

(独) 科学技術振興機構  
戦略的創造研究推進事業  
チーム型研究 (CREST)  
追跡評価用資料

研究領域「ソフトナノマシン等の高次  
機能構造体の構築と利用」  
(2002 - 2007年度)

研究総括 宝谷 紘一

2013 年 10 月



## 目次

要旨 .....	1
第1章 追跡調査概要.....	2
1.1 研究領域概要.....	2
1.1.1 戦略目標.....	2
1.1.2 研究領域概要.....	2
1.1.3 研究総括.....	2
1.1.4 領域アドバイザー.....	2
1.1.5 研究課題および研究代表者.....	2
1.2 研究領域終了後の進展と波及効果.....	4
1.2.1 研究成果の発展状況や活用状況.....	4
1.2.2 研究成果の科学技術的および社会・経済的な波及効果.....	5
第2章 追跡調査 .....	8
2.1 追跡調査について.....	8
2.1.1 調査の目的.....	8
2.1.2 調査の対象.....	8
2.1.3 調査の方法.....	8
2.2 アウトプット概要.....	11
2.2.1 研究助成金.....	11
2.2.2 論文 .....	13
2.2.3 特許 .....	15
2.3 アウトカム.....	18
2.3.1 科学技術的アウトカム.....	18
2.3.2 社会・経済的アウトカム.....	19
第3章 各研究課題の主な研究成果および波及効果.....	22
3.1 2002年度採択課題 .....	22
3.1.1 生物ナノマシン回転運動の一般化作動機構の解明(相沢 慎一).....	22
3.1.2 タンパク質分子モーターを利用したナノメカノケミカルマシンの創成(伊藤博康).....	26
3.1.3 タンパク質トランスロケータの作動原理の解明(遠藤 斗志也).....	29
3.1.4 振動するバイオナノマシンの原理と構築(神谷 律).....	34
3.1.5 遺伝子デリバリーシステムとしての人工細胞核の創製(原口 徳子).....	38
3.1.6 DNA分子モーターの動作原理の解明(原田 慶恵).....	43
3.1.7 高次細胞機能構造体観察・制御技術の開発(藤吉 好則).....	47
3.1.8 ゆらぎと生体システムのやわらかさをモデルとするソフトナノマシン(柳田	

敏雄) .....	52
3.2 2003 年度採択課題 .....	56
3.2.1 高効率ナノモーターとしてのプロトンポンプの分子機構解明(二井 将光) ..	56
3.3 2004 年度採択課題 .....	61
3.3.1 バイオナノマシンの動的構造から機能発現への階層的理論モデリング(高田 彰二) .....	61
第4章 科学技術イノベーションに資する研究成果の状況.....	66
4.1 研究領域からの研究成果事例.....	66
4.1.1 「高次細胞機能構造体観察・制御技術の開発 (藤吉好則)」 .....	66
4.1.1.1 研究の概要.....	66
4.1.1.2 研究成果の波及と展望.....	71
4.2 まとめ.....	77

## 要旨

本資料は、戦略的創造研究推進事業のチーム型研究 CREST の研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」(2002～2007 年度)において、研究終了後一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況等を明らかにし、独立行政法人科学技術振興機構(JST)事業及び事業運営の改善等に資するために、追跡調査を実施した結果をまとめたものである。

本研究領域は、「非侵襲性医療システムの実現のためのナノバイオテクノロジーを活用した機能性材料・システムの創製」を戦略目標に掲げ、宝谷 絃一研究総括のもとに、8名の領域アドバイザーと、2002年度採択8名、2003年度採択、2004年度採択各1名、計10名の研究代表者によって進められた。

本追跡調査では、本研究領域終了後の研究代表者の研究の継続と発展状況を知るために、2012年度に各種データベースを元に、研究助成金の取得状況、論文の発表や特許の出願と登録等を調査した。大型助成金の採択としては、CREST 新研究領域「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」研究課題「ミトコンドリアをハブとする構造機能の解明(2012-2017 年度)」(遠藤)、最先端・次世代研究開発プログラム「蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った1分子イメージング法の開発と生体分子観察への応用(2011-2015 年度)」(原田)、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発(2008-2012 年度)」(藤吉)、独立行政法人理化学研究所(理研)のスーパーコンピュータ「京」を使った「次世代生命体統合シミュレーション(～2012 年度)」「細胞内分子ダイナミクスのシミュレーション～細胞環境における分子および細胞スケールシミュレーション(2013 年度～)」(高田)、があげられる。

また、各研究代表者の研究成果の発展状況ならびに科学技術的及び社会・経済的波及効果を研究者のホームページ、論文や報道等から調査したところ、研究の進展としては、ミトコンドリアにおけるタンパク質の膜透過を担うトランスロケータの動的でインテリジェントな機能の実体と仕組みの解明(遠藤)、クラミドモナスのダイニン複合体の形成過程、及び、走光性のメカニズムの解明(神谷)、ライブクレム法の発展研究、減数分裂期における遺伝情報組み換えメカニズムの解明(原口)、蛍光性ナノゲル温度センサーの開発(原田)、AQP4、 $H^+K^+ATPase$ ・SCH 結合中間体、ヒト由来ギャップ結合チャネルの立体構造など、極低温電子顕微鏡による高分解能解析(藤吉)、ミオシン-IVの分子モーター機構の解析(柳田)、F 型  $ATPase$  の作動機構と酸性環境の形成機構の解明(二井)、多剤排出トランスポーター AcrB の薬剤排出過程の解析(高田)などが顕著であった。社会・経済的な波及効果の顕著な例としては、藤吉が本研究領域期間中に開発した、第6世代の極低温電子顕微鏡は、本研究領域終了後 NEDO の支援を受け日本電子株式会社と共同でさらに改良を重ね、世界最高水準の分解能を持つ第7世代の製品が完成した。液体ヘリウムの温度で構造解析ができる極低温電子顕微鏡は他社にはない製品で、この分野で日本が世界をリードしている。また、原田らが開発した「ナノゲル温度センサー」は内山をチームリーダーとする、「JST 研究開発展開事業先端計測分析技術・機器開発プログラム」(医療・生命科学計測のための機器)(2010～2013 年度)として実用化研究が展開している。

## 第1章 追跡調査概要

### 1.1 研究領域概要

#### 1.1.1 戦略目標

非侵襲性医療システムの実現のためのナノバイオテクノロジーを活用した機能性材料・システムの創製

#### 1.1.2 研究領域概要

本研究領域は、ナノレベルでの分子構造や分子間相互作用の変化等を利用して働くソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用に係わる研究等を対象とするものである。具体的には、生体に学ぶソフトナノマシンの動作機構の解析・制御およびその原理を活用したソフトナノマシンの構築、利用に関する研究、タンパク質や合成分子等の高次機能構造体によるソフトナノマシンの高効率エネルギー変換、エネルギー供給、情報の変換、伝達に係わる研究等も含まれる。なお、本研究領域は戦略目標「情報処理・通信における集積・機能限界の克服実現のためのナノデバイス・材料・システムの創製」および「環境負荷を最大限に低減する環境保全・エネルギー高度利用の実現のためのナノ材料・システムの創製」にも資するものとなる。

#### 1.1.3 研究総括

宝谷 紘一(名古屋大学 名誉教授)

#### 1.1.4 領域アドバイザー

表 1-1 領域アドバイザー

領域アドバイザー	所属	役職	任期
前田 雄一郎	理化学研究所播磨研究所	グループリーダー	2002年10月～2003年5月
石渡 信一	早稲田大学理工学部	教授	2002年10月～2008年3月
月原 富武	大阪大学蛋白質研究所	教授	2002年10月～2008年3月
山下 一郎	松下電器先端技術研究所	主席研究員	2002年10月～2008年3月
栗原 和枝	東北大学多元物質科学研究所	教授	2002年10月～2008年3月
金子 邦彦	東京大学大学院総合文化研究科	教授	2002年10月～2008年3月
曾我部 正博	名古屋大学大学院医学系研究科	教授	2002年10月～2008年3月
郷 信広	日本原子力研究所関西研究所	特別研究員	2004年10月～2008年3月

(註)所属と役職は本研究領域 終了時点のもの

#### 1.1.5 研究課題および研究代表者

研究課題(研究者)の公募は2002年度から3年間、3期にわたり、総計10件の研究課題を採択した。表1-2に各期の研究課題、研究代表者、採択当時の所属機関と役職、終了時の所属と役職ならびに2012年9月現在の所属と役職を示した。

表 1-2 研究課題と研究代表者

採択年度	研究課題	研究代表者	採択時の所属・役職	終了時の所属・役職	追跡調査時の所属・役職
2002年度	生物ナノマシーン 回転運動の一般化 作動機構の解明	相沢 慎一	帝京大学理工学部 教授	県立広島大学生命環 境学部 教授	県立広島大学生命 環境学部生命科学 科 教授
2002年度	タンパク質分子モ ーターを利用した ナノメカノケミカ ルマシンの創成	伊藤 博康	浜松ホトニクス(株) 筑波研究所 専任部員	浜松ホトニクス(株) 筑波研究所 専任部員	浜松ホトニクス (株)筑波研究所 主任部員
2002年度	タンパク質トラン スロケータの作動 原理の解明	遠藤 斗志 也	名古屋大学大学院理 学研究科 教授	名古屋大学大学院理 学研究科 教授	名古屋大学大学院 理学研究科 教授
2002年度	振動するバイオナ ノマシンの原理と 構築	神谷 律	東京大学大学院理学 系研究科 教授	東京大学大学院理学 系研究科 生物科学専攻 教授	学習院大学 客員教授
2002年度	遺伝子デリバリー システムとしての 人工細胞核の創製	原口 徳子	(独)通信総合研究所 関西先端研究センタ ー 主任研究員	(独)情報通信研究機 構関西先端研究セン ター 主任研究員	(独)情報通信研究 機構 未来ICT研究 所 上席研究員
2002年度	DNA 分子モーター の動作原理の解明	原田 慶恵	(財)東京都医学研究 機構 東京都臨床医学 総合研究所 副参事研究員	(財)東京都医学研究 機構 東京都臨床医学 総合研究所 副参事研究員	京都大学 物質一 細胞統合システム 拠点 教授
2002年度	高次細胞機能構造 体観察・制御技術 の開発	藤吉 好則	京都大学大学院理学 研究科 教授	京都大学大学院理学 研究科 教授	名古屋大学細胞生 理学研究センター 教授・センター長
2002年度	ゆらぎと生体シス テムのやわらかさ をモデルとする ソフトナノマシン	柳田 敏雄	大阪大学大学院生命 機能研究科 教授・研究科長	大阪大学大学院生命 機能研究科 教授	理化学研究所 神 戸研究所 生命システム研究 センター センター長
2003年度	高効率ナノモータ ーとしてのプロト ンポンプの分子機 構解明	二井 將光	(財)微生物化学研究 会微生物化学研究セ ンター 特別研究員	岩手医科大学薬学部 教授	岩手医科大学薬学 部 教授
2004年度	バイオナノマシン の動的構造から機 能発現への階層的 理論モデリング	高田 彰二	神戸大学理学部 助教授	京都大学大学院理学 研究科 准教授	京都大学大学院理 学研究科 准教授

## 1.2 研究領域終了後の進展と波及効果

### 1.2.1 研究成果の発展状況や活用状況

本領域は、「非侵襲性医療システムの実現のためのナノバイオテクノロジーを活用した機能性材料・システムの創製」を戦略目標に掲げ、10件の研究課題を実施した。

本研究領域終了後、回転する生物ナノマシンとして、べん毛モーターを取り上げた(相沢)の研究は、主として共同研究で海外の研究者が、サルモネラ菌以外の枯草菌、根粒菌、ビブリオ菌、光合成細菌、植物病原菌など各種バクテリアのべん毛モーターの働きを調べる方向に研究を展開している。また、ナノメカノケミカルマシンとして、F1-ATPaseの回転に関する(伊藤)の研究課題は、研究分担者であった木下(早稲田大学)によって引き継がれ、F1-ATPaseの回転機構、ATP合成酵素、リニア分子モーターの研究が実施されている。

振動するバイオナノマシンとして、クラミドモナスのべん毛を取り上げた研究は、クラミドモナスのべん毛およびダイニンの運動機構を解明し、動物に普遍的に存在するべん毛運動の分子機構の理解を進展させた(神谷)。

生体のやわらかさとゆらぎをモデルとしたソフトナノマシンの研究は、ブラウン運動整流機構などミオシンIVのステップの詳細解明からルースカップリング機構の実証や、アクチン繊維の詳細な立体構造と原子モデルの解明などに発展させた(柳田)。

また、DNA分子モーターに関する研究は、細胞内生体分子の定量的計測法の開発が、内山(東京大学)との共同研究で蛍光ナノゲル温度センサーの開発につながり、さらに、新たに蛍光ダイヤモンドナノ粒子を用いた新規1分子イメージング法の研究へと進展し始めている(原田)。

細胞膜を通した物質輸送に関する生物ナノマシンとして、タンパク質トランスロケータの研究は、ミトコンドリアタンパク質の交通管制機構・機能発現・秩序維持システムの解明から、新しくミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワークの解明の研究へと発展させている(遠藤)。また、遺伝子デリバリーシステムとしての人工細胞核の創製の研究では、減数分裂期における相同染色体の対合のメカニズムの解明、および、核-細胞間の物質輸送機構の解明から、生命の柔軟な情報処理機構の一端を明らかにした(原口)。

さらに、プロトンポンプの分子機構解明では、ATPaseの作動機構と酸性環境の形成の研究を進め、酵素学から細胞生物学に至る広い視点に立ち研究を進展させた(二井)。

高次細胞機能構造体の観察・制御技術の開発では、本研究課題期間中に開発した極低温電子顕微鏡について、NEDOの支援を受けて日本電子と共同で改良を進め、世界最高レベルの分解能をもつ第7世代の製品を生み出し、広く世界の研究者に使われ、この分野での日本の優位性に貢献している。また、同機種を用いたAQP4、H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase・SCH結合中間体、ヒト由来ギャップ結合チャンネルの立体構造解析は、注目すべき成果である(藤吉)。

バイオナノマシンのモデリング研究では、本研究領域期間中に開発した「粗視化分子シミュレーション技法(CafeMol)」を駆使して、多剤排出トランスポーターAcrBの薬剤排出過程の解析など、分子間結合に伴うタンパク質の構造変化の解析を行った。さらに、理研の「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発プロジェクト」に参画し、粗視化分子モデルを用いた大規模分子シミュレーションを実施している(高田)。

## 1.2.2 研究成果の科学技術的および社会・経済的な波及効果

### (1) 科学技術の進歩への貢献

本研究課題は、ナノレベルでの分子構造や分子間相互作用の変化等を利用して働くソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用に係わる研究等を対象とし、主に①ナノマシンの構造解析のため技術開発と②バイオナノマシン、ナノケミカルマシン、ソフトナノマシンなどのメカニズム解明が実施された。

①技術開発の最たるものは、藤吉の極低温電子顕微鏡であり、日本電子と共同で、振動を防止するシステムや新しい材料開発など様々な改良を重ね、当初のステージ温度 10K、分解能 12Åから、ステージ温度 1.5K、分解能 2Åまで、その性能を飛躍的に向上させ、世界最高水準の分解能を持つ製品に仕上げた。同機種により、水チャンネル・アクアポリン(AQP)、ギャップ結合チャンネル・コネキシン(CX)、イオン輸送ポンプ(ATPase)、イオンチャンネル、アセチルコリン受容体(AChR)、クローディングファミリー様タンパク質(IP39)、など世界的に脚光を浴びた膜タンパク質の構造と機能解析の分野で先駆的な研究成果を上げ、電子線結晶学による「構造生理学(Structural Physiology)」という新しい分野を開拓し、世界的な科学技術の発展に大きく貢献している。

また、コンピュータシミュレーションを駆使した粗視化分子モデル(CafeMol)によるAcrBの薬剤排出と回転機構様式の解析事例は、理研の次世代スーパーコンピューター「京」のソフトウエア開発の一環として、将来、新薬開発に貢献する科学技術として期待されている。

②バイオナノマシンとしては、クラミドモナスの繊毛・べん毛のダイニン複合体の新たな形成過程や走光性のメカニズムの解明、核膜と染色体における遺伝子デリバリーシステムの解明、ミトコンドリア膜透過のタンパク質トランスロケータのインテリジェントな機能の実態や仕組みの解明など、新たな発見が見られた。

また、ナノケミカルマシンとしてのATP合成酵素は、活動と休止を繰り返すにより、ATPの加水分解によるエネルギーの消費とATP合成によるエネルギーの蓄積のバランスを維持していることを解明した。さらに、ソフトナノマシンとしてのアクチン繊維の構造と単体の構造と劇的な相違による構造と機能の裏づけを明らかにするなどにより、新しい視点をもたらした。

さらに、DNA分子モーターの解明から、細胞内生体分子の蛍光ナノゲル温度センサーの開発への展開は、将来、がん細胞などの病態細胞の新しい診断法など、生物学や医学分野の発展に貢献すると期待されている。

### (2) 社会・経済的波及効果

#### ①特許から見た展開

経済的波及効果の一つ指標として特許があげられる。本研究領域期間中(2002~2007年度)の特許出願は11件、そのうち4件(相沢、伊藤、原口、藤吉)が日本で特許登録されている。

また本研究領域終了後(2008~2012年9月)の特許出願は9件で、そのうち日本特許とし

て1件(藤吉)が登録されている。

京都大学と日本電子から出願された「トッペントリ式試料ステージ傾斜装置」の特許(本研究領域期間中2005年)、ならびに「荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置」(本研究領域終了後2008年)はそれぞれ、2011年と2012年に日本特許として登録された。後者に対応した国際出願特許は、ヨーロッパ特許[EP1975974 (B1)]、および、米国特許[US8008633 (B2)]が登録されている。これらの特許は日本電子の極低温ステージと自動試料交換装置を組み込んだ標準的な電子顕微鏡として実用化されている。

## ②研究成果の実用展開

藤吉と日本電子(株)が共同開発した電子顕微鏡は、日本電子が、製品として標準的な電子顕微鏡2種(300kVと200kVの電界放出型)に、極低温ステージと自動試料交換装置を組み込んだものを発売している。極低温電子顕微鏡は現在までに、米国や欧州各国でも販売実績があり、製品として合計28台販売され(国内17台、海外11台)、総売上高は約100億円(付属装置を含む)に達している。液体ヘリウム温度で構造解析ができる極低温電子顕微鏡は他社にはなく、この分野では、日本が世界をリードしており、世界中の研究者によって広く利用されている。

## ③社会に注目された研究成果

プレスリリース、ニュースレター、新聞記事などで取り上げられた成果を下記に示した。

(i)「染色体の構造変化にかかわる新たなタンパク質を発見～生命の多様性をもたらす遺伝子情報組み換えシステムの一部を明らかに～」また、「遺伝子情報組み換えメカニズムの解明に大きな前進」という見出しで、不妊治療やダウン症の予防、人工細胞や分子通信、生体分子を利用したバイオセンサーなどといった複雑なDNA情報を簡素化する生物の仕組みに習ったセンサーの開発につながる(原口、平岡)

(ii)「細胞内の温度を測れる高分子～生細胞の温度測定を可能とする蛍光ナノゲル温度センサーの開発」ならびに「生きた細胞の内部の温度分布を画像化できる蛍光試薬の開発に成功」という表題で、細胞の種類による内部温度分布の違いを比較することで、がん細胞などの病態細胞の新しい診断法が確立できる可能性が生じること(原田、内山)

(iii)「ヒト由来ギャップ結合チャネルの立体構造を世界で初めて解明―難聴や不整脈などの病気の治療戦略に役立つと期待―」の表題で、大型放射光施設 SPring-8 の大阪大学蛋白質研究所専用ビームラインの生体超分子構造解析ビームライン BL44XU を用いて、世界で初めてヒト由来ギャップ結合チャネルの立体構造を解明することに成功したこと(藤吉、月原)

(iv)「神経・筋肉などに成長する新たな幹細胞、東北大教授ら発見」の表題で、藤吉と出澤(東北大)が人の皮膚や骨髄の中から、神経や筋肉、肝臓などの人体の様々な組織に成長できる新しい「幹細胞」を発見し、この新しい細胞を「Muse(ミューズ)細胞」と命名し

たこと

(v)「岩手医大機能生化学講座、ATP 酵素の仕組みを解明」の表題で、二井研究室の関谷瑞樹助教らの、ATP 合成酵素が活動と休止を繰り返し、エネルギーの無駄づかいともいえる ATP の加水分解を抑制していることを解明したこと

(vi)「多剤排出トランスポーターの薬剤排出とアロステリック効果を分子シミュレーションで実証」したこと(理化学研究所、高田、村上)

#### ④研究センター長など研究分野への貢献

遠藤は、2012 年 4 月から、名古屋大学大学院理学研究科附属構造生物学研究センター長を兼務し、同大学の研究センターの発展に貢献している。

藤吉は、2008 年度から、NEDO の「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発／創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」のプロジェクトリーダーとして、創薬の加速に向けた基盤技術開発、有用化合物の生産技術開発など新たな展開を目指してきた。また、2012 年 4 月から名古屋大学創薬研究科に教授として赴任し、同時に名古屋大学に藤吉が設立した細胞生理学研究センター (CeSPI) の教授も兼務することになった。なお、その後、2013 年 4 月から創薬研究科と CeSPI の特任教授として研究を進めている。

柳田は、2009 年に大阪大学と独立行政法人情報通信研究機構 (NICT) で設立した「脳情報通信融合研究センター：CiNet」のセンター長に就任した。さらに、2010 年度から大阪大学キャンパス内に、理研「生命システム研究センター (QBiC)」のセンター長に就任し、生命機能システムを理解するために、計測、計算とモデル化、細胞機能の再構成のための最先端技術開発と同分野の進展に貢献している。

高田は、理化学研究所「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発プロジェクト」(2006 年 10 月発足)の「次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ 分子スケール研究開発チーム(リーダー木寺詔紹)」に所属して京都大学の拠点代表として、「CafeMol 粗視化分子モデル計算」を担当している。

## 第2章 追跡調査

### 2.1 追跡調査について

#### 2.1.1 調査の目的

追跡調査は、本研究領域終了から一定期間を経過した後、副次的効果を含めて研究成果の発展状況や活用状況を明らかにし、JSTの事業および事業運営の改善に資するために行うもので、本研究領域終了後の研究代表者の研究課題の発展状況等を、「2009年度 戦略的創造研究推進事業ナノテクバーチャルラボ(NTVL)に係る成果論文展開調査」も含めて調査した。

#### 2.1.2 調査の対象

本追跡調査はCREST研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」(2002～2007年度)の研究代表者全員を対象とする。表2-1に調査対象と調査対象期間を示す。

表 2-1 調査対象と調査対象期間

採択年度	研究期間	研究終了後調査対象期間	研究課題数
2002年度	2002年11月～2008年3月	2008年4月～2012年9月	8
2003年度	2003年11月～2008年3月	2008年4月～2012年9月	1
2004年度	2004年10月～2008年3月	2008年4月～2012年9月	1

※ただし、

2002年度採択の相沢は、

本研究領域期間：2002年10月～2008年3月、終了後調査対象期間：2008年4月～2012年9月

2002年度採択の柳田は、

本研究領域期間：2002年11月～2007年10月、終了後調査対象期間：2007年11月～2012年9月

#### 2.1.3 調査の方法

##### (1) 研究助成金

本研究領域終了以降に、研究代表者が代表もしくはそれに相当する立場(総括研究者、プロジェクトリーダー等)で獲得した外部研究資金を調査した。

対象となる外部研究資金と調査方法は以下の通りである。

##### ① 科研費

KAKEN 科学研究費助成事業データベース(<http://kaken.nii.ac.jp/>)から、研究代表者が代表となっている研究課題を検索した。その中から、1千万円/件以上のものを抽出した。

##### ② JST 事業

JST ホームページ(<http://www.jst.go.jp/>)のサイト内検索で研究代表者の情報を検索し、本研究領域終了以降に研究代表者が代表となって採択された事業もしくはプロジェクト

ト(研究総括あるいは領域総括としての関与は含まない)を抽出した。

### ③NEDO プロジェクト

NEDO ホームページ(<http://www.nedo.go.jp/>) のサイト内検索、および成果報告書データベース(<https://app5.infoc.nedo.go.jp/disclosure/Login>) から、研究代表者の情報を検索し、本研究領域終了以降に代表者、もしくはプロジェクトリーダー等として実施しているプロジェクトの有無を確認した。

### ④最先端・次世代研究開発支援プログラム

最先端研究開発支援プログラム(FIRST プログラム)のホームページ(<http://first-pg.jp/about-us/about-30.html>) および最先端・次世代研究開発支援プログラムのホームページ(<http://www.jsps.go.jp/j-jisedai/life.html>)から、研究代表者の採択実績を確認した。

### ⑤その他

本領域においては、医学分野への応用も想定されることから、厚生労働科学研究成果データベース(<http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIST00.do>)から、厚生労働科学研究費の獲得実績についても確認した。

## (2)論文

本研究領域期間中および本研究領域終了以降の研究代表者の発表論文について、Scopus(Elsevier) の名寄せ機能を用いて検索を行った。

終了以降の論文のうち、著者名だけからは研究代表者の論文と特定できない場合には、抄録を確認し、所属機関の情報や内容から絞り込みを行った。

次に、本研究領域期間中および本研究領域終了以降の論文数を求めた。本研究領域終了以降の論文については Article と Review に絞り込み、さらに研究代表者が筆頭著者(1st Author)もしくは Last Author となっている論文を「責任著者論文」として数を求めた。

### ①本研究領域期間中の論文数

「2009 年度 戦略的創造研究推進事業(ナノテクバーチャルラボ)に係る成果論文展開調査」の結果に基づき算出した。終了報告書に記載のある原著論文およびその他著作物(総説等)のうち、被引用件数の確認できる論文については、Web of science を使用し、カウントした。

2002 年度採択課題については 2002 年～2007 年、2003 年度採択課題については 2003 年～2007 年、2004 年度採択課題については 2004 年～2007 年に発表された原著論文(Article)が主体で、一部 Conference Paper や Review が含まれている。終了報告書で in press 等となっている論文のうち、2008 年に発表されたものは本研究領域期間中の論文に含むが、2009 年以降に発表された場合には本研究領域終了後の論文としてカウントした。そのため、本研究領域期間の研究成果が、全て本研究領域期間中の論文として掲載されているとは限らない。

## ②①のうち研究代表者の論文数

①に示した論文数のうち、研究代表者の名前が入っている論文数。

## ③本研究領域終了後の論文数

本研究領域終了後の論文数は、研究代表者が著者となっているものについてのみ検索した。検索データベースは Scopus (Elsevier) を用いた。

2002 年度採択課題、2003 年度採択課題、2004 年度採択課題ともに本研究領域終了時点が同じであるために(2008 年 3 月)、2008 年～2012 年 9 月に発表された原著論文(Article)とレビュー(Review)の数を示した。この中には、①に記載したように本研究領域期間中の成果論文も含まれているが、便宜上発表年で区分した。

## ④本研究領域終了後の責任著者論文数

③に示した論文数のうち責任著者の原著論文(Article)とレビュー(Review)の数を示した。

## (3) 特許

本研究領域期間中出願特許の成立および海外出願の状況と、本研究領域終了以降の国内・海外出願特許について調査した。国内特許の出願・成立状況の検索・確認には、国内特許公報 ATMS を、海外(国際)出願・成立状況の検索・確認には、欧州特許庁の esp@cenet を用いた。

本研究領域期間中出願特許については、まず国内出願特許の成立状況を国内特許公報 ATMS で確認した。次に、その出願を優先権とする国内・海外(国際)出願と成立状況を esp@cenet で確認した。

本研究領域終了以降の出願特許については、研究代表者が発明者に含まれる国内出願特許を検索し、成立状況を確認した。海外(国際)出願と成立状況については、本研究領域期間中出願特許の確認方法に準じ、esp@cenet を用いて行った。

## 2.2 アウトプット概要

### 2.2.1 研究助成金

研究代表者の研究助成金獲得状況を表 2-2 に示した。

研究代表者は本研究領域終了後、主として科研費で研究を続けている。

科研費以外の外部の大型研助成金を取得しているのは、遠藤、原田、藤吉、3 名で、柳田は大阪大学グローバル COE プログラム、高田は理化学研究所のプロジェクトにも参画している。

① 2012 年度から、新たに CREST「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 研究総括：田中啓二(東京都医学総合研究所 所長)」の研究代表者として「ミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワークの解明」の研究課題を実施する(遠藤)。

② 「蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った新規 1 分子イメージング法の開発と生体分子観察への応用」課題が、内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム(NEXT)(若手・女性研究者等を対象とした支援策)2011 年度」に採択された(原田)。補助事業期間は、独立行政法人日本学術振興会による交付内定の日から最長で 2014 年 3 月 31 日迄。

③ 2008 年度から NEDO の「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発／創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」のプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施している(藤吉)。

- ・電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術(2008～2011 年度)
- ・核磁気共鳴法(NMR)による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術(2008～2011 年度)
- ・高精度 in silico スクリーニング等のシミュレーション技術(2008～2011 年度)
- ・創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発(2008～2012 年度)
- ・有用天然化合物の安定的な生産技術開発(2011～2012 年度)

④ 大阪大学グローバル COE プログラム「高次機能システムのダイナミクス」(2007～2011 年度)の拠点リーダーとして、21 世紀 COE プログラムで掲げた、「基礎生命科学、医学、理学、工学を含む広い範囲の研究分野を融合し、従来の生命科学の枠組みを越えた分野横断的な教育研究環境を整備し、生命機能の理解を深化させた世界最高水準の教育研究拠点を打ち立てる」という目標を引継ぎ、より高いレベルに発展させて、その成果を医療や新しい原理に基づくものづくりに展開させることを目的とした活動を行っている(柳田)。

⑤ 理化学研究所「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発プロジェクト」(2006 年 10 月発足)の「次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ分子スケール研究開発チーム(リーダー木寺詔紹)」に参画して京都大学の拠点代表として、「CafeMol 粗視化分子モデル計算」を担当(2007～2012 年度)(高田)。2011 年 10 月までに高田の開発した「CafeMol プログラム」がスーパーコンピューター「京」での試験実効効率 20%を超えている。

表 2-2 研究代表者の研究助成金獲得状況

■ : 科研費 ■ : JST ■ : NEDO ■ : その他

採択年度	研究代表者	研究費名称	研究テーマ名	開始年度	終了(予定)年度	年度												金額(百万円)	
						00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11		12
2002	相沢 慎一	プロジェクト終了以降データなし																	
2002	伊藤 博康	プロジェクト終了以降データなし																	
2002	遠藤 斗志也	科研費 基盤研究(S)	ミトコンドリアタンパク質の交通制御機構とその改変	2006	2010													111.8	
			酵母ミトコンドリア・小胞体タンパク質の機能発現・秩序維持システムの解明	2007	2011														198.0
			タンパク質社会の研究の成果取りまとめ	2007	2012														45.8
			ミトコンドリア膜を舞台としたタンパク質の交通制御機構の解明	2010	2014														137.3
			部位特異的光架橋法によるミトコンドリアアトラスロケータの過渡的複合体の動態の解析	2012	2013														5.6
			MITO CREST「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の基盤技術」	2012	2017														
2002	神谷 律	科研費 基盤研究(A)	鞭毛・繊毛軸系における高次規則構造の形成機構	2005	2008													36.4	
2002	原口 徳子	科研費 特定領域研究	核膜の構造と染色体相互作用のダイナミクス	2004	2008													107.8	
			ライブクレムを基盤とする分子特異的ナノイメージング法の開発	2009	2011														18.9
			遺伝情報場形成に関わるテトラヒメナの選択的核輸送システムの解明	2011	2012														11.2
2002	原田 慶恵	科研費 基盤研究(B)	分子イメージングによるリアルタイム分子間相互作用解析法の開発	2006	2008													18.1	
			最先端・次世代研究開発支援プログラム (NEXT)	2011	2015														149.5
2002	藤吉 好則	科研費 特別推進研究	膜を介する(チャネルおよびGPCRを中心とした)情報伝達分子機構研究	2004	2008													567.8	
			NEDO NEDOプロジェクトを核とした人材育成・産学連携等の総合的展開/蛋白質立体構造解析NEDO特別講座	2007	2009														
			NEDO ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発	2008	2012														
			電子線結晶学を用いた膜タンパク質の構造と機能研究	2010	2014														140.8
2002	柳田 敏雄	文部科学省 最先端研究基盤事業	生命動態システム科学研究の推進	2010	2012													464.3	
			大阪大学グローバルCOEプログラム	2007	2011														
2003	二井 将光	科研費 基盤研究(B)	プロトンポンプATPaseの作用機構と酸性環境の形成	2008	2010													20.3	
2004	高田 彰二	科研費 基盤研究(B)	蛋白質が主導する膜形態変化の分子シミュレーション研究	2007	2009													18.2	
			生体分子モーターのシミュレーション研究:運動から化学反応制御への構造機能解析	2010	2012														19.0
			文部科学省 次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発	2007	2012														158.0

## 2.2.2 論文

論文発表件数は研究者の研究活動を示す一つの指標であると考えられるため、2.1.2(2)に示した調査方法で、研究期間中と終了後の論文数を比較した。

他の研究者との共同研究が多い中で研究代表者がどういう役割を果たしているかを見る指標の一つとして、今回は研終了後の研究代表者の責任著者論文数を④の欄に示した。

結果を表 2-3 に示した。

研究終了後の被引用件数等を参考にした主な成果論文としては下記のものが挙げられる。

(i) ミトコンドリア内膜の膜透過装置 TIM23 複合体の作用機構を解明した J. Cell Biol. (2009)の論文(遠藤)

(ii) 武田(東京大学)との共同研究で、クラミドモナスで Ktu/PF13 遺伝子の繊毛・べん毛におけるダイニン複合体の形成過程を解明した、Nature(2008)の論文(神谷)

(iii) ライブクレム法の適用範囲を広い生物試料に広げて、核膜の構造と染色体相互作用のダイナミクス解析を行った J. Cell Sci. (2008)の論文、染色体の構造変化にかかわる新たなタンパク質を発見し生命の多様性をもたらす遺伝子情報組み換えシステムの一端を明らかにした、J. Cell Biology (2009)の論文、および、これまでメカニズムが解明されていなかった減数分裂期における相同染色体の対合における非コード RNA の役割を明らかにした、Science(2012)の論文(原口)

(iv) 内山(東京大学)との共同研究の、生細胞の温度測定を可能とする蛍光ナノゲル温度センサーに関する J. Am. Chem. Soc. (2009)の論文、および、生きた細胞の内部の温度分布を画像化できる蛍光試薬の開発に成功した Nature Comm. (2012)の論文(原田)

(v) 月原(兵庫県立大学)との共同研究で、ヒト由来ギャップ結合チャネルの立体構造を世界で初めて解明することに成功した Nature(2009)の論文、および、出澤(東北大学)らと、NEDO のプロジェクトで、人の皮膚や骨髄の中から神経や筋肉、肝臓などの人体の様々な組織に成長できる新しい幹細胞「Muse(ミューズ)細胞」を発見した、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2011)の論文(藤吉)

(vi) 難波(大阪大学)との共同研究で、アクチン繊維の原子モデルを高精度で解析した、Nature(2010)の論文(柳田)

(vii) ATP 合成酵素が活動と休止を繰り返し、エネルギーの無駄づかいともいえる ATP の加水分解を抑制していることを解明した J. Biol. Chem. (2010)の論文(二井)

(viii) 粗視化モデルによるシミュレーションで誘導適合と Population-shift の関係を解析した、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A(2008)の論文、および、村上(東京工業大学)との共同研究で、多剤耐性化のタンパク質 AcrB の 3つの部分構造が順序良く機能する仮説を分子シミュレーションで実証した Nature Comm. (2010)の論文(高田)

表 2-3 研究者の論文(原著論文)数

採択年度	研究課題	研究代表者	①PJ 期間中の論文数	②①のうち研究代表者の論文数	③PJ 終了後の論文数	④PJ 終了後の責任著者論文数
2002 年度	生物ナノマシン回転運動の一般化作動機構の解明	相沢 慎一	38	21	25	8
2002 年度	タンパク質分子モーターを利用したナノメカノケミカルマシンの創成	伊藤 博康	17	8	6	1
2002 年度	タンパク質トランスロケータの作動原理の解明	遠藤 斗志也	39	23	27	19
2002 年度	振動するバイオナノマシンの原理と構築	神谷 律	50	20	23	15
2002 年度	遺伝子デリバリーシステムとしての人工細胞核の創製	原口 徳子	40	33	23	11
2002 年度	DNA 分子モーターの動作原理の解明	原田 慶恵	18	7	9	2
2002 年度	高次細胞機能構造体観察・制御技術の開発	藤吉 好則	19	17	37	23
2002 年度	ゆらぎと生体システムのやわらかさをモデルとするソフトナノマシン	柳田 敏雄	38	34	45	20
2003 年度	高効率ナノモーターとしてのプロトンポンプの分子機構解明	二井 将光	13	12	11	10
2004 年度	バイオナノマシンの動的構造から機能発現への階層的理論モデリング	高田 彰二	49	9	18	17
	合 計		321	184	224	126

データ取得日

①、②は 2009 年 10 月 (NTVL 成果論文展開調査)

③、④は 2012 年 9 月

### 2.2.3 特許

「研究者の特許出願数と登録数」を表 2-4 に示した。

本研究領域の研究代表者 10 名のうち 6 名から、研期間中の特許出願で終了報告書に記載されているもの合計 11 件、研終了後の特許出願数は合計 9 件である。

#### (1) 国内特許登録リスト

研期間中の日本出願特許のうち、下記の 4 件が日本特許として登録されている。

##### ① (発明者) 相沢慎一、他 3 名

(発明の名称) モノテルペンを含む細菌毒性物質分泌阻害剤、及び該阻害剤を用いる保存処理方法			
(利用分野) 特定のモノテルペンを含む細菌毒性物質分泌阻害剤、該阻害剤を含む食用卵、食肉、及び植物などの保存処理剤、及び該阻害剤を用いる保存処理方法に関するもの			
出願番号	特許/登録番号	登録日	出願人/権利者
2004-133197	4671621	2011. 01. 28	独立行政法人科学技術振興機構

##### ② (発明者) 伊藤博康、

(発明の名称) 連結分子モーター及び ATP センサー			
(利用分野) 連結分子モーター及びそれを用いた ATP センサーに関するもの			
出願番号	特許/登録番号	登録日	出願人/権利者
2005-354065	4878152	2011. 12. 09	浜松ホトニクス株式会社

##### ③ (発明者) 原口徳子、他 1 名

(発明の名称) 生物試料を高精度に測定する方法			
(利用分野) 顕微鏡測定試料のずれを防止、又は軽減するためのずれ防止シート、そのようなずれ防止シートを含む顕微鏡、そのような顕微鏡を用いた生物試料の測定方法などに関するもの			
出願番号	特許/登録番号	登録日	出願人/権利者
2003-377522	3879001	2006. 11. 17	独立行政法人情報通信研究機構

##### ④ (発明者) 藤吉好則、他 1 名

(発明の名称) トップエントリ式試料ステージ傾斜装置			
(利用分野) 試料を低温に冷却した状態で保持することが可能で、試料を大きい傾斜角度で傾斜させた状態で観察し分析することが可能な、トップエントリ式試料ステージ傾斜装置に関するもの			
出願番号	特許/登録番号	登録日	出願人/権利者
2005-205558	4679279	2011. 02. 10	日本電子株式会社

研終了後の日本出願特許で日本特許として成立しているものは次の1件である。

① (発明者) 藤吉好則、他1名

(発明の名称) 荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置			
(利用分野) 試料を観察・分析する極低温試料ステージ付き荷電粒子線装置(電子ビーム、イオンビーム等を用いた分析装置等)において試料ステージのZ移動を可能にする荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置に関する			
出願番号	特許/登録番号	登録日	出願人/権利者
2008-088239	5103672	2012. 10. 12	日本電子株式会社

(2) 国際特許登録リスト

研究期間中の日本出願特許で、海外特許として成立し登録されているのは、原口の米国特許 US7336417 (B2) 1件である。

① (発明者) 原口徳子、他1名

(発明の名称) 生物試料を高精度に測定する方法			
(利用分野) 顕微鏡測定試料のずれを防止、又は軽減するためのずれ防止シート、そのようなずれ防止シートを含む顕微鏡、そのような顕微鏡を用いた生物試料の測定方法などに関するもの			
(国際公開番号) US2005120804 (A1)、(特許登録番号) [US7336417 (B2)]			
出願番号	特許/登録番号	登録日	出願人/権利者
2003-377522	3879001	2006. 11. 17	独立行政法人情報通信研究機構

研究終了後に日本出願された特許で、海外出願されている特許は2件あるが、藤吉①のヨーロッパ特許 EP1975974 (B1)、と米国特許 US8008633 (B2) は、海外特許として成立している。

① (発明者) 藤吉好則、他1名

(発明の名称) 荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置			
(利用分野) 試料を観察・分析する極低温試料ステージ付き荷電粒子線装置(電子ビーム、イオンビーム等を用いた分析装置等)において試料ステージのZ移動を可能にする荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置に関する			
(国際公開番号) EP1975974 (A2)、US2009230319 (A1) (特許登録番号) [EP1975974 (B1)]、[US8008633 (B2)]			
出願番号	特許/登録番号	登録日	出願人/権利者
2008-088239	5103672	2012. 10. 12	日本電子株式会社

② (発明者) 藤吉好則、他3名

(発明の名称) 生体組織から単離できる多能性幹細胞			
(利用分野) 生体組織由来の多能性幹細胞に関する			
(国際公開番号) W02011007900 (A1) (特許未登録)			
出願番号	特許/登録番号	登録日	出願人/権利者
2012-104994	査定なし	査定なし	発明者個人

表 2-4 研究者の特許出願数と登録数

採択 年度	研究代表者	研究期間中				研究終了以降			
		出願件数		登録件数		出願件数		登録件数	
		国内	海外 (国際)	国内	海外 (国際)	国内	海外 (国際)	国内	海外 (国際)
2002 年度	相沢 慎一	1	0	1	0	0	0	0	0
	伊藤 博康	2	0	1	0	2	0	0	0
	遠藤斗志也	0	0	0	0	0	0	0	0
	神谷 律	0	0	0	0	0	0	0	0
	原口 徳子	4	2	1	1	3	0	0	0
	原田 慶恵	2	1	0	0	1	0	0	0
	藤吉 好則	2	2	1	0	2	2	1	1
	柳田 敏雄	0	0	0	0	1	0	0	0
2003 年度	二井 将光	0	0	0	0	0	0	0	0
2004 年度	高田 彰二	0	0	0	0	0	0	0	0
領域全体		11	5	4	1	9	2	1	1

データ取得日：2012年9月

## 2.3 アウトカム

### 2.3.1 科学技術的アウトカム

#### (1) 受賞

研究終了後、これまでの研究成果が評価されて、下記の研究代表者が受賞している。

受賞者	賞の名称	受賞年
神谷 律	日本動物学会賞	2012 年
藤吉好則	日本学士院賞	2008 年度
藤吉好則	アンフィンゼン賞(The Christian B. Anfinsen Award)	2010 年
柳田敏雄	米国生物物理学会 The US Genomic Award	2011 年
二井将光	藤原科学財団藤原賞	2009 年
二井将光	日本学士院賞	2012 年度

神谷の日本動物学会賞(2012 年)は、クラミドモナスを実験材料として、様々なダイニンに異常をもつ変異体株を単離・解析するというアプローチにより、多様なダイニン分子を見出すとともに、変異株の運動性の変化を解析することによって、周辺微小管の単純な滑りでは実現できない波動運動が、多様なダイニンの働きによって実現しているという発見により、動物に普遍的に存在するべん毛運動の分子機構の理解を著しく進展させたことが評価された。

藤吉の日本学士院賞(2008 年度)は、極低温電子顕微鏡の開発を通じて、細胞の脂質膜の中に存在するため解析が困難であった膜タンパク質の構造解析を可能にし、生体内で重要な生理機能を担う種々の膜タンパク質の構造を明らかにした功績に対する受賞である。

アンフィンゼン賞(The Christian B. Anfinsen Award)(2010 年)は、米国の Protein Society が 1996 年以降毎年 1 名の研究者に授与しているもので、日本の受賞者は藤吉が初めてである。

柳田の米国生物物理学会 The US Genomic Award(2011 年)は、「1 分子ナノ計測技術の開発とその応用」が評価された。柳田はさらに、2012 年 3 月同学会の Fellow に任命された。

二井の藤原賞(2009 年)は、ATP 合成酵素(F 型 ATPase)の分子生物学的・生化学的研究、及び、V 型 ATPase の構造と分子的機能および生理的機能に関する研究成果が評価された。

日本学士院賞(2012 年度)は、ATP 合成酵素の構造と機能を、遺伝子とタンパク質レベルで明らかにした功績に対する受賞である。

#### (2) 学会・研究会等への貢献

遠藤は、日本生化学会理事(2011 年 10 月～)を務めている。

原田は、日本細胞生物学会・会計幹事(2012—2014 年度)、日本生物物理学会・運営委員(企画・啓蒙活動)男女共同参画・若手問題検討委員会委員、および、学会誌「生物物理」副編集委員長を務めている。

柳田は、日本生物物理学会名誉会員を務めている。

二井は、岩手医科大学・理事・評議員・薬学部長を務めている。

高田は、日本生物物理学会・運営委員(経理/将来計画/物理学会関係)(2011~2012年度)を務めている。

## 2.3.2 社会・経済的アウトカム

### (1) 特許から見た展開

藤吉の、研究期間中の2005年に出願された、「トップエントリ式試料ステージ傾斜装置」の特許は試料を低温に冷却した状態で保持することが可能で、試料を大きい傾斜角度で傾斜させた状態で観察し分析することが可能な、トップエントリ式試料ステージ傾斜装置に関するもので、2011年2月10日に日本特許として登録されている(特許登録番号:4679279、出願人:日本電子(株))。この日本特許に対応するヨーロッパ特許「特許番号:EP1975974(B1)」と米国特許「特許番号:US8008633(B2)」も成立している。

また、藤吉の、研究終了後に出願された「荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置」の特許は、試料を観察・分析する極低温試料ステージ付き荷電粒子線装置(電子ビーム、イオンビーム等を用いた分析装置等)において試料ステージのZ移動を可能にする荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置に関するもので、2012年10月12日に日本特許として登録されている(特許登録番号:5103672、出願人:日本電子(株))、この日本特許対応するヨーロッパ特許「特許番号:EP1975974(B1)」と米国特許「特許番号:US8008633(B2)」も登録されており、これらの特許は日本電子の極低温電子顕微鏡の販売に貢献している。

### (2) 研究成果の実用展開(製品として販売実績)

藤吉らは、研究終了後もNEDOの研究支援を受け日本電子(株)と極低温電子顕微鏡の改良と製品化に向けて共同開発を行っている(2008~2012年度)。

藤吉と日本電子が共同開発した電子顕微鏡は、日本電子が、製品として標準的な電子顕微鏡2種(300kVと200kVの電界放出型)に、極低温ステージと自動試料交換装置を組み込んだものを発売している。日本だけでなく、米国や欧州各国でも販売実績がある。

同極低温電子顕微鏡は、世界的に大きな市場規模を持つ測定装置で、この開発では日本が世界を大きくリードしている。すでに、いくつかのタンパク質構造決定の世界的な成果がこの極低温電子顕微鏡によって得られており、藤吉たちも膜タンパク質などの構造解析で多くの成果を上げている。現在も引き続き多くの膜タンパク質などの構造が解かれつつあり、科学技術の進歩にも大きな貢献をしている。

### (3) 社会に注目された研究成果

研究終了後、下記の研究成果が注目すべき研究業績として、プレスリリース、ニュースレター、新聞記事などで紹介されている。

(i)「染色体の構造変化にかかわる新たなタンパク質を発見~生命の多様性をもたらす遺伝子情報組み換えシステムの一端を明らかに~」という表題でNICT未来ICT研究所の原口らのJ. Cell Biology(2009)の論文が紹介されている(独立行政法人情報通信研究機構(NICT))

プレスリリース 2009年11月3日)。

(ii)「遺伝子情報組み換えメカニズムの解明に大きな前進」という見出しで、不妊治療やダウン症の予防などに貢献できるほか、人工細胞や分子通信、生体分子を利用したバイオセンサーなどといった複雑なDNA情報を簡素化する生物の仕組みに習ったセンサーの開発につながる成果として、NICT 原口らの Science(2012)の論文が紹介されている(産経新聞 2012年5月15日)。

(iii)「細胞内の温度を測れる高分子～生細胞の温度測定を可能とする蛍光ナノゲル温度センサーの開発」の表題で、ナノゲル温度計は、細胞内の温度測定の可能な最初の機能性高分子であり、今後これを利用した生命現象の理解などへの貢献が期待される成果として、内山、原田らの高分子学会(2009.05.14)での発表が「注目発表」の一つとして取り上げられている(ナノテクジャパン トピックス 2009年6月1日)。なお、この成果は J. Am. Chem. Soc. (2009)に論文として掲載されている。

(iv)「生きた細胞の内部の温度分布を画像化できる蛍光試薬の開発に成功」という表題で、細胞の種類による内部温度分布の違いを比較することで、がん細胞などの病態細胞の新しい診断法が確立できる可能性が生じるなど、生物学や医学分野の発展に大きく貢献することが期待される成果として、原田、内山らの Nature Comm. (2012)の論文が紹介されている(科学技術振興機構・東京大学薬学部・奈良先端科学技術大学院大学プレスリリース 2012年2月29日)。

(v)「ヒト由来ギャップ結合チャネルの立体構造を世界で初めて解明—難聴や不整脈などの病気の治療戦略に役立つと期待—」の表題で、大型放射光施設 SPring-8 の大阪大学蛋白質研究所専用ビームラインの生体超分子構造解析ビームライン BL44XU を用いて、世界で初めてヒト由来ギャップ結合チャネルの立体構造を解明することに成功した藤吉、月原(兵庫県立大学)らの Nature(2009)の論文が紹介されている(SPring-8 プレスリリース 2009年4月2日)。

(vi)「神経・筋肉などに成長する新たな幹細胞、東北大教授ら発見」の表題で、藤吉、出澤(東北大)らが人の皮膚や骨髄の中から、神経や筋肉、肝臓などの人体の様々な組織に成長できる新しい「幹細胞」を発見し、この新しい細胞を「Muse(ミューズ)細胞」と命名したと報じられている(日経新聞 電子版 2010年4月20日)。これは NEDO の支援で実施した成果で Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2011)に論文として掲載されている。

(vii)「岩手医大機能生化学講座、ATP 酵素の仕組みを解明」の表題で、二井研究室の関谷瑞樹助教らの、V 型 ATP 合成酵素が活動と休止を繰り返し、エネルギーの無駄づかいともいえる V 型 ATP の加水分解を抑制していることを解明した J. Biol. Chem. (2010)の論文が紹介されている。二井は「V 型 ATPase はがん細胞の外へプロトンを送っており、将来的にはがんの転移を防ぐような薬の開発につながっていければ」とコメントしている(盛岡タイ

ムス Web News 2010 年 12 月 8 日)。

(viii) 「多剤排出トランスポーターの薬剤排出とアロステリック効果を分子シミュレーションで実証」の表題で、理化学研究所、高田(京都大学)、村上(東京工業大学)らの共同研究成果 Nature Comm. (2010)の論文が紹介されている(文部科学省新学術領域研究「ゆらぎと生体機能」ニュースレター No. 25 2010 年 12 月 28 日)。

同じ論文が、理化学研究所と京都大学の共同発表として、「多剤排出トランスポーター機能を分子シミュレーションで初解明—多剤耐性化のタンパク質 AcrB の 3 つの部分構造が順序良く機能する仮説を実証—」という表題でプレスリリースにも取り上げられている(理化学研究所プレスリリース 2010 年 11 月 17 日)。また、「多剤耐性菌の薬剤排出、タンパク質の機能解明、理研など模擬計算」の表題で日経産業新聞でも報道されている(日経産業新聞 2010 年 11 月 17 日)。

#### (4) 研究センター長など研究分野への貢献

遠藤は、2012 年 4 月から名古屋大学大学院理学研究科附属構造生物学研究センター長を兼務し、同大学の研究センターの発展に貢献している。

藤吉は、2008 年度から、NEDO の「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発／創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」のプロジェクトリーダーとして、創薬の加速に向けた基盤技術開発、有用化合物の生産技術開発などを目指している。

柳田は、2009 年に大阪大学と独立行政法人情報通信研究機構(NICT)で設立した「脳情報通信融合研究センター: CiNet」のセンター長に就任し、脳機能の理解を通して知の創造の促進によるコミュニティの生産性や競争力の向上を目指している。また、2010 年度から大阪大学キャンパス内に、理化学研究所「生命システム研究センター: QBiC」を設立し、センター長に就任し、生命機能システムを理解するために、計測、計算とモデル化、細胞機能の再構成のための最先端技術開発、を目指している。

また、大阪大学グローバル COE プログラム「高次機能システムのダイナミクス」の拠点リーダー(2007~2011 年度)、理化学研究所の HPCI 戦略プログラム「分野 1 予測する生命科学・医療及び創薬基盤、HPCI 計算生命科学推進プログラム」のプログラムディレクターも務め同大学の研究の進展に貢献している。

高田は、理化学研究所「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発プロジェクト」(2006 年 10 月発足)の「次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ 分子スケール研究開発チーム(リーダー木寺詔紹)」に参画して京都大学の拠点代表として、「CafeMol 粗視化分子モデル計算」を担当した(2007~2012 年度)。高田の開発した「CafeMol プログラム」が理化学研究所に設置されたスーパーコンピューター「京」で試験的に実装され、2011 年 10 月までに試験実効効率 20%を超えた。2012 年 10 月から「京」が本格稼働することでさらに大きな役割を果たす。

### 第3章 各研究課題の主な研究成果および波及効果

#### 3.1 2002年度採択課題

##### 3.1.1 生物ナノマシーン回転運動の一般化作動機構の解明(相沢 慎一)

###### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

###### ①研究のねらい

バクテリアのべん毛モーターは水素イオンの流れで回転する運動器官だが、回転運動のメカニズムについては想像の域を出ないモデルがいくつかある。本研究では、バイオインフォマティクス手法でべん毛構成タンパク質の起源を探り、それぞれのパーツの由来および機能特性を明らかにすることで回転運動の起源を探ることを目指した。

###### ②期間中の研究成果

(i) 大腸菌 H<sup>+</sup>駆動型べん毛の温度過敏感株を用いて、温度変化によりモーターの回転が変動することを示した。その変異部位は従来から仮定されている FliG の電荷の多い部位ではなく、FliG の電荷の少ない中位にあり、べん毛モーターの回転子が熱運動の影響を受けることを初めて示した<sup>1)</sup>。この結果はトルク発生における静電相互作用へ疑問を投げかけた。

(ii) べん毛のフックの長さ制御に関する「計量カップモデル」ならびに「モノサシモデル」に対して、根拠となる新しいデータを提供し<sup>2)</sup>、べん毛の長さ調節における物差し理論への反論を投げかけた。

(iii) 海洋性ビブリオ菌のべん毛基部体を精製し、MotX と MotY を基部体画分に検出し、その免疫電子顕微鏡観察から、MotX と MotY は LP リングの周囲に存在していることを示した。ビブリオ菌 LP リングの下側には、これまでに他のグラム陰性細菌では観察されていない新たなリング構造が観察され、T リングと名付けた。motX motY 欠変異株では T リングは存在せず、motX motY 変異株では、GFP を融合した PomA と PomB の極局在が低下したことから、T リングは MotX, MotY で構成され、PomA/PomB 複合体のモーターへの組み込み/安定化に寄与している可能性が示唆された<sup>3)</sup>。この結果は、静電相互作用モデルに疑問を呈するなど、トルク発生機構に一石を投じた。

###### ③研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Mashimo T, Hashimoto M, Yamaguchi S, Aizawa S-I “Temperature hyper-sensitive sites of the flagellar switch component FliG in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.” *J. Bacteriol.*, 189, 5153-5160 (2007)
- 2) Shibata S, Takahashi N, Chevance F.F.V., Karlinsey JE, Hughes K.T., Aizawa S-I

“FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler.” *Mol Micro.* 64,1404-1415 (2007)

- 3) Terashima H, Fukuoka H, Yakushi T, Kojima S, Homma M, “The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na<sup>+</sup>-driven flagella and required for stator formation.” *Mol. Micro.* 62, 1170-1180 (2006)

## (2) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後も広く海外の研究者と交流を持ち共同研究を行っており、発表論文からも、広く海外の研究者と交流を持って研究を進めていることがうかがえる。ノッチングム大学(英)の Sockett 教授との共同研究論文が 5 報、クインズ大学(カナダ)の Jarrell 教授との共同研究論文 4 報、ユタ大学(米)の Hughes 教授との共同研究論文が 3 報ある。

### ① 科学技術の進歩への貢献

#### (i) ベン毛形成における C-リング構成タンパク質の役割解明

ベン毛細胞質リング(C-リング)は FliG、FliM、FliN の 3 つのタンパク質から構成され、ベン毛タンパク質の分泌、トルクの発生、モーターの回転方向切り替えに必要な多機能構造を有している。今回これらのタンパク質が欠損したミュータントを用いてそれらの機能を調べた結果、FliG、FliM、FliN の 3 つのタンパク質のいずれも、ベン毛タンパク質の分泌、トルクの発生、モーターの回転方向の転換など、正常なベン毛モーター機能に必須の役割を果たしていることを確認した<sup>1)</sup>。

#### (ii) ボレリア・ブルグドルフェリ菌のベン毛構造の解明

ライム病の病原菌ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) はマダニに媒介されるスピロヘータの一種であり、細胞周辺のベン毛(ペリプラスム性ベン毛: PFs) で運動している。PFs は基底小体、フック、ベン毛から構成されており、その構造は他のバクテリアに類似している。それらの構造を調べ、そのフックタンパク質は高分子量の複合体であり細胞周辺腔で形成されていることを解明した<sup>2)</sup>。これは、ウエスト・バージニア大学(米) Charon の本研究課題の成果がその後に発表されたものである。

#### (iii) ピロリ菌の走行性に関する研究成果

ヒトの胃潰瘍や十二指腸潰瘍を引き起こすヘリコバクターピロリ菌はベン毛と化学刺激による走化性 (Chemotaxis) で動いている。ケモタクシスセンサータンパク質の性質を変異体を使って調べ、細胞内のエネルギーセンサー TlpD がピロリ菌の走化性に重要な役割を果たしていることを新たに提唱した<sup>3)</sup>。これは、ハノーバー医科大学(独) Josenhans による本研究課題の発展研究成果である。

#### (iv) デロビブリオ菌の細菌捕食機能に関する研究成果

グラム陰性菌のデロビブリオ菌 (*Bdellovibrio bacteriovorus*) の細菌捕食機能に関し、cyclic di-GMP によるシグナル伝達機構が必須の役割を果たしていることを解明した<sup>4)</sup>。

これは、ノッチングム大学(英) Sockett による本研究課題の発展研究成果の一つである。

## ②社会経済的波及効果

べん毛モーターの回転原理が解明されれば、細菌の感染機構の解明や、新しい原理で動く分子モーターの開発、および、その医療分野への応用も期待できる。

そのために、サルモネラ菌以外の枯草菌、根粒菌、ビブリオ菌、光合成細菌、植物病原菌など各種バクテリアのべん毛モーターの働きを調べる方向に研究を展開している。

特に、ノッチングム大学(英)の Sockett との共同研究は本研究領域期間中から「べん毛交流会」を通して現在に至るまで長く継続しており、この日英共同研究チームは、基礎科学・応用科学の分野で優れた提携プロジェクトとされている。

その他の海外との共同研究の代表的な例として、ウエスト・バージニア大学(米)の Charon とライム病の病原菌であるボレリア・ブルグトフェリ細菌に関する研究<sup>2)</sup>、ハノーバー医科大学(独)の Josenhans と胃潰瘍の原因細菌ヘリコバクター・ピロリ菌に関する研究<sup>3)</sup>、クインズ大学の Jarrell (カナダ)とのメタン生成など地球上の物質循環に寄与する古細菌(Archaea)に関する研究、ユタ大学の Hughes (米)との食中毒を引き起こすサルモネラ菌に関する研究などがある。

## ③上記継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Konishi M, Kanbe M, McMurry J.L., Aizawa S-I, “Flagellar formation in C-ring-defective mutants by overproduction of FliI, the ATPase specific for flagellar type III secretion.” *J. Bacteriology*, 191 (19), 6186-6191 (2009)
- 2) Sal MS., Li C, Motalab MA, Shibata S, Aizawa S-I, Charon NW, “*Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure.” *J. Bacteriology*, 190 (6), 1912-1921 (2008)
- 3) Schweinitzer T, Mizote T, Ishikawa N, Dudnik A, Inatsu S, Schreiber S, Suerbaum S, Aizawa S-I, Josenhans C, “Functional characterization and mutagenesis of the proposed behavioral sensor TlpD of *Helicobacter pylori*.” *J. Bacteriology*, 190 (9), 3244-3255 (2008)
- 4) Hogley L, Fung RKY, Lambert C, Harris MATS, Dabhi JM, King SS, Basford SM, Uchida K, Till R, Ahmad R, Aizawa S-I, Gomelsky M, Sockett RE, “Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*.” *PLoS Pathogens*, 8(2), art.no.e1002493 (2012)

## ④その他

10以上の海外研究所と共同研究体制を組んで研究を進めており、毎年海外から数人の院生・ポスドクなどの研修生を受け入れ、日本からも海外に学生を送り出している。

本研究領域の研究分担者である本間道夫(名古屋大学大学院理学研究科 教授)の研究室

では、通常は $H^+$ で回転する大腸菌のモーターを、遺伝子組替えにより $Na^+$ 駆動型に変換して解析を容易にする、べん毛繊維にビーズを付けて回転を測定する、モーターの回転を担うタンパク質を蛍光でラベルし膜上での挙動を観察する、タンパク質を合成・精製してその構造を原子レベルで決定し、更に膜小胞中に組み込んで一からモーターを作り出す、などの試みによって、膜を介したイオンの流れが回転力へと変換される様子を、分子レベルで解明することを目指している。

なお、ノッチングム大学(英)の Sockett 教授との日英共同研究は、基礎科学・応用科学の分野で優れた提携プロジェクトとして本研究領域期間中に大和エイドリアン賞(2007年)を受賞している。

「べん毛交流会」は現在も続いている。

### 3.1.2 タンパク質分子モーターを利用したナノメカノケミカルマシンの創成(伊藤 博康)

#### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

##### ①研究のねらい

生体内には、化学的エネルギーを力学的エネルギーに直接変換するタンパク質や RNA でできた分子機械があるが、分子機械を「力づくで化学反応を逆行させる」ことを人工的に実現した例は未だない。そこで、分子機械に、力を加えて(力学的操作)化学合成を行わせる、あるいは力により化学反応を制御するというナノメカノケミカルマシンを創り出すことを目指した。

##### ②期間中の研究成果

(i) 分子モーターである ATP 分解酵素のローターである  $\gamma$  サブユニットに磁性ビーズをとりつけ、強制的に逆回転することにより、F1-ATPase が ADP と Pi から ATP を合成し溶液中に放出することを証明した。力学的エネルギーの化学エネルギーへの直接変換に初めて成功した<sup>1)</sup>。

(ii) ATP の蛍光アナログである Cy3-ATP の結合と解離、ローターである  $\gamma$  サブユニットの加水分解方向および合成方向の回転挙動の観測により、F1-ATPase の回転と加水分解を連動させる仕組みの全容を明らかにした。ATP の活性部位への結合による  $80^\circ$  のサブステップに引き続き、 $40^\circ$  のサブステップは、リン酸の解離が引き金となる。また、結合した ATP は、 $240^\circ$  活性部位に留まって、ADP として放出される。リン酸の放出が、構造変化の駆動力となることを示すことができたことは、他のモータータンパク質の働くメカニズムの解明に関しても重要な知見を与えることになった<sup>2)</sup>。

(iii) F1-ATPase は ATP の加水分解による自由エネルギー変化を利用して回転する分子モーターであるが、その入力自由エネルギーを実際に ATP、ADP、Pi の濃度比を系統的に変化させて、ステップ回転に対する影響を観察した。その結果、入力自由エネルギーの効果は、ステップ運動そのものではなく、ステップの起こる頻度の変化として現れることが明らかになった。一分子のエネルギー論を考える上で極めて重要な結果であり、全ての分子モーターの研究の中で、このようなことを調べた研究は他にはなかった<sup>3)</sup>。

本研究の成果は、これまで予想されなかった機能を実現することにより、ソフトナノマシンとしての分子機械のメカニズムの解明に資するだけでなく、バイオテクノロジーの新機軸の一つとなることが期待された。

##### ③研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Itoh H, Takahashi A, Adachi K, Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita Jr. K, "Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase.", Nature, 427, 465-468 (2004)
- 2) Adachi K, Oiwa K, Nishizaka T, Furuike S, Noji H, Itoh H, Yoshida M, Kazuhiko

Kinosita Jr. K, “Coupling of Rotation and Catalysis in F1-ATPase Revealed by Single-Molecule Imagineand Manipulation.” *Cell*, 130, 309-321 (2007)

- 3) Muneyuki E, Watanabe-Nakayama T, Suzuki T, Yoshida M, Nishizaka T, Noji H. “Single Molecule Energetics of F1-ATPase Motor.” *Biophys. J.* 92, 1806-12 (2007)

## (2) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域期間中の *Nature* (2004) の論文が最大の業績であり、被引用件数も多いが、本研究領域終了後は、研究分担者であった早稲田大学の木下一彦の本研究領域関連論文の共著者となっている。

### ① 科学技術の進歩への貢献

本研究領域期間終了後は研究分担者であった早稲田大学の木下一彦が本研究課題の成果を共著論文として報告している。

#### (i) 1 分子観察による分子モーターの回転機構

F1-ATPase 分子モーターの回転力の発生に回転軸のどの領域が不可欠なのかを調べるため、N 末と C 末からアミノ酸を遺伝子操作で段階的に削った変異体を作成し、1 分子観察によりその回転の様子を調べた。その結果、最終的に F1-ATPase は回転軸がなくても正しい方向に回転することが分かった<sup>1)</sup>。

#### (ii) 分子モーターの回転制御機構

F1-ATPase 分子モーターの回転制御機構を知るために、分子モーターの先端にポリスチレンビーズを付けて、温度を 4~50°C の範囲で変化させて回転の温度依存性や F1-ATPase の加水分解活性を調べた<sup>2)</sup>。

さらに、C 末のアミノ酸のみを削った検討で、ヘリックス領域の役割を調べた結果、回転軸の Coiled coil 領域のヘリックスは回転力には大きな役割を果たしていないことが分かった<sup>3)</sup>。

### ② 社会・経済的波及効果

2005 年に浜松ホトニクス(株)から出願した「連結分子モーター及び ATP センサー」の特許は 2011 年 12 月 9 日に特許番号 4878152 として登録されている。

### ③ 上記継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Furuike S, Hossain MD, Maki Y, Adachi K, Suzuki T, Kohori A, Itoh H, Yoshida M, Kinosita Jr. K, “Axle-less F1-ATPase rotates in the correct direction.” *Science*, 319 (5865), 955-958 (2008)
- 2) Furuike S, Adachi K, Sakaki N, Shimo-Kon R, Itoh H., Muneyuki E, Yoshida M, Kinosita Jr. K, “Temperature dependence of the rotation and hydrolysis activities of F1-ATPase.” *Biophysical J.*, 95 (2), 761-770 (2008)

- 3) Hossain MD, Furuike S, Maki Y, Adachi K, Suzuki T, Kohori A, Itoh H, Yoshida M, Kinoshita Jr. K, “Neither helix in the coiled coil region of the axle of F<sub>1</sub>-ATPase plays a significant role in torque production.” *Biophysical J.*, 95 (10), 4837-4844 (2008)

#### ④その他

本研究課題の研究分担者であった木下一彦(早稲田大学理工学術院 教授)は、本研究領域終了後、科研費特別推進研究「一分子生理学を超えて：生体分子機械を力で優しく働かせる」(2009～2013年度)で本研究課題の研究をさらに発展させ、F<sub>1</sub>-ATPaseの回転機構、ATP合成酵素、リニア分子モーターの研究を行っている。

### 3.1.3 タンパク質トランスロケータの作動原理の解明(遠藤 斗志也)

#### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

##### ①研究のねらい

細胞内で、タンパク質が本来の機能を発現するため、タンパク質の交通や生体膜を舞台とするタンパク質の配置において、中心的役割を担うのがトランスロケータである。トランスロケータはミトコンドリアと小胞体に存在し、ミトコンドリア以外の細胞内オルガネラの膜系は小胞体由来である。本研究では、トランスロケータによる局在化シグナル読み取りの仕組み、タンパク質通過用チャンネルの機能、モーター機能の原動力、膜へのタンパク質組込みの仕組みの解明を目指した。

##### ②期間中の研究成果

(i) ミトコンドリアタンパク質は、ミトコンドリアの外膜と内膜の二枚の生体膜を通過して、ミトコンドリア内に取り込まれる。この膜透過を担う外膜上のトランスロケータのタンパク質を通す孔の性質を解析し、この孔がつるつるではなく、膜透過するアンフォールドしたタンパク質を保護するシャペロンとしての機能を有することを発見した<sup>1)</sup>。

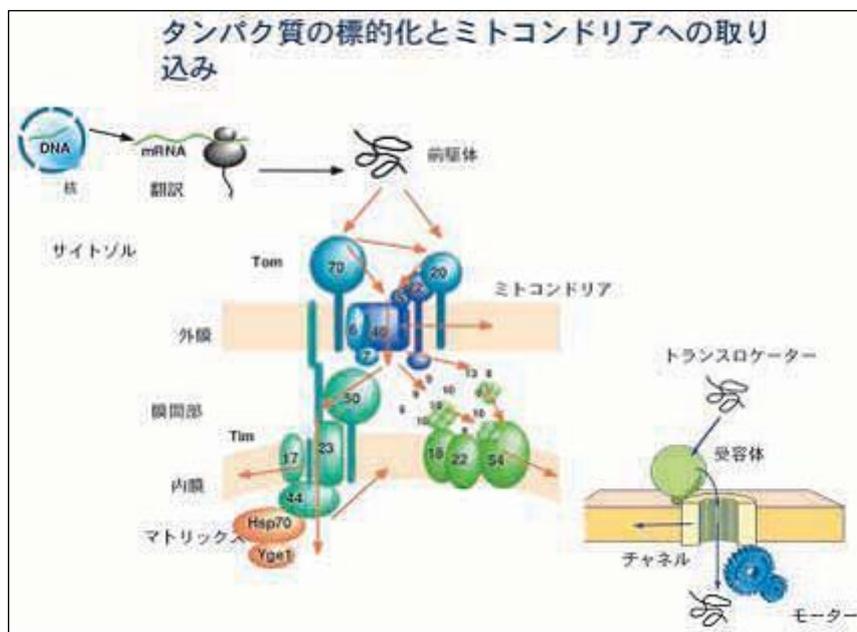


図 3-1 タンパク質の標的化とミトコンドリアへの取り込み

(ii) ミトコンドリア内にタンパク質が入るときにタンパク質の立体構造がどのようにほどけるかについて、力学的にタンパク質の立体構造をほどく場合との相違を明らかにした。ミトコンドリアタンパク質の様々な変異体について、それらがアンフォールディングしてミトコンドリア内に取り込まれる過程と AFM による力学的なアンフォールディングを詳細に比較した。その結果、ミトコンドリアの膜透過装置は、ミトコンドリア行きシグナル近

傍が部分的にほどけた「中間体」と相互作用し、その安定性を減少させることによって分子全体の効率的なアンフォールディングを引き起こすことが明らかになった<sup>2)</sup>。

(iii) 小胞体への局在化とトランスロケータ孔への進入を引き起こすシグナル配列は疎水性のアミノ酸配列からなる。近傍の正電荷を持つアミノ酸が、疎水性配列の配向を決定する。このようなトランスロケータによる配向決定が疎水性配列から予想以上に遠い位置にある正電荷アミノ酸によって制御されることを示した。小胞体トランスロケータ孔のダイナミクスの考察に重要な進展と考えられた<sup>3)</sup>。

本研究の成果は、オルガネラや細胞表層機能の改変、新しいドラッグデリバリーシステムや膜を足場とした精密なタンパク質集積技術の開発などへの展開が期待された。

### ③研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Esaki M, Kanamori T, Nishikawa S, Shin I, Schultz PG, Endo T, “Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents their aggregation.” *Nature Struct. Biol.* 10, 988-994 (2003)
- 2) Sato T, Esaki M, Fernandez JM, Endo T, “Comparison of the protein unfolding pathways between mitochondrial protein import and atomic force microscopy measurements.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 17999-18004 (2005)
- 3) Kida Y, Morimoto F, Mihara K, Sakaguchi M, “Function of positive charges following signal-anchor sequences during translocation of theN-terminal domain.” *J. Biol. Chem.*, 281, 1152-1158 (2006)

### (2) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科研費基盤研究(S)「ミトコンドリアタンパク質の交通管制機構とその改変」(2006～2010 年度)、「ミトコンドリア膜を舞台としたタンパク質の交通管制機構の解明」(2010～2014 年度)、及び、特定領域研究「酵母ミトコンドリア小胞体タンパク質の機能発現・秩序維持システムの解明」(2007～2011 年度)、「タンパク質社会の研究の成果のとりまとめ」(2010～2014 年度)で研究を進め下記の成果を得た。

また、新たにCREST研究領域「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」(研究総括：田中啓二)2012年度に採択され、研究代表者として「ミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワークの解明」の研究を開始した。

### ①科学技術の進歩への貢献

#### (i) ミトコンドリア内膜の膜透過装置TIM23複合体の作用機構の解明

タンパク質のミトコンドリア内膜を担う膜透過装置TIM23複合体の働く仕組みを、TIM23複合体を構成するTim23とTim50という二つの部品の膜間部における相互作用の役割、という観点から明らかにした。ミトコンドリアを構成するタンパク質は、ミトコンドリアの

外で合成されてから、ミトコンドリアを取り囲む外膜と内膜を通過して内部に入り、そこではじめて働くことができる。TIM23 複合体はこうしたミトコンドリアタンパク質の内膜通過を担う分子機械である。今回、TIM23 複合体の構成部品である Tim23 と Tim50 が、膜間部で結合することで、外膜から内膜へのタンパク質の受け渡し効率を上げ、内膜通過に必要なマトリクスのモータータンパク質群を活性化するスイッチを入れることを見いだした。このことは内膜の膜透過装置 TIM23 複合体がその部品の相互作用を通じて、外膜と内膜、内膜の膜間部側とマトリクス側で起こる様々なイベントを調整し、タンパク質の効率よい膜透過を実現していることを示している<sup>1)</sup>。

### (ii) ミトコンドリア膜間部のジスルフィドリレーシステム構造生物学的解析

ミトコンドリア内でタンパク質にジスルフィド結合を導入するタンパク質 Tim40 (Mia40) の結晶構造を、マルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質の形で決定し、Tim40 が基質タンパク質内にジスルフィド結合を形成させる仕組みの手がかりを得ることに成功した。最近細胞内では、分泌経路の入り口である小胞体内部だけでなく、ミトコンドリア内の膜間部でもタンパク質内にジスルフィド結合が導入されることが分かってきた。Tim40 はこのミトコンドリア内でのジスルフィド結合導入を担うタンパク質で、導入に必須の Tim40 内のジスルフィド結合の位置、基質が結合する疎水的な窪みの存在などが明らかになった。さらにこの基質結合部位は Tim40 に酸化力を提供するパートナータンパク質 Erv1 との相互作用にも重要であることが分かった。ミトコンドリアにおけるタンパク質のジスルフィド結合形成を担う Tim40 の機能解明の本質に迫るものである<sup>2)</sup>。

### (iii) ミトコンドリアのタンパク質相互作用のマッピングに成功

ミトコンドリアタンパク質の多くは、「ミトコンドリア行きシグナル」が書き込まれたプレ配列が付加された前駆体として合成され、ミトコンドリア外膜の膜透過装置 TOM40 複合体、内膜の膜透過装置 TIM23 複合体の働きで外膜と内膜の 2 枚の膜を通過して内部に移行する。TOM40 複合体のサブユニット Tom22 は、外膜表面でプレ配列中のミトコンドリア行きシグナルを認識、外膜中で TOM40 複合体のチャンネル構造を安定化し、外膜の膜間部側でプレ配列を再度認識するとともに、内膜の TIM23 複合体に効率よく前駆体を受け渡す。今回 *in vivo* 部位特異的光架橋の手法を用いて、Tom22 が多様な機能を実現するために、TOM40 複合体や TIM23 複合体の他のサブユニットと相互作用を変化させていく様子を、高い空間分解能でマッピングすることに成功した<sup>3)</sup>。

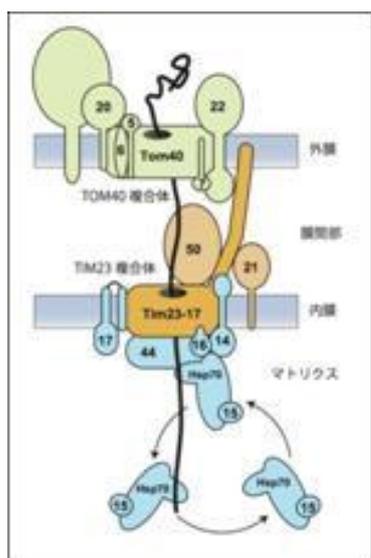


図 3-2 タンパク質膜透過装置

(iv) モデル植物シロイヌナズナの極核融合の分子機構に関する研究成果

細胞核の融合は、動植物など様々な生物の有性生殖の進行に必須な過程だが、その分子機構はほとんどわかっていない。今回、モデル植物シロイヌナズナで、小胞体シャペロン BiP を欠損すると植物の有性生殖過程における核融合のひとつである極核融合がおこらなくなることを発見した。さらに、受精後の胚乳核の分裂制御には、極核の融合が必要であることも見いだした<sup>4)</sup>。

②社会・経済的波及効果

今回の成果は、ミトコンドリアにおけるタンパク質の膜透過を担うトランスロケータの動的でインテリジェントな機能の実体と仕組みを明らかにしたもので、優れた分子機械であるトランスロケータの作動原理の解明は、細胞内のエネルギー生産工場であり、老化などとも密接な関係をもつミトコンドリアの形成の仕組みを解明する糸口となる。

「相互作用地図のスナップショットを何枚も撮る」手法は、他の系にも広く適用できる有用な手法である。

さらに、植物の有性生殖過程における核融合の発見<sup>4)</sup>は、核融合の分子機構が酵母と植物の間で保存されていることを示しており、有性生殖過程における核融合のメカニズム一般の解明に大きな進展をもたらす。また、細胞核の融合と分裂の制御機構解明につながるとともに、胚乳形成の新たな制御機構の存在を示すものであり、農作物などへの応用研究の基礎ともなりうる。

③上記、継続と発展状況を示す研究成果主な成果に関連した論文リスト

- 1) Tamura Y, Harada Y, Shiota T, Yamano K, Watanabe K, Yokota M, Yamamoto H, Sesaki H, Endo T, “Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import.” *J. Cell Biol.* 184, 129-141 (2009)
- 2) Kawano S, Yamano K, Naoe M, Momose T, Terao K, Nishikawa S, Watanabe N, Endo T, “Structural basis of yeast Tim40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space.” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,106(34),14403-14407(2009)
- 3) Shiota T, Mabuchi H, Tanaka-Yamano S, Yamano K, Endo T, “In vivo protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work.” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 108 (37),15179-15183(2011)
- 4) Maruyama D, Endo T, Nishikawa S, “BiP-mediated polar nuclei fusion is essential for the regulation of endosperm nuclei proliferation in *Arabidopsis thaliana*.” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 107(4)1684-1689 (2010)

④その他

遠藤は名古屋大学総長補佐(兼務)(2009年5月～)、独立行政法人日本学術振興会学術シ

ステム研究センター専門研究員(委嘱)(2010年5月～)、日本生化学会理事(2011年10月～)、名古屋大学大学院理学研究科付属構造生物学研究センター長(兼務)(2012年4月～)など、大学・研究センター及び学会の運営・管理にも貢献している。

遠藤グループの江崎雅俊(本研究領域当時、学振PD)は2008年より、熊本大学・発生医学研究所・助教に異動している。准教授の西川周一は2012年4月より、新潟大学理学部生物学科・教授に昇進・異動している。

### 3.1.4 振動するバイオナノマシンの原理と構築(神谷 律)

#### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

##### ①研究のねらい

べん毛・繊毛は高速の波動運動を行う細胞器官で、原生動物からヒトにいたる多くの生物で細胞の運動や物質の輸送に重要な働きをしている。本研究では、その波動を作り出している主要なタンパク質を用いて振動運動を発生する人工運動系を構築することを目的にした。

##### ②期間中の研究成果

(i) べん毛の基部体は動物細胞の中心子と相同の構造を持つが、この小器官が形成される機構は細胞生物学上の大きな謎とされているので、べん毛の欠損した変異株を分離し、解析したところ、有糸分裂紡錘体と細胞質の微小管が乱れ、異常な細胞分裂を示した。この欠損タンパク質は基部体近傍に局在するコイルタンパク質であり、べん毛の組み立てに必須であると示唆された<sup>1)</sup>。

(ii) べん毛・繊毛の運動を駆動するダイニンには、内腕、外腕と呼ばれる構造中に多くの分子種が含まれるため、特定の内腕ダイニン分子種を欠いた変異株の解析から、単頭型ダイニンと呼ばれるダイニンの構造と機能の特徴を明らかにした。このタイプのダイニンのアミノ酸配列が決定されたのは全生物種を通じて初めてのことである<sup>2)</sup>

(iii) 精製した細胞質ダイニン 1 分子の力学計測を行い、ステップサイズ、最大力、滞在時間を求めた結果、キネシンと同様な hand-over-hand メカニズムが考えられることを示した<sup>3)</sup>。

(iv) 部分解体した軸系中で、2本の微小管だけで振動的運動が発生することを証明した<sup>4)</sup>。この結果は、べん毛運動の基礎過程を直視したものとして、海外研究者にも注目されている。

本研究の成果からは、振動現象の再構成という目標は達成されていないが、ダイニン内腕を構成するダイニンの網羅的な遺伝子解析を進め、新しいダイニン(単頭型)を発見したこと、クラミドモナスの突然変異体を活用して遺伝子とその発現タンパク質(とくにダイニン)との対応関係を明らかにしたことなど幾つもの成果を挙げた。

##### ③研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Matsuura K, Lefebvre PA, Kamiya R, Hirono M, “Bld10p, a novel protein essential for basal body assembly in Chlamydomonas : localization to the cartwheel, the first nine-fold symmetrical structure appearing during assembly.” J. Cell Biol. 165, 663-671 (2004)

- 2) Yagi T, Minoura I, Fujiwara A, Saito R, Yasunaga T, Hirono M, Kamiya R, "An axonemal dynein particularly important for flagellar movement at high viscosity: implications from a new Chlamydomonas mutant deficient in the dynein heavy chain gene Dhc9." J. Biol. Chem., 280, 41412-41420 (2005)
- 3) Toba S, Watanabe TM, Yamaguchi-Okimoto L, Toyoshima YY, Higuchi H, "Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 5741-5745 (2006)
- 4) Aoyama S., Kamiya R. "Cyclical interactions between two outer doublet microtubules in split flagellar axonemes", Biophys. J. 89, 3261-3268. (2005).

## (2) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科研費基盤研究(A)「べん毛・繊毛軸系における高次規則構造の形成機構」(2005～2008年度)などで研究を進め下記の成果を得た。

本研究領域期間中から一貫してクラミドモナスを用いた研究、特に、べん毛およびダイニンの運動に関する研究が主体で、優れた成果を上げている。

### ① 科学技術の進歩への貢献

#### (i) クラミドモナスにおける Ktu/PF13 遺伝子の機能解明

ヒト遺伝病である繊毛病の原因遺伝子である Ktu/PF13 は、武田(東京大学)らによって、日本で開発された実験動物メダカを用いた研究により発見された。これは細胞質において軸系ダイニン複合体形成に必須な遺伝子である。

神谷は、武田(東京大学)、David R. Mitchell (SUNY Upstate Medical University, 米国)と協力して、これまで取り扱ってきた単細胞生物クラミドモナスでもこの遺伝子が破壊されるとべん毛の運動が停止すること、そしてその原因がダイニンアーム前駆体の形成阻害にあることも突き止めた。これにより、細胞・器官の機能に重要な繊毛・べん毛がもつダイニン複合体の新たな形成過程が明らかとなった<sup>1)</sup>。

(ii)  $\alpha$ -チューブリンの長いポリグルタミン側鎖の欠損により、軸系構造は正常のままダイニン内腕の機能が阻害され、べん毛の運動性が低下することを見出した<sup>2)</sup>。

#### (iii) 緑藻細胞の走光性の正・負の決定因子の解明

クラミドモナスは走光性を示し、光源の方向に向かって、あるいは光源の反対方向に泳ぐ。その走光性の正・負を決定する細胞内因子を明らかにすることを目的に研究を行い、細胞内の酸化・還元バランスの変化に応じて走光性の正負を切り替えるという結果を得た。この研究は、長年の謎であった行動のスイッチング機構を明らかにしたものとして高く評価されている<sup>3)</sup>(図 3-3 参照)。

本研究から、光合成の活性変化などによって起きる細胞内の酸化・還元バランスの変化が、上図 1～3 の過程のどこか、あるいは全てに影響して走光性の正・負が決まると考えら

れる。1～3のどこが影響を受けているのかを調べるのが今後の課題である。

クラミドモナスを実験材料として、様々なダイニンに異常をもつ変異株を単離・解析するというアプローチにより、多様なダイニン分子を見出した。また、変異株の運動性の変化を解析することによって、周辺微小管の単純な滑りでは実現できない波動運動が、多様なダイニンの働きによって実現していることを示した。これにより、動物に普遍的に存在するべん毛運動の分子機構の理解を進展させた。

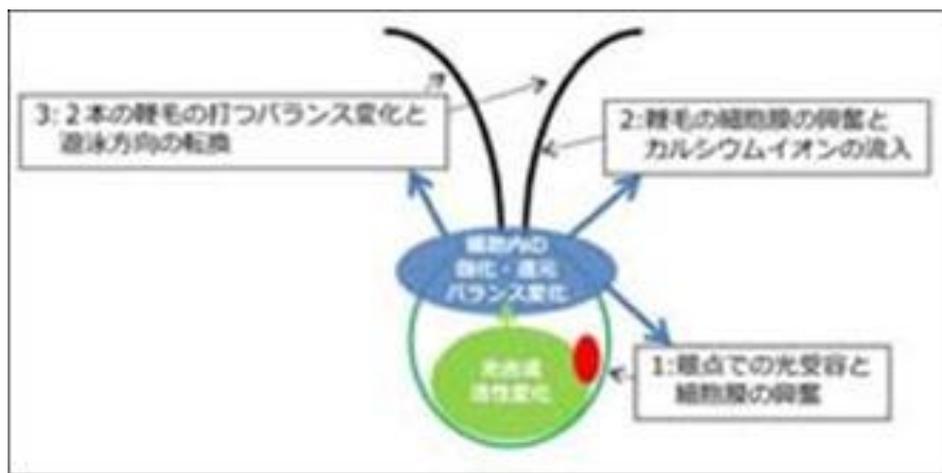


図 3-3 クラミドモナスの走光性のメカニズム

(図の説明) 現在までに分かっているクラミドモナスの走光性のメカニズム(1～3)。  
眼点のチャンネル型ロドプシンと呼ばれる光受容体が光を受けると細胞膜が興奮し(1)、次いでべん毛の細胞膜が興奮してべん毛内にカルシウムイオンが流入する(2)。クラミドモナスの2本のべん毛はカルシウムイオンに対する応答性が異なるために打つバランスが変化し、それによって方向転換すると考えられている(3)。

## ②社会・経済的波及効果

最近のゲノム研究によれば、クラミドモナスのべん毛関連遺伝子のほとんどは哺乳類にホモログが存在し、そのいくつかはヒトの遺伝病として古くから知られている不動繊毛症候群(男性不妊症、慢性の気管支炎など)の原因遺伝子であると言われている。また、最近、腎臓疾患や内臓逆位など、これまでべん毛・繊毛とは直接関連づけられていなかった疾患との関連も見いだされ、クラミドモナスを用いた研究は医学分野からも注目されている。

酸化・還元状態の変化が作り出すシグナルが、広範な細胞内の現象において重要な役割を果たしていることが近年次々に明らかになってきた。

また、最近、緑藻細胞に軽油を産生させてそれをバイオ燃料とし、発電で出た二酸化炭素を緑藻の光合成で吸収させるというクリーンエネルギーの研究が盛んに行われている。今回のクラミドモナスでの研究成果は、ポンプも遠心機も用いずに藻類細胞を簡便に濃縮する技術の開発につながるなど、緑藻細胞の基礎研究と工業的応用に貢献する可能性がある。

### ③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な研究論文

- 1) Omran H, Kobayashi D, Olbrich H, Tsukahara T, Loges NT, Hagiwara H, Zhang, Q, Leblond G, O'Toole E, Hara C, Mizuno H, Kawano H, Fliegauf M, Yagi T, Koshida S, Miyawaki A, Zentgraf H, Seithe H, Reinhardt R, Watanabe Y, Kamiya R, Mitchell DR, Takeda H, "Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins." *Nature*, 456 (7222), 611-616 (2008)
- 2) Kubo T, Yanagisawa H, Yagi T, Hirono M, Kamiya R, "Tubulin Polyglutamylation Regulates Axonemal Motility by Modulating Activities of Inner-Arm Dyneins." *Current Biology*, 20 (5), 441-445.(2010)
- 3) Wakabayashi K-I, Misawa Y, Mochiji S, Kamiya R, "Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 108 (27), 11280-11284 (2011)

### ④その他

神谷は、2012年3月に東京大学を退官し4月から学習院大学に移籍したが、その後の研究は広野雅文准教授が研究室をまとめ、主に中心小体の自己複製機構の研究に取り組んでいる。

本研究課題の研究分担者であった、豊島陽子(東京大学大学院総合文化研究科 教授)は本研究領域終了後、科研費基盤研究(B)「ダイニン分子の運動における複数頭部間の協同性」(2008～2010年度)でダイニンの研究を行った。

同じく、本研究課題の研究分担者であった、上村慎治(東京大学大学院総合文化研究科准教授)は、本研究領域終了後 中央大学教授に昇任し、科研費特定領域研究「超高分解能光学顕微鏡の開発と応用」(2009～2010年度)で顕微鏡開発の研究を実施した。

神谷グループの、八木俊樹(本研究領域当時、東京大学大学院理学系研究科助教)は、2009年より、東京大学・大学院・医学系研究科講師に昇任した。

柳澤春明(東京大学大学院理学系研究科 CREST 研究員)は、2007年より東京大学大学院理学系研究科・理学部 生物科専攻特任助教(COE 特任教員)に就任した。

神谷は、クラミドモナスを実験材料として、多様なダイニンの働きを解析し、動物に普遍的に存在するべん毛運動の分子機構の理解を著しく進展させたことが評価され、「日本動物学会賞」(2012年)を受賞している。

### 3.1.5 遺伝子デリバリーシステムとしての人工細胞核の創製(原口 徳子)

#### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

##### ①研究のねらい

細胞核は染色体分離に先がけて崩壊し、染色体分離が完了すると染色体の周りに核膜が自己集合的に形成されることにより、再形成される。本研究は、まず、染色体の周りに核膜が形成される機構を明らかにし、さらに、その原理を利用し操作することにより特殊機能を持った人工細胞核を創ることを目指した。

##### ②期間中の研究成果

(i) 核膜形成機構の解明では、BAF (barrier-to-autointegration factor) が、核膜形成にも重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、細胞周期の DNA 合成期の進行にも必要であることを証明した<sup>1)</sup>。

(ii) 「遺伝子デリバリーシステムの構築」では、人工細胞核の形成の延長として、ビーズに DNA を結合させたものを細胞核の「タネ」として用い、非生物素材だけで効率よくオートファジーを誘導できる実験系を作製することに成功した。「タネ」となる DNA の周りで自己集合的に細胞核が形成するか検討し、細胞内に核構造を作り出した。

(iii) 減数分裂期に染色体のテロメア(染色体末端)を核膜上の一点に束ねてくる分子機構を、分裂酵母を用いて解析し、核膜を貫通する 2 つのタンパク質(Sun タンパク質と KASH domain タンパク質)を介して、細胞質ダイニンモーターが、核内構造をリモートコントロール様式で動かすことを発見した<sup>2)</sup>。類似の仕組みは、後に、マウスや線虫にも存在することが分かった。

この成果は遺伝子デリバリーの担体を作製する上で重要であり、この知見に基づき、細胞に受け入れられる相性のよい素材の検索が可能になる。また、細胞核膜が自律的に再構成する機構の解明によって、細胞を模した人工的な封入体を作製する技術として遺伝子治療に大きな貢献をもたらすと期待された。

##### ③研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Haraguchi T, Koujin T, Osakada H, Kojidani T, Mori C, Masuda H, Hiraoka Y, “Nuclear localization of barrier-to-autointegration factor is correlated with progression of S-phase in human cells.” *J. Cell Sci.* 120, 1967-1977 (2007)
- 2) Chikashige Y, Tsutsumi C, Yamane M, Okamasa K, Haraguchi T, Hiraoka Y, “Meiotic proteins Bqt1 and Bqt2 tether telomeres to promote the bouquet arrangement of chromosomes in fission yeast.” *Cell*, 125, 59-69 (2006)

## (2) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、科研費特定領域研究「核膜の構造と染色体相互作用のダイナミクス」(2004~2008 年度)、基盤研究(B)「ライブクレムを基盤とする分子特異的ナノイメージング法の開発」(2009~2011 年度)、及び、新学術領域研究(研究領域提案型)「遺伝情報場形成に関わるテトラヒメナの選択的核輸送システムの解明」(2011~2015 年度)で下記の成果を得た。

### ① 科学技術の進歩への貢献

#### (i) ライブクレム法による核膜の構造と染色体相互作用のダイナミクス解析

本研究領域期間中に、培養細胞を用いて生細胞イメージング法と電子顕微鏡法とを組み合わせ、ひとつの細胞でダイナミクスを高解像度で解析できるライブクレム(live CLEM)法を独自に開発した。本研究領域終了後、ライブクレム法をさらに発展させ、これまで接着細胞に限定されていた適応範囲をより広い生物試料に広げ、より汎用性が高く空間精度の高いナノイメージング法の開発を目的に研究を進めた。本研究では、核膜と染色体に注目し、その構造とダイナミクスの解明を行うため、核膜と染色体の双方に結合する生体因子として Barrier-to-Autointegration Factor (BAF)や lamin A、Sun/Kash タンパク質などの核膜因子に注目し、ヒト細胞や分裂酵母を用いて、その細胞内動態と機能を解析し、核膜や核膜を構成する分子が、細胞増殖、分化、老化、アポトーシスに重要な働きをすることを分子レベルで明らかにした<sup>1)</sup>。

#### (ii) 染色体の構造変化に関わる核膜タンパク質を発見

細胞の減数分裂において、細胞核内に存在する染色体の末端(テロメア)が核膜上の1点に集合する特殊な構造(ブーケ配置)をとり、遺伝情報の組み換えが行われる。NICTの原口らはこの構造を形成する因子としてテロメアを核膜につなぎ止める働きがあるタンパク質(Bqt4)と、Bqt4を酵素による分解から守る働きがあるタンパク質(Bqt3)を新たに発見した。原口らは本研究課題の研究で減数分裂期に核膜とテロメアに結合する新しいタンパク質 Bqt1 及び Bqt2 を発見している(期中の成果論文4)参照)。その後さらに、Bqt3、Bqt4という新しいタンパク質を発見しその役割を突き止めたことは、核内における染色体の構造変化メカニズムの解明、減数分裂における細胞核構造の変化の意義を解き明かす上で大きな進展といえる<sup>4)</sup>。

#### (iii) テトラヒメナの大核・小核への選択的核輸送の仕組みの発見

繊毛虫は、転写の盛んな大核と転写不活性な小核がひとつの細胞内に存在する。この生物学的な特徴を生かして、転写の制御に関与する核輸送の仕組みを検討し、核膜孔複合体を構成するタンパク質のひとつである Nup98 がヒストン H1 を選択的に大小核へ運び分ける仕組みを発見した<sup>3)</sup>。この仕組みは、ヒトにまで保存されている可能性が高い。Nup98の異常は白血病の原因となることが知られており、この発見は、白血病の発症メカニズムの解明にも役立つ発見として注目されている。

#### (iv) 僅かなエネルギーで物質移動のバリアを消失させる生物メカニズムを発見

出芽酵母や分裂酵母に応用できるライブクレム法を用いて、栄養が枯渇した状況下の分裂酵母が第 2 減数分裂を起こす際に、Ran-GTP の勾配を作り出す因子の一つである RanGTPase 活性化因子 (RanGAP1) が核内へ流入することで、核膜や核膜孔複合体は構造を保っているにもかかわらず、選択的物質輸送機能が停止して、核内外の物質があたかも核膜が消失したかのように自由に移動し、混ざり合うことを発見した<sup>4)</sup> (図 3-4 参照)。

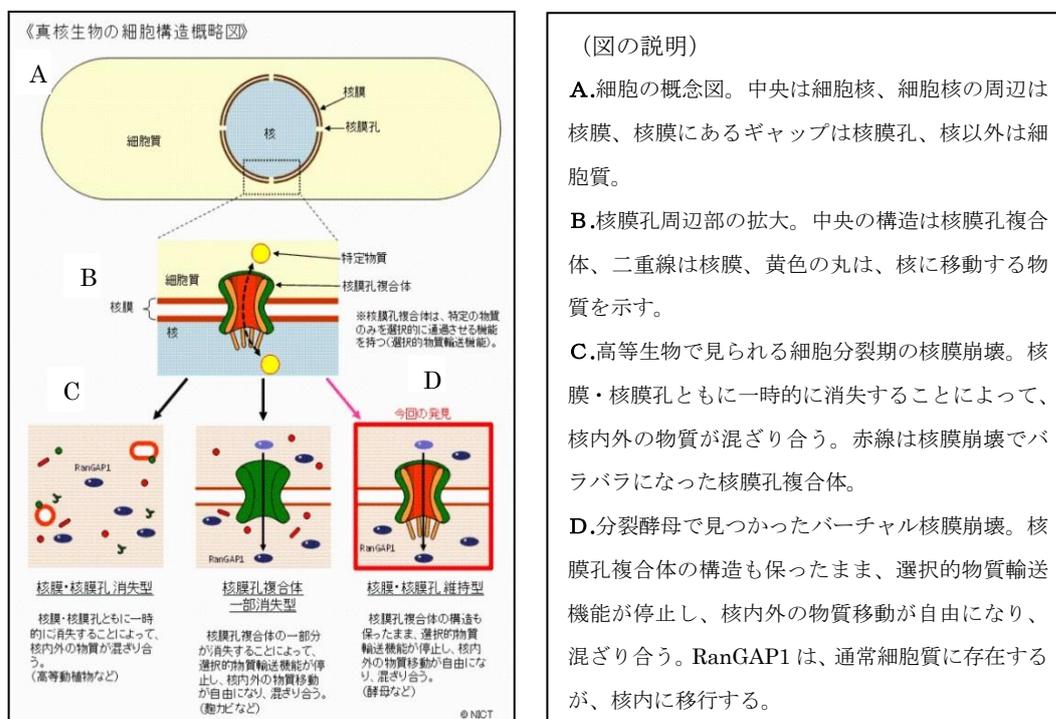


図 3-4 細胞分裂における核膜崩壊とバーチャル核膜崩壊

なお、この現象は東京大学山本正幸教授のグループにおいても独立に発見されており、Current Biology 2010 年 11 月 9 日号に両グループの論文が同時掲載されている。

#### (v) 減数分裂期における遺伝情報組み換えメカニズムの解明

分裂酵母を用いて、これまでメカニズムが解明されていなかった減数分裂期における相同染色体の対合に、染色体の特定領域の *sme2* 遺伝子から転写される非コード RNA が重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした<sup>5)</sup>。本成果は減数分裂期における相同染色体の対合という医学生物学の重要な課題解決に向けた大きな進歩である。

本研究領域終了後に開発された出芽酵母や分裂酵母をはじめとした幅広い生物試料に応用できるライブクレム法は、応用対象を発展させたことで、新たな研究分野を切り開くのに貢献すると期待される。

外部から DNA を入れて核膜形成させる研究とライブクレム法は、遺伝子デリバリー分野からも注目されており、複数の研究グループが独立に開発しているトランスフェクション試薬やドラッグデリバリー試薬の評価にも用いられている (Hirose H, et al, Mol. Therapy (2012)、および Kobayashi S. et al, J. Gene Medicine (2012) )。

また、細胞内に入れた外来の DNA が異物としてオートファジーによる分解を受ける可能

性を回避する目的で、人工ビーズに目的分子を結合させて、その周辺に核膜を形成させる研究を行い、その手始めとして、ビーズのみを入れた場合には、細胞内に入った直後にオートファジー膜が形成されることを明らかにした<sup>6)</sup>。

核-細胞質間の物質輸送機構の解明は、未知の核分裂様式の発見であり、生命活動にとって核膜および核膜孔が持つ意味を考えるうえで、生命科学の既成概念に一石を投じるものである。また、細胞が生存の危機に瀕したとき(栄養枯渇)に、エネルギーコストの大きな物理的構造変化に代えて、機能のみを制御するという省エネ型の生存方法を自律的に採用することを示しており、生命の柔軟な情報処理機構の一端を明らかにしたものである。

## ②社会・経済的波及効果

細胞は優れた分子通信システムであり、パワーフリーで動くインテリジェントな通信システムということが出来る。RanGAP1 の局在を調節することによって、核の内側と外側という機能の空間的隔離を、低エネルギーで制御する可能性を示す今回の発見は、分子通信技術への応用に役立つ知見となる。

NICT はこれらの発見をもとに、分子通信技術として、生物が持つ優れた特徴を取り入れ、柔軟で、外乱の影響による変化を防止する内的な仕組みを有する(ロバストな)情報通信システムへの応用につなげていきたいと考えている。

分子通信技術に関しては、NTT ドコモが世界に先駆けて提唱し、ナノテクノロジー、バイオテクノロジー、通信工学分野を融合した学際的な新領域として国内外から注目されている。電磁波を使った既存の通信技術では困難であった生体の現象や状態などの生化学的な情報を分子通信技術を使って伝達することを目指している。

2003 年に NICT から出願した「生物試料を高精度に測定する方法」の特許は 2006 年 11 月 17 日に日本特許として登録されている(特許番号 3879001)。さらに、米国特許としても登録されている(US7336417 (B2))。

## ③上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な研究論文

- 1) Haraguchi T, Kojidani T, Koujin T, Shimi T, Osakada H, Mori C, Yamamoto A, Hiraoka Y: "Live cell imaging and electron microscopy revealed dynamic processes of BAF-directing nuclear envelope assembly." *J. Cell Sci.*, 121(15), 2540-2554 (2008)
- 2) Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Tsutsumi C, Kojidani T, Sato M, Haraguchi T, Hiraoka Y, "Membrane proteins Bqt3 and -4 anchor telomeres to the nuclear envelope to ensure chromosomal bouquet formation." *J. Cell Biology*, 187 (3), 413-427 (2009)
- 3) Iwamoto M, Mori C, Kojidani T, Bunai F, Hori T, Fukagawa T, Hiraoka Y, and Haraguchi T "Two Distinct Repeat Sequences of Nup98 Nucleoporins Characterize Dual Nuclei in the Binucleated Ciliate Tetrahymena." *Current Biology* 19, 843-847 (2009)

- 4) Asakawa H, Kojidani T, Mori C, Osakada Hb, Sato M, Ding D-Q, Hiraoka Y, Haraguchi T, “Virtual breakdown of the nuclear envelope in fission yeast meiosis.” *Current Biology*, 20 (21), 1919-1925 (2010)
- 5) Ding D-Q, Okamasa K, Yamane M, Tsutsumi C, Haraguchi T, Yamamoto M, Hiraoka Y, ” Meiosis-specific noncoding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis.” *Science* 336(6082),732-736 (2012)
- 6) Kobayashi S, Kojidani T, Osakada H, Yamamoto A, Yoshimori T, Hiraoka Y, Haraguchi T. ”Artificial induction of autophagy around polystyrene beads in non-phagocytic cells.” *Autophagy* 6: 36-45. (2010)

#### ④その他

原口らの研究成果として、「染色体の構造変化に関わる新たなタンパク質を発見」の表題で、*J. Cell Biology* (2009)の論文<sup>2)</sup>が(NICTプレスリリース2009年11月3日)に紹介されている。

「僅かなエネルギーでバリアを消失させる生物メカニズムを発見」の表題で原口が*Curr. Biol.* (2010)の論文<sup>4)</sup>の内容を(NICT NEWS 2010年12月号 No. 399)で紹介している。この論文は(NICTプレスリリース2010年10月22日)でも紹介されている。

また、原口らの成果論文*Science*(2012)<sup>5)</sup>が、不妊治療やダウン症の予防などに貢献でき、人工細胞や分子通信、生体分子を利用したバイオセンサーなど複雑なDNA情報を簡素化する生物の仕組みを見習ったセンサーの開発につながる成果として(産経新聞2012年5月15日)に紹介されている。

なお、「分子通信」に関しては、NTTドコモのホームページに「分子通信の実現に向けた分子伝送技術」として詳しく解説されている。

([http://www.nttdocomo.co.jp/corporate/technology/rd/tech/main/molecular\\_transport\\_system/](http://www.nttdocomo.co.jp/corporate/technology/rd/tech/main/molecular_transport_system/))

### 3.1.6 DNA 分子モーターの動作原理の解明(原田 慶恵)

#### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

##### ①研究のねらい

遺伝子の相同組換えは、2 個の DNA モーターを含むタンパク質複合体によって行われる。2 個のモーター分子が協調的に働くことによって、2 本の DNA 重鎖はこのタンパク質複合体にほどかれながら取り込まれ、別のパートナー鎖と巻き戻された新しい 2 本の 2 重鎖 DNA が紡ぎ出される。本研究では、この複合体の動きを顕微鏡で直接観察することによってその動作原理を明らかにし、複数分子からなるナノマシンシステムの開発を目指した。

##### ②期間中の研究成果

(i) DNA の相同組換えの後期過程で形成される十字型の Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応に参与する RuvAB タンパク質複合体の機構を詳細に解析することを目的として、光学顕微鏡下で Holliday 構造 DNA の分岐点移動を直接観察する系を開発した。Holliday 構造 DNA の一端をガラスに固定し、反対側の端に磁気ビーズを付け、RuvAB による分岐点移動時におこることが予想されている DNA の回転をビーズの回転運動を観察することに成功した。回転速度から見積もった  $V_{max}$  は 8.2bp/秒である。同じ条件下で、生化学実験から得られた RuvAB による分岐点移動反応の速度は、低濃度 ATP においては 1 分子解析で求めた速度とほぼ一致した。このことから、DNA の回転がビーズの回転に正しく伝えられていることが示唆された。しかし、生化学実験で得られた  $V_{max}$  は 20.5bp/秒で、1 分子解析の結果の約 2.5 倍であった。この結果は DNA につけたビーズが負荷となることで、分岐点移動の速度が遅くなっていることを示唆した<sup>1)</sup>。

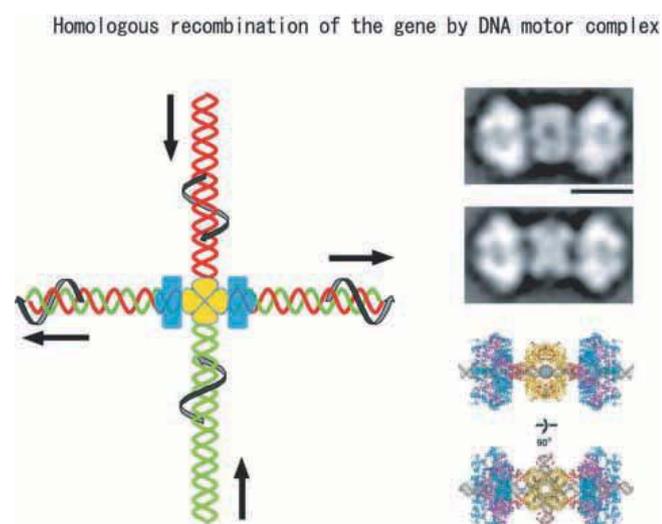


図 3-5 十字型の Holliday 構造

(ii) RuvB タンパク質の結晶解析から 3 つの構造的ドメイン(N 末, M 中央, C 末)より形成されている事が判明したので、ドメインの種々の組み合わせをもつ欠失タンパクをコー

ドするミュータント遺伝子作製し、発現させてミュータントタンパク質を精製して、種々の生化学的性質を解析した。N ドメインは RuvB 同士の結合と RuvA との結合に関与し、ATP との結合と ATPase 活性には N と C の両ドメインを必要とした。C ドメインは DNA との結合に関与し、特にその中の Arg318 が直接関与している事が示された。また、3つのドメイン間のアロステリック効果が ATP や DNA とのダイナミックな変化に必要であることが分かった<sup>2)</sup>。

本研究で開発された計測システムによって、Holliday 構造の DNA の分岐点移動反応は、DNA 螺旋に沿うように回転しながら移動することを実証したことは大きな成果であり、生物学的に意義の深い現象の解明に貢献することが望まれる。

### ③研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Han Yong-Woon, Tani T, Hayashi M, Hishida T, Iwasaki H, Shinagawa H, Harada Y, "Direct observation of DNA rotation during branch migration of Holliday junction DNA by Escherichia coli RuvA-RuvB protein complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 (31), 11544-11548 (2006)
- 2) Ohnishi T, Hishida T, Harada Y, Iwasaki H, Shinagawa H, "Structure-function analysis of the three domains of RuvB DNA motor protein." J. Biol. Chem. 280,30504-30510 (2005)

### (2) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後、特定領域研究「1 細胞内生体分子の定量的計測法の開発」(2009 年度)、および最先端・次世代研究開発支援プログラム「蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った新規 1 分子イメージング法の開発と生体分子観察への応用」(2011~2013 年度)で研究を実施し下記の成果を得た。

#### ①科学技術の進歩への貢献

##### (i) 1 分子観察に用いるナノ開口アレイの作製

生物試料を使った実験のための最適なナノ開口アレイを溶融石英基板上に作製することを目指している。しかし、これまでに石英基板上での電子線描画の実績がないため、まずプロセス全体の確認のために、ポリ(ジメチルシロキサン)：(PDMS)シリコン基板上に 10-30pL のナノ開口を作製した。このナノ開口アレイを使って細胞 1 分子を溶解させ、蛍光顕微鏡を使って 1 個の細胞内のタンパク質組成や酵素活性を測定できることを確認した<sup>1)</sup>。この成果は本研究課題の成果が終了後発表されたものである。

##### (ii) 蛍光性ナノゲル温度センサーの開発

東京大学大学院薬学研究科の内山聖一助教らとの共同研究で、ナノゲル高分子を用いた分子温度計、細胞内の温度変化をとらえることが可能な蛍光性ナノゲル温度センサーの開発を行った。その成果が内山らとの共同成果論文として発表されている<sup>2)</sup>。

(iii) 蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った新規 1 分子イメージング法の開発と生体分子観察への応用

新しい蛍光物質として、生体分子の大きさと同程度の小さなダイヤモンド粒子(ダイヤモンド内に炭素の代わりに入り込んだ窒素と炭素の欠失が近接して存在すると蛍光物質のように光る)を使った新規蛍光イメージング技術を開発し、生体分子の観察に適用する手法を確立することを目指している。(図 3-6 参照)

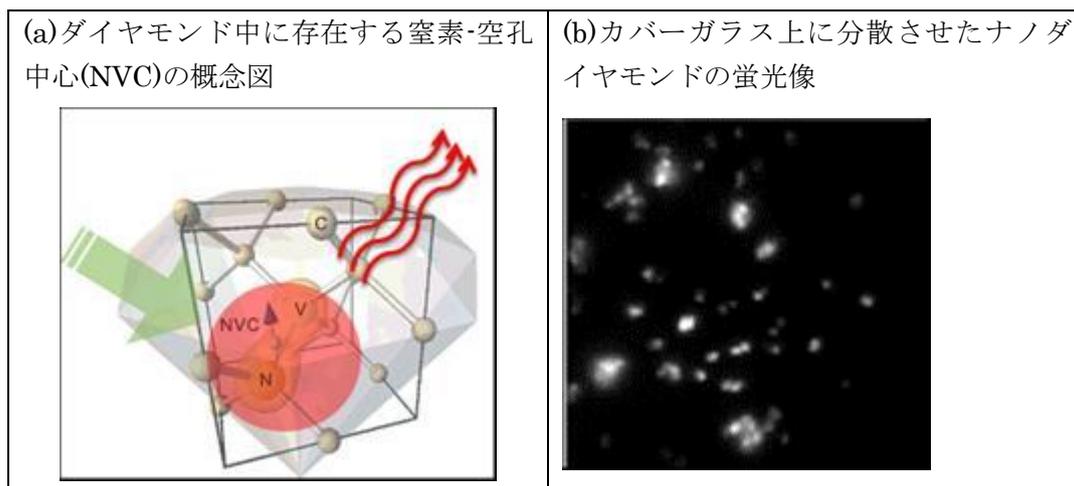


図 3-6 ダイヤモンド微粒子を用いた新規蛍光イメージング

## ②社会・経済的波及効果

「ナノゲル温度センサー」は内山をチームリーダーとする、「JST 研究開発展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム」として実用化研究が進められ、その成果が論文として発表されている<sup>3)</sup>。生体内では、無数の化学反応が生命現象の維持に関わり、温度は反応の進行を司る重要な因子となっている。がん細胞などでは、細胞内の反応の活性が高く、通常の細胞より熱生成(発熱)が大きいことが知られる。蛍光性ナノゲル温度センサーは、最近の生物学において、生命現象に対する温度の役割解明の新たな切り口になると注目・期待されている。

ナノゲル温度計に関する、原田、内山らの高分子学会(2009年5月14日)での発表が「注目発表」の一つとして取り上げられている。(ナノテクジャパン トピックス 2009年6月1日)。細胞の種類による内部温度分布の違いを比較することで、がん細胞などの病態細胞の新しい診断法が確立できる可能性が生じるなど、生物学や医学分野の発展に大きく貢献することが期待される成果として、原田、内山らの Nature Comm. (2012)の論文<sup>3)</sup>が、(科学技術振興機構・東京大学薬学部・奈良先端科学技術大学院大学プレスリリース 2012年2月29日)に紹介されている。

また、蛍光ダイヤモンドナノ粒子を使った新規 1 分子イメージング法は、安定した発光現象、既存の発光物質の排除、回転運動の定量計測、低毒性、など、従来使われている発光物質の難点をすべて克服することができる優れた性質を持つ。そのため、これまで観察することができなかった個々の生体分子の動きや構造変化を検出することが可能になる。

生体分子が機能するしくみについて新しい知見が得られ、生命現象の理解が深まる他、それらの機能不全を原因とする疾病に対する創薬や治療に重要な情報を提供するものと期待されている。

### ③上記継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Sasuga Y, Iwasawa T, Terada K, Oe Y, Sorimachi H, Ohara O, Harada Y, “Single-cell chemical lysis method for analyses of intracellular molecules using an array of picoliter-scale microwells.”  
Analytical Chem., 80 (23), 9141-9149 (2008)
- 2) Gota C, Okabe K, Funatsu T, Harada Y, Uchiyama S, “Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry.”  
J. Am. Chem. Soc., 131 (8), 2766-2767 (2009)
- 3) Okabe K, Inada N, Got C, Harada Y, Funatsu T, Uchiyama S, “Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy.” Nature Comm., 3, art. no. 705 (2012)

### ④その他

原田は、2008年7月から京都大学物質－細胞統合システム拠点(iCeMS)の教授に就任している。

また、日本細胞生物学会・会計幹事(2012～2014年度)、日本生物物理学会・運営委員(企画/啓蒙活動)男女共同参画・若手問題検討委員会委員、および、学会誌「生物物理」副編集委員長として学会活動に参画している。

本研究課題の研究分担者であった品川日出夫(大阪大学微生物病研究所 教授)は、本研究領域終了後、真核生物における Holliday 構造のプロセッシングの仕組みを明らかにするために、酵母を主な実験材料として新規の組み換え修復遺伝子の同定と機能解析を行っている。

### 3.1.7 高次細胞機能構造体観察・制御技術の開発(藤吉 好則)

#### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

##### ① 研究のねらい

傾斜機構付き極低温電子顕微鏡と 4D-Polscope を開発して、神経細胞等の立体構造観察技術を確立すると共に、棘突起や成長円錐等を動的に観察する技術の確立を目指した。

##### ② 期間中の研究成果

(i) 極低温電子顕微鏡を用いて、ニコチン性アセチルコリン受容体の構造を 4Å で解析し、このタイプの受容体の原子モデルを初めて提唱し、神経伝達物質によるゲーティング機構などを提案した<sup>1)</sup>。

(ii) 目の水晶体線維細胞に発現している水チャネル、アクアポリン-0 の構造について、電子線結晶学を用いて 1.9Å 分解能で解析し、脂質や水分子の配置などの構造が、脂質膜の中に強固に構成されている機構などを解明した<sup>2)</sup>。

(iii) ヒト由来のギャップ結合チャネル、コネクシン 26 (Cx26) の構造解析を行い、チャネルの内部にこれまで考えられてこなかったプラグ(栓)様構造が存在することを示した。これにより、新たなプラグゲーティングモデルが提唱され、これまでの混乱したゲーティング機構にきちんとした回答が得られるものと期待され、教科書を書きかえることになった<sup>3)</sup>。

本研究は、極低温電子顕微鏡とポルスコープシステムの開発が大きな柱であるが、この目標はほぼ完全に達成したと言える。日本電子(株)と連携して開発したトモグラフィーを可能にする自動試料交換機構を伴った試料傾斜機構付きの極低温電子顕微鏡(第6世代)はそれに至る段階の顕微鏡も含めすでに国内外で 20 台ほどが販売され、市場規模は 100 億円のオーダーであり、それらは国内外の研究室で稼動し最先端の成果をあげている。共同研究者である Rudolf Oldenbourg (Marlin Biological Laboratory) の開発したポルスコープも製品化され販売されている。

##### ③ 研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Miyazawa A, Fujiyoshi Y, "N Unwin Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore." *Nature*, 423, 949-955 (2003)
- 2) Gonen T, Cheng Y, Sliz P, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Harrison SC, Walz T, "Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals." *Nature*, 438, 633-638 (2005).
- 3) Oshima A, et al., "Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule." *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 104, 10034-10039 (2007).

## (2) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域期間中から本研究課題と並行して、科研費 特別推進研究「膜を介する(チャネルおよびGPCRを中心とした)情報伝達分子機構研究」(2004~2008年度)、および、NEDO 本研究領域を核とした人材育成、産学連携等の総合的展開/タンパク質立体構造解析 NEDO 特別講座「構造生物学講座」(2007~2009年度)、でも研究開発がおこなわれてきたが、本研究領域終了後は、NEDO ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発「創薬加速に向けたタンパク質の構造解析基盤研究開発」(2008~2012年度)および、科研費 基礎研究(S) 「電子結晶学を用いた膜タンパク質の構造と機能研究」(2010~2014年度)で研究開発を続行して、下記成果を得た。

### ① 科学技術の発展に対する貢献

#### (i) アクアポリン-4(AQP4)の高分解能解析

脳細胞の膜に存在し、脳浮腫や多発性硬化症などと関係があると考えられている、アクアポリン-4(AQP4)を用いて、チャネル内の水分子を分離して観察する高分解能解析と、乱れた部分の観察ができる低分解能解析を行った。以前 3.2Åの解像度で得た2層2次元の結晶構造を、2.8Åの高解像度で解析することができた。これにより脳のAQP4には8個の水分子チャンネルがあることが分かった<sup>1)</sup>。さらに、細胞質ループDのSer180リン酸化でAQP4の水透過性が低下するといわれてきたが、今回の解析でその構造自体は通常のチャンネルと大きな差がないことが分かった<sup>2)</sup>。

#### (ii) H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの阻害剤が結合した中間体の構造解析

胃のプロトンポンプであるH<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPaseの阻害剤SCH(Schering compound 28080: 2-メチル-8-(フェニルメトキシ)イミダゾ[1,2-a]ピリジン-3-アセトニトリル)が結合した中間体の3次元構造を7Åの解像度で解析した。その結果、SCHはトランスメンブレン(TM)ヘリックスの変形を引き起こし、細胞質ドメインに移送されて、管腔が開いた形態を作り出すことが分かった<sup>3)</sup>。

#### (iii) コネキシン-26ギャップジャンクションの立体構造の詳細解明に成功

ヒト由来のギャップ結合チャネル、Connexin-26(Cx26)の構造に関しては、本研究領域期間中に藤吉らが低分解能の電子線結晶構造解析によりチャネルが「閉じた状態」の構造を解析しProc. Natl. Acad. Sci. U. S. A(2007)に発表している(期間中の成果3)参照)。

本研究領域終了後、兵庫県立大学の月原富武らは、藤吉との共同研究で、大型放射光施設SPring-8の大阪大学蛋白質研究所専用の生体超分子構造解析ビームラインBL44XUを用いて、3.5Åの解像度で、「開いた状態」でのチャネル孔のConnexin-26ギャップジャンクションの構造解析を実施し、藤吉らの成果と比較考察することで、世界で初めてヒト由来ギャップ結合チャネルの立体構造を詳細に解明することに成功した<sup>4)</sup>。藤吉の本研究領域期間中の成果をさらに発展させたこの月原(兵庫県立大学)との共著論文Nature(2009)の被引用件数は114件(2012年9月現在)と注目されている。

極低温電子顕微鏡により、細胞の脂質膜の中に存在するため解析が困難であった膜タンパク質の構造解析を可能にし、生体内で重要な生理機能を担う種々の膜タンパク質の構造

を明らかにした。すでに、いくつかのタンパク質構造決定の世界的な成果がこの極低温電子顕微鏡によって得られている。現在も引き続き多くの膜タンパク質などの構造が解かれつつあり、科学技術の進歩に大きな貢献をしている。

## ②社会・経済的波及効果

本研究領域期間中 2005 年に京都大学と日本電子株式会社から出願された「トップエントリー式試料ステージ傾斜装置」の特許は 2011 年 2 月 10 日に日本特許として登録(特許番号：4679279)されている。

本研究領域終了後 2008 年に京都大学と日本電子から出願された「荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置」の日本特許も 2012 年 10 月 12 日に特許登録され(特許番号 5103672)、これに対応した、ヨーロッパ特許[EP1975974 (B1)]、および、米国特許[US8008633 (B2)]も登録されている。これらの特許は極低温電子顕微鏡に取り付けるヘリウムステージ(図 3-7、図 3-8 参照)に関するものであり、登録時の出願人は日本電子のみとなっている。

藤吉は、本研究領域終了後も NEDO の支援を受け日本電子と極低温電子顕微鏡の改良と製品化に向けて共同開発を行っている(2008 ～ 2012 年度)。

藤吉と日本電子が共同開発した電子顕微鏡は、日本電子が、製品として標準的な電子顕微鏡 2 種(300kV と 200kV の電界放出型)に、極低温ステージと自動試料交換装置を組み込んだものを発売している。日本だけでなく、米国や欧州各国でも販売実績がある。

電子顕微鏡は高さが数メートルもある大きな振動に敏感な装置で、床の振動、人の話し声などでさえ、分解能に影響するので、防振工事や防音工事をした部屋に設置する必要がある。さらに、冷却剤である液体窒素や液体ヘリウムの沸騰(バブリング)による振動がステージに伝わるのを防ぐため、日本電子と藤吉は様々な工夫をこらし、超流動ヘリウム温度まで冷却できるようにしたポットだけを試料微動台に設置し、バブリングが激しい液体ヘリウムタンクから試料台へと振動が伝わらなくした(図 3-8 参照)。

また、ポットとステージを保持する材料とその形の工夫で、ステージを低温に保つのに、熱を伝えにくい繊維強化プラスチックを用いた。熱の伝えにくさと強度とを両立させるため、試作と改良を繰り返してようやく振動防止ステージの実現にいたった。これらの改良により、顕微鏡の性能が当初ステージ温度 10K、分解能 12Å、から、1.5K、最高 2Åまで飛躍的に向上させた。

最新の第 7 世代の電子顕微鏡「U-SET system in Kyoto Univ」を(図 3-9)に示した。

藤吉と日本電子の開発した極低温電子顕微鏡は、世界的に大きな市場規模を持つ測定装置で、この分野では日本が世界を大きくリードしている。

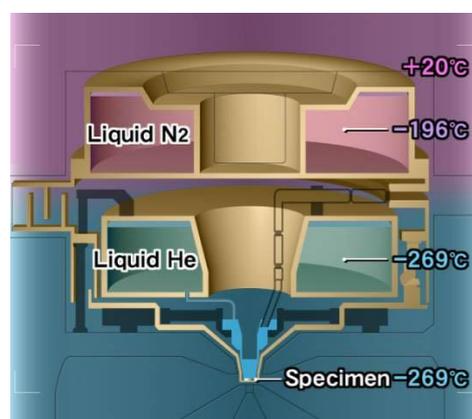
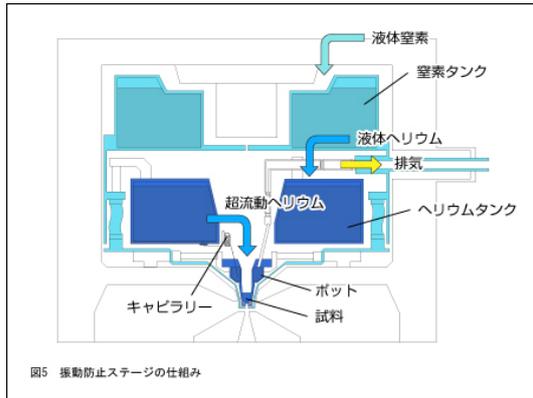


図 3-7 顕微鏡のヘリウムステージの基本構成



振動防止ステージの仕組み：液体ヘリウムタンクから細い管（キャピラリー）で液体ヘリウムを小さいポットへと導き、ヘリウムタンクの振動がポットやそれをのせている試料微動台に伝わらないようにした。

図 3-8 振動防止ステージの仕組み



図 3-9 第 7 世代極低温電子顕微鏡

藤吉は、2012 年に名古屋大学に設立された細胞生理学研究所 (CeSPI) のセンター長に就任し、基礎科学研究を推進力として、先端医療や創薬科学と連携することによって細胞構造生理学という新しい研究分野の研究を推進している。幅広い研究分野や組織との密な連携を進め、学内外の研究者と技術を本センターに結集することで、国際的で独創性の高い教育研究組織の形成を目指している。

本研究領域終了後に出願された特許はもう 1 件 (出願番号：2012-104994) ある。これは NEDO の本研究領域における成果で「生体組織から単離できる多能性幹細胞」の特許で、発明者個人名で国際特許出願もされている (W02011007900)。

### ③上記継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Tani K, Mitsuma T, Hiroaki Y, Kamegawa A, Nishikawa K, Tanimura Y, Fujiyoshi Y, “Mechanism of Aquaporin-4's Fast and Highly Selective Water Conduction and Proton Exclusion.” *J. Mol. Biol.*, 389 (4), 694-706 (2009)
- 2) Mitsuma T, Tani K, Hiroaki Y, Kamegawa A, Suzuki H, Hibino H, Kurachi Y, Fujiyoshi Y, “Influence of the Cytoplasmic Domains of Aquaporin-4 on Water Conduction and Array Formation.” *J. Mol. Biol.*, 402 (4), 669-681 (2010)
- 3) Abe K, Tani K, Fujiyoshi Y, “Conformational rearrangement of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase induced by an acid suppressant.” *Nature Comm.*, 2 (1), art. no. 155 (2011)
- 4) Maeda S, Nakagawa S, Suga M, Yamashita E, Oshima A, Fujiyoshi Y, Tsukihara T, “Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution.”

Nature, 458 (7238), 597-602 (2009)

#### ④その他

「ヒト由来ギャップ結合チャネルの立体構造を世界で初めて解明—難聴や不整脈などの病気の治療戦略に役立つと期待—」の表題で、月原との共著論文 Nature (2009) 4 の成果が (Spring-8 プレスリリース 2009. 04. 02) に紹介されている。

「神経・筋肉などに成長する新たな幹細胞、東北大教授ら発見」の表題で、出澤(東北大学)と藤吉らが人の皮膚や骨髄の中から、神経や筋肉、肝臓などの人体の様々な組織に成長できる新しい「幹細胞」を発見し、この新しい細胞を「Muse(ミューズ)細胞」と命名したと(日経新聞 電子版 2010. 04. 20 4:00)に報じられている。これは NEDO のプロジェクトの成果で Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2011) に論文として掲載されている。

藤吉は、本研究領域終了後「極低温電子顕微鏡の開発による膜タンパク質の構造決定」の業績で、2008 年日本学士院賞を受賞。さらに、2010 年 8 月 1 日 アンフィンゼン賞(The Christian B. Anfinsen Award)を受賞、これは、米国の The Protein Society から 1996 年以来毎年 1 名に授与されているもので、日本からは藤吉がただ一人の受賞者である。

藤吉グループの、光岡 薫(本研究領域当時、産業技術総合研究所 研究員)は同所 バイオメディシナル情報研究センタータンパク質構造情報解析チーム研究チーム長に昇任した。

廣明洋子(京都大学大学院理学研究科 CREST 研究員)は、2009 年 9 月より、京都大学大学院理学専攻科生物化学専攻構造生物学特別講座准教授に昇任した。

加川友己(本研究領域当時、Marine Biological Laboratory 研究員)は、2012 年 3 月より、早稲田大学 ナノ理工学研究機構次席研究員(研究院講師)に昇任した。

大嶋 篤典(京都大学大学院理学研究科 CREST 研究員)は、2008 年 10 月より、京都大学大学院理学研究科生物科学専攻構造生理学分科助教に昇任した。

### 3.1.8 ゆらぎと生体システムのやわらかさをモデルとするソフトナノマシン(柳田 敏雄)

#### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

##### ①研究のねらい

生体の運動を担う生物分子モーターは、熱ゆらぎを巧く利用して効率よく働くという人工機械では見られないユニークな性質を持っている。本研究では、タンパク質設計、1分子イメージング、ナノ計測、極低温電顕構造ダイナミクス、理論・計算機シミュレーション解析そして運動再構成などの視点から、分子モーターが熱ゆらぎを利用するしくみを徹底的に追及することを目指し、“ゆらぎ”を機能に利用するという素子のユニークな性質が、生体システム特有の“やわらかさ”にどのように関わっているのかを、実験的そして理論的に検討し、これらの結果を基に、高分子ゲルなどを使って、人工的に筋肉運動を再現するモデル系(人工筋肉)の構築を目指した。

##### ②期間中の研究成果

(i) 分子モーターの運動のメカニズムを考える上で画期的な成果として、これまで単頭のみオシンでは運動の途中でアクチンフィラメントからはずれてしまっていて連続運動はできないものと考えられていたが、双頭と同じように大きなステップで連続的に運動することを示した<sup>1)</sup>。

(ii) ミオシン V が 36 nm の大きなステップをする間に、その向きをランダムな方向に回転させながら前進していることを、ミオシン分子をガラス基盤に固定し、アクチンフィラメントの回転を観察することにより見つけ出した<sup>2)</sup>。

(iii) アクチン分子は動的な多型性を持つことを、1分子蛍光イメージングを使って示した。また、ミオシンの運動性に関して、活性型と抑制型の2つの動的平衡にあり、ミオシンの結合によって、アクチンの形態が変化することが示した。このような動的多型性はミオシンのルールとして、細胞運動の調整機構として重要であることがわかった<sup>3)</sup>。これらの観測から、最終的には、分子モーターで得られた知見をより一般化し、ゆらぎと生物システムの“やわらかさ”についての統一的な概念をうち立てた。

本研究は、技術としての応用まで視野にいれた課題であるが、その実現には運動発生のメカニズムの議論に決着をつける必要があった。今回の成果を生かし、生体分子機械から学んだ、ゆらぎを取り込んだ演算処理に必要な十分な基本的機能が確立され、それを元に、知的なアクチュエータ(マニピュレーター)、情報処理演算装置に関して企業との共同研究・開発が動き出している。近い将来、柳田開発のルースカップリング素子が現実のものとなるであろう。

##### ③研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Watanabe T, Tanaka H, Iwane A, Maki-Yonekura S, Homma K, Inoue A, Ikebe R, Yanagida T, Ikebe M, “A one-headed class V myosin molecule develops multiple

large steps successively.” Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101, 9630-9635 (2004)

- 2) Komori Y, Iwane K, Yanagida T, “Myosin-V Makes Two Brownian 90° Rotations per 36 nm-Step.” Nature Struct. & Mol. Biol. 14, 968-973 (2007)
- 3) Kozuka J, Yokota H, Arai Y, Ishii Y, Yanagida T, “Dynamic polymorphism of single actin molecules in the actin filament.” Nature Chem. Biol. 2, 83 (2006)

## (2) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後の継続研究開発は、主として大阪大学キャンパス内に設置された理化学研究所生命システム研究センター(QBiC)において行われている。また、大阪大学グローバルCOEプログラム「高次機能システムのダイナミクス」(2007～2011年度)の拠点リーダーとして、21世紀COEプログラムで掲げた「基礎生命科学、医学、理学、工学を含む広い範囲の研究分野を融合し、従来の生命科学の枠組みを越えた分野横断的な教育研究環境を整備し、生命機能の理解を深化させた世界最高水準の教育研究拠点を打ち立てる」という目標を引継ぎ、より高いレベルに発展させて、その成果を医療や新しい原理に基づくものづくりに展開させることを目的とした活動を行っている。

柳田はこれまで1分子イメージング、ナノ操作技術を使って生物分子モーターの働く仕組みを研究してきたが、最近では理化学研究所のQBiCおよび、NICT国際電気通信基礎技術研究所と共同で脳情報通信融合研究センター(CiNet)のセンター長など、幅広い活動を展開している。QBiCの細胞動態計測Gで行った研究成果としてNature Chem. Biol. (2009)、Cell (2010)、難波教授との共同研究のNature (2010)の論文などが主要なものである。

## ① 科学技術の進歩への貢献

### (i) ミオシン-VIのステップの詳細解析とブラウン運動整流機構の解明

ミオシンVIの2つのモーター部位はネック部位を介して連結されており、交互にモーターを前方に押し出しながら歩くと、分子内で歪みが増え加えられる。ブラウン運動によって結合位置を探索しているモーター部位は、前方の結合位置で加えられる分子内歪みを感じるとATPの加水分解サイクルを進めてアクチンと強く結合していることがわかった。この成果は、ナノスケールで機能する分子モーターのブラウン運動整流機構を明らかにしたことを意味する<sup>1)</sup>。

これまでミオシン-VIは2種類のステップ(前方ステップ及び後方ステップ)を持つと考えられていた。しかし、「量子ドットを用いたFIONA(Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy)法」を用いてミオシン-VIのステップをナノメートル精度で詳細に解析することで、実際はミオシン-VIのステップは3種類のステップ(前方ラージステップ、前方スモールステップ及び後方ステップ)から構成されている事を、明らかにした<sup>2)</sup>。ミオシンが何度もアクチンと相互作用し“ゆらぎ”しながら滑ってゆくことを詳細に解析したこれらの成果は、柳田の提唱したルースカップリング機構を実証したものである。

(ii) アクチン繊維の詳細な立体構造解析と原子モデルの解明

極低温電子顕微鏡による撮影とその画像解析により、 $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなどが解像できる分解能でアクチン繊維の立体像を得た。これまでに、X線結晶構造解析により単量体時の原子構造は明らかになっていた結晶構造を初期構造とし、分子動力学を用いて、今回得られた電子顕微鏡の密度マップに合うようにアクチンの構造を変化させ、アクチン繊維の原子モデルを高精度で得ることができた。この繊維構造から、繊維中のアクチンの構造が単量体の構造と劇的に異なることが明らかになった<sup>3)</sup>。

②社会・経済的波及効果

大阪大学とNICTは、2009年に脳情報通信分野における融合研究に関する基本協定を締結し、CiNetを設立し、柳田がセンター長に就任した。生命システムとしての脳の機能研究を技術開発のシーズとして情報通信技術の枠組みの中で進めていく研究開発を実施して、NICTの技術課題に対して、生命の複雑制御に学んだ解決法を提案し、脳機能の理解を通して知の創造の促進によるコミュニティーの生産性や競争力の向上を目指している。

また、2010年度から大阪大学キャンパス内に、理化学研究所QBicを設立し、センター長に就任した。ここでは、生命機能システムを理解するために、計測、計算とモデル化、細胞機能の再構成のための最先端技術開発、を目指している。柳田自身もQBicの「細胞動態計測研究グループ」を率い、ロボットや情報分野の研究者と共同で、本研究課題などこれまでの研究成果である生物分子モーターの働く仕組みにおける「ゆらぎ」制御の仕組みで、複雑なロボットやインターネットなどの情報ネットワークが実際に制御できるかの証明を試みている。

柳田は、大阪大学グローバルCOEプログラム「高次機能システムのダイナミクス」の拠点リーダーとして、21世紀COEプログラムで掲げた、「基礎生命科学、医学、理学、工学を含む広い範囲の研究分野を融合し、従来の生命科学の枠組みを越えた分野横断的な教育研究環境を整備し、生命機能の理解を深化させた世界最高水準の教育研究拠点を打ち立てる」という目標を引継ぎ、より高いレベルに発展させて、その成果を医療や新しい原理に基づくものづくりに展開させることを目的とした活動を行っている。

さらに、理化学研究所のHPCI戦略プログラム「分野1 予測する生命科学・医療及び創薬基盤、HPCI 計算生命科学推進プログラム」のプログラムディレクターも務めている。

③上記継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Iwaki M, Iwane AH, Shimokawa T, Cooke R, Yanagida T, “Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps.” Nature Chem. Biol., 5(6), 403-405 (2009)
- 2) Nishikawa S, Arimoto I, Ikezaki K, Sugawa M, Ueno H, Komori T, Iwane AH, Yanagida T, “Switch between large hand-over-hand and small inchworm-like steps in myosin VI.” Cell, 142(6), 879-88 (2010)
- 3) Fujii T, Iwane AH, Yanagida T, Namba K. “Direct visualization of secondary

structures of F-actin by electron cryomicroscopy.”Nature, 467(7316), 724-8 (2010)

#### ④その他

日本生物物理学会名誉会員、大阪大学免疫フロンティア研究センター副拠点長(2007年10月～)、NICTプログラムコーディネーター(2008年7月～)、理化学研究所特任顧問(2009年7月～)、NICT上席客員研究員(2010年4月～)、大阪大学生命機能研究科特別研究推進講座特任教授(2010年4月～)としても活躍している。

柳田は、「1分子ナノ計測技術の開発とその応用」が評価され、米国生物物理学会 The US Genomic Award(2011年)を受賞している。さらに、2012年3月同学会の Fellow に任命された。

佐甲靖志(本研究領域当時、理化学研究所主任研究員)は、2011年より大阪大学大学院生命機能研究科招聘教授に就任し、岩根敦子(本研究領域当時、大阪大学助教授)は、2007年より大阪大学大学院生命機能研究科生命機能専攻准教授に専任した。西川宗(本研究領域当時、大阪大学 JST 助手)は、2009年より株式会社ニコンインストルメンツカンパニーに転籍した。田中裕人は、未来 ICT 研究所バイオ ICT 研究室主任研究員に昇任した。本研究領域当時、大阪大学特任研究員だった小森靖則は、東京大学大学院理学系研究科理学部新領域創成科学研究科生物情報科学科特任助教に、西川正俊は、2010年度理化学研究所発生再生科学総合研究センター研究員に、岩城光宏は、2007年より、大阪大学大学院医学系研究科助教に、新井由之は、2012年より大阪大学産業科学研究所生体分子機能科学研究分野助教に、それぞれ転籍・昇任している。

## 3.2 2003 年度採択課題

### 3.2.1 高効率ナノモーターとしてのプロトンポンプの分子機構解明(二井 將光)

#### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

##### ① 研究のねらい

本研究では、ほとんどの生物が ATP 合成に用いているナノモーター F 型 ATPase (ATP 合成酵素) と液胞等によるプロトンの能動輸送に用いられる V 型 ATPase (リソソーム等のプロトンポンプ) のエネルギー変換機構と回転・調節機構の解明を目指した。F 型 ATPase については、ATP 加水分解によるサブユニットの回転機構、特に回転がプロトン輸送に至る機構を明らかにし、さらに F 型 ATPase 全体と膜サブユニット部分が膜電位/pH 勾配駆動型のモーターであることを実証し、V 型 ATPase については、回転機構とともにイソフォームによる調節機構と生理機能を明らかにする。また、これら、ナノモーターの解析とプロトンポンプの研究を通じて高効率ナノモーターへの展開を目指した。

##### ② 期間中の研究成果

(i) プロトン輸送活性を持たない一連の F 型 ATPase の変異酵素を調製し、回転とプロトン輸送の共役について検討したところ、これらの変異酵素は、ATP の分解を駆動力として回転し、発生するトルクは野生型酵素と同等であることが分かった。このことは、回転とプロトン輸送に確率的なゆらぎがあることを示している<sup>1, 2)</sup>。

(ii) タンパク質の再吸収を行う腎臓の近位尿細管上皮細胞において、a2 イソフォームを含む V 型 ATPase は、酸性 pH に依存して低分子量 GTPase や活性調節因子と結合し、小胞の輸送に関与することを示した<sup>3, 4)</sup>。

(iii) V 型 ATPase の a3 イソフォームを欠損したマウスでは、成熟したインスリンが産生されているが、膵臓β細胞からの分泌がないことを示した<sup>5)</sup>。

本研究で得られた成果である V 型 ATPase の構造と機能は、インスリンなどのホルモン等の分泌機能に関するばかりでなく、多くの病態に深く関係している点で<sup>6, 7)</sup>、今後の進展も含めて、医療、創薬に大きく貢献するものと期待される。本領域の課題の中でも応用への展開の可能性の大きなテーマである。最近では小胞輸送と V 型 ATPase の関連を示す成果が医学的な重要性から、News and View、This Week in ST、などに取り上げられた。得られた知見をもとに、外部機関や企業との連携もすでに進んでおり、今後の発展が大変期待された。

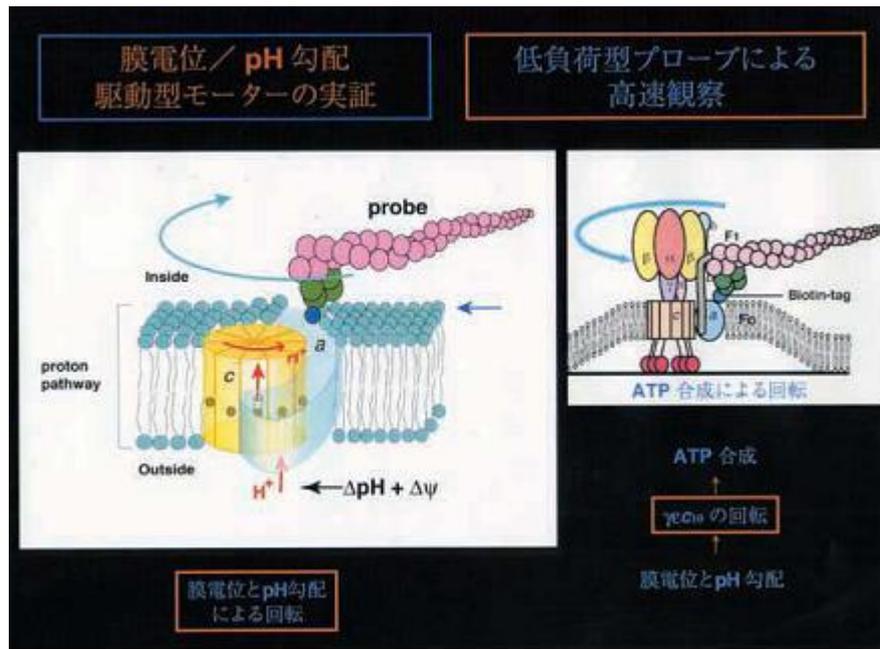


図 3-10 膜電位/pH 勾配駆動型モーター (F 型 ATPase)

### ③研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Hosokawa H, Nakanishi M, Kashiwagi S, Hayashi K, Taira I, Iwamoto-Kihara A, Wada Y, Futai M, “ATP-dependent rotation in mutant ATP synthases lacking proton transport.” *J. Biol. Chem.*, 280, 2379-23801 (2005)
- 2) Nakanishi-Matsui M, Kashiwagi S, Hosokawa H, Cipriano DJ, Dunn SD, Wada Y, Futai M, “Stochastic high-speed rotation of *Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> sector.” *J. Biol. Chem.*, 281, 4126-4131 (2006)
- 3) Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada GH, S. Bourgojn J, Casanova A, Wildeman S, Bechoua D, Ausiello A, Brown D, Marshansky V, “V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway.” *Nature Cell Biol.*, 8, 124-136 (2006)
- 4) Marshansky V, Futai M, “The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function.” *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20, 415-426 (2008)
- 5) Sun-Wada GH, Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, Futai M, Wada Y, “The  $\alpha 3$  isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cell.” *J. Cell Sci.* 119, 4531-4540 (2006)
- 6) Toyomura T, Murata Y, Yamamoto A, Oka T, Sun-Wada GH, Wada Y and Futai M, “From lysosomes to plasma membrane: Localization of vacuolar type

H<sup>+</sup>-ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation.” J. Biol. Chem., 278, 22023 - 22030 (2003)

- 7) Sun Wada GH, Murata Y, Namba M, Yamamoto A, Wada Y, Futai M, “Mouse proton pump ATPase C subunit Isoforms (C2-a and C2-b) specifically expressed in kidney and lung.” J. Biol. Chem., 278, 44843 - 44851 (2003)

#### (1) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、主として科研費基盤研究(B)「プロトンポンプ ATPase の作動機構と酸性環境の形成」(2008 ~2010 年度)で、「ATPase の作動機構と酸性環境の形成」に注目して、酵素学から細胞生物学に至る広い視点から研究を進め、生化学的には、V 型プロトンポンプ ATPase とそのモデルとしての F 型 ATPase のサブユニットの回転を伴うプロトン輸送機構を明らかにし、さらに、細胞生物学的には V 型 ATPase がオルガネラ膜と形質膜に局在化する機構と、酸性 pH がオルガネラ形成に関与する機構を実証することを目的としている。主な成果は下記の通りである。

#### ① 科学技術の進歩への貢献

##### (i) F 型 ATPase の回転機構の解析(温度依存性)

大腸菌のプロトンポンプ F-ATPase の回転機構の温度依存性を、 $\gamma$  サブユニットに金の微粒子を付けた一分子観察により詳しく解析した。その結果、F 型 ATPase はサブユニットの回転を伴う機構によって活性化エネルギーを下げていること、 $\beta$  および  $\gamma$  の 2 つのサブユニットの相互作用が速度論的に重要なステップを形成していることが明らかになった<sup>1)</sup>。

##### (ii) F 型 ATPase の回転機構の解析(ゆらぎ回転機構)

F-ATPase の  $\gamma$  サブユニットは 120 度のステップで確率的にゆらぎながら回転しており、その速度はミリ秒レベルで変化している。そして、約 1000 回転すると約 1 秒間阻害状態になる。再び回転を始める時の活性化エネルギーは通常の回転を続けている時の 2 倍の値となる。F 型 ATPase が活動と休止を繰り返し、エネルギーの無駄づかいともいえる ATP の加水分解を抑制していることを解明した<sup>2)</sup>。

##### (iii) F 型 ATPase の回転機構の解析(回転速度)

F 型 ATPase の固定子  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットと回転子である  $\gamma$  サブユニットの C 端の間でできるポケットに Piceatannol が結合すると 120 度の回転ステップ自体は変わらないが、回転速度は遅くなる。 $\gamma$  サブユニットの Met23 を Lys に置換しても同じことが起こった<sup>3)</sup>。このような研究により、回転機構に於けるサブユニット間相互作用の重要性を示している。

##### (iv) 回転プロトンポンプ V 型 ATPase の生理機能

V 型 ATPase そのものがアルブミンの取り込みやインスリンの分泌に関与していた。また、a3 イソフォームを持つ V 型 ATPase が破骨細胞の形質膜から骨吸収窩へプロトンを分泌していること、この V 型 ATPase がリソソームから移動することを示した。いずれも、疾病の

基礎的理解に通じる発見である。

二井の、ATP 合成酵素 (F 型 ATPase) の分子生物学的・生化学的研究、及び、V 型 ATPase の構造と分子的機能および生理的機能に関する研究成果は生化学分野で高く評価されている。研究は、その後も中西真弓准教授、関谷瑞樹助教らによって継続されている。

## ②社会・経済的波及効果

V 型 ATPase は、真核生物の空胞系膜に存在するプロトンポンプである。「分子モーター」としての回転触媒機構により、ATP の加水分解エネルギーを使ってプロトンを小胞内に輸送し、内部を酸性化する。V 型 ATPase はこのような作用で、細胞内の pH の調節、インスリンの分泌、骨の形成、神経の機能など、生体の幅広い機構に関与している。この研究成果は、V 型 ATPase をターゲットとする創薬のリード化合物を探索することにつながる。

ATP を加水分解して得られるエネルギーを使って行われる細胞機能に注目し、その一つとして、胃酸分泌酵素の実体と遺伝子発現機構を明らかにし、さらに、ATP 加水分解によるエネルギーを用いて H<sup>+</sup> を輸送する酵素が、ATP 合成酵素と構造ならびに反応機構がよく似ていること、H<sup>+</sup> 輸送により細胞の内外の多様な場所 (細胞内小器官) を酸性にしていることを実証した。この酵素が、細胞内の pH の調節、インスリンの分泌、骨の形成、神経の機能など、生体の幅広い機構に関与していることを実証した。ATP の加水分解によって形成される細胞内小器官の内部の酸性 pH は、生物学的に極めて重要であり、疾病にも深くかかわっている。

## ③上記継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Sekiya M, Nakamoto RK, Al-Shawi MK, Nakanishi-Matsui M, Futai M, “Temperature dependence of single molecule rotation of the *Escherichia coli* ATP synthase F1 sector reveals the importance of  $\alpha \cdot \beta$  subunit interactions in the catalytic dwell.” *J.Biol.Chem.*, 284, 22401-22410 (2009)
- 2) Sekiya M, Hosokawa H, Nakanishi-Matsui M, Al-Shawi MK, Nakamoto RK, Futai M, “Single molecule behavior of inhibited and active states of *Escherichia coli* ATP synthase F1 rotation.” *J.Biol.Chem.*, 285, 42058-42067 (2010)
- 3) Sekiya M, Nakamoto RK, Nakanishi-Matsui M, Futai M, “ Binding of phytopolyphenol piceatannol disrupts  $\beta / \gamma$  subunit interactions and rate-limiting step of steady-state rotational catalysis in *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase.” *J. Biol. Chem.*, 287 (27), 22771-22780. (2012)

## ④その他

二井は、岩手医科大学の理事・評議員として、大学の経営に参画するとともに、薬学部長として学部の完成に努めるとともに薬学教育者および研究者の指導育成に尽力している。

二井研究室の、関谷瑞樹助教らは、ATP 合成酵素が活動と休止を繰り返し、エネルギーの無駄づかいともいえる ATP の加水分解を抑制していることを解明した *J. Biol.*

Chem. (2010)の論文が、盛岡タイムス Web News (2010年12月8日)に紹介されている。二井は、V型ATPaseはがん細胞の外へプロトンを送り、「将来的にはがんの転移を防ぐような薬の開発につなげていければ」とコメントしている。

二井は、ATP合成酵素(F型ATPase)の分子生物学的・生化学的研究、及び、V型ATPaseの構造と分子的機能および生理的機能に関する研究成果が評価され、藤原科学財団藤原賞(2009年)を受賞した。受賞に際し、最近の研究成果が読売新聞(2009年6月7日)に詳しく紹介された。

さらに、「生物エネルギー生産(転換)機構の研究」の功績で、日本学士院賞(2012年度)を受賞している。2012年3月には、日本学士院賞受賞が各紙で紹介された。岩手日報には、詳しいインタビューが掲載された。

本研究課題に関わった研究グループの、平 郁子および中西(松井)真弓(微生物化学研究センターCREST 研究員)は、それぞれ岩手医科大学薬学部准教授、および京平成大学薬学部講師に就任している。V型ATPaseに貢献した孫(和田)戈虹助手は、同志社女子大学薬学部教授に昇任した。また、柏木幸子(微生物化学研究センターCREST 技術員)および細川浩之(岩手医科大学、東京大学大学院生)は、薬学博士の学位を取得し、ポストドクトラルフェローとしてMassachusetts General Hospital に所属している。

### 3.3 2004 年度採択課題

#### 3.3.1 バイオナノマシンの動的構造から機能発現への階層的理論モデリング(高田 彰二)

##### (1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況

###### ① 研究のねらい

最適な動作をするソフトナノマシンの創製のためには、手本として、バイオナノマシンの作動原理を総合的に理解することが重要であり、そこには新しい理論モデルが不可欠である。本研究は、分子モーターなどのバイオナノマシンの多様な機能発現の機構を、動的な構造情報に立脚して、理論的に解明することを目的とした。そのためにまず、1) 配列情報と各分子の構造情報からバイオナノマシンの動的構造モデリングを行う。次に、バイオナノマシンの階層性に着目して、原子レベルと粗視化レベルの両方から機能発現機構に迫る。すなわち 2) 粗視化レベルの大域的なエネルギーランドスケープ論による機能発現の統計力学的モデリング、及び 3) 原子レベルの機能発現分子動力学シミュレーションを行う。主対象を、FOF1-ATPase、アクトミオシン、べん毛などとし、理論・モデル・シミュレーションによって個々の系の実験を説明するとともに、そのモデルから検証可能な予測を行い、新しい実験、ソフトナノマシン創製に貢献することを目指した。

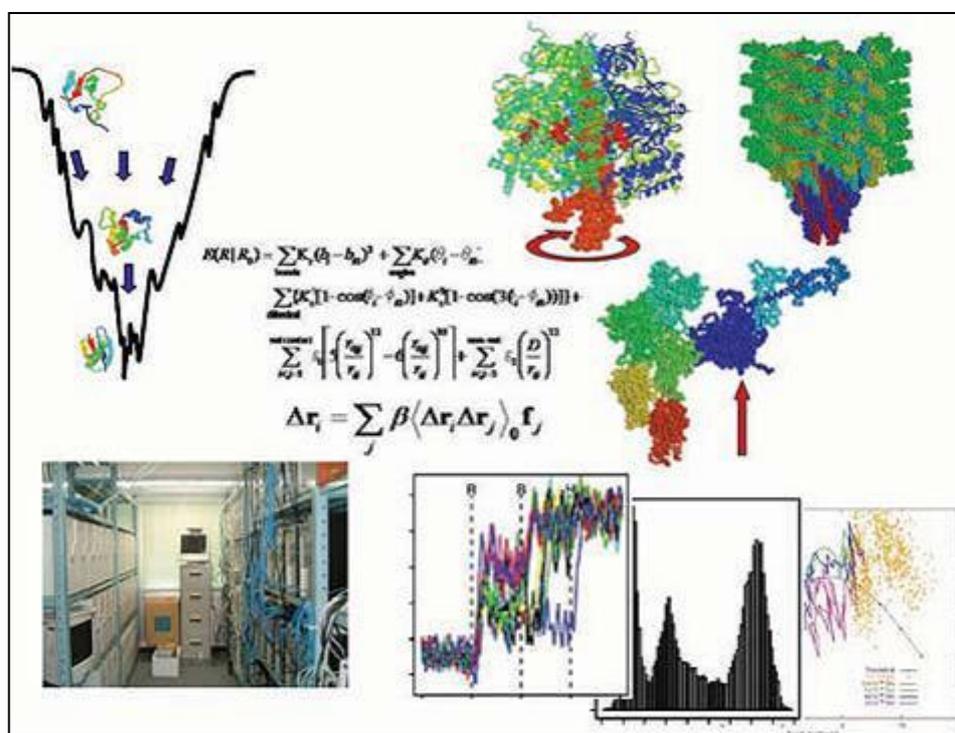


図 3-11 タンパク質の理論・モデル・シミュレーション

###### ② 期間中の研究成果

(i) 従来、タンパク質フォールディング研究に使われてきた郷モデルを初めてバイオナノ

マシンの機能研究に応用し、回転分子モーターF1-ATPase の回転運動の作動原理を研究した。スイッチング郷モデルによってF1 の回転運動を計算機の中に再現することに成功したこと、計算機中での擬似的アミノ酸置換実験を繰返し回転運動へトルクを伝えるアミノ酸部位を予測したこと、また化学—力学共役の仕組みとして、「always-bi-site モデル」を支持する結果を得たこと、が主要な成果である<sup>1)</sup>。

(ii) マクロな疎水性表面が水中にあるとき、水分子は疎水性表面から排除される傾向を持つが、メタンなどのミクロな疎水性分子のまわりでは、水分子は「かご状」の水素結合をつくって溶質をとりかこむと考えられている。中間のメゾスコピック領域で起こる現象を調べるために、カーボンナノチューブの水和を分子動力学計算により分析した。カーボンナノチューブが1本の場合には「かご状水和」が優勢であるが、2本のカーボンナノチューブが接近すると、水和構造は大きくゆらぐ。3本のカーボンナノチューブが接近すると、3本にはさまれた領域から水が排出される「乾き転移」が生じ、メゾスケールでは溶質の幾何学的配置が水和に大きな影響を与えることが示された<sup>2)</sup>。

(iii) 「タンパク質の構造ゆらぎと立体構造変化の関係を記述する線形応答理論」において、分子間相互作用を外界からの摂動ととらえ、その摂動に対するタンパク質の応答として、タンパク質の構造変化を記述した。タンパク質の応答のあり方は、タンパク質の非結合状態の熱ゆらぎと深く関わっており、分子動力学シミュレーションや基準振動解析による構造ゆらぎから計算することができる。この方法を鉄結合タンパク質、クエン酸合成酵素、F1ATP 合成酵素に適用した結果、予測される構造変化は実験値とよく相関していた<sup>3)</sup>。

生体高分子系のシミュレーション技法は、着実に進歩を遂げており、その成果は既に創薬研究において実用化されている。進歩に伴い、適用範囲は著しく拡大しつつある。本研究には、この分野におけるわが国を代表する研究者が参加しており、この分野のレベル向上への寄与は顕著であった。

### ③研究成果に関連した主な成果論文

- 1) Koga N, Takada S, “Folding-based molecular simulations reveal mechanisms of the rotary motor F1-ATPase.” Proc.Natl.Acad.Sci. USA (2006)
- 2) Hotta T, Sasai M, “Fluctuating hydration structure around nanometer-size hydrophobic solutes II - Caging and drying around single-wall carbon nanotubes”, J. Phys. Chem. C 111, No.7, 2861-2871, Feb 22, (2007)
- 3) Ikeguchi M, Ueno J, Sato M, Kidera A, “Protein structural change upon ligand binding: Linear response theory.” Phys. Rev. Lett., 94, 078102, 1-4, (2005)

### (2) 本研究領域終了後の継続と発展状況

本研究領域終了後は、主として科研費基盤研究(B)「タンパク質が主導する膜形態変化の分子シミュレーション研究」(2007~2009 年度)、「生体分子モーターのシミュレーション

研究運動から化学反応制御への構造機能解析」(2010～2012 年度)、および、文部科学省 次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発「生体分子系の粗視化シミュレーション技術の開発」(2007～2012 年度)で研究を進め下記の成果を得た。

### ①科学技術の進歩への貢献

#### (i) 分子間結合に伴うタンパク質の構造変化の解析

相手分子との結合に伴うタンパク質の構造変化は古くて新しい問題である。伝統的には Koshland の誘導適合がもっともよく受け入れられているが、最近では MWC にその起源をもつ population-shift モデルが注目されている。粗視化モデルを使って、誘導適合と population-shift の問題を調べた。その結果、結合に伴う構造変化において誘導適合と population-shift は並列の経路であり、どちらをどれくらい通るのかはケース依存であるということが分かった。特に、リガンドとタンパク質の相互作用が弱いとき、および短距離力のときは population-shift が支配的であり、反対に相互作用が強く、長距離力のときは誘導適合が支配的になる。従って、タンパク質と薬剤などの小分子の場合は population-shift が優勢で、タンパク質と核酸の結合では誘導適合が優勢になるはず、と主張している<sup>1)</sup>。粗視化モデルによるシミュレーションで誘導適合と Population-shift の関係を解析した、この論文の被引用件数は 100 件(2012 年 9 月現在)に達している。

#### (ii) 多剤排出トランスポーターAcrB の薬剤排出過程の解析

AcrB の薬剤排出過程のシミュレーションを行い、それに基づいて機能的回転機構を計算機上で実現した。計算機実験では、プロトン結合に起因する薬剤の解離過程が全体のサイクルのボトルネックになっていることが示唆された(図 3-12 参照)。

理化学研究所「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発プロジェクト」における村上(東京工業大学)との共同研究成果である「多剤耐性トランスポーターの機能解明」に関するこの Nature Comm. (2010) の論文<sup>2)</sup>も注目されている。

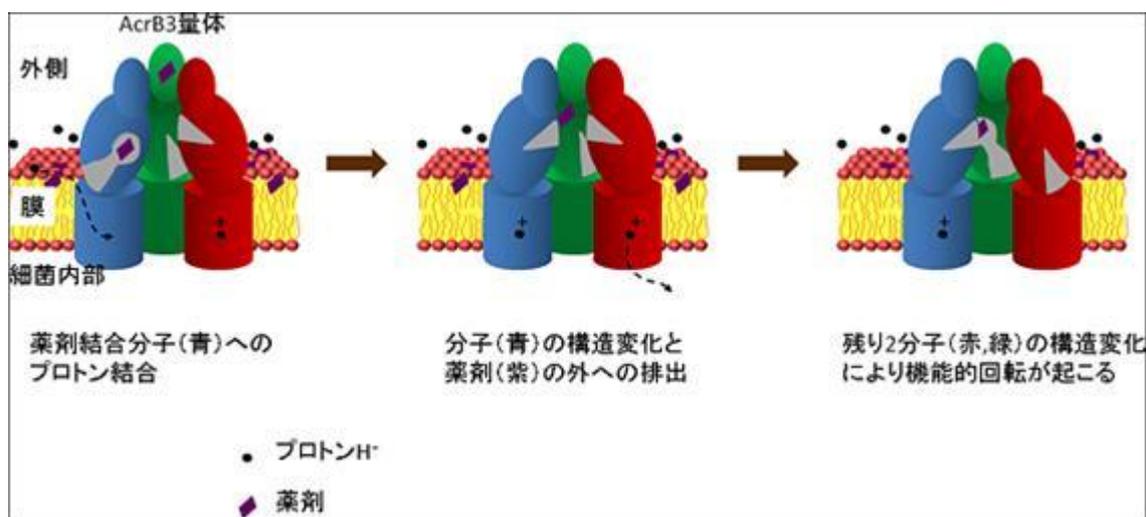


図 3-12 プロトン結合に起因した AcrB の薬剤排出と機能的回転

(図の説明) AcrB 3 量体は非対称な構造をしている。1 つ目の分子では細胞内に向けた薬剤の入り口と思われる経路が開き (図 3-11 の緑: 取込型)、2 つ目の分子では薬剤が中央に結合し (図 3-10 の青: 結合型)、3 つ目の分子では外側に向けた薬剤排出口が開いていた (図 3-11 の赤: 排出型)。薬剤が結合している 2 つ目の分子に細胞外からプロトンが結合すると (左図の破線矢印)、この分子の薬剤は細胞外に排出され (図 3-11 中央図)、ほかの 2 つの分子も状態を変化させる (図 3-11 右図)。この時の 3 量体の構造状態は、最初のもの (図 3-11 左図) からちょうど 1 段階ずつ変化し、1 つ目の分子が結合型、2 つ目の分子が排出型、3 つ目の分子が取込型になって、120 度回転したことになる (図 3-11 右図)。120 度回転につき、薬剤 1 分子が外側に運ばれる。

## ②社会・経済的波及効果

(i) 多剤耐性は、院内感染やがん化学治療など社会問題を引き起こしている。緑膿菌などの多剤耐性化の主な原因になっているのは RND (Resistance-nodulation-cell division) 型の多剤排出トランスポーターの発現量増加である。大腸菌の RND 型多剤排出トランスポーターである AcrB は、東京工業大学村上らによって X 線構造解析がなされ、それに基づいて機能的回転機構という作動機構が提唱されている<sup>2)</sup>。高田は、2008 年ごろから、村上との共同研究で、分子スケールのさまざまなレベルの計算研究を進めてきた。この研究成果はそのなかの第一弾として、粗視化シミュレーションによって薬剤排出過程を調べたものである。この研究は、次世代スパコン「京」が稼働する 2012 年を前に、理化学研究所と連携して、粗視化技術を取り込んだ分子シミュレーションの研究開発として進めたものである。

(ii) 高田らが開発した「CafeMol」粗視化分子モデル計算プログラム<sup>3)</sup>は、粗視化分子モデル計算により大規模生体分子の長時間シミュレーションを行うもので、X 線回折や NMR による構造情報が存在するタンパク質、核酸などの動態の分子動力学シミュレーション、とくに構造変化を伴うタンパク質ドッキング、分子モーターやトランスポーターの大規模構造変化などをシミュレーションできる。

(iii) 「次世代スーパーコンピューティング技術」は、第 3 期科学技術基本計画 (2006 年 3 月閣議決定) において、国家的な大規模プロジェクトとして計画期間中に集中的に投資すべき国家基幹技術と位置づけられ、文部科学省及び理化学研究所が開発・整備を進めている。スーパーコンピューター「京」の設置者である理化学研究所は、2006 年 10 月に「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発プロジェクト」(プログラムディレクター: 茅幸二) を立ち上げ、さらに、2010 年 7 月 1 日に計算科学研究機構 (AICS) を設立し、種々の研究課題を設定して研究開発を進めている。高田は、理化学研究所の「次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ 分子スケール研究開発チーム」(リーダー: 木寺詔紹) に参画して京都大学の拠点代表として、「CafeMol 粗視化分子モデル計算」を担当してきた。2011 年 10 月までに高田の開発した「CafeMol プログラム」はスーパーコンピューター「京」での試験実効効率 20% を超えている。

(iv) 「次世代生命体統合シミュレーション」では粗視化分子シミュレータ CafeMol (高

田)<sup>3)</sup>、マルチスケール分子動力学 Platypus(木寺、中村、林など)、タンパク質全原子分子動力学 Marble(池口)などを開発してきたが、2012年度でこの課題が終了するため、このプロジェクトに参加していた、高田彰二(京都大学)、池口満徳(横浜市大)、林重彦(京都大学)が、2013年度から、AICSの研究課題「細胞内分子ダイナミクスのシミュレーション～細胞環境における分子および細胞スケールシミュレーション～」(代表:杉田有治 理化学研究所)に参加する。2013年度からは高田、池口、林らの参加により本格的にプログラムの継承が実現する。また、それ以前も研究会やプログラムの利用や高度化については活発な交流をはかる。高田らは、粗視化分子モデルを用いた大規模分子シミュレーションを行うことでヌクレオソーム多量体の構造解析とモデリングを行う。また、エピジェネティクスの理解に繋がる DNA タンパク質複合体のシミュレーションを行うことで、ガン医療や再生医療などに貢献する。

今後、次世代スパコン「京」により高精度計算が可能になると、原子レベルでの詳細な動きが解明できると期待でき、多剤排出トランスポーターによって排出されない薬剤、あるいは同トランスポーターの働きを止める薬剤の開発の基礎に貢献するものと期待される。

### ③上記継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト

- 1) Okazaki K, Takada S, “Dynamic energy landscape view of coupled binding and protein conformational change: Induced-fit versus population-shift mechanisms.” Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 105,11182-11187 (2008)
- 2) Yao X, Kenzaki H, Murakami S, Takada S, “Drug export and allosteric coupling in a multidrug transporter revealed by molecular simulations.”, Nature Comm., 1: 117(8 pages) (2010)
- 3) Kenzaki H, Koga N, Hori N, Kanada R, Li W, Okazaki K-I, Yao X-Q, Takada S, “CafeMol: A coarse-grained biomolecular simulator for simulating proteins at work.”, J. Chem. Theory and Computation,7(6),1979-1989 (2011)

### ④その他

高田は 2007 年に神戸大学から京都大学大学院理学研究科生物物理学教室に移籍して准教授として自分の研究室を持ち活動している。

理化学研究所、高田(京都大学)、村上(東京工業大学)らの共同研究成果である Nature Communications (2010)の論文の内容は、科研費新学術領域研究「ゆらぎと生体機能」ニュースレターNo. 25(2010. 12. 28)、理化学研究所プレスリリース(2010. 11. 17)、および、日経産業新聞(2010. 11. 17)で紹介されている。

本研究領域当時、高田グループの、古賀(巽)理恵(京都大学大学院理学研究 CREST 研究員)は、ワシントン大学研究員に、千見寺浄慈(神戸大学理学部研究員)は、名古屋大学大学院工学研究科助教にそれぞれ昇任している。

## 第4章 科学技術イノベーションに資する研究成果の状況

### 4.1 研究領域からの研究成果事例

追跡調査時点において、科学技術イノベーション創出に資する展開をしていると思われる事例について、研究代表者 藤吉にインタビューを行い、基礎研究からの展開について本章でまとめた。

#### 4.1.1 「高次細胞機能構造体観察・制御技術の開発（藤吉好則）」

##### 4.1.1.1 研究の概要

###### (1) 研究テーマの状況

###### ①電子線結晶学を研究テーマに選んだ理由

###### (i) 第1の理由

人間は置かれた環境によって、神経のネットワーク形成が変化し、遺伝子だけでは、能力や性格は決定できない機構がある。このような環境要因の影響を分子レベルで理解したいという学者としての夢の実現に向けて、脳神経の解析に挑戦してきた。まず、その構造を分子レベルで理解するためには、その立体構造を決めることが必須と考え、X線結晶学を勉強した。しかし、脳のタンパク質は神経細胞の細胞膜に存在し、X線結晶学では解析が困難と考えたため、X線よりも1万倍程度も原子散乱因子が大きい電子線を用いた。電子線では、細胞膜の厚さが高々50 Å程度の2次元試料からでも意味のある構造が解析できるので、脂質膜の中に入っているそのままの状態構造解析するのに適している<sup>1)</sup>。室温では、エネルギーの強い電子線をタンパク質に照射すると、試料が一瞬にして分解してしまうが、液体窒素の温度では、室温の4倍、液体ヘリウムでは、室温の20倍の安定化が得られる(図4-1)<sup>2)</sup>。

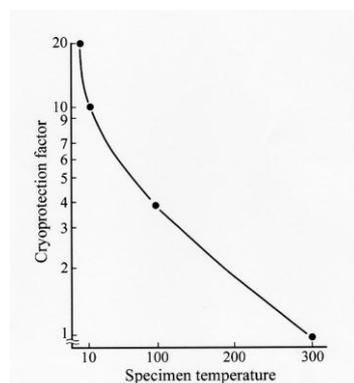


図4-1 温度(K)と試料安定性の関係

この事実をもとに、液体ヘリウムの温度で試料の損傷を減らし、電子線による構造解析ができる極低温電子顕微鏡(Cryo-EM)の開発を試みた。

さらに、電子顕微鏡では2次元結晶の投影構造しか見ることができないので、3次元構造の情報を得るためには試料を色々な角度に傾けて測定する必要がある。外部から2次元試料を傾けてみることができるCryo-EMを開発するというチャレンジングな課題を本CRESTで日本電子の協力を得て行い、最高2 Åの解像度で膜タンパク質の立体構造解析ができる装置を完成させた。

###### (ii) 第2の理由

電子線結晶学による膜タンパク質の構造解析により、創薬の研究開発等の世の中の役に立つ研究を進めたかったからである。薬物が細胞外から作用する標的は膜タンパク質であ

り、既存の薬の半分以上が G タンパク質関連の受容体や、イオンチャネルを標的としている。標的タンパク質の構造が分かっていると、その構造に基づいて薬の作用点をデザインできる可能性がある。また、薬の副作用についても、受容体の構造と薬と受容体の複合体の構造解析から、副作用を回避できるように化合物をデザイン

する SGDD (Structure-Guided Drug Development) が進展し、薬の開発効率が向上し、経費の削減にも繋がる。藤吉らは CeSPI<sup>3)</sup> で、製薬企業と共同で実際そのような試みもすでに始めており、創薬のイノベーションにつながる可能性を追求している。

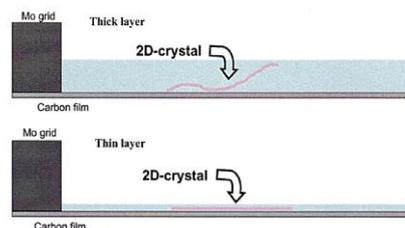


図 4-2 試料の張付け方

## ②極低温電子顕微鏡 (Cryo-EM) 開発のキーポイントとなった技術

電子顕微鏡は極低温に冷却することにより熱雑音等が減少し、高解像度を得ることができる。しかし、タンパク質を極低温下 (液体ヘリウム温度) で分析するためには幾つもの課題があり、それらを全て解決する必要があった。

### (i) 極低温化の実現

低温ステージの安定性と、高分解能の解析が短時間で出来るようにしたことが、大きなブレークスルーポイントとなっている。一つの試料を液体ヘリウム温度で撮像して 2Å の解像度で解析してから、次の試料を撮像する時間を 10 分程度に短縮する技術を開発した<sup>4)</sup>。世の中にある通常の電子顕微鏡ではもっと分解能が低くてもこの撮像時間間隔は約 1 時間である。通常サイドエントリー装置で試料を横から入れるので、熱安定になるまでに時間がかかる。藤吉のデザインした装置では特殊な工夫 (キャタピラー法) で横の試料を内部で直角に曲げて、上から入れられるようになっていて (トップエントリー)、試料を入れた瞬間に試料が固定されるように工夫したところがミソである。そのために外で氷包埋法を用いて凍結した状態でそのまま観察することができ、10 分以内に高解像度のデータを得る事が出来る。高分解能を得るために水の厚さが重要なことも、炭素薄膜の表面が原子レベルでフラットでないといけないことも、短時間で試料交換ができるシステムを使って、何度も試行錯誤を繰り返してはじめてわかったことである。このような細かい事実が経験として積み重なって初めて効率よく高分解能の立体構造解析が出来るようになったので、他所ではまねできないものである。

### (ii) 試料調製

電子線結晶学のウイークポイントは細胞膜や 2 次元結晶は柔らかく変形しやすいため、原子レベルで平らなカーボンの薄い支持膜の上に試料をぴったりと貼り付ける必要がある。試料を水中で測定するため、水の層が厚いとバックグラウンドノイズが大きくなる。S/N 比の良いデータを取るためには、水の層をできる限り薄くすることが必須の条件になる。しかし、水中でしかタンパク質試料の立体構造が保持できないために、あまり水を吸い取りすぎると試料が乾燥して分子構造が壊れてしまう。したがって、水の層の厚さを 1000 Å 程度にそろえる必要がある (図 4-2)<sup>2)</sup>。この厚さを制御する方法は非常に難しく熟練を要す

る。これらの技術と積み重ねたノウハウを統合して、Cryo-EM の分解能 2Å という世界最高性能を達成できた。

(iii) 電子線結晶学と電子顕微鏡の歩みのまとめ

電子線結晶学の主な特徴を藤吉の総説<sup>1),4)</sup>からまとめて(表 4-1)に示した。

表 4-1 電子線結晶学の特徴

1.	電子線はX線よりも1万倍程度も原子散乱因子が大きいので、細胞膜の厚さと同じくらいの高々50Å程度の2次元試料からでも意味のある構造が解析できる
2.	膜タンパク質が自然な状態に近い脂質膜の中にある状態で構造を解析することができる。
3.	結晶性がある程度悪くても立体構造を解析することができる。ただし現状では、解析可能な分解能は結晶性によって制限される。
4.	2次元結晶の両端が開いており、人為的な相互作用による分子構造の変形の影響が少ない。また、N. Unwinによって構造解析されたニコチン性アセチルコリン受容体(AChR)の例 <sup>5)</sup> のようにスプレー法と急速凍結法を用いて動的な構造変化を研究することができる。
5.	位相を直接像から計算できるので、分解能が等しいときには、X線結晶学より質の良い位相情報が得られる。それゆえ密度図の質が良い。

藤吉らが日本電子と共同で開発したCryo-EMの歴史を藤吉の総説<sup>2)</sup>から引用して(図 4-3)に示した。

第1世代から第4世代までは藤吉と日本電子で開発され、第5世代はNEDOのプロジェクトで開発、第6世代はCRESTの本研究課題で開発された。第7世代は本研究課題終了後にNEDOのプロジェクトで開発されたものである。

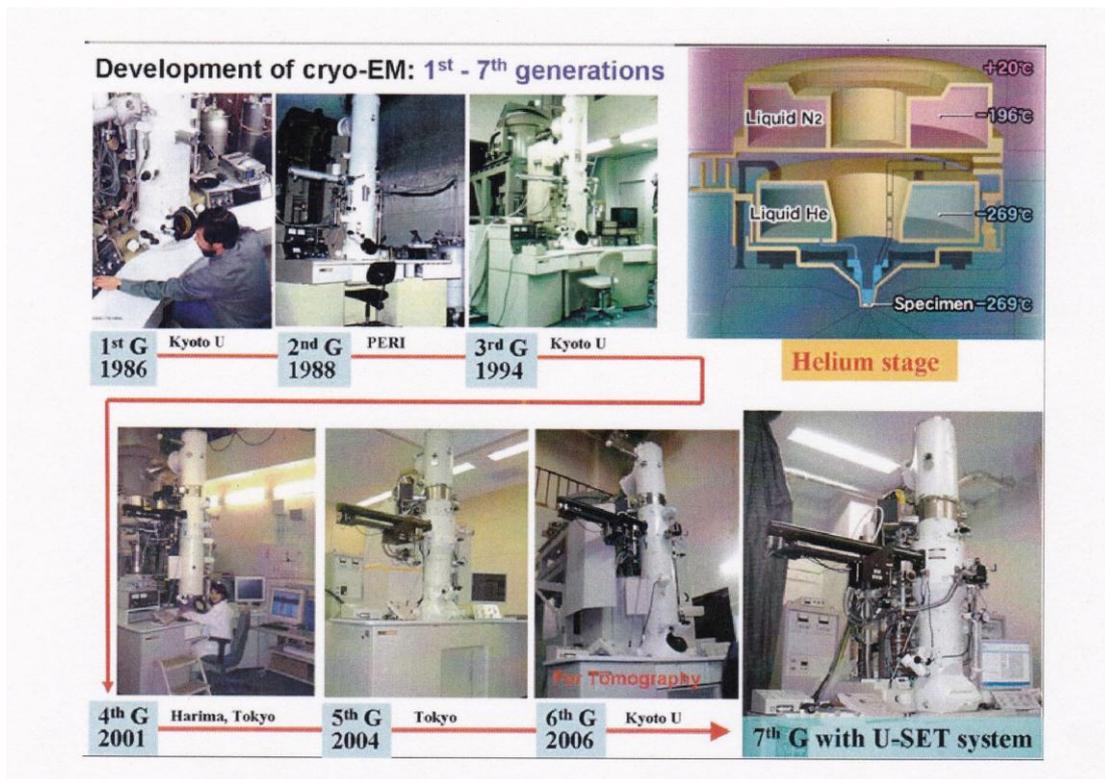


図 4-3 藤吉らの開発した Cryo-EM の歴史

図の説明：1983年から日本電子(株)と共同研究を行い、1986年、分解能2.6ÅのプロトタイプのCryo-EM第1世代が完成し、京都大学に設置された。

第2世代は、分解能2Åを目標に液体ヘリウムステージを設計し、操作性の悪い点を改善した最初の実用モデルであり、蛋白工学研究所(PERI)に納入された。この装置の基本は、液体ヘリウム温度よりさらに低い超流動ヘリウムで、冷却温度1.5K、最高解像度2.0Åに性能を向上させた。

第3世代は、電界放射型電子銃を備え、傾斜試料から安定して良好な像が得られるようになった。京都大学・松下電器国際研究所などに納入され、AQP1、AChRなどの構造解析に使われている。

第4世代は、試料を自動で交換できる自動オート・トランスファー装置を備え電界放射型電子銃とオメガフィルターを備えた。理研播磨研究所、産総研生物情報解析研究センターに納入された。

第5世代は、単粒子解析にも使えるように、より小型にできる加速電圧200kVに改良した。産総研生物情報解析研究センターなどに納入された。

第6世代は、CRESTの本研究領域で開発された。電子トモグラフィー用のデータや他の目的にも使えるように、トップエントリのヘリウムステージを堅持しつつ、外部制御の試料傾斜を可能にした。これで、より複雑な分子の解析が可能になった。京都大学などに設置された。

第7世代は、第6世代を基に、さらに改良し、傾斜角度により試料位置が変化する問題を解決するために、試料を上下移動できるようにし、2009年に完成した。京都大学に設置され、その後第3世代の装置と共に名古屋大学に移設された。開発開始から第7世代の完成まで26年かかっている。右上の図は、ヘリウムステージの構成を模式的に示したものであるが、実際はもっと複雑なコンパートメントになっている。

### ③4次元ポルスコープについて

本研究課題で、Oldenbourgらが開発した新しい偏光顕微鏡(4次元ポルスコープ)は、神経線維が伸びていく様子が直接観察できる利点があるが、神経接合部をさらに高い分解能で見ようとすると電子顕微鏡による解析が必要になる。このために、細胞全体を観測出来るトモグラフィーの技術と組み合わせ、まず4次元ポルスコープで動いている神経部分を

見ながら、電子顕微鏡でトモグラフィーを撮って分子全体の形を観測し、ポルスコープで見た部分をさらに拡大して Cryo-EM で解析できることが望まれる。これは、第 8 世代の Cryo-EM と言える技術開発であり今後の課題である。

#### ④電子線結晶学による膜タンパク質の構造と機能解析

藤吉らが解析した膜タンパク質の代表例を藤吉の総説<sup>2)</sup>から引用して(図 4-4)に示した。

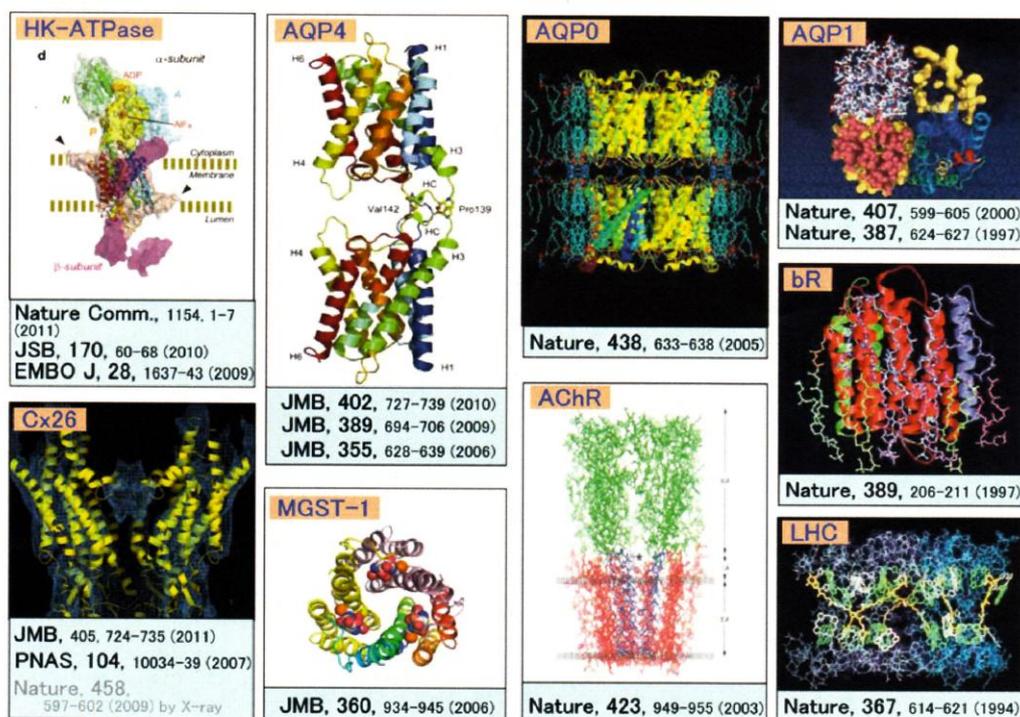


Fig. 12. Structures of membrane proteins analyzed by electron crystallography.

図 4-4 Cryo-EM による膜たんぱく質の構造解析

図の説明: アクアポリン-1 (AQP1)、バクテリオロドプシン (bR)、植物の light-harvesting complex (LHC)、は CREST の本プロジェクト以前の成果。

アセチルコリンレセプター (AChR)、アクアポリン-0 (AQP0)、microsomal glutathione transferase -1 (MGST-1)、アクアポリン-4 (AQP4) の一部、コネキシン-26 (Cx26) の一部は本 CREST 期間中の成果。

アクアポリン-4 (AQP4) の一部、プロトンポンプ (HK-ATPase)、コネキシン-26 (Cx26) の一部、は本 CREST 終了後の成果。(Cx26) のうち Nature の論文は Spring-8 のビームラインを用いた X 線回折結果である。

最近の新しい研究成果については 4.1.2 項で詳述する。

#### (2) 研究メンバーの活動状況(追加事項)

(i) 名古屋大学は旧帝大で唯一薬学部のない大学であり、2012 年度より初めて薬学系大学院として、大学院創薬科学研究科が開設され、藤吉は電子線結晶学で薬の開発に役立つ業

績が認められて、2012年4月から教授として大学院創薬科学研究科に赴任した。同時に、名古屋大学に藤吉が設立した CeSPI の教授も兼務することになった。なお、その後 2013年4月から、大学院創薬科学研究科と CeSPI で特任教授として研究を進めている。本 CREST のメンバーであった、大嶋篤典は CeSPI の准教授として、ギャップ結合チャンネルの研究を続けており、大学院創薬科学研究科の准教授を兼務している<sup>3),6)</sup>。

(ii) CREST 研究員野中美応は、京都大学大学院理学研究科博士課程(生物科学専攻)3回生の時に、ロレアル-ユネスコ女性科学者日本奨励賞-特別賞(2006年度)を受賞<sup>7)</sup>、東京大学医学系研究科特任助教(2011年-2012年)を経て、2013年から英国エジンバラ大学 Center for Cognitive and Neural Systems に在籍<sup>8)</sup>。

#### 4.1.1.2 研究成果の波及と展望

##### (1) 科学技術への波及と展望

###### ①電子線結晶学による構造と機能の解明

新しい機能を備えた高性能の Cryo-EM により、膜タンパク質等の複雑な生体高分子の構造がより詳細に解析できるようになり、世界的に脚光を浴びた膜タンパク質の構造決定に貢献し、電子線結晶学による「構造生理学(Structural Physiology)」という新しい分野を開拓した<sup>9)</sup>。この業績は他に追従を許さない世界的評価を得ている。

###### (i) アセチルコリン受容体(AChR)

アセチルコリン(Ach)をニコチン型アセチルコリン受容体(nAChR)の2次元結晶(チューブ状結晶)にスプレーして氷埋法で急速トラップして Cryo-EM で結晶構造解析を行い、nAChR が神経シナプス間溝に放出された Ach で活性化され暫定的に開口チャンネル型に変化する機構を解明した<sup>5)</sup>。このスプレー法による動的な構造変化の解析は、結晶の端が開いている2次元結晶(チューブ状結晶)だから可能で、膜タンパク質構造研究の有力な一つの手法である<sup>1),4)</sup>。

###### (ii) アクアポリン(AQP)

藤吉はこれまでに、AQP0、AQP1、AQP4、の構造解析を行っているが、AQP4 は脳機能と関連が深く、中心的研究課題の一つとなっている。AQP4 は脳の水チャンネルであり、脳浮腫、インフルエンザ脳症、神経脊髄炎などとの関係がある。更に多く発現している部位にも特徴があり、たとえば血液脳関門(BBB)を形成している脳の血管に近接するアストロサイトのエンドフィートや、浸透圧の調節で重要な視床下部ではグリア細胞が層状に重なったラメラ状構造をとっている部分に多く発現していることが知られている<sup>1)</sup>。

また、母体内の胎児の肺に一過性に AQP4 が大量に集積することで胎児の肺に存在していた羊水を急速に排出し、出生と同時に胎児が肺呼吸できるようになることもわかっている<sup>1)</sup>。このように AQP4 は非常に速い水の透過を担っており、藤吉らが解明した、プロトンを通さずに水だけを選択的に高速で透過させるメカニズムが重要な役割を果たしている。

さらに、AQP4 は水チャネルの機能以外に、弱い細胞接着や格子状アレイ形成などの機能も備えている。藤吉はチャネルでありながら、細胞接着機能を持つ “Adhennel” ファミリー の概念を提唱し<sup>1)</sup>注目されている。

### (iii) ギャップ結合チャネル

ギャップ結合チャネルについては、主として大嶋准教授のもとで研究が続けられている。ヒト由来のコネキシン Cx26 の変異体を用いてギャップ結合チャネルの構造を解析することによって、新しいゲーティング機構である、プラグゲーティングの機構を提唱した。さらに、月原研との共同で Cx26 の高分解能の構造が X 線結晶学で解析され、この構造もプラグゲーティング機構を支持している。

同様なギャップ結合チャネルとして、ヒトの Cx と異なる、イネキシン (INX) という結合チャネルが昆虫に存在する。INEX6 の構造解析したところ、8 個のサブユニットを持つ大きな結合チャネルであることが分かった<sup>10)</sup>。

### (iv) イオン輸送ポンプ ATPase とイオンチャネル

胃のプロトンポンプである  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase は細胞膜を隔てて約 100 万倍もの水素イオンの濃度勾配を形成している。 $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase の立体構造を明らかにすることで、胃内部からの  $H^+$  の逆流を防いで、輸送サイクルを正方向のみに進行させ、その濃度勾配を維持する為の性質(ラチェット機構)を解明した<sup>11)</sup>。

電界制御型  $Na^+$  チャネルのイオン選択機構の解析と、ゲーティング機構の解明を行った。バクテリア由来の  $Na^+$  チャネルについて、構造を安定化する変異体を作製しその解析を行った。 $Na^+$  チャネルの C-末端部分がヘリカルバンドル構造をとり、不活性化の制御を行っていることを解明した<sup>12)</sup>。膜電位感受性ナトリウムチャネルは、膜電位変化を感知してナトリウムイオンを選択的に透過させる機能を持つ膜タンパク質であり、神経細胞における活動電位の伝導や心臓の拍動などに必須の役割を果たす。この重要性ゆえ、ナトリウムチャネルは局所麻酔剤や抗不整脈薬、鎮痛剤といった薬剤の標的分子となっている。

### (v) クローディン様タンパク質 (IP39)

最近、大阪大学の月田教授との共同研究で、ミドリムシの外部構造を形成する IP39 の構造解析を行った<sup>13)</sup>。細胞と細胞を隙間なく繋げるタンパク質であるクローディンファミリー様タンパク質の分子構造を世界で初めて示し、分子が連なった複雑な機能構造の解明に向けて極めて重要な知見を得ることに成功した。本研究成果はクローディンなどの機能および構造解析における参考となることが期待される。

## ②PDBj EM Navigator データベース<sup>14)</sup>から見た科学技術への貢献

(i) 「日本タンパク質構造データバンク (PDBj)」は、JST バイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) と大阪大学の支援を受けて、米・欧のデータバンクと協力して、生体高分子の立体構造データベースを国際的に統一化された PDB アーカイブとして運営するとともに、様々な解析ツールを提供している。その中で、生体分子や生体組織の 3 次元電子顕微鏡データを、Web で検索できるサイト (EM Navigator) を運営している。

EM Navigator から電子線結晶学で解析されたタンパク質の構造モデルを検索すると、65件あるが、そのうち藤吉らのものは25件である(2013年8月現在)。しかも、低分解能の解析結果には誤りも多く実用にならないといわれており、高分解能の構造解析はほとんどが藤吉らの開発したCryo-EMによるものである。

(ii) アクアポリン(AQP)の構造解析データは12件登録されているが、そのうち6件は藤吉のデータである。AQP0(1), AQP1(1), AQP4及びその変異体(4)

(iii) Cx 関する構造は6件PDBjに登録されているがそのうち5件が藤吉らのデータである。

(iv) H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の構造5件全てが藤吉らのデータである。

(v) 藤吉らの電界制御型ナトリウムイオンチャネル(NavCt)の構造2件(2013年)、及びIP39の構造2件(2013年)が新たにPDBjデータベースに登録されている。

このように、世界的なデータベースから見ても、電子線結晶学による膜タンパク質の構造解析の分野において藤吉は大きな貢献をしていることが分かる。

## (2) 社会経済への波及と展望

### ①極低温電子顕微鏡(Cryo-EM)の社会経済への波及効果と将来展望

藤吉と日本電子が共同で創薬の重要なターゲットである膜タンパク質等の構造解析のために開発したCryo-EMは日本電子から製品として販売されている。

(i) Cryo-EMの販売台数と売上実績(日本電子)

現在までに製品として合計28台販売され(国内17台、海外11台)、総売上高は約100億円(付属装置を含む)である。まだ利益で開発費を回収できる段階には至っていない。第3世代(藤吉・日本電子で開発)、第4世代(NEDOの資金で開発)のものが主体で19台販売されている。第5世代(NEDOで開発)のものは3台販売され、第6世代(本CRESTで開発)、第7世代(NEDOで開発)の最新鋭機はまだ販売実績がない。

(ii) 主な製品と納入先(日本電子)

[国内](第2世代)蛋白工学研究所、(第3世代)松下電機国際研究所、大阪大学大学院生命機能研究科共同利用施設、(第4世代)理化学研究所(播磨研究所)、産総研生物情報解析研究センター、大阪大学免疫学フロンティア研究センター(JEM-3200FSC)、(第5世代)京都大学化学研究所先端ビームナノ科学センター微細構造解析プラットフォーム(倉田博基)(JEM-2100F(G5) JEM-2200FS+CEOS CETOCOR)、京都大学・低温物質科学研究センター(LTMセンター)(JEM-2200FSC)

[海外](第3世代)マックス・プランク研究所(独)(JEM FRANKFURT-3000SFF)、バイラー医科大学(米)、Lund大学(スウェーデン)。

(第4世代)カリフォルニア州立大学(バークレー校)(米)、バイラー医科大学(米)、ヘルシ

ンキ大学(フィンランド)、マックス・プランク(独)に納入された(JEM FRANKFURT-3000SFF)は最初に海外販売されたもので、藤吉も納入時に立ち会った。

(iii) 競合他社の状況(日本電子)

米国のFEI社がCryo-TEMでは電子顕微鏡の最大手であり、Cryo-EMの前世代の機種として、FEI-POLARA 300が世界的に使用され、264種類のタンパク質解析の実績を誇っている。代表的なCryo-EMの機種としてFEI-TITAN KRIOSとFEI-TECNAI POLARA F30が使われているが、いずれも液体窒素を用いる汎用機であり、膜タンパク質のような不安定なタンパク質の詳細な構造解析には向かない。FEI-TITAN KRIOSは一台約4億円の機種である。海外では手軽に扱える汎用機が主流であり、日本のように液体ヘリウム温度の極低温で構造解析できる高性能な機種の開発はまだ実現されていない。

日本電子でも液体窒素を使う汎用のCryo-EMも販売しているが、液体ヘリウムの温度で測定できる機種を販売しているのは世界で日本電子のみである。日本電子の液体ヘリウムを使うCryo-EMの主要機種としては、JEM-3000SFF(300kVの第3世代)、JEM-3200FSC(300kVの第4世代)、JEM-2200FSC(200kVの第5世代)がある。この分野で日本は世界のトップにいるといえる。

(iv) 製品の販売に関する問題点(藤吉、日本電子)

米国のヘリウム輸出制限によりヘリウムの輸入量が減ってしばらく入手困難であった<sup>15)</sup>が、最近は少し戻ってきている。しかし、液体ヘリウムの価格が高く、ランニングコストが高くなるために安定的に使えるラボは多くない。

また、極低温ステージが高価であること。液体ヘリウムのタンクは純銅のブロックを直接くりぬく方法で複雑なコンパートメントを作るため、高額となる。Cryo-EMは現状では、汎用機器ではなく受注生産方式で、高分解能のCryo-EMは細かい組み立て作業工程を経るため、作業時間もかなり長く、製品価格は1台3億円以上になる。日本電子の中でも専門技術者は数名と限られている。

さらに、構造解析のために研究者が講習を受けても解析経験が不足しているために安定して高解像度の構造解析データが得られないという問題もある。

(v) 今後の市場展望と課題(藤吉、日本電子)

電子顕微鏡の市場は伸びており、日本電子もライフサイエンス分野は注目していて、今後もCryo-EMの技術開発を続けていくとのことだが、今後の課題は、簡便で使いやすく、安価な装置を作る事である。

## ②4 次元ポルスコープについて

本研究課題で、米国MBLのOldenbourgらが開発した4次元ポルスコープの装置は売り出されているが、かなり大型で、特殊な装置であるのであまり売れていないようである。

同装置は、神経線維が伸びていく様子が直接観察できる利点があるので、トモグラフィーとCryo-EMとを組み合わせ、出来るだけ使いやすく簡便で、世の中に普及しやすい製品にしたいと藤吉は考えている。

### ③電子線結晶学の社会・経済に対する波及効果と将来展望

#### (i) 水チャネル・アクアポリン (AQP)

ヒトでは、AQP-0 から AQP-12 までの計 13 種類の水チャネルがみつかり、そのうちのいくつかは疾患にかかわることが知られている。

藤吉らは、とくに脳に多く発現しており、脳神経系の疾患と関連している AQP4 に注目し、AQP4 の迅速な水の透過をブロックする薬ができると、脳浮腫、インフルエンザ脳症、神経脊髄炎、などの疾患の治療につながる可能性があると考えている。

細胞内に水が溜まる腫瘍性脳浮腫(Cytotoxic edema)では AQP4 が細胞内への水の移動を促進し浮腫を増悪する因子となること、しかし細胞外腔に水が溜まる血管性脳浮腫(Vasogenic edema)では浮腫水をアストロサイトが吸収し血管内への移動を促進し、浮腫を改善する方向に働いていることが明らかとなった。さらにシナプス間隙でのトランスミッター濃度の調節、腫瘍性脳浮腫の発生と吸収などで多面的にアクアポリンが働いていることが明らかになりつつあり、病態の解明にも貢献している。

#### (ii) 薬剤探索への応用

札幌医科大学の片田竜一助教らは、飲酒者の頭部外傷後脳浮腫悪化の原因が AQP4 発現の上昇によることをラットへのエタノール投与実験で解明しており、AQP4 の水透過機能阻害剤アセタゾラミド(Acetazolamide)をそのラットに投与すると、脳浮腫を軽減し生存率が高まることを報告している<sup>16),17)</sup>。Acetazolamide は炭酸脱水素酵素を選択的に阻害する市販薬として緑内障の治療などに使われている<sup>18)</sup>が、藤吉らは 2009 年に、この試薬が AQP4 の水透過機能を選択的にリバーシブルに阻害することを報告している<sup>19)</sup>。

さらに、Acetazolamide を出発点にした研究、特に複合体の構造を電子線結晶学で解いて、その解析結果に基づいてヒトに使うことができる新たな AQP4 阻害剤を探索する研究が進んでおり、電子線結晶学の威力を示すよい例といえる。

#### (iii) ギャップ結合チャネル

ヒトのギャップ結合チャネル CX26 は発生や、心臓、免疫などをはじめ多くの生理的生物学的功能と関連があり、今後複雑なギャップ結合チャネルのゲーティング機構の解明が進むと、生物学・医学の発展に貢献すると期待される。

同様なギャップ結合チャネルであるが、ヒトの Cx と異なる、イネキシン(INX)という結合チャネルが昆虫に存在する。INEX6 の構造解析したところ、8 個のサブユニットを持つ大きな結合チャネルであることが分かった<sup>10)</sup>。INEX の構造を高い分解能で解析できれば、これも広い意味での創薬の標的とできるので、ギャップ結合の研究は、大きな社会貢献につながると期待される。

#### (iv) ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)

nAChR は、イオンチャネル型の受容体で、末梢では自律神経(交感神経と副交感神経)の節前線維終末(副腎髄質での神経終末を含む)及び運動神経終末に存在しており、交感神経も副交感神経も nAChR を介して興奮が伝達され、筋肉の運動はニコチン受容体を介して行われる。藤吉らの行った、神経系と関係が深い nAChR の構造と機能解析の成果により、筋

無力症や、麻酔薬、アルコールなどの作用機構やある種の癲癇の分子的な理解が進み、筋無力症や、癲癇の治療法開発や新たな麻酔薬の開発につながる可能性がある。

また、nAChR を介するカスケードが、アセチルコリン(Ach)神経伝達による記憶・知能機能の発現という役割のほかに、ニューロンの生存・維持機構に重要な役割を果たしており、nAChR を介する Ach 賦活療法は、認知症の改善のみならず、病態進行の抑制さらに発症予防へと発展する可能性があるといわれている<sup>20)</sup>。

最近、中枢神経の低分子化合物の研究開発に特化した米国のバイオベンチャーのエンヴィヴォ社(EnVivo Pharmaceuticals, Inc.)が見出した EVP-6124 という  $\alpha 7$  nAChR アゴニストを、アルツハイマー病及び統合失調症に伴う認知症の治療薬として、エンヴィヴォ社と日本の田辺三菱製薬が共同で開発すると発表している<sup>21)</sup>。

#### (v) クローディンファミリー様タンパク質(IP39)

最近、大阪大学の月田教授と共同研究で IP39 の構造解析を行った<sup>13)</sup>。タイトジャンクション(TJ)はとても重要な結合チャンネルで、脳に不要な物質が入りこまないように、クローディン-5 が脳血液関門(BBB)に働いていて、薬物の侵入をブロックしている。

IP39 はミドリムシの TJ なので、まだあまり注目されていないが、脳に薬物を到達させる問題の解決に大変重要な示唆を与える成果であり、今後の発展を期待している。

#### (vi) 創薬に対する電子線結晶学の貢献

製薬会社で開発される新薬は前臨床でよい効果が出ても、臨床の副作用でドロップアウトする例が非常に多い。電子線結晶学の構造解析手法を用いた方法の良いところは、ダメとなった場合でももう一度構造に戻って、化合物の一部を変えてみて副作用を回避できるかどうか再検討できる点である。製薬企業で過去に開発し臨床の副作用で脱落した膨大な化合物とターゲットの膜タンパク質との複合体の構造解析を行うことで、薬効に関係ない部分を変えて、副作用を回避できる方法が見つかる可能性がある。この手法はこれまで製薬企業が行ってきた創薬のアプローチと全く異なる方法なので、藤吉は製薬企業が導入するか否かについては楽観していないが、これから典型的な成功例を積み重ねて普及させていきたいと思っている。

5 年前にはこのような方法は全く製薬企業の相手にされなかったが、最近少し変わってきている。しかし、構造を基にした SGDD を考える日本の企業はまだ少ないが、海外の企業からはアプローチは多々あるようだ。類似の手法を用いて他のタンパク質について製薬会社との共同研究も始まっている。

#### (vii) 農薬開発への利用

電子線結晶学による受容体の構造解析には、農薬関連の会社も殺虫剤の開発で興味を示している。

神経系での信号伝達は、哺乳動物も昆虫も基本的な仕組みは同じで、ヒトと昆虫の受容体の結合親和性の違い、解毒・分解・不活性化能力の違いなどを利用し、ヒトには安全な神経毒作用を示す殺虫剤が開発され使われている<sup>22)</sup>。それゆえ、ヒトの膜タンパク質だけでなく、昆虫などの膜タンパク質の構造研究も重要な社会貢献となる可能性がある。

#### ④名古屋大学細胞生理学研究センター(CeSPI)の活動について<sup>3)</sup>

(i) CeSPI は藤吉が名古屋大学に提案して作った組織である。特殊な全学の研究センター組織として、学部や研究科には属さない全学の研究センターになっていて、基礎生物学研究部門、連携創薬研究部門、連携医薬研究部門、産学連携部門を持っている。NEDO の産学連携講座も担当している。創薬のために役に立つ産学連携はこれまであまり例がないので、本センターの役割は注目されている。

(ii) 産学連携部門に、株式会社三和化学研究所、日本電子株式会社、タカラバイオ株式会社とともに、“Clio” という名前の会社が名前を連ねているが、これは藤吉がギリシャ神話の女神クライオ(Clio)の名前を取って命名し設立された多能性幹細胞を扱うベンチャー企業である。本社は秋田市にあり、経済産業省 0B で大学の技術シーズを基にしたバイオベンチャーを立ち上げ成長させてきた経験を有する吉田正順<sup>23)</sup>が社長を務め、道下眞弘<sup>23)</sup>が2004年に創業し、インフルエンザワクチンの製造で大発展したベンチャー企業株式会社UMN ファーマ<sup>24)</sup>も近い会社といえる。東北大学の出澤教授らが見つけた Muse という名前の多能性幹細胞<sup>25)</sup>を用いた再生医療に関して、最近、東北大学・Clio・日本臓器製薬の3者で共同研究契約を締結した<sup>26)</sup>。これが今後どのような展開になるかまだ見えていないが、藤吉はこのような多能性幹細胞は今後の創薬にも役立つと考えて注目している。

#### ⑤NEDO のプロジェクトについて<sup>27)</sup>

藤吉は本 CREST 終了後、NEDO の「ゲノム創薬加速支援バイオ産業基盤技術開発/創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」(2008-2013 年度)のプロジェクトリーダー(PL)として、厳選された生物学的に重要な標的タンパク質を取り上げ、細胞膜内の生体内に近い状態における膜タンパク質の、[1] 立体構造を高精度で解析可能な電子線結晶学の技術開発、[2] リガンド分子(低分子化合物等)との相互作用部位の解析が可能な核磁気共鳴(NMR)等の技術開発、[3] 立体構造情報に基づいた、コンピュータによる結合化合物の高精度探索技術開発(*in silico* スクリーニング)を産官学で相互連携体制のもとに実施してきた。また、開発技術の普及と発展を目的として NEDO 特別講座、東京大学:分子認識解析講座(嶋田一夫)、名古屋大学:構造生物学講座(藤吉好則)、大阪大学蛋白質計算科学講座(中村春木)を開講している。

このように、産官学が密接に連携をとりながら創薬を目指すプロジェクトであるため、藤吉は、ここで生まれる創薬関連の特許は全て民間企業に委ねる方針を取っている。特許戦略は非常に複雑で民間企業の専門部署に任せた方が良く、アカデミアが特許取得などに個別に関与しない方が有効に活用できると考えているからである。

## 4.2 まとめ

藤吉らは、最初脳の働きを分子レベルで理解したいとの発想から、まず高分解能で膜タンパク質の構造解析ができる装置開発が必要と考え、日本電子と協力して極低温電子顕微鏡の開発を目指した。この装置開発には様々な解決すべき困難な問題点があったが、科学研究費、本 CREST の資金、NEDO の資金援助を受け、その一つ一つを試行錯誤を重ねなが

ら着実に解決し、26年の歳月をかけて第1世代の試作機から第7世代の最新鋭機種の開発までたどり着いた。これらの機種は日本電子から28台が国内外に製品として販売され約100億円の売り上げを達成し、社会貢献に資するとともに、世界の科学技術の発展に貢献している。

装置開発と並行して、水チャネル・アクアポリン (AQP)、ギャップ結合チャネル・コネキシン (CX)、イオン輸送ポンプ(ATPase)、イオンチャネル、アセチルコリン受容体(AChR)、クローディングファミリー様タンパク質(IP3R)、など世界的に脚光を浴びた膜タンパク質の構造と機能解析の分野で先駆的な研究成果を上げ、電子線結晶学による「構造生理学 (Structural Physiology)」という新しい分野を開拓した。

藤吉は、京都大学を定年退職後、名古屋大学大学院創薬科学研究科基盤創薬学専攻の特任教授に就任し、藤吉が2012年度に設立し初代センター長を務めたCeSPIの特任教授を兼務して、電子線結晶学を利用して産官学共同で創薬の開発研究を続けるとともに、NEDOのプロジェクトリーダーとして創薬に関する産官学共同研究も実施してきた。

Gタンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor:GPCR)の構造と機能解析の功績で、2012年のノーベル化学賞が、デューク大学のR.Lefkowitzとスタンフォード大学のB.Kobilkaに与えられた。Gタンパク質の機能解明研究に対しては既に1994年にノーベル医学生理学賞が授与されており、今回の受賞は、X線結晶学を使ってGPCRがGタンパク質を活性化している状態の三次元構造を詳しく解析したことが大きな受賞理由となっている。

GPCRは細胞膜に存在する7回膜貫通型受容体の一種でこれまでに1000種類以上が知られている。この受容体に特定の化合物が結合することで、細胞内のGタンパク質シグナル伝達機構を介して反応連鎖を引き起こし、その結果として、さまざまな生理現象につながる。このことから、膜タンパク質の構造とその機能解析が将来の創薬にとって重要な手法として注目されている。

藤吉らが開拓した電子線結晶学の分野も、7回膜貫通型タンパク質の構造と機能解析の分野で重要な成果を上げており、今後の医薬・医療分野の発展、医薬・農薬・化粧品などの開発に大きな役割を果たすものとして期待される。

日本でも、産官学連携の研究開発体制のもとで、分子レベルでものを考え、医薬・医療だけでなく、いろいろな産業分野の発展に貢献する試みが行われ始めている。藤吉の成功例は機器開発段階から産官学連携がうまく機能した一つの典型例といえる。

## [引用文献等]

1. 藤吉好則、「個性や能力を分子レベルから見る」生きる力とわざ研究会(2012.07.30)
2. Fujiyosi Y., “Low Dose Techniques and Cryo-Electron Microscopy.” *Methods Mol. Biol.* 955, 103-118 (2013) Review
3. 名古屋大学 細胞生理学研究センター(CeSPI) HP  
<http://www.cespi.nagoya-u.ac.jp/index.php>
4. 藤吉好則、「電子顕微鏡を活用した構造生理学研究」日本電子ニュース 41, 13-20 (2009)
5. Unwin N, Fujiyoshi Y. “Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing.” *J. Mol. Biol.* 422, 617-634 (2012)
6. 名古屋大学大学院 創薬科学研究科 HP <http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/>
7. 「ロレアル-ユネスコ女性科学者 日本奨励賞-特別賞」(2006 年度)受賞  
(野中美応)「神経のシナプスの成熟を調節するメカニズムの解明」  
<http://www.nihon-loreal.jp/corp/csr/csr001.php>
8. 野中美応(ノナカ ミオ)研究者の詳細情報 J-GLOBAL (2013.06.03 更新)  
<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201301088332415790>
9. Fujiyosi Y., “Future Directions of Electron Crystallography.” *Methods Mol. Biol.* 955, 551-568 (2013)
10. Oshima, A., Matsuzawa, T., Nishikawa, K., Fujiyoshi, Y., “Oligomeric structure and functional characterization of *Caenorhabditis elegans* innexin-6 gap junction protein.” *J. Biol. Chem.* 288, 10513-10521 (2013)
11. Abe K, Tani K, Friedrich T, Fujiyoshi Y. “Cryo-EM structure of gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase with a single occupied cation-binding site.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109, 18401-18406 (2012)
12. Irie K, Shimomura T, Fujiyoshi Y. “The C-terminal helical bundle of the tetrameric prokaryotic sodium channel accelerates the inactivation rate.” *Nat. Commun.* 3, 793 (2012)
13. Suzuki H, Ito Y, Yamazaki Y, Mineta K, Uji M, Abe K, Tani K, Fujiyoshi Y, Tsukita S. “The four-transmembrane protein IP39 of *Euglena* forms strands by a trimeric unit repeat.” *Nat. Commun.* 4, 1766 (2013)
14. PDBj : 日本タンパク質構造データベース (Protein Data Bank Japan)  
<http://pdj.org/>、および、EM Navigator : 3次元電子顕微鏡データナビゲーター(3D Electron Microscopy Data Navigator) <http://pdj.org/emnavi/>
15. 「ヘリウム需給逼迫 今後も続く」日経新聞(2013.02.05) p 15 科学技術面  
<http://blog.goo.ne.jp/pineapplehank/e/7b749309e9842d9f57d7886a5b462c62>
16. Katada, R, Nishitani Y., Honmou O., Mizuo K., Okazaki S., Tateda K., Watanabe S., Matsumoto H., “Expression of aquaporin-4 augments cytotoxic brain edema after traumatic brain injury during acute ethanol exposure” *Am.J.Pathol.* 180, 17-23 (2012)
17. 札幌医科大学 報道発表資料「飲酒者の頭部外傷後脳浮腫悪化機序を明らかにした論文

の発表について」(2012.02.01)

<http://web.sapmed.ac.jp/jp/section/publicity/03bqho0000005meo-att/03bqho00001w2dd6.pdf>

18. 情報 サイト イーファーマ : 「アセタゾラミド」(三和化学研究所)  
<http://www.e-pharma.jp/allHtml/2134/2134001X1029.htm>
19. Tanimura Y, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y., “Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4.” J. Struct. Biol. 166, 16-21. (2009)
20. 下濱俊 「アルツハイマー病とニコチン性アセチルコリン受容体」 老年認知症研究誌 17、19-20(2010)
21. 田辺三菱製薬ニュースリリース 「エンヴィヴォ社との EVP-6124 導入契約に関するお知らせ」(2009.04.01)(α7 ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト)  
[http://www.mt-pharma.co.jp/shared/show.php?url=/release/nr/2009/MTPC\\_envivo090401.html](http://www.mt-pharma.co.jp/shared/show.php?url=/release/nr/2009/MTPC_envivo090401.html)
22. 農薬工業会 HP 「殺虫剤の作用機構分類(IRAC による)」(2009.9)[http://www.jcpa.or.jp/labo/pdf/2013/mechanism\\_irac.pdf](http://www.jcpa.or.jp/labo/pdf/2013/mechanism_irac.pdf)
23. 京都大学理学研究科・理学部生物専攻グローバル CEO : キャリアパス第 7 回講演会(2010/6/25)<http://www.sci.kyoto-u.ac.jp/modules/bulletin/index.php?page=article&storyid=514>
24. (株)UMN ファーマ HP <http://www.umnpharma.com/>
25. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, Akashi H, Tanimura Y, Tsuchiyama K, Kikuchi T, Goda M, Nakahata T, Fujiyoshi Y, Dezawa M. “Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts.” Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 108, 9875-80 (2011)
26. 日本臓器製薬プレスリリース 「日本臓器製薬、東北大学及び Clio が再生医療に関する共同研究契約締結」(2013.08.01)  
[http://www.nippon-zoki.co.jp/images/topics/1375147861/1375147861\\_12.pdf](http://www.nippon-zoki.co.jp/images/topics/1375147861/1375147861_12.pdf)
27. NEDO 「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発／創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」 [http://www.nedo.go.jp/activities/EK\\_00297.html](http://www.nedo.go.jp/activities/EK_00297.html)

以上