

領域略称名：動的構造生命
領域番号：4602

令和元年度科学研究費助成事業
「新学術領域研究（研究領域提案型）」
に係る事後評価報告書

「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

令和元年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

| | |
|--|----|
| 1. 研究領域の目的及び概要 | 10 |
| 2. 研究領域の設定目的の達成度 | 12 |
| 3. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況 | 15 |
| 4. 審査結果の所見及び中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況 | 16 |
| 5. 主な研究成果（発明及び特許を含む） | 18 |
| 6. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等） | 21 |
| 7. 研究組織（公募研究を含む。）と各研究項目の連携状況 | 26 |
| 8. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む） | 28 |
| 9. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度 | 32 |
| 10. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況 | 33 |
| 11. 総括班評価者による評価 | 34 |

研究組織 (総：総括班, 支：国際活動支援班, 計：総括班及び国際活動支援班以外の計画研究, 公：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 | 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 | 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 | 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・ナノ生命科学研究所・特任教授 | 5 |
| A02 計 | 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 | 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 | 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 | 国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員 | 7 |
| A03 計 | 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・教授 | 2 |
| 統括・支援・計画研究 計 8 件 | | | | | |

| | | | | | |
|----------|--|---------------------------|--------|----------------------|---|
| A01 公 | 15H01624 NMR を主体としたタンパク質構造推移解析のための複手法の開発と応用 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 15H01654 生細胞深部の分子構 造変化ダイナミクス | 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 |

| | | | | | |
|----------|---|---|--------|----------------------------|---|
| | をとらえる1分子 FRET計測法の開発 | | | | |
| A03 公 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 (産休にて1 年延期) | 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 | 15H01655 へムトランスポータ 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 | 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 |
| A01 公 | 17H05867 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29年度 ～ 平成30年度 | 齋尾 智英 | 北海道大学・理学研究院・助教 | 2 |
| A01 公 | 17H05868 酵素基質相互作用を決定する動的構造制御 | 平成29年度 ～ 平成30年度 | 奥村 正樹 | 東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教 | 5 |
| A01 公 | 17H05877 高度な安定同位体標識技術を利用した高分子量蛋白質の新規動態解析法の開発 | 平成29年度 ～ 平成30年度 | 宮ノ入 洋平 | 大阪大学・蛋白質研究所・准教授 | 1 |
| A01 公 | 17H05878 機能性核酸の細胞内動的構造解析とDNA変換酵素のスライディングの活写 | 平成29年度 ～ 平成30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 | 17H05882 タンパク質ダイナミクス観測に資する高時空間分解能ESR・IR計測系の開発と応用 | 平成29年度 ～ 平成30年度 | 木村 哲就 | 神戸大学・理学研究科・講師 | 5 |
| A01 公 | 17H05884 光合成膜タンパク質のフェムト秒時間分解能での構造ダイナミクス | 平成29年度 ～ 平成30年度 | 菅 倫寛 | 岡山大学・異分野基礎科学研究所・准教授 | 2 |
| A01 公 | 17H05892 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29年度 ～ 平成30年度 | 横田 浩章 | 光産業創成大学院大学・光産業創成研究科・准教授 | 1 |
| A01 公 | 17H05898 ダイニン・微小管系の振動運動機構ー運動中の姿を捉える電子顕微鏡解析ー | 平成29年度 ～ 平成30年度 | 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 | 3 |

| | | | | | |
|----------|--|---------------------------|-------------|------------------------------|---|
| A01 公 | 17H05899 高時空間分解能一分子観察と理論解析を組み合わせた分子モーター運動解析法の開発 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 中村 彰彦 | 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教 | 3 |
| A02 公 | 17H05869 深紫外共鳴ラマン分光法を用いた細胞内分子のその場計測法の確立 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 中林 孝和 | 東北大学・薬学研究科・教授 | 1 |
| A02 公 | 17H05870 新規リシール細胞技術を用いた複数タンパク質・膜不透過性中分子の細胞内導入法の開発 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 村田 昌之 | 東京大学・総合文化研究科・教授 | 1 |
| A02 公 | 17H05871 擬似細胞チップによる膜タンパク質の動的構造機能計測技術の開発 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 渡邊 力也 | 理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員 | 1 |
| A02 公 | 17H05872 細胞内タンパク質結晶化を利用した外来タンパク質構造解析手法の開発 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 安部 聡 | 東京工業大学・生命理工学院・助教 | 3 |
| A02 公 | 17H05873 NMRによる細胞生理活性と細胞内蛋白質構造の解析 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 児嶋 長次郎 | 横浜国立大学・工学研究院・教授 | 3 |
| A02 公 | 17H05874 細胞環境下での核膜孔の安定かつ過渡的なナノ構造測定技術の開発 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | WONG W・R | 金沢大学・新学術創成研究機構・教授 | 2 |
| A02 公 | 17H05879 膜タンパク質複合体の成熟化過程を <i>in vivo</i> 活写する | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 森 博幸 | 京都大学ウイルス・再生医科学研究所・准教授 | 1 |
| A02 公 | 17H05880 大腸菌べん毛モーターの回転コントロールによるスイッチング機構の解明 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 西山 雅祥 | 近畿大学・理工学部理学科・准教授 | 4 |

| | | | | | |
|----------|---|---------------------------|-------|--------------------------------------|---|
| A02 公 | 17H05887 NMR を用いた細胞内 蛋白質の立体構造, 安 定性および動的平衡 状態の解析 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 伊藤 隆 | 首都大学東京・理学研究科・教授 | 2 |
| A02 公 | 17H05895 モータータンパク質 の活性化状態の生体 内可視化による繊毛 運動機構の解明 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 井手 隆広 | 理化学研究所・多細胞システム形 成研究センター (CDB)・研究員 | 1 |
| A03 公 | 17H05876 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 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 清水 啓史 | 福井大学・医学部・講師 | 3 |
| A03 公 | 17H05883 ヒト MRN の動的構 造解析が明らかにす る DNA 二本鎖切断 修復の分子メカニズ ム | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 古郡 麻子 | 大阪大学・蛋白質研究所・准教授 | 1 |
| A03 公 | 17H05888 マルチドメインタン パク質がもつ動的な 構造の解析 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 三島 正規 | 首都大学東京・理学研究科・准教授 | 4 |
| A03 公 | 17H05890 アッセンブリーシャ ペロンが関わるプロ テアソームの動的成 熟過程の活写 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 矢木 宏和 | 名古屋市立大学・薬学研究科・講師 | 4 |
| A03 公 | 17H05891 蛋白質機能を駆動す る水和構造の時空間 階層イメージング | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 中迫 雅由 | 慶應義塾大学・理工学部・教授 | 4 |
| A03 公 | 17H05893 抗体の分子認識を契 機とする補体系の活 性化を活写する | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 谷中 冴子 | 自然科学研究機構・分子科学研究 所・助教 | 5 |
| A03 公 | 17H05894 オートファジー始動 複合体の作動状態の 活写 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 藤岡 優子 | 微生物化学研究会 微生物化学研 究所・上級研究員 | 3 |
| A03 公 | 17H05896 ヘムトランスポータ ーの動的結晶構造解 析 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 杉本 宏 | 国立研究開発法人理化学研究所・ 専任研究員 | 6 |

| | | | | | |
|-------------|--|---------------------------|-------|------------------------|---|
| A03 公 | 17H05897 膜蛋白質の速くて複雑な動的機能構造を活写するハイブリッド構造解析基盤 | 平成 29 年度 ～ 平成 30 年度 | 重松 秀樹 | 国立研究開発法人理化学研究所・ 研究員 | 2 |
| 公募研究 計 57 件 | | | | | |

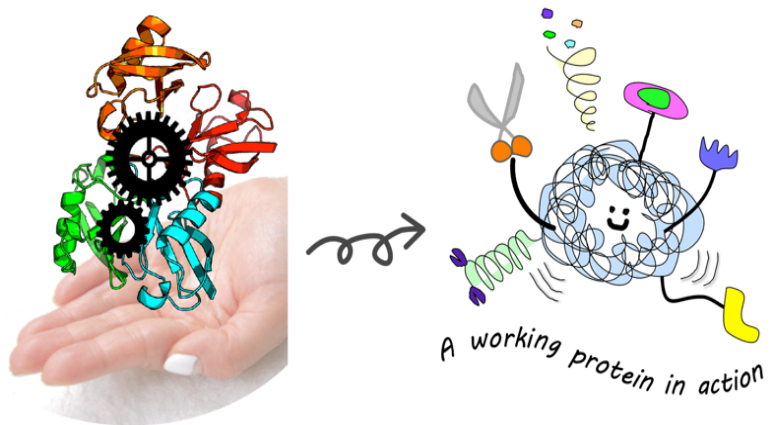
1. 研究領域の目的及び概要（2 ページ以内）

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（応募研究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。**

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ことと、ダイヤモンドナノ粒子を用いた光検出磁気共鳴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。



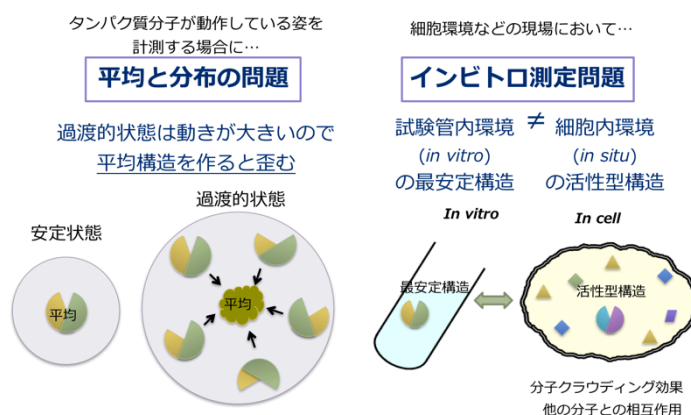
静的構造生物学から動的構造生命科学へ

▶ 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。**

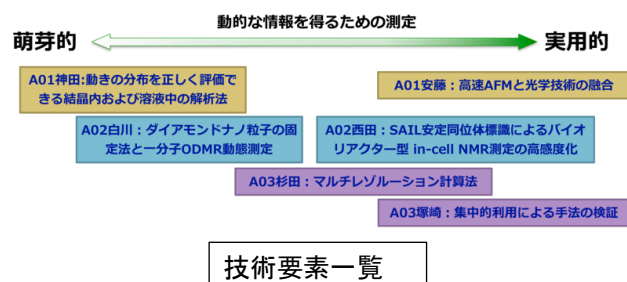
既存の多くの動的測定手段は試験管内における平均構造としての情報を与えるにすぎない。そのため、解決すべき課題として「平均と分布の問題」と「インビトロ測定問題」が残されている。研究項目 A01 において「平均と分布の問題」の解決を、研究項目 A02 において「インビトロ測定問題」の解決を目指す。平均と分布の問題とは、既存の方法による構造は分子集団の平均であるために、平均操作を適切に行わないと無意味な構造を与えてしまうことを指す。一方、インビトロ測定問題とは、試験管内で測定を行った結果をそのまま生理的条件に当てはめることが不適切であることを言う。これら2つの問題を解決する新しい計測技術を開発することで、**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。



▶ 動的構造解析を目指した新発想測定技術

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) バイオリアクター型 in-cell NMR の高度化 (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。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いている。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する。



▶ 技術講習会・技術講演会の開催

本新学術研究により開発・改良された新測定技術を実際の研究現場に取り入れてもらうことが重要である。そこで測定技術に関する講演会や新測定手法の説明と実習を兼ねた技術講習会を多数回開催して、新学術領域内外で普及活動を行う。領域内での技術移転と、開発者と利用者の共同研究を推進することが本領域の成果として重要であり、総括班・国際活動支援の目標となる。

▶ 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。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。

2. 研究領域の設定目的の達成度（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、どの程度達成できたか、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の達成度合いについて、具体的に記述してください。必要に応じ、公募研究を含めた研究項目ごとの状況も記述してください。

▶ 解決すべき課題として掲げた「平均と分布の問題」と「インビトロ測定問題」へのアプローチ

【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 A01 において「平均と分布の問題」の解決を目指した。振幅の大きな運動をしている構造の空間分布を実験的に決めることは一般的に良い方法が存在しない。これを解決する方法として、神田は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を進めた。2つの蛋白質に適用して、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)。ついで、A03 計画分担・Tama と MD 計算を用いて検証した (Proteins, 2018)。一分子観測は多数の観測を統計処理することで運動分布を直接測定できる。安藤は探針走査型 AFM 装置と光ピンセット・蛍光顕微鏡を複合化したシステムと、イメージング中に試料の特定位置に強い力を作用可能なインタラクティブ高速 AFM を開発した。これらの複合的な手法を適用することで、従来型の高速 AFM 観測だけでは得られない新しいタンパク質の動態が得られた (J Mol Biol, 2018; Sci Adv, 2018)。公募班員の技術開発では、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】

研究項目 A02 において「インビトロ測定問題」の解決を目指した。白川は人工ダイヤモンドナノ粒子 (ND) を利用した光検出磁気共鳴 (ODMR) 法を開発した。細胞環境における蛋白質の向きを観測できる。実用化に向けて、タグとして使える十分小さな ND を安定的に作製して対象蛋白質に固定する問題を解決した (Chem Lett, 2015, Bioconj Chem, 2018; Sci Rep, 2018)。西田は生きた細胞内の蛋白質や代謝物の NMR スペクトルを長時間観察可能なバイオリアクター型 in-cell NMR システムを構築して、細胞内酸化ストレス応答の in-cell NMR 観測や細胞内 Ras の活性割合のリアルタイム観測を行い、細胞生物学手法として使えることを示した (JACS, 2018)。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)。公募班員の村田は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 (Sci Rep, 2018)。in-cell NMR 法の感度上昇につながる重要な成果である。公募班員の技術開発では、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 (Sci Rep, 2015; IEEE Trans Nanotech, 2016; Lab Chip, 2016, 2018)、リン脂質のスクランブリングに適用した (PNAS, 2018)。岡本は 1 分子蛍光 FRET 計測を細胞内で行うための Alternative Laser EXcitation 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、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 (JACS, 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 の開発に成功した (Nat Methods, 2015)。

【研究項目 A03: 新規動的構造測定技術の検証と応用】

研究項目 A03 において計算機シミュレーションによる検証と測定技術の応用を行った。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) や、既存の運動エネルギーと温度など基本的な物理量の分子動力学における定義を見直し、正確な見積もりを実現した (J Chem Phys, 2018; J Chem Theory Comput, 2019)。電顕マップに既知の立体構造と異なる状態をモデリングするフレキシブルフィッティングを全原子および粗視化分子モデルを用いて高速に行うことを可能にした (Structure, 2019)。塚崎はナノディスクに埋め込んだ膜蛋白質を高速 AFM で観察する際、横向きで行うことができることを示した (Structure, 2019)。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).

全体的な総括として、計画班員のみならず、公募班員による新しい測定技術の開発が活発に行われた。これは事前に予想していなかった大変喜ばしい状況である。その背景には動的構造測定法に単一の強力な手法がなく、個々の対象に合わせた測定法を工夫する余地が大いに残されていることを示している。本領域で産み出された測定技術とそれを補佐する実験技法は、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。今後、常識を覆す発見につながるものが今後十分に期待できる。

▶ 技術講演会・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。期間内に技術講習会を多数回開催した。内容は高速 AFM, セミインタクト細胞リシール法, MD 計算プログラム GENESIS, クライオ電子顕微鏡操作と解析, 結晶コンタクトフリー空間を使う新 X 線結晶解析技術, in cell NMR, Rheo-NMR と多岐にわたる。また、これらを補完する形で、シンポジウムやワークショップを主催または共催して、動的構造生命の意義を伝えた。第 25 回ホットスプリングハーバー国際シンポジウムの企画 (2015 年 11 月, 福岡市) はその一例である。

【A01の技術講習会】

- 結晶コンタクトフリー空間法 (担当: 神田)
班会議期間内, 2018 年 6 月 13 日, 第 2 期公募班員を対象に技術講習会を開催。
- 高速 AFM (担当: 安藤)
第 4 回バイオ AFM 夏の学校, 2014 年 8 月 19 日~25 日, 金沢大学。本領域から 4 人参加。
第 5 回バイオ AFM 夏の学校, 2015 年 8 月 1 日~7 日, 金沢大学。本領域から 7 名が参加。
国際版第 5 回バイオ AFM 夏の学校, 2016 年 8 月 1 日~6 日, 金沢大学。高速 AFM では 10 名, 超解像 AFM では 4 名を選考した, うち海外から 4 名。
国際版第 6 回バイオ AFM 夏の学校, 2017 年 8 月 21 日~26 日, 金沢大学。高速 AFM を 12 名, 超解像 AFM を 6 名, SICM では 4 名を選考。海外 5 名は米国, カナダ, 中国, フランス, インド。
国際版第 7 回バイオ AFM 夏の学校, 2018 年 8 月 27 日~9 月 1 日, 金沢大学。高速 AFM を 12 名, 超解像 AFM を 7 名, SICM では 6 名が参加。海外はタイ, 米国, オランダ, イギリス。
- クライオ電子顕微鏡 (担当: 神田)
クライオ電子顕微鏡ハンズオン実技講習会, 2017 年 1 月 16 日~18 日と 2 月 27 日~3 月 1 日。九州大学。クライオ電子顕微鏡 Polara を使った実習を少人数で行った。
- クライオ電子顕微鏡 (担当: Tama)
電子顕微鏡イメージ処理プログラム SCIPION ワークショップ, 2018 年 2 月 21 日~22 日, 名古屋大学。フランスとスペインから 2 名の講師を招聘して実際にプログラムを動かしながら講習した。

【A02の技術講習会】

- インセル NMR と Rheo-NMR (担当: 白川)
班会議期間内, 2018 年 6 月 13 日, 福岡市, 第 2 期公募班員を対象に技術講習を開催した。
- In cell NMR のためのセミインタクト細胞リシール法講習会 (担当: A02 公募・村田, 西田)
2015 年 9 月 2 日, 東京大学。細胞内への蛋白質導入技術のうち, 主に in-cell NMR への応用を目的とした。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。計画と公募関係者合わせて 11 名が参加した。
2017 年 9 月 22 日, 東京大学。計画と公募関係者合わせて 10 名が参加した。
- NMR 勉強会 (担当: 白川)
第 17 回 RRR workshop 2017, 2017 年 2 月 22 日~23 日, 京都大学。海外から講師 3 名を招聘した。
第 18 回若手 NMR 研究会を賛助, 2017 年 9 月 2 日~4 日, 和歌山県田辺市。本新学術から 3 名参加。

【A03の技術講習会】

- 分子動力学計算ソフトウェア (担当: 杉田)

GENESIS ソフトウェア講習会, 2015 年 9 月 14 日, 計算科学振興財団 (神戸市).
GENESIS ソフトウェア講習会, 2017 年 1 月 13 日, 計算科学振興財団 (神戸市).
GENESIS ソフトウェア講習会, 2017 年 10 月 5 日, タワーホール船堀 (千葉市).

▶技術供与のリスト

A01 安藤→領域全体 バイオ AFM 夏の学校で自らの試料の AFM 測定を試みた例が 9 件あった.
A02 村田→領域全体 セミインタクト細胞リシール法による細胞内への蛋白質導入. 従来は蛋白質が対象であった In cell NMR 測定を初めて核酸分子に適用した例は, "新しい出会いが新しい応用"を産んだ好例である. また, 細胞のラマンイメージングや細胞内蛋白質の一分子蛍光計測などに応用された.
A03 三島→A01 宮ノ入 高活性型 Sortase を用いたプロテインライゲーション法
A02 児嶋→A01 神田 酵母 Tim21 蛋白質の自動 NMR 解析.
A02 白川→A02 児嶋 ヒト細胞の in cell NMR, 細胞導入, NMR 解析.
A02 伊藤→A02 児嶋 大腸菌の in cell NMR, 発現系構築, NMR 解析.
A03 三島→A01 神田 非天然アミノ酸の蛋白質への導入法
A02 西田→A01 永田, A02 白川, A02 伊藤 バイオリアクターを使ったインセル NMR 測定法の個別講習会を行い, 他の 3 つの研究グループ (伊藤, 永田, 白川) にノウハウが移転された.

▶ 領域内の共同研究が共同論文に結実した例

本新学術領域は他の新学術領域研究とは異なり, 新しい測定技術の開発と応用に主眼がある. そのために, 講演会などの限られた時間内に口頭で説明するだけでは「測定技術の詳細の伝達」には不十分である. そこで, 論文の Methods セクションに詳述することが最も効率が良い. 現時点で領域内の共同研究学術論文として発表された論文が 20 報ある. さらに領域全体の成果の集大成として BBA General Subject 誌に特集号の企画が進行中で, 27 報のレビューとオリジナル論文が掲載予定である.

- (1) A01 神田-A03 杉田: タンパク質結晶内に創り出した結晶コンタクト空間の利用 (Protein Sci, 2016)
- (2) A01 真柳-A01 安永: クライオトモグラフィーによる神経細胞の糸状仮足の観察 (Cytoskeleton, 2016)
- (3) A01 稲垣-A01 齋尾: 常磁性ランタニドイオン NMR による蛋白質の立体構造変化解析 (Sci Rep, 2015)
- (4, 5) A02 白川-A02 朽尾: ODMR イメージング (Nanomaterials, 2016; J Nanosci Nanotechnol, 2015)
- (6) A03 杉田-A03 塚崎: Sec トランスロコンの全原子分子動力学計算 (Cell Rep, 2015)
- (7) A01 奥村-A01 鎌形: 1 分子蛍光による p53 の DNA 上のスライディング運動の観察 (J Mol Biol, 2015)
- (8) 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 (Structure, 2016)
- (9) A01 安藤-A01 藤岡: 天然変性蛋白質 Atg13 のオートファジーの最初の複合体形成 (Dev Cell, 2016)
- (10) A03 杉田-A03 塚崎: SecDF 蛋白質の蛋白質分泌機能に "I form" が関与している (Cell Rep, 2017)
- (11) A02 森-A03 塚崎: シャペロン/プロテアーゼ BepA の構造解析・機能解析 (Mol. Microbiol., 2017)
- (12, 13) A01 安藤-A02 Wong: 核膜孔複合体の動的構造 (ACS Nano 2017) とインフルエンザウイルスの感染に関わるヘマグルチニンの構造変化 (BBA-Gen Subj 2019) を捉えることに成功した.
- (14) A01 永田-A02 村田: 世界で最初の核酸分子の in cell NMR 観測 (Physic Chem Chem Phys, 2017)
- (15) A01 神田-A03 Tama: テザリングが運動を制限しないことを示す分子動力学計算 (Proteins, 2018)
- (16, 17) A01 安藤-A03 南野: 高速 AFM 観察により, バクテリア鞭毛モーター固定子がイオン環境を感知してフォールディング・リフォールディングすることを発見し (Sci Adv, 2017). また, Type III 輸送装置の構成タンパク質 FlhA がリング構造を形成するメカニズムを解明した (Sci Adv, 2018).
- (18) A01 安藤-A03 塚崎: ナノディスクに埋め込まれた膜タンパク質の 2 方向観測 (Structure, 2019).
- (19) A01 奥村-A01 斉尾: 高速 AFM を用いた PDI による基質触媒の観察 (Nat Chem Biol, 2019)
- (20) A02 伊藤-A02 白川: 昆虫培養細胞の系を用いて生きた真核細胞内の蛋白質の高分解能立体構造決定に成功した (Angew Chem Int Ed, 2019)

3. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況（1 ページ以内）

研究推進時に問題が生じた場合には、その問題点とそれを解決するために講じた対応策等について具体的に記述してください。また、組織変更を行った場合は、変更による効果についても記述してください。

研究期間内に領域の推進上大きな問題は生じなかった。また、組織変更はなかった。計画研究においては当初計画していた目標は概ね達成されており、加えて当初計画には含まれていない新たな成果も上がっている。公募研究に関しては、本領域の趣旨とは若干異なるものもあったものの、全体班会議での発表と議論や技術講習会を通して、領域内共同研究が多く発足するなどの広がりも見せた。しかしながら、もう少し多くの件数の公募研究を採択できたならば、さらにたくさんの良い共同研究が生じたのではないかと考える。

後半期において研究の新規性と組織の連携強化が必要となった。具体的には、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を考慮して、総括班・国際連携班として対応した。クライオ電子顕微鏡ハンズオン実技講習会と、海外からプログラム開発者 2 名を招聘して単粒子解析用プログラム実習講演会を開催した。

4. 審査結果の所見及び中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況（2ページ以内）

審査結果の所見及び中間評価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。

<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>

科学研究費補助金審査部会における所見

計画研究が技術開発とその技術支援を行い、公募研究班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、⁽¹⁾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。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、⁽²⁾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。

(1) 「これまでに例を見ない体制である」との指摘に対する対応

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とは異なり、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られる。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。

(2) 「研究の新規性と研究組織のさらなる連携強化」に対する対応

当初は研究計画の確実な実行に重きを置いていたが、後半において研究の新規性と組織の連携強化について総括班・国際連携班として対応した。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のクライオ電子顕微鏡ハンズオン実技講習会やプログラム実習講演会を開催した。

<領域代表者のみに開示された所見および学術調査官を通じたさらなる所見に対する対応>

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。

(詳細が不明であったので、学術調査官を通じて詳細を聞いたところ、) 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が、⁽³⁾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連携については要対応である。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、⁽⁴⁾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。

(3) 「In cell NMR 技術に関して、他の研究課題と連携する」に対する対応

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られる。技術的な問題の一つに、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) がいた。In-cell NMR 研究者はこれまでそれぞれ独自の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。2 回の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。

(3) 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に関する新しい方法の開発 (A03 杉田, A03 Tama) と、それを実際に利用すること (A01 神田, A03 重松) を行った。また、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を行った (A01 神田-A03 Tama)。

(4) 他資金との重複について

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議論することを行った。

<国際連携の審査結果の所見に対する対応>

特に指摘事項はなかった。

<中間評価の所見等で指摘を受けた事項への対応状況>

評価結果： A (研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの進展が認められる)

開発中の技術も含め、研究領域内外での共同研究や技術講習などを通じ、新たな技術の具体的生命科学の課題への適用に積極的に取り組み、その評価や検証に基づく改良を図ることで、技術の向上とともに、(5)生命現象の新たな発見に貢献することを目指すことが必要である。

(参考意見) 平成 27 年度の国際活動支援の予算額の一部が繰越し対象となっている点に関し、今後、平成 28 年度を含む後年度は計画を踏まえ、(6)着実に事業を実施し、執行することが望まれる。

(7)論文の謝辞記載について、研究領域内で周知徹底する必要がある。本研究領域の更なる発展に向け、(8)クライオ電子顕微鏡などの新技術との連携を考慮することが望まれる。

(5) 「新たな生命現象の発見に貢献することを目指す」ことへの対応

新測定技術を利用して生命現象の新たな発見に結びつくことが、本進学領域研究の真価を示すことになる。班会議などの機会における発表内容や討議では、新しい研究成果を出すことに前向きな姿勢が随所に感じられた。新しい測定方法は新しい結果を生むことを期待できる。5 年間という短い期間で達成することは困難ではあるが、「9. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度」示すような新しい事例も多数ある。

(6) 「国際活動支援の繰り越しに関すること」に対する対応

総括班会議などで議題として取り上げて、繰り越しが発生しないように当初計画の精度を上げるように注意を喚起した。しかし、公募班員に対する支援は、予算の執行者である計画班員と実際に支援を受ける公募班員が所属する組織が異なるので、確実な予算執行が難しい、あるいは渡航計画が中止になるなどの不測の事態に起因するものがあつたので、完全に繰り越しを避けることは困難であつた。

(7) 「論文の謝辞記載がないこと」に対する対応

全体班会議やメール等での連絡の際に、論文の謝辞に本予算使用についての記載をするように連絡を行った。実際に前期 2 年間で謝辞が記載された論文は 69 報であつたが、後期 2 年間では 129 報に増加した。

(8) 「クライオ電子顕微鏡などの新技術」に対する対応

クライオ電子顕微鏡に関しては、クライオ凍結とクライオ電子顕微鏡観察のハンズオン講習会 (担当: 神田大輔, 場所: 九州大学, 2017 年 1 月と 2 月の 2 回に分けて実施) とソフトウェア SCIPION の講習会 (担当: Tama, 場所: 名古屋大学, 2018 年 2 月) を行った。

5. 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】

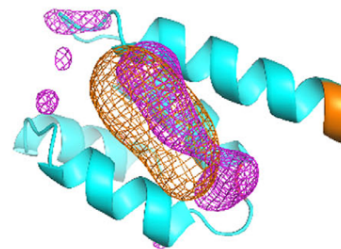
（3 ページ以内）

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】

A01-1（計画・神田）

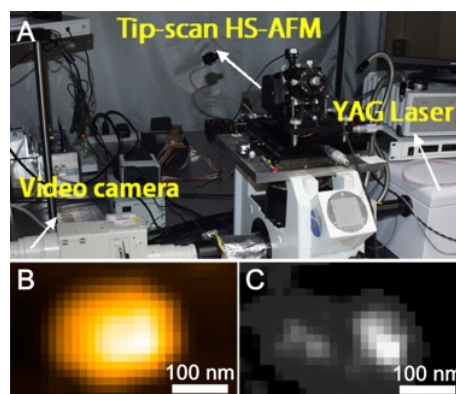
結晶コンタクトフリー空間 (CCFS) 創出技術の開発と応用：A03 計画・杉田，A02 公募・児嶋と連携 タンパク質結晶内に結晶コンタクトフリーな“隙間”を意図的に作り出すという新発想のタンパク質結晶作成を行った。目的のタンパク質を融合タンパク質として発現し、分子全体を硬くすることで分子内に CCFS 空間を確保する。CCFS 空間中にミトコンドリアプレ配列受容体 Tom20 タンパク質に結合した状態のプレ配列ペプチドを配置し、その動きをローパスフィルターを用いた差フーリエ電子密度マップ中に電子密度として可視化し（2016）、計算と比較した（2018）。応用として、結晶コンタクトの影響で変形した Tim21 タンパク質のループ構造を CCFS 中に配置し、NMR 構造および計算構造と比較した。その結果 CCFS 中のループの電子密度は溶液構造と見なして良いことがわかった（2019）。



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。

A01-2（計画・安藤）

高速 AFM 複合装置の開発：外力作用下にあるタンパク質分子の動態観察の実現を目指し、探針走査型 AFM 装置と光ピンセット・蛍光顕微鏡を複合化したシステムを開発した。また、超解像蛍光像と高速 AFM 像の同時取得を目指し、細い金属探針の作成法の検討、局所プラズモンの生成・検出用の光学系を構築し、従来より 100 倍速い走査型ニアフィールド超解像蛍光顕微鏡（空間分解能 39 nm）を開発した（2019）。



インタラクティブ高速 AFM の応用研究：イメージング中に試料の特定位置に強い力を作用可能なインタラクティブ高速 AFM を開発し、鞭毛の二連微小管の内壁に存在するタンパク質の機能解明（2018）や PrxII のヌクレオチド添加や過酸化で生ずる高分子量複合体の実体解明（2018）に応用した。

(A) 光ピンセットとの複合化装置。
(B, C) 凝集した蛍光ビーズを同時撮影した AFM 像 (B) と超解像蛍光像 (C)

A01（公募・中村）キチン加水分解酵素を金ナノ粒子で標識し、全反射暗視野顕微鏡を用いて 1 nm のステップ運動を直接計測した。本酵素は速い加水分解反応により後退運動を抑制し一方向性の運動を行う Burnt-bridge ブラウニアンラチェット酵素であることを明らかにした（2016）。

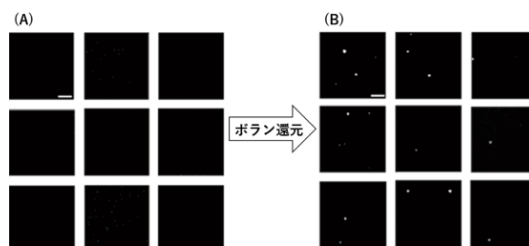
A01（公募・奥村）：A01 公募・齊尾と連携 小胞体内で働く PDI ファミリーは様々な基質のフォールディング状態を認識し、フォールディング促進、不良蛋白質内ジスルフィド結合の還元などを行う。PDI の酸化還元依存的な会合状態の制御が基質認識に重要であることを示した（2019）。

A01（公募・永田）：A02 公募・村田と連携 ヘアピンまたは四重鎖を形成する核酸の in-cell NMR シグナルを観測した。これらの構造がヒト細胞内でも形成されること、また細胞内における構造はより動的であることを示した（2017）。

【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】

A02-1（計画・白川）

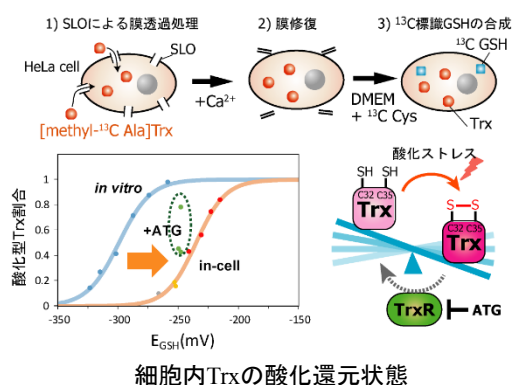
光検出磁気共鳴 (ODMR) 法の開発：A02 公募・伊藤と連携 人工ダイヤモンドナノ粒子(ND)を使った光検出磁気共鳴 (ODMR) 法の開発を行い、(1)ND 中でセンサーとして機能する格子欠陥 (NV センター) を形成する技術の開発、(2) ND による分子特異的標識技術の開発、(3) NV センターを用いた新規ナノ計測技術の開発を進めた。(1)については、分子サイズ (5nm) の爆轟ナノダイヤモンド (DND) 中に負電荷を持つ NV センターを人工的に形成したときに、ボラン還元処理で DND 中の NV センターの負電荷が安定化されることを発見した (2018)。(2)については、ND の効率的な親水化手法として、簡便なワンポット親水ポリマー化技術を開発した (2018)。更に、ミトコンドリアや核内に ND を効率的に送達する手法の開発を進めた。(3)については、分子サイズ (5 nm) の ND を用いた 1 度の精度で角度計測が実現可能であることの実証、およびミトコンドリアに送達した ND を用いた温度計測に成功した。



NV センター選択的イメージング：ボラン還元後に負電荷に帯電した NV センターの輝点を確認できる。

A02-2 (計画・西田)

細胞内酸化ストレス応答の in-cell NMR 観測：A02 公募・村田と連携 細胞内 Redox 応答分子であるチオレドキシシンとグルタチオンの酸化還元状態を観測する新たな in-cell NMR 手法を開発した。Trx がレドックスセンサーとして機能していることを明らかにした (2018)。



細胞内 Ras の活性割合のリアルタイム観測 Ras の細胞内活性型 (GTP 型) 割合を in-cell NMR 法によりリアルタイム観測を行った。その結果、野生型および発癌性変異体のいずれにおいても細胞内の GTP 型の割合は *in vitro* よりも低下しており、細胞内において加水分解速度定数の上昇と GDP-GTP 交換速度定数の低下の両方が寄与していることが明らかとなった (2019)。

A02 (公募・児嶋) 全自動 NMR 構造解析システムの構築により、最短半日での立体構造決定を可能にした。In cell NMR 測定の高感度化を行い、最短 1 分で測定することを可能にした (2019)。

A02 (公募・伊藤) 少ない距離拘束条件から正しい立体構造を算出するためのベイズ推定を用いた立体構造解析手法を確立し、昆虫培養細胞を用いて、真核細胞内としては世界初となる高分解能蛋白質立体構造決定を行った (2019)。

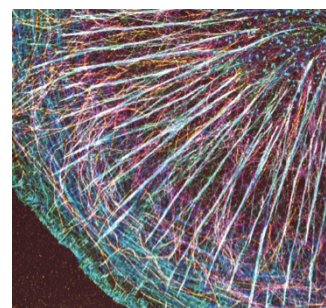
A02 (公募・中林) ラマンイメージングを用いて細胞内の分子クラウディングを定量し、細胞内の水の密度が細胞質よりも核の方が高いことを実験的に示した。紫外共鳴ラマン分光法を用いて緩衝溶液中にあるタンパク質の分子クラウディングによる構造変化を検出した (2019)。

A02 (公募・渡邊) 疑似細胞アレイチップを作成し、細胞膜機能を人工的に再構築するとともに、膜蛋白質の構造や機能の高感度計測基盤の開発を行った (2015, 2016, 2018)。

A02 (公募・Wong) 特許出願「高速原子間力顕微鏡による細胞小器官の観察のための試料調製方法」特願 2017-223106 号, 2017 年 11 月 20 日。

A02 (公募・木内) 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 の開発に成功した (2015)。

●特許出願 「結合解離プローブを用いた観察方法」. 登録番号: 6422172 日本 (特許取得済); "OBSERVATION METHOD USING BOND DISSOCIATION PROBE" 出願番号: 16761865.1, ヨーロッパ (出願済); "OBSERVATION METHOD USING BINDING AND DISSOCIATION PROBE", 出願番号: 15/696,089, アメリカ合衆国 (出願済.)



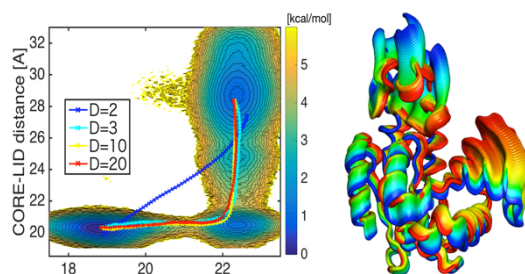
多重蛍光染色超解像 IRIS 法により、アクチン線維、微小管、中間系フィラメント、接着班を可視化した。

【研究項目 A03: 新規動的構造測定技術の検証と応用】

A03-1 (計画・杉田)

分子動力学プログラム GENESIS の高速化 超並列計算機に適した分子動力学プログラム GENESIS を最適化するとともに (2015), 新しいアルゴリズムの開発を行って計算時間を短縮した. 既存の運動エネルギーと温度など基本的な物理量の分子動力学における定義を見直し, 正確な見積もりを実現した (2018, 2019). これにより, 時間刻みを伸ばした場合にも計算精度が落ちにくい高精度計算を実現でき, 実行的に2倍以上高速な計算が可能になった.

マルチスケール・マルチレゾリューションモデルと効率の良い構造探索手法の導入 マルチレゾリューション計算法では, 全原子・粗視化の選択と効率の良いアルゴリズムの導入によって, 複雑な生体分子システムの動的構造解析を実現することができる. 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 (2015). このモデルの拡張と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, 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 (2016).

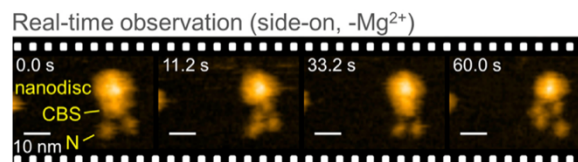


構造変化を示す最小自由エネルギー経路を記述する集団座標の次元数依存性. 左図で次元数が足りない青い系路は正しく表現できていない

電顕マップへのフレキシブルフィッティング計算: 電子顕微鏡を用いて低解像度で得られたマップに, 結晶構造をフレキシブルフィッティングする計算が行われる. この計算を高速に実行する新規アルゴリズムとソフトウェアの開発を行った. 並列化手法を用いることで, リボゾームなどの巨大な分子系のフレキシブルフィッティングでも全原子レベルで可能となった (2019).

A03-2 (計画・塚崎)

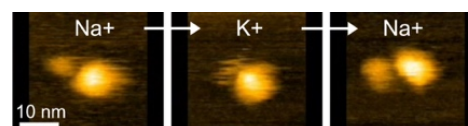
ナノディスクに埋め込んだ膜タンパク質の高速 AFM 観察: A01 計画・安藤と連携 膜タンパク質を膜へと再構成したナノ粒子と高速 AFM を組み合わせ, リアルタイムで膜タンパク質のドメインの構造変化を高精度で追跡した. 条件を最適化することで, 膜と垂直方向並びに平行方向2つの方向から膜タンパク質を観察することに成功した (2019).



マグネシウムトランスポーター含有ナノディスクの AFM 観察

トランスロコンの分子動力学: A03 計画・杉田と連携 膜タンパク質 SecDF はプロトン駆動型のタンパク質膜透過駆動モーターである. SecDF の X線結晶構造解析から, 膜貫通領域にプロトンの通り道となるトンネルが形成されることが示唆された. 分子動力学計算によって, 膜貫通領域に存在するアスパラギン酸残基の電荷状態が変化することで, トンネル形成が起こることが示唆された (2017, 2018)

A03 (公募・南野): A01 計画・安藤と連携 バクテリア鞭毛の Na⁺駆動回転モーター固定子がイオン環境を感知して機能構造を構築・解体するメカニズム (2017) や, べん毛タンパク質輸送装置の構成タンパク質 FlhA がリング構造を形成するメカニズム (2018) などを, 高速 AFM 観測を使って解明した.



Na⁺⇒K⁺⇒Na⁺置換による固定子 MotPS のペプチドグリカン層結合部位のアンフォールディング・リフォールディングを捉えた

A03 (公募・藤岡): A01 計画・安藤と連携 高速 AFM を用いて天然変性蛋白質 Atg13 のオートファジーの最初の複合体形成 (2016) とオートファジーの開始点 PAS の中核として機能する Atg1 複合体の動的構造を明らかにした. さらに Atg1 複合体が in vitro で液-液相分離して液滴状会合体を形成することを明らかにした (2019).

6. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（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。

<発表論文>

国際雑誌論文数は 383 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。そのうち、◎は 135 報（35%）、▲は 198 報（52%）であった。計画班は 5 報、計画分担と公募は 2 報程度を目安として抽出した。

【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】

A01-1（計画・神田）計 13 件（査読有 13 件）

1. *Kohda D. "Multiple partial recognitions in dynamic equilibrium" in the binding sites of proteins form the molecular basis of promiscuous recognition of structurally diverse ligands. *Biophys Rev.* 10:421-433 (2018)
2. ◎▲Srivastava A., Tama F., Kohda D., *Miyashita O. Computational investigation of the conformational dynamics in Tom20-mitochondrial presequence tethered complexes. *Proteins*, 87:81-90 (2018)
3. ▲Fujinami D., -Mahin AA., Elsayed KM., Islam MR., Nagao JI., Roy U., Momin S., Zendo T., *Kohda D., *Sonamoto K. The lantibiotic nukacin ISK-1 exists in an equilibrium between active and inactive lipid-II binding states. *Commun Biol.* 1:150 (2018).
4. ▲*Shimada A., Yamaguchi A., Kohda D. Structural basis for the recognition of two consecutive mutually interacting DPF motifs by the SGIP1 μ homology domain. *Sci Rep* 6: 19565 (2016)
5. ◎▲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)

A01-1（計画分担・稲垣）計 6 件（査読有 6 件）

1. ◎▲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)
2. Saio T., *Inagaki F. NMR Structural Biology Using Paramagnetic Lanthanide Probe. In *Advanced Methods in Structural Biology* (pp. 315-340). Tokyo: Springer Japan (2016)

A01-2（計画・安藤）計 32 件（査読有 32 件）

1. ◎▲Umakoshi T., Fukuda S., Iino R., Uchihashi T., *Ando T. High-speed near-field fluorescence microscopy combined with high-speed atomic force microscopy for biological studies. *BBA-Gen Subj*, in press.
2. ◎▲Mori T., Sugiyama S., Byrne M., Johnson CH., Uchihashi T., *Ando T. Revealing circadian mechanisms of integration and resilience by visualizing clock proteins working in real time. *Nat Commun* 9: 3245 (2018)
3. ▲Uchihashi T., Watanabe Y., Nakazaki Y., Yamasaki T., Watanabe H., Maruno T., Ishii K., Uchiyama S., Song C., Murata K., Iino R., *Ando T. Dynamic structural states of ClpB involved in its disaggregation function. *Nat Commun* 9: 2147 (2018)
4. ▲*Ando T. High-speed atomic force microscopy and its future prospects. *Biophys Rev* 10: 285-292 (2018)
5. ▲*Ando T. Directly watching biomolecules in action by high-speed atomic force microscopy. *Biophys Rev* 9: 421-429 (2017)

公募研究

A01（公募・斉尾）計 9 件（査読有 9 件）

1. ▲*Saio T., Ishimori K. Accelerating structural life science by paramagnetic lanthanide probe methods. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, in press (2019).
2. ▲Kawagoe S., Nakagawa H., Kumeta H., *Ishimori K., *Saio T. Structural insight into proline cis/trans isomerization of unfolded proteins catalyzed by the trigger factor chaperone. *J Biol Chem.* 293, 15095-15106 (2018)

A01（公募・鎌形）計 6 件（査読有 6 件）

1. ▲*Kamagata K., Murata A., Itoh Y., Takahashi S., "Finding the target: Characterization of the facilitated diffusion of transcriptional factor p53 along DNA using ensemble kinetic and single-molecule fluorescence measurements", *J. Photochem. Photobiol., C: Photochem. Reviews*, 30: 36-50 (2017).
2. ◎▲Itoh Y., Murata A., Sakamoto S., Nanataani K., Wada T., *Takahashi S. and *Kamagata K., "Activation of p53 facilitates the target search in DNA by enhancing the target recognition probability", *J. Mol. Biol.*, 428: 2916-2930 (2016)

A01（公募・奥村）計 16 件（査読有 16 件）

1. ▲*Okumura M., Noi K., Kanemura S., Kinoshita M., Saio T., Inoue Y., Hikima T., Akiyama S., *Ogura T., *Inaba K. Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative protein folding. *Nature Chemical Biology*, 15, 499-509 (2019).
2. Matsusaki M., Kanemura S., Kinoshita M., Lee YH., *Inaba K., *Okumura M. Protein Disulfide Isomerase family: from Proteostasis to Pathogenesis. *Biochim Biophys Acta-general subjects* (2019), in press

A01（公募・矢島）計 4 件（査読有 4 件）

1. Fujimura S., Ito Y., Ikeguchi M., Adachi K., Yajima J., *Nishizaka T. Dissection of the angle of single fluorophore attached to the nucleotide in corkscrewing microtubules. *Biochem Biophys Res Commun.* 485:614-620 (2017)
2. ◎▲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)

A01（公募・永田）計 18 件（査読有 18 件）

1. ◎▲Wan L., Kanba K., *Nagata T., *Katahira M. An insight into the dependence of the deaminase rate of human APOBEC3F on the length of single-stranded DNA, which is affected by the concentrations of APOBEC3F and single-stranded DNA. *Biochim Biophys Acta., in press* (2019)
2. ▲Wan OWH., Mikami B., Saka N., Kondo K., Lin MI., *Nagata T., *Katahira M. Identification of key residues for activities of atypical glutathione S-transferase of *Ceriporiopsis subvermispora*, a selective degrader of lignin in woody biomass, by crystallography and functional mutagenesis. *Macromol.* 132: 222-229 (2019)

A01 (公募・水野) 計 6 件 (査読有 6 件)

1. ◎ Higashino A, Mizuno M, Mizutani Y. Chromophore structure of photochromic fluorescent protein dronpa: acid-base equilibrium of two cis configurations. *J. Phys. Chem. B.* **120**: 3353-3359 (2016).
2. ◎ 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).

A01 (公募・菅) 計 8 件 (査読有 8 件)

1. ◎ Suga M, Akita F, Sugahara M, Kubo M, Nakajima Y, Nakane T, Yamashita K, Nakabayashi M, Umena Y, Yamane T, Nakano T, Suzuki M, Masuda T, Inoue S, Kimura T, Nomura T, Yonekura S, Yu L-J, Sakamoto T, Motomura T, Chen J-H, Kato Y, Noguchi T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Nango E, Tanaka R, Naitow H, Matsuura Y, Yamashita A, Yamamoto M, Nureki O, Yabashi M, Ishikawa T, Iwata S and Shen J-R. Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL. Comparison between water-inserted and no water-inserted structures. *Nature*, **543**: 131-135 (2017).
2. ◎ Suga M, Qin X, Kuang T, Shen J-R. Structure and energy transfer pathways of the plant photosystem I-LHCI supercomplex. *Current Opinion in Structural Biology*, **39**: 46-53 (2016).

A01 (公募・安永) 計 2 件 (査読有 2 件)

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* **73**(7):365-374 (2016)
2. ▲ Toba S, Koyasako K, Yasunaga T, Hirotsune S. Lis1 restricts the conformational changes in cytoplasmic dynein on microtubules, *Microscopy* **64**:419-427 (2015)

A01 (公募・柴山) 計 5 件 (査読有 5 件)

1. *Shibayama N, Ohki M, Tame JRH, Park SY, Direct observation of conformational population shifts in crystalline human hemoglobin. *J Biol Chem* **292**: 18258-18269 (2017)
2. Fujiwara S, Chatake T, Matsuo T, Kono F, Tominaga T, Shibata K, Sato-Tomita A, Shibayama N, Ligation-Dependent Picosecond Dynamics in Human Hemoglobin As Revealed by Quasielastic Neutron Scattering. *J Phys Chem B* **121**: 8069-8077 (2017)

A01 (公募・横田) 計 5 件 (査読有 5 件)

1. ◎ *Yokota H. Fluorescence microscopy for visualizing single-molecule protein dynamics. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* in press (2019).
2. ◎ Okuno, D., Hirano, M., Yokota, H., Ichinose, J., Kira, T., Hijiya, T., Uozumi, C., Yamakami, M., *Ide, T. A gold nano-electrode for single ion channel recordings. *Nanoscale* **10**: 4036-4040 (2018).

A01 (公募・藤岡) 計 5 件 (査読有 5 件)

1. ▲ Yamamoto H, Fujioka Y, Suzuki SW, Noshiro 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* **38**: 86-99 (2016)
2. *Noda NN, Fujioka Y. Atg1 family kinases in autophagy initiation, *Cell. Mol. Life Sci.* **72**: 3083-3096 (2015)

A01 (公募・須河) 計 2 件 (査読有 2 件)

1. Yamagishi M, Shigematsu H, Yokoyama T, Kikkawa M, Sugawa M, Aoki M, Shirouzu M, Yajima J, Nitta R. Structural Basis of Backwards Motion in Kinesin-1-Kinesin-14 Chimera: Implication for Kinesin-14 Motility. *Structure*. **24**:1322-34 (2016).
2. ◎ *Sugawa M, Okazaki K, Kobayashi M, Matsui T, Hammer G, Mसाike T, *Nishizaka T. F₁-ATPase conformational cycle from simultaneous single-molecule FRET and rotation measurements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**: E2916-24 (2016)

A01 (公募・宮ノ入) 計 5 件 (査読有 5 件)

1. ◎ *Kainosho M, Miyanoiri Y, Terauchi T, Takeda M. Perspective: next generation isotope-aided methods for protein NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR.* **71**: 119-27 (2018)
2. ◎ *Miyanoiri Y, Hijikata A, Nishino Y, Gohara M, Onoue Y, Kojima S, Kojima C, Shirai T, Kainosho M, Homma M. Structural and functional analysis of the C-terminal region of FliG, an essential motor component of *Vibrio* Na⁺-driven flagella. *Structure*. **25**: 1540-48 (2017)

A01 (公募・中村) 計 2 件 (査読有 2 件)

1. ◎ *Nakamura A, Okazaki K., Furuta T., Sakurai M., Iino R. Processive chitinase is Brownian monorail operated by fast catalysis after peeling rail from crystalline chitin. *Nat. Commun.* **9**: 3814 (2018)
2. Nakamura A, Tasaki T., Okuni Y., Song C., Murata K., Kozai T., Hara M., Sugimoto H., Suzuki K., Watanabe T., Uchihashi T., Noji H., Iino R., Rate constants, processivity, and productive binding ratio of chitinase A revealed by single-molecule analysis. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **20**:3010-3018 (2018)

【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】

A02-1 (計画・白川) 計 26 件 (査読有 26 件)

1. ▲ Terada, D., Sotoma, S., Harada, Y., Igarashi, R and Shirakawa, M. One-Pot Synthesis of Highly Dispersible Fluorescent Nanodiamonds for Bioconjugation. *Bioconj Chem* **29**:2786-2792 (2018)
2. Shingo Sotoma, Daiki Terada, Takuya F. Segawa, Ryuji Igarashi* Yoshie Harada* Masahiro Shirakawa*, Enrichment of ODMR-active nitrogen-vacancy centres in five-nanometre-sized detonation-synthesized nanodiamonds: Nanoprobes for temperature, angle and position. *Sci Rep* **8**:5463 (2018)
3. ◎Sotoma S, *Shirakawa M. Monodispersed Colloidal Solutions of Surface-modified Detonation-synthesized Nanodiamonds and Their Aggregation Resistance. *Chem Lett* **45**:697-699 (2016)
4. ◎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)
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)

A02-2 (計画・西田) 計 8 件 (査読有 7 件)

1. ▲Nishida N, *Ito Y, *Shimada I. "in situ structural biology by in-cell NMR" *Biochem Biophys Acta (General subject)* in press
2. ◎▲Mochizuki A, Saso A, Zhao Q, Kubo S, *Nishida N, *Shimada I. Balanced Regulation of Redox Status of Intracellular Thioredoxin Revealed by in-Cell NMR. *J Am Chem Soc.* **140**:3784-3790 (2018)
3. ▲Huang S, Umemoto R, Tamura Y, Kofuku Y, Uyeda TQP, Nishida N, *Shimada I. Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for structural analysis of actin-binding proteins in complex with actin. *Sci Rep* **6**:33690 (2016)
4. 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)
5. 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)

A02-2 (計画分担・甲斐荘) 計 11 件 (査読有 11 件)

1. ▲*Kainosho M, Miyanoiri Y, Terauchi T, Takeda M. Perspective: next generation isotope-aided methods for protein NMR spectroscopy. *J Biomol NMR*. **71**:119-127 (2018)
 2. ▲Takeda M, Miyanoiri Y, Terauchi T, *Kainosho M. ¹³C-NMR studies on disulfide bond isomerization in bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *J Biomol NMR*. **66**: 37-53 (2016)
 3. ▲Miyanoiri Y, Ishida Y, Takeda M, Terauchi T, Inouye M, *Kainosho M. Highly efficient residue-selective labeling with isotope-labeled Ile, Leu, and Val using a new auxotrophic *E. coli* strain. *J Biomol NMR*. **65**: 109-19 (2016)
- A02 (公募・村田) 計9件 (査読有9件)
1. ▲*Murata M. Functions in living cells. *Biochem. Biophys. Acta (General Subjects)*, (2019) in press.
 2. ▲Horiuchi, Y., Nakatsu, D., Kano, F., *Murata M. Pyruvate kinase M1 interacts with A-Raf and inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by activating MEK1/ERK pathway in mouse insulinoma cells. *Cell Signal*. **38** : 212–222 (2017).
- A02 (公募・渡邊) 計6件 (査読有6件)
1. ◎*Watanabe R, Sakuragi, T., *Noji, H., & *Nagata, S. Single molecule analysis of phospholipid scrambling by TMEM16F. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2018) 115, 3066-3071
 2. ◎▲*Watanabe R, Soga N, Hara M, Noji H. Arrayed water-in-oil droplet bilayers for membrane transport analysis, *Lab Chip* **16**:3043-3-48 (2016)
- A02 (公募・木内) 計1件 (査読有1件)
1. ◎▲*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)
- A02 (公募・朽尾) 計2件 (査読有2件)
1. ◎Sotoma S, Iimura J, Igarashi R, Hirokawa 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)
- A02 (公募・浜地) 計3件 (査読有3件)
1. ◎▲Yamaura K, *Kiyonaka S, Numata T, Inoue R, *Hamachi I. Discovery of allosteric modulators for GABA_A receptors by ligand-directed chemistry. *Nat Chem. Biol.* **12**:822-830 (2016)
 2. ◎▲*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.* **8**:958-67 (2016)
- A02 (公募・伊藤) 計9件 (査読有9件)
1. ◎▲Tanaka T, *Ikeya T, Kamoshida H, Suemoto Y, Mishima M, Shirakawa M, Güntert P, *Ito Y. High-Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells. *Angew Chem Int Ed*, in press (2019)
 2. ◎▲*Ikeya T, Hanashima T, Hosoya S, Shimazaki M, Ikeda S, Mishima M, Güntert P, *Ito Y. Improved in-cell structure determination of proteins at near-physiological concentration. *Sci Rep.* **6**: 38312 (2016)
- A02 (公募・岡本) 計2件 (査読有2件)
- 1.*Okamoto K, Sako Y. Recent advances in FRET for the study of protein interactions and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **46**:16-23.
 2. Okamoto K, *Sako Y. State transition analysis of spontaneous branch migration of the Holliday junction by photon-based single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Biophys. Chem.* **209**:21–27 (2016)
- A02 (公募・中林) 計1件 (査読有12件)
- 1.◎▲Takeuchi M, Kajimoto S, *Nakabayashi T. Experimental Evaluation of Density of Water in a Cell by Raman Microscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **8**: 5241-5245 (2017)
- A02 (公募・安部) 計3件 (査読有3件)
1. ▲Abe S, Ito N, Maity B, Lu C, Lu D, *Ueno T. Coordination design of cadmium ions at the 4-fold axis channel of the apo-ferritin cage. *Dalton Trans*, in press (2019)
 2. *Abe S, Atsumi K, Yamashita K, Hirata K, Mori H, *Ueno T. Structure of in cell protein crystals containing organometallic complexes. *Phys Chem Chem Phys* **20**:2986-2989 (2018)
- A02 (公募・児嶋) 計12件 (査読有12件)
1. ▲Sugiki T, Furuita K, Fujiwara T, *Kojima C. Amino acid selective ¹³C-labeling and ¹³C-scrambling profile analysis of protein alpha and side-chain carbons in *E. coli* utilized for protein NMR. *Biochemistry* **57**, 3576-3589 (2018).
 2. Hattori Y, Heidenreich D, Ono Y, Sugiki T, Yokoyama K, Suzuki E, Fujiwara T, *Kojima C. Protein ¹⁹F-labeling using transglutaminase for the NMR study of intermolecular interactions. *J Biomol NMR* **68**, 271-279 (2017).
- A02 (公募・WONG) 計6件 (査読有6件)
1. ▲◎Lim SK, Mohamed MS, Wang H, Hartono, Hazawa M, Kobayashi A, Voon DC, Kodera N, Ando T and *Wong RW. Direct Visualization of Avian Influenza H5N1 Hemagglutinin Precursor and its Conformational Change by High-Speed Atomic Force Microscopy. *BBA - General Subjects* in press (2019)
 2. ▲◎Mohamed MS, Kobayashi A, Taoka A, Watanabe-Nakayama T, Kikuchi Y, Hazawa M, Minamoto T, Fukumori Y, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, *Wong RW. High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Loss of Nuclear Pore Resilience as a Dying Code in Colorectal Cancer Cells. *ACS Nano*. **11**(6):5567-5578. (2017)
- A02 (公募・森) 計5件 (査読有5件)
1. ▲Miyazaki R, Akiyama Y, *Mori H. A photo-cross-linking approach to monitor protein dynamics in living cells. *BBA-General subjects in press* (2019)
 2. ▲*Mori H, Sakashita S, Ito J, Ishii E, Akiyama Y. Identification and characterization of arrest motif in VemP by systematic mutational analysis. *J. Biol. Chem.* **293**, 2915-2926 (2018)
- A02 (公募・西山) 計4件 (査読有4件)
1. *Nishiyama M. High-pressure microscopy for tracking dynamic properties of molecular machines. *Biophysical Chemistry* **231**: 71-78 (2017)
 2. ◎▲*Nishiyama M. Controlling the Motility of ATP-Driven Molecular Motors Using High Hydrostatic Pressure. The Role of Water in ATP Hydrolysis. *Energy Transduction*: 325-337 (2018)

【研究項目 A03: 新規動的構造測定技術の検証と応用】

- A03-1 (計画・杉田) 計18件 (査読有18件)
1. ▲Jung J, Kobayashi C, Sugita Y. Optimal Temperature Evaluation in Molecular Dynamics Simulations with a Large Time Step. *J. Chem. Theory Comput.* **15**, 84-94 (2019).
 2. ▲Matsunaga Y, Sugita Y. Linking *time-series* of single-molecule experiments with molecular dynamics simulations by machine learning. *eLife* (2018) **7**, e32668.

- ▲ Kobayashi C, Jung J, Matsunaga Y, Mori T, Ando T, Tamura K, Kamiya M, Sugita Y, GENESIS 1.1: A Hybrid-Parallel Molecular Dynamics Simulator with Enhanced Sampling Algorithms on Multiple Computational Platforms, *J. Comp. Chem.* **38**, 2193-2206 (2017).
- ▲ Jung J, Naruse A, Kobayashi C, Sugita Y, Graphics Processing Unit Acceleration and Parallelization of GENESIS for Large-Scale Molecular Dynamics Simulations, *J. Chem. Theory Comput.* **12**, 4947-4958 (2016)
- © ▲ 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)

A03-1 (計画分担・Tama) 計5件 (査読有5件)

- ▲ Miyashita O, Kobayashi C, Mori T, Sugita Y, *Tama F, Flexible fitting to cryo-EM density map using ensemble molecular dynamics simulations, *J. Comp. Chem.* in press (2019)
- Tokuhisa A, Jonic S, Tama F, *Miyashita O. Hybrid approach for structural modeling of biological systems from X-ray free electron laser diffraction patterns, *J Struct Biol.* **194**, 325-336 (2016)

A03-2 (計画・塚崎) 計14件 (査読有14件)

- © ▲ *Tsukazaki T. Structural basis of the Sec translocon and YidC revealed through X-ray crystallography. *The Protein Journal*, in press (2019)
- © ▲ Haruyama T, Sugano Y, Koder N, Uchihashi T, Ando T, Tanaka Y, *Konno H and *Tsukazaki T. Single-unit imaging of membrane protein-embedded nanodiscs from two oriented sides by high-speed atomic force microscopy *Structure* **27**, 152-160 (2019)
- © ▲ *Tsukazaki T. Structure-based working model of SecDF, a proton-driven bacterial protein translocation factor. *FEMS Microbiology Letters* **365**, fny112 (2018)
- © ▲ Sugano Y, Furukawa A, Nureki O, Tanaka Y, *Tsukazaki T. SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport. *PLOS ONE* **12**, e0183434 (2017)
- © ▲ Furukawa A, Yoshikaie K, Mori T, Mori H, Morimoto VY, Sugano Y, Iwaki S, Minamino T, Sugita Y, Tanaka Y, *Tsukazaki T. Tunnel formation inferred from the I form structures of the proton-driven protein secretion motor SecDF. *Cell Rep.* **19**, 895-901 (2017)

A03 (公募・奥野) 計1件 (査読有1件)

- 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)

A03 (公募・清水) 計8件 (査読有8件)

- Hirofumi Shimizu. Diffracted X-ray tracking method for recording single-molecule protein motions. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* in press (2019).
- © *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)

A03 (公募・木村) 計7件 (査読有7件)

- Kodan A, Yamaguchi T, Nakatsu T, Matsuoka K, Kimura Y, Ueda K, Kato H. Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABCB1. *Nat Commun.* 2019 10(1):88.
- Kimura T, Lorenz-Fonfria VA, Douki S, Motoki H, Ishitani R, Nureki O, Higashi M, *Furutani Y. Vibrational and molecular properties of Mg²⁺ binding and selectivity in the magnesium channel MgtE. *J. Phys. Chem. B.* **122(42)**: 9681-9696 (2018)

A03 (公募・南野) 計13件 (査読有13件)

- ▲ Furukawa Y, Inoue Y, Sakaguchi A, Mori Y, Miyata T, *Namba K, *Minamino T. Structural stability of flagellin subunit affects the rate of flagellin export in the absence of FljS chaperone. *Mol. Microbiol.* **102**: 405-416 (2016)
- ▲ 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.* **101**: 656-670 (2016)

A03 (公募・末次) 計4件 (査読有4件)

- ▲ *Suetsugu S. Higher-order assemblies of BAR domain proteins for shaping membranes. *Microscopy*, **65**:201-210. (2016)
- ▲ 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**:2766-2780 (2015)

A03 (公募・中迫) 計21件 (査読有21件)

- Kobayashi A, Sekiguchi Y, Oroguchi T, Yamamoto M, *Nakasako M. Shot-by-shot characterization of focused X-ray free electron laser pulses. *Scientific Reports* **8**:831 (2018).
- © ▲ Oide M, *Okajima K, Nakagami H, Kato T, Sekiguchi Y, Oroguchi T, Hikima T, Yamamoto M, *Nakasako M. Blue-light excited LOV1 and LOV2 domains cooperatively regulate the kinase activity of full-length phototropin2 from Arabidopsis. *J Biol Chem* **293**: 963-972 (2018)

A03 (公募・古川) 計1件 (査読有1件)

- 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)

A03 (公募・杉本) 計7件 (査読有7件)

- Naoe, Y., Nakamura, N., Rahman, M. M., Tosha, T., Nagatoishi, S., Tsumoto, K., Shiro, Y., *Sugimoto, H. "Structural basis for binding and transfer of heme in bacterial heme-acquisition systems". *Proteins* **85**, 2217-2230 (2017)
- ▲ Naoe Y, Nakamura N, Doi A, Sawabe M, Nakamura H, Shiro Y, *Sugimoto H. Crystal structure of bacterial heme importer complex in the inward-facing conformation. *Nat. Commun.* **7**, 134111 (2016)

A03 (公募・重松) 計14件 (査読有14件)

- ▲ Shima T, Morikawa M, Kaneshiro J, Kambara T, Kamimura S, Yagi T, Iwamoto H, Uemura S, Shigematsu H, Shirouzu M, Ichimura T, Watanabe T M, Nitta R, Okada Y, *Hirokawa N. Kinesin-binding-triggered conformation switching of microtubules contributes to polarized transport. *The Journal of Cell Biology*, **217**:4164-4183 (2018).
- ▲ Shigematsu H, Imasaki T, Doki C, Sumi T, Aoki M, Uchikubo-Kamo T, Sakamoto A, Tokuraku K, Shirouzu M, *Nitta R. Structural insight into microtubule stabilization and kinesin inhibition by Tau family MAPs. *The Journal of Cell Biology*, **217**: 4155-4163 (2018)

A03 (公募・古郡) 計1件 (査読有1件)

- Le TT, *Furukohri A, Tatsumi-Akiyama M, Maki H. Collision with duplex DNA renders Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme susceptible to DNA polymerase IV-mediated polymerase switching on the sliding clamp. *Scientific Reports* **7**:12755 (2017)

A03 (公募・三島) 計4件 (査読有4件)

- ▲ Tanaka T, Ikeya T, Kamoshida H, Suemoto Y, Mishima M, Shirakawa M, Guntert P, *Ito Y. "High-Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells." *Angew Chem Int Ed Engl.* **58**:7284-7288 (2019)
- ▲ Kobayashi A, Kanaba T, Satoh R, Ito Y, Sugiura R, *Mishima M. "Chemical shift assignments of the first and second RRM of Nrd1, a fission yeast MAPK-target RNA binding protein." *Biomol NMR Assign.* **11**:123-126 (2017).

A03 (公募・八木) 計 3 件 (査読有 3 件)

1. ©▲ Sekiguchi T, Satoh T, Kurimoto E, Song C, Kozai T, Watanabe H, Ishii K, Yagi H, Yanaka S, Uchiyama S, Uchihashi T, Murata K, *Kato K. Mutational and combinatorial control of self-assembling and disassembling of human proteasome α -subunits. *International Journal of Molecular Sciences*: in press (2019)
2. ©▲ Yagi-Utsumi, M., Sikdar, A., Kozai, T., Inoue, R., Sugiyama, M., Uchiyama, T., Yagi H, Satoh, T., *Kato K. Conversion of functionally undefined homopentameric protein PbaA into a proteasome activator by mutational modification of its C-terminal segment conformation. *Protein Engineering, Design and Selection*, **31**, 29-36. (2018)

A03 (公募・谷中) 計 10 件 (査読有 10 件)

1. ▲ Yanaka S, Yamazaki T, Yogo R, Yagi H, *Kato K. An NMR approach for characterizing antibody interactions in serum environment. *Molecules* **22**:1619 (2017)
2. ©▲ Yanaka S, Moriwaki Y, *Kouhei T, *Sugase K, Elucidation of potential sites for antibody engineering by fluctuation editing. *Sci Rep* **7**: 9597 (2017)

<書籍>

Nakasako M. X-ray diffraction imaging of biological cells. Springer Ser. Optic. Sciences Vol. 210 Springer, May 2018.

<ホームページ>

▲領域全体のホームページ (<http://ugoku-tanpaku.jp/>) 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)を公開した。そのほか、領域の研究概要、研究組織、公募要領、研究成果、ニュースレターなどを掲載し、班員の意思統一および外部への情報発信を行った。

<学会の年会の会長>

- 日本生物物理学会年会 第 53 回年会・年会長 (A01 計画・安藤)
- 日本蛋白質科学会年会 第 16 回年会・年会長 (A01 計画・神田)

<主催シンポジウム等の状況>

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 (世話人: A01 計画・神田) 2014 年 10 月 3 日 福岡
- 生命分子ダイナミクスを探る次世代 NMR 研究会 2015 年 1 月 13 日 岡崎
- 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~14 日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)。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、本新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 (総括班評価者) が参加し、座長と結語の挨拶を行った。
- 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 京都大学吉田キャンパス (京都市)、オーガナイザー: A02 計画・白川
- 27th ICMRBS (第 27 回生体系磁気共鳴に関する国際学会) 2016 年 8 月 25 日 京都国際会議場 (京都市)、共催セッション 20 "Live protein molecules at work"
- 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop (国際学会) (世話人: A01 計画・安藤) 2016 年 10 月 3 日~6 日 KKR ホテル金沢 (金沢市)
- 第 15 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム (世話人: A01 計画・神田) 2017 年 10 月 26 日~27 日 九州大学馬出病院キャンパス (福岡市)。「複合糖質と感染症」と「糖鎖関連蛋白質の構造生物学研究」のセッションを担当し、米国から講師を 1 名招聘した。
- 第 15 回~第 18 回日本蛋白質科学会年会 共催ワークショップを 4 回開催した。
- 第 53 回~第 56 回日本生物物理学会年会 共催シンポジウムを 4 回開催した。
- 第 41 回日本分子生物学会年会 共催ワークショップを開催した。

<新聞など>

■ プレスリリース

- ▶ 東京工業大学/微生物化学研究所からのプレスリリース (担当: A01 藤岡) オートファジー始動装置の構築メカニズムについての成果が、朝日新聞、毎日新聞、日刊工業新聞、マイナビニュース、News Medical、SCIENMAG などで紹介された (2016 年 7 月 8 日)
- ▶ 理化学研究所からのプレスリリース (担当: A03 重松) 「転写中の RNA ポリメラーゼ II の構造を解明 -細胞内で働いている巨大複合体の姿を明らかに-」について (2017 年 8 月 4 日), 他 28 件

<アウトリーチ活動>

- アウトリーチ活動として複数の計画班員が細胞工学誌や実験医学誌に一般向けの日本語解説を執筆した。
- 一般向け講演会・セミナー 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: A01 安永), 他 2 件
- 小・中・高向け授業・実験・実習 立命館高校の SSH と韓国の Korea Science Academy 高校学生を対象に実習 (担当: A03 南野, 2015 年 7 月 15 日), 他 26 件
- 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: A01 鎌形, 2015 年 7 月 11 日), 他 3 件

7. 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、総括班研究課題の活動状況も含め、どのように研究組織間の連携や計画研究と公募研究の調和を図ってきたか、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】

分子的な観点での動的測定技術開発を中心とする。

【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】

細胞内で適用可能な動的測定技術開発を中心とする。

【研究項目 A03: 新規動的構造測定技術の検証と応用】

研究項目 A01 と研究項目 A02 で開発された技術の試験的および応用的な適用を行う。計算機シミュレーションによる結果の検証を行う。

したがって、A01⇔A03 と A02⇔A03 の間をスムーズつなげることが領域推進の要となる。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た。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



▶ 全体班会議の開催

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した。全員が集まって自由な雰囲気の中で研究成果の発表とアイデアの交換を行えるようにリーダーシップを発揮した。

1人当たり25分～30分の時間をとって十分な討議ができるように配慮した。

第1回（担当：神田），2015年6月1日～3日，福岡市

第2回（担当：西田），2016年4月18日～20日，千葉市

第3回（担当：神田），2017年6月5日～7日，福岡市

第4回（担当：神田），2018年6月12日～14日，福岡市

班会議に合わせて総括班会議を開催した。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、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。



全体班会議の2日目午後1時に時間を設定して、共同研究推進のための意見交換の貴重な機会とした

▶ ニュースレターの発行（編集：塚崎智也，神田大輔）

12回発行して、班員間の情報交換と外部に対する情報公開を行った。

動的構造生命始動（1号），第一期班員名簿（2号），第1回班会議特集（3号），第1回班会議要旨集（4号），第2回班会議特集（5号），第2回班会議要旨集（6号），第一期まとめ報告号（7号），第二期班

員名簿 (8月), 第3回班会議要旨集 (9号), 第二期初年度報告号 (10号), 第4回班会議要旨集 (11号), 第二期まとめ報告号 (12号). 公開 URL : <http://vsb.bmr.kyushu-u.ac.jp/Shingakujutsu/newsletter/>.

▶ 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 9 件 (A01 藤岡, A01 矢島, A01 永田, A01 広瀬, A03 香月, A03 末次, A03 南野, A03 木村, A03 古郡) 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, 参加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). 従来の方がタンパク質を対象としていたことを考えると, 「新しい出会いが新しい応用」を産んだ好例となった. 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を行った.

○班会議などが契機となった共同研究のリスト

A03 谷中-A01 宮ノ入: 抗体分子の動態構造解析

A01 木村-A03 杉本: ABC トランスポーターの分光学的解析

A01 神田-A02 児嶋: 酵母 Tim21 蛋白質の NMR 解析

A02 白川-A02 児嶋: ヒト細胞の in cell NMR, 細胞導と NMR 解析

A02 伊藤-A02 児嶋: 大腸菌の in cell NMR, 発現系構築と NMR 解析

A02 森-A03 塚崎: SecDF の結晶構造に基づく生化学的解析

A02 森-A03 塚崎: ペリプラズムシャペロン BepA の TPR ドメインの網羅的な in vivo 光架橋実験

A02 森-A03 杉田: VemP ポリペプチドの翻訳停止と解除の分子機構をリボソームの全原子 MD 計算

A03 矢木-A03 谷中: 動物細胞を利用したタンパク質生産, NMR 計測, MD 計算

A03 清水-A01 安永: イオンチャネル蛋白質の単粒子構造解析

A01 神田-A01 齋尾: 金属イオンを活用した X 線小角散乱によるタンパク質の構造分布解析

A01 奥村-A01 齋尾: PDI と基質フォールディング中間体および変性状態の NMR

A02 伊藤-A03 杉田: マルチドメイン・アダプター蛋白質の動的構造解析

A01 安藤-A03 藤岡: オートファジー Atg1 複合体の液-液相分離状態に関する高速 AFM 解析

A03 杉本-A03 杉田: ヘムトランスポーターの全原子分子動力学

A03 杉本-A03 重松: ヘムトランスポーターのヘム結合状態のクライオ電子顕微鏡解析

▶ BBA 特集号の発行の企画

BBA General Subject (<https://www.journals.elsevier.com/bba-general-subjects>, IF=3.7)は生化学・生物物理学分野の総説と一般研究論文を掲載する科学ジャーナルである. 5年間の活動成果を特集号として発表することを BBA General Subject の編集者に提案し, 2018年9月22日に承認された. ゲスト編集者は計画班員の西田, 塚崎, 神田の3人が務める. 執筆者の選定方法を総括班で検討した結果, 若手研究者にとって総説を書くことができる貴重なチャンスであるとして, 第1期と第2期の公募班員に通知し, 計画班員を含めて27編を選んだ. 内訳は17編の総説と10編のオリジナル論文である. 刊行は2019年秋を予定している. 現在, 14編の論文が受理されている.

8. 研究経費の使用状況（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）

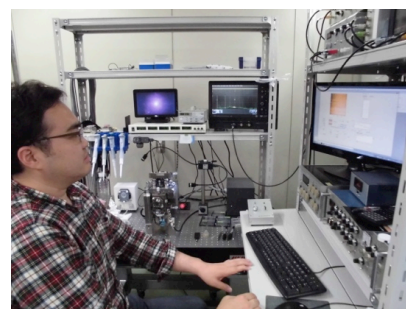
領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について記述してください（総括班における設備共用等への取組の状況を含む。）。

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）、タンパク質精製装置 AKTA pure 25（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）、共焦点レーザー走査型顕微鏡（西田）、計算用およびファイルサーバー用などの計算機システム（杉田）、蛋白質結晶化分注システム Art Robbins Gryphon LCP（塚崎）、タンパク質精製装置 AKTA pure 25（塚崎）である。神田と塚崎は同一機器を購入しているが、結晶解析をするために現場で常時使う機器であり、重複購入にはあたらない。

▶ 大型機器の導入・管理と活用の例

高速 AFM 装置（金沢大学）：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た。なお、安藤の開発による高速 AFM 装置は熊本大学、福岡大学などにもそれぞれの予算で設置されていて、これらの装置を使った公募班員の共同研究も行われている。



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。

ODMR 装置（京都大学）：ODMR 装置の組み上げはパルス化なども含めて予定通り完了した。共焦点スキャンシステムはガルバノスキャンとピエゾスキャンの併用とした。

NMR 装置（九州大学、京都大学）：九州大学と京都大学に設置されてユーザー管理をしている NMR 装置の維持と運用を行った。領域内での NMR スペクトル測定に使用した。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。

▶ 総括班予算の運用

キックオフミーティング（2014 年）、国際ホットスプリングハーバーシンポジウム（2015 年）、国際 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop（2016 年）、5 回の総括班会議と 4 回の全体班会議の企画と運営に使用した。学会の年会における公開発表（シンポジウムやワークショップ）の共催費用一件につき 20 万円程度、計 9 件を共催費として支出した。その他、研究会、技術講習会、シンポジウムの主催や共催を 5 件援助した。

■国際連携予算の運用

当初は海外からの優れた研究者の招聘旅費を中心に考えていたが、実際に運用すると実質的に国際連携に役立つ運用ができた。事例を挙げると、京都大学の教員と若手研究者 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する共同研究を進めた。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、実際に 2 つの論文 (Int J Mol Sci, 2017; Anal Chem, 2017) に結実した。オランダ、ポーランド、ドイツから毎年 2 名ずつ計 4 名が金沢大学に 1~3 カ月滞在し、高速 AFM 観察の国際共同研究を進めた。韓国の大学の准教授と学部学生数名が九州大学に計 3 年にわたり、年 2 回約 2 週間ずつ滞在し、植物タンパク質の電顕観察などの共同実験を行った。公募班員に対する支援を行った。予算執行を考慮して、海外研究室への訪問を中心に援助した。3 年間の間に 11 人の公募班員を支援した。

・研究費の使用状況（（１），（２），（３）を合わせて３ページ以内）

（１）主要な物品明細（計画研究において購入した主要な物品（設備・備品等。実績報告書の「主要な物品明細書」欄に記載したもの。）について、金額の大きい順に、枠内に収まる範囲で記載してください。）

| 年度 | 品名 | 仕様・性能等 | 数量 | 単価（円） | 金額（円） | 設置(使用)研究機関 |
|----|------------------------------|--|----------------------|------------|------------|------------|
| 26 | タンパク質結晶化分注システム | 米国 Art Robbins Instrument 社製 620-1000-21 | 1 | 13,737,600 | 13,737,600 | 奈良先端 |
| | タンパク質分離・精製装置 | 英国 GEヘルスケア社製 AKTA pure 25 M11(F9-C、PCセットを含む) | 1 | 6,480,000 | 6,480,000 | 奈良先端 |
| | 演算サーバ一式 | HPC-ProServerDPeR730 | 1 | 6,458,400 | 6,458,400 | 理化学研究所 |
| | クロマトグラフィー | GEヘルスケア・AKTA | 1 | 4,860,000 | 4,860,000 | 金沢大学 |
| | マグネトロンスポット | 真空デバイス・MSP-30T | 1 | 4,015,160 | 4,015,160 | 金沢大学 |
| | 分光蛍光光度計 | 島津製作所 RF5300PC | 1 | 3,379,320 | 3,379,320 | 東京大学 |
| | Z-ポラライザ | シグマ光機・Zpo1532 | 1 | 2,962,440 | 2,962,440 | 金沢大学 |
| 27 | 高速 AFM 制御回路 | ツジ電子・T3293-01 | 3 | 864,000 | 2,592,000 | 金沢大学 |
| | 蛋白結晶化分注システム | ArtRobbins, Gryphon LCP | 1 | 16,491,600 | 16,491,600 | 九州大学 |
| | 蛋白質結晶 UV 観察システム | JANSi UVEX-m | 1 | 7,241,400 | 7,241,400 | 九州大学 |
| | 科学技術計算用計算機システム一式 | HPC-ProServer DPeR730-rsk | 1 | 6,242,400 | 6,242,400 | 理化学研究所 |
| | ラックマウントサーバシステムワークス | Server S4431 | 1 | 3,970,000 | 3,970,000 | 名古屋大学 |
| | コンパクト FT-IR | ALPHA-HP 一回反射高圧型ダイヤモンド ATR 仕様 | 1 | 3,786,912 | 3,786,912 | 京都大学 |
| | ゲルイメージングシステム | VilberLourmat, FUSION-SOLO. 7S. WS | 1 | 3,553,200 | 3,553,200 | 九州大学 |
| 28 | イメージングシステム | 仏国 Vilber-Loumat 社製 FUSION-SOLO 7S | 1 | 2,993,004 | 2,993,004 | 奈良先端 |
| | SAIL アミノ酸セット | 各 5mg 20 種 | 1 | 2,487,888 | 2,487,888 | 東京大学 |
| | 共焦点レーザー走査型顕微鏡 | オリンパス Fv10i-LIV | 1 | 16,273,872 | 16,273,872 | 東京大学 |
| | 演算用サーバ POWER MASTER | HPC5000-XBWGPU4R1S | 1 | 12,960,000 | 12,960,000 | 理化学研究所 |
| | クロマトグラフィーシステム | AKTApure25M1, GE Healthcare | 1 | 7,538,400 | 7,538,400 | 九州大学 |
| | タンパク質分離・精製装置 | 英国 GEヘルスケア社製 AKTA pure 25 M1(F9-C、PCセットを含む) | 1 | 6,480,000 | 6,480,000 | 奈良先端 |
| | 多角度光散乱検出器 | TREOS, Wyatt Technology | 1 | 6,399,000 | 6,399,000 | 九州大学 |
| 29 | Server (電子サーバ) | S4431 | 6 | 703,836 | 4,223,016 | 名古屋大学 |
| | Low-Profile XY ホジショニングステージ 外 | Physik Instrumente 社製 | 1 | 3,801,600 | 3,801,600 | 京都大学 |
| | 大規模データ管理のためのファイルサーバ | HPC-ProStorage Control730 | 1 | 3,456,000 | 3,456,000 | 理化学研究所 |
| | 演算サーバ POWER MASTER | HPC-ProServer DPeR740-rs | 1 | 9,999,720 | 9,999,720 | 理化学研究所 |
| | Server S5130 | システムワークス社製 | 1 | 3,484,944 | 3,484,944 | 名古屋大学 |
| | 科学技術計算用防音ボックス | JPK・ND31 | 1 | 1,505,520 | 1,505,520 | 金沢大学 |
| | 30 | 計算機システム一式 | HPCProServerDPeR740- | 1 | 14,461,200 | 14,461,200 |

| | | | | | | |
|--|-----------------|--|---|-----------|-----------|------|
| | 小型超遠心機 | rxX7 工機ホールディングス(株)製 CS100FNX(アングロローター) | 1 | 4,220,469 | 4,220,469 | 奈良先端 |
| | NMR装置RFch増設(共用) | Bruker社AVANCE分光 計のチャンネル増設 | 1 | 2,991,600 | 2,991,600 | 九州大学 |

(2) 計画研究における支出のうち、旅費、人件費・謝金、その他の主要なものについて、年度ごと、費目別に、金額の大きい順に使途、金額、研究上必要な理由等を具体的に記述してください。

【平成26年度】

・旅費

1. 国際会議(ローザンヌ・Distinguished Lecture at EPFL とワシントンDC・Japan-NIH JSPS シンポジウム 803,030円 A01班安藤)
2. eystone Symposium (米国) 3/4-3/13 (交通費、宿泊費、日当) 328,910円 A03班 計画分担 Tama
3. 第5回日台NMRシンポジウム(北海道大学)と新学術領域キックオフシンポジウム(九州大学)に参加(東京⇒札幌⇒福岡⇒東京の交通費、宿泊費) 124,368円 計画分担甲斐荘 A02班
4. 第5回日台NMRシンポジウム(福岡⇄札幌交通費、宿泊、日当) 神田大輔 111,400円 A01班神田

・人件費・謝金

1. 特定研究員の雇用 2名 4,669,830円 A02班白川
2. 研究員の雇用 1名 2,054,818円 A03班塚崎
3. テクニカルスタッフの雇用 1名 1,417,751円 A01班安藤

・その他

1. 窒素ガス発生装置 AT-5NP-25CSL 点検費用 450,000円 A01班神田

【平成27年度】

・旅費

1. 博士研究員赴任旅費 SRIVASTAVA Ashutosh (名大)10/1 762,909円 A03班計画分担 Tama
2. SPring8大型放射光施設測定実験(兵庫県佐用郡) 8回(福岡⇄兵庫県交通費、宿泊料、日当) 343,560円 A01班 神田
3. FASEB-SUMMER CONFERENCE (米国フロリダ) 参加 6/21-27 (京都⇄フロリダの交通費、宿泊費) 森本大智 241,850円 A02班白川
4. PF高エネルギー加速器研究機構(茨城県つくば市)3回(福岡⇄つくば市交通費、宿泊料、日当) 188,040円 A01班神田

・人件費・謝金

1. 特定研究員3名の雇用 12,321,973円 A02班 白川
2. テクニカルスタッフ2名の雇用 6,567,884円 A01班 神田
3. 研究員(研究員、技術員)2名の雇用 4,260,602円 A03班 塚崎
4. テクニカルスタッフ1名の雇用 3,473,850円 A01班 安藤

・その他

1. AVANCE600型NMR装置クライオプローブ海外修理 11,977,200円 A01班神田
2. AV700用 冷却循環水装置設置、配管洗浄、廃棄、及びNMR動作確認作業 3,969,000円 A02班白川
3. 核磁気共鳴装置 AVANCE700型の修理 2,721,600円 A02班白川
4. AV700用クライオプローブ定期メンテナンス 2,138,400円 A02班白川
5. AVANCE600クライオプローブ定期メンテナンス 1,820,880円 A02班白川

【平成28年度】

・旅費

1. リンツ・Winter Workshop (交通費、宿泊費) 704,340円 A01班安藤
2. CL Brooks (U. Michigan), J. Straub (Boston U.) 8/2-3 516,686円 A03班杉田
3. EUROMAR2016 (デンマーク、オーフス)に参加(東京⇄オーフスの交通費、宿泊費、日当) 278,240円 A02班西田
4. 中国長春市・SPM on SPM 2016 (交通費、宿泊費) 267,150円 A01班安藤
5. 第2回動的構造生命班会議3名(福岡⇄千葉幕張) 227,700円 A01班神田

・人件費・謝金

1. 特定研究員3名の雇用 10,860,869円 A02班白川
2. 博士研究員の2名の雇用 7,566,666円 A03班杉田

3. 研究員（研究員、博士研究員、技術員）3名の雇用 7,208,155円 A03 班塚崎
4. テクニカルスタッフ1名・RA4名の雇用 5,483,173円 A01 班神田
5. テクニカルスタッフ1名の雇用 3,484,421円 A01 班安藤

・その他

1. 高機能高速冷却遠心機 Avanti HP-301 修理 1式 1,037,016円 A01 班神田
2. 窒素ガス発生装置 AT-5NP-25CSL 点検費用 S/N17380 484,920円 A01 班神田
3. LC1290 メンテナンス作業 453,600円 A01 班 神田

【平成29年度】

・旅費

1. ロンドン・Royal Society Discussion Meeting, バルセロナ・9th International Conference on Engineering of Chemical Complexity (交通費、宿泊費) 1,036,432円 A01 班安藤
2. リンツ・Winter Workshop (交通費、宿泊費) 837,800円 A01 班安藤
3. 阪大(馬越博士)との共同研究のための招聘旅費(4月~2月,10回・交通費、宿泊費) 610,500円 A01 班安藤
4. University of illinois 訪問と研究発表 7/16-22 田村康一(理研) 280,910円 A03 班杉田
5. 新学術領域研究会議(福岡市)4名(理研)6/5-7 269,620円 A03 班杉田
6. SCIPION Workshop (名古屋大学 TamaFrorence 主催・福岡⇄名古屋・交通費、宿泊料、日当) 4名 232,560円 A01 班神田
7. 第17回日本蛋白質科学会年会(仙台国際センター)に参加 (東京⇄仙台的交通費、宿泊費、日当)×3名分 176,540円 A02 班西田

・人件費・謝金

1. 特定研究員1名・研究員1名・RA2名の雇用 10,106,590円 A02 班白川
2. 研究員の雇用 3名(研究員+博士研究員+技術員) 9,960,857円 A03 班塚崎
3. 博士研究員の雇用 1名 5,542,374円 A03 班杉田
4. 博士研究員・テクニカルスタッフ2名の雇用 5,473,282円 A01 班安藤
5. テクニカルスタッフ1名 RA3名の雇用 4,088,881円 A01 班神田
6. 博士研究員の雇用 1名 2,899,434円 A03 班画分担 Tama

・その他

1. DRX600型 NMR 装置 クライオプローブシステム接続作業 16,200,000円 A02 班白川
2. NMR 装置コンバージョン作業 9,882,000円 A01 班神田
3. DRX600型 NMR 装置 700MHz コンソール移設及び周波数変更改造作業及び室温プローブでの動作確認 3,186,000円 A02 班白川
4. AV600型 NMR 装置 クライオシステム室外機 2,062,800円 A01 班神田

【平成30年度】

・旅費

1. Telluride Summer Conference & NIH Seminar 杉田(理研)7/16-29 1,083,689円 A03 班杉田
2. ACS National Meeting 杉田有治(理研)8/15-25 1,076,862円 A03 班杉田
3. XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systemsに参加・藤浪大輔(福岡⇄Dublin, Irelandの交通費、宿泊料、日当) 263,240円 A01 班神田
4. 福岡・新学術領域研究会議×2名(金沢⇄福岡の交通費、宿泊料、日当) 193,320円 A01 班安藤
5. 高速AFMを用いた共同研究実験(金沢大学)×2名(福岡⇄金沢) 160,020円 A01 班神田
6. 第18回日本蛋白質科学会年会・新学術領域ワークショップ(新潟市・福岡⇄新潟の交通費、宿泊料、日当) 87,000円 A01 班神田

・人件費・謝金

1. 研究員の雇用 3名(研究員+博士研究員+技術員) 11,220,631円 A03 班塚崎
2. 学術研究員1名・テクニカルスタッフ1名 RA4名雇用 8,393,928円 A01 班神田
3. 博士研究員の雇用 5,949,637円 A03 班画分担 Tama
4. 研究員1名・RA2名の雇用 4,223,522円 A02 班白川
5. テクニカルスタッフ雇用 1名 3,562,783円 A01 班安藤

・その他

1. AV600型 NMR 装置 クライオプローブ定期メンテナンス 2,149,200円 A02 班白川
2. AV600型 NMR 装置 クライオオーバーホール作業 1,555,200円 A01 班神田

(3) 最終年度(平成30年度)の研究費の繰越しを行った計画研究がある場合は、その内容を記述してください。該当無し

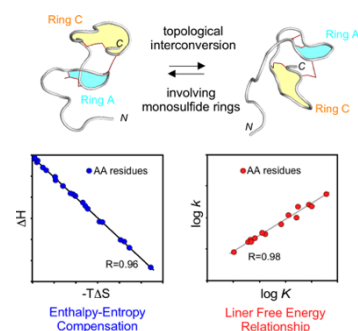
9. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度（1ページ以内）

研究領域の研究成果が、当該学問分野や関連分野に与えたインパクトや波及効果などについて記述してください。

本領域「動的構造生命」が目指す到達点は、単に「精密な立体構造」を解明することではなく、「あるがままの状態における生体分子の動的な構造を通して機能を理解すること」である。蛋白質等の生体分子は実際に機能する場合、その局在や立体構造を動的に変えながら機能している。したがって、細胞における局在や立体構造に時間軸を導入して定量的に生体分子を記述する必要がある。さらに、解析対象をできるだけ生体内と同じ環境に置くことで、より実態に近いデータの取得ができる。本領域ではこれを可能にするような新規測定法の開発とそれに基づく生物学的に重要な系での適用を研究目的に設定した。この目的設定は領域内で正しく理解・共有されているだけでなく、情報発信を通じて、多くの研究者に影響を与えた。例えば第1期の公募班員であった、浜地格（京都大学）は、本領域に参加したことを通じてインビトロ測定問題の重要性を認識し、新たな新学術領域「分子夾雑の生命化学」（平成29年～33年）の発足につながった。

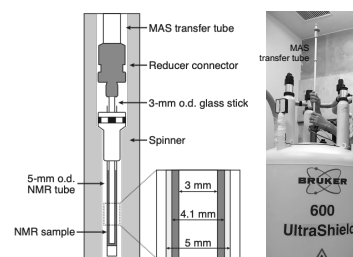
”新たな生命現象の発見に結び付く成果”や“それが産み出すインパクト”を短期間で判断することは極めて難しい。特に本領域は基礎的な分野であるために、応用分野に貢献するには時間がかかる。しかし、新しい測定方法は必ず新しい結果を生むことにつながる。以下に、当初は予期していなかった成果について記載する。

A01（計画・神田）平衡定数と交換速度の間の新しい相関関係の発見、A03 計画・杉田と連携： 抗菌ランチペプチド Nukacin は NMR 測定から溶液中で二状態の平衡にある (Biol Commun, 2018)。NMR を用いて平衡定数と交換速度を複数の温度で残基毎に精密測定を行った。logK vs. logk プロットが直線関係になることは Linear free energy relationship (LFER) と呼ばれ、多くの例で見られる。通常は分子全体から1つの平衡定数と交換速度を得て、多数の変異体あるいは溶液条件で測定することでプロットを得る。これに対し、今回は NMR を用いて、1つの分子に含まれるアミド基についてそれぞれ平衡定数と交換速度を決定して LFER 関係が成立することを示した初めての例である。その物理化学的な意義については考察中であるが、なぜ蛋白質がなぜ短時間で巻き戻るのかという基本問題に答える実験的証拠の可能性がある。



残基レベルの LFER 直線関係の発見

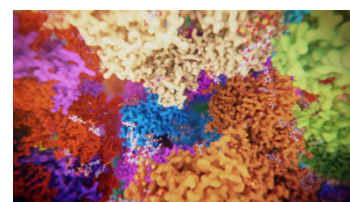
A02（計画・白川）新規 Rheo-NMR 法の開発： 試料に剪断流を加えながら NMR 測定ができる新たな Rheo-NMR 法を開発した。現在、Rheo-NMR 法として世界最高感度・分解能である。剪断流は異常タンパク質凝集体であるアミロイド線維の形成を促進することから、Rheo-NMR 法はアミロイド線維形成をリアルタイムかつ原子分解能で追跡することに役立つ。



Rheo-NMR 測定の概要

A03（計画・塚崎）ナノディスクに埋め込んだ膜タンパク質の AFM 観察： 高速 AFM による膜タンパク質の解析は従来型の平面膜に再構成した方法があるが、両側を観測できないという問題があった。そこで、ナノディスクを膜と平行方向に基盤へと結合させることによって、一度に膜の両側を観察できる系を構築した。金沢大学 AFM センターには詳細の問い合わせが多い。

A03（計画・杉田）インセルシミュレーションのムービー： 細菌の細胞質のシミュレーション結果を動画によって表現し、Youtube で公開した。細胞質内分子混雑環境を可視化し、そのイメージを伝えることで、新しい研究につながるインスピレーションを誘起することが期待できる。



細胞質内の分子混雑の動画イメージ

10. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況（1 ページ以内）

研究領域内での若手研究者育成の取組及び参画した若手研究者（※）の研究終了後の動向等を記述してください。

※研究代表者・研究分担者・連携研究者・研究協力者として参画した若手研究者を指します。

本新学術領域研究の発足時において、計画班員代表者 6 名のうち、西田と塚崎の 2 人は 39 歳と 40 歳の若手研究者であった。第一期の公募研究者 29 名（内、女性 4 名）の開始時（2015 年 4 月）において、年齢構成は 30 代が 8 名、40 代が 16 名、50 代以上が 5 名であった。また、第二期の公募研究者 29 名（内、女性 4 名）の開始時（2017 年 4 月）において、年齢構成は 30 代が 11 名、40 代が 12 名、50 代以上が 6 名であった。研究代表者の年齢構成全体を計画班および公募班を合わせてみると、30 代が 4 割、40 代が 3 割を占めていた。

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（*英語セッション）

若手育成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。

- ▶ 第 15 回日本蛋白質科学会年会（2015 年 6 月 26 日、徳島市）オーガナイザー：神田、西田
- ▶ 第 53 回日本生物物理学会年会*（2015 年 9 月 14 日、金沢市）。オーガナイザー：西田、神田。
- ▶ 第 16 回日本蛋白質科学会年会（2016 年 6 月 7 日、福岡市）。オーガナイザー：塚崎、神田
- ▶ 第 54 回日本生物物理学会年会*（2016 年 11 月 27 日、つくば市）、オーガナイザー：西田、塚崎
- ▶ 第 17 回日本蛋白質科学会年会*（2017 年 6 月 21 日、仙台市）、オーガナイザー：西田、神田
- ▶ 第 55 回日本生物物理学会年会*（2017 年 9 月 20 日、熊本市）、オーガナイザー：塚崎、神田
- ▶ 第 18 回日本蛋白質科学会年会*（2018 年 6 月 28 日、新潟市）。オーガナイザー：西田、神田
- ▶ 第 56 回日本生物物理学会年会*（2018 年 9 月 15 日、岡山市）。オーガナイザー：塚崎、神田
- ▶ 第 41 回日本分子生物学会年会（2018 年 11 月 30 日、横浜市）。オーガナイザーの一人が古郡（A03 公募班員）

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。

- ▶ 第 25 国際ホットスプリングハーバーシンポジウム（2015 年 11 月 13 日～14 日、福岡市）
神田が企画を担当し、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。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）が口演した。
- ▶ 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とした。

本新学術領域内の若手研究者のプロモーションの事例（年齢は異動時）

| | |
|----------|---|
| 計画班代表研究者 | 西田紀貴（39 歳と 42 歳）東京大学・助教 → 同准教授 → 千葉大学・教授 |
| 計画班代表研究者 | 塚崎智也（43 歳）奈良先端科学技術大学院大学 准教授 → 同教授 |
| 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・教授 |
| 公募班代表研究者 | 奥村正樹（36 歳）東北大学・学振 PD → 同助教 |
| 公募班代表研究者 | 渡邊力也（34 歳と 36 歳）東京大学・助教 → 同講師 → 理化学理研・主任研究員 |
| 公募班代表研究者 | 西山雅祥（43 歳）京都大学・研究員 → 近畿大学・准教授 |
| 計画班連携研究者 | 森貴治（34 歳）理研・開拓研究本部・研究員 → 同・専任研究員 |
| 計画班連携研究者 | Jaewoon Jung（39 歳）理研・計算科学研究機構・研究員 → 同・（定年制）技師 → 同・専任技師 |
| 公募班代表研究者 | 木村哲就（41 歳）神戸大学理学研究科・特命講師 → 講師（テニユア審査） |
| 公募班代表研究者 | 古郡麻子（42 歳，女性）奈良先端科学技術大学院大学・助教 → 大阪大学・准教授 |

若手研究者が受賞した賞

| | |
|----------|-----------------------------|
| 公募班代表研究者 | 菅倫寛 平成 27 年度文部科学大臣表彰若手研究者賞 |
| 公募班代表研究者 | 渡邊力也 平成 27 年度文部科学大臣表彰若手研究者賞 |

11. 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）

本昨年度終了した本領域の活動について、ニューズレター等でも情報をいただいていたが、平成27年から30年度にわたって全体班会議に毎年出席し、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きた。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成果をあげた。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・蛍光顕微鏡の組み込み、イメージング中に強い力を作用させるインタラクティブ高速AFMの開発に成功し、数多くの領域内共同研究につながった。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、新たな成果が次々に生まれた。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ことが常に印象的であった。領域全体としては、様々な技術講習会を通じて最新技術の普及が実現し、そこから数多くの共同研究が生まれていることが、特に注目された。従来分離しがちであった実験系研究者と計算系研究者の連携体制が本領域の特徴のひとつであったが、実際、両者が連携した共同研究が、計画研究、公募研究を問わず数多く立ち上がり、発展した。現在、細胞レベルでの生命科学では、従来の方法論では十分に斬り込めない液-液相分離のような新たな重要問題が立ち上がっており、そうした問題への取組みにおいても、本領域で開発されたわが国発の技術や研究方法が役立つことが期待される。その意味では、本領域で開発された方法論や技術が次のフェイズではより広範な生命科学各分野に応用され、飛躍的成果を生み出してほしい。本領域を、たとえば細胞生物学の新たな潮流に焦点を合わせた新学術領域研究へと発展させる努力が期待される場所である。

■中村春木（情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所）

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。さらに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として、電子顕微鏡を用いて低解像度で得られたマップに結晶構造をフレキシブルフィッティングする新規アルゴリズムとソフトウェアの開発計算が行われた。並列化手法を用いることで、リボゾームなどの巨大な分子系のフレキシブルフィッティングでも全原子レベルで可能となったことは他に例がみない優れた成果である。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、今後の細胞生物学への応用の基礎が築かれている。実際、細胞を生きたまま状態で長時間の in-cell NMR が可能なバイオリクター装置が国内外のグループにおいても広く波及し、in-cell NMR 測定法におけるスタンダードツールとして確立された。一方、高速 AFM による膜タンパク質の解析としてナノディスクを膜と平行方向に基盤へと結合させることによって、一度に膜の両側を観察できる系が構築された。インセルシミュレーションのムービーも Youtube で公開され、細胞質内における分子混雑環境の可視化が広く国内外に紹介できた。

■森川耿右（京都大学・生命科学研究所）

本領域「動的構造生命」の主要な目標は「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つた。本領域以前の構造生物学研究は、機能的観点から重要なタンパク質や核酸、あるいはそれらの複合体の立体構造を決定し、物性的特徴の知識を加味して、化学的な言葉で生物的功能を説明することに主眼をおいてきた。当評価者は、本領域の全期間に渡ってほぼ全ての班研究会に出席し、計画班員、公募班メンバーを問わず、多数の班員の発表を拝聴する機会を持った。研究の軸足を、時間経過に沿った生体高分子の変形として観察し記述する研究は、新規方法論の開発を前提とするため、単なる分子の構造決定とは異なった苦勞を伴う。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 線解析手法などの発展に焦点を絞る一方、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 などの技術についても、生体試料を使えるようにする汎用性を高める努力を続けてきた。本領域の優れた側面は、NMR、X 線解析、AFM の専門家と細胞生物学、生化学研究者の緊密な連携プレイであり、今後の発展性は有望との好印象を持った。一方、現在超一流の科学雑誌で報告される構造生物学的研究記事のほとんどは、電子顕微鏡単粒子解析に関連している。この技術は、分子の立体構造と機能の変化を時間軸に沿って、記述する手法としても、今後急速に発展することは間違いない。政府による今後の重点化は急務と考える。