

領域略称名：革新的ナノバイオ  
領域番号：521

平成23年度科学研究費補助金  
「特定領域研究」に係る研究成果等の報告書  
「膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス」

(領域設定期間)  
平成18年度～平成22年度

平成23年6月

領域代表者 東京大学・大学院工学系研究科・教授・野地博行

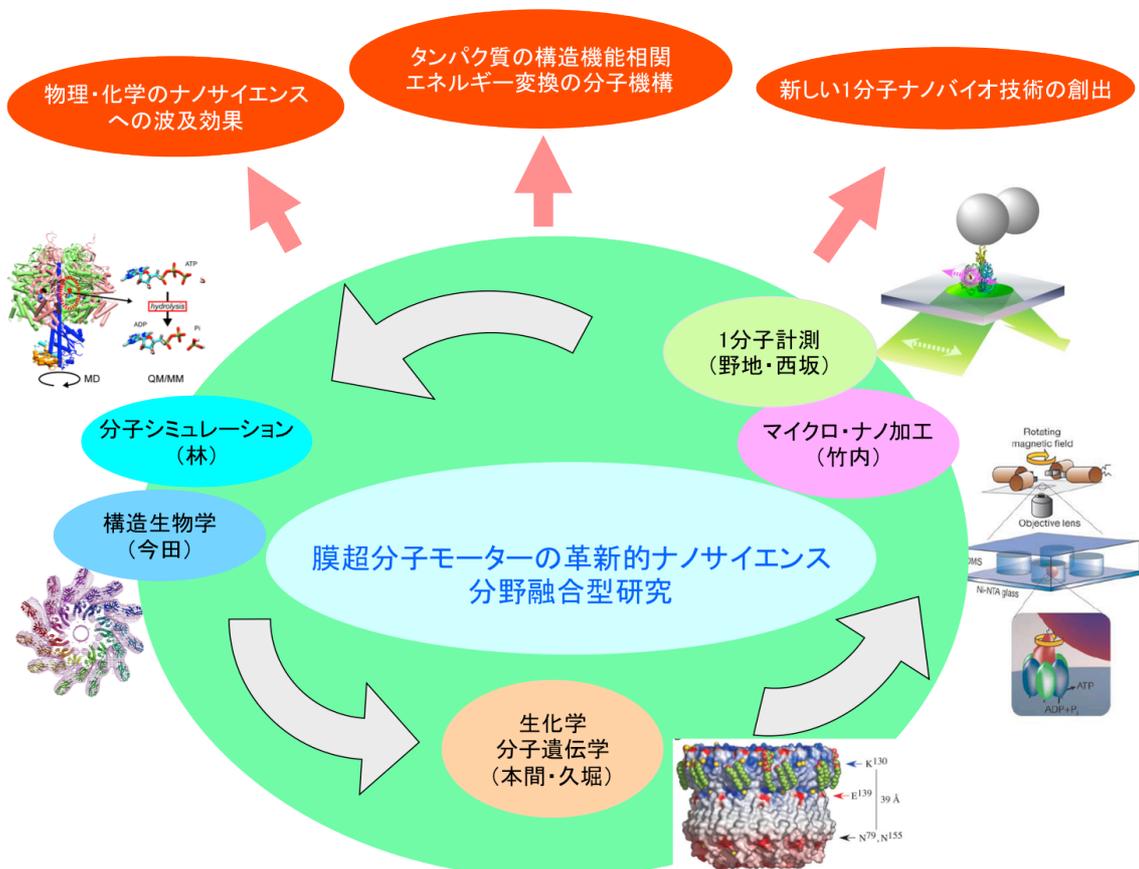
## 目 次

頁

1	表紙	
2	目次	1
3	研究領域の目的および概要	2
4	研究領域内の設定目的の達成度	3
5	研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況	5
6	主な研究成果（発明および特許を含む）	6
7	研究成果のとりまとめの状況	16
8	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）	17
9	研究組織と各研究項目の連携状況	24
10	研究費の使用状況	27
11	当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	28
12	研究計画に参画した若手研究者の状況	29
13	総括班評価者による評価の状況	30

### 3. 研究領域の目的および概要

本領域研究の設定目的は、膜超分子モーター研究において、わが国の1分子ナノバイオ分野の研究者が有する圧倒的なアドバンテージを維持、そして発展させ、最終的には膜超分子モーターの新しいタンパク質科学を創造していくことにある。それは、これまでに大きな成果をあげてきた分子遺伝学と生化学研究を先端的なマイクロ・ナノ加工技術を利用した1分子ナノバイオ計測を融合し、そこから得られる結果を構造生物学と分子シミュレーションによって解釈し、再び実験に還元しようというものである。具体的には、マイクロ・ナノ加工技術や、光学顕微鏡技術、そして大規模計算シミュレーション科学の専門家が結集し、革新的な1分子ナノバイオ技術の開発を行う。例えば、膜タンパク質の1分子計測技術、3次元で分子の動きを計測できる1分子顕微鏡と1分子の蛍光偏光面を測定する顕微鏡、マイクロ・ナノデバイスを利用した超高感度検出技術と平面膜チップの開発、および、分子シミュレーションと組み合わせた量子化学計算、などを組み合わせることにより、機能性タンパク質の触媒反応機構がどのような構造基盤によって実現しているのかを原子レベルの分解能で理解することを目指す。この目的を達成するために、まったく新しいナノバイオ技術の開発を推進し、これを全面的に活用できる創造的な共同研究を実施する。



## 4. 研究領域内の設定目的の達成度

本領域では、最新の分子機械解析技術を駆使して膜超分子モーターのエネルギー変換メカニズム解明を目標として掲げて研究を5年間推進してきた。研究における最大の成果は、ATP合成酵素の $F_1$ -ATPaseの反応スキーム解明である（領域代表野地, *Cell* 2007, *Nat. Chem. Bio.* 2010）。この成果は、各種メディアに取り上げられただけでなく、最新の教科書に取り上げられた(Molecular Biology of Machines and Assemblies, Garland, 2011)。申請時に掲げた「将来教科書に掲載される成果を挙げる」という目標を5年間で達成したことを特筆したい。また、 $F_1$ -ATPaseのトルク発生ユニット $\beta$ の構造変化を1分子可視化し、新しい中間構造を発見したことも最重要成果である(A02 西坂, *Nat. Str. Mol. Bio.* 2008)。これ以外にも、 $F_1$ -ATPaseの活性制御メカニズム解明(A01 久堀 *EMBO J.* 2006)、生細胞中におけるべん毛タンパク質の局在ダイナミクス(A01 本間 *JMB* 2007)などが代表的成果である。また、領域発足時には全く予想もしていなかった発見があった。例えばべん毛タンパク質輸送装置が $F_1$ と酷似しており、しかも回転子に対応するサブユニットまで存在するという発見である(A03 今田, *PNAS* 2007 & *Nat. Str. Bio* 2011)。今後、この輸送装置における回転運動の証明が楽しみである。

本領域のもう一つの特徴は、膜超分子モーターの駆動原理解明という一つの目標に向かった「異分野間共同研究クラスター」の形成である。本領域は、領域発足以前からメンバーが自発的に取り組んでいた共同研究を効果的に組織化している。このボトムアップ的共同研究の代表的成果として、領域代表(野地)とA02 公募班(内橋)による「高速AFMによる $F_1$ 固定子リング中におけるトルク発生ユニットの協同性の実証(*Science* in press)」が挙げられる。また、量子化学計算(A03 班林)、分子動力学計算(A03 班池口)、1分子計測(領域代表野地)による「 $F_1$ -ATPaseの加水分解反応の分子メカニズム解明」も特筆すべき成果である。これは未だ投稿中(*Nat. Chem.*)であるが、殆ど前例のない量子力学計算と1分子生物物理の融合研究であり、 $F_1$ -ATPaseを含め多くのNTPaseの化学反応モデルに大きな修正を迫る重大な発見である。これ以外にも、べん毛モーターの固定子サブユニットの構造解析(A01 班本間&A03 班今田, *PNAS* 2008)、細胞内ATP濃度可視化プローブ(領域代表:野地&A02 公募班:永井ら *PNAS* 2010)、 $V_1$ -ATPaseの回転素過程解明(A01 公募班横山&領域代表野地, *Nat. commun.* 2011)などが挙げられる。公募班同士の共同研究も活発であり、膜輸送装置タンパク質の構造解析(A01 公募班石谷&A01 公募班森, *Nature* 2008 & *Nature* 2011)が代表的成果である。

本領域では新しい1分子計測技術の開発も精力的に行った。3次元1分子計測技術(*Nat. Str. Mol. Bio.* 2008b)、マイクロ加工技術を用いた細胞トラップ技術(*PNAS* 2007)、非平衡物理理論を利用した新しいトルク計測技術(*Phys. Rev. Lett.* 2010)など多数ある。

そして、本領域最大の成果は人材育成と言えるかもしれない。本領域の計画研究・公募

研究の代表者自身も非常に若い、それを支える若手研究員が大きく育った。例えば、競争率 10 倍以上もある生物物理学会の若手奨励賞受賞者のうち実に 40% (10/25 人) が本領域の若手研究者である。現在、その多くは大学正規ポジションを獲得するなど大きく羽ばたいている。さらに計画代表研究者 7 名のうち 3 名が学術振興会賞を受賞している。このように本領域は人材育成に関しても大きな成果をあげた。

以上の通り、本領域は異分野共同研究クラスターを核とし、膜超分子モーターに関する本質的課題の解明、予想外の発見、そして優秀な若手研究者の育成など、発足時には予想できなかったほどの成果を上げた。十二分に当初目標を達成したと自負する。ただし、重要な課題が残された。それは、ATP 合成酵素の ATP 合成時の回転観察である。これは、本領域発足時からの最重要課題であった。顕微鏡下における平面膜法の確立 (*EMOB. J.* 2008) など技術的進展はあったが、課題達成には至っていない。国内外の他の超大型プロジェクトにおいても同様の試みがなされているが未だ達成されていない技術的難易度が極めて高い課題であるが、これが取り残されたことが非常に悔やまれる。本研究分野における日本の優位性をさらに決定的にするために、本課題が早急に達成されなければならないことを最後に付記する。

## 5. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況

### ● 総括班の体制変更

領域での研究の進展とともに、想定以上に総括代表にかかる事務的作業の負担が増大した。そこで、本年度より、事務作業の効率化と強化を図るため、大阪(野地)と名古屋(本間)に事務組織を分散させ、さらに名古屋においては事務補助員も雇用し、HPの作成と管理、班会議の運営補助を行った。これにより、研究に専従できる時間が増え、より領域の研究に打ち込むことができた。

### ● ビデオ会議システムの導入

領域を運営するに当たり、総括班には緊密な連携が求められる。通常、それは総括班会議という形で年に数回行われるが、領域を運営するには十分とは言い難い。しかし、日本各地に散らばる総括班員を一カ所に集めるには時間や労力も必要とし、負担が増えるだけである。そこで我々は総括班にビデオ会議システムを導入した。本システム導入後、総括班会議を月に一回開催し、領域運営に関して細かな議論がなされるようになった。また、副次的な効果として、総括班内の研究者における共同研究がより推進されるようになった。いつでもお互いの顔を見ながらディスカッションできる利点は計り知れない。そこで、計画班や、公募班にもこのビデオ会議システムの導入をおこなった。これにより、さらに踏み込んだ共同研究が展開され、論文として投稿できるまでの成果を上げたものもある。

### ● 班員の主催する研究会へのサポート

班員が主催している研究会へのサポートを行った。研究会やシンポジウムを開催するに当たって、招待講演者の旅費や、運営費用は大きな負担となっている。そこで、このような費用の一部を総括班が負担し、積極的に研究会を開催してもらうことで、各班員が研究の裾野を広げて、新しい研究の芽を生み出し易くなるように環境を整えた。

### ● 中間評価において指摘された問題点の改善

2008年度に行われた中間評価において、「1, これまで、の公募研究課題の一部が、本研究領域内での位置づけとして不明確である。今後、新規の公募研究課題をどのように取り込んで新しいものを創成するかを考えるべきである。2, *in vivo* での蛋白質機能の理解や生物学への提言を出してほしい。」というご指摘をいただいた。これを受けて、次のような対策を行った。

問題点1：これは公募班にかかわる点であった。公募班と計画班の直接的な関係がかならずしも明らかではないことが指摘されているが、本領域は公募班に関してはテーマを膜超分子モーターにあえて絞らず、むしろ広い意味でのタンパク質科学推進をするために多様性を持たせることを意識している。そこで、第二期の公募ではこの点をより明確に記載し、広く公募した。その結果、応募総数は第一期よりはるかに増え、様々なタンパク質の分子科学的研究、計測手法開発、理論、構造解析、分子シミュレーションに関する提案を採択することができた。さらに、この広い研究分野から参加している研究者を効果的に連携させるため、各種勉強会(F<sub>1</sub>勉強会、膜張りまっせ、等)を企画するなど行った。実際に共同研究は多岐にわたっており、本領域が狙っている公募班と計画班の間での活発な共同研究がおこなわれたと考えられる。

問題点2：これは、*in vivo*での蛋白質機能解析に関する要望である。これは、本領域にかぎらず1分子生物物理全体の今後の方向にかかわる重要な意見である。そこで、計画班のA01計画研究ア・イとA03班計画研究力では、細胞内における膜超分子モーターであるATP合成酵素もしくはべん毛モーターの構成サブユニットの蛍光イメージングを実施している。また、計画班のA01計画研究アでは、細胞内ATP濃度計測のためのFRET型蛍光プローブを開発し、細胞内におけるATP分布やダイナミクス計測に成功した(PNAS 2009)。このように、膜超分子モーターの1分子生物物理学の次の道筋の一つを具体的に示すことができた。今後は、このような方向の研究の重要性がよりますものと考えられる。

## 6. 主な研究成果（発明および特許を含む）

### A01班 膜超分子モーターの分子機構の解明

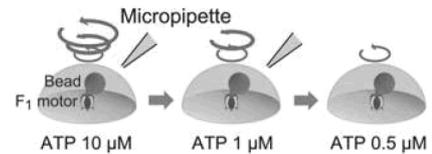
#### 計画研究ア 「F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素の回転動作機構の解明」

研究代表 野地博行

本研究では、本特定領域研究の学際的な特徴を最大限に生かし、新しい膜タンパク質の1分子計測技術、1分子解析用マイクロデバイス、新規蛍光プローブ、非平衡物理に基づく新しい1分子解析技術など、全く新しい1分子計測技術を開発した。さらに、これらの技術を有効に利用することで、F<sub>1</sub>モーターの反応スキームの完成、協同性の構造的基盤、化学力学エネルギー変換のメカニズムなど、本質的知見を数多く得ることに成功した。

① F<sub>1</sub>モーターの各反応速度定数の回転角度依存性：ATP結合待ち状態のF<sub>1</sub>の1分子操作により、ATP結合の平衡定数が角度とともに指数的に上昇することを明らかにした。一方、F<sub>1</sub>上におけるATP加水分解/合成の平衡定数は、10倍程度しか変化しなかった。平衡定数と自由エネルギー変化の関係から、F<sub>1</sub>は少なく見積もってもATP加水分解自由エネルギーの50%を放出していること、合成過程では大きく見積もっても10%程度であることが分かった。さらに、構造揺らぎによる反応速度加速など、タンパク質科学的知見からみて非常に重要な結果が得られた。

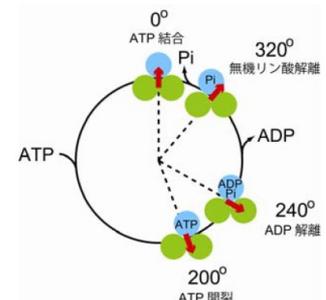
② F<sub>1</sub>モーターを強制回転したときの反応効率と強制回転速度・基質濃度の関係：PDMSをもとに作製した超微小溶液チャンバー中で、F<sub>1</sub>を本来の速度の1倍から10倍以上の速度で強制回転させた。その結果、反応効率が強制回転速度の上昇とともに減少し、ATP結合速度定数が回転方向に指数関数的に上昇することが示唆された。また、より操作性の高いW/Oドロプレット型超微小溶液チャンバーの開発に成功し、W/Oドロプレット中におけるF<sub>1</sub>回転アッセイにも成功した。



③ ATP合成酵素の膜電位駆動回転の1分子計測システム確立：顕微鏡下における平面膜作成技術を確立し、この手法の有効性を実証するため、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>より操作・再構成が容易な小胞輸送形成因子COPIIタンパク質を平面膜に再構成しそのダイナミクスを観察した。その結果、COPII因子同士の活発な会合過程が観察された。また、GTP加水分解活性との関連を調べた結果、GTPによる輸送小胞の輸送基質の濃縮効果を見出した。この手法を用いてATP合成酵素の電位駆動依存的な回転運動を調べる過程で、ATP合成には膜電位よりもプロトン濃度差が決定的であることを発見した。

④ 細胞内ATPとF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP合成酵素の活性の相関：ATP合成酵素のεサブユニットは、ATPだけを特異的に結合して構造変化する。この特徴を生かしてバクテリア由来のεサブユニットにBFPとYFPを遺伝子操作によって接続し、そのリンカー構造や円順列変異を検討することでBFP-YFP間のForsterエネルギー移動効率からATP濃度を計測できるプローブの開発に成功した。さらに、Ca<sup>2+</sup>指示薬との同時計測が可能なように波長調整したATPプローブの開発にも成功した。

⑤ F<sub>1</sub>-ATPaseの反応スキームの完成：低温回転計測により、新しい反応中間体を発見した。この反応中間体寿命がより長くなった変異体を発見し、これを含むキメラ型F<sub>1</sub>を用いて、この反応中間体がATP結合前後の構造変化に関わることを見いだした。リン酸解離に関しては、上述の酵素上でATP分解/合成の平衡が達成されていることから、リン酸の解離は加水分解角度とは異なる点で起こると結論した。その他の実験結果と総合し、リン酸解離がATP結合後320度回転した場所であることを決定し、F<sub>1</sub>の反応スキームを完成させた。



⑥ **F<sub>1</sub>-ATPaseの協同的触媒機構の構造基盤の解明**： $\gamma$ を取り除いた $\alpha_3\beta_3$ 固定子リング中の触媒細部ユニット $\beta$ の構造状態を高速AFMで計測し、 $\beta$ の「閉じた」構造と「開いた」構造の間の遷移を明らかにした。3つの $\beta$ 間で90%以上の確率で協調していることから、 $\gamma$ との相互作用無しでも $\beta$ 同士は協同性を有することが証明された。

その他、F<sub>1</sub>の結晶構造と1分子計測にみられる安定構造の対応を、クロスリンク変異体を用いて決定した。また、非平衡物理の揺らぎ理論を応用して回転プローブの粘性抵抗に依存しないトルク計測方法を開発した。さらに、これまでの1分子イメージング技術のなかでも最速となる10マイクロ秒をきる速度でのナノメーター手法を開発し、無負荷時のF<sub>1</sub>の回転計測を行った。この手法は、ミオシンのパワーストローク解明にも活用されている。

---

## 計画研究イ 「ナトリウムイオン駆動型膜内回転モーターの力発生機構の解明」

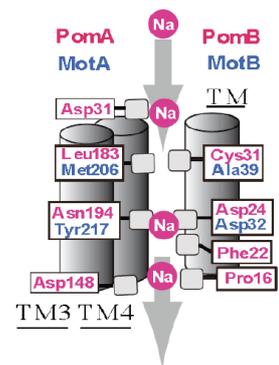
研究代表 本間道夫

本研究で対象としたナトリウム駆動べん毛モーターは、プロトン型に比べ解析に多くの利点を持つ。これまで固定子内のイオン透過経路については、ほとんど研究が進んでいなかったが、ATR-FTIRを用いた測定によりPomB-D24がNa<sup>+</sup>結合部位であることを初めて実験的に明らかにした。また、固定子タンパク質膜貫通部位への変異導入により、イオン透過経路を推測した。固定子構成タンパク質にGFPを融合させて、それらの局在の条件を調べたところ、Na<sup>+</sup>依存的な局在が観察された。この局在化が、回転子タンパク質のFliGの変異によって阻害されることから、FliGと固定子の相互作用が、固定子の局在化に重要であると結論された。さらに、固定子タンパク質のペリプラズム側断片の結晶構造の解明により、この断片がイオンチャンネルを形成するために二量体となっていること、ペプチドグリカンと相互作用できるような大きな構造変化がイオンチャンネルの活性化に必要であることを示唆することができた。

① **リポソームに再構成したPomAB複合体によるNa<sup>+</sup>取り込みの定量的測定系の試み**：リポソームに再構成したPomAB複合体によるNa<sup>+</sup>チャンネル活性の定量的測定系を確立するために、大腸菌由来の転写翻訳再構成系PURESYSTEMを用いて界面活性剤存在下でタンパク質合成を行い、PomABの合成と可溶化画分からの回収に成功した。また、ホスファチジルコリンで作成したリポソーム存在下でPomABの合成を行った。PomBPro-12に変異を導入することにより、正常な分子量のタンパク質の発現に成功した。また、PomB Pro-12 変異タンパク質を発現した菌体が、野生型と同程度の運動能を示すことを明らかにした。合成PomABを用いて、プロテオリポソームへの再構成を行い、Na<sup>+</sup>取り込み活性の測定を試みたが、活性の検出はできなかった。

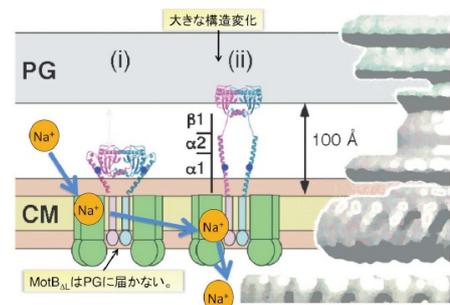
② **PomBの極局在**：固定子構成タンパク質PomBにGFPを融合させたGFP-PomBの局在の条件を調べたところ、培地にNa<sup>+</sup>が存在するときは極局在がみられるが、K<sup>+</sup>に置換すると極局在がみられず蛍光は菌全体に拡散し、更に蛍光ドットの局在と拡散が可逆的であることが分かった。次に、PomBの推定イオン結合部位を含む種々の変異体を作成してモーターの局在を調べ、モーター機能と局在の関連を明らかにした。固定子の集合が適切に行われないうえに遊泳欠損(Mot)を示すFliGの変異体の存在を予想し、大腸菌・サルモネラ菌で以前単離されたMotを与えるFliGの16種類の1残基置換の変異をビブリオ菌の相当する残基に導入した。その結果、運動能が完全に失われる変異体(L259Q, L270R, L271P)、運動能が野生型に比べ大きく低下する変異体(V274E, L279P)の取得に成功した。これらの変異FliGをGFP-PomB, PomAと共発現させ、蛍光顕微鏡観察によってGFP-PomBの極局在率を測定した。Wild typeでは80%の菌体の極にGFP-PomBの集合による蛍光のドットが見られるのに対し、上記の変異体と共発現させると、このような蛍光のドットが消失し、FliGが固定子の集合に重要であることが示唆された。

③イオン透過経路の解析：べん毛モーター固定子中を透過するイオンは、固定子複合体中の膜貫通部位に唯一存在するカルボン酸である Asp24-PomB (Asp32-MotB)がイオン結合部位と推定されている。全反射型赤外分光法 (ATR-FTIR) を用い、Asp残基とイオンの相互作用を確かめることに成功した。ビブリオ菌でPomA/PomBの発現・精製を行い、大腸菌Polar lipidに再構成した。この試料を用い塩存在下・非存在下での測定を行った結果、Na<sup>+</sup>存在下で、COOH型からCOO<sup>-</sup>型へ変化するカルボン酸を見出した。D24N変異体での信号消失から、これがAsp24とNa<sup>+</sup>の結合による変化であることを確かめるとともに、Asp24以外のNa<sup>+</sup>結合部位も明らかにした。さらに、Asp24に至る透過経路を調べるため、Asp24 (Asp32-MotB)のヘリックス2ターン分、イオン取り込み側に位置し、H<sup>+</sup>駆動型でAla、Na<sup>+</sup>駆動型でCysに保存されている残基に着目し、側鎖の大きさを変える種々の変異体を作成した。その結果、MotA-M206がMotB-A39と向かい合ってイオン透過経路を形成していると推定した。



④固定子複合体のイオン結合メカニズム：海洋性ビブリオ菌 (*Vibrio alginolyticus*) は、固定子タンパク質としてPomA、PomBを持ち、4A:2B複合体を形成する。この複合体中をNa<sup>+</sup>が透過し、共役して回転力が発生する。PomAの3番目、4番目の膜貫通領域とPomBの膜貫通領域によってイオン透過経路は形成されると考えられている。PomBの膜貫通領域には、高度に保存されたべん毛の回転に必須なアスパラギン酸残基 (PomB-D24) が存在し、Na<sup>+</sup>結合残基として働く。必須であるPomB-D24の負電荷を中和し運動能を完全に欠損した変異体から、運動能を回復させる抑圧変異体PomA-N194D (PomAの4番目の膜貫通領域) を得た。この結果は、固定子複合体のイオン結合ポケットに負電荷が必要とされるが、PomB-D24の位置である必要はないことを示唆している。タンデムに融合したPomAダイマーでは、N末端側、C末端側どちらのPomAにPomA-N194D変異を導入しても、PomB-D24Nのバックグラウンドにおいて運動能が回復した。すなわち、PomB-D24は、PomAダイマーのどちらのサブユニットともイオン結合ポケットを形成できることを示唆しており、固定子複合体のイオン結合メカニズムの新たな情報を与えた。

⑤MotBのC末端ペリプラズム側断片 (MotBC) の結晶構造：ナトリウム駆動モーター固定子Pom複合体と相同であるMotタンパク質からなる固定子複合体は、プロトン流と共役し回転力を発生している。このMot複合体のMotBのC末端ペリプラズム側断片 (MotBC) の結晶構造を解明した。MotBCにはPGBドメインだけでなく、ペリプラズム側において運動に必須な部分がすべて含まれている。構造情報をもとに行った機能解析により、PGBドメインはプロトンチャネルを形成するために二量体となっていること、MotBCのN末端部分の大きな構造変化がPG結合とプロトンチャネルの活性化に必要であることが明らかとなった。そして、同様な構造変換がPomBのPGBドメインでも起こっていることが推測された。



## 計画研究ウ 「ATP合成酵素の回転モーター制御の分子機構」

研究代表 久堀徹

分子モーターの制御とは、モーター分子の原子レベルでの動きの制御である。本研究では、これを理解するために、回転軸 (1サブユニット) 側からの研究と、外的要因の研究を同時平行して実施した。(1) 1サブユニットの構造変化による回転制御を1分子レベルで解析し、正確な角度解析により軸受け側の"サブユニットの構造と停止位置の対応付けを行った。また、磁気ピンセット技術を用いて、停止と回転に要する力を実測した。さらに、制御時に起こる構造変化を立体構造レベルで解明し、制御と構造の関連付けを行なった。(2) 内在性阻害因子である#サブユニットの機能を、阻害にかかる力の測定と分子構造の変化の両面から検証した。さらに内在性阻害因子の構造変化と膜ポテンシャルの関連付けを目指した。(3) 細胞内におけるATP合成量と分子レベルでのATP合成酵素の活性変化の対応付けを行うことにより、回転調節の生理的な重要性につ

いて考察した。

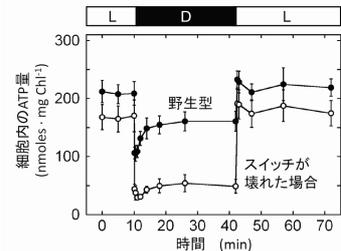
①植物型と細菌型εサブユニットの阻害効果の比較：細菌型ATP合成酵素の生化学的な解析から、細菌型である好熱菌ATP合成酵素では、阻害型から活性型への転換が起こると、構造変化を起こしたεサブユニットへATPの結合が起こり、これにより阻害型への再転換が起こりにくくなっている事が明らかになった。このことが、植物型と比較して細菌型ではεサブユニットの阻害効果が弱い事の一因と考えられる。

②好熱菌F<sub>1</sub>のεサブユニットの構造解析と機能解析：好熱菌F<sub>1</sub>のεサブユニットのNMR構造解析およびX線構造解析により、このサブユニットのC末端ヘリックス構造の構造変化がATP依存で起こり、この部分が酵素のATPセンサーとして働く可能性を明らかにした。さらに、好熱菌εサブユニットの構造変化と膜ポテンシャル維持機構を調べた結果、εのC末端ヘリックスが膜ポテンシャルの維持に重要な役割を担っていることを明らかにした。この成果に関連して、研究分担者の山田康之氏は、平成20年度日本生化学会奨励賞を受賞した（発表研究題目「ATP合成酵素の活性調節におけるεサブユニットの役割」）。

③葉緑体型ATP合成酵素の回転阻害の解析：葉緑体型ATP合成酵素の特異的阻害剤であるテントキシンによる回転阻害の解析によってADP遊離段階が阻害されること、高濃度テントキシンによる活性化がADP阻害からの解除であることを明らかにした。

④葉緑体型F<sub>1</sub>のεサブユニットの構造解析：葉緑体型ATP合成酵素のモデル酵素である好熱性シアノバクテリア由来の酵素を用いて、阻害サブユニットεのNMR溶液構造を明らかにした。合わせて、ハイブリッド蛋白質の構造解析によって、葉緑体ATP合成酵素εサブユニットのC末端ヘリックス構造を明らかにした。

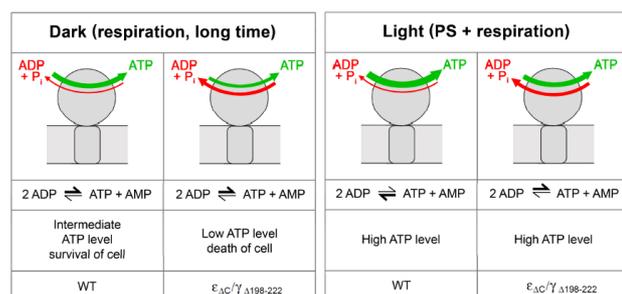
⑤葉緑体型F<sub>1</sub>のγサブユニットの制御領域の機能解析：シアノバクテリアATP合成酵素が持っているγサブユニットの挿入配列が制御スイッチとしてADP阻害の誘導に重要な役割を果たしていることを、変異体酵素の1分子解析により明らかにした。シアノバクテリアの形質転換株の解析により、このADP阻害が暗所での細胞内ATPレベルの維持に重要な役割を担っていることを明らかにした。



⑥葉緑体型F<sub>1</sub>のγサブユニットの酸化還元制御機構の解析：植物型ATP合成酵素のεサブユニットの酸化還元制御による回転調節機構の詳細を明らかにするために、シアノバクテリアATP合成酵素に変異導入し、回転と停止の詳細(特に停止位置の解明)を一分子レベルで詳細に調べた。その結果、酸化状態ではいわゆる「ADP阻害」と言われている80度の停止位置での停止頻度が増加し、停止時間も長くなることを明らかにした。

⑦葉緑体型F<sub>1</sub>のADP阻害とε阻害の比較解析：シアノバクテリアATP合成酵素を用いて、1分子解析によりε阻害とADP阻害の関連を調べた。その結果、ε阻害が物理的により強固な阻害であり、ADP阻害とは異なる性質を持つことを明らかにした。

⑧葉緑体型ATP合成酵素のATP加水分解機能制御の生理的意義の解析：シアノバクテリアATP合成酵素のεサブユニットおよびγサブユニットの変異が細胞レベルで光合成機能、細胞内ATP量、細胞の生存率に及ぼす影響を詳細に調べ、これらの調節機能が実際に暗所での細胞の維持に重要であることを明らかにした。



公募班の成果

A01班の公募班には、平成19・20年度に11名、平成21・22年度に9名が参加し、活発な研究を行った。主たる成果は、タンパク質膜透過促進因子SecDFの機能解析によるタンパク質膜透過機構の解明（森博幸）、Sec複合体によるタンパク質膜透過機構の構造機能相関研究による膜透過に寄与する膜内在性シャペロンモデルの提唱（石谷隆一郎）、べん毛のロータリー型分子モーターのトルク発生コントロールと運動計測によるモーターの動作機構の解明（西山雅祥）、X-D伸縮振動領域を含めた時間分解赤外分光法によるバクテリオロドプシンの光誘起構造変化解析によるプロトン輸送機構の解明（古谷祐詞）、好熱性バシラス属細菌のべん毛モーターの固定子の機能解析（薬師寿治）、V型ATPaseのサブユニット集合機構の解明（村田武士）、回転子を有する人工分子のリアルタイム分子イメージングの実現（竹内正之）、マイコプラズマ滑走のあしの動きの検出による滑走の分子機構の解明（宮田真人）、膜結合型AAA+プロテアーゼFtsHの構造解析に基づくタンパク質分解機構の解明（寿野良二）、シアノバクテリア時計タンパク質の分子機構の解明（寺内一姫）、無負荷回転プローブを用いた好熱菌  $V_0V_1$  および  $V_1$  の回転のステップ解析（横山謙）、偏光を用いた蛍光分子の配向検出のための顕微鏡構築によるべん毛モーターの回転解析（福岡創）、光ピンセット法によるタンパク質翻訳機構の1分子操作技術の開発（上村想太郎）、好熱菌ATP合成酵素の全体構造の解析に向けた結晶条件の確立（三留規誉）などである。

## A02班 膜超分子モーターを解析する1分子ナノバイオ技術の創出

計画研究エ 「3次元を検出する新しい原理の光学顕微鏡で解明する膜超分子モーターの作動原理」

研究代表 西坂崇之

本研究では、新しい光学顕微鏡技術を用い、膜超分子モーター（主に $F_0F_1$ -ATPase）の作動原理について、分子のレベルにおける解明を試みた。タンパク質の部分的な領域が機能する瞬間のダイナミクスが可視化され、化学反応と対応づけることもできた。さらにキネシン-微小管系におけるコークスクリュー運動の直接可視化にも成功した。これらの技術や成果は「1分子構造生物学」という新しい学問領域に発展する可能性がある。

### ①分子モーターによる微小管の回転観察の直接測定：開発

した3次元位置検出システムを用い、リニア分子モーターであるキネシン・微小管系における回転成分を検出する研究を進めた。装置開発は、研究代表者である西坂、研究室に所属する学生である水谷佳奈氏が行い、生物試料の調製と実際の測定については、科研費研究員である矢島潤一郎氏が行った。最初にQdotを微小管に特異的に結合し、ガラス面上に結合したキネシンによってこの微小管が滑り運動が観察できる実験系を開発した。キネシンにゲルゾリンという別のタンパク質を融合したリコンビナントタンパク質を用い、またQdotと微小管の結合にはビオチン-アビジン系を糊として用いている。このQdotの動きを通じて、微小管のコークスクリュー状の動きを直接観察する実験系を完成した。これまでにも、微小管の先端や後端に非対称なマーカーを付け、その動きから回転を定量化する方法は存在したが、タンパク質レベルの大きさである~10ナノメートルのプローブによって回転の直接観察に成功したのは今回が初めてである。この手法を用い、キネシン-1、および細胞分裂に関与するキネシン-5について、双頭もしくは単頭の場合にどのような回転運動を行うかを詳細に調べた。回転のピッチはprocessivityに関与することが分かり、リニアモーターEg5が回転モーターとして機能する様子が、ありありと画像化された。この成果に関連して、科研費研究員の矢島潤一郎氏は、平成19年度の生物物理学会若手奨励賞を受賞した（発表研究題目「単頭キネシンによる微小管の並進・回転運動機構の研究」）。現在、ATP濃度や分子モーターの密度、変異体の影響といった点から回転のピッチを測定し、キネシンモーターが回転を生み出す機構を分子レベルで調べている。以上、3次元位置検出手法を用いて分子モーターの新しい性質を解明した成果は、国内においても国際的にも高い評価を得ている。研究員であった矢島氏は、2010年度より東京大学大学院・総合文

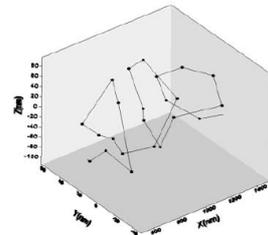


Fig1. 微小管が螺旋運動するときの量子ドットの3次元プロット

化研究科の准教授として採用され、引き続き分子モーターの研究を研究代表者と共同で発展させている。

②タンパク質内部のコンフォメーション変化の可視化：化学状態と蛋白質内部のコンフォメーション変化がどのように対応しているかは、生物物理学における最重要課題の1つである。この問いに答える目的で、色素の振動モーメントの向きを、特殊な全反射型顕微鏡で可視化するという方法を用い、 $F_1$ -ATPaseの構造変化を、特定の領域に限定して可視化することに成功した。 $\beta$ サブユニットのC末端ドメインの構造変化について、1分子のレベルで再現性良く検出でき、さらにハイブリッドのミュータントを用いることで化学状態とのカップリングも明らかにできた。この成果に関連して、研究分担者の政池知子氏は、平成20年度の生物物理学会若手奨励賞を受賞し（発表研究題目「 $F_1$ -ATPaseをモデルとした1分子構造変化検出による酵素機能発現の理解」、新聞（朝日新聞2011年3月9日朝刊、9頁）でも報道された。

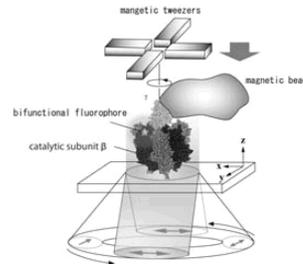


図1 磁気ピンセットと偏光変調全反射型顕微鏡を用いた $\beta$ の構造変化観察の実験系

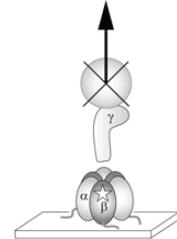


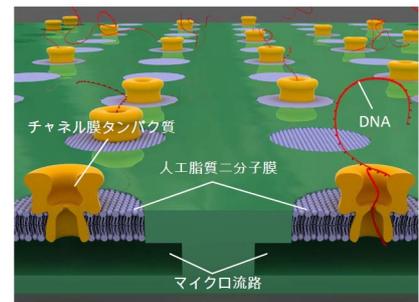
図2 三次元位置検出顕微鏡と光ピンセットを用いた $\gamma$ の引き抜き破断力測定

以上、偏光変調全反射型蛍光顕微鏡によるタンパク質コンフォメーション変化の可視化を成し遂げた成果は、国内外で非常に高い評価を得ている。

## 計画研究オ 「マイクロ・ナノ加工技術を用いた膜タンパク質機能解明のためのプラットフォーム」

研究代表 竹内昌治

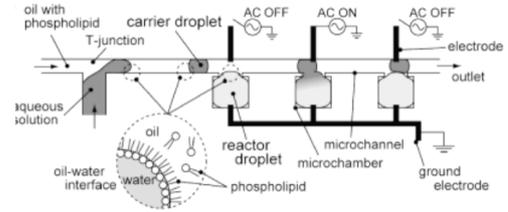
本研究では、膜超分子モーターの機能解明の効率化を可能とする実験プラットフォームを、マイクロ・ナノ加工技術を利用して実現することを目的とした。まず、マイクロ・ナノ加工技術を利用して、小型チップ上に再現性よく、安定して脂質膜を再構成できる計測プラットフォームの実現を試みた。マイクロ加工により、小孔のサイズを調整し、平面膜の安定化に挑戦した。さらに、小孔を独立にアレイ化し、異種の膜タンパク質の膜電流計測、物質輸送イメージングを選択的に進めるシステムを開発した。加えて、マイクロ流体デバイス技術の特長をいかし、マイクロチャンネルと人工膜を組み合わせた実験系の構築に関しても検討した。さらに、10ミクロンサイズのマイクロビーズを流路中でハンドリングするダイナミックマイクロアレイや、ピコリットルオーダーの液滴内の溶液を交換するシステムなど、マイクロデバイス中で微小物体や分子を効率的に操作するための基本的なデバイスを実現した。また、水、有機溶媒を交互に流し、微小孔に再現性良く脂質2重膜（平面膜）を形成する方法を開発し、マイクロデバイス中でアレイ化することに成功した。これらの平面膜を変形させ、均一直径のリポソーム膜を生成する方法を開発した。



①膜超分子モーターが再構成可能な脂質二重膜アレイの実現：平面膜チップの研究に関しては、マイクロ・ナノ技術を利用して、膜を形成することで、再現性、安定の問題に取り組んだ。複数同時に膜形成が行なえれば、そこに複数種の膜タンパク質を導入し、同時に多くの機能解析を行なうことができる。膜タンパク質の機能計測のうち、イオンチャンネル電流計測は比較的簡単に行うことができる。これまでに我々は、脂質を溶解させた有機溶媒中に2つの液滴を用意し、それらの界面に形成された脂質の単分子膜を接触させる方法によって脂質二重膜を効率的に形成する方法（接触法と名づけた）を確立している。この接触法により形成した膜に、チャンネル性の膜タンパク質などを導入し、膜の両端にかかる電圧を固定した条件でのイオンチャンネル電流の計測に成功した。実験では、膜タンパク質の中でも、比較的分子量が小さく、扱いの容易なチャンネルタンパク質（グラミシジンAや $\alpha$ -ヘモリシンなどのペプチドやタンパク質）を利用し

た。これらは、多量体化によりナノポアを形成し、チャンネル電流を発生させる。実際の膜タンパク質の再構成は、一般的に膜融合法が用いられる。これは、膜画分やリポソーム中に精製した膜タンパク質を平面膜上にばら撒くことによって融合をさせる方法である。この融合により、スパイク状のチャンネル電流を計測できた。また、これらの方法を利用して多チャンネル膜形成用のデバイスを試作し、実際に各部に再構成した膜から、ペプチドなどからのイオンチャンネル電流を複数同時に計測することに成功した。

**②一分子観察のための簡便なマイクロチャンバーの実現：**マイクロチャンバーを利用した実験システムの構築については、マイクロ流路を組み合わせることで一層の効率化を図った。マイクロ流路を作成し、ここに水層と油層を交互に流すことによって、チャンバーを作成する方法を考案した。本方式は、長時間大量のチャンバーを観察する実験に適していることが分かってきた。また、このデバイスに脂質を混入させた有機溶媒を用いることによって、チャンバーの開口部を脂質二重膜で覆うこともできた。



**③溶液交換チャンバーの実現：**最終年度までに、脂質膜で囲われたマイクロ油中水滴の電気融合・分裂現象をベースにした溶液交換チャンバーを実現することに成功した。このシステムにより、膜超分子モーターを含む生体高分子の構造変化や機能発現の様子を生体高分子の周囲の溶液を数十から数百ミリ秒オーダーの高速で交換しながら観察し解析することができるようになった。

以上のシステムを集積化することで、再現性・安定性・ハイスループット性の高いデバイスの構築が可能であり、膜超分子モーターの機能解明の一層の効率化が可能になるシステムを開発することができたと考えられる。

**④外部トルクに対する $F_1$ -ATPaseの応答：**分担者の宗行は、誘電泳動の原理を用いて回転分子モーターである $F_1$ -ATPaseに時間・空間的にほぼ均一な外部トルクをかけて、その応答を観察する研究を行った。この実験系では溶液のイオン強度を下げなければならないため、実験条件下でのATPMgとATP、Mgの平衡関係や $F_1$ -ATPaseの活性等を検討し、最適と考えられる実験条件を模索した。さらに実験手順を洗練して外部トルクの校正を全ての実験について個別に行うことにより、データのばらつきをある程度減らすことに成功し、外部トルク存在下でのステップ回転の挙動を論文として発表した。この時点では、電場をかけることによる発熱が問題となっており、定性的な考察しかできなかったが、その後、回転電場法による温度上昇の問題を溶液条件、セルの構造、回転観察用ビーズの大きさなどを検討することで問題にならない程度まで軽減した。また録画系、データ処理系に関しても改良を行い、1000fpsで撮影した動画を撮影と同時に重心解析をしながらハードディスクに取り込むシステムを構築した。このことにより以前に比べると飛躍的に実験が楽になり、順調にデータが得られるようになった。

## 公募班の成果

A02班の公募班には、平成19・20年度に4名、平成21・22年度に5名が参加し、活発な研究を行った。主たる成果は、電気化学的手法を用いた導電性高分子イオンポンプの開発とその評価（梶弘和）、未処理・無染色の生体試料の観察を可能にする透過照明条件下の高分解能光学顕微鏡の開発（上村慎治）、モータータンパクの熱的環境を分子レベルで制御する顕微鏡システムの開発（井上裕一）、高速AFMによる回転子のない $F_1$ -ATPaseの“回転”の直接観察（内橋貴之）、パターン化モデル生体膜を利用した膜タンパク質再構成技術の開発（森垣憲一）、蛍光・化学発光タンパク質のエンジニアリングによるバイオイメージング用ツール開発（永井健治）、酵母細胞内におけるSup35 プリオンタンパク質の線維状構造の実証（田口英樹）、高濃度蛍光ATPアナログを用いた1分子ATPの加水分解のイメージング（西川宗）などである。

## A03班 構造解析と分子シミュレーション

## 計画研究力 「回転モータートルク発生ユニットの構造基盤」

研究代表 今田勝巳

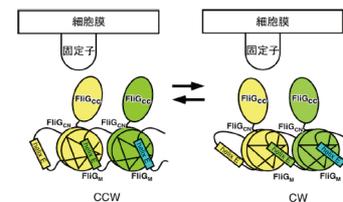
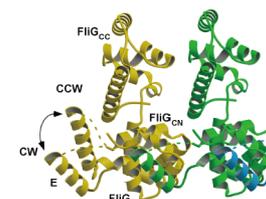
べん毛モーター固定子蛋白質MotYとMotBフラグメントの構造を明らかにし、固定子がモーターへ組み込まれるしくみを明らかにした。また、モーター回転子蛋白質FliG変異体の構造と回転計測から、モーターの反転機構を明らかにした。さらに、輸送装置蛋白質FliIとFliJがF<sub>1</sub>-ATPase 構成蛋白質と同様の構造を持ち、F<sub>1</sub>-ATPaseと同様のFliI<sub>6</sub>-FliJ複合体を形成することを明らかにした。

①**固定子蛋白質MotYの構造**: Naイオン駆動型べん毛モーター固定子蛋白質MotYの構造を2.9Å分解能で解析した。固定子蛋白質では初めての構造である。MotYはモーター基部でMotXと共にTリングを形成する。MotYは2つのドメインから成り、N末ドメインが新規構造であるのに対してC末ドメインは、Palなどのペプチドグリカン結合蛋白質と非常に似ていた。N末ドメインはMotXと基部体へ結合することで、基部体周囲への固定子の組み込みに関わり、C末ドメインは高速回転するNaモーターの固定子ユニットを細胞壁に強固に固定することがわかった。また、ペプチドグリカン結合部位は結晶構造中でdisorderしていた。ペリプラズム中に輸送されたMotXとMotYは複合体を形成しペリプラズム中をさまようが、その間はペプチドグリカンに結合せず、基部体と結合することで初めてペプチドグリカン結合部位はフォールディングし、ペプチドグリカンに固定されると考えられる。

②**水素イオン駆動型モーター固定子蛋白質MotBのペリプラズムフラグメントの構造**: 固定子のモーターへの組み込み及びペプチドグリカンへの固定に働くMotBのペリプラズムフラグメント(MotBc)の構造解析を行い、3種類の結晶について5つの独立なMotBc分子の構造を明らかにした。MotBcは2量体を形成しており、2量体形成を阻害する変異を入れたところ、モーター機能が失われると共に、イオンチャネルを形成する内膜部の構造も変化することが明らかになった。また、MotBcの構造とミュータントの解析から、モーターに組み込まれる際に大きな構造変化が起こり、それがイオンチャネルにプロトンを通すON/OFFとカップルしていることが示唆された。また、モーターに組み込まれた後の構造に対応すると考えられるMotB(L119P)変異体の結晶作成に成功した。

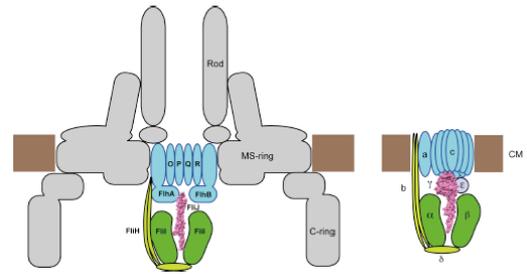
③**Naイオン駆動型モーター固定子蛋白質PomBのペリプラズムフラグメントの構造**: Naイオン駆動型モーターにおいて固定子のモーターへの組み込み及びペプチドグリカンへの固定に働くPomBc(132-315)の構造を2.5 Å分解能で解析した。MotBcと同様の2量体を形成し、N末側に長短2本のヘリックスが存在した。さらに、PomBの機能に重要な122-131の領域を含むPomBc(122-315)の結晶化にも成功し、回折データを収集した。

④**回転子構成蛋白質FliGの構造と回転計測に基づく回転方向スイッチ機構の解明**: 時計回りの回転と反時計回りの回転にバイアスされたモーターの回転ステップ計測を行い、トルク発生の素過程が回転方向によらず対称であることを示した。また、時計回りに回転方向がバイアスされた変異FliGのMCドメインの2.3 Åの構造を解明し、モーターの回転方向がスイッチする分子モデルを提案した。



⑤**固定子蛋白質の機能解析**: 固定子構成蛋白質であるMotAを単独で発現させると、野生株のモーター機能が著しく低下した。その原因はMotAがモーターに組み込まれ、回転子周囲の正常な固定子複合体の数が減少したためであり、MotAがモーター組み込みの機能を持つことが明らかになった。また、MotAの細胞質ループ中の荷電残基が固定子の回転子周囲への組み込みに重要であることを見出した。さらに、pH感受性蛍光蛋白質フルオリンをコードする遺伝子をサルモネラ菌の染色体に組み込んだ。このフルオリン発現株を用いることで、固定子複合体のプロトン透過活性の測定が蛍光変化で容易に行えるようになった。

⑥ **べん毛輸送系モータータンパク質**：X線結晶構造解析から、べん毛輸送装置蛋白質FliIがF<sub>1</sub>-ATPaseのα/βサブユニットと、FliJがF<sub>1</sub>-ATPaseのγサブユニットと著しい類似性を持つことを明らかにした。さらに、FliJとFliIが、F<sub>1</sub>-ATPaseにおけるα,β,γ複合体と同様の構造を持つFliI<sub>6</sub>FliJ複合体を形成することを極低温電子顕微鏡による画像解析から明らかにした。このことから、輸送装置がF<sub>1</sub>-ATPaseと共通の作動機構を持つことが示唆された。また、FliJ変異体の解析からFliI-FliJ複合体がFliJを介してべん毛輸送装置を構成する膜蛋白質と相互作用し、その結果、FliIのATPase活性が著しく上昇することを明らかにした。さらに、べん毛輸送装置の輸送駆動力がATP加水分解エネルギーではなく、水素イオンの濃度差であることを明らかにし、輸送装置とF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>システムとの類似性は、F<sub>0</sub>部分にまで広がる可能性を見出した。



計画研究キ 「分子シミュレーションによるF1分子モーターの化学-力学エネルギー変換機構の解明」

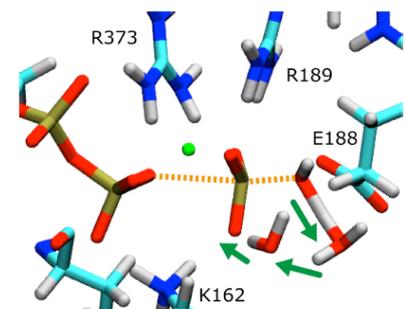
研究代表 林重彦

本研究では、分子シミュレーションの手法を用い、可逆的回転分子モーターである F<sub>1</sub>-ATPase の化学-力学エネルギー変換機構を原子・電子レベルから解明した。まず、ATP 分子の触媒活性及びその制御機構について、ハイブリッド量子力学・分子力学 (QM/MM) 法及び分子動力学 (MD) 法を用いて理論的に解明するとともに、触媒活性を増強する変異酵素の人工設計を行った。また、MD 計算により、モーター動作に関わるタンパク質の構造変化を原子レベルから明らかにした。

① **catalytic dwell 構造における平衡揺らぎの解析**：F<sub>1</sub> 分子モーターの catalytic dwell 構造と考えられている結晶構造を出発点として、α,β,γ サブユニットからなる 3000 残基以上の生体超分子について、周囲の水もすべて含めた 32 万原子以上の MD シミュレーションを 30 ns 以上にわたり遂行した。また、水中における β サブユニット単体の MD シミュレーションも行い、単体の β サブユニットの揺らぎの中に分子モーターの機能に重要な構造変化が内在していることを見出した。この結果は大阪大学・八木グループの NMR 実験による研究結果と整合するものである。この β サブユニットの機能に関わる揺らぎは、α,β,γ の揺らぎの中にも異なるサブユニット間の相関を伴って見出されており、揺らぎと機能の構造変化の密接な関係を示唆している。

② **catalytic dwell 構造における加水分解反応機構の解析**：

F<sub>1</sub> 分子モーターのエネルギー源である ATP 加水分解反応の反応機構を QM/MM 法を用いて解析した。800 基底関数を越える大きな QM 領域を持つ QM/MM 系に対して、反応経路の同定を行った。また、QM/MM 系の初期構造は、上記の MD シミュレーションにより構築した。次頁図に、計算により同定された反応の遷移状態を示す。反応の遷移状態は、従来考えられている γ リン酸の 5 配位構造ではなく、近傍の水分子を通るプロトン移動であることが示された。また、反応の触媒活性は、遷移状態に先立って解離した反応性の高いメタリン酸によりプロトン移動が活性化される連鎖的活性化機構によりもたらされることを明らかにした。さらに、この反応モデルに対する検証実験のデザインを行い、そのデザインに従って行った大阪大学の野地グループによる一分子観察実験により、理論的に予測された反応機構が実証された。また、実証された反応機構で得られた知見に基づき、酵素活性を増強する新規変異体の人工設計を試みた。現在、提案された設計モデルを実験により検証中である。

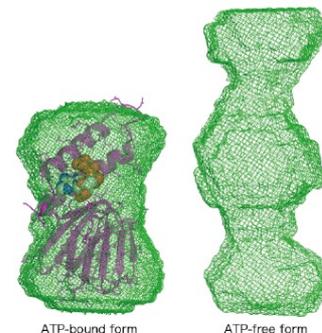


③ **ATP結合時の β サブユニットの構造変化**：分子モーターの力学エネルギー発生の主原因

と考えられる ATP 結合時の  $\beta$  サブユニットの構造変化について、MD シミュレーションにより、構造変化過程の自由エネルギープロファイルを得た。ATP 結合状態と非結合状態の自由エネルギープロファイルの間には顕著な違いが認められ、ATP 結合に伴う構造変化は、典型的な induced fit 型であることを見出した。また、局所的な構造変化を網羅的に調べることにより、ATP 結合と  $\beta$  サブユニット構造変化の相関について、側鎖レベルに至る詳細なメカニズムが明らかになった。

#### ④ $\epsilon$ サブユニットの X 線溶液散乱実験と構造モデリング :

$\epsilon$  サブユニットの ATP 結合に伴う構造変化の詳細を明らかにするために、立教大学の山田グループから提供された  $\epsilon$  サブユニットの試料を用いて、X 線溶液散乱法により ATP 結合型と非結合型の溶液構造を実験的に測定した。その結果、ATP 結合型は X 線結晶構造に相当する散乱が得られたが、非結合型はかなり伸びた構造であることが明らかになった。さらに、分子動力学-X 線小角散乱法を用い、非結合型の原子レベルの構造モデリングを行うことにより、 $\epsilon$  サブユニットの構造変化の分子機構を解明した。



⑤ 水の統計力学理論を用いたタンパク質構造変化と水和の解析 : 京都大学・木下グループと共同で、水の統計力学理論を用いた  $F_1$  分子モーターの解析を行い、MD シミュレーションで観察された  $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニット間の非対称なパッキングとそれに伴う水分子のエントロピー差が分子回転メカニズムにおいて重要な役割を果たしていることを指摘した。

### 公募班の成果

A03班の公募班には、平成19・20年度に7名、平成21・22年度に7名が参加し、活発な研究を行った。主たる成果は、液胞膜の亜鉛輸送体MTP1 および $H^+$ -PPase の構造と機能の解析(前島正義)、一分子時系列情報に基づく革新的モデリング法の確立(李振飈)、多次元固体NMR 法による膜蛋白質pHtrIIの主鎖構造の解析(藤原敏道)、リボソームにおけるtRNA 転位ダイナミクス解析によるリボソームのサブユニットのratchet-like 運動の解明(石田恒)、ハロロドプシンの立体構造解析に基づく塩素イオン輸送機構の解明(井原邦夫)、二量子遷移ESR によるタンパクの構造解析への分子動力学計算の応用(大庭裕範)、計算機実験を援用した蛋白質結晶のX線散漫散乱データ解析理論の構築(城地保昌)、トランスロコンを通過中のポリペプチド鎖の環境解析によるシグナルアンカー配列の膜組み込み過程の解析(木田祐一郎)、分子動力学計算による $F_1F_0$  の回転機構解析(高野光則)、統計力学とベイズ推定の枠組みを用いた隠れた自由度を持つ微小系に対するパラメータ推定の一般的な枠組みの確立(原田崇広)、NMRによるシアノバクテリア時計タンパク質の相互作用の解明(池上貴久)などである。

## 7. 研究成果のとりまとめの状況

本年度、本領域研究は成果取りまとめ予算を受けている。この予算に基づき、以下の活動を予定している。1つ目は、本領域研究の成果に基づき、1分子生物物理学とその周辺分野の今後の方向性を議論する企画シンポジウムである。これらのシンポジウムに基づき、それぞれの分野の将来展望をまとめる。これは、本年度最終的に取りまとめる領域研究最終報告書に掲載する予定である。

### 1. 1分子生物物理学とその周辺分野の新潮流を議論する研究会の企画

#### (ア) 若手研究者企画に基づくシンポジウム

生物物理若手奨励賞を受賞した新進気鋭の若手女性研究者2名に、今後の1分子生物物理学の方向性を議論するシンポジウム企画をお願いした。理論物理、細胞生物学、分子機械化学など本領域研究からさらに視野を広げた方向性を議論する予定である。「異分野融合する1分子計測」というタイトルで国内外の演者によるシンポジウムをH23年度に日本生物物理学会年会で実施する(9月16日予定)。

#### (イ) 超高感度マイクロデバイス開発に関するシンポジウム

国際生物物理学会年会(17<sup>th</sup> International Biophysics Congress)において、超高感度マイクロデバイスとナノバイオ研究に関するシンポジウム(Nanobiophysics)を企画している(11月1日予定)。スウェーデン、アメリカ、韓国、イギリスから第一線の研究者を招待している。ここでは、特に1分子そして1細胞を超高感度に解析するナノバイオ研究の潮流を議論する。

#### (ウ) 計算機に基づく生物分子機械の設計に関する研究会

今後の生体分子機械研究において重要となるアプローチは構成的アプローチであると考えられる。すなわち、これまでの生体分子機械に関する理解を検証しその応用を模索するために、新しい分子機械を実際に設計・作成してその機能を解析するアプローチである。ただし、現況では非常に未開拓分野であるため、理論物理、計算機科学、生物物理、分子機械化学における新進気鋭の研究者を集めた集中的な研究会を予定している。その性格上、公開型のシンポジウムではなく、合宿型のものを予定している(日程未定)。

### 2. 5年間の研究を総括する報告書の刊行

計画研究班と公募班全体の研究成果をふまえ、本領域研究全体を総括する報告書をまとめる予定である。ただし、各研究を全て並列に並べるような総花的なものではなく、国内外の研究者にとって真に閲覧する価値のあるものにするため、重要なポイントに絞って深く掘り下げた報告書の作成を計画している。具体的にはATP合成酵素やべん毛モーターの分子メカニズムや制御メカニズムに関するまとまったレビュー形式を考えている。技術に関しても、国内外の状況を踏まえながら本領域で開発された技術の適応範囲や課題等に関して総括したものを用意する。そして、今後の研究展開に関し、上述の企画シンポジウムや研究会の結果を踏まえて展望を取りまとめる予定である。これらの内容は、まず報告書という形を取るが、積極的に各出版社と連携し、刊行本として発信したいと考える。

## 8. 研究成果の公表の状況

### (1)主な発表論文一覧

#### ● 領域全体で発表した論文数 (334) 報

##### A01 計画研究 野地博行/田端和仁/飯野亮太/井出 徹 (32)

1. Uchihashi, T; Iino, R; Ando, T; [Noji, H](#); High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotor-less F<sub>1</sub>-ATPase, **Science in press**, 2011
2. Ueno, H; Nishikawa, S; Iino, R; Tabata, KV; Sakakihara, S; Yanagida, T; [Noji, H](#); Simple Dark-Field Microscopy with Nanometer Spatial Precision and Microsecond Temporal Resolution, **BIOPHYSICAL JOURNAL**, **98**, 2014-2023,2010,被引用回数7
3. [Ide, T](#); Takeuchi, Y; [Noji, H](#); Tabata, KV; Simultaneous Optical and Electrical Single Channel Recordings on a PEG Glass, **LANGMUIR**, **26**, 8540-8543,2010, 被引用回数0
4. Okuno, D; Ikeguchi, M; [Noji, H](#); Measurement of the Conformational State of F-1-ATPase by Single-Molecule Rotation, **METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL 475: SINGLE MOLECULE TOOLS, PT B, 474**, 279-296,2010, 被引用回数0
5. Watanabe, R; Iino, R; [Noji, H](#); Phosphate Release in F-1-ATPase Catalytic Cycle Follows ADP release, **NATURE CHEMICAL BIOLOGY**, **6**, 814-820,2010, 被引用回数6
6. Okuno, D; Iino, R; [Noji, H](#); Stiffness of Gamma Subunit of F-1-ATPase, **EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS**, **39**, 1589-1596,2010, 被引用回数2
7. Hirono-Hara, Y; [Noji, H](#); [Takeuchi, S](#); Single-Biomolecule Observation with Micro One-Way Valves for Rapid Buffer Exchange, **JOURNAL OF APPLIED PHYSICS**, **105**, 2009, 被引用回数1
8. Iino, R; Hasegawa, R; Tabata, KV; [Noji, H](#); Mechanism of Inhibition by C-Terminal Alpha-Helices of the Epsilon Subunit of Escherichia Coli FoF<sub>1</sub>-ATP Synthase, **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, **284**, 17457-17464,2009, 被引用回数10
9. Enoki, S; Watanabe, R; Iino, R; [Noji, H](#); Single-Molecule Study on the Temperature-Sensitive Reaction of F-1-ATPase with a Hybrid F-1 Carrying a Single Beta(E190D), **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, **284**, 23169-23176,2009, 被引用回数7
10. Imamura, H; Nhat, KPH; Togawa, H; Saito, K; Iino, R; Kato-Yamada, Y; Nagai, T; [Noji, H](#); Visualization of ATP Levels Inside Single Living Cells with Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Genetically Encoded Indicators, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, **106**, 15651-15656,2009, 被引用回数19
11. Iko, Y; Tabata, KV; Sakakihara, S; Nakashima, T; [Noji, H](#); Acceleration of the ATP-Binding Rate of F-1-ATPase by Forcible Forward Rotation, **FEBS LETTERS**, **583**, 3187-3191,2009, 被引用回数4
12. Tabata, KV; [Sato, K](#); [Ide, T](#); Nishizaka, T; Nakano, A; [Noji, H](#); Visualization of Cargo Concentration by COPII Minimal Machinery in a Planar Lipid Membrane, **EMBO JOURNAL**, **28**, 3279-3289, 2009, 被引用回数7

##### A01 計画研究 久堀 徹/山田康之/榊野宏記/八木宏昌 (13)

1. Imashimizu, M; Bernat, G; Sunamura, EI; Broekmans, M; Konno, H; Isato, K; Rögner, M; [Hisabori, T](#); Regulation of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase from Synechocystis Sp. PCC 6803 by the  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits is Significant for Light/Dark Adaptation, **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, 2011 [Epub ahead of print],被引用回数0
2. Kadoya, F; Kato, S; Watanabe, K; [Kato-Yamada, Y](#); ATP Binding to the  $\epsilon$  subunit of Thermophilic ATP Synthase is Crucial for Efficient Coupling of ATPase and H<sup>+</sup> Pump Activities, **BIOCHEMICAL JOURNAL**, **437**, 1, 135-140, 2011, 被引用回数0
3. Konno, H; Iku, A; Kim, Y; Murakami-Fuse, T; Sugano, Y; [Hisabori, T](#); Characterization of the Relationship Between ADP-Inhibition and  $\epsilon$ -inhibition in Cyanobacterial F<sub>1</sub>-ATPase, **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, **286**, 13423-13429, 2011, 被引用回数0
4. Kim, Y; Konno, H; Sugano, Y; [Hisabori, T](#); Redox Regulation of Rotation of the Cyanobacterial F<sub>1</sub>-ATPase Containing Thiol Regulation Switch, **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, **286**, 9071-9078, 2011, 被引用回数0
5. Haruyama, T; Hirono-Hara, Y; [Kato-Yamada, Y](#); Inhibition of Thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase by the  $\epsilon$  Subunit Takes Different Path from the ADP-Mg Inhibition, **BIOPHYSICS**, **6**, 59-65, 2010, 被引用回数0
6. Yagi, H; Konno, H; Murakami-Fuse, T; Iku, A; Oroguchi, T; Akutsu, H; Ikeguchi, M; [Hisabori, T](#); Structural and Functional Analysis of the Intrinsic Inhibitor Subunit  $\epsilon$  of F<sub>1</sub>-ATPase from Photosynthetic Organisms, **BIOCHEMICAL JOURNAL**, **425** 85-94, 2010, 被引用回数1
7. Sunamura, E; Konno, H; Imashimizu-Kobayashi, M; Sugano, Y; [Hisabori, T](#); Physiological Impact of Intrinsic ADP Inhibition of Cyanobacterial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> Conferred by the Inherent Sequence Inserted into the  $\gamma$  Subunit, **PLANT AND CELL PHYSIOLOGY**, **51**, 855-865, 2010, 被引用回数1
8. Feniouk, BA; [Kato-Yamada, Y](#); [Yoshida, M](#); Suzuki, T; Conformational Transitions of Subunit  $\epsilon$  in ATP Synthase from Thermophilic Bacillus PS3, **BIOPHYSICAL JOURNAL**, **98**, 3, 434-442, 2010, 被引用回数2
9. Yasuno, T; Muneyuki, E; Yoshida, M; [Kato-Yamada, Y](#); Modulation of Nucleotide Binding to the Catalytic Sites of Thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase by the  $\epsilon$  Subunit: Implication for the Role of the  $\epsilon$  Subunit in ATP Synthesis, **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, **390**, 2, 230-234, 2009, 被引用回数1
10. Imamura, H; Nhat, KPH; Togawa, H; Saito, K; Iino, R; Kato-Yamada, Y; Nagai, T; [Noji, H](#); Visualization of ATP Levels Inside Single Living Cells with Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Genetically Encoded Indicators, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, **106**, 37, 2009, 被引用回数19
11. Meiss, E; Konno, H; Groth, G; [Hisabori, T](#); Molecular Processes of Inhibition and Stimulation of ATP Synthase, **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, **283**, 24594-24599, 2008, 被引用回数7
12. Kato, S; Yoshida, M; [Kato-Yamada, Y](#); Role of the  $\epsilon$  Subunit of Thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase as a Sensor for ATP, **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, **282**, 52, 37618-37623, 2007, 被引用回数9
13. Yagi, H; Kajiwara, N; Tanaka, H; Tsukihara, T; [Kato-Yamada, Y](#); Yoshida, M; Akutsu, H; Structures of the Thermophilic F<sub>1</sub>-ATPase  $\epsilon$  Subunit Suggesting ATP-Regulated Arm Motion of its C-Terminal Domain in F<sub>1</sub>, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, **104**, 27, 11233-11238, 2007, 被引用回数17
14. Iizuka, S; Kato, S; Yoshida, M; [Kato-Yamada, Y](#);  $\gamma\epsilon$  Sub-Complex of Thermophilic ATP Synthase Has the Ability to Bind ATP, **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, **349**, 4, 1368-1371, 2006, 被引用回数4

##### A01 計画研究 本間道夫/小嶋誠司/滝口金吾/柿沼喜也/村田武士 (26)

1. Hosogi, N; Hgematsu, H; Terashima, H; [Oma, M](#); Nagayama, K; Zernike Phase Contrast Cryo-Electron Tomography of Sodium-Driven Flagellar Hook-Basal Bodies from Vibrio Alginolyticus, **J. STRUCT. BIOL.**, **173**, 67-76, 2011,被引用回数0
2. Terashima, H; [Kojima, S](#); [Homma, M](#); Functional Transfer of an Essential Aspartate for the Ion Binding Site in the Stator Proteins of the Bacterial Flagellar Motor, **J. MOL. BIOL.**, **97**, 3, 689-696, 2010, 被引用回数0
3. [Kojima, S](#); Imada, K; Sakuma, M; Sudo, Y; [Kojima, C](#); Minamino, T; [Homma, M](#); Namba, K; Stator Assembly and Activation Mechanism of the Flagellar Motor by the Periplasmic Region of MotB, **MOL. MICROBIOL.**, **73**, 4, 710-718, 2009,被引用回数11
4. Sudo, Y; Kitade, Y; Furutani, Y; [Kojima, M](#); [Kojima, S](#); [Homma, M](#); [Kandori, H](#); Interaction Between Na<sup>+</sup> Ion and Carboxylates of the PomA-PomB Stator Unit Studied by ATR-FTIR Spectroscopy, **BIOCHEMISTRY**, **4**, 49, 11699-11705, 2009, 被引用回数4
5. Ohno, M; Hamada, T; [Takiguchi, K](#); [Homma, M](#); Dynamic Behavior of Giant Liposomes at Desired Osmotic Pressures, **LANGMUIR**, **25**, 19, 11680-11685, 2009, 被引用回数1
6. Hizukuri, Y; [Yakushi, T](#); Kawagishi, I; [Homma, M](#); Role of the Intramolecular Disulfide Bond in Flgl, the Flagellar P-ring Component of Escherichia Coli, **J. BACTERIOL.**, **188**, 12, 4190-4197, 2006, 被引用回数8
7. Fukuoka, H; Wada, T; [Kojima, S](#); [Ishijima, A](#); [Homma, M](#); Sodium-Dependent Dynamic Assembly of Membrane Complexes in Sodium-Driven Flagellar Motors, **MOL. MICROBIOL.**, **71**, 4, 825-835, 2009, 被引用回数16
8. Inoue, Y; Lo, C.J; Fukuoka, H; Takahashi, H; Sowa, Y; Pilizota, T; Wadhams, G.H; [Homma, M](#); Berry, R.M; [Ishijima, A](#); Torque-Speed Relationships of Na<sup>+</sup>-Driven Chimeric Flagellar Motors in Escherichia Coli, **J. MOL. MICROBIOL.**, **376**, 5, 1251-1259, 2008, 被引用回数14
9. Terashima, H; [Kojima, S](#); [Homma, M](#); Flagellar Motility in Bacteria Structure and Function of Flagellar Motor, **INT. REV. CELL. MOL. BIOL.**, **270**, 39-85, 2008, 被引用回数16
10. Terashima, H; Abe-Yoshizumi, R; [Kojima, S](#); [Homma, M](#); Cell-Free Synthesis of the Torque-Generating Membrane Proteins, PomA and PomB, of the Na<sup>+</sup>-driven Flagellar Motor in Vibrio Alginolyticus, **J. BIOCHEM.**, **144**, 5, 635-642, 2008, 被引用回数4
11. Obara, M; [Yakushi, T](#); [Kojima, S](#); [Homma, M](#); Roles of Charged Residues in the C-Terminal Region of PomA, a Stator Component of the Na<sup>+</sup>-Driven Flagellar Motor, **J. BACTERIOL.**, **190**, 10, 3565-3571, 2008, 被引用回数3
12. Fukuoka, H; Sowa, Y; [Kojima, S](#); [Ishijima, A](#); [Homma, M](#); Visualization of Functional Rotor Proteins of the Bacterial Flagellar Motor in the Cell Membrane, **J. MOL. BIOL.**, **367**, 3, 692-701, 2007, 被引用回数11
13. Shiomi, D; Yoshimoto, M; [Homma, M](#); [Kawagishi, I](#); Helical Distribution of the Bacterial Chemoreceptor Via Co-Localization with the Sec Protein Translocation Machinery, **MOL. MICROBIOL.**, **60**, 4, 894-906, 2006, 被引用回数4
14. [Yonekura, K](#); [Yakushi, T](#); [Atsumi, T](#); [Maki-Yonekura, S](#); [Homma, M](#); Namba, K; Electron Cryomicroscopic Visualization of PomA/B Stator Units of the Sodium-Driven Flagellar Motor in Liposomes, **J. MOL. BIOL.**, **357**, 73-81, 2006, 被引用回数9
15. [Yakushi, T](#); [Yang, J](#); [Fukuoka, H](#); [Homma, M](#); [Blair D. F](#); Roles of Charged Residues of Rotor and Stator in Flagellar Rotation, **COMPARATIVE STUDY USING H<sup>+</sup>-DRIVEN AND N<sup>+</sup>-DRIVEN MOTORS IN ESCHERICHIA COLI**, **J. BACTERIOL.**, **188**, 4, 1466-1472, 2006, 被引用回数16

##### A01 公募 上村想太郎 (5)

1. [Uemura, S](#); Aitken, CE; Korlach, J; Flusberg, BA; Turner, SW; [Puglisi, JD](#); Real-Time tRNA Transit on Single Translating Ribosomes at Codon Resolution, **NATURE**, **464**, 1012-1017, 2010, 被引用回数22

2. Uemura, S; Iizuka, R; Ueno, T; Shimizu, Y; Taguchi, H; Ueda, T; \*Puglisi, JD; \*Funatsu, T, Single Molecule Imaging of Full Protein Synthesis by Immobilized Ribosomes, **NUCLEIC ACIDS RESEARCH**, **36**, e70, 2008, 被引用回数11
3. Uemura, S; Dorywalska, M; Lee, TH; Kim, HD; Puglisi JD; \*Chu, S, Peptide Bond Formation Destabilizes Shine-Dalgarno Interaction on The Ribosome, **NATURE**, **446**, 454-457, 2007, 被引用回数42
- A01 公募 福岡 創 (5)**
1. Terasawa, S; Fukuoka, H; Inoue, Y; Sagawa, T; Takahashi, H; \*Ishijima, A, Coordinated Reversal of Flagellar Motors on a Single Escherichia coli Cell, **BIOPHYSICAL JOURNAL**, **100**, 2192-2200, 2011, 被引用回数0.  
Terasawa, S, and Fukuoka, H contributed Equally to This Work.
2. Fukuoka, H; Inoue, Y; Terasawa, S; Takahashi, H; \*Ishijima, A, Exchange of Rotor Components in Functioning Bacterial Flagellar Motor, *Biochem Biophys Res Commun*, **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, **394**, 130-135, 2010, 被引用回数7
3. Fukuoka, H; Wada, T; Kojima, S; Ishijima, A; \*Homma, M, Sodium-Dependent Dynamic Assembly of Membrane Complexes in Sodium-Driven Flagellar Motors, **MOLECULAR MICROBIOLOGY**, **71**, 825-835, 2009, 被引用回数17
- A01 公募 前島正義 (33)**
1. \*Martinoia, E; Maeshima, M; Neuhaus, E. Vacuolar Transporters and Their Essential Role in Plant Metabolism, **JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY**, **58**, 83, 2007, 被引用回数89
2. Kawachi, M; Kobae, Y; Mimura, T; \*Maeshima, M, Deletion of a Histidine-Rich Loop of AtMTP1, a Vacuolar Zn<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter of Arabidopsis Thaliana, Stimulates the Transport Activity, **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, **283**, 8374, 2008, 被引用回数15
3. Hirono, M; \*Maeshima, M, Functional Enhancement by Single-Residue Substitution of Streptomyces Coelicolor A3(2) H<sup>+</sup>-Translocating Pyrophosphatase, **JOURNAL OF BIOCHEMISTRY**, **145**, 617, 2009, 被引用回数0
- A01 公募 三留規誓 (1)**
1. Mitome, N; Ono, S; Sato, H; Suzuki, T; Sone, N; \*Yoshida, M, Essential Arginine Residue of the F<sub>0</sub>-a Subunit in FoF<sub>1</sub>-ATP Synthase Has a Role to Prevent the Proton Shortcut Without C-Ring Rotation in the F<sub>0</sub> Proton Channel, **BIOCHEMICAL JOURNAL**, **430**, 171-177, 2010, 被引用回数4
- A01 公募 森 博幸 (2)**
1. \*Tsukazaki, T; \*Mori, H; Echizen, Y; Ishitani, R; Fukai, S; Tanaka, T; Perederina, A; Vassilyev, DG; Kohno, T; Matsuura, A; \*Ito, K; \*Nureki O, Structure and Function of a Membrane Component SecDF That Enhances Protein Export, **NATURE**, **474**, 235, 2011, \*These authors contributed equally to this work, 被引用回数0
2. \*Tsukazaki, T; \*Mori, H; Fukai, S; Ishitani, R; Mori, T; Dohmae, N; Perederina, A; Sugita, Y; Vassilyev, DG; \*Ito, K; \*Nureki O, Conformational Transition of Sec Machinery Inferred from Bacterial SecYE Structures, **NATURE**, **455**, 988, 2008, \*These authors contributed equally to this work, 被引用回数52
- A01 公募 古谷祐嗣/神取秀樹 (29)**
1. Eurutani, Y; Murata, T; \*Kandori, H, Sodium or Lithium Ion-Binding-Induced Structural Changes in the K-Ring of V-ATPase from Enterococcus Hirae Revealed by ATR-FTIR Spectroscopy, **JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, **133**, 2860-2863, 2011, 被引用回数0
2. Sudo, Y; Kitade, Y; Eurutani, Y; Kojima, M; Kojima, S; Homma, M; \*Kandori, H, Interaction Between Na<sup>+</sup> Ion and Carboxylates of the PomA-PomB Stator Unit Studied by ATR-FTIR Spectroscopy, **BIOCHEMISTRY**, **48**, 11699-11705, 2009, 被引用回数4
3. Lórenz-Fonfría, VA; Furutani, Y; \*Kandori, H, Active Internal Waters in the Bacteriorhodopsin Photocycle. A Comparative Study of the L and M Intermediates at Room and Cryogenic Temperatures by Infrared Spectroscopy, **BIOCHEMISTRY**, **47**, 4071-4081, 2008, 被引用回数22
- A01 公募 竹内正之 (20)**
1. Ogi, S; Ikeda, T; Wakabayashi, R; Shinkai, S; \*Takeuchi, M, Bevel Gear-Shaped Rotor Bearing a Double-Decker Porphyrin Complex, **CHEM. EUR. J**, **16**, 8285-8290, 2010, 被引用回数3
2. Wakabayashi, R; Ikeda, T; Kubo, Y; Shinkai, S; \*Takeuchi, M, Unexpected Effects of Terminal Olefins on Cooperative Recognition System Implicate Olefin-Olefin Interaction, **ANGEW. CHEM. INT. ED**, **48**, 6667-6670, 2009, 被引用回数2
3. Takebayashi, S; Ikeda, M; Shinkai, S; \*Takeuchi, M, Metal Ion Induced Allosteric Transition in the Catalytic Activity of an Artificial Phosphodiesterase, **ORG. BIOMOL. CHEM.**, **6**, 493-499, 2008, 被引用回数8
- A01 公募 村田武士 (8)**
1. Yuji, Furutani; Murata, T; \*Kandori, H, Sodium or Lithium Ion-Binding-Induced Structural Changes in the K-Ring of V-ATPase from Enterococcus Hirae Revealed by ATR-FTIR Spectroscopy, **JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, **133**, 2860-2863, 2011, 被引用回数0
2. Arai, S; Yamato, I; Shiohara, A; Saijo, S; Kakinuma, Y; Ishizuka-Katsura, Y; Toyama, M; Terada, T; Shirouzu, M; Yokoyama, S; Iwata, S; \*Murata, T, Reconstitution in Vitro of the Catalytic Portion (NtpA3-B3-D-G Complex) of Enterococcus Hirae V-Type Na<sup>+</sup>-ATPase, **BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN**, **390**, 698-702, 2009, 被引用回数1
3. Yamamoto, M; Unzai, S; Saijo, S; Ito, K; Mizutani, K; Suno-Ikeda, C; Yabuki-Miyata, Y; Terada, T; Toyama, M; Shirouzu, M; Kobayashi, T; Kakinuma, Y; Yamato, I; Yokoyama, S; Iwata, S; \*Murata, T, Interaction and Stoichiometry of the Peripheral Stalk Subunits NtpE and NtpF and the N-Terminal Hydrophilic Domain of NtpI of Enterococcus Hirae V-ATPase, **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, **283**, 19422-19431, 2008, 被引用回数12
- A01 公募 藤原敏道 (3)**
1. Kobayashi, M; Struts, A; Fujiwara, T; Brown, M; Akutsu, H, Fluid Mechanical Matching of H<sup>+</sup>-ATP Synthase Subunit c Ring with Lipid Membranes Revealed by <sup>1</sup>H Solid-State NMR, **BIOPHYS. J**, **94**, 4339-4347 (2008), 被引用回数0
2. Todokoro, Y; Kobayashi, M; Sato, T; Kawakami, T; Yumen, I; Aimoto, S; Fujiwara, T; Akutsu, H, Structure Analysis of Membrane-Reconstituted Subunit C-ring of E. Coli H<sup>+</sup>-ATP Synthase by Solid-State NMR Under MAS, **J. BIOMOL. NMR**, **48**, 1-11 (2010), 被引用回数0
3. Ikeda, K; Kameda, T; Harada, E; Akutsu, H; Fujiwara, T, Combined Use of Replica-Exchange Molecular Dynamics and Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR Spectral Simulations for Determining the Structure and Orientation of Membrane-Bound Peptide, **J. PHYS. CHEM. B**, in press 2011, 被引用回数0
- A01 公募 古谷祐嗣/神取秀樹 (29)**
1. Eurutani, Y; Murata, T; \*Kandori, H, Sodium or Lithium Ion-Binding-Induced Structural Changes in the K-ring of V-ATPase from Enterococcus Hirae Revealed by ATR-FTIR Spectroscopy, **JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, **133**, 2860-2863, 2011, 被引用回数0
2. Sudo, Y; Kitade, Y; Eurutani, Y; Kojima, M; Kojima, S; Homma, M; \*Kandori, H, Interaction between Na<sup>+</sup> ion and Carboxylates of the PomA-PomB Stator unit Studied by ATR-FTIR Spectroscopy, **BIOCHEMISTRY**, **48**, 11699-11705, 2009, 被引用回数4
3. Lórenz-Fonfría, VA; Furutani, Y; \*Kandori, H, Active Internal Waters in the Bacteriorhodopsin Photocycle. A Comparative Study of the L and M Intermediates at Room and Cryogenic Temperatures by Infrared Spectroscopy, **BIOCHEMISTRY**, **47**, 4071-4081, 2008, 被引用回数22
- A01 公募 寺内一雄 (5)**
1. Murayama, Y; Mukaiyama, A; Imai, K; Onoue, Y; Tsunoda, A; Nohara, A; Ishida, T; Maeda, Y; Terauchi, K; Kondo, T; \*Akiyama, S, Tracking and Visualizing the Circadian Ticking of the Cyanobacterial Clock Protein KaiC in Solution, **EMBO JOURNAL**, **30**, 68-78, 2011, 被引用回数0
2. Kitayama, Y; Nishiwaki, T; Terauchi, K; \*Kondo, T, Dual KaiC-based Oscillations Constitute the Circadian System of Cyanobacteria, **GENES & DEVELOPMENT**, **22**, 1513-1521, 2008, 被引用回数38
3. Terauchi, K; Kitayama, Y; Nishiwaki, T; Miwa, K; Murayama, Y; Oyama, T; \*Kondo, T, ATPase Activity of KaiC Determines the Basic Timing for Circadian Clock of Cyanobacteria, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, **104**, 16377-16381, 2007, 被引用回数36
- A01 公募 寿野良二 (1)**
1. Watanabe, Y; Nakazaki, Y; Suno, R; \*Yoshida, M, "Stability of the Two Wings of the Coiled Coil Domain of ClpB Chaperone is Critical for Its Disaggregation Activity," **Biochemical J**, **421**, 71-7, 2009, 被引用回数7
- A01 公募 森垣憲一/今石浩正 (9)**
1. Okazaki, T; Tatsu, Y; \*Morigaki, K, Phase Separation of Lipid Microdomains Controlled by Polymerized Lipid Bilayer Matrices, **LANGMUIR**, **26**, 4126-4129, 2010, 被引用回数1
2. \*Tawa K; Morigaki, K, In Situ Imaging of Micropatterned Phospholipid Membranes by Surface Plasmon Fluorescence Microscopy, **COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES**, **81**, 447-451, 2010, 被引用回数0
3. Watanabe, K; Miyazaki, R; Terakado, G; Okazaki, T; Morigaki, K; \*Kano, H, High Resolution Imaging of Patterned Model Biological Membranes by Localized Surface Plasmon Microscopy, **APPLIED OPTICS**, **49**, 887-891, 2010, 被引用回数2
- A01 公募 西山雅祥 (2)**
1. \*Nishiyama, M; Kimura, Y; Nishiyama, Y; Terazima, M, Pressure-Induced Changes in the Structure and Function of the Kinesin-Microtubule Complex, **BIOPHYSICAL JOURNAL**, **96**, 1142-1150, 2010, 被引用回数4
2. \*Nishiyama, M; Shimoda, Y; Hasumi, M; Kimura, Y; Terazima, M, Microtubule Depolymerization at High Pressure, **ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, **1189**, 86-90, 2010, 被引用回数0
- A01 公募 薬師寿治 (7)**
1. Hizukuri, Y; Morton, J.F; Yakushi, T; Kojima, S; \*Homma, M, The Peptidoglycan-Binding (PGB) Domain of the Escherichia Coli Pal Protein can also Function as the PGB Domain in E. Coli Flagellar Motor Protein MotB, **JOURNAL OF BIOCHEMISTRY**, **146**, 219-229, 2009, 被引用回数7
2. Kojima, S; Shinohara, A; Terashima, H; Yakushi, T; Sakuma, M; Homma, M; Namba, K; \*Imada, K, Insights into the Stator Assembly of the Vibrio Flagellar Motor from the Crystal Structure of MotY, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, **105**, 7696-7701, 2008, 被引用回数16
3. Hizukuri, Y; Kojima, S; Yakushi, T; Kawagishi, I; \*Homma, M, Systematic Cys Mutagenesis of FliG, the Flagellar P-ring Component of Escherichia Coli, **MICROBIOLOGY**, **154**, 810-817, 2008, 被引用回数3

**A01 公募 宮田真人 (7)**

1. Nakane, D; Adan-Kubo, J; Kenri, T; Miyata, M, Isolation and Characterization of P1 Adhesin, a Leg Protein of the Gliding Bacterium *Mycoplasma pneumoniae*, **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, **193**, 715-722, 2011, 被引用回数0
2. Miyata, M, Unique Centipede Mechanism of *Mycoplasma* Gliding, **ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY**, **64**, 519-537, 2010, 被引用回数1
3. Chen, J; Neu, J; Miyata, M; \*Oster, G, Motor-Substrate Interactions in *Mycoplasma* Motility Explains Non-Arrhenius Temperature Dependence, **BIOPHYSICAL JOURNAL**, **97**, 2930-2938, 2009, 被引用回数4

**A01 公募 横山 (7)**

1. Furuike, S; Nakano, M; Adachi, K; Noji, H; \*Kinoshita Jr.K; and \*Yokoyama, K, Resolving Stepping Rotation in *Thermus Thermophilus* H<sup>+</sup>-ATPase/Synthase with An Essentially Drag Free Probe. **NATURE COMMUNICATIONS**, **2**, 233-239, 2011, 被引用回数0
2. Maher, M.J; Akimoto, S; Iwata, M; Nagata, K; Hori, Y; Yoshida, M; Yokoyama, S; \*Iwata, S; \*Yokoyama, K, Crystal Structure of A3B3 Complex of V-ATPase From *Thermus Thermophilus*. **EMBO JOURNAL**, **28**, 3771-3779, 2009, 被引用回数7
3. Jormakka, M; Yokoyama, K; Yano, T; Tamakoshi, M; Akimoto, S; Shimamura, T; Curmi, P; and \*Iwata, S, **NATURE STRUCTURAL AND MOLECULAR BIOLOGY**, **15**, 730-737, 2008, 被引用回数 19

**A02 計画研究 西坂崇之/政池知子 (19)**

1. Tsuji, T; Kawai-Noma, S; Pack, CG; Terajima, H; Yajima, J; Nishizaka, T; Kinjo, M; Taguchi, H, Single-Particle Tracking of Quantum Dot-Conjugated Prion Proteins Inside Yeast Cells. **BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN**, **405**, 638-43, 2011, 被引用回数 0
2. Nishizaka, T, Molecular Bio-Motors in Living Cells. **ADV BIOCHEM ENG BIOTECHNOL**, **119**, 3-15, 2010, 被引用回数0
3. Tabata, KV; Sato, K; Ide, T; Nishizaka, T; Nakano, A; Noji, H, Visualization of Cargo Concentration by COPII Minimal Machinery in a Planar Lipid Membrane. **EMBO JOURNAL**, **28**, 3279-89, 2009, 被引用回数 7
4. Yajima, J; Mizutani, K; Nishizaka, T, A Torque Component Present in Mitotic Kinesin Eg5 Revealed by Three-Dimensional Tracking. **NAT. STRUCT. MOL. BIOL.**, **15**, 1119-21, 2008, 被引用回数 10
5. Mसाaike, T; Koyama-Horibe, F; Oiwa, K; Yoshida, M; Nishizaka, T, Cooperative Three-Step Motions in Catalytic Subunits of F<sub>1</sub>-ATPase Correlate with 80° and 40° Substep Rotations. **NAT. STRUCT. MOL. BIOL.**, **15**, 1326-33, 2008, 被引用回数 23
6. Nishizaka, T; Mizutani, K; Mसाaike, T, Single-Molecule Observation of Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase Through Microbeads. **METHODS MOL. BIOL.**, **392**, 171-82, 2007, 被引用回数 不明
7. Nishizaka, T; Mसाaike, T, Advanced Method for Single Molecule Imaging: Application to Rotary Molecular Motor. **TANPAKUSHITSU KAKUSAN KOSO**, **52**, 317-22, 2007, 被引用回数 不明
8. Muneyuki, E; Watanabe-Nakayama, T; Suzuki, T; Yoshida, M; Nishizaka, T; Noji, H, Single Molecule Energetics of F<sub>1</sub>-ATPase Motor. **BIOPHYS JOURNAL**, **92**, 1806-12, 2007, 被引用回数 5
9. Adachi, K; Oiwa, K; Nishizaka, T; Furuike, S; Noji, H; Itoh, H; Yoshida, M; Kinoshita, K, Jr., Coupling of Rotation and Catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase Revealed by Single-Molecule Imaging and Manipulation. **CELL**, **130**, 309-21, 2007, 被引用回数 87

**A02 計画研究 竹内昌治/糸行英朗 (27)**

1. Takinoue, M; Onoe, H; Takeuchi, S, Fusion and Fission Control of Picoliter-Sized Microdroplets for Changing The Solution Concentration of Microreactors, **SMALL**, vol. 6(21), pp. 2374-2377, 2010, 被引用回数1
2. Kawano, R; Osaki, T; Sasaki, H; Takeuchi, S, A Polymer-Based Nanopore-Integrated Microfluidic Device for Generating Stable Bilayer Lipid Membranes, **SMALL**, vol. 6(19), pp. 2100-2104, 2010, 被引用回数2
3. Hara, Y; Noji, H; Takeuchi, S, Single-Biomolecule Observation with Micro One-Way Valves for Rapid Buffer Exchange. **JOURNAL OF APPLIED PHYSICS**, vol. 105, pp. 102016-1-6, 2009, 被引用回数1
4. Mori, N; Kuribayashi, K; Takeuchi, S, Artificial Flagellates: Analysis of Advancing Motions of Biflagellate Micro-Objects, **APPLIED PHYSICS LETTERS**, vol. 96, p. 083701, 2010, 被引用回数1
5. Osaki, T; Suzuki, H; LePiouffe, B; Takeuchi, S, Multichannel Simultaneous Measurements of Single Molecule Translocation in  $\alpha$ -Hemolysin Nanopore Array, **ANALYTICAL CHEMISTRY**, vol. 81, no. 24, pp. 9866-9870, 2009, 被引用回数7
6. Ota, S; Yoshizawa, S; Takeuchi, S, "Microfluidic Formation of Monodisperse, Cell-Sized and Unilamellar Vesicles", **ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION**, vol. 48, pp. 6533-6537, 2009, 被引用回数10
7. Suzuki, H; Lepiouffe, B; Takeuchi, S, 96-Well Parallel Ion Channel Recording Chip Fabricated by Hybrid Stereolithography, **BIOMEDICAL MICRODEVICES**, vol. 11, pp. 17-22, 2009, 被引用回数8
8. Suzuki, H; Takeuchi, S, Microtechnologies for Membrane Protein Studies, **ANALYTICAL AND BIONALYTICAL CHEMISTRY**, vol. 391, no. 8, pp. 2695-2702, 2008, 被引用回数11
9. Lam, L; Sakakihara, S; Ishizuka, K; Takeuchi, S; Noji, H\*, An Integrated System for Enzymatic Cleavage and Electrostretching of Freely-Suspended Single DNA Molecules, **LAB ON A CHIP**, vol. 7, pp. 1738 - 1745, 2007, 被引用回数7
10. Tan, W-H.; Takeuchi, S, Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation, **ADVANCED MATERIAL**, vol. 19, pp. 2696-2701, 2007, 被引用回数64
11. Le Piouffe, B; Suzuki, H; Tabata, K; Noji, H; Takeuchi, S, Lipid Bilayer Microarray for Parallel Recording of Transmembrane Ion Currents, **ANALYTICAL CHEMISTRY**, vol. 80, pp. 328-332, 2008, 被引用回数18
12. Funakoshi, K; Suzuki, H; Takeuchi, S, Formation of Giant Lipid Vesicle-Like Compartments From a Planar Lipid Membrane by a Pulsed Jet Flow, **JOURNAL OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, vol. 129, pp. 12608-12609, 2007, 被引用回数21
13. Lam, L; Sakakihara, S; Ishizuka, K; Takeuchi, S; Noji, H\*, An Integrated System for Enzymatic Cleavage and Electrostretching of Freely-Suspended Single DNA Molecules, **LAB ON A CHIP**, vol. 7, pp. 1738 - 1745, 2007, 被引用回数7
14. Tan, W-H.; Takeuchi, S, Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation, **ADVANCED MATERIAL**, vol. 19, pp. 2696-2701, 2007, 被引用回数64
15. Tan, W-H.; Takeuchi, S, A Trap-and-Release Integrated Microfluidic System for Dynamic Microarray Applications, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE**, vol. 104, no. 4, pp. 1146-1151, 2007, 被引用回数63
16. Atsuta, K; Suzuki, H; Takeuchi, S, A Parylene Lift-off Process with Microfluidic Channels for Selective Protein Patterning, **JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING**, vol. 17, pp. 496-500, 2007, 被引用回数9
17. Suzuki, H; Tabata, VK; , Noji, H; Takeuchi, S, Electrophysiological Recordings of Single Ion Channels in Planar Lipid Bilayers Using a Polymethyl Methacrylate Microfluidic Chip, **BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS**, vol. 22, pp. 1111-1115, 2007, 被引用回数22
18. Toyabe, S; Sagawa, T; Ueda, M; Muneyuki, E; \*Sano, M., Experimental Demonstration of Information-to-Energy Conversion And Validation of The Generalized Jarzynski Equality. **NAT. PHYS.** **6**, 988-992, 2010, 被引用回数8
19. Toyabe, S; Okamoto, T; Watanabe-Nakayama, T; Taketani, H; Kudo, S; \*Muneyuki, E., Nonequilibrium Energetics of a Single F-1-ATPase Molecule. **PHYS. REV. LETT.** **104**, 2010, 被引用回数6
20. \*Muneyuki, E; Sekimoto, K., Allosteric model of an ion pump. **PHYS. REV. E Part** **181**, 2010, 被引用回数0
21. Shimo-Kon, R; Muneyuki, E; Sakai, H; Adachi, K; Yoshida, M; \*Kinoshita, K., Chemo-Mechanical Coupling in F-1-ATPase Revealed by Catalytic Site Occupancy during Catalysis. **BIOPHYS. J.** **98**, 1227-1236, 2010, 被引用回数4

**A02 公募 井上裕一 (3)**

1. Okuro, K; Kinbara, K; Takeda, K; Inoue, Y; Ishijima, A; \*Aida, T, Adhesion Effects of a Guanidinium Ion Appended Dendritic "Molecular Glue" on the ATP-Driven Sliding Motion of Actomyosin, **ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION**, **49**, 3030-3033, 2010, 被引用回数1
2. Fukuoka, H; Inoue, Y; Terasawa, S; Takahashi, H; \*Ishijima, A, Exchange of rotor components in functioning bacterial flagellar motor, **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, **394**, 130-135, 2010, 被引用回数6
3. Nishiyama, S; Ohno, S; Ohta, N; Inoue, Y; Fukuoka, H; Ishijima, A; \*Kawagishi, I, Thermosensing Function of the Escherichia Coli Redox Sensor Aer, **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, **192**, 1740-1743, 2010, 被引用回数1

**A02 公募 内橋貴之 (8)**

1. Shibata, M; Uchihashi, T; Yamashita, H; Kandori, \*H; Ando, Structural Changes in Bacteriorhodopsin in Response to Alternate Illumination Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy, **ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION**, **50**, 4410-4413, 2011, 被引用回数0
2. Shibata, M; Yamashita, H; Uchihashi, T; Kandori, \*H; Ando, High-Speed Atomic Force Microscopy Shows Dynamic Molecular Processes in Photo-Activated Bacteriorhodopsin, **NATURE NANOTECHNOLOGY**, **5**, 208-212, 2010, 被引用回数14
3. Yamashita, H; Voitchevsky, K; Uchihashi, T; Contera, S. A; Ryan, J. F.; \*Ando, T, Dynamics of Bacteriorhodopsin 2D Crystal Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy, **JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY**, **167**, 153-158, 2009, 被引用回数16

**A02 公募 田口英樹 (14)**

1. Fujiwara, K; Ishihama, Y; Nakahigashi, K; Soga, T; \*Taguchi, H, A Systematic Survey Of In Vivo Obligatе Chaperonin-Dependent Substrates, **EMBO JOURNAL**, **29**, 1552-1564, 2010, 被引用回数4
2. Kawai-Noma, S; Pack, CG; Tsuji, T; Kinjo, M; \*Taguchi, H, Single Mother-Daughter Pair Analysis to Analyze The Diffusion Properties of Yeast Prion Sup35 In Guanidine-Hcl Treated [PSI<sup>+</sup>] Cells. **GENES TO CELLS**, **14**, 1045-1054, 2009, 被引用回数7
3. Niwa, T; Ying, BW; Saito, K; Jin, W. Z; Takada, S; \*Ueda, T; \*Taguchi, H, Bimodal Protein Solubility Distribution Revealed by an Aggregation Analysis of the Entire Ensemble of Escherichia Coli Proteins, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, **106**, 4201-4206, 2009, 被引用回数14

**A02 公募 井上裕一 (3)**

1. Fukuoka, H; Inoue, Y; Terasawa, S; Takahashi, H; \*Ishijima, A, Exchange of Rotor Components in Functioning Bacterial Flagellar Motor, **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS**, **394**, 130-135, 2010, 被引用回数6
2. Nishiyama, S; Ohno, S; Ohta, N; Inoue, Y; Fukuoka, H; Ishijima, A; \*Kawagishi, I, Thermosensing Function of the Escherichia Coli Redox Sensor Aer, **JOURNAL OF**

- BACTERIOLOGY**, 192, 1740-1743, 2010, 被引用回数1
3. Okuro, K; Kinbara, K; Takeda, K; Inoue, Y; Ishijima, A; \*Aida, T, Adhesion Effects of a Guanidinium Ion Appended Dendritic "Molecular Glue" on the ATP-Driven Sliding Motion of Actomyosin, **ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION**, 49, 3030-3033, 2010, 被引用回数1
- A02 公募 西川 宗 (3)**
1. Sugawa, M; Nishikawa, S; Iwane, AH; Biju, V; \*Yanagida, T, Single-molecule FRET Imaging for Enzymatic Reactions at High Ligand Concentrations. **SMALL**. 2010 Feb 5;6(3):346-50. 被引用回数2
2. Ueno, H; Nishikawa, S; Iino, R; Tabata, KV; Sakakihara, S; Yanagida, T; Noji, H, Simple Dark-Field Microscopy with Nanometer Spatial Precision and Microsecond Temporal Resolution. **BIOPHYS J**. 2010 May 19; 98(9):2014-23. 被引用回数6
3. Nishikawa, S; Arimoto, I; Ikezaki, K; Sugawa, M; Ueno, H; Komori, T; Iwane, AH; Yanagida, T, Switch Between Large Hand-Over-Hand and Small Inchworm-Like Steps in Myosin VI. **CELL**. 2010 Sep 17;142(6):879-88. 被引用回数1
- A02 公募 永井健治 (3)**
1. Nakano, M; Imamura, H; Nagai, T; \*Noji, H, Ca<sup>2+</sup> Regulation of Mitochondrial ATP Synthesis Visualized At The Single Cell Level. **ACS CHEMICAL BIOLOGY** ( in press)
2. Kotera, I; Iwasaki, T; Imamura, H; Noji, H; \*Nagai, T, Reversible Dimerization of Aequorea Victoria Fluorescent Proteins Increases The Dynamic Range of FRET-Based Indicators. **ACS CHEMICAL BIOLOGY**, 5, 215-222, 2010, 被引用回数3
3. Imamura, H; Nhat, KPH; Togawa, H; Saito, K; Iino, R; Kato-Yamada, Y; Nagai, T; \*Noji, H, Visualization of ATP Levels Inside Single Living Cells with Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Genetically Encoded Indicators, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, 106, 15651-15656, 2009, 被引用回数19
- A03 計画研究 今田勝巳/南野 徹 (2 2)**
1. Minamino, T; \*Imada, K; Kinoshita, M; Nakamura, S; Morimoto, YV; \*Namba, K, Structural Insight into the Rotational Switching Mechanism of the Bacterial Flagellar Motor, **PLOS. BIOLOGY**, 9, e1000616, 2011, 被引用回数0
2. Ibuki, T; \*Imada, K; Minamino, T; Kato, T; Miyata, T; \*Namba, K, Common Architecture between the Flagellar Type III Protein Export Apparatus and F- and V-Type ATPases, **NATURE STRUCTURAL AND MOLECULAR BIOLOGY**, 18, 277-282, 2011, 被引用回数0
3. Morimoto, YV; Nakamura, S; Kami-ike, N; \*Namba, K; \*Minamino, T, Charged Residues in the Cytoplasmic Loop of MotA are Required for Stator Assembly into the Bacterial Flagellar Motor. **MOLECULAR MICROBIOLOGY**, 78, 1117-1129, 2010, 被引用回数1
4. Nakamura, S; Kami-ike, N; Yokota, JP; Minamino, T; \*Namba, K, Evidence for Symmetry in the Elementary Process of Bidirectional Torque Generation by the Bacterial Flagellar Motor. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, 107, 17616-17620, 2010, 被引用回数0
5. \*Imada, K; Minamino, T; Kinoshita, M; Furukawa, Y; \*Namba, K, Structural Insight into the Regulatory Mechanisms of Interactions of the Flagellar Type III Chaperone FlitT with Its Binding Partners. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, 107, 8812-8817, 2010, 被引用回数3
6. Kojima, S; \*Imada, K; Sakuma, M; Sudo, Y; Kojima, C; Minamino, T; \*Homma, M; \*Namba, K, Stator Assembly and Activation Mechanism of the Flagellar Motor by the Periplasmic Region of MotB, **MOLECULAR MICROBIOLOGY**, 73, 710-718, 2009, 被引用回数11
7. Kojima, S; Shinohara, A; Terashima, H; Yakushi, T; Sakuma, M; \*Homma, M; Namba, K; \*Imada, K, Insights into the Stator Assembly of the Vibrio Flagellar Motor from the Crystal Structure of MotY, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, 105, 7696-7701, 2008, 被引用回数15
8. Minamino, T; \*Namba, K, Distinct roles of the ATPase and Proton Motive Force in Bacterial Flagellar Protein Export, **NATURE**, 451, 485-488, 2008, 被引用回数51
9. Imada, K; Minamino, T; Tahara, A; Namba, K, Structural Similarity between the Flagellar Type III ATPase Flit and F1ATPase Subunits, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, 104, 485-490, 2007, 被引用回数26
- A03 計画研究 林 重彦/池口満徳 (3 8)**
1. Oroguchi, T; \*Ikeguchi, M, Effects of Ionic Strength on SAXS Data for Proteins Revealed by Molecular Dynamics Simulations, **JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS**, 134, 025102, 2011, 被引用回数0
2. Ito, Y; Oroguchi, T; \*Ikeguchi, M, Mechanism of the Conformational Change of the F<sub>1</sub>-ATPase  $\beta$  Subunit Revealed by Free-energy Simulations, **JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, 133, 3372-3380, 2011, 被引用回数0
3. Yoshidome, T; Ito, Y; Ikeguchi, M; \*Kinoshita, M, Rotation Mechanism of F<sub>1</sub>-ATPase: Crucial Importance of Water-entropy Effect, **JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, 133, 4030-4039, 2011, 被引用回数0
4. Nishihara, Y; Kato, S; \*Hayashi, S, Protein Collective Motions Coupled to Ligand Migration in Myoglobin, **BIOPHYSICAL JOURNAL**, 98, 1649-1657, 2010, 被引用回数0
5. Kosugi, T; \*Hayashi, S, Local Entropy Difference upon a Substrate Binding of a Psychrophilic  $\alpha$ -amylase and a Mesophilic Homologue, **CHEMICAL PHYSICS LETTERS**, 501, 517-522, 2011, 被引用回数0
6. Yagi, H; Konno, H; Murakami-Fuse, T; Ito, Y; Oroguchi, T; Akutsu, H; Ikeguchi, M; \*Hisabori, T, Structural and Functional Analysis of the Intrinsic Inhibitor Subunit e of F<sub>1</sub>-ATPase from Photosynthetic Organisms. **BIOCHEMICAL JOURNAL**, 425, 85-94, 2010, 被引用回数1
7. Ito, Y; \*Ikeguchi, M; Structural Fluctuation and Concerted Motions in F<sub>1</sub>-ATPase: a Molecular Dynamics Study. **JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY**, 31, 2175-2185, 2010, 被引用回数1
8. Ito, Y; \*Ikeguchi, M, Molecular Dynamics Simulations of the Isolated  $\beta$  Subunit of F<sub>1</sub>-ATPase. **CHEMICAL PHYSICS LETTERS**, 490, 80-83, 2010, 被引用回数3
9. Yamane, T; Okamura, H; Nishimura, Y; Kidera, A; \*Ikeguchi, M, Side-chain Conformational Changes of Transcription Factor PhoB upon DNA Binding: a Population-shift Mechanism. **JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, 132, 12653-12659, 2010, 被引用回数0
10. Okuno, D; Ikeguchi, M; \*Noji, H, Measurement of the Conformational State of F<sub>1</sub>-ATPase by Single-molecule Rotation, **METHODS IN ENZYMOLOGY**, 475: SINGLE MOLECULE TOOLS, PT B, 474, 279-296, 2010, 被引用回数0
11. \*Hayashi, S; Tajkhorshid, E; Schulten, K, Photochemical Reaction Dynamics of the Primary Event of Vision Studied by Means of a Hybrid Molecular Simulation, **BIOPHYSICAL JOURNAL**, 96, 403-416, 2009, 被引用回数13
12. Fujimoto, K; \*Hayashi, S, Electronic Coulombic Coupling of Excitation-energy Transfer in Xanthorhodopsin, **JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, 131, 14152-14153, 2009, 被引用回数3
13. Oroguchi, T; Hashimoto, H; Shimizu, T; Sato, M; \*Ikeguchi, M, Intrinsic Dynamics of Restriction Endonuclease EcoO109I Studied by Molecular Dynamics Simulations and X-ray Scattering Data Analysis. **BIOPHYSICAL JOURNAL**, 96, 2808-2822, 2009, 被引用回数4
14. Chung, L. W; Hayashi, S; Lundberg, M; Nakatsu, T; Kato, H; \*Morokuma, K, Mechanism of Efficient Firefly Bioluminescence Via Adiabatic Transition State and Seam of Sloped Conical Intersection, **JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, 130, 12880-12881, 2008, 被引用回数14
15. Nishihara, Y; Hayashi, S; \*Kato, S, A Search for Ligand Diffusion Pathway in Myoglobin Using a Metadynamics Simulation, **CHEMICAL PHYSICS LETTERS**, 464, 220-225, 2008, 被引用回数9
16. Fujimoto, K; Hayashi, S; Hasegawa, J; \*Nakatsuji, H, Theoretical Studies on Color Tuning Mechanism in Retinal Proteins, **JOURNAL OF CHEMICAL THEORY AND COMPUTATION**, 3, 605-618, 2007, 被引用回数34
17. Hashido, M; Kidera, A; \*Ikeguchi, M, Water Transport in Aquaporins: Osmotic Permeability Matrix Analysis of Molecular Dynamics Simulations. **BIOPHYSICAL JOURNAL**, 93, 373-385, 2007, 被引用回数13
- A03 公募 木田祐一郎 (7)**
1. \*Kida, Y; Kume, C; Hirano, M; \*Sakaguchi, M, Environmental Transition of Signal-anchor Sequences During Membrane Insertion Via the Endoplasmic Reticulum Translocon. **MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL**, 21, 418-429, 2010, 被引用回数1
2. Kida, Y; Morimoto, F; \*Sakaguchi, M, Signal-anchor Sequence Provides Motive Force for Polypeptide-chain Translocation Through the ER Membrane. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, 284, 2861-2866, 2009, 被引用回数5
3. Kida, Y; Morimoto, F; \*Sakaguchi, M, Two Translocating Hydrophilic Segments of a Nascent Chain Span the ER Membrane During Multispanning Protein Topogenesis. **JOURNAL OF CELL BIOLOGY**, 179, 1441-1452, 2007, 被引用回数14
- A03 公募 高野光則 (2)**
1. \*Takano, M; Terada, TP; Sasai, M, Unidirectional Brownian motion Observed in an In Silico Single molecule Experiment of an Actomyosin motor, **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, 107, 7769-7774, 2010, 被引用回数2
2. Morita, H; \*Takano, M, Residue Network in Protein Native Structure Belongs to the Universality Class of a Three-dimensional Critical Percolation Cluster, **PHYSICAL REVIEW E**, 79, 020901, 2009, 被引用回数1
- A03 公募 池上貴久 (2)**
1. Nakamura, T; Mine, S; Hagihara, Y; Ishikawa, K; \*Uegaki, K; \*Ikegami, T, Tertiary Structure and Carbohydrate Recognition by the Chitin-binding Domain of Hyperthermophilic Chitinase from Pyrococcus Furiosus. **JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY**, 381, 670-680, 2008, 被引用回数5
2. Yokogawa, D; \*Ikegami, T, A Robust Approach to Calculate Entropy Change Based on Density Functional Theory in the Energy Representation, **THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS**, 131, 221101, 2009, 被引用回数0
- A03 公募 井原邦夫/神山 勉 (5)**
1. \*Kouyama, T; Kanada, S; Takeguchi, Y; Narusawa, A; Murakami, M; hara, K, Crystal Structure of the Light-Driven Chloride Pump Halorhodopsin from Natronomonas Pharaonis, **J. MOL. BIOL.**, 396, 564-579, 2010, 被引用回数2
2. Nakao, Y; Kikukawa, T; Shimono, K; Tamogami, J; Kimitsuki, N; Nara, T; Unno, M; hara, K; \*Kamo, N, Photochemistry of a Putative New Class of Sensory Rhodopsin (SR11) Coded by Xop2 of Haloarcal Marismortui, **J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOI. B-Biol.**, 102, 45-54, 2011, 被引用回数1
3. \*Sudo, Y; hara, K; Kobayashi, S; Suzuki, D; Ineda, H; Kikukawa, T; Kandori, H; Homma, M, A Microbial Rhodopsin with a Unique Retinal Composition Shows Both Sensory Rhodopsin II and Bacteriorhodopsin-like Properties, **J. BIOL. CHEM.**, 286, 5967-5976, 2011, 被引用回数0

**A03 公募 城地保昌／北尾彰朗（7）**

1. Sakuraba, S; Joti\_Y; \*Kitao\_A. Detecting Coupled Collective Motions in Protein by Independent Subspace Analysis, **JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS**, **133**, 185102, 2010, 被引用回数0
2. Joti\_Y; Nakagawa, H; Kataoka M; \*Kitao\_A. Hydration Effect on Low-Frequency Protein Dynamics Observed in Simulated Neutron Scattering Spectra, **BIOPHYSICAL JOURNAL**, **94**, 4435-4443, 2008, 被引用回数8
3. Joti\_Y; Nakagawa, H; Kataoka M; \*Kitao\_A. Hydration-Dependent protein Dynamics Revealed by Molecular Dynamics Simulation of Crystalline Staphylococcal Nuclease, **JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B**, **112**, 3522-3528, 2008, 被引用回数3

**A03 公募 大庭裕範（5）**

1. Ohba\_Y; Watanabe, C; Nakazawa, S; Yamauchi, S. Determination of Quality Factor for Highly Overcoupled EPR Resonators, **APPLIED MAGNETIC RESONANCE**, **37**, 781-794, 2010, 被引用回数0
2. Yamauchi, S; Tanabe, M; Takahashi, K; Islam, S; Matsuoka, H; Ohba\_Y. Time-Resolved High-Frequency EPR Studies on Magnesium and Zinc Tetraphenylporphines in Their Lowest Excited Triplet States, **APPLIED MAGNETIC RESONANCE**, **37**, 317-323, 2010, 被引用回数1
3. Takahashi, A; Ohba\_Y; Yamauchi, S; Fujii, H. ENDOR Study of Oxoiron(IV) Porphyrin pi-Cation Radical Complexes as Models for Compound I of Heme Enzymes, **CHEMISTRY LETTERS**, **38**, 68-69, 2009, 被引用回数1

**A03 公募 李 振風／小松崎民樹（15）**

1. Baba, A; Komatsuzaki, T\*. Extracting the Underlying Effective Free Energy Landscape From Single-Molecule Time Series - Local Equilibrium States and Their Network, **PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS**, **13**, 1395-1406, 2011, 被引用回数 1
2. Matsunaga, Y; Li\_CB; Komatsuzaki, T\*. Cooperativity at Different Space and Time Scales in Multiscale Protein Dynamics, **PHYSICAL REVIEW E**, **82**, 016213-01624, 2010, 被引用回数 0
3. Li\_CB; Yang, H; Komatsuzaki, T\*. New Quantification of Local Transition Heterogeneity of Multiscale Complex Networks Constructed from Single-Molecule Time Series, **JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B**, **113**, 14732-14741, 2009, 被引用回数 2

**A03 公募 石田 恒（1）**

1. \*Ishida\_H. Branch Migration of Holliday Junction in RuvA Tetramer Complex Studied by Umbrella Sampling Simulation Using a Path-Search Algorithm, **J. COMPUT. CHEM.**, **31**, 2317-2329, 2010, 被引用回数0

## (2)ホームページについて

本領域では、各研究者が本領域の研究進捗状況やシンポジウム開催などの情報伝達をスムーズにするために下記のホームページを開設した。本領域では、担当者の負担が非常に大きいニュースレターを定期発行するかわりに、各メンバーの成果をホームページに掲載することにした。ホームページは、開設後定期的に更新し、会議の開催案内、また、研究成果を分かりやすい形で掲載するなど、広く成果を公表する媒体として機能するよう努めた。

<http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/tokutei/>

## (3)公開発表について

### ● シンポジウムやセミナーの開催状況

学会名	会期	場所	参加者数
EABS&BSJ 2006	平成18年11月12日～平成18年11月16日	沖縄コンベンションセンター	150
日本分子生物学会2006フォーラム	平成18年12月 6日～平成18年12月 8日	名古屋国際会議場	100
日本生体エネルギー研究会	平成18年12月14日～平成18年12月15日	東京工業大学・デジタル多目的ホール	90
第3回オープンラボ in 未来館	平成18年12月23日	日本未来科学館	30
ABPBP	平成19年 7月 8日～平成19年 7月12日	ケアンズ・オーストラリア	150
青少年のための科学の祭典	平成19年 7月27日～平成19年 7月30日	科学技術館	30
第4回オープンラボ in 未来館	平成19年 8月25日	日本未来科学館3階実験工房	30
革新的ナノバイオ第2回班会議	平成19年 9月 3日～平成19年 9月 5日	北海道・富良野市・新富良野プリンスホテル	70
日本生体エネルギー研究会	平成19年11月15日～平成19年11月17日	山口大学吉田キャンパス・大学会館	80
第45回日本生物物理学会年会	平成19年12月21日～平成19年12月23日	パシフィコ横浜	150
ゴードン会議	平成20年 1月13日～平成20年 1月21日	米国・カリフォルニア州・ベンチュラ	50
ソウル大学－北海道大学ジョイントシンポジウム	平成20年 1月24日～平成20年 1月26日	ソウル・韓国	50
第82回日本細菌学会	平成20年 3月12日～平成20年 3月14日	名古屋国際会議場	100
革新的ナノバイオ第3回班会議	平成20年 6月27日～平成20年 6月28日	名古屋大学・野依記念学術交流館	80
日本生体エネルギー研究会	平成20年11月6日～平成20年11月8日	東京医科歯科大学5号館 講堂・第一ゼミ室	70
BMB2008ワークショップ	平成20年12月 9日～平成20年12月12日	神戸ポートアイランド(神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、ワールド記念ホール)	100
第46回日本生物物理学会年会	平成20年12月 3日～平成20年12月5日	福岡国際会議場	150
第9回蛋白質科学学会年会	平成21年 5月20日～平成21年 5月22日	熊本全日空ホテルニュースカイ	100
革新的ナノバイオ第4回班会議	平成21年 6月17日～平成21年 6月19日	万国津梁館(沖縄)	80
INSMP2009	平成21年 9月 8日～平成21年 9月10日	京都大学・芝蘭会館	100
第47回日本生物物理学会年会	平成21年10月30日～平成21年11月 1日	アスティ徳島	150
日本生体エネルギー研究会	平成21年12月18日～平成21年12月20日	旭川医科大学・大講義室	60
革新的ナノバイオ第5回班会議	平成22年 6月24日～平成22年 6月25日	学習院大学・創立百周年記念会館3階	80
第48回日本生物物理学会年会	平成22年 9月20日～平成22年 9月22日	東北大学川内キャンパス	100
第36回日本生体エネルギー研究会	平成22年11月18日～平成22年11月20日	大阪大学・銀杏会館	100
第2回膜輸送体研究会	平成22年12月20日～平成22年12月21日	ホテルピアノ(北海道)	10

## ● 領域全体での国内外における招待講演数 284 回

### ◆ 国内外における招待講演 A01班

- Ryota Iino, Single-molecule studies of ATP synthase, a complex of two rotary nanomotors, The Symposium "Bioinspired Materials and Functionalities", 2011年6月22日, Groningen (Netherlands)
- Hiroyuki Noji, Femto-liter Reactor Array for Single-molecule Bioanalysis, PITTCON 2011, 2011年3月15日, Georgia World Congress Center, Atlanta (USA)
- Hiroyuki Noji, Femtoliter Chamber Array for Single Molecular Bioassay, ISMM2010, 2010年5月29日 KUST(Hong Kong)
- 野地博行, Single Molecule Studies on F1-ATPase, The 6th JSPS Forum in France, "Chemical and physical nanobiology for medicine", 2007年11月23日, Strasbourg(France)
- Hiroyuki Noji, Rotary Motors, 2006 Biophysical Society Discussions, 2006年10月20日, California (USA)
- Hiroyuki Noji, Mechanochemical Coupling of F1-ATPase, The 20th Symposium of The Protein Society and 20th Anniversary Celebration, 8月6日, San Diego (USA)
- Hisabori, T., New target enzymes for redox regulation in chloroplasts revealed by thioredoxin affinity chromatography, Gordon Research Conference 'CO<sub>2</sub> Assimilation in Plants: Genome to Biome', 2008年8月18日, University of New England (USA)
- 小嶋 誠司, Cell-free synthesis of the torque generating bacterial flagellar motor proteins, Pep Con-2010, 2010年3月21日, 北京国際コンベンションセンター(China)
- 本間 道夫, Ion flux pathway of stator complex in sodium-driven flagellar motor, ゴードン会議, 2010年1月26日, ベンチュラビーチマリオート (USA)
- 本間 道夫, Structure and Function of Sodium-driven Polar Flagellar Motor of *Vibrio alginoliticus*, VIBRIO-2009, 2010年11月5日, Univ. Federal do Rio de Janeiro (Brazil)
- 本間 道夫, Bacterial flagellar motor assembly in membrane, ゴードン会議(Sensory Transduction in Microorganisms Gordon Research Conference) 2008年1月15日, ベンチュラビーチマリオート (USA)
- 本間 道夫, Dynamic assembly of the sodium-driven flagellar motor complex in membrane, The Third Workshop of the UK-Japan Bionanotechnology Collaboration, 2007年7月20日 Lindemann Lecture Theatre (UK)
- Kenichi Morigaki, Model biological membranes composed of polymerized and fluid lipid bilayers, 241st Meeting of the American Chemical Society, 2011年3月30日, Anaheim Convention Center (USA)
- Masayoshi Nishiyama, Control of Bio-nanomotors by High-pressure Techniques, NanoMedicine 2010, 2010年10月25日, 北京 (China)
- Sotaro Uemura, Single molecule measurement for protein synthesis, SSF-JST joint symposium, 2008年5月27日, Sigtuna (スウェーデン)
- 三留規彦, Biochemical study of ATP synthase using fusion protein technique, 日韓技術士会議 2010 2010年10月17日, 下関海峡メッセ(下関)
- 寺内一雄, シアノバクテリアの生物時計: 試験管内で時を刻むタンパク質, 光生命科学研究セミナー, 2009年5月15日, 立命館大学(滋賀県)
- Furutani Yuji; Kandori Hideki, Protein-Protein Interactions in Sensory Rhodopsins Studied by FTIR Spectroscopy, 13th International Conference on Retinal Proteins (13<sup>th</sup> ICRP), 2008年6月18日, Casa Convalescència (Spain)
- Furutani Yuji, Interaction between Membrane Proteins and Ions Studied by ATR-FTIR Spectroscopy: A Potential Tool for Drug Screening, BIT's 1<sup>st</sup> Annual International Conference of Medicines-2010, 2010年5月18日, Beijing International Convention Center (中国)
- Takeshi Murata; Sinya Saijo; Satoshi Arai; Yoshiko Ishizuka; Takaho Terada; Mikako Shirouzu; Ichiro Yamato; Shigeyuki Yokoyama; So Iwata, Structural studies of V1-ATPase from *Enterococcus hirae* The 10<sup>th</sup> conference of the Asian Crystallographic Association, 2010年11月1日, 韓国(釜山)
- Masayuki Takeuchi, Design of  $\pi$ -Conjugated Molecules and Supramolecular Assemblies, 2nd NIMS-NZ Workshop on Nanotechnology, 2009年11月17日, オークランド大学(ニュージーランド)
- Hajime Fukuoka, The chemotactic response and correlation of the multiple flagellar motors in a single bacterial cell, International Symposium "Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins", 2009年9月8日, 京都大学芝罘会館(京都)
- Hirono, M., Segami, S., Muto, Y., Kawachi, M. and Maeshima, M.: Structure-function relationship and physiological meanings of H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. The XII Meeting of the SBFV (The Brazilian Society of Plant Physiology), Fortaleza, Brazil, September 7-12 (presentation, Sep. 9), 2009. (ブラジル、フォルタレーザ)

### ◆ 国内外における招待講演 A02班

- 西坂崇之; 矢島潤一郎; 足立健吾; 政池知子 "Imaging structure and function of motor proteins at the single molecular level" TSRC Workshop on Protein Dynamics, 2009年8月6日, Telluride Science Research Center, (USA)
- 西坂崇之; 矢島潤一郎; 足立健吾; 政池知子, "Visualizing structure dynamics and function in single motor proteins" The 4th Asian And Pacific Rim Symposium On Biophotonics, 2009年5月28日, The Shilla Jeju (South Korea)
- 西坂崇之; 矢島潤一郎; Sergey V. Mikhailenko; 政池知子, "Imaging structure and function of motor proteins by using advanced optical microscopes" The 6th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium, 2009年1月13日, HKUST (Hong Kong)
- Shoji Takeuchi, Dynamic Fluidic Microarray for Biological Cell Analysis, CIMTEC2008, 2008年6月12日, Congress Centre La Perdalonica (Italy)
- Shoji Takeuchi, Microfluidic Devices for Membrane Protein Analysis, 1st Biomedical Engineering Seminar 2008 2008, 2008年1月18日, ウィスコンシン大学 (USA)
- Shoji Takeuchi, Membrane Protein Chips, Taiwan-Japan Bilateral Symposium Research and Education of Nanotechnology, 2007年12月3日, 成功大学 (台南)
- Shoji Takeuchi, Microfluidic technologies for membrane protein analysis, 2007年9月13日, COEX (韓国)
- Furutani Yuji; Kandori Hideki, Protein-Protein Interactions in Sensory Rhodopsins Studied by FTIR Spectroscopy, 13th International Conference on Retinal Proteins (13<sup>th</sup> ICRP), 2008年6月18日, Casa Convalescència (Spain)
- Takayuki Uchihashi, Direct visualization of dynamic processes on biomolecules with high-speed AFM, AFM BioMed Conference (3<sup>rd</sup> International Meeting on AFM in Lifesciences and Medicine), 2010年5月12-15日, Red Island (クロアチア)
- Hideki Taguchi, Direct Observation of Yeast Prion Sup35 Dynamics in Single-living Cells, Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Molecular Chaperones and Stress Responses, 2008年5月1日, Cold Spring Harbor Laboratory (USA)
- So Nishikawa, Lifting the Concentration Limits in Single-Molecule Bioimaging, Seminar on Nanoparticles and Single Molecules, 2008年7月17日, AIST-Shikoku Center (香川)
- Yuichi Inoue, Torque steps of the bacterial flagellar motor induced by temperature control, International Symposium: Advanced Science and Technology for Single Molecular Analysis of DNA and Related Molecules, 2011年1月25日, 国立京都国際会館(京都)
- Takeharu Nagai, How to engineer fluorescent proteins to construct high performance FRET-based indicators for biological functions, 3rd Advanced bioimaging workshop-tracking molecules with light - 2011年11月17日 (シドニー, オーストラリア)
- Takeharu Nagai, Toward invention of high performance genetically-encoded luminescent probes for functional imaging in living organisms, Annual meeting of Mexican Biochemistry Society, 2011年11月9日 (チアパス, メキシコ)
- Takeharu Nagai, A novel way to expand the dynamic range of genetically-encoded FRET-based indicators, Bio Korea 2010, 2011年9月3日 COEX (ソウル, 韓国)

### ◆ 国内外における招待講演 A03班

- Katsumi Imada, Structure of the bacterial flagellum and the mechanism of its self-assembly. Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and Chinese Crystallography Society, 2009年10月23日, Jingyi Hotel (China)
- Tohru Minamino, Molecular Mechanism of Bacterial Flagellar Protein Export. Mexico-Japan Workshop "Bacterial Physiology and Biophysics", 2009年2月26日, UNAM (Mexico)
- Tohru Minamino, Dynamics of the proton-driven bacterial flagellar motor, T3SS-UK meeting, 2008年9月10日, Badock Hall, University of Bristol, (UK)
- Shigehiko Hayashi, Chemical reactions and molecular dynamics in functional processes of motor and photoreceptor proteins, Pacificchem 2010 symposium "Computational Quantum Chemistry: Theory and Interactions with Experiment", 2010, 12月19日 Sheraton Waikiki (USA)
- Mitsunori Ikeguchi, Theoretical study on rotation mechanism of molecular motor F<sub>1</sub>-ATPase, Pacificchem, 2010, 12月18日, Sheraton Waikiki (USA)
- Mitsunori Ikeguchi, Dynamics and conformational changes in DNA-binding proteins, 238th American Chemical Society National Meeting, 2009, 8月16日, Walter E. Washington Convention Center (USA)
- Shigehiko Hayashi, Chemical reactions in photoreceptor and motor proteins studied by hybrid QM/MM simulations", Telluride science research center workshop on "Protein dynamics", 2007年8月1日, Telluride(USA)
- Shigehiko Hayashi, Chemical reactions in photoreceptor and motor proteins studied by hybrid QM/MM Simulations, I2CAM exploratory workshop "Quantum dynamics and biomolecular function", 2007年4月12日, Yeppoon (Australia)
- Yasumasa Joti, Development of XFEL applications at SPring-8, 2011 Annual Meeting of the Physical Society of ROC, Symposium "New Light Source", 2011年1月27日, National Taiwan Normal University (台湾)
- Takahisa Ikegami, Analysis of interaction between the SAMP motifs of APC and the SH3 domain of DDEF, Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, 2008年4月25日, Seoul National University (韓国・ソウル)
- \*Kouyama, T. Crystal Structure of the Halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*, 2010年8月5日, 第14回国際レチナルタンパク質会議 (USA)
- M. Takano, Molecular mechanism of unidirectional motions in protein motors, 13th Slovenia-Japan Seminar on Nonlinear Science 2010年11月5日, 早稲田大学 (東京)
- Chun-Biu Li, Single Molecule Time Series Analysis of Supermolecular Motor Proteins, Graduate Student Seminar, 2010年8月3日, Radboud University Nijmegen (Netherlands)

- 「国民との科学・技術対話」について

本領域の研究を発信するため、日本未来科学館において「オープンラボ」を開催し、小学生～中高年を対象に $F_1$ -ATPaseの回転1分子計測を体験してもらった。これは、本領域研究のアウトリーチ活動の一環であるが、大変好評であった。H19年度も夏休みの時期に合わせて開催し、継続した成果をあげている。

# 9. 研究組織と各研究項目の連携状況

## ① 研究組織

### ○総括班

代表者氏名(所属/職)	総括班における役割
(研究代表者) 野地 博行 (東京大学・大学院工学系研究科・教授)	研究代表の総括  研究方針の策定 研究方針の策定 事務担当 領域の企画・広報担当 研究方針の策定 研究方針の策定
(研究分担者) 本間 道夫 (名古屋大学・大学院理学研究科・教授)	
久堀 徹 (東京工業大学・資源化学研究所・教授)	
西坂 崇之 (学習院大学・理学部・教授)	
竹内 昌治 (東京大学・生産技術研究所・准教授)	
今田 勝巳 (大阪大学・大学院理学研究科・教授)	
林 重彦 (京都大学・大学院理学研究科・准教授)	
吉田 賢右 (東京工業大学・資源化学研究所・教授)	
木下 一彦 (早稲田大学・理工学研究科・教授)	
柳田 敏雄 (大阪大学・生命機能研究科・教授)	
二井 将光 (岩手医科大学・薬学部・教授)	領域の評価
阿久津秀雄 (大阪大学・蛋白質研究所・特任教授)	領域の評価

### ○計画班

#### A01班 膜超分子モーターの分子機構の解明

<b>計画研究ア 「FoF1-ATP合成酵素の回転動作機構の解明」</b> 研究代表 野地 博行 (東京大学・大学院工学系研究科・教授) 研究分担 井出 徹 (光産業創成大学院大学・光バイオ分野・教授) 研究分担 田端 和仁 (東京大学・大学院工学系研究科・助教) 研究分担 飯野 亮太 (東京大学・大学院工学系研究科・講師)
<b>計画研究イ 「ナトリウムイオン駆動型膜内回転モーターの力発生機構の解明」</b> 研究代表 本間 道夫 (名古屋大学・大学院理学研究科・教授) 研究分担 小嶋 誠司 (名古屋大学・大学院理学研究科・助教) 研究分担 柿沼 善己 (愛媛大学・農学部・教授) 研究分担 瀧口 金吾 (名古屋大学・大学院理学研究科・助教) 研究分担 村田 武士 (千葉大学・大学院理学研究科・准教授)
<b>計画研究ウ 「ATP合成酵素の回転モーター-制御の分子機構」</b> 研究代表 久堀 徹 (東京工業大学・資源化学研究所・准教授) 研究分担 紺野 宏記 (東京工業大学・資源化学研究所・助教) 研究分担 八木 宏昌 (大阪大学・たんばく質研究所・助教) ※平成19年度まで 研究分担 山田 康之 (立教大学・理学部・准教授)

#### A02班 膜超分子モーターを解析する1分子ナノバイオ技術の創出

<b>計画研究エ 「3次元を抽出する新しい原理の光学顕微鏡で解明する膜超分子モーターの作用原理」</b> 研究代表 西坂 崇之 (学習院大学・理学部・教授) 研究分担 池地 知子 (学習院大学・理学部・助教)
<b>計画研究オ 「マイクロ・ナノ加工技術を用いた膜タンパク質機能解明のためのプラットフォーム」</b> 研究代表 竹内 昌治 (東京大学・生産技術研究所・准教授) 研究分担 宗行 英朗 (中央大学・理工学部・教授)

#### A03班 構造解析と分子シミュレーション

<b>計画研究カ 「回転モーター-トルク発生ユニットの構造基盤」</b> 研究代表 今田 勝巳 (大阪大学・大学院理学研究科・教授) 研究分担 南野 徹 (大阪大学・生命機能研究科・助教)
<b>計画研究キ 「分子シミュレーションによるF<sub>1</sub>分子モーターの化学-力エネルギー変換機構の解明」</b> 研究代表 林 重彦 (京都大学・理学研究科・准教授) 研究分担 池口 満徳 (横浜市立大学・大学院国際総合科学研究科・准教授)

### ○公募班 (平成19年度～平成20年度)

#### A01班 膜超分子モーターの分子機構の解明

<b>公募研究ア 「光ピンセット法によるタンパク質翻訳機構の1分子操作」</b> 研究代表 上村超太郎 (東京大学・大学院薬学系研究科・助教)
<b>公募研究イ 「液相型ATP合成酵素のATP合成反応の解明」</b> 研究代表 横山 謙 (東京工業大学・資源化学研究所・特別研究員)
<b>公募研究ウ 「ATP合成酵素の全体構造解析を突破口とした分子機構の解明」</b> 研究代表 三留 規誓 (東京工業大学・資源化学研究所・特別研究員)
<b>公募研究エ 「時計タンパク質ナノタイマーの生化学的基盤構築」</b> 研究代表 寺内 一姫 (名古屋大学・大学院理学研究科・研究員)
<b>公募研究オ 「細胞膜に関連したエネルギー変換メカニズムの構築-機能解明」</b> 研究代表 石谷隆一郎 (東京工業大学・資源化学研究所・准教授)
<b>公募研究カ 「光駆動プロトンポンプの動作機構の解明」</b> 研究代表 古谷 祐詞 (名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教)
<b>公募研究キ 「タンパク質膜透過システムの一分子計測」</b> 研究代表 森 博幸 (京都大学・ウイルス研究所・准教授)
<b>公募研究ク 「膜内連続球状ナトリウム輸送型V型ATPアーゼの分子機構の解明」</b> 研究代表 村田 武士 (京都大学・大学院医学研究科・分子細胞情報学・助教)
<b>公募研究ケ 「人工超分子モーターのナノサイエンス」</b> 研究代表 竹内 正之 (独立行政法人物質材料研究機構・グループリーダー)
<b>公募研究コ 「バクテリアペラムモーターの無細胞系回転実験と試験管内再構成」</b> 研究代表 業野 寿治 (山口大学・大学院医学系研究科・准教授)
<b>公募研究サ 「生体回転分子モーター-構成要素の回転の可視化」</b> 研究代表 福岡 創 (東北大学・多元物質科学研究所・助教)

#### A02班 膜超分子モーターを解析する1分子ナノバイオ技術の創出

<b>公募研究シ 「膜タンパク質会合過程の高速AFMイメージング」</b> 研究代表 内橋 貴之 (金沢大学・理工学域・准教授)
<b>公募研究ス 「光ピンセット法によるタンパク質翻訳機構の1分子操作」</b> 研究代表 永井 健治 (北海道大学・電子科学研究所・教授)
<b>公募研究セ 「高濃度の蛍光ATPを用いた1分子ATP加水分解イメージング」</b> 研究代表 西川 宗 (大阪大学・大学院生命機能研究科・助教)
<b>公募研究ソ 「酵母プリオン伝播におけるAAAシャペロンHsp104の役割」</b> 研究代表 田口 英樹 (東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授)

#### A03班 構造解析と分子シミュレーション

<b>公募研究タ 「分子シミュレーションで探るABCトランスポーターの膜輸送動力発生機構」</b> 研究代表 城地 保昌 (東京大学・分子細胞生物学研究所・助教)
<b>公募研究チ 「膜タンパク質構造形成におけるダイナミクスの解明」</b> 研究代表 木田祐一郎 (兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教)
<b>公募研究ツ 「回転分子モーターの動力計算と自由エネルギー変換メカニズムの解明」</b> 研究代表 高野 光則 (早稲田大学・先進理工学研究所・准教授)
<b>公募研究テ 「核磁気共鳴による藍色細菌時計タンパク質の相互作用とダイナミクスの研究」</b> 研究代表 池上 貴久 (大阪大学・蛋白質研究所・准教授)
<b>公募研究ト 「脂質二重膜にある蛋白質ナノ複合体の固体NMRによる原子分解構造解析」</b> 研究代表 藤原 敏道 (大阪大学・蛋白質研究所・教授)
<b>公募研究ナ 「分子シミュレーションによる、DNA組換えをおこなうモーター蛋白質の分子機構解明」</b> 研究代表 石田 恒 (日本原子力研究所量子ビーム応用研究部門・研究員)
<b>公募研究ニ 「新規プロトン輸送ピロホスファターゼの結晶構造解析と展開研究」</b> 研究代表 前島 正義 (名古屋大学・生命農学研究科・教授)

### ○公募班 (平成21年度～平成22年度)

#### A01班 膜超分子モーターの分子機構の解明

<b>公募研究ア 「分子モーターSecAATPaseによるタンパク質膜透過機構の構造機能解明」</b> 研究代表 石谷 隆一郎 (東京大学・医科学研究所・准教授)
<b>公募研究イ 「膜結合型AAA+プロテアーゼの品質管理機構に関する研究」</b> 研究代表 寿野 良二 (京都産業大学・総合生命科学部生命システム学科・研究員)
<b>公募研究ウ 「回転膜タンパク質によるATP合成反応の解明」</b> 研究代表 横山 謙 (京都産業大学・総合生命科学部生命システム学科・教授)
<b>公募研究エ 「時計タンパク質ナノタイマーの分子機構解明」</b> 研究代表 寺内 一姫 (立命館大学・生命科学部・准教授)
<b>公募研究オ 「光駆動イオン輸送蛋白質の動作機構の解明」</b> 研究代表 古谷 祐詞 (分子科学研究所・生命・細胞分子科学研究領域・准教授)
<b>公募研究カ 「光駆動プロトンポンプの動作機構の解明」</b> 研究代表 森 博幸 (京都大学・ウイルス研究所・准教授)
<b>公募研究キ 「SecAに依存したタンパク質膜透過反応機構の解明」</b> 研究代表 森 博幸 (京都大学・ウイルス研究所・准教授)
<b>公募研究ク 「ロータリー型分子モーターのトルク発生コントロールと運動計測」</b> 研究代表 西山 雅祥 (京都大学・理学研究科・助教)
<b>公募研究ケ 「マイクロプラズマ清定の足の動きを抽出」</b> 研究代表 宮田 真人 (大阪市立大学・大学院理学研究科・教授)
<b>公募研究コ 「バクテリアペラムモーターの無細胞系回転実験と試験管内再構成」</b> 研究代表 竹内 正之 (独立行政法人物質材料研究機構・グループリーダー)

#### A02班 膜超分子モーターを解析する1分子ナノバイオ技術の創出

<b>公募研究サ 「微小空間内溶液のマルチオン環境動的制御システム」</b> 研究代表 梶 弘和 (東北大学・工学研究科・助教)
<b>公募研究シ 「生体モーター運動活性の局所的熱変調」</b> 研究代表 井上 裕一 (東北大学・多元物質科学研究所・助教)
<b>公募研究ス 「高速AFMを用いたATP合成酵素のダイナミクスと機械特性に関する研究」</b> 研究代表 内橋 貴之 (金沢大学・理工学域・准教授)
<b>公募研究セ 「超高分解能光学顕微鏡の開発と応用」</b> 研究代表 上村 慎治 (中央大学・理工学部生命科学科・教授)
<b>公募研究ソ 「固体基板表面におけるモル生体膜作製技術の開発」</b> 研究代表 森 博幸 (神戸大学・自然科学系先端融合環境遺伝子実験センター・准教授)

#### A03班 構造解析と分子シミュレーション

<b>公募研究タ 「Innovative Multiscale Modeling of Biological Systems from Single Molecule Time Series」</b> 研究代表 李 振風 (北海道大学・理学研究科・准教授)
<b>公募研究チ 「2次元二重子コヒーレンスEPR法のタンパク質構造解析への応用」</b> 研究代表 大庭 裕範 (東北大学・多元物質科学研究所・准教授)
<b>公募研究ツ 「X線散乱法による生体分子の動的構造決定に向けた理論基盤の構築」</b> 研究代表 城地 保昌 (理化学研究所・X線自由電子レーザー計画推進本部・利用グループ・研究員)
<b>公募研究テ 「隠れた自由度を持つタンパク質一分子のパラメータ推定法」</b> 研究代表 原田 崇広 (東京大学・大学院理学系研究科・講師)
<b>公募研究ト 「液相膜プロトンポンプと運動輸送体の分子構造と作用・共役機構の解明」</b> 研究代表 前島 正義 (名古屋大学・生命農学研究科・教授)
<b>公募研究ナ 「光エネルギーで動作するナノイオンポンプの構造-機能解明」</b> 研究代表 井原 邦夫 (名古屋大学・遺伝子実験施設・助教)
<b>公募研究ニ 「新規プロトン輸送ピロホスファターゼの結晶構造解析と展開研究」</b> 研究代表 高野 光則 (早稲田大学・理工学術院・教授)

## ② 連携状況（共同研究一覧）

現在、投稿中、投稿準備中を含め26報の論文が、発表済みおよび発表予定である。構造生物学と生化学、あるいは生化学とシミュレーションなどが組み合わされ、領域内共同研究が活発に行われた。本特定研究をベースにした、研究論文は、さらに最終的には増えると予想される。代表的な発表や予定論文を選択して記載しておく。

共同研究者	計A01 野地博行、計A01 飯野亮太、公A02 内橋 貴之
発表論文	*Uchihashi, T; Iino, R; Ando, T; Noji, H; High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotor-less F <sub>1</sub> -ATPase, <i>Science in press</i> , 2011
概要	高速AFMを用いて、F <sub>1</sub> -ATPaseの固定子リング ( $\alpha_3, \beta_3$ ) を直接可視化し、ATPの加水分解に伴う $\beta$ サブユニットの動きを観察した。これにより、F <sub>1</sub> -ATPaseの1方向回転に必須である反応の共同性が固定子リングのみでもあることが明らかとなった。
共同研究者	計A01 野地博行、計A01 飯野亮太、計A01 田端和仁、公A02 西川宗
発表論文	Ueno, H; <u>Nishikawa, S</u> ; Iino, R; Tabata, KV; Sakakihara, S; Yanagida, T; Noji, H, Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution. <i>Biophys J.</i> 2010 May 19;98(9):2014-23. 被引用回数 6
概要	全反射型の暗視野顕微鏡を開発し、簡便な高速1分子追跡が可能となった。
共同研究者	計A01 野地博行、計A02 竹内昌治、計A01 田端和仁
発表論文	Hiroaki Suzuki, Kazuhito V. Tabata, Hiroyuki Noji and Shoji Takeuchi*: Electrophysiological recordings of single ion channels in planar lipid bilayers using a polymethyl methacrylate microfluidic chip, <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , vol. 22, pp. 1111-1115, 2007 被引用回数22
概要	アクリルを用いて作成したマイクロチップを利用して、脂質2重膜の形成過程の観察やチャンネル電位計測に成功した。
共同研究者	計A01 本間道夫、計A01 小嶋誠司、計A03 今田勝巳
発表論文	Kojima, S., Shinohara, A., Terashima, H., Yakushi, T., Sakuma, M., * <u>Homma, M.</u> , Namba, K. & * <u>Imada, K.</u> , Insights into the stator assembly of the <i>Vibrio</i> flagellar motor from the crystal structure of MotY, <i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA.</i> 105(22): 7696-7701, 2008, 被引用回数15
概要	2つのドメインからなるMotYの結晶構造を2.9Åの分解能で決定した。MotY-Nは新規の構造を示した。MotY-Nは固定子の回転子周囲への集合に必要であり、MotY-CはPG層に結合することで、固定子-回転子間相互作用を安定化していると考えられた。
共同研究者	計A01 本間道夫、計A01 小嶋誠司、公A01 古谷祐詞、公A01 神取秀樹
発表論文	Sudo, Y; Kitade, Y; <u>Furutani, Y</u> ; Kojima, M; Kojima, S; Homma, M; * <u>Kandori, H</u> , Interaction between Na <sup>+</sup> ion and carboxylates of the PomA-PomB stator unit studied by ATR-FTIR spectroscopy, <i>BIOCHEMISTRY</i> , <b>48</b> , 11699-11705, 2009, 被引用回数 4
概要	べん毛モーターの固定子であるPomA-PomBにおけるNa <sup>+</sup> 結合サイトがAsp24であることを全反射赤外分光計測 (ATR-FTIR) によって明らかにした。Na <sup>+</sup> イオン結合に伴う赤外差スペクトルにより、Asp24のカルボン酸の脱プロトン化を実験的に明らかにした。
共同研究者	公A01 古谷祐詞、公A01 神取秀樹、公A01・計A01 村田武士
発表論文	<u>Furutani, Y</u> ; Murata, T; *Kandori, H, Sodium or Lithium Ion-Binding-Induced Structural Changes in the K-ring of V-ATPase from <i>Enterococcus hirae</i> Revealed by ATR-FTIR Spectroscopy, <i>JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY</i> , <b>133</b> , 2860-2863, 2011, 被引用回数 0
概要	Na <sup>+</sup> イオンを輸送するV型ATPaseに対して全反射赤外分光計測 (ATR-FTIR) を適用し、Na <sup>+</sup> およびLi <sup>+</sup> イオン結合に伴うKリングの構造変化を明らかにした。9種類のサブユニットからなる分子量70万にも達する超蛋白質複合体の構造や活性を保持したままATR-FTIR計測が可能であることを示した。
共同研究者	公A01 西山雅祥、公A01 曾和義幸、計A01 本間道夫
発表論文	* <u>Nishiyama, M</u> ; Sowa, Y; Kimura, Y; Homma, M; Ishijima, A; Terazima, M; Reverse rotation in bacterial flagellar motors at high hydrostatic pressures, 投稿中
概要	高圧力を用いてタンパク質の構造変化や機能変調の実時間観察を可能にする顕微鏡の開発を行った。高圧力により、べん毛モーターの水の状態が変化し、回転子の構造が変化していると考えられる。
共同研究者	公A01 森 博幸、公A01 石谷隆一郎
発表論文	Tsukazaki, T; <u>Mori, H</u> ; Echizen, Y; Ishitani, R; Fukai, S; Tanaka, T; Perederina, A; Vassilyev, DG; Kohno, T; Maturana, A; *Ito, K; *Nureki O. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. <i>NATURE</i> , <b>474</b> , 235, 2011, 被引用回数0
概要	高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB8由来の膜タンパク質SecDFの高分解能の立体構造を決定した。得られた構造情報を基に詳細な生化学的解析を進め、SecDFは、プロトン駆動力を利用して、自身の構造変化を引き起こし、タンパク質膜透過を昂進するという新しい作業仮説を提案した。
共同研究者	公A01 森 博幸、公A01 石谷隆一郎
発表論文	Tsukazaki, T; <u>Mori, H</u> ; Fukai, S; Ishitani, R; Mori, T; Dohmae, N; Perederina, A; Sugita, Y; Vassilyev, DG; *Ito, K; *Nureki O. Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. <i>NATURE</i> , <b>455</b> , 988, 2008, 被引用回数50
概要	高度好熱菌 <i>T. thermophilus</i> HB8由来のタンパク質膜透過チャンネルSecY/E複合体の高分解能の立体構造を決定した。得られた構造情報を基に、膜透過駆動モータSecA ATPaseとの結合部位を同定した。生化学的解析も進め、膜透過チャンネル結合に依存したSecA ATPase活性の昂進に関する作業仮説を提案した。
共同研究者	計A02 竹内昌治、計A01 野地博行、計A01 田端和仁
発表論文	Bruno Le Piofle, Hiroaki Suzuki, Kazuhito Tabata, Hiroyuki Noji, and Shoji Takeuchi*: Lipid Bilayer Microarray for Parallel recording of Transmembrane Ion Currents, <i>Analytical Chemistry</i> , vol. 80, pp. 328-332, 2008. 被引用回数18
概要	アクリルを微細加工して作製した多チャンネル脂質2重膜デバイスによって、ペプチドなどからのチャンネル電流計測をマルチで計測することに成功した。
共同研究者	計A02 西坂崇之、計A01 野地博行、計A01 井出徹、計A01 田端和仁
発表論文	Tabata, KV; *Sato, K; Ide, T; Nishizaka, T; Nakano, A; <u>Noji, H</u> . Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane, <i>EMBO JOURNAL</i> , <b>28</b> , 21, 2009, 被引用回数7
概要	顕微鏡下に脂質二重膜を作成し、そこへ小胞体上で起こる小胞形成反応を <i>in vitro</i> 再構成した。小胞形成に関わるタンパク質を1分子レベルで観察し、小胞形成過程の可視化に成功した。これにより、細胞機能というシステムがどのように機能しているのか、各素過程を追いながら理解できるようになった。

共同研究者	公A02 永井健治、計A01 野地博行、計A01 飯野亮太、計A01 山田康之
発表論文	Imamura, H; Nhat, KPH; Togawa, H; Saito, K; Iino, R; Kato-Yamada, Y; Nagai, T; *Noji, H, Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, <b>106</b> , 37, 2009, 被引用回数19
概要	細胞内でATP濃度を可視化するためのFRETベースプローブを作成した。これまで、ATPの細胞内における濃度変化を知る術はなかった。このプローブはATPが結合するだけで蛍光のFRET変化を生じるため、リアルタイムイメージングが可能となった。
共同研究者	計A03 今田勝巳、計A03 南野徹、計A01 本間道夫、計A01 小嶋誠司
発表論文	Kojima, S., *Imada, K., Sakuma, M., Sudo, Y., Kojima, C., Minamino, T., *Homma, M. & *Namba, K., Stator assembly and activation mechanism of the flagellar motor by the periplasmic region of MotB, <i>Mol. Microbiol.</i> 73(4): 710-718, 2009, 被引用回数11
概要	MotBのC末端ペリプラズム側断片(MotBc)の結晶構造を解明した。構造情報をもとに行った機能解析により、PGBドメインはプロトンチャネルを形成するために二量体となっていること、MotBcのN末端部分の大きな構造変化がPG結合とプロトンチャネルの活性化に必要であることが明らかとなった。
共同研究者	計A03 池口満徳、計A01 久堀徹、計A01 紺野宏記、計A01 八木宏昌
発表論文	Yagi H, Konno H, Murakami-Fuse T, Isu A, Oroguchi T, Akutsu H, Ikeguchi M, *Hisabori T, Structural and functional analysis of the intrinsic inhibitor subunit epsilon of F <sub>1</sub> -ATPase from photosynthetic organisms., <i>Biochem J.</i> <b>425</b> (1), 85-94., 2009 被引用回数1
概要	本研究では、シアノバクテリアのATP合成酵素εサブユニットの単独発現系を構築し、NMRによって溶液構造を解明した。さらに、高等植物葉緑体ATP合成酵素のC末端側ヘリックス部分とシアノバクテリアのεサブユニットとのキメラタンパク質の構造解析により、C末端部分の特異な構造不安定性も明らかにした。
共同研究者	計A03 林重彦、計A03 池口満徳、計A01 野地博行、計A01 飯野亮太
発表論文	*Hayashi, S.; Ueno, H.; Shaikh, A. R.; Umemura M.; Ito, Y; Ikeguchi, M.; Komoriya, Y.; Iino, R., Noji, H., NATURE CHEMISTRY, 投稿中
概要	F <sub>1</sub> -ATPase における ATP 加水分解反応機構を分子シミュレーション及び一分子観察実験を用いて解明した。QM/MM 法及び分子動力学法を用いた計算により、非常に高いATP 加水分解触媒活性及びモーター機能に必須な反応活性制御を説明する新しい反応機構を予測した。

## 10. 研究費の使用状況

以下のように、領域発足当初から、大型備品購入し領域内での研究に活用している。具体的には、ビデオ会議システムを導入し、総括班会議や共同研究打ち合わせを頻繁に行うことが可能となった。その結果、野地と林の共同研究が促進され論文投稿に至っている。この共同研究には京都大学に納入された計算機システムを用いている。また、大阪大学に納入された電動倒立顕微鏡を用いて、細胞内ATP濃度のリアルタイム可視化に成功したり（野地、永井）、ハイスピードカメラシステムと半導体レーザーを使用して、新規な暗視野顕微鏡を開発し（野地、西川）、タンパク質1分子の10万frame/secという超高速撮影に成功している。それ以外にも、分子運動解析システムを総括班にて開発し、班員に安価で提供を行った。このように、研究費を共同研究のための備品に使用することで効率的な運用を行った。さらに、研究成果の公表の状況でも示したが、多くのセミナーや学会を総括班経費にてサポートし、領域の成果を公表している。

### 本特定研究経費で購入した大型備品とその使用状況

年度	機器名(品名・仕様)	(千円)	設置場所・使用状況
18	電子線描画システム 1式	13,776	大阪大学・マイクロチャンバーや、マイクロヒーターのマスクパターンの製造に使用している(計画)
	独国 JPK インストルメンツ社製:ライフサイエンス用原子間力顕微鏡 Nanowizard	12,337	東京大学生産技術研究所・脂質 2 重膜の形状の計測などに利用している
	多機能型超遠心機	7,381	大阪大学生命機能研究科ナノバイオロジー総合研究棟 6 階・毎日稼働
	ハイスピードビデオカメラシステム	5,250	大阪大学・FoF1-ATPsynthase の回転運動を高速撮影する(計画)
	Dual MCP イメージ・インテンシファイア 1 式	4,536	大阪大学・蛍光色素ラベルされた蛋白質や ATP などの観察に使用(計画)
	クラスタ計算機(計算ノード)	4,305	横浜市立大学鶴見 A417・シミュレーション計算
	NTSC シングルカメラモデル 1 式	4,189	大阪大学・F1-ATPase や、べん毛モーターの回転観察とその記録をデジタルで行うために使用している(総括)
	超遠心機固定角ローター・45Ti, 50,2Ti	4,042	大阪大学生命機能研究科ナノバイオロジー総合研究棟 6 階・毎日稼働
	計算機システム HPC-ProServer(DPr490/300D16G-Ce4-kk) 4 式	3,990	京都大学理学部 6 号館 259 号室・QM/MM シミュレーション計算
	顕微鏡観察用高速ビデオカメラ	3,570	中央大学・活躍中
	分子運動解析システム 1 式	3,328	大阪大学・F1-ATPase やべん毛モーターの回転運動を詳細に解析するためのシステム(総括)
	超純水製造装置 1 式	2,604	大阪大学・1 分子観察用の蛋白質精製のために使用する水を製造している(計画)
	小型半導体励起固体レーザー	2,520	大阪大学・F1-ATPase の 1 分子操作実験に使用(計画)
	HPLC システム (FP-2020, PU-2080, UV-2070)	2,513	立教大学・タンパク質の精製、リガンドの結合測定に使用中
	ニューテック RAID システム	1,628	横浜市立大学鶴見 A417・データ管理
	倒立型顕微鏡 IX-71(オリンパス)	1,321	東京工業大学・1 分子観察に使用中
	ニコン顕微鏡用培養装置/INU-F1, INU-N1	1,133	東京大学生産技術研究所・膜タンパク質を発現した細胞の培養に利用している。
	19	ナノシステムソリューションズ社製 デジタル露光システム DLS-50	20,531
電動倒立顕微鏡 TE2000-PFS 1 式		7,980	大阪大学(計画) 計測の自動化のために使用。
全自動タンパク質合成機		4,305	名古屋大学 効率的にインビトロ系での蛋白質合成を行うことに使用
高性能高速冷却遠心機 HP-26XP およびローター類		4,200	大阪大学生命機能研究科ナノバイオロジー総合研究棟 6 階・毎日稼働
Polycom 製テレビ会議システム		4,032	大阪大学(総括) 本システムを用いて、総括班内での緊密な連絡を行っている。
卓上型全自動蛋白質合成装置 ProtomistDT-FV		3,570	大阪大学生命機能研究科ナノバイオロジー総合研究棟 6 階・2-3 週間に 1 度の割合で稼働
ハイパフォーマンス計算機システム(QuadCore Xeon 3.0GHz 3node)		2,650	早稲田大学・Fo/F1 の粗視化分子動力学シミュレーションに使用(高野)
パーソナルクラスタ・TYAN VX50		2,580	東大分生研・稼働中
ニコン TE2000-FRET 解析ユニット		2,419	薬学系総合研究棟生体分析化学教室
Yb ファイバレーザー 1 式		2,383	大阪大学・(計画) 光ビームによる操作や力測定に利用。
分光蛍光光度計 (FP-6500ST 他)		2,378	立教大学・タンパク質に対するリガンドの結合測定に使用中
細胞破碎装置 1 式		1,680	大阪大学・(計画) タンパク質調製用。
フォトン顕微鏡観察用高速ビデオカメラ FASTCAM 1024-MLSN 専用データ管理解析 PC		1,655	中央大学・活躍中
クボタ高速冷却遠心機 Model7780		1,297	名古屋大学 蛋白質の精製に常時使用
Gaussian03 用計算機(ビジュアルテクノロジー社 VT64 Workstation2300XDW)		1,250	名古屋工業大学・アミノ酸残基の水素結合状態の解析等で使用中
自動精製システム(Biotage 社製 Flash・SP1 システム)		1,197	物質・材料研究機構・毎日使用
日本ミリボア株 Milli-Q Advantage 一式 超純水製造器		1,039	名古屋大学 培養や精製に用いる日常の水の供給に必要
分子モーター解析データ蓄積システム(ナラサキ産業株式会社 (HPC3000-XC104FS12R3/500GB12n-i))		1,000	日本原子力研究開発機構 計算・先端情報センター棟/分子シミュレーションのデータ解析
20	温調付動物細胞工学実験ユニット	20,328	大阪大学・(計画) 動物細胞培養実験などを通して細胞内におけるエネルギーレベルの変化を検出する実験を行う。
	Polycom 製テレビ会議システム 1 式	1,905	大阪大学・(総括) 計画班の一部にも本システムを配布し、共同研究打ち合わせに役立たせている。
21	紫外可視分光光度計(日本分光製 V-650)	1,345	東京工業大学 タンパク質の定量・解析に頻繁に使用
	マルチモードマイクロプレートリーダー (Tristar LB941VT)	4,866	東京工業大学 細胞内 ATP レベルの定量に使用
	CHEF-DRIF1 チラーシステム一式	1,984	大阪大学 頻繁に活用
22	デジタルマイクロスコブ VHX-1000	2,992	大阪大学 マイクロデバイスの評価に使用

## 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度

### ● 当該学問分野における貢献度

- 本領域の当該学問分野は、1分子生物物理学である。本領域研究の貢献度は、生物物理学会における生物物理学会若手奨励賞の受賞者数で示されている。この賞は競争率10倍以上の当該学問分野における若手研究者の登竜門であるが、過去5年間において本領域研究に関わった若手研究者がしめる受賞数は44%（11人/25人）という圧倒的割合を占める。また、計画研究代表者7名に関しても、そのうち3名が日本学術振興会賞を受賞者している。これらの数字は、本領域研究が学問的貢献と人材育成の2点において生物物理学分野のみならず基礎生物学において重要な貢献をしたことに対する揺るぎない証拠であると考えられる。また、領域代表（野地）の招待講演に限っても、生体エネルギー研究分野で最重要国際会議である Gordon Research Conference (Bioenergetics) より招待（2011年6月29日発表予定）など非常に多数の国際会議の招待依頼を受けており、その成果は国内外で広く認められている。さらには、その成果が早速教科書に掲載される等、本領域研究から生まれた成果のいくつかは古典となる可能性もある。また、本領域で開発された新技術の評価も高い。例えば、本領域で開発された時間分解能10 $\mu$ 秒、空間分解能10nmのイメージング技術は、領域外のミオシン研究者によって利用され大きな成果を上げることに貢献した(Nishikawa et al. CELL 2010)。また、細胞内ATP計測プローブに関しては、生物物理学にとどまらず細胞生物学者から大きな反響を受け、これまでの200件を超えるサンプル提供の依頼が国内外から殺到している。

### ● 関連学問分野

- ナノバイオデバイス：この分野においても、領域代表である野地とA02班計画代表者である竹内は、国際会議のKeynote lectureを含む招待講演を極めて数多く受けている。例えば、野地は2011年のGordon Research Conferenceで、上述のBioenergetics meetingに加えmicrofluidics meetingにおいても招待講演予定である（6月28日予定）。また、竹内は、当該領域における最も重要な専門誌であるLab on a Chip誌において「注目すべき研究者」として取り上げられている。また、昨年度より野地、竹内ともにマイクロデバイス関連の大型研究プロジェクト(GREST, ERATO)を開始しており、本領域の研究成果が高く評価されていることを裏付けている。
- 分子シミュレーション：本領域研究では、これまで殆ど前例の無い量子化学計算と1分子生物物理計測の融合研究研究を実施した。その結果、これまでのF<sub>1</sub>-ATPaseをはじめとするヌクレオチド三リン酸加水分解酵素に対して提案されていた反応機構とは異なり、基質周囲の水分子によるプロトンリレーが重要であるとする新しい反応モデルを提案し、これを1分子実験で検証・確認した。この研究は未だ投稿中であるが、当該分野において既に2点において大きなインパクトを与えている。1つは、量子化学計算が実験の検証に耐えうる予測を行うことが可能であることを示した点である。量子化学計算を主導した林は、この成果にとどまらず現在反応速度を加速する変異体の提案を行っており、実験による検証を待っている。2つ目は、提案された新しい反応モデルである。現在、異なる加水分解酵素においても、追従する計算実験が行われている。

以上にとどまらず、膜輸送体のメカニズム、非平衡物理を用いた分子モーター計測技術、先端的1分子計測技術等、本領域は生物物理学分野を大きく超えて様々な分野に貢献した。

## 11. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況

当該学問分野において、本領域に参画した若手研究者の5年間の活躍は圧倒的なものであったといえる。様々な学会や数々のシンポジウムでの講演をこなし、タンパク質化学や生物物理学においてたくさんの重要な流れをリードすることに成功した。それがもっとも顕著な数字として表れているのは、生物物理学会の若手に与えられる奨励賞の受賞数の多さである。平成18年度から22年度の研究期間に、実に10名の若手研究者<sup>(1)</sup>が奨励賞を受賞した。総勢25名に与えられた賞であることを考えると、生物物理学会全体を牽引する優れた若手研究者の実に40%に当たる人数が本領域に参画し、そして研究を発展させたということになる。他学会における受賞<sup>(2)</sup>や、若手研究者の最高峰の賞である日本学術振興会賞<sup>(3)</sup>も目立った成果として挙げられる。さらに数多くの助教や研究員が、次のステップとしてのポストを得ることに成功している<sup>(4)</sup>。本領域で培われた技術や基礎が、新しい芽として次の研究領域として発展していくこととなる。また本領域では、研究計画班の代表として、そもそもが30代後半から40代のPIが数多く参画していた。彼らのプロモーション<sup>(5)</sup>についても付記したい。学生の受賞と研究員への異動も見られた<sup>(6)</sup>。

- (1) 日本生物物理学会 若手奨励賞受賞者 (10名) 塚崎智也、林久美子、福岡創、柴田幹大、西山雅祥、政池知子、今村博臣、矢島潤一郎、上村想太郎、鈴木宏明
- (2) 若手研究者による受賞 (9件) 上村想太郎 (文部科学大臣表彰若手科学者賞、光科学技術振興財団研究表彰) 竹内昌治 (文部科学大臣表彰若手科学者賞)、西山雅祥 (文部科学大臣表彰若手科学者賞)、内橋貴之 (日本学術振興会 ナノプローブテクノロジー賞)、山田康之 (日本生化学会 奨励賞)、瀬上紹嗣 (日本生化学会中部支部奨励賞)、山下隼人 (日本応用物理学会講演奨励賞) 飯野亮太 (電気学会 2007年度研究会優秀論文発表賞)
- (3) 日本学術振興会賞 (2名) 西坂崇之 (平成19年度)、竹内昌治 (平成21年度)
- (4) 参画した研究グループ・公募班における若手の異動 (18名) 上村想太郎 (理化学研究所)、梶弘和 (東北大学 准教授)、寺内一姫 (名古屋大学 特任講師/立命館大学 准教授)、古谷祐詞 (自然科学研究機構 准教授)、南野徹 (大阪大学 准教授)、矢島潤一郎 (東京大学 准教授)、山田康之 (立教大学 准教授)、飯野亮太 (東京大学 講師)、瀧ノ上正浩 (東京工業大講師)、三留規誉 (宇部工業高等専門学校 講師)、田端和仁 (東京大学 助教)、中村修一 (東北大学 助教)、渡邊力也 (東京大学 助教)、山崎久嗣 (トヨタ自動車 主任研究員)、梅村舞子 (産業技術総合研究所 常勤研究員)、今村博臣 (京都大学 准教授)、林久美子 (東北大学 助教)、横山謙 (京都産業大学 教授)
- (5) 計画班代表の昇格昇任・異動 (4名) 今田勝巳 (大阪大学 教授)、西坂崇之 (学習院大学 教授)、野地博行 (東京大学 教授)、久堀徹 (東京工業大学 教授)
- (6) 学生の賞・異動 (17件) 河内美樹 (2010-学振 PD/2011-名古屋大学 YLC 特任助教)、広野めぐみ (2007-博士研究員)、川島文明 (KIST-Tohoku Joint Symposium on Nanobiomedical Engineering ポスター賞)、伊吹達也 (国際結晶学会 ポスター賞、日本蛋白質科学会年会 ポスター賞、学振 DC)、中村修一 (学振 DC)、蔡荣淑 (学振 DC)、金流星 (学振 DC)、砂村英一郎 (学振 DC)、中根大介 (井上研究奨励賞、Meeting of International Organization for Mycoplasma Lewis Deans Award、日本マイコプラズマ学会学術集会 ベストプレゼンテーション、学振 DC、学振 PD)、太田禎生 (MicroTAS Widmer Award)、安達亜希 (MicroTAS Student Poster Award)

## 12. 総括班評価者による評価の状況

**木下一彦先生** (早稲田大学・教授)

本評価者は、特定領域研究という研究方式には問題があると考えている。問題点はおくとして、大集団研究に意味があるとする、広い意味での「雰囲気」の形成が第一であろう。その点において、本特定領域は大成功であった。若いリーダー達を中心とした会議、成果発表会に何度か参加させてもらい、和気藹々しかし活発に成果を語り未来を語り合う姿に、感激した。技術開発と応用、理論と実験の協調も、うまくいっていた。

研究成果も、 $F_1$ -ATPaseの反応スキームの解明、鞭毛モーターにおいて手つかずといっていた固定子部分の立体構造解明、従来の水系でのナノ操作を超えた膜系の操作システムの開発、新しい光学顕微鏡技術、など見るべきものが多い。班員が実力を遺憾なく発揮したわけである。ただし、少し意地悪い見方をすると、期待通りの成果であり、期待を遙かに超えて、はまだない。領域研究はまだ終了したばかりであるから、蒔かれた種を更にしっかり育てて収穫して欲しい。

トピックとしては、最新の成果である、回転子無しの $F_1$ の「回転」が面白い。ATP合成酵素の範疇を広く超えて、ヘリケースなどリング状たんぱく質分子機械一般の作動機構の研究に大きな影響を及ぼし得る。今のところ、微妙な解析に依存しているようなので、更なる進展は難しくそうにも思えるが、ブレークスルーを望みたい。

**吉田賢右先生** (東京工業大学・教授)

この特定領域研究のおもしろさは、モーターとナノというキーワードで多様な研究者が議論交流をしながら研究を進めてきたところであろう。その成果は期待通りというべきで、特に、理論的計算的な研究者と実験者との共同成果に印象的なものがあった。このような交流は、これからも継続してゆくことがのぞましい。

**柳田敏雄先生** (大阪大学・生命機能研究科・教授)

異分野融合は、単に多様な人材をひとつの領域に集めただけでは達成できない。実際に一緒になって物事に取り組まないとうまくいかない。この特定領域は、そのような本当の交流が活発に行われ、多くの成果が生まれた。しかし、その成果も専門家だけが「おもしろい」と感じるだけでは、いけない。一般の人たちにも「すごい、それおもしろい」と感じさせるものを、どんどん生み出していかなければならない。今後それを可能とする異分野融合が、この領域ではでき上がってきたように見える。また、生物物理学会若手奨励賞の受賞者の多さにみられるように、若手主体で運営する中からさらに若い世代が数多く育ったのもこの領域の特徴である。領域研究は終了したが、今後のさらなる発展を期待したい。

**二井將光先生** (岩手医科大学 薬学部・教授)

本特定研究は、ATP合成酵素とべん毛モーターを中心に研究が進められ、大きな国際的成果が得られている。報告書を拝見し、発表論文に触れ、研究開始(2006年)以前よりもさらに高いレベルに研究が進展したと評価する。それぞれの成果に加えて、研究領域の目的に述べられている「まったく新しいナノバイオ技術」を開発できたこと、異なる分野の若手研究者の共同研究が成果を上げたこと、等は高く評価できる。ATP合成酵素の研究は、好熱菌のものを中心に行われているが、これがヒトのミトコンドリアにまで外挿できることを積極的に他分野の研究者に周知させるべきだろう。

**阿久津秀雄先生** (大阪大学 蛋白質研究所・特任教授)

若手中心の特定領域研究「膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス」は清新なエネルギーにあふれており、多くの優れた研究を生み出した。エエっと驚いたのは鞭毛モーターを構成する蛋白質の中に

F/V型ATPaseのサブユニットと非常によく似た性質を持ったものが次々と見つかったことで、モーターのメカニズムの面からも、進化的な面からも今後の展開が注目される。本特定の特徴である一分子計測と計算機科学の融合も重要な成果に結びついている。特に、 $F_1$ の回転メカニズムについては両者の協力により精緻な描像を描けるようになって来た。ここでは代表者のリーダーシップが生かされている。本特定領域の成果の多くは今後の発展のシーズとなると思われる。したがって、特定領域研究としては成功していると考えられる。