

# 研究報告書

-2017年度研究会活動-

第25回 研究報告会

2018年7月10日

**ATI** 公益財団法人 **新世代研究所**  
FOUNDATION ADVANCED TECHNOLOGY INSTITUTE

バイオ単分子研究会

## 2017年度バイオ単分子研究会活動報告 —機能するタンパク質を活写する—

委員長 西野 吉則  
北海道大学 教授

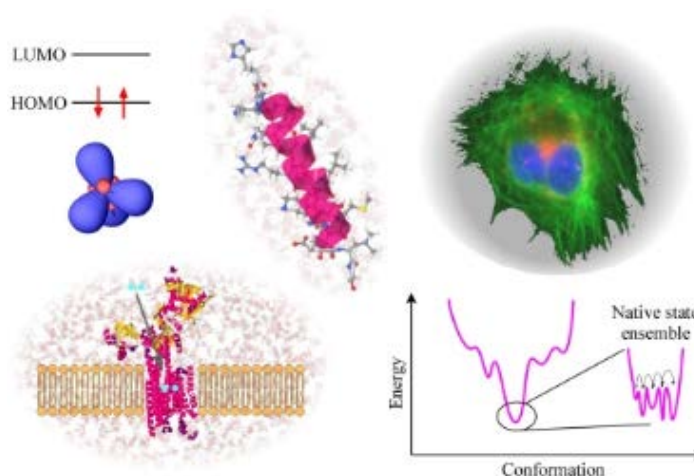
### 1. 研究構想

バイオ単分子研究会は、ATI研究会第6期の2009年度に発足した研究会である。第6期(2009~2011年度)および第7期(2012~2014年度)では、佐々木裕次教授(東京大学大学院新領域創成科学研究科)が委員長を務めた。第8期(2015~2017年度)では、西野が委員長を務めている。第8期におけるバイオ単分子研究会を始めるにあたり、以下の研究構想を描いた。

生命現象を動的な分子レベルから理解することは、生物学の究極の目標の一つである。これは量子力学的な「デジタル」世界と古典統計力学的な「アナログ」世界とを結び付けるといふ、自然科学の壮大な問いにも通じる。特定の立体構造をもったタンパク質分子やその複合体は、あるものは精密な「デジタル」な分子機械として振る舞う一方で、あるものは熱的なゆらぎを受けて「アナログ」な動的機能を発現する。DNAを介して「デジタル」な遺伝情報は次世代に正確に受け継がれるが、エピジェネティックな制御により「アナログ」で多様な表現型に道が開かれる。さらに、生物は雄大な時間スケールで大進化を起こす。このように、生物は、確実な動作や情報伝達を行うデジタルな世界と、多様性と個性をもったアナログな世界を巧みに使い分けて自らを制御している。

多数の分子のアンサンブル(集団)平均や時間平均ではなく、生物試料を、生きた細胞の中や生きているに近い環境で、分子レベルで理解するには、多岐に亘る革新的な技術開発が求められる。

本研究会では、様々なプローブを用いた単分子レベルでの計測技術や、細胞の動的制御技術、さらには情報科学や理論など、様々なアプロー



(図1) ATI研究会第8期でのバイオ単分子研究会の構想図

チから、生命現象の動的な分子レベルからの理解を目指す議論を交わすことを目的とする。

## 2. 2017 年度の研究会活動の概要

2017 年度は、以下に詳述するように、バイオ単分子研究会を 2 回開催した。

### 2.1 2017 年度第 1 回バイオ単分子研究会 (2017 年 9 月 11~12 日)

2017 年度第 1 回バイオ単分子研究会は、朽尾豪人委員に座長をお願いして企画を進めた。研究会のテーマと副題は、朽尾委員に幾つかご提案いただき、「タンパク質の作動原理の理解へ向けて 一機能する姿を活写する」とした。研究会の講演者は、朽尾委員と相談して人選を行い、朽尾委員に加え、内橋貴之先生 (名古屋大学)、五十嵐龍治先生 (京都大学)、渡邊力也先生 (東京大学) をお願いした。

ATI 研究会第 8 期のバイオ単分子研究会では、第 6~7 期の研究会を踏襲して、1 日目は温泉地等での合宿形式での密な議論を行い、2 日目は見学・視察などを行っている。1 日目の研究会は、富山市の呉羽ハイツを会場に行った。2 日目の見学先は、これまでの研究会で多くの要望のあった、スーパーカミオカンデを選んだ。

#### 2.1.1 タンパク質の作動原理の理解へ向けた研究会

1 人目の発表は、朽尾豪人委員が「NMR を使ったタンパク質の *in situ* 解析の最近の動向」という演題で行った。核磁気共鳴 (NMR: Nuclear Magnetic Resonance) は、水溶液中のタンパク質の立体構造やダイナミクスを測定できるユニークな手法として広く用いられている。NMR で用いられるラジオ波は生体や細胞を非侵襲的に透過するため、*in-cell* NMR によって、生きた細胞内のタンパク質の構造・相互作用・ダイナミクスも調べることができる。*in-cell* NMR は、2001 年に UCSF の V. Dötsch らによって生きた大腸菌中の生体高分子の異各種多次元 NMR スペクトルが計測されたことに始まる (Z. Serber *et al.*, JACS **123**, 2446 (2001))。細胞内には多種多様な生体分子が存在し、そのままでは NMR 測定ができない。このため、細胞内の着目するタンパク質を安定同位体核種 ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$  など) で標識する必要がある。大腸菌では、 $^{15}\text{N}$  や  $^{13}\text{C}$  を含む栄養源を用いることにより、大量発現するタンパク質を標識できる。一方、ヒト体細胞に対しては、検出可能な NMR スペクトルを得るために、大量の細胞 (1 測定で  $10^6\sim 10^7$  個) が必要となり、技術的困難を伴う。朽尾先生らは、細胞膜透過性ペプチド (CPP: Cell Penetrating Peptide) などの技術により、HeLa 細胞に対する *in-cell* NMR を実現した。応用例として、水素交換実験と *in-cell* NMR を組み合わせた実験手法による、細胞内でのタンパク質のフォールディング安定性の解析などの研究が紹介された。また、*in-cell* NMR の将来的な発展には、NMR 装置の更なる高感度化が必須であることが強調された。

2 人目の発表は、京都大学の五十嵐龍治先生が「量子センサーによる一分子計測」

という演題で行った。電子等の量子状態は、磁場・電場・温度等の外界の変化に非常に敏感で、これを利用すると高感度なセンサーに応用できる。量子状態の利用や制御には、ほとんどの場合、極低温が必要であり、生命科学への応用は困難であった。1997年にケムニッツ工科大学の J. Wrachtrup のグループは、ダイヤモンド窒素-空孔中心 (NVC: Nitrogen-Vacancy Center) の量子現象が常温・常圧で観測可能であることを示した (A. Gruber *et al.*, Science **276**, 2012 (1997))。これにより量子センサーの生命科学への応用に道が拓かれた。ダイヤモンド NVC を用いた光検出磁気共鳴 (ODMR: Optically Detected Magnetic Resonance) 顕微鏡は、①量子の状態を光を用いて初期化し、②外界の影響をマイクロ波を用いて量子に書き込み、③量子の状態を光を用いて読み取る。①初期化と③読み出しを光を用いて行っているため、通常の蛍光顕微鏡の装置を利用できる点が大きなメリットである。計測方法は2つに大別され、1つはダイヤモンド基板上に計測対象を置く方法で、もう1つはダイヤモンドをナノ粒子化して計測対象に導入する方法である。後者のナノダイヤモンド量子センシングとナノ粒子の位置制御技術を組み合わせることにより、細胞内の特定の微小空間において、温度、電場、磁場、粘度などといった様々な物理量を直接計測できるようになる。ODMR は開発途上の技術であるが、質・量共に NMR を遥かに超えるものとなる可能性を秘めている。

3 人目の発表は、名古屋大学の内橋貴之先生が「高速原子間力顕微鏡による生体分子のダイナミクス計測」という演題で行った。通常の原子間力顕微鏡 (AFM) では1画像取得するのに分オーダーの時間を要するのに対し、内橋先生らが携わり実現した高速 AFM では、生理機能や弱い分子間相互作用を乱すことなくタンパク質の動態を 10 fps 以上のフレームレートでイメージングできる。これまでの生体分子のダイナミクス解析への応用例として、セルロースを分解しながら一方向に運動するセルラーゼ、バクテリオロドプシンの光応答、回転軸のない F1-ATPase の構造変化の回転伝搬、アネキシン V の 2 次元結晶のダイナミクスなどの観察結果が紹介された。また、タンパク質分子の動態を観察しながら、その分子を操作できるインターラクティブモードの開発により、アクチン線維上のミオシン V の後ろ足を外すことで、ミオシン V が ATP なしでも前に進むという、定説を覆す現象が観察された。最近の技術的展開として、昇温機能、電気化学計測、広範囲スキャナー、光学顕微鏡との複合化、高速 AFM/蛍光顕微鏡複合機の開発などが紹介された。さらに、最近の一分子計測への応用例として、東京大学の濡木理教授らとの共同研究で行ったゲノム編集ツール CRISPR-Cas9 による DNA 切断過程の観察や、岡山大学の竹居孝二教授らとの共同研究で行ったエンドサイトーシスにおける膜切断分子 (ダイナミン-アンフィフィジン複合体) による膜切断過程の観察について紹介された。

4 人目の発表は、東京大学の渡邊力也先生が「マイクロチップを利用した膜タンパク質の単分子計測」という演題で行った。渡邊先生らが膜輸送体の 1 分子機能解析に

向けて独自開発を行っている、生体膜マイクロチップについて講演された。マイクロチップを利用したバイオ分析の技術発展は近年目覚ましいが、従来、取り扱いのしやすさから、主として水溶性生体分子が標的とされてきた。生理的および薬理的な重要性を考えると、膜タンパク質に代表される脂好性生体分子への拡張



(図 2) 2017 年度第 1 回バイオ単分子研究会 1 日目の発表の様子

は重要である。膜タンパク質は、機能に基づいて、主として、「受容体」、「酵素」、「膜輸送体」に分類でき、このうち膜輸送体に着目したマイクロチップ開発を渡邊先生らは進めている。膜輸送体は、更に、「チャンネル」と「トランスポーター」に分類される。1 個あたり毎秒 1000 万個以上の標的分子を輸送できるチャンネルに対してはパッチクランプ法により電気化学的に定量分析が行える。一方、輸送速度が遅いトランスポーターに対しては、1 分子単位での機能分析はおろか、定量分析も困難であった。生体膜を実装したマイクロチップの開発は、1998 年に発表されたヴェストファーレン・ヴィルヘルム大学の R. Peters らの研究に端を発する。渡邊先生らが開発したフッ素樹脂の試験管とクロロホルムに溶解したリン脂質溶液を利用することにより、最小 200 アトリットルの容積の試験管に対しても、十分に薄膜化した生体膜を安定的に形成することが可能となった。これにより、計測限界が毎秒 2 分子で定量的に能動輸送が計測できる世界最高の感度を達成した。



(図 3) 2017 年度第 1 回バイオ単分子研究会 1 日目の夕食の様子

### 2.1.2 スーパーカミオカンデの見学

スーパーカミオカンデは、岐阜県飛騨市神岡町にある、東京大学宇宙線研究所が運用する世界最大の水チェレンコフ宇宙素粒子観測装置である。ニュートリノの性質の解明、ニュートリノ天文学、大統一理論が予言する陽子崩壊の実験的検証という 3 つのテーマでの研究を行っている。前身のカミオカンデでは、小柴昌俊東大特別栄誉教

授が、超新星爆発で生じたニュートリノを世界で初めて検出したことで、ニュートリノ天文学を拓き、2002年にノーベル物理学賞を受賞した。スーパーカミオカンデでは、ニュートリノが質量を持つ証拠となるニュートリノ振動を観測した、素粒子の標準模型に修正を迫る成果により、東大の梶田隆章教授が2015年度にノーベル物理学賞を受賞した。



(図4) スーパーカミオカンデ  
実験区域の入口



(図5) チェレンコフ光を捉える世界最大の  
直径 50 cm の光電子増倍管

スーパーカミオカンデは個別の見学を受け付けていないが、研究会では許可を得て見学が実現した。見学には、入坑用の低公害マイクロバスとバス一台につき1名の保安員の手配が必要であった。第1日目の会場である富山市の呉羽ハイツを低公害バスで出発し、1時間ほどで神岡鉱業跡津坑口に到着した。坑口で一旦バスを降り、全員ヘルメットを着用して、保安員が同乗して再びバスに乗った。鉱山のトンネルを5分ほど進むとスーパーカミオカンデ実験区域の入口に到着した(図4)。前身のカミオカンデ時代からの伝統で、実験区域内の実験室の扉に、訪れた有名なゲストがメッセージやサインを残すそうで、取り外された歴代の扉が入口を入った付近に展示されていた。

スライドでの説明の後に、見学に移った。スーパーカミオカンデで有名な装置として、チェレンコフ光を捉える世界最大の直径50cmの光電子増倍管(浜松ホトニクス社製)がある(図5)。ニュートリノが水中の物質と相互作用し、荷電粒子を叩き出し、この荷電粒子が水中での光速を超えると、チェレンコフ光が円錐状に発生する。光を音波に置き換えてたとえと、チェレンコフ光は、超音速で飛翔する物体が発生する衝撃波に相当する。スーパーカミオカンデの光電子増倍管は1個30万円ほどで、合計



(図6) スーパーカミオカンデの  
実験水槽の蓋の上での見学



(図7) スーパーカミオカンデの  
コントロールルーム

1万3千個設置されているとのことである。その後、実験水槽の蓋の上（図6）や、信号処理回路や高電圧電源が置かれたエレクトロニクスハットや、コントロールルーム（図7）を回り、およそ1時間の見学を終えた。

## 2.2 2017年度第2回バイオ単分子研究会（2018年3月29日）

2017年度第2回バイオ単分子研究会は、「バイオ単分子研究の近年の展開 一次期（第9期）バイオ単分子研究会活動に向けて」というテーマと副題で、研究会の委員のみが集まり、ATIで開催した。委員長西野の独断で、次期のバイオ単分子研究会で扱いたいテーマとして、情報生命科学、クライオ電子顕微鏡、環境を選定し、それぞれ、小松崎民樹委員、宮澤淳夫委員、養王田正文委員に講演をお願いした。

1人目の発表は、小松崎民樹委員が「一細胞ラマン計測と情報科学の高度融合による情報計測技術」という演題で行った。1細胞ラマン分光イメージングは、細胞や生体組織を無標識で生きたまま観察することができ、かつ細胞内分子を網羅的に分析することができる有望な手法である。一方で、シグナル・ノイズ比が低いことが難点に挙げられる。ラマンスペクトル画像が張る高次元の特徴空間上に、スペクトル間測度（距離）を導入し、細胞の状態（癌/非癌、病変など）を判別することで、細胞病理診断の信頼性の質的向上を目指す研究をCRESTのプロジェクトとして進めていることが発表された。

2人目の発表は、宮澤淳夫委員が「クライオ電子顕微鏡法による含水性試料の観察」という演題で行った。クライオ電子顕微鏡法は、これまで主に生体試料の観察に用いられてきたが、生物以外の含水性材料の観察にも有力であることが示された。また、近年、分解能性能を飛躍的に向上させているクライオ電子顕微鏡法による生体分子の立体構造解析法である単粒子解析法も紹介された。単粒子解析法では、結晶化が不要であることから、X線結晶構造解析よりも迅速に多くのタンパク質の立体構造を原子レベルに近い高分解能で解析できる。近い将来にX線構造解析に比肩するとの予想もある。

3人目の発表は、養王田正文委員が「Hsp104/C1pBのタンパク質脱凝集機構とマラリア原虫での機能」という演題で行った。ATPのエネルギーを利用して、凝集したタンパク質をひも解き天然のフォールディング状態へと戻すことができるC1pB/Hsp104に関する研究が示された。また、養王田先生は“from molecules to environment”をキャッチフレーズに研究を進めている。微生物を用いたバイオレメディエーション（生物学的環境修復）の実例として、養王田先生が進めている沖縄での土壌浄化の試みなどが紹介された。

3名の講演の後に、フリーディスカッションとして、次期バイオ単分子研究会活動に向けた議論を行った。



（図8）2017年度第2回バイオ単分子研究会での発表の様子

研究会の後の意見交換会においても、引き続き、次期バイオ単分子研究会活動に向けた議論を行い、バイオ単分子研究会の委員が中心メンバーとなり、科研費の新学術領域研究に申請する可能性も話し合われた。

## 2. 研究成果とトピックスなど

外部資金では、秋山委員が「統合的多階層アプローチによるシアノバクテリア生物時計システムの新展開」という課題で科研費基盤研究(S)に採択された。研究成果では、須藤委員の分子進化的にユニークで極めて熱に安定なロドプシンに関する研究 (Scientific Reports)、佐々木委員の凝集化するタンパク質1分子の励起運動の観察 (Scientific Reports)、養王田委員のトリクロロエチレンを還元的に脱塩素化してエテンにする細菌コンソーシアムの研究 (Scientific Reports) などがあった。



## 研究会開催記録

【第1回】2017年9月12日(月)–13日(火) 富山県富山市、スーパーカミオカンデ  
テーマ：「タンパク質の作動原理の理解へ向けて - 機能する姿を活写する -」

9月12日(月) 呉羽ハイツ

1. 「NMRを使ったタンパク質の in situ 解析の最近の動向」  
朽尾 豪人 (京都大学)
2. 「高速原子間力顕微鏡による生体分子のダイナミクス計測」  
内橋 貴之 (名古屋大学大学院理学研究科)
3. 「量子センサーによる一分子計測」  
五十嵐 龍治 (京都大学大学院工学研究科)
4. 「マイクロチップを利用した膜タンパク質の単分子計測」  
渡邊 力也 (東京大学大学院工学系研究科)

9月13日(火)

スーパーカミオカンデ (岐阜県飛騨市) 見学

【第2回】2017年3月29日(木) 御茶ノ水

テーマ：「バイオ単分子研究の近年の展開

— 次期 (第9期) バイオ単分子研究会活動に向けて —」

1. 「一細胞ラマン計測と情報科学の高度融合による情報計測技術」  
小松崎 民樹 (北海道大学)
2. 「クライオ電子顕微鏡法による含水性試料の観察」  
宮澤 淳夫 (兵庫県立大学)
3. 「Hsp104/ClpB のタンパク質脱凝集機構とマラリア原虫での機能」  
養王田 正文 (東京農工大学)
4. フリーディスカッション  
「次期 (第9期) バイオ単分子研究会活動に向けて」

## バイオ単分子研究会員名簿

|        |   |              |
|--------|---|--------------|
| 西野 吉則  | 北海道大学 電子科学研究所光科学研究部門<br>コヒーレント光研究分野       | 教授<br>研究会委員長 |
| 佐々木 裕次 | 東京大学 大学院新領域創成科学研究科物質系専攻                   | 教授           |
| 井出 徹   | 岡山大学 自然科学研究科化学生命工学専攻                      | 教授           |
| 大島 泰郎  | 共和化工(株) 環境微生物学研究所                         | 顧問           |
| 飯野 亮太  | 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           |
| 関口 博史  | 高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門<br>バイオ・ソフトマテリアルグループ | チームリーダー      |
| 宮澤 淳夫  | 兵庫県立大学 大学院生命理学研究科細胞構造学講座                  | 教授           |
| 小松崎 民樹 | 北海道大学 電子科学研究所附属社会創造数学研究センター               | センター長・教授     |
| 平野 美奈子 | 光産業創成大学院大学 光バイオ分野                         | 講師           |
| 朽尾 豪人  | 京都大学 大学院理学研究科生物科学専攻                       | 教授           |
| 城地 保昌  | 高輝度光科学研究センター                              | チームリーダー      |
| 須藤 雄気  | 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科                         | 教授           |
| 秋山 修志  | 分子化学研究所 協奏分子システム研究センター                    | センター長        |
| 古田 寿昭  | 東邦大学 理学部生物分子科学科                           | 教授           |
| 養玉田 正文 | 東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻                       | 教授           |

2018年3月現在