



生命化学研究 レター

No. 22 (2006年10月)

1.	巻頭言	2
	Observations on the ISBC2006 Symposium	
	Dipankar Sen (Simon Fraser University, Canada)	
	Kai Johnsson	
	(Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland)	
2.	関連シンポジウム報告	5
	第2回生命化学国際シンポジウム (ISBC 2006)	
	合同シンポジウム (第21回生体機能関連化学部会・	
	第9回バイオテクノロジー部会・第9回生命化学研究会)	
3.	研究紹介	9
	再生医療における工学技術	
	山岡哲二 (国立循環器病センター研究所)	
4.	論文紹介「気になった論文」	15
	田代省平 (東京大学大学院理学系研究科)	
	水上 進 (大阪大学大学院工学研究科)	
	柿本真司 (大阪市立大学大学院工学研究科)	
5.	生命化学研究法	24
	ファージディスプレイ法を用いたセレクション	
	~ 標的分子に結合する生体分子の作製 ~	
	福田将虎、杉本健二、森井 孝	
	(京都大学エネルギー理工学研究所)	
6.	カリフォルニア大学サンフランシスコ校留学体験記	30
	今西 未来 (京都大学化学研究所)	
7.	シンポジウム等会告	33
8.	お知らせコーナー	39
	受賞・会員異動のお知らせ / 編集後記	



巻頭言

Observations on the ISBC2006 Symposium

Dipankar Sen
Dept. of Molecular Biology & Biochemistry/Chemistry
Simon Fraser University
British Columbia, Canada



These are a few thoughts on the recently concluded ISBC2006 Symposium, held at the Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER) of Konan University, Kobe, from August 6-9, 2006. Any account of a visit to FIBER must begin with reminiscences of Professor Naoki Sugimoto, the genial and inspiring leader of that institute. I first met Professor Sugimoto at a conference in Albany, New York, many years ago, and we have run into each other from time to time at various conferences venues across the world. I have always admired Professor Sugimoto's scientific versatility, and when he started to publish papers on guanine-quadruplexes in DNA, a particularly favourite subject of mine, I sat up and took notice. His recent body of work on the effect of molecular crowding on the behaviour of biological macromolecules (for instance, the formation and stability of G-quadruplexes), has been really noteworthy, having simulated, as it has, the close-packed environment of the cell nucleus itself. It so happened that Professor Sugimoto and I were both speaking at a session of Pacificchem 2005 in Hawaii last December when, in the course of his presentation, Professor Sugimoto showed a number of slides of FIBER, his new institute in Kobe, which he described as having the mission of bringing under one roof scientists researching broad areas of biomolecular chemistry and engineering.

Having seen those intriguing photographs of FIBER late last year, it was both a great surprise and pleasure to receive an email of invitation from Professor Sugimoto, in the first months of 2006, to visit FIBER and to make a presentation at the upcoming ISBC2006 Symposium. As it happened, I had other plans for that period of time; however, I immediately sent Professor Sugimoto an email of acceptance. For one thing, the list of speakers looked most interesting and, now, I would now have a chance not only to visit FIBER but also Japan, for the second time. My first visit to Japan, to Sapporo a few years ago, had been very brief indeed-- I had more or less arrived, given my talk, and left. This time, I hoped to spend some time there, particularly in the Kansai area, to experience the great cultural treasures of Kyoto, Uji, and Nara.

The Symposium itself proved to be one of the most enjoyable and productive ones that I have attended in recent years. The science of both the oral presentations and posters was uniformly of the cutting edge, and very exciting. It was a fine opportunity to encounter so much outstanding Japanese science, especially during the poster sessions, and to make many new friends among the visiting faculty, postdoctoral fellows, as well as graduate students. It was a chance for me to hear, within the framework of a small, intimate conference (with the attendant opportunity of participating in free-flowing discussions) both colleagues and friends whom I have known for some time, such as Professors Woolley, Bevilacqua, Hud, and Carell, as well as others whom I had never met or had a chance to hear before. It was also a fine opportunity to meet up once again with Professor Sugimoto as well as with an old friend, Professor Kazuo Harada, whose work has had a major impact on our own. Professor Takehiko Wada, of Osaka University, was my 'host' for the proceedings, and was very gracious and accommodating indeed in that capacity.

I cannot possibly end this reminiscence without mentioning the outstanding hospitality of the member of FIBER-- the incredible helpfulness and enthusiasm of the corps of graduate students at the oral and poster sessions and beyond. I will also never forget the magnificent banquet at that sake brewery in Kobe (which included tasting sessions of, literally, a hundred varieties of sake!), the unforgettable taste of Kobe beef, and also the experience of walking around this beautiful city between the mountains and the ocean, now fully recovered from the earthquake ten years ago, and thriving again.

In summary, thank you again, Professor Sugimoto, and all the other friends and colleagues who made ISBC 2006 such a great experience for me.



Kai Johnsson

Institut de Chimie Moléculaire et Biologique
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne
Lausanne, Switzerland

This summer, the Second International Symposium on Biomolecular Chemistry (ISBC2006) took place from the 6th to the 9th of August at the Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), Konan University, Japan. The meeting was organized by Itaru Hamachi, the chairman of the Forum on Biomolecular Chemistry (FBC) and Naoki Sugimoto, the executive chairman of the symposium. The central scientific



theme chosen by the organizers was the use of chemical approaches to understand and control phenomena in living systems. What better place is there for such a meeting than the FIBER in Kobe? As participants walked into the entry hall of the FIBER, their eyes fell on a stunning DNA model that runs from the bottom to the top floor of the building. Attached to the model are small plates that commemorate important events in the history of DNA, including the elucidation of its structure and the sequencing of humane genome. As the visitor walks up the stairs to the 4th floor of the building towards the (blunt) end of the double helix, his or her attention is drawn to a final plate which holds a bold prediction of the future: 40 years from now there will be no differences anymore between chemistry *in vivo* and *in vitro*! The ISBC2006 provided an excellent opportunity to review how far we have come towards this ambitious goal and where future developments are needed. The talks covered all areas of chemical biology with a focus on using the tools of chemistry to tackle important biological problem that resist more traditional approaches to resolve them. It is beyond the scope of this brief report to list all speakers, and their names can be found at the meeting website (<http://www.isbc2006.jp/index.html>); representative examples were the talk by Kazuya Kikuchi on fluorescent probes to monitor biological processes *in vivo* and the talk by Thomas Carell on molecular aspects of DNA repair.

The lasting memories associated with a scientific meeting are usually not only the talks themselves but the discussions with other participants and the friendships formed. In this respect too, the ISBC2006 was a full success. The number of participants of the meeting was limited to about 100, which facilitated discussions among the participants, and social events were included to catalyze interactions. The guided visit of a Sake factory in Kobe certainly deserves special mention here. Another highlight of the meeting were the poster sessions, which gave an impressive overview over the vibrant chemical biology community in Japan. The quality of the posters was exceptional and almost all of the posters would have deserved a full lecture.

In the end, I can only congratulate the (local) committee and sponsors for the organization of such a scientifically rich and stimulating meeting and express my gratitude for their hospitality. As the participants finally left the meeting to return to the daily routine in the laboratory, everybody pondered the same question: when and where will the next ISBC be held?



主催シンポジウム報告

The Second International Symposium on Biomolecular Chemistry (ISBC2006) in KONAN FIBER, Japan

The Second International Symposium on Biomolecular Chemistry (ISBC2006) was held from 6th to 9th in August, 2006 in FIBER (Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research), Konan University, Japan, organized by the Forum on Biomolecular Chemistry (FBC) in the Chemical Society of Japan, and coorganized by Konan FIBER, by Itaru Hamachi, the chairman of FBC, and Naoki Sugimoto, the execution chairman of the symposium. This symposium emphasized the diversity of modern research in chemical studies on DNA/RNA, proteins, carbohydrates and metals, with particular emphasis on understanding and controlling the phenomena in living systems.



SCIENTIFIC PROGRAM

Session I. Protein Interaction (August 7th 9:00-12:00)

Floyd E. Romesberg (The Scripps Research Institute, USA)

The Evolution of Biomolecular Function

(Chair: Ikuo Fujii, Osaka Prefecture University)

Masayuki Matsushita (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd, Japan)

Blue Fluorescent Antibody Sensors

(Chair: Ikuo Fujii, Osaka Prefecture University)

Kai Johnsson (Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Switzerland)

Observing and Manipulating Proteins in Living Cells

(Chair: Ikuo Fujii, Osaka Prefecture University)

Andrew Woolley (University of Toronto, Canada)

Designing Photo-controlled Peptides and Proteins

(Chair: Hisakazu Mihara, Tokyo Institute of Technology)

Jaehoon Yu (Seoul National University, Korea)

Generation of RNA Specific ligands & Their Usages As Versatile Chemical Tools

(Chair: Hisakazu Mihara, Tokyo Institute of Technology)

Session II. Functional DNA/RNA (August 7th 14:00-17:00)

Philip C. Bevilacqua (Pennsylvania State University, USA)

General Acid-Base Catalysis and pKa Shifting in RNA Enzymes

(Chair: Shu-ichi Nakano, Konan University)

Larry W. McLaughlin (Boston College, USA)

Use of Nucleotide Analogues to Probe DNA Structure and Function

(Chair: Kazuya Koumoto, Konan University)

Nichokas V. Hud (Georgia Institute of Technology, USA)

Controlling Nucleic Acid Assembly by Small Molecule Binding

(Chair: Daisuke Miyoshi, Konan University)

Dipankar Sen (Simon Fraser University, Canada)

Light as Cofactor and Substrate in the Chemistry and Biology of DNA and RNA

(Chair: Takehiko Wada, Osaka University)

Session III. Metals in Chemical Biology (August 8th 9:00-12:00)

Takashi Hayashi (Osaka University, Japan)

Functionalization of Hemoproteins by Chemical Modification of Prosthetic Groups

(Chair: Mitsuhiko Shionoya, University of Tokyo)

Thomas Carell (Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany)

DNA Repair and Mutagenic Replication of DNA Lesions

(Chair: Mitsuhiko Shionoya, University of Tokyo)

Kazuya Kikuchi (Osaka University, Japan)

Design, Synthesis and Biological Application of Fluorescent Probes which Convert Biological Responses to Chemical Output

(Chair: Hitoshi Ishida, Kitasato University)

Thomas V. O'Halloran (Northwestern University, USA)

Inorganic Battlegrounds in Infectious Disease: Zinc and Iron Chemistry of Malaria Parasite

(Chair: Hitoshi Ishida, Kitasato University)

Session IV. Cell Function of Macromolecules (August 8th 14:00-17:00)

Stefan Matile (University of Geneva, Switzerland)

Synthetic Functional Architecture in Lipid Bilayers: From Porous Sensors to Smart Photosystems and cytosolic delivery

(Chair: Shiroh Futaki, Kyoto University)

Jean Gariepy (University of Toronto, Canada)

Design and Mining of Combinatorial Toxin Libraries to Identify Anticancer Agents

(Chair: Takeshi Nagasaki, Osaka City University)

Geert-Jan Boons (The University of Georgia, USA)

Increasing the Antigenicity of Tumor Associated Carbohydrates by Targeting Toll-like Receptors

(Chair: Koichi Fukase, Osaka University)

Injae Shin (Yonsei University, Korea)

Carbohydrate Microarrays for Glycomics Research

(Chair: Toshinori Sato, Keio University)

Session V. Nanobiotechnology and Technology Innovation in Biomolecular Chemistry (August 9th 9:00-12:00)

Constantinos A. Varotsis (University of Crete, Greece)

Probing the Q-Proton Pathway and Docking site Dynamics of ba3-Oxidoreductase by Time-Resolved Step-scan Fourier Transform Infrared Spectroscopy

(Chair: Shun Hirota, Kyoto Pharmaceutical University)

Shoji Takeuchi (The University of Tokyo, Japan)

Membrane Protein Chips

(Chair: Yoshinobu Baba, Nagoya University)

Rainer Haag (Free University of Berlin, Germany)

Functional Dendritic Architectures for Biomedical Applications

(Chair: Keigo Aoi, Nagoya University)

Haesik Yang (Pusan National University, Korea)

An Electrochemical Immunosensor Using Carbon Nanotube Film

(Chair: Shigeori Takenaka, Kyushu Institute of Technology)



第21回生体機能関連化学部会・第9回バイオテクノロジー部会・

第9回生命化学研究会 合同シンポジウムが開催されました。

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・京都大学21COE 化学連携教育研究拠点

会期 9月28日(木) 30日(土)

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)

特別講演 白川昌宏博士(京大院工)、林崎良英博士(理化学研究所ゲノム科学総合研究センター)
加藤博章博士(京大院薬)、西本清一博士(京大院工)

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。



左から浜地 格 氏(生命化学研究会会長)、青山安宏 氏(実行委員長、
生体機能関連化学部会長)、松永 是 氏(バイオテクノロジー部会長)



再生医療における工学技術

国立循環器病センター研究所生体工学部
山岡哲二
(yamtet@ri.ncvc.go.jp)



1. はじめに

これまでの生命化学研究レターの雰囲気からすると、私たちの研究のなかでは、非ウイルス遺伝子キャリアーが相応しいのかと思いましたが、もう少し引いたところから書かせて頂くことにしました。キーワードは、新たな領域としてすっかり定着してきた“再生医療”です。スコープがずれるのが不安ですが、ご笑読下さい。

さて、再生医療とは、「生体や細胞が備えている再生能力あるいは増殖能力を利用した治療法」とでも説明できでしょうか。では“再生医療”の発祥の地は何处でしょうか。実は、“再生”という用語のルーツは日本にあります。1996年、京大生体医療工学研究センターの筏義人教授が、日本学術振興会の未来開拓学術研究推進事業に“再生医工学”という分野を立てました。筏教授によると、これは完全な造語で、古紙再生などをイメージされることを強く懸念したとのことです。概念的には、“再生医工学”の意味するところは、当時注目され始めていた組織工学 (Tissue Engineering) であったようです。その2年後、“再生”は、京都大学再生医科学研究所にも受け継がれて、十分な市民権を得て、海外でも Regenerative Medicine という英語が使われるようになりました。

私たちのグループでは、再生医療を支援する工学技術の開発を目指して、ポリ乳酸 (PLA) を一成分とする共重合体からなる機能性スキャホールドの開発、*in vitro* 組織再生を進める新規バイオリアクターの設計開発、移植細胞の単離システムと単離細胞のバリデーション技術、増殖因子遺伝子導入の直接導入による組織再生支援、細胞移植技術におけるインジェクタブルスキャホールドの開発などを進めてきました。再生医療の実現 (臨床化) のために、その効果はもちろんのこと、安全性の担保と認可の容易性を確保した上で、工学が果たすべき役割について、私たちの研究を中心に紹介させていただきます。

2. 再生医療

1988年に、米国のシンポジウムのタイトルとして Tissue Engineering という用語が初めて使用されました。ある程度の大きさのすり傷や切り傷は時間とともに治癒しますが、たとえ皮膚組織でも大きな損傷を受けるともはや正常に修復されることはありません。また、器官 (臓器) が受けた損傷の治癒は、さらに困難です。従来的人工臓器では、材料に対する生体反応の制御が不十分ですし、また、臓器移植では、ドナーの不足や免疫反応による拒絶反応に加えて倫理的問題が残ります。そこで、組織工学の検討が始まり、1993年、R. Langer らは、スキャホールド (Scaffold, 足場材料) と呼ばれたポリグリコール酸 (PGA) の不織布に軟骨細胞を播種してヌードマウスの皮下に埋入することで、異所的な軟骨の再生が誘導できること、さらに、この手法が、肝臓、腸、尿管、骨などへ展開できる可能性を示唆しました¹。再生が困難と考えられていた軟骨組織を対象にしたことや、異所的な組織の再構築に成功したことで、世界的に組織工学が注目を集めました。

実は、このような、マトリックと細胞とを融合させるアイデアは、1980年頃から皮膚組織の再建をターゲットにして検討されていきました。フィーダーレイヤー (Feeder Layer) なる細胞層の上で表皮組織が重層化することを利用して表皮シートが作製され、続いて、真皮の再生や、コラーゲンゲルと線維芽細胞、表皮細胞を組み合わせた皮膚の再生が相次いで報告されました。その後、

上述の軟骨再生へと展開され、さらに 1988 年には、ヒト胚性幹細胞の単離が報告され、その後も続々と組織幹細胞が発見されると、組織工学の最大の問題であった有用細胞の入手問題が解決するとの期待がふくらみ、ますます、研究は盛んになりました。

時間的な変遷はこんな感じですが、現在の再生医療を内容的に整理すると図1ようになります。まず、再生医療は、再生医工学と細胞移植に大別できます。再生医工学の



図1 再生医療の戦略。

中心は、生分解性マトリックス(スキャホールド)に細胞を播種して組織再生を狙うタイプの戦略です(図1- ,)。上述の例では、スキャホールドとして、ポリグリコール酸不織布やコラーゲン多孔質体が使われたこととなります。図1の は、スキャホールドのみを使って、*in vivo* で、組織再生を試みる戦略です。例えば図2のように、断裂した末梢神経を生体吸収性チューブでつなぐことで、ある期間、末梢神経が再生する空間を確保する手法で、組織再生誘導法(GTR, Guided Tissue Regeneration)と呼ばれます。このスキャホールドがなければ、周囲組織が入り込み、神経細胞の再生を妨げます。これまでに、歯周組織や顎堤への検討が進んでいます。また、図1の の細胞移植は、マトリックスを利用することなく体外に取り出した細胞を欠損部位に注入することで治療効果をねらう方法です。1994年に、患者の膝関節から採取した軟骨細胞を増幅し、その細胞分散液を膝関節の軟骨欠損部に注入することで、関節軟骨が再生できることが示されました。彼らの手法では、軟骨再生の場を確保するために創部を骨膜でカバーしており、外科的手法によるGTR効果も組み合わされていました。現実には、現在、最も進んでいるのがこの細胞治療と言うことも出来ます。特に自己細胞移植では、認可等の問題も少なくすむことから、臨床研究、および、医師主導型の治験システムへのアプローチも進められており、間葉系幹細胞や骨格筋細胞を移植することによる心疾患の治療などが報告されています。また、ドーパミン分泌細胞を移植することによるパーキンソン病の治療なども精力的に検討されています。

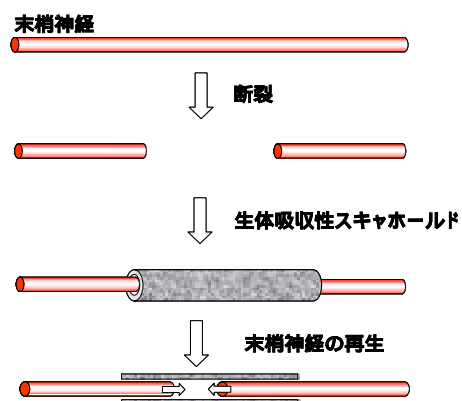


図2 GTRによる組織再生。

3. 細胞移植を支援するインジェクタブルスキャホールド

細胞移植術において、細胞懸濁液を直接組織などに注入した場合には、細胞を効率よく患部に留められないという問題があります。また、足場と空間確保の問題から細胞の十分な機能を果たすことはできていません。そこで、細胞注入を支援する材料として、体内で、水溶液から含水ゲルへ変化する生体吸収性材料(インジェクタブルスキャホールド)が注

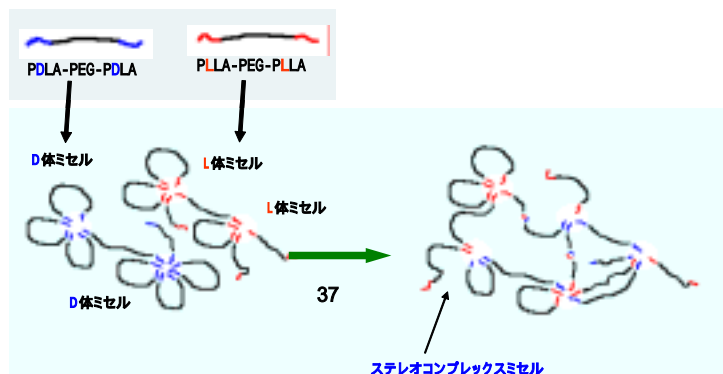


図3 L体ミセルとD体ミセルを混合した液は、温度に反応してゲル化するインジェクタブルスキャホールドとなると考えた。

目されています。従来から、光反応性基や、化学反応性基、あるいは、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)などの温度応答性ポリマーが利用されてきましたが、いずれも、その生体内での安全性は確保されていません。我々は、ポリ乳酸(PLA)とポリエチレングリコール(PEG)という、生体内での利用実績に優れた2つの高分子材料のみを利用することで、温度応答性インジェクタブルスキャホールドの開発を進めました。

まず、PLA-PEG-PLA トリブロック共重合体が、水中ではPLA コアと PEG コロナ(外層)からなるミセルを形成することは1980年代から知られています。京都工芸繊維大学木村良晴教授らとの共同研究の中で、いろいろなミセルをAFMで観察していた時、ある条件を満たしたミセルが、加熱処理によってナノ繊維構造に変化することを、偶然、見いだしました²。ミセルからナノ繊維への変化には、隣接するミセル同士が相互作用(コアを形成するポリ乳酸部分が、コロナ構造を形成するPEG層を乗り越えて融合)する必要があります。そこで、ポリ-L-乳酸からなるミセル(L体ミセル)と、ポリ-D-乳酸からなるミセル(D体ミセル)の分散液を混合することを考えました(図3左)。というのも、加熱により隣接するL体ミセルとD体ミセルが融合すると、ステレオコンプレックスミセルが形成すると考えたからです。その結果、図3右に示すように3次元架橋構造が成長しゲル化するという仕組みです。ポリ乳酸のステレオコンプレックスは、ホモ結晶に比べて融点が約50も高い安定な構造であることも、ゲル化を促進して安定化することに寄与すると考えられます。

実際に、共重合組成などを調節して37度でゲル化することに成功したインジェクタブルスキャホールドの写真を図4に示しました。X線散乱測定により、温度上昇とともにステレオコンプレックス結晶が成長することが確認されて、ゲル形成現象が進行することが確認されました。得られたゲルの含水率は90%以上であり、その物質透過性に優れること、さらに、細胞毒性を誘発する一切の化学物質を利用していないために、細胞生存率を下げることなく、対象部位に細胞を注入できる材料と考えられます。図5は、このことを示す*in vitro*実験の結果です。混合ミセル液にGFP(緑色蛍光タンパク)組換えマウス胎児線維芽細胞を懸濁させて、アガロースゲル中で昇温ゲル化させた3日後にも、細胞は正常な形態とGFP発現機能を維持していることが判ります。現在、GFP(-)マウスへの同種同形移植モデルシステムにおいても細胞の安定した移植効率と、移植細胞の生存と機能維持が確認されています。

4. ポリ乳酸系機能性スキャホールド

従来は、PGAやPLAの多孔質体が組織再生スキャホールドとして利用されてきましたが、疎水性が高いために水分を多く含む軟組織との親和性には問題が

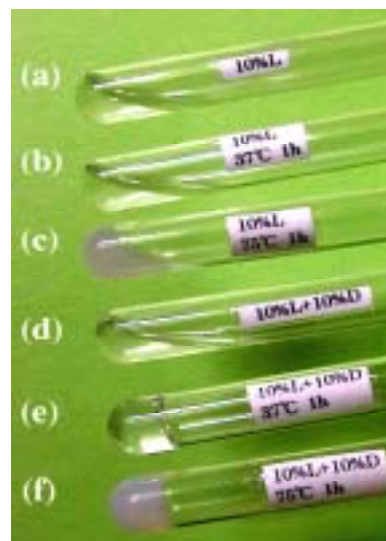


図4 L体ミセルとD体ミセル混合液(d)は、37度で加温することで透明なゲルに転移する(e)。それに対して、L体ミセルのみの分散液(a)は、75度で白濁はするが、ゲル化には至らない。

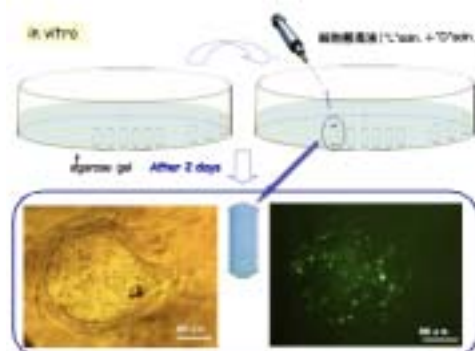


図5 L体ミセル、および、D体ミセル混合液に対して、GFP遺伝子組換え細胞を混合し、ゲル化する様子と、ゲル中で細胞が生存する様子を、*in vitro*細胞移植モデル実験で検討した光学写真。

を下げることなく、対象部位に細胞を注

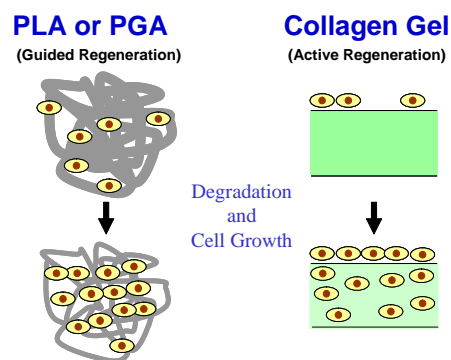


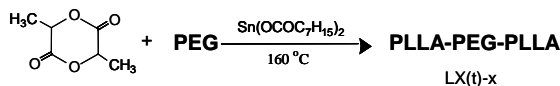
図6 PLAなどの疎水性の生体吸収性材料とコラーゲンゲルとではその組織再生機構が大きく異なる。

ありました。図 6 には、ポリ乳酸不織布を用いた場合と、コラーゲンゲルを用いた場合の組織再生の違いについて示しました。コラーゲンゲルは、軟組織との親和性が高いために、周囲から積極的に細胞が浸潤して組織と置換していきます。それに対して、PLA などでは、非酵素的加水分解の結果生成した間隙で細胞が増殖します。我々は、様々な水溶性ポリエーテル(PEth)とのブロック共重合体について検討し、高親水性かつコラーゲン様組織再生を誘導する生体吸収性“バルク材料”として利用することを目的に研究を進めてきました^{3,4}。一般的には、上述のトリブロック共重合体は、図7に示した PEth 末端の水酸基を開始点とするラクチドの開環重合により合成されます。PEth 組成が高いトリブロック共重合体は、薬物担体や、上述のような細胞移植材料として有用ですが、フィルムや繊維あるいはスポンジなどのバルク材料として利用する場合には、問題があります。このような材料に要求される3つの条件を図8に示しました。

十分な力学的強度を得るためには、100,000 程度の分子量が必要。
PEth の分子量が、腎臓から排泄される20,000 程度以下であることが必要。
十分な含水性を達成するためには、数十%以上の PEth 組成が必要。

これら3つの条件を満たす共重合体は、トリブロック体では合成が不可能であり、(AB)_n 型マルチブロック共重合体が必須となります(図8)。そこで、オリゴ乳酸と PEth の直接縮合反応によりマルチブロック共重合体を開発しました。所定量のデカンジカルボン酸を系中の水酸基とカルボキシル基を等モル量に調節するために添加し、さらに、ジフェニルエーテルを溶媒とした環流により脱水重縮合を加速させます。PEth 組成の上昇と共に共重合体の分子量が低下するトリブロック共重合体とは異なり、マルチブロック共重合体では、PEth 組成に関係なく分子量 100,000 以上を実現することができています。また、速い分解速度と親水性表面を有しながらも十分な初期破断強度を有する繊維、メッシュ、フィルム、不織布、スポンジなどを調製することが可能となりました。PEth 組成の上昇とともに、含水率が上昇し、ラット皮下に埋入実験において、ほとんどカプセル化も認められず、炎症反応も軽微でありました⁵。これらの含水性マルチブロック共重合体をベースにして作製した、ハイドロキシアパタイトとのコンポジット材料は、ラット皮膚組織再建用完全合成マトリックスとして働くことが明らかとなりました。結果の一例を図9に示しました。埋入1月で、ほぼ完全に組織再生が完了し、毛細血管網も構築されています。この所見は、コラーゲンをベースにした比較実験と

Synthesis of Triblock Copolymers



Synthesis of Multiblock Copolymers

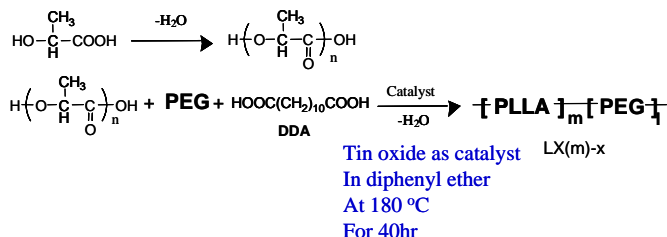
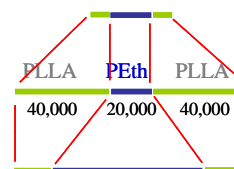


図7 従来のトリブロック合成法と開発したマルチブロック合成法。トリブロック共重合体は感温性インジェクタブルスキャホールドとして、また、マルチブロック共重合体は、完全生体吸収性ハイドロゲルとして、あらなた機能性を発現した。

- Mw > 100,000**
(Sufficient strength)
- Mw of PEth < 20,000**
(Low accumulation)
- Large PEth content**
(To prepare hydrogel)



Multiblock copolymer is promising.



図8 トリブロック・マルチブロック共重合体の構造。

新生血管

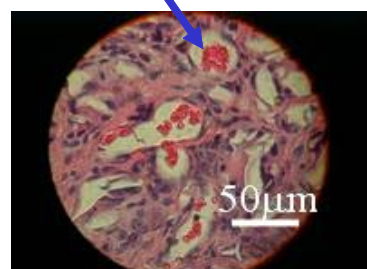


図9 マルチブロック共重合体をベースとしたスキャホールドを用いて、生体内で再建された軟組織。毛細血管網の再生も確認できる。

ほぼ同等の組織浸潤性であることも明らかとなりました。

5. 増殖因子の利用 - 増殖因子遺伝子導入 -

スキャホールドと細胞、そして、もう一つの再生医療の主役ともされているのが増殖因子などによる組織再生支援です。増殖因子タンパクを用いる方法と、増殖因子をコードするプラスミド DNA を用いて遺伝子導入する方法とがあります。我々のグループでは、後者について検討を重ね、特に、高効率の非ウイルスキャリアー分子が具備すべき化学的因子の特定とそのメカニズム解明を進めてきました。

一般的な、遺伝子導入機構を図 10 に示しました。キャリアー分子は静電的作用によって DNA 分子を凝縮し、粒子径約 100 nm の複合体を形成します。この複合体がエンドサイトーシス(貪食作用)により細胞に取り込まれ、小胞に包まれて細胞内を移行します。この小胞は、分解酵素がつまったライソゾームと融合する運命ですが、導入された DNA は、ライソゾーム酵素による分解から回避して、細胞質に移行し、さらに核内にまで輸送されて転写因子に認識されなければなりません。

従来、非ウイルス性キャリアーとして利用されたのは、ジエチルアミノエチルデキストラン

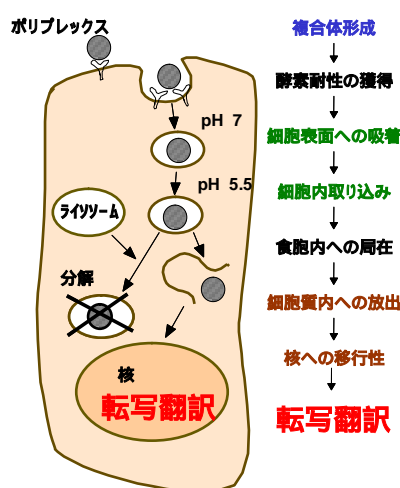


図 10 非ウイルスキャリアーによる遺伝子導入機構。

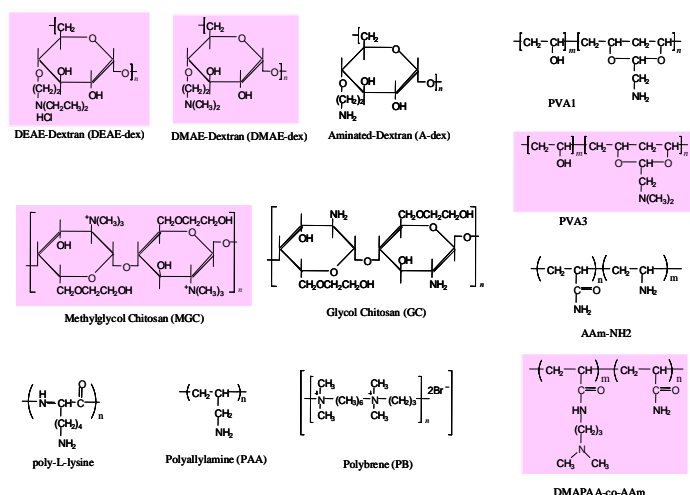


図 11 化学構造の異なる非ウイルスキャリアー。ピンクで示したキャリアーのみが遺伝子発現を誘導した。

(DEAE-dex)⁶ やポリ-L-リジン(PLL)の様な直鎖状高分子です。最近、表面をカチオン性に修飾したりポソームが高效率発現を誘導することが報告され、さらに、最近、ポリエチレンイミンのような分岐ポリカチオンや⁷、ポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマーなどの高い遺伝子導入効率が確認されています⁸。

我々のグループで、図 11 に示したように化学構造の異なるポリカチオンによる遺伝子導入実験を行った結果、ボックスで囲んだポリカチオンのみが高い遺伝子発現頻度を示しました。カチオン化多糖のみに注目すると、3級あるいは4級カチオン基をもつ場合に高い発現が認められ、1級カチオン基をもつ A-dex, GC では発現は認められません。さらに、導入遺伝子発現を誘導できるポリカチオンには、カチオン基以外に水酸基やアミド基などの非電荷親水基を有することが必須なようです。このような条件がなぜ遺伝子発現の有無を強く左右するのか、その機構解明は、新規な遺伝子キャリアー分子を設計する上で重要であります。遺伝子導入後の細胞による取り込み量や、あるいは、コンプレックスの細胞内移行性の違いなどを詳細に検討した結果、これらの、発現を説明できるほどの顕著な差異は認められませんでした。すなわち、遺伝子発現の有無を決定している因子は、細胞内移行後に転写因子などによって正常に認識され得るような DNA の状態を保つ複合体の物理化学的性質だと考えられました。

そこで、プラスミド DNA を Cy3(赤色蛍光)ラベルした後に細胞に導入することで、細胞により取り込まれた DNA 量を実測し、さらに、その DNA の発現量は、GFP タンパク量の緑色蛍光で

実測するシステムを構築しました(図 12)。遺伝子を導入した細胞を、フローサイトメーターにて 2 色蛍光同時解析することで、単一細胞内での、単位量 DNA あたりからの GFP タンパクの発現量、すなわち、導入遺伝子の細胞内被転写翻訳効率を実測することが出来ます。その結果、上述のように、非電荷親水基を有するキャリアー分子が高い被転写翻訳効率を示すことが明らかとなりました。蛍光消光測定法などにより複合体の物性を詳細に検討した結果、これらの複合体ではそのコンパクションが有意に抑制されており(図 13)、このために、遺伝子の被転写を効率よく許容したものと考えられます^{9,10}。

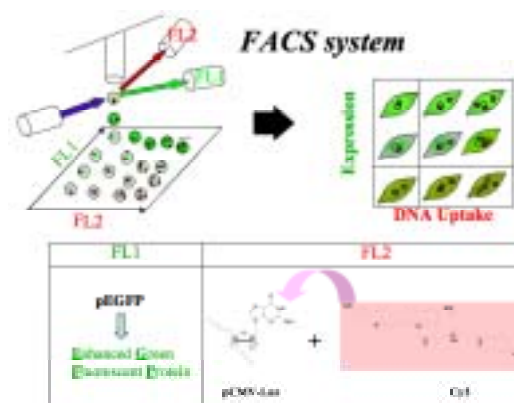


図 12 FACS を用いた、細胞内被転写効率の実測システム。

6. さいごに

現在までに、技術的には数ミリ程度の厚みの皮膚組織や軟骨組織を工場で大量生産することが可能となってきましたが、さらに厚みの大きなバルク状の組織を作製することは未だに困難です。機能性スキャホールドの開発や、増殖因子による組織再生支援の他にも、*in vitro* 組織再生のための様々なバイオリアクターの開発や、患者自身の末梢血や骨髄から目的細胞を容易に効率よく単離する手法の開発など、工学的に解決すべき課題は多くあります。さまざまな幹細胞が次々と発見されても、それを使う新たなシステムの構築が必要です。

「生体や細胞が備えている再生能力あるいは増殖能力を利用した治療法」は、単純明快で、容易に実現できそうに思われましたが、実際に生体を工学的に操作しようとしたところ、次々と課題が噴出して来たわけです。「すぐ出来ると思ったのに・・・これでは時間がかかりすぎる」と退却するのの一つですが、個人的には、今こそ、工学の踏ん張りどころだと思っています。もちろん、材料化学だけではなく、化学工学や機械工学など他の工学領域の力もお借りして、歩を進めてまいります。

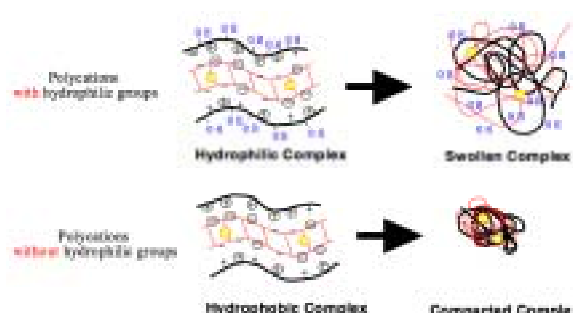


図 13 水酸基などを有するキャリアー分子は、コンパクションの抑制されたポリプレックスを形成する。

7. 文献

- 1) R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920-6 (1993).
- 2) T. Fujiwara, T. Mukose, T. Yamaoka, H. Yamane, S. Sakurai, and Y. Kimura, *Macromol. Biosci.*, **1**, 204-208 (2001).
- 3) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Ohta, M. Miyamoto, A. Murakami, and Y. Kimura, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **37**, 1513-1521 (1999).
- 4) A. EL-Salmawy, T. Kitagawa, I. K. Ko, A. Murakami, Y. Kimura, T. Yamaoka, and H. Iwata, *J. Artificial Organs*, **8**, 245-251 (2005).
- 5) T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Fujisato, C. W. Lee, T. Tsuji, T. Ohta, A. Murakami, and Y. Kimura, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 470-479 (2001).
- 6) T. Yamaoka, H. Iwata, N. Hamada, H. Ide, and Y. Kimura, *Nucl. Acids Res. Symp. Series*, **31**, 229-230 (1994).
- 7) F. D. Ledley, *Human Gene Ther.*, **6**, 1129 (1995), P. L. Felgner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413-7421 (1987).
- 8) A. V. Kabanov, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 7 (1995).
- 9) T. Yamaoka, T. Kimura, R. Iwase, and A. Murakami, *Chem. Lett*, 118-119 (2000).
- 10) T. Kimura, T. Yamaoka, R. Iwase, and A. Murakami, *Macromol. Biosci.*, **2**, 437-446 (2002).

気になった論文



田代 省平 (たしろ しょうへい)

東京大学大学院理学系研究科 化学専攻 助手

tashiro@chem.s.u-tokyo.ac.jp

この度は、論文紹介の機会を与えてくださり感謝申し上げます。簡単な自己紹介ですが、私は昨年より同大学院の生物無機化学研究室にて、塩谷光彦教授のもと研究をスタートさせていただきました。現在は、研究の芽を育てる、探すことをめざして、日々有機合成や関連分野の勉強をしながら、バイオへの展開を視野に入れた錯体化学を模索しております。

本論文紹介では、 β -ペプチド (β -アミノ酸から構成されたペプチド) を扱った最新の研究成果を3報、化学の観点から取り上げさせていただきました。機能性分子を設計、合成する立場から考えますと、極めて精巧な構造をもつタンパク質は理想的な手本であり目標だと思います。そんな理想の構造を、人工的に創ることができるのではないかとおぼせるのが β -ペプチドです。現在、 β -ペプチドでは2次構造の設計にとどまらず、生理活性や液晶、さらなる高次構造の設計まで非常に多岐にわたった分野へと展開しています。そういった研究の広がり、ほんの裾野の紹介ですがご一読いただければ幸いです。

Toward β -amino acid proteins: a cooperatively folded β -peptide quaternary structure

J. X. Qiu, E. J. Petersson, E. E. Matthews, and A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 11338–11339.

この論文では、 β -ペプチドの2次構造 (14-Helix) が溶液中で会合することで、ディスクリートな4次構造を形成することを示唆しています。

α -アミノ酸からなる天然のペプチド鎖は、ヘリックスやシートなどの2次構造、分子内で2次構造同士が精巧に会合した3次構造、さらにそれらが分子間で会合した4次構造を形成することによって、タンパク質として生体内で様々な役割を果たしています。このような階層的な自己組織化を、 β -ペプチドでも設計することが一つの大きな目標であると言えますが、これまでのところ、ほとんど例がありませんでした。

筆者らは、12残基程度の比較的短い β -ペプチドを2種類設計しました (図1: Base-1F と Acid-1F)。配列の要点を簡単に説明しま

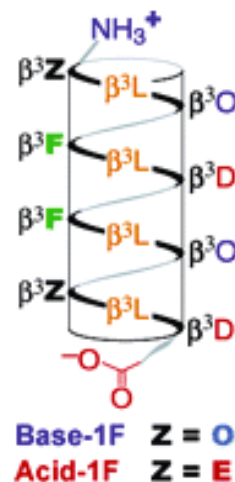


図1. 疎水面をもつ β -ペプチド (論文中より抜粋)。

すと、このペプチドが 14-Helix 構造を形成したときヘリックスの一面が疎水的になるように、 β^3 -homoleucine ($\beta^3\text{L}$) 4 残基と β^3 -homophenylalanine ($\beta^3\text{F}$) 2 残基が配置されています。また、その疎水面の 2 カ所 ($\beta^3\text{Z}$) にカチオン性残基 **O** (β^3 -homoomithine) をもつペプチド **Base-1F** と、逆にアニオン性残基 **E** (β^3 -homoglutamic acid) を有するペプチド **Acid-1F** の 2 種類が本論文で扱われています。すなわち、**Base-1F** と **Acid-1F** が疎水性相互作用および相補的な静電相互作用を介して、ヘテロダイマーを形成することを狙った配列設計です。実際に筆者らは、**Base-1F** と **Acid-1F** が相補的に会合することを CD、沈降平衡法から解析しました。CD からは 2 種類のペプチドを 1:1 で混合した場合のみ、ヘリシティが大きく増大することが示唆されました。また沈降平衡法では、両者を混合すると 6 量体か 8 量体が形成しているという実験結果が得られています。さらに疎水面の β^3 -homoleucine を β^3 -homoalanine に変えた変異体では同様の会合が観測されなかったことから、当初の設計通り疎水面を介して会合していることが示されました。ただ、何量体なのかということも含めて会合状態の詳細な構造情報は得られていません。また HPLC による disulfide exchange assay も検討していますが、結果を合理的に解釈することは困難であり、不明な点は多く残されていると言えます。とはいえ本論文は、 β -ペプチドから天然のタンパク質の様な精巧かつ機能的な構造を創ることができるかもしれないという、大きな可能性を示した点で興味深いと感じました。

Lytotropic liquid crystals from designed helical β -peptides

W. C. Pomerantz, N. L. Abbott, and S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 8730–8731.

2 報目は Samuel H. Gellman 教授らによる β -ペプチドの論文です。筆者らは 10 残基程度の β -ペプチドが、リトロピック液晶性(濃度変化によって現れる液晶状態)を示すことを見いだしました。

本研究の最終的な目的は、配列や長さを精密に設計できるペプチド鎖から液晶をつくることによって、ペプチドの構造と液晶性との相関を明らかにし、新たな液晶分子の設計指針を得ることです。しかし天然の α -ペプチドでは、液晶性を示すのは一般的に長いポリペプチド鎖であり、上記の相関を調べるには不適です。筆者らは、 α -ペプチドよりも安定なヘリカル構造を形成する β -ペプチドならば、配列設計が可能な短い鎖長でも液晶化すると考えました。

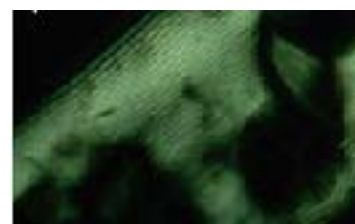
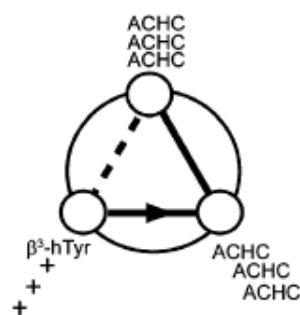


図 2 左 . 10 残基のペプチド鎖。+ はカチオン性残基。ACHC は環状アミノ酸残基 図 2 右 . 同ペプチド水溶液の顕微鏡写真 (論文中より抜粋)。

本論文で用いられたペプチドは、シクロヘキサン環型 β -アミノ酸が連結したオリゴマー (4 · 13 残基) であり、これまでの知見から安定なヘリカル構造を形成すると考えられます。配列設計の重要なポイントは、カチオン性残基を 3 残基ごとに配置した所で、図 2 左の様にヘリックスの一面が親水面になります。この両親媒性が液晶化のポイントです。例えばカチオン性残基の配置を変え

て両親媒性を解消したペプチド配列では、液晶性を全く示しませんでした。筆者らは様々な濃度における両親媒性 β -ペプチド水溶液の光学顕微鏡写真から、7残基のペプチドではネマチック液晶相（1軸性の配向をもつ凝集相）、10残基ではコレステリック液晶相（らせん構造を有するネマチック液晶相）を示すことを明らかとしました（図2右）。一方、より短い4残基のペプチドでは液晶性を示さず、より長い13残基ではゲル化したことから、配列の長さが液晶性に大きな影響を与えることが分かりました。ヘリカルなペプチド鎖の電荷と疎水性を設計することで、会合性を制御した点は1報目と非常に似ています。ならば本論文のペプチドも希薄溶液中ではディスクリートの会合構造を形成し、逆に1報目のペプチドも高濃度溶液では液晶性を示す可能性があるのかもかもしれません。

β -Peptidic secondary structures fortified and enforced by Zn^{2+} complexation – on the way to β -peptidic zinc fingers?

G. Lelais, D. Seebach, B. Jaun, R. I. Mathad, O. Flögel, F. Rossi, M. Campo, and A. Wortmann, *Helv. Chim. Acta*, **2006**, 89, 361–403.

亜鉛イオンによって、 β -ペプチドの2次構造を制御しようという論文を最後に紹介いたします。この論文の結果自体はまだ途中経過という印象ですが、 β -ペプチドから亜鉛フィンガーを作ろうという目的もさることながら、確かに実現できそうだと思うような洗練された β -ペプチドの配列設計が興味深き思い、紹介することにいたしました。

1報目の紹介論文と同様、 β -ペプチドからタンパク質のような高次構造を創ろうという観点から、金属イオンを用いた高次構造の安定化は必ずターゲットとされる課題です。金属イオンとの相互作用は、 α -ペプチドでさえ現在も活発に研究されている課題であり、まして β -ペプチドではそういった研究は筆者らの知る限りではありません。そこで筆者らは、亜鉛イオンの添加によってヘリカル構造やヘアピンといった2次構造から、天然の亜鉛フィンガーの様な β -ペプチド3次構造の安定化を試みています。

筆者らによれば、現在ではどんな β -アミノ酸をいかに並べるかによって、ヘリックスやヘアピンなどの2次構造形成をある程度設計することができます。すなわち、 β -アミノ酸に導入する置換基の位置（ β^2 位か β^3 位か）とそのキラリティー

によって、ヘリカルやターン、ヘアピン構造を作り分けることも可能です。配列の詳細は省きますが、筆者らは14-Helixを形成する10残基の配列や、ヘアピン構造を形成しうる配列を合成し、亜

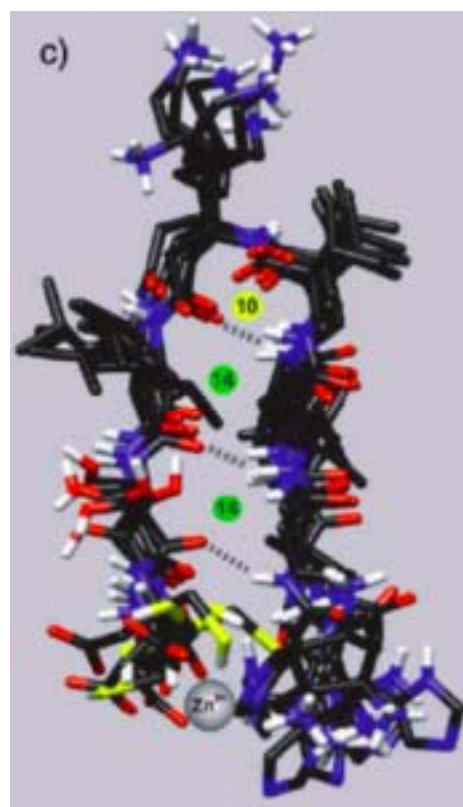


図3 NMRから解析されたヘアピン構造。亜鉛イオンの位置は仮想的（論文中より抜粋）。

鉛イオンの添加によるペプチド構造の変化を CD や NMR から追跡しました。その結果、適切な位置に存在する配位性残基の β^3 -homohistidine 2 残基が亜鉛イオンと錯体形成することで、ヘリックス構造、ヘアピン構造が安定化されたことが示唆されました(図3)。さらに上記の知見を生かし、より長いペプチド鎖から亜鉛フィンガーの様な3次構造の安定化も試みています。配位性残基を有するヘアピン部位とヘリックス部位を連結した16残基のペプチドを合成し同様の検討を行いました。現在のところ明瞭な結果は得られていないようです。



水上 進(みずかみ しん)
 大阪大学大学院工学研究科 助手
 smizukami@mls.eng.osaka-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、編集委員の先生方に深く感謝致します。現在、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 菊地研究室において、生体分子可視化プローブ、生体機能探索分子の開発研究に携わっています。今回の論文紹介では、近年注目を集め始めているタンパク質のラベル化に関する論文の中から、新しいラベル化法の開発について一報、タンパク質をラベル化してイメージングへ応用した例を二報紹介します。

Transglutaminase-catalyzed site-specific conjugation of small-molecule probes to proteins *in vitro* and on the surface of living cells

C. -W. Lin, and A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 4542-4543 (2006).

近年、GFP を始めとする蛍光タンパク質が多種報告されており、それらの機能改変体や他のタンパク質との融合タンパク質を用いて生体分子の生細胞レベルでの機能を調べる研究が多く行われています。このテクニックが急速に広がった背景には、蛍光タンパク質自身が遺伝子でコードされており、融合させる相手のタンパク質の種類や細胞内局在などを自由にデザインできることが挙げられます。通常、合成化合物にこのような機能を付与することは困難であることから、遺伝子で操作可能なタンパク質を合成化合物で部位選択的にラベル化する技術が求められています。本論文の著者である Ting (MIT) はこの分野で注目されている若手研究者で、ユニークなタンパク質ラベル化法を複数報告しています。本論文では、

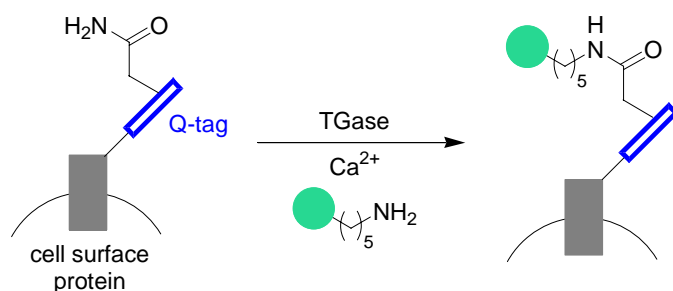


図1 . TGase を用いた細胞表面タンパク質 (Q-tag) のラベル化反応 .

transglutaminase (TGase) を用いた方法を報告しています。

TGase は 77 kDa の単量体タンパク質で生体内に幅広く存在しており、タンパク質中の Gln と Lys をアンモニアの脱離を伴って架橋する酵素です。基質特異性に関しては Gln 残基を含む側には高い特異性を示しますが、アミンに関しては Lys 以外にも多様なアミンを認識することが知られています。そこで彼らは、ラベル化したいタンパク質 (CFP: cyan fluorescent protein) の N 末端に Gln (Q) を含む基質ペプチド配列 (Q-tag) を融合させ細胞膜上に発現させた後、アミノ基を含む biotin 誘導体で TGase によるラベル化を行いました (図 1)。その後、蛍光色素 (Alexa 568) 修飾 streptavidin で処理を行った結果、CFP (水色蛍光) を発現している細胞のみ Alexa 568 (赤色蛍光) で細胞表面がラベル化されました。Q-tag の Gln を Ala に置換した場合、あるいは TGase を加えなかった場合は、ラベル化されませんでした。この手法の特長としては、ラベル化に必要な部位 (Q-tag) がアミノ酸残基と非常に小さいことが挙げられます。このことは目的タンパク質の機能をラベル化によって阻害しない為には重要なポイントと言えます。細胞内には内在性の TGase の基質が豊富に存在する為、現段階では細胞表面および *in vitro* のラベル化に限られてはいるものの、本手法は有用なラベル化法であると考えられます。

Metabolic biotinylation of cell surface receptors for *in vivo* imaging

B. A. Tannous, J. Grimm, K. F. Perry, J. W. Chen, R. Weissleder, and X. O. Breakefield, *Nat. Meth.*, **3**, 391-396 (2006).

二報目はマサチューセッツ総合病院の Weissleder らによる MRI に関する論文です。彼らは Ting らも以前に報告している biotin ligase によるラベル化法を用いています。biotin ligase は biotin acceptor peptide (BAP) と呼ばれるペプチド鎖中の Lys 残基に biotin を修飾する酵素です。一方、biotin は streptavidin と解離定数が 10^{-15} M 程度で非常に強く結合するので、あらかじめ streptavidin に機能性分子を修飾しておくことによって、目的タンパク質を機能性分子でラベル化することができます。著者らが BAP を細胞膜上に発現させたところ、biotin が細胞内の biotin ligase によって BAP に修飾され、細胞表面に提示されました (図 2)。さらに、BAP を細胞膜上に発現している癌細胞を持つマウスに、MRI プローブである磁気ナノ粒子 streptavidin 複合体を注射したところ、MRI プローブが癌細胞に集積し、細胞に結合したことを示唆する横緩和時間 (T₂) が短縮した MRI 画像が得られました。この論文のポイントは、外から酵素を加えなくても内在性の biotin ligase によって細胞膜上への biotin 提示が *in vivo* で起こせることを示したことであり、*in vivo* での遺伝子発現の可視化などへの応用が期待されます。

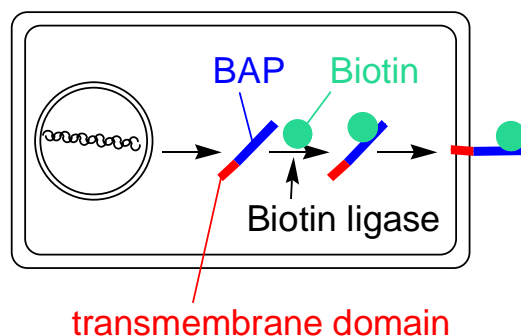


図 2 . ビオチンを細胞表面に発現させるスキーム .

Self-illuminating quantum dot conjugates for *in vivo* imaging

M. -K. So, C. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambir, and J. Rao, *Nat. Biotechnol.*, **24**, 339-343 (2006).

最後はスタンフォード大学の Rao らによる報告で、量子ドット (QD) の周りにウミシイタケ由来の luciferase を修飾し、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を *in vivo* で観察している論文です。用いた luciferase は酸素の存在下、基質である coelenterazine を分解し、それに伴い青色の発光を出します。この発光は短波長である為に組織透過性が悪く、*in vivo* イメージングには適していません。そこで著者らは luciferase 発光を吸収して 655 nm の光を放出する QD655 を luciferase に修飾し、BRET によって長波長の光を放出させることを計画しました。その結果、QD655 luciferase 複合体の発光スペクトルは BRET が高効率で起こっていることを示しており、長波長であることから血清中や血液中においても高感度で発光観察が可能でした。また、QD655 luciferase 複合体をマウスの皮下 3 mm の筋肉中に注射した場合でも、発光を捉えることが可能でした。

次に QD655 luciferase 複合体にポリアルギニン (R9) を修飾して細胞に取り込ませ、その細胞をマウスに注射したところ、ラベル化した細胞が肺に集まり発光する様子が観察されました。503-555 nm の励起波長で QD655 を光励起した場合は、短波長の励起光が組織によって吸収および散乱されて蛍光が全く観測されなかったことから、*in vivo* で QD を用いた BRET 発光を利用する有用性が示されました。本システムは QD の長波長の発光と励起光を必要としない生物発光の長所を組み合わせたものであり、*in vivo* イメージングにおける応用研究が期待されます。

また、本研究で著者らは QD と luciferase との連結は化学的なカップリング試薬を用いて行っていますが、その後の論文で HaloTag と呼ばれるラベル化合物を用いて両者を連結する方法も報告しています (*Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 4936-4940 (2006))。

以上、タンパク質のラベル化およびそれらの応用に関する論文を紹介させて頂きましたが、既存のラベル化法は一長一短であり、現状では理想のラベル化法は開発されておりません。特に細胞内でタンパク質を選択的にラベル化する手法が開発されれば、医学・生物学研究に大きなブレイクスルーを与えると期待されています。



柿本 真司 (かきもと しんじ)

大阪市立大学大学院工学研究科 後期博士課程 1 年

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

非ウイルス遺伝子キャリアーは、ウイルスキャリアーと比較して遺伝子発現効率が低いことが知られており、その問題点がいくつか指摘されております。その中でも、私は、細胞内への取り込み、エンドソームからの脱出の効率向上に焦点をあてて、現在研究を行っています。今回は、エンドソ

ーム脱出、および、その後の核までの輸送に関する論文を紹介したいと思います。

Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability

S. Hong, P. R. Leroueil, E. K. Janus, J. L. Peters, M. M. Kober, M. T. Islam, B. G. Orr, J. R. Baker Jr., and M. M. Banaszak Holl, *Bioconjug. Chem.*, **17**, 728-734 (2006).

本論文では、カチオン性ポリマーによる細胞膜におけるナノサイズのホール形成、膜透過能の向上について報告しています。カチオン性ポリマー (polyethylenimine (PEI), poly-L-lysine (PLL), diethylaminoethyl-dextran (DEAE-DEX)など)は、様々な遺伝子デリバリーシステムに利用されています。このようなカチオン性ポリマーによるナノサイズホールの形成については、基盤上に形成した脂質二重膜を用いて、AFMで観察しています。その結果、検討を行った PEI, PLL, DEAE-DEX すべてでナノサイズホールが確認されています。さらに、細胞膜に対しても、細胞内からの LDH (ラクトースデヒドロゲナーゼ)や LUC (ルシフェラーゼ)の漏洩量、または propidium iodide (PI), fluorescein diacetate (FDA)の細胞内外の比率を評価することでナノサイズホールの形成を確かめています。コントロールとして、poly(ethylene glycol), poly(vinyl alcohol)などの中性ポリマーではナノサイズホールは形成されず、*in vitro* でもホールの形成は確認できていません。このようなホール形成は、ポリマーのサイズにはほとんど影響を受けないが、カチオン密度には大きく影響を受けることが示されており、ポリマー形状の影響も可能性として挙げられています。

一般的にカチオン性ポリマーの細胞内への内在化は、膜表面のリン脂質や糖脂質への吸着、エンドサイトーシスによる取り込み、エンドソームからの脱出によって起こっていることが知られています。導入遺伝子との複合体でもエンドソームを介して取り込まれることが知られていますが、それが本当に遺伝子発現に寄与しているかは不明な点も多く残されています。遺伝子にもナノサイズホールを通過する取り込み経路が存在するのか？どのような経路で取り込まれた複合体が遺伝子発現に寄与しているのか？確認できたら面白いのではないかと思います。

Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH

A. M. Funhoff, C. F. van Nostrum, G. A. Koning, N. M. Schuurmans-Nieuwenbroek, D. J. Crommelin, and W. E. Hennink, *Biomacromol.*, **5**, 32-39 (2004).

本論文では、カチオン性ポリマーのプロトンスポンジ効果仮説に疑問を投げかけています。プロトンスポンジ効果とは、低 pH (pH 5~7)でバッファリング能を有したポリマーがエンドソーム内の pH 低下を抑制し、塩化物イオンを集積することで、エンドソームを膨張、破裂させる効果のことである。カチオン性ポリマーと導入遺伝子の複合体は、この効果によりエンドソームを脱出し、遺伝子は核に移行され、発現されると考えられています。本論文では、DNA との複合化のための高い pKa、プロトンスポンジ効果のための低い pKa を共に有する新規な pDAMA (polydiamine methacrylate)の評価を行っています。このポリマーと導入遺伝子との複合体は、その表面にエンドソーム膜を乱すことが知られている INF7 (エンドソーム膜を乱すことが知られているインフルエンザウィルス由来のペプチド)をまぶすことによりトランスフェクション効率が大きく向上しています。この結果から、pDAMA のトランスフェクション能が低い主要因はエンドソーム脱出効率で

あり、pDAMA ではプロトンスポンジ効果は認められていません。プロトンスポンジ効果に一般性があるかどうか疑問視される結果となっています。

Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic Tat and oligoarginine peptides

T. Shiraishi, S. Pankratova, and P. E. Nielsen, *Chem. Biol.*, **12**, 923-929 (2005).

本論文では、カルシウムイオンによるエンドソーム脱出効果について報告しています。カルシウムイオンを mM の濃度で添加した時、ペプチド核酸 (PNA) のアンチセンス効果の向上が確認されています。この効果は、ただの PNA だけでなく、オリゴアルギニン修飾 PNA や Tat 修飾 PNA でも確認されています。著者らは、このカルシウムイオンによるアンチセンス効果向上のメカニズムを解析した結果、カルシウムイオンの添加により、PNA の細胞内局在の変化や細胞膜との相互作用の増加が確認でき、さらにエンドソーム脱出の促進が確認されています。PNA のアンチセンス効果は、クロロキン (~120 μ M) の添加によっても向上し、カルシウムイオンと同等の効果を示しています。エンドソームからの脱出については、共焦点蛍光顕微鏡により、FITC-デキストランや FITC-トランスフェリンの局在を比較することで検討を行っています。その結果、カルシウムイオンの添加により、FITC-デキストランは細胞質への拡散が確認でき、カルシウムイオンのエンドソーム脱出誘導への関与を支持しています。

カルシウムイオンは、生体中では μ M の濃度で存在していますが、エンドソーム脱出効果を得るにはさらに高い濃度が必要となります。そのため、*in vivo* への適用は難しいと考えられますが、遺伝子デリバリーなどの過去のどのような手法にも適用可能であると締めくくっています。FITC-デキストランを用いたエンドソーム脱出の評価はきれいに示されており、エンドソーム脱出を評価するのに大変有用なのではないかと思えます。

Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules

E. E. Vaughan and D. A. Dean, *Mol. Ther.*, **13**, 422-428 (2006).

リポソームを用いた遺伝子デリバリー法では、エンドソーム脱出後、フリーのプラスミド DNA が細胞質に放出されると考えられています。エレクトロポレーション法でも、まず細胞質にプラスミド DNA が運ばれます。しかし、細胞質では、サイズの大きいプラスミド DNA は単純拡散できないと考えられます。にもかかわらず、プラスミド DNA は核まで到達し、発現が見られます。本論文では、プラスミド DNA の細胞質内での輸送が、微小管、ダイニンによって引き起こされることを報告しています。著者らは、エレクトロポレーションやマイクロインジェクションによりプラスミド DNA を細胞質内に打ち込み、微小管の重合安定化剤、阻害剤存在下での遺伝子発現効率を比較しています。その結果、微小管安定化による遺伝子発現効率の向上、不安定化による低下が確認され、細胞質でのプラスミド DNA の輸送への微小管の関与を示しています。蛍光顕微鏡の観察によっても、微小管不安定化によりプラスミド DNA の核への輸送の阻害が確認されています。さらに、プラスミド DNA の微小管への結合には、ダイニンなど他の因子が寄与していることもスピンドウンアッセイにより確かめられています。

過去に、細胞質では 2000 bp 以上のプラスミド DNA は単純拡散できないことが報告されています (*J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 7823-7828)。しかし、プラスミド DNA の細胞質内での輸送はまだ理解

しきれておらず、さらにプラスミド DNA とキャリアーの複合体についての理解はより不明点が残されています。このような細胞質内での挙動についての研究は、これからの効率的な遺伝子デリバリー技術の開発には必要不可欠な情報をもたらすのではないかと思います。



生命化学研究法

ファージディスプレイ法を用いたセレクション ～ 標的分子に結合する生体分子の作製～

京都大学エネルギー理工学研究所 福田将虎、杉本健二、森井 孝

生体内で行われている重要な分子間の相互作用（抗原・抗体、受容体・ホルモン、酵素・基質）は優れた分子認識能を持つ分子が担っており、それらの相互作用を解明し、人工的に作製することで様々な分野で応用することができる。標的物質に対して特異的に結合する（認識する）ペプチドまたはタンパク質を選択する方法論の一つとしてファージディスプレイを利用したセレクションが挙げられる。

ファージディスプレイは1985年にG. Smithが繊維状ファージの生活環（図1）を利用し、そのファージ表面にランダムペプチドを提示することができることを報告した¹のが始まりである。その後現在までに目的の機能を有するポリペプチドを単離する方法として発展し、有用な生理活性ペプチド^{2,3}や新規な機能を持ったタンパク質の創生^{4,5,6}、抗体の作製^{7,8}など様々な分野で応用されている。

ファージとは大腸菌に感染するウィルスのことであり、繊維状ファージ M13 は環状の一本鎖ゲノム DNA をもち、その DNA を数種類のコートタンパク質（g3p、g6p、g7p、g8p、g9p）が包み込んだ形態をしている。ファージディスプレイは、このコートタンパク質に外来ポリペプチドまたはタンパク質を融合させた形で発現させることにより、ファージ表面にそれらをディスプレイさせる方法である。

標的物質に特異的に結合するペプチドを得るためのファージディスプレイ法を用いたセレクションについて述べる（図2）。ファージディスプレ

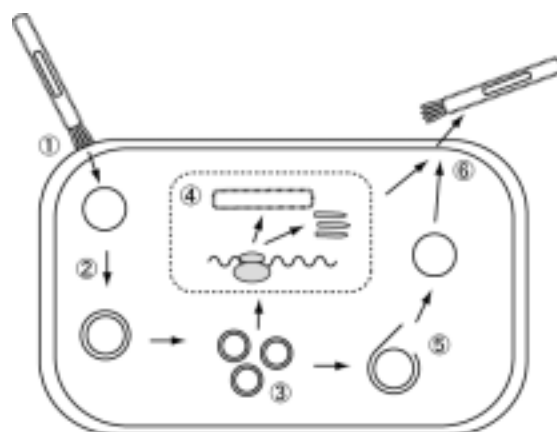


図1 繊維状ファージの生活環

①ファージが宿主大腸菌に感染。②注入された一本鎖ゲノム DNA を鋳型にして、二本鎖 DNA が合成される。③合成された二本鎖 DNA が複製される。④コートタンパク質が合成されると同時に⑤子孫ゲノム DNA が複製される。⑥コートタンパク質、一本鎖 DNA が集積し、成熟したファージとなり放出される。

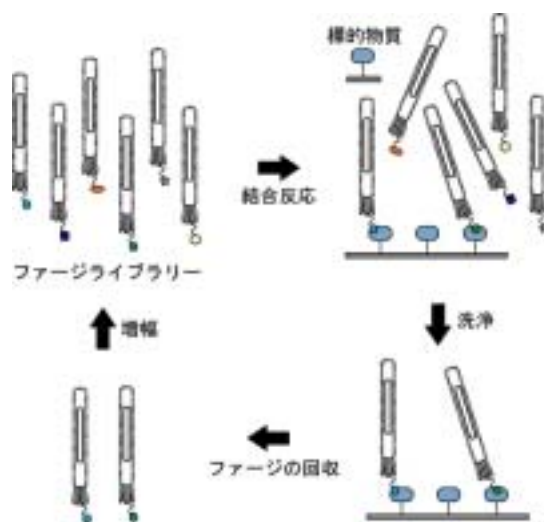


図2 ファージディスプレイ法を利用したセレクション

イ法を利用して目的ポリペプチドをスクリーニングする方法は、標的物質を担体に固定化し、ファージライブラリー溶液を加え結合反応を行った後、非特異的に結合したファージを洗浄操作により除去し、標的分子に結合したファージを回収する方法で行われる。この行程は鍋にすくった砂利の中から砂金を取り出すことをパンニングということからバイオパンニングとも呼ばれている。その後、回収したファージを宿主大腸菌に感染させ、ファージを増幅することにより再びファージライブラリーが作製される。この一連の操作を繰り返すことによって、標的物質に親和性をもつファージを選択することができる。

ファージライブラリーの作製

ファージライブラリーはファージのコートタンパク質をコードしている遺伝子に外来遺伝子を挿入することにより作製できる。ランダムな合成 DNA や抗体遺伝子、cDNA などが外来遺伝子としてファージミドベクター（繊維状ファージを大腸菌内で作らせるためのベクター）にライゲーション反応により組み込むことでファージミドライブラリーが作製される。このファージミドベクターを宿主大腸菌に形質転換し、その大腸菌を培養することでファージが増殖し様々なペプチドを提示したファージライブラリーを得ることができる。大きなサイズのファージライブラリーを作製する場合は多様性を失わないよう、ライゲーション反応や形質転換反応に注意を払う必要がある。現在では試薬メーカーから様々なファージライブラリーが市販されている。

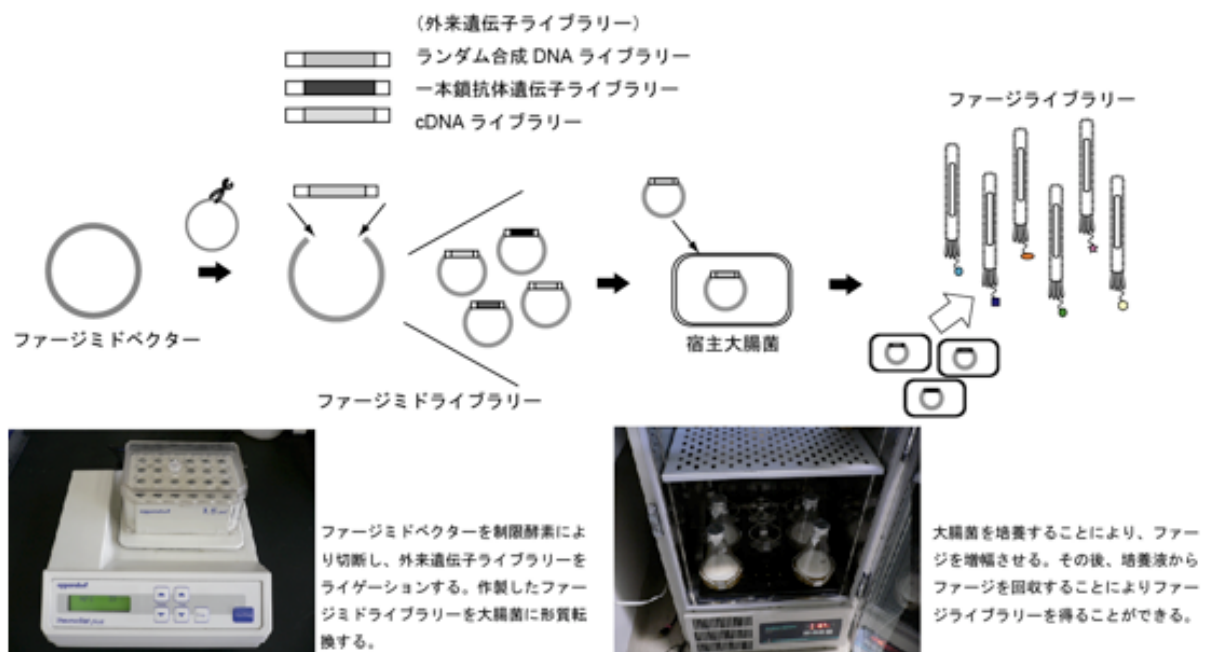


図3 ファージライブラリーの作製方法

ターゲット分子の準備

標的分子は様々な方法で単体に固定化することができる。標的分子を担体に共有結合で固定化する方法、ポリスチレンなどの担体に標的タンパク質を疎水吸着させる方法や、担体に固定化したストレプトアビジンにビオチン化した標的分子をビオチン・ストレプトアビジン相互作用を利用して固定化させる方法などがある。最近では吸着容量が大きく、分離が容易である磁性ビー

ズがよく用いられている。どの固定化方法でもファージの非特異的な吸着が少ない担体を選択することが、特異的に標的分子と結合したファージを選択してくる上で非常に重要である。

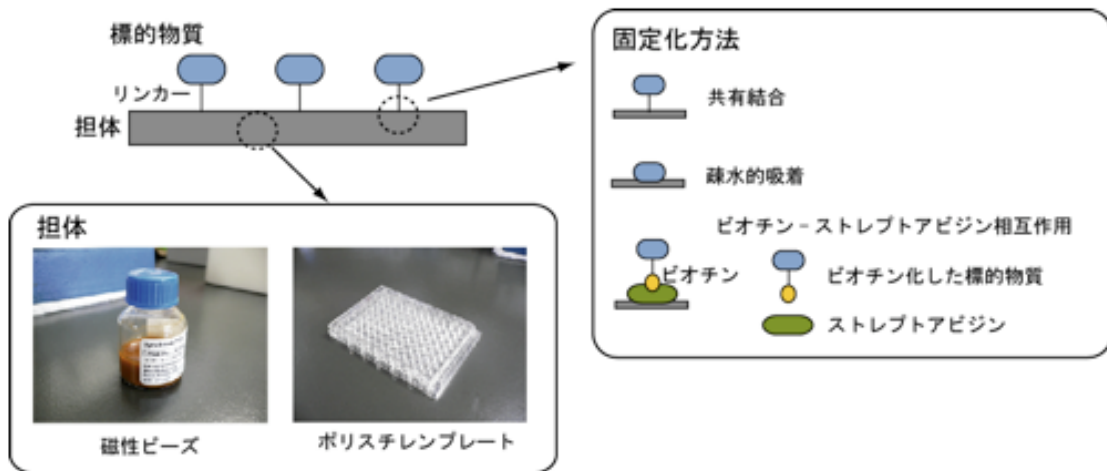


図4 スクリーニングに用いる担体に固定化された標的物質

セレクション (バイオパンニング)

ファージライブラリーを用いたセレクションは標的分子を固定化した担体にファージ溶液を加え提示しているペプチドと標的物質の結合反応を行うことにより、標的分子に対して親和性のあるファージを選択する。得られるファージの標的分子に対する親和性は結合反応時の標的分子の濃度で調節することができ、親和性の高いファージを得るためには標的分子の濃度を下げ、逆に親和性の低いファージを得るためには標的分子の濃度を上げればよい。また、ファージが提示しているペプチドまたはタンパク質の数を制御することによって、標的分子に対する親和性をコントロールすることもできる。実際は標的分子にファージ溶液を加え適当な時間インキュベートした後、非特異的に結合したファージの洗浄を行なうが、この際、特異的に結合したファージの選択が効率よく行われるかはこの洗浄操作にかかっており、どれだけ特異的に結合したファージが解離しない条件で非特異的に結合したファージを除けるかが重要である。洗浄後の特異的に結合したファージの回収は、

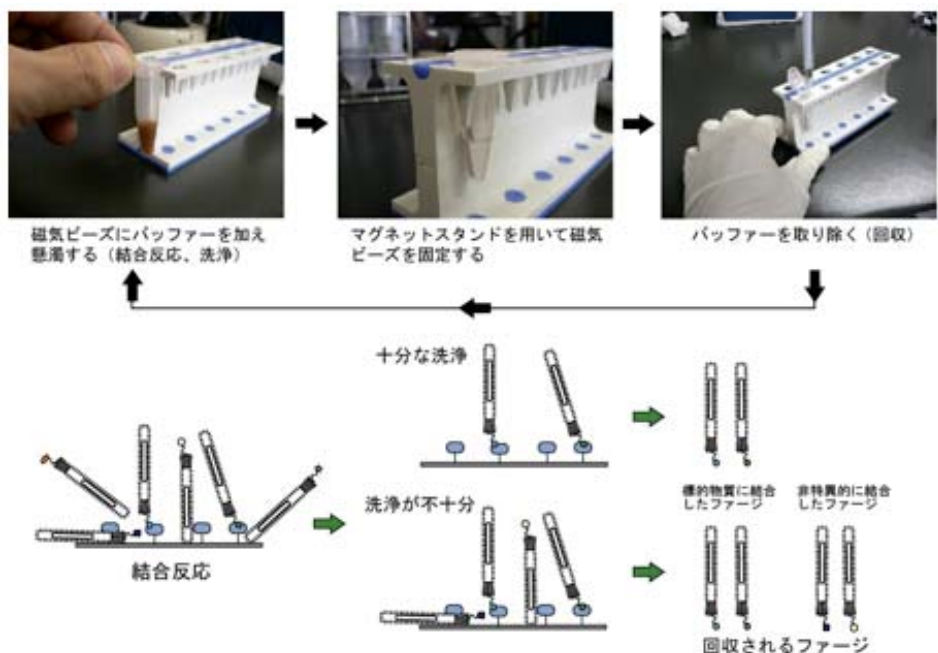


図5 ファージディスプレイ法を用いたセレクションの方法

標的分子を溶液中に存在させることにより担体に固定化された標的分子に結合しているファージとの交換反応を利用した特異的溶出や、結合したファージを酸やアルカリを加え変性させることにより回収する方法などがある。回収したファージは大腸菌に感染させることにより増幅させ、次のサイクルのプールとする。

ファージのタイター測定

タイター測定と呼ばれる方法により溶液中のファージの数を測定することができる。ファージ溶液をある程度希釈し、大腸菌に感染させる。その大腸菌をプレートに塗布し培養すると、ファージが感染した大腸菌は感染していない大腸菌に比べ成長速度が遅くなることにより、プレート上にプラークと呼ばれる斑点が形成される。このプラークを数えることにより溶液中に存在するファージの数を測定できる。単一ファージを得るためにはこのプラークをピックアップすると良い。また、結合反応溶液のタイターと溶出液のタイターを測定することにより、ファージの結合割合を算出することもできる。

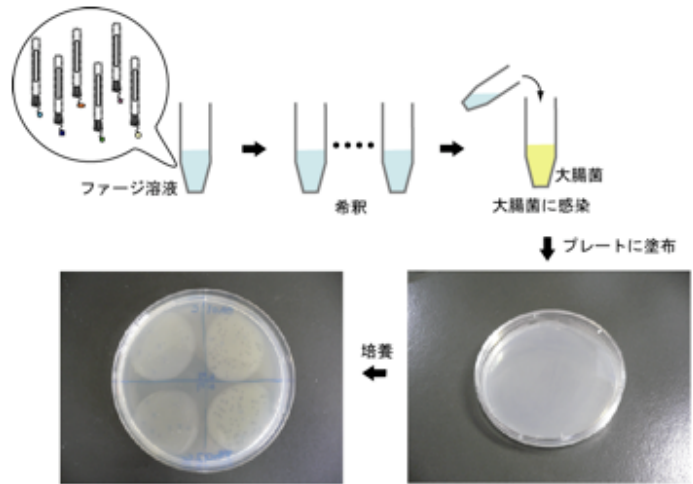


図6 ファージのタイター測定

ディスプレイされているペプチドの配列確認

スクリーニングで選択されたファージが提示しているペプチドは、そのファージのゲノムDNAを解析することにより同定することができる。プレート上に形成したプラークからPCRにより外来遺伝子の挿入されている領域を増幅し、それをテンプレートとし BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems 社)を用いて蛍光標識されたDNAフラグメントを作製する。このフラグメントを ABI PRISM 377 DNA Sequencing System (Applied Biosystems 社)により解析を行うことで、ファージが提示しているペプチド配列を同定することができる。

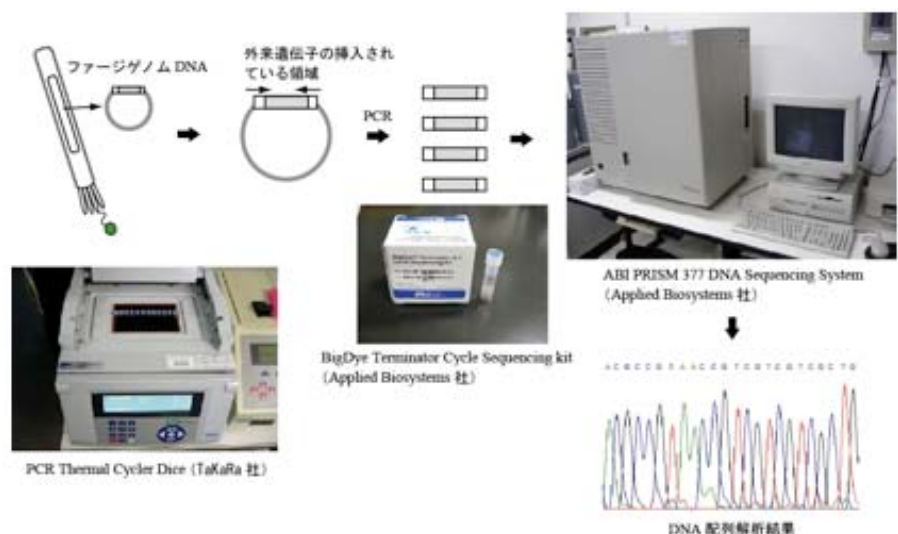


図7 ディスプレイされているペプチドの配列確認

例として市販されている New England Biolabs 社のファージライブラリー (ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit) を用いて、ストレプトアビジンに対してセレクションを行った結果について示す⁹。3 サイクルのスクリーニング後、ストレプトアビジンに対して結合するエピトープ配列 (HPQ) を得ることができる¹⁰。



ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit

ファージが提示しているペプチド (上段: DNA配列, 下段: アミノ酸配列)
 GCCTGT MNK MNK MNK MNK MNK MNK MNK TCGGTGGAGGTTGCG...gIII
 A C X X X X X X X X C G G G S ...pIII

ストレプトアビジンに対するセレクションにより得られた配列 (3サイクル後)

01.	GGT	ACT	TTT	TCT	CAT	CCT	CAG
	G	T	F	S	H	P	Q
02.	GGT	TCG	TGG	TAT	CAT	CCT	CAG
	G	S	W	Y	H	P	Q
03.	GGT	CAG	TTT	GAT	CAT	CCT	CAG
	G	Q	F	D	H	P	Q
04.	GGT	CAG	TAT	AGT	CAT	CCG	CAG
	G	Q	Y	S	H	P	Q
05.	GGT	ACG	TTT	TCG	CAT	CCT	CAG
	G	T	F	S	H	P	Q
06.	GGT	ATG	TGG	AAT	CAT	CCT	CAG
	G	M	W	N	H	P	Q
07.	GGT	ATG	TGG	AAT	CAT	CCT	CAG
	G	M	W	N	H	P	Q
08.	GGT	AAG	TGG	GAT	CAT	CCG	CAG
	G	K	W	D	H	P	Q
09.	GGG	AAT	TAT	AAT	CAT	CCG	CAG
	G	N	Y	N	H	P	Q
10.	GGT	TCG	TGG	TAT	CAT	CCT	CAG
	G	S	W	Y	H	P	Q
11.	GGT	ATG	TGG	TCT	CAT	CCT	CAG
	G	M	W	S	H	P	Q
	G	X	S/Y/W	S/H	H	P	Q

ランダムな配列 AC XXXXXX COGGG...pIII
 ↓ ストレプトアビジンに対して選択
 AC GXFSHPQ COGGG...pIII
 YH
 W

図8 ストレプトアビジンに対して行ったセレクションの結果

ファージディスプレイ法を用いたセレクションの応用

本研究室では RNA とペプチドの複合体 (RNP) を用いて、RNA、ペプチドそれぞれのサブユニットにライブラリーを導入しセレクションを行うことにより RNP リセプターを段階的に機能化する方法論を開発した^{11, 12}。本方法論ではまずライブラリー化した RNA サブユニットと Rev ペプチドの複合体を用いて *In vitro* セレクション法により ATP 結合性 RNP リセプターを作製した¹¹。その後ファージディスプレイ法を用いて RNA との複合体形成領域 (Rev ペプチド) とその N 末端にシステインに挟まれたランダムな 7 アミノ酸残基から形成されるランダムループペプチドを提示させることによりペプチドサブユニットのライブラリー化を行った。そのファージ Rev ペプチドライブラリーと ATP 結合性 RNP の RNA サブユニットとの複合体を用いてセレクシ

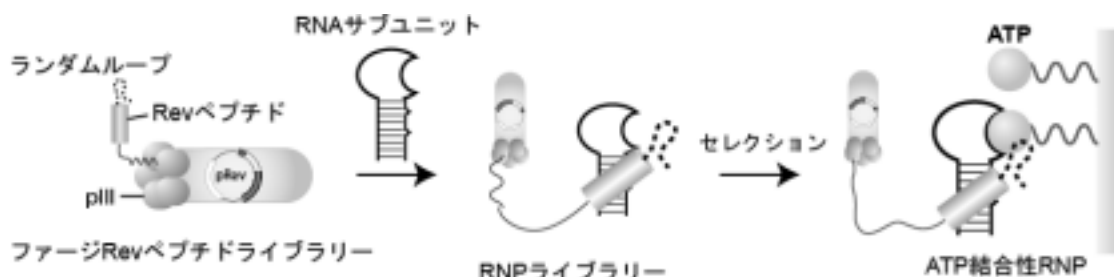


図9 ファージディスプレイ法を用いた RNP リセプターの高機能化方法

ンを行った結果、得られたループ Rev ペプチドは ATP に対する親和性、選択性をさらに向上させる機能を有していた¹²。このようにファージディスプレイ法を用いたセレクションはファージライブラリー単体だけではなく、複合体としてもセレクションが可能である。

参考文献

- 1) G. P. Smith, *Science*, **228**, 1315 (1985).
- 2) A. E. Nixon, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **3**, 1 (2002).
- 3) S. Schlehuber, G. Beste, A. Skerra, *J. Mol. Biol.*, **297**, 1105 (2000).
- 4) J. D. Marks, H. R. Hoogenboon, T. P. Bonnert *et al.* *J. Mol. Biol.*, **222**, 581 (1991).
- 5) S. Demartis, A. Huber, F. Viti, L. Lozzi, L. Giovannoni, P. Neri, G. Winter, D. Neri, *J. Mol. Biol.*, **286**, 617 (1999).
- 6) H. Pedersen, S. Holder, D.P. Sutherlin, U. Schwitter, D. S. King, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 10523 (1998).
- 7) P. Forrer, S. Jung, A. Pluckthun, *Curr. Opin Struct. Biol.*, **9**, 514 (1999).
- 8) J. Sharon, M.A. Liebman, B. R. Williams, *J. Cell. Biochem.* **96**, 305 (2005).
- 9) ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit Instruction Manual, NEW ENGLAND BioLabs Inc.
- 10) J. J. Devlin, L. C. Panganiban, P. E. Devlin, *Science*, **249**, 404 (1990).
- 11) T. Morii, M. Hagihara, S. Sato, K. Makino, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4617 (2000).
- 12) S. Sato, M. Fukuda, M. Hagihara, K. Ohkubo, T. Morii, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 30 (2005).





カリフォルニア大学サンフランシスコ校 留学体験記

京都大学化学研究所 今西 未来

現在、京都大学化学研究所生体機能設計化学研究部門(二木史朗教授)で助手をしております今西未来と申します。博士課程終了後すぐの2002年4月から2003年6月までの1年3ヶ月間、米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校 Ronald D. Vale 研究室へ留学していました。帰国してから、はや3年がたっしまい、懐かしい話になってしまうのですが、このような機会をいただきましたので、紹介させていただきます。
留学先決定まで



移転前に過ごした Parnassus キャンパス(丘の上に見えるビル…といっても、手前の道路から1ブロックしか離れておらず、すごい坂を登らないといけなない)。閑静な住宅地に病院と研究施設、図書館、ジムなどがありました。スーパー、レストランもたくさんあり、私はこの近くに住んでいました。



2003年3月にラボが Mission Bay 新キャンパスに移転。海沿いの埋め立て地で、ダウンタウンが一望。でも周りは未開拓地でした。当時はこの建物しかなかったのですが、現在は研究棟も増え、基礎研究のほとんどが移転しています。Parnassus キャンパスとのシャトルバスが朝6時から深夜0時まで頻繁にあり便利でした。

大学院時代は京都大学化学研究所の杉浦幸雄教授のもとで、DNA 結合タンパク質である亜鉛フィンガータンパク質と DNA との相互作用に関する研究を行っていました。新しい手法を使って分子間の相互作用を追えないかということに興味があり、一分子可視化法に惹かれていました。日本が中心となって展開されてきた技術なので、海外留学をするかどうか迷いはあったのですが、行ける時期に様々な体験をしておきたいという単純な気持ちから留学を考えました。メールを数通出したところ、UCSFの Ron Vale 教授から面接に来てほしいという連絡があり、初めての英語発表に大きな不安をかかえつつ、面接に出向きました。研究分野も異なり、全くの初対面だったのですが、びっくりと同時にほっとしたのが、何と Vale 教授が日本語をしゃべれる！ということでした。日本でも研究されていたことがあり、「Shoujin-ryori wa suki desuka?」などと聞かれ、精進料理を食べたことのない私よりもずっと日本通でした。また日本人ポスドクが一人いらっしや、色々サポートして下さいました。面接訪問では、約一時間の発表と、二日にわたるラボ全員とのディスカッションをしました。それを通じて、ボスをはじめ、ラボのメンバーの親しみやすい人柄や、サイエンスに対する熱意を直接感じることができ、ここに留学できたらいいなと強く思いました。また、サンフランシスコの町の雰囲気も大変気に入りました。実際に留学が決まり、ラボに対しても、治安など生活環境に対しても、ほとん

ど不安なく渡米できたのは、面接訪問があったからだと思います。

カリフォルニア大学サンフランシスコ校 Ron Vale 研究室

Ron が分子モータータンパク質キネシンの発見者であり、細胞生物学の分野では知らない人はいないというほどの人物であるということは、恥ずかしながら、入ってから知りました。ラボの構成は、ポスドク 11 名、大学院生 3 名、顕微鏡とコンピューターの専門家、ラボマネージャー、秘書各 1 名で、約半数がアメリカ人、次いで多いのが日本人 3 人でした。女性ポスドクが 6 名もいました。ポスドクのバックグラウンドは、細胞生物学、生物物理学、構造生物学と様々でした。



筆者の送別会にて Vale lab メンバーと
(Vale 教授は前列右端のサングラス姿)



ラボの風景
ベンチやいすの高さが高い!



全反射顕微鏡
各自の条件に合うようにセットして使用していましたが、動くかどうか、どきどきしながら、一分子運動を観察していました。

研究内容は、微小管上で小胞輸送に関わる分子モータータンパク質、キネシンやダイニンの細胞内における役割解明から、一分子レベルでの運動メカニズムの解明まで、微小管トラフィックおよび細胞骨格形成に関する幅広い研究が行われていました¹。研究テーマは、ボスと相談して決まりますが、進め方などは個人に任せられ、自主性が重んじられています。しかし毎週一回、ボスの部屋に集まり、希望者が進行状況から実験条件など細かいことまで何でもみんなと気楽に意見交換できる時間がありました。ラボミーティングは週一回、アクチン骨格を研究している隣の Mullins lab と一緒に行っており、4、5ヶ月に一回の割合でまわってきました。前回の発表者がみんなの食べ物、飲み物を用意するという面白いルールがありました。食べながら聞くというスタイルに慣れるのには時間がかかりましたが、また自分の発表の時に、discussion が盛り上がり、発言しようと考えている間に勝手に話題が発展して取り残されてしまう…という困った状況は、慣れる前に帰国してしまい、克服できませんでした…。

実際の研究は、キネシンの運動メカニズムに関するものでした。機器の使い

方などは、ラボのメンバーから手取り足取り教えてもらいましたが、当初目的としていたサンプル調製が難しく、年明けから、サブテーマを始めました。UC Davis 校で *C. elegans* の繊毛内輸送にとって重要なキネシンの研究が *in vivo* で進められており、その *in vitro* 解析でした。すでに、キネシンファミリーの運動に関しては多くの報告があり、定石通り始めたのですが、進めていくうちに意外と面白い挙動が謎解きのように明らかになってきました。しかしその間に、



Vale 教授と

全く予想外に出身研究室への帰国が決まり、あっという間に帰国の日がきてしまいました。幸い、Ron、帰国先の杉浦先生、二木先生のご理解をいただき、また Vale lab の大学院生にも協力してもらい、帰国後も共同研究を進めさせてもらいました。メールでの密度の濃いディスカッションを何度も繰り返し、つい最近 publish されました²。一分子を見ながらも、微小管輸送に関する深い洞察に基づいたディスカッションを通じ、留学中以上に、Ron の研究対象に対する幅広く柔軟かつ冷静な姿勢を感じ取りました。続けさせてもらったことに、感謝しています。

サンフランシスコ生活など

これから留学を考えておられる方の中には、生活環境に不安を抱かれる方も多いかと思いますが、サンフランシスコはおすすめです。一年中涼しく(肌寒く?)、名物の霧を除いては快適です。また、町が都会すぎず田舎すぎず、ちょうど京都のような感じで、どこへ行くにもバスか徒歩で十分です。ジャパントウンには、日本のスーパーや紀伊国屋があり、また家の近くにも中国系のお店が多く、食材には困りませんでした。レストランもアジア料理を中心に各国料理が徒歩圏内にそろっており、外食も楽しみの一つでした。また、日本人の美容室が多いのも助かりました(一度だけ、アメリカ人ポスドクの友人に勧められて挑戦してみたのですが、文化の違いを実感する体験でした!)。それに、夜も女性一人で歩けます。唯一の欠点は、家賃が高いこと(studio で月 \$1000 くらい)でしょうか。UCSF 内においては、優秀な日本人の方がたくさん留学しておられ、分野を超えて親しくなれるのも、貴重な環境でした。

最後に、Vale 教授とラボのメンバー、家族のように接してくれた大家さんに感謝します。また、留学体験記執筆の機会を与えて下さいました、編集委員の先生方に御礼申し上げます。

- 1) Vale, R. D. "The molecular motor toolbox for intracellular transport" *Cell*, **112**, 467-480 (2003).
- 2) Imanishi, M., Endres, N. F., Gennerich, A., and Vale, R. D. "Autoinhibition regulates the motility of the *C. elegans* intraflagellar transport motor OSM-3" *J. Cell. Biol.*, **174**, 931-937 (2006).

シンポジウム等会告



お茶の水女子大学糖鎖科学研究教育センター 特別シンポジウム 「分子と認識の生命ドラマ」

分子と分子が織りなす生命ドラマを、様々な立場からとらえます。

研究者、大学院生、大学生、一般の方(含む高校生)にも分かりやすい講演内容ですので、お気軽にご参加ください。
講演者と歓談できる茶話会も予定しております。(なるべく事前にお申込ください)

日 時: 平成18年10月30日(月) 13:30 - 17:10

講演会場: お茶の水女子大学 講堂(徽音堂)

参加費: 無料

***** プ ロ グ ラ ム *****

13:30 開催あいさつ 郷 通子 お茶の水女子大学学長

講演

13:35 小川温子 お茶の水女子大教授・糖鎖科学研究教育センター長

糖鎖生化学・糖鎖暗号の発掘と解析 お茶の水女子大院修了

「糖鎖 - 昨日のやっかい者は明日の星」

14:10- 加藤晃一 名古屋市立大学教授・お茶の水女子大学客員教授

構造生物学・NMRによる糖鎖の立体構造解析第一人者

「タンパク質社会における糖鎖の役割」

14:45- 高橋禮子 お茶の水女子大学客員教授・名古屋市立大学客員教授

糖鎖構造解析・日本を代表する女性科学者 東京女高師昭和23(理科)卒

「私のたどった糖鎖構造解析法30年の道程」

** 休憩 **

15:30- 棚谷綾 お茶の水女子大学助教授
医薬化学・戦略的創造研究推進事業さきがけ「構造制御と機能」領域に採択
「核内受容体の機能制御と医薬リード創製」

16:00- 西村紳一郎 北海道大学教授
生物有機化学・世界初の糖鎖自動合成装置を開発
「糖鎖研究から未来創薬へ」

16:35- 板井昭子 (株) 医薬分子設計研究所社長
分子設計学・コンピュータによる新薬開発ベンチャーを創業
「分子認識から論理的創薬へ」

17:15-18:15 茶話会 (本館会議室)

お申込み・お問合せ: お茶の水女子大学(広報渉外課) TEL 03-5978-5105 FAX 03-5978-5545
e-mail: info@cc.ocha.ac.jp 東京都文京区大塚 2-1-1 (112-8610) <http://www.ocha.ac.jp>
アクセス 東京メトロ丸ノ内線「茗荷谷」徒歩7分または有楽町線「護国寺」徒歩8分。



第 14 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会

1. 主催：化学とマイクロ・ナノシステム研究会
2. 会期：平成 18 年 11 月 5 日（日）
3. 会場：東京国際フォーラム
4. 内容とプログラム

今回は、microTAS2006 にあわせて、microTAS の歴史と今回の国際会議の特徴について基調講演を行って頂いた後に、microTAS でポスター発表される若手研究者のなかから、優れた発表を実行委員会が選考し、日本語での依頼講演をお願いしました（今回は一般発表は実施しません）。microTAS2006 の初日に、今年の国際会議の概要を把握する上でこの上ない機会となっております。多数の参加をお願い致します。

11 月 5 日（日）

10:00 受付開始

10:25-10:30 開会の挨拶

10:30-11:00 基調講演 1 庄子習一（早稲田大学）

microTAS 国際会議の歴史と今後の課題

11:00-11:30 基調講演 2 北森武彦（東大院工）

microTAS2006 の内容と特徴

11:30-13:00 昼食

13:00-16:40 依頼講演

1. 斉藤真人 北陸先端科学技術大学院大学
ピンセット型プローブを用いた単一染色体/細胞マニピュレーションと微量 PCR による DNA 検出
2. 佐藤記一 東京大学農学生命科学研究科
マイクロ人工授精チップの開発
3. 安田隆 九州工業大学大学院生命体工学研究科
ナノホールを通じた培養神経細胞の化学的刺激計測
4. 丸尾昭二 横浜国立大学院工学研究院
2光子マイクロ光造形による P D M S 構造体の形成とバイオチップ応用
5. 鈴木宏明 東京大学生産技術研究所
人工脂質膜マイクロチャンバーを用いた生体膜輸送計測システム
6. 服部明彦 日本板硝子株式会社
マイクロ化学チップ用モバイル型検出器の開発
7. 久本秀明 兵庫県立大学大学院物質理学研究科
キャピラリー・アセンブルド・マイクロチップ：医療診断・創薬支援を指向した多機能集積マイクロチップ開発に向けて

8. 木下晴之 東京大学生産技術研究所
共焦点マイクロ PIV の開発とそれを用いた液滴内部流動の 3 次元計測
9. 栗田僚二 産業技術総合研究所
ナノ表面を用いたバイオセンシング技術の開発
10. 梶弘和 東北大学工学研究科
電気化学バイオリソグラフィによる界面分子制御

- 16:40-17:00 特別講演：Lab on a Chip のオフィシャルジャーナル化
Harp Minhas (Editorial Manager of Lab on a Chip, Royal Society of Chemistry)
- 17:00-17:10 閉会挨拶
- 18:00-20:00 Cheminas & microTAS 合同 Banquet

5. 申し込み方法

化学とマイクロ・ナノシステム研究会ホームページより申し込んでください。

<http://www.apchem.nagoya-u.ac.jp/III-2/baba-ken/CHEMINAS/>

6. 実行委員

委員長：馬場嘉信（名大院工）

委員：丸尾昭二（横浜国大）、渡慶次学（名大院工）、小穴英廣（東大院工）

竹内昌治（東大生研）、加地範匡（名大院工）

7. 問い合わせ先：第 14 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会実行委員会

〒464-8603 名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院工学研究科

化学・生物工学専攻 馬場教授室 TEL: 052-789-4666 FAX: 052-789-4666



国際シンポジウム

UT Symposium on NanoBio Integration / NANOBIO-TOKYO 2006

- ・ 主催: 東京大学ナノバイオ・インテグレーション拠点
- ・ 開催日: 2006年12月4日(月) - 12月7日(木)
- ・ 場所: 東京大学本郷キャンパス (安田講堂・小柴ホール)
- ・ 講演: プレナリーをはじめ招待講演 45件、公募によるポスター164件発表
- ・ 会議参加費: 無料
- ・ リサーチミキサー(懇談会)参加費: 一般 1万円、学生 5千円

本拠点で生み出される新しい「ナノバイオ・インテグレーション」の成果を広く国内外に発信し、グローバルなスケールでナノバイオ分野に関する議論を深め、さまざまな地域の方々との情報交換するために、国際シンポジウムを開催します。専門分野、地域、産、学、官など分野の異なる研究者が集い、ナノバイオ研究の進むべき方向について話し合います。(1)バイオインスパイアード・ナノマシン、(2)ナノバイオセンシング、(3)セル・セラピー、(4)各国のナノバイオ研究拠点紹介と国際連携・共同研究の観点から、45名の第一線でご活躍の招待講演者と拠点メンバーにより最先端の研究を紹介していただくとともに、ポスター発表を一般から公募し、本拠点の全研究者によるポスター発表と合わせて、対話形式でより深い議論を行います。

また、本シンポジウムでは国際連携のセッションを設け、日、米、欧、アジアの各地域におけるナノバイオ研究の取り組みについて紹介していただき、国際的共同研究の進め方について議論を行います。

最先端の研究成果に触れ、世界の動きを実感できる場とすると同時に、ナノバイオ融合分野における研究者間の世界規模の人的ネットワークの構築を図ります。

皆様ふるってご参加いただきますよう、よろしくお願い申し上げます。

国際シンポジウム URL: <http://www.sntt.or.jp/nanobio/>

Invited Speakers (45名) アルファベット順

*: Plenary Speakers (7名) 2006.09.26 時点

(alphabetical order)

*Masuo Aizawa (Tokyo Inst. Tech., Japan)

Kazunari Akiyoshi (Tokyo Medical and Dental Univ., Japan)

Fu-Hsiung Chang (National Taiwan Univ., Rep. of China)

Yoshinobu Baba (Nagoya Univ., AIST, Japan)

Dennis E. Discher (Univ. Pennsylvania, USA)

Paolo Fortina (Thomas Jefferson Univ., USA)

David W. Grainger (Univ. Utah, USA)

*Nobutaka Hirokawa (Univ. Tokyo, Japan)

Ging-Ho Hsiue (National Tsing Hua Univ., Rep. of China)

Jeffrey Hubbell (SWISS Federal Inst. of Tech. (EPFL), Switzerland)

Jae-Ho Kim (Ajou Univ., Korea)

Young-Ha Kim (Kwangju Inst. of Science & Tech., Korea)
*Wolfgang Knoll (Material Science Group of the MPI-P Mainz, Germany)
Bruce Kramer (NSF, USA)
Ick Chan Kwon (KIST, Korea)
Young-Soo Kwon (Dong-A Univ., Korea)
Eun Kyu Lee (Hanyang Univ., Korea)
Kam Leong (Duke univ., USA)
Charles P Lin (Massachusetts General Hospital, USA)
Wen-Tso Liu (National Univ. Singapore, Singapore)
*Carlo D. Montemagno (Univ. Cincinnati, USA)
Hiroyuki Noji (Osaka Univ., Japan)
Teruo Okano (Tokyo Women's Medical Univ., Japan)
Jung-Keug Park (Dongguk Univ., Korea)
Kinam Park (Purdue Univ., USA)
Alessandra Pavesio (Fidia Advanced Biopolymers, Italy)
Bruno Le Pioufle (Univ. Tokyo, Japan)
Dong-Jin Qian (Fudan Univ., China)
*Buddy Ratner (Univ. Washington, USA)
Yasushi Sako (RIKEN, Japan)
Masatsugu Shimomura (Hokkaido Univ. Japan)
*Subra Suresh (MIT, USA)
Yasuhiko Tabata (Kyoto Univ., Japan)
Fuyuhiko Tamanoi (UCLA, USA)
Eiichi Tnmiya (Japan Advanced Inst. of Science and Tech., Japan)
*Marcus Textor (ETH Zurich, Switzerland)
Wiwut Thanthapanichakoon (National Science and Technology Development Agency, Thailand)
Joel Voldman (MIT, USA)
Horst Vogel (EPFL, Switzerland)
Xin-Hui Xing (Tsinghua Univ., China)
Kenji Yasuda (Tokyo Medical and Dental Univ., Japan)
Jackie Yi-Ru Ying (National Univ. Singapore, SINGAPORE)
Hiroshi Yokoyama (AIST, Japan)
Kyung-Hwa Yoo (Yonsei Univ., Korea)
Hanry Yu (National Univ. Singapore, Singapore)

(平成18年9月26日現在)

お知らせコーナー



受賞のお知らせ

桑原 正靖 (群馬大学工学部)

日本化学会第 86 春季年会優秀講演賞

「種々の修飾ヌクレオチドの酵素的取込みによる DNA ライブラリの多様化」

(平成 18 年 5 月)

馬場 嘉信 (名古屋大学大学院工学研究科)

第 28 回応用物理学会論文賞「ナノバイオデバイスの創製とゲノム・プロテオーム解析への応用」

(平成 18 年 8 月 29 日)

民秋 均 (立命館大学理工学部)

2006 年度光化学協会賞「クロロフィル超分子系の構築とその光化学」

(平成 18 年 9 月 11 日)



会員異動

叶 直樹 (KANOH, Naoki)

東北大学大学院薬学研究科 創薬化学専攻 合成制御化学分野 助教授

〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6 番 3 号

TEL & FAX: 022-795-6847

E-mail: kanoh@mail.pharm.tohoku.ac.jp



編集後記

ここに 2006 年最後の生命化学研究レターを無事お送りすることができ、編集担当一同、喜んでおります。今回も、執筆者による力のこもった原稿に後押しされて、何とか編集作業を終えることができました。重ねてお礼申し上げます。

今年の夏は天候不順もあって、あっという間に過ぎってしまった感があります。そんな短い夏ではありましたが、ニュースレター冒頭の報告、および、Dipankar Sen、Kai Johnsson 両氏の巻頭言にありますように、生命化学研究会主催の第 2 回国際シンポジウムでは熱い議論が交わされました。詳しくは、巻頭言をご覧ください。

次号(No. 23)は、石田 斉氏(北里大学)の担当により、2007年2月に発行を予定しております。今後も、生命化学研究レターをよろしくお願い致します。



原田和雄

東京学芸大学教育学部

(harada@u-gakugei.ac.jp)

編集担当:

石田 斉(北里大学)

長崎 健(大阪市立大学)