

領域略称名：過渡的複合体
領域番号：4104

平成26年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る事後評価報告書

「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解
-生理的準安定状態を捉える新技術-

(領域設定期間)

平成21年度～平成25年度

平成26年6月

領域代表者

(東京大学大学院・薬学系研究科・教授・嶋田 一夫)

目 次

1. 研究領域の目的及び概要	2
2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況	4
3. 研究領域の設定目的の達成度	6
4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況	9
5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況	10
6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	11
7. 総括班評価者による評価	12
8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	14
9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）	17
10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	22

1. 研究領域の目的及び概要（2ページ程度）

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

研究の学術的背景

タンパク質の立体構造の視点に基づく構造生物学研究は、生物学研究の基盤技術として生命現象の理解に大きく貢献している。しかしながら、従来の構造生物学研究の方法論および技術的制約から、決定された立体構造の多くは、インタクトのタンパク質から機能ドメインを切り出すなどの処置を施した対象に限られ、必ずしも *in situ* の状態を反映しているわけではない。さらに、同様の制約のため、複合体の構造解析も、多くは高親和性のリガンドとその標的タンパク質に限られている。一方、実際の生命現象発動の場においては、分子、細胞レベルなど様々な階層において、不安定で過渡的な複合体の存在およびその重要性が指摘されている。

細胞膜に存在する受容体は、リガンド結合に伴い受容体・細胞質因子を含むシグナル開始複合体をいわば”決定論的”に形成するかのよう記述されるが、実際は個々の因子間の相互作用は細胞内においてしばしば過渡的で、不安定である(Nature, 443:651-7, 2006)。また、多くの細胞内タンパク質複合体では、最終的な安定複合体が形成される前に、両者が緩く接触した遭遇複合体とよばれる不均一な状態が過渡的に形成される(Nature, 447:1021-5, 2007)。例えば、化学反応や輸送を司る様々なタンパク質間相互作用では、遠距離でも作用できる静電相互作用により、タンパク質同士が引き寄せ合った遭遇複合体が素早く形成し、ついで最終的な複合体を形成することにより、 $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ を越える高い結合速度を達成し、迅速で効率の高い化学反応や輸送が可能となっている(PNAS, 105: 12855-60, 2008)。

さらに、細胞表層に目を向けるならば、シグナル伝達を効率に行うためにスフィンゴ脂質とコレステロールが過渡的に集合した膜ドメイン構造（ラフト構造）が存在する。ここでは、膜タンパク質や細胞質因子がシグナル依存的に弱い相互作用で結合し、情報伝達のプラットフォームを形成している(Nat. Cell Biol., 9:7-14, 2007)。また、オルガネラ移行や分泌系のシグナル配列および細胞内のソーティング・輸送にかかわる種々のモチーフでは、コンセンサス配列が短く、しかもいくつかの位置で任意のアミノ酸残基が許されることから、多様なアミノ酸配列がモチーフとして許容されることが多く、これらのモチーフの受容体による認識には過渡的で動的な複合体が関与していると推定されている(Cell 100: 551-560, 2000, EMBO J 26: 4777-87, 2007)。

免疫細胞やがん細胞の生体内における動態においても過渡的準安定状態の重要性が明らかとなりつつある。例えば、血液中を循環する免疫細胞は必要に応じて血管内皮細胞上へと接着する。このような血流下における細胞接着の初期段階においては、細胞上の受容体と血管内皮細胞上のリガンドが一過性の結合と解離を繰り返しながら徐々に細胞の移動速度を落とすローリング反応が必須となる。ローリング反応において受容体リガンドと親和性の低い過渡的な複合体を形成することが重要であると考えられている(Nat Immunol., 7:883-9, 2006)。

上記で述べてきた現象は、生命現象を理解する上で重要であるものの、過渡的に形成される短寿命かつ不均一な状態が関与しているため、従来の構造生物学的手法を適用することは困難である。その理由は過渡的複合体を *in vitro* で再現することが容易ではないことと、生細胞における過渡的複合体を分子・原子レベルで解析する手法がないこと、などのため適切な解析戦略に欠けるからである。したがって、どのようにして *in situ* な状態における過渡的複合体の性状解析を行うか？そして、どのようにして過渡的な複合体の機能を原子レベルで解析するか？について真剣に考察することが重要である。

本領域では、構造生物学、分子生物学、ケミカルバイオロジー、1分子計測学および免疫学の研究者の相互協力により、*in situ* における過渡的準安定複合体を原子・分子レベルの精度で可視化する方法論を確立し、開発された手法を個別の系に適用することにより実証する。そして、従来の構造生物学的研究アプローチと合わせて過渡的準安定複合体が関わる生命現象の解明を行うことを目的とする。

研究期間内で開発する具体的な研究要素として、1. *in situ*における過渡的準安定状態を原子レベルで記述可能にするサンプル調製法の開発を含めたNMRやX線結晶法における新規測定・解析法の開発、2. 細胞表層におけるタンパク質の過渡的準安定状態を観測可能とする、蛍光顕微鏡の回折限界（約 250 nm）を破る超高解像度 1 分子蛍光顕微鏡の開発、3. 細胞表層および細胞内標的タンパク質分子に対する蛍光および低分子プローブを自在に導入できる新規化学反応の開発、4. 生細胞内におけるタンパク質の過渡的相互作用を解析できる新規NMR法の確立、5. 免疫細胞およびがん細胞の生体内動態機構の解明、を設定する。そして、原子レベル、分子レベルおよび細胞レベルの研究を行うことを目指し、

研究要素 1 を含む、A01:準安定的に形成される生体分子複合体の構造とその機能発現機構、研究要素 2 と 3 を含む、A02:準安定状態の動態を分子レベルで可視化する 1 分子観測技術の開発、研究要素 4 と 5 を含む、A03:生理的準安定状態が引き金となって起こる高次生命現象の解析の 3 種類の研究項目を設定する。

生物学の発展を歴史的に俯瞰するならば、個体および細胞レベルで生命を理解しようとした観察学と分類学に始まり、酵素反応をとおして生体を理解しようとする生化学、制限酵素による DNA ハンドリングに基礎をおく分子生物学、原子レベルでの生命現象を目指した構造生物学という順番で、より分析的で精緻なレベルでの学問領域が登場し、それまでの学問領域とあいまって進歩してきた。本領域では原子、分子、細胞レベルのそれぞれを取り扱うマルチスケール（多階層）な研究項目を設定し、研究項目間の相互作用的な共同研究を展開することにより、生命科学の統合的な理解を目指す。

「我が国の学術水準の向上・強化につながる点」

上記述べてきたような新しいコンセプトを適用することで、従来の方法を用いたのでは困難であった立体構造情報や動的情報を得られると考える。従来、構造生物学における日本の研究スタイルは、一部を除き、国外で開発された新しい技術を自らの対象に適用すること、または国外動向のキャッチアップが多かったと思われる。しかしこれでは新しい発見を行うには限界がある。真に新しい測定技法や概念を生み出して、国内外にその有効性を示すことで新しい分野をつくるような創造型の研究領域を生み出すことを目指すべきである。本申請における提案技術・技法は既存の方法では見落としてきた対象を実際に“見る”ことが可能になることから、パラダイムシフトを促すような斬新な結果が必然的に期待できる。

2008 年度より発足した文部科学省「ターゲットタンパク質研究プログラム」では、「基本生命」、「医学・薬学」、「食品・環境」など生命科学の重要な領域における構造生物学研究者および医学、生物学領域の研究者による共同研究が行われている。これに対し、本領域では研究リソースの重複投資を避けるため、また新規コンセプトの提案とそれに基づく研究手法の開発・応用を目指すため、転写・翻訳などの特定の生命現象に焦点を絞って研究することを避けた。さらに、「ターゲットタンパク質研究」における技術開発では、「生産」、「解析」、「制御」、「情報プラットフォーム」の領域が設定され、構造生物学的研究である「解析」ではマイクロフォーカスビームラインを用いた X 線結晶構造解析法の改良を主として行い、本領域が目指すようなコンセプトの提案および方法論の開発は行っていない。したがって、本提案領域と「ターゲットタンパク質研究」は、いわば縦糸と横糸の相補的關係にあり、本領域から得られる成果は「ターゲットタンパク質研究」で生かされ、全体として我が国の生命科学の発展に貢献すると考える。

2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2 ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、どのように研究組織間の連携や計画研究と公募研究の調和を図ってきたか、組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

また、本提案領域では、総括班を活用し、共通研究対象の設定や研究者の他研究室への長期派遣を行うことにより、一方がもつ技術を他方が使うという一方向の共同研究ではなく、双方が同等の役割を果たすことを理想とする双方向的共同研究である「相互作用的」共同研究体制を敷くことを目指した(図1参照)。

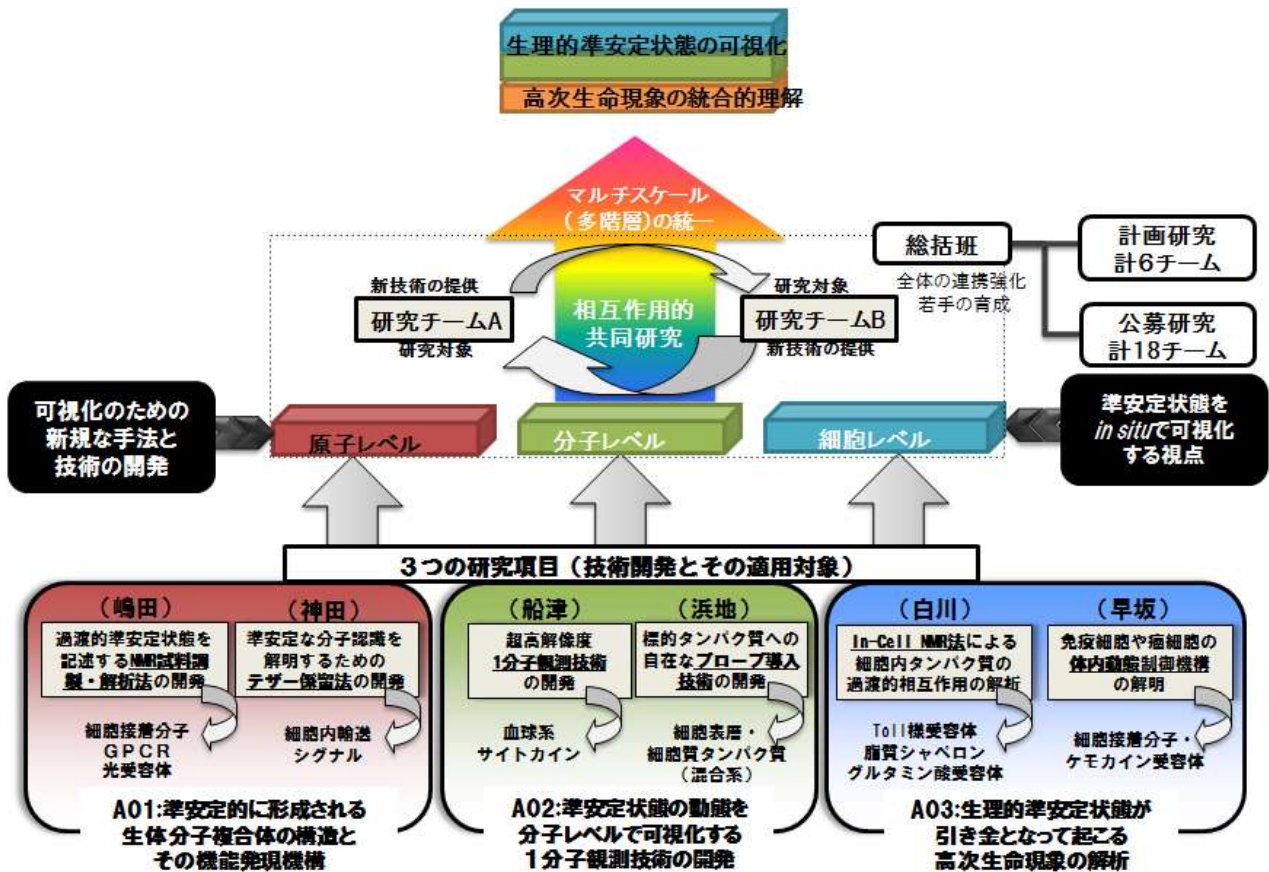


図1 領域内共同研究の推進における総括班の役割

計画研究では、各研究項目間で「相互作用的」共同研究を行い、原子、分子、細胞レベルの研究を統合的に進めた。本領域を構成する計画研究代表者は技術開発とその応用研究のバランスがとれた研究者で構成されており、また公募班員として、生物学、有機化学、および分析化学など多様な研究領域から、オリジナリティの高い技術を持った研究者に多く参加していただいている。そのため、班会議などの交流を通して、多数の共同研究がスムーズに立ち上がった。その結果、領域内で26件の共同研究が行なわれ、既に18件の論文発表がなされていることから、多くの成果が上がったと判断している(図2)。

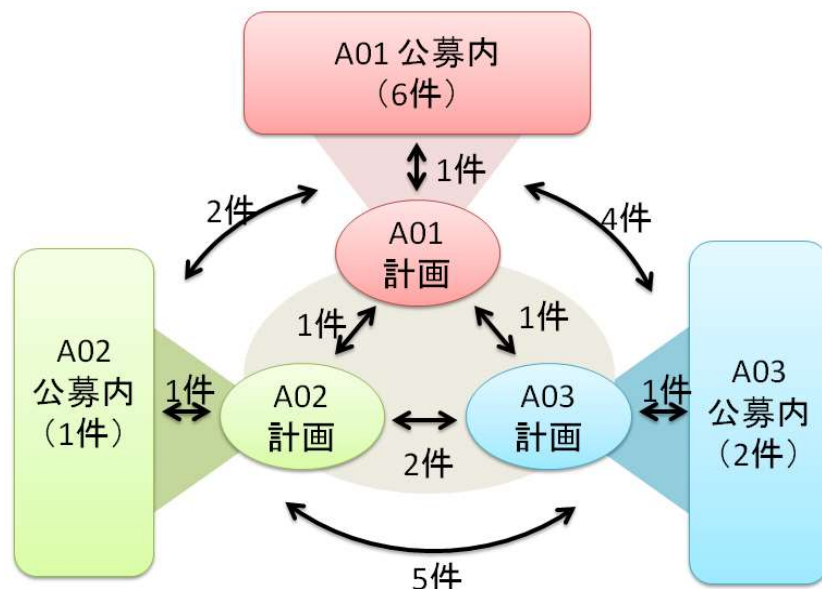


図2 領域内で行なわれた共同研究の件数とその関係性

個別の共同研究成果として、準安定状態の存在を検証するため、A01 公募班員の杉田らの計算科学手法との連携を積極的に進めた。例えば A01 計画班員の神田は Tom20-プレ配列複合体の動的平衡認識モデルの妥当性を評価するためにレプリカ交換動力学計算を行った。動的平衡状態の自由エネルギー地形を得て、複数の結合状態の自由エネルギーの比較を行ったところ、実験から得られた複数のスナップショット構造を良く再現する結果が得られた (J Phys Chem, 2013)。また、A01 計画班員の塚崎は、Sec トランスロコンの結晶構造結果に基づいて分子動力学計算を実施し、pre-open から closed 状態への遷移を観測した (Nature 2011, Biochemistry, 2011)。その他、A01 公募班員の高木もインテグリンの金属結合部位に関する MD シミュレーションから Ca^{2+} の役割を明らかにした (J Cell Biol, 2012)。

A02 計画班員の浜地のケミカルバイオロジーによるアプローチは多くの領域内共同研究が発生した。具体例としては、A03 計画班員の白川との共同研究において、新しい原理で蛋白質を選択的に検出する自己集合性 ^{19}F NMR/MRI プローブの開発に成功し (Nature Chemistry, 2009)、 ^{19}F -NMR プローブを化学修飾した蛋白質バイオセンサーの結晶構解析と、炭酸脱水酵素の *in vitro* と *in cell* での動的揺らぎの差異の評価にも成功した (Chem Commun 2013)。A02 公募班員の森井と A03 公募班員の清中との共同研究により、生細胞内の特定のオルガネラ局所での温度変化をイメージングできる新規蛋白質プローブの創製に成功した (Nature Methods, 2013)。また、A03 公募班員の鈴木との共同研究では、蛋白質キナーゼの基質を同定する新規手法の開発に取り組み、ATG1 に対する新規阻害剤の候補化合物を 16 種類合成し、5 種類について阻害剤としての活性が認められている。

3. 研究領域の設定目的の達成度（3 ページ程度）

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、どの程度達成できたか、また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らしての達成度合いについて、具体的に記載してください。必要に応じ、公募研究を含めた研究項目毎の状況も記述してください。

本領域では具体的な開発項目として、以下の5点を設定した。

1. *in situ* における過渡的準安定状態を原子レベルで記述可能にするサンプル調製法の開発を含めたNMRやX線結晶法における新規測定・解析法の開発、
2. 細胞表層におけるタンパク質の過渡的準安定状態を観測可能とする、蛍光顕微鏡の回折限界(約 250 nm)を破る超高解像度 1 分子蛍光顕微鏡の開発、
3. 細胞表層および細胞内標的タンパク質分子に対する蛍光および低分子プローブを自在に導入できる新規化学反応の開発
4. 生細胞内におけるタンパク質の過渡的相互作用を解析できる新規NMR法の確立
5. 免疫細胞およびがん細胞の生体内動態機構の解明、

1の「*in situ* における過渡的準安定状態を原子レベルで記述可能にするサンプル調製法の開発を含めた NMR や X 線結晶法における新規測定・解析法の開発」に関して、A01 嶋田らは *in situ* を反映した膜タンパク質試料調製法 (rHDL 法) を開発し、従来の界面活性剤による可溶化試料と比較して、10 倍以上の安定性を膜タンパク質に持たせることに成功した (図 3, J Am Chem Soc 2010)。また、開発した方法を CCR5 などのケモカイン受容体とリガンドとの相互作用解析に応用して、その有効性を実証した。また、A01 神田らはミトコンドリアプレ配列受容体 Tom20 のプレ配列認識機構において、巧みにリガンド・受容体間にジスルフィド結合を導入し過渡的複合体を安定化するテザー係留技術と、プレ配列内に分子内 S-S 結合を導入して結合状態を安定化させる分子内架橋係留技術法を開発した。得られた 6 つの複合体結晶構造から、複数の結合状態の動的平衡が単一受容体の多様なプレ配列認識を可能としていることを明らかにした (図 4A, Biochemistry 2011)。さらに、本手法をオリゴ糖転移 (OST) 酵素にも適応し、ジスルフィド結合で tethering され、かつ糖鎖受容活性を保持した OST 酵素・基質ペプチド複合体を得ることに成功した (Proc Natl Acad Sci USA 2013)。また、嶋田らは、神田らによって開発された分子内架橋係留法を細胞接着因子 CD44 に適応し、A03 の早坂とともに CD44 のリガンド認識部位の構造平衡が細胞のローリング現象に関与していることを明らかにした (Structure 2010)。

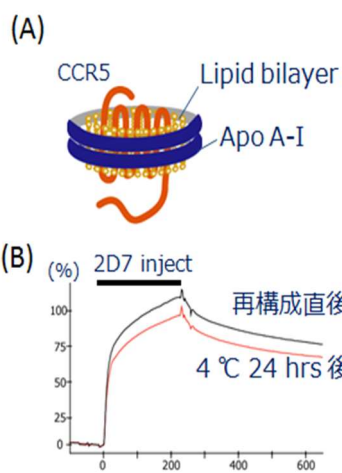


図 3 GPCR を安定化させる試料調製法
(A) rHDL 中に再構成した CCR5 の模式図。
(B) rHDL 中での GPCR の安定性の評価。

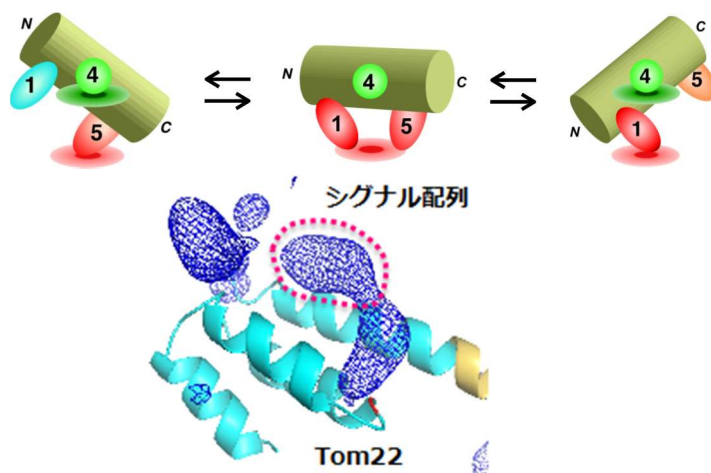


図 4 Tom20 によるプレ配列認識機構
(A) 3 つの動的構造平衡認識モデル
(B) 結晶コンタクトフリーなタンパク質結晶化法を利用したプレ配列電子密度の観測

また、当初計画には含まれていないが、下記の成果を得ている。A01 嶋田らは、昆虫細胞を用いて安定同位体標識を施した GPCR の試料調製法を確立した、メチオニンメチル基を選択的に ^{13}C 標識した β_2 -アドレナリン受容体($\beta_2\text{AR}$) の NMR 解析から、 $\beta_2\text{AR}$ は 2 種類の不活性化構造と 1 種類の活性化構造の間の平衡にあること、および平衡における活性化構造の割合がシグナル伝達強度を決定していることを明らかにした(Nature Commun 2012)。さらに、K イオンチャネルの不活性化機構を、イオン選択フィルターの動的構造平衡の観点から解明した (Proc Natl Acad Sci USA 2010)。また神田らは、結晶中における大振幅運動を捉えるため、結晶コンタクトフリーな蛋白質結晶化法と解析法を新たに開発し、Tom20 に結合した状態のプレ配列に由来する棒状の電子密度を観測することに成功した (図 4B)。

2 の「細胞表層におけるタンパク質の過渡的準安定状態を観測可能とする、蛍光顕微鏡の回折限界 (約 250 nm) を破る超高解像度 1 分子蛍光顕微鏡の開発」に関して、A02 船津らは超解像光学顕微鏡 (STORM) を開発し、水平方向に 20 nm, 奥行き方向に 60 nm と従来の回折限界を超えた分解能を達成した (図 5)。開発した STORM をストレス顆粒 (SG) の精製と消失のダイナミクスの計測に用いた。その結果、SG の構成成分である RNA が外部とシャトルしていることを明らかにした (Nucleic Acid Res 2011)。また、船津らが開発した超解像蛍光顕微鏡システムは、スピロ環化の形成、崩壊に伴って自発的に明滅を繰り返す新規 STORM 用蛍光色素の開発と評価にも貢献した。

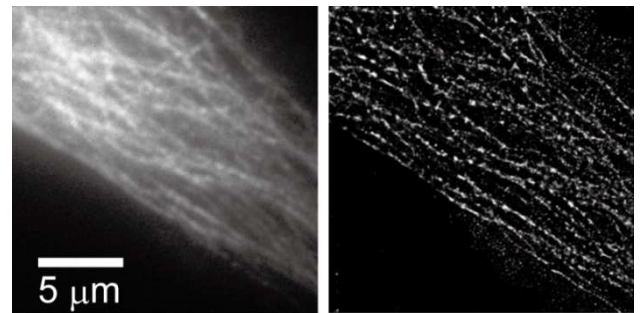


図 5 STORM による微小管像の取得
HeLa 細胞の微小管を Alexa647 標識した抗 α チューブリン抗体で染色し、(A) 通常の蛍光顕微鏡および (B) 超解像度顕微鏡にて観察した。

3 の「細胞表層および細胞内標的タンパク質分子に対する蛍光および低分子プローブを自在に導入できる新規化学反応の開発」に関しては、A02 浜地らにより新規ペプチドタグを融合させて、細胞内で発現後にタグ選択的にプローブを導入する手法を開発した (図 6, J Am Chem Soc 2010)。またリガンド指向性トシル (LDT) 化学を利用して、生細胞内に内在するタンパク質のケミカルラベル化にも成功した (J Am Chem Soc 2012)。

また LDT とは異なる新しいリガンド指向性化学として、アルコキシアシルイミダゾールを用いた LDAI 化学を開発した。この方法を応用して生細胞表層に発現している葉酸受容体(FR)を標的としたラベル化を行い、生細胞環境下で受容体とリガンドの結合に関する平衡論と速度論的な解析を始めて実現した (J Am Chem Soc 2012)。

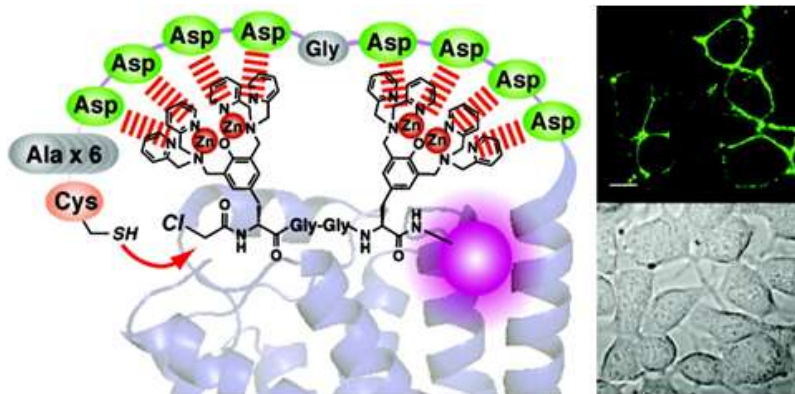


図 6 リアクティブタグ法を用いた細胞表層タンパク質のケミカルラベル化
D4 タグを融合した膜タンパク質を細胞表面に発現させ、発現後にプローブを導入した。

4の「生細胞内におけるタンパク質の過渡的相互作用を解析できる新規 NMR 法の確立」に関しては、A03 白川らはこれまでに確立した哺乳細胞を対象とした *in-cell* 法を用いて、脂肪酸シャペロンタンパク質 FABP4 の構造ダイナミクスの解析を行った。また A02 の浜地との共同研究により、新しい原理で蛋白質を選択的に検出する自己集合性 ^{19}F NMR/MRI プローブの開発に成功した (図 7, Nature Chem 2009)。 ^{19}F -NMR プローブを化学修飾した蛋白質バイオセンサーの結晶構解析と、炭酸脱水酵素の *in vitro* と *in cell* での動的揺らぎの差異の評価にも成功した (Chem Commun 2013)。また、当初計画には含まれていないが、ダイヤモンド窒素-空孔中心 (NVC) を用いた光検出磁気共鳴 (ODMR) 顕微鏡を開発し、細胞内、線虫腸管内、ヌードマウス皮内に導入したナノダイヤモンドを ODMR 検出し、良好なイメージおよびスペクトルを得た (Nano Lett 2012)。また、A431 細胞の表面に発現する EGFR をナノダイヤを修飾した抗体を用いて標識して、ナノダイヤの自由揺動の回転拡散係数を NVC の ODMR によって計測することにも成功した。また A01 計画班員の嶋田も、細胞膜に可逆的なポアを形成する Streptolysin O を用いて *in-cell* NMR 観測のためのタンパク質導入法を独自に開発した (J Am Chem Soc 2009)。また、*in-cell* NMR 測定の際に、細胞に培地を供給して長時間生存状態に保つことのできるバイオリアクター装置を開発し、その装置を用いて細胞内に導入したタンパク質と内在性分子の特異的な相互作用様式を観測することに成功した (Angew Chem Int Ed 2013)。

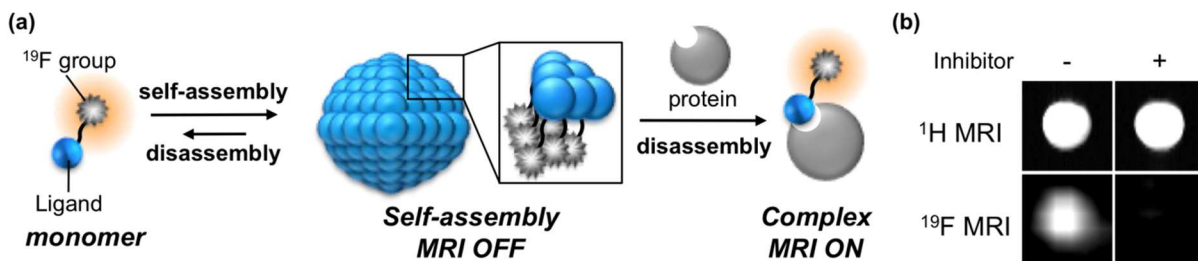


図 7 自己集合性 ^{19}F NMR/MRI プローブの検出

(A) 自己集合性 ^{19}F プローブの作動原理の模式図

(B) 特定のタンパク質を認識して、自己集合状態が解除されると MRI シグナルが観測される。

5の「免疫細胞およびがん細胞の生体内動態機構の解明」については、A03 計画班員の早坂は A01 嶋田との共同研究により、CD44 を介した細胞ローリング活性の解析を行い、リガンド認識部位の構造平衡が細胞のローリング現象に関与していることを明らかにした (Structure 2010)。また、二状態平衡の片方の状態に構造を固定した CD44 変異体を発現する細胞をマウスに移植して腫瘍形成能と転移能を比較し、野生型と比べていずれの変異体でも造腫瘍能が低下するという予備的な結果を得ている。また、ケモカイン受容体 CXCR4 と CCR7 の共同作用に関してその分子メカニズムを明らかにした。

また、公募班員によっても過渡的複合体を捉える様々な新しい技術が開発されている。A01 内藤らは、NMR ローター内のサンプルにレーザー光を照射する *in situ* 光照射固体 NMR システムを構築し、光受容体膜タンパク質の光中間体を補足して光反応サイクルの解明に成功した (Angew Chem Int Ed 2014)。また A03 水野らは生細胞内における G-アクチンの濃度変化をリアルタイムで観測し、定量化する技術 (s-FDAP) を開発した (J Cell Biol, 2012)。A02 清水らは、観測中にトリガー光を照射することによって酸性 pH (開状態) ヘジャンプさせるシステムを構築し、KcsA チャネルの構造変化の過程をサブミリ秒の時間分解能で計測する X 線 1 分子計測法を開発した。

以上より、応募時に設定した課題はほぼ達成されており、また計画班員を中心に当初計画には含まれない新たな成果も上がっている。

4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況（1 ページ程度）

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

研究期間内に、領域の推進上大きな問題は生じていない。計画研究においては、当初計画していた目標は概ね達成されており、加えて当初計画には含まれていない新たな成果も上がっている。公募研究に関しては、本領域の趣旨とは若干異なるものもあったものの、班会議での発表および議論を通して、班員間共同研究が多く発足するなどの広がりも見せた。しかしながら、もう少し多くの公募研究があるならば、さらに良い共同研究が生じたのではないかと考える。本領域を発足させるに当たり、公募要項の重複制限（1 研究者は 1 領域のみ参加可）を考慮し、公募研究の一人当たりの研究費を 500 万円と高めに設定した。その結果、採択可能件数が 20 件と絞られ、十分な数の公募研究を採択できなかった。本領域へは、採択可能件数の 5 倍程度の申請があり、そのいずれも研究レベルは高く、これらを採択できなかったことが残念であった。

中間評価の結果と対応策について

H23 年度に受けた中間評価の結果は A+であり、研究領域の設定目的に照らして、期待以上の進展が認められるという評価を受けた。

研究成果に対する所見としては、以下のようなコメントがあった。

「数多くの新技術が開発されると共に、インパクトの高い論文が多数発表されており、精力的な研究活動の成果が得られている。また一方で、計算科学のさらなる導入や生命現象の定量化、プローブ感度の向上など、複合領域として、理工系と生物系のさらなる融合を期待したいとの意見が多数あった。」

そこで、①計算科学のさらなる導入、②生命現象の定量化、③プローブ感度の向上を目指し、以下のような研究を展開した。

①計算科学の導入については、公募班の計算科学の専門家と共同研究を積極的に進めた。例として A01 神田らは Tom20-プレ配列複合体の動的平衡認識モデルの妥当性を評価するためにレプリカ交換動力学計算を行った。MD 計算から得られた自由エネルギー地形は、X 線結晶解析から得られた複数のスナップショット構造を良く再現していた（J Phys Chem 2013）

②生命現象の定量化については、細胞のローリングのようなマクロスコピックな生命現象を定量的に記述するため、A01 嶋田らは、接着分子 CD44 のリガンド結合ドメインを表面に固定化したマイクロビーズを用いて再構成系を確立した。その結果、細胞ローリング現象を定量的に記述できるようになり、2 状態構造平衡の遷移速度が張力存在下で加速していることが明らかとなった（論文投稿準備中）。

③プローブ感度の向上については、¹H 核と同程度の検出感度を持ち、特に in-cell NMR においてバックグラウンドシグナルが観測されない ¹⁹F-NMR を活用して感度の向上を試みた。A02 浜地と A03 白川らはヒト赤血球内の CA を LDT 化学により選択的に ¹⁹F 標識して in-cell NMR 観測を行い、細胞内 CA の構造平衡の速度論的な解析を行うことができた（Chem Commun, 2013）。

5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況（1ページ程度）

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

若手育成の取り組み

平成 23 年 7 月に領域主催のシンポジウム「過渡的複合体複合体が関わる生命現象の統合的理解」を開催し、3 名の若手公募研究者に講演を依頼し（A01 塚崎智也、A02 清水啓史、A03 西野邦彦）、若手研究者に対してシンポジウムへの参加のための旅費の援助を行った。また、国内の比較的規模の大きな学会（日本蛋白質科学会 第 10 回年会（平成 22 年）、第 49 回 NMR 討論会（平成 22 年）、日本生物物理学会 第 51 回年会（平成 25 年）、日本分子生物学会 第 36 回年会（平成 25 年））において、シンポジウム・ワークショップを開催し、若手研究者に講演を依頼するとともに、学生を含む若手研究者に領域の成果の発表し、領域の重要性をアピールした。新しい NMR 技術に関するチュートリアルコースの開催も積極的に行った。公募班員の児嶋らが中心となって「先導的若手 NMR スペシャリスト育成プログラム研修会」を開催した（第 1 回：平成 22 年 12 月 2-4 日・琵琶湖リゾートクラブ（守山市）、追加研修会：平成 23 年 1 月 20-22 日・大阪大学蛋白質研究所（吹田市）、第 2 回：平成 23 年 2 月 4-9 日・大阪大学蛋白質研究所（吹田市）&理化学研究所横浜研究所 NMR 施設（横浜市）、第 3 回：平成 23 年 6 月 2-4 日・琵琶湖リゾートクラブ（守山市））。本プログラムでは、半年程度にわたって合宿形式のシステムティックなカリキュラムを実施し、新規 NMR パルスプログラムの理解と開発が可能な先導的 NMR スペシャリストの育成を行った。また、計画班員の白川らが中心となり、蛋白研セミナー「In cell NMR workshop 2012」（平成年 3 月 27-28 日、大阪大学蛋白質研究所（吹田市）、「in cell NMR トレーニングコース 2014」（平成 26 年 3 月 17-18 日、理化学研究所横浜キャンパス（横浜市））を開催し、in-cell NMR 技術の講習会（座学と実習）を行った。

若手研究者の研究終了後の動向

本新学術領域に公募研究代表者として参画した 3 名の若手研究者が独立ポジションを獲得している。

A01 塚崎智也：東京大学大学院理学系研究科 助教

→奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科独立准教授

A01 須藤雄気：名古屋大学大学院理学研究科（准教授）

→岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（教授）

A02 中瀬生彦：京都大学化学研究所 / 助教

→大阪府立大学 21 世紀科学研究機構ナノ科学・材料研究センター 特別講師

また、計画研究および公募研究代表者および研究に参画したグループ員においては、14 名が助教以上のポジションを新たに獲得または昇進し、研究に参画した 12 名が学振特別研究員として採用された。また、学会賞や若手奨励賞を多数受賞している。主なものを以下列挙する。A01 塚崎智也は文部科学大臣表彰 若手科学者賞（H24 年）および日本生物物理学会若手奨励賞（H22 年）を受賞した。また岡部弘基（A02 船津高志の研究室の助教）日本バイオイメージング学会奨励賞（H24 年度）および日本生物物理学会第 8 回若手奨励賞を時受賞した。A02 清水啓史は文部科学大臣表彰 若手科学者賞受賞（H22 年）を、A02 中瀬生彦 日本ペプチド学会 奨励賞（H23 年）をそれぞれ受賞している。

6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1 ページ程度）

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

本領域で購入した大型備品は、NMR 分光光度計（A01 嶋田）、円二色性分散計およびUPLC システム（A01 神田）、超解像度 1 分子蛍光顕微鏡（A02 船津）、および等温滴定熱量測定装置（A03 白川）であり、それぞれ申請した計画研究に従って効率よく機能している。またこれらの備品は領域内共同研究の実施に有効活用されている。

また研究経費を効果的に使用するため、総括班で試薬（安定同位体標識試薬）を大量購入して適宜班員への配布を行っている。これにより購入の単価を抑えることができている。

総括班では当初、総括班員を研究分担者として登録し、旅費をあらかじめ配布していたが、効率よく研究費を使用するために、2 年度目からは総括班員を連携研究者として登録し、班員の旅費を総括班から支給している。

7. 総括班評価者による評価（2ページ程度）

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

4名の総括班評価者によるコメントを以下掲載する。

北海道大学・大学院先端生命科学研究院 稲垣冬彦

「過渡的複合体」は現在の生命科学の方向性を的確に表したネーミングである。分子レベルから細胞レベル、個体レベルへと生命科学は発展しており、各レベルで過渡的に形成される複合体が生命現象の理解に欠かせないことが多くの研究で示唆されている。このような領域に構造生物学、ケミカルバイオロジー、一分子計測学の複合的な方法論を切り口として挑戦することが本新学術領域の使命であり、その使命を十分に果たしたと評価している。計画班員を中心とした方法論と公募班員による生命科学への応用と調和のとれた研究が展開され、素晴らしい研究成果をあげるとともに、多くの共同研究が領域内で始められ、実りの多い新学術領域となった。30分という比較的長い発表時間の中で、わかりやすいイントロを加えた発表のおかげで、部外者にも理解でき、多くの活発な討論が行われたことも特筆すべき点である。評価委員としての参加であったが、最先端の研究発表を毎回の班会議で聞けることを楽しみにしていた。嶋田研究総括のリーダーシップのもとに領域の方向性が明確に示されていたことが本領域研究の成功の一因と思っている。本領域で培われた技術や新しい概念そして班員相互の研究交流は今後の生命科学を牽引していくであろうことを確信しているし、次の新学術領域研究につながることを切望している。

最後に甲斐駒ヶ岳、鳳凰三山、八ヶ岳を望む素晴らしい地で、班研究会を開催していただいた嶋田研究総括ならびに研究室の方々にお礼を述べたい。

大阪大学蛋白質研究所 阿久津秀雄

嶋田新学術領域は、構造生物学、分子生物学、ケミカルバイオロジー、1分子計測学および免疫学の研究者の相互協力により新しい方法論を創出することを目指して発足した。班会議・シンポジウムなどに参加して感じたことは本新学術領域が目指した異分野融合がケミカルバイオロジーと構造生物学および1分子計測学の間で顕著な成果をあげたように思う。この異分野間共同研究により生きた細胞中でのタンパク質機能発現メカニズム、タンパク質—タンパク質間相互作用解析のためのさまざまな方法論が開発された。さらに *in situ* における過渡的準安定複合体を原子・分子レベルの精度で可視化する方法論の探索でも多くの成果をあげた。特に、膜タンパク質であるカリウムイオンチャネル、 β_2 AR (GPCR の一つ) の機能メカニズムを生理学的方法と NMR を合わせ用いることにより原子レベルで明らかにした嶋田代表グループの研究は高く評価される。ここで開発された方法は今後膜タンパク質とリガンドの相互作用機構の解明に広く利用されるであろう。この他、計画研究はいずれも優れた成果をあげている。公募研究も領域の裾野を広げるのに大きな役割を果たした。全体として、本新学術領域は目標であった過渡的準安定複合体に関わる生命現象の解明に大きく貢献したといえる。

横浜市立大学大学院生命医科学研究科 西村善文

本新学術領域の研究目的は、「あるがままの状態における生体分子の立体構造を通してその機能を解明すること」である。タンパク質などの生体分子は立体構造を動的に変化させて機能している。またその機能する場所も細胞内外において時間的に変化している。本領域では細胞局在の時間変化や立体構造のダイナミクスの解析を可能にするような新規方法論の開拓とそれに基づく生物学的に重要な系での解析を研究目的にしている。その目的にしたがって、構造生物学、細胞生物学、化学生物学、生化学などの多様な研究者が有機的に連携し、しかも領域内で様々な共同研究を行って解決を目指していると評価できる。

領域代表者の嶋田は様々な薬物の標的になっている GPCR の例として β_2AR を取り上げ、結晶構造解析では必ずしも解明されていないリガンドごとに薬効度が異なる機構を NMR で解析している。薬効度依存的に活性化状態と不活性化状態の中間の位置に観測される NMR シグナルを見つけ、 β_2AR は活性化状態と 2 種類の不活性化状態の動的な平衡状態にある事を示した。その構造に基づいて完全作動薬、部分作動薬、阻害薬、逆作動薬の結合状態を解析し、動的な構造変化が薬物の機構解析上非常に重要である事を示した。逆にこの解析を用いることにより様々な薬物の薬効度を評価できることになり、今後の研究の発展が期待される。

さらに京大の七田は GPCR の 2 状態モデルを 1 分子観察で解析し、東大の船津はトロンボポエチン受容体の 1 分子ダイナミクスにより過度的に形成される 2 量体化とリン酸化の機構を解析した。また京大の浜地は生細胞系でのタンパク質のケミカルラベル化を開発し内在性グルタミン酸受容体の選択的なラベル化に成功し、九大の王子田は特異的ケミカルラベル化によるチャネルや受容体の超高解像度可視化を行っている。更に九大の神田はタンパク質結晶中の大振幅運動の解析を理研の杉田のレプリカ交換分子動力学計算法との共同研究で行っている。この様に本学術領域研究では細胞生物学的に重要な対象を化学生物学や構造生物学や 1 分子計測学などの手法を取り入れて過渡的複合体に関する新たな知見を得ることに成功している点でおおむね高く評価できる。

大阪大学大学院医学系研究科 宮坂昌之

本領域では、領域代表の見事なリーダーシップにより、工学、理学、薬学、医学それぞれの分野の第一線で活躍する研究者が、過渡的複合体というチャレンジングなテーマについて、切磋琢磨する機会が与えられた。この中で、参加研究者はお互いに強い刺激を受け、活性化され、結果として、きわめて優れた成果が生み出されてきた。特に、毎年小淵沢で行われた班会議では、準安定的に形成される生体分子複合体の構造生物学的解析や過渡的複合体を解析する戦略の構築の試みだけでなく、実際の細胞で起こっている動的複合体に関わる生命現象に重きが置かれ、構造生物学、分子生物学、ケミカルバイオロジー、1 分子計測学および免疫学の研究者の間で、非常に活発な討論が行われた。これは、過渡的複合体研究の有機的統合と発展に非常に有効であり、領域内で多数の共同研究を生み出すきっかけとなった。また、同時に高く評価すべきは、領域代表を中心に若手研究者の育成、社会貢献活動が精力的に行われ、その結果、過渡的複合体研究という、新しい生命科学における一つの潮流が形成されつつあることである。

8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）【研究項目毎または計画研究毎に整理する】

（3 ページ程度）

新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（発明及び特許を含む）について、現在から順に発表年次をさかのぼり、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

【研究項目 A01: 準安定的に形成される生体分子複合体の構造とその機能発現機構】

計画研究：嶋田らは脂質二重膜環境を反映した膜タンパク質 NMR 試料調製法（rHDL 法）を開発し、界面活性剤可溶化試料と比較して、GPCR の安定性を 10 倍以上向上させることに成功した（J Am Chem Soc 2010）。また、転移交差法などを用いて様々な過渡的複合体の相互作用様式を解明した（J Biol Chem 2009, Plant Cell 2012）。また、生細胞内で長時間の NMR 測定を行う装置を開発し、細胞内での蛋白質間相互作用の観測にも成功した（Angew Chem Int Ed 2013）。さらに、K イオンチャネルにおける動的構造平衡を、NMR を用いて解析し、X 線結晶構造解析の知見のみからでは説明できない K チャネル不活性化機構を解明した（Proc Natl Acad Sci USA 2010、掲載号の commentary で取り上げられた）。神田らはミトコンドリアプレ配列受容体 Tom20 のプレ配列認識機構において、巧みにリガンド・受容体間にジスルフィド結合を導入し（molecular tethering 法）、過渡的複合体を安定化することに成功し、合わせて複数の結合状態の動的平衡が単一受容体の多様なプレ配列認識を可能としていることを明らかにした（Biochemistry 2011）。さらに、本手法をオリゴ糖転移（OST）酵素にも適応し、ジスルフィド結合で tethering され、かつ糖鎖受容活性を保持した OST 酵素・基質ペプチド複合体を得ることに成功した。さらに、結晶中における大振幅運動を捉えるため、結晶コンタクトフリーな蛋白質結晶化法と解析法を新たに開発した。

公募研究：塚崎らは Sec トランスロコン複合体を構成する SecDF の結晶構造を決定し、そのタンパク質輸送メカニズムを提唱した（Nature 2011）。さらに Sec トランスロコンとともに働く YidC の立体構造を決定し、基質膜タンパク質が膜へと組み込まれる機構を提唱した（Nature 2014）。高木らは、ニューレキシン（Nrx）のニューロギリン（NL）結合ドメインの X 線結晶構造を明らかにし、シナプス膜間で Nrx-NL 複合体がつくる準安定な高次構造体を蛍光-電子線相関顕微鏡観察法によって観察し、Nrx の細胞外領域のサイズによってシナプス間の集積構造が変化することを示した（Cell Rep 2012）。広常らは、モーター蛋白質である細胞質ダイニンとその制御因子 LIS1 の機能解析を行い、微小管・細胞質ダイニン・LIS1 複合体がキネシン依存的に微小管のプラス端に運搬されるのに必須であることを明らかにした（J Biol Chem 2011）。また、ダイニン・LIS1 複合体が微小管に結合する際に、NUDC がアダプター蛋白質として機能することを明らかにした（EMBO J 2010）。片平らは、抗 HIV 活性を有する APOBEC3G のデアミネーション反応を NMR でリアルタイム観測し、A3G が DNA 上を上流に向かってスライディングするモデルを提唱した（Angew Chem Int Ed, 2013）。また、ATP を捕捉する RNA アプタマーに関し、A02 森井と共同で構造・機能解析を行い、動作原理の解明に成功した（J Am Chem Soc 2011）。三島らは転写共役抑制因子 SHARP の SPOC ドメインとリン酸化 SMRT 複合体の立体構造を決定した（Structure 2014）。また、微小管結合蛋白質 EB1 と微小管との過渡的な複合体構造を明らかにした（BBA 2013）。須藤らは、赤外分光（FTIR）法を利用して X 線結晶構造解析や NMR 解析では得ることが難しい情報の取得を試みた。これまでに、1) FTIR 解析に適した試料調製（J. Biol. Chem 2011, Biophysics 2011）、2) 低温/時間分解赤外分光法によるロドプシンタンパク質の構造変化解析（J. Biol. Chem 2011, Biochemistry 2011）、3) ラマン分光法など他の分光測定（Biochemistry 2011 J. Phys. Chem. B 2011）、4) 全反射型 FTIR (ATR-FTIR)におけるイオンと膜タンパク質の相互作用解析を行い、解析の難しい膜タンパク質の微細構造変化を明らかにした。樋口らは、Wnt シグナル伝達因子の集合離散を制御する CCD1-DIX ドメインの結晶化を行い、7 回らせん状のオリゴマーを形成していることを見出した（Acta Crystallgor 2011）。また、シトクロム c が 2 量体以上のオリゴマーを形成することを見出し、その結晶構造解

析に成功した (Proc Natl Acad Sci USA 2010)。内藤らは、光受容体膜タンパク質を解析する *in situ* 光照射固体 NMR システムを構築し、ppR-pHtrII 複合体や SRI において光中間体の補足に成功し、光反応サイクルの解明に成功した (Angew Chem Int Ed 2014)。島村らは、GPCR の一種であるアデノシン A2a 受容体の活性型構造を安定化する抗体をスクリーニングし、得られた抗体の Fab 断片と A2a 受容体の複合体の結晶化を行うことで活性型 A2a の構造決定を試みた。現在までに 3.5 Å のデータを取得している。小椋らはマルチドメイン蛋白質 p47phox の構造解析を行い、PX ドメインと SH3-SH3-AIR ドメインが接触した closed 構造と遊離した open 構造が 8 : 2 の平衡に有ることを明らかにした。また、PI(3,4)P2 を組み込んだナノディスクを用いた NMR 解析から、PX ドメインの 2 段階相互作用機構を明らかにした。潮田らは小胞体で還元活性に特化する ERdj5 の機能解析を行い、小胞内でミスフォールドした糖タンパク質および非糖タンパク質の分解機構が、ERdj5 を含む複合体の違いによって 2 つの経路に分かれることを明らかにした (Mol Biol Cell, 2013)。手塚らは受容体型チロシンキナーゼ MuSK とその活性化因子 Dok-7 の活性化機構を明らかにするため、Dok-7 の MuSK 活性化に必要な領域の同定を行った。杉田らは神田らが提唱した Tom20 によるプレ配列の動的平衡認識モデルの妥当性を検証したするため、全原子動力学計算とレプリカ交換法に基づく分子動力学計算を行った。得られた計算結果は、実験から得られた複数のスナップショット構造を良く再現するものであった (J Phys Chem, 2013)

【研究項目 A02:準安定状態の動態を分子レベルで可視化する 1 分子観測技術の開発】

計画研究：船津らは、トロンボポエチン (TPO) 受容体 Mpl の二量体形成を 1 分子イメージングにより解析し、Mpl 二量体は Mpl のリン酸化によって安定化され、安定化された Mpl 二量体は逆に Mpl のリン酸化を促進する正のフィードバック機構を明らかにした。また、超解像光学顕微鏡 (STORM) を開発し、従来の回折限界を超えた水平方向に 20 nm, 奥行き方向に 60nm の分解能を達成した。開発した STORM をストレス顆粒 (SG) の観測に応用し、SG の精製と消失のダイナミクスを明らかにした (Nucleic Acid Res 2011)。浜地らは A03 の白川とともに、特定のタンパク質の存在を、¹⁹F-NMR/MRI を用いて検出およびイメージングできる新しい測定法の開発に成功した (Nature Chemistry 2009)。また、新規ペプチドタグを融合させて、細胞内で発現後にタグ選択的にプローブを導入する手法を開発した (J Am Chem Soc, 2010)。またリガンド指向性トシル (LDT) 化学を利用して、生細胞内に内在するタンパク質のケミカルラベル化にも成功した (J Am Chem Soc 2012)。また LDT とは異なるリガンド指向性科学の開発にも成功した。

公募研究：富重らはモーター蛋白質キネシンが協調的な二足歩行運動において、キネシン頭部とネックリンカーとの相互作用が ATP 加水分解に重要であるという仮説を実証した。また ATP 加水分解が低下するネックリンカー変異体 I325G の一分子蛍光観察やクライオ電顕の解析を行い、ネックリンカーと頭部の相互作用が ATP 加水分解を促進するモデルを立てることに成功した。清水らは、X 線 1 分子計測法を用いた KcsA イオンチャネルの観測において、観測中にトリガー光を照射することによって酸性 pH (開状態) ヘジャンプさせるシステムを構築し、KcsA チャネルの構造変化の過程をサブミリ秒の時間分解能で計測することに成功した。七田らは、Alexa594 で蛍光標識したロドプシンを全反射蛍光顕微鏡で 1 分子観測し、メタ I 中間体とメタ II 中間体の熱平衡に由来する蛍光の増減を観測し、メタ I とメタ II はいずれも活性構造と不活性構造の平衡にあることを明らかにした。さらに活性型変異体 (CAM) の解析から、CAM で生じている高頻度な構造変化が高い G タンパク質活性化能につながることを明らかにした (Biophys J 2014)。森井らは、A03 の清中との共同研究により、PH ドメインを土台とした IP₄ センサーと IP₃ センサーを Hela 細胞内に導入し、両者の発光を単一細胞で同時計測した (Angew Chem Int Ed 2010)。また、DNA ナノ構造体を足場として、タンパク質 1 分子配置技術を開発した (Methods 2014)。中瀬らは、高効率に形質膜を通過し、サイトゾル移行後にミトコンドリアに集積する性質を持つペプチド (RLA : D(RLARLAR)₂) を新たに見出した (Chem

Commun, 2012)。古田らは、1光子励起および2光子励起で高い光反応性が期待される新規ケージド化合物を設計合成した (Chem Bio Chem, 2011)。また、核酸のケージド化合物の高機能化や、多様な機能を容易に導入可能なケージンググループを開発した (Org Lett, 2014)。王子田らは、生細胞上のタンパク質のケミカルラベル化において、従来よりも高いラベル化選択性を示す D2 タグ/マイケルアクセプター型亜鉛錯体プローブペアを開発した。

【研究項目 A03:生理的準安定状態が引き金となって起こる高次生命現象の解析】

計画研究: 白川らは独自に開発した in-cell NMR 技術を応用して、¹⁹F 標識 FKBP12 の NMR シグナルを高感度で検出する手法を開発した。また A02 浜地と共同で、ヒト赤血球内の内在性タンパク質 CA を特異的に ¹⁹F 標識し、細胞内におけるダイナミクスを観測した (Chem Commun, 2013)。また、ダイヤモンド窒素-空孔中心 (NVC) を用いた光検出磁気共鳴 (ODMR) 顕微鏡を開発し、細胞内、線虫腸管内、ヌードマウス皮内に導入したナノダイヤモンドを ODMR 検出し、良好なイメージおよびスペクトルを得た (Nano Lett. 2012)。A431 細胞の表面に発現する EGFR をナノダイヤを修飾した抗体を用いて標識して、ナノダイヤの自由揺動の回転拡散係数を NVC の ODMR によって計測することにも成功した。早坂らは、A01 嶋田との共同研究により、CD44 を介した細胞ローリング活性の解析を行い、リガンド認識部位の構造平衡が細胞のローリング現象に関与していることを明らかにした (Structure, 2010)。また、二状態平衡の片方の状態に構造を固定した CD44 変異体を発現する細胞をマウスに移植して腫瘍形成能と転移能を比較し、野生型と比べていずれの変異体でも造腫瘍能が低下するという予備的な結果を得ている。また、ケモカイン受容体 CXCR4 と CCR7 の共同作用に関してその分子メカニズムを明らかにした。

公募研究: 水野らは、生細胞の局所におけるアクチン単量体濃度の経時的変化を測定する s-FDAP 法を開発し、アクチン単量体とアクチン結合タンパク質の過渡的複合体形成ダイナミクスを定量的に解析することに成功した (J Cell Biol 2012)。また、生細胞内のタンパク質間相互作用を検出する BiFC 法をアクチンとコフィリンの相互作用に適用し、Damanacanthal が LIMK を阻害し、癌細胞の運動・浸潤を阻害することを見出した (Mol Biol Cell, 2014)。鈴木らは、オートファゴソーム形成の隔離膜形成にかかわる Atg-1 の基質タンパク質を同定するため、浜地らと共同で ATP アナログ誘導体の新規阻害剤を合成し、基質を修飾した後、生化学的に精製・同定することを試みた。清水らは、アポトーシス時とネクローシス時のミトコンドリア膜の形態変化の補足、膜透過装置を構成する新規分子の探索、アポトーシス時のミトコンドリア膜の形態変化にかかわる Bax、Bak 分子の構造変化の解析、ミトコンドリア膜の原子間力顕微鏡を用いた解析などを行った。Wong らは、Nup98-Hoxa9 タンパク発現が Rael タンパク発現の減少や有糸分裂時に異所局在を誘導することを見出し、Rael と Nup98 の複合体形成の異常が白血病化をもたらす可能性があることを明らかにした。また、白川らと共同で Rael の構造解析を試みている。遠藤らは、TOM40 複合体の中心サブユニット Tom22 に *in vitro* 部位特異的光架橋法を適用し、外膜側の相互作用分子として Por1 を同定した。また、TOM40 複合体中の Tom22 と Tom40 の配置を、*in vitro* 光架橋法によって調べている。清中らは、Ca²⁺チャネルの β サブユニットとプレシナプスの足場タンパク質である CAST との複合体形成を評価し、 β 4 サブユニットが選択的に相互作用すること、CAST がより低電位側で Ca²⁺チャネルを活性化しやすくしていることを明らかとした。また、 β サブユニットの核内移行、ヒストンの脱リン酸化、転写制御について解析した。児嶋らは、大腸菌大量発現系において、培養時に非標識培地を、誘導時に安定同位体標識培地を用いることで、観測したい膜タンパク質のみを均一ならびにアミノ酸選択的に安定同位体標識した。また、リジン側鎖アミノ基に ¹³C メチル基を導入することにより、0.2 μ M という極めて低濃度の ¹³C メチル化ユビキチンについて、YUH1 結合によるスペクトル変化を部位特異的に検出することに成功した。

9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5ページ程度）

新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、現在から順に発表年次をさかのぼり、計画研究・公募研究毎に順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に*印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

主な学術論文

計画研究：A01 嶋田一夫

Tokunaga Y, Takeuchi K, Takahashi H, *Shimada I Allosteric enhancement of enzymatic activity and substrate selectivity of MAP kinase p38 α by the docking interaction, Nat Struct Mol Biol (2014) in press

Kofuku Y, Ueda T, Okude J, Shiraishi Y, Kondo K, Maeda M, Tsujishita H, *Shimada I. Efficacy of the β 2-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region., Nat Commun. 3:1045 (2012).

Ueda T, Nomoto N, Koga M, Ogasa H, Ogawa Y, Matsumoto M, Stampoulis P, Sode K, Terasawa H, *Shimada I. Structural basis of efficient electron transport between photosynthetic membrane proteins and plastocyanin in spinach revealed using nuclear magnetic resonance., Plant Cell. 24(10):4173-86 (2012).

Imai S, Osawa M, Takeuchi K, *Shimada I. Structural basis underlying the dual gate properties of KcsA., Proc Natl Acad Sci U S A. 107(14):6216-21 (2010).

Yoshiura C, Kofuku Y, Ueda T, Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Terashima Y, Matsushima K, *Shimada I. NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers., J Am Chem Soc. 132(19):6768-77 (2010).

Ogino S, Nishida N, Umemoto R, Suzuki M, Takeda M, Terasawa H, Kitayama J, Matsumoto M, Hayasaka H, Miyasaka M, *Shimada I. Two-state conformations in the hyaluronan-binding domain regulate CD44 adhesiveness under flow condition. Structure., 18(5):649-56 (2010).

Kofuku Y, Yoshiura C, Ueda T, Terasawa H, Hirai T, Tominaga S, Hirose M, Maeda Y, Takahashi H, Terashima Y, Matsushima K, *Shimada I. Structural Basis of the Interaction between Chemokine Stromal Cell-derived Factor-1/CXCL12 and Its G-protein-coupled Receptor CXCR4., J Biol Chem. 284(50):35240-50 (2009).

A01：神田大輔

N. Maita, J. Nyirenda, M. Igura, J. Kamishikiryo, *D. Kohda, Comparative structural biology of eubacterial and archaeal oligosaccharyltransferases., J. Biol. Chem., 285, 4941-4950 (2010)

M. Igura, *D. Kohda, Selective control of oligosaccharide transfer efficiency for the N-glycosylation sequon by a point mutation in oligosaccharyltransferase., J. Biol. Chem., 286, 13255-13260 (2011)

T. Saitoh, M. Igura, Y. Miyazaki, T. Ose, N. Maita, *D. Kohda, Crystallographic snapshots of Tom20-mitochondrial presequence interactions with disulfide-stabilized peptides., Biochemistry, 50, 5487-5496 (2011)

J. Nyirenda, S. Matsumoto, T. Saitoh, N. Maita, N. Noda, F. Inagaki, *D. Kohda, Crystallographic and NMR evidence for flexibility in oligosaccharyltransferases and its catalytic significance., Structure, 21, 32-41 (2013)

S. Matsumoto, A. Shimada, J. Nyirenda, M. Igura, Y. Kawano, *D. Kohda, Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 110, 17868-17873 (2013)

A02：船津高志

J. Zhang, K. Okabe, T. Tani, *T. Funatsu, Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules., J. Cell Sci., 124, 4087-4095 (2011)

K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, *S. Uchiyama, Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy., Nat. Commun., 3, 705 doi: 10.1038/ncomms1714 (2012)

A02：浜地格

Y. Takaoka, T. Sakamoto, S. Tsukiji, M. Narazaki, T. Matsuda, H. Tochio, M. Shirakawa, *I. Hamachi, Self-assembling nano-probes displaying off/on ¹⁹F NMR signals for protein detection and imaging., *Nature Chemistry*, 1, 557-561 (2009)

K. Mizusawa, Y. Ishida, Y. Takaoka, M. Miyagawa, S. Tsukiji, *I. Hamachi, Disassembly-Driven Turn-On Fluorescent Nanoprobes for Selective Protein Detection., *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 7291-7293 (2010)

Y. Takaoka, K. Kiminami, K. Mizusawa, K. Matsuo, M. Narazaki, T. Matsuda, *I. Hamachi, Systematic Study of Protein Detection Mechanism of Self-assembling ¹⁹F NMR/MRI Nanoprobes toward Rational Design and Improved Sensitivity., *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 11725-11731 (2011)

T. Tamura, S. Tsukiji, *I. Hamachi, Native FKBP12 Engineering by Ligand-Directed Tosyl Chemistry: Labeling Properties and Application to Photo-Cross-Linking of Protein Complexes *in vitro* and in Living Cells., *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 2216-2226 (2012)

Y. Takaoka, Y. Kioi, A. Morito, J. Otani, K. Arita, E. Ashihara, M. Ariyoshi, H. Tochio, M. Shirakawa, *I. Hamachi, Quantitative comparison of protein dynamics in live cells and *in vitro* by in-cell ¹⁹F-NMR., *Chem. Commun.*, 49, 2801-2803 (2013)

T. Tamura, Y. Kioi, T. Miki, S. Tsukiji, *I. Hamachi, Fluorophore labeling of native FKBP12 by ligand-directed tosyl chemistry allows detection of its molecular interactions *in vitro* and in living cells., *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 6782-6785 (2013)

A03:白川昌宏

R. Igarashi, T. Sakai, H. Hara, T. Tenno, T. Tanaka, *H. Tochio, *M. Shirakawa, Distance Determination in Proteins inside *Xenopus laevis* Oocytes by Double Electron-Electron Resonance Experiments., *Journal of the American Chemical Society*, 132, 8228-8229 (2010)

R. Igarashi, Y. Yoshinari, H. Yokota, T. Sugi, F. Sugihara, K. Ikeda, H. Sumiya, S. Tsuji, I. Mori, H. Tochio, *Y. Harada, *M. Shirakawa, Real-time background-free selective imaging of fluorescent nanodiamonds *in vivo*., *Nano Lett.*, 12, 5726-5732 (2012)

A03:早坂晴子

*H. Hayasaka, K. Taniguchi, S. Fukai, M. Miyasaka, Neogenesis and development of the high endothelial venules that mediate lymphocyte trafficking., *Cancer Sci.*, 101, 2302-2308 (2010)

E. Umemoto, K. Otani, T. Ikeno, N. Verjan Garcia, H. Hayasaka, Z. Bai, M. H. Jang, T. Tanaka, K. Ueda, *M. Miyasaka, Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling., *J. Immunol.*, 189, 191-199 (2012)

公募研究 A01:高木淳一

T. Nogi, N. Yasui, E. Mihara, Y. Matsunaga, M. Noda, N. Yamashita, T. Toyofuku, Y. Goshima, A. Kumanogoh, *J. Takagi, Structural basis for semaphorin signaling through the plexin receptor., *Nature*, 467, 1123-1127 (2010)

H. Tanaka, N. Miyazaki, K. Matoba, T. Nogi, K. Iwasaki, *J. Takagi, Higher-order architecture of cell adhesion mediated by polymorphic synaptic adhesion molecules neuroligin and neuroligin., *Cell Reports*, 2(1), 101-110 (2012)

A01:広常真治

M. Yamada, S. Toba, T. Takitoh, Y. Yoshida, D. Mori, T. Nakamura, A.H. Iwane, T. Yanagida, H. Imai, LY. Yu-Lee, T. Schroer, A. Wynshaw-Boris, *S. Hirotsune, mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1., *EMBO J.*, 29, 517-531 (2010)

A01 : 樋口芳樹

17, Y. Shomura, K. Yoon, H. Nishihara, *Y. Higuchi, Structural Basis for a [4Fe-3S] Cluster in the Oxygen-tolerant Membrane-bound [NiFe]-hydrogenase., *Nature*, 479, 253-257 (2011)

S. Terawaki, K. Yano, T. Katsutani, K. Shiomi, K. Keino-Masu, M. Masu, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata, *Y. Higuchi, Crystallographic Characterization of the DIX Domain of the Wnt Signalling Positive Regulator Ccd1., *Acta Crystallogr. F*, 67, 758-761 (2011)

A01 : 小椋賢二

*K. Ogura, H. Okamura, M. Katahira, E. Katoh, F. Inagaki. Conformational dynamics of yeast calmodulin in the Ca²⁺-bound state probed using NMR relaxation dispersion., *FEBS Letters*, 586, 2548-2554 (2012)

*K. Ogura, H. Okamura, Conformational change of Sos-derived proline-rich peptide upon binding Grb2 N-terminal SH3 domain probed by NMR., *Scientific Reports*, 3, 2913 (2013)

A01 : 塚崎智也

T. Tsukazaki, H. Mori, Y. Echizen, R. Ishitani, S. Fukai, T. Tanaka, A. Perederina, D.G. Vassilyev, T. Kohno, A.D. Maturana, *K. Ito, *O. Nureki, Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export., *Nature*, 474, 235-238 (2011)

K. Kumazaki, S. Chiba, M. Takemoto, A. Furukawa, K. Nishiyam, Y. Sugano, T. Mori, N. Dohmae, K. Hirata, Y. Nakada-Nakura, A.D. Maturana, Y. Tanak, H. Mori, Y. Sugita, F. Arisaka, K. Ito, R. Ishitani, *T. Tsukazaki *O. Nureki, Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC., *Nature in press*.

A01:内藤晶

H. Yomoda, Y. Makino, Y. Tomonaga, T. Hidaka, *I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, *Y. Sudo, *A. Naito, Color discriminating retinal configurations of sensory rhodopsin I by photo-irradiation solid state NMR spectroscopy., *Angew Chem. Int. Ed.* (2014) in press.

A01:須藤雄気

T. Tsukamoto, K. Inoue, H. Kandori, *Y. Sudo, Thermal and spectroscopic characterization of a proton pumping rhodopsin from an extreme thermophile., *J. Biol. Chem.*, 288, 21581-21592 (2013)

*Y. Sudo, M. Mizuno, Z. Wei, S. Takeuchi, *T. Tahara, *Y. Mizutani, The early steps in the photocycle of a photosensor protein sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber*., *J. Phys. Chem. B*, 118, 1510-1518 (2014)

A01 : 片平正人

A. Furukawa, K. Sugase, R. Morishita, T. Nagata, T. Kodaki, T. Takaori, A. Ryo, *M. Katahira, Quantitative analysis of the location- and sequence-dependent deamination by APOBEC3G using real-time NMR., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 2349-2352 (2014)

T. Mashima, F. Nishikawa, Y. Kamatari, H. Fujiwara, M. Saimura, T. Nagata, T. Kodaki, S. Nishikawa, K. Kuwata, *M. Katahira, Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis., *Nucleic Acids Res.*, 41, 1355-1362 (2013)

A01 : 三島正規

T. Kanaba, R. Maesaki, T. Mori, Y. Ito, T. Hakoshima, *M. Mishima, Microtubule-binding sites of the CH domain of EB1 and its autoinhibition revealed by NMR., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834, 499-507 (2013)

S. Mikami, T. Kanaba, N. Takizawa, A. Kobayashi, R. Maesaki, T. Fujiwara, Y. Ito, *M. Mishima, Structural insights into the recruitment of SMRT by the co-repressor SHARP under phosphorylative regulation., *Structure*, 22, 35-46 (2014)

A01:潮田亮

R. Ushioda, J. Hoseki, *K. Nagata, Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress., *Mol. Biol. Cell.*, 24(20), 3155-3163 (2013)

A01:杉田有治

M. Nagase, S. Re, M. Emiko, T. Nogo, Y. Sugita, *J. Takagi, Crystal structure of alpha-5-beta-1 integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor., *J. Cell Biol.*, 197, 131-140 (2012)

Y. Komuro, N. Miyashita, T. Mori, E. Muneyuki, T. Saitoh, D. Kohda, *Y. Sugita, Energetics of the Presequence-Binding Poses in Mitochondrial Protein Import Through Tom20., *J. Phys. Chem. B*, 117, 2864-2871 (2013)

A01:手塚徹

K. Takeshita, *T. Tezuka, Y. Iozaki, E. Yamashita, M. Suzuki, M. Kim, Y. Yamanashi, T. Yamamoto, *A. Nakagawa, Structural flexibility regulates phosphopeptide-binding activity of the tyrosine kinase binding domain of Cbl-c., *J. Biochem*, 152, 487-495 (2012)

A02:中瀬生彦

*I. Nakase, S. Okumura, S. Katayama, H. Hirose, S. Pujals, H. Yamaguchi, S. Arakawa, S. Shimizu, *S. Futaki,

Transformation of an antimicrobial peptide into a plasma membrane-permeable, mitochondria-targeted peptide via the substitution of lysine with arginine., *Chem. Commun.*, 48, 11097-11099 (2012)

A02:七田芳則

R. Maeda, M. Hiroshima, T. Yamashita, A. Wada, S. Nishimura, Y. Sako, Y. Shichida, *Y. Imamoto, Single-molecule observation of the ligand-induced population shift of rhodopsin, a G-protein-coupled receptor., *Biophys. J.*, 106, 915-924 (2014)

A02:森井孝

S. Nakano, T. Mashima, A. Matsugami, M. Inoue, M. Katahira, *T. Morii, Structural Aspects for the Recognition of ATP by Ribonucleotide Receptors., *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 4567-79 (2011)

E. Nakata, F. F. Liew, C. Uwatoko, S. Kiyonaka, Y. Mori, Y. Katsuda, M. Endo, H. Sugiyama, *T. Morii, Zinc finger proteins for site-specific protein positioning on DNA origami., *Angew Chem. Int. Ed.*, 51, 2421-2424 (2012)

A02:王子田彰夫

I. Takahira, H. Fuchida, S. Tabata, N. Shindo, S. Uchinomiya, I. Hamachi, *A. Ojida, Design of a Binuclear Ni(II)-Iminodiacetic Acid (IDA) Complex for Selective Recognition and Covalent Labeling of His-tag Fused Proteins., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press.

A02:古田寿昭

W. Nomura, T. Narumi, N. Ohashi, Y. Serizawa, N. E. Lewin, P. M. Blumberg, T. Furuta, *H. Tamamura, Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically Controlled Activation of Protein Kinase C., *Chem. Bio. Chem.*, 12, 535-539 (2011)

*T. Furuta, K. Manabe, A. Teraoka, K. Murakoshi, A. Ohtsubo, A. Suzuki, Design, synthesis and photochemistry of modular caging groups for caged nucleotides., *Org. Lett.* 14, 6182-6185 (2012)

A03:水野健作

* T. Kiuchi, T. Nagai, K. Ohashi, *K. Mizuno, Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension., *J. Cell Biol.*, 193, 365-380 (2011)

* K. Ohashi, K. Sampei, M. Nakagawa, N. Uchiumi, T. Amanuma, S. Aiba, M. Oikawa, *K. Mizuno, Damnacanthal, an effective inhibitor of LIM-kinase, inhibits cell migration and invasion., *Mol. Biol. Cell*, 25, 828-840 (2014)

A03:鈴木邦律

*K. Suzuki, M. Akioka, C. Kondo-Kakuta, H. Yamamoto, *Y. Ohsumi, Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*., *J. Cell Sci.*, 126, 2534-2544 (2013)

A03:Richard Wong

A. Endo, A. Moyori, A. Kobayashi, *R.W.Wong, Nuclear Mitotic Apparatus protein, NuMA modulates p53 mediated transcription in cancer cells., *Cell Death Dis.*, 4, e713 (2013)

A03:遠藤斗志也

H. Okamoto, A. Miyagawa, T. Shiota, Y. Tamura, *T. Endo, Intra-molecular disulfide bond of Tim22 maintains integrity of the TIM22 complex in the mitochondrial inner membrane., *J. Biol. Chem.*, 289, 4827-4838 (2014)

A03 : 清中茂樹

S. Kiyonaka, T. Kajimoto, R. Sakaguchi, D. Shinmi, M. Omatsu-Kanbe, H. Matsuura, H. Imamura, T. Yoshizaki, I. Hamachi, T. Morii, *Y. Mori, Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells., *Nat. Methods*, 10, 1232-1238 (2013)

A03:児嶋長次郎

K. Furuita, J.G. Jee, H. Fukada, M. Mishima, *C. Kojima, Electrostatic interaction between oxysterol binding protein and VAMP-associated protein-A revealed by NMR and mutagenesis studies., *J. Biol. Chem.*, 285, 12961-12970 (2010)

K. Taoka, I. Ohki, H. Tsuji, K. Furuita, K. Hayashi, T. Yanase, M. Yamaguchi, C. Nakashima, Y.A. Purwestri, S. Tamaki, Y. Ogaki, C. Shimada, A. Nakagawa, *C. Kojima, * K. Shimamoto, 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen., *Nature*, 476, 332-335 (2011)

「過渡的複合体」領域ホームページ

http://ishimada.f.u-tokyo.ac.jp/public_html/tmc/

書籍

日本生化学会 学会誌「生化学」2011年10月号にて特集

過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解—生理的準安定状態を捉える新技術と応用— (企画 嶋田一夫)

シンポジウムおよびワークショップ

■日本蛋白質科学会 第10回年会

ワークショップ「過渡的複合体の視点から生命現象を捉えなおす」

平成22年6月16日、札幌コンベンションセンター

■第49回NMR 討論会

平成22年11月15-17日、タワーホール船堀 (東京都)

■日本化学会第91回春季年会 (震災のため中止、発表は成立)

平成23年3月27日、神奈川大学

■新学術領域研究「過渡的複合体」公開シンポジウム

平成23年7月21日東京大学薬学部講堂 (東京都)

■日本生物物理学会 第51回年会

シンポジウム「過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解」

平成25年10月29日、京都国際会館 (京都府)

■日本分子生物学会 第36回年会

ワークショップ「原理まで遡って再確認する核磁気共鳴法の実力」

平成25年12月3日、神戸国際会議場 (兵庫県)

チュートリアルコース

■先導的若手NMR スペシャリスト育成プログラム第1回研修会

2010年12月2-4日・琵琶湖リゾートクラブ (守山市)

■先導的若手NMR スペシャリスト育成プログラム第1回研修会 (追加研修会)

2011年1月20-22日・大阪大学蛋白質研究所 (吹田市)

■先導的若手NMR スペシャリスト育成プログラム第2回研修会

2011年2月4-9日・大阪大学蛋白質研究所 (吹田市) & 理化学研究所横浜研究所 NMR 施設 (横浜市)

■先導的若手NMR スペシャリスト育成プログラム第3回研修会

2011年6月2-4日・琵琶湖リゾートクラブ (守山市)

■蛋白研セミナー「In cell NMR workshop 2012」

2012年3月27-28日、大阪大学蛋白質研究所 (吹田市)

■In cell NMR トレーニングコース 2014

2014年3月17-18日、理化学研究所横浜キャンパス (横浜市)

10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度（1 ページ程度）

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

本領域「過渡的複合体」が目指す到達点は、単に「短時間存在する構造」を解明することではなく、「あるがままの状態における生体分子の立体構造を通してその機能を解明すること」である。タンパク質等の生体分子は実際に機能する場合、その局在や立体構造を動的に変え機能している。

したがって、細胞におけるロケーションや精緻な立体構造に時間軸を導入して定量的に生体分子を記述する必要がある。さらに、解析対象をできるだけ生体内と同じ環境に置くことで、より実態に近いデータの取得ができる。本領域ではこれを可能にするような新規方法論の開拓とそれに基づく生物学的に重要な系での解析を研究目的に設定した。この目的設定は領域内で正しく理解・共有されているだけでなく、文科省が主体となるプロジェクトに下記のように影響を与えている。

1. 領域代表者は若槻壮市教授（元高エネルギー加速器研究機構、現スタンフォード大学）らによって企画された日本学術会議公開シンポジウム「先端的異分野融合を核とした構造生命科学の飛躍に向けて」にて、本領域の内容を紹介し、その結果 2012 年より発足した JST・CREST 領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」（田中啓二領域統括, 東京都臨床医学総合研究所所長）および文部科学省「創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業」（田中啓二推進委員長）に、本領域の概念が取り入れられた。なお、領域代表者は、「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」領域アドバイザーおよび「創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業」の推進委員を拝命している。

2. 「過渡的複合体」の成果を受けて計画班員の神田と白川は、研究代表者の嶋田（東大）、総括班員の阿久津秀雄（阪大）、西村善文（横浜市大）、稲垣冬彦（北大）とともに、当該分野の発展を加速するための今後の課題を議論した。過渡的複合体は有用なコンセプトであり、多くの重要かつ将来性のある成果が出ていることを確認するとともに、過渡的複合体が本質的に動的な性格をもち、しかも準安定で存在割合が少ないことから、観測対象として困難な対象であり、測定手法の更なる改良や新しい発想に基づいた測定手法の開発が強く求められていることが結論された。そこで、過渡的複合体終了後の発展的新学術領域研究として「動的構造生命科学を拓く新発想測定技術ータンパク質が動作する姿を活写するー 略称：動的構造生命」を、計画班員の神田と白川が中心となり、公募班から杉田と塚崎の 2 名が参加し、さらに外部から安藤（金沢大）と西田（東大）の 2 名を新たに加えて複合領域（理工系化学＋生物）に申請を行うこととした。

本報告書を提出時の時点では、ヒアリングを終えて、最終結果を待っているところである。今後 5 年間でもたらされるはずの新しい次元の測定結果により、過渡的複合体の概念が発端となり、生物学の新しい潮流が生まれることを期待している。