

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14466

研究課題名(和文) 生体内氷晶のX線ナノスケール観測に基づいた不凍タンパク質多細胞系凍結保存法の確立

研究課題名(英文) Cryopreservation of antifreeze protein multicellular systems based on X-ray nanoscale observations in vivo for ice crystals

研究代表者

倉持 昌弘 (Kuramochi, Masahiro)

茨城大学・理工学研究科(工学野)・助教

研究者番号：60805810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、AFPの最も有効な凍結保存法の確立を目指し、その効果検証およびAFPによる氷晶制御のX線ナノスケール計測を実施した。AFPを遺伝子導入した線虫の生存率は、AFPを発現しない線虫と比較して有意に高いことがわかった。次に、AFPによる氷晶制御の様子を生体内で捉えるX線ナノスケール計測を実施した。興味深いことに、野生型AFPと機能欠損AFP変異体とで、 $-5$ 、 $-10$  °Cにおける分子ダイナミクスが定性的に異なる振る舞いを示すことがわかった。AFPによる氷晶成長阻害が凍結保存においても重要な機能の1つとして働いていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不凍タンパク質(Antifreeze Protein: AFP)は、氷晶成長を抑制するユニークな機能をもつ。本研究から、多細胞生物である線虫の凍結保存において、AFPが有効に働くことがわかった。その分子メカニズムとして、氷晶成長抑制という機能が動物体内でも発揮している様子をX線ナノスケール計測によって捉えることができた。これらの知見は、細胞や組織、臓器に至るさまざまな生体材料の凍結保存において、AFPが効果的に機能する可能性を示している。将来的に、臓器保存などを課題とする医療・医学分野での技術展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the current study, I aimed to establish the most effective cryopreservation method for AFP. I verified AFP effectiveness and analysed the AFP-ice interaction by X-ray nanoscale measurement in vivo. I found that the survival rate of transgenic *C. elegans* expressing AFP at body wall muscles was significantly higher than that of the wild-type control animals. Next, X-ray nanoscale measurements were applied to monitor AFP-induced ice crystal regulation in vivo. Interestingly, I found that the molecular dynamics of the wild-type AFP and the loss-of-function AFP mutant behaved qualitatively differently at  $-5$  and  $-10$  °C. These results indicate that the inhibition of ice crystal growth by AFP also acts as an important function in cryopreservation in vivo.

研究分野：生物物理

キーワード：不凍タンパク質 線虫 凍結保存 氷晶制御 熱ヒステリシス 時分割X線計測

### 1. 研究開始当初の背景

凍結保存技術の鍵は、氷晶成長の抑制である。不凍タンパク質 (Antifreeze Protein, AFP) は、極地の生物がもつタンパク質で、例えば菌類由来 AFP は、氷晶結合面 (B-face) をもち、この面が氷に結合することで氷晶成長を防ぐ特異機能を有する (図 1)。凍結しても微晶サイズの氷を維持できるため、氷晶による凍結損傷を防いで鮮度をキープできる利点を持ち、産業界でも注目されている物質である。最近では、医療分野においても注目されており、細胞レベルの凍結保存法として、その有効性が報告されるようになってきた。将来的には、生体組織や臓器の新規凍結保存技術への応用も期待されている。

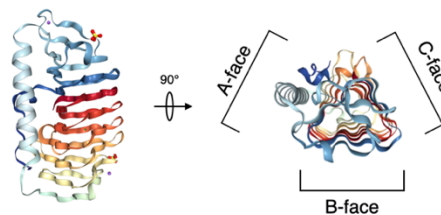


図1. 不凍タンパク質の構造. 担子菌由来の不凍タンパク質TisAFP6は、A、B、C面をもち、B面が氷晶と結合できることが知られている。

我々は、これまでモデル動物線虫 *C. エレガンス* を用いて、さまざまな生物由来の AFP を線虫に遺伝子発現させ、凍結および低温環境における線虫の耐性を調べてきた。その結果、AFP の氷晶成長阻害という機能が、線虫体内でも有効に働くことを発見した (図 2A)。また驚くべきことに、 $-5^{\circ}\text{C}$  凍結環境における線虫生存率は、野生型 10% 以下に対して、AFP を発現する線虫は最大で 70% 以上と非常に高い凍結耐性を示した。

(図 2B)。さらに、機能欠損をもつ AFP 変異体を線虫に遺伝子導入した所、凍結耐性の有意な低下が観察され、AFP の氷晶成長抑制が重要な役割をもつことも見出した。この AFP による凍結耐性獲得に加え、氷の発生しない低温でも、AFP が線虫の生存率を改善することを発見した (図 2C)。

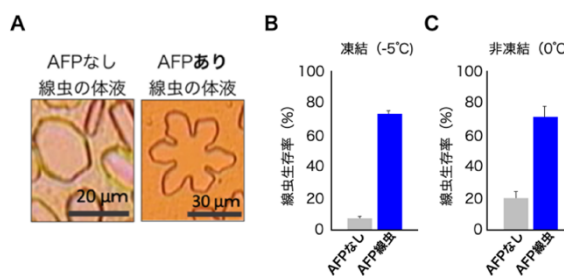


図2. 不凍タンパク質の生体内効果. (A) 線虫体液を凍結した際に形成された氷晶形状. AFPを遺伝子発現する線虫の氷晶は、AFPによる氷晶成長抑制効果により、雪結晶状の形を示した。(B) 凍結温度 $-5^{\circ}\text{C}$ に曝露後の線虫生存率. (C) 非凍結温度 $0^{\circ}\text{C}$ に曝露後の線虫生存率.

### 2. 研究の目的

これまでの我々の取り組みから、AFP が線虫という多細胞生物の体内において氷晶成長抑制と細胞保護という2つの機能を発揮することがわかってきた。これらの知見に基づくと、多細胞生物の凍結保存において AFP が有効に機能する可能性が高い。そこで本研究では、凍結保存における AFP の効果を *in vivo* 観察し、その有効性を検証することを目的とした。また、凍結保存において氷晶制御が重要であることは明らかだが、線虫という動物体内の夾雑環境で形成される氷晶や AFP の氷晶抑制機能を直接的に観測した研究は皆無であった。我々が考案したX線ナノスケール観察法 (Diffracted X-ray Blinking, DXB) を駆使することで、氷晶形状やサイズ、成長速度、さらに AFP による氷晶制御の描像を明らかにし、AFP の機能的意義を再定義する挑戦的な課題にも取り組む。これら実験的検証を踏まえ、個体生物 (多細胞系) に最適な AFP 凍結保存技術を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、AFP による個体生物レベルでの凍結保存効果を *in vivo* で検証、また AFP の分子、構造レベルでの作用機序理解を目指す。基礎科学知見に立脚した保存技術を開発することを目的とした。

### AFP による凍結保存効果の検証

3 種類の AFP 分子に着目し、 $-80^{\circ}\text{C}$ での凍結保存後の線虫生存率を観察した。魚類 *Zoarcis elongatus* Kner (Notched-fin eelpout) 由来 NfeAFP6、アイソフォームの 1 つである NfeAFP8、真菌類 *Antarctomyces psychrotrophicus* 由来 AnpAFP1a N55D (AnpAFP) を用いた。

AFP の性能指標として、しばしば Thermal hysteresis (TH) 活性値が用いられる。AFP 分子を含む溶液の温度が低下し、融点  $T_m$  に達すると水溶液中に氷核が発生する。融点  $T_m$  以下の温度では、AFP 分子が氷晶に結合することで、溶液中の氷晶成長が阻害され、数  $10\ \mu\text{m}$  の大きさの微結晶状態を保ち続ける。さらに温度が低下して凍結開始の臨界温度  $T_f$  に達すると、氷晶は爆発的な成長をはじめ。しかし、凍結した AFP 溶液が融解する温度は  $T_m$  であるため、融点  $T_m$  と凝固点  $T_f$  の間に温度ギャップが生じる。この温度ギャップを TH 活性 ( $\Delta T = T_m - T_f$ ) と呼ぶ (図 3)。この値

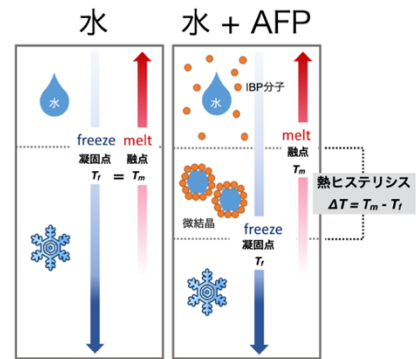


図3. 熱ヒステリシス活性. 融点 $T_m$ と凝固点 $T_f$ の間に生じる温度ギャップを熱ヒステリシス (Thermal Hysteresis, TH) 活性と呼ぶ。

は、AFP 分子量から予測されるモル凝固点降下の影響よりも 500 倍以上大きいとされる。NfeAFP6、NfeAFP8、AnpAFP の TH 活性はそれぞれ約  $0^{\circ}\text{C}$  ( $0.4\text{mM}$ )、 $0.5^{\circ}\text{C}$  ( $0.4\text{mM}$ )、 $0.7^{\circ}\text{C}$  ( $0.3\text{mM}$ ) である。

これら 3 種類の AFP を線虫体壁筋に特異的に遺伝子発現する線虫を作出した。この AFP 発現線虫を用いて凍結保存後の生存率を観察した。まず線虫を NGM (Nematode Growth Medium) プレート



図4. 線虫の生存率評価.  $22^{\circ}\text{C}$ で飼育した線虫を回収し、凍結保存液で $-80^{\circ}\text{C}$ 保存する。室温 (Room Temperature, RT) で解凍後、生存率を評価した。

上で、十分な餌 (*Escherichia coli* OP50 大腸菌) を用いて  $22^{\circ}\text{C}$ で培養した。よく肥育された線虫を凍結保存に使用した。新鮮な L1-L4 および成虫が大量に存在する NGM プレートを 3-5 枚使用した。NGM プレートを 1mL の M9 バッファーで 2 回洗浄し、虫を含む M9 懸濁液をコニカルチューブに回収した。M9 懸濁液を 5 つのクライオバイアルに 1mL ずつ分注し、1mL の凍結液と混合した。クライオバイアルは $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーに移した。線虫は $-80^{\circ}\text{C}$ で 1 日以上保存した。生存率評価では、クライオチューブを室温 (RT) に静置し、すべての氷が溶けた後、チューブの中身を新しい NGM プレートに注いだ。室温 (Room Temperature, RT) で 1 時間ほど静置し、プレート状の懸濁液の水分が蒸発した後、線虫の動きや頭部刺激に対する反応に基づき、生死を判定した。生存率は、5 回の試行実験から求めた (図 4)。

### X 線分子動態計測法による AFP ナノスケール観測

回折 X 線ブリッキング法 (Diffracted X-ray Blinking, DXB) は、金ナノ結晶を標的分子にラベルし、ナノ結晶由来の X 線回折輝点から標的分子の運動を評価する (図 5) (Sekiguchi et al., Sci. Rep., 2018)。本実験では、まず線虫体内の AFP 分子標識法を新しく考案した。elt-2 プロモーター遺伝子を利用し、線虫の腸細胞特異的に AFP を発現させる。AFP 分子は、膜タンパク質 CD4 の N 末端側にフ

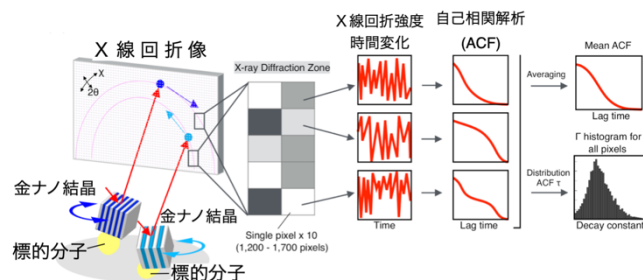


図5. DXB法の概要. 標的タンパク質に金ナノ結晶を標識し、時分割 X 線計測することでタンパク質の動態を捉える手法。単色 X 線を用いるため、放射光施設だけでなく、ラボ X 線でも計測できる。

ユージョンし、AFP-CD4 コンプレックスとして、細胞膜外に露出するように発現させた。金ナノ結晶溶液をフィーディング(経口投与)法で線虫腸管に取り込ませ、AFP-CD4 と金ナノ結晶をジスルフィド結合で標識した。研究室 X 線光源を利用し、DXB 法による線虫 AFP 分子動態計測を行った。20°Cから-10°Cまで温度条件を変えた時の AFP 分子動態を *in vivo* 測定した。1 分子の運動と連動したX線回折強度の時系列変化は、自己相関解析(AutoCorrelation Function : ACF)によって分析し、ACF 曲線の減衰定数から 1 分子運動を定量評価した。

#### 4. 研究成果

##### AFP の凍結保存効果

AFP による凍結保存効果を検証するため、凍結保存した線虫の解冻後生存率を評価した。野生型および蛍光タンパク質 *Venus* を体壁筋に発現する線虫生存率は、それぞれ 6.9% および 4.8% であった。一方、NfeAFP6、NfeAFP8、AnpAFP を体壁筋に発現する線虫生存率は、

16.2%、12.7%、18.9% だった(図 6)。また、AnpAFP を体壁筋に発現する線虫生存率は、野生型より統計的に有意に高かった(Kuramochi et al., microPub. Biol., 2023)。

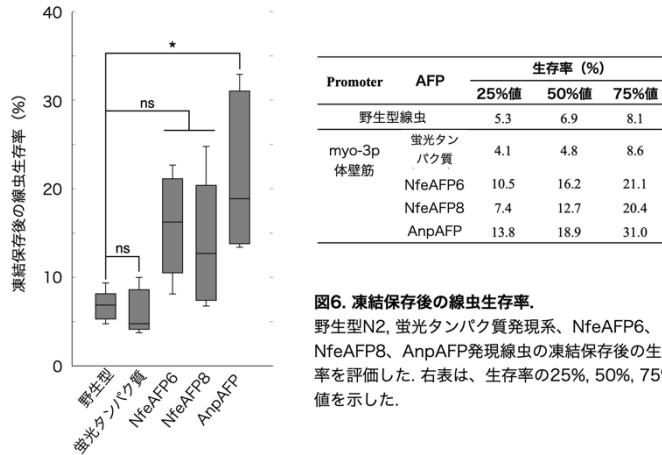


図6. 凍結保存後の線虫生存率。野生型N2, 蛍光タンパク質発現系、NfeAFP6、NfeAFP8、AnpAFP発現線虫の凍結保存後の生存率を評価した。右表は、生存率の25%、50%、75%値を示した。

##### 線虫体内 X 線 1 分子計測による不凍タンパク質動態計測

AFP が生体内部で発生する氷晶と素早く結合することで、氷晶成長を阻害、細胞の凍結損傷を抑えることで、生存率改善が観察されたと思われる。しかし、実際に生体内での AFP 分子の機能、氷晶に対する作用を観察しているわけではない。そこで、我々が考案した DXB 法を駆使し、生きた線虫体内における AFP 分子の動的特性を評価した。ここでは、AnpAFP とその機能欠損変異体である AnpAFP T156Y を用いた。AnpAFP は、図 1 に示すような三角形断面を持つ 3 枚の平行な  $\beta$  シート(A 面、B 面、C 面)を持ち、B 面を介して氷晶と結合し、氷晶成長抑制を実現する。一方で、B 面に T156Y の変異を持つ AnpAFP 欠損変異体は、この変異により氷との結合能が著しく低下する。生きた線虫体内における AnpAFP-CD4 複合体の動態を DXB 法によって測定した。タンパク質に標識された金ナノ結晶由来の時分割 X 線回折像には、

AFP-CD4 複合体(今後、AFP と呼ぶ)の傾きやねじれといった運動情報が含まれ、これは自己相関関数(ACF)から得られる指数関数緩和として評価できる(Kuramochi et al., Sci. Rep., 2021)。興味深いことに、野生型 AFP の ACF 減衰定数は、温度が 20°C から -10°C に低下したときに著しく減少した(図 7)。これは運

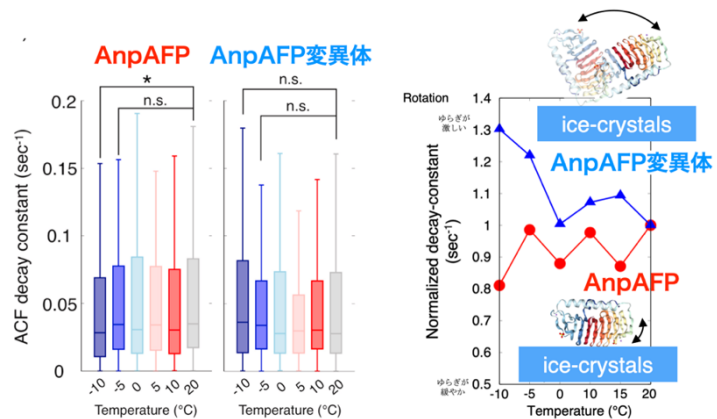


図7. DXB計測による動物体内のAFPダイナミクス。野生型AnpAFPと機能欠損AnpAFP変異体の線虫体内でのダイナミクスをDXB測定した(左)。-5、-10°CにおけるAnpAFPは野生型AFPの動きは低下、変異AFPの動きは上昇することがわかった(右)。

動低下を示唆する結果である。野生型 AFP は氷点下で氷晶と結合することにより、AFP-氷複合体を形成することで、運動低下を示したと考えられる。AFP-氷複合体の回転運動は、AFP 単体の回転運動よりも遅い。一方、AFP 変異体の ACF 減衰定数は有意な減少は示さず、むしろ-5, -10°C 程度では運動が上昇する結果を示した。AFP 変異体の氷結合部位に変異があると、氷結合能は著しく低下する。AFP 変異体は氷晶に結合できないため、-5, -10°Cにおける分子の回転運動は制限されず、むしろ氷晶形成の影響を受け、AFP 分子自身が氷に押し出され、ダイナミクスが激しくなる可能性が、この結果から読み解けた。実際、野生型 AFP は氷の表面に吸着し、固定されるが、AFP 変異体は氷に結合できず、成長する氷の前面に先立って拡散するという氷ドッキングシミュレーションが複数報告されている (Kuiper et al., eLife, 2015 等)。これらシミュレーション結果と一致して、我々の計測データは、氷点下での野生型 AFP と AFP 変異体の異なる挙動を示すことがわかった (Kuramochi et al., Biochem. Biophys. Rep., 2022)。さらに、生体内で発生する氷晶由来の回折像も確認でき、この回折像を分析することで氷晶サイズや氷晶成長過程を評価できることがわかってきた。現在、最適な測定条件の検討、分析を実施している。

### 凍結保存における AFP 分子メカニズム

本研究において、我々は AFP が凍結保存時の線虫生存率を有意に改善することを報告した。AFP の氷晶抑制機能を踏まえると、おそらく凍結時に発生した生体内部の氷晶に対して、AFP が瞬時に結合し、その成長を阻害することで、細胞や組織損傷を防ぎ、生存率向上に起因したと考えられる。実際、DXB 測定による分子動態評価から、野生型 AFP と機能欠損 AFP 変異体とで、-5, -10°C程度の凍結開始温度における分子ダイナミクスが定性的に異なることがわかった。野生型 AFP は運動低下を示し、変異 AFP は運動上昇を示す。これは MD シミュレーション等の結果とも一致し、野生型 AFP は瞬時に氷の微結晶に結合し、運動低下するのに対し、AFP 変異体は氷晶と結合できず、発生した氷晶に押し出されることで運動上昇を示す可能性が高い。凍結保存における AFP の効果、また生体内の AFP 分子動態の結果を考慮すると、氷晶成長阻害が凍結保存においても重要な機能として働いていることが示唆された。

凍結保存で用いた 3 種類の AFP、NfeAFP6、NfeAFP8、AnpAFP に着目すると、これらの TH 活性は異なっており、氷晶成長抑制効果は NfeAFP6 < NfeAFP8 < AnpAFP の順である。線虫生存率は、AFP 間でも効果に違いがあるようであった。この要因として、AFP 機能や発現量(濃度)と関連する可能性があり、さらなる検証が必要である。また、AFP の氷晶成長阻害以外の機能に着目する必要も重要である。近年、AFP は凍結温度だけでなく、低温(非凍結)環境において、細胞保護機能を示すことが報告されている。氷晶成長抑制だけでなく、非凍結低温における細胞膜保護も、-80°C凍結保存時の線虫生存率を向上させる重要な因子である可能性がある。最近、我々は、NfeAFP6 の点変異による不凍活性修飾が、線虫の低温耐性にどのような影響を及ぼすか調べた。興味深いことに、不凍活性が増強された変異体を合成した線虫は、+2°C曝露後の生存率が劇的に向上した。一方、不凍欠損変異体の発現系では、生存率は改善されなかった。これらの結果から、おそらく AFP の不凍活性と低温耐性は相関するものと考えられる (Kuramochi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2022)。AFP は、氷結合機構を巧みに利用することで、細胞膜を保護し、最終的に AFP 含有動物の耐寒性を向上させるのかもしれない。構造特異的な細胞保護機能について、より詳細な検証を実施していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 倉持昌弘、新井達也、三尾和弘、津田栄、佐々木裕次	4. 巻 7
2. 論文標題 凍結低温環境下での生命活動維持を実現する氷晶結合タンパク質	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 74-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuramochi Masahiro, Arai Tatsuya, Mio Kazuhiro, Tsuda Sakae, Sasaki Yuji C.	4. 巻 -
2. 論文標題 The effect of ice-binding proteins on the cryopreservation of <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.000734	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 倉持昌弘、新井達也、三尾和弘、津田栄、佐々木裕次	4. 巻 6
2. 論文標題 氷結合タンパク質は個体生物の凍結・非凍結低温環境における生存率を改善する	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 64-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inamasu Rena, Yamaguchi Hiroki, Arai Tatsuya, Chang Jaewon, Kuramochi Masahiro, Mio Kazuhiro, Sasaki Yuji C.	4. 巻 -
2. 論文標題 Observation of molecular motions in polymer thin films by laboratory grazing incidence diffracted X-ray blinking	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-023-00762-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohkubo Tatsunari, Shiina Takaaki, Kawaguchi Kayoko, Sasaki Daisuke, Inamasu Rena, Yang Yue, Li Zhuoqi, Taninaka Keizaburo, Sakaguchi Masaki, Fujimura Shoko, Sekiguchi Hiroshi, Kuramochi Masahiro, Arai Tatsuya, Tsuda Sakae, Sasaki Yuji C., Mio Kazuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Visualizing Intramolecular Dynamics of Membrane Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 14539 ~ 14539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232314539	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuramochi Masahiro, Zhu Shumiao, Takanashi Chiaki, Yang Yue, Arai Tatsuya, Shinkai Yoichi, Doi Motomichi, Mio Kazuhiro, Tsuda Sakae, Sasaki Yuji C.	4. 巻 628
2. 論文標題 A mutation to a fish ice-binding protein synthesized in transgenic Caenorhabditis elegans modulates its cold tolerance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 98 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chang Jaewon, Arai Tatsuya, Kuramochi Masahiro, Inamasu Rena, Lee Zhuoqi, Ohkubo Tatsunari, Mio Kazuhiro, Sasaki Yuji C.	4. 巻 31
2. 論文標題 Dynamic observations of various oligomers in amyloid isoforms using laboratory diffracted X-ray blinking	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101298 ~ 101298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuramochi Masahiro, Dong Yige, Yang Yue, Arai Tatsuya, Okada Rio, Shinkai Yoichi, Doi Motomichi, Aoyama Kouki, Sekiguchi Hiroshi, Mio Kazuhiro, Tsuda Sakae, Sasaki Yuji C.	4. 巻 29
2. 論文標題 Dynamic motions of ice-binding proteins in living Caenorhabditis elegans using diffracted X-ray blinking and tracking	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101224 ~ 101224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujimura Shoko, Mio Kazuhiro, Ohkubo Tatsunari, Arai Tatsuya, Kuramochi Masahiro, Sekiguchi Hiroshi, Sasaki Yuji C.	4. 巻 23
2. 論文標題 Diffracted X-ray Tracking Method for Measuring Intramolecular Dynamics of Membrane Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2343 ~ 2343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi Takuya, Ishizaki Kazuki, Takagi Daisuke, Nishimura Kazuki, Shigemune Hiroki, Kuramochi Masahiro, Sasaki Yuji C., Koshima Hideko, Asahi Toru	4. 巻 5
2. 論文標題 Superelasticity of a photo-actuating chiral salicylideneamine crystal	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-021-00618-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinkai Yoichi, Kuramochi Masahiro, Miyafusa Takamitsu	4. 巻 9
2. 論文標題 New Family Members of FG Repeat Proteins and Their Unexplored Roles During Phase Separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.708702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arai Tatsuya, Inamasu Rena, Yamaguchi Hiroki, Sasaki Daisuke, Sato-Tomita Ayana, Sekiguchi Hiroshi, Mio Kazuhiro, Tsuda Sakae, Kuramochi Masahiro, Sasaki Yuji C.	4. 巻 8
2. 論文標題 Laboratory diffracted x-ray blinking to monitor picometer motions of protein molecules and application to crystalline materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structural Dynamics	6. 最初と最後の頁 044302 ~ 044302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/4.0000112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -



1. 著者名 Mio Kazuhiro, Fujimura Shoko, Ishihara Masaki, Kuramochi Masahiro, Sekiguchi Hiroshi, Kubo Tai, Sasaki Yuji C.	4. 巻 22
2. 論文標題 Living-Cell Diffracted X-ray Tracking Analysis Confirmed Internal Salt Bridge Is Critical for Ligand-Induced Twisting Motion of Serotonin Receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5285 ~ 5285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22105285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morton C. R., Rzechorzek N. J., Maman J. D., Kuramochi M., Sekiguchi H., Rambo R., Sasaki Y. C., Davies O. R., Pellegrini L.	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural basis for the coiled-coil architecture of human CtIP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 210060 ~ 210060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsob.210060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 三尾和弘、藤村章子、倉持昌弘、関口博史、佐々木裕次	4. 巻 34
2. 論文標題 X線1分子追跡法を用いたTRPイオンチャネル運動の高速時分割計測と制御機構の理解	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本放射光学会誌	6. 最初と最後の頁 258-266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 倉持昌弘、李卓起、赤穂昭太郎、佐々木裕次
2. 発表標題 機械学習を用いたX線動画解析による動態物性の抽出
3. 学会等名 2022年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 楊越、新井達也、佐々木大輔、倉持昌弘、関口博史、三尾和弘、久保泰、佐々木裕次
2. 発表標題 Twisting Motions of Different Ligand-bound States of nAChR 7 Monitored by Diffracted X-ray Tracking
3. 学会等名 日本放射光学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 下谷祐平、新井達也、三尾和弘、津田栄、佐々木裕次、倉持昌弘
2. 発表標題 氷結合タンパク質を発現した線虫の凍結保存効果 Cryopreservation effects of <i>C. elegans</i> expressing ice-binding proteins
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉持昌弘、三尾和弘、佐々木裕次
2. 発表標題 X線プリンキング法による動態物性取得と機能相関 生体内分子、高分子、ソフトクリスタルまで
3. 学会等名 2022年度OPERANDO-OIL・COMS・量子ビーム計測クラブ合同研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Kuramochi
2. 発表標題 Dynamical Measurement of Material Characteristics using Diffracted X-ray Blinking
3. 学会等名 ICPAC KK 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yue Yang、Tatsuya Arai、Daisuke Sasaki、Masahiro Kuramochi、Hiroshi Sekiguchi、Kazuhiro Mio、Tai Kubo、Yuji C. Sasaki
2. 発表標題 X 線 1 分子追跡法によるイベルメクチン存在下での nAChR 7 の逆回転運動の測定
3. 学会等名 第 60 回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉持昌弘
2. 発表標題 Mechanism of in-cell protein crystallization with supersaturated environment and its application
3. 学会等名 分子夾雜の生命化学 成果とりまとめ公開シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉持昌弘、山口一輝
2. 発表標題 味覚神経ASE を介したAIY 神経の活動制御
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原生蔭、倉持昌弘
2. 発表標題 サンゴ由来蛍光結晶化遺伝子Xpa 導入による線虫体内での結晶形成
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗山稜平、倉持昌弘
2. 発表標題 テラヘルツ光照射による線虫初期胚の非熱効果検証
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下谷祐平、倉持昌弘
2. 発表標題 不凍タンパク質の凍結保存効果と水和構造に起因した氷結合メカニズム
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M. Kuramochi
2. 発表標題 Expression of Ice-Binding Proteins in <i>Caenorhabditis elegans</i> Improves the Survival Rate after freezing and cold shock.
3. 学会等名 IBP conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉持 昌弘
2. 発表標題 Functional analysis in vivo of ice-binding proteins based on their dynamic behaviour. 氷結合タンパク質の動的挙動に基づいた生体内機能解析
3. 学会等名 日本蛋白質学会PSSJ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉持昌弘
2. 発表標題 Mechanism of in-cell protein crystallization with supersaturated environment and its application
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下谷祐平、倉持昌弘
2. 発表標題 Cryopreservation of C. elegans by ice-binding protein
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉持昌弘
2. 発表標題 X線プリンキング法による生物個体内の結晶化タンパク質および分子夾雑場観察
3. 学会等名 3 新学術領域合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------