

横川 暖 お茶の水女子大学 2年 理学部生物学科 ホストラボ ジョージア工科大学 PI: Dr. Lily Cheung メンター: Dr. Quang Tran

## 1. ジョージア工科大学での研究活動

私は、ジョージア工科大学で、植物アポプラスト内のカルシウムイオンバイオセンサー開発に取り組みました。

植物は塩害や病原菌など、環境ストレスを受けると、カルシウムイオンを使って細胞にシグナルを伝えます。カルシウムは「セカンドメッセンジャー」として働き、ストレス応答の中心にある分子です。特にアポプラスと呼ばれる、細胞壁と細胞膜の間の空間にはカルシウムが非常に多く蓄積しています。カルシウムは細胞壁のペクチンと結合してゲル化し、病原菌の侵入を防ぐという役割が知られています。

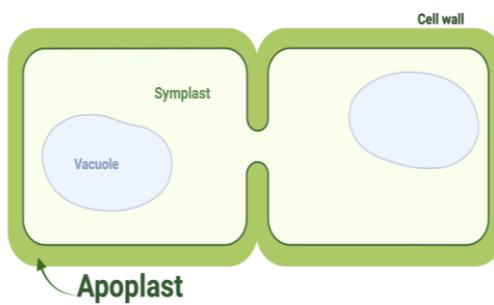


図1：アポプラスの位置

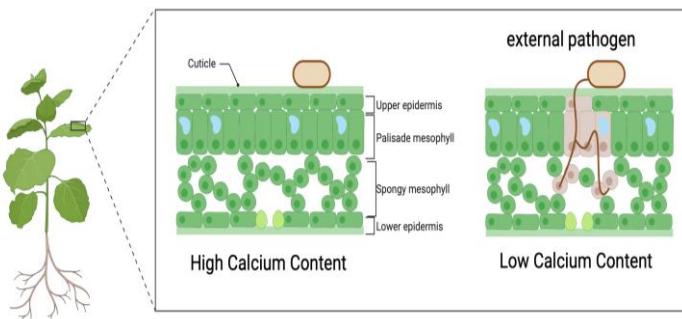


図2：カルシウムとペクチンが協働し病原菌に応答する説明図

しかし、そのアポプラスでカルシウムが「どのように動いているのか」をリアルタイムで観察した例はこれまでなく、アポプラスの  $\text{Ca}^{2+}$  動態は、完全なブラックボックスとして残されてきました。

そこで私は、FRET という方法に注目しました。

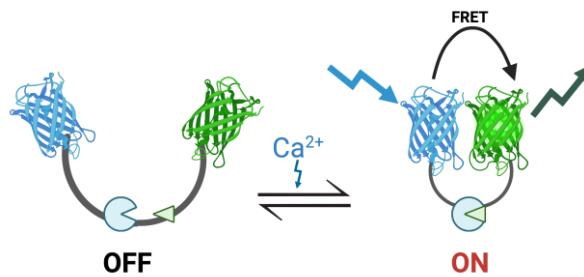


図3：FRET の概要図

FRET は「蛍光共鳴エネルギー移動」と呼ばれ、二つの蛍光タンパク質の距離や向きによってエネルギーが移動し、蛍光の色の比率が変化する現象です。

FRET を選んだ理由は主に 3 つあります。

①植物の細胞にはクロロフィルなどの自家蛍光がたくさんありますが、FRET は「2 つの蛍光の比率」を見ているため、そうしたノイズの影響を受けにくいです。しかも、分子同士の距離が 10 ナノメートル以内で少し変わるだけでも検出できるので、カルシウムが結合してセンサーがわずかに動いただけでもシグナルを捉えることができます。

②FRET センサーは遺伝子としてコードされているので、アポプラスに送るシグナルペプチドをつければ、

狙った場所だけにセンサーを運べます。これで他の小器官のシグナルと混ざることなく、アポプラストの動きだけを観察できます。

③FRET の現象は非常に速く、カルシウムシグナルのオン・オフをミリ秒単位で追うことができます。植物がストレスを受けた瞬間に起こる急激な変化を、そのまま生で見ることができます。

## 方法 1

今回のセンサーの基本的な構成は、ドナーに CFP、アクセプターに酸性環境に強い或る GFP、そしてカルシウム結合ドメインとしてカルモジュリンと M13 ペプチドを使いました。



図4：タンパク質の様々な環境での活性を解析する実験の流れ

- ①CFP と GFP 各単体、CFP と GFP の FRET をそれぞれ準備しました。
- ②それを、10 mM、1 mM、0 mM の塩化カルシウム水溶液に加えました。
- ③それぞれの溶液を pH 7（細胞質環境）と pH 4（アポプラスト環境）に調整しました。
- ④、⑤プレートリーダーにセットして、加えたタンパク質の蛍光強度を調べました。

## 結果 1

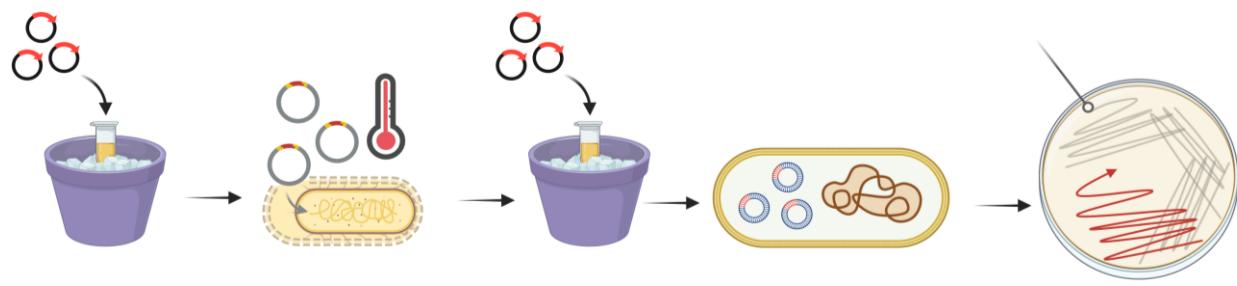
GFP、CFP 単体では酸性環境でも問題なく活性を維持することがわかりました。

しかし、FRET センサーとして組み合わせると、pH 4 では活性が大きく低下し、さらに 0 mM でも FRET 応答が起こってしまいました。つまり、カルシウムがないのに信号を出してしまったことがわかりました。

## 方法 2

この問題を解決するために、私は GFP と CFP を繋ぐリンカーについて、より酸性環境に強く、GFP と CFP が過剰に近づきにくくカルシウムイオンへの親和性が低く、安定して使えるリンカーを作ることを目指して開発に取り組みました。

塩基配列についても工夫を重ね、大腸菌のコドンバイアスにも配慮して自分で配列を開発し、大腸菌とアグロバクテリウムに導入しました。



- ① **Cooling:** Cool the *E. coli* containing the vector and competent cells on ice
- ② **Heat shock:** Exposed *E. coli* to 42°C for 45 seconds
- ③ **Recooling:** Plasmid import into *E. coli*
- ④ ***E.Coli* transformation**
- ⑤ **Cultivation:** Selectively cultivate on LB medium containing kanamycin

図5：大腸菌に遺伝子カセットを導入する実験の流れ

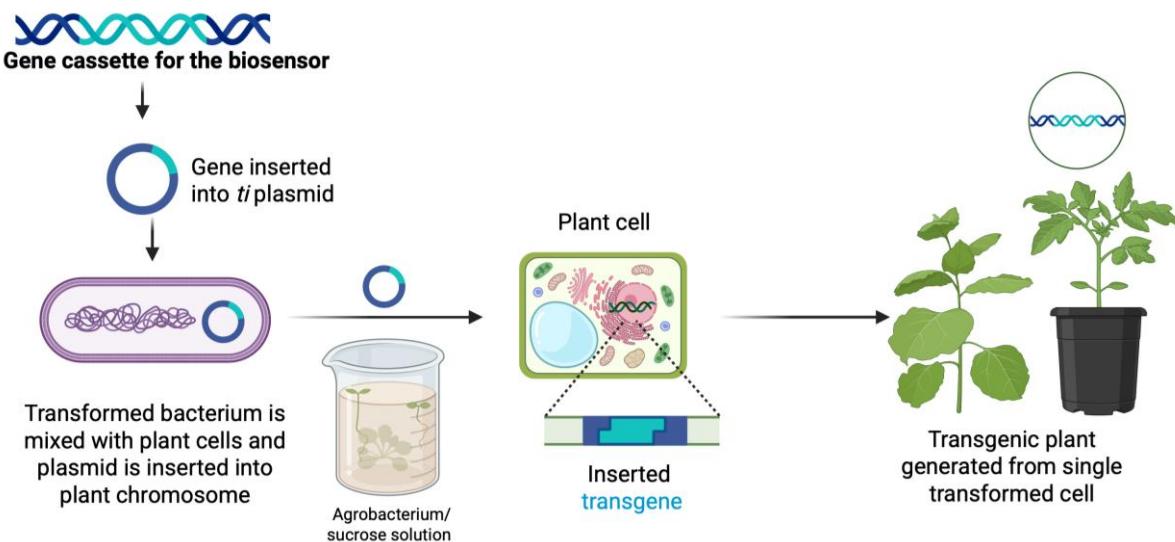


図6：アグロバクテリウムを用いて植物に遺伝子カセットを導入する実験の流れ

## 結果2

新たにリンカー配列を含んだプラスミドの構築と、アグロバクテリウムへの導入に成功しました。

大腸菌への導入は、今回はうまくいきませんでした。

植物幼体に対してアグロバクテリウムを通じて遺伝子カセットを導入することに成功しました。

## 今後の展望

今後は、作成したセンサーが本当にアポプラストに局在しているのかを確認する必要があります。

また、他の細胞区画にもこのセンサーを応用し、植物がストレスを受けたときのカルシウム動態を幅広く可視化することを目指したいです。

## 2. 研究活動における日米の違い

研究のやり方の違い、キャリアの考え方、学生の自覚、日米のいいところ、悪いところ等々アメリカでの研究生活では、印象的なことが二つありました。

まず研究室文化です。学部生とポスドク、PIが対等に議論できる雰囲気があり、自由に意見を出し合える環境でした。また、学部低学年から、研究に主体的に取り組める環境がありました。一方で、実験ノートの記録や

データ管理は日本以上に厳格で、そのメリハリに驚きました。

私がお世話になった研究室では、たまたまメンターさんが日本語を話せる方で凡そ 95%英語、5%日本語でコミュニケーションをとることができ、日々赤ちゃんのように実験に関する単語を尋ねて覚え、日を追うごとに使える単語やフレーズが増えていきましたが、英語でのディスカッションには壁を感じる場面も多々ありました。

日本では話を聞きながら自分の発想を乗せて打ち返すことができる質問や議論も、英語ではまず理解することにリソースが割かれ、自分の意見や発想を考え、話すことがうまくできず、欲求不満のような感覚を覚えていました。

また、研究室内に人を育てる文化があり、私はポスドクのメンターさんだけでなく、B3 の研究室の学部生の子にも「プチメンター」のような形で研究の指導をしてもらっていました。実験を教えていただくだけでなく、一つひとつの手技のコツや実験ノートの書き方、私が将来国際的に活躍できる研究者になるために、どのような知識をどのようにして学んでいけば良いか、どのようなマインドで研究に取り組んでいけば良いか、私が望む分野にはどんな進路があるのかなど、これから研究者を目指すにあたって役立つ知識や技術をたくさん教えていただけました。

メンターさんたち以外のラボメンバーの方々も何か実験で困ったことがあればすぐに教えてくださり、日常生活でも他愛のない話をしたり、一緒に昼食を食べたり、私の拙い英語を理解して一緒に盛り上がりってくれたり、お互いの母語の単語を学んだり、毎日研究室に行くのが楽しい、と思える環境を作ってくださいました。



図 7：お世話になった Dr. Quang Tran とのツーショット

### 3. 米国の文化・生活面での発見・苦労等

訪米・長期滞在して初めて分かったこと、生活して嫌だったこと、困ったこと、好きだったこと、現地人とのコミュニケーション等々

私には食物アレルギーがありますが、アメリカではビーガン向けのオプションが豊富で、外食のときにもお店が柔軟に対応してくれる文化がありました。そのおかげで私は、人生で初めてアイスクリームやピザ、ケーキやクッキーを食べることができました。食の自由を得られたことは、研究生活と同じくらい大きな喜びでした。日本では外食をした時に食べられるものが1つしかないこともよくあるため、アメリカでは食べるものがないだろうと思い、野菜以外は日本から持ち込んだ分で足りるくらい食料を持ち込みました。しかし、いざアメリカに来てみると ingredients の公開をしてくれているお店があったり、たまに選べるメニューが複数あることがあったりして、様々な食を楽しむことができました。



図8：ピザを食べる私

生活して大変だったことは、ルームメイトとの日々の生活です。もちろん友人であり同じ経験を共有している良き仲間として滞在中も非常に心の支えとなりましたが、これまで育ってきた家庭も環境も違う相手と同じ部屋に長期間一緒に住み続けることで、小さなトラブルは多く起きました。感覚の違いに戸惑い、ストレスを感じることもありましたが、他人との共同生活という初めての経験をできたことは、将来ルームシェアが主流の国への進学を視野に入れる際に非常に役に立つ経験だったと思いました。

米国に長期滞在して、街と大学の規模の大きさに驚きました。休日に自転車を借りてアトランタの街外れまで探検に行ってみましたが、ジョージア工科大学のキャンパスからまだそう離れていないのにすでにホテルを出てから1時間経過していく、一つ一つの建物の大きさや駐車場の広さ、道の広さに驚きました。

現地の方と交流して、非常にフレンドリーな方々だなという印象を受けました。

見知らぬ現地の方にご飯を食べている時に話しかけられて1時間話しあったり、ご飯を奢ってもらったりすることがありました。

ホテルでも朝起きてエレベーターの中で出会ったご婦人と話したり、話すまでいかなくとも居合わせた方々と挨拶を交わしたりことが多くありました。

RIES の US Fellows もたくさん遊びに誘ってくれ、多くの思い出を作ることができました。レザーショーを見たり、夜のキャンパスを探検したり、フラットのパーティーに参加させてもらったりして、アメリカの同年代がどのように日々を楽しんでいるのか垣間見ることができ、とても興味深く、楽しかったです。

私がやってみたいと行ったことにも付き合ってくれて。経験者の Fellow が撃ち方を手取り足取り教えてくれて実弾射撃をしたり、生クリームを食べたいと言うとわざわざケーキを焼いてくれてアトランタで過ごした最終日に一緒にケーキを囲んで楽しんでくれたりと、今後忘ることのできない経験ができました。

#### 4. 本プログラムに参加の成果・意義

こうした経験から自分の目標が明確になった、やる気が起きた、こんなもの（例えば今回の Fellows 仲間）

を得て、これからこうして行きたい等々。がっかりしたこともある。

私はこれまでの研究経験で植物の環境ストレス応答に興味を持ち、どうして植物はこんなに賢いのに、私たちはその仕組みをまだ知らないのだろうと疑問に思ってきました。そして「植物がどう感じ、どう判断し、どう応答するか」を知る研究者になりたいと考えてきました。また、将来、農薬を使わなくても乾燥や病気に打ち勝てる植物や、人の健康に良い成分を多く含んだ機能性の高い植物の開発や、栽培環境の厳しい地域の農業の改善に貢献し、人間の健康や美容をより手軽に、安価に、安全にすることに役立てたいと考えていました。今後の農業では、「どんな野菜を、どこで作るか」が重要になるのではないかと考え、例えばストレスの少ない植物工場のような環境で、シュウ酸を抑えた腎疾患の方も安心して食べられる野菜を作ったり、インドのスパイスを日本で生産してフードマイレージを抑えたり、持続可能かつ効率的で機能的な植物生産ができるようにできたら、と RIES プログラムに参加する前に考えていました。

RIES に参加して、私は植物の環境ストレスに関わる分子について、これまで機器を使って外部から測っていましたが、遺伝子カセットを導入して内部からそのダイナミクスを調べるという、これまで行ったことのなかったアプローチと発想に触れることができました。

この経験を通じ、私は、植物の栽培環境を外側から制御するだけでなく、内側の「声」をリアルタイムで聞きながら植物を育てられる仕組みを作りたいと思うようになりました。

また、今回の渡米が私の人生で初めての長期の海外滞在でしたが、海外で研究やコミュニケーションについてもどかしさやうまくいかない苦しさを知りました。しかし、それでも研究を続けたいと渡米前より強く思うようになりました。

私は、研究者として、そして人間として、この人生の中で自分自身にどんな使命を与え、どう世界に貢献していくのか、改めて考えることができました。

RIES に参加する前は、自分の興味のある部分が単語単語で存在していて、自分がどのようにして興味のある分野に参加し、研究者としてどのようにアカデミアの世界と社会に貢献していきたいのだろう、と悩んでいました。このプログラムでの研究を通じて、私は植物の環境ストレスに対する応答の中でも特に即時的に見えない反応を見たいのだ、ということ、そしてその信号が植物の他の分子や代謝とどう繋がり、どのようにして植物の有用成分の生合成、輸送、蓄積、分泌につながるのか体系的に知りたい、そしてそれを植物生産に応用して、植物の健康と、それがもたらす人間の健康を考えてみたいと考えるようになりました。

このプログラムでの研究を通じて植物の環境ストレスに関わる分子の謎を解く方法の一つを知り、命の仕組みの面白さに触れることができました。

また、このプログラムで出会った同期は皆それぞれ自分の興味の軸を持っていて、専門性の種とそれに対応してアプローチする情熱、行動力、知識、説明力、そして研究を楽しむ心を持っていました。

私は RIES に参加する前、「私の周りには今の時点で大学院について具体的に見据え、さらに海外にも目が向いている人がいない。Nakatani RIES で私の夢やビジョンに共感してくれる仲間と出会うことで、私のビジョンを躊躇なくアウトプットして、好奇心や挑戦する心を持った仲間と議論して言葉にしていくことで発展させたい。また、自分がマイノリティに位置付けられる世界に身を置くことで自分のアイデンティティを見つめ直し、真に私がやりたいことは何なのか、これまでの自分を相対化して客観視したい。」という目標を立てていました。

RIES の同期は、私が当時ビジョンだと思っていたものの薄さを教えてくれ、日本の同年代にこんなに志が高く、自分の軸を持っている人たちがいるのだ、と驚かされました。

研究者を目指すものとして、自分のこれまでとこれからを振り返り、自分はこの人生の中で何に対してどのようにアプローチして、何を目指して、何に貢献していきたいのか、よく考える機会になりました。

これから先、研究に行き詰まり、情熱を失いかけそうになった時も、RIES の同期と接する中で感じた興奮と危機感が、より高みに自分を連れていく原動力になると思います。

## 5. その他

プログラムの全般的な感想と要望事項等々、何かあれば自由に！

このプログラムに参加できたことに、心から感謝しています。

RIES プログラムは、私にとって人生の大きな転機になり、研究者としても人としても大きく成長できたと感じています。

Georgia Tech での研究経験を通じて、これまで挑戦したことのなかった分野での学びは、私の研究に対する視野を大きく広げてくれました。また、実験技術だけでなく、多様なバックグラウンドを持つ学生との交流や、研究者としての姿勢、挑戦する勇気、国際的な環境で自立して学ぶ力を身につけることができました。

この経験を無駄にせず、将来は植物の知恵を人の健康や農業に役立てる新しい研究分野をつくる研究者になりたいです。さらに、この経験で得た学びを日本の研究コミュニティにも還元し、将来、未来の学生に機会を提供できるような立場を目指していきたいです。

プログラム全体としては素晴らしかった一方で、特に渡航前のビザ手続きが非常に大変だったため、サポートが少し強化されると、参加者の負担がより軽減されるのではないかと感じました。

大変貴重な機会を本当にありがとうございました。



図9：RIES 同期の一部と公園で撮った一枚