

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
「生命現象の解明と応用に資する新しい
計測・分析基盤技術」
(2004 年度～2011 年度)

研究総括： 柳田 敏雄

2018 年 3 月

目次

要旨	1
第 1 章 追跡調査概要.....	3
1. 1. 研究領域概要	3
1. 1. 1. 戦略目標.....	3
1. 1. 2. 研究領域概要.....	3
1. 1. 3. 研究総括.....	4
1. 1. 4. 領域アドバイザー.....	4
1. 1. 5. 研究課題および研究代表者.....	5
1. 2. 研究領域終了後の進展と波及効果.....	6
1. 2. 1. 研究成果の発展状況や活用状況.....	6
1. 2. 2. 研究成果から生み出されたの科学技術や社会・経済への波及効果.....	7
1. 3. 研究領域の展開状況(系譜図).....	7
第 2 章 追跡調査(研究領域全体動向).....	9
2. 1. 追跡調査について.....	9
2. 1. 1. 調査の目的.....	9
2. 1. 2. 調査の対象.....	9
2. 1. 3. 調査方法.....	9
2. 2. 研究成果概要	12
2. 2. 1. 研究助成金.....	12
2. 2. 2. 論文	19
2. 2. 3. 特許	21
2. 3. 科学技術や社会・経済への波及効果.....	21
2. 3. 1. 科学技術への波及効果.....	21
2. 3. 2. 社会・経済への波及効果.....	22
第 3 章 各研究課題の主な研究成果および波及効果.....	24
3. 1. 2004 年度採択研究課題	24
3. 1. 1. タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発(安藤 敏夫).....	24
3. 1. 2. 光駆動ナノマシンを用いた新原理バイオ計測ツールの研究(生田 幸士)...	27
3. 1. 3. 磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測(白川 昌宏).....	32
3. 1. 4. タンパク質の折り畳み運動解明を目指した一分子観測法の確立(高橋 聡)...	35
3. 2. 2005 年度採択研究課題	40
3. 2. 1. ハイブリッド局在 SPR を用いた生体分子の環境応答性計測(青山 茂).....	40
3. 2. 2. 生体分子の動的可視化プローブの開発と応用(長野 哲雄).....	43
3. 2. 3. 多目的 RNA ナノセンサー・モジュレーターの開発(中村 義一).....	46
3. 2. 4. タンパク質完全結晶創成(森 勇介).....	51

3.2.5. 次世代無侵襲・定量的脳機能イメージング法の開発(吉岡 芳親).....	56
3.3. 2006 年度採択研究課題.....	62
3.3.1. 高精度 1 分子内動画計測から見える生体分子構造認識プロセス(佐々木 裕次)	62
3.3.2. カーボンナノチューブを用いた単一生体分子ダイナミクスの計測(中山 喜萬)	67
3.3.3. ns-nm 分解能の光子・電子ハイブリッド顕微鏡の開発(永山 國昭).....	70
3.3.4. in vivo ナノイメージング技術の開発と生体運動機構の解明(樋口 秀男) .	74
3.3.5. 細胞内標識による生物分子トモグラフィー(宮澤 淳夫).....	78
第 4 章 科学技術イノベーションの創出に資する研究成果.....	82
4.1. タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発 (安藤 敏夫).....	82
4.1.1. 研究の概要.....	82
4.1.2. 研究成果の波及と展望.....	85
4.2. 磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測 (白川 昌宏).....	92
4.2.1. 研究の概要.....	92
4.2.2. 研究成果の波及と展望.....	94
4.3. 生体分子の動的可視化プローブの開発と応用 (長野 哲雄).....	100
4.3.1. 研究の概要.....	100
4.3.2. 研究成果の波及と展望.....	103

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「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」（2004 年度-2011 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、国立研究開発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、追跡調査実施した結果をまとめたものである。

本研究領域では、生命現象の解明を目指し「新たな手法の開発等を通じた先端的な計測・分析機器の実現に向けた基盤技術の創出」が戦略目標として設定され、全く新しい発想に基づく技術開発、新原理の探索を通じた新たな手法の開発等、多方面の先端科学技術分野における創造的な研究活動を支える新たな計測・分析機器の実現に向けた基盤技術の確立を目指していた。特に、細分化、多様化が進む先端分野の研究開発において、画期的な進展をもたらすため、あるいは全く新しい領域を切り拓くため、従来技術では不可能であった生命の現象や事象をにらみつつ、新たな方法論の開拓と多分野の技術の融合等を併行して進められた。

世界最先端の研究データ・独自の研究データは、具体的な研究ニーズに基づく創意工夫による技術開発や、新たな方法論の開拓や多分野の技術の融合を通じた新しい測定機器によって生み出されるものであるが、このような新しい手法の開発等を通じた測定機器の開発自体も極めて新規性・独創性の高い研究である。また、新しい手法の開発を通じた先端的な計測・分析技術基盤の確立は、生命現象の理解を広げるとともに次の開発段階である実用化・汎用化をすることにより産業応用も可能となるものであり、社会経済上大きな波及効果も期待できるものである。これまで国内では、新しい測定機器に関する研究・技術開発を、各研究機関及び個々の研究者・技術者が個別に進めてきたが、これらの研究を行うにあたっては分野横断的に体系的に基盤技術を確立していくことが重要であり、また、本基盤技術の確立のためには、全く新しい発想に基づく研究が適切な規模で長期間実施される必要がある。以上のことから、本基盤技術の開発が目標として設定された。

これらの研究成果として、学術論文においては研究期間中に 353 報、研究終了後には 293 報が、また特許においては研究期間中に国内 51 件、海外 28 件、研究終了後に国内 45 件、海外 28 件の出願が行われており、本研究領域で得られた研究は研究終了後も継続的に発展、深化している。生命現象の解明に最も重要なファクターの一つである生体内におけるタンパク質の機能動態を計測・分析するための基盤技術開発が行われており、例えば、タンパク質のダイナミズムを高解像度かつリアルタイムで観察可能な顕微鏡開発や、一分子レベルでの動態を観察可能にするプローブや装置の開発、新規の結晶化技術の確立などが行われた。さらに、一細胞レベルでのハンドリング技術の確立や、生きた試料や生体を非侵襲的にイメージングする技術の開発などを通じて、新規の疾患診断法の確立や創薬分野への寄与が認められた。

上記したようなその後の研究進展を、以下のような目次にそって、本報告書をまとめる。

第1章は、本追跡調査の概要であり、研究領域の戦略目標、領域概要、研究総括、領域アドバイザー、研究課題と研究代表者を記載すると共に、研究領域終了後の進展と波及効果について概説した。

第2章は、追跡調査の目的、調査の対象、調査の方法（研究助成金、論文、特許）を記載し、各研究代表者の研究成果の概要と、受賞歴や報道等から見た科学技術の進歩への貢献、および社会・経済的な波及効果の概要を記述した。

第3章は、各研究代表者で、研究期間中の達成状況と共に、研究終了後の研究の継続と発展状況についてまとめた。特に、科学技術の進歩への貢献および社会・経済的な波及効果の観点から記述し、併せて研究成果に関連した代表的な成果論文を提示した。

第4章は、特徴ある成果を上げている研究課題のうち3名の研究代表者にインタビューを行い、本研究領域の期間中から現在に至る研究課題に関わる国内外の研究状況、さらに科学技術や社会・経済への波及と展望を記述した。

第 1 章 追跡調査概要

1.1. 研究領域概要

1.1.1. 戦略目標

「新たな手法の開発等を通じた先端的な計測・分析機器の実現に向けた基盤技術の創出」
本研究領域では、生命現象解明を目指した「新たな手法の開発等を通じた先端的な計測・分析機器の実現に向けた基盤技術の創出」が戦略目標として設定され、生命系科学技術の発展の原動力である未解明の生命現象の解析に資する新たな計測・分析に関する基盤的な技術の創出を目指す研究が対象となった。具体的には、生体分子を生きたまま観察する原子間力顕微鏡の高速化や光子・電子ハイブリッド顕微鏡等、観測装置の技術開発を目指す研究から、光駆動ナノマシンや in cell NMR 手法の開発等、観測ツール・センサーの技術開発を目指す研究、また、新規可視化プローブの開発や、多目的 RNA ナノセンサー・モジュレーターの開発等、観測対象へのタグ・プローブの技術開発を目指す研究まで、非常に多岐の領域にわたっている。

新しい手法の開発を通じた先端的な測定機器を確立する基盤技術の研究開発は、各研究機関又は各研究者・技術者個人において独自に取り組まれているものの、複合的な分野にわたり全く新しい発想による体系的な取り組みが必要となる。本戦略目標は広汎な先端科学技術分野において根本かつ普遍的な価値を有する基盤技術を確立するものであり、国家として戦略的・長期的に取り組む必要がある。また、技術動向に応じて適宜新しい技術を確立していく必要もあるので、次世代を担うべき若手研究者の育成も重要な課題となっている。以上のことから、複数の技術開発を同時並行的に競争的環境下で進めることにより、最も有用な計測・分析技術を抽出し、世界に先駆けて世界標準となる基盤技術を確立することが重要である。さらに、20 代、30 代の若手研究者・技術者の育成にも重点を置く必要がある。また、本戦略目標は、新しい手法の開発を通じて新規性・独創性を有する計測・分析基盤技術を確立するものであるが、その開発の推進にあたっては、国内において実施されている他の先端計測分析技術・機器を開発する事業と情報交換をしつつ、連携をとりながら推進していくことが重要である。

1.1.2. 研究領域概要

本研究領域は、生命系科学技術の発展の原動力である未解明の生命現象の解析に資する新たな計測・分析に関する基盤的な技術の創出を目指す研究を対象としている。

具体的には、生命現象を司る生体分子の作用機構の本質に迫る解析技術や、生体または細胞中での生体分子のその場観察技術、単一細胞レベルでの分析技術、個体から生態系にわたる多様なスケールでの新規な計測・観測技術などを対象とした。また、環境試料中に含まれる極微量物質が生体に与える影響を計測・分析するための新規な技術も対象とした。

さらに、既存の基本原理に基づく技術であっても、計測・分析の速度、感度、精度を飛躍的に向上させる技術あるいはその限界に挑む技術等、新原理の探索や新現象の発見と解明に資する研究や生命系科学技術にブレークスルーをもたらすことが期待できる研究を含んでいる。

1.1.3. 研究総括

柳田 敏雄

採択時の所属・役職：大阪大学生命機能研究科 生命機能専攻 教授

追跡調査時の所属・役職：大阪大学生命機能研究科 特任教授（常勤）

1.1.4. 領域アドバイザー

本研究領域は、領域アドバイザー・研究者の個性・自主性を尊重するという研究総括の研究領域運営方針のもと、研究グループ間の相互乗り入れ・協同研究で新しいものが生まれるよう環境を整える努力がなされ、領域研究の推進には充実したアドバイザー陣を研究者とのディスカッションに加えることにより有効に活用した。また、同じ戦略目標のもとで、同時期に実施されたさきがけ研究領域「生命現象と計測分析」の研究総括をアドバイザーに加えるなど、この研究領域の概要に沿って研究を行うため、14人の領域アドバイザーを定め、研究者の指導にあたった。表 1-1 に領域アドバイザーを示す。

表 1-1 領域アドバイザー¹

領域アドバイザー	所属	役職	任期
上野 昭剛	九州大学	特任教授	2004 年 7 月～2012 年 3 月
岡野 栄之	慶應義塾大学	教授	2004 年 7 月～2012 年 3 月
佐野 雅己	東京大学	教授	2004 年 7 月～2012 年 3 月
田口 隆久	産業技術総合研究所	副部門長	2004 年 7 月～2006 年 3 月
難波 啓一	大阪大学	教授	2004 年 7 月～2012 年 3 月
増原 宏	奈良先端科学技術大学院大学	特任教授	2004 年 7 月～2012 年 3 月
美宅 茂樹	名古屋大学	教授	2004 年 7 月～2012 年 3 月
吉田 多見男	榊島津製作所	取締役	2004 年 7 月～2012 年 3 月
竹安 邦夫	京都大学	教授	2005 年 4 月～2012 年 3 月
入江 正浩	立教大学	教授	2005 年 6 月～2012 年 3 月
松田 道行	京都大学	教授	2005 年 6 月～2012 年 3 月
森島 績	立命館大学	客員教授	2005 年 6 月～2012 年 3 月
長野 哲雄	東京大学	教授	2004 年 7 月～2005 年 3 月
谷藤 学	(独)理化学研究所	チームリーダー	2006 年 4 月～2012 年 3 月

¹ 所属と役職は、領域終了時点のものである

1.1.5. 研究課題および研究代表者

研究課題（研究代表者）の公募は2004年度から3年間、3期にわたり、総計14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、並びに追跡調査時点の所属と役職を示した。

表 1-2 研究課題と研究代表者(第1期、第2期、第3期)

期(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
第1期 (2004 年度)	タンパク質のナノ ダイナミクス高速 撮影装置の開発	安藤 敏夫 Ando Toshio	金沢大学大学 院理工研究域 数物科学系 教授	金沢大学理工研究 域数物科学系 教 授	金沢大学理工研究 域バイオ AFM 先端 研究センター イ メージング研究部 門長・特任教授
	光駆動ナノマシン を用いた新原理バ イオ計測ツールの 研究	生田 幸士 Ikuta Koji	名古屋大学大 学院工学研究 科 教授	名古屋大学大学院 工学研究科 教授	東京大学大学院情 報理工学系研究科 教授
	磁気共鳴法による 生体内分子動態の 非侵襲計測	白川 昌宏 Shirakawa Masahiro	京都大学大学 院工学研究科 教授	京都大学大学院工 学研究科 教授	京都大学大学院工 学研究科 教授
	蛋白質の折り畳み 運動解明を目指し た一分子観測法の 確立	高橋 聡 Takahashi Satoshi	東北大学多元 物質科学研究 所 教授	東北大学多元物質 科学研究所 教授	東北大学多元物質 科学研究所 教授
第2期 (2005 年度)	ハイブリッド局在 SPR を用いた生体 分子の環境応答性 計測	青山 茂 Aoyama Shigeru	オムロン株式 会社技術本部 参与	オムロン株式会社 技術本部 参与	日本サムスン電子 LED 事業部 常務
	生体分子の動的可 視化プローブの開 発と応用	長野 哲雄 Nagano Tetsuo	東京大学大学 院 薬学系研究 科 教授	東京大学大学院薬 学系研究科 教授	東京大学 名誉教 授／創薬機構客員 教授
	多目的 RNA ナノセ ンサー・モジュレ ーターの開発	中村 義一 Nakamura Yoshikazu	東京大学 医科 学研究所 教 授	東京大学医科学研 究所 教授	東京大学 名誉教 授／株式会社リボ ミック 代表取締役 社長
	タンパク質完全結 晶創成	森 勇介 Mori Yusuke	大阪大学大学 院工学研究科 教授	大阪大学大学院工 学研究科 教授	大阪大学大学院工 学研究科電気電子 情報工学専攻 教 授
	次世代無侵襲・定 量的脳機能イメー ジング法の開発	吉岡 芳親 Yoshioka Yoshichika	大阪大学免疫 学フロンティ ア研究センタ ー 特任教授	大阪大学 免疫学 フロンティア研究 センター 特任教 授	大阪大学 免疫学 フロンティア研究 センター 特任教 授／脳情報通信融 合研究センター

期(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
第3期 (2006 年度)	高精度 1 分子内動 画計測から見える 生体分子構造認識 プロセス	佐々木 裕次 Sasaki Yuji	東京大学大学 院新領域創成 科 学 研 究 科 教授	東京大学大学院 新領域創成科学 研究科 教授	東京大学大学院 新領域創成科学 研究科 教授
	カーボンナノチュ ーブを用いた単一 生体分子ダイナミ クスの計測	中山 喜萬 Nakayama Yoshikazu	大阪大学 大学 院工学研究科 機械工学専攻 教授	大阪大学大学院工 学研究科 教授	大阪大学名誉教授 ／四国職業能力開 発大学校 校長
	ns-nm 分解能の光 子・電子ハイブリ ッド顕微鏡の開発	永山 國昭 Nagayama Kuniaki	自然科学研究 機構 岡崎統合 バイオサイエ ンスセンター 教授	自然科学研究機構 岡崎統合バイオサ イエンスセンター 教授	総合研究大学院大 学 理事
	in vivo ナノイメ ージング技術の開 発と生体運動機構 の解明	樋口 秀男 Higuchi Hideo	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 教授	東京大学大学院理 学系研究科 教授
	細胞内標識による 生物分子トモグラ フィー	宮澤 淳夫 Miyazawa Atsuo	兵庫県立大学 大学院生命理 学研究科 教 授	兵庫県立大学大学 院生命理学研究科 教授	兵庫県立大学大学 院生命理学研究科 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

本研究領域では 14 件の研究課題が取り組まれたが、研究期間中に得られた研究成果のほとんどがその後の研究のコア技術として継続的に発展し有効活用され、またそれが研究代表者本人のみならず世界の多くの研究者に受け入れられている。

上記については、インタビュー調査を行った 3 名の研究代表者を具体例として、研究成果の発展・活用状況の概略を記載する。

安藤は、原子間力顕微鏡 (AFM) の高速化を目指した開発研究を 1990 年代から継続的に行っており、CREST 研究期間中に装置を実用レベルにまで到達させるに至った。その結果、水溶液中で働くタンパク質の動態をリアルタイムで観察することに成功し、この技術を利用することで疾患の機構解明につながる重要な知見を得た。また、高速 AFM 国際コンソーシアムプログラムを立ち上げ、AFM 技術の普及・事業化にも精力的に取り組んでいる。

白川は、CREST 研究期間中に in cell NMR 手法を開発し、生きた細胞内におけるタンパク質の立体構造を高精度で決定することに世界で初めて成功した。この手法を応用して、細胞内における薬剤の作用機序や、タンパク質の不安定化機構を明らかにするなど、医療分野、創薬分野への貢献が期待されている。また、この in cell NMR の応用性の高さから、国際学

会での注目度も非常に高く、海外との共同研究も盛んに行われており、今後の発展が期待される分野となっている。

長野は、in vivoにおいて生体分子の動態を捉えるために欠かすことのできない可視化プローブの開発に取り組んでおり、CREST 研究期間中に、蛍光発光強度の制御機構を解明するとともに、その機構を応用して多くの新規プローブの開発に成功している。研究終了後にも医療分野において有用性の高い蛍光プローブ開発に精力的に取り組んでおり、現在までに発表してきた蛍光プローブに関する学術論文の多くは非常に高い被引用回数を記録していることから、長野の研究成果に対する注目度の高さが伺い知れる。

1.2.2. 研究成果から生み出された科学技術や社会・経済への波及効果

(1) 研究成果の科学技術の進歩への貢献

本研究領域では、新しい発想に基づく技術開発が多くなされ、新規に開発された計測・分析機器を応用することによって、医療や創薬分野への貢献だけでなく、社会経済上の大きな波及効果が認められた。これは、CREST の特徴であるチーム型の研究体制と、5 年という長期間に渡る適切な規模の助成により、分野横断的かつ体系的なコラボレーションが行われたことが背景にあると伺える。目に見える指標としては論文の被引用件数が 100 を超えたものが研究期間中も含め 41 件、被引用件数が 51-100 のものが 56 件存在する（2017 年 2 月調査時点）。本研究領域における研究成果が世界的にも注目を集め、さまざまな形で継承、発展されていると考えられる。

(2) 研究成果の応用に向けた発展状況

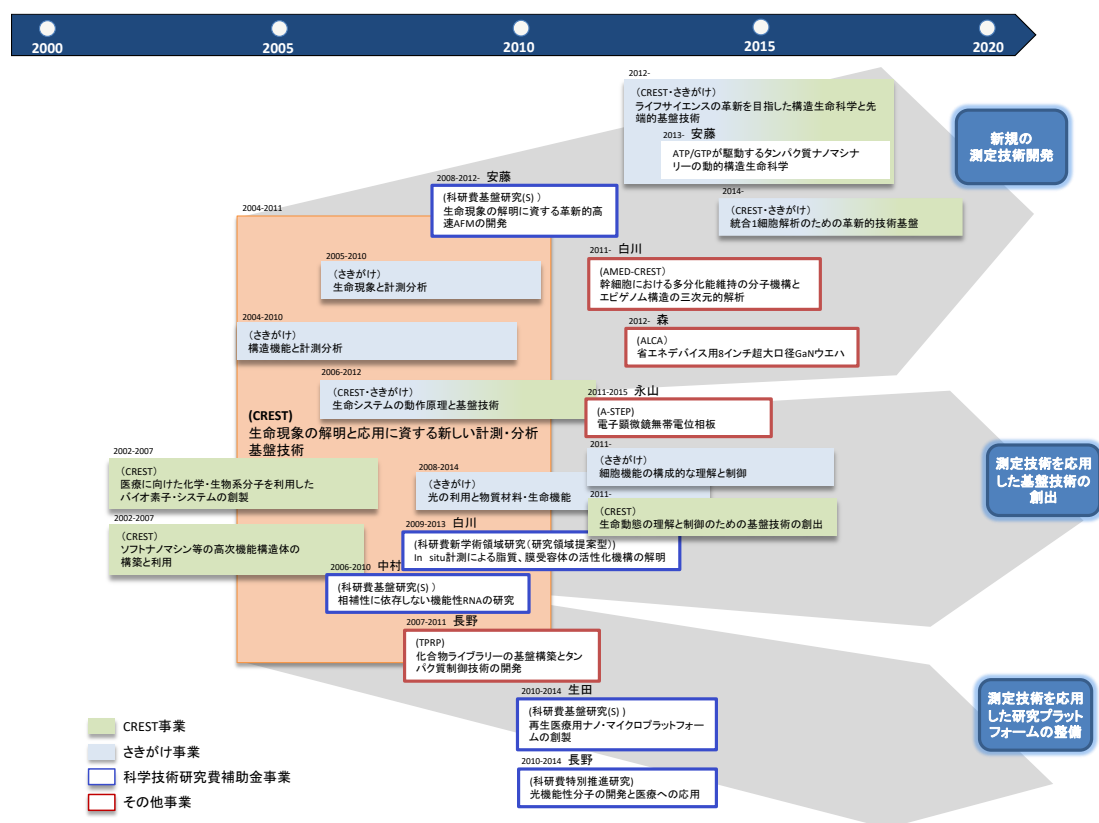
研究成果応用の目安として研究終了後の特許出願件数は国内で 45 件、海外で 28 件に上り、研究成果の社会応用を意識した取組みが行われてきたことが伺える。研究期間中に出願された特許も含めると、成立件数（現時点で特許登録されている件数）は、国内で 52 件、海外で 29 件ある。

事業化の観点からは、商品化に至った事例がいくつか存在すること、ベンチャー企業への関与も 2 件あることが確認された。商品化に関しては、安藤の高速 AFM は RIBM 社により製品化され、長野の開発した新規蛍光プローブは 14 種類が市販化されている。ベンチャー化に関しては、森は株式会社創晶を通じてタンパク質や医薬候補化合物の結晶化受託事業を行っており、中村は株式会社リボミックを通じて、大手製薬会社との提携によりバイオ医薬品を開発・販売している。

1.3. 研究領域の展開状況(系譜図)

本研究領域の展開状況を記す。ここでは、本研究領域と関連する計測・分析基盤技術に係りの深い他の研究事業を含めて整理する。

文部科学省が2004年度に設定した戦略目標「新たな手法の開発等を通じた先端的な計測・分析機器の実現に向けた基盤技術の創出」に基づき、JSTは生物分野において本研究領域であるCREST「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」に加え、さきがけ「構造機能と計測分析」を、2005年度に「生命現象と計測分析」研究領域を発足させた。



第 2 章 追跡調査(研究領域全体動向)

2.1. 追跡調査について

2.1.1. 調査の目的

追跡調査は、研究終了後の研究者の研究課題の状況等と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 の事業及び事業運営の改善に資するために行った。

2.1.2. 調査の対象

本追跡調査は、CREST 研究領域「新たな手法の開発等を通じた先端的な計測・分析機器の実現に向けた基盤技術の創出(2004 年度～2011 年度)」の研究代表者を対象とした。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

	CREST 調査対象期間	CREST 終了後の調査対象期間	研究課題数
第 1 期	2004 年 1 月～2010 年 12 月	2011 年 1 月～2017 年調査終了月	4
第 2 期	2005 年 1 月～2011 年 12 月 ²	2012 年 1 月～2017 年調査終了月	5
第 3 期	2006 年 1 月～2012 年 12 月 ³	2013 年 1 月～2017 年調査終了月	5

2.1.3. 調査方法

(1) 研究助成金

次のとおりリスト作成の手順を記載する。

手順 1：JST 戦略的創造研究推進事業、JST 産業連携事業、科研費(特別推進研究、基盤研究、特定領域、新学術創成で 1 千万円／件 以上)、最先端・次世代研究開発支援プログラム、ImPACT、FIRST、NEDO プロジェクトなど比較的大型の外部研究資金の獲得状況を調査した。具体的には、研究課題や研究者についての国内最大級のデータベースサイト(日本の研究.com, <https://research-er.jp/>)から研究者名により検索を行い、研究資金の獲得状況をリスト化した。

手順 2：さらに研究代表者となっているもののみを抽出した。

手順 3：データベース等で内容を確認した。

手順 4：一覧表を作成した。

(2) 論文

次のとおり調査の方法を記載する。

² 青山の場合のみ、CREST 調査対象期間は 2005 年 1 月～2010 年 12 月

³ 永山の場合のみ、CREST 調査対象期間は 2006 年 1 月～2010 年 12 月

発表論文の調査については、旧トムソン・ロイター社（現 Clarivate Analytics 社:以下 CA 社）Web of Science（以下 WoS）を用いて、「研究期間中の論文リスト」「研究終了後の論文リスト」を作成した。

① 研究期間中の論文調査

研究期間中に発表された論文の情報については、抽出した論文の書誌情報に基づいて WoS 上での同定作業を実施し、以下の書誌情報を抽出・整理することで、研究代表者毎の「研究期間中の論文」リストを作成した。

- ・ 著者名（姓名の内、名はイニシャルのみ）
- ・ タイトル
- ・ 掲載誌
- ・ 発行年
- ・ 被引用数

成果報告書などの情報が十分でない領域については、研究者名（著者名、ただし姓名の内、名はイニシャルのみ）と所属機関（研究開始時点、終了時点、追跡調査時点の3ヶ所）、論文発表年（研究期間中の年次に限定）を条件として WoS を検索し、まずは「研究期間中の論文」の候補を抽出した。ただし、ここで作成した「研究期間中の論文」の候補には、同姓同名（正確には姓は同一で、名はイニシャルのみ一致）の別人が著者である論文、同一人物の論文だが本調査対象のプログラムの成果とは言えない論文といった「ノイズ」が含まれている。

これら「ノイズ」を除去するため、本調査対象のプログラムの成果と判断できる論文を抽出し、「研究期間中の論文」リストへ追加した。

② 研究終了後の論文調査

研究終了後に発表された論文の内、研究課題に関係すると考えられる論文については以下の手順でそれぞれ抽出を行った。

(i) 「研究終了後の論文」候補リストの作成

研究者名（著者名、ただし姓名の内、名はイニシャルのみ）と所属機関（研究開始時点、終了時点、追跡調査時点の3ヶ所）、論文発表年（研究終了の翌年～2016年に限定）を条件に WoS を検索し、論文の書誌情報を抽出・整理することで、「研究終了後の論文」候補リストを作成した。ただし、ここで作成した候補リストは「研究期間中の論文」の候補を抽出した際と同様に多数の「ノイズ」が含まれている。

(ii) 「研究期間中の論文」を引用している論文の特定

「研究終了後の論文」候補リストに含まれる論文の内、「研究期間中の論文」を引用している論文を特定する。「研究期間中の論文」を引用している論文は、本調査対象のプログラムと研究上の関連が示唆されるものであり、プログラムの成果論文に該当するか否かの判断材料となる。

(iii) 「ノイズ」の除去

「研究終了後の論文」候補リストに含まれる論文について、WoS から書誌情報を抽出・整理することで、研究代表者毎の「研究終了後の論文」リストを作成した（抽出する書誌情報は「研究期間中の論文」リストと同様）。

上記の書誌情報および前述 ii) の情報を基に、本調査対象のプログラムの成果論文に該当する論文のみを抽出し、「研究終了後の論文」リストを作成した。

③ 国際的な水準との比較

①および②で作成した論文リストの和集合として「プログラムの成果論文」リストを作成した上で、各論文について以下の書誌情報を付加した。

- ・被引用順位（パーセンタイル）
- ・被引用順位をカウントした分野領域

被引用順位（パーセンタイル）については、Clarivate Analytics 社の Web of Science に収録されている論文を対象に、同社の InCites Essential Science Indicators における Fields Baselines の情報を基に、発行年および分野（ESI 分類）における被引用順位（パーセンタイル）を Top 1%以内、Top10%以内、Top 10%超の 3 区分で分類した。なお、Fields Baselines は Document Type が Article または Review を対象としているため、それ以外の Document Type では、分類することができない。

なお、トムソン・ロイター社の Base Line Percentile 表は、過去 10 年間のデータを対象としているため、2004 年と 2005 年に発行された論文に関しては、被引用件数は算出していない。

(3) 特許

特許については、日米欧の特許をカバーする Wisdomain 社の UltraPatent データベース（以下「特許 DB」と記す）を用い、「研究期間中に」出願された特許出願・公開特許リスト」「研究終了後に」出願された公開特許リスト」を作成した。

研究期間中の特許出願・公開特許・登録特許については、原則として最終成果報告書に記載されている特許情報（出願番号・公開番号など）に基づいて特許 DB 上での同定作業を実施し、公開または登録されたものについて以下の書誌情報を抽出した。

- ・出願番号
- ・公開番号

- ・ 審査請求状況（日本のみ）
- ・ 特許番号（あれば）
- ・ 発明者
- ・ 出願人/権利者
- ・ 発明の名称
- ・ 国際出願番号

研究終了後の、研究課題に関係した公開特許・登録特許については、まず候補リストとして特許 DB 上で研究者名が発明者名称と一致するものを抽出した。候補リストの中から、同姓同名の別人による公開特許・登録特許、また該当研究者による公開特許・登録特許であっても研究課題との関連性が低いものを目視により除いた。公開特許・登録特許と研究課題との関連性については、概要及び請求項などの情報から判断した。

抽出する書誌情報は研究期間中の特許出願・公開特許・登録特許リストと同様である。

- ・ 出願番号
- ・ 公開番号
- ・ 審査請求状況（日本のみ）
- ・ 特許番号（あれば）
- ・ 発明者
- ・ 出願人/権利者
- ・ 発明の名称
- ・ 国際出願番号

(4) 受賞、招待講演、ベンチャー、報道

受賞、招待講演、ベンチャー、報道については、ウェブ検索を用い、各研究代表者の研究室ホームページ等を参考にして、それぞれのリストを作成した。

研究終了後の受賞、招待講演、ベンチャー、報道を対象とし、研究期間中は対象外とした。

2.2. 研究成果概要

2.2.1. 研究助成金

研究発展状況を把握するために、プロジェクト終了後の外部資金獲得状況を把握することは非常に重要である。当該領域の代表研究者の外部資金獲得状況を表 2-2 に示す。

多数の研究者が、プロジェクト終了後も競争的研究資金を獲得して、研究開発を継続的にを行っている。その中でも、安藤は戦略的創造研究推進事業 CREST チーム型研究「ATP/GTP が駆動するタンパク質マシナリーの動的構造生命科学」（2013-2017）、科学技術研究費補助金

進学術領域研究（研究領域提案型）「高速 AFM の高度化技術の開発とタンパク質の動作機序解析」（2014-2018）などの大型資金を多数獲得し、研究代表者として、研究を発展させている。また、白川も戦略的国際科学技術協力推進事業（SICP）「細胞内における SOD1 タンパク質の構造・運動性解析による神経変性疾患の発症機構の解明」（2011-2013）、AMED-CREST 「OMDR と in-cell NMR による細胞内タンパク質間相互作用・胴体の解析法の開発」（2014-2018）などの大型資金を多数獲得し、研究代表者として、研究を発展させている。

表 2-2 研究者の研究助成金獲得状況

科研費  JST  内閣府  文科省  厚労省 
 NEDO  AMED  その他 

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	金額 (百万円)
安藤 敏夫	2004～2009	科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST チーム型研究(CREST) 生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術	タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発														625.0
	2008～2012	科研費 基盤研究(S)	生命現象の解明に資する革新的高速 AFM の開発														194.7
	2012～2016	科研費 基盤研究(S)	高速バイオAFMが拓く新構造生物学														215.5
	2013～2017	科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST チーム型研究(CREST)	ATP/GTP が駆動するタンパク質マシナリーの動的構造生命科学														150.0-500.0
	2014～2018	科研費 新学術領域研究(研究領域提案型)	高速 AFM の高度化技術の開発とタンパク質の動作機序解析														75.4
生田 幸士	2004～2009	科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST チーム型研究(CREST) 生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術	光駆動ナノマシンを用いた新原理バイオ計測ツールの研究														390.0
	2010～2014	科研費 基盤研究(S)	再生医療用ナノ・マイクロプラットフォームの創製														217.4
	2016～2018	科研費 基盤研究(A)	癌早期診断のための血中 microRNA 分析用化学 IC														14.7

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	金額 (百万円)
白川 昌宏	2004～ 2009	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推 進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新し い計測・分析基盤 技術	磁気共鳴法による生体 内分子動態の非侵襲計 測														503.0
	2009～ 2011	科研費 基盤研究(A)	DNA メチル化のエピ ジェネティックな継承 と維持の構造的基盤														16.4
	2009～ 2013	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	In situ 計測による脂 質、膜受容体の活性化機 構の解明														213.7
	2011～ 2013	科学技術振興機構 (JST) 戦略的国際科学技 術協力推進事業 (SICP) スウェーデン	細胞内における S O D 1 たんぱく質の構造・運 動性解析による神経変 性疾患の発症機構の解 明														22.5
	2011～ 2015	日本医療研究開発 機構 (AMED)・科 学技術振興機構 (JST) CREST	幹細胞における多分化 能性維持の分子機構と エピゲノム構造の三次 元的解析														150.0- 500.0
	2014～ 2018	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	OMDR と in-cell NMR による細胞内タンパク 質間相互作用・動態の解 析法の開発														96.3
高橋 聡	2004～ 2009	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推 進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新し い計測・分析基盤 技術	蛋白質の折り畳み運動 解明を目指した一分子 観測法の確立														468.0
	2009～ 2011	科研費 基盤研究(B)	高度化した一分子観察 法による蛋白質の折り 畳みダイナミクスの解 明														18.9
	2013～ 2017	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	高度化した一分子蛍光 計測によるタンパク質 の構造形成運動の解明														34.8

研究者	研究 期間 (年度)	研究種目	研究課題	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	金額 (百万円)
	2014～ 2016	科研費 基盤研究(B)	一分子選択による人工 タンパク質の新規デザ イン戦略の創製														16.8
青 山 茂	2005～ 2009	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推 進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新し い計測・分析基盤 技術	ハイブリッド局在 SPR を用いた生体分子の環 境応答性計測														237.0
長 野 哲 雄	2005～ 2010	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推 進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新し い計測・分析基盤 技術	生体分子の動的可視化 プローブの開発と応用														603.0
	2007～ 2011	文部科学省研究事 業 TPRP ターゲット タンパク研究プロ グラム (TPRP)	化合物ライブラリーの 基盤構築とタンパク質 制御技術の開発														6,142.6
	2010～ 2014	科研費 特別推進研究	光機能性分子の開発と 医療への応用														545.0
	2012～ 2016	日本医療研究開発 機構(AMED) 創薬支援技術基盤 プラットフォーム 事業	大型創薬研究基盤を活 用した創薬オープンイ ノベーションの推進														800.0- 900.0
中 村 義 一	2005～ 2010	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推 進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新し い計測・分析基盤 技術	多目的 RNA ナノセン サー・モジュレーターの 開発														650.0
	2006～ 2010	科研費 基盤研究(S)	相補性に依存しない機 能性 RNA の研究														113.1

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	金額 (百万円)
	2009～2011	厚生労働省(MHLW) 厚生労働省研究事業 厚生労働科学研究費補助金(厚生科研費)	関節リウマチに対するアプタマーRNA新薬の開発														58.0
	2012～2015	科研費 基盤研究(A)	RNAの造形力を利用した医薬品探索														33.7
森 勇介	2005～2010	科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST チーム型研究(CREST) 生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術	タンパク質完全結晶創成														611.0
	2008～2010	科研費 基盤研究(B)	完全バルク GaN 結晶育成技術の研究開発														19.4
	2011～2012	科学技術振興機構(JST) 先端的低炭素化技術開発(ALCA) 探索ステージ	8 インチ超大口径 GaN バルク結晶育成技術														20.0-60.0
	2011～2013	科研費 基盤研究(B)	レーザー分子注入法によるタンパク質結晶化技術														20.7
	2012～2016	科学技術振興機構(JST) 先端的低炭素化技術開発(ALCA)	省エネデバイス用 8 インチ超大口径 GaN ウェハ														50.0-150.0
	2014～2016	科研費 基盤研究(B)	レーザーキャビテーションバブルによる結晶多形制御														16.0
	2005～2010	科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST チーム型研究(CREST) 生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術	次世代無侵襲・定量的脳機能イメージング法の開発														867.0

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	金額 (百万円)
	2016～ 2020	科研費 基盤研究(A)	磁気共鳴法による免疫 ダイナミズムの非侵襲 的可視化法の開発														24.83
佐々木 裕次 中山 喜萬	2006～ 2011	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推 進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新し い計測・分析基盤 技術	高精度 1 分子内動画計 測から見える生体分子 構造認識プロセス														354.0
	2010～ 2012	科研費 基盤研究(A)	コンパクト X 線 1 分子 計測装置の実現と複合 計測法開発														45.0
	2014～ 2018	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	バイオロジーにおける 3D 活性サイト科学														64.0
	2015～ 2017	科研費 基盤研究(A)	実験室における天然変 性タンパク質の X 線 1 分子動態計測装置開発														30.9
	2006～ 2011	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推 進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新し い計測・分析基盤 技術	カーボンナノチューブ を用いた単一生体分子 ダイナミクスの計測														383.0
	2011～ 2013	科研費 基盤研究(A)	カーボンナノチューブ 層間滑りにおけるエネ ルギー損失—リニア振 動子の構築に向けて—														45.2
	2004～ 2008	科学技術振興機構 (JST) 地域結集型共同研 究事業 (大阪府)	ナノカーボン活用技術 の創成														1,972

研究者	研究期間 (年度)	研究種目	研究課題	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	金額 (百万円)
永山 國昭	2006～ 2009	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新しい計測・分析基盤 技術	ns-nm 分解能の光子・ 電子ハイブリッド顕微 鏡の開発														350.0
	2011～ 2015	科学技術振興機構 (JST) A-STEP 実用化挑戦ステージ 実用化挑戦タイプ (中小・ベンチャー 開発)	電子顕微鏡用無帯電位 相板														300.0
樋口 秀男	2006～ 2011	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新しい計測・分析基盤 技術	in vivo ナノイメージ ング技術の開発と生体 運動機構の解明														369.0
	2011～ 2013	科研費 基盤研究(A)	階層を登る 1 分子生理 学—分子内、1 分子そし て細胞へ—														48.5
	2011～ 2015	科研費 新学術領域研究 (研究領域提案型)	細胞内分子機能のナノ イメージングと機能の モデル解析														74.2
宮澤 淳夫	2006～ 2011	科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 CREST チーム型 研究(CREST) 生命現象の解明と 応用に資する新しい計測・分析基盤 技術	細胞内標識による生物 分子トモグラフィー														353.0

(注) 本研究領域開始以降に開始されたプロジェクトで助成金総額が1千万円／件以上のもののみを抽出した。

2016年8月19日調査を元に加筆修正

2.2.2. 論文

論文発表件数は研究者の研究活動を示す重要な指標であるため、研究代表者について研究期間中の論文数と終了後の論文数とを調査した。終了後の論文については、責任著者として、研究者がFirst Author またはLast Author となっている論文を求めた。検索はいずれも2016年10月に実施した。

研究期間中の発表論文数は全体で 349 報、研究終了後の発表論文数は 292 報であり（表 2-3 の脚注参照）、総じて活発な発表を行っている状況が確認できる。

研究期間中の論文数では、長野、森が 60 報を超え、安藤、白川、中村も 30 報を超える論文を発表している。

研究終了後は、安藤、長野、吉岡が 40 報以上の論文発表をしている他、4 名の研究者が 20 報を超える論文発表をしており、論文発表が継続されている。研究期間中と比較すると安藤、生田、吉岡の論文発表数が大きく伸びていることがわかる。

表 2-3 研究者の論文（原著論文）数⁴

期（採 択年 度）	研究課題	研究代表者	①研究 期間中 の論文 数	②研究 終了後 の論文 数	③研究 終了後 の責任 著者論 文数
第 1 期 (2004 年度)	タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発	安藤 敏夫	33	53	29
	光駆動ナノマシンを用いた新原理バイオ計測ツールの研究	生田 幸士	6	26	26
	磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測	白川 昌宏	47	29	13
	蛋白質の折り畳み運動解明を目指した一分子観測法の確立	高橋 聡	11	13	8
第 2 期 (2005 年度)	ハイブリッド局在 SPR を用いた生体分子の環境応答性計測	青山 茂	2	0	0
	生体分子の動的可視化プローブの開発と応用	長野 哲雄	68	50	15
	多目的 RNA ナノセンサー・モジュレーターの開発	中村 義一	36	22	7
	タンパク質完全結晶創成	森 勇介	62	25	19
	次世代無侵襲・定量的脳機能イメージング法の開発	吉岡 芳親	19	40	4
第 3 期 (2006 年度)	高精度 1 分子内動画計測から見える生体分子構造認識プロセス	佐々木 裕次	8	6	1
	カーボンナノチューブを用いた単一生体分子ダイナミクスの計測	中山 喜萬	29	2	2
	ns-nm 分解能の光子・電子ハイブリッド顕微鏡の開発	永山 國昭	10	18	11
	in vivo ナノイメージング技術の開発と生体運動機構の解明	樋口 秀男	13	6	3
	細胞内標識による生物分子トモグラフィ	宮澤 淳夫	9	3	2

2016 年 9 月 13 日調査を元に加筆修正

①には中村と森の共著が 2 報、長野と森の共著が 2 報あり、②には佐々木と宮澤の共著 1 報がある。従って、研究領域全体の論文数は、各研究課題の単純合計とは一致しない。

⁴ CREST では研究チーム制を採っているため、各研究課題における期間中の研究成果論文に研究代表者が著者に含まれていない場合がある。本調査では（研究代表者名で検索しているため）このような論文は研究期間中の論文数や添付資料のリストから除かれている。

2.2.3. 特許

特許が基礎研究から産業への貢献を分析する指標となることや特許からの研究の発展について記述する。研究者毎に特許の出願や登録数を一覧表にまとめる。

特許出願件数・登録件数は研究開発が応用に向けて進展していることを表す一つの指標であると考えられるため、研究期間中と研究終了後の状況について調査し、下表に示した。

研究期間中の研究代表者の特許出願は国内 51 件、海外 33 件であった。成立件数（研究期間中に特許出願した特許のうち、現時点で特許登録されている件数）は、国内 32 件、海外 20 件であった。研究期間中では、中村と中山の特許出願数が突出している。

研究終了後の特許出願は、国内 45 件、海外 27 件であり、うち国内 20 件、海外 13 件が特許として成立している。長野は海外出願を積極的に行っており、国際特許を多く有している。

表 2-4 研究代表者の特許出願・登録状況

採択年度	研究代表者	研究期間中				研究終了後			
		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)
2004 年度	安藤 敏夫	7	6	7	6	2	0	1	0
	生田 幸士	8	7	7	2	4	2	2	1
	白川 昌宏	0	0	0	0	2	1	1	0
	高橋 聡	0	0	0	0	0	0	0	0
2005 年度	青山 茂	6	6	4	4	0	0	0	0
	長野 哲雄	0	0	0	0	24	18	12	9
	中村 義一	13	8	7	7	1	1	1	1
	森 勇介	2	2	2	0	1	1	1	1
	吉岡 芳親	1	1	1	0	4	0	0	0
2006 年度	佐々木 裕次	0	0	0	0	0	0	0	0
	中山 喜萬	12	2	4	1	0	0	0	0
	永山 國昭	0	0	0	0	7	4	2	1
	樋口 秀男	1	1	0	0	0	0	0	0
	宮澤 淳夫	1	0	0	0	0	0	0	0

領域全体	51	33	32	20	45	27	20	13
------	----	----	----	----	----	----	----	----

2016 年 10 月 26 日調査を元に加筆修正

2.3. 科学技術や社会・経済への波及効果

2.3.1. 科学技術への波及効果

(1) 受賞

研究終了後も、多くの研究者が受賞歴を有することが確認できた。文部科学省、内閣府をはじめとする公的機関に加え、各研究者が所属する学術領域の学会（例えば日本薬学会、日

本機械学会など）から受賞している。特に、文部科学省文部科学大臣表彰で、安藤と中山は開発部門⁵において科学技術賞の受賞を果たしている点は特筆に値するといえる。

(2) 学会・研究会等への貢献

学会や研究会への貢献として、招待講演者としての講演参加や学会誌への編集協力等が挙げられる。

招待講演については、各研究者とも活発に行っていることが確認できたが、特に安藤（国内 10 件、海外 46 件）は国内外の国際的な学会や研究会での招待講演を多く行っている。

その他、学会への貢献として、長野が 2005 年の日本ケミカルバイオロジー学会の設立に貢献し、同学会の初代会長に就任していた。

2.3.2. 社会・経済への波及効果

(1) 報道

報道調査の結果、多くの研究者が何らかのメディアにおいて研究成果が取り上げられていることが確認できた。

掲載メディアとしては、日刊工業新聞等の専門紙の他、日本経済新聞や朝日新聞などの全国誌また地方紙に記事が掲載されることも多々あった。本研究領域の研究者の活動が、科学技術に新しさや価値をもたらすものとして認知されたばかりでなく、社会・経済への波及効果が期待されるものとして認識されたことを示している。

特に安藤の高速 AFM の開発やそれによるタンパク質の動態観測は、国内主要全国誌を含む 13 社に取り上げられ、社会的にインパクトの大きな研究であるといえる。

(2) 企業との連携や共同研究

複数の研究者において、試薬や計測機器メーカーや医療機関等との連携や共同研究を行っていることが確認できた。

例えば、安藤が開発した高速 AFM については、試料ステージ走査型の高速 AFM がすでに事業化されており、製品は 2012 年の販売から、国内では 30 台以上、海外では 10 台以上の販売実績がある。

また、長野はイオンや低分子、酵素活性等を対象とする 40 種類以上のプローブ開発に成功し、すでに 14 種類の蛍光プローブが市販されている。

(3) ベンチャー

⁵ 科学技術賞（開発部門）は、我が国の社会経済、国民生活の発展向上等に寄与する画期的な研究開発若しくは発明であって、現に利活用されているもの（今後利活用されることが期待できるものを含む）を行った個人若しくはグループ又はこれらの者を育成した個人に対して与えられる。

ベンチャー企業を設立し、自身の研究成果を商品化するなどの動きにつなげている。具体的には、中村は2003年に設立した株式会社リボミックにおいて、自身の研究成果を生かし、新しいタイプのバイオ医薬品としてアプタマーの開発・販売を行っている。また、森は2005年に株式会社創晶を設立し、結晶化受託や結晶構造解析受託等のサービスを提供している。

第 3 章 各研究課題の主な研究成果および波及効果

3. 1. 2004 年度採択研究課題

3. 1. 1. タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発(安藤 敏夫)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況⁶

① 研究のねらい

タンパク質の構造と機能メカニズムの解明のために、これまで様々な技術開発が行われてきた。しかし、当時は、水中に在って機能している個々のタンパク質分子そのものを高い空間・時間分解能で直接見る技術は存在しなかった。従って、タンパク質分子の構造が機能中にダイナミックに変化する様子をサブ分子スケールの解像度で連続的に観察することは不可能であった。この不可能を可能にする顕微鏡として、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）を開発し、機能しているタンパク質分子を映像として捉えることを目標として、本チームは研究を開始した（図 3-1）。

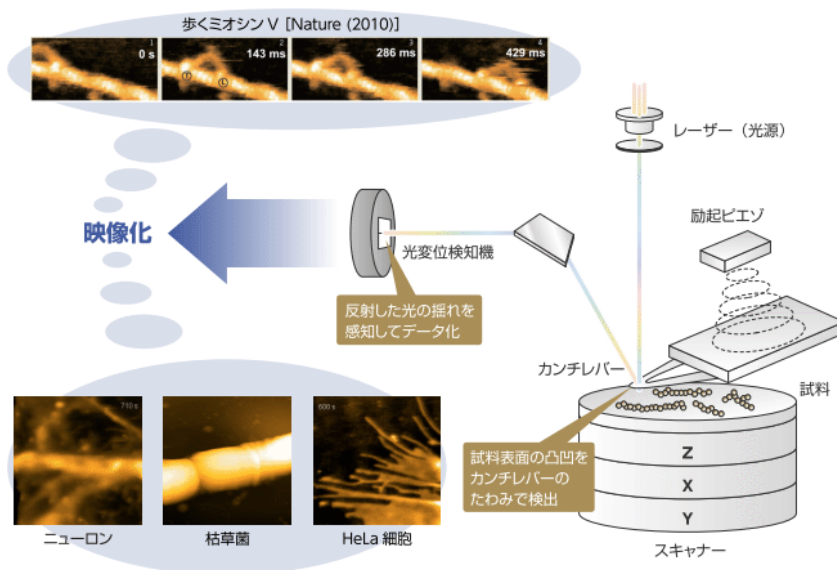


図 3-1 生きたタンパク質の挙動を捉えることができる高速 AFM の概念図⁷

⁶ JST_CREST 研究終了報告書（研究課題「タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発」（2009 年度））http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/01ando.pdf

⁷ 金沢大学先端科学・イノベーション推進機構 研究部門「世界最先端 AFM 技術によるナノバイオロジー研究」<http://www.o-fsi.kanazawa-u.ac.jp/about/section/research/program1/>

② 期間中の研究成果

研究成果は以下の項目の通りであるが、詳細は第4章において記述する。

(iv) 高速 AFM 装置の開発

(v) 試料用基板最適化の必要性・課題の認識

(vi) タンパク質の動態観察の成功^{[1][2][3]}

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト3報以内(被引用トップ3位)

[1] Kodera, N; Yamamoto, D; Ishikawa, R; Ando, T, “Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy”, NATURE, 468, 7320, nature09450, 2010.

[2] Ando, T; Uchihashi, T; Fukuma, T, “High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes”, PROGRESS IN SURFACE SCIENCE, 83, 42925, 337-437, 2008.

[3] Ando, T; Uchihashi, T; Kodera, N; Yamamoto, D; Miyagi, A; Taniguchi, M; Yamashita, H, “High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes”, PFLUGERS ARCHIV-EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, 456, 1, 211-225, 2008.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究期間中に、科学研究費補助金基盤研究(S)「生命現象の解明に資する革新的高速 AFM の開発」(2008-2012)、ほくりく健康創造クラスター 事業「生きた細胞の微細構造動態を高速撮影する顕微鏡の開発」(2008-2012)、ほくりく健康創造クラスター事業(広域プログラム)「高速バイオ AFM 国際コンソーシアム」(2008-2012)、科学研究費補助金新学術領域研究(天然変性蛋白質)「天然変性タンパク質の新規構造解析法の開発」の研究が開始され、終了後に、ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム「Visualizing nanometer-scale structural plasticity of synapses in real time using AFM」(2011-2014)、先端計測分析技術・機器開発「プローブスキャン方式高速 AFM 用スキャナーの開発」(2012-2015)の研究を進め、現在、CREST「ATP/GTP が駆動するタンパク質マシナリーの動的構造生命科学」(2013-2018)、科学研究費補助金基盤研究(S)「高速バイオ AFM が拓く新構造生物学」(2012-2016)、科学研究費補助金新学術領域研究(動的構造生命)「高速 AFM の高度化技術の開発とタンパク質の動作機序解析」(2014-2018)の研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献⁸

⁸ 科学研究費補助金基盤研究(S) KAKEN(研究課題「高速バイオ AFM が拓く新構造生物学」研究実績の概要(2012-2016年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24227005/>

科学技術の進歩への貢献は以下の項目の通りであるが、詳細は第 4 章において記述する。

(i) 高速・広域走査技術^{[1][2]}

(ii) 探針走査型高速 AFM^{[3][4]}

(iii) 高速 SICM（走査型イオン伝導顕微鏡）

② 社会・経済への波及効果

疾患の機構解明など医療分野への波及が考えられ、詳細は第 4 章において記述する。

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 4 報以内

[1] Watanabe, H; Uchihashi, T; Kobashi, T; Shibata, M; Nishiyama, J; Yasuda, R; Ando, T, “Wide-area scanner for high-speed atomic force microscopy”, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 84, 053702, 2013.

[2] Shibata, M; Uchihashi, T; Ando, T; Yasuda, R, “Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells”, SCIENTIFIC REPORTS, 5, 8724, 2015.

[3] Fukuda, S; Uchihashi, T; Iino, R; Okazaki, Y; Yoshida, M; Igarashi, K; Ando, T, “High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope”, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 8, 073706, 2013.

[4] Fukuda, S; Uchihashi, T; Ando, T, “Method of mechanical holding of cantilever chip for tip-scan high-speed atomic force microscopy”, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 86, 063703, 2015.

④ その他

本研究により、安藤敏夫は、2010 年一般財団法人材料科学技術振興財団山崎貞一賞を受賞、2012 年にペンシルベニア大学 NBIC 研究優秀賞、金沢市文化賞を受賞、2013 年に平成 25 年度科学技術分野文部科学大臣表彰、公益社団法人発明協会発明協会会長賞を受賞、2014 年に島津科学技術振興財団島津賞を受賞、2016 年に国立研究開発法人科学技術振興機構井上春成賞を受賞した。

3.1.2. 光駆動ナノマシンを用いた新原理バイオ計測ツールの研究(生田 幸士)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況⁹

① 研究のねらい

研究室で独自開発してきた「マイクロ・ナノ光造形法」を駆使して作製する透明な可動メカニズムを、赤外レーザトラッピングにより遠隔駆動制御する「光駆動マイクロ・ナノマシン」技術の確立を目指した。さらに、これをキーテクノロジーとする新原理マイクロ・ナノ計測手法として、「細胞内操作ナノマニピュレータ」と「光駆動型バイオ化学 IC」を開発した。前者は細胞の個別操作、細胞内小器官の操作、細胞内分子間の超微小力計測を目的とし、後者は申請者が提案・開発してきた新発想マイクロ化学デバイス「化学 IC チップ」のマイクロ流路内の光駆動バルブ、光駆動ミキサーなどを目的とした。従来手法では困難な μm からサブ μm の世界で、一切通電の必要が無い「光による超微細操作」と「光による超微小力計測」を同時に合わせ持つことが特徴であり、これらは従来のマイクロビーズを用いたレーザトラッピングなどでは実現不可能な機能である (図 3-2)。

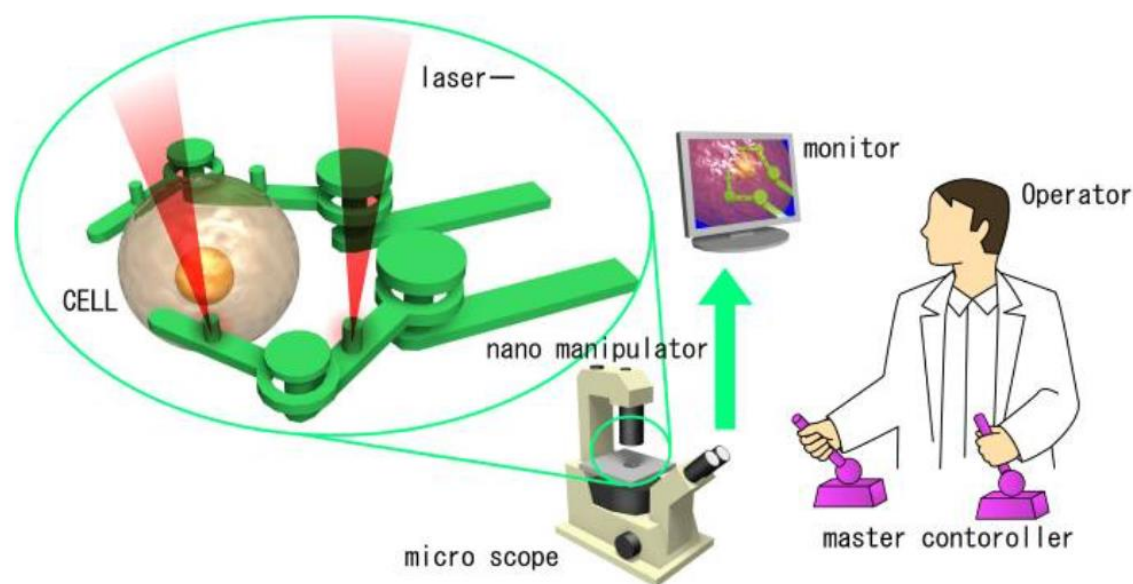


図 3-2 光駆動ナノマシンによる細胞触診システムのコンセプト¹⁰

⁹ JST_CREST 研究終了報告書 (研究課題「光駆動ナノマシンを用いた新原理バイオ計測ツールの研究」(2009 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/02ikuta.pdf

¹⁰ JST_CREST 研究終了報告書 (研究課題「光駆動ナノマシンを用いた新原理バイオ計測ツールの研究」(2009 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/02ikuta.pdf

② 期間中の研究成果

(i) 光駆動マイクロ・ナノマシンの開発

世界最小の 10 μm で液中駆動可能なナノロボットハンドを開発し、イースト細胞、PC12 細胞、赤血球など生細胞の光学顕微鏡下での個別操作に加え、細胞の力学特性の精密計測にも成功した。pN 以下の超微小力のキャリブレーション手法の開発、さらにリアルタイムな力計測システムと、細胞反力を感じながら微細操作が可能な遠隔操縦システムまで完成した。細胞生物学分野に光駆動ナノマシンを応用する基盤を築いた。

(ii) 光駆動ナノマシンの基礎技術確立

光駆動ナノマシンの光駆動力学の解析ツールを開発し、任意形状のナノマシンの光駆動特性を解析できるようになった。また、長時間、安定した蛍光を有する光硬化樹脂と、複数種類の光硬化樹脂を用いたハイブリッドナノ光造形法を開発し、長時間の光駆動とリアルタイムな力計測を実現した。

(iii) バイオ化学 IC チップの開発

合成用、分析用の化学装置を指の上に乗るサイズにマイクロ化することを目的とした。欧米で研究が盛んなラボオンチップや μTAS と異なり、輸液装置や検出装置などすべての構成単位をマイクロチップ化してきて、すでに 30 種以上の化学 IC チップを開発した。細胞からの蛋白の抽出・分離・回収、リアルタイム PCR など、細胞機能解析用の化学 IC チップ群の開発に成功した。現在では、大きなインキュベータ不要で各種生化学実験が可能となっており、生化学の全工程を微小化する「真のマイクロ化」が進展しつつある。

(iv) 新原理バイオナノメカトロニクスの開発^[1]

50wt%以上の高密度で希土類磁性粒子を混在させた「磁性光硬化樹脂」を開発し、任意の 3 次元マイクロ磁性構造体の光造形を実現した。磁気により駆動される 100 μm スケールのマイクロスクリューポンプなど、従来の加工技術では作製困難なマイクロアクチュエータを実証した。

(v) 再生医療用ナノデバイスの開発^{[2][3]}

ポリ乳酸など生分解性樹脂薄膜から構成されたマイクロ流路の作製手法 MeME 法を開発し、肉厚数 μm 、内径 50 μm の膜構造のマイクロ流路の人工毛細血管デバイスを実現した。物質・ガス交換、熱交換が容易な新原理マイクロ流路である。再生医療における細胞・組織の *in vitro* 培養で課題となっている、血管系を含む培養の実現に貢献する技術である。また、浮遊細胞の効率的培養を行う新規マイクロデバイスの開発にも成功し、再生医療の基本チッ

プとして期待されている。さらに、体内埋め込み型人工すい臓チップの開発と、動物実験による実証まで到達した。

(vi) 細胞機能解明ツールとしての実証研究

光駆動ナノマシンの特長を生かした細胞生物学研究用マイクロツールを開発してきた。すでに従来手法では不可能であった測定の足がかりを得ている。また、生物分子モーターと、マイクロマシンとの統合という観点からも興味深い知見が得られている。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Kobayashi, K; Ikuta, K, “Three-dimensional magnetic microstructures fabricated by microstereolithography”, APPLIED PHYSICS LETTERS, 92, 262505, 2008.
- [2] Yamada, A; Niikura, F; Ikuta, K, “A three-dimensional microfabrication system for biodegradable polymers with high resolution and biocompatibility”, JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING, 18, 025035, 2008.
- [3] Hasegawa, T; Nakashima, K; Omatsu, F; Ikuta, K, “Multi-directional micro-switching valve chip with rotary mechanism”, SENSORS AND ACTUATORS A: PHYSICAL, 14, 390-398, 2008.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後に、科学研究費補助金基盤研究(S)「再生医療用ナノ・マイクロプラットフォームの創製」(2010-2014)、科学研究費補助金基盤研究(A)「癌早期診断のための血中 microRNA 分析用化学 IC」(2016-2018) などの研究が進められている。さらに内閣府 ImPact プロジェクト内の「脳波メガネ」プロジェクト(2016-2019)のリーダーとして乾式電極の研究にも応用されている。

① 科学技術の進歩への貢献¹¹

(i) 再生医療用ナノ・マイクロプラットフォームの創製

再生医療の実用化を目指し、3次元組織を低コストかつ省スペースで培養し、個別操作できるマイクロデバイスの開発に取り組んだ。微細加工に適し、かつ細胞培養への適性を併せ持つ新たな素材や、新規の単一細胞ハンドリング技術、新たなマイクロ流路作製技術等の要素技術を開発し^[1]、最終的にはそれらを統合したオンチップ自動培養システムの実証機を完成させた。実証機では1センチ角に100個の独立したマイクロウェルを配置し、人手を介することなく組織体の形成から分化誘導、ソーティングまで、個別に操作することに成功した

¹¹ 科学研究費補助金基盤研究(S) KAKEN (研究課題「再生医療用ナノ・マイクロプラットフォームの創製」研究成果の概要(2010-2014年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-22220008/>

[2][3]。本研究を発展させた TASCL は 2014 年、日本臓器保存生物医学会「会長賞」を受賞した。さらに共同研究者の若手が日本機械学会や新化学技術推進協会奨励賞など 3 件の受賞をしている。

(ii) microRNA 分析用化学 IC の開発

2016 年から開始された「microRNA 分析用化学 IC」に関してもすでに 4 個のマイクロ試料を同時にリアルタイム PCR 分析可能な指先サイズのマイクロデバイスの開発に成功し、高度な国際会議で発表し、新聞などマスコミでも注目されている。現在、スマホと通信できる電子回路も含むすべての機能がマイクロ化、一体化された手のひらサイズのデバイスに仕立て上げている。

(iii) 磁気マイクロマシンの展開

医療、バイオデバイス用のマイクロポンプなどマイクロマシン分野で注目され、従来見過ごされていたミリサイズからマイクロサイズにおけるアクチュエータとしても想定外の応用展開が始まっている。国内外の学会、国際会議で 3 件の受賞をしている。

(iv) 光硬化樹脂の細胞適合レベルでの無毒化プロセスの発見

CREST プロジェクトの後半から始めた「光硬化樹脂の細胞適合レベルでの無毒化」にも成功し、化学 IC チップをはじめマイクロ光造形法で作製するデバイスで細胞も培養可能となった。具体的には樹脂の軟化温度を少し超える温度でベイクすることで毒性の原因である硬化開始剤を樹脂からガス化、昇華させた。無毒化のメカニズムの解明にも成功した。この光硬化樹脂の細胞適合性は医療用デバイスに光造形法を利用する際の重要課題であり、2012 年には日本コンピュータ外科学会から「最優秀論文賞」を受賞した。今後、光造形法で作製される医療デバイスの実用化の加速が期待される。

② 社会・経済への波及効果

生田らが開発した上記デバイスを使用することにより、iPS 細胞の自動培養が可能となった。直径約 1 ミリの微小な穴を試験管に見立て、1 センチ角のチップで 100 個の細胞を同時に培養し、選んだ細胞を取り出すことも可能にした。作業の自動化により手作業を従来の 10 分の 1 以下に減らすことができる上、様々な薬の効き目を 10 種類同時に調べるような実験も可能となり、再生医療研究や新薬開発のスピードアップが期待される¹²。

「microRNA 分析用化学 IC」は、従来の癌マーカーより早期に癌の発症を検知可能であるため、癌の発症率の激減による医療費の大幅な削減が見込まれ、装置のサイズだけでなく、価格も個人や家庭で購買維持可能なレベルまでコストを下げるができるため、ポイントオブ

¹² 日本経済新聞「東大、iPS 細胞を自動培養 100 個同時に」（2013 年 10 月 1 日）
<http://www.nikkei.com/article/DGXNZ060423970Q3A930C1TJM000/>

ケア用のポータブル検査デバイスとして予防医療を将来的に変革する可能性がある。

③ 上記、継続と発展状況を示す研究成果に関連した主な成果論文リスト 4 報以内

[1] Ikeuchi, M; Tane, R; Ikuta, K, “Electrospray deposition and direct patterning of polylactic acid nanofibrous microcapsules for tissue engineering”, BIOMEDICAL MICRODEVICES, 14, 1, 35-43, 2012.

[2] Yukawa, H; Ikeuchi, M; Ikuta, K; Miyamoto, Y; Noguchi, H; Hayashi, S, “Embryonic body formation using the tapered soft stencil for cluster culture device” BIOMATERIALS, 32, 15, 3729-38, 2011.

[3] Inoue, Y; Ikuta, K, “Reduction of Cytotoxicity by High Temperature Heat Treatment for Microstereolithography”, JOURNAL OF JAPAN SOCIETY OF COMPUTER AIDED SURGERY, 13, 2, 67-73, 2011. (in Japanese)

[4] Miyamoto, Y; Ikeuchi, M; Noguchi, H; Yagi, T; Hayashi, S, “Three-Dimensional In Vitro Hepatic Constructs Formed Using Combinatorial Tapered Stencil for Cluster Culture (TASCL) Device”, CELL MEDICINE, 7, 2, 67-74, 2015.

④ その他

本研究により生田幸士は、2010 年秋に内閣府から紫綬褒章を受賞、2012 年一般社団法人日本機械学会 ROBOMECH 賞、同年、英国での The Hamlyn Symposium on Medical Robotics にて Best oral paper award を受賞、2013 年に第 22 回日本コンピュータ外科学会大会優秀論文賞を受賞、2014 年に一般社団法人日本機械学会 ROBOMECH 賞を受賞した。

2012 年には日本ロボット学会フェロー、日本機械学会フェローに推挙された。2008 年からは日本学術会議連携会員にも任命された。

2016 年には AAAS の Science 誌の新規姉妹誌である、サイエンスとマイクロマシンを融合した新分野を対象とする Science Robotics の国際顧問委員として任命された。

青少年への科学教育についても、日本全国の SSH（スーパーサイエンススクール）からの依頼で、東京、大阪、島根、兵庫、和歌山など年間数回以上の「出前授業」を実施している。

3.1.3. 磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測(白川 昌宏)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況¹³

① 研究のねらい

細胞・生体内のタンパク質の立体構造、機能、局在や動態・安定性を非侵襲的に計測するための、核磁気共鳴法(NMR)、電子スピン共鳴法(ESR)、及び磁気共鳴画像法(MRI)を使った新しい研究手法を開発し、実際に働いているタンパク質の実像を捉えることを目的とした。特に極度な混在系・複雑系である細胞・生体内において、特定分子の挙動や機能を選択的に観察するために、特異的安定同位体標識の手法や分子プローブの開発に重点を置いた。また高感度、高分解能 MRI のための測定機器、手法の開発も並行して進めた(図 3-3)。

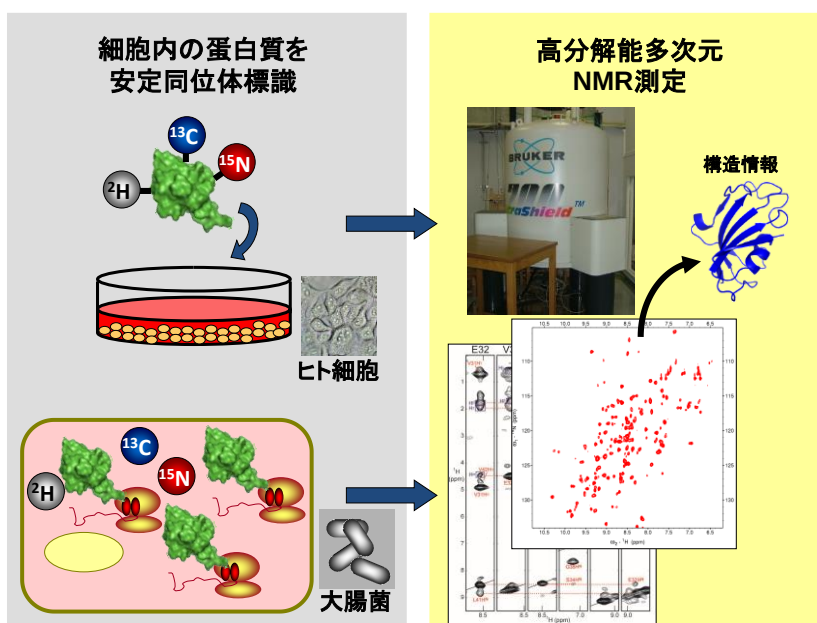


図 3-3 In-cell NMR の測定¹⁴

② 期間中の研究成果

研究成果は以下の項目の通りであるが、詳細は第4章において記述する。

(i) In-cell NMR

(ii) 細胞内タンパク質の分子間相互作用、立体構造の解析手法の開発^{[1][2][3]}

¹³ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測」(2009 年度))

http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/03shirakawa.pdf

¹⁴ JST プレスリリース「生きた細胞内タンパク質の構造と働きの観察に成功」

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20090305/index.html?newwindow=true>

- (iii) 細胞内遺伝子発現の分子イメージング手法の開発
- (iv) タンパク質の細胞内局在の超高分解能イメージング機器・手法の開発
- (v) 生物個体における物質動態の解明を目指したメタボロミクス技術の構築
- (vi) 磁気共鳴の光検出法

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内(被引用トップ 3 位)

- [1] Arita, K; Ariyoshi, M; Tochio, H; Nakamura, Y; Shirakawa, M, “Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism”, NATURE, 455, 7214, nature07249, 2008.
- [2] Inomata, K; Ohno, A; Tochio, H; Isogai, S; Tenno, T; Nakase, I; Takeuchi, T; Futaki, S; Ito, Y; Hiroaki, H; Shirakawa, M, “High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells”, NATURE, 458, 7234, nature07839, 2009.
- [3] Otani, J; Nankumo, T; Arita, K; Inamoto, S; Ariyoshi, M; Shirakawa, M, “Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain”, EMBO REPORTS, 10, 11, 1235-1241, 2009.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題期間中に、科学研究費補助金基盤研究(A)「DNA メチル化のエピジェネティックな継承と維持の構造的基盤」(2009-2011)、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「In situ 計測による脂質、膜受容体の活性化機構の解明」(2009-2013)の研究が開始され、終了後に、戦略的国際科学技術協力推進事業(SICP)「細胞内における SOD1 タンパク質の構造・運動性解析による神経変性疾患の発症機構の解明」(2011-2013)、AMED-CREST「幹細胞における多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析」(2011-2015)、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「ODMR と in-cell NMR による細胞内タンパク質間相互作用・動態の解析法の開発」(2014-2018)などの研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献

科学技術の進歩への貢献は以下の項目の通りであるが、詳細は第 4 章において記述する。

- (i) DNA メチル化のエピジェネティックな継承・維持の構造的基盤の解明¹⁵

¹⁵ 科学研究費補助金基盤研究(A) KAKEN (研究課題「DNA メチル化のエピジェネティックな継承と維持の

(ii) In situ 計測による脂質・膜受容体の活性化機構の解明

(iii) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の分子機構解析¹⁶

(iv) DNA 脱メチル化の構造基盤研究とエピゲノム構造の三次元的解析¹⁷

② 社会・経済への波及効果

医療分野や創薬分野などへの波及が考えられ、詳細は第4章において記述する。

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4報以内

[1] Otani, J; Arita, K; Kato, T; Kinoshita, M; Kimura, H; Suetake, I; Tajima, S; Ariyoshi, M; Shirakawa, M, “Structural basis of the versatile DNA recognition ability of the methyl-CpG binding domain of methyl-CpG binding domain protein 4”, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 288, 9, 6351-62, 2013.

[2] Yoshinari, Y; Mori, S; Igarashi, R; Sugi, T; Yokota, H; Ikeda, K; Sumiya, H; Mori, I; Tochio, H; Harada, Y; Shirakawa, M, “Optically Detected Magnetic Resonance of Nanodiamonds In Vivo; Implementation of Selective Imaging and Fast Sampling”, JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY, 15, 2, 1014-21, 2015.

[3] Danielsson, J; Inomata, K; Murayama, S; Tochio, H; Lang, L; Shirakawa, M; Oliveberg, M, “Pruning the ALS-associated protein SOD1 for in-cell NMR”, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 135, 28, 10266-10269, 2013.

[4] Unoki, M; Masuda, A; Dohmae, N; Arita, K; Yoshimatsu, M; Iwai, Y; Fukui, Y; Ueda, K; Hamamoto, R; Shirakawa, M; Sasaki, H; Nakamura, Y, “Lysyl 5-hydroxylation, a novel histone modification, by Jumonji domain containing 6 (JMJD6)”, JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 288, 9, 6053-6062, 2013.

構造的基盤」研究概要 (2011 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/en/report/KAKENHI-PROJECT-21247013/RECORD-212470132011jisseyi/>

¹⁶ 科学研究費補助金特別研究員奨励費 KAKEN (研究課題「細胞内における SOD1 タンパク質の構造・運動性解析による神経変異疾患の発症機構の解明」研究の成果 (2013-2014 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-13J04532/>

¹⁷ JST_CREST (研究課題「幹細胞による多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析」研究概要 (2011-2015 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/project/34/34_04.html

3.1.4. タンパク質の折り畳み運動解明を目指した一分子観測法の確立(高橋 聡)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況¹⁸

① 研究のねらい

タンパク質は、アミノ酸の配列によって規定される特定の構造に自発的に折り畳む性質を持つポリペプチド鎖である。タンパク質が折り畳む性質を理解することで、任意の構造を持つタンパク質をデザインするなどの応用が可能になると予想される。本研究では、タンパク質一分子が折り畳むダイナミクスを観測することで得られるデータを解析する手法を開発し、さらに、開発した手法を使って熱安定性の異なるタンパク質の性質を比較する研究を展開することで、タンパク質が折り畳む性質を理解することを目的とした。変性したタンパク質とは、無数の異なる構造を持つ分子の集合体である。従って、変性したタンパク質が折り畳む過程では、多数の構造間を複雑にジャンプする運動が関与すると思われる。しかし、これまでの手法では、このような運動を観察することが不可能だった。この過程を直接一分子観察することで、タンパク質の折り畳みに関する理解が大きく進むと期待される(図 3-4)。

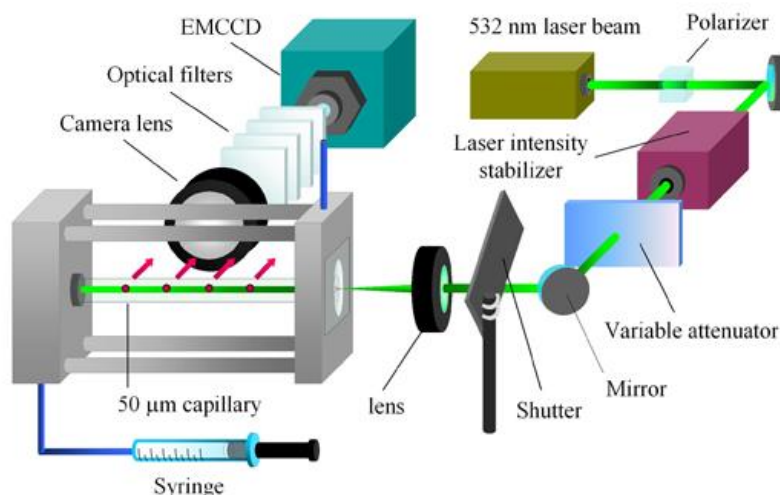


図 3-4 高橋らが開発した一分子観測装置¹⁹

② 期間中の研究成果

¹⁸ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「蛋白質の折り畳み運動解明を目指した一分子観測法の確立」(2004-2009 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/04takahashi.pdf

¹⁹ 東北大学多元物質科学研究所生命分子ダイナミクス研究分野 高橋聡研究室 HP
<http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/takahashi-s/introduction/>

(i) 新しい一分子蛍光観測装置の開発

タンパク質試料を一分子レベルで長時間観察する新規手法を開発した。蛍光色素でラベル化したタンパク質をフローセルに一分子レベルで流し、フローセルに励起レーザーを導入することで、タンパク質が蛍光を発しながら流れる過程をイメージングし、基板に固定しない一分子の連続観察を行った。このシステムにより、ミリ秒程度の時間分解能で、数十ミリ秒程度の観察時間にわたって一分子観察することが可能になった。

(ii) 反射放物面鏡を主要部品とした新規光学系の開発

上述の一分子観察装置は、比較的 S/N 良く一分子時系列データを得ることができる利点を持つが、試料を極端な低濃度で観測する必要があるために、試料の送液系への吸着が起りやすかった。したがって、再現性のよい一分子観察が大変難しく、この手法を一般的に応用することは大変困難であった。そこで、より容易に一分子観察を行うために、反射放物面鏡を基礎とした新規集光システムを開発した。

(iii) ラインフォーカス型共焦点顕微鏡の開発

通常の共焦点顕微鏡は、背景光を極端に減らした条件で一分子観察が可能である特徴を持つが、一分子を顕微鏡の焦点を通り過ぎる一瞬しか観察することができない。そこで、比較的倍率の小さな顕微鏡レンズを用い、通常の共焦点顕微鏡のピンホール型空間フィルターにあたる部分に、スリット型の空間フィルターを導入することで、分子が流れながら蛍光を発する過程を継続観察することを可能にした。開発した顕微鏡を、ラインフォーカス型共焦点顕微鏡と名付けた。この顕微鏡を使用することで、背景光が非常に少ない条件で、高時間分解能の一分子観察が可能となった。

(iv) シトクロム c を使った一分子観察実験

上述の開発装置を、酵母由来のシトクロム c や、熱安定性の異なるシトクロム c の変性状態、折り畳み中間状態に適用し、変性状態における運動性を確認した。また、一分子データを解析する手段を開発した。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内(被引用トップ 3 位)

- [1] Kimura, T; Uzawa, T; Ishimori, K; Morishima I; Takahashi, S; Konno, T; Akiyama, S; Fujisawa, T, “Specific collapse followed by slow hydrogen-bond formation of beta-sheet in the folding of single-chain monellin”, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 102, 8, 2748-2753, 2005.
- [2] Yamaguchi, K; Takahashi, S; Kawai, T; Naiki, H; Goto, Y, “Seeding-dependent propagation and maturation of amyloid fibril conformation”, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 352, 4, 952-960, 2005.
- [3] Uzawa, T; Nishimura, C; Akiyama, S; Ishimori, K; Takahashi, S; Dyson, HJ;

Wright, PE, "Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultra-fast H/D exchange coupled with 2D NMR", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 105, 37, 13859-13864, 2008.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後に、科学研究費補助金基盤研究(B)「高度化した一分子観察法によるタンパク質の折り畳みダイナミクスの解明」(2009-2011)、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「高度化した一分子蛍光計測によるタンパク質の構造形成運動の解明」(2013-2017)、科学研究費補助金基盤研究(B)「一分子選択による人工タンパク質の新規デザイン戦略の創製」(2014-2016)、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「ハイブリッド光検出器を使った高速度一分子蛍光観察法の開発」(2014-2015)などの研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献

(i) タンパク質の折り畳みダイナミクスの解明²⁰

タンパク質のフォールディング現象を理解するために、一分子を長時間観察するための球面鏡システムを開発し、この装置を用いて、変性したシトクロム c のエネルギー地形を解析する研究を行った。また、一分子の蛍光強度データを高時間分解能で観察するためのラインフォーカス型の共焦点顕微鏡を開発し、この装置を免疫グロブリン結合性蛋白質であるプロテイン A の B ドメイン部分 (BdpA) に適応することで、変性状態に複数の副順位が存在することを明らかにした^[1]。

(ii) タンパク質の構造形成運動の解明²¹

新しい一分子分光計測法と関連技術を開発し、タンパク質のフォールディング過程や機能発現過程に応用した。ラインフォーカス型一分子の蛍光観察装置を用いて、タンパク質のフォールディング運動を観察し、データの解析方法を深化させた。プロテイン A の B ドメインについて、二つのラベル化試料を一分子観察し、サブミリ秒の時間領域で揺らぎ運動を行うことを見いだした^[2]。また、ハイブリッド型フォトダイオードとラインフォーカス型共焦点顕微鏡を組み合わせた高時間分解能一分子観測装置を開発した。本装置を用いるこ

²⁰ 科学研究費補助金基盤研究(B) KAKEN (研究課題「高度化した一分子観察法によるタンパク質の折り畳みダイナミクスの解明」研究成果報告書 (2009-2011 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/file/KAKENHI-PROJECT-21370072/21370072seika.pdf>

²¹ 科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型) KAKEN (研究課題「高度化した一分子蛍光計測によるタンパク質の構造形成運動の解明」研究実績の概要 (2013-2017 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-25104007/>

とで 10 マイクロ秒の時間分解能で 10 ミリ秒程度の観測時間一分子蛍光観察を可能にした。本装置を用いてプロテイン A の B ドメインの計測を行った^[3]。

(iii) 一分子選択による人工タンパク質の新規デザイン戦略の創製²²

タンパク質をデザインするための新しい研究手法として、ファージディスプレイ実験を一ファージレベルで実施することを目指し、タンパク質を一分子選別するための光学系の高度化と流路系の高速化を計った。このために、十字形の流路を元にした流体力学的絞り込みにより試料流を集中させ、N. A. 値の大きな顕微レンズによる効率的な蛍光光子の集光を可能にした。さらに、応答速度の速いバルブを導入することにより、条件が良い場合には 100 ミリ秒程度で一個の粒子の選別を可能にした。さらに、装置による試料の選別を効率よく行うために、イメージング方式の検出器を光学系に組み合わせ、検出器の切り替えを可能にした。また、ファージ表面に分割した GFP の C 末端断片を提示し、N 末端断片を加えることでファージ表面に再構成させた。この GFP ファージを装置に流したところ、十分な蛍光強度でファージごとに観察することが可能になった。また、装置に流したあとのファージを回収し、大腸菌への感染能を維持していること、また、DNA 配列を PCR 法により解析可能であることを確認した。

② 社会・経済への波及効果

高橋らのグループは、新規に開発した一分子蛍光観察法を用いて天然変性蛋白質 p53 の運動解析を行っている^[4]。p53 タンパク質は癌抑制因子として DNA を認識して結合することで、目的の遺伝子の転写を調節する機能を持つ重要なタンパク質である。p53 が機能を発現するためには、DNA 上のターゲット配列を探し出して特異的に結合する必要がある。この過程は驚くほど短時間内に起きることが知られているが、そのメカニズムは明らかにされていない。そこで、高橋らは自作の蛍光顕微鏡を用いて、蛍光色素修飾 p53 が基板に固定された DNA 上を動く過程を直接観察することで、p53 の機能の解明を目指している。これまでに、伸長した DNA 上を一次元拡散運動する多数の p53 粒子を観測することに成功している。さらに、DNA 配列と p53 の探索の関連性を明らかにし、単分子解析でより多くの粒子を観測するため、DNA を基盤に整列させる技術を開発しており、この技術を用いて、がん化変異体、活性化変異体などの機能解析を行っている。このように、生物物理的な装置開発を通して、p53 の機能解析を進めることで、癌発症のメカニズム解明に寄与することが期待される。

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 4 報以内

[1] Kamagata, K; Kawaguchi, T; Iwahashi, Y; Baba, A; Fujimoto, K; Komatsuzaki, T;

²²科学研究費補助金基盤研究(B) KAKEN (研究課題「一分子選択による人工タンパク質の新規デザイン戦略の創製」研究実績の概要 (2002-2004 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-26282213/>

Sambongi, Y; Goto, Y; Takahashi, S, “Long-term observation of fluorescence of free single molecules to explore protein-folding energy landscapes”, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 134, 11525-32, 2012.

[2] Oikawa, H; Suzuki, Y; Saito, M; Kamagata, K; Arai, M; Takahashi, S, “Microsecond dynamics of an unfolded protein by a line confocal tracking of single molecule fluorescence”, SCIENTIFIC REPORTS, 3, 2151, 2013.

[3] Oikawa, H; Kamagata, K; Arai, M; Takahashi, S, “Complexity of the folding transition of the B domain of protein A revealed by the high-speed tracking of single-molecule fluorescence time series”, JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, 119, 6081-91, 2015.

[4] Murata, A; Ito, Y; Kashima, R; Kanbayashi, S; Nanatani, K; Igarashi, C; Okumura, M; Inaba, K; Tokino, T; Takahashi, S; Kamagata, K, “One-dimensional sliding of p53 along DNA is accelerated in the presence of Ca^{2+} or Mg^{2+} at millimolar concentrations”, JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 427, 2663-78, 2015.

3.2. 2005 年度採択研究課題

3.2.1. ハイブリッド局在 SPR を用いた生体分子の環境応答性計測(青山 茂)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況²³

① 研究のねらい

生物は極めて多数の生体分子間相互作用のネットワークが機能することによって形成されるシステムであり、生命現象の動的挙動を、簡便かつリアルタイムに把握するにはその事象を司る生体分子間相互作用を非標識、リアルタイムに観察する手法が求められる。そこで、生体分子と同程度であるナノオーダーサイズの独自構造を表面プラズモン共鳴 (SPR; Surface Plasmon Resonance) センサ表面に設けることにより、金属と光の相互作用をナノスケールで自在にコントロールし、センサとして応用することで、従来困難であった高感度、小型、簡便なリアルタイムセンサを構築し、生命現象の解明に寄与することを目的とした (図 3-5)。



図 3-5 手のひらサイズの小型 SPR システムの外観²⁴

② 期間中の研究成果

(i) 新規のセンサデバイスの開発

センサ表面に極微細(～100nm)なギャップ構造を狭ピッチ(300nm)で作製することにより、ギャップ内部において局在した表面プラズモン共鳴モードが発生することを発見した。今回発見したモードは、ギャップの深さ、幅の調整により、従来困難であった広範囲での感度領域や共鳴波長のチューニングが容易に可能であることが明らかとなった。上記ギャップ

²³ JST_CREST 研究終了報告書 (研究課題「ハイブリッド局在 SPR を用いた生体分子の環境応答性計測」(2005-2009 年度))

http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/05aoyama.pdf

²⁴ 青山先生提供資料

構造を用いることで、ナノパターンを高速で転写するナノインプリント法を応用したデバイス作製が可能となり、ローコスト、高品質、高 S/N(従来比 10 倍)なセンサデバイスを実現した。さらにナノ・マイクロハイブリッド構造の実現により、LSPR 用のナノ構造とサンプル送液用のマイクロ流路を同時一括に作製することに成功した。

(ii) SPR システムの小型化

本デバイスを使用するためのセンサシステムとして、全反射等の特殊な光学系が不要といった LSPR の特徴を活かすことで、W77×D52×H56 (240g) と従来市販装置比約 200 分の 1 の小型プロトモデルの構築を行った。これは流路系等を含むオールインワンの SPR システムとしては世界最小である。

(iii) 生体分子固定化技術の開発

実際の生体分子間の相互作用検出においては、センサ表面に対する抗体等のプローブ分子の密度や配向状態を、できるだけ高い精度で制御することが非常に重要となる。そこで、自己組織化単分子膜を用いた共有結合方式の他、ビオチン-アビジン結合や融合タンパク質を用いた方式など、異なる構造を有する生体分子の固定化技術を比較検討し、優れた結果を示した方式に関しては、プロセス条件の最適化を実施し、センサの高 S/N 化に成功した。

(iv) センサの特性評価法の確立

センサの特性評価用のモデルタンパク質として、肝臓癌の腫瘍マーカーである AFP(α -fetoprotein)の検出を行い、直接法では従来の SPR と同等な感度である 20ng/ml、金コロイドを用いたサンドイッチ法では従来比で約 10 倍程度の感度となる 1ng/ml と非常に高感度検出を実現した。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Ishizuka-Katsura, Y; Wazawa, T; Ban, T; Morigaki, K; Aoyama, S, “Biotin-Containing Phospholipid Vesicle Layer Formed on the Self-Assembled Monolayer of a Saccharide-Terminated Alkyl Disulfide for Surface Plasmon Resonance Biosensing”, JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 105, 5, 527-535, 2008.
- [2] Matsushita, T; Nishikawa, T; Yamashita, H; Hasui, R; Fujita, S; Okuno, Y, “Localized Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Fabricating Nano-period Structure for High Throughput by Polymer”, JAPANESE JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, 47, 9, 7420-7427, 2008.
- [3] Wazawa, T; Ishizuka-Katsura, Y; Nishikawa, So; Iwane, H; Aoyama, S, “Grafting of Poly(ethylene glycol) onto Poly(acrylic acid)-Coated Glass for a Protein-Resistant Surface”, ANALYTICAL CHEMISTRY, 78, 8, 2549-2556, 2006.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

研究時所属していた企業を退職しており、研究終了後の継続と発展状況についての実績に係る情報は得られなかった。

3.2.2. 生体分子の動的可視化プローブの開発と応用(長野 哲雄)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況²⁵

① 研究のねらい

生命現象を解明するためには、生きた状態の細胞や生体組織あるいは in vivo 系において様々な生体分子（生理活性種・酵素・受容体など）のダイナミックな営みを捉えるプローブとその計測法が求められている。そこで、観測したい生体分子を検出できる選択的かつ高感度な蛍光プローブの開発と、その生体への応用を目指した。具体的には、プローブ設計の原理の解明、およびその原理に基づいたプローブのデザインと有機合成を行う事を目的とした。また、合成された可視化プローブを生細胞あるいは組織へと適用し、その機能の有用性を評価することで、分子構造の最適化を行った（図 3-6）。

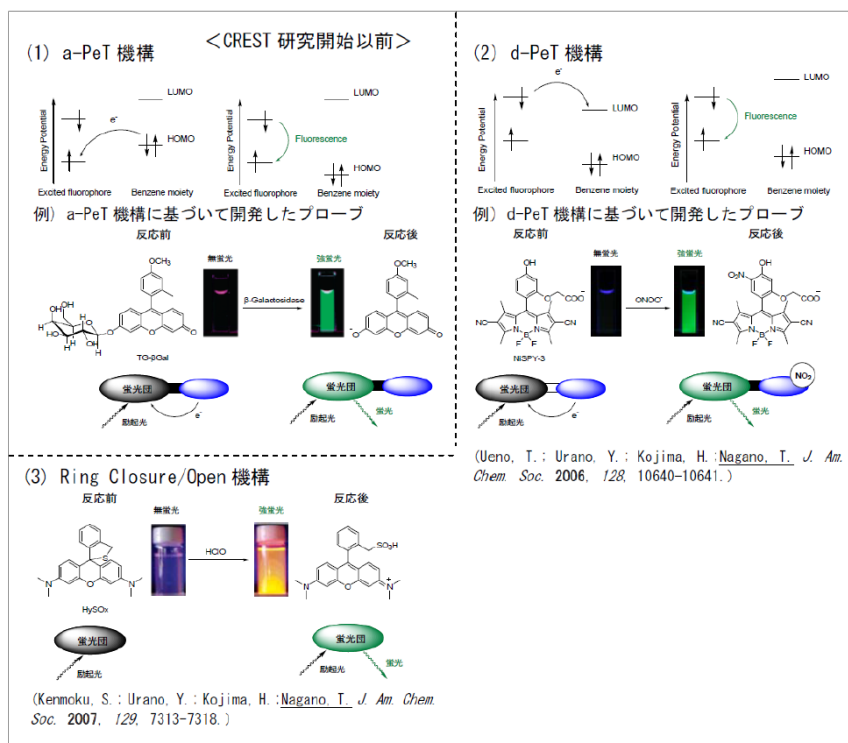


図 3-6 蛍光 Off/On 制御機構²⁶

²⁵ JST_CREST 研究終了報告書（研究課題「生体分子の動的可視化プローブの開発と応用」（2005-2010 年度））http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei17/seimei/01nagano.pdf

²⁶ JST_CREST 研究終了報告書（研究課題「生体分子の動的可視化プローブの開発と応用」（2005-2010 年度））http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei17/seimei/01nagano.pdf

② 期間中の研究成果

研究成果は以下の項目の通りであるが、詳細は第4章において記述する。

(i) 蛍光発光制御原理の解明

(ii) 新規蛍光プローブの開発と生命科学への応用

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト3報以内（被引用トップ3位）

[1] Komatsu, K; Urano, Y; Kojima, H; Nagano, T, “Development of an iminocoumarin-based zinc sensor suitable for ratiometric fluorescence imaging of neuronal zinc”, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 129, 44, 13447-13454, 2007.

[2] Urano, Y; Kamiya, M; Kanda, K; Ueno, T; Hirose, K; Nagano, T, “Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes”, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 127, 13, 4888-4894, 2005.

[3] Urano, Y; Asanuma, D; Hama, Y; Koyama, Y; Barrett, T; Kamiya, M; Nagano, T; Watanabe, T; Hasegawa, A; Choyke, PL; Kobayashi, H, “Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes”, NATURE MEDICINE, 15, 1, 104-109, 2009.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題期間中に、文部科学省研究事業ターゲットタンパク研究プログラム「化合物ライブラリーの基盤構築とタンパク質制御技術の開発」（2007-2011）、終了後に、科学研究費補助金特別推進研究「光機能性分子の開発と医療への応用」（2010-2014）、AMED 創薬支援技術基盤プラットフォーム事業「大型創薬研究基盤を活用した創薬オープンイノベーションの推進」（2012-2016）などの研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献

科学技術の進歩への貢献は以下の項目の通り、詳細は第4章において記述する。

(i) 新規蛍光プローブの活用

(ii) 可視光駆動型ケージド化合物の開発^[1]

(iii) 近赤外蛍光イメージングプローブ^{[2][3][4]}

② 社会・経済への波及効果

創薬分野などへの波及が考えられ、詳細は第4章において記述する。

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 4 報以内

- [1] Takeda, A; Komatsu, T; Nomura, H; Naka, M; Matsuki, N; Ikegaya, Y; Terai, T; Ueno, T; Hanaoka, K; Nagano, T; Urano, Y, “Unexpected Photo-instability of 2,6-Sulfonamide-Substituted BODIPYs and Its Application to Caged GABA”, CHEMBIOCHEM, 1, 17, 13, 1233-40, 2016.
- [2] Egawa, T; Koide, Y; Hanaoka, K; Komatsu, T; Terai, T; Nagano, T, “Development of a fluorescein analogue, TokyoMagenta, as a novel scaffold for fluorescence probes in red region”, CHEMICAL COMMUNICATIONS, 47, 4162-4164, 2011.
- [3] Mizunuma, M; Norimoto, H; Tao, K; Egawa, T; Hanaoka, K; Sakaguchi, T; Hioki, H; Kaneko, T; Yamaguchi, S; Nagano, T; Matsuki, N; Ikegaya, Y, “Unbalanced excitability underlies offline reactivation of behaviorally activated neurons”, NATURE NEUROSCIENCE, 17, 503-505, 2014.
- [4] Egawa, T; Hanaoka, K; Koide, Y; Ujita, S; Takahashi, N; Ikegaya, Y; Matsuki, N; Terai, T; Ueno, T; Komatsu, T; Nagano, T, “Development of a Far-Red to Near-Infrared Fluorescence Probe for Calcium Ion and its Application to Multicolor Neuronal Imaging”, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 133, 14157-14159, 2011.

3.2.3. 多目的 RNA ナノセンサー・モジュレーターの開発(中村 義一)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況²⁷

① 研究のねらい

RNA の試験管内人工進化(SELEX)技術を利用して、各種の標的分子に対する特異的な高親和性 RNA 分子を創成した。RNA 分子は従来知られていた塩基配列ではなく構造を通して認識していることが示され、それらを用いた新しい計測技術(RNA センサー)の開発、細胞内外の生理活性因子の調節デバイス(RNA モジュレーター)の開発、それら新機能性 RNA 創成のための新技术を開発し、タンパク質と RNA の分子擬態に関する学理解明とともに、RNA を計測・医用マテリアルに利用する次世代の計測・分析基盤技術の確立や新規の RNA 創薬の確立を目指した(図 3-7)。

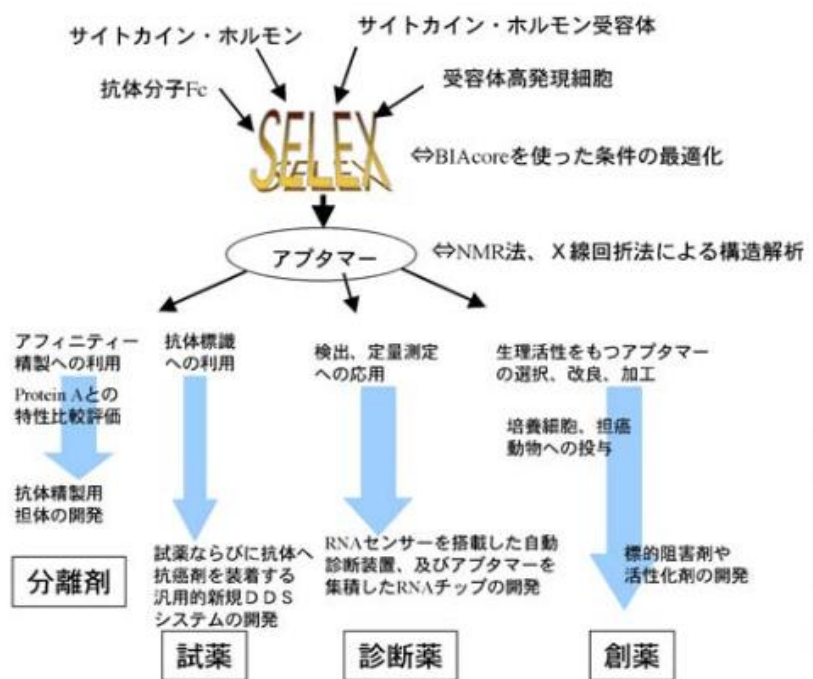


図 3-7 SELEX 技術を用いたプロジェクトの概要²⁸

② 期間中の研究成果

(i) 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発

²⁷ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「多目的 RNA ナノセンサー・モジュレーターの開発」(2005-2010 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei17/seimei/02nakamura.pdf

²⁸ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「多目的 RNA ナノセンサー・モジュレーターの開発」(2005-2010 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei17/seimei/02nakamura.pdf

細胞膜表面に発現している受容体に対するモノクローナル抗体の取得が困難なことは、基礎研究並びに応用研究の発展にブレーキをかけている。そこで、細胞膜表面に発現している受容体やリガンドをターゲットに SELEX 法により RNA アプタマーを作製し、特性解析を実施した上で、センサーとする疾患の診断システムを開発した。具体的には、IL-17 アプタマーを作出し、培養細胞を用いた IL-17 に対する強い阻害効果を確認した上で、自己免疫疾患のモデルマウスを用いた *in vivo* 薬理試験を行ない、詳細な解析を行った。ヒト多発性硬化症のモデルマウスである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルマウスでは、極めて高い発症抑制効果を確認し、リウマチ関節炎モデルマウスでは、発症抑制効果及び治癒効果を確認した。

(ii) 細胞内 RNA 可視化システムの開発

既存の RNA 標識法は、細胞外の RNA の分析法であり、細胞内 RNA の標識には使えない。そこで、*in vivo* RNA 標識を可能にするために、蛍光化合物に対して高結合性の RNA アプタマーを創成し、その配列をタグとして任意の RNA 末端に付加する *in vivo* 発現系を構築した。

(iii) 抗体 IgG に対する RNA センサーの多目的利用

医療用抗体は、培養細胞を用いて製造され、精製過程で抗体に親和性のある Protein A 樹脂が用いられている。しかし、Protein A 樹脂を用いた精製では抗体を酸性条件下で溶出する必要があり、その過程で抗体が変性もしくは凝集する可能性が指摘されている。そこで、抗体を中性で溶出することができるヒト IgG 特異的 RNA アプタマー樹脂を作製した。これにより、酸性条件下で失活し製品化するのに困難を極めた新規抗体医薬品の実用化に大きく寄与できるものと期待される。

(iv) RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発

一般的に RNA に対する特異的な抗体の作製は困難である。また、当時報告されていた核酸に対する核酸プローブは、塩基対形成に依存したものであり、RNA の高次構造を識別することはできなかった。そこで、標的 RNA を、塩基配列ではなく高次構造によって認識する RNA アプタマーを作製し、非翻訳 RNA (non-protein-coding RNA, ncRNA) を構成する天然アプタマーの高次構造を識別できるツールを開発した。塩基対形成に依存せずに RNA 構造を認識する RNA アプタマーを取得するための普遍的な実験系として、人工のリボザイム (RNA 酵素) の触媒反応を指標とした選別系を確立した。また、この選別系によって、天然の RNA 構造体において RNA-RNA 相互作用には関与しない C ループに対するセレクションを行い、C ループに対する全く新規な受容体モチーフ (アプタマー) の取得に成功した。この系は様々な RNA 構造体に対して特異的な認識能をもつ RNA センサーの開発に汎用的に利用することが期待できる。

(v) 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

白血病では、AML1-MTG8 を代表とする融合遺伝子が形成され、そこから融合タンパク質が発現することが癌化の大きな要因となっている。癌の早期発見のためには高感度な検出法の開発が必要とされる。そこで、白血病融合タンパク質の超高感度測定法を開発するために、すでに作製済みの AML1 および MTG8 結合アプタマーを改良し、AML1-MTG8 の AML1 部分と MTG8 部分のそれぞれに同時にアプタマーを結合させることに成功した。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内（被引用トップ 3 位）

[1] Cheng, Z; Saito, K; Pisarev, AV; Wada, M; Pisareva, VP; Pestova, TV; Gajda, M; Round, A; Kong, CG; Lim, M; Nakamura, Y; Svergun, DI; Ito, K; Song, HW, “Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1”, GENES & DEVELOPMENT, 23, 9, 1106-1118, 2009.

[2] Ohuchi, SP; Ohtsu, T; Nakamura, Y, “Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor-beta type III receptor displayed on cell surface”, BIOCHIMIE, 88, 7, 897-904, 2006.

[3] Wang, JY; Takeuchi, H; Sonobe, Y; Jin, S; Mizuno, T; Miyakawa, S; Fujiwara, M; Nakamura, Y; Kato, T; Muramatsu, H; Muramatsu, T; Suzumura, A, “Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population”, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 105, 10, 3915-3920, 2008.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題期間中に、科学研究費補助金基盤研究(S)「相補性に依存しない機能性 RNA の研究」(2006-2010)、厚生労働省研究事業厚生労働科学研究費補助金「関節リウマチに対するアプタマー-RNA 新薬の開発」(2009-2011)、終了後に、科学研究費補助金基盤研究(A)「RNA の造形力を利用した医薬品探索」(2012-2015)などの研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献

(i) 試験管内進化法(SELEX)を用いた人工アプタマーの創成²⁹

ヒト IL-17A に対して作出したアプタマーの薬効評価と医薬開発を目的とした最適化実験を実施した。開発候補アプタマーは IL-17A に対して解離定数 50pM の強い親和性をもち、受容体への結合を顕著に阻害する。試験管内反応と細胞試験でも強い IL-17A 阻害効果を示し、2 種類のマウス病態モデル(EAE モデルと誘導関節炎モデル)において顕著な発症抑制効果が確認された^[1]。また、IL-17 には 6 種類のサブタイプが存在し、そのうち IL-17A と IL-17F

²⁹ 科学研究費補助金基盤研究(S) KAKEN (研究課題「相補性に依存しない機能性 RNA の研究」研究概要(2006-2010 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-18107005/>

の2種類が主要な構成メンバーである。IL-17は2量体を形成するため、生体内にはホモ2量体(IL-17A/AとIL-17F/F)とヘテロ2量体(IL-17A/F)が存在し、上述のIL-17A アプタマーや既存の抗体がホモとヘテロいずれにも交差するためにIL-17A/F単独の機能が明らかにされていなかった。そこで、IL-17A/Fヘテロ2量体に対して subtractive SELEX を行い、ホモ2量体に交差しないIL-17A/Fヘテロ2量体特異的なアプタマーの創成に成功した^[2]。

(ii) SELEX 技術を利用した医薬品探索とその作用機序の解明³⁰

SELEX 技術を用いる事により FGF2 アプタマーを創成し、動物モデルでの薬効確認、さらに複数の骨疾患モデルでの優れた薬効を確認し、骨疾患に伴う疼痛に対してもモルヒネと同等の鎮痛効果を示すことを確認した^[3]。また、肺線維症治療薬として創製した抗オートタキシン(ATX)アプタマーとATXとの複合体のX線結晶構造を2.0Åの解像度で明らかにし、阻害機序を解明した^[4]。

② 社会・経済への波及効果³¹

中村は、2003年、アプタマーという新しいタイプのバイオ医薬品開発を手掛けるバイオベンチャー企業株式会社リボミックを設立し、2012年に東京大学退官と同時に同社の代表取締役社長に就任した。標的となるタンパク質に対し、RNAアプタマーが“羽交い絞め”にして働きを止める薬(阻害剤)を作るもので、抗体医薬と性格が似ている。提携先の手製薬メーカーが標的の疾患を示すと、それに対応した薬のシーズをライブラリーからすくい上げ、最終的に1つの製品まで仕上げていく。リボミックが開発を進めてきた製品は8つあり、共同開発が3件、自社開発が5件で、このうち藤本製薬株式会社に導出した自社開発品のRBM004は、脳に痛みを伝達するタンパク質の働きを阻害するもので、モルヒネと同じくらい強い効き目を持つ疼痛薬となる。副作用が少ないため、将来的には、末期がん患者などに対して大きな代替需要が期待される。また、自社開発品のRBM007は加齢黄斑変性症や軟骨無形成症(難病指定の希少疾患)に対する新規な治療薬となる可能性があり、2018年に米国で臨床試験の開始が予定されている。

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リスト4報以内

[1] Ishiguro, A; Akiyama, T; Adachi, H; Inoue, J; Nakamura, Y, “Therapeutic potential of anti-interleukin-17A aptamer: suppression of interleukin-17A signaling and attenuation of autoimmunity in two mouse models”, ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY, 63, 2, 455-66, 2011.

³⁰ 科学研究費補助金基盤研究(A) KAKEN (研究課題「RNAの造形力を利用した医薬品探索」研究実績の概要(2012-2015年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24241074/>

³¹ 日本証券新聞「IPO社長会見 リボミック(4591) 向こう3年も黒字化に成算」(2014年9月30日) <http://kabu.nsjournal.jp/kobetsu/22315.html>

- [2] Adachi, H; Ishiguro, A; Hamada, M; Sakota, E; Asai, K; Nakamura, Y, “Antagonistic RNA aptamer specific to a heterodimeric form of human interleukin-17A/F”, BIOCHIMIE, 93, 7, 1081-8, 2011.
- [3] Jin, L; Nonaka, Y; Miyakawa, S; Fujiwara, M; Nakamura, Y, “Dual Therapeutic Action of a Neutralizing Anti-FGF2 Aptamer in Bone Disease and Bone Cancer Pain”, MOLECULAR THERAPY, 24, 11, 1974-1986, 2016.
- [4] Kato, K; Ikeda, H; Miyakawa, S; Futakawa, S; Nonaka, Y; Fujiwara, M; Okudaira, S; Kano, K; Aoki, J; Morita, J; Ishitani, R; Nishimasu, H; Nakamura, Y; Nureki, O, “Structural basis for specific inhibition of Autotaxin by a DNA aptamer”, NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY, 23, 5, 395-401, 2016.

④ その他

2003 年 8 月 1 日に株式会社リボミックを設立。2014 年 9 月 25 日に東京証券取引所マザーズ市場上場。

3.2.4. タンパク質完全結晶創成(森 勇介)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況³²

① 研究のねらい

これまでに開発した新しいタンパク質結晶化技術であるフェムト秒レーザー照射による結晶核発生技術、及び溶液攪拌による高品質化技術に関しての高度化を行うとともに、膜タンパク質や水溶性タンパク質をはじめとする難結晶化タンパク質の高品質大型結晶育成技術の確立と汎用化を目的とした(図 3-8)。

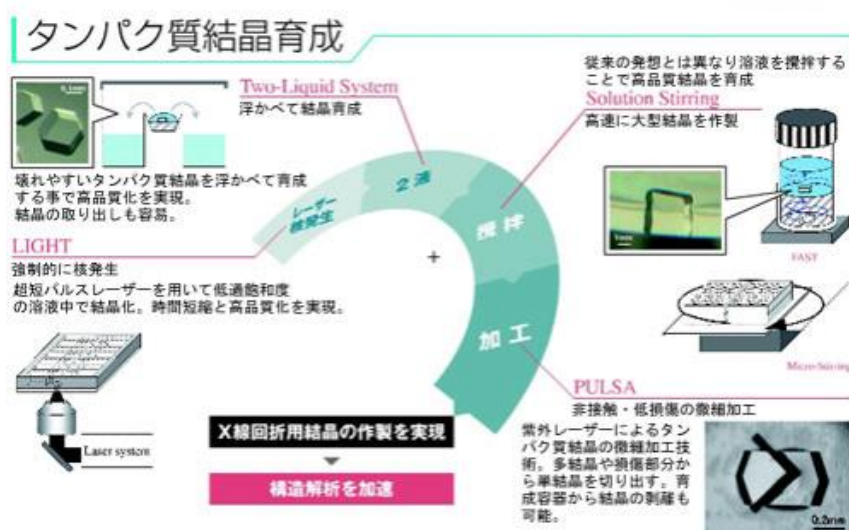


図 3-8 タンパク質結晶化及び構造解析³³

② 期間中の研究成果

(i) フェムト秒レーザー照射による結晶核発生技術の原理解明

フェムト秒レーザー照射による結晶核発生技術においては、レーザー集光点からのキャビテーション発生が結晶核発生の促進に重要であることを明らかにした。キャビテーションは膨張と収縮を繰り返しながら最後には崩壊するが、その収縮時に、キャビテーション周辺に数倍程度タンパク質濃度が高まる領域が生じ、この高濃度化が結晶核発生を促進することが示唆された。一方で、キャビテーションの“崩壊”は、生成されたタンパク質高濃度化領域の崩壊に繋がることが懸念される。そこで、溶液の高粘性化を試みたところ、キャビテーションの収縮を保ちつつ、その崩壊を抑制することに成功し、結晶核発生確率が向上する

³² JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「タンパク質完全結晶創成」(2005-2010 年度))

http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei17/seimei/03mori.pdf

³³ 大阪大学 COE プログラム http://www.fel.eng.osaka-u.ac.jp/coe/study/study_mori.html

結果が得られた。さらに、レーザー集光点が壁等に近いと、キャビテーションは壁側に移動することを利用し、キャビテーション周囲に形成された高濃度タンパク質を壁面に塗布したゲル中に注入するという新しいタンパク質高濃度化技術を提案し、実際に結晶核発生確率の向上を確認した。

(ii) 溶液攪拌による高品質化技術の高度化

溶液の流れが成長表面へのタンパク質分子供給、及び吸着を促進することを確認した。様々な成長機構のリゾチーム結晶成長表面において、ステップ成長速度を測定した。その結果、これまで経験的に得られていた結晶の X 線構造解析分解能が向上する流速条件下では、流速の増加とともに、ステップ成長速度が増す傾向であることが分かった。このことは、適切な溶液攪拌条件では、不純物の影響による結晶性の低下が抑制されることを示唆する。また、膜タンパク質 AcrB 等、いくつかのタンパク質結晶の転位（線欠陥）密度、及びマイクロ欠陥密度と X 線構造解析分解能の評価を行った。その結果、溶液攪拌により結晶中の転位密度は増加するが、一方でマイクロ欠陥密度が減少することが分かり、これが X 線構造解析分解能の向上に繋がるという可能性が示唆された。

(iii) 難結晶化タンパク質の高品質大型結晶育成技術の確立

膜タンパク質や各種複合体、水溶性タンパク質をはじめとする、難結晶化タンパク質の結晶化に関しては、汎用性の高い溶液条件下での試行を行うとともに、添加試薬等の検討も含めた幅広い溶液条件探索による結晶化を試みた。難結晶化タンパク質高品質結晶化に関しては、中性子回折測定用大型 HIV protease-KNI272 複合体、RNA アプタマー-IgG 複合体、Tomato mosaic virus 130K、機能性 Biotin 誘導体-Avidin 複合体等の結晶化と構造解析の成功など、14 個の成功例を示し、新しい結晶化技術の有効性を実証した。また、開発したタンパク質結晶化技術を有機低分子化合物にも展開し、BODIPY 系蛍光プローブ分子、ダブルカリックスアレーン系有機レジスト材料の結晶化と構造解析にも成功した。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Adachi, M; Ohhara, T; Kurihara, K; Tamada, T; Honjo, E; Okazaki, N; Arai, S; Shoyama, Y; Kimura, K; Matsumura, H; Sugiyama, S; Adachi, H; Takano, K; Mori, Y; Hidaka, K; Kimura, T; Hayashi, Y; Kiso, Y; Kuroki, R, “Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography”, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 106, 12, 4641-4646, 2009.
- [2] Nomura, Y; Sugiyama, S; Sakamoto, T; Miyakawa, S; Adachi, H; Takano, K; Murakami, S; Inoue, T; Mori, Y; Nakamura, Y; Matsumura, H, “Conformational plasticity of RNA for target recognition as revealed by the 2.15 angstrom crystal structure of a human IgG-aptamer complex”, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 38, 21, 7822-7829, 2010.

[3] Yoshikawa, HY; Murai, R; Sugiyama, S; Sazaki, G; Kitatani, T; Takahashi, Y; Adachi, H; Matsumura, H; Murakami, S; Inoue, T; Takano, K; Mori, Y, “Femtosecond laser-induced nucleation of protein in agarose gel”, JOURNAL OF CRYSTAL GROWTH, 311, 3, 956-959, 2009.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究課題期間中に、科学研究費補助金基盤研究(B)「完全バルク GaN 結晶育成技術の研究開発」(2008-2010)、終了後に、先端的低炭素化技術開発(ALCA)探索ステージ「8 インチ超大口径 GaN バルク結晶育成技術」(2011-2012)、科学研究費補助金基盤研究(B)「レーザー分子注入法によるタンパク質結晶化技術」(2011-2013)、先端的低炭素化技術開発(ALCA)「省エネデバイス用 8 インチ超大口径 GaN ウエハ」(2012-2016)、科学研究費補助金基盤研究(B)「レーザーキャビテーションバブルによる結晶多形制御」(2014-2016)、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「フェムト秒レーザーによるタンパク質結晶成長モードの時空間制御」(2015-2018)などの研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献

(i) バルク GaN 単結晶育成技術の開発³⁴

Na フラックス法において微小 GaN 単結晶を種結晶に用いた、バルク GaN 単結晶成長を行った。種結晶外核発生を抑制する C に加え、Sr や Ba、Ca をフラックスに添加することで六角柱状の結晶が得られることを明らかにした。また、溶液攪拌により、種結晶上成長が促進されることを明らかにした。これらの結果を踏まえて、従来で最も長い 600 時間育成を行った結果、高さ 11mm、幅 9.0mm、X 線ロッキングカーブ半値幅が 20~50 秒と極めて良好な結晶性を有する六角柱状バルク GaN 単結晶成長に成功した^[1]。

(ii) 新規のタンパク質結晶化効率向上手法の開発³⁵

タンパク質の結晶化確率を向上させる新規手法として、フェムト秒レーザーと界面を組み合わせた新規結晶化手法の開発を行った。鶏卵白リゾチームを用いた核発生誘起実験の結果、ゲル-液や気-液界面にレーザー照射することで、条件によっては従来までの溶液中照射より核発生確率が高くなることを示した。また、ゲル-液界面に晶出したインシュリン結晶を溶液攪拌しながら育成することで、従来法(溶液中で静置しながら育成)よりも高品質を有する結晶を得ることに成功した^[2]。

³⁴ 科学研究費補助金基盤研究(B) KAKEN (研究課題「完全バルク GaN 結晶育成技術の研究開発」研究概要(2008-2010 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-20360140/>

³⁵ 科学研究費補助金基盤研究(B) KAKEN (研究課題「レーザー分子注入法によるタンパク質結晶化技術」研究概要(2011-2013 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23360011/>

(iii) 高品位の大口径 GaN 基板の開発³⁶

結晶欠陥低減と大口径化を達成するために、Na フラックス法とポイントシード法を用いて、微小種結晶から無転位・無歪の結晶を育成・合体させ、6 インチ径までの GaN 基板の作製に成功した。また、その上に作製したダイオードでは良好な電気的特性が得られ、結晶欠陥の低減がデバイス性能に有効であることを確認した^[3]。

(iv) レーザーキャビテーションバブルを用いた多形制御³⁷

超音波導入によるキャビテーションバブルを用いた多形制御を行い、溶液の過飽和度と超音波の周波数を最適化することで、100%準安定相が得られることを明らかにした。モデル物質であるインドメタシンおよびアセトアミノフェンの過飽和溶液において、溶液へのレーザー集光位置によって溶液中に起こる物理的な変化が異なることを確認した^[4]。

② 社会・経済への波及効果³⁸

2005 年に森勇介らが設立した株式会社創晶は、レーザー照射による結晶核発生や溶液攪拌による結晶育成といった独創的な発想から生まれた技術を活用し、タンパク質や医薬候補化合物（有機低分子化合物）の結晶化受託を行なっている。起業してから 10 年間で、国内の製薬メーカーや化学メーカー、食品メーカーなどを中心に、幅広い産業分野の企業から注文を受けており、受託実績は 90 社を超える。顧客のニーズに応じて、X 線結晶構造解析やタンパク質生産、結晶輸送「シバックス・クリスタル・ライン」など、受託サービスのラインナップも拡充している。また、タンパク質生産から構造解析までを一括受注する「創薬支援ワンストップサービス」も手掛けている。最近の成果としては株式会社三和化学研究所と共同で、経口糖尿病治療薬の anagliptin（製品名はスイニー）とタンパク質 DPP-4（Dipeptidyl Peptidase-4）の複合体結晶を作製し、X 線結晶構造解析により薬効メカニズムを明らかにした。結晶化が難しいものにも積極的に取り組んでおり、今後も創薬を含む生命科学全般への貢献が期待される。

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 4 報以内

[1] Mori, Y; Imade, M; Murakami, K; Takazawa, H; Imabayashi, H; Todoroki, Y; Kitamoto, K; Maruyama, M; Yoshimura, M; Kitaoka, Y; Sasaki, T, “Growth of bulk GaN crystal by Na flux method under various conditions”, JOURNAL OF CRYSTAL GROWTH, 350, 1, 72-74, 2012.

³⁶ JST_ALCA（研究課題「高品位大口径 GaN 基板の開発」領域概要（2012-2016 年度））

https://www.jst.go.jp/alca/kadai/prj_01.html

³⁷ 科学研究費補助金基盤研究(B) KAKEN（研究課題「レーザーキャビテーションバブルによる結晶多形制御」研究実績の概要（2014-2016 年度））<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26286042/>

³⁸ 産学官連携ジャーナル「株式会社創晶 創薬や生命科学の研究開発を結晶化技術で支援する」2015 年 10 月号

- [2] Imade, M; Imanishi, M; Todoroki, Y; Imabayashi, H; Matsuo, D; Murakami, K; Takazawa, H; Kitamoto, A; Maruyama, M; Yoshimura, M; Mori, Y, “Fabrication of low-curvature 2 in. GaN wafers by Na-flux coalescence growth technique”, APPLIED PHYSICS EXPRESS, 7, 3, 035503, 2014.
- [3] Ikeda, K; Maruyama, M; Takahashi, Y; Mori, Y; Yoshikawa, HY; Okada, S; Adachi, H; Sugiyama, S; Takano, K; Murakami, S; Matsumura, H; Inoue, T; Yoshimura, M; Mori, Y, “Selective crystallization of the metastable phase of indomethacin at the interface of liquid/air bubble induced by femtosecond laser irradiation”, APPLIED PHYSICS EXPRESS, 8, 4, 045501, 2015.
- [4] Tominaga, Y; Maruyama, M; Yoshimura, M; Koizumi, H; Tachibana, M; Sugiyama, S; Adachi, H; Tsukamoto, K; Matsumura, H; Takano, K; Murakami, S; Inoue, T; Yoshikawa, HY; Mori, Y, “Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation”, NATURE PHOTONICS, 10, 723-726, 2016.

④ その他

本研究により、森勇介は、2013 年第 25 回中小企業優秀新技術・新製品賞優秀賞・産学官連携特別賞を受賞、内閣府第 11 回産学官連携功労者表彰日本学術会議会長賞を受賞、2014 年第 3 回大阪大学総長顕彰[研究部門]を受賞、日本学士院第 14 回山崎貞一賞を受賞、日本結晶成長学会第 21 回技術賞を受賞、日本結晶成長学会 40 周年記念学会貢献賞を受賞、2015 年第 4 回大阪大学総長顕彰[研究部門]を受賞、文部科学省文部科学大臣賞を受賞、2016 年電子デバイス産業新聞半導体・オブ・ザ・イヤー2016 半導体用電子材料部門グランプリを受賞した。また、2005 年に大阪大学発ベンチャーとして株式会社創晶を設立している。

3.2.5. 次世代無侵襲・定量的脳機能イメージング法の開発(吉岡 芳親)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況³⁹

① 研究のねらい

機能的磁気共鳴画像法(fMRI)、脳磁図法(MEG)、近赤外分光法(NIRS)などの脳機能計測法が進歩し、非侵襲的に高時空間分解能で脳活動部位を知ることができるようになってきた。しかし、どの程度脳が活動しているのか、ヒトの脳活動を定量的に非侵襲的に詳細に評価することは困難である。そこで、脳波、心電図、呼吸等の脳の活動情報が反映される多種の生理学的指標と、非侵襲的な定量計測(温度・代謝量)が期待される磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)、fMRI、NIRSの同時計測法を確立し、非侵襲的計測法に盛り込まれた生理学的情報に基づいて、計測法を定量化できるようにすることを目指した。この計測法は、ヒト脳の覚醒安静時・活動時や睡眠時の脳活動を定量的に解析できる次世代無侵襲・定量的脳機能イメージング法となる(図3-9)。

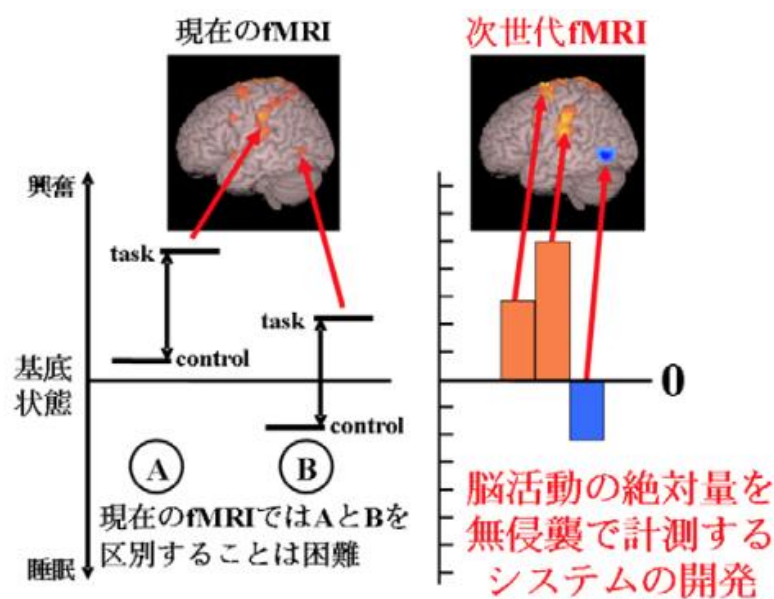


図 3-9 次世代 fMRI⁴⁰

³⁹ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「次世代無侵襲・定量的脳機能イメージング法の開発」(2005-2010年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei17/seimei/04yoshioka.pdf

⁴⁰ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「次世代無侵襲・定量的脳機能イメージング法の開発」(2005-2010年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei17/seimei/04yoshioka.pdf

② 期間中の研究成果

(i) 高精度脳温計測技術の開発

脳活動を定量的に評価できる可能性がある脳の温度に注目し、開発を行った。高精度に脳内温度を計測するため、装置の安定性を見直し、新規の測定シーケンス・受信コイル・解析方法の開発を進めた。装置の安定性と新規受信コイルの S/N の向上により、測定精度並びに時間分解能を向上させた。さらに、生理的条件下での各種刺激や負荷を行えるようにし、いくつかの生理学的パラメータを同時計測できるようにした。運動負荷や飲水といった生理的条件下でも脳内温度は容易に 0.5°C 程度変化することが分かった。日常的な口腔内刺激や発熱時の温度変化も評価できるようになった。脳温の変化を指標として、運動負荷による脳活動時や鎮静剤を用いた場合の脳のエネルギー変化を推算した。掌握運動や下腿部の運動では $20\text{mW}\sim 0.5\text{W}$ レベルの上昇であり、鎮静剤の場合には、脳全体と考えると、 0.5W レベルの減少であった。このように、脳の温度から、脳活動の変化をエネルギーの面から定量的に評価できるようになった。ヒトの脳では、一般的に呼ばれる脳活動においては、さほどエネルギー消費はしていないことが示された。脳内温度の臨床応用のため、患者症例のデータも蓄積し、温度と PET で得られる脳循環代謝と比較できるようにした。脳内温度により、一側性脳主幹動脈閉塞性病変による慢性脳虚血の脳酸素代謝量低下および脳酸素摂取率上昇を高い精度で計測することが分かった。さらに、脳内温度は、頸動脈狭窄症に対する内膜剥離術後合併症である過灌流の発生を、高い精度で術前に予知することも分かった。今までは PET や SPECT といった造影剤を用いた検査でなければ知り得なかった手術適応や術後予測に活用でき、スクリーニングに十分使用することが分かった。二次元計測でも精度が向上し、脳内温度分布の時間変化を画像化できた。二次元では高速撮像シーケンスを新規に開発し、約 40 秒で脳温度画像を取得できるようにした。

(ii) 神経-脳血流・脳温変化の基礎理論の構築

神経活動に伴う脳局所の温度変化を高精度に計測可能なシステムを構築し、脳温とともに生理学的パラメータの変化を定量的に測定することにより、脳内温度イメージング法の理論的・生理学的裏付けを行った。ラット脳スライス切片や麻酔下のラット脳表での温度を 0.01°C 以下(ミリケルビンレベル)で測定可能なシステムを構築した。脳スライス切片を用いて、血流に影響されない条件下で、脳活動に伴う温度変化を計測できた。ラットの下肢やヒゲの刺激に伴い、刺激開始数秒後にピークを持つ脳温度の上昇を観察でき、脳活動と脳温度変化を対応させた。

(iii) fMRI/NIRS と生理学的指標の同時計測技術の開発による脳活動計測の定量化

fMRI 計測定量化のためのマルチモーダル fMRI 計測システムの構築を行い、このシステムを用いて、覚醒レベルの変動に伴う自発性脳活動ネットワークの変化と、fMRI による定量

的計測のための自律神経活動と fMRI 信号の対応を検討した。マルチモーダル fMRI 計測システムの構築では、脳波をはじめ筋電図・眼電図及び心電図や、呼吸などの自律神経系を含む神経生理学的指標、更に被験者のモニター映像を時間的に同期して記録・解析できる計測システムを構築した。この計測・解析システムは、覚醒～睡眠時の電気生理学的神経活動に伴う賦活部位を fMRI で正確に同定できるシステムとして関心を集め、多くの研究機関に対してシステムの紹介や技術的指導を行っている。このシステムを用いて覚醒レベルの変動に伴う自発性脳活動ネットワークの変化を調べ、覚醒時・浅い NREM 睡眠・深い NREM 睡眠・REM 睡眠における自発性脳活動ネットワークの特性を明らかにした。最近脚光を浴びている DMN (Default Mode Network) の先行研究では、DMN が脳死状態では消失し、深い NREM 睡眠では減弱する事から、DMN が意識レベルをダイレクトに反映している可能性が示唆されていた。しかし、今回の結果では、深い NREM 睡眠でも DMN に顕著な減弱は認められず、覚醒～睡眠段階の変化に伴う DMN の変化は、各睡眠段階に特有の脳活動を反映している事が示唆された。fMRI による定量的計測のための自律神経活動と fMRI 信号の対応では、同時計測した心電図(心拍)・呼吸の変動が fMRI 信号に及ぼす影響を明らかにするとともに、これらの自律神経系の変動による fMRI 信号の変化を nuisance regressor として除去し、脳活動に伴う fMRI 信号を抽出する方法を確立した。

(iv) 高度生体機能イメージング技術の開発

動物を用いて新規機能イメージング法の開発を行うと共に、侵襲的ではあるが、電極・熱電対・血流計を束ねたマイクロプローブによる同時計測も行えるようにし、脳機能計測の理論的・生理学的裏付けを行った。脳活動量と温度上昇量がほぼ対応していることを示すことができた。瞬時的な脳活動のみならず、長時間的な神経可塑性や記憶に関わる基質的・生理的变化の描出も行うことができるようになった。細胞レベルでの超高感度・高機能撮像のための高感度プローブや機能・分子イメージングプローブの開発も同時に行った。In vivo での磁気共鳴と光のデュアル計測のため、近赤外蛍光を用いることとし、従来のプローブに比し数十倍の高感度プローブを合成できた。マウスを使用したテストでも、良好な近赤外イメージングが可能で、MRI でも造影効果がある事を確認し、特許申請した。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

[1] Satoh, T; Yoshioka, Y, "Contribution of reduced and oxidized glutathione to signals detected by magnetic resonance spectroscopy as indicators of local brain redox state", NEUROSCIENCE RESEARCH, 55, 34-39, 2006.

[2] Ishigaki, D; Ogasawara, K; Yoshioka, Y; Chida, K; Sasaki, M; Fujiwara, S; Aso, K; Kobayashi, M; Yoshida, K; Terasaki, K; Inoue, T; Ogawa, A, "Brain Temperature Measured Using Proton MR Spectroscopy Detects Cerebral Hemodynamic Impairment in Patients With Unilateral Chronic Major Cerebral Artery Steno-Occlusive Disease: Comparison With Positron Emission Tomography", STROKE, 40, 3012-3016, 2009.

[3] Inui-Yamamoto, C; Yoshioka, Y; Inui, T; Sasaki, K; Ooi, Y; Ueda, K; Seiyama, A; Ohzawa, I, “The brain mapping of the retrieval of conditioned taste aversion memory using manganese-enhanced magnetic resonance imaging in rats”, NEUROSCIENCE, 167, 2, 199-204, 2010.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後に、科学研究費補助金基盤研究(A)「磁気共鳴法による免疫ダイナミズムの非侵襲的可視化法の開発」(2016-2021)の研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献

(i) プロトン MR スペクトロスコピーを用いた脳循環代謝の評価

頸部内頸動脈狭窄症における予防的外科治療である頸動脈内膜剥離術(CEA)においては、術後合併症として脳出血や高次脳機能障害がある。そこで、患者 100 人について、非侵襲的な測定が可能な 3T プロトン MR スペクトロスコピーを用いて、術前と術後の脳の代謝産物(N-アセチルアスパラギン酸や、コリン、クレアチン)変化を調べた。その結果、術後に見られる脳代謝産物の変化は予後と相関することが明らかになった^[1]。

(ii) 脳内食行動調節機構の解明⁴¹

おいしさと記憶による食行動の調節機構を明らかにするために、味覚嫌悪学習における記憶の成立と嗜好性の変化を個別に分析し、その神経メカニズムを調べた。行動学的実験において、新規に実験装置を開発し、ラットの飲み口への接近を検出することで記憶の成立を定量的に解析する方法を確立した。また、飲み口へのリックを検出することで摂食行動のパターンを分析し、嗜好性の変化を明らかにする方法を確立した。これらの方法に基づいて、行動薬理学的実験を行い、扁桃体基底外側核が味覚嫌悪学習における記憶の成立と嗜好性の変化の両方の機能において非常に重要な役割を果たしていることを明らかにした^[2]。

(iii) マウス脳内への貪食細胞の移動機構の解明⁴²

最近の研究で、免疫細胞が多くの神経関連疾患の発生に重要な役割を担うことが分かってきた。免疫細胞は、恒常性の目印となる因子群のレベルに異常がないか、脳の微小血管系を常時監視している。異常があった場合、免疫反応が始まり、中枢神経系(CNS)内のミクログリアの動員、または末梢からの細胞の浸潤、あるいはその両者が起こる。しかし、正

⁴¹ 科学研究費補助金基盤研究(C) KAKEN (研究課題「おいしさと記憶の相互作用による脳内食行動調節機構の解明」研究成果の概要(2012-2014年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-24500973/>

⁴² natureasia.com「想像図からリアルタイムMRIへ：貪食細胞のマウス脳内への移動を生きたまま追跡する」(2014年11月11日) <http://www.natureasia.com/ja-jp/srep/abstracts/59404>

常状態・疾病状態での免疫細胞の動態には、不明な点が多い。それは、生きた組織内での細胞の動きを、低侵襲で長期にわたって可視化することが難しかったためである。そこで、CNS内の細胞移動を単一細胞レベルで連続的に追跡する目的で、高感度生体MRI（磁気共鳴イメージング）技術を開発した。MRIと超常磁性酸化鉄粒子（SPIO）の血管内投与を組み合わせることで、末梢の貪食細胞が、正常およびリポ多糖投与マウスの脳内部に移行する様子を追跡できた。また、MRIのタイムラプス動画により、生きた動物脳内での細胞移動の様子を示すことにも成功した^[3]。

(iv) MRIによる非侵襲的生体機能イメージングを用いた薬理作用解析⁴³

無麻酔条件下のラットにおける脳血液量(rCBV: relative cerebral blood volume)を指標としたfMRI実験系を構築し、注意欠陥多動性障害の治療薬であり、ドパミントランスポータとノルアドレナリントランスポータに対する阻害作用を有するMethylphenidateと共に、ドパミン遊離促進剤であるAmphetamine及び選択的ドパミントランスポータ阻害剤であるGBR12909による神経作用を解析した。その結果、いずれの薬剤も線条体や前頭前野皮質等のドパミン神経関連領域におけるrCBVを増加させ、類似したrCBV反応パターンが認められた。さらに、MethylphenidateのrCBV反応に対するDSP-4 [N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzyl-amine]によるノルアドレナリン神経破壊の影響について検討を行った結果、MethylphenidateによるrCBV増加反応はいずれの領域においても抑制されず、ドパミン関連領域において増強した。このことから、Methylphenidateによる神経作用としてはノルアドレナリン神経の関与は少なく、ドパミン神経が主に寄与していることが示唆された^[4]。

② 社会・経済への波及効果⁴⁴

吉岡らの研究グループは、神経系や免疫系のように統合された生体システムの機能を明らかにするための可視化技術の開発に力を入れている。脳機能のような、ヒトの体のダイナミックな機能を理解するためには、詳細な機能計測のためのイメージング技術が重要かつ必須である。しかし、神経系、免疫系、内分泌系の相互作用を非侵襲的なイメージング技術を用いて可視化するための評価方法は確立されていなかった。そこで吉岡らは、磁気共鳴法や超高磁場MRI装置を用いて、生きたそのままの状態で、ヒトや実験動物において構造、機能、代謝など多様な情報を得る事ができる、非侵襲かつ高分解能で、繰り返し測定のできる機能イメージング技術開発を試みた。その結果、今までは容易ではなかったヒトの脳内の温度の非侵襲的な測定を可能にし、脳活動に伴う変化を明らかにした。動物を用いた実験では、

⁴³ Osaka University Knowledge Archive「MRIによる非侵襲的生体機能イメージングを用いた薬理作用解析に関する研究」論文内容の要旨（2014年度）http://ir.library.osaka-u.ac.jp/dspace/bitstream/11094/52243/1/27773_%E8%A6%81%E6%97%A8.pdf

⁴⁴ 脳情報通信融合研究センターCiNet 研究者紹介ページ <https://cINET.jp/people/20151372/>

体内深部のダイナミックな免疫細胞の動きを、非侵襲的に 1 細胞レベルで追跡できるようにした。細胞・マウス・ラット等を用いた詳細な検討とともに、ヒトを対象とした機能解析といった、「細胞レベルからヒトレベルまで」を包括的に行うことで、今まで詳細な解析が困難であった神経系や免疫系の機能解明への寄与が期待される。

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 4 報以内

- [1] Saito, H; Ogasawara, K; Nishimoto, H; Yoshioka, Y; Murakami, H; Fujiwara, S; Sasaki, M; Kobayashi, M; Yoshida, K; Kubo, Y; Beppu, T; Ogawa, A, “Postoperative Changes in Cerebral Metabolites Associated with Cognitive Improvement and Impairment after Carotid Endarterectomy: A 3T Proton MR Spectroscopy Study”, AMERICAN JOURNAL OF NEURORADIOLOGY, 34, 976-982, 2013.
- [2] Inui, T; Inui-Yamamoto, C; Yoshioka, Y; Ohzawa, I; Shimura, T, “Activation of efferents from the basolateral amygdala during the retrieval of conditioned taste aversion”, NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY, 106, 210-220, 2013.
- [3] Mori, Y; Chen, T; Fujisawa, T; Kobashi, S; Ohno, K; Yoshida, S; Tago, Y; Komai, Y; Hata, Y; Yoshioka, Y, “From cartoon to real time MRI: in vivo monitoring of phagocyte migration in mouse brain”, SCIENTIFIC REPORTS, 4, 6997, 2014.
- [4] Kashiwagi, Y; Rokugawa, T; Yamada, T; Obata, A; Watabe, H; Yoshioka, Y; Abe, K, “Pharmacological MRI Response to a Selective Dopamine Transporter Inhibitor, GBR12909, in Awake and Anesthetized Rats”, SYNAPSE, 69, 203-212, 2015.

3.3. 2006 年度採択研究課題

3.3.1. 高精度 1 分子内動画計測から見える生体分子構造認識プロセス (佐々木 裕次)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況⁴⁵

① 研究のねらい

タンパク質分子が機能発現する際に起こる分子内部の構造変化情報を、マイクロ秒の高速性かつ Å 以下の高精度性で 1 分子検出することは、多くの生命現象の素過程を理解する最善策である。そこで、着目した 1 分子からの動的構造情報を in vivo において高感度計測するために、実験室規模の装置で 1 分子計測システムを実現することを目的とした。位置決定精度を高精度にするために、超短波長プローブである X 線や電子線を用い、X 線 1 分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT (基本特許申請済)) ではミリ秒からマイクロ秒レベルで、電子線 1 分子追跡法 (Diffracted Electron Tracking: DET (基本特許申請済)) では数十ミリ秒の 3 次元動画計測を目標とした (図 3-10)。

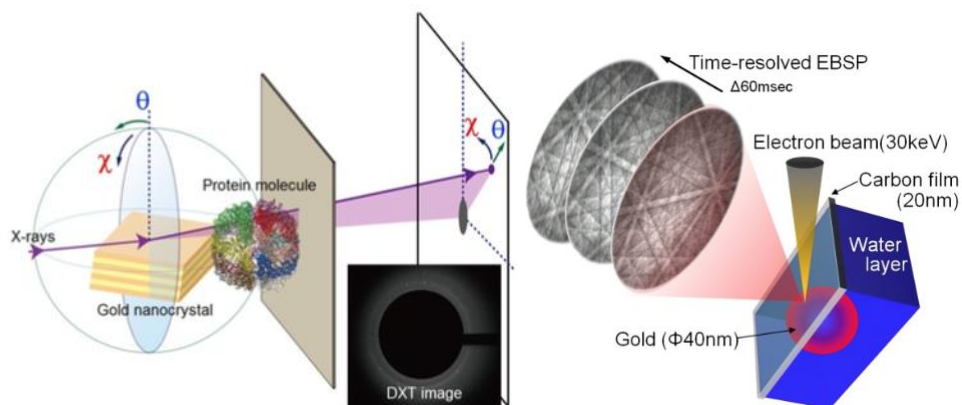


図 3-10 DXT 原理 (左) と DET 原理 (右) ⁴⁶

② 期間中の研究成果

(i) 分子内部運動の可視化

⁴⁵ JST_CREST 研究終了報告書 (研究課題「高精度 1 分子内動画計測から見える生体分子構造認識プロセス」(2006-2011 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/02_01.pdf

⁴⁶ JST_CREST 研究終了報告書 (研究課題「高精度 1 分子内動画計測から見える生体分子構造認識プロセス」(2006-2011 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/02_01.pdf

nAChR（ニコチン性アセチルコリン受容体）及びそのリガンド結合部位のホモログである AChBP に DXT を適用した。100 μ s の時間スケールで計測をすることで分子内部運動の可視化に成功した。得られた運動パターンは rotation と tilt がステップ的に現れる運動であった。この運動が観測される確率はそれほど高くないが、rotation と tilt の両方の運動が重要であることは間違いない。これは ACh 系における世界初の分子内運動計測である。

(ii) T 細胞受容体 (TCR) と組織適合性抗原 (MHC) の認識機構解明

リガンドとして I-Ak と、I 型糖尿病を起こす I-Ag7 を選び、DXT 計測した。その結果、抗原ペプチドが MHC とは独立に運動することが確認でき、その運動が日単位で経時的に減少していくことも分かった。次に抗原ペプチドの回転運動と T 細胞の活性化がほぼ関連することを見出した。抗原ペプチドが動くことにより準安定状態を作り、それを TCR が認識するという全く新しい認識機構が示唆された。

(iii) DET 計測法の汎用化

DET で従来の自作金ナノ結晶の代わりに市販金コロイドを用いて良好な電子後方散乱回折像 (EBSP) の取得に成功した。これは全く期待していなかった成果で、本計測法を汎用法として広めるブレイクスルーである。金コロイドで水中のブラウン運動を計測した結果、金ナノ結晶より大きな運動として捉えられ、更には金ナノ結晶では捉え切れなかった電子線による局部励起が起因する 3 次元の異方性を持つ運動性が確認された。これにより、3 次元 1 分子計測技術が確立された。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Shimizu, H; Iwamoto, M; Konno, T; Nihei, A; Sasaki, YC; Oiki, S, “Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon Gating”, CELL, 132, 1, 67-78, 2008.
- [2] Okumura, Y; Oka, T; Kataoka, M; Taniguchi, Y; Sasaki, YC, “Picometer-scale dynamical observations of individual membrane proteins: The case of bacteriorhodopsin”, PHYSICAL REVIEW E, 70, 2, 1, 021917, 2004.
- [3] Sekiguchi, H; Suzuki, Y; Nishino, Y; Kobayashi, S; Shimoyama, Y; Cai, WY; Nagata, K; Okada, M; Ichiyonagi, K; Ohta, N; Yagi, N; Miyazawa, A; Kubo, T; Sasaki, YC, “Real Time Ligand-Induced Motion Mappings of AChBP and nAChR Using X-ray Single Molecule Tracking”, SCIENTIFIC REPORTS, 4, 6384, 2014.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後に、科学研究費補助金基盤研究 (A) 「コンパクト X 線 1 分子計測装置の実現と複合計測法開発」(2010-2012)、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「マイクロ回折粒子を用いた中性子 1 分子追跡法の実現」(2014-2015)、科学研究費補助金新学術領域研究 (研究

領域提案型)「バイオロジーにおける 3D 活性サイト科学」(2014-2018)、科学研究費補助金基盤研究(A)「実験室における天然変性タンパク質の X 線 1 分子動態計測装置開発」(2015-2017)などの研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献

(i) 新規の DXT 装置の開発⁴⁷

2000 年に大型放射光施設を用いた X 線 1 分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking:DXT)を提案し、それ以来、ポリマーや DNA 分子、抗原抗体反応、そして機能性膜タンパク質と分子内運動をマイクロ秒からミリ秒レベルで、かつピコメートルという超高精度で高速 1 分子計測してきた。この高精度 1 分子追跡法を実験室レベルで計測可能とする装置開発を行い、汎用的手法として確立させた。直径 100-800nm サイズの完全ナノ結晶作製技術の確立、デモ的な実験室レベル X 線光源として放射光施設を用いての高効率集光化、そして、究極的信号バックグラウンドの低減対策を放射光施設で実現した^[1]。

(ii) 中性子 1 分子追跡法の開発⁴⁸

直径マイクロメートル以下の中性子回折する微結晶を目的分子に標識し、秒レベルの時間分割で中性子 1 分子追跡法(Diffracted Neutron Tracking :DNT)を開発した。同様の発想で X 線及び電子線において 1 分子追跡法はすでに実現させており、これで 3 大量子ビームを用いた 1 分子追跡法が完成した。X 線 1 分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking ;DXT)では、多くの機能性タンパク質分子の機能に伴う分子内部動態計測を実現してきた^{[2][3]}。中性子をプローブに用いる最大の利点は、そのダメージレスである。これにより X 線や電子線では全くできなかった長時間時間分割測定が初めて可能になった。さらに、標識可能なナノ結晶の素材を決定するために、金ナノ結晶とダイヤモンド結晶の中性子回折評価を行った。その結果、直径 0.1 ミクロンのダイヤモンド結晶の方が、非常に高感度であることを証明した。

(iii) タンパク質単結晶の蛍光 X 線ホログラフィー測定⁴⁹

直径 5-6mm の巨大ヘモグロビン(Hb)単結晶の作製に成功し、蛍光 X 線ホログラフィー測定に成功した。この実験で、2 日間 X 線を照射しても、その後の測定したタンパク質単結晶

⁴⁷ 科学研究費補助金基盤研究(A) KAKEN (研究課題「コンパクト X 線 1 分子計測装置の実現と複合計測法開発」研究の概要 (2010-2012 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-22241032/>

⁴⁸ 科学研究費補助金挑戦的萌芽研究 KAKEN (研究課題「マイクロ回折粒子を用いた中性子 1 分子追跡法の実現」研究実績の概要 (2014-2015 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-26600140/>

⁴⁹ 科学研究費補助金新学術領域研究 (研究領域提案型) KAKEN (研究課題「バイオロジーにおける 3D 活性サイト科学」研究実績の概要 (2014-2018 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-26105005/>

からの回折パターンに乱れがなかったことが確認できた。さらに、この Hb をサンプルにして X 線 1 分子追跡法による計測を行い、R-R2 転移というアロステリック転移に近い構造変化を捉えることに成功した。X 線 1 分子追跡法を用いることで、無機材料系の過飽和現象のナノスケールダイナミクスの測定に成功した。また、そのタンパク質バージョンの 1 分子計測にも成功し、過飽和現象における新しい物性研究の展開が期待される。X 線 1 分子追跡法を用いた他のサンプル系としては、今まで分子内の活性サイトが不明であった天然変性タンパク質分子の活性中心と考えられる部位の決定と、その動的挙動を捉えることに成功した^[4]。

② 社会・経済への波及効果⁵⁰

佐々木らの研究グループは、変性してしまったタンパク質分子を修復する機能を持つシャペロニンタンパク質分子の内部運動を、1 分子でリアルタイムに高精度計測することに初めて成功した。シャペロニンは 8 量体のリング構造が 2 つ重なったシリンダ構造をとるが、ATP (アデノシン三リン酸) と結合した後にリング内の一部が構造変化し、その後、リング全体で同期した反時計方向へのドミノ倒しに似たねじれ運動を伴って、開状態から閉状態へ移行することがわかった。これらの一連の運動は、1998 年に佐々木が考案し開発した X 線 1 分子追跡法 (DXT) を用いて、30 ミリ秒の時間分解能で、ピコメートルの位置決定精度で計測された。今までは静止画として何枚も撮影して、一連の運動を予測していたが、実時間で見ることで、分子内部運動にどのような協同性があるかを定量的に議論できることが明確となった。分子生物学では今まで、分子は構造を持った静止体 (点) として認識してきた。しかし、今回計測した分子内部運動という新しい物性を高速高精度計測することで、今後、創薬の戦略指針や分子間相互作用の考え方が全く違ったものになる可能性もある。例えば、鍵と鍵穴のような創薬ではなく、機能発現に必須な分子運動のみを阻害する「分子内運動阻害分子」の設計が重要になることが考えられる。そして、この新規創薬分子が非常に機能依存であればあるほど、薬剤による副作用効果激減への新しい戦略となることが期待される。

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 4 報以内

[1] Sekiguchi, H; Nakagawa, A; Moriya, K; Makabe, K; Ichiyanagi, K; Nozawa, S; Sato, T; Adachi, S; Kuwajima, K; Yohda, M; Sasaki, YC, “ATP dependent rotational motion of group II chaperonin observed by X-ray single molecule tracking”, PLOS ONE, 29, 8, 5, 64176, 2013.

[2] Ogawa, N; Hirohata, Y; Sasaki, YC; Ishikawa, A, “Time-resolved measurement of the three-dimensional motion of gold nanocrystals in water using diffracted

⁵⁰ 東京大学「世界初、タンパク質修復に新たな分子内運動を発見」～ドミノ倒し運動から見えた驚きの生体分子機構～ (2013 年 5 月 30 日) <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130530/>

electron tracking”, ULTRAMICROSCOPY, 140, 1, 2014.

[3] Ichiyanagi, K; Sekiguchi, H; Hoshino, M; Kajiware, K; Hoshisashi, K; Jae-won, C; Tokue, M; Matsushita, Y; Nishijima, M; Inoue, Y; Senba, Y; Ohashi, H; Ohta, N; Yagi, N; Sasaki, YC, “Diffracted X-ray Tracking for monitoring intramolecular motion in individual protein molecules using broad band X-ray”, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 84, 103701-6, 2013.

[4] Sato-Tomita, A; Shibayama, N; Happo, N; Kimura, K; Okabe, T; Matsushita, T; Park, SY; Sasaki, YC; Hayashi, K, “Development of an X-ray fluorescence holographic measurement system for protein crystals”, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 87, 6, 063707, 2016.

3.3.2. カーボンナノチューブを用いた単一生体分子ダイナミクスの計測(中山 喜萬)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況⁵¹

① 研究のねらい

生体内反応の多くは、それに関与する生体分子の構造変化や相互作用、エネルギー移動を伴って、連続した時間軸の中で進行する。本研究は、タンパク質一分子の連続した反応過程の解明に資するために、数ミリ秒の時間分解能でzeptogram精度の質量とpiconewton精度の2次元力、アトジュール精度の熱量を計測する技術を構築することを目的とした。具体的には、これまでにない優れた電氣的、機械的および熱的性質をもち、タンパク質より充分小さな直径をもつカーボンナノチューブ(CNT)を用いてアームを製作し、その変位、振動数、熱流の計測を行うための技術を確立することを目指した(図 3-11)。

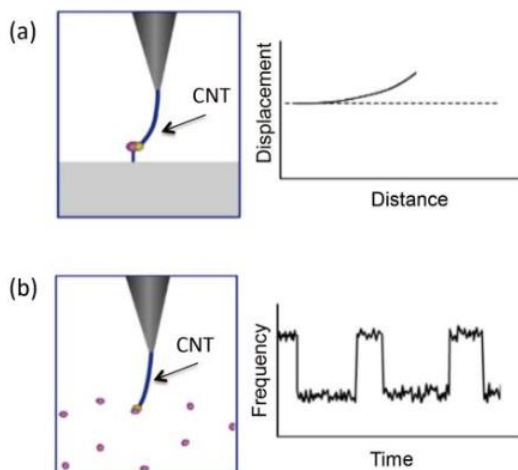


図 3-11 (a)力計測モードと(b)質量計測モード⁵²

② 期間中の研究成果

(i) CNT を用いた単一生体分子ダイナミクスの計測

シリコンプローブに CNT アームを取り付け、その先端に importin α を部位特異的に捕捉し、importin β との特異的結合の有無を原子間力顕微鏡によるフォースカーブにより調べた。アジド基を組み込んだ非天然アミノ酸によるタンパク質の部位特異的ラベル化とスタ

⁵¹ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「カーボンナノチューブを用いた単一生体分子ダイナミクスの計測」(2006-2011 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/02_02.pdf

⁵² JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「カーボンナノチューブを用いた単一生体分子ダイナミクスの計測」(2006-2011 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/02_02.pdf

ウディンガー反応による CNT 先端へのタンパク質の部位特異的捕捉が行われていること、また CNT 先端に捕捉されたタンパク質の活性が失われていないことを実証した。

(ii) 片持ちはり CNT の振動計測

片持ちはり CNT の振動を液中で光学的手法により計測した。CNT の一次振動は粘性減衰のため消失し、2 次振動を観測した。また、分子動力学計算および連続体モデルを基にした粘性減衰論から観測した振動周波数の水中における温度依存性が説明でき、水中での多層 CNT の振動が連続体モデルで説明できることを明らかにした。

(iii) 褐色脂肪細胞の一細胞レベルでの熱計測

数個の細胞からの発熱をバイメタルカンチレバーにより初めて計測した。褐色脂肪細胞の熱量計測は成人病予防などに対する基本的な原理解明に重要なものである。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内

- [1] Yoshimura, SH; Khan, S; Maruyama, H; Nakayama, Y; Takeyasu, K, “Fluorescence Labeling of Carbon Nanotubes and Visualization of a Nanotube-Protein Hybrid under Fluorescence Microscope.” BIOMACROMOLECULES, 12, 4, 1200-1204 (2011)
- [2] Maruyama, H; Yoshimura, SH; Akita, S; Nagataki, A; Nakayama, Y; “Covalent attachment of protein to the tip of a multiwalled carbon nanotube without sidewall decoration” JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, 102, 9, 094701 (2007)
- [3] Akita, S; Sawaya, S; Nakayama, Y; “Energy loss of carbon nanotube cantilevers for mechanical vibration” JAPANESE JOURNAL OF APPLIED PHYSICS PART 1-REGULAR PAPERS BRIEF COMMUNICATIONS & REVIEW PAPERS, 46, 9B, 6295-6298 (2007)

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後に、科学研究費補助金基盤研究(A)「カーボンナノチューブ層間滑りに置けるエネルギー損失-リニア振動子の構築に向けて-」(2011-2013)が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献⁵³

両端が太く真ん中が細い(ダンベル形状)カーボンナノチューブ(CNT)の中に電荷を持たせたカプセル状 CNT を内包し、外部電界でギガヘルツオーダーの高い周波数で振動するリニア振動子を製作し、CNT 間の滑りによるエネルギー損失の計測と、実用的な振動子の設計

⁵³ 科学研究費補助金基盤研究(A) KAKEN (研究課題「カーボンナノチューブ層間滑りにおけるエネルギー損失-リニア振動子の構築に向けて-」研究概要(2011-2013 年度))
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23241045/>

指針を明らかにするため、リニア振動子を製作するための要素技術の構築や装置の開発を行い、電荷を付与した CNT カプセルを実現し、ダンベル形状の CNT を実現した^{[1][2]}。

② 社会・経済への波及効果⁵⁴

発見当初、カーボンナノチューブ (CNT) は簡単な装置で合成できるが、長さや太さ構造が不揃いで、精製分別も困難な状態だった。現在でもこの状況は同じであるが、理論的に予測される性質はとても魅力のあるものであり、原子間力顕微鏡探針として実用化され、ナノエレクトロニクスや高機能樹脂複合材、燃料電池電極、平面型ディスプレイ電極に向けた優れた特性が実証され、応用展開が大いに期待されている。本研究は、CNT をあるがままに使うのではなく、加工して新しい機能を与えることを目指すものであり、今後のナノテクノロジーの進展に貢献することが期待される。

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 4 報以内

[1] Nakayama, Y; Senga, R; Hirahara, K, “Carbon nanotube electromechanical devices”, PROCEEDINGS OF THE 12TH ASIA PACIFIC PHYSICS CONFERENCE, 1, 012064, 2014.

[2] Fallah, A; Yonetani, Y; Senga, R; Hirahara, K; Kitaura, R; Shinohara, H; Nakayama, Y, “Thermal/electron irradiation assisted coalescence of Sc₃N@C₈₀ fullerene in carbon nanotube and evidence of charge transfer between pristine/coalesced fullerenes and nanotubes”, NANOSCALE, 7, 5, 23, 11755–60, 2013.

④ その他

本研究の基礎となる成果により、2012 年文部科学省平成 24 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰科学技術賞を受賞した。

⁵⁴ 阪大フロンティア研究機構企画 FRe-大学 第 5 講座「カーボンナノチューブの基礎と応用」
<http://www.fre.jp/lecture/nakayama.html>

3.3.3. ns-nm 分解能の光子・電子ハイブリッド顕微鏡の開発(永山 國昭)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況⁵⁵

① 研究のねらい

生物試料を見る電子顕微鏡技術は最近まで重金属染色が必須だったが、急速凍結技術と位相差法の融合で無染色の凍結試料の電顕像が高コントラストで撮れるようになった。そこで、これをさらに一歩進め常温常圧の生きた試料をそのまま電顕で観察する方法を確立するために、i)位相差電子顕微鏡の高度化と応用、ii)パルス電子銃による電線損傷軽減法、iii)電子・光子ハイブリッドレンズ系の確立などを進め、それら要素技術が一体化された電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発を目指した(図 3-12)。

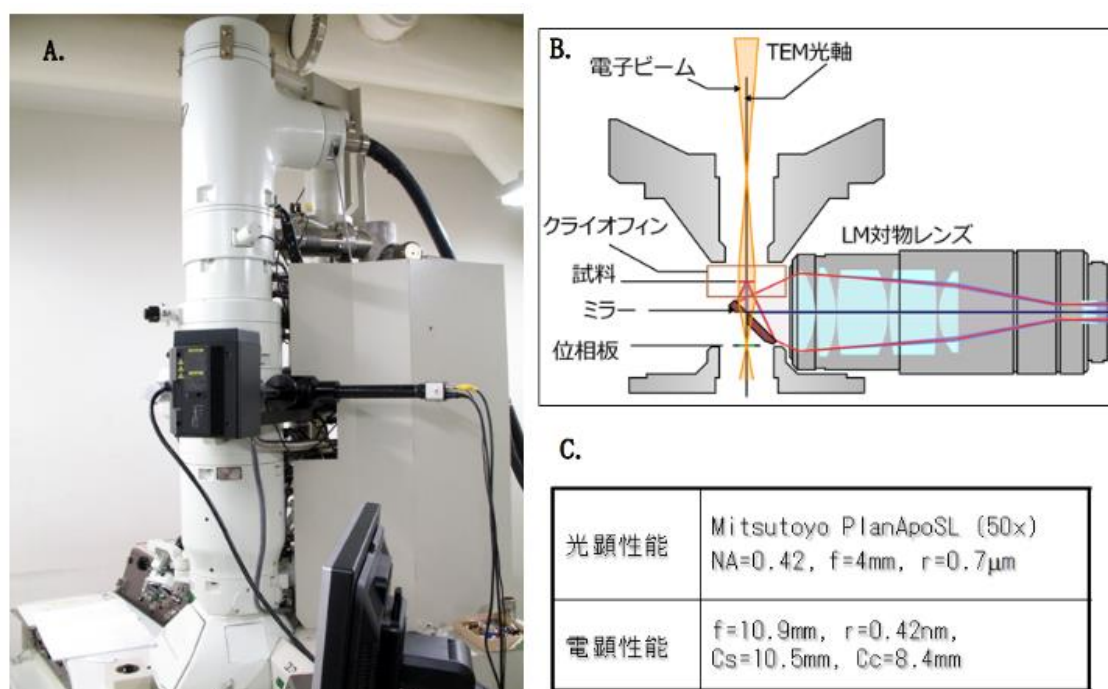


図 3-12 電子・光子ハイブリッド顕微鏡 (A) 外観 (B) デザイン (C) 性能⁵⁶

② 期間中の研究成果

(i) 位相差電子顕微鏡の高度化と応用

⁵⁵ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「ns-nm 分解能の光子・電子ハイブリッド顕微鏡の開発」(2006-2009 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/06nagayama.pdf

⁵⁶ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「ns-nm 分解能の光子・電子ハイブリッド顕微鏡の開発」(2006-2009 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/06nagayama.pdf

ベクトルポテンシャルによる電子線位相変調現象、いわゆる AB (Aharonov-Bohm) 効果を位相板法の 1 つ、ヒルベルト微分法に応用した。各種微小磁石 (コバルト、ニッケル、パーマロイ) の加工法を確立し、各種性能テストを行い、ほぼ期待通りの位相変化が見られた。また導入された基本体 200kV 電顕に位相差トモグラフィシステムを付加し応用の高度化を図った。タンパク質、ウイルス、オルガネラ立体構造観察に大きな成果があった^[1,2]。

(ii) パルス光電子による電子線損傷軽減法の開発

可視光に対し量子効率の高いセシウム素光電子材料 (Cs_3Sb) を塗布した光電子を高効率に発生させる光電子銃の製作に供される光電子銃作製装置 (光電子エミッター作製用蒸着装置) を作製した。

(iii) 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発と電子像光子像同時観察

位相差法は無染色または光顕染色生物試料の観察に有効であり、その利点を生かした電子顕微鏡と光学顕微鏡のハイブリッド顕微鏡の製作を行った。完成した装置を用いて、生物テストを行い、電子像光子像同時観察に関し成果を得た。またこのハイブリッド顕微鏡の持つ新規性 (電子と光同時照射と同時検出) が有利に作用し、有機物蛍光体に関し電子と蛍光のカップルに関する新規発見があった^[3,4]。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内 (被引用トップ 3 位)

[1] Akita, H; Kudo, A; Minoura, A; Yamaguti, M; Khalil, IA; Moriguchi, R; Masuda, T; Danev, R; Nagayama, K; Kogure, K; Harashima, H, “Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process”, BIOMATERIALS, 30, 15, 2940-2949, 2009.

[2] Murata, K; Liu, XA; Danev, R; Jakana, J; Schmid, MF; King, J; Nagayama, K; Chiu, W, “Zernike Phase Contrast Cryo-Electron Microscopy and Tomography for Structure Determination at Nanometer and Subnanometer Resolutions”, STRUCTURE, 18, 8, 903-912, 2010.

[3] Sasaki, K; Kogure, K; Chaki, S; Nakamura, Y; Moriguchi, R; Hamada, H; Danev, R; Nagayama, K; Futaki, S; Harashima, H, “An artificial virus-like nano carrier system: enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives”, ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 391, 8, 2717-2727, 2008.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後に、A-STEP 実用化挑戦ステージ実用化挑戦タイプ (中小・ベンチャー開発) 「電子顕微鏡用無帯電位相板」(2011-2015) の研究が進められた。

① 科学技術の進歩への貢献

(i) 位相差電子顕微鏡に用いる新しい原理に基づいた位相板の開発⁵⁷

位相差電子顕微鏡は、生物試料のような軽い元素(C、N、O)からなる試料の無染色観察に必須の技術である。従来の電子顕微鏡用の位相板は、FIB(フォーカスイオンビーム装置)などの超微細加工技術によって加工された炭素薄膜を用いていた。これは電子線が透過する際に感じる固体炭素の内部電位を利用するものである。しかし、薄膜による電子散乱があり、その散乱分は位相差像に寄与しないのでS/N比の劣化があった。新たに開発する位相板は、ナノスケールの磁性体細線が空間中に作るベクトルポテンシャルによって電子波に位相差を付加する。これはAharonov-Bohm(AB)効果として知られており、電子線が炭素膜のようなものを通過しないので無損失が期待される。ナノ磁性体細線を中心に架橋した位相板を作成する手段として以下の2つの方法を試みた。①電子線ホログラフィーに使用されるパイプリズム(白金細線)を支持体として磁性薄膜をその上に作製、②無垢の白金細線からFIB切削によりブレード状細線を作り、そのブレード刃上に磁性薄膜を作製。これらの加工手法によって作製された位相板を電子光学的手法(コントラスト伝達関数(CTF))を用いて解析し、予想に近いAB位相板性能を得た。本手法の研究は、その後、日本の電子顕微鏡学者により続行され高精度化が図られた(名古屋大学 丹司 敬義)。

② 社会・経済への波及効果^{58,59}

永山らの研究グループで作成された位相板を用い、共同研究者である米国Bayler CollegeのChiuグループは、2013年に位相差電子顕微鏡を用いて、ウイルスが生物の細胞に侵入する過程を立体的に解析することに成功した。光合成する藻類の一種「ラン藻(シアノバクテリア)」の細胞を急速凍結して観察し、細胞表面にとりついたウイルスが、サッカーボール形の外殻からDNAだけを内部に注入すると、中でDNAがタンパク質を使って同じ形の外殻を作らせ、自己複製したDNAを包み込ませて増殖した。ウイルスの角や尾のような形の部位を形成する過程も観察できた。成果は英科学誌「ネイチャー」に掲載された^[1]。この結果は、人間のウイルス感染の予防・治療法につながることを期待され、医学や生物学の研究における位相差電子顕微鏡の有効性が証明された。さらに、2013年には、スマートフォンなどのモバイル機器専用の顕微鏡、スマートフォン顕微鏡を発明し、2014年「L-eye」とし

⁵⁷ 葉山高等研究センター研究プロジェクト(「位相差電子顕微鏡に置けるAharonov-Bohm効果を応用した無損失位相板の開発」研究報告書)

https://ir.soken.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=3247&item_no=1&page_id=29&block_id=15

⁵⁸ 中日メディカルサイト「ウイルス感染を立体的に観察 生理研などが成功」(2013年10月25日)

⁵⁹ 毎日新聞「スマホ顕微鏡変身で人気 生理学研の永山名誉教授開発」(2014年5月17日)

て販売し、研究者ではない一般の人々からの高い関心を集めた。今後、学校の理科授業への導入や市民科学によるオープンイノベーションなど、幅広い活用が期待される。

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 4 報以内

[1] Dai, W; Fu, C; Raytcheva, D; Flanagan, J; Khant, HA; Liu, X; Rochat, RH; Haase-Pettingell, C; Piret, J; Ludtke, SJ; Nagayama, K; Schmid, MF; King, JA; Chiu, W, “Visualizing virus assembly intermediates inside marine cyanobacteria”, NATURE, 502, 7473, 707-10, 2013.

[2] Taylor, DW; MA, E; Shigematsu, H; Cianfrocco, MA; Noland, CL; Nagayama, K; Nogales, E; Doudna, JA; Wang, HW, “Substrate-specific structural rearrangements of human dicer”, NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY, 6, 662-670, 2013.

[3] Iijima, H; Fukuda, Y; Arai, Y; Terakawa, S; Yamamoto, N; Nagayama, K, “Hybrid fluorescence and electron cryo-microscopy for simultaneous electron and photon imaging”, JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, 185, 107-115, 2014.

[4] K. Nagayama, T. Onuma, R. Ueno, K. Tamehiro, H. Minoda, “Cathodoluminescence and Electron-Induced Fluorescence Enhancement of Enhanced Green Fluorescent Protein”, J. Phys. Chem. B, 120 (2016)1169-1174.

3.3.4. in vivo ナノイメージング技術の開発と生体運動機構の解明(樋口 秀男)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況⁶⁰

① 研究のねらい

生命科学における最終ゴールの 1 つは、身体の仕組みを分子レベルで理解することである。このゴールに向けて本研究では、動物個体の機能を分子レベルで理解するために、マウス個体での生体運動に関連する分子の挙動を 1 分子かつナノメートル精度でイメージング (ナノイメージング) する技術と装置を開発し、in vitro や細胞中とは違う個体での生体運動の機構解明を目指した (図 3-13)。

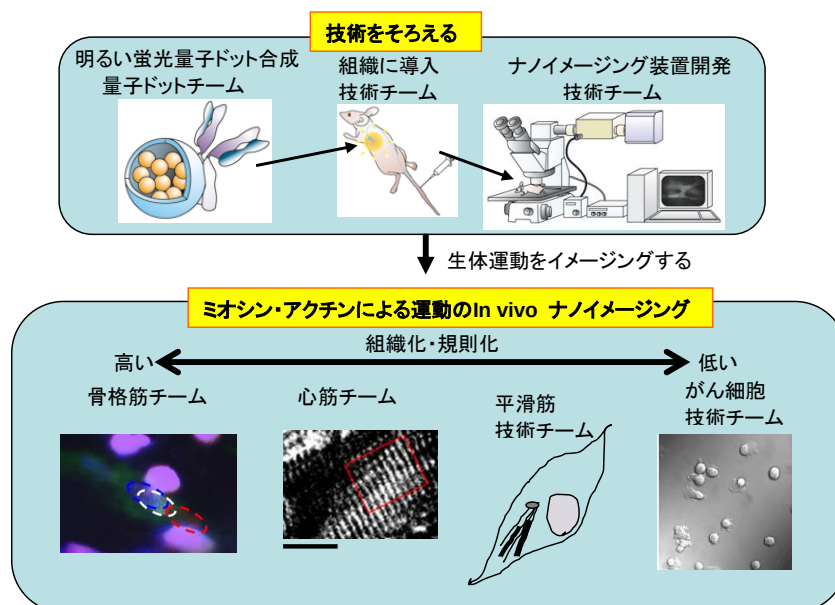


図 3-13 プロジェクトの概要⁶¹

② 期間中の研究成果

(i) 量子ドットを利用したマウス in vivo での 1 分子観察

抗がん剤であるハーセプチン (抗 HER2 抗体) がどのような経路で腫瘍に到達するかを明らかにすることを目的として、担がんマウスの尾静脈からハーセプチン-量子ドットを細い針で注入し、数時間後に in vivo ナノイメージングを行った。その結果、ハーセプチン-量子ドットは、血管付近を流れ、血管をすり抜け、そして血管と腫瘍との間をさまよいながらがん細胞にたどり着き、がん細胞膜に結合し細胞内を輸送された (精度 30nm・33ms)。これら

⁶⁰ JST_CREST 研究終了報告書 (研究課題「in vivo ナノイメージング技術の開発と生体運動機構の解明」(2006-2011 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/02_03.pdf

⁶¹ 樋口先生提供資料

全過程において、ハーセプチンは動いたり止まったりを繰り返すことを発見し、これを「Stop and go」メカニズムと名付けた。Stopするのは、繊維タンパク質などのネットワークにトラップされるか、タンパク質に非特異的な結合をするためであり、Goするのは、拡散や能動輸送によることが示唆された。従って、分子標的の薬物送達を考えたときに、送達の律速となる「Stop」状態の理解が重要であることがわかった。

(ii) 多量子ドットを用いた新規測定装置の開発

多量子ドットを用いて、in vitro のミオシンやアクチン線維の1分子の弾性を精度 $3\text{\AA}$ 、 0.1pN 、 2ms で測定できる装置の開発と測定を行った。このデータを元にして、in vivo における筋肉の筋節にかかる力をアクチン線維の伸びから算出できるようになった。

(iii) 量子ドット分散ガラスビーズ作成方法及び用途の特許出願

量子ドット表面のシラン化(ガラス分子被覆)、集合体形成、ガラス被覆の3段階の作製法について特許出願した。作製されるガラスビーズのサイズ、発光効率、量子ドット分散数を詳細に記述した。蛍光試薬用途の他に、ディスプレイ、照明、カソードルミネッセンスなどに使用が可能である。(特許国際出願 PCT/JP2010/72777 ゴルーゲル法によって作製した半導体ナノ粒子分散蛍光性微粒子、村瀬至生、楊萍、安藤昌儀)

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内 (被引用トップ 3 位)

[1] Tada, H; Higuchi, H; Wanatabe, TM; Ohuchi, N, “In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice”, CANCER RESEARCH, 67, 3, 1138-1144, 2007.

[2] Watanabe, TM; Higuchi, H, “Stepwise movements in vesicle transport of HER2 by motor proteins in living cells”, BIOPHYSICAL JOURNAL, 92, 11, 4109-4120, 2007.

[3] Kaya, M; Higuchi, H, “Nonlinear Elasticity and an 8-nm Working Stroke of Single Myosin Molecules in Myofilaments, SCIENCE, 329, 5992, 686-689, 2010.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後に、科学研究費補助金基盤研究(A)「階層を登る1分子生理学-分子内、1分子そして細胞へ-」(2011-2013)、科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型)「細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析」(2011-2015)、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「マウス内非侵襲1分子観察」(2013-2014)などの研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献

(i) ダイニン分子の1分子測定⁶²

組換えヒト双頭ダイニン分子の力測定と、単頭ダイニンの破弾力の測定を行った。その結果、ダイニン分子は約 6pN の大きな力を発生する能力があり、天然ダイニンの発する力と同程度であった。単頭ダイニンの破弾力は、ADP、AMPPNP、核酸なしでは強結合であったが、ADPVi 存在下では弱結合であった。また力を前方向に加えると外れやすかった。ダイニンの前方への歩行に有利であることが明らかとなった。また、細胞内に PAR-1 膜タンパク質がエンドサイトーシスされる過程を3次元的に高精度(～10nm)に測定を行った結果、細胞膜から細胞内にエンドサイトーシスするだけでなく、細胞内から細胞膜に戻る反応も発見された^[1]。

(ii) 好中球内部の小胞輸送機構の解明⁶³

これまでに開発した非侵襲 in vivo 観察技術を用いることで、マウス耳介内において、活性化した好中球内部の小胞輸送速度は、しばしば 4 μ m/sec にも達することが明らかとなった。精製された単一のモータータンパク質(細胞質ダイニンやキネシン)の運動速度は～1 μ m/sec でしかないことから、これには、複数のモータータンパク質が協調して働くような未知の機構によってなされていると予想された。この高速小胞輸送のより詳細な特徴を明らかにするために、QD(Quantum Dots)を内包した明るい小胞を持つ、活性条件の良い好中球を精製する手法を確立した。この精製した好中球内部における小胞の速度を解析したところ、マウス耳介内で観測された際と同様に 2 μ m/sec を超える高速小胞輸送が頻繁に観測されることが確認された。このようにして精製された好中球に微小管重合阻害剤であるノコダゾールを作用させたところ、2 μ m/sec 以上での高速小胞輸送が観察されなくなった。一方で、アクチンのモータータンパク質である myosin II の阻害剤である blebbistatin や、myosin II の上流で活性制御を行っている ROCK の阻害剤である Y-27632 を作用させた際にも、2 μ m/sec 以上での高速小胞輸送の頻度は大きく減少することが観測された^[2]。

(iii) マウス非侵襲1分子観察⁶⁴

非侵襲で1粒子レベルの小胞輸送を観察するため、明るい量子ドットの作成を行った。量子ドットを 40nM で液体窒素を用いて急速に冷却することで、数10個～数100個程度の量子ドットによる凝集体を形成した。さらに、マウス腫瘍に対して量子ドットの蛍光を観察で

⁶² 科学研究費補助金基盤研究(A) KAKEN (研究課題「階層を登る1分子生理学-分子内、1分子そして細胞へ-」研究成果の概要(2011-2014年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23247022/>

⁶³ 科学研究費補助金新学術領域研究(研究領域提案型) KAKEN (研究課題「細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析」研究実績の概要(2011-2015年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-23107002/>

⁶⁴ 科学研究費補助金挑戦的萌芽研究 KAKEN (研究課題「マウス内非侵襲1分子観察」研究成果の概要(2013-2014年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25650047/>

きるかを確認した。がん細胞に過剰に発現している EGFR に対する抗体を量子ドットに結合して、マウスの尾静脈から注入した。約 1 時間後に腫瘍部位を非侵襲で、共焦点観察を行った。その結果ブリンキングするような単一量子ドットを観察することはできないが、多粒子であれば観察が可能であることが明らかとなった。ナノ粒子の蛍光を元に細胞の輪郭を同定できた^[3]。

② 社会・経済への波及効果⁶⁵

樋口らの研究グループは東北大学と共同で、がんの転移活性化因子の量を高精度で検出する方法を開発した。これまで、抗がん剤の有効性や術後の予後を診断するために、がんの組織切片に対する酵素発色反応を利用した方法(免疫組織化学法)が用いられてきた。しかし、この方法は、酵素反応による発色強度が温度、時間、基質量に左右され、標的因子の存在量の定量性(数値化)が不十分だった。定量性が低いと、がんの診断精度が悪くなるため、定量性の高い方法の開発が大きな課題となっていた。この課題を解決するため、蛍光ナノ粒子の 1 粒子イメージングと画像解析を組合せた新規の検出方法の開発を行った。これは、がん組織に存在するがんの転移活性化因子 PAR1 を光るナノ粒子で標識し、この粒子を 1 粒子ずつ計測する技術により可能となった。さらに、この方法を手術で摘出したヒトがん組織の診断に応用した結果、手術後のがん再発リスクを確度よく数値化することに成功した。この成果は、がんの新規再発予防治療薬(抗体医薬)への応用とともに、がん患者の新たな予後予測診断法へ発展することが期待される。

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 4 報以内

- [1] Shingyoji, C; Nakano, I; Inoue, Y; Higuchi, H, “Dynein arms are strain-dependent direction-switching force generators”, CYTOSKELETON, 72, 8, 388-401, 2015.
- [2] Kikushima, K; Kita, S; Higuchi, H, “A non-invasive imaging for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils”, SCIENTIFIC REPORTS, 3, 1913, 2013.
- [3] Ichimura, T; Jin, T; Fujita, H; Higuchi, H; Watanabe, TM, “Nano-scale measurement of biomolecules by optical microscopy and semiconductor nanoparticles”, FRONTIERS IN PHYSIOLOGY, 5, 273, 2014.

⁶⁵ 東北大学「光るナノ粒子を使い、がんの性状を高精度診断する方法の開発」(2015 年 9 月 24 日)
<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2015/09/press20150918-01.html>

3.3.5. 細胞内標識による生物分子トモグラフィー(宮澤 淳夫)

(1) 研究のねらいと研究期間中の達成状況⁶⁶

① 研究のねらい

生命現象の解明には、様々な細胞機能を担う生体分子が生きた状態に近い環境で、しかも機能を発現している状態において解析することが重要である。細胞内に存在する分子複合体や繊維状構造体などの三次元構造解析には、電子線トモグラフィーが有効な手法である。しかし、細胞内には非常に多くの生体分子や細胞内小器官が存在しており、電子顕微鏡法で観察できる確実な分子標識法がないため、細胞内で生体分子の同定が困難であった。また電子線トモグラフィーは、これまで非生物系分野の試料を主な研究対象として測定装置や解析ソフトウェアの開発が行われてきたため、電子線損傷を考慮する必要がない分、高分解能での解析結果を得ることができた。これを生物試料にそのまま適用しても、電子線による損傷や試料ドリフトなど生物試料特有の問題のために、生体分子の構造を分子レベルの高い分解能で解析することは非常に困難であった。そこで、本研究では細胞内の分子の形が観察できて、その分子を同定することを可能にする「細胞内標識による生物分子トモグラフィー」の実現を目指した(図 3-14)。

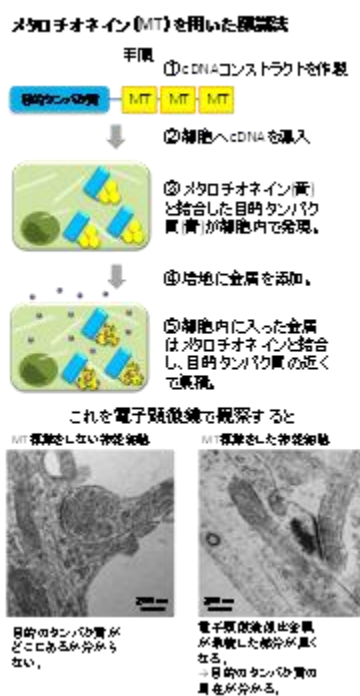


図 3-14 3MT タグを用いた細胞内分子標識法⁶⁷

⁶⁶ JST_CREST 研究終了報告書(研究課題「細胞内標識による生物分子トモグラフィー」(2006-2011 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/02_04.pdf

⁶⁷ 宮澤先生提供資料

② 期間中の研究成果

(i) 3MT タグの開発

3MT タグは、金属結合タンパク質であるメタロチオネイン(MT)を3分子連結したもので、細胞内において電子顕微鏡で観察可能な標識となる金属クラスターを形成することができる。3MT タグの基礎的検証のため、ホモ 14 量体を形成する大腸菌シャペロンタンパク質 GroEL や、神経ポストシナプス肥厚部に集積する足場タンパク質 PSD-95 に 3MT タグを遺伝的に融合して細胞内で発現させ、そこに形成された金属クラスターの電子顕微鏡観察を行った。その結果、3MT タグは世界初の電子顕微鏡用の遺伝的コード化標識として細胞内タンパク質の標識に有用であることを示した。さらに標識の効率化、検出感度の向上を目指したモデルタンパク質として、単量体蛍光タンパク質 GFP に 3MT タグを融合させたタンパク質を作製した。この電子顕微鏡観察を行うと共に、システム開発グループを中心に開発した画像解析システムを適用し、観察手法と解析手法の両面から同時に検討を行うことにより 3MT 標識による一分子レベルの検出が可能であることを示した。

(ii) 生物分子トモグラフィー技術の確立

透過型電子顕微鏡の利点は、標識された目的分子だけでなく、周辺要素も同時に観測(ブラウジング)でき、かつ、ナノメートルの分解能でそれら分子構造も観察できることである。この利点を生かしつつ、生きている状態に近い水和した試料の観測を可能にする生物分子トモグラフィー技術の開発に取り組んだ。その結果、クライオ電子線トモグラフィー実データの取得や、非晶質凍結切片法(CEMOVIS)、光-電子相関顕微鏡法の立ち上げ、ならびに、独自の電子顕微鏡制御システムと画像解析システムの構築などの成果が得られた。クライオ電子線トモグラフィーの実現では、これまでの切片観察では不可能だった天然状態の超分子構造の観測ができることを示した。事例として、活性化血小板では、これまでの報告とは異なるアクチン構造を示し、ウイルス感染宿主細胞では、細胞内のウイルス粒子およびその伝搬装置ともいえるベキチューブ構造解明に関して顕著な成果をあげた。CEMOVIS では、最も難易度の高い CEMOVIS の電子線トモグラフィーという技術的な面の進展から、ミドリムシの光センサー器官解明という成果を得た。光-電子相関顕微鏡観察では、神経シナプスにおける接着装置解明という重要な結果に貢献した。

③ 研究成果に関連した主な成果論文リスト 3 報以内 (被引用トップ 3 位)

- [1] Noda, T; Sugita, Y; Aoyama, K; Hirase, A; Kawakami, E; Miyazawa, A; Sagara, H; Kawaoka, Y, “Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus” NATURE COMMUNICATIONS, 3, 639, 2012.
- [2] Aoyama, K; Takagi, T; Hirase, A; Miyazawa, A, “STEM tomography for thick biological specimens”, ULTRAMICROSCOPY, 109, 1, 70-80, 2008.
- [3] Mori, S; Kubo, S; Akiyoshi, T; Yamada, S; Miyazaki, T; Hotta, H; Desaki, J;

Kishi, M; Konishi, T; Nishino, Y; Miyazawa, A; Maruyama, N; Shigemoto, K, “Antibodies against Muscle-Specific Kinase Impair Both Presynaptic and Postsynaptic Functions in a Murine Model of Myasthenia Gravis”, AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, 180, 2, 798-810, 2012.

(2) 研究領域終了後の継続と発展状況

本研究終了後に、科学研究費補助金基盤研究(C)「クライオ電子顕微鏡を用いた相関顕微鏡法による神経筋接合部の分子メカニズムの解析」(2011-2012)、科学研究費補助金基盤研究(C)「培養シナプスモデルを用いた神経筋接合部の形態と機能に関わる分子メカニズムの解析」(2014-2016)などの研究が進められている。

① 科学技術の進歩への貢献

(i) クライオ電子顕微鏡を用いた神経筋接合部の分子メカニズムの解析⁶⁸

運動神経と筋肉の間では神経筋接合部と呼ばれるシナプスが形成されている。このシナプスでは神経終末から放出されるアセチルコリンが筋肉表面にあるアセチルコリン受容体に結合することにより神経から筋肉へ情報が伝達される。アセチルコリン受容体はシナプス領域に集積し、様々なタンパク質と相互作用してクラスターを形成している。クラスターは神経と筋肉の情報伝達に重要であると考えられているが、クラスターの実体やクラスターの形成機構は分子レベルでは明らかにされていなかった。そこで、光学顕微鏡と電子顕微鏡、特にクライオ電子顕微鏡を用いた解析^[1]を相関させることにより、クラスターの分子メカニズムを明らかにした。

(ii) 神経筋接合部の形態と機能に関わる分子メカニズムの解析⁶⁹

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は神経筋接合部 (NMJ) のポストシナプスにおいて集積しており、その集積あるいはシグナル伝達に関わる様々な分子と共にクラスターを形成している。このクラスターの形態は、NMJ の成熟や疾患により大きく変化する。このクラスターを詳細に解析するため、分化 C2C12 筋管細胞上に、分化 NG108-15 神経細胞とそれと同細胞数のシュワン細胞を添加して 3 者共培養の検討を行い、1 週間培養維持することに成功した^[2]。また、NMJ の成熟度を判断するために、NMJ に形成されるヒダ状形態を光学顕微鏡で観察する手法の検討も行った。nAChR と細胞膜の二重染色法を検討し、成熟したラ

⁶⁸ 科学研究費補助金基盤研究(C) KAKEN (研究課題「クライオ電子顕微鏡を用いた相関顕微鏡法による神経筋接合部の分子メカニズムの解析」研究概要 (2011-2013 年度))
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23570196/>

⁶⁹ 科学研究費補助金基盤研究(C) KAKEN (研究課題「培養シナプスモデルを用いた神経筋接合部の形態と機能に関わる分子メカニズムの解析」研究実績の概要 (2014-2016 年度))
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26440080/>

ット横隔膜の NMJ におけるヒダ状構造を可視化する方法を確立した。本手法によって観察した 3 者共培養 1 週目の NMJ にはヒダ状構造は認められなかったが、シュワン細胞の添加によって共培養における nAChR クラスターの形成が促進され、3 者細胞間において相互作用が起こっていることを確認できた。

② 社会・経済への波及効果⁷⁰

宮澤らの研究グループは、東京大学、産業技術総合研究所と共同で、筋肉運動や記憶・学習を制御する極めて注目度の高いタンパク質「ニコチン性アセチルコリン受容体」1 分子の 3 次元分子内部運動を、100 マイクロ秒の時分解能で、かつピコメートル（原子直径の 1/100 の長さ）の精度で、動画として観察することに世界で初めて成功した。2 つの同種なタンパク質の 1 分子計測結果から、5 つのサブユニットからなる 5 量体の分子内部運動は、そのサブユニット構成がヘテロ構造とホモ構造で明確な違いがあり、各サブユニットの構成を変えることで多様な運動を実現できることが分かった。本研究グループが今回用いた計測法「X 線 1 分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT)」を用いることで、それほど特殊な分子操作をせず、すべての分子内部動態の主要部位において、1 分子動画計測の結果を提供できる。また、副作用の低減が期待できるアロステリック創薬の実現には、分子内部動態情報の取得が必須であることから、アロステリック創薬への貢献が大いに期待される^[3]。

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 4 報以内

- [1] Ito, Y; Ranner, R; Mimietz-Oeckler, S; Nishino, Y; Miyazawa, A, “Development of a cryo-SEM system enabling direct observation of the cross sections of an emulsion adhesive in a moist state during the drying process”, MICROSCOPY, 64, 6, 459-63, 2015.
- [2] Ishihara, A; Saito, J; Fukunaga, Y; Miyazawa, A, “In vitro formation of neuromuscular junction with NG108-15 cells and C2C12 myotubes”, NEUROSCIENCE RESEARCH, 71, e243, 2011.
- [3] Sekiguchi, H; Suzuki, Y; Nishino, Y; Kobayashi, S; Shimoyama, Y; Cai, W; Nagata, K; Okada, M; Ichiyangi, K; Ohta, N; Yagi, N; Miyazawa, A; Kubo, T; Sasaki, YC, “Real time ligand-induced motion mappings of AChBP and nAChR using X-ray single molecule tracking”, SCIENTIFIC REPORTS, 4, 6384, 2014.

⁷⁰ 東京大学大学院新領域創成科学研究科「運動や記憶を制御する受容体の巧みな分子内部運動の 1 分子観察に成功！～アロステリック創薬に向けた X 線計測技術の確立～」(2014 年 9 月 26 日) <http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/observing-intramolecular-motion-of-ligand-gated-ion-channel-in-real-time/>

第 4 章 科学技術イノベーションの創出に資する研究成果

第 4 章では研究代表者のヒアリングで得た詳細な説明とその見解に基づき、内容を記述している。

4.1. タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発（安藤 敏夫）

4.1.1. 研究の概要

(1) 研究テーマの状況（国内）

研究代表者安藤は、光学プローブを介さずにタンパク質分子の構造と機能動態を直接観測することがタンパク質の機能メカニズム解明に最も直接的なアプローチであると考え、その観察を可能にするための技術開発を推進した。具体的には、原子レベルでタンパク質の構造を決める X 線結晶構造解析や NMR より解像度は低いものの、サブ分子分解能で溶液環境下にあるタンパク質分子を可視化できる原子間力顕微鏡（AFM）を飛躍的に高速化するための技術開発と、その技術の実証応用研究に取り組んできた。

本 CREST 研究領域に採択された研究課題「タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発」での各研究テーマは以下の通りである。

① 高速 AFM 装置の開発

CREST 採択当時、タンパク質の機能メカニズムを調べる研究手法には、大きく 2 つの流れがあったが、どちらの手法にも限界があった。一つは、1950 年代頃から始まった X 線結晶構造解析、及び、電子顕微鏡と NMR である。しかし、これらの技術による構造解析では平均化された情報しか得られず、また判明するのは静的な構造に限られる。もう一つは、1 分子生物物理学手法である。これは、多数の分子の平均化された情報ではなく、1 分子を直接観測する。大阪大学の柳田教授を筆頭として技術開発が進められた新しい研究手法である。例えば、タンパク質に付けられた蛍光プローブからの蛍光を観察することにより、タンパク質分子の挙動をイメージングする。だが、あくまでも蛍光を観察する間接的な観察手法である。本手法が開発された当初は、一分子で観測すれば平均化された情報よりも詳しいことがわかると期待されていたが、実際に利用されてみると、同じ観測データでも異なる解釈がなされ、論争が生ずることもあり、間接的な手法の限界も明らかになってきた。

そこで、安藤らは 1994 年から、高速 AFM の技術開発に着手した。AFM は、試料と探針の間にはたらく力を検出することにより、物体表面の形状や物性（弾性、電荷分布等）をナノメートルの解像度でイメージングできる装置として発展し、今ではナノサイエンス／テクノロジーに欠かせない計測ツールの一つとなっている。AFM の大きな特徴の一つは観察対象、観察環境が広い点にある。バイオ分野では溶液環境下にあるタンパク質・核酸・染色体・細

胞など多岐にわたる生体試料の構造観察が行われている。生体分子の経時的観察も AFM の発明直後から試みられ、1989 年には血液凝固因子の重合過程の観察例が報告されている。その後も、いくつかの生体試料で AFM による数秒～分スケールでのダイナミクス観察例がある。しかしながら、脆弱なタンパク質を壊さず、その構造動態を捉えるほど高速に、かつ 1 分子の構造変化を検出できる解像度でイメージングすることは非常に困難であった⁷¹。高速 AFM は既存の技術・装置の組み合わせで実現するものではなく、開発には非常に時間がかかった。ようやく 2001 年に最初的高速 AFM 装置が完成し、12.5 フレーム/秒の撮影速度でタンパク質分子の動いている様子を観察することに成功した^[1]。

しかし、この装置を用いてタンパク質分子が機能している様子を観察しようとしたが、探針と試料の接触力が強すぎ、タンパク質分子が測定中に壊れてしまった。この原因は主に機械デバイスの応答速度の不十分さと、探針と試料との接触力を一定に保つために利用される通常のフィードバック制御法では高速性と低侵襲性の両立が困難であることにあった。そこで、安藤は 2004 年からこれらの問題を新しいアイデアにより解決し、ようやく 2008 年頃に実用レベルの装置を完成させることに成功した^{[2][3][4][5][6]} (図 4-1)。

② 試料用基板最適化の必要性・課題の認識

実際にタンパク質が機能している様子を観察するには、装置ばかりでなく、タンパク質分子を載せる基板の最適化も重要な課題である。タンパク質分子と基板の吸着が弱すぎると、タンパク質分子は基板上を速く拡散し、高速 AFM でも観察が困難になる。一方、吸着が強すぎると、タンパク質分子の機能が阻害されてしまう。個々の試料系や観察すべき現象に合わせた基板の最適化が重要な課題であった。そこで基板表面の修飾を種々試み、脂質平面膜やストレプトアビジンの 2 次元結晶などが有効であることを見出した^{[7][8][9]}。

③ タンパク質の動態観察の成功

この高速 AFM 装置を使い、モータータンパク質であるミオシン V がアクチンフィラメントに沿って運動する様子^[10] (図 4-2)、光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン (bR) の二次元結晶の境界部で起こるダイナミクス^[11]、バクテリオロドプシンが光照射によって構造変化する様子^[12]等を観察することに成功した。

⁷¹ 生化学「特集：生化学に新たな視点を与える技術の開発とその応用」第 86 巻第 2 号 127-136 (2014)
https://groups.ims.ac.jp/organization/iino_g/pdf/2014UchihashiSeikagaku.pdf

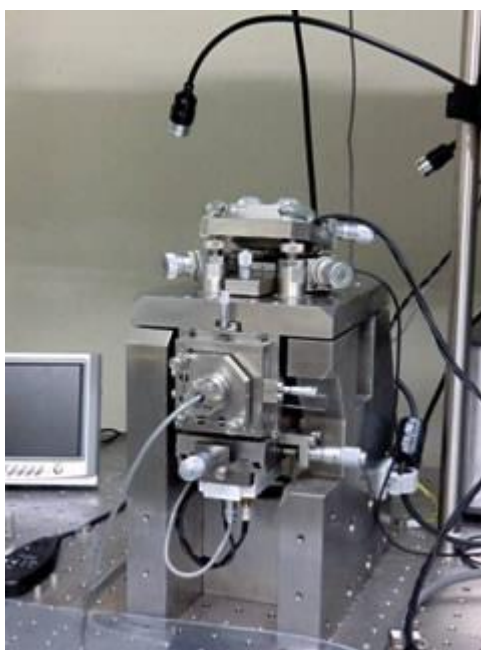


図 4-1 高速 AFM 装置の外観⁷²

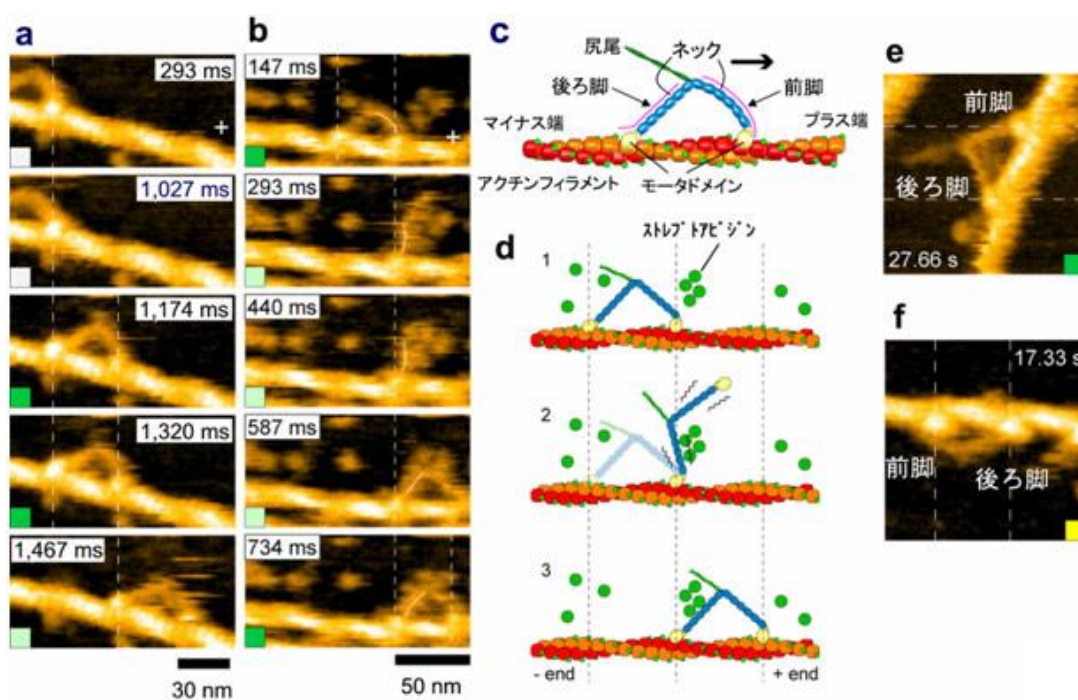


図 4-2 アクチンフィラメントに沿って歩行運動するミオシンVを捉えた高速AFM像（a、b）と前脚の形態の違いを示すAFM像（e、f）⁷³

⁷² JST プレスリリース「タンパク質の構造動態を直接高解像撮影することに成功」（2010 年 10 月 11 日）
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20101011/>

⁷³ JST プレスリリース「タンパク質の構造動態を直接高解像撮影することに成功」（2010 年 10 月 11 日）
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20101011/>

④ 事業化に向けた成果普及

安藤は、高速 AFM の基礎研究以外にも、実用化に向けたプログラムとして、地域イノベーション戦略支援プログラム（文部科学省）の助成も受けている。これは、地域イノベーションの創出に向けた地域の主体的かつ優れた構想に対して支援を行うプログラムであり、富山・石川地域のほくりく健康創造クラスターにおいて、安藤らは生きた細胞の微細構造動態を高速撮影する顕微鏡の開発領域において、AFM の製品化や技術者の育成等に取り組んだ。共同研究のメンバーには機械メーカーも名を連ね、高速 AFM による受託計測事業を行う株式会社生体分子計測研究所（RIBM）も含まれている。特に、高速バイオ AFM 国際コンソーシアムプログラムでは、高速 AFM の普及を加速することを目的として、安藤が外国の 6 機関（フランス 3 大学、アメリカ 1 大学、オーストリア 1 大学、ドイツ 1 社）と協力し、国際的な連携研究組織を立ち上げ、国際シンポジウムの開催も行った。RIBM 社が安藤研究室の高速 AFM のコピー機を作成し、それをコンソーシアムメンバーに非常に安価な値段で販売した。技術が確立し製品化が可能になっても、新しい研究手法の普及には時間がかかるが、この装置の販売により海外の研究室でも高速 AFM を使った研究が早期に開始され、普及が加速した。

(2) 海外での共同研究の状況

2008 年に立ちあげた国際コンソーシアムの活動の一環として、海外の研究者達と本研究課題の期間中に共同研究を行った。高速 AFM の技術開発よりも、それを使って観測するための試料調製において、共同研究の効果は大きかった。

例えば、フランスの研究室との共同研究においては、フランスの研究者が来日して、共同で試料調製し、観察を試みた。脂質膜のリポソームを基板に置くと、静電相互作用で破裂して膜ができる。その途中の形成メカニズムを解明するための研究である。フランスの研究者は脂質の知見を有し、日本は高速 AFM の知見を有していたため、お互いを補完する共同研究はうまく進み、研究成果は BBA-BioMembranes に掲載された^[13]。同様にフランスの別の研究室との共同研究では、リソスタチンペプチドによるアミロイド様線維形成過程の観察に成功し、PLoS One に発表した^[14]。

4.1.2. 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

① 期間後の研究成果

安藤は、期間後もタンパク質の機能動態撮影を進めている。例えば、2011 年には、 F_1 -ATPase の ATPase 反応に伴う構造変化の観察を行い、その成果を Science 誌に発表した。 F_1 -ATPase の作用機構としては、 γ ディクテーターモデルが定説であったが、高速 AFM により γ サブユ

ニットを欠落させた F_1 -ATPase を直接観測することで、同モデルを否定し、新しいメカニズムの発見に繋がった^[15]。また、同年にはセルラーゼがセルロースを分解しながらセルロース上を一方向運動することを発見し、これも Science 誌に発表した^[16]。これ以降も継続的に高速 AFM のバイオ応用研究を展開し、例えば、生きた細菌の細胞表面にあるポリーリン分子のダイナミクス^[17]、AAA タンパク質 p97 の ATPase 反応に伴う構造変化^[18]、キチナーゼの酵素反応に伴う一方向運動^[19]、格子に配置された抗原上に結合した抗体分子の歩行運動^[20]、コフィリンとアクチン線維との相互作用に伴うアクチン線維らせん構造変化の伝搬運動^[21]、キネシンの一種であるセントラルスピンドリンの動的構造^[22]、シャペロニン GroEL の 2 つのリングとコシャペロニン GroES の協同的結合解離反応^[23]など、高速 AFM によるナノスペース空間で起こるダイナミクスの可視化により、従来技術では困難な発見が続いている^{[24][25]}。

加えて、高速 AFM の開発により、既存の観測手法ではなかなか得られないタンパク質の構造を解明することが可能となった。 α ヘリックス、 β シート等の構造をとるタンパク質であれば、既存の手法で観測することは可能であるが、天然変性タンパク質はそのような構造を持たず、既存の手段での観測は困難である。一方、高速 AFM ではそのダイナミックな様子を高い精度で観測することができる^[26]。天然変性タンパク質はタンパク質全体の 50%程度を占めているため、高速 AFM の貢献は大きい。

安藤らはこれまで開発した高速 AFM 技術を更に発展させ、高速 AFM の対象拡大と機能拡張を実現するために本研究課題後も以下のような様々な技術開発を行っている。

(i) 高速・広域走査技術

タンパク質を観測する場合、観測対象は非常に小さいため、観測する領域は狭く、高速で観測することはさほど困難ではない。しかし、細胞を観測する場合のように、観測対象が大きい場合は、高速で観測することが難しい。そのため、安藤らは細胞などの大きな系の動態を観察するための技術開発を行った^[27]。共振周波数が低くなる広域スキャナーの振動を抑え、広域を高速にスキャンする技術を開発し、ニューロンなどの生細胞で起こる動的現象の観察に成功した^[28]。

(ii) 探針走査型高速 AFM

試料走査型から探針走査型に切り替える技術である。試料走査型では、ペトリ皿など大型の試料ステージを高速で動かすことが困難であった。また、装置の構造上、他の技術との複合化が困難であった。そこで、探針を走査する技術について、JST の研究成果展開事業の先端計測分析技術・機器開発プログラム (2012. 10-2016. 3) や、科学研究費補助金基盤研究 (S) 「高速バイオ AFM が拓く新構造生物学」(2012-2016) から助成を受け、要素技術開発を行ったところ、技術が確立し、2016 年に装置として完成した^{[29][30]}。

試料走査型高速 AFM では、試料の下側にスキャナーが入っているため空間がないが、探針走査型だと、試料台の下側に空間ができる。そこで、光ピンセットや光学顕微鏡をその空間に置くことで、探針走査型高速 AFM と組み合わせることができる。例えば、DNA などの細い紐状分子の一端に粒子を付け、他端にタンパク質を付け、光ピンセットで粒子を動かしながら探針走査型高速 AFM で観測することにより、外力作用下にあるタンパク質の振舞いを観測することが可能になる。これらを組み合わせた技術開発を、現在、科研費「新学術領域研究」により実施している。機能拡張性の高い探針走査型高速 AFM が完成したことから、実際の機能拡張に向け、まず蛍光顕微鏡との複合システムを組み上げ、高速 AFM 像と 1 分子蛍光像の同時取得が可能であることを実証した^[29]。

(iii) 高速 SICM（走査型イオン伝導顕微鏡）

AFM では、探針が観測対象に接触しなければならない。試料が非常に柔らかく脆い場合、接触力により試料が変形する、ダメージを受ける、等の問題が生じる。非接触の走査型プローブ顕微鏡である SICM であれば、生きた細胞の極めて柔らかい膜に存在する膜タンパク質の観測も原理的に可能である。だが、実際には、画像をとるのに非常に時間がかかり、また、AFM に比べると、空間分解能が低く実用にならない。これらの欠点を克服するため、科学研究費補助金基盤研究 (S)「高速バイオ AFM が拓く新構造生物学」(2012-2016) から助成を受け、安藤らは高速 SICM の研究に着手した。イオン電導計測の高速化と低ノイズ化を実現し、更に、プローブであるガラスキャピラリを高速走査するスキャナーの開発を進め、高速 AFM に匹敵する高速走査性能を実現した（論文準備中）。しかし、例えばミトコンドリアの表面を観測した場合、空間分解能が低くタンパク質分子を可視化できない。高解像観測の実現は今後の課題である。

② 研究成果の波及

安藤以外の研究室では、国際コンソーシアムのメンバーが優れた成果を出している。例えば、フランスのグループは高速 AFM を用いて ESCRT-III が渦巻きばねとして機能することを発見した成果を Cell に発表している^[31]他、オーストリアの研究グループは膜タンパク質の熱揺らぎの観察からそのタンパク質内の硬さ分布をマッピングすることに成功している^[32]。

(2) 社会・経済への波及と展望

安藤らが開発した高速 AFM は、アンサンブル平均あるいは静止画としてしか観測できなかった生体分子の構造をリアルタイムで可視化できる。生化学的手法や 1 分子計測など、さまざまな解析手法を駆使して明らかにされてきた事実や仮説が高速 AFM による 1 回の観察によって視覚的証拠として検証でき、そこから新しい事実の発見も可能になる。この技術開

発により、病気に関わるタンパク質の動態観察を通して、治療に効果的なリード化合物の探索が可能になる。

例えば、レット症候群という脳疾患に、タンパク質 MeCP2 の異常が関与することが知られている。脳疾患なので、喋れない、痙攣する、等の症状が現れ、致死率が高い。原因がわからず、治療が困難であるが、MeCP2 が関わっていることは判明している。このタンパク質はメチル化された DNA に結合するが、調べたレット症変異体のすべてで、その結合ドメインが解けていることが高速 AFM 観察で明らかになった（論文準備中）。従って、この解けた構造を元に戻す化合物が効果的な治療薬と成り得る。また、この治療薬探索において高速 AFM 観察は非常に効率的である。

アルツハイマー病は、脳内にアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) が蓄積することで発症する。高速 AFM を使用して $A\beta$ が溶液内で集まる過程を動画撮影したところ、 $A\beta$ の繊維構造として、すでに知られている「らせん型」と「直線型」に加え、それら 2 つの型を併せ持つ「混在型」が存在すること、混在型は、らせん型→直線型→らせん型のように繊維が変換されながら形成されることが発見された。従来はタンパク質が脳で集まり始めた時点で形状が定められ、その後は同じ構造が繰り返し作られると考えられていた。脳内の $A\beta$ の線維構造を変化させることができれば、アルツハイマー病の発症や進行を制御できる可能性もあり、今回の研究成果が今後の治療研究へ活用されることが期待される^[33]。

(3) その他特筆すべき事項

高速 AFM の開発を通じ、高速 AFM を可能にする要素技術について、国内で 13 件、海外では 9 件の特許を登録している。取得した特許は、5 社とのライセンス契約に活用されている。そのうちの 1 社が RIBM である。

試料ステージ走査型の高速 AFM はすでに事業化されている。製品は 2012 年から販売を開始し、国内では 30 台強が、海外では 10 台以上売れている。次に探針走査型を事業化する予定である。高速 SICM の高解像度版はいずれ事業化する予定である。

また、2009 年アメリカの第 49 回細胞生物学会年会の特別シンポジウム”Breaking Diffraction Barrier”において、1000 人程度の聴衆を前に招待講演を行った。

引用文献

- [1] Ando, T; Koder, N; Takai, E; Maruyama, D; Saito, K; Toda, A, “A High-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules”, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 98, 12468-12472, 2001.
- [2] Koder, N; Yamashita, H; Ando, T, “Active damping of the scanner for high-speed atomic force microscopy”, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 76, 053708, 2005.
- [3] Koder, N; Sakashita, M; Ando, T, “Dynamic proportional-integral-differential controller for high-speed atomic force microscopy”, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 77, 083704, 2006.

- [4] Yamashita, H; Uchihashi, T; Kodera, N; Miyagi, A; Yamamoto, D; Ando, T, “Tip-sample distance control using photo-thermal actuation of a small cantilever for high-speed atomic force microscopy”, REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, 78, 083702, 2007.
- [5] Ando, T, “Control techniques in high-speed atomic force microscopy”, PROCEEDINGS OF THE AMERICAN CONTROL CONFERENCE, 4586984, 3194-3200, 2008.
- [6] Ando, T; Uchihashi, T; Fukuma, T, “High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes”, PROGRESS IN SURFACE SCIENCE, 83, 337-437, 2008.
- [7] Yamamoto, D; Uchihashi, T; Kodera, N; Ando, T, “Anisotropic diffusion of point defects in two-dimensional crystal of streptavidin observed by high-speed atomic force microscopy”, NANOTECHNOLOGY, 19, 384009, 2008.
- [8] Yamamoto, D; Nagura, N; Omote, S; Taniguchi, M; Ando, T, “Streptavidin 2D crystal substrates for visualizing biomolecular processes by atomic force microscopy”, BIOPHYSICAL JOURNAL, 97, 2358-2367, 2009.
- [9] Yamamoto, D; Uchihashi, T; Kodera, N; Yamashita, H; Nishikori, S; Ogura, T; Shibata, M; Ando, T, “High-speed atomic force microscopy techniques for observing dynamic biomolecular processes”, METHODS IN ENZYMOLOGY, 475, 541-564, 2010.
- [10] Kodera, N; Yamamoto, D; Ishikawa, R; Ando, T, “Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy”, NATURE, 468, 72-76, 2010.
- [11] Yamashita, H; Voïtchovsky, K; Uchihashi, T; Antoranz Contera, S; Ryan, JF; Ando, T, “Dynamics of bacteriorhodopsin 2D crystal observed by high-speed atomic force microscopy”, JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, 167, 153-158, 2009.
- [12] Shibata, M; Yamashita, H; Uchihashi, T; Kandori, H; Ando, T, “High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photo-activated bacteriorhodopsin”, NATURE NANOTECHNOLOGY, 5, 208-212, 2010.
- [13] Giocondi, MC; Yamamoto, D; Lesniewska, E; Milhiet, PE; Ando, T; Le Grimallec, C, “Surface topography of membrane domains”, BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES, 1798, 703-718, 2010.
- [14] Milhiet, PE; Yamamoto, D; Berthoumieu, O; Dosset, P; Le Grimallec, C; Verdier, JM; Marchal, S; Ando, T, “Deciphering the structure, growth and assembly of amyloid-like fibrils using high-speed atomic force microscopy”, PLOS ONE, 5, 11, e13240, 2010.
- [15] Uchihashi, T; Iino, R; Ando, T; Noji, H, “High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F1-ATPase”, SCIENCE, 333, 755-758, 2011.
- [16] Igarashi, K; Uchihashi, T; Koivula, A; Wada, M; Kimura, S; Okamoto, T; Penttila, M; Ando, T; Samejima, M, “Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface”, SCIENCE, 333, 1279-1282, 2011.
- [17] Yamashita, H; Taoka, A; Uchihashi, T; Asano, T; Ando, T; Fukumori, Y, “Single molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM”, JOURNAL OF

MOLECULAR BIOLOGY, 422, 300–309, 2012.

[18] Noi, K; Yamamoto, D; Nishikori, S; Arita-Morioka, K; Ando, T; Ogura, T, “High-speed atomic force microscopic observation of ATP-dependent rotation of the AAA+ chaperone p97”, *STRUCTRE*, 21, 1992–2002, 2013.

[19] Igarashi, K; Uchihashi, T; Uchiyama, T; Sugimoto, H; Wada, M; Suzuki, K; Sakuda, S; Ando, T; Watanabe, T; Samejima, M, “Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin”, *NATURE COMMUNICATIONS*, 5, 3975, 2014.

[20] Preiner, J; Kodera, N; Tang, J; Ebner, A; Brameshuber, M; Blaas, D; Gelbmann, N; Gruber, H; Ando, T; Hinterdorfer, P, “IgGs are made for walking on bacterial and viral surfaces”, *NATURE COMMUNICATIONS*, 5, 4394, 2014.

[21] Ngo, KX; Kodera, N; Katayama, E; Ando, T; Uyeda, QP, “Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy”, *E-LIFE*, 4, e04806, 1–22, 2015.

[22] Davies, T; Kodera, N; Kaminski Schierle, GS; Rees, E; Erdelyi, M; Kaminski, CF; Ando, T; Mishima, M, “CYK4 promotes antiparallel microtubule bundling by optimizing MKLP1 neck conformation” *PLOS BIOLOGY*, 13, e1002121, 1–26, 2015.

[23] Yamamoto, D; Ando, T, “Chaperonin GroEL-GroES functions as both alternating and non-alternating engines”, *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, 428, 3090–3101, 2016.

[24] Ando, T; Uchihashi, T; Kodera, N, “High-speed AFM and applications to biomolecular systems”, *ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS*, 42, 393–414, 2013.

[25] Ando, T; Uchihashi, T; Scheuring, S, “Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy”, *CHEMICAL REVIEW*, 114, 3120–3188, 2014.

[26] Hashimoto, M; Kodera, N; Tsunaka, Y; Oda, M; Tanimoto, M; Ando, T; Morikawa, K; Tate, S, “Phosphorylation-coupled intramolecular dynamics of unstructured regions in chromatin remodeler FACT”, *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 104, 2222–2234, 2013.

[27] Watanabe, H; Uchihashi, T; Kobashi, T; Shibata, M; Nishiyama, J; Yasuda, R; Ando, T, “Wide-area scanner for high-speed atomic force microscopy”, *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*, 84, 053702, 2013.

[28] Shibata, M; Uchihashi, T; Ando, T; Yasuda, R, “Long-tip high-speed atomic force microscopy for nanometer-scale imaging in live cells”, *SCIENTIFIC REPORTS*, 5, 8724, 2015.

[29] Fukuda, S; Uchihashi, T; Iino, R; Okazaki, Y; Yoshida, M; Igarashi, K; Ando, T, “High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope”, *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*, 8, 073706, 2013.

[30] Fukuda, S; Uchihashi, T; Ando, T, “Method of mechanical holding of cantilever chip for tip-scan high-speed atomic force microscopy”, *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*, 86, 063703, 2015.

[31] Chiaruttini, N; Redondo-Morata, L; Colom, A; Humbert, F; Lenz, M; Scheuring, S; Roux, A, “Relaxation of loaded ESCRT-III spiral springs drives membrane

deformation”,

CELL, 163, 1-14, 2015.

[32] Preiner, J; Horner, A; Karner, A; Ollinger, N; Siligan, C; Pohl, P; Hinterdorfer, P, “High-speed AFM images of thermal motion provide stiffness map of interfacial membrane protein moieties”, NANO LETTERS, 15, 759-763, 2014.

[33] Watanabe-Nakayama, T; Ono, K; Itami, M; Takahashi, R; Teplow, DB; Yamada, M, “High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of amyloid β_{1-42} aggregates”, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 113, 5835-5840, 2016.

4.2. 磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測（白川 昌宏）

4.2.1. 研究の概要

(1) 研究テーマの状況(国内)

研究代表者白川は、物理化学的な手法を使って、生きた細胞における分子レベルの動きを計測する方法を開発するため、主に in-cell NMR とダイヤモンドを用いた磁気共鳴の光検出法の開発に取り組んできた。

本 CREST 研究領域に採択された研究課題「磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測」での各研究テーマの状況は以下の通りである。

① in-cell NMR

本研究課題開始時、in-cell NMR で一細胞を観測するには、非効率なタンパク質導入や、長時間にわたる計測等、いくつか問題があった。そこで、ラベルしたタンパク質の効率的な導入のために、タンパク質トランスダクション(PTD)技術の実用化研究を行った。すなわち CPP (cell penetrating peptide) として PTD 活性を有するタグに HIV-TAT を採用し、一方、細胞内導入をモニターする蛍光標識としてランタニド結合タグを有する LBT/PTD-dual tagged ベクターを開発し、この発現システムを用いることでタンパク質の効率的な導入を可能にした^[1]。また、計測の時間短縮には、通常行っている線形観測ではなく、非線形観測によりシグナルをサンプリングし、ベイジアン予測することで、時間を短縮して観測できるようにした。それにより、短い時間にも拘わらず、高感度で観測できるようになった^[2] (図 4-3)。これらの成果により in-cell NMR で構造を決めるだけの環境が整った。

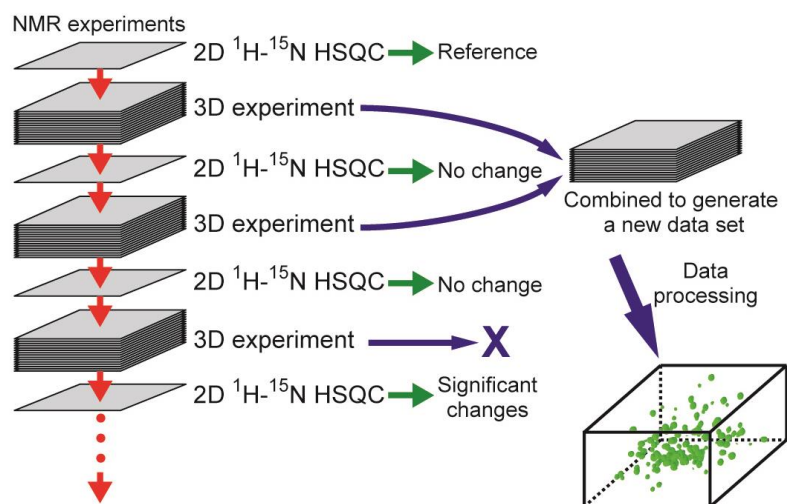


図 4-3 非線形サンプリング法を用いた in-cell NMR 測定法のスキーム⁷⁴

⁷⁴ JST_CREST 研究終了報告書（研究課題「磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測」（2004-2009 年度））http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/03shirakawa.pdf

② 細胞内タンパク質の分子間相互作用、立体構造の解析手法の開発

細胞内タンパク質の選択的多次元 NMR 測定である in-cell NMR の開発に関して、二つの成果を上げた。その一つは生きた大腸菌内のタンパク質の高分解能立体構造決定である。細胞の寿命等から、測定時間や感度が限られるという制約があったが、測定手法、データ処理や立体構造計算手法を開発・最適化することで実現した^[2]。もう一つの成果はヒト細胞内のタンパク質の高分解能 2 次元 NMR の測定手法の開発である。このヒト細胞における in-cell NMR により、哺乳動物細胞内でのタンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質のプロセッシング、タンパク質-薬剤相互作用の構造生物学的解析が可能となった^[3]。

③ 細胞内遺伝子発現の分子イメージング手法の開発

ポリリン酸を分子プローブとした酵母細胞における遺伝子発現の分子イメージング手法の開発を行った。特に T1 緩和時間の変化を 1H-MRI により画像化することにより、高感度化を図ることに成功した。また測定法・データ処理法・細胞チップ作成法等細部を工夫することにより定量性の改善を図るとともに、vtc1-1 アレルを新規レポーター遺伝子として単離・同定し、バックグラウンドの大幅な低減を達成することにも成功した^[4]。

④ タンパク質の細胞内局在の超高分解能イメージング機器・手法の開発

極低温環境で稼動する磁気共鳴力顕微鏡 (MRFM) の研究を進め、目標であった数十 nm 分解能に迫る約 100nm 分解能を持つ装置開発に成功した。また同環境下で MRFM・AFM 像の重畳計測のための技術開発も行った^[5]。

⑤ 生物個体における物質動態の解明を目指したメタボロミクス技術の構築

未精製の代謝混合物を NMR 計測し、分離能よく、代謝動態を追跡するメタボロミクス解析において、多次元 NMR を利用する手法の開発を行った。植物個体については、光合成による $^{13}\text{C}_2$ 固定、あるいは根圏からの安定同位体有機物吸収を、また動物や微生物の標識については、従来の $^{13}\text{C}_6$ -Glc 等の単純有機化合物からの吸収以外に、安定同位体標識植物を摂食源とする方法を検討し、NMR メタボロミクス基盤技術を構築した^[6]。

⑥ 磁気共鳴の光検出法

本 CREST 研究領域開始時において、研究総括の柳田らを筆頭に、一分子の動きを観測する研究が広がりを見せつつあった。しかし in-cell NMR は、分子単体ではなく分子全体を対象とした観測方法であり、一分子の動きを見ることはできない。そこで、一分子を感度よく定量的に観測するため、ダイヤモンド分子を使った NMR による量子センシングの研究に進展した。ダイヤモンドには不純物として含まれる窒素と格子欠陥が形成する NV 中心が存在し蛍光を発するが、そこを磁気センサーとして微小磁場と磁気共鳴現象に関係する蛍光強度変化を定量的に測ることで、生体に近い環境の中で分子の挙動を調べることができる (図

4-4)。これにより、細胞の中でタンパク質がどのような運動をしているか、どの程度構造が変化するのか、等を原子レベルで調べる事が可能になった^[7]。

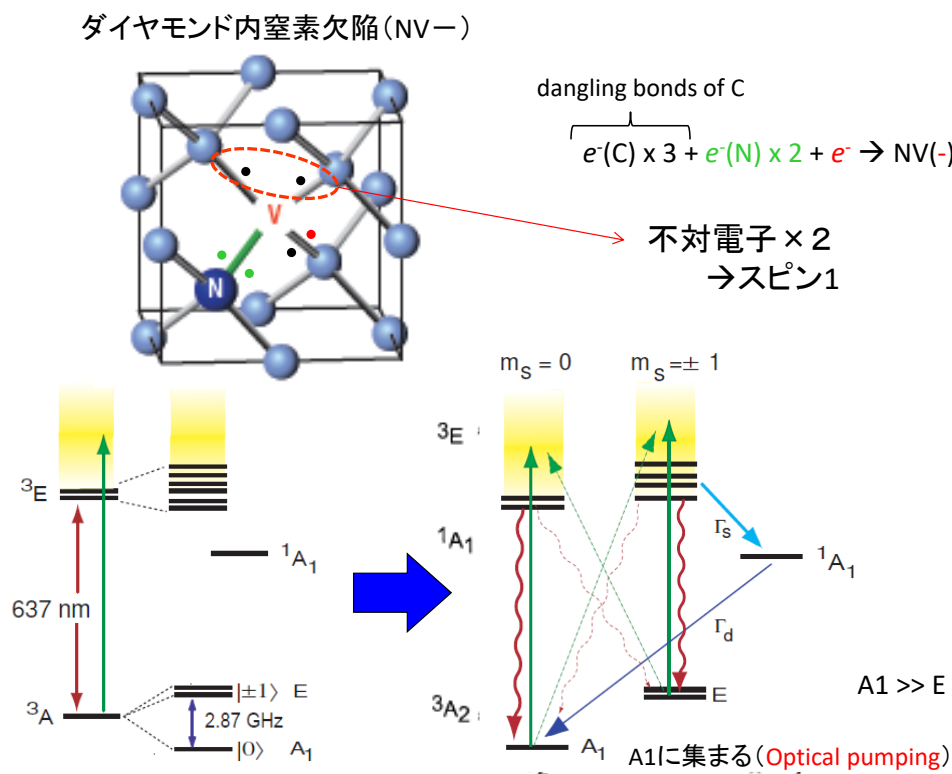


図 4-4 磁気共鳴の光検出法における検出原理の概要⁷⁵⁾

(2) 海外での共同研究の状況

In-Cell NMR やダイヤモンド NMR の研究が進むにつれ、海外との共同研究が行われるようになった。特に最初の in-cell NMR の論文はインパクトがあり、国内外の共同研究に繋がった。In-Cell NMR では、ALS の原因遺伝子産物 (SOD1) に関して、スウェーデンの研究グループと in-cell NMR を用いた共同研究^[8]を行い、磁気共鳴の光検出法についてスイスの研究グループと共同研究を始めようとしている。また、これらの研究以外でも、細胞内の水流を観測する分野である Rheo-NMR について、ドイツの研究グループと共同研究を行っている。

4.2.2. 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

① 期間後の研究成果

⁷⁵⁾ 0JST_CREST 研究終了報告書 (研究課題「磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測」(2004-2009 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/sh_heisei16/seimei/03shirakawa.pdf

(i) DNA メチル化のエピジェネティックな継承・維持の構造的基盤の解明⁷⁶

DNA メチル化の維持・継承において重要な役割を果たす片鎖メチル化 DNA 結合タンパク質 UHRF1 と DNA 修復酵素 MBD4 の構造機能解析を行った。その結果、ヒストンコード認識と DNA メチル化の機能的なカップリング、DNA メチル化・脱メチル化制御を支える分子認識機構に関する構造基盤を明らかにした。

(ii) In situ 計測による脂質・膜受容体の活性化機構の解明

細胞内や細胞表層で形成される過渡的なタンパク質複合体のその場 (in situ) 観察・解析を行うための手法として、in-cell NMR 及びダイヤモンド粒子の磁気共鳴の光検出法 (optically detected magnetic resonance; ODMR) を利用した手法の開発を行った。In-cell NMR の開発の上で、免疫系のシグナル伝達蛋白質である FKBP12 と脂肪酸シャペロンタンパク質 FABP4 を用い、¹H-¹⁵N 相関スペクトルや ¹⁹F-NMR スペクトルを得た。また ODMR についてはダイヤモンド粒子の選択的蛍光観察法や、粒子の方向決定手法を開発した。

(iii) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の分子機構解析⁷⁷

ALS の発症には SOD1 タンパク質のミスフォールディングが深く関わりとされる。そこで、in-cell NMR の技術を利用して ALS 関連変異を有する SOD1 (ALS-SOD1) が細胞内でどのような状態であるかを調べるために、まずは SOD1 変異体 (apoSOD1^{ΔIVΔVII}) について、最も適切なコンストラクトをデザインし、良好な in-cell NMR スペクトルが得られる細胞の導入条件を見出した^[3]。今回の成果に基づき、ALS-SOD1 についても in-cell NMR 実験を進めることで、ALS 発症機構の分子論的解明に貢献することが期待される。

(iv) DNA 脱メチル化の構造基盤研究とエピゲノム構造の三次元的解析⁷⁸

メチル化 DNA に結合する機能を持つ MBD4 (Methyl-CpG binding domain 4) は、DNA 修復に関わるグリコシラーゼで、転写抑制にも関わりと知られている。MBD4 によるメチル化 DNA 認識は、その MBD ドメインが担っているが、MBD と様々なタイプのメチル化 DNA との複合体の結晶構造を決定し、その分子認識機構の詳細を解明した。

⁷⁶ 科学研究費補助金基盤研究(A) KAKEN (研究課題「DNA メチル化のエピジェネティックな継承と維持の構造的基盤」研究概要 (2011 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/en/report/KAKENHI-PROJECT-21247013/RECORD-212470132011jiseki/>

⁷⁷ 科学研究費補助金特別研究員奨励費 KAKEN (研究課題「細胞内における SOD1 タンパク質の構造・運動性解析による神経変異疾患の発症機構の解明」研究の成果 (2013-2014 年度)) <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-13J04532/>

⁷⁸ JST_CREST (研究課題「幹細胞による多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析」研究概要 (2011-2015 年度)) http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/project/34/34_04.html

② 研究成果の波及

本プロジェクト期間中の 2009 年に、CREST 開始時点の技術では困難とされていた、広範囲な真核細胞への適用を可能とする in-cell NMR の手法を開発した^[9]。さらに、新しく開発した in-cell NMR を用いて、世界で初めて生きたヒト細胞内のタンパク質の三次元構造を計測した^[10]。これらの成果は Nature に掲載され、被引用件数は共に 100 報を越える等世界中に注目された。

In-Cell NMR については、大きな NMR の総合的な学会で必ずセッションができるようになった。これは、細胞内の分子を定量的に解析できるようになったことと、ヒト細胞におけるタンパク質の構造安定性に関する研究成果が影響している。例えば、ICMRBS⁷⁹では、当初は in-cell NMR の分野がなかったが、現在は特別セッションが組まれるようになり、NMR のメジャーな分野の一つとなっている。この学会で日本人が基調講演を行うことは非常に珍しいが、研究代表者の白川は同学会で in-cell NMR と磁気共鳴の光検出法について、5 年間に 3 回連続で基調講演を行った。

また、in-cell NMR を用いた細胞内分子の観測により、細胞内分子の働きが in vitro とは全く異なるというパラダイムシフトが生じた。In vitro の観測では、サンプルの濃度が非常に高い状態で、周りに他のタンパク質がない状態である。一方で真核生物の中では、一分子の周辺に数多くの多様なタンパク質があり、乖離乗数から考えても全く異なる挙動を示している。このような状態を試験管内で再現することはとても難しく、実際に細胞の中で定量的に観測しなければ、タンパク質の本来の挙動を把握することは難しい。

ダイヤモンド NVC は、蛍光検出の技術と磁気共鳴によるスピン操作技術の組み合わせにより、従来にないユニークな計測法を生み出すと大きな期待が寄せられている。すなわち、ダイヤモンド周辺の電場・磁場・温度が直接得られるほか、間接的にタンパク質の運動性・相互作用についての情報も獲得できることが期待される。ダイヤモンド NVC は、細胞内の任意の「ナノ空間」についてこれまで得ることができなかったさまざまな情報を獲得可能にすると期待され、細胞内事象の分子論的・物理化学的理解に大きく貢献するものと思われる

⁸⁰。

(2) 社会・経済への波及と展望

① 医療分野

In-Cell NMR は、神経疾患のタンパク質の不安定性に関する研究や、神経疾患における脳内のタンパク質蓄積のメカニズム解明に良く利用されている。例えば、最近の 2016 年でも、

⁷⁹ International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems の略で、2 年に 1 回開催される

⁸⁰ 生化学第 86 巻第 2 号「生化学に新たな視点を与える技術の開発とその応用」(2014)

パーキンソン病で蓄積するタンパク質に関して、in-cell NMR を利用した研究成果がドイツから Nature に報告されている^[11]。

また、例えばミトコンドリア病の治療にも役に立つ可能性がある。ミトコンドリア病は、ミトコンドリアが老化することによって活性炭素が放出され、それによりオートファジーが起こり、続いて細胞死が起こる病気である。この状況を観測するために、ダイヤモンド NVC を使った量子イメージングにより、ミトコンドリアの脂質の硬さや、プロトン勾配などを調べることが期待できる。パーキンソン病の原因もミトコンドリアにあることが、最近わかってきた。こういった研究において、ダイヤモンドを細胞に入れることで、量子センシングにより、電荷チャージ、温度変化、活性酸素の濃度変化、などを計測することが期待できる。

② 創薬分野

タンパク質を標的とした薬物動態について計測することにより、in vitro のみならず、in vivo で本当に薬が標的に結合するかどうかを確認することができる。例えば、in vitro だと良く結合するが、細胞内で本当に結合するかどうかは、細胞内での相互作用を確認することが必要である。動物での実験により薬の作用を確認することはできるが、その前に確認することができる。

また、in vivo でタンパク質の相互作用を観察することにより、同タンパク質の異常を原因とする疾患の治療薬の開発にも役立っている。例えば、岐阜大学との共同研究で、白川らはインターロイキン 18(IL-18)がレセプターに結合した複合体の 3 次元立体構造を世界に先駆けて解明した。IL-18 は細胞やウイルス感染から体を守るために免疫を司るリンパ球などから放出されるサイトカインであるが、過剰に生産されると関節リウマチや敗血症性ショック、アレルギーなどの免疫異常を起こす。阻害薬開発が期待されてきたが、薬開発の重要な基礎となる IL-18 とレセプター 2 種類の 3 者複合体構造およびその活性化メカニズムの詳細は、技術的にきわめて困難であったため、研究の開始からこれまでの約 20 年間、未解明だった。そこで白井らの研究グループは、遺伝子組み替え技術を用いて IL-18 タンパク質と IL-18 レセプタータンパク質を合成し、NMR 法やエックス線結晶構造解析を用いて、IL-18 の立体構造、IL-18 に結合するレセプター α と β の構造、その結合のメカニズムを解明した。これにより、過剰な IL-18 の働きを抑制し、関連疾患を治療するような薬の開発が加速することが期待される^{81, 82}。

(3) その他特筆すべき事項

⁸¹ 京都大学「免疫・神経難治疾患の治療薬開発を促進するインターロイキン 18 複合体立体構造を解明」(2014 年 12 月 11 日) http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/documents/141215_1/01.pdf

⁸² 岐阜大学大学案内特集「リウマチやアレルギーなどの新薬開発に大きな一歩！インターロイキン 18 の立体構造を世界で初めて解明」http://www.gifu-u.ac.jp/about/publication/g_lec/special/201506_kato.html

ダイヤモンド NVC を使った磁気共鳴の光検出法に関して、2 件の特許が登録されている。1 件は測定装置で、2014 年に国内で登録されている。もう 1 件はナノダイヤモンド粒子とこれを用いたタンパク質の構造解析方法に関わるもので、国際出願しており、日本、アメリカ、欧州、中国に国内移行し、まずはアメリカで 2016 年に登録されている。

現時点で製品化の予定はないが、測定装置は顕微鏡にコイルと磁石を配置したもので、通常の顕微鏡が利用可能であるため、顕微鏡があれば 200 万円程度の負担で可能になるものである。

引用文献

- [1] Goda, N; Tenno, T; Inomata, K; Iwaya, N; Sasaki, Y; Shirakawa, M; Hiroaki, H, “LBT/PTD dual tagged vector for purification, cellular protein delivery and visualization in living cells”, *BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, 1773, 141-146, 2007.
- [2] Ikeya, T; Sasaki, A; Sakakibara, D; Shigemitsu, Y; Hamatsu, J; Hanashima, T; Mishima, M; Yoshimasu, M; Hayashi, N; Mikawa, T; Nietlispach, D; Wälchli, M; Smith, B0; Shirakawa, M; Güntert, P; Ito, Y, “NMR protein structure determination in living *E. coli* cells using nonlinear sampling”, *NATURE PROTOCOLS*, 5, 1051-60, 2010.
- [3] Ohno, A; Inomata, K; Tochio, H; Shirakawa, M, “In-Cell NMR Spectroscopy in Protein Chemistry and Drug Discovery”, *CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY*, 11, 1, 68-73, 2011.
- [4] Ki, S; Sugihara, F; Kasahara, K; Tochio, H; Okada-Marubayashi, A; Tomita, S; Morita, M; Ikeguchi, M; Shirakawa, M; Kokubo, T, “A Novel magnetic resonance-based method to measure gene expression in living cells”, *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 34, 6, e51. 2006.
- [5] Tsuji, S; Yoshinari, Y; Kawai, E; Nakajima, K; Park, HS; Shindo, D, “Magnetic resonance force microscopy combined with surface topography”, *JOURNAL OF MAGNETIC RESONANCE*, 188, 2, 380-6, 2007.
- [6] Chikayama, E; Suto, M; Nishihara, T; Shinozaki, K; Hirayama, T; Kikuchi, J, “Systemic NMR analysis of stable isotope labeled metabolite mixtures in plant and animal systems: Coarse grained views of metabolic pathways”, *PLOS ONE*, 3, e3805, 2008.
- [7] Genjo, T; Sotoma, S; Tanabe, R; Igarashi, R; Shirakawa, M, “A Nanodiamond-peptide Bioconjugate for Fluorescence and ODMR Microscopy of a Single Actin Filament”, *ANALYTICAL SCIENCES*, 32, 1165-117, 2016.
- [8] Danielsson, J; Inomata, K; Murayama, S; Tochio, H; Lang, L; Shirakawa, M, “Oliveberg M, Pruning the ALS-associated protein SOD1 for in-cell NMR”, *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 135, 10266-9, 2013.
- [9] Inomata, K; Ohno, A; Tochio, H; Isogai, S; Tenno, T; Nakase, I; Takeuchi, T; Futaki, S; Ito, Y; Hiroaki, H; Shirakawa, M, “High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells”, *NATURE*, 458, 106-109, 2009.

- [10] Sakakibara, D; Sasaki, A; Ikeya, T; Hamatsu, J; Hanashima, T; Mishima, M; Yoshimasu, M; Hayashi, N; Mikawa, T; Walchli, M; Smith, BO; Shirakawa, M; Guntert, P; Ito, Y, “Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy”, NATURE, 458, 102-105, 2009.
- [11] Theillet, FX; Binolfi, A; Bekei, B; Martorana, A; Rose, HM; Stuiver, M; Verzini, S; Lorenz, D; van Rossum, M; Goldfarb, D; Selenko, P, “Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells”, NATURE, 530, 7588, 45-50, 2016.

4.3. 生体分子の動的可視化プローブの開発と応用（長野 哲雄）

4.3.1. 研究の概要

(1) 研究テーマの状況

研究代表者長野は、生体分子の活性あるいは濃度を時々刻々の変化に対応して、ダイナミックに捉える可視化プローブを創製することを目的として、特に蛍光発光制御原理の解明と、制御原理の生命科学への応用、そして研究成果の波及に取り組んできた。

本 CREST 研究領域に採択された研究課題「生体分子の動的可視化プローブの開発と応用」での各研究テーマの状況は以下の通りである。

① 蛍光発光制御原理の解明

長野は、図 4-5 のフルオレセインに代表される蛍光化合物の蛍光の発光強度を制御できる新たな原理として、光誘起電子移動（Photoinduced electron Transfer: PeT）機構を見出し、その機構には a-PeT、d-PeT と命名した 2 種類ある事を明らかにした^[1]。

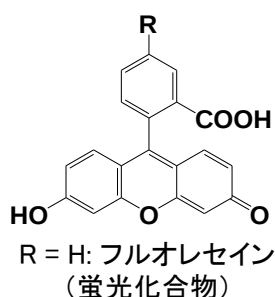


図 4-5 フルオレセインの化学式

a-PeT 機構では、フルオレセインは励起状態から基底状態への緩和過程で光を発する。しかし、ベンゼン部位の最高被占軌道（HOMO）レベルが、蛍光団部位の電子軌道の間にあるときは、空いた蛍光団の軌道にベンゼン部位の電子が一電子移動するため、蛍光団部位の励起された電子は基底状態に戻ることができず、ベンゼン部位の最高被占軌道に移動し、この過程により無蛍光になることがわかった（図 4-6）。

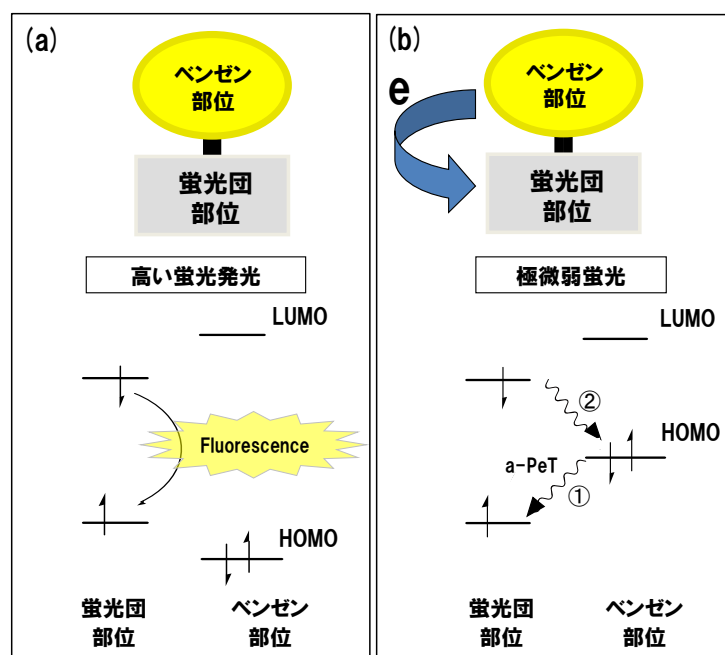


図 4-6 光誘起電子移動 (a-PeT) 機構⁸³

d-PeT 機構では、a-PeT 機構とは逆にベンゼン部位の最低空軌道 (LUMO) が蛍光団部位の電子の間にある時は、蛍光団部位の励起された一電子が最低空軌道に移動した後に、基底状態に戻る。この緩和過程が d-PeT 機構であり、a-PeT 機構と同様、ほぼ無蛍光になることがわかった (図 4-7)。

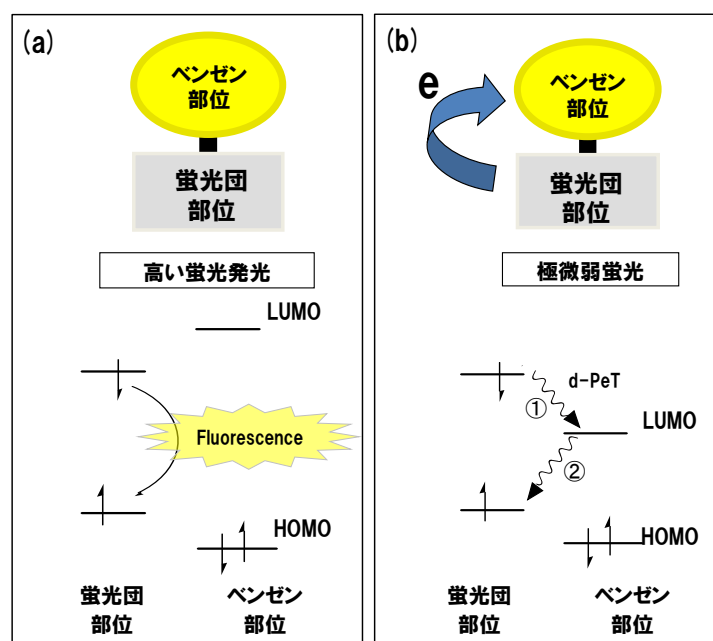


図 4-7 光誘起電子移動 (d-PeT) 機構⁸⁴

⁸³ 長野教授提供資料

⁸⁴ 長野教授提供資料

② 新規蛍光プローブの開発と生命科学への応用

2 種類の機構をバイオイメージング蛍光プローブの分子設計に応用し、40 種類以上のプローブ開発に成功した。更にこれらプローブを活用して、創薬の画期的なスクリーニング法に貢献した。

PeT 機構に基づくイメージングプローブの論理的分子設計では、分子軌道計算化学による解析、電気化学による解析、分光光学による解析等を踏まえ、PeT 機構に基づく蛍光量子収率を予測し、少しの構造変化で PeT 機構が解除されて蛍光強度が大きく増大するプローブを設計している。プローブでは、例えばカルシウムイオン、マグネシウムイオン等のイオンに加え、一酸化窒素 (NO) や一重項酸素等の低分子、キナーゼ活性等の機能も対象として、40 種類以上のイメージングプローブの開発に成功している (図 4-8、図 4-9)。

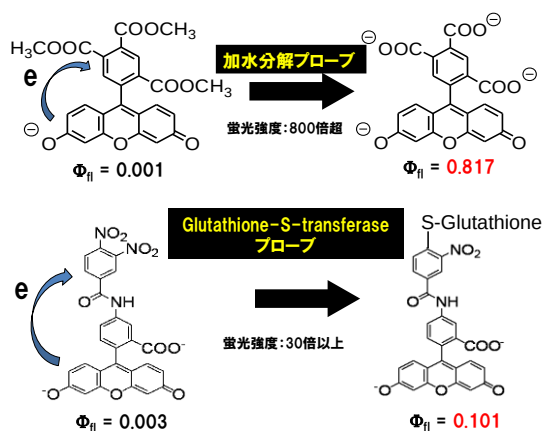


図 4-8 d-PeT 機構により化合物の蛍光強度が大きく増大する例⁸⁵

- 一酸化窒素(NO)プローブ (DAF-2, DAF-DA, DAF-FM, DAF-FM DA, DAR-4M, DAR-4M AM, DAMBO, DAMBOO, MAMBO, DAC)
- Various Esteraseプローブ(がん細胞可視化プローブを含む)
- Highly Reactive Oxygen Speciesプローブ (HPF, APF, MitoHR, MitoAR)
- Zn²⁺プローブ (ACFs, ZnAF-2, ZnAF-2 DA, ZnAFs, ZnAB, ZnAF-R-2, DIPCY, JICBT-DPA)
- Peroxynitriteプローブ (NiSPY)
- Mg²⁺プローブ (2'-CFs)
- 一重項酸素プローブ (DPAX-1, -2, -3, DMAX)
- OCl⁻プローブ (HySOx)
- Acroleinプローブ
- pHプローブ
- 環境感受性プローブ
- Anionプローブ (TC2412-Cd)
- グルクロン酸転移酵素プローブ (薬物代謝抱合反応可視化プローブ)
- Caspaseプローブ
- Phosphodiesteraseプローブ (CPFs)
- Protein tyrosine phosphataseプローブ (PTPs)
- β-Galactosidaseプローブ (TG-βGal)
- β-Glucuronidaseプローブ (TG-βGlu)
- Glucosidaseプローブ (TG-βGlu)
- Leucine aminopeptidaseプローブ (臨床検査薬)
- Phosphataseプローブ (TG-Phos)
- DPP-IVプローブ
- NPP-6プローブ
- 蛋白質発現可視化プローブ
- キナーゼ活性可視化プローブ
- 低酸素感受性プローブ
- Glutathion S-transferaseプローブ (前がん病変可視化プローブ)

14種類の蛍光プローブを市販

図 4-9 開発に成功した 40 種類以上のイメージングプローブ⁸⁶

⁸⁵ 長野教授提供資料

⁸⁶ 長野教授提供資料

こうしたプローブ開発を通して、具体的には、キナーゼ活性可視化プローブ、長寿命型蛍光プローブ（DPP4 活性、アクロレイン）、タンパク質発現可視化プローブ、近赤外蛍光プローブ（NO、低酸素環境、活性酸素）、環境感受性蛍光プローブなどを新たに開発した。実際に開発した可視化プローブを用いて、ブタ好中球における次亜塩素酸の発生や、新たな DPP4 阻害剤の発見、内皮細胞における NO の発生（図 4-10）など、生細胞・生体系への応用に成功した。

さらに、これらの蛍光可視化プローブを用いて、より臨床を意識した動脈硬化巣の診断および治療を目指した基礎検討も行い、その結果、種々の培養血管細胞あるいは動脈硬化発症遺伝子改変マウスにおいて NO や活性酸素種の検出が可能となった。また、動脈硬化巣の構成細胞の由来を蛍光プローブを用いた細胞標識により追跡したところ、骨髓由来でかつ流血中に存在する平滑筋前駆細胞の関与が示唆された。また、虚血時の血管新生、血管外膜への血管新生の特徴と動脈硬化発症への意義も明らかにした。

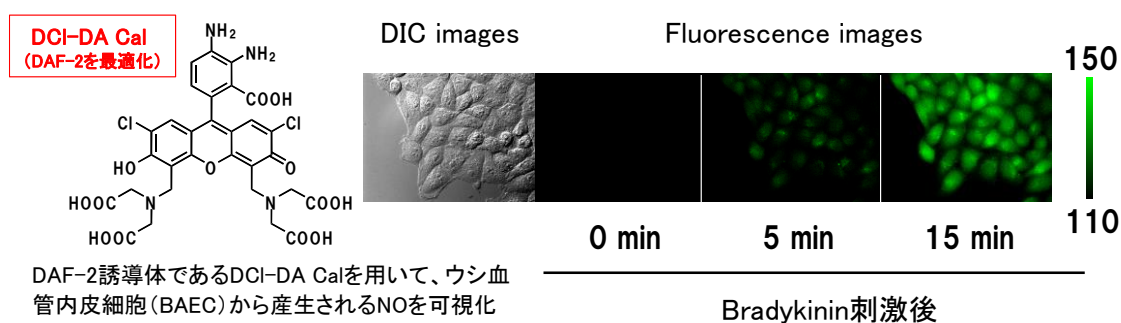


図 4-10 NO イメージングプローブの開発 (DCI-DA Cal) ⁸⁷

4.3.2. 研究成果の波及と展望

(1) 科学技術への波及と展望

研究成果は多数の学術論文として公表されている。論文の総被引用回数は 17,500 回を超えており、高被引用論文も数多くある。CREST が開始された 2005 年以降、100 回以上引用されている論文が 26 報、そのうち被引用回数が上位 1%以内に入っている論文が 6 報ある。

① 期間後の研究成果

(i) 新規蛍光プローブの活用

本プロジェクト期間後の 2011 年には、長野が開発した蛍光プローブ DAF-2 を用いた研究が Cell に投稿された^[2]。悪性グリオーマ幹細胞の腫瘍形成能が NOS2 酵素活性に依存し、

⁸⁷ 長野教授提供資料

NOS2 の高発現はヒトのグリオーマ患者の生死と相関があり、NOS2 阻害剤はグリオーマの増殖を抑制するが、この研究においては NOS2 から生成する一酸化窒素 (NO) と窒素酸化物を検出することが極めて重要であった。

また、2012 年には、長野が解明した蛍光発光の PeT 機構に基づいて、長野が開発した新規蛍光化合物 TokyoGreen の誘導体を合成・開発し、結核菌の新規高感度検出法を報告している。具体的には、結核菌の β -lactamase により加水分解される lactam 骨格を蛍光化合物に組み込み、新規の結核菌特異的蛍光プローブを創製したもので、結核菌の迅速、特異的、高感度検出を可能とした。この論文は Nature Chemistry に掲載された^[3]。

(ii) 可視光駆動型ケージド化合物の開発

観測用のプローブのみならず、可視光で反応するケージド化合物も開発された。光依存的に生理活性分子を放出するケージド化合物は、神経生物学分野等で幅広く活用される有用な研究ツールであるが、ケージド化合物の多くは 300 nm 台の紫外領域に吸収ピークを有しており、生物応用には必ずしも適切でない。そこで、緑色蛍光団の一つである BODIPY を構造修飾することにより、可視領域(約 500 nm)の光で反応が進行する新たなケージド化合物が開発された。これにより、可視光照射により神経伝達物質を放出することに成功し、神経細胞や脳スライスへの応用が行われた^[4]。

(iii) 近赤外蛍光イメージングプローブ

近赤外蛍光を用いたプローブとして、柳田研究総括の要請に基づき TokyoMagenta を開発した他^[5]、PeT 機構による蛍光強度の制御が可能、かつ組織透過性に優れた長波長発光の新規蛍光団 SiR-1 を開発した。特に CaSiR-1 は、 Ca^{2+} 濃度依存的に 1000 倍以上の蛍光強度上昇を示す Ca^{2+} プローブで、細胞内あるいは in vivo イメージングにおいて非常に有用である(図 4-11)^[6]。例えば、この CaSiR-1 を用いて、脳が精細な興奮性調節に基づいて記憶を再生するメカニズムが発見された^[7]。

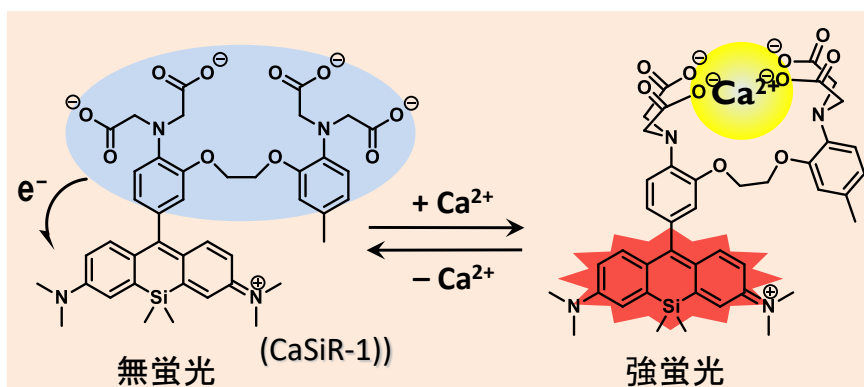


図 4-11 Ca^{2+} 近赤外蛍光イメージングプローブの開発 (CaSiR-1)⁸⁸

⁸⁸ 長野教授提供資料

② 研究成果の波及

本研究を通じて、バイオイメーシングを「ケミカルバイオロジー研究」の中心的分野の一つに発展させた。例えば、国際ケミカルバイオロジー学会は2011年に設立されたが、長野は2005年に日本ケミカルバイオロジー学会を設立している。なお、本研究成果の直接の延長ではないが、その成果は日本医療研究開発機構（AMED）の創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業にも活用されている。

(2) 社会・経済への波及と展望

本CREST期間中、新規蛍光プローブを10件以上のアカデミア創薬のスクリーニング系に応用している。例えば、NPP-2（オートタキシン）は臓器の線維化や炎症等に関わる酵素で、創薬の標的分子であり、優れたスクリーニング形の構築が求められていた。そこで、長野らは蛍光OFF/ON機構に基づき独自にプローブの設計・開発を行い、それを用いたスクリーニングによりオートタキシン阻害薬を選出し、その化合物を最適化することで、製薬企業への導出にも成功している。

また、新規のプローブ開発として、補酵素を検出する希土類発光プローブを開発した。NAD(P)Hは酸化還元酵素の補酵素として重要な生体分子であり、その簡便かつ高感度な検出方法は創薬スクリーニングなどへの適用が期待される。そこで、発光性希土類錯体とNAD(P)Hとの相互作用という新しい原理に基づく測定法を考案し、これを利用することで、マイクロプレート上でリアルタイムにNAD(P)Hの定量が可能であることを示した⁸⁹ [8]。

(3) その他特筆すべき事項

本研究成果関係で、2004年に上原賞、2005年に島津賞、2006年に日本薬学会学会賞、紫綬褒章、2008年に日本酸化ストレス学会賞を受賞している。また、2014年4月より2016年3月までPMDA（医薬品医療機器総合機構）の理事に就任していた。

引用文献

- [1] Ueno, T; Urano, Y; Setsukinai, K; Takakusa, H; Kojima, H; Kikuchi, K; Ohkubo, K; Fukuzumi, S; Nagano, T, "Rational principles for modulating fluorescence properties of fluorescein", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 3, 126, 43, 14079-85, 2004.
- [2] Eyler, CE; Wu, Q; Yan, K; MacSwords, JM; Chandler-Militello, D; Misuraca, KL; Lathia, JD; Forrester, MT; Lee, J; Stamler, JS; Goldman, SA; Bredel, M; McLendon, RE; Sloan, AE; Hjelmeland, AB; Rich, JN, "Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2", CELL, 8, 146, 1, 53-66, 2011.

⁸⁹ 科学研究費補助金特別推進研究 KAKEN（研究課題「光機能性分子の開発と医療への応用」研究成果報告書（2010-2014年度））<https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-22000006/22000006seika.pdf>

- [3] Xie, H; Mire, J; Kong, Y; Chang, M; Hassounah, HA; Thornton, CN; Sacchettini, JC; Cirillo, JD; Rao, J, "Rapid point-of-care detection of the tuberculosis pathogen using a BlaC-specific fluorogenic probe", NATURE CHEMISTRY, 4, 10, 802-9, 2012.
- [4] Takeda, A; Komatsu, T; Nomura, H; Naka, M; Matsuki, N; Ikegaya, Y; Terai, T; Ueno, T; Hanaoka, K; Nagano, T; Urano, Y, "Unexpected Photo-instability of 2,6-Sulfonamide-Substituted BODIPYs and Its Application to Caged GABA", CHEMBIOCHEM, 1, 17, 13, 1233-40, 2016.
- [5] Egawa, T; Koide, Y; Hanaoka, K; Komatsu, T; Terai, T; Nagano, T, "Development of a fluorescein analogue, TokyoMagenta, as a novel scaffold for fluorescence probes in red region", CHEMICAL COMMUNICATIONS, 47, 4162-4164, 2011.
- [6] Egawa, T; Hanaoka, K; Koide, Y; Ujita, S; Takahashi, N; Ikegaya, Y; Matsuki, N; Terai, T; Ueno, T; Komatsu, T; Nagano, T, "Development of a Far-Red to Near-Infrared Fluorescence Probe for Calcium Ion and its Application to Multicolor Neuronal Imaging", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 133, 14157-14159, 2011.
- [7] Mizunuma, M; Norimoto, H; Tao, K; Egawa, T; Hanaoka, K; Sakaguchi, T; Hioki, H; Kaneko, T; Yamaguchi, S; Nagano, T; Matsuki, N; Ikegaya, Y, "Unbalanced excitability underlies offline reactivation of behaviorally activated neurons", NATURE NEUROSCIENCE, 17, 503-505, 2014.
- [8] Ito, H; Terai, T; Hanaoka, K; Ueno, T; Komatsu, T; Nagano, T; Urano, Y, "Detection of NAD(P)H-dependent enzyme activity with dynamic luminescence quenching of terbium complexes", CHEMICAL COMMUNICATIONS, 14, 51, 39, 8319-22, 2015.