

生命化学研究レター

(2014 年 7 月)

2. 巻頭言 夢への責任

大阪府立大学大学院理学系研究科 藤井 郁雄

4. 研究紹介

4. RNA ワールドから iPS 細胞へ -生命起源と細胞構築原理の探求-

京都大学 iPS 細胞研究所 白眉センター 齊藤 博英

9. バクテリア融合チャンバー -細胞の再構成に向けた人工物との融合-

東京大学大学院工学研究科 田端 和仁

14. 論文紹介「気になった論文」

14. 京都大学大学院工学研究科 博士課程 1 年 河崎 陸

18. 東北大学多元物質科学研究所 博士課程 2 年 上松 亮平

21. 九州大学大学院薬学研究院 助教 田畑 栄一

25. 留学体験記

カリフォルニア工科大学留学体験記

Division of Chemistry and Chemical Engineering, California Institute of Technology 田村 朋則

30. シンポジウム等会告

第 8 回 バイオ関連化学シンポジウム

第 41 回 国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2014)

第 24 回 バイオ・高分子シンポジウム

14-1 バイオ・高分子研究会

人工光合成国際会議 2014

第 17 回 生命化学研究会

受賞、異動

編集後記



巻頭言

夢への責任

大阪府立大学大学院理学系研究科 藤井 郁雄

2008年に「生命化学研究会」が「フロンティア生命化学研究会」に改名され、再出発してから6年が過ぎました。本年度2014年より第3期がスタートして、今期の会長を拝命することになりました。皆さんと議論し、またお力をお借りして進めていければと考えておりますので、どうぞよろしくお願い致します。ということで、最初の仕事が巻頭言の執筆になりました。この時期の話題といえば、少し食傷気味ですが、STAP細胞は外せません。そして、今回の騒動で私が強く感じたのは、研究者の資質でした。

どんな人が研究者に向いているか？調べてみるといくつかの資質と能力が挙げられています。学生時代に読んだ「若き数学者のアメリカ」(藤原正彦著/新潮文庫)という本には、研究者に必要な資質として4つのことが書かれています。その資質とは、知的好奇心があること、野心があること、楽観的であること、そして執拗であることの4つです。これらは研究者の「夢」を達成するための資質を扱ったものでしょう。研究者の仕事は、夢のある職業です。研究によって、これまで常識だと思っていた多くの事柄の本質が明らかにされてきました。これまでの研究に対して、すべてに賛同するのではなく、批判的な精神で、これまでとは違った観点から新しい論理や考えを創造すること、これが研究者の仕事なのです。この意味で研究職とは、野心的で夢のある職業です。旺盛な知的好奇心と、少しでも可能性があればこだわりつづける執拗さ、それを信じて疑わない人、そんな人物に任されるべき仕事といえます。「夢」に対する資質においては、O女史は合格であった。

一方、研究職は、危険な側面を持つ職業でもあります。なぜなら、「研究」とは、私たちを取り巻く社会生活とかけ離れた「異質のもの」を含んだ特別な仕事だからです。iPS細胞にしろSTAP細胞にしろ、異質なもののこの上ない。だから、研究者の一人として、今回のテレビなどのマスコミ報道には大きな違和感を感じました。研究者は、社会と自身との間に一定の距離をおいて研究しなければいけません。そうしなければ、研究成果から絶対的な「客観性」が失われることになります。この距離を保つことは、そんなに難しいことではないはずです(正直なところ、最近は結構難しくなっていますが...)。むしろ、研究者が日常的に行っていることであり、あまり語られることはありません。とは言え、この一定の距離がなければ、研究室の上司の命令や金銭的な利益の供与によって研究者のもつ責任は、崩れ去ってしまうことになってしまうのです。どのような理由があったのか、今回、R研もO女史も社会へ近づきすぎて距離感を忘れてしまったようです。研究者の仕事は、「夢」と「責任」という2つの相反する性質をもつ、極めて危険な職業なのです。

研究者は、「夢への責任」を負っています。飽くなき探究心と果てしない情熱で、いつまでも夢を追いつけること、そして、それにともなう責任を決して忘れない人、その人こそが研究を目指すべきなのです。今後しばらくは、国際会議へ行くたびに、今回の不正問題が必ず話題にのぼります。先月、出席した国際会議で友人から「日本の科学技術の信頼を傷つけたO女史の罪は大きい」と言われた。これを聞いて私は不愉快な思いをするよりもむしろホッとしました。今回のことはO女史の問題であり、これまでもそして今も日本の科学技術の信頼はまだ保たれている。築いてきた信頼がこれ以上傷つかないよう、この騒動に決着がつくことを願うばかりです。

2014年6月



藤井会長 教授室にて

研究紹介

RNA ワールドから iPS 細胞へ ～生命起源と細胞構築原理の探究～

京都大学 iPS 細胞研究所、白眉センター
齊藤 博英
(hirohide.saito@cira.kyoto-u.ac.jp)



1. はじめに: RNA との出会い

「宇宙の果てはどうなっているのか？生命は宇宙のどこで、一体どのように誕生したのか？」宇宙や生命の起源の問題に関して、根源的な興味をもって東京大学工学部に進学した私は、当時化学生命工学科におられた渡辺公綱先生の研究室に配属され、RNA と出会った。渡辺先生の分子生物学の授業は当時の私には難しく、多くのことは理解できなかったのだが(すいません)、その中で「RNA ワールド」という仮説を知った。「生命は自己複製能と触媒機能を併せ持った RNA から始まった」とする仮説はとても魅力的で、RNA の研究で生命起源の理解が進めば面白い！と強く感じた。その後、のらりくらりと過ごしていた修士課程の時に、アメリカの Jack Szostak 博士や David Bartel 博士らが出した RNA 酵素の試験管内進化実験に関する論文に触発され、博士課程へ進学する際に RNA 実験進化法を学びたいと思い、当時ニューヨーク州立大学におられた、Szostak 研出身の菅裕明先生にメールを書いた。菅さんから「アメリカに来てもいいよ」という返事をもらえたときはとても嬉しく、自分の前に新しい世界が開けていく気がした。アメリカでのアパートが見つかるまで菅さんの自宅に一週間程泊めていただけたことになったが、一つの問題が生じた。私は当時ヘビースモーカーだったが、渡米前に菅さんから電話で「齊藤君はタバコすわないよね？」と聞かれた時に(菅さんがタバコ嫌いということは人づてに聞いていた)思わず「はいもちろんです！」と答えてしまったのである。実は成田空港でタバコのカートンを何箱か買いだめしていたのだが、結局、飛行機に乗る直前にそのカートンを全部捨てた。それが今までの自分との決別宣言である気がした。タバコのカートンをゴミ箱に投げ捨てたシーンは今も良く覚えている。渡米後は、何もわからない新参者を菅さんは徹底的にトレーニングしてくださり、人工 RNA 酵素を試験管内進化させる研究をはじめた。当時私は遺伝暗号の起源に RNA 酵素が関与した可能性に興味があった。そこで、tRNA にアミノ酸を転移する反応を触媒する最も原始的な酵素の一つである、アミノアシル tRNA 合成酵素の働きを模倣する RNA 酵素の進化実験を進めた。実験進化の過程で生じた RNA 酵素の機能を調べた RI ゲルを初めて見た時は、感動した。ランダムな配列から進化した RNA は、非常に巧妙にアミノ酸と tRNA を認識し、アミノ酸転移反応を触媒できるということがわかった^{1,2,3}。この海外での研究経験が、以後の研究生活に大事なことを教えてくれた。当時の菅研には、村上裕さんや築地真也さんがポスドクとして参加していて、みんなで毎日色々とディスカッションをするのは、何にも代え難い楽しい経験だった。その後皆独立したが、今も会って色々と話すことが良い刺激となっている。大分前置きが長くなってしまったが、この経験を元に私は現在「RNA を創る」ことに関連した研究を行っている⁴。その内容について以下紹介したい。

2. RNA-タンパク質相互作用で遺伝子スイッチを創る

帰国後に癌研究所の芝清隆部長のもとでタンパク質の進化分子工学と哺乳類細胞を用いた実験技術⁵を学んだ私は、RNAとタンパク質を組み合わせた研究をしたいと考えていた。そこで2005年の秋に京大生命科学研究科の井上丹先生の研究室に助手として配属させていただいた後、RNAとタンパク質の相互作用を利用した翻訳制御技術 (RNA スイッチ) の開発を始めた。

Conceptual Scheme of synthetic RNA switches

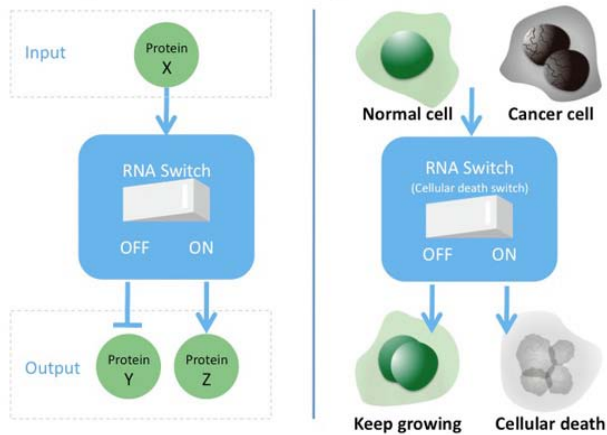


図 1 人工 RNA スイッチの概念図

これまでに、天然の mRNA が低分子に应答して遺伝子発現を調節する機構、リボスイッチが発見されていた。また、それ以前の研究でも、RNA とタンパク質の相互作用を基盤とした翻訳制御の例は知られていた。我々はこれら先行研究を参考に、細胞内で発現するタンパク質を検知して、遺伝子発現をコントロールできる人工の RNA システム (RNA スイッチ) を開発したいと考えた。すなわち RNA スイッチとは、標的細胞内で発現する特定の因子 (タンパク質など) に应答して、翻訳のオン・オフを切り替える仕組みのことを指す (図 1 左)。これが実現でき

れば、生きた細胞内の状態に応じたシグナル情報の変換を実現し、細胞運命を自律的に制御できる可能性がある。たとえば、細胞内状態の微妙な違いを精密に識別し、それに応じて遺伝子発現を自在に制御できれば、がん化した細胞にのみ細胞死誘導シグナルを活性化するといったように、細胞内状態変動に応じた標的細胞の選別や運命制御への応用が期待できる (図 1 右)。この RNA スイッチ技術開発のため、RNA とタンパク質の特異的相互作用が活用できると考えた。そこで mRNA シスエレメントに結合するタンパク質の機能を模倣し、人工翻訳制御システムを設計・構築することを試みた。まず、mRNA の 5' 非翻訳領域 (UTR) に特定のタンパク質を結合させることで、目的遺伝子の翻訳を効果的に抑制する「mRNA オフスイッチ」を開発することを試みた。筆者らは、リボソームタンパク質の1つである L7Ae と、L7Ae に特異的に結合する RNA モチーフであるキンクターン RNA (K-turn) が翻訳抑制のモジュールとして利用できることを見出した⁶。この K-turn を導入した mRNA は L7Ae と強固な複合体を形成するため、L7Ae を発現する細胞内では、標的 mRNA 上でのリボソーム機能が阻害され、翻訳が効率よく抑制される。このように「強い抑制」だけではなく、細胞内状態に応じて翻訳量を様々なレベルでコントロールすることは可能だろうか？

3. 複数 mRNA の同時かつ特異的な翻訳チューニング

最近我々は、哺乳類細胞内で mRNA からの翻訳量を精密にチューニングできる新しい方法の開発に成功した。この仕組みの鍵となるのは、mRNA シスエレメントのエンジニアリングである。すなわち、標的タンパク質に結合する RNA モチーフ配列の「mRNA 上での場所と数」を変化させることで、様々なレベルで翻訳量を調節できることを見出した (図 2)⁷。まず、mRNA の 5' 末端から RNA モチーフ配列までの距離と、モチーフに結合する制御タンパク質による翻訳抑制効果との間に極めて高い相関がみられることを見出した。また、このモチーフ配列を複数連結して mRNA に挿入すると、その数に応じて強く翻訳が抑制される。これら 2 つの特徴を組み合わせ、標的配列のコピー数を増やして離散的に翻訳抑制効果を高めつつ、一方

で 5' 末端から標的配列までの距離を伸ばして連続的に翻訳抑制効果を低めることによって、制御因子の存在下における翻訳量を広い範囲で調節することができる。個々の出力遺伝子の翻訳効率は 5' UTR で cis に働く要因で決められるので、異なる設計の UTR をもつ複数の出力遺伝子は、1つの制御因子によってそれぞれ様々な量に調節できる。したがってこの仕組みを利用すれば、同じ活性をもつ一つの入力タンパク質の発現に応じて、複数の mRNA からの翻訳をそれぞれ様々なレベルで調節することが可能となる。ここまで、特定のタンパク質発現に応じて、遺伝子発現を抑制する「オフスイッチ」のはたらきをみてきた。では逆に、遺伝子発現を活性化する「オンスイッチ」はどのように構築できるだろうか？

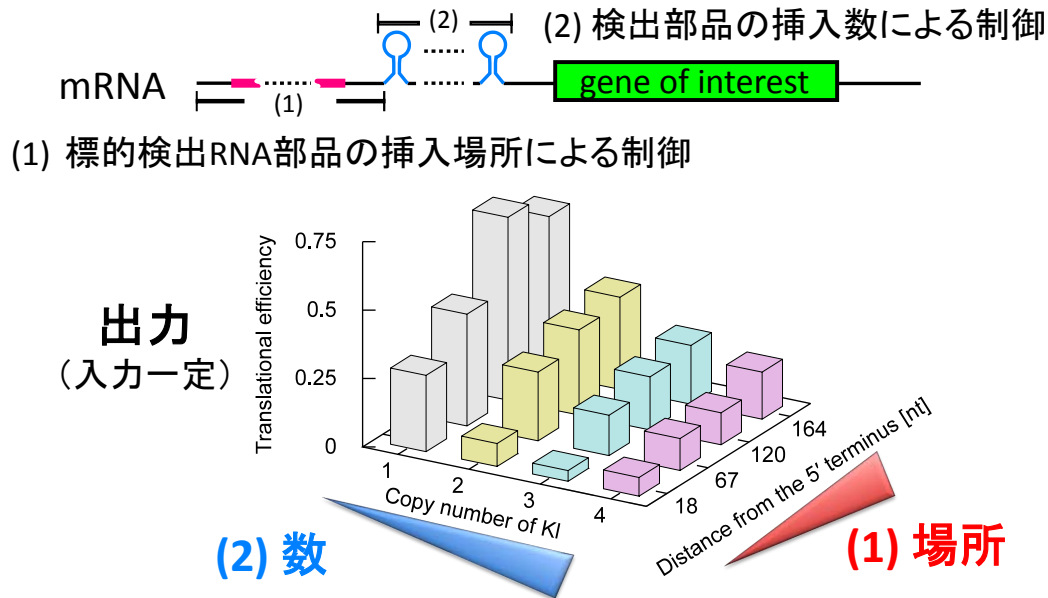


図 2 mRNA 翻訳の二次元チューニング法

4. RNA インバータモジュールの開発: オフからオンへの切り替えが大事

我々は、簡便に RNA スwitch の性能を調節・反転する手法を開発し、それを実現する人工 RNA からなる部品を「RNA インバータ」と名づけた⁸。今回開発した RNA インバータは、RNA スwitch の機能を OFF から ON へ、その検出物質への特異性や感度を維持したまま自在に変換することができる(図 3)。この RNA インバータを挿入した人工 mRNA は、細胞内で標的となる因子が発現していない場合、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) という現象により、速やかに分解される。ここで標的因子が発現すると、人工 mRNA は標的に結合し、その結合に応じて NMD が抑制されることで mRNA が安定化され、目的とする外来遺伝子の翻訳を活性化する。たとえば応用例として、がん細胞に特有の物質(例: がんマーカー因子など)が「ある」と、その細胞が死滅する遺伝子(例: 細胞死誘導遺伝子)を発現する ON スwitch の構築が考えられる。また、これまでの研究では遺伝子の発現を抑制する OFF スwitch と、活性化する ON スwitch は独立に作成・最適化する必要があったが、本手法により哺乳類細胞内での遺伝子スwitch の OFF と ON の切り替えを簡便に行うことができるようになった。さらに、これまでの技術では、一つの因子で複数の遺伝子の発現を同時、かつ独立に制御することは困難であった。今回の方法では、mRNA 1 分子内の改変で、スwitch の性能を調整したり、機能を反転させたりすることができる。したがって、1 つの制御因子が複数の外来遺伝子発現のオン・オフを個別かつ同時に制御することができるようになった。

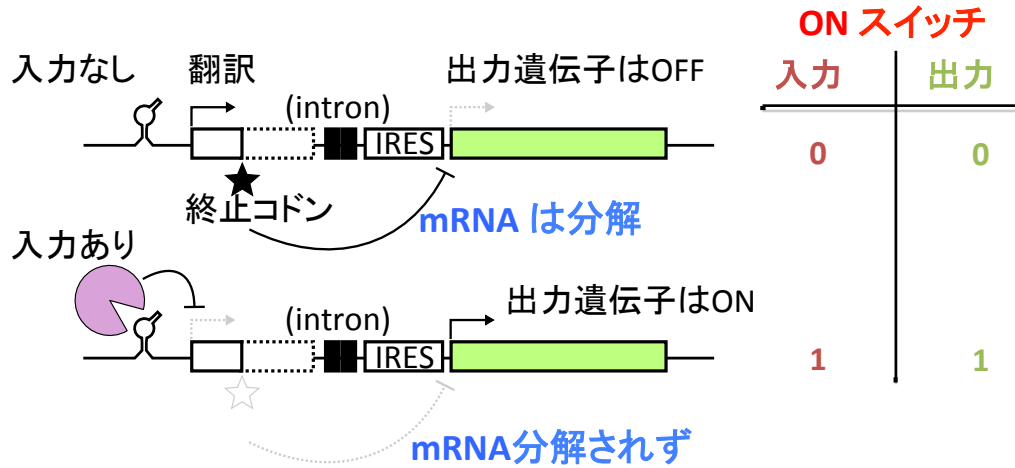


図 3 RNA インバータモジュールの開発

5. RNA-タンパク質相互作用でナノ構造体を創る

遺伝子スイッチ作成に用いた RNA-タンパク質相互作用は、ナノ構造体の分子デザインにも利用できる。これまでに報告された L7Ae-K-turn の結晶構造の情報から、L7Ae は、K-turn RNA の屈折領域の構造を約 60 度に固定するという性質が知られていた。この特徴を利用して、L7Ae-K-turn モジュールからなる人工ナノ正三角形のデザインと構築を試みた(図 4 左)⁹。まずそれぞれの辺が互いに相互作用しないように、3 辺の配列を設計しておく。その 3 つの頂点には、3 つの K-turn モチーフを配置させた。したがって、3 つの頂点に 3 つの L7Ae を配置させることで 60 度に折れ曲がり、正三角形形状のナノ構造体が構築できるのではと考えた。デザインしたナノ構造体を実際に作成し、その構造体を AFM で観測した結果、確かに L7Ae の存在下でのみ正三角形様の RNA 構造体が形成されることが確認された (図 4 右)。従って、RNA とタンパク質からなる 1 辺約 10nm 程度の人工ナノ三角形の設計と作製に成功した。このナノ三角形の利用法として、様々な機能性タンパク質や機能性 RNA を、精密な距離と配向性をもって配置できることが挙げられる。我々はこの構造体が細胞内の環境に類似した生理条件下でも安定に保持できることを既に確認している。

多機能性RNP構築のための基盤技術の開発

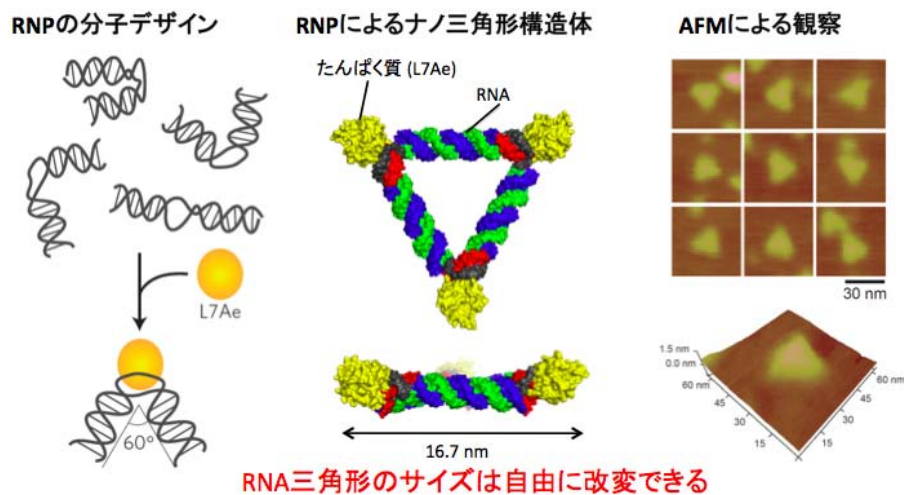


図 4 RNA-タンパク質ナノ三角形の設計と観察

6. おわりに: RNA 技術と iPS 細胞技術の融合を目指して

私は2010年度に独立し、2011年度よりiPS 細胞研究所で人工RNAをもちいた細胞機能制御に関する研究を進めている。細胞分化や細胞リプログラミングの過程でダイナミックに変動する細胞内状態を人工RNA技術で精密に解析、制御することを目指して研究を進めている。ここで紹介したRNAスイッチやRNAナノ構造体は、シンセティックバイオロジーやナノテクノロジー分野にRNP(RNA-Protein複合体)という材料を提供するものである。特定タンパク質の存在下でのみ遺伝子発現の切り替えや、三角形ナノ構造体の形成がおけるといったように、環境に応じた遺伝子情報・構造の変換が期待できる。将来的には、これらRNAやRNPを分子マテリアルとして活用することで、生命システム構築原理の理解につながる「人工細胞モデル」や、医療応用につながる「分子ロボット」¹⁰を創出したいと考えている。

謝辞

本研究は、京都大学 生命科学研究科 井上丹教授、藤田祥彦助教、大野博久研究員、京都大学iPS細胞研究所 遠藤慧研究員、長田江里子研究員、樫田俊一研究員、林香倫技術員らとの共同研究に基づく。また、これまで多々ご指導くださった全ての皆様、現研究室メンバーに深く感謝したい。

文献:

1. Saito, H., Kourouklis, D. & Suga, H. An in vitro evolved precursor tRNA with aminoacylation activity. *EMBO J* **20**, 1797-1806 (2001).
2. Saito, H. & Suga, H. A ribozyme exclusively aminoacylates the 3'-hydroxyl group of the tRNA terminal adenosine. *J Am Chem Soc* **123**, 7178-7179 (2001).
3. Saito, H., Watanabe, K. & Suga, H. Concurrent molecular recognition of the amino acid and tRNA by a ribozyme. *RNA* **7**, 1867-1878 (2001).
4. Saito, H. & Inoue, T. Synthetic biology with RNA motifs. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 398-404 (2009).
5. Saito, H. et al. Synthesis of functional proteins by mixing peptide motifs. *Chem Biol* **11**, 765-773 (2004).
6. Saito, H. et al. Synthetic translational regulation by an L7Ae-kink-turn RNP switch. *Nat Chem Biol* **6**, 71-78 (2010).
7. Endo, K., Stapleton, J.A., Hayashi, K., Saito, H. & Inoue, T. Quantitative and simultaneous translational control of distinct mammalian mRNAs. *Nucleic Acids Res* **41**, e135 (2013).
8. Endo, K., Hayashi, K., Inoue, T. & Saito, H. A versatile cis-acting inverter module for synthetic translational switches. *Nat Commun* **4**, 2393 (2013).
9. Ohno, H. et al. Synthetic RNA-protein complex shaped like an equilateral triangle. *Nat Nanotechnol* **6**, 116-120 (2011).
10. Hagiya, M., Konagaya, A., Kobayashi, S., Saito, H. & Murata, S. Molecular Robots with Sensors and Intelligence. *Acc Chem Res* **47**, 1681-1690 (2014).

研究紹介

バクテリア融合チャンバー

～細胞の再構成に向けた人工物との融合～

東京大学大学院工学系研究科

田端 和仁

(kazuhito@nojilab.t.u-tokyo.ac.jp)



1. はじめに

生物の最小構成単位は細胞である。生命科学者は、その細胞が増殖し分裂する様を見て生き物らしさを感じ、また持ち上がってくる疑問、「生物とはなんぞや」という問いに答えるべく、研究に邁進してきた。これまでの生物学で行ってきた研究は、遺伝子を同定し、タンパク質の機能を調べ、それらが細胞の中でどのようなネットワークを作り細胞機能を発現するのかという研究であろう。そして、これらの関連を一つずつ明らかにし、最終的には細胞のカatalogを作成するというような研究ではないだろうか。その中でもマイルストーンとよぶべきは、全ゲノムの解読であろう。細胞の全てが書き込まれているゲノムを解読する術を手にした結果、細胞のカatalog化に一層の拍車がかかったように思われる。近年は、技術やコンピューターの計算能力の著しい向上によって、網羅的にゲノムや転写産物、タンパク質などを調べる研究が台頭している。その結果、生命システムとしての細胞の理解に手が届きつつあるといってもいいだろう。とはいえ、細胞は未だブラックボックスであり、我々は何が細胞の生物らしさを生んでいるのかを理解できていない。そこで、生物学が次に目指すべき目標は「創ること」ではないかと思う。結局の所、いくらカatalogを充実させたところで、真に生物を理解できたかという、それは否であると考えている。そのカatalogから要素を抜き出し、元々の機能を再現できるかを検証し、それを元に新しい機能を創り出すことができて理解したといえるのではないだろうか。そして、創ることの先にあるものは大きな変革である。抽象的になってしまったが、無機化学や有機化学の発展を考えてほしい。これらは創ることができる科学である。それらの化学によって生み出されたものは、産業革命を引き起こし、我々の生活を一変させたといっても過言ではない。ゆえに、生物学にこれまで投入されてきた資金や人的資源を生かすためにも、生物学は創ることができる学問にならなくてはならない。

2. いかにか細胞を創るか

細胞を創るということに関して、最近最も話題になったのは、Craig Venterらによるマイコプラズマゲノムの全合成と、その導入であろう[1]。彼らは、1Mbpに及ぶ*Mycoplasma mycoides*ゲノムを完全に化学合成し、一部改変を加えて、それを別種のマイコプラズマ(*Mycoplasma capricolum*)中に導入し、*Mycoplasma mycoides* JCVI-syn 1.0へ作り替えることに成功した。この研究の意味するところは、ゲノムをデザインすることで、新しい細胞や生物を創ることができる可能性を示したということである。この研究が示したように、ゲノムを創ることも、細胞を創る方法の一つであるが、これは細胞を創る上で通過点の一つであると考えている。究極的には、細胞に必要な要素であるタンパク質や化学物質などを数百から数千集め、1カ所に閉じこめるこ

とが細胞を創ることである。この方法は構成的アプローチとよばれ、個々の要素を一つずつ積み上げて創っていくことから、細胞を創るという問題に対して様々な方向からアプローチできる。そのため、得られる情報や理解はとても多い。しかしながら、実験において決めなくてはならないパラメーターも尋常ではないぐらいに多い。正直なところ、細胞を創る方法として現時点では現実的とはいえない。そして、そもそもこの方法で細胞が創れるかどうかはまだ分からない。そこで、構成的ではない方法で、細胞に必要な要素を全て集め、そこから細胞が再生するかを確認することとした。

3. バクテリアを再生させる条件

バクテリアは最も単純な細胞である。電子顕微鏡で観察しても、その構造は細胞壁と細胞膜、細胞質からなり、ゲノムやその他タンパク質も一部を除いてほとんど細胞内局在がみられない。乱暴なことを言えば、バクテリアをつぶして懸濁液を用意し、脂質二重膜で覆ってしまえば、細胞として機能するのではないかということである。バクテリアをつぶした懸濁液には、直前まで生きていたバクテリアの要素全てが含まれているため、構成的に要素を全て集める必要がないのも都合がいい。しかしながら、バクテリアの懸濁液をリボソームで覆ってみても、そこからバクテリアが再生することはない。全ての要素があるにもかかわらず、バクテリアとして再生しないのはなぜか？ 考えてみればとても単純な話なのだが、懸濁液には生きていたバクテリアと比べて、大きく分けると2つの状態が失われている。一つは、タンパク質濃度の状態。元々バクテリアの細胞質タンパク濃度は数百mg/mlともいわれ、非常に高濃度の溶液で満たされている。これを破碎すると、破碎のための緩衝液などを加える必要があるため、その濃度は10倍から1000倍程度まで低下してしまう。もう一つは、膜タンパク質などが存在している細胞膜の状態である。破碎懸濁液中には、細胞膜と膜タンパク質は存在するが、それらは全て小胞のような形になっており、元のように機能しない。また、懸濁液を脂質二重膜で覆ったとしても、脂質二重膜上に膜タンパク質は存在しない。このように、2つの状態が失われているため、元々のバクテリアに戻れないのではないかと考えた。

4. バクテリアとマイクロデバイスを融合させる

これらの状態を保ちつつ、バクテリアを破碎することができれば、そこからバクテリアは再生するのだろうか？ この問題をクリアするため、我々はマイクロデバイスを利用した実験系を考案した。まず、濃度の減少に関しては、バクテリアを破碎する際に、非常に小さい体積の入れ物を使用すれば濃度の減少を抑えることができる。たとえば、バクテリアの体積と同じぐらいの入れ物を利用すれば、その希釈率は最大で2倍である。バクテリアの体積よりも小さい入れ物であれば、さらに希釈率を抑えることができる。また、膜の状態を維持するために、バクテリアの細胞膜と人工の脂質膜を融合させることで膜タンパク質を保った脂質二重膜を作成することが可能となる。これらの実験を

実現するために、図1に示すようなマイクロチャンバーを用いた。このデバイスは、過去の研究において微小液滴を作成し、その中で1分子の酵素反応やdigital ELISAが実現できると報告されており、生体物質とも相性が良いことが示されている[2,3]。また、このマイクロチャンバーの容量は数fLから数十fLとバクテリア

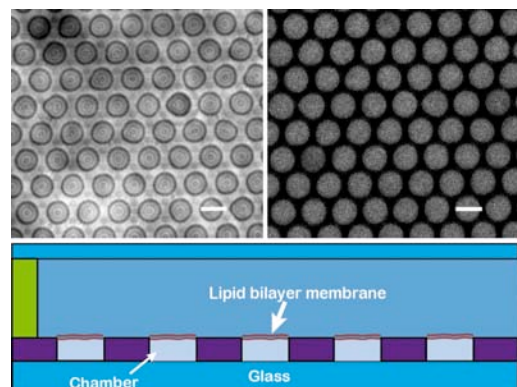


図1 (上段) 実験に使用したマイクロデバイス (左) 透過像。 (右) 蛍光色素を閉じこめた後、脂質二重膜で覆っている。スケールバーは 5 μm 。 (下段) 脂質二重膜で覆われたチャンバーのイメージ。

の容量ともほぼ一致する。さらに我々は、このマイクロチャンバー上に脂質二重膜を作成する方法も開発した(図1下段)[4]。つまり、このマイクロチャンバーを用い、チャンバー部分に脂質二重膜を作成し、バクテリアのプロトプラストを導入する。すると、バクテリアのプロトプラストは脂質二重膜とくっつき、自発的に膜融合が起きる。膜融合が起きると、チャンバー内部には、バクテリア1個体分の細胞質成分全てが導入され、脂質二重膜部分には、膜タンパク質の全てが導入される(図2)。このチャンバーは、バクテリアの全てを持ったチャンバーとなり、かつ、タンパク質濃度の低下も抑えられ、細胞膜の状態も維持している。このような、マイクロデバイスと融合したハイブリッドチャンバー細胞から、バクテリアが再生するかを検証する。図3は実際の実験で得られた画像である。矢印で示したGFPを発現している大腸菌プロトプラスト(a)が3分後にチャンバーの形にGFPの蛍光が広がり、拡散して蛍光が無くならないことがわかる(b)。このことから、脂質二重膜が張られたチャンバーに、大腸菌プロトプラストが融合していることがわかる。つまり、このチャンバーは、大腸菌の全てを持っているチャンバーとなる。

5. チャンバー融合細胞のタンパク質合成

チャンバー融合細胞の利点の一つとして、チャンバー内液に化合物やDNA等をあらかじめ加えておくことで、融合後にそれらがどのような影響を及ぼすか調べられるということがある。そこで、チャンバー中にATP(アデノシン三リン酸)をあらかじめ加えておき、タンパク合成に対するその影響を調べた。具体的には、チャンバー融合細胞は、GFPを発現しているため、その蛍光変化を経時的に調べた。図4に示すように、各チャンバーの蛍光強度はチャンバー間で様々に変化する。そこで、実験開始から2時間以上続く変化にのみ着目した。その変化した部分の蛍光強度変化の傾きをプロットしたものが図5である。バッファーのみのチャンバーに融合させた場合、GFP蛍光強度変化の傾きは平均してマイナスである。これは、蛍光強度が減少していることを意味している。ところが、チャンバー内に5mM ATPを加えると、その方向きがプラスに転じるものが増える。その結果、平均値はプラスの値となった。つまり、ATPをチャンバー内にあらかじめ加えることによって、チャンバー融合細胞のタンパク質合成能が増加したことを示している。今回の実験では、ATPのみを検証したが、アミノ酸や、その他タンパク合成に関わる化合物に関しても検証する必要があるのではないかと考えられる。次に、チャンバーにDNAを導入し、そのDNAからのGFP発現を調べた。その結果を図6に示す。実験は、チャンバー内にあらかじめGFPをコードしたプラスミドを導入し、GFPを発現していない大腸菌プロトプラストを融合させた。融合後、プラスミドからのGFP発現を蛍光でモニターした。

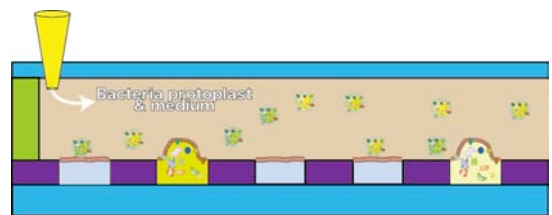


図2 バクテリアとマイクロデバイスの融合模式図

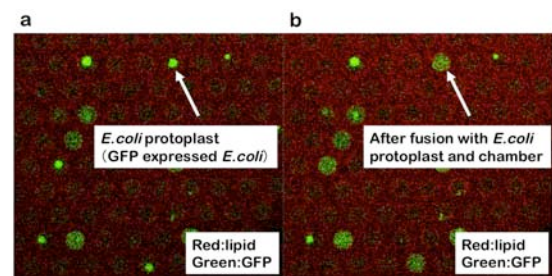


図3 共焦点顕微鏡下でのバクテリアとマイクロデバイスの融合 (a) 融合前。(b) 融合後

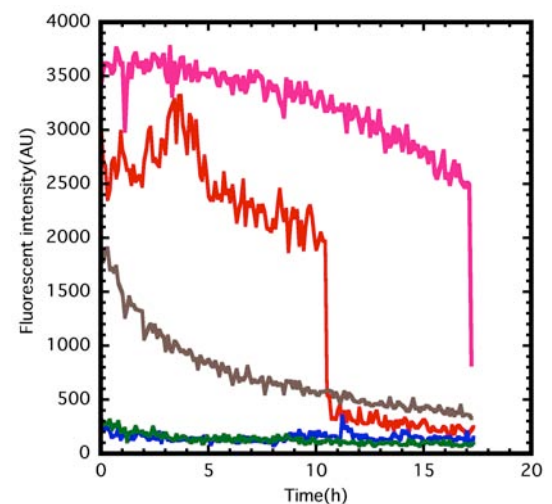


図4 チャンバー融合細胞のGFP 蛍光強度変化
ピンク、赤、茶はそれぞれチャンバー融合細胞 1つを表す。緑と青のラインは融合していないチャンバーの蛍光強度変化。

すると、十数時間にわたって、GFPの蛍光が観察されるチャンバーがみられた。一方で、まったく蛍光強度が変化しないチャンバーも確認されている(Background)。これは、チャンバー融合細胞内で、チャンバー内に導入されたプラスミドからGFPが発現していることを示している。つまりチャンバー融合細胞においても、DNAからタンパク質への転写翻訳というセントラルドグマが機能していることを示している。これらのことより、大腸菌プロトプラストとチャンバーを融合させた、チャンバー融合細胞となってもタンパク質合成を継続的に行い、DNAからの転写翻訳も可能であることから、チャンバー内部のタンパク質合成系や代謝系といった生命システムは機能しうる状態にあることが示唆される。

6. チャンバー融合細胞から大腸菌は再生するか？

これまでの実験において、大腸菌とチャンバーの融合や、チャンバー融合細胞のタンパク質合成に関して報告した。これらの実験を行っていると、非常に希ではあるが、チャンバー細胞から出芽するような現象がみられた。その連続写真を図7に示す。このように、チャンバー融合細胞からリポソーム様のものが飛び出てくるように見える。しかしながら、この出てきた何かを回収する方法が現状ではないため、これが分裂し増殖するのか、大腸菌のゲノムを持っているのかなど検証はできていない。そのため、この現象がバクテリアの再生を示しているのかはわからないが、非常に興味深い現象であることに違いはない。

7. おわりに

バクテリアの再構成を目指して、バクテリアとマイクロデバイスを融合させる方法に関していろいろ検討を行ってきた。まだまだ発展途上の研究であり、つたない部分も多々ある。しかしながら、非常に興味深い現象もみえてきており、今後の発展にご期待願いたい。当面は、飛び出てきた何かを突き止める実験を進めていきたいと思っている。

謝辞

本研究は科学技術振興機構さきがけ研究によって実施された。また、チャンバーに脂質二重膜を張る技術に関しては同じ研究室の渡邊力也助教の開発した技術を用いている。野地博行教授からは、研究全般にわたって、様々な助言を頂いた。この場を借りてお礼申し上げます。

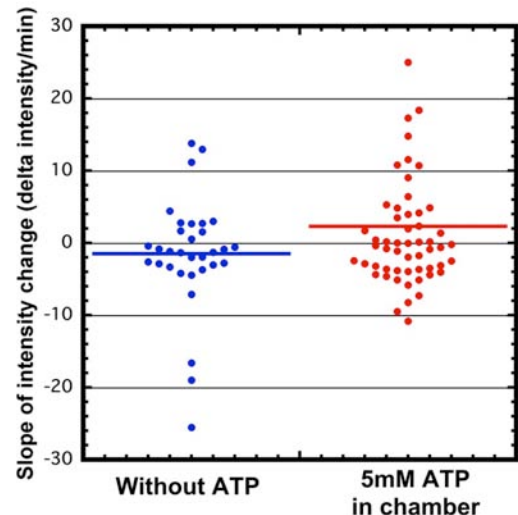


図5 各チャンバー融合細胞の蛍光強度変化

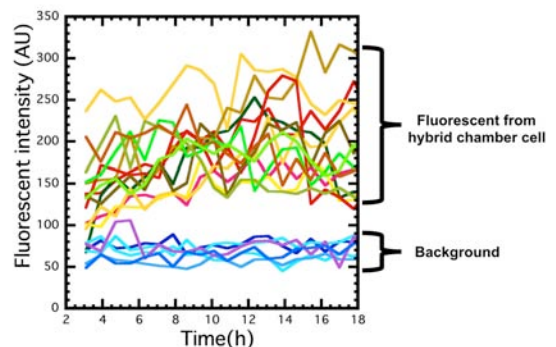


図6 プラスミドを導入したチャンバー内でのGFP発現による蛍光強度変化
各ラインは一つのチャンバーを現す。

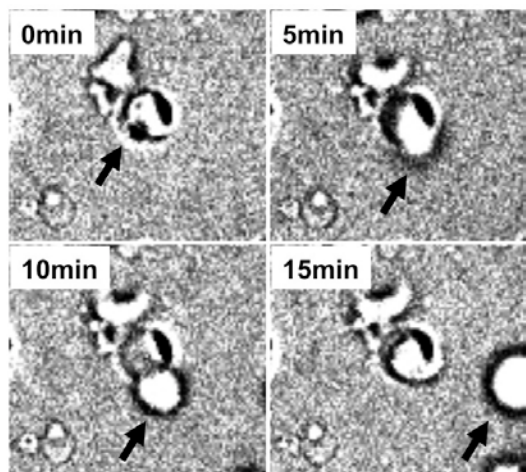


図7 チャンバー融合細胞からの出芽
矢印はチャンバー融合細胞から出芽してきたものを示す。

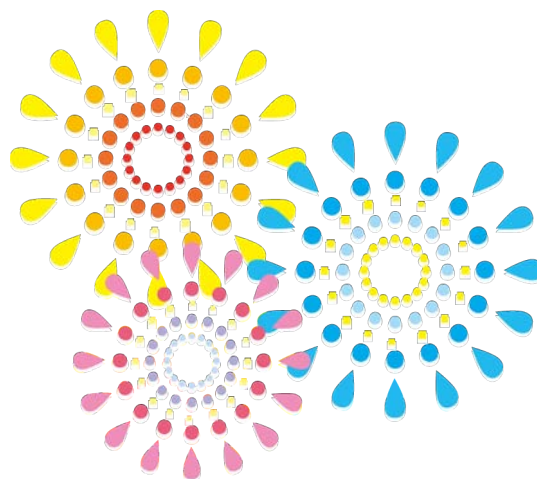
参考文献

- [1] D.G. Gibson, J.I. Glass, C. Lartigue, V.N. Noskov, R.Y. Chuang, M.A. Algire, G.A. Benders, M.G. Montague, L. Ma, M.M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E.A. Denisova, L. Young, Z.Q. Qi, T.H. Segall-Shapiro, C.H. Calvey, P.P. Parmar, C.A. Hutchison, 3rd, H.O. Smith, J.C. Venter, Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome, *Science*, **329** (2010) 52-56.

- [2] S. Sakakihara, S. Araki, R. Iino, H. Noji, A single-molecule enzymatic assay in a directly accessible femtoliter droplet array, *Lab on a Chip*, **10** (2010) 3355-3362.

- [3] S.H. Kim, S. Iwai, S. Araki, S. Sakakihara, R. Iino, H. Noji, Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules, *Lab on a Chip*, **12** (2012) 4986-4991.

- [4] R. Watanabe, D. Fujita, K.V. Tabata, L. Yamauchi, N. Soga, S.H. Kim, H. Suga, H. Noji, High throughput formation of sub-million lipid membrane arrays for measuring membrane protein activities, *proceedings of MicroTAS 2013*, (2013) 1314-1316.



気になった論文

氏名 河崎 陸(かわさき りく)

京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 後期博士課程1年

kawasaki.riku.47n@st.kyoto-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆の機会を与えていただき、深く感謝申し上げます。私は昨年、2014年3月まで大阪市立大学・長崎 健教授に御指導いただき、2014年4月より、京都大学・秋吉 一成教授に御指導いただいております。宜しくお願い申し上げます。現在はナノゲルを用いた、疎水化多糖からなるナノゲルと無機化合物を組み合わせたナノゲル―無機ハイブリッドに関する研究に携わらせていただいております。今回はイメージング機能を有する治療薬及びドラッグデリバリーシステム用キャリアに関する論文を3報紹介させていただきます。

Near-infrared dye loaded polymeric nanoparticles for cancer imaging and therapy and cellular response after laser-induced heating

T. Lei, A. F. Fernandez, R. Manchanda, Y. -C. Hung, and A. J. McGoron, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 313-322.

近年、がん治療を目的としたイメージング機能を有するセラノステックナノデバイスに関する研究が進められています。なかでも、ナノ微粒子が血中滞留性に優れていることやナノ微粒子内部に薬剤を封入することががん細胞の薬剤耐性に対して有効であることが報告されています。また、腫瘍周辺部の血管透過性が著しく亢進していることから、粒子径が 100 nm 以下に精密に制御されたナノ微粒子が腫瘍部へ集積しやすく、加えて腫瘍部のリンパ系が発達していないことから、腫瘍部に集積した物質が外部へ排泄されず蓄積しやすいという EPR 効果が報告されて以来、デンドリマーなどの高分子材料を利用したナノ微粒子に関する研究が進められています。また蛍光造影法は MRI や PET などの従来のイメージング技術と比較して、高解像度である点や比較的安価に実施することができる点など様々な利点を有しています。なかでも、近赤外光 (700-900 nm) は生体内において吸収をもつ化合物が存在していないことから、近赤外光を励起光とする化合物は生体内イメージングを行ううえで有用であるとされています。近赤外光を励起光にもつ化合物として、インドシアニグリーン(ICG)が注目されています。この ICG は近赤外光を吸収した際に蛍光を発する以外にも、熱を発生することが知られているため、がん温熱療法(ハイパーサーミア)への応用が期待されています。しかしながら、この ICG は血漿中における安定性に乏しく、その応用範囲は制限されました。従来、ハイパーサーミアは臨床において、抗がん剤を用いた化学療法や放射線療法の術後における補助療法として用いられてきました。しかしながら、このハイパーサーミアを施すことによって、HIF-1 が過剰発現する可能性が示唆されています。HIF-1 とはがん細胞において、転移や浸潤に関するタンパク質の転写を促進するため、この HIF-1 が過剰発現することによって、治療効果の低下が危惧されています。ハイパーサーミアにより、HIF-1 の発現が促進されるメカニズムにはヒートショックプロテイン(HSP)が関与しているといわれています。ここで筆者らは、ハイパーサーミアによる HSP 発現量は加温時間の長さに依存しており、ICG を用いることでレーザー照射に対して、即時的な加温が行えることから、HSP 発現抑制におい

で有利にはたらくことを見出しています。

筆者らはグリセロール、リンゴ酸そしてドデカンジオールからなるポリマー (PGMD) を合成し、ICG 類縁体である IR820 を修飾した IR820-PGMD ナノ微粒子のイメージング能および、ハイパーサーミアにおける機能評価を行いました。PGMD に IR-820 を修飾することによって細胞・生体内でのイメージングを行えるだけでなく、IR820 単独で用いた場合と比較して、IR820-PGMD は投与後、24 時間においても強い蛍光を示すことを確認しています (Figure 1)。さらに IR820-PGMD を MES-SA/Dx5 細胞に対して、曝露し、レーザーあるいはインキュベーターを用いて、光照射することによって、優位な殺細胞効果を得るだけでなく、ROS 産生、VEGF 発現、そして、HIF-1 活性を優位に抑制することを見出しています。

このように IR820-PMGD により従来の ICG の抱えていた安定性の問題点に加え、レーザーを用いたハイパーサーミアの抱えていた HIF-1 発現の問題点の双方を解決することに成功していることから、この IR820-PMGD はイメージング能を有する治療薬として、期待することができるのではないのでしょうか。

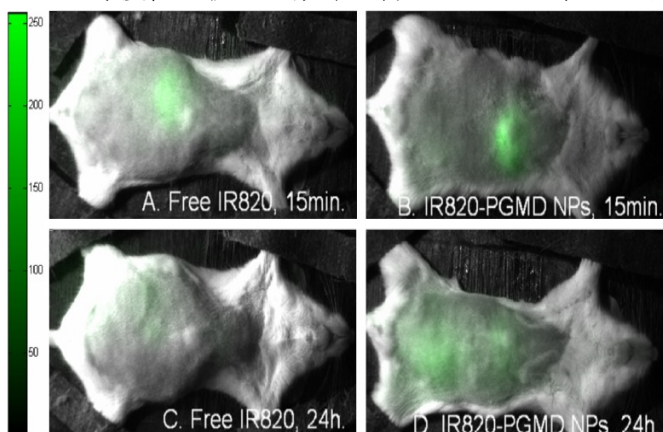


Figure 1 IR820 の生体内イメージング像 (論文より引用)

Superparamagnetic hollow hybrid nanogels as a potential guidable vehicle system of stimuli-mediated MR imaging and multiple cancer therapeutics

W. -H. Chiang, V. -T. Ho, H. -H. Chen, W. -C. Huang, Y. -F. Huang, S. -C. Ling, C. -S. Chern, and H. -C. Chiu, *Langmuir* **2013**, 29, 6434-6443.

高分子化合物の自己組織化はドラッグデリバリーシステム (DDS) のキャリアやナノサイズのバイオリクターを設計するうえで非常に有用な手段として用いられてきました。なかでも、医療の分野への応用は目覚ましく、なかでも MRI の造影剤として強磁性を有する酸化鉄 (SPIONs) をリポソームやミセルそしてナノゲルなどの内部に封入した例が多く報告されています。また SPIONs のもつ磁性を利用した患部への局所的なデリバリー、そして、がん温熱療法 (ハイパーサーミア) への応用など様々な応用例が報告されています。これらの性能は全て酸化鉄の封入率によって決定します。

筆者らはクエン酸で被覆した SPIONs と 2-メタクリロイルエチルアクリレート (MES) とポリエチレングリコール (PEG) をグラフト化したポリアクリル酸 (PAA) とポリイソプロピルアクリルアミド (PNIPA) 共重合体を複合化することによって、中空状のナノゲルを作製しました (Figure 2)。このハイブリッドナノゲルは MES を介したエステル結合により構造を安定化しています。この方法によって、生理 pH 条件下で粒子径 190 nm 程度、表面電荷が -18.5 mV の球状のハイブリッドナノゲルが得られました。このハイブリッドナノゲルは導入した SPIONs によって、高周波数の磁界中において、ハイパーサーミアにより発熱することを確認しています。また、pH や温度などの外部刺激に応答することで内部に封入したドキシソルビシン (DOX) などの薬剤をハイブリッドナノゲル外部へと放出することを確認しています。さらに、このハイブリッドナノゲルを用いた T₂-type の MRI を行うことによって、生理 pH 条件下において、よいコントラストイメージ像を得ることができたため、高い MRI 造影性能をもつことを確認しました (Figure 2)。これを利用して細胞周辺部の微小環境が弱酸性に傾

いている腫瘍組織において *in vivo* イメージングが可能であると考えられます。またハイブリッドナノゲルを細胞内に取込ませた状態で **MRI** によりイメージングすることに成功しています。今回、ハイブリッドナノゲルを **HeLa** 細胞に曝露し、その後、外部から磁場を印加し、ハイブリッドナノゲルを細胞周辺部へと誘導したところ、磁場により誘導しなかった場合と比較して、倍以上の細胞内への取込みが確認されました。それだけでなく、**SPIONs** のハイパーサーミアと **DOX** の併用により、ハイパーサーミア、**DOX** それぞれ単独の場合と比較して、**HeLa** 細胞に対する細胞障害性が増強することを確認しました。

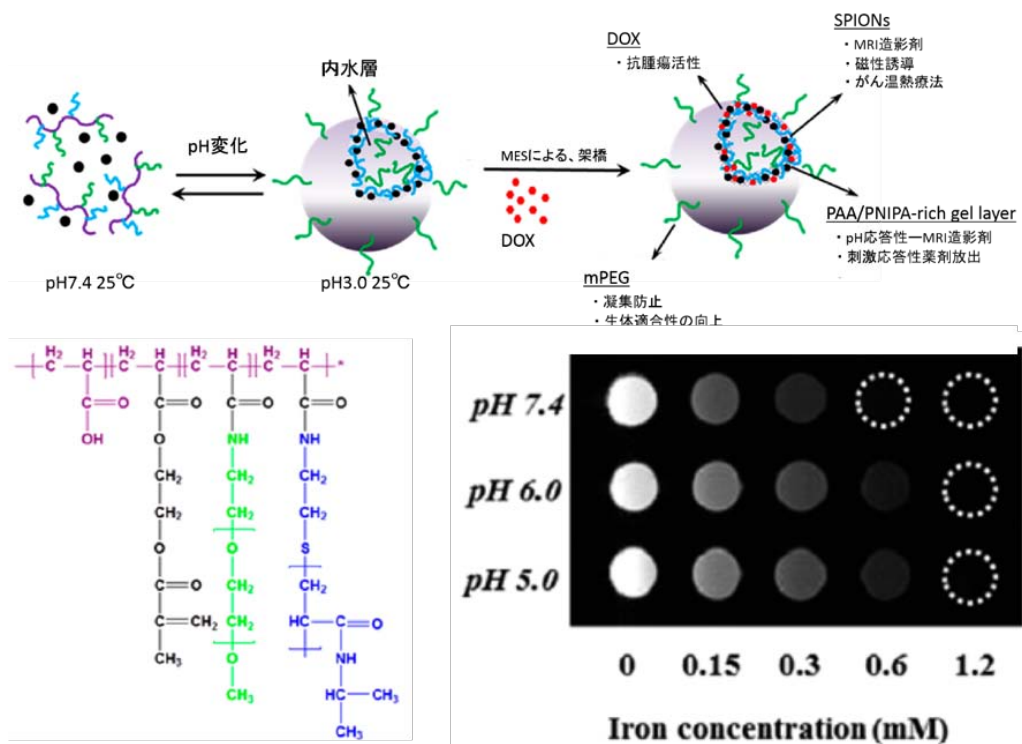


Figure 2 ナノゲルの模式図及びその造影機能(論文を一部改変)

今回、筆者らの作製した中空状ハイブリッドナノゲルは内部に薬剤を封入することができ、pH や温度といった外部刺激に応答して薬剤を放出することを見出しました。それだけでなく、ナノゲル形成時に導入した SPIONs による、ハイパーサーミア、MRI 造影機能を確認しました。このように今回作製したハイブリッドナノゲルはハイパーサーミアと化学療法の併用が可能な新規セラノステックナノデバイスとしての応用が期待されます。

SiO₂@YBO₃: Eu³⁺ hollow mesoporous spheres for drug delivery vehicle

G. Yang, S. Gai, F. Qu, and P. Yang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 5788-5796

近年、高効率かつ副作用を軽減することが可能なドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究が盛んに進められてきました。例えば、その高い生体適合性、高い生分解性そしてキャリア表面のポアを制御することができるメソポーラスシリカを基体としたDDSキャリアの開発が注目を集めています。メソポーラスシリカはシリカ表面に機能性を付与することができるため、DDSによる治療のみならず、同時にイメージングを行うことができるセラノステックナノデバイスとして期待されています。また、イットリウムやユーロピウムなどの希土類金属は高い蛍光機能を有しているため、染色材料として期待されています。

筆者らは酸化鉄をテンプレートとしたメソポーラスシリカを合成し、テンプレートとした酸化鉄を酸処理によって除去し、中空のメソポーラスシリカを合成しました。シリカ表面にユーロピウムをドーピングさせたホウ酸イットリウムを修飾することでDDS用新規ナノキャリア (Figure 3) を合成し、その機能評価を行っています。

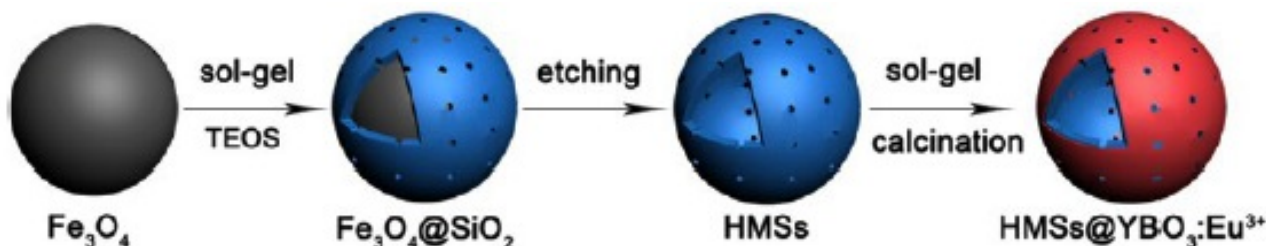


Figure 3 新規メソポーラスDDSキャリア設計の概略図

まず、塩化鉄(III)と酢酸ナトリウムをエチレングリコールとエチレンジアミン溶液中に溶解させ、 200°C に加熱し、放冷することによって、テンプレートとする粒子径90 nm程度の酸化鉄を合成しました。この他にも粒子径180、300 nmの酸化鉄を合成し、テンプレートとして用いました。ここで得られた酸化鉄に対して、塩酸処理そして超音波処理を行うことで酸化鉄を十分分散させ、アンモニア水を含むエタノール中、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド存在下、TEOSを添加することで酸化鉄表面にシリカを被覆しました。ここに濃塩酸を処理することにより、シリカ内部の酸化鉄を溶出させることで中空状のシリカナノ微粒子を合成しました。このシリカの表面に硝酸イットリウムと硝酸ユーロピウムを作用させることにより、ナノキャリア ($\text{HMSs}@\text{YBO}_3:\text{Eu}^{3+}$) を得ました。 $\text{HMSs}@\text{YBO}_3:\text{Eu}^{3+}$ の内部に抗がん剤であるDOXを封入しました。このときPBS中において、30-40%を放出しました。それだけでなく、粒子径依存的に放出する量は増大することを確認しています。 $\text{HMSs}@\text{YBO}_3:\text{Eu}^{3+}$ の表面とDOXの間に生じる相互作用だけでなく、形成された中空構造のサイズや表面のポアのサイズによって、放出は制御されています。それだけでなくDOXのリリースは生理pH条件下と比較して、酸性条件下において促進されるため、細胞周辺部の微小環境が弱酸性に傾いている腫瘍組織において効率的なDOXのリリースが可能であるため副作用の低減に期待できます。マウス結合組織由来の細胞であるL929細胞に対する $\text{HMSs}@\text{YBO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 単独の細胞障害性をMTTアッセイにより評価したところ、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで細胞障害性は確認されなかったため、DDSにおけるキャリアなどバイオメディカル分野への応用が期待できます。

今回、筆者らの作製した $\text{HMSs}@\text{YBO}_3:\text{Eu}^{3+}$ はテンプレートとした酸化鉄の粒子径によって、その構造を制御することができ、中空状のメソポーラス構造を有することに加え、発光機能をもつため、DDS用新規キャリアとして期待することができます。

末筆になりますが、今回、このような機会を与えて頂いた 大阪市立大学大学院工学研究科 化学生物系専攻 長崎 健 教授 に深く御礼申し上げます。



気になった論文

上松 亮平 (うえまつ りょうへい)

東北大学多元物質科学研究所 生命機能制御物質化学研究分野 博士課程 2 年

uematsu@mail.tagen.tohoku.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、心より感謝申し上げます。現在私は、東北大学多元物質科学研究所 和田健彦教授のもと、ハイポキシア関連疾患を標的とする核酸医薬開発を目指した人工核酸の創製をテーマに研究に取り組んでおります。

天然核酸リン酸基の酸素原子を硫黄原子に置換した PS オリゴに端を発し、これまでに主に核酸医薬としての応用を目指し多数の人工核酸（修飾核酸）が開発されてきました。今回は、近年盛んに行われている核酸医薬開発の現状に関する報告を 1 報、さらに臨床応用する上で欠かせない核酸医薬のドラッグデリバリー技術に関する最新の論文 2 報を紹介いたします。

Antisense therapies for cardiovascular/metabolic diseases

R. S. Geary, R. Crooke, S. Bhanot, W. Singleton, *Drug Discov. Today Ther. Strateg.*, **2014**, in press. (DOI: 10.1016/j.ddstr.2013.06.001)

RNA を標的とする核酸医薬は選択性・特異性が高く、化学合成による大量入手が可能であり、また、容易に分解されるので安全性が高いという利点があります。そのため、次世代型医薬として広く研究されており、現在では RNase H や RNAi を活用した手法が先端研究として行われています。この論文では、それらの中でも治験段階まで進んだ事例を紹介しておりますので、一部抜粋いたします。

Mipomersen (KYNAMROTM) はアポリポタンパク質 apoB-100 を標的とした核酸医薬です。Gap motif (図 1) と呼ばれる酵素耐性と RNase H 活性の両立を可能とする構造を有し、Phase 3 試験において高コレステロール血症患者への投与により有効な治療効果が報告されています。米国で医薬品認可を受け、核酸医薬の先駆けとして注目を集めています。

RNAi を利用した核酸医薬では ALN-PCS が Phase 1 試験を完了しています。ALN-PCS は LDL 受容体を分解する PCSK9 を標的とし、PCSK9 発現を阻害することで血中 LDL コレステロール濃度降下に成功しています。

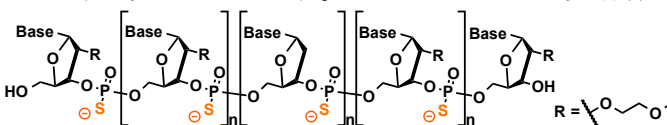


図 1. Gap motif

続いて、核酸医薬のドラッグデリバリー技術に関する最新の論文 2 報を紹介させていただきます。

Ultrasmall gold nanoparticles as carriers for nucleus-based gene therapy due to size-dependent nuclear entry

S. Huo, S. Jin, X. Ma, X. Xue, K. Yang, A. Kumar, P. C. Wang, J. Zhang, Z. Hu, X. -J. Liang, *ACS Nano*, **2014**, 5852-5862.

Triplex-forming oligonucleotides (TFOs) は特定の DNA 配列と三重鎖を形成し、遺伝子発現を阻害すると知られています。しかしながら、TFO は標的 DNA が存在する細胞核に到達する前に、細胞質で DNase により分解されてしまうので、その細胞レベルへの応用は困難です。そこで著者らは、コンジュゲーションによりオリゴヌクレオチドの安定性を高め分解を防ぐことが報告されている金ナノ粒子 (Au-NPs) に着目しました。

著者らは既に、50 nm の金ナノ粒子が、腫瘍細胞内部に深く浸透することを見出し、報告していますが、細胞核導入は未達成でした。粒径の微小化により、粒子とコンジュゲートした TFO の細胞核導入が可能になると考え、Tiopronin で表面修飾した金ナノ粒子を作製しました (Au-TIOP NPs)。二通りの方法で粒径 2 nm、6 nm (図 2 a)、粒径 10 nm、16 nm (図 2 b) を作り分けています。さらに、細胞質・細胞膜導入可視化のために、表面を FITC で蛍光標識した化合物も合成しています。

実際に MCF-7 細胞内への導入を検討した結果、いずれの粒径を有する金ナノ粒子も細胞質への導入が観測され、特に 2 nm Au-FITC NP は細胞核への導入も観測されました (図 3)。著者らは、核膜孔複合体による核膜内への輸送が可能な微小粒子 (粒径 9 nm 以下) のみが核膜を透過した結果だと考えています。

次に、核膜透過可能であることが明らかとなった 2 nm Au-TIOP NP に c-myc 遺伝子を標的とする POY2T と名付けた TFO をそれぞれコンジュゲートしました (Au-POY2T NPs, 図 2c)。Au-POY2T NPs を MCCF-7 細胞とともに 24 h インキュベーションした後の c-myc 遺伝子発現量をリアルタイム PCR およびウェスタンブロッティングで追跡したところ、TFO (POT2T) 単独添加系では 80 % 程度までしか発現量が抑制されなかったのに対し、Au-POY2T NPs 添加系では 20%程度まで大きな発現量抑制が観測されました (図 3)。これらの実験結果は、金ナノ粒子が TFO に核膜透過性を付与し、さらにその透過性は、粒径に依存し、極微小 (2 nm) の金ナノ粒子を利用することで、核内の標的遺伝子の発現を抑制できることを示しています。細胞核へ薬剤を輸送する汎用性の高い新規の手法のひとつと考えられ、今後の展開が期待されます。

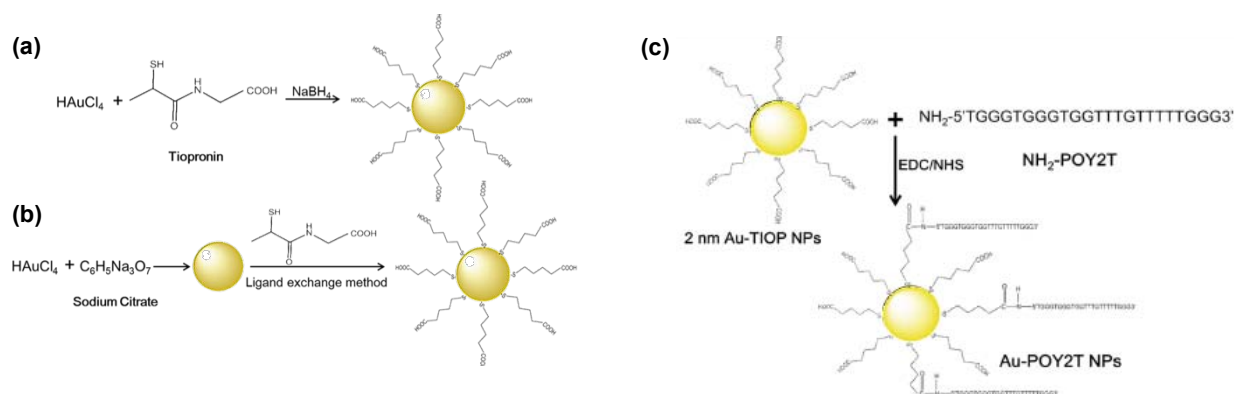


図 2. (a) Au-NPs 作製法 (粒径 2, 6 nm); (b) Au-NPs 作成法 (粒径 10, 16 nm) (c) Au-POY2T 作製法 (Copyright 2014 American Chemical Society)

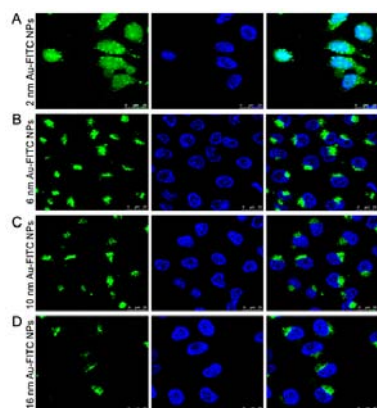


図 3. A 2 nm, B 6 nm, C 10 nm, D 16 nm Au-FITC NPs 局在イメージング; 緑: Au-FITC NPs; 青: MCF-7 細胞核 (Copyright 2014 American Chemical Society)

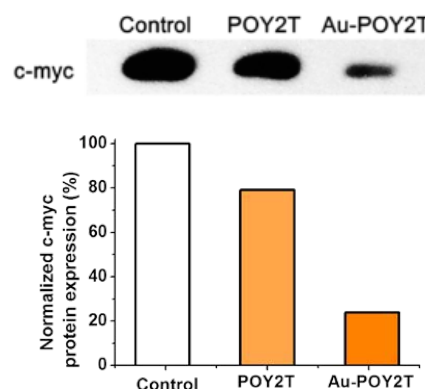


図 4. ウェスタンブロッティング結果 (Copyright 2014 American Chemical Society)

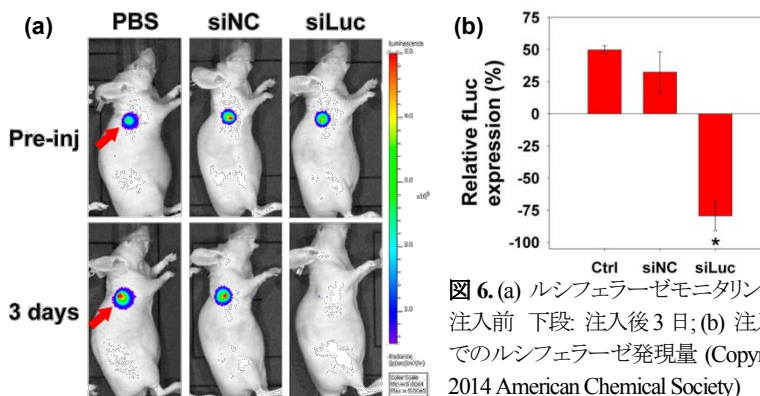
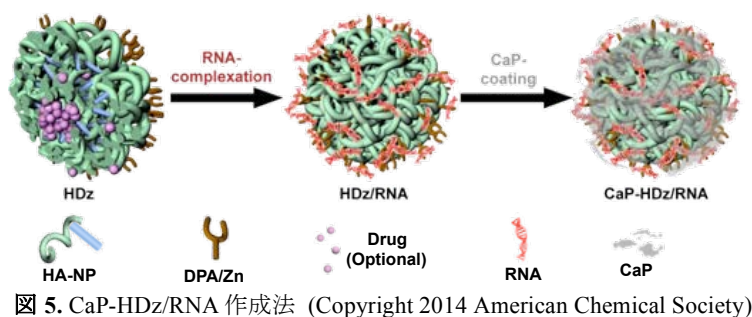
Versatile RNA interference nanoplatform for systemic delivery of RNAs

K. Y. Choi, O. F. Silvestre, X. Huang, K. H. Min, G. P. Howard, N. Hida, A. J. Jin, N. Carvajal, S. W. Lee, J. -I. Hong, X. Chen, *ACS Nano*, **2014**, 8 (5), 4559-4570.

癌細胞を標的とし、毒性のない RNA デリバリーシステムの開発が RNAi 療法の分野で精力的に行われています。RNAi の鍵となる siRNA や miRNA の細胞導入のために、これまでに多数の RNA デリバリーシステムが開発されてきました。著者らは汎用性が高く、かつ安全を高めた RNA デリバリーシステムの構築に向けて、新規 RNA ナノキャリアの開発に取り組んでいます。

このナノキャリアは親水的なヒアルロン酸と疎水的な 5β -コラン酸をコンジュゲートした両親媒性構造をコアにしています (HA-NP)。癌細胞表面にはヒアルロン酸レセプターである CD44 が過剰発現していることが知られており、CD44 を介したエンドサイトーシスによる癌細胞特異的細胞導入が期待されます。さらに、リン酸アニオンと結合することが知られている Zn(II)-dipicolylamine (DPA/Zn) を連結し、HA-NP に RNA 結合・運搬機能を付与しています (HDz/RNA)。しかし、このままでは、生体内のリン酸アニオンとの交換により標的到達前に RNA が解離してしまう可能性が高いので、HDz/RNA 表面をリン酸カルシウム (CaP) で被覆しました (CaP-HDz/RNA、図 5)。CaP-HDz/RNA がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれると、後期エンドソーム内の酸性環境により、CaP 被覆が溶解し、溶出したリン酸イオンが DPA/Zn 上の RNA と交換し RNA が解離します。CaP の溶解でエンドソーム内のイオン強度が上昇し、浸透圧によりエンドソームが崩壊すると、RNA や HA-NP コアが細胞質に放出され、薬効の発現が期待されます。遺伝子導入システムの多くは強い正電荷を有しており、細胞毒性も少なからずみられますが、HA-NP コアはヒアルロニダーゼにより分解されるので、細胞毒性はほとんど示しませんでした。このことから、CaP-HDz/RNA は汎用性が高く、癌細胞に対して効果的な RNA ナノキャリアであると考えられます。

さらに著者らは、マウスを用いて *in vivo* での細胞導入機能と siRNA による RNAi の検討を行いました。ホタルルシフェラーゼ (fLuc) を発現する癌細胞の消失をモニタリングし評価したところ、siLuc を注入したマウス (Control: PBS, Non-coding sequence: siNC) においてのみ、fLuc 発現量の劇的な減少がみられました (図 6)。生体内において、CaP-HDz/RNA により運搬された siRNA が効果的な RNAi を惹起したことから、有用な新規 RNA ナノキャリアとして期待されます。



気になった論文

田畑 栄一 (たばた しげかず)

九州大学大学院 薬学研究院 生体分析化学分野(王子田研究室) 助教

tabata.shigekazu.825@m.kyushu-u.ac.jp

この度は、生命科学研究レター「気になった論文」に執筆する機会をいただき、誠にありがとうございます。私は、修士課程までは九州大学工学研究院において、竹中繁織先生(現・九州工業大学 教授)のもとでDNAの分析方法に関する研究に取り組みました。博士課程からは同じく九州大学の生体防御医学研究所に移り、前仲勝実先生(現・北海道大学 教授)のもとで、それまでとは全く異なる研究内容である免疫細胞表面の受容体の構造生物学的研究に取り組み、2008年に学位を取得しました。そして、今年の4月に九州大学薬学研究院の助教に採用され、現在は王子田彰夫先生の研究室にてタンパク質のケミカルラベル化法の開発、およびその応用研究に取り組んでいます。

以上のような経歴ですので、普段はタンパク質のケミカルバイオロジーに関する論文を読む機会が多いのですが、本稿ではphoto affinity labelingにより薬剤の作用機序を分子レベルで解明した論文、細胞内タンパク質の活性を制御する手法に関する論文、そして天然変性タンパク質の相互作用解析法に関する論文をご紹介します。

A propofol binding site on mammalian GABA_A receptors identified by photolabeling

G. M. S. Yip, Z. -W. Chen, C. J. Edge, E. H. Smith, R. Dickinson, E. Hohenester, R. R. Townsend, K. Fuchs, W. Sieghart, A. S. Evers, N. P. Franks

Nature Chem. Biol. **2013**, 9, 715-720.

Propofol (図1左)は現在世界で最も広く使われている麻酔薬の1つで、その作用機序については今なお不明な点が多く残されていますが、現時点では、 γ -アミノ酪酸(GABA)の受容体であるGABA_A受容体が最も重要な標的分子であると考えられています。GABA_A受容体は5種類のサブユニットが様々な構成で5量体を形成することで機能するCl⁻チャネルで、**a**変異型 β_3 サブユニットのノックインマウスではpropofolの麻酔効果が顕著に弱くなることから、作用機序の研究はGABA_A受容体の β_3 サブユニットに集中しています。しかし、変異体を用いた解析では、変異導入による機能への影響の可能性がつきまとうことになるため、著者らはphoto affinity labelingが可能な官能基としてtrifluoromethyl diazirine基を導入したpropofolアナログ(図1右)を合成し、これと野生型GABA_A受容体を使ってpropofolの結合部位を解析しました。

まず、Sf9細胞(昆虫細胞)GABA_A受容体に α_1 サ

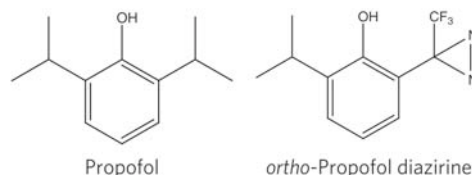


図 1. Propofol(左)、および trifluoromethyl diazirine 基を導入したアナログ(右)

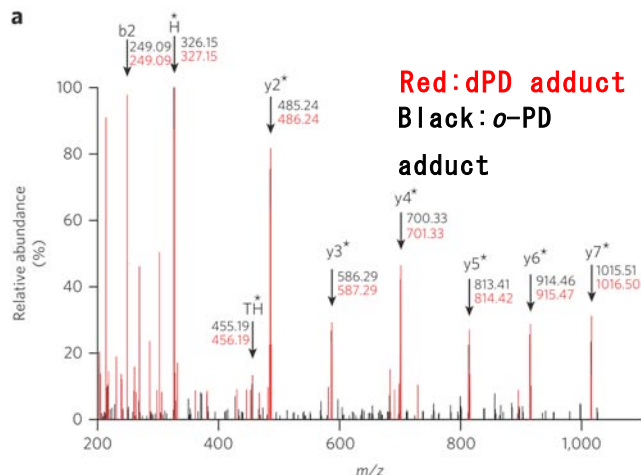


図 2. o-PD 標識体(black)とdPD 標識体(red)のマスペクトル

ブユニットと β_3 サブユニットを強制発現させ、その後抽出した膜画分を*ortho*-propofol diazirine(*o*-PD)、および重水素化した*o*-PD(dPD)で標識します。これをLC/MSで解析すると、*o*-PD標識体とdPD標識体ではMSにおいてm/z値に1の違いが生じます。ゆえに、両者のマスペクトルを重ね合わせると、標識部位を含むフラグメントのピークはm/z値が1だけずれることになり、このズレを目印にすることで、数あるシグナルの中から*o*-PDにより標識されたフラグメントを容易、かつ正確に同定することができます(図2)。以上のような解析の結果、*o*-PDはGABA_A受容体 β_3 サブユニットのH267のみに共有結合しており、このHisをAlaに置換した変異体は野生型に比べて、細胞でのアッセイにおいて*o*-PDに対する応答が顕著に弱くなったことから、H267の周囲がpropofolの結合部位であることが明らかとなりました。ホモロジーモデリングにより構築された β_3 サブユニットのモデル構造上では、同定されたpropofolの結合部位は1つの β_3 サブユニットのみから構成されており、5量体として機能するGABA_A受容体では構成する β_3 サブユニットの数によって、受容体そのものに結合するpropofolの数は変動することが示唆されました。様々なタンパク質の立体構造が解明されつつあるとはいえ、GPCR(G protein-coupled receptor)をはじめとする複数回膜貫通タンパク質の結晶構造解析は依然として困難であり、このようなタンパク質に対してphoto affinity labelingは機能解析のための強力な手法になり得ることを、本論文は示しました。

Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells

J. Li, J. Yu, J. Zhao, J. Wang, S. Zheng, S. Lin, L. Chen, M. Yang, S. Jia, X. Zhang, P. R. Chen, *Nature Chem.* **2014**, 6, 352-361.

タンパク質の機能を制御する低分子化合物や手法は数多く開発されていますが、そのほとんどは標的タンパク質の活性を阻害する方法です。一方で、標的タンパク質を活性化させる数少ない手法の1つに、chemical rescue strategyという方法があります。この方法では、標的タンパク質の活性部位に変異を導入して一時的に失活した状態で発現させ、試薬添加などの外部刺激により本来の活性が回復する、という機構で標的タンパク質の活性を制御します。本論文では活性中心のLys残基を標的にしており、 ϵ -NH₂基をpropargyl基で保護した非天然アミノ酸を部位特異的に導入し、この変異体を

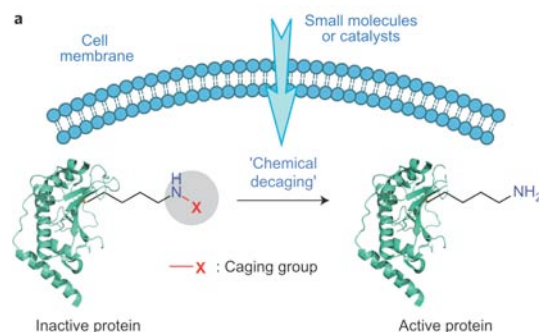


図3. 保護基 X でケージド化された Lys を部位特異的に標的タンパク質に導入し、脱保護することで活性化

発現させた後にパラジウム(Pd)触媒を加えて脱保護することで、任意のタイミングで本来の活性を回復させる、というコンセプトになっています(図3)。

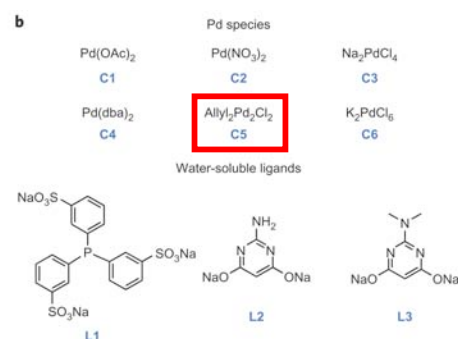
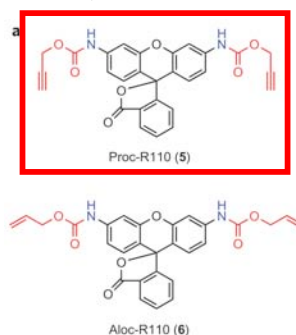


図4. a)モデル化合物の構造、および b)検討した脱保護試薬

著者らはまず、rhodamine 110のNH₂基にpropargyloxycarbonyl(Proc)基とallyloxycarbonyl(Alloc)基を導入したモデル化合物(図4a)を用いて適切な保護基と脱保護試薬(Pd触媒)の検討を行い(図4b)、Proc基と

Pd触媒C5の組み合わせでもっとも効率よく脱保護できたことから、次にこの組み合わせをモデルタンパク質で検証しました。ここで、著者らは細胞内のタンパク質に本系を応用するに当たり、モデル系として赤痢菌が持つphosphothreonine lyaseの1つ、OspFを選びました。OspFは赤痢菌が有するlyase(二重結合の形成反応を触媒する酵素)の一種で、その活性中心ではLys134が重要な役割を担っています(図5a)。著者らはOspFのLys134を、 ϵ -NH₂基をProcで保護したLys誘導體(Proc-Lys)にコドン拡張により部位特異的に置換し、失活した状態(OspF-K134-Proc-Lys)でHeLa細胞に強制発現させました。Pd触媒なしでは、OspF-K134-Proc-Lysを強制発現させてもリン酸化Erk(p-Erk)は脱リン酸化されず(図5b レーン4)、Pd触媒を加えることで初めてp-Erkが脱リン酸化されました(図5b レーン1,2)。また、培地中にProc-Lysを加えなければ、OspF-K134-Proc-Lysを発現できないことから(図5b レーン3,6,7)、OspF-K134-Proc-Lysは確かにProc-Lysを取り込んでおり、その触媒活性はPd触媒を加えることで初めて回復することが確認できました。紫外光照射で脱ケージ化する手法もありますが、紫外光そのものに応答して細胞内のリン酸化シグナルスケーラードが変化することがあり、本手法はその様な外部刺激の副作用がない優れた手法といえます。

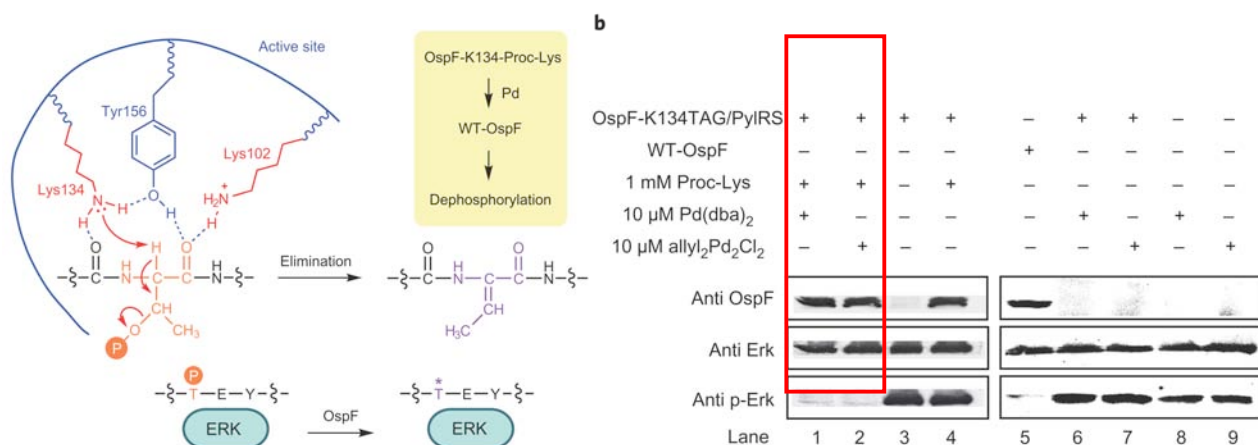


図 5. a)OspF の酵素反応メカニズム、および b)細胞内でのリン酸化 Erk の脱リン酸化アッセイ

The hepatitis B virus preS1 domain hijacks host trafficking proteins by motif mimicry

M. C. Jürgens, J. Vörös, G. J. P. Rautureau, D. A. Shepherd, V. E. Pye, J. Muldoon, C. M. Johnson, A. E. Ashcroft, S. M. V. Freund, N. Ferguson

Nature Chem. Biol. **2013**, 9, 540-547.

感染性のB型肝炎ウイルス(HBV)のウイルス粒子は、ヌクレオカプシド(コア粒子)が3種類のウイルス表面タンパク質で覆われた構成になっています。表面タンパク質の1つであるL proteinは宿主細胞内で発現すると、小胞体膜に複数回膜貫通の状態でもフォールドしますが、2通りのフォールド様式で存在すると考えられています。1つはPreSDドメイン(図6aのpreS1 + preS2)がcytosol側(小胞体の外側)に露出したi-preS Lと呼ばれる形状で、もう一つはPreSDドメインがlumen側(小胞体内部)を向いたe-preS Lです(図6b)。これまでに、i-preS Lが γ 2-adaptinと呼ばれるタンパク質のEARドメイン(以下、 γ 2-EAR)と相互作用することが明らかとなっています(図6c)。

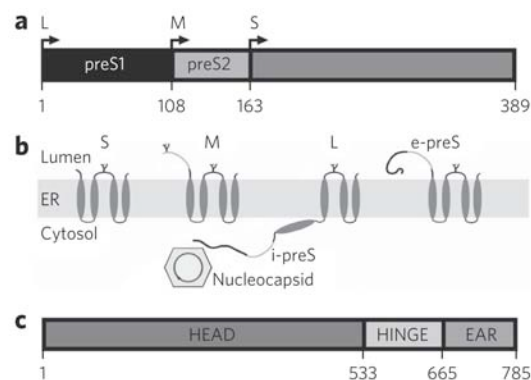


図 6. a)HBV 表面タンパク質のドメイン構造、b)小胞体膜上でのフォールド、および c) γ 2-adaptin のドメイン構造

γ 2-adaptinは、タンパク質の細胞内輸送に関わるタンパク質で、i-preS Lによりゴルジ体に輸送されることが確認されていますが、その詳細な相互作用様式についてはよくわかっていません。そこで本論文では、核磁気共鳴法(NMR)と等温滴定型熱量測定(ITC)などの手法を駆使してi-preS Lと γ 2-EARの相互作用を詳細に解析し、i-preS L上の相互作用部位の同定を試みました。

著者らは、PreSドメインの中でも感染に重要な役割を果たすことが知られているPreS1ドメインに絞り、解析を行いました。まず、 γ 2-EARにPreS1ドメインを滴下した際のHSQC(heteronuclear single quantum coherence)スペクトルの変化からアミノ酸ごとにchemical shift perturbation(CSP)値(以下、 δ 値)を算出したところ、PreS1ドメインでは29-41番目の残基にて大きな δ 値を示しました(図7)。相互作用に関わる領域は大きな δ 値を示すため、この領域が γ 2-EARとの相互作用部位であると推測されました。次に、29-41番目以外の領域も含めてpreS1ペプチド断片の γ 2-EARに対する親和性をITCで評価したところ、PreS1ドメインには γ 2-EAR と相互作用する領域として、9-16番目、29-36番目、そして59-68番目の3つが存在することを見いだしました(表1)。最後に、PreS1ドメインと γ 2-EARの複合体について、 ^{15}N - ^1H heteronuclear NOEとion mobility spectrometry-mass spectrometry(IMS-MS)により詳細に解析しています。IMS-MS法では、イオンの大きさ(体積)で分離するIMS部と質量分析部を連結した装置を用いることで、 m/z 値(分子量)が同じタンパク質でも、コンパクトにフォールドしているタンパク質と、フォールドせずにペプチド鎖が伸びた状態のタンパク質では別のシグナルとして検出されます。まずPreS1ドメインは天然変性タンパク質(intrinsically disordered protein; IDP)であり、ほぼextended formを取ることがNMRにより確認されています。しかし、 γ 2-EARと結合することで一部の構造の揺らぎが小さくなる、つまり一定の構造を取ることが、 ^{15}N - ^1H heteronuclear NOEから明らかとなりました。さらにIMS-MSの結果から、 γ 2-EAR-preS1複合体は2種類のコンホメーションで存在することが確認され、これはpreS1がコンパクト折りたたまれた、もしくはポリペプチド鎖が伸びたコンホメーションで γ 2-EARに対して結合した状態を反映したものであると、著者らは結論づけています。最終的には、得られた知見を踏まえて宿主細胞内でのHBVウイルス粒子の形成メカニズムを提唱しています。本論文では、NMR、ITC、IMS-MSと様々な分析手法を駆使し、IDPの相互作用メカニズムを詳細に解明しています。IDPのように定まった構造を取らないタンパク質の結晶構造解析は難しく、本論文はこのようなフレキシブルなタンパク質の相互作用メカニズムの解明における、よいモデルケースになるかもしれません。

以上、タンパク質のケミカルバイオロジー研究の論文を3報紹介しましたが、特にはじめの2報は利用している化学反応そのものはシンプルで、これをタンパク質化学、細胞生物学の技術、知識と組み合わせることで素晴らしい仕事に仕上がっています。最後の論文では、結晶構造解析による相互作用機構の詳細な解明が難しいIDPについて、様々な分析手法を駆使することで、結晶構造解析にも劣らない詳細なデータを得られることを実証しており、今後のIDP研究の一つのモデルとなり得る論文です。近年、様々な化学反応、分析手法がタンパク質にも適用可能になり、これらを駆使した様々なタンパク質の機能解析、そしてエンジニアリングがますます盛んになっていくものと期待されます。

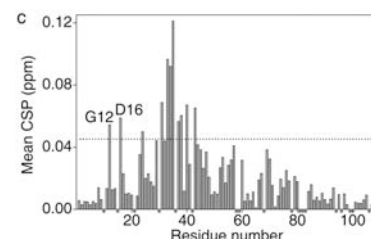


図7. PreS1ドメインの各アミノ酸の δ 値

表1. PreS1 ペプチド断片と γ 2-EARの解離定数

preS1	K_d for WT γ 2-EAR (μM)
preS1(9-16)	2,200
preS1(29-40)	1,400
preS1(29-36)	1,000
preS1(33-40)	No binding
preS1(50-58)	Insoluble [†]
preS1(59-68)	5,200
preS1(42-108)	750

留学体験記

カリフォルニア工科大学留学体験記

Division of Chemistry and Chemical Engineering,
California Institute of Technology

田村 朋則
(tamura@caltech.edu)



私は2013年3月に京都大学浜地格教授のもとで学位を取得後、同年5月から日本学術振興会特別研究員(国内学振)の海外渡航制度を利用してカリフォルニア工科大学(以下Caltech)Linda Hsieh-Wilson研究室に留学しています。この度、光栄にも留学体験を報告する機会を頂きましたので、留学に至る経緯やCaltechでの研究生活等について紹介させていただきます。執筆現在でちょうど1年の短い留学経験ではありますが、本稿が今後海外での研究を計画している学生さんやポスドクの皆さんのお役に少しでも立てれば幸いです。なお、生命化学研究レターNo.18には、梅野太輔先生がよりDeepなCaltech留学体験記を執筆されていますので、Caltechへの留学をお考えの方はそちらも合わせてご覧頂くと宜しいかと思います。

1、渡米までの経緯

私は今回の留学以前に、博士課程1年の1月から4月にかけてイギリス、オックスフォード大学(Benjamin G. Davis研究室)に滞在したことがありました。初めての海外生活は苦労の連続でしたが、下手な英語を駆使しながら多国籍なメンバーと議論するのは刺激的で楽しい経験でした。一方、研究面においてはあまり成果をあげることができないまま、あっという間に帰国の日を迎えてしまいました。このとき日本に向かう飛行機の中で、「3ヶ月では物足りない!」という気持ちが芽生え、これが今回の留学の大きなきっかけになったように思います。その後、D2の3月頃に紆余曲折を経てアカデミックの道に進む覚悟を決め、ポスドク期間は改めて海外で新しい事に挑戦しようと決意しました。そこから大急ぎで日本学術振興会の海外特別研究員(海外学振)の申請準備を始めたのですが、残念ながら結果は不採用でした。一方幸運にも、同時期に申請していた国内学振に採用され、学位取得後は東京大学津本浩平先生の研究室に所属させて頂くことになりました。ご存知の方も多いと思いますが、国内学振は任期3年のうち1年半の海外渡航が認められています。そこで海外留学を強く指向していた私は、津本先生からお許しを頂いて、任期の前半を留学に充てることにしました。

博士課程において、私はタンパク質の選択的化学修飾手法の開発に携わっていたのですが、Ben Davis研への短期留学を機にGlycobiologyにも興味を持ち始めていました。そこで国内学振内定直後から、当該分野のいくつかのラボにポスドクとして受け入れてもらうようお願いするメールを送りました。しかしなかなか良い返事がもらえず(というか返事すらもらえず)焦りはじめたD3の12月頃、それを見兼ねた浜地先生が、私の事を現在のボスであるLindaに紹介して下さいました。Lindaは神経伝達や疾病における糖鎖の機能に

関して研究している新進気鋭の女性研究者で、近々学生が何人か卒業するので私をポスドクとして受け入れる余地があるとのことでした。彼女の仕事に大変興味があった私はすぐにCV(英文履歴書)を送り、浜地先生、築地真也先生、清中茂樹先生に書いて頂いた推薦状の後押しもあって無事採用に至りました。私の場合フェローシップを持っており、また日本にいてもあって面接等はありませんでした。卒業前の忙しい時期に面接を免除して頂いたことは幸運でしたが、今思うと無理してでも訪問しておいたほうがラボの雰囲気やLindaの人柄などが事前に分かって渡米前の不安は和らいだかと思います(P. G. Schultz 研出身のLindaはSlave driverかも…という噂がありビクビクしていたものの、実際はそんなことはありませんでした)。

2、パサデナ

Caltechはロサンゼルス北東に位置するパサデナ市の街中にあります。パサデナは閑静な高級住宅街として知られ、古いレンガ造りの建物を利用したショッピングモールは多くの人で昼夜賑わっています。また、毎年1月1日に行われる「ローズパレード」と、カレッジフットボールの「ローズボウル」の開催地として全米的に有名で、元旦には100万人を越える人々がパサデナに押し寄せます。街は全体的に治安が良く、夜遅くに歩いても危険を感じることはありません。もちろん場所によってはやや雰囲気の悪い場所もありますが、基本的には日本とさほど変わらない感覚で住むことができます。天候は一年を通して雨がほとんど降らず、爽やかな青空の日が続きます。ロスよりやや内陸に位置するパサデナは、夏は日差しがきつく、日中は連日100 °F(約37.7 °C)を越える暑さになりますが、夜は一気に気温が下がるので日本のような熱帯夜はありません。冬は日本と比べると温暖ですが、半袖で充分というくらい暑くなる日もあれば、凍えるほど寒くなる時もあります(カリフォルニアだし…と、たかをくくって厚手の防寒具を持って来ていなかった私は年末に重篤なインフルエンザに罹りました)。街の雰囲気が良く、ロスからも車で20~30分程と近いので、日本人も多く住んでおり、日本食レストランや日本の食材が手に入るスーパーも充実しています。また市民サービスとして、パサデナシティカレッジでは誰でも参加できる無料のESL(English as a Second Language)クラスを開講しています。私も妻も受講しており、様々な国からの移民たちと一緒に異文化交流しながら英語やアメリカの文化を勉強しています。



ローズパレードの様子。中には場所取りのために大晦日の夜を路上で BBQ しながら過ごす人もいます。

3、新生活の立ち上げ

私の場合、渡米後3日でアパート契約と銀行口座の開設、7日で車の購入を済ませ、あとは少しずつ家具・家電を揃えていきました。

多くの留学生同様、家探しが最大の難関でした。パサデナの家賃は東京都心並に高く、Caltech周辺となるとStudio(ワンルームタイプの部屋)で月\$900～、1bed room(1LDK)で\$1200～くらいが相場になります。ほとんどの学生は寮に入るかルームシェアして\$600くらいに抑えています。ロス近郊にはアパートを斡旋してくれる不動産屋がありませんので、渡米直後からホテル住まいをしながら自分で歩き回ってFor rentの看板のあるアパートを探すのが一般的かと思います。私の場合は賃貸情報サイト(Craigslist, Zillow, Padmapperなど)で空き部屋の目星を付け、その周辺を歩いて治安や生活の利便性などを確認してから、アパートの大家さんや管理会社を訪問するという手法をとりました。照りつける太陽の中、広い街中を歩いて探しまわるのは大変でしたが、街の中心と大学のどちらにも近く家賃も相場からすると安めの\$1065の1bed room(電気、水道、ガス代込み)を見つけました。これ幸いと下手な英語を駆使しながら契約したものの、いざ住んでみると信じられない数のゴ○ブリが生息しており、渡米早々絶望したのを覚えています。唯一の救いはこちらのものは比較的小さく、動きも遅いので簡単に退治できたことですが、他にもクモやコオロギ、ゲジゲジなども時折家に遊びにやってくるので日々蟲達との戦いです。(注:私の知る限りこんな家はパサデナで我が家だけですのであしからず)。

家が決まったらすぐに現地の銀行で口座を開設し、車を購入しました。パサデナやロス中心部はバスやメトロがあり、車がなくても何とか生活できますが、やはり車があったほうが買い物などに便利ですし行動範囲が広がります。アメリカは物を大事にする国なので、日本ではあり得ないくらい古い車でも現役で走っています。日本車は故障が少ないため特に人気があり、私はディーラーから中古の98年式TOYOTA CAMRYを購入しました。さすがに型が古いので初めは不安でしたが、とてもよく走り、結局この車でサンフランシスコ、ナパバレー、ラスベガス、デスバレーなど色んな所にドライブ旅行しました。現地で免許証、Social security numberの取得等はおおよそアメリカ留学サイトに掲載されている情報の通りで、大学の留学生向けオリエンテーションでも詳しい情報を教えてくれました。

新生活に必要な家具、家電は市内の量販店でも手に入りますが、Craigslistや「びびなび」という日本コミュニティサイトの個人売買用掲示板で見つけたほうが安上がりです。また、Caltechのポスドク間では情報共有用のメーリングリストがあって、moving sale等の情報が頻繁に届くので何か欲しいものがある時にはとても便利です。新生活の立ち上げは非常に労力を要しますが、英語で交渉したり、困難を乗り越えていく過程はいま振り返ると良い思い出です。

4、Caltech

カリフォルニア工科大学(California Institute of Technology)は、Caltechの愛称で親しまれる科学と工学研究の専門大学です。学部生約900人、大学院生約1,300人、ポスドク約600人、教員約300人の、小規模な大学ですが、これまでに31人のノーベル賞受賞者を輩出しており、そのうち5人は今も現役の教授として研究を続けています(私の研究室の上の階にはRobert Grubbsがいます)。同じ工科大学であるMITと比較するとCaltechの知名度は日本ではあまり高くないように感じますが、英高等教育専門誌「Times Higher Education」による世界大学ランキングでは3年連続1位になるなど、名門大学として知られています。

Caltechに来てまず驚かされたのは、学科が主催する招待講演の数と質の高さです。世界トップレベルの研究者による招待講演が文字通り毎日のように催されるため、常にその分野における最新の研究動向を知ることができます。しかも時にFaculty候補(?)と思われる若くて優秀なポスドクの招待講演もあり、アメリカの若手研究者の高い実力を肌で感じることができました。また、学内の大学院生・ポスドクによるセミナーも盛んで、(ピザとコーラが無料で振る舞われることもあって)聴衆も多く、学生からは知識をどんどん吸収して自分の視野を広げようという強い好奇心が見て取れます。

研究環境は非常に恵まれており、NMRや質量分析等の大型測定機器は共通機器として完備され、専門の技官さんが常にメンテナンスしてくれるので快適に使用できます。また非常に便利だと感心したのは、化学科の研究室間でネットワーク共有されている試薬管理データベースです。このデータベースに登録されている試薬は、たとえ他のラボが所有するものであっても自由に使うことができます。特に、ふと思いついて試したい合成をする時や、うっかり試薬を切らしてしまった時など、時間の節約になりました。ポスドクや学生に対する福利厚生も充実していて、本格的なジムが安い年会費(私が来た当初は無料でしたが最近ポスドクから年\$200の会費を取るようになりました…)で使えるほか、大体月に一度、ビールと食事が無料で提供されるSocial Partyが開かれます。また、大学が主催する配偶者・家族向けのイベントやクラブ活動等もあり、家族連れのポスドクや学生でも安心して研究に打ち込めるような環境が整えられています。



ケミカルバイオロジー分野の研究棟。かつてはあの Linus Pauling もここで研究していた。

5、Linda研究室での生活

私の所属するLinda Hsieh-Wilson研では現在、(1) Glycosaminoglycan、(2) O-GlcNAc化タンパク質、(3) Fucose- α (1-2)-galactoseの3つを研究対象とし、独自に開発した分子ツールを駆使して神経系や腫瘍形成における糖鎖の役割について研究しています。ラボはPI(Principal Investigator)のLinda、博士課程学生7人、ポスドク3人で構成されており、有機化学、分子生物学、神経生物学をバックグラウンドに持つメンバーが集まっています。勤務時間は特に決まっていますが、ほとんどのメンバーは平日9~10時に来て18時頃には帰ります。Lindaが求めるのは長時間労働ではなく、あくまでも結果なので、皆実験のペースに合わせて効率的に仕事をするよう心がけているようです。私は大体毎日9時頃登校し、20-21時に帰宅しています。空いた時間には台湾人の学生のチームに混じってソフトボールをしたり、こちらで知り合った日本の方たちとテニスをしたりしてリフレッシュしています。

ラボメンバーは基本的に独立したテーマをひとつか2つ持っており、研究の進め方は各自に委ねられています。学生の研究遂行能力は極めて高く、自主的にそのテーマにおける課題を見つけ周囲の人たちとコラボレートしながら研究をどんどん前に進めていきます。およそ月に1度Lindaとマンツーマンで面談するMicromeeetingがあり、そこで研究の進捗と今後の方針を議論します。また各自半年に1度の割合で、メンバー全員の前で研究成果をプレゼンする機会があり、やはりピザを食べながら活発な議論が行われます。Lindaは多忙を極めていてこれらのミーティング以外で彼女と会うことはほぼありませんが、各自の研究状況

をよく把握し、的確なSuggestionでメンバーを指導しています。

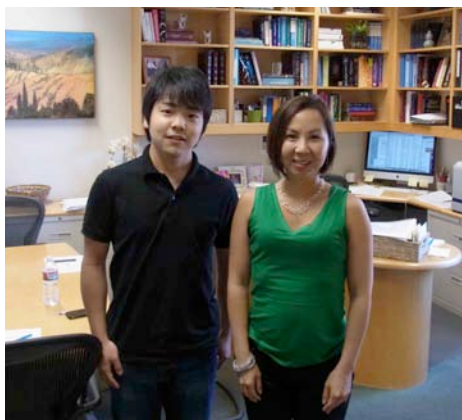
私の研究のメインテーマはおおまかにいうと「ガン細胞/正常細胞におけるO-GlcNAcylationの比較定量的解析」で、翻訳後修飾の一種であるO-GlcNAc化がガン細胞の性質や代謝にどういった影響を与えているのかを解明するというものです。渡米直後にLindaからテーマタイトルが提示され、あとはラボメンバーと議論していく中で実験デザインを考えていきました。やはり英語での議論は相当苦勞していますが、ラボの仲間は皆私の無茶苦茶な英語にも嫌な顔一つせず熱心に耳を傾けてくれます。有機合成や細胞実験等、学生時代と実験スタイルが似ていたのですんなりと研究をスタートできましたが、最近はバイオロジーの知識が必要になる場面が多く勉強の毎日です。ある程度プロジェクトが立ち上がったところで、いくつかの企業と共同研究することになり、現在は先方の研究員とメールでのやり取りや、いつまでたっても慣れない電話会議に四苦八苦しながらも楽しく研究を進めています。

6、最後に

新しい分野に挑戦したこの一年間は、楽しいこともたくさんありましたが、思い通りにならないことや苦しいことはそれ以上にありました。しかしそうした苦難を乗り越えていく過程で、いままでには無かった視点や物事の考え方を身につけることができ、少しは研究者として成長できたのではないかと思います。また、各国から多様な人材が集まるアメリカでポスドクとして過ごせたことは、人脈形成の点でも、世界の研究者の姿勢や実力を自分の眼で直に見るという点でも私にとってたいへん有意義なものでした。留学には大きなエネルギーが必要ですし、リスクも少なからずありますが、海外に行かなければ得られない経験がたくさんあります。少しでも留学に興味のある学生さんやポスドクの方には、ぜひ海外に思い切って飛び込んで新しい環境で挑戦してほしいと思います。

謝辞

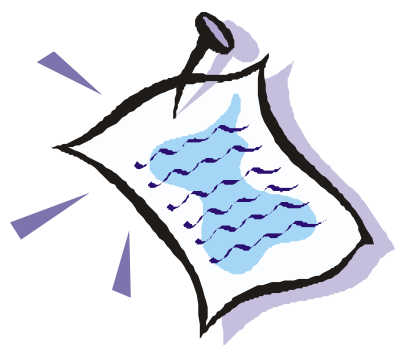
末筆ではございますが、留学にあたって快く送り出して頂いた津本浩平先生、学生時代から温かく厳しくご指導してくださる浜地格先生、推薦状を書いて頂いた築地真也先生、清中茂樹先生に深く感謝致します。また、留学を経済的に支援して頂いた日本学術振興会と家族にこの場をお借りして御礼申し上げます。最後に、研究室に快く受け入れて下さったLinda Hsieh-Wilson教授、研究生生活をサポートしてくれるラボメンバー、一年間にわたるアメリカ新婚旅行に付き添ってくれた妻に深く感謝致します。



Micrometing 前の Linda と筆者



クリスマスパーティーでの一コマ



シンポジウム等会告

第8回 バイオ関連化学シンポジウム

(第29回 生体機能関連化学シンポジウム、第17回 バイオテクノロジー部会シンポジウム、
第17回 生命化学研究会シンポジウム)

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

会 期：2014年9月11日（木）～13日（土）

会 場：岡山大学 津島キャンパス 一般教育棟

（岡山市北区津島中3-1-1、JR岡山駅からバスで15-20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：日本薬学会、高分子学会、電気化学会

協 賛：有機合成化学協会

内 容：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。若手研究者の育成のための講演賞の授与も行う。

発表申込締切：7月2日（水）

予稿原稿締切：7月18日（金）

参加登録（予約）締切：7月25日（金）

参加申込方法：

WEBサイト（<http://jointsympo.csj.jp/>）から発表申込、予稿原稿の提出、参加登録のすべての手続を行う。

発表形式：口頭ならびにポスター

*口頭発表（15分発表、5分質疑、3会場）は原則として1研究室1件まで。ただし、申込は2件まで可。この場合は発表優先順位をつけ、2件目の採否は実行委員会の判断による。

部会講演賞：生体機能関連化学部会あるいはバイオテクノロジー部会のいずれかの部会員になって1年以上が経過し、受賞時40才以下の部会員が対象。賞応募申請は発表申し込み時点で受付を行う。

参加登録費：

7月25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25日以降・・・上記の各参加種別に2,000円プラス。

*いずれの価格にも予稿集代金が含まれています。

*予稿集の事前送本は予定していません。

懇親会：9月12日（金） 岡山全日空ホテル（JR岡山駅西口前）

参加費 6,000 円

実行委員：大槻高史、依馬正、世良貴史、永谷尚紀

連絡先： 大槻高史（岡山大学大学院自然科学研究科化学生命工学専攻）

Tel : 086-251-8218, Fax: 086-251-8219, E-mail: ohtsuk@okayama-u.ac.jp



第 41 回 国際核酸化学シンポジウム

The 41th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2014)

<http://btl.nishitetsutavel.jp/niccs/isnac2014/>

日時：2014 年 11 月 5 日（水）～7 日（金）

会場：北九州国際会議場（福岡県北九州市小倉北区浅野 3-9-30）

本シンポジウムでは、（１）新機能を持つ核酸関連分子の化学合成、（２）核酸関連バイオテクノロジー、（３）核酸構造に関する物理化学的研究、（４）機能性核酸の生物機能・医薬応用に関する研究、など核酸化学に関する重要な分野における、最新の成果が発表されます。また、海外から 10 人の招待講演者を招きます。

招待講演者：

Harald Schwalbe, Goethe Universitat Frankfurt, Germany

Jean-Jacques Toulme, Bordeaux University, France

Kumiko Ui-Tei, The University of Tokyo, Japan

Mitsuo Sekine, Tokyo Institute of Technology, Japan

Peter Beal, UC Davis, USA

Ryszard Kierzek, Polish Academy of Sciences, Poland

W. David Wilson, Georgia State University, USA

Wojciech T. Markiewicz, Polish Academy of Sciences, Poland

Yves Mely, CNRS, France

Ta-Chau Chang, Institute of Atomic and Molecular Sciences & Genomics Research Center,
Academia Sinica, Republic of China

Sihyun Ham Sookmyung, Women's University, Korea

Robert H. E. Hudson, The University of Western Ontario, Canada

主なトピックス：

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

詳しくは web site をご覧ください。

<http://btl.nishitetsutavel.jp/niccs/isnac2014/>

参加登録と参加費：

事前参加登録 2014 年 6 月 9 日～10 月 15 日（web site から）

事前登録 一般 25,000 円、学生 5,000 円

当日登録 一般 30,000 円、学生 7,000 円

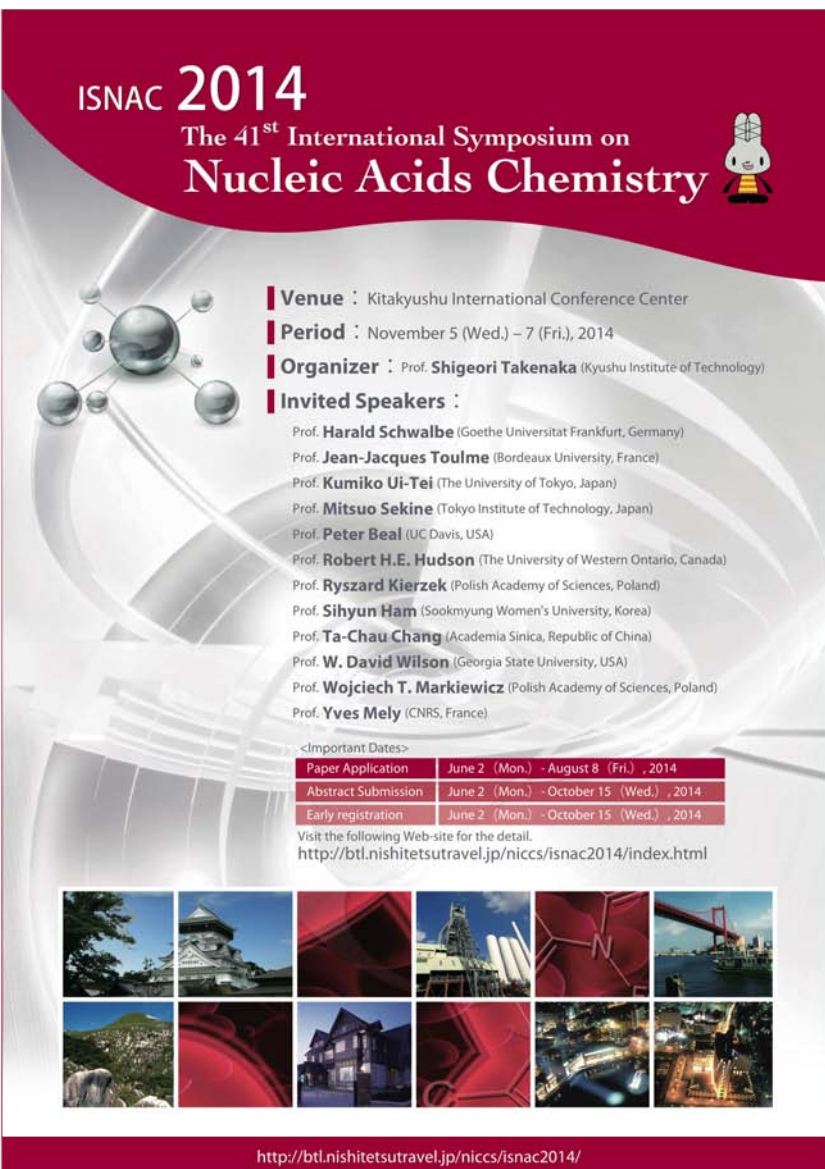
発表申込み：2014 年 6 月 9 日～8 月 8 日 (web site から)

要旨提出：2014 年 6 月 9 日～10 月 15 日 (web site から)

問い合わせ：

竹中繁織 (九州工業大学)

E-mail: isnac2014@takenaka.che.kyutech.ac.jp



ISNAC 2014
The 41st International Symposium on
Nucleic Acids Chemistry

Venue : Kitakyushu International Conference Center
Period : November 5 (Wed.) – 7 (Fri.), 2014
Organizer : Prof. Shigeori Takenaka (Kyushu Institute of Technology)

Invited Speakers :

- Prof. **Harald Schwalbe** (Goethe Universitat Frankfurt, Germany)
- Prof. **Jean-Jacques Toulme** (Bordeaux University, France)
- Prof. **Kumiko Ui-Tei** (The University of Tokyo, Japan)
- Prof. **Mitsuo Sekine** (Tokyo Institute of Technology, Japan)
- Prof. **Peter Beal** (UC Davis, USA)
- Prof. **Robert H.E. Hudson** (The University of Western Ontario, Canada)
- Prof. **Ryszard Kierzek** (Polish Academy of Sciences, Poland)
- Prof. **Sihyun Ham** (Sookmyung Women's University, Korea)
- Prof. **Ta-Chau Chang** (Academia Sinica, Republic of China)
- Prof. **W. David Wilson** (Georgia State University, USA)
- Prof. **Wojciech T. Markiewicz** (Polish Academy of Sciences, Poland)
- Prof. **Yves Mely** (CNRS, France)

<Important Dates>

Paper Application	June 2 (Mon.) - August 8 (Fri.) , 2014
Abstract Submission	June 2 (Mon.) - October 15 (Wed.) , 2014
Early registration	June 2 (Mon.) - October 15 (Wed.) , 2014

Visit the following Web-site for the detail.
<http://btl.nishitetsutransel.jp/niccs/isnac2014/index.html>



<http://btl.nishitetsutransel.jp/niccs/isnac2014/>

第 24 回 バイオ・高分子シンポジウム

<http://www.spsj.or.jp/entry/>

主 催：高分子学会バイオ・高分子研究会

協 賛：日本化学会、日本薬学会、有機合成化学協会、日本生物物理学会、
日本化学会フロンティア生命化学研究会

日 時：平成 26 年 7 月 24 日（木）、25 日（金）／懇親会 24 日（木）

会 場：東京工業大学西 9 号館 2 階デジタル多目的ホール（目黒区大岡山 2-12-1）

交 通：東急目黒線・東急大井町線大岡山駅下車徒歩約 3 分

内 容：バイオ・高分子についての基礎および応用に関する研究。次の分野については特に重点をおく。

- （１）ポリペプチド、タンパク質の人工機能化、酵素の機能改変
- （２）核酸と関連化合物
- （３）多糖および糖質が関与する機能高分子
- （４）生体膜、人工膜
- （５）人工分子組織体
- （６）細胞機能の制御、細胞と高分子の相互作用

プログラム：

第 1 日＝7 月 24 日（木）

<10:30～12:30> 一般研究発表 1 件 20 分（研究発表 12 分・討論 8 分）

<13:30～15:50> 若手研究者奨励発表 1 件 20 分（研究発表 12 分・討論 8 分）

<16:00～18:00> ポスター発表

<18:10～20:00> 懇親会

第 2 日＝7 月 25 日（金）

<10:00～12:00> 一般研究発表 1 件 20 分（研究発表 12 分・討論 8 分）

<13:00～13:40> 特別発表：スーパー抗体酵素の発見と展開

（大分大研機構/JST-CREST）一二三 恵美

<13:40～16:20> 一般研究発表 1 件 20 分（研究発表 12 分・討論 8 分）

参加要領：

参加費（税込） 主催・協賛団体会員 一般 7,560 円、学生 3,240 円

懇親会費（税込） 一般 5,000 円、学生 2,500 円

申込方法 下記 HP よりお申込み下さい。

申込先/問合先

104-0042 東京都中央区入船 3-10-9 新富町ビル 6F 高分子学会バイオ・高分子シンポジウム係

TEL 03-5540-3771 FAX 03-5540-3737 jigyo@spsj.or.jp

<http://www.spsj.or.jp/entry/>



14-1 バイオ・高分子研究会

<http://www.spsj.or.jp/entry/annaidetail.asp?kaisaino=964>

主 催：高分子学会バイオ・高分子研究会
日 時：平成 26 年 9 月 26 日（金）19:00 ～9 月 27 日（土）13:10
会 場：にしゅうかん新館・梅松鶴（〒850-0041 長崎市浜平 2 丁目 14-1）
TEL：095-824-2153 FAX：095-824-5299
<http://www.nisshokan.com/baishokaku/>
交 通：[行き] JR 長崎大学から送迎バスで約 20 分
[帰り] JR 長崎駅まで送迎バス

プログラム：

第 1 日＝9 月 26 日（金）
<19:00～> 懇親会
第 2 日＝9 月 27 日（土）
<8:50～9:35> 1. 非二重らせん構造に隠された核酸の機能を知る
（甲南大学先端生命工学研究所（FIBER））杉本直己
<9:35～10:20> 2. 核酸に結合する低分子を創る・使う
（大阪大学産業科学研究所第 3 研究部門（生体・分子科学系））中谷和彦
<10:40～11:25> 3. 核酸と多糖の相互作用を DDS として使う
（北九州市立大学国際環境工学部環境生命工学科）櫻井和朗
<11:25～12:10> 4. 相互作用をプログラムして核酸を分析する
（熊本大学大学院自然科学研究科）井原敏博
<12:15～13:10> 昼食
<13:10> 送迎バス出発

参加要領：

- 1) 定員 50 名
- 2) 参加費（税込・振込①企業 5,400 円 ②大学・官公庁 3,240 円 ③学生 2,160 円 ④名誉・終身・フェロー・ゴールド）・シニア会員 2,160 円 ⑤バイオ・高分子研究会メンバー：無料
- 3) 宿泊費（1 泊 3 食付・当日支払い）17,000 円 学生 15,000 円
懇親会は研究会の前日に開催しますので、できるだけ 9 月 26 日からご参加ください。9 月 10 日(水)以降はキャンセル料が発生します。
- 4) 申し込み方法 高分子学会ホームページ (<http://www.spsj.or.jp/entry/>) からの申し込みの上、参加費のみをご送金下さい。宿泊費は当日徴収いたします。プログラムは変更になることがございます。最新情報は HP でご確認ください。
- 5) 申し込み締め切り 8 月 22 日(金)
- 6) 振込先 銀行振込 三菱東京 UFJ 銀行 銀座支店（普通）1126232 公益社団法人高分子学会
郵便振替 00110-6-111688 公益社団法人高分子学会
振込手数料は振込人にてご負担くださいますようお願いいたします。
銀行・郵便振替の領収書をもちまして本会からの領収書にかえさせていただきます。

連絡先：九州工業大学物質工学系応用化学部門 竹中繁織 E-mail: shige@che.kyutech.ac.jp
TEL/FAX: 093-884-3322

申込先：〒104-0042 東京都中央区入船 3-10-9 新富町ビル
公益社団法人 高分子学会 14-1 バイオ・高分子研究会係
<http://www.spsj.or.jp/entry/>
TEL 03-5540-3770 FAX 03-5540-3737

人工光合成国際会議 2014

2014 International Conference on Artificial Photosynthesis (ICARP2014)

<http://artificial-photosynthesis.net/ICARP2014/>



主 催：科研費新学術領域「人工光合成」総括班

共 催：JST さきがけ「光エネルギーと物質変換」研究領域

会 期：11 月 24 日(月)－28 日(金)

会 場：兵庫県立 淡路夢舞台国際会議場

発表申込締切：8 月 20 日(水)

予稿原稿締切：8 月 20 日(水)

参加登録予約申込締切：9 月 20 日(土)

討論主題：人工光合成研究において第一線で活躍している世界各国の研究者が集結し、研究の現状と今後の課題に関する報告と議論、そして各国における関連プロジェクトの説明等を集中的に行います。

発表形式：口頭発表(依頼講演のみ)とポスター発表。ポスター賞あり

特別講演：藤嶋 昭(東京理科大)，根岸英一(Purdue Univ. & JST)[予定]

招待講演：Richard Cogdell(Univ. Glasgow)，Huub de Groot(Univ. Leiden)，Devens Gust(Arizona State Univ.)，Sang Ook Kang(Korea Univ.)，Can Li(Dalian Inst. Chem. Phys.)，Thomas Meyer(Univ. North Carolina)，Daniel Nocera(Harvard Univ.)，Licheng Sun(KTH Royal Inst. Tech.)，John Turner(Natl. Renewable Energy Lab.)，Rienk van Grondelle(Free Univ. Amsterdam)，Michael Wasielewski(Northwestern Univ.)，Kyung Byung Yoon(Sogang Univ.)，堂免一成(東大)，福住俊一(阪大)，沈建仁(岡山大)など

発表申込方法：下記HPより

参加登録費：一般 40,000 円、学生・同伴者 25,000 円(木曜日夕方の懇親会と会期中の昼食には参加者全員を御招待)。なお、9 月 21 日以降は、各1万円アップとなります。

申込先・問合先：ICARP2014 事務局 民秋 均(立命館大)

E-mail: icarp2014@artificial-photosynthesis.net

<http://artificial-photosynthesis.net/ICARP2014/>

第 17 回 生命化学研究会 ～生命化学の大海原を探る～

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

主 催：日本化学会フロンティア生命化学研究会

会 期：2015 年 1 月 8 日（木）13 時 ～ 9 日（金）12 時

会 場：三翠園（〒780-0862 高知市鷹匠町 1-3-35・TEL: 088-822-0131）

<http://www.sansuien.co.jp/>

アクセス：1. 高知龍馬空港から 連絡バス（高知駅行き）に乗車、はりまや橋観光バスターミナル下車【約 40 分、¥720】

2. はりまや橋から 路面電車を利用、はりまや橋→県庁前停留所下車後徒歩 3 分程【約 15 分、¥200】

3. JR 高知駅から 路面電車ではりまや橋乗換【約 20 分、¥200】

講 師【敬称略】：杉山雄一（理研）、大塚英幸（東工大理工）、武政誠（早大理工）、濱田勉（北陸先端大）、清中茂樹（京大工）、佐々木善浩（京大工）、高島義徳（阪大理）、松浦和則（鳥取大工）

会 費：参加登録費 13,000 円、宿泊費 10,000 円、食事代 7,000 円（当日徴収）

参加申込方法：氏名・所属・役職（学年）・E-mail アドレス・ポスター発表の希望の有無を明記の上、11/18（火）までに下記の連絡先へ申し込みください。

定 員：80 名 ポスター発表募集（件数は 40 件迄）

要旨締切：11/18（火）ポスター発表希望者は A4 白黒半ページ、テンプレートを使用して作製し、申し込み時に添付ファイルとして下記連絡先迄送付してください。テンプレートは生命化学研究会ホームページ (<http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/>) よりダウンロードできます。なお、ポスター題目は出来るだけ能動態で動的なタイトルをつけて下さい。（例：__は__である。__は__する。）

問い合わせ・連絡先：

〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138 大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻 長崎 健

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

Tel: 06-6605-2696 Fax: 06-6605-2785

受賞



民秋 均(立命館大学 教授)
平成25年度 第31回 日本化学会学術賞
「クロロフィルの構造と機能に関する研究」
(2014年3月)

異動



小野 慎
金沢工業大学バイオ・化学部応用化学科 教授
2014年1月1日付
〒924-0838 石川県白山市八束穂 3-1 やつかほリサーチキャンパス ゲノム生物工学研究所
E-mail: shinono@neptune.kanazawa-it.ac.jp



編集後記

今年も力作ぞろいの夏号(No. 45)をお届けすることができました。お忙しい中、執筆して下さった皆さんには心からお礼申し上げます。

さて、こうして45号の編集作業を行っているのはサッカーワールドカップの真っ最中です。今朝、日本はかなり押し込みながらも10人のギリシャと引き分けてしまいました。これで決勝T進出はかなり厳しくなったようです。気を取り直して次の楽しみをみつけないと...、マー君のサイ・ヤング賞?、子供と過ごす夏休み?、そして S-Jシンポ in Bern?...

次号(No. 46)は、松浦さんの担当により、2014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26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(京都大学)
松浦和則(鳥取大学)

