

生命化学研究レター

(2012年6月)

2. 巻頭言

東京大学大学院理学研究科 小澤 岳昌

4. 研究紹介

4. 細胞構造生物学 –in-cell NMR を用いたアプローチ–

首都大学東京大学院理工学研究科 伊藤 隆

10. 世界最大規模の食中毒シガテラを予防する

–抗シガトキシン抗体の作製とシガトキシンの微量検出法の開発–

大阪府立大学大学院理学研究科 円谷 健

18. 細胞外マトリックスのペプチド科学

–メラニンの分子解剖と医薬分野への応用–

東京薬科大学薬学部 野水 基義

23. 論文紹介「気になった論文」

東京大学大学院理学研究科化学専攻 博士課程1年 桂 嘉宏

名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻 博士後期課程3年 内藤 豊裕

30. 留学体験記

ドイツ・マックスプランク分子生理学研究所留学体験記

Max Planck Institute of Molecular Physiology, Department of Chemical Biology 高山 浩

34. シンポジウム等会告

第6回 バイオ関連化学シンポジウム (第27回 生体機能関連化学シンポジウム、第15回 バイオテクノロジー部会シンポジウム、第15回 生命化学研究会シンポジウム)

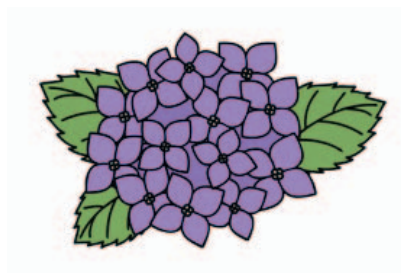
第39回 国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2012)

アンチセンス・遺伝子・デリバリーシステムシンポジウム2012

第2回 アジアケミカルバイオロジー会議 (ACBC2) (第15回生命化学研究会)

編集後記

巻頭言



東京大学大学院理学研究科 小澤 岳昌

分子化学研究所から東京大学理学部化学科に異動して4年が経過した。3年間の分子研生活の間に、大学のみならず学生の気質にも大きな変革が訪れたことを強く感じている。その一つが、世間でも囁かれている若者の安定志向である。若者にとっては、未来への希望を抱くより「日本の現状を維持することが大切である」とのアンケート結果が新聞に報道されていた。この安定志向は、全てに満ち足りた平和な社会の象徴なのかもしれない。また、経済危機や社会保障問題など、マスメディアは若者の将来の不安を煽っている。先日学部生へ、理学系研究科の紹介記事で希望する内容を尋ねたところ、「先生がどんな研究をしているかではなく、理学系に進んだら先生は学生に何をしてくれるのかを教えて欲しい」という答えが返ってきた。レールのスタート地点に立つから途中駅と終着点全てをセットして欲しい、と言わんばかりである。問題点をあげると切りがながないが、若者の安定志向は、彼らの心に根深く浸透しているように見える。

さて我々研究の世界も、いつのまにか安定志向に走っていないであろうか。分野の垣根を越えた研究はこの10年の間に確かに増えた。国際的な共同研究も増大したことは疑う余地はない。しかし、本当に独創的といえるような研究を行う土壌は、まだ十分には培われていないように思う。研究を行うためには、高額の研究費獲得にむけ、日夜申請書作成に追われる毎日である。研究費獲得には、必ず過去の業績リストがつきものであり、論文内容を評価するものではない。従って業績評価は論文のIFや知名度で評価することとなる。とある雑誌で読んだアイロニーに、「米国人研究者は、研究費を獲得するために論文を書いている」という記事があった。安定した研究費の獲得には、時代の流行にのって、論文の質・量を増やすことが最短ルートである。しかし化学の新たな芽となる研究は、トップジャーナルを賑わす流行の研究とは別世界にある。真に革新的な研究の土壌を育むには、成果尊重主義を払拭しアカウンタビリティーなど気にせず、分野の垣根などない自由な発想を実践できる環境が必要であろう。もちろん、社会に直結する実学的研究や成果重視の研究資金も必要であり、全体のバランスが大切であるこ

とは言うまでもない。

生命化学研究はもはや学際的研究ではなく、一大分野としての確固たる地位を築きあげている。脈々とした伝統ある分野に較べたら、研究者の平均年齢は 20 歳以上若いかもしれない。しかし、若さ故に研究会メンバーは皆、高い志気をもって、独創的な発想と研究分野の開拓に勤しんでいると個人的に感じている。様々な分野から研究者が集い、熱い議論が交わされていることも特徴であろう。私自身この 2 年間は部局の広報委員長を委され、様々な理学分野の方の発表を聞いてきた。共通して感じたことは、研究者がそれぞれ独自の「視点」を哲学として持っていることである。素粒子、宇宙、物質、生物等、現存する自然界に対して、どのような視点で観るかが非常に面白く思った。生命化学研究も、化学的な「物質観」で生命という対象にどのようにアプローチするか、視点を豊かにすることそのものが、学問の発展につながり、ひいては社会貢献につながるであろう。この独自の物質観で生命という謎を解くことこそが、生命化学の最大の魅力であると感じている。独自の物質観とは何か？それは研究者独自の哲学であり、独創性そのものでもある。いずれにせよ、我々は目先の生体分子の構造や機能研究に縛られがちになるが、究極的には生命を理解することに他ならない。研究会メンバーが、知を創造し共有する自然科学研究の魅力を若い学生に伝達し、若者の独自の物質観や創造力を涵養することが今の教育に必要であると感じている。そして若者が金銭問題や社会不安を本質とせず、研究に没頭できる精神教育・育成こそが急務の課題ではなかろうか。



細胞構造生物学

～ in-cell NMR を用いたアプローチ～

首都大学東京大学院理工学研究科

伊藤 隆

(ito-yutaka@tmu.ac.jp)



はじめに

細胞内は水っぽいスープではなく濃厚なシチューであると言われる。大腸菌の細胞質には300～400 mg/mLの濃度で生体高分子が存在しており、真核細胞においては、細胞骨格や膜構造等で細胞質はさらに細長い狭いスペースに分画されている。また、細胞内は、多数の分子が協調してダイナミックに働く系で、動的な非平衡状態にあると考えられる。このような細胞内の環境、特に分子が濃密であること(macromolecular crowding)は、その中で働く蛋白質のさまざまな性質に少なからず影響を与えていると考えられている[1]。事実、細胞内を模した環境では酵素の結合活性が異なる例が報告されており、立体構造や動的性質も異なる可能性が示唆されている。これを踏まえて、蛋白質の機能発現のメカニズムを厳密に理解するためには、*in vitro*試料の解析だけでなく、細胞内環境における立体構造とその変化や相互作用を解析する必要があるのではないかと考えられるようになった。

細胞内環境を調べる手立てとしては光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた手法が最近とみに進歩し、想像ではなく実際のデータに即した細胞内のイメージを目にすることも多くなった。しかし、たとえば細胞内の蛋白質の立体構造やダイナミクスといった、より微視的で詳細なデータを観測することは依然として非常に困難である。その中で、NMRは非侵襲性に優れ、かつ原子分解能での解析が可能なことから、細胞内環境での蛋白質の詳細な解析に適していると考えられる。事実、後述のようにin-cell NMRという手法を用いることで、細胞内環境における蛋白質の様々な解析が行なわれるようになってきた[2]。さらに、筆者らのグループはin-cell NMRを用いることで(大腸菌細胞内にかつ大量発現させたものという条件下であるが)生きた細胞内の蛋白質の詳細な立体構造を世界で初めて示すことができた[3,4]。ここでは、in-cell NMRと、この手法を用いた大腸菌細胞内蛋白質の立体構造解析の概略を紹介し、さらにin-cell NMRによる細胞構造生物学の今後の展開についても考察したい。

In-cell NMR

前述のようにNMRは非侵襲性に優れた手法であるので、従来から生きた細胞を用いた測

定は行われてきた (*in vivo* NMR) が、観測対象の分子は主に代謝産物等の低分子であった。1990年代になって大腸菌の系を用いた蛋白質の大量発現技術が広く用いられるようになり、またNMR観測可能な安定同位体 (^{13}C , ^{15}N) による標識技術と、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識蛋白質についての新しいNMR測定法である異種核多次元NMRが確立した。その結果、2001年にUCSFのDötschらのグループが、細胞懸濁試

料(以下、*in-cell*試料と略記)を用いて、生きた大腸菌の中の蛋白質の2D ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルを測定し、この手法を*in-cell* NMRと名づけ報告した[5]。

当初*in-cell* NMRは大腸菌などのバクテリアに限られていたが、その後、アフリカツメガエルの卵および卵母細胞へ安定同位体標識蛋白質のマイクロインジェクションを行うことで、真核細胞初の*in-cell* NMR実験が報告された[6,7]。2009年には、細胞膜透過ペプチドとの融合蛋白質を用いることで、培養哺乳類細胞を用いた*in-cell* NMR測定を可能にする画期的な報告がなされた[8]。また、毒素を用いて細胞膜に一時的に穴をあけ、培養細胞に蛋白質を導入する方法も報告されている[9]。図1には現在採用されている、*in-cell* NMR測定のための細胞試料調製法(細胞内への目的蛋白質の導入法)を模式的に示した。

In-cell NMRの応用範囲としては、当初から、細胞内での蛋白質の立体構造変化、翻訳後修飾、基質結合、蛋白質間相互作用、などの観察が想定されており[10]、既にさまざまな解析結果が報告されている。

In-cell NMRを用いて、細胞内での蛋白質の立体構造変化をとらえるアプローチとしては、たとえば2次元の ^1H - ^{15}N 相関スペクトルを測定し、NMRシグナルの化学シフト変化で間接的に解析するアプローチと、主鎖や側鎖NMRシグナルを帰属したうえでNOE等の高次構造情報を収集する直接的なアプローチ (*in vitro* の解析の際に用いられるアプローチと同一) が考えられる。これまでに報告されているほとんどの*in-cell* NMR解析では、低い測定感度と試料の寿命の問題から、前者の化学シフト変化を解析する方法が採られている。しかし、細胞内で大きな構造変化が起きた場合には、変化前と変化後の化学シフトの対応を取るのは困難になることが想像されるため、化学シフトに基づいた解析には自ずと限界がある。一方で、「NMRシグナルの帰属+高次構造情報の取得」のアプローチのためには異種核3D/4D NMR測定が必要

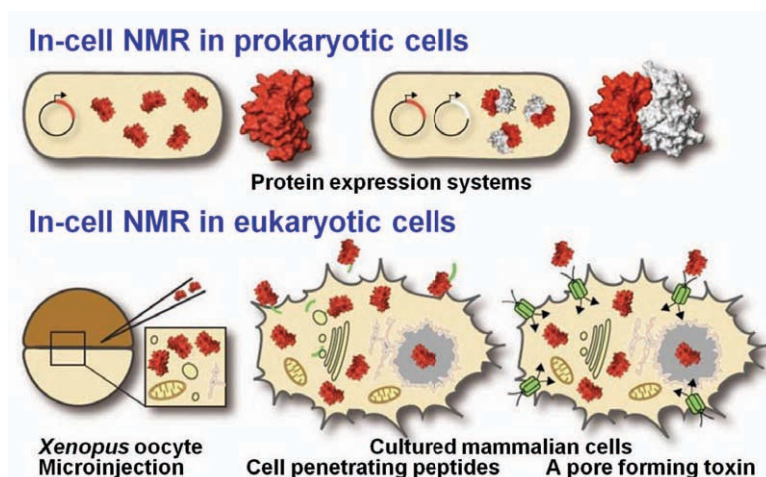


図 1. *In-cell* NMR 測定に用いられる細胞試料調製法

大腸菌を用いた系では細胞内の大量発現系が用いられる。異なるプロモーターで制御されている 2 つのプラスミドを用いて蛋白質間相互作用を観察した報告もある[17]。

真核細胞を用いた系では、精製した安定同位体標識済みの蛋白質を外部から導入する。

である. 3D/4D NMR測定は*in vitro*の高濃度の試料であっても数時間~数日の測定時間を要するため, はたしてこのアプローチが可能かどうかは検証されずにあった. そこで, 筆者らは後者のアプローチが可能であることを検証するために, 大腸菌細胞を用いて, 生きた細胞中の蛋白質の立体構造解析を開始した.

In-cell NMRを用いた細胞内蛋白質の立体構造解析

生細胞内蛋白質の立体構造のためのモデル試料の候補として, まず高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト (http://www.thermus.org/j_index.htm) から, アミノ酸100残基未満で単量体で存在する発現の良好な20種の蛋白質を選びだし, 大腸菌中で大量発現させてin-cell NMRの予備実験を行った. その中で最も良好なNMRスペクトルを与えたのが, TTHA1718遺伝子産物(66アミノ酸残基)であった. これをモデル試料として立体構造解析を試みた.

まず, 6種類の3重共鳴3次元NMRスペクトルを解析することで蛋白質主鎖NMRシグナルの帰属を行った. NMR試料管中での大腸菌試料の寿命は, NMR試料の一部を経時的にプレートに播き生存菌数をカウントすることで見積り, 約6時間で85%以上生存という値を得た. この6時間という時間を考えると, 何らかの手段を用いて3次元NMRの測定時間を著しく短縮させる必要がある. 筆者らは, 既に他の*in vitro*試料で効果を実証していた, nonlinear samplingという測定手法とmaximum entropyによるデータ処理というアプローチを採用することにした[4,11,12]. この結果, 従来法の約1/8の時

間で十分な分解能と感度を持つ3次元NMRスペクトルを測定することに成功した. 得られたスペクトルを解析した結果, 観測可能な主鎖NMRシグナルのほとんどの帰属に成功した(図2左および中央). 同様の手法を用いることで, 大多数の側鎖NMRシグナルも帰属することができた(図2右).

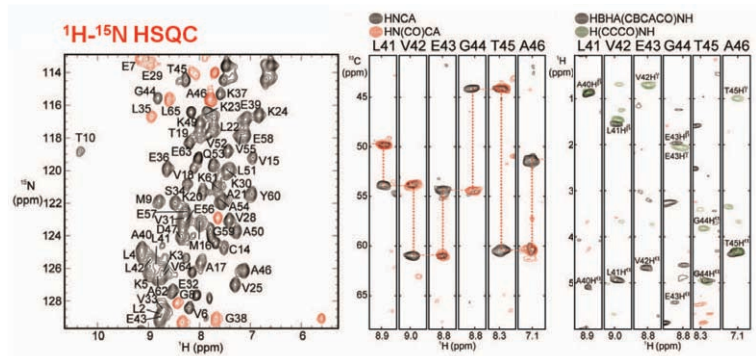


図 2. 大腸菌内 TTHA1718 の NMR シグナル帰属

(左) ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル. クロスピークには帰属を付した. (中央) 主鎖 NMR シグナル帰属の例. (右) 側鎖 NMR シグナルの帰属の例. それぞれ, Leu41 から A46 までを示した.

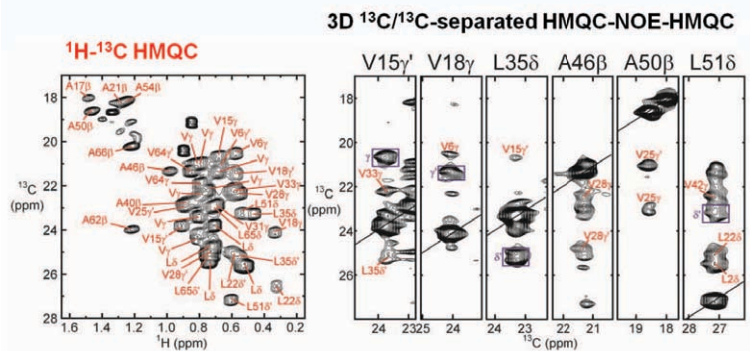


図 3. 大腸菌内 TTHA1718 のメチル基選択的 ^1H 標識

(左) ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル(メチル領域). クロスピークには帰属を付した. (右) 側鎖メチル基間 NOE 情報の解析例.

次に、側鎖メチル基のみが $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 標識され、他の部分は ^2H 標識された試料を作成し、測定を行った。この手法は高分子量蛋白質のNMR解析で実績がある方法である[13]。生細胞内は粘性が高く、Stokes-Einstein-Debyeの式に従って、低分子量蛋白質であっても*in vitro*の高分子量蛋白質のような挙動をする。また、主として試料の不均一性からNMRシグナルの線幅が広いため、シグナルのオーバーラップも激しい。このため、このメチル選択的 ^1H 標識法が極めて有効に働くのである(図3左)。この試料について3D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -separated NOESYスペクトルを測定し、解析した結果、蛋白質の疎水的コアの形成に関わるメチル基間のNOE由来の距離情報を効率的に取得することができた(図3右)。さらに、均一に $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識された細胞試料を用いて測定した3D ^{15}N -separated NOESYと3D ^{13}C -separated NOESYからも距離情報を取得した。

立体構造計算は、NOE由来の距離情報、 ^{13}C 核の化学シフトから推定した主鎖2面角情報、2次構造部分に推定された水素結合情報から、共同研究者のPeter Güntertが開発した立体構造自動計算ソフトウェアCYANA v3.0[14]を用いて行った。得られた高次構造は主鎖RMSDが0.96 Åと良好であり(図4左)、

独立に決定した精製試料の高次構造とも非常に良く似ていた。また、メチル基選択的標識試料で収集したメチル基由来のNOE情報は極めて効果的であり、これらメチル基由来のNOEを除くと得られる構造のクオリティは著しく損なわれる(図4中央)。

生きた大腸菌内のTTHA1718の立体構造は、米化学会のC&EN誌のChemical Year in Review 2009の中で9つのトピックのうちの1つに選ばれたのをはじめ、さまざまな反響を呼んだ。同時に、*in-cell* NMRの持つ問題点についても議論がなされた。もっとも重要視される問題点はターゲットとなる試料の細胞内濃度である。TTHA1718の場合、*in-cell* NMR試料の中のTTHA1718の濃度は3~4 mMに達し、これはもちろん生理的濃度とはかけ離れた値である。他の(特に大腸菌を用いた)*in-cell* NMR研究においても、生理的条件に対して著しく高い細

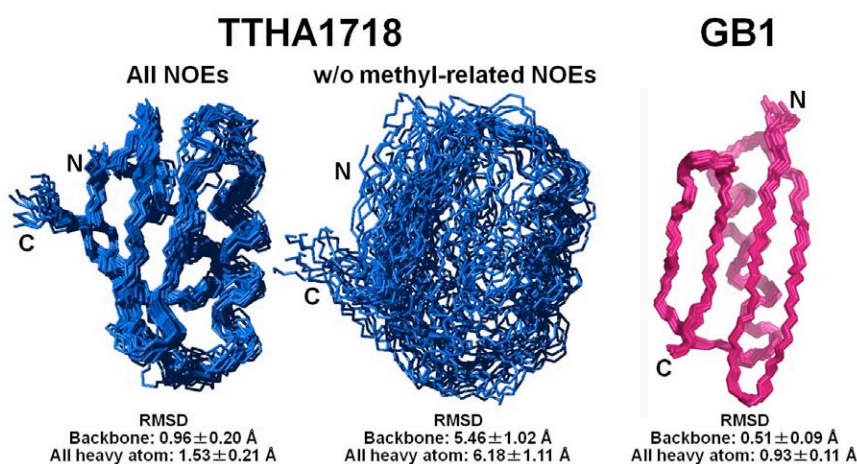


図4. 生きた大腸菌細胞内蛋白質の立体構造

(左)高度好熱菌 TTHA1718 の立体構造解析結果。(中央)図左の例の計算に用いた構造情報から、メチル基選択的標識試料を用いて得られたNOE情報を取り省き、再び立体構造計算をしたもの。(右)連鎖球菌 protein G B1ドメイン(GB1)の立体構造解析結果。それぞれCYANAで計算した100個の最終構造から最もエネルギーの小さい20個の構造を抽出し、主鎖原子を重ね合わせて示した。また、20個の構造アンサンブルにおける、主鎖原子および全ての重原子の位置の平均二乗偏差も併せて示してある。

胞内濃度で研究がおこなわれている。一方で、アフリカツメガエル卵母細胞の系で行われたヒトTau蛋白質の解析の際には、5 μM というかなり生理的濃度に近い濃度で実験が行われていることを付け加えておきたい[15]。

筆者が考えるに、in-cell NMRで解析されるべきmacromolecular crowdingの効果は大きく分けて2種あり、非選択的な効果と選択的な効果に大別できるであろう。非選択的な効果としては、たとえば排除体積効果や様々な分子との非選択的相互作用が蛋白質の構造安定性やコンフォメーション平衡に与える影響等が考えられる。選択的な効果については、相互作用する相手の細胞内濃度が重要であるので、生理的濃度にできるだけ近づけることが必要になるであろう。しかし、非選択的な効果については、現在の手法を用い、NMRの感度が要求する濃度で測定を行うことは(他のいかなる手法を用いても、生細胞中の蛋白質について、NMRが提供するほど高分解能の情報を得ることができない以上)、十分に大きな意味があるのは明らかである。しかし、実験科学者の一人として、現在の手法をさらに改良・最適化することによって、できるだけ生理的条件に近づける努力は怠ってはならないと思う。そこで、その最初のステップとして、TTHA1718の細胞内濃度(正確にはin-cell NMR試料中の蛋白質濃度)に比べておおよそ1/10の濃度(200~500 μM)を持つ、連鎖球菌protein G B1ドメイン(GB1, 66残基)について、大腸菌細胞中での立体構造解析を行った。詳細は省くが、新しいメチル基選択的 ^1H 標識法の適用、新しいmaximum entropyのアルゴリズムを用いたデータ処理、NOESYスペクトルを用いた側鎖NMRシグナルの自動帰属[16]等を行うことによって、結果的にはTTHA1718の場合よりさらに高分解能の立体構造を得ることに成功した(図4右)。TTHA1718以降、世界中のどのグループからもまだ細胞内蛋白質の報告例はないので、GB1の例は世界で2番目となるものである。

今後の展望

In-cell NMRを用いた細胞内蛋白質の立体構造解析例はまだ2例しかないが、筆者らが確立した手法を拡張していくことによって、細胞内環境における様々な蛋白質の詳細な立体構造や、多様な生物現象に伴う構造変化が解析されるようになると期待される。特にin-cell NMRによる解析が期待されている興味深い蛋白質群として、内在的にレギュラーな高次構造を持たないintrinsically disordered proteins (IDPs)と呼ばれるものがある。現在までに、macromolecular crowdingが構造に積極的に影響を与えた例[18]と、影響を与えなかった例[15]の、まったく相反する結果が報告されているので、今後の詳細な研究が待たれる。複数のドメインが弱く相互作用している蛋白質についても、in-cell NMRによる解析が重要な知見を与えることが期待される。これらの蛋白質では、溶液状態と結晶中でドメイン間の相対配置が異なっている例が報告されつつあり、細胞内環境も相対配置に影響を与える可能性がある。

ヒト培養細胞の系のin-cell NMR解析で示唆されているように、細胞内環境が蛋白質の構造安定性にわれわれが予想していた以上の効果を及ぼしている可能性もある[8]。大腸菌内蛋白質については ^{15}N 核の緩和パラメータの測定による主鎖のダイナミクス解析も進行中であ

る。In-cell NMRによる立体構造解析結果とダイナミクスの解析結果が蓄積していけば、細胞内環境の影響の定量的解析が可能になり、細胞の中の蛋白質の「真の動態」に迫ることができるようになるであろう。

真核細胞中の蛋白質の立体構造解析も次の大きな目標である。アフリカツメガエルの卵の系では既にNOESY測定が可能と考えられるほどの高い蛋白質濃度が達成されている。大腸菌の系で筆者らが用いている手法を単純にヒト培養細胞の系に適用するためには、一桁以上の蛋白質導入効率の上昇が必要である。しかし、これについてもNMR測定感度の向上など様々な要素技術の改良や、高次構造解析法の改良などを行なうことで、あまり遠くない将来に立体構造解析が可能になるのではないかと期待される。

参考文献

1. Ellis, R.J., *Trends. Biochem. Sci.* **26**, 597-604 (2001).
2. Ito, Y. & Selenko, P., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 640-648 (2010).
3. Sakakibara, D. *et al.*, *Nature* **458**, 102-105 (2009).
4. Ikeya, T. *et al.*, *Nat. Protoc.* **5**, 1051-1060 (2010).
5. Serber, Z. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2446-2447 (2001).
6. Selenko, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11904-11909 (2006).
7. Sakai, T. *et al.*, *J. Biomol. NMR* **36**, 179-188 (2006).
8. Inomata, K. *et al.*, *Nature* **458**, 106-109 (2009).
9. Ogino, S. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10834-10835 (2009).
10. Serber, Z. & Dotsch, V., *Biochemistry* **40**, 14317-14323 (2001).
11. Barna, J. C. J. *et al.*, *J. Magn. Reson.* **73**, 69-77 (1987).
12. Rovnyak, D. *et al.*, *J. Magn. Reson.* **170**, 15-21 (2004).
13. Rosen, M.K. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **263**, 627-636 (1996).
14. Güntert, P., *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **43**, 105-125 (2003).
15. Bodart, J.F. *et al.*, *J. Magn. Reson.* **192**, 252-257 (2008).
16. Ikeya, T. *et al.*, *J. Biomol. NMR* **50**, 137-146 (2011).
17. Burz, D. S. *et al.*, *Nat. Methods.* **3**, 91-93 (2006).
18. Dedmon, M. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12681-12684 (2002).

研究紹介

世界最大規模の食中毒シガテラを
 予防する
 ～抗シガトキシン抗体の作製とシガトキシンの
 微量検出法の開発～



大阪府立大学大学院理学系研究科

円谷 健

(tsumu@b.s.osakafu-u.ac.jp)

1. はじめに

食中毒シガテラは、ポリネシア、ハワイ、沖縄、カリブ海等の広いサンゴ礁海域で発生し、年間5万人以上の食中毒患者が罹患する世界最大規模の非バクテリア由来の食中毒である。^{1), 2)} シガテラ毒素は植物プランクトンが生産し、食物連鎖を介して多数の魚介類に移行する。毒の所在が明確なフグ毒などと異なり、漁業の基盤を支えている多数の食用魚が広範に毒化するので、世界規模の脅威となりうる。

シガテラ食中毒では、下痢、嘔吐、腹部麻痺、神経過敏の中毒症状の他、ドライアイスセンセーションと呼ばれるシガテラ食中毒に特徴的な冷温感覚の異常を生じることがある。症状の回復は極めて遅く(通常、数ヶ月から数年)、重症になると死亡する。シガテラ食中毒の予防が難しいのは、1)外見、におい、味等で毒化した魚を判別不可能であることや、2)毒魚を料理しても(煮ても焼いても)毒性は軽減されないことなどが原因となっている。

シガテラ食中毒の主要原因毒素はシガトキシンと呼ばれ、5, 6, 7, 8および9員環エーテルが13個はしご状に連結した、不斉炭素が30個を超える分子長が3 nm以上のいも虫状の巨大分子である(図1)。シガトキシンは1989年に安元らにより構造決定されてから、³⁾ 天然からは極めて微量しか採集されないことや、電位依存性ナトリウムチャンネルに作用する猛毒性と複雑な構造に興味を持たれ、世界中の科学者により様々な研究が行われてきた。特に、平間らにより2001年に報告されたシガトキシンCTX3Cの全合成の完成は特筆に値する。^{4), 5), 6)}

シガテラ食中毒の予防のためには、信頼性の高いシガテラ毒素検出法の開発が必要である。化合物の微量検出法の一つに、モノクローナル抗体を用いた免疫学的測定法があるが、この方法は、比較的簡便に高い検出感度を示す。そこで、我々は、シガトキシンを高い検出感度と特異性で検出可能な免疫学的測

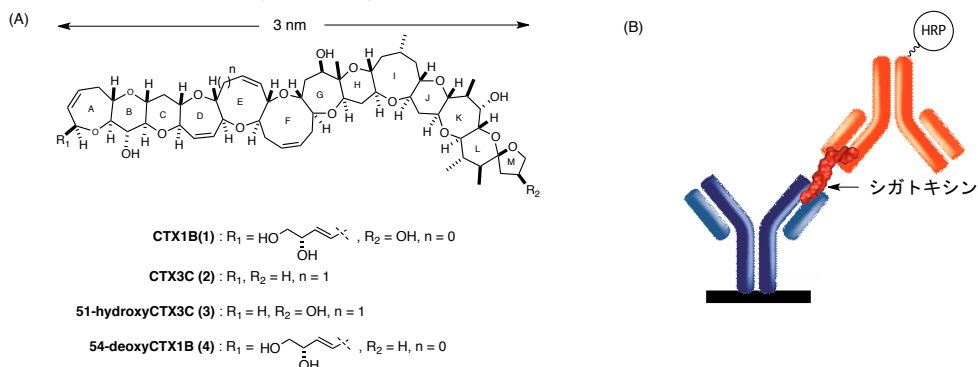


図 1. (A) シガトキシンの化学構造. (B) サンドイッチ免疫アッセイによるシガトキシンの検出

定法の開発に取り組んだ。免疫学的測定法の開発には、シガテラの主要原因毒素であるシガトキシンに特異的にしかも強力に結合する抗体が必要となってくるが、天然からは極微量しかシガトキシンを採集できないことが抗体作製の障害となっていた。そこで、我々は、平間らと共同で、シガトキシンの全合成研究で確立した有機合成化学的手法を駆使して、シガトキシンの標的部位特異的に結合するモノクローナル抗体の調製を検討し、デザインされたハプテンを免疫することにより、シガトキシンを特異的に検出するモノクローナル抗体の調製に成功した。さらに、シガトキシンの左右両端を認識する2種類のモノクローナル抗体を組み合わせることで、シガトキシンを高感度で検出するサンドイッチ免疫アッセイを開発することに成功した。^{7), 8), 9), 10)}

2. ハプテン設計と抗原の合成

我々が研究を開始する以前に、ハワイ大学のホカマらは、貴重な毒本体CTX1B (1 μg)を用いて活性エステル法によりタンパク質コンジュゲートを合成し、これを免疫してモノクローナル抗体を作製した。¹¹⁾ これは、シガトキシンの化学構造が決定される以前のことであり、その時点ではシガトキシンにカルボキシル基があると予想して、このような化学変換が行われた。しかしながら、シガトキシンCTX1Bの化学構造が明らかになってみると、CTX1Bにカルボキシル基は存在せず、タンパク質コンジュゲート合成の際に何が起きているのかは不明である。また、得られた抗体はCTX1Bの右端を認識し、オカダ酸と交差活性を示すことが明らかとなった。シガトキシンの天然からの採集や培養による供給が極めて困難な状況から、我々は抗原決定基になりうる部分構造を化学合成し、これをハプテンとして免疫することにより、シガトキシン本体の標的部位に結合する抗体を作製する新しいアプローチを試みた。^{12), 13)}

シガトキシンには、図1 (A)に示すように左右末端構造およびE環の環構造が異なる4種類の主要な類縁体が存在するが、まず最初に、最も単純な構造をもつCTX3C (2)のモノクローナル抗体を作製した。CTX3C (2)の両端に特異的に結合する抗体を調製するにあたり、抗原-抗体複合体の構造を考慮することによりハプテンを設計した。我々は、これまで抗体酵素の研究を行なってきており、低分子を認識する抗体の立体構造に関する知識があったため、これが非常に役に立った。抗原-抗体複合体の結晶構造から、抗体と接触する低分子抗原の表面積は、200 ~ 400 Å²と見積もられている。CTX3C (2)の左側3環性、4環性、5環性エーテル骨格(ABC, ABCD, およびABCDE環)の接触表面積を計算するとそれぞれ253, 318, 398 Å²と算出された(図2)。

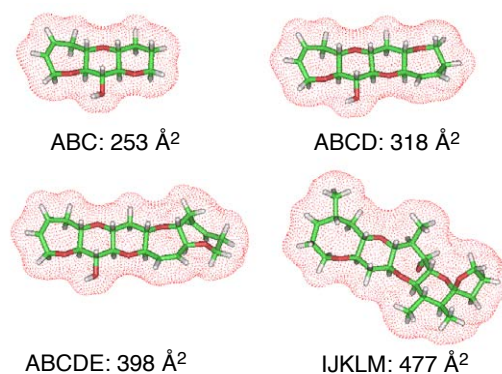


図2. CTX3Cの部分構造化合物の最適化構造及び接触表面積

CTX3C(2)の左端構造を認識する抗体を獲得するために5環性のABCDE環からなるハプテン**5**を設計した. ハプテン**5**は, 5環性のABCDE環 (接触表面積:398 Å²)をもち, 環状アセタールを介してリンカーと結合している. 既に述べたように, 低分子ハプテンの抗原-抗体反応における接触表面積は最大でおよそ400 Å²であることから, ハプテン**5**のA~E環は抗原結合部位にすっぽりと収まり, 一方, アセタールやリンカー部は抗原結合部位の外に出ることが期待される. また, ハプテン**5**の免疫により得られた抗体はCTX3Cの左端を認識し, その他の部分は抗原結合部位の外側に出ていることが予想されるため, サンドイッチイムノアッセイを行うにあたり, 最適な結合様式を有するものと考えられる. 同様に, CTX3Cの右端を認識する抗体を作製するため, 5環性のハプテン**6**(IJKLM環, 接触表面積:477 Å²)を設計した. ハプテン**5**および**6**はいずれもCTX3C(2)の全合成における合成中間体を原料として合成することができた. 一般に, 低分子ハプテンは免疫原性を示さないため, タンパク質に結合させて免疫原性を付与する必要がある. そこで, ハプテン**5**および**6**を活性エステル法によりそれぞれBSAコンジュゲートおよびKLHコンジュゲートを作製した.

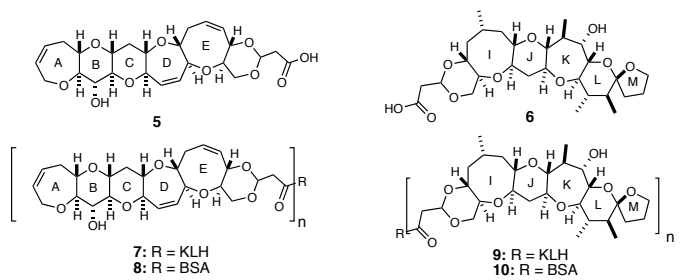


図3. ハプテン**5**, **6**およびタンパク質コンジュゲートの構造

3. シガトキシンCTX3C左端および右端特異的モノクローナル抗体の作製^{7),9)}

5環性ハプテン**5**のKLHコンジュゲート**7**を5匹のマウスに3回接種した後採血し, 最も高い抗体価を示したマウスについて**7**を再度接種し, 脾臓を摘出後, 脾臓細胞とミエローマと細胞融合した. BSAコンジュゲート**8**に対して高い結合活性を示したハイブリドーマについて限界希釈法によりクローニングし, 最終的に6個のIgG産生ハイブリドーマを得た. 抗体はハイブリドーマを大量培養して, 培養上清を抗マウスIgG+Mアフィニティークロマトグラフィーにより精製した.

得られた6種類のモノクローナル抗体の結合活性および特異性を検討する目的で, それぞれの合成シガトキシン部分構造化合物に対する解離定数(K_d)を決定した. 予想通り, 6種類の抗体は免疫に用いた5環性ハプテン**11**に対して, K_d が0.8 nM~10.8 nMと極めて高い結合を示した. この中で最も高い結合活性を示した抗体**10C9**についてさらに詳細を検討した. **10C9**の4環性ハプテン**12**に対する K_d は1.9 μMと**11**に対する結合と比べて2000倍以上低かった. さらに, 3環性ハプテン**13**に対しては73.6 μMと4環性ハプテン**12**と比較して30倍程度低かった. このように, 抗体の合成シガトキシン部分構造化合物に対する結合は, 環が1つ減少するごとに結合が弱くなっていることが明らかとなった. また, これらの抗体はいずれもCTX3Cの右端構造を有する化合物**14**とは全く結合を示さず, 高い特異性を有していることが判明した.

同様に, CTX3CのIJKLM環構造を有するハプテン**6**のKLHコンジュゲート**9**をマウスに免疫することにより, IgG産生ハイブリドーマ**3D11**を得た. 抗体**3D11**は免疫に用いた5環性ハプテン**14**のみに結合し, 高い特異性を有することが明らかとなった. 競合ELISA法により K_d を求めたところ, 免疫に用いた5環性構造を有する化合物**14**に対する K_d は4 nMであり, 極めて強い結合を示した. さらに抗体**3D11**は, CTX3Cそのものとも強く結合し, その K_d は122 nMであった. 一方, 構造の類似した他のポリエーテル海産毒との交差反応を検討したところ, 唯一ブレベトキシシンAと弱い結合($K_d = 43 \mu\text{M}$)を示したが, ブレベトキシシンB, オカダ酸, マイトキシシンとは結合活性を示さず, 高い選択性を有することが明らかとなった.

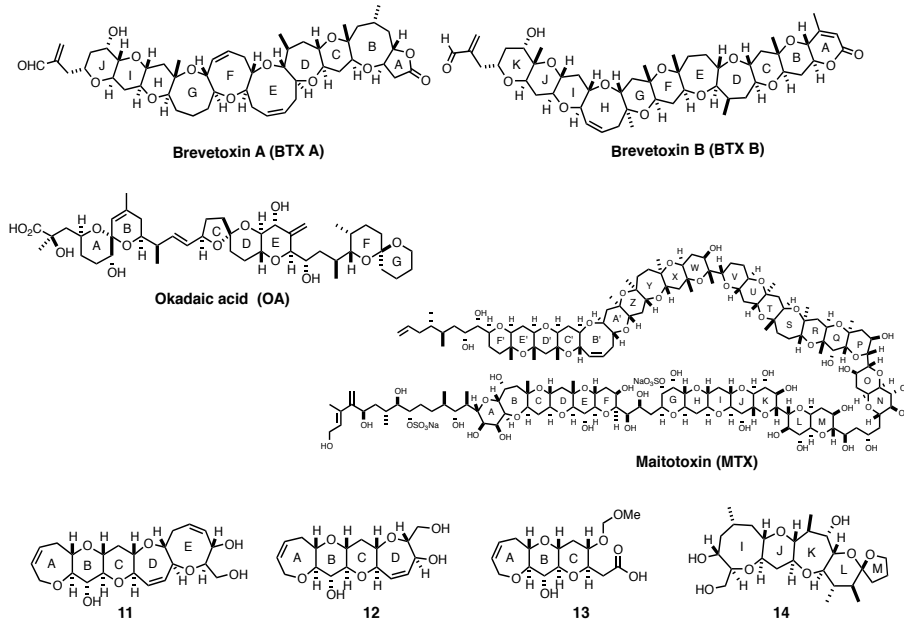


図 4. ポリエーテル海産毒と CTX3C の部分構造化合物の構造

4. シガトキシシンCTX1Bおよび51-hydroxyCTX3C右端特異的モノクローナル抗体の作製^{8),9)}

シガトキシシンには左右末端構造およびE環の構造の異なる4種類の主要な類縁体が存在する(図1). これらは, いずれも高い毒性を示すため, シガテラ食中毒の予防のためには, これら4種類の主要なシガトキシシンを網羅的に検出することができる検出法の開発が重要である. そこで, 次にM環にOH基を有するシガトキシシン類 (CTX1B および 51-hydroxyCTX3C の右端構造)を検出するための抗体を調製した.

すでに, 我々の研究から明らかなようにシガトキシシンそのものを認識する抗体を調製するためには5環性より大きなハプテン(接触表面積 $> 400\sim 500 \text{ \AA}^2$)を免疫する必要がある. そこで, 新たにM環にOH基を有する6環性のハプテン**15**を設計, 合成した(図5). ハプテン**15**を活性エステル法によりKLHおよびBSAと縮合させ, それぞれタンパク質コンジュゲート**16**, **17**を調製した. KLHコンジュゲート**16**をマウスに4回接種後, 定法により細胞融合を行い, 3種類のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た. モノクローナル抗体7C9, 8B9, 8H4のHIJKLMフラグメント**18**に対する解離定数(K_d)を競合ELISA法により求めたところ, それぞれ, 407, 108, 48 nMであった. そこで, 最も高い結合活性を示した8H4を用いて詳細を検討することとした.

モノクローナル抗体8H4はシガトキシシンCTX1B($K_d = 20.4 \text{ nM}$)および51-hydroxy-CTX3C($K_d = 13.6 \text{ nM}$)も強く認識した. 一方M環にOH基を持たないシガトキシ

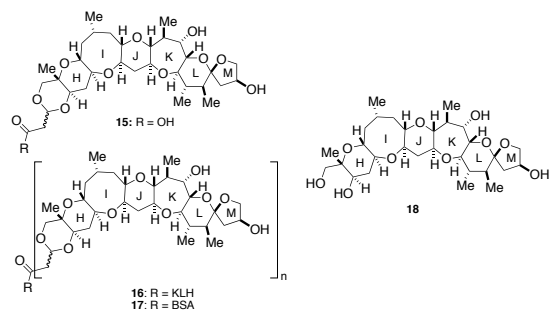


図 5. ハプテン**15**, タンパク質コンジュゲートおよび阻害化合物の構造

ン CTX3C に対する結合は弱く, $K_d = 3.2 \mu\text{M}$ であった. このことは, 抗体 8H4 が M 環の OH 基の有無を見分けていることを示している. 8H4 は構造の類似した海産毒ポリエーテル類 (BTX-A, BTX-B, OA, MTX) とは全く交差反応を示さず, 非常に高い分子認識能を有している. 以上述べたように我々は CTX1B および 51-hydroxyCTX3C の右端を高い結合活性で認識する抗体を作製することに成功した.

5. シガトキシン CTX1B 左端特異的モノクローナル抗体の調製¹⁰⁾

シガトキシンの主要な4種類の構造を網羅的に検出するためには, A 環にジヒドロキシブテニル基を有する CTX1B の左端構造を認識する抗体を作製する必要がある. CTX1B は, 太平洋地域で発生するシガテラ食中毒の毒魚には比較的多く含まれていることが知られているため, 特にその検出は重要である. 従って, 我々も当初より CTX1B を認識するモノクローナル抗体を作製するために様々な検討を行ったが,¹²⁾ CTX1B の A 環部を認識するモノクローナル抗体の獲得には至らなかった. ハプテン構造(環の数など)やタンパク質コンジュゲートの合成法, 免疫法など様々な条件を検討した結果, 最終的に以下に述べる方法で CTX1B の左端構造を認識する抗体の獲得に成功した.

まず, CTX1B の左端構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製するために, 5 環性ハプテン **19** を設計・合成した. ハプテン **19** はタンパク質のシステイン残基のマイケル付加反応によりタンパク質コンジュゲートを調製するためマレイミド基を導入した. まず, DTSSP と BSA あるいは KLH とを反応させ, ついで TCEP により還元することにより, BSA および KLH のリジン残基をチオール基で修飾したチオール化タンパク質 **22** (BSA) および **23** (KLH) を調製した. さらにこれらタンパク質 **22** および **23** とハプテン **19** とを反応させ, BSA および KLH コンジュゲート **24** および **25** を調製した. KLH コンジュゲート

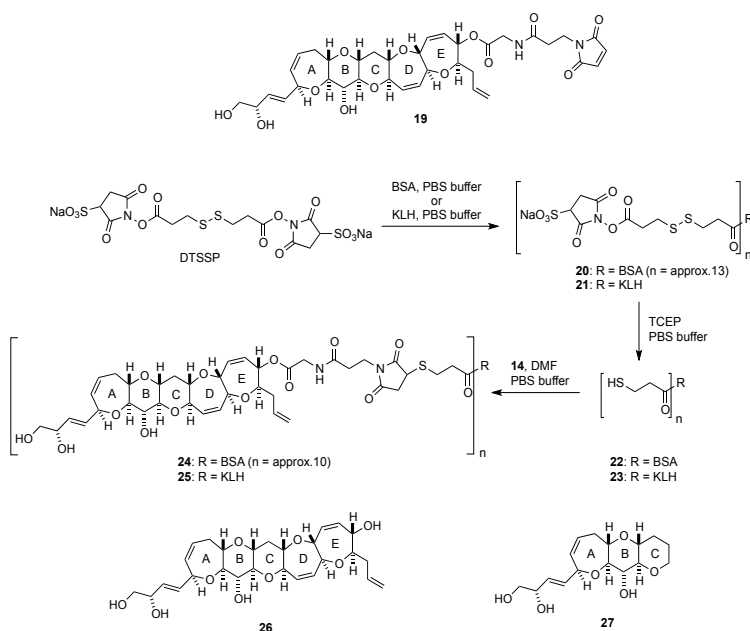


図6. ハプテン 19 の構造およびタンパク質コンジュゲートの合成

ト **25** をマウスに 4 回接種後, 電気細胞融合法により脾臓細胞とマウスミエローマ細胞とを融合させた. ELISA により BSA コンジュゲート **24** に結合活性を示した IgG 産生ハイブリドーマについてクローニングを行い, モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 3G8 を得た. モノクローナル抗体 3G8 の ABCDE フラグメント **26** に対する解離定数 (K_d) を競合 ELISA 法により求めたところ 1.5 nM と強い結合活性を示した. 3G8 はシガトキシン CTX1B とも強く結合しその解離定数は $K_d = 14.9 \text{ nM}$ であった. 一方, A 環にジヒドロキシブテニル基を持たないシガトキシン CTX3C とはほとんど結合せず, このことは, 3G8 が A 環のジヒドロキシブテニル基の有無を見分けていることを示している. また, 3G8 の ABC フラグメント **27** に対する K_d は 410 nM となり, ABCDE フラグメント **26** と比べて約 270 倍結合活性が減少することが明らかとなった. この結果は, 3G8 が CTX1B (**1**) の ABCDE 環部を認識していることを支持するものである. さらに, 3G8 は構造の類似した他の海産毒ポリエーテル類(BTX-A, BTX-B, OA)とは全く交差反応を示さず, 非常に高い分子認識能を示すこ

とが判明した。

6. サンドイッチイムノアッセイによるシガトキシンの検出^{7), 8), 9), 10)}

低分子抗原(薬物, 毒物等)の検定では, 従来, ラベル化した抗原との競争阻害が広く利用されてきた。しかし, 本手法は擬陽性判定のリスクが高く, また, 感度が不十分なことが問題となっている。貴重な抗原の場合には, ラベル化抗原の作製及びその供給が大きな障害となる。今回我々は4種類の主要なシガトキシンの2種類の左端構造および2種類の右端構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を獲得することに成功した。そこで, シガトキシン類が分子長 3 nm におよぶ巨大低分子化合物であることに着目し, 分子両端をこれらの抗体で捕捉してシガトキシンを検出するためのサンドイッチイムノアッセイ法を検討した。我々が獲得した左端構造を認識する2種類の抗体と右端構造を認識する2種類の抗体とを組み合わせることにより4種類の主要なシガトキシンを網羅的に検出するサンドイッチイムノアッセイを構築することができる(図7)。

ここでは, CTX1B の左端構造を認識するモノクローナル抗体 3G8 と右端構造を認識するモノクローナル抗体 8H4 とを利用した CTX1B の微量検出について紹介する。ELISA プレート上に固定化した抗体 3G8 を用いて, CTX1B を捕捉し, これに酵素標識(西洋わさびペルオキシターゼ)した 8H4 を用いて検出すると濃度依存的なシグナルの増加が観測され, 検

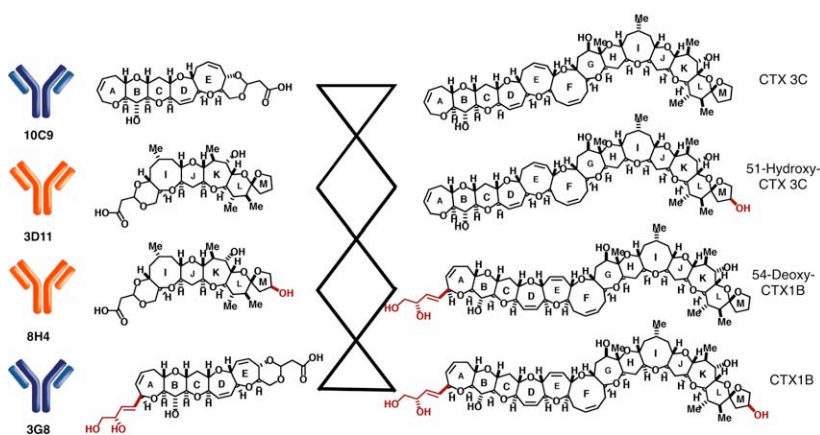


図7. サンドイッチイムノアッセイによる太平洋型シガトキシンの検出

出感度 0.28 ng/mL で CTX1B を検出することに成功した(図8)。また, 本検出法は, シガトキシン類縁体である CTX3C やオカダ酸やブレベトキシン類といったポリエーテル海産毒を加えても全くシグナルを与えず, 本イムノアッセイ法がシガトキシン CTX1B に対して極めて特異性の高い検出法であることが証明された。同様に CTX3C の左端構造を認識する 10C9 と右端構造を認識する 3D11, 51-hydroxyCTX3C の左端構造を認識する 10C9 と右端構造を認識する 8H4 とを組み合わせると, それぞれ CTX3C や 51-hydroxyCTX3C を高感度で特異性高く検出が可能である。54-deoxyCTX1B の検出に関しては天然物が入手できないために実証していないが, 3G8 と 3D11 との組み合わせで検出できるものと考えられる。

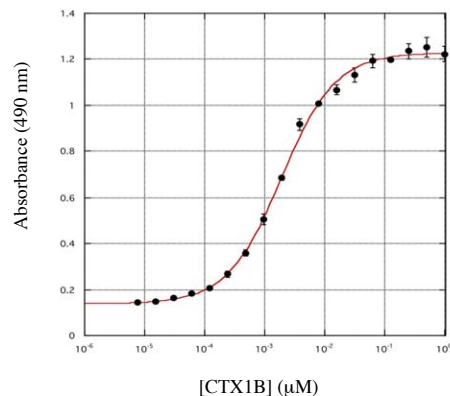


図8. サンドイッチイムノアッセイによる CTX1B の検出

8. おわりに

今回, 我々は有機合成化学により合成したシガトキシンの部分構造化合物を免疫することによりシガトキシンそのものを特異的に認識するモノクローナル抗体の獲得に成功した。本手法は, 標的特異的抗体を獲得するためのラショナルなデザインが可能であるため非常に有効な手法である。さらに, 得られたモノクローナル抗体のなかからシガトキシンの左端構造を認識する抗体と右端構造を認識する抗体とを組み合わせ

せたサンドイッチ免疫アッセイによりシガトキシンの微量検出法を確立することができた。今回開発した手法は、他の海産毒一般にも応用が可能と考えられる。また、カリブ海海域でおこるシガテラ食中毒では、構造の異なるカリブ海型シガトキシンが原因毒素であることが明らかとなっている。現在、カリブ海型シガトキシンを認識する抗体の作製を鋭意検討中である。また、本研究で開発されたサンドイッチ免疫アッセイ法をインフルエンザウイルス検出キットなどのような簡便なキットへ展開することも容易であるため、現在検定キットの実用化を進めている。さらに、モノクローナル抗体は抗体医薬としてシガテラ食中毒治療に用いることができる。これまでに、モノクローナル抗体を用いたシガトキシンの毒性の中和¹⁴⁾やマウスモノクローナル抗体のヒト化についても成功している。今後、我々が獲得した抗シガトキシン抗体がシガテラ食中毒の予防のみならず、治療においても役に立つことが期待される。

本研究は、1994年に東北大学理学部の平間正博教授が、私が当時務めていた花王基礎科学研究所の顧問をされていたときに相談いただいたのが共同研究のはじまりで、その後、花王基礎科学研究所の抗体グループおよび生物分子工学研究所と大阪府立大学の藤井郁雄研究室で行われたものである。開始から約17~8年かかって、やっと当初の目的をほぼ完成することができた。それには、有機合成化学における合成技術の進歩の発展が大きく寄与していることは言うまでもない。これまで、本研究を支援していただいた平間正博教授、藤井郁雄教授はじめ多くの共同研究者の皆様にご心から感謝いたします。

9. 文献

- 1) Scheuer, P. J., Ciguatera and its off-shoots chance encounters en route to a molecular structure, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3.
- 2) Lewis, R. J., The changing face of ciguatera, *Toxicon* **2001**, *39*, 97.
- 3) Murata, M., Legrand, A. M., Ishibashi, Y., Yasumoto, T., Structures of Ciguatera and Its Congener, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8929.
- 4) Hiramata, M., Oishi, T., Uehara, H., Inoue, M., Maruyama, M., Oguri, H., Satake, M., Total Synthesis of Ciguatera toxin CTX3C, *Science* **2001**, *294*, 1904.
- 5) Inoue, M., Miyazaki, K., Uehara, H., Maruyama, M., Hiramata, M., First- and second-generation total synthesis of ciguatera toxin CTX3C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12013.
- 6) Inoue, M., Miyazaki, K., Ishihara, Y., Tatami, A., Ohnuma, Y., Kawada, Y., Komano, K., Yamashita, S., Lee, N., Hiramata, M., Total Synthesis of Ciguatera toxin and 51-HydroxyCTX3C, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9352.
- 7) Oguri, H., Hiramata, M., Tsumuraya, T., Fujii, I., Maruyama, M., Uehara, H., Nagumo, Y., Synthesis-Based Approach toward Direct Sandwich Immunoassay for Ciguatera toxin CTX3C, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7608.
- 8) Tsumuraya, T., Fujii, I., Inoue, M., Tatami, A., Miyazaki, K., Hiramata, M., Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of ciguatera toxin 51-hydroxyCTX3C, *Toxicon* **2006**, *48*, 287.
- 9) Tsumuraya, T., Fujii, I., Hiramata, M., Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatera toxins, *Toxicon* **2010**, *56*, 797.
- 10) Tsumuraya, T., Takeuchi, K., Yamashita, S., Fujii, I., Hiramata, M., Development of a monoclonal antibody against the left wing of ciguatera toxin CTX1B: Thiol strategy and detection using a sandwich ELISA, *Toxicon* **2012**, doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.347.
- 11) Hokama, Y., Hong, T. W. P., Isobe, M., Ichikawa, Y., Yasumoto, T., Cross-Reactivity of Highly Purified

Okadaic Acid (OA), Synthetic, Spiroketal East Sphere of OA and Cigutoxin, *J. Clinical Anal.* **1992**, 6, 54.

12) Oguri, H., Tanaka, S., Hishiyama, S., Oishi, T., Hirama, M., Tsumuraya, T., Tomioka, Y., Mizugaki, M., Designed Hapten Aimed at Anti-ciguatoxin Monoclonal Antibody: Synthesis, Immunization and Discrimination of the C2 Configuration, *Synthesis* **1999**, 1431.

13) Nagumo, Y., Oguri, H., Shinodo, Y., Sasaki, S., Oishi, T., Hirama, M., Tomioka, Y., Mizugaki, M., Tsumuraya, T., Concise Synthesis of Ciguatoxin ABC-Ring Fragments and Surface Plasmon Resonance Study of the Interaction of Their BSA Conjugates with Monoclonal Antibodies, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2037.

14) Inoue, M., Lee, N., Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirama, M., Use of monoclonal antibodies as an effective strategy for treatment of ciguatera poisoning, *Toxicon* **2009**, 53, 802.

研究
紹介細胞外マトリックス分子の
ペプチド科学
～ラミニンの分子解剖と
医薬分野への応用～

東京薬科大学薬学部病態生化学教室

野水 基義

(nomizu@toyaku.ac.jp)

1. はじめに

基底膜は、表皮下や血管周囲、筋肉細胞や神経細胞のまわりなどほとんどの組織に存在しているうすい膜状の細胞外マトリックスである。近年、基底膜は、個体の発生や分化、組織の修復あるいはがんの増殖転移に深く関与していることが明らかとなりつつあり、構成成分の機能や作用メカニズムの解明が注目されているとともに、医薬分野への応用が期待されている。基底膜の構成成分には、IV型コラーゲン、ラミニン、パールカン（ヘパラン硫酸プロテオグリカン）、ニドジェンなどの巨大分子が知られており、これらがお互いに結合したスプラモレキュラーネットワークによるマトリックスを形成し、細胞に対して作用していると考えられている。これらの基底膜構成成分は様々な機能を有するが、中でもラミニンは基底膜の生物活性の中心を担っていることが知られている。著者はラミニンの機能部位を合成ペプチドを用いて網羅的に解析することにより、複雑なラミニンの機能を個々の機能部位に分けて解明し、さらにそこから得られる様々な活性配列（活性ペプチド）を医薬分野に応用することを目的に研究を行ってきた。ここでは、我々の研究のアウトラインを紹介する。

2. ラミニンの分子解剖

ラミニンは細胞接着、器官形成、神経網再生、血管新生、創傷治癒やがんの増殖転移など、複雑で多彩な生物活性を有する巨大分子のため、ラミニンの生物活性メカニズムを詳細に解明するには、個々の機能部位に分けて解析していくことが重要と考えられてきた。以前より、ラミニンの酵素消化によって得られる分解フラグメント、組換えタンパク質、合成ペプチドなどを用いた方法でラミニンの生物活性部位の探索が行われてきた¹⁾。著者らは最も古くから研究されているラミニンアイソフォームであるラミニン-111のアミノ酸配列を網羅した673種類のペプチドを合成し、種々の細胞を用いて細胞接着活性を詳細に評価することにより、図1に示した約20種類の活性ペプチドを同定した²⁻⁶⁾。活性のあったペプチドのなかには細胞特異的に接着活性や細胞遊走を促進するもの、またインテグリンや膜貫通型プロテオグリカンのシンデカンに特異的に結合するものなどが見つかってきている。例えば、 $\alpha 1$ 鎖のC末端の5つの球状モジュールの中でも4番目のLG4モジュール

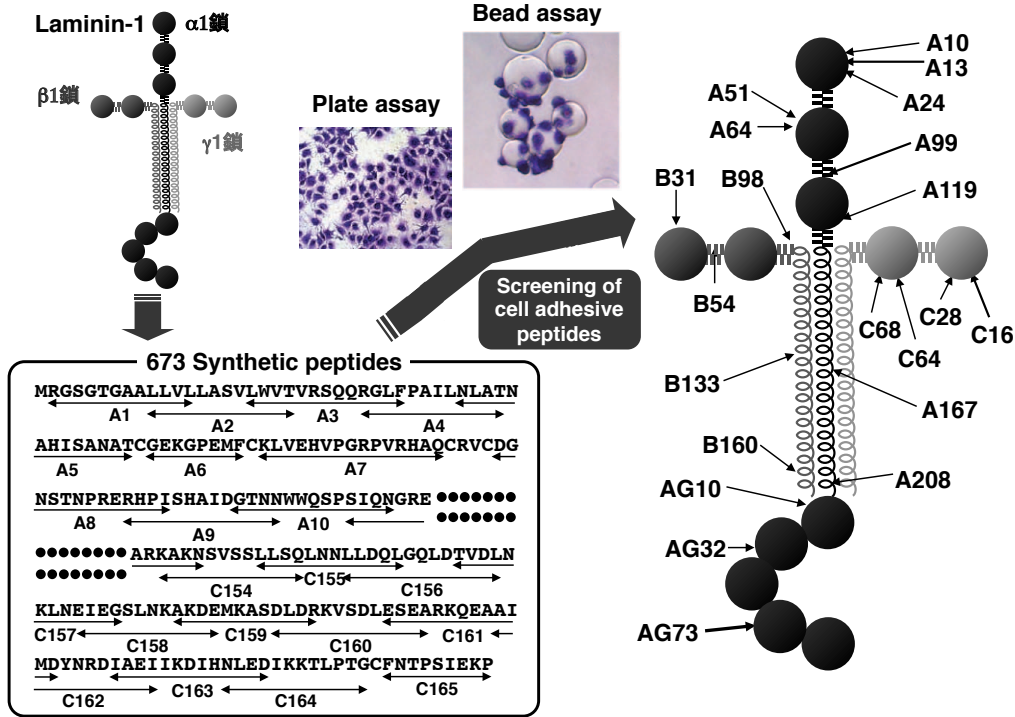


図1 ラミニン-111配列の中の細胞接着ペプチドの同定。ラミニン-111配列を網羅するペプチドライブラリーより細胞接着活性を示した代表的な活性配列(活性ペプチド)の位置を矢印にて示した。

の配列である AG73 (RKRLQVQLSIRT : マウスラミニン $\alpha 1$ 鎖 2719-2730) は、特に強い細胞接着活性を示し、細胞の遊走・浸潤やマトリックスメタロプロテアーゼの放出を促進させること、ヒト唾液腺由来細胞に作用して腺様構造を形成させ、神経細胞に作用して神経突起伸長を促進させること、*ex vivo* で器官形成を抑制させるなど様々な生物活性を持つことが分かってきた^{7, 8)}。さらに、AG73 がシンデカンを介して細胞に作用することが解明され、この部位がラミニン分子中において発生や分化に関する生理作用に深く関与していることが示唆された⁹⁾。また、ラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールからは $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンと特異的に結合する EF1 (DYATLQLQEGRLHFMFDLG : マウスラミニン $\alpha 1$ 鎖 2747-2765) も同定された⁶⁾。AG73 と EF1 の活性を比較したところ、AG73 はラフリング構造を伴った非常に強い細胞接着活性を示すが細胞伸展活性を示さず、EF1 は細胞接着活性に加えてアクチンストレスファイバーを形成し強い細胞伸展活性を示すことが分かった。これらの結果を変異導入した組換えタンパク質を用いて検証したところ、AG73 と EF1 はそれぞれ LG4 モジュールの細胞接着活性と細胞伸展活性に重要な機能部位であることが分かった¹⁰⁾。

現在までにラミニン-111~523 までの 17 種類のアイズフォームが知られている。最近、ラミニン-111 の発現はかなり限定された組織に局在することが分かってきており、基底膜は組織特異的に様々なラミニンアイズフォームが発現していることが明らかとなってきた。例えば、ラミニン-211, -221 は神経組織特異的に、ラミニン-332, -311, -321 は皮膚に多く、ラミニン-411, -421 は血管内皮に多く存在する。これらの機能部位の研究を行うことで、全てのラミニンに共通に保存されている機能部位や、神経や血管内皮などの組織特異的に作用する機能部位の同定が期待される。ラミニン-111 の研究でも示されたように、多彩な生物活性を有しているラミニンアイズフォームには様々な活性部位の存在が考えられる。ラミニンはインテグリン、シンデカン、ジストログリカンなど、20 種類以上の受容体と結合することが知られている。細胞は、細胞外マトリックス中のラミニン分子、あるいは、その分解フラグメントなどのリガンドの種類に応じて、細胞表面の受容体の使い分けを行い、様々なシグナルを受容していることが考えられる。

3. ラミニン活性ペプチドの細胞・組織工学への応用

基底膜においてラミニンは、細胞接着活性をはじめ様々な生物活性を有し、基底膜の主役的な役割を果たしている。細胞・組織工学において基底膜機能を有する理想的な材料として汎用されている「マトリゲル」は、マウスがん組織から抽出された可溶化基底膜で、ラミニン-111 を主成分としている。「マトリゲル」はマウスがん組織由来である事から実際の医療への応用には限界があるため、基底膜機能を模倣した安全な高分子材料の創製が期待されている。前述のラミニン活性ペプチドを高分子多糖に結合させ、基底膜分子の働きを再現し、人工基底膜の創製を目指した著者らの取り組みを紹介する。

これまで述べてきたラミニンの活性ペプチドは様々な活性を有することから組織工学分野への応用が期待できるが、ペプチドはそのままでは分解されやすく、組織に長くとどめることは困難である。すなわち、これらのペプチドを組織工学分野へ応用するためにはペプチドの活性を効率良く細胞に作用させることが重要になってくる。そこで著者らは、ラミニンの活性ペプチドを高分子多糖のキトサンの膜に固定化することを検討した(図2)¹¹⁾。キトサンは生分解性であり、人工皮膚などの形ですでに臨床応用されている。無血清状態で細胞接着活性を測定したところ未修飾のキトサン膜には細胞は接着しなかった。AG73 及び EF1 ペプチドをそれぞれキトサン膜に固定した膜を作成し、これらの膜に細胞を加えたところ、AG73-キトサン膜上で細胞は強く接着しラフリング構造をとること、EF1-キトサン膜上ではアクチンストレスファイバーを形成し強く伸展することが分かった。また、AG73 を固定化したキトサン膜上において神経系細胞の神経突起伸長が促進されるが、EF1-キトサン膜上では神経突起伸長が促進されないことが分かった。これらの結果から、細胞特異的な生物活性の違いはキトサン膜に固定されたペプチドが結合する細胞膜受容体に依存することがわかった。

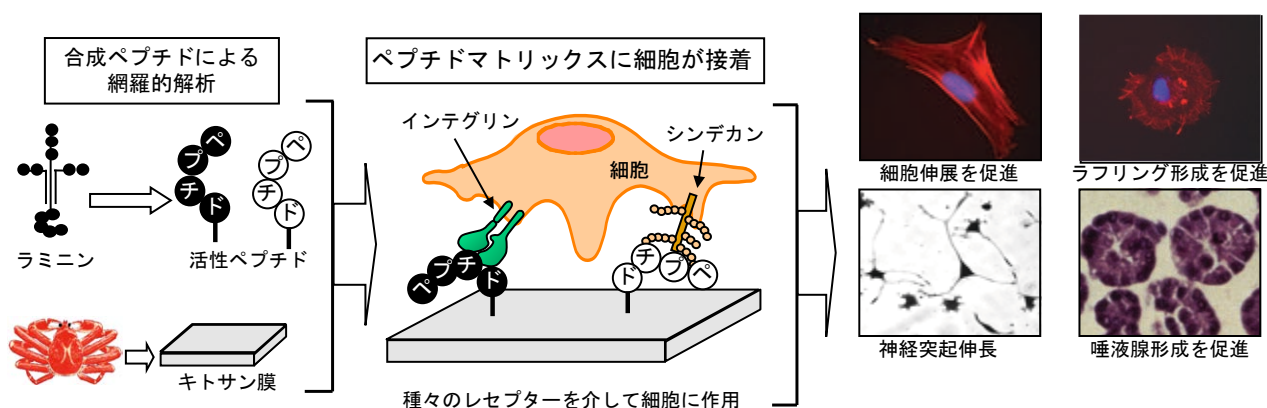


図2 ラミニン活性ペプチドを固定化したペプチド-キトサン膜と生物活性

ラミニン $\alpha 1$ 鎖 LG4 モジュールは AG73 部位でシンデカンと EF1 部位で $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンに作用することで細胞接着活性を有している¹⁰⁾。そこで、この LG4 モジュールの機能を模倣した医用材料を作製する目的で AG73 と EF1 を様々な比で混合しキトサン膜に結合させた膜を調製した。AG73 と EF1 の混合比によって細胞接着の強さや接着した細胞の形態が変化することが分かった。AG73 と EF1 の混合比が 1 : 9 のとき、LG4 モジュールと同程度の強い細胞接着・伸展と神経突起伸長活性を示した。キトサン膜上で AG73 と EF1 の混合比を変化させることにより、シンデカンとインテグリンの作用をコントロールできることが分かった¹²⁾。さらに、ラミニン-111 の活性ペプチドを数種類組み合わせることでキトサンに固定化することにより、飛躍的に活性を増大することができた¹³⁾。以上の

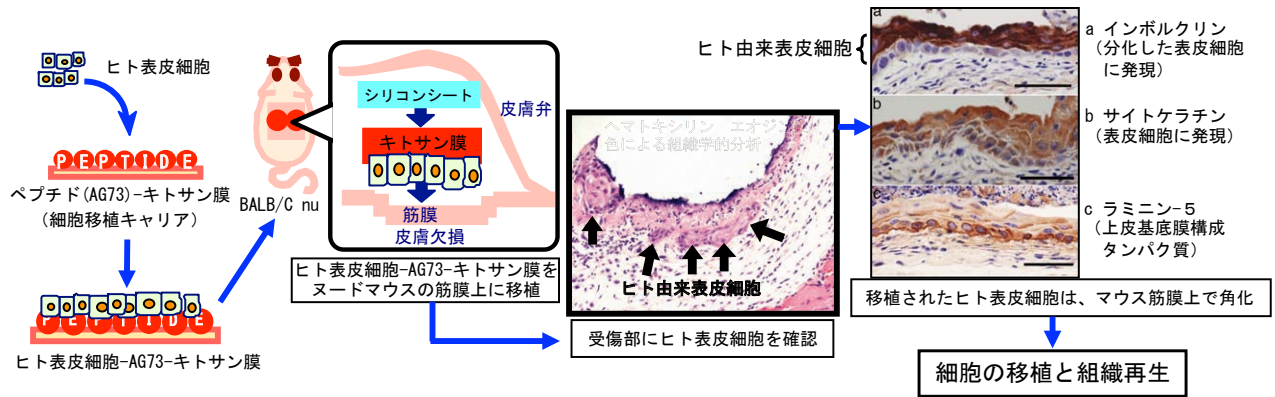


図3 ペプチド-キトサン膜を用いた細胞移植実験。ペプチド-キトサン膜上で培養したヒト表皮細胞をヌードマウスに移植したところ、生着し、マウス筋膜上で角化した。

実験から、受容体の異なる複数の細胞接着活性ペプチドをキトサン膜に固定化することにより、複雑な機能を有する基底膜タンパク質の機能を模倣することが可能であることが示された。この方法をさらに発展させることにより、複数の受容体に作用する人工基底膜ともいえる多機能性医用材料の開発が期待される。

また、ペプチド-キトサン膜が細胞移植に有効であることが実際の動物を用いた実験から分かった^{14, 15)}。図3に示したように、AG73-キトサン膜にヒト表皮細胞を接着させて表皮細胞組込み型創傷被覆材とし、ヌードマウスの側腹部に皮膚欠損創を作成し、表皮細胞組込み型創傷被覆材を移植して経時的に組織学的所見を観察した。3日後のヌードマウス側腹部にはヒト表皮細胞が生着し、角化していることが観察された。以上のように、ペプチド-キトサン膜の細胞移植への応用の可能性が示された。ペプチドを固定化した高分子多糖複合体を人工基底膜として開発を行うことにより、創傷治癒や神経再生を目的とした細胞移植や再生医療の分野での応用が期待される。

4. おわりに

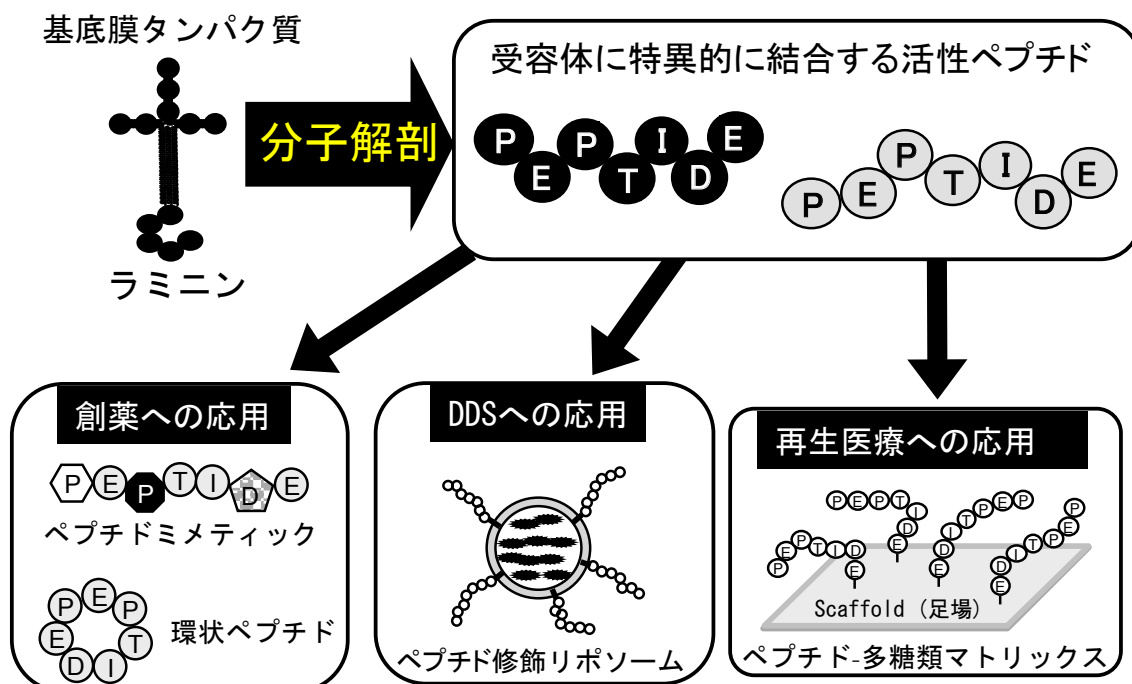
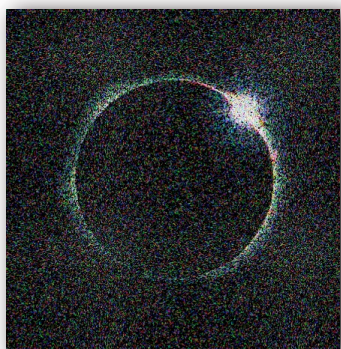


図4 基底膜タンパク質・ラミニンの分子解剖と医薬分野への応用 (研究の流れ)

巨大な細胞接着タンパク質であるラミニンの分子解剖, すなわち網羅的スクリーニングと機能ペプチドの詳細な生物活性の解析, さらにはそれらの医薬分野への応用をめざした研究の流れで, 「細胞接着分子のペプチド科学」を展開している (図 4)。現在, 著者らは, 先述の手法を用いて, 全てのラミニンアイソフォームの網羅的スクリーニングを行っており, これまでに 3000 種類以上の合成ペプチドから約 50 種類の活性ペプチドを同定してきた。これらの活性ペプチドの中から実際に医療に応用できるものが出てくることを期待して研究を続けて行く予定である。

参考文献

- 1) Yamada, Y. & Kleinman, H. K. (1992) *Current Opin. Cell Biol.*, **4**, 819-823.
- 2) Nomizu, M., Kim, W. H., Yamamura, K., Utani, A., Song, S. -Y., Otaka, A., Roller, P. P., Kleinman, H. K., & Yamada, Y. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 20583-20590.
- 3) Nomizu, M., Kuratomi, Y., Song, S.-Y., Ponce, L. M., Hoffman, M. P., Powell, S. K., Miyoshi, K., Otaka, A., Kleinman, H. K., & Yamada, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 32198-32205.
- 4) Nomizu, M., Kuratomi, Y., Malinda, K. M., Song, S.-Y., Miyoshi, K., Otaka, A., Powell, S. K., Hoffman, M. P., Kleinman, H. K., & Yamada, Y. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 32491-32499.
- 5) Nomizu, M., Kuratomi, Y., Ponce, L. M., Song, S. -Y., Miyoshi, K., Otaka, A., Powell, S. K., Hoffman, M. P., Kleinman, H. K., & Yamada, Y. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **378**, 311-320.
- 6) Suzuki, N., Nakatsuka, H., Mochizuki, M., Nishi, N., Kadoya, Y., Utani, A., Oishi, S., Fujii, N., Kleinman, H. K., & Nomizu, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 45697-45705.
- 7) Hoffman, M. P., Nomizu, M., Roque, E., Lee, S., Jung, D. W., Yamada, Y., & Kleinman, H. K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 28633-28641.
- 8) Kadoya, Y., Nomizu, M., Sorokin, L. M., Yamashina, S., & Yamada, Y. (1998) *Dev. Dyn.*, **212**, 394-402.
- 9) Hoffman, M. P., Engbring, J. A., Nielsen, P. K., Vargas, J., Steinberg, Z., Karmand, A. J., Nomizu, M., Yamada, Y., & Kleinman, H. K. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 22077-22085.
- 10) Hozumi, K., Suzuki, N., Nielsen, P. K., Nomizu, M., & Yamada, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **281**, 32929-32940.
- 11) Mochizuki, M., Kadoya, Y., Wakabayashi, Y., Kato, K., Okazaki, I., Yamada, M., Sato, T., Sakairi, N., Nishi, N., & Nomizu, M. (2003) *FASEB J.*, **17**, 875-877.
- 12) Hozumi, K., Yamagata, N., Otagiri, D., Fujimori, C., Kikkawa, Y., Kadoya, Y., & Nomizu, M. (2009) *Biomaterials*, **30**, 1596-1603.
- 13) Hozumi, K., Sasaki, A., Yamada, Y., Otagiri, D., Kobayashi, K., Fujimori, C., Katagiri, F., Kikkawa, Y., Nomizu, M. (2012) *Biomaterials*, **33**, 4241-4250.
- 14) Ikemoto, S., Mochizuki, M., Yamada, M., Takeda, A., Uchinuma, E., Yamashina, S., Nomizu, M., & Kadoya, Y. (2006) *J. Biomed. Mater. Res. A*, **79**, 716-722.
- 15) Masuda, R., Mochizuki, M., Hozumi, K., Takeda, A., Uchinuma, E., Yamashina, S., Nomizu, M., & Kadoya, Y. (2009) *Wound Repair Regen.*, **17**, 127-135.



気になった論文

桂 嘉宏 (かつら よしひろ)

東京大学大学院理学系研究科化学専攻 分析化学研究室 博士課程 1年

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

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」へ執筆の機会を与您にいただきまして、誠にありがとうございます。私は現在、東京大学大学院理学系研究科、小澤岳昌教授のもとでタンパク質の活性を光によって制御する新規手法の開発とその応用研究に携わっております。光による分子機能の制御法は、その時空間的分解能の高さや対象分子に対する特異性の高さなどの利点から、近年非常に発展著しい分野となっております。これらの光制御法はその原理に基づいて、大きく2つに分けられます。すなわち、光分解性の保護基を導入することによって本来の機能を抑制した有機小分子であるケージド化合物を用いる手法、および光受容タンパク質を利用した遺伝子コード型の手法の2つです。

今回は、ケージド化合物を用いた光制御法から1報、光受容タンパク質を利用した光制御法から2報を紹介させていただきます。それでは、よろしくお願いいたします。

Spatiotemporal resolution of the *Ntla* transcriptome in axial mesoderm development.

Shestopalov IA, Pitt CL, Chen JK., *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 270–276(2012).

遺伝子の発現を動物個体内で時空間的に制御できれば、ある遺伝子が生体内のある場所である時間にどのような生理的役割を果たすか、詳細に解析することが可能です。

今回は、遺伝子をターゲットとしたケージド化合物から、アンチセンス分子の1つであるモルホリノオリゴ(MO)を用いた遺伝子制御法とそのゼブラフィッシュ初期胚への応用研究を紹介します。ゼブラフィッシュの胚は胚発生の全期間において透明であるため、顕微鏡下で全ての細胞を追跡することが可能であり、光制御を要する実験系で頻繁に用いられるモデル生物です。

ケージドモルホリノオリゴ(cMO)は光照射によってアンチセンス分子であるMOを遊離する分子であり、目的遺伝子の発現を時空間的に抑制することが可能です(図.1(a))。筆者らは、脊索形成で主要な役割を果たす転写因子*Ntla*を標的としたcMOを開発し、これをフローサイトメトリーおよびマイクロアレイに組み合わせ、ゼブラフィッシュの中胚葉において*Ntla*のトランスクリプトームを解析しました(図.1(b))。具体的には、まず蛍光色素フルオレセインをケージングしたケージドフルオレセイン(cFD)をcMOとともにゼブラフィッシュの胚に注入し、その後、将来脊索となる領域を紫外線照射します。紫外線照射によって*Ntla*発現が抑制さ

れた細胞はフルオレセインの蛍光を示すため、フローサイトメリーによってこれらを選択的に分取します。分取した細胞の遺伝子発現パターンをマイクロアレイによって解析し、これを遺伝子発現が抑制されていない個体と比較することで、Ntlaの時空間的トランスクリプトームが明らかとなります。

筆者らは本手法により、実際に、Ntlaの下流でその発現が調節されている候補遺伝子を100個程度特定し、それらの機能解析を行いました。個体全身のNtlaを抑制する従来法と比較して8倍以上の数の遺伝子を特定できたことから、本手法の有用性が示されました。これほど多くの遺伝子を特定できた理由は、光照射領域を限定し、発現抑制された細胞をフローサイトメリーによって分取したことで、バックグラウンドが下がったためと考えられます。ここにバックグラウンドとは、実際は、ある一部の細胞においてNtlaの下流で調節されている遺伝子が、その他の細胞では恒常的に発現しているなどの理由で、個体全体の平均としては見かけ上Ntlaの下流で発現調節されていないように解析されることを指します。

さらに、筆者らは、これまでNtlaの下流で調節されていると広く考えられていた2つの遺伝子*flh*と*fgf8a*が、実際には直接的な調節を受けていないのではないかというデータを示します。すなわち、従来法では個体全体にわたってNtlaを一様に抑制するため生体に与える摂動が強すぎ、本来ならばNtlaが直接的に関わらない遺伝子の発現にさえも抑制の効果が現われたのではないかと考察しています。

本論文で示されたように、遺伝子発現の光制御法によって遺伝子発現を高い時空間分解能で制御することが可能となり、今後ゼブラフィッシュに限らずその他の個体においても新規の遺伝子機能が明らかになっていくことが十分に期待されます。

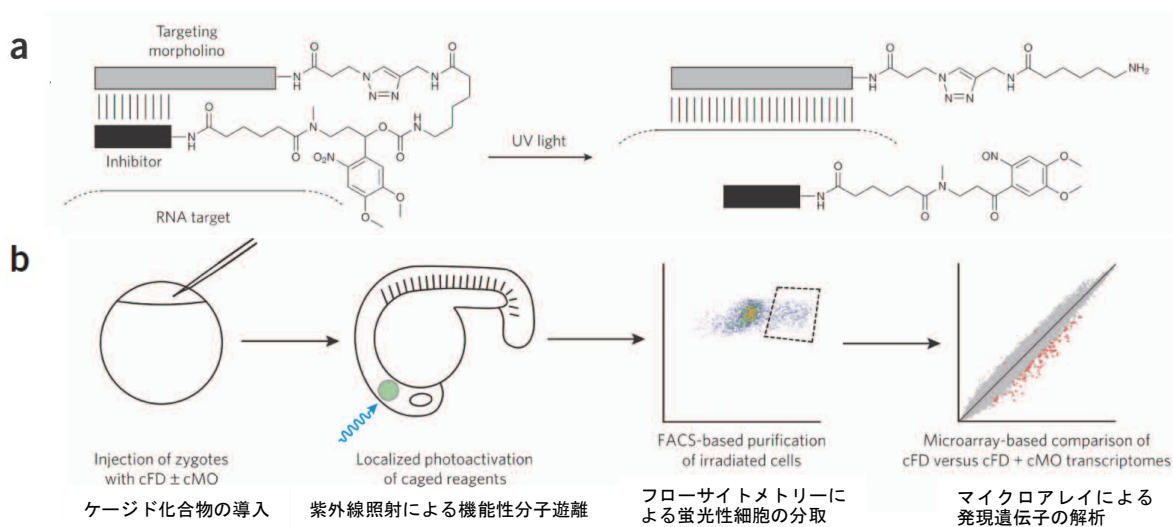


図 1 (a)ケージドモルホリノオリゴ(cMO)の原理と構造. (b) cMO およびケージドフルオレセイン(cFD)を用いた遺伝子発現パターン解析法の実験スキーム. (論文より一部改変)

Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system.

Xue Wang, Xianjun Chen, Yi Yang, *Nat. Methods.*, **9**, 266–269 (2012).

ケージド化合物による遺伝子発現の光制御法と同様の試みは、光受容タンパク質を用いた遺伝子コード型の手法でも行われています。ケージド化合物による光制御が、多くの場合400 nm以下の紫外線を利用するのに対し、遺伝子コード型の手法は光受容タンパク質の吸収特性から可視光領域を用いるものが主であり、細胞に対する毒性、生体透過性という点で有利と考えられています。しかしその反面、一般に生体イメージングで用いる蛍光・発光タンパク質のスペクトルが可視光領域であることを考えると、イメージングで

用いる光と光刺激に用いる光がオーバーラップすることは短所とも捉えられます。

本論文では、光照射によりホモダイマーを形成する光受容タンパク質Vividを利用して、転写因子Gal4の活性化を光によって誘導する手法を開発し、さらに、本手法によって、特に可視光を透過しにくいとされるマウスの肝臓でも遺伝子発現を光誘導できることを実証しました(図.2(a))。これまでも、光受容タンパク質を利用した遺伝子発現の光制御法はいくつか報告がありますが、生きた哺乳動物個体を切開などの特別な処置なしに使用した前例はなく、本手法の特徴がその高い光感受能にあることを示唆します。また、2種類のタンパク質を導入する必要がある従来法と比較して、導入するタンパク質が1種類であることから、発現量の調節が簡単であるという利点もあります。

まず、筆者らは培養細胞において、開発した手法の最適化を試みます。すなわち、光受容タンパク質のアミノ酸変異によって、バックグラウンドとなる暗状態での二量体化を弱めた変異体の作製を目指しました。結果、2つのアミノ酸変異により、光照射によって数100倍の遺伝子転写量増加を達成し、さらに光照射の時間および回数によって段階的に遺伝子転写量を増加させられることを実証しました。

次に、開発した手法をマウス個体に応用します。ハイドロナミクス法と呼ばれる手法により肝臓に光制御タンパク質を発現させ、LED光で生きたマウスを光照射しました。結果、光照射によって遺伝子発現を制御できることを確認し、さらにInsulinの遺伝子をターゲットとすることによって、肥満マウスの血糖値を光照射によって低下させることに成功しました(図.2(b))。現段階ではマウス個体の場合、数時間にも及ぶ光照射が必用であるなど実用的な課題もありますが、今後、光感受性のさらなる向上等によって、臨床面への応用も検討できるかもしれません。

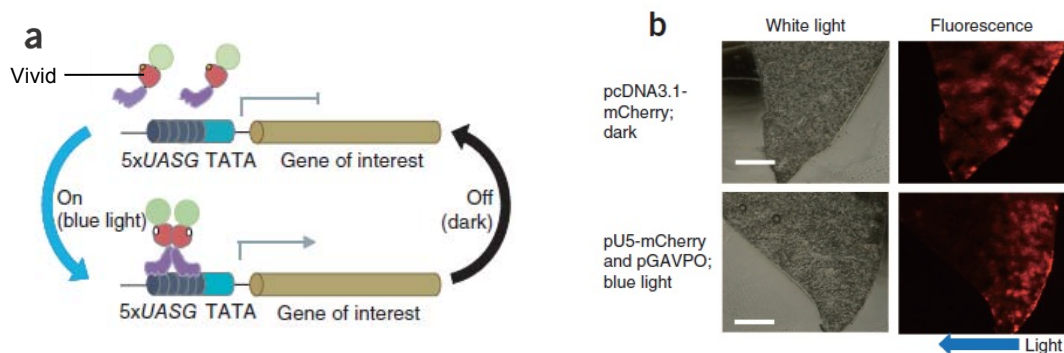


図 2 (a)光受容タンパク質 Vivid を用いた転写因子の光制御法の原理. (b)マウス肝臓における遺伝子発現制御実験. 蛍光タンパク質 mCherry の発現を光制御. 上は mCherry を一過的に過剰発現した対照実験の図であり, 下は制御対象である転写因子の認識配列下流に mCherry の配列を挿入した場合の図. (論文より一部改変)

Light-based feedback for controlling intracellular signaling dynamics.

Toettcher JE, Gong D, Lim WA, Weiner OD. *Nat. Methods.*, **8**, 837–839 (2011).

分子機能の光による制御法の大きな利点の1つは、光の強度を変えることによって、分子の活性化または不活性化の強度を調節できる点にあります。しかし、その活性化強度の正確な調節は多くの場合簡単ではありません。なぜなら、一般に細胞内に発現する光受容タンパク質の分子数は細胞によって異なり、また、例え同じであるとしても、複雑な細胞内環境下では光受容タンパク質の活性化は光強度に対し完全に線形ではないからです。応答強度を予め正確に予測することが難しく、また同じ強度で光を照射しても細胞によって応答強度が異なるため、定量性という点に大きな課題があるのが現状です。

本論文では、光照射した細胞からの応答を逐一解析し、光照射の強度を自動で調節することによって任

意の活性化パターンを達成するというユニークな手法を提案しています。すなわち、光照射された系からのフィードバックをもとに、光の強度を微妙に変化させながら目的の活性化強度を達成するというものです。

筆者らは、原理証明実験として、細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質をリン酸化するタンパク質PI3Kの光制御法を示します。光受容タンパク質にはPhyBとPIF6と呼ばれるタンパク質を用います。これらは650 nmの光によりヘテロダイマーを形成し、750 nmの光によりヘテロダイマーを解離する性質をもちます。そのため、活性化したい領域以外を750 nmの光で照射し、不活性化しておくことで高いS/Nを達成することが可能です。

まず、2つの光受容タンパク質のうち一方をPI3Kが活性化する細胞膜に局在させ、他方をPI3Kと融合させ細胞質に局在させます。光照射によるPhyBとPIF6のヘテロダイマー化はPI3Kの細胞膜への局在を誘導し、PI3Kは細胞膜上でイノシトールリン脂質(PIP_2)をリン酸化します。この際、リン酸化されたイノシトールリン脂質(PIP_3)を認識するレポーターがあれば、ある光照射の強度によってどの程度PI3Kが活性化したかを定量することができます。そこで筆者らは、 PIP_3 を認識するタンパク質Aktに蛍光タンパク質を融合させ、レポーターとして PIP_3 産生を定量し、光照射強度の調節に用いるという光制御システムを構成しました(図.3(a), (b))。 PIP_3 産生に伴いAktは細胞膜に局在変化するので、細胞膜の蛍光強度を解析することで簡単に PIP_3 産生を定量できます。得られた活性化強度と指向する活性化強度の差異を埋めるように逐次的に光照射の強度を変えていけば、どのような活性化パターンも実現することが可能です。図.3(c)は実際に系からのフィードバックを利用した場合のPI3Kの活性化、および一定の光強度を照射し続けた場合のPI3Kの活性化、それぞれの経時変化を表すグラフです。400秒のときにPI3Kの阻害剤であるLY294002で細胞を処理し、応答強度の変化を解析しました。結果、系からのフィードバックを利用した場合には応答強度がほぼ一定になるのに対し、一定の光強度で照射し続けた場合には、PI3Kの活性化強度が望むべき応答強度に対して大きく揺らぐことがわかります。本手法は、様々な生体内の摂動に対して、系からのフィードバックを利用することで、実験者の望む応答強度を自在に達成するという点において非常に画期的であり、今後、光による分子機能の制御法に正確な定量性を与える点で非常に強力であると考えられます。

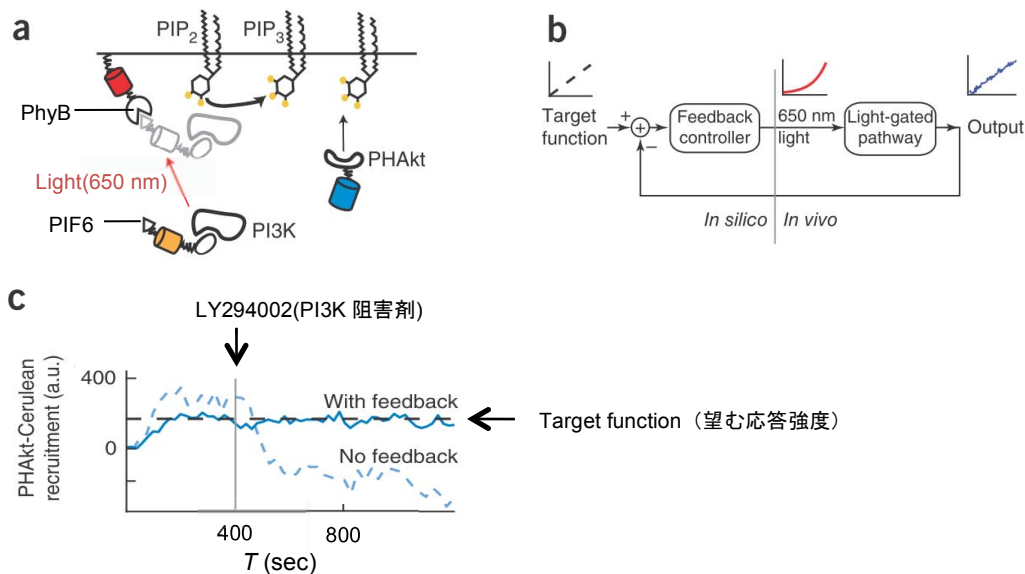


図 3 (a) PhyB と PIF6 による PI3K 活性の光制御原理図. PHAkt は PIP_3 を認識する Akt のドメインを表す. (b)系からのフィードバックを利用し光強度を調節する手法の概略. (c)系からのフィードバックを利用する場合 (With feedback(水色線))および一定強度の光を照射し続けた場合 (No feedback(水色点線))の比較. (論文より一部改変)

気になった論文

内藤 豊裕 (ないとう とよひろ)

名古屋大学大学院 工学研究科化学・生物工学専攻応用化学分野馬場研究室 博士課程後期課程 3年
naito.toyohiro@f.mbox.nagoya-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆の機会を頂き、誠にありがとうございます。私は現在、名古屋大学工学研究科の馬場嘉信教授の研究室に在籍しております。馬場研究室は、マイクロ・ナノ技術を応用して、生体分子の新規高性能分離・検出技術の開発や、医療分野への展開を目指した*in vivo*イメージング技術や早期診断デバイスの開発等、新規分析手法・分析デバイス開発研究を行っている研究室です。私は特に、マイクロ流体デバイスと呼ばれる半導体製造に用いられる加工技術によってマイクロサイズの溝をもつ小型デバイスを作製し、デバイスへ溶液を流すだけで分子生物学実験が行えるような分析デバイスの開発を目指して研究しております。今回は、マイクロ流体デバイスを用いた、単一細胞解析、細菌由来のDNA定量的検出、生体組織の模倣に関する研究を紹介いたします。

Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility

B. B. Aldridge, M. Fernandez-Suarez, D. Heller, V. Ambravaneswaran, D. Irimia, M. Toner, S. M. Fortune, *Science*, **355**, 100–104 (2012).

結核は年間死者数150万人以上という世界的にも重要な健康問題であり、HIV/エイズ、マラリアに並んで世界三大感染症のひとつです。病原であるヒト型結核菌*Mycobacterium tuberculosis*は異なる抗生物質感受性を持つため完治するために様々な抗生物質による長期間の治療が必要になります。筆者らはこの多様な抗生物質感受性の獲得は、非対称な細胞成長過程によるものではないかと考え、マイクロ流体デバイスを用いた細胞の成長過程観察と、抗生物質感受性について単一細胞レベルでの解析によって、マイコバクテリアの非対称性成長過程と、抗生物質感受性獲得との関連性を調べています。

*M. tuberculosis*と類似の非対称性成長する*M. smegmatis*をモデル細胞とし、成長過程観察開始直前に細胞表面のアミンを染色することで、染色されていない部位を新しく成長した部位として、その非対称な増殖過程の観察が可能になります。観察には櫛のような幅広い流路の片側に細い流路を並べた構造のマイクロ流体デバイスが使用され、流路内の細胞を顕微鏡による明視野および蛍光観察しております(図1)。マイクロ流体デバイスの深さは、幅

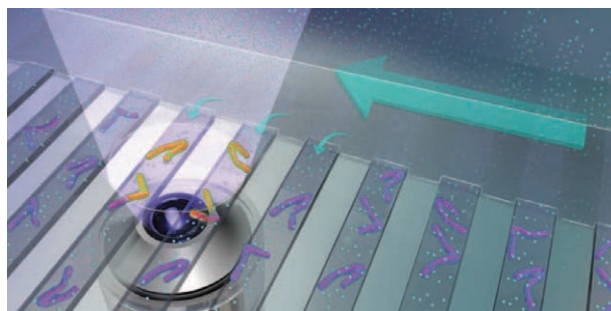


図1 マイクロ流体デバイスを用いた細胞観察実験 (論文より抜粋)

広い流路が10-17 μm , 細い流路は0.8-0.9 μm になるように作製されており、幅広く深い流路は細胞への培地や刺激物質供給用, 浅い流路は細胞の培養と観察用に使用しています。浅い流路を細胞観察用に用いることで、細胞の動きを2次元的なものに制限し、単一細胞ごとの成長過程の観察が可能になります。また、容易に細胞周囲の環境を変えられるのもマイクロ流体デバイスの特徴で、細胞の染色や特定物質によ

る刺激も、流路内への溶液導入だけで可能です。これらの特徴を利用して、抗生物質による細胞刺激後の細胞の生死判定による抗生物質感受性テストを行っています。

この手法により、マイコバクテリア細胞は、成長極を受け継いだ細胞は速く、もう一方の細胞は遅く成長し、速く成長する細胞ほどサイズが大きくなる事を明らかにしています。また細胞分裂を繰り返すほど、速く成長する細胞は抗生物質への感受性が強く、細胞増殖特性の非対称性と抗生物質への抗生物質感受性獲得の違いの関連性を示唆しています。結核菌も同様の多様性獲得機構を持つことが予想され、多様性獲得機構の解明による結核治療への貢献が期待されます。

Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification

K. Hsieh, A. S. Patterson, B. S. Ferguson, K. W. Plazco, H. T. Soh, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 4896–4900 (2012).

マイクロ流体デバイスの最も大きな利点のひとつは、装置の小型化にあります。分子診断学、食品安全検査、環境モニタリングや検査においては、ポイントオブケア(POC)検査と呼ばれる、検体を取ったその場での病原菌検出の需要が大きくなりつつあります。マイクロ流体デバイスは、携帯性に優れ、またその熱容量の低さから温度環境を一定に保ちやすいため、POCに最適なデバイスです。Hsiehらは、マイクロ流体デバイスを用いて、食中毒菌 *Salmonella enterica enterica* 由来遺伝子の検出技術(MEQ-LAMP)を開発しました。

この論文では電気化学的に活性なインターカレーターであるメチレンブルー(MB)を用いて、LAMP法におけるDNA増幅のリアルタイム観察を電気化学的に行っています。標的遺伝子の増幅に伴ってMBがDNAへと結合すると、溶液中にあるDNA未結合のMB分子数が減少します。LAMP法を行うマイクロサイズの反応場には金電極が埋め込まれており、DNA未結合MBによる還元電位を測定することで、DNAの増幅を還元電位の減少として得られます(図2)。体積を小さくすると、比表面積が大きくなるため、マイクロ空間を用いることで電極表面と作用するMB分子数が相対的に多くなり、バルク実験に比べて高感度な検出が可能になります。

標的遺伝子を含んだサンプルと、含まないサンプルのLAMP法中の還元電位の計時変化を測定すると、標的遺伝子を含むサンプルの還元電位は時間経過とともに減少していることが確認されました。得られた減少曲線の導関数の極小値をしきい値(時間)とすると、しきい値は標的遺伝子の濃度に対して指数関数的に減少しており、通常のリアルタイムPCRと同様の検量線を得る事ができます。この技術では、4 fg/μLのDNAの検出に成功しており、今後前処理のプロセスを組み込む事で非常に有用なPOCデバイスへの発展が考えられます。

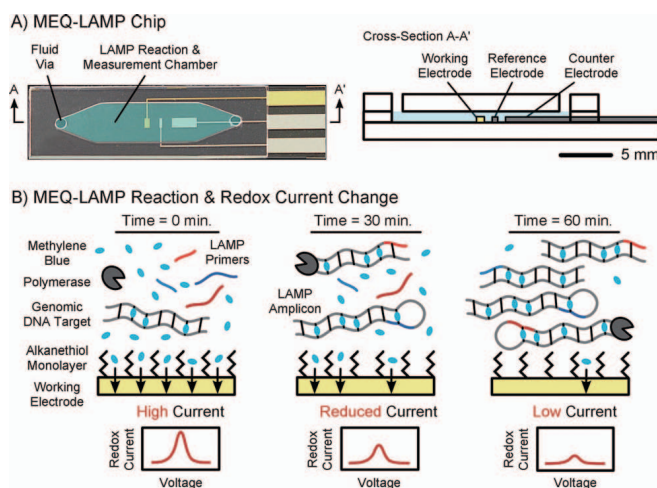


図2 MEQ-LAMPの概要 A) マイクロ流体デバイスの俯瞰図(左)と断面図(右) B) MEQ-LAMPの検出原理(論文より抜粋)

Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow

H. J. Kim, D. Hub, G. Hamilton D. E. Ingber, *Lab Chip*, DOI: 10.1039/C2LC40074J (2012).

創薬分野では、新薬の効能や副作用の評価、代謝、輸送、経口吸収のメカニズム解析に培養細胞を用いられます。ディッシュや、ウェルプレート上で培養した組織細胞は、構造、機能、共生細菌の有無など、病態生理学的な特性が実際の組織と異なっているという問題があり、より体内の環境に近い臓器モデルが求められています。この論文では、マイクロ流体デバイスによって、体液から受けるシェアストレスと、蠕動運動のような周期的な機械的変形を再現した、より生体内の環境に近い状態での組織細胞培養を行い、構造的、機能的に実物に近い腸モデル (gut-on-a-chip) を作製しています。

ここで用いられるマイクロ流体デバイスは、直径 10 μm の孔を持つ多孔質膜と、その上下にある溶液用流路、さらにその左右にある圧力調整用の空洞から構成されています。多孔質膜は細胞の足場として働き、溶液用流路は細胞への培地供給に使用されます。材質はシリコンゴムで作製されているため、圧力調整用の空洞内の圧力を変化させる事で、足場を最大50%の伸長が可能です。筆者らは、培地の流れによってシェアストレスを、足場変形によって機械的ストレスを再現しています (図3)。

ヒト小腸様細胞株のCaco-2 BBe細胞を3つの条件下 (①トランスウェル上での静的培養, ②マイクロ流体デバイス内でせん断応力を与えながらの培養, ③マイクロ流体デバイス内でせん断応力と機械的ストレス両方を与えながらの培養) で培養して比較しています。細胞間分子輸送を制御するタイトジャンクションの形成は、静的培養では21日かかるのに対して、シェアストレスを与えることにより3日間に短縮され、さらに細胞の厚みもシェアストレスを与えた場合、体内の腸細胞とほぼ同じ厚みの30-40 μmまで成長しており、静的培養した細胞の約6倍の厚みになっています。また、シェアストレスと機械的ストレスを与えながら長時間培養することで、実際の腸と同じようなしわと折りたたみ構造をもつ事が観察されています (図3e)。機能面においても、静的培養に比べて適正なストレス下で培養した細胞の方が、電気化学的測定によるタイトジャンクションの形成度合い評価で3-4倍高い値を示し、消化酵素活性も7倍以上高いことが分かりました。筆者らは腸内細菌*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)との共生実験もおこなっており、シェアストレスと機械的ストレスを与えることではじめてLGGと共生できたことを述べています。

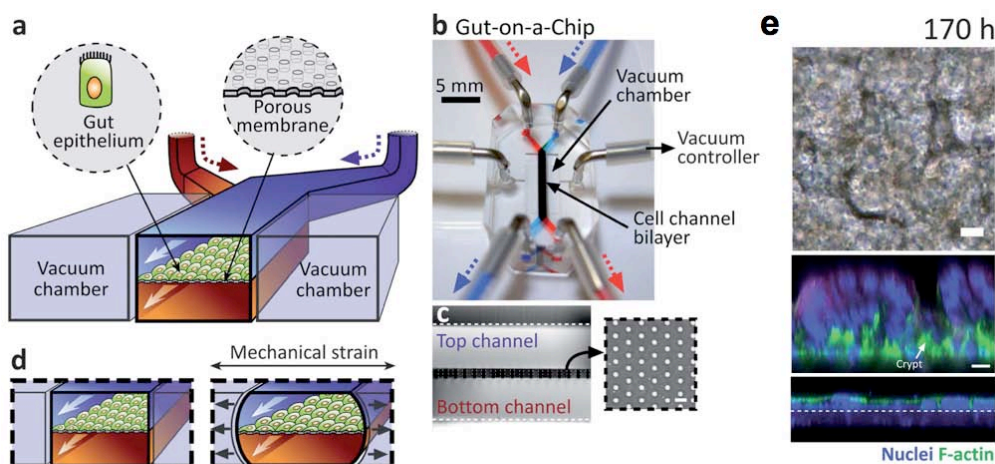


図3 a) gut-on-a-chip の概要 b) gut-on-a-chip の写真 c) gut-on-a-chip の断面写真 d) 機械的ストレスの与え方 e) gut-on-a-chip によって培養した細胞の明視野画像 (上), 蛍光断層画像 (中), トランスウェル上で静的培養した細胞の蛍光断層画像 (下) (スケールバー20 μm) (論文より一部改変)

留学
体験
記

ドイツ・マックスプランク分子生理学研究所留学体験記

Max Planck Institute of Molecular Physiology, Department of Chemical Biology

高山 浩 (Hiroshi.Takayama@mpi-dortmund.mpg.de)

私は現在、ドイツ・マックスプランク分子生理学研究所 (Max Planck Institute of Molecular Physiology) の Herbert Waldmann 教授の下、博士研究員として研究を行っております。2011年3月に東北大学大学院薬学研究科、岩淵好治教授、叶直樹准教授の下で博士号を取得し、同年4月より Waldmann 教授の下、博士研究員として研究に従事する機会を頂き現在に至ります。今回、留学体験記を執筆する機会を頂きましたので、編集委員の井原先生に感謝すると共に、今後海外での研究留学を希望されている学生の皆さんのお役に少しでも立てばと思ひ、ポスドクポジションの獲得、研究生活等について紹介させていただきます。



研究室メンバーと（中央が筆者、右隣が Group Leader の Andrey）Münster での学会にて

ポスドク先決定まで

私が Waldmann 教授に初めて連絡を取ったのは、博士課程修了まで約1年となった2010年3月でした。ポスドクでは、有機合成化学的手法を用いて、生物活性天然物が有する特異な基本骨格を母骨格とする化合物ライブラリーの構築と、その生物活性評価を行いたいと考えていました。そこで、上記研究分野で実績があり、かつ興味深い研究を行っていた Waldmann 研究室に問い合わせを行いました。Waldmann の研究に大変興味を持ち、ぜひポスドクとして研究室に参加したいという内容に加え、これまで行ってきた自分の研究内容と自身の強みに言及した内容のメールを書きました。また、当時指導教官でもあった岩淵

好治教授、叶直樹准教授と修士課程時の指導教官であった理化学研究所、長田裕之教授に推薦人になって頂き、ポスドクとして受け入れてくれるか伺うメールを送りました。送信から2週間後に、Waldmann 教授から研究室に2年間受け入れますとの旨のメールを頂き大変嬉しかったのを覚えています。同時に留学への不安もありましたが、ドイツへ行くことへの期待や好奇心の方が強かったのを覚えています。残念ながらグラントを獲得することはできませんでしたが、Waldmann 教授のご厚意によりマックスプランクから fellowship を頂き、現在に至ります。

ドイツ・ドルトムントでの生活

私が留学しているマックスプランク分子生理学研究所は、ドイツ西部に位置する NRW 州のドルトムントにあります。ドルトムントは人口 59 万人の大都市ですが、観光には縁のない鉄鋼業で発展したルール地方の工業都市であったため、日本ではこれまであまり知られていなかったと思います。現在では、サッカー日本代表の香川真司選手が所属しているボルシア・ドルトムントが本拠地としている都市としてよく知られていると思います。ドルトムントは、工業都市とは思えないほど緑豊かな都市です。天候は、日本の平均気温より低く、特に夏場は過ごしやすい天候です。30℃を超えることは殆んどなく、かつ乾燥しており大変過ごしやすい晴天の日が続きます。しかし冬場は一転し、寒さの厳しい氷点下の日が続きます。

ドイツの公用語は当然ドイツ語で、ドイツ語が全くできない筆者には最初の生活セットアップは一苦労でした。家探しから始まり、住民登録、ビザ取得、銀行口座の開設など、同僚の助けを借りながら行いました。最初の頃は、レストランやパン屋さんに行っても商品名が分からず…欲しい物を指差しながら、Das Bitte! (これ、ください!) で、何とか買い物をしていました。最近では、少しドイツ語が喋れるようになった気がしています。こちらは家賃、物価ともに日本に比べれば安く (缶ビールが約 50 円!!) 大変生活しやすい環境だと思えます。ただ、お米などの日本食材は割高で、また日本食材で欲しいものを見つけるのも至難の業です。日本食が食べたい時や日本の物が欲しい時は、電車で一時間程度で行くことができるデュッセルドルフに向かいます。デュッセルドルフには世界最大の日本人街があるために、日本の物を買うことが可能ですが、こちらも割高です。ただ、ドルトムントにはない日本食レストランやラーメン屋さんがあるので、たまにお世話になっています。



ドルトムントのシンボル (左) 「ドルトムントの U」はかつてのユニオン・ビールの発酵所 (中央) ジグナル・イドゥーナ・パーク (右) クリスマスツリー

ドイツと言えば、サッカーとビールのイメージが強いかと思います。ドルトムントも例外なく、サッカーとビールをこよなく愛する町です。サッカー日本代表の香川真司選手が所属しているボルシア・ドルトムントのホ

ームスタジアム、ジグナル・イドゥーナ・パークはドイツで最も大きいスタジアムであり、ヨーロッパでも屈指の観客動員数を誇り、約8万人以上の観客でスタジアムは埋め尽くされます(上記中央の写真)。試合当日は黄色(ポルシアのチームカラー)のユニフォームを着たサポーターで町中も埋め尽くされます。スタジアムは熱狂的かつ地鳴りのような応援が続き、筆者も観戦に行きましたが、ただただその雰囲気圧倒されるばかりでした。ドイツでサッカーが文化の一つとして深く根付いていることを肌で感じられた貴重な体験でした。また、幸運にも、ポルシア・ドルトムントの2010-2011、2011-2012年シーズンの連覇に立ち会えることが出来、大変良い思い出となっています。

クリスマスシーズンと年末も日本にはない雰囲気を体験することが出来ました。クリスマスシーズンが近づくと、町は一転して華やかな雰囲気に包まれ、多くの出店が集まったクリスマスマーケットが始まります。ドルトムントには、世界一の大きさを誇るクリスマスツリー(40 m)が立ち、多くの人で賑わいます。こちらの大晦日(ジルベスター)には、カウントダウンと共に花火を打ち上げて新年を祝う習慣があります。ドイツでは個人で花火をすることが法律で禁止されているのですが、大晦日のみ花火を行うことが許されています。そのためか、ここぞとばかりに大量の爆竹やらロケット花火やらが夜中の2時過ぎまで続き…次の日の朝の道は大変なことに。当然、筆者も花火を楽しみました。

ドイツには魅力的な町が多く、ハンブルク、ドレスデン、ケルン、ハイデルベルクなどに一人旅行に行くのも楽しみの一つでした。また、ドルトムントで行われた東北地方太平洋沖地震のチャリティーイベントのお手伝いや、デュッセルドルフで在独の日本人小学生向けの科学教室の講師をやらせていただいたりと、研究生活以外にも様々な出来事があり、良い経験となっています。日本とは全く異なる文化、環境で悪戦苦闘しながらも生活することは、大変貴重な経験の一つだと感じています。

Waldmann 研究室での生活

ここで私が所属している研究室について紹介します。研究室のメンバーはPIであるWaldmann教授の下に10名程度のグループリーダーがおり、その各グループリーダーの下にポスドク、学生、研究補助員が付き、総勢60名近いビックラボです。所属メンバーの国籍は様々で、ドイツ、イタリア、スペイン、フランスなどのEU諸国、インド、中国、タイなどのアジア諸国からポスドク、PhDの学生が集まっています。そのため、研究室での公用語は英語になっています。研究場所もMPIだけでなく、MPIに隣接するドルトムント工科大学にも研究室を持っており、私は大学の研究室で研究に従事しています。日本の研究室の様にコアタイムは設定されておらず、何時に来ようが何時に帰ろうが、各個人に任されています。ただ、一人で実験を行う事は固く禁止されています。また、驚くことに必要な試薬の注文も各個人に任されており、自由に試薬を注文することが可能です。



筆者が勤務するドルトムント工科大学の化学棟

Waldmann研究室の研究課題は多岐にわたりますが、生物活性小分子の創成とその作用機序解析を主とするケミカルバイオロジーの研究室です。行われている実験も天然有機化合物の全合成を含む有機合成から、分子生物学、構造生物学、タンパク-ペプチド相互作用解析と幅広く研究を行っています。私は研究テーマとして、新規不斉触媒反応の開発と、その反応を利用した生物活性天然物の基本骨格を母骨格と

する化合物ライブラリーの構築を行っております。幸いにも、合成した化合物群の中から生物活性を示す化合物が見つかり、現在 SAR Study、Pull Down Probe の合成と作用機序解析を行っているところです。研究は基本的にポストドクも PhD の学生も独立して行っています。研究室では各個人が年二回、約 30 分間の研究発表を行う機会があります。MPI の大ホールで、パワーポイントを使っての発表なので大変緊張します。私の場合はそれに加えて、グループリーダーの Andrey に一ヶ月に一度、マンツーマンで研究進行状況を報告しています。また、彼は頻繁に僕の所に来て、研究の調子はどう？から始まり、頻繁にディスカッションを重ね、研究を進めています。まだまだ拙い英語ですが寛容に見守って頂き、有意義かつ楽しい研究生生活を送れています。

最後に

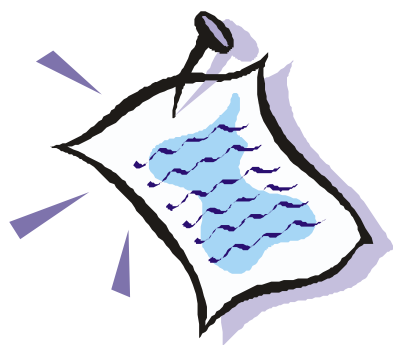
ドルトムントでの生活は一年が過ぎましたが、留学体験記を書きながら振り返ってみると時間の経つ早さに驚くと共に、残りの一年を悔いなく過ごそうと改めて思いました。

様々な文化、価値観に触れてみてはどうでしょうか？私は英語が堪能でないために、様々な場面で不自由すること、上手くいかず歯痒い思いをする事も多々ありました。それでも、私はここでの経験が今後の糧になると信じています。当たり前の事ですが、自分で行動しないと何も始まりません。ぜひ、チャンスを生かして海外に飛び出すことを強くお勧めします。

最後になりましたが、留学に当たり推薦人になっていただきました東北大学大学院薬学研究科 岩淵好治教授、叶直樹准教授、理化学研究所 長田裕之教授に心より御礼申し上げます。また、研究室に受け入れてくださった、Herbert Waldmann 教授、また研究生生活をサポートしてくださったグループリーダーの Andrey Antonchick 博士と研究室の同僚にこの場をお借りして深く感謝いたします。



Waldmann 研究室のメンバー（左端が Herbert Waldmann 教授）研究室旅行にて



シンポジウム等会告

第6回バイオ関連化学シンポジウム

(第27回生体機能関連化学シンポジウム、第15回バイオテクノロジー部会シンポジウム、第15回生命化学研究会シンポジウム)

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

今年は札幌で開催致します。奮ってご参加下さい。残暑から逃れて熱い議論を交わしましょう。

- 会期** 2012年9月6日(木)～8日(土)
- 会場** 北海道大学 高等教育推進機構(札幌市北区北17条西8丁目)
札幌市営地下鉄南北線北18条駅下車 徒歩10分
JR 札幌駅下車 徒歩25分
- 主催** 日本化学会-生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、
生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会
- 共催** 日本化学会、日本薬学会、高分子学会、電気化学会
- 協賛** 有機合成化学協会
- 概要** 全国のバイオ関連化学の研究者、学生による研究発表および討論を行い、ペプチド・タンパク質・酵素、分子認識・超分子・モデル系、遺伝子関連など、幅広いバイオ関連化学のための情報交換の場を提供することで、我が国の当該分野の発展に貢献することを目的とする。発表形式は招待講演、一般口頭発表、ポスター発表のいずれかとし、若手研究者の育成のための講演賞の授与も行う。
- 発表形式** 口頭発表およびポスター発表。口頭発表(15分発表、5分質疑、3会場)は原則、1研究室1件まで。ただし、申込みは2件まで可。この場合は、発表優先順位を付け、2件目の採否は実行委員会の判断による。
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歳以下の部会員が対象。賞応募申請は発表申込時点で受付を行う。
- 参加要領** WEBサイト(<http://jointsympo.csj.jp/>)から発表申込、予稿原稿の提出、参加登録のすべての手続を行う。
発表申込締切: 2012年6月19日(火)

予稿原稿締切: 2012年7月13日(金)

参加登録予約申込締切: 2012年7月23日(月)

参加費

7月23日(参加登録(予約)締切)まで、部会員:一般5,000円、学生3,000円、非部会員:一般7,000円、学生4,000円

7月24日以降...上記の各参加種別に2,000円プラス

*いずれの価格にも予稿集代金が含まれています。*予稿集の事前送本は予定していません。

懇親会

2012年9月7日(金) 会費 6,000円(事前申込み要)

連絡先

第6回バイオ関連化学シンポジウム実行委員会

居城邦治(北海道大学電子科学研究所)

〒001-0021 札幌市北区北21条西10丁目

TEL: 011-706-9360 FAX: 011-706-9361

E-Mail: 6thbiojoint@poly.es.hokudai.ac.jp

第27回生体機能関連化学シンポジウム
第15回バイオテクノロジー部会シンポジウム
第15回生命化学研究会シンポジウム

第6回
バイオ関連化学シンポジウム

2012年 **9月6日(木) - 8日(土)**
北海道大学 高等教育推進機構
(札幌市北区北17条西8丁目)

発表申込締切: 6月19日(火)
予稿原稿締切: 7月13日(金)
参加登録予約申込締切: 7月23日(月)
※学会ホームページよりお申込みください。
<http://jointsympo.csj.jp/>

懇親会: 9月7日(金) 京王プラザホテル札幌

主催
日本化学会-生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、
生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、
フロンティア生命化学研究会

共催・協賛
日本化学会、日本薬学会、高分子学会、電気化学会
有機合成化学協会

お問い合わせ先: 第6回バイオ関連化学シンポジウム実行委員会 委員長・居城邦治
【事務局】〒001-0021 札幌市北区北21条西10丁目
北海道大学電子科学研究所 生体分子デバイス研究分野
TEL:011-706-9360 / FAX:011-706-9361 E-Mail: 6thbiojoint@poly.es.hokudai.ac.jp

第 39 回国際核酸化学シンポジウム

The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2012)

<http://www.knt.co.jp/ec/2012/ISNAC2012/>

主催：核酸化学シンポジウム組織委員会

共催：名古屋大学博士課程教育リーディングプログラム

シンポジウムテーマ：

1. Chemistry of Nucleosides, Nucleotides, and Their Analogues
2. Medicinal Chemistry of Nucleosides and Oligonucleotides
3. DNA/RNA Chemistry and Biochemistry
4. DNA/RNA Structure and Recognition
5. Ribozymes, siRNAs, and miRNAs
6. DNA/RNA Materials and Diagnostics
7. Drug Delivery Systems and Nanotechnology of Oligonucleotides

会期：2012 年 11 月 15 日(木)～11 月 17 日(土)

会場：名古屋大学豊田講堂（名古屋大学構内）

交通：名古屋市営地下鉄名城線「名古屋大学」下車すぐ

参加要領

発表形式：口頭またはポスター

発表申込み方法：ホームページを經由してお申し込みください（URL は以下参照）

発表申込締切：2012 年 8 月 12 日（日）

要旨締切：2012 年 9 月 2 日（日）

参加登録予約申込方法：ホームページを經由してお申し込みください（URL は以下参照）

事前参加登録締切：2012 年 10 月 15 日（月）

参加登録費（予稿集代込みで） 一般：予約 25,000 円、当日 30,000 円

学生：予約 5,000 円、当日 7,000 円

連絡先：名古屋大学大学院工学研究科物質制御工学専攻 浅沼浩之

〒464-8603 名古屋市千種区不老町

TEL: 052-789-2488 FAX: 052-789-2528

E-Mail : asanuma@mol.nagoya-u.ac.jp

ホームページ：<http://www.knt.co.jp/ec/2012/ISNAC2012/>

その他：今年度は学生の参加費を 5,000 円に下げましたので、積極的に参加するよう学生に促していただければと存じます。なおホームページに詳細は記載されておりますが、去年に引き続いて優秀講演賞や優秀ポスター賞も用意しております。多くの方々のご参加をお待ちしております。

アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012

<http://res.tagen.tohoku.ac.jp/~antisens/index.html>

日時：2012年9月24日(月)～26日(水)

会場：仙台市民会館(仙台市青葉区桜ヶ岡公園4番1号)

世話人：永次 史(東北大学)、佐藤智典(慶應義塾大学)

主催：アンチセンスDNA/RNA研究会

遺伝子・デリバリー研究会

東北大学多元物質科学研究所

共催：5大学附置研究所間「ナノマクロ物質・デバイス・システム創製アライアンス」ほか

協賛：有機合成化学協会 ほか

特別講演：松田 彰教授(北海道大学)「4'-チオオリゴリボヌクレオチド誘導体による核酸創薬への展開」

丸山一雄教授(帝京大学薬学部)「超音波を利用したデリバリーシステムと治療」

依頼講演：泊 幸秀(東京大学)「RNAサイレンシング複合体の形成と機能」

中島信孝(産業技術総合研究所)「大腸菌の遺伝子のアンチセンスRNAによる発現抑制」

水谷隆之(東京医科大学)「人工エクソソームによる次世代核酸医薬品の開発」

櫻井和朗(北九州市立大学)「抗原提示細胞上の多糖認識受容体Dectin-1を經由した核酸医薬のDDS」

高倉喜信(京都大学)「遺伝子・核酸医薬のデザインとデリバリーの最適化」

菊地利明(東北大学病院)「遺伝子治療の回顧と展望」

参加費：会員3,000円(当日は4,000円)、非会員5,000円(当日は6,000円)、学生無料、賛助会員である法人、会社、団体：一口につき2名まで無料

懇親会：9月25日(火)、同会場にて 一般5,000円、学生2,000円

講演申込締切：2012年7月31日(火)

一般演題として口頭発表(質疑を含めて15分)とポスター発表を募集します。また若手研究者を対象に奨励賞も設けており、口頭発表、ポスター発表いずれもエントリー可能です。奮ってご応募ください。奨励賞にエントリーする若手研究者で口頭発表する場合、ポスター発表も行っていただきます。

事前参加登録締切：2012年8月31日(金)

問い合わせ先：アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2012事務局

〒980-8577 仙台市青葉区片平2丁目1番1号 東北大学多元物質科学研究所東1号館203号室(TEL & FAX:022-217-5633, e-mail: antisens@res.tagen.tohoku.ac.jp)

発表申し込み及び参加登録方法の詳細、ならびに要旨作成要項についてはシンポジウムホームページ(<http://res.tagen.tohoku.ac.jp/~antisens/index.html>)をご参照ください。

第2回アジアケミカルバイオロジー会議 (第15回 生命化学研究会)

The Second Asian Chemical Biology Conference (ACBC2)

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/fukase/acbc2>

主催：フロンティア生命化学研究会

協賛：日本化学会他

会期：2012年7月4日(水)～7月6日(金) 3日間

会場：サザンビーチホテル&リゾート沖縄 (〒901-0305 沖縄県糸満市西崎町1-6-1)

[交通] 那覇空港より約10 km (車で約20分)

- 討論主題：ケミカルバイオロジー分野の最先端研究について、以下の主領域を中心に討議する。
1. タンパク質、ペプチド、2. 糖鎖、脂質、複合体、3. 核酸、4. 低分子生物活性分子、5. 細胞

- 参加登録申込方法：下記のシンポジウム HP から参加登録などの手続きを行いますので、詳細は HP をご参照下さい。

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/fukase/acbc2>

- 参加登録費：事前登録 (5月15日まで) 大学・官公庁 40,000 円、企業 45,000 円、学生 20,000 円;
(5月16日以降) 大学・官公庁 45,000 円、企業 50,000 円、学生 25,000 円

- 問合先：〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-1 大阪大学大学院理学研究科内
ACBC2 事務局 (実行委員長 深瀬浩一) Tel: 06-6850-5388 Fax: 06-6850-5419

HP: <http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/fukase/acbc2>

E-mail: acbc2@chem.sci.osaka-u.ac.jp



受賞

北村 裕介(熊本大学大学院自然科学研究科 助教)
平成24年度 日本分析化学会 奨励賞
「金属錯体の特異的な形成および相互作用を利用した新規核酸プローブの開発」
(2012年9月19日、日本分析化学会第61年会において受賞)

異動



富崎 欣也
龍谷大学理工学部物質化学科 教授
〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷1-5
Tel: 077-543-7469 Fax: 077-543-7483
E-mail: tomizaki@rins.ryukoku.ac.jp

松浦 和則
鳥取大学大学院工学研究科 化学・生物応用工学専攻 応用化学コース 教授
〒680-8552 鳥取市湖山町南4-101
Tel: 0857-31-5262
E-mail: ma2ra-k@chem.tottori-u.ac.jp

上野 隆史
東京工業大学大学院生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻 教授
〒224-8501 横浜市緑区長津田町4259-B55
Tel: 045-924-5844 Fax: 045-924-5806
E-mail: tueno@bio.titech.ac.jp

北村 裕介
熊本大学大学院自然科学研究科 助教
〒860-8555 熊本市中央区黒髪2-39-1
Tel & Fax: 096-342-3872 Fax: 096-342-3679
E-mail: ykita@kumamoto-u.ac.jp



編集後記

今回も力作を集めて 39 号をお送りすることができます。著者の皆さん、お忙しいところ素晴らしい原稿をご執筆いただきたいへんありがとうございました。

最近では、地球温暖化説もかなり怪しくなっているようで、原発再開の議論の中でも CO₂ の話は完全に忘れ去られているかのようで、ちょっと不思議な感覚に陥ります。ゴアのノーベル賞、国連での鳩山宣言... あの大騒ぎはいったい何だったのでしょうか。むしろ地球は寒冷化に向かうという話さえあります。科学的事実だけでなく、政治、経済の絡む“大人の事情”もあって、エネルギー問題は一筋縄ではいかないようです。

関西だけでなく、ここ九州でもこの夏 10% の電力削減が求められています（給与削減もちょうどそれくらいになりそうです（笑））。私の精神論は、冷暖房に慣れきった学生達にはなかなか伝わらないようで、油断をすると実験室のエアコンが 20 °C でフル稼働してます。電力消費にも基礎代謝分がありますから目標達成はかなり厳しいようです。暑くじめじめした季節を頑張って乗り切りましょう。梅雨の明けた清々しい沖繩で、7 月 4 ~ 6 日、ACBC2 が開催されます。

次号 (No. 40) は、松浦さんの担当により、2012 年 10 月頃の発行を予定しております。ニュースレター改善のため、皆さんからのご要望、ご意見等をお待ちしております。下記編集担当までご連絡をいただければ幸いです。

平成 24 年 6 月 20 日

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

編集担当
大神田淳子 (大阪大学)
松浦和則 (鳥取大学)