

(独) 科学技術振興機構
戦略的創造研究推進事業
個人型研究 (さきがけ)

追跡調査報告書

「生体分子の形と機能」
(2001-2006 年度)

研究総括 郷 信広

2012 年 3 月 31 日

目次

要旨	1
第1章 追跡調査について	3
1.1 調査の目的	3
1.2 調査の対象	3
1.3 研究領域の概要	3
1.4 研究領域全体としての特筆すべき研究成果	8
第2章 研究領域終了から現在に至る状況	10
2.1 参加研究者全体の動向	10
2.1.1 研究者の職位の推移	10
2.1.2 原著論文の発表件数	11
2.1.3 特許出願件数	12
2.1.4 研究者の受賞	17
2.1.5 研究者の研究助成金獲得状況	18
2.2 参加研究者の研究成果の発展状況	25
2.2.1 第1期生（10名）	25
2.2.2 第2期生（8名）	35
2.2.3 第3期生（5名）	45
2.3 第2章のまとめ	52
第3章 研究成果から生み出された科学技術的、社会的及び経済的な波及効果	54
3.1 「色素タンパク質による生体機能の時空間的な不活性化法の確立」	54
3.1.1 研究成果の発展状況	54
3.1.2 研究成果の科学技術の進歩への貢献	57
3.1.3 社会経済への波及	59
3.2 「マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム」	61
3.2.1 研究成果の発展状況	61
3.2.2 研究成果の科学技術の進歩への貢献	64
3.3 「構造ゲノム科学およびプロテオミクスに基づく新規の遺伝暗号翻訳装置の同定と機能発現メカニズムの解明」	68
3.3.1 研究成果の発展状況	68
3.3.2 研究成果の科学技術の進歩への貢献	73
3.3.3 研究成果の応用に向けての発展状況	74
3.3.4 その他	75

要 旨

さきがけ「生体分子の形と機能」研究領域は 2001 年から 2006 年までわたって実施された。この期間における一連の研究について、携わった研究者がその後どのように研究を発展させたかについて追跡調査を行った。

永井健治、濡木 理、佐藤 健、木下 専、宮田真人、村上 聡、稲葉謙次（村上聡との共同研究）が当時のさきがけ研究における特筆すべき研究成果として挙げられる。これらはいずれも 2004 年から 2006 年にかけてプレスリリースされた。これらの研究者は特に 2006 年度に入ってから、タンパク質の立体構造形成の仕組みを解明する研究から結晶構造を解いてタンパク質の活性発揮メカニズムを解明した成果を創出し、Science、Nature、Cell などの有力雑誌に次々掲載された。稲葉謙次、永井健治は 1 期生、濡木理と村上聡は 2 期生、木下専、宮田真人は 3 期生であり、さきがけ研究期間を終了した後も、引き続き研究を進展させ、注目すべき成果が発表されている。これらの研究はさらなる発展が認められ、タンパク構造科学の進歩に大きく貢献している。彼らの論文は世界の研究者から高頻度で引用されており、また多くの特許が登録されている。携わった研究者の多くが大学教授や研究機関のリーダーとなっており、この研究分野の中核を形成している。

さきがけ研究後に注目される研究として次のようなものが挙げられる。永井健治は蛍光蛋白の電子移動の詳細を解明し、その応用として神経、ミトコンドリアなどの細胞タンパク質の動的変化を可視化し、更にその応用として細胞内 Ca、ATP 濃度の研究を続けている。濡木理は tRNA とタンパク質の形態の研究を続けているが、更に Mg イオントランスポータの結晶構造、脱ユビキノン化酵素の開裂様式の結晶学的研究、分泌蛋白を輸送する secYE 結晶構造などいずれも 40 回以上引用される論文を発表している。2011 年度からは CREST 研究代表者を務めている。佐藤健は coat protein complexII に関する研究と amyloid に関する研究など疾患関連研究に進展させている。木下専は細胞骨格タンパク質セプチンの構造と機能の詳細の研究を進展させている。宮田真人はさきがけ研究時に発見した滑りタンパク質について詳細な研究を続け、関連タンパク質を抽出し、滑り運動という特異な運動の機序を解明している。村上聡はさきがけ研究時に取り組んだ薬物排出トランスポーター AcrB の研究を進展させ、排出機序の詳細を解明している。同じくジスルフィド結合研究についても発展として動的性質を DsbB の結晶を用いて解明している。稲葉賢治は DsbB の構造とジスルフィド結合の研究を進展させている。この他、井上豪は結晶成長法など実用的な成果、木下賢吾は表面電位の周辺からの活性発現構造推定、根本知己は開口分泌、高野和文は HIV プロテアーゼの構造、小澤岳昌はタンパク質の細胞内変化の可視化、西坂崇之はタンパク質 1 分子の可視化といった大きな成果をそれぞれ上げている。

本調査を通して、さきがけ研究者がそれぞれ「生物分子の形と機能」という研究領域の発展に貢献し、各種の受賞や特許の成果に基づくベンチャー企業の立ち上げなども社会や産業界に

も将来のイノベーション創出に向けた萌芽を生み出していることが確認された。

第1章 追跡調査について

1.1 調査の目的

戦略的創造研究推進事業の個人型研究（さきがけタイプ）（以下、さきがけ研究）において、事後評価を補完するとともに基礎研究の事業に係わる評価に資することを目的として、研究終了後一定期間を経た後、研究成果の発展状況や活用状況、参加研究者の活動状況等を調査し、客観的事実について収集する。

1.2 調査の対象

本追跡調査は、さきがけ研究領域「生体分子の形と機能(2001-2006年度)」の23研究課題全てを対象とする。表1-1に調査対象と調査対象期間を示す。なお、さきがけは個人型研究であるため、各研究者がそれぞれに1研究課題を設定し、研究を展開しているため、参加研究者全員を調査した。

表 1-1 調査対象と調査対象期間

	さきがけ期間	さきがけ終了後調査対象期間	研究課題数
第1期	2001年12月－2005年3月	2005年4月－2011年9月	10
第2期	2002年12月－2006年3月	2006年4月－2011年9月	8
第3期	2003年12月－2007年3月	2007年4月－2011年9月	5

1.3 研究領域の概要

研究総括：郷 信広

研究領域の概要：

本研究領域は、遺伝情報が機能として発現するのを支えている物理的実体としての生体分子(タンパク質)に焦点をあて、物理学、化学等の物質科学の原理に基づき、その立体構造形成の仕組みや立体構造に基づく機能発現の仕組みを研究するとともに、今急速に蓄積が進んでいるゲノム情報等を対象としたバイオインフォマティクス的手法を用いた研究も対象とする。

具体的には、タンパク質等の立体構造の実験的決定・理論的予測、物性研究、相互作用や

複数の分子からなる超分子構造体の解析に関する新しい研究方法の開発等の基礎的研究と共に、合理的薬物設計、生物的機能の工学的利用を目指した応用的研究等が含まれる。

本領域の概要に沿って研究を行うため、10人の領域アドバイザーを定め、研究者の指導にあたった。表 1-2 に領域アドバイザーを示す。

表 1-2 領域アドバイザー

領域アドバイザー	所属	役職	任期
板井 昭子	(株)医薬分子設計研究所	代表取締役	2001年10月～平成2002年4月
北川 禎三	豊田理化学研究所	豊田フェロー	2001年10月～2007年3月
桑島 邦博	東京大学大学院理学系研究科	教授	2001年10月～2007年3月
五條堀 孝	情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所	教授	2001年10月～2005年7月
近藤 滋	名古屋大学理学部 生命理学科	教授	2001年10月～2007年3月
月原 富武	大阪大学 蛋白質研究所	教授	2001年10月～2007年3月
中野 明彦	東京大学大学院理学系研究科	教授	2001年10月～2007年3月
西川 建	情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所	教授	2002年5月～2007年3月
吉田 賢右	東京工業大学資源化学研究所	教授	2001年10月～2007年3月

(注) 所属と役職はさきがけ終了時点に記載

研究課題（研究者）の公募は平成13年度(2001年)から3年間にわたり、3度行い、総計23件の研究課題を採択した。表1-3に各期の研究課題、研究者ならびに所属機関と役職を示した。

表 1-3 各期の研究課題、研究者ならびに所属機関と役職 (2011年10月調査)

	研究課題	研究者	所属		
			さががけ採択時	さががけ終了時	調査時
1 期 (2001 年度) (10 名)	水和情報を取入れた蛋白質相互作用解析法の確立	伊倉貞吉	キリンビール探索研究所 博士研究員	東京医科歯科大学大学院 疾患生命科学研究部 助教授	東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究部 准教授
	oxidative protein folding に関わる細胞因子の構造・機能解明とその工学的利用	稲葉謙次	京都大学ウイルス研究所 博士研究員	科学技術振興機構 さががけ研究員	九州大学生体防御医学 研究所蛋白質化学分野 准教授
	2 重のプロスタグランジン合成酵素の構造解析と医薬品への応用	井上 豪	大阪大学大学院工学研究科 講師	大阪大学大学院工学研究科 助教授	大阪大学大学院工学研究科 教授
	たんぱく質の構造機能相関を利用した構造からの機能予測法	木下賢吾	横浜市立大学大学院総合 理学研究科 助手	東京大学医科学研究所 助教授	東北大学大学院 情報科学研究科 教授
	色素タンパク質による生体機能の時空間的な不活性化法の確立	永井健治	理化学研究所脳科学総合 研究センター 研究員	北海道大学電子科学研究科 教授	同左
	新規機能創成を目指した酵素蛋白質の立体構造・触媒機構の系統的解析	長野希美	産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 特別研究員	産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 研究員	産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 主任研究員
	2 光子励起法を用いた生体膜融合分子機能の顕微解析とシステム化	根本知己	岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 助手	同左	北海道大学大学院 情報科学研究科 教授
	機能性分子素子の構築を目指した脂質膜の物性に関する基礎的研究	早川枝李	NIH NIAAA/LMBB/SFS 博士研究員	同左	自治医科大学医学部 感染・免疫学講座 医動物学部門 助教
	癌・パーキンソン病の解明を目指したユビキ	水島恒裕	大阪大学蛋白質研究所	同左	兵庫県立大学生命理学研究科 教授

	チンリガーゼ複合体の結晶構造に関する基礎的研究		博士研究員		
	タンパク質機能の構造揺らぎの検出と制御	水谷泰久	神戸大学分子フォトサイエンス研究センター 助教授	同左	大阪大学大学院理学研究科 教授
2 期 (2002 年度) (8 名)	タンパク質選別輸送装置の人工膜小胞への再構成	佐藤健	理化学研究所中央研究所 研究員	同左	東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系 准教授
	生体光エネルギーの変換の分子構造—光化学系II複合体の構造と機能の解明及びその応用	沈建仁	理化学研究所播磨研究所 専任研究員	同左	岡山大学大学院自然科学研究科 教授
	蛋白質の「配列—構造—安定性」相関の系統的解析	高野和文	大阪大学大学院工学研究科 助手	同左	京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 教授
	シャペロニンの役割の解明による効率的なタンパク質折りたたみ法の確立	田口英樹	東京工業大学 資源化学研究所 助手	同左	東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授
	構造ゲノム科学およびプロテオミクスに基づく新規の遺伝暗号翻訳装置の同定と機能発現メカニズムの解明	濡木理	東京大学大学院理学系研究科 助教授	同左	東京大学大学院理学系研究科 教授
	蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の新規構造解析法の開発	芳坂貴弘	岡山大学工学部 助手	同左	北陸先端科学技術大学院大学 教授
	分子進化工学的手法による新規トポロジーを有する蛋白質の探索	松浦友亮	Universitat Zurich Biochemisches Institut Postdoctoral fellow	同左	大阪大学大学院工学研究科 准教授
	薬剤耐性化問題の克服を目指した多剤排出蛋白質の薬剤認識機構の解明とその応用	村上聡	大阪大学産業科学研究所 助手	同左	東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授
3 期 (2003 年度)	タンパク質オルガネラ移行と遺伝子発現の非侵襲的時空間解析法の確立	小澤岳昌	東京大学大学院 理学系研究科 講師	同左	東京大学大学院 理学系研究科 教授

(5名)	極低温電子線断層法によるセプチン系超分子構造体の解析	木下専	京都大学 先端領域融合医学研究機構 助教授	同左	名古屋大学理学部 生命理学科 教授
	蛋白質1個における局所的構造変化の可視化	西坂崇之	学習院大学理学部 助教授	同左	学習院大学理学部 教授
	ミクロな化学反応過程がもたらすマクロなタンパク質機能発現の分子物理	林重彦	京都大学 福井謙一記念研究センター 研究員	同左	京都大学大学院 理学研究科 准教授
	マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム	宮田真人	大阪市立大学大学院 理学研究科 助教授	同左	大阪市立大学大学院 理学研究科 教授

応募課題の採択にあたっては、「生体分子の形と機能」という領域の定義を広めに捉え、(i) 生体分子立体構造の仕組み解明、(ii) 立体構造に基づく機能発現の仕組み解明、(iii) バイオインフォマティクス手法による構造・機能予測、の3分野に適合する研究課題が各年度で採択された。

下表 1-4 に示すように、第1年目は、本領域の第1の柱として重要視したタンパク質の立体構造形成に関する研究課題が多く採択され、またバイオインフォマティクスの課題も2件採択された。2年目、3年目は第2の柱である機能発現の研究課題も重視して採択が行われた。

表 1-4 研究分野と年度別採択研究課題

研究分野	採択研究課題数		
	2001	2002	2003
生体分子（タンパク質）立体構造形成の仕組み解明	5	3	1
立体構造に基づく機能発現の仕組み解明	3	5	3
バイオインフォマティクス手法による構造機能予測	2	—	1

1.4 研究領域全体としての特筆すべき研究成果

本研究領域の特筆すべき研究成果のいくつかは、以下の通り、プレスリリースされた。

表 1-5 本研究領域におけるプレスリリース

研究者	発表時期	プレスリリース概要（掲載誌）
永井健治	2004年 7月	FRETを用いた細胞内カルシウム観測技術の向上（PNAS）
濡木 理	2004年 8月	鋳型非依存性RNAポリメラーゼの反応機構解明（Nature）
佐藤 健	2005年 1月	細胞内のタンパク質輸送メカニズムを解明（NSMB）
木下 専	2005年 2月	セプチンリングの機能の精子無力症関与解明（Dev. Cell）
宮田真人	2005年 8月	マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズムを解明（PNAS）
濡木 理	2006年 6月	生命誕生初期のタンパク質合成メカニズムを解明（Science）
濡木 理	2006年 7月	生体分子硫化反応の酵素触媒メカニズムを解明（Nature）
村上 聡	2006年 8月	多剤排出蛋白質の機能的回転メカニズムを解明（Nature）
濡木 理	2006年 9月	鋳型非依存性RNA合成の分子メカニズムを解明（Nature）
稲葉謙次/ 村上聡	2006年11月	蛋白質中のジスルフィド架橋創出の仕組みを解明（Cell）

この中で最初の永井健治の成果は、光増感物質を用いる生体機能不活性化の研究を進め、本来の目的には合わなかった蛍光タンパク質を、機能指示薬に展開し、従来品を大きく凌駕する蛍光指示薬を開発して国内外特許6件に結びつけた。特に2006年

度に入ってから、タンパク質の立体構造形成の仕組み解明の成果がScience、Nature、Cellの有力雑誌に次々掲載された。また、2期生の濡木理 (Snapshots of tRNA sulfuration via an adenylated intermediate, Nature, 442, 419-424 (2006)) と村上聡 (Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism, Nature, 443, 173-179 (2006)) および1期生の稲葉謙次 (Crystal structure of DsbA-DsbB Complex reveals a disulfide bond generation mechanism, Cell, 127, 789-801 (2006)) の研究はさきがけ研究期間を終了した後、引き続き研究を行った成果である。

第2章 研究領域終了から現在に至る状況

2.1 参加研究者全体の動向

参加研究者のほとんどが、さきがけ研究を発展させ新たな成果を創出している。木下専（SORST）、長野希美（BIRD）、濡木理（SORST）、松浦友亮（ERATO）、村上聡（CREST）、小澤岳昌（BBSRC）、西坂崇之（NEDO）などの研究者はその後も括弧内に示した JST 等の資金を獲得し、この領域の研究を発展させている。

2.1.1 研究者の職位の推移

職位は、研究成果の蓄積が社会から認められたことを確認する一つの指標であると考えられるため、研究者全員のさきがけ採択時、終了時及び調査時の職位の推移を図 2-1 に示した。大部分の研究者はさきがけ研究期間後に教授へと昇進し、独立した研究者として一人立ちを果たしている。

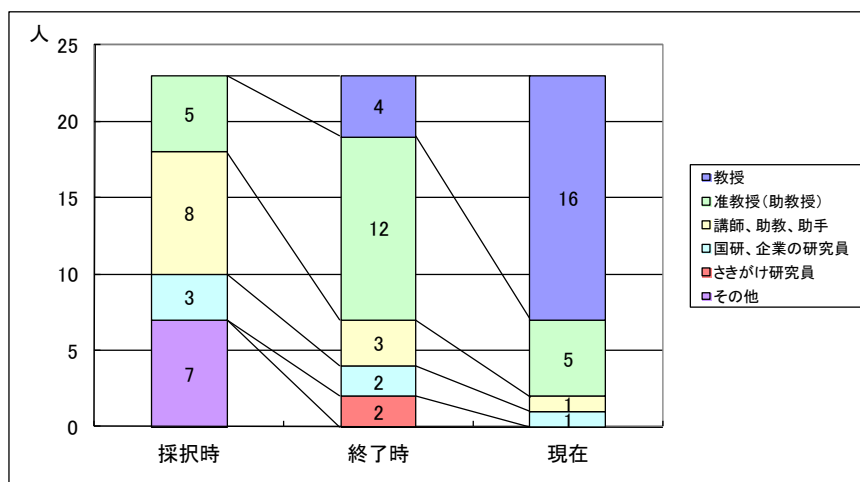


図 2-1 研究者のさきがけ採択時、終了時および調査時の職位の推移

2.1.2 原著論文の発表件数

表 2-1 研究者の論文数（原著論文）（2011年8月末検索 DB:SCOPUS）

期 (採択年度)	研究課題	研究者	①PJ開始 時からの 論文数	②PJ終 了後の論 文数	②/①
1 期生 (2001 年度)	水和情報を取入れた蛋白質相互作用解析法の確立	伊倉貞吉	9	7	77.8%
	oxidative protein folding に関わる細胞因子の構造・機能解明とその工学的利用	稲葉謙吉	14	12	85.7%
	2種のプロスタグランジン合成酵素の構造解析と医薬品への応用	井上豪	99	73	73.7%
	たんぱく質の構造機能相関を利用した構造からの機能予測法	木下賢吾	45	34	75.6%
	色素タンパク質による生体機能の時空間的な不活性化法の確立	永井健治	36	22	61.1%
	新規機能創製を目指した酵素蛋白質の立体構造・触媒機構の系統的解析	長野希美	7	7	100.0%
	2光子励起法を用いた生体膜融合分子機能の顕微解析とシステム化	根元知己	17	14	82.4%
	機能性分子素子の構築を目指した脂質膜の物性に関する基礎的研究	早川枝李	3	3	100.0%
	癌・パーキンソン病の解明を目指したユビキチンリガーゼ複合体の結晶構造に関する基礎的研究	水島恒裕	16	13	81.3%
	タンパク質機能の構造揺らぎの検出と制御	水谷泰久	22	18	81.8%
2 期生 (2002 年度)	タンパク質選別輸送装置の人工膜小胞への再構成	佐藤健	18	9	50.0%
	生体光エネルギー変換の分子機構—光化学系II複合体の構造と機能の解明及びその応用	沈建仁	27	14	51.9%
	蛋白質の「配列—構造—安定性」相関の系統的解析	高野和文	118	76	64.4%
	シャペロニンの役割の解明による効率的なタンパク質折りたたみ法の確立	田口英樹	49	33	67.3%
	構造ゲノム科学およびプロテオミクスに基づく新規の遺伝暗号翻訳装置の同定と機能発現メカニズムの解明	濡木理	77	56	72.7%
	蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の新規構造機能解析法の開発	芳坂貴弘	32	20	62.5%
	分子進化工学的手法による新規トポロジーを有する蛋白質の探索	松浦友亮	26	21	80.8%
	薬剤耐性化問題の克服を目指した多剤排出蛋白質の薬剤認識機構の解明とその応用	村上聡	45	33	73.3%
3 期生 (2003 年度)	タンパク質オルガネラ移行と遺伝子発現の非侵襲的時空間解析法の確立	小澤岳昌	29	18	62.1%
	極低温電子線断層法によるセプチン系超分子構造体の解析	木下専	19	13	68.4%
	蛋白質1個における局所的構造変化の可視化	西坂崇之	8	7	87.5%
	ミクロな化学反応過程がもたらすマクロなタンパク質機能発現の分子物理	林重彦	20	10	50.0%
	マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム	宮田真人	22	9	40.9%
全体			758	523	69.0%

註：②終了後から 2011 年までの原著論文数（1 期生は 7 年間、2 期生は 6 年間、3 期生は 5 年間の論文数）。

2.1.3 特許出願件数

各研究者の特許出願状況は表 2-2 に示したとおり、いずれの研究者も成果を特許出願している。国外出願の件数も多く成果の権利化を目指している。国際特許も出願されており国際的にも通用する研究成果であることを示している。登録された特許も多く、それをもとにベンチャー企業（株式会社創晶）を立ち上げた高野 和文、井上 豪、村上 聡がいる。

また、権利化状況を表 2-3 に示した。

表 2-2 特許出願状況

採択年度	研究者	日本出願(登録)	国際出願(登録)
2001 年度 (1 期生)	井上 豪	9(6)	3(3)
2001 年度 (1 期生)	木下賢吾	2(2)	0
2001 年度 (1 期生)	永井健治	5(4)	4(2)
2001 年度 (1 期生)	長野希美	1(0)	1
2002 年度 (2 期生)	高野和文	6(2)	2(1)
2002 年度 (2 期生)	田口英樹	3(0)	0
2002 年度 (2 期生)	濡木 理	1(0)	1
2002 年度 (2 期生)	芳坂貴弘	4(1)	1(1)
2002 年度 (2 期生)	松浦友亮	5(0)	0
2002 年度 (2 期生)	村上 聡	2(1)	1
2003 年度 (3 期生)	小澤岳昌	5(2)	5(2)
2003 年度 (3 期生)	西 崇之	5(2)	2

表 2-3 特許権利化状況(2011年8月末検索 DB:ATMS)

採択年度	研究者	出願番号	公開番号	特許番号	発明者 /考案者	出願人 /権利者	発明の名称	国際出願番号
2001年度 (1期生)	井上豪	特願2001-346035	特開 2003-144145	特許 004071477号 (2008.01.25)	井上 豪, 甲斐 泰, 裏出 良博, 岡野 洋介, 衣笠 茂浩, 松村 浩由, 入倉 大祐, 早石 修, 山本 雅貴, 熊坂 崇, 宮野 雅司	財)大阪バイオサイエ ンス研究所, JST	プロスタグランジ ンD合成酵素の3 次元立体構造及 びその使用	WO03042381 (A1) 2003-05-22(US7547532 (B2) 2009-06-16)
		特願2002-171569	特開 2004-002248	特許 004500483号 (2010.04.23)	井上 豪, 板井 昭子, 武藤 進, 裏出 良博, 甲斐 泰	JST	ヒト由来プロスタ グランジン合成 酵素阻害剤	-
		特願2002-214788	特開 2004-051600	特許 004550353号 (2010.07.16)	武藤 進, 板井 昭子, 井上 豪, 裏出 良博	(株)医薬分子 設計研究所, (財)大阪バイオ サイエンス研究所	造血管型プロス タグランジンD2 合成酵素阻害剤	-
		特願2002-350569	特開 2004-180565	特許 004257894号 (2009.02.13)	井上 豪, 岡野 洋介, クバタ ブルノ キルン ガ, 裏出 良博, 甲斐 泰	JST	プロスタグランジ ンF合成酵素の 結晶化と構造、 およびその利用	-
		特願2004-541270		特許 004395073 (2009.10.23)	板井 昭子, 武藤 進, 井上 豪, 裏出 良博	(株)医薬分子 設計研究所	キナゾリン-4- オン誘導体	WO2004031180 (A1) 2004-04-15(JP4395073 (B2) 2010-01-06, GB2410025 (B) 2007-03-28)

		特願2005-517109		特許 004459169号 (2010.02.19)	安達 宏昭, 森 勇介, 高野 和文, 井上 豪, 松村 浩由, 村上 聡	(株)創晶	温度調節装置およびそれを用いたタンパク質結晶化装置	WO2005068066 (A1) 2005-07-28 (JP4459169 (B2) 2010-04-28)
	木下賢吾	特願2002-365709	特開 2004-199288	特許 004401650号 (2009.11.06)	木下 賢吾	JST	データ処理装置、データ処理方法、データ処理プログラム及び記録媒体	-
		特願2003-279375	特開 2005-044235	特許 004532860号 (2010.06.18)	木下 賢吾	JST	三次元構造データベースから特定のリガンドが結合した生体高分子を検索する検索方法、検索装置、検索プログラム及び記録媒体	-
	永井健治	特願2002-357768	特開 2004-187544	特許 004214206号 (2008.11.14)	宮脇 敦史, 永井 健治	理研, JST	FRETを利用した蛍光指示薬	WO2004053499 (A1) 2004-06-24
		特願2003-135591	特開 2004-340663	特許 004014536号 (2007.09.21)	御厨 健太, 田名網 健雄, 関 直樹, 永井 健治, 宮脇 敦史	横河電機(株), JST, 理研	共焦点光スキャナ	US7283306 (B2) 2007-10-16(US2004262506 (A1) 2004-12-30), EP1494058 (A1) 2005-01-05
		特願2003-143932	特開 2004-347430	特許 004288571号 (2009.04.10)	永井 健治, 宮脇 敦史	JST, 理研	標的物質の生理的機能を解析する方法	WO2004104583 (A1) 2004-12-02 (US7553624 (B2) 2009-06-30)
		特願2004-330267	特開 2006-136271	特許 004557685号 (2010.07.30)	永井 健治, 宮脇 敦史	理研	蛍光蛋白質	WO2006051944 (A1) 2006-05-18

2002年度 (2期生)	高野和文	特願2002-341478	特開 2003-238300	特許 003893102号 (2006.12.15)	佐々木孝友, 森 勇介, 吉村 政志, 安達宏昭, 渡辺隆裕, 高野和文	JST	結晶育成法	-
		特願2005-501234		特許 004029987号 (2007.10.26)	佐々木 孝友, 森 勇介, 吉村 政志, 安達 宏昭, 増原 宏, 細川 陽一郎, 高野 和文	財)大阪産業 振興機構	結晶核の製造方 法および結晶化 条件スクリーニ ング方法	WO2004018744 (A1) 2004-03-04(US7247203 (B2) 2007-07-24, EP1559814 (B1) 2011-02-09, CN1317431 (C) 2007-05-23)
		特願2005-517109		特許 004459169号 (2010.02.19)	安達 宏昭, 森 勇介, 高野 和文, 井上 豪, 松村浩由, 村上 聡	株)創晶	温度調節装置お よびそれを用い たタンパク質結 晶化装置	WO2005068066 (A1) 2005-07-28
	芳坂貴弘	特願2004-522731		特許 004362106号 (2009.08.21)	芳坂 貴弘, 穴戸 昌彦	(株)プロテイン・エクス プレス, 芳坂 貴弘	標識化アミノアシ ルtRNA	WO2004009709 (A1) 2004-01-29(JP4362106 (B2) 2009-11-11, US7385038 (B2) 2008-06-10, EP1439210 (B1) 2007-09-05)
	村上 聡	特願2005-517109		特許 004459169号 (2010.02.19)	安達 宏昭, 森 勇介, 高野 和文, 井上 豪, 松村 浩由, 村上 聡	(株)創晶	温度調節装置お よびそれを用い たタンパク質結 晶化装置	WO2005068066 (A1) 2005-07-28
2003年度 (3期生)	小澤岳昌	特願2006-510829		特許 004628355号 (2010.11.19)	梅澤 喜夫, 小澤 岳昌	JST	蛋白質核内移行 検出用プローブ とそれを用いた 蛋白質核内移行 の検出・定量方 法	WO2005085439 (A1) 2005-09-15(CA2559299 (C) 2010-08-17)
		特願2008-548903		特許 004491516号 (2010.04.16)	梅澤 喜夫, 小澤 岳昌, 菅野 憲	東大, NINS	活性化プロテア ーゼインジケー ター	WO2008140060 (A1) 2008-11-20(JP4491516 (B2) 2010-06-30)

	西坂崇之	特願2002-302158	特開 2004-138735	特許 003671227号 (2005.04.28)	西坂 崇之	NICT	全反射型蛍光顕 微鏡および照明 光学系	-
		特願2005-101764	特開 2006-284243	特許 004448471号 (2010.01.29)	西坂 崇之	JST	高時間分解能画 像化方法及び装 置並びに全反射 型蛍光顕微鏡	-

2.1.4 研究者の受賞

さきがけ期間中には表 2-4 の受賞リスト、期間後は表 2-5 のリストに示した賞を受賞した。

(a) さきがけ期間中

表 2-4 受賞リスト (2011 年 8 月末検索)

受賞者名	賞の名称	授与者名	受賞日 (時期)
井上 豪、 高野 和文、 村上 聡 (創晶メンバー で受賞)	第5回バイオビジネスコンペJAPAN協賛企業特別賞	バイオビジネスコンペ実行委員会	2005年4月
井上 豪、 高野 和文、 村上 聡	2006年(第16回)「日経BP技術賞」大賞	日経BP社	2006年3月
井上 豪、 高野 和文、 村上 聡	第20回独創性を拓く先端技術大賞[企業・産学部門]特別賞	フジサンケイ ビジネスアイ社	2006年7月
高野 和文	2006年(第4回)産学官連携功労者表彰科学技術政策担当大臣賞	産学官連携推進会議	2006年6月
瀧木 理	手島工業教育資金団手島記念研究賞	手島工業教育資金団	2005年2月
芳坂 貴弘	日本化学会進歩賞	日本化学会	2003年3月
芳坂 貴弘	東京テクノ・フォーラム21ゴールドメダル	東京テクノフォーラム21、 読売新聞東京本社	2003年4月
芳坂 貴弘	第4回バイオビジネスコンペJAPAN最優秀賞	バイオビジネスコンペ実行委員会	2004年4月
村上 聡	国立大学法人大阪大学教育記念功績賞	大阪大学	2004年1月
小澤 岳昌	日本化学会進歩賞	日本化学会	2004年4月
小澤 岳昌	文部科学大臣表彰若手科学者賞	文部科学省	2005年4月

(2007 年 1 月 31 日現在)

(b)さきがけ期間後

表 2-5 受賞リスト

採択年度	受賞者名	賞の名称	授与機関	受賞年
1 期生 (2001 年 度)	稲葉 謙次	第7回 日本分子生物学会 三菱化学奨励賞	日本分子生物学会	2009
	稲葉 謙次	2009年度文部科学大臣表彰 若手科学者賞	文部科学賞	2009
	井上 豪	第15回日本結晶成長学会 技術賞	日本結晶成長学会	2008/11
	井上 豪	2008年度文部科学大臣表彰科学技術賞	文部科学賞	2008/4
	井上 豪	2008年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)	文部科学賞	2008/4
	井上 豪	第5回日本バイオベンチャー大賞大阪科学機 器協会賞	フジサンケイ ビジネスア イ	2007/10
	井上 豪	第16回「日経BP技術賞」大賞	日経BP社	2006
	根本 知己	第13回光設計賞光設計奨励賞	日本光学会	2010/10
	根本 知己	題38回内藤記念科学振興賞	内藤記念科学振興財団	2006
2 期生 (2002 年 度)	佐藤 健	第3回分子科学会優秀講演賞	第3回分子科学会	2009/9
	沈 建仁	第14回国際光合成学会優秀ポスター賞	14th International Congress on Photosynthesis, Glasgow, England.	2007/7
	濡木 理	2007年手島記念研究賞	手島工業教育資金団	2007
	濡木 理	2007年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)	文部科学賞	2007
	濡木 理	第5回 日本学術振興会賞	日本学術振興会	2008
	濡木 理	平成2009年度 持田記念学術賞	持田記念医学薬学振興 財団	2009
	濡木 理	第18回木原記念財団学術賞	木原記念 横浜生命科 学振興財団	2010
	濡木 理	第27回井上学術賞	井上科学振興財団	2010
	松浦 友亮	第14回 μ TAS Widmer Award Winner	The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences	2010/10
	松浦 友亮	平成2008年度 酵素工学研究会奨励賞	酵素工学研究会	2008/11
	村上 聡	2009年 東京農工大学研究学術賞	東京農工大学	2009
村上 聡	第1回日本ゲノム微生物学会 最優秀ポスター賞	日本ゲノム微生物学会	2007	
3 期生 (2003 年 度)	小澤 岳昌	第7回 日本学術振興会賞	日本学術振興会	2011/2
	宮田 真人	2010年 ルイスディーンズ賞	国際マイコプラズマ学会	2010
	宮田 真人	2007年度 小林六造記念賞	日本細菌学会	2007

2.1.5 研究者の研究助成金獲得状況

表 2-6 に示すように多くの研究者は継続的に助成金を獲得している。

研究者	研究費	研究テーマ名	'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07	'08	'09	'10	'11
水谷泰久			1期生			さきがけ期間後							
	科研費 基盤研究(B)	タンパク質内エネルギー散逸の時空間分解観測による機構解明											
	科研費 基盤研究(B)	タンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピング											
	科研費 特定領域研究	時間分解共鳴ラマン分光法によるタンパク質アロステリック機構の動的構造基盤の解明											
	科研費 基盤研究(B)	時間分解紫外共鳴ラマン分光法による光センサータンパク質の構造ダイナミクスの解明											
	科研費 基盤研究(B)	反応余剰エネルギー分布の定量測定による溶液内光反応メカニズムの解明											
科研費 奨励研究(A)→若手研究(B)	化学反応に関わる媒質としてのタンパク質の超高速構成ダイナミクス												

科研費	特別推進			
	特定領域			
	新学術領域			
	基盤(S)	基盤(A)	基盤(B)	
	若手(S)	若手(A)	若手(B)	
JST				
その他	NEDO、厚労省など国の競争的資金制度に採択されたもの			

	科研費
	JST
	NEDO
	その他

【2期生】

研究者	研究費	研究テーマ名	'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07	'08	'09	'10	'11
佐藤健			2期生			さきがけ期間後							
	科研費 特定領域研究	完全再構成系を用いた輸送小胞形成機構の解析											
	科研費 若手研究(A)	人工脂質平面膜を用いた輸送小胞形成のダイナミクス解析											
	科研費 特定領域研究	小胞体における輸送小胞形成とタンパク質選別機構の解析											
	科研費 若手研究(B)	プロテオソームを用いた輸送小胞形成機構の解析											
	科研費 若手研究(B)	小胞輸送におけるタンパク質選別・輸送小胞形成の再構成系の構築											
	科研費 特定領域研究	小胞輸送におけるタンパク質選別機構の解析											
科研費 奨励研究(A)→若手研究(B)	小胞輸送におけるタンパク質選別の分子機構												
沈建仁			2期生			さきがけ期間後							
	科研費 基盤研究(B)	結晶構造解析による光化学系II複合体の分子機構の解明											
高野和文			2期生			さきがけ期間後							
	科研費 若手研究(B)	新規リアルタイム変性巻き戻りプロテオリシス法によるタンパク質フォールディング研究											
	科研費 若手研究(B)	超好熱菌由来モデルタンパク質の熱力学的安定性解析											
	科研費 特定領域研究	蛋白質モデリング・デザイン評価システムの開発と応用											
	JST 産業技術研究助成事業(若手研究グラント)	医療器具洗浄・難分解産業廃棄物分解用の超安定・超強カプロテアーゼの実用化											
田口英樹			2期生			さきがけ期間後							
	科研費 特定領域研究	シャペロンの機能発現におけるプロセシビティ機構の解明											
	科研費 特定領域研究	酵母プリオンの伝播におけるAAAシャペロンHsp104の役割											
	科研費 特定領域研究	プリオンなどの構造多形と機能発現システムの再構築											
	科研費 特定領域研究	1分子・1細胞レベルでの酵母プリオンのダイナミクス観察											
	科研費 基盤研究(B)	酵母プリオンをモデルとしたプリオン伝搬機構の解明											
	科研費 特定領域研究	シャペロンGroELのダブルリング構造の役割とキネシンの類似性											
	科研費 特定領域研究	酵母プリオンの線維成長の実時間1分子イメージング											
	科研費 特定領域研究(A)→特定領域研究	X線結晶構造解析によるシャペロン・マシーナリーの作用機構解析											
	科研費 奨励研究(A)→若手研究(B)	酵母プリオンSup35の線維成長の実時間イメージング											
濡木理			2期生			さきがけ期間後							
	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	ほ乳類アミノアルルRNA合成酵素による自然炎症誘導の構造基盤											
	科研費 基盤研究(S)	膜輸送体による基質認識・輸送調節機構の構造基盤の解明											
	科研費 基盤研究(A)	金属トランスポーターによる基質認識と輸送制御の構造基盤											
	科研費 基盤研究(B)	リボヌクレオプロテインにおけるRNAの役割											
	科研費 特定領域研究	がん遺伝子産物の構造的ライフサイエンス											
	科研費 特定領域研究	X線結晶構造解析に基づく嗅覚・味覚・温覚レセプターの情報変換メカニズムの解明											
	科研費 特定領域研究	タンパク質に新たに見出された結び目構造のフォールディング機構の解明											
	科研費 特定領域研究(A)→特定領域研究	立体構造に基づく蛋白質合成マシーナリーの動作機構の解明											
	JST SORST	遺伝暗号翻訳装置の機能的統合および機能的分散の構造的基盤の解明											
JST グローバルCOEプログラム	生命時空間ネットワーク進化型教育研究拠点												
芳坂貴弘			2期生			さきがけ期間後							
	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	非天然アミノ酸の部位特異的導入技術を用いたタンパク質の揺らぎ解析											
	科研費 基盤研究(B)	蛍光標識アミノ酸の部位特異的導入によるタンパク質構造変化のFRET解析											
	科研費 若手研究(A)	遺伝暗号表の完全な書き換えと非天然タンパク質合成への応用											
	JST 重点地域研究開発推進プログラム(育成研究)	拡張遺伝暗号により修飾化アミノ酸を部位特異的に導入したタンパク質の発現技術の開発											
NEDO 産業技術研究助成事業(若手研究グラント) バイオテクノロジー分野	遺伝コードの拡張による部位特異的変異導入のための新技術の開発												

研究者	研究費	研究テーマ名												
			'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07	'08	'09	'10	'11	
松浦友亮						2期生					さきがけ期間後			
	科研費 特定領域研究	リボソーム内における生化学反応の検出及びその解析												
	JST ERATO	四方動的微小反応場プロジェクト												
村上聡						2期生					さきがけ期間後			
	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム (ライフ・イノベーション)	多剤耐性化の克服を目指した薬剤排出トランスポーターの構造機能解析												
	科研費 基盤研究(A)	RND型トランスポーターの結晶構造に基づく機能解析												
	科研費 若手研究(B)	多剤排出トランスポーター群の内因性基質の解析												
	JST CREST	生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術「異物排出トランスポーターの構造機能解析」												

科研費	特別推進			
	特定領域			
	新学術領域			
	基盤(S)	基盤(A)	基盤(B)	
	若手(S)	若手(A)	若手(B)	
JST				
その他	NEDO、厚労省など国の競争的資金制度に採択されたもの			

	科研費
	JST
	NEDO
	その他

【3期生】

研究者	研究費	研究テーマ名	'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07	'08	'09	'10	'11
小澤岳昌					3期生			さきがけ期間後					
	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	分割蛍光タンパク質再構成法を用いた生理機能イメージング技術の開発											
	科研費 若手研究(S)	タンパク質化学に立脚した革新的生細胞内分子分析法の創製											
	科研費 特定領域研究	タンパク質立体構造情報に基づく発光プローブの開発											
	科研費 基盤研究(B)	生体内情報伝達分子の可視化検出法に関する研究											
	科研費 特定領域研究	タンパク質立体構造情報に基づく生物発光プローブの開発											
	科研費 若手研究(A)	プロテインスプライシング反応を利用した機能性プローブ分子の開発と応用											
	JST 戦略的国際科学技術協力推進事業 (BBSRC)												
	JST A-STEP「本格研究開発ステージハイリス」スク挑戦タイプ	高S/N型細胞内イベント検出システムの構築											
NEDO 産業技術研究助成事業(若手研究 Grant)革新的融合	低侵襲的生体分子イメージングに向けた生物発光プローブの開発												
木下尊					3期生			さきがけ期間後					
	科研費 基盤研究(B)	遺伝子改変マウスを用いた哺乳類セブチン系の生理機能の探索と解析											
	科研費 特定領域研究	ブルキンエ細胞およびバーグマングリア特異的Sept7欠損マウスの解析											
	科研費 特定領域研究	膜骨格系による膜輸送複合体の安定化機構											
	科研費 基盤研究(B)	細胞表層におけるセブチン重合・脱重合機構の解析											
	科研費 特定領域研究	パーキンソン病におけるセブチンスカフォールドの破綻とドパミンニューロンの障害											
	科研費 基盤研究(B)	セブチン重合・脱重合機構の探索と解析											
	科研費 特定領域研究	脳特異的Sept7欠損マウスを用いた神経系セブチンスカフォールドの機能解析											
	科研費 特定領域研究	「がん抑制遺伝子」Sept4遺伝子破壊マウスの解析											
	科研費 特定領域研究	小脳バーグマングリア終末足に集積するセブチン系細胞骨格の機能解析											
	科研費 特定領域研究	セブチン系細胞骨格と脂質2重膜との相互作用の解析											
	JST 平成21年度シーズ発掘試験A(発掘型)	トランスジェニック動物マーカーの開発と応用											
	JST 平成17年度シーズ発掘試験	早発性神経変性性障害のトランスジェニック動物モデルの開発と応用											
西坂崇之					3期生			さきがけ期間後					
	内閣府 最先端・次世代研究開発支援プログラム (ライフ・イノベーション)	医療への応用を目指した高解像3次元ナノマニピュレーション技術の開発											
	科研費 特定領域研究	3次元を検出する新しい原理の光学顕微鏡で解明する膜超分子モーターの作動原理											
	科研費 若手研究A	ミリ秒の高時間分解能を持つ新しい蛍光顕微鏡系の開発											
NEDO	細菌の運動を3次元で追跡できる医療への応用を目指した新しい光学顕微鏡の開発												

研究者	研究費	研究テーマ名											
			'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07	'08	'09	'10	'11
林重彦						3期生		さきがけ期間後					
	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	タンパク質機能におけるpKa制御の分子機構											
	科研費 基盤研究(B)	タンパク質機能発現の分子機構に関する理論的研究											
	科研費 特定領域研究	分子シミュレーションによるF ₁ 分子モーターの化学—力学エネルギー変換機構の解											
宮田真人						3期生		さきがけ期間後					
	科研費 基盤研究(A)	マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム											
	科研費 特定領域研究	マイコプラズマ滑走の足の動きの検出											
	科研費 特定領域研究	マイコプラズマ滑走運動の再構成											
	科研費 特定領域研究	マイコプラズマ滑走運動装置の構造と変化											
	科研費 基盤研究(A)	マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム											
	科研費 特定領域研究	ゲノム情報を用いた、マイコプラズマの滑走と細胞構築に関する構造の統合的理解											
	科研費 特定領域研究	マイコプラズマ滑走と接着の分子メカニズム											
	科研費 特定領域研究	マイコプラズマ細胞中に局在するタンパク質の網羅的探索											

科研費	特別推進		
	特定領域		
	新学術領域		
	基盤(S)	基盤(A)	基盤(B)
	若手(S)	若手(A)	若手(B)
JST			
その他	NEDO、厚労省など国の競争的資金制度に採択されたもの		

	科研費
	JST
	NEDO
	その他

2.2 参加研究者の研究成果の発展状況

以下に個別の研究者について、さがけ期間中の業績の概要と終了後の業績の発展状況について詳述した。期間中の業績については対応する論文を脚注に示し、終了後の業績については業績に対応する論文を主要論文として掲げた。主要論文は引用数の多いものを優先して掲げたが、最近の研究状況を示す文献についても注目されるものを挙げた。

2.2.1 第1期生（10名）

(1) 伊倉貞吉（水和情報を取入れた蛋白質相互作用解析法の確立）

(a) さがけ期間中の主な研究成果

大腸菌のシャペロニンである GroEL が硫安存在下で再折りたたみをし、それが天然のものと同じ構造であることを X 線回折で証明した。シャペロニン蛋白のペプチド配列が天然のタンパク質と同様な折りたたみを起こす性質を持つことを証明した⁽¹⁾。タンパク質相互作用への水和の影響について雄性不稔誘導酵素とそれを回復する酵素の相互作用をプラスモン共鳴と X 線結晶解析で検討した結果、水を介した間接的相互作用を証明した⁽²⁾。

(b) さがけ終了後の発展状況

①さがけ終了後の研究としてラットのビタミン D の受容体へのビタミン D 類似体の結合様式を研究した。②各種ビタミン D 誘導体の結合を検討の結果、水分子網により、その結合が堅固になることを見出した。③また FK-506 結合タンパク質 PPIase の研究から酵素活性発現に結合部位の穴の大きさが重要であることを見出した。水分子を介する結合についてさらに追及し、成果を上げている。科研費・特定領域研究費により研究が行われている。

(c) 主な論文

① Nakabayashi, M., Yamada, S., Yoshimoto, N., Tanaka, T., Igarashi, M., Ikura, T., Ito, N., Makishima, M., Tokiwa, H., DeLuca, H.F., Shimizu, M. "Crystal structures of rat vitamin D receptor bound to adamantyl vitamin D analogs: Structural basis for vitamin D receptor antagonism and partial agonism" *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (17), pp. 5320-5329 (2008). Cited 13 times

② Shimizu, M., Miyamoto, Y., Takaku, H., Matsuo, M., Nakabayashi, M., Masuno, H., Udagawa,

¹ Arai, M., Inobe, T., Maki, K., Ikura, T., Kihara, H., Amemiya, Y., Kuwajima, K.

"Denaturation and reassembly of chaperonin GroEL studied by solution X-ray scattering" *Protein Science*, 12 (4), pp. 672-680 (2003). Cited 5 times.

² Ikura, T., Urakubo, Y., Ito, N. "Water-mediated interaction at a protein-protein Interface". *Chemical Physics*, 307, 111-119 (2004) Cited 16 times

N., DeLuca, H.F., Ikura, T., Ito, N.

2-Substituted-16-ene-22-thia-1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-19-norvitamin D3 analogs: Synthesis, biological evaluation, and crystal structure" *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16 (14), pp. 6949-6964(2008). Cited 10 times

③ Ikura, T., Kinoshita, K., Ito, N. "A cavity with an appropriate size is the basis of the PPIase activity" *Protein Engineering, Design and Selection*, 21 (2), pp. 83-89(2008). Cited 9 times.

(2) 稲葉謙次 (oxidative protein folding に関わる細胞因子の構造・機能解明とその工学的利用)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

大腸菌のタンパク質ジスルフィド結合導入システムの反応機構解明に関してその還元酵素 DsbB と DsbA の酸化の詳細を研究し、酸化還元電位の測定により解明した^(3,4)。光吸収からの分析でも DsbB と DsbA の相互作用を測定した⁽⁵⁾。結晶構造解析については期間中に結晶を得られず。引き続き研究を続行した結果、2期生の村上聡研究者の領域内研究協力により良質の結晶が得られ、2006年度になってタンパク質中のジスルフィド架橋創出の仕組みを解明し *Cell* 誌に成果が掲載された。

(b) さきがけ終了後の発展状況

① DsbB によるジスルフィド結合の詳細を解明する研究を続けるとともに、② DsbB と DsbA の複合体の結晶構造を研究し、ジスルフィド結合形成の詳細を明らかにしている。③ タンパク質ジスルフィドイソメラーゼの研究から蛋白折り畳みの仕組みの解明に挑戦している。

第7回 日本分子生物学会 三菱化学奨励賞(2009年)、文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2009年)などの賞を受けている。科研費により研究が行われている。

(c) 主な論文

① Kenji Inaba, Yoh-hei Takahashi, Koreaki Ito and Shigehiko Hayashi, "Critical Role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in de novo disulfide bond generation by DsbB", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 287-292 (2005) cited 23 times

② Inaba, K., Murakami, S., Suzuki, M., Nakagawa, A., Yamashita, E., Okada, K., Ito, K. "Crystal Structure of the DsbB-DsbA Complex Reveals a Mechanism of Disulfide Bond Generation" *Cell*, 127 (4), pp. 789-801(2006) Cited 80 times.

³ Kenji Inaba and Koreaki Ito, "Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade", *EMBO J*, 21, 2646-2654, (2002)

⁴ Takahashi, Y.-H., Inaba, K., Ito, K. "Characterization of the menaquinone-dependent disulfide bond formation pathway of *Escherichia coli*" *J Biol Chem*, 279 (45), pp. 47057-47065(2004). Cited 17 times.

⁵ Kenji Inaba, Yoh-hei Takahashi and Koreaki Ito, "DsbB elicits a red-shift of bound ubiquinone during the catalysis of DsbA oxidation" *J. Biol Chem.*, 279, 6761-6768, (2004)

③Inaba, K., Murakami, S., Nakagawa, A., Iida, H., Kinjo, M., Ito, K., Suzuki, M. "Dynamic nature of disulphide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB" *EMBO Journal*, 28 (6), pp. 779-791(2009) Cited 15 times.

(3)井上豪 (2種のプロスタグランジン合成酵素の構造解析と医薬品への応用)

(a)さきがけ期間中の主な研究成果

①ヒト由来で血液増加作用のあるプロスタグランジンD合成酵素の結晶構造を高分解能で構造解析に成功し、酵素の金属イオンによる活性化の仕組みを発見し、金属イオン効果を構造化学的に解明した⁽⁶⁾。②プロスタグランジンDおよびプロスタグランジンF合成酵素と阻害剤の複合体の結晶構造から阻害薬の開発に向けた研究成果をあげた⁽⁷⁾。③また結晶化方法について研究する⁽⁸⁾とともに、連携組織を結成し、新しい分子の結晶構造解析を効率的におこなう研究の仕組みを構築した。これらの成果は創薬つながる成果としていくつかの賞を獲得した(表2-4参照)。③それを応用し、各種酵素の構造解析を行った⁽⁹⁾。

(b)さきがけ終了後の発展状況

①さきがけ研究初期に受賞したバイオビジネス大賞などの方向を受け継ぎ創薬につながる結晶構造解析を継続している。例えば、プロスタグランジンD2合成酵素と経口投与可能な阻害薬HQL-79との複合体の結晶の構造解析からHQL-79がプロスタグランジンD2合成酵素を競合的に阻害することを見出し、ぜんそくモデルで有効性を証明した。②超音波照射による迅速な結晶成長手法を開発し、大きな結晶を得ることはタンパク質結晶構造学では非常に重要な研究であるが、井上グループは多くの方法を開発した。③さらにそれを発展させるとともに、④改良を加えている。また改良した結晶化法を活用し、各種重要酵素の結晶構造を解明している。

文献数は多いが結晶化法の論文は引用が少ない。レーザー応用結晶化法を使ったタンパク質の構造や活性発現機序などの研究の文献は引用されているが引用回数は多くない。

第15回日本結晶成長学会 技術賞(2008年)、文部科学大臣表彰科学技術賞 文部科学賞(2008年) "科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)(2008年) 第5回日本バイオベンチャー大賞大阪科学機器協会賞(2007年)、第16回「日経BP技術賞」大賞(2006

⁶ T. Inoue, D. Irikura, N. Okazaki, S. Kinugasa, H. Matsumura, N. Uodome, M. Yamamoto, T. Kumasaka, M. Miyano, Y. Kai and Y. Urade, "Mechanism of metal activation of human hematopoietic prostaglandin D synthase" *Nat. Struct. Biol.*, 10, 291-296 (2003)

⁷ T. Inoue, Y. Okano, Y. Kado, K. Aritake, D. Irikura, N. Uodome, N. Okazaki, S. Kinugasa, H. Shishitani, H. Matsumura, Y. Kai & Y. Urade. "The First Determination of the Inhibitor Complex Structure of Human Hematopoietic Prostaglandin D Synthase," *J. Biochem.*, 135, 279-283 (2004)

⁸ Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Youichiro Hosokawa, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Hiroyoshi Matsumura, Masashi Yoshimura, Yasuo Tsunaka, Masaaki Morikawa, Shigenori Kanaya, Hiroshi Masuhara, Yasushi Kai, and Takamoto Sasaki "Laser irradiated growth of protein crystal." *Jpn. J. Appl. Phys.*, 42(2-7B), L798-L800 (2003)

⁹ K. B. Kilunga, T. Inoue, Y. Okano, Z. Kabututu, S. K. Martin, M. Lazarus, M. Duzsenko, Y. Sumii, Y. Kusakari, H. Matsumura, Y. Kai, S. Sugiyama, K. Inaka, T. Inui & Y. Urade "Structural and Mutational analysis of Trypanosoma brucei prostaglandin H2 reductase provides insight into the catalytic mechanism of aldo-ketoreductases" *J. Biol. Chem.*, 280, 26371-26382 (2005)

年) などの受賞をしている。科研費・基盤研究および特定領域研究費により研究されている。

(c) 主な論文

- ① Kosuke Aritake, Yuji Kado, Tsuyoshi Inoue, Masashi Miyano and Yoshihiro Urade, "Structural and Functional Characterization of HQL-79, an Orally Selective Inhibitor for Human Hematopoietic Prostaglandin D Synthesis" *J. Biol. Chem.*, 281, 15277-15286 (2006) cited 31 times
- ② Kakinouchi, K., Adachi, H., Matsumura, H., Inoue, T., Murakami, S., Mori, Y., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S. "Effect of ultrasonic irradiation on protein crystallization" *Journal of Crystal Growth*, 292 (2), pp. 437-440(2006) Cited 8 times.
- ③ Noriko Shimizu, Shigeru Sugiyama, Mihoko Maruyama, Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoshinori Takahashi, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Hiroyoshi Matsumura and Yusuke Mori "Growth of large protein crystals by top-seeded solution growth together with floating and aolution-stirring technique" *Cryst. Growth Des*, 9, 5227-5232 (2009) cited 6 times
- ④ Matsumura, H., Sugiyama, S., Hirose, M., Kakinouchi, K., Maruyama, M., Murai, R., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Mori, Y., Inoue, T. "Approach for growth of high-quality and large protein crystals" *Journal of Synchrotron Radiation*, 18 (1), pp. 16-19(2011). Cited 1 time.

(4) 木下賢吾 (たんぱく質の構造機能相関を利用した構造からの機能予測法)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

① 構造機能予測ソフト開発研究分野において、タンパク質立体構造情報から機能予測する手法の開発を進め、分子表面およびその表面上の静電ポテンシャルの類似性を利用して機能未知タンパク質の機能を予測する機能部位データベース (eF-site) 開発に成功した^(10, 11, 12, 13)。このデータベースは国内外で高く評価され、日経サイエンスや Protein Data Bank でも取り上げられ、本領域にバイオインフォマティクス研究も取り入れたいという当初の狙いが達成できた。

(b) さきがけ終了後の発展状況

① 開発したデータベース eF-seek を発展させ表面電位と形状からタンパク質の活性部位を予

¹⁰ Kinoshita K, Furui J, and Nakamura H. "Identification of Protein Functions from a Molecular Surface Database eF-site" *J. Struct. Funct. Genomics*, 2, 9-22. (2002) cited 67 times

¹¹ Kinoshita K and Nakamura H. " Identification of protein biochemical functions by similarity search using the molecular surface database, eF-site" *Protein Science*, 12, 1589-1595 (2003) Cited 67 times

¹² Ota M, Kinoshita K and Nishikawa K " Prediction of catalytic residues in enzymes based on known tertiary structure, stability profile, and sequence conservation" *J Mol Biol*, 327, 1053-1064 (2003) cited 52 times

¹³ Kinoshita, K and Nakamura, H. " Identification of the ligand binding sites on the molecular surface of proteins" *Protein Science*, 14, 711-718 (2005)

測する研究を続けている。開発したデータベースの更新の続けている。②その応用によるタンパク質の無秩序部分の予測方法も開発した。③共発現した遺伝子の相関からその意義の解釈などバイオインフォマティック的アプローチの研究を継続している。

これらの研究は SORST・2004 年度採択「立体構造情報を利用したタンパク質間相互作用様式の予測法の開発」に発展している。科研費・特定領域研究費により研究されている。

(c) 主な論文

① Kinoshita, K., Murakami, Y., Nakamura, H. "eF-seek: prediction of the functional sites of proteins by searching for similar electrostatic potential and molecular surface shape" *Nucleic acids research*, 35 (Web Server issue), pp. W398-402(2007) Cited 13 times.

② Ishida, T., Kinoshita, K. "Prediction of disordered regions in proteins based on the meta approach" *Bioinformatics*, 24 (11), pp. 1344-1348(2008) Cited 33 times.

③ Obayashi, T., Kinoshita, K. "Rank of correlation coefficient as a comparable measure for biological significance of gene coexpression" *DNA Research*, 16 (5), pp. 249-260(2009) Cited 13 times.

(5) 永井健治 (課題名: 色素タンパク質による生体機能の時空間的な不活性化法の確立)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

① 光増感物質を用いる生体機能不活性化研究を進めたが、本来の目的とは異なる機能指示薬に展開し、従来品を大きく凌駕する GFP の改良蛍光指示薬である YFP を開発して細胞内粒子でその実用性を確認した^(14, 15)。国内外特許 6 件を取得した。② それを応用し、シナプスにおける F アクチンと G アクチンの刺激に対する平衡状態の制御機構を解明した⁽¹⁶⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

① さきがけで開発した手法を用いて細胞内 Ca イオンと DNA の形の多様性、② カスパーゼ活性化機構、③ 細胞周期と nestin 発現の関連性の研究、④ 細胞内 Ca イオン濃度の推移、⑤ 細胞内 ATP 濃度の推移、などの細胞内に起こる現象をを視覚化し、細胞内物質の変化の解明を進めている。

¹⁴Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., Miyawaki, A. "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications" *Nature Biotechnology*, 20 (1), pp. 87-90(2002) Cited 922 times.

¹⁵Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M & Miyawaki A, "Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10554-10559 (2004) Cited 246 times

¹⁶ Okamoto K., Nagai T., Miyawaki A. & Hashi Y., "Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity" *Nature Neuroscience*, 7, 1104-1112 (2004) Cited 239 times

JST さきがけ（5年型）「ナノサイズ高輝度バイオ光源の開発と生命機能計測への応用」
として研究が発展している。科研費・特定領域研究、新学術領域研究により研究されてい
る。

(c) 主な論文

① Kazuno, A.-A., Munakata, K., Nagai, T., Shimozone, S., Tanaka, M., Yoneda, M., Kato, N.,
Miyawaki, A., Kato, T. "Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter
mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics" *PLoS Genetics*, 2 (8), pp.
1167-1177(2006) Cited 34 times.

② Takemoto, K., Kuranaga, E., Tonoki, A., Nagai, T., Miyawaki, A., Miura, M. "Local
initiation of caspase activation in *Drosophila* salivary gland programmed cell death in
vivo" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,
104 (33), pp. 13367-13372(2007) Cited 16 times.

③ Sunabori, T., Tokunaga, A., Nagai, T., Sawamoto, K., Okabe, M., Miyawaki, A.,
Matsuzaki, Y., Miyata, T., Okano, H. "Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with
morphological changes in embryonic cortical neural progenitors" *Journal of Cell Science*,
121 (8), pp. 1204-1212(2008) Cited 16 times.

④ Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A., Shoji,
T., Kubo, K., Isogai, A., Takayama, S. "Fine-Tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is
essential for pollen tube growth" *Plant Physiology*, 150 (3), pp. 1322-1334(2009) Cited 15
times.

⑤ Imamura, H., Huynh Nhat, K.P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai,
T., Noji, H. "Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence
resonance energy transfer-based genetically encoded indicators" *Proceedings of the
National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (37), pp. 15651-15656
(2009) Cited 25 times.

(6) 長野希美（新規機能創製を目指した酵素タンパク質の立体構造・触媒機構の系統的解析）

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

タンパク質の機能に関する比較方法に着目し、酵素触媒機構の分類データベースや表示シス
テムという研究ツールを作成し公開した⁽¹⁷⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

¹⁷ Nozomi Nagano, C.A. Orengo, J. Thorton, "EzCatDB: The Enzyme Catalytic Mechanism Database"
Nucleic Acids Research, 33 Database Issue, D407-D412 (2005) Cited 33 times

①加水分解酵素と転移酵素の触媒機序をその構造から分析し、その機序をいくつかの反応に分類した。②活性部位と結合部位に含まれる機能情報と構造情報の関連を調べるためにアルドラーゼなどのスーパーファミリー酵素7個について詳細を解析した。③クラスター分析などを行い活性部位のこれらの酵素群の機能多様性の理由を明らかにした。④活性部位の同定や比較する手法を開発し、その形成過程などを論じている。しかし、発表論文は少なく、引用数も少ない。

2007年度 JST BIRD の「酵素反応分類に基づく酵素反応予測システムの開発」にこの研究に用いたバイオインフォマティク技術を展開している。科研費・基盤研究費により研究されている。

(c)主な論文

①Nagano, N., Noguchi, T., Akiyama, Y. "Systematic comparison of catalytic mechanisms of hydrolysis and transfer reactions classified in the EzCatDB database" *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 66 (1), pp. 147-159(2007) Cited 6 times.

②Nagao, C., Nagano, N., Mizuguchi, K. "Relationships between functional subclasses and information contained in active-site and ligand-binding residues in diverse superfamilies", *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78 (10), pp. 2369-2384(2010) Cited 2 times.

(7) 根元知己 (2光子励起法を用いた生体膜融合分子機能の顕微解析とシステム化)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

①機能発現機序の研究分野において、2光子励起を用いた顕微鏡による可視化解析技術を開発し、インシュリンの粒子の分泌機序をナノメートルのオーダーで明らかにした。この技術を生体分子機能発現機構研究に応用して、「逐次開口放出」分泌機構の可視化を世界にさきがけて実現した⁽¹⁸⁾。②膵臓の分泌機構とミトコンドリア遺伝子の異常による糖尿病との関連を研究し、インスリン分泌の障害に結びつく機序を解明した⁽¹⁹⁾。③膵臓の腺房細胞における開口分泌の推移についても Ca イオンとの関連を含めて2光子励起顕微鏡で観察している⁽²⁰⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

①粘液分泌の研究に展開するとともに、②膵臓におけるインスリンの開口分泌の研究につい

¹⁸ Norkiko Takahashi, Takuya Kishimoto, Tomomi Nemoto, Takashi Kadowaki, Haruo Kasai, "Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet", *Science*, 297, 1349-52 (2002) cited 117 times

¹⁹ Noda, M., Yamashita, S., Takahashi, N., Eto, K., Shen, L.-M., Izumi, K., Daniel, S., Tsubamoto, Y., Nemoto, T., Iino, M., Kasai, H., Sharp, G.W.G., Kadowaki, T. "Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the β -cell model of mitochondrial diabetes: Characteristics of BHC9 cells deficient in mitochondrial DNA transcription" *Journal of Biological Chemistry*, 277 (44), pp. 41817-41826(2002) Cited 36 times.

²⁰ Tomomi Nemoto, Tatsuya Kojima, Akihiro Oshima, Haruhiko Bito and Haruo Kasai, "Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini", *J. Biol. Chem.*, 279, 37544-37550 (2004) cited 54 times

でも研究を続けている。③培養神経細胞など開口分泌のさまざまな形態の詳細な過程の研究に発展させている。④神経細胞のニューロトロピックファクターの分泌機序解明の研究を行ない、分泌機序の本質を解明すると同時に疾患への応用を構想している。

第13回光設計賞光設計奨励賞（2010年）、内藤記念科学振興賞（2006年）を受賞している。公的研究費に基づかず研究している。

(c) 主な論文

① Akihiro Oshima, Tatsuya Kojima, Kenji Dejima, Yasuo Hisa, Haruo Kasai, and Tomomi Nemoto “Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands”, *Cell Calcium*, 37, 349-357 (2005) cited 12 times

② Hatakeyama, H., Kishimoto, T., Nemoto, T., Kasai, H., Takahashi, N. “Rapid glucose sensing by protein kinase A for insulin exocytosis in mouse pancreatic islets” *Journal of Physiology*, 570 (2), pp. 271-282(2006) Cited 25 times.

③ Ting-Ting Liu, T. Kishimoto, H. Hatakeyama, T. Nemoto, N. Takahashi, H. Kasai, “Exocytosis and endocytosis of small vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis”, *J. Physiol.*, 570, 271-282 (2006) cited 20 times

④ Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., Poo, M.-M. “Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite” *Journal of Neuroscience*, 29 (45), pp. 14185-14198(2009) Cited 19 times.

(8) 早川枝李（機能性分子素子の構築を目指した脂質膜の物性に関する基礎的研究）

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

① 脂質の機能に着目し、対象の結核菌宿主細胞の脂質膜物性や脂質分子の形と結核菌生存機構の関係解明を目指した。結核菌由来の脂質が膜ドメイン構造を変化させ融合阻害を起こし生存するという仮説の端緒をモデル的に得た⁽²¹⁾。期間中の論文と思われるものが2007年に発表されているが、米国留学など異動が多く論文発表が遅れたと思われる。

(b) さきがけ期間後の主な研究成果

① 実験材料をヘモグロビンに移し、その膜分子組成により膜の構造が変化していることを解明した。② 蛍光による hERG 蛋白の構造の推定から疾患を予知することが可能となり、診断に応用可能なことを示した。膜の構造から hERG 蛋白の構造研究に転進したようであるが、十分な研

²¹ Hayakawa, E., Tokumasu, F., Nardone, G.A., Jin, A.J., Hackley, V.A., Dvorak, J.A. “A Mycobacterium tuberculosis-derived lipid inhibits membrane fusion by modulating lipid membrane domains” *Biophysical Journal*, 93 (11), pp. 4018-4030(2007) Cited 8 times.

究環境にないためか論文の数は少ない。公的研究費の補助は受けていない。

(c)主な論文

①Tokumasu, F., Nardone, G.A., Ostera, G.R., Fairhurst, R.M., Beaudry, S.D., Hayakawa, E., Dvorak, J.A. "Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin C erythrocytes" PLoS ONE, 4 (6), art. no. e5828(2009) Cited 4 times.

②Hayakawa EH, Furutani M, Matsuoka R, Takakuwa Y. "Comparison of protein behavior between wild-type and G601S hERG in living cells by fluorescence correlation spectroscopy." J Physiol Sci. Jul;61(4):313-9 (2011) no Citation information

(9) 水島恒裕 (癌・パーキンソン病の解明を目指したユビキチンリガーゼ複合体の結晶構造に関する基礎的研究)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

①立体構造研究分野において、糖鎖を目印として折りたたみ異常タンパク質にユビキチンを付加する新規なユビキチンリガーゼ複合体の糖鎖認識領域の構造決定に成功し、糖鎖認識機構を明らかにした。直接、タンパク質の構造を決定して機能発現の仕組みを明らかにした⁽²²⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

①牛心のチトクロームC酸化酵素における13種の脂質は酸素移送機構に重要な構造上の役割をしていることを解明。②不要タンパク質の分解排除に関与するユビキチンリガーゼ複合体は糖タンパク質のユビキチン化する酵素であるが、マンノースを多く含有するオリゴサッカライドを認識する Fbs1/Fbs2 分子の結晶構造を解析し、マンノースの認識部位を同定した。③自食に関与する p62 の LC3 複合体結晶の解析から相互作用部位を同定し、細胞内 p62 量が自食を制御していることを明らかにした。④タンパク質分解経路の non-ATPase サブユニットである Rpn のうち酵母の Rpn14 の結晶解析から 26S プロテアソームの構成粒子である 19s 制御粒子 (19sRp) の会合に必要な Rpn14 と Rpt6 の構造を解明した。科研費・特定領域研究費で研究している。

(c)主な論文

①Shinzawa-Itoh, K., Aoyama, H., Muramoto, K., Terada, H., Kurauchi, T., Tadehara, Y.,

²² Mizushima T, Hirao T, Yoshida Y, Lee S J, Chiba T, Iwai K, Yamaguchi Y, Kato K, Tsukihara T, Tanaka K, "Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase" Nat Struct Mol Biol. 11, 365-370 (2004)

Yamasaki, A., Sugimura, T.,Kuronon, S., Tsujimoto, K., Mizushima, T., Yamashita, E., Tsukihara, T., Yoshikawa, S."Structures and physiological roles of 13 integral lipids of bovine heart cytochrome c oxidase"EMBO Journal, 26 (6), pp. 1713-1725(2007). Cited 55 times.

②Mizushima, T., Yoshida, Y., Kumanomidou, T., Hasegawa, Y., Suzuki, A., Yamane, T., Tanaka, K."Structural basis for the selection of glycosylated substrates by SCF Fbs1 ubiquitin ligase" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104 (14), pp. 5777-5781 (2007) Cited 22 times.

③Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y.-S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka,K., Komatsu, M."Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy" Journal of Biological Chemistry, 283 (33), pp. 22847-22857(2008) Cited 90 times.

④Kim, S., Saeki, Y., Fukunaga, K., Suzuki, A., Takagi, K., Yamane, T., Tanaka, K., Mizushima, T., Kato, K."Crystal structure of yeast Rpn14, a chaperone of the 19 S regulatory particle of the proteasome" Journal of Biological Chemistry, 285 (20), pp. 15159-15166(2010) no citaton

(10) 水谷泰久（タンパク質機能の構造揺らぎの検出と制御）

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

①独自の工夫を重ね、高感度観測を可能にした改造ラマン装置により、タンパク質のピコ秒レベルの揺らぎの測定手法を確立した。ヘモグロビンの鉄-ヒスチジンのストレッチング周波数を測定し、アロステリック作用などの影響を研究した⁽²³⁾。②ミオグロビンの一酸化炭素の光解離時のピコ秒の構造変化を紫外時間共鳴ラマンスペクトルで解明した⁽²⁴⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

①ヘムからの CO₂ の解離後のヘム蛋白の挙動をラマンスペクトロメトリーで解析した結果、E-Helix の動きを介して A-helix に伝わることを見出した。②ルテニウム触媒による炭化水素の酸化に溶媒の水が関与していることを指摘した。③Cr と Sb をドーブした酸化チタンは可視光照射により硝酸銀から酸素を発生させる。この機序をラマン分光で解明した。④リガンド光分解後のヒトヘモグロビン A の時間分解共鳴ラマン分光測定により測定し、その構造変化が 300 ピコ秒の間に起こっていることを解明した。ラマン分光による分子構造の時間経過の詳細の研究を継続している。科研費・基盤研究費、特定領域研究費、挑戦的萌芽研究費で研究されている。

²³ Shigenori Nagatomo, Masako Nagai, Yasuhisa Mizutani, Takashi Yonetani, and Teizo Kitagawa, "Quaternary Structures of Intermediately Ligated Human Hemoglobin A and Influences from Strong Allosteric Effectors; Resonance Raman Investigation" Biophyscal. Journal.,89, 1203-1213(2005) cited 7 times

²⁴ Akira Sato, Yasuhisa Mizutani, "Picosecond Structural Dynamics of Myoglobin following Photodissociation of Carbon Monoxide as Revealed by Ultraviolet Time-Resonance Raman Spectroscopy", Biochemistry, 44, 14709-14714 (2005) cited 17 times

(c)主な論文

①Sato, A., Gao, Y., Kitagawa, T., Mizutani, Y. "Primary protein response after ligand photodissociation in carbonmonoxy myoglobin" *Pro Natl Acad Sci*, 104 (23), pp. 9627-9632(2007) Cited 23 times.

②Hirai, Y., Kojima, T., Mizutani, Y., Shiota, Y., Yoshizawa, K., Fukuzumi, S. "Ruthenium-catalyzed selective and efficient oxygenation of hydrocarbons with water as an oxygen source" *Angewandte Chemie - International Edition*, 47 (31), pp. 5772-5776(2008) Cited 20 times.

③Ikeda, T., Nomoto, T., Eda, K., Mizutani, Y., Kato, H., Kudo, A., Onishi, H. Photoinduced dynamics of TiO₂ doped with Cr and Sb "Journal of Physical Chemistry C, 112 (4), pp. 1167-1173(2008) Cited 22 times.

④Yasuhisa Mizutani, Masako Nagai "Ultrafast protein dynamics of hemoglobin as studied by picosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy" *Chemical Physics* doi:10.1016 Key: citeulike:9371263(2011) no citation info

2.2.2 第2期生 (8名)

(1) 佐藤健 (タンパク質選別輸送装置の人工膜小胞への再構成)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

①細胞小器官内でのタンパク質選別輸送に関する研究を行い、輸送小胞形成の完全再構成に関する独自の実験系を創出し、タンパク質輸送に必要な膜タンパク質 Emp47p が Emp46p の受容体タンパク質であり、そのオリゴマーが特異的に Emp46p を輸送することを発見した⁽²⁵⁾。②輸送小胞形成過程における低分子量 GTPase Sar1p の役割を解明した⁽²⁶⁾。③再構成したりポソームをもちいて FRET 測定により、Sar1-GTPase の輸送小胞へのソーティングを制御するための仕組みを明らかにした⁽²⁷⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

①各種エンドソームを制御する RabGTPase のサブファミリーである Rab5 の活性化機序についてシロイヌナズナを用いて研究し、ARA6, ARA7, RHA1 など各種シロイヌナズナ Rab5 メンバーはグアニンヌクレオチド交換因子、VPS9a のみ活性化することを見出した。VPS9a のミュータントの植

²⁵ Sato, K. and Nakano, A. "Oligomerization of a cargo receptor directs protein sorting into COPII-coated transport vesicles" , *Mol. Biol. Cell* , 14, 3055-3063 (2003) Cited 34 times

²⁶ Sato, K. and Nakano, A. "Reconstitution of coat protein complex II (COPII) vesicle formation from cargo-reconstituted proteoliposomes reveals the potential role of GTP hydrolysis by Sar1p in protein sorting" , *J. Biol. Chem.* 279, 1330-1335 (2004) Cited 22 times

²⁷ Sato, K. and Nakano, A. "Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis" *Nature Struct.& Mol. Biol.* 12, 167-174 (2005) Cited 45 times

物機能への影響を見た結果、それぞれの Rab5 メンバー分子は分化した機能を持つことが分かった。②Coat protein complex II の新たな因子を探索し SMY2 を見出した。少量の発現でも sec24-20 変異による温度感受性を抑制する。SMY2 は ER-Golgi 輸送系に参与するいくつかの遺伝子と相互作用することも明らかとなった。SMY2 蛋白質の所在について議論を進めた。細胞内小胞体の因子の相互作用と変化の研究を継続している。科研費・若手研究費、特定領域研究費で研究されている。

(c) 主な論文

① Goh, T., Uchida, W., Arakawa, S., Ito, E., Dainobu, T., Ebine, K., Takeuchi, M., Sato, K., Ueda, T., Nakano, A. "VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana*" *Plant Cell*, 19 (11), pp. 3504-3515. (2007) Cited 22 times.

② Higashio, H., Sato, K., Nakano, A. "Smy2p participates in COPII vesicle formation through the interaction with Sec23p/Sec24p subcomplex" *Traffic*, 9 (1), pp. 79-93 (2008) Cited 5 times.

(2) 沈建仁 (生体光エネルギー変換の分子機構—光化学系Ⅱ複合体の構造と機能の解明及びその応用)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

① シアノバクテリウムの生体光エネルギー変換の分子機構 (PSII) に関する研究を行い、その結晶構造から酸素分子の発生機序を明らかにした。活性中止からの酸素運搬機構についてもクロロフィル、ベータカロテンからの類推により議論した⁽²⁸⁾。② シネコッカスとホウレンソウの PS II 膜を液体ヘリウム温度下、近赤外で活性化し EPR を測定しその電子状態を研究した²⁹。③ pH 変化による PS II のマンガン安定化タンパク質 (MSP) の構造変化を蛍光スペクトル、遠紫外円偏光二色性分析により研究した。pH6-4 において安定な PS II は酸素発生のコファクター機能などの研究に適していることが分かった⁽³⁰⁾。④ ホウレンソウ PS II の圧による 23kD タンパク質のアンプオールディングを諸条件で検討し、160MPa 付近が遷移点であり、これまで検討したタンパク質より低いことが明らかになった⁽³¹⁾。

²⁸ Kamiya N. and Shen J.-R. "Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98-103 (2003) 2011年8月現在被引用回数: 631回

²⁹ Koulougliotis D., Shen J.-R., Ioannidis N. and Petrouleas V. "Near-IR irradiation of the S₂ state of the water oxidizing complex of photosystem II at liquid helium temperatures produces the metalloradical intermediate attributed to S₂Y⁺" *Biochemistry*, 42, 3045-3053 (2003) Cited 41 times

³⁰ Weng J., Tan C.-Y., Shen J.-R., Yu Y., Zeng X.-M., Xu C.-H., Ruan K.-C. pH-induced conformational changes in the soluble manganese stabilizing protein of photosystem II " *Biochemistry*, 43, 4855-4861 (2004) Cited 11 times

³¹ Tan C.-Y., Xu C.-H., Wong J., Shen J.-R., Sakuma S., Yamamoto Y., Lange R., Balny C. and Ruan K.-C. "Pressure Equilibrium and Jump Study on Unfolding of 23kDa Protein from Spinach Photosystem II" , *Biophysical Journal*. 88, 1264-1275 (2005) Cited 19 times

(b) さきがけ終了後の発展状況

①各種生体内分子の結合状態と機能発現の関係を、条件を変化させるとともに結晶解析を用いて測定して解明している。PsbYはハウレンソウなどの酸素発生機構PSⅡの小さいサブユニットであるが、その位置ははっきりしていない。好熱菌のPsbY欠損株のPSⅡダイマーの結晶からその位置を同定した。②フジツボの20kDセメント蛋白からヒントを得て、自己凝集する24ケのペプチドを合成しその性質を調べた。塩の存在で不可逆的凝集を起こすこと海水と同じ濃度の塩により凝集が始まることなどが明らかになった。ClイオンはPSⅡの酸素発生に必須な補助因子であることは知られているがPSⅡにおいてその位置と機能は未知であった。ClイオンをBr、Iイオンに置き換え結晶解析と機能を調べた結果、Br置換で酸素発生機能は保持されたが、Iイオン置換では無くなった。Mn4CaクラスターとのClイオンの位置関係が機能に影響していると推定した。④PSⅡの構造を高分解能で解明しMnとCaの位置関係を明らかにした。公的研究費の助成なしで研究している。

(c) 主な論文

①Kawakami, K., Iwai, M., Ikeuchi, M., Kamiya, N., Shen, J.-R. "Location of PsbY in oxygen-evolving photosystem II revealed by mutagenesis and X-ray crystallography" *FEBS Letters*, 581 (25), pp. 4983-4987(2007) Cited 17 times.

②Nakano, M., Shen, J.-R., Kamino, K. "Self-assembling peptide inspired by a barnacle underwater adhesive protein" *Biomacromolecules*, 8 (6), pp. 1830-1835(2007) Cited 13 times.

③Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N., Shen, J.-R. "Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography" *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (21), pp. 8567-8572(2009) Cited 36 times.

④Umena Y, Kawakami K, Shen JR, Kamiya N. "Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å" *Nature*. 2011 May 5;473(7345):55-60. Epub 2011 Apr 17

(3) 高野 和文 (課題名: 蛋白質の「配列-構造-安定性」 相関の系統的解析)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

①包埋水分子がタンパク質の安定化に寄与していることをヒト3SSライソザイムにおいて明らかにした⁽³²⁾。牛アデノシンデアミネーゼの結晶化が8の字振とう機で攪拌することで促進され、品質も良いことを見出した⁽³³⁾。低温で増殖する菌である psychrotropic bacterium *Shewanella* の菌内可溶性タンパク質を分離し、4度で増加したタンパク質を同定した結果、大腸菌FKBP22と相同性の高いタンパク質を得た。その性質を調べた結果、このタンパク質が低温

³² Takano, K., Yamagata, Y., Yutani, K. "Buried water molecules contribute to the conformational stability of a protein" *Protein Engineering*, 16 (1), pp. 5-9(2003) Cited 32 times.

³³ Adachi, H., Matsumura, H., Niino, A., Takano, K., Kinoshita, T., Warizaya, M., Inoue, T., Mori, Y., Sasaki, T. "Improving the quality of protein crystals using stirring crystallization" *Japanese Journal of Applied Physics, Part 2: Letters*, 43 (4 B), pp. L522-L525(2004). Cited 23 times

順応に関係することが明らかになった⁽³⁴⁾。また、大阪大学発タンパク質結晶化ベンチャー「創晶」の立ち上げを主導し、1期生の井上豪研究者および2期生の村上聡研究者とともに技術顧問としてその活動を支えている。

(b) さきがけ終了後の発展状況

①タンパク質の配列と構造の相関関係を、安定性の要因も加えて系統的に行う研究を進め、この過程で凝集性のアミロイド配列の構造解析に成功した。②超好熱古細菌の subtilisin 前駆体 Tk- subtilisin (pro-S324A) の結晶を解いた結果、バクテリアの subtilisin 前駆体と Ca イオン結合部位があること、活性化部位が成熟領域にあることを明らかにし、その折りたたみに対する Ca イオン必要性の違いを解明した。③Pro-Tk subtilisin とプロセシングされたその成熟体の結晶構造を比較し、Ca 結合部位の違いがあるのみであることを明らかにした。④HIV-1 のプロテアーゼと阻害剤の複合体を結晶化し、中性子回折像を測定した。活性部位の状態を解析し、医薬開発の基礎データをつくった。⑤フェムト秒レーザーによるタンパク質の結晶化核形成をアガロースゲル中で行い結晶化の核の形成プロセスを明らかにした。⑥大きな結晶を迅速に得るため結晶の効率的生成方法の改良を続けてる。以上のように菌成分の構造と活性化の関連、酵素と阻害剤の結合様式、結晶形成の機序の研究など結晶学的手法により生体成分の研究を続けている。科研費・若手研究費で研究されている。

(c) 主な論文

- ①Takano K, Endo S, Mukaiyama A, Chon H, Matsumura H, Koga Y, Kanaya S. Structure of amyloid β fragments in aqueous environments" FEBS J. 273, 150-158 (2006) Cited 19 times
- ②Tanaka, S.-I., Saito, K., Chon, H., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S."Crystal structure of unautoprocessed precursor of subtilisin from a hyperthermophilic archaeon: Evidence for Ca²⁺-induced folding" J Biol Chem, 282 (11), pp. 8246-8255(2007) Cited 19 times.
- ③Tanaka, S.-i., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S."Four New Crystal Structures of Tk-subtilisin in Unautoprocessed, Autoprocessed and Mature Forms: Insight into Structural Changes during Maturation" J Mol Biol, 372 (4), pp. 1055-1069(2007) Cited 14 times.
- ④Matsumura, H., Adachi, M., Sugiyama, S., Okada, S., Yamakami, M., Tamada, T., Hidaka, K., Hayashi, Y., Kimura, T., Kiso, Y., Kitatani, T., Maki, S., Yoshikawa, H.Y., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Kuroki, R., Mori, Y."Crystallization and preliminary neutron diffraction studies of HIV-1 protease cocrystallized with inhibitor KNI-272" Acta Crystal Sec F: Struct Biol Crystal Comm, 64 (11), pp. 1003-1006(2008). Cited 8 times.
- ⑤Yoshikawa, H.Y., Murai, R., Sugiyama, S., Sazaki, G., Kitatani, T., Takahashi, Y., Adachi, H.,

³⁴ Suzuki, Y., Haruki, M., Takano, K., Morikawa, M., Kanaya, S."Possible involvement of an FKBP family member protein from a psychrotrophic bacterium *Shewanella* sp.SIB1 in cold-adaptation" European Journal of Biochemistry, 271 (7), pp. 1372-1381(2004) Cited 24 times

Matsumura, H., Murakami, S., Inoue, T., Takano, K., Mori, Y. "Femtosecond laser-induced nucleation of protein in agarose gel" *Journal of Crystal Growth*, 311 (3), pp. 956-959 (2009)
Cited 7 times.

⑥ Shimizu, N., Sugiyama, S., Maruyama, M., Yoshikawa, H.Y., Takahashi, Y., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Matsumura, H., Mori, Y. "Growth of large protein crystals by top-seeded solution growth together with the floating and solution stirring technique" *Crystal Growth and Design*, 9 (12), pp. 5227-5232 (2009) Cited 6 times.

(4) 田口 英樹 (課題名: シャペロニンの役割の解明による効率的なタンパク質折りたたみ法の確立)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

① シャペロン複合体の反応サイクル機構解明および基質タンパク質が存在する場での GroEL の役割や構造解明を進展させた。特にシャペロニンの働きをタンパク質物性のレベルで考えられるようにした⁽³⁵⁾。② *Thermus thermophilus* の GroEL-GroES-ADP の結晶構造から 24 の基質蛋白を同定し、その周りの構造が大腸菌のそれと大きく異なることを明らかにした⁽³⁶⁾。③ GroEL と結合する 2 つの GroES サブユニットの L309K が結合に重要な役割を果たしていることを解明した⁽³⁷⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

① 原核生物の翻訳延長因子である Tu (EF-Tu) はその aminoacyl-tRNA 送達機能のほかにシャペロン機能を持つ。ミトコンドリア EF-tu について哺乳類の EF-tu を用いて研究の結果、リコンビナント EF-tu が熱凝集を抑制すること、熱ストレスでミトコンドリア蛋白と EF-tu が免疫沈降をすること、EF-tu 過剰発現がタンパク質を脱安定化することなどを見出した。② 蛍光標識した 1 分子タンパク質を用いて蛋白合成から折りたたみのプロセスを明らかにした。酵母③ プリオンに蛍光標識し、その細胞伝播機序を解明した。シャペロンの折りたたみプロセスの研究を続けている。科研費・特定領域研究費で研究されている。

(c) 主な論文

① Suzuki, H., Ueda, T., Taguchi, H., Takeuchi, N. "Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu" *J Biol Chem*, 282 (6), pp. 4076-4084 (2007)

³⁵ Ueno, T., Taguchi, H., Tadakuma, H., Yoshida, M., Funatsu, T. "GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism" *Mol. Cell*, 14, 423-434 (2004)

³⁶ Shimamura, T., Koike-Takeshita, A., Yokoyama, K., Masui, R., Murai, N., Yoshida, M., Taguchi H., Iwata, S. "Crystal structure of the native chaperonin complex from *Thermus thermophilus* revealed unexpected asymmetry at the cis-cavity." *Structure*, 12, 1471-1480 (2004)

³⁷ Koike A., Shimamura T., Yokoyama K., Yoshida M., Taguchi H., "Leu-309 plays a critical role in the encapsulation of substrate protein into the internal cavity of GroEL" *J. Biol. Chem.*, 281, 962-967 (2006)

Cited 18 times.

②Uemura, S., Iizuka, R., Ueno, T., Shimizu, Y., Taguchi, H., Ueda, T., Puglisi, J.D., Funatsu, T. "Single-molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes" *Nucleic Acids Research*, 36 (12), art. no. e70 (2008) Cited 11 times.

③Fujiwara, K., Ishihama, Y., Nakahigashi, K., Soga, T., Taguchi, H. "A systematic survey of in vivo obligate chaperonin-dependent substrates" *EMBO Journal*, 29 (9), pp. 1552-1564(2010) Cited 8 times.

(5) 濡木 理 (課題名: 構造ゲノム科学およびプロテオミクスに基づく新規の遺伝暗号翻訳装置の同定と機能発現メカニズムの解明)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

① 鋳型非依存性 RNA ポリメラーゼ反応機構に関する論文は、さきがけ期間中に *Nature* 誌に掲載された⁽³⁸⁾。② glutamyl-tRNA 合成酵素 (GluRS) は ATP とアミノ酸からアミノアシル AMP を合成するが好熱菌の GluRS 結晶を用いて ATP と GluRS 酵素の相互作用を解明した⁽³⁹⁾。③ アーケオシン tRNA グアニトランスグリコシレースと結合した tRNA の結晶構造を解析し、活性部位を推定した⁽⁴⁰⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

① DEAD-box タンパク質ファミリーに属する RNA ヘリケースの Vasa タンパク質と RNA との複合体の立体構造を解き、RNA ヘリケースが RNA の適切な折りたたみには影響を与えることなく、解離すべき塩基対だけを巧妙に選んで作用し、絡まった RNA をほどくという仕組みを解明した。② エクソサイトーシスにおいて小胞体輸送を活性化する Sec2p と Sec4p の複合体の Sep2p GEF 領域の結晶構造を解き、GDP 放出機序とヌクレオチド交換反応の中間構造をつきとめた。③ Mg トランスポーターの結晶構造から Mg のホメオスタシスを保つ仕組みを解明した。④ 脱ユビキノン酵素であるヒト AMSH-LP とユビキチンとの複合体の結晶から脱ユビキチン機序を解明した。⑤ *Thermus thermophilus* の蛋白移送分子 SecYE と抗 SecY Fab フラグメント複合体の結晶構造から Sec 機械系のチャンネル構造と機械構造が協調的に働いて蛋白移送を担っていることを解明した。2006 年 SORST 遺伝暗号翻訳装置の機能的統合および機能的分散の構造的基盤の解明に研究を発展させている。

³⁸ K. Tomita, S. Fukai, R. Ishtani, T. Ueda, N. Takeuchi, D.G. Vassyliev, O. Nureki, "Structure basis for template-independent RNA polymerization", *Nature*, 430, 700-704 (2004) 42 回

³⁹ Sekine, S.-I., Nureki, O., Dubois, D.Y., Bernier, S., Chênevert, R.G., Lapointe, J., Vassyliev, D.G., Yokoyama, S. "ATP binding by glutamyl-tRNA synthetase is switched to the productive mode by tRNA binding" *EMBO Journal*, 22 (3), pp. 676-688(2003) Cited 69 times

⁴⁰ Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S., Yokoyama, S. "Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme" *Cell*, 113 (3), pp. 383-394(2003) Cited 94 times

t RNA の働き、細胞外への蛋白分泌機序、Mg イオン調節機序などを関連分子の結晶構造から解析する研究を続けており、Nature, PNAS の常連投稿者となっている。

2005 年、2007 年 手島工業教育資金団手島記念研究賞、2007 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)、2008 年第 5 回 日本学術振興会賞「遺伝暗号翻訳の動的機構の構造基盤」、2009 年平成 21 年度 持田記念学術賞、2010 年第 18 回 木原記念財団学術賞 受賞、2011 年第 27 回 井上学術賞 受賞など数多くの賞を受賞している。科研費・基盤研究費、特定領域研究費、新学術領域研究費で研究されている。

(c)主な論文

- ①Hiroyuki Oshikane, Kelly Sheppard, Shuya Fukai, Yuko Nakamura, Ryuichiro Ishitani, Tomoyuki Numata, R. Lynn Sherrer, Liang Feng, Emmanuelle Schmitt, Michel Panvert, Sylvain Blanquet, Yves Mechulam, Dieter Söll, Osamu Nureki, “Structural Basis of RNA-Dependent Recruitment of Glutamine to the Genetic Code” *Science*, 312. No.5782, 1950-1954 (2006) 161 回
- ②Sato, Y., Fukai, S., Ishitani, R., Nureki, O. “Crystal structure of the Sec4p-Sec2p complex in the nucleotide exchanging intermediate state” *Proc of the Nat Acad of Sci*, 104 (20), pp. 8305-8310(2007) Cited 17 times.
- ③Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R., Nureki, O. “Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter” *Nature*, 448 (7157), pp. 1072-1075(2007) Cited 44 times.
- ④Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., Fukai, S. “Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains” *Nature*, 455 (7211), pp. 358-362(2008) Cited 40 times.
- ④Ishitani, R., Sugita, Y., Dohmae, N., Furuya, N., Hattori, M., Nureki, O. “Mg²⁺-sensing mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE probed by molecular dynamics study” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (40), pp. 15393-15398(2008) Cited 16 times.
- ⑤Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassylyev, D.G., Ito, K., Nureki, O. “Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures” *Nature*, 455 (7215), pp. 988-991(2008) Cited 49 times.

(6) 芳坂 貴弘 (課題名 : 蛍光標識アミノ酸の導入によるタンパク質の新規構造機能解析法の開発)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

① さきがけ研究採択前に、4 塩基コドンによる効率的な非天然アミノ酸のタンパク質への導入という結晶構造解析に有用な斬新な手法を見出した⁽⁴¹⁾。その技術を応用した FRET 解析法の開

⁴¹ Takahiro Hohsaka, Norihito Muranaka, Chie Komiyama, Kinue Matsui, Satomi Takaura, Ryoji Abe, Hiroshi Murakami, Masahiko Sisido “Position-Specific Incorporation of Dansylated Non-natural Amino

発をした。②導入効率を向上させる tRNA 変異体を見出し、特許出願 2 件に結び付けた⁽⁴²⁾。tRNA 変異体については生産試験検討もし、実用化を試みた。③タンパク質の特定の部位に非天然アミノ酸に蛍光体を付加し取り込ませ、蛍光共鳴エネルギー移動を測定することでタンパク質のコンフォメーション変化を容易に観察する方法を開発した⁽⁴³⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

①化学的にアシル化した tRNA により非天然カルボン酸をタンパク質の N 末に導入する方法を開発した。②Amber codon は release factor 1 もデコードできるので非天然アミノ酸の取り込みが阻害される。それを避けるために大腸菌と *Mycoplasma capricolum* の tRNA の Amber 抑制 tRNA をスクリーニングし、合成遺伝子から Amber 抑制 tRNA を合成した。その結果 *Mycoplasma capricolum* の Trp1 tRNA で一部変異を持つものが Amber Codon による非天然アミノ酸の取り込みに適していることが明らかになった。③安定な Rhodamin ラベルアミノ酸を蛋白に導入する方法を工夫したが、N 末に導入可能なプローブを得た。

4 塩基デコーディング法による、非天然アミノ酸の導入するためのタンパク質合成法の改良を続けている。この方法により機能性を持ったタンパク質が自由に製造可能になる。科研費・新学術領域研究費、挑戦的萌芽研究費、基盤研究費で研究されている。

(c) 主な論文

①Muranaka, N., Miura, M., Taira, H., Hohsaka, T. "Incorporation of unnatural non- α -amino acids into the N terminus of proteins in a cell-free translation system" *ChemBioChem*, 8 (14), pp. 1650-1653(2007) Cited 7 times.

②Taira, H., Matsushita, Y., Kojima, K., Shiraga, K., Hohsaka, T. "Comprehensive screening of amber suppressor tRNAs suitable for incorporation of non-natural amino acids in a cell-free translation system" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374 (2), pp. 304-308(2008) Cited 4 times.

③Abe, R., Shiraga, K., Ebisu, S., Takagi, H., Hohsaka, T. "Incorporation of fluorescent non-natural amino acids into N-terminal tag of proteins in cell-free translation and its dependence on position and neighboring codons" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110 (1), pp. 32-38(2010) Cited 3 times.

Acids into Streptavidin by using a Four-Base Codon" *FEBS Letters.*, 560, 173-177 (2004)

⁴² Hikaru Taira, Takahiro Hohsaka, Masahiko Sisido " In vitro Selection of tRNAs for Efficient Four-Base Decoding to Incorporate Non-Natural Amino Acids into Proteins in an Escherichia coli Cell-Free Translation System" *Nucleic Acids Res.*, 34, e44 (2006)

⁴³ Daisuke Kajihara, Ryoji Abe, Issei Iijima, Chie Komiyama, Masahiko Sisido, Takahiro Hohsaka "FRET analysis of protein conformational change through position-specific incorporation of fluorescent amino acids" *Nature Methods*, 3, 923-929 (2006)

(7) 松浦 友亮 (課題名: 分子進化工学的手法による新規トポロジーを有する蛋白質の探索)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

進化工学的手法により新規機能性タンパク質をつくり出そうという試みを、タンパク質ライブラリー⁽⁴⁴⁾やドメイン置換を用いる進化工学的手法で行ない、新規なタンパク質がつくりだせることを示した。リボソームディスプレイ法ではコンパクトに畳まれた蛋白と親水蛋白を得た⁽⁴⁵⁾。大腸菌の精製コンポーネントを使ったリボソームディスプレイのピュアシステムでは4-50°Cで安定な3元複合体を生成した⁽⁴⁶⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

①リポソームの内腔を細胞内反応の解析に応用するためには内腔の均一なりポソームが必要である。蛍光タンパク質とFACSを用いて細胞大のリポソームを選ぶ方法を開発した。②リポソーム内に自己複製する遺伝子を入れ進化の過程をしめす、自己エンコーディングシステムと呼ぶ、マイクロ環境を構築した。③巨大多層リポソームを作りと蛍光付加基質のカスケード反応を観察した。反応はリポソームの一部で起こり、内腔の大きさに依存することが明らかになった。リポソームによるモデル細胞系を研究する方法として有用である。④βガラクトシダーゼ(GAL)とグルクロニダーゼ(GUS)の折りたたみと凝集のキネティクスを測定した結果、GALはGUSより早く4量体になること、GALの凝集には律速ステップがないのに対し、モノマーからダイマー、ダイマーからテトラマー2段階があることを見出した。リポソームを用いた細胞機能のモデルの構築を旨として研究を続けている。

ERATO四方動的微小反応場プロジェクト区画内反応グループのグループリーダーとして研究を進展させている。

Widmer Award Winner (2010年)、酵素工学研究会奨励賞(2008年)を受賞している。

特定領域研究費で研究されているが助成期間は1年のみである。

(c) 主な論文

① Takeshi Sunami, Kanemoto Sato, Tomoaki Matsuura, Koji Tsukada, Itaru Urabe, Tetsuya Yomo, "Femtoliter compartment in liposomes for in vitro selection of proteins" *Analytical Biochemistry*, 357, 128-136 (2006) cited 31 times

② Kita, H., Matsuura, T., Sunami, T., Hosoda, K., Ichihashi, N., Tsukada, K., Urabe, I., Yomo, T. "Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes" *ChemBioChem*, 9 (15), pp. 2403-2410(2008) Cited 20 times.

⁴⁴ Matsuura, T., Ernst, A., Plückthun, A. "Construction and characterization of protein libraries composed of secondary structure modules" *Protein Science*, 11 (11), pp. 2631-2643(2002) Cited 15 times

⁴⁵ Tomoaki Matsuura and Andreas Plückthun, "Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display" *FEBS letters*, 539, 24-28, (2003)

⁴⁶ Tomoaki Matsuura, Hayato Yanagida, Junya Ushioda, Itaru Urabe and Tetsuya Yomo, "Nascent chain, mRNA, and ribosome complexes generated by a pure translation system" *BBRC*, Jan 12:352(2):372-7(2007). Epub 2006 Nov 17

③Hosoda, K., Sunami, T., Kazuta, Y., Matsuura, T., Suzuki, H., Yomo, T. "Quantitative study of the structure of multilamellar giant liposomes as a container of protein synthesis reaction" *Langmuir*, 24 (23), pp. 13540-13548(2008) Cited 17 times.

④Matsuura, T., Hosoda, K., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Yomo, T. "Kinetic analysis of β -galactosidase and β -glucuronidase tetramerization coupled with protein translation" *Journal of Biological Chemistry*, 286 (25), pp. 22028-22034 (2011) no citation

(8) 村上 聡 (課題名: 薬剤耐性化問題の克服を目指した多剤排出蛋白質の薬剤認識機構の解明とその応用)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

①立体構造研究分野において、世界で始めて結晶構造解析により多剤排出タンパク質 AcrB の薬剤認識機構解明の研究を進め、多剤と AcrB 結合複合体や発現制御因子の結晶構造解析に成功し、AcrB 非対称構造にもとづく新しい反応形態による、薬剤の認識機構と多剤の排出メカニズムを解明した⁽⁴⁷⁾。インパクトの大きい研究成果であり、2002年のNature誌に掲載された。②排出タンパク質には中心に孔があり、中心孔の変形が薬剤排出機能に重要な役割を果たしていることを結晶構造の解析から示した⁽⁴⁸⁾。③レーザー照射による膜タンパク質の結晶化法を開発した⁽⁴⁹⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

①多剤排出トランスポーターAcrBの結晶構造を解析し、3段階の機能的回転システムにより排出が起こることを示した。②DsbA-DsbB複合体の結晶からジスルフィドの形成の経過とDsbAによるDsbBの超酸化酵素への機能変化を解明した。粘着性物質で結晶を捕まえるCT-100を改良し、凍結が十分でない結晶を扱う方法や高粘度の液体中の硬質結晶が捕捉できるCT-200を開発した。カルサイトのキラル生体分子による制御機序は未解明である。③結晶化表面の生成過程の形態をL-Aspをモデルに干渉分光法で測定し、カルサイト結晶のキラリティーに対するキラル分子の影響は小さく、カルサイトが生物由来かどうか判定は困難だることが明らかになった。中性子回折法はより詳細な結晶構造の解析には有用であるが大きな結晶を必要とする。それにこたえるためにtop-seeded溶液を浮遊攪拌法で行い、大きな卵白リゾチームの単結晶を得た。Top-seeded protein growth法を改良し、注射器タイプの結晶成長法を考案した。

近年は大きな結晶を迅速に作成する方法を開発に力を入れて取り組んでいる。

⁴⁷ Satoshi Murakami, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita and Akihito Yamaguchi, "Crystal structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB", *Nature*, 419, 587-593 (2002)

⁴⁸ Murakami, S., Tamura, N., Saito, A., Hirata, T., Yamaguchi, A. "Extramembrane Central Pore of Multidrug Exporter AcrB in *Escherichia coli* Plays an Important Role in Drug Transport" *Journal of Biological Chemistry*, 279 (5), pp. 3743-3748(2004). Cited 35 times

⁴⁹ Adachi, H., Murakami, S., Niino, A., Matsumura, H., Takano, K., Inoue, T., Mori, Y., Yamaguchi, A., Sasaki, T. "Membrane protein crystallization using laser irradiation" *Japanese Journal of Applied Physics, Part 2: Letters*, 43 (10 B), pp. L1376-L1378(2004). Cited 21 times.

東京農工大学研究学術賞（2009年）を受賞している。科研費・若手研究費、基盤研究費で研究されている。

(c)主な論文

①Satoshi Murakami, Ryosuke Nakasima, Takashi Matsumoto, Akihito Yamaguchi, "Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism" *Nature*, 443, 173-179 (2006)

②Kenji Inaba, Satoshi Murakami, Mamoru Suzuki, Atsusi Nakagawa, Eiki Yamashita, Kengo Okada and Koreaki Ito, "Crystal structure of DsbA-DsbB Complex reveals a disulfide bond generation mechanism", *Cell*, 127, 789-801 (2006)

③Kitatanl, T., Adachi, H., Sugiyama, S., Matsumura, H., Murai, R., Takahashi, Y., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Takano, K. "Evaluation and improvement of a technique to manipulate protein crystals in solution" *Japanese Journal of Applied Physics*, 47 (12), pp. 8995-8997(2008) Cited 3 times.

④Maruyama, M., Tsukamoto, K., Sazaki, G., Nishimura, Y., Vekilov, P.G. "Chiral and achiral mechanisms of regulation of calcite crystallization" *Crystal Growth and Design*, 9 (1), pp. 127-135(2009) Cited 6 times.

⑤Shimizu, N., Sugiyama, S., Maruyama, M., Yoshikawa, H.Y., Takahashi, Y., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Matsumura, H., Mori, Y. "Growth of large protein crystals by top-seeded solution growth together with the floating and solutionstirring technique" *Crystal Growth and Design*, 9 (12), pp. 5227-5232(2009) Cited 6 times.

⑥Matsumura, H., Kakiniuchi, K., Nakamura, T., Sugiyama, S., Maruyama, M., Adachi, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y. "Growth of protein crystals by syringe-type top-seeded solution growth" *Crystal Growth and Design*, 11 (5), pp. 1486-1492.(2011) no citation

2.2.3 第3期生（5名）

(1) 小澤 岳昌（課題名：タンパク質オルガネラ移行と遺伝子発現の非侵襲的時空間解析法の確立）

(a)さきがけ期間中の主な研究成果

二分した発光タンパク質をプロテインスプライシングにより再構成させるという独自の手法

により⁽⁵⁰⁾、生きた細胞におけるタンパク質の核内移行を観察することが可能になった。各種薬物などのスクリーニングに利用可能な有用な手法である②ER に輸送されるタンパク質をエンコードする遺伝子を効率的に同定する方法を開発し、その遺伝子を発現することにより新しいタンパク質を27個発見した⁽⁵¹⁾。新しいレポーター遺伝子アッセイ法を考案し、細胞内でのタンパク質相互作用を細胞を破壊せずに蛍光で観察できるようになった⁽⁵²⁾。日本化学会進歩賞や文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞し、高い評価を得ている。

(b) さきがけ終了後の発展状況

ミトコンドリア RNA の局在と動きを1個の細胞内で測定するプローブを開発し、NADH デヒドロゲナーゼサブユニット6の mtRNA を認識するプローブを用いて、そのミトコンドリア内の局在と消滅までの経過を生きた細胞で観察できることを示した。サイクリックルシフェラーゼを開発し、カスパーゼ-3の活性の時間経過を観察可能にした。蛍光を用いた protein-fragment complement assay (PCA) による細胞内タンパク質動態観察は有用な方法であるが、蛍光が不可逆的であるためと発色に時間を要するために経過を完全には追跡できない。欠点をコメツキムシのルシフェラーゼを使って克服した。ヒトの RNA 結合蛋白である PUMILIO1 を使って遺伝的にエンコードされたプローブを作り、1分子の mRNA の動きを細胞内で観察する方法を開発した。微小管上を移動する速度なども測定できた。以上のように蛍光を用いた細胞内動態を観察する方法の改良を続け、各種細胞内分子を次々に視覚化している。日本学術振興会賞(2011)を受賞している。科研費・基盤研究費、特定領域研究費、若手研究費、挑戦的萌芽研究費、新学術領域研究費で研究されている。

(c) 主な論文

- ① T. Ozawa, Y. Natori and Y. Umezawa, "Imaging dynamics of endogenous mitochondrial RNA in single living cells" *Nature Methods*, 4(5):413-9 (2007) cited 53
- ② Kanno, A., Yamanaka, Y., Hirano, H., Umezawa, Y., Ozawa, T. "Cyclic Luciferase for Real-Time Sensing of Caspase-3 Activities in Living Mammals" *Angewandte Chemie - International Edition*, 46 (40), pp. 7595-7599(2007). Cited 27 times.
- ③ Hida, N., Awais, M., Takeuchi, M., Ueno, N., Tashiro, M., Takagi, C., Singh, T., Hayashi, M., Ohmiya, Y., Ozawa, T. "High-sensitivity real-time imaging of dual protein-protein interactions in living subjects using multicolor luciferases" *PLoS ONE*, 4 (6), art. no. e5868(2009) Cited 12

⁵⁰ Sung Bae Kim, Takeaki Ozawa, Shigeaki Watanabe, Yoshio Umezawa, "High-Throughput Sensing and Noninvasive Imaging of Protein Nuclear Transport by Using Reconstitution of Split Renilla Luciferase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 11542-11547 (2004)

⁵¹ Takeaki Ozawa, Kongo Nishitani, Yusuke Sako, Yoshi Umezawa "A high-throughput screening of genes that encode proteins transported into the endoplasmic reticulum in mammalian cells" *Nucleic Acids Research*, 33, e34 (2005)

⁵² Kanno, A., Ozawa, T., Umezawa, Y. "Intein-mediated reporter gene assay for detecting protein-protein interactions in living mammalian cells" *Analytical Chemistry*, 78 (2), pp. 556-560(2006) Cited 12 times

times.

④Yamada, T., Yoshimura, H., Inaguma, A., Ozawa, T. "Visualization of nonengineered single mRNAs in living cells using genetically encoded fluorescent probes" *Analytical Chemistry*, 83 (14), pp. 5708-5714(2011) no citaion

(2) 木下 専 (課題名: 極低温電子線断層法によるセプチン系超分子構造体の解析)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

セプチン系タンパク質の構造解析は難度が高く、さきがけ期間中には目標達成には至らなかったが、セプチン分子の微細形態や生理・病理機能解析において成果を上げ、発見したセプチンリング欠損と雄性不妊症との関係を明らかにした⁽⁵³⁾。哺乳類の septin は有糸分裂時にセントロメア関連蛋白 E のスキヤッフールドとして働いている可能性を示した⁽⁵⁴⁾。③SEPT6 の欠損マウスを作成し、SEPT6 が発癌に関与していないことを示した⁽⁵⁵⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

パーキンソン病の Lewy 小体はポリメライジングスキヤッフールドである Septin4 を含むがその意味づけは不明であった。Septin4 欠損マウスはドパミン神経の活性を低下させることからパーキンソン病の発病に重要な関係があることを明らかにした。Septin2 が細胞骨格微小管への結合が上皮細胞の極性形成に役割を果たしていること解明した。細胞形態の構成因子を探るためにリボソームに各種因子を封入して探索の結果、Septin の重合体が細胞膜の形態変換を起こしていることが明らかになった。Septin 繊維が細胞の周辺から梁を作っている微細構造が観察された。T 細胞で Septin 遺伝子をノックアウトし、観察の結果、運動性や堅牢性に障害を生じることが分かった。⑤細胞分裂に必須の Septin が中間期にどんな働きをしているか研究し、細菌感染時にケージ様の構造を形成し、Autophagy に導くという生体防護機能を果たしていることを推測した。

Septin の機能の解明に注力し、研究を進展させている。科研費・基盤研究費、特定領域研究費により研究されている。

(c) 主な論文

①Ihara M., Yamasaki N, Hagiwara A., Tanigaki A., Kitano A., Hikawa R., Tomimoto H., Noda

⁵³ Ihara M., Kinoshita M., Yamada S., Tanaka H., Tanigaki A., Kitano W., Gotoh M., Ohkubo K., Nishiyama H., Ogawa O., Takahashi T., Itohara S., Nishimune Y., Noda T., Kinoshita M., " Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa" *Developmental Cell*. 8(3), 343-352 (2005) cited 68 times

⁵⁴ Spiliotis ET, Makoto Kinoshita, Nelson WJ., " A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation" *Science*, 307, 1781-1785 (2005) cited 68 times

⁵⁵ Ono, R., Ihara, M., Nakajima, H., Ozaki, K., Kataoka-Fujiwara, Y., Taki, T., Nagata, K.-I., Inagaki, M., Yoshida, N., Kitamura, T., Hayashi, Y., Kinoshita, M., Nosaka, T."Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced byMLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4" *Molecular and Cellular Biology*, 25 (24), pp. 10965-10978(2005) Cited 14 times

- ①M., Takanashi M., Mori H., Hattori N., Miyakawa T., Kinoshita M. "Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of alphasynuclein neurotoxicity" *Neuron*, 53(4), (2007) cited 55 times
- ②Spiliotis, E.T., Hunt, S.J., Hu, Q., Kinoshita, M., Nelson, W.J. "Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules" *Journal of Cell Biology*, 180 (2), pp. 295-303(2008) Cited 22 times.
- ③Tanaka-Takiguchi, Y., Kinoshita, M., Takiguchi, K. "Septin-Mediated Uniform Bracing of Phospholipid Membranes" *Current Biology*, 19 (2), pp. 140-145(2009) Cited 20 times.
- ④Tooley, A.J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W.S., Kinoshita, M., Krummel, M.F. "Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility" *Nature Cell Biology*, 11 (1), pp. 17-26(2009) Cited 20 times.
- ⑤Mostowy, S., Bonazzi, M., Hamon, M.A., Tham, T.N., Mallet, A., Lelek, M., Gouin, E., Demangel, C., Brosch, R., Zimmer, C., Sartori, A., Kinoshita, M., Lecuit, M., Cossart, P. "Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures" *Cell Host and Microbe*, 8 (5), pp. 433-444(2010) Cited 3 times.

(3) 西坂 崇之 (課題名: 蛋白質 1 個における局所的構造変化の可視化)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

タンパク質 1 分子の運動を観察できる顕微鏡技術を開発し、回転分子モーター F1-ATPase の 1 分子の回転を可視化した^(56,57)。この研究の過程で微粒子の変異をナノメートルオーダーで三次元検出できる画期的な光学顕微鏡も開発し、特許化もしている(表 2-2 参照)。F1ATPase 1 分子の自由エネルギーの出入りを測定し、1 分子のタンパク質の運動とエネルギーの関係を明らかにした⁽⁵⁸⁾。

(b) さきがけ終了後の発展状況

①細胞分裂キネシン Eg5 単分子のラセン状運動を可視化するために微小管上に量子ドットをつけ 3 次元追跡を行った。双頭のキネシン 1 にくらべ双頭の Eg5 は前進運動がかなり少ないことが明らかになった。②分子モーターの F1 ATPase の中心軸である γ サブユニットは 3 つの触媒 β サブユニットにより駆動されていると考えられている。蛍光体を付けて直接観察をした

⁵⁶ Takayuki Nishizaka, Kazuhiro Oiwa, Hiroyuki Noji, Shigeki Kimura, Eiro Muneyuki, Masasuke Yoshida and Kazuhiko Kinoshita Jr., "Chemo-mechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation" *Nature Struct.& Mol. Biol*, 11, 142-148 (2004) Cited 116 times

⁵⁷ Eiro Muneyuki, Takahiro Watanabe-Nakayama, Tetsuya Suzuki, Masasuke Yoshida, Takayuki Nishizaka and Hiroyuki Noji "Single molecule Energetics of F1-ATPase Motor" *Biophysical Journal*, 92(5),1806-1812(2007) cited 6 times

⁵⁸ Takayuki Nishizaka, Kana Mizutani, Tomoko Masaïke, "Single-molecule observaton of rotation of F1-ATPase through micro beads" *Methods in Molecular Biology*, 392:171-81 (2007)

結果、 β サブユニットは3段階の屈伸をすることが明らかになった。ATP を合成する F(o)F(1)-ATP 合成酵素の軸ドメインは回転すると推定されていたが、1 分子 ATP の分解が触媒部位に結合したときに約 80 度、加水分解後で約 40 度回転することを光学顕微鏡下で観察した。

量子ドットを用いる手法で各種タンパク質分子を可視化し、その動きを直接観察する研究を続けている。科研費・若手研究費、特定領域研究費により研究されている。

(c)主な論文

①Yajima, J., Mizutani, K., Nishizaka, T. "A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking" *Nature Structural and Molecular Biology*, 15 (10), pp. 1119-1121(2008) Cited 9 times.

②Masaike, T., Koyama-Horibe, F., Oiwa, K., Yoshida, M., Nishizaka, T. "Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F1-ATPase correlate with 80° and 40° substep rotations" *Nature Structural and Molecular Biology*, 15 (12), pp. 1326-1333(2008) Cited 24 times.

③Nishizaka, T., Mizutani, K., Masaike, T. "Single-molecule observation of rotation of F1-ATPase through microbeads" *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 392, pp. 171-181(2007)

(4) 林 重彦 (課題名 : ミクロな化学反応過程がもたらすマクロなタンパク質機能発現の分子物理)

(a)さきがけ期間中の主な研究成果

採択前に開発していたハイブリッド分子シミュレーション法を用いて、局所的な化学反応における電子状態の変化が、タンパク質の構造変化と機能発現を引き起こす様子の解析を行った^(59,60) が、大域的な構造変化を解析する手法には至らなかった。光受容タンパク質などの化学反応解析では、従来シミュレーションより有用な手法であることを示した。1 期生の稲葉謙次研究者との領域内研究協力で、タンパク質ジスルフィド結合創生の基本化学原理について非経験的分子軌道法を用いて理論面から解明した⁽⁶¹⁾。

(b)さきがけ終了後の発展状況

ミオグロビン中の CO 分子の移動経路を分子動力学シミュレーションを用いて解明した。QM/MM MD シミュレーションをもちいてロドプシンにおける網膜色素の光イソメリゼーション

⁵⁹ Shigehiko Hayashi, Emad Tajkhorshid, Hideki Kandori, and Klaus Schulten "Role of hydrogen-bond network in energy storage of bacteriorhodopsin's light driven proton pump revealed by ab initio normal mode analysis" *Journal of the American Chemical Society (communication)*, 126, 10516-10517 (2004) cited 27 times

⁶⁰ Markus Dittrich, Shigehiko Hayashi, and Klaus Schulten, "ATP hydrolysis in the β TP and β DP catalytic sites of F1-ATPase" *Biophysical Journal*, 87, 2954-2967 (2004) cited 34 times

⁶¹ Kenji Inaba, Yoh-hei Takahashi, Koreaki Ito, and Shigehiko Hayashi "Critical role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in de novo disulfide bond generation by DsbB" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ., 103, 287-292 (2006)cited 23 times

オン反応の機序を検討し、その反応が水分子が構成する「プロトンチャンネル」があるために速い速度で起こることを明らかにした。ミオグロビン中の CO 分子の移動は熱によって活性化される経路というよりも集団運動によるタンパク全体の動きに支配されていることを明らかにした。科研費・基盤研究費、特定領域研究費により研究されている。

(c)主な論文

①Nishihara, Y., Hayashi, S., Kato, S. "A search for ligand diffusion pathway in myoglobin using a metadynamics simulation" *Chemical Physics Letters*, 464 (4-6), pp. 220-225 (2008) Cited 13 times.

②Hayashi, S., Tajkhorshid, E., Schulten, K. "Photochemical reaction dynamics of the primary event of vision studied by means of a hybrid molecular simulation" *Biophysical Journal*, 96 (2), pp. 403-416 (2009) Cited 15 times.

③Nishihara, Y., Kato, S., Hayashi, S. "Protein collective motions coupled to ligand migration in myoglobin" *Biophysical Journal*, 98 (8), pp. 1649-1657(2010) no citation

(5) 宮田 真人 (課題名: マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム)

(a) さきがけ期間中の主な研究成果

従来知られている運動系と異なる運動系であるマイコプラズマの運動メカニズムを解明した。粘着と脱粘着を繰り返し、運動するマイコプラズマの運動タンパクの性質について各種薬物を用いて明らかにした⁽⁶²⁾。また、そのタンパク質の形態⁽⁶³⁾、力学的性質⁽⁶⁴⁾を解明した。接着の詳細⁽⁶⁵⁾、マイコプラズマによる高効率の微小回転モーターの構成の試み⁽⁶⁶⁾など精力的に研究が行われた。

(b) さきがけ終了後の発展状況

マイコプラズマの接着蛋白 Gli349, と Gli519 を単離し、その抗体、や変異体を作成運動の変化を研究した。菌の接着蛋白の温度依存性を研究し非アレニウス型温度依存性を示すことを明らかにした。Gli349 の結合力を AFM で研究した。

⁶² Atsuko Uenoyama, Makoto Miyata "Gliding ghosts of *Mycoplasma mobile*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 12754-12758 (2005)

⁶³ Jun Adan-Kubo, Atsuko Uenoyama, Toshiaki Arata, Makoto Miyata "Morphology of Isolated Gli349, a Leg Protein Responsible for *Mycoplasma mobile* Gliding via Glass Binding, Revealed by Rotary Shadowing Electron Microscopy" *Journal of Bacteriology*, 188, 2821-2828 (2006)

⁶⁴ S. Seto, A. Uenoyama, M. Miyata "Identification of a 521-Kirodalton Protein(Gli521) Involved in Force Generation of Force Transmission for *Mycoplasma mobile* Gliding" *Journal of Bacteriology*, .187, 3502-3510 (2005)

⁶⁵ Ryoichiro Nagai, Makoto Miyata "Gliding Mobility of *Mycoplasma mobile* Can Occur by Repeated Binding to N-Acetylneuraminylactose (Sialyllactose) Fixed on Solid Surfaces" *Journal of Bacteriology*, 188, 6469-6475 (2006)

⁶⁶ Yuichi Hiratsuka, Makoto Miyata, Tetsuya Tada, Taro Q.P.Uyda "A microrotary motor powered by bacteria" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 133, 13618-13623 (2006)

接着性運動の詳細の研究を続け、発展させている。

国際マイコプラズマ学会、ルイスディーンズ賞（2010年）を受賞している。

科研費・基盤研究費、特定領域研究費により研究されている。

(c)主な論文

①Uenoyama, A., Seto, S., Nakane, D., Miyata, M. "Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of mycoplasma mobile gliding machinery, suggested by use of inhibitory antibodies and mutants" *Journal of Bacteriology*, 191 (6), pp. 1982-1985(2009) Cited 7 times.

②Chen, J., Neu, J., Miyata, M., Oster, G. "Motor-substrate interactions in Mycoplasma motility explains non-Arrhenius temperature dependence" *Biophysical Journal*, 97 (11), pp. 2930-2938 (2009) Cited 4 times.

③Lesoil, C., Nonaka, T., Sekiguchi, H., Osada, T., Miyata, M., Afrin, R., Ikai, A. "Molecular shape and binding force of Mycoplasma mobile's leg protein Gli349 revealed by an AFM study" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391 (3), pp. 1312-1317(2010) Cited 6 times.

2.3 第2章のまとめ

「生体分子の形と機能」領域は2001年度に出発し、最初の年に採択された1期生10名の研究者は2004年度に、2002年に採択された2期生8名の研究者は平成2005年度に既に任期を終了している。そして2003年に採択された3期生5名は2006年度に任期を終了した。この間、Nature, Science, Cellを始めとする一流の学術雑誌に多数の論文が成果として発表されている他、表2-4に掲げた数多くの受賞があった。また1.4に述べたように、多くの成果がプレスリリースされ、マスコミに取り上げられて報道された。これらの成果を反映して、殆どの研究者が、さきがけの研究期間中、あるいは終了直後に所属機関の人事で、昇格を果たしている(図2-1)ことから、さきがけの本領域は数多くの優れた個々の研究成果を挙げ得たと同時に、30歳台の若い研究者をわが国におけるこの分野の研究の中心的担い手に育てることに寄与している。また、同じ「生体分子の形と機能」領域に属することになり、知り合った研究者同士が、研究協力を進める領域内研究が約10件を数え、研究領域を広げた。新たなベンチャー会社も創出され(株式会社創晶、表2-2)産業界にも寄与した。

本領域は主として力点を置く方法論により、1. タンパク質の形をX線結晶学により解明し機能発現の本質に迫るアプローチ、2. 機能の発現機序の解明を目的に結晶内部構造や表面構造、エネルギー伝播機構を追求する研究、3. 機能を解明するために分子を可視化したり、コンピュータシミュレーションして観察する研究、4. それらを包括的に分子コンフォメーション、表面電位などから検索するバイオインフォマティック的アプローチに分類できるが、1の研究では井上豪や高野和文、村上聡らは大きな良い結晶を迅速に調製する方法を研究発展させている。特に井上らの結晶化受託会社「創晶」の創立は事業化した成果である。2の研究では研究者が多く、それぞれの領域で重要な発見をしているが、水島恒裕、濡木理らが著名な学術誌に比較的多く引用される論文を発表している。芳賀貴弘の非天然アミノ酸をタンパク質に導入する方法は応用に近い研究で、成果をあげている。3の領域では永井健治、根元知己、小沢岳昌、西坂崇之がそれぞれ特徴的な可視化方法を発展させてタンパク質の機能解明に貢献している。4の研究は木下賢吾、長野希美らによってなされたが、研究者のツールとして重要な研究だが、多様なタンパク質機能探求の黒子の役割にとどまり、タンパク質研究においてはDNA研究の時に比べ脚光を浴びる成果に乏しい。また、さらに大きな領域研究に発展している研究として木下賢吾はSORST(立体構造情報を利用した蛋白質間相互作用様式の予測法の開発)でバイオインフォマティック的アプローチを深化している。永井健治はタンパク質可視化技術を5年型さきがけ(ナノサイズ高輝度バイオ光源の開発と生命機能計測への応用)や産学連携(ニコンバイオイメージングセンター)に発展させている。長野希美はJST BIRDでバイオインフォマティック技術を実用化している。濡木理はSORSTで遺伝子翻訳機構の統合的解明、松浦友亮はERATO(四方微小反応場)で細胞内反応の特性を解明している。村上聡はCRESTで異物排出機構の詳細を追求している。また、さきがけ終了後の多くの研究も研究者は各種の賞を受賞している(表2-5)。

本追跡調査で明らかになったのは、「さきがけ研究」参加研究者はその後の研究についてもこの領域を大きく発展させ、国際的な主要雑誌に発表され引用が多い研究がなされていることである。現在のタンパク質構造科学研究の中核に「さきがけ研究」参加研究者が多く存在し、領域の発展に寄与していることが明らかになった。

研究領域単位で研究を遂行する「さきがけ研究」制度の長所が活用されこの領域の研究が進展したことが証明された。研究者の選考に当たっては、研究期間の3年間で確実に成果の上がることのみを求めず、長期的展望を持ち骨太の構想の下に進めるタイプの研究計画も採択されたことが、研究期間終了後の発展と、大きな成果に結びついたと考えられる。

第3章 研究成果から生み出された科学技術的、社会的及び経済的な波及効果

3.1 「色素タンパク質による生体機能の時空間的な不活性化法の確立」

永井健治（北海道大学電子科学研究科 教授）

3.1.1 研究成果の発展状況

(1) さきがけ期間中の研究成果

さきがけ研究では、cDNA にコードされた光増感物質を開発することによって、細胞内小器官や細胞の役割の解明を目指した。蛍光タンパク質開発にも研究を展開させ、従来の性能を大きく凌駕する蛍光タンパク質や蛍光タンパク質性の機能プローブを開発しバイオイメージングへの応用でその実用性を確認した[1-2]。更に、シナプスにおける F アクチンと G アクチンの刺激に対する平衡状態の制御機構を解明した[3]。

(2) さきがけ終了後の発展状況

(a) 光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内の生体分子の動きの可視化技術の開発：FRET を利用した光変換蛍光タンパク質 Phamret

近年、紫外線などの光刺激によるスイッチングで蛍光色を変化させることのできる光変換蛍光タンパク質が細胞や分子の「動き」を解析するために用いられるようになった。従来の光変換蛍光タンパク質では蛍光波長の変化を観察するために、波長の違う 2 種類の励起光を用意する必要があった。永井らは、二つの蛍光タンパク質を繋げたキメラ蛍光タンパク質をデザインしてスイッチング前後の 2 色の蛍光(前:シアン色, 後:緑色)を 1 種類の励起光で観察することのできる光変換蛍光タンパク質“Phamret (photo-activation-mediated resonance energy transfer ; ファムレット)”を開発した[4]。1 種類の励起光で観察できるため、特殊な光学系を使わずに、光変換によって生じた 2 種類の蛍光を同時に測定することが可能になり、動きの速い分子の挙動を映像化することができるようになった。また、光刺激によるダメージを受けやすい生物には観察のために与える光の量は 1 種類の励起光だけでよいため負担が少なくなった。

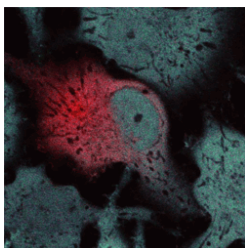


写真1 光変換タンパク質を利用した細胞内タンパク質動態解析

<http://www.es.hokudai.ac.jp/nano/NanosystemsPhysiology.html>

(b) 群青色蛍光タンパク質シリウスの開発

長波長の蛍光をもつ蛍光タンパク質⁶⁷が豊富な種類をもつものに対し、短波長の蛍光を発する変異体の種類は少ない。永井ら⁶⁸は蛍光タンパク質の発色団⁶⁹とそれを取り巻くアミノ酸に変異を導入することで、紫と青色の中間色である群青色の蛍光を発するタンパク質“Sirius(シリウス)”の開発に成功した[5]。これにより、15年ぶりに蛍光タンパク質の最短波長発光記録が更新⁷⁰された。従来の蛍光タンパク質とは異なり、Sirius はいかなる pH 条件下でも安定した蛍光を発するという特徴をもつため、これまで困難であった酸性環境下にある細胞内小器官内でのタンパク質動態の観察が可能となった。また、Sirius を用いた Dual FRET⁷¹により、同一細胞内での複数の生理現象を可視化することも実現した。

⁶⁷ 2008年のノーベル化学賞の受賞対象となった緑色蛍光タンパク質 (GFP, Green Fluorescent Protein) は、1960年代に下村脩博士によってオワンクラゲから発見された。1990年代に GFP の遺伝子が単離され、生きた細胞にその遺伝子を導入するだけで蛍光を作り出すことができることが明らかになって以来、生物学研究における重要なツールとして多くの研究者に利用されてきた。現在までに、GFP を構成するアミノ酸の一部を他のアミノ酸に置換した GFP の蛍光色変異体が数多く開発された。また、サンゴやイソギンチャクなどオワンクラゲ以外のたくさんの生物種から新しい蛍光タンパク質が発見されてきた。とりわけ長波長の蛍光を発する蛍光タンパク質は2008年のノーベル化学賞を受賞したロジャー・ツェン博士によって数多く開発され、生命科学研究に大きく貢献してきた[6]。

⁶⁸ 北海道大学大学院理学院生命理学専攻修士課程(当時)の友杉亘氏、自然科学研究機構生理学研究所の計画共同研究プログラムに基づく根本知己准教授らとの共同研究

⁶⁹ 分子内に存在し、ある特定の光を吸収して励起されると蛍光を発することのできる構造単位。一般に有機化合物中で二重結合と単結合の繰り返しからなる π 電子共役系をもつ原子団からなる。オワンクラゲ由来の GFP においては、セリン、チロシン、グリシンの3つのアミノ酸が自己触媒的に環化、脱水、酸化を行い、蛍光発色団が形成されることが知られている。

⁷⁰ Sirius の吸収極大は 355nm、蛍光極大は 424nm であり、1994年に報告された青色蛍光タンパク質 BFP の 380nm および 450nm よりもさらに短波長側に移行した。

⁷¹ 蛍光共鳴エネルギー移動。エネルギー供与体 (ドナー) となる蛍光タンパク質の励起エネルギーがエネルギー受容体 (アクセプター) となる別の蛍光タンパク質へ移動する現象。FRET が生じるためにはドナーとアクセプターが 10nm 以内に接近しなければならない。また、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルの重なりが大きいほど FRET 効率が大きくなる。FRET をうまく利用することによって、カルシウムイオン等の生体分子の濃度変化や生体内に存在するタンパク質の構造変化・相互作用などを生きた細胞内でリアルタイムに観察することができる。

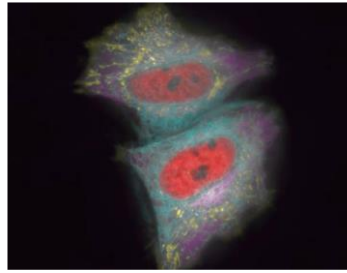


写真 2. Sirius を含む 4 つの蛍光タンパク質で 4 重染色した HeLa 細胞
細胞の中の核に Sirius, 小胞体に mseCFP, ミトコンドリアに Venus, 微小管に mCherry を発現させ, それぞれ可視化した. 上図はこれらの画像を重ね合わせたもの. 4 重染色しても, それぞれの細胞小器官およびタンパク質を明確に可視化することができた.

<http://www.es.hokudai.ac.jp/news/img/2009-04-07-nagai.pdf>

(c) 世界最高の検出感度をもつカルシウムイオンセンサー“カメレオン-Nano”の開発に成功

細胞内の極微量(nM:ナノモラー-)レベルのカルシウムイオン(Ca²⁺)のわずかな濃度変化を超高感度に検出することができる蛍光性 Ca²⁺センサーを開発することに成功した[7]. これにより, 従来は捉えることができなかった"細胞種毎の静止期における Ca²⁺濃度の違い"や"大脳皮質神経活動の高感度検出", "生きた動物の神経ネットワークや筋肉組織の活動パターンの同時計測", "大規模ネットワークにおける細胞間シグナル伝達計測"に成功した.

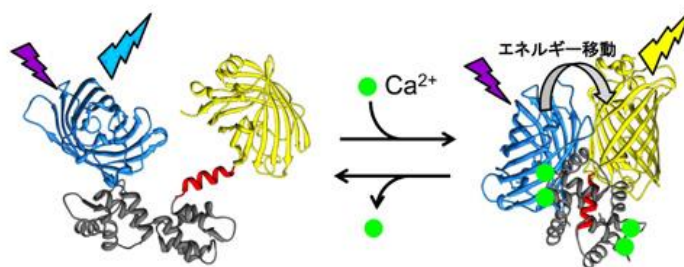


図 1. カメレオン-Nano の構造模式図

カメレオン-Nano では CaM (灰色) と M13 ペプチド(赤色)のつなぎ目のアミノ酸数を増やすことでカルシウムイオン (緑色) の結合力を増加させている.

[北海道大学プレスリリース <http://www.hokudai.ac.jp/news/2010/08/lab-2.html>]

(d) 青, 緑, 赤の蛍光を発する超高性能蛍光性 Ca²⁺センサータンパク質の開発に成功

永井らは 細胞活動の指標となる Ca²⁺を鋭敏に検出することができる青, 緑, 赤などの各色蛍光性 Ca²⁺センサーの開発に成功した[8]. 三色を使い分けることによって, 複数の細胞の様子と同時に分かる. 他の各種蛍光センサーと組み合わせることで, 神経を含む多くの細胞の

働きを多面的に同時測定することが可能になる。また、従来は最大で 10 倍であった明度を最大 26 倍まで向上させた[9]

(e) 超高輝度化学発光タンパク質ナノ-ランタン(Nano-lantern)の開発

化学発光タンパク質と蛍光タンパク質をハイブリッド化することで、化学発光の強度が従来よりも 10 倍以上明るく光る超高輝度化学発光タンパク質ナノ-ランタン(Nano-lantern)を開発した[10]。このナノ-ランタンをプローブに利用することによって自由行動下におけるマウス体内の癌組織を実時間検出することに成功した。更に、ナノ-ランタンを改変して Ca^{2+} や cAMP, ATP を検出できる発光プローブの開発にも成功した。これらの発光プローブは励起光を必要としないため、蛍光タンパク質ではできなかった観察による新たな発見が期待される。

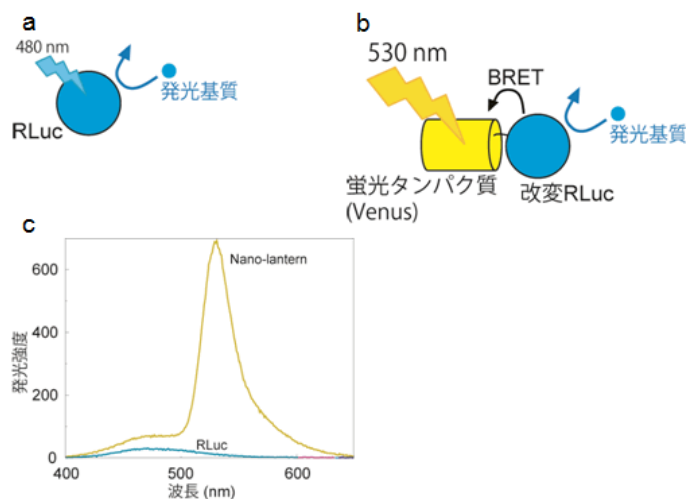


図 2. ナノスケールの光源：ナノ-ランタンの発光メカニズムと発光強度

- a 従来は RLuc に酸化された発光基質は発光効率が低く、480nm（青色）の光を微弱ながら放出する。
- b ナノ-ランタンでは、改変 RLuc に酸化された発光基質のエネルギーは隣接する蛍光タンパク質(Venus)に移動する。蛍光タンパク質は発光効率が高いため、530nm（黄色）の光を強く放出する。
- c 精製したタンパク質でスペクトルを測定するとナノ-ランタンは従来の RLuc よりも 10 倍以上明るく光ることが明らかになった。

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20121212/index.html>

3.1.2 研究成果の科学技術の進歩への貢献

(1) さきがけ「光の利用と物質材料・生命機能」領域

2008 年、さきがけ「光の利用と物質材料・生命機能」領域(研究総括：増原宏)に採択され「ナノサイズ高輝度バイオ光源の開発と生命機能計測への応用」(2008～2015)に取り組んでいる。この研究課題では、天然ナノ発光タンパク質であるルシフェラーゼの発光強度を試験管内分子進化により大幅に向上させ、かつ様々な波長変異体も開発することを目指す。これらの高輝度発

光タンパク質を“ナノスケール局所照明光源”として利用することで、生細胞内のタンパク質 1 分子観察や小動物個体内の生理機能を実時間で観察できるようにし、また、発光基質を細胞内で産生させることで“発光の完全自動化”も達成し究極のバイオイメージング法の確立を目指す。

(2) 科研費新学術領域「少数性生物学—個と多数の狭間が織りなす生命現象の探求—」(領域代表:永井健治)(2011~2015)

http://paradigm-innovation.jp/outline/outline_index.html

「個と多数の狭間である少数個の要素分子が織りなす化学反応システム」に注目し、顕微光学、MEMS 工学、蛍光物理化学、合成有機化学、タンパク質工学、細胞生物学、システム生物学、数理科学の諸分野を融合することにより技術開発系と実験系、理論系の専門家が手を組み、細胞内生体分子をターゲットとした「少数性生物学」と称する新学問領域を形成した。特に、少数の生体分子からなる化学反応システムにおける分子間の協同性、超コヒーレンス、自己組織化、ポアソン性、エルゴード性、多階層間相互作用などの観点からのアプローチを進めている。

招待講演

4th International Symposium on Photonic Bioimaging	2012.9.17
14th international congress of histochemistry	2012 . 8 . 27
第 52 回生命科学夏の学校	2012 . 8 . 25
第 24 回高遠シンポジウム	2012 . 8 . 23
第 19 回細胞生物学ワークショップ	2012 . 8 . 6
大阪府立大学	2012 . 8 . 1-3
Alberta University	2012 . 7 . 16
新学術領域「超高速バイオアセンブラ」第一回若手研究者シンポジウム	2012 . 7 . 4
SPIE Smart Nano + Micro Materials and Devices 2011	2011 . 12 . 5
The 14th Oriental COCODA Conference	2011 . 10 . 28
第 3 回光イメージングに関する国際シンポジウム	2011 . 10 . 21
第 84 回日本生化学会大会	2011 . 9 . 21
2011 Promega NewTechnology Seminar	2011 . 9 . 20
第 49 回日本生物物理学会年会	2011 . 9 . 17
第 20 回バイオイメージング学会	2011 . 9 . 1-2
第 20 回バイオイメージング学会の公開市民講座	2011 . 8 . 31
第 14 回浜松医科大学メディカルホトニクス・コース	2011 . 8 . 9
日独修好 150 周年シンポジウム	2011 . 7 . 15
大阪大学免疫学フロンティア研究センター	2011 . 7 . 11

第 63 回細胞生物学会	2011 . 6 . 28
Academia Sinica (Taiwan)	2011 . 5 . 26
IUPAC 国際分析科学会 2011	2011 . 5 . 24
第 44 回発生生物学会	2011 . 5 . 19
ローザンヌ工科大学	2011 . 4 . 19
2nd International Symposium on Photonic Bioimaging	2011 . 2 . 6-10
スタンフォード大学化学科	2011 . 1 . 25
台湾成功大学	2011 . 1 . 21

[研究室 HP を基に作成]

3.1.3 社会経済への波及

(1) 疾患の原因解明や治療への応用可能性

永井らが開発してきた数々の Ca^{2+} センサーは様々な疾患の原因解明や治療に貢献することが期待される。「世界最高の検出感度をもつ Ca^{2+} センサー “カメレオン-Nano” の開発」は、カルシウムイオン動態の異常が関連する様々な疾患（てんかん発作や躁うつ病、循環器疾患、アレルギー疾患、内分泌異常など）の原因究明や創薬スクリーニングにつながるものと期待される。また、「青、緑、赤の蛍光を発する超高性能蛍光性 Ca^{2+} センサータンパク質の開発」は光遺伝学的技術と組み合わせて、行動、思考、記憶など計測が難しい感情関連の神経細胞活動の計測、神経回路の動作メカニズムの解明が一層進み、精神・神経系の病気の解明・治療に役立つことが期待される[9].

(2) 発光プローブの多様な応用可能性

永井らが開発してきた発光プローブも広範な応用可能性が考えられる。群青色蛍光タンパク質シリウスは GFP のような従来の蛍光タンパク質とは異なり、目に見えない紫外線(UV-A)を吸収するので、これを用いることによって屋外の紫外線の強さを蛍光発色で分かりやすく示す繊維や遺伝子改変園芸植物などの開発につながることを期待される。また、酸性環境下でも安定なので、胃の中のように酸性環境下にある組織中の分子レベルのイベントを観察できる可能性がある。例えば、生きた試料を用いてピロリ菌が胃がんを発症するメカニズムを解析する道が拓ける可能性もある。この他にも、癌細胞など細胞の中が酸性化していても安定なことから、二光子レーザー顕微鏡を使い生体内の癌細胞のモニタリングすることができるようになる可能性もある。この群青色蛍光タンパク質シリウスは読売新聞、毎日新聞、日刊工業新聞など約 20 紙に記事が掲載され、更に日経産業新聞の“2009 年技術トレンド第五位”に選出される[12]など社会の注目度は高い [13] .

一方、ナノランタンおよびそこから生み出された発光プローブは遺伝子にコードされてい

るため、任意の生物の多様な組織における計測を可能にし、多くの疾病の原因究明や効果的な創薬スクリーニングの開発が期待される。

(3) ニコンバイオイメージングセンター開設

永井が中心となって北海道大学内に、世界で3番目のニコンイメージングセンター⁷²（北海道大学ニコンバイオイメージングセンター）を当領域出身研究者が中心となって設立した。

（2005年11月1日に開所。）同センターは、ニコンを初め多くの企業から技術や機器を提供され、蛍光バイオイメージング技術に関する更なる技術改良、或いは新技術開発およびその生物学研究への応用を推進することを目的としている。また、様々なバイオイメージングを可能にする4つのステーションを常設し、北海道大学のみならず日本国内外の多くの研究者に顕微鏡技術に親しんで貰う環境を提供している。

参考文献

- [1] T. Nagai, et al., *Nature Biotechnology*, 20, 1, 87-90, 2002)
- [2] T. Nagai, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10554-10559, 2004
- [3] K. Okamoto, et al., *Nature Neuroscience*, 7, 1104-1112, 2004
- [4] T. Matsuda, et al., *Nature Methods*, 5, 339-345, 2008
- [5] W. Tomosugi, et al., *Nature Methods*, 6, 351-353, 2009
- [6] <http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2009/04/post-6.html>
- [7] K. Horikawa, et al., *Nature Methods*, 7, 729-732, 2010
- [8] Y. Zhao, et al., *Science*, 333, 1888-1891, 2011
- [9] <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20121212/index.html>
- [10] 日本経済新聞 2011年9月15日
- [11] K. Saito, et al., *Nature Communications*, 3, 1262, 2012
- [12] http://paradigm-innovation.jp/outline/outline_index.html
- [13] 日経産業新聞 2010.01.14
- [14] 北海道大学 HP

⁷²北海道大学と(株)ニコンインステックとの産学連携による。米国・ハーバード大学、欧州・ハイデルベルグ大学に引き続く世界で三番目のニコンイメージングセンター。

3.2 「マイコプラズマ滑走運動の分子メカニズム」

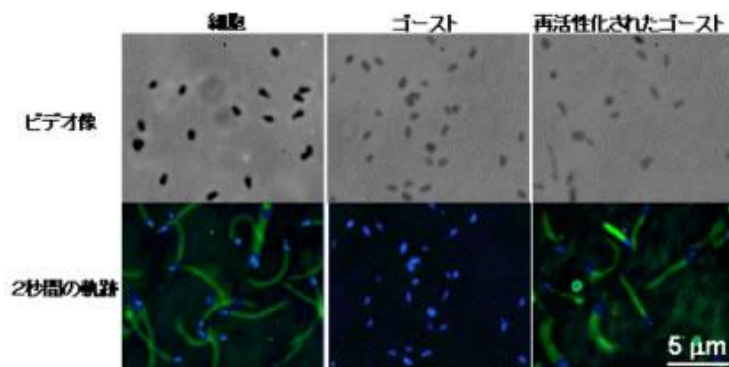
宮田真人(大阪市立大学大学院 理学研究学科)

3.2.1 研究成果の発展状況

(1) さきがけ研究における主な研究成果

(a) 新しいバクテリア細胞運動の装置を発見

従来知られている運動系と異なる運動性⁷³のバクテリアの一種であるマイコプラズマの細胞運動の分子メカニズムを解明した。ガラス上を滑走するマイコプラズマ細胞の膜を界面活性剤で短時間に溶かし、細胞質を取り除くことにより、生存も運動もできない“ゴースト”をガラス上に作製した。この“ゴースト”にATP(アデノシン三リン酸)を加えることによりマイコプラズマの運動を再現し(図 1), バクテリアであるマイコプラズマの運動が ATP のエネルギーによることを示した⁷⁴ [1-2]。これらの知見に基づき、宮田らは「マイコプラズマモービルの滑走運動に参与する 3 つのタンパク質の内、主に Gli349[3-5]で形成されたあしが、ATP の加水分解によって生じた力によって動かされ、ガラスへの結合、ストローク、解離、もどりを繰り返して細胞を前に引っ張る」というモデルを提案した(図 2)⁷⁵。



⁷³マイコプラズマゲノムの塩基配列やこれまでに同定された運動に関するタンパク質の構造から、細胞の片方の極に“接着器官”により宿主の細胞にはり付いたまま“滑走運動”を行うマイコプラズマの運動はモーター蛋白質とバクテリアのべん毛モーターのどちらのものとも全く異なるメカニズムであると考えられていた。

⁷⁴多くの運動性バクテリアで見られる“(バクテリアの)べん毛運動”では、細胞外部から内部へのイオンの流れによりべん毛モーターが回転する。ところが、運動性のバクテリアの中には、イオンの流れではなく、真核生物と同じようにATPをエネルギー源として動くものの存在が示唆されていた。しかしながら、これまでにそれが証明されたことはなかった。

⁷⁵宮田らはこれまでに滑走運動に直接関与する三つの巨大なタンパク質を *Mycoplasma mobile* から同定、単離した。Gli123, Gli349, Gli521 と名づけられた 3 つのタンパク質は、膜突起の基部 (neck) に局在しており、既知のタンパク質とは全く異なる分子構造を持っていることを明らかにした。

図1 “ゴースト”の再活性化[2]

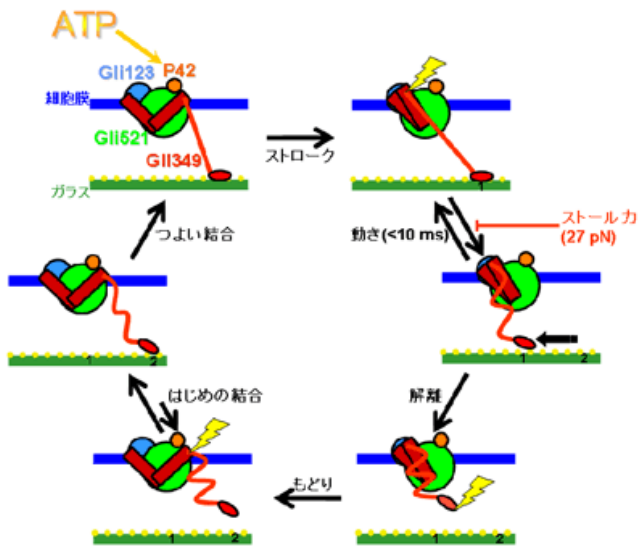
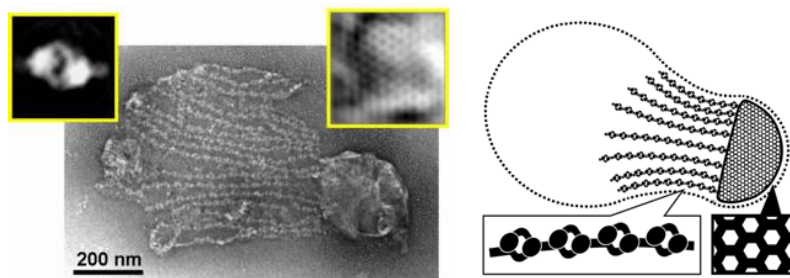


図2 宮田らによるマイコプラズマ滑走運動モデル

また、そのタンパク質の形態[6]、力学的性質[7]を解明した。更に、接着の詳細[8]、マイコプラズマによる高効率の微小回転モーターの構成の試み[9]など精力的に研究を行った。

(b) マイコプラズマ滑走装置の構造解析

マイコプラズマ細胞の膜から滑走装置部分のみを抽出⁷⁶し電子顕微鏡により詳細に解析⁷⁷することで、“くらげ構造”(図 3)と形容できるユニークな形状をとることを明らかにした[10-11]。この“くらげ構造”が細胞骨格となり、細胞形態を維持し滑走の力を受けとめていると考えられる[12]。



⁷⁶ マイコプラズマ細胞の膜を界面活性剤で溶かし、DNA を分解酵素で取りのぞくことにより、滑走装置のみを電子顕微鏡下に可視化し、詳細に解析することに成功した。

⁷⁷ マイコプラズマ細胞内部に細胞骨格構造以外に可溶性のたんぱく質や DNA などが存在するため、これまでの超薄切片を用いた電子顕微鏡観察では十分な画像コントラストが得られなかった。そこで細胞膜と DNA をそれぞれ界面活性剤と DNA 分解酵素で除去し、細胞骨格構造のみを残す方法を取り、これまで見いだせなかった細胞骨格様構造を発見することに成功した(図 3)。

図3 “くらげ構造”

(2) さきがけ終了後の発展状況

さきがけ研究後もマイコプラズマの接着性運動の詳細な研究を更に深め、発展させている。現在、宮田らは先に提案した作業仮説を基に、高解像度の電子顕微鏡観察、結晶化、一分子計測、再構築、遺伝子操作などを積極的に研究に取り込んでメカニズムの本質に踏み込みつつある。

また、2010年には国際マイコプラズマ学会、ルイスディーンズ賞(Louis Dienes Award), 2012年には第15回北本賞⁷⁸を受賞するなど、その業績は学界においても高く評価されている。2012年から科研費新学術領域研究の代表者として研究を牽引し、さきがけ研究の成果は更に発展している。以下に科研費新学術領域研究の概要について述べる。

科研費新学術領域研究「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」(2012~2016)⁷⁹

生体運動の中には、細菌や原生生物の表面運動や遊泳運動などのように、“モータータンパク質”のみでは説明できないメカニズムが多数存在している。科研費新学術領域研究「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」では、生体運動のメカニズムの中でこれまでにあまり理解の得られていないものを最新の解析技術を駆使することによって原子レベルから超分子複合体レベルの研究により解明することを目指している。運動マシナリーを萌芽研究として育てる一方で、モータータンパク質研究エキスパートの本分野への参入を推進する。具体的には、これまでそれぞれ全く別の分野で活躍していた運動超分子マシナリーの研究者が一堂に会し、微生物学、遺伝学、生化学、生物物理学、構造生物学などで用いられる技術をマルチスケールに用いて研究を展開する。

この研究分野の発展に不可欠なサブナノメートルスケールで生体構造を可視化する三つの技術、すなわちクライオ電子線トモグラフィ、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法、高速 AFM (原子間力顕微鏡) の応用技術についても開発・支援する。

宮田らは、これまでに明らかにしてきた滑走の装置とその構成タンパク質、直接のエネルギー源、結合対象などを基に提案した運動メカニズムの作業仮説にさらに踏み込むため、電子顕微鏡観察による滑走装置の三次元像撮影、結晶構造解析、光学顕微鏡と高速 AFM による ATP 加水分解に伴う滑走装置の構造変化解明に取り組んでいる。この領域研究の中ではさきがけ「生体分子の形と機能」領域で研究を行った西坂が連携研究者として滑走装置の構造変化解明を担当しており、さきがけ「生体分子の形と機能」領域が波及している様子が窺える[13]。

⁷⁸杏林大学・北本治名誉教授(第一内科学講座)を記念して創設された学会賞。優れたマイコプラズマ研究を行ないマイコプラズマ学会へ多大な貢献をされた研究者に授与される。

⁷⁹ 2012年度-2016年度 1,162,600千円

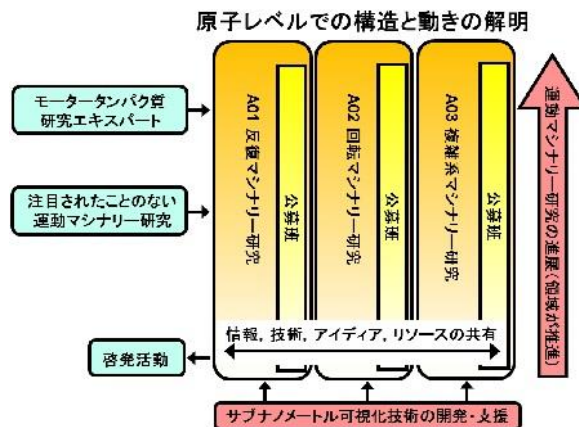


図4 科研費新学術領域研究「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」概念図[13]

3.2.2 研究成果の科学技術の進歩への貢献

(1) さきがけ研究成果の科学技術の進歩への貢献

(a) マイコプラズマ滑走運動メカニズムのモデル提唱

3.3.1(1)で先述したように、宮田らはこれまでに滑走運動に直接関与する三つの巨大なたんぱく質 Gli12, Gli349, Gli521 を *Mycoplasma mobile* から同定・単離した。これら三つのたんぱく質は、膜突起の基部 (neck) に局在しており(図5)、既知のたんぱく質とは全く異なる分子構造を持っていること [15]や 50 ナノメートル長の"あし"様構造物が多数 neck 部分から突き出しており、それぞれの先端がガラス表面に接している様子[16]も明らかにしている。さらに、界面活性剤で細胞膜に穴をあけ、細胞質をとりのぞいた"ゴースト"が ATP の添加により、もと同じ速度で滑走することを示した。これらの発見を踏まえて、宮田らは、「主に Gli349 で形成されたあしが、ATP の加水分解によって生じた力によって動かされ、ガラスへの結合・ストローク・解離・もどりをくり返して細胞を前に引っ張る」というモデルを提案した[1]このように、“マイコプラズマの滑走運動”という研究分野を確立したことは科学技術における特筆すべき貢献といえる。

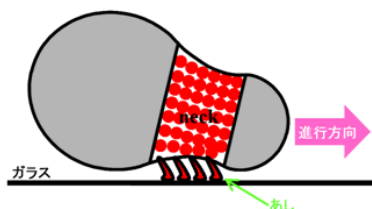


図5 マイコプラズマ細胞の模式図[2]

(b) マイコプラズマ滑走運動機構研究の拡がり

宮田らが「マイコプラズマの滑走運動」の研究を始めた1997年頃には、この現象のメカニズムについての研究例は殆どなかった。宮田らは、最速種のマイコプラズマ・モービレを主な材料に用いて、滑走装置と構成タンパク質、力学特性、結合対象、エネルギー源、細胞骨格構造、“あし”の実際の動きなどを短期間に次々と明らかにし、マイコプラズマの滑走運動が、これまでに調べられたことのない全く新しいメカニズムで起こっていることを証明してきた。さらに、そのメカニズムを説明する作業仮説である、「ムカデモデル（パワーストロークモデル）」を提案した。また、これらと並行して、ヒト肺炎の病原菌であるマイコプラズマ・ニューモニエの滑走装置の概要、滑走の“あし”であるタンパク質、細胞分裂様式などを明らかにした。PNASに掲載された中根・宮田の論文「マイコプラズマ=モービレの細胞骨格“くらげ構造”」に関連する図は日本細菌学会などの欧文誌、*Micriobiology and Immunity* の表紙第一号に採用されるなど各種の学術雑誌の表紙に取り上げられている。(図5) 現在、宮田らはこの作業仮説を基に、高解像度の電子顕微鏡観察、結晶化、一分子計測、再構築、遺伝子操作などを積極的に研究に取り込んでメカニズムの本質に踏み込みつつある。

このように宮田らが地道に取り組んできた研究の進展と蓄積により、この分野は実験結果を基に具体的な仮説とそれを検証するための実験計画を立てることができるようになった。これは、他分野の研究者がそれぞれの発想でこの生体運動の分子メカニズム研究分野に参入できる下地ができたことを意味し[15]、今後、研究分野の更なる拡大が期待される。



図6 各種学術雑誌の表紙に掲載された宮田らの研究成果

(2) 社会経済への波及の見通し

(a) マイコプラズマ性疾患に対する特效薬への期待

2011年から、マイコプラズマ肺炎はかつてない世界的な大流行となっているが、これは耐性菌の出現が原因と考えられている。宮田らが明らかにしてきたマイコプラズマの滑走運動は、マイコプラズマが有する特異的な現象であると同時にマイコプラズマ感染に深く関連するためマイコプラズマ感染において重要な位置を占める。マイコプラズマ滑走運動についての理解を

深めることは、人間における安全性の高いマイコプラズマ特効薬の開発につながると考えられる。また、鳥や豚などの深刻なマイコプラズマ性疾患に対する特効薬開発においても重要な知見になると期待される[2, 11]。実際に宮田らは、インフルエンザウイルスの特効薬としても使われている、シアル酸オリゴ糖類似化合物が、マイコプラズマの特効薬となりえることを示唆した[16]。

(b) マイコプラズマ滑走運動メカニズム研究を基にした応用研究

宮田らの研究を基にした応用研究も始まっており、一つはマイコプラズマの“あし”の部分のタンパク質をターゲットにマイコプラズマの治療薬を探索しようというものであり、もう一つはマイコプラズマを MEMS の動力として使おうというものである[17]。後者についてはすでに *M. mobile* で回転する微小モーターが作られている⁸⁰[18-19]。

(c) 研究成果の報道

PNAS に掲載された中根・宮田の論文「マイコプラズマ=モービルの細胞骨格“くらげ構造”[10]」は社会の関心も集め NHK のニュースや朝日新聞、読売新聞、毎日新聞、日本経済新聞など多くの一般紙でも報道された。また、肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) の写真や動画がテレビの報道番組⁸¹で取り上げられるなど社会からの注目は高い。

[参考文献]

- [1] A. Uenoyama & M. Miyata, Natl. Acad. Sci. USA., 102, 12754-12758, 2005
- [2] <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20050823/>
- [3] A. Kusumoto et al., Microbiology, 150, 4001-4008, 2004
- [4] A. Uenoyama, et al., J. Bacteriol. 186, 1537-1545, 2004
- [5] S. Metsugi, et al., Biophysics 1, 33-43, 2005
- [6] J. Adan-Kubo, et al., J. Bacteriol., 188, 2821-2828, 2006
- [7] S. Seto, et al., J. Bacteriol., 187, 3502-3510, 2005
- [8] R. Nagai, et al., J. Bacteriol., 188, 6469-6475, 2006
- [9] Y. Hiratsuka, et al., Natl. Acad. Sci. USA, 133, 13618-13623, 2006
- [10] D. Nakane & M. Miyata, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 19518-19523, 2007
- [11] <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20071120-2/index.html>
- [12] D. Nakane & M. Miyata, J. Bacteriol., 191, 3256, 2009

⁸⁰ 筆頭著者の平塚祐一はさがけ「ナノ製造技術の探索と展開」(研究総括：横山直樹)において「生体分子モーターを動力源としたマイクロマシン」の研究を行った。

⁸¹ 2010年12月14日放映の報道ステーション(テレビ朝日), 同年12月15日放映の目覚ましテレビ(フジテレビ)など。

- [13] <http://bunshi5.bio.nagoya-u.ac.jp/~mycmobile/index.html>
- [14] T.Nonaka et al., J. Bacteriol., 192, 636, 2010
- [15] 宮田真人, 日本細菌学雑誌, 62, 3, 347-361, 2007
- [16] T.Kasai, D.Nakane, H.Ishida, H.Ando, M.Kiso, M., J. Bacteriol., 195,429, 2013
- [17] 宮田真人, 現代科学, 5, 27-32, 2008
- [18] Y.Hiratsuka, et al., Proc. Natl. Acad.. Sci. USA, 103, 13618, 2006
- [19] Y. Hiratsuka, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun, 331, 318, 2005

3.3 「構造ゲノム科学およびプロテオミクスに基づく新規の遺伝暗号翻訳装置の同定と機能発現メカニズムの解明」

濡木 理（東京大学大学院 理学系研究科）

3.3.1 研究成果の発展状況

(1) さきがけ期間中の研究成果

遺伝暗号翻訳過程において、t-RNA はプロセッシング、転写後修飾、アミノアシル化を受けてキー分子として働く。これらの諸過程において各酵素群は弱い相互作用および強い結合によって機能ユニットごとに「装置」を形成していることが示唆されている。そこで、構造ゲノム科学およびプロテオミクスを駆使して、新規の遺伝暗号翻訳装置を同定し、装置全体の高次構造を解明し、機能発現のメカニズムを原子レベルで明らかにすることを目指した。その結果、(i) 鋳型非依存性 RNA ポリメラーゼ反応機構の解明[1]、(ii) ATP とアミノ酸からアミノアシル AMP を合成する glutamyl-tRNA 合成酵素(GluRS)の好熱菌由来結晶を用いて ATP と GluRS 酵素の相互作用を解明[2]、(iii) アーケオシン tRNA グアニントランスグリコシレースと結合した tRNA の結晶構造の解析とその活性部位を推定し[3]、構造解析と機能発現の基盤を築いた。

(2) さきがけ終了後の発展状況

生命現象を原子分解能レベルで理解することを目的として、生物学的に重要なタンパク質・核酸の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、その情報に基づき、機能発現のメカニズムについて、(i)非翻訳 RNA 関連、(ii) 膜タンパク質、(iii) シグナル伝達と癌を中心に研究を展開し、多くの研究成果を得ている。

(i) 非翻訳 RNA 関連

(a) 「ピロリジン tRNA 合成における翻訳の直交性の分子構造基盤」 [4]

22 番目の天然アミノ酸といわれているピロリジンがタンパク質合成に組み込まれる際に、他の tRNA やアミノアシル tRNA 合成酵素と反応することなく、ピロリジン tRNA(tRNA^{PyI}) とピロリジン tRNA 合成酵素(PyIRS)は大腸菌内で翻訳の直交性を保つことで、30 億年前から生息している古細菌の遺伝暗号の拡張が行われたメカニズムを解明した。

本研究の成果に基づいて、さらに遺伝暗号を拡張し、新しいアミノ酸をタンパク質に取り込ませて、新規機能を持たせることが可能となり、非天然タンパク質を用いたイメージング解析やNMRのプローブ調製など、プロテインエンジニアリングへの応用が期待されている。

そのために、東海大学工学部生命化学科の北條 裕信教授と共同研究を展開し、L-リジンの誘導体(ピロリジン類似体)を、PylRS と tRNAPyl を用いて、大腸菌で組み換えタンパク質として発現させることに成功した[5].

(ii) 膜タンパク質

(a) 「生体内のマグネシウムバランスを維持するメカニズムを解明」 [6]

細胞は、金属イオン等、化学物質の外界環境からの取り込み・排出を厳密に制御しており、その機能は、生体膜に埋め込まれた輸送体タンパク質によって担われている。膜輸送体の遺伝子は全遺伝子数の 10%にも及ぶ。輸送体について構造面から理解することを目的とし、マグネシウム輸送体 MgtE(高度高熱菌由来)の X 線結晶構造解析を行い、マグネシウムセンサーが生体内のマグネシウム濃度を感知することでマグネシウムが過剰な時には輸送体によるマグネシウム取り込みを阻害し、欠乏している場合には、輸送体によるマグネシウム取り込みを促進させるというマグネシウムバランス維持のメカニズムを発見した(図1).

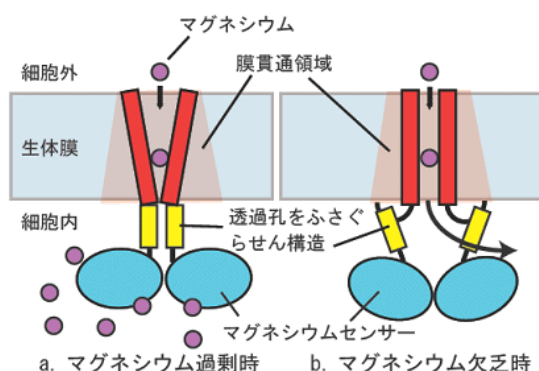


図1 マグネシウムバランスを維持するメカニズムの概念図

a. マグネシウム過剰時: マグネシウムセンサーが細胞内のマグネシウムの過剰を感知した場合、らせん構造の立体配置を変化させ、マグネシウム透過孔に蓋をしてこれ以上細胞内にマグネシウムが取り込まれないようにする。 b. マグネシウム欠乏時: マグネシウムセンサーが細胞内のマグネシウムの欠乏を感知した場合、らせん構造の立体配置を変化させ、マグネシウム透過孔の蓋を外して細胞内へのマグネシウムの取り込みを促進する。

(b) 「イオンを利用して細胞の外にタンパク質を運ぶメカニズムを初めて解明—原子レベルの膜タンパク質の構造から見えてきた仕組み— [7,8]

細胞内で合成されるタンパク質は、膜透過装置Secトランスロコンの働きにより、膜を通過し

て細胞外に移動したり、正しい方向で膜中に埋め込まれたりする。Sec 膜タンパク質群の構造を決定することによって、タンパク質の膜透過・膜組込み機構の解明を目指した。SecDFの詳細構造を電子顕微鏡の6Å解像度で、世界で初めて明らかにし、その結果から「SecDFは水素（陽）イオンの細胞内への流入を利用して大きな構造変化を繰り返しながら、ペリプラズム側で膜透過基質タンパク質と相互作用し、膜透過の高効率化に寄与する膜内在性シャペロンである」との結論を得た。図2はその様子を機能モデルとして、示したものである。

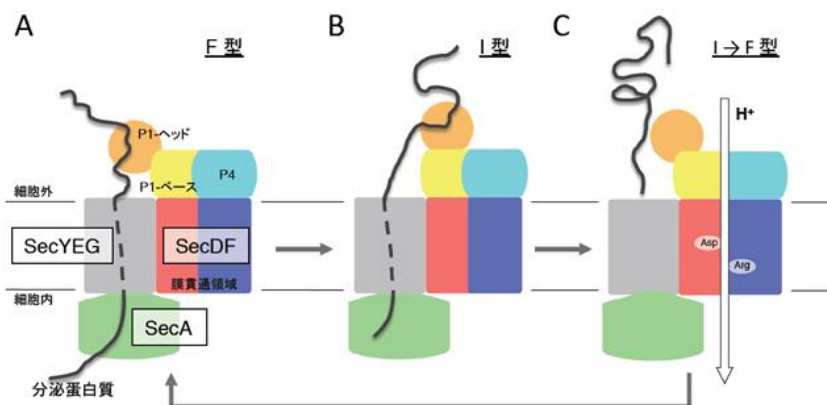


図2 プロトン駆動力(PMF: proton motive force)を利用した SecDF の機能モデル

A: SecDF は SecYEG と複合体を形成し、SecA ATPase によって SecYEG を介して運搬された前駆体タンパク質は細胞外で SecDF の細胞外領域と相互作用する。B: その後 SecDF は F 型から I 型へと前駆体タンパク質を保持したまま構造変化を起こし、タンパク質を透過させる。C: 最終的にプロトンの透過により、SecDF はタンパク質を手放し、I 型から F 型へと構造変化する。このような過程を繰り返すことにより SecDF はタンパク質の膜透過に関与するとのモデルを提唱しました。※必須のアルギニン残基 (Arg)、アスパラギン酸残基 (Asp) を図中に模式的に示す。

(c) 「光が当たると陽イオンを細胞内に取り込む膜タンパク質の構造とメカニズムを解明」[9]

緑藻類から単離された光駆動性の陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシンは、480 nm の青色光を吸収すると陽イオン、とくに Na⁺を取り込むという性質を持っている。このタンパク質をニューロンに発現させ青色光を照射すると主に Na⁺が細胞内に流入する結果、脱分極が生じニューロンは興奮するため、神経生物学で着目されている。

そこで、チャンネルロドプシンの結晶構造を 2.3 Å という高分解能で決定し、さらに、この結晶構造と電気生理学的な解析の結果、発色団であるレチナールの結合部位の詳細な構造や長らく論争となってきたチャンネルロドプシンのイオン輸送経路を解明し、同時に、チャンネルロドプシンの初期反応を明らかにすることに成功した。この結果は、光エネルギーを陽イオンの輸送に

変換する分子機構の一端を明らかにしたというだけでなく、神経生物学のツールとしてより有用な変異型チャネルロドプシンをデザインするため必要な構造情報を提供したという点にも大きな意義がある。図3はチャネルロドプシンの結晶構造とバクテリオロドプシンとの活性の比較を示したものである。現在、構造から得られた知見を実証するために、本さきがけの同窓である京都大学 理学部 化学科 林 重彦准教授と共同で、レチナールとロドプシンのMD(Molecular Dynamics)シミュレーション解析を実施している。

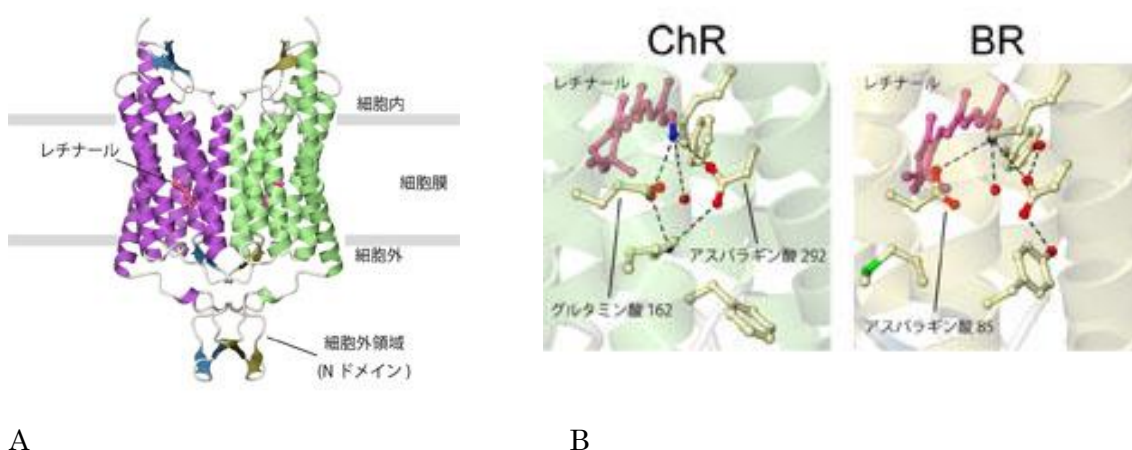


図3 チャネルロドプシン(ChR)の2量体の結晶構造とバクテリオロドプシンとの比較

A: ChRの結晶構造から、ChRは従来の微生物型ロドプシンと同様7本の膜貫通ヘリックスから形成されている一方で、アミノ末端側に大きな細胞外領域(Nドメイン)を持っていることが分かった。ChRはこのNドメイン同士の相互作用によって、微生物型ロドプシンとしては初めて二量体構造を形成していることが判明した。
 B: ChRを他の微生物型ロドプシンであるバクテリオロドプシン(以下、BR)と比較した場合、光サイクルの初期反応で非常に重要な働きをしているアミノ酸残基が、予想に反してBRとChRでは異なっていることが示唆された。

(iii) シグナル伝達と癌

(a) がん転移の原因タンパク質の構造解明:

「脂質メディエーターリゾホスファチジン酸(LPA)の産生酵素であるオートタキシン(ATX)がLPAを産生するメカニズムを分子レベルで解明」 [10]

マウス由来のATXと脂肪酸種の異なる5種類のLPAの複合体の立体構造をX線結晶構造解析から、ATXが複数種のLPCを基質として切断する分子メカニズムを解明した。活性部位に通じる疎水性チャンネルが存在し、そこに脂質分子が結合していることを発見した(図4)。

また、疎水性チャンネルを塞ぐような変異体酵素の解析から、LPA産生活性は保持されている一方で、細胞運動性促進活性が著しく低下していることを見出し、がんの細胞運動にも

関与し、がん転移の原因となっていることを示した。

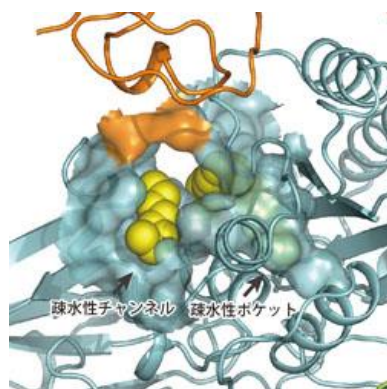


図4 ATXの疎水性チャンネル

疎水性ポケットにLPAが結合している一方で、疎水性チャンネルに脂質が結合。ATXによって産生されたLPAはこのチャンネルを通してLPA受容体へと効率的に運ばれると考えられる。

(iv) その他

「Toll様受容体と、その受容体の下流で自然免疫に働くシグナル伝達タンパク質の解明」

核内において細胞内シグナルを末梢で制御する転写調節因子タンパク質、例えば、NF- κ Bシグナルに直結した自然免疫（抗腫瘍免疫）に働くタンパク質群（複合体）の立体構造をX線結晶構造解析により解明し、立体構造から提唱される作業仮説を検証するため機能解析を行い、慢性炎症のメカニズムを原子分解能レベルで解明をすすめている。この研究は、CREST「慢性炎症による疾患発症機構の構造基盤」（2011～）において進行中である。

「生殖細胞、ゲノムが変異しない仕組みを解明」2012/10/22 21:51」

東京大学の濡木理教授、塩見美喜子教授らのグループは、生殖細胞でゲノム（全遺伝情報）の変異が起こらないようになる仕組みを解明した。たんぱく質「ズッキーニ」によって、変異を起こす「動き回る遺伝子（トランスポゾン）」の働きを抑える小さなRNA（リボ核酸）が作られることを突き止めた。変異が起きると不妊の原因になるとされる。論文が英科学雑誌ネイチャー（電子版）に掲載された。慶応義塾大学、東北大学との共同研究。ショウジョウバエの小さなRNA作りに関与しているとされるズッキーニを大腸菌に作らせて、大型放射光施設「Spring-8」で構造を解析した。RNAを切る部位が存在し、切断する酵素だとわかった。ズッキーニの遺伝子を一部変えて、ショウジョウバエの生殖細胞に入れると、小さなRNAが作れなくなった。ショウジョウバエやマウスでズッキーニの機能がなくなると不妊になることは知られていた。

「細胞内蛋白質を外に運ぶ仕組みの解明」[日経産業「2011. 5.23」]

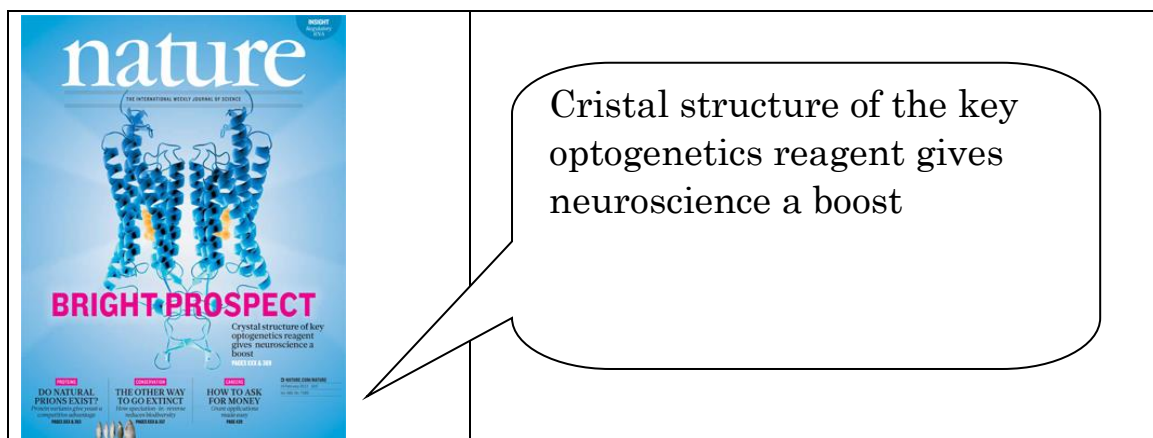
京産大・伊藤維昭教授らと共同で、細胞内で作られた蛋白質を膜を通じて外に運び出す仕組みを解明。針の穴に糸を通すように蛋白質を通しており、穴を通過中の蛋白質を引っ張る仕組みがあることが分かった。病原菌などもこの仕組みを備えており、菌を抑える新しい抗生物質の発見につながる可能性もある。細胞内で作られる蛋白質の内、約 3 割は細胞外に出て働く。細胞膜には蛋白質が通過する穴があり、膜蛋白質が複合して出来ている。研究チームは通過時に働く膜蛋白質に注目。高度好熱菌から採取して結晶にした上で Spring-8 において X 線構造解析を行った。

3.3.2 研究成果の科学技術の進歩への貢献

(1) 神経生物学発展への貢献

2005年以降、チャネルロドプシンの光照射によって特定の神経細胞を興奮させられる性質は、自由行動を行っている生物を用い、ニューロンの集団を非常に高い時間分解能および空間分解能で興奮させることのできる有用なツールとして、神経生物学の分野では、利用されつづけてきた。濡木らの構想解析とそのメカニズムの解明は有用な神経生物学のツールをデザインするための基本的枠組みを提供したという意味で、神経生物学や神経病理学の分野にも大きく寄与することが期待される [9]。チャネルロドプシンの結晶構造に関する論文は、2012年のNature誌の表紙を飾り、神経科学の突破口となることが有望視されている。

ことに、2006年から盛んになった光遺伝学(optogenetics、オプトジェネティクス)において、有用なツールとなり、光活性化イオンチャネルであるチャネルロドプシンを特定のニューロンに遺伝子工学的手法を用いて強制発現させた後、これらの細胞に特定の波長の光を照射することにより、標的とするニューロンをそれぞれ興奮または抑制させることが可能となった。



(2) 細胞内外へのイオンや薬剤などの輸送の研究への貢献

生命体に欠くことのできない基本的な生命現象の一つであるタンパク質の輸送を原子レベルで解析した膜タンパク質 SecDF の詳細構造の成果は、膜を超えた細胞内外へのイオンや薬剤等の輸送の研究にも大きな影響を与えることが期待される。

因みに、2003年のノーベル化学賞はピーター・アグリの細胞膜に水輸送のための「水チャネルタンパク質（アクアポリン）」の発見と、ロデリック・マッキノンカリウムの「イオンチャネルの構造と仕組みの解明」に対して与えられており、膜タンパク質の機能を解明した最初の研究として評価された。同様に、濡木のマグネシウム輸送体の構造解析や他の輸送体タンパク質の立体構造解析は、生化学、分子生物学分野に構造と機能という面から大きな影響を与えるものとなる。

3.3.3 研究成果の応用に向けての発展状況

(1) 構造解明から新規創薬研究の基盤形成

(a) microRNA 関連タンパク質

micro RNA (miRNA) は、Argonaute⁸²などのタンパク質と RISC 複合体を形成し、特定の遺伝子の mRNA に相補的に結合し、これを切断することで、遺伝子の発現を調節している。RNA 干渉 (RNAi) などほとんどの ncRNA に関して、その作用機序は解明されていない。そこで、特に RNAi に注目し、様々な真核生物の体細胞および生殖細胞において siRNA あるいは miRNA が Dicer から Argonaute タンパク質にローディングされ、mRNA の切断あるいはヘテロクロマチンを形成するに至る過程を構造生物学的視点から追及し、解明を進めている。これらの成果は RNA 創薬につながるものとして、期待される。

(b) 膜透過関連タンパク質

Mg 輸送体は、大腸菌からヒトなどの哺乳類まで広く保存されており、その輸送メカニズムは普遍的なものであると考えられる。そのため、マグネシウム欠乏がその一因とされる心筋梗塞などの疾患の治療へつながる研究を大きく前進させるものと期待される。

近年、多剤耐性遺伝子を持つ病原菌の院内感染が問題となっているが、これらの菌体は SecDF を持つため、SecDF の細胞外領域を標的とする新しいタイプの抗生物質の発見につながるなど医学への応用も期待される。

(c) 疾患関連酵素の阻害

LPA は G タンパク質共役型受容体に作用し、多岐にわたる細胞応答を引き起こすことで、正常な発生過程における血管形成に必須な酵素タンパク質であると同時に、がん、動脈硬化、肺線維症、神経因性疼痛など様々なヒト疾患に関与していることが知られており、創薬ターゲットとしても注目されている。

⁸² RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) を構成する触媒タンパク質

ATX はがん、肝硬変、肺線維症などの病態と深く関係することから、世界中の研究グループが ATX の阻害剤の開発に取り組んできたが、ATX の立体構造が不明だったこともあり、治療薬として使用可能な阻害剤は得られていなかった。本研究で得られた立体構造情報は、抗がん剤として有望な選択性と親和性に優れた阻害剤開発の基盤となる。濡木は東大大学院薬学系研究科の長野哲雄教授の薬物ライブラリーから得られた ATX 阻害剤の複合体が Zn イオンと結合していることも解明し、国内の大手製薬企業との共同研究も進行し、薬物動態試験も実施されている。この化合物は初めての大学発の創薬として、今後の研究開発が期待されている。

TGF- β シグナルを制御する調節因子の構造解析については、TGF- β は、細胞の分化を促進する反面、細胞外マトリックスの蓄積、血管新生、免疫抑制を引き起こすことから細胞の癌化を促進する因子として注目されており、TGF- β の拮抗剤は癌の治療に有効であると考えられる。

3.3.4 その他

(1) 受賞

2005 年、2007 年 手島工業教育資金団手島記念研究賞、2007 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)、2008 年第 5 回 日本学術振興会賞「遺伝暗号翻訳の動的機構の構造基盤」、2009 年平成 21 年度 持田記念学術賞、2010 年第 18 回 木原記念財団学術賞 受賞、2011 年第 27 回 井上学術賞 受賞、平成 23 年度 日本結晶学会学術賞 受賞など数多くの賞を受賞している。科研費・基盤研究費、特定領域研究費、新学術領域研究費で研究されている。

[参考文献]

- [1] Tomita, K., Fukai, S., Ishitani, R., Ueda, T., Takeuchi, H., Vassylyev, D.G., Nureki, O. , "Structural basis for template-independent RNA polymerization", *Nature*, 430, 700-704, 2004
- [2] Sekine, S.-I., Nureki, O., Dubois, D.Y., Bernier, S., Chênevert, R.G., Lapointe, J., Vassylyev, D.G., Yokoyama, S."ATP binding by glutamyl-tRNA synthetase is switched to the productive mode by tRNA binding" *EMBO J.*, 22, 676-688, 2003
- [3] Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S., Yokoyama, S. , "Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme" *Cell*, 113, 383-394, 2003
- [4] Nozawa, K., O'Donoghue, P., Gundllapalli, S., Arais, Y., Ishitani, R., Umehara, T., Söll, D., Nureki, O., "Pyrrolysyl-tRNA synthetase-tRNAPyl structure reveals the molecular basis of orthogonality", *Nature*, 457, 1163-1167, 2009
- [5] Katayama, H., Nozawa, K., Nureki, O., Nakahara, Y., Hojo, H., "Pyrrolysine analogs as

substrates for bacterial pyrrolysyl-tRNA synthetase in vitro and in vivo", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 76, 205-208, 2012

[6] Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R., Nureki, O., "Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter", *Nature*, 448, 1072-1075, 2007

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

[8] Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassylyev, D.G., Ito, K., Nureki, O., "Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures", *Nature*, 455, 988-991, 2008

[9] Kato, H.E., Zhang, F., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Nishizawa, T., Hirata, K., Ito, J., Aita, Y., Tsukazaki, T., Hayashi, S., Hegemann, P., Maturana, A.D., Ishitani, R., Deisseroth, K., Nureki, O., "Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel", *Nature*, 482, 369-374, 2012

[10] Nishimasu, H., Okudaira, S., Hama, K., Mihara, E., Dohmae, N., Inoue, A., Ishitani, R., Takagi, J., Aoki, J., Nureki, O., "Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators", *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 205-213, 2011