

領域略称名：高速分子動画
領域番号：8101

令和6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）」
に係る研究成果報告書（研究領域）兼
事後評価報告書

「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6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	交付決定額	7
4	研究領域の目的及び概要	8
5	審査結果の所見及び中間評価結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況	10
6	研究目的の達成度及び主な成果	12
7	研究発表の状況	16
8	研究組織の連携体制	21
9	研究費の使用状況	22
10	当該学問分野及び関連学問分野への貢献の状況	24
11	若手研究者の育成に関する取組実績	25
12	総括班評価者による評価	26

研究組織

(令和6年3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・大学院医学研究 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・大学院医学研究 科・教授	6
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	3
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	6
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3年度	足立 伸一	大学共同利用機関法人高エ 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	国立研究開発法人理化学研 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、国：国際活動支援班、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	京都工芸繊維大学・分子化学系・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・大学院理学系研究科生物科学専攻・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)・准教授(採用当時:助教)	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・異分野基礎科学研究所・教授	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	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・技師	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課程の時分割構造解析	令和2年度 ～ 令和3年度	島 扶美	神戸大学・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・准教授	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	20H05441 ハイブリッド自由エネルギー最適化法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・理学研究科・教授	1
C01 公	20H05452 ヘム酵素が生成する酸素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っと出す	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 上席研究員	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	20H05448 シリアルフェムト秒結晶構造解析による銅含有アミノ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	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
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	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
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	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
A01 公	22H04750 光薬理学リガンドを駆使したタンパク質の光機能化	令和 4 年度 ～ 令和 5 年度	松尾和哉	京都工芸繊維大学・分子化学系・助教	1
A01 公	22H04754 酸素非発生型の光合成反応中心-アンテナ超複合体の高速分子動画解析	令和 4 年度 ～ 令和 5 年度	菅 倫寛	岡山大学・異分野基礎科学研究所・教授	1
A01 公	22H04759 大腸菌無細胞合成系を利用した光反応性非天然型アミノ酸導入タンパク質調製法の開発	令和 4 年度 ～ 令和 5 年度	保坂俊彰	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・技師	1

A01 公	22H04752 光制御型 Ras を用いたがん化シグナル伝達機構の原子スケールでの解明	令和4年度 ～ 令和5年度	島 扶美	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授	1
B01 公	22H04741 散漫 X 線散乱による動的構造解析に向けた高感度計測システムの実現	令和4年度 ～ 令和5年度	鈴木明大	北海道大学・電子科学研究所・准教授	1
C01 公	22H04748 ハイブリッド自由エネルギー最適化法によるタンパク質機能活性化の理論的解明	令和4年度 ～ 令和5年度	林 重彦	京都大学・理学研究科・教授	1
A01 公	22H04742 中間体構造解析による光感受性膜タンパク質の光エネルギー変換機構の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	福田昌弘	東京大学 総合文化研究科 先進科学研究機構・特任助教(当時) ※現在: 東京大学 先端科学技術研究センター・助教	1
A01 公	22H04743 Next Generation Biosensors Enabled by High-speed Visualization of Dynamic Mechanisms	令和4年度 ～ 令和5年度	キャンベル ロバート, アール	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授	1
A01 公	22H04746 迅速二液混合法とポンププローブ法を用いたシトクロム酸化酵素の未知中間体構造の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	島田敦広	岐阜大学・応用生物科学部・准教授	1
A01 公	22H04751 二元機能性青色光受容タンパク質の光応答機構	令和4年度 ～ 令和5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	22H04753 高速分子動画で TRP チャネルの温度センサー部位を見極める	令和4年度 ～ 令和5年度	日野智也	鳥取大学・工学部・准教授	1
A01 公	22H04757 シリアルフェムト秒結晶構造解析に基づく銅含有アミン酸化酵素の触媒機構の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	村川武志	大阪医科薬科大学・医学部・助教	1
A01 公	22H04758 非天然アミノ酸を用いた汎用かつ簡便なタンパク質光感受化法	令和4年度 ～ 令和5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	22H04760 金属酵素活性中心による一酸化窒素還元反応の高速分子動画撮影	令和4年度 ～ 令和5年度	當舎武彦	兵庫県立大学・理学研究科・教授	1

C01 公	22H04744 Direct visualization of the excited state structural dynamics of a synthetic Cu(I)-phenanthroline complex by TR-SFX method.	令和4年度 ～ 令和5年度	Basudev Maity	東京工業大学・生命理工学院・特任助教	1
C01 公	22H04745 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4年度 ～ 令和5年度	北尾彰朗	東京工業大学・生命理工学院・教授	1
C01 公	22H04755 フェムト秒顕微過渡吸収測定法によるたんぱく質微結晶の非破壊計測とその機構解明	令和4年度 ～ 令和5年度	片山哲郎	徳島大学・ポストLEDフォトリクス研究所・助教	1
C01 公	22H04756 分子シミュレーションを駆使したオレキシン受容体の機能機構の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	光武亜代理	明治大学・理工学部・准教授	1
C01 公	22H04761 非断熱QM/MM分子動力学計算による光駆動タンパク質の反応ダイナミクス	令和4年度 ～ 令和5年度	八木清	理化学研究所・開拓研究本部杉田理論分子科学研究室・専任研究員	1
C01 公	22H04749 高速分子動画と大規模励起状態分子動力学の共創が拓く光生命化学現象の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	小野 純一	早稲田大学・理工学術院総合研究所(理工学研究所)・次席研究員	1
公募研究 計 41 件 (廃止を含む)					

[1] 総：総括班、国：国際活動支援班、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 交付決定額

年度	合計	直接経費	間接経費
令和元年度	283,530,000 円	218,100,000 円	65,430,000 円
令和2年度	279,240,000 円	214,800,000 円	64,440,000 円
令和3年度	260,923,000 円	200,710,000 円	60,213,000 円
令和4年度	255,970,000 円	196,900,000 円	59,070,000 円
令和5年度	258,050,000 円	198,500,000 円	59,550,000 円
合計	1,337,713,000 円	1,029,010,000 円	308,703,000 円

4 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。

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してきた。

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った化学反応などの早い反応の追跡に適している。

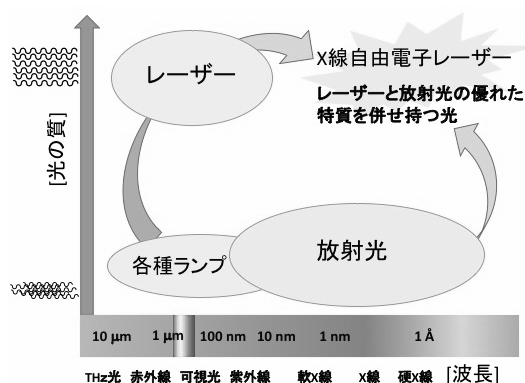
本領域研究では、本法をタンパク質の中で起こる早い反応を追跡するスタンダードな技術として確立するために、ケミカルバイオロジーの手法を中心に用いて反応を同期させる技術を開発するとともに、反応開始のち徐々に同期が外れて複数の状態が混ざっていく問題をコンピューターシミュレーションにより解析分離し、実際のタンパク質の中で起こっている反応をより現実に即して捉えることを主眼とした。同時に、この目的を達成するための測定システムの開発を行い、光によるタンパク質のスイッチ機構の解明、ユニークな反応を触媒する酵素の反応機構など、幅広いターゲットに適用することを目指した。更に、本法によって得られた精密な構造情報を基に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

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た。

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関心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と期待された。

(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してきた。



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の解明に取り組んだ。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た。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した。

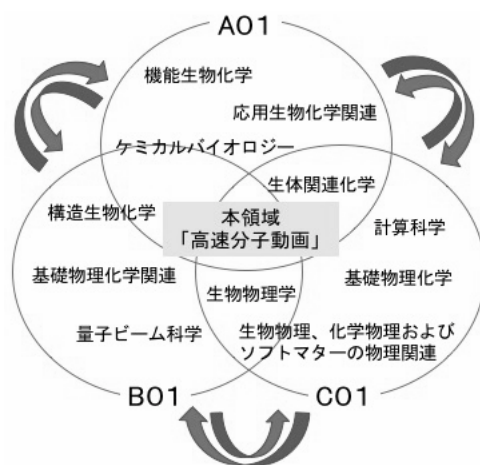
研究項目 2：高速分子動画撮影法の基盤構築

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困難であった。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んだ。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開拓も行った。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てきた。

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した。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に取り組んだ。

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した。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した。



(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された。

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。

5 審査結果の所見及び中間評価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、審査結果の所見及び中間評価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。

(審査結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況)

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。

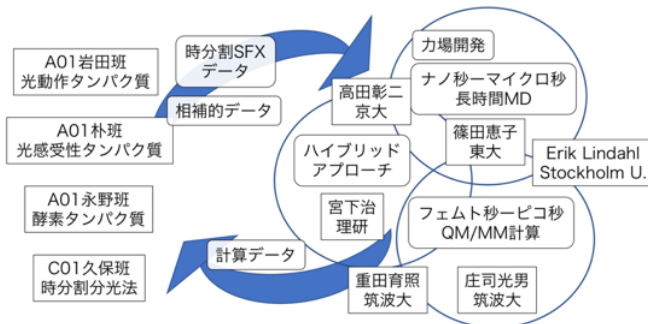
庄司光男(分担)：電子状態計算、QM/MM 計算

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きた。

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た。

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。



(中間評価結果の所見において指摘を受けた事項への対応状況)

中間評価は A+であり、全般的にポジティブな評価をいただいたが、“今後の方向性として掲げている、高速分子動画から得られる知見に立脚した、光機能性タンパク質の創生や、光によりタンパク質の機能を制御する化合物の創製に関しては、具体的な研究戦略、作製する化合物、目指す機能などを明確化し、これまで以上の進展を期待したい。”というコメントをいただいている。我々としては、今後の高速分子動画実験に役に立つということも鑑み、受容体の光作動性リガンドや各種ケージド化合物のデザインに注力した。その成果の一端を以下にまとめる。

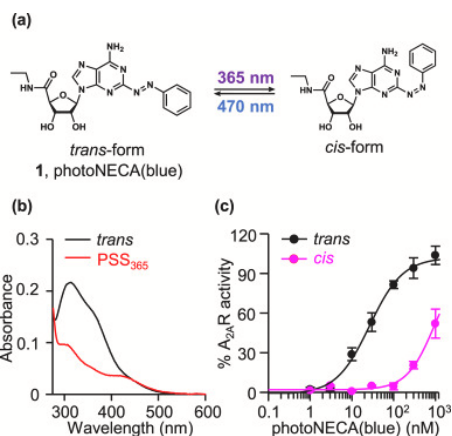
(1) GPCR に対する光作動性リガンドの開発

光作動性リガンドの合理的な設計は、基礎科学実験への応用や光薬理学にとって重要である。これらの化合物は薬理活性のない形で投与でき、光を照射した部分でだけその活性を示すことができる。アデノシン A_{2A} 受容体 (A_{2A}R) はパーキンソン病やその他の疾患の治療薬のターゲットとして注目されている。清中班と岩田班は共同して A_{2A}R に対する新規光作動性リガンド photoNECA(blue) を設計した (ChemRxiv 2023)。この化合物はジアゾベンゼン基を含み 365nm の光照射で *cis* 体に、470nm の光照射でトランス体に変換する。*trans* 体は強いアゴニスト活性を有するが *cis* 体は有さない (右上図)。我々はこの化合物の機能を理解するために A_{2A}R との複合体を形成しその構造解析を行った (BBRC 2024、右図)。この結果、リガンドがわれわれの設計通りに結合部位に結合しており、またなぜ *trans* 体だけがアゴニスト活性を有するのかについても解明ができた。そのほかにも松尾、下村らにより光作動性化合物の開発や利用が行われた。これら化合物は今後の分子動画実験や分子生物学実験に利用する予定である。

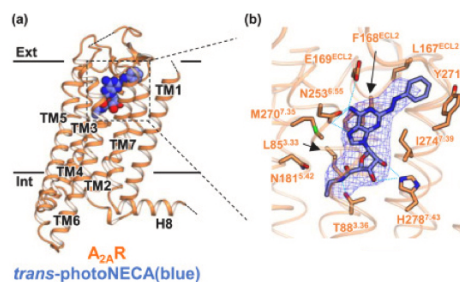
(2) ケージド化合物の開発

各種の付加機能を持たせた高度なケージド化合物の開発が行われた。古田らは細胞腫選択性を有したケージド化合物の合成を行なった (Chem. Commun. 2021, Chem. Commun. 2022, 右下図)。これらの化合物は特定の酵素を発現している細胞においてのみ、活性基が遊離して働くことができる。これ以外にも任意の機能部位をクリックケミストリーによって付与できる Clickable ケージド化合物 (Chem. Commun. 2019) などユニークなケージド化合物の作成を行っている。島、永澤らのグループにおいてもケージド化合物を用いた研究が盛んに行われた。

これに比して新規機能を有したタンパク質の生成にはあまり成功していない。プロジェクト当初から水野らを、第二期公募班からはキャンベルらをグループに加え、特に新規機能を有した蛍光タンパク質の開発等を目指したが十分な結果を得られなかった。タンパク質のデザインは難しく、それによりフォーカスしたプログラムが必要と考えられる。この点に関しては、本新学術領域の若手領域代表を中心として形成した、学術変革領域研究(A)「タンパク質機能のポテンシャルを解放する生成的デザイン学」において、再び実験科学と計算科学の協力により重点的に研究されていくであろうことを期待している。

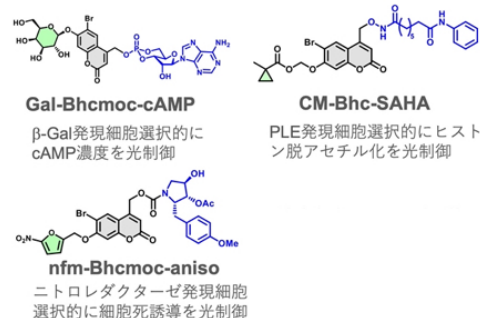


アデノシン A_{2A} 受容体への光作動性リガンド photoNECA(blue)の作成



アデノシン A_{2A} 受容体と photoNECA(blue) の複合体の結晶構造

細胞種選択性を持つ遺伝子指向性ケージド化合物



6 研究目的の達成度及び主な成果

(1) 領域設定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、(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。

(1) 領域設定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

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

目標：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。

達成度：(2)でまとめたように非常に多くの生理的に重要な化学変化・構造変化を捉えることができたこの部分に関しては満点近い。光に反応しないタンパク質に対しても二液混合系で対応することができた。ケミカルバイオロジーによるアプローチも光作動性リガンドやケージド化合物に関してはかなり進捗し、70%以上達成できた。合理的なタンパク質設計はあまり進めることができず、未達であるが、本領域の多くの若い計画代表が参加する次の学術変革領域研究(A)でのブレークスルーを期待したい。

研究項目2：高速分子動画撮影法の基盤構築

目標：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。

達成度：上記にも述べたように二液混合系を用いて対象タンパク質の幅を広げることができた。温度ジャンプ法などの開発も行ない、開発に関しては80%程度と考えられる。金属錯体に関しては100%目的を達成することができた。放射光での開発も着実に進み、SACLAと合わせて結果にも貢献していることより70%以上と言える。

研究項目3：高速分子動画に資する反応精密分析

目標：計算科学及び分光学との連携により、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。

達成度：実際に多くの高速分子動画の実験において分光をガイドとしており、この点については100%到達している。SACLAやSPRING-8の結果とQM/MMやMDなどを組み合わせた成果は多く論文としてまとめることができ、この点でも80%以上の成果を上げることができた。

(2) 本研究領域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

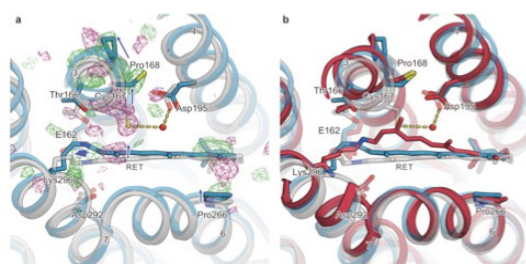
高速分子動画の撮影に関しては非常に多くの成果が出ているが、主要なものだけをまとめる。

(1) 研究計画班の成果

光応答性イオンチャネルの高速分子動画の撮影に関して草木迫らはチャ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可視化することに成功している。(eLife 2021 右図)

別所らは大阪大学の山元および東北大学の南後らと協力

して光回復酵素の損傷DNAの修復反応を原子レベルで解明することに成功している(Science 2023, 次ページ図)。



チャネルロドプシンの光照射による構造変化

(eLife 2021)

他機関が主体となって行ったものに計画班が我々の装置を用い協力した成果として、インペリアルカレッジの van Thor 教授に東北大学の南後らが協力し光スイッチ型蛍光タンパク質 (rsEGFP2) の蛍光のオンオフの切り替えを観察することに成功した例がある。発色団の分子構造がねじれながら変化する(Hula Twist 機構)ことを見出した (JACS 2023)。また Swiss Light Source との共同研究で南後らが、光受容体であり GPCR であるロドプシンの光活性化の初期過程を解明することに成功している (Nature 2023, 右図)。

ケミカルバイオロジーの分野においては、ミリ秒の時間制御を行う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、環状ス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 (Chem. Commun. 2022)。本手法では、迅速かつ選択性の高いクリックケミストリーを使うが、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。

新規デザイン化合物がタンパク質内でどのように働いているかを調べる実験も行われた。清中班と岩田班の共同研究により、アデノシン A2A 受容体と新しくデザインされた光作動性リガンドの複合体の結晶構造が解析された (BBRC 2024, 右下図)。今後この結晶を用いて上記のロドプシン同様の実験を計画している。

(2) 公募班の成果

公募班は目覚ましい成果を挙げており、プロジェクトの公募・選考が良好に行われたことを示している。

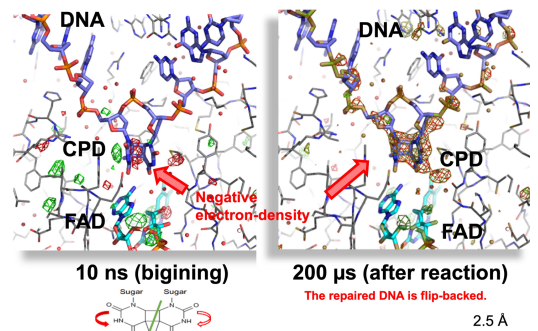
保坂らはクロライドポンプロドプシンのアニオンが輸送される際のコンフォメーション変化を可視化することに成功した (PNAS 2022)。

村川らは南後班と共同で反応の開始を光励起によらない二液混合システムを用いて時分割構造解析を行い、銅含有アミン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 (Acta Cryst. D 2022)。またプロジェクト終了間際に、菅らによって光合成の光化学系 II の S1-S2-S3 のトランジションにおける、Mn クラスターおよび水分子の構造変化が示された (Nature 2024, 次ページ図)。非常に複雑な光化学系 II による酸素発生機構のメカニズム解明に向けて大きなブレークスルーであると言える。

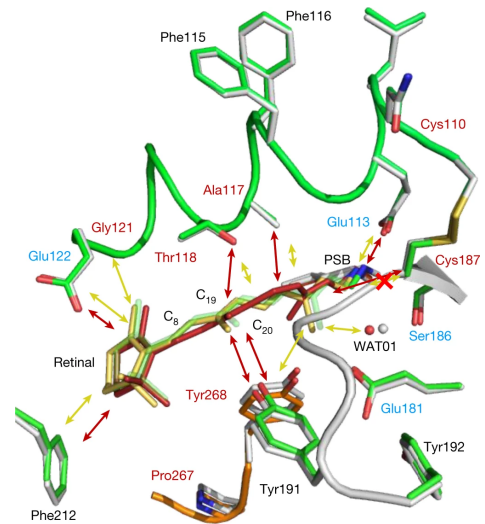
研究項目 2 (B01) : 高速分子動画撮影法の基盤構築

(1) 研究計画班の成果

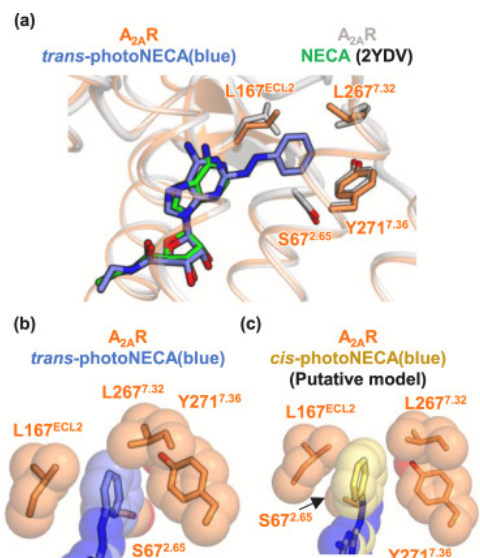
足立班は本プロジェクトの立ち上げ時の研究代表の一人であるが、目覚ましい成果をあげ特別推進研究を獲得したため、中間評価前に離脱した。銅(I)フェナントロリン錯体の実験系では、銅錯体の光励起後の構造変化と分子振動の計測を試み、Cu-K 吸収端での X 線吸収分光スペクトルの解析から、光励起直後の電子移動 (MLCT) に伴う錯体構



光回復酵素の損傷 DNA の修復機構の原子レベルでの解明 (Science 2023)



ロドプシン光活性化初期過程の構造変化。暗状態を赤、1ps 後を黄色、100ps 後を緑で示してある (Nature 2023)



アデノシン A2A 受容体と光作動性リガンドの複合体の構造とその作用機構

造のヤーン・テラー歪みと分子振動を明らかにした(Nature Commun. 2019)。ジシアノ金(I)錯体 (Au(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)。

南後班は高速分子動画法のための各種反応同期方法を開発している。最もよく使われているのは光励起法と二液混合法でこれらが上記の高速分子動画実験のために用いられている (J. Appl. Crystallogr. 2019 など)。サンプルの導入法は旧来のインジェクターに頼る方法だけでなくベルトコンベアのシステムも開発を行っている。また IR レーザー照射による温度ジャンプにより反応を開始する方法の研究も行った (Nat. Chem 2023)。右下図は IR レーザー照射で温度の上昇させた時のタンパクの動きを実際に観察したものである。温度が非常に早く下がってしまうという問題がみつきり現在それに対する対策を検討中である。

(2) 公募班の成果

研究項目 2 は大規模施設依存の研究項目なので公募班員は少ない。その中で Maity らのグループはリゾチームに導入したマンガンを結合した一酸化炭素がレーザーの照射によって外れていく過程を明確に示した (Nat. Commun. in press、次ページ図)。

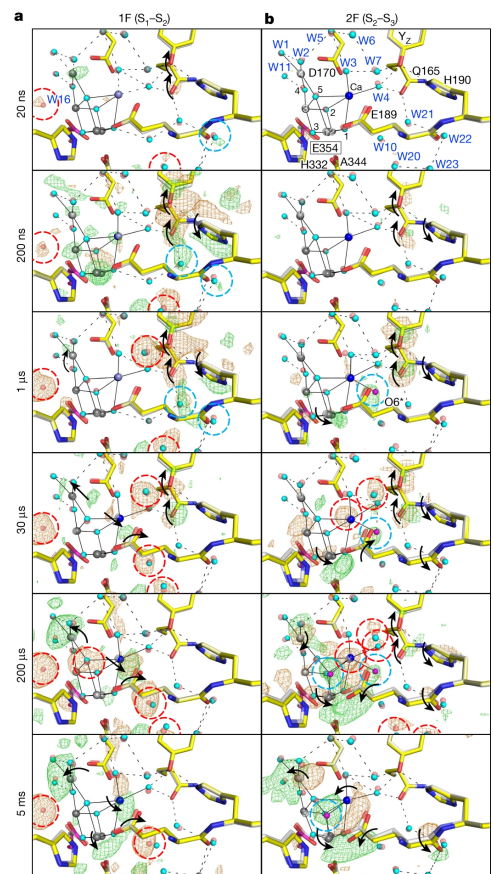
研究項目 3 (C01) : 高速分子動画に資する反応精密分析

(1) 研究計画班の成果

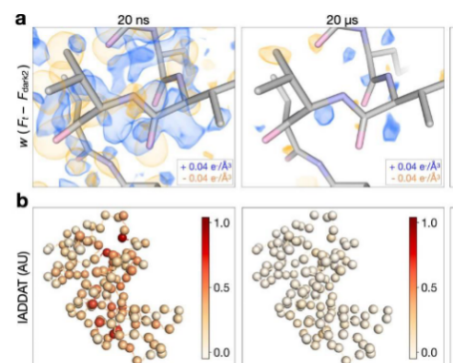
計算科学の分野では実験科学との共同研究により、大きな成果をあげた。庄司は領域内共同研究を強力にすすめ、梅名らとフィコシアニン (BCSJ 2023)、村川らと銅含有アミン酸化酵素 (ACS catalysis 2023)、片山耕大・神取らとヘリオロドプシン、Maity らとリゾチーム中のマンガ錯体についての共同研究(Nature Commun. in press)を行った。篠田らは本研究領域で多く研究対象とされる膜タンパク質の脂質の力場の最適化を行った。宮下らは、TR-SFX 実験データから得られる時間発展前後の電子密度の差を反映する差フーリエマップをもとに、MD シミュレーションを用いること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 (次ページ図)。

分光は上記の光感受性タンパク質のモニターのために広く使われた。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メカニズムの解明 (eLife 2021) において久保班は、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。保坂らとのクロライドポンプロドプシン(PNAS 2022)、志甫谷らとのヘリオロドプシン、山元、重田らとの DNA フォトリアーゼの研究においても同様の役割を果たした。木村は中津らとのイクオリンの研究において時分割蛍光分光を用い、古谷らはロドプシン類の研究において、志甫谷や庄司らと連携した。

温室効果・オゾン層破壊の原因である N₂O の生物的発生機構の解析 (PNAS 2021) のために、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 (次ページ図)。この研究は地球環境における N₂O 排出量を抑制する上で重要な分子基盤を提供し



光化学系 II の S1-S2-S3 のトランジションにおける、Mn クラスタおよび水分子の高速分子動画 (Nature 2024)



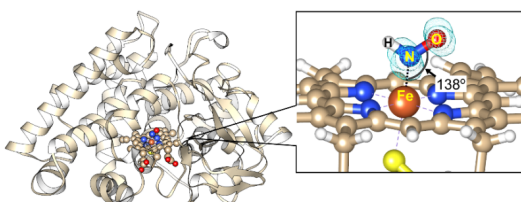
IR レーザーによる温度ジャンプ実験におけるタンパクの動き

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、新開発の極微量フロー測定を用いて、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。また青色光を使って 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では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。

(2) 公募班の成果

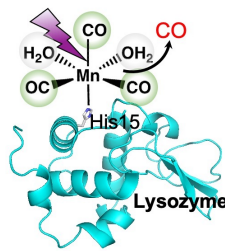
計算科学においては計画班を補完する各種の計算手法を有するグループが参加した。小野らは、南後らによるバクテリオロドプシンの光反応サイクル L 状態スナップショット構造で観測された内部水分子に着目し大規模量子 MD 計算を実行し、水が近傍残基へとリレー形式でプロトンを受け渡した後、生じた水酸化物イオン中間体が Schiff ベースからプロトンを受け取る 1 段階目のプロトン移動の機構を明らかにした (J.Phys.Chem.B 2020, 図右下)。また同様の手法を他のタンパク質にも適用している (Chem. Phys. Lett. 2022)。このほかにも、八木班は QM/MM の手法や非断熱 MD の手法を、林班は中津班と共同でイクオリンの MD を中心とした解析を、北尾班は清中班と共同で mGlu1 のエネルギーランドスケープ解析によるアロステリック制御メカニズムの解明を、光武班はオレキシン受容体の大規模構造変化の研究を行った。

分光においても計画班を補完する形で公募班が新しい技術を持ち寄った。片山哲郎班は超高速時分割分光を用い梅名班と共にフィコシアニンの励起エネルギー移動の研究を行った。片山耕大班はヒトロドプシンの時分割構造解析に向けて作製した遺伝子コンストラクトに対し、光誘起赤外分光解析を行うことで、野生型のヒトロドプシンと同一のレチナールの異性化反応や活性化反応を示すことを実証した。

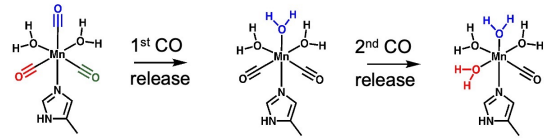


カビ由来 NO 還元

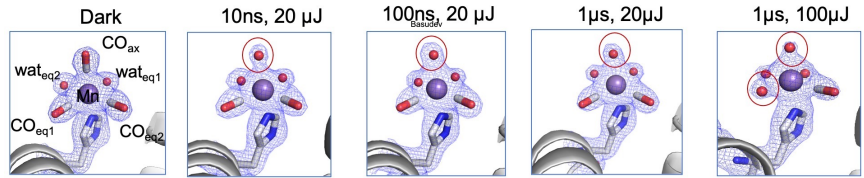
酵素中間体の構造及び電子状態。水素原子の位置は時分割赤外分光計測により決定。水色のメッシュは反応性に富む対電子の分布。



Light-induced removal of CO ligand

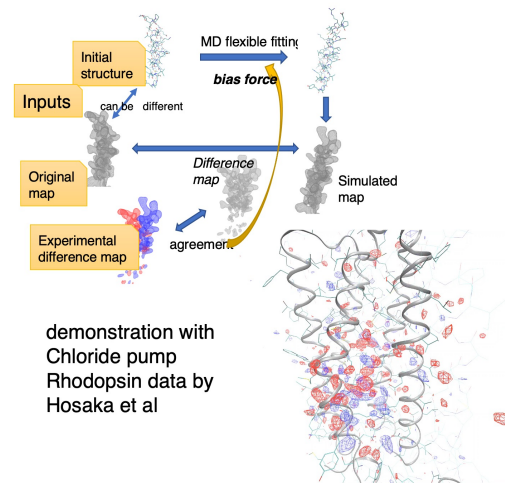


Time-resolved structures after photoexcitation

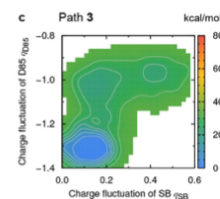
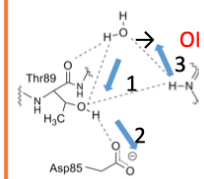
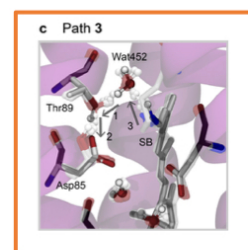


マンガンに結合した一酸化炭素がレーザーの照射によって外れていく過程 (Nature Commun. in press)

MD based Flexible fitting against differential maps



MD シミュレーションを用いた TR-SFX 実験の構造モデルの自動構築



バクテリオロドプシンにおけるプロトン移動のシミュレーション

7 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、一般向けアウトリーチ活動等の状況。令和6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101件（以下5件を抜粋）

1. Chazan A, Das I, Fujiwara T, Murakoshi S, Rozenberg A, Molina-Márquez A, Sano FK, Tanaka T, Gómez-Villegas P, Larom S, Pushkarev A, Malakar P, Hasegawa M, Tsukamoto Y, Ishizuka T, Konno M, Nagata T, Mizuno Y, Katayama K, Abe-Yoshizumi R, Ruhman S, Inoue K, Kandori H, León R, *Shihoya W, *Yoshizawa S, *Sheves M, *Nureki O, *Béjà O. “Phototrophy by antenna-containing rhodopsin pumps in aquatic environments” *Nature* 615: 535-540 (2023)
2. Kosugi K, Akatsuka C, Iwami H, Kondo M, Masaoka S. “Iron-Complex-Based Supramolecular Framework Catalyst for Visible-Light-Driven CO₂ Reduction” *J. Am. Chem. Soc.* 145(19): 10451-10457 (2023)
3. Asami J, Kimura KT, Fujita-Fujiharu Y, Ishida H, Zhang Z, Nomura Y, Liu K, Uemura T, Sato Y, Ono M, Yamamoto M, Noda T, Shigematsu H, Drew D, Iwata S, Shimizu T, *Nomura N, *Ohto U. “Structure of the bile acid transporter and HBV receptor NTCP” *Nature* 606(7916): 1021-1026 (2022)
4. Kishi KE, Kim YS, Fukuda M, Inoue M, Kusakizako T, Wang PY, Ramakrishnan C, Byrne EFX, Thadhani E, Paggi JM, Matsui TE, Yamashita K, Nagata T, Konno M, Quirin S, Lo M, Benster T, Uemura T, Liu K, Shibata M, Nomura N, Iwata S, Nureki O, Dror RO, Inoue K, *Deisseroth K, *Kato HE. “Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine” *Cell* 185(4): 672-689 (2022)
5. 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, *Nureki O. “Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin” *eLife* 10: e62389 (2021)

A01 清中班 計13件（以下5件を抜粋）

1. Araya T, Matsuba Y, Suzuki H, Doura T, Nuemket N, Nango E, Yamamoto M, Im D, Asada H, *Kiyonaka S, *Iwata S. “Crystal Structure Reveals the Binding Mode and Selectivity of a Photoswitchable Ligand for the Adenosine A_{2A} Receptor” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 695: 149393 (2024)
2. Ojima K, Kakegawa W, Yamasaki T, Miura Y, Itoh M, Michibata Y, Kubota R, Doura T, Miura E, Nonaka H, Mizuno S, Takahashi S, Yuzaki M, *Hamachi I, *Kiyonaka S. “Coordination chemogenetics for activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue” *Nat. Commun.* 13(1): 3167 (2022)
3. Kawai K, *Hirayama T, Imai H, Murakami, T, Inden M, Hozumi I, Nagasawa H. “Molecular Imaging of Labile Heme in Living Cells Using a Small Molecule Fluorescent Probe” *J. Am. Chem. Soc.* 144(9): 3793 (2022)
4. 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(1): 831 (2021)
5. 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.*

A01 朴班 計21件（以下5件を抜粋）

1. Asami J, J Park JH, Nomura Y, Kobayashi C, Mifune J, Ishimoto N, Uemura T, Liu K, Sato Y, Zhang Z, Muramatsu M, Wakita T, Drew D, Iwata S, Shimizu T, *Watahiki R, *Park SY, *Nomura N, *Ohto U “Structural basis of hepatitis B virus receptor binding” *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3: 447-454 (2024)
2. Ang AKR, Umena Y, Sato-Tomita A, Shibayama N, Happo N, Marumi R, Yamamoto Y, Kimura K, Kawamura N, Takano Y, Matsushita T, Sasaki YC, Shen JR, Hayashi K. “Development of serial X-ray fluorescence holography for radiation-sensitive protein crystals” *J. Synchrotron. Radiat.* 30: 368–378 (2023)
3. *Maestre-Reyna M, Wang PH, Nango E, Hosokawa Y, Saft M, Furrer A, Yang CH, Gusti Ngurah Putu EP, Wu WJ, Emmerich HJ, Caramello N, Franz-Badur S, Yang C, Engilberge S, Wranik M, Glover HL, Weinert T, Wu HY, Lee CC, Huang WC,

- Huang KF, Chang YK, Liao JH, Weng JH, Gad W, Chang CW, Pang AH, Yang KC, Lin WT, Chang YC, Gashi D, Beale E, Ozerov D, Nass K, Knopp G, Johnson PJM, Cirelli C, Milne C, Bacellar C, Sugahara M, Owada S, Joti Y, Yamashita A, Tanaka R, Tanaka T, Luo F, Tono K, Zarzycka W, Müller P, Alahmad MA, Bezold F, Fuchs V, Gnau P, Kiontke S, Korf L, Reithofer V, Rosner CJ, Seiler EM, Watad M, Werel L, Spadaccini R, Yamamoto J, Iwata S, Zhong D, Standfuss J, Royant A, *Bessho Y, *Essen LO, *Tsai MD. “Visualizing the DNA repair process by a photolyase at atomic resolution” *Science* 382(6674): eadd7795 (2023)
- Park JH, Iwamoto M, Yun JH, Uchikubo-Kamo T, Son D, Jin Z, Yoshida H, Ohki M, Ishimoto N, Mizutani K, Oshima M, Muramatsu M, Wakita T, Shirouzu M, Liu K, Uemura T, Nomura N, Iwata S, Watashi K, Tame JRH, Nishizawa T, *Lee W, *Park SY “Structural insights into the HBV receptor and bile acid transporter NTCP” *Nature* 606(7916): 1027-1031 (2022)
 - 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, Zatspein 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)

A01 永野班 計 16 件 (以下 5 件を抜粋)

- Pan D, Oyama R, Sato T, Nakane T, Mizunuma R, Matsuoka K, Joti Y, Tono K, Nango E, Iwata S, Nakatsu T, *Kato H. “Crystal structure of CmABCB1 multi-drug exporter in lipidic mesophase revealed by LCP-SFX” *IUCrJ* 9(1): 134-145 (2022)
- Nagata R, Suemune H, Kobayashi M, Shinada T, Shin-ya K, Nishiyama M, Hino T, Sato Y, *Kuzuyama T, *Nagano S. “Structural Basis for the Prenylation Reaction of Carbazole-Containing Natural Products Catalyzed by Squalene Synthase-Like Enzymes” *Angew. Chem. Int. Ed.* 61(20): e202117430 (2022)
- *Fukuda W, Osaki M, Yasuda Y, Hidese R, Higuchi T, Umezawa N, Fujiwara S, *Mizohata E. “Substrate Specificity of an Aminopropyltransferase and the Biosynthesis Pathway of Polyamines in the Hyperthermophilic Crenarchaeon *Pyrobaculum calidifontis*” *Catalysts*. 12(5):567 (2022)
- 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-Alderases that produce decalin skeletons.” *Angew. Chem. Int. Ed.* (First Published: 13 June 2021)
- Hidese R, Toyoda M, Yoshino KI, Fukuda W, Wihardja GA, Kimura S, Fujita J, Niitsu M, Oshima T, Imanaka T, *Mizohata E, *Fujiwara S. “The C-terminal flexible region of branched-chain polyamine synthase facilitates substrate specificity and catalysis” *FEBS J.* 286(19):3926 (2019)

B01 南後班 計 75 件 (以下 6 件を抜粋)

- Wolff AM, *Nango E, Young ID, Brewster AS, Kubo M, Nomura T, Sugahara M, Owada S, Barad BA, Ito K, Bhowmick A, Carbajo S, Hino T, Holton JM, Im D, O’Riordan LJ, Tanaka T, Tanaka R, Sierra RG, Yumoto F, Tono K, Iwata S, Sauter NK, Fraser JS, *Thompson MC. “Mapping protein dynamics at high spatial resolution with temperature-jump X-ray crystallography” *Nat. Chem.* 15: 1549-1558 (2023)
- Gruhl T, Weinert T, Rodrigues MJ, Milne CJ, Ortolani G, Nass K, Nango E, Sen S, Johnson PJM, Cirelli C, Furrer A, Mous S, Skopintsev P, James D, Dworkowski F, Báth P, Kekilli D, Ozerov D, Tanaka R, Glover H, Bacellar C, Brünle S, Casadei CM, Diethelm AD, Gashi D, Gotthard G, Guixà-González R, Joti Y, Kabanova V, Knopp G, Lesca E, Ma P, Martiel I, Mühle J, Owada S, Pamula F, Sarabi D, Tejero O, Tsai CJ, Varma N, Wach A, Boutet S, Tono K, Nogly P, Deupi X, Iwata S, Neutze R, Standfuss J, *Schertler G, *Panneels V. “Ultrafast structural changes direct the first molecular events of vision” *Nature* 615: 939-944 (2023)
- Fadini A, Hutchison CDM, Morozov D, Chang J, Maghlaoui K, Perrett S, Luo F, Kho JCX, Romei MG, Morgan RML, Orr CM, Cordon-Preciado V, Fujiwara T, Nuemket N, Tosha T, Tanaka R, Owada S, Tono K., Iwata S, Boxer SG, Groenhof G, *Nango E, van *Thor JJ. “Serial Femtosecond Crystallography Reveals that Photoactivation in a Fluorescent Protein Proceeds via the Hula Twist Mechanism” *J. Am. Chem. Soc.* 145: 15796-15808 (2023)
- Hosaka T, Nomura T, Kubo M, Nakane T, Fangjia L, Sekine SI, Ito T, Murayama K, Ihara K, Ehara H, Kashiwagi K, Katsura K, Akasaka R, Hisano T, Tanaka T, Tanaka R, Arima T, Yamashita A, Sugahara M, Naitow H, Matsuura Y, Yoshizawa S, Tono K, Owada S, Nureki O, Kimura-Someya T, Iwata S, *Nango E, *Shirouzu M. “Conformational alterations in unidirectional ion transport of a light-driven chloride pump revealed using X-ray free electron lasers” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119(9): e2117433119 (2022)
- 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, *Nureki O. “Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin” *eLife* 10: e62389 (2021)
6. Shimazu Y, *Tono K, Tanaka T, Yamanaka Y, Nakane T, Mori C, Terakado-Kimura K, Fujiwara T, Sugahara M, Tanaka R, Doak RB, Shimamura T, Iwata S, Nango E, Yabashi M. “High-viscosity sample-injection device for serial femtosecond crystallography at atmospheric pressure” *J. Appl. Crystallogr.* 52: 1280-1288 (2019)

B01 足立班 計 24 件 (以下 2 件を抜粋)

1. Kim JG, Nozawa S, Kim H, Choi EH, Sato T, Kim TW, Kim KH, Ki H, Kim J, Choi M, Lee Y, Heo J, Oang KY, Ichianagi K, Fukaya R, Lee JH, Park J, Eom I, Chun SH, Kim S, Kim M, Katayama T, Togashi T, Owada S, Yabashi M, Lee SJ, Lee S, Ahn CW, Ahn DS, 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)
2. *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 TJ. “Tracking multiple components of a nuclear wavepacket in photoexcited Cu(I)-phenanthroline complex using ultrafast X-ray spectroscopy” *Nature Comm.* 10: 3606 (2019)

B01 山本班 計 26 件 (以下 5 件を抜粋)

1. *Bokhove M, Kawamura T, Okumura H, Goto S, Kawano Y, Werner S, Jarczowski F, Klimyuk V, Saito A, Kumasaka T. “The structure of the rat vitamin B₁₂ transporter TC and its complex with glutathionylcobalamin” *J. Biol. Chem.* 300(5): 107289 (2024)
2. Asami J, Kimura K T, Fujita-Fujiharu Y, Ishida H, Zhang Z, Nomura Y, Liu K, Uemura T, Sato Y, Ono M, Yamamoto M, Noda T, Shigematsu H, Drew D, Iwata S, Shimizu T, *Nomura N, *Ohto U. “Structure of the bile acid transporter and HBV receptor NTCP” *Nature* 606(7916): 1021 (2022)
3. Kwon H, Basran J, Pathak C, Hussain M, Freeman S L, Fielding A J, Bailey A J, Stefanou N, Sparkes H A, Tosha T, Yamashita K, Hirata K, Murakami H, Ueno G, Ago H, Tono K, Yamamoto M, Sawai H, Shiro Y, Sugimoto H, *Raven E L, *Moody PCE. “XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II” *Angew. Chem. Int. Ed.* 60(26): 14578 (2021)
4. 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 N(2)O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118(21): e2101481118 (2021)
5. Baba S, Shimada A, Mizuno N, Baba J, Ago H, Yamamoto M, Kumasaka T. “A temperature-controlled cold-gas humidifier and its application to protein crystals with the humid-air and glue-coating method” *J. Appl. Crystallogr.* 52(Pt.4): 699 (2019)

C01 久保班 計 27 件 (以下 5 件を抜粋)

1. Li H, Nakajima Y, Nango E, Owada S, Yamada D, Hashimoto K, Luo F, Tanaka R, Akita F, Kato K, Kang J, Saitoh Y, Kishi S, Yu H, Matsubara N, Fujii H, Sugahara M, Suzuki M, Masuda T, Kimura T, Thao TN, Yonekura S, Yu L, Tosha T, Tono K, Joti Y, Hatsui T, Yabashi M, Kubo M, Iwata S, Isobe S, Yamaguchi I K, *Suga M, *Shen JR. “Oxygen-evolving photosystem II structures during S1-S2-S3 transitions” *Nature* 626(7999): 670 (2024)
2. Wolff AM, *Nango E, Young ID, Brewster AS, Kubo M, Nomura T, Sugahara M, Owada S, Barad BA, Ito K, Bhowmick A, Carbajo S, Hino T, Holton JM, Im D, O’Riordan LJ, Tanaka T, Tanaka R, Sierra RG, Yumoto F, Tono K, Iwata S, Sauter NK, Fraser JS, *Thompson MC. “Mapping protein dynamics at high spatial resolution with temperature-jump X-ray crystallography” *Nat. Chem.* 15: 1549-1558 (2023)
3. Ochiai S, Ichikawa Y, Tomida S, Furutani Y. “Covalent Bond between Lys-255 Residue and the Main Chain is Responsible for Stable Retinal Chromophore Binding and Sodium-Pumping Activity of Krokinobacter Rhodopsin 2” *Biochemistry* 62(12): 1849-1857 (2023)
4. 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. U. S. A.* 118(21): e2101481118 (2021)
5. 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, Nureki O. “Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin” *eLife* 10: e62389 (2021)

C01 宮下班 計 33 件 (以下 5 件を抜粋)

1. Zhao W, Miyashita O, Nakano M, Tama F. “Structure determination using high-order spatial correlations in single-particle X-ray scattering.” *IUCrJ* 11: 92-108 (2024)
2. Miyashita O, Tama F. “Advancing cryo-electron microscopy data analysis through accelerated simulation-based flexible fitting approaches.” *Curr. Opin. Struct. Biol.* 82: 102653 (2023)
3. Shinoda K, Yokojima S, Fukaminato T, Nakamura S. “Determining Factor of the Quantum Yield of the Cyclization Reaction via Triplet States for Dye-Attached Diarylethene” *J. Phys. Chem. A* 11: 5895 (2021)
4. Tiwari SP, Tama F, Miyashita O. “Protocol for Retrieving Three-Dimensional Biological Shapes for a Few XFEL Single-Particle Diffraction Patterns.” *J. Chem. Inf. Model.* 61: 4108-4119 (2021)
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” *Bull. Chem. Soc. Japan* 93(12): 1509-1519 (2020)

A01 公募班 計 88 件 (以下 2 件を抜粋)

1. Maestre-Reyna M, Wang P.-H, Nango E, Hosokawa Y, Saft M, Furrer A, Yang C.-H, Gusti Ngurah Putu EP, Wu W.-J, Emmerich H.-J, Caramello N, Franz-Badur S, Yang C, Engilberge S, Wranik M, Glover HL, Weinert T, Wu H.-Y, Lee C.-C, Huang W.-C, Huang K.-F, Chang Y.-K, Liao J.-H, Weng J.-H, Gad W, Chang C.-W, Pang AH, Yang K.-C, Lin W.-T, Chang Y.-C, Gashi D, Beale E, Ozerov D, Nass K, Knopp G, Johnson PJM, Cirelli C, Milne C, Bacellar C, Sugahara M, Owada S, Joti Y, Yamashita A, Tanaka R, Tanaka T, Luo F, Tono K, Zarzycka W, Müller P, Alahmad MA, Bezold F, Fuchs V, Gnau P, Kiontke S, Korf L, Reithofer V, Rosner CJ, Seiler EM, Watad M, Werel L, Spadaccini R, Yamamoto J, Iwata S, Zhong D, Standfuss J, Royant A, Bessho Y, Essen L.-O, Tsai M.-D. “Visualizing the DNA repair process by a photolyase at atomic resolution” *Science* 382: 6674 (2023)
2. Li H, Nakajima Y, Nango E, Owada S, Yamada D, Hashimoto K, Fangjia L, Tanaka R, Akita F, Kato K, Kang J, Saitoh Y, Kishi S, Yu H, Matsubara N, Fujii H, Sugahara M, Suzuki M, Masuda T, Kimura T, Thao TN, Yonekura S, Yu LJ, Toshi T, Tono K, Joti Y, Hatsui T, Yabashi M, Kubo M, Iwata S, Isobe H, Yamaguchi K, Suga M and Shen JR. “Oxygen-evolving photosystem II structures during S₁-S₂-S₃ transitions” *Nature*, 626, 670-677 (2024).

B01 公募班 計 7 件 (以下 1 件を抜粋)

1. B. Maity, M. Shoji, F. Luo, T. Nakane, S. Abe, S. Owada, J. Kang, K. Tono, R. Tanaka, T. T. Pham, M. Kojima, Y. Hishikawa, J. Tanaka, J. Tian, H. Noya, Y. Nakasuji, A. Asanuma, X. Yao, S. Iwata, Y. Shigeta, E. Nango, T. Ueno. “Real-time observation of a metal complex-driven reaction intermediate using a porous protein crystal and serial femtosecond crystallography. *Nat. Commun. in press* (2024)

C01 公募班 計 60 件 (以下 2 件を抜粋)

1. Nakai H, Takemura T, Ono J, Nishimura Y, “Quantum-Mechanical Molecular Dynamics Simulations on Secondary Proton Transfer in Bacteriorhodopsin Using Realistic Models”, *The Journal of Physical Chemistry B*, 125,10947~10963(2021)
2. Otaki H, Ishiuchi S, Fujii M, Sugita Y, Yagi K, “Similarity scores of vibrational spectra reveal the atomistic structure of pentapeptides in multiple basins” *Phys. Chem. Chem. Phys.* 26:9906 (2024)

<学会発表>

計画研究班：354 件(招待講演、一般口頭講演、ポスター発表)

公募班：211 件(招待講演、一般口頭講演、ポスター発表)

<主な書籍>

1. 生体の科学 特集「高速分子動画：動的構造からタンパク質分子制御へ」, 金原一郎記念医学医療振興財団 (2024). [A01 岩田班、清中班、B01 南後班、山本班、C01 久保班、宮下班他]
2. 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]

3. 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]
4. 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]
5. 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]
6. 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]
8. 竹中章郎, 熊坂崇, 近藤次郎, 角南智子, 茶竹俊行, 森下えら, “生体高分子結晶のX線構造解析: ー実践手法と基礎理論ー”, 丸善出版, 2022年 [B01 山本班]
9. 久保稔, 山田大智 第1章第6節 ラマン分光法の構造生物学的利用. *タンパク質の構造解析手法とIn silico スクリーニングの応用事例*, 技術情報協会, 51-61 (2023). [C01 久保班]
10. 久保稔 第1編第5章第2節 反応ダイナミクスの時間分解測定. *ヘムタンパク質の科学* (城宜嗣, 青野重利, 齋藤正男監修), エヌ・ティー・エス, 193-201 (2022). [C01 久保班]
11. 當舎武彦, 木村哲就 第1編第5章第5節 反応速度論. *ヘムタンパク質の科学* (城宜嗣, 青野重利, 齋藤正男監修), エヌ・ティー・エス, 219-225 (2022). [C01 久保班]
12. Raymond G. Sierra, Uwe Weierstall, Dominik Oberthuer, 4 Michihiro Sugahara, Eriko Nango, So Iwata, Alke Meents (分担執筆) 『X-ray Free Electron Lasers-A Revolution in Structural Biology』 Springer (2019) [B01 南後班]

他 9 件

<産業財産権>

1. 特願 2021-088794 (出願日: 2021年5月26日) 岩田 想, 非変性チャンネルロドプシン検出キット
2. 特願 2021-028956 (2021/2/25) 清中茂樹, 堂浦智裕, 長谷川寛太, 柏俊太郎, 変異型 G タンパク質共役型受容体, 出願人: 名古屋大学, [A01 清中班]
3. 特願 2019-192046 (2019年10月21日) 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, [B01 足立班]

他 4 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>

<主催シンポジウム>

1. 第95回日本生化学会大会シンポジウム「タンパク質構造ダイナミクス研究の最近のトピックスと未来展望」: A01 野村, A01 清中 (名古屋, 2022年11月)
2. AsBIC-10 Symposium “Molecular Movies in Structural Metallobiology”: C01 久保, 木村 (2022年12月)
3. 第77回顕微鏡学会講演会・シンポジウム共催, オルガナイザー: A01 岩田 (つくば&オンライン, 2021年6月)

他 14 件

<一般向けのアウトリーチ活動等>

動画コンテンツ作成 (<https://www.youtube.com/watch?v=weAMSjIViQI> など二件)、領域パンフレット、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)、兵庫県立大学公開講座など他 13 件

8 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）。

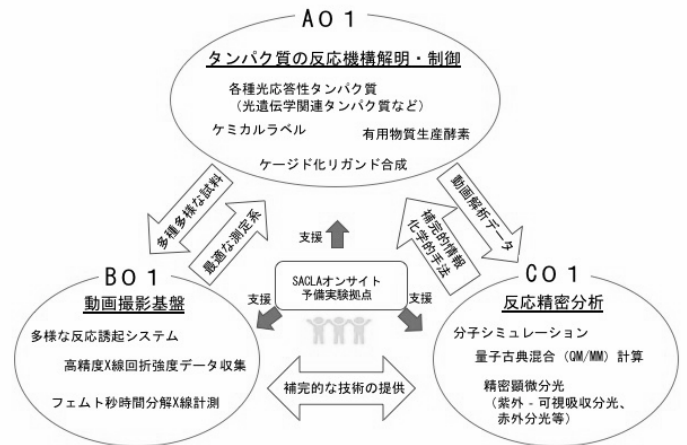
研究項目1：高速分子動画によるタンパク質の反応機構解明及び分子制御法の開発（A01）

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）

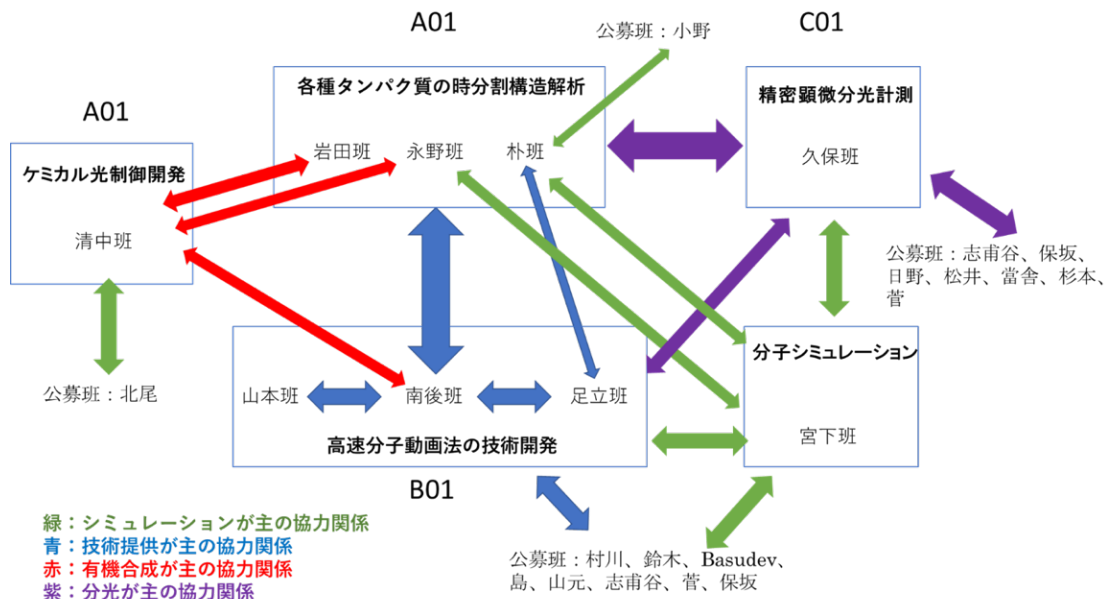
それぞれの研究計画は自己完結型の研究ではなく相補的であることから、互いの専門分野を融合させながら進行している。本領域で実施する計画研究は、X線自由電子レーザー（XFEL）を利用した実験を核としており、計画研究のメンバーがSACLAに集合し協力して実験を実施してきた。コロナ禍で各種機会がオンライン化される中で、SACLAでの実験は貴重な議論の場となり、緊密な連携関係が構築されている。

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。



9 研究費の使用状況

研究領域全体を通じ、研究費の使用状況や効果的使用の工夫、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2頁以内で記述すること。また、領域設定期間最終年度の繰越しが承認された計画研究（総括班・国際活動支援班を含む。）がある場合は、その内容を記述すること。

【総括班研究経費】

総括班の事務局を京都大学に設置し、領域代表者及び事務局の業務を補佐する理系人材一名を雇用するため、その人件費として総括班費を使用した。また実験拠点を SPring-8/SACLA キャンパス内に設置し、X線自由電子レーザーを用いる実験で用いられる機材を共通物品として領域内研究者に提供した。

まず事務局では、会議・シンポジウム、ホームページの作成・維持管理、ニュースレター作成等の実施を担当し、それらに関する経費を総括班費で賄った。特に領域会議の開催にあたっては、主に総括班経費で実施され、予算額としては人件費に次ぐ割合を占めた。領域会議は年2回、国際会議は領域実施期間に2回開催され、コロナ禍による移動制限があった年を除いて、対面会議（横浜または淡路）で行われ、領域に参加する研究者が多く参加するに至った。また、設備品としては、ストレージサーバーを購入し実験拠点に設置した。これは、SACLA で取得される実験データ量が膨大であるためであり、そうしたデータの保管や計測データと計算科学との連携に活用した。当初の計画では、国際シンポジウムなどにおける海外招聘研究者の旅費や、若手研究者を中心とした海外での XFEL 実験等に参加する研究者の海外派遣や海外動向調査に関する経費を計上していたが、2020年から3年間ほど続いたコロナ禍により、こうした活動を行うことは困難であった。こうした状況に対する対策として、オンライン会議ツールを用いたミーティング、セミナーを頻繁に開催し、領域内外の連携を図った。また、海外渡航の旅費として計上していた経費については、代わりに実験拠点で使用する実験器具の購入費用に充て、実験を円滑に実施することができた。また、良質な結晶を準備するため放射光施設での回折実験は必須であったため、それに用いるドライシッパーを総括班費で購入し、領域内の共通備品として使用することにより有効活用した。

【計画研究経費】

各計画研究班の経費執行内容について以下記載する。留意点として、計算科学関連の計画研究班は申請段階で計画に含まれていたが、代表者の逝去により計画研究班がない形で領域が開始された。しかし、B01 南後班に含める形で計算科学の研究者を分担者に迎え、研究自体は初年度から開始した。次年度に計画研究班として採択され、正式に班としての活動を始めた。研究経費は当初領域に配分された予算から、新たな計画研究班分を各々の班が供出して研究経費を捻出した。

<設備備品費>

本領域の研究は、主に①高速分子動画測定に必要な装置開発、試料調製及び解析②ターゲットとなる試料の活性測定、中間体の同定を目的とした分光学による解析、③高速分子動画に資するケミカルバイオロジー研究、④計測データと計算科学の連携研究から構成された。以下、項目ごとに記載する。

① 高速分子動画測定に必要な装置開発、試料調製及び解析

放射光施設で用いる回折計の作成、X線等の光学系関連機材の購入、試料温度安定性向上のための冷却系改造、寄生散乱低減に向けたX線入射系の改造、高速分子動画測定で用いられる試料インジェクターなどの開発費、溶液散乱実験のための高速液体クロマトグラフィー装置購入等に本経費が用いられた。

高速分子動画における試料調製は大量に行う必要があることから、その調製で用いられる超遠心分離機や高速冷却遠心機、タンパク質精製用クロマトグラフの装置の購入が行われた。また、良質な結晶を得ることが本実験で重要であるため、タンパク質結晶化分注システム一式も複数の計画研究班で購入された。解析では多くのデータを取りあつかう必要があり計算機が複数台購入された。

② ターゲットとなる試料の活性測定、中間体の同定を目的とした分光学による解析

光感受性タンパク質やケージド化合物の励起のためのナノ秒ダイオード励起 OPO レーザー、調製した試料の状態評価のための分光光度計（兵庫県立大学）、DNA 光修復酵素や金属タンパク質等の嫌気試料の調製用として嫌気性チャンバー、赤外分光測定用として狭帯域 MCT 検出

器、化学発光タンパク質の発光測定のための高感度冷却 CMOS カメラ、ロドプシン試料の光励起用として多波長 LED 光源が購入された。

③ 高速分子動画に資するケミカルバイオロジー研究

細胞における光制御分子の解析のために、共焦点レーザー顕微鏡、顕微鏡用の光照射装置、LED アレーシステムなどが設置された。純度の高いケージド化合物の合成に必須である分取クロマトシステム用の蒸発光散乱検出器も本経費で購入された。また、実際にタンパク質と合成したりガンドの活性測定のためにタンパク精製用装置などが本経費により設置された。

④ 計測データと計算科学の連携研究

主にデータを保存する大容量ハードディスクの購入、ワークステーションの購入に使用された。

<消耗品>

消耗品費は各班の分野に応じて全期間に渡って計上し、執行された。高速分子動画開発関連では、試料グリット作成、試料インジェクター関連、装置の部材などに用いられた。分光測定における消耗品、結晶化のためのガラス等消耗品類の他、試料調製のための有機合成試薬、遺伝子工学試薬、細胞培養試薬、タンパク質精製用試薬、遺伝子工学試薬などの購入費として使用された。

<人件費・謝金>

博士研究員やテクニカルスタッフ等の雇用が必要不可欠であり、各班の研究計画における必要性に応じて人件費を計上した。領域実施期間内に、最終的には博士研究員・特任助教・特任准教授として計7名が雇用され、技術補佐員として計2名が雇用された。経費活用の工夫として、班によっては人材雇用を円滑に進めるために代表者と分担者の配分額の調整が各年度で行われた。

<旅費>

研究成果を世界に向けてアピールすることを目的として国際学会の参加や、世界の最新の研究動向を調査するために世界の XFEL 施設で行われる会議に参加するための海外旅費を申請時に計画されていたが、領域開始直後に新型コロナウイルスによるパンデミックとなり、こうした海外渡航が困難となった。そのため、海外渡航関連の旅費について最終年度以外ではほとんど使用することができなかった。多くの班では海外渡航経費を消耗品費や設備品の調達に利用し、返上することなく経費を有効活用した。

国内旅費については、本領域の会議や打ち合わせ等への参加、成果発表・ネットワーク構築・情報収集のための学会や研究会への参加、SACLA での実験への参加等に係る旅費として使用した。特に SACLA での高速分子動画実験では3名以上の実験参加者が常であり、事前準備も行うためことから、比較的高額な旅費が必要となる。本領域からの旅費は SACLA での実験を促進し、十分に活用されることができた。

<その他>

人工遺伝子合成や DNA 配列解析などは業者に受託して行い、主にその経費を本費目から支出した。論文投稿費、装置修理費にも充てられた。スーパーコンピュータ使用料 (Wisteria/BDEC-01 東京大学情報基盤センター)、SACLA などの放射光施設での施設使用料も本経費から支出された。

【公募研究経費】

公募研究1回目の応募では、21件(廃止1件を含む)、2回目では20件の公募研究が採択され、一公募班あたり、年200万円から500万円程度の研究費が配分された。設備としては、結晶観察用顕微鏡、結晶化用低温インキュベーター、試料調製用の各種機器、解析のための計算機等が購入された。消耗品としては、大腸菌無細胞合成系に関連する試薬などの試料調製のための消耗品に主に使用された。人件費としては、技術補佐員の雇用で使用された。旅費は、領域会議、学会参加、SACLA での実験参加などに使用された。その他としては、NMR 測定、SPRING-8 での X 線結晶解析、SACLA での高速分子動画測定に必要な施設使用料、ケージド化合物合成の外注費などに使用された。

10 当該学問分野及び関連学問分野への貢献の状況

研究領域全体を通じ、本研究領域の成果が当該学問分野や関連学問分野に与えたインパクトや波及効果などについて、「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1頁以内で記述すること。なお、記述に当たっては、応募時に「①既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域の創成を目指すもの」、「②当該領域の各分野発展・飛躍的な展開を目指すもの」のどちらを選択したか、また、どの程度達成できたかを明確にすること。

応募時に「①既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域の創成を目指すもの」を選択した。当初の目標以上に達成できたと考えられる。

一番わかりやすいのは、学術変革領域研究(A)「タンパク質機能のポテンシャルを解放する生成的デザイン学」が本新学術領域の若手研究代表を中心に企画され採択されたことであろう。この全く違うプロジェクトが、構造生物・計算・ケミカルバイオロジー・分光などの学際的な専門家のチームによって取り組まれることになったことは、本領域がこれらの研究者を有機的に結びつけたことを顕著に表している。

この原動力になったのはオンラインセミナーと総括班会議であろう。本新学術領域は非常に不幸なことに開始直後に CoVID-19 パンデミックがおこり、キックオフの淡路島での班会議こそ対面でできたものの、その後対面のミーティングが出来なくなくなってしまった。それを克服するために月2回程度のオンラインセミナーを行うことを決定した。総括班評価者の中村先生の淡路島でのコメントを参考に実験科学と計算科学のコラボレーションを促すために毎回一人ずつ実験科学と計算科学のスピーカーに30人程度の視聴者の前で25分ずつ話題提供者をしてもらい、トータルで90分自由に意見を交換してもらいフォーマットをとった。オンラインセミナー全36回、若手セミナーは7回行われた。これが功を奏して、領域内での共同研究は急速に広まった。異分野融合に基づく論文数は報告があっただけでも85報ある。これらの多くは構造生物・計算科学・化学・生物物理学的手法(主に分光)を組み合わせたものであり、これにより非常に高いレベルでの高速分子動画実験や関連研究を組むことができ、非常にインパクトのある成果をあげることができた。この組み合わせは次の学術変革領域研究(A)のテーマであるタンパク質のデザインのような全く違う問題にも有効であると考えられる。

これ以外にも総括班の連携が非常に良好で休みを除き1-2ヶ月に1回の割合で40回の総括班会議を開いた。これは信頼関係の醸成にもとても重要で、この場で色々なアイデアが話し合われた。この一つの結果が2021年4月2日に開かれた、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」であり、われわれの領域研究が直接関連のない感染症の領域にもインパクトがあることを示すことができたと考えている(領域内外から243名の参加者)。2022年5月と2023年11月に2回の国際会議を開くことができ、無名の研究グループにも関わらず世界中のエキスパートを招待して開催できたのは、まさに総括班の団結力とオンライン開催の威力の賜物であると言える。

総括班評価者の先生方の言われるように是非とも、この研究グループを維持・拡大していき、学際的なアイデアで各種の困難なプロジェクトに挑戦していきたいと考えている。

新学術領域「高速分子動画」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」

新学術領域「高速分子動画」はタンパク質の動的な構造を観察し、それを分子制御に活かしていくことを目的とし、構造生物学・化学・計算科学を融合した研究を行っています。我々の領域がウイルス・パンデミックに対し有用であるかを考えるため、領域内外のスピーカーによるオープンなWebセミナーを開催いたします。

【開催日時】令和3年4月2日(金)13:00-17:00

【開催】Zoom、参加費不要
【申込】当該Web HP (www.molmovies.med.kyoto-u.ac.jp) から事前参加登録をお願いします
【問合せ】高速分子動画事務局: mol_movie@four.med.kyoto-u.ac.jp

13:00 「はじめに」 岩田 博 (京大)

13:05 基調講演「新型コロナウイルス感染症感染流行の数值シミュレーション基盤」 佐藤 彰洋 (横浜市大)

13:45 「インフルエンザウイルスに挑む」 朴 三用 (横浜市大)

14:15 「電子顕微鏡を用いた病原性ウイルスの増殖機構の解析」 野田 岳志 (京大)

14:45 「COVID-19 治療開発に向けたコロナウイルス3CLプロテアーゼ阻害剤の創製研究」 林 良雄 (東大)

15:25 「SARS-CoV-2 エンドリボスクレアーゼのオリゴマー化阻害」 北尾 彰朗 (東工大)

15:55 「新型コロナウイルスに対する迅速な人工抗体創製」 村上 裕 (名大)

16:25 「Covid-19 関連タンパク質に関する計算ドラッグリポジショニング」 重田 育照 (筑波大)

16:55 「おわりに」 南後 恵理子 (東北大)



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」の開催の様子



11 若手研究者の育成に関する取組実績

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6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。）の育成に係る取組の実績について、具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

計画研究班の構成については、2018年の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った。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、対面での会議、海外派遣や海外招聘等が難しい状況が続いた。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たが、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、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た。プロジェクトの終了までに36回のオンラインセミナーを開催した。これは新学術領域としてはかなり飛び抜けた数字ではないかと思う。中間評価以降さらに若手自身にセミナーの企画も全て任せようということで、名古屋大学の堂浦、筑波大学の庄司、東北大学の藤原を中心のこれとは別の若手オンラインセミナーを開催した。これはプロジェクト終了までに7回の開催されている。これらのセミナーにおいて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、貴重な経験となったと考えている。

さらに年2回の領域会議をオンラインまたはハイブリッドで開催し、当初から若手のために懇親会を兼ねたポスターセッションを実施し、研究を話題に活発な議論の場を提供している。コロナの影響でポスターセッション開催が難しくなってからは、2回の国際会議をふくめてオンラインのショートトークパラレルセッションを開催した。演題数はいずれも50件程度である。また23年5月の横浜の領域会議では2日目の午前中を若手シンポジウムに当てている。これ以外にも「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」を起こし、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。また13回のニュースレターを発行し領域ホームページからダウンロード可能となっている。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。

これらの結果、多くの学生が本領域の研究の結果をもとにした論文で学位を取得し、東京大学の山下恵太郎博士、大阪大学の中根崇智博士、名古屋工業大学の片山耕大博士、北海道大学の鈴木明大博士らのように本新学術領域の中心的なメンバーから、研究員・助教より准教授に昇任したメンバーもいる。中根崇智博士、志甫谷 渉博士、片山耕大博士は科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞を受賞している。領域開始当時若手中心であった本新学術領域の計画班の代表・分担者のうち南後恵理子博士は東北大学教授に庄司光男博士は筑波大学教授、近藤美欧博士は東京工業大学教授、中津亨博士は和歌山県立医科大学教授に昇任している。南後博士は本領域研究の成果により第18回日本学術振興会賞、第18回日本学士院学術奨励賞、日本化学会第41回学術賞・第3回長倉三郎賞を受賞し、その研究業績を非常に高く評価されている。彼らを中心として形成した、学術変革領域研究(A)「タンパク質機能のポテンシャルを解放する生成的デザイン学」が採択されており、本領域のDNAが引き継がれていると同時に、彼らの研究室の現在の若手のメンバー・公募で採択される若手研究者もまた新しい学術変革領域研究(A)で活躍してくれることを期待している。

12 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）

2019年度から2023年度まで続いた新学術領域研究「高速分子動画」においては、XFELを用いることで、生命機能を司るタンパク質の中で、実際に起こっている化学反応や構造変化を追跡する手法の発展を目的に実施された。岩田領域代表の強力なリーダーシップの下に、実力と実績を兼ね備えた中堅、若手研究者が集結した。

極めて多くの画期的成果が報告されたが、特筆すべき成果としては、光化学系IIにおける酸素発生機構解明に繋がるMnクラスターおよび水分子の構造変化（菅ら、Nature 2024）、マイクロ秒、ミリ秒オーダーでの時間制御による分子動画撮影に繋がるケージド化合物およびタンパク質ラベル化法の活用（清中ら、Chem Commun.2022）を上げることができる。ケージド化合物などの機能性合成分子を、構造生物学分野におけるツールとして位置づけたことで、光以外をトリガーとするタンパク質内反応の分子動画撮影に道を拓いた。また、コロナ禍での困難な状況にもかかわらず、オンライン会議を活用して、異分野の専門家による多くの共同研究が促進され、成果を挙げた点は特筆すべきである。中でも、計算科学と実験科学との融合は著しく進み、次世代学術変革領域研究(A)の「タンパク質機能のポテンシャルを解放する生成的デザイン学」発足へと繋がる本分野の新たな流れを作り出した。

全体として、本領域は数多くの画期的成果を生み出すと共に、若手研究者育成のプラットフォームとして有効に機能し、関連分野の新しい流れを生み出すターニングポイントとなったと評価できる。本分野の今後の発展に期待したい。

中川敦史（大阪大学蛋白質研究所・教授）

本研究領域では、タンパク質で起こるフェムト秒オーダーの化学変化や構造変化を原子分解能で明らかにする技術開発とそれを利用した構造研究を進め、さらには得られた時間分割構造情報を基に計算科学や物理化学的手法を用いて分子内の挙動を理解し、それらの知見を基に新たな分子創成を目指した。

当初中心目標とした高速分子動画撮影による分子メカニズムの解明については、技術開発を着実に進めることで、チャンネルロドプシンやクロロイドポンプロドプシンなどの光応答性イオンチャンネルの動的構造変化の追跡、銅含有アミン酸化酵素の反応サイクルの活性化における構造変化の解明、光回復酵素の損傷DNAの修復機構の解明、光化学系IIによる酸素発生メカニズムの分子機構の解明などを始めとして、数多くの成果を挙げ、Nature, Scienceを含む数多くの論文をトップジャーナルにおいて報告されている。さらにケミカルバイオロジーや計算科学の手法と組み合わせることで、領域間あるいは領域を越えた研究者との緊密なネットワーク形成を行い、従来からの単なる単純な動的構造解析を越えた動的な分子メカニズムの解明へと領域を発展させた。まさに「新学術領域」を開拓したことは特筆すべきことであるといえる。そして、本領域で開発された技術は、最先端の研究を進めるだけでなく、汎用的な技術へと発展させてきており、今後、より幅広い関連分野に対しての大きな波及効果が期待される。

中村春木（大阪大学蛋白質研究所・名誉教授）

新学術領域研究（研究領域提案型）では、これまでの既存の研究分野・研究領域に限定されてきた研究手法を、これまでは異種の研究分野・研究領域と考えられ、研究者の交流もほとんどなかった状況を変革し、具体的な研究課題を解決することが喫緊の目的であったと理解している。

その意味で、本領域研究では、生命現象を支えているタンパク質の機能・メカニズムの理解を最終的な課題

とし、モデル系でなく実際のタンパク質の中で起きている化学反応や構造変化をリアルタイムでフェムト秒から秒に渡る広い時間領域で追跡する手法を、異なる研究領域の手法を組み合わせ、さらに個々の手法も先鋭化することによって追求した。

具体的には、光以外の温度や pH などの外部刺激や基質・リガンドの添加などをトリガーとする時分割実験を新規に開発することに成功する一方、光感受性でない系を光で同期できる系に改変して、タンパク質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解明がなされた。

これらを達成するため、本領域研究の領域代表の強いリーダーシップのもと、ビデオ会議を活用した研究打ち合わせが頻繁に実施され、全ての参画研究者は相互に共同研究を積極的に進めた。特に、構造生物学、分光学、ケミカルバイオロジー、計算科学の異なる研究手法に秀でた研究者が、同一の研究対象に対して共同研究を実施し、それぞれの個々の研究手法だけでは到達できなかった新規な知見が多く解明され、その結果として国際的に認められるハイレベルの科学雑誌に多くの発表がなされた。

このように、単に少数の研究者が良い成果を出したということではなく、冒頭に記した新学術領域研究（研究領域提案型）としては類を見ない成功した研究プログラムであり、多くの若い研究者が育ったことも特筆すべきである。

松田道行（京都大学医学研究科・教授）

SACLA の特徴である高速撮影という特性を駆使して、分子活性変化に伴うタンパク質の構造変化を可視化するという本領域の研究は、SACLA の持つ利点を十二分に生かして、数々の研究成果をあげた。この点をまず高く評価したい。具体的な研究成果は枚挙にいとまがないが、チャンネルロドプシン、クロライドポンプロドプシン、光回復酵素、光合成の光化学系 II 等の活性変化に伴う構造変化を明らかにし、その分子機構を解明したことなどがあげられる。これらの研究成果はトップジャーナルに多く発表されている。また、構造解析を高度化させるためのオプトジェネティクス、ケミカルバイオロジー、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基盤技術の開発、さらには MD シミュレーションをはじめとする理論によるアプローチなど、研究終了後のさらなる発展に向けての布石も打つことができている。この領域が今後も発展するための礎ができたといえるだろう。

当初、COVID-19 の影響により ZOOM 開催であった領域会議であるが、近年は、対面での会議が開催され、活発な議論が交わされた。個々の優れた研究もさることながら、共同研究が極めて多いことが印象的であった。新学術領域研究にふさわしい内容であったと評価できる。二度にわたる公募研究者の募集により、多くの研究者が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も高く評価したい。また、領域代表の若手育成という方針が明瞭であり、公募 40 歳未満の研究代表者も多かった点も今後に繋がるものである。一方、採択に努力はされたようではあるが、女性研究者の比率は必ずしも高くはなく、この研究領域の今後の課題となった。また、ホームページは日英とも優れた内容であるが、領域会議が日本語であった点は残念である。外国人の研究代表者が複数いたのであるから、英語でやるべきだったのではなかろうか。

以上、本研究は、研究代表者の優れたリーダーシップのもと、幅広い研究者が集まって多彩な共同研究を行い、十二分の成果を上げた。また、今後の発展への布石も打たれており、高く評価する。