第1章 論文作成の準備

1-1 論文を作る

論文は研究成果を発表するものである。本文を書く、図を作る、文献を入力する。皆さんは、それぞれの論文作成のステップで、どのようなソフトを使っているのだろうか？

冒頭の論文はわたしが1999年にNature に発表した食欲を刺激するホルモン“グレリン”の発見の論文である1-1-1～1-1-5。論文発表の舞台裏については，今は廃刊になったMolecular Medicine にエッセイを書いているので、図書館で探して読んで欲しい。

この論文の評価は結構高く、グレリンに関する研究論文はPubMedで検索すると2015年1月の段階で7,300編を超えている。このグレリン発見の論文には、医学・生物学分野の科学論文に典型的なFigureをいくつか含んでいる。それは棒グラフ、線グラフ、写真などの画像である。

わたしは機会があれば多くの研究者に、どのワープロソフトを使って本文を書いているか、どのソフトで図を作成しているかを質問する。その結果、ワープロソフト以外は研究

1-1-1

Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach

わたし（著者）です。

Masayasu Kojima*, Hiroshi Hosoda*, Yukari Date*, Masamitsu Nakazato†, Hisayuki Matsuo* & Kenji Kangawa*

** Department of Biochemistry, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan*
† Third Department of Internal Medicine, Miyazaki Medical College, Miyazaki 889-1692, Japan

Small synthetic molecules called growth-hormone secretagogues (GHSs)[1–3] stimulate the release of growth hormone (GH) from the pituitary[4,5]. They act through GHS-R, a G-protein-coupled receptor for which the ligand is unknown. Recent cloning of GHS-R[6,7] strongly suggests that an endogenous ligand for the receptor does exist and that there is a mechanism for regulating GH release that is distinct from its regulation by hypothalamic growth-hormone-releasing hormone (GHRH)[4,5]. We now report the purification and identification in rat stomach of an endogenous ligand specific for GHS-R. The purified ligand is a peptide of 28 amino acids, in which the serine 3 residue is *n*-octanoylated. The acylated peptide specifically releases GH both *in vivo* and *in vitro*, and *O*-*n*-octanoylation at serine 3 is essential for the activity. We designate the GH-releasing peptide 'ghrelin' [root of the word 'grow'). Human ghrelin apart from two amino acids both rat and human indicates that GH release from the pituitary may be regulated not only by hypothalamic GHRH, but also by ghrelin.

☞第3章「タッチタイピングをマスターする」

1-1-2

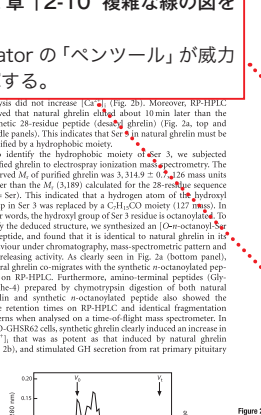
Cells expressing an orphan G-protein-coupled receptor (one with no known ligand) have been used as assay systems to identify unknown endogenous ligands[8–12]. We constructed a stable CHO cell line expressing rat GHS-R (CHO-GHSR62) to monitor changes in the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) that were induced by rat tissue extracts from brain, lung, heart, kidney, stomach and intestine. As the highest activity was found in the stomach extract, this was further purified by successive chromatography[13,14], including Sephadex G-50 gel filtration (Fig. 1), CM-ion-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC) and reverse-phase HPLC (RP-HPLC) (Fig. 2a, top panel). Gel filtration revealed potent $[Ca^{2+}]_i$-increasing activity in the fractions of relative molecular mass (M_r) ~3,000 (3K; Fig. 1). Active fractions (fractions 43–48) were further purified by CM-

analysis did not increase $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 2b). Moreover, RP-HPLC showed that natural ghrelin eluted about 10 min later than the synthetic 28-residue peptide (desacyl ghrelin) (Fig. 2a, top and middle panels). This indicates that Ser 3 in natural ghrelin must be modified by a hydrophobic moiety.

To identify the hydrophobic moiety of Ser 3, we subjected purified ghrelin to electrospray ionization mass spectrometry. The observed M_r of purified ghrelin was 3,314.9 ± 0.7, 226 mass units higher than the M_r (3,189) calculated for the 28-residue sequence (X = Ser). This indicated that a hydrogen atom of the hydroxyl group in Ser 3 was replaced by a $C_7H_{13}CO$ moiety (127 mass). In other words, the hydroxyl group of Ser 3 residue is octanoylated. To verify the deduced structure, we synthesized an [*O*-*n*-octanoyl-Ser 3] peptide, and found that it is identical to natural ghrelin in its behaviour under chromatography, mass-spectrometric pattern and GH-releasing activity. As clearly seen in Fig. 2a (bottom panel), natural ghrelin co-migrates with the synthetic *n*-octanoylated peptide on RP-HPLC. Furthermore, amino-terminal peptides (Gly-1–Phe-4) prepared by chymotrypsin digestion of both natural ghrelin and synthetic *n*-octanoylated peptide also showed the same retention times on RP-HPLC and identical fragmentation patterns when analysed on a time-of-flight mass spectrometer. In CHO-GHSR62 cells, synthetic ghrelin clearly induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ that was as potent as that induced by natural ghrelin (Fig. 2b), and stimulated GH secretion from rat primary pituitary

cells (described below). Thus, the complete structure of rat ghrelin is unambiguously identified as an [*O*-*n*-octanoyl-Ser 3]-peptide (Fig. 2c). Octanoylation has not been observed previously in peptide modification. The fact that the *n*-octanoyl moiety is essential for the activity of ghrelin indicates that the post-translational mechanism for acyl modification should be urgently elucidated. It is also interesting that no structural homology with ghrelin is observed among synthetic GHSs.

Ghrelin potently induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in CHO-GHSR62 cells (50% excitatory concentration (EC_{50}) 2.5×10^{-9} M), whereas GHRH had no effect on the cells under the same conditions. The threshold for the ghrelin-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ was 10^{-10} M (Fig. 3), but the $[Ca^{2+}]_i$ increase was depressed in the presence of 10^{-6} M [D-Lys-3]-GHRP-6, an antagonist specific for GHS-Rs[15]. A high dose of ghrelin, however, regenerated the $[Ca^{2+}]_i$



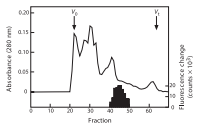


Figure 1 Gel filtration of Sephadex G-50 (fine) of SP-II fraction from 40 g rat stomach. Black bars indicate fluorescence change owing to $[Ca^{2+}]_i$ increase on CHO-GHSR62 cells. Active fractions were eluted around *M* 3,000. V_0, void volume; V_t, total volume.

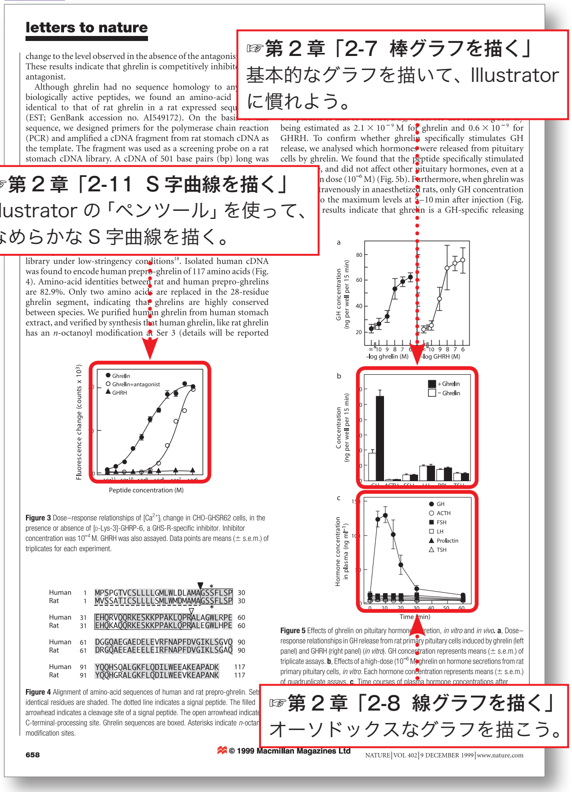
Figure 2 Identification of the *n*-octanoyl modification in ghrelin. **a**, Chromatographic comparison on RP-HPLC of natural ghrelin (top panel), synthetic ghrelin and desacyl ghrelin (middle panel), and co-migration of natural and synthetic ghrelin (bottom panel). Black bar indicates $[Ca^{2+}]_i$-increasing activity (top panel). Desacyl ghrelin is a synthetic 28-residue peptide (X = Ser), which has the sequence deduced from cDNA analysis. Each peptide (2 μg) was applied on a μBondasphere column (Waters). Flow rate, 1 ml min^{-1}. Solvent system, a linear gradient elution from A to B for 40 min. A, 0.1% CH_3CN, 10% TFA for A was 90:10:1, for B, 40:60:1 (v/v). Natural ghrelin co-migrates with synthetic ghrelin in the present conditions (bottom panel). **b**, Time courses for changes in $[Ca^{2+}]_i$ in CHO-GHSR62 cells induced by natural ghrelin, synthetic ghrelin and desacyl ghrelin. Each peptide (10^{-8} M) was added at the time indicated by the arrow. **c**, Structure of rat ghrelin.

☞第2章「2-10 複雑な線の図を描く」
Illustratorの「ペンツール」が威力を発揮する。

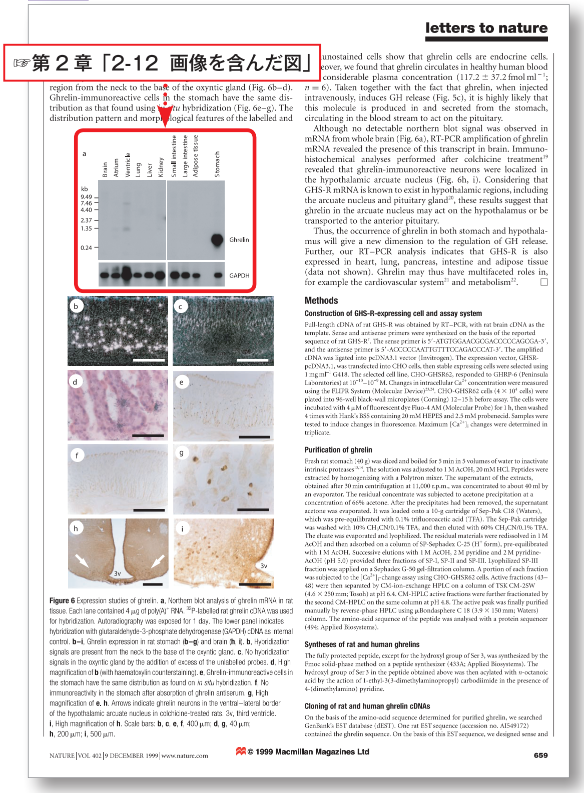
室（研究者ごと？）によって使われているソフトは千差万別である。なかには図を描くのに「まだこんな古いソフトを！」と驚くこともしばしばある。

またわたしは「ブラインドタッチ（タッチタイピング）で文章を打てるか？」とよく質問する。結果は 10 人に聞いて、よくて 1 人が正統なタッチタイピングで打てるという低率である。ほとんどの研究者は昔から自己流で何となくキーを打ってきたから、特に不自由ないと思っている。自慢ではないが（いや、自慢かもしれないが）わたしは、正統なタッチタイピングで文章が打てる。しかもプロにはかなわないが、かなりのスピードで打てると自負している。たいていの研究者よりは速いのではないかな？　これまでに他の研究者

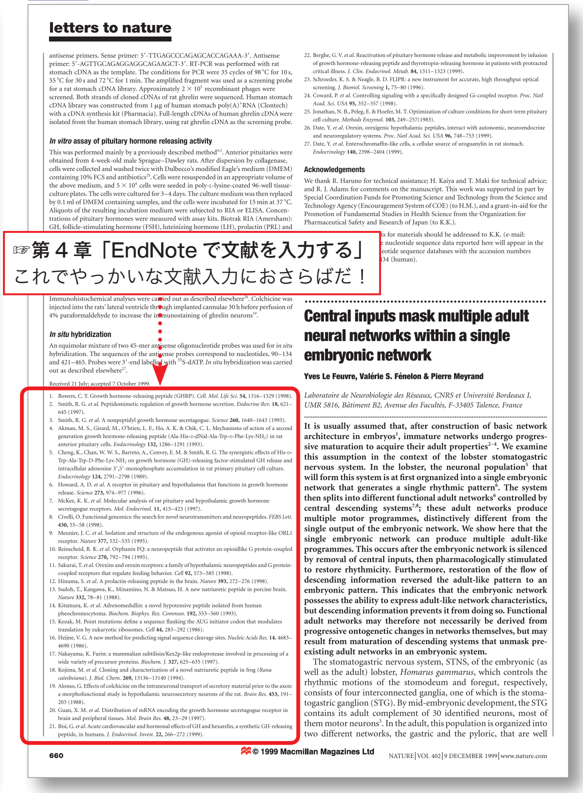
1-1-3



1-1-4



1-1-5



がキーボードで文章を打っているのを横から眺めていて、「俺より速く打てる！」と感嘆したことはない。

またキーボードが速く打てても、論文の最後には、あの面倒な引用文献が待っている。しかも雑誌ごとに文献のスタイルが違っているため、投稿論文がリジェクトされて別の雑誌に再投稿するときにはまた最初から文献を入力する、あるいは文章を変更したため文献の番号がズレてしまって混乱した、などの経験はないだろうか？

気になったので、何人かの研究者に現在どのようなソフトを使って論文を作成しているのかを聞いてみた。以下、そのうちの５名の回答。

研究者 A

（研究者の標準的な回答だと思う）
【ワープロ】Word
【図の作成】PowerPoint で作成。
【文献入力】EndNote を使っている。
【オンラインストレージ】
使っていない。

研究者 B

【ワープロ】Word
【図の作成】PowerPoint。用紙サイズを A4 にして、最終的に PDF あるいは tiff ファイルに変換する。グラフは Excel から移す。
【文献入力】EndNote を使っている。
【オンラインストレージ】
使っていない。

研究者 C

【ワープロ】Word
【図の作成】Illustrator で作図している（なんとわたしが以前に Illustrator の使い方を教えたらしい?!）。
【文献入力】EndNote を使っている。
【オンラインストレージ】
使っていない。

研究者 D

【ワープロ】Word
【図の作成】PowerPoint で作成して、PDF や tiff ファイルに変換する。
【文献入力】手入力。
【オンラインストレージ】
使っていない。

研究者 E

【ワープロ】Word
【図の作成】Photoshop か、PowerPoint で作成。
【文献入力】手入力。
【オンラインストレージ】
使っていない。

このようにワープロはほとんどの方は Word を使用しているが、図の作成にIllustratorを使っていたのは 1 名だった。予想通り PowerPoint を使って作図している人が多かった。またこの 5 名以外で Dropbox を使っている方が何名かいたが、オンラインストレージはほとんどの研究者が使っていない。タッチタイピングができると自信を持って答えてくれたのは、わたしの研究室のメンバー以外では 1 人だった。おそらくもっと多くの方に聞いてみても、同じような傾向になるだろう。

さて、**この本の構成は、実際にわたしが発表した論文の作成に沿って、図の作成から、本文、文献の記入、投稿用ファイルの作り方までを、できるだけ実例のままに説明し、実際に読者が論文作成のときにすぐに役立つようにしてある**。

この本で使用したソフトはすべて Mac 版（OSX10.9.3）の

① Illustrator（Illustrator CS6）
② Photoshop（Photoshop CS6）
③ Word（Word X for Mac）
④ EndNote（EndNote X7）
⑤ Acrobat（Acrobat 6.0）

である。これらのソフトは、入手も簡単だし、論文作成のために最もポピュラーなものだ。しかし、どのソフトも機能が多く、解説書が分厚く、「とてもこんなに覚えきれない」「使いこなせない」と嘆くかもしれない。しかし、科学論文作成に使うだけならば、それほど高機能な使い方は必要なく、**使うべき機能はすごく限られている**ので、実はマスターするのは簡単だ。ぜひ以下の章でそのことを実感して欲しい。