



生命化学研究レター

目次

1.	巻頭言	2
	生命化学研究における「美」を求めて 原田 和雄 (東京学芸大学自然科学系)	
2.	関連シンポジウム紹介	3
	第3回産学連携 BICS シンポジウム	
3.	研究紹介	
	細胞内で遺伝子発現を調節できる人工分子の開発を目指して	5
	永次 史 (東北大学多元物質科学研究所)	
	セルサージェリー: ナノスケールの針で細胞を操作する技術	10
	中村 史 (産業技術総合研究所セルエンジニアリング部門)	
4.	論文紹介「気になった論文」	18
	開発 邦宏 (大阪大学産業科学研究所)	
	北村 裕介 (熊本大学大学院自然科学研究科)	
	嶋田 直彦 (北九州市立大学大学院国際環境工学研究科)	
5.	生命化学研究法	25
	ラットモノクローナル抗体作製法 〜ラット腸骨リンパ節を用いた迅速かつ高効率な抗体作製法〜	
	立花 太郎 (大阪市立大学大学院工学研究科)	
6.	コロンビア大学中西研究室留学体験記	29
	田中 克典 (大阪大学大学院理学研究科)	
7.	シンポジウム等会告	35
8.	お知らせコーナー	40
	受賞のお知らせ	
	会員異動のお知らせ	
	編集後記	

生命化学研究における「美」を求めて



東京学芸大学自然科学系

原田 和雄

最近ベストセラーになっている「国家の品格」の中で、著者である藤原正彦氏は日本人が大変独創的であると述べていて、とてもうれしい気分させられた。藤原氏の専門である数学の分野では江戸時代から引切りなしに大数学者が出ていることをその理由として挙げているが、日本人が持っている「美的情緒」が重要であるとしている。日本人が持っている自然への感受性や美的感覚についてはよく言われていることであり、例えば、西欧人が雑音と感じる虫の音に対して日本人は「もののあわれ」や「無情」を感じ、虫の音を表す様々な言葉を作り出すなど、「音」に対する繊細な感覚を持っている。数学は美意識と強く結びついている学問であるため、美的情緒が豊かな日本人に数学の天才が現れるというのである。

化学や生物分野の研究においても、数学ほどではないにしても、研究者の美意識が強く影響しているのではないかと思う。生命科学研究に携わる人で、DNA の二重らせん構造に一種の美しさ、機能美を感じないものはいないでしょう。二重らせん構造発見後まもなく、James Watson が Cambridge で行った講演で、DNA の構造について一通り説明し、まとめようとしたところで、多少アルコールが入っていたためか感極まって言葉を失い、分子模型を眺めながら”It’s so beautiful, you see, so beautiful!”としか言えなかったそうである。単純なもの、エレガントで美しいものに真理が見いだせる例は化学、生物の分野では数多くあるのではないかと思う。

一方、生命現象は、物理学、化学の法則に基づくものではあるが、長い生物進化の歴史が反映されている点で特有であると言える。宇宙・地球科学も長い歴史の中での変化を扱うが、生命現象との決定的な違いは、まず、生物は「正確に」複製することである。そして、生物は複製を繰り返すなかで自然選択により、現在あるものに新しいメカニズムを次々に付け加えながらどんどん複雑化する。解糖系を中心とする代謝系の進化がその一つの例である。そのため、生命現象の解析においては、必ずしも単純でエレガントなもの、あるいは効率的であることが真実を明らかにする上での指標にはならない。Francis Crick は、”Biologists must constantly keep in mind that what they see was not designed, but evolved”と指摘している。上述の DNA の二重らせん構造に見られる単純でエレガントな機能美は、生物進化のごく初期の段階で創りだされたものだったためであると考えることができる。生命化学研究の面白さの一つは、これまでに明らかにされてきた生体メカニズムを参考にしながら、理想的な生命システムを「デザイン」できることであると個人的に考える。そして、このようにゼロから何かをデザインする時に力を発揮するのは藤原氏が言う美的情緒ではないかと思う。

以前と比べて、イギリス、アメリカ、ドイツ、日本など、国と国との間で研究スタイルに違いが無くなり、研究の世界も画一化されていくような気がするのは私だけだろうか？日本人として日本文化を大切にすることによって、日本ならではの生命化学研究がどんどん生まれてくることを期待する今日このごろである。

(はらだ かずお harada@u-gakugei.ac.jp)

関連シンポジウム報告



第3回産学連携 BICS シンポジウムを開催しました。 「生命化学と次世代技術は創薬、医療を変え得るか」 ーケミカルバイオロジーを支えるケミカルライブラリーー

東京大学先端科学研究センター 菅 裕明

日本化学会第86回春季年会開催中2日目、「生命化学と次世代技術は創薬、医療を変え得るか」と題し、産学連携 BICS シンポジウムが開催された。本シンポジウムでは、化学工学会の渡邊英一氏と生命化学研究会浜地会長から委任を受けた東大・菅を中心に、慶応大・佐藤、東工大・三原、名古屋大・馬場が講演者人選と企画を行った。ご協力を頂いた各氏には、この場を借りてお礼を申し上げたい。

平成16年から始まったこの BICS シンポジウムは、生命化学と通じたアカデミア研究の現場と産業界の接点を探り、お互いの利になる密接な交流関係や共同研究への進展を促進する目的で開催されている。第1回、第2回では、次世代産業技術としての期待について学および産の講師に様々な観点から講演をお願いし、産業界、社会に対する広報、宣伝の位置づけで、アカデミアの最新の動きと社会還元への思いを中心に紹介した。しかしながら、「生命化学」の特徴を活かした実例が少ないため、産業技術としての革新性、特徴を具体的に思い浮かべることが難しく、社会的に認められるにはさらなる工夫と継続が必要であった。そこで今回は、「ケミカルライブラリー」と「生命化学」を通して具体化しつつある応用分野に焦点をあて、具体的に「化学」が大きく関わる内容を紹介して、「生命化学」技術の革新性、特徴をより浮き彫りにするシンポジウムを企画することになった。

すでに、アカデミアばかりでなく産業界でも、コンビナトリアル化学とそれを支える「ケミカルライブラリー」の必要性について認識がいきわたっている。また、米国の国家プロジェクトとなった Molecular Libraries Screening Centers Network に触発される形で、文科省・経産省はゲノム創薬の次期プロジェクトとして「ケミカルライブラリーとその生理活性探索」関連のプロジェクトを立ち上げようとしている。そういった中、本シンポジウムでは、産学から関連研究に携わる一線の研究者を招き、講演とパネルディスカッションを通して、この研究領域における「生命化学」の重要性と今後の役割の明確化を試みた。

本シンポジウムで行われた生命化学研究会の会員による講演の内容は、読者の皆さんはご存じと思うので紹介は割愛させて頂き、非会員のアカデミア講演者、産業界からの講演者による講演内容を以下簡単に紹介させて頂く。なお、私(菅)が「化学と生物学の接点から生まれる創薬戦略」と題して行った基調講演資料(パワーポイント、MacOS Xで作成)は、本研究会 WEB サイト (<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/FBC/FBCmember/3rdBICSsymp.ppt>)にてダウンロード可能にしてあるので、一般資料として参考・使用して頂ければ幸いである。

東大・先端科学技術研究センターの油谷浩幸教授は、ゲノム創薬のこれまでの歴史的経緯と現状、さらにテーラーメイド医療を目指した迅速オーム解析の新技术として ChIP-on-chip (chromatin immunoprecipitation-on-chip)を紹介された。最後に、抗体医療の現状と今後の進展について語られた。続いて、大塚化学(株)の笹岡三千雄氏が、ヒト型2分岐糖鎖ライブラリーの構築とその応用について講演された。笹岡らは、まず鶏卵黄からヒト型2分岐糖鎖ペプチドを大量に抽出し、酵素分解と化学分解を融合した独自の技術を開発、さらにこの技術を高速クロマト分離と組み合わせることで、30種類に及ぶ高純度の糖鎖ライブラリーを構築した。講演では、糖鎖誘導体を用いた抗体医療への応用等、将来ビジネスビジョンが語

られた。

午後からは、化学合成ケミカルライブラリーの視点から、東工大・高橋孝志教授がロボットを駆使した天然物やコンビナトリアル低分子化合物ライブラリーの合成を紹介された。続く、三菱ウェルファーマ(株)の城内正寿氏は、新規免疫抑制剤 FTY720 の開発に至る経緯を講演された。特に圧巻であったのは、天然物の低分子化・簡素化化合物のデザインからスタートしたこの開発研究は、マウスへの皮膚移植の拒絶抑制活性をモニターすることで、当初期待された薬剤作用機構とは異なる作用機構をもった優れた免疫抑制剤の開発に至ったことである。その経験から、城内氏は、化学者がもつ「勘」とセーレンディピティーの重要性を訴えたのが印象的であった。

(株)リバース・プロテオミクス研究所の田中明人氏は、現在ケミカルゲノミクスで多用されているアフィニティー樹脂による標的選択と同定の手法を再検討し、タンパク質の非特異吸着ができる限り軽減されたアフィニティー樹脂を開発、薬剤標的分子探索に適した方法論を確立させた。この技術を駆使し、既に 100 種類の医薬品を固定化したアフィニティー樹脂を作成、網羅的に結合タンパク質を探索することで 500 以上の新標的の同定に成功していると報告された。エーザイ(株)の大和隆志氏は、抗腫瘍性化合物がガン細胞に及ぼす遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイにより調査することで各化合物の構造-転写プロファイル相関を徹底的に解析、さらに化合物ライブラリーのファーマコフォアに対する標的タンパク質を定量的に表す新手法を紹介された。この技術を駆使することで、薬剤リードの予測を可能にするシステムの確立を将来的に目指している。

産業界の講演者から「米国の研究動向に負けるな」という叱咤激励する言葉が聞かれ、産学連携で研究推進の速度を加速する必要性を私自身感じた。さらに最後のパネルディスカッションでは、これからの薬剤探索における創薬シーズの重要さは当然のこと、その資源をどこに求めるか、天然物に求めるのか合成物に求めるか、議論が進められた。また既存技術ばかりにたよらず、日本独自のシーズ合成技術開発の重要性をパネラーが訴えた。会場からは、これから我々日本のアカデミア研究者がどのように産業界と連携を計るべきか、産業界からの講演者へ質問があり、本シンポジウムのような交流機会をより多くもつべきとの認識で一致した。

本シンポジウム終了後、研究会メンバーを含む参加者や学生達から多くのポジティブなコメントを頂き、様々な意味でインパクトの高いシンポジウムであったようである。本シンポジウムを通し、私個人は、我々生命化学に携わる研究者一人ひとりが独創性の高い研究を推進することの重要性を再認識したばかりでなく、産業界との密接な関係も積極的に構築することの重要性を感じた。もちろん、産業化ばかりを意識した研究では、ブレイクスルーを創出するアカデミア研究はできない。したがって、我々アカデミアの研究者は真のブレイクスルーを創出できる優れた研究に果敢に挑み遂行し、その上で産業界との連携を深めることで日本の将来の経済に大きな影響を与える研究へ進展させるべく努力することが大切であろう。



細胞内で遺伝子発現を調節できる人工分子の開発を目指して

東北大学多元物質科学研究所

永次史

(nagatugi@phar.kyushu-u.ac.jp)



1. はじめに

「生命の設計図」に例えられる遺伝子には、たったひとつの細胞から生命をスタートさせ生命活動を維持していくために必要な情報がすべて記録されている。細胞はこの遺伝子の情報をもとに、そこで必要とする蛋白質を作り、生命活動を維持している。これらの遺伝子に異常、すなわち変異がおこると、遺伝子によって保たれていた細胞の秩序が壊され、様々な病気へとつながることがわかってきている(図1)。

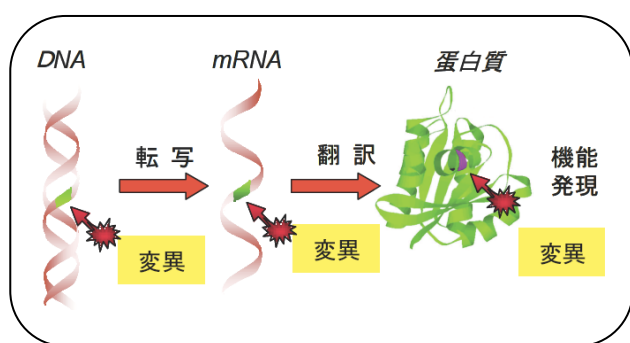


図1 遺伝子の流れと病気の原因

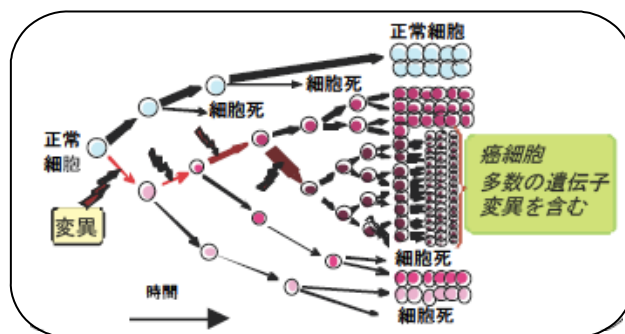


図2 正常細胞から癌細胞への変化(癌化)

特に癌は遺伝子の病気とまでいわれるようになってきており、癌遺伝子及び癌抑制遺伝子など癌の発生にかかわる多数の遺伝子が知られるようになってきた。癌の発生にはこれらの遺伝子が複雑に関与しており、多くの多様性を含むため、その治療にはいくつかの標的を設定する必要があると考えられるようになってきている。私はこのような遺伝子発現を化学的にしかも細胞の中で調節できる方法の開発を目指して、研究を進めてきた。「遺伝子」を標的とした化学的なアプローチは数多くの研究者により古くから検討されてきている。例えば遺伝子に対するアルキル化反応は抗癌剤の主たる作用メカニズムであり、また変異原性を持つ化合物は遺伝子に対して化学反応を起こし塩基の化学構造を変化させることも知られている。しかしいずれの化学反応も選択性がなく、抗癌剤の副作用の原因の一つとも考えられている。これらの化学反応を選択的に狙った位置だけに起こすことができれば、異常になった遺伝子のみを障害したり、あるいは塩基構造を人為的に変えることで遺伝コードを変化させることも可能になると期待される。私はこのように細胞内で遺伝子発現を選択的に調節できる人工分子の開発を目指し、「反応の選択性」を実現するために、変化した遺伝子の配列情報に基づきその配列を設計することで臨機応変に対応できる、オリゴヌクレオチドを用いる方法に注目した。オリゴヌクレオチドとはA,T,G,Cの4種類の塩基が15-30塩基繋がった、短い人工のDNA断片である。この短い人工DNA断片は水素結合によりmRNAを配列選択的に認識・結合し、蛋白の発現を阻害することが知られている。私は、この人工DNA断片に、天然型の塩基ではできない、より高い機能を持つ新しい人工の分子、機能性核酸を導入することで、遺伝子発現を化学的にコントロール

する方法の開発を目指して研究を行ってきた。その結果、最近ようやく細胞内でも機能する人工分子の開発に成功したので、本稿ではその開発の経緯などについて述べたい。

2. 遺伝子発現制御における反応性オリゴヌクレオチドの機能

私は図3に示すような、新しい機能を期待した反応性オリゴ DNA の開発を目指して研究を開始した。反応性分子としてはまず選択的に特定の塩基に対して共有結合を作る分子を設計した(②)。この反応性 DNA オリゴは目的の遺伝子に対して強固に結合す

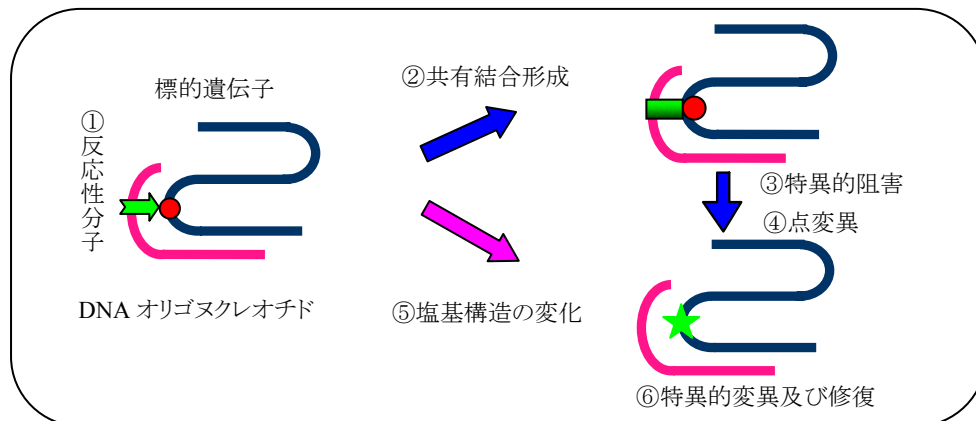


図3 反応性オリゴヌクレオチドの機能

ることで、その遺伝子発現阻害の特異性及び効率を上げることが期待される(③)。また、このような共有結合形成部分が細胞内で DNA が複製される際に変異(塩基の置換)を起こすことが報告されており¹⁾、阻害法としてだけでなく点変異を誘導する方法への展開を検討した(④)。さらに新たな機能として、細胞内の機構を利用した変異の誘導ではなく、化学的に塩基構造を変えることで、塩基の認識コードを変化できる反応分子(⑤)を設計した。このような化学的な方法は、任意の遺伝子機能を選択的に変えることができると期待され、変異した塩基をもとに戻す(修復)することも可能であると考えられる。これらの選択的な化学反応性を持つ機能分子の分子設計の段階から、最終的にはこれらの化学反応を細胞内にも適用することを念頭におきながら、研究をすすめていくことにした。

3. 2本鎖 DNA を形成しアルキル化反応する人工 DNA²⁾

細胞内で特異的に目的の遺伝子に対してのみ共有結合を形成する反応性分子としては1)安定性 2)高反応性 3)高選択性を持つことが望まれる。そこでこのような条件を満たして効率的に目的の塩基に対してのみ共有結合を形成する分子として、まず2-アミノ-6-ビニルプリン誘導体(1)を設計した。

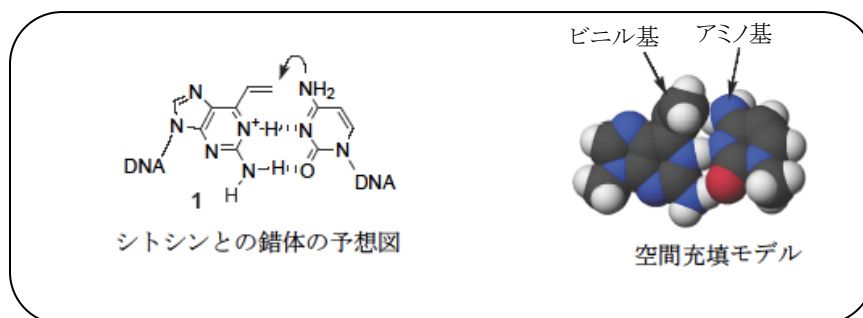


図4. シトシンアミノ基との効率的な反応を期待した2-アミノ-6-ビニルプリン誘導体(1)のデザイン

この分子は反応する部位と認識部位を同一分子内に持つという非常にユニークな構造をしている。この分子を組み込んだオリゴDNAを合成しその反応性を検討したところ、非常に選択的にシトシンに対して反応することがわかった。細胞内への適用を考えた場合、標的近くでのみ高い反応性を示す分子設計が必要と

される。そこで、**1**の高い反応性を目的の配列を持つ DNA の近傍でのみ発生させる方法として、2本鎖を形成することで自動的に活性化される反応を設計した(図5)。これらの分子を持つオリゴ DNA を合成しその反応性を検討した結果、**2** 及び **3** は1本鎖では非常に安定であるが、2本鎖を形成した時にのみ活性化され反応すること、さらにこれらの一連の化学反応はシトシンに対して非常に選択的に起こることもわかった。

試験管内においてモデル反応は当初の設計どおりに進行することがわかったので、次に細胞内においてこれらの反応が進行するかどうかを検討することとした。細胞内での化学反応を直接検出することは

困難であると考えられるので、アンチセンス効果による蛋白発現阻害を反応の指標とすることにした。天然型のオリゴ DNA は細胞透過性さらには細胞内における安定性が低く、細胞内にこれらを適用するためには、適切なドラッグデリバリーシステムが必要である。そこで今回は、PEGをコンジュゲートしたオリゴDNAとポリカチオンを混合させることで形成される、PIC (Polyion complex) ミセルを利用することにした³⁾。まず機能性核酸を含むオリゴ DNA の PEG コンジュゲート体を合成し、細胞内における蛋白発現阻害を調べた。その結果を図6にまとめてある。反応性核酸を含むオリゴ DNA は天然型の DNA に比べて効率よく蛋白合成を阻害していることがわかる。さらに図6に示すように、1塩基のミスマッチを含む配列では、機能性核酸を含むオリゴ DNA による阻害効率が低下しており、天然型では認識できない1塩基の違いの認識できることがわかった⁴⁾。これらの結果は機能性核酸が細胞内においても試験管内と同様に、標的とのハイブリッド形成による活性化さらにはアルキル化反応が選択的に進行していることを示唆しており、さらなる in cell chemistry への展開を計画している。

4. 3本鎖を形成し反応する人工 DNA を用いた点変異導入 (図3④)⁵⁾

私は、2本鎖 DNA を形成し非常に選択的に反応する人工 DNA の開発に成功した。これらの反応性分子

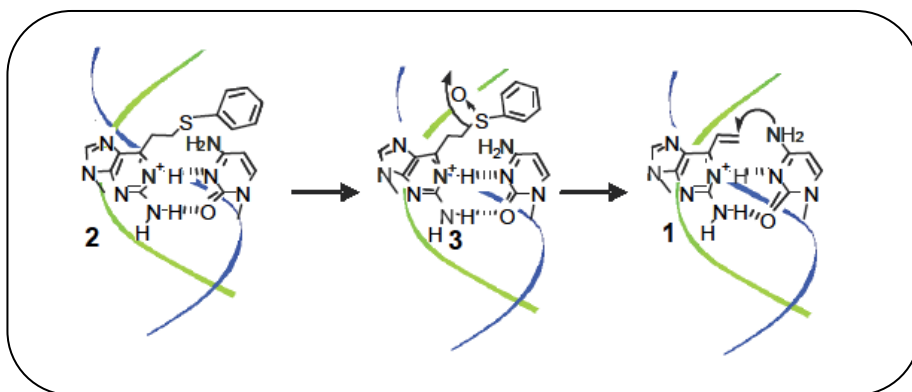


図5 2本鎖 DNA 内で自動活性化されるクロスリンク反応

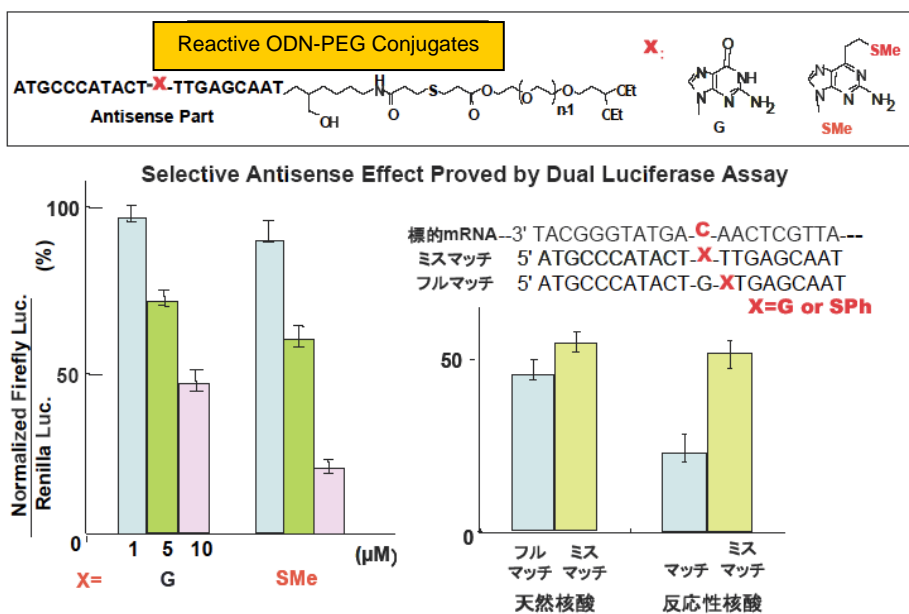


図6 反応性オリゴ DNA を用いた細胞内における蛋白阻害

の構造に基づき、さらに3本鎖内でも反応する反応性分子を設計し、それぞれアデニン(A)及びシトシン(C)に対して非常に選択的に共有結合を形成する分子(4, 5)を開発した(図7)。共有結合を形成した部分は細胞内の修復系などの酵素に認識され他の塩基に置き換えられる、すなわち点変異が起こることが知られている。

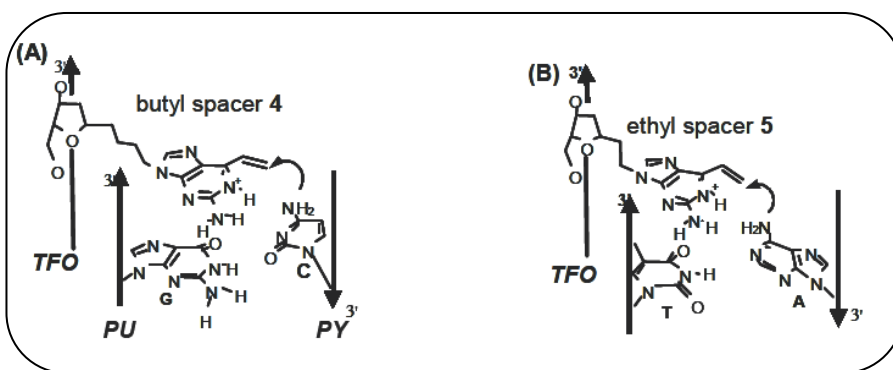


図7 3本鎖内で反応する反応性分子の設計

そこで非常に高い選択性を持つこれらの反応性分子を用いて、モデル細胞内における点変異導入について検討した。その結果、細胞内における変異の導入効率(反応した塩基が他の塩基に置き換えられる効率)は 0.1-0.3 %と高くないものの、変異が導入されたのはすべて反応した塩基に限定されていることがわかった。またアデニン(A)と反応する反応剤を用いた場合には、反応したアデニン(A)はグアニン(G)へと選択的に変換されることがわかった。このような反応剤の例は、光により活性化され反応するソラーレンが知られているのみであり、新規の反応剤により変異が導入できたことは非常に興味深い。

5. 塩基構造を変化させる(点変異を誘導する)人工 DNA の設計 (図3⑤)⁶⁾

選択的に共有結合を形成する反応性核酸を含むオリゴ DNA を用いて細胞内で点変異の誘導を起こすことに成功した。このような変異をねらった位置に選択的に導入できれば、化学的に遺伝子を変える、つまり化学的な遺伝子操作も可能になると考えられる。そこで、次に細胞内の仕組みで変異を誘導するのではなく、化学的に特定位置で塩基構造の変化を起こす分子の開発を計画した。すでに述べたようにシトシンに対して選択的にアルキル化する反応性核酸が開発できたので、この構造に基づき、図8に示すような、塩基の構造を変化させる反応の設計を行った。反応分子(6)はシトシンと錯体を形成し、選択的にシトシンのアミノ基に NO を転移させ、NO が転移したシトシンがさらに化学変換を受け、結果的にシトシン(C)がチミン(T)の等価体へと変換されると考え設計した。

6 を含むオリゴ DNA を合成しその反応を検討した結果、期待通りに上記の反応が進行することがわかった。この反応は 6 の相補的な位置にシトシンを含む配列に対してのみ選択的に進行し、塩基選択性、位置選択性ともに高いことがわかった。さらに NO が転移したシトシンはチミン等価体へと変換されることも明らかとなった。この結果から 6 を含むオリゴ DNA は、選択的に狙った位置に C から T への点変異を導入できるという、非常に興味深い機能を持つことがわかった。

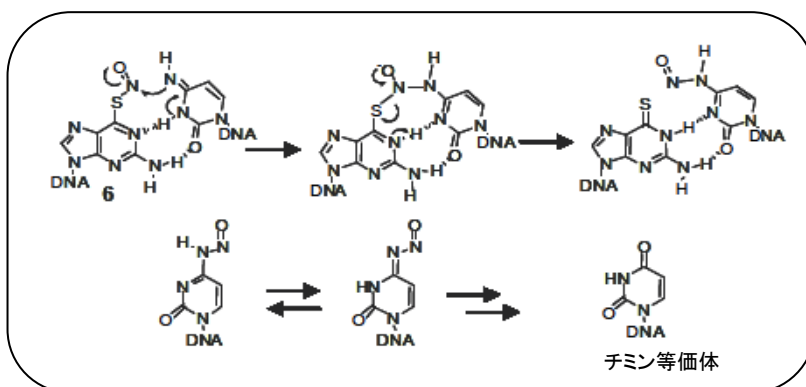


図8 点変異を誘導する反応の設計

6. 結論

以上のように私は、遺伝子発現を化学的にコントロールする方法の開発を目指して研究を行ってきた。その結果、目的の機能を達成できる機能性核酸の開発に成功した。特にアルキル化反応を選択的に起こす機能性核酸を含むオリゴ DNA は、細胞内でも目的の化学反応が進行していることを確認しており、現在さらに細胞内での高い機能の実現に向けて検討中である。また狙った場所でのみ化学的に塩基の構造を変化させ、遺伝コードを変化させる機能性核酸の開発にも成功しており、現在、細胞内への適用についても検討中である。今回開発した非常に選択的な反応性を持つ機能性核酸は、将来様々なバイオ機能への展開を目指しており、今後はさらにその実現に向けて研究を進めていきたいと考えている。本研究の進展が、化学で生命科学を解きほぐしていく、ケミカルバイオロジー分野において貢献できれば幸いである。

【参考文献】

1. Wang, G., Levy, D.D., Seidman, M.M., and Glazer, P.M., *Mol Cell Biol.*, **15**, 1759-1768 (1995); Majumdar, A., Khorlin, A., Dyatkina, N., Lin, F.L., Powell, J., Liu, J., Fei, Z., Khripine, Y., Watanabe, K. A., George, J., Glazer, P. M., and Seidman, M. M., *Nature Genet.*, **20**, 212-214 (1998).
2. Kawasaki, T., Nagatsugi, F., Ali M. M., Maeda, M., Sugiyama, K., Hori, K., and Sasaki, S., *J. Org. Chem.*, **70**, 14-23 (2005); Nagatsugi, F., Kawasaki, T., Usui, D., Maeda, M., and Sasaki, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6753-6754 (1999).
3. Oishi, M., Sasaki, S., Nagasaki, Y., and Kataoka, K., *Biomacromolecules*, **4**, 1426-1432 (2003); Oishi, M., Nagatsugi, F., Sasaki, S., Nagasaki, Y., and Kataoka, K., *ChemBioChem*, **6**, 718-725 (2005).
4. Ali M. M., Oishi, M., Nagatsugi, F., Mori, K., Nagasaki, Y., Kataoka, K., and Sasaki, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 3136-3140 (2006).
5. Nagatsugi, F., Sasaki, S., Miller P. S., and Seidman M. M., *Nucleic Acids Research*, **31**, e31 (2003); Nagatsugi F., Matsuyama, Y., Maeda, M., and Sasaki, S., *Bioorg Med Chem Lett*, **12**, 487-489 (2002); Nagatsugi, F., Tokuda, N., Kawasaki, T., Maeda, M., and Sasaki, S., *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **11**, 2577-2579 (2001).
6. Ali M. M., Alam, Md. R., Kawasaki, T., Nagatsugi, F., and Sasaki, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8864-8865 (2004).



セルサージェリー: ナノスケールの針で細胞を操作する技術

産業技術総合研究所セルエンジニアリング部門

中村 史

(chikashi-nakamura@aist.go.jp)



研究紹介

1. はじめに

生命現象は急速に解明されつつあり、そう遠くない将来に細胞レベルで様々な精密操作を行う技術が必要になると筆者は考えている。例えば、幹細胞から終末分化状態の細胞まで、どのような経路で細胞が変化していくのか解き明かされたときに、その経路を完全にトレースし、目的の細胞を作れることを誰もが考えるであろう。分化誘導された細胞は研究用途だけでなく、細胞治療など医療分野で用いたい。故にその細胞のネイティブな性質が操作によって変化しないことが望ましい。拒絶反応がない自家細胞を用いた上で、細胞の活性損失、ガン化などは無く、化学物質による修飾や、外来遺伝子の残留による異種蛋白質の発現も伴わない。これが安全な細胞を提供する究極の細胞操作である。そのためには単一細胞を取り扱う精密な操作が必要となり、細胞になるべくダメージを与えずに機械的に直接内部にアクセスする技術が必要になると考えられる。

少し馬鹿げた話をすれば、テレポーテーション操作が可能で、例えば、遺伝子疾患の治療において、細胞内の一本の病原変異染色体を、健全な染色体に瞬間的に入れ替えることが出来れば、目的は達成できる。当然ながらこれは物理的に不可能である。物理的に細胞に何らかのアクションをして、細胞膜という障壁を乗り越えなければ操作は出来ない。しかし細胞内部に物理的に物質を導入することは実はあまり簡単ではない。DNAの細胞への導入を例にとると、カチオン性脂質や化学物質を使って化学的に導入する方法や、細いキャピラリーを用いて物質を注入するマイクロインジェクションなどの機械的に導入する方法があるが、これらの手法では、細胞の中に物質を入れようとするだけで、細胞は大きな損傷を受け、多くの細胞は死に至る。細胞は、細胞膜という障壁により外界と自らを隔てることにより生命活動を維持しており、また細胞構造を維持すること自体が重要な意味を持っているようであるから、物理的にアクセスする行為によって細胞が損傷を受けるのは当然と言える。細胞死を免れたものがあったとしても、多くの操作をひとつの細胞に連続的に施すことは不可能である。従来細胞生物学的な研究分野では、生き死にはさほど関係なく、操作後の細胞がある程度の効率で手に入れば問題はなかった。しかし健全な細胞を取得することを目的とした場合にはこのような方法ではその目的を満足できない。

本項で紹介する「細胞に針を刺す技術」は、

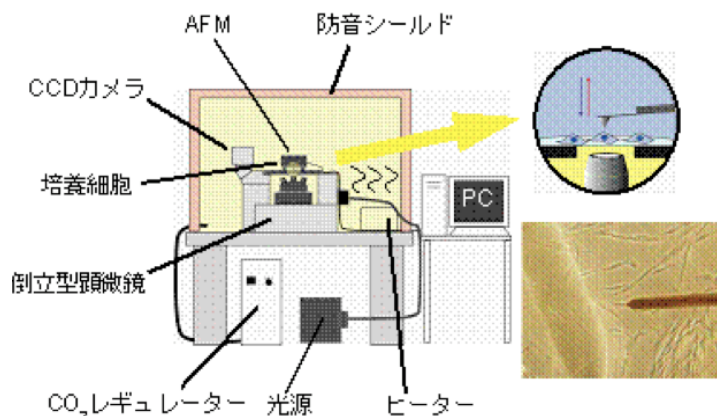


図1 細胞操作装置の外観図

写真は操作中の細胞の透過明視野像。AFMには Asylum Research 社の MFP-3D、倒立顕微鏡は Olympus 社 IX-71 を使用。

細胞に損傷を与えずに細胞内に物理的に接触することが出来れば、上記の問題点を解決出来るだろうという単純な発想に基づいている。ヒト体細胞は、直径およそ20~30 μmである。これに対し、マイクロインジェクションで用いられるキャピラリーは細胞に挿入した時の最大直径が数ミクロン以上である。細胞への侵襲性を考慮すると、少なくともこれを下回るサブミクロンオーダーの材料が必要になるが、光学的に観察することが難しく、針材料の細胞挿入をどのように観察するかが問題になる。

2. 原子間力顕微鏡の応用

原子間力顕微鏡 (AFM) は、物質間に働く原子間力を測定・検出する走査型プローブ顕微鏡である。光をこの原理として、カンチレバー先端の探針と試料との間に働く微小な力を一定に保つように圧電素子が制御される。探針先端の曲率半径は5~50 nmであり、走査する表面構造をナノスケールで画像化出来る。AFMは溶液中での使用が可能であるため、生体試料の測定に特に適している。また、Z軸方向の走査のみを行うことで、探針と基板の間に働く力を検出する、いわゆるフォーススペクトロメリー解析が可能であり、数 pNレベルの力分解能で解析が可能である。細胞の話から少し脱線するが、

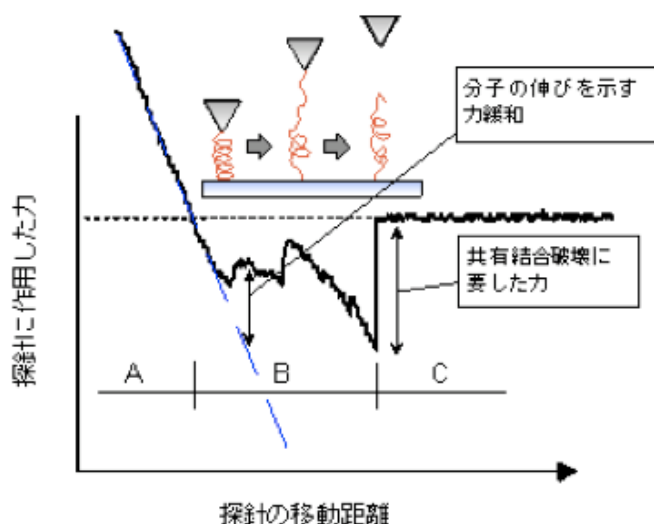


図2 αヘリックスペプチド伸展破壊のフォースカーブ
 ヘリックス上ペプチドの片方を基板に、片方をプローブ表面に共有結合で固定化する。プローブを引き離す過程においてヘリックス構造の破壊に伴う力応答の変化をフォースカーブから観察することが出来る。ゼロ点以下の力は引力を示す。引力の緩和は分子の伸びを示し、最終的に分子内の共有結合が切断され力はゼロ点に戻る。

図2に、αヘリックスペプチド1分子を伸展破壊する際に得られるフォースカーブを示した。フォースカーブを測定することによって、結合を破壊するのに要する力の最大値が計測出来る。この力の大きさはプローブ移動速度に相関する。表1に示すように、Si-Cの共有結合[1]の他にも、アビジン-ビオチン[2]、抗原-抗体[3, 4]、我々の研究グループでも、甲南大杉本先生のグループで取得されたポルフィリン結合ペプチドを用いて相互作用を力学的に解析した例がある[5]。他にも、ペプチドのヘリックス形成に係る水素結合のエ

表1 種々の結合破壊にかかる力

結合種類	結合破壊に必要な力	Force loading rate	文献
Si-C (共有結合)	2.0 nN	10 nN/s	1
アビジン-ビオチン	150 pN	1 nN/s	2
HSA-抗HSA抗体	240 pN	54 nN/s	3
FITC-抗FITCのscFv	70-135 pN	1 nN/s	4
ポルフィン-ポルフィリン結合ペプチド	14 pN	4 nN/s	5

エネルギーを構造破壊に掛かる力学的な仕事量から測定することや[6]、ペプチドの α ヘリックス含量の測定[7]も可能である。このようにAFMを使って力を測定することで、様々な情報が得られる。

我々は、①試料に対して直接接触

する、②精密な3次元の位置制御が可能である、③カンチレバーにかかる微小な力応答を測定できる、という3つの利点からAFMは細胞操作の制御装置として有用であると考え、市販の単結晶シリコンAFM探針を集束イオンビーム(FIB)によってサブミクロン直径の針状にエッチングし用いることを考案した(図3)。デイスコ上で培養された細胞の大きさは大きいものでは10 μm ほどになる。針先を核内へ到達させることを考慮し、長さは5 μm 以上で作製した。この針をナノ針と呼び使用している。ナノ針に加工したカンチレバーは図1に示す倒立顕微鏡とAFMを組み合わせた装置に設置し、細胞を操作する。

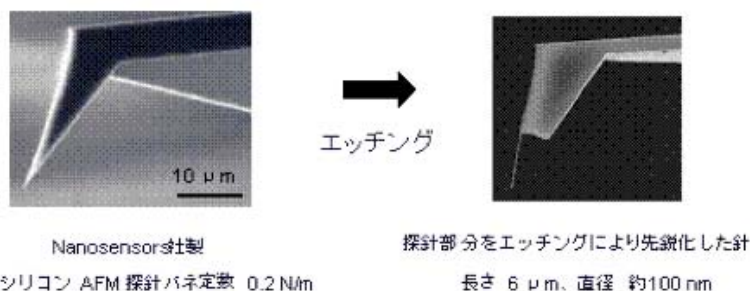


図3 FIB エッチングにより作製したナノ針

3. ナノ針細胞挿入における力学応答

我々ははじめに、作製したナノ針と通常のAFM探針を細胞に近づけ、その力学応答を確認した。その結果を図4に示す。通常のピラミッド型のAFM探針(図3左)を近づけた場合は、図4左のフォースカーブのように、接近過程(赤線)において細胞との接触後、斥力が増加し、引き離し過程(青線)において斥力が減少するという連続的な斥力変化が観察される。細胞は弾性体ではなく塑性変形するので、接近時と引き離し時でヒステリシスが観察される。これに対しナノ針では、図4右のフォースカーブに示すように斥力増加が始まってから1 μm ほどのところで斥力の上昇が緩和し、しばらくの間、一定の斥力を保った後に再び斥力が増加している。この斥力の緩和は、ナノ針の先が細胞膜を通過した点と考えられる。また、再び斥力が増加するのは、探針の土台部分が細胞表面に接触したためと解釈できる。

斥力の緩和が、細胞内へのナノ針の通過を示す現象であることを確認するために、共

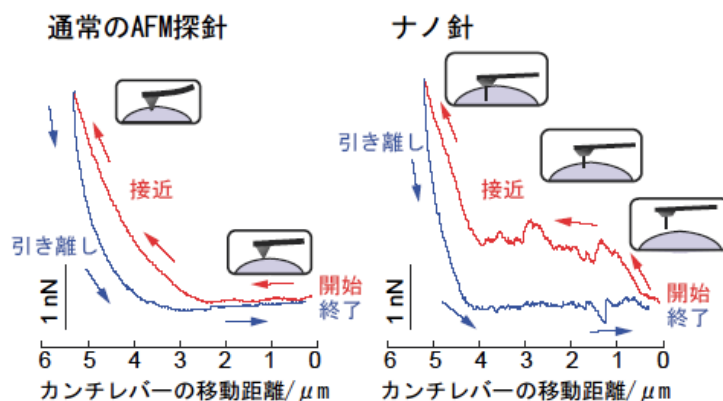


図4 ナノ針細胞接触時の力応答

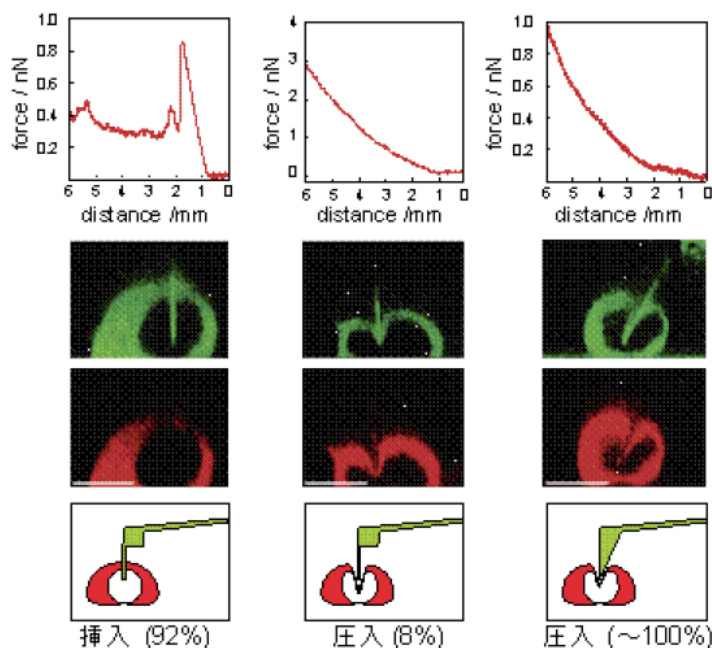


図5 ナノ針細胞接触の斥力応答と共焦点蛍光像

焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM) を用い、AFMによる細胞操作中のナノ針および細胞の三次元画像観察を行った。ナノ針は、直径200 nmのものを用い、表面をシラン化剤APTES (3-Aminopropyltriethoxysilane) によりアミノ化した後にFITC (Fluorescein isothiocyanate) で蛍光標識した。また、核外輸送シグナルを付加したDsRed2-NES (NES: nuclear export signal) を発現させたHEK293細胞を用いた。細胞に対して接近させた時のフォースカーブを測定し、最も近づけた点で停止し、蛍光像をLSM (Laser Scanning Microscopy) により観察した。

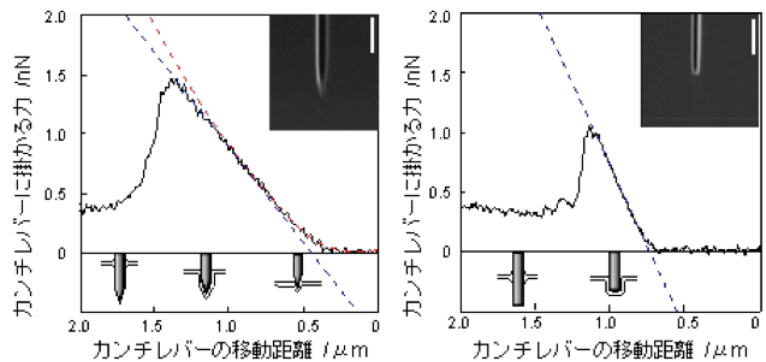
結果を図5に示すが、左はナノ針を接近させた時に緩和が観察された場合の、中央はナノ針接近させた時に緩和が観察されなかった場合の、右は通常のAFM探針を接近させた場合の結果を示している。1段目は接近過程のフォースカーブ、2段目の緑の像、3段目の赤の像は、488 nm、543 nmレーザーで励起した針部分を含む、垂直切片の再構築蛍光像を示している。488 nm励起の場合は、Ds-Redも励起されるために、針のみならず細胞質も観察されている。フォースカーブ上で斥力緩和が観察された場合(左)は、ナノ針は細胞の核内に到達しており、細胞の変形など無く、スムーズに細胞に挿入されていることが分かる。また、通常のピラミッド状のAFM探針では、緑色蛍光の図では細胞内に深く侵入し、針が核内に到達しているように見える。しかし、細胞質のみが観察される赤色蛍光の図では、探針先端は細胞質を巻き込み圧入しているのみで、細胞内に侵入していないことが明らかである。また、中央の図に示すように、ナノ針を使用している場合でも斥力緩和が観察されず、細胞が変形するのみで針が細胞に侵入しないという現象が8%ほど観察された。新しく用意した針ではこのような挿入不成功は見られないことから、針を繰り返し挿入している間に細胞成分が針表面に吸着し、挿入しにくくなるものと考えられる。また、このように、ナノ針が挿入に失敗した場合のフォースカーブでは、通常の探針と同様の単純斥力上昇しか観察されず、ナノ針の細胞への挿入が成功した場合には必ず斥力緩和が観察されることが確認された。すなわち斥力緩和と挿入は1対1で対応しており、フォースカーブを観察することによって、細胞や針を特別に修飾することなく、挿入現象を捉えることが可能となった。細胞に修飾が必要なく、ネイティブな状態で用いることが出来るのは本方法の大きな利点である[8, 9]。

フォースカーブ上で、斥力緩和は1回ないし2回観察されるが、3回観察されることはない。このことから2回目の緩和は核膜通過を示すものと推察される。が、証明するに至っていない。また、脂質二重膜のみから成るリポソームを用いた場合には、斥力の上昇は観察されるが、明確な斥力緩和は観察されない。次項で詳述するが、フォースカーブの圧入過程から、物質の固さ(ヤング率)を求めることが出来る。求められるヤング率から、細胞の方がリポソームと比べて5~10倍くらい固いことが分かる。これらのことから脂質二重膜だけではなく、蛋白質から成る裏打ち構造を伴う細胞表面構造全体の破断と針先端の貫通が緩和として観察されているものと考えられる。

4. ナノ針の細胞挿入における圧入過程と先端形状

ナノ針の圧入過程の力学挙動について解析した。ナノ針は、直径 200 と 800 nmのものを用意した。通常の探針はピラミッド状であるために、針状にエッチングした状態では先端が円錐型である。そのままの円錐型の先端形状のものと、先端を平坦にエッチングし円筒型に加工したものそれぞれ2種用意し、ヒト新生児メラニン細胞に圧入する過程の力学応答を解析した。直径200 nmの針の挿入時のフォースカーブを図6

に示した。圧入過程に注目し、Hertzモデルによって解析した。Hertzモデルは図中式の通り、圧入する物質の形状が円筒形ならば、力 F と圧入距離 I は $F = cI$ (c : 定数) で表され、圧入距離に対して一次の関数となる。一方、円錐形ならば $F = c'I^2$ (c' : 定数) と二次の関数として表される。先端形状が円錐型の場合は初期の段階で二次関数として増加するがその過程の中で一次関数へ変化する。この関数の次数変化の点が円錐形から



$$F = \frac{2E \tan \alpha}{\pi(1-\nu^2)} I^2$$

$$F = \frac{2aE}{(1-\nu^2)} I$$

図6 ナノ針圧入過程の Hertz モデルによるフィッティング
E; ヤング率、 α ; 円錐形の内角度、I; 押し込み距離、 ν ; ポアソン比、a; 半径

円筒形へと形状が変わる点と一致している。また、先端形状が円筒形のものは初期の段階から一次関数として斥力の増加が見られる。これらの結果は、得られる力学応答がHertzモデルとよく一致しており、初期の斥力の増加は針先端が細胞表面に圧入していることを支持するものである。細胞が塑性変形することを述べたが、微視的な圧入過程の観察においては弾性体における接触理論が適用できるものと考えられる。本測定から算出された細胞の ヤング率2~10 kPaは、既に報告されている臍帯静脈内皮細胞のヤング率7.2 kPa [10]、繊維芽細胞のヤング率3~5 kPa [11]と大きく矛盾しない値であった。

細胞表面への圧入後、貫通を示す力の緩和までの距離に注目すると、先端形状が円錐の針では、接触から貫通までの圧入過程が 1 μm 程度であった。これに対し、先端が円柱状の針では、500 nm程度と短い。図7では、直径800 nmの針の結果も合わせて、圧入距離と挿入確率を検討した結果を示す。挿入確率は直径が200 nmの針の方がどちらの形状でも高く、かつ円錐状の針での70%と比較して、円柱状の針では92%と高かった。この傾向は直径800 nmの時に、より顕著であり、円錐型21%に対し、円筒型56%であった。鋭い針ほど挿入確率が高いわけではなく、逆に円筒型に切り落とした針の方が細胞挿入の確率が高いことが明らかとなった[9]。針の貫通には細胞の表層構造の破壊が必要となる。円筒型の針の場合、圧入距離に対して、細胞膜面に対して水平方向の張力をより増加させるため、貫通しやすいのだと考えている。

鯨を獲る銚(もり)は、鯨の体に刺さりやすいように先端を切り落としてあるようだ。原理は違うかもしれないが、同じようなことが細胞を刺す針でも要求されるというのは興味深い一致である。

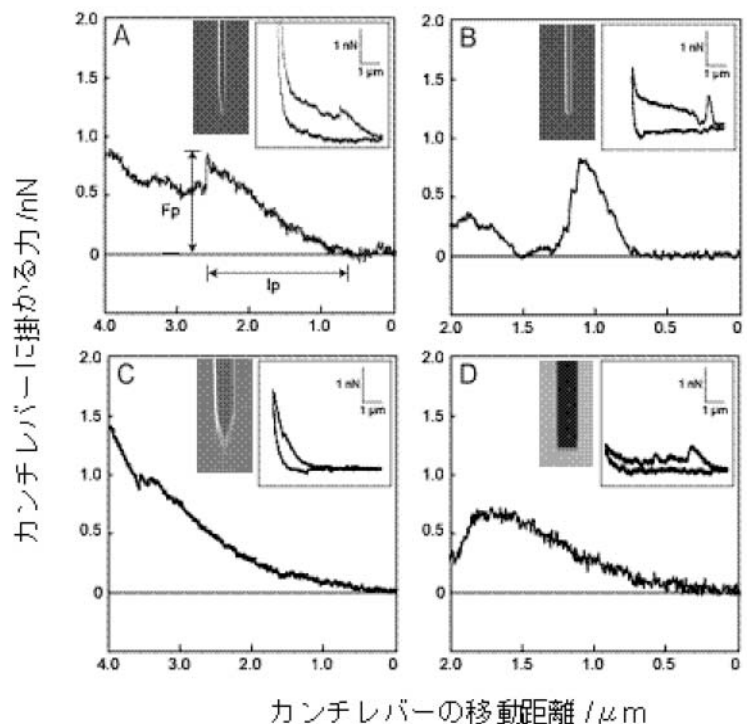


図7 ナノ針先端形状と挿入時力緩和

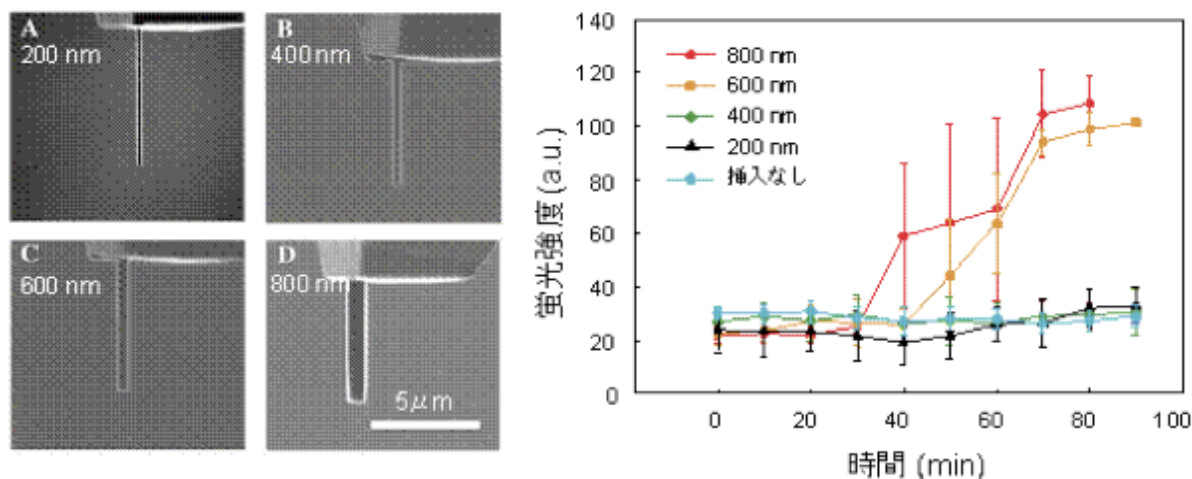


図8 種々直径のナノ針とDAPI 排出試験の結果

5. ナノ針細胞挿入の侵襲性評価

冒頭で述べたように、細胞に対して物理的操作を行う技術では、操作による細胞死や細胞の活性低下が問題となる。ナノ針の細胞への侵襲性を評価するために、図8に示すような直径200, 400, 600, 800 nmの4種の針を用意し、各種ヒト培養細胞に対して挿入操作を行い、細胞内に針を挿入した状態を維持しながら、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色による死細胞判定を行った。細胞が蛍光色素DAPIを排出できない状態になると色素は染色体DNAにインターカレートし、細胞核が染色される。よって細胞の蛍光強度の上昇は細胞活性の低下を意味する。新生児メラニン細胞を用いた試験結果を図8に示す。直径200, 400 nmの針では、1時間以上の挿入を維持してもDAPIの蛍光強度の上昇はほとんど無く、挿入操作をしていない細胞とほぼ同等であった。これに対し、600, 800 nmの針では、30分を過ぎるあたりから、DAPIの蛍光が顕著に上昇し始めた。400 nmの針挿入で全く蛍光強度の上昇が観察されないことは、針により穿たれた穴から色素が侵入しているのではないことを示しており、細胞活性の低下により核染色に至っていることを意味している。他にもヒト乳ガン細胞、ヒト腎臓由来胚性細胞を用いて試験を行ったところ、800 nmの針でのみDAPI蛍光の上昇が確認された。マイクロインジェクション用のガラスキャピラリーを直径1 μm および400 nmの針状に加工したものを挿入した場合でも、同様の結果が得られた。材料によらず挿入する針状材料の直径が400 nm程度以下であれば、1時間以上挿入状態を維持しても生細胞の活性を低下させずに操作できる事がわかった[12]。

直径の大きい針の挿入により最終的に引き起こされる細胞死は、ネクローシスであることも確認されている。北大 川端教授らは伸縮性材料の上で培養した細胞をストレッチしたときにわずか15%伸長しただけで細胞死が起こることを報告している[13]。細胞の構造、骨格が破壊されたときに、細胞死が誘発される、破壊、破断面積(あるいは体積)に閾値が存在していることが示唆される。

市販のマイクロインジェクション用の最も細いキャピラリーの一番細い先端の外径が大体700 nm程度である。ヒト培養細胞の生死の境目の直径が、この最も細い外径と偶然にも一致しているのであるから、それよりも遙かに太い直径1 μm 以上のキャピラリーの胴体部分が細胞に侵入した場合、侵襲性が高いことは推して知るべしというところである。しかしながら、マイクロインジェクションは、瞬間的に溶液を注入する等の短時間の挿入操作が目的であるから、実際の使用上はさほど問題ない。このことは、直径800 nmの針でも、30分以下の挿入時間では、DAPI蛍光強度が上昇しないという本実験の結果が支持している。ナノ針を用いた細

胞操作はもっと長時間の数時間に及ぶ操作も想定しているので、本実験では、長時間の挿入操作を行っている。

6. ナノ針による遺伝子導入

ヒト由来の間葉系幹細胞 (hMSC) は附着培養状態で厚さが2 μm 以下の扁平な細胞であり、遺伝子導入効率が非常に悪く、確実に高効率な遺伝子導入法が求められる。ナノ針を用いた遺伝子導入の効率を評価するためにhMSCへの遺伝子導入について検討を行った。

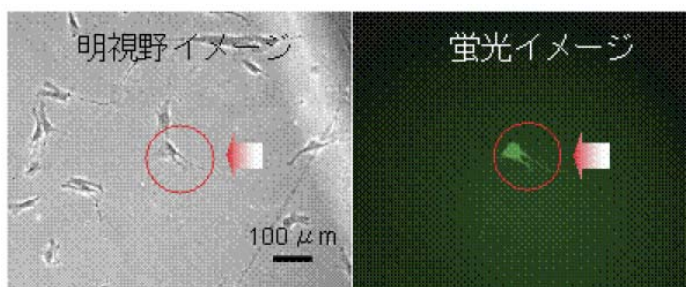


図9 初代培養間葉系幹細胞への遺伝子導入

直径200 nmのナノ針をシラン化し、チオール基を提示させる。二価性架橋剤であるEMCS (N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide) を用いて、最後にポリリジンを結合する。このポリリジン修飾ナノ針にプラスミドDNAを培地と同じpH 7.4の条件下で静電的に吸着させる。細胞内のpHは細胞外、培地よりも低い、hMSCsではpH 7.1程度である。このpH低下によって吸着DNAは効率よく表面から放出される。図9には遺伝子導入操作したhMSCのみがGFPを発現している様子を示している。

二名の患者から培養されたhMSCsに対してGFP遺伝子を有するpHRGFPの導入操作を行った。対照実験として、リポフェクション、マイクロインジェクションを行った。その結果、遺伝子導入効率はリポフェクションで最大13%、マイクロインジェクションではわずか8%だったのに対して、ナノ針による導入では70%以上の高効率遺伝子導入が可能であった。また、各細胞におけるGFP蛍光強度のばらつきを変動係数で評価したところ、リポフェクションで98%、マイクロインジェクションで52%、ナノ針では25%であった。ナノ針を用いた遺伝子導入では細胞への遺伝子導入部位、導入時間を精密に制御されているため、DNA導入量が一定になっており、蛋白質発現量を精密にコントロールできる可能性が示唆された。

このように、本方法によって遺伝子導入が難しいとされる細胞にも確実に操作を行うことが可能であることが、明らかとなった。

7. おわりに

本稿ではナノ針の細胞挿入における力学的な知見を中心に我々の開発する細胞操作技術を紹介した。200 nmの直径では、ナノ針ではなくサブミクロン針だという人がいるかもしれない。呼び名が長いのでナノ針にしているが、サブミクロン針でも結構である。細胞を殺さない、十分な量の物質を細胞内に導入できるなどの本来の目的を達成することが出来るサイズが重要であって、ナノであるかどうかは問題ではない。

200 nmの針は細胞を全く殺さないことから、操作後確実にその細胞を解析したり、利用したりすることが出来るようになる。このような技術は今までになく、新しい細胞工学の技術領域として我々は「セルサージェリー」と名付けている。細胞を外科的に手術するという意味である。外科手術は術後の患者の生存を保証するものでなければならない。「セルサージェリー」という言葉には、操作後、確実に生きた細胞を提供できるという意味を込めているのである。

現在のところ、DNAをナノ針に固定化し、細胞に挿入している時間だけ発現させ、完全に抜き去ることに

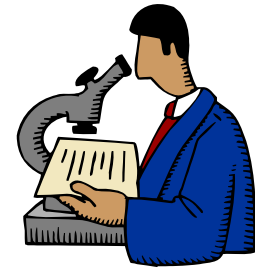
よってDNAの転写を停止する、in/out遺伝子発現制御法や、抗体固定化ナノ針を挿入し、抜き去る際の抗原抗体結合力を測ることによって、細胞を殺さずに細胞内蛋白質を検出する方法の開発に取り組んでいる。また別の機会にこれらの成果を紹介出来ることを願いつつ、私の研究紹介を終わらせて頂きます。

参考文献

- [1] M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann and H.E. Gaub, *Science* **283** (1999) 1727-1730.
- [2] E.L. Florin, V.T. Moy and H.E. Gaub, *Science* **264** (1994) 415-417.
- [3] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H.J. Gruber, K. Schilcher and H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** (1996) 3477-3481.
- [4] F. Schwesinger, R. Ros, T. Strunz, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, A. Honegger, L. Jermutus, L. Tiefenauer and A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (2000) 9972-9977.
- [5] C. Nakamura, S. Takeda, M. Kageshima, M. Ito, N. Sugimoto, K. Sekizawa and J. Miyake, *Biopolymers*, **76** (2004) 48-54.
- [6] M.A. Lantz, S.P. Jarvis, H. Tokumoto, T. Martynski, T. Kusumi, C. Nakamura and J. Miyake, *Chem. Phys. Lett.*, **315** (1999) 61-68.
- [7] S. Takeda, R. Ptak, C. Nakamura, J. Miyake, M. Kageshima, S.P. Jarvis and H. Tokumoto, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **49** (2001) 1512-1516.
- [8] I. Obataya, C. Nakamura, S. Han, N. Nakamura and J. Miyake, *Nano. Lett.*, **5** (2005) 27-30.
- [9] I. Obataya, C. Nakamura, S. Han, N. Nakamura and J. Miyake, *Biosens. Bioelectron.*, **20** (2005) 1652-1655.
- [10] A.B. Mathur, G.A. Truskey and W.M. Reichert, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, **28** (2000) 197-202.
- [11] C. Rotsch, K. Jacobson and M. Radmacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** (1999) 921-926.
- [12] S. Han, C. Nakamura, I. Obataya, N. Nakamura and J. Miyake, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332** (2005) 633-639.
- [13] T. Mizutani, H. Haga and K. Kawabata, *Cell. Motil. Cytoskel.*, **59** (2004) 242-248.



気になった論文



開発 邦宏(かい はつ くにひろ) 大阪大学産業科学研究所 助手
 kunihiro@sanken.osaka-u.ac.jp

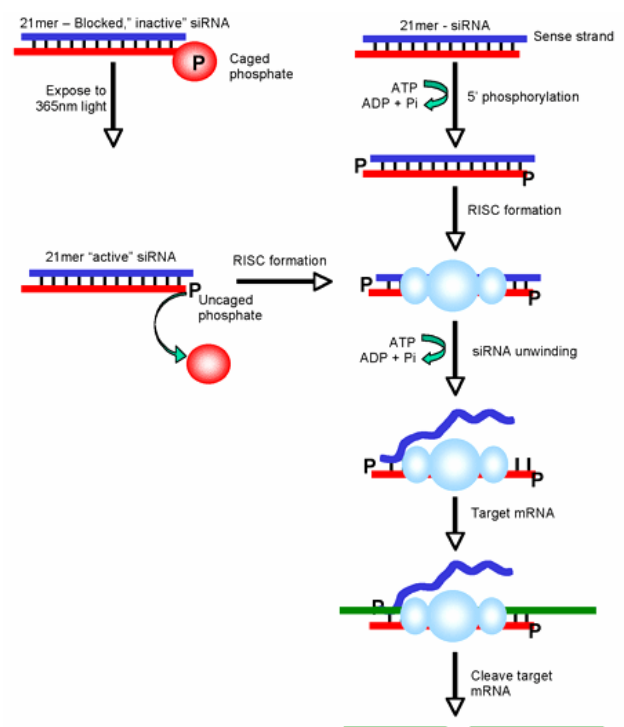
この度は、生命化学研究レターの「論文紹介」への投稿機会を与えてくださいました編集委員の皆様にご感謝いたします。2005年8月から、大阪大学産業科学研究所機能分子科学研究部門にて、加藤修雄先生のご指導のもとで、1) 光応答性アンチセンス分子を用いた細胞内遺伝子発現の制御、2) リパーゼ触媒反応を用いたカテキン類の位置選択的アシル化法の開発および抗インフルエンザウイルス薬の創製、などの研究を行っています。

上記の研究内容1)に関連して、アンチセンス技術は標的とする遺伝子に相補的な核酸を用い、その遺伝子発現を制御する技術です。今日では、優れた核酸認識能や生理条件下での安定性を持つ非天然型アンチセンス分子が開発され、研究室レベルで簡単に細胞内の標的遺伝子発現を抑制することが可能になりました。現在では、アンチセンス分子を標的細胞にデリバリーする技術の開発が活発に行われています。さて、これからアンチセンス技術はどのように進展するのでしょうか？もしかすると、アンチセンス分子の機能をリモートコントローラーで操り、細胞の分化や増殖を自由に制御できるようになるかもしれません。そこで今回は、紫外線により生体システムをリモートコントロールする技術に焦点をあて、a) 細胞内の遺伝子発現を OFF にする、b) DNA の転写活性の ON/OFF を制御する、c) 細胞膜上のイオンチャンネルのイオン透過活性を ON/OFF に制御する、という論文を紹介させていただきます。

Light controllable siRNA regulated gene suppression and phenotypes in cells

Q.N. Nguyen, R.V. Chavli, J.T. Marques, P.G. Conrad II, D. Wang, W. He, B.E. Belisle, A. Zhang, L.M. Pastor, F.R. Witney, M. Morris, F. Heitz, G. Divita, B.R.G. Williams, and G.K. MacMaster, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1758**, 394-403 (2006).

Small interfering RNA (siRNA)とは、標的遺伝子(mRNA)の一部と同じ配列を有する短い二本鎖 RNA からなり、その遺伝子発現を効率的に抑制できる有用なツールとして注目されています。著者らは、siRNA の RNA 鎖の 5'末端リン酸に、紫外線照射にて切断可能な 1-(2-ニトロフェニル)エチル基(NPE)を導入した light controllable siRNA (csiRNA) を開発しました(右図の左上)。この csiRNA は暗条件下では5'末端リン酸基が NPE で保護されており、“RNA-induced silencing complex (RISC)”に認識されないため、RNA 干渉による遺伝子発現の抑制機能を持ちません。しかし、この csiRNA に紫外線(365 nm)を照射すると5'末端のリン酸

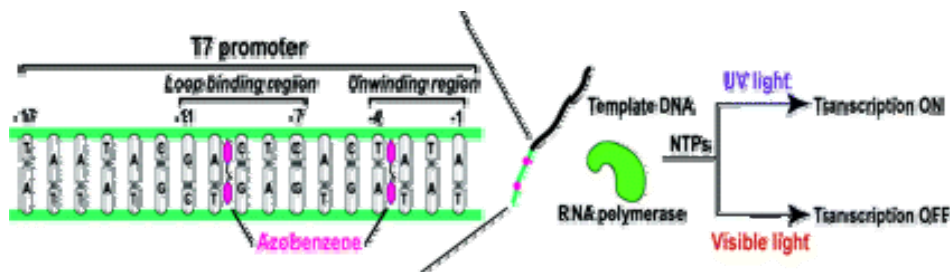


基から NPE が切断され、RISC を介した RNA 干渉が起こり、標的遺伝子の発現が抑制されるようになります。本技術を利用すれば細胞へ照射する紫外線量を調節することにより、望むべきタイミングで標的遺伝子の発現量を制御できるようになります。本技術は遺伝子が細胞サイクルや細胞分化・成熟機構に及ぼす影響を紫外線照射部位においてリアルタイムで制御できる有効な手法になると期待されます。

Azobenzene-tethered T7 promoter for efficient photoregulation of transcription

M. Li, H. Asanuma, and M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**,1009-1015 (2006).

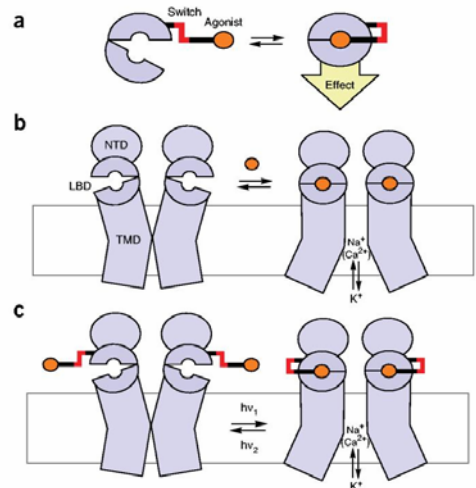
今回、著者らはT7バクテリオファージのRNAポリメラーゼ(T7RNAP)が認識するプロモーター配列の二重鎖DNAにアゾベンゼンを導入し、紫外線を照射することによりT7RNAPの転写反応を制御する手法を報告しました。まず戦略として、下図のT7プロモーターでT7RNAPのループ構造が結合する領域(loop-binding region)、およびT7RNAPが転写開始時に二重鎖を解離する領域(unwinding region)にアゾベンゼンを導入します。これらの位置に導入されたアゾベンゼンは、トランス型の場合、隣接する核酸塩基とスタッキングすることにより二重鎖DNA構造を安定化させ、T7RNAPの転写活性を約10分の1程度に抑制しました。次に、ここに紫外線(UV 365 nm)を照射すると、核酸塩基間でスタッキングしていたアゾベンゼンがシス型に異性化することで、二重鎖DNA構造が不安定化され、T7RNAPの転写活性が紫外線非照射時と比較して最大で約7.6倍までに向上することがわかりました。これら各条件下でのRNAPの転写反応を速度論的に解析した結果、アゾベンゼンがシス異性化するとT7RNAP が loop-binding region により結合しやすくなり、さらにT7RNAP が unwinding region において転写基質であるヌクレオチド(NTP)を効率的に取り込めるようになるという2つの効果が相乗的に働いて転写反応が活性化されることが明らかになりました。このように光技術を利用してDNAの転写レベルを制御する技術は革新的であり今後の応用が期待されます。



Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch

M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R.H. Kramer, E.Y. Isacoff, and D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 47-52 (2006).

イオンチャンネル型グルタミン受容体 (iGluR) は神経細胞の膜上でグルタミン酸を受容し、Ca²⁺, Na⁺, K⁺などの細胞透過を制御することで記憶獲得や学習といった高次脳機能に関与しています。このiGluRはN末端ドメイン(NTD)、リガンド結合ドメイン(LBD)、膜貫通部位(TMD)の3つのサブユニットからなる四量体タンパクで中心に穴を形成しています。このLBDにグルタミン酸が結合すると短時間だけ穴が開いてカチオンを透過します(右図b)。今回、著者らはヒト胎児腎細胞 (HEK293) の膜上にiGluR-L439Cを発現させ、そのグルタミン酸結合部位近傍のシス



テインにアゾベンゼン-グルタミン酸会合体 (MAG) を結合させました (右図c)。そしてこれに紫外線 (380 nm) を照射すると MAG の末端グルタミン酸が LBD に結合して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、可視光線 (500 nm) を照射すると MAG の末端グルタミン酸が LBD から解離して細胞内 Ca^{2+} 濃度が減少することを見出しました (右図c)。この iGluR-MAG 会合体のカチオン輸送効率は iGluR にグルタミン酸溶液を添加した時の約 50% であり、またそのアロステリック効果は約 100 ms で可逆的に制御できることがわかりました。このように光で膜タンパクの機能を制御する手法は、他の細胞膜レセプターなどの機能調節にも応用可能であると期待されます。



北村裕介 (きたむら ゆうすけ)

熊本大学大学院自然科学研究科 博士研究員

y_kitamura@chem.kumamoto-u.ac.jp

私は熊本大学大学院自然科学研究科の井原敏博助教授の下で研究を行っている北村裕介 (本年度より同大博士研究員) と申します。この度は、このレターへの寄稿の機会を頂き大変光栄に思っております。ヒトゲノム解読をきっかけに、ゲノム科学は構造解析から機能解析に、または種から個に、現在その研究対象を移してきております。私達の研究グループにおいても、新規機能性核酸の創出、並びに簡便でハイスループットな核酸検出法の確立に向けて研究を行っておりますが、私達は生体中に見られる様々な「協同的な相互作用」に着目し、共通のコンセプトとしてこれを分子設計に取り入れています。ここでは、核酸が有する機能や協同性をキーワードに気になった論文を簡単にいくつか紹介させていただきます。

Aptamer to ribozyme: The intrinsic catalytic potential to small RNA

D. M. Brackett and T. Dieckmann, *ChemBioChem*, **7**, 839-843 (2006).

カチオン性のリガンドであるマラカイトグリーン (MG) は、RNA アプタマーが提供するマイナス荷電環境中に最適な構造で結合し (induced-fit)、複合体を形成しております。図 1 に示すように MG の芳香環 C への置換基の導入は、アプタマーへの結合に立体的反発を生じないと考えられています。そこで本論文では、芳香環 C へアセチル基を導入し、その加水分解を追跡しております。結果、バルク水溶液中における酸加水分解速度と比較すると、アプタマーに結合した MG のアセチル基の酸加水分解反応は pH 5.0 で 1000 倍促進され、逆に pH 7.8 では 800 分の 1 の速度に抑制される事が判りました。つまり、同加水分解反応の遷移状態は、アプタマーが提供するマイナス荷電環境によって安定化されている (よって逆に塩基による加水分解は抑制される) と考えられます。アプタマー自身が、ある反応を触媒する (反応場を提供する) といった点で興味深い論文であると思います。

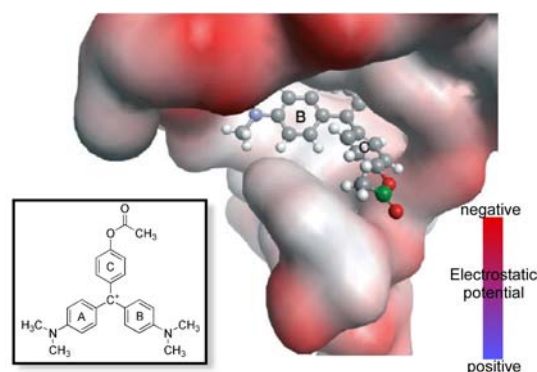


図 1 マラカイトグリーン誘導体のアプタマーへの結合様式図と結合部位近傍の静電ポテンシャル

Binary malachite green aptamer for fluorescent detection of nucleic acids

D. M. Kolpashchikov, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12442-12443 (2005).

マラカイトグリーン(MG)はその RNA アプタマーと結合することによって発光強度が 2000 倍程度増大する事が判っております(J. R. Babendure et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14716-14717 (2003))。図 2 に示しますように、この論文では同アプタマー(MGA)はダウンサイジングされた後、さらに二つに切り離され、それぞれを別々のオリゴ RNA に連結されております(biMGA プローブ)。分離されたアプタマー断片は、オリゴ RNA 部位が標的 DNA へ協同的に結合すれば互いに近接するように設計されています。つまり、標的 DNA はいわゆるアプタマー構造を再構築するための鋳型として働くわけです。実際に biMGA プローブと MG の混合溶液に標的 DNA を添加しますと、MG の発光強度は 20 倍程度増加しております。我々は、モレキュラービーコンなどの FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)に基づくプローブを用いることによって、均一溶媒系での遺伝子解析系をある程度簡単に設計できます。しかし、ヘアピンループ型 DNA の両末端、もしくは複数のオリゴ DNA を異なる蛍光色素で標識しなくてはなりません。これに対し同論文の手法では、標的の相補鎖(任意の配列)にアプタマー断片を付け加えた二種類の RNA を用意するだけでよいわけです。加えて、協同性を利用し、塩基選択性の高い検出系が設計されていると思います。標的 DNA の赤色で示す部位にミスマッチ塩基対を導入すると、その種類に依存することなく、ほぼバックグラウンドと近い発光強度が得られております(完全相補鎖を添加した際の 20 分の 1 以下)。

手元にある蛍光色素を使って、プローブ間に働く相互作用を巧妙に利用した点で面白い論文であると思います。

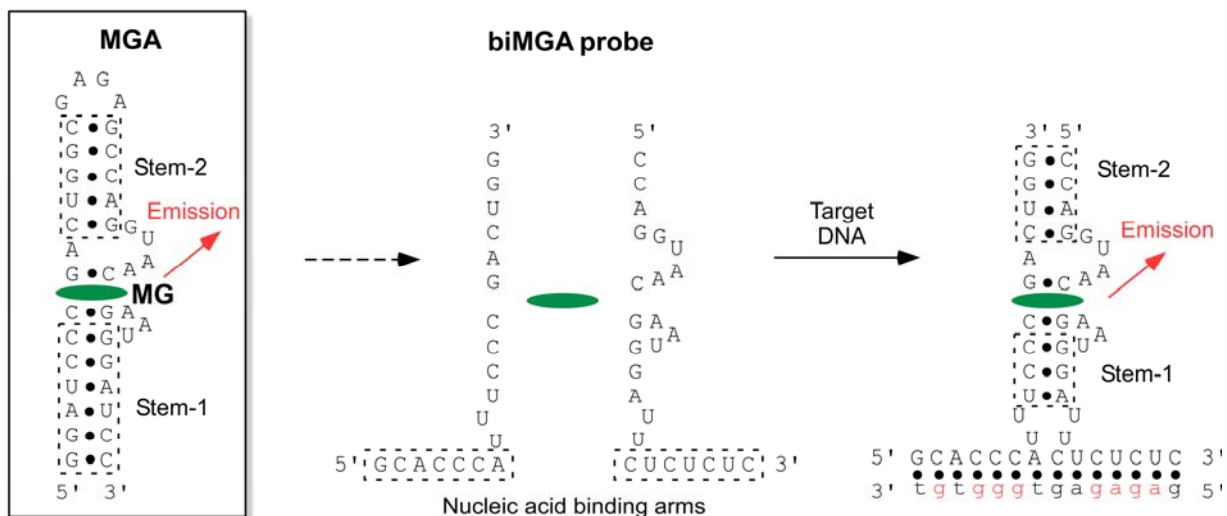


図2 マラカイトグリーンアプタマー (MGA) とその構造を基に設計されたアプタマープローブ (biMGA probe)

Self-catalyzed site-specific depurination of guanine residues within gene sequences

O. Amosova, R. Coulter, and J. R. Fresco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4392-4397 (2006).

鎌状赤血球貧血はβ-グロビン遺伝子の変異に起因する事が判っております。そのホットスポット(野生型:A、変異型:T)周辺は図3に示すように5'-G-T-G-G-3'をループ部位とするヘアピンループ構造をしております。この論文では、同遺伝子に点変異が起こると、一つ上流に位置するG(ループ部位5'末端)において脱プリン反応が促進されるという興味深い結果を報告しております

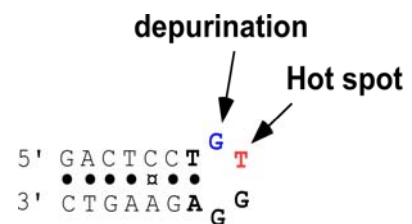


図3 β-グロビン遺伝子のホットスポット周辺の構造

す。一般的なデオキシリボザイムと異なり、反応機構に二価のカチオンなどの補因子を必要としない点で、珍しい現象でもあります。詳細が調べられた結果、ループ部位が 5'-T・A-3'塩基対の上にスタックする構造も必要である事が判りました。しかし、後は安定なステム構造が必要であるだけで、非常にシンプルな構造で脱プリン反応が制御されていると思われまます。生体中で、脱プリン反応は突発的に起こっており、その速度は $k_{\text{obs}} = 2 \times 10^{-9} \text{ min}^{-1}$ 程度であると考えられています。そこで同論文では、クラウディング条件下 (37°C in 0.1 M NaCl / 5 mM MgCl₂ / 20 mM Tris-HCl, pH 6.9 / 20% PEG 1000) で、同ヘアピン構造が自己触媒的に引き起こす脱プリン反応の速度について検討がなされております。結果、生体中の速度より約 3×10^3 倍も速い速度 (一次速度定数 $k_{\text{obs}} = 7 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$) で反応が起こっている事が判りました。

加えて本論文では、ヒトゲノム中の 50000 箇所以上で同様な構造 (5'-G-T-G-G-3'ループ構造と隣の 5'-T・A-3'塩基対) が形成されている可能性があると報告しております。一塩基変異は転写中に水素結合していないステムループ構造中にこそ頻繁に起こっているとも言われておりますため、脱プリン反応は遺伝子の破壊や修復を制御しているのかもしれない。また、DNA 二重らせん構造に局所的な柔軟性を提供できると考えられているため、DNA のパッキングにも関与しているのかもしれない。



嶋田直彦 (しまだ なおひこ)

北九州市立大学国際環境工学部・SORST 博士研究員

shimada@env.kitakyu-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への投稿機会を与えて頂き感謝しております。現在、私は北九州市立大学国際環境工学部 櫻井和朗教授の下、博士研究員として多糖を使った遺伝子デリバリーの研究を行っております。

Translocation of molecules into cells by pH-dependent insertion of transmembrane helix

Y. K. Reshetnyak, O. A. Andreev, U. Lehnert, and D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6460-6465 (2006).

一報目は、pH依存的に構造が変化し、細胞膜に突き刺さるペプチドを使って、薬剤を細胞内に送りこむシステムを報告した論文です。GALAペプチド (グルタミン酸-アラニン-ロイシン-アラニン配列の繰り返し構造をもつ pH応答性ペプチド) 等エンドソーム内の pH 変化に応答して構造変化を引き起こし、エンドソーム膜等を破壊するシステムは多くあります。しかし、この bacteriorhodopsin 由来の 38 量体のペプチド (pH (low) insertion peptide: pHILIP) は pH 7.0 以下の比較的高い pH で α -helix へ構造転移することにより、C 末端側を細胞質内に向け細胞膜に突き刺さります。そ

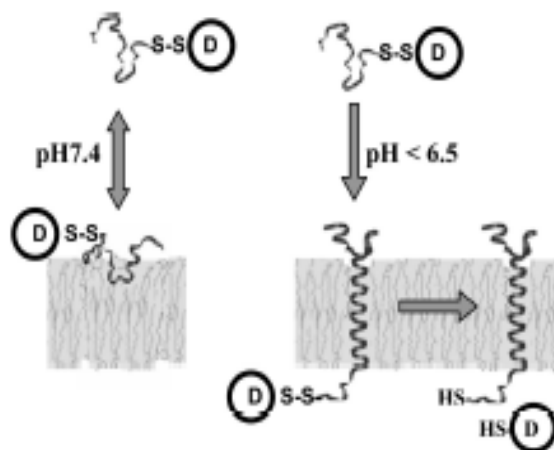


図1 pH 応答性ペプチドを使った細胞内へのドラッグデリバリー概念図 (論文より抜粋)

の際、C末端側にジスルフィド結合で繋がった分子が還元され、細胞質内に直接、分子をデリバリーするシステムです(図1)。筆者らはpHLIP-S-S-dansylを用い、メディアムのpHを7.4, 7.0, 6.5, 5.5へと変化させた時のdansylの取り込みを蛍光顕微鏡で評価しています。pH 5.5での取り込み量を100%とした時、pH 6.5, 7.0, 7.4でそれぞれ78%, 48%, 18%となっていました。このように生理的条件下よりpHが「1」小さくなると、取り込み量が約4倍変化するという面白い現象が起きています。細胞への取り込みは15分程度であり、すばやく分子を送達できるとしています。また、筆者らは環状ペプチドであるphalloidine (Ph)を結合したpHLIP-S-S-Ph-TRITCを使って、いくつかの細胞種で細胞内のアクチン分子を染色しています。37°Cと4°Cにおける細胞への取り込みをFACSで評価した時、温度によって取り込み分布に変化がないことから、エンドサイトーシスでの取り込みでないことも証明しています。さらに、ペプチド核酸であるPNAを結合したpHLP-S-S-PNAはpH 6.5で細胞内に取り込まれていました。しかし、残念なことにリン酸ジエステル結合を有するオリゴDNA (ODN)は導入されませんでした。ODNのように、電荷を帯びている分子は細胞膜を透過するのに無理があるからだとしています。

このように、細胞外のpHの変化に応じて、素早くかつ効果的に分子を細胞内にデリバリーできることから、酸性側に傾いた組織(腫瘍、梗塞、動脈硬化病変等)の診断や治療に使えるのではないかとまとめています。私個人的には、ODNのような電荷を持つ分子の送達が達成される事を期待しています。

Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon- α induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells

M. Kerkmann, L. T. Costa, C. Richter, S. Rothenfusser, J. Battiany, V. Hornung, J. Johnson, S. Englert, T. Ketterer, W. Heckl, S. Thalhammer, S. Endres, and G. Hartmann, *J. Biol. Chem.*, **280**, 8086–8093 (2005).

皆様は花粉症に悩まされていませんか？二報目は花粉症等のアレルギーが治るかもしれない、免疫刺激性DNAである「CpG DNA」についての論文です。CpG DNAとは5'-...CG...-3'という配列をもつDNAのことです。メチル化されていない「CG」配列を含む微生物の遺伝子が体内に侵入した時、そのDNA自体を微生物の侵入と捉え、排除しようと数々のサイトカイン(IL-12, INF- γ 等)を産出し、細胞性免疫(Th1型)を誘導することが知られています。Th1型への誘導は、アレルギーの原因であるIgE産出に関わるTh2型を抑制することができます。この現象は一本鎖オリゴDNAでも引き起こされる事がわかっています。さらに近年の研究から、CpG DNAは産出するサイトカインの種類に応じて主に二種類のグループ(CpG-A(別名D-type)、CpG-B(別名K-type))に区別されるようになってきました。CpG-Aは5'-AACGTT-3'のようにパルンドローム配列と末端にpoly(dG)(少なくとも4量体)を有しており、大量のインターフェロン α (IFN- α)を産出します。一方、CpG-Bは配列中に5'-TCGT-3'あるいは5'-TCGA-3'を含んでおり、主にIL-12を産出しますが、INF- α は少量しか産出しません。

前置きが長くなりましたが、この論文ではCpG-Aに含まれるパルンドロームとpoly(dG)配列がIFN- α の産出に大きく関わっているということ、構造的な観点から調べた論文です。Poly(dG)は抗原提示細胞表面のスカベンジャーレセプター経路で取り込まれることが知られています。CpG-A(GGG GGA CGA TCG TCG GGG GG)を形質細胞様樹状細胞に添加すると、期待通りINF- α が産出されました。しかし、CpG配列は有するがパルンドローム配列ではないCpG-A mis(GGG GGT CGA ACG TCG GGG GG)を加えてもCpG-Aの半分程度のINF- α がしか産出されず、さらにパルンドローム配列を有するがpolyG部位に二つ7-deazaguanosine(Gカルテット構造形成を阻害する)を導入したCpG-A deazaでは、まったくINF- α が産出されませんでした。Poly(dG)配列はGカルテット構造を形成することが良く知られています。よって、IFN- α の

産出にはGカルテットの構造を取ることが重要であると考えました。そこで筆者らはCpG-Aを変性PAGEで分析したところ、8M尿素存在下にもかかわらず一本鎖のバンド以外に2、3、4、8量体のバンドがはっきりと確認されました。またその強度は2量体よりも、4、8量体のバンドが強く、duplexよりも安定な構造があるに違いないと考えました(図2に予想モデルを示す)。AFMでも50 nm程度のパーティクルが確認されていました。このことよりCpG配列がある程度凝集した構造を取っていればIFN- α を産出できるのではないかと考え、本来ならばIFN- α を産出しないはずのCpG-Bをポリスチレンナノパーティクル(180 nm)に結合させると、驚くべきことにCpG-Aよりも高いIFN- α 産出が確認されていました。

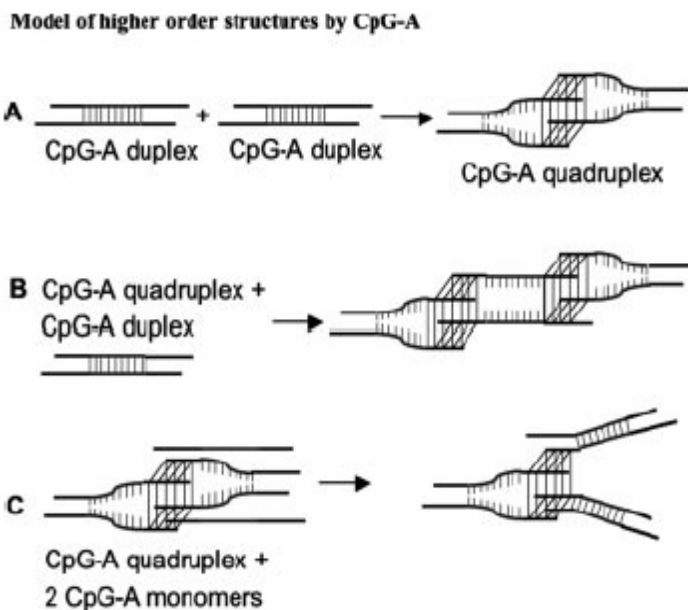


図2 CpG-A が取り得る予想高次構造モデル(論文より抜粋)

CpGDNAの高次構造的な観点からサイトカインの産出を調べた論文であり、CpG-Bでも大量のINF- α を産出できることがわかった大変興味深い論文でした。



生命化学研究法

ラットモノクローナル抗体作製法

～ラット腸骨リンパ節を用いた迅速かつ高効率な抗体作製法～

大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻 立花太郎

tarou@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

1) **モノクローナル抗体とは?**：抗体産生細胞であるBリンパ球とガン細胞(ミエローマ)を融合させると、無限に増殖する融合細胞(ハイブリドーマ)が得られる。ハイブリドーマはただ1種類の抗体を産生し、培養液中に分泌する。この抗体をモノクローナル抗体と呼ぶ。モノクローナル抗体の特徴は、特定の抗原分子の特定の箇所に非常に高いアフィニティーで結合することである。抗体分子はタンパク質であるが、糖や低分子化合物などタンパク質以外のものでも抗原として認識出来る。この特性を利用して、生体分子の機能解析だけでなく、有機合成をはじめとした様々な基礎研究に応用されている。また、病気の診断や治療などの医療分野をはじめ、BSE 検査や環境ホルモン検出など生活に密接した多くの分野で利用されており、モノクローナル抗体は今や私達の暮らしに欠かすことの出来ないツールとなっている。

2) **ラット腸骨リンパ節法**：重井医学研究所の佐渡らは今から10年ほど前、自らの研究の過程でラット腸骨リンパ節由来のリンパ球がモノクローナル抗体作製に非常に適していることを見だし、ラット腸骨リンパ節法と名付けた¹⁾。この方法では、抗原の免疫回数が1回でよく、免疫後最短2週間でリンパ球とミエローマ細胞の融合が可能である。つまり免疫してから1ヶ月でモノクローナル抗体を樹立出来る。(一般的な作製方法では2～3週間の間隔で数回の免疫が必要である。)しかも特筆すべき点は、陽性クローンの出現率が非常に高く、高い効率で高品質の抗体を作製出来ることである。我々の研究室でもこの方法を用いて多くのラットモノクローナル抗体の作製に成功している^{2,3)}。ラット抗体の利点の1つは、市販されている抗体のほとんどがマウスやラビット由来であるため、免疫染色の際に多重染色が容易なことである。また、マウス組織の免疫染色をマウス抗体で行う場合、その高いバックグラウンドに悩まされることが多いが、ラット抗体だとその問題も回避出来る。マウス脾臓を用いる通常の方法に比べ、すべての点においてラットリンパ節法の方が優れていると思われる。しかしこの方法はあまり知られておらず、利用している者のひとりとして本稿で紹介させて頂くこととした。なお、100ページを超えるラット腸骨リンパ節法の詳しいプロトコールが重井医学研究所から出ているので、この方法を用いてはじめてモノクローナル抗体を作製される方は入手されることをお勧めする。詳しくは重井医学研究所ホームページ(<http://www.shigei.or.jp/smri/smri1/1top.htm>)を参照して頂きたい。

3) **ラット腸骨リンパ節法を用いたモノクローナル抗体の作製法**：ラット腸骨リンパ節法は免疫期間と腸骨リンパ節を用いること以外は一般的なモノクローナル作製法とほとんど変わらない。その一連の流れを図1に示し、それぞれの操作を以下に概説する。

3-1) ラットへの抗原分子の免疫

抗原はあまり小さなものと免疫応答を惹起しないので適なさい。低分子化合物やペプチドであれば

ラットモノクローナル抗体作製法(ラット腸骨リンパ節法)

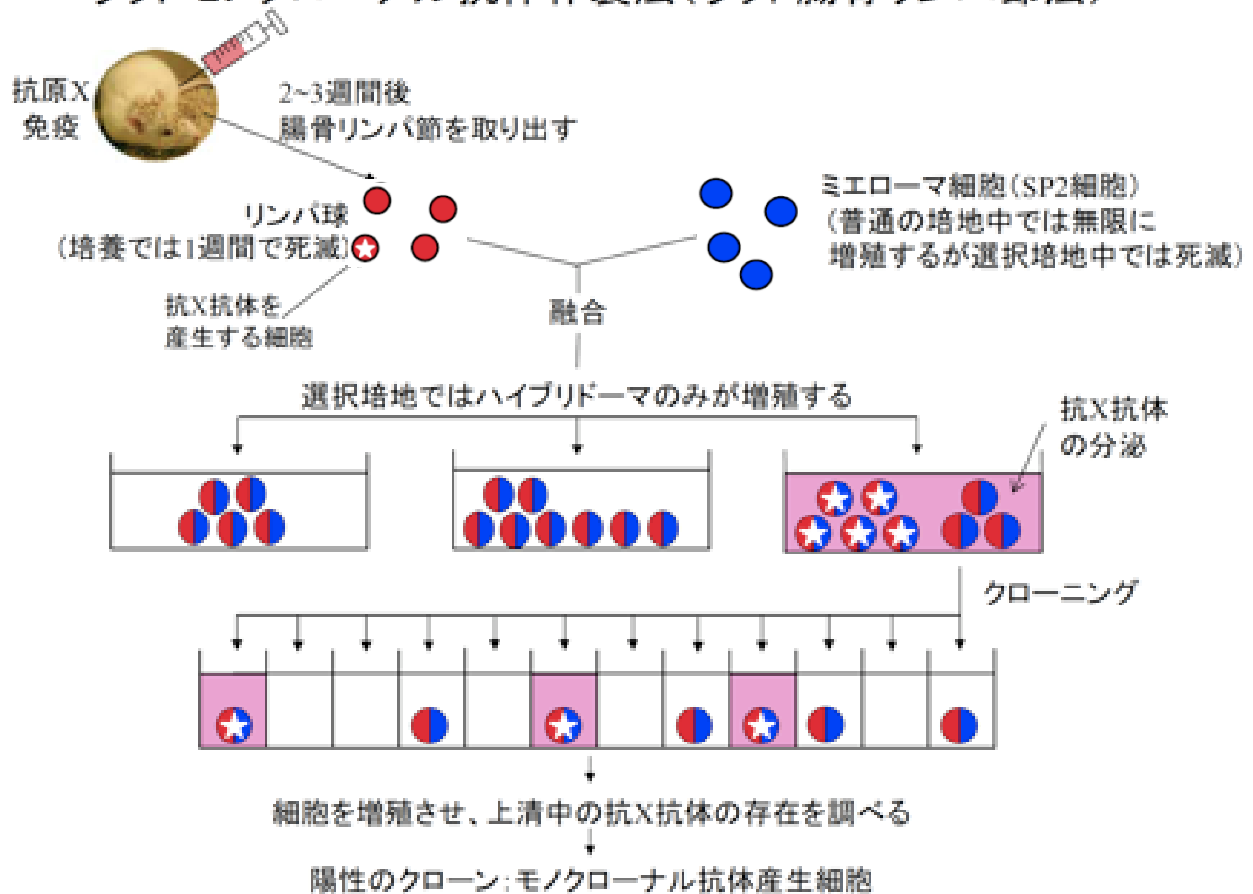


図1 ラット腸骨リンパ節を用いたモノクローナル抗体作製法(一連の流れ)

BSA(Bovine Serum Albumin)や KLH (Keyhole limpet hemocyanin)などのキャリアタンパク質に結合させて免疫する必要がある。抗原溶液はタンパク質濃度で 1 mg/ml のものが 0.1 ml もあれば十分である。抗原をコンプリートアジュバントと混合してエマルジョンを作製し、後肢足底(肉球がある足裏の部分)に皮内注射する。本法は基本的にどの系統のラットでも用いることが出来るが、我々は佐渡らの方法に従い、WKY (Wistar-Kyoto) ラットを用いている。

3-2) ミエローマの準備

我々はマウス SP2 細胞を用いている。融合細胞はマウスとラットの雑種細胞となるが、増殖能および抗体産生能には全く問題がない。融合には活発に増殖しているミエローマを用いることが重要であり、融合直前までミエローマの培養には十分気を配る必要がある。

3-3) 腸骨リンパ節の取り出し

免疫後、1 週間も経過すると腸骨リンパ節がかなり肥大化してくる。融合には 2~3 週間後の腸骨リンパ節が適している。初心者には腸骨リンパ節を見つけることは難しいので初回だけは経験者に見てもらわなければならない。



図2 シャーレ上の腸骨リンパ節

(内蔵の写真を不快に思われる方もおられると思うので、リンパ節取り出しの写真は省かせて頂いた。重井研究所のプロトコールにはわかりやすい写真が掲載されている。)取り出した腸骨リンパ節のまわりに脂肪組織が付着していると融合効率が低下するので丁寧に取り除く(図 2)。次に滅菌済みの金網(ステンレススチールメッシュ)の上で腸骨リンパ節をすり潰しリンパ球を取り出す(図 3)。一対の腸骨リンパ節から約 1×10^8 個のリンパ球が得られる。腸骨リンパ節には赤血球がほとんど含まれていないので脾臓法のようにそれを取り除く作業は必要ない。融合前にリンパ球を血清の含まない培養液でよく洗っておく。



図 3 腸骨リンパ節からリンパ球を取り出す

3-4) 細胞融合

ミエローマとリンパ球を 1:5~10 の比で混ぜて試験管内で融合する。融合には 50%PEG 溶液を用いる。自分で調製することも可能だが、Roche 社からすぐ可以使用できる溶液状態のものが市販されている。37 度に保ちながら PEG 処理を行うと融合効率が上がる(図4)。融合後、96 ウェルプレート 8~10 枚で細胞を培養する。HAT 含有培養液を用いることで融合しなかったミエローマは死滅し、融合細胞のみが増殖する。(HAT 選択の原理は多くの生化学系教科書に記載されている。)この際、ハイブリドーマ培養添加剤 BM-Condimed H1 (Roche 社)を 5~10%加えると、ハイブリドーマの出現率が大幅に上昇する。



図 4 細胞融合(PEG 処理)

3-5) 融合細胞(ハイブリドーマ)

融合後数日で図 5 に示すようなハイブリドーマのコロニーが観察出来るようになる。1 ウェルあたりこのようなコロニーが平均 5 個以上形成していれば融合成功である。

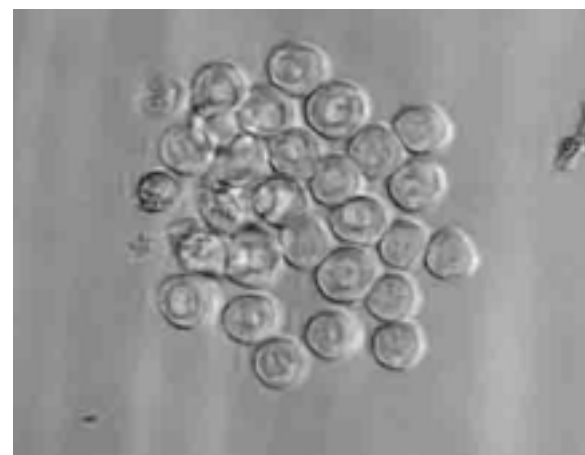


図 5 ハイブリドーマのコロニー

3-6) 抗体のスクリーニング(ELISA)

どのウェルに目的の抗体を産生するハイブリドーマが存在しているか調べるため、融合して 7~10 日後に培養上清を用いてスクリーニングを行う。スクリーニングには ELISA 法を用いるのが一般的であるが、ウエスタンブロッティングや免疫染色で行っても構わない。抗原性が極端に低い場合を除き、ELISA で 20 以上の陽性クローンが得られる。我々の経験ではそのほとんどがウエスタンブロッティングに利用出来る。その後は自分の実験の目的に応じて陽性クローンを絞り込んでいく。

3-7) 融合細胞のクローニング

ひとつのウエルには複数のハイブリドーマが存在するので、モノクローナル抗体を得るためにはハイブリドーマのクローニングを行う必要がある。96 ウエルプレートの1 ウエルあたり1 細胞となるようにハイブリドーマをまき、1 週間程度培養した後、ELISA 法などでアッセイする。ここで陽性クローンが得られれば、モノクローナル抗体作製に成功したことになる。出来れば再度同様の操作を行い、樹立したクローンが1 つの細胞に由来する(つまりモノクローンである)ことを確認する。ハイブリドーマが樹立出来れば、出来るだけ早く抗体のサブクラスを決定する。最近ではマウス抗体用だけでなくラット用の抗体サブクラス決定キットが各社から販売されている。免疫期間が短いにも関わらず、腸骨リンパ節法で得られる抗体のサブクラスのほとんどはIgG である。我々の経験では免疫後1週間で融合すると、抗体の多くがIgM であった。

3-8) モノクローナル抗体の使用

モノクローナル抗体の最大の利点は、ハイブリドーマを樹立すれば無尽蔵に抗体が得られることである。培養液を交換せず、ハイブリドーマがほぼ死滅するまで培養を続けると培養液中の抗体濃度は約 0.1 mg/ml にまで達する。ELISA、ウエスタンブロッティング、免疫沈降、免疫染色などの実験にはハイブリドーマの培養液をそのままあるいは希釈して用いることが出来る。最近では各社からハイブリドーマ用の無血清培地が販売されている。それらを利用すれば、ゲル濾過などで培養液のバッファー交換をするだけで、目的の実験に応じた純度の高い抗体溶液を得ることが出来る。我々はそれをさらに濃縮して細胞へのマイクロインジェクション実験などに用いている。

おわりに：モノクローナル抗体の作製は、動物飼育スペースと動物細胞培養のための設備があれば十分行える。これからモノクローナル抗体の作製を始める方、あるいは従来法では不満を持っておられる方は本法を試されることを是非お勧めする。余談になるが、我々の研究室では新しく入ってきた学生さんにはまずモノクローナル抗体作製に取り組んでもらっている。抗体作製を行えば、動物(ラットやマウス)の扱い、細胞の培養方法、細胞融合などの細胞工学的手法、ELISA、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング、免疫染色、抗体(タンパク質)の精製など多くの実験手法を身につけることが出来る。しかも本法は短期勝負なので、失敗してもすぐに再度挑戦出来る利点がある。

最近、佐渡らはマウス腸骨リンパ節法の開発にも成功した。ラットを用いた方法とは免疫箇所が異なる。詳しくは論文⁴⁾を参照されたい。

参考文献

- 1) Kishiro, Y., et al., *Cell Struct. Funct.* **20**, 151-156 (1994).
- 2) Sakaguchi, N., et al., *Hybridoma Hybridomics*, **22**, 397-400 (2003).
- 3) Fukuhara, T., et al., *Hybridoma*, **25**, 51-59 (2006).
- 4) Sado, Y., et al., *Acta Histochem. Cytochem.*, in press.



コロンビア大学中西研究室留学体験記

大阪大学大学院理学研究科 天然物有機化学研究室
田中 克典

<はじめに>

私は、2002年4月から2005年3月の間、コロンビア大学・中西香爾教授、Nina Berova教授のもとで博士研究員として研究させていただく機会をいただきました。私はそれまでに、関西学院大学大学院理学研究科・勝村成雄教授のもとで天然物の合成研究と新しい反応開発に関する研究を中心に博士号を取得し、この際に、タンパク質を簡単に修飾してしまうという興味深い有機合成反応に遭遇いたしました。これを機に、化学生物学の分野に大変興味を持つようになりましたので、この分野のパイオニアの1人であり、現在でも世界のトップとしてご活躍されている中西香爾先生のもとで、一から勉強させていただくつもりで留学を決心したのです。しかし、なぜかしらCD (Circular Dichroism) を用い



中西香爾教授と筆者

たキラル化合物の絶対立体配置を3年間みっちり研究することとなりました。思いもよらず、このテーマをいただいたことが、間違いなく一研究者としての自分、および一個人としての今の自分を築き上げる基礎となり、終始ご指導いただいた中西先生およびBerova先生に心より感謝しておりますが、今回、このテーマの選択にまつわる様々な出来事、中西研究室およびニューヨークで私が経験した様々な失敗と苦悩、そしてそれらを含めて、今では何にも代え難い貴重な経験の一つ一つを順に思い巡らせながら執筆させていただきたく思います。前述いたしましたように、私の中西研究室での研究テーマはいわゆる生命化学とはあまり関係ありませんが、最近有機合成化学協会誌¹⁾に総説としてまとめさせていただく機会をいただきました。そこで本稿では、私が最も大切だと感じた、海外で“戦いながら”研究する経験について筆を執らせていただきたく思っております。この体験記をご覧頂くことでお分かりいただけるかと思いますが、先の有機合成化学協会誌における私共の総説は、その研究結果のご報告以上に、私がニューヨークであがき、転機を迎えることのできた証明であり、また私の宝物なのです。

<1年目・中西研究室でのテーマ決め>

中西研究室では、中西先生の他、スタッフにNina Berova先生がおられます。中西先生はVisionの化学およびイチョウより単離されるGinkgolide天然物の生物有機化学に関する研究の指揮を取られているのに対して、Berova先生は主にCDを武器としたキラリティー解析に関する研究を指導されています。私が中西研究室に到着した2002年4月に、中西先生からBerova先生の指導のもと、CD、および丁度その時期に同研究室で開発された蛍光観察によるCDの研究を行うよう指示さ



ニューヨークマンハッタンにあるコロンビア大学化学科
(手前入り口でジュリアロバーツとすれ違った)

れました。私は当時、CDおよび蛍光に関する知識は全くと言ってよいほど持っておりませんでした。さらに spectroscopy の分野では計算化学を用いてスペクトルを解析する、すなわち物理化学的および理論化学の知識が必要です。すなわち、私が一番苦手とするテーマを与えられたわけです。渡航した瞬間から悩みましたが、その時は中西先生の指示に意見する勇気など持っておりませんし、見るもの全てが新しく、皆が憧れるニューヨークで生活できることに幸せを感じておりましたので、勉強していく決心をいたしました。しかし、英語で全く無知の分野の研究を行うのはご想像通り大変で、いくら教科書を見て勉強しても覚えても、何もかも左から右へ抜けていくばかり。私は大学の時代からかなり気合いを入れて英会話には力を入れており、実は自信はあったのですが、分光計の講演を聴いてもロシア語を聞いているみたく、一言も分からない日々が長く続きました。さらに仕事の進め方にしても、知らない分野を知らない専門用語を使って議論するわけですから、先生にも何も信用してもらえず、今から思うとつらい日々が続きました。心にあるのは、“有機合成ならできるのに”。このように1年目は何かしら違和感を持ちながらも、とりあえず“中西研究室から一報論文を出す”ことだけを夢見て分光学的手法と理論化学などの勉強に集中いたしました。

< 語学について ・ 多国籍軍におけるディスカッション >

私の中西研究室における3年間の滞在期間には、アメリカ人、日本人、韓国人、チェコ人、スロバキア人、中国人、イタリア人、フランス人、ブルガリア人、ブラジル人、ロシア人、インド人、パキスタン人、クロアチア人、スウェーデン人のポスドク、学生が多数在籍しており、言葉は適当ではないかも知れませんがまさに多国籍軍でした。日本では夜は暗いのが“常識”ですが、中東の地域では明るい夜も存在するようです。仕事、または研究室の役割分担の決定においてディスカッションする際に、通常の日本人の感覚での“筋の通った”、“常識”で話がまとまるわけがありません。それよりも、これだけ多くの人種が集まれば、何が正しい国際語としての“英語”なのかも分からない状況です。このような状況の中、ディスカッションで意見が通るのは、私達日本人の感覚で一見わがままと思えるくらいいけんか腰で“強く”物事を言うことなのです。



研究室のメンバー(後列右から5人目が Berova 教授)

特筆すべきは、例外無くやかましく、ディスカッションの能力が際立って高いのはイタリア人です。先にも述べましたが、私は英会話には多少自信を持っていましたが、会話するのに会話能力など必要ないことを改めて学びました。たとえ英語が話せなくても彼らには全く関係なく、放っておけばゆっくりとしたスピードで一日中しゃべっています。若者が出向くアメリカのバーは耳鳴りがする程ハードロック音楽がやかましく、思い切って声を張り上げて話さないと会話になりません。私達が小さい声で英語を話すと、ある程度発音をごまかせて話せますが、大きい声で英語を話すと、一語一語、かっこ良くななくても良いですが、正確に発音して話さないと相手に伝わらないことを学びました。こうなってくると、もう恥ずかしさなど何もありません。このように、多くの人々と朝まで飲みながら“真”の英語を身につけていけたような気がします。アパートの横にみんながよく行くバーがあったのですが、水曜日は“カラオケナイト”の日であり、ここでハードロックをめちゃくちゃな英語で歌うことが私の何よりの楽しみでした。

“化学ができれば英語は関係ない”という言葉は良く耳にしますが、決してそうではなく、国際語の英語で

一人の国際人としてきっちりと自分の意志を伝え、自己表現し、そして相手を愛しながら愛情を持ってけんかできることの大切さ、そしてその上に化学者としての自分がいることの大切さに気づいた瞬間でした。英語を自由自在に操るのは何よりも大事なことです。中西先生の言葉をお借りするならば、“人に使われる国際的な研究者になるのではなく、国際人としての自己を確立しなさい。Yesと言う言葉を軽々しく使ってはいけない！”。留学初期に強い剣幕で叱咤激励を受けたことが今の自分の核となっています。最近では英語を学ぶことが世間でも一般的となっていますが、奇麗な英語を話す能力に加え、英語で緊張せずに自己アピールする能力もそれ以上に非常に重要だと考えます。英会話教室でアメリカ人、イタリア人が議論しているところに、強制的に一人で放り込まれるクラスがあっても良いのではないのでしょうか？なんて自分は意見を持っていないのか、物事とまじめに向き合っていないのかを身を以て考えさせられる瞬間です。

<2年目に入って・転機とニューヨーク諸事情>

2年目に入って、やっと Berova 先生と1つのアイデアに辿り着きました。私の得意とする有機合成と CD 法とを融合させるというものであり、これによりこれまで難しかった二重結合を持つ有機化合物の絶対立体配置が簡単に決定できるというものです。このアイデアに従って、早速色々な例について検討し、新しい方法論を確立しました。こうなると私の頭の中では、“chemist”特有の研究の進め方に従って、様々に研究が展開され、やっと春が来たような気がしておりました。

まず、これまでに得られた方法論を *J. Am. Chem. Soc.* に投稿しようとしたときに、しかしここで問題が起きました。Berova 先生が、これらの結果は上記ジャーナルに報告するに値しないと判断されたのです。Berova 先生はキラリティー分野における権威であり、私の合成反応を中心にした CD 法を高いレベルのジャーナルへ報告することにご心配されたのも無理はありません。これから2ヶ月もの間、中西先生、Berova 先生、私の3人でいったいどのジャーナルに投稿するのかについて議論しました。ただ、悪い見本の日本人であったそのときの私は、片や中西香爾先生、片や Nina Berova 先生にまともに意見することができず、結局自分を苦しめていたのです。“反対意見して自分の意思を貫くのか？それとも論文投稿をあきらめるのか？では何のためにがんばってコロンビア大学に来たのか？これまでの勉強は無駄だったのか？”むろんこの間、実験に気が入るわけはありません。この2ヶ月間、半ばやけっぱちになり、ニューヨークを食事に遊びに楽しみました。ここで少し、ニューヨークの諸事情についてご紹介いたします。

やはり世界の中心都市であるニューヨークは、エキサイティングな街であることは言うまでもありません。ヤンキースタジアムで松井とイチローの初対決は私がやけっぱちになっている丁度その時期に行われ、同じ1973年生まれで海外で活躍しているイチローが羨ましくも憎らしくも見えました。

土曜の夜には街でジャズが楽しめます。いかさまではなく真正正銘のプレイヤーをアルコール片手に目の前で堪能しました。私は大学時代、プロギタリストとして生計を立てることを真剣に考えておりましたが、日本では滅多に接することのできないロックプレイヤーと兄弟のように親密になることができたのも NY ならではの特典でした。マニアックな話になりますが、スティーヴ・ヴァイ(ギタープレイヤー)、イングヴェイ・マルムスティーン(ギター)、ビリー・シーン(ベース)の演奏を目前で観たときには気を失いそうになりました。一方、カーネギーホールと Metz で世界最高のクラシック音楽やオペラを、メインイベントがある度に中西、Berova 両先生方と心ゆくまで楽しんだことは決して忘れることができません。

時々、コロンビア大学の由緒ある建物を風景にして映画撮影が行われます。私の滞在時期では、スパイダーマン II の撮影時のクリスティン・ダントに遭遇いたしましたし、Hitch(日本題:最後の恋の始め方)撮影時のウィル・スミスは、握手のために近くに来てくれました。モナリザスマイルの撮影の際には、化学科での火災警報機が鳴ったため、実験している化学者と映画撮影者の全員が外に出ることを余儀なくされ

(日本と違い警報機が半端ではなくうるさいのです)、ジュリア・ロバーツと出口のドアですれ違った緊張感は彼女の映画を見る度に蘇ってきます。

映画と言えば、これはニュー Yorker の大きな趣味の一つであり、私も必ず週に2、3の映画を見ました。アメリカでの映画は、日本のテレビドラマに丁度相当しており、良い映画も悪い映画も含め、週に3、4つもの新作が毎週公開されるほどの盛況です。テレビではなく、みんなで劇場に集まって泣いて笑って映像を楽しむのです。これら映画鑑賞によって、英語を始めとしてたくさんの文化、思想を学びました。コロンビア大学はハーレムの真横に位置しておりますが、実験の合間に抜け出して、友人とハーレム中の映画館によく歩いて行きました。同じアメリカの小さいニューヨークの町中でも、ロウワーマンハッタン、ミッドタウン、アッパーマンハッタン、ハーレムの映画館で、それぞれ客層、人種が違います。それぞれの場所で上映される映画はもちろん異なっておりますし、同じ映画でも場所によってリアクションが全く違うのは非常に興味深い現象でした。



スパイダーマン、モナリザスマイルの撮影が行われた化学科大講義室

その映画の中で特に私の中で強烈に印象に残ったのは、2003年のジェイソン vs フレディーというホラー映画です。ご想像いただけますように、本映画ではジェイソンとフレディーが多くの人を殺害していきます。びっくりすることに観客は、彼ら殺人鬼が殺害を行う度に、大きく手を叩いてスクリーンに歓声を送るのです。観客の盛り上がりとそれに調和して会場から流れる大音響のロック音楽の調和。これはその場を体験しないときっと想像していただけないでしょうが、1つの一体感ある世界が創り上げられていました。身持ち悪いを通り越した明るいお祭りです。日本ではただのホラー映画として評判は良くありませんでしたが、これはまさにアメリカの本場でしか味わうことのできない映画の醍醐味であり、カルチャーショックを受けました。アメリカの映画はアメリカで見るべきであり、それ以外で真価を問うことはできないことに気づきました。



ジェイソン vs フレディー

この他にも、11月の感謝祭、新年のカウントダウン、ニューヨークのクリスマス、ロックフェラーセンターのツリー、冬のスケート、エンパイヤーステートビルから眺める世界最大の都



巨大なニューヨークすし



アパートからの眺め(写真左がハーレム、写真上方がミッドタウン。上右方向にエンパイヤーステートビルが眺められる。このアパートで、コロンビア大学のサポートが半分あっても13万円する。物価は何もかもが高い！)

市、ミュージカル、美術館、高級料理店など、ニューヨークを語れば話はつきません。

さて、論文をどこに投稿するかについての途方も無い議論が2ヶ月間延々と続き、その後、“どうしても *J. Am. Chem. Soc.* に投稿したく、それだけの自信を持っている”旨をお伝えしました。かなりの強い気持ちでしたので、提案を受け入れていただけない場合、または論文がアクセプトされない場合には帰国する覚悟でした。決して良い仕事であるとは夢にも思っておりませんでした。私の個性を出すことのできた自分らしい仕事だという自信がありましたので、後悔もありませんでした。

強い気持ちと良い意味での“わがまま”を押し通し、その後、私達の論文は無事に *J. Am. Chem. Soc.* にアクセプトされましたが²⁾、このときに初めて、Berova 先生に1人の化学者として認めていただけたような気がします。つまらない出来事かも知れませんが、この出来事で1つ自分の中の壁を乗り越えることができたような気がしています。

<2年目から3年目へ・1人の国際人および研究者として>

1つ大きな壁を乗り越えたことで、それ以降は私自身にも、または私の周りにも大きな変化が表れました。先生方や研究室の共同研究者にも chemist としての私の意見を積極的に研究に取り入れていただき、また1人の人間として対等に接していただけるようになりました。グループ内外での議論においても、全く遠慮なく中西先生および Berova 先生に対しても意見し、逆にスムーズに物事が運ぶようになりました。“私のようなどこにでもいるごく平凡な人間と対等に議論していただけるということはなんと光栄なことなのでしょうか”と言うと中西先生にはいつも、“君は馬鹿じゃないのか？”と真剣にお叱りを受けておりました。この言葉からも、世界中の化学者誰もが崇拝する中西香爾先生のお人柄を容易にご理解いただけるかと思えます。

私が滞在時には、幸運にも(本当はそのときは相当苦勞いたしました)3つの大きな NIH プロポーザルのお手伝いをさせていただく機会を得ましたが、先生のもとみんなをまとめてプロポーザルを構成し英文を作成していくプロセス、および財形システムを学ぶ機会が得られたことは、何事にも変えられない貴重な経験となっています。先生方にはその後1年半の間に、国際学会を含めた10個近くの様々な学会に連れていただき、アメリカ中の多くの教授に紹介していただきました。また、週に2、3度は両先生と食事をご一緒し、様々な問題点について議論いたしました。この際、中西教授に伝授いただいた研究の“秘伝”をいつの日か紐解けるよう一から再びがんばっていこうと決意し、3年間のコロンビア大学での研究生活にけじめを付け、丁度その時に幸運にもお誘いいただいた大阪大学大学院理学研究科・深瀬浩一先生のもとで新たな気持ちで帰国することを決断いたしました。

<終わりに>

“ポストドクはどうでしたか？”と聞かれたならば、もちろん私も、みなさんと同様に躊躇なく“最高でした”とお答えします。しかしこれは結果論であり、楽しかったこと50%、苦勞したこと50%をお示ししたく、敢えてこのように体験記を執筆させていただきました。“ポストドクに行けば楽しい”ことは間違いありませんが、そこでは大変苦勞することも多々あることを認識していただきたく思います。また、その中で“あがく”のか“現状維持なのか”、帰国して得られるものは違うでしょうし、意識してこの大切な期間を過ごした方がきっと良いと思います。

もし私が、“あのとき自分を信じて意見を押し通さなかったら”と考えるとぞっとします。私の場合は、幸運にもすばらしい2人の先生に恵まれ、一步踏み出してみることで全てが変わったと思っています。いえ、2人の先生にそのように仕組んでいただいたのかも知れませんが、本体験記にお示しいたしましたのは私のちっぽけな自分との戦いの例ですが、海外で研究された方はきっと、人それぞれの貴重な経験をされているこ

と思います。もし私がこれから博士号を取得される若い研究者の皆様に対してアドバイスできるならば、“是非機会があれば海外に行って戦っててください”。躊躇なく推奨いたします。

最後になりましたが、私をまるで子供、孫のように面倒を見ていただき、とんでもなく多くのわがままに辛抱して最後までつき合ってくださいましたコロンビア大学・Nina Berova 先生及び中西香爾先生に心より感謝申し上げます。私の友人は、私をからかって Berova 先生のことを“ニューヨークの母親”と呼んでいましたが、これは全く(実は)その通りで、研究から私生活に至るまで何から何までお世話になりました。またこの場をお借りして、私に化学および研究者の基礎、倫理、信念を一から叩き込んでいただき、コロンビア大学に留学するきっかけまで作っていただいた、生涯の恩師・勝村成雄教授(関西学院大学理工学部)に感謝申し上げます。また、コロンビア大学の先輩であり、私のような何の特徴もない化学者を助手として招いていただいた大阪大学大学院理学研究科・深瀬浩一教授(元 Still 研)、および藤本ゆかり先生(元中西研)に感謝申し上げますとともに、先生方のもとでついに念願であった生物化学、および化学生物学の研究を行う機会に巡り会い、日々幸せに感じております。また、本稿において、留学体験記を自由気ままに執筆させていただく機会をお与えいただきました、長崎先生、石田先生、および編集委員の先生方に深く感謝いたします。本文章にはいくつかお見苦しい点があるかとは思いますが、ご容赦いただければ幸いです。

今でも週に一度は映画に行こうとしますが、それは私が特に映画を愛しているからではなく、少しでもニューヨークで過ごした3年間のことを忘れたくないからであることを付記して、最後の言葉に代えさせていただきます。

- (1) Tanaka, K., “Combined Cross Metathesis/CD・FDCD Protocols in Natural Products Research: Micro-scale Approach for Configurational Analysis.”, *J. Synth. Org. Chem. Jpn*, **64**, 382-394 (2006).
- (2) Tanaka, K., Nakanishi, K., and Berova, N., “Absolute Stereochemistry of Allylic Alcohols, Amines, and Other Ene Moieties: A Microscale Cross Metathesis/Exciton Chirality Protocol.”, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10802-10803 (2003).

たなか かつのり ktzenori@chem.sci.osaka-u.ac.jp





シンポジウム等会告

生体機能関連化学部会（21回）・バイオテクノロジー部会（9回）・ 生命化学研究会（9回）合同シンポジウム

主催 生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生命化学研究会

共催 日本化学会

会期 9月28日(木)、29日(金)、30日(土)(28日午後から30日夕方まで)

会場 京都大学工学研究科(桂キャンパス)(京都市西京区京都大学桂)

発表申込締切 6月18日(土)

予稿原稿締切 8月10日(木)

参加登録予約申込締切 8月31日(木)

内容 生体機能、バイオテクノロジー、生命化学に関する日本化学会2部会・1研究会の合同シンポジウム。特別講演(29日午後)、一般講演(28日午後、29日午前、30日午前・午後)、ポスター発表(29日午後、30日午後)。申込窓口は一つ。一般講演のプログラムは部会／研究会別ではなく分野ごとに編成。

参加申込方法 発表申込用紙(Excel様式)をHP: <http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/goudou2006/>から入手し、必要事項を記載のうえE-mailに添付して申込。発表形式は口頭またはポスター。口頭発表の件数は原則的に1研究室1件。但し、申込は2件まで可。この場合は優先順位をつけ、2件目の採否は世話人に一任。分類:アルファベット1文字(a. 分子認識・超分子・モデル系、b. ペプチド・蛋白・酵素、c. 遺伝子関連、d. 糖・脂質、e. 細胞、f. その他)。

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。申請希望者は発表申し込み時に必要事項を記載。

参加登録費 部会員:8月31日(参加登録予約申込締切)以前は部会員:一般 5000 円、学生 4000 円、非部会員:一般 7000 円、学生 5000 円(要旨集込み)。8月31日以降は 2000 円プラス。事前送本は 500 円アップ。

懇親会 9月29日。費用 6000 円(必ず事前に申込のこと)。

送金方法 必要事項(氏名、送金内訳)を記載し銀行振込。振込先:みずほ銀行百万遍支店 普通預金 口座番号 2457879。名義:合同シンポ 2006 代表者青山安宏。

申込先 E-mail: goudou2006@sbchem.kyoto-u.ac.jp

HP <http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/goudou2006/>

実行委員長 青山安宏(京都大学工学研究科)Tel: 075-383-2766, Fax: 075-383-2767,

E-mail: aoyamay@sbchem.kyoto-u.ac.jp

発表申込締切(6/18)間近です

奮ってお申し込み下さい。

**「膜透過ペプチド」国際ミニシンポジウム
膜透過ペプチド: 化学、生物学と臨床応用**

Membrane-permeable peptides: Chemistry, biology and therapeutic applications

趣旨

近年、HIV-1 Tat ペプチドをはじめとした膜透過性ペプチドベクターを用いた生理活性タンパク質や薬物の細胞内導入法が注目されています。本シンポジウムでは、このような高機能細胞膜透過ベクターの開発を念頭に、国内外の主要研究者を集め、特にベクターの化学的なデザインと細胞内移行能や移行機序との関係、さらにはこの方法論の医療や材料科学等への応用に関して討論することを目的としています。本シンポジウムは、11月5-8日に開催される第43回ペプチド討論会・第4回ペプチド工学国際会議のサテライトシンポジウムの第9回ペプチドフォーラムとして開催されます。

日程 2006年11月10日(金)～11日(土)

会場 京都大学薬学部記念講堂(京都市左京区吉田下阿達町)

主催 日本ペプチド学会

オーガナイザー 二木史朗(京大化研)、松崎勝巳(京大院薬)

招待講演者

Steven S. Dowdy(米国)、Jonathan Rothbard(米国)、Bernard Lebleu(フランス)、Ulo Langel(スウェーデン)、Alan Prochiantz(フランス)、Ernest Giralt(スペイン)、Michael Gait(英国)、Sung-Kee Chung(韓国)、Ferenc Hudecz(ハンガリー)、原島秀吉(北大薬)、松井秀樹(岡大医)、太田成男(日本医大)、山本昌(京都薬大)、丸山厚(九大先導研)、森井孝(京大エネ研)、野口洋文(名大医)、永井義隆(阪大医)、米谷芳枝(星薬大)、山田秀徳(岡大工)、森下真莉子(星薬大)、二木史朗(京大化研)、松崎勝巳(京大薬)

ポスター発表(20件程度を募集) 申込締切 9月1日(金)

事前参加申込締切 9月30日(土)

詳しくは <http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/cpp.html> をご覧ください。

問合せ先

〒611-0011 宇治市五ヶ庄

京都大学化学研究所 二木史朗

電話 0774-38-3210

FAX 0774-32-3038

電子メール futaki@scl.kyoto-u.ac.jp

第 9 回 日 中 韓 酵 素 工 学 会 議

9th Japan-China-Korean Joint Symposium on Enzyme Engineering

共 催: 日本酵素工学研究会, Chinese Society for Enzyme Engineering, Korean Society of Enzyme Engineering

日 時: 平成 18 年 10 月 30 日(月)~11 月 2 日(木)

場 所: ピアザ淡海(おうみ) (滋賀県大津市におの浜1-1-20)

実行委員会委員長: 長棟輝行(日本酵素工学研究会会長, 東大院工)

同プログラム委員長: 安達修二(同会 副会長, 京大院農)

同 組 織 委 員 長: 長谷川淳三(同会 副会長, (株)カネカ)

中国側世話人: Prof. Chen Jin (Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science), Prof. Ri-Bo Huang (Guangxi University), Prof. Gaoxiang Li (Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science)

韓国側世話人: Prof. Sun Bok Lee (POSTECH), Prof. Hak-Sung Kim (KAIST), Prof. Do-Man Kim (Chonnam National University)

発表予定件数:

Keynote lectures (3 件, 各 45 分)

(日本側) 清水 昌(京都大学)・(中国側) 交渉中・(韓国側) Hak-Sung Kim (KAIST)

Plenary lectures (6 件, 各 30 分)

(日本側) 浅野泰久(富山県立大学), 森 英郎(協和発酵株)・(中国側) 交渉中

(韓国側) Do-Man Kim (Chonnam National University), Sun Bok Lee (POSTECH)

Oral presentation* (54 件, 各 20 分) 日本 24 件, 中国 15 件, 韓国 15 件

ポスターセッション(42 件) 日本 23 件, 中国 7 件, 韓国 12 件

*Oral presentation の予定セッション:

•Fundamentals of Biocatalysts I (Gene and Protein Engineering, Directed Evolution)

•Fundamentals of Biocatalysts II (Characterization of Biocatalysts, Bioinformatics)

•Application of Biocatalysts I (Bioconversion, Chemical Synthesis)

•Application of Biocatalysts II (Biosensor, Bioremediation)

発表申込:

回答書を Fax (075-753-6285) でお送りください(締切:2006 年 7 月 21 日).

要旨は Microsoft Word® で作成し(例を参照), 2006 年 8 月 31 日までに, E-mail の添付ファイルで, adachi@kais.kyoto-u.ac.jp にお送りください. 体裁等に手を加える場合がありますので, ご了解ください.

日 程:

10 月 30 日(月) 受付, 基調講演

10 月 31 日(火) 招待講演, 口頭発表, ポスター発表

11 月 1 日(水) 口頭発表, ポスター発表, Banquet

11 月 2 日(木) Excursion

(講演申込み件数等により, 一部を変更する可能性もあります.)

その他:

使用言語は英語です.

Oral Presentation は 3 つのセッションを平行して行います.

(講演申込み件数等により, 変更になる可能性があります.)

Banquet:

日 時: 11 月 1 日 午後 6 時より(予定)

場 所: ホテル ピアザびわ湖(ピアザ淡海と同一建物内)

問い合わせ先(事務局):

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻

安 達 修 二

Tel: 075-753-6286 Fax: 075-753-6285

E-mail: adachi@kais.kyoto-u.ac.jp

(できるだけ, Fax または e-mail でお願いいたします.)

FCCAセミナー/
FCCAグライコサイエンス若手フォーラム2006

本会は、糖関連の化学・工学・生化学・生物学等を研究対象とする若手研究者および学生の交流の会です。普段は交流のない様々な分野の研究者により、糖質を科学的かつ多角的に議論できればと思っております。以下の招待講演をお聞きした後、講師の先生方をお囲みした懇親会、参加者による口頭又はポスター発表(発表形式は事務局へ御一任下さい。学会とは異なりますので、他分野の方にも理解できるようにお願い致します。)等、内容は豊富です。また、企業にお勤めの方でしたら商品の説明でも構いません。経験のある研究者の聴衆としての参加も歓迎しております。糖質をキーワードに新たな研究を展開し、新しい人脈を培うきっかけになれば幸いです。是非、お気軽に御参加下さい。

日時:2006年8月26日(土)～27日(日)

会場:東北大学大学院工学研究科総合研究棟1F講義室2

宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-11 (Phone:022-795-7231)

内容:

1、招待講演

中山亨先生(東北大院工)「植物フラボノイドのグルコシル化の酵素科学」

西村紳一郎先生(北大院理)「糖鎖医薬品の研究開発に必要な鍵テクノロジー」

上田実先生(東北大院理)「植物の生命現象をコントロールする配糖体型生理活性物質と多糖類の生物有機化学」

2、若手研究者(学生も含む)による一般講演及びポスター発表

3、交流会

定員:50名

参加費:FCCA会員 無料、

非会員:一般4,000円、学生1,000円

旅費申請:本FCCAセミナーへの参加者は川口基金

(<http://www.gak.co.jp/AN/kkfundJ.html>)からの旅費の補助を受けることができます。

申込締切:平成18年8月12日(土)

※口頭あるいはポスターの希望、発表題目を明記の上、下記の代表幹事へE-mailでお申し込み下さい。

申込先:昭和女子大学 天野麻穂(E-mail: m-amano@swu.ac.jp)

詳細は以下のホームページでもご覧になることができます。

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~poly/glyco/glycoyoung.htm>

若手フォーラム代表

井ノ口仁一 (東北薬科大)

グライコサイエンス若手の会

代表幹事 天野麻穂 (昭和女子大)

遺伝子・デリバリー研究会第6回夏期セミナー

本セミナーは、遺伝子デリバリー関連の医学・薬学・化学・工学・生化学・生物物理学等を研究対象とする研究者と遺伝子・デリバリー研究会会員の交流の場です。以下の招待講演を聴講し、講師の先生方を囲んだ懇親会、参加者による口頭発表などで議論を尽くし、毎回非常に濃厚な内容となっています。非会員の方はこの機会に是非入会し、ご参加下さい。

会期:2006年9月7日(木)～9日(土)

場所:みのお山荘風の杜(〒562-0001 箕面市箕面 2-14-71)

TEL:072-722-2191 FAX:072-722-2426

<http://www.minoo-kazenomori.com/top.html>

内容:

1. 招待講演者(確定者のみ記載)

- ・米満 吉和 (千葉大学大学院医学研究院 遺伝子治療学)
- ・近藤 昭彦 (神戸大学大学院自然科学研究科 分子物質科学専攻)

2. 参加者による口頭発表

その他詳細については <http://www.gene-delivery.org/> をご覧ください。

定員:40-50 名程度(遺伝子・デリバリー研究会会員限定です、未会員の方は研究会ホームページをご参照の上是非ご入会下さい <http://www.gene-delivery.org/>)

参加費:一般 30,000 円、学生 15,000 円(宿泊、食事代、懇親会費込み)

申込締切:2006年8月31日(木)

※口頭発表の希望有無、発表題目を明記の上、下記まで E-mail でお申し込み下さい。

申込先:大阪市立大学大学院工学研究科 長崎 健

(E-mail: nagasaki@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp)





お知らせコーナー

受賞のお知らせ

林 高史(大阪大学大学院工学研究科)
第7回酵素応用シンポジウム研究奨励賞 平成18年6月9日
「高活性酸化触媒をめざした機能性人工ヘムを有するヘム酵素創製」

北村裕介(熊本大学大学院自然科学研究科)
日本化学会第86春季年会 学生講演賞 平成18年5月
「金属配位能を持つDNAコンジュゲートの協同的複合体形成およびその遺伝子多型解析への応用」
九州分析化学奨励賞 平成17年8月4日
「DNAコンジュゲートの協同的ハイブリダイゼーションを利用した遺伝子の特異的検出」

会員異動

長谷川 健 (順不同)
東京工業大学大学院 理工学研究科 化学専攻 助教授 JST PRESTO(兼任)
〒152-8551 東京都目黒区大岡山2-12-1
TEL & FAX: 03-5734-2238
E-mail: hasegawa@chem.titech.ac.jp

永次 史
東北大学 多元物質科学研究所 分子機能制御研究分野 教授
〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1 反応化学研究棟
TEL: 022-217-5633 FAX: 022-217-5667
E-mail: nagatugi@tagen.tohoku.ac.jp

野島 高彦
東京大学 生産技術研究所 附属マイクロメカトロニクス国際研究センター 助手
153-8505 東京都目黒区駒場4-6-1
TEL & FAX: 03-5452-6213
E-mail: nojima@iis.u-tokyo.ac.jp

編集後記

編集委員を仰せつかつてはや三度目の生命化学研究レターを無事お送りすることができ、これもひとえに執筆者の皆様のおかげと心より感謝しております。三度目ということで多少は編集作業になれてきましたが、昨年に続き編集時期が海外出張と重なりホテルの部屋で時差ぼけのまま朝に目が覚めてはマックに向かう日々でした。今回も、執筆者の皆様のお熱い思いがひしひしと伝わってき、読者の皆様にも非常に役に立つ情報を盛りだくさんでお届けできたと確信しております。次号(No. 22)は、原田氏の担当により、2006年10月に発行を予定しております。乞うご期待ください。

長崎 健
大阪市立大学大学院工学研究科
(nagasaki@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp)