「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」
研究領域 領域活動・評価報告書
－平成28年度終了研究課題－

研究総括 若槻 壮市

1. 研究領域の概要

本研究領域は、先端的ライフサイエンス領域と構造生物学との融合によりライフサイエンスの革新に繋がる「構造生命科学」と先端基盤技術の創出を目指します。すなわち最先端の構造解析手法をシームレスに繋げ、原子レベルから細胞・組織レベルまでの階層構造ダイナミクスの解明と予測をするための普遍的原理を導出し、それらを駆使しながら生命科学上重要な課題に取り組みます。具体的には、様々な生命現象で重要な役割を果たしているタンパク質を分子認識のコアとして位置づけ、以下の研究を対象とします。

（1）タンパク質同士または核酸や脂質等の生体高分子との相互作用や、糖鎖修飾、ユビキチン化、リン酸化、メチル化などの翻訳後修飾及び生体内外の化合物による時間的空間的な高次構造の変化等を階層的に捉えることにより機能発現・制御機構を解明する研究
（2）ケミカルバイオロジー等の手法による将来の分子制御、分子設計に資する研究
（3）結晶構造解析、溶液散乱、核磁気共鳴（NMR）、電子顕微鏡、分子イメージング、質量分析、計算科学、バイオインフォマティクス、各種相互作用解析法等、様々な位置分解能、時間分解能（ダイナミクス）、天然度（in situ から in vivo）で構造機能解析を行う新規要素技術開発
（4）要素技術を相補的かつ相乗的に組み合わせることで、重要な生命現象の階層構造ダイナミクスの解明をめざす相関構造解析法の創出

こうした目標達成に向け、最先端の構造生物学的アプローチとの融合により生命科学上の挑戦的なテーマを独自の視点で取り組む研究、または、独自に開発した革新的構造機能解析手法で細胞分子生物学、医学、薬学分野の重要な課題解決に取り組む研究を奨励します。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名
件数： 12件（内、大挑戦型0件）
※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針
選考の基本的な考えは下記の通り。
1）、「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」領域に設けた選考委員15名の協力を得て、研究総括が行う。
2）選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
3）選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準（URL：http://www.jst.go.jp/pr/info/info986/sankou2.html）の他、以下の点を重視した。
（1）最先端の構造生物学的アプローチとの融合により生命科学上の挑戦的なテーマを独自の視点で取り組む研究
（2）独自に開発した革新的構造機能解析手法で細胞分子生物学、医学、薬学分野の重要な課題解決に取り組む研究

4. 事前評価の選考の経緯
一応募課題につき領域アドバイザー15名・外部評価者9名の合計24名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選　考	書類選考	面接選考	採択数			
対象数	165件	30件	12件	内訳	3年型	12件（0件）
					5年型	0件（0件）

（　）内は大挑戦型としての採択数。

5．研究実施期間

平成25年10月～平成29年3月（3年型）

6．領域の活動状況

1）領域会議：7回

2）CREST 構造生命科学との合同キックオフミーティング：2回(平成 25、26 年)

3)さきがけ、CREST 4 研究領域合同シンポジウム

CREST 生命動態、構造生命科学、さきがけ細胞構成、構造生命科学 4 研究領域が合同国際シンポジウム(JST CREST-PRESTO joint international symposium～Structural Biological Dynamics)を開催（平成 27 年 11 月）

4）1 期生の研究成果報告会(2 期生はポスター発表)(平成 27 年 11 月)

5）2 期生の研究成果報告会(平成 29 年 1 月)

6）SciFoS(Science for Society)活動

インタビューを通じて自らの研究を位置づけなおし、今後の研究のステップアップにつなげることを目的にした SciFoS に研究者 2 名が参加(平成 27 年度)

7）研究総括（または技術参事）の研究実施場所訪問(サイトビジット)：11 回

研究実施期間中に海外在住研究者 1 名を除く 11 名を訪問し、研究環境・体制の確認、上司への協力依頼を行った。

7．事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会（研究報告会、領域会議等）での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

（事後評価の流れ）

平成29年1月　評価会開催

平成29年3月　研究総括による事後評価

平成29年3月　被評価者への結果通知

8．事後評価項目

（1）外部発表(学術論文、口頭発表等)、特許等研究成果の発信状況

（2）学術賞、学会招待講演等外部からの評価状況

（3）研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果（今後の見込みを含む）

9．評価結果

総論・・・採択された課題は GPCR、モータータンパク質、小胞体糖タンパク質フォールディング装置、K^+イオンチャネル、RNA 干渉に関わる Argonuate タンパク質、ゲノム編集ツールとしてのヌクレアーゼ、オートファジータンパク質群の細胞内動態、膜タンパク質複合体による物質輸送体等の生命科学の重要課題を研究対象とし、細胞内NMR、超高磁場 NMR、高速AFM、ナノスケール光顕／電子線トモグラフィー、MEMS（マイクロデバイス)、X 線結晶構造解析、X 線小角散乱、重水素標識を利用した中性子小角散乱、計算機科学等の最先端の研究手法を組み合わせて解析する研究が多く含まれている。

さきがけ研究は基本的には個人型研究であるが、本戦略目標の基本的な考え方である異分野連携を推奨した結果、さきがけ研究者同士あるいは外部研究者との様々な連携、共同研究が行われ、研究が進展したことは非常に喜ばしい。

ゲノム編集技術では、バクテリアのもつ CRISPR-Cas 免疫機構にかかわる Cas9 タンパク質（DNA 切断酵素）が応用されている。Cas9 は案内役となるガイド RNA と結合し、ガイド RNA と塩基相補的な DNA 配列を見つけ出し、その場所を正確に切断する。西増研究者は Cas9 単体の結晶を捨て、Cas9-sgRNA-DNA 複合体の結晶化に集中するという戦略をとることにより、熾烈な研究競争のなか、世界で初めて Cas9-sgRNA-DNA 複合体の結晶構造を報告した。さらに、小型の *Staphylococcus aureus* 由来 Cas9（SaCas9）、Cas9 オルソログのなかで最大の *Francisella novicida* 由来 Cas9（FnCas9）、Cas9 オルソログのなかで最小の *Campylobacter jejuni* 由来 Cas9（CjCas9）の結晶構造を世界にさきがけて決定し、CRISPR-Cas9 の作動機構を原子レベルで解明した。さきがけ研究による本研究成果は世界的にも反響が大きく、CRISPR-Cas 分野の世界的なトップランナーの一人として認知され、研究者としての大躍進につながった。
成果は Cell 誌等に発表され、プレスリリースを 4 回行った。

1. 安達 成彦 研究者 「転写基本因子 TFIID の結晶構造解析を介したクロマチン転写制御機構の解明」
評価結果・・・純度に改善すべき点はあるが、転写基本因子 TFIID を構成する発現量が多くない 15 種類のタンパク質の超分子複合体を発現し、90%の純度の精製に成功し、結晶化の前段階まで進められたことは大きな進展である。
ただし、TFIID の結晶化と立体構造解析の達成のためには、なんらかのブレークスルー（新しい技術開発）等が必要かもしれないので、タンパク質試料作製の効率化、再構成の方法の簡便化等の技術を種々検討して開発して欲しい。巨大な複合体タンパク質の競争力はこの辺から生まれると期待される。

2. 猪股 晃介 研究者 「細胞内 NMR 計測法によるタンパク質の構造多様性解析」
評価結果・・・細胞内への同位体ラベルタンパク質導入にエレクトロポレーションが有効であること、in cell NMR に PCS(Pseudocontact Shift)法が有用であることを示した。また、NMR 試料管内培地循環システムを改良し、細胞状態の維持を可能とした。上記のように個々の技術課題では一定の成果を得た。
しかし、残念ながら、タンパク質の細胞内での構造多様性を明らかにするまでには至らなかった。in cell NMR を汎用性のある測定法とするためには、未だ多くの技術的な改良が必要であるので、既存技術を直ぐに導入した上で、独自開発すべき問題を絞り込み、技術開発に取り組んで欲しい。

3. 上田 卓見 研究者 「NMR による脂質二重膜中における GPCR の動的構造平衡の解明」
評価結果・・・重水素交換により NMR の感度を高め、rHDL(reconstituted high-density lipoprotein)脂質二重膜中の β2アドレナリン受容体を NMR 解析することに成功した。また、P2X4 受容体の構造平衡状態を解析し、イオン透過性のメカニズムを明らかにした。NMR を用いた GPCR の機能解析としては、非常に高いレベルに達したと考える。
今後は、手法を GPCR の生理的機能の説明に適応していくことが重要であるので、さらに試料の量を減らす手法等を開発して欲しい。

4. 古寺 哲幸 研究者 「新規高速原子間力顕微鏡で解き明かすミオシン V の化学-力学エネルギー変換機構」
評価結果・・・高速 AFM の技術開発を進め、高速 AFM のもつ優位性（さわれる、リアルタイム）を存分に活かし、ミオシン V の歩行運動の従来定説を覆す数々の観察事実を見出した。高速 AFM の特徴を十分に引き出した質の高い成果と考える。他の研究者との共同研究においても成果を出した。
独自技術の高度化とその技術を以て科学上の問題を解決していくことによる生命科学への貢献とおそらく同等に重要なことは、その技術を世界の多くの研究者が使えるようにすることである。その開発者である古寺研究者は、その道筋をつけ得る立場にあり、その責任を背負っているとも言えるのでぜひ尽力していただきたい。

5. 佐藤 匡史 研究者 「小胞体糖タンパク質フォールディング装置作動メカニズムの解明」
評価結果・・・グルコシル化を触媒する全長 UGGT（UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素）の X

線小角散乱、高速 AFM による動的構造情報を取得した。また、UGGT の Trx3 ドメインと触媒ドメインの結晶構造解析に成功した。さらに、脱グルコシル化を触媒するグルコシダーゼⅡの触媒サブユニットの結晶構造解析に成功し、グルコシル化糖鎖のプロセシングに関する重要な知見を得た。制御サブユニットの構造解析にも成功した。以上のように目標とした事項の多くはほぼ達成できた。

グルコシダーゼⅡの構造を解き、反応機序を明らかにしたこと、そして UGGT の構造についても概ね解明し、反応機序に新規の理解を与えたことは、ともに糖鎖科学への構造生物学からの重要な貢献であると評価できる。

6. 角野 歩 研究者 「原子間力顕微鏡を駆使した膜中イオンチャネル集団動作機構の革新的理解」
評価結果・・・pH 依存性カリウムチャネル KcsA の開閉と集合・離散の関係とそのメカニズムの解明を目指し、pH 依存的な離合集散を AFM 観察するための再構成膜調製法を確立した。ポアドメインと膜との相互作用、膜の相状態、厚さが影響を及ぼすことを見いだしたことは立派な成果であると評価できる。

チャネルの開閉についてより詳細な機能解析を行うために、AFM 観察と電気生理計測を同時に行うことができるような技術をぜひ開発して欲しい。

7. 中西 孝太郎 研究者 「Agoタンパク質による遺伝子発現制御機構の構造生物学的基盤」
評価結果・・・遺伝子発現を制御する 4 種類の Argonaute (AGO)タンパク質の一つである AGO4 と RNA の複合体の結晶構造を 1.9 オングストロームの分解能で明らかにし、AGO2 や変異体との構造・機能の比較から、guide RNA の AGO 結合特異性を説明した。AGO の種類、構造がターゲットの特異性を決定しているという結論は明確である。ほぼ目標通りの成果を達成した。

今後は、構造生物学の専門性を生かし、堅実な努力を続けることで、より大きな系の中での AGO の働きを理解する方向に進んでいって欲しい。

8. 西増 弘志 研究者 「立体構造にもとづく次世代ゲノム編集ツールの創出」
評価結果・・・各種の CRISPRーCas9 の結晶構造解析を立て続けに成功した。また、PAM(protospacer adjacent motif)認識配列を変えた各種 Cas9 の変異体の構造ベース設計・機能確認・結晶構造解析にも成功した。また、古寺研究者との共同研究により、高速 AFM を使ってダイナミックな動きの観察ができたことは今回のさきがけの大きな成果である。

ゲノム編集の応用に関しても国際競争になっているので、これからも画期的な成果を挙げて頂きたい。

9. 野田 岳志 研究者 「ウイルスゲノム転写装置の動態解析」
評価結果・・・さきがけに採択されたのをきっかけに高速 AFM による観察を始め、vRNP (ribonucleoprotein)からの RNA 合成時の構造解析をおこない、合成された RNA 鎖が 1 本鎖の状態とおそらく鋳型 RNA と新規に合成された RNA が結合したループ状の 2 本鎖の状態で結果が得られた。AFM によるイメージングは大変説得力がある。

クライオ電子線トモグラフィーによるスナップショットで vRNP 複合体や合成 RNA の低分解能構造も得られており研究は進捗している。自身の専門でない技術分野で、様々な共同研究をアレンジして目的達成を図ったことは大変評価出来る。

今後は、感染細胞を用いての更なる精査を期待したい。

10. 濱崎 万穂 研究者 「ナノスケール細胞内位置情報・3次元超微細膜構造を基盤とするオートファジータンパク質ネットワークの相関構造解析」
評価結果・・・光学顕微鏡と電子顕微鏡を使ってオートファゴソーム(AP)の形成機構を調べるというとても興味深いテーマの研究である。小胞体(ER)とミトコンドリアが接触している部分から AP の膜形成が行われること、AP 形成に関係する因子が ER とミトコンドリアが接触している AP 形成部位に局在していることを明らかにした。光学顕微鏡・電子顕微鏡相関法(CLEM)と電子線トモグラフィーによる3次元超微細膜構造観察による解析に力を入れたところが研究のユニークな点であり、細胞生物学的には進展があった。

簡単なテーマではないので、今後、他の手法を持った研究者と協力して進めていくのが望ましい。

11. 光武 亜代理 研究者 「緩和モード解析によるタンパク質構造ダイナミクスの解明」
評価結果・・・シミュレーションでよく研究されているペプチドであるシニョリンの分子動力学トラジェジェクトリ(時系列データ)を用い、緩和モード解析結果と主成分解析等の他の解析法による結果を比較することにより、緩和

モード解析の有用性を示唆した。また、さきがけ研究者も含めた多くの研究者と精力的に共同研究を行ったことは高く評価できる。
今後は、更に実験系との融合を進めて、実験との相補的な解析となっていることをもっとアピールして欲しい。

12. 渡邉 力也 研究者 「膜タンパク質の構造変化と物質輸送の1分子同時計測技術の開発」
評価結果・・・人工生体膜マイクロチップを新規開発し、輸送速度が極めて遅いトランスポータの1分子機能解析、人工生体膜の外側、内側の脂質組成の非対称化、膜電位操作法として金ナノ電極を実装した人工生体膜マイクロチップの開発（パッチクランプ、イオン拡散電位の代替技術）、人工生体膜マイクロチップ上にF1-ATPase を再構成することによる構造変化の一分子観察 等数多くの技術開発に成功した、
人工生体膜チップの開発は、これからの応用研究のみならず、基礎研究のためにも大きな意義を持つものであり、高く評価される。チップの技術開発だけでなく、それを用いてトランスポータの活性を実際に測る等は大きな成果である。
今後、人工生体膜チップ技術を活用して生命科学上の課題を解決できるケースが多々でてくると思われる。その課題を抱える研究者が実際に人工生体膜チップ技術を使いこなせるかがポイントなので、他の人が使えるように尽力していただきたい。

10. 評価者
研究総括 若槻 壮市 米国 SLAC 国立加速器研究所 光科学部門 教授/スタンフォード大学 医学部 構造生物学 教授

領域アドバイザー（役職は平成 29 年 3 月末現在）

稲垣 冬彦＊1	北海道大学 先端生命科学研究院 次世代ポストゲノム研究センター 特任教授
岩田 想	京都大学 大学院医学研究科 分子生体統御学講座 分子細胞情報学分野 教授
小椋 利彦	東北大学 加齢医学研究所 神経機能情報研究分野 教授
上村 みどり	帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所 創薬化学研究所 上席研究員
木下 タロウ	大阪大学 微生物病研究所 免疫不全疾患研究分野/ 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 糖鎖免疫学研究室 教授
栗栖 源嗣	大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質結晶学研究室 教授
阪下 日登志	産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 総括研究主幹
杉尾 成俊	東京工業大学 科学技術創成研究院 特任教授
高木 淳一	大阪大学 蛋白質研究所 分子創製学研究室 教授
永田 和宏	京都産業大学 総合生命科学部 教授
中村 春木	大阪大学 蛋白質研究所 所長 蛋白質情報科学研究室 教授
濡木 理	東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻 構造生物学・生化学 教授
原田 慶恵	大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質ナノ科学研究室 教授
宮脇 敦史	理化学研究所 脳科学総合研究センター 副センター長
吉田 稔 ＊2	理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室 主任研究員

＊1 平成 25 年 4 月～28 年 6 月
＊2 平成 25 年 4 月～

（参考）
件数はいずれも、平成29年3月末現在。

（1）外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	3	88	91
口 頭	208	85	293
その他	18	2	20
合 計	229	175	404

（2）特許出願件数

国　内	国　際	計
6	4	10

（3）受賞等

・古寺　哲幸

2013 年　第 9 回若手奨励賞（日本生物物理学会）

・佐藤　匡史

平成 28 年度名古屋市立大学学長表彰(2016)

・角野　歩

福井大学医学部教員・学生等による優秀論文賞　2014.4

第 91 回日本生理学会大会　優秀ポスター賞　2014.3

・西増　弘志

平成 26 年度　日本結晶学会　進歩賞 2014.11

平成 26 年度　日本生化学会　奨励賞「立体構造から迫る酵素の作動機構」2014.10

SPRUC 2014 Young Scientist Award 2014.9

平成 26 年　平成 26 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞

・野田　岳志

平成 27 年　第 16 回日本顕微鏡学会奨励賞(日本顕微鏡学会)

・濱崎　万穂

平成 27 年度　大阪大学総長奨励賞(研究部門)

・光武　亜代理

分子シミュレーション研究会　学術賞(2013 年 11 月)

・渡邉　力也

公益財団法人アステラス病態代謝研究会　優秀発表賞（2016）

RSC Lab on a Chip Emerging Investigators (2016)

公益財団法人長瀬科学技術振興財団　長瀬研究振興賞（2016）

一般財団法人　田中貴金属記念財団　MMS 賞（2016）

コニカミノルタ画像科学奨励賞　2016.03

平成 27 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞　2015.4

一般財団法人エヌエフ基金　研究開発奨励賞　優秀賞 2014.11

Tokyo ATPase Workshop Best Poster Award　2014.6

（4）招待講演

国際　　24件

国内　103件

別紙

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」領域
事後評価実施　研究課題名および研究者氏名

（3年型）

研究者氏名 （参加形態）	研　究　課　題　名 （研究実施場所）	現　職（平成 29 年 3 月末現在） （応募時所属）	研究費 （百万円）
安達　成彦 （兼任）	転写基本因子 TFIID の結晶構造解析を介したクロマチン転写制御機構の解明 （高エネルギー加速器研究機構　物質構造科学研究所）	高エネルギー加速器研究機構　物質構造科学研究所　特別助教 （　同　上　）	40
猪股　晃介 （兼任）	細胞内 NMR 計測法によるタンパク質の構造多様性解析 （理化学研究所生命システム研究センター）	理化学研究所生命システム研究センター　研究員 （理化学研究所生命システム研究センター　特別研究員）	40
上田　卓見 （兼任）	NMR による脂質二重膜中における GPCR の動的構造平衡の解明 （東京大学　大学院薬学系研究科）	東京大学　大学院薬学系研究科　助教 （　同　上　）	40
古寺　哲幸 （兼任）	新規高速原子間力顕微鏡で解き明かすミオシン V の化学−力学エネルギー変換機構 （金沢大学　理工研究域）	金沢大学　理工研究域　准教授 （　同　上　）	39
佐藤　匡史 （兼任）	小胞体糖タンパク質フォールディング装置作動メカニズムの解明 （名古屋市立大学　大学院薬学研究科）	名古屋市立大学　大学院薬学研究科　准教授 （　同　上　）	41
角野　歩 （専任）	原子間力顕微鏡を駆使した膜中イオンチャネル集団動作機構の革新的理解 （科学技術振興機構(福井大学　医学部)）	科学技術振興機構さきがけ研究者 （日本学術振興会　特別研究員）	45
中西　孝太郎 （兼任）	Agoタンパク質による遺伝子発現制御機構の構造生物学的基盤 （オハイオ州立大学　化学・生化学科）	オハイオ州立大学　化学・生化学科　アシスタントプロフェッサー （　同　上　）	46
西増　弘志 （兼任）	立体構造にもとづく次世代ゲノム編集ツールの創出 （東京大学　大学院理学系研究科）	東京大学　大学院理学系研究科　助教 （　同　上　）	48
野田　岳志 （兼任）	ウイルスゲノム転写装置の動態解析 （京都大学　ウイルス・再生医科学研究所）	京都大学　ウイルス・再生医科学研究所　教授 （東京大学医科学研究所　准教授）	51
濱崎　万穂 （兼任）	ナノスケール細胞内位置情報・3次元超微細膜構造を基盤とするオートファジータンパク質ネットワークの相関構造解析 （大阪大学　大学院医学系研究科）	大阪大学　大学院医学系研究科　准教授 （大阪大学　大学院医学系研究科　助教）	47
光武　亜代理 （兼任）	緩和モード解析によるタンパク質構造ダイナミクスの解明 （慶應義塾大学理工学部）	慶應義塾大学理工学部　専任講師 （　同　上　）	37
渡邉　力也 （兼任）	膜タンパク質の構造変化と物質輸送の1分子同時計測技術の開発 （東京大学　大学院工学系研究科）	東京大学　大学院工学系研究科　講師 （東京大学　大学院工学系研究科　助教）	52

研 究 報 告 書

「転写基本因子 TFIID の結晶構造解析を介したクロマチン転写制御機構の解明」

研究タイプ:通常型
研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研 究 者: 安達 成彦

1. 研究のねらい

生命は極めて性能の良い機械であり、部品サイズの小ささ・エネルギー変換効率の高さ・情報処理の巧みさなどの点においては、人類の創出した機械をはるかに凌駕した性能を有する。その一方で生命の設計図である遺伝情報は、ヒトでさえわずか 750 メガバイトしかないことは驚くべき事実であり、生命は少ない情報を有効活用する何らかの仕組みを獲得したことが想定される。ゲノム DNA から遺伝情報を読み出す初発段階が転写開始反応であることから、転写開始反応は生命が有する巧みな情報処理の一翼を担っていると考えられる。

転写開始反応の分子機構の研究は大腸菌において精力的になされて、1 種類の転写酵素・1 種類の転写開始因子で基本的な反応が遂行されることが明らかにされた。大腸菌と同様に、ヒトを始めとする真核細胞の転写開始反応も、転写酵素・転写開始因子によって遂行されるが、転写酵素は 3 種類、転写開始因子は 6 種類と、非常に複雑化したことが明らかになった。真核細胞における転写開始反応の複雑化の主な原因は、遺伝子の増加によるゲノム DNA の長大化であり、ヒトではおよそ 1 メートルの DNA をわずか数ミクロンの核内に収納する必要がある。ゲノム DNA の核内への収納は、ヒストンタンパク質が約 200bp の DNA と結合してクロマチンと呼ばれる高次構造を形成することで達成されており、ゲノム DNA はヒストンに巻き取られるように核内に収納されている。

しかしながら、ヒストンはゲノム DNA の折りたたみには有用であるが、同時に転写酵素などの接近に阻害的に作用する。そのため、真核細胞における転写開始には、ゲノム DNA 内の標的遺伝子周辺に結合したヒストンを一旦除去する必要がある。そのためには、まずヒストン翻訳後修飾酵素・ヒストン翻訳後修飾認識因子・ヒストン除去因子がヒストンに作用し、さらに、転写開始因子・転写酵素が集合する。この反応にはおよそ 80 種類のタンパク質が関与し、それぞれが集合と解離を繰り返す極めて複雑な反応である。このように複雑な反応の分子機構を解明するには立体構造情報が必須であるが、全ての因子の立体構造を解析することは極めて困難である。

真核細胞の転写反応に関わる因子の中で、転写基本因子 TFIID は正確な位置からの転写に必須な転写開始因子であり、全遺伝子の 9 割の発現に関わる転写開始における重要因子である。さらに、TFIID は先述の真核細胞の転写開始に必要な一連のドメインを全て持っていることから、TFIID の立体構造解析を中心に研究を進めれば、真核生物の転写開始反応の全容を理解できると考え、私たちは TFIID の立体構造解析を目指した研究を開始した。

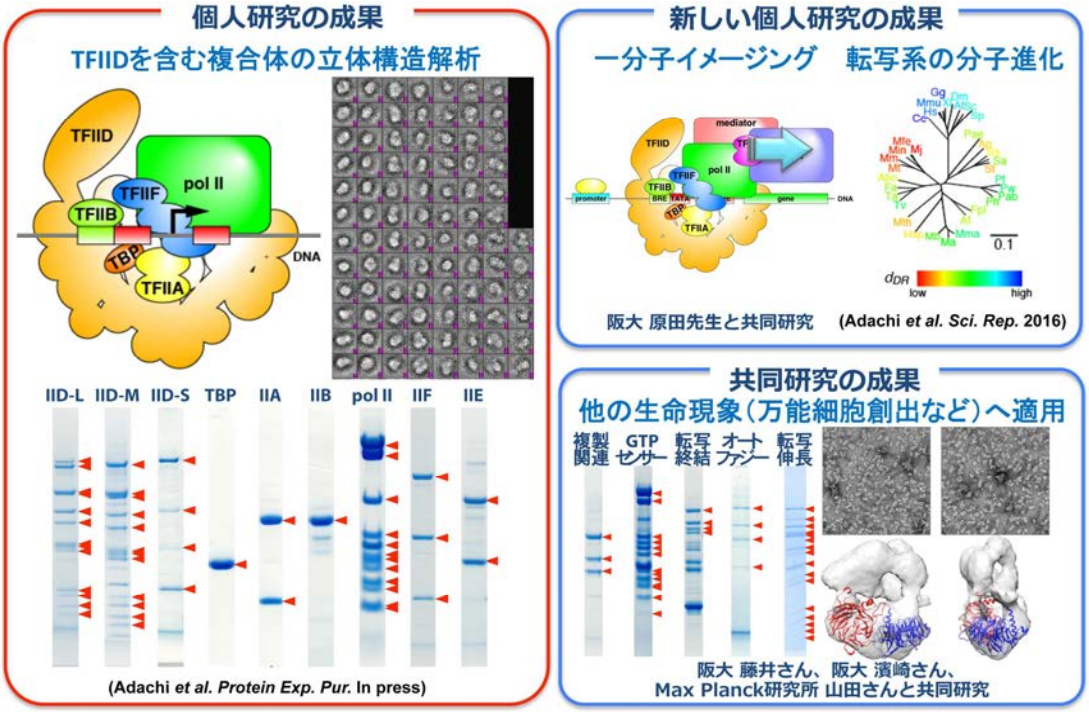
2. 研究成果

（1）概要

TFIID の立体構造解析に向けた大量精製における難点（分子量が大きい・サブユニット数が多い・細胞内での発現量が少ない・精製の過程でサブユニットが脱離しやすい）を、さきがけ研究のサポートを経て克服し、約 90%の純度で TFIID を大量精製する系を確立した。現在は、領域内のさきがけ研究者である阪大・藤井博士との共同研究によって、最終精製標品の品質を電子顕微鏡による負染色像観察で確認しつつ、結晶化スクリーニングを行っている。

また、TFIID は三日月型の形状を持つが、柔軟な形状を持つことが知られている。TFIID の形状を安定化させるためには、三日月型の凹部分に相互作用因子を結合させることが望ましい。私たちは生化学的な相互作用解析や電子顕微鏡による低分解能の単粒子解析から、TFIID の凹部分に相互作用することが予想されている TFIIB, pol II, TFIIF, TFIIE, TFIIA を約 90%の純度で精製した。特に TFIIA については、2 種類のサブユニットを単独で発現させると不溶化するため、精製法の改善を行い、2 種類のサブユニットを融合して発現した後に protease で切り離すことによって、可溶性画分から精製することに成功した［論文リスト 1］。これらの精製標品を用いて、TFIID を含む超分子巨大複合体を再構成して立体構造を解析する計画である。

さらに、超分子巨大複合体の再構成においては、各因子を混合する順序が重要であることから、進化的に誕生した順序を参考にすることを考えた。新しい分子進化の指標を開発して、TFIID の DNA 結合サブユニットである TBP よりも、TFIIB が先に生まれたことを解明し［論文リスト 2］、進化的に誕生した順序で混合することによって、より安定な複合体の再構成を試みる計画である。



（2）詳細

研究テーマ A「TFIID の大量精製法の改善」

TFIID は 15 種類のサブユニットから構成される約 1MDa の複合体であるが、立体構造解析に

向けた大量精製における難点（分子量が大きい・サブユニット数が多い・細胞内での発現量が少ない・精製の過程でサブユニットが脱離しやすい）を、さきがけ研究のサポートを経て克服し、約 90%の純度で TFIID を大量精製することに成功した。

大量精製法の改善において、具体的に検討した項目は、タグの種類（HA タグ、TAP タグなど）、タグを付加するサブユニット（どのサブユニットにタグを付加するかによって、最終精製標品のサブユニット構成が変わってくるため、適切なサブユニットにタグを導入する必要がある）、集菌 OD（TFIID は制御複合体であるため、細胞の対数増殖期以外は発現量が減少するため、集菌時の OD を厳密にコントロールする必要がある）、破砕方法（出芽酵母は細胞壁があり、プロテアーゼの活性も高いため、低温かつ短時間で破砕できる方法を採用する必要がある）、レジンと WCE の比率、溶液条件（TFIID は高塩濃度では安定だが、低塩濃度ではサブユニット間相互作用が維持されないため、適切な塩濃度を維持する必要がある）、レジンの種類（第一段階のタグアフィニティー精製だけでは純度が不十分なので、第二段階としてイオン交換レジンやアフィニティーレジンを網羅的に検討した）、核酸の除去（精製の過程で混入する核酸が RNA であることを突き止め、nuclease によって除去した）、濃縮時の additive の検討（濃縮時の回収率を上昇させるために、複数種類の塩を additive として加えて、その影響を調べた）。以上の通り、一連の検討を行った結果、最終精製標品の収率が上昇し、研究テーマ A の目標は達成できたと考えている。

以上、TFIID の大量精製法の改善を通して確立した精製手法を、他の複合体の精製にも適用してきた。さきがけ研究期間中に、細胞の万能化に関わる複製関連複合体、GTP センサーに関連する複合体、転写終結に関わる複合体、オートファジーに関わる複合体、転写伸長に関わる複合体を精製することに成功した。

研究テーマ B「電子顕微鏡による負染色像観察および X 線小角散乱による観察」

研究テーマ A で精製した TFIID について、領域内のさきがけ研究者である阪大・藤井博士との共同研究により、電子顕微鏡による負染色像観察を行った。その結果、TFIID に対応する約 20nm の粒子を観察できたものの、粒子像を詳細に観察したところ、粒子のサイズや形状の均一性が低いように見られた。一部のサブユニットが外れたものが混ざっているか、形状の不均性が原因と考えられる。これらを克服するために、研究テーマ C において TFIID の相互作用因子を精製し、相互作用因子によるサブユニット間相互作用の安定化と全体形状の安定化を試みる計画である。

TFIID とほぼ同様の方法で精製し、同時進行している複製関連複合体については、電子顕微鏡による負染色像観察において均一な粒子が見られ、試験的な画像解析によって、単粒子構造が得られた。現在は、高分解能の単粒子解析を目指して、クライオ電子顕微鏡による氷包埋像の観察を行っており、詳細な観察条件を検討中である。

研究テーマ C「TFIID 相互作用因子の精製」

これまでに行われた電子顕微鏡による低分解能での単粒子解析から、TFIID が三日月型の形状を持つことや、その形状が不安定であることが明らかにされている。TFIID の形状を安定化するには、三日月型の凹部分に対して、DNA, TFIIB (1 subunit), pol II (12 subunits), TFIIF (3

subunits), TFIIE (2 subunits), TFIIA (2 subunits) などの相互作用因子を結合させることが必要であると想定されている。本研究課題が開始する前に、TFIIB, pol II については、既に約 90%の純度で精製することに成功していた。また、本研究課題の開始後、直ちに TFIIF, TFIIE の精製に取りかかり、TFIID で確立した出芽酵母からの内在性複合体の精製法を適用したところ TFIIF, TFIIE を約 90%の純度で精製することに成功した。

しかし、TFIIA については TFIID と同じ方法で、出芽酵母から内在性複合体を精製することはできなかった。TFIIA は、真核細胞の転写開始に必須な因子であるが、2 種類の構成サブユニットを単独で発現させると不溶性画分に分画されることが知られており、精製には変性とリフォールディングといった数多くの操作が必要であったため、真核細胞の in vitro 転写系を再構成する上での、材料調製のボトルネックと考えられていた。今回、TFIIA の 2 種類のサブユニットを融合して発現することによって、可溶性画分に発現させることに成功し、精製途中に protease で切り離すことによって、少ないステップ数で精製することに成功した [論文リスト 1]。これらの精製標品を用いて、TFIID を含む超分子巨大複合体を再構成して立体構造を解析する計画である。

加えて、超分子巨大複合体の再構成においては、各複合体を混合する順序が重要である。私たちは、対象とする遺伝子の祖先型からの変化度を示す d_{DR} (distance between Direct Repeat) という分子進化の示標を開発し、約 30 億年前に、TFIID の DNA 結合サブユニットである TBP よりも、TFIIB が先に生まれたことを解明した [論文リスト 2]。この結果を踏まえて、進化的に誕生した順序で混合することによって、より安定な複合体を再構成できるのではないかというコンセプトを提案し、実際に、TFIID を含む複合体に対して試みる計画である。

3. 今後の展開

今後も引き続き、TFIID および TFIID を含む超分子巨大複合体の立体構造解析を試みる。また、X 線結晶構造解析や電子顕微鏡による単粒子解析では得ることが難しい、分子の動的な情報を得るために、構造生命領域アドバイザーである阪大・原田先生との共同研究を開始し、真核細胞の転写開始反応の一分子イメージングの研究を進めている。

さらに、転写開始反応という極めて洗練された情報処理システムが、進化の過程で、どのようにして構築され、どのように高度化したか、といった設計原理を理解するために、分子進化の研究を発展させている。私たちが開発した d_{DR} に基づいて、転写開始反応に関わる因子の祖先型からの変化の様子や、どのようにして真核細胞の転写システムが機能的な複雑性を獲得していったかを解明していく計画である。

今後、TFIID の構造・機能・進化の研究で確立した様々な研究手法を、他の生命現象にも応用し、さらに研究を発展させる事を計画しており、既に、複製反応を経由して細胞の万能化に関わる超分子複合体などを出芽酵母から大量精製し、結晶化スクリーニングを行っている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

研究テーマとして、(A) TFIID の大量精製法の改善、(B) 立体構造に向けた品質確認法の確

立、(C) 安定化因子の精製の 3 点を挙げ、それを踏まえて、TFIID の結晶化と立体構造解析を最終目的として掲げた。これら 4 点の中で、研究テーマの 3 点については、上述の通りに達成できたと考えており、この時点での研究目的の達成状況は 75%と考えている。

次に、目的として掲げた TFIID の結晶化と立体構造解析については、さきがけ研究期間内に、TFIID および TFIID を含む複合体の立体構造は決定できなかったものの、結晶化に至るパイプラインを確立し、今後、結晶化スクリーニングを繰り返すだけという状況を作り出すことに成功した。また、研究計画には含まれていなかった、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析について、共同研究を通して本格的に着手できる状況を整えた。さらに、TFIID の研究で確立した手法を他に適用することで、複製関連複合体、GTP センサー関連複合体、転写終結関連複合体、オートファジー関連複合体、転写伸長関連複合体を精製することに成功した。以上の一連の成果を加味し、研究目的の達成状況は 90%と考えている。

・研究の進め方

実施体制は、学生 1 名、テクニシャン 1 名という体制であった。マンパワーの不足はいなめなかったものの、共同研究によって克服する方針をとり、構造生命領域の阪大・藤井博士、阪大・原田先生、Max Planck 研究所・山田博士などとの領域内連携を通して、研究を大きく発展させることができたと考えている。

研究費はほぼ計画通りに執行することができた。ただし、さきがけ研究期間中に、新たに誕生した共同研究については研究費が不足したため、平成 27, 28 年度に、それぞれ増額申請を行った(平成 27 年度:800 千円、平成 28 年度:750 千円)。

・研究成果の科学技術および社会・経済への波及効果

生命科学の基盤情報を与える構造生物学において、様々な技術的な進歩により、多くのタンパク質の立体構造が解析可能になってきた。しかし、生体内においてタンパク質は単体で働くのではなく、複合体を形成して機能するにも関わらず、本研究課題で対象としたようなタンパク質複合体の立体構造解析は、未だ困難が多く成功例も少ない。特に、TFIID のような制御複合体は、生命の恒常性維持に関わる重要なタンパク質複合体であるにもかかわらず、少量しか精製できないことや、形状が柔軟であることから、高分解能での立体構造解析は極めて困難である。本研究課題において、制御複合体の大量精製法の確立や、立体構造解析に向けた品質確認法の確立ができた点は、今後、生命科学研究の様々な分野において制御複合体を精製する際に適用可能であり、多大な貢献をできることが期待される。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

純度に改善すべき点はあるが、転写基本因子TFIIDを構成する発現量が多くない15種類のタンパク質の超分子複合体を発現し、90%の純度の精製に成功し、結晶化の前段階まで進められたことは大きな進展である。

ただし、TFIID の結晶化と立体構造解析の達成のためには、なんらかのブレークスルー(新しい技術開発)等が必要かもしれないので タンパク質試料作製の効率化、再構成の方法の簡便化等の技術を種々検討して開発して欲しい。巨大な複合体タンパク質の競争力はこの辺から生まれると思う。

５．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Adachi. N., Senda, T., and Horikoshi, M. Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. *Scientific Reports* 2016, 6, 27922.
2. Adachi, N., Aizawa, K., Kratzer, Y., Saijo, S., Shimizu, N., and Senda, T. Improved method for soluble expression and rapid purification of yeast TFIIA. *Protein Expression and Purification* 2017, in press.

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

学会発表（国外）

Adachi, N., Aizawa, K., Yamaguchi, Y., and Senda, T. (2014.09). Large-scale purification of general transcription factor TFIIF. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Epigenetics & Chromatin, New York (USA). （ポスター発表）

Adachi, N., Yamaguchi, Y., and Senda, T. (2015.08). Large-scale purification and functional analyses of RNA polymerase II and general transcription factor TFIIF. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Mechanisms of eukaryotic transcription, New York (USA). （ポスター発表）

Adachi, N., Senda, T., and Horikoshi, M. (2016.03). Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. Keystone Symposia: Chromatin and Epigenetics, Whistler (Canada). （口頭発表）

Adachi, N., Senda, T., and Horikoshi, M. (2016.09). Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Epigenetics & Chromatin, New York (USA). （ポスター発表）

Adachi, N. (2017.01). Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. JST-Bay Area Structural Biology Work Shop, Stanford Univ. （口頭発表）

学会発表（国内）

安達成彦 (2014.12).「立体構造解析に基づいた真核細胞生物の遺伝子発現制御機構の解析」, BIO interconference 2014, 東京. （口頭発表）

安達成彦 (2015.03).「生き物が遺伝情報を巧みに活用する仕組みの研究」, 早稲田大学・理工バイオの集い, 東京. （口頭発表）

安達成彦、千田俊哉 (2016.06).「出芽酵母からの超分子複合体の精製」, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡. （口頭発表・ワークショップ）

安達成彦、千田俊哉、堀越正美 (2016.07).「分子進化の新しい解析法の発見により数十億年前から現在に至る遺伝子制御システムの進化を明らかにした」, 日本 Archaea 研究会第 29 回講演会, 東京. （口頭発表）

安達成彦 (2016.08).「立体構造解析を手掛かりにした分子進化の新しい解析法の発見」,

I-URIC フロンティアコロキアム（第 2 回），つくば．（口頭発表）

安達成彦、相沢恭平、山口佑香、千田俊哉（2016.09）.「超分子複合体の大量精製と立体構造解析に向けた試み」，第 89 回日本生化学会大会，仙台．（口頭発表・シンポジウム）

Adachi, N. (2016.10). Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. NIG Biological Symposium, 静岡．（口頭発表）

安達成彦、相沢恭平、山口佑香、千田俊哉（2016.11）.「マルチサブユニット複合体研究の出発点：大量精製と立体構造解析に向けた試み」，第 39 回日本分子生物学会年会，横浜．（座長と口頭発表・シンポジウム）

プレスリリース

「分子進化の新しい解析法の発見により、数十億年前から現在に至る遺伝子制御システムの進化を明らかにした」（2016.06）
http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/pressrelease/20160616/

「分子進化の新たな解析法を発見」（2016.06）
https://www2.kek.jp/imss/news/2016/topics/0617evolution/

「分子進化論」（2016.07）
https://www.kek.jp/ja/NewsRoom/Highlights/20160725134700/

研　究　報　告　書

「細胞内 NMR 計測法によるタンパク質の構造多様性解析」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成25年10月～平成29年3月
研 究 者：　猪股　晃介

1．　研究のねらい

タンパク質の立体構造やその動態が生理機能と深く関わっていることは既に自明である。一方で、それらタンパク質の構造・動態は外部環境（温度、pH、塩濃度、密度等）に影響を受けて変化しうる。これを念頭に、タンパク質の多くが実際に機能する細胞内環境を考えてみると、細胞内部は多種多様な生体分子が高密度に分布し、細胞骨格や細胞小器官によって内部が区分けされて非常に混み合っている。更に、外部刺激等により内部環境が変化する非平衡性もある。ゆえにタンパク質の生理機能をより厳密に理解するためには、実際に機能する環境下で計測した知見を基盤とすることが望ましい。上記の要請に答えるための最も有望な手法の一つが in-cell（インセル）NMR 法である。インセル NMR 法は、観察対象のタンパク質を非侵襲的かつ原子核選択的に計測可能という磁気共鳴計測法の特徴を活かし、生きた細胞内におけるタンパク質の立体構造やその変化、分子間相互作用、化学修飾、動的挙動などを原子レベルで解析することができる。そこで本研究では、数年来私が中心となって手法の開発・高度化を進めている、ヒト等高等動物細胞を対象とした in-cell NMR 法を駆使し、生きた細胞内におけるタンパク質の構造・動態解析を行うことを通して、それらタンパク質の「構造の多様性」を明らかにすることを目指している。これより厳密な分子機能の理解を目指すことを主たるねらいとしている。

また本研究は、in-cell NMR 法を用いることにより、生きた細胞内におけるタンパク質の挙動を原子レベルで解析するという特性から、他の構造解析手法に比べ、生体分子が実際に機能する生理的な環境に近い状態で生命現象を明らかにすることを可能にする。これは構造生物学的な知見と細胞生物学の知見とをより直接的に比較できることを意味する。つまり、構造生物学とライフサイエンスの間を取り持つ仲介役となり、両研究領域の融合を促進させることが見込める。

2.　研究成果

（1）概要

本研究は、私が中心となって手法の開発・応用を進めてきたヒト等高等動物培養細胞を用いた細胞内 NMR 法（in-cell NMR 法）を駆使し、生きた細胞内におけるタンパク質の「構造多様性」を明らかにすることを目指している。これまでに複数のタンパク質を標的として、in-cell NMR 計測・解析を実施してきた結果、さらなる手法の高度化が必要不可欠かつ急務であることがわかった。このことから以下に挙げる3点について in-cell NMR 法の高度化を行った。1点目は、細胞内へ安定同位体タンパク質を導入する方法の再検討である。以前までは標的とするタンパク質に細胞透過性ペプチド（CPP）と呼ばれるペプチドをタグとして共有結合させ、これを試料として細胞内に導入していた。しかしながらタグを結合させるためのタンパク質デザインが必要な場合があり、汎用性が低い手法だった。そこで本研究ではタグの必要ないエレクトロポレーション法への変更・最適化を行い、その基盤を完成させた。2点目は、常磁性金属タグの利用による PCS (Pseudocontact Shift)を用いた細胞内蛋白質の構造解析法の検討である。NMR によるタンパク質の立体構造決定等に必要な原子間距離の取得は、常法では NOE 測定によってなされるが、測定感度の制約から in-cell NMR 法での利用には向かない。そこでその代替法の一つである PCS の利用をモデル実験系によって確認し、その有効性を実証した。3点目は NMR 試料菅内培地循環系の構築である。これまでの in-cell NMR 測定試料は動物培養細胞の懸濁液を用いてきた。それゆえ細胞は生存しているものの、高度にストレス環境下にさらされた状態での実験を余儀なくされていた。そこで NMR 試料菅内培地循環系を構築し、NMR 測定中の細胞を常に健全な状態に保ちつつ実験を行うための基盤構築を行い、実践可能なシステムであることを確認した。

（2）詳細

研究テーマ A「細胞内へ安定同位体タンパク質を導入する方法の再検討」

本研究で用いる in-cell NMR 法は、①安定同位体標識されたタンパク質の調製、②動物培養細胞へのタンパク質の導入、③迅速な NMR 計測、の3つの要素技術を高度に組み合わせることによって達成される。中でも動物培養細胞へのタンパク質導入技術は、本手法の実装安定性や汎用性を決める最も重要な鍵要素である。さきがけ研究開始前までは、標的とするタンパク質に細胞透過性ペプチド（Cell Penetrating Peptide, CPP）と呼ばれるペプチドをタグとして共有結合させ、これを試料として細胞内に導入していた。しかしながら CPP の仕様は下記

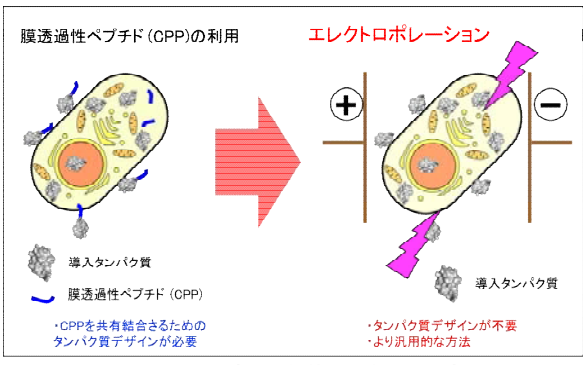


図1　タンパク質導入法の更新

のような制約があることがわかっていた。すなわち、細胞内に導入する際には CPP が共有結合していることが必要だが、一旦細胞内に導入された際には、CPP によって引き起こされる細胞内凝集を避けるため、標的タンパク質から解離されなければならないということである。以上のことから CPP タグ結合のためのタンパク質デザインが必要となり、汎用性の低い手法であった。そこで本テーマではタグの必要ないエレクトロポレーション法への変更・最適化を行い、その基盤を完成させた。これにより、標的タンパク質ごとに in-cell NMR 試料用のデザインをする必要のない、より汎用的な手法を確立した（図1）。

研究テーマ B「常磁性金属タグの利用による PCS (Pseudocontact Shift)を用いた細胞内蛋白質の構造解析法の検討」

In-cell NMR 法は希薄溶液中におけるタンパク質の構造解析等、生体高分子の溶液 NMR 研究の発展系として位置づけることができると考えられるが、計測対象をより高次で複雑なものにすることと引き換えに、通常の生体高分子 NMR に比べて幾つかの制約を含むこととなった。その際たるものが測定の検出感度である。これによって残念ながら得られる情報量にも制約が生じているのが現状である。たとえば、NMR でタンパク質の立体構造を決定しようとした時、重要となるのが原子間の距離情報の取得である。常法では NOE（Nuclear Overhauser Effect）を利用するが、検出感度の問題から in-cell NMR によって上記を測定するのは現状では不可能である。そこで、距離情報取得の代替法として常磁性金属タグを利用した長距離（～30Å程度まで）情報取得が可能な PCS（Pseudocontact Shift）法の検討を行った。この方法の利点は NOE に比べて、測定そのものはより単純かつ検出感度が高いことである。共同研究先によってデザインされたタグ（M8-CAM-I, 図2）を利用し、モデルタンパク質であるユビキチン変異体を用いた in-cell NMR 実験を行った結果、PCS 効果が明確に観察され、本法が細胞内のタンパク質における原子間距離情報取得に有効な手段であることが示された（図2）。また、本法の成果を学術誌に投稿し掲載された。

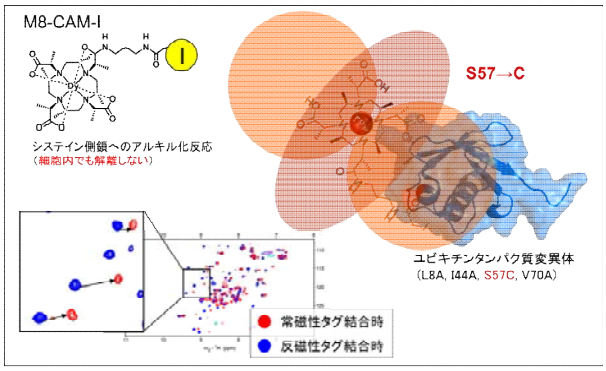


図2　in-cell NMRによるPCS実験

研究テーマ C「NMR 試料菅内培地循環系の構築」

これまでの in-cell NMR 測定試料は動物培養細胞の懸濁液を用いてきた。それゆえ NMR 測定試料として用いる細胞は生存しているものの、実験開始後直ちに細胞内の pH は低下し、酸化的ストレスにさらされ、ATP やグルコース等の栄養源が枯渇する。このような状況で

in-cell NMR 実験を行うと様々な不都合が起こることが予想される。例えば、ストレス環境下にさらされることで細胞が死滅しやすくなることによって、NMR 測定時間が極めて制限されることや、本来明らかにしたいタンパク質の構造・動態とは異なる結果を得てしまうなどである。そこで本テーマでは、NMR 試料菅内培地循環系を構築し、NMR 測定中の細胞を常に健全な状態に保ちつつ実験を行うための基盤構築を行った。図3に本研究によって構築した NMR 試料菅内培地循環系の概略を示す。また、構築された培地循環系を用いて、モデルタンパク質(ユビキチン変異体)を対象とした検証実験を行なった。その結果、本培地循環系が in-cell NMR 測定の実装に耐えうるものであることを確認した。これにより、上記に示した不都合(測定時間の制限や実験結果の誤解釈等)を克服するための基盤を確立した。

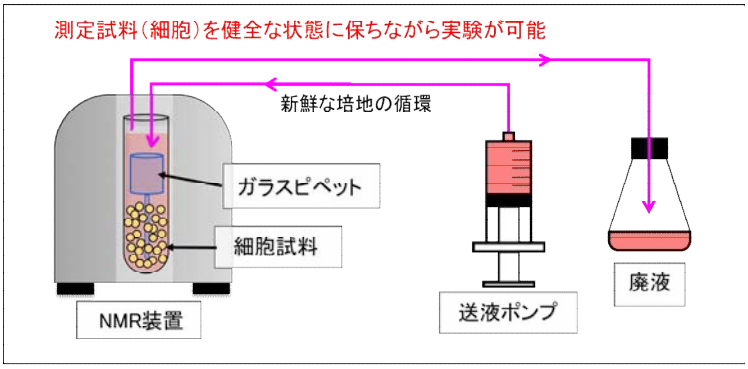


図3　NMR試料菅内培地循環システム

研究テーマ D「細胞内におけるタンパク質の「構造の多様性」を明らかにするための試み」

研究テーマ C「NMR 試料菅内培地循環系」を活用し、細胞内におけるタンパク質の「構造の多様性」を明らかにするための試みを現在進行中である。

まず1つ目は、FKBP12-rapamycin 複合体と mTOR complex の相互作用解析である。mTOR complex はアミノ酸や酸素の取り込み、エネルギーレベル等の環境の変動に応答し、基質のリン酸化を通して、タンパク質生合成や細胞の生育を制御するが、FKBP12-rapamycin 複合体が mTOR の FRB (FKBP12-rapamycin binding) ドメインと相互作用することによって mTOR のキナーゼ活性を阻害することが知られている。しかし、その阻害機構には現在2つのモデル(立体障害モデル、2量大解離モデル)が考えられており、その詳細には不明な点が残されている。そこで私は、in-cell NMR 法を駆使し、細胞内において上記相互作用解析を行うことで、FKBP12-rapamycin 複合体による mTOR complex の阻害機構の詳細に迫ることを目指している。現状では、in-cell NMR の予備検討を実施し、細胞外から導入された FKBP12-rapamycin 複合体と細胞内在性の mTOR complex と相互作用をしていることを示唆する結果(図 S2)を得た段階であり、さらなる実験・解析を進めている。

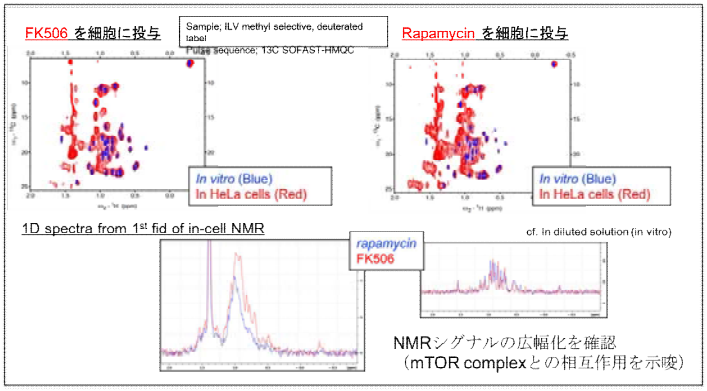


図 S2　FKBP12-rapamycin複合体とmTOR complexとの相互作用解析

2つ目は、アデニンヌクレオチド（AMP, ADP, ATP）の相互転換反応を触媒し、細胞のエネルギー恒常性維持に関わるリン酸転移酵素アデニル酸キナーゼ1（AK1）の構造・動態・機能相関解析である。本タンパク質は基質結合に伴い大きな構造変化を引き起こす。また、結合する基質の種類や量比に応じて様々な構造変化を引き起こす多様性を有する。そこで私は、in-cell NMR 法を駆使し、本酵素が実際に機能する細胞内においてその構造の多様性を明らかにすることを通して、その分子機能のさらなる理解を目指すことを目指している。現状では、in-cell NMR の予備検討を実施し、NMR 試料菅内培地循環系を用いない場合と比較したところ、NMR スペクトルパターンに大きな違いがあることが確認できた（図 S3）。

これは、細胞試料が置かれている環境（健全な状態 vs ストレス環境）に応じて、本タンパク質の構造が変化している可能性を示している。さらに、培地循環系を用いた際の in-cell NMR スペクトルは、希薄溶液中で ATP が過剰に添加した際のものとよく似ていた（図 S4）。これは、本タンパク質が細胞内で ATP と結合し触媒反応をしている、活性化状態にあることを示唆している。本件に関してもさらなる実験を進行中である。

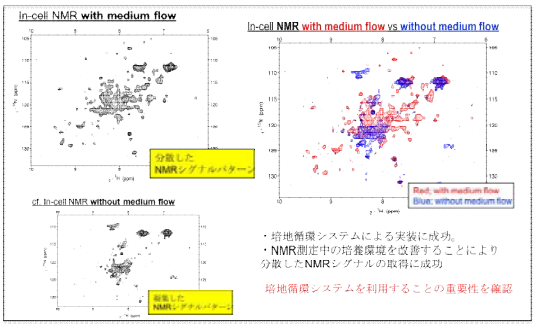


図 S3　hAK1のin-cell NMRスペクトルの比較

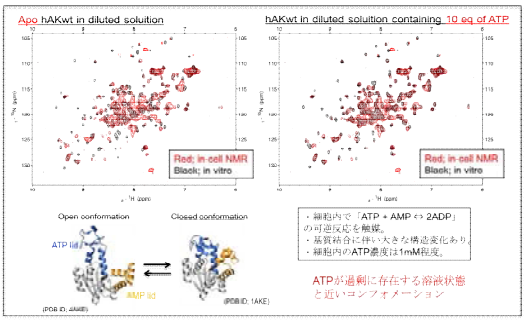


図 S4　hAK1のNMRスペクトルの比較 (in cells vs *in vitro*)

3.　今後の展開

「2.　研究成果」で述べてきた通り、いくつかの課題は残るものの in-cell NMR 法の高度化をほぼ達成し、応用研究の実装を行える段階にある。しかしながら、さきがけ研究期間中に本研究の主たるねらいである「生きた細胞内におけるタンパク質の構造多様性を明らかにする」た

めの応用研究の成果を得るまでには至っていない。そこで今後は現在取り組んでいる標的を含め、本手法の特徴が活きる応用研究の実施例を提示していきたい。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

本研究の目的は大きく分けて、①本研究の主要技術である in-cell NMR 法の高度化と② in-cell NMR 法を用いた応用研究の2つに大別されるか、手法の高度化については研究計画当時の目標をほぼ達成することができた。しかしながら手法の高度化の進度が計画通り進められなかったため、応用研究を行うための時間を十分に確保することができなかった。研究の実施について、研究計画では研究補助者を招き入れる予定であったが、適切な該当者を選定することができず断念した。その分実験装置等を拡充し、研究の効率化を図った。研究費執行の状況としては、本研究期間中に研究拠点を移動した都合により、計画当初とは一部執行内容の変更はあったが、計画段階で設定した研究費の枠内で、必要かつ十分な予算執行が行えたと考えている。最後に、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果については、本研究期間内に達成した in-cell NMR 法の高度化によって、これまで限定的であった本手法の利用の拡大が見込め、細胞内タンパク質の構造・動態に関する知見が蓄積されることが見込める。よってこれを通して、構造生命科学の発展に貢献するものと期待される。さらに将来的には、疾患関連タンパク質をターゲットとした本法の計測・解析法を確立することによって、新薬候補探索等の先端医療への貢献も期待できる。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

細胞内への同位体ラベルタンパク質導入にエレクトロポレーションが有効であること、in cell NMR に PCS(Pseudocontact Shift)法が有用であることを示した。また、NMR 試料管内培地循環システムを改良し、細胞状態の維持を可能とした。上記のように個々の技術課題では一定の成果を得た。

しかし、残念ながら、タンパク質の細胞内での構造多様性を明らかにするまでには至らなかった。in cell NMR を汎用性のある測定法とするためには、未だ多くの技術的な改良が必要であるので、既存技術を直ぐに導入した上で、独自開発すべき問題を絞り込み、技術開発に取り組んで欲しい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Yuya Hikone, Go Hirai, Masaki Mishima, Kohsuke Inomata, Teppei Ikeya, Souichiro Arai, Masahiro Shirakawa, Mikiko Sodeoka, and Yutaka Ito. A new carbamidemethyl-linked

lanthanide chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells.
Journal of Biomolecular NMR. 2016, 66, 99-110,

（2）特許出願
研究期間累積件数：0件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

～学会発表～

1. Technical improvements for advanced in-cell NMR of mammalian cells
Kohsuke Inomata
第４２回内藤コンファレンス(2016)
＜ポスター発表＞

2. **Technical Improvements for Advanced in-cell NMR of Mammalian Culture Cells**
Kohsuke Inomata, Hajime Kamoshida, Yutaka Ito, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, & Takanori Kigawa
The XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (2016)
＜ポスター発表＞

3. In-cell NMR analysis for protein conformational diversity in cells
Kohsuke Inomata
BMB2015 (2015)
＜招待講演, English session＞

4. In-cell NMR analysis for protein conformational diversity in a cell
Kohsuke Inomata
第５２回日本生物物理学会年会, 2014 年 9 月 25 日～9 月 27 日
＜招待講演, English session＞

5. In-cell NMR 法による細胞内タンパク質の構造多様性解析
猪股　晃介
第１４回日本蛋白質科学会年会, 2014 年 6 月 25 日～6 月 28 日
＜招待講演＞

～著作物～

和文総説

1. 核磁気共鳴法を用いた細胞内タンパク質の無侵襲解析
枋尾 豪人, 村山 秀平, 猪股 晃介, 森本 大智, 大野 綾子, 白川 昌宏
YAKUGAKU ZASSHI, 第135巻, 3 号, 391-398 (2015)
＜査読あり＞

2. in-cell NMR で哺乳動物細胞内タンパク質の分子間相互作用を解析する
猪股 晃介
細胞工学, 第 33 巻, 8 号, 820-824, 特集 (2014)
＜査読あり＞

3. In-cell NMR 法による細胞内タンパク質の構造動態研究
猪股 晃介
日本分光学会誌「分光研究」, 63巻1号 トピックス (2014)
＜査読あり＞

研 究 報 告 書

「NMR による脂質二重膜中における GPCR の動的構造平衡の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研 究 者： 上田 卓見

1． 研究のねらい

G タンパク質共役型受容体（GPCR）は、シナプスの神経伝達物質や血中のホルモン、および体外の光や感覚刺激物質の受容体であり、多くの重要な生理機能を制御する。GPCR を標的とする薬は、現在市販されている医薬品の 30%以上を占める。GPCR は、7 回膜貫通型の膜タンパク質であり、リガンド結合により活性化すると、細胞内の G タンパク質を活性化して、cAMP 濃度変化等のシグナルを誘起する。

申請時までに、本研究者は、GPCR に属するβ_2アドレナリン受容体（β_2AR）の NMR スペクトルを、活性の異なる各種リガンドが結合した状態で取得した。その結果から、β_2AR が二つの不活性型と一つの活性型の動的構造平衡状態にあり、結合しているリガンドに応じて存在割合や交換速度が変化しており、活性型の割合が G タンパク質活性化能を決定していることを明らかにした。この事実は、GPCR の活性発現は、動的構造平衡により行われていることを示している。

また、本研究者は、GPCR であるケモカイン受容体 CCR5 を、生理的な膜環境を模倣した再構成高密度リポタンパク質、rHDL（reconstituted high-density lipoprotein）の脂質二重膜中に再構成して、活性を十分保持する試料調製法を開発してきた。さらに、カリウムチャネルの開状態と閉状態の動的構造平衡の量比が、rHDL の脂質二重膜中とミセル可溶化状態では異なることを明らかにした。この事実は、膜タンパク質、さらには GPCR の動的構造平衡は、脂質二重膜構造の有無や脂質組成といった膜環境の影響を受けることを示している。

一方、生理的な膜環境を反映した、rHDL に再構成した GPCR は巨大分子であるため、NMR でその動的構造平衡を明らかにするためには、NMR シグナルの先鋭化、およびスペクトルの簡略化が必須である。そのためには、重水素化および選択標識が必要である。一方、酵母や昆虫細胞でしか、GPCR の活性体は大量発現しない。しかし、酵母や昆虫細胞では、安定同位体標識が難しい点が問題である。

そこで本研究では、生理的な膜環境を反映した、rHDL の脂質二重膜中における GPCR の動的構造平衡を NMR により解明して、GPCR のシグナル伝達や制御の機構を明らかにすること、および、これらを可能とする要素技術として、酵母および昆虫細胞発現系を用いて、重水素化と選択標識を両方施した GPCR を大量調製する方法を開発することをねらいとした。

2． 研究成果

（1）概要

本研究では、昆虫細胞発現系において重水素化を開発して、rHDL の脂質二重膜中のβ_2AR の膜貫通領域のメチオニン残基の NMR シグナルの感度を約 5 倍に上昇させることに成

功した。さらに、脂質二重膜中における β_2AR の活性型の割合および交換速度が、界面活性剤中とは顕著に異なることが明らかになった。脂質二重膜中における活性型の割合は、ミセル中における値よりも、G 蛋白質シグナル活性化能と良く対応しており、GPCR が活性を正しく発揮する上では脂質二重膜環境が必要であることが明らかとなった。また、β_2 アドレナリン受容体の活性化に要する時間は受容体型チロシンキナーゼより顕著に短く、迅速な神経伝達や感覚認知を可能としていることが示された。

さらに、一期生の服部素之研究員と、$P2X_4$ 受容体の共同研究を行った。リガンド依存型イオンチャネルは、部分アゴニストの結合により部分的に活性化して、完全アゴニスト結合時より弱い電流を流すことが知られている。完全アゴニストより望ましい薬理作用を持つ、リガンド依存型イオンチャネルの部分アゴニストが複数開発されている。ATP により開口する陽イオンチャネルである P2X 受容体では、α,β–メチレン ATP との結合に伴い、ATP 結合時より弱い電流が誘起される。しかし、P2X 受容体が部分的に活性化されるメカニズムは不明であった。本研究では、α,β–メチレン ATP 結合状態において、ゼブラフィッシュ由来 $P2X_4$ 受容体の膜貫通領域が、ポアを開いた構造と閉じた構造の動的平衡状態にあり、開いた構造の割合が電流の大きさを決定することを明らかにした。

（2）詳細

研究テーマA「重水素化と選択標識を両方施した GPCR の調製」

入手可能な重水素化アミノ酸を全て添加した培地で、モデル蛋白質であるチオレドキシンを発現させて、その NMR スペクトルから、各アミノ酸残基の重水素化率を算出した。その結果、添加量やタイミング等を最適化した条件では、14 種類の残基が、重水素化されたことが示された。一方、発現量の限られる GPCR の重水素化体の調製においては、重水素化するアミノ酸の数を必要最小限とした方が、収量やコストの面で望ましい。そこで、β_2AR の立体構造において、観測するメチオニン残基と近接するアミノ酸を調べて、重水素化するアミノ酸を選定した。その結果、A, C, F, I, L, M, T, V, Y, W を部分重水素化すると、観測原子に近接するプロトンを効率良く減らして、rHDL 中のβ_2AR のシグナル強度を数倍以上増大できることが示唆された。

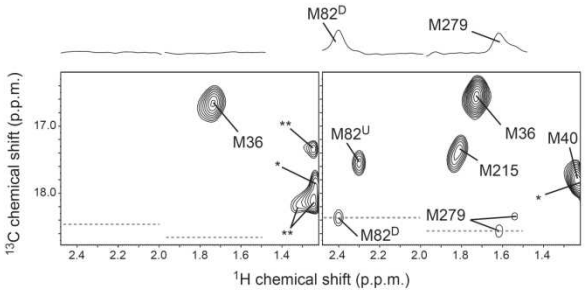


Fig.1 非重水素化(左)および重水素化(右)メチオニン選択標識 β_2AR-rHDL の、逆アゴニスト (carazolol) 結合状態における ^{1}H-^{13}C HMQC スペクトル。

そこで次に、部分重水素化とメチオニン ^{13}C 標識を両方施した β_2AR –rHDL と、重水素化していない β_2AR–rHDL を調製して、逆アゴニスト存在下における NMR スペクトルを測定した(Fig.2)。その結果、重水素化を行わなかった時の β_2AR–rHDL の NMR スペクトルでは、M82, M215, M279 の NMR シグナルはほとんど観測されなかったのに対し、重水素化した条件では、各メチオニン残基の NMR シグナルが、十分な感度で観測された。これらの結果は、重水素化によりシグナル強度が 5 倍以上向上したことを示しており、重水素化率からの予測と良く対応

した。

さらに、アラニン ^{13}C 標識と重水素化を両方施す方法の最適化を進めた。その結果、部分重水素化しながら、モデルタンパク質のアラニン残基のメチル基を約 30%の標識効率で標識することが可能となった。

研究テーマ B「rHDL の脂質二重膜中における GPCR の動的構造平衡の NMR 解析」

活性の異なる様々なリガンドが結合した状態における、重水素化 β_2AR–rHDL の NMR スペクトルを測定した上で、ミセル状態の解析において活性と対応するシグナル変化を示していた M82 のシグナルを重ね合わせた(Fig.2)。その結果、ミセルの時と同様、各リガンドの efficacy に対応した、連続的な化学シフト変化が観測された。したがって、rHDL 中においても、β_2AR が活性型と不活性型の構造平衡にあることが示された。一方、ミセル中の β_2AR のスペクトルと比べると、部分アゴニスト結合状態の化学シフトが、より完全アゴニスト結合状態に近い値となっていた。このことは、rHDL 中では、活性型の割合がやや多いことを示している。また、ミセル状態と比べると、部分アゴニスト結合状態のシグナルが顕著に広幅化しており、特に弱い部分アゴニスト結合状態では、シグナルが二つに割れていた。以上の現象交換速度がミセルの時よりも小さいことを示している。

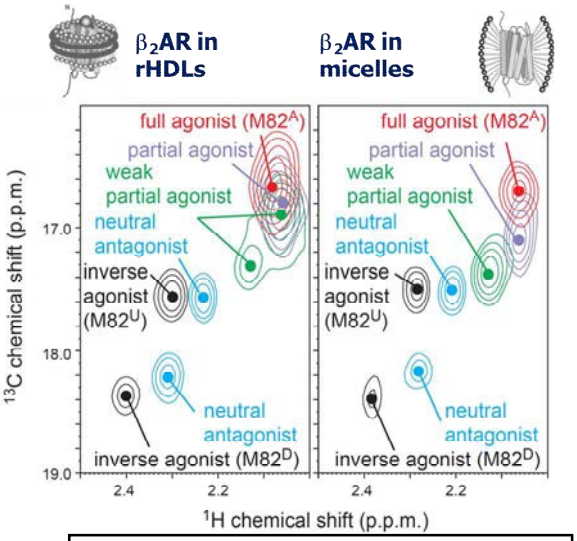


Fig.2 重水素化およびメチオニン選択標識を施した、rHDL 中（左）およびミセル中（右）の β_2AR-rHDL における、各リガンド結合状態の ^1H-^{13}C HMQC スペクトル。

ミセル中および rHDL 中における活性型の割合から cAMP 変化量を計算して、実験値と比較した結果、rHDL 中の方が、DDM 中より良く対応した（Fig.3）。したがって、脂質二重膜環境が、β_2AR の活性に重要な影響を与えることが示された。

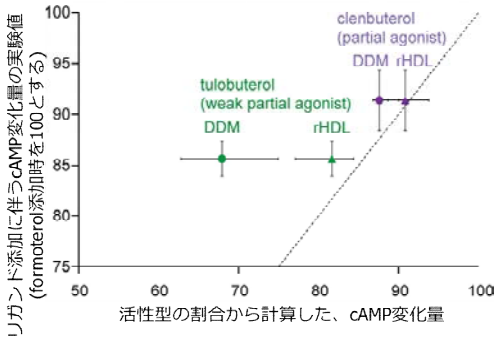


Fig.3 rHDL 中および DDM ミセル中における、活性型の割合から計算した cAMP 変化量と、実験値の相関プロット。

研究テーマ C「NMR による P2X 受容体の活性を制御する動的構造平衡の解明」

（服部素之研究員（一期生）との共同研究）

ゼブラフィッシュ由来 $P2X_4$ 受容体（以下単に $P2X_4$ と記述する。）を昆虫細胞に発現させて、界面活性剤 DDM で可溶化して、精製した上で、rHDL の脂質二重膜に再構成した。その結果、リガンド結合活性を保持した $P2X_4$–rHDL が培地 1 L あたり 0.05 mg の収量で得られた。

SEC の溶出体積が rHDL のストークス径と対応したこと、および SDS-PAGE における MSP と P2X4 のバンドの強度比がモル比として 2:3 であったことから、3 量体の $P2X_4$ が rHDL に再構成されたことが示された。

部分重水素化とメチオニン ^{13}C 標識を両方施した $P2X_4$-rHDL の NMR スペクトルを apo 状態および ATP 結合状態の両状態で取得した結果、$P2X_4$ のメチオニン残基数（5 個, Fig.4）とおよそ対応する数のシグナルが観測された。各メチオニン残基の変異体のスペクトルと比較することで、全ての残基のシグナルを帰属した。また、アラニン ^{13}C 標識を利用して、細胞外領域と膜貫通領域を繋ぐ位置に存在する A330（Fig.4）のシグナルの観測および帰属を行った（Fig.5）。さらに、膜貫通領域の動的構造平衡を調べるために、膜貫通領域に位置する L339 および L351（Fig.4）にメチオニン残基を導入した変異体のスペクトルを取得して、M339、M351 の NMR シグナルの観測および帰属を行った（Fig.5）。ATP の結合に伴い、M339 のシグナルの ^{1}H の化学シフトが低磁場シフトしたこと（Fig.5）は、結晶構造において、apo 状態においてのみ、L（M）339 が環電流効果を受ける程度にまで Y45 と近接することと対応していた。したがって、apo 状態および ATP 結合状態で観測されたシグナルは、結晶構造で観測された閉状態および開状態の構造に対応することが示された（Fig.6）。

次に、α,β-meATP 結合状態における、上記の残基に由来する NMR シグナルを観測した。その結果、膜貫通領域に導入した M351 と M339、ならびに lower body の膜側に位置する A330 と M325 のシグナルが二つ観測され、一方はアポ状態と、もう一方は ATP 結合状態と化学シフトが同じであった(Fig.5)。また、温度を上昇させた結果、ATP 結合状態と化学シフトが同じシグナルの相対強度が可逆的に増大した。したがって、膜貫通領域およびリガンド結合部位と膜貫通領域を繋ぐ領域が、閉じた状態と開いた状態の間を化学シフト差よりも遅いタイムスケール（< 100 /s）で交換していることが示された(Fig.6)。

約 20℃では、α,β-meATP 結合状態の $P2X_4$ の 35%が開構造を取っていることが、NMR スペクトルから示唆される。一方、電気生理実験において、$P2X_4$ にα,β-meATP が作用した時に観測された電流の大きさは、ATP が作用した時の 28%程度であり(Fig.7)、開構造の割合と良く対応していた。したがっ

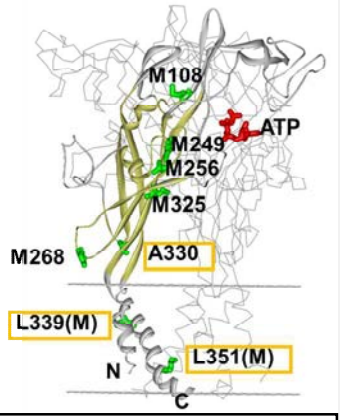


Fig.4 $P2X_4$ 受容体の NMR シグナルを観測した残基の分布。(PDB entry: 4DW1)

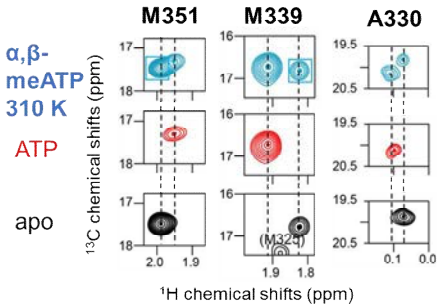


Fig.5 各リガンド結合状態における、A330, M339, M351 の NMR シグナル。

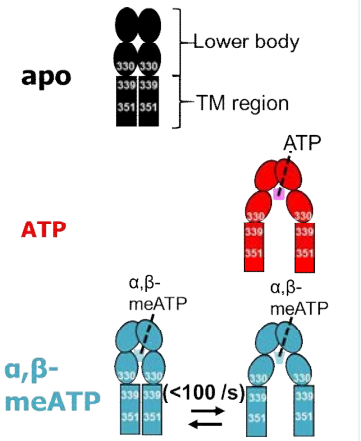


Fig.6 NMR により解明した、各リガンド結合状態における $P2X_4$ の構造平衡。

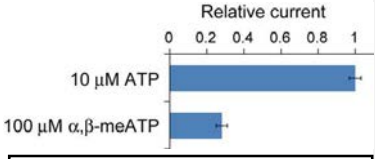


Fig.7 $P2X_4$ 発現細胞に ATP および α,β-meATP が作用した時に誘起される電流の大きさ。

て、α,β-meATP 結合状態において、開構造をとる $P2X_4$ 受容体が少量存在することにより、部分的に活性化されることが示された。

3. 今後の展開

GPCR は、G 蛋白質シグナルとアレスチンシグナルを活性化する。一方、片方のシグナルを選択的に活性化する GPCR リガンドが知られており、副作用の小さい薬物を開発する上で重要であると考えられている。我々は、μ オピオイド受容体が、不活性型と複数の活性型の動的構造平衡状態にあり、各活性型の割合がシグナルの選択性に関与することを明らかにした。今後、これまでの研究を発展させて、NMR により得られる情報の空間的および時間的な精度を向上する手法を開発した上で、開発した手法を応用してシグナル選択性の機構を解明する。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

・研究目的の達成状況、

本研究では、重水素化により、昆虫細胞発現系に発現させた GPCR の NMR シグナルの感度を 5 倍以上向上させることに成功した。また、開発した手法を応用して、rHDL の脂質二重膜中の GPCR の動的構造平衡を NMR で明らかにして、脂質二重膜中では平衡の交換速度および量比が界面活性剤ミセル中とは顕著に異なることを明らかにした。加えて、アラニン残基の選択標識法を開発した上で、rHDL の脂質二重膜中の $P2X_4$ 受容体の NMR 解析に応用して、P2X 受容体の薬効発現機構を解明した。以上の成果を、投稿論文に発表している（Kofuku et al., Angew. Chem., 2014, Minato et al., PNAS, 2016)。さらに、より高度な生理的膜環境下の GPCR の動的構造平衡の解析に予備的に成功している。したがって、研究目的を達成していると考えた。

・研究の進め方（研究実施体制及び研究費執行状況）、

研究者が所属する、NMR 試料調製、NMR 測定、データ解析に必要な設備が整った研究室において、学生 2 名と研究を進め、P2X 受容体の研究に関しては一期生の服部素之研究員と共同研究を行った。したがって、研究実施体制は適切であると考えた。研究費に関しても、昆虫細胞および酵母に発現させた安定同位体標識 GPCR を rHDL に再構成した NMR 試料を多数調製して、NMR 解析を行っており、適切に執行していると考えた。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果（今後の見込みを含む）

従来の医薬品の合理的設計では、標的部位への結合の強さが主な指標として用いられてきた。しかし、結合の強さのみを指標とした場合、リガンドが誘起するシグナルの強さを設計するのは困難である。本研究で、脂質二重膜中における GPCR の活性制御機構を明らかにしたことで、アンタゴニストからアゴニストへの変換の指針を提示することが可能となり、GPCR を標

的とした創薬が加速することが期待される。

G タンパク質と β-アレスチンの一方を選択的に活性化する GPCR リガンドが存在することが知られており、理想的な作用を持つ薬物を開発する上で重要であると考えられている。例えば、μオピオイド受容体に結合して、G 蛋白質依存的な経路を選択的に活性化する化合物である TRV130 が、G 蛋白質依存的な経路と β-アレスチン依存的な経路を両方活性化するモルヒネよりも、動物実験において副作用が生じにくいことが報告されている。本研究で得られた、脂質二重膜環境における GPCR の活性制御機構の知見を応用して、G タンパク質および β-アレスチンの活性化および活性制御機構を解明すれば、一方のシグナルを選択的に活性化するリガンドを設計する指針を提示することが可能となり、GPCR を標的とした創薬が加速することが期待される。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

重水素交換により NMR の感度を高め、rHDL(reconstituted high-density lipoprotein)脂質二重膜中の β2 アドレナリン受容体を NMR 解析することに成功した。また、P2X4 受容体の構造平衡状態を解析し、イオン透過性のメカニズムを明らかにした。NMR を用いた GPCR の機能解析としては、非常に高いレベルに達したと考える。

今後は、手法を GPCR の生理的機能の説明に適応していくことが重要であるので、さらに試料の量を減らす手法等を開発して欲しい。

なお、本研究者は本さきがけ研究の成果が認められ、代表的な NMR 国際学会である ENC の招待講演をうけるとともに、国内学会の招待講演も増え、本分野のトップランナーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Yuichi Minato, Shiho Suzuki, Tomoaki Hara, Yutaka Kofuku, Go Kasuya, Yuichiro Fujiwara, Shunsuke Igarashi, Ei-ichiro Suzuki, Osamu Nureki, Motoyuki Hattori, Takumi Ueda, and Ichio Shimada., “Conductance of P2X4 purinergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region”, ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** (2016) 113,4741-4746
2. Junya Okude, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Motohiko Sato, Naoyuki Nobuyama, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Takuya Mizumura, Kento Onishi, Mei Natsume, Masahiro Maeda, Hideki Tsujishita, Takefumi Kuranaga, Masayuki Inoue, and Ichio Shimada,“Identification of a Conformational Equilibrium That Determines the Efficacy and Functional Selectivity of the μ-Opioid Receptor”,***Angew. Chem. Int. Ed.*** (2015) 54, 15571-15576
3. Chie Yoshiura, Takumi Ueda, Yutaka Kofuku, Masahiko Matsumoto, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Koh Takeuchi, and Ichio Shimada, “Elucidation of the CCR1- and

CCR5- binding modes of MIP-1α by application of an NMR spectra reconstruction method to the transferred cross-saturation experiments", ***J. Biomol., NMR*** (2015) 63, 333-340

4. Takumi Ueda, Chie Yoshiura, Masahiko Matsumoto, Yutaka Kofuku, Junya Okude, Keita Kondo, Yutaro Shiraishi, Koh Takeuchi, and Ichio Shimada, "Development of a method for reconstruction of crowded NMR spectra from undersampled time-domain data", ***J. Biomol., NMR*** (2015) 62, 31-41

5. Yutaka Kofuku, Takumi Ueda, Junya Okude, Yutaro Shiraishi, Keita Kondo, Takuya Mizumura, Shiho Suzuki, and Ichio Shimada, "Functional dynamics of deuterated β_2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR Spectroscopy", ***Angew. Chem. Int. Ed.*** (2014) 53, 13376-13379

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

主要な学会発表

"Conductance of P2X4 receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region", 58th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, California, March 25-31, 2017

"リガンドとの相互作用に伴う膜蛋白質の動的立体構造変化", 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢, 2015 年 9 月

"NMR による、限定されたデータからの GPCR の動的構造情報の抽出", 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 2014 年 7 月

研　究　報　告　書

「新規高速原子間力顕微鏡で解き明かすミオシンＶの化学−力学エネルギー変換」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研 究 者：　古寺　哲幸

1．　研究のねらい

ミオシンＶは ATP の加水分解エネルギーを使って、アクチン繊維上を一方向に歩行運動するモータータンパク質である。ミオシンＶの ATP 加水分解にともなう化学−力学エネルギー変換機構において、ATP の加水分解エネルギーの大半が消費される過程は、ミオシン Ｖ のモータードメインからのリン酸放出の過程であるとされ、その化学状態変化の過程とカップルして力学的な力発生が起こると広く信じられている。しかしながら、私たちのこれまでの研究から、ミオシンＶの力発生（前進運動）は自発的に起こり、ヌクレオチドの化学遷移を必要としていないこと、つまり、力発生の過程で ATP の加水分解エネルギーを消費しなくてもよいことが示唆されていた。そしてそこから、ATP の加水分解エネルギーの大部分が消費される過程は、ミオシン Ｖ がアクチンから離れる過程であることが導かれている。私たちの観察結果が事実ならば、ATP を含まない溶液条件でさえも、ミオシン Ｖ の後ろ足だけをアクチン繊維から離してあげれば、ミオシン Ｖ は前進運動を行うはずである。そこで本研究では、この観察実験を実現するために、探針で触りながら生体分子の“構造”と“動き”を同時に観察することができる高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）の特徴を活かし、観察対象の特定の部位だけを強く触りながら分子イメージングすることができる新規の実験技術を開発する。そして、開発した実験技術を実践することで、上記の真相を明らかにし、ミオシン Ｖ の化学−力学エネルギー変換機構の本質を解明することをねらいとした。さらに、本研究で開発した新規の実験技術をミオシンV以外の生体分子に応用し、それらの機能メカニズムを新たな観点から探ることをねらいとした。

2．　研究成果

（1）概要

カンチレバー探針で触りながら生体分子の“構造”と“動き”を同時に観察することができる高速 AFM の特徴を活かし、観察対象の特定の部分だけを強く触ること（力学的刺激）ができる新規の高速 AFM イメージングモードを開発し（研究テーマ A）、その技術をミオシンＶの観察に応用することで、ミオシン Ｖ の化学−力学エネルギー変換メカニズムの解明を目指した（研究テーマ B）。その結果、ATP 非存在下でミオシン Ｖ の後ろ足をアクチン繊維から解離させると、ミオシン Ｖ が ATP 存在下で見られたように前進運動することを直接示すことができた（図 1）。これにより、ミオシンの構造状態と化学状態はタイトにカップルしていなくてもよく、前進運動に関わる分子内張力の獲得は熱エネルギーで行え、ミオシンの力発生はミオシンがアクチンと最安定構造を形成する過程であることが導かれた（論文準備中）。また、高速 AFM の基礎性能と力学的刺激の位置精度を向上させるために、先鋭・高安定のカンチレバー探針の開発に取り組んだ。まだ十分ではないが大きな改善がみられた（研究テーマ C）。また、本研究で開発した技術をミオシン Ｖ だけではなく、その他の生体分子系にも応用し、いくつかの系で

それらの機能メカニズムを新しい観点から明らかにすることに成功した（研究テーマ D）。以上の研究を通して、生体分子の化学−力学エネルギー変換を生体分子の構造と動きを見ながら直接議論できる実験手法を新たに創出し、それを応用した研究を推進することができた。

また、さきがけ期間中に、Johannes Kepler 大学の P. Hinterdorfer 博士のグループとの抗体−抗原反応の分子機構に関する国際共同研究、Warwick 大学の三嶋 将紀 博士のグループとのセントラルスピンドリンの構造動態に関する国際共同研究、広島県立大学の相沢慎一博士のグループとのバクテリアべん毛のフック構造の長さを決定するタンパク質に関する共同研究、早稲田大学の上田 太郎 博士のグループとのアクチン繊維の構造多形に関する共同研究を含む計 8 報の論文を出版した。

以下、個々の研究テーマの研究目的とその達成状況について説明する。

（2）詳細

研究テーマ A「新規高速 AFM イメージングモードの開発」

A−1） 手動クリック法による新規高速 AFM イメージングモードの開発

高速 AFM は観察している領域の画像をパソコンのモニターにリアルタイムで表示することができる。表示されている画像のどの部分にタンパク質のどの部位があるかを識別・記憶し、走査中のカンチレバー探針がその部位に来たときにだけ、探針−試料間の相互作用力が強くなるような信号をパソコンから出力し、その後、通常の高速 AFM イメージングを行うといった新規のイメージングモードの開発を行った。具体的には、高速 AFM イメージング中にパソコンにリアルタイム表示される画像上の任意の部位の XY 座標をパソコンのマウスでクリックすることによって記憶し、その部位付近に強めの力を作用させたいときの AFM 画像において、AFM 探針が記憶した XY 座標の付近に来たときにだけ、パソコンから AFM 探針の振動振幅を仮想的に大きくするような信号をフィードバック制御回路に送るようなソフトウェアを開発した。これにより、高速 AFM 観察している最中に、観察対象の特定の部位に力学的刺激を与えることができるようになった（図 1A）。

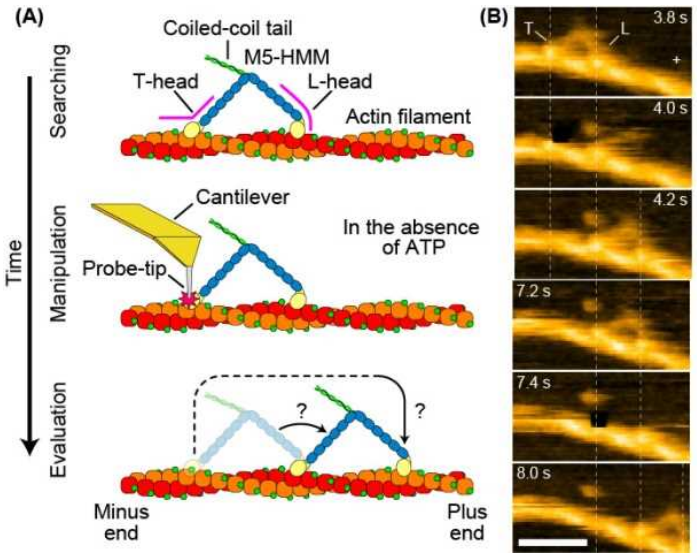


図 1（A） 新規高速 AFM イメージング法の概念図。（B） ATP 非存在下でミオシン V の後ろ足（図中の T）をアクチン繊維から離すと、ミオシン V は ATP 存在下のときのように、前進運動を行った。4. 0 s と 7.4 s のところで後ろ足の部分がカンチレバーにより強く押され、周りよりも高さが低く（色が暗く）なっていることが分かる。スケールバーは 50 nm。

A-2) 力精度・位置精度の見積り

開発したイメージングモードの性能を最大限に生かすために、高速走査性を保ちながら位置精度や安定性を兼ね備えた高速スキャナーを開発した。XYZ 軸スキャナーの変位測定や周波数応答は、新たに購入したレーザー変位計と周波数分析器を用いて行った。さらに XYZ 軸スキャナーに可変ゲインピエゾドライバーを導入し、2～5 倍程度高精度に位置をコントロールできるようになった。これにより、スキャナー側の位置精度の誤差は、本手法の位置精度の誤差に対して、無視できるほど小さくなった。本手法の位置制度の誤差は、主にカンチレバー探針の先端曲率半径で決まるようになった。また、力学的刺激の力精度はフォースカーブを計測することから見積もった。力学的刺激によって試料に及ぼされる力は、カンチレバーの振動エネルギーの保存則から導かれる式ではなく、カンチレバーの静力学から導かれる式（カンチレバーのたわみとバネ定数で記述される式）に従っていることを明らかにした。

A-3) 様々な力学的刺激を行えるイメージングモードの開発

観察される生体分子の運動が AFM の走査によって起こるアーティファクトでなはいことを証明するために、力を及ぼしたいところに探針を直接移動させ、一定時間だけ力を及ぼした後に（XY 走査は行わない）、通常の高速 AFM 観察を行うといったイメージングモードや、探針を特定部位に来たときにだけ往復運動するようなイメージングモードを開発した。開発した走査モードをミオシンVの観察に応用しても、走査モードによらず、ミオシンVが私たちの仮説に従う運動を行うことを示すことができた。

A-4) 自動画像認識による新規高速 AFM イメージングモードの開発

上記の手動クリック法によって観察対象の特定の部位に手動で力学的刺激を加えるだけではなく、高速 AFM で得られた画像から力学的刺激したい場所を自動的に認識して、力学的刺激を加えられるイメージングモードの開発を計画していた。ユーザーの習熟度に依らない実験結果が提供されることにつながるので、重要な課題である。しかし、AFM 探針の不安定さから、自動認識できる画像を毎回得ることは困難であったことから、この研究テーマは、AFM 探針の先鋭化・長寿命化（研究テーマC）を進めてから行うべきと判断した。研究テーマ C を進めることで、AFM 探針に一定の改良が見られたが、そこに長い時間を費やしてしまったためにA-4 の研究テーマを進めることができなかった。AFM 探針による力学的刺激の手法が汎用的に利用されるために、この研究テーマを進めていくことは今後の課題である。

研究テーマ B「ミオシンVの化学-力学エネルギー変換メカニズムの解明」

研究テーマ A で開発した新規高速 AFM イメージングモードをミオシン V の化学-力学エネルギー変換機構の解明に応用した。B-4 以外は研究目的を概ね達成することができた。

B-1) ミオシンVの後ろ足を解離させた場合

ATP 非存在下において、アクチン繊維に結合したミオシン V の後足を力学的に離すと、私たちの仮説の通り、後足を離されたミオシン V は、ATP 存在下で観察されたときと同じように前進運動を行った（図 1B）。結果の再現性は極めて高く、研究テーマ A-1、A-3 で開発したそれぞれの走査モードでも観察することができた。ADP 存在下では 90%以上、ヌクレオチドフリー条件では 70%程度の成功率で、後ろ足を解離させるたびにミオシンVは前進運動した。しかし、ミオシンVをアクチン繊維からほぼ 100%の確率で解離させるためには、100 pN 程度の力学的刺激を加えなければならず、この力によりミオシン V が変性していることも考えられた。そ

こで、力学的刺激を加えた後にミオシン V が ATP の加水分解能、及び、運動能を失っていないかを検証するために、高輝度 UV-LED を利用して Caged ATP を光解除できる光学系を導入した。その結果、力学的刺激で数歩ミオシンVを前進運動させた後に Caged を解除して ATP を導入すると、ミオシンVは通常通り一方向に前進運動を行った。これにより、100 pN 程度の力学的刺激を行ってもミオシンVは機能を保持していることが示された。以上のことにより、ミオシン V の分子内張力の獲得と力発生に ATP の加水分解反応が必須ではないことを直接示すことができた。

B-2) ミオシンVの前足を解離させた場合

次に、ATP 非存在下で、力学的刺激によって前足を解離させたときに何が起こるかを調べた。その結果、ミオシンVは前方にも後方にも移動することはなく、アクチンから離れた前足は瞬く間にもともと結合していたところへ再結合するだけだった。これにより、ミオシンの後ろ足には前後の駆動力は存在しておらず、前足にのみ前方の駆動力が存在していることが端的に示された。また、前足が離れた後にすぐに再結合することから、ミオシンのポストパワーストローク構造からプレパワーストローク構造からの構造遷移には化学エネルギーを必要としないで、熱エネルギーレベルで遷移可能ということが直接的に示された。

B-3) ミオシンの特定の部位を力学的刺激した場合

また、アクチン繊維に結合するミオシンの特定の部位を力学的刺激した場合にアクチン繊維から解離させやすい部位(ツボののようなもの)があるかどうかを調べた。ここで用いた力学的刺激はどの部位を刺激してもミオシンが解離してしまう約 100 pN よりも弱い約 60 pN で行った。約 60 pN で力学的刺激することで、全体の 22%の力学的刺激でしかミオシンの頭部はアクチンから解離しなかった。そのうち、ミオシンのモーターコア部を力学的刺激したときは約 30%の確率でアクチンから解離した。一方、ミオシンのコンバーター部位やネック部位、アクチンを力学的刺激しても、ミオシンがアクチンから解離するのは 5%以下だった。ただし、アクチンへ力学的刺激は試行回数が少ないため、ツボを見いだせていない可能性も否定できない。さらにミオシンのモーターコア部に関して詳しく見ると、ATP 結合部位自体を力学的刺激しても 27%でしかミオシンはアクチンから解離しなかった。一方、Upper 50 kDa サブドメインの ATP 結合部位と隣接している部分、または、loop 1 の部分を力学的刺激すると、それぞれ 85%と 67%の高確率での解離がみられた。ミオシン頭部の結晶構造を考慮すると、これらの部位は ATP が結合したときに大きく構造変化が起こる部位である。そこで起こる構造変化がミオシン-アクチンのインターフェースである 50 kDa クレフトに伝搬し、クレフトを開けて、ミオシンとアクチンの結合力を弱くすることが提案されている。ここで得られた結果は、化学的エネルギーによって本来起こる構造変化を力学的刺激によってミミックできたということを示唆している。また、ミオシン-アクチンのインターフェースを直接的に刺激した場合の解離確率は 40%程度でやや高くなっていた。本研究を推進することによって、生体分子の化学-力学エネルギー変換を生体分子の構造と動きを見ながら直接議論できる実験手法を新たに提案できたといえ、意義深いと考える。

ただし、空間分解能が高く、安定に長時間測定できる AFM 探針がほとんど得られないため、この実験の測定ができる頻度が非常に少なかった。そのため、上述した結果の測定回数や統計処理がまだ十分でないことが考えられる。そこでより効率よくこの研究テーマを進めるために、AFM 探針の先鋭化・長寿命化(研究テーマC)を進めてから行うべきと判断した。研究

テーマCを進めることで、AFM探針に一定の改良が見られたが、そこに長い時間を費やしてしまったためにB-3の研究テーマをさらに進めることができなかった。上記の結果が統計的にこの研究テーマを進めていくことは今後の課題である。また、刺激位置に関しては手動でマッピングしているため、正確性や客観性が失われていることも憂慮される。研究テーマB-4を進めることも今後の課題である。

B-4） 力学的刺激位置と高解像度構造情報をフィッティングするプログラムの開発

AFM 画像に現れるタンパク質の低分解の構造と、既存の高空間分解能構造（X線結晶構造解析や電子顕微鏡解析による PDB のデータ）とをフィッティングするプログラムの開発を計画していた。これにより、AFM 探針で力学的刺激した部位がタンパク質の構造のどの部分に対応するのかといった議論を定量的に行えることが期待できる。しかし、このフィッティングを十分な精度で行えるためには、ある程度高い空間分解能の AFM 画像が毎回得られているべきであると考え、この研究テーマは AFM 探針の先鋭化・長寿命化（研究テーマC）を進めてから行うべきと判断した。研究テーマ C を進めることで、AFM 探針に一定の改良が見られたが、そこに長い時間を費やしてしまったために、この研究テーマを推進することができなかった。本手法の定量性を向上させるために、この研究テーマは非常に重要であるので、今後推進する。

B-5） ミオシンVの化学-力学エネルギー変換機構の再考

研究テーマ B-1、B-2 の結果を考慮してミオシンVの化学-力学エネルギー変換機構を解析した。ADP 存在下で、後ろ足を解離させたときにミオシンVが前進運動を行うことができた成功率は 90%程度だった。このとき、アクチン繊維から後ろ足を解離させられたミオシンVが一歩前進運動を行うためには、①前足が反矢尻構造から矢尻構造への構造遷移、②離れた後ろ足がポストパワーストローク構造からプレパワーストローク構造への構造遷移を行わなければならない。成功率とこれらの2つの構造遷移の関係は結び付けられるが、①の構造遷移に関しての自由エネルギー差は、ADP 存在下で観察した単頭ミオシンVのネック部がアクチン繊維となす角の関係より、-5.2 k_BT と見積もられた。その結果、残りの②の構造遷移に関する自由エネルギー差が 2.6 k_BT と見積もることに成功した。これらの自由エネルギー差から、ミオシン V の力発生（①の構造遷移）は自発的過程で ATP の加水分解エネルギーを用いていないこと、②の構造遷移はミオシン V のモーター部とネック部の構造のフレキシビリティーを考慮すれば、熱エネルギーで数 ms 以内に超えられる程度の自由エネルギー差であることが導かれた。これにより、ミオシンの構造状態と化学状態はタイトにカップルしていなくてもよく、前進運動に関わる分子内張力の獲得（②の構造遷移）は熱エネルギーで行え、ミオシンの力発生はミオシンがアクチンと最安定構造を形成する過程であることが導かれた。また、ヌクレオチドフリーでも同様の考えで、観察された力学的刺激による前進運動の成功率の低さを説明でき、ADP 結合状態よりも①と②の自由エネルギー差の絶対値が大きいことが導かれた。

これまで広く信じられているミオシンの化学-力学エネルギー変換を説明するモデルでは、細胞内などで高負荷がかかって一度アクチン繊維から離れてしまったミオシンの頭部はさらに余分に ATP を消費しないと力発生することができない。しかし本研究から、ミオシンの力発生のメカニズムによれば、ミオシンは ATP をさらに消費しなくとも、力発生を行える省エネルギーな分子機械であることが導かれた。

研究テーマ C「先鋭・高安定カンチレバー探針の開発」

AFM 観察で得られる画像の空間分解能や美しさは、カンチレバー探針先端の先鋭さや安定性に強く依存する。また、本研究で開発した新規高速 AFM イメージングモードでは、観察対象に力学的刺激を及ぼすが、その位置精度は探針先端の形状や特性に強く依存する。よって、先鋭・高安定カンチレバー探針の開発は、実験の質の高さや力が及ぶ位置精度を保証するための重要な課題である。走査型電子顕微鏡内に昇華性物質を入れて EBD（Electron Beam Deposition）法で探針を作ると、物質に依存した特性の探針が得られることが分かっていた。そこで、様々な物質を系統的に試すことによって、先鋭・高安定のカンチレバー探針を開発することを試みた。試験に長い時間を要したが、特定の昇華性物質を用いると、EBD 探針のアスペクト比、単位時間当たりの成長速度が著しく向上することを見出した。また、まだ統計量が不足しているが、それらの物質で作成したEBD 探針を用いると、これまで多用していたフェノールに比べて、比較的高い空間解像度で長時間安定して AFM 画像を取得できることが分かってきた（未公開データ）。今後、さらにデータ数や知見を重ねていくことで、高速 AFM の空間分解能や定量性、実験効率の改善といった基礎性能の向上を図り、研究テーマ A-4、B-3、B-4 を推進していく。

研究テーマ D「その他の生体分子系への応用」

研究テーマ A で開発した新規高速 AFM イメージングモードをミオシン V 以外の生体分子系へ応用し、手法の有効性を示すとともに、それら生体分子の機能メカニズムを新たな観点から理解すること目指した。本さきがけ領域内外の研究者と共同研究を行い、いくつかの生体分系で高速 AFM イメージングと本研究で開発した力学的刺激の組み合わせにより、それらの機能メカニズムや複合体の形成機序や、タンパク質-タンパク質やタンパク質-核酸間の親和性の高さなどを理解することにつながった（未公開データ）。

3. 今後の展開

本研究によって、タンパク質分子の形状変化をナノメートルオーダーの空間分解能でリアルタイム観察しながら、分子の特定の部位に力学的刺激を与え、その効果を探ることができる新規のイメージング技術が提供された。今後さらに、AFM 探針の先鋭・高安定化、力学的刺激位置の自動認識や、刺激した位置とタンパク質の高空間分解能構造とのフィッティングプログラムの開発を推進することで、手法の高度化を目指す。また、この新規可視化技術を、ミオシン V 以外のモータータンパク質や、その他の分子内・分子間張力をシグナルとして機能していたり、アロステリック性を発揮しているタンパク質などに広く応用することで、その機能メカニズムを新しい観点から探る研究を推進していきたい。これらの研究を通じて、従来の手法で調べることができなかった生命現象の解明が進展すると考えられる。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

研究目的の達成状況については、「2. 研究成果」で述べたように、研究テーマ A で、分子の特定の位置に力学的刺激を加え、その効果を映像としてみることができる新技術を提供することができた。それをミオシン V に応用し、その化学−力学エネルギー変換機構の詳細を解明することに成功した（研究テーマ B）。これらは非常に順調に進んだ。その一方で、手法の高度化と定量化を目指すために、力学的刺激位置の自動認識（A−4）、力学的刺激位置と高解像度構造情報をフィッティングするプログラムの開発（B−4）を計画していたが、そのテーマの基盤となる AFM 探針の先鋭化・高寿命化（研究テーマ C）の推進に長い時間を要してしまった。AFM 探針の先鋭化と高寿命化については、一定の改善は見られたもののまだ十分とは言えず、探針の物理化学的な手法による定量解析を推進することが重要である。AFM 探針に一定の改善が見られたので、A−4 や B−4 についての研究を現在推進中である。また、研究の進め方としては、さきがけ研究で推奨されている“異分野連携”を積極的に推進することで、研究領域内外の研究者らとの共同研究を進めた（研究テーマ D）。自身の枠では考えもつかない発想や構想を得て、様々な課題に取り組むことができ、結果も得られてきている。また、研究費執行については、当初研究補助員は 2 年度目から雇用する予定であったが、研究内容とマッチする人材の確保に時間を要したため 3 年度目からの雇用となった。その他は研究計画に沿った執行を行った。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果については、本研究で新たに開発された分子マニピュレーション機能を持った可視化技術は、生命科学の理解を深める相関構造解析の一翼を担うことが期待される。また、新しい可視化技術の誕生は、生命科学に留まらず化学、物理学、工学など様々な科学分野に広く波及することが考えられる。この可視化技術によって明らかになった現象や原理に基づいて、医薬品やデバイス、システムが創製されることによって、社会や経済に研究成果が還元されることが期待される。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

高速 AFM の技術開発を進め、高速 AFM のもつ優位性（さわれる、リアルタイム）を存分に活かし、ミオシンＶの歩行運動の従来定説を覆す数々の観察事実を見出した。高速 AFM の特徴を十分に引き出した質の高い成果と考える。他の研究者との共同研究においても成果を出した。

独自技術の高度化とその技術を持って科学上の問題を解決していくことによる生命科学への貢献とおそらく同等に重要なことは、その技術を世界の多くの研究者が使えるようにすることである。その開発者である古寺さんは、その道筋をつけ得る立場にあり、その責任を背負っているとも言えるのでぜひ尽力していただきたい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. **N. Kodera,** T. Ando. The path to visualization of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Biophys. Rev.* 6, 237–260 (2014).

2. J. Preiner, **N. Kodera,** J. Tang, A. Ebner, M. Brameshuber, D. Blaas, N. Gelbmann, HJ. Gruber, T. Ando, P. Hinterdorfer. IgGs are made for walking on bacterial and viral surfaces. *Nature Communications* 5, 4394 (2014).
3. **N. Kodera,** K. Uchida, T. Ando, S. Aizawa. Two-ball structure of the flagellar hook-length control protein FliK as revealed by high-speed atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 427, 406-414 (2015).
4. #KX. Ngo, *#**N. Kodera,** E. Katayama, T. Ando, *TQP. Uyeda. Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *eLife* 4, e04806 (2015). (*責任著者、#Contributed equally)
5. #T. Davies, #**N. Kodera,** GS. Kaminski-Schierle, EJ. Rees, M. Erdelyi, CF. Kaminski, T. Ando, M. Mishima. CYK4 promotes antiparallel microtubule bundling by optimizing MKLP1 neck conformation. *PLoS Biol.* 13, e1002121 (2015). (#Contributed equally)
6. K.X. Ngo, N. Umeki, S. Kijima, **N. Kodera,** H. Ueno, N. Furutani-Umezu, J. Nakajima, TQP. Noguchi, A. Nagasaki, K. Tokuraku, TQP. Uyeda. Mutually exclusive cooperative binding of myosin and cofilin to actin filaments involves cooperative conformational changes of actin. *Sci. Rep.* 6, 35449 (2016).

(2)特許出願
研究期間累積件数:3 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)
・招待講演
1. **古寺哲幸,** 内橋貴之, 安藤敏夫. 新規高速 AFM 走査モードで解明するミオシンⅤの化学-力学エネルギー変換機構. 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 横浜 (2014).
2. **古寺哲幸.** 高速 AFM で生体分子の動きを見る. 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 VII」, 理化学研究所・和光 (2015).
3. **古寺哲幸.** 高速 AFM によるプロセッシブミオシンのビデオ観察. 第 5 回分子モーター討論会, 東京大学駒場キャンパス (2015).
4. **古寺哲幸,** 内橋貴之, 安藤敏夫. Principle for force generation in myosin V illustrated by high-speed AFM. 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学角間キャンパス (2015).
5. **古寺哲幸,** 内橋貴之, 安藤敏夫. 高速 AFM の開発とそのバイオ応用. 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会, 新潟市朱鷺メッセ (2016).

・国際学会(口頭)
1. **N. Kodera,** T. Uchihashi, T. Ando. Direct observation of proteins at work by high-speed atomic force microscopy. Nano In Bio 2016, Guadeloupe, France (2016).
2. **N. Kodera,** T. Uchihashi, T. Ando. ATP-free unidirectional walking of myosin V revealed by interactive high-speed atomic force microscopy. 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop 2016, Kanazawa, Japan (2016).

・受賞

1. **古寺哲幸.** 第 9 回若手奨励賞. 日本生物物理学会 (2013).

・著作物

1. **古寺哲幸,** 内橋貴之, 安藤敏夫. 高速原子間力顕微鏡による生体分子のナノ動態撮影. 日本物理学会誌 69, 459-465 (2014).
2. T. Uchihashi, **N. Kodera,** T. Ando. High-speed Atomic Force Microscopy. Chapter 22, pp.481-518 in Noncontact Atomic Force Microscopy Vol.3 (Seizo Moprita, Franz J. Giessibl, Ernst Meyer, Roland Wiesendanger, Eds) 527 pp. Springer (2015).
3. **古寺哲幸.** 分子の動きを見る. 天然物の化学-魅力と展望-, 158-163 (2016).

研　究　報　告　書

「小胞体糖タンパク質フォールディング装置作動メカニズムの解明」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成25年10月～平成29年3月
研　究　者：　佐藤　匡史

1．　研究のねらい

糖鎖はタンパク質が適正な完成品となって出荷されるための品質管理の標識として機能することが明らかになりつつある。小胞体糖タンパク質フォールディング装置は、2 つの糖鎖プロセシング酵素、すなわちグルコシル化を触媒する UGGT （UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素）と脱グルコシル化を触媒するグルコシダーゼ Ⅱ、糖鎖結合能を有するレクチンであるカルネキシン・カルレティキュリンが協同的に働くことによって機能している。本研究は、本さきがけ研究者がこれまで確立してきた技術基盤と学術的成果を背景として、様々な構造生物学的手法（X 線結晶構造解析、超高磁場 NMR 分光法、X 線小角散乱、高速原子間力顕微鏡解析）を縦横に活用した相関構造解析を遂行することにより、小胞体品質管理機構の構造基盤を統合的に理解することを目指した。

2．　研究成果

（1）概要

小胞体で誕生した糖タンパク質は、アスパラギン結合型糖鎖上の非還元末端のグルコース残基を目印とした品質管理システムを通じて正しい立体構造を獲得している。本研究では、このシステムを作動させる 2 つの糖鎖プロセシング酵素、すなわちグルコシル化を触媒する UGGT と脱グルコシル化を触媒するグルコシダーゼⅡを対象として、構造生物学的アプローチを縦横に活用した相関構造解析を行い、本品質管理システムの作動機構を探査した。

グルコシーゼⅡにおいては、触媒-制御サブニット間の相互作用様式に加えて、2 つの異なるグルコシル化糖鎖との複合体の立体構造を明らかにした[研究成果 1, 2]。これにより、本酵素の活性部位が瓢箪型の深いポケットからなることが判り、2 段階の脱グルコシル化反応は連続しては起こらないことが示された。このことは、糖タンパク質がモノグルコシル化した糖鎖を認識するシャペロンと相互作用するための猶予時間を与えているものと考察される。

一方 UGGT では、本酵素が大きなフォールディングセンサー領域と小さな触媒ドメインが柔軟なリンカーを介して繋がれた構造をとっていることが明らかになった。また、UGGT のセンサー領域はチオレドキシン様ドメインがタンデムに 3 つ繋がったマルチドメイン構造を形成していることを見出した[研究成果 3]。UGGT は幅広い疎水性パッチを有する可動性のセンサー領域を介して、疎水性残基を露出した変性糖タンパク質基質を認識しているものと考えられる。

さらに、これらの酵素の基質と生成物にあたるモノグルコシル化した糖鎖の動的な立体構造を NMR 分光法と分子動力学シミュレーションにより明らかにした[研究成果 4, 5]。これにより、小胞体レクチンであるカルレティキュリンは糖鎖の構造変化を伴う誘導適合によって分子認識を行っていることが示された。

（2）詳細

研究テーマ「小胞体グルコシダーゼ II の作動メカニズムの解明」

小胞体品質管理システムは、タンパク質に結合した *N* 型糖鎖の末端に付加されるわずか 1 残基のグルコース残基の有無を目印として、タンパク質の品質を見分けている。すなわち、フォールディングが完成したタンパク質にはグルコース残基が付加されず、輸送系へと導かれる。一方、フォールディングが未完成なものにはグルコース残基が付加され、レクチン・シャペロン複合体の標的となる。このカルネキシンサイクルと呼ばれる品質管理システムにおいて、グルコース残基の切除と付加はそれぞれグルコシダーゼ II と糖転移酵素 UGGT によって担われている。グルコシダーゼ II は、ジグルコシル化状態からグルコース残基を切除する”切断 1”とモノグルコシル化状態からグルコースを取り除く”切断 2”をともに触媒する活性を有している（図 1）。カルネキシンサイクルの離脱を促すのは切断 2 であるが、この反応過程は切断 1 と比較して遅いことが知られている。しかしながら、この点を含めてグルコシダーゼ II による糖鎖プロセシング機構の構造的理解はほとんど得られていなかった。

立体構造解析の結果、触媒 αサブユニットの活性部位は 2 つのサブサイトを含む瓢箪型のポケットから構成されていることを見出した（図 1）。活性部位ポケットが深いために、切断 1 の次に切断 2 に移行するためには糖鎖がいったん離れる必要があり反応が連続で起こらないことが示された。このように切断 2 が遅れを伴う過程であることは、モノグルコシル化されたグライコフォームを持つシャペロンとの相互作用を通じて糖タンパク質が折りたたまれる猶予時間を与えているものと考察される[研究成果 1]。また、本酵素は触媒 αサブユニットと制御 βサブユニットから構成されるヘテロダイマーとして機能している。本研究では、α サブユニットと βサブユニット G2B ドメインからなる複合体の立体構造解析に成功し、α-βサブユニット間の相互作用様式を明らかにした[研究成果 2]。その結果、G2B ドメインのカルシウム分子の結合は、その立体構造形成や α-βサブユニット間の相互作用に寄与していることを見出した。

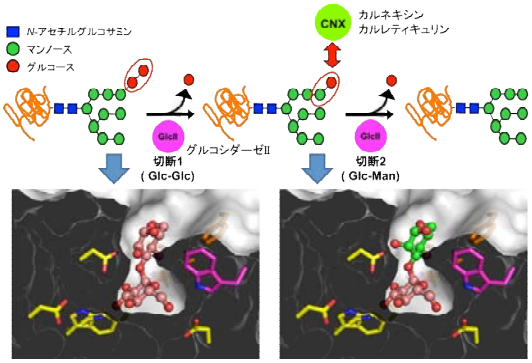


図1　グルコシダーゼ II による糖鎖プロセッシング（上）とその構造基盤を与える基質複合体の結晶構造（下）。

研究テーマ「フォールディングセンサー酵素 UGGT の作動メカニズムの解明」

小胞体品質管理システムにおいて UGGT は、フォールディングが未完成なタンパク質に対してのみグルコース残基を転移することで、フォールディングセンサーとしての機能を果たしている。しかしながら、この品質管理機構の中核を担う鍵酵素の分子認識および作動機構には未だ不明な点が多く存在しており、その理解はほとんど進んでいなかった。そこで本研究では、構造生物学的手法を縦横に活用した相関構造解析を行い、本酵素の作動メカニズムを理解することを目指した。

UGGT の全体構造を明らかにすることを目的として、X 線小角散乱および高速原子間力顕

微鏡解析を行った。その結果、本酵素は大きな N-lobe（フォールディングセンサー領域）と小さな C-lobe（触媒ドメイン）が柔軟なリンカーによって繋がれた構造をとっていることを見出した。また高速原子間力顕微鏡解析の結果、フォールディングセンサー領域は 4 つのドメインから構成されるリング状の構造をとっていることが示唆された。次に、原子分解能で立体構造を明らかにするために、本酵素の X 線結晶構造解析を試みた。バイオインフォマティクス解析を行い、フォールディングセンサー領域のドメイン構造の同定を試みた。その結果、フォールディングセンサー領域は小胞体品質管理機構に関わるタンパク質・酵素群においてよく見出されるドメインであるチオレドキシン様ドメインが 3 つタンデムに繋がった構造を有していることを見出した[研究成果 3]。そこで、このドメイン構造の情報をもとに、様々な組み合わせのドメイン欠損体の結晶化を行い、3 番目のチオレドキシン様ドメインと触媒ドメインの 3 次元構造を解明することに成功した。触媒ドメインの立体構造は 1.5 Å の高分解能で決定し、活性に必要な Ca^{2+}およびドナー基質である UDP グルコースとの結合様式を詳細に明らかにした。さらに興味深いことに、このチオレドキシン様ドメインは C 末端にフレキシブルなヘリックスを有し、疎水性パッチを露出した open 型と遮蔽した close 型のコンフォメーションをとり得ることが明らかとなった[研究成果 3]（図2）。以上の結果より、UGGT がこのヘリックスを介して基質糖タンパク質をセンシングするメカニズムが推測された。

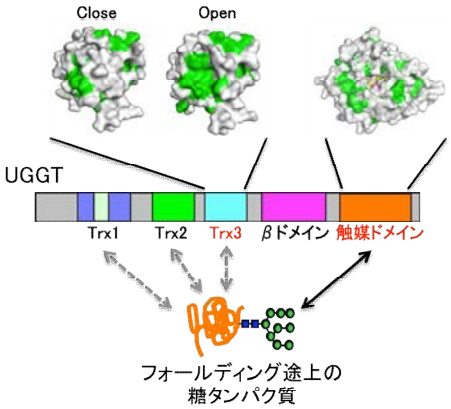


図２　UGGT による基質糖タンパク質認識の概略図。

研究テーマ「モノグルコシル化高マンノース型糖鎖の動的構造解析」

グルコシダーゼⅡとUGGTの基質と生成物にあたるモノグルコシル化した糖鎖の動的な立体構造を NMR 分光法と分子動力学シミュレーションにより明らかにすることを試みた。本研究者が所属するグループでは、新たな立体構造情報として常磁性効果に着目し、ランタニドイオンの導入によって観測される擬コンタクトシフト（PCS）を利用した糖鎖の NMR 立体構造解析法を開発してきた。これまでに、$Man_9GlcNAc_2$（M9）などの糖鎖の動的構造解析を行ってきた。そこで、本研究では更に 1 残基大きいモノグルコシル化糖鎖（GM9）に拡張した。GM9 の部位選択的な安定同位体標識体は、UGGT を用いた酵素法と化学合成法を組み合せることで調製した[研究成果 4]。NMR 解析の結果、レクチンであるカルレティキュリンは糖鎖の構造変化を伴う誘導適合によって分子認識を行っていることが示された（図3）[研究成果 5]。

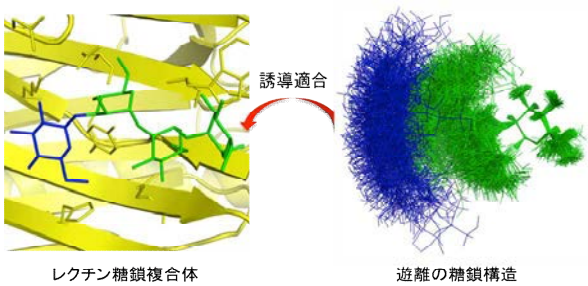


図3　レクチンであるカルレティキュリンの誘導適合を介した糖鎖認識機構

3. 今後の展開

グルコースによるタグは、小胞体で誕生する新生ポリペプチド鎖の中でも特にフォールディングが困難なタンパク質上に選択的に提示されていることが予想される。しかしながら、この品質管理システムのターゲットとなる基質タンパク質の実体についてはほとんど明らかにされていない。従って、本研究で明らかにした構造的知見を踏まえて、この問題に取り組むことが重要な課題だと考えている。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

本研究では、小胞体品質管理システムの中核を担う、2 つの糖鎖プロセシング酵素（UGGT およびグルコシダーゼII）に焦点をおき、構造生物学的手法を縦横に活用した相関構造解析を遂行することにより、これら酵素の作動メカニズムの解明を目指した。脱グルコシル化に関わるグルコシダーゼIIでは、その糖鎖複合体の立体構造解析に成功し、2 報の論文発表を行うことが出来た。一方 UGGT では、その全体構造を X 線小角散乱および高速原子間力顕微鏡解析により明らかにした。また、部分構造ではあるが、チオレドキシン様ドメインと触媒ドメインの立体構造を決定することに成功し、これまでに 1 報の論文発表を行った。現在、UGGT のフォールディングセンサードメインのクライオ電子顕微鏡解析と結晶化が順調に進んでおり、本さきがけ研究期間内に、論文投稿を予定している。さらに、グルコシダーゼ II と UGGT の基質と生成物にあたるモノグルコシル化した糖鎖の動的な立体構造を NMR 分光法と分子動力学シミュレーションにより明らかにし、2 報の論文発表を行った。

以上の通り、当初の研究計画を概ね進めることができたことから、研究目的を十分に達成出来たものと自己評価している。各年度において、本研究を進める上で肝となるデータが得られたことから、研究の進め方（研究実施体制及び研究費執行状況）は、問題無かったものと考えている。また本研究成果は、一部のデータを除き、これまでに論文発表を行うことが出来ているので、本研究成果の科学技術への波及効果は期待できるものと考えている。社会・経済への波及効果については、本研究成果のみではまだ不十分であり、3の「今後の展開」で記載した内容の更なる研究の遂行が必要だと考えている。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

グルコシル化を触媒する全長 UGGT（UDP−グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素）の X 線小角散乱、高速 AFM による動的構造情報を取得した。また、UGGT の Trx3 ドメインと触媒ドメインの結晶構造解析に成功した。さらに、脱グルコシル化を触媒するグルコシダーゼIIの触媒サブユニットの結晶構造解析に成功し、グルコシル化糖鎖のプロセシングに関する重要な知見を得た。制御サブユニットの構造解析にも成功した。以上のように目標とした事項の多くはほぼ達成できた。

グルコシダーゼIIの構造を解き、反応機序を明らかにしたこと、そして UGGT の構造に

ついても概ね解明し、反応機序に新規の理解を与えたことは、ともに糖鎖科学への構造生物学からの重要な貢献であると評価できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Satoh T., Toshimori T., Yan G., Yamaguchi T., and Kato K., Structural basis for two-step glucose trimming by glucosidase II involved in ER glycoprotein quality control, ***Sci. Rep.*** **6**, 20575 (2016).
2. Satoh T., Toshimori T., Noda M., Uchiyama S., and Kato K., Interaction mode between catalytic and regulatory subunits in glucosidase II involved in ER glycoprotein quality control, ***Protein Sci.*** 25, 2095-2101 (2016).
3. Zhu T., Satoh T., and Kato K., Structural insight into substrate recognition by the endoplasmic reticulum folding-sensor enzyme: crystal structure of third thioredoxin-like domain of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase, ***Sci. Rep.*** **4,** 7322 (2014).
4. Zhu T., Yamaguchi T., Satoh T., Kato K., A hybrid strategy for the preparation of ^{13}C-labeled high-mannose-type oligosaccharides with terminal glucosylation for NMR study, ***Chem. Lett.*** **44**, 1744-1746 (2015).
5. Suzuki, T., Kajino, M., Yanaka, S., Zhu, T., Yagi, H., Satoh, T., Yamaguchi, T., and Kato, K., Conformational analysis of a high-mannose-type oligosaccharide displaying glucosyl determinant recognised by molecular chaperones using NMR-validated molecular dynamics simulation, ***Chembiochem in press*** (2017).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 佐藤匡史, 加藤晃一, 糖鎖認識を介したタンパク質品質管理機構の構造基盤
   平成 28 年度日本応用糖質科学会東日本シンポジウム, 東京, 2016 年 7 月 22 日.
2. 佐藤匡史, Zhu, T., 年森隆泰, 山口拓実, 加藤晃一, 糖鎖を目印としたタンパク質品質管理機構の構造基盤.
   第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 2016 年 6 月 9 日.
3. Satoh, T., Inagaki, K., Yagi-Utsumi, M., Kozai, T., Zhu, T., Itoh, S.G., Okumura, H., Kamikubo, H., Uchihashi, T., and Kato, K., Structural insights into the working mechanisms of multi-domain enzymes involved in ER protein quality control.
   8th Japan-Korea Seminars on Biomolecular Sciences, Okazaki, February 15-17 (2016).
4. Satoh, T., and Kato, K., Structural insights into glycoprotein processing mechanisms in ER quality control system.

The 87th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Kyoto, October 15 (2014).

5. Satoh, T., and Kato, K., Structural basis for the glycan-processing mechanisms in glycoprotein quality control system.
   The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sapporo, September 26 (2014).

受賞

1.「平成 28 年度名古屋市立大学学長表彰」(2016)

研　究　報　告　書

「原子間力顕微鏡を駆使した膜中イオンチャネル集団動作機構の革新的理解」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研 究 者：　角野　歩

1．　研究のねらい

様々な生理現象を司る生体内の電気信号は、細胞膜中に存在する膜タンパク質であるイオンチャネル分子により制御されている。イオンチャネルはイオンを通過させる通り道（ポア）を有しており、チャネルが刺激に応じてポアを開閉させる構造変化（ゲーティング）と、特定のイオン種を選択的に透過させる機能（選択性）によって、細胞の膜電位を調節している。我々はこれまでに、pH 依存性カリウムチャネル KcsA が開閉と連動して集合・離散することを原子間力顕微鏡(AFM)により明らかにした。しかし、集合・離散といった集団構造がチャネル機能に及ぼす影響については明らかでない。本さきがけ研究は、チャネルの集団的動作機構を分子レベルで明らかにすることを最終目標とした。

2．　研究成果

（1）概要

イオンチャネルの集団的な動作機構を明らかにするために、下記の研究を行った。

A. KcsA の開閉と連動した集合・離散の分子メカニズムの解明

膜タンパク質の集合・離散をはじめとする再構成膜中での自己組織化構造や動態を分子レベルで評価するために、まずはAFM基板上で Ni^{2+}–His–tag の特異的相互作用を用いて膜タンパク質の配向を揃えて任意の脂質膜中に再構成する手法を開発した。この手法をもとにして、KcsA チャネルの集合離散現象が引き起こしているのか、諸種のドメイン切除体や膜組成の影響を検討した。その結果、ポアドメインと膜との相互作用が集合離散を引き起こしていることが明らかになり、脂質膜が薄くて流動的なほど開チャネルが離散しやすく、膜が厚くて流動性が低いほど開条件においてもチャネルが集合したままになることがわかった。また、薄い膜のほうがチャネルは開きやすいことが先行研究から明らかになっており、チャネルの開閉と膜の厚さ、チャネルの集合・離散状態に相関があることを明らかにした。

B. K^+チャネルとサソリ毒の結合動態の高速 AFM による一分子解析

サソリの毒液に含まれるアジトキシン－2(Agtx2)は、細胞外からチャネルのポアに結合してイオン透過をブロックするペプチドである。今回我々は、K^+チャネルと Agtx2 の結合動態を高速AFMによって一分子観察することに成功した。得られた結合・解離の時間変化を解析したところ、KcsA の状態に高親和性状態と低親和性状態があり、また Agtx2 がアロステリックエフェクターであることが明らかになった。（金沢大学の内橋貴之教授との共同研究）

C. AFM／電気生理同時測定系の開発

チャネルの集合・離散とチャネルの機能の関係を直接的に解明することを目的として、AFMと電気生理の同時計測システムの構築に取り組んだ。

（2）詳細

研究テーマ A「KcsA の開閉と連動した集合・離散の分子メカニズムの解明」

A-a. 膜タンパク質の自己組織化を観察するための再構成手法の開発

近年、再構成膜中の膜タンパク質の表面構造や自己組織化構造の観察に AFM が適用されるようになってきた。AFMは常温・常圧・水溶液中での試料の構造や動態を非標識かつ高分解観察することができる唯一の手法であるためである。ここで共通の課題になっているのは、観察基板上での膜タンパク質の配向制御である。膜タンパク質の配向が揃っていないと、膜タンパク質のどの表面構造を観察しているのか特定できず、また形成された自己組織化構造の解釈も難しくなる。そこで私は、これらの検討に対し汎用的に適用可能、かつ簡便な配向制御および膜再構成手法を開発した。

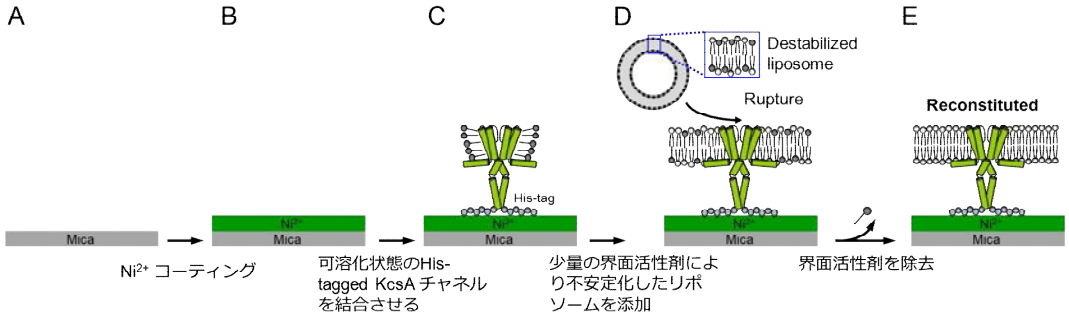


図 1. AFM 基板上での膜タンパク質の配向制御した脂質膜中への再構成

今回開発した再構成手法の概略図を図1に示す。この手法のポイントは、界面活性剤に可溶化した His-tag 膜タンパク質を Ni^{2+}をコーティングしたマイカ基板上に配向制御して固定化し、その後界面活性剤で不安定化したリポソームを添加して平面膜中に再構成することである。用いる脂質や界面活性剤の濃度等を最適化することで、配向選択的な基板上での組織化と表面構造、自己組織化構造の観察に成功した。この手法を用いて KcsA の開閉各状態における自己組織化状態を観察した結果が図 2 である。KcsA チャネルの中性・閉状態では集合し、酸性・開状態では離散するという、特徴的な自己組織化構造の変化を観察することができた。この再構成手法は膜タンパク質の His-tag の位置を変えることで観察する表面を自由に制御することができ、また再構成する脂質の電荷やアシル鎖長などの制限もない。試料調製の所要時間は15分程度であり、特別な実験装置も必要としない点からも、膜タンパク質の AFM 観察に汎用的な手法を開発できた。(Sumino et al., *J. Phys. Chem. Lett.* 2017)

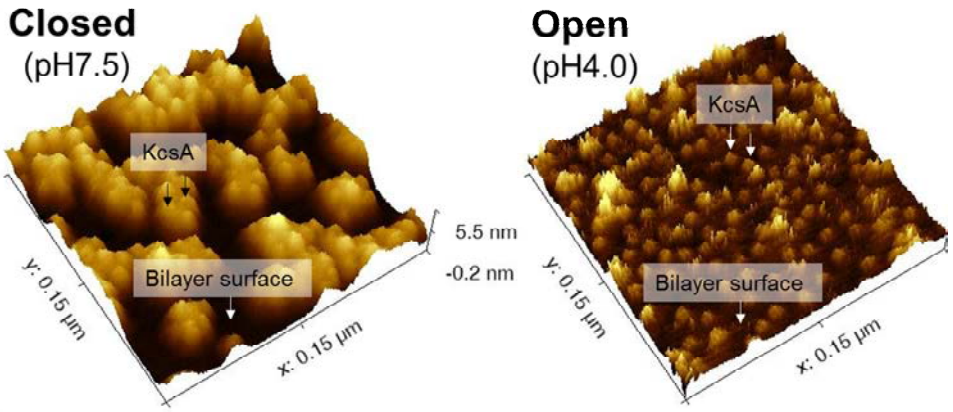


図 2. 配向制御した再構成膜中での KcsA の開閉と連動した集合・離散

以下の研究成果については論文準備中のため、報告書の非公開項目欄に記載する。

A-b. KcsA の集合離散を引き起こす部位の検討

A-c. KcsA の局在に及ぼす膜の相状態・厚さの影響

研究テーマ B「K^+チャネルとサソリ毒の結合動態の高速 AFM による一分子解析」

研究テーマ C「AFM／電気生理同時測定系の開発」

3. 今後の展開

本研究では K^+チャネルの開閉と連動した集合・離散がポアドメインと膜との相互作用によりおこることを明らかにした。また、チャネルが離散しやすい膜環境とチャネルが開きやすい膜環境に相関があることも明らかになった。ポアドメインは K^+チャネルの基本的機能（開閉や選択的透過）を担う最も重要なドメインであり、すべての K^+チャネルで保存されている。本研究は、イオンチャネルの働きがチャネル単独の開閉のみならず、膜上での集団的振る舞いも寄与していることを初めて明らかにしたものであり、チャネルの生理機能を考える上で重要な知見をもたらしたと考えている。我々が KcsA の集合・離散を発表した直後に、植物の孔辺細胞に存在する K^+チャネル GORK においても同様の現象が発見された。現時点ではこの二種類の K^+チャネルでしかこのような集合・離散は報告されていないが、今後同様のポアドメインを有する様々なチャネルで確認されるかもしれないと期待している。AFM と電気生理の同時計測システムの開発については十分な進捗が得られなかったが、今後も引き続き検討していく予定である。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

さきがけ研究期間の前半は、変異体調製や配向制御手法の確立に四苦八苦していてほとんど研究が進まなかったため、期間全体で考えても当初期待していたほどの進捗は達成できなかった。後半に差し掛かって、膜タンパク質の配向制御した再構成の基盤技術ができてからは、かなりスムーズにデータが出るようになり、集合・離散の分子メカニズムに迫ることができ

た。また、当初予定していなかった研究テーマにおいてもインパクトの大きい論文になりうる量・質のデータが出ており、さきがけ期間内には間に合わなかったものの、十分な成果になると感じている。ただ、当初は「集合・離散の分子メカニズム解明」と「AFM/電気生理同時計測系の開発」を研究の両輪としていたが、実際にはほとんどの時間と労力を前者に費やしてしまい、後者に関しては十分な進捗が得られていない。さきがけ期間終了後は後者に重点をおいて研究活動を続ける所存である。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

pH 依存性カリウムチャネル KcsA の開閉と集合・離散の関係とそのメカニズムの解明を目指し、pH依存的な離合集散をAFM観察するための再構成膜調製法を確立した。ポアドメインと膜との相互作用、膜の相状態、厚さが影響を及ぼすことを見いだしたことは立派な成果であると評価できる。

チャネルの開閉についてより詳細な機能解析を行うために、AFM 観察と電気生理計測を同時に行うことができるような技術をぜひ開発して欲しい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Sumino, A.; Yamamoto, D.; Iwamoto, M.; Dewa, T.; Oiki, S. Gating-Associated Clustering-Dispersion Dynamics of the KcsA Potassium Channel in a Lipid Membrane. *J. Phys. Chem. Lett.* 2014, *5*, 578-584.
2. Sumino, A.; Uchihashi, T.; Oiki, S. Oriented Reconstitution of the Full-Length KcsA Potassium Channel in a Lipid Bilayer for AFM Imaging. *J. Phys. Chem. Lett.* 2017, acs.jpclett.6b03058.
3. Uragami, C.; Sugai, Y.; Hanjo, K.; Sumino, A.; Fujii, R.; Nishioka, T.; Kinoshita, I.; Dewa, T.; Nango, M.; Gardiner, A. T.; et al. Observation of Hybrid Artificial Photosynthetic Membranes Using Peripheral and Core Antennae from Two Different Species of Photosynthetic Bacteria by AFM and Fluorescence Micro-Spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2015, *313*, 60-71.

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

【学会発表】

1. Ayumi Sumino, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Shigetoshi Oiki “HS-AFM revealed blocking dynamics of a scorpion toxin on the KcsA potassium channel” 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop, 2016, Kanazawa, Japan （国際・口頭）

【受賞】

1. 「福井大学医学部優秀論文賞」(2014)
2. 第 91 回日本生理学会年会ポスター賞(2014)

【解説記事】

1. Sumino, A.; Yamamoto, D.; Sumikama, T.; Iwamoto, M.; Dewa, T.; Oiki, S. Structure and Dynamics of Membrane-embedded KcsA Potassium Channel Revealed by Atomic Force Microscopy. 生物物理 55 (1), 005-010 (2015)

【その他】

1. 発表論文(Sumino et al., J. Phys. Chem. Lett. 2014, 5, 578-584.)がACS Live Slides掲載対象に選ばれる
2. 生理学会誌表紙掲載(2014)

とができた。

研 究 報 告 書

「Agoタンパク質による遺伝子発現制御機構の構造生物学的基盤」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研 究 者： 中西 孝太郎

1． 研究のねらい

Argonaute は、ガイド鎖と呼ばれる一本鎖 RNA と結合して RNA-induced silencing complex (RISC) を 形成する。RISC はガイド鎖と塩基相補的な配列を含むメッセンジャー(mRNA) と結合し、その mRNA を切断もしくは mRNA を分解する因子をリクルートすることにより、遺伝子の発現を制御する。研究者は本プロジェクトを始める前に、ガイド RNA と結合した出芽酵母 *Kluyveromyces polysporus* 由来の AGO の結晶構造を決定した(Nakanishi *et al.*, Nature 2012)。その結果、ガイド鎖の取り込みによる構造変化によって触媒テトラッドが形成され、AGO が RNA 切断活性型になることを明らかにした。また、ガイド鎖と結合したヒトの Argonaute1 (AGO1) の結晶構造の決定にも成功し、標的 mRNA が結合する核酸結合チャネルの形がヒトの Argonaute2 (AGO2) と異なることを明らかにした(AGO2)。本研究では、ヒトがもつ 4 種類の Argonaute タンパク質 (AGO1、AGO2、AGO3、AGO4) が二本鎖 RNA を1）取り込み 、2）ほどき、そして 3) 標的 mRNA と結合する分子機構を原子分解能レベルで理解するために、それら複合体の結晶構造を決定する。近年、製薬業界やベンチャー企業が人工的な二本鎖 RNA もしくは一本鎖 RNA を AGO に取り込ませ、疾患に関わる蛋白質の発現を制御する技術を開発している。本研究では、RNA 干渉を用いた医薬品の技術開発や臨床開発の発展には欠かせない構造学的基盤を与えることを最終目標とする。

2． 研究成果

（1）概要

ヒトは4種類の Argonaute タンパク質、AGO1, AGO2, AGO3, そして AGO4 をもつ。これらのうち RNA 切断活性をもつのは AGO2 のみである。ほぼすべての細胞において AGO2 の発現レベルが高いことから、他の AGO タンパク質は AGO2 のバックアップ的な働きをすると考えられてきた。さらに、AGO2 の切断活性に依存した生理反応が多く見られることから、これまでの Argonaute やそれに結合する microRNAs(miRNAs)や small interfering RNAs(siRNAs)の研究は主に AGO2 を中心に行われてきた。しかし最近になり、各 AGO が特定の細胞で特有の働きを担うことが報告されてきた。例えば、シカゴ大学の Gomez グループらによって、脊髄小脳変性症の原因となっているメッセンジャーRNA(mRNA)の転写を抑制する際、デザインした miRNA は4つの AGO のうちの AGO2 と AGO4 のみに取り込まれ、実際に標的 mRNA に結合するのは AGO4 に取り込まれた時のみであることが報告されている(Miyazaki *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 2016)。この結果は、miRNA を研究してきた者としては非常に驚きだった。というのは、miRNA はヒトがもつ 4 種類の AGO にランダム取り込まれると考えられてきたからだ。さらに驚くことに、AGO2 と AGO4 は同じ miRNA を取り込んだにも関わらず、AGO4 のみが標的 mRNA に結合することを同著者らは報告している。これらの結果は、AGO が取り込んだ miRNA の塩基配列に従って標的 RNA に結合するという従来のモデル

では説明できない。

ヒトの４種類の Argonaute タンパク質のアミノ酸配列が 82%の相同性を持つことから、それらの全体構造も非常に似ていることが予想されてきた。実際、これまで AGO1 と AGO2 の結晶構造が決定されており、両者の全体構造は非常に似ていることが報告されている(Elkayam *et la., Cell* 2012; Faehnle *et al., Cell Rep.;* Nakanishi *el al., Cell Rep.* 2013; Schirle and MacRae *Sciene* 2012)。しかしながら、AGO1 と AGO2 の立体構造は局所的に異なり、その違いが両者の機能の違いを生み出していることが明らかになった。 Argonaute は4つのドメインで構成され、N 末端ドメインと PAZ ドメインが N 末端 lobe を形成し、MID ドメインと PIWI ドメインが C 末端 lobe を形成している。この2つの lobes の間を核酸結合チャネルが走っており、ガイド鎖(miRNA)とターゲット鎖(mRNA)は共にそのチャネルに結合する。上述した AGO1 と AGO2 の構造の相違点のうちの幾つかは核酸結合チャネルに沿って局在する。これらの事実から、本研究は、「small RNA が Argonaute に取り込まれることで初めて完成するチャネルの形状こそが標的 RNA を規定している」という作業仮説を立てて Argonaute の研究を行った。

（2）詳細

研究テーマ「ヒトの Argonaute4」

真核生物の遺伝子発現は階層的に制御されており、その制御機構の１つが microRNA (miRNA)を介した遺伝子サイレンシングである。miRNAs はそれら単体では生理的活性をもたないが、Argonaute と呼ばれるタンパク質に取り込まれ RNA-induced silencing complex (RISC) を形成することで、相補的な塩基配列を含むメッセンジャーRNA に結合することができる。ヒトがもつ4種類の Argonaute タンパク質のうち、RNA 切断活性をもつのは AGO2 のみであるが、すべての Argonaute が RISC を形成して切断非依存的に翻訳抑制や脱アデニル化することができる。最近の研究から、Argonaute4 が精子形成で重要な役割を担うことや脊髄小脳変性症の原因となっている mRNA の翻訳を阻害する役割があることが明らかになり注目され始めている (Modzelewski et al., Dev. Cell 2012; Miyazaki et al., Sci. Trans. Med. 2016)。このような機能を AGO4 がどのようにしてもつのかを理解するためには、生化学的な手法による機能解析のみならず、構造学的基盤が不可欠である。これまで AGO1 と AGO2 については、それらがガイド鎖と結合した RISC の結晶構造が決定されているが、AGO4 の構造は未だ決定されていない。

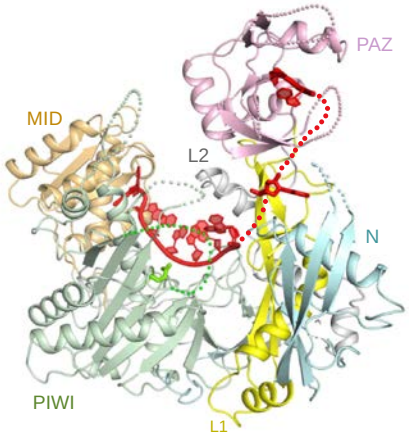


図 1: ヒトの Argonaute4 とガイド RNA(赤)の複合体の結晶構造

今回私たちのグループは、AGO4 とガイド RNA の複合体の結晶構造を分解能 1.9 Å で決定した。回折実験は NE-CAT, Advanced Photon Source (Argonne, Chicago)で行った。2014 年にドイツのグループが AGO4 のアミノ酸配列と AGO2 の既知構造から AGO4 の立体構造モデルを報告している。しかし、私たちが決定した結晶構造から、AGO4 に特異的な挿入部位の立体構造が報告されたモデルと異なることが明らかになった。Argonaute タンパク質はガイド鎖の取り込みに伴って構造を変化させ、保存されたグルタミン酸残基(glutamate finger)が移動して触媒テトラッドを完成させることが知られている。今回の構造は、以前モデルを基に予想された残基とは異なるグ

ルタミン酸残基が glutamate finger として触媒テトラッドを完成させていることを示した。RNA 切断活性に関係なくArgonauteタンパク質は触媒テトラッドを完成させることから、Argonauteが生理活性をもつ RISC となるためには触媒テトラッドの完成が不可欠であることが強く示唆された。

ドイツのグループは、AGO2 の結晶構造を基に AGO4 の構造モデルを報告している(Hauptmann *et al., RNA* 2014)。同モデルでは、AGO4 に特有の挿入領域が β-ストランドを形成し、触媒ドメイン上に位置している。しかし、本研究で決定した結晶構造から、AGO4 に特有の挿入領域は触媒ドメイン上には存在せず、核酸結合チャネルに突き出していることが明らかになった。このことから、AGO4 はこのループの存在によって、他の Argonaute とは異なるターゲット鎖認識機構を持つことが考えられた。この仮説が変異体機能解析の結果と合致したことから、当初掲げた「ガイド鎖が Argonaute のチャネルに結合することで完成するターゲット鎖結合チャネルの形状が標的 RNA を規定する」という作業仮説が成り立つことが強く示唆された。現在同内容についてまとめた論文を準備している。

3. 今後の展開

これまでの遺伝子サイレンシング研究は、主に AGO2 の役割を解明することに焦点が当てられてきた。ヒトは 4 種類の Argonaute タンパク質をもつが、それらは余剰的に働いていると考えられている。しかし、最近報告された研究結果は、4つの Argonaute がそれぞれに特化した役割も担うことを示唆している。今後は生化学的手法を用いて、AGO4 の機能解析を進めていく予定である。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

本研究を提案した際には、本研究者は preliminary データを持ち合わせてなかったので、アイデアで採択して頂いたと考えています。”さきがけ”という言葉通り、自分が面白いと信じる研究テーマについて申請書を書き、その目的に向かって3年半研究できるだけの予算(機会)を頂いたことに感謝しております。自分がポスドクであったならば、もっとできたであろうという思いは正直あります。それでも、空っぽのスペースに実験機材を置くことから始め、学生を指導していく中で彼らが実働部隊として成長し、その結果が発表できるようになったことを振り返ると、研究テーマの推進を最終目的とするものの、その過程で科学者としてラボを経営する資質を学ぶことができたと考えております。

ヒトがもつ4種類の Argonaute 分子がどのように振る舞うのかについて、その構造情報を提供することは、miRNA や siRNA の医療応用に非常に重要になってくると考えています。これまで、small RNAs がどのような mRNA を標的とするかについては、両者(つまり、ガイド鎖とターゲット鎖) の塩基対相補性のみが着目され研究の対象とされてきました。しかしながら、本研究の結果から、small RNA が Argonaute に取り込まれることで初めて完成する「チャネルの形状」が標的 RNA を規定していて、ガイド鎖とターゲット鎖の塩基相補性のみから正確な標的 RNA を予測するのは困難であることが分かり、今後 RNAi の医療応用の実現に向け必要な研究対象を明確化できたと考えています。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

遺伝子発現を制御する 4 種類の Argonaute （AGO)タンパク質の一つである AGO4 と RNA の複合体の結晶構造を 1.9 オングストロームの分解能で明らかにし、AGO2 や変異体との構造・機能の比較から、guide RNA の AGO 結合特異性を説明した。AGO の種類、構造がターゲットの特異性を決定しているという結論は明確である。ほぼ目標通りの成果を達成した。

今後は、構造生物学の専門性を生かし、堅実な努力を続けられることで、より大きな系の中での AGO の働きを理解する方向に進んでいって欲しい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Nakanishi, K. (2016) Anatomy of RISC: How do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip Rev RNA. 7,* 637-60.

2. Jannot G, Michaud P, Quévillon Huberdeau M, Morel-Berryman L, Brackbill JA, Piquet S, McJunkin K, Nakanishi K, Simard MJ. (2016) GW182-Free microRNA Silencing Complex Controls Post-transcriptional Gene Expression during Caenorhabditis elegans Embryogenesis. PLoS Genet. 2016 Dec 9;12(12):e1006484

3. Swarts, D.C., Makarova, K., Wang, Y., Nakanishi, K., Ketting, R.F., Koonin, E.V., Patel, D.J., van der Oost, J. (2014) The evolutionary journey of Argonaute proteins from a structure-function perspective. *Nat. Struct. Mol. Biol. 21,* 743-53

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

なし

研　究　報　告　書

「立体構造にもとづく次世代ゲノム編集ツールの創出」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研 究 者：　西増　弘志

1.　研究のねらい

II 型 CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関与する RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼ Cas9 はガイド RNA と複合体を形成し相補的な標的二本鎖 DNA を切断する。2013 年、Cas9 を応用したゲノム編集技術が報告され、基礎研究から臨床研究にいたる様々な分野において急速に普及した。しかし、Cas9 の RNA 依存的 DNA 切断機構は不明であった。本さきがけ研究では、Cas9 の X 線結晶構造を決定し、Cas9 の作動機構の解明をめざす。さらに、構造情報にもとづき Cas9 を改変することにより、新規のゲノム編集ツールを創出する。

2.　研究成果

（1）概要

ゲノム編集に広く利用されている *Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9（SpCas9）、小型の *Staphylococcus aureus* 由来 Cas9（SaCas9）、Cas9 オルソログのなかで最大の *Francisella novicida* 由来 Cas9（FnCas9）、Cas9 オルソログのなかで最小の *Campylobacter jejuni* 由来 Cas9（CjCas9）の結晶構造を世界にさきがけて決定し、CRISPR-Cas9 の作動機構を原子レベルで解明した。さらに、立体構造をもとづき SpCas9、SaCas9、FnCas9 を改変することにより新規ツールを開発した。また、V 型 CRISPR-Cas 系にかかわる RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼ Cpf1 の結晶構造を世界にさきがけて決定し、CRISPR-Cpf1 の作動機構を解明した。

（2）詳細

研究テーマ A 「CRISPR-Cas9 の結晶構造」

2012 年、Cas9 は原核生物のもつ II 型 CRISPR-Cas 獲得免疫機構にかかわる RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼであることが報告された。Cas9 は 2 つのヌクレアーゼドメイン（RuvC と HNH）をもち、crRNA（CRISPR RNA）、tracrRNA（*trans*-activating crRNA）とよばれる 2 種類のガイド RNA と複合体を形成し、crRNA 中のガイド配列と相補的な標的二本鎖 DNA を特異的に切断する。標的二本鎖 DNA のうち、crRNA と相補的な DNA 鎖（相補鎖 DNA）は HNH ドメインにより切断され、もう一方の DNA 鎖（非相補鎖 DNA）は RuvC ドメインにより切断される。Cas9 による標的 DNA の認識には，PAM（protospacer adjacent motif）とよばれる特定の数塩基が標的配列の近傍に存在することが必要である。PAM は生物種によって異なり、SpCas9 は NGG という配列を PAM として認識する。crRNA と tracrRNA を連結した sgRNA（single-guide RNA）もガイド RNA として機能し、ガイド配列は自由に交換できる。2013 年、Cas9 と sgRNA を用いることにより、ゲノム DNA の標的配列を選択的に切断し、その近傍の配列を改変することが可能であることが報告され、Cas9 は効率的なゲノム編集ツールとして広く普及した。さらに、sgRNA 依存的にゲノムの任意の場所にターゲッティングできるという性質を利用した新規の技術も多数報告されている。

本さきがけ研究では、ゲノム編集に広く利用されている SpCas9 に関して、SpCas9-sgRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造を決定し、Cas9 による RNA 依存性 DNA 切断機構を解明した（Nishimasu et al. Cell 2014 成果 7）（図 1）。結晶構造から、（1）SpCas9 は REC ローブと NUC ローブの 2 つのローブからなること、（2）sgRNA のガイド配列は標的 DNA と RNA-DNA ヘテロ二本鎖を形成し 2 つのローブのあいだに収容されること、（3）ガイド RNA は特徴的な立体構造をとり Cas9 によって広範囲に認識されること、（4）2 つのヌクレアーゼドメインは標的 DNA を切断するのに適した位置に存在すること、（5）PAM は C 末端の PI ドメインによって認識されることが明らかになった。本研究成果は世界初の Cas9-sgRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造として基礎・応用の両面において極めて高い評価を得ている。

異なる生物種に由来する Cas9 とガイド RNA には多様性があり、Cas9 は特定のガイド RNA とのみ複合体を形成する。Cas9 の多様性を理解するために、SaCas9（Nishimasu et al. Cell 2015 成果 5）、FnCas9（Hirano et al. Cell 2016 成果 4）、CjCas9（Yamada, Watanabe et al. Mol Cell 2017 成果 1）に関して、Cas9-sgRNA-DNA 複合体の結晶構造を決定し、Cas9 オルソログによるガイド RNA および PAM の認識機構を解明した（図 1）。結晶構造の比較から、異なる生物種に由来するガイド RNA は異なる立体構造をとり、Cas9 によって特異的に認識されていることが明らかになった。さらに、SpCas9、SaCas9、FnCas9、CjCas9 は異なるアミノ酸残基を用いることにより、NGG、NNGRRT、NGG、NNNVRYM という多様な PAM 配列をそれぞれ認識していることが明らかになった。また、PAM 特異性の異なる SpCas9 改変体の結晶構造を決定し、その PAM 認識機構を解明した（Hirano, Nishimasu et al. Mol Cell 2016 成果 3）（図 1）。

研究テーマ B 「立体構造にもとづく CRISPR-Cas9 の機能改変」

Cas9 の構造情報は誘導型 Cas9 や高精度 Cas9、PAM 特異性の異なる Cas9 など様々な Cas9 改変体の開発にも大きく貢献してきた。本研究では、立体構造にもとづき SpCas9-sgRNA 複合体を改変し新規の転写活性化ツールを開発した（Konermann et al. Nature 2014 成果 2）。これは世界初の機能獲得型のゲノムワイドスクリーニング系として高く注目され、Nature 誌の News & Views においても紹介された。同様に、SaCas9-sgRNA 複合体を改変し小型の誘導型 SaCas9 および転写活性化ツールを開発した（Nishimasu et al. Cell 2015 成果 3）。また、立体構造にもとづき、FnCas9 にアミノ酸変異を導入することにより、YG という配列を PAM として認識する FnCas9 改変体の作製に成功した。

研究テーマ C 「新規 CRISPR—Cas9 ヌクレアーゼの結晶構造」

2015 年、V 型 CRISPR-Cas 系に関わる RNA 依存性 DNA エンドヌクレアーゼ Cpf1 が発見された。Cpf1 は Cas9 と同様に、ガイド RNA 依存的に標的二本鎖 DNA を切断するはたらきをもつ一方、Cas9 とは異なる特徴をもつためゲノム編集ツールとして注目されている。RuvC ドメインをのぞき、Cpf1 は既知のタンパク質とアミノ酸配列の相同性をもたないため，Cpf1 の crRNA 依存的な DNA 切断機構は不明であった。本研究では、Cpf1-crRNA-標的 DNA 複合体の結晶構造を決定し、その作動機構を世界にさきがけて解明した（Yamano, Nishimasu et al. Cell 2016 成果 2）（図 1）。Cpf1 は 2 つのローブ（REC と NUC）からなる構造をとっていた。REC ローブは REC1 ドメインと REC2 ドメインから構成されていた。一方、NUC ローブは WED ドメイン、RuvC ドメイン、PI ドメイン、Nuc ドメインから構成されていた。crRNA のガイド配列は標的 DNA と RNA-DNA ヘテロ

二本鎖を形成し、2 つのローブの間に収容されていた。crRNA の 5’末端領域はシュードノット構造をとり WED ドメインと RuvC ドメインにより認識されていた。さらに、Cpf1 は保存されたリジン残基を用いて PAM 二本鎖の配列と構造の両方を認識していることが明らかになった。さらに、Cas9 と Cpf1 の構造比較から、これらの間の機能収斂が示唆された。

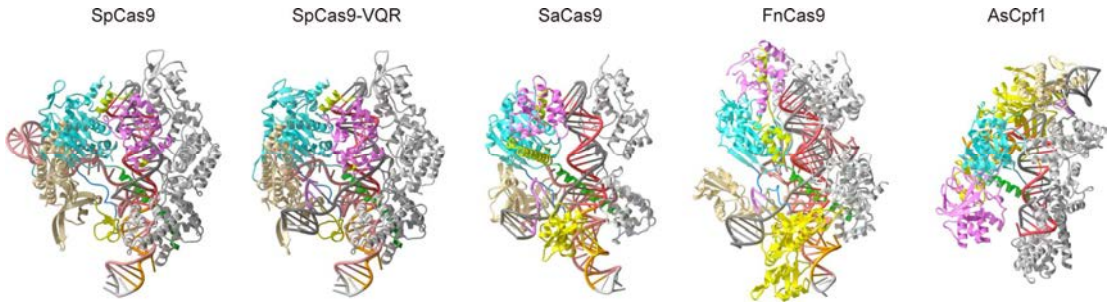


図 1　本さきがけ研究において決定した CRISPR-Cas ヌクレアーゼの結晶構造

3.　今後の展開

これまでの研究を基盤とし、異なる細菌に由来する多様な Cas9 や Cpf1、新規の CRISPR-Cas ヌクレアーゼの構造機能解析を推進し、それらの作動機構の全容解明をめざす。さらに、立体構造にもとづく機能改変により新規のゲノム改変ツールを作製する。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

CRISPR-Cas9 の構造決定と機能改変という研究開始当初の目標の達成にとどまらず、自身の想定をはるかに凌駕する研究成果を上げることができた。研究開始当初、世界的に最も注目されているといって過言ではない CRISPR-Cas9 の構造解析に挑戦することに関し、熾烈な研究競争を不安視されていたアドバイザーの先生も多かった。しかし、Cas9 単体の結晶を捨て、Cas9-sgRNA-DNA 複合体の結晶化に集中するという戦略をとることにより、熾烈な研究競争のなか、世界初の Cas9-sgRNA-DNA 複合体の結晶構造を報告することに成功した。そのちょうど一週間前には競合を予想していた Doudna 研から SpCas9 単体の結晶構造が Science 誌に報告された。SpCas9 に加えて、SaCas9、FnCas9、CjCas9 の結晶構造を決定し、CRISPR-Cas 系の保存性と多様性を解明することにも成功した。これまでに SpCas9 以外の Cas9 オルソログの複合体構造の決定に成功しているのは世界的に見ても我々の研究グループのみである。さらに、本さきがけ研究中に発見された新規の CRISPR-Cas ヌクレアーゼ Cpf1 に関して、Cpf1-crRNA-DNA 複合体の結晶構造を世界にさきがけて報告した。Cpf1 の構造解析も熾烈な競争があり、我々の報告のちょうど 1 日前には Cpf1-crRNA 複合体の結晶構造が Nature 誌に報告された。本さきがけ研究では、結晶構造解析に加えて、SpCas9、SaCas9、FnCas9 を改変した新規ツールの開発にも成功した。本さきがけ研究において、1、2 年次は自身の手で実験を行い、筆頭著者として Cell 誌に 2 報発表した。さらに、3 年次からは数人の学

生が研究に加わり、学生の指導を行いながら、筆頭著者として Cell 誌に 1 報、学生が筆頭著者の論文を責任著者として Cell 誌に 1 報、Mol Cell 誌に 2 報発表した。さらに、当初予定になかったが、本さきがけ領域の古寺博士との共同研究を開始し、高速 AFM を用いて CRISPR-Cas9 のダイナミクスを可視化することにも成功した（論文準備中）。本さきがけ研究の成果は世界的にも反響が大きく、CRISPR-Cas 分野の世界的なトップランナーの一人として認知され、研究者としての大躍進につながった。また、CRISPR-Cas9 のトップランナーである Feng Zhang 博士とのエキサイティングな共同研究を通じて、研究者として圧倒的な成長をとげることができた。本さきがけ領域に採択されていなかったら、私の研究者人生はまったく違ったものになっていたのは間違いない。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

各種の CRISPR—Cas9 の結晶構造解析を立て続きに成功した。また、PAM(protospacer adjacent motif)認識配列を変えた各種 Cas9 の変異体の構造ベース設計・機能確認・結晶構造解析にも成功した。また、古寺さんとの共同研究により、高速 AFM を使ってダイナミックな動きの観察ができたことは今回のさきがけの大きな成果である。

ゲノム編集の応用に関しても国際競争になっているので、これからも画期的な成果を挙げて頂きたい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Yamada M†, Watanabe Y†, Gootenberg JS, Hirano H, Ran FA, Nakane T, Ishitani R, Zhang F, *Nishimasu H, *Nureki O. Crystal structure of the minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* reveals the molecular diversity in the CRISPR-Cas9 systems. Mol Cell in press (2017)
2. Yamano T†, Nishimasu H†, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, Fedorova I, Nakane T, Makarova KS, Koonin EV, Ishitani R, *Zhang F, *Nureki O. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. Cell 165, 949-962 (2016)
3. Hirano S†, *Nishimasu H†, Ishitani R, *Nureki O. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9. Mol Cell 61, 886-894 (2016)
4. Hirano H, Gootenberg JS, Horii T, Abudayyeh OO, Kimura M, Hsu PD, Nakane T, Ishitani R, Hatada I, Zhang F, *Nishimasu H, *Nureki O. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9. Cell 164, 950-961 (2016)
5. Nishimasu H, Cong L, Yan WX, Ran FA, Zetsche B, Li Y, Kurabayashi A, Ishitani R, *Zhang F,

*Nureki O.
Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9.
Cell 162, 1113-1126 (2015)

6. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, *Zhang F.
Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex.
Nature 517, 583-588 (2015)

7. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, *Zhang F, *Nureki O.
Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA.
Cell 156, 935-949 (2014)

（2）特許出願

研究期間累積件数：5 件

1.
発明者: Feng Zhang, Osamu Nureki, Hiroshi Nishimasu, Ryuichiro Ishitani
発明の名称: Crispr-Cas, Crystal Structure and Uses Thereof
出願人：MIT、東京大学
出願日: 2014/1/22
出願番号: 61/930,214 CASTI 整理番号: 13-0667-001US02

2.
発明者: Feng Zhang, Osamu Nureki, Hiroshi Nishimasu
発明の名称: Crispr-Cas, New Nickases and Uses Thereof
出願人：MIT、東京大学
出願日: 2013/12/12
出願番号: 61/915,260 CASTI 整理番号: 14-0099-001US01

3.
発明者：Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki, Le Cong, Wiston Yan, Ann Ran, Bernd Zetshe, Yinqing Li, Feng Zhang
発明の名称：ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS,ENZYME AND GUIDE SCAFFOLDS OF CAS9 ORTHOLOGS AND VARIANTS FOR SEQUENCE MANIPULATION
出願人：MIT、東京大学
出願日：2015/8/19
出願番号：米国仮出願 62/207318

4.
発明者：平野央人、西増弘志、石谷隆一郎、濡木理
発明の名称：改変された FnCas9 タンパク質及びその使用
出願人：東京大学
出願日：2015/7/15
出願番号：特願 2015-140761

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）
主要な学会発表

2014/12/5
大阪大学蛋白質研究所セミナー　大阪大学蛋白質研究所（大阪）（招待講演）
Cas9-ガイド鎖 RNA-標的 DNA の結晶構造
西増弘志

2015/9/15
第 53 回日本生物物理学会年会　金沢大学（石川）（招待講演）
CRISPR-Cas9 の結晶構造
西増弘志

2016/9/25
第 89 回日本生化学会大会　仙台国際センター（仙台）（招待講演）
CRISPR-Cas9 および CRISPR-Cpf1 の結晶構造
西増弘志、山野 峻、平野央人、石谷隆一郎、濡木理

2016/10/6
第 42 回 内藤コンファレンス　シャトレーゼガトーキングダムサッポロ（北海道）
RNA-guided DNA cleavage mechanism of class 2 CRISPR-Cas effectors
Hiroshi Nishimasu

2016/11/15
第 2 回核酸医薬学会　東京理科大学（東京）（招待講演）
RNA-guided DNA cleavage mechanism of class 2 CRISPR-Cas effectors
西増弘志、濡木理

受賞

平成 26 年　日本結晶学会　進歩賞
平成 26 年　日本生化学会　奨励賞
平成 26 年　SPRUC 2014 Young Scientist Award

平成 26 年　文部科学大臣表彰　若手科学者賞

著作物

新着論文レビュー　V 型 CRISPR-Cas 系にかかわる Cpf1 の結晶構造
山野 峻・西増弘志・濡木 理

新着論文レビュー　Cas9 の改変体による PAM の認識機構
平野清一・西増弘志・濡木 理

新着論文レビュー　細菌 *Francisella novicida* に由来する Cas9 の結晶構造および機能の改変
平野央人・西増弘志・濡木 理

新着論文レビュー　*Staphylococcus aureus* に由来する小型の Cas9 の結晶構造
西増弘志・濡木 理

新着論文レビュー　Cas9-ガイド鎖 RNA-標的 DNA 三者複合体の結晶構造
西増弘志・濡木 理

プレスリリース

ゲノム編集のための新たな「はさみ」のかたち－CRISPR-Cpf1 の構造解明－
ゲノム編集のための新たな「はさみ」―立体構造にもとづく CRISPR-Cas9 の改変―
ゲノム編集のための“小さなはさみ”のかたち―小型 CRISPR-Cas9 の立体構造を解明―
ゲノム DNA を自在に切断する“はさみ”のかたち

研　究　報　告　書

「ウイルスゲノム転写装置の動態解析」

研究タイプ: 通常型
研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研 究 者: 野田　岳志

1. 研究のねらい

RNA ポリメラーゼによりゲノムから mRNA が合成される転写過程は、セントラルドグマの第一ステップであり、あらゆる生物に普遍的な生命現象である。インフルエンザウイルスやエボラウイルスなど一本鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスにおいても、ウイルスゲノム RNA はウイルスがコードする RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによって mRNA に転写される。この mRNA を合成する転写過程は、細胞においてもウイルスにおいても増殖に必須のステップであり、ウイルスを用いた転写装置およびその作動機構の解明は、生命現象の根幹の理解へとつながる。本研究では、インフルエンザウイルスをモデルとして用いる。インフルエンザウイルスのゲノム RNA は、それ自身だけでは RNA ポリメラーゼによって転写されず、ゲノム RNA がウイルス核蛋白質（NP）およびウイルス RNA ポリメラーゼと結合した vRNP 複合体（ribonucleoprotein complex）の状態でのみ、転写反応が実行される。すなわち、vRNP 複合体は、ゲノム RNA の転写装置として機能することが知られている。しかし、mRNA 合成過程における vRNP 複合体の動態に関しては、その解析手法の欠如が一因となり、これまで全く明らかにされていない。

本研究の目標は、転写過程において vRNP 複合体に生じる構造変化を高速原子間力顕微鏡や電子顕微鏡を用いて解析し、ウイルスゲノムの転写機構を構造学的観点から解明することにある。

2. 研究成果

（1）概要

インフルエンザウイルスは 8 分節のマイナス鎖一本鎖 RNA（vRNA）をゲノムとして持つ。各 vRNA はウイルス核タンパク質 NP およびウイルス RNA ポリメラーゼとともに、二重螺旋状の ribonucleoprotein（vRNP）複合体を形成する。感染細胞の核内において、vRNP 複合体は vRNA の転写（mRNA 合成）および複製（cRNA 合成）を担う分子装置として機能する。これまでの研究から mRNA 合成ならびに cRNA 合成の分子機構が明らかにされつつあるが、一方で、mRNA 合成および cRNA 合成時に螺旋状 vRNP 複合体の構造がどのような構造変化を示すかについては全く明らかにされていない。そこで我々は、ウイルスから精製した vRNP 複合体を用いた in vitro ポリメラーゼ反応と高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）解析ならびにクライオ電子顕微鏡解析を組み合わせ、機能的な状態の vRNP 複合体の構造変化・動態を明らかにすることを試みた。

初めに、ウイルス粒子から精製した vRNP 複合体を用いた in vitro RNA 合成系を確立した。従来の報告では、本実験系において mRNA のみが合成されると考えられていたが、qRT-PCR 法にて mRNA だけでなく cRNA が合成されること、すなわち転写過程だけでなく複製過程の一部（複製中間体の合成）が行われていることを確認した。次に、in vitro RNA 合成

中の vRNP 複合体を高速 AFM で観察したところ、①螺旋構造を維持した vRNP 複合体が折りたたまれた（二次構造を形成した）RNA と結合している様子が認められた。また、②螺旋構造が崩れた vRNP 複合体がループ状の RNA と結合している様子も認められた。Br-UTP および Click 反応を利用した実験から、折りたたまれた RNA もループ状の RNA も、新規合成された RNA であることが確認された。さらに螺旋構造が崩れた vRNP 複合体の構造の詳細を明らかにするため、クライオ電子線トモグラフィーによりループ状 RNA－vRNP 複合体の立体再構築を行った。その結果、ループ状 RNA が結合している領域のみ、vRNP 複合体の螺旋構造が崩れており、RNA の新規合成とカップルして vRNP 複合体の螺旋構造に変化が生じることが示唆された。

以上の結果から、精製 vRNP 複合体から mRNA 合成および cRNA 合成の両方が起こっていること、また、RNA 合成中の vRNP 複合体は微細構造学的に 2 種類に分類されることが明らかになった。今後は、どちらの RNA 合成様式が mRNA あるいは cRNA 合成を表しているのかを決定し、ウイルスゲノムの転写・複製機構を構造学的観点から明らかにしたいと考えている。

（2）詳細

研究テーマ A 「インフルエンザウイルスのゲノム転写装置の動態解析」

インフルエンザウイルスの vRNP 複合体は、感染細胞核内でゲノム RNA の転写（vRNA→mRNA）および複製（vRNA→cRNA→vRNA）を担う。当初は、精製 vRNP 複合体を用いた in vitro transcription 反応系により転写過程をミミックし、mRNA 合成中の vRNP 複合体の螺旋構造の変化を解析する計画だったが、研究の過程で、我々の in vitro transcription 反応系では mRNA だけでなく、cRNA（複製中間体）も合成されることを見出した。そこで、研究計画を予定より拡大させ、ウイルスゲノム転写・複製装置の動態解析を進めることとした。高速 AFM およびクライオ電子顕微鏡による RNA 合成中の vRNP 複合体の微細構造解析を行い、RNA 合成中の vRNP 複合体の構造を 2 種類に分類できた。今後、どちらの vRNP 複合体の構造が mRNA 合成を表し、どちらが cRNA 合成を表しているかを決定できれば、ゲノム転写・複製装置の動態をスナップショットで明らかにすることとなり、当初の計画以上の目標を達成できると言える。

一方、当初の計画の 1 つである高速 AFM を用いたウイルスゲノム転写装置の構造変化のリアルタイム解析については、種々の実験を進めてきたが、RNA 合成中の vRNP 複合体を観察するには至らなかった。その原因としては、vRNP 複合体をマイカ基板に結合させることで立体障害が起き、RNA 合成の効率が極端に落ちたためと考えられる。今後は、AFM 観察基板だけでなく用いる vRNP 複合体についても検討し、引き続き mRNA あるいは cRNA 合成中の vRNP 複合体の動態解析に取り組みたい。

研究テーマ B 「エボラウイルスのゲノム転写・複製装置の構造解析」

エボラウイルスはインフルエンザウイルスと同様にマイナス鎖一本鎖 RNA をゲノムとして持ち、その vRNP 複合体はウイルスゲノム RNA の転写ならびに複製を担う。エボラウイルスゲノムの転写・複製機構を構造学的観点から明らかにするため、vRNP 複合体のコア構造となる

NP-RNA 複合体に着目し、クライオ電子顕微鏡による構造解析を実施した。C 末端を欠損させたNPタンパク質を発現させ、CsCl密度勾配遠心法により対称性を有する螺旋状NP－RNA複合体を精製した。直接電子検出器を搭載したクライオ電子顕微鏡を用いて精製NP-RNA複合体を撮影し、らせん構造解析により、NP-RNA 複合体の構造を近原子分解能で決定しつつある。今後は、得られた構造情報を元に NP 変異体を作出し、その機能解析を行うことで、エボラウイルス vRNP 複合体の構造―機能相関を明らかにする予定である。

3. 今後の展開

今後は、mRNA 合成時および cRNA 合成時に特有の vRNP 複合体ならびに合成 RNA の構造（構造変化）をスナップショットで決定し、ウイルスゲノム転写・複製装置の機能―構造相関の解明を目指す。さらに、mRNA および cRNA 合成時の vRNP 複合体・合成 RNA の動態を高速 AFM によりライブイメージングし、より詳細にウイルスゲノムの転写・複製機構の解明を目指す

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

インフルエンザウイルスのゲノム転写装置の動態解析に関して、最終目標としていた RNA 合成中の vRNP 複合体のライブイメージング解析を実施するまでには至らなかったが、新規 RNA 合成中の vRNP 複合体の溶液中での構造（高速 AFM）やネイティブな 3 次元構造（クライオ電子線トモグラフィー）のスナップショット解析により、RNA 合成中の vRNP 複合体の構造や合成 RNA の構造を初めて明らかにできたことは評価できる。また、当初予定していた転写中の vRNP 複合体の構造変化だけでなく、複製中（cRNA 合成中）の vRNP 複合体の解析へも発展させたことから、今後さらにウイルス学に重要な知見をもたらすことが期待できる。本さきがけ研究で着目したインフルエンザウイルスゲノムの転写・複製過程は、宿主個体におけるウイルス増殖能と密接に相関しているため、抗ウイルス剤開発の重要な標的である。本さきがけ研究を進展させるために確立してきた種々の実験系は、ウイルスゲノムの転写・複製を阻害する新規抗ウイルス剤開発へと応用可能であり、我々の医療・公衆衛生の向上に大きく貢献できると考えられる。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

さきがけに採択されたのをきっかけに高速 AFM による観察を始め、vRNP (ribonucleoprotein)からの RNA 合成時の構造解析をおこない、合成された RNA 鎖が 1 本鎖の状態とおそらく鋳型 RNA と新規に合成された RNA が結合したループ状の2本鎖の状態で結果が得られたのは良かった。AFM によるイメージングは大変説得力がある。

クライオ電子線トモグラフィーによるスナップショットで vRNP 複合体や合成 RNA の低分解能構造も得られており研究は進捗している。自身の専門でない技術分野で、様々な共同研究をアレンジして目的達成を図ったことは大変評価出来る。

今後は、感染細胞を用いての更なる精査を期待したい。

なお、高速AFMやクライオ電子顕微鏡を駆使した微細構造学的解析を中心にウイルス学研究を進めるウイルス学者は世界的に見ても稀であり、本研究者はウイルス学分野では世界的にも若手トップランナーの一人として注目されている。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Nakatsu et al., Complete and incomplete genome packaging of influenza A and B viruses. MBio. (2016) 7, E01248-16
2. Sugita et al., Structure of the Ebola virus nucleocapsid core by single particle cryo-electron microscopy. Microsc Microanal. (2016) 22, 66-67.
3. Watanabe et al., Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. Cell Host Microbe. (2014) 16, 795-805.
4. Hatakeyama et al., A novel functional site in the PB2 subunit of influenza A virus essential for Acetyl-CoA interaction, RNA polymerase activity, and viral replication. J Biol Chem. (2014) 289, 24980-94.
5. Sugita et al., The configuration of viral ribonucleoprotein complexes within the influenza A virion. J Virol. (2013) 87, 12879-84.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・平成 27 年　第 16 回日本顕微鏡学会奨励賞　(日本顕微鏡学会)

・インフルエンザウイルスの増殖に関わる宿主タンパク質を発見(プレスリリース)

http://www.jst.go.jp/pr/info/info1070/

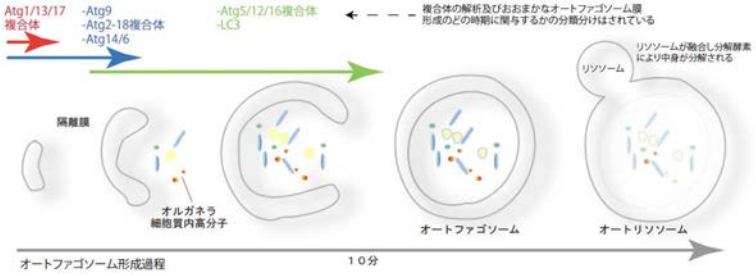
研　究　報　告　書

「ナノスケール細胞内位置情報・3次元超微細膜構造を基盤とするオートファジータンパク質ネットワークの相関構造解析」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研　究　者：　濱崎　万穂

1．　研究のねらい

全ての真核細胞は、飢餓時や不要物除去が必要な際に、自己の細胞質やときにはオルガネラまでをリソソームに運び分解・再利用するオートファジーと呼ばれる機構を持つ。オートファジーは、飢餓時のエネルギー源確保による生存維持や細胞内浄化による発がん、神経変性疾患、炎症性疾患、感染症、生活習慣病等の疾患発症の抑制など多岐に亘る病気での重要な役割を担うことが分かり注目を集めている。オートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる扁平の2重の脂質膜を持つ膜が出現し、伸張しながらオルガネラや細胞質等を取り囲みオートファゴソーム(AP)が形成され、分解酵素を持つリソソームと融合して内容物が消化される。AP は他のオルガネラと異なり必要時に初めて膜形成が起こるため、どこでどのように膜が形成されるのか興味深く解明されてない点が多い。1993年にオートファジーに関与する一連のタンパク質群 Atg が、申請者が学位を取得した大隅良則研究室において酵母で発見されたことで、その実態や生理的病理的意義の理解が急速に進んだ。約30個見つかっている Atg たんぱく質は、幾つかの機能ユニットに分かれ、相互に作用しながら協働して AP の形成に働いている。Atg たんぱく質個々の構造解析や分子生物学的解析はこれまで盛んに行われてきたが、これらがいつ、どこで、どのような相互作用を持ち強調して AP 膜を形成するのかは未だ明らかにされていない。



本研究のねらいは、AP 膜形成機構の全容解明に少しでも近づくため、様々なイメージングツールを駆使することで特に AP 形成場に着目し研究を行った。

2．　研究成果

（1）概要

オートファゴソーム(AP)膜の形成場が小胞体・ミトコンドリア接触部位で起こることがわかったが、更に詳細な解析を行うため、いくつかのイメージングツールや生化学的手法を用いることで行った。

a)　オートファゴソーム形成場の膜動態の詳細な解析

オートファゴソーム形成場を改良された CLEM（Correlative light and electron microscopy）に tomography を組み合わせることで小胞体・ミトコンドリア接触部位との関係性を探るべく観察を行った。改良型 CLEM では、x, y の位置のみならず z 情報もナノスケールで位置を合わせることができる。トモグラフィーは、3D 情報が得られるため、構造物がチューブの形態なのか小胞なのか等クリアにできる。また、オートファゴソーム形成場である小胞体・ミトコンドリア接触部位と Atg 因子との関係性を光学顕微鏡を用いて行った。様々な Atg 因子が小胞体・ミトコンドリア接触部位とどのような関係にあるのか最上流因子を主に解析した。

b） オートファゴソーム形成に関わる新規因子の探索

小胞体・ミトコンドリア接触部位は生化学的単離が可能なため、オートファジー誘導時の小胞体・ミトコンドリア接触部位を単離しプロテオミクス解析を行った。また、オートファジーは細胞内膜動態の一種なので、小胞体からの輸送経路に関与する因子と AP 膜形成の関与を調べることで新たな因子のスクリーニングを行った。

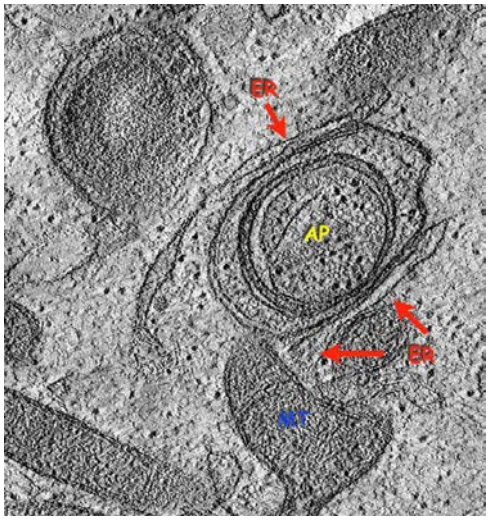
c） 未知の構造体であるプレオートファゴソーム構造(PAS)の同定

CLEM の手法で、酵母のオートファゴソーム初期形成場の観察も行った。酵母では、すべての Atg が集積する PAS（Pre-autophagosome structure）が液胞そばに形成されるがその詳細は未だわかっておらず、CLEM 及びトモグラフィーを用いることでどのようなものなのか解析した。

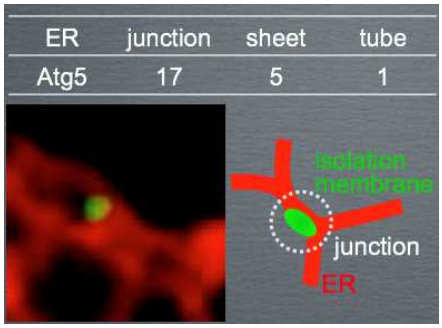
（2）詳細

a） オートファゴソーム形成場の膜動態の詳細な解析

AP 膜形成場である小胞体・ミトコンドリア接触部位と AP 膜との関係を CLEM にトモグラフィーを組み合わせた手法で観察を行った。その際に AP 膜形成の比較的初期に関わる因子である PI3 キナーゼ複合体の因子を用いた。その結果、AP 膜はほぼ ER よりにできており、ミトコンドリアと接触している AP はみられなかった。このことは、AP 膜形成により関わっているのは小胞体だと推測されるがなぜ小胞体・ミトコンドリア接触部位で形成されるのかは今後の課題として残る。次に、AP 膜形成の最上流因子らの観察を行った。オートファジー誘導シグナルを細胞が感知するまでは、ほとんどの Atg タンパク質は細胞質に存在する。しかしながら、オートファジー誘導が起こると輝点が形成される。PI3 キナーゼ複合体の因子らによりその輝点が小胞体・ミトコンドリア接触部位と判明したが、その更に上流にいる因子(Ulk1, Atg9)の輝点も小胞体・ミトコンドリア接触部位に来ることがわかった。Atg9 は 30 以上ある Atg の中で唯一の膜タンパク質として知られ、20−30nm の小胞にのっていることがわかっている。Atg9 の詳細な挙動を観察し、小胞体・ミトコンドリア接触部位に長く存在するものと短く存在するものがあることがわかった。また、Atg9 は小胞だけではなくリサイクリングエンドソームにも存在することがわかっている。リ



サイクリングエンドソームとAP膜形成場との間の輸送に必要なドメインも明らかにした。また、小胞体よりで AP 膜が形成されるため、小胞体の形態変化がもたらす AP 膜形成への影響を観察した。形成開始後10秒ほどで AP 形成は小胞体のジャンクション(トライポッド形成されている箇所)に局在し、形成が終わるまでそこに留まることが観察された。小胞体は脂質を産生する場所でもあるため、脂質の供給を得ているのか、あるいは、小胞体のジャンクションは動きが少なく AP 膜形成の間そのような場所が必要なのかは定かではない。ジャンクションをより安定的に保つために必要なタンパク質があり、それが局在するところで AP 膜が形成されることから、今後理由を明らかにしていきたい。また、AP 膜は完成後分解酵素をもつリソソームと融合するわけだが、リソソームがどのようにAP膜形成途中のものではなく完成したAPを認識するのかわかっていなかった。そこには新規の因子であるフォスファターゼ INPP5E が関与することがわかった。この仕事は採択者主体で行ったわけではないが関与しているので記述する。この因子はリソソーム側の制御をしており、リソソーム膜上の PI3, 5P2 を減らすことでアクチンが安定化し融合することが可能になることが解明された。AP 膜形成は完成するまで小胞体・ミトコンドリア接触部位で行われるが、リソソームとの融合には形成部位から移動する。AP 膜形成完成後新たな因子がきてその移動を促すのか等考えらえるがこれも今後の課題である。

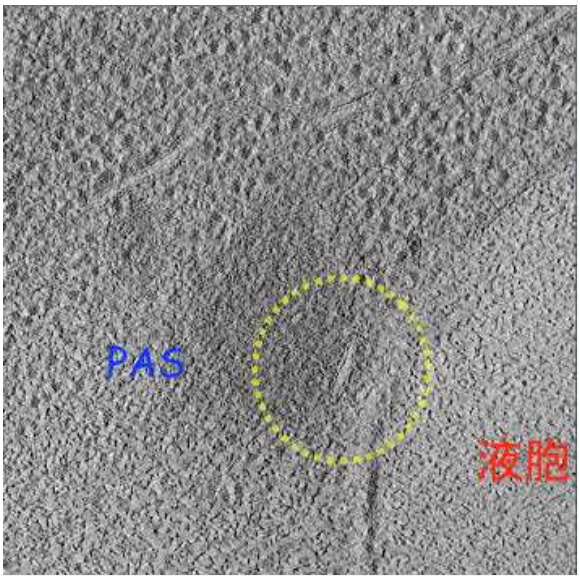


b)オートファゴソーム形成に関わる新規因子の探索

AP とリソソームの融合に関わる因子、あるいは AP 膜形成に関わる新たな因子探しをするために、概要に書いたスクリーニングを行った。その中で、AP 膜形成に関与する最上流因子の局在に影響を示す因子が見つかった。その因子がないと、最上流因子らが小胞体・ミトコンドリア接触部位にこられないことがわかった。詳細解析は現在行っている最中である。

c)未知の構造体であるプレオートファゴソーム構造(PAS)の同定

オートファジーは酵母から哺乳類まで保存されている。2001 年に大隅先生らが全ての Atg 因子が局在する輝点、プレオートファゴソーム構造(PAS)を報告したが、どのような構造をとっているのか明らかにされていなかった。そこで CLEM 及トモグラフィーを用いることで、どのような構造体があり、AP 膜形成がどのように行われるのか解析した。その結果、液胞膜近くに細胞質を排除したグレーの構造物がみえた。タンパク質の集まった構造体はこのようなグレーに見えることからタンパク質が集積した場所であることがわかる。また、小さな2重膜のかけらがそのグレー構造に沿って出現している様子も観察された。そしてその膜は液胞側で見られることが多く、グレーの構造と液胞の間



で AP 膜が形成されることが示唆された。

3. 今後の展開

さきがけの援助のおかげで小胞体・ミトコンドリア接触部位と AP 膜形成機構の理解を飛躍的に進めることができた。なぜ小胞体・ミトコンドリア接触部位なのかはまだ解明しきれていないので今後進めていくことで意義がわかるとAP膜の起源にもつながり非常に興味深い。大きな展望は AP 膜形成における膜動態の全容解明だが、まずは小胞体の形態関与等含め論文としてまとめていく予定である。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

さきがけに採択して頂けたおかげで、阪大内に場所を提供して頂きラボを立ち上げさせてもらえた。さきがけの資金の支援によりそれが可能となり、立ち上げにはそれなりの時間がかかったが、色々と学ぶことができた。ただ振り返ると、総括が最初の年にオンサイトに来てくださった時に頂いた助言を生かしきれなかったと感じる。自分のことをメインに進めるということに重きをおけなかった。独立したわけではないので、他の学生の世話もあり、どの学生にどのテーマをやってもらうか等含めた采配も甘かったので勉強にはなった。自分が実験を卒業し学生の面倒をみる、という役割にまわる時期と重なり、起動に乗る前にさきがけスタートとなった。今振り返るとそういう状況がわかるが当初は見えてなかったように思う。色々と未熟だったがさきがけのおかげで今後の研究を行う上でのノウハウを学ばせて頂く機会となった。また、資金のみならず、採択された他の研究者及びアドバイザーの先生方との出会いは今後の糧にしかならない。おかげさまで、採択者内で共同研究も始まり是非成果として報告できるよう引き続き継続していく。新たな共同研究も始められる可能性もあり、細胞生物学のみやってきた人生で構造生物学の方らと出会えたことは非常に有用だと感じている。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

光学顕微鏡と電子顕微鏡を使ってオートファゴソーム(AP)の形成機構を調べるというとても興味深いテーマの研究である。小胞体(ER)とミトコンドリアが接触している部分から AP の膜形成が行われること、AP 形成に関係する因子が ER とミトコンドリアが接触している AP 形成部位に局在していることを明らかにした。光学顕微鏡・電子顕微鏡相関法(CLEM)と電子線トモグラフィーによる3次元超微細膜構造観察による解析に力を入れたところが研究のユニークな点であり、細胞生物学的には進展があった。

簡単なテーマではないので、今後、他の手法を持った研究者と協力して進めていくのがのぞましい。

5.　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y, Hamasaki M, Noda　T, **Yoshimori** T. Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. J Cell Sci. 2016 Oct 15;129(20):3781-3791.

2.　Hasegawa J, Iwamoto R, Otomo T, Nezu A, Hamasaki M, Yoshimori T. Autophagosome-lysosome fusion in neurons requires INPP5E, a protein associated with Joubert syndrome. EMBO J. 2016 Sep 1;35(17):1853-67.

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

学会発表（口頭発表）

第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016.11.30

第68回日本細胞生物学会大会、京都、2016.6.17

ASCB annual meeting, San Diego, 2015.12.15

IRB cell biology seminar, Barcelona, 2016.9.16

第34回日本糖質学会年会、東京、2015.8.2

研 究 報 告 書

「緩和モード解析によるタンパク質構造ダイナミクスの解明」

研究タイプ：通常型
研究期間： 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研 究 者： 光武 亜代理

1． 研究のねらい

原子レベルでの分子間の相互作用の機構やダイナミクスを研究するのに分子シミュレーションは強力な手法の1つである。分子シミュレーションは、分子間に作用する力を計算し、運動方程式を数値的に解き、タンパク質や溶媒の動きを追うことができる。よって、構造変化に伴う機能の出現や、水和や脱水和などの溶媒の影響などを分子レベルで調べることができる。 近年、並列計算機、GPU や専用ハードウェアの発展により、急激にマイクロ秒からミリ秒程度の長時間シミュレーションが可能となってきた。長時間シミュレーションにより、タンパク質が大きく構造変化することが可能になってきたが、シミュレーション中の構造変化を見るだけでは、協同的な動きが分からず、どのような構造変化（揺らぎ）が機能に重要か調べることは難しい。シミュレーション結果から、特徴的な動き（構造揺らぎ）を抜きだす方法を開発することは、重要な課題である。

シミュレーション分野において、これまで十分な時間(サンプリング)のシミュレーションができなかったこともあり、ダイナミクスを調べる解析手法は世界的にも多くない。長時間シミュレーションが可能になってきていることから、先駆けて動的な解析手法である緩和モード解析の開発を進めてきた。緩和モード解析は、シミュレーションの結果から近似的に緩和の遅いモードとそれに対応する緩和率を求めることができる。複雑なタンパク質の動きから、原子レベルで遅い動きを抜き出すことができる新規の独創的な構造機能解析手法である。これまで、ホモポリマーである高分子系に適用されていたが、我々は、ヘテロポリマーであるタンパク質系にいくつかの技術的な困難を解決して、緩和モード解析の開発を進めてきた。

本研究では、タンパク質系の緩和モード解析の開発を進めるとともに、この手法を広く確立させる。まず、フォールディングなどの大きな構造変化を起こす系に対して、この手法を適用して有効性を調べる。この際、多自由度を取り扱うために開発した主成分緩和モード解析の評価や関連の方法であるマルコフ鎖モデルとの比較を行う。次に、非調和型の構造揺らぎを持つタンパク質系に適用し、大きな構造揺らぎに対して、この手法が有効であるか調べる。これらの研究から、方法論を洗練し、本手法の有効性について調べる。また、実験家と共同研究を進め、中性子散乱やNMRなどから得られる動的な情報と本解析で得られる動的な情報との関係を明らかにし、タンパク質のダイナミクスの解明を試みる。タンパク質構造のダイナミクスに加えて、タンパク質周りの水の動的性質についても調べる。会合系などのシステムで、2つのタンパク質の協同的な遅い動きなどを抜き出せるかについても検討する。

2. 研究成果

（1）概要

本研究では、緩和モード解析の方法論の開発を進め、タンパク質に関する動的性質の特徴について調べる。まず、いくつかの具体的な系に緩和モード解析を適用し、そこで生じる問題を解決する。さらに、方法論の開発を行う。

- 研究テーマ A

自由度が小さく、大きく構造変化が生じる系に関して緩和モード解析を行う。具体的には 10 残基からなるペプチドの遷移温度でのシミュレーションを行ない、複数の安定構造、準安定構造、伸びた構造の遷移を生じたトラジェクトリーに関して従来の方法である主成分解析と緩和モード解析を行ない、得られた結果を比較する。また、動的解析手法としてマイルストーン法やマルコフ鎖モデルという方法があるので、これらの方法との比較を行う。

- 研究テーマ B

非調和型のタンパク質に緩和モード解析を行う。具体的には、数百残基からなるタンパク質系に関して、天然構造を初期構造としたシミュレーション系に関して、緩和モード解析を行う。マイクロ秒程度の有限のシミュレーションのトラジェクトリーから緩和モード解析を用いるとどのような情報が得られるか調べる。また、ANTON などの 100 残基以下のフォールディングのトラジェクトリーに関して、解析を行ない、フォールディング過程について調べる。

- 研究テーマ C

中性子散乱や NMR から得られる動的実験データとの比較を行う。具体的には、中性子散乱や NMR から得られる動的データと分子シミュレーションから得られる動的データの関係を明らかにして比較を行う。また、緩和モード解析から得られた動的データとの関係も明らかにする。数百ナノ秒からマイクロ秒のタンパク質のダイナミクスに関する分子レベルでの知見を得る。

- 研究テーマ D

構造安定性などの側面からも研究を進めるための GPGPU を用いた計算機システムの構築を行う。具体的には溶媒和自由エネルギーを計算できる 3D-RISM 理論を用いて、構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーを計算することによりタンパク質の安定性について調べる。

（2）詳細

- 研究テーマ A

「大きく構造変化する系に関する緩和モード解析の有効性と新規手法の開発」

はじめにフォールディングなど大きな構造変化のある系に関して、本手法を適用して有効性を調べた。10残基のシニョリンはシミュレーションでよく研究されているペプチドである。安定構造の他に準安定構造があることが知られており、本方法の有効性を確認するのに適している。水中で数百ナノ程度のシミュレーションを行うと本システムが伸びた構造から天然構造や準安定構造に巻き戻ることを確認した。しかし、天然構造や準安定構造はエネルギー的に安定なため、一度巻き戻ると他の状態に遷移するのに長時間がかかる。よって、遷移温度でのシミュレーションを行った。遷移温度でシミュレーションを行うことにより、安定構造、準安定構造、伸びた構造を複数回遷移するトラジェクトリーを得ることができた。このトラジェクトリーに関して、構造揺らぎの大きなモードを抜き出す静的な解析手法である主成分解析と、緩和の遅いモードを

抜き出す動的解析手法である緩和モード解析を行ない、自由エネルギー曲面の比較を行った。緩和モード解析で得られた自由エネルギー曲面は主成分解析よりも特徴的な構造を分類することができ、また自由エネルギーからフォールディングプロセスを明確に説明できることが分かった。図１は緩和モード解析から得られた自由エネルギー曲面である。安定構造、準安定構造を区別するばかりか、共通のターン構造を持つ中間構造や完全に伸びた構造を明確に分類することができた。緩和モード解析は遅いモードを抜き出すため、エネルギー的に安定な安定構造や準安定構造間の遷移が緩和の遅いモードに対応するため、安定構造や準安定構造間の遷移が緩和の遅いモードに対応していた。また、遅い動きに注目するため、末端の早い動きを取り除いたターンの固まった特徴的な構造を持つ中間構造を抜き出すことができた。この自由エネルギー曲面から、先に真ん中のターン構造が形成され、天然構造や準安定構造に巻き戻ることが分かった。大きな構造揺らぎを持つ系に有効な方法であることが分かった。

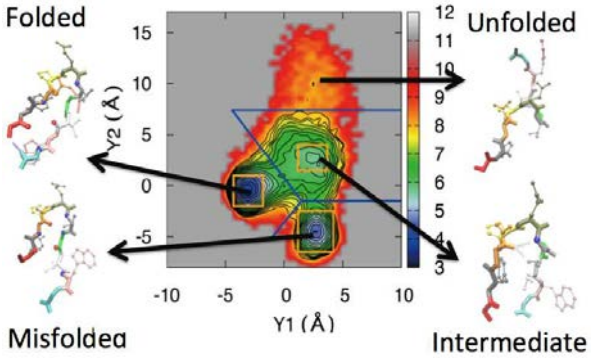


図 1:緩和モード解析から得られた緩和の遅い自由度を座標軸に用いた自由エネルギー曲面。緩和の遅い自由度を用いることにより大きく構造変化するトラジェクトリから安定構造、準安定構造、中間構造と伸びた構造を分類することができた。自由エネルギー曲面からフォールディング過程の知見を得た。

また緩和モードは理論的には、マスター方程式の時間発展演算子の左固有値と固有ベクトルに対応する。この点から、タンパク質系で広く使われている動的解析手法であるマルコフステイトモデルと関係がある。マルコフステイトモデルとの関係を明らかにして、マルコフステイトモデルを修正する方法であるマルコフステイト緩和モード解析という方法の開発も行った。シニョリンの自由エネルギー曲面を用いて状態を定義して、本方法の有効性を調べた。

他新規手法の開発としては、より良い緩和モードと緩和時間を得るために、２段階緩和モード解析という方法が高分子の分野で開発されたので、これをタンパク質系へも適用して、有効性を調べた。この際、緩和モード解析で用いる t0 という変数を複数の変数にする方法の開発も行った。

研究テーマＡについては、論文化も行ない（論文2）、また2つの新しい方法の提案もできたので、十分本テーマを達成できたと考えている。

● 研究テーマＢ、Ｃ

「非調和型のタンパク質に緩和モード解析」

「中性子散乱や NMR から得られる動的実験データとの比較」

研究テーマＢとＣはともに関係している。 領域内の中性子散乱実験と NMR の実験家と共同研究を進めていて、数百残基程度のタンパク質の水中のシミュレーションを実行中である。NMR に関しては 200 残基程度のタンパク質の 5 マイクロ秒程度のシミュレーション4本を行ない、解析を行っている。マイクロ秒程度の時間スケールは側鎖の運動に対応しているため、側

鎖の自由度も含めて緩和モード解析を行った。緩和モード解析は理論的には状態間の十分な遷移のあるトラジェクトリーを必要とするが、有限時間のシミュレーション中のレアイベントを効率良く抜きだせることが分かった。マイクロ秒程度のトラジェクトリーで起こる構造揺らぎの少ない側鎖のまれな動きを自動的に見つけることができた。現在得られた側鎖の動きと、NMR の実験データとの間に関係があるか、考察中である。また、この系は低分子を結合するがそのシミュレーションも行ない解析を進める予定である。

緩和モード解析を用いるとレアイベントを抜き出せることができることは分かったが、GPGPU を用いてもマイクロ秒のシミュレーションでも数ヶ月程度かかるため、期間中に解析や結果の解釈も含めた論文化を行うことはできなかった。実験と理論の物理量の関係に関しても明らかにしていき、得られたダイナミクスの情報と機能との関係について明らかにしていきたい。

● 研究テーマ D

「構造安定性の側面からも研究を進めるための GPGPU を用いた計算機システムの構築」

GPGPU を用いた 3D-RISM 理論の計算を行ない、構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーに基づくタンパク質の安定性についての知見を得た。まずは、全エネルギーをタンパク質の構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーの和と考え定義した。常温のシニョリンの分子動力学シミュレーションから安定構造と準安定構造が得られたので、これらの構造に関して 3D-RISM 理論を用いて溶媒和自由エネルギーを計算し、全エネルギーを求めた。現理化学研究所の丸山博士の 3D-RISM 理論は GPGPU を用いて高速に計算を行えるため、複数のサンプルで計算をし、平均値を求めた。図 2 に、横軸天然構造からの RMSD、縦軸全エネルギーの図を示す。安定構造と準安定構造は伸びた構造よりも安定なエネルギーを持つことがわかった。このことから全エネルギーは安定性の指標によいエネルギー関数であることがわかった。また、安定構造と準安定構造は安定性の機構が違っており、安定構造は構造エネルギーがより安定で、準安定構造は水和自由エネルギーがより安定であることが分かった。現在、論文作成中である。また、溶媒和自由エネルギーの理論的構築の妥当性を確認するのに本計算で得られた構造を用いた。(論文 4)

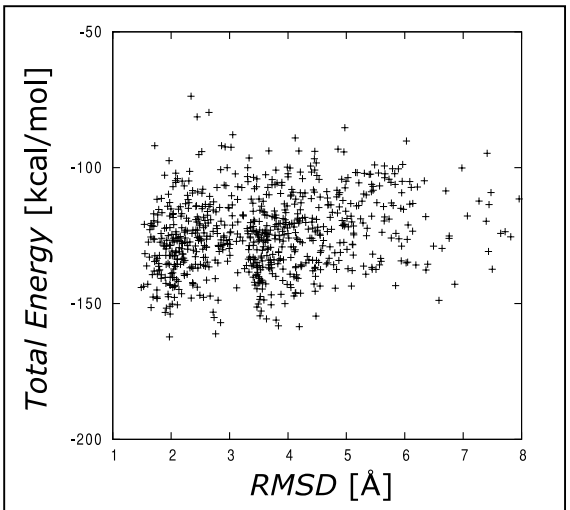


図 2:シニョリンのシミュレーションから得られた構造エネルギーと溶媒和自由エネルギーの和の値。横軸は天然構造からの RMSD で、2 付近が天然構造、3.5 付近が準安定構造に対応。これらの構造は伸びた構造より全エネルギーの値が低い。

他タンパク質のトラジェクトリーに関しても、このシステムを用いて安定性の議論をした。

3. 今後の展開

さらに、方法論の改良を考えており、この開発を行う。

中性子散乱実験と NMR の実験データとの比較を行う。中性子散乱実験に関しては、スピンエ

コーで得られるデータとの比較を行う。また、NMR で得られる実験データとの比較を行う。

ANTON などの 100 残基程度のフォールディングのトラジェクトリーの解析を行う。

膜タンパク質はいろいろな機能を有するため、膜タンパク質のシミュレーションを行ない、解析手法を適用していきたい。低分子力場なども作成し、低分子とタンパク質の会合系についても研究を進めたい。

これまで開発してきたダイナミクスと安定性に関するアルゴリズムを駆使して、低分子とタンパク質の会合の機構について原子レベルでの知見を得る。また、応用として、アミノ酸置換などによる機能予測を行う。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

研究目的に沿って研究を進めてきた。研究テーマ A に関しては、達成できたと考える。また、加えて新しい方法論の開発も行うことができた。本期間中に、緩和モード解析に関する手法の開発、プログラムの蓄積ができた。実験との比較に関しては、まだ時間が必要である。大きなタンパク質系に対してもう少し早い段階で計画を進めることができたらよかったと考えている。力場の作成や膜タンパク質系も取り組めればよかったと考えている。

研究実施体制に関しては、研究補助者を雇用することにより、研究内容に広がりができた。新規プログラムの開発も行えた。また、博士課程の学生を含めて、新規手法の開発につながった。研究費に関しては、研究補助者雇用費用以外に関しては、GPGPU 計算機とファイルサーバに主に費やし、大規模な計算や解析をスムーズに行うことができた。また、旅費に関して、共同研究や成果発表を行うことができた。

期間中では主に理論の有効性を示した段階であるが、今後科学技術及び社会・経済への波及効果に努めたい。これまで開発してきた手法を駆使して、実験家と共同研究を進めることにより具体的なタンパク質に関する機能の予測を進めていきたい。現在行っている研究に関して機能に関して予測をしていきたい。

なるべく研究に時間を費やすようにと考えて、全力で頑張ったつもりだが、時間配分が難しかった。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

シミュレーションでよく研究されているペプチドであるシニョリンの分子動力学トラジェジェクトリ(時系列データ)を用い、緩和モード解析結果と主成分解析等の他の解析法による結果を比較することにより、緩和モード解析の有用性を示唆した。また、さきがけ研究者も含めた多くの研究者と精力的に共同研究を行ったことは高く評価できる。

今後は、更に実験系との融合を進めて、実験との相補的な解析となっていることをもっとアピールして欲しい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. T. Sumi, Y. Maruyama, A. Mitsutake, and K. Koga, *J. Chem. Phys.*, **144**, 224104 (2016).
2. A. Mitsutake and H. Takano, *J. Chem. Phys.*, **143**, 124111 (2015).
3. 光武亜代理、日本物理学会学会誌、**70**(3), 194 (2015).(総説)
4. T. Sumi, A. Mitsutake, and Y. Maruyama, *J. Compt. Chem.*, **36**, 1359 (2015).

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

- 主要な招待講演

1. A. Mitsutake, “Investigating Dynamics and Kinetics of Proteins by using Relaxation Mode Analysis”, The Third Korean-Polish Conference on "Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches" High-1 Resort, Korea, February 2017.
2. A. Mitsutake, “Exploring Dynamics and Kinetics of Proteins using Relaxation Mode Analysis", The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Kanazawa, Japan, September 2015.
3. A. Mitsutake, “Exploring Free Energy Surfaces with Generalized-Ensemble Algorithms", International Symposium on Extended Molecular Dynamics and Enhanced Sampling: Nose Dynamics 30 Years (NOSE30), Tokyo, Japan, November 2014.
4. A. Mitsutake, “Effective Sampling Algorithms and Analysis Methods for Protein Simulations", The 14th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul, Korea, September 2014.
5. A. Mitsutake, “Effective Sampling Algorithms and Analysis Methods for Protein Simulations", 3rd International Conference on Molecular Simulation, Kobe, Japan, November 2013.**（受賞講演）**

- 分子シミュレーション研究会　学術賞（2013 年 11 月）

「多次元焼き戻し法の開発及び緩和モード解析と WHAM 法の一般化による構造解析法の開発」

- 国際会議の副実行委員

International Symposium on Extended Molecular Dynamics and Enhanced Sampling: Nose Dynamics 30 Years (NOSE30), Keio Univ., Tokyo, Japan, November 2014.

研　究　報　告　書

「膜タンパク質の構造変化と物質輸送の1分子同時計測技術の開発」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月
研　究　者：　渡邉　力也

1．　研究のねらい

本研究では、マイクロデバイス(MEMS)を利用して、物質輸送に関わる膜タンパク質の構造変化と物質輸送活性の 1 分子同時計測技術を新規開発し、構造と機能の相関関係を直接的に解明にすることを目的とする。

生体膜上には様々なイオンや分子を輸送する膜タンパク質(膜輸送体)が存在し、人間を含む生物が生存する上で必要とされる恒常的な細胞内外の環境を維持している。近年、様々な疾患が膜輸送体の遺伝子異常によって引き起こされることが明らかにされつつあり、各々が持つ機能だけでなくその作動機構を同時に解明することが必要となっている。現在、それら作動機構を解明するにあたり、立体構造解析、構造変化のダイナミクス計測、生化学計測などによる多領域にわたる研究がなされているが、それらは個々に独立しており、作動機構の根底をなす構造と機能の相関関係を理解するためには、研究領域をつなぐ融合研究が必要であった。そこで、本研究では、1 分子計測法に立脚した構造変化のダイナミクスと物質輸送活性の同時計測技術を新規開発し、膜輸送体の構造と機能の相関関係を直接的に明らかにしようと考えている(図 1)。

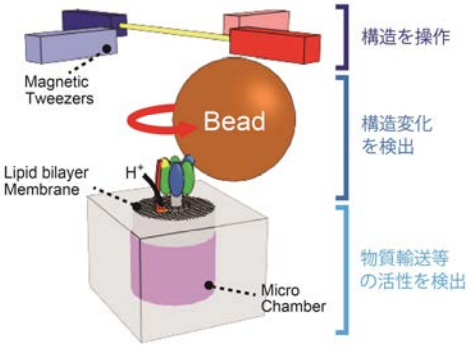


図 1　本研究のコンセプト

具体的な測定対象には、F 型 ATP 合成酵素(F_oF_1)などの膜輸送体を用いる。F_oF_1 は回転運動によってプロトンの輸送や ATP の合成を行う膜タンパク質であり、生理的な重要性と回転分子モーターとしての興味深い性質から、作動原理の解明が強く望まれている。F_oF_1 は、脂質膜に再構成した状態でその構造変化(回転運動)が直接可視化された数少ない膜タンパク質であり、プロトンの輸送と共役した回転運動の可視化は、私達によって達成されたばかりである。また、マイクロデバイスを利用した生体反応の 1 分子計測法も近年開発されており、それらを融合することによって、1 分子レベルで構造変化のダイナミクスと物質輸送活性を同時に計測できると考えている。そして、それらの 1 分子計測から F_oF_1 の構造と機能の相関関係を直接的に理解したいと考えている。

2.　研究成果

（1）概要

マイクロ分析化学、1 分子生物物理学の学際融合により、膜輸送体のための新しい 1 分子計測技術を開発した。具体的には、生体膜が高度に集積化されたマイクロリアクターチップ(生体膜チップ)を自主開発し、膜輸送体の輸送機能と構造変化を 1 分子単位で計測するための技術基盤を確立した。また、本基礎研究の延長として、当該技術の応用展開を目指し、創薬や医療に資する新しいマイクロ分析システムなどの開発も行った。

（2）詳細

i) 膜輸送体のための 1 分子計測基盤の確立

膜輸送体の入力と出力およびそれらを仲介する構造変化を 1 分子計測・制御できる技術基盤を確立した。以下に詳細を示す。

・生体膜チップ(ALBiC)を利用した出力(物質輸送)の 1 分子計測技術の開発

従来、感度の不足から、多くの膜輸送体の物質輸送を計測することが困難であり、高感度な輸送計測システムの開発は長年の課題であった。そこで、私は、従来、水溶性分子の高感度分析に利用されてきたマイクロリアクターチップを発展させた生体膜チップ”ALBiC”を開発した(図 1)。私が自主開発した ALBiC では、生体膜で密閉したマイクロリアクター(容積: 7 fL)が約 10 万個集積化されており、マイクロリアクターを利用した高感度な物質輸送計測だけでなく、リアクターを並列利用することでハイスループットな計測を実現している。当該技術を利用すると、従来のパッチクランプ法と比較して物質輸送の検出感度が約 100 万倍向上し、輸送速度が遅い膜輸送体(例えば、トランスポーター)に関しても、1 分子計測が可能となった。

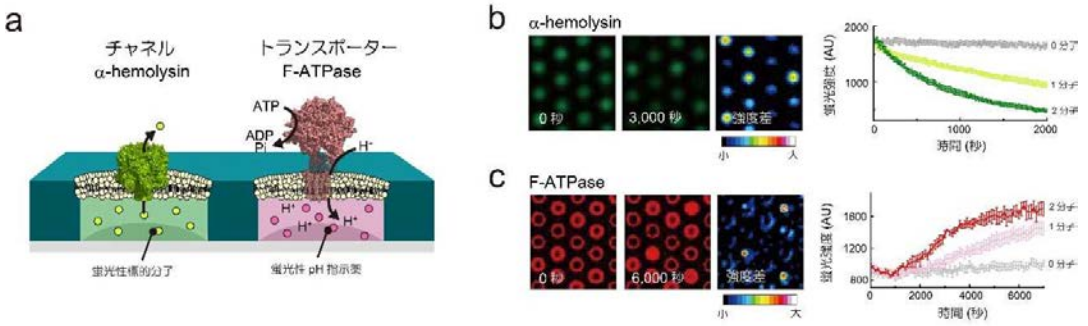


図 1　生体膜チップを利用した膜輸送体の 1 分子輸送計測
(a)1 分子計測系模式図、(b) 膜輸送体の 1 分子輸送計測結果

更に、自主開発した ALBiC の膜輸送体研究における汎用性を拡張させるため、①世界最小のリアクター、②脂質組成の非対称な生体膜を実装した新型の ALBiC を開発した(図 2)。世界最小のリアクターを実装した ALBiC(aL-ALBiC)では、マイクロリアクターの容積が約 200 aL であり、これは大腸菌の容積とほぼ同等である。ちなみに、aL-ALBiC を利用すると、従来の ALBiC よりも約 15 倍検出感度が向上している。また、非対称な生体膜を実装した ALBiC（非対称膜 ALBiC）では、細胞膜の特徴である内外層の脂質組成の非対称性を再現している。そのため、より細胞環境に近い状況での膜輸送体の機能解析が実現するものと考えている。

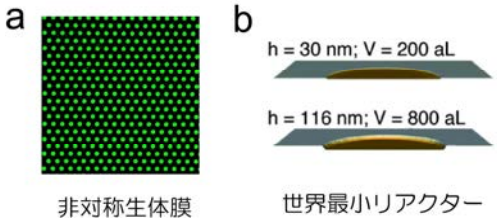


図 2　発展型 ALBiC
(a) 非対称な生体膜を実装した ALBiC
(b) 世界最小のリアクターを実装した ALBiC

・金ナノ電極を実装した ALBiC による入力(膜電位)の制御技術の開発

膜輸送体の多くは膜電位差によって機能する。そのため、膜電位差の制御装置を実装することができれば、膜輸送体の研究における ALBiC の汎用性を大幅に拡張することが可能となる。そこで、私は、膜電位差を制御する金ナノ電極を実装した ALBiC (el-ALBiC)を開発した(図 3)。el-ALBiC は、従来困難であった長時間にわたる膜電位差の制御が可能であり、そのため、膜電位差で機能する膜輸送体の高感度機能解析を実現した。

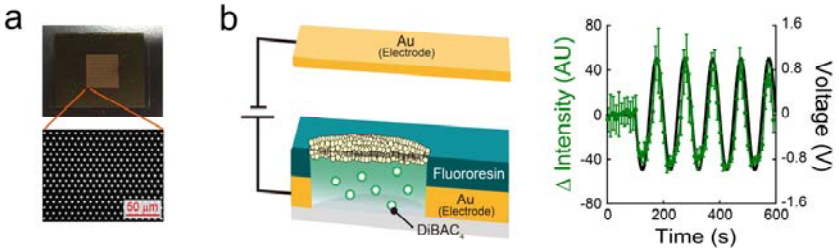


図 3　金ナノ電極を実装した ALBiC
(a)チップの写真、(b) 金ナノ電極による膜電位差の制御

・ALBiC を基盤とした構造変化の 1 分子計測技術の開発

トランスポーターなどの膜輸送体は構造変化と共役して分子を輸送する。そのため、構造変化を可視化することができれば、輸送の作動機序の大きな理解につながる。そこで、私は、膜輸送体である F-ATPase を測定対象とし、その構造変化(回転運動)を ALBiC 上で 1 分子計測する技術を開発した。現在までに、F-ATPase が ATP 加水分解を駆動力として、反時計方向に回転している様子を観察することが可能となり、今後は他の膜輸送体の計測にも利用できると考えている。

ii) 1 分子計測技術の創薬や医療への応用展開

・薬物の生体膜透過性の高感度検出チップの開発

生体膜を介した薬物の透過は、創薬において重要な指標である。そこで、私は、ALBiC の汎用性を薬物の生体膜透過計測に拡張すべく、生体膜の両側に反応容器を配置したチップ(DIB-ALBiC)を新規開発した(図 4)。DIB-ALBiC を用いて薬物の生体膜透過計測を行ったところ、人工生体膜を実装したシステムであるにも関わらず、細胞膜とほぼ同等の物性を保持しており、すなわち、DIB-ALBiC は、薬物の生体膜透過計測に最適なプラットフォームであることが判明した。

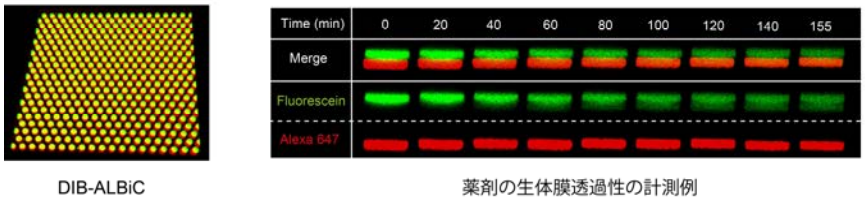


図 4　DIB-ALBiC による薬物の膜透過計測

3.　今後の展開

本さきがけ研究を通じて、膜輸送体の構造・機能を１分子単位で計測・制御するための新規技術の開発に成功した。今後は、これらの新規技術群を融合・発展させることで、膜輸送体の基礎研究を推進するだけでなく、創薬・医療に資するバイオ分析装置への応用発展などの社会還元が強く期待される。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

本さきがけ研究では、当初の研究目標を大きく超え、様々な新規技術の開発を成功に導くことができた。これは、領域内および領域外のさきがけ/CREST 研究者との共同研究による成果であり、研究者として大変喜ばしく思う。今後は、共同研究を加速させ、本さきがけ研究を基盤とした膜タンパク質の基礎・応用研究の更なる発展を目指してゆきたいと考えている。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

人工生体膜マイクロチップを新規開発し、輸送速度が極めて遅いトランスポータの１分子機能解析、人工生体膜の外側、内側の脂質組成の非対称化、膜電位操作法として金ナノ電極を実装した人工生体膜マイクロチップの開発（パッチクランプ、イオン拡散電位の代替技術）、人工生体膜マイクロチップ上に F1-ATPase を再構成することによる構造変化の一分子観察　等数多くの技術開発に成功した、

人口生体膜チップの開発は、これからの応用研究のみならず、基礎研究のためにも大きな意義を持つものであり、高く評価される。チップの技術開発だけでなく、それを用いてトランスポータの活性を実際に測る等は大きな成果である。

今後、人工生体膜チップ技術を活用して生命科学上の課題を解決できるケースが多々でてくると思われる。その課題を抱える研究者が実際に人工生体膜チップ技術を使いこなせるかがポイントなので、他の人が使えるように尽力していただきたい。

5.　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. ***Watanabe, R.**, Soga, N., Ohdate, S., & *Noji, H. “Single molecule analysis of membrane transporter activity by using a microsystem” ***Methods in Molecular Biology*** (in press)	
2. ***Watanabe, R.**, Soga, N., Hara, M., & *Noji, H. “Arrayed water-in-oil droplet bilayers for membrane transport analysis” ***Lab on a Chip*** (2016) 16, 3043-3048	
3. ***Watanabe, R.**, Soga, N., & *Noji, H. “Novel nano-device to measure voltage-driven membrane transporter activity” ***IEEE Transactions on Nanotechnology*** (2016) 15, 70-73	
4. Soga, N., ***Watanabe, R.**, & *Noji, H. “Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters” ***Scientific Reports*** (2015) 5, 11025	
5. ***Watanabe, R.**, Soga, N., Yamanaka, T., & *Noji, H. “High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition” ***Scientific Reports*** (2014) 4, 7076	
6. ***Watanabe, R.**, Soga, N., Fujita, D., Tabata, K. V., Yamauchi, L., Kim, SH., Asanuma, D., Kamiya, M., Urano, Y., *Suga, H., & *Noji, H. “Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity” ***Nature Communications*** (2014b) 5, 4519	

（2）特許出願

研究期間累積件数：2 件

1.
発　明　者：渡邉力也，大舘真也，曽我直樹，野地博行
発明の名称：脂質膜非透過性指示薬
出　願　人：東京大学
出　願　日：2015 年 10 月 14 日
出 願 番 号：特願 2015-202821

2.
発　明　者：渡邉力也，曽我直樹，野地博行
発明の名称：高密度微小チャンバーアレイおよびこれを用いた測定方法
出　願　人：JST
出　願　日：2015 年 6 月 8 日
出 願 番 号：特願 2015-116045

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

- 主要な学会発表(招待講演)

1. **渡邉力也** “マイクロチップが実現する膜輸送体の高感度構造機能解析” ***第 39 回日本分子生物学会年会 指定シンポジウム「膜タンパク質の構造ダイナミクスと機能発現」*** Dec 2 (2016), Yokohama, Japan
2. **Watanabe, R.** “Artificial cell-membrane microsystems for highly sensitive analysis of membrane proteins” ***Cold Spring Harbor Conferences Asia “Synthetic Biology”*** Nov 28 (2016), Suzhou, China

3. **渡邉力也**“Single molecule analysis of F_oF_1-ATP synthase”
第 54 回日本生物物理学会年会 シンポジウム「モーターと細胞骨格の新展開」
Nov 25 (2016), Tsukuba, Japan

4. **渡邉力也**“マイクロデバイスを利用した膜局在型回転分子モーターの 1 分子機能解析”
第 16 回 日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「回転分子モーターを調べてつくって理解する」Jun 9 (2016), Fukuoka, Japan

5. **渡邉力也**“生体膜マイクロチップを利用した膜輸送体の超高感度活性イメージング”
第 370 回 CBI 学会講演会「分子イメージングと創薬」
March 3 (2016), Tokyo, Japan

6. **Watanabe, R.** “Novel nano-device to measure voltage-driven membrane transporter activity”
15th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE NANO 2015)
July 27 (2015), Rome, Italy

7. **渡邉力也**“膜タンパク質の構造変化と物質輸送の 1 分子同時計測技術の開発”
第 14 回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム 「構造生命科学をさきがける先端的基盤技術」
June 25 (2014), Yokohama, Japan

- 受賞

1. **渡邉力也** 公益財団法人アステラス病態代謝研究会 優秀発表賞 (2016)
2. **Watanabe, R.** RSC Lab on a Chip Emerging Investigators (2016)
3. **渡邉力也** 公益財団法人長瀬科学技術振興財団 長瀬研究振興賞 (2016)
4. **渡邉力也** 一般財団法人 田中貴金属記念財団 MMS 賞 (2016)
5. **渡邉力也** 公益財団法人コニカミノルタ科学技術振興財団 画像科学奨励賞 優秀賞 (2016)
6. **渡邉力也** 文部科学大臣表彰 若手研究者賞 (2015)
7. **渡邉力也** 一般財団法人エヌエフ基金 研究開発奨励賞 優秀賞 (2014)
8. **渡邉力也** Tokyo ATPase Workshop Best Poster Award (2014)

- 著作物

1. **渡邉力也**.「マイクロチップを用いて明らかにする ATP 合成酵素の作動機構」
CSJ カレントレビュー第 28 号 分子マシンの展開, 第 2 章, 化学同人 (編集中)
2. MacMillan, D., & **Watanabe, R.** “Biologically relevant model bilayer systems for the study of ion movement” ***Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*** (in press)
3. **渡邉力也**.「容量分析・電気泳動」***工学教程 分析化学*** 第 4 章, 第 8 章, 丸善 (編集中)
4. **渡邉力也**.「生体膜マイクロチップを利用した膜輸送体のデジタルバイオ分析」
現代化学 (2016) 7, 50-53, 化学同人

- プレスリリース

1. 膜輸送体の超高感度輸送活性計測に成功 ～創薬候補の効率的探索方法の確立を目

指して～
2. 非対称性をもつ人工生体膜の量産技術を確立 ～がんやアルツハイマー病などの疾患の解明、創薬探索などの活用へ～