

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2023

課題番号：19KK0178

研究課題名（和文）計算科学と実験の融合によるベータバレル型膜中会合タンパク質の分子デザイン

研究課題名（英文）Design of beta-barrel type transmembrane protein complex by combination of computational and experimental studies

研究代表者

田中 良和（Tanaka, Yoshikazu）

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：20374225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,200,000円

研究成果の概要（和文）：膜孔形成毒素は標的細胞の細胞膜で会合して膜孔を形成するタンパク質会合体である。本研究では、黄色ブドウ球菌の膜孔形成毒素をモデルに、タンパク質工学と立体構造解析の技術を用いて、意図した構造・機能を有する膜孔をデザインすることを目指した。2成分性の膜孔形成毒素と1成分性膜孔形成毒素のキメラ型変異体を用いた実験から、1成分性の7量体の膜孔として機能する2つの活性型キメラ変異体の創出に成功したほか、7量体・8量体の両方の膜孔を形成できるキメラ変異体を取得することに成功し、膜外ドメインが1成分性の膜孔でも2成分性の膜孔形成毒素として振る舞うことができることを立証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜孔形成毒素は、可溶性のタンパク質として分泌されるが、ターゲット細胞上で会合した後、非常に大きな構造変化を起こして膜孔を形成する。そのため、その構造を自在に制御することがむずかしい。本研究では、さまざまな膜孔形成毒素のキメラ変異体を作成して、意図した構造・機能の膜孔を形成することに成功した。膜孔内部を分子が透過する際に膜電位が変化する性質を利用して膜孔はさまざまな分子センサーとして応用されている。本研究により得られた知見は、膜孔を用いたバイオセンサーを開発する際に有意義な情報になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Pore-forming toxins (PFTs) are proteins that associate at the plasma membrane of target cells to form pores. In this study, using *Staphylococcus aureus* PFTs as a model, we aimed to design membrane pores with the intended structure and function using protein engineering and structure analysis. We have successfully prepared two chimeric mutants that act as a single-component heptameric pore. In addition, we have successfully obtained chimeric mutants that can form both heptameric and octameric pores. These results revealed that even PFTs with a single-component outer membrane domain can behave as two-component PFTs.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：膜孔 タンパク質工学 クライオ電顕

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌が分泌する膜孔形成毒素は、赤血球膜上で会合した後に大きく構造変化してベータバレル型の直径約 2nm の膜孔を細胞膜に形成する。膜孔は、最先端の加工技術でも作ることでできない、原子レベルで正確なナノメートルオーダーの孔(ナノポア)を形成でき、さらに、ナノポア中を分子が通過する際の膜電位を測定すれば、電位特性からその分子を同定することができるため、本研究開始当初から、膜孔を利用した分子センサー開発が行われていた。加えて、ベータバレルは鎖間で多数の水素結合を形成する頑丈なシート状の立体構造であり、種々の薬剤に対して強い耐性を持つため、黄色ブドウ球菌の膜孔形成毒素は、分子デバイスなどの工学材料として利用する際に有用である。一方で、有用なデバイスを開発するには、目的に応じた径のサイズや膜孔内の電荷の異なるナノポアを自在に設計するための技術開発が求められていたが、膜孔形成毒素の構造デザインの難易度は高く、その実現には至っていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、構造情報を中心とした実験系の研究グループと計算科学を得意とする研究者が国際的な共同研究を組織し、動的挙動を伴うベータバレル型膜孔タンパク質をデザインし、任意のサイズのナノポアを創り出す技術を開発することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 分子のデザイン

本研究では、LukF と Hlg2 という 2 種類のポリペプチドが 4 分子ずつ会合して 8 量体のポアを形成する 2 成分性毒素と、ホモ 7 量体のポアを形成する 1 成分性毒素 (HLA) に着目して実験を行った。はじめに、これらの 3 種類の膜孔形成毒素の立体構造に基づき、膜外ドメインと膜貫通領域のキメラ型タンパク質を設計した。Rosetta などのプログラムを用いて、安定な会合構造を形成するキメラタンパク質 (AF 変異体: 膜外領域が HLA で膜貫通領域が LukF のキメラ変異体、AG 変異体: 膜外領域が HLA で膜貫通領域が Hlg2 のキメラ変異体) を設計した。さらに、トライアングル領域とよばれる、膜外領域と膜貫通領域を連結する領域のアミノ酸配列が異なる 3 種類の変異体を AF、AG のそれぞれで設計した (AF1~3、AG1~3 の合計 6 種類)。さらに、トライアングル領域の重要性についての知見を得るために、この領域の重要な残基の変異体を AF2 に対して作製した (AF2-F110K、AF2 K151V)。

(2) 各変異体タンパク質の調製

設計したこれらのタンパク質の遺伝子を作成し、pET 系発現ベクターの T7 プロモーター下流のマルチクローニングサイトに挿入して大腸菌用の発現ベクターを作製した。得られた発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入して 310K の LB 液体培地で培養し、IPTG 誘導により発現を誘導した。298K にて一晚培養後に集菌し、バッファーにて懸濁後、超音波破碎し、菌体内可溶性画分を Ni アフィニティクロマトグラフィーに供して目的タンパク質を精製した。カラムからの溶出はイミダゾールのグラジエンとで行った。精製試料の純度を SDS PAGE にて確認し、十分な純度のフラクションを用いて以後の実験を行った。

(3) 溶血活性の活性評価

溶血活性はヒト赤血球とウサギ赤血球の両方を用いて行った。PBS にて 50% に調整したヒトおよびウサギ赤血球に、5、10、40、80pmol の精製タンパク質を添加した後、310K にて 1 時間インキュベートし、8,000G にて 5 分間遠心分離した後の上清の 540nm の吸光度を測定して溶血活性を評価した。

(4) 構造解析

形成された膜孔の立体構造は、ネガティブ染色法により観察した。2% 酢酸ウランにて染色した試料を透過型電子顕微鏡を用いて観察し、プログラム Rion を用いて単粒子解析を行った。明らかになった構造から、作製した変異体の会合状態についての知見を得た。

4. 研究成果

(1) タンパク質の調製

それぞれの変異体を菌体内可溶性画分から精製したところ、いずれの変異体も可溶性分子として精製することができた。いずれの変異体も、SDS-PAGE において単量体の他に、多量体のバンドが確認された。これらの結果より、いずれの変異体も自己会合して膜孔を自発的に形成することができることがわかった。

(2) 溶血活性の評価

6 種の変異体について、ウサギとヒトの赤血球に対する溶血活性を評価した。溶血活性はウサギ赤血球上では AF2 と AF3 でのみ観察された。特に AF3 はウサギ赤血球に対して強い活性を示し、40pmol の添加で 100% の溶解活性を示したが、AF2 は同量の毒素 (40pmol) でウサギ赤血球

の約 13%しか溶解しなかった。ウサギ赤血球に対する溶血活性の濃度依存性を評価したところ、AF3の溶血活性は野生型 HLA の溶血活性と同程度であったが、AF2の溶血活性はAF3に比べると弱かった。他の4つの変異体(AF1、AG1、AG2、AG3)は、添加量を増やしても溶血活性を示さなかった。さらに、ヒト赤血球に対しては、6つの変異体のいずれでも溶血活性が確認できなかった。AF2およびAF3がウサギ赤血球のみを溶血させることから、HLAと同様の性質(すなわち、ヒト赤血球に対しては活性がないが、ウサギ赤血球に対しては溶血活性を示す)を有することがわかった。以上の結果より、膜外領域の性質が溶血活性に強く影響することが示唆された。

(3) トライアングル領域の重要性の評価

AF3とAF2の溶血活性を比較すると、AF2はAF3よりも著しく活性が低い。AF2とAF3の違いはトライアングル領域の2つの残基(110位がPhe110(AF2)かLys(AF3)、151位がLys(AF2)かVal(AF3))の違いだけである。トライアングル領域は、単量体の際は折り畳まれた構造をしている一方で、膜孔では伸びた構造となる。そのため、非常に大きな構造変化を起こす領域である。AF2とAF3の溶血活性が大きく異なることは、膜孔形成毒素をデザインする際にこの領域のフィニチューニングが重要であることを示唆している。そこで本研究では、トライアングル領域の末端の残基を置換したAF2の2種類の点変異体(AF2-F110KとAF2-K151V)を作製し、溶血活性とMPDによる自発的なオリゴマー形成を評価し、孔形成機構におけるこれら2残基の役割を調べた。

ウサギ赤血球を用いた溶血活性評価の結果、AF2-F110K変異体は88%を溶解し、AF2-K151V変異体では27%を溶解した(40pmolで比較した場合)。これらの結果は、元のAF2よりも高い活性である。また、これらの2つの変異体は、ヒト赤血球に対する溶解活性を示さなかった。自己会合特性に関しては、25%MPD存在下で両変異体は安定なSDS耐性オリゴマーに自己会合することができ、このオリゴマーは熱処理によって解離した。これらの結果から、トライアングル領域の末端に位置する両残基が溶血活性に重要であることが明らかになった。

(4) ネガティブ染色単粒子解析による会合構造の評価

AF1-3とAG1-3の生化学的解析の結果、AF2とAF3は溶血活性を持ち、AGは溶血活性を持たないにもかかわらず、SDS耐性オリゴマーに会合することがわかった。AFとAGの溶血活性の違いの原因となる構造の違いを明らかにするためには、自己会合した多量体の立体構造を確認することが重要であると考え、本研究では透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、AFとAGのオリゴマーの立体構造の違いを調べた。ネガティブ染色された自己会合したAF3とAG2を観察・比較した。電顕像には、様々な方位の球状の粒子が確認され、自己会合したAF3とAG2であることが示唆された。観察された粒子の構造的特徴を明らかにするために、得られた粒子像を用いて単一粒子解析を行った。2D分類解析により、粒子は特定のクラスに収束した。上部から見ると、AF3およびAG2変異体のそれぞれについて、直径約110Åの7量体の像が得られた。つづいて、3次元構造を構築したところ、AF3とAG2の両方で、マッシュルーム状の7量体の構造が得られた。膜外領域と膜孔の明瞭な構造が確認できた。7量体のHLAおよび8量体のHLと構造比較したところ、明らかに7量体のHLAの構造と一致した。

(5) シナジー効果についての知見

AF1-3、AG1-3の変異体は、2成分性毒素のどちらかのステムドメインと、1成分性毒素HLAの膜外ドメインから構成される。構築した6つの変異体のうち、AF2とAF3だけが溶血活性を示したが、AFとAGが共存した場合、これらが相乗的に会合して2成分性の膜孔を形成する可能性があると考えた。また、すべてのAG変異体の溶血活性も、AFと協働的に機能することで回復する可能性があると考えた。これらの仮説を評価するために、単独では弱い溶血活性を示すAF2の溶血活性を、3種類のAGの存在下および非存在下で評価した。80pmolのAF2を80pmolの各AGと混合し、ウサギ赤血球に添加し、1時間インキュベーション後、活性を評価した。その結果、23%の溶血活性しか示さなかったAF2が、AG1、AG2、AG3のいずれかを混合すると、その溶血活性は著しく向上し、添加したウサギ赤血球の85%、64%、66%を溶血した。以上の結果から、AG1-3はAF2の細孔形成活性を改善したと結論した。

AGとの相乗効果のメカニズムを解明するために、AF2のC末端に27kDaの緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合した変異体(AF2-GFP)を調製した。GFPの存在により、AF2-GFPはAGと区別できる。AF2-GFPとAG2の両方を大腸菌で共発現させ(AF2-GFP/AG2)、自発的に形成されたオリゴマーを可溶性画分から精製した。熱処理を行わない場合、AF2-GFP/AG2の自己会合体は、SDS-PAGEで観察すると200kDa以上の様々なバンドを示した。これらのバンドは熱処理をすると解離し、それぞれ単量体のバンド(AF2-GFP:61kDa、AG2:34kDa)になった。熱処理しない場合にみられる会合体のバンドの多くは、AF2に融合したGFPに由来する蛍光を示した。AF2-GFP/AG2で観察された多量体のバンドを、AF2-GFPおよびAG2の多量体のバンドと比較すると、熱処理なしで最も高いバンドおよび最も低いバンドは、ホモ多量体のAF2-GFPおよび、ホモ多量体のAG2であることが示された。これらの結果を考え合わせ、ホモ多量体のAF2-GFPとAG2の間に観察された

複数の蛍光を示すバンドは、ホモ多量体の AF2-GFP ; 427kDa とホモ多量体の AG2 ; 238kDa の間の分子量を持つヘテロ 2 成分多量体であると考えられる (これらの分子量は 7 量体集合を仮定して計算した)。

次に、AF2-GFP/AG2 のヘテロ会合体の会合状態を理解するために、AF2-GFP/AG2 多量体のネガティブ染色 TEM 単粒子解析を行った。コントロールとして、自己組織化した AF2-GFP 多量体も解析した。AF2-GFP と AF2-GFP/AG2 のネガティブ染色電顕像から、中央に孔を持つ円形の粒子が観察されたことから、観察された粒子は多量体化した AF2-GFP と AF2-GFP/AG2 複合体であることが示唆された。粒子はいくつかの 2D クラスに収束したが、AF2-GFP の上面図では、各プロトマーから突出した部分を持つ 7 量体が確認された。観察された突出は、C 末端に融合した GFP の密度と考えられる。AF2-GFP/AG2 の 2 次元分類解析では、3 種類のオリゴマーが示された。GFP の有無に基づき、各オリゴマーは以下のように分類された:(1)GFP のない 7 量体オリゴマー、(2) GFP が隣接するプロトマーの一部から突出した 7 量体オリゴマー、(3)8 量体オリゴマー。一方、8 量体オリゴマーでは、GFP の突起間の距離が広く、柔軟性が高いため、GFP の密度は不明瞭であった。これらの結果から、AF2-GFP/AG2 は 7 量体および 8 量体の 2 成分膜孔を形成できることが確認された。これらの結果から、AG の共存による AF2 の溶菌活性が相乗的に向上するのは、AF2-GFP と AG2 が 8 量体の細孔内で交互に会合することに起因するということが示唆された。

(6) 結論

HLA の膜外ドメインと 2 成分性膜孔形成毒素の膜貫通ドメインを融合させることで、1 成分型の 7 量体の膜孔として機能する 2 つの活性型キメラ変異体 (AF2 と AF3) の創出に成功した。さらに、AF2 が AG と協同すると、7 量体・8 量体の両方の膜孔が効率よく形成されること、すなわち、膜外ドメインが 1 成分性の膜孔でも、AF2 と AG は 2 成分の膜孔形成毒素として振る舞うことを証明した。本研究で得られた知見は、会合状態、膜孔形成、 β -バレル形成の動的な過程を理解しデザインするために有用なものである。本研究の知見が、膜孔を利用した医薬品やナノセンサーの開発をはじめとした様々なタンパク質工学研究を加速することを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Watari Hiromi, Kageyama Hiromu, Masubuchi Nami, Nakajima Hiroya, Onodera Kako, Focia Pamela J., Oshiro Takumi, Matsui Takashi, Kodera Yoshio, Ogawa Tomohisa, Yokoyama Takeshi, Hirayama Makoto, Hori Kanji, Freymann Douglas M., Imai Misa, Komatsu Norio, Araki Marito, Tanaka Yoshikazu, Sakai Ryuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 A marine sponge-derived lectin reveals hidden pathway for thrombopoietin receptor activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34921-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishizaka Masato, Chen Minghao, Narai Shun, Tanaka Yoshikazu, Ose Toyoyuki, Horitani Masaki, Yao Min	4. 巻 24
2. 論文標題 Quick and Spontaneous Transformation between [3Fe ₄ S ₄] and [4Fe ₄ S ₄] Iron-Sulfur Clusters in the tRNA-Thiolation Enzyme TtuA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 833 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24010833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsugita Atsushi, Uehara Shiro, Matsui Takashi, Yokoyama Takeshi, Ostash Iryna, Deneka Maksym, Yalamanchili Subbarao, Bennett Clay S., Tanaka Yoshikazu, Ostash Bohdan	4. 巻 289
2. 論文標題 The carbohydrate tail of landomycin A is responsible for its interaction with the repressor protein LanK	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 6038 ~ 6057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ghanem Nouran, Kanagami Natsuki, Matsui Takashi, Takeda Kein, Kaneko Jun, Shiraishi Yasuyuki, Choe Christian A., Uchikubo Kamo Tomomi, Shirouzu Mikako, Hashimoto Tsubasa, Ogawa Tomohisa, Matsuura Tomoaki, Huang Po Ssu, Yokoyama Takeshi, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 0
2. 論文標題 Chimeric mutants of staphylococcal hemolysin, which act as both one component and two component hemolysin, created by grafting the stem domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tagami Takayoshi, Chen Minghao, Furunaga Yuta, Kikuchi Asako, Sadahiro Juri, Lang Weeranuch, Okuyama Masayuki, Tanaka Yoshikazu, Iwasaki Tomohito, Yao Min, Kimura Atsuo	4. 巻 289
2. 論文標題 Structural insights reveal the second base catalyst of isomaltose glucohydrolase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1118 ~ 1134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Konan, Tsukamoto Yuya, Horitani Masaki, Ogawa Tomohisa, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 85
2. 論文標題 Biochemical properties of CumA multicopper oxidase from plant pathogen, Pseudomonas syringae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1995 ~ 2002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uyeda Atsuko, Reyes Sabrina Galianes, Kanamori Takashi, Matsuura Tomoaki	4. 巻 133
2. 論文標題 Identification of conditions for efficient cell-sized liposome preparation using commercially available reconstituted in vitro transcription-translation system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 181 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakai Hiroki, Isshiki Kinuka, Hattori Masato, Maehira Hiromasa, Yamaguchi Tatsumi, Masuda Keiko, Shimizu Yoshihiro, Watanabe Takayoshi, Hohsaka Takahiro, Shihoya Wataru, Nureki Osamu, Kato Yasuhiko, Watanabe Hajime, Matsuura Tomoaki	4. 巻 94
2. 論文標題 Cell-Free Synthesis of Human Endothelin Receptors and Its Application to Ribosome Display	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3831 ~ 3839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c04714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onodera Taishi, Kita Shunsuke, Adachi Yu, Moriyama Saya, Sato Akihiko, Nomura Takao, Sakakibara Shuhei, Inoue Takeshi, Tadokoro Takashi, Anraku Yuki, Yumoto Kohei, Tian Cong, Fukuhara Hideo, Sasaki Michihito, Orba Yasuko, Shiwa Nozomi, Iwata Naoko, Nagata Noriyo, Suzuki Tateki, Sasaki Jiei, et all	4. 巻 54
2. 論文標題 A SARS-CoV-2 antibody broadly neutralizes SARS-related coronaviruses and variants by coordinated recognition of a virus-vulnerable site	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 2385 ~ 2398.e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2021.08.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Kein, Tanaka Yoshikazu, Kaneko Jun	4. 巻 168
2. 論文標題 The N-terminal amino-latch region of Hlg2 component of staphylococcal bi-component - haemolysin is dispensable for prestem release to form -barrel pores	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 349 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makabe Koki, Yokoyama Takeshi, Uehara Shiro, Uchikubo-Kamo Tomomi, Shirouzu Mikako, Kimura Kouki, Tsumoto Kouhei, Asano Ryutaro, Tanaka Yoshikazu, Kumagai Izumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Anti-EGFR antibody 528 binds to domain III of EGFR at a site shifted from the cetuximab epitope	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5790-5790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84171-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minghao Chen, Masato Ishizaka, Shun Narai, Masaki Horitani, Naoki Shigi, Min Yao & Yoshikazu Tanaka	4. 巻 3
2. 論文標題 The [4Fe-4S] cluster of sulfurtransferase TtuA desulfurizes TtuB during tRNA modification in Thermus thermophilus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0895-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsubasa Hashimoto, Yuxin Ye, Mihoko Ui, Tomohisa Ogawa, Takashi Matsui, and Yoshikazu Tanaka	4. 巻 514
2. 論文標題 Protein encapsulation in the hollow space of hemocyanin crystals containing a covalently conjugated ligand	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigekazu Yano, Wasana Suyotha, Natsuki Oguro, Takashi Matsui, Shota Shiga, Takafumi Itoh, Takao Hibi, Yoshikazu Tanaka, Mamoru Wakayama and Koki Makabe	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structure of the catalytic unit of GH 87-type α -1,3-glucanase AgI-KA from <i>Bacillus circulans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51822-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 ストップコドンリードスルーの分子機構解明
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 タンパク質立体構造解析と質量分析の融合研究
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 ヘモリシンの立体構造解析と構造情報を生かしたデザイン
3. 学会等名 分子ロボティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 tRNA thiolation by TtuA-TtuB using [4Fe-4S] cluster
3. 学会等名 the 12th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千足啄馬、高田希美、橋本翼、深野華子、山本健太郎、鈴木仁人、星野仁彦、横山武司、田中良和
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析を用いた、非結核性抗酸菌の薬剤耐性因子によるリボソーム解離機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野航佑、伴野詢太、鈴木仁人、横山武司、田中良和
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析による、リボソームを標的とするアミノ配糖体抗菌薬の微細構造差が生み出す阻害活性増強機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Tsugita, Shiro Uehara, Takashi Matsui, Takeshi Yokoyama, Iryna Ostash, Maksym Deneka, Subbarao Yalamanchili, Clay S. Bennett, Bohdan Ostash, and YoshikazuTanaka
2. 発表標題 Crystal structure analysis of LanK complexed with landomycinA, a potent antitumor antibiotic
3. 学会等名 e-Asia Joint Symposium on "Marine Biodiversity as a Source of New Chemotypes (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 Design of staphylococcal two-component pore forming toxin to change pore formation property
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会シンポジウム実験と理論の共同による生命金属動態研究の最前線 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoaki Matsuura
2. 発表標題 In vitro directed evolution of membrane proteins using ribosome and liposome display
3. 学会等名 New Proteins by Evolution and Engineering (Online organized by OIST) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦友亮
2. 発表標題 要素から創る無細胞分子システムの構築と応用
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 産学連携委員会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoaki Matsuura
2. 発表標題 Bottom-up construction of synthetic cells and its relation to Earth-Life science
3. 学会等名 10th ELSI symposium (Online organized by ELSI, Tokyo Tech) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 喜多俊介、小野寺大志、安達悠、森山彩野、野村尚生、田所高志、安楽佑樹、湯本航平、田聡、福原秀雄、鈴木干城、佐々木慈英、福士秀悦、里深博幸、香月康宏、押村光雄、橋口隆生、高橋宜聖、前仲勝実
2. 発表標題 新型コロナウイルスspike蛋白質と中和抗体NT-193複合体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 令和3年(2021年)度日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 喜多俊介、小野寺大志、安達悠、森山彩野、野村尚生、田所高志、安楽佑樹、湯本航平、田聡、福原秀雄、鈴木干城、橋口隆生、高橋宜聖、前仲勝実
2. 発表標題 SARS-CoV-2スパイク蛋白質と中和抗体NT-193複合体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 第39回PFシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋田穂、日下裕規、TIAN Cong、田所高志、井貫晋輔、新山真由美、杉山成、村田道雄、藤本ゆかり、喜多俊介、前仲勝実
2. 発表標題 脂質抗原提示分子CD1dの熱安定性解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会(MBSJ2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋田穂, 日下裕規, 田聡, 田所高志, 井貫晋輔, 新山真由美, 杉山成, 村田道雄, 藤本ゆかり, 喜多俊介, 前仲勝実
2. 発表標題 MHC class I様分子CD1dとアミド型 -GalCer複合体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 令和3年(2021年)度日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Cong Tian, Hiroki Kusaka, Takashi Tadokoro, Shunsuke Kita and Katsumi Maenaka
2. 発表標題 X-ray crystal structure analysis of lipid antigen presenting molecule CD1b in complex with endogenous ligand from silkworm
3. 学会等名 令和3年(2021年)度日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Cong Tian, Hiroki Kusaka, Takashi Tadokoro, Shunsuke Kita and Katsumi Maenaka
2. 発表標題 Functional analysis of lipid loading of CD1b mediated by Saposin proteins
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 巨大タンパク質会合体ヘモシアニンの結晶中の空隙への生体分子の包摂
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 蛋白質の立体構造解析 -X線結晶構造解析とクライオ電顕単粒子解析-
3. 学会等名 酵素工学研究会第84回講演会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 巨大タンパク質会合体ヘモシアニンの構造解析
3. 学会等名 農芸化学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多葵一、松井崇、小松玲子、谷藤涼、大栗博毅、横山武司、田中良和
2. 発表標題 Saframycin A合成関連蛋白質のクライオ電子顕微鏡単粒子解析
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 次田篤史、松井崇、堀口安彦、横山武司、田中良和
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡単粒子解析による百日咳壊死毒の構造解析
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Okabe, Shinichi Sato, Takeshi Yokoyama, Shusuke Tomoshige, Minoru Ishikawa, and Yoshikazu Tanaka
2. 発表標題 Crystal structure analysis of BIR3 domain of ubiquitin ligase in complex with its specific ligand for designing potent ligand
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiro Uehara, Iryna Ostash, Bohdan Ostash, Takashi Matsui, Tomohisa Ogawa, Yoshikazu Tanaka
2. 発表標題 Structural analysis of LanK, a protein associated with the production of antibiotics in actinomycetes
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshikazu Tanaka
2. 発表標題 Structure analysis of protein using both electron microscopy and X-ray crystallography
3. 学会等名 Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中良和
2. 発表標題 巨大タンパク質会合体ヘモシアニンの構造解析 結晶構造と電顕構造
3. 学会等名 2019年度 日本生化学会九州支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 伴野 詢太, 田中 良和, 横山 武司	4. 発行年 2023年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 460
3. 書名 クライオ電子顕微鏡ハンドブック、第4章14節、クライオ電子顕微鏡で見る、リボソームの「かたち」と「動き」	

1. 著者名 安楽佑樹, 喜多 俊介, 前仲 勝実	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 医学のあゆみ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山下 恵太郎 (Yamashita Keitaro) (20721690)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教 (12601)	
研究分担者	松浦 友亮 (Matsuura Tomoaki) (50362653)	東京工業大学・地球生命研究所・教授 (12608)	
研究分担者	喜多 俊介 (Kita Shunsuke) (10702003)	北海道大学・薬学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	スタンフォード大学	ペイラー大学	ケースウエスタン大学	
ドイツ	ミュンスター大学			
ドイツ	マックスプランク研究所			