

「特別推進研究」研究期間終了後の効果・効用、波及効果に関する自己評価書

- 研究代表者氏名 藤吉 好則（京都大学・大学院・理学研究科・教授）
- 研究分担者氏名 宮澤 敦夫（理化学研究所・生体マルチソーム研究チーム・連携研究員）
土井 知子（日本電子（株）・基礎研究部・主任研究員）
佐藤 主税（産業技術総合研究所・構造生理研究グループ・主任研究員）
- 研究課題名「情報伝達に関わる膜タンパク質 (GPCR とイオンチャネル) の構造研究」
- 課題番号 13001003
- 補助金交付額（直接経費のみ）

平成13年度	79,000千円
平成14年度	75,000千円
平成15年度	49,000千円

【研究期間終了後の効果・効用、波及効果に関する内容】

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか。

(1) 概要

本研究課題では、情報伝達に関わる膜タンパク質の構造研究を遂行した。具体的には、以下の5研究課題を掲げて研究を進め、期間内だけでなく期間終了後にも（引き続き特別推進研究を実施することができて）それぞれ興味深い発展をみている。

研究5課題を要約すると以下の様である。

1. 水チャネル、アクアポリン-4 (AQP4) の大量発現系を確立し、結晶化、構造解析。 脳等において重要な機能を担う AQP4 の構造解析を目指す。**2. アセチルコリン受容体 (nAChR) の構造解析。** 神経筋接合部において重要な情報伝達制御を担っている nAChR の構造と機能の解明を目指す。**3. 単粒子解析法を用いたチャネル等の構造解析。** 電圧感受性チャネルや IP₃ 受容体などは、結晶化が困難であるので、単粒子解析法を用いて構造解析を行う。**4. Co-LET 法の開発。** 界面活性剤を用いて可溶化すると変性や構造変化してしまう膜タンパク質の構造を解析する新しい方法の開発を目指す。**5. GPCR の機能研究を進める。** 血圧の制御など重要な機能を担うエンドセリン受容体の機能研究を進める。

上記5課題に関する**主要成果**。**1.** 期間内に、AQP4 の組み換え遺伝子を昆虫細胞で発現し、精製する系をたちあげ、その2次元結晶化に成功すると共に、像飛びの問題を解決して (*J. Struct. Biol.*, **146**, 325-333 (2004))、構造解析に成功した。その構造解析に基づいて、期間終了後、この水チャネルの新しい細胞接着性機能を発見して Adhennel ファミリーと名づける多機能性チャネルの概念を提案した。そして、生体内で結晶性アレイ構造を形成・制御する機構を解明したので、これらの結果を論文として発表した (*J. Mol. Biol.*, **355**, 628-639 (2006), *BBA*, **1778**, 1181-1189 (2008))。さらに、脳での発現が見られ、脳浮腫と関係する AQP4 のブロッカーを見出して、脳浮腫や高山病などに関わる創薬への興味深い情報を提供できるような研究へと発展を見せている (*J. Struct. Biol.*, in press)。また、より広く Adhennel ファミリーの研究が進展しており、AQP0 の高分解能構造解析 (*Nature*, **438**, 633-638 (2005))、ギャップ結合チャネルの構造解析 (*PNAS*, **104**, 10034-10039 (2007), *Nature*, in press) などへと順調に発展している。**2.** nAChR の構造を解析した (*J. Mol. Biol.*, **319**, 1165-1176 (2002), *Nature*, **423**, 949-955 (2003))。その結果をさらに発展させることによって、この受容体のゲーティング機構の詳細な理解を目指して研究が進展している。すなわち、スプレー法という動的に変化した構造を研究できる電子線結晶学の特徴的な手法を生かして、リガンド結合型 (チャネルオープン) の構造解析が進展している。**3.** 単粒子解析法で Na⁺チャネルの構造を解析し (*Nature*, **409**, 1047-1051 (2001))、粒子拾い上げプログラムの開発を行い (*J. Struct. Biol.*, **136**,

227-238 (2001))、IP₃R の立体構造を解析した (*J. Mol. Biol.*, **336**, 155-164 (2004))。この方法では、期間終了後、TRP チャンネルを始めとする多くの構造研究が進んでいる (*J. Mol. Biol.*, **367**, 373-383 (2007)) 4. Homer 分子の構造を解析 (*J. Mol. Biol.*, **318**, 1117-1126 (2002)) し、Co-LET 法を開発した (*BBRC*, **295**, 756-765 (2002))。期間終了後、Co-LET 法を応用した研究が進展している。5. ET_BR とカベオリン 1 との相互作用の解析 (*Eur. J. Biochem.*, **270**, 1816-1827 (2003)) 等を行った。期間終了後、まだ構造解析には至っていないがエンドセリン受容体 B 型の構造解析を目指した研究が進展している。

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など

論文発表

「2. (2) 論文引用状況」に記載。その他の論文発表は以下。

1. K. Irie, T. Nakatsu, K. Mitsuoka, A. Miyazawa, K. Sobue, Y. Hiroaki, T. Doi, Y. Fujiyoshi and H. Kato, Crystal structure of Homer 1 family conserved region reveals the interaction between EVH1 domain and own proline-rich motif. *J. Mol. Biol.*, **318**, 1117-1126 (2002).
2. J. Nakamura, G. Tajima and C. Sato, Substrate regulation of calcium binding in 2⁺-ATPase molecules of the sarcoplasmic reticulum. II. Effect of CTP, GTP, ITP and UTP. *J. Biol. Chem.*, **277**, 24191-24196 (2002).
3. Y. Hiroaki, K. Nishikawa, K. Mitsuoka, T. Tachibana, K. Sobue, T. Doi and Y. Fujiyoshi, A new technique to co-localise membrane proteins with Homer/ves1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**, 756-765 (2002).
4. J. Nakamura, G. Tajima and C. Sato, ATP regulation of calcium binding in Ca²⁺-ATPase molecules of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **986**, 341-343 (2003).
5. D. Sato, T. Takahashi, G. Tajima, C. Sato, Y. Nagata, T. Yamamoto and J. Nakamura, The Ca²⁺-ATPase of the scallop sarcoplasmic reticulum is of a cold-adapted type. *J. Membrane Biol.*, **196**, 33-39 (2003).
6. T. Ogura and C. Sato, Automatic particle pickup method using a neural network has high accuracy by applying an initial weight derived from eigenimages: a new reference free method for single-particle analysis. *J. Struct. Biol.*, **145**, 63-75 (2004).
7. T. Ogura and C. Sato, Auto-accumulation method using simulated annealing enables a fully automatic particle pickup completely free from matching template or learning data. *J. Struct. Biol.*, **146**, 344-358 (2004).
8. T. Yamaguchi, I. A. Tahara, Y. Fujiyoshi and T. Doi, Characterization and application of monoclonal antibodies against human endothelin B receptor expressed in insect cells. *Biotechnology Letters*, **26**, 293-299 (2004).
9. Y. Murata, T. Doi, H. Taniguchi, and Y. Fujiyoshi, Proteomic analysis revealed a novel synaptic proline-rich membrane protein (PRR7) associated with PSD-95 and NMDA receptor. *Biochem. Biophys. Research Communications*, **327**, 183-191 (2005).
10. T. Kodama, H. Imai, T. Doi, O. Chisaka, Y. Shichida and Y. Fujiyoshi, Expression and localization of an exogenous G protein-coupled receptor fused with the rhodopsin C-terminal sequence in the retinal rod cells of knockin mice. *Exp. Eye Res.*, **80**, 859-869 (2005).
11. M. Nonaka, T. Doi, Y. Fujiyoshi, S. Takemoto-Kimura and H. Bitto, Essential Contribution of the Ligand-Binding β B/ β C Loop of PDZ1 and PDZ2 in the Regulation of Postsynaptic Clustering, Scaffolding, and Localization of Postsynaptic Density-95. *J. Neurosci.*, **26**, 763-774 (2006).
12. C. Gerle, K. Tani, K. Yokoyama, M. Tamakoshi, M. Yoshida, Y. Fujiyoshi and K. Mitsuoka, Two-dimensional crystallization and analysis of projection images of intact

Thermus thermophilus V-ATPase. *J. Structural Biol.*, **153**, 200-206 (2006).

13. T. Hige, Y. Fujiyoshi and T. Takahashi, Neurosteroid pregnenolone sulfate enhances glutamatergic synaptic transmission by facilitating presynaptic calcium currents at the calyx of Held of immature rats. *Eur. J. Neurosci.*, **24**, 1955-1966 (2006).
14. T. Hirai, K. Mitsuoka, A. Kidera and Y. Fujiyoshi, Simulation of charge effects on density maps obtained by high-resolution electron crystallography. *J. Electron Microsc.*, **56**, 131-140 (2007).
15. M. Toei, C. Gerle, M. Nakano, K. Tani, N. Gyobu, M. Tamakoshi, N. Sone, M. Yoshida, Y. Fujiyoshi, K. Mitsuoka and K. Yokoyama, Dodecamer rotor ring defines H⁺/ATP ratio for ATP synthesis of prokaryotic V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *PNAS*, **104**, 20256-20261 (2007)
16. H. Suzuki, K. Nishikawa, Y. Hiroaki and Y. Fujiyoshi, Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-terminal cysteine residues. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1778**, 1181-1189 (2008).
17. Structural analysis of 2D crystals of gastric H⁺,K⁺-ATPase in different states of the transport cycle. T. Nishizawa, K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi, *J. Structural Biol.*, **162**, 219-228 (2008).
18. S. Hayakawa, M. Mori, A. Okuta, A. Kamegawa, Y. Fujiyoshi, Y. Yoshiyama, K. Mitsuoka, K. Ishibashi, S. Sasaki, T. Hattori and S. Kuwabara, Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neuroimmun.*, **196**, 181-187 (2008).
19. H. Suzuki, M. Kurooka, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and Y. Kaneda, Sendai virus F glycoprotein induces IL-6 production in dendritic cells in a fusion-independent manner. *FEBS Lett.*, **582**, 1325-1329 (2008).
20. Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and G. E. Sosinsky, Projection Structure of a N-terminal Deletion Mutant of Connexin 26 Channel with Decreased Central Pore Density. *Cell Commun. Adhes.*, **15**, 85-93 (2008).
21. T. Sakisaka, Y. Yamamoto, S. Mochida, M. Nakamura, K. Nishikawa, H. Ishizaki, M. Okamoto-Tanaka, J. Miyoshi, Y. Fujiyoshi, T. Manabe and Y. Takai, Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. *J. Cell Biol.*, **183**, 323-337 (2008).

国際会議等への招待講演

1. Y. Fujiyoshi 「2-D Crystals of Membrane Proteins」 Gordon Conference • Bristol (2001.6.24-29)
2. Y. Fujiyoshi 「Structure and Function of Channels」 International Conference on Biological Physics 2001 • Kyoto (2001.8.1-3)
3. Y. Fujiyoshi 「Structure and Function of a Water Channel Analysed By Electron Crystallography.」 Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis • Beijing (2001.10.17-20)
4. Y. Fujiyoshi 「Where electron crystallography is and where it is going.」 French yearly meeting on cryo electron microscopy • France (2002.1.16-18)
5. A. Miyazawa 「High Resolution Structure of Nicotinic Acetylcholine Receptor by Electron Crystallography.」 Canada-UK-Japan Joint Symposium “Toward Post DNA-Sequencing Era” • Yokohama (2002.2.25-27)
6. A. Miyazawa 「Structure and Activation Mechanism of Acetylcholine Receptor.」 Gordon Research Conferences “Ligand Recognition and Molecular Gating” • Italy (2002.3.26-31)

7. Y. Fujiyoshi 「Structure and Function of Channels.」 Olga G. Nalbandov Symposium • Illinois (2002.5.4-5)
8. Y. Fujiyoshi 「Structure analysis based on electron crystallography at 2.5Å resolution.」 ACA Meeting • Texas (2002.5.27-30)
9. Y. Fujiyoshi 「Functional details on membrane proteins observed through an electron beam.」 Structural Forum 2002 • Stockholm (2002.8.28-9.1)
10. Y. Fujiyoshi 「Observation of functional details on membrane proteins through an electron beam.」 15th International Congress on Electron Microscopy • Durban (2002.9.1-6)
11. A. Miyazawa 「Structure and Activation Mechanism of Nicotinic Acetylcholine Receptor by Electron Microscopy.」 8th Keihanna International Conference on Molecular Biophysics “Macromolecular Structure Assembly and Dynamics” • Kyoto (2002.9.19-21)
12. Y. Fujiyoshi 「Structural determinants of water and ion channels.」 Symposium “The Biophysics of Membrane-Bound Transporters” • Stockholm (2002.9.30)
13. Y. Fujiyoshi 「Molecular contrivance of Water selective Channel.」 日本学術振興会主催日英合同シンポジウム “Ion Channels and Transporters” • Oxford (2003.1.10)
14. T. Ogura and C. Sato 「A novel automatic particle pickup method applicable to low-contrast electron micrographs.」 The 30th NIPS International Symposium “Frontiers of Biological Electron Microscopy” • Okazaki (2003.3.12)
15. A. Miyazawa 「Structure and Activation of Nicotinic Acetylcholine Receptor」 International Symposium on Diffraction Structure Biology 2003 • Tsukuba (2003.3.28-31)
16. Y. Fujiyoshi 「Structures of ion and water channels observed through an electron beam.」 5th European Symposium of the Protein Society • Florence (2003.3.29-4.2)
17. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of channels analysed by cryo-electron microscopy.」 Inauguration Symposium • Lund (2003.4.10)
18. Y. Hiroaki, K. Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, T. Doi, S. Sasaki, K. Mitsuoka and Y. Fujiyoshi 「Expression, two-dimensional crystallization and structure analysis of aquaporin-4.」 Gordon Research Conference on “Three dimensional electron microscopy” • New Hampshire (2003.6.22-27)
19. Y. Fujiyoshi 「Postsynaptic function observed through light and electron beam.」 第19回国際生物学賞記念シンポジウム • 奈良 (2003.12.3-4)
20. Y. Fujiyoshi 「Cryo-electron microscopy for studying molecular functions of membrane proteins.」 The Membrane Protein Workshop • Melbourne (2004.2.6)
21. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of water and ion channels analysed by cryo-electron microscopy.」 The 29th Lorne Conference on Protein Structure and Function • Lorne (2004.2.8-12)
22. Y. Fujiyoshi 「Structure and Function of a Water Channel Expressed in Brain.」 The Third Waterfront Symposium of Human Genome Science • Tokyo (2004.2.24)
23. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of water channels」 UK-Japan Structural genomics “Whither Structural Genomics?” • Oxford (2004.3.23-25)
24. A. Miyazawa 「Structure and molecular mechanism of nicotinic acetylcholine receptor」 UK-Japan Structural genomics “Whither Structural Genomics?” • Oxford (2004.3.23-25)
25. Y. Fujiyoshi 「Electron crystallography and single particle analysis of membrane proteins」 workshop “Membrane, Membrane Proteins and Membrane Associated Molecular Machines” at the Howard Hughes Medical Institute • Chevy Chase (2004.5.4-7)
26. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of channels observed through an electron beam」 16th International Congress of the IFAA Anatomical Science 2004 -From Gene to Body-

(2004.8.22-27)

27. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of water channels」 The 7th International Conference on Molecular and Basic Mechanisms of Anesthesia (2005.2.25-27)
28. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of various water channels」 The 2nd Bilateral Japan-UK Symposium on Structural Genomics and Proteomics ・ Yokohama (2005.5.28-30)
29. Y. Fujiyoshi 「Whither study of membrane proteins for structure guided drug design ?」 BioJapan 2005 ・ Yokohama (2005.9.8)
30. Y. Fujiyoshi 「A new research field, Structure Physiology, and a prospect of it.」 Cluj-Napoca International Symposium of Molecular Medicine, Society and Public Health on Structure Physiology ・ Cluj-Napoca (2005.10.5)
31. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of water channels」 4th World Congress of Cellular and Molecular Biology ・ Poitiers (2005.10.9)
32. Y. Fujiyoshi 「Cryo-protection and cryo-electron microscopy」 The Fourth International Workshop on X-ray Damage to Biological Crystalline Samples ・ Harima (2006.3.7)
33. Y. Fujiyoshi 「Structure Analysis of Water Channel by Electron Crystallography」 The 16th International Microscopy Congress-IMC16 ・ Sapporo (2006.9.3-8)
34. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of cell adhesive」 5th International NCCR Symposium on New Trends in Structural Biology ・ Zürich (2006.9.15-16)
35. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of channels」 Albany 2007: The 15th Conversation ・ Albany (2007.6.19-23)
36. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of aquaporins」 The 5th International Conference of Aquaporin ・ Nara (2007.7.13-16)
37. Y. Fujiyoshi 「Structure and Function of Multifunctional Channels」 Neuroscience 2008 ・ Tokyo (2008.7.9-11)
38. Y. Fujiyoshi 「Structure and function of Multifunctional channels」 IUCr2008 ・ Osaka (2008.8.23-31)

他、多数あり。

(3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得しているもののみ）

科学研究費補助金

- 特別推進研究「膜を介する（チャネルおよびGPCRを中心とした）情報伝達の分子機構研究」平成16年度～平成20年度、574,470千円

その他の研究費

- 文部科学省、科学技術振興調整費「細胞分子複合体構造解析用極低温電顕の開発」平成15年度～平成17年度、415,870千円
- 科学技術振興機構、戦略的創造推進事業 ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用「高次細胞機能構造体観察・制御技術の開発」平成14年度～平成19年度、488,500千円
- 経済産業省、健康安心プログラム 生体高分子立体構造情報解析「電子線及びX線等による膜タンパク質等の構造、分子機構解析技術の開発及びデータの取得」平成14年度～平成18年度、689,400千円

- 新エネルギー・産業技術総合開発機構、健康安心プログラム 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術の開発」平成20年度～平成23年度、350,000千円

(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

本研究課題で達成された水チャネル AQP4 の構造解析から、驚くべきことに細胞接着機能を併せ持つことが明らかになった。別の水チャネル AQP0 の構造をこれまでの電子線結晶学による最高の分解能で解析して、脂質分子を可視化すると共に細胞接着性の構造を解明した。これら2つの水チャネルと他の電位感受性イオンチャネルやギャップ結合チャネルなど、チャネルでありながら接着機能を有するチャネルを Adhennel ファミリーと命名し、新しい研究分野を発展させつつある。

それらの中で特に、ギャップ結合チャネルの構造解析から、これまでの教科書の記述を改めることになると思われる「プラグゲーティングモデル」を提案した。また、混乱していたヘリックスの配置などを確定した論文を Nature に発表することになった。

アセチルコリン受容体の構造解析結果は、構造生物学にとどまらず神経科学や麻酔科学、病理学など他の分野への波及効果もあり、世界的な評価を受けている。

独自に開発した極低温電子顕微鏡を用いて、膜タンパク質の構造を高い分解能で解析することを可能にし、総合的に生理機能研究を進めており、構造生理学という新しい分野を創設しつつある。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況はどうか。

(1) 学界への貢献の状況

狭い分野ではあるが、電子線結晶学による膜タンパク質の構造解析に関して、高分解能の構造解析がなされた全て（6種類）は我々が貢献している。

また、電子線結晶学や単粒子解析などを用いた高分解能の構造研究のために、世界的に我々との共同研究の依頼が多く（例えば、最近欧米の8箇所から）来ている。また、我々が開発した電子線結晶学や単粒子解析などのデータ収集の方法を教えてほしいとの依頼が多く、10人を超える研究者の教育を日本で行うと共に、米国スクリプス研究所の電子顕微鏡法の教育コースで定期的に講師として教育を行っていることを始めとして、世界的なこの分野の教育に貢献している。

ほとんど毎年、欧米からの学術振興会が支援する研究者を受け入れており、さらに、欧米の大学院生が我々の研究室で、研究教育を受けている。

論文発表後5年の間に407回引用されているアセチルコリン受容体の構造解析の論文を始めとして研究期間内の論文4報が150回以上の引用を受けている（(2)論文引用状況参照）。

(2) 論文引用状況

調査日 2009年1月14日

研究期間中に発表された論文

- Miyazawa, Y. Fujiyoshi and N. Unwin, Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, **423**, 949-955 (2003). 「アセチルコリン受容体の最初の原子モデル

を発表した論文」 407 件

- T. Okada, Y. Fujiyoshi, M. Silow, J. Navarro, E.M. Laudau and Y. Shichida, Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5982-5987 (2002). 「ロドプシンの分解能を 2.6 Å まで向上させて、機能に重要な水分子の構造を解明した論文」 359 件
- P. Agre, L. S. King, M. Yasui, W. B. Guggino, O. P. Ottersen, Y. Fujiyoshi, A. Engel and S. Nielsen, Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.*, **542.1**, 3-16 (2002). 「水チャネルの医学的、生理的意味とそのタイプのチャネルに一般的と考えられる特徴的で特別な構造について解説した総説」 244 件
- N. Unwin, A. Miyazawa and Y. Fujiyoshi, Activation of the Nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the subunits. *J. Mol. Biol.*, **319**, 1165-1176 (2002). 「ニコチン性アセチルコリン受容体の構造解析から、リガンド結合に伴う構造変化の機構を解明した論文」 157 件
- Y. Fujiyoshi, K. Mitsuoka, B.L.de Groot, A. Philippsen, H. Grubmüller, P. Agre and A. Engel, Structure and function of water channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 509-515 (2002). 「水チャネルAQP1 の水の選択的透過機構を構造学的視点から解説した総説」 79 件
- A. Oshima, T. Doi, K. Mitsuoka, S. Maeda and Y. Fujiyoshi, Roles of Met-34, Cys-64, and Arg-75 in the Assembly of Human Connexin 26. *J. Biol. Chem.*, **278**, 1807-1816 (2003). 「ギャップジャンクションにおいて、聴覚障害の原因として知られるコネキシン 26 の変異体の解析を行った論文」 33 件
- H. Stahlberg, D. Fotiadis, S. Scheuring, H. Remigy, T. Braun, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi and Engel, Two-dimensional crystals: a powerful approach to assess structure, function and dynamics of membrane proteins. *FEBS Lett.*, **25154**, 1-8 (2001). 「膜タンパク質の構造解析を行う有力な方法として、2次元結晶を作製して、電子線結晶学で構造と機能研究について解説した総説」 32 件
- F. Imamura, S. Maeda, T. Doi and Y. Fujiyoshi, Ligand Binding of the Second PDZ Domain Regulates Clustering of PSD-95 with the Kvl.4 Potassium Channel. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3640-3646 (2002). 「PSD-95 の 2 番目のPDZドメインとその位置が局在化機能に重要であることを解明した論文」 26 件
- C. Sato, K. Hamada, T. Ogura, A. Miyazawa, K. Iwasaki, Y. Hiroaki, K. Tani, A. Terauchi, Y. Fujiyoshi and K. Mikoshiba, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor contains multiple cavities and L-shaped ligand-binding domains. *J. Mol. Biol.*, **336**, 155-164 (2004). 「解析期間の飛躍的な短縮に成功し、多孔性窓構造を持つイオンチャネルの機能上重要な点を議論可能にした論文」 25 件
- T. Yamaguchi, Y. Murata, Y. Fujiyoshi and T. Doi, Regulated Interaction of Endothelin B Receptor with Caveolin-1. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1816-1827 (2003). 「ET_BRとカベオリン 1 との相互作用を研究して、ET_BRにおけるシグナル伝達の制御機構を解明した論文」 23 件
- T. Ogura and C. Sato, An automatic particle pickup method using a neural network

applicable to low-contrast electron micrographs. *J. Struct. Biol.*, **136**, 227-238 (2001). 「単粒子解析のボトルネックである“粒子選びだし”用プログラムを開発した論文」 19 件

- N. Gyobu, K. Tani, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, K. Mitsuoka, and Y. Fujiyoshi, Improved Specimen Preparation for Cryo-Electron Microscopy using a Symmetric Carbon Sandwich Technique. *J. Structural Biol.*, **146**, 325-333(2004). 「電子顕微鏡像撮影において、電子線照射試料部分が帯電して像の劣化が生ずるが、その問題を解決する方法開発に関する論文」 17 件
- J. Nakamura, G. Tajima, C. Sato, T. Furukohri and K. Konishi. Substrate regulation of calcium binding in Ca^{2+} -ATPase molecules of the sarcoplasmic reticulum. I. Effect of ATP. *J. Biol. Chem.*, **277**, 24180-24190 (2002). 「筋小胞体における Ca^{2+} -ATPaseのATP依存的カルシウムイオン結合の制御機構に関する論文」 15 件
- T. Ogura, K. Iwasaki and C. Sato, Topology representing network enables highly accurate classification of protein images taken by cryo electron-microscope without masking. *J. Struct. Biol.*, **143**, 185-200 (2003). 「Growing Neural Gas Network (GNG)を改良することで、膨大な単粒子画像の分類が極めて高精度にかつ短時間に行えることを見出した論文」 14 件
- Y. Kyogoku, Y. Fujiyoshi, I. Shimada, H. Nakamura, T. Tsukihara, H. Akutsu, T. Odahara, T. Okada and N. Nomura, Structural Genomics of Membrane Proteins. *Accounts of Chemical Research*, **36**, 199-206 (2003). 「創薬などに関わる膜タンパク質の構造研究手法や結果に関する総説」 14 件

研究期間終了後に発表された論文

- T. Gonen, Y. Cheng, P. Sliz, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, S. C. Harrison and T. Walz, Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature*, **438**, 633-638 (2005). 「電子線結晶学を用いて1.9 Å分解能でアクアポリン-0の構造を解析し、水分子を可視化することに成功した論文」 107 件
- Y. Hiroaki, K. Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, K. Nishikawa, H. Suzuki, T. Walz, S. Sasaki, K. Mitsuoka, K. Kimura, A. Mizoguchi and Y. Fujiyoshi, Implications of the Aquaporin-4 Structure on Array Formation and Cell Adhesion. *J. Mol. Biol.*, **355**, 628-639 (2006). 「脳に発現が見られるアクアポリン-4の解析から、チャンネルでありながら細胞接着の機能を有すること等を解明した論文」 63 件
- T. Ogura, K. Mio, I. Hayashi, H. Miyashita, R. Fukuda, R. Kopan, T. Kodama, T. Hamakubo, T. Iwastubo, T. Tomita and C. Sato, Three-dimensional structure of the gamma-secretase complex. *BBRC*, **343**, 525-534 (2006). 「単粒子解析法によるガンマセクレターゼの立体構造を解析した論文」 30 件
- P. J. Holm, P. Bhakat, C. Jegerschold, N. Gyobu, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi, R. Morgenstern and H. Hebert, Structural Basis for Detoxification and Oxidative Stress Protection in Membranes. *J. Mol. Biol.*, **360**, 934-945 (2006). 「極低温電子顕微鏡を用いて細胞小胞で機能するグルタチオン転移酵素、MGST-1の構造を解析した論文」 21 件
- K. Yakata, Y. Hiroaki, K. Ishibashi, E. Sohara, S. Sasaki, K. Mitsuoka and Y. Fujiyoshi, Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim.*

Biophys. Acta., **1768**, 688-693 (2007). 「アクアポリン-11 の水透過機能を解析して、アクアポリン-11 が水透過性の機能を有することを証明した論文」 16 件

- K. Iwasaki, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, K. Sekiguchi and T. Yamada, Electron tomography reveals diverse conformations of integrin α IIb β 3 in the active state. *J. Structural. Biol.*, **150**, 259-267 (2005). 「細胞接着や情報伝達に重要な役割を担うインテグリンの機能構造を解析した論文」 15 件
- Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and G. E. Sosinsky, Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *PNAS*, **104**, 10034-10039 (2007). 「ギャップ結合チャネルのゲーティング機構を解明し、教科書を書き換えることとなるプラグモデルを提唱した論文」 11 件

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報。

(1) 研究成果の社会への還元状況

水チャネルやアセチルコリン受容体などの構造が解析されたので、これら膜タンパク質の構造情報を使って、チャネルのブロッカーを始めとする創薬にむけた設計に利用され始めている。

2004年1月9日付けの日本経済新聞の「経済教室」の部分に野依良治先生（理化学研究所理事長）が「科学技術国益を考え新戦略、競争意識を高めよ、個人の創造力重視が基本」と題して記事を書かれている。その最初の部分で、（ノーベル賞の）「結果を見ての印象は第1に、化学賞の米国アグリ教授（マッキノン教授と共同受賞）の業績に---藤吉好則・京都大学教授の水チャネルタンパクの構造解析研究が大いに貢献していることだ。」と書いていただいているように、Johns Hopkins School of Medicine の Peter Agre 博士は、我々との共同研究により 2003 年のノーベル化学賞を受賞した。また、上記マッキノン教授（Prof. Roderick MacKinnon, Rockefeller University/Howard Hughes Medical Institute）に書いていただいた藤吉へのある推薦状（2007年5月22日付けの Program Committee of the World Premier International Research Center initiative 宛の藤吉拠点長としての応募を支持する推薦状）の中で、” Professor Fujiyoshi has received international recognition for his scientific achievements, including the Keio Medical Science Prize. A case can easily be made that he should have shared the Nobel Prize in Chemistry with Professor Agre for Aquaporin studies.” と評価して下さっている。

ノーベル賞受賞後の 2004 年の 3 月に、Agre 教授が我々の研究室を訪ねて下さることになったので、平成 15 年度科学研究費補助金追加配分を受けて、2004 年 3 月 17 日に「ノーベル化学賞受賞者 Peter Agre 博士講演会」を開催した。2004 年 3 月 16 日の朝日新聞にはこの講演会を記事として掲載しており、その中で「アグレ教授の共同研究者、藤吉好則・京大理学研究所教授が代表を務める文部科学省の特別推進研究班の主催で、朝日新聞社後援」と、この講演会の開催を伝えている。この講演会には多くの若い研究者を含む人々が参加し、水チャネルの不思議や研究の面白さなどを伝えることによって、重要な社会的還元と考えられる催しとなった。講演会終了後の懇親会では、学生や大学院生などの多くの若い研究者やその卵が、ノーベル賞受賞者と直接親しく懇談した。参加者は感激すると共に、異口同音に研究への興味を持ったと感想を述べていた。

独自に開発した極低温電子顕微鏡は 1 台 3 億円から 4 億円と高価であるが、欧米各国

を含めて合計20台ほどが販売されて、主に研究分野への貢献をすると共に日本の企業の経済活動の助けにもなっていると思われる。

(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況

本研究計画には、3人の研究分担者が参加した。

土井知子：＜当時＞日本電子株式会社基礎研究部・主任研究員

佐藤主税：＜当時＞産業技術総合研究所・構造生理研究グループ・主任研究員

宮澤淳夫：＜当時＞理化学研究所・生体マルチソーム研究チーム・連携研究員

本研究計画の進展もあり、土井知子氏は現在、京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学教室の准教授に昇進した。佐藤主税氏は現在、産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門構造生理研究グループ・グループ長に昇進した。宮澤淳夫氏は現在、理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター構造生理学研究グループ・ディレクターに昇進し、2009年4月から兵庫県立大学教授に就任予定である。

本研究計画に参加した研究分担者はいずれもすばらしい研究成果をあげて、昇進しており、しかもそれぞれのポジションでより精力的に研究を進めている。

また、研究分担者ではないが、ポスドクや大学院生として本計画に参加していた研究者も、研究成果をあげて良いポジションを獲得すると共に、活発な研究を推進している。

例えば、本研究計画に大学院生として協力していた大嶋篤典博士は、ギャップ結合チャンネルコネキシン26の構造を解析して、教科書を書き変えるプラグゲーティングモデルを提案した。これらの研究は世界的に高く評価されており、京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学教室の助教のポジションを得て、引き続きギャップ結合の構造研究を進めている。

また、例えば、本研究に京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学教室の教務補佐員として協力していた谷一寿氏は、学位を取得すると共に、京都大学大学院理学研究科特別講座特任助教のポジションを得て、水チャンネル等の研究などを精力的に進めている。