フォールディング中間体と PDI との複合体構造解析	計画中
A01	矢島	—	A02	村田	リシール細胞技術を利用した細胞内ダイニン分子の運動観察	
A01	矢島	—	A03	重松	微小管モーターの運動計測, 結晶解析, クライオ電子顕微鏡解析	論文投稿中
A01	安永	—	A03	重松	クライオ電子顕微鏡法による構造解析法に関する技術交流	
A01	安永	—	A03	香月	微小管の精製等に関する技術交流	
A01	矢島	—	A03	香月	微小管ダイナミクスの光学顕微鏡での可視化	
A02	村田	—	A01	永田	核酸をリシール細胞技術により細胞へ導入し, in-cell NMR 測定する	
A03	木村	—	A03	重松	ヒト ABCA1 のクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析	計画中
計 10 件						

特筆すべき連携活動

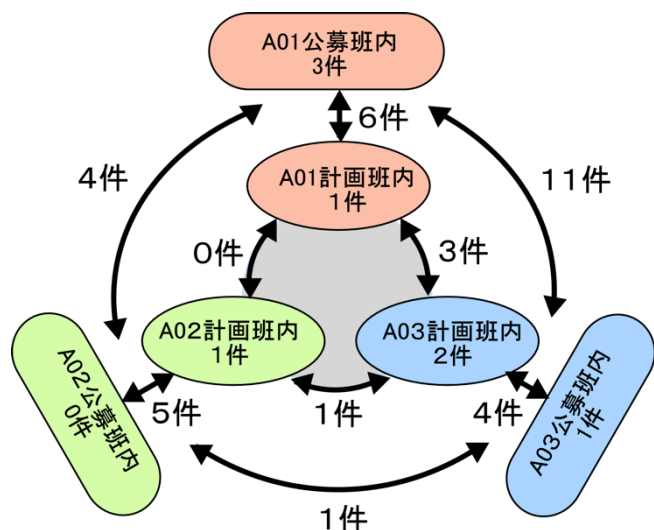
高速 AFM 使用の研究が 12 件と予想通り多かった。金沢大学（安藤）に設置されている高速 AFM 装置以外に、熊本大学や福岡大学にある高速 AFM 装置も使われている。

計画—公募間の共同研究の数が多いのは当然であるが、公募—公募間の共同研究も 10 件あった。合同班会議や技術講習会における交流が契機になっていると思われる。

共著論文の発表が 6 件（7 報）あった。また、論文投稿中が 1 件ある。

本領域内の共同研究の相関図

研究領域間では A01-A03 が多い。A02 が関係している件数が相対的に少なく見えるが、もともと構成員として A02 関係の研究者が少ないこともその理由の 1 つであろう。



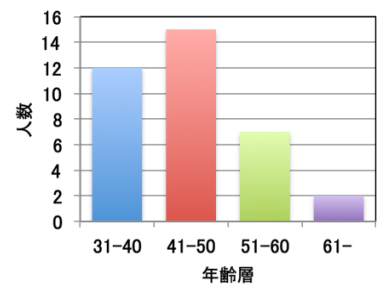
7. 若手研究者の育成に係る取組状況（1ページ以内）

領域内の若手研究者の育成に係る取組状況について記述してください。

計画班および公募班の研究代表者の年齢構成（2016年4月1日現在、以下同じ）を見ると、50歳以下の研究者が全体の4分の3を占める。班会議での議論にも積極的に参加していることから、本領域が若手研究者の育成に寄与していると考えられる。

計画班員代表者6人のうち、西田と塚崎の2人は39歳と40歳の若手研究者である。若手育成の一環として、学会の年会における共催シンポジウムやワークショップのオーガナイザーを担当した。シンポジウムやワークショップの司会は初めての経験であったとのことで、貴重な経験を提供できた。

計画班と公募班代表者の年齢構成



若手研究者がオーガナイザーと司会を務めたシンポジウムやワークショップ

- ▶ 第15回日本蛋白質科学会年会（2015年6月26日、徳島市）
ワークショップ「動的構造生命科学を拓く新発想測定技術」（オーガナイザー：神田，西田）
- ▶ 第16回日本蛋白質科学会福岡年会（2016年6月7日、福岡市）
メインシンポジウム「技術開発が牽引する新しいライフサイエンス研究」（オーガナイザー：塚崎，神田）

若手研究者（大学院生を含む）に口頭発表の機会を積極的に与えた。

最近ではポスター発表形式が増えたために、若手研究者の口頭発表の機会が減っている。そこで、貴重な機会を作る試みをした。まだ、数として不十分と認識しており、今後もっと機会を増やすことを計画している。

- ▶ 第25回国際ホットスプリングハーバーシンポジウム（九州大学生体防御医学研究所の毎年の行事であるが、平成27年度は神田が主催した）（2015年11月13日～14日、福岡市）
例年のポスターセッションの代わりに、英語口演の機会（Short Talks, 各6分）を設定した。神田研究室の大学院生（女性）を含め、生体防御医学研究所の若手研究者16人（内、女性5人、外国籍1人を含む）が口演した。
また、今後の予定として、
- ▶ 第54回日本生物物理学会つくば年会（2016年11月25日～27日、つくば市）
シンポジウムの1つを西田と塚崎がオーガナズする。このシンポジウムは若手研究者を中心とした発表の場として企画した。計画班員および公募班員の研究室に所属する若手8人による英語による口演を行うことが決定している。

本新学術領域内の若手研究者のプロモーションの事例

- 計画班代表研究者 西田紀貴（39歳）東京大学・薬学系・助教 → 同准教授
計画班分担研究者 Florence Tama（41歳，女性）理研・計算科学研究機構・研究ユニットリーダー → 名古屋大学・理学系・教授
公募班代表研究者 奥村正樹（36歳）東北大学・多元研・学振PD → 同助教
公募班代表研究者 渡邊力也（34歳）東京大学・工学系・助教 → 同講師

8. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1ページ以内）

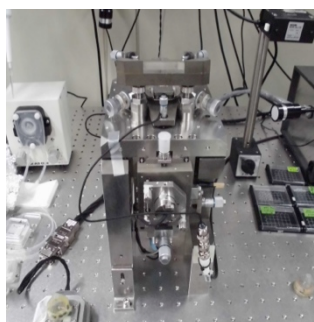
領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

本領域で購入した大型備品は蛋白質結晶化分注システム Art Robbins Gryphon LCP（神田）、蛋白質結晶 UV 観察システム JANSi UVEX-m（神田）、パーツを購入して高速 AFM 装置を自作（安藤）、ダイヤモンドナノ粒子調製用の FT-IR 装置（白川）、蛋白質結晶化分注システム Art Robbins Gryphon LCP（塚崎）であり、それぞれ申請した計画研究どおりに効率良く使用している。神田と塚崎は時期が異なるが同一の機種（オプションは異なる）の蛋白質結晶化分注システムを購入した。それぞれの研究室で複数の競合製品のデモンストレーションを入念に行って決めた結果である。蛋白質結晶化スクリーニングにおける分注はタンパク質精製の直後に行った方がよく、したがって各研究室に個別に設置することが必要である。

白川が進めているパーツを購入しての ODMR 装置の組み上げは、パルス化なども含めて予定通り進捗しているが、共焦点スキャンシステムの選定のみ遅れている。共焦点スキャンの部分については現在、ガルバノスキャナカレブネータを使い、いずれかをピエゾスキャンと併用する方向で計画している。

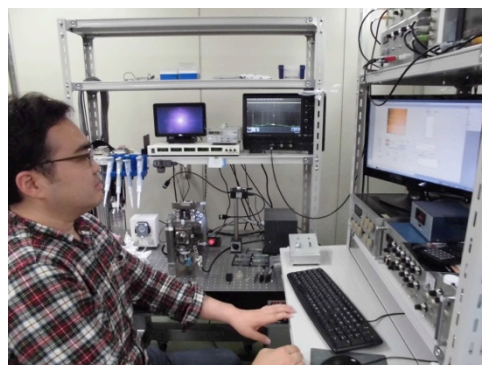
■大型機器の導入と活用の例

高速 AFM 装置試料: 部品を購入して自作した。仕様は安藤が開発したステージ走査型の最新バージョンの装置と同一である。従って、高速性やノイズレベルといった性能は最高スペックである。タンパク質分子のイメージングの場合、機能を損なわずに 1 画像を 60 ms~100 ms で撮れる速度性能を持ち、観察される分子の高さの精度は 0.15 nm 程度である。新学術領域研究費で雇用されたテクニカルスタッフの支援の下、計画班員や公募班員は優先的に使うことができる。



← 高速 AFM 本体（ステージとカンチレバーからなる）

→ 装置全体は PC からコントロールする。専属のテクニカルスタッフが操作を補助する。



■総括班予算の運用

▶ 学会の年会などにおける公開発表（シンポジウムやワークショップ）の共催：一件につき 20 万円程度、計 4 件を共催費として支出した。

▶ NMR 研究に用いる安定同位体化合物は高額であるが、一括して購入することでディスカウントを受けることができ、予算の効率的な運用を行うことができた。NMR 装置（九州大学）の超伝導磁石冷却用の液体窒素（90 万円・年）と液体ヘリウム（200L×3 回、130 万円・年）に充当した。

■国際連携予算の運用

国際連携支援班の予算は使用できる用途が限定されていることから、対象となる人や時期などが具体的な計画を国際連携支援班員から事前に集約し、実現性の高いものだけに絞って分担金の配分を行った。初年度の平成 27 年度は開始時期が年度の後半だったため、2 人（白川、甲斐荘）に重点的に予算を配分した。特に、白川研究室から 4 人がドイツの研究室に 10 日間短期滞在し、Rheo-NMR という特殊な装置を使用して共同研究を進めた。これは単なる学会参加や研究室訪問ではない、実質的な国際共同研究につながる連携活動であり、本予算の有効な活用例となった。

9. 総括班評価者による評価（2ページ以内）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

■遠藤斗志也（京都産業大学）

本領域は3年目に入り、その間ニュースレター等でも情報をいただいているが、平成27年度と28年度の全体班会議に出席し、計画研究、公募研究の進展の成果を直接拝聴する機会を得ている。三つの研究班体制により、「過渡的なタンパク質複合体」と「細胞環境下のタンパク質分子」の動的構造測定技術の開発、そしてその「検証と応用」に向けて、計画研究、公募研究ともに着実に発展していることがうかがえた。計画研究では、結晶内に結晶コンタクトがない空間を作り出すという独創的なアイデアの有用性が具体的に示され、高速 AFM では光ピンセットの組込により新たな応用が期待され、in-cell NMR やナノダイヤモンドによる ODMR はわが国が先導的な技術開発を担っていることもあり、毎回何が出てくるかが楽しみな状況であった。公募研究は手厚い支援により、個性的で興味深い進展が数多く見られ、また若い班員の方が生き生きと成果を発表されているのが印象的でもあった。領域全体としては、様々な技術講習会を支援して、最新技術の普及をめざすとともに、そこから様々な共同研究が生まれていることが、特に注目された。今後は個別の技術の開発と応用によるインクリメンタルな成果から、様々な共同研究や、本領域の全体目標を意識した積極的な研究推進により、飛躍的な成果が出てくることが期待される。そこから生物学的に重要な新規概念の提出、未解決の問題決着等につながる成果が出れば、さらに素晴らしい。また、本領域の特色である実験系研究者と計算系研究者の相互作用のなかから、どんな新しい成果が出てくるか、も注目される場所である。

■中村春木（大阪大学）

本新学術研究の目的は、タンパク質機能の発現に対して本質的なダイナミクスに焦点をあて、新規な技術開発を進めるとともにその応用を行うことと理解される。実際、研究項目 A02 において、ダイヤモンドナノ粒子を利用した光検出磁気共鳴 (ODMR)、1 分子蛍光 FRET 計測を細胞内で行うための Alternative Laser Excitation (ALEX)、標的タンパク質に結合解離する蛍光プローブを用いて超解像度顕微鏡法を改良する IRIS、等、細胞環境下でのタンパク質分子の動的構造の全く新たな測定手法を開発し、成功しつつあることは高く評価できる。一方、日本での技術開発が世界をリードしている高速 AFM および in cell NMR については、講習会を開催するなどして多くの新たな共同研究が生まれていることも本新学術研究の運営の特長であり、評価できる。クライオ電子顕微鏡の活用については、急速に手法が発展している状況で、そのキャッチアップをすることにとどまらず、本新学術研究なりの技術開発に期待する。すなわち、計算科学によるフィッティング手法をさらに拡充して、大きな構造変化や多様な構造を区別してそれぞれ解析できるような新たな解析手法の開発にも取り組んでいただきたい。また、期間の後半においては、これらの特徴的な手法を細胞環境下の動的構造解析に活用して、これまで不明であった機能解析に取り組むような研究を公募班として広く募集してほしい。

■森川耿右（京都大学・生命科学研究所・研究員）

本領域「動的構造生命」の主な目標は「タンパク質の作動中の形態を時間軸に沿って追跡する」新規技術を開発することにある。当評価者は28年度の班研究会に出席する機会をもった。これまでの新学術領域は主にNMRとX線構造解析に軸足をおいてきたが、それに比べて、本領域では、それらの手法をin cell NMRの高感度化、動きに特化したX線解析手法など更なる改善と発展に焦点を絞っている。更に、ナノダイヤモンド蛍光検出磁気共鳴(ODMR)や高速原子間力顕微鏡 AFM などの新規技術についても、生体試料の汎用性を高める努力を続けており、今後の発展性は有望との印象をもった。実際、計画班、公募班のメンバーを問わず、AFM 専門家と細胞生物学、生化学研究者の緊密な連携プレイは印象的であった。また、in cell NMR に関しても、細胞のリシール法の適用を通じて今後の発展が期待される。一方、本領域に直接関係する問題ではないが、電子顕微鏡単粒子解析のわが国の遅れは国際競争の観点から残念であり、政府による今後の重点化に期待したい。研究進捗に関しては、既に特筆すべき成果もでており、本領域終了までには多数の重要な論文が報告されるものと信ずる。技術講習会なども効果的に行われており、若手研究者の育成にも力を注いでいる。総じて、緊密な共同研究の成果が、本領域の終了までには顕在化するものと期待している。

10. 今後の研究領域の推進方策（2ページ以内）

今後どのように領域研究を推進していく予定であるか、研究領域の推進方策について記述してください。また、領域研究を推進する上での問題点がある場合は、その問題点と今後の対応策についても記述してください。また、目標達成に向け、不足していると考えているスキルを有する研究者の公募研究での重点的な補充や国内外の研究者との連携による組織の強化についても記述してください。

全体班会議での班員による発表・討論および総括班会議・国際連携班会議での議論を通し、当新学術領域の方向性に関するコンセンサスは公募班員を含めて十分に取れていると判断する。また、研究進捗状況から見ても大きく修正すべき点は生じていない。

以上のことから基本的に申請時の推進方策を継続する。

- 1) **研究推進の考え方**：基礎研究においてはトップダウン的な運営を目指すより、自由な発想に基づく個々の研究が重要であり、個々のアイデアを実行しやすい環境を整備することが本新学術領域の任務である。全体班会議を重視して、知識の伝搬と交流の場をセッティングすることで、各研究項目内および項目間、そして計画研究と公募研究間の共同研究が十分に推進されるように最大限に配慮する。
- 2) **技術講習会の開催**：計画班員あるいは公募班員がもつ生体分子の動的情報測定技術を領域内および領域外に利用してもらうための実技を重視した講習会を開催する。
- 3) **公開発表・情報発信**：班員が成果を発表できるシンポジウムなどを主催または共催する。ニュースレターの発行と領域ホームページを通じた情報発信を行う。
- 4) **若手研究者の育成**：班会議への若手研究者（大学院生を含む）の積極的参加を奨励する。主催または共催シンポジウム等において、最近機会が少なくなった口演の機会を若手研究者に与える。当新学術領域だけでなく、他の新学術領域とのタイアップや周辺領域研究との共同開催などに拡大する。
- 5) **知的所有権への対応**：本領域では技術開発と個別研究とに大別できる。技術開発の成果に関しては、広く活用してもらうため成果を公表し、計画研究、公募研究および領域外の研究に活用する。個別研究の成果に関しては内容により知的所有権の取得を推奨する。

推進方針自体の問題点ではないが、今後、考慮すべき点を2つ挙げる。

■村田昌之（A02 公募班員）からの問題提起

村田が開発した動物培養細胞の細胞質をまるごと置き換えたセミインタクト細胞を作るためのリシール細胞技術の応用範囲は極めて広く、細胞操作の技術としては大変有用である。しかし、村田の長年の努力にかかわらず、構造生物学研究者からのレスポンスが期待通りではないとのことである。その理由として、「細胞」と「分子」という2つの研究分野の距離が遠いことが原因と推察される。これは科学としての学問全体の根本的な問題であり、1つの新学術領域が扱える範囲を超えている。それでも本新学術のような枠組みで溝を埋める努力ができるはずである。総括班活動や国際連携活動を有効に使うことが考えられる。

■公募研究を公募・選定する際の留意点

技術開発を領域目標に挙げている新学術領域は少ないので、それを目指している研究者に対して貴重な機会を与えていると考える。第2期の公募をするにあたり、以下の問題点と解決策を考えている。

- 1) 第1期では応募者の研究テーマが事前に想定していた研究項目ごとにはっきり分かれることはなく、似たようなテーマが3つの研究項目に分散することになった。全体班会議など研究項目を横断した活動を推進しているので大きな支障はないが、第2期の公募では研究項目の意義と区別を丁寧に説明する必要がある。
- 2) 単年度の予算額を2年分の予算額と勘違いして、限度額の半分の応募が複数あった。これに対しては満額予算を認めるなどの救済措置をとった。次回はこのような誤解が生じないように説明を徹底する。
- 3) 研究手法やテーマをもとに公募研究を選別して採用する予定はないが、昨今のクライオ電子顕微

鏡技術の進展を考慮すべきである。電子直接検出器によるクライオ電子顕微鏡観察は本領域の申請時には大きなインパクトはなかった測定技術である。

今後の公开发表の計画と技術講習会を以下に掲載する

■今後予定している学会等の年会におけるシンポジウムやワークショップの企画

公开发表を通じて、本新学術領域の意義と目的を浸透させるとともに、成果の発信を行う。

- 1) 第 27 回生体系磁気共鳴国際会議 XXVII ICMRBS (主催者：甲斐荘正恒，嶋田一夫，阿久津秀雄)
2016 年 8 月 21 日～26 日，京都国際会議場，セッションの 1 つを共催。
- 2) 第 4 回 Kanazawa Bio-AFM Workshop (主催者：安藤敏夫)
2016 年 10 月 3 日～6 日，金沢大学，海外から 15 件程度、国内から 10 件程度の招待講演と 35 件程度の一般参加者の講演を予定。AFM 関連企業約 10 社から AFM 装置などの出展も予定。
- 3) 第 10 回 DNA 複製，組み換え，修復に関する国際会議
2016 年 11 月 13 日～17 日，ホテル一畑 (松江市)，セッションの 1 つを共催。
- 4) 第 54 回日本生物物理学会つくば年会
2016 年 11 月 25 日～27 日，つくば国際会議場，シンポジウムの 1 つ (オーガナイザー：西田紀貴，塚崎智也) を企画する。若手を中心とした発表の場として，計画班員および公募班員の研究室 8 人による英語による口演を行う。
- 5) 第 15 回日本糖鎖科学コンソーシアム JCGG シンポジウム
2017 年 10 月 28 日～29 日，会場：九州大学病院キャンパス，主催して関連セッションを企画する。

■今後開催する技術講習会

技術講習会の開催を行い，知識やノウハウの共有と領域内の共同研究を推進する。

- 1) クライオ顕微鏡ハンズオントレーニング (担当：神田大輔)
2016 年夏頃を予定，連続 5 日間，九州大学生体防御医学研究所，九州大学生体防御医学研究所技術室に設置されているクライオ電子顕微鏡 FEI 社 Tecnai F30 Polara の使用を実技を中心に少人数 (5 人程度) で集中的にトレーニングする。
- 2) 第 5 回国際版バイオ AFM 夏の学校 (担当：安藤敏夫)
2016 年 7 月 31 日～8 月 6 日，金沢大学角間キャンパス，今回から国際版に拡張し，国内参加者に加えてアジア地域から 5～6 名の参加者を募る。
- 3) RRR workshop 2016 (担当：白川昌宏)
2016 年 12 月あるいは 2017 年 1 月，京都大学桂キャンパス，海外講師を招いたチュートリアル。
- 4) GENESIS 講習会 (担当：杉田有治)
日時と会場は未定。