

中谷 ARIP 参加報告書

氏名：原田 茉優

所属：京都大学農学部応用生命科学科 B3（現 B4）

ホストラボ：UC Davis, Biomedical Engineering, Dr. Soichiro Yamada

期間：2026年1月31日～4月10日

1. はじめに

約2ヶ月間、UC Davis の Dr. Soichiro Yamada のもとで研究インターンをさせていただきました。報告書を記載している4月下旬現在でも、毎日のように Yamada ラボでの研究生活を思い出しており、まだまだ興奮は冷めやみません。この報告書では、ARIP での経験を少しでも共有できたらと思っております。研究内容の他にも、研究者としての将来観に与えた影響について 3. ARIP で習得したものや 4. ARIP に参加した成果・意義の段落で触れています。ぜひ楽しんで読んでいただけたら幸いです。

また、RIES や ARIP への応募を考えていらっしゃる方で質問等ありましたら、LinkedIn アカウント (<http://www.linkedin.com/in/mayu-harada>) や Email (harada.mayu.55c@st.kyoto-u.ac.jp) を通じてご連絡ください。お力になれば嬉しいです。

2. インターン先での研究内容

2.1 要旨

伸張力を加えられた細胞において、細胞質タンパク質 Cten (Tensin-4) がケラチン繊維上に結合する領域の同定を行いました。配列解析により生物種間で高度に保存された3つの領域が同定され、そのうち2領域が結合に寄与していることが示されました。また、2領域の中で特定のアミノ酸残基の寄与率が高いことがわかりました。さらに、異種 Cten もイヌケラチン繊維との結合能を有することが明らかになり、この相互作用が系統ごとに最適化されてきた可能性が示唆されました。

2.2 背景

Tensin ファミリーの一員である Cten は、その大部分が天然変性領域 (IDR) で構成されています (Lo, 2017)。先行研究によって、細胞に対し外的に伸張力を与えると、Cten がケラチン骨格と

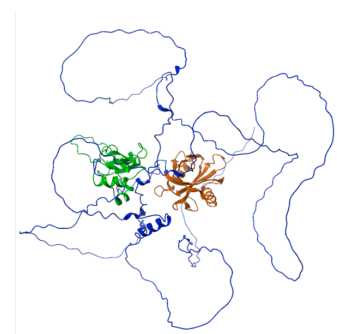


Fig 1 Cten の構造
緑および橙はドメイン構造、青は IDR を示す。

結合すること、およびこの結合には Cten の IDR が不可欠であることが示されています (Cheah et al., 2019)。しかし、IDR はその不安定さがゆえに、相互作用の構造的なメカニズムを調べるのが非常に難しい領域です。実際、これまでに多数の Cten の断片が作られ、それぞれのケラチン結合能が調べられてきましたが、相互作用に参与する配列の同定には至っていません。そこで本研究では、さまざまな生物種の間で保存されている領域に着目しました。一般に、保存領域は生物にとって重要な役割を果たしていることが知られています。仮にヒト以外の Cten も伸張刺激応答性をもっていた場合、保存されている領域が重要な役割を果たしていると推察できます。

Cten などの結合タンパク質を含むケラチンネットワークは、機械刺激を細胞に伝えるメカノトランスダクションに大きな役割を果たしている可能性が示唆されており、本研究で得られた新たな知見はメカノトランスダクションの機序を明らかにする重要な手掛かりとなり得ます (Kim et al., 2024)。

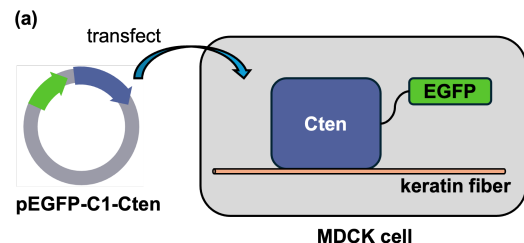
2.3 方法

保存領域の同定

OrthoDB から Cten の系統樹を作成して注目する生物種を選定し、CLASTALW を用いて Cten の多重配列アラインメントを実施しました。その結果、IDR の中に 3 つの保存領域を同定しました。未発表のデータであるため、ここでは具体的なアミノ酸番号については触れず、領域 1 ～ 3 と呼称します。

一細胞実験

イヌの 腎尿管上皮細胞である MDCK 細胞に異種由来の Cten や欠失・変異を与えた Cten を EGFP タグとともに発現させ、隣接細胞をマイクロニードルで引っ張りました。伸張力と平行な方向にケラチン繊維が並ぶため、ケラチン繊維への結合能をもつコンストラクトの場合は、Fig 2 (c) に示すような繊維状の蛍光が見られます。異種 Cten としては、メダカ (*Oryzias latipes*)、セイヨウツメガエル (*Xenopus tropicalis*)、ニワトリ (*Gallus gallus*) の三種を用いました。また、領域 1 ～ 3 を単独または複数欠損したコンストラクトを作成しました。MDCK 細胞はイヌのケラチン繊維を内在していることから、これらの Cten とイヌケラチン繊維との相互作用を見ることができます。メダカケラチン繊維との相互作用を見る実験では、イヌケラチン (K8/K18) のノックアウト細胞にメダカケラチンをトランスフェクションしたものをを用いました。



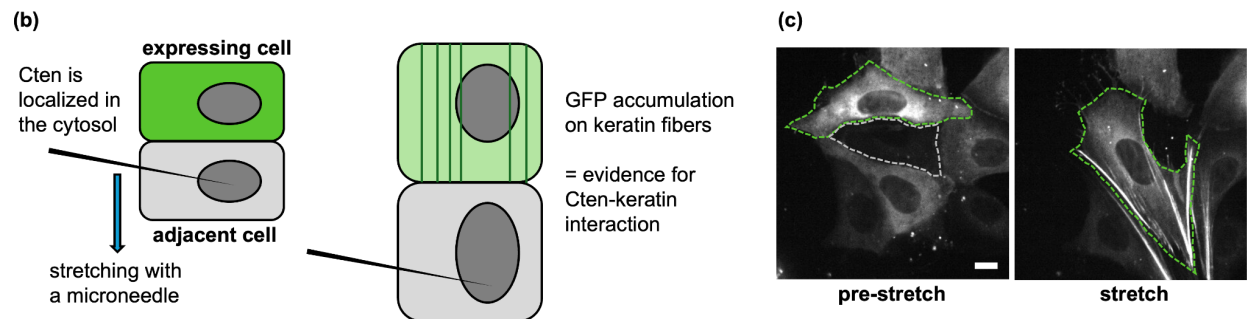


Fig 2 一細胞実験の概略図

スケールバーは 10 μm を表す。

画像解析

ImageJを用いて画像解析を行い、伸張前後の繊維状蛍光面積を比較しました。GFP accumulation と Relative intensity の2つのパラメータを算出したところ、これらは非常に強い正の相関を示したことから、先行研究で用いたれてきた GFP accumulation のみに着目することしました。GFP accumulation は伸張前後の繊維面積変化を、伸張後の細胞面積で割った値として求められ、大きい値ほど Cten とケラチン繊維の相互作用が強いことを意味します。

$$GFP\ accumulation = \Delta fiber\ area\ (stretch - prestretch) / cell\ area$$

$$Relative\ intensity = GFP\ in\ fibers / GFP\ in\ a\ whole\ cell$$

2.4 結果・考察

異種 Cten もイヌケラチン繊維との結合能を有する

メダカ、セイヨウツメガエル、ニワトリの Cten はいずれもイヌケラチン繊維との結合能を示しました。GFP 単体はケラチン繊維への集積を全く示さず、ヒト Cten は最も効率よく集積した。

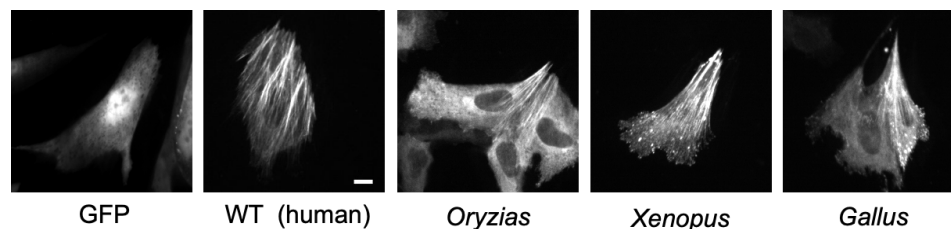


Fig 3 伸張後の GFP-異種 Cten による蛍光

ネガティブコントロールとして GFP 単体、ポジティブコントロールとして GFP-ヒト Cten の解析も行った。

スケールバーは 10 μm を表す。

Cten とケラチン繊維の相互作用は系統ごとに最適化されてきた可能性がある

Fig 3 の結果に対して定量解析を行うと、メダカ、セイヨウツメガエル、ニワトリの Cten はヒト Cten と比較してイヌケラチン繊維との相互作用が有意に弱いことが示されました。そこで、この相互作用が哺乳綱などの系統ごとに最適化されてきた可能性を考え、イヌケラチンの代わりにメダカケラチン繊維を使った実験を行いました。その結果、伸張力を与えた際のヒトおよびメダカの Cten はメダカケラチン繊維との共局在は確認されましたが、有用なデータ数を十分に集めることができず、定量解析を行うことができませんでした。これは、内在性のイヌケラチン繊維をノックアウトしたことで、細胞接着が脆弱になり、Cten とケラチン繊維が相互作用を始める前に千切れてしまう細胞が多かったことが原因だと考えられます。

領域 1 と領域 2 は相互作用に大きく寄与する

単独欠損 (d1 ~ d3) に着目すると、領域 1 と領域 2 を欠損したときは GFP accumulation が低下するが、領域 3 の欠損は有意な影響を与えないことがわかります。また、領域 1 と 2 の重欠損が、GFP accumulation をより低下させることが明らかとなりました。さらに、領域 1 と領域 2 の中間に存在するリンカー区間を欠損した細胞 (d_linker) では、野生型と同程度の GFP accumulation を示しました。以上より、領域 1 および領域 2 は Cten とケラチン繊維の相互作用に有意に寄与するが、それらの一次構造上の距離は影響を与えないことが示されました。

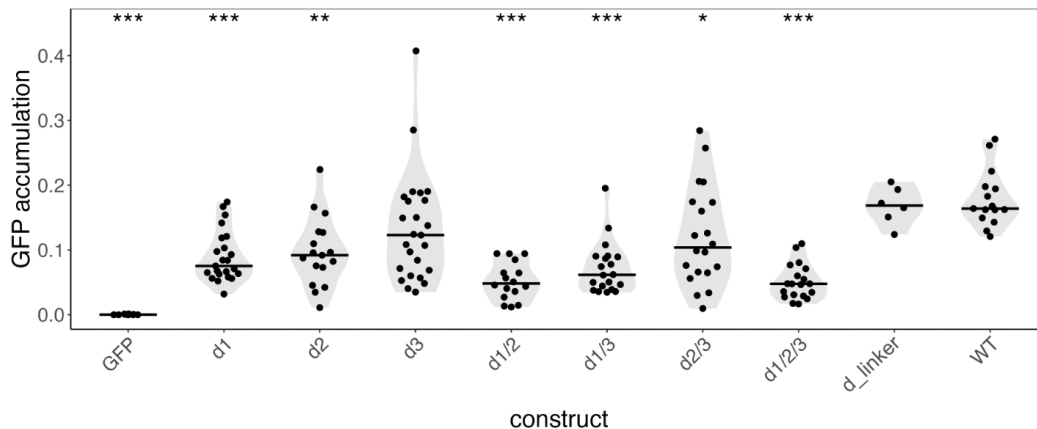


Fig 4 各コンストラクトにおける GFP accumulation の比較

アスタリスクは WT とのダネット検定の結果を示す。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

特定のアミノ酸残基が相互作用に重要な役割をもつ

相互作用に寄与する領域を残基レベルで特定するため、領域 1 および領域 2 に点変異を与えたコンストラクトを作成しました。その結果、領域 1 の極性アミノ酸および領域 2 のセリン残基が重要な役割を果たしている可能性が示唆されました。一方、領域 2 のセリン残基のリン酸化・脱リン酸化状態は相互作用に有意な影響を与えませんでした。これらの結果は、保存領域

の特定のアミノ酸残基が Cten とケラチン繊維の相互作用に重要な役割を果たしている可能性を強く示唆しました。

2.5 今後の展望

本研究では、Cten とケラチン繊維の相互作用に寄与する Cten の領域を示すことに成功しました。今後は、寄与率の高い残基の絞り込みやケラチン繊維側の重要な領域の同定を通じて、相互作用の機序を明らかにすることが求められます。さらに、本研究の手法ではメダカケラチンを用いた解析が困難であったことから、今回採用した一過性トランスフェクションの代わりに安定トランスフェクションを採用したり、MDCK 細胞の代わりに魚類の上皮細胞を利用したりすることで、相互作用の最適化という仮説を検証する必要があります。

2.6 参考文献

- 1) Lo, S. H. (2017). Tensins. *Current Biology*, 27(9), R331–R332.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.041>
- 2) Cheah, J. S., Jacobs, K. A., Heinrich, V., Lo, S. H., & Yamada, S. (2019). Force-induced recruitment of cten along keratin network in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(40), 19799–19801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911865116>
- 3) Kim, D. S., Cheah, J. S., Lai, T. W., Zhao, K. X., Foust, S. R., Julie Lee, Y.-R., Lo, S. H., Heinrich, V., & Yamada, S. (2024). Tandem LIM domain-containing proteins, LIMK1 and LMO1, directly bind to force-bearing keratin intermediate filaments. *Cell Reports*, 43(7), 114480. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114480>

3. ARIP で習得したもの

RIES 後の報告会でいただいたアドバイスの中で、特に心に残ったのは「ラボで自分が何をしたいかだけでなく、自分がどのようにラボに貢献できるかも考えるとよい」というお話でした。RIES のときは周囲の人から考え方やスキルを吸収することに集中していましたが、ARIP では自分の研究者としての価値や独自性を示せるように取り組みたいと考えました。そこで、ARIP の選考前に Yamada 先生にどのような人材を求めているのかをお聞きし、自分の強みをどのように活かせばその人物像に近づけるかを模索しました。具体的には、生体分子の構造の進化に対する私の興味を、Cten の保存領域に着目するという形で反映し、これまで Yamada ラボで注目していなかったアプローチを提示しました。その結果、新しい発見や示唆に辿り着くことができ、ラボにも微力ながら貢献できたのではないかと思います。実際、Yamada 先生やラボメンバーから「あなたが来てからこのテーマが進み出した」というコメントをいただけたとき

は、達成感と安心感でいっぱいになったのを覚えています。以前は、研究プロセスの中で論理的思考や試行錯誤を繰り返すことにやりがいを感じていましたが、それに加えて、所属ラボや学問分野の進歩に貢献できたという実感も研究者の原動力になるのだと気づきました。

また、新たに研究スキルを身につけることができました。ARIP での研究内容においては、コンストラクトの作成までの分子生物学的スキル、それをトランスフェクションする細胞生物学的スキル、マイクロニードルを使って細胞に伸張力を与えるハードウェアスキルの3つが求められました。一つ目のスキルはこれまでの研究経験でそれなりに培ってきましたが、細胞培養や蛍光顕微鏡の操作といった後半に必要なスキルは、ARIP を通じて新たに習得したものです。私は今後追求する道として微生物学を考えており、これらのスキルが直結する分野ではありません。しかし、本来の専門分野とは異なるスキルを得られたことは、研究者としての可能性を広げる上で非常に貴重な機会になったと思います。

4. ARIP に参加した成果・意義

RIES では研究者としての自信や大切な人脈を手に入れたことが最大の成果でした。一方、ARIP では単独で渡航するため、一人時間に将来や研究について思いを巡らせることが多くありました。これは、自分を客観視し、自分に取ってベストな未来を見つけるという意味で非常に有意義な時間でした。ここでは、ARIP 期間に得た、研究者としての意識や将来観に関する3つの学びを共有させていただきます。

希少性効果

アイスクリーム店に行ったとき、個数限定フレーバーを見つけると、つい手に取ってしまいませんか。人によるかもしれませんが、私はこの戦略に嵌るタイプで、渡米中も常にアメリカ限定メニューに惹かれていました。この傾向はマーケティングでは希少性効果（Scarcity Effect）と呼ばれ、期間や個数が定められており希少なもののほど価値が高いと感じる心理に基づいているそうです。私が ARIP で学んだのは、この希少性効果が経験にも当てはまるのではないかとことです。つまり、2ヶ月という期限が設けられていることで、その期間の価値が一層高く感じられ、研究も休暇も充実させようという意識が働くのだと気づきました。とはいえ、これからずっと2ヶ月スパンで研究をこなしていくのは不可能です。同じ場に滞在しながらもモチベーションを保つには、発表や要旨の締切など数ヶ月ごとの「期限」の設定が必要です。

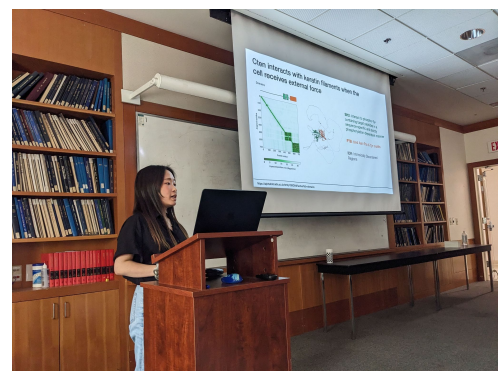


ARIP の期間中にも、（後述しますが）2回の発表の機会を得られたことで、この発表までにこの結果を得よう、というモチベーションのもと常に全速力で研究に取り組みました。今後も、所属ラボや学校から与えられる期限を利用しつつ、こうした期限を自主的にも設けるように心掛けます。

研究は結果を共有してなんぼ

渡航して最初の週末、日本学術振興会のバイエリアでの集まりに参加し、iPS細胞で著名な山中伸弥先生の講演を拝聴する機会をいただきました。山中先生のお話はユーモアに溢れていて、医学知識が身に付いていない私にとっても、45分間があつという間に感じられるほどでした。次第に、私もこんな風に人に感銘を与える話をしてみたい、という思いが芽生え、翌朝には Yamada 先生にプレゼンの機会がないかご相談しました。今振り返ると、なぜそのとき行動力と積極性を発揮できたのかは謎ですが、アメリカンマジックということにして素直に自分を褒めたいと思います。というのも、Yamada 先生をはじめとする方々のおかげで結局2回の発表の機会をいただけたのです。発表の日時が決まってからは、それに間に合うような実験スケジュールを立て、得られたデータをオーディエンスが理解しやすいように可視化し、それを論理的かつ一貫性のある資料にまとめるという怒涛の作業が待っていました。Yamada 先生や PhD 学生の Dah Som にアドバイスをもらいながら何とか仕上げることができ、自分なりのベストは尽くせました。ただ、質疑応答で一度詰まることもあり、やはり最初に夢見た山中先生レベルのプレゼンには到底物足りなかったと悔しさも残りました。

一般的に、研究の醍醐味は、自分で立てた仮説を自分で検証し、その結果を見るプロセスだと思います。しかし、どれほど興味深い研究を行っていても、それを共有する機会やうまく伝える話術や筆力がなければ、誰からも評価してもらえないものです。また、質疑応答を通じて改善点に気付いたり、新たなアプローチに目を向けたりすることもあります。当たり前のことですが、ARIP を通じて結果を共有する重要性を再認識しました。今後も発表の機会には積極的に飛び込み、共有する価値のある結果を生み出せる研究者を目指そうと思います。

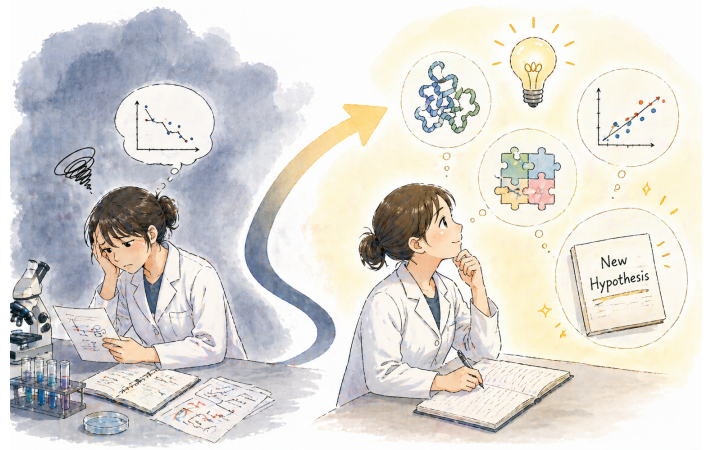


言い訳が得意な研究者

山中先生の講演の中で、もう一つ心に残ったエピソードがあります。アメリカで研究中、予想に全く反する結果を得て、失望ではなく好奇心を掻かれていることに気がつき、研究の道に

進む自身と覚悟がついた、というお話です。これを聞いた当時は、私ならば正反対の反応を示すだろうと自虐的に思ったのですが、実際に研究を進める中で逆転の発想に至りました。つまり、結果に対して一喜一憂する性格は、一見すると研究者に不向きであるように思いますが、その失望感や悔しさをバネにして解決策を見出せるのであれば、むしろ研究の推進力になり得ると考えたのです。仮説を支持しない結果に対する焦燥感を活かしてなんとか論理的な関連づけを行えば、それは新たな仮説となるはずです。実際、ARIP の期間にもこの現象は何度も起きました。言い訳的思考から生まれた新たな仮説のおかげで、研究の裾野が当初の想定よりも広がり、多くの洞察に繋がる研究として結実しました。

自分の理想と外れた現実に対する悪習慣を、逆転の発想で自分の強みにする。ARIP で学んだこの考え方を活かし、私は言い訳が得意な研究者を目指そうと思います。



5. その他

私は RIES と ARIP で異なる都市に滞在しました。Atlanta は大都市でイベント等が活発ですが、治安の面で不安を感じることも多くありました。一方、Davis は娯楽が少ない小さな町ではありますが、夜まで安心して研究に集中できる場所でした。同じアメリカという国であっても、全く異なる 2 つの環境を経験できたことで、将来の進学先や就職場所を考える材料が得られたと思います。

また、ARIP 滞在中にはアメリカ西海岸に滞在することの強みを活かし、多くの場所を訪れました。San Francisco や Los Angeles を訪れたほか、Vancouver や Washington D. C. など遠い地域も訪れ、複数のラボを訪問したり恩師との再開を実現したりしました。逆に RIES で仲良くなった友人がアトランタから遥々 Davis を訪れ、近況やキャリア観を語り合っ刺激を与えてくれることも多くありました。研究という最大の目的とは異なりますが、新しく人脈が形成され、その繋がりが強いものになることは、RIES と ARIP に共通する最大の魅力だと思います。これからもずっと、中谷財団のコミュニティで多くの学生の方々と繋がりが続けられることが非常に楽しみです。

6. 謝辞

今回のプログラムでは、非常に多くの方に支えられ、有意義な留学をすることができました。私を受け入れてくださった Yamada ラボの皆様へ改めて感謝申し上げます。特に Dr. Soichiro Yamada には研究の進め方や研究者としての心掛けをマンツーマンで教えていただきました。また、進路やキャリアに関する相談にも乗っていただいた上、発表したいという私の意思を尊重してくださったおかげで、2 回ものプレゼンの機会を得ることができました。1 年前に Alumnus である百合香さんから「ARIP で得られた最大の成果は Yamada 先生と出会ったことだ」と聞いてから、ずっと Yamada ラボでのインターンを心待ちにしていたのですが、実際に渡航してみて、その言葉に深く頷く毎日でした。PhD 学生である Dah Som には、セミナーでの共同発表をさせていただいたほか、公私ともにさまざまな相談に乗っていただきました。海外 PhD への進学を志している私にとって、心強い先輩です。



最後になりましたが、私の研究留学を支えてくださった小川様、藤川様をはじめとする中谷財団の皆様へ感謝申し上げます。また、タンパク質間相互作用の解析について詳細かつ専門的なご助言をくださった京都大学の菅瀬謙治教授、渡航前から Davis での研究や生活についてアドバイスをくださった先輩方、渡米中も常に刺激とモチベーションを与え続けてくれた同期の友人にも感謝いたします。今後も RIES や ARIP で得られた方々との繋がりを大切に、学問と研究に精進して参りたいと思います。