

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」
研究課題「X 線 1 分子計測からの *in-vivo* 蛋白質
動的構造/機能解析」

研究終了報告書

研究期間 平成 13 年 12 月～平成 19 年 3 月

研究代表者:佐々木裕次
((財) 高輝度光科学研究センター
利用研究促進部門 構造物性Ⅲグループ
主幹研究員)

1 研究実施の概要

研究構想

蛋白質分子の動的構造情報/機能相関を詳細に解析するには、原子レベル以下の精度で *in vivo* 動的1分子構造情報が安定に得られ、同時に1分子機能計測も併用可能な X 線1分子計測法が最も有効である。本法を膜蛋白質分子の *in vivo* 計測へ適用し、また本法と計算科学を合体させた全く新しい蛋白質構造決定法を検討する。本研究は敏速な蛋白質分子の構造・機能情報の取得を可能にすることで、医薬利用等とならび1分子技術、バイオ技術、そしてナノ技術との融合をも目指す。

実施内容

上記構想を効率的に実現するために、3つのグループを構成した。X線1分子計測技術等の基盤技術の各サンプル系に対する最適化、及び高度化を主に担当する佐々木グループ。また、構造変化と機能評価の同時計測を実現することで極めてインパクトのある系として、Kチャネルタンパク質分子を設定し、この膜タンパク質分子に関する研究を老木グループが担当した。そして、1分子運動の理論的な裏付けを研究するために岡本グループが加わった。

佐々木グループは、実際に放射光を用いた実験をするだけではなく、本計測技術の最重要プロープであるナノ結晶の完全結晶化技術を軸に研究開発を進めた。また、安定なタンパク質1分子計測を実現するもう1つの基幹技術である分子の基板配向技術も未知な部分が多く残されているので時間を要した。1分子運動計測を行った生体分子は、数多くあり例えば光励起型の構造変化が知られている膜タンパク質分子からフィラメント分子まで多くの形状の生体分子の計測を試みた。それらの計測から、X線1分子計測法の高精度性の証明、分子配向技術の開発、X線放射圧の計測、またその応用、抗原抗体反応の高感度計測法の提案等が行われた。また実際の放射光を用いた装置開発においては、測定自身の自動化、解析ソフトの開発、ナノ結晶の評価技術の確立、広波長領域X線利用と準単色X線利用の場合のX線分子計測技術の基盤技術に関してもその確立に成功した。

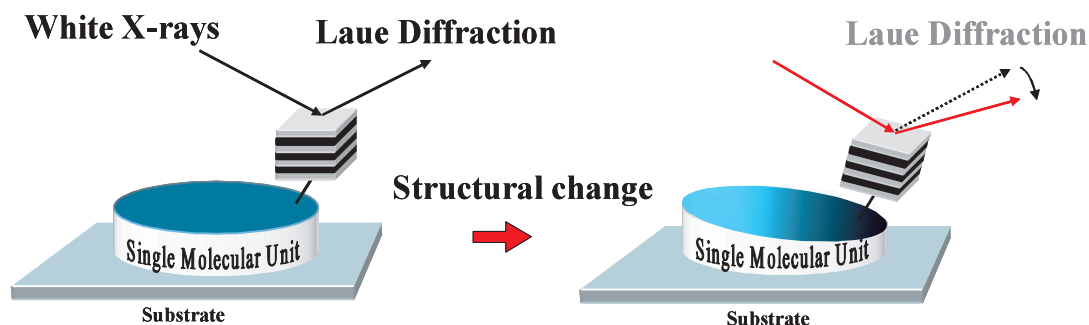
老木グループでは、X線1分子計測を利用することで必要となった生体分子へのシステイン残基の導入を主に行い、その過程で新しい構造評価法や実験に用いた KcsA なるKチャネル膜タンパク質分子の新たな特性に関する研究へと進展した。最終的には、チャネルの開閉時における構造変化計測とそれに同期した機能計測の実現であるが、得られた計測結果からより信頼できる解釈を行うために、最初に KcsA 分子を基板表面に配向させ、チャネル開閉状態を水溶液の条件を変化させることで制御し、多くの変異体を用いて測定を行った。これらの結果は、同時測定の前座の研究として位置づけられるが、それに余りある多くの新しい事実が明らかになった。結果的には、ある程度 KcsA 分子自身の運動を抑制することで、運動の解釈を精確に行うことができた。それほどにKcsA分子の開閉時に伴う運動は予想を超えて極めて大きな運動であることが本実験で明らかとなった。

岡本グループは、近年多くのX線以外の可視光を用いた1分子計測法が盛んに行われている中で、計測されている現象を理論的に解釈することが平行して進められている訳ではないという現状に注目し、生体分子の構造予測を中心に研究を行ってきた。X線1分子計測の基本は、生体分子を基板に配向し、ナノ結晶を標識するという一見生体分子にとってはかなり過酷な運動条件となっている。これがどの程度運動を抑制しているか定量的な検討を行った。無論実際の実験においてもこれらの検証は、ナノ結晶の大きさを制御したり、配向スペースの制御したりなどの実験は可能で、それらも佐々木グループの協力で行うことができた。理論計算とX線1分子計測の組み合わせは非常に合理的で、両分野共に1分子に着眼点を置いている。理論ではかなりの位置精度が達成されるし、X線1分子計測も類似の1分子計測技術の中では最高精度を誇る。

成果(抜粋)

常識を越えた位置決定精度の実現

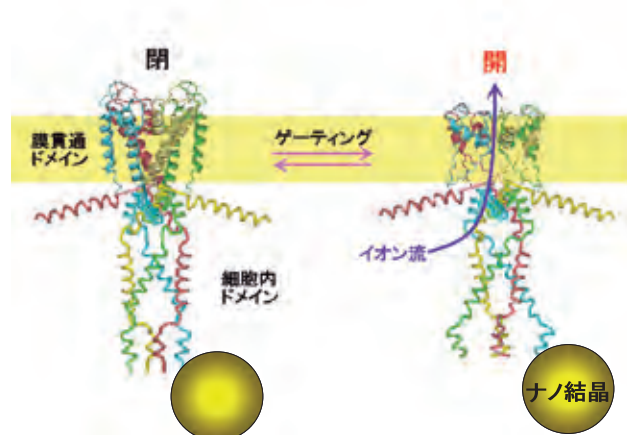
分解能、検出限界、回折限界等の壁が顕微鏡的技術では重要因子として議論される。特に顕微鏡の世界では、空間分解能は使用している波長の半分程度という「回折限界」なる概念が絶対的であった。光学顕微鏡は広範囲の領域で利用されている汎用的顕微法であるが、従来型の光学顕微鏡で原子像を見ようとした例を聞いたことがない。これは上記の「発想の壁」が影響している。しかしこの「回折の壁」を巧妙にすり抜けた計測法が1980年代に登場した。走査型トンネル顕微鏡(STM)である。また同時期に、可視蛍光の輝点を追跡すれば、その分子の運動が読み取れるという1分子計測法の概念が登場した。この1分子計測の発想は、free-standing なプローブを用いた STM 的走査型顕微法と言える。ここでは、波長 λ に対して回折限界が $\lambda/2$ であっても、輝点を追跡する位置決定精度は $\lambda/100$ となる。しかし、「回折の壁」回避後でも確実に成立している原理もある。それは使用している光源の波長依存性が位置決定精度にある点だ。つまり、波長を短くすれば決定精度が向上する。そこで登場したのが本研究の主な方法論であるX線1分子計測(Diffracted X-ray Tracking, DXT)である。実現すれば、生きた状態における生体1分子の動きを究極的精度〜ピコメートル(原子直径の1/100程度)で計測できる。X線1分子計測法のアイデアは単純である(下図)。直径数十nm程度のナノ結晶を機能性分子にその機能を損なわないように標識する。そして、1つのナノ結晶からのラウエ斑点を指標に、着目したタンパク質分子の動きを時分割(〜ms程度)トレースする。ここで注目することは、長いX線の歴史の中で、結晶方位の回転という因子を積極的に運動という現象に適応した例がなかったという点である。この点だけでもX線1分子計測法の発想は全く新しいと言える。この計測法を実現するために、ナノ結晶の完全結晶化、生体分子の配向技術、ナノ結晶標識技術等の研究開発を進め、膜タンパク質分子の分子内運動で pm レベルの運動計測に成功した。



チャネルタンパク質分子内運動計測

イオンチャネルは電氣的測定により最も古くから単1分子の振る舞いが実験・解析されてきた系である。チャネルタンパク質分子の立体構造も次々に明らかになり、機能と構造のダイナミクスを1分子で明らかにできる期待が高まっている系でもある。本実験の目的は単一チャネル電流記録による機能の測定とX線1分子計測法による構造変化を同時記録し、機能するタンパク質の動きをリアルタイムで捉えることにある(次図)。対象とするイオンチャネルをKcsAチャネルとした理由は、本研究発足当時、唯一チャネルタンパク質分子で構造が明らかになっていた分子であるからだ。ただ、決定された結晶構造は膜貫通領域のみで、細胞内には比較的大きな未知の構造をもった細胞内ドメインが存在する。また決定された立体構造はゲートが閉じた閉構造で、開構造については様々な議論があり明らかになっていなかった。したがってゲートの開閉に伴う分子の動きを予想し、それを観察するために最適な位置に標識(金ナノ結晶)を導入する必要がある。そこで既知の膜貫通領域の立体構造等によって予想された細胞内ドメイン構造をもとに、様々な位置にシステイン残基(金結晶を結合させる)を導入した。導入したシステイン残基が表面に露出していなければ金結晶を結合できないので、表面露出性をスクリーニングするために表面プラズモン共鳴法を使った

新しい方法も考案した。このように最適な金結晶標識位置をもとめるスクリーニング実験に平行して、変異したチャネルの機能を脂質平面膜法の一つである tip-dip 法によって単一チャネル電流記録を行った。この過程でチャネルゲート機構に関するまったく新しい機構を発見することもできた。



平面膜内での運動計測をより確かなものにするために、第一段階の実験としてチャネル分子を基板に固定した状態で X 線 1 分子計測実験を行うことにした。KcsA チャネルはホモ4量体であるため点変異によって4箇所の対称な位置に変異を導入できる。細胞外に飛び出たループ領域にリジン残基を導入し基板に固定した。この状態ではチャネルは細胞外ループの4箇所で基板に結合し、細胞内ドメインを上に向けた配向にある。細胞内ドメインにある C 末端にシステイン残基を導入し金結晶を結合させた。イオン流を遮断するゲート(膜貫通領域にある)の動きが細胞内ドメインに伝達すれば、その動きを観察できると予想した。また、このチャネルの pH センサーは細胞内ドメインにあると予想されているので、センサーからゲートへの動きの伝達過程も条件によっては計測可能になる。またゲートの動きを止めるブロッカーの存在下で運動も興味ある計測である。運動の解釈をより精確にするために、他の位置へ金結晶結合部位を導入する実験も平行して行った。細胞内ドメインを削除してもチャネル活性があることはすでに電気生理学的方法で確認している。ゲートに直近の位置に結合部位を導入することを行った。

これと並行して最終目的である単一チャネル電流記録と X 線1分子計測法の同時記録のための実験系を構築した。予想もしなかった数々の問題点に遭遇はしたが、工夫を重ねて一つ一つ解決できた。例えば SPring-8 というノイズが渦巻く巨大パワーの環境にあってピコアンペアという微小電流を測定する必要がある。さまざまな改良の結果、現在までに通常の電気生理学の実験室並みのノイズレベルまで低減させることに成功した。

電位依存性チャネルを実験対象とすることも検討した。電位依存性チャネルこそ膜蛋白質のもっとも重要な特徴を備えている。リガンド作動性チャネルは膜環境になくてもリガンドを結合しゲートを開閉することができるが、電位依存性チャネルは膜電位変化という物理的現象がゲートを制御しており、膜という環境でのみ意味のある働きをする。もう一つの利点は電気生理学の実験によって膜電位を自由にコントロールできるため動きをコントロールできるだけでなく、動きをフィードバックさせてチャネルゲートをコントロールできることである。

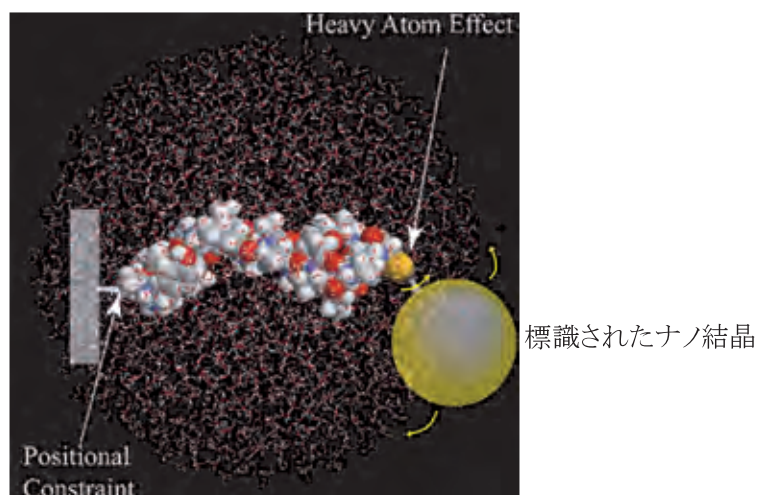
1分子運動シミュレーション

1分子計測の実験結果を理論計算と比較検討することは非常に重要な研究姿勢である。これにより分子ダイナミックスのより一層の理解が進む。分子シミュレーションは実験では測定不可能である分子の微視的挙動を調べることが可能で、X 線 1 分子計測による測定結果をよりマイクロに分析でき非常に有効である。また X 線 1 分子計測は、分子の動きをピコメートルのオーダーの精度で計測できる極めて高精度の手法であるので、分子シミュレーションの方にも高い精度が求められる。

分子シミュレーションには拡張アンサンブル法を用いている。タンパク質など、局所安定状態が

多数ある分子系において、通常のカノニカルアンサンブルシミュレーションでは局所安定状態に留まってしまい、広い配置空間を探索できず、信頼できる定量的な予測が出来ない。それに対して、拡張アンサンブル法は、非ボルツマン因子による人工のアンサンブルに基づき、ポテンシャルエネルギー空間上のランダムウォークを可能にする。これにより、幅広い配置空間を探索できるのみならず、一回のシミュレーションで様々な温度のカノニカルアンサンブル平均を得ることが出来、生体分子のシミュレーションには非常に効果的である。特に、本研究のように、実験結果とシミュレーションの結果とを対比する際には、定量的な予測が必要になり、拡張アンサンブルを使う意義は大きい。本研究では拡張アンサンブル法の一つであるレプリカ交換法を用いて生体分子のX線1分子計測を再現するようにシミュレーションを行い、分子ダイナミックスの定量的な予測を目指している。

シミュレーションの対象となる分子系は Chakrabatty ら (Protein Science (1994) 3: 843-852) によって合成された YG ペプチド (塩基配列は YGKAAAKAAAAKAAAKC) である。実際のシミュレーションには、N 末端はアセチル基、C 末端は CONH₂ でブロックしたものを使っている。このペプチドの最安定構造は α -helix 構造であることがわかっている。このペプチドを水分子 2580 個の球に入れ、レプリカ交換を用いて分子動力学シミュレーションを行った (下図)。レプリカ交換分子動力学法で完全に伸びきった一次元構造の初期配置より、 α -helix 構造を再現できるか確かめるために、まずは、何も束縛のない条件でシミュレーションを行った。その結果、 α -helix の構造が最安定になることを正確に予測することができた。これはレプリカ交換法を使ったことにより、広いエネルギー空間をランダムウォークし、広い配置空間を探索することに成功したからこそである。また、レプリカ交換法を用いることにより、様々な温度における自由エネルギー曲面の構築が可能となり、分子の挙動をよりよく解析できた。次に、X 線 1 分子計測に近い条件でシミュレーションをするために以下の条件を加えて、レプリカ交換分子動力学法にてシミュレーションを行った。(1)X 線 1 分子計測では、N 末端が基板に固定されているが、シミュレーションでは N 末端のアセチル基におけるカルボニル炭素の位置を固定した。(2)X 線 1 分子計測では、金結晶が C 末端のシステインの硫黄に結合しているが、シミュレーションではシステインの硫黄分子を重くした。初期配置は束縛のない条件で安定であった α -helix 構造である。現在、システインの硫黄分子の重さを 2 段階変えて 2 種類のシミュレーションを行っている最中である。これにより、生体分子におけるダイナミックスの金結晶サイズの依存性を調べる事が可能となる。ある重さのところで、分子の挙動が大幅に変化するような相転移も期待できる。

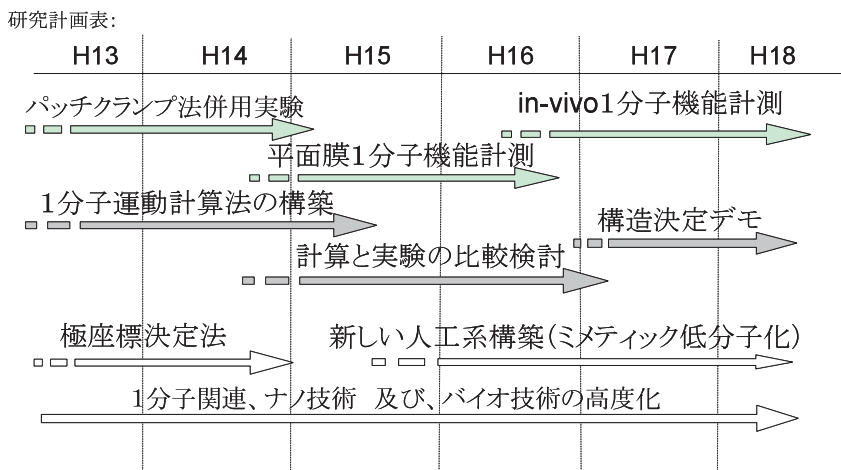


実際の実験との比較には主成分解析を利用する。主成分解析により、生体分子の大きな運動の主成分がわかるので、X 線 1 分子計測による測定結果との容易な比較が可能となり、測定結果と併せて生体分子の運動をより一層理解できる。また、異なるシミュレーションの違いを見ることにより、X 線 1 分子計測をする際に、生体分子の挙動がどのような影響を受けるかについても調べることができ、X 線 1 分子計測のさらなる発展につながる知見が得られる。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

立案時の研究計画を下図に示す。透明の線が佐々木G、緑色の線が老木G、紫色の線が岡本Gの研究計画及び研究目標である。

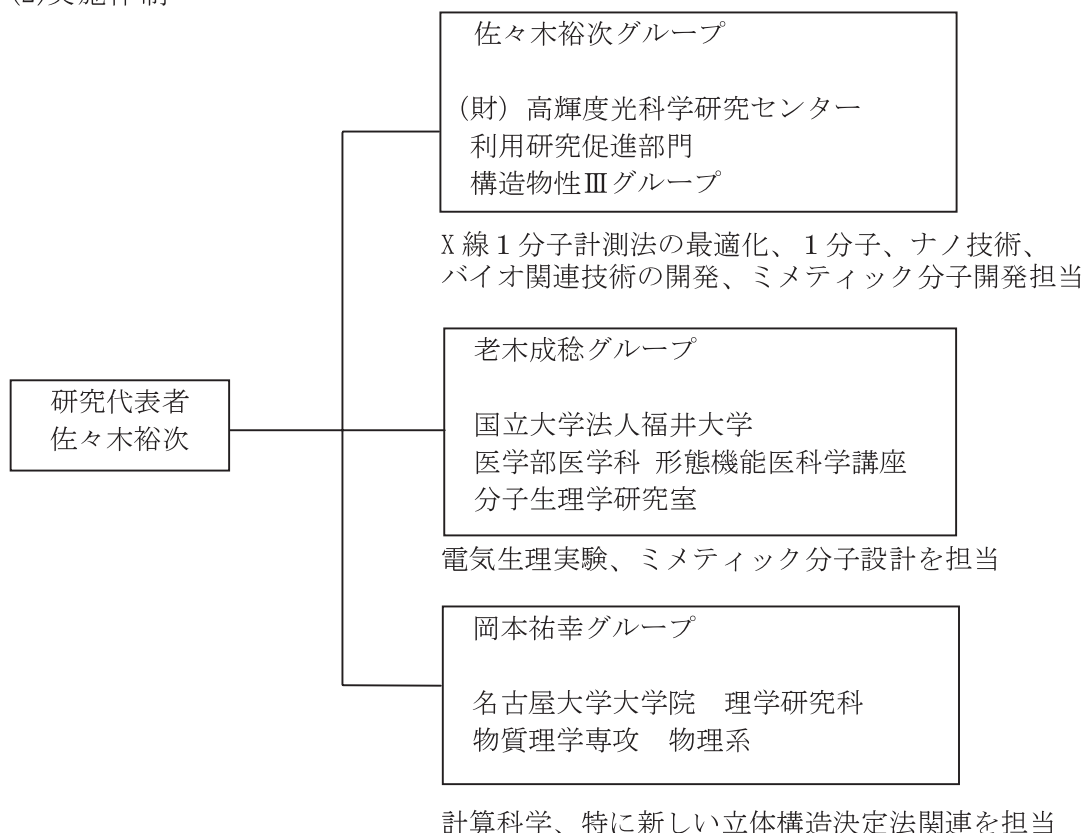


佐々木Gの研究担当は、X線1分子計測法の最適化、1分子、ナノ技術、バイオ関連技術の開発、ミメティック分子開発である。当初検討されていた極座標決定法は、ナノ結晶強度の変調を利用した方法で原理的に有効であったが、その計測される強度がナノ結晶の結晶性の再現性が計画当初において得ることができなかったため完成できなかった。他の基本技術は予定通りに完成した。人工構築系に関しては、非常に粘性の高いポリマー系を用いて、生体分子の運動と同様の運動を検出できるなどの成果は得られたが、ミメティック化までは到達できなかった。意外な成果としては、X線放射圧の計測がこのX線1分子計測で確認されたことである。この現象は光トラップ技術の短波長版であり多くの応用が考えられる。厳密な定量化も進んでおり、非常に有効な検証となった。

老木Gの研究担当は、電気生理実験、ミメティック分子設計を担当である。放射光施設におけるパッチクランプ法の実験可能環境の整備は、H14年に終了することはできなく、独立アースの設置等で施設側の認可等で時間を費やしたのは意外であった。平面膜の実験の前に行われたチャンネル膜タンパク質分子の基板配向法による実験結果が予想していなかった大きな運動を検出したために、多くの条件設定を余儀なくされ、多くの時間を費やした。平面膜の実験はH18年においても行っているが、複雑な運動を正確に解釈するためには、予想以上の基板固定における実験を行わなければならないことに起因し、またその解釈があるからこそ、より複雑な運動が予想された平面膜状の運動計測の解釈も自信を持って行うことができた。In-vivo 計測に関しては、少々の問題点が残っているが、平面膜における同時計測が実現可能になったことは極めて実現可能に近づいていると言える。一番予想外であった研究成果は、多くの変異体を作製する過程で、それらの分子物性特性を把握するために、表面プラズモン法を用いて、膜タンパク質分子の表面残基の同定法の考案に至ったことは、分子構造が明確でない分子を計測する場合に大きい役割を担うと思われる。

岡本Gの研究担当は、計算科学、新しい立体構造決定法関連を担当した。拡張アンサンブル法という独創的計算方法によって、X線1分子計測における計測された運動評価を行った。基本的なアルファヘリックス分子に対して、基板固定効果とナノ結晶の標識効果を評価した。原理的には、膜タンパク質分子などの比較的大きな分子に関しても応用可能であり、今回老木Gにおいて計測された非常に興味ある運動もすべて拡張アンサンブル法で再現可能になれば、より信頼できる運動計測が完成したことになる。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 サブテーマ名1((財) 高輝度光科学研究センター 佐々木グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1. 膜タンパク質1分子の光励起構造変化計測

機能性生体高分子が細胞場で機能発現する際に、分子内部でどのような動きを伴ってその機能を具現化するかを1分子ごとに時分割的に計測できれば、それら機能発現の素過程が物理的に明確になり、生物学的機能プロセスに対して新しい制御系が確立できる可能性や、人工的に再現及び利用が可能になるかもしれない。また、理解された機能を利用した新しい計測法や薬理的利用への応用も考えられる。そんな夢のような基盤技術を実現し、現在盛んに行われている静的構造情報の取得時代から次のターゲットとなる動的構造情報の時代へと進展させるために本研究は発案された。分子内部を高精度で1分子計測できるプローブは限られている。原子サイズ以下という極めて精確な位置決定精度を実現するために、超高輝度プローブか、もしくは極めて短波長なプローブを利用することになる。本研究では後者であるX線(放射光)を用いる。pmレベルの高精度性を持ち1分子内部の運動計測が可能なX線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)を提案し、生体分子内部の構造的熱揺らぎの1分子実時間計測、膜タンパク質1分子の光励起構造変化計測の pm レベル測定、Kチャネル開閉時における1分子運動計測、免疫系における新しい動的抗原認識機構の提案、実験系と対比できる汎用的1分子シミュレーション、そして超微小圧力であるX線放射圧現象の確認等、生体分子に関わる多くの新しい事実が計測された。その多くの成果において、動的1分子構造情報がいかに重要な情報であるかを認識することができた。

膜蛋白質分子バクテリオロドプシン(bR)は、あらゆるフェイズの構造情報がすでにあり、DXT の測定信頼度を確認する意味でもbR実験は理想的であった。DXT を用いて膜蛋白質であるbR1分子の機能発現時における分子内構造変化計測を試みた。図1にサンプル断面図を示す。膜内において2次元六方格子状に配列するbRは、分子内に存在するレチナール分子が特定の光吸収(568nm)により異性化反応を示し、いくつかの中間体構造を経て細胞内から細胞外にプロトンを輸送するポンプとしての機能を発現する。図中では基板に向かってプロトンが移動するように流れる。実験ではまず立体構造を正常な状態に維持して実験を行えるように、2次元配向した天然のbR膜(紫膜)自身を基板に一方向から固定し、システイン基を導入した変異体を使用して、金のナノ結晶を特定部位に標識させた。図でわかるように最密充填状態のbRとナノ結晶を1対1の比で標識するために余分なシステイン基を水銀化合物でつぶした。つぶさない実験も行ったが、予想通り統計処理に耐えうる再現性あるデータを取ることはできなかった。この結果は、DXT にとってナノ結晶との標識部位の反応サイト数は、非常に重要で1対1対応が理想であることが分かった。

実験結果では、特定部位(アミノ酸 35 残基目、金ナノ結晶が標識されている部位)において、光照射により約 $73 \pm 43 \text{ pm}$ の構造変化をモニターすることに成功した。これは70-90個の回折斑点の統計処理した値であり、その上で pm の精度を確保できるという高精度性をDXTは持っていることが確認された。この値は X 線結晶構造解析により得られた値とよく一致することが分かった。本報告では、これら計測結果を用いてbR の機能発現時の詳細な運動特性、更にはその分子揺らぎの相関についても報告する。

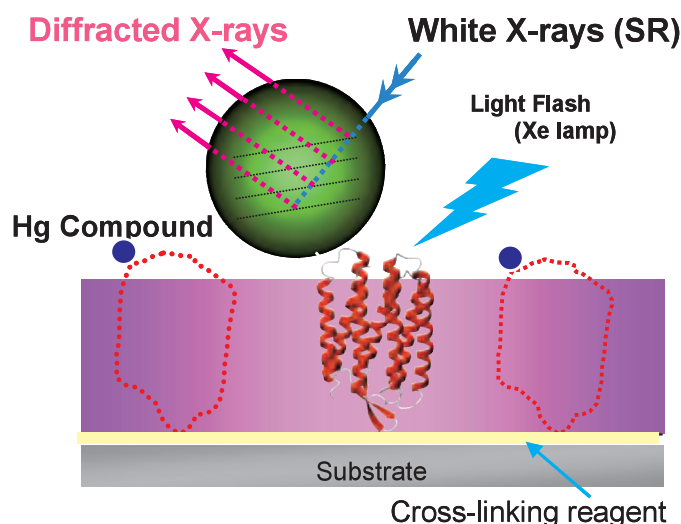


図1 バクテリオロドプシンの光励起構造変化1分子実時間計測

2. 分子シャペロンの分子内運動変化計測

蛋白質の構造形成を効率よく進むように関与しているのが分子シャペロンである。大腸菌由来の分子シャペロン GroEL は ATP 加水分解活性を伴い、蛋白質の構造形成を補助する。構造も決定されているが、ヌクレオチドの結合・加水分解による構造変化等に関しては不明な点が多く残されている。中でも ATP の結合と GroEL の構造変化の関係については現在でも様々な提唱がされている。今回、ヌクレオチドの結合による GroEL に対する影響をDXT計測してみた。DXT 計測をすることで、これまで計測できなかった GroEL1分子のピコメートル精度の構造変化計測が可能になり、これまで理解できなかった GroEL の機能発現と構造揺らぎの関係を考察できるようになるのではと考えた。

本実験では変異型 GroEL A133C を用いて、Cys 部位にナノ結晶を修飾することによって、ヌクレオチド結合部位近傍の揺らぎを観測している。実験条件としては、ヌクレオチド存在下と非存在下でナノ結晶から得られる回折点の動きに注目した。その結果、ヌクレオチド非存在下では回折点が一方方向に移動するのに対して、ヌクレオチドが存在した場合、回折点は振幅を持った軌跡を示した。これはヌクレオチドが結合していない時、GroEL 分子には分子内に空間的余裕がありブラウン運動

による大きな揺らぎを生じている。一方、ヌクレオチドが結合すると分子内の構造安定性が増し、ブラウン運動が抑制され、より小さい振幅をもった運動に変わるのではないかと考えられる。この実験結果から図にあるように、ヌクレオチドの結合が分子の揺らぎを制御しているのではないかと考えている。もし、ヌクレオチドによって GroEL の動きを制御出来るようになれば、有意な物質を GroEL 内部に包括させ、分子カプセルの役目をさせるといった医薬的利用にも応用できるのではないかと期待できるかもしれない。

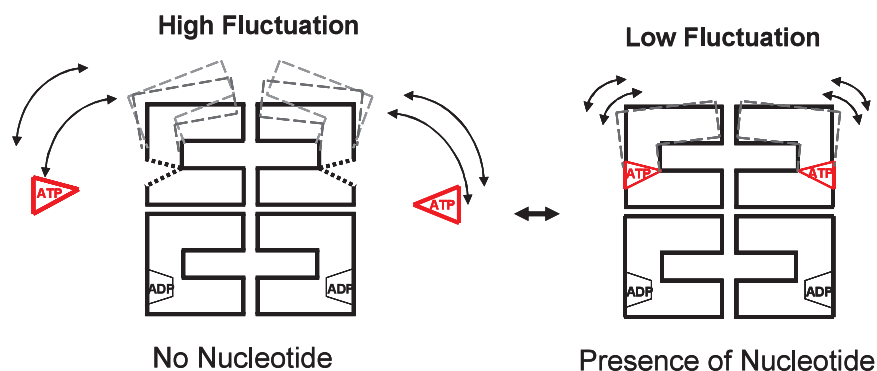


図2 GroEL と ATP 分子の結合により分子内揺らぎの変化モデル

3. 免疫系における新しい動的抗原認識機構

生体分子間の相互作用を構造生物学的に解析することは極めて重要である。反応特性がよく理解できるし、その後の現象もある程度予想できる場合がある。しかし、今までその相互作用は静的な側面を考慮する場合が多く、1分子レベルの運動情報に関して議論されたことはない。ここでは、分子間相互作用において一番シンプルな現象として有名な抗原抗体反応の1分子相互作用計測を行った。一般にB細胞の活性化には外来抗原による抗原受容体同士の間架橋が必須であるとされている。しかし抗原として考えられる物質には、この架橋構造をとらせることができない物も数多く存在しており、別のシグナル伝達機構も存在すると考えられている。その可能性の一つとして抗原結合による抗体分子の構造変化があげられている。これまでの研究において、抗体分子が抗原と結合することで、抗原結合部位のみならず定常領域にまで構造変化が及んでいることを抗体定常領域に特異的に結合するプロテインAやプロテインGをプローブ分子とした Biacore 測定で確認している。しかしながらこの構造変化が具体的にどのようなものであるのかは、不明のままであった。そこで DXT を用いて抗原結合による抗体分子の揺らぎの変化を計測した。本実験では、マウス抗ニトロフェニル(NP)抗体 Fab 断片の C_H1 ドメインと C_Lドメインとの間で形成されているジスルフィド結合に金ナノ結晶を修飾し定常領域近傍の揺らぎを計測した(図3)。その結果、抗原(NP-Cap)非存在下では一方向に大きく移動する回折斑点が良く見られるのに対し、抗原存在下では小さな振幅を持った回折斑点が多かった。これは、抗原結合により抗原結合部位のみならず、定常領域の構造もより安定な状態をとっていることを示唆している。用いた抗体は4種類で、すべての抗体において、抗原反応時において測定された揺らぎ幅はかなり減少することが確認された。抗原抗体反応が起こると分子全体が安定化して、その運動特性も安定化し揺らぎ幅も小さくなるという予想はされていた。ここで初めて1分子レベルでの運動安定化が確認されたことになる。また面白いことに、この運動幅の減衰比を取ってみると、図3に示すように全く配列に規則性のない変異体を用いた実験において、結合に伴う自由エネルギー変化との比例関係が極めてよく成り立っている。これは今後多くの分子相互作用において類似の法則性が成立するかどうか確認を急がなければならないが非常に興味ある結果となった。このように、分子間相互作用を安定的な結合状態の従来の解析から本実験のように1分子レベルからの運動情報として解析することで分子間結合という現象を再認識でき、その動的挙動が生体膜を介したシグナル伝達系にどのように機能しているか今後の研究に期待される。

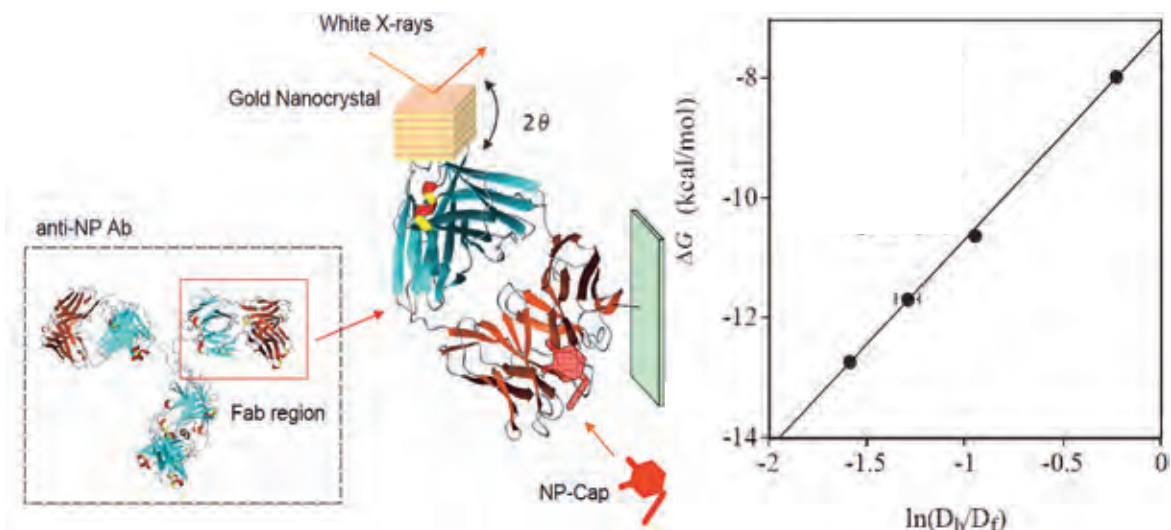


図3 基板上での抗原抗体反応、及び運動減衰率と結合に伴う自由エネルギー変化との関係

4. X線放射圧の確認実験

DXTを用いてDNA分子、可溶性タンパク質分子、機能性膜タンパク質分子など多くの1分子動的挙動の計測を行ってきた。すべての1分子計測において明確に言えることは、分子内部にもブラウン運動が存在するという点である。ブラウン運動は 1827 年にイギリスの植物学者 Robert Brown によって水中における花粉の顕微鏡観察で発見された。その後、この現象が当時注目されていたアインシュタインの分子運動論を証明することに利用された。つまり、この現象を詳細に解析することは、機能性生体高分子の動的挙動を理解する上で無くてはならない過程である。

タンパク質分子の動的挙動を研究対象にする場合、ここの分子内運動を詳細に計測できるということは、多くの生体1分子の相対的な1分子硬さ測定という比較実験も可能になり、それらの物理定数的因子は生体分子間の相互作用を物理的に検討する場合の重要な指標になり得る。X線を用いて多種類の1分子運動計測を行った結果、X線照射時において計測された分子に1方向の運動成分が検出された。計測された1方向の流れを持ったブラウン運動は、比較的固い分子では、その方向性は確認できないが、比較的柔らかい分子、例えばアンフォールド状態のポリペプチドや親水性蛋白質分子などでは顕著であった。今まで可視光を用いた光ピンセットやエバネセント減衰波内の放射圧に関しては多くの研究がなされてきたが、物質系に対して光の吸収効果が少ないX線領域で、その放射圧が確認されたことはなかった。今回の現象は、非常に高感度なX線1分子計測法を用いたことにより初めて確認された現象である。X線の放射圧に関する議論は、天文学において中性子星やブラックホールの説明に今では無くてはならない物理現象として知られている。また放射圧現象は、ミクロのスケールにおいても、可視領域の光の放射圧を用いた光ピンセットなどの先端技術において、多くの分野で利用され始めている。検出された力は数 aNである。この極めて小さい力を計測できた事は、このレベルの力場を利用できるようになり、例えば分子を微かにひっぱったり、新しい構造解析手法の原理に利用できたり、高精度で分子を捕まえるトラッピング現象を生み出す可能性を示したことになる。

5. ナノ結晶作製技術

ナノ結晶作製技術の向上に関する研究は、本プロジェクトがスタートして以来の最重要テーマであり、かつ最難関テーマである。ナノ結晶の結晶性が向上すれば、それだけ小さいナノ結晶を標識するだけで運動が計測可能となる。また、X線の照射強度も減少させることが可能となる。プロジェクト初期において、アニーリング処理工程において、結晶性を向上させる基板であるNaCl回りの飽和蒸気圧を向上させることが、基板上で成長する金結晶の結晶性を極めて向上させることが分かった。つまり、真空状態化でアニーリングするのではなく、高圧化でアニーリングすることが結晶性向上と基板上の蒸着された金の並進的な拡散を減少させるので、より小さい結晶性の高いナノ結

晶の作製が可能になる。このように良質ナノ結晶を作製するための意外な因子がその後多く確認された。例えば、基板である NaCl 基板の清浄性、NaCl 基板への蒸着速度、NaCl への蒸着距離、蒸着時の NaCl 基板の温度、そして再アニーリング時のアルゴン圧力、再アニーリング時の炉内の残留酸素量、飽和蒸気圧を上げるためのダミーの NaCl の純度など、当初は予想できなかった条件も関与していることが判明した。特に蒸着基板への距離に関しては、5cm 程度にすると蒸着源か

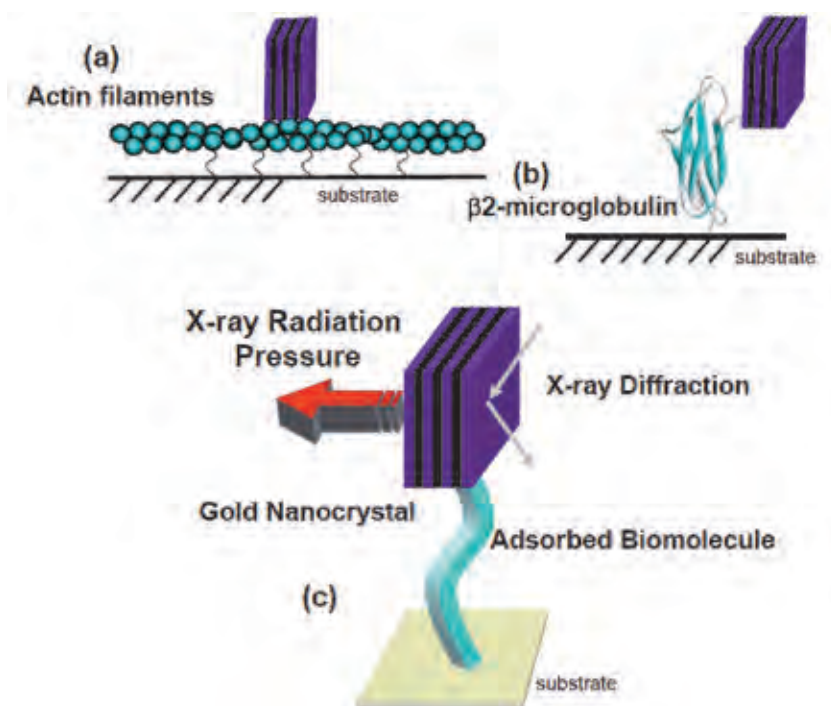


図 4 計測された X 線放射圧と標識された結晶の位置関係

らの輻射熱の影響で、金のアイランド成長に対する重要な変調を来してしまうが、非常に均一な小さなアイランドを形成する可能性があることが分かった。また、最新になってアルゴン圧力を 0.2MPa から 6.5MPa へと高圧化することにも成功したので結晶性が一段と向上した。作製装置を改良することにより、20–30MPa までの高圧下が可能であることも分かったので、高圧条件下のアニーリング方法として全く新しい可能性が開けてきた。これらの成果は、ナノ結晶のオフラインに置ける評価方法が確立したことにより得られた。走査電子顕微鏡での評価条件の決定や電子後方散乱回折法 (EBSP) によるナノ結晶内の結晶不整合性 (双晶) の存在を確認できた。特に、後者の EBSP による評価は、プロジェクト後半に研究が始まった電子線 1 分子追跡法の基本実験と重なるところが大きい。現状の X 線 1 分子計測法の最大の弱点であるマシンタイムの確保 (1ヶ月で 24 時間程度) を打開できる唯一の解がラボレベルの実験法の確立にある。最終年度は溶液セルの形状や装置測定精度の計測等、より具体的な因子決定へと進めたい。

作製された完全ナノ結晶は、本プロジェクトのような X 線 1 分子計測用のプローブとしてだけではなく、多くの応用利用が可能である。可視光領域のプローブとしても利用できるし、方向性を持ったナノプローブとして化学標識やデバイスの利用の可能性さえある。国際的な共同研究を通して、異分野の研究者に多く提供していく予定である。

6. 電子顕微鏡への応用意義と基礎検討

放射光施設の利用は限定されている。1ヶ月に多くて一度のマシントimeで、1回の平均マシントimeが24時間である。競争相手である可視域波長を用いた1分子ダイナミクス計測法と比較して問題外の少なさである。是非X線1分子追跡法と同等レベルの高精度1分子計測法をラボレベルで実現したいと考えた。最初に考えられた代用案はラボレベルの小型放射光施設の利用である。しかし光の強度不足でナノレベルの結晶の回折スポットは実時間では計測することはできなかった。もう一つの可能性は、装置を小型にするために、より散乱断面積の大きいプローブに代えて装置構成をもう一度組み直す方法である。そこで、極短波長特性を有する電子線の利用が候補にあがった。X線よりも 10^4 倍の散乱断面積を有する電子線利用を考えた理由は、装置が非常にコンパクトで既存技術として電子線後方散乱回折装置(EBSP)がすでに実用化されており、基本的に電子線をナノレベルに集光(実用化済み)して、標識されたナノ結晶の結晶方位をEBSPで測定すればよく、主要な技術部分がすでに他の用途に利用されている点が上げられる。また、得られる情報もX線の一次元的な運動情報に比べ、その多重散乱特性により、三次元的な運動情報が得られる可能性もある。電子線の多重散乱という点においては、回折斑点を追跡するという本法の特徴を実現するためにX線では疑似白色光(ある幅を持った波長を使用する)が必要であったが、電子線の場合は、単色でもその多重散乱特性のゆえに回折斑点の連続追跡が可能であるのは極めて幸運であった(実験的に確認済)。また、この新しい電子顕微鏡の利用法において、工夫によっては可視光による分析併用も可能なので、今までの1分子装置関連の多くの技術を導入できる装置が将来的に組める。以上のような背景から、本開発では直径20nm程度の金ナノ結晶のビデオレイトのEBSP動画計測を高感度高精度化することを目標に研究を進めた。具体的には、ウェットセル観察用走査電子顕微鏡(SEM, 空間分解能5nm、電子線プローブ径2nm)のEBSPを基本構成として、目的生体分子の分子内動的挙動計測にナノ結晶標識法を用いて、分子内変位決定精度Åレベルの究極的な動的1分子挙動解析装置を実現しようと考えた。

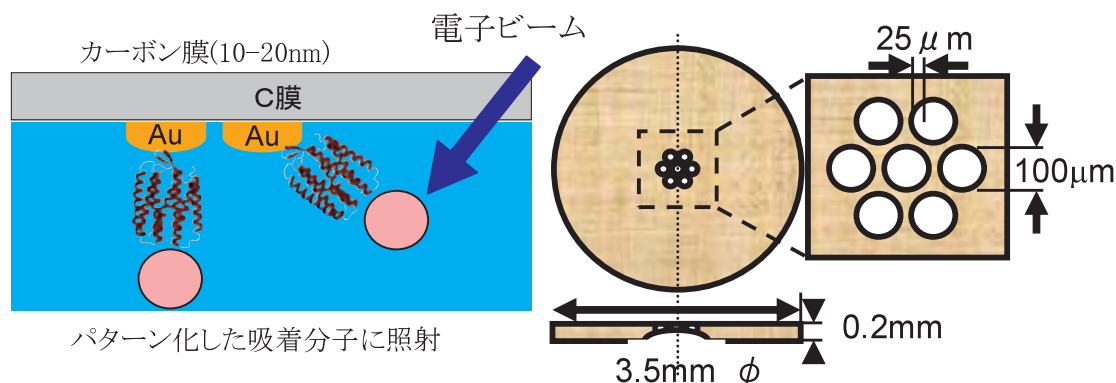


図5 電子線1分子追跡法用のウェットセル構造

ウェットセル観察用走査電子顕微鏡を基本とし、機能性生体分子に標識されたナノ結晶の結晶方位を高速時分割計測する装置開発が目標であるが、低エネルギー(30KeV以下の加速電圧)による電子後方散乱回折装置(EBSP)による金ナノ結晶の回転運動を高感度検出したい。目標は直径20nmの金ナノ結晶の実時間検出(時分解能30ms)とした。現状のEBSP装置においては直径30nmの金ナノ結晶からのEBSPパターンを、45nmのカーボン蒸着膜を通して検出できることは、X線1分子追跡法で用いているナノ結晶を利用して確認した(図6)。

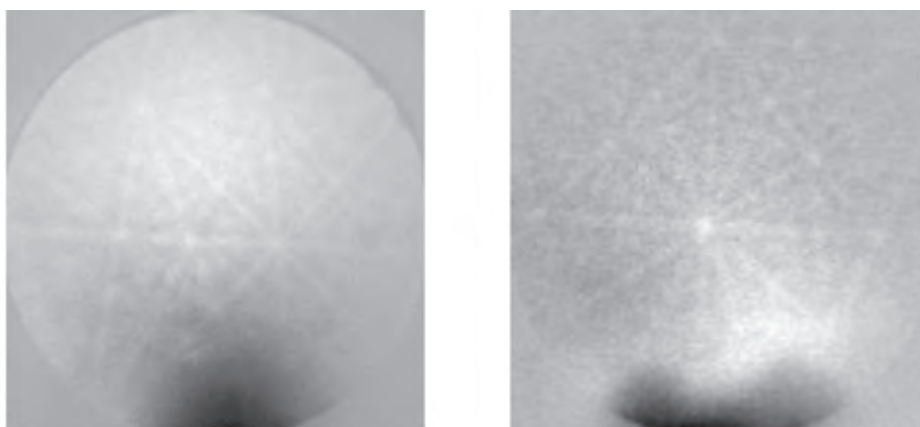


図6 左から直径 40nm,30nm の1つの金ナノ結晶からの EBSP。30 ミリ秒積算。加速電圧 30KeV。

生体分子へのダメージを極力減らすために、照射電子線量を減らし 20nm 程度の金ナノ結晶からの EBSP 信号を連続動画として検出することを試みた。この微弱な信号を得るために、今後検出系にはファイバーカップリングを使用した CCD カメラの開発を行い、さらにこれにイメージングインテンシファイア機能を組み合わせて高感度化を計る。これにより2-3桁以上の感度改善が見込まれている(日本電子(株)にて検討済み)。また、検出された画像の解析、つまりソフト面においても EBSP が比較的単純なパターンであることから、画像認識技術を応用することで、より微弱なパターンの検出から標識されたナノ結晶の結晶方位を決定し、実質的な電子線ドーズ量の極端な低減に結びつけることが可能となる。得られる像である菊池パターンは、回折点と線状のバンド構造(エクセスコーン及びデフェクトコーン)からなり、結晶方位を決めるということは、その中心位置を求めるだけなので、画像認識技術(直線部の検出には Hough 変換法の利用)を駆使して、低電子ドーズ量下で得られた僅かな信号強度パターンから中心位置(交差点)を割り出す。その像解析法で低ドーズ量での位置決定精度の向上も見込める。電子顕微鏡において、一番の利点はナノサイズのビームが照射可能なので生体分子への直接照射なしで、標識されたナノ結晶だけに照射してその結晶方位を決定することができる。これはX線計測技術(放射光のビームサイズは μm レベル)にはない大きな利点である。例えば、より確実に生体分子の直接照射を避けるために、測定基板に吸着した生体分子の場所を nm レベルでパターン化して、その場所には電子線照射をしない等の対策は容易に考えられる。また、ナノ結晶の生体分子への結合状態によっては、ナノ結晶が生体高分子から比較的離れた距離(1-2nm 以上)でも運動を精確に伝達する場合もあり、より確実に直接的でない照射下での EBSP データ取得が可能になる。以上のような利点を考慮し、短い時間と限られた予算内で、それらの基礎検討を行い、基本的技術の確認は終了することができた。

今後、EBSP の高感度化を実現するためにナノ結晶が標識された目的1分子を基板に固定し、その周りが水溶液状態で満たされた耐久性の高い薄膜セルの開発が必要となる。セルの外側の膜には 10-20nm カーボン(C)膜が利用できることは実験的に確認済みである。現在までの実験で、C薄膜(厚さ 45nm)で覆われた金ナノ結晶(直径約 30nm)のサンプルに対して、1 点当りの取り込み時間 0.03 秒で、1nA ビームによって明確な菊池パターンを確認した。現状では試料上の各点に照射される電子の数(ドーズ量)は約 2×10^8 個になる。プローブ径が 5nm なので、単位面積($\text{\AA}^2$)当たりで 10^5 個の電子が衝突することになり、このドーズ量がすべて直接生体試料へ照射されればダメージは極めて深刻になる。先にも述べたが目的生体高分子の基板への吸着位置及び配向をナノテク加工した基板を用いて、生体高分子への電子線照射を全く無しにできる可能性がある点はX線技術と違いナノプローブの利点と言える。生体系へのダメージ低減のために、ナノビーム集光束技術による生体分子無照射効果と、検出器の改善による通常 EBSP 画像に比した照射量低減での結晶方位決定を実現し、電子顕微鏡で生体材料の破壊しきい値(試料面上) 0.1-0.2 electrons/

$\text{\AA}^2$ 以下の照射量でのEBSP動画計測を実現したと考えている。

やはり最大の主要技術は水溶液層が100–200nm程度の安定な薄膜水溶液セルの作製である。またC膜以外にもポリマー系薄膜を用いて可視領域1分子計測も併用できるような透明薄膜セルも検討した。将来的に細胞を取り扱う事を考えると200nm以上の厚さのセルでもバックグラウンドが上がらない照射条件も検討しなければならない。また、将来的には、機能計測を行えるようにサンプルホルダー周りの多機能化も必要と考えている。ストップドフロー法、パッチクランプ法併用等の利用可能なセルホルダーの作製も検討し、色々な機能計測が同時計測可能なシステムを今後完成させる予定である。

7. DXT自動測定と自動解析について

Automatic DXT Measurement System(Labview使用)と名づけられた自動測定ソフトは、手動時のサンプル測定頻度を3桁程度向上させることに成功した。今後、現在律速となっている画像保存部分の高速化などの問題解決を行い、より安定化した自動測定システムを確立する。

X線回折パターンは、実空間での運動モニターと違いフーリエ空間になるが直接的にフーリエ空間を利用した解析を使用することはない。実際、ステレオ投影と解釈して運動を解析した方が実空間との対応が想像しやすい。自動解析を目指して多くの画像解析ソフトの応用として、本DXTの解析を試みたが完成はしていない。自動解析ソフトの開発過程で明確になったのは、以外のDXTからの信号のバックグラウンドが高い点であった。ダイレクトX線位置を最高として放射状にバックグラウンドは下がっていくのだが、予想以上にS/Nが良くない。今後、より小さいナノ結晶観察や高速計測をここ見る場合に問題にある。対策としては、サンプルの薄膜化、スリット改造、ストッパー形状の改造、X線全反射現象の利用等が考えられる。少なくとも白色X線を利用していたBL44B2よりも擬似白色X線(少々幅のある単色X線)を用いたBL40XUの利用の方が、はるかにバックグラウンドが低いことも確認できた。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究において研究費と時間を一番費やしたのは、ナノ結晶の作製技術の確立であった。当初400度付近でNaCl基板から蒸発していた金原子は、最終的に810度まで加熱しても蒸発しない条件を決定することができた。当初は予想もしていなかった因子が関与していた。作製されたナノ結晶は、水溶液中においても安定に存在させなければならないが、その条件を出すのにも時間が費やされた。水溶液上で安定化したナノ結晶は多くの可能性がある。X線技術を離れても利用できる可能性がある。現在利用されている金コロイドの研究領域にそのまま置き換わる形で利用されるであろう。利点としては散乱能が高いこと、形状が明確であること、形状から来る表面反応性においても異方性があることなど多くの興味ある利点が予想される。現在、世界中の共同研究者に配付し、その完全結晶性や、特異的異方性の評価をしている。

多くの分子からの1分子動的挙動を計測することができた。中でも抗原抗体反応は、反応前と後での明確な分子運動の差異が認められた。今回はX線を用いた1分子計測での差異であったが、より小規模な装置構成で利用できるプローブでもその差異を検出できる可能性があり、抗原抗体反応の1分子検出が現実的に利用できる。このようにX線で初めて確認された1分子挙動が感度をあげた可視光の1分子計測でも工夫次第では確認できるだろう。このような意味においても、高精度性を誇るX線1分子計測の存在意義は大きい。

また、本研究において初めて確認されたX線放射圧の計測は多くの応用が期待できる。一番期待できるのは、現在のX線1分子計測の最大の欠点であるナノ結晶を標識しなければ測定できないという点の克服である。原子間顕微鏡の光テコのような表面の力計測から生体分子の構造が計測されているが、この力計測をナノ結晶が標識された光テコを用いて、より高感度に表面力計測することが可能になるかもしれない。それ以外の応用も光トラッピング技術で光圧を利用していることから類推できる。非常に期待される新現象である。

X線1分子計測法のもう1つの欠点は、安定な計測を実現するために、測定分子を基板等に固定配向させる点である。これは現状の検出器の計測速度(ミリ秒)レベルではどうにもならない。幸い

な事に、X線イメージングインテンシファイヤーの増幅機能が最近開発されたり、検出器後部に設置されているCCDカメラの高速化(マイクロ秒)が現実のものとなってきた。マイクロ秒の計測が可能になれば、従来のブラウン運動がほぼ止まってしまうので、基板の固定も必要なくなる。また、今回の測定においても運動が大きすぎてX線1分子計測のダイナミックレンジにはいきらない実験系が多々あったが、高速化することでより詳細な運動を計測できる能力のある本法は、その能力を存分に発揮できることになる。高速化こそX線1分子計測の次のターゲットである。

X線1分子計測の最後の弱点は、その解析に多くの時間を費やすことである。すべての回折斑点を肉眼で追跡し、現状、ルーチン的な解析方法がそれほど多く持っていない。解析の高速化の最大の何点は、高感度な自動画像解析ソフトの開発である。本研究時においても多くの画像解析の専門家と共同研究を行ったが、今だあらゆる回折点を追跡できるソフトの完成に至っていない。ルーチン化したソフト体系の早急の実現を図りたい。

3. 2 サブテーマ名2(福井大学 老木グループ)

(1)研究実施内容及び成果

K チャネルはあまねく生物界に存在する普遍的な膜蛋白分子である。カリウムイオンを選択的に透過できるための共通の構造(ポアドメイン)をもった数百種類の分子種がバクテリアからヒトまで存在する。数種類のKチャネルが同一細胞上に存在することもまれではない。Kチャネルは生体膜の電気化学的シグナル伝達に関与するという生物学的に重要な意味を持つ。個々の K チャネル分子種は、K 選択性ポアドメインという共通構造に加えて、膜電位などの物理的刺激やリガンドの化学刺激に応答できるようなセンサーを備えていることが、多様な分子機能を発現できる基礎となっている。

最近数年間で数種類のKチャネルの立体構造が得られた。これらの像から明らかになったことが2つある。一つは、ポアドメイン構造の高い共通性である。どのようなセンサーを備えた K チャネルであれ、またどのような生物種由来の K チャネルであれ、そのポアドメイン構造は高いカリウムイオン選択性と速いイオン透過速度を実現させるための、共通の立体構造をもつことが明らかになった。もう一つは、開・閉構造のチャネル分子種間の共通性である。得られた K チャネル結晶のあるものは閉状態(ポアドメインがイオン非透過構造にある)であり、他方、開状態(イオン透過構造)のものも解かれた。閉状態ではチャネルのヘリックス束が絞られた構造をとりイオン流を遮断する。また開状態のチャネルではヘリックスが折れ曲がり、絞られたヘリックス束が緩んで透過路が開放される(図1)。この2つの構造間で遷移すること(ゲーティング)でイオン流を制御している。

結晶構造として得られた開閉2つの構造は、ゲーティングというダイナミックな過程のはじまりと終わりを示すスナップショットである。2つの構造を結ぶ構造変化の軌跡をリアルタイムでたどることが、ゲーティングの分子機構を解明するための最重要課題である。このために1分子 X 線計測法を使

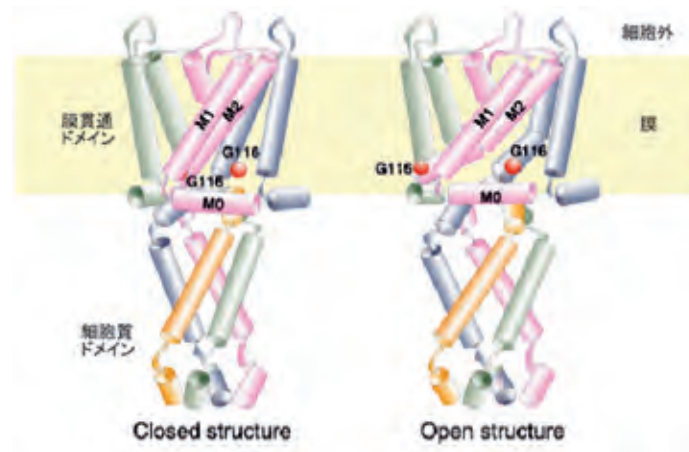


図1. KcsA チャネル構造模式図。4量体の各サブユニットごとに色分けした。膜貫通ドメインの M0, M1, M2 ヘリックスを示す。

った方法を確立し、チャネルのグローバルな開閉運動すなわちゲート運動を 1 分子レベルで捉えることに成功した。

本研究では実験対象として、構造と機能の関係が現在最も深く研究されつつあるKcsAチャネルを使った。KcsA チャネル(放線菌由来)は pH 依存性であり、ゲーティングをコントロールすることが容易である。

1. KcsA チャンネル表面露出残基とゲーティングによる露出度の変化

KcsA チャンネルでは、膜貫通ドメインの構造は高解像度で求められているが、細胞質ドメインは予想構造が得られているに過ぎない。DXT 法において金ナノ結晶を細胞質ドメインに結合させるに際し、露出度が高く反応性の高い残基を知る必要がある。これを探るために表面プラズモン共鳴法を使った新しい方法を開発した。

SH 基を持つ Cys 残基を KcsA チャンネルの様々な場所に導入し、Cys 残基の平坦面に対する接近し易さ(アクセシビリティ)を測定した。この測定には SH-Au カップリング反応を利用し、平坦面としてガラス基板上的金薄膜表面を用いた。KcsA チャンネルにシステイン走査変異を 25 箇所を導入した。図2に KcsA チャンネル(野生型・変異型)添加と SDS による洗浄による表面プラズモン共鳴 (SPR) シグナルを示す。野生型 KcsA チャンネルには Cys 残基が存在しないので特異的な結合はないが、161C 変異(C 末端残基の修飾)では有意な吸着がみられた。A133 残基は細胞質ドメインのコアに埋もれている。SPR シグナルの変化から定量的に SH-Au 反応を評価し、表面露出残基と pH 変化に伴う露出性の変化を捉えることに成功した。連続する数残基の表面露出パターンから 2 次構造が予想された。チャンネル閉状態(pH7.5)と比較してゲーティング状態(pH4)ではほとんどの細胞質ドメインにある残基が露出した(図3)。KcsA チャンネルの細胞質ドメインに比較的大きな構造変化が引き起こされることが示された。ゲーティングにより複数のコンフォメーションが引き起こされたこと、また細胞質ドメインが柔軟化したことが示唆された。

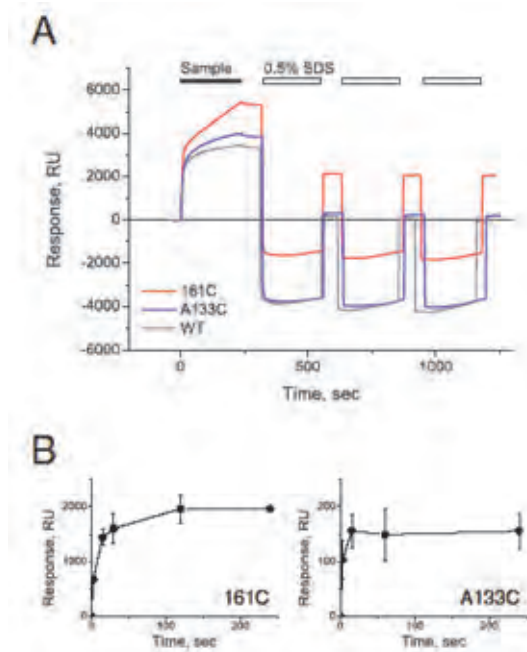


図2. A. システイン変異 KcsA チャンネルの金表面結合による表面プラズモン共鳴シグナル変化。B. 特異吸着の時間経過。一分以内に反応が起こっている。

2. ガラス基板への固定と原子間力顕微鏡による分子配向の確認

KcsA チャンネル分子の配向を決めて固定するために(図 4d, e)、細胞外ループでガラス基板上に結合させた(図 4a)。KcsA チャンネルはホモ 4 量体であるから 4 箇所固定することになり、倒立状態にあるはずである。これを原子間力顕微鏡で確認した(図 4b)。チャンネル分子の基板からの高さ分布は 10 nm にピークがあった。これは KcsA チャンネルの長径に一致し、倒立状態での固定を示した。

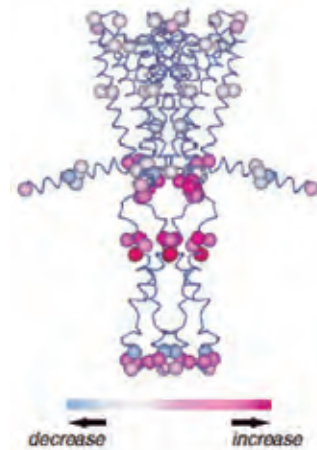


図3. KcsA チャンネルの残基露出パターン。閉状態から開状態への構造変化で露出度が高くなるものを赤で、低くなるものを青で示している。細胞質ドメインの変化が顕著である。

3. KcsA チャンネルへの特異的金結合

KcsA の C 末端を Cys に置換し、4つのシステイン残基で金結晶を結合させた。金コロイドが高いイオン強度では凝集し、特徴的な吸光度を失うことを利用し、導入した Cys 残基への特異的結合を確認した。

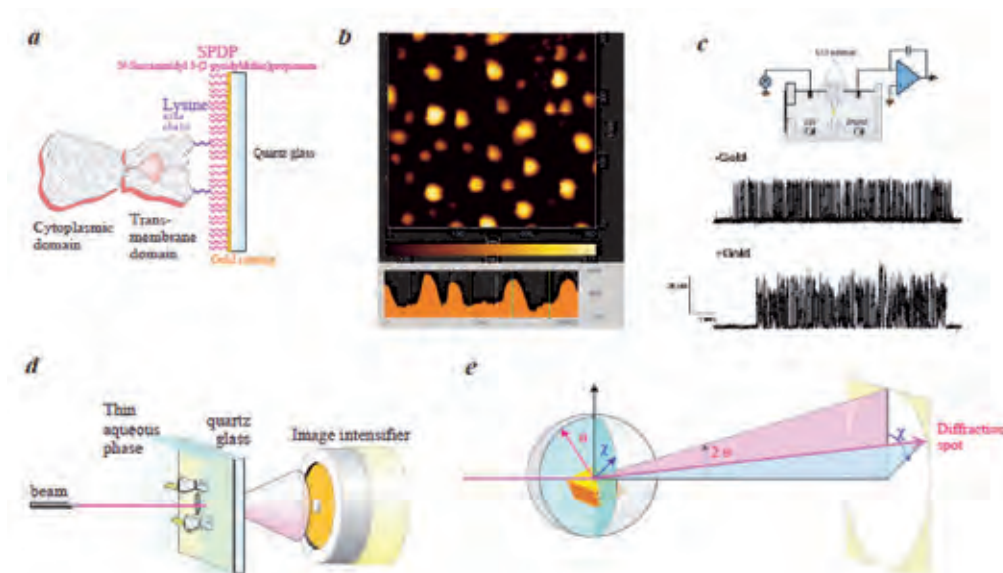


図 4. KcsA チャンネルの固定と DXT 測定。a. KcsA チャンネルのガラス基板への固定。b. 固定 KcsA チャンネルのAFM像。c. KcsA チャンネルの単一チャンネル電流。金ラベルなし(上トレース)とあり(下トレース)で大きなチャンネル活性の変化はない。d. 測定系の配置。放射光が薄い水相を透って基板に固定したチャンネルに到達する。e. 座標の定義。ナノ結晶の回転運動を χ 角で、ティルト運動を θ 角であらわす。

4. 閉状態でのブラウン運動

図 5a は回折点像である。図 5b では重ね焼きによるスポットの軌跡を示した。KcsA チャンネルは中性 pH では閉じている。この状態での DXT 測定では、従来の他の蛋白質に対する測定結果と同様、半径方向の回折点の動きが観察された(図 5a-c)。スポットの χ 角- θ 角空間での軌跡の全体像を図 5c に示す。スポットの時間的ゆらぎは χ 角(円周方向)、 θ 角(半径方向)の狭い範囲にとどまっている。個々のスポットの軌跡はランダムで独立であった。イメージインテンシファイア上の軌跡(a,b)では θ 角の動きが増幅され大きく見えるが、チャンネル分子の変位角として表すと、 χ 角にたいし θ 角がわずかに広い分布をしめした。図 5d ではスポットの始点を座標の原点とした。 θ 方向の動きの優位性が明らかである。KcsA チャンネルは長軸方向に折れ曲がるような傾き運動(ティルト運動)をしている。ただしその程度はごくわずかであった。

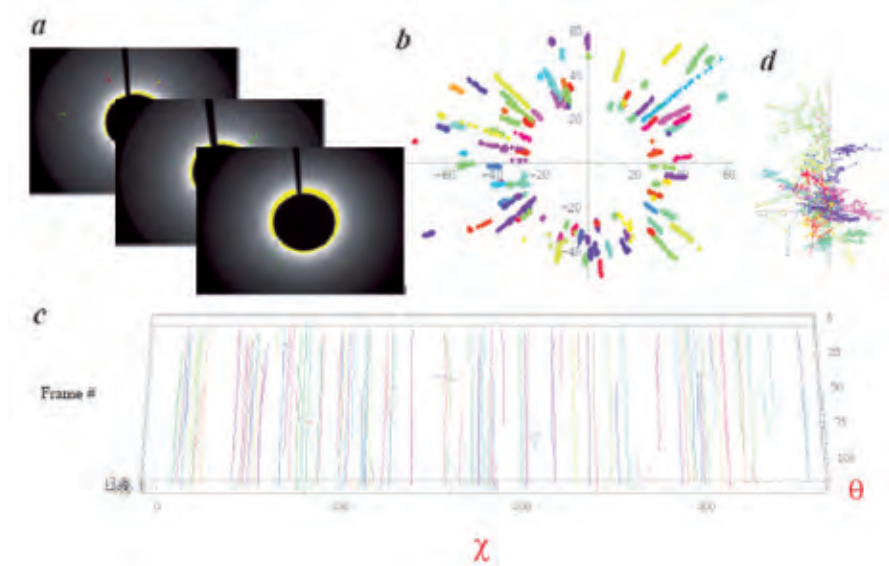


図5. 回折点運動。閉状態(pH 7.5)での測定。a. 回折スポットのスナップショット。b. 回折スポットの重ね焼き像。c. χ - θ - t 座標におけるスポットの軌跡。d. 回折スポット始点からの運動軌跡。

閉状態での運動を統計的に記述するために χ 角、 θ 角に対する平均自乗変位 (MSD) カーブを示す(図6)。横軸は運動開始後のフレーム数(ビデオレート)である。運動初期の MSD カーブには直線性があり、ブラウン運動であることが示唆される。初期の変位速度は χ 角、 θ 角ともに似た値を与えた。ところが 1 秒以内に変位の飽和が顕著に現れてきた。 χ 角すなわち回転運動の制限は強く、はきわめて狭い角度範囲に閉じ込められている。

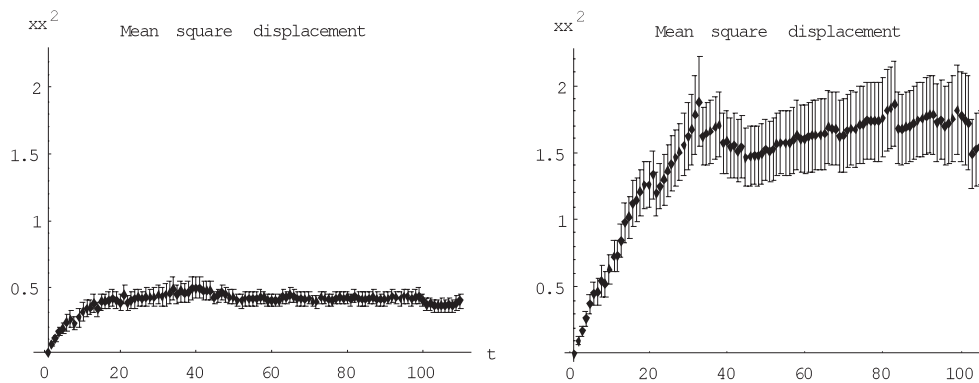


図6. 閉状態 KcsA チャンネル運動の χ 成分と θ 成分の平均自乗変位 (MSD) カーブ。横軸はビデオレートでのフレーム数。縦軸は角度。

5. ゲーティングにおける運動

pH 依存性 KcsA チャンネルは酸性(pH 4.0)で開確率が顕著に増大する。このことを単一チャンネル電流記録で確認した(図4c)。酸性 pH では活動的なゲーティングのさなか、回折スポットが円周運動をすることが明らかになった(図 7a-d)。これはチャンネル回転対称軸を回転軸としたねじれ運動で

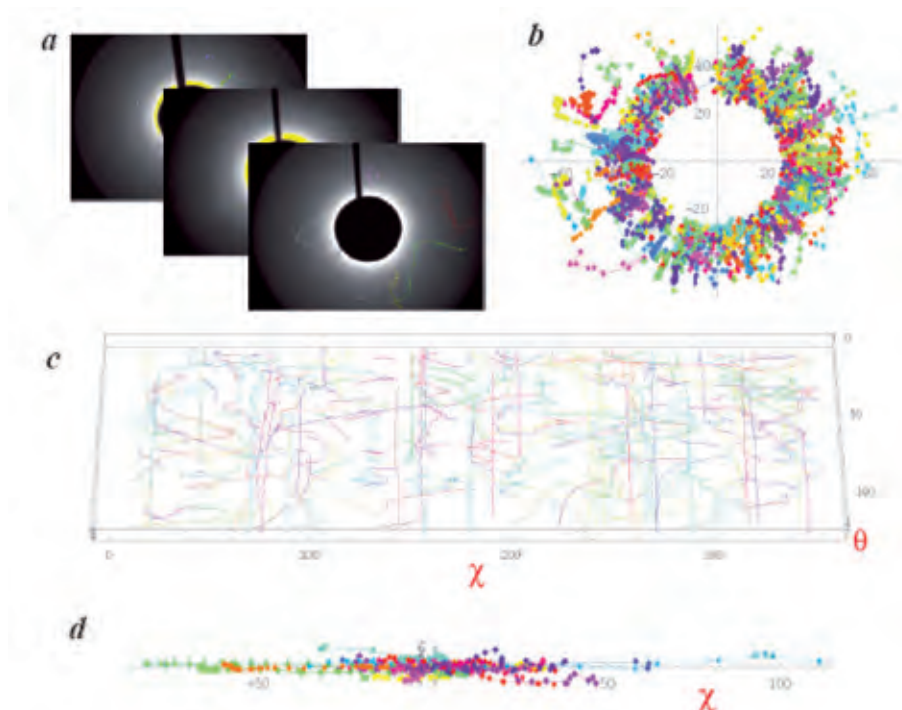


図 7. 回折点運動。ゲーティング状態(pH 4.0)での測定。a. 回折スポットのスナップショット。b. 回折スポットの重ね焼き像。c. χ - θ - t 座標におけるスポットの軌跡。 χ 方向の運動が高い頻度で見られる。d. 回折スポット始点からの運動軌跡。 χ 方向の運動が圧倒的に優位になっている。

ある。回転角は数十度にわたる幅広い分布を示したが(図 7d)、行き返りするものも見られた。

時計回り、反時計回りの間には有意な差はなかった。図7d は初期位置に対する記録最終点の相対位置を表す。中性 pH でのシャープな χ 分布に比べ、酸性 pH では大きく分布が広がっている。一方、 θ 角に関してはその分布にほとんど差がなかった。

この運動は、従来知られている M2 ヘリックスの折れ曲がりとそれによる C 末端側ヘリックスのスイングアウトによる開口を軸方向から眺めたものに相当する。KcsA チャンネルはホモ 4 量体であるので、個々のサブユニットにおけるヘリックスの折れ曲がり運動が回転対称性を持つチャンネルでは協同的な回転運動として実現することが初めて観察された。

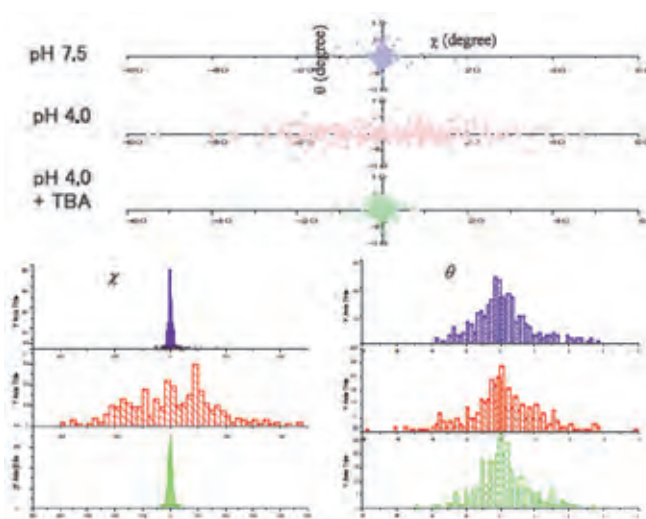


図 8. 回折スポットの到達点分布。A. χ 、 θ 角の到達点分布。B. χ 、 θ 角の到達点ヒストグラム。

6. 細胞質ドメイン削除 KcsA

細胞質ドメイン末端部で観察されるゲーティング中のねじれ運動が、チャネル分子のどこに起因するのかを明らかにするために、細胞質ドメインを削除したチャネルを作成した。M2ヘリックスの C 末端に金結晶をラベルして運動を観察した。pH 7.5 ではティルト運動が見られたが pH4.0 にすると絞り込み運動が見られた。細胞質ドメインの有無による運動様式の差はほとんど認められなかった。すなわち、pH4.0 での運動は細胞質ドメインの独立した運動をとらえているのではなく、膜貫通ドメインにおけるゲーティング運動をとらえていることが明らかになった。またこのゲーティング運動が細胞質ドメイン全体を動かしている、あるいは細胞質ドメインは受動的な動きをしていることが明らかになった。

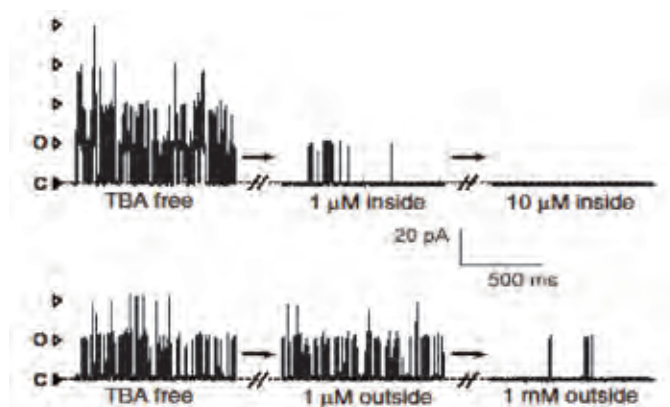


図 9. TBA による KcsA チャネル単一チャネル電流の阻害。脂質平面膜法による測定。

7. ブロッカーによるゲーティングの阻害

チャネルブロッカーはポアに結合し、イオン透過を遮断する。Tetrabutylammonium (TBA) は K チャネルの代表的なブロッカーで、ポアの中心空洞に結合しイオン流をブロックする。TBA 共存下の KcsA チャネル結晶構造では、

TBA がチャネルに結合した状態でゲートが閉じられたトラップ状態にある。ただしこのデータは pH6 付近というチャネルが閉状態での結果である。一方私たちはゲート活性化状態で TBA によりゲートが開状態にロックされることを SPR 法により明らかにした (Iwamoto et al. 2006)。

pH 4.0、TBA 存在下で DXT 測定を行った。細胞質ドメイン削除 KcsA チャネルでは絞り込み運動が消失するという結果を得た。SPR の結果と同様に、TBA 存在下ではゲートの動きがロックされていることを示している。さらに全長 KcsA チャネルで同様の実験を行った。細胞質ドメイン存在下でもやはりゲートの動きは停止していた。

ゲートを固定すれば細胞質ドメイン独自の運動がとらえられなかった。すなわち TBA 非存在下

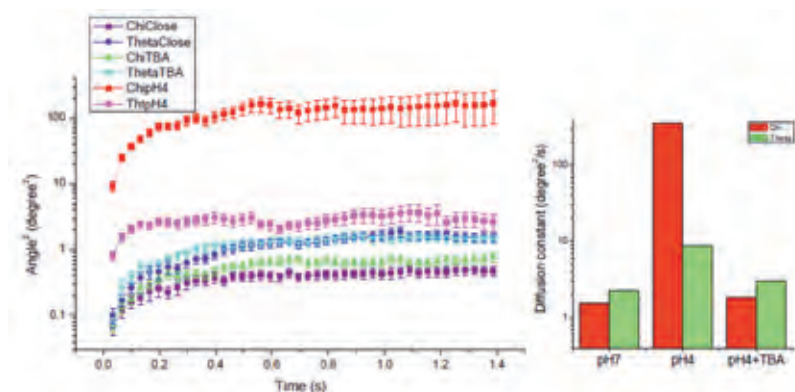


図 10. MSD カーブと拡散係数。pH 7.5 での値(紫: χ 角、紺: θ 角)と pH 4.0 (赤: χ 角、桃: θ 角)、および pH 4.0+TBA 存在下(緑: χ 角、青: θ 角)。

で観察されるねじれ運動はゲートヘリックスを起源とすることを明らかにした。全長 KcsA チャンネルで閉状態 (pH 7.5) と開状態 (pH 4.0 + TBA) での MSD カーブを比較した。線型部分から拡散係数を求めた。 χ 角、 θ 角ともに有意な差はなかった。TBA で開状態に固定されていることを示した。

8. 考察

今回得られた結果は、次の 2 点にまとめられる。

1) ゲーティングはねじれ運動である。

ゲーティングに伴うチャンネル分子の局所的構造変化を示唆する結果はいくつか報告されているが、チャンネル分子の開閉に伴うグローバルな構造変化を 1 分子レベルで捉えた報告は本研究が初めてである。実験を始める前に、今回捉えたねじれ運動は全く予想されなかった。しかしこの運動様式は従来の結晶構造の結果と対応するものであることが明らかである。これまでイオン流を遮断する構造 (ゲート) である内部ヘリックス (M2 ヘリックス) 束は、開口に際し各ヘリックスが中心部分でヒンジ折れ曲がり運動をする予想されてきた。ホモ 4 量体を形成し、4 回回転対称性をもつ KcsA チャンネルでは、このようなサブユニット内での構造変化が大域的に回転運動となる。

MSD カーブから得られる運動速度に関して、閉状態では χ 角と θ 角に大きな差がなかった。一方、ゲーティングにおける χ 角の回転速度は閉状態のゆらぎにくらべ格段に速くなった。この速度はチャンネル蛋白質構造変化のどの局面を現しているのだろうか。単一チャンネル電流記録においてチャンネル分子の構造変化の遷移過程を捉えることに成功した報告はない。単一チャンネル電流記録の時間分解能が最大数 100 kHz であることから、遷移自体を捉えることは不可能であると考えられている。一方、DXT 法では運動のジャンプではなく、連続的な動きが捉えられた。絞込み運動が等速運動ではなく、減衰を示すことから、回転運動に対するなんらかの力学的粘性項が作用していることが明らかであるが、その実体にたいして今後の研究が必要である。

2) 膜貫通ヘリックスのゲート運動は細胞質ドメインを伝播する

膜貫通ドメインのゲートの動きを捉えただけでなく、この運動がチャンネル分子全長にわたって、細胞内ドメインの末端まで波及していることが明らかになった。すでに SPR によって細胞質ドメイン独自の構造変化が酸性 pH で起こることを捉えている。細胞質ドメイン末端で捉えられた運動が膜貫通ドメイン近傍で捉えられた運動と大きく変わらないということから、膜貫通ドメインのゲート運動を細胞質ドメインはダンプすることなく分子末端まで伝えていることになる。

細胞質ドメインの大域的運動を捉えたのは本研究がはじめてである。この運動の機械的作用が膜近傍のイオン環境を変える可能性が示唆される。このことの生理的意義が今後考慮されなければならない。

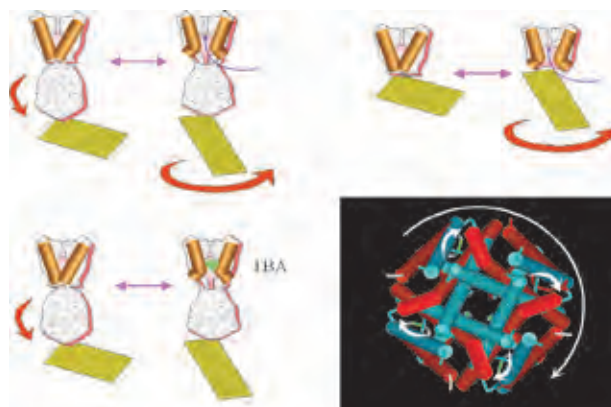


図 11. ゲーティングにおける KcsA チャンネルの運動様式。右下図は KcsA チャンネルの膜貫通ドメインを細胞質側から眺めたもの。青が閉構造の、赤が開構造のヘリックス構築。閉状態では M2 ヘリックスの細胞質側が絞られイオン流を遮断している。開状態では M2 ヘリックスが折れ曲がり、ヘリックス束の集束部が開放されイオンが流れる。このようなヘリックスの動きが 4 量体チャンネル全体としては回転絞込み運動となる。

9. チャネル機能・構造変化同時記録実験

X 線1分子計測法による立体構造変化の情報をもとに、現在1分子構造機能同時測定の実験を進めている。脂質平面膜に組み込んだ KcsA チャネルに薄い水溶液層を通して放射光を当て、単一チャネル電流と回折点の動きを同時記録するのである。水による X 線の散乱を最小限にとどめ信号雑音比を上げるために 400 μm 以下の厚さのチェンバーを開発し、安定な脂質平面膜を再現性よく張ることに成功した。KcsA チャネルを膜に再構成し単一チャネル電流を測定しつつ、放射光を照射した。繰り返し放射光を照射しても膜は安定で、チャネル電流も連続して記録できることが明らかになった。

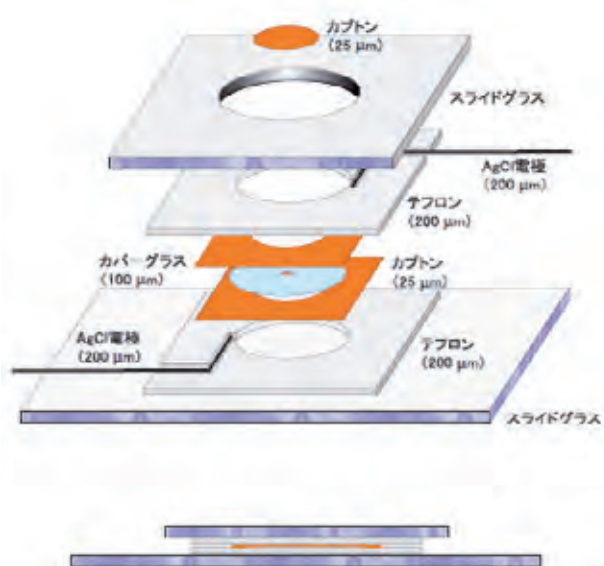


図12. DXT用極薄チェンバー。直径50 μm の穴に脂質平面膜を張り、両側に電解質溶液を満す。その厚みは200 μm 以下である。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究において、チャネルタンパク質分子の分子内運動を世界で初めてリアルタイム計測できた成果は、今後のチャネル研究に大きな軌跡を残したと言える。実際、初めてX線モニターの上でその運動を見たときの感動は忘れられない。多くの解析結果から現状不足するデータの質や、理解がまだ不十分な現象も認識できた。今後はX線1分子計測法実験の継続的な研究はもとより、可視光の1分子計測を用いた回転運動の全体像の把握、より積極的な回転運動の解析や利用を検討しなければならない。特に予想されていなかった大きな回転運動が、チャネルタンパク質分子全体の共通運動様式であるならば、チャネル自身の運動制御に新しい展開が可能になるのではと考えている。積極的な回転運動の利用を筆頭に今後のより包括的な研究展開を行う予定である。

電気生理実験という極めて電氣的なノイズに敏感な計測法を放射光施設という今までに行われたことのない環境で実現することに予想以上に時間を費やした。現在は放射光施設のハッチ内に置いて、全くなにも装置がない状態から約2-3時間程度あれば、1分子からの pA レベルの電流値を低ノイズ化で安定に計測できるセットアップが可能になった。近々、生体膜系の実験においてもルーチンのセットアップが可能になるであろう。多くのチャネルタンパク質分子への応用が期待できる。

次のサンプルとして期待されるのは、電位依存性チャネルである。電位依存性チャネルこそ膜タンパク質分子のもっとも重要な特徴を備えている。リガンド作動性チャネルは膜環境になくてもリガンドを結合しゲートを開閉することができるが、電位依存性チャネルは膜電位変化という物理的現象がゲートを制御しており、膜という環境でのみ意味のある働きをする。もう一つの利点は電気生理学的実験によって膜電位を自由にコントロールできるため動きをコントロールできるだけでなく、動きをフィードバックさせてチャネルゲートをコントロールできることである。これらの利点を踏まえて、電位依存性チャネルの変異体作製等を着実に進めていきたい。

3. 3 サブテーマ名3(名古屋大学大学院 岡本グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1分子の X 線回折実験解析のために、拡張アンサンブル法と総称される計算機シミュレーション法の適用を目的として研究を行った。タンパク質系のような多自由度複雑系では、系にエネルギー極小状態が無数に存在し、それらが高いエネルギー障壁で隔てられているため、計算機シミュレーションがそれらに留まってしまうという困難が存在した。従来のシミュレーション法を使う限り、結果が初期条件に強く依存したものとなって、信頼度が極めて低いものである。拡張アンサンブル法は、ポテンシャルエネルギー空間のランダムウォークを実現することによって、エネルギー極小状態からシミュレーションが脱出することを可能にする。そして、精度の高い予測結果を出すことが可能になる。拡張アンサンブル法には、マルチカノニカル法、焼き戻し法、レプリカ交換法などいろいろなものが存在するが、ここでは、我々が独自に開発した、レプリカ交換分子動力学法を適用することにした。

手法の有効性を確かめるためには、大規模な生体系よりも小規模な系で試す方が便利である。よって、我々は水中の小ペプチド系においてレプリカ交換法に基づく分子動力学シミュレーションを実行した。特に、1分子 X 線実験解析のためにつける金のクラスターの寄与を考察することを目的とした。実験で α ヘリックスを形成することが知られている、アミノ酸数19の小ペプチドにおいて、拡張アンサンブル法の一つである、レプリカ交換分子動力学法(REMD)に基づくシミュレーションを実行した。このペプチドのアミノ酸配列は YGKAAAKAAAKAAAKC である。このペプチドを半径 27 Å の TIP3P の水球(水分子の数は 2580 個)の中に入れ、48個のレプリカによる REMD シミュレーションを実行した。対応する48個の温度は 250 K から 700 K の間に分布させた。初期構造は完全に伸びた構造だった。まず、1分子 X 線測定のための末端を固定する影響を詳しく調べた。具体的には、ペプチドに何も拘束を与えない場合と、X 線 1 分子計測では固定する N 末端を固定した場合の二つのシミュレーションを行い、N 末端を固定することによる効果について調べた。REMD シミュレーション自体が成功したかどうかを確かめるために、ポテンシャルエネルギーの確率分布を調べたが、各隣合う分布が十分な重なりを持ち、REMD シミュレーションが成功したことが確認できた。図1に自由端の場合のポテンシャルエネルギーの確率分布を示す。

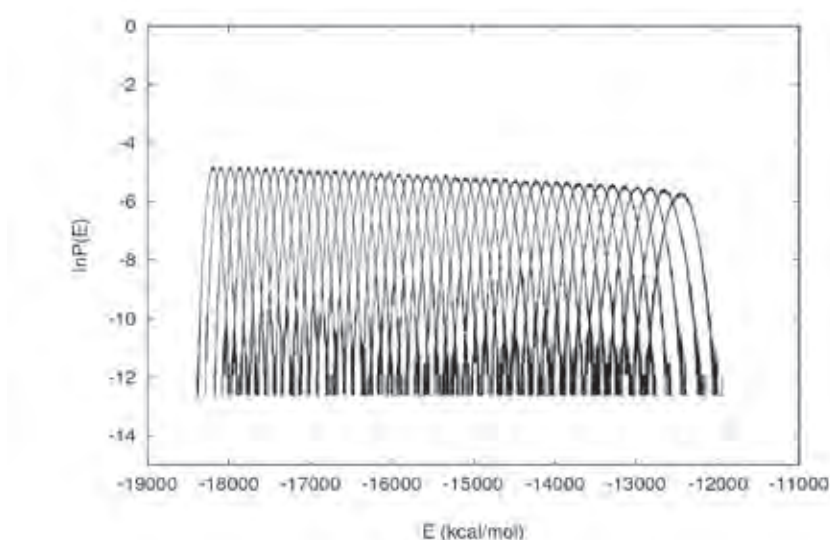


図1 レプリカ交換分子動力学シミュレーションにおけるポテンシャルエネルギーの確率分布。自由端の場合の48個の温度に対応する分布を示す

その結果、まず、いずれのシミュレーションにおいても α ヘリックスの最安定構造を再現することが出来た。図2に自由エネルギー最小状態の代表的な構造を示す。これは、通常のシミュレーションとは異なり、エネルギー局所状態に留まらず、広く構造空間をサンプリングできる拡張アンサンブル法を用いて初めてできることである。次に、主成分解析を用いて、それぞれの条件における自由エネルギー面を構築した。二つのシミュレーションから得られるそれぞれの自由エネルギー面を比較したところ、N 末端を固定することにより、分子の動きが制限されることがわかった。また、Ramachandran plot を解析したところ、N 末端の固定により局所的に運動が制限されるのではなく、分子全体の動きが制限されることがわかった。

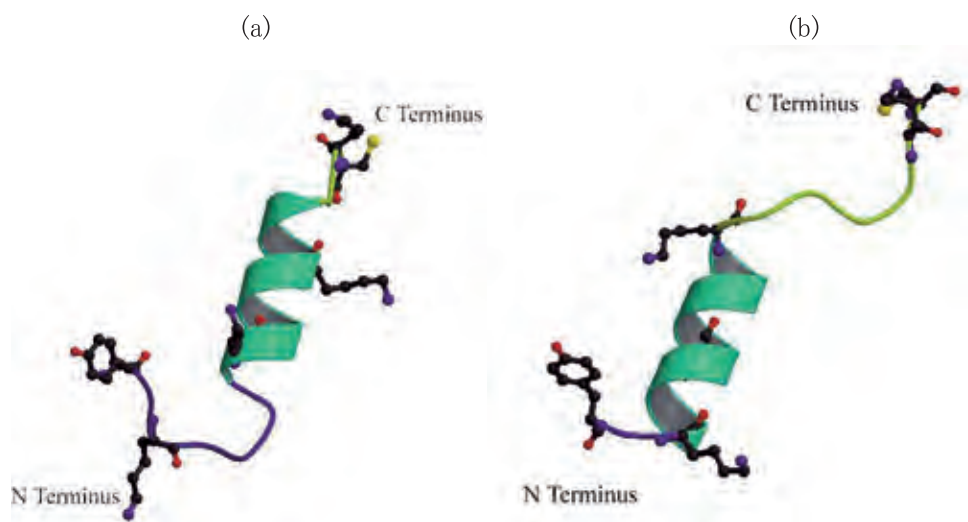


図2 自由エネルギー最小状態の代表的な構造 (a)自由端の場合 (b)固定端の場合

次に、X 線 1 分子計測において分子に結合させる金ナノ結晶の効果についても調べた。金ナノ結晶を Cys 残基の側鎖に結合させる効果として、簡単のために、Cys の側鎖の硫黄原子の質量を重くすることで近似した。そして、上の同様の REMD シミュレーションを実行した。その結果、この場合でも、 α ヘリックス構造が維持されることが確認された。図3に温度の関数としての α ヘリックス含量を示した。全ての場合に低温で α ヘリックス構造が維持されていることが分かる。特に、自由端の場合が最もヘリックス含量が一般的に低いことが分かる。高温では、自由端の場合はヘリックスが壊れ易いことが分かる。

我々は、更に2次元の主成分解析によって、自由エネルギー面を構築した。まず、自由エネルギー最小状態 (GM) は全て似たような α ヘリックス構造をしていることが判明した。また、自由端と固定端の場合はエネルギー極小状態 (LM) も見つかった。予想されるように、自由端から固定端、更に固定端と重い硫黄原子の場合と移るに従って、ペプチドの空間的な動きの幅が狭められていくことが判明した。

このようにレプリカ交換分子動力学シミュレーションによって、X 線 1 分子計測における分子の動的状態が詳しく調べられることを示すことができた。

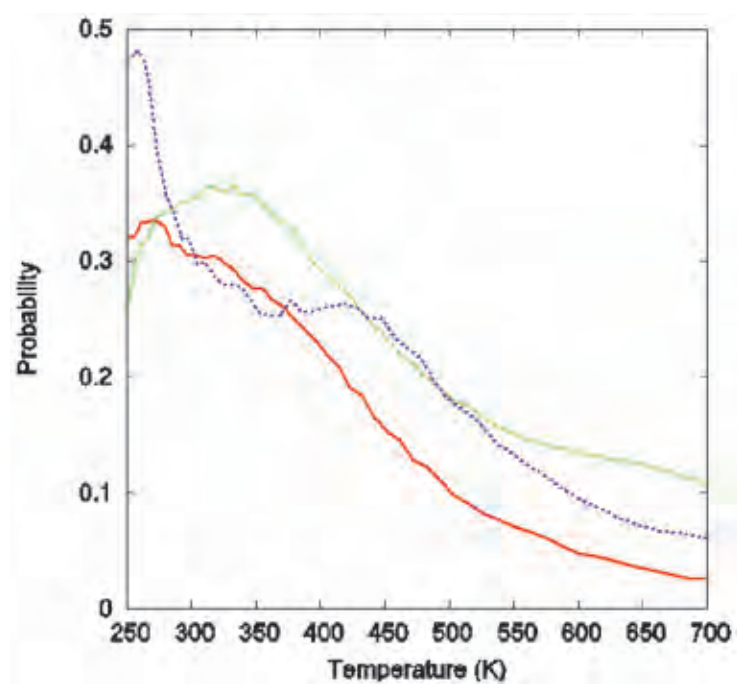


図3 温度の関数としてのアルファヘリックス含量。赤、緑、青色はそれぞれ自由端、固定端、固定および Cys の硫黄原子の質量を重くした場合に対応する。

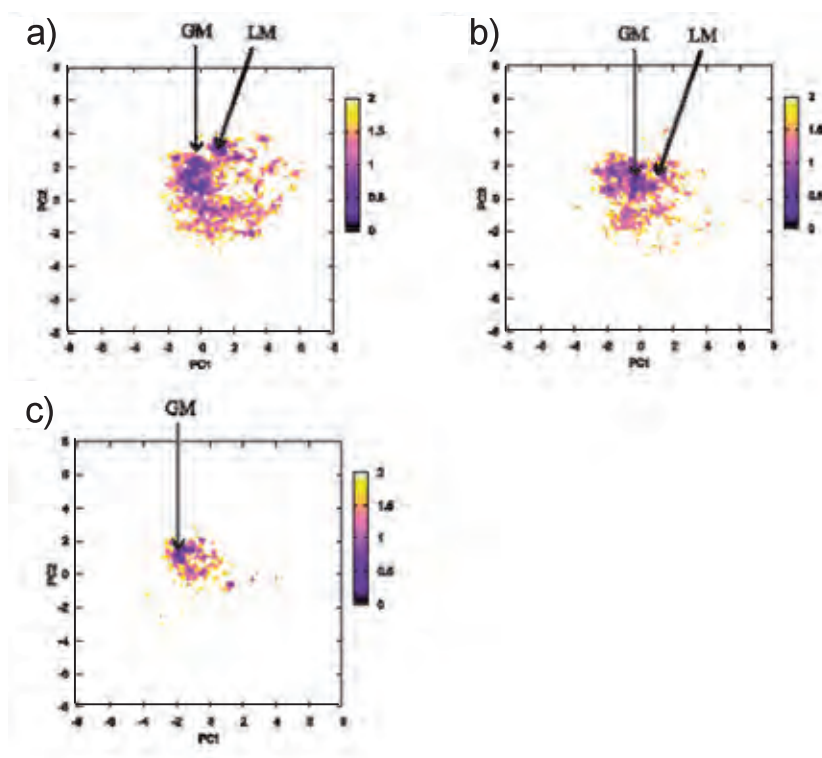


図4 温度 297K における自由エネルギー地形。(a), (b), (c)はそれぞれ自由端、固定端、固定および Cys の硫黄原子の質量を重くした場合に対応する

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究では、1分子の X 線回折実験の解析のために分子シミュレーション法を開発した。このように実験と計算を組み合わせる相補的なアプローチは今後いろいろな分野に広く使われていくことであろう。特に生体系では、その複雑さ故に計算機シミュレーションの結果の精度が悪く、実験家の参考になる程の信頼度がなかった。本研究で適用された、レプリカ交換分子動力学法などの強力な拡張アンサンブル法の導入によって、初めてシミュレーション結果の信頼性が高まったと言える。今後、レプリカ交換分子動力学法ばかりでなく、他の拡張アンサンブル法もこの問題に適用していきたい。

多自由度複雑系は生体系に限らず多くの分野に遍在する。それらは、実験及び理論的予測を絶望的に難しくしている。本研究で開発された手法、すなわち、実験と計算の結果を相補的に組み合わせることによって、ミクロの詳細までを精度良く調べる手法は、創薬などのバイオ関係の企業ばかりでなく、直接実験の難しい原子力関係の分野、災害予測の分野などの企業や公的研究機関で幅広く使われていくものと期待される。

4 研究参加者

① 佐々木裕次グループ

(X線1分子計測法の最適化、1分子、ナノ技術、バイオ関連技術の開発
ミメティック分子の開発)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
佐々木裕次	SPring-8/JASRI	主幹研究員	研究総括	H13.12～H19.3
奥村 泰章	SPring-8/JASRI	CREST 研究員	X線1分子計測の高度化	H13.12～H16.11
岡 俊彦	SPring-8/JASRI	研究員	高速X線計測実験	H14.4～H15.3
井上 勝晶	SPring-8/JASRI	研究員	高速X線計測実験	H14.4～H15.3
後藤 祐児	阪大/蛋白研	教授	フォールデング実験	H14.4～H15.3
日暮 卓志	SPring-8/JASRI	CREST 研究員	フォールデング実験	H14.4～H16.3
佐々木史子	JST	チーム事務員	研究事務	H14.6～H19.3
宮崎 拓也	SPring-8/JASRI	CREST 研究員	パッチクランプ法	H15.4～H17.2
須田 斎	東海大学	教授	筋肉系実験	H15.4～H19.3
大石 昇	帝京大学医学部	講師	筋肉系実験	H15.4～H19.3
石川 晃	日本大学文理学部	教授	電子顕微鏡学	H17.4～H19.3
佐川 琢麻	SPring-8/JASRI	CREST 研究員	X線1分子計測の高度化	H17.4～H19.3

② 老木成稔グループ (電気生理実験、ミメティック分子設計)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
老木 成稔	福井大学医学部	教授	電気生理学	H13.12～H19.3
今野 卓	福井大学医学部	助教授	電気生理学	H13.12～H19.3
清水 啓史	福井大学医学部	助手	電気生理学	H13.12～H19.3
山田 克幸	福井大学医学部	助手	電気生理学	H14.4～H15.9
井上 史子	福井大学医学部	研究補助員	電気生理学	H14.4～H18.3
岩本 真幸	福井大学医学部	CREST 研究員	電気生理学	H16.4～H19.3
安藤 博之	福井大学医学部	大学院生	電気生理学	H14.6～H16.11
後藤 妙子	福井大学医学部	事務員	電気生理学	H14.6～H19.3
土屋 賢一	福井大学医学部	医学部生	電気生理学	H14.6～H15.3
坂下清登志	福井大学医学部	医学部生	電気生理学	H14.6～H15.3
三田建一郎	福井大生医学部	医学部生	電気生理学	H14.6～H15.3

③ 岡本祐幸グループ (計算科学、特に新しい立体構造決定法関連)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
岡本 祐幸	名古屋大学大学院 理学研究科	教授	計算科学	H13.12～H19.3
川島 雪生	名古屋大学大学院 理学研究科	CREST 研究員	計算科学	H14.7～H18.6

5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 1 件、国際誌 48 件)

《著者、論文タイトル、掲載誌 巻、号、発行年》

1. Maeser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E. P., Shinmyo, A., Oiki, S., Schroeder, J. I., and Uozumi, N. : “Glycine residues in potassium-channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 6428-6433 (2002)
2. Yasuaki Okumura, Yoshio Taniguchi, Yuji C. Sasaki
“Dispersive One-Dimensional (Mo/Si) Nanocrystals for Single Molecular Detection System using x rays” *Journal of Applied Physics* 92, 7469-7474 (2002). 2002.12.15 号
3. Shimizu, H., Toyoshima, C. and Oiki, S:
“Interaction between Tetraethylammonium and Permeant Cations at the Inactivation Gate of the HERG Potassium Channel.” *Jpn. J. Physiol.* 53, 25-34, 2003
4. Kamatari, Y., Dobson, C. M. and Konno, T.:
“Structural dissection of alkaline-denatured pepsin.” *Protein Sci.* 12: 717-724, 2003.
5. Berthomieu, P., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Conéjéro, G., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Véry, A.-A., Sentenac, H. and Casse, F.:
“Functional analysis of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na^+ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance.” *EMBO J.* 22: 2004-14, 2003.
6. Mori, M., Konno, T., Morii, T., Nagayama, K., Imoto, K. : “Regulatory interaction of sodium channel IQ-motif with calmodulin C-terminal lobe” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 290-296 (2003)
7. Futaki, S., Zhang, Y., Kiwada, T., Yagami, T., Oiki, S. and Sugiura,
“Gramicidin-based Channel Systems for the Detection of Protein-ligand Interaction.” *Bioorg. Med. Chem.* 12: 1343-50, 2004.
8. Niraula TN, Konno T, Li H, Yamada H, Akasaka K, Tachibana H.
“Pressure-dissociable reversible assembly of intrinsically denatured lysozyme is a precursor for amyloid fibrils.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 4089-93, 2004
9. G. La Penna, A. Mitsutake, M. Masuya, and Y. Okamoto,
“Molecular dynamics of C-peptide of ribonuclease A studied by replica-exchange Monte Carlo method and diffusion theory,” *Chem. Phys. Lett.* 380, 609-619 (2003).
10. B. A. Berg, H. Noguchi, and Y. Okamoto, “Multi-overlap simulations for transitions between reference configurations,” *Phys. Rev. E* 68, 036126 (11 pages) (2003).
11. Y. Sakae and Y. Okamoto, “Optimization of protein force-field parameters with the Protein Data Bank,” *Chem. Phys. Lett.* 382, 626-636 (2003).
12. H. Kokubo and Y. Okamoto, “Prediction of transmembrane helix configurations by replica-exchange simulations,” *Chem. Phys. Lett.* 383, 397-402 (2004).
13. H. Okumura and Y. Okamoto, “Monte Carlo simulations in multibaric-multithermal ensemble,” *Chem. Phys. Lett.* 383, 403-408 (2004).
14. K. Murata, Y. Sugita, and Y. Okamoto, “Free energy of DNA base stacking studied by replica-exchange umbrella sampling,” *Chem. Phys. Lett.* 385, 1-8 (2004).
15. T. Yoda, Y. Sugita, and Y. Okamoto, “Comparisons of force fields for proteins by generalized-ensemble simulations,” *Chem. Phys. Lett.* 386, 460-467 (2004).

16. H. Kokubo and Y. Okamoto, "Prediction of membrane protein structures by replica-exchange Monte Carlo simulations: case of two helices," *J. Chem. Phys.* 120, 10837-10847 (2004).
17. H. Kokubo and Y. Okamoto, "Self-assembly of transmembrane helices of bacteriorhodopsin by a replica-exchange simulation," *Chem. Phys. Lett.* 392, 168-175 (2004).
18. A. Mitsutake and Y. Okamoto, "Replica-exchange extensions of simulated tempering method," *J. Chem. Phys.* 121, 2491-2504 (2004).
19. H. Okumura and Y. Okamoto, "Monte Carlo simulations in generalized isobaric-isothermal ensembles," *Phys. Rev. E* 70, 026702 (14 pages) (2004).
20. S.G. Itoh and Y. Okamoto, "Multi-overlap molecular dynamics methods for biomolecular systems," *Chem. Phys. Lett.* 400, 308-313 (2004).
21. T. Yoda, Y. Sugita, and Y. Okamoto, "Secondary-structure preferences of force fields for proteins evaluated by generalized-ensemble simulations," *Chem. Phys.* 307, 269-283 (2004).
22. Yasuaki Okumura, Toshihiko Oka, Yoshio Taniguchi, Yuji C. Sasaki
"Dynamical observations of membrane proteins: the case of Bacteriorhodopsin"
Proc. 8th international Conference on Synchrotron. Rad. Instrum 2004.5(1174-1177)
23. Yasuaki Okumura, Takuya Miyazaki, Yoshio Taniguchi, Yuji C. Sasaki
"Fabrications of dispersive gold one-dimensional nanocrystals using vacuum evaporation"
Thin Solid Films 2004.7
24. Yasuaki Okumura, Toshihiko Oka, Mikio Kataoka, Yoshio Taniguchi, Yuji C. Sasaki
"Picometer-scale dynamical observations of individual membrane proteins: the case of Bacteriorhodopsin" *Phys. Rev. E* 70, 1(2004)
25. Yuji C. Sasaki, Yasuaki Okumura, Noboru Ohishi
"Dynamical observations of local bio-molecular sites using nanocrystals"
Proc. 8th international Conference on Synchrotron. Rad. Instrum 2004(1023-1026)
26. Yuji C. Sasaki "Single protein molecular dynamics determined with ultra-high precision"
Biochem. Soc. Transactions 2004 32(761-763)
27. Konno, T., S. Oiki, K. Hasegawa and H. Naiki: "Anionic contribution for fibrous maturation of proto-fibrillar assemblies of human tau repeat domain in a fluoro-alcohol solution."
Biochemistry. 43, 13613-13620, 2004.
28. Kimura, T., Uzawa, T., Ishimiri, K., Morishima, I., Takahashi, S., Konno, T., Akiyama, S., Fujisawa, T. : "Specific collapse followed by slow hydrogen-bond formation of β -sheet in the folding of single-chain monellin" Proc. Natl. Acad. USA. 102 (2005)
29. Iwamoto, M. : "Correlation of the O-intermediate rate with the pKa of Asp-75 in the dark, the counterion of the Schiff base of pharaonis phoborhodopsin (sensory rhodopsin II)" Biophysical Journal. 88 (2005)
30. Konno, T., T. Morii, A. Hirata, S. Sato, S. Oiki, and K. Ikura: "Covalent blocking of fibril formation and aggregation of intracellular amyloidogenic proteins by transglutaminase-catalyzed intramolecular cross-linking." Biochemistry. 44, 2072-2079, 2005.
31. Konno, T., T. Morii, H. Shimizu, S. Oiki, and K. Ikura : "Paradoxical inhibition of protein aggregation and precipitation by transglutaminase-catalyzed intermolecular cross-linking." J. Biol. Chem. (2005)
32. Ando, H., Kuno, M., Shimizu, H., Muramatsu, I., Oiki, S. : "Coupled K⁺-Water Flux through the HERG Potassium Channel Measured by a Osmotic Pulse Method." J. Gen. Physiol. , Volume 126, Number 5, 529-538 2005
33. Yuji Sugita, Yuko Okamoto: "Molecular mechanism for stabilizing a short helical peptide studied by generalized-ensemble simulations with explicit solvent" Biophysical Journal, Vol. 88, pp. 3180-3190 (2005)
34. Katsumi Murata, Yuji Sugita, Yuko Okamoto: "Molecular dynamics simulations of DNA dimers based on replica-exchange umbrella sampling. I. Test of sampling efficiency" Journal of Theoretical and Computational Chemistry, Vol. 4, pp. 411-432 (2005)
35. Katsumi Murata, Yuji Sugita, Yuko Okamoto: "Molecular dynamics simulations of DNA dimers based on replica-exchange umbrella sampling. II. Free energy analysis" Journal of Theoretical and Computational Chemistry, Vol. 4, pp. 433-448 (2005)
36. Koji Yoshida, Toshio Yamaguchi, Yuko Okamoto: "Replica-exchange molecular dynamics

- simulation of small peptide in water and in ethanol”
Chemical Physics Letters, Vol. 412, pp. 280-284 (2005)
37. Masamichi Nishino, Yuji Sugita, Takao Yoda, Yuko Okamoto: “Structures of a peptide fragment of beta2-microglobulin studied by replica-exchange molecular dynamics simulations - towards the understanding of the mechanism of amyloid formation”
FEBS Letters, Vol. 579, pp. 5425-5429 (2005)
 38. Yukio Kawashima, Yuji Sugita, Takao Yoda, Yuko Okamoto: “Effects of the fixed end in single-molecule imaging techniques: A replica-exchange molecular dynamics study”
Chemical Physics Letters, Vol. 414, pp. 449-455 (2005)
 39. H. Kida, T. Miyoshi, K. Manabe, N. Takahashi, T. Konno, S. Ueda, T. Chiba, T. Shimizu, Y. Okada and S. Morishima. : “Role of Aquaporin-3 water channels in volume-regulatory water flow in a human epithelial cell line”. J. Membrane Biol. 208 (2005)
 40. Hisashi Okumura, Yuko Okamoto: “Effects of the fixed end in single-molecule imaging techniques: A replica-exchange molecular dynamics study”
Journal of Computational Chemistry, Vol. 27, pp. 379-395 (2006)
 41. Satoru G. Itoh, Yuko Okamoto: “Theoretical studies of transition states by the multi-overlap molecular dynamics methods” Journal of Chemical Physics, Vol. 124, 104103 (14 pages) (2006)
 42. Yuji C Sasaki, Yasuaki Okumura, Takuya Miyazaki, Takashi Higurashi, Noboru Oishi:
“Observations of x-ray radiation pressure force on individual gold nanocrystals”
APPLIED PHYSICS LETTERS Vol. 89, Issue 5, 053121(2006)
 43. Masayuki Iwamoto, Hirofumi Shimizu, Fumiko Inoue, Takashi Konno , Yuji C. Sasaki , Shigetoshi Oiki : “Surface structure and its dynamic rearrangements of the KcsA potassium channel upon gating and tetrabutylammonium blocking”
The Journal of Biological Chemistry, Vol. 281, Issue 38, 28379-28386(2006)
 44. Yuki Sudo, Masaki Yamabi, Shinnosuke Kato, Chisa Hasegawa, Masayuki Iwamoto, Kazumi Shimono, Naoki Kamo : “Importance of specific hydrogen bonds of archaeal rhodopsins for the binding to the transducer protein” Journal of Molecular Biology, 357, 1274-1282(2006)
 45. Yoshitake Sakae, Yuko Okamoto “Secondary-structure design of proteins by a backbone torsion energy” Journal of Physical Society of Japan, Vol. 75, 054802 (9 pages) (2006)
 46. Hironori Kokubo, Yuko Okamoto : “Replica-exchange methods and predictions of helix configurations of membrane proteins” Molecular Simulation, Vol. 32, 791-801 (2006)
 47. T. Sagawa, Y. C. Sasaki, T. Azuma: “Dynamical regulations of protein-ligand bindings at single molecular level” Biochemical and Biophysical Research Communications (2007), in press.
 48. Y. Kawashima, Y.C. Sasaki, Y. Sugita, T. Yoda, Y. Okamoto : “Replica-exchange molecular dynamics simulation of diffracted X-ray tracking” Molecular Simulation (2007), in press.
 49. 小久保裕功、岡本祐幸：「拡張アンサンブル法による膜タンパク質の立体構造予測」
統計数理第 54 巻第 2 号 211－222 (2006)

(2)その他の著作物(総説、書籍などを記載してください。)

1. Tanaka, N., Ikeda, C., Kanaori, K., Hiraga, K., Konno, T & Kunugi, S.
“Fluctuation of apomyoglobin monitored from H/D exchange and proteolysis under high pressure” in Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology (ed. R. Hayashi) Elsevier Science (2002)
- 2 佐々木裕次
“X線1分子計測” 日本生理学会誌(実験方法の紹介) 2003 年 6 月号
3. 佐々木裕次
“ピコメーター精度の生体1分子構造変化計測”
応用物理学会 応用物理(先端計測関連の特集号) 2003 年 8 月号
4. 佐々木裕次
“動的単分子X線解析” 蛋白質核酸酵素、2004 年8月号増刊

5. 佐々木裕次
“X線1分子計測によるタンパク質の動的構造・解析”
BIONICS 2004 年3月号(オーム社)
6. Y. Okamoto, “Generalized-ensemble algorithms: enhanced sampling techniques for Monte Carlo and molecular dynamics simulations,”
J. Mol. Graphics Modell. 22, 425-439 May(2004).
7. 佐々木裕次
“ナノ結晶をプローブとした X 線1分子計測法” 放射光 2005 年5月号 第 18 巻 3 号
8. 佐々木裕次
“X 線を用いた1分子計測法” 熱測定 Vol.32,No.3(2005)
9. 佐々木裕次
“高質ナノ結晶作製で実現したX線1分子計測” 日本結晶学会誌 Vol.47 No.5, 354-360 (2005)
10. 老木成稔
“電位依存性イオンチャネル:K チャネル” 生物物理学ハンドブック 朝倉書店(2005)
11. 佐々木裕次
“X 線が可能にした1分子内構造変化計測” 表面科学会誌 2006 年5月号
12. 岡本祐幸
“生体系における大規模分子シミュレーション” 応用数理 16, 9月号, 15-19 (2006)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

学会名(学会場所)	タイトル	発表者・所属	月日
第 15 回日本放射光学会年会 東京大学物性研究所 (千葉県柏市)	生体・機能性1分子における光異 性化反応の実時間構造変化計測	奥村泰章 信州大 学,SPring-8/JASRI,JST/CREST, 日 本学術振興会	2001.1.12
第 15 回日本放射光学会年会 東京大学物性研究所 (千葉県柏市)	F-アクチンを用いた分子内局部揺 らぎ実時間計測	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2002.1.12
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting(Cold Spring Harbor Laboratory,NY,USA)	X-RAY SINGLE MOLECULAR OBSERVATIONS OF BETA2-MICROGLOBULIN	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2002.5.4
Gordon Research Conference IL CIOCCO Centro Internazionale (55020 Castelveccchio Pascoli, Lucca , Italy)	X-RAY SINGLE MOLECULAR OBSERVATIONS OF BACTERIORHODOPSIN	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2002.5.26- 29
第2回日本蛋白質科学会 名古屋国際会議場(愛知県 名古屋市)	X線による1分子局部極微運動 実時間計測	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2002.6.13
第2回日本蛋白質科学会 名古屋国際会議場(愛知県 名古屋市)	X線1分子法によるb2-ミクログロブ リンの遅い構造揺らぎ計測	日暮卓志 JST/CREST,大阪大学蛋 白質研究所	2002.6.14

第2回日本蛋白質科学会 名古屋国際会議場(愛知県 名古屋市)	バクテリオロドプシンの光異性化 反応による1分子内揺らぎ計測	奥村泰章 信州大 学,SPring-8/JASRI,JST/CREST, 日 本学術振興会	2002.6.13
Crystal Chemistry of New Materials&Soft Matter IUCr-2002Satellite Meeting(ILL-ESRF) Grenoble FRANCE	Real-Time X-ray Observations of Single Bio-Molecule	奥村泰章 信州大学, SPring-8/JASRI,JST/CREST, 日本学術振興会	2002.8.1
X-TOP 2002 Centre Paul Langevin(CAES-CNRS) Aussois FRANCE	Dynamical Observations of Individual Protein Molecules Using X-rays	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2002.9.12
第 75 回日本生化学会大会 国立京都国際会館(京都市 左京区宝ヶ池)	X線1分子計測でタンパク質分子 内構造変化を見る	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2002.10.16
日本生物物理学会第 40 回 年会 名古屋大学東山地区(名古 屋市千種区不老町)	1分子に局部標識したナノ結晶の 運動特性	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2002.11.4
日本生物物理学会第 40 回 年会 名古屋大学東山地区(名古 屋市千種区不老町)	蛋白質構造形成反応のリアルタイ ム1分子観察の試み: β 2-ミクログ ロブリンをモデルとして	日暮卓志 JST/CREST,大阪大学蛋 白質研究所	2002.11.4
2002 ANNUAL MEETING (THE AMERICAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY) Moscone Convention Center(San Francisco,CA USA)	POSSIBILITY OF IN-VIVO X-RAY SINGLE MOLECULAR OBSERVATIONS	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2002.12.18
第 16 回日本放射光学会年 会 イーグレひめじ(兵庫県名 姫路市)	タンパク質1分子とナノ結晶の結合 数	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2003.1.10
第 16 回日本放射光学会年 会 イーグレひめじ(兵庫県名 姫路市)	タンパク質フォールディング現象を1 分子で追う	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2003.1.10
47th Annual Meeting (Biophysical Society) San Antonio Convention Center(San Antonio,Texas USA)	Real time observation of individual beta2-microglobulin unfolding and refolding equilibrium using X-ray diffraction	日暮卓志 JST/CREST,大阪大学蛋 白質研究所	2003.3.3
47th Annual Meeting (Biophysical Society) San Antonio Convention Center(San Antonio,Texas USA)	INDIVIDUAL PROTEIN MOLECULES AND LABELED NANOCRYSTALS	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2003.3.4
47th Annual Meeting (Biophysical Society) San Antonio Convention Center(San Antonio,Texas USA)	Single Molecular Observations of Bacteriorhodopsin :Remains of Conformational Changes	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST,大阪 大学蛋白質研究所	2003.3.5

5th European Symposium of The Protein Society PALAZZO DEI CONGRESSI (Florence, ITALY)	THE RELATIONSHIP BETWEEN INDIVIDUAL PROTEINS AND THE LABELED CONDITIONS OF NANOCRYSTALS	佐々木裕次 SPring-8/JASRI, JST/CREST, 大阪大学蛋白質研究所	2003.3.30
5th European Symposium of The Protein Society PALAZZO DEI CONGRESSI (Florence, ITALY)	Real time observation of unfolding and refolding equilibrium of beta2-microglobulin single molecule using X-ray diffraction	日暮卓志 JST/CREST, 大阪大学蛋白質研究所	2003.4.1
分子科学研究所研究会 ロドプシンの分子科学 (愛知県岡崎市 岡崎コンファレンスセンター)	膜タンパク質1分子の構造変化をX線で高精度に計測する	佐々木裕次 SPring-8/JASRI, JST/CREST	2003.5.30
第3回日本蛋白質科学会 年会 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)	シャペロニン GroEL 構造変化の1分子計測	宮崎拓也 JST/CREST, Spring-8/JASRI	2003.6.23
第3回日本蛋白質科学会 年会 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)	光サイクルにおけるバクテリオロドプシン1分子ダイナミクス	奥村泰章 信州大学, Spring-8/JASRI, JST/CREST, 日本学術振興会	2003.6.23
第3回日本蛋白質科学会 年会 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)	タンパク質の運動様式から機能が読めるか?(X線1分子計測の試み)	佐々木裕次 SPring-8/JASRI, JST/CREST	2003.6.25
第3回日本蛋白質科学会 年会 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)	b2-ミクログロブリン1分子のフォールディング反応観察の試み	日暮卓志 JST/CREST, Spring-8/JASRI	2003.6.25
第30回生体分子科学討論会 京都大学理学部(京都市左京区北白川追分町)	X線でタンパク質1分子内運動を精確に計測する	佐々木裕次 SPring-8/JASRI, JST/CREST	2003.6.28-29
17th Symposium of The Protein Society Marriott Copley Place (Boston, USA)	Dynamical Observations of Individual Protein Molecules Using X-rays	佐々木裕次 SPring-8/JASRI, JST/CREST	2003.7.29
8th INTERNATIONAL CONFERENCE ON SYNCHROTRON RADIATION INSTRUMENTATION Yerba Buena Arts Center (San Francisco, USA)	Dynamical Observations of Local Bio-molecular Sites using Nanocrystals	佐々木裕次 SPring-8/JASRI, JST/CREST	2003.8.26
日本生物物理学会第41回 年会 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟市万代島)	X線1分子測定で追うシャペロニン GroEL の揺らぎ DXT analysis of chaperonin GroEL fluctuation	宮崎拓也 JST/CREST, Spring-8/JASRI	2003.9.

日本生物物理学会第41回 年会 朱鷺メッセ新潟コンベンショ ンセンター(新潟市万代島)	光吸収による生体1分子の極微振 動現象	奥村泰章 信州大 学,SPring-8/JASRI,JST/CREST, 日 本学術振興会	2003.9.
9th Single Molecule Detection and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences Pico Quant GmbH WISTA Campus(Berlin,GERMANY)	Dynamical Observations of Individual Single Protein Molecules Using X-rays	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST	2003.9.24
日本生物物理学会第41回 年会 朱鷺メッセ新潟コンベンショ ンセンター(新潟市万代島)	ナノ粒子-タンパク質分子複合体 の動的挙動	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST	2003.9.
International Symposium "New Horizons in Molecular Sciences and Systems: An Integrated Approach" (万 国津梁館:沖縄県名護市喜 瀬 1792)	Single Protein Molecular Dynamics Determined Ultra-high Precision	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST	2003.10.17
全科展 in 大阪 2003(第 19 回) インテックス大阪 6 号館 A・ B ゾーン:大阪府大阪市住之 江区南港北 1-5-102	Picometer-scale Dynamical Observations of Individual Protein Molecules Using X-rays	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST	2003.10.
生理学研究所研究会「電子 位相顕微鏡法の医学的・生 物学的应用-超分子・細胞 のナノ形態生理」岡崎コン ファレンスセンター(愛知県 岡崎市)	ピコメーター(pm)レベルの動的1 分子構造情報を得るには?	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST	2003.12.09
分子研研究会「生体分子ダ イナミクスと機能・立体構造 形成研究会」岡崎コンファ レンスセンター(愛知県岡崎 市)	X線を用いた動的1分子計測法の 考案	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST	2003.12.24
第 17 回日本放射光学会年 会 放射光科学合同シンポ ジウム,物質・材料研究機構 千現地区・つくば国際会議 場(茨城県つくば市)	ハイブリッド分子のブラウン運動1 分子解析	佐々木裕次 SPring-8/JASRI,JST/CREST	2004.1.9-1 0
第 17 回日本放射光学会年 会 放射光科学合同シンポ ジウム,物質・材料研究機構 千現地区・つくば国際会議 場(茨城県つくば市)	X 線1分子観測による分子シャペ ロン GroEL の揺らぎ	宮崎拓也 JST/CREST,SPring-8/JASRI	2004.1.9-1 0
第 17 回日本放射光学会年 会 放射光科学合同シンポ ジウム,物質・材料研究機構 千現地区・つくば国際会議 場(茨城県つくば市)	光吸収発光過程における生体 1 分子の構造ダイナミクス	奥村泰章 信州大 学,SPring-8/JASRI,JST/CREST, 日 本学術振興会	2004.1.9-1 0

第 17 回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム,物質・材料研究機構 千現地区・つくば国際会議場(茨城県つくば市)	X線を用いた蛋白質 1 分子の構造形成反応計測	日暮卓志 JST/CREST,SPRing-8/JASRI	2004.1.9-10
International Symposium on Portable Synchrotron Light Sources and Advanced Applications (滋賀県草津市 立命館大学びわこ・くさつキャンパス)	Dynamical Observations of Individual Protein Molecules using X-rays	佐々木裕次 SPRing-8/JASRI,JST/CREST	2004.1.13-14
The Third CCLRC (Council for Central Laboratory of the Research Councils)-JASRI Symposium	Dynamical Observations of Individual Protein Molecules using X-rays	佐々木裕次 SPRing-8/JASRI,JST/CREST	2004.1.15
応用物理学会分科会 バイオテクノロジー(愛知県名古屋市)	生体1分子の構造変化はどの精度まで計測できるか?	佐々木裕次 SPRing-8/JASRI,JST/CREST	2004.1.23
Biophysical Society 48th Annual Meeting Baltimore Convention Center(Baltimore,USA)	ATOMIC-SCALE PROPAGATED BROWNIAN FLUCTUATIONS FROM PROTEIN MOLECULES TO SINGLE NANOPARTICLES	佐々木裕次 SPRing-8/JASRI,JST/CREST	2004.2.14-18
Biophysical Society 48th Annual Meeting Baltimore Convention Center(Baltimore,USA)	Diffraction X-ray Tracking Analysis of Chaperonin GroEL Fluctuation	宮崎拓也 JST/CREST,SPRing-8/JASRI	2004.2.14-18
東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 セミナー	生体1分子内の運動はどこまで精確に計測できるか?	佐々木裕次 SPRing-8/JASRI,JST/CREST	2004.3.12
京都大学 再生医科学研究 所 セミナー	生体1分子内の運動を精確に計測し機能を読む	佐々木裕次 SPRing-8/JASRI,JST/CREST	2004.3.30
The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)	Effect of Chaperonin GroEL Fluctuation by Nucleotide	宮崎拓也 (JST/CREST)	2004.4.16
The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)	ATOMIC-SCALE PROPAGATED BROWNIAN FLUCTUATIONS FROM ACTIN FILAMENTS TO SINGLE NANOPARTICLES	奥村泰章 (JST/CREST)	2004.4.16
2004 WORKSHOP ON ULTRAFAST X-RAY SCIENCE(サンディエゴ,USA)	Towards in-vivo Dynamical observations of single molecules using X-rays	佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JST/CREST)	2004.4.30

第 81 回日本生理学会年会 シンポジウム(札幌)	イオンチャネルの構造機能相関： 結晶時代の電気生理学	老木成稔、清水啓史(福井大学、 JST/CREST)	2004.6.2
第 81 回日本生理学会年会 シンポジウム(札幌)	非電解質の KcsA チャネルゲーテ ィングに対する非対称効果	清水啓史、老木成稔(福井大学、 JST/CREST)	2004.6.2
Gordon Research Conference: Computational Chemistry(New Hampshire/U.S.A.)	Protein force fields: comparisons and improvements	Y. Okamoto(分子科学研究所、JST /CREST)	2004.7
Bio Science 2004 – from molecules to organisms (グ ラスゴー、UK)	Single protein molecular Dynamics Determined with Ultra-high Precision	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、 JST/CREST)	2004.7.18
Bio Science 2004 – from molecules to organisms (グ ラスゴー、UK)	Single protein molecular Dynamics Determined with Ultra-high Precision	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、 JST/CREST)	2004.7.18
生物物理 夏の学校	X線1分子計測によるタンパク質動 的構造・機能解析	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、 JST/CREST)	2004.8.5
18th Symp. Protein Soc. "Protein Structure, Function and Disease"(サン ディエゴ,USA)	Single molecular Dynamics of Folded and Unfolded Proteins Determined Ultra-high Precision	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、 JST/CREST)	2004.8.17
5th Intl. Conf. Biological Physics ICBP2004 Chalmers Conf. Cent. (Gothenburg, Sweden)	ATOMIC-SCALE DYNAMICAL SINGLE MOLECULAR OBSERVATIONS USING X-RAYS	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、 JST/CREST)	2004.8.14- 18
5th Intl. Conf. Biological Physics ICBP2004 Chalmers Conf. Cent. (Gothenburg, Sweden)	Single Bio-Molecular Fluctuations due to Light Absorption	奥村泰章 1、宮崎拓也 1、佐々木裕 次 2(1:JST/CREST、2: JST/CREST,SPring-8/JASRI)	2004.8.23- 27
5th Intl. Conf. Biological Physics ICBP2004 Chalmers Conf. Cent. (Gothenburg, Sweden)	Single Molecular Analysis of Chaperonin GroEL Fluctuations under Nucleotides	Takuya Miyazaki1,Yasuaki Okumura1,Yasushi Kawata2,Yuji C. Sasaki3(1:JST/CREST、2:Tottori Univ.,3:JST/CREST, SPring-8/JASRI)	2004.8.23- 26
第 11 回「生命をはかる」研 究会 日本コンベンションセンタ ー国際会議室(幕張)	蛋白質1分子内運動の計測精度 はどこまでいくか？	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、 JST/CREST)	2004.9.3
The 4th KIAS Conference on Protein Structure and Function(Seoul/Korea)	Prediction of transmembrane helix configurations of membrane proteins by replica-exchange simulations	Y. Okamoto(分子科学研究所、JST /CREST)	2004.9
XTOP2004 7th Biennial Conference on High Resolution X-Ray	SINGLE PROTEIN MOLECULAR DYNAMICS DETERMINED WITH ULTRA-HIGH PRECISION	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、 JST/CREST)	2004.9.7

Diffraction and Imaging Congress Center (Pruhonice near Prague, Czech Republic)			
UK Synchrotron Radiation User Meeting 2004, House Conference Center (Milton Hill near Oxford, UK)	DYNAMICAL OBSERVATIONS OF SINGLE PROTEIN MOLECULES USING X-RAYS	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2004.9.14
International Workshop on Physics of Soft Matter Complexes (TOKYO)	Generalized-ensemble simulations of soft matter systems	Y. Okamoto (分子科学研究所、JST/CREST)	2004.11.
情報計算化学生物学会 (CBI学会) セミナー (東京)	Protein folding と大規模計算	岡本祐幸 (分子科学研究所、JST/CREST)	2004.12
第 42 回日本生物物理学会 年会 (京都)	レプリカ交換法を用いた X 線 1 分子計測法によるたんぱく質の構造解析のシミュレーション	川島雪生 1、杉田有治、依田隆夫、岡本祐幸 1、佐々木裕次 2 (1: 分子科学研究所、JST/CREST・2: SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2004.12
Biophysical Society 49th Annual Meeting (Long Beach, USA)	OBSERVATIONS OF X-RAY RADIATION PRESSURE FORCE USING X-RAY SINGLE MOLECULAR METHOD	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2004.12.12
日本生物物理学会第 42 回 年会 (国立京都国際会館)	光吸収による蛋白質 1 分子の構造揺らぎと機能活性	奥村泰章、佐々木裕次、宮崎拓也 (SPring-8/JASRI JST/CREST)	2004.12.13
日本生物物理学会第 42 回 年会 (国立京都国際会館)	1 分子計測から見たヌクレオチドの結合による GroEL の揺らぎ変化	宮崎拓也 1、奥村泰章 1、河田康志 2、佐々木裕次 1 (1: SPring-8/JASRI JST/CREST、2: 鳥取大学・工学部)	2004.12.13
日本生物物理学会第 42 回 年会 (国立京都国際会館)	X 線照射時に 1 分子への力場を確認	佐々木裕次、宮崎拓也 (SPring-8/JASRI JST/CREST)	2004.12.13
生物物理学会第 42 回 年会 (京都)	非電解質の中心空洞へのアクセスは KcsA カリウムチャネルの開確率を増大させる	清水啓史、井上史子、今野卓、老木成稔 (福井大学、JST/CREST)	2004.12.13 -15
生物物理学会第 42 回 年会 (京都)	タウ蛋白質リピートドメインの繊維性凝集における陰イオンの寄与	今野卓、老木 成稔 (福井大学、JST/CREST)、長谷川一浩、内木宏延	2004.12.13 -15
第 18 回日本放射光学会 年会 放射光科学合同シンポジウム (サンメッセ鳥栖)	X 線 1 分子計測による分子シャペロン GroEL のヌクレオチド結合の影響	宮崎拓也 1、奥村泰章 1、河田康志 2、佐々木裕次 1 (1: SPring-8/JASRI JST/CREST、2: 鳥取大学・工学部)	2005.1.8
第 18 回日本放射光学会 年会 放射光科学合同シンポジウム (サンメッセ鳥栖)	X 線 1 分子計測法による X 線放射圧の計測	佐々木裕次、宮崎拓也 (SPring-8/JASRI JST/CREST)	2005.1.8

CENTER FOR NANOSCALE MATHERIALS SEMINAR APS (Argonne, USA)	TOWARDS in-vivo DYNAMICAL OBSERVATIONS OF SINGLE PROTEIN MOLECULES USING X-RAYS	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2005.2.9
CENTER FOR NANOSCALE MATHERIALS イリノイ大学 UIUC (Champaign-Urbana, USA)	DYNAMICAL OBSERVATIONS OF SINGLE PROTEIN MOLECULES USING X-RAYS	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2005.2.10
NAREGI ナノサイエンス実証研究 第3回公開シンポジウム(岡崎)	レプリカ交換 MD 法によるたんぱく質の X 線 1 分子計測法にシミュレーション	川島雪生 1、杉田有治、依田隆夫、岡本祐幸 1、佐々木裕次 2(1: 分子科学研究所、JST/CREST・2: SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2005.2.
第1回日本生物物理学会中部支部討論会(名古屋)	たんぱく質の X 線 1 分子計測シミュレーション	川島雪生 1、杉田有治、依田隆夫、岡本祐幸 1、佐々木裕次 2(1: 分子科学研究所、JST/CREST・2: SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2005.3.
第1回 SPring-8 ユーザーズミーティング	X線1分子計測からの in-vivo 蛋白質動的構造 / 機能解析	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2005.3.16
Nano Bionics III—from Molecules to Applications Castle of Rauischholzhausen (Rauischholzhausen near Marburg ,Germany)	ATOMIC-SCALE PROPAGATED BROWNIAN FLUCTUATIONS FROM PROTEIN MOLECULES TO SINGLE NANOPARTICLES	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2005.4.4
VIth European Symposium of The Protein Society Fira Palace Hotel(Barcelona,Spain)	DYNAMICAL OBSERVATIONS OF INDIVIDUAL SINGLE MEMBRANE PROTEIN MOLECULES AT WORK USING X-RAYS	佐々木裕次 (SPring-8/JASRI、JST/CREST)	2005.5.2
US-Japan Symposium on Folding and Design (Philadelphia/USA)	Generalized-ensemble simulations of protein folding	Yuko Okamoto (Nagoya Univ., JST/CREST)	2005.5.2-5
Jpn. J. Physiol. 55, Supple.	Probing cytoplasmic domain of single KcsA channel by use of surface plasmon resonance signal and planar lipid bilayer.	Iwamoto, M., Simizu, H., Inoue, F., Konno, T., Sasaki, Y., Oiki, S. (福井大学、JST/CREST)	2005.5.18
Jpn. J. Physiol. 55, Supple.	A novel method for the streaming potential under the whole-cell patch-clamp configuration.	Ando, H., Kuno, M., Shimizu, H., Muramatsu, I., Oiki, S. (福井大学、JST/CREST)	2005.5.18
Jpn. J. Physiol. 55, Supple.	Unique temperature dependence of the voltage-gated proton channel: two-phase behavior with a variable transition temperature.	Kuno, M., Morihata, H., Mori, H., Kawawaki, J., Sakai, H., Shimizu, H., Oiki, S. (福井大学、JST/CREST)	2005.5.18

2005 International Conference on Scientific Computation and Differential Equations (Nagoya/Japan)	Molecular dynamics simulations of protein folding	Yuko Okamoto (Nagoya Univ., JST/CREST)	2005.5.23-27
CECAM Workshop: Rugged Free Energy Landscapes (Lyon/France)	Rugged free energy landscapes of protein systems studied by generalized-ensemble simulations	Yuko Okamoto (Nagoya Univ., JST/CREST)	2005.6.6-8
1st NAREGI International Nanoscience Conference (Nara/Japan)	Nanosimulation of protein folding	Yuko Okamoto (Nagoya Univ., JST/CREST)	2005.6.14-17
The 1st CRIS International Symposium on Computational Science and Neuroscience (Sapporo/Japan)	Generalized-ensemble algorithms and protein folding simulations	Yuko Okamoto (Nagoya Univ., JST/CREST)	2005.6.14-17
分子研研究会「ロドプシンの仲間・G蛋白質共役型レセプターの機能と構造」岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)	膜タンパク質分子のピコレベル運動1分子計測(バクテリオロドプシンの場合)	佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JST/CREST)	2005.6.17
30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference Eötvös University Convention Center (Budapest, Hungary)	TOWARDS in-vivo DYNAMICAL OBSERVATIONS OF INDIVIDUAL PROTEIN MEMBRANE USING X-RAYS	佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JST/CREST)	2005.7.4
Colby-Sawyer College (New London, USA)	TOWARDS in-vivo DYNAMICAL OBSERVATIONS OF SINGLE PROTEIN MOLECULES USING X-RAYS	佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JST/CREST)	2005.8.8-11
15th IUPAB & 5th EBSA International Biophysics Congress (モンペリエ, フランス)	DYNAMICAL HIGH-ACCURACY OBSERVATIONS OF INDIVIDUAL SINGLE MEMBRANE PROTEIN MOLECULES USING X-RAYS	佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JST/CREST)	2005.8.29
第1回バイオナノ研究会(松島)	短いタンパク質の折り畳みシミュレーション	岡本祐幸 (名古屋大学, JST/CREST)	2005.9.8
名古屋大学情報連携基盤センター連続講演会第一回(名古屋)	スパコンによるタンパク質折り畳みのシミュレーション	岡本祐幸 (名古屋大学, JST/CREST)	2005.9.30
生理学研究所研究会「細胞シグナリングの時空間統御機構解明への方略探索」	Probing cytoplasmic domain of single KcsA channel by use of surface plasmon resonance signal and planar lipid bilayer.	Ando, H., Kuno, M., Shimizu, H., Muramatsu, I., Oiki, S. (福井大学, JST/CREST)	2005.10.6
10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine (Hersonissos Crete, Greece)	TOWARDS in-vivo OBSERVATIONS OF INDIVIDUAL FUNCTIONAL MEMBRANE PROTEINS USING X-RAYS	佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JST/CREST)	2005.10.13

第8回横幹技術フォーラム (東京)	短いタンパク質の折り畳みシミュレーション	岡本祐幸 (名古屋大学, JST/CREST)	2005.11.14
第25回表面科学講演大会 大宮ソニックシティ(さいたま市)	X線が可能にする機能性1分子の 分子内構造変化計測	佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JTS/CREST)	2005.11.18
日本生物物理学会第43回 年会(札幌市)	X線1分子計測を用いた抗原抗体 反応の揺らぎ評価	佐川琢麻 (JST/CREST) 東隆親(東 京理科大、生命科学、生命情報) 佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JTS/CREST)	2005.11.23
生物物理学会第43回年会 (札幌)	全細胞パッチクランプ下での流動 電位測定法の開発と HERG カリウ ムチャネルにおける透過イオンと 水分子の流束比	安藤博之、清水啓史、老木成稔 (福井大学、JST/CREST)	2005.11.24
生物物理学会第43回年会 (札幌)	表面プラズモン共鳴シグナルを利用 した KcsA チャネル細胞質ドメイ ンに関する研究	岩本真幸、清水啓史、井上史子、今 野卓(福井大学、JST/CREST)、 佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JST/CREST)、老木成稔 (福井大 学、JST/CREST)	2005.11.24
第19回分子シミュレーショ ン討論会(岡崎)	タンパク質折り畳みの分子シミュ レーション	岡本祐幸 (名古屋大学, JST/CREST)	2005.11.30
International Symposium on Frontiers of Computational Science 2005	All-atom protein force fields for folding simulations	Yuko Okamoto (Nagoya Univ., JST/CREST)	2005.12.13
第35回日本免疫学会総会 (横浜)	糖尿病誘導性 I-Ag7/peptide の1 分子レベルでの動きの解析	槇田純一(東京理科大、生命科学、 生命情報)佐川琢麻(JST/CREST) 東隆親(東京理科大、生命科学、生 命情報)金川修身(理化学研、免疫 アレルギー、自己免疫制御)小園晴生 (東京理科大、生命科学、生命情報)	2005.12.14
第10回シミュレーション・サ イエンス・シンポジウム(土 岐)	タンパク質折り畳みの計算機シミュ レーション	岡本祐幸 (名古屋大学, JST/CREST)	2006.1.11
統合バイオサイエンスセン ター5周年記念シンポジウ ム(岡崎)	拡張アンサンブルシミュレーション による膜タンパク質の立体構造予 測	岡本祐幸 (名古屋大学, JST/CREST)	2006.2.8
Biophysical Society's 50th Annual Meeting (Salt Lake City, Utah、 USA)	Dynamical single molecular observations of real-time structural fluctuations in antigen-antibody interactions.	佐川琢麻 (JST/CREST) 東隆親(東 京理科大、生命科学、生命情報) 佐々木裕次 (SPRing-8/JASRI, JTS/CREST)	2006.2.19
50th Biophysical Society Annual Meeting (Solt Lake City/USA)	Surface Accessibility of the Cytoplasmic Domain of KcsA Channel Evaluted by Surface Plasmon Resonance Signal.	Iwamoto, M., Simizu, H., Inoue, F., Konno, T., Sasaki, Y., Oiki, S. (福 井大学、JST/CREST)	2006.2.20

第 83 回日本生理学会年会 (群馬)	ゲーティングに伴う KcsA カリウム チャネル細胞質ドメインの構造変 化	岩本真幸、清水啓史、井上史子、今 野卓(福井大学、JST/CREST)、 佐々木裕次(SPring-8/JASRI、 JST/CREST)、老木成稔(福井大 学、JST/CREST)	2006.3.28
2006 NCTS Spring Workshop on Critical Phenomena and Complex Systems (Taipei, Taiwan)	Generalized-ensemble algorithms for protein folding	岡本祐幸(名古屋大学, JST/CREST)	2006.4.1
第2回「計算科学による新 たな知の発見・統合・創出」 シンポジウム(つくば)	超高速計算機によるタンパク質の 立体構造予測	岡本祐幸(名古屋大学, JST/CREST)	2006.4.5
第6回 日本蛋白質科学会 年会(京都)	X 線 1 分子計測による抗体分子の 構造揺らぎ評価	佐川琢麻(SPring-8/JASRI JST/CREST)、東 隆親(東京理 科大、生命科学、生命情報) 佐々木 裕次(SPring-8/JASRI JST/CREST)	2006.4.24
第6回 日本蛋白質科学会 年会(京都)	病理的蛋白質凝集における生化学 的修飾効果	今野卓(福井大学、JST/CREST)、 平田晃義(京都大学)、老木成稔 (福井大学、JST/CREST)、伊倉宏 司、森井孝(京都大学)	2006.4.25
WE-Heraeus-Seminar “Biomolecular Simulation: From Physical Principles to Biological Function” (Bad Honorf, Germany)	Generalized-ensemble simulations and protein force fields	岡本祐幸(名古屋大学, JST/CREST)	2006.5.24
Symposium on Progress and Future Prospects in Molecular Dynamics Simulations – In Memory of Professor Shuichi Nose’ – (Yokohama)	Generalized-ensemble algorithms for molecular dynamics simulations	岡本祐幸(名古屋大学, JST/CREST)	2006.6.6
Symposium on Progress and Future Prospects in Molecular Dynamics Simulations – In Memory of Professor Shuichi Nose’ – (Yokohama)	Simulation of Diffracted X-ray Tracking	川島雪生(名古屋大学, JST/CREST)	2006.6.7
von Neumann Symposium: From Computational Biophysics to Systems Biology (Juelich, Germany)	Generalized-ensemble algorithms and membrane protein structure predictions	岡本祐幸(名古屋大学, JST/CREST)	2006.6.9
12-th ICRP Satellite Meeting: Structure, Function & Evolution of Rhodopsins (Nagoya)	Transmembrane configurations of bacteriorhodopsin predicted by replica-exchange simulations	岡本祐幸(名古屋大学, JST/CREST)	2006.6.12
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (京都)	Dynamical single molecule observations of real-time antibody structural fluctuations by antigen binding.	佐川琢麻(SPring-8/JASRI JST/CREST)、東 隆親(東京理 科大、生命科学、生命情報) 佐々木裕次(SPring-8/JASRI JST/CREST)	2006.6.20

ENCOUNTER with MATHEMATICS 第37回 「数学者のための分子生物学入門」	タンパク質の折り畳みに関する最適化問題	岡本祐幸 (名古屋大学, JST/CREST)	2006.7.1
Bio Science 2006 (Glasgow,UK)	High-Accuracy Dynamical Observations of Single Membrane Proteins with X-rays	佐々木裕次 (SPRING-8/JASRI, JTS/CREST)	2006.7.27
XTOP2006 (ハーデンハーデン, ドイツ)	DYNAMICAL OBSERVATIONS OF SINGLE MEMBRANE PROTEINS WITH X-RAY	佐々木裕次 (SPRING-8/JASRI, JTS/CREST)	2006.9.20
福井大学 21 世紀 COE「生体画像医学の総合研究プログラム」ワークショップ(福井)	Dynamic rearrangements of the surface structure of KcsA potassium channel evaluated by surface plasmon resonance signal	Masayuki Iwamoto, Hirofumi Shimizu, Fumiko Inoue, Takashi Konno (福井大学, JST/CREST), Amiko Niihei (セイコーインスツルメント), Yuji C. Sasaki (SPRING-8/JASRI, JST/CREST), Shigetoshi Oiki (福井大学, JST/CREST)	2006.9.24
生理学研究所研究会「膜機能分子ダイナミクス of 分子機構解明に向けて」	KcsA チャネルのゲーティングによる構造変化	老木成稔、清水啓史、岩本真幸、今野卓(福井大学, JST/CREST)、佐々木裕次 (SPRING-8/JASRI, JST/CREST)	2006.9.29
第 44 回日本生物物理学会 年会、沖縄	Biochemical modification of pathological protein aggregation	Takashi Konno 1, Akiyoshi Hirata 2, Shigetoshi Oiki 1, Koji Ikura 3, Takashi Morii 2, (1 Dept of Biophysics, Univ. Fukui, JST/CREST), 2 Inst. Of Advanced Energy, Kyoto Univ., 3 Dept. of Applied Biology, Kyoto Inst. Of Tech.)	2006.11.14
第 44 回日本生物物理学会 年会、沖縄	Normal Mode Analysis of Small Membrane Polypeptide	Takaharu Mrii 1, Hironori Kokubo 2, Hirofumi Shimizu 3, Masayuki Iwamoto 3, Shigetoshi Oiki 3, Yuko Okamoto 1 (1 Dept. of physics, Magoya Univ., Dept. of Chemistry, Univ. of Houston, Dept. of Mol. Physiol. Biophys., Univ. of Fukui, JST/CREST)	2006.11.14
第 44 回日本生物物理学会 年会、沖縄	Single-molecular gating dynamics of KcsA potassium channel measured by diffracted X-ray tracking	Hirofumi Shimizu 1,2, Masayuki Iwamoto 1,2, Fumiko Inoue 1,2, Takashi Konno 1,2, Yuji C. Sasaki 1,3, Shigetoshi Oiki 1,2 (1 JST/CREST SASAKI-Team, 2 Dept of Mol Physiology Biophysics, Faculty of Medical Science, Univ Of Fukui, 3 JST/JASRI)	2006.11.14

第44回日本生物物理学会 年会、沖縄	Changes in surface exposing sites of the KcsA potassium channel upon active gating: Effect of a channel blocker, tetrabutylammonium(TBA)	Masayuki Iwamoto 1,3, Hirofumi Shimizu 1,3, Fumiko Inoue 1,3, Takashi Konno 1,3, Yuji C. Sasaki 2,3, Shigetoshi Oiki 1,3 (1 JST/CREST SASAKI-Team,3 Dept of Mol Physiology Biophysics, Faculty of Medical Science, Univ Of Fukui, 3JST/JASRI)	2006.11.14
第44回日本生物物理学会 年会、沖縄	Multiple time scales in the folding dynamics of single chain monellin revealed by single molecule measurements	Akio Maeda 1, Masahito Kinoshita 1, Kiyoto Kamagata 1, Takashi Konno 2, Yuji Goto 1, Satoshi Takahashi 1,3(1 Institute for Protein Research, Osaka University, 2 Faculty of Medical Science, Fukui University, CREST/JST)	2006.11.14
Laue2007(グルノーブル、フラン ス)	Dynamical Observations of Individual Membrane Proteins with X-rays and Measurements of X-ray Radiation Pressure Force	佐々木裕次(SPring-8/JASRI、 JTS/CREST)	2007.1.26
The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society (Baltimore, USA).	Effect of gating and tetrabutylammonium (TBA) blocking on the surface structure of KcsA potassium channel	Masayuki Iwamoto 1,3, Hirofumi Shimizu 1,3, Fumiko Inoue 1,3, Takashi Konno 1,3, Yuji C. Sasaki 2,3, Shigetoshi Oiki 1,3 (1 JST/CREST SASAKI-Team,3 Dept of Mol Physiology Biophysics, Faculty of Medical Science, Univ Of Fukui, 3JST/JASRI)	2007.3.4
The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society (Baltimore, USA).	Single-molecular measurement of pH-sensitive gating dynamics of KcsA potassium channel by Diffracted X-ray Tracking (DXT)	Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Fumiko Inoue, Takashi Konno,(福井大学、JST/CREST) Yuji C. Sasaki, (Spring-8/JASRY、 JST/CREST) Shigetoshi Oiki(福井 大学、JST/CREST)	2007.3.4
The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society (Baltimore, USA).	Quantification of protein-ligand bindings from structural fluctuations of single molecules	佐々木 裕次(SPring-8/JASRI JST/CREST)、佐川 琢麻 (SPring-8/JASRI JST/CREST)、 東 隆親(東京理科大、生命科学、 生命情報)	2007.3.5
The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society (Baltimore, USA).	Single Molecular Damage Evaluation with X-rays	佐々木裕次(SPring-8/JASRI、 JTS/CREST)	2007.3.5

- ① 招待講演 (国内会議 15 件、国際会議 14 件)
 ② 口頭発表 (国内会議 21 件、国際会議 17 件)
 ③ ポスター発表 (国内会議 38 件、国際会議 39 件)

(4)特許出願

① 国内出願 (2 件)

1. 発 明 者：老木成稔・久野みゆき・安部可伸
 発明の名称：パッチクランプ装置
 出 願 人：老木成稔・久野みゆき・安部可伸

出 願 日：2004 年 3 月 30 日
出願番号：特願 2004－129009 号

2. 発 明 者：老木成稔・山内紀宏・坪田圭介
発明の名称：シーストランス液流方式によるイオンチャネル解析方法と
その方法に使用するイオンチャネル解析装置
出 願 人：老木成稔・轟産業株式会社
出 願 日：2004 年 5 月 24 日
出願番号：特願 2004－153209 号

②海外出願 (0件)

(5)受賞等

①受賞

1. 佐々木裕次
平成16年度第6回「研究助成金」制度MMS賞
(貴金属完全ナノ結晶及び多層ナノ粒子の創製とその普及のために)
2. 佐々木裕次
UK Synchrotron Radiation User Meeting 2004 Best Poster Prize
(バイオ系から1名の選出。イギリスの放射光学会主催)

②新聞報道

1. 佐々木裕次
“放射光で生体1分子内運動を見る” 日刊工業新聞 2003年5月8日
2. 佐々木裕次
“生体高分子1個の動き追跡 X線放射圧実計測” 日刊工業 2006年7月21日
3. 佐々木裕次
“「最も微弱な力」検出” 日経産業 2006年7月21日
4. 佐々木裕次
“「超微弱な力」測定に成功 日本経済 2006年7月21日

③その他

(6)その他特記事項

なし

7 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

なし

8 結び

本研究の最大の誤算は、放射光施設内の使用ビームラインが変更したことである。BL44B2 の白色モードが使えなくなった。今考えると、単色モードのビームラインの仕様に近づけることは、多くのユーザーに本計測法を利用してもらえる環境をより提供しやすくなることになり、非常に思い切った展開で時間も要したが結果的に良い展開になったと思っている。今後、海外の放射光施設においても本計測法の実践利用を啓蒙していく予定であるが、単色的な装置構成はその可能性を広げたことになる。

本研究の達成度としては、研究スタート当初本測定方法の問題点自身がすべて明確化されていた訳ではなく、それらが本研究の終了現時点で、多くの問題点が解決し、また問題点の解決策が明確化された点等を考慮すると、予想外の到達度であったと自負する。一番計画通り進まなかったのは、チャンネルタンパク質分子の運動計測であった。測定運動自身に変異体依存があり、多くて月に24時間程度のマシンタイムしか与えられない状況で、それらの変異体の向き不向きを判断するのに極めて多くの時間を要してしまった。これらすべて、放射光施設を利用した本研究の限界である。その経験があつて、本計測原理を電子顕微鏡に応用する事を考え、実践する方向で研究が進展している。

以上のような本研究の成果が認められたからこそ、H18年からの新たな CREST テーマが採用された。より汎用的な高精度1分子計測法を誰よりも早く確立すべく、今後も今まで同様研究に邁進していく覚悟である。

若手研究者の育成に関しては、本研究で6人の研究員を採用したが、多くの研究員が充実した研究環境で最先端の研究に集中することができたと自負する。その一人が国際会議において若手賞を受賞し、また独立行政法人日本学術振興会(JSPS)の平成16年度海外特別研究員として採用(生物系部門)された。海外留学助成金の最難関であるヒューマン フロンティア サイエンス プログラム(HFSP)のH16年度長期フェローシップに採用された者もいた。彼らの今後の研究生活の良い経験となれればと願っている。

振り返って見ると、大島総括を始め研究事務所の存在は大きく、研究環境においてその改善、要望等がタイムラグなしで実現してきたことは非常に感謝している。今後、研究事務所を置かない運営がJSTの採択研究で行われていくようであるが、かなりの不安を持っているのは私だけではないであろう。心から敬意を表したい。