

領域略称名: 高速分子動画
領域番号: 8101

令和3年度科学研究費助成事業
「新学術領域研究(研究領域提案型)」
に係る中間評価報告書

「高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析と分子制御への応用」

領域設定期間

令和元年度～令和5年度

令和3年6月

領域代表者 京都大学・医学研究科・教授・岩田 想

目 次

研究組織

1	総括班・総括班以外の計画研究	2
2	公募研究	3

研究領域全体に係る事項

3	研究領域の目的及び概要	5
4	審査結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況	7
5	研究の進展状況及び主な成果	8
6	研究発表の状況	13
7	研究組織の連携体制	18
8	若手研究者の育成に関する取組状況	19
9	研究費の使用状況・計画	20
10	今後の研究領域の推進方策	21
11	総括班評価者による評価	23

研究組織

(令和3年6月末現在。ただし完了した研究課題は完了時現在、補助事業廃止の研究課題は廃止時現在。)

1 総括班・総括班以外の計画研究

研究項目[1]	課題番号 研究課題名	研究期間	研究代表者 氏名	所属研究機関・部局・職	人数 [2]
X00 総	19H05776 高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析と分子制御への応用	令和元年度 ～ 令和5年度	岩田 想	京都大学・医学研究科・教授	1
A01 計	19H05777 光動作タンパク質の時分割構造解析と合理的改変	令和元年度 ～ 令和5年度	岩田 想	京都大学・医学研究科・教授	4
A01 計	19H05778 タンパク質の非平衡状態構造解析を可能にするケミカル光制御法の開発	令和元年度 ～ 令和5年度	清中 茂樹	名古屋大学・工学研究科・教授	3
A01 計	19H05779 光感受性タンパク質の多様な光反応機構解明	令和元年度 ～ 令和5年度	朴 三用	横浜市立大学・生命医科学研究科・教授	2
A01 計	19H05780 酵素が巧みに織りなす化学反応過程のダイナミズムの撮像	令和元年度 ～ 令和5年度	永野 真吾	鳥取大学・工学研究科・教授	3
B01 計	19H05781 時分割実験のための多様な反応誘起システムの開発	令和元年度 ～ 令和5年度	南後 恵理子	東北大学・多元物質科学研究所・教授	3
B01 計	19H05782 (廃止) 金属錯体のフェムト秒時間分解分子構造・電子状態計測	令和元年度 ～ 令和2年度	足立 伸一	高エネルギー加速器研究機構・その他部局等・理事	2
B01 計	19H05783 動的構造解析に資する固定ターゲット微小結晶解析法の開発	令和元年度 ～ 令和5年度	山本 雅貴	理化学研究所・放射光科学研究センター・部門長	2
C01 計	19H05784 時間分解構造解析を補完する精密顕微分光計測	令和元年度 ～ 令和5年度	久保 稔	兵庫県立大学・大学院理学研究科・教授	3
C01 計	20H05453 分子シミュレーションによるタンパク質化学反応ダイナミクスの解明	令和2年度 ～ 令和5年度	宮下 治	理化学研究所・計算科学研究センター・上級研究員	3
総括班・総括班以外の計画研究 計 10 件 (廃止を含む)					

[1] 総:総括班、計:総括班以外の計画研究、公:公募研究

[2] 研究代表者及び研究分担者の人数(辞退又は削除した者を除く。)

2 公募研究

研究項目[1]	課題番号 研究課題名	研究期間	研究代表者 氏名	所属研究機関・部局・職	人数 [2]
A01 公	20H05432 タンパク質のリガンド結合・解離過程の 高速分子動画	令和2年度 ～ 令和3年度	松尾 和哉	北海道大学・電子科学研究所・助教	1
A01 公	20H05435 ケージド中間体を用いた2種のヘム分 解酵素の機構解明	令和2年度 ～ 令和3年度	松井 敏高	東北大学・多元研物質科学 研究所・准教授	1
A01 公	20H05437 XFELを用いた非古典的ロドプシンのダ イナミクスの解明	令和2年度 ～ 令和3年度	志甫谷 渉	東京大学・理学系研究科・助教	1
A01 公	20H05440 明暗視をもたらす動物ロドプシンの構 造ダイナミクスの解明	令和2年度 ～ 令和3年度	片山 耕大	名古屋工業大学・工学(系) 研究科(研究院)・助教	1
A01 公	20H05442 (6-4)光回復酵素によるDNA修復 過程の分子動画撮影	令和2年度 ～ 令和3年度	山元 淳平	大阪大学・大学院基礎工学 研究科・准教授	1
A01 公	20H05445 高速分子動画撮影によるTRPチャネ ルの熱刺激応答機構の解明	令和2年度 ～ 令和3年度	日野 智也	鳥取大学・工学部・准教授	1
A01 公	20H05446 光合成反応中心とアンテナ複合体の 超複合体の高速分子動画解析	令和2年度 ～ 令和3年度	菅 倫寛	岡山大学・異分野基礎研究 所・准教授	1
A01 公	20H05448 シリアルフェムト秒結晶構造解析による 銅含有アミン酸化酵素の触媒機構の 解明	令和2年度 ～ 令和3年度	村川 武志	大阪医科薬科大学・医学部・ 助教	1
A01 公	20H05449 光異性化アミノ酸導入による、リガン ド依存性イオンチャネルの光制御化 法の開発	令和2年度 ～ 令和3年度	下村 拓史	生理学研究所・分子細胞生 理研究領域・助教	1
A01 公	20H05450 大腸菌無細胞合成系を利用した時 分割SFX実験に適したサンプル調 製法の開発	令和2年度 ～ 令和3年度	保坂 俊彰	理化学研究所・生命機能科 学研究センター・技師	1
A01 公	20H05451 高速分子動画でみる金属酵素活性 中心におけるNO還元反応	令和2年度 ～ 令和3年度	當舎 武彦	理化学研究所・放射光科学 研究センター・専任研究員	1
A01 公	20H05444 caged-GTPを用いた低分子量G蛋 白質のシグナル伝達過程の時分割構 造解析	令和2年10月 ～ 令和3年度	島 扶美	神戸大学・大学院科学技術イ ノベーション研究科・教授	1

B01 公	20H05433 高感度動的結晶構造解析のための 超低バックグラウンド試料セル	令和2年度 ～ 令和3年度	鈴木 明大	北海道大学・電子科学研究所・助教	1
B01 公	20H05438 Time-resolved serial crystallography for dynamic observation of non-enzymatic reactions promoted inside crystalline protein scaffold	令和2年度 ～ 令和3年度	Basudev Maity	東京工業大学・生命理工学院・特任助教	1
C01 公	20H05436 光をトリガとしない高速酵素反応機構 解明	令和2年度 ～ 令和3年度	田中 伊知朗	茨城大学・理工学研究科(工学野)・教授	1
C01 公	20H05439 高速分子動画を補完する構造変化の 自由エネルギー地形と経路・流量の解 析	令和2年度 ～ 令和3年度	北尾 彰朗	東京工業大学・生命理工学院・教授	1
C01 公	20H05441 ハイブリッド自由エネルギー最適化に よるタンパク質機能活性化の理論的解 明	令和2年度 ～ 令和3年度	林 重彦	京都大学・大学院理学研究 科・教授	1
C01 公	20H05443(廃止) イオン輸送を駆動する水素結合ネット ワークの高速精密分光計測	令和2年度	水野 操	大阪大学・理学研究科・助教	1
C01 公	20H05447 分子動画に基づく大規模量子分子動 力学法による生体内プロトン輸送機構 の解明	令和2年度 ～ 令和3年度	小野 純一	京都大学・学際融合教育研 究推進センター・特定研究員	1
C01 公	20H05452 ヘム酵素が生成する酸化活性種の精 密構造解析	令和2年度 ～ 令和3年度	杉本 宏	理化学研究所・放射光科学 研究センター・専任研究員	1
C01 公	20H05454 タンパク質の大きな構造変化をさと出 す	令和2年度 ～ 令和3年度	櫻庭 俊	量子科学技術研究開発機 構・量子生命科学研究所・主 任研究員	1
公募研究 計 21 件 (廃止を含む)					

[1] 総:総括班、計:総括班以外の計画研究、公:公募研究

[2] 研究代表者及び研究分担者の人数(辞退又は削除した者を除く。)

研究領域全体に係る事項

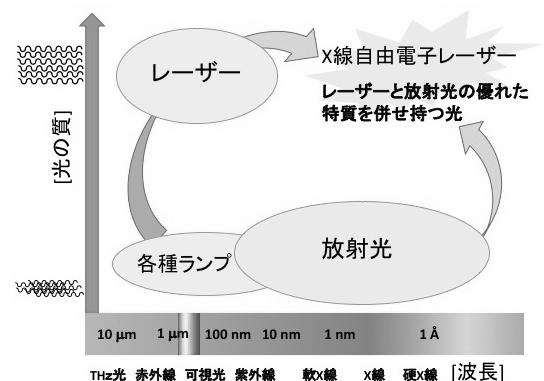
3 研究領域の目的及び概要

研究領域全体を通じ、本研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時の領域計画書を基に、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。なお、記述に当たっては、どのような点が「革新的・創造的な学術研究の発展が期待される研究領域」であるか、研究の学術的背景や領域設定期間終了後に期待される成果等を明確にすること。

(研究目的)

本領域研究では、X線自由電子レーザー(XFEL)を用いて、タンパク質の中で起こる非常に早い化学反応などを他の手法では全く考えられない時間分解能と空間分解能を併せ持った分子動画として観察する手法の開発を推進する。

生命現象を支えているタンパク質の機能やその機構を理解するためには、タンパク質の中で実際に起こっている化学反応や構造変化を追跡することが不可欠である。現在、タンパク質の動的構造を観察する方法としては構造解析の手法や分光学的手法があげられるが、構造解析の手法は平衡に達したのちの分子種の分布を観察しているだけで、構造変化の途中で一時的に生じるような非常に寿命が短かつポピュレーションの低い分子種の観察はできない。分光学的手法はタンパク質分子の原子分解能での位置情報を与えない。これに対し、XFEL(右図)を用いたポンププローブ法による分子動画撮影



は、フェムト秒に達する時間分解能でタンパク質の平衡に達するまでの構造変化を原子分解能で分子動画記述できる唯一の方法である。特にこの手法はその時間分解能から、これまで原子分解能で追うことのできなかつた化学反応などの早い反応の追跡に適している。

本領域研究では、本法をタンパク質の中で起こる早い反応を追跡するスタンダードな技術として確立するために、ケミカルバイオロジーの手法を中心に用いて反応を同期させる技術を開発するとともに、反応開始のち徐々に同期が外れて複数の状態が混ざっていく問題をコンピューターシミュレーションにより解析分離し、実際のタンパク質の中で起こっている反応をより現実に即して捉えることを主眼とする。同時に、この目的を達成するための測定システムの開発を行い、光によるタンパク質のスイッチ機構の解明、ユニークな反応を触媒する酵素の反応機構など、幅広いターゲットに適用することを目指す。更に、本法によって得られた精密な構造情報を基にタンパク質分子の光制御法の確立など分子制御への応用も推進する。

本領域研究が始まる前の段階では、光で反応を開始するタンパク質を標的とした分子動画法が実証されていたが、光以外をトリガーとして用いる分子動画法はほとんど確立されておらず、例えば温度やpHなどの外部刺激や、基質・リガンドの添加などによる時分割実験を可能とする装置の開発が急務であった。またタンパク質工学やケミカルエンジニアリングを用いて、光感受性でない系を光で同期できる系に改変することにより、タンパク質の中の酵素反応の追跡や受容体タンパク質の活性化機構の研究などに、本手法の対象を大きく拡張することが可能になると考えられる。

2010年から本格的に稼働が始まったXFELは、10フェムト秒以下の強力なX線パルスレーザーという既存にはなかった特性のために、従来のX線結晶解析の技術そのままでは装置・解析法ともに適用できず、現在も各国で激しい開発競争が行われるなど新興技術として脚光を浴びている。一方、タンパク質の動的構造解析もまた、タンパク質機能発現や理解を深めるために非常に興味を集めている分野である。本領域が取り組むXFELによる解析は、空間分解能及び時間分解能の点で他の手法では全く解析不可能な領域であることから、XFELによる分子動画法が汎用的な技術として確立され、多種多様なタンパク質試料で動的構造が解明されると、XFEL技術の発展並びに生命科学研究の飛躍的深化に繋がる。

(全体構想)

本提案では、以下の異なる分野から構成される3つの研究項目を設置する。多種多様なタンパク質中

で起こる反応・構造変化の解明を軸とし、XFEL を用いた分子動画法の基盤構築グループと、計算科学、物理化学から成る反応分析グループとが連携・融合して解析技術を発展させ、より精細な生命科学研究を展開する。

研究項目 1：高速分子動画によるタンパク質の反応機構解明及び分子制御法の開発

受容体、酵素といった様々なタンパク質中で起こる化学反応及び構造変化を原子レベルで解析し、その詳細な反応機構を解明する。また、光に反応しない多くのタンパク質にも分子動画法を適用可能とするため、光作動性リガンドやケージド基質の利用などケミカルバイオロジーによるアプローチを取り入れる。得られた構造情報から合理的なタンパク質設計を行い、高機能人工分子デバイスなどタンパク質分子制御法の開発も推進する。

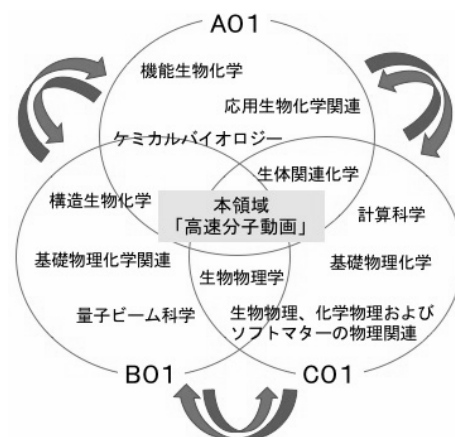
研究項目 2：高速分子動画撮影法の基盤構築

本法は、2016年に領域代表らが光で反応を開始するタンパク質を用いて、光刺激とXFELを組み合わせることによりその方法を確立したが、タンパク質全般にそのまま適用することは難しい。そこで、基質や温度によって反応を開始するなど光以外の反応誘起法の技術開発に取り組む。また、タンパク質の活性中心モデルとなる金属錯体を用いたフェムト～ピコ秒に起こる超高速分子動画計測の技術も開拓する。XFELの利用だけではなく、本領域ではSPring-8などの放射光施設との連携にも取り組み、微小結晶の高効率なX線回折強度データ測定技術などの開発を進める。

研究項目 3：高速分子動画に資する反応精密分析

計算科学及び分光科学との連携により、タンパク質中で起こる反応を精密分析し、タンパク質動的解析の発展を促進する。例えば、分子動画法で得られる結果は、補因子の電子状態などX線では捉えられない部分もあり、量子古典混合(QM/MM)計算や分光学的解析が重要となる。また、時系列の補完や構造アンサンブルの評価など、実験からは直接得ることのできない構造情報を分子シミュレーションによって分析する。

以上の構成に基づいて、本申請研究では、領域内に3つの研究グループ(A01、B01、C01)を設定し、A01に4班、B01に3班、C01に2班の計9つの計画研究班を含む構成とする。総括班は、領域全体の研究方針に基づいて計画研究班と公募班で実施される研究を牽引し、分子動画法による生命現象の理解の飛躍的深化とタンパク質分子制御による応用を目指す。



(領域設定期間終了後に期待される成果)

本領域研究から得られる成果を活用することで、以下の研究成果が期待できる。

① 生体分子の機能やその機構に対する理解の飛躍的深化

XFELによる分子動画法の開発が達成されると、既存の方法では解明できなかったタンパク質などの生体分子内で素早く起こる構造変化や化学反応を捉えることが可能となる。生体分子が機能する瞬間を原子レベルで可視化できることから、これは生命科学研究におけるパラダイムシフトに値する発展であり、生体分子の働きやそのメカニズムに対する理解が飛躍的に深まると期待される。

② 合理的戦略による生体分子制御への応用

生体分子を利用した応用技術は、バイオセンサーなどの医療診断デバイス、生体イメージングなど、近年ではナノバイオテクノロジー等の分野を形成するなど非常に注目されている。しかしながら、従来行われてきた手法は、ランダムに変異を導入して多くの検討を重ねて高機能化するなど効率性に欠ける。分子動画法によりタンパク質の詳細な動的立体構造が得られると構造情報に基づく合理的な設計が可能となり、生体分子を意のままに効率良く制御することができると期待される。

本領域で得られる成果は構造生物学だけではなく、連携するそれぞれの分野へのインパクトも大きい。分子動画解析と計算科学が互いに補完しあうことにより、生体分子中で起こっている早い反応についてその化学的・物理的な性質が明らかになることが期待されるだけでなく、より正確なシミュレーション方法の確立への指針が示され、それは計算科学分野においても飛躍的進展となるであろう。

4 審査結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況

研究領域全体を通じ、審査結果の所見において指摘を受けた事項があった場合には、当該指摘及びその対応状況等について、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。

(指摘事項)

本研究領域で重要な位置付けとなる計算科学を担当する計画研究については、体制の強化など再構築が必要である。

(対応状況)

領域計画書を申請した時点では、下記の計画研究班を含んでいたが、その後研究代表者の逝去により、採択時は計算科学分野の独立した班がない状態となった。

(申請時の計画研究班 C01 分子シミュレーションによるタンパク質化学反応ダイナミクスの解明)

<研究組織> 3名(及び研究協力者4名)

研究代表者: 藤谷 秀章(東大・特任教授・理論物理学・分子動力学シミュレーション)

研究分担者: 宮下 治(理研・上級研究員・生物物理学・ハイブリッドシミュレーション)

研究分担者: 庄司 光男(筑波大・助教・理論化学・量子古典混合計算)

そこで初年度は、B01 南後班の研究分担者として、宮下治(理研・上級研究員)、庄司光男(筑波大・助教)、篠田恵子(東大・助教)が参加し、本領域研究活動を行った。また、宮下を代表として、計画研究班の追加申請を行い、次年度より班として独立した。

その研究体制と内容は、以下の通りである。

宮下治(代表): シミュレーションと実験データの統合によるハイブリッドアプローチの開発

フェムト秒時分割 X 線構造解析や相補の実験からのデータを分子動力学シミュレーションに反映させることにより、より精確なモデリングを行い、時系列の補完や構造アンサンブルの評価など、実験からは直接得ることのできない新しい構造情報を得ることを目指す。

篠田恵子(分担): 脂質分子パラメータの高度化と、大規模 MD シミュレーション

高精度 FUJI 力場を用いて脂質二重膜に埋もれた膜タンパク質のダイナミクスを全原子分子動力学計算による長時間シミュレーションで調べてタンパク質の構造変化メカニズムを明らかにする。

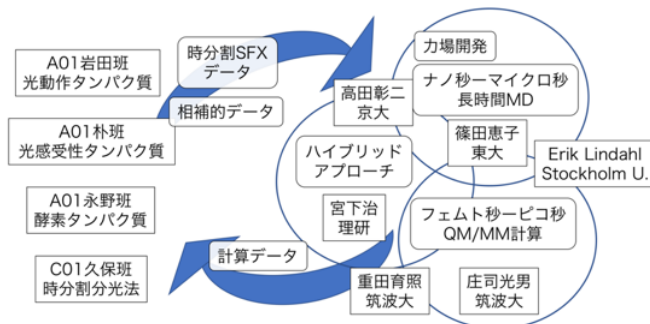
庄司光男(分担): 電子状態計算、QM/MM 計算

光合成における高速な集光過程および光回復酵素(DNA フォトリアーゼ)における DNA の修復メカニズムについて、A01 朴班と密接に連携し、量子古典混合(QM/MM)計算により精密に理論解明する。

研究協力者としては、粗視化モデルによる長時間 MD 手法開発の第一人者である高田彰二(京大・教授)、量子化学計算の専門家である重田育照(筑波大・教授)、膜タンパク質の専門家であり GROMACS の中心開発者でもある Erik Lindahl (Stockholm 大・教授)が研究に参加し、多方面かつ高度に専門的な知識と技術をもって理論研究を推進できる体制となっている。下図にあるように領域内の実験グループと幅広い連携研究を進めている。

また、公募研究においても、林重彦(京大・教授)、北尾彰朗(東工大・教授)、櫻庭俊(量研機構・主任研究員)、小野純一(京大・特定研究員)が参画し、量子化学計算から MD シミュレーションに至る様々な計算手法を得意とする専門家が領域研究を推進している。

本領域研究においては、日本国内の計算科学分野における優れた多くの研究者の参画が行われ、指摘事項にある体制の強化は十分達成されていると考えている。



5 研究の進展状況及び主な成果

(1) 領域設定期間内及び中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価実施時までにはどこまで研究が進展しているのか、(2) 本研究領域により得られた成果について、具体的かつ簡潔に5頁以内で記述すること。(1)は研究項目ごと、(2)は研究項目ごとに計画研究・公募研究の順で記載すること。なお、本研究領域内の共同研究等による成果の場合はその旨を明確にすること。

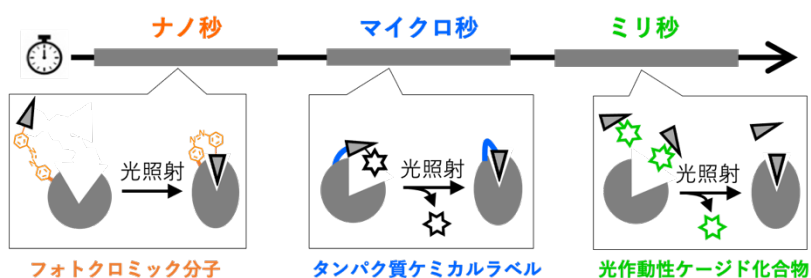
【領域設定期間内及び中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価実施時までにはどこまで研究が進展しているのか】

研究項目1 (A01) : 高速分子動画によるタンパク質の反応機構解明及び分子制御法の開発

(岩田班) タンパクの立体構造を光によって高い空間分解能と時間分解能で人為的に制御する基本原理を考求し、機能のオン/オフを自在に切換え可能な生体内計測や医療等の新技術開発につなげる。異分野融合の意欲的な試みとして光応答性金属錯体触媒-抗体複合体化による人工機能性分子の創出と時分割構造解析にも挑戦する。中間評価の時点ではこれらの実験に必要なサンプルの調製および結晶化を目指した。

(清中班) ケミカルバイオロジーを駆使して、本来は光に対して非感受的なタンパク質に対して光制御能を付与する手法を開発する。具体的には、幅広い時間スケールで起こるタンパク質の構造変化や酵素反応の素過程を動画撮像するために、各時間域に適したケミカル光制御技術を開発する。ミリ秒に関しては、高速分子動画に資する新たなケージド化合物の開発を進める。マイクロ秒に関しては、ケージド化合物とタンパク質のケミカルラベルを組み合わせ、タンパク質のリガンド結合部位近傍に活性種を産生させる新たな手法を開発する。ナノ秒に関しては、フォトクロミック分子を用いた制御方法を開発する。中間評価実施時までには、各制御技術の開発を行い、時分割構造解析の足掛かりとすることを目標とし、実際に様々な光制御技術の開発に成功し、ケージド化合物を用いた高速分子動画撮像結果も得られつつある。

(永野班・朴班) 領域設定期間内に光応答性タンパク質(朴班)と光応答性ではないタンパク質・酵素(永野班)が機能する過程を動画撮影し、そのメカニズムの解明と光遺伝学などへの応用展開の基盤を提供する。中間評価の時点ではこれらの実験に必要なサンプルの調製および結晶化を目指した。



研究項目2 (B01) : 高速分子動画撮影法の基盤構築

(南後班) X線自由電子レーザー(XFEL)によるタンパク質結晶を用いた分子動画法における新たな反応誘起法の確立を目的として、光励起以外の方法である(1)二液混合法と(2)温度ジャンプ法による時分割実験手法の開発を進めている。中間評価実施時までには、前者では微結晶を含む溶液と基質など低分子化合物を含む溶液を瞬時に混合する装置を作成し、実際に酵素を用いて構造解析を行う。後者では、測定装置の構築を行うと共に、正確な昇温測定のための顕微温度イメージング装置の開発を行う。また、結晶調製の制約を課さない溶液を用いた分子動画測定の開拓にも取り組んでいる。中間評価実施時までにはXFEL施設SACLAにて、時分割溶液散乱測定装置の開発を行い、その基盤を構築する。

(足立班) 反応性金属タンパク質の活性中心モデルとしての金属錯体を主な対象とし、その分子構造と電子状態の時間発展をフェムト秒の時間分解能で精密に計測・解析することを目的として、(1)金属錯体の光化学反応研究のためのフェムト秒時間分解X線装置開発と(2)金属錯体の光化学反応のフェムト秒時間分解X線計測・解析に取り組んでいる。中間評価実施時までには金属錯体の過渡的な分子構造や電子状態を観測するための基盤的プラットフォームの構築、銅および金錯体についてフェムト秒時間分解X線計測・解析を行う。

(山本班) 汎用的な動的X線結晶構造解析基盤を構築し、様々なタンパク質において構造ダイナミクスの解明を可能にすることを目的としており、中間評価実施時までには、(1)真空回折計の製作を中心とした高S/Nデータ収集系の開発及び(2)生理活性温度環境での構造解析のための技術開発を行う。

研究項目 3 (C01) : 高速分子動画に資する反応精密分析

(久保班) 本研究では溶液測定に加えて、中間評価時までタンパク質微結晶を測定できる顕微分光装置を開発し、領域設定期間内に、以下の研究対象の時分割構造(分子動画)を分光解析する計画である。**ロドプシン類の光活性制御(紫外可視吸収分光、ラマン・赤外振動分光)**: チャンネルロドプシンや新規ロドプシン類を対象に、光で構造を制御する物理機構を解明。A01 岩田班と連携。

紫外損傷した DNA の光修復(紫外可視吸収分光、ラマン・赤外振動分光): DNA フォトリアーゼを対象に、損傷した DNA を光で修復する化学機構を解明する。A01 朴班と連携。

ケミカルバイオロジーによる反応の光制御(ラマン・赤外振動分光): 光合成 CO₂ 固定酵素 Rubisco を対象に、ケミカルバイオロジーの手法で反応開始を制御し、触媒機構を解明。A01 永野班及び A01 清中班と連携。

タンパク質の発光反応制御(蛍光分光): Ca²⁺の結合により蛍光を発するイクオリンを対象に、二液混合法で反応開始を制御し、発光制御機構を解明。A01 永野班及び B01 南後班と連携。

その他、公募班のタンパク質試料や金属錯体など研究対象を拡げながら、本領域における精密分光分析を推進する。

(宮下班) 時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析(SFX)法による「高速分子動画」は、原子分解能で数 10 フェムト秒からミリ秒までの構造変化を捉えることを可能にする他に例を見ない実験手法である。本研究では量子古典混合計算による複雑な化学反応解析や、高精度力場を用いた大規模長時間シミュレーション、実験データとシミュレーションを融合させるハイブリッドアプローチなどの**多角的な理論・計算研究アプローチ**を用いて、**高速分子動画法による実験データを活用しながら、タンパク質反応の時間・空間・エネルギーに関する詳細な情報を得ることで、タンパク質の動的構造変化とその化学反応機構を解き明かすことを目的とする。**中間評価時までには、実例に応用可能な手法の開発・実証を目指す。

【本研究課題により得られた成果】

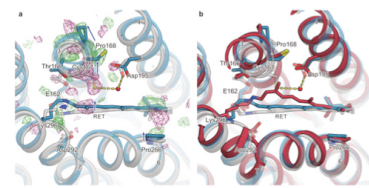
研究項目 1 (A01) : 高速分子動画によるタンパク質の反応機構解明及び分子制御法の開発

(岩田班) 光応答性イオンチャンネルの高速分子動画の撮影に関して最も進んでいるのは草木迫らで、チャンネルロドプシンの閉状態から開状態への遷移に伴う構造変化を明らかにし *eLife*(2021)に報告している。反応開始より 1m 秒後にヘリックス 3 と 7 が動くことにより、分子の内部に溶媒の侵入が可能になることが実験によって示された(右図)。

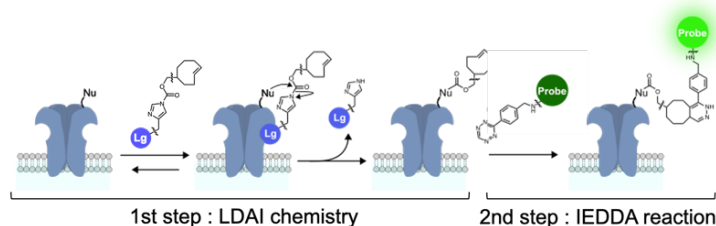
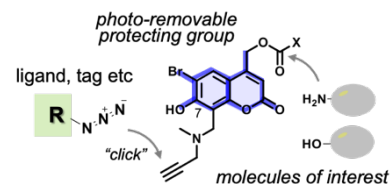
岩田らは 2 光子励起で光遺伝学ツール CRY2 を活性化する BFP との融合タンパク質を分子設計することに成功した(*Nature Meth.* 2019)。現在この融合タンパク質の結晶を得ることに成功しており、静的・動的構造研究に供する予定である。また清中班によって合成された、光作動性リガンドと GPCR であるアデノシン A2a 受容体との複合体との結晶を得ることに成功しており今後の動的構造解析への期待がもたれる。フォトクロミック光タンパク質 Dronpa の分子動画撮影の実験は SACLA において行われたが、現在までに有意な構造変化の検出には至っていない。

(清中班) ミリ秒の時間制御を時間するケージド化合物に関して、古田らは、光特性を失うことなく新たな機能を付与できるケージド化合物の開発に成功した。中でも、酵素によって光反応性のスイッチングができるケージド化合物を開発して、環状ヌクレオチド類の精緻な機能制御を達成した(*Chem Commun.* 2021)。マイクロ秒の時間制御を実現するために、清中らは、ケージド化合物のリガンド結合部位近傍への標識を実現する新たなタンパク質ラベル化法を開発した(*Nat. Commun.* 2021)。本手法では、迅速かつ選択性の高いクリック化学を使うが、それに適用可能なケージド化合物の開発を進めており、マイクロ秒光制御法へとつなげた。

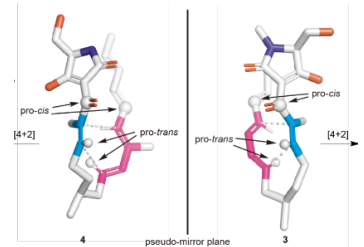
(朴班) 光感受性アデニル酸シクラーゼの微結晶を用いた構造解析では、一部のドメインの揺らぎが大きく分子動画撮影での課題が明らかとなったが、フィコシアニンでは光照射後過渡的に表れる中間状態の速度論的パラメータを決定し、分子動画撮影に向けた準備が整いつつある。



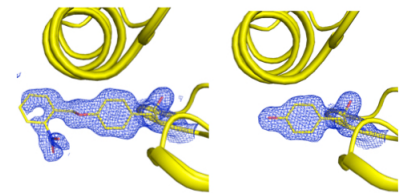
チャンネルロドプシンの光照射による構造変化 (a.灰色→水色)。QM/MM シミュレーションの結果 (b.赤色) ともタンパク質部分の構造はよく一致する。



(永野班) 発光を誘導する Ca^{2+} の結合に伴うイクオリンの構造変化を解明しつつあり、発光メカニズムの解明に向けて順調に研究が進展している。立体選択性が異なる 2 種類の DAase では微結晶の調製に課題がみられるものの、それらの酵素の MD シミュレーションから、それぞれの酵素に基質が疑似的な鏡像異性のコンフォメーションで結合することで立体選択的な環化付加反応を行っていることを示した (右図; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021)。また、Rubisco の反応過程の動画撮影に必要なリガンド非結合型微結晶を作製する条件を見出し、その構造を決定した。



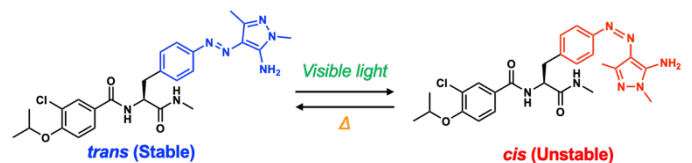
(公募班: 保坂班) クロライドポンプの光照射後の構造変化が示された。光照射によってヘリックス C と G (チャンネルロドプシンのヘリックス 3 と 7 に相当) に構造変化が起こり、もともとイオンが結合していた部位が閉じるように動くことにより、細胞内側に移動したイオンが逆流するのを防ぐようになっていることを明らかにした (投稿準備中)。また、タンパク質にケージドチロシンを導入する技術を確認し、実際にリゾチームに導入して光照射でケージを外すことをできることを構造解析して証明した (右図)。今後領域内での共同研究により、活性部位にチロシンを持つ酵素での分子動画の作成を目指している。



リゾチーム結晶内でのケージドチロシンの電子密度図 (左) と光照射後の電子密度図 (右)。

(公募班: 志甫谷班) 非古典的ロドプシンヘリオロドプシンの分子動画を撮影することに成功し、現在その解釈を行っている。同時に次の分子動画のターゲットとなりうるシゾロドプ (*PNAS*, 2020) および酵素型ロドプシン Rh-PDE (*Nat. commun.* 2020) の静的な構造についても報告を行っており今後の研究に期待がもたれる。高機能人工タンパク質開発や構造変化を制御し、生体内でスイッチできる新機能薬剤開発にも進歩があった。

(公募班: 松尾班) ナノ秒での時間制御を実現するためのフォトクロミック分子に関して、松尾らは核内のモータータンパク質 (CENP-E) の活性を光制御できる CENP-E 阻害剤を見出した。この化合物は光照射でシス体に異性化するが、熱緩和により速やかにトランス体に戻る。その性質を生かして、細胞内で染色体の左右非対称性の制御に成功した (*submitted*) (右図)。



(公募班: 下村班) 下村らは、pH 感受性 K^+ チャンネルである KcsA に対してアゾベンゼン基を有する非天然アミノ酸を導入し、イオンチャンネル活性の光制御に成功している。

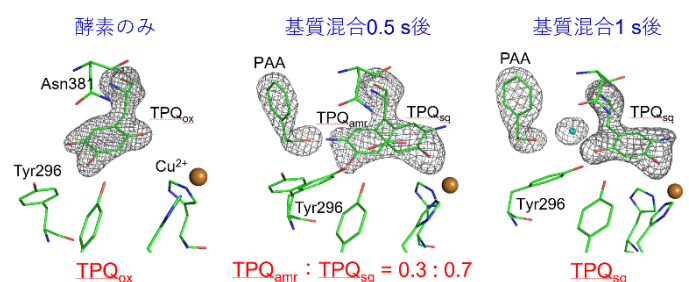
(公募班: 島班) ケージドヌクレオチド (cagedGMP) を使った時分割構造解析結果として、島らは、cagedGMP と低分子量 G タンパク質 (Ras) の共結晶を作成して時分割構造解析の初期的結果の取得に成功した。具体的には、南後班と連携して、SACLA での SFX 測定および SS-RDX 測定により、caged の脱離過程および GTP の加水分解過程の高速分子動画撮影に成功した。

(公募班: 松井班) また、松井らは、ヘム鉄分解酵素の反応過程を追跡するために、ケージド水酸化ヘムを用いた構造解析を進めており、その研究過程で歪んだポルフィリン環が反応過程に必須であること明らかにした (*Biochemistry*, 2020)。

(公募班: 山元班) 光回復酵素の微結晶を再現性良く調製する条件を見出し、基質 DNA の大量作製する手法を確認し、今後の動画観察に期待がもたれる。

(公募班: 菅班) LH1-RC 超複合体の微結晶作成はいまだ困難であるが、高分解能の結晶の再現性に向上がみられた。

(公募班: 村川班) B01 南後班と共同で二液混合システムを用いて時分割構造解析を行い、銅含有アミノ酸化酵素の反応サイクルの一部を動画観察し、活性部位の構造変化などを明らかにした (右図)。



(公募班: 當舎班) エチレン-ビニルアルコール共重合体からなるフィルム中で還元型 NOR の微結晶を嫌気的条件下作製し、一部を切り抜いて X 線回折実験が可能であることを確認し、 3.0 \AA 分解能で構造を決定した。

研究項目 2 (B01) : 高速分子動画撮影法の基盤構築

(南後班) 基質と結晶を急速に混合する二液混合法の開発では、実際に酵素微結晶を用いて実験を行い、活性部位に基質、イオン、補酵素が結合している様子を時間に応じて追跡していくことに成功した(投稿準備中)。また、同様の実験を A01 公募班の村川助教(大阪医科大)と共同で行い、銅アミン酸化酵素における反応の様子を可視化することにも成功している。溶液散乱法の技術開発では、装置及び解析ソフトウェアを新たに開発し、4種の標準タンパク質試料を用いて、それぞれ複数の濃度における散乱プロファイルの獲得に成功した。

(足立班) 銅(I)フェナントロリン錯体の実験系では、銅錯体の光励起後の構造変化と分子振動の計測を試み、Cu-K 吸収端での X 線吸収分光スペクトルの解析から、光励起直後の電子移動 (MLCT) に伴う錯体構造のヤーン・テラー歪みと分子振動を明らかにした(*Nature Comm.*2019)。ジシアノ金(I)錯体 ($\text{Au}(\text{CN})_2^-$) を試料として、液相光化学反応の超高速初期過程の直接観測を試みたところ、時間分解 X 線溶液散乱データにより、レーザー励起直後から 1 ピコ秒の間に X 線散乱強度が時間的に振動する成分が観測され、励起分子が励起ポテンシャル曲面上で振動して Au-Au 間の共有結合が形成する過程を捉えることに成功した(*Nature*2020)。

(山本班) 高 S/N データ収集系の開発においては、SPring-8 BL29XUL で開発したシステムを用いて多角体病ウイルス由来ポリヘドリンタンパク質微結晶を用いて回折実験を実施し、従来の大気条件下での測定と比較して、真空回折計で測定したデータは遥かに高 S/N でデータ収集が可能であることを実証した。試料環境制御装置の開発については、湿度、pH 調節に対応出来る温度範囲を拡張し 20-40°C までの温度範囲で湿度調整環境での回折実験が可能となった。また、微結晶測定技術開発では、室温での適切な X 線照射線量の評価を行うとともに、初期的な測定結果から目標分解能を得るために必要な回折画像数を見積もる方法を提案し、学術誌に報告した(*Acta Crystallogr. D* 2021)。

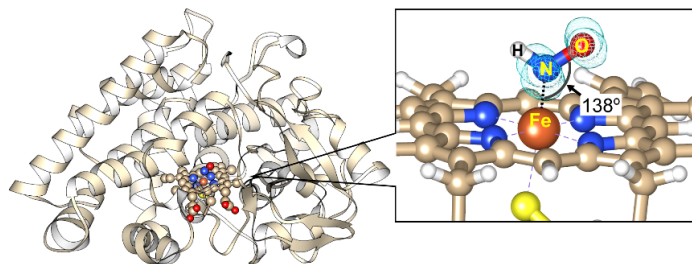
(公募班: 鈴木班) 高感度動的結晶構造解析のための超低バックグラウンド試料セルの開発を進め、従来と比較して厚さが 1/4 の 50 nm SiN 膜を利用しても、試料ホルダを安定的に作製することに成功した。また、山本班と共同で真空回折実験系の開発を進めている。

(公募班: Maity 班) 低分子化合物の反応可視化技術の確立を目的として、XFEL 時分割実験を南後班と共同で実施した。その結果、反応場となる足場タンパク質結晶内に固定された $\text{Mn}(\text{CO})_3$ が光励起によって CO を放出していく過程を捉えることに成功している(投稿準備中)。

研究項目 3 (C01) : 高速分子動画に資する反応精密分析

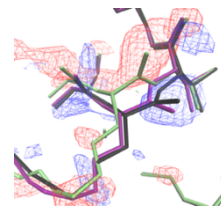
(久保班)

- 光遺伝学ツール・チャンネルロドプシンの光誘起チャンネル開口のメカニズムを解明 (*eLife* 2021) (A01 岩田班、B01 南後班と連携)。久保班は、時分割顕微紫外可視吸収分光により結晶相の反応過程を解析し、分子動画で観測されたチャンネルロドプシンの時々刻々の構造変化がどの中間体遷移に相当するかを帰属した。
- 温室効果・オゾン層破壊の原因である N_2O の生物的発生機構を解明 (*PNAS* 2021) (A01 公募; 當舎班、B01 山本班、C01 公募; 杉本班と連携)。久保班は、時分割顕微赤外分光装置を開発し、分子動画で観測されたカビ由来 NO 還元酵素中間体の化学構造および電子状態(ラジカル性)を解明した(右図)。地球環境における N_2O 排出量を抑制する上で重要な分子基盤を提供した。
- 時分割顕微紫外可視吸収分光装置にマイクロ流路デバイスを組み込み、極微量フロー測定の新技術を開発。(*Bull. Chem. Soc. Japan.* 2020) (A01 公募; 當舎班と連携)。それを用いて、緑膿菌由来 NO 還元酵素の反応速度論解析を行い、三段階からなる酵素反応ステップの詳細を明らかにした。
- 青色光を使って DNA を修復する DNA フォトリアーゼの反応中間体を時分割赤外分光で捕捉 (*Unpublished*) (A01 公募; 山元班と連携)。反応の鍵となる中間体を初めて分光学的に観測し、その化学構造を提案した。本研究に携わった兵庫県立大の学生(M1)が第 47 回生体分子科学討論会優秀ポスター賞を受賞。

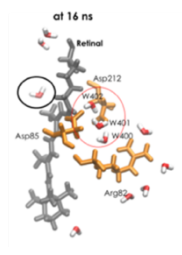


カビ由来 NO 還元酵素中間体の構造及び電子状態。水素原子の位置は時分割赤外分光計測により決定。水色のメッシュは反応性に富む対電子の分布。

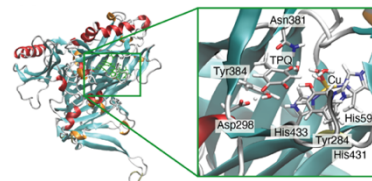
(宮下班) 宮下らは、TR-SFX 実験データから得られる時間発展前後の電子密度の差を反映する差フーリエマップをもとに、MD シミュレーションを用いることで反応後の構造モデルを構築する手法を開発した。ロドプシンの実験データについても実証研究を行い、これまで手作業で作られた構造モデルと同等な構造を自動的に導き出すことができることを示した(右図)(B01 南後 C01 篠田との共同研究)。また、XFEL の単粒子散乱画像から 3次元構造を回復するデータ解析の手法を開発し、実験データへの応用を行った(B01 公募;鈴木班との共同研究)。



篠田らは、古細菌モデル膜をモデリングし、バクテリオロドプシンのより正確な MD シミュレーションを行った。光励起前構造と励起後を比べた結果、レチナル分子のダイナミクスの変化や周りのアミノ酸 Asp212 との相互作用の変化、結晶構造ではわかっていない水の分布の変化(右図の黒丸)を明らかにした。



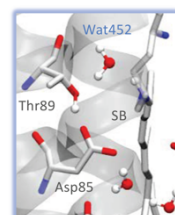
庄司らは、C-フィコシアニンのフィコビルン色素の励起状態構造変化を理論解析し、側鎖プロピオン酸のコンフォメーションが励起状態の構造変化に寄与することを理論解明した(A01 梅名との共同研究)。また、銅含有アミン酸化酵素(右図)の反応サイクルで重要なプロトン化状態について理論解析し、Asp298 残基がプロトン化していること、回転自由度を持っていることを見出した(O1 村川の共同研究)。



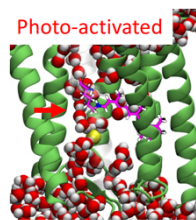
(公募班:杉本班) 過酸化水素を還元除去するペルオキシダーゼの反応中間体の化学構造を解明(*Angew. Chem. Int. Ed.* 2021)。1.06 Å の超高分解能で反応中間体の構造を精密解析し、水素原子の電子密度観測から活性部位の化学構造(Fe⁴⁺=O)を決定することに成功した。

(公募班:田中班) 細菌の細胞壁にある多糖を分解するリゾチームの基質結合複合体の精密構造を決定(*Acta. Crystallogr. D Struct. Biol.* 2021)。1.03 Å の超高分解能で X 線構造解析し、教科書記載のモデルを支持しない構造を報告した。中性子回折データの収集も完了しており、現在水素原子を含めた更なる精密構造解析を進めている。

(公募班:小野班) 南後(B01)岩田(A01)らによるバクテリオロドプシンの光反応サイクル L 状態スナップショット構造で観測された内部水分子に着目し大規模量子 MD 計算を実行し、水が近傍残基へとリレー形式でプロトンを受け渡した後、生じた水酸化物イオン中間体がシッフベースからプロトンを受け取る 1 段階目のプロトン移動の機構を明らかにした(右図)(*J.Phys.Chem.B* 2020)。

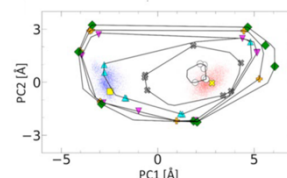


(公募班:林班) QM/MM RWFE-SCF 法、大規模 MD 法を活用し、光操作実験に活用されるタンパク質について構造変化に関する研究を行った。光感受性塩素イオンチャネルタンパク質 GtACR1 の暗状態において既に塩素イオンがチャネル内に広く分布することを明らかにし、光異性化後の中間状態について水分子鎖が膜間で繋がった開状態の構造モデル(右図)を得ることに成功した。また、タンパク質イクオリンのカルシウム結合による発光状態活性化の分子機構を明らかにするために、X 線結晶構造を用いて、MD シミュレーション系の構築を行った(A01 中津との共同研究)。



(公募班:北尾班) 時分割実験データを補完する分子シミュレーション法の適用範囲をさらに広げるため、edge expansion PaCS-MD を開発した。これは、ターゲットとなる別の立体構造や指標がなく、1つの立体構造のみが得られた時にどのような構造変化が起こりうるかを予測する方法(右図)でドメイン運動などの大振幅の構造変化を従来法よりも高効率で予測することを可能にする。また G タンパク質共役受容体 mGlu1 とリガンドの相互作用がアミノ酸変異やリガンドのわずかな違いにどの様に影響されるかの評価を進めた(A01 清中との共同研究)。

多次元主成分空間分布の頂点から探索空間を拡大



(公募班:櫻庭班) 空間スケールに基づく新しい計算手法の研究としてタンパク質などの分子に対し、本来であれば構造変化の遅い方向に対して空間を歪ませること(右図)で構造変化を容易にするアルゴリズムを実装し、chignolin と Trp-cage をターゲットとして、アルゴリズムの実証と様々なパラメータの改良を行った。



6 研究発表の状況

研究項目ごとに計画研究・公募研究の順で、本研究領域により得られた研究成果の発表の状況（主な雑誌論文、学会発表、書籍、産業財産権、ホームページ、主催シンポジウム、一般向けのアウトリーチ活動等の状況。令和3年6月末までに掲載等が確定しているものに限る。）について、具体的かつ簡潔に5頁以内で記述すること。なお、雑誌論文の記述に当たっては、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、研究代表者（発表当時、以下同様。）には二重下線、研究分担者には一重下線、corresponding author には左に*印を付すこと。

<主要な雑誌論文>

A01 岩田班 計15件（以下6件を抜粋）

1. Maeda S, Shiimura Y, Asada H, Hirata K, Luo F, Nango E, Tanaka N, Toyomoto M, Inoue A, Aoki J, *Iwata S and *Hagiwara M. “Endogenous agonist-bound S1PR3 structure reveals determinants of G protein-subtype bias” *Science Adv.* 7, eabf5325 (2021)
2. Oda K, Nomura T, Nakane T, Yamashita K, Inoue K, Ito S, Vierock J, Hirata K, Maturana AD, Katayama K, Ikuta T, Ishigami I, Izume T, Umeda R, Eguma R, Oishi S, Kasuya G, Kato T, Kusakizako T, Shihoya W, Shimada H, Takatsuji T, Takemoto M, Taniguchi R, Tomita A, Nakamura R, Fukuda M, Miyauchi H, Lee Y, Nango E, Tanaka R, Tanaka T, Sugahara M, Kimura T, Shimamura T, Fujiwara T, Yamanaka Y, Owada S, Joti Y, Tono K, Ishitani R, Hayashi S, Kandori H, Hegemann P, Iwata S, *Kubo M, *Nishizawa T and *Nureki O. “Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin” *Elife* 10: e62389 (2021)
3. Kondo M, *Masaoka S. “Pentanuclear Scaffold: A Molecular Platform for Small-Molecule Conversions.” *Acc. Chem. Res.* 53(10):2140-2151 (2020)
4. Im D, Inoue A, Fujiwara T, Nakane T, Yamanaka Y, Uemura T, Mori C, Shiimura Y, Kimura KT, Asada H, Nomura N, Tanaka T, Yamashita A, Nango E, Tono K, Kadji FMN, Aoki J, *Iwata S and *Shimamura T. “Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone.” *Nat. Commun.* 11, 1, 6442 (2020)
5. Shiimura Y, Horita S, Hamamoto A, Asada H, Hirata K, Tanaka M, Mori K, Uemura T, Kobayashi T, *Iwata S, *Kojima M. “Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode” *Nat. Commun.* 11(1):4160 (2020)
6. Kinjo T, Terai K, Horita S, Nomura N, Sumiyama K, Togashi K, Iwata S and *Matsuda M. “FRET-assisted photoactivation of flavoproteins for in vivo two-photon optogenetics.” *Nat. Methods* 16: 1029-1036(2019)

A01 清中班 計9件（以下5件を抜粋）

1. *Tsai, YH, Doura T, *Kiyonaka S. “Tethering-based chemogenetic approaches for modulation of protein function in live cells.” *Chem. Soc. Rev.* in press.
2. Suzuki AZ, Sakano T, Sasaki H, Watahiki R, Sone M, Horikawa K, *Furuta T. “Design and synthesis of gene-directed caged cyclic nucleotides exhibiting cell type selectivity” *Chem. Commun.* in press.
3. Ojima K, Shiraiwa K, Soga K, Doura T, Takato M, Komatsu K, Yuzaki M, *Hamachi I, *Kiyonaka S. “Ligand-directed two-step labeling to quantify neuronal glutamate receptor trafficking.” *Nat. Commun.*, 12, 831 (2021).
4. Mukaimine, A., *Hirayama, T., Nagasawa, H. “Asymmetric bismuth-rhodamines as an activatable fluorogenic photosensitizer.” *Org. Biomol. Chem.*, 19, 3611–3619 (2021)
5. *Hirayama T, Niwa M, Hirosawa S, Nagasawa H. “High-throughput screening for the discovery of iron Homeostasis modulators using an extremely sensitive fluorescent probe.” *ACS sensors* 5, 2950–2958 (2020)

A01 朴班 計11件（以下4件を抜粋）

1. Yun JH, Li X, Yue J, Park JH, Jin Z, Li C, Hu H, Shi Y, Pandey S, Carbajo S, Boutet S, Hunter MS, Liang M, Sierra RG, Lane TJ, Zhou L, Weierstall U, Zatsepin NA, Ohki M, Tame JRH, Park SY, Spence JCH, Zhang W, *Schmidt M, *Lee W, *Liu H. “Early-stage dynamics of chloride ion-pumping rhodopsin revealed by a femtosecond X-ray laser.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 118(13):e2020486118. (2021)
2. Yun JH, Park JH, Jin Z, Ohki M, Wang Y, Lupala CS, Liu H, *Park SY, *Lee W. “Structure- Based Functional

- Modification Study of a Cyanobacterial Chloride Pump for Transporting Multiple Anions.” *J. Mol. Biol.* 432, 19, 5273 (2020)
- *Shibayama N, Sato-Tomita A, Ohki M, Ichianagi K, Park SY. “Direct observation of ligand migration within human hemoglobin at work.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 117, 9, 4741-4748 (2020)
 - Yun JH, Ohki M, Park JH, Ishimoto N, Sato-Tomita A, Lee W, Jin Z, Tame JRH, Shibayama N, *Park SY, *Lee W. “Pumping mechanism of NM-R3, a light-driven bacterial chloride importer in the rhodopsin family.” *Sci. Adv.*, 6, 6, eaay2042 (2020)

A01 永野班 計 6 件 (以下 3 件を抜粋)

- Fujiyama K, Kato N, Re S, Kinugasa K, Watanabe K, Takita R, Nogawa T, Hino T, Osada H, Sugita Y, Takahashi S, Nagano S. “Molecular basis for two stereoselective Diels-Alderses that produce decalin skeletons.” *Angew. Chem. Int. Ed.* (First Published: 13 June 2021)
- Matsuoka K, Nakatsu T, *Kato H., “The crystal structure of the CmABCB1 G132V mutant, which favors the outward-facing state, reveals the mechanism of the pivotal joint between TM1 and TM3.” *Protein Sci.*, 30, 2021, 1064–1071.
- Kodan A, Futamata R, Kimura Y, Kioka N, Nakatsu T, Kato H, *Ueda K. “ABCB1/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs” *FEBS Lett.*, 595, 2021, 707 – 716.

B01 南後班 計 11 件 (以下 5 件を抜粋)

- Nat. Commun.* (2020) ※A01 岩田班 4 参照
- Wickstrand C, Katona G, Nakane T, Nogly P, Standfuss J, Nango E, *Neutze R. “A tool for visualizing protein motions in time-resolved crystallography.” *Struct. Dyn.* 7, 024701 (2020)
- Toma-Fukai S, Hibi R, Naganuma T, Sakai M, Saijo S, Shimizu N, Matsumoto M and *Shimizu T. “Crystal structure of GCN5 PCAF N-terminal domain reveals atypical ubiquitin ligase structure.” *J. Biol. Chem.* 295, 14630 (2020)
- Shimazua Y, *Tono K, Tanaka T, Yamanaka Y, Nakane T, Mori C, Kimura TK, Fujiwara T, Sugahara M, Tanaka R, Doak RB, Shimamura T, Iwata S, *Nango E and Yabashi M. “High-viscosity sample injection device for serial femtosecond crystallography at atmospheric pressure.” *J. Appl. Cryst.* 52, 1280 (2019)
- Hirata A, Okada K, Yoshii K, Shiraishi H, Saijo S, Yonezawa K, Shimizu N and *Hori H. “Structure of tRNA methyltransferase complex of Trm7 and Trm734 reveals a novel binding interface for tRNA recognition.” *Nucleic Acids Res.* 47, 10942 (2019)

B01 足立班 計 4 件

- Kim J G, Nozawa S, Kim H, Choi E H, Sato T, Kim T W, Kim K H, Ki H, Kim J, Choi M, Lee Y, Heo J, Oang K Y, Ichianagi K, Fukaya R, Lee J H, Park J, Eom I, Chun S H, Kim S, Kim M, Katayama T, Togashi T, Owada S, Yabashi M, Lee S J, Lee S, Ahn C W, Ahn D-S, Moon J, Choi S, Kim J, Joo T, Kim J, *Adachi S, Ihee H. “Mapping the emergence of molecular vibrations mediating bond formation” *Nature* 582, 520 (2020)
- Koide A, *Uemura Y, Kido D, Wakisaka Y, Takakusagi S, Ohtani B, Niwa Y, Nozawa S, Ichianagi K, Fukaya R, Adachi S, Katayama T, Togashi T, Owada S, Yabashi M, Yamamoto Y, Katayama M, Hatada K, *Yokoyama T, and *Asakura K. “Photoinduced anisotropic distortion as the electron trapping site of tungsten trioxide by ultrafast W L1-edge X-ray absorption spectroscopy with full potential multiple scattering calculations” *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 2615 (2020)
- *Katayama T, Northey T, Gawelda W, Milne C J, Vankó G, Lima F A, Bohinc R, Németh Z, Nozawa S, Sato T, Khakhulin D, Szlachetko J, Togashi T, Owada S, Adachi S, Bressler C, Yabashi M, and *Penfold T J. “Tracking multiple components of a nuclear wavepacket in photexcited Cu(I)-phenanthroline complex using ultrafast X-ray spectroscopy” *Nature Comm.* 10, 3606 (2019)
- *Ichianagi K, Takagi S, Kawai N, Fukaya R, Nozawa S, Nakamura K G, Liss K-D, Kimura M. and Adachi S. “Microstructural deformation process of shock-compressed polycrystalline aluminum”, *Scientific Reports*, 9, 7604 (2019)

B01 山本班 計 3 件

1. Hasegawa K, Baba S, Kawamura T, Yamamoto M, and *Kumasaka T. “Evaluation of the data-collection strategy for room-temperature micro-crystallography studied by serial synchrotron rotation crystallography combined with the humid air and glue-coating method.” *Acta Crystallogr. D* 77, 300-312 (2021)
2. Kobayashi A, Takayama Y, Hirakawa T, Okajima K, Oide M, Oroguchi T, Inui Y, Yamamoto M, Matsunaga S, and *Nakasako M. “Common architectures in cyanobacteria Prochlorococcus cells visualized by X-ray diffraction imaging using X-ray free electron laser.” *Sci. Rep.* 11, 3877 (2021)
3. Baba S, Shimada A, Mizuno N, Baba J, Ago H, Yamamoto M, and *Kumasaka T. “A temperature-controlled cold-gas humidifier and its application to protein crystals with the humid-air and glue-coating method.” *J. Appl. Cryst.* 52, 699-705 (2019)

C01 久保班 計 12 件 (以下 4 件を抜粋)

1. Nomura T, Kimura T, Kanematsu Y, Yamada D, Yamashita K, Hirata K, Ueno G, Murakami H, Hisano T, Yamagiwa R, Takeda H, Gopalasingam C, Kousaka R, Yanagisawa S, Shoji O, Kumasaka T, Yamamoto M, Takano Y, Sugimoto H, *Tosha T, Kubo M, *Shiro Y. “Short-lived intermediate in N₂O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118 (21): e2101481118 (2021).
2. *Elife* (2021) ※A01 岩田班 2 参照
3. Takeda H, Kimura T, Nomura T, Horitani M, Yokota A, Matsubayashi A, Ishii S, Shiro Y, Kubo M, *Tosha T. “Timing of NO binding and protonation in the catalytic reaction of bacterial nitric oxide reductase as established by time-resolved spectroscopy.” *Bull. Chem. Soc. Japan* Vol. 93, 825-833 (2020) (Selected paper).
4. Tomida S, Ito S, Mato T, Furutani Y, Inoue K, *Kandori H. “Infrared spectroscopic analysis on structural changes around the protonated Schiff base upon retinal isomerization in light-driven sodium pump KR2.” *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* Vol. 1861, 148190 (2020).

C01 宮下班 計 7 件 (以下 6 件を抜粋)

1. *Yamasaki S, *Shoji M, Kayanuma M, Sladek V, Inaoka D K, Matsuo Y, Shiba T, Young L, Moore A L, Kita K, Shigeta Y. “Weak O₂ binding and strong H₂O₂ binding at the non-heme diiron center of Trypanosome Alternative Oxidase.” *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1862, 148356-9 (2021)
2. Kamiya N, Kayanuma M, Fujitani H, and *Shinoda K. “A New Lipid Force Field (FUJI)” *J. Chem. Theory Comput.* 16, 6, 3664–3676 (2020)
3. SP Tiwari, S Chhabra, *Tama F, Miyashita O. “Computational Protocol for Assessing the Optimal Pixel Size to Improve the Accuracy of Single-particle Cryo-electron Microscopy Maps.” *J. Chem. Info Model* 60, 2570-2580 (2020)
4. *Shoji M, Murakawa T, Boero M, Shigeta Y, Hayashi H, Okajima T. “Unique Protonation State of Aspartate and Topaquinone in the Active Site of Copper Amine Oxidase.” *RSC Advances*, 10, 38631-38639 (2020)
5. *Mishima K, *Shoji M, Umena Y, Boero M, Shigeta Y. “Role of the Propionic Acid Side-Chain of C-Phycocyanin Chromophores in the Excited States for the Photosynthesis Process.” *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 93, 1509-1519 (2020)
6. *Shoji M, *Abe Y, Boero M, Shigeta Y, Nishiya Y. “Reaction Mechanism of Monomeric Sarcosine Oxidase with N-Cyclopropylglycine.” *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22, 16552-16561 (2020)

A01 公募班 計 16 件 (以下 4 件を抜粋)

1. Li H, Nakajima Y, Nomura T, Sugahara M, Yonekura S, Chan SK, Nakane T, Yamane T, Umena Y, Suzuki M, Masuda T, Motomura T, Naitow H, Matsuura Y, Kimura T, Tono K, Owada S, Joti Y, Tanaka R, Nango E, Akita F, Kubo M, Iwata S, *Shen JR, *Suga M. “Capturing structural changes of the S₁ to S₂ transition of photosystem II using time-resolved serial femtosecond crystallography.” *IUCrJ.* 8, 431-443 (2021)

- Ikuta T, Shihoya W, Sugiura M, Yoshida K, Watari M, Tokano T, Yamashita K, Katayama K, Tsunoda SP, Uchihashi T, Kandori H, Nureki O. “Structural insights into the mechanism of rhodopsin phosphodiesterase.” *Nat. Commun.* 11(1):5605 (2020).
- Takahashi S, Nambu S, Matsui T, Fujii H, Ishikawa H, Mizutani Y, Tsumoto K, Ikeda-Saito M. “Unique Electronic Structures of the Highly Ruffled Hemes in Heme-Degrading Enzymes of *Staphylococcus aureus*, IsdG and IsdI, by Resonance Raman and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopies.” *Biochemistry* 59 (40), 3918-3928 (2020).
- Terai, Y., Sato, R., Matsumura, R., Iwai, S., and Yamamoto, J. “Enhanced DNA repair by DNA photolyase bearing an artificial light-harvesting chromophore.” *Nucleic Acids Res.* 48, 10076-10086 (2020).

B01 公募班 計 1 件

- Kimura T, Suzuki A, Yang Y, Niida Y, Nishioka A, Takei M, Wei J, Mitomo H, Matsuo Y, Niikura K, Ijiri K, Tono K, Yabashi M, Ishikawa T, Oshima T, Bessho Y, Joti Y, Nishino Y. “Micro-liquid enclosure array and its semi-automated assembling system for x-ray free-electron laser diffractive imaging of samples in solution.” *Rev. Sci. Instrum.*, **91**, 083706 (2020).

C01 公募班 計 10 件 (以下 5 件を抜粋)

- Tanaka I, Nishinomiya R, Goto R, Shimazaki S and Chatake T. “Recent structural insights into the mechanism of lysozyme hydrolysis.” *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 77, 3, 288-292 (2021).
- Cheng C and Havashi S. “Ab initio evaluation of the redox potential of cytochrome c.” *J. Chem. Theory Comput.* 17, 1194-1207 (2021)
- Kwon H, Basran J, Pathak C, Hussain M, Freeman SL, Fielding AJ, Bailey AJ, Stefanou N, Sparkes HA, Tosha T, Yamashita K, Hirata K, Murakami H, Ueno G, Ago H, Tono K, Yamamoto M, Sawai H, Shiro Y, Sugimoto H, Raven E, Moody PCE. “XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II.” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* Online ahead of print. (2021)
- Takaba K, Tran PD and Kitao A. “Edge expansion parallel cascade selection molecular dynamics simulation for investigating large-amplitude collective motions of proteins.” *J. Chem. Phys.* 152, 225101(1-13) (2020)
- J. Ono, M. Imai, Y. Nishimura, H. Nakai. “Hydroxide Ion Carrier for Proton Pumps in Bacteriorhodopsin: Primary Proton Transfer.” *J. Phys. Chem. B*, **124**, 8524–8539 (2020).

<学会発表>

計画研究班：105 件(招待講演、一般口頭講演、ポスター発表)

公募班：45 件 (招待講演、一般口頭講演、ポスター発表)

<書籍>

- Nomura N, Nomura Y, Sato Y and Iwata S. “The Intervening Removable Affinity Tag (iRAT) System for the Production of Recombinant Antibody Fragments” *Methods Mol Biol.* 2247; 77-103(2021) “Multiprotein Complexes”, Humana Press. [A01 岩田班]
- Tsukamoto, H. and Furutani, Y. “Optogenetic Modulation of Ion Channels by Photoreceptive Proteins” *Optogenetics. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Nature, Vol. 1293, 73-88(2021). [C01 久保班]
- 片山耕大, 「GPCR の赤外分光研究」, 月間「細胞」特集「G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の新展開」 Vol. 53 pp. 21~25, ニューサイエンス社, (2021) [A01 公募片山班]
- 山下恵太郎, 溝端栄一. X 線結晶解析による新規構造の解明. 膜タンパク質工学ハンドブック (津本浩平 監修, エヌ・ティー・エス) (2020), p.27-33 [A01 永野班]
- 溝端栄一, 久保稔 第 1 編 第 1 章 “X 線自由電子レーザーによる膜タンパク質の構造解析” *膜タンパク質工学ハンドブック*, エヌ・ティー・エス 11-15 (2020). [A01 永野班, C01 久保班]
- 庄司光男, フリーソフトで始める分子モデリング, Amazon Kindle direct publishing (電子書籍), ASIN: B087Q6PCDB, (2020) [C01 宮下班]

7. 福本恵紀、野澤俊介、足立伸一著、編集、「X線分光-放射光の基礎から時間分解計測まで-」(化学の要点シリーズ) 日本化学会、共立出版(2019) [B01 足立班]

その他2件

<産業財産権>

1. 清中茂樹、堂浦智裕、長谷川寛太、柏俊太朗、変異型Gタンパク質共役型受容体、出願人：名古屋大学：特願2021-028956、2021/2/25 [A01 清中班]
2. 福本恵紀、足立伸一、時間分解光電子顕微鏡装置、正孔空間分布検出法、正孔寿命推定方法及び正孔移動度演算方法」 出願番号：特願2019-192046、出願日：2019年10月21日 [B01 足立班]

その他1件

<ホームページ>

高速分子動画 HP: <http://www.molmovies.med.kyoto-u.ac.jp/>

高速分子動画 Facebook: <https://www.facebook.com/MolMovies>

プレスリリース:

1. X線自由電子レーザーで捉えた、光照射によるチャンネルロドプシンの構造変化の過程を捉えることに成功(2021年3月26日、A01 岩田・草木迫, C01 久保)
2. 記憶や学習に関わる神経伝達物質受容体の迅速な蛍光標識に成功(2021年2月5日、A01 清中)
3. 原子が振動しながら共有結合が形成されていく様子を直接観測-光化学反応において、初期の構造変化を10兆分の1秒単位で追跡-(2020年6月25日、B01 足立・片山・大和田)

その他13件

<主催シンポジウム>

1. 第21回日本蛋白質科学会・共催ワークショップ, オーガナイザー: B01 南後、C01 木村 (オンライン, 2021年6月17日)
2. 第77回顕微鏡学会講演会・シンポジウム共催, オーガナイザー: A01 岩田 (つくば&オンライン, 2021年6月14日)
3. 第47回生体分子科学討論会, 共催, 実行委員長: C01 久保 (オンライン, 2021年6月4-5日)
4. 日本薬学会第141年会・一般シンポジウム, オーガナイザー: A01 清中, 永澤 (オンライン, 2021年3月29日)
5. 第43回日本分子生物学会年会・ワークショップ共催, オーガナイザー: A01 朴, A01(公募班) 日野 (オンライン, 2020年12月4日)
6. 令和二年度「高速分子動画」シンポジウム (淡路&オンライン, 2020年10月19-20日, 現地57名・オンライン55名)
7. 第58回日本生物物理学会年会・シンポジウム共催, オーガナイザー: C01 久保, 庄司 (オンライン, 2020年9月16日)
8. 第93回日本生化学会大会・シンポジウム共催, オーガナイザー: A01 永野, 溝端 (オンライン, 2020年9月14日)
9. 令和元年度 新学術領域研究「高速分子動画」キックオフミーティング・膜タンパク質研究会 (淡路, 2019.10.7-8, 83名参加)
10. 領域説明会 (YouTube配信とのハイブリッド, 2019年9月17日)

<一般向けのアウトリーチ活動等>

1. 新学術領域「高速分子動画」主催 Web セミナー「構造生物学・化学・計算科学を融合させたウイルス・パンデミックに対する取り組み」 (オンライン, 2021年4月2日, 243名参加)
2. 動画コンテンツ作成: 本領域 HP から視聴可能
 - (1) X線自由電子レーザー: <https://www.youtube.com/watch?v=weAMSjIViQI>
 - (2) 分子動画法(時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析): <https://www.youtube.com/watch?v=QeWzcyFdrhk>
3. 領域パンフレット作成

7 研究組織の連携体制

研究領域全体を通じ、本研究領域内の研究項目間、計画研究及び公募研究間の連携体制について、図表などを用いて具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

本研究領域は、下記の3つのグループから構成されている（右上図）。

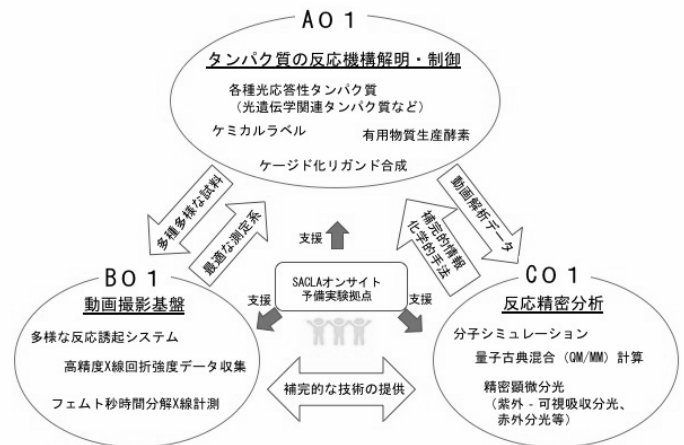
研究項目1：高速分子動画によるタンパク質の反応機構解明及び分子制御法の開発（A01）

研究項目2：高速分子動画撮影法の基盤構築（B01）

研究項目3：高速分子動画に資する反応精密分析（C01）

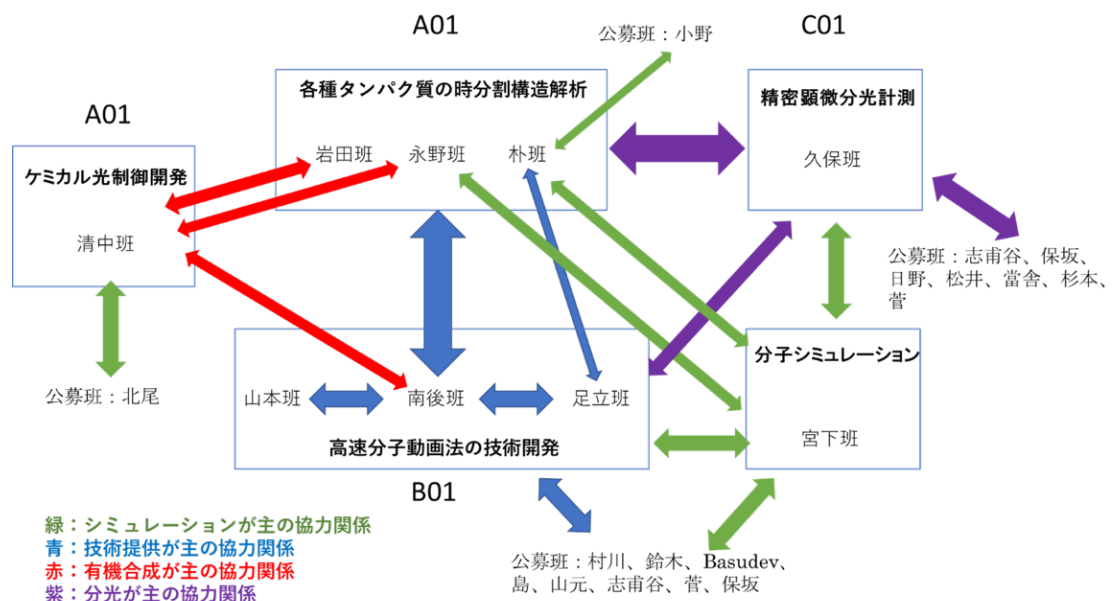
それぞれの研究計画は自己完結型の研究ではなく相補的であることから、互いの専門分野を融合させながら進行している。本領域で実施する計画研究は、X線自由電子レーザー（XFEL）を利用した実験を核としており、計画研究のメンバーがSACLAに集合し協力して実験を実施してきた。コロナ禍で各種会合がオンライン化される中で、SACLAでの実験は貴重な議論の場となり、緊密な連携関係が構築されている。

また、領域代表者は月1-2回程度、定期的にオンラインセミナーを開催してきた。このセミナーの講演者は領域に参加している代表、分担、協力研究者が中心で、自身の研究紹介を通じて、今後の研究方針、戦略、討論を活発に行ってきた。互いに連携可能な領域を見出し、このオンラインセミナーを通じて始まった共同研究も数多い。



主な共同研究を挙げると

- ・岩田班と清中班による GPCR 活性制御法の開発
- ・朴班と久保班との顕微分光分析
- ・永野班と南後班との時分割測定方法の確立
- ・清中班と公募の北尾班との新たな GPCR ケモジェネティクスリガンドの分子動力学計算
- ・山本班と公募の鈴木班との高 S/N データ収集系の共同開発
- ・足立班と岩田班との抗体を反応場とした触媒反応可視化
- ・宮下班と公募の村川班による銅含有アミン酸化酵素の還元的半反応の反応機構解析など 42 件を超える共同研究が領域内で進行しており、強固な連携関係を構築している。下記の図にその主な連携関係を示す。



8 若手研究者の育成に係る取組状況

研究領域全体を通じ、本研究領域の研究遂行に携わった若手研究者（令和3年3月末現在で39歳以下。研究協力者やポスドク、途中で追加・削除した者を含む。）の育成に係る取組状況について、具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

本領域の領域代表者（岩田想）は、膜タンパク質 X 線結晶構造解析の世界的権威であり、X 線自由電子レーザー（XFEL）によるタンパク質動的構造解析の第一人者としても知られる。スウェーデンやイギリスで教授を歴任し、数々の大型プロジェクトを牽引するなど、豊かな人脈と国際経験を有する。また、専門とする X 線結晶学や構造生物学に限らず、生化学、分子生物学、医学、計算科学、放射光科学などの幅広い研究分野の知識を兼ね備えている。領域代表者を中心に、世界トップレベルにある国内研究者を巻き込み、若手研究者を積極的に登用し、新学術領域の研究推進や種々の企画を通して、オン・ザ・ジョブ・トレーニングを計画した。

計画研究班の構成については、2018年の計画段階で計画研究の代表者と分担者の合計23名のうち、39歳以下の若手研究者3名、40歳から45歳の比較的若い研究者10名を含む研究推進体制を構築した。次いで、2020年の公募班選考では、一人では研究を遂行するのが簡単でない、若手研究者に的を絞って選考を行ったので、研究代表者20名のうち半数が39歳以下である。本領域は幅広い異なる分野の共同研究から、予想しなかった全く新しいパラダイムを生み出すことを目指しており、この目標を達成するためには計画研究班や公募班にかかわらず、領域内そして領域外も含めてこれまでしてこなかったような共同研究を進めていくことが最も大切である。そのために、若手研究者にはこの研究期間に自分の研究の枠を広げ、将来の自分のキャリア形成の礎になるような研究及び共同研究を見つけることを最大の目的にしてもらう後押しをしている。

2020年4月から新型コロナウイルスの感染拡大により、十分に研究活動ができない時期が存在し、また、この先も対面で会議、海外派遣や海外招聘等が難しい状況が続くことが想定される。若手研究者の育成に関する取り組みも困難な状況に直面しているが、この状況下で新しい方法を模索した。2020年8月からオンラインセミナーを企画し、現在、月に2回程度で若手研究者を積極的に指名し、共同研究の契機を促進している（第1回 小野（京都大）、第3回 櫻庭（量研機構）/山元（大阪大）、第5回 篠田（東京大）/志甫谷（東京大）、第6回 山下（MRC）/松尾（北海道大）、第7回 古田（東邦大）/堂浦（名古屋大） 他、下線は若手研究者）。若手研究者に発表の機会を与えることで、領域代表、計画研究班、公募班のメンバーと活発な議論を行うことができ、貴重な経験となっている。「高速分子動画のための光化学制御研究会」、「Serial crystallography 技術開発研究会」を起し、関係者の所属する大学生・大学院生・博士研究員をはじめとして、若手研究者の参画を可能とした。領域会議では懇親会を兼ねたポスターセッションを実施し、若手研究者の研究を話題に活発な議論の場を提供している。オンライン会議を実施する際には、若手研究者が積極的に意見交換することができるポスターセッション等の企画を若手研究者と検討を進めたい。ニュースレターは領域ホームページからダウンロード可能であるので、ニュースレター執筆の機会を与えることによって、領域内外に対して、若手研究者の研究アピールの場になったと考えている。

さらに各計画研究班でも個別に若手研究者育成の取り組みを実施している。例えば、山田大智助教（33歳、兵庫県立大久保担当）が、第58回日本生物物理学会年会において英語のシンポジウム「Diversity of photobiology; from molecules to organisms: 光生物学研究の多様性～分子から生物個体まで～」をオーガナイズした。宮川晃一博士研究員（29歳、筑波大庄司担当）が共同研究課題を担当し可能な限り自力での課題解決を試みているが、専門分野のオンライン研究報告会を開き進捗状況を議論している。Sriram Raghavan 博士研究員（理研宮下担当）は、コロナ禍での入国制限のため母国インドで研究を行っているが、オンラインで日常的に研究に関する連絡・議論を行っている。藤山啓博博士後期課程学生（鳥取大永野担当）は、ターゲット酵素のディールスアルダー酵素 Phm7 と Fsa2 の基質非結合型の結晶構造を決定し、宮下班の杉田らと共同で分子動力学計算などを行い、これらの酵素の作用メカニズムの重要な一端を解明するとともに、X 線自由電子レーザー実験に積極的に取り組んだ。

9 研究費の使用状況・計画

研究領域全体を通じ、研究費の使用状況や今後の使用計画、研究費の効果的使用の工夫、設備等（本研究領域内で共用する設備・装置の購入・開発・運用、実験資料・資材の提供など）の活用状況について、総括班研究課題の活動状況と併せて具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

【研究費の使用状況】

本研究遂行上で不可欠な基盤整備のために機械や装置等の導入を進めた。共同研究も含めた研究推進のために博士研究員等の雇用を行なった。人員や備品の拡充を必要としない研究機関においては消耗品や試薬等の購入を中心に研究を遂行した。総括班の活動詳細は中間報告書（総括班）に記載するが、領域運営、研究支援活動、国際活動支援やアウトリーチ活動等を実施した。

物品費：A01 清中班では共焦点レーザー顕微鏡・光照射装置・蒸発光散乱検出器等、永野班では超遠心機・発光蛍光装置等、朴班ではタンパク質結晶化分注システム・小型超遠心機等を導入した。B01 南後班では高速液体クロマトグラフィー装置等を導入した。C01 宮下班では GPU を搭載した計算機サーバー・ワークステーション等、久保班ではナノ秒ダイオード励起 OPO レーザー・高感度冷却 CMOS カメラ・多波長 LED 光源等を導入した。B01 山本班では、高 S/N データ収集系や in situ 測定用試料雰囲気制御技術の開発に関わる製作を行なった。また、各班ではそれぞれの研究計画に基づき、有機合成試薬、遺伝子工学試薬、細胞培養試薬、タンパク質調製や結晶化用消耗品、分光測定用消耗品、光学素子等の実験資材に使用した。総括班では会議やアウトリーチのための環境を整えた。

人件費・謝金：コロナ禍で海外からの研究員雇用に遅れが生じているが、本研究の遂行に必要な人材の確保に努め研究を遂行した。博士研究員等としては、東邦大、東北大、理研、高エネ研、兵庫県立大や筑波大で各1名、RAとして鳥取大1名を雇用した。また、研究支援者を JASRI や鳥取大等で各1名雇用した。

旅費：放射光施設での実験のための出張受け入れは特定期間を除いて可能であったが、コロナ禍により出張および学会発表が制限されたために、当初計画より低い実績であった。その費用は少額備品を含めた物品費として使用し研究を推進した。総括班では総括班評価者、海外研究者等の招聘に用いた。

その他：オリゴ DNA 合成や DNA 配列解析などの業者委託、スーパーコンピューターの利用料、英文校閲や論文出版、故障機器修理等に用いた。総括班ではホームページ・動画コンテンツ・領域パンフレット等の作成、会議やシンポジウム開催等を行った。

【今後の使用計画、研究費の効果的使用の工夫、設備等の活用状況について】

研究成果の創出のために各経費を積極的に活用するとともに、共同研究を推進することで各班の設備をより有効に利用する。総括班は国内外の共同研究を加速するために、会議開催、国内外の研究者の招聘や派遣、研究成果の促進のために実験拠点の整備や成果の公開促進等を進める。総括班で X 線自由電子レーザーの実験拠点に整備したストレージを用いて、測定データの保存、測定環境の維持管理等に役立てている。以下は計画研究班に関して具体的に記載する。

物品費：本研究遂行上で不可欠な基盤整備は2年次までにほぼ完了しているが、さらにケージド化合物の光反応性を定量的に評価するための光反応評価装置等、研究課題の加速が期待される備品を導入する。公募班の研究試料の測定が増加する研究機関については、現有機器を改良しながら対応する。本研究費で購入した機器や既存の試作品を効果的に活用しながら研究成果を伸ばしていく。それぞれの研究計画に基づき、装置開発に関する機器類、有機合成試薬、遺伝子工学試薬、細胞培養試薬、タンパク質調製や結晶化用消耗品、分光測定用消耗品、光学素子等の実験資材を購入する。

旅費：共同研究が活発化しており今後は特にその連携が重要となってくるため、旅費を多く計上している。本領域は放射光施設や X 線自由電子レーザー施設での実験が欠かせないため、そのための出張費を計上している。コロナ禍が終息した場合に出張が活発になることも想定されるので、臨機応変に対応することを前提した研究推進を行う。

人件費・謝金：博士研究員等としては、東邦大、兵庫県立大、筑波大や岩田班では各1名、高エネ研や理研では各2名の継続的または新規の雇用を計画している。

その他：オリゴ DNA 合成など業者受託できる部分は委託し研究を円滑に進める。今まで同様に、スーパーコンピューターの利用料、英文校閲や論文出版、故障機器修理等に使用予定である。

10 今後の研究領域の推進方策

研究領域全体を通じ、今後の本研究領域の推進方策について、「革新的・創造的な学術研究の発展」の観点から、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。なお、記述に当たっては、今後公募する公募研究の役割を明確にすること。また、研究推進上の問題点がある場合や、国際的なネットワークの構築等の取組を行う場合は、その対応策や計画についても記述すること。

研究領域の今後の方針としては、(1) 分子動画撮影の推進 (2) 研究連携の推進 (3) デザインしたタンパク質や化合物などの成果物の創出、の3点に力を入れたい。新たな公募に関してもこの3点に重点をおいて行いたいと考えている。

(1) 分子動画撮影の推進

この新学術の柱である、高速分子動画撮影をより推進したい。コロナ禍による施設へのアクセス制限や海外研究者の来日制限（これは現在でも続いている）により、予定ほど分子動画の撮影が進んでいない。これまで SACLA において B01 班が開発した装置のユーザーは半数以上が海外ユーザーだったこともあり、成果の創出に遅れがみられる。今年度後半から状況が改善することが見込まれるが、国内ユーザー、とくに領域内での高速分子動画撮影を促進していく必要がある。具体的には以下の通りである。

① 光による反応開始

現在レチナルタンパク質で解析が進んでいる。クロライドイオンポンプやヘリオロドプシンの解析を確実に完了させて論文化することは重要である。同時に、他のレチナルタンパク質や光感受性タンパク質で結晶が得られているものについては分子動画の撮影を目指す。また、光感受性でないタンパク質の分子動画の撮影についても推進を行う。ケージド化合物を使って反応を開始させる方法は汎用性があり、各種タンパク質に応用が期待できる。さらに、光作動性リガンドの開発やタンパク質に直接ケージドアミノ酸を組み込む方法の開発も進んでおり、これらを用いた分子動画の作成も学術的にインパクトがあり重点的に推進する。

② 二液混合による反応開始

イソクエン酸脱水素酵素をモデルタンパク質として、装置の開発は進んでおり、最近銅含有アミン酸化酵素の触媒機構の解明にも適用され成果を上げている。技術的には旧来より用いられていたコンティニューアスフロー等の技術を微結晶に応用したものであり、各種酵素反応の追跡に適用可能であると考えられる。領域内外の共同研究を推進したい。

③ 温度ジャンプによる反応開始

赤外レーザーのパルスをジェットに当てて温度を上昇させる技術であるが、温度コントロールが難しかった。インジェクター中の結晶温度が維持できる改良が行われたとともに、レーザーを照射した部分の温度観測が可能になっている。温度の上昇幅が現状では小さいので、レーザーを吸収する物質を混合することにより、0度付近から室温程度への温度ジャンプを可能にできれば多くの酵素反応の研究に適用可能な技術になると考えられる。

(2) 研究連携の推進

これまでも領域内での共同研究は比較的良好に行われてきたと考えられる。ただコロナの影響もあり、公募班として領域に加わったメンバーが全て良好にプロジェクトに組み込まれているわけではない。現在月2回程度行われているオンラインセミナーが領域内の共同研究の促進に役立っている。毎回、計算科学のスピーカー1名、実験科学のスピーカーが1名セミナーを行い、その後意見交換会を行う形式となっている。これを継続すると共に、研究に問題を抱えている班員にスピーカーになってもらい、皆とディスカッションしながらアドバイスをもらえるような機会を設定したいと考えている。同時に総括または総括班が班員と面談を行い問題を抱えている班員を見つけ出す試みも行いたいと考えている。これと並行して半年に一回の領域会議を継続して行う。理想的には一堂に会してポスターセッションを行うのが望ましいと考えているが、コロナにより実施困難な場合は今年度5月の領域会議のようにオンライン

ショートトークのセッションと Remo(オンライン交流ツール)を用いた仮想懇親会により班員間のコミュニケーションを図りたい。

コロナ禍のために進んでいない国際交流も積極的に推進したい。来年度以降は人の行き来も可能になると思うので、若い人を中心に積極的に国際学会等への派遣を行ないたいと考えている。また完全オンラインで行なった5月の領域会議成功をうけてオンライン国際シンポジウムの開催も考えている。すでに各所で先例もあり、うまく午前や夕方のセッションを利用することでヨーロッパやアメリカなどの研究者にも参加者してもらうことは可能であると考えている。

(3) デザインしたタンパク質や化合物などの成果物の創出

本領域は単にタンパク質の分子動画を撮るだけではなく、タンパク質のダイナミクスを理解し、それに基づき新しい機能性タンパク質やタンパク質の機能を制御できる化合物の創生を目指している。現在までに光遺伝学に使える新規機能タンパク質や光薬理学に使えるツールはプロジェクト中で作成されたり構造解析されたりしているが、それを実際の細胞や動物を用いた実験で実証する必要がある。公募班も含めてそのような共同研究の枠組みを作っていきたい。

(4) 公募の方針について

公募の方針としては、出口に向かって成果を創出できる班員を加えて行きたい。分子動画撮影に関しては二液混合や温度ジャンプなどを活用したプロジェクトを加えていきたい。また新規機能タンパク質やタンパク質の機能を制御する化合物の創生や評価を行えるような班員を加えていきたいと考えている。現在、構造生物の分野では電子顕微鏡を用いたより大きく、より複雑な分子の構造解析が盛んになっているが、それとは相補的に時間軸方向の動きをみること、そしてその情報を生かす科学をプロジェクトの柱としていきたいと考えている。いずれにせよ、構造生物学、ケミカルバイオロジー、計算科学、分光学などの各要素を融合していくために力となってくれる分野の次世代をになう若い研究者を中心に採用していきたい。また、物理・工学系の内容を多く含み、参加している女性研究者の数が少ないため、積極的に応募を呼びかけ、登用して行きたいと考えている。

11 総括班評価者による評価

研究領域全体を通じ、総括班評価者による評価体制（総括班評価者の氏名や所属等）や本研究領域に対する評価コメントについて、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。

上田実(東北大学理学研究科・教授)

新学術領域「高速分子動画」は、岩田領域代表の明確なビジョンと独自性、強力なリーダーシップの下、順調に運営されている。本領域の主眼は、①タンパク質の反応を同期させる技術の開発、②反応開始後に混ざっていく複数の状態のコンピューターシミュレーションによる解析分離、③タンパク質中の反応をより現実に即して観測、の3点に集約される。①に関しては、ケージド化合物を用いる汎用性の高い反応同期法が成果を上げつつあり、今後の分子動画撮影への展開が大いに期待できる、②に関しては、構造生物学者や生化学者と計算科学者の相互理解が成否を分ける。本領域では、柔軟性の高い若手研究者を多く採択し、領域の異なる若手同士を指名して、月に2回という高頻度で、定期的にオンラインセミナーを実施することで、計算科学者を取り込んだ異分野共同研究に結実させるという試みに成功している。③に関しては、対象となるタンパク質や反応の選択が鍵となるが、実績のある光駆動性反応（レチナル系）を中心とした技術基盤の整備と共に、新規な対象への展開にも活発に取り組んでいる。特にケージド化合物を用いることで対象タンパク質をGPCRなどへ拡大でき、期待が持てる。

本領域のように幅広い分野を包含するグループ研究は、しばしば各要素研究に分離しがちである。しかし本領域は、領域代表者の見事な手腕により、ケミカルバイオロジー、生化学、構造生物学、計算科学などが見事に融合することで、生命科学のこれまで手が届かなかった領域へのアプローチを可能にしつつある。これらの成果は、Nature1報、Science1報、Nature/Science姉妹誌8報という中間評価段階としては驚異的な研究実績に如実に表れている。また、本領域の性質上、国際共同研究を存分に実施できない点には忸怩たるものがあるが、それを補って余りある国内若手研究者のレベルアップが達成されていることも特筆すべき点である。今後は、コロナ禍の収まりと共により活発な研究展開が期待できる。生命科学の未踏領域の開拓とそのための人材育成に大いに期待したい。

中川敦史(大阪大学蛋白質研究所・教授)

これまでの研究で、岩田班によるチャンネルロドプシンの閉状態から開状態への遷移に伴う構造変化の解明、保坂班によるクロライドポンプの光照射後の構造変化の観測、足立班による光励起直後の電子移動(MLCT)に伴う錯体構造のヤーン・テラー歪みと分子振動の解明や、励起分子が励起ポテンシャル曲面上で振動してAu-Au間の共有結合が形成する過程の観測など、着実に成果が得られている。

一方、領域開始前後から新型コロナウイルス感染拡大が広がったことで、SACLAへのアクセスの制限や海外研究者の来日制限を始めとして、平常時に比べて分子動画を得るための回折実験が大幅に制限を受けた。そのような状況下で、南後班による二液混合法や温度ジャンプ法、久保班による顕微分光装置、清中班によるナノ秒からミリ秒までの幅広い時間領域の構造変化を捉えるためのケミカル光制御技術、山本班による高S/Nのデータ収集を可能とする真空回折計、20-40℃までの温度範囲で湿度調整環境での回折実験を行う試料環境制御装置などの技術開発が順調に進み、また、松尾班によるCENP-Eの活性を光制御できる阻害剤などの周辺技術の開発や、岩田班によるCRY2を活性化するBFPとの融合タンパク質の作製に加えて、計画・公募班により数多くの高速分子動画撮影ターゲットの結晶化が進んでいる。海外研究者の来日制限はもうしばらく続くと予想されるが、ワクチン接種が進むことで国内研究者の移動制限が徐々に解消されることが期待され、また、リモート会議システムなどを活用することで移動を伴わないで実験に参加できる環境整備が進んでおり、現在準備の進んでいる試料に対して、今後、多くの回折実験が行われていくものと考えられる。

研究代表者の強力なリーダーシップの下、コロナ禍の逆境を逆手にとってオンライン会議システムを活用して定期的なオンラインセミナーを開催し、領域参加者の情報交換を進めてきた。その結果、この1年強の間に数多くの共同研究が開始されてきていることは特筆すべきである。

中村春木(大阪大学蛋白質研究所・名誉教授)

- ・計画班における中間時までの当初計画はほぼ全てが高いレベルで満たされつつあり、審査結果として指摘された「計算科学を担当する研究体制の強化」についても、研究協力者や公募研究者の追加によって対応がなされている。ただし、追加された計算科学分野における小野班、林班以外の公募研究者においては、他の班員との連携が強くなされていないも見受けられる。今後は、個人的な研究の推進だけでなく新学術研究としての協力体制がさらに強く取られるようにしていただきたい。
- ・本新学術研究は、時間分解能と空間分解能を併せ持った分子動画として蛋白質等の生体高分子の構造と機能の発揮を観察する手法の開発を目的とし、全く新たな測定・解析手法の開発とその応用による新規知見の発見を目指しており、その研究途上で培った内容の詳細は、広く国内外へ示されるべきである。すなわち、オープンサイエンスを尊重し、論文等は出来るだけオープン・アクセスとして **San Francisco Declaration on Research Assessment (DORA)** に示されるような透明性が図られるべきである。しかしながら、これまでに発表された計画班による論文では、岩田班、朴班、南後班、足立班、山本班、久保班のように多くがオープン・アクセスされている場合もあるが、ほとんどがオープン・アクセスとなっていない宮下班のような場合もある。今後の論文発表においては、オープン・アクセスのジャーナルを選ぶか、出版費用を追加してオープン・アクセスとするようにして、開発された技術や研究結果が広く公開されることを徹底していただきたい。
- ・蛋白質中の電子伝達経路や蛋白質のフォールディング path の理論的解析において示唆されているように、必ずしもその道筋は一つのみとは限らない。本新学術研究の結果、これまで全く不明であった分子動画が描かれることはたいへん素晴らしいが、**Time-resolved serial femtosecond crystallography (TR-SFX)** の本質的な課題の一つとして、道筋が複数ある可能性を考慮した解析の可能性を、研究の中間時として考察していただきたい。例えば、理論が先行して複数の可能な道筋を示し、個々の道筋に応じた観測を変異体導入などの工夫をして行う、などの可能性はありうる。また、複数の道筋をあらかじめ考慮した観測結果の解析手法の開発も必要と考える。

松田道行(京都大学医学研究科・教授)

- ・X線自由電子レーザーによる構造解析という新技術の発展を目指して、構造解析、MD、解析技術、タンパク工学、細胞生物学等の研究者を結集した研究領域であり、その目標に向けて順調に研究が進んでいる。タンパク質の反応機構の解明はその本丸ともいえる研究であるが、チャンネルロドプシンや光感受性アデニル酸シクラーゼについて興味深い成果が得られている。また、構造変化を制御するためのケミカルバイオロジーの技術や、時分割顕微赤外光分光装置、時分割顕微可視吸収分光装置等の計測機器、マイクロチャンネル、あるいはまたMDシミュレーションなど、ゴール達成に必要な様々な周辺技術の開発も順調に進んでおり、今後の応用が期待される。
- ・領域会議等に参加して一番印象に残ったのは、共同研究が極めて多いということである。構造データに生物学的意味付けを付けるために細胞生物学者との共同研究が重要であるのは論を待たないが、ケミカルバイオロジーやMDシミュレーションなどの研究者と構造研究者のタイアップもスムーズに進んでいる。特に、多くの公募研究者が、この領域に参加することにより最新の解析技術にアクセスできるようになって、本邦の研究レベルの底上げに貢献している点は高く評価したい。
- ・領域代表の若手育成という方針が明瞭であり、公募研究代表者の半数が40未満である。彼・彼女らに最先端の技術を提供するという方針は素晴らしいと思う。しかし、公募班の研究代表者に女性が1名しかいなかったのは反省すべきだろう。2022年度の公募の際にはぜひ配慮してほしい。
- ・残念であったのは、COVID-19のために国内外の共同研究に若干の遅れが認められる点である。来年度以降の巻き返しに期待したい。一方、COVID-19にも関わらず、ZOOMを使って活発に領域間のコミュニケーションをとる努力がされており、この不測の事態を活発な交流のチャンスに変えたのは素晴らしい。
- ・アウトリーチ活動は活発に行っており、十分であると判定される。
- ・総括班経費の使い方が中間報告書からは読み取れなかったが、今後の計画に記載の通り、共同研究をさらに進めるために使ってほしい。