

# 生命化学研究レター

(2018年10月)

## 2. 巻頭言

生命化学研究会の10年+フロンティア生命化学研究会の10年  
大阪府立大学 大学院理学系研究科 円谷 健

## 4. 研究紹介

4. 細胞外微粒子を追跡する遺伝子制御分子  
～非コード RNA を操って生命現象を操る～  
長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系) 山吉 麻子

9. 金ナノ粒子を用いた分子検出  
～一分子計測を駆使した検出法開発～  
愛媛大学 大学院理工学研究科 座古 保

## 15. 論文紹介「気になった論文」

大阪大学 大学院薬学研究科創成薬学専攻 博士後期課程3年 堀場 昌彦  
九州大学 大学院工学府応用化学部門 博士後期課程2年 佐々木 光一  
千葉大学 工学部共生応用化学科第二分野 日本学術振興会 PD 上田 大次郎

## 24. 留学体験記

アルバータ大学留学体験記

九州大学 大学院工学府 長尾 匡憲

## 28. シンポジウム等会告

第45回 国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2018)、日本核酸医薬学会 生物セッション 第3回サテライトシンポジウム、KUMP International Symposium

受賞、異動  
編集後記



# 巻頭言

## 生命化学研究会の10年＋フロンティア生命化学研究会の10年

大阪府立大学大学院理学系研究科 円谷 健

「フロンティア生命化学研究会」は2018年3月に10年を迎えました。前身の「生命化学研究会」から数えると、20年となります。大きな節目にあたりますので、ちょっとだけ「生命化学研究会」をふりかえってみたいと思います。生命化学研究会は、1996年にはじまった3回の「生物分子化学研究会」(熊本, 箱根, 徳島)での議論をもとに、1998年3月に「生命および生体分子が関与する化学」を基礎から応用にわたり広く研究・展開し、関連学問並びに利用技術の一層の発展を図るため設立されました。さらに、10年後の2008年3月に「生命化学研究会」を発展させる形として、「フロンティア生命化学研究会」が発足しました。そのあいだ、歴代会長の杉本直己さん、馬場嘉信さん、浜地格さん、三原久和さん、深瀬浩一さん、藤井郁雄さん、佐藤智典さんの強力なリーダーシップのもと、堅実に発展してきました。ここでは、あえて「さん付け」で呼びましたが、これは生命化学研究会では、「〇〇先生」と呼んではいけないことになっているためです。杉本さんが生命化学研究レターの第1号にかかっているように、生命化学研究会の特長の一つが(当時は)平均年齢が若いこと、もう一つはヘテロな集団であるということでした。研究会初期の頃は、主要な参加者の平均年齢は30代前後で、当時はお酒を飲んで、夜遅くまでサイエンスの話をしていました。そのときによく話題になったのですが、「偉い先生とご一緒させていただいてお酒を飲むと必ず健康の話題になるよね?」と言っていたのですが、最近ではあまり遅い時間まで飲むこともなくなり、また、健康やダイエットなどが話題にのぼることが多いことに気づき、愕然としてしまいます。当初、生命化学研究会で開催してきたセミナーは、「これからどのような研究をやっていくべきか?」を探るいわゆるブレインストーミングのようなものが多く、その後の私の研究にも大きな影響を与えるものでした。

私自身は、1997年に箱根で開催された「第2回生物分子化学研究会」から参加させていただいていますが、当時は20～30名程度の参加者全員が「10年後の自分の研究」のようなテーマで話していたと思います。ただし、質問は講演の途中でしても良いということになっていたのも、いつも議論が白熱しすぎて、最後の発表者まで順番が回ってこずに次回に持ち越し、というようなこともありました。その後、2007年より5年間生命化学研究レターの編集委員を務めさせていただきました。生命化学研究レターの第1号は二木史朗さんを編集委員として1999年6月に11ページでスタートしましたが、生命化学研究会の発展に呼応するようにしてページ数は増加を続け、現在では毎号30～40ページを超えるのが普通となっており、とても読みごたえのあるものに仕上がっています。生命化学研究レターは現在、3人の編集委員がそれぞれ年1回担当することにより毎年3回発行されていますが、その中で私が担当していたのは10月～11月発行のものでした。この時期は科研費の申請と重なっているのですが、忙しい時期にもかかわらず快く引き受けていただいた執筆

者の皆様のご協力、そして、面白かったというご意見はとても励みになり、楽しく編集作業を進めることができました。なんとといっても、毎回寄稿いただくとても面白い原稿をいち早く読むことができたのは、編集委員の大きな特権と言えるでしょう。また、生命化学研究レターの編集を通じていろいろな方と知り合えたことも、私にとって大きな財産となりました。掲載されている内容も少しずつ変化しており、初期にはデジカメ企画「研究の風景」として写真のみで研究室の紹介があったり、「生命化学研究法」として様々な生命化学研究に使われる実験法のノウハウが紹介されていたりしています。特に圧巻なのは、初期の論文紹介「気になる論文」で、現在それぞれの学会でリーダーとして活躍されている方々が数多く執筆しています。これらは、いずれも研究会のホームページ (<http://res.tagen.tohoku.ac.jp/FBC/>) よりダウンロードできますので、ぜひ一度ご覧ください。生命化学研究レターは研究会が多様な分野の研究者の集まりであることを反映して、その内容は非常に幅広いものとなっています。そのため、ときにはなかなか理解することが困難なこともあります。非常に勉強になり、また刺激の多いものとなっています。これからも「ワクワクするような」生命化学研究レターであってほしいと思っています。

さて、これから10年後の「フロンティア生命化学研究会」は、どの様になっているのでしょうか？ひょっとしたら、名前も変わっているかもしれません…。ちょうど生命化学研究会ができたころ、欧米を中心にChemical Biologyという新しい概念が提出され、ここ20年ほどで大きく発展してきました。そのような、全く新しい概念が生命化学研究会から出て、ずっと刺激し続けてくれることを願っています。その結果として、日本ならではの「生命化学研究」が生まれてくることを期待します。そして、これまで以上に幅広い分野の研究者を仲間として受け入れ、夢を語り合っていけるヘテロな研究会としてますます発展していくことを祈念しています。

最後になりましたが、今年は6月に大阪府北部地震、7月には西日本を中心とした平成30年7月豪雨、そしてこの巻頭言を書いている最中にも、台風21号による強風被害、北海道胆振東部地震と大きな被害を及ぼす自然災害が続いています。これらの災害により多くの方々が大被害を受けました。お亡くなりになられた皆様のご冥福をお祈り申し上げますとともに、被災された皆様に心よりお見舞い申し上げます。一刻も早い復旧をお祈り申し上げます。



研究紹介

細胞外微粒子を追跡する

遺伝子制御分子

～非コード RNA を操って生命現象を操る～

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科(薬学系)

山吉 麻子

(asakoy@nagasaki-u.ac.jp)



1. はじめに

私は京都工芸繊維大学の村上章先生の研究室で機能性核酸の研究に携わる機会を頂戴し、その後、九州大学の2カ所の研究所でポストドクの間を得た。生体防御医学研究所(別府)の和気徳夫教授、加藤聖子講師(現・九州大学 教授)の研究室、九州大学先端物質化学研究所(福岡)の丸山厚教授(現・東京工業大学 教授)の研究室である。計4年間弱のポストドク生活の後、2007年、京都工芸繊維大学の村上章先生の研究室へ助教として戻り、最初にかかせて頂いた原稿が生命化学研究レターの「気になった論文」である。当時、英語はもちろん、日本語の原稿も全て、ボスにきたお話を受けて私が執筆させて頂く機会を頂戴するものであった。このため、自分自身に直接オファーが来て書かせて頂くこと自体が初めてであり、大変に嬉しく感激したことを鮮明に覚えている。その後、2015年に京都大学白眉センターへ特定准教授として異動し(受入:理学研究科、杉山弘教授)、そして今年の3月より、大変幸運にも、九州の長崎大学に研究室を持つ機会を頂戴した。試行錯誤の年月だったが、今もなお、試行錯誤の日々である。壁にぶつからない日は無い。けれども、これまで様々な分野で仕事をさせて頂けたことで、分野の壁を越えるためのエネルギーは、かなり低くなった様に思う。これまでも、そして今の環境でも、こちらが本気で研究の相談をすれば、どんな著名な先生も(興味深いことに、偉大な先生ほど)、真摯に応えてくださる。あとは自分次第だ。

私は、遺伝子の情報を核酸によって制御するというコンセプトに魅せられ、核酸医薬開発を行っている。近年はタンパク質をコードしない RNA (非コードRNA)の機能に大変な注目が集められており、筆者もこれを標的とした核酸医薬開発を目指している。本稿では、非コードRNAを狙い撃つ核酸医薬開発の研究と、そのDDS戦略について紹介する。

2. 効果的な anti-miR核酸の設計指針とは？

ヒト遺伝子の全配列を解読したヒトゲノムプロジェクトの成果は、生命科学ならびに疾患治療の現場に大きな夢と混乱を与えた。とりわけ、遺伝子の『発現』に関する情報はセントラルドグマの変更さえ求める勢いである。タンパク質産生に関わるmRNAは転写される全RNA量の 2 %を下回り、その他 98 %以上はタンパク質をコードしないNon-coding RNAであることも明らかとなっている<sup>1</sup>。

Non-coding RNAの中でも、とりわけmicroRNA(miRNA)と呼ばれる小さな RNA に高い関心が寄せられている。miRNAは、細胞の分化、増殖、代謝、アポトーシスなど、極めて重要な生命活動を制御する non-coding RNAである。ほ乳類遺伝子の約 60% 以上がmiRNA による発現抑制を受けていると考えら

れており、miRNAの発現異常が癌をはじめとした様々な疾患の原因の1つであることが知られている<sup>2-4</sup>。

miRNAはそれ単独で機能せず、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるリボヌクレオプロテインを形成して初めてその機能を獲得する(図1)。一般的な anti-miR 核酸(miRNAに相補的に結合する核酸)は、RISC中のmiRNAに結合することで、RISCの標的遺伝子への結合サイトにフタをし、RISCの機能を阻害するように分子設計するのが主流であり、現在では様々な化学修飾が施されたanti-miR核酸が開発されている<sup>5-7</sup>。

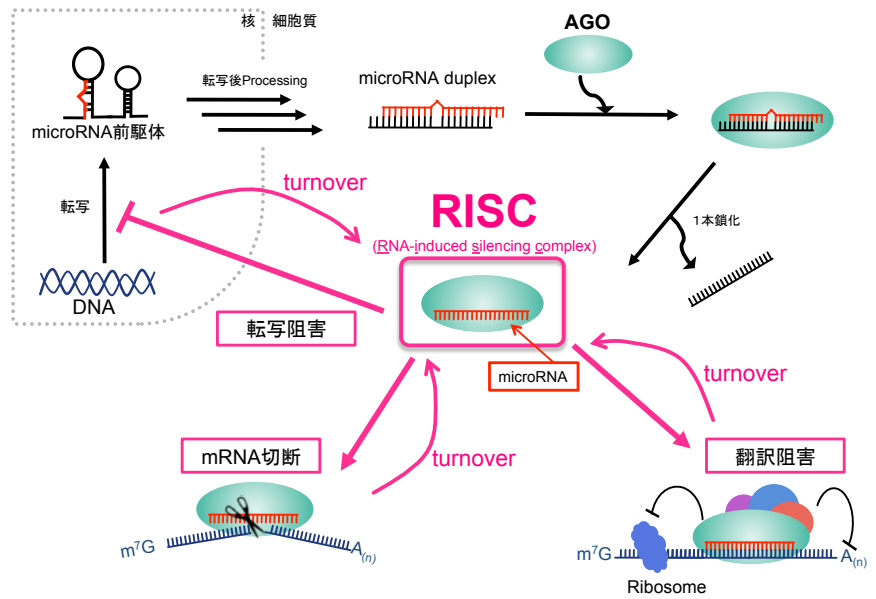


図1 miRNAのプロセッシング経路と遺伝子発現調節機構。miRNAは、様々なプロセッシングを受けた後、RISCと呼ばれる『RNAとタンパク質の複合体』となって機能を発現する。

筆者は、RISCの標的鎖認識機構における要の分子であるmiRNAをRISCから解離させることで、RISCの機能を完全にノックダウンする新しい機能性分子の開発が出来るのではないかと考えた。RISCには、miRNAの5'末端が結合する塩基性ポケット(PIWI-box)が存在し、miRNAの5'末端とPIWI-boxとの相互作用が、RISC活性に重要であることが報告されている<sup>8</sup>(図3)。そこで筆者は、この相互作用を阻害することで、RISC活性を制御出来るのではないかと考えた。両者の相互作用を阻害するペプチド・アンタゴニスト(RINDA: RISC-inhibitor disturbing active site of RISC)を設計し、miRNAと相補的な配列を持つ2'-OMe型RNAの3'末端にRINDAをコンジュゲートしたanti-miR核酸(RINDA-Oligo)を合成した(図2、3)。RINDA-Oligoの生細胞系におけるRISC機能阻害効果を検討したところ、酸性のアミノ酸残基を有するRINDA-Oligo(RINDA(EEE)-as)を用いた場合にmiRNA機能抑制効果が向上することが明らかとなった

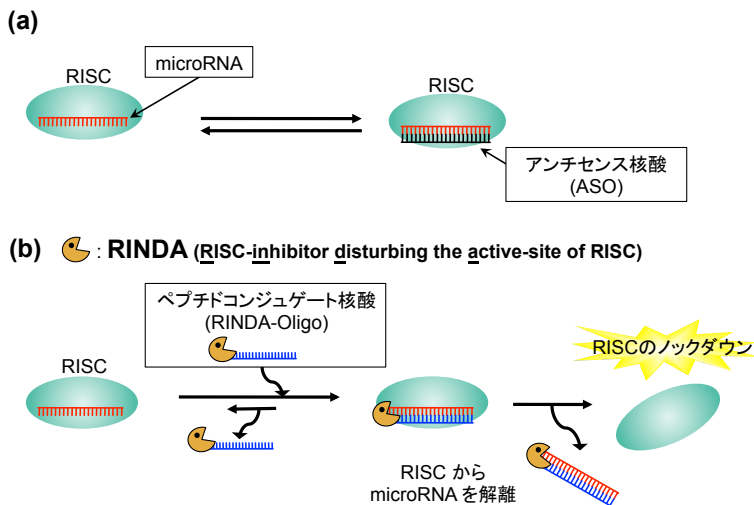


図2 miRNAをRISCから解離させる新しいRISC機能阻害法  
(a) アンチセンス核酸による従来型の機能阻害法  
(b) RISCからmiRNAを解離させる機能性核酸(RINDA-Oligo)を用いてRISCの機能を完全に阻害する。

(図4)。また、カチオン性のアミノ酸残基を有する RINDA-Oligo (RINDA(KKK)-as)を用いた場合には、その効果が減少することも見いだされた。以上の結果より、酸性のアミノ酸残基をオリゴヌクレオチドに導入することで、RISC機能阻害効果が向上されることが示された。

この現象が、RINDA(EEE)-asによってRISCからmiRNAが解離されたことに起因するものかどうかを検証するために、RINDA-OligoのmiRNA解離効果を *in vitro*

Unloading Assay により評価した。その結果、RINDA(EEE)-as はペプチドをコンジュゲートしていないアンチセンス核酸と比較してmiRNA解離効果が10~15%向上することが明らかとなった。一方、RINDA(KKK)-asの場合には、miRNA解離効果はペプチドをコンジュゲートしていないアンチセンス核酸より20%低下した。また、RINDAを導入していないアンチセンス核酸を用いた場合にも、RISCからmiRNAが解離することが見出された。以上の結果より、miRNAの5'末端のリン酸基と、PIWI-box中のLys残基との相互作用を阻害することが、RISC機能を抑制する上で極めて重要であることが示された<sup>9</sup>。

anti-miR核酸がRISC中のmiRNAに結合した後の運命に関しては、様々な議論がなされながらも明解な解答がない状態だった。筆者らはanti-miR核酸によってmiRNAがRISCから解離する現象を見出した。さらに、anti-miR核酸のmiRNA解離効果を促進することで、RISC機能阻害効果が向上することも確認しており<sup>10, 11)</sup>、これらの知見から、これまでとは異なった作用機序に立脚したmiRNA阻害剤の開発も期待される。

### 3. エクソソームに随伴して薬物を送達するシステムの構築

上記項目でanti-miR核酸の分子構造の最適化を行なった後、エクソソームに内包されるmiRNA (exosomal-miRNA) の機能阻害を目指したanti-miR核酸のDDS戦略開発に着手した。

近年、癌細胞が分泌するエクソソームと呼ばれる小胞が、癌の転移において重要な役割を果たすことが明らかとなった<sup>12,13)</sup>。エクソソームは癌細胞を含むすべての細胞から分泌される直径 100 nm程度の小胞であり、miRNAなどのRNA、DNA、タンパク質がその中に含まれる。とりわけエクソソームに含まれるmiRNA (exosomal-miRNA) は、癌の転移にも深く関与しており、新たな治療標的として注目されている。miRNAの一般的な機能阻害法としては、先述の様にanti-miR核酸を用いた手法が主流であるが、exosomal-miRNA

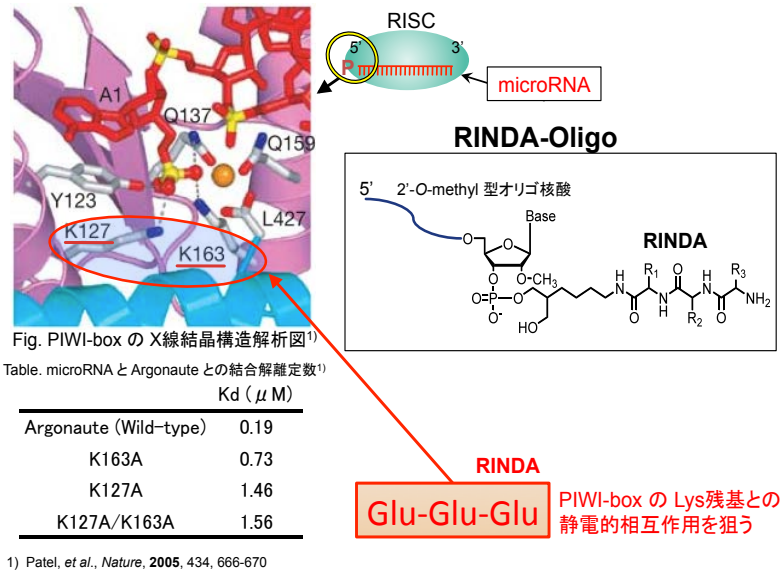
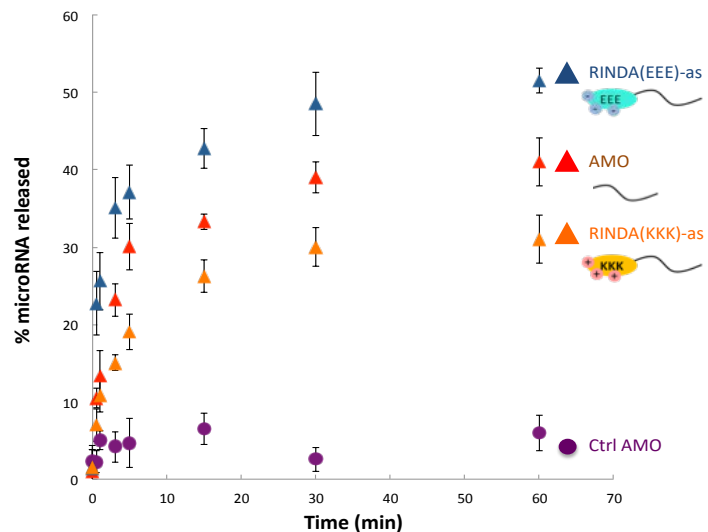


図3 RISC と miRNA との X線結晶構造解析結果 RINDA-Oligo の構造



はエクソソームに内包されているため、*in vivo* に投与した anti-miR核酸がexosomal-miRNA にアクセスするのは困難である。また近年、エクソソームは全ての細胞や臓器に取り込まれるのではなく、その効率に指向性があることが見出された<sup>14,15)</sup>。特に癌細胞から放出されるエクソソームは転移先臓器に選択的に取り込まれ、前転移ニッチ形成に寄与していることが明らかにされている<sup>15)</sup>。このため、癌を根治するためには、癌細胞由来エクソソームが取り込まれる細胞選択的に薬剤を送達する技術が求められる。しかしながら、エクソソーム受容細胞選択的な DDS技術は存在しない。そこで筆者は、エクソソーム表面抗原を認識する抗体(anti-Exo抗体)を薬物輸送担体として利用することで、anti-miR 核酸のエクソソーム受容細胞への送達と、exosomal miRNA の機能阻害を実現する新規抗体結合型anti-miR核酸(ExomiR-Tracker)の開発を行った(図5)。

蛍光標識した ExomiR-Tracker を培養細胞上清に添加し共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、エクソソーム表面タンパク質のうち、あるタンパク質を抗原とする抗体を用いたExomiR-Trackerが細胞内に導入され、細胞質に局在することが確認された。また、細胞内に取り込まれた標的miRNAに対する機能阻害効果をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価したところ、細胞内に導入されたExomiR-Trackerは標的miRNAの機能を配列特異的に阻害することが示された。以上の効果は培養細胞系だけでなく、*in vivo* でも確認された。特筆すべきは、ExomiR-Tracker の *in vivo* における動態である。担がんマウスに ExomiR-Tracker を尾静脈投与したところ、腫瘍に選択的に集積することが明らかとなった。さらに、ExomiR-Tracker は原発腫瘍だけでなく、転移腫瘍へも集積することが確認された(図6)。今後、ExomiR-Trackerの細胞内導入機構や作用機序について、さらに詳細に解析していく予定である。

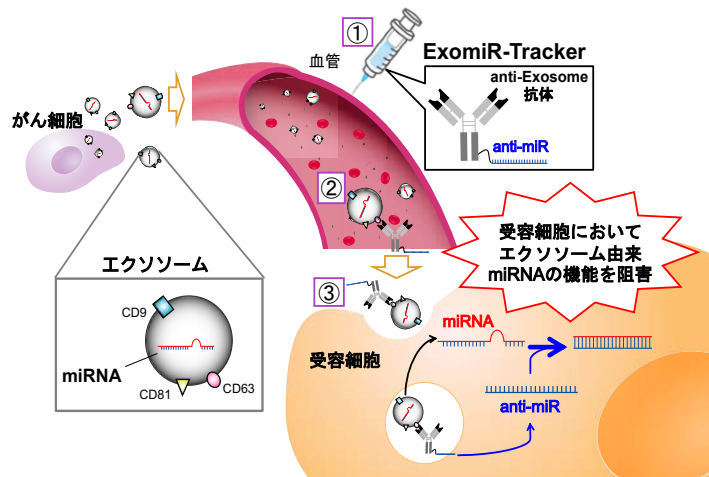


図5 エクソソーム随伴導入型・新規薬物送達システム  
① ExomiR-Tracker を投与、②体液中(この図では血中)にて ExomiR-Tracker がエクソソームに結合、③エクソソームに随伴して ExomiR-Tracker が受容細胞に取り込まれ、エクソソームから放出された miRNA の機能を阻害する戦略の構築を目指した。

#### 4. おわりに

本筆者らは、極微量で高度な機能を発揮し、生体制御系に大きな役割を果たしている exosomal-miRNAを標的とした機能性分子の開発に成功した。近年、エクソソームを回収した後、様々な分子を内包させることでDDSとして利用する研究が盛んに行われているが、筆者らの開発した手法はエクソソームを単離・精製する必要がなく、体内に直接投与できるという点において一線を画すものである。エクソソームには miRNA 以外の non-codingRNA や、mRNA、MMPなどのタンパク質が含まれており、が

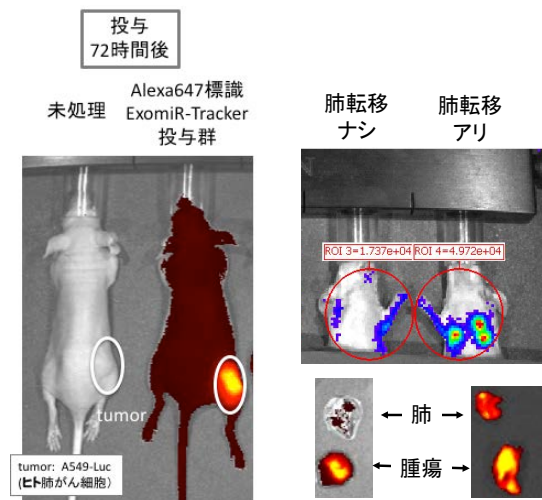


図6 ExomiR-Tracker の腫瘍集積効果および転移腫瘍への集積効果

ん化に寄与するものが次々と報告されている。筆者らの開発した ExomiR-Tracker は、anti-miR核酸でなく、mRNAを 標的としたアンチセンス核酸、siRNA、アプタマー、さらには核酸だけでなく低分子化合物を導入することも可能である。今後、exosomal-miRNA だけでなく、エクソソームに内包される様々な分子を標的とした新規分子標的医薬の創製へと発展させていきたい。

## 5. 謝辞

本稿で紹介した研究成果は、京都工芸繊維大学在籍時に村上研究室にて、また、京都大学白眉センター在籍時に受入研究室である理学研究科・杉山研究室にて実施させて頂いたものです。恵まれた環境において自由に研究をさせて頂くことをお許し下さった村上章先生、杉山弘先生、多くのアドバイスを下さった研究室メンバーに心より感謝申し上げます。特に、RINDAペプチド結合型anti-miR核酸開発の研究を熱心に進めてくれた有吉純平博士(現・甲南大学 特任助教)に深く感謝いたします。また、本研究に携わって下さった全ての共同研究者に感謝申し上げます。最後に、11年前に生命化学研究レター「気になる論文」に執筆の機会を与えて下さった大阪市立大学の長崎健先生、そして今回、本稿の執筆機会を与えて下さった熊本大学工学部の井原敏博先生に深く御礼申し上げます。

## 6. 参考文献

- 1) Mattick J.S., *EMBO Rep.*, **2**, 986–991 (2001).
- 2) Krol, J. *et al.*, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 597-610 (2010).
- 3) Ma, L., *Breast Cancer Res.*, **12**, 210 (2010).
- 4) Osaki, M., *et al.*, *Biomarkers*, **13**, 658-670 (2008).
- 5) Teplova, M., *et al.*, *Nature Structural Biology*, **6**, 535 - 539 (1999).
- 6) Stenvang, J., *et al.*, *Silence*, **3**, 1 (2012).
- 7) Obika, S., *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8735-8738 (1997).
- 8) Ma, J.-B., *et al.*, *Nature*, **434**, 666-670 (2005).
- 9) Ariyoshi, J., *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **26**, 2454-2460 (2015).
- 10) Ariyoshi, J., *et al.*, *Chem. Lett.*, **46**, 143-145 (2017).
- 11) Ariyoshi, J. *et al.*, *Nucleic Acids Ther.*, **27**, 303-308 (2017).
- 12) Valadi *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **6**, 654-659 (2007).
- 13) Kosaka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **285**, 17442-17452 (2010).
- 14) Toda *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **456**, 768-773 (2015).
- 15) Hoshino *et al.*, *Nature*, **527**, 329-335 (2015).



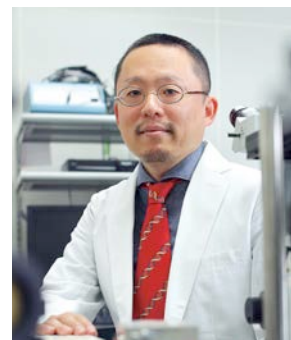
## 金ナノ粒子を用いた分子検出

## 一分子計測を駆使した検出法開発

愛媛大学 大学院理工学研究科

座古 保

(zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp)



## 1. はじめに

愛媛大に着任して3年が経った。生物工学分野での学位取得後、早稲田大、東京農工大、理化学研究所(理研)で研究を行ってきたが、その間に生物物理学、生化学、分析化学と様々な分野の研究に携われたことは、自分の研究の幅を広げる僥倖であったと同時に、これらのどれが欠けても今の自分の研究を行うことはできなかつたと感じている。2004年から幸運にも理研の前田バイオ工学研究室に採用して頂き、それまでの研究を活かしてタンパク質の構造形成を助ける分子シャペロンの機能解明や、アルツハイマー病などの原因と考えられているアミロイド凝集の病理メカニズムを明らかにする研究を進めていた。一方で、研究室では金ナノ粒子を用いた核酸検出の研究が盛んに行われており、それらを横目に見ながら、せっかく前田研にいたのだから、何か金ナノ粒子研究に関われればと思っていた。そんなあるとき、早稲田大でポストドクをしているときに学んだ一分子計測の考えを導入することで新しいことができるのではと思いついた。

## 2. 金ナノ粒子を用いた分析

ナノメートルサイズの金の微粒子(金ナノ粒子)を用いた分析法が注目を集めている<sup>1, 2</sup>。サイズが直径数ナノメートル~数十ナノメートルの金ナノ粒子が分散した溶液は赤色を示す。これは、表面に局在化しているプラズモン(自由電子の集団振動)と可視領域の光が共鳴して光を吸収するためである。この性質により、古くから金ナノ粒子はガラスの原料に混ぜるなどの方法でステンドグラスなどの彩色に用いられてきた。さらに近年ではこの性質を用いた検出・診断試薬として、イムノアフィニティ

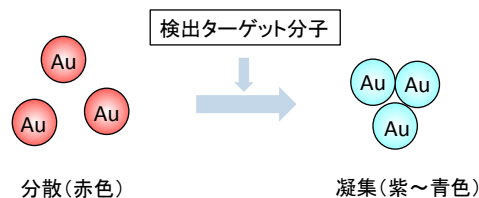


図1 金ナノ粒子凝集による色変化を利用した分子検出

クロマトグラフィー法などに応用されている。一方、なんらかの外的な要因により金ナノ粒子を凝集させると、吸収する光の波長が長波長側にシフトして、水溶液は赤色から紫色もしくは青色に変色する(図1)<sup>3</sup>。この金ナノ粒子の分散・凝集に伴う色調の変化を利用して、タンパク質やDNAなどの生体分子、金属イオン、有機化合物などの様々な分子を検出するセンサーを構築する試みが近年盛んに行われている。ターゲット分子に起因する溶液の色変化を観察することで、目視により簡便に目的分子を検出することができる利点がある。

## 3. DNA配列依存的な金ナノ粒子凝集

筆者が前田研に入った頃、完全に相補な2本鎖DNAを担持した金ナノ粒子が塩存在下で凝集するという面白い現象が発見されていた<sup>4, 5</sup>。金ナノ粒子に末端チオール化1本鎖DNAをチオール基と金表面との結合により密に固定化する。1本鎖DNA固定化金ナノ粒子は塩存在下でも分散するが、相補的な配列を有

する1本鎖DNAを加え2本鎖を形成させると、塩存在下でナノ粒子凝集を形成した(図2)。一方興味深いことに、外側末端にミスマッチが生じるような1本鎖DNAを加えた場合は粒子の凝集は起きなかった。すなわち、完全相補を形成する1本鎖DNA存在下でのみ金ナノ粒子の非架橋凝集が生じる。この結果は、金ナノ粒子溶液の色変化により、加えるDNAを配列依存的に検出できることを示し、遺伝子診断などが可能になることを示した。本研究結果は非常に興味深く、研究室ではこの現象のメカニズム解明や、同現象を利用した水銀検出などの応用研究が進められていた。一方、本現象により1本鎖DNAを検出しようとする、数~数十nMのDNAを加える必要があり、検出感度に問題があった。そこで筆者はナノ粒子凝集を一分子計測できればDNAの高感度検出が実現できるのではないかと考えた。

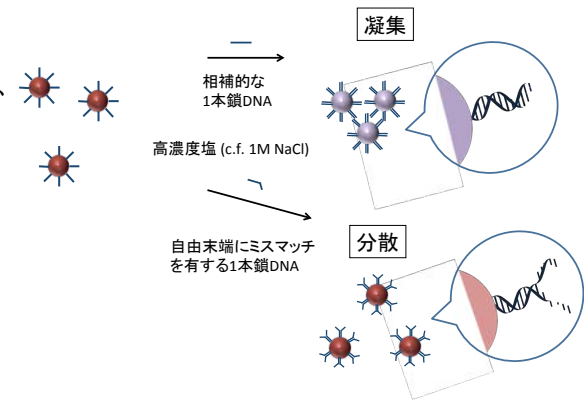


図 2 1 本鎖担持金ナノ粒子に塩存在下で相補的1本鎖を加えたときの凝集

#### 4. 一分子計測

近年、タンパク質などの機能する生体分子を1分子で観測できるようになったことで、様々なことが新たに明らかになった。一分子計測の利点は主に3つある。一つは従来の多分子の平均値を調べる方法では分からない、個々の分子の状態の差異が明らかにできることである。反応素過程を直接一分子レベルで観察することで、従来の生化学的手法による多分子系の実験からは分からなかった反応中間体などが明らかになった。もう一つは分子の構造変化などのダイナミクスが分かることである。モータータンパク質であるキネシンやミオシン分子がどのように運動しているかのモデルも一分子観察により初めて提案された。さらに分析化学的観点から言えば、一分子観察により超高感度測定が可能になる。「一分子」検出とはすなわち、 $1.7 \times 10^{-24}$  molの分子を検出しているという意味では原理的に最も高感度な検出である。

そこで我々は最後の利点に注目し、金ナノ粒子凝集を一分子観察してやれば、高感度に検出することができ、ひいてはターゲット分子の超高感度検出が可能になると考えた。この目的のために暗視野顕微鏡を用いた。暗視野顕微鏡ではコンデンサーで絞った光を照射し、ナノ粒子からの散乱光をイメージングする(図3a)<sup>6</sup>。視野下でナノ粒子あるいはその凝集体一つひとつの散乱光強度を観察することで、ナノ粒子凝集体の高感度検出および凝集をおこすターゲット分子の高感度検出も可能になると期待した。

#### 5. 金ナノ粒子凝集の一分子計測による高感度DNA検出

直径40 nmの金ナノ粒子表面を1本鎖DNAで修飾し、様々な濃度の相補鎖DNAもしくは末端変異鎖DNAと1時間インキュベートした。その後6  $\mu$ Lをスライドガラスに滴下し、暗視野顕微鏡を用いて金ナノ粒子凝集体の一つひとつの散乱強度を観察した。ナノ粒子がモノマーからオリゴマーと成長するにつれ、一つの観測点における光の散乱強度が強くなり、輝度が増加した(図3b)。視野下で100個以上の輝点の一つひとつについて輝度を定量し、横軸に輝度、縦軸にその個数をプロットした頻度分布(ヒストグラム)を得た(図3b)<sup>7</sup>。そのパターンはターゲット分子の添加量度に応じて徐々に高輝度側へとシフトした。このパターンシフトから粒子の凝集の程度を評価することが出来る。本手法では、金ナノ粒子を「一粒」観察しているわけではなく、ナノ粒子「凝集」を一分子計測しており、いわば「単一クラスター」観察していると言える。

ナノ粒子凝集をおこさない、末端変異 DNA鎖とインキュベートした場合、ナノ粒子凝集は観察されなかった(図3b)。一方、散乱輝度の頻度分布パターンは加えた相補鎖DNAの濃度に応じて徐々に高輝度側へとシフトした。輝度分布より凝集しているナノ粒子の割合をそれぞれのDNA濃度に対して求めたところ、濃度依存的にナノ粒子凝集の程度は増加した。DNAを添加していない、バックグラウンドの値に測定誤差3倍を加算した値(3 $\sigma$ ライン)との交点を検出限界(LOD)とする3 $\sigma$ 法によりLODを求めたところ100 fMであった(図3c)<sup>7</sup>。この感度は、ナノ粒子溶液の色変化を用いた方法よりも約10<sup>6</sup>倍高感度といえる。

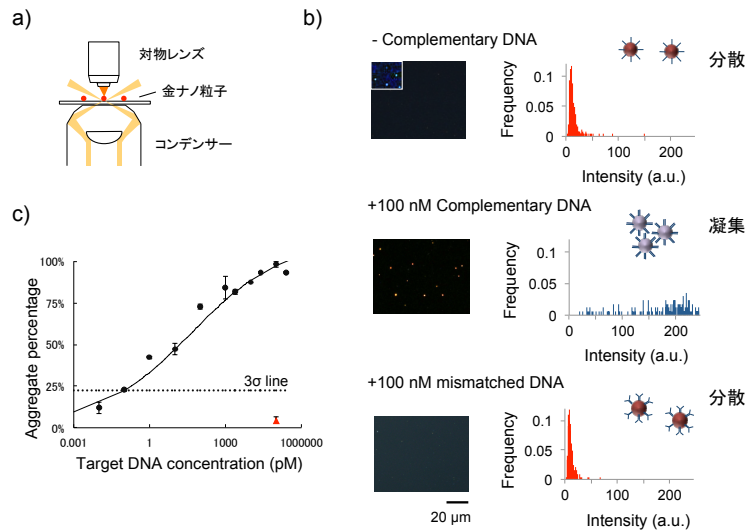


図3 暗視野顕微鏡による金ナノ粒子凝集の一分子計測を用いたDNA検出

### 6. アミロイド凝集の高感度検出

金ナノ粒子凝集の一分子計測により、DNAの超高感度検出に成功した。そこで、この手法が他の分子検出に応用できるかどうか検討することにした。それには筆者が研究をすすめていたアミロイド凝集の検出が適切だと考えた。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患においては、特定のタンパク質が形成するアミロイド凝集が疾病の主な原因になると考えられている。アミロイド凝集は自己集成的に成長する超分子であり、最終的には線維状の不溶性凝集体(フィブリル)を形成する。フィブリルは培養細胞や動物組織などに添加することで細胞死を引き起こす。フィブリルに関しては、積層 $\beta$ シートに特異的に結合する、チオフラビンT(ThT)やコンゴレッドなどの色素が主に検出に用いられている。しかしこれらの方法においても、 $\mu$  Mレベルのフィブリルが必要であり、感度に問題があった。抗体を用いることで高感度検出は可能であるが、無毒のモノマーか、あるいは毒性のある凝集体かの区別は困難であるなどの問題があった。

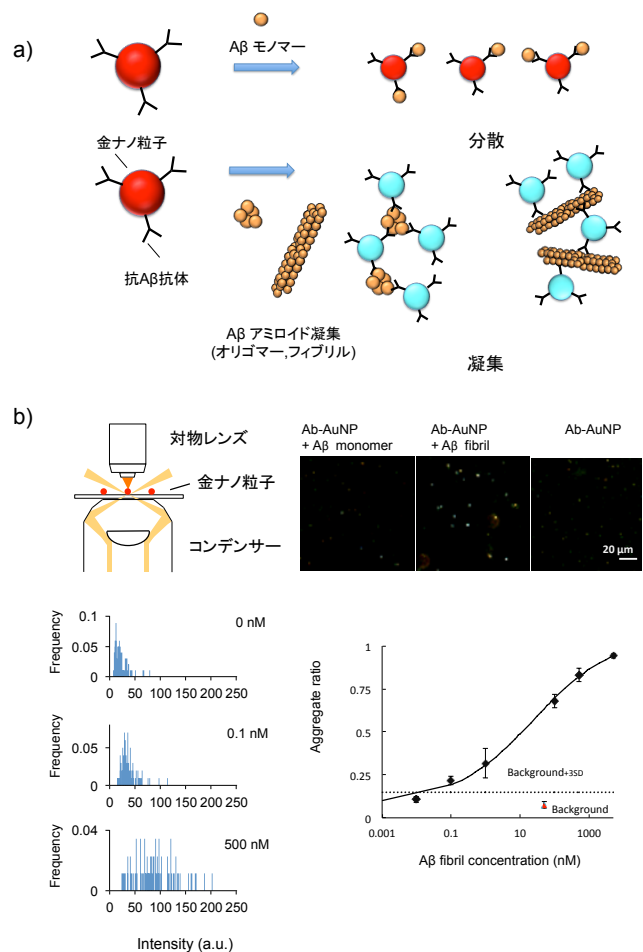


図4 金ナノ粒子凝集の一分子計測によるアミロイド凝集検出

そこで我々は、抗体を修飾した金ナノ粒子を用い、アミロイド凝集に結合して生じる金ナノ粒子凝集を目視検出することによるフィブリルの検出系の構築を試みた(図4a)<sup>8, 9, 10</sup>。金ナノ粒子表面に抗体が吸着する

という性質を用い、金ナノ粒子にAβモノマーを認識する抗Aβ抗体を吸着させた。この抗体担持金ナノ粒子は、モノマー・フィブリルに関わらずすべての状態のAβを認識し結合する。無毒であるAβモノマーに結合した場合は、金ナノ粒子は溶液中で分散しているが、フィブリルの場合は、これらアミロイド凝集を介して複数の抗体担持金ナノ粒子が結合し、架橋型ナノ粒子凝集が生成する(図4a)。これにより、毒性を有するアミロイド凝集の存在を簡便に視認することが可能になった。

次に、暗視野顕微鏡でアミロイド凝集によって形成する金ナノ粒子凝集を一分子観察することによるアミロイドの高感度検出をおこなった(図4)。直径40 nmの金ナノ粒子表面を抗Aβ抗体で修飾し、様々な濃度(0~5 μM)のAβフィブリルもしくはモノマーと1時間インキュベートした。その後同様に、暗視野顕微鏡を用いて金ナノ粒子凝集体の一つひとつの散乱強度を観察した。Aβモノマーとインキュベートした場合、ナノ粒子凝集は観察されなかった(図4b)。散乱輝度の頻度分布パターンは添加アミロイド凝集の濃度に応じて徐々に高輝度側へとシフトした。輝度分布より凝集しているナノ粒子の割合をそれぞれのAβフィブリル濃度に対して求めたところ、濃度依存的にナノ粒子凝集の程度は増加した。3σ法によりLODを求めたところ40 pMであった<sup>8</sup>。この感度は、これまでのThTなどの蛍光プローブを用いた方法よりも約10<sup>5</sup>倍高感度といえる。近年はフィブリルの前駆体であるオリゴマーの方が高毒性であることが分かって来ており、現在はオリゴマーの高感度検出をすすめている。

### 7. 金ナノ粒子凝集の一分子計測による検出感度

金ナノ粒子凝集の一分子計測により、凝集形成をおこなす分子の高感度検出が可能であることが分かった。ではどのくらいの高感度化が可能であろうか？それにはまず金ナノ粒子凝集の検出感度を明らかにする必要がある。そのために、40 nmの金ナノ粒子溶液に、凝集のモデルとして80 nmの金ナノ粒子を様々な割合で混合させ、どの程度の割合まで検出可能かを検討した(図5)。80 nmの金ナノ粒子は40 nmのものよりも明るい散乱光を示すため、凝集モデルとして用いた。図に示すように、80 nmの金ナノ粒子の割合が0, 1, 10, 100%と上がるにつれ、暗視野像での明るい輝点の割合が増えているのがわかる。輝度ヒストグラムから明るい輝点の割合を求めたところ、1%の80 nmナノ粒子の混在を有意に判別できることが分かった。つまり、この結果は100個の単量体粒子に存在する一つの凝集体が検出可能であることを示している。

では、どのくらいのサイズの凝集体まで検出可能であろうか？そのためには粒子数を制御した凝集体を作成する必要がある。ここでも前田研にいたことが幸いした。その頃研究室では、金ナノ粒子で構造体を作成する研究が行われていた。我々は金ナノ粒子表面に固定化するDNA本数を制御し、そのDNAを用いてナノ粒子間を架橋することで、2量体・3量体金ナノ粒子を生成することに

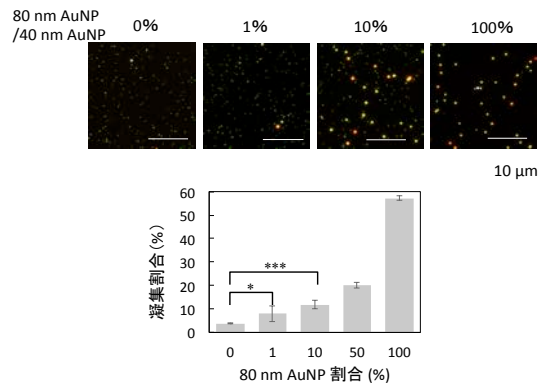


図5 様々な割合の80 nm 金ナノ粒子検出

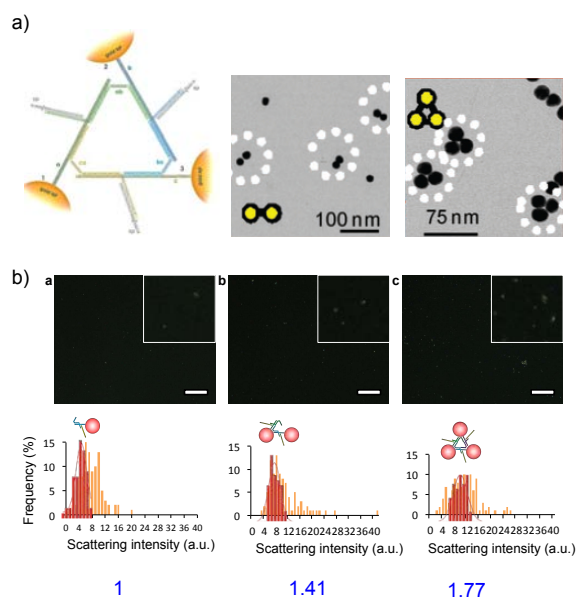


図6 金ナノ粒子2量体・3量体の形成および散乱輝度の単分子計測

成功していた(図6)<sup>11, 12</sup>。理研では分野を越えた共同研究が推進されており、この研究は田中メタマテリアル研究室と、新しい光学特性を有する材料を創製する目的で行っていた。このときに作成した2量体・3量体が使えるのではと考え、これらを暗視野顕微鏡で一分子計測・解析を行い、それぞれの輝度を求めた。その結果、2量体と3量体の散乱強度は単量体のそれぞれ1.4倍、1.7倍であった(図6)<sup>13</sup>。これらの結果より、境界値をうまく設定することで、2量体以上の凝集形成を観察できる可能性があることが分かった。

## 8. 本手法の応用可能性

本手法はどの程度まで応用可能であろうか？ 上述のように、金ナノ粒子を用いた分子検出が盛んに行われている。金ナノ粒子表面を修飾することで、様々な分子検出が可能となる。例として、核酸アプタマーで修飾したナノ粒子を用いた例を挙げる(図7)。1本鎖DNAには金ナノ粒子に吸着しやすいという性質がある。1本鎖DNAでも、特定の分子との特異的な結合能を持つDNAアプタマーを用いることで、ターゲット分子存在下でおこる金ナノ粒子凝集の色変化により分子検出を行う方法が開発されている。Weiらはトロンピンタンパク質に結合するDNAアプタマー(トロンピンアプタマー)を吸着させた金ナノ粒子を利用

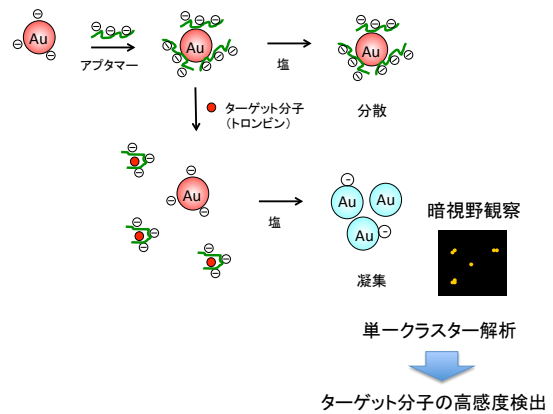


図7 アプタマー修飾金ナノ粒子を用いた分子検出

したトロンピン検出を報告した<sup>14</sup>。トロンピン非存在下では、トロンピンアプタマーが金ナノ粒子に吸着しているため塩存在下でも凝集せず分散しているが、トロンピン存在下では金ナノ粒子に吸着していたアプタマーが解離しトロンピンと結合するため、金ナノ粒子同士の静電反発が起こらなくなり、塩存在下で凝集が起こる。ナノ粒子凝集の色変化によりトロンピンの検出に成功した。この方法のメリットは様々な分子検出に応用が可能であることである。これまで多くの核酸(DNA, RNA)アプタマーが見つかっており、これらを用いることで様々な分子検出が可能となる。さらに我々が開発している、ナノ粒子凝集の単一計測技術を応用することで、様々な分子の高感度検出が可能になると期待できる。

## 9. おわりに

本稿では、一分子計測の手法を用いた金ナノ粒子凝集観察による、高感度分子検出について述べた。さらに近年我々は、愛媛大において、疾病バイオマーカー等の超高感度検出を目指した先端ナノ・バイオ分析研究ユニットを立ちあげた。愛媛大では分野横断的な研究グループの立ち上げを推奨しており、大学内において生化学、ナノ分光学、環境化学、病理学分野の分析化学研究室が協力し合い、疾病の早期診断のための分析システムの構築および医療応用を目指した研究開発を進めている。

## 謝辞

本研究は、理化学研究所の前田研および愛媛大で実施したものです。前田瑞夫主任研究員、Bu博士をはじめとする理化学研究所のラボメンバー、愛媛大学の朝日剛教授(工学部)、小川敦司准教授(プロテオサイエンスセンター)およびラボメンバーのご協力に深く感謝いたします。データの作成は当研究室の矢野湧暉君と矢野雄暉君に協力頂きました。ここに謝意を記します。また、本稿に記したように、本研究には早

稲田大学および東京農工大でのポストドク時の研究経験が大きく寄与しています。船津高志教授(現東京大学大学院薬学系教授)、養王田正文教授のご指導に深謝いたします。最後に、執筆の機会を与えて下さった、井原敏博教授(熊本大学)に御礼申し上げます。

#### 参考文献

1. 座古保. (2016). 一分子計測技術を用いたバイオ分析化学. *ぶんせき* **497**, 173-4.
2. 座古保. (2016). 金ナノ粒子を用いた検出・診断技術. *バイオマテリアル-生体材料-* **34**, 190-7.
3. Ghosh, S. K. & Pal, T. (2007). Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chem. Rev.* **107**, 4797-862.
4. Sato, K., Hosokawa, K. & Maeda, M. (2003). Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by non-cross-linking DNA hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8102-8103.
5. 宝田徹 & 前田瑞夫. (2015). DNA 二重らせん担持金ナノ粒子を用いる分析化学. *分析化学* **64**, 15-23.
6. Jans, H., Liu, X., Austin, L., Maes, G. & Huo, Q. (2009). Dynamic Light Scattering as a Powerful Tool for Gold Nanoparticle Bioconjugation and Biomolecular Binding Studies. *Anal. Chem.* **81**, 9425-32.
7. Bu, T., Zako, T., Fujita, M. & Maeda, M. (2013). Detection of DNA induced gold nanoparticle aggregation with dark field imaging. *Chem. Commun.* **49**, 7531-3.
8. Bu, T., Zako, T. & Maeda, M. (2016). Dark Field Microscopic Sensitive Detection of Amyloid Fibrils Using Gold Nanoparticles Modified with Antibody. *Anal. Sci.* **32**, 307-11.
9. Zako, T. & Maeda, M. (2014). Application of biomaterials for the detection of amyloid aggregates. *Biomater. Sci.* **2**, 951-5.
10. Sakono, M., Zako, T. & Maeda, M. (2012). Naked-eye detection of amyloid aggregates using gold nanoparticles modified with amyloid beta antibody. *Anal. Sci.* **28**, 73-6.
11. Ohshiro, T., Zako, T., Watanabe-Tamaki, R., Tanaka, T. & Maeda, M. (2010). A facile method towards cyclic assembly of gold nanoparticles using DNA template alone. *Chem. Commun.* **46**, 6132-4.
12. Watanabe-Tamaki, R., Ishikawa, A., Tanaka, T., Zako, T. & Maeda, M. (2012). DNA-Templating Mass Production of Gold Trimer Rings for Optical Metamaterials. *J. Phys. Chem. C.* **116**, 15028-33.
13. Wang, G., Bu, T., Zako, T., Watanabe-Tamaki, R., Tanaka, T. & Maeda, M. (2017). Dark field microscopic analysis of discrete Au nanostructures: Understanding the correlation of scattering with stoichiometry. *Chem. Phys. Lett.* **684**, 310-5.
14. Wei, H., Li, B., Li, J., Wang, E. & Dong, S. (2007). Simple and sensitive aptamer-based colorimetric sensing of protein using unmodified gold nanoparticle probes. *Chem. Commun.*, 3735-7.

気になった論文

堀場 昌彦 (ほりば まさひこ)

大阪大学大学院薬学研究科 創成薬学専攻 博士後期課程 3年

horiba-m@phs.osaka-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レター「気になった論文」の執筆機会をいただき、誠にありがとうございます。私は、大阪大学大学院薬学研究科生物有機化学分野で小比賀教授のご指導のもと、核酸医薬に導入する新規人工核酸の設計・合成に携わっております。核酸医薬の分野では、ターゲット遺伝子に対する特異性の獲得や標的組織へのデリバリーを目的として、これまでに様々な分子が開発されてきました。近年、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムの医療応用が注目を集めており、核酸医薬で用いられてきた分子も積極的に活用されています。本稿では、CRISPR/Cas9 システムを構成する RNA やタンパク質に化学修飾を施すことで、標的遺伝子および細胞に対する特異性の獲得や、ゲノム編集効率の向上を狙った研究について、最新の 3 報を紹介いたします。

**Partial DNA-guided Cas9 enables genome editing with reduced off-target activity**

Yin, H.; Song, C.-Q.; Suresh, S.; Kwan, S.-Y.; Wu, Q.; Walsh, S.; Ding, J.; Bogorad, R. L.; Zhu, L. J.; Wolfe, S. A.; Kotliansky, V.; Xue, W.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 311–316.

CRISPR/Cas9 システムでは、CRISPR RNA (crRNA) とトランス活性化型 RNA (tracrRNA) が複合体を形成し、crRNA の 5'末端から 20 塩基の領域で標的遺伝子を認識します (図 1. a)。この領域内にミスマッチ塩基を含む配列 (オフターゲット配列) に対してもゲノム編集が起こることが知られており、この問題を回避する手段について研究されてきました。著者らは、crRNA の一部を DNA 鎖に置換することで、標的遺伝子に対するゲノム編集効率を維持しつつ、オフターゲット配列へのゲノム編集を抑制することに成功しました。

crRNA が標的遺伝子を認識する 20 塩基は、10 塩基毎に tail 領域および seed 領域と呼ばれており、seed 領域において Cas9 タンパク質とより強く相互作用していると考えられています。そこで著者らは、GFP 遺伝子を標的とする crRNA に対して、tail 領域側から段階的に DNA の導入数を増加させた配列を用意し、ゲノム編集効率について評価しました (図 1. b)。その結果、crRNA の 5'末端から 12 塩基までを DNA 鎖とした配列 (12 DNA) まででゲノム編集が確認され、tail 領域の DNA 鎖への置換が可能であることを見出しました。さらに著者らは、DNA-DNA 二重鎖が DNA-RNA 二重鎖よりも不安定であることに着目し、導入した DNA 鎖に

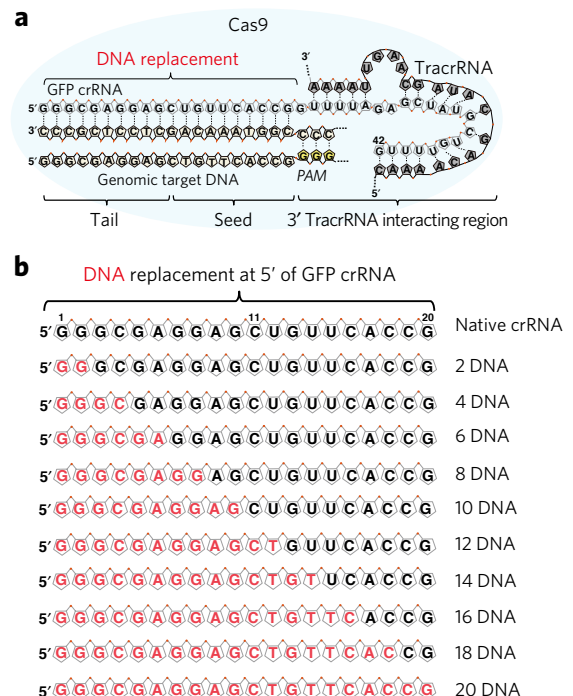


図 1. (a) CRISPR/Cas9 システムの概要。(b) DNA 鎖に置換した crRNA の配列。赤字: DNA、黒字: RNA。(論文より許可を得て抜粋、一部改変)

よってオフターゲット配列への認識を抑制できると仮説を立てました。そこで、ヒトゲノム中に多くのオフターゲット配列が存在する VEGFA 遺伝子を標的とした crRNA を設計し、オフターゲット配列に対するゲノム編集の有無について調査しています (図 2)。それによって、RNA のみで構成された crRNA (Native crRNA) と 10 塩基を DNA 鎖に置換した crRNA (10 DNA) は VEGFA 遺伝子に対して同等のゲノム編集効率を示す一方で、オフターゲット配列に対するゲノム編集は 10 DNA において大幅に抑制されることが明らかになりました。以上の結果から、CRISPR/Cas9 システムが抱えるオフターゲット配列に対するゲノム編集という問題を回避する新たな手段が示されました。CRISPR/Cas9 システムを医療応用する上で非常に重要な知見であり、本研究領域が更に発展していくことが期待されます。

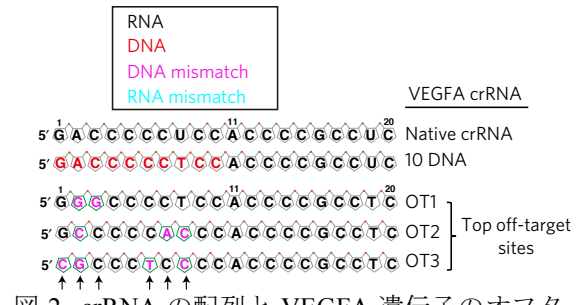


図 2. crRNA の配列と VEGFA 遺伝子のオフターゲット配列。(論文より許可を得て抜粋、一部改変)

**A G-quadruplex motif at the 3' end of sgRNAs improves CRISPR-Cas9 based genome editing efficiency**

Nahar, S.; Sehgal, P.; Azhar, M.; Rai, M.; Singh, A.; Sivasubbu, S.; Chakraborty, D.; Maiti, S. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 2377–2380.

ゲノム編集効率の向上を目的に、これまで crRNA や tracrRNA に人工核酸を導入し、細胞内のヌクレアーゼに対する安定性や標的遺伝子への認識能を高める手段が研究されてきました。その一方で人工核酸の導入は、オフターゲット配列のゲノム編集や化学修飾に由来する毒性および免疫応答といった問題を孕んでいます。著者らは、crRNA と tracrRNA を繋げて一本鎖とした sgRNA に対し、細胞内に実際に存在するグアニン四重鎖構造を修飾することで、毒性などの問題を回避すると共に、ヌクレアーゼ耐性の付与が可能であると考えました。

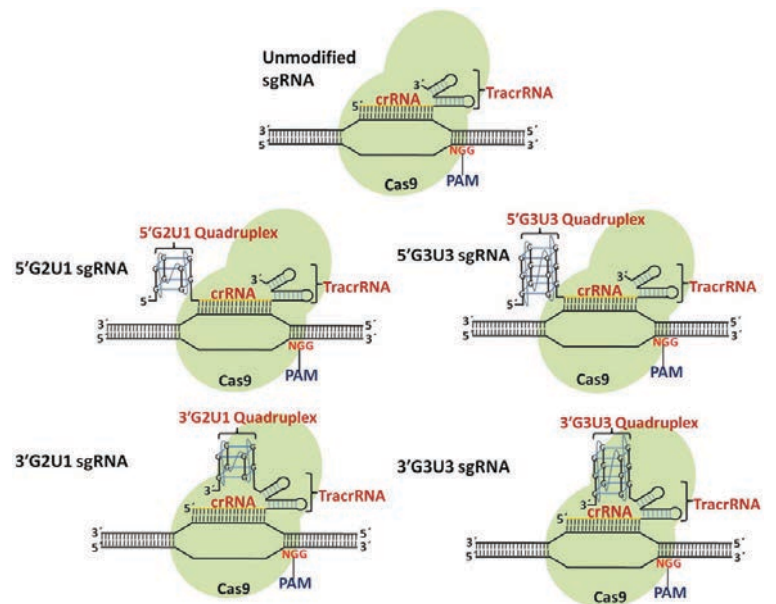


図 3. sgRNA の 5'末端および 3'末端にグアニン四重鎖構造を修飾した Cas9-sgRNA 複合体。(論文より許可を得て抜粋、一部改変)

まず著者らは、sgRNA の 5'末端および 3'末端に配列の異なる 2 種類のグアニン四重鎖構造を修飾しました (図 3)。詳細については割愛いたしますが、3'末端にグアニン四重鎖構造を修飾した場合においてヌクレアーゼ耐性が上昇し、中でもサイズの小さい G2U1 四重鎖でゲノム編集効率の向上が確認されました。この結果について著者らは、グアニン四重鎖構造の長さや二次構造が sgRNA の機能に影響を与えていると考察しています。一方、5'末端にグアニン四重鎖構造を修飾した場合は、ゲノム編集が著しく阻害されてしまうという結果になっています。こちらについては、活性な Cas9-sgRNA 複合体の形成、または、標的遺伝子の認識が不利になっていることが原因ではないかと考察しています。また、オフターゲット配列に対するゲノム編集は、グアニン四重鎖構造を 3'末端に有する sgRNA において特に起こっておらず、修飾由来の毒性も見られていないと述べております。以上のように、ヌクレアーゼ耐性とゲノム編集効率の結果から、



グアニン四重鎖構造が sgRNA の修飾として優れた分子であることが示されました。先の論文と同様、天然由来の構造を巧みに応用することで sgRNA の機能向上に成功しており、汎用性の高さやコスト面からも非常に価値のある研究と言えます。

### Receptor-mediated delivery of CRISPR-Cas9 endonuclease for cell-type-specific gene editing

Rouet, R.; Thuma, B. A.; Roy, M. D.; Lintner, N. G.; Rubitski, D. M.; Finley, J. E.; Wisniewska, H. M.; Mendonsa, R.; Hirsh, A.; De Oñate, L.; Barrón, J. C.; McLellan, T. J.; Bellenger, J.; Feng, X.; Varghese, A.; Chrnyk, B. A.; Borzilleri, K.; Hesp, K. D.; Zhou, K.; Ma, N.; Tu, M.; Dullea, R.; McClure, K. F.; Wilson, R. C.; Liras, S.; Mascitti, V.; Doudna, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 6596–6603.

核酸医薬の標的細胞選択的なデリバリー技術として、末端にリガンドを結合させる手法が広く研究されています。中でも、肝臓細胞の表面に特異的に発現する asialoglycoprotein receptor (ASGPr) に対するリガンドである *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) は、核酸医薬に搭載することで細胞内への取り込みを飛躍的に向上させることが知られています。著者らのグループでは以前に、GalNAc の構造活性相関を行い、従来型よりも ASGPr に対する結合力の強いリガンドの開発に成功しました。彼らは、その改良型 GalNAc を Cas9 タンパク質に搭載し、CRISPR/Cas9 システムの肝臓細胞特異的なデリバリー技術の開発を試みました (図 4)。本論文では、GalNAc 搭載型 Cas9 タンパク質に付加させる核移行シグナル (NLS) の数やエンドソーム不安定化ペプチドの利用についても検討されています。

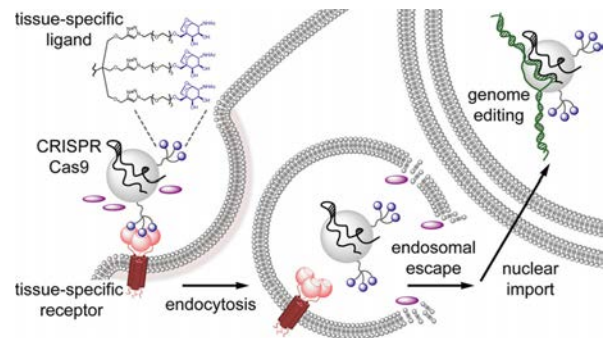


図 4. 改良型 GalNAc を搭載した CRISPR/Cas9 システムの細胞内取り込みメカニズム。(論文より許可を得て抜粋、一部改変)

まず著者らは、Cas9 タンパク質に改良型 GalNAc と蛍光タンパク質、3 つの NLS をコンジュゲートし、ASGPr を細胞表面に豊富に有する HEPG2 細胞に対する取り込み効率を評価しました。その結果、GalNAc 非搭載型 Cas9 タンパク質と比較して、短時間で細胞内への取り込み効率の上昇が確認されましたが、時間経過とともに取り込み効率の差が小さくなっていきました。また、ASGPr をほとんど発現していない SKHEP 細胞に対しても、取り込みが見られました。この結果に関して彼らは、カチオン性の NLS がアニオン性の細胞膜と非特異的に相互作用することで、GalNAc 非依存的な細胞内取り込みが促進されたためであると考察しています。そこで、NLS の数を 1 つに減らしたところ、長時間経過後も有意な取り込み効率の差が見られました (図 5)。さらに、SKHEP 細胞に対する取り込みも抑制されており、標的細胞特異性の獲得に成功しました。一方、ゲノム編集効率については、GalNAc の搭載により細胞内取り込みが向上しているにもかかわらず、ゲノム編集が行われていないことが明らかになりました。こちらの結果については、エンドソーム内から脱出できず、リソソームで分解されていることが原因ではないかと考えています。そこで、エンドソーム不安定化ペプチド ppTG21 を併用し、正常なゲノム編集を行うことに成功しています。今後 *in vivo* でのゲノム編集効率や肝臓移行性などを評価していく予定と述べており、これからの進展に期待のできる研究成果が得られております。

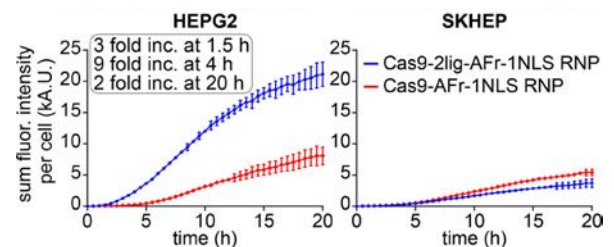


図 5. NLS を 1 つコンジュゲートした Cas9 タンパク質の細胞内取り込み評価。青線: GalNAc 搭載型 Cas9 タンパク質、赤線: GalNAc 非搭載型 Cas9 タンパク質。(論文より許可を得て抜粋、一部改変)

## 気になった論文

佐々木 光一 (ささき こういち)

九州大学大学院工学研究府応用化学部門 博士後期課程 2年

k.sasaki@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

この度は生命化学レター「気になった論文」の執筆機会を頂きまして、大変光栄に存じます。この場をお借りし、厚く御礼申し上げます。私は学部4年生の頃より一貫して、片山佳樹教授のご指導の下抗体リクルート分子の研究を行っております。遂行中の研究もそうなのですが、私は免疫機構の特性を巧みに利用する分子・マテリアルの開発に強い興味を持っております。現在は主にペプチドを取り扱っておりますが、将来はペプチドに限らず、タンパク質・合成高分子・核酸・細胞材料も取り扱い、ユニークなアイデアを展開できるようになれば、と未熟ながら精進しております。

ということで私からは、免疫のエンジニアリングに関連して2報、論文を紹介致します。1報目はorthogonalなinterleukin-2 (IL-2) IL-2受容体を導入したT細胞によるがん治療の論文です。副作用がなく、より効果的な細胞療法が現実となりつつあることを感じます。2報目は、薬剤内包ナノ粒子を細胞傷害性T細胞 (CTL) にコンジュゲートすることで、抗原認識をトリガーとした薬剤放出を達成した論文です。薬剤放出の時空間的制御はドラッグデリバリーシステムにおける大きな目標の一つであり、抗原認識という極めて精密な機構を利用したこのコンセプトは面白いと感じました。また2報目の例は、1報目のような細胞の改変技術と組み合わせることで、更なるポテンシャルを発揮するのでは、とも感じます。

### Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes

J. T. Sockolosky et al., *Science* **359**, 1037-1042 (2018)

CAR-T細胞療法が昨年FDAにより初めて承認され、がん治療における養子免疫細胞移植 (Adoptive T cell Transfer, ACT)の有用性が証明された。しかし、必要量のT細胞を用意するコストや、患者へ投与されたT細胞が生着しない場合がある、といった課題も山積している。解決策として、IL-2を投与すると移植されたT細胞の生存率・抗腫瘍活性が改善したとの報告はあるものの、IL-2の免疫活性化能/抑制能、強い毒性といった多面的特性が、事態を複雑にしている。

IL-2の持つ問題を回避するため、著者らはwild-type (WT) のIL-2/IL-2受容体 (IL-2R) ペアと直交なorthoIL-2/IL-2Rペアを生み出し、ACTに応用しようと考えた (Fig. 1)。IL-2Rは3つのサブユニット ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) からなるが、その内シグナル伝達に関与し、かつ単独でIL-2に結合できるものは $\beta$ 鎖に限られる。 $\beta$ 鎖に注目した著者らは、まずWTIL-2と結合しないorthoIL-2R $\beta$ を設計した。これを用い次に、WTIL-2R $\beta$ とは相互作用せずorthoIL-2R $\beta$ にのみ結合するorthoIL-2 (1G12, 3A10) をスクリーニングにより得た。orthoIL-2R $\beta$ を遺伝子導入したT細胞 (orthoT cell) と通常のT細胞を用い、IL-2変異体の活性を調べたところ、1G12はorthoT cellに対し30倍高い活性を示し、3A10はorthoT cellに対してのみ活性を示すことがわかった (Table 1)。1G12がWT T cellにも活性を示したのは、1G12がIL-2R $\alpha$ 存在下ではWTIL-2R $\beta$ と相互作用できるため

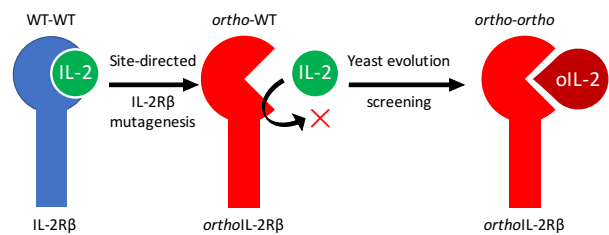


Fig. 1 orthoIL-2/IL-2R $\beta$  ペア創製の戦略

と推察された。また、WTIL-2がorthoT cellにも作用したのはIL-2Rα, γ鎖を含むIL-2Rヘテロライマーと相互作用できるためと考えられた。

著者らは次に、orthoIL-2がin vivoでorthoT cell特異的に作用するか検証した。方法としては、YFPレポーターつきorthoT cellとWT T cellの混合物を用意し、コンジェニック系統のレシピエントに移植、5日間IL-2変異体を投与した後で脾臓からT細胞を回収し、フローサイトメリーによる解析を行った (Fig. 2左)。

活性の違いを考慮し (Table 1)、3A10のみ10倍量が投与された。すると、ドナー由来orthoT cellはorthoIL-2 (1G12, 3A10) 投与群でのみ有意に増殖し、かつ増殖効率率はWTIL-2/WT T cellの組み合わせより高いこと、3A10はWT T cellの増殖に全く影響しないことが分かった (Fig. 2右)。

WTIL-2によるドナー由来WT T cell, orthoT cellの増殖が共に顕著でなかったのは、宿主細胞との競合が起こったためと考えられる。加えて、WTIL-2の頻回投与で見られたマウスの体重・血小板数の減少や死といった有害事象は、orthoIL-2投与群では認められなかった。以上より、orthoIL-2により効率的かつ特異的にorthoT cellを活性化できること、orthoIL-2は重篤な副作用をもたらさないことが示された。

より詳細にIL-2変異体の効果を調べたところ、T細胞における免疫抑制受容体の発現に関し、極めて興味深い結果が得られている。IL-2変異体の投与は一樣にPD-1の発現を上昇させた一方で (Fig. 3左)、orthoIL-2投与群におけるTIM-3の発現はWTIL-2投与群と比較しても低かった (Fig. 3右)。原因の一つとして、WTIL-2はT細胞のみならず宿主中の様々な細胞に作用し、それらが間接的にTIM-3の発現上昇に寄与したと考えられる。TIM-3の発現はT細胞の機能不全の度合いを反映するといわれている。この結果から、細胞間の複雑な相互作用ネットワークが存在する生体内では、orthoIL-2のように特定の細胞のみに働きかける手法が何かしら重要な意義をもたらす可能性があること示唆された。

最後に著者らは、orthoT cellの移植と、その後のorthoIL-2投与によりがんの成長を抑制できるか検証した。具体的には、マウスメラノーマ細胞株 (B16F10) 特異的orthoT cellと、マウス血清アルブミン融合3A10 (MSA-3A10) を用い実験を行なった。結果として、MSA-3A10はorthoT cellと併用した場合にのみ、WTIL-2 + WT T cellペア同様の抗腫瘍効果を示した (Fig.4)。

本戦略では、orthogonalなIL-2を得る過程でIL-2Rへの親和性を犠牲にしており、特に3A10の活性はWTと比較し顕著に低下している。それを補うため、一部の実験では多量の投与や、MSA融合体の使用などの工夫がなされている。活性を落とさず直交性を示す理想的な変異体は開発されなかったが、今回の報告は、IL-2の重篤な副作用を回避しつつACTと組み合わせるという目標を達成して見せた。CAR-T細胞療法や、その他のサイトカイン・増殖因子などへの応用も期待される有望な手法と思われる。

Table 1 IL-2 変異体の配列と活性 (in vitro)

AA#	AA#							WT	Ortho	Ratio
	29	30	33	34	36	37	41	EC <sub>50</sub> (pM)	EC <sub>50</sub> (pM)	(WT/ortho EC <sub>50</sub> )
WT	E	Q	M	D	Q	E	R	3	3	1
1G12		N	V	L	T	H	K	300	10	30
3A10		D	N	V	L	K	A	∞	1000	ortho

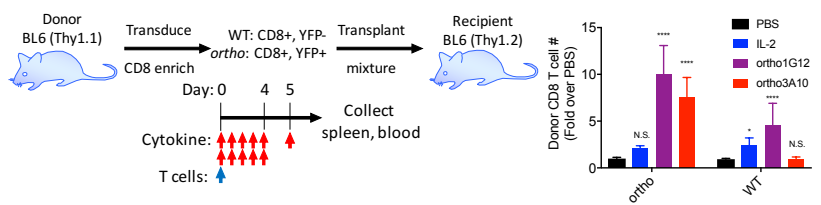


Fig. 2 養子免疫細胞移植モデルの概要と移植細胞の増殖

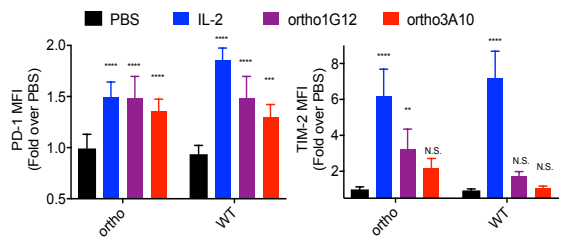


Fig. 3 移植 T 細胞の抑制性受容体発現

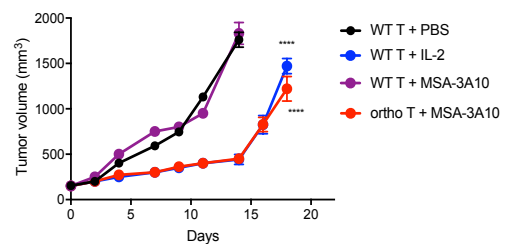


Fig. 4 orthoT cell と orthoIL-2 によるメラノーマモデルの治療

Antigen recognition-triggered drug delivery mediated by nanocapsule-functionalized cytotoxic T-cells

R. B. Jones et al., *Biomaterials* **117**, 44-53 (2017)

薬剤放出の時空間制御を目指し、標的組織特有の刺激 (pH, 酵素など) や外部刺激 (光・熱・磁場など) に応じて薬剤を放出するドラッグキャリアが開発されてきた。これらの戦略に加えて、細胞療法とDDSとを融合させる戦略は、細胞の有する正確な組織移行能力を利用できる点で大変有望である。著者らは過去に、脂質ベースのナノ粒子を細胞障害性T

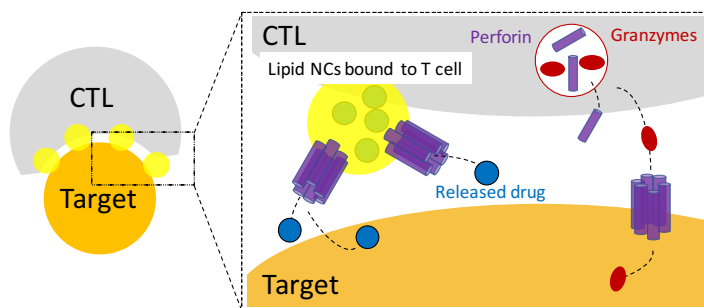


Fig.5 CTL による抗原認識をトリガーとした薬剤放出戦略

細胞 (CTL) 表面上の膜タンパク質と共有結合することで、CTLに薬剤内包粒子を運搬させてきた (*Nat. Med* **16**, 1035-1041 (2010), *Sci. Transl. Med* **7**, 291ra94 (2015))。その際、CTLの体内動態や標的細胞の殺傷能力に悪影響がないことを確かめている。加えて著者らは、粒子の一部が免疫シナプスに局在化するタンパク質 (CD45, LFA-1, Thy1) に修飾されることも示している (*Biomaterials* **33**, 5776-5787 (2012))。以上を踏まえ本論文では、抗原認識に伴うパーフォリンの放出をトリガーとして、CTL表面に修飾した粒子からの薬剤放出が可能であることが示された (Fig.5)。

まず著者らは、二分子膜間架橋多重膜ベシクルを薬剤キャリアに選択した (*Nat. Mater* **10**, 243-251 (2011))。このナノカプセル (NC) は、リポソームより高いタンパク質内包特性を備える。脂質で構成されるこのNCにAlexa647標識したオボアルブミン (Alexa647-OVA) を内包し、1nMのパーフォリン存在下でインキュベートすると、70%以上の放出が確認された。パーフォリン非存在下ではOVAの放出はほとんど起こらないこと、放出は初期の10分以内に速やかに進行することも確かめられた。

次に著者らは、Alexa647-OVA内包NCと、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) Gagタンパク質特異的CTLをコンジュゲートしたものを用意した (NC-CTL)。事前にGagタンパク由来ペプチドでパルスしたCD4<sup>+</sup>T細胞とNC-CTLを共培養すると、NC-CTLはAlexa647-OVA由来の蛍光強度を減少させると共に、CD107aを細胞膜上に表出させた。この結果に加え、ペプチド非パルスCD4<sup>+</sup>T細胞との共培養では同様の現象が見られなかったこと、パーフォリン依存性細胞傷害経路の阻害剤を加えると、薬剤放出が抑制されたことも合わせ、CTL表面での薬剤放出は抗原認識と、それに伴うパーフォリンの放出をトリガーにしていると示された。

最後に著者らは、HIVモデルマウスを用いて治療応用の可能性を示した。HIV根治療法の候補として抗原特異的CTLの移入が検討されているが、①CTLを更に活性化する薬剤、②潜伏感染中の細胞にHIV抗原を発現させる薬剤の併用が必要と考えられている。著者らの過去の報告は、IL-15スーパーアゴニスト (IL-15Sa; IL-15とIL-15Rαの複合体)がこの2条件を満たすと示唆している (*Nat. Med* **16**, 1035-1041 (2010), *PLoS Pathog* **12**, e1005545 (2016))。IL-15Saを搭載

したNC-CTLをHIV感染マウスに移入すると、リンパ節におけるHIV感染CD4<sup>+</sup>T細胞の割合が減少した (Fig.6左)。また、感染マウスのリンパ節でのみ、投与後のIL-15Saの濃度が高まっていた (Fig.6右)。以上より、本コンセプトを用い、*In vivo*においても抗原認識をトリガーとした薬剤放出が起こせること、本法が疾患治療に有用な可能性が示された。

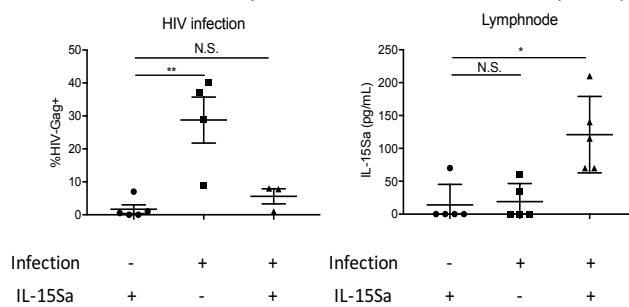


Fig.6 *In vivo* における HIV 感染細胞の除去 (左) リンパ節での IL-15Sa 放出 (右)

## 気になった論文

上田 大次郎 (うへだ だいじろう)

千葉大学工学部共生応用化学科第二分野バイオマテリアル研究室 日本学術振興会特別研究員 (PD)

dai88nba@gmail.com

この度は、生命科学研究レター「気になった論文」への執筆の機会をいただきまして、井原敏博先生をはじめとする編集委員の先生方に深く御礼申し上げます。私は、2018年3月に新潟大学自然科学研究科で、佐藤努准教授の指導の下、博士(農学)の学位を取得し、同年4月より千葉大学工学部で、梅野太輔 准教授の下、日本学術振興会特別研究員 (PD)として勤務しております。専門分野は生物有機化学であり、学生時代は「*Bacillus* 属細菌由来新規テルペノイド生合成経路の解析と利用」というテーマで博士論文をまとめ、テルペンの中でも珍しい部類に入るもの(炭素数35や25)の生合成についての研究を行ってきました。その中で、スクアレンもしくはオキシドスクアレンが両末端から環化するオノセロイドに着目しました。オノセロイドはシダ植物、高等植物、動物から発見されており、天然物では珍しい媚薬作用等様々な生理活性を持っています。その最初の発見はシダ植物から1955年にされていました(D. H. R. Barton, K. H. Overton, *J. Chem. Soc.*, 2639-2652, 1955.)。しかしながら、その詳細な生合成経路は謎に包まれたままでした。私は、*Bacillus* 属細菌にオノセロイドの生産を確認するとともに生合成を調べており、世界で初めて、オノセロイド合成酵素(BmeTC)を発見し報告しました(Fig. 1, D. Ueda, T. Hoshino, T. Sato, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 18335-18338, 2013)。細菌では1つの酵素がオノセロイドを生合成していることが判明し、また、2環中間体を経ることが分かりました(Fig. 1)。

一方で、植物に由来するオノセロイド合成酵素はその後も暫く見つかりませんでした。そしてごく最近、ついに植物由来のオノセロイド合成経路が明らかになり始めたので、ご紹介します。

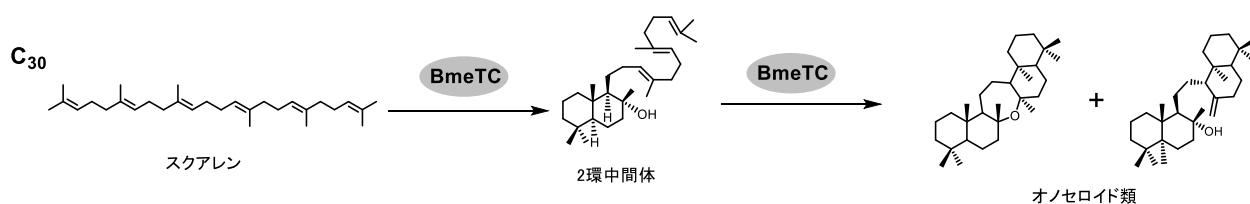


Fig. 1. 細菌由来オノセロイドとオノセロイド合成酵素

### Onocerin biosynthesis requires two highly dedicated triterpene cyclases in a Fern *Lycopodium clavatum*

T. Araki, Y. Saga, M. Marugami, J. Otaka, H. Araya, K. Saito, M. Yamazaki, H. Suzuki, T. Kushiro, *ChemBioChem.*, **17**, 288-290, 2016.

オノセロイドの一種である $\alpha$ -onocerin(**2**)は2, 3, 22, 23-dioxidosqualene(**1**)の生合成は、*O. spinosa*のセルフリー実験等から、両末端から環化したものであることが知られていたが、その生合成の詳細は不明であった(Fig. 2, M. G. Rowan, P. D. G. Dean, T. W. Goodwin, *FEBS Lett.* **12**, 229-232, 1971; M. G. Rowan, P. D. G. Dean, *Phyto-chemistry* **11**, 3111-3118, 1972.)。動物コレステロール合成の研究人口の多さからか、エポ

キシ環が片側しかない oxidosqualene 環化酵素 (OSC) の研究は例が多く、同定されている遺伝子も多い。筆者らは OSC 関連酵素遺伝子の探索を行った。OSC に高く保存されているモチーフに対し様々なプライマーを用意し、ヒカゲノカズラ

(*L. clacatum*) から LCA, LCB, LCC の 3 つの遺伝子を候補とした。LCA, LCB は OSC と高い相同性を示した一方、LCC は低い相同性であった。よって、筆者らはこれが OSC ではなく、似て非なるものであるオノセリン合成酵素の可能性を考えた。酵母内発現系にて生成物を確認した (Fig. 3 赤)。結果 **1** が片側のみ環化した pre- $\alpha$ -onocerin (**3**) であった。**3** は **2** の中間体であると予想されたため、*L. clacatum* からはもう一端を環化する酵素があると予想した筆者らは、cDNA ライブラリーの中から、OSC ホモログを再検索したところ LCD が新たな候補として見出された。LCD は **1** を基質として認識しない (Fig. 3 緑) が、LCC と共発現させることによって **2** を生成した (Fig. 3 青)。よって LCC が初めての **1** 環化酵素であり、LCD が植物での初めてのオノセロイド合成酵素であることが判明した (Fig. 4)。細菌は 1 つの酵素でオノセロイドを生合成する一方、植物体では 2 つの酵素によってオノセロイドを合成することが明確に実証された。

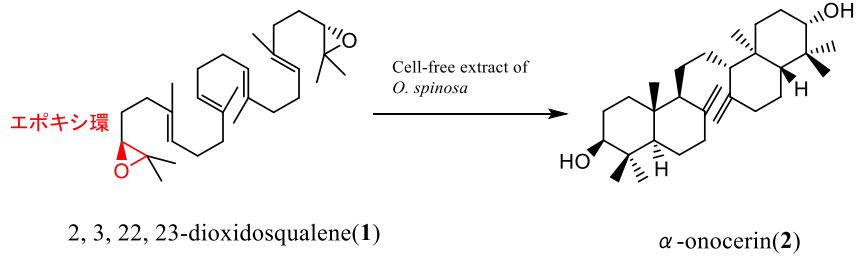


Fig. 2. Dioxidosquale の環化

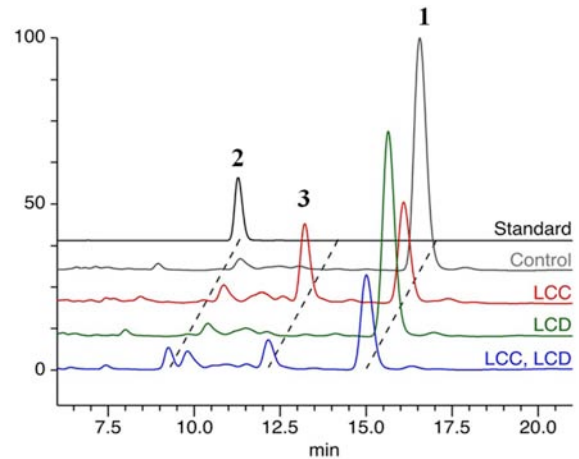


Fig. 3. 酵母内発現遺伝子と HPLC による生成物解析結果 (一部論文より抜粋)

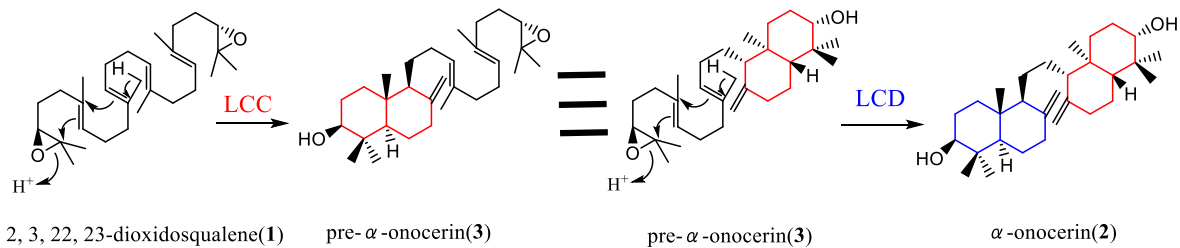


Fig. 4. 今回明らかにされた  $\alpha$ -onocerin 生合成機構

### Identification of Serratane Synthase Gene from the Fern *Lycopodium clavatum*

Y. Saga, T. Araki, H. Araya, K. Saito, M. Yamazaki, H. Suzuki, T. Kushiro, *Org. Lett.*, **19**, 496-499, 2017.

筆者らは上記の研究結果から同植物の OSC ファミリー酵素がオノセロイド生合成に関わると考え、さらなる遺伝子候補探索を行った。前回とは異なる OSC に特異的なモチーフをきっかけに LCE を候補とした。LCC との共発現系において、前回と異なる新たな生成物が確認された (Fig. 5)。それぞれ 5 環性セラタン骨格を持つ Tohogenol (**4**) と Serratane diol (**5**) であった。セラタン骨格オノセロイド合成酵素は初めての発見であった。以前 **5** の生合成は **2** から生合成されると予想されていた (Fig. 6B)。しかし、今回 LCE の機能解析により、**3** から 5 環性カチオン中間体を通じて水が付加することによって **4** が、15 位のプロトンが脱離する

ことによって **5** が生合成されることが明らかにされた (Fig. 6A)。これは、以前予言されていた生合成経路 (Fig. 6B)とは明らかに異なる。

以上、植物では 2 酵素によりオノセロイド合成が行われていると報告されていた。しかし、最近植物でも細菌と同様に 1 酵素でオノセロイドを合成する酵素も報告されている (A. Almeida, L. Dong, B. Khakimov, J. Bassard, T. Moses, F. Lota, A. Goossens, G. Appendino, S. Baka., *Plant Physiol.*, 176, 1469-1484, 2018.)。1 酵素オノセロイド生合成系と 2 酵素オノセロイド生合成系が、どのような違いによってすみ分けられているのか興味深い。

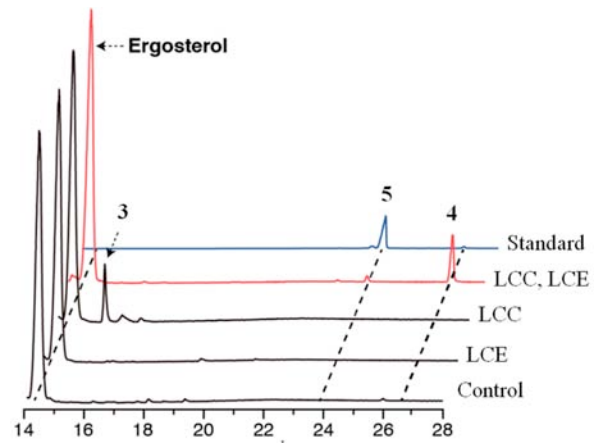


Fig. 5. 酵母内発現遺伝子と HPLC による生成物解析結果 (一部論文より抜粋)

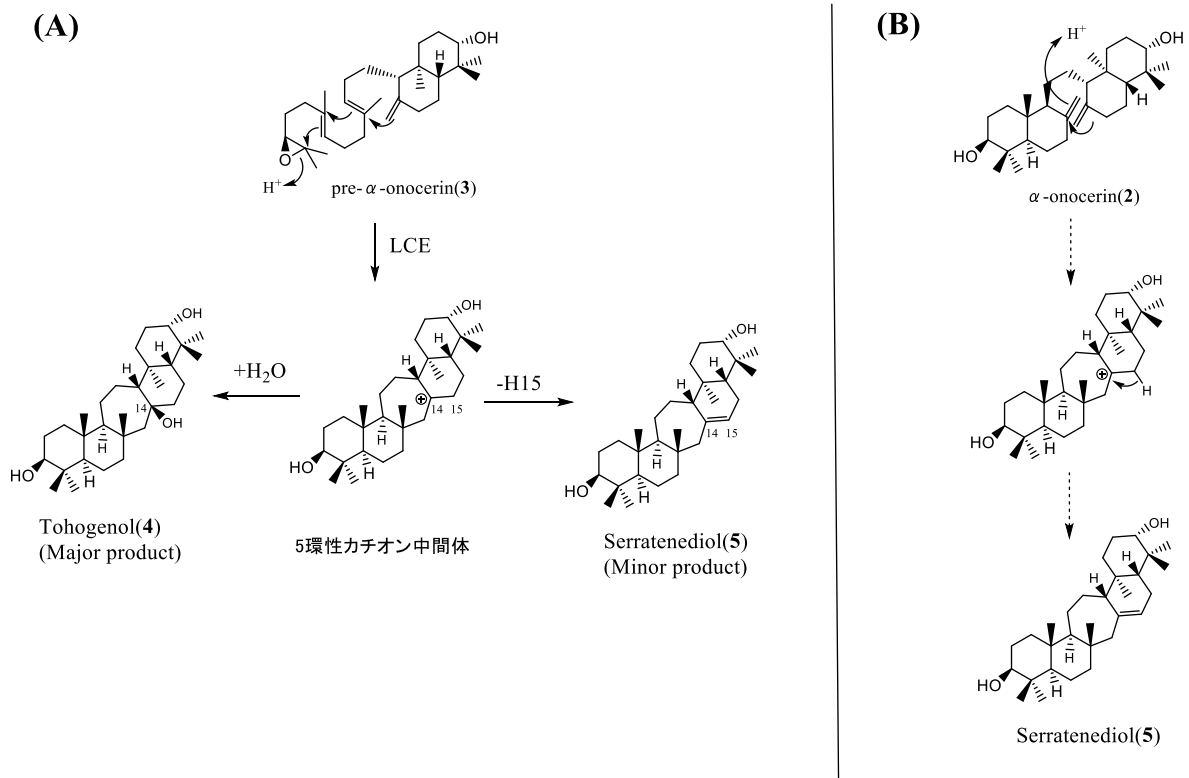


Fig. 6. セラタン骨格オノセロイド合成機構 (A:今回明らかにされた経路 B:以前予想されていた経路)

## 留学体験記

## アルバータ大学留学体験記

### ～リーディングプログラムを通じて～

九州大学大学院 工学府 三浦研究室  
長尾 匡憲  
(3te16026e@s.kyushu-u.ac.jp)



#### はじめに

私は現在、九州大学大学院に博士後期課程の3年生として所属しております。研究室の所属は工学府の化学システム工学専攻、三浦研究室です。化工部門ですが、自身の研究内容は「生体機能性高分子の合成およびその機能評価」であり応用化学的な側面が強いです。私は修士1年時より文部科学省が遂行する博士課程リーディングプログラムに参加しており、通常の研究室生活と並行して科学技術と社会の結びつきやビジネスマインドなどを学んできました。このプログラムでは博士人材が卒業後、アカデミック・企業を問わず社会に貢献できる人材に成長できるためのカリキュラムが用意されており、今回の留学体験もその一環でした。それぞれのリーディング学生は博士課程1年時に単身で最長9か月間の海外留学に行くことができ、皆様々な場所で研究者としてはもちろんのことそれ以外の経験も含めて人間的に成長できたと思っております。この体験記を読まれた方に少しでも留学に興味を持っていただければ幸いです。

#### 留学先の選定 (カナダ・アルバータ大学、Narain研究室、渡航期間：2016/06/01~2017/02/26)

上述の通り、私は博士課程リーディングプログラムの一環で留学させていただきました。その際の渡航先の選定は学生の指導教員に一任されており、比較的自由に行く先を決めることができました。指導教員である三浦佳子先生と相談した結果、先生のお知り合いであるProf. Narainのもとに行くことにしました。Prof. Narainはカナダのアルバータ大学にラボをもっており、研究も自身のものと近い糖鎖高分子関係のものでしたのでそこに決めました。9か月という限られた期間ではありましたが、せっかく日本で進めている研究を止めて留学に行くのであれば向こうでの成果を論文という形にしたいと思っており、そういった意味でもProf. Narainの研究は魅力的でした。またカナダは治安もよく、Prof. Narainは若くて優しい人だということで留学が初めての自分には安心できる部分も大きかったです。

#### 現地についてから最初の三か月間

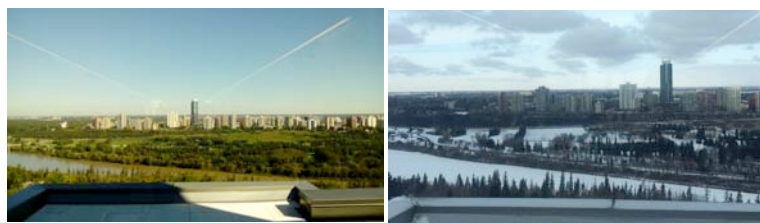
実は飛行機で飛び立つ前日までなかなか自分が留学に行く実感は沸いておらず、「本当に自分は明日からカナダに行くのだろうか」などと考えていました。飛行機が到着するエドモントン国際空港に、親切なProf. Narainが車でわざわざ迎えに来てくれていました。そこから大学の近くまで行く車のなかから広大に広がるカナダの風景を見たとき、自分がこれまでとは全く違う場所に立っていることを実感しました。どこまでも続く緑の景色を見ながら、「これから自分はどれだけ頑張れるだろう」と思ったことを覚えています。



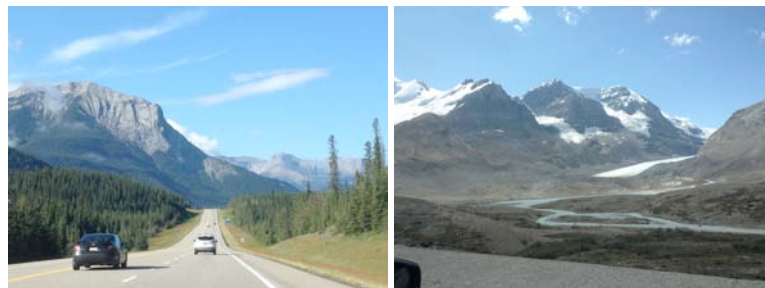
英語に関して留学以前は読むことは得意でしたが、話す・聞くということに関しては苦手でした。最初にラボに行きメンバーによろしくと挨拶した後、彼らの雑談にはあまりついて行けず焦ったことを覚えています。しかし今後実験のやりとりをはじめとしてラボのメンバーと関わっていくため、なるべく円滑なコミュニケーションができるようになるべきだと思いました。そこからは毎晩家で英会話の動画を見ながら日常で使えるフレーズを勉強する、また彼らが使っている表現を真似して使うようにする、といったことを心がけました。1か月くらいで話している内容がスムーズにわかるようになり、3か月経つ頃には自分の言いたいことが概ね伝えられるようになっていました。またカナダは移民の多い国であり、様々な国から学生が来ていました。Narain研のメンバーも多くが中国やタイ、コロンビアなどから来ており、Prof. Narainを含めネイティブではなかったため彼らの英語が聞き取りやすかったのも助かりました。

### カナダにおける生活について

滞在していたのはアルバータ州のなかのエドモントンという都市であり、バンクーバーに比べると自然がより多いイメージでした。夏は20℃程度で過ごしやすいですが、真冬は最高気温でも-20℃とイメージ通り寒い場所でした。真冬でもバス通学していましたが、凍えそうになりながらバスを待っていたのはよい思い出です。近くにはロッキー山脈の一部で有名なバンフ国立公園があり、夏にラボのメンバーと一緒に行きました。山々の間を車でドライブし間近で動物を見ることができました。冬には一人でエドモントンよりさらに北上し、イエローナイフという町で念願だったオーロラを見ることができました。



夏と冬のアルバータ



バンフ国立公園の風景 (右は氷河の一部)

普段街で会う人々もみな親切で、たどたどしい英語で話す自分に対しても優しく接してくれました。エドモントンは公共交通機関が発達しており、主にバスで移動していましたがバスから降りる際に多くの人が運転手に「Thank you」と言っていたのが印象的でした。またカナダで働いている人々はメリハリの効いた生活をしており、少しプライベートに比重を置いているように感じました。決められた勤務時間分の仕事をきっちりこなすという雰囲気、休日の余暇は家族みんなで楽しむという家庭が多く見受けられました。

### ラボでの研究生生活について

ラボについてすぐ、Prof. Narainから三つのプロジェクトを渡されました。一つ目は不凍タンパク質を模倣した糖鎖高分子の合成、二つ目はRNAデリバリーのための高分子合成、三つ目は細胞培養のための温度応答性物理ゲルの合成でした。Narain研の研究は高分子によるドラッグデリバリーをはじめとする生体応用材料の開発が中心で、高分子の合成という材料開発もきちんと行っているところが強みだと思います。自分はそのまで一度に複数のプロジェクトを同時に進めた経験がなかったため、最初は実験の予定を立てるのが大変でしたが、やっていくうちに慣れていきました。マルチタスクに慣れるための良い経験だったと思います。また途中で学部生の面倒を二回ほど任せられ、拙い英語で一生懸命自分の知っていることを教えてあげ

ました。科学の話に関しては論理の筋道を立てて話すよう工夫し、なんとか思っていることを伝えられました。

普段の研究の進め方は完全に学生に任されていて、特にコアタイムも設定されていませんでした。早い人は夕方4時ごろにはもう帰宅し、夜遅くまで残る人は大学のキャンパス内にもほとんどいませんでした。自分自身も朝は8時

過ぎから夜6時ごろまでという生活を規則正しく送っていましたが、9か月間という制限のある中でできれば論文を書いて帰りたいという気持ちがあったのでなるべく土日でも大学に行き実験していました。また大学全体として実験における安全への意識は日本よりも高いと感じ、そこは見習うべきだと思いました。

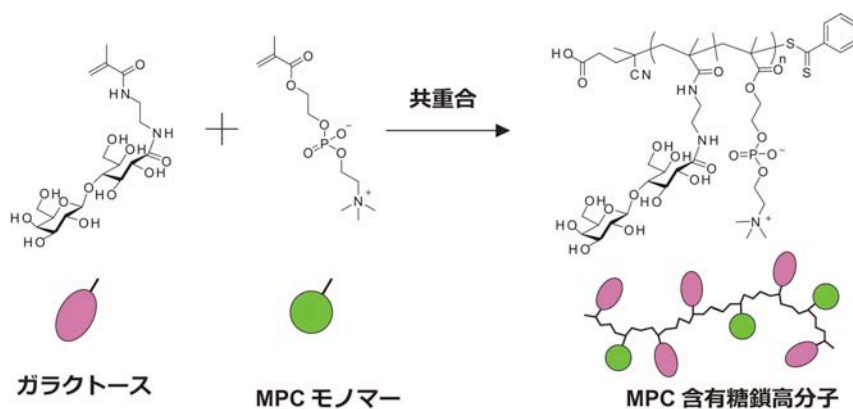
私自身の研究内容としては一貫して糖鎖高分子の合成を行っていました。メインはガラクトースを有するモノマーを用い、ものによっては両イオン性であるMPCモノマーを組み合わせて重合しました。正直なところ高分子の合成に関しては日本である程度学んでおり、現地の学生に実験のコツや細かいところを教える場面も多かったです。これまで使っていた試薬が無い、といったことをはじめとした様々な研究環境の違いを感じましたが、文献調査により手元の試薬でどこまで補えるかを考えできるだけ実験を遂行するよう工夫しました。この経験を通じ、工夫次第で環境や設備の違いを乗り越えて研究することができるのだと学びました。また上述のように高分子合成はすでに経験していましたが、反面その材料を使った細胞実験などは全くの素人でありバイオが得意な学生から教えてもらいました。

### 大変だった・辛かったところ

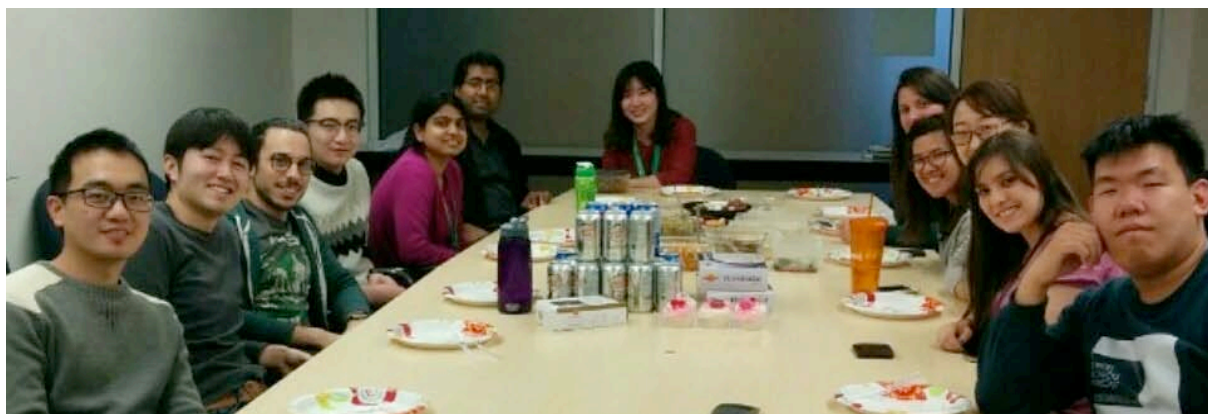
英語によるコミュニケーションに慣れていたとはいえ、微妙なニュアンスや研究に対する考え方を伝えるのはやはり難しかったです。また自分と同じ意見の人とディスカッションするのはできますが、異なる意見・考え方の人に対し自分の意見を述べその正当性を主張するのはまだまだハードルが高いように感じました。工夫しながら実験していましたが、なかなか狙い通りの結果を細胞実験で出すことはできず当初思っていた課題は解決できずじまいに終わったところも辛いところではありました。装置が急に故障し、しばらく使えなかったことなどもあり自分の力の無さに歯噛みすることも多く、モチベーションを保ち続けるのも大変でした。

### 良かったところ

毎日の生活の中でラボの仲間が自分をちゃんと受け入れてくれ、また頼りにしてくれていたことは精神的に大きな支えになりました。ラボの運営としてこういうルールはきちんと作った方がいい、という自分に提案に対してみんな賛同してくれたり、私が何か教えて欲しいときはきちんと教えてくれたりしました。またゼミが終わった後にみんなでよく晩御飯を食べに行ったのも楽しかったです。研究が進まないことに対してカリカリするのではなく、毎日できることをやっていくという前向きな気持ちにリセットできていました。



合成した糖鎖高分子作製のスキーム



ゼミが終了したあとそのままみんなで持ち寄った料理を食べたときの写真

### まとめ

この留学では様々なことを学びました。今までは周囲に日本人が多い環境で研究活動を行い、実験に関しても不自由を感じることはありませんでしたが、異なる環境に身を置くことでこれまで自分のいたところがいかに恵まれているかということを実感しました。お互いが同じ言葉話しその意図するところを100%伝え合えることが当たり前ではないことも学びました。日本から外に出ればこんなにも多くの人々がいて、彼らと話すには英語やそのほかの言語をきちんと使いこなす必要があると感じました。日本人同士で話し合っているだけではなく、もっと多くの人々に向けて議論をするべきだと思いました。

留学先で行った研究については当初の想定とは異なりましたが、他の学生の助けもあってなんとか論文を一報執筆することができました。9か月という短い時間でしたが、周囲の力を借りることである程度の成果を出すことができるという自信につながりました。私を受け入れてくれたProf. Narain、そしてラボのメンバーに感謝したいと思います。

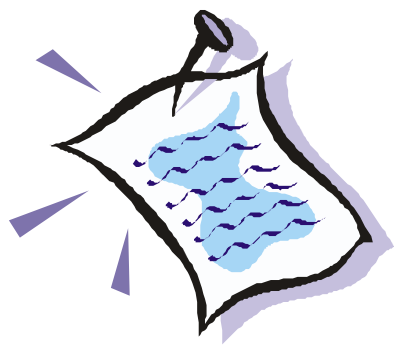


(左) 夏にラボメンバーの家で集まってバーベキューしたときの写真、(右) イエローナイフに行ってオーロラを見たときの写真。



### 謝辞

このような貴重な留学の機会を与えてくださった博士課程リーディングプログラムみなさまに厚く感謝申し上げます。また留学に理解を示してくださった指導教員である三浦先生、受け入れてくださったProf. Narain、現地のラボメンバーにもお礼申し上げます。最後に本稿執筆の機会を与えてくださった熊本大学の井原先生に改めて御礼申し上げます。



# シンポジウム等会告

## 第 45 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC 2018) 日本核酸化学会第 2 回年会

<http://web.apollon.nta.co.jp/isnac2018>

主 催：日本核酸化学会 (JSNAC)

共 催：日本化学会 ほか

協 賛：有機合成化学協会 ほか

日 時：11 月 7 日 (水) ～ 11 月 9 日 (金)

会 場：京都大学 時計台記念館 百周年記念ホール (京都市左京区吉田本町)

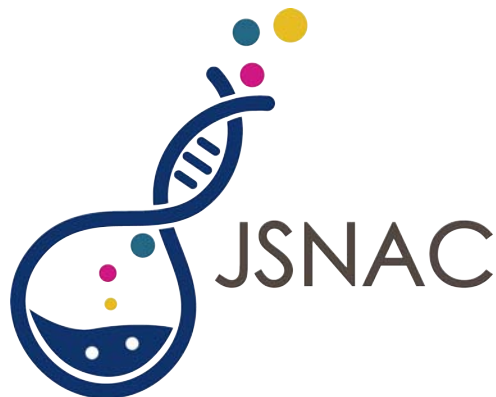
事前参加登録申込締切：10 月 8 日 (月)

参加費：事前登録：一般 30,000 円\*<sup>1</sup>，学生 10,000 円\*<sup>1</sup>，学生(推薦) 9,000 円\*<sup>2</sup>。当日登録：一般 35,000 円\*<sup>1</sup>，学生 15,000 円\*<sup>1</sup>，学生(推薦) 14,000 円\*<sup>2</sup>。

[\*<sup>1</sup> 日本核酸化学会年会費 (正会員 5,000 円, 学生会員 1,000 円) 含む。\*<sup>2</sup> 指導教員 (入会予定) の推薦を受けた学生の年会費は無料。]

申込方法：年会 HP (URL: <http://web.apollon.nta.co.jp/isnac2018>) よりお申し込み下さい。

問合先：ISNAC 2018/日本核酸化学会第 2 回年会事務局 京都大学大学院理学研究科杉山弘研究室 (Tel: 075-753-4002, E-mail: [isnac@chemb.kuchem.kyoto-u.ac.jp](mailto:isnac@chemb.kuchem.kyoto-u.ac.jp))





日本核酸医薬学会  
生物セッション第3回サテライトシンポジウム  
—免疫系と核酸医薬—毒性と免疫賦活化—

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/research/facilities/med-pharm-collaboration-bldg/fujita-memorial-hall/>

日 時: 11月10日(土)12:55-16:15

場 所: 京都大学医薬総合研究棟の藤多記念ホール

主 催: 日本核酸医薬学会

共 催: 日本核酸化学会

コーディネーター:

京都大学医学研究科医化学分野 竹内 理 教授

日本核酸医薬学会生物セッション幹事 藤井政幸

実行委員: 日本核酸医薬学会生物セッション幹事

参加費: 無料

申込先: 近畿大学産業理工学部 藤井 政幸 mfujii@fuk.kindai.ac.jp

(当日参加も歓迎しますが、人数把握のためにできるだけ事前に申し込みをお願いします。)

演 者:

東京大学医科学研究所感染遺伝学分野 三宅 健介 教授

「核酸に対する自然免疫応答を制御する分子基盤」

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所大阪大学免疫学フロンティア研究センター石井 健 教授

「核酸アジュバントの免疫療法への応用と安全性研究」

北海道大学大学院医学研究院ワクチン免疫学分野 瀬谷 司 教授

「サイトカイン毒性を抑えた TLR3 アジュバントのデザイン」

京都大学医学研究科医化学分野 竹内 理 教授

「mRNA 分解による免疫調節とその制御」

扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター 山本 誠司 博士

「アンチセンス医薬の自然免疫活性化の評価に関する研究」

国立医薬品食品衛生研究所 井上 貴雄 博士

「Gapmer 型アンチセンスの肝毒性低減に関する研究」

## KUMP International Symposium

<http://wps.itc.kansai-u.ac.jp/kumpis/>

関西大学では、私立大学研究ブランディング事業『人に届く』関大メディカルポリマーによる未来医療の創出プロジェクトの国際シンポジウムを下記の通り開催いたします。一般発表は受け付けておりませんが、プロジェクトメンバー研究発表に加え国内外から著名な先生方をお呼びして、招待講演していただきますので、ご参加いただければ幸いです。

日 時 : 2019 年 1 月 24-25 日

場 所 : 関西大学 100 周年記念会館

参加費 : 無料 (要事前登録)

Website : <http://wps.itc.kansai-u.ac.jp/kumpis/>

問合先 :

関西大学 KU-SMART PROJECT 事務局 (先端科学技術推進機構内)

〒564-8680 大阪府吹田市山手町3-3-35

TEL: 06-63 68-1178

E-mail : [kump-intsymp@cm.kansai-u.ac.jp](mailto:kump-intsymp@cm.kansai-u.ac.jp)

Project Site : [WWW.kansai-u.ac.jp/ku-smart/](http://WWW.kansai-u.ac.jp/ku-smart/)



## 受賞

稲葉 央(鳥取大学 助教)

バイオ・高分子シンポジウム 若手研究者奨励講演賞

「微小管内部に結合するTau由来ペプチドの創製と分子内包への応用」

(2018年7月)

杉本直己(甲南大学 教授)

The Imbach-Townsend Award for Outstanding and Fundamental Accomplishments in  
Nucleoside Chemistry

(2018年8月)

大矢裕一(関西大学 教授)

2018年度 高分子学会三菱ケミカル賞

「温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーの開発」

(2018年9月)

## 異動

山吉麻子

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系) 教授

2018年3月付

E-mail: asakoy@nagasaki-u.ac.jp





## 編集後記

たいへんな夏でした。地震、台風、集中豪雨に見舞われた、北海道、関西、中四国、および北部九州の皆様には心よりお見舞いを申し上げます。文字通りの国土の形（道路、造成地など）、日本人の生活スタイルが地球規模の気候変動に対応した"かたち"になるまでは頻繁に同様の被害に苦しむことになるのかもしれませんが。アカデミックにおける教育・研究への圧力も非常に厳しいものになっています。「変化するものだけが生き残る」。よく知られたダーウィンの名言のように、辛い時期を変化しながら軽やかに乗り越えなければ... と思います。

今回も、充実した内容満載の夏号 (No. 57) をお届けすることができます。お忙しい中、素晴らしい内容の論文を執筆下さった皆さんには心からお礼を申し上げます。次号 (No. 58) は、松浦さんの担当により、2019年4月頃の発行を予定しております。ニュースレター改善のため、皆さんからのご要望、ご意見等をお待ちしております。下記編集担当までご連絡をいただければ幸いです。

平成 30年 10月 10日

井原 敏博  
熊本大学大学院 先端科学研究部  
(toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp)

編集担当

大神田 淳子(信州大学)  
松浦 和則(鳥取大学)