

# 生命化学研究レター

(2019年4月)

## 2. 巻頭言

それでも「論文」をださなければならない？！

北里大学大学院理学研究科 石田 齊

## 5. 研究紹介

### 5. Blinking 制御による核酸 1 分子分析

～1 分子の反応速度を測る～

大阪大学産業科学研究所 川井 清彦

### 11. エラスチンの可能性を拓く

～自己組織化とバイオマテリアル～

名古屋大学大学院工学研究科 鳴瀧 彩絵

### 17. 細胞の分子夾雑環境における核酸構造と核酸構造リガンドの挙動

～細胞内でも望みの機能を発現する分子の合理設計に向けて～

甲南大学フロンティアサイエンス学部 三好 大輔

## 22. 論文紹介「気になった論文」

東北大学多元物質科学研究所 西嶋 政樹

東京工業大学生命理工学院 三木 卓幸

## 28. 留学体験記

Northwestern 大学留学体験記

東京工業大学生命理工学院 佐藤 浩平

## 32. お知らせ

会告・異動・受賞

編集後記

# 巻頭言

## それでも「論文」をださなければならない？！

北里大学大学院理学研究科 石田 斉

今世紀に入って、日本は毎年のようにノーベル賞受賞者を輩出しているが、そのたびに判を押したように、日本の研究環境の現状が憂えられ、将来はこんなにノーベル賞は出ないだろうと悲観的な予想が指摘される。その根拠の一つになっているのが、日本の論文数が減少している現状である。全米科学財団(NSF)が発表したScience and Engineering Indicators 2018によると、2016年の論文数世界ランキングでは日本は中国、アメリカ、インド、ドイツ、イギリスに次いで第6位であり、論文総数が減少傾向にあるのは日本だけだという。本庶 佑先生(2018年ノーベル医学・生理学賞受賞)は、短期間に成果が出る研究に研究費が割り振られる現状に危機感を訴えられている。国立大学は法人化以降、運営費交付金はどんどん減り、私立大学の私学助成も減少の一途をたどる。必然的に研究は外部資金で行わざるを得ず、外部資金は「短期間に成果が出る研究」を行う研究者が獲得しやすいために、本庶先生が懸念される事態を招く。いやそれどころか、自身が行いたいと思う研究方針を曲げて(?)、防衛装備庁が公募する研究助成に応募せざるを得なくなるのでは、本末転倒であろう。

研究環境と研究費、研究成果、そして論文数は密接に関係している。研究成果を論文数で評価することが、内容そのものを評価するよりはるかに容易であるからだ。基礎研究が重要であり、なかなか論文まで結びつかないことは、多くの研究者が理解している。しかし、研究費をどの研究に振り分けるかを定める側は、成果が上がる研究を優先しないわけにはいかないだろう。逆に言えば、どの基礎研究が重要であるかを正しく評価できる目利きが少ないことが問題である。研究費を割り当てられた側も、もらったら終わりではなく、成果を上げなければ次がないことはわかっている。成果とはすなわち論文であり、審査員が優秀であれば、科研費申請書から研究業績リストがなくなっても、ちゃんと見透かされているはずなのである。

やっぱり論文はださないとなあ・・・



最近、ハゲタカジャーナルが話題になった。オープンアクセス(OA)ジャーナルが出始めてから、いろいろな問題が起こっているようだ。読むほうではなく、論文を出す方がお金を払う、このシステムを、文科省は最初から推奨している。科研費などの研究費は元は税金であるから、誰でも無料で読めるこのシステムを利用しなさい、というのは筋が通っているように思える。しかし実際には日本にはこのお金を補助する仕組みは存在しない。それを思い知らされたのは、あるOA出版社から本の執筆を依頼され、脱稿するときに、サポートを受けられるサイトを紹介された時だった。国別に国旗が並んでいて、国旗をクリックするとその国でOA費用の補助申請ができるサイトが出るというものだったのだが・・・日本がなかったのだ。今は日本の国旗はでているが、開いても学振やJSTなどのサイトへ飛ぶだけである。その頃、たまたまRSCの*Chemical Science*に投稿し、「お前はラッキーだ」というメールが来て、Golden OAを始めると連絡を受けた。考えてみると、オープンアクセスに出せるのは研究費が潤沢な人で、我々はGolden OAを狙うのが健全なのかもしれない。

毎日のように、インバイトするから論文投稿しないかというメールが来る。これがいわゆるハゲタカジャーナルなのかもしれない。出版するのに3,000ドルくらいとられるらしいが、ジャーナル自体のインパクトファクター(IF)が低くても、出した論文がGoogleに引っかかってさえくれれば無料で読んでもらえるわけだし、別にいいような気がする。何よりメ切を設定されるので、頑張っ書こうという気になるだろう。私はお金がもっていないのでやらないが、投稿しようという人の気持ちは理解できる。ただ、問題はその査読(ピアレビュー)にあるようだ(栗山正、「ハゲタカオープンアクセス出版社への警戒」*情報管理*, 2015, 58巻, 2号, p. 92-99 (<https://doi.org/10.1241/johokanri.58.92>)). これらのジャーナルに嘘の論文を投稿したら、そのほとんどが採択されたというのだ。

査読は悩ましい別の問題である。日頃、周囲に議論できる人がいなくて、自分なりにベストを尽くして作成、投稿した時に、査読者から思いがけず建設的な良い意見を聞けたりすると、投稿してよかったと思えるが、そういうことのほうがむしろ少なく、「ちゃんと読んでるのか」「本当に専門家か?!」と思わず悪態をつきたくなるようなコメントが来ることの方が多い。査読は、同じ分野に一定数の研究者が関わっているような場合は有効かもしれないが、他の人がやらない、新しい、それも基礎的なことを研究していると、なかなか理解されず、いいコメントがもらえないようにも思う。私は縁あって、*Frontiers in Chemistry*のAssociate Editorをさせていただいている。2017年のIFは4.155と、至極まともなジャーナルだと思っているが、その査読システムは随分違って、査読コメントがweb上に出版されて、査読者に対して何度も回答、反論などを繰り返して議論することができる。著者が粘り勝ちできるのではないかと懸念する人もいるが、査読者の間に名前が知られていなくて、結果の信ぴょう性を疑われたりするために論文が採択されないような場合には、査読者を説得できる有効なシステムであるような気もしている。ただ、査読を引き受けてくれる人がなかなか見つからず、Editor泣かせではある。

でも、論文を書く時間がとれないなあ・・・



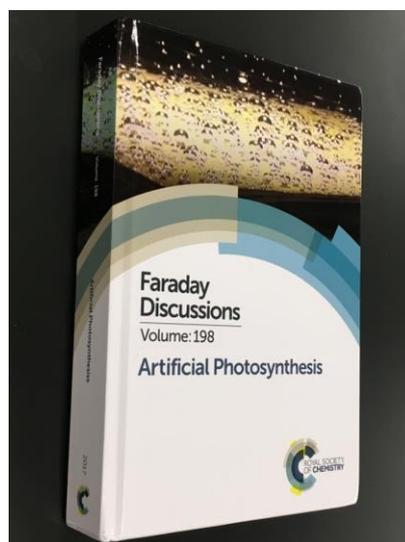
大隅良典先生(2016年ノーベル医学・生理学賞受賞)は、今の大学教員が忙しすぎることを指摘されている。忙しくても論文を出さないといけなく、となると、無理やりメ切を作るという方法がある。先に挙げたハゲタカジャーナルは問題があるかもしれないが、私が経験したFaraday Discussionを紹介したい。2017年3月に京都でArtificial Photosynthesis Faraday Discussionが開催され、その前年に参加を申し込んだ。この会議で講演(口頭)するためには事前にFaraday Discussionsに投稿する必要がある。2017年のIFは3.427とそれほど高くはないかもしれないが、RSCにおいて長い伝統のあるジャーナルである。通常の査読プロセスを経て論文はアクセプトされ、会議の前に集まった原稿が参加者に送られ、事前に予習することができる。会議当日は何人かのグループにまとめられ、短い時間ではあるが一人ずつ論文の概要を説明し、そのままステージに残る。その後、会場から質問が出て、それに答えながらディスカッションをしていくのだが、それがすべて記録として残され、最終的には論文とそのディスカッションが併せて掲載されるというものである。論文を書くだけでなく、実際に議論もしなければならぬため、ハードルは高いが、かなり密度の高いディスカッションを経験することができる。ちなみに、このときの会議が日本で初めて行ったFaraday Discussionだったそうである。

月日の経つのが早くて、どんどん年度末が近づくのに、なかなか論文が仕上がらなくて、つい愚痴のような話を書かせていただいたが、そうしている間に気になることが2つあった。

一つは数学の超難問といわれる「リーマン予想」を、英エディンバラ大名誉教授の先生が「偶然解けた」と投稿した論文が、検証中に先生が亡くなられたために論文が撤回されたというニュースである(朝日新聞2019年1月26日)。この先生は享年89歳で、投稿先は英王立協会が発行する科学誌と書かれており、査読途中であったとしても、Editor判断で査読意見とともに掲載するなどすればいいのに、と思わなくもないが、89歳で論文出したのか、ということに驚いた。もう一つは私事であるが、父親が入院し、一時期、危篤状態になったときに起こった。家族が集まり、見守る中、近くで父の面倒を見ていた妹が、「ベットの脇に投稿中の論文がある」と言い出した。共著者の先生から父の携帯に電話があり、査読意見が返ってきて、修正のうえ再投稿しないといけなく、進んでいますか、ということだった。父は88歳で、今年、89歳になる。

その後、幸いなことに父は奇跡的に回復した・・・それでも「論文」をださなければならない?! 次は、研究の終活について考えないといけないだろう!!

論文  
総



研究紹介

Blinking 制御による核酸 1 分子分析

～1 分子の反応速度を測る～

大阪大学 産業科学研究所

川井 清彦

(kiyohiko@sanken.osaka-u.ac.jp)



1. はじめに ～有機合成から、時間分解分光による反応速度の測定へ～

学生時代、齋藤烈先生、杉山弘先生のご指導の下、修飾核酸の合成によるDNA構造の制御、その熱力学的安定性、光反応生成物の分析に関する研究に取り組んだ<sup>1</sup>。また、4回生の後期半年間は、中條善樹先生のご指導の下、機能性高分子の研究を行った。私の学会デビューは日本化学会年会の高分子セッションで、タイトルは「三塩化ホウ素と末端ジイン類のハロボレーション重合」であった。このように、学生時代は合成化学科(大学院から合成・生物化学専攻)に所属し、文字通り合成化学を基盤とした研究を行った。学位取得後すぐに、レーザー(光)、電子線パルス(放射線)をトリガーとした時間分解分光測定により、現象を反応速度に基づき説明する研究室に職を得た。引き続き有機合成をベースとして修飾核酸の合成、そして、その時間分解分光測定により、DNA内に生じたホール(正の電荷)の移動機構<sup>2-11</sup>、DNA一電子酸化損傷機構<sup>12-15</sup>、DNA構造転移ダイナミクス<sup>16-17</sup>等に関して研究を行った。同時に、解き明かされた速度定数に基づく核酸構造の分析法の開発を目指した。ここで大きな問題点として、時間分解分光測定には多量のサンプル(通常は10 nmol以上)と大掛かりな装置が必要であり、貴重な生体試料などを対象とした分析法や診断法とはなりえなかった。我々は、2段階の情報増幅、すわなち、PCRによるターゲットDNAの増幅と、光触媒的ヨウ素生成により、DNA中の1塩基多型をヨウ素デンプン反応で読み出せることを報告した(図1)<sup>18</sup>。DNA内の光電荷分離、ホール移動という複雑な現象を紐解いて各素反応の速度定数に基づき制御し、我々日本人が小学校で習うヨウ素デンプン反応で読み出すことは、化学者が目指す1つのゴールではないかと当時は考えていた。杉山先生の「シンプルなもの美しい」という教えによるものかもしれない。しかしながら、最先端の装置を用いた測定が有力紙を飾る今の時代では、あまり評価されず引用もされていない。このテーマは、卒業後学校の先生になることが決まっていた学生さんに、もっと研究に興味を持ってもらおうと「高校の化学の便覧に載っている反応を使って、将来生徒さんに自分の研究を説明できるようにしよう！」との思いから、化学便覧を見ながら学生さんと一緒に考えたテーマである。学生さんは卒業の最後の最後まで実験を頑張ってくれて、そういう意味では本研究は大成功であった。将来学生さんの教え子が研究の道を目指してくれれば大成功と言える。こんな遊び心で研究をしている研究者は、今の日本にどれくらいいるだろうか? 「研究には遊び心が必要だ」という概念は、合成化学科で受けた教育、そして、両親の子育てにより私の中に植え付けられたのではと思っている。「だから君は駄目なんだ・・・」という人もおられようが、誰よりも研究を楽しんで生きて行きたいと思う。

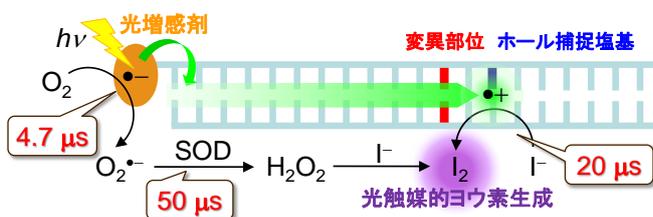


図 1. ヨウ素デンプン反応による点変異の検出

## 2. 1分子蛍光観測による反応速度の測定 ～blinkingとの出会い～

時間分解分光で得られた知見を分析法や診断法などに活用するためには、どうしても上述のヨウ素デンプン反応のような工夫が必要となる。現象を解き明かすのと同時に、そのままその測定法を分析・診断に使うことはできないか？ 反応速度を測るためには、しばしば「よーいどん」で分子たちの反応を一斉に開始する必要がある。時間分解分光では、レーザーパルスが反応を開始し(図2A)、分子を混ぜることにより平衡をずらし反応を開始する手法がストップフロー法である。一方筆者は2000年初頭より、柳田敏雄先生の助けられた1分子蛍光観測に魅了された。1分子観測では、1分子しかいないので、反応の同期をとる必要が無い！ 筆者は、1分子蛍光観測特有の現象である、蛍光が点滅して観測される現象＝blinkingに着目した。blinkingは、光を吸収し発光するサイクルを繰り返している分子が(この状態がblinkingにおけるON状態)、何らかの理由により光らないOFF状態になることにより観測される。ON状態にいる時間( $\tau_{ON}$ )から、その逆数としてONからOFFへの転移速度が、OFF状態にいる時間( $\tau_{OFF}$ )の逆数から、OFFからONへの転移速度が求められる(図2B)。ここで、OFF状態が光反応により生じる場合、OFF状態の時間を測ることにより、レーザー時間分解分光で求めていた速度を1分子蛍光観測で求めることができる！ 合成化学者の立場からは、極微量のサンプルで測定ができることも大きな魅力である。我々は、blinkingを制御・活用することに基づいた1分子レベル分析・診断法の開発を進めており(**K**inetic **A**nalysis based on the **C**ontrol of the fluorescence **B**linking: **KACB**法)、実験結果の一例を下記に紹介する<sup>19-22</sup>。ちなみに、KACB法は「手法に名前をつけて研究をアピールしましょう」という丸山厚先生のご指導によりネーミングいただいたものである。

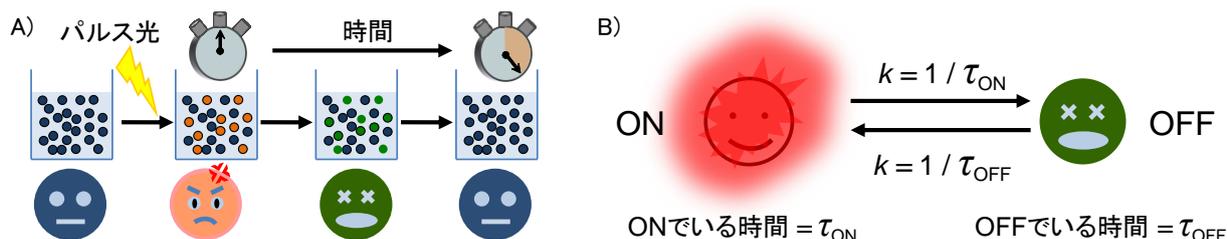


図 2. 反応速度の測り方。A) 反応を同期 (よーいどん)、B) 1分子測定

## 3. 溶液中の分子のblinking測定 ～オリンパスMF20を用いたハイスループット測定～

blinkingは共焦点顕微鏡を用いた蛍光相関分光 (Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS) を用いて、マイクロ秒の時間分解能で測定することができる。「誰でも、簡単に、再現性良く測定できる」重要性を学生時代に説かれていたため、384のマイクロウェルに分注するだけで測定できる、オリンパスMF20に着目し、丸山厚先生に共同研究をお願いし、blinkingの研究をスタートした。最初に、DNA内で発生させた光電荷分離状態の寿命測定を行った。蛍光分子を光増感剤として用いると、電荷分離状態では光ることができないラジカルアニオン状態、すなわちOFF状態となる。OFF状態の長さが電荷分離寿命に対応する。筆者らは、DNA光1電子酸化損傷について長く研究し、ラジカルアニオンと酸素の反応速度が損傷効率に大きく寄与することを見出していた<sup>15</sup>。ラジカルアニオンと酸素との反応速度が遅いATTO 655を用いることにより、DNA損傷にいたることなく、DNA内の光電荷分離過程の観測に成功した(図3)<sup>19</sup>。時間分解分光測定との整合性を確認し、我々の測定条件で約1万分の1のサンプル量での測定を達成した。しかしながら、溶液中を分子が自由に拡散している本測定では、nMで数十 $\mu$ L程度、即ちまだ約 $10^{11}$ の分子が必要である。

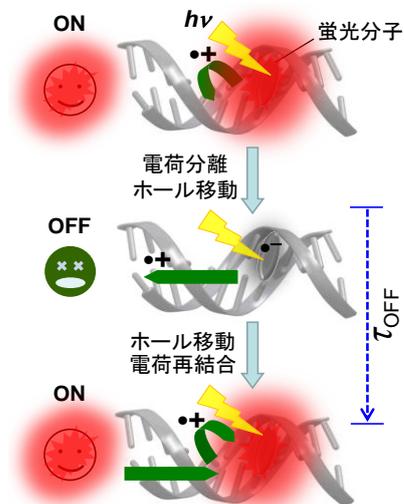


図 3. DNA 内光電荷分離の観測

#### 4. アボガドロから1分子へ ～分子間電子移動速度の1分子測定～

真に1分子からのFCS測定を行うためには、1分子を固定して観測する必要がある。2013年にJSTさきがけに採択され、ようやく1分子蛍光観測の装置を立ち上げることができた。これまで、さきがけ、日本化学会進歩賞、教授公募など、面接の失敗率は9割を超え(つまり10回以上落ちている)、採択いただいたのはこの一回だけである。相当な時間と精神力を消耗したこと、アカデミアのレコードホルダーではないかなどということはさておき、採択いただいた加藤隆史総括には心から感謝申し上げる。Tinnefeldらは、酸化剤と還元剤を共存させることにより、蛍光分子の光退色を抑制できることを報告していた<sup>23</sup>。この際、蛍光分子が一電子還元された、ラジカルアニオンをOFF状態としたblinkingが起こり、酸化剤による一電子酸化速度を1分子測定することができる。我々は、分子間電子移動が蛍光分子周辺の環境により変化するよう系を設計することにより、blinkingによる核酸構造読みわけを試みた。蛍光分子としてATTO 655をDNAに結合し、還元剤としてリン酸化ビタミンC(VcP)、酸化剤としてFeDTPAを用いて、酸化還元由来するblinkingを制御しDNAのヘアピン構造と二本鎖構造の読みわけを行った。図4Aに示したように、前後が単環のピリミジン塩基チミン(T)となる部位に鎖内アミノリンカーを介して蛍光分子を配置し、ATTO 655がヘアピンループの一本鎖領域にあるときは溶液に突き出すのに対し、二本鎖領域にある時は鎖内に埋没するよう分子設計した。酸素のような小さな酸化剤では、二つの構造を明確に読み分けることは難しい。本研究の1つのポイントは、かさ高い酸化剤としてFeDTPA、そして、FeDTPAとは直接は電子移動反応しない生体適応性の還元剤としてVcPを用いる点にある。アビジン-ビオチン相互作用を利用してDNAをガラス基板上に固定し、共焦点顕微鏡を用いて1分子から放たれる蛍光の揺らぎを観測した。図4Bを一目見てわかるように、ヘアピンループ部位で蛍光分子が溶液に突き出しているときは速い蛍光の揺らぎが、蛍光分子が二本鎖部位にある時は遅い蛍光のゆらぎが観測され、blinkingの制御・観測によりDNAのヘアピン構造、二本鎖構造の読み分けに成功した。なお、ここで用いている蛍光分子修飾DNAは、通常はヘアピン構造であるが、ターゲット鎖存在下で二本鎖構造を形成するモレキュラービーコンタイプ型プローブとして機能する。すなわち、図4Bはたった1分子のDNAの検出に成功していることを意味する。酸化剤FeDTPAの濃度を変えてblinkingを観測し、OFF状態の長さ、すなわち、ラジカルアニオンの寿命を測定し、その逆数を図4Cにプロットした。この図は、学生実験でもしばしば行われるStern-Volmer plotで、傾きから分子間電子移動速度が求められる。電子移動速度は、二本鎖とヘアピンループで約11倍変化し、blinkingの観測により構造転移を観測できることが示された。ラジカルアニオンと酸化剤の電子移動速度は、通常は時間分解分光で求められるが、200分子程度のDNA、すなわち、実に $10^{12}$ 分の1のサンプル量で測定が達成されたことになる<sup>21</sup>。

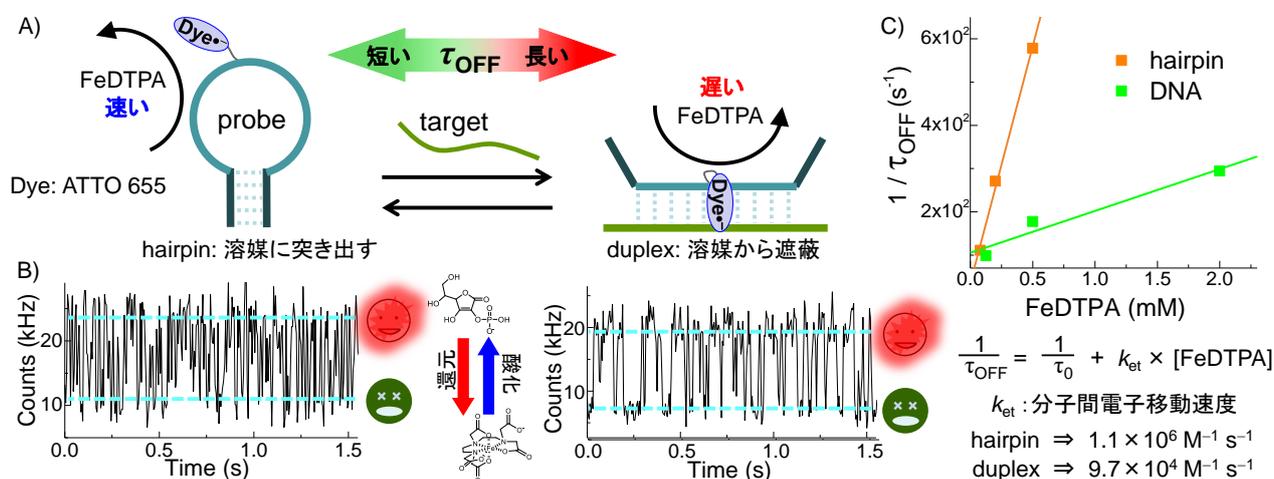


図4. 電子移動速度の1分子測定: A) プローブ設計、B) 蛍光強度のゆらぎ、C) Stern-Volmer plot

### 5. KACB法によるriboswitchの構造転移ダイナミクス ～構造転移速度の1分子測定～

一歩進んで、KACBをriboswitch構造転移の観測に応用した。riboswitchは、ターゲット分子と結合し遺伝子発現の調節を行う天然に存在するRNAである。我々は、図5Aに示した2状態I, IIの平衡にあるpreQ1 riboswitchに注目し、状態Iの時は遅いblinking、状態IIの時は速いblinkingが観測されるように分子設計し、構造転移速度の測定を行った。preQ1が無い時、ある時で、各20分子のRNAのblinkingを測定し、速いblinking、遅いblinkingの2状態間の転移を観測し、各状態で存在した時間のヒストグラムを作成した。状態Iのヒストグラムから、状態IからIIへの転移速度がわかり、状態IIのヒストグラムから状態IIからIへの転移速度がわかる。状態IおよびII間の平衡定数は、ウリジンの5位のフッ素化とNMRを用いて、preQ1の存在下で平衡が右に傾くことがMicuraらにより報告されており<sup>24</sup>、我々はこの実験結果を再現することができた。NMRは過渡分光測定に増してサンプルを多量に用いるが、今回はわずか40分子で測定を達成し、かつ、初めてpreQ1 riboswitchの構造転移速度を決定することができた。何故40分子かという、わずかな分子数で測定できることを謳うためと、もう1つは実験から解析まで45歳のおじさん1人で行っており、特に解析がしんどかったからである。なお、本データはFRETを用いても工夫すれば得られるかもしれない。構造転移観測におけるKACBとFRETを比較すると、FRETの方がより速い構造転移を観測できるが、蛍光分子間の距離が大きく変わるような構造転移しか観測できない。一方、KACBでは0.5秒程度の時間分解能であるが、蛍光分子周辺のわずかな構造変化を読み出せる。KACBがFRETの相補的な分析法として使われるよう、その発展に日々取り組んでいる。

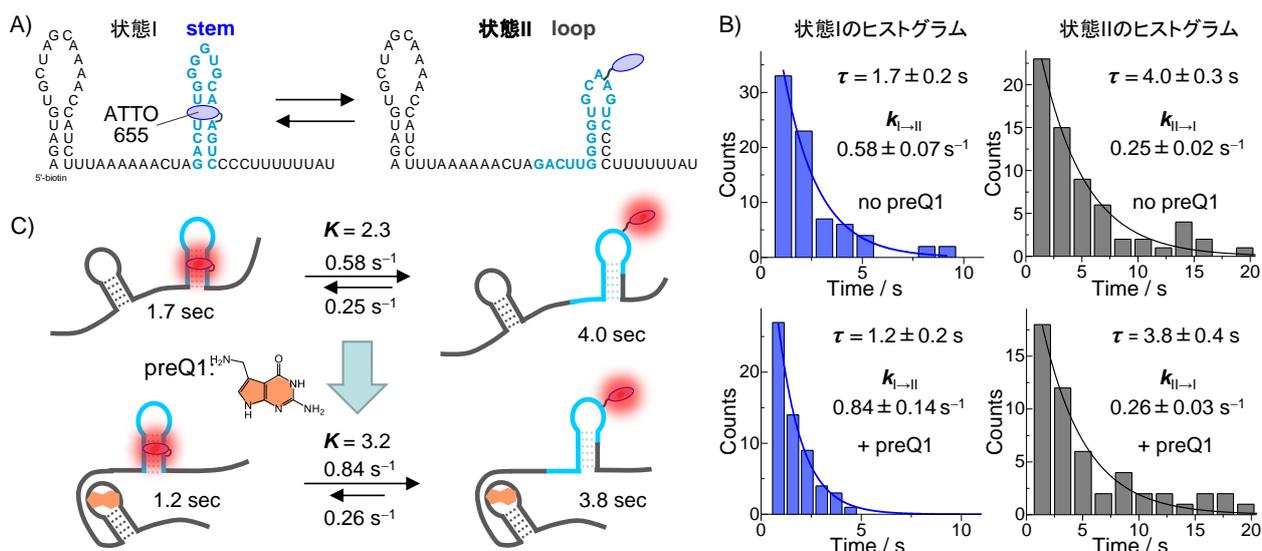


図5. riboswitch 構造転移の1分子観測、blinking の変化から状態I⇌IIの構造転移を観測：A) preQ1 riboswitch の配列。B) 状態I, IIの持続時間のヒストグラム、C) 構造転移速度、平衡定数

### 6. 人生に風を起こす ～45歳おじさんの留学～

45歳になり留学もあきらめていたそんな折、産業科学研究所が採択されているJSPSの頭脳循環プログラムにより、ベルギーLeuvenにあるimec研究所への留学機会をいただいた。Google Mapを立ち上げ、ベルギーの位置を確認するところから留学の準備が始まった。imec研究所は、半導体産業で世界トップレベルの研究所であり、化学系雑誌への論文発表がほとんどなく、最初は躊躇した。1人で実験しているため、留学すると1分子観測の研究は完全にストップしてしまう。しかし、燻っている人生に変化を起こすにはこのチャンス逃す手は無いと考え、留学を決意した。プライベートでは、父の留学により幼少期に2年間アメリカSan Diegoで過ごさせてもらったので、自分の子供達にも留学の機会を与えられる喜びがあった。imecではPhotonic Waveguide(光導波路)上での1分子蛍光観測に取り組んだ。ベルギーに到着してすぐ、疲れきつ

たまま出席した蛍光の国際会議(Methods and Applications in Fluorescence: MAF@Bruges)で2人の研究者に出会えた。1人は、1分子蛍光観測の速度論で著名なドイツLMUのPhilip Tinnefeld教授。強引に売り込んで、のちに招待講演でよんでいただいた。超解像顕微鏡でのノーベル賞に届かず、本人ではなくまわりのスタッフが悔しそうにしていたのがチームとしての団結を感じさせ印象的だった。もう1人は、PacBioの次世代シーケンサー(RSII+)を1分子蛍光観測に用いているスイスZurich大学のJens Sobek博士。RSII+を用いると、150,000のzero mode waveguide(ZMW)内にある各1分子からの蛍光を、クリック1つでハイスループットに測定できる。恥ずかしながら1分子蛍光観測に転用できることに講演を聞くまで気付かなかった<sup>25</sup>。私が、MF20を本来の使用目的からblinkingの観測に転用しているように、JensもRSII+を本来のシーケンサーとしてではなく、1分子蛍光観測に用いて1人で実験しており、非常に親近感を覚えた。帰国間際にチューリッヒを訪れ、実際に測定させていただき、共同研究をスタートした(図6)。



図6. PacBio RSII+@チューリッヒ

ベルギーに着いてだいぶ日を経てから知ったが、実はimecで私が所属した部署はPacBioの最新のシーケンサー(Sequel)の共同開発に関わっていた(imecは会社なので具体的なことが書けなくて残念)。現行の時間分解能は10 ms程度で、私が扱ってきた1分子blinkingには不十分なものの、原理的には測定数を150,000から、100分の1の1500に減らせば、0.1 msの時間分解能を達成できる。そう、blinkingの社会実装は可能なのだ。装置開発につながるよう、blinkingの研究をより発展させようとの希望を胸に帰国の途に着いた。MAFに出席したのは、imecと繋がり深いKU-LeuvenのJohan Hofkens教授にご推薦いただいたからで、そのおかげでJensらとの出会いがあった。派遣予定者の急遽変更によりいただいた機会だが、結果的には誰かにすべてをコーディネートいただいたかのような、非常に有意義な1年間であった。おじさんの留学の利点は、年をとってあつましくなっていることだろうか。頼み込んで企業との共同プロジェクトに参加したり、招待講演に呼んでもらったり、講演におしかけたり。日本の専門学校に相当する機関で、アウトリーチ活動もした。博士取得後すぐだったら、実験だけして終わっていたであろう。子供達が大きくなっており、いろいろな経験ができたと思う。8歳だった長女は、わずか4ヶ月で私の英語を直し出し、嬉しさよりショックがまさり、あわてて英語アプリをダウンロードし対抗したが焼け石に水だった。子供達は英語を話しだし、日本語教師を経験した妻は外国人児童に日本語を教える小学校教諭としての職を得た。肝心の私はいとうと、First Draftを先方に送り3ヶ月経ったがまだ投稿に至っていない、頑張らねば。

学生の皆さん、応用に直結したサイエンスを目指すのであれば、imecは非常に魅力的なPD先ですよ。imecは、世界でも例が少ない大学と企業の橋渡しで成功している研究所で、働いている研究者の2割程度は学生、ポスドク、教授などのアカデミア。大部分は企業とのプロジェクトに関わっており、学生のうちから世界の企業が次に(あるいはずっと先に)何を狙っているか、最先端の研究に触れることができる。また、imecは所内発のベンチャーの立ち上げにも積極的で、私の隣に座っていた学生はマーケティング等の様々な指導を受け、卒業後にimec発ベンチャーの幹部になると聞いた。imecの活動の一部なので、imec内で仲間を集めて起業することは遠い夢などではありません、是非挑戦されて下さい。私がいた隣の部署では、DNA合成のできるPDを募集していたように、学生諸君のスキルに合う応募があるかもしれません。

最後にどうしても一言書かせていただきたい。この留学で受けた一番大きなインパクトは、何故我々日本人はこれほど時間に追われているのかというカルチャーショックであった。道路は突然通行止めとなり、何ヶ月もバスが来ない、深夜に工事なんてしない。バスの運転手が道を間違える、バス停で待っていた乗客が家にスマホを忘れたから待ってくれとバスの発車が遅れる。お店では働いている人の方が偉く、日曜日

はスーパーも百貨店も閉まっている。店員が長蛇のレジを放棄して、尋ねてきた彼氏にキスをしにいく。誰一人として文句を言わない。皆が互いに寛容であるから、夕方5時半には皆帰宅し道路から車が消えるのではなかろうか？日本人は私も含め、同じ日本人には厳しすぎると思う。丁寧で緻密な日本の良さや強みを残したまま、個々がより多くの自分の時間を使えるようになれないものだろうか。誰かに文句を言われたいため言い訳となる書類を用意するようなことに膨大な時間を使うのは、あまりにもったいないと考えさせられた。

## 7. おわりに

本研究は、東工大生命理工の丸山厚教授との共同研究で行わせていただきました、熱く御礼申し上げます。研究テーマを自由に選び研究させていただいた真嶋哲朗名誉教授、本稿で紹介したDNA内ホール移動、光電荷分離の研究を一緒に行ってくれた卒業生の小寺遥さん、松谷恵利さんに感謝します。1分子蛍光顕微鏡の立ち上げのご指導をいただいた、大阪大基礎工学部、伊都将司准教授、宮坂博教授に感謝いたします。本研究は、JSTさきがけ(「分子技術」加藤隆史総括)、文科省・JSPS科研費「基盤(B)」、新学術領域「レゾナンスバイオ」の研究助成により行われました、感謝申し上げます。留学の機会をいただいたJSPS頭脳循環プログラム、大阪大学産業科学研究所、imec、KU-Leuvenに感謝いたします。

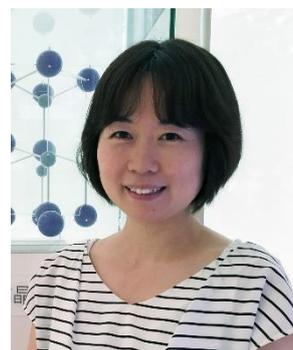
## 参考文献

- (1) Kawai, K.; Saito, I.; Sugiyama, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1391.
- (2) Kawai, K.; Takada, T.; Tojo, S.; Ichinose, N.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12688.
- (3) Kawai, K.; Takada, T.; Tojo, S.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6842.
- (4) Takada, T.; Kawai, K.; Cai, X.; Sugimoto, A.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1125.
- (5) Kawai, K.; Osakada, Y.; Takada, T.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12843.
- (6) Takada, T.; Kawai, K.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14002.
- (7) Osakada, Y.; Kawai, K.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 18072.
- (8) Kawai, K.; Kodera, H.; Osakada, Y.; Majima, T., *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 156.
- (9) Kawai, K.; Kodera, H.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 627.
- (10) Kawai, K.; Hayashi, M.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4806.
- (11) Kawai, K.; Hayashi, M.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9406.
- (12) Kawai, K.; Wata, Y.; Ichinose, N.; Majima, T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4327.
- (13) Kawai, K.; Takada, T.; Nagai, T.; Cai, X.; Sugimoto, A.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16198.
- (14) Kawai, K.; Cai, X.; Sugimoto, A.; Tojo, S.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2406.
- (15) Kawai, K.; Osakada, Y.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1049.
- (16) Kawai, K.; Miyamoto, K.; Tojo, S.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 912.
- (17) Kawai, K.; Yoshida, H.; Sugimoto, A.; Fujitsuka, M.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13232.
- (18) Kawai, K.; Kodera, H.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14216.
- (19) Kawai, K.; Matsutani, E.; Maruyama, A.; Majima, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15568.
- (20) Kawai, K.; Maruyama, A., *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4861.
- (21) Kawai, K.; Miyata, T.; Shimada, N.; Ito, S.; Miyasaka, H.; Maruyama, A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15329.
- (22) Miyata, T.; Shimada, N.; Maruyama, A.; Kawai, K., *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 6755.
- (23) Vogelsang, J.; Cordes, T.; Forthmann, C.; Steinhauer, C.; Tinnefeld, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 8107.
- (24) Rieder, U.; Kreutz, C.; Micura, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 10804.
- (25) Sobek, J.; Rehauer, H.; Schauer, S.; Fischer, D.; Patrignani, A.; Landgraf, S.; Korlach, J.; Schlapbach, R., *Methods Appl. in Fluoresc.* **2016**, *4*, 015002/1.
- (26) 研究の詳細は: <https://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/kawairesearch.html> よく光る分子を合成の方、冷蔵庫に眠っているその分子、1分子では輝いているかもしれません！是非再プロデュースに関わらせてください！

## 研究紹介

## エラスチンの可能性を拓く ～自己組織化とバイオマテリアル～

名古屋大学 大学院工学研究科  
鳴瀧 彩絵  
(ayac@chembio.nagoya-u.ac.jp)



### 1. はじめに

皆さんは、エラスチンというタンパク質を知っていますか。エラスチンは、その名のとおり弾性 (elasticity) に関わる細胞外マトリックス (ECM) タンパク質で、血管、肺、皮膚、靭帯などに豊富に存在します<sup>1)</sup>。これらの組織において弾性線維を形成し、引っ張りに対する優れた復元性を示します。エラスチンの半減期は70年以上と長く、何十億回と繰り返される血管の脈動や、呼吸に伴う肺の伸縮を、生涯にわたって支え続けます<sup>2)</sup>。このようにエラスチンは、生体におけるゴム、というユニークな位置づけにあるタンパク質ですが、その安定性、すなわち不溶性ゆえに取扱いが難しく、基礎研究・応用研究ともに他の ECM タンパク質に比べて大幅に遅れていました<sup>3)</sup>。筆者は、この興味深いタンパク質を、バイオ研究の新しいプラットフォームとして世に送り出したい(エラスチンをメジャーデビューさせたい!)という目標のもと、研究に取り組んでいます。

### 2. エラスチンとの出会い

筆者の、広い意味での学術的興味は、自己組織化—混沌とした状態から秩序が生まれる現象—にあります。その原点は、学生時代、東京大学の加藤隆史先生のもとで、超分子液晶や無機結晶の美しい秩序構造に触れたことに遡ります。「バイオミネラリゼーションに倣う高分子/無機ハイブリッド材料の創製」で、2004年に博士の学位を取得しました。その後、東京医科歯科大学(現京都大学)の秋吉一成先生のもとで、ポスドクとして「高分子ナノゲル/無機ハイブリッドのドラッグデリバリー (DDS) 応用」に取り組み、自己組織化材料をバイオ分野に活用することに興味を持ち始めました。実は有機合成が苦手でしたが、それでも、自己組織化する分子を自分で設計して創りたい、という想いがあり、それを叶えてくれるのが遺伝子工学でした。カリフォルニア工科大学の David Tirrell 先生は、遺伝子工学を用いた人工タンパク質合成のパイオニアであり、研究テーマのひとつとしてタンパク質の自己組織化システムの開発に取り組んでおられました。筆者は2006年から Tirrell Lab でセカンドポスドクをする幸運に恵まれ、このときからエラスチン類似ポリペプチド (Elastin-like polypeptide; ELP) を触り始めました。後述しますが、ELP は天然エラスチンの配列を単純化した人工タンパク質であり、生理学的温度域に下限臨界共溶温度 (LCST) を持ちます。秋吉先生のナノゲルに着想を得て<sup>4)</sup>、ELP の LCST を、タンパク質のフォールディングを補助する人工分子シャペロンの機構に活用できないかと考えました。LCST 以上で疎水的となった ELP に変性タンパク質を捕捉させ、その後 LCST 以下に降温し、孤立空間でタンパク質の自発的なフォールディングを促すというアイデアです。しかし、絵に描いた餅は実現せず、フォールディングはほとんど起きないという結果に終わりました。10年以上を経た今となって、この原因がわかるような気がします。ELP は他のタンパク質を吸着しにくい性質があるので、おそらく変性タンパク質が ELP にうまく捕捉されなかったのでしょう。

### 3. ELP 研究の背景

生体内でエラスチンは、水溶性のモノマータンパク質(トロポエラスチン, 約 72 kDa)として細胞から分泌され、自己集合と、酵素による分子間架橋を経て成熟した線維状組織を形成します。トロポエラスチンは図 1 に示すドメイン構造を持ち、繰り返しアミノ酸配列に富んでいます<sup>5)</sup>。このうち、架橋ドメインはリシン(K)残基を多く含み、エラスチンの架橋反応の起点となります。一方、大部分のドメインは疎水的であり、プロリン(P)を多く含む領域と、グリシン(G)を多く含む領域に分類されます。Proline-rich ドメインはエントロピー弾性の発現と自己集合に関与しますが、Glycine-rich ドメインの役割に関してはコンセンサスが得られていません。Glycine-rich ドメインを化学合成して得たフラグメントはアミロイド様の線維を形成する傾向があることから、このドメインは自己集合やエラスチンの力学特性の制御に寄与するのでは、という説があります<sup>6)</sup>。

ELP は、エラスチン由来のアミノ酸配列から構成される人工タンパク質の総称です。ELP 研究のほとんどは、Proline-rich ドメインに頻出する Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (VPGXG) をポリマー化した (VPGXG)<sub>n</sub> に関するものです。1974 年に Urry らによって、この単純な (VPGXG)<sub>n</sub> がトロポエラスチンと同様に LCST を示すことが見出され、研究が活性化しました<sup>7)</sup>。(VPGXG)<sub>n</sub> は、水中で LCST 以上に加温されると、疎水的に凝集して水溶液から相分離(コアセルベーション)します。ここで、(VPGXG)<sub>n</sub> の X 位には、プロリン以外の任意のアミノ酸を置くことができ、そのアミノ酸の親・疎水性に応じて LCST が変化します<sup>8)</sup>。LCST を 37 °C 付近に設定するために V (バリン) が良く用いられますが、これを親水性のアミノ酸(たとえば E(グルタミン酸))に置換すると LCST が上昇し、より疎水的なアミノ酸(たとえば、F(フェニルアラニン))を用いると下降します。この温度応答性を利用して、(VPGXG)<sub>n</sub> 配列を持つ ELP を、DDS キャリアや、組換えタンパク質の精製用タグとして利用する研究が進展しました<sup>9,10)</sup>。また (VPGXG)<sub>n</sub> は β-turn 構造に富み、その水和構造と関連してエントロピー弾性を示します<sup>11)</sup>。リシンやシステイン残基を導入した (VPGXG)<sub>n</sub> を化学架橋してフィルムやゲルを構築し、細胞培養足場として利用した例も報告されています<sup>12)</sup>。ただし、ELP は細胞接着性に乏しいため、しばしば RGD 等の細胞接着性配列を付加して利用されます。さらに、(VPGXG)<sub>n</sub> 配列の特色として、血小板を粘着しにくい性質があり、抗血栓性のコーティング材料としての利用も進められています<sup>13)</sup>。血小板低粘着性の理由として、ELP のタンパク質の低吸着性との関連を指摘する論文もありますが<sup>14)</sup>、決定的なメカニズムはまだ明らかになっていません。

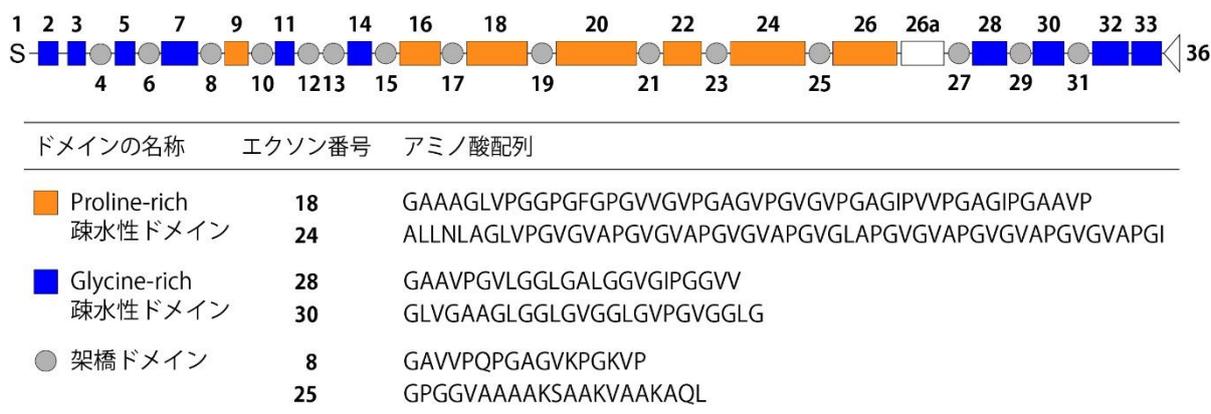


図 1 トロポエラスチンのドメイン構造と代表的なアミノ酸配列。

### 4. ナノファイバー形成能を持つ ELP

筆者は、2008 年に帰国して、東京大学の久保達也先生の研究室の助教となりました。久保研究室はゼオライトをはじめとする無機固体材料の研究室ですが、先生が「研究室としての仕事(研究)以外に、

自分だけの研究も同時に進めなさい」とおっしゃって下さり、人工タンパク質の研究を継続することに決めました。当時、学内にナノバイオ・インテグレーション研究拠点(代表:片岡一則先生)があり、遺伝子工学実験ができたことも大きな助けでした。新天地での試行錯誤でいろいろな知見が蓄積されてきた 2010 年、当時修士 1 年の Duc H. T. Le 君と相談し、かねてからの想いである「自己組織化するオリジナル分子の作製」に着手しました。

そもそも生体中のエラスチンは、線維状の ECM として存在し、その網目中に細胞を保持しています。しかし、人工エラスチンである  $(VPGXG)_n$  は、LCST 以上に加温しても無秩序な凝集・沈殿を生じるのみでした。なぜなら、この自己集合の駆動力は、方向性を持たない疎水性相互作用であるからです。筆者らはこの問題に着目し、分子デザインの工夫によって LCST 以上でナノファイバーへと自己集合する ELP をつくりたいと考えました。ここで、トロポエラスチンのドメイン構造(図1)をよく見ると、その分布が一様ではないことに気づきました。すなわち、分子中央部に Proline-rich ドメイン、分子両末端に Glycine-rich ドメインが局在しています。自己組織化研究でブロック共重合体を扱うことが多かった筆者は、「もしかして、このブロック構造が生体エラスチンの線維形成に重要なのでは？」と予想しました。そこで、トロポエラスチンのドメイン構造を単純化し、 $(VPGXG)_{25}$  (P 配列)の両末端に、 $(VGGVG)_5$  (G 配列)を配置したトリブロックペプチド **GPG** を設計しました(図2(a))<sup>15)</sup>。G 配列は  $\beta$ -sheet 構造をとりやすい配列なので、少なくとも **GPG** は、分子間水素結合して異方的な構造へ自己集合してくれるはず、と期待しました。

Le 君の努力で、**GPG** のプラスミド DNA の合成と、大腸菌を用いたタンパク質発現が無事に完了し、いよいよその自己集合性を調べることになりました。**GPG** を冷水に溶解後、LCST(16°C)以上に加温すると、紫外可視分光測定でわずかに濁度の変化が検出されました。しかし、従来の ELP のような沈殿形成はなく、見た目は透明な水溶液です(図2(b))。この溶液をマイカ基板に塗布し、原子間力顕微鏡で観察すると、図2(c)のようにナノファイバーが形成されていました！ファイバーは曲がりくねった外観をもち、アミロイド検出試薬である Thioflavin T や Congo Red で染色されません<sup>16)</sup>。また、ナノファイバーを拡大して観察すると、

ナノ粒子が連なった、数珠状のモルフォロジーを持っていました(図2(c))。溶液の昇温に伴うタンパク質二次構造の変化を CD スペクトルで追跡すると、冷水中ではランダムコイル状であった **GPG** が、昇温後すぐに  $\beta$ -turn 構造へと転移し、その後徐々に  $\beta$ -sheet 構造が形成されていくことが

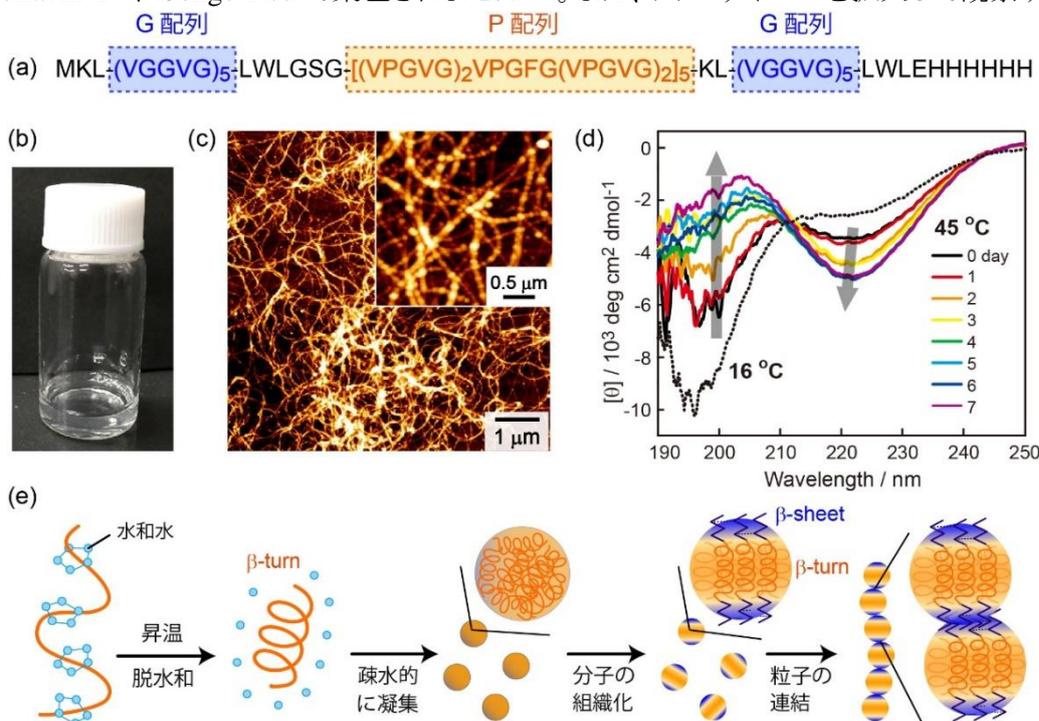


図2 ブロックポリペプチド **GPG**。(a) アミノ酸配列, (b) ファイバー分散液の外観, (c) AFM 像, (d) CD スペクトル, (e) 提案されている自己集合過程。アメリカ化学会の許可を得て文献 15 の図を一部改変。

わかりました(図2(d))。数珠状ナノファイバーの形成過程を、現在のところ図2(e)のように提案しています<sup>15)</sup>。昇温により、まず P 配列が脱水和して  $\beta$ -turn 構造を形成し、疎水的に凝集してナノ粒子を形成します。この粒子内で、分子両末端に位置する G 配列が粒子両極に配置します。さらに、G 配列同士が粒子間で  $\beta$ -sheet 構造を形成し、数珠状のナノファイバーへと組織化します。ナノファイバーの形成は、水中で3日ほどかかりますが、トリフルオロエタノールなどの有機溶媒を添加すると、1時間以内に短縮されます。これは、溶媒の誘電率が低下し、水素結合の形成が促進されたことを示しています。ナノファイバーは、P 配列と G 配列を連結したジブロック体でも得られる一方、各ブロックのみ(P 配列または G 配列)では得られないことから、ブロック構造の重要性を示すことができました。

2011年に Tirrell 先生が高分子学会国際賞を受賞され、日本にいらっしゃる機会がありました。Tirrell Lab 在籍中の不振を心残りに思っていた私は、先生をつかまえ「私はエラスチン研究をまだあきらめてなくて、最近こんな結果に巡り合えました！」と興奮気味に報告しました。その後、論文原稿を添削していただき、共著論文を出版できたことは、とても嬉しい思い出です。

### 5. ELP ナノファイバーと細胞との相互作用

**GPG** は、末端に 10 残基程度までのアミノ酸を付加しても、ナノファイバー形成能が保持されます。この拡張性の良さを利用して、これまでに、ナノファイバーの化学架橋体を作製したり<sup>16)</sup>、抗菌性を持つナノファイバー<sup>17)</sup>を構築してきました。

筆者は 2014 年より名古屋大学に異動し、大槻主税先生の研究室の准教授となりました。大槻研究室では、人工骨の開発をはじめとするバイオマテリアル研究を精力的に行っています。筆者もいよいよ、ELP を「本当に使えるバイオマテリアル」とするべく、細胞や血液との相互作用を明らかにする研究に取り組んでいます。**GPG** ナノファイバーは、細胞培養プレートに容易にコーティングでき、血清を含む DMEM 培地と接触させても安定にファイバー構造を保ちます。**GPG** に細胞接着性配列 **GRGDS** を付加した誘導体は、マウス胎仔由来線維芽細胞 (NIH/3T3) を用いた場合、フィブロネクチンと同等の細胞接着性・増殖性を示しました(図3)<sup>18)</sup>。未修飾の **GPG** と顕著な差がみられることから、親水的な配列である **GRGDS** がファイバー表面に効果的に提示されていると考えられます。最近では、共同研究を通じて、従来 *in vitro* での培養

が難しいとされていた細胞群を **GPG** ファイバー上で長期培養することに取り組んでいます。**GPG** 上での振る舞いは細胞種によっても様々に異なっており、これを、エラスチン特有の粘弾性特性と関連付けて議論できたら面白いと思っています。今後も知見を収集し、いつか、コラーゲン、フィブロネクチン、あるいはマトリゲルのよ

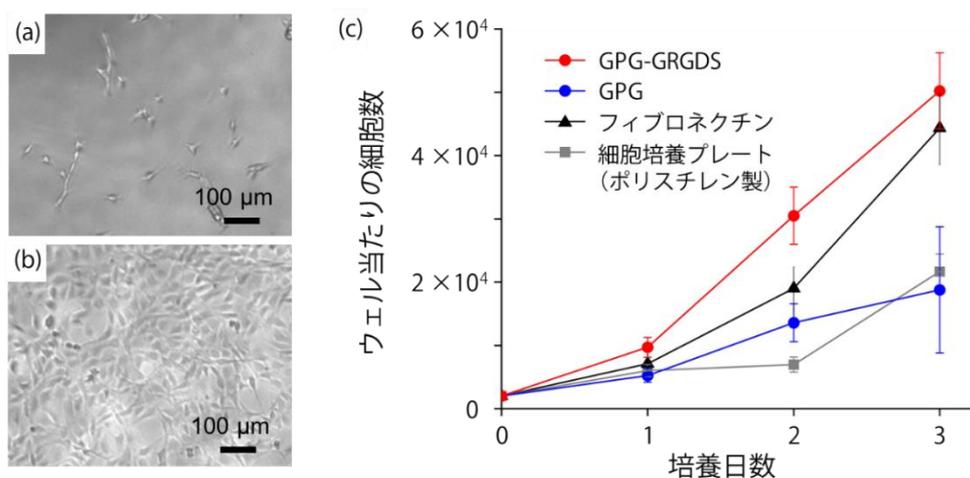


図3 細胞播種1日後にファイバー膜上に接着した NIH/3T3 細胞の位相差顕微鏡像: (a) **GPG**, (b) **GRGDS** を付加した **GPG**. (c) 96 穴プレート上に調製した各表面における NIH/3T3 細胞の増殖性. Wiley Periodicals の許可を得て文献 18 の図を一部改変.

うに、研究者が気軽に利用できる細胞培養プラットフォームに成長させたいという夢をもっています。

## 6. おわりに

本稿では、エラスチン類似ポリペプチド (ELP) の研究の動向と、筆者らが開発したブロックポリペプチド **GPG** による生体模倣 ECM について紹介しました。生体温度でナノファイバーを形成し、ハンドリング性に優れる本材料は、基材へのコーティングや他のマトリクスへの混合が容易です。皆様のご研究のお役にたてることがあれば、是非ご一報ください。また、ELP 研究の潮流に関して、今年、総説論文<sup>19)</sup> を発表しました。最近のホットな論文として、細胞内で発現させた ELP 融合ペプチドを細胞内シグナル伝達経路の ON/OFF に利用したり<sup>20)</sup>、翻訳後修飾を活用して自己集合性を持つ脂質/ELP コンジュゲートを創製したり<sup>21)</sup>、ELP と他分子の Co-Assembly を利用して時空間的に動的なシステムを構築した例<sup>22)</sup> などがあります。ELP は、材料科学と生命科学をつなぐ面白い分子であり、より多くの研究者が本分野へ参画してくれたらと願っています。

本研究は、科研費新学術領域研究「融合マテリアル」(22107005)、若手研究(16H05911)、JST A-STEP (AS282I011e) 等の支援を受けて遂行されました。また、Duc H. T. Le 博士(現アイントホーヘン工科大学)をはじめとする共同研究者の皆様にご心より御礼申し上げます。最後に、本稿を執筆する機会を与えて下さいました鳥取大学の松浦和則先生に、厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) S. M. Mithieux, A.S. Weiss, *Adv. Protein Chem.* **2005**, *70*, 437–461.
- 2) S. D. Shapiro, S. K. Endicott, M. A. Province, J. A. Pierce, E. J. Campbell, *J. Clin. Invest.* **1991**, *87*, 1828–1834.
- 3) D. M.-Nieves, E. L. Chaikof, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 694–711.
- 4) Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Chem. Rec.* **2010**, *10*, 366–376.
- 5) A. M. Tamburro, B. Bochicchio, A. Pepe, *Biochemistry* **2003**, *42*, 13347–13362.
- 6) L. D. Muiznieks, F. W. Keeley, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 39779–39789.
- 7) D. W. Urry, M. M. Long, B. A. Cox, T. Ohnishi, L. W. Mitchell, M. Jacobs, *Biochim. Biophys. Acta.* **1974**, *371*, 597–602.
- 8) D. W. Urry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 819–841.
- 9) S. R. MacEwan, A. Chilkoti, *Biopolymers* **2010**, *94*, 60–77.
- 10) E. E. Fletcher, D. Yan, A. A. Kosiba, Y. Zhou, H. F. Shi, *Protein Express. Purif.* **2019**, *153*, 114–120.
- 11) B. Li, D. O. V. Alonso, B. J. Bennion, V. Daggett, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11991–11998.
- 12) G. C. Yeo, B. Aghaei-Ghareh-Bolagh, E. P. Brackenreg, M. A. Hiob, P. Lee, A. S. Weiss, *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 2530–2556.
- 13) E. M. Srokowski, K. A. Woodhouse, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2014**, *102*, 540–551.
- 14) I. H. Jaffer, J. C. Fredenburgh, J. Hirsh, J. I. Weitz, *J. Thromb. Haemost.* **2015**, *13*, S72–S81.
- 15) D. H. T. Le, R. Hanamura, D.-H. Pham, M. Kato, D. A. Tirrell, T. Okubo, A. Sugawara-Narutaki, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1028–1034.
- 16) D. H. T. Le, R. Kawakami, Y. Teraoka, T. Okubo, A. Sugawara-Narutaki, *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 530–532.
- 17) T. T. H. Anh, M. Xing, D. H. T. Le, A. Sugawara-Narutaki, E. Fong, *Nanomedicine* **2013**, *8*, 567–575.
- 18) D. H. T. Le, Y. Tsutsui, A. Sugawara-Narutaki, H. Yukawa, Y. Baba, C. Ohtsuki, *J. Biomed. Mater. Res. A*

2017, 105, 2475–2484.

- 19) D. H. T. Le, A. Sugawara-Narutaki, *Mol. Syst. Des. Eng. in press* (DOI: 10.1039/C9ME00002J).
- 20) M. K. Pastuszka, C. T. Okamoto, S. F. Hamm-Alvarez, J. A. MacKay, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24, 5340–5347.
- 21) D. Mozhdghi, K. M. Luginbuhl, M. Dzuricky, S. A. Costa, S. Xiong, F. C. Huang, M. M. Lewis, S. R. Zelenetz, C. D. Colby, A. Chilkoti, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 945–951.
- 22) K. E. Inostroza-Brito, E. Collin, O. Siton-Mendelson, K. H. Smith, A. Monge-Marcet, D. S. Ferreira, R. Pérez Rodríguez, M. Alonso, J. C. Rodríguez-Cabello, R. L. Reis, F. Sagués, L. Botto, R. Bitton, H. S. Azevedo, A. Mata, *Nature Chem.* **2015**, 7, 897–904.



## 研究紹介

細胞の分子夾雑環境における  
核酸構造と核酸構造リガンドの挙動

～細胞内でも望みの機能を発現する分子の

合理設計に向けて～



甲南大学 フロンティアサイエンス学部

(FIRST) 生命化学科

三好 大輔

(miyoshi@konan-u.ac.jp)

## 1. はじめに

甲南大学にはフロンティアサイエンス学部(FIRST)という耳慣れない学部がある。甲南学園創立 90 周年を機にポートアイランドに新しいキャンパスを取得し、100 周年に向けた飛躍の一助にするために設立された学部である (Fig. 1)。真っ新のキャンパスの新しい学部で新しい研究室を立ち上げたのがつい最近のような気がするが、2019 年は創立 100 周年である。思い返すと、FIRST が開設されたタイミングで、生命化学研究会レターで研究紹介の機会を頂いた。その後の 10 年の間に、毎日ハードに実験をこなす研究室のメンバーに加え、学内外の様々な共同研究者に恵まれ、細胞内分子環境の模倣実験系の構築し、その実験系における核酸構造安定性や機能分子の合理設計指針を提案してきた。本稿では、これらの点について、前回の研究紹介以降に得られた結果の一部を紹介する。特に、合理設計した機能性分子の一例として、がん関連 mRNA の四重らせん構造と選択的に結合し、光切断できる化合物について述べる。



Fig. 1 The Port Island campus, Konan University, established in 2009.

## 2. 驚くべき細胞内環境

大腸菌を一辺が 1  $\mu\text{m}$  の直方体であるとする。大腸菌一つの中に約  $3 \times 10^6$  個のタンパク質が存在する。タンパク質濃度は約 5 mmol/L となる。タンパク質の平均分子量を 50000 とすると、大腸菌内部にはおよそ 250 g/L のタンパク質が含まれていることがわかる。このように、高濃度の分子が作り出す込み合った状態を「分子クラウディング」状態とよぶ。大腸菌には、約 5000 種のタンパク質がある。これとほぼ同種類の mRNA があり、それ以上の種類の ncRNA もある。もちろん、DNA や糖鎖も生命体に欠かせない生体高分子である。さらに、膨大な種類の代謝産物と、数百 mM 以上にもなる浸透圧調節分子も存在する。その結果、細胞には最大で 400 g/L 程度の生体分子が含まれることになり、それらの生体分子は、細胞体積の 40 % 程度を占有する。この生体分子の占有率は、ダイヤモンドなどの結晶構造における原子の空間充填

率(0.34)と同程度である。一方、生化学的実験が行われるのは、一般的に生体分子の濃度が数  $\mu\text{mol/L}$  程度であり、極めて希薄な溶液環境にある。このように比較すると、細胞内環境は試験管内の希薄溶液の分子環境は大きく異なり、むしろ固体に近いともいえる(図2)。

近年、多種多様な生体分子が高濃度に存在する環境は、「細胞の分子夾雑」環境と定義され、細胞の化学的理解と合目的な制御の達成における重要なコンセプトとして認識されつつある<sup>2,4</sup>。次節では、この分子夾雑環境の化学的模倣に向けた取り組みと、分子夾雑環境での核酸の構造安定性について述べる。

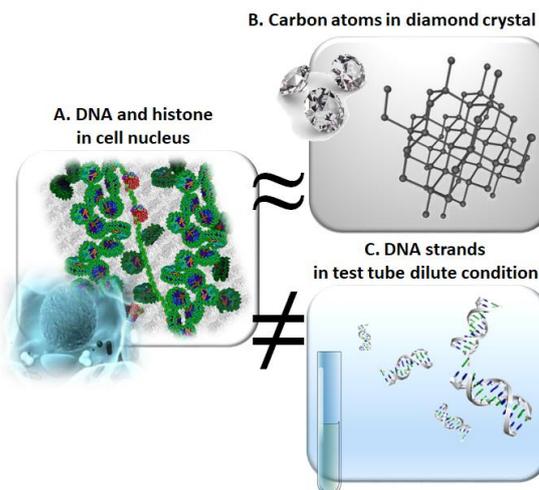


Fig. 2 Schematic illustration of molecular conditions in a cell nucleus (A), a diamond crystal (B), and a diluted test tube (C).

### 3. 分子夾雑環境での核酸構造とその熱力学的安定性

我々の研究グループでは、ポリエチレングリコール(PEG)などを用いて分子クラウディング環境を誘起し、様々な核酸構造に対する効果を検討した。その結果、通常の緩衝溶液である希薄環境と比較して、分子クラウディング環境では、核酸の標準構造である二重らせん構造が熱力学的に不安定化し、グアニンに富んだ核酸鎖が形成する四重らせん構造が安定化することが分かった<sup>5</sup>。さらに、様々な核酸構造の熱力学的安定性に及ぼす分子ク

ラウディングの効果を検討すると、四重らせんのみならず、様々な非標準構造(平行型二重らせん、三重らせん、枝分かれ、ダングリグエンド、ヘアピンループ等)も安定化することも示された<sup>2,5-8</sup>。これらの結果は、細胞内分子環境で、核酸が周辺環境に応答して、非常に多様な構造を形成する可能性を示唆している(Fig. 3)。また、このような非標準構造と標準構造に及ぼす分子クラウディングの真逆の効果は、構造形成に伴う水和環境の変化によるものであることも示されている。

水和分子の挙動の違いは、テロメアの突出領域(ヒトの場合、GGGTTA が約 200 塩基繰り返されている)が形成する高次構造においても重要な役割を果たすことも明らかになりつつある。我々はこれまでに、上述のように長鎖のテロメアの突出領域が、四重らせ

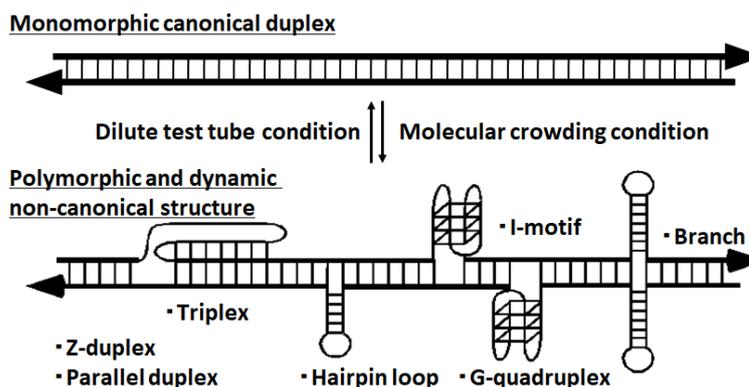


Fig. 3 Schematic structure of DNA under a dilute test tube condition (top) and under a cellular molecular crowding condition (bottom).



Fig. 4 Schematic beads-on-a string structure of a single-stranded telomere DNA.

ん構造をユニットとする数珠状構造 (Beads-on-a string structure: Fig. 4) を形成することを報告しているが、このビーズをつなぐ領域が数珠構造全体の熱力学的安定性を調節していることが示唆されている。

一方で、PEG などの合成高分子は細胞内に存在しない。そこで、我々の研究グループでは、細胞核や細胞質をより精密に化学模倣することにも取り組んでいる<sup>10-14</sup>。核内は、DNA 鎖がヒストンに巻き付き、ヌクレオソームを形成した状態で存在している (Fig. 2A)。ヒストンテールと呼ばれるヒストンの DNA 結合部位は、構造を形成していない Lys や Arg に富んだアミノ酸配列をもつ。そこでヒストンテールを模倣したペプチドや Poly (L-lysine)-graft-dextran (PLL-g-Dex) などが DNA の構造に及ぼす効果を検討した。その結果、PEG などの無電荷高分子以上に様々な非標準構造を惹起することが明らかになりつつある。

#### 4. 分子夾雑環境での核酸構造リガンドの挙動

試験管内で、リガンド、プローブ、阻害剤などの機能分子を設計開発しても、細胞で望みの機能を発現しないことが多い。これは、標的となる生体分子の構造などが試験管内と細胞内で異なることが一つの原因であると考えられる。では、設計した機能分子と標的分子の相互作用は分子夾雑環境でも保持されるのであろうか。分子夾雑環境下でも標的生体分子との結合親和性と結合選択性を保持できる分子設計が可能になれば、細胞内で望みの活性を示す機能性分子の合目的設計に有用である。我々は、テロメア DNA が形成する四重らせん構造と結合するリガンドについて、結合親和性ととも、テロメアを伸長するテロメラーゼの活性阻害能に及ぼす分子クラウディングと分子夾雑の効果を検討した<sup>15-17</sup>。細胞核内では、ゲノムの大部分が二重らせん構造を形成していることから、PEG200 と二重らせんを形成する DNA ( $\lambda$  DNA) を四重らせん構造に対して過剰に添加した実験条件で、テロメア DNA が形成する四重らせん構造を種々のリガンドの結合親和性とテロメラーゼ阻害能を検討した<sup>15</sup>。その結果、負電荷を有する核酸を標的とする際に通常用いられる正電荷を有するリガンドは、この実験環境では親和性とテロメラーゼ阻害能が大幅に低下することが示された (Fig. 5)。これは、二重らせん構造への非特異的な結合と、静電的相互作用による複合体形成における水分子の取り込み挙動の相乗効果によることがわかった。一方、負電荷をもつリガンドは、分子クラウディングで大過剰の二重らせんが存在する細胞核化学模倣環境でも親和性と阻害能を保持した。このような結果から、非特異的な静電的相互作用は、細胞内で標的分子を狙う際には適さないことが示された。一方で、相互作用形成により水分子を放出するような相互作用 (スタッキング相互作用、水素結合、配位結合など) は、細胞化学模倣環境での結合に適していることも示唆された。実際に、正電荷を有するポルフィリン (TMPyP4)

は、がん細胞の増殖を阻害しないが、負電荷を有するフタロシアニン (APC) は増殖を阻害した。また、APC は、正常細胞に対する毒性が低いことも示された。この結果は、APC とゲノム間の非特異的相互作用がほとんど形成されないことに由来すると考えられる。以上のように、細胞環境を化学模倣した実験系は、細胞内部での機能性分子の活性予想に有用で

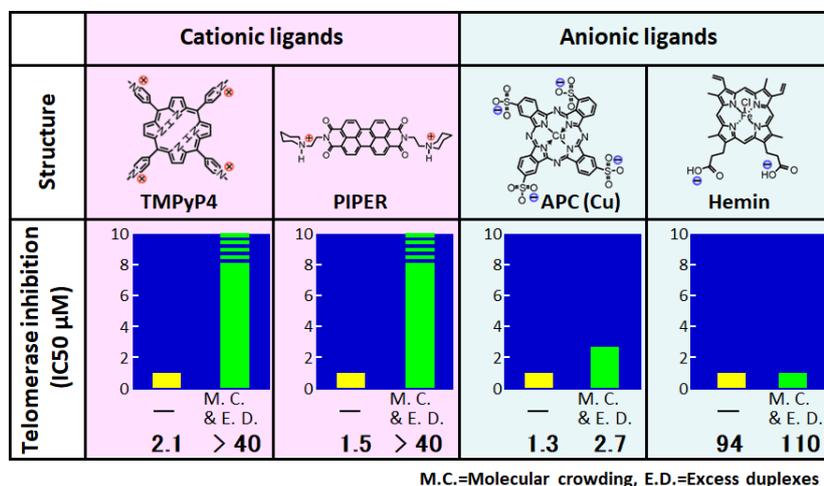


Fig. 5 Structures and IC50 values of G-quadruplex ligands.

あることが示唆された。より精密に細胞や各オルガネラの分子環境を化学模倣した新たな実験系を構築することで、試験管と細胞の大きな分子環境のギャップを乗り越え、細胞で望みの活性を発現する機能分子の合理設計指針が得られると期待される。

## 5. 四重らせん構造に対する分子標的薬の開発

四重らせん構造は、テロメアのみならず、多くのがん関連遺伝子においても形成される。さらに、転写産物であるがん関連 mRNA の非翻訳領域においても四重らせん構造が形成され、遺伝子発現の調節に関与していることが示されている。上述のように、核酸四重らせん構造と親和性をもつ分子として、負電荷と広い $\pi$ 平面を有する分子の有用性が示された。

そこでがん関連(NRAS) mRNA が形成する四重らせん構造を標的にすることを試みた<sup>18</sup>。その結果、上述の APC の中心に亜鉛が配位した ZnAPC は、大過剰の二重らせん RNA 存在下でも、構造・配列選択的に NRAS mRNA 四重らせん構造と結合することが分かった。さらに、ZnAPC は近赤外光の照射で、結合した標的 NRAS mRNA を選択的に切断することも分かった。この結果をもとに、NRAS が高発現している乳がん細胞(MCF-7)に ZnAPC を導入し、NRAS mRNA 及び NRAS タンパク質の発現量を検討したところ、ZnAPC の添加と光照射によって、両者の発現量が選択的に抑制されることが示された。さらに、光照射後 24 時間と 48 時間後の細胞生存率は、それぞれ約 5%と 0%であった。このように、四重らせん構造に構造・配列選択的に結合する ZnAPC を光増感剤として用いることで、NRAS mRNA の四重らせん構造に対する分子標的型光線力学療法

(molecularly-targeted photodynamic therapy: mtPDT)を提唱することができた(Fig. 6)。興味深いことに、切断機構の検討から、ZnAPC による光切断には活性酸素の発生が必要ないことも明らかとなった。今後、細胞や実験動物を用いたさらなる検討が必要であるが、ZnAPC を用いた mtPDT は既存の PDT では適応外であった腫瘍深部や活性酸素耐性がんにも効果的であると期待される。

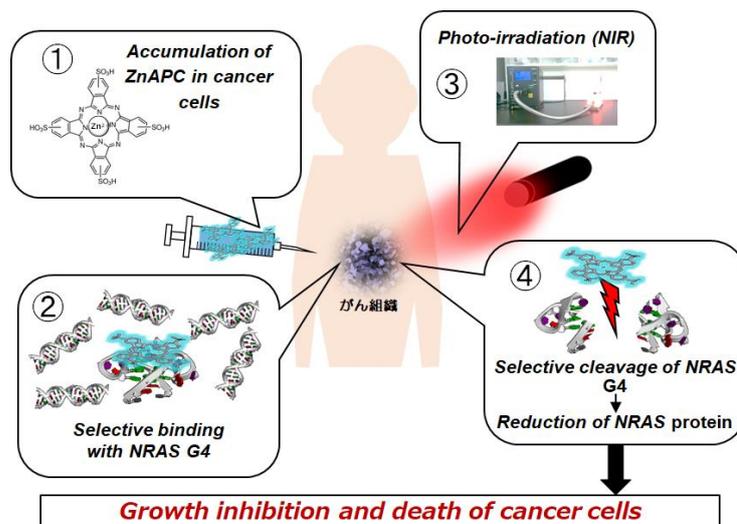


Fig. 6 mtPDT for NRAS mRNA G-quadruplex.

## 6. おわりに

10 年前の生命化学研究レターに掲載していただいた研究紹介の「おわりに」を読み返してみた。4 つの方向で研究を進めたいと記していた。10 年前に考えていた方向に研究が進んでいるような気がするが、十分に研究を遂行できたとは言い難いと感じた。分子クラウディングや分子夾雑に着目して、細胞環境における核酸の物性を検討すると、核酸が細胞内環境因子に依存して非常に複雑な構造・安定性の多様性を示すことが分かってきた。(少なくとも我々にとっては)面白い結果が少しずつ得られつつある。やや発想に飛躍があることは承知であるが、分子クラウディングや分子夾雑に関する知見は、細胞内でも活性を保持する機能性分子の合目的設計指針を提供し、医薬品開発などにも役に立つのではとひそかに期待している。甲南学園の創立者・平生鈞三郎は「人間は面白いが、有り難いのかのいずれかでないと寄ってくるものじゃないよ」と述べたそうである。甲南学園創立 100 周年の今、面白くて、人の役に立つ研究を進めたい

と考えている。

## 7. 謝辞

本研究の一部は、甲南大学先端生命工学研究所(FIBER)所長の杉本直己教授のご指導とご協力のもとで遂行しました。この場を借りて深く感謝いたします。細胞環境模倣実験系の研究は、東京工業大学丸山厚教授・嶋田直彦助教、東京大学石原一彦教授、関西大学岩崎泰彦教授などとの共同研究の成果です。リガンドや分子標的型光線力学療法の研究は、甲南大学 FIRST の川内敬子准教授やパナソニック株式会社夜久英信博士などとの共同研究により進めました。素晴らしい共同研究に深謝いたします。また、本研究の一部は、新学術領域研究「分子夾雑の生命化学」(17H06351)と挑戦的研究(萌芽)(18K19153)の補助を受けて遂行されました。最後に、常日頃より様々にお世話を頂き、私にとって節目の年に執筆の機会を与えてくださいました鳥取大学松浦和則教授に御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 三好大輔, *生命化学研究レター*, **29**, 9-14 (2009).
- 2) Nakano S., et al., *Chem. Rev.*, **114**, 2733-2758 (2014).
- 3) 新学術領域研究「分子夾雑の生命化学」web site, <http://www.bunshi-kyouzatsu.jp/>
- 4) 浜地格, *分子夾雑の生命化学(1)分子夾雑の有機化学*, 化学同人, (2019).
- 5) Miyoshi D., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3522-3531 (2009).
- 6) Muhuri S., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9268-9280 (2009).
- 7) Fujimoto T., et al., *J. Phys. Chem. B*, **117**, 963-972 (2013).
- 8) Miyoshi D., et al., *Quadruplex Nucleic Acids (Springer)*, 330, 87-110 (2013).
- 9) Yu H., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 20060-20069 (2012).
- 10) Pramanik S., et al., *Chem. Commun.*, **47**, 2790-2792 (2011).
- 11) Miyoshi D., et al., *ChemMedChem*, **9**, 2156-2163 (2014).
- 12) Moriyama R., et al., *J. Phys. Chem. B*, **119**, 11969-11977 (2015).
- 13) Yamaguchi N., et al., *Chem. Commun.*, **52**, 7446-7449 (2016).
- 14) Yamayoshi A., et al., *J. Phys. Chem. B*, **121**, 4015-4022 (2017).
- 15) Yaku H., et al., *Chem. Commun.*, **46**, 5740-5742 (2010).
- 16) Yaku H., et al., *Molecules*, **17**, 10586-10613 (2012).
- 17) Yaku H., et al., *J. Phys. Chem. B*, **118**, 2605-2614 (2014).
- 18) Kawauchi K., et al., *Nat. Commun.*, **9**, 2271 (2018).

## 気になった論文

西嶋 政樹 (にしじま まさき)

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 助教

m.nishijima@tohoku.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」への執筆機会をいただき、編集委員の先生方に深く感謝申し上げます。私は、大阪大学工学研究科分子化学専攻(現・応用化学専攻)、井上佳久教授(現・大阪大学名誉教授)に師事し、博士後期課程在学中に大阪大学先端科学イノベーションセンター(何度か改組を経て、現・大阪大学産学共創本部)助教に着任し、産学連携技術コーディネータの傍ら研究に従事してきました。2018年3月より東北大学多元物質科学研究所・和田健彦教授の下、研究・教育に邁進する毎日です。これまで、血清アルブミンをはじめとするタンパク質が織りなす規制空間を反応場に用いたキラール光反応に従事し、タンパク質と光化学の融合に興味をもって進めてきました。和田研究室への着任をきっかけに、光化学のみならず、高分子化学や有機合成化学と生体機能化学との融合に興味を持っています。環境調和型プロセス開発の重要性は言うまでもなく、様々なアプローチが新たに提唱・実証されています。本稿では生体機能関連分野から少し視点を広げ、有機合成を基盤とする環境調和型反応・プロセスの最新研究成果をご紹介します。本稿をきっかけに学際融合研究テーマ提案のヒントになれば幸いです。

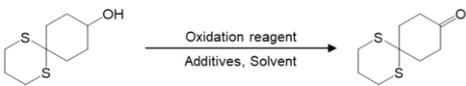
## 2-Azaadamantane N-oxyl (AZADO)/Cu Catalysis Enables Chemoselective Aerobic Oxidation of Alcohols Containing Electron-Rich Divalent Sulfur Functionalities

Yusuke Sasano, Naoki Kogure, Shota Nagasawa, Koki Kasabata, and Yoshiharu Iwabuchi

*Org. Lett.* **2018**, *20*, 6104–6107.

有機合成の多くは、触媒を利用することが一般的ですが、その多くに白金やパラジウムといった貴金属が用いられています。しかしながら貴金属は、埋蔵量が有限であるとともに、埋蔵地域の偏在により、需要と供給には国際情勢の影響を少なからず受けます。こうした背景から、鉄やニッケルといった汎用的金属(卑金属)による触媒開発とともに、有機触媒の研究が盛んに行われています。中でもアルコール酸化によるアルデヒド形成は、有機工業分野において重要な位置を占めています。しかしながら、アルコール酸化に用いられる酸化剤は、比較的取り扱いが難しい(爆発性、高毒性等)ため、これらを用いない反応提案が求められてきました。

こうした背景から、空気酸素を利用した、安全かつ安価なアルコール酸化触媒の開発が熱望されてきました。安定な有機ニトロキシルラジカル TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidine N-oxyl) は、比較的古くから知られ、1級アルコールの選択的酸化触媒として利用されてきました。一方本論文著者らは、新規な有機安定ラジカルとしてアダマンタン骨格を有する AZADO (2-Azaadamantane N-oxyl)を開発し、TEMPOと比較してラジカル近傍の立体障害が少ない特徴



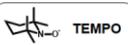
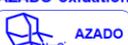
	Oxidation reagent	Additives	Temp.	Reaction time / hr	Yield / %	Disadvantage
<b>PCC oxidation</b>	 PCC	Molecular sieves	r.t.	2	54	High toxicity
<b>Swern oxidation</b>	DMSO	(COCl) <sub>2</sub> , Et <sub>3</sub> N	-78°C	0.8	88	Stinchy
<b>Dess-Martin oxidation</b>	 DMP	-	r.t.	1	17	Explosibility
<b>TEMPO oxidation</b>	 TEMPO	Air O <sub>2</sub> , CuCl, Bipyridine, 1-Methylimidazole	r.t.	3	trace	
<b>AZADO oxidation</b>	 AZADO	Air O <sub>2</sub> , CuCl, Bipyridine, 1-Methylimidazole	r.t.	1	94	

図 1. 様々な酸化剤によるジチアスピロアルコール誘導体の酸化反応(論文より一部抜粋の上、改変)

から、効率的な2級アルコールの酸化反応触媒として機能することを見出してきました。本論文では、より酸化されやすい硫黄原子を含む2級アルコールの選択的酸化について、従来の酸化反応と比較しています。図1に示したジチアスピロアルコールに対するジチアスピロケトンへの汎用的酸化反応(クロロクロム酸ピリジニウム(PCC)酸化、Swern酸化、Dess-Martin酸化)では、中～高収率を達成しましたが、それぞれCrを含む高毒性や、悪臭物質が副生成物になるなどのデメリットがあります。一方、空気酸素を酸化剤とするTEMPOとAZADOを用いた場合、TEMPOは触媒として機能しませんでした、AZADOは、高収率に反応を進行することが明らかとなりました。本法は、不安定な官能基を有する複雑な基質に対しても、マイルドな条件での酸化反応が可能であり、含硫黄分子への展開だけでなく、様々な有機合成への展開が期待されます。

### Hydrocarbon Synthesis via Photoenzymatic Decarboxylation of Carboxylic Acids

Wuyuan Zhang, Ming Ma, Mieke M. E. Huijbers, Georgy A. Filonenko, Evgeny A. Pidko, Morten van Schie, Sabrina de Boer, Bastien O. Burek, Jonathan Z. Bloh, Willem J. H. van Berkel, Wilson A. Smith, and Frank Hollmann

*J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3316-3120.

光合成に関与する単細胞緑色微細藻類の一種である *Chlorella variabilis* NC64A (CvFAP) は、フラビンアデニンヌクレオチド(FAD)構造を有し、青色光の照射によって、脂肪酸の光脱炭酸を誘起し、対応する脂肪族炭化水素を生成することが知られています。しかしながら CvFAP による光脱炭酸は、一部のアルキル鎖長を持つ脂肪酸でのみ行われており、有機合成の観点から、その応用展開が望まれていました。一方 CvFAP は、ターゲット基質構造に類似した化合物「疑似基質 (decoy molecule (デコイ分子))」の取り込みがトリガーになり、反応が進行することが知られています。本論文では、CvFAP を光触媒とする、様々な脂肪酸および類縁体に対する光脱炭酸反応について、デコイ分子の最適化およびその反応機構について報告しています。

まず、酢酸をモデル分子に用いた光脱炭酸反応について、発生するメタン量とデコイ分子のアルキル鎖長の最適化を行いました。デコイ分子の種類を変化させた結果、デコイ分子非存在下と比較して、テトラデカン(C14)を用いた時のメタン発生率が2.5倍向上することを見出しました(図2)。続いて、様々な脂肪酸を基質に用いた場合についても評価しました。ギ酸、酢酸、プロピオン酸といった直鎖脂肪酸だけでなく、分岐脂肪酸であるイソ酪酸、イソ吉草酸とともに、

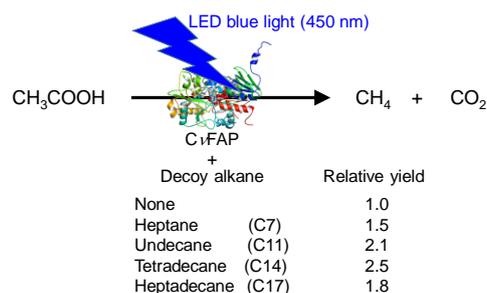


図2. CvFAPによる酢酸の光脱炭酸反応と、デコイ分子によるメタン発生への依存性(論文記載内容を基に再改変の上、記載)。CvFAP構造はPDBjより引用(PDB ID: 5NCC, F. Beisson et al, *Science*, **2017**, 357, 903.)

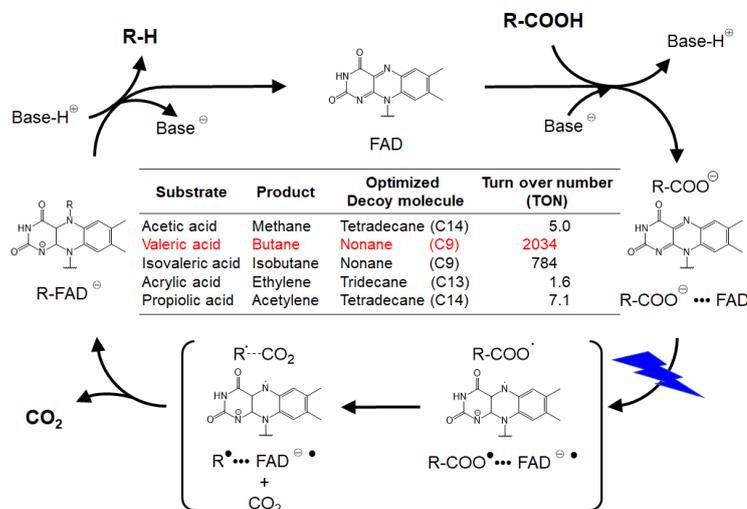


図3. CvFAPを触媒とする脂肪酸の光脱炭酸機構(論文記載内容を基に再改変の上、記載)

不飽和カルボン酸のアクリル酸、ヘキセン酸、プロピオール酸について検討しています。いずれの基質においても、適切なデコイ分子を用いることで、選択性ととも数倍～数千倍のターンオーバー数(TON)を達成し、対応する炭化水素がほぼ定量的な選択性で得ることを見出しました。特に顕著な例として、ペンタン酸を基質にし、ノナン(C9)をデコイ分子とした場合、対応するブタンが99.99%の選択性、約2000のTONを達成しました。これらの結果について、シミュレーションも行っており、図3に示した、FADのラジカルアニオンを経由する触媒サイクルによって達成することを報告しています。本方法論は現時点ではごく低濃度条件に限られますが、今後バイオ燃料の高効率合成をはじめ、様々な有機合成法への展開が期待されます。

## Efficient Electrocatalytic Reduction of Furfural to Furfuryl Alcohol in a Microchannel Flow Reactor

Yiran Cao and Timothy Noël

*Org. Process Res. Dev.* **2019**, in press (DOI: 10.1021/acs.oprd.8b00428)

生体由来樹脂の原料となるフルフリルアルコールは、トウモロコシの穂軸やキビの絞りカスから抽出されるフルフラールを高圧接触水素化することで工業的に生産されており、一般的に原料・溶媒を釜に入れ、温度・圧力を制御して反応させるバッチ法が適応されています。しかしながらバッチ法は、系中の温度勾配や、不均一反応における液-固界面の接触効率といった点で、必ずしも最適な系ではありません。一方、フローマイクロリアクターは、原料を微小空間へのフロー挿入することで、精緻な温度制御・高効率反応系が達成できるだけでなく、安全性の観点からも注目されています。中でも、マイクロリアクターと電気化学の融合は、還元剤(または酸化剤)を用いることなく、電気エネルギーによる酸化還元反応が行える点で大きな優位性をもちます。

本論文では、フルフリルアルコールをフルフラールの電気的還元反応による生成について、最適化条件の探索とともにバッチ法との効率について比較しています。図4に示すように、フローマイクロリアクターは大きく、シリンジポンプ、電極を取り付けたフローセル、および電源から構成されています。実験方法としては、直径数 mm の流路を持つフローセルに、シリンジポンプからフルフラール溶液を送液し、所定の電圧を印加しました。酸性度、印加電圧、電解液、電極などの条件を最適化し、バッチ法との比較を行いました。(図4、下表)。その結果、バッチ法では5時間の反応時間に対し、フローマイクロリアクターではわずか10分と短時間にも関わらず収率が劇的に向上することが明らかとなりました。またファラデー効果と呼ばれる、投入電流に対して生成物形成に寄与した電流の割合を算出したところ、いずれもバッチ法よりも高効率を示すことが明らかとなりました。結びに、フローマイクロリアクターは、すでに工業的にフローマイクロリアクターの設置と利用がなされており(機密事項のため詳細は不明な場合が多い)、高い産業応用性は実証されていますが、一般的に反応スケール拡大の困難さと、系中の固体形成による詰まり(埃なども含む)、固体形成反応には不向き、などの弱点も挙げており、これら課題を克服することが求められています。

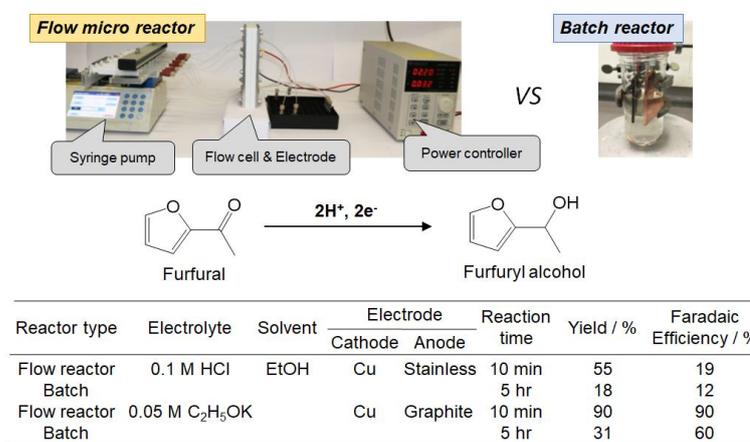


図4. フローマイクロリアクターとバッチ法によるフルフラールの電気的還元反応およびその比較((論文記載内容を基に再改変の上、記載))

## 気になった論文

三木 卓幸 (みき たかゆき)  
 東京工業大学生命理工学院 助教  
 tmiki@bio.titech.ac.jp

この度は、生命化学研究レター”気になった論文“への執筆機会を頂きありがとうございます。私は2016年3月に京都大学大学院 浜地格教授のもと学位を取得し、JSR株式会社に2年勤め、2018年4月から東京工業大学生命理工学院 三原久和教授のもとペプチド工学をメインに研究を行なっています。

博士課程では、蛋白質ラベル化技術を応用した”Conditional プロテオミクス”を開発してきました。細胞内でpHや金属イオン濃度等の環境は局所的に変化し、その局所に存在する蛋白質の機能に影響を与えます。その動的なメカニズムを解析する上で、特定の環境下に存在する蛋白質群を網羅的に同定する必要があります。そこで、私はZn<sup>2+</sup>イオン環境に注目し、Zn<sup>2+</sup>に応じて活性化するラベル化剤を開発し、高濃度Zn<sup>2+</sup>環境下に存在する蛋白質群を選択的かつ網羅的にラベル化しました。これらを質量分析機器によって解析・同定しました。これは特定の細胞応答に関連する蛋白質を同定する手法ですが、工学部出身の私としては、同定された蛋白質を組み合わせて生体メカニズムを再現できるのかという”合成生物学”に最近興味湧いているところです。

合成生物学は、DNAや蛋白質などの構成要素を設計し人工システムを構築することにより、”生命機能の理解“や ”新しい機能を持った生命システムの構築“を目指す学問です。その細胞レベルの検討では、プロモータの改変などにより遺伝子回路を設計し、人工細胞を構築する研究が盛んに行われています。しかし、最近では、蛋白質レベルで回路を設計・構築する報告が見受けられます。その多くはin vitroでの検討ですが、細胞内での回路構築に成功した事例もあります。今回、私はその中で、特定のアミノ酸配列を切断するウイルス性プロテアーゼを利用したシステムに注目し、2例紹介することにしました。

### Programmable Protein Circuits in Living Cells

Xiaojing J. G.; Lucy S. C.; Matthew S. K.; Michael B. E. *Science* **2018**, *361*, 1252

天然の細胞機能に着目すると、蛋白質レベルでの応答(例えば、局在変化、翻訳後修飾、蛋白質分解など)が多くの場合で観察されます。このような応答を模倣した人工蛋白質回路の構築は、遺伝子発現制御と比べて迅速な応答が期待でき、更に内在的な蛋白質間相互作用に関与するシステムの構築が期待できます。本論文でMichael B. Elowitzらは、ウイルス性プロテアーゼを利用し、細胞中で組み立て可能な蛋白質によるロジックゲートを報告しています。

まず、筆者らは蛋白質分解シグナル配列(degron)と蛍光蛋白質(Citrine)の間にTEVP(tobacco etch virus protease)認識配列を挿入した蛋白質を設計し、HEK293細胞に発現しました。TEVPを

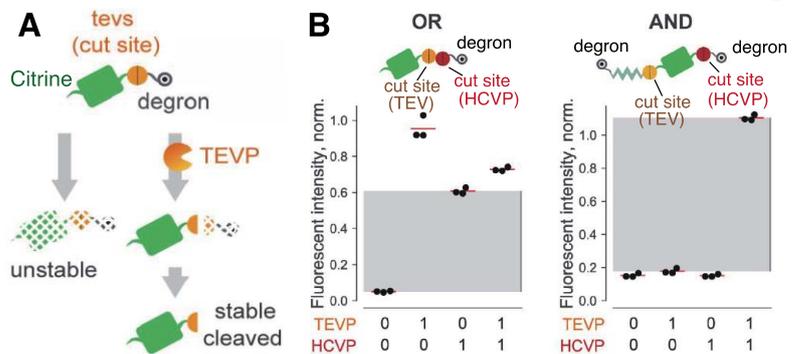


図1. 蛋白質回路を構成する分子デザイン  
 (論文より抜粋、一部改変)

発現しない場合、Citrine蛍光蛋白質はdegronによりプロテアソームで分解を受け、細胞内の蛍光強度は弱くなります。一方、TEVPを共発現した場合、Citrineはdegronと切り離され、分解経路から逃れる為、細胞内の蛍光強度は高いまま維持されます(図1-A)。同様なメカニズムで他のプロテアーゼ(HCVP)と組み合わせることで、様々なロジックゲートを構築できることが示されています。例えば、degronと蛍光蛋白質の間に、TEVPとHCVPの認識を連続して挿入することでOR応答する素子が、蛍光蛋白質の両末端にそれぞれの認識配列とdegronを付加することでAND応答する素子が構築できます(図1-B)。このような直交性を有するプロテアーゼを組み合わせたシステムを筆者らはCHOMP(circuits of hacked orthogonal modular proteases)と呼ぶこととしました。

CHOMPを精密に設計することで、ポジティブフィードバックループの導入や、蛋白質を一過的に活性化する回路の構築を実現しています。更に、筆者らはRasシグナル伝達の上流の刺激を受けると、細胞死を誘導するように設計したCHOMP回路の作成にも成功しています(図2-A)。これは、分割されたTEVPの断片をRasに融合し、Ras-binding domain (RBD)にもう片方のTEVP断片を融合します。この2つの蛋白質はRasを活性化するSOS蛋白質によって相互作用し、TEVPは細胞膜直下で活性化されます(図2-B)。TEVPによる反応で活性化するようにデザインされたCasp3 (Caspase 3)をミリストイル化によって細胞内膜に発現しておく、SOS蛋白質による刺激によって活性化されたTEVPは、Casp3を活性化でき細胞死のシグナル伝達が走ります(図2-B)。

これらの回路だけではSOS蛋白質による刺激がない条件(バックグラウンド条件)でも、多くが細胞死することから、更に筆者らは、このシステムに加えてシグナル伝達を抑制する回路を付与し、明確な応答性を示す人工的なシグナル伝達系を蛋白質レベルで構築しました。

本論文は、細胞内の複雑な環境においても、転写翻訳による発現調節を利用せず、蛋白質レベルのみで回路を作成した報告です。登場する分子は基本的に蛋白質のみであり驚異的な報告だと私は感じました。

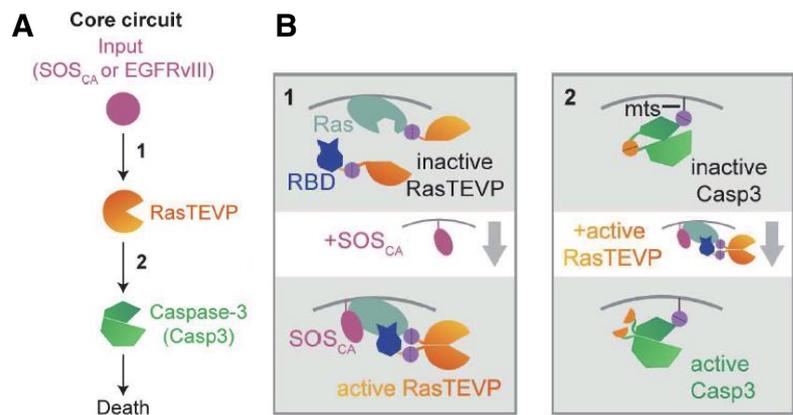


図 2. Ras シグナル伝達によって Casp3 を活性化する CHOMP 回路. (論文より抜粋、一部改変)

### Controllable Protein Phase Separation and Modular Recruitment to form Responsive Membraneless Organelles

Benjamin S. S.; Ellen H. R.; Ranganath P.; Craig N. J.; Reese M. C.; Jessica G. B.; Holly R.; Matthew C. G.; Daniel A. H. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2985

脂質膜を持たないmembraneless organelleは、細胞内でストレス応答や遺伝子発現制御などの役割を果たすことから、近年注目を浴びています。この相分離構造(流動性を持つliquid droplet)は天然変性蛋白質の自己集合によって形成されることが知られ、構成要素となる様々な蛋白質およびdomainが発見されています。Daniel A. Hammerらは、本論文でdropletを形成するLAF-1蛋白質のRGG (arginine-glycine-glycine-rich) domainを用い、プロテアーゼによる切断に伴ってdropletが形成・崩壊するシステムをin vitroで構築し、その系を細胞内でも再現しました。

まず初めに、筆者らは *in vitro* の検討において、1つの RGG domain しか持たない蛋白質は凝集力が弱く droplet を形成しないが、RGG domain を2つ若くは3つ連結した蛋白質は droplet を形成することを明らかにしました。次に、連結した RGG domain 間に TEVP 認識配列を導入した蛋白質を設計しました。この蛋白質は droplet を形成するが、プロテアーゼを添加すると、RGG domain 同士が分離するため、droplet が崩壊する様子が観察されました (図3-A)。また、

筆者らは3つの RGG domain を連結し、その間に2種類の異なるプロテアーゼ認識配列を導入することで、2種類のプロテアーゼを添加した場合のみ droplet が崩壊する AND 型の論理素子を作成しました (図3-A)。

また、N 末端に可溶性の高い maltose-binding protein (MBP) を融合した MBP-RGG-RGG 蛋白質は droplet を形成しないが、MBP と

RGG 間に HRV3C (human rhinovirus 3C) プロテアーゼ認識部位を導入した場合、プロテアーゼによる MBP の分離に伴った droplet の形成が確認されました (図3-B)。

次に、任意の蛋白質を濃縮し、またプロテアーゼに応じて放出するシステムを組み立てるため、GFP をモデルとし、その両末端にプロテアーゼ認識部位を介して2つの RGG domain を連結したところ、期待通りにプロテアーゼ添加に伴って droplet が崩壊し、GFP が放出されました (図4-A)。

同様な droplet 形成は、HEK293 細胞内でも確認されました。また、RGG-x-GFP-RGG (x は TEV 認識部位) 蛋白質は TEV プロテアーゼと共発現した場合、droplet を形成しなかったことから、細胞内においてもプロテアーゼによって droplet が崩壊したと思われる (図4-B)。

本論文は、プロテアーゼによる切断を引き金とした droplet の形成・崩壊をデモン

ストラレーションした事例でした。先に紹介したより高度な論理ゲートと組み合わせると、細胞内でもより動的な droplet の崩壊・形成システムを作り上げられるのではないかと、期待できます。また、近年注目を浴びる liquid droplet を合成生物学としての利用する試みが、盛んになるのではないかと予感されます。

TEV プロテアーゼによる酵素反応は、その基質特異性が高いため、一種の "Bio-orthogonal" な開裂反応として考えられ、一報目は蛋白質の分解・活性制御、二報目は蛋白質局在 (会合体) 制御を目的に、プロテアーゼ切断部位を導入し、回路を構築しています。これらは、細胞内での蛋白質回路構築の先駆けとなる論文だと思われませんが、やはりプロテアーゼを用いた回路は、原理的に "不可逆" という問題点をもちます。本分野の発展した先には、"翻訳後修飾を用いた回路構築"、"金属イオンや pH 環境変化を利用した蛋白質回路の構築" などと可逆的な本来の細胞機能を模倣したシステムが挙げられるのではないのでしょうか。

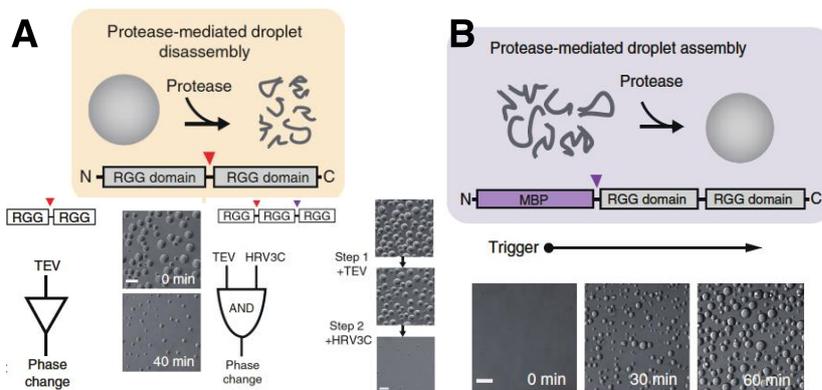


図 3. プロテアーゼによる切断をトリガーとした RGG 蛋白質の凝集体形成と崩壊 (論文より抜粋、一部改変)

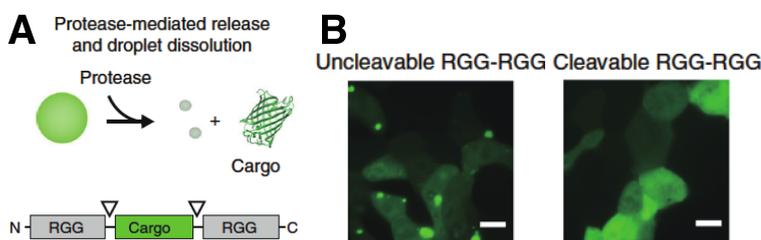


図 4. プロテアーゼによる切断をトリガーとした Cargo の放出と会合体の崩壊 (論文より抜粋、一部改変)

留学  
体験  
記

## Northwestern 大学留学体験記

東京工業大学 生命理工学院  
佐藤 浩平  
(koheisato@bio.titech.ac.jp)



## はじめに

東京工業大学生命理工学院助教の佐藤浩平と申します。私は2014年3月に東京大学の相田卓三先生の研究室で博士(工学)を取得後、2014年4月から2018年2月まで、アメリカのイリノイ州にあるNorthwestern大学にて、博士研究員として研究を行なっておりました。本稿を通じて、一人でも多くの方々に留学に興味を持っていただければ幸いです。

## 留学に至った経緯

私が博士課程2年に在籍中の秋頃、指導教員である相田先生から、学位取得後に海外の大学で博士研究員として研究を続けることを勧められました。それ以前は漠然と、学位取得後は国内の化学系企業に就職したいと考えていました。しかし、「海外(研究)生活」という言葉の響きに心が傾いた結果、就職活動を中断し、相田先生のお知り合いであるNorthwestern大学のSamuel I. Stupp先生とのInterviewをセッティングしていただきました。そして、Stupp先生が日本国内で行われていたシンポジウムのために来日された際に、1時間ほど個別にお時間をとっていただき、私の大学院での研究成果を紹介しました。初対面の際は大変緊張しましたが、Stupp先生は大変気さくな方で、Interview中も明るく話しかけて下さいました。そして、Interviewを終えたその日のうちに、私を博士研究員として受け入れていただけるとのお話を頂戴することができました。今となってはお恥ずかしい話ですが、自らの強い意志で留学を希望したというよりも、周囲の勧めで何となく留学に至ったというのが正直なところです。

## Northwestern大学

Northwestern大学はアメリカ中西部のイリノイ州シカゴ市、および隣接するエバンストン市に2つのキャンパスを構える私立大学です。地図上では、アメリカの北端にあるわけでも、西端にあるわけでもありませんが、大学設立当時(開拓時代)はアメリカの北西部に位置していたため、その名がつけられたそうです。日本での一般的知名度はあまり高くありませんが、私がお世話になったStupp先生の所属する化学科には、2016年にノーベル化学賞を受賞されたFraser Stoddart先生をはじめ、Chad Mirkin先生やTobin Marks先生など、世界的に有名な化学者が数多く在籍しています。したがって、Northwestern大学に集まる学生と博士研究員のレベルも総じて非常に高かったように思います。シカゴキャンパスはシカゴ市ダウントウンの中心に位置しており、周囲にはデパートやレストラン、ホテルなどが立ち並んでいます。一方で、エバンストンキャンパスは住宅地の中にあり、落ち着いた雰囲気の良いキャンパスです。Stupp先生は、シカゴキャンパ

スとエバンストンキャンパスの両方に研究室を構えていたため、私は実験の内容に応じて両キャンパスを行き来していました。どちらのキャンパスも、五大湖の一つであるミシガン湖に面しており、夏はキャンパス近くのビーチで、バレーボールやバーベキューを楽しむことができます。シカゴの夏は暑すぎず、比較的過ごしやすい気候ですが、一方で冬の寒さは大変厳しく、気温がマイナス20℃を下回ることも珍しくありません。あまりにも厳しい寒さのために、大学が休校になることもありました。



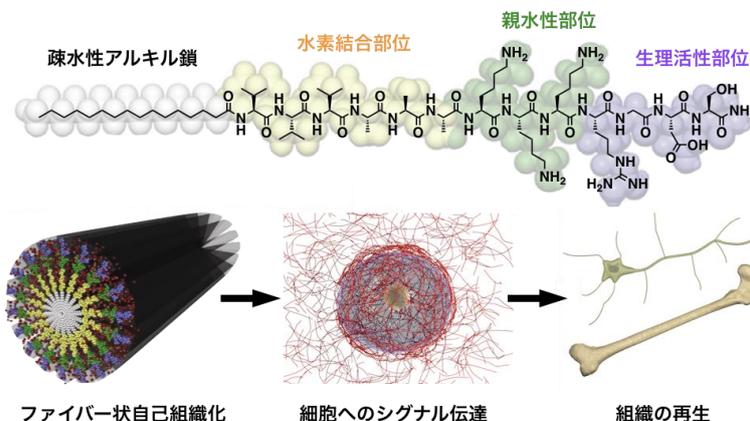
シカゴキャンパス



エバンストンキャンパス

### Stupp研究室

私が在籍していた時のStupp研究室のメンバーはおよそ40人で、その半数が学生、残りの半数が博士研究員という構成比でした。Stupp先生は複数学部の教授を兼任しているため、化学や材料工学、バイオエンジニアリングや医学など、様々な専攻から学生達を受け入れています。また、博士研究員達のバックグラウンドも多岐に渡り、有機化学や高分子化学、計算化学や材料科学をはじめ、分子生物学や細胞生物学、さらにはかつて外科医として病院に勤務していた人までも在籍していました。加えて彼らの出身国も様々で、アメリカをはじめ、カナダ、メキシコ、フランス、ドイツ、スペイン、イスラエル、シンガポール、中国、韓国、そして日本と、世界中から研究者が集まっていました。Stupp研究室は、超分子化学(分子の自己組織化に関する化学)をキーワードに、再生医療やエネルギーデバイスなどに活用できる新物質の開発を目指す研究室です。中でも、ファイバー状に自己組織化する両親媒性ペプチドに関する研究が特に盛んで、分子の合成からその生理活性評価、そして動物実験までの全てを研究室内で行うことができました。研究が複数の分野にまたがっていることから、メンバーのバックグラウンドも国籍も、バリエーションを豊かにしようというのがStupp先生のポリシーです。



### 両親媒性ペプチドの自己組織化と再生医療への応用

一般的にアメリカでは、博士研究員に対して研究プロジェクトがあらかじめ決められていることが多いという話を耳にします。しかしStupp研究室では、例外的とも言えるほど博士研究員に大きな自由度が与えられ

ており、むしろ新しい研究テーマを立ち上げることを期待されています。その一方で学生は、興味のある研究を行っている博士研究員の指導を受けながら、その派生テーマについて研究するという形がほとんどです。基本的にStupp先生が日々の指導に当たることはなく、年に2、3度行われる先生との1対1のミーティングにて、各々の研究方針や論文投稿に関するディスカッションを行います。

Stupp研究室での研究ミーティングは、各メンバーが年に一度、1年間分の研究成果を1時間ほどかけてメンバー全員の前で発表するという形式で行われていました。学生、博士研究員問わず、ミーティングでは非常に活発に発言し、ディスカッションがヒートアップしすぎて収拾がつかなくなることも珍しくありませんでした。また、発表者とは異なる分野出身のメンバーが多いために内容の理解に誤解が生じることもありましたが、そのためにメンバー全員がプレゼンテーションに工夫を凝らしており、彼らのスライドの見せ方・話術は大変勉強になりました。



Stupp 先生のご自宅でのパーティー（前列中央が Stupp 先生）。なんと、シカゴ市ダウントウンにある高級マンションのワンフロアを全て買い取り、自宅にしてしまったとのこと。

## 研究生活について

私は大学院での5年間、研究発表は全て英語で行っていました。そのため、渡米前は自分の英語力にそれなりの自信を持っていましたが、実際にStupp研究室での生活をスタートしてみると、ミーティングの内容はほとんど理解できず、とても大きなショックを受けました。それでもしばらく時間が経てば英語に慣れて、自然と内容が理解できるようになるだろうと楽観的に考えていたのですが、1、2ヶ月ほどが経過しても一向に英語が上達することはありませんでした。同時にその頃は、私自身の研究の進捗も芳しくない時期でした。私は、両親媒性ペプチドが形成するナノ構造を細かく作り分けることで、その構造的特徴が生理活性に及ぼす影響を調べたいと考えていました。そして、まずはそれを実現するための分子の合成を試みていました。しかし、設計した分子の安定性に問題があり、はじめの半年間は目的分子を得ることができませんでした。この頃は精神的に大変辛い時期で、日本在住の友人に弱音を聞いてもらったり、一人でミシガン湖をぼーっと見つめたりしていました。

しかしこのままではいけないと考え、まずは英語力の強化に努めました。そして毎日、研究室から戻った後にリスニング教材のシャドーイングを1時間ほど行うようにしました。勉強を始めて1ヶ月ほどすると効果が現れはじめ、少しずつですが英語のリスニング、スピーキングが上達していくのを実感しました。英語が上達してくると研究室のメンバーと話せる機会も増え、研究室からの帰りや週末に、近所のbarへお酒を飲み

に行ったり、彼らの自宅に招待してもらえたりするようになりました。研究が上手く行っていない時期に彼らにかけてもらった励ましの言葉の数々には、本当に救われました。

その後、研究面では何とか目的の分子を得ることができました。しかし、当初期待していた物性は観察されず、研究の方向性を見失ってしまいました。そんな中、仲良くなった研究室メンバーと一緒に何か研究できないかと考え、ディスカッションをするようになりました。中でも、神経生物学のバックグラウンドを有する博士研究員とは密にディスカッションを行い、自分は有機合成でこんな分子を合成できるが、君はどうか？と提案してみると、逆に相手の方から、こんな機能を持つ分子を設計できないかと聞かれることもありました。時にはお酒を飲みつつディスカッションを重ね、いざ共同研究をスタートすると、今までの苦労が嘘のように興味深い現象が次々と見つかるようになりました。そして、それを見た他の博士研究員からも一緒に研究をしようと声をかけてもらえるようになりました。異分野の研究者同士が力を合わせることの強みを知るとともに、そのためにもまずは人と人同士の信頼関係を構築することが重要であることを改めて学びました。



友人宅での Thanksgiving パーティー

## 留学を終えて

言語・文化が全く異なる環境で新しい研究を始めることは容易ではなく、留学当初は辛い日々を過ごしましたが、素晴らしい友人たちに支えられたおかげで、研究・私生活ともに大変充実した毎日を過ごすことができました。様々な困難を乗り切ったことで、自分自身が研究者として何とかやっていたのではないかと自信を深めるとともに、人間的にも成長できたのではないかと思います。そして何と云っても、研究という共通点を通じて、世界中の人達と繋がることのできる素晴らしさを知りました。留学時の私の友人の多くは現在、世界各地の大学や企業にて研究者として活躍しています。また、私自身も幸いなことに、現在東京工業大学生命理工学院の金原数先生の研究室にて、助教として教育と研究に携わる機会をいただいております。目の前の学生さん達を精一杯支えながら面白い研究成果を発信していくことが、私を支えてくれた友人達に対する最高の近況報告になると考えています。

## 謝辞

最後になりましたが、本留学体験記執筆の機会を与えてくださいました、鳥取大学の松浦先生に感謝申し上げます。また、研究者としての基礎を教えてくださいました、留学の機会をセッティングしていただきました相田先生、そして私を快く受け入れてくださいましたStupp先生に心より感謝申し上げます。

# お知らせ

## 第22回 生命化学研究会 ～開拓者魂を思い出せ～

主催：日本化学会フロンティア生命化学研究会

開催月日：2019年6月21日(金) 14時～22日(土) 12時

会場：北見工業大学講演ホール・多目的ホール(北海道北見市公園町)、サロマ湖鶴雅リゾート(北海道北見市常呂町栄浦)

北見工大へのアクセス (<http://www.kitami-it.ac.jp/about/access/>): 最寄りの空港は女満別空港(東京、名古屋、札幌便が就航)です。発着便にあわせて空港ー北見間をバスが運行(料金：片道 1,000円、約40分)。札幌ー北見間は、直行バス・ドリーメントオホーツク号が運行(片道 約4時間35分、1日10往復)。

講師【敬称略】:小澤 岳昌(東大院理)

吉田 孝(北見工大工)

今西未来(京大化研)

山吉麻子(長崎大薬)

建石寿枝(甲南大 FIBER)

会費：参加登録費 一般 4,000円・学生 2,000円(予定)、宿泊費 12,000円、懇親会費 3,000円

参加・ポスター発表申込方法：氏名、所属、役職(学年)、性別、E-mail アドレスを明記の上、5月10日(金)までに下記の連絡先へ申し込みください。

定員：50名

ポスター発表希望者は、要旨(A4 白黒半ページ)を作成の上、参加申込情報と同時に送付してください。要旨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、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。)

※ 今回はポスタープレビュー(2分程度のパワポによる概要説明)を予定しています。詳細は発表申し込み後にご連絡します。

問い合わせ・申込先：

〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

東京薬科大学薬学部 野水 基義

E-mail: nomizu @ toyaku.ac.jp (@の前後のスペースは削除してください。)

## 異 動

清中茂樹

名古屋大学大学院工学研究科 生命分子工学専攻 教授

2019年3月

E-mail: kiyonaka@chembio.nagoya-u.ac.jp

野中 洋

JST ERATO 浜地ニューロ分子技術プロジェクト グループリーダー

京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻 特定准教授

2019年3月

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

叶 直樹

星薬科大学薬学科 化学域 生体分子有機化学研究室 教授

2019年4月

E-mail: n-kanoh@hoshi.ac.jp

## 受 賞

田中克典 (理化学研究所 開拓研究本部)

第15回日本学術振興会賞 (2019年2月7日 受賞)

「糖鎖ドラッグデリバリーシステムによる生体内での有機合成化学」

建石寿枝 (甲南大学 先端生命工学研究所)

第7回女性化学者奨励賞 (2019年3月18日 受賞)

「非二重らせん DNA に制御される疾患発症機構の解明と非二重らせん DNA の機能制御」



## 編集後記

いよいよ今年の5月に新元号になりますね。本号は、「平成最後」の生命研究レターとなりました。このレターが発行された時には、次の年号が発表されているかと思いますが、果たして何になるのでしょうか。

昨年から生命研究レターは年二回発行になり、今回初めて年度末に編集作業を行いました。昨年までは、9月の学会シーズンに科研費申請と格闘しながらの編集作業でしたが、年度末の方が比較的余裕をもって編集できるなと思いました。

さて、次号の生命化学研究レターは、大神田さんの担当により、2019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に、みなさんからのご要望・ご意見をお待ちしております。下記の編集担当まで、ご連絡をいただければ幸いです。

2019年4月1日

松浦和則  
鳥取大学大学院工学研究科  
ma2ra-k@tottori-u.ac.jp

編集担当  
井原敏博(熊本大学)  
大神田淳子(信州大学)