

公益社団法人 日本化学会 バイオテクノロジー部会

# NEWS LETTER

*Division of Biotechnology, The Chemical Society of Japan*

Vol. 20, No. 2 (2017. 02. 01)

## 目 次

- ◆ 巻頭言 ..... 1  
松永 是(東京農工大学)
- ◆ 先端研究ウォッチング ..... 3  
山本 卓(広島大学)
- ◆ 若手研究者からのメッセージ ..... 7
  - ① 窪田 亮(京都大学)
  - ② 中田 栄司(京都大学)
  - ③ 細川 正人(早稲田大学)
- ◆ 海外の研究室から ..... 19  
武田 康太(マックス・プランク研究所)
- ◆ 学会活動報告 ..... 23  
神谷 典穂(九州大学)
- ◆ 各種研究会、国際会議から ..... 25  
藤田 聡史(産業技術総合研究所)
- ◆ 編集後記 ..... 27  
中村 史(産業技術総合研究所)

## ◆巻頭言◆

### バイオテクノロジー部会 20 周年によせて

2017 年で日本化学会バイオテクノロジー部会は、20 周年を迎える。1970 年代後半に遺伝子組み換え・解析や生物応用技術の発見によりバイオテクノロジーが勃興し、1980 年以降には驚異的な進歩を遂げた。バイオテクノロジーは様々な分野に広がり、医学、薬学、理学、農学、工学分野で広く研究が発展してきた。日本化学会でも、年会におけるバイオテクノロジー関連の発表が、徐々に増加してきた。また、大学でも工学系にバイオテクノロジー関連の学科・学部等が新設されてきた。

そこで、1995 年に、日本化学会の中に生物工学会が設立され、これを基にバイオテクノロジー部会を作ろうということになった。当時のメモを見ると、その時のメンバーは（五十音順、敬称略）相澤 益男（幹事、東工大）、今中 忠行（阪大）、大倉 一郎（東工大）、小林 猛（名大）、田中 渥夫（京大）、堀越 弘毅（主査、東洋大）、松永 是（東京農工大）、渡辺 公綱（東大）となっていた。私の記憶ではこのメンバーを中心に、あと何名か加わっていただき、堀越先生を初代の部会長として 1997 年度に日本化学会バイオテクノロジー部会がスタートした。日本化学会では、すでに生体機能関連化学部会があったが、こちらは生体分子やバイオミメティックを中心にし、バイオテクノロジー部会は細胞や生体組織そのものを対象にしていた。その後、両部会は協力してバイオ関連化学シンポジウムを毎年行っている。当時のバイオテクノロジー部会では、日本化学会の年会やシンポジウムを通じてバイオテクノロジー研究を盛り上げてきた。しかし、研究を進めるためには、研究資金が必要である。大学での研究費は、公費、科研費、受託研究費（JST, NEDO 等）、民間との共同研究費が主なものであった。日本化学会バイオテクノロジー部会では、生物工学会、電気化学会、化学工学会等と協力して、科研費の特定領域の立ち上げも準備してきた。1999 年には、小林猛先生が代表者になって、特定領域研究「バイターゲットのための生体分子デザイン」をスタートさせることができた。今中、田中両先生と松永が班長を務めた。2005 年には、神原秀記日立製作所フェロー（当時）を代表者として、特定研究「生体分子群デジタル精密計測に基づいた細胞機能解析：ライフサーベータをめざして」を始めた。この時の班長は浜地格（京大）、植田允美（京大）、民谷栄一（阪大）の各先生方が務めバイオテクノロジーの発展に寄与してきた。生物工学会、バイオテクノロジー部会の立ち上げにかかわった先生方とは、毎年の年会、シンポジウム、科研費の獲得など多岐の面で一緒に協力してきた。一方では互いの理解を深めるために懇親の時間も多く費やしてきた。お陰で多くの先生方とは今でもお付き合いが続いている。

工学系のバイオテクノロジーは、20 年間で大きく発展し、さらなる広がりを見せている。ポストゲノム時代に入り、オミックス解析や単一細胞解析が進み、生命に対する理解が深まった。一方では、計測、画像解析、情報処理などの技術開発が驚異的なスピードで進み、バイオテクノロジーへの期待がますます高まり、この分野の研究者は先の進路に戸惑うこともあると思う。科学者というのは論理的思考や緻密さが何より必要で、的確且つ迅速に課題の状況や実験結果を分析し、先を見通す洞察力もいる<sup>1)</sup>。一方で、行く手に起こるであろう困難や無駄を察知したり他者の間違いを容易に見つけてしまったりするがゆえに先を急ぎすぎ、真理を見落とし、向上心や努力を忘れてしまいがちになる。むしろ鈍感なほどに失敗を怖れず、試せることは何でもがむしゃらに試し、とにか

く根気よく粘り強く歩を進めた方が、謙虚にじっくりと物事を勘案し、見つけられなかったものに気づき、そしてついには社会に貢献する素晴らしい成果を得られることがある。バイオテクノロジー一部会に集う、研究者や学生の皆さんには、急ぎすぎずにじっくりと自分の分野に研究に従事して、新たな地平を切り開いていただきたい。

横山憲二部会長（東京工科大）、高木昌宏前部会長（北陸先端大）を中心とする現バイオテクノロジー部会のメンバーも、ますます発展を続けるバイオテクノロジーに貢献すると同時に、バイオテクノロジー部会を通して産官学の立場を超えて広く長く交流を続け、互いに懇親の実を結んでほしいと思う。最後に、今後の日本化学会バイオテクノロジー部会の先生方の益々の活躍を祈念して、20周年に寄せての言葉の結びとしたい。

1) 寺田寅彦、科学者とあたま

2017年1月10日 東京農工大学学長 松永是

◆先端研究ウォッチング◆

ゲノム編集とはどんな技術なのか

広島大学大学院理学研究科 山本 卓

ゲノム編集は遺伝情報を書き換える技術である

ゲノム (genome) とは、生物のもつ全遺伝情報であり、ヒトゲノムであればひとつの細胞の核 DNA に含まれる約 30 億の塩基 (A,G,C,T) のならび順 (塩基配列) が情報となっている。ゲノム編集 (Genome Editing) は、この膨大な情報の中から、書き換えたい情報を選んでピンポイントで変えることのできる技術として近年大きな注目を浴びている。

ゲノム編集の基盤となるのは、任意の塩基配列を特異的に切断する人工 DNA 切断システムである。人工 DNA 切断システムによって切断された DNA は、細胞内の DNA 二本鎖切断 (DSB: double strand break) の修復経路によって修復されるが、ゲノム編集はこの修復過程で情報を書き換えることができる<sup>1)</sup>。DSB 修復経路としては、非相同末端結合 (NHEJ: non-homologous end joining) や相同組換え (HR: homologous recombination) が知られている。NHEJ は、修復エラーが起り易い経路であり、多くの場合、切断部分の塩基配列に短い欠失や挿入の変異が導入される。これを利用して、遺伝子部分に変異を導入し、簡便に遺伝子の機能を破壊 (ノックアウト) することができる (図 1)。人工 DNA 切断システムを細胞へ導入するだけで可能な技術であることから、モデル生物に限られていた標的遺伝子のノックアウトが様々な生物種で成功している。一方、DSB 部位の両側の配列をもつドナーベクターを細胞へ共導入することによって、HR を介した遺伝子の挿入 (ノックイン) もゲノム編集では可能である (図 1)。例えば、ある遺伝子座に切断を入れ、オワンクラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を挿入し、遺伝子の発現を追跡することも可能である<sup>2)</sup>。

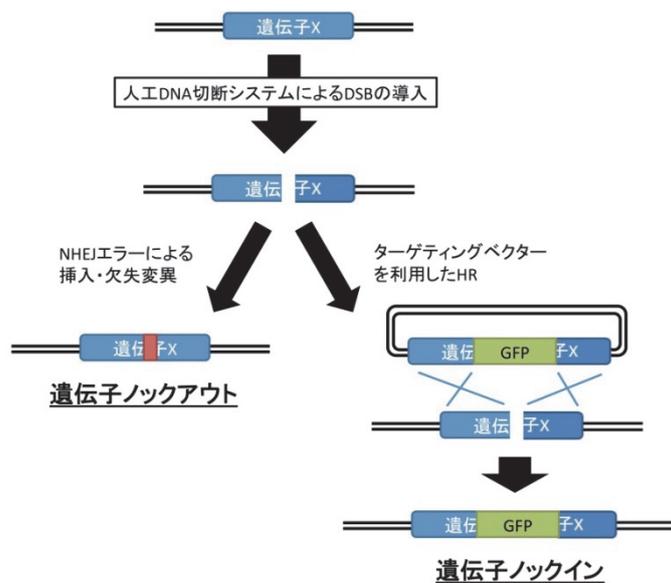


図 1 ゲノム編集による遺伝子改変 (山本ら, ウイルス, 2014<sup>3)</sup> を改変)

## CRISPR-Cas9 は生命科学研究に革命をもたらした

ゲノム編集で利用される人工 DNA 切断システムは、2013 年前半まで ZFN や TALEN などの人工制限酵素(人工ヌクレアーゼ)が主流であった。人工ヌクレアーゼは、DNA 結合ドメインの C 末端に DNA 切断ドメインを融合した人工酵素であり、主に分子クローニング手法によって作製される。ZFN は、DNA 結合ドメインとして転写調節因子のもつジンクフィンガーを利用したもので、作製が煩雑で特異性の高い ZFN の作製が難しい(図 2 A)。そのために研究者の期待は大きかったが利用は予想以上に広がらなかった。TALEN は、植物病原細菌キサントモナスの TALE タンパク質を DNA 結合ドメインとして利用する人工ヌクレアーゼである(図 2 B)。ZFN に比べると作製が簡単なことから、2011 年から TALEN を用いたゲノム編集が急速に広がった<sup>4)</sup>。

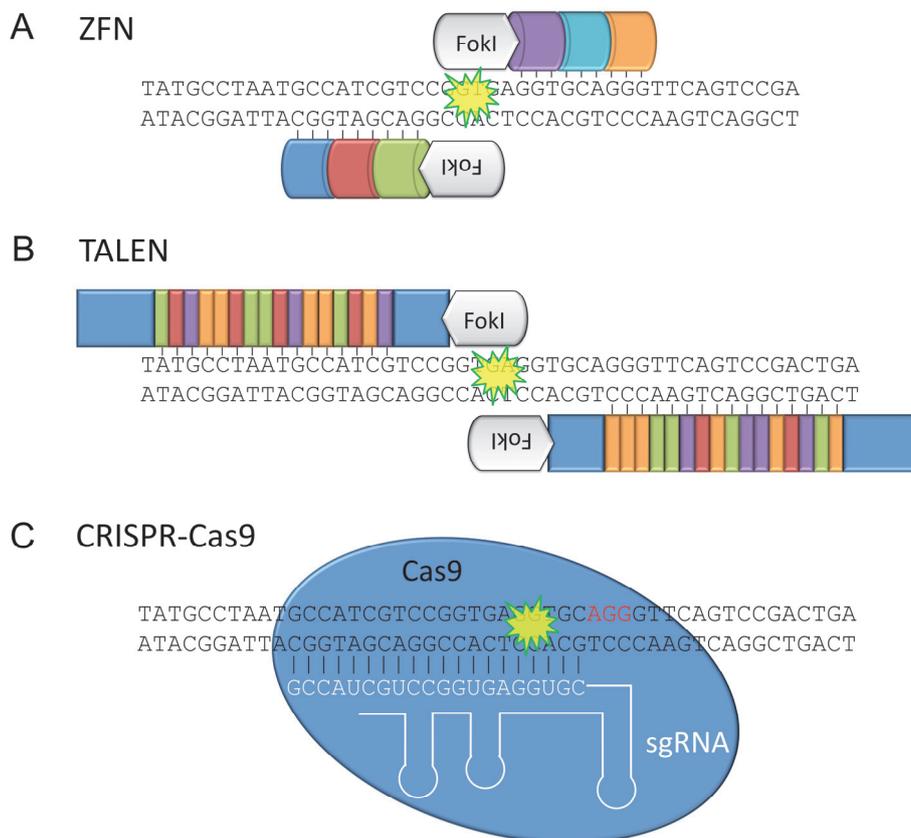


図2 様々な人工 DNA 切断システム(山本ら, ウイルス, 2014<sup>3)</sup>を改変)

2012 年、新しい人工 DNA 切断システムの CRISPR-Cas9 が彗星のごとく現れた (図 2 C)<sup>5)</sup>。CRISPR-Cas9 は、真正細菌や古細菌の獲得免疫システムを利用したゲノム編集システムである。人工ヌクレアーゼがタンパク質の DNA 結合ドメインで標的の塩基配列に結合するのに対して、CRISPR-Cas9 では 1 本鎖ガイド RNA (sgRNA) が DNA と塩基対形成することにより標的塩基配列に結合する。sgRNA は 2 つの DNA 切断ドメインをもつ Cas9 ヌクレアーゼと複合体を形成し、標的配列に DSB を導入する。この方法が人工ヌクレアーゼに比べて圧倒的に優れているのは、簡便

性とコストである。sgRNA は合成 DNA をもとに試験管内で作製することが可能で、煩雑な分子クローニング作業は必要ない。さらに、細胞内での複数遺伝子座の改変が、sgRNA の種類を増やすだけで可能となる。実際、ノックアウトマウスの作製には、これまで半年から1年かかっていたが、ゲノム編集によってひと月から数ヶ月で可能となっている。2013年以降、CRISPR-Cas9によるゲノム編集が次々に報告され、2016年には毎週のようにゲノム編集を使った論文が発表されている。CRISPR-Cas9は開発から5年の間に生命科学研究に必要な不可欠な技術に発展していることから、ノーベル賞に最も近い技術と言われている。

### ゲノム編集は生命科学の全ての分野で利用が可能な技術である

ゲノム編集は基礎研究に必須な技術であるだけでなく、応用研究や商業利用に大きな期待が寄せられている。生命科学の基礎研究分野では、遺伝子ノックアウトが可能な生物が主にモデル動物と呼ばれていたが、ゲノム編集によって全ての生物をモデル生物と呼べる時代となってきた。人工DNA切断システムを発現することができれば、微生物から動物や植物にわたる全ての生物種でゲノム編集技術を利用できる。

応用研究では、品種改良でのゲノム編集の利用が期待されている。ノックアウト植物であれば、自然突然変異で作出した作物と区別することは難しく、安全性を評価した上で有効利用することが望まれる。我々の研究グループは、大阪大学の村中俊哉教授や理化学研究所との共同研究によって、芽に毒のないジャガイモの開発に成功している<sup>6)</sup>。水畜産分野では、筋肉量の多いタイやブタの作出が報告されている。これらの動物は、ミオスタチン遺伝子のノックアウトによって作製されており<sup>7)</sup>、自然突然変異と同程度の突然変異が導入されたものである。

医学分野では、様々な疾患の発症機構の解明に加えて、疾患モデルの細胞や動物の作製に大きな期待が寄せられている。ゲノム編集で作製された細胞や動物は創薬スクリーニング、再生医療や治療に向けた研究に利用されている。これまで哺乳類のモデル動物としてマウスが中心であったが、ゲノム編集技術を利用したラットやサルでの疾患モデル作製に国内で成功している。実験動物中央研究所の佐々木えりか博士は、免疫不全マーマーセットの作製を昨年報告し、国内外から注目を浴びた<sup>8)</sup>。

再生医療分野では、疾患患者から樹立したiPS細胞で原因変異をゲノム編集によって修正することに成功している。京都大学iPS細胞研究所の堀田秋津講師は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子ジストロフィンの修復(ゲノム手術)を報告している<sup>9)</sup>。将来的には、ゲノム編集細胞を再生医療に利用することに加えて、ゲノム編集を使った治療が進むと予想される。

### ゲノム編集の問題点

ゲノム編集技術には、大きな期待が寄せられているが、利用にあたってはいくつか注意を払うべき問題もある。1つの問題は、オフターゲット作用とよばれる予期せぬ塩基配列への変異導入である。人工DNA切断システムは、目的の塩基配列に変異を導入すると同時に確率は低いが類似の塩基配列へ変異を導入することがある。当初開発されたCRISPR-Cas9は、このオフターゲット作用が高い傾向にあったが、最近ではこの作用を低減するCas9変異体が作製されている。もう1つの問題は、変異個体を作製する場合のモザイク性である。一般に動物個体のゲノム編集は、受精卵に人

工 DNA 切断システムを顕微注入することによって行う。理想的には受精卵の段階で父方と母方の遺伝子両方に変異が入れば、発生する動物には同一の変異が受け継がれるが、受精卵の細胞分裂過程で細胞ごとに異なる変異が導入される場合がある。その結果、個体中で異なる変異を有する細胞をもつことをモザイク性と呼んでいる。モザイク性を低減するためには、受精卵で確実に変異を導入する技術開発が今後必要とされる。

#### 参考文献

- 1)山本 卓編, 「ゲノム編集入門」 裳華房 (2016)
- 2)Ochiai H, Ochiai H, Sakamoto N, Fujita K, Nishikawa M, Suzuki KI, Matsuura S, Miyamoto T, Sakuma T, Shibata T and Yamamoto T. Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for quantitative imaging of gene expression in sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 10915-10920 (2012)
- 3)山本 卓, 坂本尚昭, 佐久間哲史, 部位特異的ヌクレアーゼを基盤とするゲノム編集技術, ウイルス, Vol.64(1): 75-82 (2014)
- 4) Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki KI, Kashiwagi K, Wada H, Ochiai H, Miyamoto T, Kawai N, Sasakura Y, Matsuura S, Okada Y, Kawahara A, Hayashi S and Yamamoto T. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes to Cells*, 18: 315-326, 2013
- 5) Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337: 816-821(2012)
- 6) Sawai S, Ohyama K, Yasumoto S, Seki H, Sakuma T, Yamamoto T, Takebayashi Y, Kojima M, Sakakibara H, Aoki T, Muranaka T, Saito K and Umemoto N. Sterol Side Chain Reductase 2 Is a Key Enzyme in the Biosynthesis of Cholesterol, the Common Precursor of Toxic Steroidal Glycoalkaloids in Potato. *Plant Cell*, 26: 3763-3774 (2014)
- 7) Rao S, Fujimura T, Matsunari H, Sakuma T, Nakano K, Watanabe M, Asano Y, Kitagawa E, Yamamoto T and Nagashima H. Efficient modification of myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets. *Molecular Reproduction and Development*, 83: 61–70 (2016)
- 8) Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein E, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H and Sasaki E. Non-human primate model of severe combined immunodeficiency using highly efficient genome editing. *Cell Stem Cell*, 19, 127-138 (2016)
- 9) Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S and Hotta A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4: 143-154 (2015)

## はじめに

私の研究のモチベーションは、「生命と非生命の違いを明らかとする」ことです。これまで「生命を自分の手で合成するにはどうしたら良いのか？」を念頭に置き研究を行ってきました。学生時代には、東京大学大学院理学系研究科 塩谷光彦教授の元で、金属錯体化学を基盤とした酵素様ナノ空間の構築と機能開発を行いました<sup>1-5</sup>。現在は京都大学大学院工学研究科 浜地研究室で、金属錯体化学を武器とした生細胞の人工制御技術の開発および細胞機能の人工模倣についての研究を行っています。そこで本稿では、最近開発した膜タンパク質受容体、特に神経伝達物質受容体を錯体化学で思い通りに動かすための化学技術について説明させていただきます。

## 膜タンパク質受容体とは？

生細胞に存在する膜タンパク質受容体は、細胞外の神経伝達物質・ホルモン・サイトカインを受容し、様々な細胞応答を引き起こす生理学的に重要なタンパク質群です。膜タンパク質受容体には、リガンド作動性イオンチャネルやGタンパク質共役受容体(GPCR)、受容体型チロシンキナーゼ等の種類が存在し、極めて複雑な細胞内シグナル伝達を制御しています。生細胞において、これら受容体の活性を人工的に制御する事が出来れば、望みの膜タンパク質受容体の生理機能解明、および細胞機能の人工編集への展開が期待されます。しかしながら、膜受容体の立体構造・活性化メカニズムは極めて複雑なため、膜受容体の活性を制御できる手法は限定されています。こうした背景から、生細胞において標的の膜受容体を選択的に活性化する手法の開発が求められています。

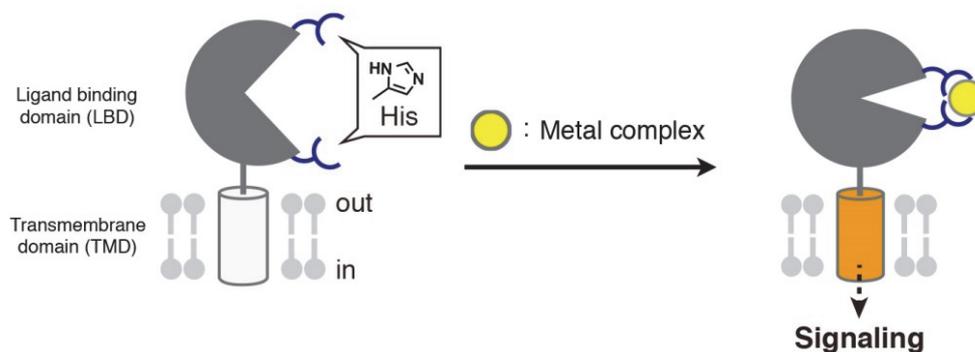


図 1. On-cell Coordination Chemistry (OcCC)の模式図

## On-cell Coordination Chemistry (OcCC)によるイオンチャネル型グルタミン酸受容体の活性制御

膜受容体を思い通りに動かすための方法論として、我々は膜受容体の活性化メカニズムに着目した On-cell Coordination Chemistry (OcCC)を考案しました(図 1)<sup>6</sup>。OcCC では、狙った膜受容体に変異導入した His と金属錯体間に配位結合を形成させ、膜受容体の活性化構造を安定化させることで人

工的な活性制御を達成可能です(図 1)。OcCC の標的として、神経伝達物質受容体の一種であるイオンチャンネル型グルタミン酸受容体(iGluR)を選択しました<sup>7</sup>。iGluR はカチオン透過性イオンチャンネルであり、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を受容し、細胞内に  $\text{Na}^+$ および  $\text{Ca}^{2+}$ を透過させることで神経細胞を活性化させます。iGluR は記憶や学習のメカニズムに関与するとされ、脳機能を解明する上で重要です。特に iGluR サブタイプの一つである AMPA 型グルタミン酸受容体(GluA2)は全長の結晶構造ならびに活性化メカニズムが詳細に解析されています<sup>8,9</sup>。GluA2 の N 末端ドメイン(amino-terminal domain)、リガンド結合ドメイン(ligand-binding domain: LBD)、膜貫通ドメイン(transmembrane domain: TMD)の三種に大別され、LBD と TMD の構造変換が活性化に重要です。すなわちアゴニスト(活性化剤)であるグルタミン酸の結合に伴い、LBD が open から closed へ構造変化を示します(図 2 上)。その結果、イオンチャンネルが開口することで活性化します。そこで我々は、この活性構造相関に基づき、LBD の closed 構造を配位結合により安定化することで活性化できると着想しました。具体的には、LBD の活性化時に近接するアミノ酸残基に対して二つの His 変異を導入し、その変異 His が金属錯体(金属イオン)に対して二座配位子として機能することで、LBD の closed 構造を安定化させることで活性化を惹起します(図 2 上)。

この設計指針に則り、His 変異を導入した iGluR を設計しました。本研究では iGluR の中でも、結晶構造解析に代表される構造情報が豊富に存在する GluA2 を標的として選択しました。具体的には、LBD の可溶性リコンビナントタンパク質(S1S2J)の結晶構造を基礎として変異体を設計しました(図 2 下)。S1S2J のアポ状態とグルタミン酸結合状態の結晶構造を比較すると、グルタミン酸結合に伴い、近接するアミノ酸残基が存在します。そこで、この近接するアミノ酸残基のうち”上唇”と”下唇”から一つずつ選択し、二つの His 変異を導入した変異型 GluA2 を構築しました。各アミノ酸残基の距離・配向を考慮し、変異箇所を変えた変異型 GluA2 を合計 8 種類構築しました。

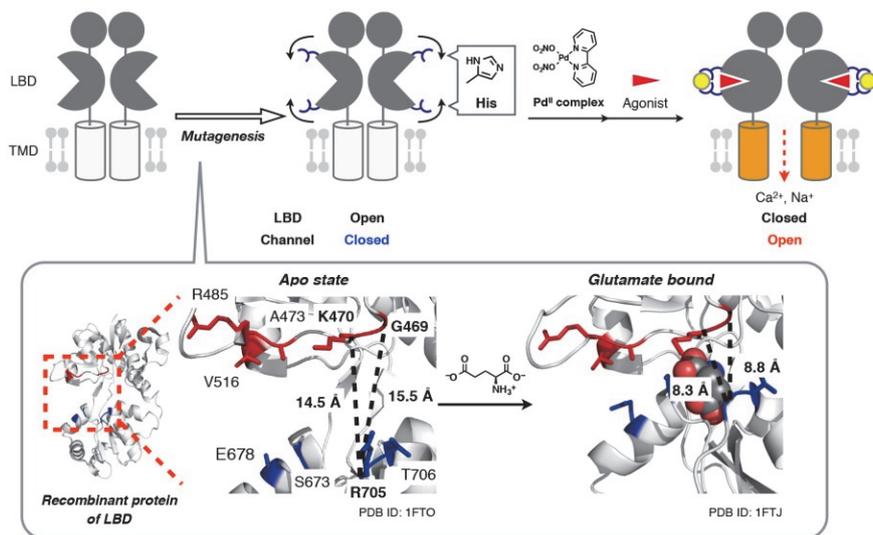


図 2. OcCC による iGluR 活性化の模式図と変異型 iGluR のデザイン

続いて、構築した変異型 GluA2 の活性を蛍光  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングにより評価しました。構築した変異型 GluA2 及び野生型 GluA2 (WT GluA2)を、モデル細胞である HEK293T 細胞に強制発現させたのち、種々の金属イオン・錯体存在下においてグルタミン酸を作用させた際の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を蛍光  $\text{Ca}^{2+}$ インジケータである Fura-2 を用いて定量的に評価しました。検討した金属イオン・錯体は、

His と高親和性を示すソフトな金属中心を持つ  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{PdCl}_2$ ,  $\text{Pd(en)(NO}_3)_2$  (en: エチレンジアミン),  $\text{Pd(bpy)(NO}_3)_2$  ( $\text{Pd(bpy)}$ 、bpy: 2,2'-ビピリジン) を選択しました。結果、 $\text{Pd(bpy)(NO}_3)_2$  と K470H/R716H 変異体(GluA2(KR))および G471H/R705H 変異体が Hit pair であることが明らかとなりました。これら二つの pair は、 $\text{Pd(bpy)}$ 非存在下ではほとんど活性化を示さない一方で、 $\text{Pd(bpy)}$ 存在下では顕著な活性を示しました。また興味深いことに、金属錯体による活性化は  $\text{Pd(bpy)}$ 以外の金属イオン・錯体では観測されませんでした。一方で、WT GluA2 では  $\text{Pd(bpy)}$ 存在下でも活性増強を示さないことから、変異体で観測された活性増強は導入した His 変異と  $\text{Pd(bpy)}$ の相互作用に由来することが示唆されました。

この活性化の詳細を蛍光  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングで確認したところ、 $\text{Pd(bpy)}$ と変異 His の相互作用により、アゴニストであるグルタミン酸の親和性が向上していることが明らかとなりました。まず始めに、 $\text{Pd(bpy)}$ の濃度依存性を確認しました。一定濃度(10  $\mu\text{M}$ )のグルタミン酸存在下における  $\text{Pd(bpy)}$ の濃度依存性を蛍光  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングにより評価した結果、シグモイド型の飽和曲線が得られ、その  $\text{EC}_{50}$ は 1.2  $\mu\text{M}$  でした(図 3a)。一方で野生型 GluA2 では明確な飽和曲線は示しません。このことから  $\text{Pd(bpy)}$ は変異導入した His と相互作用することで、GluA2(KR)の活性増強を誘起していることが示唆されました。さらに、3  $\mu\text{M}$   $\text{Pd(bpy)}$ 存在下におけるグルタミン酸の濃度依存性を蛍光  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングにより確認したところ、GluA2(KR)ではその  $\text{EC}_{50}$ 値が  $\text{Pd(bpy)}$ 有無で 30 倍低濃度シフトすることが明らかとなりました( $\text{Pd(bpy)}$ 非存在下 110  $\mu\text{M}$ 、存在下 3.6  $\mu\text{M}$ ) (図 3b)。一方で WT GluA2 では  $\text{EC}_{50}$ 値の顕著な低濃度シフトは観測されませんでした(図 3c)。以上の結果から、変異導入した二つの His が  $\text{Pd(bpy)}$ と錯体形成し、二座配位子として機能することで LBD の closed 構造を安定化していることが示唆されました。 $\text{Pd(bpy)}$ は GluA2(KR)の「アロステリックモジュレータ」として機能すると考えられます。

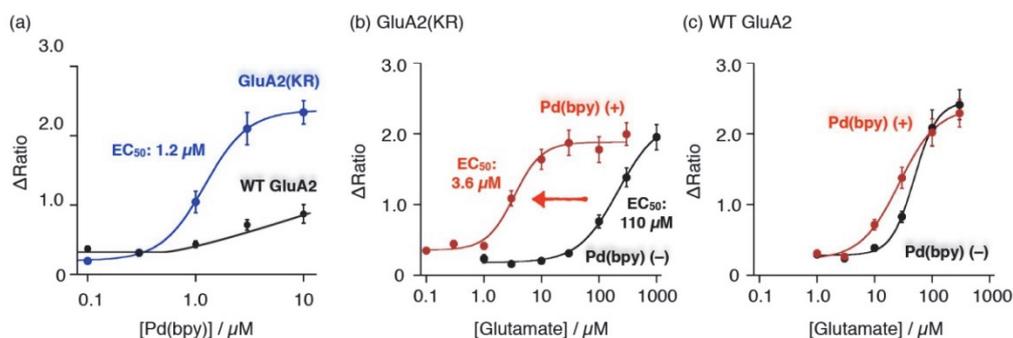


図 3. (a) グルタミン酸(10  $\mu\text{M}$ )存在下における  $\text{Pd(bpy)}$ 濃度依存性。 (b,c)  $\text{Pd(bpy)}$  (3  $\mu\text{M}$ )存在下におけるグルタミン酸濃度依存性。

また OcCC を用いることで、代謝型(GPCR 型)グルタミン酸受容体(mGluR)の人工活性化にも成功しています。iGluR では OcCC 活性化にアゴニストであるグルタミン酸が必須ですが、mGluR の場合では活性化にグルタミン酸は不要であり、 $\text{Pd(bpy)}$ のみで活性化できることを明らかとしました。すなわち、mGluR では  $\text{Pd(bpy)}$ が「アロステリックアゴニスト」として機能することが判明しました。この結果から、mGluR の場合は生体直交的に活性化することが可能です。

## 神経細胞における OcCC 活性化

最後に、OcCC が培養神経細胞において機能するかを確認しました(図 4a)。神経細胞では、イオンチャネル型・代謝型グルタミン酸受容体が内在的に発現しているため、変異型 GluA2 のみを選択的に活性化することは挑戦的な課題となります。実際、GluA2(KR)を強制発現させた培養神経細胞(大脳皮質)のグルタミン酸応答を蛍光  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングにより活性を評価したところ、Pd(bpy)の存在下で、グルタミン酸応答が顕著に増大することが明らかとなりました。一方で、WT GluA2 を発現させた神経細胞では Pd(bpy)有無でグルタミン酸応答に変化は見られませんでした。さらにグルタミン酸応答による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇におけるシグナル伝達経路の下流である CREB(転写因子の一種)のリン酸化を免疫染色により確認しました。結果、図 4b に示したように、トランスフェクションマーカーである mCherry 蛍光を示す細胞のみからリン酸化 CREB 由来の蛍光が観察されました。また他のコントロール条件と比較して、有意差があることも明らかとなりました。以上の結果から、OcCC は培養神経細胞に適用可能であり、かつ変異型 GluA2 を活性化するだけでなく下流のシグナル伝達経路も活性化できることが示されました。

## 最後に

OcCC では、二つの His と Pd 錯体の極めてシンプルな錯体化学が、膜受容体・細胞機能の人工制御に有効であることを示すことができました。本研究で用いた GluA2 は約 100 kDa のモノマーからなる四量体型膜タンパク質です。OcCC では、この巨大な膜受容体の活性をたった二本の配位結合で制御可能であり、よくよく考えれば、この事実は驚異的です。金属錯体化学が複雑な化学システムである生命に太刀打ちできるポテンシャルを有しており、ケミカルバイオロジー等の分野で強力な武器になると期待されます。

本稿では、細胞機能を制御し理解するための新しいツールについて述べてきました。OcCC は未だ発展途上の技術であり、より自在にタンパク質・細胞機能を制御・編集するための技術として昇華していきたいと考えています。また最近では、細胞が示す「自己と非自己の認識」を模倣した self-sorted 超分子ナノファイバーの直接観察にも成功しました<sup>10</sup>。私の研究のモチベーションでもある「生命と非生命の違い」を明らかとするためには、まだまだ先が遠いですが、持てる力を振り絞り努力していきたいと考えています。

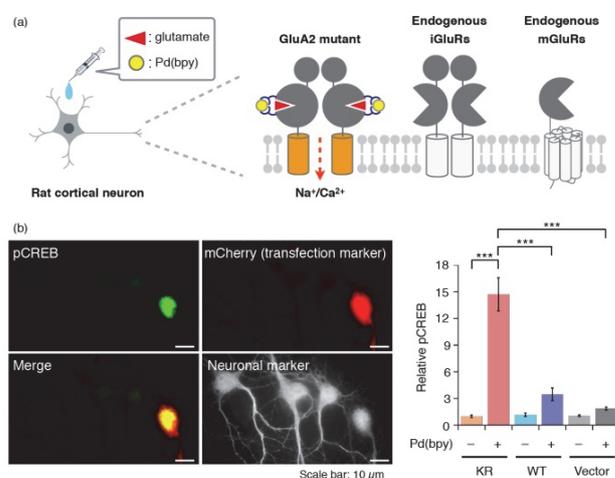


図 4. (a) 培養神経細胞における変異型 GluA2 の選択的活性化。(b) リン酸化 CREB の免疫染色像(左)と蛍光強度プロット(右)。

参考文献

1. Tashiro, S., Kubota, R., Shionoya, M. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 2461–2464 (2012).
2. Kubota, R., Tashiro, S., Umeki, T., Shionoya, M. *Supramol. Chem.* **24**, 867–877 (2012).
3. Tashiro, S., Umeki, T., Kubota, R., Shionoya, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 8310–8315 (2014).
4. Kubota, R., Tashiro, S., Shiro, M., Shionoya, M. *Nature Chem.* **6**, 913–918 (2014).
5. Kubota, R., Tashiro, S., Shionoya, M. *Chem. Sci.* **7**, 2217–2221 (2016).
6. Kiyonaka S., Kubota, R. *et al.* *Nature Chem.* **8**, 958–967 (2016).
7. Traynelis, S. F. *et al.* *Pharmacol. Rev.* **62**, 405–496 (2010).
8. Armstrong, N. & Gouaux, E. *Neuron* **28**, 165–181 (2000).
9. Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P. & Gouaux, E. *Nature* **462**, 745–756 (2009).
10. Onogi, S. *et al.* *Nature Chem.* **8**, 743–752 (2016).

窪田 亮 (くぼた りょう)

京都大学大学院工学研究科

合成・生物化学専攻 浜地研究室 助教

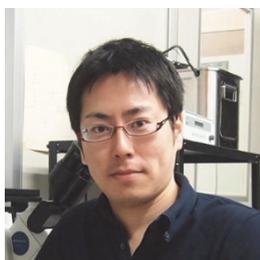
2008年3月 東京大学理学部化学科 卒業

2010年3月 東京大学大学院理学系研究科化学専攻 修士課程修了

2013年3月 東京大学大学院理学系研究科化学専攻 博士課程修了 博士(理学)

2013年4月 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 博士研究員

2015年1月 現職



## 1. はじめに

この度、「若手研究者からのメッセージ」というタイトルで寄稿する機会をいただき、大変光栄に思っている。この話をいただいた当初から、自分の研究紹介をメッセージに換えてと思っていたのだが、幸せにもちょうど同時期に別のニュースレター<sup>[1]</sup>にも研究紹介をする機会をいただいた(併せて読んでいただくと光栄である)。同一の内容で寄稿してもつまらないので、本稿では、別の視点に立ち、同様の目的でおこなわれた他の研究例と比較しながらの研究紹介をさせていただいた。この紹介の中で、特に私よりもさらに若い世代の方々が、何か参考となるものをくみ取ってくれば幸いである。

## 2. 機能性分子を配置するための足場としての DNA ナノ構造体

私は、縁あって現在の所属に異動して、初めて DNA ナノテクノロジーに触れた新参者である。あくまでも軸は、「DNA ナノテクノロジーを駆使して構築された DNA ナノ構造体の上にタンパク質・酵素を配置することで見出される新規な機能を探求すること」にあるが、それでも DNA ナノ構造体の魅力と偉大さを日々充分に感じている。DNA ナノ構造体は、DNA が相補的な塩基配列を認識して安定な二重らせんを形成することを基軸に構築される。その基礎を築いたのは N. C. Seeman で 1980 年代から様々な構造体が設計・構築されてきた<sup>[2]</sup>。そして、2006 年に P. W. K. Rothemund が DNA オリガミ法を報告して以降、その魅力の高さから注目され、非常に身近に感じられる技術として多くの研究者が扱うようになった。そのインパクトの大きさは、Rothemund が最初に DNA オリガミ法を発表した論文が、既に 2,000 回以上も引用されていることから窺い知ることができる<sup>[3]</sup>。DNA オリガミ法では、一本鎖の環状 DNA を使って一筆書きで様々な構造体を描き、その形状を数百本もの相補的な短い DNA 鎖(staple strand)が二重鎖を形成することで成型する(図 1)。実際には、ルールに従って設計さえしてしまえば、これらを適宜混ぜ合わせて加熱変性して冷却することで、シンプルな構造から複雑な形状の二次元ナノ構造体、より複雑な三次元構造体までも設計通りに構築することができる。さらには工夫次第で、動的な要素も付与することができる。DNA オリガミ法の魅力は、そのデザイン性の高さや調製の容易さ、収率の高さにある。そして構築される DNA ナノ構造体には、更なる魅力がある。それは、構造体上のすべての位置の塩基配列が明らかであることから、特定の位置の staple strand に新たな塩基配列を付加することで、構造体上に機能性分子を導入するためのアドレスを数や場所をナノスケールの精度で制御して配置できることである。これは、他の材料で構築されるナノ構造体では実現不可能な大きな特長である。このアドレスを一本鎖 DNA にしてやれば、相補的な一本鎖 DNA を導入した機能性分子を DNA ナノ構造体上に精微に配置することができる。これまでにも、蛍光色素などの有機小分子や、アプタマーなどの認識素子、金ナノ粒子、半導体素子、カーボンナノチューブなど様々な機能性材料が DNA ナノ構造体上に配置されてきた<sup>[4]</sup>。その中にはタンパク質ももちろん含まれるが、タンパク質は他の材質の機能性分子とは異なるソフトな物性をもっており、取り扱いに注意が必要である。

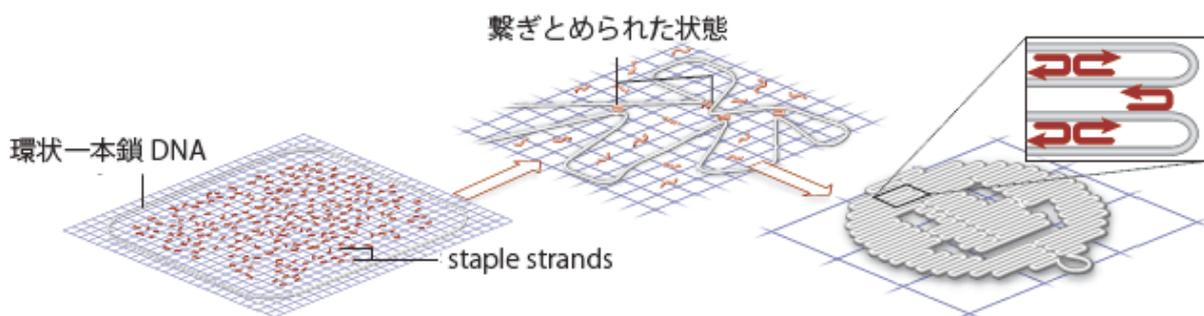


図 1. DNA オリガミ法による DNA ナノ構造体の構築過程

### 3. DNA ナノ構造体にタンパク質を配置するための方法論

タンパク質や酵素は、分子認識や触媒作用、モーターなどの生体内での機能の多くを担っており、これらを精微に配置してうまく連携させることができれば、新規な機能が発揮される期待感がある。タンパク質や酵素を DNA ナノ構造体上に配置する方法としては、既に様々な方法が報告されているが、配置後の機能化までを見据えた研究では、前述の相補的な一本鎖 DNA を導入し、アドレス DNA とのハイブリダイゼーションによって DNA ナノ構造体上の特定の場所に配置する方法が多用されている<sup>[5]</sup>。このようなタンパク質に DNA を化学修飾する方法(図 2)では、タンパク質表面の Lys の側鎖にランダムに架橋剤を化学修飾し、修飾された架橋剤に対する選択的な化学反応により一本鎖 DNA を導入した上で、得られた DNA 修飾タンパク質を精製する必要がある。これは一般的に、煩雑な操作を伴う上に化学修飾の過程でタンパク質が機能を損なう可能性もあり、かつ配置する際には (タンパク質の性質によるところが大きい) 加温等の操作がおこなえないために、満足な配置効率が得られないなどの問題を含んでいる。これでは、前述した DNA ナノ構造体の「アドレスの場所や数を精密に制御して配置できる」という魅力的な特長が失われてしまう。また、DNA ナノ構造体に配置されたタンパク質の定量が困難となってしまう、後の機能化において重要な要素となるタンパク質濃度が曖昧な状態となることが想像でき、機能評価時の定量性に不安要素を残すことになる。

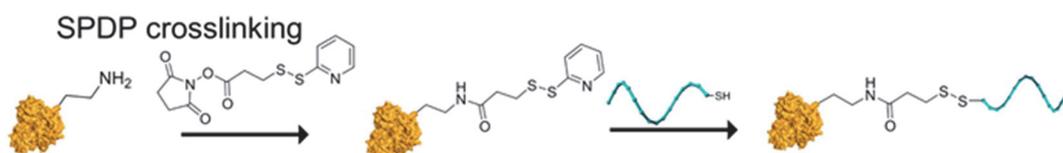


図 2. タンパク質表面にランダムに一本鎖 DNA を導入する手法

我々は、これらの問題を伴わずにタンパク質をそのまま配置できる方法として「DNA 結合性アダプター法」の開発をおこなった<sup>[6-9]</sup>。DNA 結合性アダプター法では、亜鉛フィンガータンパク質(ZFP)やロイシンジッパータンパク質(ZIP)などの DNA 結合性タンパク質の「特定の塩基配列の DNA に対して、高選択的かつ強固に結合する」特長に注目している。特に ZFP は、多様な DNA 配列に単量体として特異的に結合する人工亜鉛フィンガータンパク質(AZP)が作製できることが知られている。実際に、複数のタンパク質を融合した ZFP を調製することで、それぞれが強固に認識する特定の塩基配列を導入した任意のアドレスに目的のタンパク質を直交性を持って一分子ずつ配置することができた<sup>[6]</sup>。また、配置したいタンパク質が二量体の場合に併せて、二量体として DNA に結合する ZIP をアダプターとして採用した<sup>[7]</sup>。試験管内で評価する際には、これらのアダプターは融合タンパク質として遺伝子工学的に調製した後、大腸菌を宿主として発現し、単離精製して評価するが、DNA 結合タンパク質の性質上、大腸菌を破碎したそのまま DNA ナノ構造体と混ぜて配置することができ

た。これは、将来的な展開を考える上で非常に有意義であり、これまでに開発されているタンパク質配置法では示されていない特長である<sup>[6]</sup>。一方で、これら DNA 結合性アダプターと DNA の結合は非共有結合であるため、余剰のタンパク質を除去した場合に、平衡に従い一部解離してしまい、その後の評価段階を複雑にしてしまう。そこで、アダプターの配置効率を高め、安定な複合体を形成させるため、共有結合型アダプター(モジュール型アダプター)を開発した(図 3)<sup>[8, 9]</sup>。SNAP-tag<sup>[10]</sup>などのタンパク質タグシステムは、特定の基質と反応して安定な共有結合を形成するツールとして知られているが、単独では、その反応性の低さから迅速かつ定量的な配置は実現されていなかった<sup>[11]</sup>。モジュール型アダプターでは、DNA 結合性アダプターの迅速かつ高い DNA 認識能とタンパク質タグの安定な共有結合形成能により、共有結合形成過程の反応速度を飛躍的に高めることができ、安定かつ定量的に目的の融合タンパク質を DNA ナノ構造体上に配置することに成功している<sup>[8, 9]</sup>。現在、この手法は、複数のタンパク質を共有結合を介して同時にかつ安定にそれぞれ狙った場所に配置できるよう展開しているところである。

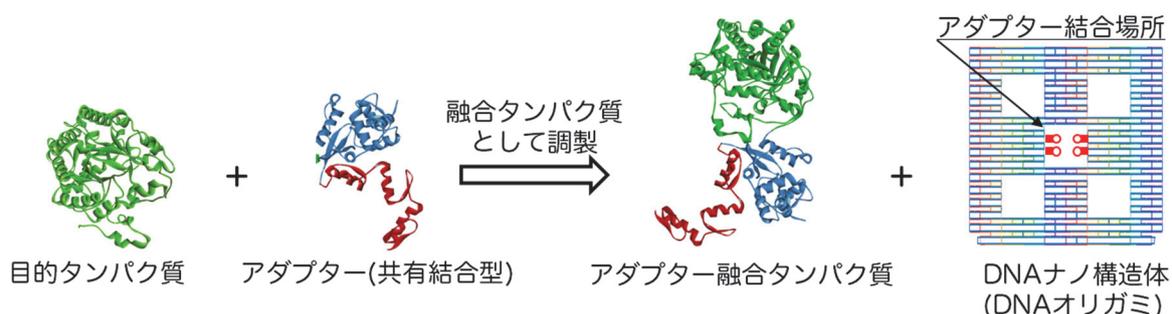


図 3. アダプター融合タンパク質の構築概念と DNA ナノ構造体への配置

#### 4. おわりに

本稿では、主としてタンパク質を配置するための足場としての DNA ナノ構造体の魅力と、その魅力を損なわずに活用するために、我々が開発した DNA 結合性アダプター法について焦点をあてて紹介した。その応用例として、DNA ナノ構造体上に連続する代謝反応を触媒する二種類の酵素を配置した反応場(分子スイッチボード)の開発に成功し、報告している<sup>[10]</sup>。詳細については、参考文献<sup>[10]</sup>または前述のニュースレター<sup>[1]</sup>を参考にさせていただきたいが、DNA ナノ構造体本来の特長と我々の DNA 結合性アダプター法の特長を生かし、DNA ナノ構造体上に配置された酵素の定量を原子間力顕微鏡(AFM)を利用しておこない、その機能の定量的な評価に努めたことを強調しておきたい。時々見かけることがあるが、ある研究者が、ある手法を開発して、その応用例を模索するうちに、その方法が苦手とする応用研究へと展開してしまう。非常に残念な事例である。誤解を恐れずに言えば、秀逸な食材があっても、その後の味付け次第で出来上がりの料理の良し悪しが変わってしまう。食材を生かすも殺すも料理人次第である。私は、食材のよさを存分に引き出せる料理人になりたいと思う。

#### 5. 謝辞

冒頭で述べたように、本研究は現所属(京都大学 エネルギー理工学研究所 森井研究室)に異動してからの日々の研究生活の中で得られた知見と研究成果です。私が、それなりのことをここで述べることができるのは、森井 孝 教授の、世界の他の研究との差別化を図ることを念頭に置いた研究姿勢と日頃からのご指導と叱咤激励のおかげです。ここに、厚く御礼を申し上げます。もちろん、共に研究を楽しんでいる研究室メンバーとすべての共同研究者の方々のごなすが欠けても現状には至ることができません。改めて感謝いたします。本文中で述べた研究成果は、日本学術振興会科学研究費補助金 (24651150・15H05492) の支援により実施されました。この場を借りて感謝いたします。

最後になりましたが、執筆の機会を与えてくださいました浜地 格 先生(京都大学)と中村 史 先生(産総研)に感謝いたします。

## 6. 参考文献

- [1] 生体機能関連化学部会ニュースレター(Vol.31, No.3, 2016.12)  
<http://seitai.csj.jp/newsletter/NL31-03.pdf>  
(または、日本化学会生体機能関連化学部会 HP : <http://seitai.chemistry.or.jp/index.html>)
- [2] 総説として : N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427.
- [3] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297.
- [4] K. Sanderson, *Nature* **2010**, *464*, 158.
- [5] 総説として : Y. R. Yang, Y. Liu, H. Yan, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1381.
- [6] E. Nakata, F. F. Liew, C. Uwatoko, S. Kiyonaka, Y. Mori, Y. Katsuda, M. Endo, H. Sugiyama, T. Morii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2421.
- [7] T. A. Ngo, E. Nakata, M. Saimura, T. Kodaki, T. Morii, *Methods* **2014**, *67*, 142.
- [8] E. Nakata, D. Huyen, T. A. Ngo, M. Saimura, T. Morii, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1016.
- [9] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86.
- [10] T. A. Ngo, E. Nakata, M. Saimura, T. Morii, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3012.

中田 栄司 (なかた えいじ)  
京都大学 エネルギー理工学研究所  
生物機能化学研究分野 森井研究室 講師



平成 17 年 8 月 九州大学大学院工学府博士後期課程物質創造工学専攻 修了  
平成 17 年 9 月 日本学術振興会特別研究員 (PD、九州大学) (平成 18 年 3 月まで)  
平成 18 年 4 月 京都大学工学研究科博士研究員 (平成 18 年 11 月まで)  
平成 18 年 12 月 日本学術振興会海外特別研究員  
(スイス工科大学ローザンヌ校(EPFL)) (平成 19 年 9 月まで)  
平成 19 年 4 月 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 助教 (平成 22 年 10 月まで)  
平成 22 年 10 月 現職

※森井研究室では、京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻の協力講座 (K11 エネルギー生物機能化学分野) として、積極的に外部から修士課程・博士課程の学生を受け入れています。興味を持っていただいた方は、まずはお問い合わせください。詳細は下記 HP を参照ください。

<http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/material/jp/index.html>



## ◆若手研究者からのメッセージ◆

早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構 招聘研究員  
科学技術振興機構 さきがけ研究者  
細川 正人

### はじめに

「ヒトゲノムの解読により、生命の設計図が明らかに」という言葉に10代の筆者は夢を抱き、その壮大な目標に貢献したいと思い、研究者を志しました。筆者が研究者となる前にヒトゲノムの解読は完了しましたが、この実現のためには塩基配列情報を迅速・高精度に獲得する技術が必要であり、この成果は多様な技術開発の賜物であったことは説明するに及びません。塩基配列読取装置DNAシーケンサーの進化は加速度的に進み、2016年現在では遂に1000ドルゲノムが現実のものになっています。そしていま、パーソナルゲノム医療の時代に移り変わろうとしています。生物学の研究分野においては、多様な生物の全ゲノム解読や遺伝子発現の網羅解析、エピジェネティック解析など大量な情報を統合的に解析し、生命現象のより深い理解へとアプローチすることができるようになりました。最近では、人体版のGoogle mapとも呼べるHuman cell Atlas(ヒト細胞地図)を作るための国際プロジェクトが発足しました。このプロジェクトでは、生体の組織中のどこに、どんな細胞が存在しているかを詳細に把握し、疾患や発生の過程でそれらの細胞の役割を正しく理解することのできる地図を作ることを目標としています。この壮大な人体地図を作るには、1細胞レベルでゲノム配列や遺伝子発現状況を網羅的に調べる技術が必要となります。最近では、高出力型の1細胞RNA-seq技術が開発され<sup>1</sup>、1細胞中のmRNAの3'末端を網羅的に読取り配列毎にカウントし、遺伝子発現情報を数千から数万の1細胞単位で調べる事ができるようになりました。このように、革新的な解析技術の登場により、全く新しい生物学的な理解への道が切り拓かれています。ここでは、この目標に向かって現在筆者が取り組んでいる「新しい1細胞ゲノム解析技術の開発」について紹介したいと思います。

### ◎1細胞がもつゲノム情報を正確に読み取る

1つの細胞に含まれるゲノムDNAの総量は、ヒト細胞では7 pg、大腸菌では5 fgです。現在の分析技術では、この微量なゲノムDNAを捉え漏らさなく、直接読み取ることはできません。はじめにゲノムDNA全体を増幅して、次世代シーケンサーで繰り返し配列読取りが可能な量までDNAを複製増幅する必要があります。この量は $\mu\text{g}$ オーダーに相当するため、初期量から $10^6\sim 10^9$ 倍にも増幅する必要があります。微量ゲノム増幅における一番の大敵は反応環境の汚染です。市販の全ゲノム増幅試薬では、 $5\ \mu\text{L}$ の反応溶液中に5~50個のコンタミネーションDNA断片が存在すると言われてきました<sup>2</sup>。最近では、UV照射により清浄化した試薬が発売されていますが、一般的な実験室環境では空気中からのエアロゾル等の反応試薬へのコンタミネーションを避けることは困難です。一方で、反応ボリュームが小さくなれば、自ずとコンタミネーションのリスクは小さくなります。そこで、通常の $\mu\text{L}$ 容量の反応液を数十万個の微小液滴エマルジョンへと変換し、ゲノム増幅反応を行う事を考えました。理論的には、反応液をピコリットル容量の液滴までサイズダウンすると、1反応区画当たりのコンタミネーションDNAの存在率は従来法の千分の1以下になります。反応場を微小区画化することの効果として、コンタミネーションDNAと標的DNAとの増幅競合を排除でき、増幅バイアス発生の低減を同時に実現できるだろうと考えました(図1)<sup>3</sup>。

はじめに、均一な液滴を高速生成するためのマイクロ流体デバイス開発に取り組みました<sup>4</sup>。我々が開発したデバイスでは、水溶液の定常流をオイルでせん断することで液滴を毎秒1000個生成します。この時、液滴径は $30\text{—}140\ \mu\text{m}$  ( $14\ \text{pL}\text{—}1.4\ \text{nL}$ )の範囲で制御が可能です。細胞またはDNA分子を含む水溶液をデバイスに導入すると、細胞や分子がポアソン分布に従って液滴中に封入・区画化されます。本液滴は熱安定性が高く、核酸増幅のための熱サイクル反応を経ても形状が安定的に維

持されます。1細胞ゲノム解析に向けた実証試験として、大腸菌を用いた反応では、微小液滴反応では非標的の増幅産物量を従来法の約1500分の1に抑制できました。各液滴でDNA断片が均質に増幅されるため、増幅バイアスが大幅に低減され、従来の4分の1のデータ量で全ゲノム配列の90%以上を補完することが可能となりました。

本法では、全ゲノム増幅の課題となってきた増幅バイアスとコンタミネーションリスクを抑えることが可能で、高精度な1細胞ゲノム解析を実現できます。この特徴は、未知の難培養微生物からドラフトゲノム配列を獲得する際などに有効であると考えています。

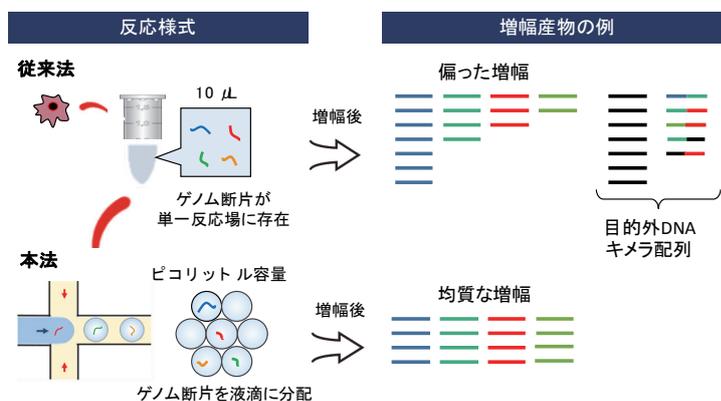


図1 液滴区画化反応による高精度な1細胞ゲノム増幅

### ◎たくさんの1細胞のゲノム情報を一度に読み取る

上記の技術開発により、1細胞ゲノムを高精度に読み取ることが出来るようになりました。次に必要とされる技術は、1細胞ゲノム解析に必要な全ての処理工程の自動並列化です。1細胞のゲノム解析では、1細胞の単離、細胞溶解、ゲノム増幅、シーケンスライブラリの調製という、連続多段階の処理工程が必要となります。現在ではウェルプレートを用いた反応が主流となっていますが、一度に処理できる細胞数は96個程度です。一方で、生体組織の多様性を評価するためには、数千から数万個単位のシングルセル解析が必要であると言われております<sup>5</sup>。この超大量な1細胞の並列解析を実現するには、従来の方式に囚われない全く新しい分析法の開発が必要です。このために、微小液滴を用いて複雑・多段階の1細胞反応を同時並列的に実行するシステム開発に取り組んでいます。

具体的には、微小液滴を流路内で連続融合させるシステムを開発し、1細胞ゲノム解析に必要な連続多段階の反応を数十万の細胞に対して超並列的かつ迅速に実施する系を確立しようと考えています。これまでに、微小液滴内に連続封入した1細胞に対して、並列的に全ゲノム増幅を行うため、2種の液滴を高速に融合させるマイクロ流体デバイスを開発しました(図2)。この液滴融合デバイスを用いて、細胞と細胞溶解液、さらに増幅試薬液滴を次々と合流させていきます。このデバイスの中では、液滴は油の中に漂う「動く試験管」として機能します。この「動く試験管」が流路を流れる内に、細胞が液滴内部で試薬と反応し、細胞溶解とDNA増幅が段階的に処理されていきます。液滴は毎秒1000個ものスピードで生み出されるため、1細胞の単離からゲノム増幅までを高速に行い、多量の1細胞ゲノムを並列的に処理することが可能となりました。現段階では、大腸がんや乳がんの細胞、さらに大腸菌などの細菌を対象として、数万個の1細胞ゲノムDNAを3時間で一遍に増幅することが出来ています。今後は、本法で処理した1細胞ゲノム情報を次世代シーケンサーにて並列解析することで、組織内の細胞多様性や環境微生物の多様性をゲノムレベルで解明するアプローチを提案していきたいと考えています。

マイクロ流体デバイスで作製する微小液滴は、極めて均質で独立閉鎖的な反応環境として機能し、外部または細胞間のコンタミネーションを完全排除した形で、1細胞ゲノムの増幅を可能とします。個々の液滴内で増幅されたゲノムは、ライブラリとして保管が可能であり繰り返しの利用ができるため、様々な応用展開が見込めます。我々の論文報告以降、同様に液滴を反応場とした全ゲノム増

幅法が提案され、1細胞ゲノム解析に貢献する技術としてのマイクロ液滴利用の可能性が相次いで報告されています<sup>6</sup>。

## おわりに

微小液滴はシンプルな流路構造で、容易に調製が可能でありながら、生成・融合・分割など様々な操作を行うことができます。これをモジュールとして組み合わせることで、より複雑な解析システムを構築することも可能と考えています。近い将来に、マイクロ液滴反応場を利用したシステムをゲノム・エピゲノム・トランスクリプトームなど様々な階層での統合1細胞解析を実現する技術基盤として確立したいと考えています。

次世代シーケンサーをとりまく機能ゲノム解析の技術革新は目まぐるしく、様々な論文、それらに基づく機器・試薬が次々と生産されており、その情報をキャッチアップしていくことも困難なほどです。残念ながら、これらの多くは海外から発信されたものであり、日本の研究者・研究機関はフォロワー・消費者の立ち位置にあります。この状況を打破するためにも、多くの研究者との協同、そして自らのアイデアと行動により、新たな技術革新を生み、真に評価され・貢献できる解析技術を生み出したいと思っています。

- 1 Macosko, E. Z. *et al.* Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* **161**, 1202-1214, (2015).
- 2 Blainey, P. C. & Quake, S. R. Digital MDA for enumeration of total nucleic acid contamination. *Nucleic Acids Res* **39**, e19, (2011).
- 3 Nishikawa, Y. *et al.* Monodisperse Picoliter Droplets for Low-Bias and Contamination-Free Reactions in Single-Cell Whole Genome Amplification. *PLoS One* **10**, e0138733, (2015).
- 4 Hosokawa, M. *et al.* Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomic library for isolation of microbial enzymes. *Biosensors & bioelectronics* **67**, 379-385, (2015).
- 5 Gawad, C., Koh, W. & Quake, S. R. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat Rev Genet* **17**, 175-188, (2016).
- 6 Tay, A., Kulkarni, R. P., Karimi, A. & Di Carlo, D. Research highlights: enhancing whole genome amplification using compartmentalization. *Lab Chip* **15**, 4379-4382, (2015).

細川 正人 (ほそかわ まさひと)

早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構 招聘研究員  
科学技術振興機構 さきがけ研究者



2006年4月 東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻 博士前期課程 修了  
2010年3月 東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻 博士後期課程 修了  
2010年4月 東京農工大学 工学府 日本学術振興会特別研究員(PD)  
2011年4月 静岡県立静岡がんセンター研究所 日本学術振興会特別研究員(PD)  
2013年6月 早稲田大学 理工学術院 日本学術振興会特別研究員(PD)  
2014年4月 早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構次席研究員 (研究院助教)  
2015年10月 科学技術振興機構 さきがけ「統合1細胞解析のための革新的技術基盤」研究者

◆海外の研究室から ◆

Max Plank Institute for Chemical Energy Conversion, Department of Biophysical Chemistry

Visiting Scientist

武田 康太

マックスプランク化学エネルギー変換研究所(MPI-CEC: Max Plank Institute für Chemische Energiekonversion)のあるミュールハイム・アン・デア・ルールはドイツ西側に位置し、近くにはエッセンやデュッセルドルフといった大都市が隣接しています。デュッセルドルフは日系企業の拠点も多く、日本との関わりが深い街です。日本の食材を扱ったスーパーマーケットがあり、寿司をはじめとした日本料理レストランや、ラーメン屋があります。最近ではドイツでも日本食は人気で、土日はラーメン屋にドイツ人と日本人が行列しているほどです。デュッセルドルフ国際空港には成田からの直行便が就航しており、空港からミュールハイム・アン・デア・ルールまではドイツ鉄道(DB: Deutsche Bahn)の快速列車(RE: Regional Express)で20分ほどです。ミュールハイム・アン・デア・ルールは比較的小さな街で、ライン川の支流であるルール川が南西に面した丘の上に研究所があります。研究所の周りは閑静な住宅街で、老人ホームも多く、犬を連れて散歩を楽しむご年配のドイツ人をよく見かけます。研究所に向かう途中で、ずんぐりしたコーギーを連れてたおばあさんとよくすれ違うことから、顔見知りになりました。こちらはドイツ語がさっぱりであるため(基本的にドイツ人は英語が上手ですが、特に高齢の方だとドイツ語しか話せない方も多いようです)、飼い犬の名前がヘンリーということだけしか分かりませんでした。今は毎朝ヘンリーの会うのが楽しみになっています。

筆者は2016年1月に東京農工大学の特任助教として採用され、その任期の間に客員研究員として同年5月からミュールハイム・アン・デア・ルールに滞在しています。現在、MPI-CECではBiophysical Chemistry、Heterogeneous Catalysis、Molecular Theory and Spectroscopyの三つの部門に分かれており、各部門長の下にグループリーダーがいます。規模によってグループリーダーの人数は異なり、パーマネントのグループリーダーもいますが、任期付きである場合の方が多くようです。部門長の権限が非常に強く、どちらかというDepartment自体が一つの大きな研究室といえます。筆者は生物物理化学部門のProf. Dr. Wolfgang Lubitzの研究室に所属しており、PIであるLubitz教授の下には5人のグループリーダーがいて、全体としてスタッフ等も含めると40人近くになります。Lubitz教授が来年6月に退官されるため、ラボ全体は縮小しつつあり、ポストドクや学生達とは来年の就職先がもっぱらの話題です。Lubitz先生は退官された後も、数年間はMPI-CECに在籍し、残った学生の指導と研究を今後も続けられるそうです。Lubitz研では金属タンパク質の物理化学、分光学的研究を行っており、特にヒドロゲナーゼや光化学系II (PS II)を対象に、電子スピン共鳴法(EPR)、フーリエ変換赤外分光法(FTIR)、メスバウアー、その他の振動分光法といった解析や、X線結晶構造解析、タンパク質の電気化学測定といった手法を用いて研究をしています。研究討論の場として月に1、2回不定期でセミナーを行っています。一回に一人ずつ1時間ぐらいの発表で、ところどころでLubitz先生が質問を挟みながら、積極的な議論が行われています。研究所内のセミナーや招待講演などが頻繁にあり、著名な研究者の知り合う機会も非常に多いです。ちなみにこれらは全て英語で行われています。というのも研究所のポストドク、学生達は国際色豊かで、Lubitz研だけでもイギリス、スペイン、ロシア、ギリシャ、シリア、オーストラリア、アメリカ、インド、中国と多くの国から来ています。またMPI-CECは、マックスプランク石炭研究所

(MPI-KOFO: Max-Planck-Institut für Kohlenforschung)と隣接しており、両研究所間での共同研究や交流も盛んです。

筆者は、Lubitz研において日本人のグループリーダーである緒方英明先生の構造解析グループに配属されています。グループといっても、緒方先生を含めてインド人ポスドクのNipaと筆者の3人しかメンバーはおらず、Nipaも筆者も結晶構造解析に関してはほぼ素人です。筆者のプロジェクトは、ヒドロゲナーゼ成熟化酵素を用いた[FeFe]ヒドロゲナーゼの成熟化です。ヒドロゲナーゼは水素ガスを酸化しプロトンと電子に変換する反応を可逆的に触媒する酸化還元酵素で、活性中心の違いによって3種類のヒドロゲナーゼが知られています。[FeFe]型と呼ばれるヒドロゲナーゼの活性中心は、Hクラスターと呼ばれる特殊な2核鉄錯体で、大腸菌による組換え発現ではHクラスターの合成ができず、活性の無いアポ体として発現します。そこで筆者は、自然界において必要とされる3種類の成熟化遺伝子をそれぞれ発現させ、さらに基質とアポ体[FeFe]ヒドロゲナーゼを反応させることで、*in vitro*での成熟化を試みています。ヒドロゲナーゼ及び成熟化酵素は酸素によって不可逆的に不活性してしまうため、一連の実験は全て嫌氣的に行う必要があります。成熟化酵素の組換え発現がうまくいかないことや、慣れないグローブボックスでの作業ということもあって、こちらに来てから半年過ぎても結果が出ませんでした。12月には自身の業績評価の審査のために一時帰国する必要があるため、焦燥に駆られる日々でしたが、帰国当日の午前中になってようやく活性のあるヒドロゲナーゼが得ることに成功しました。直前に研究成果が出るというのは、よくある話だとは思いますが、大変嬉しくそしてとても興奮したのが記憶に新しいです。

さて、海外での研究が初めてな筆者にとってドイツでの研究生活で驚いたことはたくさんありますが、まずは実験室が非常に整理整頓され、とても綺麗である点を挙げたいです。これは掃除が大好きなドイツ人の気質によるものかもしれません。こちらではマックスプランクに直接雇用されているテクニシャンによって、研究室の消耗品の管理や測定機器のメンテナンス、運営がきっちり行われています。ある日、引き出しを開けたらメディアム瓶の蓋がきっかりと赤と青で色分けされて並べた状態でしまわれておりました。誰か聞いたところ、テクニシャン見習い(トレーニング生)が片付けたという返事が返ってきました。研究室は十分に広く、日本の大学の研究室のように研究機器の設置スペースや、オフィスの机の割り振りに頭を悩ませるということはありません。ドイツ人のテクニシャンやオフィススタッフ達は、8時から9時までの間に出勤して16時から17時ごろまでにはほぼ全員帰ります。有休消化率は非常に高く、夏になると3週間程度の長期休暇を取るのも珍しくありません。

筆者が研究所に来たのは、初夏の訪れを感じる5月の終わり頃でとてもいい季節でした。6月には研究所のサッカー大会があるからと、毎週末、研究所のメンバーとサッカーの練習をしておりました。大会が終わり、7月にはMPI-CECとKOFOの合同のサマーパーティーが開催されました。8月になるとLab tripがあり、Xantenという大きな湖がある避暑地へ出かけ、水上スキーやパターゴルフをして楽しみました。Lab tripの準備のために、何回かみんなで集まってきっちり計画を立てているのがドイツ人らしいなと思いました。その間には、9月にミュールハイム市で開催されるドラゴンボード大会に向けて、ルール川でドラゴンボートの練習に参加していました。やってみるとなかなかしんどいのですが、漕いだ後に飲むビールは格別に美味しいです。後で知りましたが、ドラゴンボートの練習に必要な費用は全てマックスプランクが負担してくれていたそうです。

11月の終わりになると、クリスマスマーケットがいたるところで始まり、ドイツはまた賑やかになってきます。この頃になるとテクニシャン達は、15時頃からコーヒースペースに集まり、誰かが持ってきたケーキを食べながらお茶をして帰るといったのが日常です。Lubitz研ではシークレットサンタというリクリエーションをやります。事前にくじ引きによりプレゼントをあげる相手を決めておき、それぞれのプレゼントはコーヒースペースにあるクリスマスツリーの下に集めて置いておきます(自分が誰のサンタなのかは秘密)。そして12月1日からクリスマスまでに毎日1人ずつプレゼントを受け取り、みんなで贈られたものを見て誰が自分のシークレットサンタなのかを当て合います。ちなみに筆者が貰ったプレゼントは、オクトーバーフェストで使われるマスジョッキ(1L入る巨大なジョッキ)とミュンヘンのビールでした。研究所全体のクリスマス会が開催され、毎年恒例のテクニシャンたちによる劇や歌(内容は内輪ネタ)の後は、ディナーがあり、後半はダンスクラブ仕様にした部屋で踊っていたりと飲んでいたり、朝方まで騒いでいました。こちらで生活を始めるにあたって苦労することも多々ありましたが(特にドイツ語という面で)、慣れてしまえば、ドイツでの生活は筆者にはとても合っており、毎日とても充実した生活を送っています。一言にまとめるのであれば、ドイツのビールは最高です！

#### <謝辞>

この原稿をご依頼頂いた産業技術総合研究所の中村史先生にお礼を申し上げます。また、東京農工大学の特任助教という立場でありながら、このように約10ヶ月に及ぶ長期の留学を許して下さった、大野弘幸先生、中村暢文先生に感謝致します。経済的支援に関しては、未来価値創造実践人材育成コンソーシアム及び東京農工大学の学長裁量経費による海外渡航支援プログラムによるもので、この場をお借りして御礼申し上げます。最後に、温かく受け入れて頂いた緒方先生、Lubitz先生、いつも楽しませてくれる明るいラボメンバーのみんなに深く感謝致します。



研究室メンバーと、前列左から4人目がLubitz教授で右隣が筆者、後列右から2人目が緒方先生(写真左)。MPI-CECのエントランス、11月からクリスマスツリーが飾られています(写真右)。



実験室の様子。真ん中の写真はグローブボックスで作業する同グループの Nipa。右の写真は、巨大なオートクレーブ装置と硫酸還元菌の培養器なのですが、テクニシヤンの仕業により培養器がミニオンズに乗っ取られています。



研究所のサマーパーティーにて、MPI-KOFO のディレクターの List 教授とツーショット(写真左)。Xanten の湖へ研究室メンバーと小旅行、水上スキーの後は芝生でのんびり(写真右)。

◆学会活動報告◆

**The 22<sup>nd</sup> Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community  
(YABEC 2016)**

九州大学 未来化学創造センター・応用化学部門  
YABEC 2016 実行委員長 神谷 典穂

YABEC 2016 は、2016 年 10 月 27 日～29 日の日程で、宮崎市フェニックス・シーガイア・リゾート内のコンベンションセンターにて開催されました。YABEC (Young Asian Biochemical Engineer's Community) は、アジア地域のバイオテクノロジー、バイオプロセスエンジニアリング分野のアクティブな若手研究者が数十名の規模で参集し、2～3 日間に渡る合宿形式のシンポジウムのなかで寝食を共にしながら、研究発表会や懇親会その他の機会を通して、相互啓発や情報交換、密度の濃い個人ベースの国際交流を図ることを目的として設立されました。第 1 回の YABEC は、1994 年 6 月に開催されたアジア環太平洋生物化学工学会議 (APBioChEC) に参加した日本、韓国、中国、台湾の若手研究者の有志が中心となって企画、開催されました。以来、毎年この 4 地域の持ち回りで開催を積み重ね、今年で 22 回目の開催、日本では 6 回目の開催となりました。現在、YABEC は AFOB (Asian Federation of Biotechnology) の傘下であり、参加者の専門性も多岐に渡っています。これを踏まえ、昨年韓国で開催された YABEC 2015 にて、その略称の 'B' を Biochemical から Biological へと変更することが決まり、本年度は、会の名称が Young Asian Biological Engineer's Community へと変わって最初の YABEC となりました。その意味も踏まえ、AFOB メンバーである国内バイオ関連分野の各学会に案内を出し、若手研究者ならびに大学院学生の参加を広く呼びかけました。

学会の全体スケジュールは、初日夕方にウェルカムレセプション、2 日目は終日討論の後、バンケット、最終日は貸切バスにて宮崎観光の後、主に国外参加者を宮崎空港へと送り届けました。基調講演は、北陸先端科学技術大学院大学の高木昌宏先生にご登壇頂き、'Membrane: Order and Dynamics' という演題にて、非常に示唆に富んだご講話を頂戴しました。その後、各地域からの推薦演者によるキーノート講演、引き続き口頭セッションならびにポスターセッションを 4 つのトピックに分類して実施 (A: Medical Biotechnology & Biochip/Biosensor, B: Bioenergy, Biorefinery & Environmental Biotechnology, C: Applied Microbiology, Synthetic Biology and Bioinformatics, D: Enzyme, Food Biotechnology, Bioprocess Engineering, Biophysics & Others)、各会場にて熱い討論が繰り広げられました。また、YABEC の特徴的なプログラムの 1 つに、Biofun というセッションがあります。これは、各地域からの代表者が、バイオに関連する様々なトピックを、独自の視点で 15 分間自由に話そう、というものです。通常の学会発表とは異なり、参加者全員で楽しめる 1 時間となっています。今回、日本からは東北大学の梅津光央先生に 'We like autophagy? –Destructing and Restructing–' という演題でご登壇頂きました。ポスター発表の優秀者の表彰の後、バンケットでは地元宮崎大学理事の水光正仁先生に乾杯のご発声を頂戴し、最後は恒例のカラオケ大会で幕を閉じました。参加者総数は 205 名、内訳は、日本 98 名、韓国 25 名、中国 43 名、台湾 39 名 (一

般 133 名、学生 72 名) でした。

2016 年 4 月より、本バイオテクノロジー部会も AFOB の Institutional Members として参入されたと聞いております。来年度の YABEC 2017 は、中国西安にて、2017 年 10 月 18～20 日を会期として開催予定です。部会員の皆様のご参加をお待ち申し上げますと共に、YABEC へのご支援・ご協力を賜りますと幸甚です。

最後になりますが、YABEC2016 へご参加頂きました皆様ならびに関連学会からのサポート、要旨への広告を頂戴した関連企業様に厚く御礼申し上げます。また、宮崎県ならびに宮崎コンベンションビュローの皆様のご支援、そして、本会の運営に主体的に携わって頂いた実行委員の皆様の献身的なご支援に、心より感謝申し上げます。



参加者全員の集合写真

◆各種研究会、国際会議から◆

日本化学会春季年会における複合組織チップ中長期講演企画について

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門

藤田 聡史

毎年3月に開催される日本化学会春季年会では、一般講演に加えて複数のシンポジウムや特別講演が開催されますが、中長期的に重点的取組みが必要な研究分野については「中長期テーマ」として複数年のシンポジウムが企画されます。これは、春季年会実行委員会と学術研究活性化委員会の合同企画として行われるシンポジウムであり、毎年6件程度採用されています。

私はマイクロチップやマイクロデバイスを用いた検出技術を細胞や組織の評価に活かす事を考えて細胞チップや組織チップの研究を進めて参りましたが、ここ数年、本分野が世界的な盛り上がりを実感しています。これまで動物実験によって担保してきた毒性・薬効のADME（吸収・分布・代謝・排泄）評価を、複合組織チップ（Organs on a chip）等のオンチップデバイスで代替しようという野心的な試みが、日米欧で進められています。ヨーロッパにおいて、2013年に動物実験を行った化粧品販売を全面禁止した事も契機の一つになったと思われま



会場となった同志社大学・京田辺キャンパス

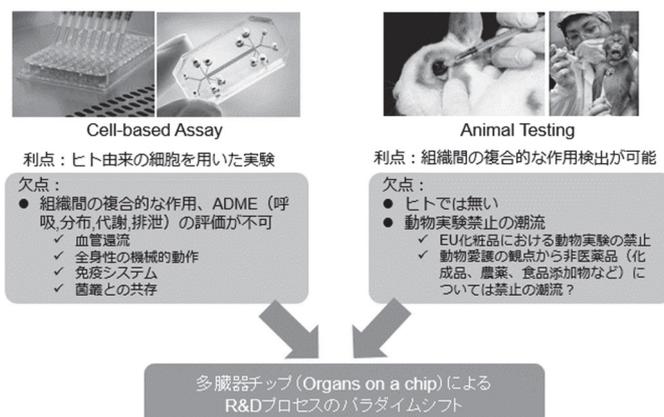
米国では DARPA（国防高等研究計画局）、NIH（国立衛生研究所）、FDA（食品医薬品局）が中心となり、5年総額170億円のプロジェクトが2012年より開始されました。Tissue Chip for Drug Screening と名付けられたこのプロジェクトでは、ドラッグスクリーニングや薬剤評価のため、人体システムとして機能するヒト組織機能を模倣した複合チップを作成する事や、10臓器（脳、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、消化器系、女性器、血管、皮膚）を複合した人体チップ（Body on a chip）プラットフォームを構築し、軍事防衛用途を含めた薬効予測、ワクチン、毒性、薬物動態、前臨床試験に役立てる事を目指しています。欧州では EU-FETs（欧州委員会・未来最先端技術プログラム）において、Insphero社（スイス）が中心となった3年総額2億円のBody on a chipプロジェクトが2012年に開始されています。一方、国内ではこのような世界的潮流があまり注目されておらず、個々の研究者が独自に研究を進めてきました。これは、我々研究者のアピールと組織化が不十分で、産官学全体でフォーカスされなかった事が大きな原因であり、本研究分野を盛り上げるべく、研究者の意識のベクトルを揃えていく試みが必要と感じています。そのような経緯を同じ思いで見られていた大阪大学の民谷先生に声掛けを頂いた事がきっかけとなって、民谷先生と「複合組織チップ」をテーマとした中長期企画講演を日本化学会にて提案させて頂く事となりました。

1回目は、日本化学会第96春季年会（2016年3月24日～27日、同志社大学京田辺キャンパス）

にて、「Organs on a chip の最新動向と生体分子科学との接点を求めて」と題して 12 人の先生にお集まり頂き、シンポジウムを開催いたしました。講演を頂いたのは、10 年以上にわたり臓器マイクロチップの研究開発を進めておられる東京大学の酒井康行先生、肝臓 *In vitro* モデルを用いた毒性・薬効評価の研究を進めておられる国立医薬品食品衛生研究所の石田誠一先生、シスメックス株式会社中央研究所の所長として研究開発を統括され、次世代の診断技術開発

を行っておられる吉田智一氏、その他細胞センシング技術や 3 次元組織構築技術を開発している若手の先生方 8 名をお招きして、それぞれの研究開発について講演をいただきました。複合組織チップをプラットフォームとした薬効・毒性評価システムを構築するには、(1) 細胞をつくる (細胞リソースの作製)、(2) 組織を組み立てる (細胞・組織リソースのチップ上への配列や臓器構築)、(3) 細胞組織を検出する (チップ上の細胞組織の検出)、(4) 従来手法と比較する (動物モデルとの比較評価) 事が必要になります。講演を頂いた先生方の最新研究を聴講し、複合組織チップ技術に取り入れる重要性を感じ、またそれぞれの研究についても大変勉強になりました。会場の熱気も非常に高かったことを覚えています。その他、2016 年度は、日本生物工学会、化学工学会においても 3D プリンターを用いた組織・臓器構築がシンポジウムのトピックとなっており、本分野の盛り上がりを実感しています。

この春、日本化学会第 97 春季年会 (2017 年 3 月 16 日～19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス) にて、「*Ex vivo* バイオデバイス—細胞・組織・臓器機能の分子理解と応用を目指して—」と題して、2 回目のシンポジウム企画を開催する予定です。今回は各種組織・臓器チップを開発されている先生方を中心に講演をお願いする事になっております。特別講演として、オランダの複合組織チップ (Organ on a chip) 研究開発ベンチャーの CEO である Paul Vulto 氏にも講演を依頼しております。バイオテクノロジー部会では様々な研究分野の方が会員として活躍されておりますので、複合領域の分野融合が必要な本分野に参集頂くことは大きな力になると思います。是非、興味を持って頂き、まずは年会シンポジウムにお越し頂ければ幸いです。



### なぜ Organs on a chip が今注目されているのか?

## ◆編集後記◆

名古屋大学堀克敏先生より引き継ぎまして、ニュースレターの編集を仰せつかりました産業技術総合研究所の中村史です。年度内2回の発行という目標が掲げられており、これを達成すべく努めて参りますので部会員の皆様方にはご協力をお願い申し上げます。

2月1日発行に向けて準備を進めて参りましたが、ご執筆の先生方には年末のお忙しい中、玉稿を賜り深く感謝しております。まず巻頭言では東京農工大学学長松永是先生に、部会発足20周年を迎えるにあたり、創立メンバーのお一人としてご執筆をお願いいたしました。部会の発展を祈念した激励のお言葉を頂きましたが、中でも「急ぎすぎずにじっくりと」というメッセージに、はたと我が身を振り返られた方も多くいらっしゃると思います。先端研究ウォッチングでは日本ゲノム編集学会会長に就任されました広島大学山本卓先生にゲノム編集における最新の技術動向についてご紹介頂きました。ゲノム編集は既に多くの方が何らかの形で取り入れている、あるいは始めようとされているのではないかと思います。ご参考にして頂ければ幸いです。若手研究者からのメッセージでは、バイオ関連シンポジウム講演賞あるいは春季年会優秀講演賞を受賞された京大窪田先生、京大中田先生、早稲田大細川先生にお声掛けをして原稿執筆して頂きました。三者三様の熱のこもった文章に大いに刺激を受けたのは私だけではないと想像します。また東京農工大武田先生のマックスプランクのレポートでは、海外での研究生活を満喫している様子が生き生きと描写されていました。後半では、九州大学神谷先生、産総研藤田先生からは学会活動に関する話題提供を頂きました。ご興味ある方にはご参加を検討頂ければ幸いです。

さて、2017年のバイオ関連化学シンポジウムは9月7～9日東京大学本郷キャンパスにて開催の予定です。シンポジウム開催の前には次号 Vol.21, No.1 お届けする予定でおりますので、よろしくお願ひいたします。

NEWS LETTER Vol. 20, No.2 2017年 2月1日発行

事務局：〒101-8307 東京都千代田区神田駿河台1-5, 日本化学会バイオテクノロジー部会

Office of Secretary: The Chemical Society of Japan, 1-5, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8307, Japan