

生命化学研究レター

(2011年7月)

2. 巻頭言

新しい時代に向けて

大阪大学大学院理学研究科 深瀬 浩一

4. 研究紹介

4. ヒト血清アルブミン (HSA) を用いた機能分子・材料の創製
-人工ヘム蛋白質からナノチューブまで-

中央大学理工学部 小松 晃之

11. まさかシャペロンが... ! ?

東京大学分子細胞生物学研究所 泊 幸秀

16. DNA の微小空間を利用する分析法の開発

-小分子結合リガンドの開拓と脱塩基部位含有 DNA の利用-

東北大学大学院理学研究科 西澤 精一

22. 論文紹介「気になった論文」

九州大学稲盛フロンティア研究センター 野中 洋

奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 長尾 聡

30. 留学体験記

メリーランド大学留学体験記

University of Maryland, Department of Chemistry and Biochemistry 中山 静香

35. 特集 東日本大震災の記録・教訓

35. 震災対応の事例

東北大学大学院薬学研究科 叶 直樹

43. 阪神淡路大震災、そして東北地区太平洋沿岸地震 (東日本大震災) を体験して...

東北大学大学多元物質科学研究所 和田 健彦

49. シンポジウム等会告

第5回 バイオ関連化学シンポジウム (第26回 生体機能関連化学シンポジウム、第14回 バイオテクノロジー部会シンポジウム、第14回 生命化学研究会シンポジウム、第8回 ホスト-ゲスト超分子化学シンポジウム)

第38回 国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2011)

第14回 生命化学研究会

編集後記

巻頭言



新しい時代に向けて

大阪大学大学院理学研究科 深瀬 浩一

このたびの東日本大震災は多くの方の命を奪っただけでなく、多くの地域に甚大な被害をもたらしました。東北大学をはじめ本会の会員の皆様の中にも、被害にあわれた方が多数おられますが、大きな怪我をされた方はいなかったと伺っております。一日も早い復旧、復興を心よりお祈り申し上げますが、現状ではそれもままならぬ困難な状況です。その中でも皆様が真摯に教育研究に取り組まれていることに深く敬意を表したいと存じます。微力ではありますが、フロンティア生命化学研究会として何ができるのか考え、今後実行していきたいと考えています。

福島第一原発の事故も相まって、我が国全体が困難な状況に置かれています。しかし、多くの問題が複雑な相関関係を持ち、常に動的に変化しているために、現状のシステムでは対応が困難な上に、政治のみならず社会全体でも様々な意見や利害が対立して、それらの調整もままならない状況です。硬直化した組織やシステムでは急激な環境変化や予想もしない危機には対応できず、速やかな戦略変更や組織変革を適切に進めることも困難です。従って 複雑な危機に対応していくために、これからの我国の様々な社会や組織において、戦略やシステム等の変更が余儀なくされると考えております。若い方には前例(因習?)に囚われず、未来に向けて道を切り拓いてほしいと思います。

原発事故がなくてもエネルギー、環境問題は重要課題でしたが、今や愁眉の問題となっております。本会の会員の中にもエネルギー、環境問題に取り組まれている方がおられると思います。これらの課題を解決するには新しい科学技術が必要であることは言うまでもないことであり、自由な発想をもってブレイクスルーがもたらされることを切に期待します。言い尽くされた言葉ではありませんが「科学技術は諸刃の剣」ということを念頭に置きつつ、人間の幸福を実現するためのサイエンスとテクノロジーに取り組んでいただきたいと思います。

フロンティア生命化学研究会では、生命システムを化学の言葉で理解し、応用するという高い目標と理念を掲げ、分野の壁を越えて(それまでは前例のなかった)取り組みを行ってきました。メンバーの研究対象、研究アプローチは多様性に富み、その発想やアイデアは好奇心を大いに刺激してくれるだけでなく、貴重な情報の交換の場となっています。会員の皆様には、フロンティア生命化学研究会活動をドライビングフォースにして新しい領域を切り拓いていってほしいと願ってい

ます。そのためには、サイエンス・テクノロジーが好きであること、自由な気持ちでこれらに取り組むこと、すなわち やりたいことをやることが重要だと存じます。一方で公的な資金で研究を行っているからには、常に新しいことに取り組み、成果を挙げることはプロフェッショナルな科学者としての義務でもあります。鍵となるのはやはり創造性だと思いますが、最後に私の師匠である芝哲夫先生がJames Watson博士に創造性とは何かと尋ねられた時の答えを示させていただきます。

“Creativity equals successful curiosity. By James D. Watson”



ヒト血清アルブミン(HSA)を用いた 機能分子・材料の創製 —人工ヘム蛋白質からナノチューブまで—

中央大学 理工学部 応用化学科

小松 晃之

(komatsu@kc.chuo-u.ac.jp)



【要旨】我々はヒト血清アルブミン(HSA)の多分子結合能を利用して、その内部に機能性分子を包接させる方法や、HSA と高分子電解質の交互積層膜を細孔内で作成する方法により、自然界には見ることのできない一群の機能分子・材料を創製してきている。遺伝子組換えアルブミン(rHSA)に鉄プロトポルフィリン IX (heme)を結合させた rHSA-heme 錯体は酸素吸脱着のできる人工ヘム蛋白質となり、HSA-亜鉛プロトポルフィリン IX 錯体は水の光還元による水素発生反応の増感剤として作用する。一方、多孔性ポリカーボネート膜をテンプレートとした鋳型内交互積層法により、HSA からなる中空シリンダー構造のナノチューブが合成できる。これら新機能分子・材料の特徴と応用展開について、最近の話題を紹介する。

1. はじめに

ヒト血清アルブミン(HSA)は血漿蛋白質の約 60%を占める補欠分子族を持たない単純蛋白質(分子量:66,500)であり、血流中では膠質浸透圧維持のほか、各種内因性・外因性物質(脂肪酸、ヘミン、ビリルビン、金属イオン、ホルモン、薬物)の運搬・貯蔵、pH 緩衝作用、エステラーゼ活性などの役割を担っている^[1,2]。1992年、CarterらはHSAのX線結晶構造解析に初めて成功し、その三次元構造の全容を明らかにした^[3]。585個のアミノ酸からなる一本鎖ポリペプチドは、17個のジスルフィド結合を介して折りたたまれ(長径:約8nm)、相同性の高い3つのドメインI~IIIを構成している[各ドメインはさらに2つのサブドメインA、Bに分けられる(Fig. 1)]。

我々はHSAの多分子結合能にいち早く着目し、その内部に鉄テトラフェニルポルフィリン誘導體(合成ヘム:FeP、Fig. 2a)を包接させたアルブミン-ヘム(HSA-FeP)複合体を調製した。面白いことに得られたHSA-FeP複合体は、生理条件下でヘモグロビン(Hb)と同様に酸素を可逆的に吸脱着することができた^[4,5]。これまでに30種類以上のFePを合成し、その酸素結合能とヘム構造の相関を整理してきている^[5]。酸素錯体の安定度は天然のミオグロビン(Mb)を上回り、酸素親和性($P_{1/2}$)は0.1 Torrから230 Torrまで望みの値に揃えることができる。HSA-FeP水溶液の血液適合性は高く、血液凝固系、補体系、血小板の活性化にも影響はない。小動物を用いた脱血交換投与試験から、生体内酸素輸送能が実証されている^[6a,b]。修飾Hb製剤に見られるような血管内皮細胞からの漏出、NO捕捉

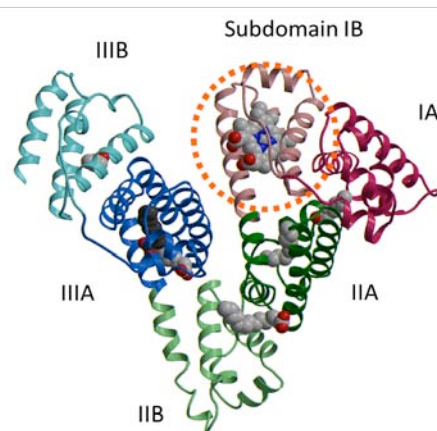


Fig. 1 Structure of HSA complexed with hemin and fatty acids (PDB 1o9x). The domains are colored (I; red, II; green, III; blue). The A and B subdomains are depicted in dark and light shades, respectively.

に伴う血管収縮、血圧亢進は全く見られない^[6c]。これは HSA の表面電荷が負に帯電しているため、血管から漏れ出しにくいことに起因する。

近年、HSA を用いた人工蛋白質の例がいくつか報告されている。Gross らは HSA に Mn(III) コロルを結合させた複合体が、過酸化水素によるスルフィドの立体選択的酸化に有効であることを見出した^[7]。また、Reetz らは HSA に Cu(II) フタロシアニンを結合させた複合体が、Diels-Alder 反応の触媒になることを報告している^[8]。

本稿では、酸素運搬体、光増感剤から、蛋白質ナノチューブまで、我々が進めている HSA を利用した新しい機能分子・材料の創製と応用について紹介したい。

2. 遺伝子組換えアルブミン-プロトヘム錯体

2-1 人工ヘムポケットの構築

HSA-FeP 複合体の酸素結合部位は、複雑な立体構造を有する鉄テトラフェニルポルフィリン誘導体 (FeP) であり、可逆的な酸素結合解離は分子設計通りの機能発現ともいえる。酸素運搬体の開発において、究極の挑戦はやはり天然の鉄プロトポルフィリン IX (プロトヘム、heme) (**Fig. 2b**) を用いた人工ヘム蛋白質の構築にあらう。我々はアミノ酸の一部を改変した組換え HSA (rHSA) に heme を包接させた rHSA-heme 錯体が、Hb と同じように酸素を吸脱着することを見出した^[9]。

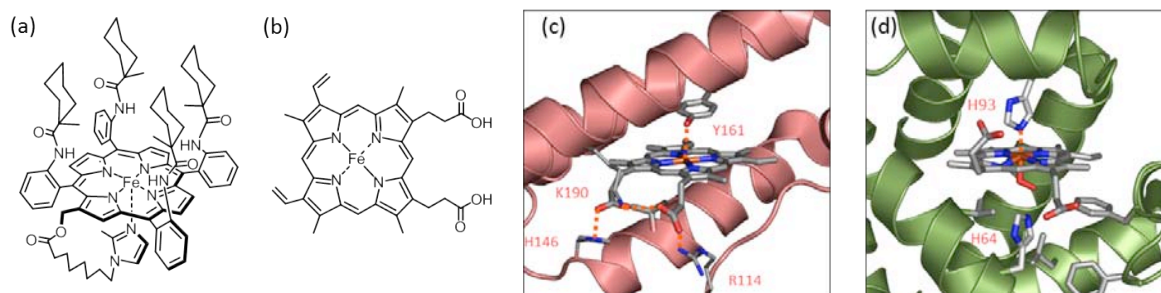


Fig. 2 Chemical formula of (a) synthetic iron(II) tetraphenylporphyrin (FeP) and (b) iron(II) protoporphyrin IX (heme). Heme pocket structures of (c) HSA-hemin complex (PDB 1o9x) and (d) oxy-Mb (PDB 1mbo).

溶血により血中に放出されたメト Hb から解離した鉄 (III) プロトポルフィリン IX (hemin) は、通常 ヘモペキシンという糖蛋白質に捕捉される。しかし、ヘモペキシンの血中濃度はきわめて低いため、遊離 hemin の多くは HSA に結合し肝臓へと運ばれる。Hemin が HSA に捕捉されることは古くから知られていたが、その構造は明らかにされていなかった。2002 年、Carter と我々のグループは独自に HSA-hemin 錯体の X 線結晶構造解析に成功し、hemin がサブドメイン IB 内の疎水ポケットに挟み込まれるような形で結合していることを解明した (**Fig. 1**)^[10,11]。Hemin の中心鉄には Tyr-161 のフェノレート酸素が軸配位し、二つのカルボキシル基は塩基性アミノ酸残基 (Arg-114, His-146, Lys-190) と相互作用することより、しっかりと固定されている (**Fig. 2c**)。よく知られているように、Mb のヘムポケット内では His-93 がヘム鉄に軸配位し、酸素分子はそのトランス側 (第 6 配位座) に結合する。さらに His-64 が遠位塩基として酸素錯体を安定化している (**Fig. 2d**)。ここで両者 (**Fig. 2c,d**) を見比べてみると、その高い構造類似性に気づく。しかし、HSA-hemin 錯体の中心鉄を鉄 (II) に還元し酸素を吹き込んでみても、残念ながら酸素錯体は得られない^[9]。それは軸配位子が His ではないためである。Heme が疎水的な分子空間に固定されている構造は Mb と共通しているので、それならば HSA の場合でもヘム鉄の配位圏内 (サブドメイン IB) に His が存在すれば、酸素錯体

ができるのではないかと考えた。そこで Ile-142 位置へ近位塩基としての His を変異導入し、さらに中心鉄に軸配位している Tyr-161 を疎水性アミノ酸 (Leu) に変換してみると、得られた組換え HSA-heme [rHSA (I142H/Y161L)-heme] 錯体 (Fig. 3a) は、室温で酸素を可逆的に吸脱着することができた^[9,12a]。rHSA と heme から構成される酸素輸送人工ヘム蛋白質の初めての例である。

rHSA(I142H/ Y161L)-heme 錯体の $P_{1/2}$ は 18 Torr (22°C) で、Hb、Mb、ヒト赤血球の値に比べて高い (酸素親和性は低い)。この低い酸素親和性は、大きな酸素解離速度定数 (k_{off}) に起因する。rHSA の中では heme を取り囲む分子環境が疎水的であるため k_{off} が大きく、酸素親和性が低く抑えられているのである。

2-2 酸素親和性の制御

実際に rHSA (I142H/Y161L)-heme 錯体を人工酸素運搬体として利用するためには、その $P_{1/2}$ 値を Hb や赤血球の値に近づけなければならない。そこで、第三の変異を導入することにより、酸素親和性を上げる試みを行った。前述したように、Hb や Mb のヘムポケット内には His-64 が遠位塩基として存在し、酸素親和性の増大に寄与している。我々は rHSA の場合も、酸素配位座側の適当な位置に遠位塩基を導入すれば、酸素親和性が上昇するであろうと考えた。分子シミュレーションの結果から配位酸素直上の Leu-185 を選定し、そこへ遠位塩基としての Asn を導入した [rHSA (I142H/Y161L/L185N)]^[12b]。rHSA (I142H/Y161L/L185N)-heme 錯体 (Fig. 3b) の $P_{1/2}$ は 1 Torr (22°C) となり (酸素親和性はもとの二重変異体 rHSA (I142H/Y161L)-heme に比べ 18 倍上昇)、Hb と同等の酸素親和性を有する人工ヘム蛋白質が完成した。つまり、我々は本来補欠分子族すら持たない単純蛋白質の HSA に酸素結合能を付与することに成功したばかりでなく、ヘムポケットの微小空間を部位特異的アミノ酸置換により最適化することで、酸素親和性のコントロールも可能にしたのである^[5,12b,c]。

rHSA-heme 錯体は天然のプロトヘムを活性中心とする、いわば“酸素輸送のできる赤色の血漿蛋白質”といえる。臨床利用可能な赤血球代替物として、実用化に向けた努力を進めている。

3. アルブミン-亜鉛プロトポルフィリン錯体

水素は二酸化炭素排出のないクリーンエネルギーである。Grätzel らは亜鉛テトラメチルピリジニウムポルフィリン (ZnTMPyPP^{4+}) をメチルビオロゲン (MV^{2+}) / 白金コロイド / EDTA 水溶液に加え可視光照射すると、水の光還元反応が進行し、水素が発生することを見出した^[13]。もし、プロトポルフィリン IX を水の光還元利用にできれば、天然物質を増感剤とした水素生成システムが確立する。しかし、亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) は水 (pH 7.0) に難溶で、そのまま使用することは難しい。そこで ZnPP を HSA に包接させることにより HSA- ZnPP 錯体とし、アルゴン雰囲気下で MV^{2+} を加えてレーザーフラッシュ (532 nm) 照射してみると、 ZnPP の励起三重項状態から MV^{2+} への電子移動が生じた^[14]。さらに、白金コロイド、犠牲試薬としてのトリエタノールアミンを加え可視光照射すると、溶液中から水素が発生した。水素発生効率は ZnTMPyPP^{4+} を用いた場合よりも高く、HSA- ZnPP 錯体が有効な増感剤として機能することがわかった。

この結果は、アルブミン-ポルフィリン錯体において、ポルフィリンの中心金属を変えることにより、

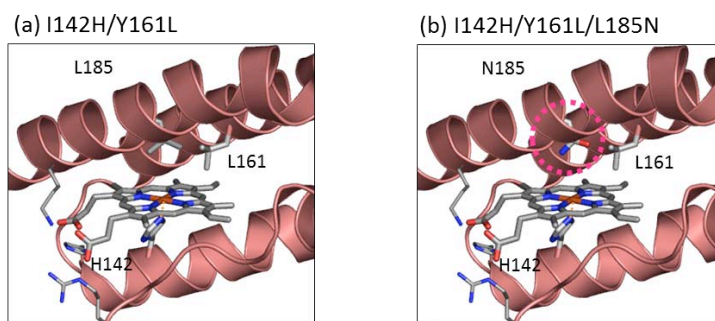


Fig. 3 Structural model of the heme pocket in (a) rHSA(I142H/Y161L)-heme complex and (b) rHSA(I142H/Y161L/L185N)-heme complex.

様々な機能を持った人工蛋白質が創製できることを示唆している。また、金属ポルフィリン以外の機能性分子も HSA に包接させることが可能である。例えば、HSA にフラーレン誘導体を結合させたアルブミン-フラーレン複合体が、一重項酸素生成の光増感剤となり、腫瘍光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) に有用であることも見出している^[15]。

4. 蛋白質ナノチューブ

4-1 HSA からなるナノチューブの合成

ピキア酵母を用いた遺伝子組換え体の量産体制が確立して以来、HSA は臨床利用のみならずバイオマテリアルの有用な素材としても注目を集めている^[16]。我々は多孔性膜の均質な細孔空間を利用した鋳型内交互積層法により、HSA からなる中空シリンダー構造のナノチューブを合成することに成功した^[17]。HSA の等電点は 4.8 と低く、生理条件下では分子表面が負に帯電している。前述したように HSA が血管外へ逸脱し難いのは、血管内皮細胞の外側にある基底膜との静電反発による。そこで、①適当な高分子電解質 (例えば、ポリ-L-アルギニン (PLA) などのポリアミノ酸など) を多孔性ポリカーボネート (PC) 膜の細孔に通し、②続いて HSA 水溶液を通過させる。この操作①②を丁寧に繰り返しながら、細孔内壁に HSA の交互積層 (Layer-by-Layer) 膜を作成し、最後に PC 膜を溶解除去すると、均一で柔軟なナノチューブが得られる^[17c]。孔径 400 nm の PC 膜に PLA と HSA を各三回ずつ通過させて作成した計 6 層構造からなる (PLA/HSA)₃ ナノチューブの外径は 407 ± 10 nm、管壁厚は 50 ± 4 nm であった (Fig. 4a)。水中における形態を明らかにするため、(PLA/HSA)₃ ナノチューブの水分散液を凍結乾燥し、得られた試料の SEM、TEM 観察を行った。水中では管壁が膨潤し、その厚みは約 100 nm に増大する (Fig. 4b,c)。

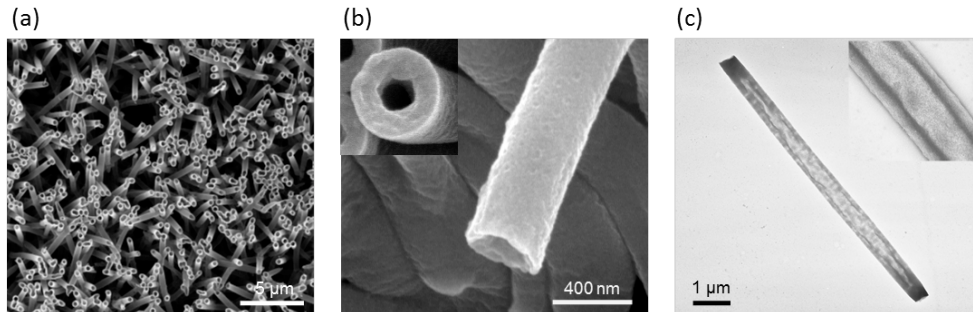


Fig. 4 Electron microscopy images of (PLA/HSA)₃ nanotubes. (a) SEM of as-prepared dried sample, (b) SEM of the freeze-dried sample of the aqueous dispersion, and (c) TEM of the air-dried sample of the aqueous dispersion.

4-2 HSA ナノチューブの分子捕捉能

得られたナノチューブは、HSA の分子捕捉能を保持していた^[17c]。例えば、(PLA/HSA)₃ ナノチューブの水分散液に HSA のリガンドである蛍光色素 3,3'-ジエチルチアカルボシアニン (DTC; 結合定数 (K) = 1.7×10^4 M⁻¹) を加え、遠心分離後、上澄み溶液の蛍光スペクトルを測定すると、蛍光強度はナノチューブがない場合に比べ 35%まで減少し、DTC が (PLA/HSA)₃ ナノチューブに捕捉されていることがわかった。(i) 内孔表面の HSA 層を PLA でブロックした (PLA/HSA)₃ PLA ナノチューブでも同様な蛍光強度の減少が見られたこと、(ii) HSA の代わりにポリ-L-グルタミン酸 (PLG) を用いて作成した (PLA/PLG)₃ ナノチューブでは蛍光スペクトルが全く変化しないことから、DTC は (PLA/HSA)₃ ナノチューブの管壁を構成する HSA 層に結合していると考えられる。

ZnPP は HSA のサブドメイン IB 内に中心金属と Tyr-161 との軸配位を介して結合する^[14]。

(PLA/HSA)₃ ナノチューブの水分散液に ZnPP を添加すると、DTC 同様 管壁に効率よく捕捉された。一方、組換え HSA 変異体[rHSA (I142H/Y161L/L185N)]では、Tyr-161 に代わり His-142 が ZnPP に配位するため、結合定数は HSA に比べ約 3 倍上昇する。rHSA (I142H/Y161L/L185N)を用いてナノチューブを調製し、同条件で ZnPP の取り込みを観測してみると、(PLA/HSA)₃ ナノチューブより高い捕捉率を示した。

HSA のサブドメイン IB は脂肪酸の結合サイトでもある。ZnPP を捕集した(PLA/HSA)₃ ナノチューブに過剰量のミスチン酸を加えると、リガンド交換反応が起こり、結合していた ZnPP が速やかに解離した。

以上の結果は、HSA ナノチューブが可逆的な分子捕捉能を有するばかりでなく、遺伝子組換え技術を利用した HSA とリガンドの結合力調節により、その分子捕捉能が調整できることを示している。

4-3 ハイブリッド蛋白質ナノチューブ

分子捕捉能をより選択的かつ強固にするため、最内層にアビジン(Avi, Mw: 68,000)を配置した(PLA/HSA)₃PLG/Avi ナノチューブを合成した(外径:416 ± 11 nm、管壁厚:119 ± 9 nm)^[17c]。このナノチューブには、フルオレセイン標識ビオチン(FITC-ビオチン)が効率よく取り込まれた(**Fig. 5a**)。(PLA/HSA)₃PLA ナノチューブには全く捕捉されないことから、FITC-ビオチンは Avi 層に結合していると考えられる。この反応を利用すると、ビオチン修飾蛍光ナノビーズをサイズ選択的にチューブ内へ取り込ませることができる。直径 250 nm の大きなビーズは内孔に入らないのに対し、直径 100 nm の小さなナノビーズは充填率約 30%まで捕捉されることが、蛍光スペクトル測定と TEM 観察から明らかとなった(**Fig. 5b**)^[17c]。

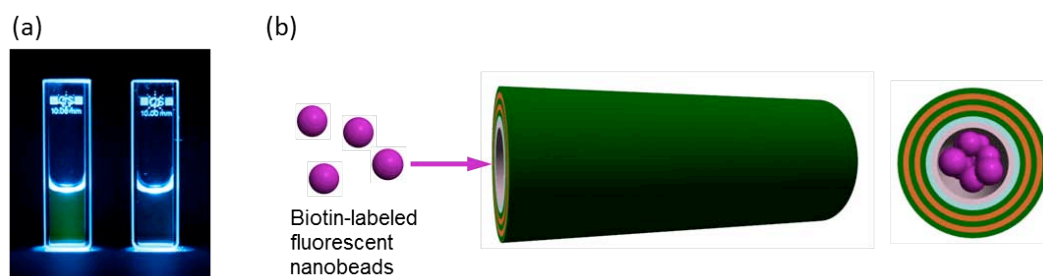


Fig. 5 (a) Photograph of (left) FITC-biotin solution and (right) supernatant treated with (PLA/HSA)₂PLA/PLG/Avi nanotubes and (b) schematic illustration of biotin-fluorescent nanoparticle capture in (PLA/HSA)₂PLA/PLG/Avi nanotube.

微小な一次元内孔空間で化学反応を起こすことができれば、選択的な分子変換や、内孔をテンプレートとした鋳型合成が可能となる。最内層に α -グルコシダーゼ (α GluD, Mw: 68.5 kDa)を積層したナノチューブを作成し、その酵素反応について検討した。得られた(PLA/HSA)₂PLA/ α GluD ナノチューブの水分散液に基質(クマリンが α -1,4 結合したグルコピラノシド)を加えると、瞬時に加水分解が生起し、生成物(4-メチルウンベリフェロン)に基づく強い蛍光(450 nm)が観測された^[18]。

一方、フェリチン(Fr)は生体内で鉄イオンの捕捉・貯蔵の役割を担う 直径 12 nm、内部に径 6 nm の酸化鉄コアを有する球殻状蛋白質である。鋳型内交互積層法により、Fr と PLA の計 6 層構造からなる(PLA/Fr)₃ ナノチューブを合成した^[19]。TEM 観察では、無染色でも管壁を構成する Fr 分子の配列まではっきりと捉えることができた。そのナノチューブを熱処理(500 °C)し、有機成分を完全に除去すると、酸化鉄(α -Fe₂O₃)ナノ粒子(粒径:約 5 nm)からなるナノチューブが得られた(**Fig. 6**)。シリ

ダー構造を保持したまま、外径は 400→200 nm、長さは 9→5 μm に減少した。この赤褐色のナノチューブは、超常磁性や光触媒活性を有する。例えば、クロロフェノールの光分解反応では、酸化鉄粉末(粒径:約 400 nm)に比べ高い触媒能を示した。より高温(700 $^{\circ}\text{C}$)で調製したナノチューブは、管壁を構成する $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 粒子の直径が大きく(20 nm)、触媒活性が低下したことから、高い触媒能は $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ナノ粒子の緻密積層構造がもたらす特異な機能発現といえる。コバルト置換フェリチンを用いると、酸化コバルトからなる均質なナノチューブが得られる。

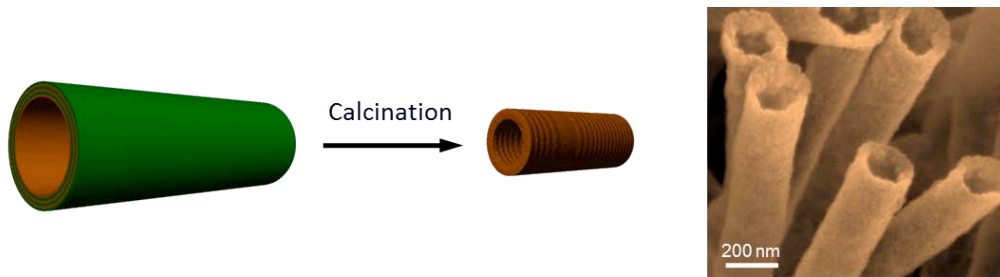


Fig. 6 Schematic illustration of (PLA/Fr)₃ nanotube and calcinated Fe₂O₃ nanotube, and SEM image of Fe₂O₃ nanotubes.

ごく最近、最内層に抗 HBs 抗体を配置した HSA ナノチューブを調製し、その内孔にヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) を捕捉させることに成功した^[20]。感染性のある球状粒子 (Dane 粒子) のみを選択的にほぼ 100% 捕まえる能力があり、注目を集めている。

5. おわりに

我々はヒト血清アルブミンを利用して、ユニークな一群の人工蛋白質を創製している。当初は酸素運搬体に焦点を絞った展開であったが、水の還元による水素発生や一重項酸素生成の光増感剤となるアルブミンも開発した。多分子結合能のみならず、きわめて高い水溶性、光や熱に対する安定性といった血漿蛋白質アルブミンならではの特徴が、これらの物質系において重要な役割を果たしている。他方、アルブミンからなる中空シリンダー構造のナノチューブを合成し、ウイルス捕捉、標的薬物の結合・放出、ナノリアクター、ナノバイオデバイスなど、多くの機能展開を進めている。

参考文献

- 1) T. Peters, *All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*; Academic Press: San Diego (1996).
- 2) a) U. Kragh-Hansen, *Pharmacol. Rev.* **1981**, *33*, 17; b) U. Kragh-Hansen, *Danish Med. Bull.* **1990**, *37*, 57.
- 3) X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **1992**, *358*, 209.
- 4) a) T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 397; b) Y. Huang, T. Komatsu, R.-M. Wang, A. Nakagawa, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 393; c) A. Nakagawa, T. Komatsu, M. Iizuka, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 581.
- 5) E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, K. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1419.
- 6) a) T. Komatsu, H. Yamamoto, Y. Huang, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, *J. Biomed. Mater.*

- Res. **2004**, 71A, 644; b) Y. Huang, T. Komatsu, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, *Biomaterials* **2006**, 27, 4477; c) E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Matsukawa, A. Nakagawa, H. Sakai, K. Kobayashi, M. Suematsu, *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, 64A, 257.
- 7) A. Mahammed, Z. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2883.
 - 8) M. T. Reetz, N. Jiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2416.
 - 9) T. Komatsu, N. Ohmichi, P. A. Zunszain, S. Curry, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14304.
 - 10) M. Wardell, Z. Wang, J. X. Ho, J. Robert, F. Ruker, J. Rubel, D. C. Carter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 291, 813.
 - 11) P. A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, S. Curry, *BMC Struct. Biol.* **2003**, 3, 6.
 - 12) a) T. Komatsu, N. Ohmichi, A. Nakagawa, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15933; b) T. Komatsu, A. Nakagawa, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11286; c) T. Komatsu, A. Nakagawa, S. Curry, E. Tsuchida, K. Murata, M. Nakamura, H. Ohno, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 3836.
 - 13) K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, *Helv. Chim. Acta* **1980**, 63, 478.
 - 14) T. Komatsu, R.-M. Wang, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16297.
 - 15) X. Qu, T. Komatsu, T. Sato, O. Glatter, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1556.
 - 16) K. Kobayashi, *Biologicals* **2006**, 34, 55.
 - 17) a) G. Lu, T. Komatsu, E. Tsuchida, *Chem. Commun.* **2007**, 2980; b) X. Qu, G. Lu, E. Tsuchida, T. Komatsu, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 10303; c) X. Qu, T. Komatsu, *ACS Nano* **2010**, 4, 563.
 - 18) T. Komatsu, H. Terada, N. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 1849.
 - 19) X. Qu, N. Kobayashi, T. Komatsu, *ACS Nano* **2010**, 4, 1732.
 - 20) T. Komatsu, X. Qu, H. Ihara, H. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 3246.

研究紹介

まさかシャペロンが...!?

東京大学分子細胞生物学研究所

泊 幸秀

(tomari@iam.u-tokyo.ac.jp)



はじめに: small RNAはややこしい

今や、遺伝子名で検索をすれば「ロックダウン保証付き」の siRNA (small interfering RNA) が数万円程度で購入でき、それを普通にトランスフェクションすれば、(よっぽど不運でない限り) だいたいどんな遺伝子でも簡単にロックダウンできる時代である。1998 年の Mello と Fire による「例の論文」¹ から十数年、RNAi はもはや日常のツールとして確固たる地位を獲得したと言って過言ではない。また、1993 年に Ambros と Ruvkun により発見された当初は、「線虫にだけ存在する変な現象」だと思われていた miRNA (microRNA)^{2,3} も、その後ヒトを含めた動物・植物・菌類・ウィルスに至るまで広く保存された遺伝子発現制御システムであることが明らかとなり、また最近では癌をはじめとする様々な疾患と関わりも指摘されており、多くの研究者の耳目を集めている。

にもかかわらず、これらの small RNA が、どのようなしくみで標的遺伝子の発現を抑制するのか、ということについては、まだまだ不明な点が数多く残されている。その理由の一つとして、通常の酵素とは違い、small RNA はそれ自身が触媒活性を持っているわけではなく、small RNA と複数のタンパク質を含むエフェクター複合体を形成してはじめてその機能を発揮できるという点が挙げられる。つまり、small RNA が働くしくみを理解するためには、small RNA のことだけではなく、エフェクター複合体がどのようなタンパク質によって構成されているのか、その複合体がどのようにして組み立てられるか、そしてその複合体全体としてどのような機能を持つのか、ということを考える必要があり、非常にややこしいのである^A。最近我々は、ひょんなことから、このエフェクター複合体の組み立てに Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーが重要な働きを果たしていることを明らかにした⁴。以下はその背景と(紆余曲折の)いきさつである。

RISCの中核因子Argonaute

small RNAのエフェクター複合体のことを、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ぶ。RISCを介し、small RNAは標的mRNAの切断や翻訳抑制を行う。RISCの見かけ上の分子量は百数十kDaから80S程度とばらついており、その構成タンパク質因子(の候補)も数多く報告されている。しかし、それらの因子のほとんどは、具体的な役割がよく分かっていない。唯一、機能がはっきりしているのが、Argonaute (Ago) と呼ばれるタンパク質である^B。Agoタンパク質はsmall RNAに直接結合し、small RNAの一本の鎖を「ガイド」として用い、その鎖に対して相補的な配列を持つ標的

RNAを認識する。Agoタンパク質の一部（例えばショウジョウバエやヒトではAgo2）は、RNaseHに似た切断活性を有しており、標的RNAとsmall RNAとの相補性が高い場合は、その切断を直接触媒する。逆にこの相補性が低い場合や、切断活性を持たないAgoタンパク質（例えばヒトではAgo1, 3, 4）の場合は、標的の翻訳抑制や脱アデニル化を引き起こす一群のタンパク質をリクルートする^C。つまり、Agoタンパク質は、RISCの最も中核をなす因子であると言える。

二本鎖から一本鎖へ

siRNAもmiRNAも、生合成過程において21塩基程度のRNAが二本鎖を組んだ様な中間段階を経る。これらをsiRNA二本鎖、miRNA/miRNA* 二本鎖と呼び、合わせてsmall RNA二本鎖と呼ぶ^D。しかし、（当然二本鎖のままでは標的RNAと塩基対を組むことは出来ないために）RISCの中で標的認識のガイドとしてはたらくことができるのは、片方の鎖だけである。よって、RISCが形成されるどこかの過程で、二本の鎖が一本ずつに分離され、片方が捨てられる必要がある。small RNA二本鎖のうち、捨てられる方の鎖を「パッセンジャー鎖」、RISCのガイドとして働く方の鎖を「ガイド鎖」と呼ぶ。以前は、small RNA二本鎖は、まず何らかのRNAヘリカーゼにより一本鎖に巻き戻された後に、一本鎖としてAgoに取り込まれると考えられていた^E。しかし、最近の研究から、siRNA二本鎖もmiRNA/miRNA*二本鎖も、まず二本鎖のままAgoに取り込まれ、その後Agoの内部において二本鎖が一本鎖に巻き戻されるということが実験的に示されている^{F-12}。このsmall RNA二本鎖のAgoへの取り込み段階を“RISC loading”，Agoの内部で二本鎖が一本鎖に変換される段階を“unwinding”と呼ぶ。

ATPはなぜ必要なのか？

miRNAのRISC形成過程を解析している中で、我々は、RISC loadingにはATPの加水分解が必要なものに対し、unwindingにはATPが必要ないという意外な事実を見いだした^{11,12}。RISC loading”という、Agoとsmall RNA 二本鎖との一見単純な「結合」になぜかエネルギーが消費され、“unwinding”では20個程度の塩基対が壊されるのにも関わらずエネルギーが必要ないということは、通常の生化学的感覚からすれば非常に不思議なことである。

我々はこの実験事実を合理的に説明するために、「輪ゴムモデル」を提唱した¹³。このモデルでは、Agoにsmall RNA 二本鎖が取り込まれるためには、Agoのダイナミックな構造変化が必要であり、この変化にこそATPが消費されるということを想定している。これはちょうど、小さめの輪ゴムに長い二本の棒を入れ込もうとすると、まず（エネルギーを使って）手で輪ゴムを引っ張る必要があるのに似ている。続いて、small RNA 二本鎖がひとたびAgoに入ると、さらに構造変化が起こりAgoはより閉じた安定構造に戻ろうとする。この時、Ago内部の空間が小さくなることにより、small RNAは二本鎖のままではとどまれなくなり、片方が押し出されると想定すれば^E、unwindingにATPが必要ないことがうまく説明できる。これは、輪ゴムを引っ張っていた手を離れた時を考えると分かりやすい。バクテリアや古細菌のAgoのホモログ^Fの結晶構造解析^{14,15}から、Agoタンパク質

に対して、21塩基程度のsmall RNA二本鎖がA型ヘリックスとったものは大きすぎることが示唆されていることは、このモデルを支持するものである。

RISC loading因子の探索（と挫折）

ここで問題になるのは、最初にAgoの構造を広げるために働く“RISC loading 因子”，つまり「輪ゴムを引っ張っている手」の本質が何かということである。幸いなことに、我々はショウジョウバエ胚およびS2細胞，ヒトのHeLa細胞やHEK293細胞等の粗抽出液を用いて，効率良くin vitroでRISC形成を行える実験系を持っていた。さらに，ショウジョウバエAgo2経路においては，これまでにRISC形成に必要なだということが生化学的に確認されているAgo2，Dicer-2およびR2D2をリコンビナントで作成し，そこに*dcr-2;ago2* 二重変異体のショウジョウバエ胚粗抽出液^Gを加え戻すことで，RISC形成が再構成できることを見いだした。これは，粗抽出液中に未知のRISC loading 因子が存在することを明確に示すものであった。

実験系は立った。あとは因子を同定するのみである。そこで，我々はショウジョウバエAgo1およびAgo2をモデルとして，既知因子^Hをリコンビナントとして調製したところに，粗抽出液をカラム分画したものを加え戻してRISC活性を確認することで，RISC loading 因子を精製することを試みた。しかし，当初の楽観的な予想に反して，精製作業は困難を極めた。カラム精製を進めると，ピークが複数に分かれてしまい，またどれだけ大量の粗抽出液から始めてみても，3つ以上のカラムをかけるとほぼ活性がなくなってしまうのである。小林さんと岩崎君という二人の学生がそれぞれAgo1とAgo2を担当し，8ヶ月間に渡って何度も低温室で精製を繰り返し，標的切断活性とタンパク質溶出のピークが合うそれらしいバンドを切り出しては，いわゆる「ドーバー海峡」^Iを渡り，工学部の鈴木勉さんと坂口さんのところにサンプルを持ち込み，幾度となくMS解析をお願いしたが，結局因子の単離同定には至らなかった。しかし，その過程の中で，Hsp70の恒常的発現ホモログであるショウジョウバエHsc70-4が，しばしば活性のピークと一致することに気がついた。また，試しにAgo1とAgo2を免疫沈降し，結合するタンパク質を調べてみると，Hsc70-4のほか，Hsp90のショウジョウバエホモログであるHsp83，Hsc70とHsp90をつなぐとされるHop，Jドメインタンパク質（Hsp40ホモログ）の一つであるDroj2など，Hsc70/Hsp90シャペロンマシナリーの構成要素が釣れてきた。通常であれば，タンパク質精製あるいは免疫沈降実験においてシャペロンが出てきても，非特異的なものとして即座に捨てる場合が多いだろう。我々も，最初に実験結果を見た時は「まさかシャペロンが・・・!？」という思いだった。しかし，「輪ゴムモデル」を考えた時，シャペロンの働きは「ATPを消費してAgoの構造を変化させる」というRISC loadingの反応にピタリと一致するものだったのである。

Hsc70/Hsp90シャペロンマシナリーがRISC loadingを媒介する

ここからは展開が早かった。Hsp90には特異的阻害剤としてゲルダナマイシンやその誘導体である17-AAGがよく知られている。また，もともとp53の活性を阻害することが知られており，構造が

簡単で入手しやすいPifithrin- μ (phenylethynesulfonamide: PES) が、実はHsp70の阻害剤として働くことが最近示されていた^{J,16}。そこで、これらの阻害剤を購入し、ショウジョウバエAgo1およびAgo2経路、およびヒトAgo2経路におけるRISC形成過程に対する影響を解析した。その結果、これらすべての経路において、Hsp90阻害剤とHsp70阻害剤はともに、small RNA二本鎖がAgoに取り込まれるRISC loadingの段階を特異的に阻害するのに対し、その後Ago内で二本鎖が巻き戻されるunwindingの段階や、さらにその後の標的切断反応、そしてその切断産物の放出には全く影響を与えないことが明らかとなった。また、Hsc70-4のドミナントネガティブ変異体を実験系に加えると、RISC形成が顕著に阻害されることも分かった。これらの実験結果は、ATPを消費するRISC loadingの際に、Hsc70/Hsp90シャペロンマシナリーによるAgo構造変化が必要であることを示唆するものであり、我々が提案した「輪ゴムモデル」を強く支持するものである。ちょうど同じ時期に、農業生物資源研究所の石川先生のグループ、慶応大学の塩見先生のグループも、それぞれ植物のAGO1経路、ショウジョウバエのAgo2経路において、Hsp90に着目した同様の実験結果を得ていることが分かり、結果的にこの3グループから論文が発表されることになった^{4,17,18}。RISC形成にシャペロンが必須な働きを果たすという新たなモデルを、日本から世界に向かって発信できたことは、誇るべきことだと思う。

さいごに: RISC 形成の“PURE System”に向けて

以上の様に、本研究から、RISC形成には、シャペロンを介したAgoタンパク質のダイナミックな構造変化が伴うことが明らかになった。しかし、その具体的な分子メカニズムはまだ不明瞭である。実際、我々が免疫沈降で同定したHsc70-4, Hsp83, Hop, Droj2だけではRISC形成は全く起こらない。よって、良く解析されたステロイドホルモンレセプターの成熟過程同様¹⁹、Agoタンパク質にもHsc70/Hsp90と多くのコシャペロンが順序よく作用することが必要なのだろう^K。ふたを開けてみれば、最初の精製においてピークが複数に分かれてしまったことも、精製が進むと活性が失われたことも、Hsc70/Hsp90システムが様々なコシャペロンを含む「マシナリー」として働き、様々なクライアントタンパク質に結合していることを考えれば納得がいく。しかし、今後分子レベルの詳細な作用機序を明らかにするためには、RISC形成過程を完全に再構成することが必要であろう。そして、結局そのためには初心に戻り、既知因子をリコンビナントとして調製し、さらに必要となる因子を精製・同定することを避けては通れないと思われる。「単離と再構成」という愚直な生化学²⁰は、次世代シーケンサが1時間に1,000億塩基読もうとする現代もなお黄金律でありつづけている。RISC形成の“PURE System”²¹を構築することは、我々の目標であり、あこがれである。

文献と注釈

1. Fire, A. et al.: Nature, 391: 806-811, 1998
2. Lee, R. C. et al.: Cell, 75: 843-854, 1993
3. Wightman, B. et al.: Cell, 75: 855-862, 1993
4. Iwasaki, S. et al.: Mol Cell, 39: 292-299, 2010

5. Bohmert, K. et al.: EMBO J, 17: 170-180, 1998
6. Nykanen, A. et al.: Cell, 107: 309-321, 2001
7. Leuschner, P. J. et al.: EMBO Rep, 7: 314-320, 2006
8. Matranga, C. et al.: Cell, 123: 607-620, 2005
9. Miyoshi, K. et al.: Genes Dev, 19: 2837-2848, 2005
10. Rand, T. A. et al.: Cell, 123: 621-629, 2005
11. Kawamata, T. et al.: Nat Struct Mol Biol, 16: 953-960, 2009
12. Yoda, M. et al.: Nat Struct Mol Biol, 17: 17-23, 2010
13. Kawamata, T. & Tomari, Y.: Trends Biochem Sci, 35: 368-376 2010
14. Song, J. J. et al.: Science, 305: 1434-1437, 2004
15. Wang, Y. et al.: Nature, 461: 754-761, 2009
16. Leu, J. I. et al.: Mol Cell, 36: 15-27, 2009
17. Miyoshi, T. et al.: Nat Struct Mol Biol, 17: 1024-1026, 2010
18. Iki, T. et al.: Mol Cell, 39: 282-291, 2010
19. Taipale, M. et al.: Nat Rev Mol Cell Biol, 11: 515-528, 2010
20. 水島昭二: 蛋白質核酸酵素, 38: 2089-2091, 1993
21. Shimizu, Y. et al.: Nat Biotechnol, 19: 751-755, 2001

- A. しかしそのややこしさのおかげで我々研究者は飯が食えているとも言える。
- B. ちなみに、Argonauteとは、植物での変異体が(miRNAが機能できないことにより)葉が細長くタコのような異常な形態を示すことから、殻を持つタコ的一种Argonauta(日本語ではアオイガイまたはカイダコ)にちなんで付けられた名前である⁵。
- C. かつては、翻訳抑制などを含めたRNAサイレンシング現象のことを総称してRNAiと呼んでいたが、最近ではRNAiと言えば標的切断反応のことを指す場合が多い。
- D. 通常実験室で使われている siRNA は、まさに「siRNA 二本鎖」のことである。
- E. これまでの知見から、ガイド鎖の5'リン酸基は、Agoに固くアンカーされることが明らかになっていることから、unwindingの際には(アンカーされていない)パッセンジャー鎖が選択的に排除されると考えられる。
- F. バクテリアや古細菌にはmiRNAやsiRNAは存在しないため、これらのAgoホモログの生理的機能は不明である。
- G. R2D2はDicer-2 非存在下では非常に不安定なため、*dcr-2;ago2* 粗抽出液は、既知因子であるAgo2, Dicer-2, R2D2の3つすべてを欠損している。
- H. Dicer-2とR2D2というRISC loadingに必須な因子が同定されているショウジョウバエAgo2 経路に対し、ショウジョウバエAgo1 経路およびヒトAgo1~4の経路においてRISC形成に必要なことが明確に示されている因子はAgoタンパク質自身だけである。
- I. 東大の本郷キャンパスと弥生キャンパスを隔てる言問通りのことをこう呼ぶらしい。
- J. 元の論文では、ほ乳類においてはPESはHsp70特異的に阻害し、Hsc70には作用しないことが示唆されていたが、我々はショウジョウバエHsc70-4とAgo1およびAgo2の結合はPESによって阻害されることを実験的に確認した。
- K. small RNA二本鎖をAgoタンパク質のリガンドだと捉えれば、Hsc70/Hsp90シャペロンマシナリーがきちんと作用して成熟化することにより、はじめてリガンドであるステロイドに結合できるようになるステロイドホルモンレセプターの場合と極めてよく似ている。

DNAの微小空間を利用する分析法の開発

～小分子結合リガンドの開拓と
脱塩基部位含有DNAの活用～

東北大学大学院理学研究科化学専攻

西澤 精一

(nishi@m.tohoku.ac.jp)



1. はじめに

エチジウムブロマイドやヘキストに代表される DNA 結合リガンドは、核酸の定量や染色体染色、リアルタイム PCR 法などにおいて汎用されており、ケミカルバイオロジー分野において欠かすことのできない研究ツール（分析試薬）となっている。現在、「インターカレーター（塩基対間への挿入結合）」および「グロブバインダー（溝への結合）」と呼ばれる二つのタイプの典型的な DNA 結合リガンド（モード）が知られており、前者は1本鎖/2本鎖DNAの識別機能、後者はある程度の塩基配列選択性を持つ。例えば、ヘキスト33342は、ATリッチな塩基配列を有するDNA二重鎖の副溝に結合するグロブバインダーで、結合によって蛍光強度が著しく増大することから、染色体観察における有用な蛍光プローブである。しかし、多くのDNA結合リガンドは主にDNA二重鎖を標的とする蛍光色素として利用されており、分析試薬としてのDNA結合リガンドの機能（応用）は限定されていると言わざるを得ない。

著者らは、既存のDNA結合リガンドにはない新しい機能を有するDNA結合リガンドの開発、特に分析試薬としての機能開拓を意図して研究を進めてきた。著者らのアプローチの最大の特徴は、DNA二重鎖中の核酸塩基に直にアクセスするための微小空間（脱塩基部位）を設けることで、これによりワトソン・クリック型類似の疑似塩基対形成が可能となるため、DNA結合リガンドによる核酸塩基の精密識別・検出（一塩基多型検出）が達成できることになる。また、脱塩基部位への可逆的かつ選択的なりガンド結合に基づき、核酸のアフィニティーラベル化法を提案するとともに、脱塩基部位含有二重鎖DNAをアプタマーとして利用することを提案した。本稿では、これらの研究成果について紹介させていただきたい。

2. 一塩基多型検出[1-3]

一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs）検出法は、ハイブリダイゼーション法及び酵素法に大別される。ハイブリダイゼーション法は、アレル特異的オリゴプローブ（allele specific oligo probe: ASO）の熱力学的安定性の差を利用するもので、蛍光団などでラベル化処理を施した検体DNAに、標的となる配列に対して特異的に二本鎖形成能を有するASOをハイブリダイズさせた後、洗浄操作などを経て蛍光検出を行う。この検出原理は主にDNAチップなどで採用されている。また、後者の酵素反応を利用する手法としては、Dye-labeled oligonucleotide ligation 法や一塩基伸長反応を利用する手法があり、TaqMan PCR 法や Invader Assay 法は酵素反応と ASO の両方を検出原理に利用する代表的な手法である。

一方、著者らは、DNA 結合リガンドならびに脱塩基部位 (AP sites; apurinic/apyrimidinic sites) 含有 DNA プローブを併用する、全く独自の塩基多型検出法を提案した [1-3]。具体的には、AP site 含有プローブ DNA を検体 DNA とハイブリダイゼーションさせることで標的塩基の向側に微小空間を構築、同空間中におけるリガンド/核酸塩基間の相互作用の有無をモニターすることにより遺伝子中の塩基の違いを検出する (図 1)。つまり、

核酸塩基 (アデニン、グアニン、シトシン、チミン) を見分けることのできる新しい蛍光性 DNA 結合リガンドを開発、これらが塩基選択的に微小空間 (脱塩基部位) に取り込まれる際の蛍光シグナル変化を検出する [1,2]。また、この検出原理を応用し、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 検出や電気化学検出システムを併せて開発した [3]。

図 1 に示したように、見出したリガンドはいずれも、標的塩基と水素結合する部位を有し、脱塩基部位に隣接する核酸塩基とスタッキング相互作用し得る π 電子系骨格を有しており、脱塩基部位で核酸塩基と結合することにより蛍光特性が変化する。これらの蛍光性リガンドは標的塩基に対して解離定数 μM 以下の十分な結合親和力を有し、複数のリガンドを併用することで、SNPs タイピングが可能となる。

SNPs に基づく薬剤感受性の個人差を迅速かつ確実に分析しうる技術や高効率ゲノム情報解析技術の実現を目指す研究は極めて重要な位置を占めており、上述のとおり SNPs を分析する技術として多くの方法が提案され、かつ実用に供されている。しかし、それらの方法の多くは海外で開発されたものであり、我が国の科学・技術の独自性を考えるとき、日本から発信し得る独自技術の開発が必要不可欠となる。本手法は、多くの既往法で多用される検体 DNA の蛍光ラベル化といった化学修飾操作や特殊な酵素を一切必要としないユニークな解析法であり、加えて、検出の際には、DNA ポリメラーゼ・原料 dNTP 等の除去操作や標的 DNA の精製操作、また、精密な温度制御や洗浄操作が一切不要で、低コストかつ簡便な解析が可能であることから、臨床等における簡易検査法として、ハイスループットな解析技術と相補的な検出技術になりうると期待される。現在、さらにリガンドの検出機能の改良を進めるとともに、実用化に向けた取組みを進めている。

3. トリヌクレオチドリピート配列の認識 [5]

トリヌクレオチドリピート病と総称される遺伝性の神経変性疾患は、遺伝子内の特定の3つの核酸塩基 (トリヌクレオチドリピート) 配列の異常伸張により発症する。異常伸張は、中間体として生成されるヘアピン構造形成に起因していると考えられており、熱力学的に準安定なミスマッチ塩基対がステム部位に存在することが特徴である。中谷らは、この構造に着目し、ハンチントン病に関連する $(\text{CAG})_n$ 配列を標的とした結合リガンド (ナフチリジン-アザキノロンヘテロダイマー) を開発、これに基づく SPR (surface plasmon resonance) アッセイを提案している [4a]。また、Baranger らは、筋強直性ジストロフィーに関連する $(\text{CTG})_n$ 及び $(\text{CUG})_n$ 配列を標的とした結合リガンド (トリアミノトリアジン-アクリジンコンジュゲート) を開発、RNA 結合タンパク質 (MBNL, muscleblind-like) の結合を阻害しうることを明らかにしている [4b]。

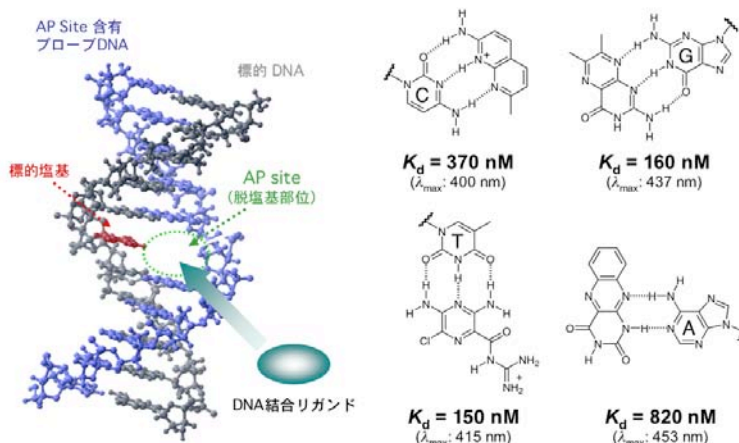


図1 脱塩基部位含有 DNA プローブを併用する DNA 結合リガンドによる塩基多型検出

一方、筆者らは脆弱性 XE 精神遅滞症 (fragile site XE-linked mental retardation, FRAXE MR) に関連する (CCG)_n 配列を標的とし、これを高感度かつ簡便に蛍光検出する DNA 結合リガンドの開発を試みた [5]。(CCG)_n 配列では、CC ミスマッチ塩基対が形成されることから、シトシンと結合する蛍光性の 2-アミノ-1,8-ナフチリジン誘導体と (CCG)_n 配列との相互作用を評価した。その結果、2-アミノ-1,8-ナフチリジン誘導体が、CC ミスマッチ塩基対と特異的に結合しうることを見出し、

中でもナフチリジン骨格に 3 個のメチル基を導入した化合物 (ATMND, 2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine) が (CCG)_n 配列を高感度に検出しうることを見出した (図 2)。化学量論の検討から、1つの CC ミスマッチ塩基対に 2 分子の ATMND が結合していることが示唆され、その結合定数は $2.5 \times 10^{12} \text{ M}^{-2}$ ($K_{11} = 3.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}, K_{12} = 8.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) に達することがわかった (pH 7.0, $I = 115 \text{ mM}$, at 4°C)。

これらの小分子リガンドは、いずれも水素結合を介してミスマッチ塩基対に結合することに特徴があり、既往の核酸結合リガンドでは達成しえない結合選択性を有することから、抜本的な治療薬が存在しないトリヌクレオチドリピート病に関する創薬研究の一助になりうると期待できる。

4. アプタマーとしての脱塩基部位含有二重鎖 DNA [6]

RNA あるいは DNA を生体関連基質に対する機能性核酸 (分析試薬) として利用する試み、いわゆるアプタマーは、SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法を主体とする方法論によって開発されており、主にインターナルループやステムループ構造が標的基質に対する結合サイトとして機能していることが知られている。一方、筆者らは DNA 中の脱塩基部位 (AP site) を基質結合サイトとして利用することに着目し、AP site 含有 DNA 二重鎖を低分子化合物に対するアプタマーとして利用することを提案した [6]。

具体的には、脱塩基部位の対面に位置する塩基をレセプター塩基として利用するもので、まず、リボフラビン (ビタミン B₂) を標的基質として、レセプター塩基や隣接塩基、及び二重鎖の長さについて検討した (図 3) [6a]。その結果、チミン塩基をレセプターとする 23-meric AP site 含有 DNA 二重鎖 (5'-TCT GCG TCC AGX GCAACG CACAC-3'/3'-AGACGC AGG TCT CGT TGC GTG TG-5', X = AP site, T = レセプター塩基) が、リボフラビンに対する優れたアプタマーとして機能することを見出した ($K_d = 1.9 \mu\text{M}$ at 20°C , pH=7.0, $I = 0.11 \text{ M}$)。得られた結合力は、SELEX法によって開発された RNA アプタマー ($K_d = 50 \sim 0.5 \mu\text{M}$) [7] に匹敵するもので、また、アロキサジン環に対して明瞭な結合選択性 (K_d / mM : 7,8-dimethylalloxazine, 0.062; FMN, 49; FAD, 40) を示す点は、既存の RNA アプタマーには見られない特徴である。

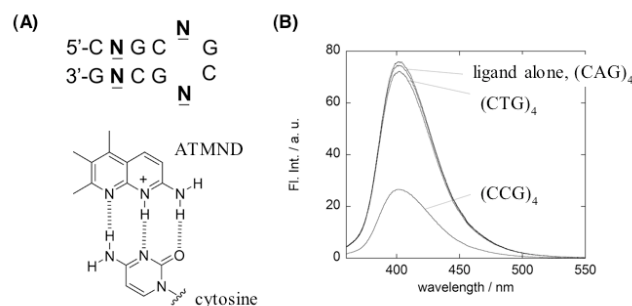


図 2 (CCG)_n 配列の検出: (A) ヘアピン構造と結合リガンド、(B) 蛍光スペクトル応答

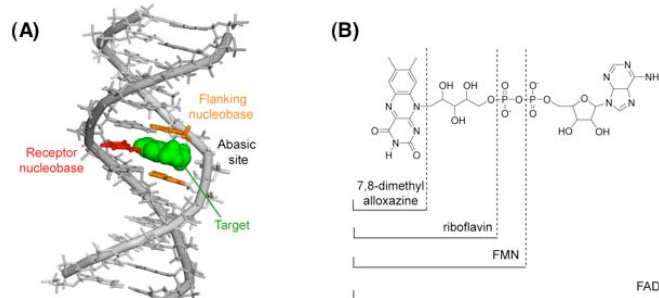


図 3 脱塩基部位含有 DNA 二重鎖アプタマー

さらに、テオフィリン（気管支喘息の治療薬）を標的基質とする蛍光性のアプタマーを開発した（図4）[6b]。ここでは、2-アミノプリンをレポーター塩基として導入し、蛍光性のAP site 含有DNA二重鎖（5'-TCT GCG TCC **TPX** TTA ACG CAC AC-3'/3'-AGA CGC AGG ATN AAT TGC GTG TG-5', **X** = AP site, **P** = レポーター塩基：2-アミノプリン, **N** = レセプター塩基：G, C, A, or T）と種々の基質（テオフィリン、テオブロミン、カフェイン、クレアチニン、グルコース、尿酸）との相互作用を蛍光法により評価した。その結果、レセプター塩基としてシトシンを用い

ることで、テオフィリンに対するほぼ特異的な蛍光シグナル応答（蛍光極大波長：367 nm）を得られることが分かった。蛍光スペクトル変化からテオフィリンに対する解離定数を算出した結果、 $10 \pm 1.0 \mu\text{M}$ となり、実試料測定（テオフィリンの有効血中濃度：60~100 μM ）に対応しうる十分な結合親和力を有していることが分かった。事実、本アプタマーを馬血清中のテオフィリン検出に適用したところ、50~200 μM のテオフィリン検出が可能であった。

このDNAアプタマーの優れた機能は、テオフィリンに対して高選択性を示す点にあり、特に、テオフィリンとカフェインを明確に識別しうる結合選択性は、SELEX法によって開発されたRNAアプタマー ($K_d/\mu\text{M}$: theophylline, 0.32; caffeine, 3,500) [8] に匹敵する。このRNAアプタマーでは、二つのインターナルループが基質結合サイトを形成し、シトシン塩基と二点水素結合を形成することでテオフィリンと選択的に結合することが報告されている。これと比較して、本DNAアプタマーでは、極めて単純な結合サイトで高選択性が発現しており、RNAアプタマーの場合と同様に、シトシン塩基との二点水素結合によりテオフィリンと結合しているものと考察している。

以上のように、AP site含有DNA二重鎖は低分子化合物に対するアプタマーとして機能しうる。既存のアプタマーはRNAをベースとするものが主流で、優れた結合親和力と選択性を発現することが報告されている。しかし、化学的に不安定であることがRNAアプタマーの問題で、汎用性のある分析試薬としての活用には難があると言わざるをえない。これに対し、DNA二重鎖中に設けたAP siteを基質結合サイトとして利用することで、十分な結合選択性と明瞭な蛍光シグナルを発現しうるセンシング機能、そして化学的安定性を兼ね備えたアプタマーの開発が可能であり、低分子化合物を標的とする場合、有用な開発方法論になると期待できる。

5. 核酸のアフィニティーラベル化法 [9]

モレキュラービーコン (MB) 法は、ステムループ構造を有する一本鎖核酸プローブを利用するもので、一塩基多型検出やRNAの発現解析、またタンパク質/核酸相互作用解析において極めて有用な蛍光アッセイ法の一つである。しかし、既往のモレキュラービーコンは、複数の蛍光色素及び消光色素を、共有結合を介して化学標識 (ラベル化) する必要があるため、その経済性の改善が重要課題となる。筆者らは、独自に開発

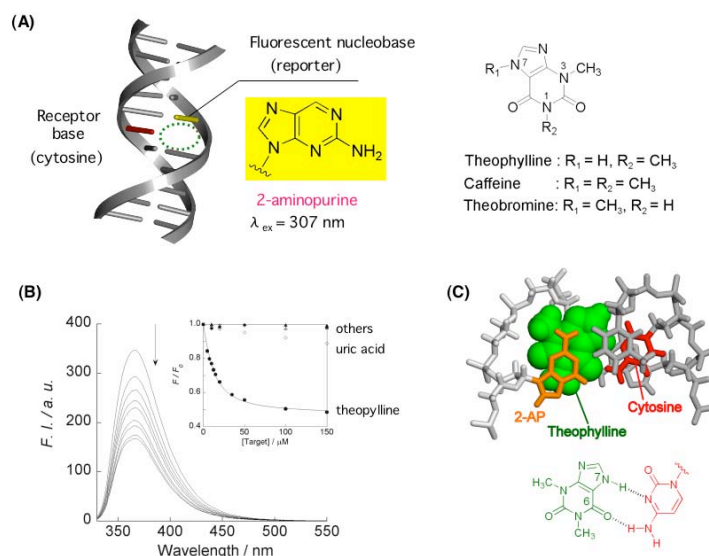


図4 テオフィリンアプタマー：(A) 構造と標的基質、(B) 蛍光スペクトル応答、(C) テオフィリンとの結合様式 (MacroModel)

した蛍光性のAP site結合リガンドをアフィニティーラベル化試薬として用いることに着目し、ラベルフリーモレキュラービーコンを提案した [9a,9b]。

具体的には、一本鎖核酸プローブのステム部位に設けた脱塩基部位 (AP site) と蛍光性物質 (AP site 結合リガンド) との特異的かつ可逆的な結合を利用するもので、モデル系として AP site 含有 MB (APMB: 5'-GCGGXGAG AAG TTA AGA CCT

ATG CTCGCCGC-3', X = AP site) ならびにナフチリジン誘導体 ATMND を用いて、標的 DNA (5'-ATA GGT NTT AACT-3', N = G, C, A, or T) に対する SNPs 検出能について評価した (図 5)。その結果、完全相補配列である標的 DNA (N = C) に対して、ほぼ特異的かつ明瞭な蛍光シグナル応答を得られることが分かった。これは、完全相補 DNA とのハイブリダイゼーションによって、APMB のステムループ構造が解消され、AP site に結合していた ATMND が解離することに起因するもので、PCR 産物 (107-meric) を解析した場合にも、既往の MB に準じて SNPs の有無を明瞭に検出可能であることが分かった。

また、本手法はアプタマー法にも効果的に適用できる [9c,9d]。例えば、Huizenga らによって開発されたアデノシンアプタマー [10a] に適用した場合、アデノシンに対する特異性を損なうことなく、明瞭な蛍光シグナルを得ることが可能である (図 6)。一般に、アプタマーを改変してシグナル機能を付与する場合、オリジナルの結合力や選択性、応答速度等を維持することは必ずしも容易ではなく、アデノシンアプタマー ($K_d = 6 \pm 3 \mu\text{M}$) も例外ではない。例えば、金ナノ粒子修飾系では検出限界が $50 \mu\text{M}$ に低下し [10b]、また、フェロセン修飾系 (検出限界 20 nM) では応答速度が著しく悪くなること (90 min) が報告されている [10c]。一方、本系の検出限界は $2 \mu\text{M}$ で、迅速かつ安定な蛍光応答を得ることができる。

以上のように、核酸プローブ中に設けた脱塩基部位と蛍光性リガンドとの特異的かつ可逆的な結合を利用することで、簡便かつ効果的な蛍光ラベル化が可能となる。本ラベル化法では、共有結合を介した蛍光標識が一切不要で、また消光色素を使用する必要もないため、モレキュラービーコン法のコストを効果的に軽減することができる。加えて、アプタマーアッセイといった核酸プローブを利用する他の蛍光アッセイ法にも適用可能で、今後、結合リガンドの結合力と蛍光特性の改良を進めることで、汎用性の高い蛍光ラベル化法になりうると期待できる。

6. おわりに

本稿では、DNA 二重鎖中に脱塩基部位を構築することをベースとして、DNA 結合リガンドによる一塩基多型検出やアフィニティーラベル化法としての応用、さらにアプタマーとしての脱塩基部位含有二重鎖 DNA の活用やトリヌクレオチドリピート配列の検出に関する著者らの取り組みを紹介させていただいた。実際に使っていただける方法論とするために、引き続き努力を重ねていきたい。

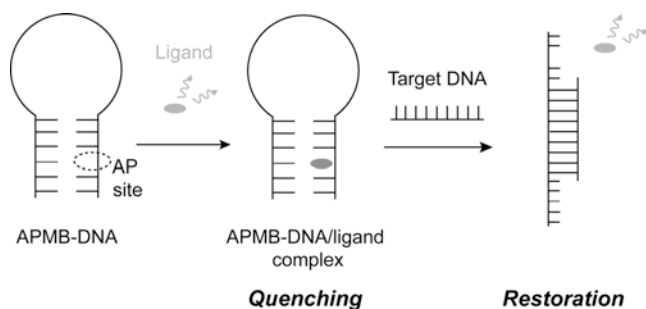


図5 ラベルフリーモレキュラービーコン

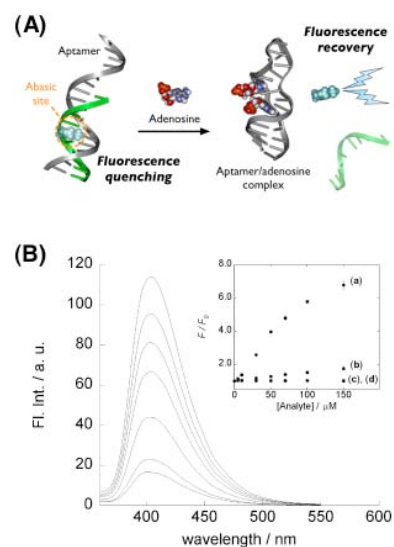


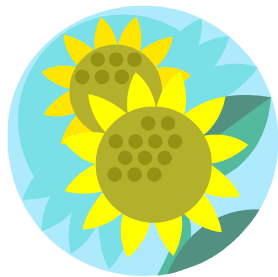
図6 ラベルフリーアデノシンアプタマー : (A) 検出原理、(B) 蛍光応答

謝辞

本稿で紹介させていただいた研究は全て、東北大学大学院理学研究科化学専攻寺前紀夫（分析化学）研究室にて行われたものです。寺前先生をはじめ、全ての共同研究者の方々に、心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1) a) K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa, N. Teramae, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8982–8983; b) K. Yoshimoto, C.-Y. Xu, S. Nishizawa, T. Haga, H. Satake, N. Teramae, *Chem. Commun.* **2003**, 2960–2961; c) C. Zhao, Q. Dai, T. Seino, Y.-Y. Cui, S. Nishizawa, N. Teramae, *Chem. Commun.* **2006**, 1185–1187; d) Q. Dai, C.-Y. Xu, Y. Sato, K. Yoshimoto, S. Nishizawa, N. Teramae, *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 201–203; e) C. Zhao, A. Rajendran, Q. Dai, S. Nishizawa, N. Teramae, *Anal. Sci.* **2008**, *24*, 693–695; f) B. Rajendar, S. Nishizawa, N. Teramae, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 670–673; g) Z. Ye, B. Rajendar, Q. Dai, S. Nishizawa, N. Teramae, *Chem. Commun.* **2008**, 6588–6590; h) N. B. Sankaran, Y. Sato, F. Sato, B. Rajendar, K. Morita, T. Seino, S. Nishizawa, N. Teramae, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 1522–1529; i) Y. Sato, S. Nishizawa, K. Yoshimoto, T. Seino, T. Ichihashi, K. Morita, N. Teramae, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1411–1422; j) V. Thiagarajan, A. Rajendran, H. Satake, S. Nishizawa, N. Teramae, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 94–100; k) 特許第 4320188 号; l) 特許第 4638419 号.
- 2) T. Ihara, A. Uemura, A. Futamura, M. Shimizu, N. Baba, S. Nishizawa, N. Teramae, A. Jyo, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1386–1387.
- 3) a) K. Morita, N. B. Sankaran, W. Huang, T. Seino, Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae, *Chem. Commun.* **2006**, 2376–2378; b) W. Huang, K. Morita, N. B. Sankaran, S. Nishizawa, N. Teramae, *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 395–398; c) K. Morita, Y. Sato, T. Seino, S. Nishizawa, N. Teramae, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 266–268; d) S. Miura, K. Ono, M. Watanabe, S. Nishizawa, N. Teramae, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 123–124; e) Y. Shao, K. Morita, Q. Dai, S. Nishizawa, N. Teramae, *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 438–442.
- 4) a) K. Nakatani, S. Hagihara, Y. Goto, A. Kobori, M. Hagihara, G. Hayashi, M. Kyo, M. Nomura, M. Mishima, C. Kojima, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 39–43; b) J. Z. Arambula, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. Zimmerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 16068–16073.
- 5) Y. Sato, A. Honjo, D. Ishikawa, S. Nishizawa, N. Teramae, *Chem. Commun.* **2011**, 5885–5887.
- 6) a) N. B. Sankaran, S. Nishizawa, T. Seino, K. Yoshimoto, N. Teramae, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1563–1568; b) M. Li, Y. Sato, S. Nishizawa, T. Seino, K. Nakamura, N. Teramae, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2448–2449; c) S. Nishizawa, Y. Sato, Z. Xu, K. Morita, M. Li, N. Teramae, *Supramol. Chem.* **2010**, *22*, 467–476.
- 7) P. Burgstaller, M. Famulok, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1084–1087; P. Fan, A. K. Suri, R. Fiala, D. Live, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1996**, *258*, 480–500; C. T. Lauhon, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1246–1257; M. Roychowdhury-Saha, S. M. Lato, E. D. Shank, D. H. Burke, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2492–2499.
- 8) R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, *263*, 1425–1429; G. R. Zimmermann, R. D. Jenison, C. L. Wick, J. P. Simorre, A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 644–649.
- 9) a) Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 121–122; b) 特願 2008-088483 (PCT/JP2009/055922); c) Z. Xu, K. Morita, Y. Sato, Q. Dai, S. Nishizawa, N. Teramae, *Chem. Commun.* **2009**, 6445–6447; d) Z. Xu, Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10375–10378.
- 10) a) D. E. Huizenga, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1995**, *34*, 656–665; b) J. Liu, J. H. Lee, Y. Lu, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4120–4125; c) Z.-S. Wu, M.-M. Guo, S.-B. Zhang, C.-R. Chen, J.-H. Jiang, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2933–2939.



気になった論文

野中 洋 (のなか ひろし)

九州大学稲盛フロンティア研究センター 山東研究室 特任助教

nonaka@ifrc.kyushu-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆機会を与えていただきまして、誠に有り難うございます。私は昨年1月に、京都大学工学研究科の浜地研究室にて学位を取得し、同年2月より九州大学稲盛フロンティア研究センターの山東研究室に特任助教として勤めさせていただいております野中洋と申します。今後とも宜しくお願い致します。現在、私は山東教授指導の下、核磁気共鳴技術(超偏極など)を用いた生物個体における分子プローブの開発を目指し、研究を進めております。今回は気になった論文として、超偏極を利用した核磁気共鳴センサー分子をはじめ、パラジウム触媒による細胞内有機化学、タンパク質(生体分子)の超高速指向進化法に関する論文を紹介させていただきます。

A hydrogen peroxide-responsive hyperpolarized ^{13}C MRI contrast agent

A. R. Lippert, K. R. Keshari, J. Kurhanewicz, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 3776–3779 (2011).

活性酸素種(reactive oxygen species : ROS)は様々な疾患への関与が示唆されており、幅広い研究領域で注目を集めている低分子群です。ChangらはROSの一種である過酸化水素を核磁気共鳴法により検出する分子プローブの開発を行いました。核磁気共鳴法は生体透過性に優れており、生体深部での解析に適しているという利点を有していますが、検出感度が低いという問題を抱えていました。Changらは、この問題を解決するためのアプローチとして、超偏極(Hyperpolarization)を用いたプローブ分子を用いることにしました。超偏極とは、動的核偏極法などにより核スピンを通常の熱平衡状態から超偏極状態にシフトさせることにより、 ^{13}C や ^{15}N といった安定同位体の感度を数万倍以上向上させる技術です。そのため、核磁気共鳴法の抱える感度の問題をクリアできる可能性を秘めた手法であります。Changらは、安定同位体核である ^{13}C 標識したプローブ分子(^{13}C -BFA)を超偏極して用い、過酸化水素との選択的な反応によって α -ケト酸誘導体(^{13}C -BFA)からカルボン酸誘導体(^{13}C -BA)への構造変化を ^{13}C NMRの化学シフト変化で感度よく検出しています(図1左)。最終的に、超偏極プローブを用い ^{13}C の化学シフト選択的イメージングを行うことで、過酸化水素による反応の進行を画像化することにも成功しています(図1右)。本論文は、まだコンセプトの段階であり、超偏極状態の寿命の問題など解決しなければならない点もありますが、今後の展開が期待される論文だと思います。分子の構造が変化すれば化学シフトが変化するという点は有機化学者に

とって非常にわかりやすく、蛍光プローブなどで必要な蛍光団のように余分な分子量の増加を伴わない点も利点かと思われます。

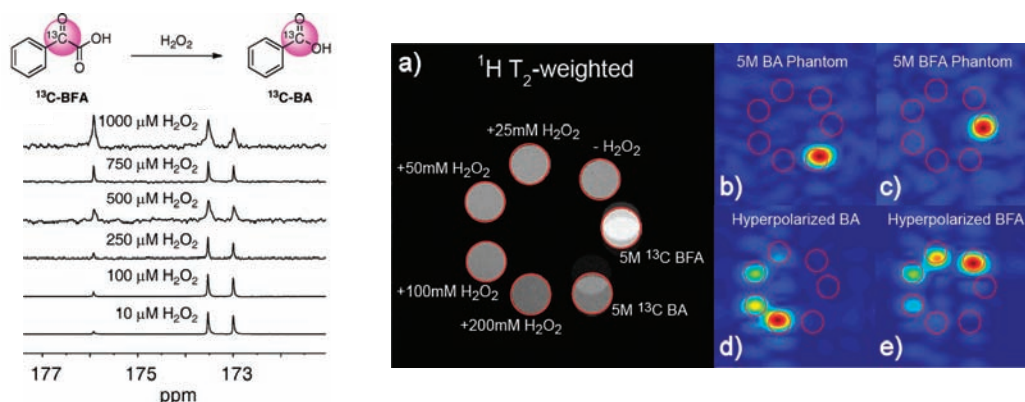


図1 左: プローブ分子の構造と H₂O₂ との反応スキーム, 右: a) ^1H -MRI と各サンプルの濃度条件, b-c) 熱平衡状態での ^{13}C -MRI, d-e) 超偏極状態での ^{13}C -MRI (論文より一部改変)

Palladium-mediated intracellular chemistry

R. M. Yusop, A. Unciti-Broceta, E. M. V. Johansson, R. M. Sánchez-Martín, M. Bradley,
Nat. Chem., **3**, 239-243 (2011).

2010年のノーベル化学賞が「パラジウム触媒を用いたクロスカップリング」に与えられたことは記憶に新しいのではないかと思います。パラジウム触媒は、合成反応に役立つ多くの遷移金属触媒の中でも最も多角的で触媒反応の種類も多いものとなっており、有用な化合物の合成に多数用いられています。

本論文で、Bradleyらは、パラジウム担持ポリスチレンマイクロ粒子を用い、細胞内で Alloc 基の脱保護や鈴木-宮浦カップリングなどのパラジウム触媒反応を行うことに成功しています。これまでに、彼らはポリスチレンのマイクロ粒子を用いた目的分子の細胞内への導入等を行っており、この粒子の優れた生体適合性と核外局在性を確認しております。今回は、ポリスチレンのマイクロ粒子(500 nm)に Pd(0)を担持させ、パラジウム触媒として細胞に取り込ませることにしました。調製した粒子は、細胞添加後 24 時間で 75%以上の細胞に 1つ以上の触媒粒子が取り込まれていることがフローサイトメトリーを用いた解析により確認されました。次に、実際に触媒反応を行った鈴木カップリングの例を紹介致します。カップリング前は無蛍光の分子 **3** とミトコンドリア移行能をもつ分子 **4** があります(図 2 A)。この 2 分子と触媒粒子共存下においてのみカップリング生成物 **5** 由来の蛍光が観測され、細胞内でのカップリング反応を示唆する結果でした。共焦点レーザー顕微鏡による解析の結果、合成された分子は蛍光を発するだけでなくミトコンドリアに局在していることからカップリング反応が進行していることを示唆しています(図 2 B, C, D)。

今回用いられたようなパラジウム触媒の有機化学反応は、生体成分との反応直交性を有している可能性が高く、細胞内で目的の化合物を合成するのに役に立つのではないかと思います。細胞内でのパラジウム触媒を用いた解析系や機能発現(プロドラッグなどへの可能性が示されていました)

への応用が考えられるようです。

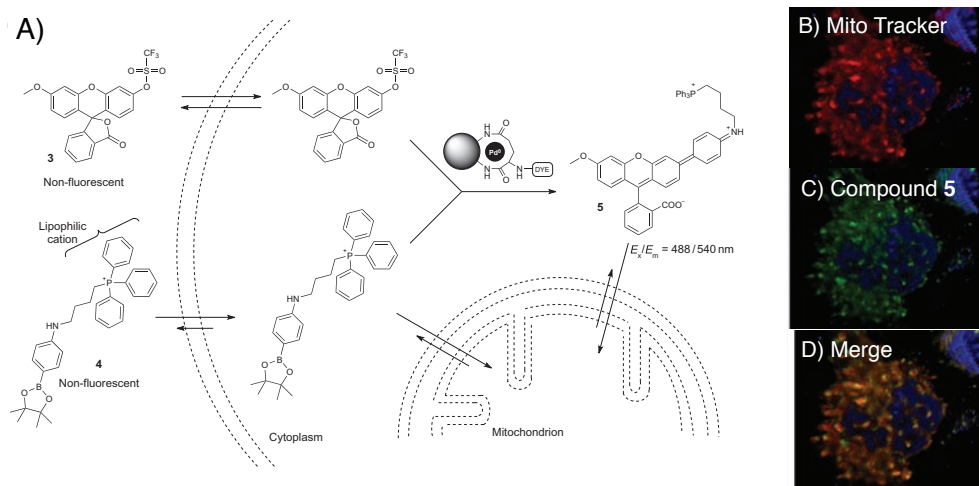


図2 細胞内での鈴木-宮浦カップリング、A) 模式図、B-D) 共焦点レーザー顕微鏡画像（論文より一部改変）

A system for the continuous directed evolution of biomolecules

K. M. Esvelt, J. C. Carlson, D. R. Liu, *Nature*, **472**, 499-503 (2011).

最後に、タンパク質（生体分子）の高速指向進化のための新手法に関して紹介させていただきます。Liu らは「進化」をキーワードにこれまで研究を展開してきており、合成分子や生体分子に目的の機能を持たせるよう進化させる研究を行ってきております。

本論文で Liu らは、ファージ（細菌に感染するウイルス）を使う連続的な指向進化法 PACE (Phage-Assisted Continuous Evolution)を開発することに成功しました。従来型の指向進化法では、進化のスピードが細菌のライフサイクルの長さに依存していたため手早く進化させることが難しく、またその過程内でも様々な操作を必要としていました(図 3 A)。今回彼らが用いた PACE では、進化のスピードはファージのライフサイクルに依存しており、少ない時間で多くの世代を経ることが出来ます(図 3 B)。また、変異、選択、増幅を1ポットで連続的に行えるようにシステムが組み立てられています(図 3 C)。これによって、進化の早さを従来の約 100 倍も上げることに成功しています。

具体的にみていきますと、まず進化させたいタンパク質の性能とファージの感染に必要な gene III 遺伝子(protein III: pIII を発現)の転写活性との対応づけを選択します(図 4 A)。次に、ファージのホストとなる *E-coli* に、変異生成のためのプラスミド(mutagenesis plasmid: MP)とファージの感染に必要な gene III 遺伝子に対応づけを組み込んだプラスミド(accessory plasmid: AP)とを導入しておきます(図 4 B)。この *E-coli* に進化させたいタンパク質とファージの構成成分(ファージの感染に必要な pIII を除く)を発現するセレクションプラスミド(Selection plasmid: SP)を有するファージに感染させます。もし SP に変異が起これば、進化させたいタンパク質に望んだ進化が起これば、AP での pIII 発現につながります。これによりファージは感染力を持ち、次の感染に用いられます。発現が起これなければ、ファージは感染能を持たず淘汰されます。新たなホストも連続的に導入されるシステムとなっていますので、pIII 発現がおこる SP を持つファージは連続的に変異を受けることが可能となり、結果的に優れた性能のタンパク質を得ることが出来ます。

本論文の実験では、T7 RNA polymerase (RNAP)を指向進化により、本来のペアではない T3 promoter での転写活性を持たせることに成功しています。ほぼ活性が検出できないレベルから、本来のペアである T7 RNAP-T7 promoter の活性を 600%以上上回るレベルまで指向進化させていました。進化のスピードとしては、8日で200回のタンパク質の進化が促されているようです。今回紹介した進化手法は、新たな機能をもったタンパク質や核酸などの開発につながるものと考えられ、それを用いた新展開が期待されます。

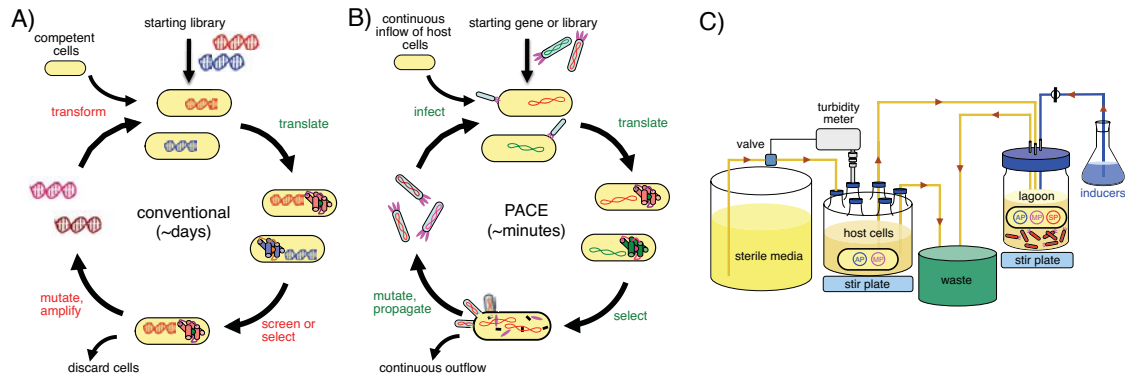


図3 A) 従来の指向進化法, B) 本論文の指向進化法 PACE, C) PACE での装置の一例 (論文より一部改変)

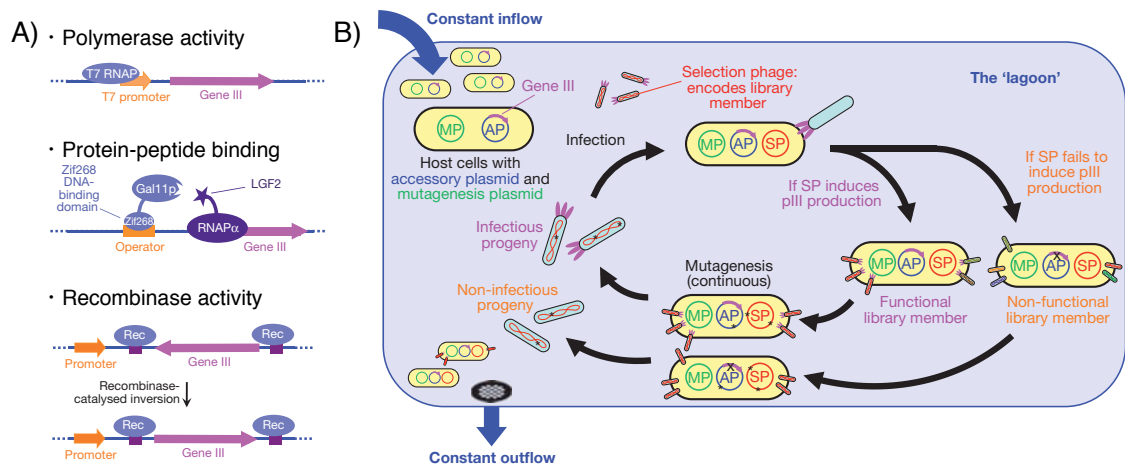


図4 A) タンパク質の活性とファージの感染能との対応づけの3パターン, B) PACE の概念図 (論文より一部改変)

気になった論文

長尾 聡 (ながお さとし)

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 超分子集合体科学研究室 (廣田研究室) 助教
s-nagao@ms.naist.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」へ執筆の機会を与您いただきまして、誠に有り難うございます。私は現在、奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科、廣田俊教授のもとで研究を行っています。廣田研究室では、タンパク質の変性とドメインスワッピングによる多量体形成について研究しています。

ジフテリアトキシンやリボヌクレアーゼA(RNase A)のドメインスワッピングした多量体の結晶構造が1990年代に報告されて以来、様々なタンパク質がドメインスワッピングによって多量体を形成することが明らかになり、多量化の分子機構や多量体とアミロイド線維形成の関係が調べられています。そこで、ドメインスワッピングによるタンパク質多量化についての論文を3つ紹介したいと思います。1報目はRNase Aの多量化の分子機構についてCDやNMRなど各種分光法を用いて調べた論文です。2報目と3報目は病気に関連しているタンパク質 (プリオンタンパク質および β_2 ミクログロブリン) とドメインスワッピングによるタンパク質の多量化の関係について調べた論文です。

NMR spectroscopy reveals that RNase A is chiefly denatured in 40% acetic acid: implications for oligomer formation by 3D domain swapping

J. P. López-Alonso, M. Bruix, J. Font, M. Ribo, M. Vilanova, M. A. Jiménez, J. Santoro, C. González, D. V. Laurents, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1621–1630 (2010).

ウシ膵臓由来のRNase Aは3本の α -ヘリックスと6本の β -ストランドをもち、単量体で機能するタンパク質です。RNase AはN末端の α -ヘリックスとC末端の β -ストランド、またはその両方が三次元的にドメインスワッピングすることで安定な多量体を形成します。RNase Aの多量化は、40%酢酸共存下のRNase A溶液を凍結乾燥し、緩衝液に再溶解すると起こります。この多量化の分子機構としては、40%酢酸共存下でRNase Aの末端の α -ヘリックスや β -ストランドが開いた構造を有する穏やかなアンフォールド状態をとり、そこからドメインスワッピングが進行すると考えられてきました(図1A)。筆者らは、吸収およびCDスペクトル、フォールディングの速度論的解析、二次元NMRスペクトル測定など種々の分光法を用いて、40%酢酸共存下でRNase Aは3本の α -ヘリックスを除いてほぼアンフォールドしていることを明らかにしました。また、40%酢酸共存下で凍結乾燥したRNase Aを緩衝液に再溶解させたときのタンパク質濃度が高くなると多量体形成量が増加したことから、RNase Aの多量化が凍結乾燥時ではなく、再溶解時に起こることを示しました(図1B)。RNase Aは*trans*型と*cis*型のコンフォメーションをもつプロリンを2つずつ有していますが、40%酢酸共存下では、それらがすべて*trans*型に異性化していました。筆者らは、天然状態で*cis*型のコンフォメーションをとっているプロリン(Pro 114, Pro 93)はそれぞれN末端の α -ヘリックスとC末端の β -ストランドの安定化に寄与していることから、フォールディング段階におけるプロリンの*trans*型から*cis*型への異性化がスワップする部位を決める要因になっていると述べています。

ドメインスワッピングによりタンパク質が多量化する分子機構はこれまで未解明でしたが、本研究によって新しい多量化のモデルが提案されたことにより、他のタンパク質の多量化やアミロイド線維の形成機構に対する理解が進むと考えられます。

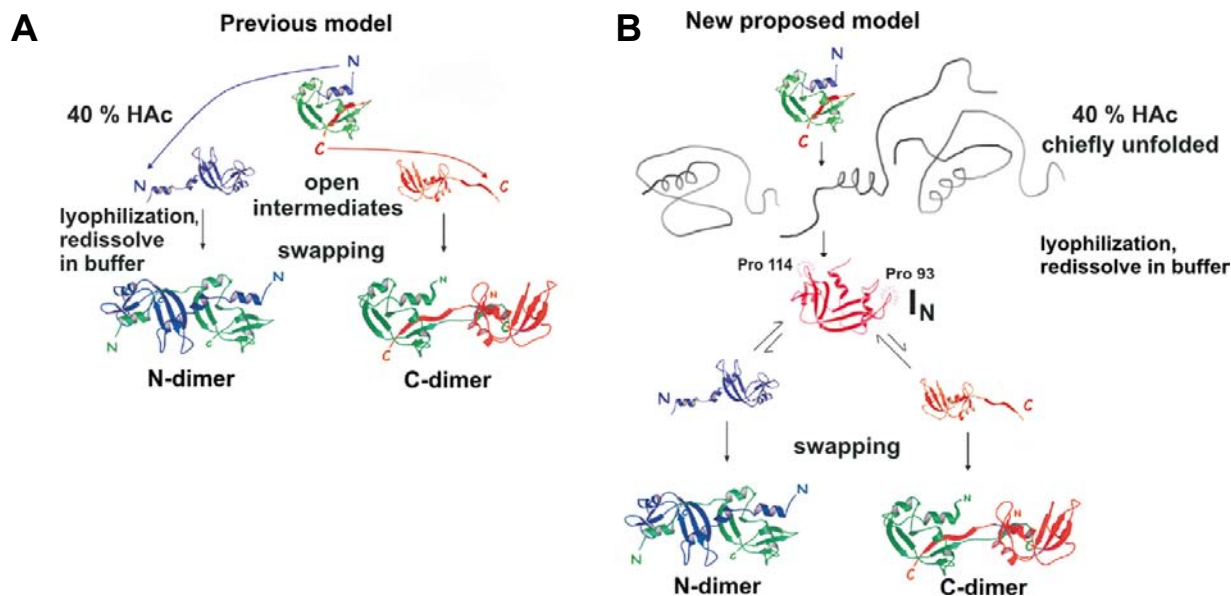


図1 RNase A の多量体形成機構。(論文より抜粋)

Globular domain of the prion protein needs to be unlocked by domain swapping to support prion protein conversion

I. Hafner-Bratkovic, R. Bester, P. Pristovsek, L. Gaedtke, P. Veranic, J. Gaspersic, M. Mancek-Keber, M. Avbelj, M. Polymenidou, C. Julius, A. Aguzzi, I. Vorberg, R. Jerala, *J. Biol. Chem.*, **286**, 12149-12156 (2011).

プリオン病は多くの哺乳類において発症する致死的な神経変性病です。プリオン病の原因となるプリオンタンパク質(PrP)は天然の構造(PrP^C)から β-シート構造を有する凝集形態(PrP^{Sc})に変化します。PrP^Cでは、N末端側の領域は天然状態で特定の構造を形成しておらず、C末端側の領域は3本の α-ヘリックス(H1-H3)と2本の β-ストランド(B1, B2)から成るグロビン構造を有しています(図 2)。PrP^Cの立体構造はこれまでに解明されていますが、PrP^{Sc}の立体構造は明らかにされておらず、PrP^CからPrP^{Sc}への構造遷移過程の詳細は未解明でした。筆者らは PrP の構造遷移の分子機構を明らかにするために、PrP の α-ヘリックスや β-ストランドなどの二次構造エレメント間をジスルフィド架橋することで立体構造変化を抑制した種々の変異体を作製し、これらの変異体の線維形成能を調べました。サブドメイン内でジスルフィド架橋した変異体は天然の PrP と同様に線維を形成しましたが、サブドメイン間で架橋した PrP 変異体

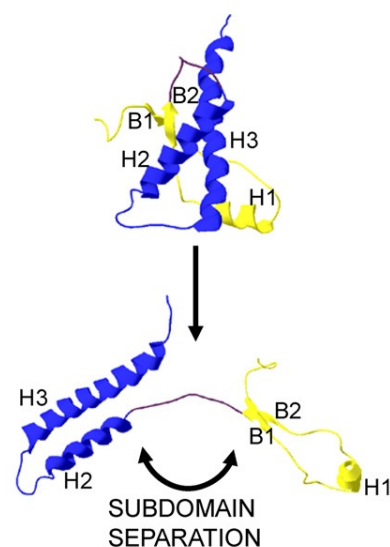


図2 PrP の C 末端側領域の構造。青と黄はサブドメインを表す。(論文より一部改変)

は線維形成しませんでした。これらの結果から、サブドメイン B1-H1-B2 とサブドメイン H2-H3 を構造的に分離することが PrP^{Sc} への構造遷移に不可欠な過程であると筆者らは述べています(図 2)。また、PrP^C から PrP^{Sc} への変化は大きな二次構造変化を伴うと考えられてきましたが、サブドメイン内のジスルフィド架橋で二次構造変化を抑制した変異体が線維形成したことから、サブドメイン内の二次構造は保持されたまま線維形成することを明らかにしました。さらに、筆者らは PrP の構造遷移にドメインスワッピングが関わっていることを証明するために、ドメインスワッピングによりヘテロな二量体を形成したときのみジスルフィド架橋される M133C 変異体と Q216C 変異体を作製しました。SDS-PAGE による分析から、これらの変異体を 1:1 混合して形成させた線維にジスルフィド架橋した二量体が含まれており、線維形成している PrP の N 末端領域がプロテイナーゼ K で分解したため、二量体はドメインスワッピングした構造を有していることを明らかにしました。以上の結果より、筆者らはドメインスワッピングした PrP 二量体がビルディングブロックとなって線維形成する分子機構を提唱しています(図 3)。

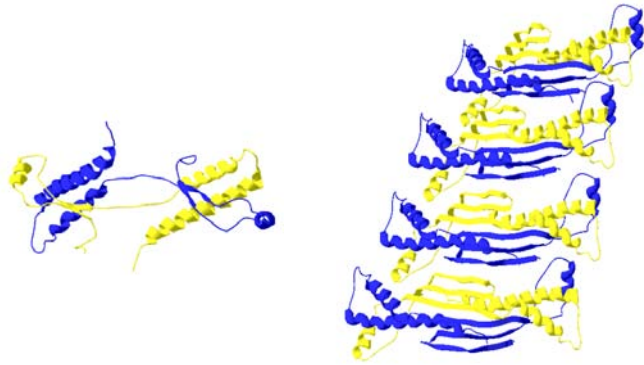


図 3 PrP の二量体と線維の模式図。(論文より一部改変)

β_2 -microglobulin forms three-dimensional domain-swapped amyloid fibrils with disulfide linkages

C. Liu, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, *Nat. Struct. Biol.*, **18**, 49-56 (2011).

β_2 -ミクログロブリン(β_2m)は99残基のアミノ酸から成るタイプIの組織適合性複合体の軽鎖で分子内にジスルフィド結合を1つ有しています。 β_2m は長期の血液透析を必要とする患者の神経や関節などにアミロイド線維として溜まり、骨関節障害を発症する原因となります。 β_2m の線維形成は医学的に重要であるにも関わらず、その詳細な線維形成機構は明らかになっていません。筆者らは、還元剤共存下で β_2m の多量化が促進され、様々な大きさの多量体から精製した β_2m 二量体は分子間でジスルフィド架橋したドメインスワッピング構造を有していることを明らかにしました。 β_2m のジスルフィド架橋を欠損させた変異体は線維形成せず、 β_2m のジスルフィド架橋は線維形成に重要であることを示しました。また、筆者らが決定した β_2m 二量体の構造は既に報告されていた銅イオン添加により形成された β_2m 二量体の構造と異なっていたことから、溶液条件によって β_2m の多量化機構が異なることが分かりました。筆者らは β_2m 多量体がドメインスワッピングにより形成することについて、¹⁵Nラベルした β_2m を用いた巧妙な方法で証明しました。 β_2m 多量体がドメインスワッピングしていればホモだけでなくヘテロな分子間でもジスルフィド架橋すると考えられます。MALDI-TOF MS分析により、¹⁵Nラベル β_2m と非ラベル β_2m を1:1混合して形成させた β_2m 多量体のトリプシン消化物にヘテロな分子間でジスルフィド架橋したペプチド断片が含まれていたことから、 β_2m 多量体がドメインスワッピングしてい

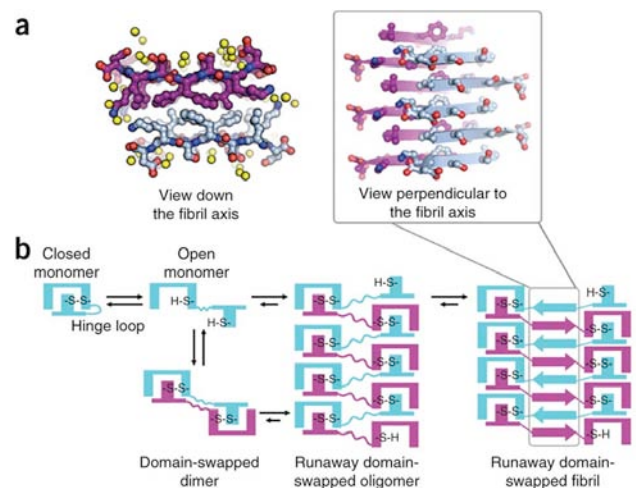


図 4 β_2m の多量体形成機構。(論文より一部改変)

ることが明らかにされました。また、 β_2m のスワッピングした領域とコアとなる領域を繋ぐヒンジループのアミノ酸配列(LSFSKD)をもつペプチドがアミロイド線維の構造に類似した立体ジッパー構造を形成することを結晶構造解析により明らかにしました。筆者らは以上の結果から、 β_2m がジスルフィド交換を伴うドメインスワッピング機構で多量化し、ヒンジループが β -シート構造を形成して線維になる分子機構を提案しています(図4)。さらに、 β_2m のドメインスワッピングによる多量化は生理的条件下において数カ月という遅いタイムスケールで進行することから、検出されるまでに数年かかる β_2m のアミロイド線維の形成と関連していると述べています。

留学
体験
記

メリーランド大学留学体験記

University of Maryland, Department of Chemistry and Biochemistry

中山 静香 (snakayam@umd.edu)

私は 2007 年に九州大学薬学部、佐々木茂貴教授、永次史助教授(現在、東北大学、多元物質科学研究所、教授)の研究室にて博士号を取得後、同研究室の先輩である谷口陽祐さん(現在九州大学、助教)の紹介により、2007 年 10 月に Maryland 大学の Herman Sintim 先生 (Assistant professor) の研究室にてアメリカ生活をスタートさせ、現在に至ります(2011 年)。そもそも私は諸先輩方のような華々しい、〇〇研究費を取った、〇〇企業を立ち上げた、などの経験はありません。ただひたすら雑草のように、明日が明るいことを信じて目の前にあることをこなす日々を続けています。今回体験記の依頼をいただき、こんな私でも、将来に不安を抱いていたり、自分自身に自信が持てなくて悩んでいる方が、こんな私を見て、「その程度なら出来る」と少しの勇気を抱くことが出来れば幸いだと思い、投稿させていただきました。また特筆すべきことは、私はただひたすら運が良かったということをご了承していただければ幸いです。



前列右から 2 番目が著者
前列右から 3 番目が Herman Sintim 先生

渡米準備

私にはとにかく英語が苦手という致命的な Background がありました。ただ幸いにも、なぜかアメリカに憧れを抱いており、不安よりも好奇心の方が強い傾向にありました。九州大学にいるときも、バングラディッシュから来られていたポスドクのアリさん(現在 McMaster University)の日本語上達に貢献するなど、とにかく英語を使う能力がありませんでした。ただなぜか、「なんとかなるような気がする」と感じていました。特に研究費を持っていたわけではありませんでした。そんな私を面接なしで受け入れてくださったボスに今でも感謝しています。そして、そんな私をボスに紹介してくださった谷口さんには、どのように感謝すればいいのかわからないくらい感謝しています。

渡米準備中に私のアメリカ生活を左右した決定的ポイントは、アメリカにある日本人コミュニティを利用した点だと思います。私が利用したのは、Mixi (<http://www.mixi.jp>)、Web コミュニティ in ワシントン DC (<http://www.kaigailink.com/dc/>) です。渡米前にこちらのサイトで情報収集し、見ず知らずの方に友達に

なっただき、連絡先もいただきました。その方々のおかげでアメリカでの住む場所も決めることができ、大学内にも友達が出来ました。今の私があるのは、その出会えた方々のおかげだと言っても過言ではないでしょう。

研究生活—前期

私の所属した研究室は結成2年目だったということもあり、所属当初は非常に不便を強いられました。私と入れ替わりで先代のポスドクは研究室を去り、引継ぎや研究室内の説明もなかったため、全て自分で把握する日々が続きました。今まで日本で使っていた HPLC ですら、肩身の狭い思いをしながら使っており、トラブルがあった際には、根拠もなくまず疑われたりしていました。所属後の3ヶ月間は研究室の鍵すら渡してもらえず（全ての部屋には常にロックがかかっています）、研究室に入る際には、ドアをノックし、開けてくれた人に「煩わせてすみません」と謝罪する日々が続きました。後でわかることですが、こちらでは常に主張しなければ誰かがやってくれるなんてことは起こりません。毎日のように「鍵はまだ出来ないのか」と主張するべきだったようですが、2週間程度で出来るという言葉が鵜呑みにしておとなしく待っていたため、予定よりも鍵を得ることすら長く時間がかかってしまいました。先手は必勝で無知は罪です。日本の素晴らしさをアメリカに来てすぐ痛感し、1年間ほどは激しいホームシックに罹っていました。

研究生活—中期

所属当初与えられていたテーマは、ある化合物の類似体を合成することでした。しかし目的の化合物はまったく出来ません。1ヶ月（11月）、2ヶ月、3ヶ月、鍵をもらって4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月・・・私の転機は5月でした。アメリカにきて約半年が過ぎたあたりです。私たちの研究室は大きく分けて二つに分類されます。一つは合成、一つは分析。目指している大きな流れは合成チームが作ったものを、分析チームが使いデータを取ることです。まだ分析チームの生物寄りの研究が整っていないため、細胞を使ったような *in vivo* の実験は難しいのでコラボレーションに頼っているのですが、*in vitro* での分析を主に分析チームは行っています。5月、分析系に属する中国人レイ君が、夏休みのため3ヶ月間中国に帰ることになりました。Visa の関係ですぐには帰ってこれられないため、長期の休暇になりました。ただ5月、6月はボスにとって研究費の申請が重なる時期で、非常に忙しい期間になっています。そんな大事な時期に分析系の人間が欠けないように、レイ君の引継ぎを私がすることになりました。

私の契約期間は1年（更新は1年ごと）、これが私の最後のチャンスでした。合成期間（所属前期）も、とにかくがむしゃらで、慌てすぎて割れたパスツールで指を刺し流血、自分の血を見て貧血を起こし、日曜日の誰もいない研究室の床で泣きながら横になったりしていましたが、そんな日々には比べたらマシだと思い、ただがむしゃらにボスの望む実験を最低限しようと必死でした。使える器具や機械に制限があったので、それなら大学に泊まって深夜に実験をしようと、自分の体力に胡坐をかいた馬鹿なアイデアを実践していました。その甲斐あって、なんとかそのときの結果がペーパーになり、2年目の更新をしていただきました。中国に帰ったレイ君に感謝したのは言うまでもありません。

研究生活—現在

私のボスがまだ Assistant professor であるため、とにかく速い研究が求められます。日ごろ心がけていることは、当然のことですが、ボスに言われたことはすぐに結果にする。それがたとえ望ましい結果でなくても、何をして、どういう結果になったのか、詳しく自信を持って説明できるように、データもわかりやすくまとめ、毎日のようにボスの部屋に行っています。ボスがオフィスにいないときは、メールでボスにデータを送信し、メール上でディスカッションをします。これが出来たのは、ボスのパワーとやる気と崖っぷちの状況があったからで、いまだ崖っぷちではあるものの、なんとか私を現在も雇ってくれています。私の運が良かったところは、この私のスタイルと、ボスの求めるスタイルが一致したからで、放任主義のボスだったら、私はすぐに首を切られ、今頃はどこかのコンビニでバイトの生活を送っていたでしょう。

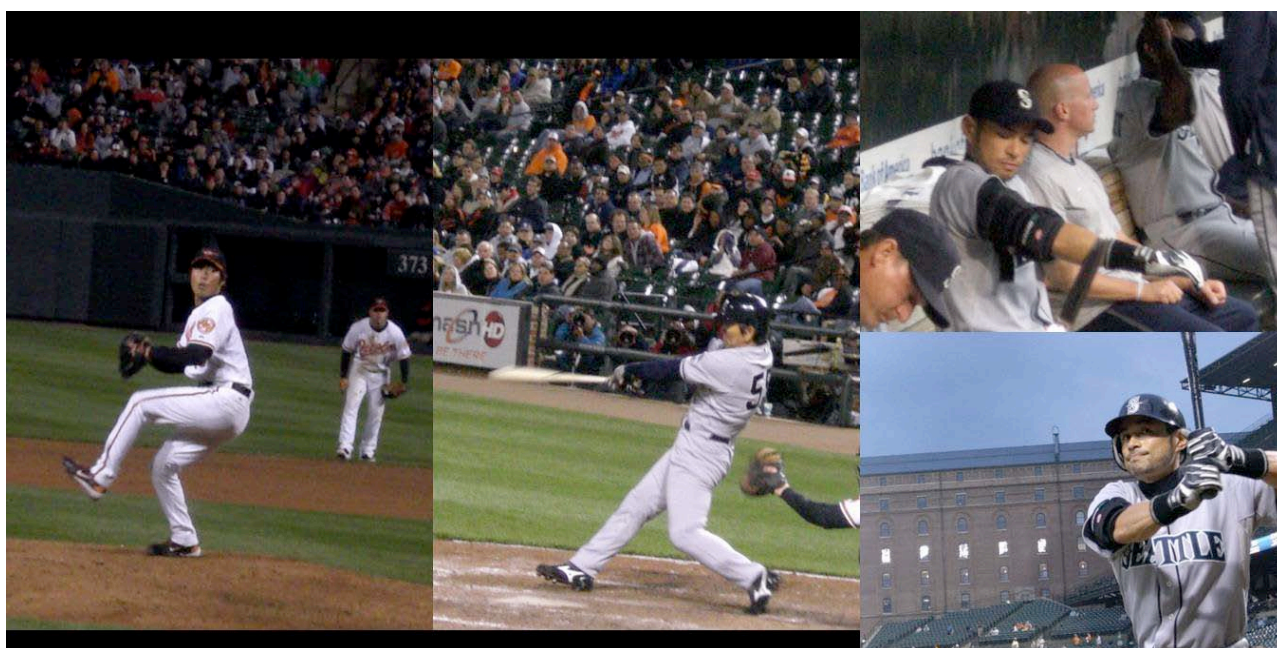
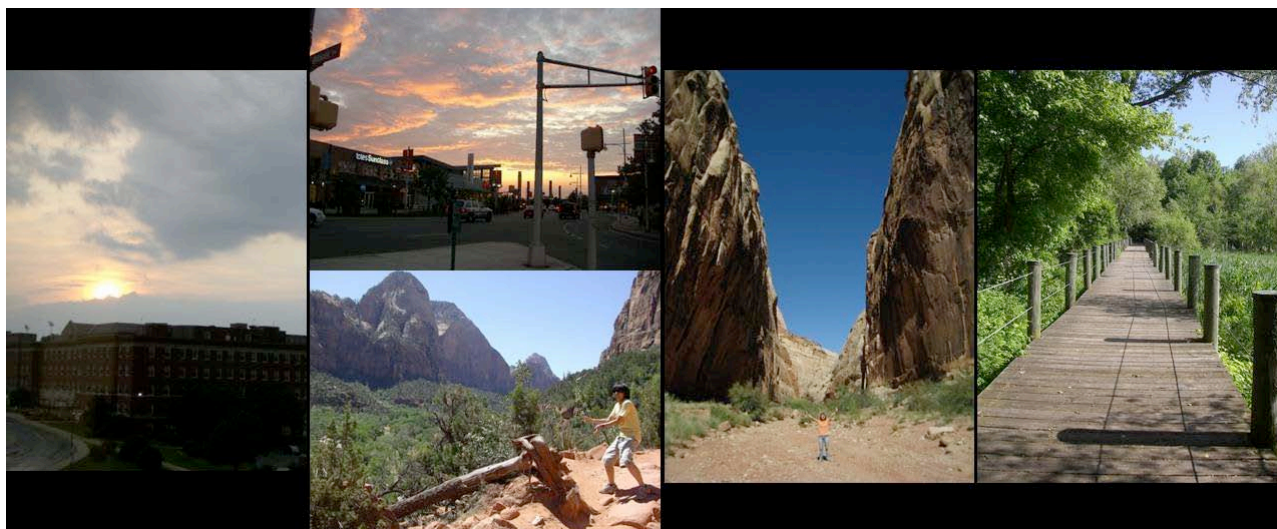
研究生活—難点

私の場合はとにかく給料が安い。その上健康保険などもその中から払っていますし、家賃が信じられないくらいどこも高い上、現在 1 ドルが 80 円程度であるため、親への仕送りも苦労しています。例えば 500 ドル送ったとしても 4 万円程度にしかなりません。この遣る瀬無さをどのように伝えればよろしいでしょうか。さらに私は、交通費も駐車場代も支給されていません。シャトルバスは無料ですが、1 時間にバスが 1 本だったり、1 つのバスが広範囲を網羅しているため、車で 15 分程度の距離に約 1 時間かかります。公共のバスもありますが (片道一律 1 ドル 25 セント)、土曜日は特に時間通りに来たことがありませんし、日曜日は運行していません。Faculty の場合学生に比べて駐車場代は 4 倍近くし、私の給料は PhD の生徒とほぼ同じ程度です。また学生だとジムを無料で利用できるのに、Faculty は入場毎に 7 ドル支払わなければなりません。Maryland 大学は学生のための大学のような気がします。学生のとときに来たかったです。

さらに、今まで自分を健康だと勘違いしていたため、無理を承知で睡眠時間を削った生活を運動もせずに続けていたため、ある日突然ぎっくり腰で動けなくなりました。それからというもの、しばらく実験をしていると、首から腰にかけて激痛が続いたり、肩が懲りすぎて頭痛が治らなかつたりと、体の異変が続きました。Physical therapy に通ったりしたのですが治りませんでした。そんなある日、ドクターに検診をしてもらったら、私の保険が途中で止められていることが発覚しました。毎月 400 ドル近い保険料を払っていて、保険を止められる理由がまったく思いつきません。いろいろ調べた結果、最近導入された保険料をオンラインで払うシステムがおかしい動きをし、私が払った保険料を勝手に払い戻しており、それに気づかないまま時間が経ち、保険会社側は保険料未納と判断し、保険を勝手に途中で止めていたことがわかりました。運よく私の銀行口座に保険会社への支払い記録が残っていたため、保険会社側のトラブルであることを相手に認めさせ、なんとか保険を再開させることができたのですが、その間の治療費などかなり高額に達していたので、自分の正しい点を証明できて本当に良かったと、備えあれば憂いなしを痛感したのでした。私の所属する大学では日本の大学のように健康診断が義務的に定期的に行われていないので、自分の健康は自分で維持しなければなりません。現在私は YOGA を始め、体の調子もだいぶよくなりつつあります。こちらにこられる予定の方はぜひ健康第一を心がけてください。

楽しい思い出

難点が色濃い内容になってしまったので、楽しい思い出も紹介したいと思います。私の住んでいる地域はとにかく自然が多く、秋や春は本当に気持ちがいいです。空や草木も綺麗だし、野生の動物も近所で見るすることができます。また、かなり大規模な博物館や動物園も無料であるため、アメリカに来て4年目ですが今だに探索したい場所が近くにたくさんあります。



さらに、ボルチモアにある球団のオリオールズに上原選手が入団されたのをきっかけに、日本人対決を見に数回球場に足を運びました。そこで松井選手や、イチロー選手も間近で見ることが出来、イチロー選手のアップの写真も取れました。アメリカで頑張っている日本人の活躍を目の前で見ると、それが例え雲の上の人物でも身近に感じられ、私にも頑張れることがまだまだある、と初心に帰ることができ、刺激を受けられるのもこちらにいる利点なのかな、と少しだけ思います。

最後に

先日ある女性に「今から書く英語を日本語で教えてほしい」と言われました。彼女の選んだ言葉は「Thank you, Hello, Good bye」でした。漢字も書いてほしいと言われたので書こうとしましたが、「ありがとう」の漢字に違和感を覚えて、教えてあげることが出来ませんでした。なぜ「ありがとう」の漢字が「有難う」なのでしょう。今まで気づきませんでした。こちらに来て、「ありがとう」は本当に「有ることが難しい」と実感しています。私のアメリカ生活はまだ続いています。この不便な生活の先にきっと見つかる明るい光があると私は信じています。こんなに濃い人生を送れていること自体、とても貴重で有難いなあと毎日思っています。私を叱咤激励してくださっている先生や先輩、友達、家族、全ての方に感謝しています。これからもよろしくお願いします。これから留学を考えている方も、そうでない方も、しゃかりきに一緒に、頑張りましょう！私は現在、研究室の Safety, Instrument, Order Manager です。形振り構わなければ、なんとかなるもんです。

特集

東日本大震災
の記録・教訓

震災対応の事例

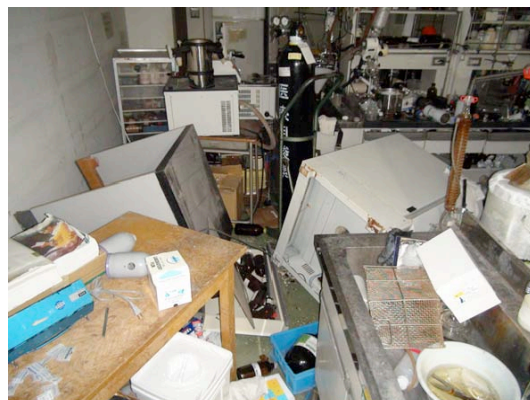
東北大学大学院薬学研究科

叶 直樹

先の東日本大震災では東北大学薬学部を含む青葉山キャンパスも大変大きな被害を受けました。このような大きな自然災害の発生時には、まず人命の救助と安全の確保、続いて生活拠点とライフラインの確保が間違いなく最重要課題ですが、高等教育と研究開発の場である大学に在職している者として、研究を行うための施設と場所の確保はその次に重要な責務だと考えます。今回、生命化学研究会レターに執筆の機会を頂きましたので、あくまでも一つの事例として今後の参考になればと思い、地震後3ヶ月が経過した現在までに、私達の研究室(岩淵研究室)や私個人が経験した事とその対応をまとめました。

東北地方太平洋沖地震発生と直後の対応

3月11日午後2時46分過ぎに東北地方太平洋沖地震は小さな揺れから始まりました。我々の研究室は薬学研究科4階の二つの棟(A棟、B棟)のつなぎ目に隣接したB棟にあります。その頃は地震が頻繁に起きていましたので、研究室で研究費の申請書を作成していた私は、いつもの事ですぐにおさまらさうと思っていました。しかし、次第に揺れが強くなる中で「これはいつもと違う」と思い直し、実験中の学生に加熱器具の電源を切って廊下に出るように指示して自身も廊下に出ました。最大の揺れはその直後に来たと記憶しています。研究室のドアを開放して、そのドアにつかまり、部屋の中を見ながら、まだ室内にいた学生に早く研究室を出ると叫びましたが、その学生はサンプルの入ったフラスコを片手に持ち、実験台の前で立ち尽くしていました。ガラスが割れて飛び散る音や、棚やロッカーが激しく揺れる騒音で聞こえないのかと思いましたが、後から聞いたところでは、つかまるのに精一杯で動きが取れなかったようです。廊下に座り込んでいた秘書さんに「いつ治まるのでしょうか…」と聞かれ、「大体の地震は1分以内で治まりますから大丈夫ですよ、心配しないで下さい…」とは答えたものの、強弱を繰り返しながら強い揺れはなかなか収まらず、自分自身も身動きが取れませんでした。強い揺れが数分間続いた後、パッと停電し瞬間的に非常灯に切り替わった時には、研究科の建物



本震後の研究室。(上段)乾燥器が台から落ちて倒れ、通路を塞いでいる。(下段)ドラフトの天板が外れ、落ちかけている。震災直後、この状況を改めて見た時には途方に暮れたが、後に他の研究科の状況を見学させて頂いた時、この程度の被害は深刻ではなかったことを実感した。

は持つだろうか…と本気で心配になりましたが、その後、揺れはようやくおさまりました。

幸いにも非常出口までの通路は確保されていたので、まず研究室員に外への避難を指示しました。加熱機器類の電源を簡単にチェックした後、消火器を1本抱えて自分も非常階段を降り、避難場所である研究科の駐車場に出ました。すぐに研究室員の点呼を行い、当時研究室にいた全員の無事を確認の後、研究科の事務担当者にその旨を報告しました。

その後、研究科緊急運営会議の対応を待つ間、雪が降る中数時間その場所で待機することになったのですが、私は駐車場から4階の研究室を眺め、煙など火事の前兆がないかを心配していました。我々の研究科で火が出なかったのは本当に不幸中の幸いでした。

本震から1~2時間後に、ひとまず学生を自宅に帰しました。その後、薬学研究科緊急運営会議の決定事項として、出勤が可能な教員は翌日の午後1時に薬学研究科前に集合するように伝えられ、ようやく帰宅の途についたのは夕方5時半頃でした。青葉山近郊の道路はところどころ寸断されており、信号機や街灯も含めて完全に停電していたために道路は大渋滞でしたので、仕方なく徒歩で一時間以上かけて帰宅し、真っ暗な中、自宅に戻ったのは7時過ぎでした。

強い揺れが数分続いた激しい地震であったにもかかわらず、薬学研究科、更に大学全体として構内で人的被害が出なかったのは、(1)昼の明るい時間帯に本震が起きたこと、(2)本震が比較的穏やかな揺れから始まったため、安全と思われる場所への移動や机の下に潜り込むなどの初期対応が出来たこと、(3)2日前(3月9日)にも大きな地震があったため、それが学生や職員の予行演習となり、火の元や近くの加熱機器の対応が出来たこと、などが考えられます。また、年に1度の避難訓練どおりに移動し、点呼が出来たということは、月並みですが、日頃の訓練が如何に大切かを物語っています。

翌日からの研究室の対応

本震以降もM6.0以上の余震が度々起きており、また研究科の建物の安全性が保証されていませんでしたので、まずは時間を決めて教員が数人ずつ組になって建物の中に入り、安全の確保と必要なものを持ち出す措置が取られました。本震直後から、非常電源を含めた研究科内の全ての通電が止められておりましたが、3日後(3月14日)の月曜日には青葉山の電源が復旧したため、研究科内での協議の結果、通電時の安全を十分チェックした後に、冷蔵庫など、必要な装置の電源を入れても良いことが通達されました。生物試料の損失を最小にするための措置でした。ただし、有機化学系の研究室では多くの試薬瓶が割れ、破損したため、有機溶媒の蒸気や臭いが室内に充満していましたので、数日間は窓を開放して空気を置換した後に通電する措置を取りました。白煙が発生していた箇所もあったようですが、これは漏れだしたアミン系化合物と塩酸が反応した塩酸塩だったとのことでした。

震災当日とその翌日に研究室内の全てのブレーカーを落としてありましたが、室内のコンセントを全て抜いた後、ブレーカーを入れ、ひとつひとつの機器の電源ケーブルを確認し、その後に通電のチェックを行いました。通電時は問題なかったものの、地震によりケーブルが何かに踏まれて損傷しており、少し時間が経過した後に小火になりかけた研究室もあったようです。市内では電気が復旧した直後に火災になったケ



本震後の研究室。市販の家具転倒防止用品を設置していたおかげで通路が確保された。

ースも複数ありました。

本震の翌週にはライフラインの復旧が始まりましたが、余震のみならず、約100 km 離れた福島第一原子力発電所の状況も見通しが立っておりませんでしたので、我々の研究室では3月16日に携帯メールで連絡網を構築し、実家等に避難できる学生は避難するように指示しました。地震後数日は停電のために携帯電話は使えませんでした、停電から復旧し携帯メールが使えるようになってからは、携帯メール連絡網は学生との連絡に大変役に立ちました。

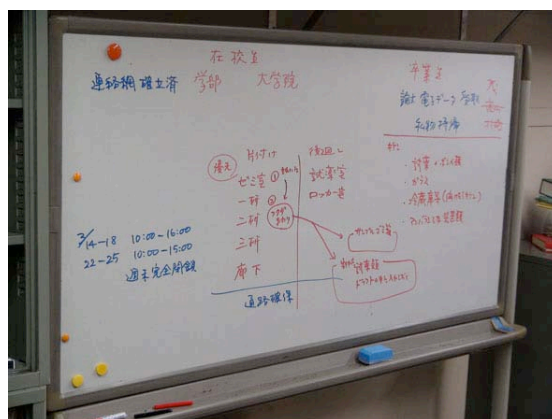
地震も原発も厳しい状況が続いておりましたが、比較的被害が少なかった研究室のセミナー室を3月17日に片付け、今後の対応を教員4人で話し合いました。実験室内はめちゃくちゃで、当初はどこから手を付けたら良いか全く分かりませんでした、まずは通路確保の手順やその際の問題点などを確認することにしました。

その次に課題となったのは学生への対応です。3月19日には、4月末頃まで大学が休講になることが決まっていたのですが、先行き不透明な中で彼らにどう情報を与え、どのように対応するか私自身、全く案がありませんでした。

生命化学研究会幹事会の方々は覚えておられるかと思いますが、幹事会のメーリングリストにメールを送らせて頂いたのはこの頃です。阪神淡路大震災の時に被災地域の大学でどのように対応されたかや、その教訓をご教示頂くことは、間違いなく今回の震災の復興の指針になると考えました。半面、自身が現在経験している大変な現状を鑑みると、阪神淡路大震災当時の記憶の詳細を思い起こして頂くのは大変申し訳なく、暫く躊躇しましたが、最終的には送る決心をし、「このような状況を経験された先生方、是非お知恵を拝借させて頂き下さい」という旨のメールを送信させて頂きました。

それまでにも既に多くの先生方に有り難い申し出や有益な情報を頂いておりましたが、翌日には私のヘルプサインに対して、何人もの先生に大変有用なご助言と経験談を頂きました。この時ほど、ヒューマンネットワークの有り難さを実感したことはありません。

先生方のご厚意に感謝しつつ、ポイントを手帳にまとめ、翌日からの対応策を私なりに考えました。助言を頂いた先生方に了解を得た上で、その時の一部をご紹介させて頂きます。



セミナー室の復旧前(上段)と復旧後(中段)。部屋を一つ片付けると、相談や食事のできる場所が確保できる。(下段)ホワイトボードを使って今後の対応をスタッフ間で相談。

【研究室メンバーに関して】

- 一週間ごとに誰が何曜日の何時から何時まで出て来るかという一覧表を作成する。スケジュールを作成して掲示する。個人の生活を優先させた方が後々良い結果を生む。

- 週に一度は皆で集合し、進捗と今後の予定を考える。これで研究室が復興する様子が実感でき、連帯感も生まれる。学生諸氏からも自発的なアイデアが生まれる。
- 復旧作業は時間を区切って行う。お茶飲み場(我々の研究室ではセミナー室)を先に確保したのは正解。
- OB に助けを求めるのも良い。
- 作業中は寒さをしのぐためにカイロがあると良い。手袋やマスクを用意する。
- 復旧につれて、なるべく通常のラボ活動を行うように努力する。セミナーなど、可能なものは行う。
- 数ヶ月後には復旧できているイメージを持ち、学生を安心させる。
- 作業は数名のリーダーを中心に手分けして行う。
- 休憩時間をしっかりと盛り込む。
- 安全第一で怪我のないように。
- 最終的にはこの中からたくましく成長した学生が数名出て来ます(経験談)。

【装置や試薬、試料に関して】

- どれが駄目になり、どれが大丈夫かのリストアップを行う。特に装置は詳細まで検討する方が良い。皆で分担し、できるだけ早急に。価格を調べておく。
- どの装置が使えないかが分かったら、その装置があるところを調べて、出来るだけ近隣の研究者に SOS を出して装置を使わせてもらう。そうすることで、将来的に新しい関係を構築できるかもしれない。
- 焼け太りにならないように、必要なもの以外は必要以上に新調しない。

【論文投稿に関して】

- 投稿やリバイスの予定があれば、その旨を editor に連絡し、事情を説明して投稿やリバイスが遅れる旨を伝えておいた方が良い。

これらの助言と経験談は我々にとって本当に貴重なものでした。状況の違いにより、全て実行できた訳ではありませんが、特に研究室メンバーへの対応に関する助言は大変参考になりました。すぐに学生に復旧作業を手伝って貰うことは、学生教育研究災害障害保険が現状で適用されるかどうかの確認が必要だったために難しかったのですが、研究室携帯メール連絡網に研究室の復興の現状や問題、大学からのアナウンスなどを逐次流すことで、学生と教員が同じ情報を共有し、研究室としての統一感を保つことができたと考えています。

この間、全世界規模の研究機関や多くの先生方より、研究場所や学生受け入れの申し出を頂いたのは大変嬉しいことでした。我々の研究室でも学生を外に出すことを話し合いましたが、職員4人の作業でも少しずつ復旧の糸口が見えだしてしまし



学生が関わった後は復旧作業が加速的に進行。学生あってこそその大学を実感(写真はバイアルが割れて床に飛び散った蛍光色素(無毒)を掃除しているところ)。

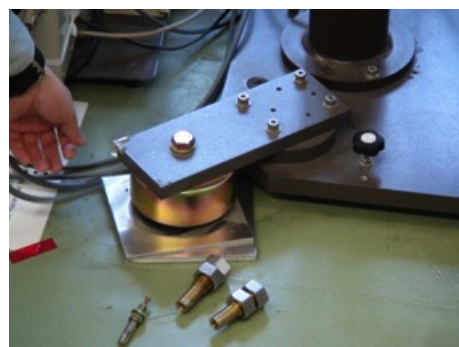
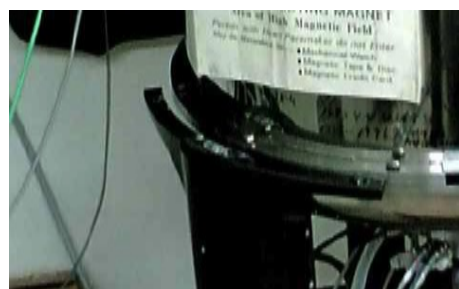
たので、「後に学生にも復旧作業を手伝って貰うことになった時に、復旧作業を手伝ってくれた学生と、その間に受け入れ先で最先端の研究を行った学生との間で温度差が生まれるのではないかと危惧されました。被害が甚大で、復旧の目処を立てることも難しい研究室では本当に必要とされる緊急の措置だと思われませんが、復旧が想像できた我々の研究室ではなかなか難しいものだと考えさせられました。いずれの場合もPIの判断がとても重要だと思われま

す。本震後2週間が経過した3月25日より、学生に手伝って貰える状況が整いましたので、希望する学生に加わって貰いました。それまで教員だけで地道に復旧作業を行っていたため、作業がマンネリ化していましたが、学生が手伝ってくれることで随分雰囲気が変わり、場が明るくなりました。この日を境に復旧作業は加速度的に進み、それから1週間後(4月1日)までの間に、とりあえず片付けられるものは片付け終わりました。

この頃は、昼間は大学で復旧作業を行い、家族が寝静まった深夜か朝方に各種申請書や投稿論文の準備、学会発表要旨(参加できるかどうか分かりませんが、とりあえず)の作成というなかなか大変な日々が続きましたが、研究室復旧作業や、論文投稿準備など、学生との共同作業は、ポジティブかつ建設的な作業でしたので、研究活動が出来る状態に近づいていることを実感できました。

4月の初めの時点で、NMR など大型機器の修理の問題は残っていましたが、様々な状況が上向きになっていましたので、我々は皆、復旧は以外に近くと楽観的に考えていました。そこで襲ってきたのが4月7日深夜の震度6強の余震でした。とりあえず積み上げておいた書類は崩れ落ち、本震で生き残ったガラス製デシケーターや器具類も床に落ちて粉々に割れてしまいましたが、一番ショックだったのは、このような大きな余震がまた起こるのだという現実でした。それまでに余震は数多く経験していましたが、このように大きなものは想定していませんでした。大きな地震の後には必ずそれに見合った余震が来るということを想定した復旧作業(工程)を常に考えておく必要があります。

機器や装置の被害状況に関しましては、5月16日までに、大学から要請された3回の被害調査に対応しました。どの機器が使えなくなって、それがどのくらいの被害額かを見積もる作業、いわばネガティブな評価のとりまとめは、大変消耗する作業だということを感じ知らされました。復興費がどの位降りてくるか分からない状況で、様々な憶測が飛び交い、その度にその情報に一々踊らされます。また、大学本部やその他、様々な部署から要求される各種被害状況確認、調査依頼もそれぞれが大変消耗する作業です。情報収集を可能な限り一元化して頂ければ有り難いのに...と思うこともありま



NMR の損傷状況。(上段)本震で傾いた 500 MHz 用超伝導マグネットと(中段)脚の拡大図。外れてめり込んでいる。(下段)400 MHz 用超伝導マグネットの耐震用アンカーは全て抜けていたが、このマグネット自身に損傷は無かった。

大型共通機器 (NMR) への対応

私は震災当時、研究科の NMR の運用および利用を取りまとめる役割を担当していましたので、地震の当日から NMR の状況は心配の種でした。研究科の共同利用機器として、JEOL 製 ECA-600 (600 MHz, 薬学研究科1階に設置) が2台、ECP-500 (500 MHz, 1階に設置) が1台、Varian 製 Gemini 2000 (300 MHz, 4階に設置) が1台あり、更に有機化学系研究室で共通に使用している JEOL 製 AL-400 (400 MHz, 4階に設置) 2台の管理・運用を行っておりましたので、これらが使える状態にあるかどうかは研究科の今後の研究活動を大きく左右すると考えられました。

まず本震の翌日 (3月12日) に、限られた時間の中で超伝導マグネットを手分けしてチェックしました。1階に設置してある 600 MHz は見たところ大きな損傷は見当たらなかったのですが、500 MHz のマグネットは土台が損傷して傾いていました。一方、それ以外の研究科4階に設置してある NMR は、耐震用のアンカーで固定してあったものはアンカーが全て抜けてしまっていました。これらのマグネットは、若干磁力は感じるものの、磁石を近づけても落ちるような状態でしたので、全てクエンチしたと考えていました。400 MHz 1台に至っては、研究科の電源が復旧後、電源を入れようとする度にブレーカーが落ちるため、漏電か電源系のトラブルが考えられました。

電源が復旧した3月14日に確認したところ、幸いにも1階に設置してある窒素供給装置は作動したため、600 MHz 2台への液体窒素の供給は継続して行うことに決めました。

状況が少し落ち着いた3月22日、JEOL の担当者に 500 MHz の現状を写メールで伝えたとこ、この現状は倒壊の恐れがある大変危険な状態と JEOL 本社で判断され、すぐに作業員を派遣し、マグネット倒壊防止措置と液体窒素、液体ヘリウム の抜き取り作業を行うとの連絡を受けました。その時の電話で、クエンチしても磁場は残るのかどうかを軽い気持ちで尋ねたところ、「超伝導マグネットの磁場は1かゼロのため、ほんの少しでも磁力が残っていればクエンチしていない可能性が大である」との返事に、慌てて鉄製のドライバー片手に全ての装置を再度チェックしなおしました。すると、全ての装置で弱いながらもドライバーが吸いつけられることが分かりました。最近の超伝導マグネットは防磁対策がしっかりしているために、磁石を近づけても落ちてしまうということを知ったのはその時が初めてでした。その時点で窒素レベルは既に20%以下を指していましたが、とりあえず全ての装置に液体窒素を供給し、それから定期的な供給を続けました。

500 MHz の装置は、その翌日 (24日) に東京から到着した JEOL 担当者により、液体窒素とヘリウムが抜き取られる強制クエンチ作業が行われましたが、他の装置は上記の対応が功を奏して、全て超伝導状態が保たれた状態で震災を乗り切ることができました。6月現在では、全ての装置の耐震用アンカーの打ち直しと修理、再調整がほぼ終了し、通常稼働状態に戻っております。



倒壊防止対策を行い、液体窒素と液体ヘリウムが抜き取られた後の超伝導マグネット。

留学生への対応

震災翌日、青葉山の薬学部キャンパスに自転車で出勤し、解散となった後、駐車場に停めてあった車に自転車を積み込み、薬学部キャンパスを出ようとしていた時のことでした。遠くのバス停前でうろろしているアジア系の留学生(男性)らしき姿が見えました。この状況ではバスが来るはずも無いので、こちらから手を振って何をしているのか尋ねたところ、研究室の状況を確認しに来てこれから帰るところだとのことでした。留学生用の宿舎は丁度私の帰り道にありましたので、私は彼を車に乗せて、送ってあげることにしました。

送り届ける途中で、色々な話をしましたが、留学生は我々以上に情報を得るのに苦労していることが見て取れました。幸い、留学生会館の近くに避難所があったとのことで、そこで日本語が分からない留学生は留学生同士で情報を得ていたようですが、このような緊急事態にあってはサポートも多分十分には出来ないことが予想されます。私の憶測ですが、日本語が分からない多くの方は海外メディアの過激な情報を鵜呑みにする事で、我々以上に不安な思いをしたのではないのでしょうか。海外から沢山の留学生を受け入れる大学としては、自治体と協力し、このような連絡手段すらない緊急時を予想して、予めガイドラインをしっかりと作成しておく必要があることを改めて実感しました。仙台市では盛んに外国人向けの情報をラジオで流していたようです。

一方、避難所や給水所で、日本のシステムや現状を良く理解できずに取った留学生の行動が原因で、トラブルになりかかったことも後に耳にしています。

おわりに

現在までに、多くの大学や先生、事業主の方々から支援物資をお送り頂きました。この場を借りて深謝致します。この原稿を仕上げている6月17日現在、我々の研究室は学生用の机や大型機器類の耐震補強も終え、ほぼ通常営業の状態に戻りました。一方、震災の被害状況は、被災地区、建物の構造、建物の高さ、研究室のある階により千差万別ですので、同じ青葉山キャンパスでも建物の被害が甚大で、研究活動を再開できない研究室が沢山あります。更に、大学からほんの10 km 先の沿岸地域に目を向けますと、津波による甚大な被害を被り、家族や親族、友人を失い、ライフラインの確保や普通の生活もままならない方々が大勢居られます。震災直後、地震や津波の惨状を目の当たりにし、食料の調達やライフラインの確保が最重要課題であった時は、正直、大学や研究活動とは何なのかと自問自答することもありました。しかし、現在では、現状を直視した上で、我々が研究教育活動を元気に行うことが支えて下さった多くの方々への恩返しとなり、また、東北地方の復興につながると信じております。

この文章をまとめるにあたって、研究室教授の岩淵好治先生には大変お世話になりました。私の不確かな記憶とノートの走り書きを基に初稿を仕上げた後、岩淵先生には幾つかの記憶違いや曖昧な点をご指摘頂き、この最終稿では時系列も含めてほぼ全て正確なものに上げることができました。また、最終稿をチェックし、適切な助言をしてくれた助教の澁谷正俊博士にも感謝いたします。



研究室の耐震対策。学生用の机(上段、入れ替え前)は全て転落防止用の棚がついて、壁に固定したもの(下段)に入れ替えた。

最後に、この震災で亡くなられた方々のご冥福を心よりお祈り申し上げます。



平成23年6月17日



特集

東日本大震災
の記録・教訓阪神淡路大震災、そして東北地区太平洋沿岸地震（東
日本大震災）を経験して…

東北大学多元物質科学研究所

和田 健彦

まず、東北地区太平洋沿岸地震（東日本大震災）により、亡くなられた1万5千人を超える方々に哀悼の意を表すると共にご冥福をお祈り致します。また、甚大な被害を被られた地域のみなさまに心よりお見舞い申し上げますと共に、一日も早い復旧と復興を祈念致します。

また、今回このような執筆の機会を与えて下さった深瀬会長をはじめとする運営委員のみなさま、そして非常に遅れた納稿を快く、かつ辛抱強く待って下さった今号の編集担当井原さんに感謝致します。6月30日時点、未だ3月11日の本震と4月7日の最大余震より被った震災被害により、研究室のドラフトや実験台は大きく移動し、脚部が折れたままで安全に実験が出来ず、またHPLCやCD、UV、そしてレーザー分光分析機器類は復旧は途半ば…復旧に向けた交渉や予算申請も重なり、慌ただしく、時間的、物理的余裕がなく、本当にご報告したい、知って頂きたい地震被害や、地震後の経過、地震被害復旧の経過と問題点、そして地震対策など…十分に書くことが出来ず、もどかしく、かつ申し訳ない気持ちで一杯でございます。今回は速報的概要…また、機会があればご報告させて頂ければと思います。中途半端なものとなり、申し訳ございません。最初にお詫び申し上げます。

2011年3月11日…未曾有の巨大地震が東北地区を襲いました。東北地区太平洋三陸沖を震源とする、マグニチュード9.0の日本国内観測史上最大で、1900年以降で世界第4位の逆断層型巨大地震でした。今回の地震は、北米プレートと、その下に潜り込んでいる太平洋プレートとの間で起きた典型的な海溝型地震だと報告されています。このタイプの地震は、周期的に発生しており、近い将来発生が予想され、対策などが求められてきました。しかし今回発生した巨大地震は、想定されていた三陸沖・宮城県沖を起点とした単発地震ではなく、岩手から茨城までの南北約500Kmにもおよぶ範囲のプレート間で、M7クラスの少なくとも3つの大きな地震が連動して発生した点、加えて海溝型地震の特徴である地震によって誘起された津波が想定を遙かに上回る規模であったことが、未曾有の災害を招いてしまったと考えられています。

今回の本震の特徴の一つは、先にも書きましたように、3つの大きな地震が連動して発生した点です。そのため、地震による揺れが、強くなったり弱くなったり、大きな揺れが2分以上も続いたとのこと。このため、その揺れの周期と建物の固有振動数が近似する場合、共振のような現象も発生したようで、隣接する



建物でも被害には雲泥の差が生じた例をいくつか目の当たりしています。この今回の東日本大震災の特徴は、1995年に体験した直下型地震であった阪神淡路大震災とは大きく異なりました。

阪神淡路大震災時、私は大阪府豊中市に住んでおり、地震が発生した1月17日5時46分…突き上げられ、ベッドから放り出されるような凄まじい震動で目覚めたことを今でもハッキリ覚えています。もちろん余震は頻発しましたが、本震の持続時間は今回の東日本大震災に比較すると、遙かに短く感じられました。また、その震動の種類・加速度は大きく異なるように感じられます。実際の建物や屋内の被害も、全く異なる…と言うのが実感です。阪神淡路大震災時には、阪神高速や阪急電車の高架道路や高架橋が倒壊し、一階にガレージなどが設置されたマンションで座屈が多く見られたのとは対照的に、今回の震災被害、特に仙台近郊における建物被害では、建物の座屈は比較的少ないように思われます。むしろ長時間続いた震動により、建物内部の被害が大きいと感じています。

つまり、一言に地震対策と一般化し、議論され、その対策が声高にアナウンスされても、地震のタイプによって対策は大きく異なり、一般的・包括的な対応だけでは十分ではない。その地域、地域に応じた対策…特に、過去に発生し、将来的に予想される地震のタイプを解析・把握し、その特徴に応じた対策を検討し、地域住民に周知徹底すると共に、避難方法をも含めた対策・訓練の実施が大切ではないか…が、個人的な感想です。もちろん阪神淡路大震災と東日本大震災の差異は、後ほど述べますが、現在精力的に施行されている建物の耐震補強工事による、建物強度の増加による座屈耐性向上対策の功績も大きいことは忘れてはならないと思います。

ただ、今回の東日本大震災発生時、私はタイ・バンコックでの東北大学グローバル30(G30)プログラムの現地面接入試実施中で、実際の地震を体験しておらず、上記地震の規模・持続時間などは、研究室メンバーや友人、そして家族からの伝聞、加えて4月7日に発生したM7.1の執筆時点で最も大きな余震の体験を基にした記述であり、実体験ではないことを申し添えます。

また、今回の東日本大震災の甚大な被害は、津波によってもたらされた…と言っても過言ではないと思います。先に述べたようにバンコックでの面接中、一人の教員の携帯に仙台で大地震発生…との連絡が入り、面接の合間にインターネットに接続した際、津波が沿岸部を襲う映像が当に配信されたところ…大きなショックを受け、面接終了後にフライトを変更して11日には帰国しなければ…と決意しました。11日夜タイからの帰国、そして帰仙するプロセス…みなさまの参考になるかとは思いますが、次の機会にご紹介させていただければ…と思います。

さて実際、津波の被害は、みなさまご存知のように凄まじいものであり、地震発生から約1週間後、被災者救援のため名取市閑上地区と塩竈市近郊に出かけた際、目の



前に広がる想像を絶する光景…絶句するしか為す術はなく、津波の恐ろしさと、対策の難しさ…厳しい現実には文字通り打ち拉がれてしまいました。目の前に広がる、津波で道路や強固な建物の周りに押し流され積み重なる車の山々、田畑や道路、そして人家に打ち上げられた見上げるように大きい漁船の合間を縫わなければ車を走らせられない道、そして記憶とは全く異なり建物はもちろん、人造物が全く見当たらず、人の営みなど感ずることすら出来ない広陵とした砂埃舞い上がり、独特の香り漂う沿岸部…デジカメが鞆に入っていましたが、それを取り出すことすら思いもつかず、ただただ視界が滲み、自然の脅威、自分の、そして人間の無力感に打ち拉がれ、車を降り、立ち竦むしかありませんでした。この沿岸部の惨状を何度も目の当たりしたこと、そして福島原発事故とその後の事故対策…私の化学者・科学者としての価値観と使命に対する想い、そして人生観を大きく揺さぶり、変えました。(仙台空港近くの航空大学校や閑上地区写真は一通り落ち着いた4月初旬の撮影)

さて、東日本大震災による震災被害・今後の地震対策に関し、特に重要だと思う点を、極簡単に記しますと…

1. 耐震補強建物

多くの大学の研究室、実験室や居室が入る建物も、古いものはもちろん、比較的新しい建物でも、耐震補強工事が施されていることが多いと思います。この耐震補強…先にも書きましたが、建物強度の増大には効果的に機能していることは事実だと思います。東北大学工学部系の建物4棟が立ち入り禁止となるほどの被害を被ったのは、種々の原因があるとは思いますが、地震の震動周期と建物固有振動数・強震減少が関与しているのではないかと個人的には感じています。さて、我々研究者にとって建物強度と共に重要な問題である建物内部の実験・研究室に関しては、耐震補強工事の影響は建物強度ほど単純な問題ではないと感じています。現在の耐震補強工事の主流は、外部あるいは内部から鉄柱などを現存建物に組み込むことにより、建物の強度を担保するものです。この工事により、建物強度の増加と共に、建物の剛性も増加します。つまり、現在地震に強い建築物の主流である、免震や制震工法とは大きく異なる、耐震工法に分類されます。免震・制震工法が、建物を柔らかくしなやかに構築するのに対し、耐震工法、特に耐震補強工事は、建物を堅く強く作ることを目的としていると捉えることもできます。

この堅く強くなった建物…地震発生時において低層階では、その効果が著しく発揮され、被害がほぼなかったのに対し、高層階では建物の堅さ故、低層階と比較にならないほど激しく、角のある揺れ(極めて激しい揺れ返し)となったようです。実際我々の研究室が入る4階建て建物でも、1階の研究室はほぼ被害がないのに対し、2階研究室では不安定な物品の横転が発生し、3階研究室では設置方向にも影響を受け設置方向の悪い分析装置は、重いものでも横転してしまっただとお聞きしています。さて、4階にある私の研究室では、やはり振動方向により被害に差異は認められるものの、そんなことお構いなしで、基本的に全ての分離・分析装置、測定機器・装置類は落下・転倒しました。特にレーザー関係分光・分析装置は、200Kg近い除震台の上に固定していたにもかかわらず、振幅の大きい、そして揺り戻しに角のある振動により、ストリークカメラやシングル・フォトン・カウンティング検出装置はもちろん、レーザー本体も3本ほど除震台から転倒・飛び出してしまいました。また、落下せず、ラッキーと思った装置は、石膏ボードを突き破り壁に強打し、電源ボードなど内部に致命的な損傷を被ってしまいました。このように、耐震補強工事後の建物においては、上層階になるほど横揺れが大きくなり、物品被害が大きくなることを認識頂ければ…と思います。さらに今回の被害は、1階の違いで雲泥の差、一階上がる毎に著しく大きくなり、わずか4階でも高層階のリスクを強く感じました。4階を選択した自分…まさに、煙と??は高いところに上る状態だと、強く反省しています(苦笑)。

しかし、現在ほぼ全国的に施行されている同様の耐震補強工事…こんなリスクがあるのなら、皆さんの

ためにも設計会社にコメントしておこう、しかしその先に設計図や工法に関する説明書には目を通しておかなければ…と、事務をお願いして書類をチェックすると。。。「この工法は建物の強度を増すことに主眼を置いた工法であり、建物内部は施工前より大きな被害を被ることもあることをご承知下さい。。。」などと記載されていました。自分の無知さを恥ずかしく思うと共に、賢明な皆様はご存知かもしれませんが、現実的には非常に厳しくシリアスなこのデメリット…再認識頂ければ、と思います。

ただ、上記コメントは長時間の横揺れを中心とした東日本大震災に特有なものであり、阪神淡路大震災のように上下方向の大きな揺れを伴う直下型地震の場合は、下層階では座屈の恐れも捨てきれず、一概に低層階が安全とは言い切れないのでは…とは思っています。

いずれにせよ、柱のない、オープンスペースやサテライトラボのように開口部の広い空間・部屋の上層階での被害は大きいこと…これは、共通していると感じています。すなわち、自分の研究室だけではなく、その上下階の構造なども把握し、もし被害の拡大が予想される場合は、階下の研究室に支柱の設置などをお願いするなども今後検討する必要があるのでは…とっております。

2. 実験台やドラフトの固定：

1ページ目の写真では分かり難いかもしれませんが、今回当研究室で所有するほぼ全てのHPLCシステム9セットは実験台から落下したり、落下しかけました。皆さんご存知の100kgを超えるような日本分析化学工業社製のリサイクル分取HPLCシステムですら、床面に叩きつけられていました。また、多くのHPLCセットは送液系、混合系、カラム系、検出系等いくつものパーツで組み合わされていますが、このパーツがバラバラと落下し、互いにステンレスチューブで繋がれ、ブラブラ揺れているような状態のものもありました。しかし、幾つかのHPLCパーツは幸い落下せず、実験台の上に踏みとどまり、修理により再利用可能なものもありました。これらの装置は、振動のエネルギーを実験台の動きによってある程度吸収することができ、その結果上部設置装置の落下を防いでくれたと考えています。同様に、当研究室の合成実験用ベンチには、全てフュームフードを被せていました。この実験台と、フュームフードの接合部はボルト固定してあるものの、かなりの重量物であるフュームフードが、左右への大きく、角のある横揺れで実験ベンチから大きくずれてしまい、落下しているのではないかと設置業者の方も心配していました。しかし幸いにも全てのフュームフードは落下することなく、ベンチ上で留まってくれました。もしフュームフードが落下してしまったら、ベンチ前の学生は…考えるだけでも恐ろしい事態が想定されます。壁に固定してあったドラフトは、約50センチほど手前に移動し、フュームフードの乗った実験台も最大40センチ程度移動し、さらに捻れたように両端の移動方向が南北方向にずれた状態に動いたり、東方向に動いたりしていました。これらの実験台の場合も、大きく左右、前後にフュームフードと一緒に実験台が動くことにより、地震の震動エネルギーを吸収し、その結果幸いにも上部のフュームフードが落下から耐えられたのではないかと推測しています。しかしこのように移動により振動エネルギーをある程度吸収できたようですが、その大きなエネルギーにより、スチール製実験台の脚部の溶接部分に亀裂が入ったり、折れかけたりしている箇所が数カ所存在していました。もし単純に接地面を床にボルトなどで固定していたら、フュームフードの落下だけでなく、脚部を中心とした実験台の倒壊を引き起こし



たのではないかと推測しています。

このように、もし実験台を床に強固に固定していたら、実験台の動きは止められてかもしれませんが、その結果上部に設置された機器・装置、フュームフード、そして実験台本体には、より大きな振動・力が加わり、落下や倒壊など今回以上の被害をもたらした可能性が高く、先に述べたように固く・強く固定する耐震補強施行と同様の地震対策は、被害軽減にとって最も優れた方法であるのかに対しては、疑問をもたざるを得ません。

一方で、先に述べました日本分析化学工業分取HPLCの場合、サイド実験台2台を背中合わせでレイアウトし、その上に分取HPLC 2台を同じく背中合わせで2台設置していました。地震による揺れで、2台のサイド実験台は異なった方向に動き、その結果2台の実験台の間に大きな隙間が生じ、この隙間に一台の分取HPLCが落下してしまいました。その結果、本来作業空間であった通路がなくなってしまいました。もし地震発生時、この空間で学生さんがHPLC作業中だったら二つの実験台の間に挟まれ…考えただけで身震いするような恐ろしい結果になっていたと想像しています。また、移動に伴い電気配線や給水、そしてArラインや排水配管が、折れ曲がったり破断してしまったのも、たいしたことはありませんが弊害です。このような実験台の移動に伴う事故を防止するという観点からは、実験台を床固定することが有効なようにも思えます。先に述べた実験台上の装置や機器落下の防止には、実験台を固定せず、適度な実験台の動きによるエネルギー吸収が有効であるようにも思われ、実験台の移動による人身事故を予防する観点からは強固な床固定が効果的であるようにも思われ、未だ、どちらの対策が有効なのか…答えを見出せずにいます。

現時点で最も有効な方法論だと思うのは、実験台は床固定し、実験台脚部と天板など上部構造物の間に、ある程度エネルギーを吸収できるゴムやバネのような免震機構を導入し、かつ設置機器類は強固なバンドなどで固定化し、その底部には免震シートのように適度な変形によりエネルギーを吸収できるシートを設置することが有効ではないかと考えています。少なくともHPLCシステムなどは、各構成機器がバラバラになることを防ぐ意味からも、荷造りに用いるような強固で、タイトに縛れるようなバンドで一体化することが有効ではないかと考えています。

3. 本棚などの固定：

当研究室では、複数の机と本棚が一体化したシステムを導入し、かつ複数箇所壁に固定していました。このシステムは今回の巨大な地震でも有効に機能し、倒壊は免れました。ただし、本棚の本類は激しい振動で全て落下し、机の上のPCもいくつか落下してしまいました。本類の落下防止には、本棚に落下防止用バンドを設置し、PCの底部には免震シートの設置が有効ではないかと考えています。また、当研究室ではデータ共有・保存の観点から、全てのデータや要旨・レジメなど全てのファイルは共通サーバーに保存するよう指導してきました。ところがこのサーバーが、今回の地震で落下し、運悪く完全に壊れてしまいました。その結果、卒業生・修士生のデータ・ファイルも含め、ほとんどのデータが失われてしまい、大きな痛手を被りました。データ類の1箇所集中の危険性を痛感し、現在は違った場所の床面に2



台のサーバーを設置し、バックアップを取りながら運営することと致しました。また、出入り口付近に設置していた電子レンジは落下し全損、冷蔵庫も倒れてしまいました。これらは避難の際、障害となりましたので、入り口付近の物品の落下・転倒防止策の重要性も再認識しました。

最後に：

先にも述べましたが今回の東日本大震災の特徴の一つは、長時間にわたる強い横揺れだと思います。この特徴は本震だけでなく、4月7日の最大余震も同様でした。私が実際に研究室で体験した最大余震の場合、まず地鳴りのような音が聞こえ、引き続き中程度の横揺れが30秒程度発生しました。この時、また余震だ…と、立ち上がり、実験中の学生や職員に「大丈夫ですか…」と声を掛けようとドアを開けた時、さらに強い横揺れに襲われ、隣の部屋の整備しかけたHPLCが落下する音、さらには机の上に整理し直した書類や本類が落下する音が響きました。本震も同じようなプロセスだったと、職員・学生から教えられ、幸いにして人的被害が出なかった理由の一つが分かりました。すなわち、長時間にわたる揺れであるため、初期振動時に危険な場所からの待避が可能となり、待避した頃に大きな揺れが襲い、機器・装置の落下を引き起こしたものと推測しています。つまり、初期振動の時点で身の安全を確保すれば、少なくとも人身災害は予防できるのではないかと思います。このような経験が、他の地域・タイプの地震に対して有効であるか否かは疑問ですが、少しでもみなさまの参考になれば幸いです。

以上、取り留めもなく書き綴ってしまいましたが、まだまだ書き足りない思いです。機会があれば、またご報告させて頂ければ…と思います。

最後になりましたが、震災直後からフロンティア生命化学研究会のみなさま、そして関連のみなさまから寄せて頂いたとても温かい励ましのメールや、お気遣いのメールや連絡、そして生活物品が入手できない状況下での大変有り難い生活物資のご恵送…この場を借りて、心から御礼申し上げます。本当にありがとうございました。また、上記の様に研究室が大きな被害を被ったことを知って下さった方々から、実験スペースの提供のみならず、旅費・宿泊費の負担までお申し出頂き、言葉がないほど有り難く、心より感謝しております。東北大学が、他大学への一時避難より研究室復旧と復興を優先するよう、指導・連絡したこともあり、みなさまの温かいお申し出を活用させて頂くことが出来ず、大変申し訳ない気持ちで一杯でございます。

しかし、沿岸部の甚大な被害、そして福島原発事故などで、意気消沈、自分の無力感に苛まれている時期に、みなさまから頂いた温かいお言葉、そしてお申し出…どんなに心強く感じ、また頑張ろう！って元気と気力、勇気を頂け、言葉に表すことが出来ないほど感謝しております。本当にありがとうございました。

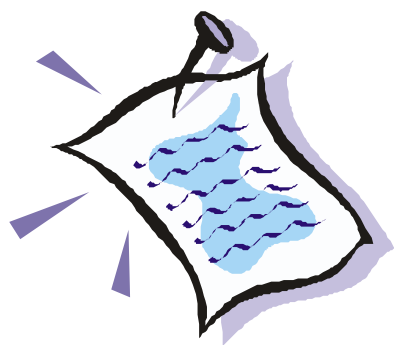
みなさまの温かいご支援に応えるべく、復旧、そして復興に全力で取り組み、この震災の経験を糧に、人間として、研究者として成長できるよう努力致します。

文末になりましたが、みなさまのご健康とご健勝を心より祈念しております。

ありがとうございました。

余 談：

今回の震災で、免震構造・制震構造建物と、耐震構造建物における内部被害の大きな差異をマザマザと見せつけられました。免震構造の近隣私立大学の研究室では、6Fでもナスが倒れたくらいの被害しか出なかったようです。現在全国で施工されている耐震補強工事…地震対策として本当に有効なのでしょうか…



シンポジウム等会告

第5回バイオ関連化学シンポジウム

(第26回生体機能関連化学シンポジウム、第14回バイオテクノロジー部会シンポジウム、第14回生命化学研究会シンポジウム、第8回ホスト-ゲスト超分子化学シンポジウム)

<http://jointsympo.csj.jp/>

主催 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会

共催 日本化学会他

会期 2011年9月12日(月)～14日(水)

会場 つくば国際会議場「エポカルつくば」(つくば市竹園2-20-3)、[交通]秋葉原より、つくばエクスプレス「つくば駅」下車、徒歩10分

- 発表申込締切：6月28日(火)
- 予稿原稿締切：7月19日(火)
- 参加登録(予約)締切：7月29日(金)

- 内容：ペプチド・タンパク・酵素、分子認識・超分子・モデル系、遺伝子関連などが関連する幅広いバイオ関連化学
- 発表形式：口頭発表およびポスター発表*二日目および三日目の午後1時から2時30分をポスター、それ以外を口頭発表(15分発表、5分質疑、3会場)とする予定。*口頭発表は原則として1研究室1件まで。但し、申し込みは2件まで可。この場合は発表優先順位をつけ、2件目の採否は実行委員会の判断による。
- 参加申込方法：WEBサイト(<http://jointsympo.csj.jp/>)から発表申込、予稿原稿の提出、参加登録のすべての手続を行う。
- 部会講演賞：生体機能関連化学部会あるいはバイオテクノロジー部会のいずれかの部会員になって1年以上が経過し、受賞時40才以下の部会員が対象。賞応募申請は発表申し込み時点で受付を行う。
- 参加登録費：7月29日(参加登録(予約)締切)まで・・・部会員は一般6,000円、学生4,000円、非部会員は一般8,000円、学生5,000円

7月30日以降・・・上記の各参加種別に2,000円プラス。

*いずれの価格にも予稿集代金が含まれています。

*予稿集の事前送本は予定していません。

- 懇親会：9月13日(火)。参加費6,000円(事前に申し込み要)。
- 問合先：実行委員長：鍋島達弥(筑波大学大学院数理物質科学研究科)

連絡先 305-8571 つくば市天王台 1-1-1 筑波大学大学院数理物質科学研究科 第5回バイオ関連化学シンポジウム事務局 Tel・Fax: (029)853-4507, E-mail: biojoint@chem.tsukuba.ac.jp

第38回国際核酸化学シンポジウム(ISNAC2011)

<http://www.knt.co.jp/ec/2011/ISNAC2011/>

主催 核酸化学シンポジウム組織委員会

協賛 日本化学会・高分子学会・東北大学多元物質科学研究所ほか

会期 平成23年11月9日(水)~11日(金)

会場 北海道大学クラーク会館講堂 札幌市北区北8西8〔交通〕JR札幌駅より徒歩8分

- 発表申込締切：8月19日
- 予稿集締切：9月2日
- 参加登録予約申込締切：10月14日

●討論主題：1. Chemistry of Nucleosides, Nucleotides, and Their Analogues, 2. Medicinal Chemistry of Nucleosides and Oligonucleotides, 3. DNA/RNA Chemistry and Biochemistry, 4. DNA/RNA Structure and Recognition, 5. Ribozymes, siRNAs, and miRNAs, 6. DNA/RNA Materials and Diagnostics, 7. DDS and Nanotechnology of Oligonucleotides

●発表形式：口頭発表及びポスター発表。口頭発表は原則一研究室1件。

●若手講演賞・優秀ポスター賞：賞応募申請は、発表申し込み時に受け付けます。詳細はHPをご参照下さい。

●発表申込方法：下記のシンポジウムHPから発表申込、参加登録などの手続きを行います。予稿原稿提出方法についてもHPをご参照下さい。

●参加登録費：事前登録一般25,000円、学生8,000円；当日一般30,000円、学生10,000円

●参加登録予約申込方法申込方法：発表申込方法に記載。

●申込先・問合先：〒980-0022〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1 東北大学多元物質科学研究所内 ISNAC2011事務局(実行委員長 和田健彦) Tel: 022-217-5608 Fax: 022-217-5609

HP: <http://www.knt.co.jp/ec/2011/ISNAC2011/>

E-mail: isnac2011@res.tagen.tohoku.ac.jp

第 14 回 生命化学研究会
～In-Cell Interactions を調べる・動かす・組み上げる～

<http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/14th.html>

主催 日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期 2011 年 12 月 2 日 (金) 昼～3 日 (土) 昼

会場 ラフォーレ南紀白浜 (<http://www.laforet.co.jp/lfhotels/shm/>) (〒649-2211 和歌山県西牟婁郡白浜町 2428, TEL 0739-43-8000)

● 講師：伊藤 隆 (首都大学東京)「細胞構造生物学：in-cell NMR を用いたアプローチ」、叶 直樹 (東北大学)「固定化・プローブ化を基軸とした生物活性小分子のケミカルバイオロジー」、金原 数 (東北大多元研)「高分子の超分子化学と機能物質設計」、島本啓子 (サントリー生物有機科学研)「大腸菌膜タンパク質挿入に関わる新しい因子：機能と構造」、高木淳一 (阪大たんぱく研)「高難度タンパク質生産と解析を加速するタギング技術開発」、藤本ゆかり (阪大理)「細菌由来の複合糖質；合成法開発と自然免疫機構制御のためのアプローチ」、水上 進 (阪大工)「ナノとバイオを繋ぐ分子設計」

● 会費：参加登録費 7,000 円、宿泊費 (食事代込) 13,000 円 (当日徴収)

● 参加申込：氏名・所属・役職 (学年)・E-mail アドレス・ポスター発表の希望の有無を明記の上、10/24 (月) までに、下記の連絡先へ申し込み下さい。

● ポスター発表募集 (件数はTBA)

● 要旨締切：10 月 24 日 (月) ポスター発表希望者は A4 白黒半ページ、テンプレートを使用の上作成し、申し込み時に添付ファイルとして下記連絡先まで送付してください。テンプレートは生命化学研究会ホームページ (<http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/>) よりダウンロードできます。

● 問い合わせ・連絡先：

〒819-0395 大阪府茨木市美穂ヶ丘 8-1

大阪大学産業科学研究所 大神田淳子

Phone : 06-6879-8472 Fax : 06-6879-8474

E-mail: johkanda@sanken.osaka-u.ac.jp

● 第 14 回生命化学研究会 in 白浜温泉 幹事

菊地和也 (阪大工)・大神田淳子 (阪大産研)・円谷 健 (阪府大)



編集後記

梅雨も明け、日本列島全体が本格的な猛暑に突入しようとしています。電力不足で職場でのエアコンの使用もままならない状況にある方も多いと思います。どうかご自愛ください。先日、ドラッグストアに行くことができました。お店の一番目立つ場所には、水に濡らすと気化熱で冷た〜くなるタオル、シャツにかけると涼しく感じるスプレー、風呂上がりに塗ってから体を冷やす?ローション…。日本人は、震災から電力不足が心配され始めてほんの1、2ヶ月の間にこんなに多くの製品を開発するんですね。その(商魂?)逞しさにあらためて感心するとともに、(原発を除く)被災地の復興も、いまを乗り切れば、思いのほか早いのではないかと期待してしまいました。

この度は支部ニュースの発行が遅れましてたいへん申し訳ありませんでした。次号(No. 37)は、円谷さんの担当により、2011年10月頃の発行を予定しております。ニュースレター改善のため、皆さんからのご要望、ご意見等をお待ちしております。下記編集担当までご連絡をいただければ幸いです。

平成23年7月20日

井原敏博
熊本大学大学院自然科学研究科
(toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp)

編集担当
円谷 健(大阪府立大学)
大神田淳子(大阪大学)