

生命化学研究レター

(2016 年 6 月)

2. 巻頭言

旅と研究

東京薬科大学薬学部 野水 基義

4. 研究紹介

4. 糖脂質関連分子の機能および構造解析

～蛍光顕微鏡と質量分析装置を効果的に利用して～

大阪大学大学院理学研究科 樺山 一哉

9. DNA はどこまで（化学的に）入れ換え可能か？

名古屋大学大学院工学研究科 樫田 啓

15. 論文紹介「気になった論文」

九州大学大学院工学研究院 特任助教 与那嶺 雄介

大阪大学大学院工学研究科 博士前期課程2年 高 靖馳

22. 留学体験記

イリノイ大学留学体験記

鳥取大学大学院工学系研究科 稲葉 央

26. シンポジウム等会告

第19回 生命化学研究会、第10回 バイオ関連化学シンポジウム、第43回 国際核酸化学シンポジウム (ISNAC 2016)、第26回 バイオ・高分子シンポジウム

受賞、異動
編集後記



巻 頭 言

旅 と 研 究

東京薬科大学薬学部 野水基義

4月16日未明に本震が発生した熊本地震については現在も余震が続いており、犠牲になられた方々のご冥福をお祈りするとともに、被災された皆さまに心からお見舞いを申し上げます。また、一日も早い復旧を果たされることを願うと同時に、被災された皆様が平穏な日々を取り戻せるようお祈り申し上げます。

旅と研究は何か似ている。両者とも、新しい発見を求めて動き、何かを得ていくもので、楽しいものである。旅に出れば何らかの発見がある。人生を変えるような大きな発見、その場限りの楽しい発見、苦しかったり悲しかったりの発見、いろいろな発見は自分を成長させる栄養になる。研究も同じである。いろいろな発見は、研究成果の源である。私は、高校までは何度もの転校、その後、東京→京都→高崎→アメリカ→カナダ→札幌→東京と転々としてきた。大学院時代は父親の転勤先のブラジルで1ヶ月ほど旅して過ごした。アメリカでは48州を車で旅したり、カナダでは北東部の人々が住んでいないあたりまで旅したり、北海道では地球環境に手を染めて全道を旅したりと、勝手気ままに生きてきた気がする。海外の学会にも参加させて頂き、いろいろな国を旅してきた。確かにいろいろな発見があった。いつも旅先で感じることは、それぞれの場所で違った自然と街があり、人も違う。その場所で独特の風景が形成されており、それに適合した人が生活している。生体も同様に、様々な組織で細胞を取り巻く環境や細胞自体も違う。その違いをみていくのが楽しい。米国 NIH で過ごした8年余りの中での最も大きな成果は、48州を車で制覇し、いろいろな発見をしたことかもしれない。各州にはそれぞれの特徴があり、州境は何となく細胞膜のような雰囲気があった。1997年にアメリカからカナダに永住者として車で移民したのであるが、この国境は生体でいうと組織の壁のようで、私の研究分野である基底膜のようで興味深かった。移民していく私は、基底膜を分解して

浸潤するがん細胞になった気分であった。人それぞれ違ったいろいろな発見、研究と同じように人それぞれ異なった感性からの発見が待っているのが旅であろう。旅に出るといろいろなことを考え、思いもかけない研究のアイデアが浮かぶことがある。旅先は研究のアイデアを放出させる異次元空間なものかもしれない。「旅は道連れ」という故事があるが、同様に研究も共同研究者が大事なかもしれない。旅と研究、新しい発見を求めて動くことは同じであり、至極の楽しみである。

2016 年 5 月



研究紹介

糖脂質関連分子の機能および構造解析

～蛍光顕微鏡と質量分析装置を

効果的に利用して～

大阪大学大学院 理学研究科 化学専攻

樺山 一哉

(kaba@chem.sci.osaka-u.ac.jp)



1. はじめに

学部の学生時代、友人に手渡された一冊の本「糖鎖と細胞(日経サイエンス)」が私をこの世界へ導いた。そこで糖脂質のことを知り、糖脂質の阻害剤を合成している研究室に入ることになったのが1996年、今から20年前である。当時、研究室で合成されたグルコセレブロシドの代謝阻害剤(N-オクチルバリエナミン)が高活性を示したことから、ボスに提案した研究テーマ(いくつも却下された末)はラクトシルセラミドを模倣した酵素阻害剤の合成研究であった。合成してから思ったことは「せっかく作ったのだから自分で活性を調べてみたい」。そこで、家の隣に偶然建っていた生化学工業(株)の中央研究所に外研させてもらい、活性検定を行った。残念ながら結果は×。しかしながら、良く言えば好奇心が強い、悪く言えば移り気な私は、この外研のお陰で糖脂質が細胞で働く仕組みに興味を持ち、糖脂質代謝の阻害剤合成から糖脂質分子の機能研究へと分野を変更した。

そして博士課程のテーマとしたのが、「ラクトシルセラミド分岐の生物学的意義」と「脂肪細胞におけるガングリオシドGM3の役割解明」であった。前者では、遺伝子導入によりラクトシルセラミドの硫酸化とシアル酸化を細胞に施し、表現型として現れた細胞外マトリクスへの接着能の変化が、インテグリンの遺伝子発現変化によるものであることを追究した(1)。後者では、インスリン抵抗性を惹起した脂肪細胞においてGM3が増加しており、これを糖脂質生合成阻害剤で減らすとインスリンシグナルが回復するという結果を報告した(2)。

なぜだろう？という興味が人より強いのが研究者の性であり、私は上述のGM3が増加するとなぜインスリン抵抗性が起こるのかという“仕組み”に興味を持った。GM3は糖脂質なので細胞膜の外膜に存在する。GM3がインスリンシグナルに接点を持つとすれば、相手はインスリン受容体(IR)であろうと当たりを付け、糖脂質が形成する脂質ラフトにIRが集積するかをショ糖密度勾配遠心法で調べた。その結果、インスリン抵抗性状態の脂肪細胞においてIRはシグナル伝達場のカベオラから解離していることを実証できた(3)。しかし、まだ謎は残っている。なぜGM3が増えるとIRがカベオラから外れるのか？である。この疑問に対しては、分子の静電的相互作用を排除しない方法として生細胞を使う実験の重要性を感じ、GM3、IR、カベオラの局在や動態を蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いて解析する実験を行った(4, 5)。最近では、この顕微鏡技術を用いた糖脂質や膜局在分子の動態解析に興味を持ち(また移り気して)、糖脂質の形成する動的な微小ドメインを表現できる新規の技術が作れないか模索中である。また、脂質ラフトの形成に糖脂質の脂肪酸残基の長さや水酸化などの修飾が重要ではないかと考えるに至り、質量分析装置を用いた構造解析(6, 7)も行っ

ている。

もう少し辛抱強く一つの事象を追究できないのかと反省もしつつ、一方で既存の技術や知見にとらわれない自由な発想で、細胞膜上で起こっているイベントを糖脂質の視点から観ることができたら嬉しいな、というのが私の本望である。

2. 蛍光顕微鏡を用いた膜分子の機能解析

私は上述のような経緯から、現在、細胞膜上の糖脂質組成が成長因子受容体などの膜タンパク質の局在に影響を与えることによる細胞内へのシグナル伝達制御の実証を試みている。

詳細は別の解説(8)に譲るが、おもに

Fluorescence recovery after photobleaching

(FRAP) と呼ばれる手法でライブセルイメージングによる分子動態解析を行っている。

FRAP法ではターゲットとなる分子に蛍光標識

を施すことが必要である。その標識分子を発現させた細胞において解析したい領域(ROI)に強

いレーザーを短時間照射し、分子の機能を壊すことなく蛍光のみを退色(ブリーチ)させる。も

し目的分子が不動ならば、ブリーチ領域の蛍光は回復しない。動的な分子ならば、拡散すること

とで、周囲の未退色分子が混ざり合い、ブリーチ領域の光学は回復していく。この時間経過に

ともなう蛍光回復率をグラフにプロットする

ことで、目的分子の動的成分比率や拡散速度を算出することができる(図1)。これまでに筆

者は、GM3再構成細胞を用いた蛍光標識IRおよびcaveolin-1の生細胞イメージング（FRAP法）、免疫沈降法および光感受性GM3を用いた架橋実験などにより、GM3の発現上昇によっ

てIRの β サブユニットの細胞膜直上のリジン残基とGM3のシアル酸残基の静電的相互作用が増大した結果、IR/caveolin-1複合体が解離する分子機構を実証している(4)。(図2)

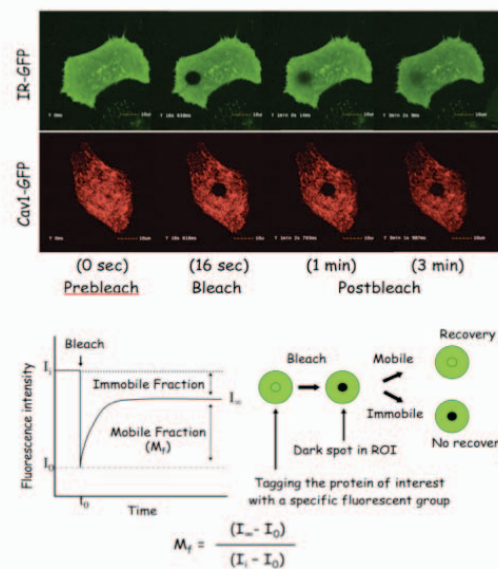


図1 FRAP法による膜分子の動態解析

ことで、目的分子の動的成分比率や拡散速度を算出することができる(図1)。これまでに筆者は、GM3再構成細胞を用いた蛍光標識IRおよびcaveolin-1の生細胞イメージング(FRAP法)、免疫沈降法および光感受性GM3を用いた架橋実験などにより、GM3の発現上昇によってIRの β サブユニットの細胞膜直上のリジン残基とGM3のシアル酸残基の静電的相互作用が増大した結果、IR/caveolin-1複合体が解離する分子機構を実証している(4)。(図2)

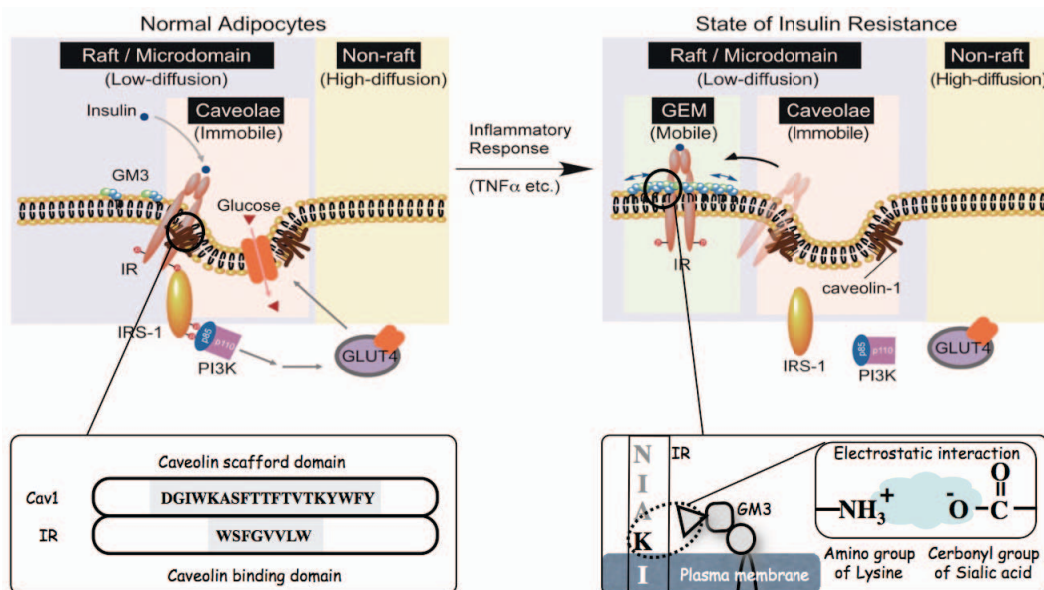


図2 ガングリオシドとインスリン受容体の静電的相互作用によるインスリン抵抗性惹起の分子機構

また、FRAPのような手法は、例えば薬剤刺激において細胞膜の流動性変化を解析するのに有用であると考えられるが、観察中も薬剤刺激の影響が継続しているため、統計的データを取得しづらいことが今後の詳細な解析において問題点となると筆者は考えた。そこで現在、これを解消できる策として、マイクロ流体デバイスを観察系に導入する検討を試みている。マイクロ流体デバイスとは、コンピューター基板の作成などに用いられる微細加工技術で作られた装置のことであり、医療工学などの分野で活用されている。筆者らはまず、Y字型のマイクロ流体デバイスと2台のシリンジポンプを用いて、層流と呼ばれる2つの培地環境を同時に観察系内に作り出すための検討を行った。始めに、片方のシリンジにFITCを添加し層流形成の確認を行ったところ、開始後約20分で層流を蛍光観察することができた(図3A)。層流の量的な調節はシリンジポンプの流量設定でリアルタイムに変えられる。設定変更とライブイメージングとのタイムラグは数秒程度である。初期検討としてRhodamine-C18を片方の流路に含有し、もう片方の流量を $2.0 \mu\text{L}/\text{min}$ から $5.0 \mu\text{L}/\text{min}$ に上昇させたところ、スムーズに流路幅が変更し、染色液の残存なども見られなかった(図3B)。

次に、デバイス内にEGFPを安定発現させたCHO-K1細胞を播種し、片方のシリンジにトリプシンを添加して同様の検討を行った。その結果ト

リプシン含有流路でのみ、細胞が剥がれていく様をリアルタイムで確認することができた(図4A)。次に上記条件の下、蛍光標識したインスリン受容体(IR-EGFP)を安定発現させた細胞において、コレステロールの除去剤であるメチル化 β -シクロデキストリン (M β CD) 有無の環境を観察系内に同時に作り出し、FRAP法による動態解析を行った所、M β CDに暴露された細胞においては、これまでに筆者らが行っている通常のガラス底ディッシュにおけるFRAP測定(図4B)と同様に、有意にIR-EGFPの膜流動性の低下が観察された(図4C)。本技術は細胞膜脂質の機能変化をライブイメージングで観察できることから、細胞膜分子の流動性変化から惹起されるシグナル制御を志向する新規薬剤の評価実験において、細胞への薬剤暴露の有無を“同時に”観察し検証することができると考えている。

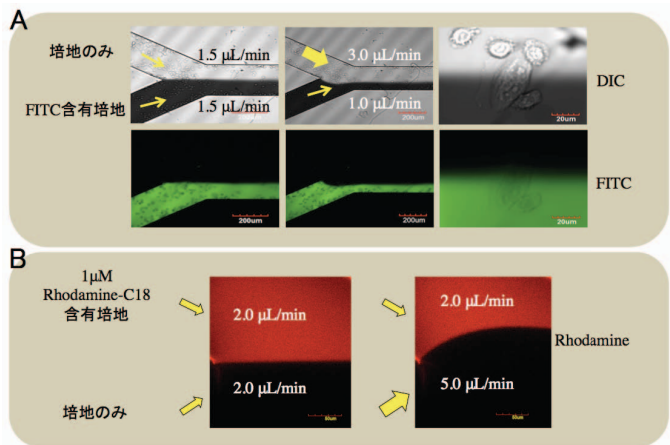


図3 マイクロ流体デバイスを用いた層流形成の確認

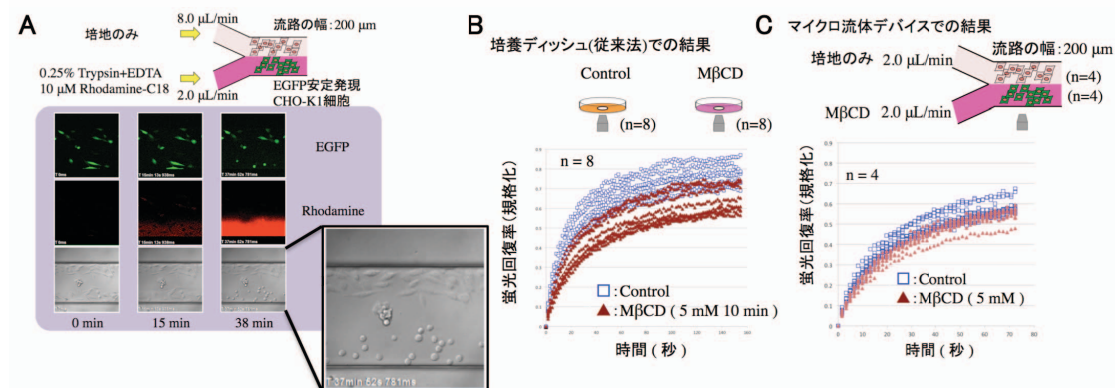


図4 マイクロ流体デバイスを用いた薬剤処理とFRAP計測

3. 質量分析装置を用いた膜分子の構造解析

筆者らは図2の研究仮説において、炎症性状態の脂肪細胞ではGM3の発現亢進だけではなく、GM3自体の脂肪酸組成にも変化が生じるのではないかと考えた。そこで、ショ糖密度勾配遠心法によって調製される細胞膜の界面活性剤不溶性画分（DRM画分）に集積するGM3の、TOF-MSによる解析を試みた。初期検討において、DRMの調製に用いるTriton X-100により低分子量領域にポリマー状のピークが出現するためにMS解析が妨害されるという問題が生じた。そこで、界面活性剤を除去する方法として各種カラムワークを含めて種々検討

した結果、1,2-ジクロロエタン（DCE）による洗浄が効果的に界面活性剤を除去できることを発見（およそ99.99%の除去に成功）し、MS解析が可能な状態になることが分かった(6)。この簡便かつ完全な界面活性剤除去法を用いて、腫瘍壊死因子TNF- α 処理と未処理の3T3-L1脂肪細胞をDRM分画後、氷冷DCE洗浄を行い、Triton X-100を除去した。DRM画分をそのままLC-MS解析したところ、糖脂質以外の成分が多いためにMSの検出器が飽和し、回避するために

希釈するとベースラインノイズの影響が見られた。そこで、Svennerholm分配によって極性の低い物質を除去したのち、LC-MS解析を行った。以前に100 pM 96時間のTNF- α 処理により脂肪細胞のGM3が約2倍に増加することを報告しているが、増加する際にセラミド鎖長の選択性は見られずほぼ一様に増加することが分かった（図5）。

今回解析した3T3-L1脂肪細胞ではTNF- α 処理によってGM3は分子種に関わらず2倍に増加する結果を得たが、高脂肪食を与えた高齢肥満マウス（C57BL/6J）副睾丸脂肪や高齢の糖尿病モデルマウス（KKおよびKKAy）の卵巣周囲脂肪において詳細な分子種は報告されていないながら短鎖脂肪酸（C16やC18）の割合が増加することが報告されている(9)。また、高齢ob/obマウスの脂肪組織において短鎖脂肪酸（C16）を含むスフィンゴミエリン（SM）が増加し、長鎖脂肪酸（C24）のSMが減少することが示されている(10)。このように肥満状態でスフィンゴ脂質のセラミド鎖長変化が報告されていることから、今後、若齢の肥満モデルマウスを用いてGM3をはじめとする糖脂質のLC-MS解析を行うことで、肥満を引き金とする2型糖尿病の病態のさらなる解明を行う予定である。

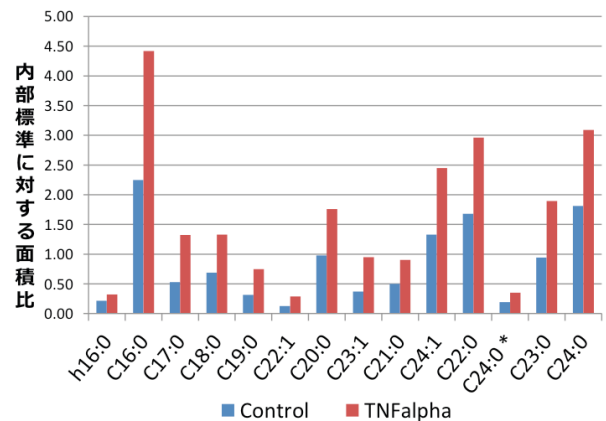


図5 脂肪細胞のDRM画分のGM3分子種

4. まとめ

近年、体内の脂質代謝に対する医療分野の注目度はさらに増していると感じる。コレステロールの代謝抑制はもちろんのこと、最近では糖脂質の生合成を抑制したり、糖脂質分子そのものを補充したりすることで、生活習慣病や癌、腎臓および神経疾患に対する研究開発が進行している。しかしながらその作用機序としては、個体レベルでの表現型解析やリスクファクターとしての定量解析が報告されるばかりであり、上記分子を構成成分とする細胞膜表面上でどのような変化が起こっているのか（細胞膜上のシグナル伝達分子にどのような影響

を及ぼすのか) に関しては、依然として明確な説明は成されていない。

筆者らの研究において細胞膜脂質の体系的な解析法が確立しつつある。細胞膜の流動性および細胞膜受容体の側方拡散についての情報を数値化するためには、ライブセルイメージング技術が非常に適しており、細胞膜構成脂質の構造解析にはLC-MSを主力とする各種質量分析技術が不可欠であると考えている。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、糖脂質に関するご指導を賜りました東北医科薬科大学 分子生体膜研究所長 井ノ口仁一教授、マイクロ流体デバイスをご提供頂いた東海大学工学部 木村啓志准教授、質量分析に関してお世話になりました日本大学理工学部 鈴木佑典助教、ならびに立命館大学生命科学部 小島寿夫助教、実験を丁寧に実行してくれた大阪大学理学研究科博士課程の新井健太君他、関係各位に深く御礼申し上げます。また本研究の継続をご支持頂いている大阪大学理学研究科 深瀬浩一教授ならびに深瀬研スタッフ、学生の皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Kabayama K, Ito N, Honke K, Igarashi Y, & Inokuchi J (2001) Suppression of integrin expression and tumorigenicity by sulfation of lactosylceramide in 3LL Lewis lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 276(29):26777-26783.
2. Tagami S, *et al.* (2002) Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem* 277(5):3085-3092.
3. Kabayama K, *et al.* (2005) TNF- α -induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology* 15(1):21-29.
4. Kabayama K, *et al.* (2007) Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(34):13678-13683.
5. Sekimoto J, Kabayama K, Gohara K, & Inokuchi J (2012) Dissociation of the insulin receptor from caveolae during TNF α -induced insulin resistance and its recovery by D-PDMP. *FEBS Lett* 586(2):191-195.
6. Suzuki Y & Kabayama K (2012) Convenient and rapid removal of detergent from glycolipids in detergent-resistant membrane microdomains. *J Lipid Res* 53(3):599-608.
7. Kojima H, Suzuki Y, Ito M, & Kabayama K (2015) Structural characterization of neutral glycosphingolipids from 3T3-L1 Adipocytes. *Lipids* 50(9):913-917.
8. Kabayama K (2012) Modulation of growth factor receptors in membrane microdomains. *Yakugaku Zasshi* 132(4):417-423.
9. Tanabe A, *et al.* (2009) Obesity causes a shift in metabolic flow of gangliosides in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 379(2):547-552.
10. Samad F, Hester KD, Yang G, Hannun YA, & Bielawski J (2006) Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* 55(9):2579-2587.

研究紹介

DNA はどこまで
(化学的に) 入れ換え可能か？名古屋大学大学院工学研究科
檜田 啓
(kashida@nubio.nagoya-u.ac.jp)

1. はじめに

「DNAが持つ最も重要な性質は何か？」と聞かれたら、多くの人は二重らせん形成(塩基対形成)を挙げると思う。DNAが持つ塩基は、AはTを、GはCを選択的に認識し二重鎖を形成する一方、その他の組み合わせでは不安定化する。この高い選択性(直交性)は他の生体高分子には見られない性質であり、まさにDNAが遺伝子である所以と言える。近年ではこの二重鎖形成を利用することによってDNA(RNA)は生物学の領域を超え、ナノマシンやコンピュータ、分子バーコード、DNA Origamiなど多岐にわたる材料としての応用が報告されている。しかしながら一方で、核酸塩基それ自身は材料として魅力的な性質に乏しいのもまた事実である。例えば核酸塩基の蛍光量子収率は極めて低いし、光反応性などの機能もない(もちろん、生物学的にはこれらの性質はなくて当然であるが)。以前、タンパク質を研究されている先生に「核酸の研究はみんな同じに見える」と言われたことがあったが、これも一つは核酸が4種類の塩基しか持たないことに起因すると思われる。

数が少ないならば増やせばいいだけのことである。実際、細胞中で機能する新しい“人工”塩基対の開発は平尾先生をはじめいくつかの研究グループによって行われており、Romesbergらは2014年に第3の塩基対を持つ生物(大腸菌)を創りだすことに成功している^[1]。また、D-riboseを介して塩基を導入することで多様な人工塩基対がこれまでに報告されている^[2]。それに対し、筆者らの研究グループでは主として材料としての応用に着目し、天然とはかけ離れた構造を持つ人工核酸の開発を行ってきた。その際、それらの人工核酸が天然核酸の化学的機能を模倣でき、かつ天然が持ちえない機能を持つことを明らかにした。本稿では特に筆者が開発した“疑似塩基対”についてその内容を概説する。なお、天然核酸はD-(deoxy)riboseを骨格にもつが、我々はD-threoninolを介して“塩基”を導入している。D-threoninolを利用することによって合成が容易となり、またD-riboseでは導入が難しい分子の導入も可能となる。

2. アゾ系色素ペアによる二重鎖の安定化^[3]

筆者らが開発した最初の疑似塩基対がアゾ系色素(メチルレッド)によるペアである(図1)。メチルレッドは天然塩基対と比較してはるかに大きな分子サイズを持つため、当初はこれをペアにしまうと二重鎖が不安定化すると予想していたが、実際は予想に反し大きく二重鎖を安定化した。これは大きな驚きであった。そこで、この安定化の要因を探るためにNMRで構造解析を行った^[3b]。その結果、メチルレッドは互い違いに分子間でスタックすることにより二重鎖を安定化したことが分かった。さらに驚くべきことにこのメチルレッド同士では二重鎖を安定化するものの、メチルレッドの相補部位に天然塩基(アデニン)がある場合は二重鎖を大きく不安定化することが分かった。このことはメチルレッドが天然塩基に対して直交性を有しているこ

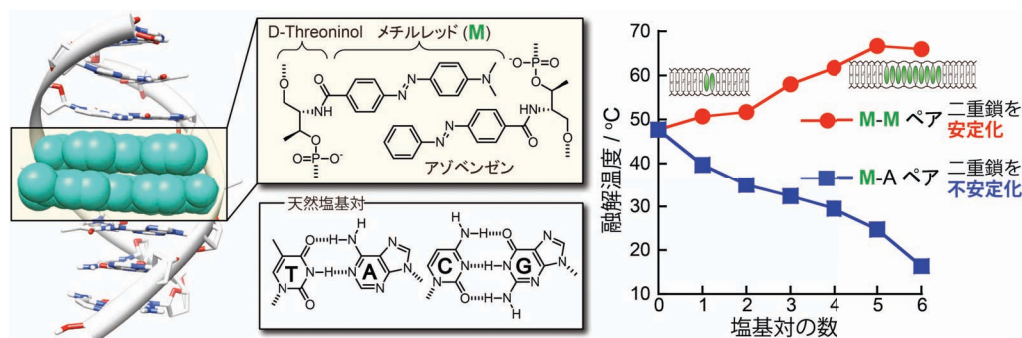


図1 アゾ系色素ペア含有 DNA の構造解析結果、及びメチルレッド(M) 導入 DNA の二重鎖安定性

とを示している。これらの結果から、天然核酸と全く異なる構造を持つ分子であっても、天然核酸の化学的機能(二重鎖安定化・直交性)を持つことが明らかとなった。逆に言えば、天然核酸の化学的機能を模倣するだけであれば、必ずしも天然核酸の化学構造を模倣しなくてもよいことになる。そこで、この設計を利用することで以下に述べる様々な機能を持った疑似塩基対を開発してきた。

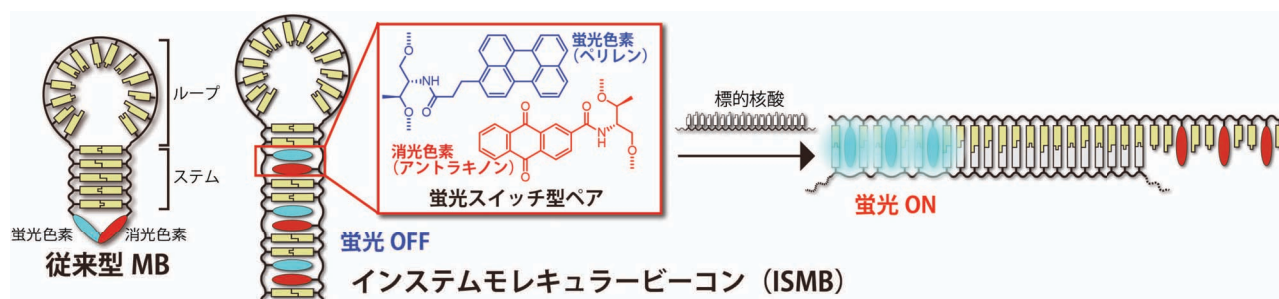


図2. 蛍光スイッチ型ペアを利用した核酸検出の模式図

3. 蛍光スイッチ型ペアによる高感度核酸検出^[4]

天然核酸は極めて優れた直交性を有しているため、相補鎖の配列特異的な認識が可能である。しかしながら、天然塩基対は蛍光などの顕著なシグナル発信能を持たないという欠点がある。そこで、蛍光色素と消光剤のペアを疑似塩基対として用いることによって蛍光スイッチ可能な疑似塩基対を開発した。具体的にはまず蛍光色素としてペリレン、消光剤としてアントラキノンを用いた疑似塩基対を開発した(図2)。このような蛍光スイッチという考え方は筆者らのオリジナルではなく、Tyagiらによって開発されたMolecular Beacon (MB)に代表される核酸プローブに既に利用されている^[5]。しかしながら、従来のMBでは色素が末端に結合していたのに対し、筆者らはこの疑似塩基対をステム内部に導入した。こうすることで、末端のブリーディングによる影響を低減でき、また複数分子の蛍光色素を(量子収率を低下させることなく)導入することも可能となる。実際、疑似塩基対を2ペア導入したIn Stem Molecular Beacon (ISMB)は従来のMBと比較して高感度なDNA・RNA検出が可能であることを明らかにした^[4a]。さらに、丸山厚先生(東工大)らが開発されたポリマー(PLL-g-Dex)と疑似

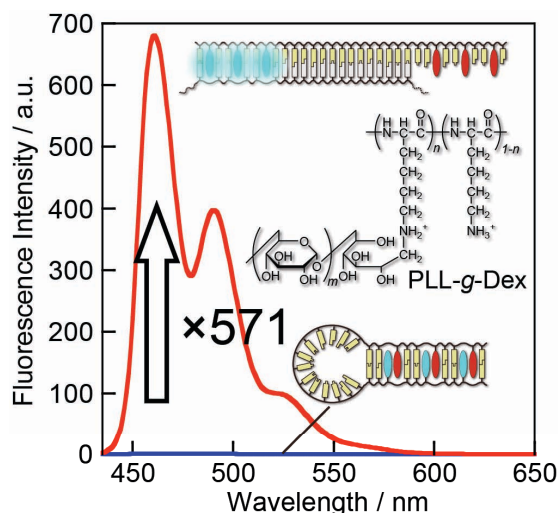


図3. ISMB による DNA 検出結果

塩基対を3組導入したISMBとを併用することによってシグナル／バックグラウンド比500以上を実現した(図3)^[4c]。この設計は他の色素にも応用でき、Cy3とアゾ系色素ペアを利用したISMBも報告している^[4b, 4e]。これらのプローブを利用すれば固定化した細胞内におけるRNAの可視化が可能であることも分かった^[4c]。

4. カチオン性ペアによる二重鎖の安定化・光架橋^[6]

天然塩基対は高温で解離する。この解離プロセスは生体機能において必須の機能であるが、核酸を材料として利用するには必ずしも望ましい性質ではない。そこで、天然塩基対よりはるかに安定な疑似塩基対をつくれまいかと考えた。DNAはリン酸骨格を持つため、カチオン性分子(*p*-メチルスチルバゾール)を導入することによって静電相互作用を利用した疑似塩基対を開発した(図4A)^[6a]。実際にこのカチオン性ペアをDNAに導入してみると、G-Cペアよりも安定であり、かつ天然塩基対に対して優れた直交性を持つことが分かった(図4B)。更に、*p*-メチルスチルバゾールは紫外光照射によって[2+2]光環化付加反応することが知られている。従って、このカチオン性ペアに紫外光を照射すれば二重鎖の光架橋が期待できる。実際に340nmの紫外光を照射したところ5分以内に反応は完了し、二重鎖が大幅に安定化することが分かった(図4C)^[6c]。このようにカチオン性ペアは高い直交性を持ち、かつ光架橋能を持つために、これを利用したナノ構造体の調製・安定化が期待できる。なお、我々は更に他の光架橋ペアについても検討を進め、最近になり可視光照射によって架橋するペアも報告している^[7]。

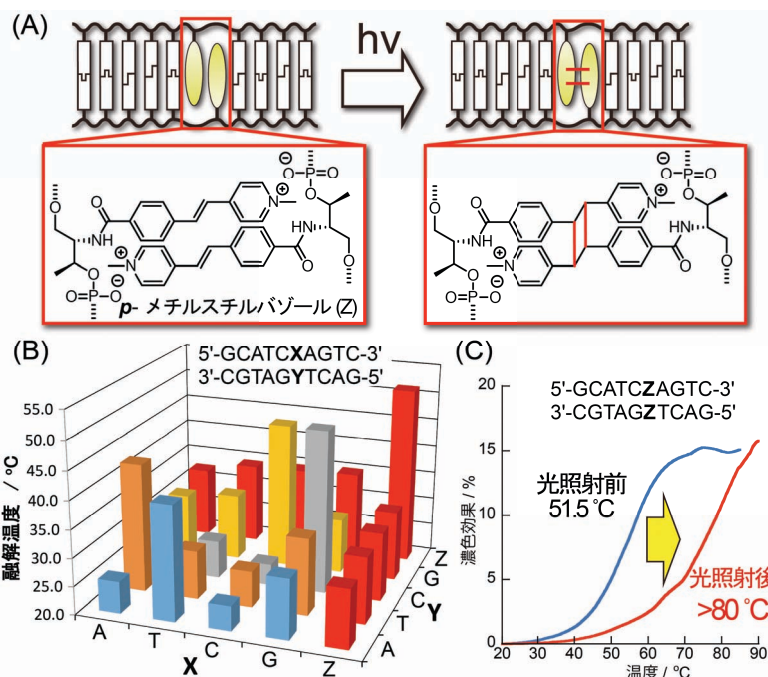


図4. カチオン性ペアの(A)模式図、(B)天然塩基対に対する直交性及び(C)光架橋による二重鎖安定化。(B)カチオン性疑似塩基(Z)は天然塩基とは不安定化し、自身とは大きく安定化する。

5. 非平面ペアによる電子移動抑制^[8]

核酸塩基は比較的優れた電荷移動媒体であると同時に、電荷移動によって多くの蛍光色素を消光することが知られている。特にグアニンは酸化電位が最も低く、強い消光剤としてはたらくことが知られており、核酸を蛍光ラベルする際の大きな問題となっている。そこで、電荷移動を抑制する疑似塩基対を開発することを考えた。具体的にはシクロヘキサン誘導体(イソプロピルシクロヘキサン)を疑似塩基対として選択した(図5A)。シクロヘキサンは非平面構造を持ち、 π 電子を持たないために効率的に電子移動を抑制する“絶縁体”として機能することが期待できる。しかしながら、このシクロヘキサンは通常DNA二重鎖を安定化している水素結合部位やスタッキングするための芳香環を持っていない。そこで、まずNMR構造解析を行ったところ、このペアは非平面構造を持つにも関わらず二重鎖の内部に位置することが分かっ

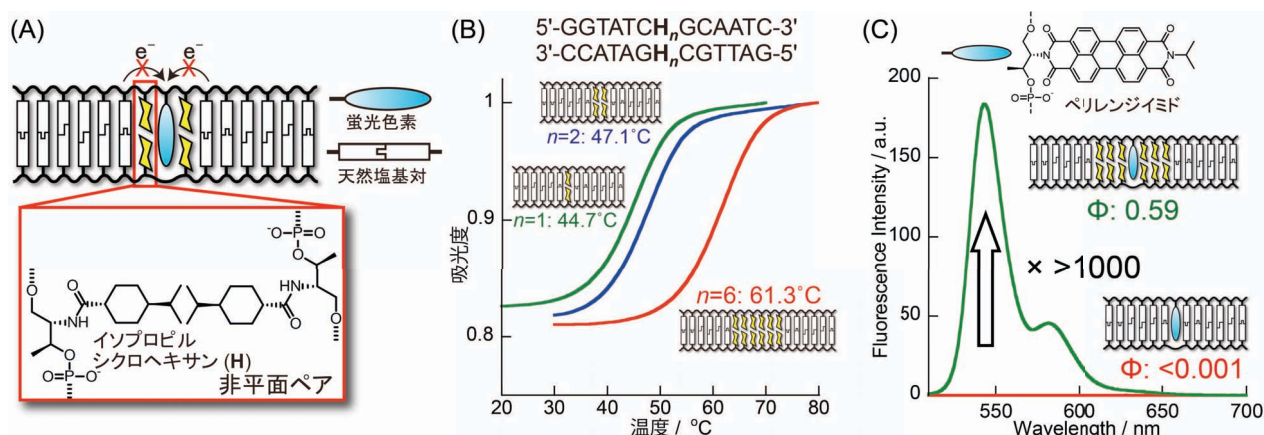


図5. 非平面ペアの(A)模式図、(B)安定性及び(C)電子移動の遮蔽によるペリレンジイミドの高輝度化。

た。更に驚くべきことに、このペアを導入すればするほど二重鎖がむしろ安定化することが分かった(図5B) [8b]。詳細な検討の結果、このペアはイソプロピル基間の疎水相互作用によって二重鎖を安定化していることが明らかとなった。この水素結合・スタッキングに依らない二重鎖安定化は筆者らも全く予想しておらず大きな驚きであった。更に、このペアについてその“絶縁能”の評価を行った。核酸塩基によって大きく消光するペリレンジイミドと核酸塩基との間に非平面ペアを導入したところ、蛍光量子収率が数千倍も上昇した(図5C) [8a]。このことは非平面ペアが蛍光色素—核酸塩基間の電子移動を抑制したことを示している。また、このペアはその他の蛍光色素(ピレン、ローダミン、ナイルレッドなど)の発光増大に利用できることも明らかにしている [8c, 8d]。

6. 電荷移動ペアを利用した人工二重鎖調製^[9]

天然塩基対は水素結合を利用することでヘテロ選択的な塩基対形成を実現している。一方、筆者らの疑似塩基対はスタッキング相互作用や静電相互作用、疎水相互作用などを利用しているため基本的にホモ選択的な認識しか実現できていなかった。そこで、なんとかD-threoninolを利用した設計でヘテロ選択的な疑似塩基対を実現できないかと考えた。具体的に利用したのは電荷移動(ドナー・アクセプター)相互作用である。電子ドナーとアクセプターとをペアとして用いれば、ヘテロ選択的な相互作用が期待できる。そこで、ドナーとしてピレン(P)、アクセプターとしてアントラキノン(Q)による疑似塩基対を開発した(図6)。これらはそれぞれ蛍光色素、消光剤としても機能するため、塩基対形成を蛍光変化によってモニターできるという利点もある。このP-QペアをまずDNAに導入したところ、DNA二重鎖が大きく安定化し、ホモペア(P-P、Q-Qペア)よりも安定であることが分かった。これは電荷移動相互作用を利用したヘテロ選択的な塩基対形成が可能であることを示している。そこで次に、天然塩基を導入していないピレンオリゴマーとアントラキノンオリ

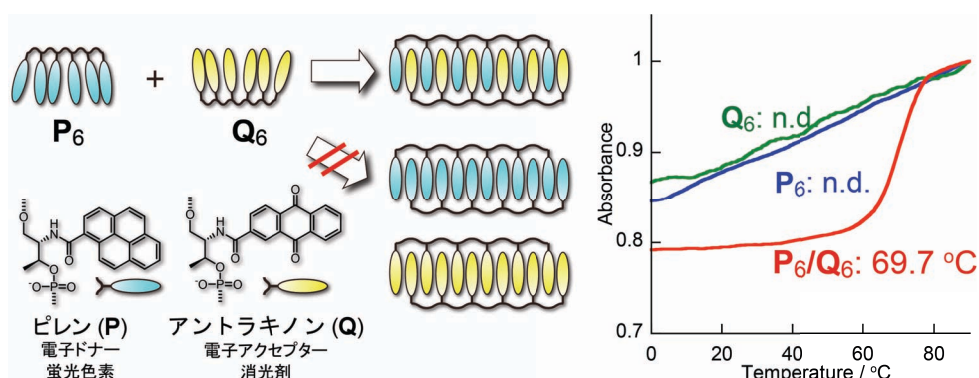


図6. ピレン—アントラキノン間の電荷移動相互作用を利用した人工二重鎖調製及び六量体の融解曲線。

ゴマーによる人工二重鎖形成について検討を行った。その結果、図6に示すようにこの疑似塩基対は単独でヘテロ選択的な複合体を形成することが分かった。化学量論比を検討したところ、1:1の複合体、すなわち二重鎖を形成していることが分かった。更に興味深いことに、この電荷移動ペアは極めて安定であるため、天然核酸では二重鎖形成しえない三量体という極めて短い鎖長であってもヘテロ二重鎖を形成することがわかった。このように電荷移動相互作用を利用することで極めて安定な人工二重鎖を調製できることを明らかにできた。

7. おわりに

以上、これまで開発してきた疑似塩基対の分子設計・機能について簡単に紹介した。これらの研究を通じて強く感じることは、「DNAは意外と入れ換え可能」ということである。シクロヘキサンのような平面ですらないようなペアでも二重鎖を安定化することは可能であるし、ピレンとアントラキノンのような比較的単純な設計でもヘテロ選択的な二重鎖を形成することは可能である。筆者らの疑似塩基対は天然と似ても似つかない化学構造をしているため、時々「どこが塩基対なんだ？」とお叱り(?)を受けることがあるが、少なくとも(化学的)疑似塩基対と呼べるレベルの機能は持っているのではないかというのが筆者らの考えである。今後、この(似ても似つかない)疑似塩基対を更に拡張することによってより多様な核酸材料が開発できると考えている。また、これらの研究を通じて「なぜDNA・RNAは現在の化学構造に落ち着いたのか？」という問いに対しても何らかの回答を得ることを目指していきたい。

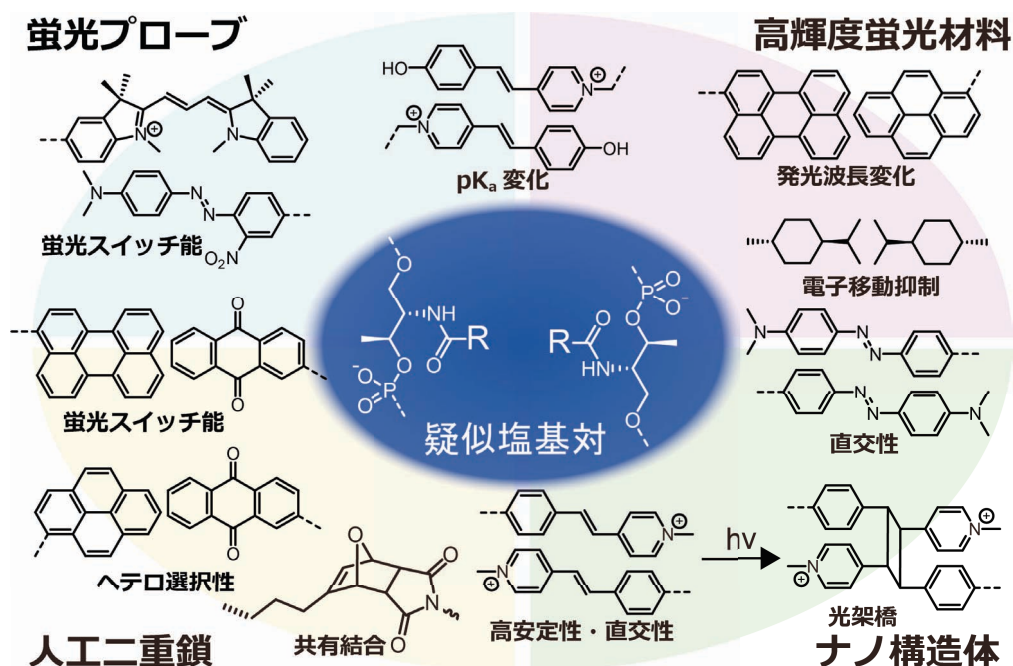


図7. これまで調製した疑似塩基対のまとめ。

謝辞

本稿で紹介した研究はすべて名古屋大学大学院工学研究科物質制御工学専攻浅沼研究室で行われました。浅沼浩之教授をはじめスタッフの先生方、共同研究していただいた先生方に感謝申し上げます。また、本成果は学生諸氏の弛まぬ努力なくては実現しえなかったものであり、研究に携わったすべての方に感謝いたします。

参考文献

- [1] a) I. Hirao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 622-627; b) D. A. Malyshev, K. Dhami, T. Lavergne, T. Chen, N. Dai, J. M. Foster, I. R. Correa, F. E. Romesberg, *Nature* **2014**, *509*, 385-388.
- [2] J. Štambaský, M. Hocek, P. Kočovský, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729-6764.
- [3] a) H. Kashida, T. Fujii, H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2892-2899; b) T. Fujii, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10092-10102.
- [4] a) H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7044-7047; b) Y. Hara, T. Fujii, H. Kashida, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5502-5506; c) H. Asanuma, T. Osawa, H. Kashida, T. Fujii, X. Liang, K. Niwa, Y. Yoshida, N. Shimada, A. Maruyama, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1760-1762; d) T. Fujii, Y. Hara, T. Osawa, H. Kashida, X. Liang, Y. Yoshida, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10865-10872; e) H. Kashida, T. Osawa, K. Morimoto, Y. Kamiya, H. Asanuma, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1758-1762.
- [5] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
- [6] a) H. Kashida, H. Ito, T. Fujii, T. Hayashi, H. Asanuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9928-9930; b) H. Kashida, T. Hayashi, T. Fujii, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2614-2622; c) H. Kashida, T. Doi, T. Sakakibara, T. Hayashi, H. Asanuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7960-7966.
- [7] a) T. Doi, H. Kashida, H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 4430-4437; b) T. Doi, H. Kawai, K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.*, in press.
- [8] a) H. Kashida, K. Sekiguchi, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11554-11557; b) H. Kashida, K. Sekiguchi, N. Higashiyama, T. Kato, H. Asanuma, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8313-8320; c) H. Kashida, H. Asanuma, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7196-7204; d) H. Kashida, N. Higashiyama, T. Kato, H. Asanuma, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6191-6197.
- [9] T. Doi, T. Sakakibara, H. Kashida, Y. Araki, T. Wada, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 15974-15980.



気になった論文

与那嶺 雄介 (よなみね ゆうすけ)

九州大学大学院 工学研究院化学工学部門 特任助教 (ImPACT 研究員)

yonamine@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

この度は生命化学研究レター「気になった論文」の執筆の機会を与えて頂き、大変光栄に思います。私は2010年に東京工業大学大学院 生命理工学研究科にて学位を取得後、カリフォルニア大学アーバイン校化学科、ミシガン大学歯学部、物質・材料研究機構 超分子ユニットにて博士研究員を経た後、2016年1月より、九州大学大学院 工学研究院化学工学部門 三浦・星野研究室にて特任助教として着任致しております。現在は、革新的研究開発推進プログラム(ImPACT)、「セレンディピティの計画的創出」の研究員として、バイオ燃料を効率的に生産する藻類のスクリーニング法の開発を行っております。

私は、生体高分子を専門にしておりますが、数十nm～数十 μ mの精巧な機能性材料にも、興味をもっております。近年、自己組織化やDNAナノテクノロジー、MOFなどのbottom-up技術と、フォトリソグラフィーや3Dプリント、MEMSといったtop-downの技術が、どちらも円熟し、上記のサイズ領域に到達しています。そのような技術的背景の下、様々な分野の研究が融合し始めて、独創的な研究が生まれている印象があります。また、各種顕微鏡で可視化でき、直感的に面白さが伝わる点も魅力の一つだと思います。本稿では、そのような「ハイブリッド化」が進行している研究領域の論文を4報、ご紹介させていただきます。

Programmable motion of DNA origami mechanisms

A. E. Marras, L. Zhou, H.-J. Su, and C. E. Castro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, 112, 713–718.

DNAオリガミ技術を用いることで、100 nm程度の精密な構造体が作製可能である。著者らは巨視的な器械の構造を基にして、ヒンジやスライド構造の可動部位を持ったDNAオリガミをデザインし、それらを組み合わせて2次元的、3次元的に動かすことができる機構を示した。

著者らは、DNAバンドル構造をビルディングユニットとして、接続部位に柔軟な一本鎖DNA部位を用いることで、ヒンジ構造を形成した(図1a)。また、筒状の構造に、軸状のものを差し込むことで、スライド機構も作製した(図1b)。これらのTEM像を観察した結果、ヒンジ角度は11-147° (平均79.7°)の間で分布し、スライ

ダーの位置移動は29.2 nmの幅で分布していた。これらの構造を組み合わせることで、2次元的に動くクランク-スライダー機構も作製した(図1c)。TEM像から、角度と位置移動の関係をプロットした所、理論値(実線)とよく一致して

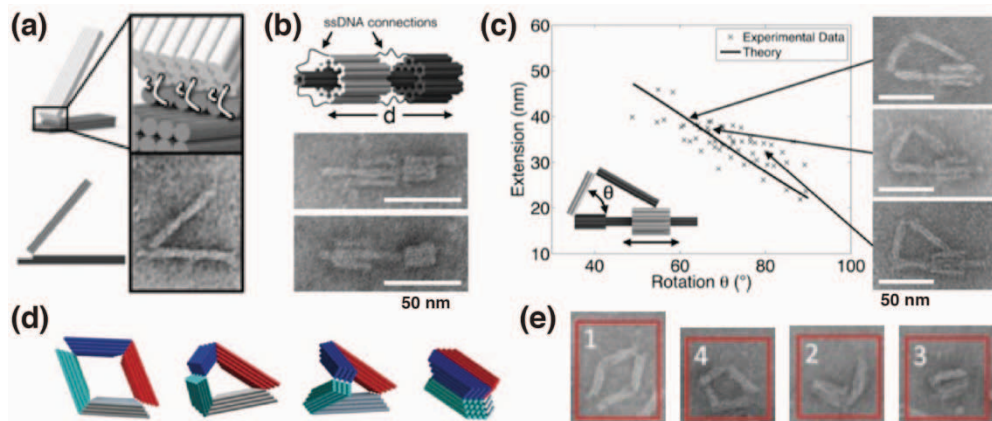


図1 DNA オリガミから成る機構の模式図とTEM図。(a) ヒンジ機構。(b) スライド機構。(c) クランク-スライダー機構。(d, e) Bennett 機構。論文より抜粋・一部改変。

いた。最後に、3次元的な動きを行うBennett機構を作製し(図1d, e)、補助DNAを添加することで、開閉が駆動できることを示した。

Programmed switching of single polymer conformation on DNA origami

A. Krissanaprasit, M. Madsen, J. B. Knudsen, D. Gudnason, W. Surareungchai, V. Birkedal, and K. V. Gothelf, *ACS Nano* **2016**, *10*, 2243–2250.

著者らは、一本鎖DNAを側鎖に持つ有機共役ポリマーを矩形DNAオリガミ上に固定化し、補助的なDNA鎖を添加することで、右折・左折状態の可逆的な切り替えを行った(図2)。

まず、共役ポリマー(APPV)を担体に固定化し、側鎖の水酸基から核酸9塩基を伸長した。その後、リンカー部を切断して、DNA-APPVを遊離させ精製した(図2a)。一方、矩形DNAオリガミ上には、中央部位の端から中心位置まで、ポリマー側鎖DNAと相補的な一本鎖DNAが伸びており、混合することでポリマーが固定化される(図2b緑色配列; AFM像も示す)。DNAオリガミ上には、その他に右折(図2b青四角)や左折(図2b黄四角)状で固定する「DNAトラック」も存在しているが、それぞれ緑色の配列とは異なる。ここへ右折ガイド鎖(RgDNA; 青色配列と緑色配列を持つ)を添加すると(図2c)、青四角トラックに結合し、緑色配列を提示するため、そこへポリマーが右折した状態で固定化される。同様に左折ガイド鎖(LgDNA; 黄色配列を持つ)を添加すると、左折状態で

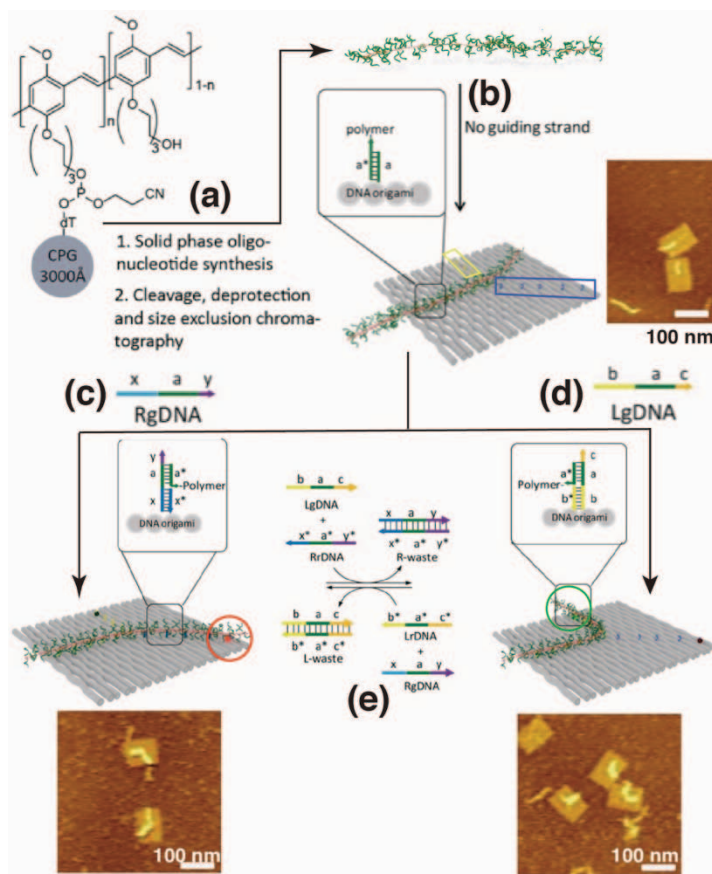


図 2 (a) DNA を側鎖に持つ共役ポリマーの合成。(b) ポリマーのDNA オリガミ上への固定。(c) 左折状、(d)右折状での固定。(e) 右折・左折の可逆的な切り替え。論文より抜粋・一部改変。

固定化された(図2d)。DNAトラックからポリマーを引き剥がす、除去DNA(RrDNA、あるいはLrDNA)と各ガイド鎖を同時に添加することで、右折・左折の状態を切り替えた(図2e)。ポリマーが蛍光を有することを利用して、2種のアクセプター色素をDNAオリガミ上に配置し、FRETによる右折・左折状態を調べることで(図中の赤・緑の円)、連続で6回まで切り替え可能であることが分かった。

3D printed microtransporters: Compound micromachines for spatiotemporally controlled delivery of therapeutic agents

T.-Y. Huang, M. S. Sakar, A. Mao, A. J. Petruska, F. Qiu, X.-B. Chen, S. Kennedy, D. Mooney, and B. J.

Nelson; *Adv. Mater.* **2015**, 27, 6644–6650.

著者らは、数 μm の物質の充填、運搬、放出を、磁場により制御できるマイクロランスポーターを作製した。

光硬化樹脂に対して、二光子吸収によるレーザー直接描画法 (direct laser writing) を行うことにより、サブマイクロメートルの位置精度で構造体を形成できる。著者らは、スクリ

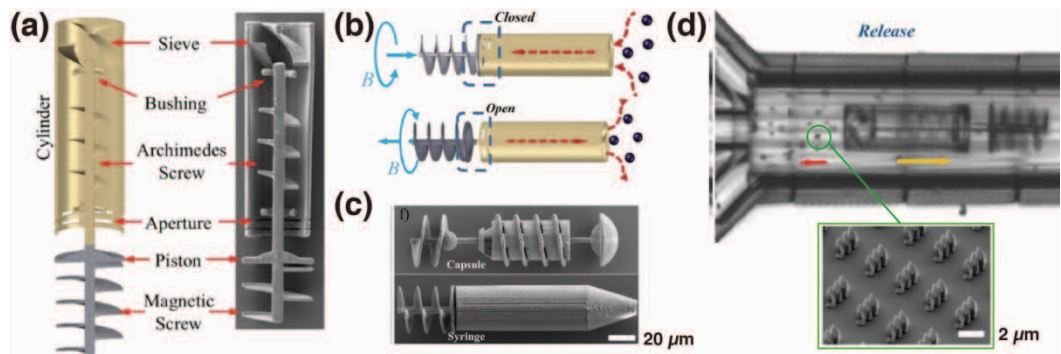


図 3 (a) マイクロランスポーターの模式図。(b) 磁界による充填と放出。(c) カプセル構造 (上)、シリンジ構造 (下)。(d) 小らせん構造の放出と、分岐した細管への推進。論文より抜粋・一部改変。

ューを持つシャフトと、シリンダーから構成されるマイクロランスポーターを設計した(図3a)。シャフト部のみを磁性金属で被覆し、外部からの磁界で回転させることで推進力を発生し、さらに、シリンダー内へマイクロビーズを封入することができた(図3b)。一方、逆回転にすると、内包物の放出が可能であった。同様の手法で、キャップが取り外せるカプセル構造や、押し込み可能なシリンジ構造も作製できた(図3c)。さらに、スクリューの巻方向を逆にした、小らせん構造をマイクロランスポーターへ封入しておき(図3d)、細い流路まで到達した際に、磁場を逆回転させて、小らせん構造の放出と、推進を同時に誘導することができた。

Cellular cargo delivery: Toward assisted fertilization by sperm-carrying micromotors

M. Medina-Sánchez, L. Schwarz, A. K.Meyer, F. Hebenstreit, and O. G. Schmidt; *Nano Lett.* **2016**, 16, 555–561.

著者らは、運動性を欠如した精子細胞に、磁場で操作可能なマイクロモーターを搭載し、卵母細胞へと運搬した(図4a)。

著者らは上記の *Adv. Mater.* 2015の論文と類似の手法でマイクロらせん構造を作製し、らせんのピッチ数や駆動する振動数を最適化して、培地中で通常のウシ精子細胞と同様の速度(最大70 $\mu\text{m/s}$)での遠隔操作を達成した。不動の精子細胞の中から、低浸透圧膨張試験(HOS; 遺伝子の保持を確認する)により、尾部がカールしたものを選び(図4bi)、マイクロらせんを通して(図4ci)その運動を自在に制御した(図4cii)。卵母細胞壁まで運搬した後、磁場を逆回転して、抜き取ることもできた(図4ciii)。新たな不妊治療法への可能性を主張している。

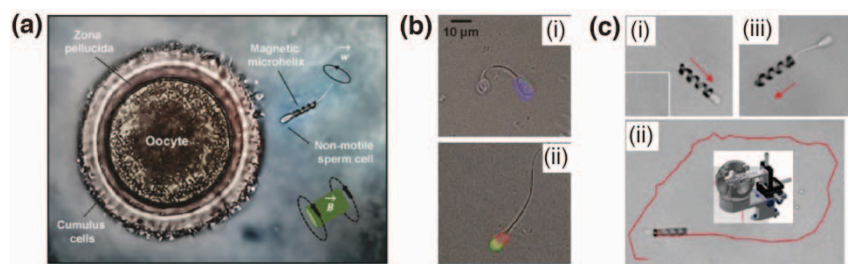


図 4 (a) 研究の概念図。(b) (i)遺伝子を保持した精子細胞、(ii)損傷した細胞。(c) マイクロらせん構造による精子細胞の(i)捕捉、(ii)運搬、(iii)脱離。挿入図は磁界制御の装置。論文より抜粋・一部改変。

細胞と同様の速度(最大70 $\mu\text{m/s}$)での遠隔操作を達成した。不動の精子細胞の中から、低浸透圧膨張試験(HOS; 遺伝子の保持を確認する)により、尾部がカールしたものを選び(図4bi)、マイクロらせんを通して(図4ci)その運動を自在に制御した(図4cii)。卵母細胞壁まで運搬した後、磁場を逆回転して、抜き取ることもできた(図4ciii)。新たな不妊治療法への可能性を主張している。

Top-down方式で作製された、無機化合物の「マイクロマシン」は、磁界・電界で強力に駆動可能である。DNAオリガミ技術は、より微細に構造体を設計できるが、物理的な力で駆動させるには安定性の向上が課題であろう。一方、生体分子との適合性が高い点を活かし、生体関連技術への応用には有利であると思う。



気になった論文

高 靖馳 (Gao Jingchi)

大阪大学大学院工学研究科 博士前期課程 2 年

gao@molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆機会を与えていただき、大変光栄に思っております。私は現在大阪大学工学研究科、菊地和也教授の指導のもと、タンパク質工学手法を用いてタグタンパク質と合成蛍光プローブを用いる生細胞内標的タンパク質の蛍光標識技術の開発を行っております。生細胞蛍光イメージング技術は生命現象や生体分子の挙動を生きた細胞で観測することを可能にし、生命科学研究分野において非常に重要な手法です。本稿では、特定の生命現象・生体分子を可視化する技術の開発について、最近発表された論文の中から、2報取り上げて紹介いたします。

Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow

Ma, H.; Tu, L. C.; Naseri, A.; Huisman, M.; Zhang, S.; Grunwald, D.; Pederson, T. *Nat Biotechnol.* **2016**, 34, 528–530.

CRISPR/Cas9システムはバクテリアにおいて発見されてから、その生命科学研究への応用が飛躍的に広がり、生命科学研究に非常に有用な手法として注目を集めています。CRISPR/Cas9システムはゲノム編集技術として注目されていると同時に、このシステムを用いて特定の遺伝子座を生細胞内で標識する試みもなされています。ヌクレアーゼ活性を持たないCas9の変異体(dCas9)は、ガイドRNA(Single-guide RNA, sgRNA)を介して標的遺伝子を認識し、切断することなく結合します。このため、生細胞に蛍光タンパク質を融合させたdCas9を発現させ、sgRNAを用いてdCas9を標的遺伝子に結合させることで目的とする遺伝子座を蛍光標識することができます。しかしながら、こちらの手法を用いて複数の遺伝子座を同時に標識することが困難です。

本論文で著者らはCRISPR/Cas9に基づいた遺伝子座を生細胞で標識する新たな手法、CRISPRainbowを報告しました。この手法は従来と違い、蛍光タンパク質を直接dCas9に融合させるのではなく、sgRNAとdCas9を標的遺伝子座の認識にのみ利用します。そして、sgRNAに特殊なヘアピ

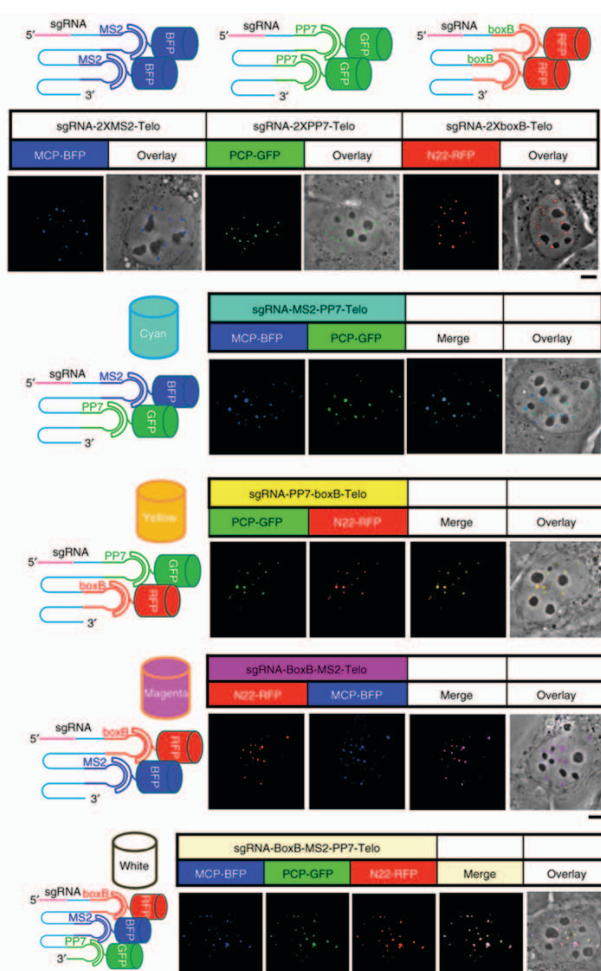


図 1. CRISPRainbow による遺伝子座のマルチカラー標識(原論文より一部改変)

ン構造を組み込み、そのヘアピン構造に特異的に結合するタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質によりsgRNA/dCas9複合体を標識することで標的遺伝子座を蛍光標識します。

本論文で著者らは、sgRNAに組み込むヘアピン配列としてMS2、PP7とboxBを選択し、そして、MS2に結合するタンパク質ドメインMCPにBFPを、PP7に結合するPCPドメインにGFPを、そしてboxBを認識するN22ペプチドにRFPを融合させました(図1)。この手法の特徴として、1個のsgRNAに複数のヘアピン配列を組み込み、ヘアピンの組み合わせによりマルチカラーで複数の遺伝子座を同時に蛍光標識することが可能です。図1に示すように、sgRNAの組み合わせにより最大7個の遺伝子座を異なる色の蛍光で同時標識することができます。さらに、もう一つの近赤外領域の蛍光タンパク質を用いれば、理論上CRISPRainbow用いて同時に標識できる遺伝子座の数は15に増えます。

次に著者らはCRISPRainbowを用いて、生細胞イメージングを行いました。細胞核内のテロメアと、異なる染色体上にある複数の遺伝子座を同時に標識するために、これらの遺伝子座を認識するsgRNAに異なる組み合わせのヘアピンを組み込み、それぞれのヘアピンを認識するタンパク質と、異なる色の蛍光タンパク質の融合タンパク質、dCas9及びsgRNAをU2OS細胞に発現させ、複数の染色体の動態を同時に追跡することに成功しました(図2)。

本論文で報告したCRISPRainbowは、従来のdCas9に蛍光タンパク質を融合させる手法と違う原理で、複数の蛍光タンパク質を用いて複数の遺伝子座を同時に標識することができ、興味深く感じました。

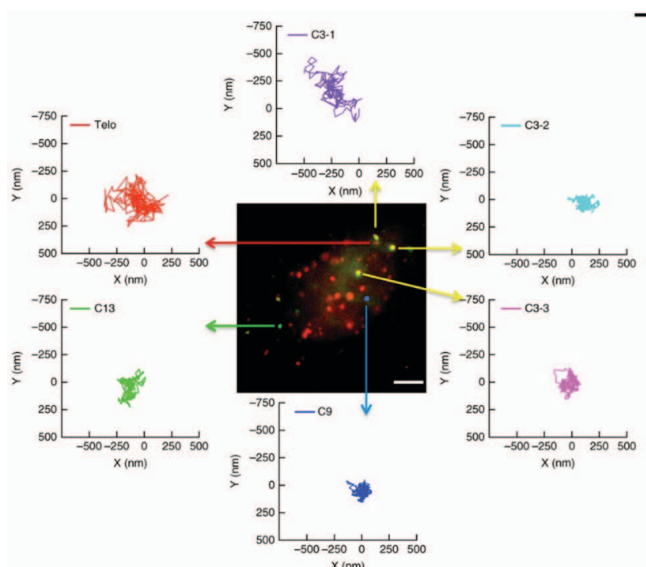


図 2. CRISPRainbow による遺伝子座のマルチカラー標識(原論文より一部改変)

Visualization of protein-specific glycosylation inside living cells

Doll, F.; Buntz, A.; Späte A. K.; Scharf, V. F.; Timper, A.; Schimpf, W.; Hauck, C. R.; Zumbusch, A.; Wittmann, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 2262–2266.

タンパク質は翻訳後修飾を受けることによりその機能が制御されています。なかでも、糖鎖付加(Glycosylation)は重要な翻訳後修飾の一つとして知られています。しかしながら、現在報告されている糖鎖付加を可視化する手法では細胞表面の糖タンパク質しか可視化できません。

本論文で著者らは、生細胞内における標的タンパク質のセリンやトレオニン残基のヒドロキシ基に修飾されたN-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)を可視化する手法を報告しました(図3)。この手法では、標的タンパク質(Protein of interest, POI)と蛍光タンパク質EGFPの融合タンパク質を細胞内に発現させ、そして、メチルプロペンによって修飾され、細胞膜透過性付与のためにアセチル化されたグルコサミン(Ac₄GlcNCyoc)を添加します。次に、テトラジンと結合した蛍光色素を添加すると、標的タンパク質に取り込まれたAc₄GlcNCyocに逆電子要請型ディールス・アルダー反応(Inverse-electron-demand Diels-Alder reaction, DA_{inv})により蛍光色素が付加し、標的タンパク質に融合したEGFPの間に蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起こります。EGFPから蛍光色素へのエネルギー移動が起こるとEGFPの蛍光寿命が減少する

ため、FRETの検出には蛍光寿命イメージング (Fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) が利用されています。FLIMを用いることにより、細胞内に過剰量の遊離蛍光色素の存在下でも分子内FRETをコントラストよく検出できます。また、著者らはEGFPがAc₄GlcNCyocにより修飾されないこと、また、メチルプロペンを含まないアセチルグルコサミン (Ac₄GlcNAc) を用いる場合に蛍光色素を添加してもFRETが起こらないことを示しました。このため、この手法を用いて標的タンパク質の糖鎖付加を生細胞内で特異的にイメージングすることが可能です。

著者らが今回開発した手法の前提条件として、糖鎖修飾サイトとEGFPの近接、そして高い糖鎖修飾レベルが必要です。著者らはこれら

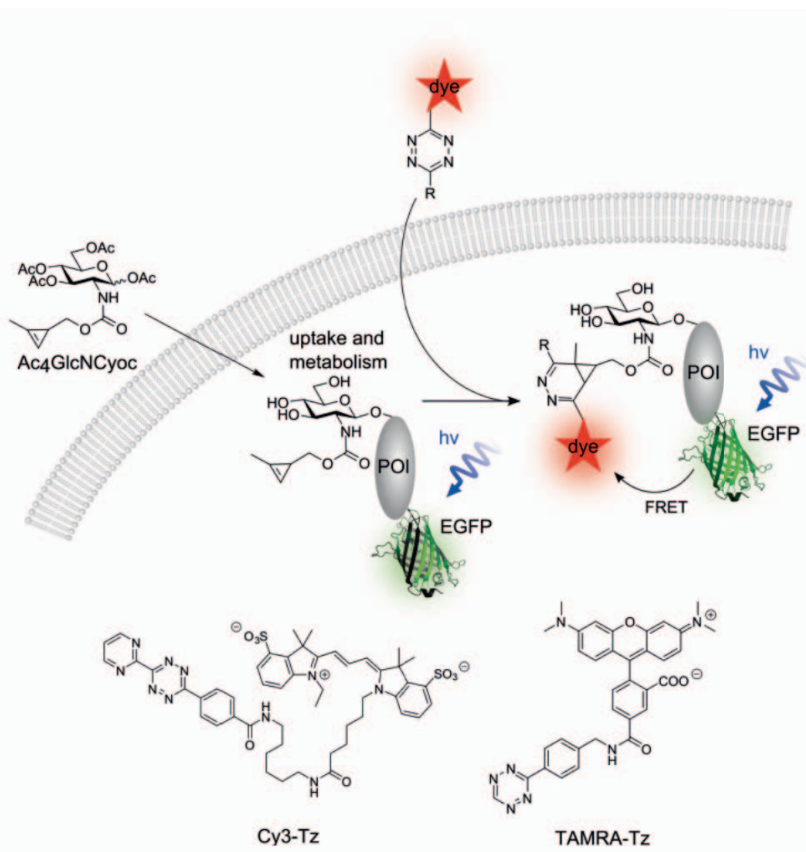


図 3. 標的タンパク質の糖鎖付加の可視化戦略 (原論文より一部改変)

の前提条件を満たす細胞内タンパク質Foxo1、p53とAkt1の糖鎖付加の生細胞イメージングに成功しました (図4)。これらのタンパク質の糖鎖修飾としてO-GlcNAcのみが報告されています。これらのタンパク質それぞれのEGFPとの融合タンパク質をHEK293T細胞に発現させ、Ac₄GlcNCyocと、テトラジンに連結した蛍光色素 TAMRA-Tzを添加し、FLIM-FRET観察を行いました。その結果、これらのタンパク質の糖鎖付加によるFRETがEGFPの蛍光寿命の減少として観察されました。一方、シクロプロペンを持たない Ac₄GlcNAcを用いる時に色素が糖鎖に付加されず、FRETによる蛍光寿命の減少は観測されませんでした。特に、Akt1に関して細胞核内の蛍光寿命は細胞質と比較して減少が見られました。Akt1の細胞核への局在はO-GlcNAc修飾により制御されることは以前に報告されています。今回の生細胞イメージング手法を用いて、それと一致する結果が得られ、この手法の有用性が示されました。

本論文で著者らは生きた細胞内において標的タンパク質の糖鎖付加を可視化する手法を報告しました。標的タンパク質に対して制限があるものの、多くの細胞内タンパク質に対してこの手法は適用可能です。今後この手法を用いて、細胞外刺激に応答する糖鎖付加を可視化し、糖鎖付加のより詳細な機能解明が期待されます。

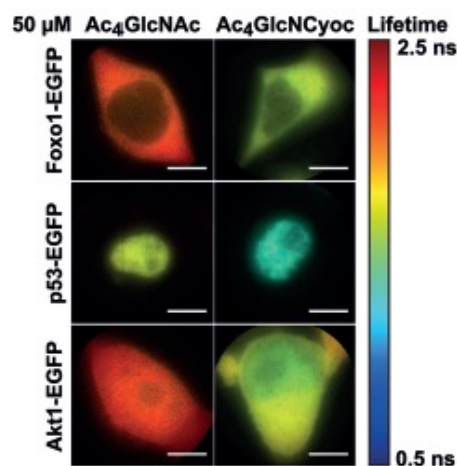


図 4. 生細胞内タンパク質糖鎖付加の可視化 (原論文より一部改変)

留学体験記

イリノイ大学留学体験記

鳥取大学大学院 工学研究科

稲葉 央

(hinaba@chem.tottori-u.ac.jp)



はじめに

私は2015年1月に京都大学の北川進研究室で博士(工学)を取得後、2016年2月までアメリカのイリノイ大学アーバナ・シャンペーン校でポスドクとして研究を行いました。2016年3月から鳥取大学の松浦和則研究室で助教を務めております。今回はアメリカでの留学体験を書かせていただく機会をいただいたので、その経験をお伝えしたいと思います。

留学に至った経緯

今回の留学の前に、博士課程在籍時にアメリカのUCバークレー (Christopher J. Chang研究室) に二ヶ月間短期留学させていただく機会を得ました。そのときにChrisの研究室でポスドクをしていたのが、現在イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校化学科で研究室を構えているJefferson Chanです。私はその短期留学の際にJeffと一緒に研究をしており、帰国後もよくやりとりしていました。博士を取得する目処が立ったときにちょうどJeffが独立することになり、ポスドクとして来ないかと声をかけていただいたのが留学に至った直接の理由です。一度海外に出ることで新たな文化を学び、自分の研究を見つめ直したいと考え、留学を決意しました。こうして考えると改めて縁は大事だと思います。博士課程時に在籍していた京都大学物質・細胞統合システム拠点 (iCeMS) は外国人研究者が多く、また周りに留学経験者が多いことも決断を後押ししました。ポスドクとして渡米する前に一度Jeffの研究室を見学する機会があり、メンバーの前で博士課程時の研究を発表しました。

イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校

イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校 (University of Illinois at Urbana-Champaign, UIUC) はシカゴからバスで三時間ほどの、アーバナ、シャンペーンという二つの街にまたがった大学です。夏は涼しく快晴で非常に過ごしやすい環境です。ただし冬は最低-20℃近くまで下がり、防寒は必須です。最初に着いたときは雪がものすごく、ここでやっていけるのかと不安になったことを覚えています。大学を中心とした小さな街なので都会のような便利さはありませんが、自然に囲まれ、落ち着いて研究に集中できる環境です。最初は車が必要だと思っていましたが、バスが発達しており大学関係者は無料で使用できることから、結局車は購入せずにバスと自転車で不自由なく生活できました。

UIUCの化学科はProf. LuやProf. Mooreなど著名な先生が多く、学生のレベルも高いように思います。個

人的にアメリカでは効率的に研究を行い夕方には帰宅するというイメージでしたが、日本と変わらず深夜までハードワークをしているのをよく見かけました。大学全体として安全管理が徹底されており、安全トレーニングを受けなければ実験ができません。例えばNMR測定を行うためには、その原理や測定方法に関する試験をパスする必要があります。大学内に大きな試薬保管庫があり、必要な時はすぐにそこから購入できるため、非常に便利です。一方でアメリカにおける試薬管理の規制の厳しさから、共同研究先から試薬を送っていただくのに数ヶ月かかることもありました。化学科では毎週学内外から来られた先生による招待講演が行われ、最新の研究を聞くことができました。名古屋大学の伊丹健一郎先生も二日間にわたって講演され、大きな反響を呼んでいました。発表後に少しお話しできたのもいい思い出です。



UIUC。自然豊かなキャンパスです。



学会会場にて、研究室メンバーと。真ん中がボスのJeff。

研究について

Jeffの研究室が発足して一年未満という段階で参加したため、研究室の立ち上げにも関わりました。必要な機器や試薬をリストアップし業者と打ち合わせをしたり、デモ用の装置を借りて実験系を構築したりすることは、大変でしたが貴重な経験となりました。Jeffの研究室は細胞内の対象物(金属イオン、シグナル小分子、酵素活性など)と反応して蛍光や光音響シグナルが増幅される分子センサーの開発を目指しています。私が参加した時は合成分子によるセンサー開発のみを行っていましたが、私は博士課程時の経験を活かし、蛍光蛋白質を骨格とした研究を行いました。装置の準備や蛋白質発現系の構築を一から行うため多少時間がかかりましたが、Jeffが新しい実験を信頼して任せてくれたことが嬉しかったと同時に、その責任から身が引き締まる思いでした。

Jeffは若くして独立したことから、「上司と部下としてではなく、まず友人として議論したい」と言っていたが、そのスタンスを研究室の学生にも示していました。そのこともあり、研究室のメンバーはボスやポスドクだからといって変に遠慮することではなく、白熱したディスカッションを展開していました。自分の意見を言うことが求められることも多く、そのような環境で揉まれることは大きな経験になりました。留学中に大学院生一名、学部生一名を指導する機会を与えていただきましたが、彼女らがただ言われたことをこなすのではなく、自分でやるべきことを考えて、意見を主張する姿が印象に残っています。Jeffは気軽に実験室に足を運び、実験の進行状況に関する簡単なディスカッションを毎日のように行いました。アイデアを頭ごなしに否定

することはほとんどなく、よく話し合ってお互い納得したらすぐに実験に取り掛かることができました。共同研究を積極的に行うなど、このフットワークの軽さ、決断の早さは今後見習っていききたい点です。

研究室では毎週月曜日にJeffと一対一でディスカッションするindividual meetingがあり、先週の結果、今週の計画について話し合いました。一対一なので詳細まで議論することができる、有意義な時間でした。また、週一回の研究室のミーティングでは、(主にJeffのおごりで)ディナーを食べながら研究報告と文献紹介が行われました。研究報告では実験結果に対するディスカッションだけでなく、その背景となる研究や実験原理、将来的な展望などかなり細かく突っ込まれるため、しっかり準備する必要がありました。文献紹介は毎回スタイルが異なりましたが、印象に残っているのは、大きな研究分野(私の場合Genetically-encoded sensors)をテーマとしてJeffから与えられ、その歴史、課題、最新の研究をまとめて発表するものです。特定の分野を一から調べるのは大変ではありましたが、系統的に学び直すいい機会となりました。また、メンバー二人がペアとなり、新しい研究テーマを発案して発表する“proposal competition”という試みもありました。

私が在籍している間に二報の論文が研究室から発表されました。どちらも結果を出してから一気に書き上げ、投稿するスタイルです。英語ネイティブであることはもちろんですが、分子センサー開発という目的がはっきりしている研究内容なこともあり、あらかじめイントロダクションを考えておくからこそのような迅速な対応が可能になるのだと思います。実験を行う前からイントロダクションを考えておくというのは基本ではありますが、その重要性を改めて感じました。

研究以外での生活

博士課程時に在籍していたiCeMSでは英語が公用語として使われており、短期留学も経験したことから、ある程度英語はできると思っていました。しかし、やはり日常的に生活する上で英語力はまだまだだなと感じることが多くありました。特にネイティブの英語は聞き取りが難しく、業者との電話でのやり取りはかなり苦戦しました。毎日研究室メンバーとやり取りをすることで徐々に慣れてはきましたが、英語力向上のためにはとにかく自分から積極的に会話をするしかないように思います。

Jeffはラボメンバーを非常に大切に思っており、アパートに入るまでの一ヶ月ほど自宅に住まわせていただくなど、大変お世話になりました。よくJeffの家でホームパーティが開催されたり、誰かの誕生日にはケーキを買ってお祝いする、ボーリングやゴルフ、映画に行くなど、様々な研究室のイベントがありました。また日本と同じように研究室対抗のスポーツ大会がありましたが、面白いのが、Lab Olympicと称して、サッカーやバレーボール、一マイル走、ベンチプレス、砲丸投げなど多くの種目を競い合うものです。これらを一日かけて行うため、終わるとヘトヘトになりました。

一年間で休暇を取れる日数は決まっていますが、その範囲内であれば基本的にいつでも休暇を取ることができます。8月には、2014年に受賞させていただいたSciFinder Future Leaders in Chemistry (<https://www.cas.org/products/scifinder/futureleaders-alumni>)の受賞メンバーがオハイオ州のコロンバスで再び集まる機会をCAS (Chemical Abstract Service) が設けてくださいました。これは毎年世界中から受賞したメンバーが集まってSciFinderやCASについて学び、自身の研究に関するディスカッションを行うプログラムです。以前の受賞メンバーと再会し、また他の年のメンバーと交流を深めた素晴らしい経験となりました。他に個人的な旅行として、シカゴには他研究室の留学生や日本から来られた友人とよく日帰り旅行に行きました。また、オレゴン州ポートランドでは素晴らしい雪山 (Mt. Hood) の風景を眺めることができました。このように、アメリカ国内を比較的気軽に旅行できるのもアメリカ留学の魅力の一つだと思います。研究室の学生曰く、「大きな都市は日本にもあるのだから、アメリカでは広大な自然を見た方がいい」とのことでした。



コロンバスにて、2014年受賞メンバーと。



“オレゴン富士”と称されるMt. Hood。

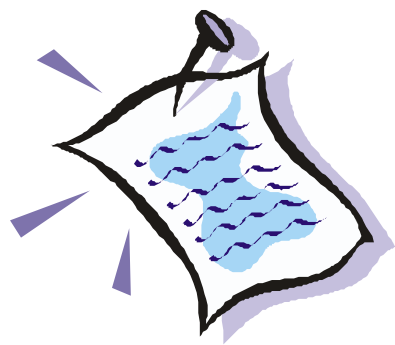
留学を終えて

およそ一年という短い期間でしたが、本留学はかけがえのない経験となりました。よく言われることですが、現在は実験設備や研究環境は日本の方が優れていることも多いと思います。しかし、文化も言語も異なる環境で、ある意味よそ者として研究生活を送ることは、別の視点で物事を見る良い訓練となりました。自分の中の引き出しとして今後活かせるのではないかと思います。もちろん留学期間に形成したネットワークも大きな財産です。

研究室での生活を通じて何より印象に残っているのは、メンバーの本気度、熱量です。Jeffが若いこともあると思いますが、一方的に自分の意見を押し付けるのではなく、とことんディスカッションをしてメンバーが納得してから実験に移ることを望んでいました。学生もそれに応え、自分の言いたいことを言い合える環境でした。このように教員とメンバーがある意味対等に話し合うことでより優れた研究を目指すというスタイルを学びました。もちろん意見が分かれることもあります。お互いの意見を本気で言い合う分わだかまりは少ないように思います(たまに衝突していましたが、、、)。国籍や年齢、背景がばらばらなメンバーですが、サイエンスをやるために来ているという共通項を持つことで繋がっているという感覚です。自分の研究の面白さはどこにあるのか、将来的に何をを目指すのか、といったことを日常的に、かつ真剣に考えることの大切さを感じました。また、日々笑顔で過ごし、挨拶を気持ち良く行うことが日々過ごす上で意外と大事だということもアメリカに来て学んだことの一つです。根底にあるのは、日々の生活を大事に、楽しく過ごすことを意識しているということだと思います。

現在は教員として学生を指導する立場となりましたが、本留学で得た多くの経験を学生に伝えていきたいと考えています。特に、自分が受けた指導の中から自分なりの方針を定め、学生に研究の楽しさを伝えられればと思います。

最後になりましたが、この留学体験記を書く機会を与えてくださった熊本大学の井原敏博先生、松浦先生に感謝申し上げます。また、研究はもとより、留学にあたる心構えをご指導いただいた北川先生、東京工業大学の上野隆史先生、そして研究室の立ち上げという重要な時期に私を受け入れてくださったJeffに心より感謝申し上げます。



シンポジウム等会告

第 19 回 生命化学研究会 ～生命化学・温故知新～

<https://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：2016年8月1日（月）13:30～2日（火）12:00

会場：ホテル西長門リゾート（山口県下関市豊北町）

アクセス：<https://www.kgh.ne.jp/10/access/>

1. JR新山口駅から車で約60分

2. 山口宇部空港から車で約90分

宇部空港および新山口駅からの交通手段については追ってお知らせします。

（参考）

JAL 291：羽田 0800-宇部 0935,

ANA 3811：羽田 0720-宇部 0900,

のぞみ3：新大阪 0845-新山口 1038,

さくら545-こだま731(広島乗換)：新大阪 0804-広島 0943-新山口 1043,

さくら541：博多 0943-新山口 1020

講演者【敬称略】：松浦和則（鳥取大・工）、竹中繁織（九工大・工）、野水基義（東京薬科大・薬）、桑原正靖（群馬大・理工）、世良貴史（岡山大・自然科学）、小倉俊一郎（東工大・生命理工）

会費：参加登録費 8,000円、宿泊費 18,360円（食事、税込）

参加申込み方法：氏名、所属、役職（学年）、性別、E-mailアドレスを明記の上、6月20日（月）までに大阪府立大・円谷まで（tsumu @ [b.s.osakafu-u.ac.jp](mailto:tsumu@b.s.osakafu-u.ac.jp), @の前後のスペースは削除してください）まで申込みください。

定員：40名

要旨×切：6月20日（月）

ポスター発表希望者はA4白黒半ページで作成して大阪府立大・円谷まで（tsumu @ [b.s.osakafu-u.ac.jp](mailto:tsumu@b.s.osakafu-u.ac.jp), @の前後のスペースは削除してください）まで申込みください。テンプレートはフロンティア生命化学研究会ホームページ（<https://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/>）よりダウンロードできます。なお、題名は、できるだけ能動態で動的なタイトルをつけてください。（例：__は__である。__は__する。）

問い合わせ先：

〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1

大阪府立大学大学院理学系研究科 藤井 郁雄

TEL：072-254-9834

第10回 バイオ関連化学シンポジウム

(第31回 生体機能関連化学シンポジウム、第19回 バイオテクノロジー部会シンポジウム)

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

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

共 催：日本化学会(生体関連化学・バイオテクノロジーディビジョン)、日本薬学会、日本生物工学会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト・超分子化学研究会

会 期：9月7日(水)～9日(金)

会 場：石川県立音楽堂 もてなしドーム地下イベント広場
〔交通〕JR 金沢駅 東口 エスカレーターを降りてすぐ

発表申込締切：6月29日(水)

予稿原稿締切：7月15日(金)

参加登録予約申込締切：7月22日(金)

討論主題：ペプチド・タンパク質・核酸・脂質、そして分子認識・超分子・モデル系などが関連する幅広いバイオ関連化学

発表形式：口頭発表・ポスター

申込分類：

- 1) 分子認識・超分子・モデル系、2) ペプチド・蛋白・酵素、3) 核酸関連、
4) 糖・脂質、5) メディカルバイオ、6) 環境バイオ、7) 分析・計測・センサー・デバイス

◎ポスター発表：原則、1日目および2日目。

◎口頭発表：全日で15分発表、5分質疑。

*口頭発表は原則として1研究室1件まで。但し、申し込みは2件まで可。

発表申込方法：WEBサイトから (<http://jointsympo.csj.jp/>)

参加登録費：

(事前) 部会員：一般 7,000円、学生 3,000円、
非部会員：一般 9,000円、学生 4,000円

(7月22日以降、当日) 部会員：一般 9,000円、学生 5,000円、
非部会員：一般 11,000円、学生 6,000円

懇親会：9月8日(木) ANA クラウンプラザホテル金沢にて開催

参加費 8,000円(当日申込も可能)

参加登録予約申込方法：WEBサイトから (<http://jointsympo.csj.jp/>)

申込先/問合先：

923-1292 石川県能美市旭台1-1

北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス系

第10回 バイオ関連化学シンポジウム

実行委員会 高木昌宏

電話/FAX (0761)51-1650

E-mail: takagi@jaist.ac.jp

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

第 43 回国際核酸化学シンポジウム
The 43rd International Symposium on Nucleic Acid Chemistry 2016, ISNAC2016
<http://isnac2016.org/>

主催：核酸化学シンポジウム組織委員会

協賛：日本化学会、日本薬学会、日本分析化学会、高分子学会、中分子戦略、熊本大学

日時：2016 年 9 月 27 日（火）～29 日（木）

会場：くまもと森都心プラザ 5 階プラザホール（〒860-0047 熊本市西区春日 1-14-1）

おもなトピックス：

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

参加要領：

発表申込：2016 年 4 月 11 日～6 月 17 日

要旨提出：2016 年 4 月 11 日～7 月 8 日

事前参加登録：2016 年 4 月 11 日～8 月 12 日

参加登録費 一般：事前 30,000 円、当日 35,000 円

学生：事前 10,000 円、当日 15,000 円

発表申し込み、要旨提出、参加登録などのすべての手続きはウェブサイト(<http://isnac2016.org/>)を経由して行って下さい。参加登録費のお支払いはクレジットカードまたは銀行振込でお願いします。

問合先：井原敏博（熊本大学大学院自然科学研究科）

E-mail: isnac2016@nta.co.jp（事務局）

Tel: 096-342-3873, Fax: 096-342-3679



第43回 国際核酸化学シンポジウム

ISNAC2016
The 43rd International Symposium on Nucleic Acid Chemistry 2016

Period September 27 (Tue) – 29 (Thu), 2016
2016年9月27日(火)～29日(木)

Venue Kumamoto Shintoshin Plaza
くまもと森都心プラザ 〒860-0047 熊本市西区春日1丁目14番1号

Organizer Prof. Toshihiro Ihara Kumamoto University
井原 敏博 (熊本大学大学院自然科学研究科)

Invited Speakers

- Marvin H. Caruthers University of Colorado, USA
- Vyacheslav V. Filichev Massey University, New Zealand
- Piet Herdewijn Rega Institute KU Leuven, Belgium
- Christian J. Leumann University of Bern, Switzerland
- Kazuo Sakurai The University of Kitakyushu, Japan
- Dmitry A. Stetsenko Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia
- Weihong Tan University of Florida, USA; Hunan University, China
- Xinghua Xia Nanjing University, China
- Danzhou Yang The University of Arizona, USA
- Steven C. Zimmerman University of Illinois, USA

Important Dates

- Paper Application April 11 (Mon) – June 10 (Fri), 2016
- Abstract Submission April 11 (Mon) – July 8 (Fri), 2016
- Early Registration April 11 (Mon) – August 12 (Fri), 2016

Visit the following Web-site for the detail
<http://isnac2016.org/>

第26回 バイオ・高分子シンポジウム

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

開催日：7月28日(木)、29日(金)／懇親会28日(木)

会場：東京工業大学西9号館 デジタル多目的ホール

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きます。

- (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

発表形式：

- 1. 学生奨励ポスター発表
- 2. 若手研究者奨励発表
- 3. 一般発表：口頭発表（時間20分：発表12分、討論8分）または
ポスター発表

参加要領：

参加者は全員参加登録制です。参加申込は4月中旬より開始します。

1)参加費

- ①企業・大学・官公庁 7,560円
- ②バイオ・高分子研究会メンバー 5,400円
- ③学生・ゴールド・シニア会員 3,240円

2)懇親会参加費： 学生以外 5,000円、学生 2,500円

詳細・申込：<http://www.spsj.or.jp/entry/>

受賞



片山 佳樹(九州大学 教授)

平成27年度 第33回 日本化学会学術賞

「ペプチドグラフト高分子による疾患細胞特異的遺伝子制御分子システム」

(2016年3月)

松浦 和則(鳥取大学 教授)

平成27年度 第33回 日本化学会学術賞

「生体分子認識に基づいた機能性バイオマテリアルの創成」

(2016年3月)

馬場 嘉信(名古屋大学 教授)

平成28年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞 研究部門

「ナノバイオデバイス創製とゲノム医療応用に関する研究」

(2016年4月)

塩谷 光彦(東京大学 教授)

平成28年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞 研究部門

「生体情報分子を用いた精密金属配列化に関する研究」

(2016年4月)

大神田 淳子(京都大学 准教授)

第21回 日本女性科学者の会奨励賞

「タンパク質間相互作用を調整する合成分子の創製」

(2016年5月)

異動



水上 進

東北大学多元物質科学研究所 教授

2016年4月1日付

E-mail: shin.mizukami@m.tohoku.ac.jp



編集後記

4月14日夜、および16日未明の2度の大きな地震で熊本はかつてないほどの被害を受けました。先の見えな
い日々の単調な作業の中、多くの方々から頂いた暖かいお見舞いの言葉が心に沁みました。この場をお借り
して心からお礼を申し上げます。大学は 5月9日から学生が戻って講義がはじまり、当研究室も6月中旬くら
いから少しずつ実験を再開することができています。幸い、熊大全体でも地震による学生の怪我はほとんど
報告されていませんが、機器類などの資産に関しては研究室の被害は甚大です。これから、私たちの本当の
復旧が始まるのかもしれません。

今回も力作ぞろいの夏号 (No. 51) をお届けすることができます。お忙しい中、締め切りを守って執筆し
て下さった皆さんには心からお礼申し上げます。次号 (No. 52) は、松浦さんの担当により、2016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28年 6月23日

井原 敏博

熊本大学大学院 先端科学研究部
(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)

