

第51回生物物理若手の会夏の学校参加報告

20110928大浅 翔

日時：2011年8月25日～28日

場所：関西セミナーハウス（京都）

<概要>

今年の夏の学校のメインシンポジウムのテーマは、「生物における運動とエネルギー 実験と理論の調和」だったが、メインテーマに縛られず、バラエティーに富んだ内容であった。参加者は、主に大学院生（修士、博士）であったが、学部学生も少なからずいた。全体としては、講師の先生も含めておよそ70人の参加者がいた。

<自分の発表（ポスター）>

タイトル：FCS と Microwell を組み合わせた単一細胞内タンパク質定量測定

私の研究は、単一細胞由来のタンパク質測定系の構築である。測定系の概要としては、Microwell（直径：60 μm 、深さ：40 μm 、体積：113pL）に単一細胞を隔離し、各々のMicrowell に隔離された単一細胞を lysis buffer を用いて、細胞破碎を行う。その後、Microwell 内の単一細胞由来の蛍光ラベルしたタンパク質を FCS（Fluorescence Correlation Spectroscopy）を用いて測定するというものである。

夏の学校では、Microwell system と FCS の概要と Microwell 内で単一細胞を破碎した時の EGFP 濃度の定量下限と細胞の体積測定について発表した。以下、夏の学校での質問について述べていくことにする。

Q：FCS の原理について

A：FCS とは、溶液内の蛍光物質の測定領域内の平均分子数と平均拡散時間を求めることができる手法です。ビームを絞っていくと約 0.1fL の測定領域ができ、この領域内に蛍光物質が出入りすることにより蛍光強度が揺らぎ、この揺らぎの自己相関関数をとることにより上記の平均分子数や平均拡散時間を求めることができます。

Q：EGFP の folding 効率を考えないと真の EGFP 濃度というのはわからないのではないのでしょうか。

A：今回発表した EGFP の定量下限については、問題にはならないと思いますが、この次のステップとして目的のタンパク質の濃度を測定するにあたって、問題になってくると思います。そのため、EGFP の folding 効率というのを出しておく必要があります。Folding 効率の値次第では、補正する必要もあると思います。

<興味を持ったシンポジウム発表>

「時間」の生命科学

上田 泰己

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

人は、24時間周期の体内時計のようなものを持っている。一般的には、サーカディアンリズムと呼ばれる24時間周期で起こる生命現象などのことである。体内時計は、中枢時計として脳の視交叉上核にあり、また末梢時計も肝臓など体全体にあると話されていた。体内時計の周期を作る遺伝子というものもいくつか発見されていて、これらの遺伝子から生産されるタンパク質が揺らぐことにより24時間の周期というものを作り出している。周期を作り出すメカニズムとしては、タンパク質の分解活性は一定であるのに対して、転写（遺伝子発現）が促進と抑制を繰り返すことにより周期が生まれ、24時間周期というものを作り出しているらしい。また、外的環境（朝日など）によって体内時計はリセットされるので体内時計がおかしくなる（夜更かし）のを次の日に持ち越さないようにしている。また、体内時計も24時間と数分という長さをもっているので数分の部分が次の日に持ち越されてしまい、日々のズレが蓄積してしまうのではないかと考えられるが、これに関しても外的環境によって、毎日リセットされている。この体内時計は、三つの性質をもっていると上田先生は言う。それは、約24時間であることと外部環境によってリセットされること、さらに温度が変化しても周期が一定である（温度補償性）ということである。この温度補償性は、体内時計に関係する酵素の働く度合いのバランスによって周期が一定に保たれていると話されていた。また、朝、昼、夜を制御している遺伝子というものについて話されていて、朝配列（E-box/E'-box）、昼配列（D-box）、夜配列（RRE）があり、CLOCKなど体内時計に関連する約20の遺伝子によって朝に朝配列が活性化し、昼には、昼配列が活性化し、夜には、夜配列が活性化するようになっているメカニズムがわかってきたと上田先生は話していました。この朝昼夜遺伝子は、それぞれが互いの制御に関わっていて、朝配列が活性化しないと体内時計が壊れるため、朝配列のONとOFFが体内時計に関して重要な役割を担っていると話されていた。また、体内カレンダー（季節時計）も存在して、脳の正中隆起部にあるらしい。これは、季節による日の長さによってホルモンが転写されるといふものである。また気温も関わっているだろうが、関わりについてはまだはっきりしたことがわかっていないらしい。

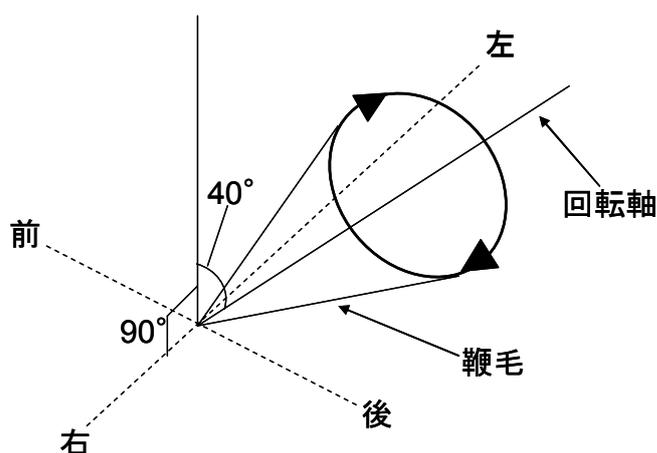
私の興味としては、約20種の遺伝子の制御によって朝、昼、夜の移り変わりがあるもののタンパク質の分解活性が関与していないことに面白いと感じた。また、あるマウスの体内時計を別の種の体内時計に置き換えると、体内時計が置き換わることも面白いと思ったが、癌細胞の細胞周期と正常細胞の周期の違いがわかれば、癌治療はできないものの治療するための期間を長くすることなどできるのではないかと考える。

「キネシン型分子モーターの運動機構」

岡田 康志

東京大学大学院医学系研究科

キネシンは、生命現象の輸送隊として働き、ニューロンにおいては細胞の端へと輸送を行う。キネシンとは、チューブリンの鎖（微小管）の上をマイナス端からプラス端へと動き、輸送する。また、一般的に知られている2足歩行のキネシンは、連続で100ステップ動く事が知られている。また、キネシンはニューロンの軸索の方に物資を輸送するため神経の軸索の伸びる速度（神経の再生速度）は軸索へのキネシンの輸送速度に依存するらしい。また、この輸送速度が低下は、神経変性疾患の原因になっている。話としては、微小管と結合部位が一つしかない KIF1A のキネシン型モータータンパク質の話が主であった。KIF1A は、マウスの脳にてシナプス小胞の前駆体を輸送するものとして発見され、単量体のままで微小管上を600ステップ以上連続で動くことを一分子観察することにより見出し、運動の方法としては、ATP の結合により微小管から一端離れ、静電的引力により微小管にまた結合する。微小管の非対称ポテンシャルにより前進する確率が高いため、KIF1A は前進する。つまり、バイアスのかかったレールの上をブラウン運動しているのである（フラッシュ・ラチェット機構）。また、微小管の結合部位を頭とすると二足歩行キネシンと同じように首振りをしているらしい。次に、KIF3 について岡田先生は話されていた。KIF3 は、鞭毛の先に材料を輸送し、繊毛を作るのに働いているらしい。この鞭毛は、図のように鞭毛の回転軸を後側に40度倒した形で回転することにより右から左へと水流を起こし、胚の左側を決めている。また、この水流によって hedgehog などの分子を右から左へと流すことで濃度差を生み出している。



私の面白いと思った点は、キネシンの輸送速度が低下すると、神経変性疾患になるというところで、ALS などの原因として知られている凝集性タンパク質の凝集とどのような関わりがあるのかについて興味を持ちました。タンパク質の凝集が増えると、輸送速度は低下するようですが、どのように関わっているかは、わかっていないらしい。また、KIF1A は、

ATP によって動くので、タンパク質凝集体ができたときに輸送速度が低下するときは、シャペロンなどに ATP を奪われているのではないかと考えたのですが、そうなっているかどうかはわからないとの事でした。それから、この鞭毛の運動で前後左右軸が確定するように見えるが、前後軸に関与しているかどうかは不明との事でした。

<興味を持った発表（ポスター）>

「細胞接着に脂質は必要？」

鈴木 まゆ

京都大学大学院

細胞間接着には、密着結合やギャップ結合などが知られている。その中でもギャップ結合に焦点をあて、発表内容は研究の途中段階までで測定システムについての話がメインだった。内容としては、膜タンパク質（ギャップ結合）が機能するにあたって、脂質の種類によって、違いがでてくるのではないかと調べるために実際にリポソームに膜タンパク質を埋め込み、実験をするという内容を発表していた。

まだ、結果があまり得られていないようだったのですが、膜タンパク質の周りの脂質の種類（性質）が機能に関与しているという話は聞いたことがなかったので興味を持った。また、タンパク質を多量体化させるために使われる FKBP ドメインをリポソームの中側にあたる方に二つ付けて、多量体化できるようにしていたが、そもそも研究している膜タンパク質が二量体化で働かづらいので実際に *in vivo* で働くときと異なった挙動をしてしまう恐れもあり、またゲルシフトアッセイもしていないようなので研究としてはまだまだという印象を受けました。ただ、やろうとしている事は、非常に興味深く面白いと思った。

「Spectroscopic study of the photoactivation process of *Xenopus* (6-4) photolyase」

山田大智

名古屋工業大学

DNA は紫外線により隣り合ったチミン同士が共有結合を形成し、Cyclobutane Pyrimidine Dimer (CPD) または(6-4)光産物を形成する。生物はこれらの DNA 損傷を解消するために酵素が働き、解消している。また、この酵素は、不活性化状態のときは紫外光の範囲に吸収極大があり、この範囲の光によって中間体を形成する。また、この中間体は、赤色の範囲に吸収極大を持ち、この範囲の光によって、活性化状態になる。つまり、紫外光と赤色光を吸収することで活性化状態となる。発表は、FTIR（赤外分光）を用いて、この酵素が光修復過程における構造変化を解析したという内容だった。

紫外線による DNA 損傷の修復として損傷のした部分の両隣を切除して、DNA ポリメラーゼで伸長し、リガーゼによってつけるというものが一般的に知られている。この他の修復方法を知らなかったのが、面白いと思った。また、DNA 損傷部位に酵素がどのようにアクセスするのかと質問したところ、よくわかっていないらしい。ただ、DNA 損傷部位と他の DNA 部位ではアフィニティーが異なるみたいで DNA をレールとして移動しながらアクセスしているのではないかと発表者は話していた。しかし、DNA は、クロマチンのまわりに巻き付いた状態で存在していて、特にヘテロクロマチンには、アクセスしにくいと考えると、DNA 上をすべるように移動しているという感じでもなさそうに考える。寧ろ、DNA 損傷を標識する分子がいて、この酵素を呼び込んでいるもしくは、酵素自体の量が紫外線により増加して、アクセスする確率を高めていると私は考える。

<全体の感想>

今年の夏の学校も去年の名古屋と同じく、暑い場所で行われて、北海道から行く私にはかなりこたえる感じでした。夏の学校の中身としては、上記に興味を持った発表を載せましたが、他にも面白い発表が多くありました。去年の夏の学校と引き続き、シミュレーションにかなり興味を持ち、質問した人には理論式や規格化法（モデル化、粗視化）などを丁寧に教えていただき、大変お世話になりました。また、他大学の学生と話す機会もあり、発表内容に対して質問や討論するという貴重な経験ができました。また、今回私の目標として一講演一質問以上する事を掲げていたのですが、7割ぐらい達成できたかなと思います。それから、北海道支部には、交通費を支援して頂きありがとうございました。また、今回の夏の学校役員の方にもとても御世話になりました。