

学 校 名	杏 林 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	X線1分子計測法による微小管の極微分子運動現象の 解明 －脳内の微小管の分子運動はなぜ小さいのか？－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①微小管 ②Tubulin ③X線1分子計測 ④電子線1分子計測			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 山 高 宏	医 学 部	助 教	研究総括および微小管Tubulin精製・組換え体作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 川 直 樹	日 本 大 学 文 理 学 部	非 常 勤 講 師	電子線1分子計測(DET)の実施
佐 々 木 裕 次	東 京 大 学 大 学 院 新 領 域 創 成 科 学	教 授	X線1分子計測(DXT)の実施

# X線1分子計測法による微小管の極微分子運動現象の解明 — 脳の微小管の分子運動はなぜ小さいのか? —

## 1. 研究の目的

### (1) 研究の背景

全身性のあらゆる細胞においてその形態維持に必要とされる微小管は、恒常性維持や神経伝達物質の軸索輸送に不可欠な小胞膜輸送機能にも関与していることが知られている。我々はこの小胞膜輸送に対して微小管の重合・脱重合に代表される分子動態の変化が作用し、形質膜表面への小胞輸送に影響を及ぼす現象を明らかにしてきた(Nakayama, *J Cell Sci* 2012)。更に我々はこの微小管の分子動態変化に伴って分子運動自体にも変化が起きることにより輸送小胞との物理的親和性が輸送効率に影響している可能性に着目し、ラット脳より精製した微小管と、水溶タンパク試料にて1ピコメートルの分子運動変化を検出可能な新技術であるX線1分子計測法(DXT)(Sekiguchi, Sasaki *PLoS One* 2013)を用いて、分子運動度の計測を試みた。その結果、脳由来の微小管において、これまで確認されたことのない極微な分子運動が存在する現象を見出してきた。またこの現象が他の臓器由来の微小管においても見られるか検証したところ、脳由来の微小管の方が肝臓由来のものに比べて、その分子運動度が小さくなる現象を見出してきた。興味深いことに同様の現象は、MAPs, Kinesin等の微小管結合タンパクを除いた高純度の微小管でも確認された(Nakayama, Unpublished data)ことから、分子運動度の差は微小管自体の分子運動に起因することが示唆された。この修飾因子を除いた場合、一般的にタンパク質分子の運動に影響を及ぼす因子として分子内極性が大きな比重を占めていると考えられるが、本現象の詳細については更なる解析が必要とされている。

近年、組織特異性を示すTubulin (TUB) isoformが多数同定されてきた。それらの中には、ユビキタス発現型のTUBB5以外にも、TUBB3のような脳に高発現を示し小胞膜輸送に基づくAxonガイダンスに関与したisoformが同定されてきているが、これらisoform間での特にC末端領域においてアミノ酸配列相同性に相違が見られることが知られている(Leandro-Garcia, *Cytoskeleton*, 2010)。またTUBは様々な翻訳後修飾を受けるが、その中でも二量体分子の極性に大きな影響を及ぼすC末端は、リン酸化、パルミトイル化、 $\Delta 2$ 化、脱チロシン化、ポリグリシン化、ポリグルタミン酸化に代表される分子修飾を受けることが知られている。この中で特に大きな荷電変化をもたらすポリグルタミン酸化は、興味深いことに、ほとんどの神経の微小管で特異的に修飾を受けていることが明らかになっている(Janke, *Trends Neurosci* 2010)。これらの知見は、脳と肝臓由来の微小管の間で極微な分子運動度に差が見られた現象が、その構成因子であるTUB二量体のisoformの構造および翻訳後修飾による分子特性の差に起因している可能性を示唆しているものと考えられる

### (2) 研究の目的

従って本研究は、TUBB3, 5に代表される脳と肝臓で高発現を示す内在性TUB二量体の詳細な分子運動度の測定を行う。更に組換えタンパク質を用いた再構成実験によって、微小管の極微な分子運動がTUB配列依存的に決定されるのか、分子修飾依存的に決定されるかの可否を明らかにすることを通して、微小管の分子運動度に差が生まれる因子を同定することを目的とする。

## 2. 研究の計画

### (1) 内在性Tubulin (TUB) 二量体の精製 (中山)

脳由来の微小管で高発現を示すTUBB3, 4Aと脳以外の組織由来の微小管で高発現を示すTUBB5, 2Cについて分子運動度計測のための内在性TUB精製を行う(Nakayama, *J Cell Sci* 2012)。具体的には、内在性TUB二量体を精製するために、ラット脳および肝臓組織より抽出を行う。具体的にはラット脳および肝臓組織にReassembly buffer (RB)を加え破碎を行い、超遠心によりTUB-rich上清を得て微小管重合および脱重合反応を行いTUB分画を得る。このTUB分画をPhosphocelluloseカラムに通し、MAPs, Kinesinモーター等のTUB結合タン

パク質の除去を行った高純度 TUB 分画を得る。上記 TUB isoform について Protein-G 架橋した抗 TUB 抗体カラムを作製し、高純度 TUB 分画との結合反応、酸溶出、中和、自然重合阻止のための処理を行い、最終的に技法の異なる極微 1 分子計測 (X 線、電子線) の為の組織特異的内在性 TUB 二量体の精製試料を得る。

### (2) 内在性 TUB 二量体の X 線 1 分子計測 (DXT) による分子運動解析 (佐々木) (小川)

(1) にて得られた精製 TUB 二量体サンプルをもとに、水溶試料にてピコメートルオーダーの極微小な分子変化を検出可能な X 線 1 分子計測法 (DXT) と電子線 1 分子計測法 (DET) を用いて分子運動度の評価を行う (Yamamoto, Ogawa, Sasaki *FEBS Open Bio* 2016)。特徴として、DXT は早い時分解能 ( $10 \mu \text{sec}$ ) を持つ X 線照射によって大量の回折点が得られデータ取得が容易である一方で、DXT は微量サンプル (50n1) でより正確な 3 次元分子運動測定が可能である。具体的には、 $1-10 \mu \text{g}$  の精製タンパクと金ナノ結晶との間で、チオール基の配位結合を介した架橋標識を行う。次に水溶試料の計測を可能にする DXT セル内にセットするため、金ナノ結晶架橋タンパク試料を金支持基板上に固定し、 $100 \mu \text{l}$  の緩衝溶液中において、SPRING8-BL40XU による DXT 計測を行う。この DXT 計測により、早い時間成分における TUB 二量体の分子運動が定量的に同定可能になる。また電子線 1 分子計測法 (DET) (Ogawa, *Sci Rep* 2013) は DXT 計測法と同じく水溶試料にて極微分子変化を検出可能である。特徴としては微量サンプル (50n1) でより正確な 3 次元分子運動測定が可能一方で、取得データ数と時分解能は悪い (1msec)。具体的には、(1) にて得られた精製 TUB 二量体サンプルと金コロイド粒子との間で、チオール基の配位結合を介した架橋標識を行った後、厚さ 20nm、耐圧 1.3 気圧の真空蒸着カーボン隔膜と対峙した支持膜上に固定し、DET セル内にて 50n1 の緩衝溶液中において計測を行う。この DET 計測により、遅い時間成分における TUB 二量体の分子運動が 3 次元詳細情報として定性的に同定可能になる。技法の異なる一連の DXT、DET 計測を通して、より確度の高い分子運動が計測可能になると共に、組織特異性をもつ TUB 二量体の分子運動度の値から微小管と TUB 二量体の分子運動の相関関係を示せることが期待される。

### (3) 組換え TUB 二量体の極微 1 分子計測 (DXT、DET) による分子運動解析 (中山) (佐々木) (小川)

TUB 二量体は、isoform により極性アミノ酸の位置と数が異なっている。そこで組換え TUB 二量体を用いた DXT、DET 計測を行うと共に、分子動力学法 (MD) による予測計算 (Yoshidome, Ikeguchi, *Phys Rev E* 2015) を行う。具体的には、(2) で得られた分子運動情報の比較から配列特異性を抽出し、翻訳後修飾の少ない大腸菌発現系で野生型とアミノ酸置換を施した組換えタンパク質の作製 (Nakayama, *FEBS Lett* 2003) を行い、再構成 TUB 二量体と  $37^\circ\text{C}$ 、GTP 存在下で重合させた微小管系における DXT、DET 計測によって配列依存性の検証を行うと共に、スーパーコンピューターを用いた原子間力計算に基づく MD により isoform 間、アミノ酸置換に伴う理論的な動態変化予測を行う。MD 計算に際しては、モデリング構造と実験値を比較した溶液構造モデルを導出すると共に、必要に応じて粗視化 MD、全原子 MD による動態変化予測を行う。微小管の DXT、DET 計測に際しては静電的吸着法により行い、二量体の計測では詳細な運動方向を計測するため、TUB 二量体が支持膜上に垂直に固定されるようヒスチジン法を採用し、セル内の  $\text{Ni}^{2+}$  支持基板を介して TUBA のヒスチジン (6 x His) タグを固定し計測を行う。

## 3. 研究の成果

内在性 TUB 二量体を精製するために、ラット脳及び肝臓組織より TUB-rich 上清を得て、微小管重合及び脱重合反応を行い TUB 分画を得た。この TUB 分画を Phosphocellulose カラムに通し、TUB 結合タンパク質の除去を行った高純度 TUB 分画を得た。脳由来の微小管で高発現を示す TUBB3, 4A と脳以外の組織由来の微小管で高発現を示す TUBB2C, 5 isoform の各抗体を ProteinG に架橋した TUB 抗体カラムを作製し、高純度 TUB 分画を用いて、最終的に技法の異なる極微 1 分子計測 (X 線、電子線) の為の組織特異的内在性 TUB 二量体の精製試料を得ることに成功した。これにより得られた精製 TUB 二量体サンプルをもとに、水溶試料にてピコメートルオーダーの極微小な分子変化を検出可能な X 線 1 分子計測法 (DXT) と電子線 1 分子計測法 (DET) を用いて分子運動

度の評価を行った結果、脳由来 TUB 二量体の方が肝臓由来のものと比較して  $\chi$  軸方向の分子運動度が低くなる傾向を示し、微小管運動の結果と相関傾向にあることが示された。そこで次にこの現象が TUB アミノ酸配列に起因しているか否かの検証を試みた。具体的には、上記脳由来 TUBB と肝臓由来 TUBB について翻訳後修飾の少ない大腸菌発現系で His タグ組換え TUB 二量体を作製し、再構成 TUB 二量体が支持膜上に垂直に固定されるよう、観測セル内の  $\text{Ni}^{2+}$  支持基板を介して二量体中の TUBA のヒスチジンタグを固定し、詳細な運動方向の計測を行った。その結果、脳由来 TUBB 二量体の方がそれ以外の TUB 二量体と比べて垂直軸方向の分子運動が低下していたことから、脳由来 TUBB 中に配列特異性がある可能性が示唆された。そこで各々の二量体について、アミノ酸配列の相違が見られる C 末端アミノ酸残基を置換したキメラ変異クローンを作製し、三次元分子運動測定が可能な DET 法により詳細な分子運動の計測を行った。その結果、脳由来 TUBB 変異体では、野生型で低下していた垂直軸方向の分子運動が上昇すると共に、肝臓由来 TUBB 変異体では逆に低下する現象が得られてきた。

#### 4. 研究の反省・考察

内在性 Tubulin 二量体の分子運動度解析より、脳由来 TUB 二量体と肝臓由来 TUB 二量体との間で比較をして、 $\chi$  軸方向の分子運動度が低くなる明確な傾向が得られてきた。また組換え Tubulin 二量体の分子運動度解析により、脳由来 TUBB の C 末端アミノ酸配列中に TUB 二量体の分子運動の差を規定する因子が存在することを明らかにしたことは大きな発見であった。これらの結果は、脳と肝臓由来の微小管で見られた分子運動度の違いが、それを構成する Tubulin 二量体の C 末端アミノ酸配列の差に起因していることを示唆しているものと考えられる。今後の解析により、このアミノ酸配列以外にも大きな分子荷電変化をもたらすことが予想される翻訳後修飾の関与も明らかにする必要があると考えている。またこれらの現象は、当初予定していたものマシントイムの事情により遅延が認められる MD 解析によっても再現されることが予想され、その為にも 100m 秒オーダーの全原子 MD データの取得が急務であると考えている。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ①Ogawa N, Mizokawa R, Saito M, Ishikawa A. “A simple method for environmental cell depressurization for use with an electron microscope.” *Microscopy (Oxf)*. 2017 66(6):424-430. doi: 10.1093/jmicro/dfx029.
- ②Matsushita Y, Sekiguchi H, Wong CJ, Nishijima M, Ikezaki K, Hamada D, Goto Y, Sasaki YC. “Nanoscale Dynamics of Protein Assembly Networks in Supersaturated Solutions.” *Sci Rep*. 2017 7(1):13883. doi: 10.1038/s41598-017-14022-7.

##### (2) 口頭発表

Nakayama T, Fukutomi T, Fujiwara T, Terao Y, Akagawa K. “P300/CBP is a neuron-specific positive regulator of the syntaxin 1A gene expression: participation to unusual behavioral profile.” *ConBio 2017*, kobe.

##### (3) 出版物

なし

学 校 名	中 央 大 学	研究所名等	理工学研究所
研 究 課 題	光駆動型エネルギーキャリアシステムの構築		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①メタノール ②光脱水素 ③金属錯体 ④光触媒		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
張 浩 徹	理 工 学 部	教 授	研究代表者 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
芳 賀 正 明	理 工 学 部	教 授	光誘起電子・プロトン移動の設計
片 山 建 二	理 工 学 部	教 授	無輻射過程等の光誘起ダイナミクスの解析
松 本 剛	理 工 学 部	助 教	光応答性有機配位子及び錯体の合成
孫 雲 龍	理 工 学 部	助 教	水素種の励起状態ダイナミクスの測定と解析

# 光駆動型エネルギーキャリアシステムの構築

## 1. 研究の目的

申請者らは、H25年に安価な *o*-フェニレンジアミン(opda)を含む Fe(II)錯体が「室温で光により有機骨格から水素を触媒的に発生」することを見出した (*J. Am. Chem. Soc.*表紙)。更に EC としての利用が熱望されている MeOH の脱水素化にこの材料設計概念を応用し、opda の NH<sub>2</sub> の一つを O に置換したアミノフェノール(apH)及びその Fe(II)錯体が、「室温で MeOH の触媒的光脱水素化を世界最高の量子収率(2.9-4.8%)で駆動」することを見出した(*Nature Commun.*)。これらの反応は、安価な有機骨格と非貴金属の相乗効果により発現する光反応であることから、これまでに無い EC 操作技術として高い注目を集めている。そこで本研究では、申請者らが見出したアミノフェレート 3d 金属錯体 (非貴金属触媒) が示す有機骨格上での光誘起電子・プロトン移動の高次設計と反応ダイナミクスの解明による、高活性光駆動型キャリアシステムの構築を目指す。本研究では、錯体及び有機化学を専門とする張・松本に加え、電子・プロトン移動の精密制御を専門とする芳賀及び、励起状態ダイナミクスを専門とする片山・孫からなる研究グループを新たに立ち上げ、室温下での「光」エネルギーの入力により、効果的に水素を利用できる材料を得るための基礎学理を構築することを目的とした。

## 2. 研究の計画

本研究を遂行すべく、H29年度には主に課題1：光触媒の基本設計-活性種の光誘起発生-について検討する。申請者らが見出した apH 等のプロトン・電子プーリング配位子と Fe(II)等の非貴金属の協奏による光水素発生反応は、有機骨格の光励起を引き金として生じる。具体的には、 $\pi\text{-}\pi^*$  状態への励起に続く N-H( $\pi\text{-}\sigma^*$ )状態への円錐交差により N-H 結合が均等解裂し、「水素ラジカル(H•)」を発生することが実証されている(*Nature Commun.*, 2016)。ここで、EC を活性化する触媒部位は、①プロトン・電子プーリング配位子と、②非貴金属から構成される。従って、これらの組み合わせにより、望む EC の触媒的光活性化を達成しうる。以下その具体的設計を記す。

- (1) **プロトン・電子プーリング配位子の設計**：配位子は、光吸収部位である  $\pi$  電子系と、金属への配位部位 (O, S, NH<sub>x</sub>, PH<sub>x</sub> ( $x = 1, 2$ )) からなる。X = O, S, NH<sub>x</sub> と、Y = N, P を組み併せることで、異なる反応活性種を発生しうる。本研究では、各種金属及びこれらの配位子を組み合わせにより光による活性種の発生を実現する。中でも、EC 種との反応性が期待される水素ラジカルとヒドリド種を効率的に発生する配位子開発を次に記す②金属種の選定と組み合わせにより遂行し、他に類を見ない独自の活性種ライブラリを活用した触媒設計を進める。
- (2) **非貴金属の設計**：金属は、活性電子/水素種を発生する配位子と結合することで配位子の分解を抑制し、触媒サイクルを担保する役割を担う。本研究では、高活性 EC 活性化触媒を創成するための金属種の役割である、1) 活性光励起状態の形成、2) 電子・プロトン移動の促進、3) 基質活性化能を重要視し、非貴金属種に限定した触媒開発を展開する。1) については金属が絡む MLCT, LMCT (可視光励起) 状態からの活性種の放出を、2) においては配位子からのスムーズな活性種の放出を、3) に関しては金属中心における EC 分子のトラップと活性化を指向し、高活性触媒を構成する化学因子を最適化する。

## 3. 研究の成果

光化学的に水素ラジカルを生成し MeOH からの脱水素を触媒的に駆動する反応場において、発生した水素ラジカル種と 2-iminosemiquinonato を有する中間体間の N-H 結合再形成や配位子部位の解離に伴う触媒の不活化といった副反応を抑制し、効率的にメタノールと反応させるための中心金属および配位子の設計が重要であると考えられる。そこでまず以下の検討を行い有用な知見を得た。

### (1) MeOH の触媒的光化学的脱水素反応に対する金属効果の解明

貴金属触媒を使用した高温反応により進行する既報の熱的メタノール脱水素反応に比べ、本系の TON<sub>H<sub>2</sub></sub> は低く、さらなる改善が必須である。特に、光反応過程において推定される輻射及び無輻射失活を抑制し、効果的に  $\pi\pi^*$  および  $\pi\sigma^*$  状態へ光励起させた後、発生すると予想される水素ラジカルとメタノールを効率的に反応させる反応条件を見出すこ

とが、触媒活性向上への鍵となると考えられる。そこで本研究では、 $d^6$  電子配置を有する既報の Fe(II) に対し、 $d^5$  及び  $d^7$  配置を持つ Mn(II) と Co(II) に加え、 $d^0$  及び  $d^{10}$  配置を有する Mg(II) および Zn(II) を用いた系統的研究により、最適な金属イオンを選定し、 $d$  電子数の違いに依存した反応性の差異を確認した。

各種金属塩と apH の混合により得られる MapH (M = Fe, Mn, Co, Mg, Zn) の MeOH- $d_4$  中での  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを測定したところ、MapH (M = Mn, Co) はブロードなシグナルを与え、常磁性錯体種の形成が示唆する一方、MapH (M = Mg, Zn) は apH $_2$  類似のシグナルパターンを与えたものの、いずれも apH $_2$  よりわずかに低磁場側にシグナルを与えた。このことから、全ての金属種が apH と錯形成し、類似の触媒活性を示しうる構造を有することが確認できた。実際、Co については、同形の単結晶構造解析に成功し、上述の仮定を支持する結果を得た。

apH $_2$  (2.0 mM) および MapH (M = Fe, Mn, Co, Mg, Zn) (1.0 mM) の MeOH 溶液に、紫外光 ( $\lambda = 289 \pm 10$  nm) 照射を行なったところ、apH $_2$  の MeOH 溶液への 6 時間の光照射により 0.8 当量の水素発生が確認された。一方、MapH (M = Fe, Mn, Mg, Zn) においてはそれぞれ、1.1, 1.5, 0.7, 1.5, 1.0 当量の水素の発生が確認でき Co を除く金属イオンの利用による水素発生量の増加が確認でき、 $d^6$  以下の  $d$  電子を持つ錯体により水素発生反応が促進されることが確認された。

## (2) MeOH の触媒的光化学的脱水素反応に対する置換基効果の解明

中心金属を Fe(II) から Mn(II) へ変更し、前述の FeapH と同様の反応条件において光反応を検討した結果、MnapH では 8.9 当量 (5 h) の水素が発生することが明らかになった。さらに Mn(II) 錯体に関して、*t*-Bu 基をアミノフェノラートの 4 位並びに 4,6 位にそれぞれ導入した錯体 (MnBuapH および MnBu $_2$ apH) の光水素発生量は、MnBuapH では 9.2 当量 (5 h)、MnBu $_2$ apH では 9.4 当量 (5 h) となり、いずれの場合も無置換の MnapH の場合と比べ水素発生量は向上した。これらの反応においては、触媒の構造や性質に関する詳細は明らかではないものの、配位子に導入する置換基が反応活性に有意な影響を及ぼし得ることを明らかにした。

## (3) 光脱水素反応を阻害する抑制反応の解明

本光触媒活性を向上させるためには、それを抑制する因子の制御が重要である。apH $_2$  の MeOH 溶液に対し光照射したところ、新たな吸収帯を 406 nm に示した。その生成物の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルにはオルト二置換ベンゼン骨格の形成を示唆する二組の二重線および三重線を与え、MS 測定により 2,3-ジヒドロベンザオキサドールの形成が示唆された。2,3-ジヒドロベンザオキサドールは、apH 及び HCHO の暗条件下における反応によっても生成が確認されたことから、光照射後の 2,3-ジヒドロベンザオキサドールの形成は、遊離した apH と MeOH の光脱水素化により生成する HCHO 間の暗反応により生成したと推察された。一方、MapH (M = Fe, Mn, Co, Mg, Zn) は光照射後にそれぞれ薄黄色、橙色、茶色、薄茶色、黄色、黄色を呈する生成物を与え、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいても apH $_2$  とは異なるオルト二置換骨格の存在を示唆する二組の二重線および三重線シグナルを与えた。注目すべき事に、MapH (M = Mg および Zn) の場合は apH $_2$  の場合と同様の光照射後生成物に由来するシグナルと共に、光照射前に確認された錯体種由来のシグナルが確認された。これらの結果は、錯形成により光照射後生成物の生成が抑制され、初期状態の錯体種が残存していることを示唆する。以上の結果は、金属イオンの共存により apH が固定化され、光生成した HCHO との反応を抑制した結果、光反応活性が向上したことが強く示唆された。

以上の結果は、Fe 系において初めて見出された世界最高の量子収率で MeOH からの室温光脱水素反応を向上しうる化学因子が存在することを示す結果であると共に、金属により活性部位である apH 骨格の補足が極めて重要な鍵を握る事を解明した有用な知見であると考えられる。

## 4. 研究の反省・考察

H29 年度は過去に報告されている apH $_2$  および FeapH による光水素発生反応とその反応機構をもとに、光反応に対する金属効果の検証に加え、副反応に及ぼす金属効果を検証し、本光触媒の活性向上を検討した。今後はより脱水素活性効率を向上させるため条件の最適化を図るべく、①強配位子場の形成・置換不活性金属の利用及び②無機担体への固定化に焦点を当て研究

を展開する。①に関しては配位子の解離を抑制すべく、これまでに用いた  $d^0$ ,  $hs-d^5$ ,  $hs-d^6$ ,  $hs-d^7$  および  $d^{10}$  という置換活性電子配置に対し、 $d^3$  や  $ls-d^6$  置換不活性系を構築すべく、CN 基や  $NR_3$ ,  $PR_3$  軸配位子の導入を検討する。②については、シリカ等の担体表面への固定化により液相において生じる配位子交換や無輻射失活を抑制し、触媒相とその励起状態の安定化を図る。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌

- ① Masanori Wakizaka, Takeshi Matsumoto, Atsushi Kobayashi, Masako Kato, Ho-Chol Chang, A coordination network with ligand-centered redox activity based on *facial*-[Cr<sup>III</sup>(2-mercaptophenolato)<sub>3</sub>]<sup>3-</sup> metalloligands, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 9919-9925.
- ② Takahiro Ito, Takeshi Matsumoto, Masanori Wakizaka, Ho-Chol Chang, Coordination behavior of *N,N'*-bis(diisopropylphosphinoacetyl)-*o*-phenylenediamide with Ni<sup>II</sup> and Cu<sup>I</sup> ions, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 3498-3507.
- ③ 張 浩徹, 松本 剛、非貴金属-電子・プロトンプーリング有機骨格の協奏による光水素発生システムの構築、*JXTG Technical Review* **2017**, *60*, 12-18.
- ④ 張 浩徹, 松本 剛、レドックス活性配位子によるメタノールの光脱水素化、*化学と工業 (Division Topics, 錯体化学・有機金属化学)* **2017**, *70*, 1105.

### (2) 口頭発表

- ① 秋澤 秀明, 山本 莉紗, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン錯体の光水素発生反応とその制御因子、日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月 20-23 日
- ② 西澤 忠晃, 秋澤 秀明, 王 龍坤, 張 嶺碩, 松本 剛, 張 浩徹、レドックス活性三座配位子を有する Fe(II) 錯体の合成と多電子・多プロトン移動反応、日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月 20-23 日
- ③ 小池 拓司, 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、Photochemical hydrogen radical generation of *o*-phenylenediamine iron(II) complexes、日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月 20-23 日
- ④ 小池 翔太, 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、2-アミノフェノール及びその金属錯体が示すメタノールの光脱水素化、日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月 20-23 日
- ⑤ 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン Fe(II) 錯体が示す CO<sub>2</sub> の光固定化錯体化学会第 67 回討論会, 2017 年 9 月 16-18 日
- ⑥ 小池 拓司, 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン鉄(II) 錯体が示す光水素ラジカル発生反応、錯体化学会第 67 回討論会, 2017 年 9 月 16-18 日
- ⑦ 秋澤 秀明, 山本 莉紗, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-ベンゾキノジイミン錯体の水素化法の開発錯体化学会第 67 回討論会, 2017 年 9 月 16-18 日
- ⑧ 小池 拓司, 内城 大貴, 松本 剛, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン鉄(II) 錯体が示す光化学的水素ラジカル発生反応、第 29 回配位化合物の光化学討論会, 2017 年 8 月 5-7 日
- ⑨ 松本 剛, 内城 大貴, 張 浩徹、*o*-フェニレンジアミン鉄(II) 錯体が CO<sub>2</sub> 下において示す光化学的カルボキシル化反応、第 29 回配位化合物の光化学討論会, 2017 年 8 月 5-7 日
- ⑩ Takuji Koike, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang、Photochemical hydrogen evolution reaction of *o*-phenylenediamine iron(II) complexes、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日
- ⑪ Daiki Uchijyo, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang、Photochemical reaction of [Fe<sup>II</sup>(opda)]<sup>2+</sup> under CO<sub>2</sub> atmosphere、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日
- ⑫ Hideaki Akisawa, Risa Yamamoto, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang、Syntheses of *o*-phenylenediamine/*o*-benzoquinodiimine complexes and their electron/proton transfer processes、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日
- ⑬ Ho-Chol Chang、Design and properties of redox-active metallomesogens、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日
- ⑭ Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang、Photochemical hydrogen evolution based on metal complexes bearing redox-active ligands、6th Asian Conference On Coordination Chemistry (ACCC6), 2017 年 7 月 23-28 日

### (3) 出版物

なし。



学 校 名	明 星 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ヌクレオソームダイナミクスの分子機構に関する研究 —原始レベルから細胞までの統合的理解—		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①ヌクレオソーム ②クロマチン ③リモデリング因子 ④リピート配列 ⑤ヒストンテール ⑥ヒストン修飾 ⑦転写制御 ⑧相同組換え			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
香 川 亘	理 工 学 部	准 教 授	総括、構造生物学・生化学的解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
清 水 光 弘	理 工 学 部	教 授	分子遺伝学・生化学・分子生物学的解析
須 賀 則 之	理 工 学 部	准 教 授	生化学・細胞生物学・分子生物学的解析

# ヌクレオソームダイナミクスの分子機構に関する研究 —原子レベルから細胞までの統合的理解—

## 1. 研究の目的

真核生物において、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームは、ゲノムDNAを核内に収納するだけでなく、生命の根幹に関わるDNAの転写、修復、組換えなどを制御する機能を有する。このような制御において、ヌクレオソームの構造はダイナミックに変化することが考えられているが、その分子機構はほとんど不明である。そこで本研究では、緊密な共同研究体制を組み、ヌクレオソームダイナミクスに重要と考えられるクロマチンリモデリング因子、ヒストン結合因子、およびDNAの構造特性に着目した。そして、それらを原子レベルでの立体構造解析から細胞における機能解析まで多角的に解析することによって、ヌクレオソームダイナミクスの分子機構を統合的に解明することを目的とした。

## 2. 研究の計画

### (1) リモデリング因子とヌクレオソームとの相互作用解析

クロマチンリモデリング因子の機能構造は、未だ明らかにされていない。そこで代表的なクロマチンリモデリング因子として、相同組換えで働くRad54に着目し、そのヌクレオソームとの複合体の立体構造を明らかにすることを目的とした。平成28年度の研究で確立した、全長のゼブラフィッシュRad54の大量調製系を用いてRad54を調製し、Rad54とヌクレオソームとの相互作用を生化学的に解析した。

### (2) DNA構造特性によるヌクレオソーム多様性の解析

DNAの構造特性とヌクレオソーム構造の多様性との関係を明らかにすることを目的として、ヒトゲノムに存在する単純反復配列に着目した。ヒトゲノムでは3~5塩基の単純反復配列（マイクロサテライト配列）が広く見出されている。そこで、これらのリピート配列におけるヌクレオソームの安定性と構造の多様性について、物理化学的解析およびX線結晶構造解析を用いて解析した。

### (3) *In vivo*における新規ヌクレオソーム解析法の開発

*In vivo*でのヌクレオソームの位置と動態を解析するために、酵母遺伝学・分子生物学的手法に化学的アプローチを組み合わせ、全ヒストンのDNA結合部位特異的的化学切断法を開発することを目的とした。出芽酵母ヌクレオソームのX線結晶構造に基づいて、4種類のヒストンH2A、H2B、H3、H4のDNA接触部位を予測した。それらのアミノ酸残基にCys変異を導入し、N-(1, 10 phenanthroline-5-yl) iodoacetamideを連結し、Cu<sup>2+</sup>をキレートした後、OHラジカルを局所的に発生させてDNAを切断する方法を計画した。

## 3. 研究の成果

### (1) リモデリング因子とヌクレオソームとの相互作用解析

Rad54と再構成ヌクレオソームとの相互作用を調べるために、様々なモル比で混合したゼブラフィッシュRad54（以下DrRad54）とヌクレオソームの混合液を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、複合体の形成効率を調べた。混合液には、ATPまたはその非加水分解アナログ5種類（ATP  $\alpha$ S、ApCpp、AppCp、AppNHp、ATP  $\gamma$ S）を加え、それぞれの複合体の形成効率への影響を調べた。ゲルシフト法によるDrRad54とヌクレオソームとの相互作用解析を行なった結果、DrRad54とヌクレオソームのモル比が3:1以上の条件において、DrRad54・ヌクレオソーム複合体と考えられるバンドが検出された。さらに、ATPおよびATP非加水分解アナログ存在下におけるDrRad54とヌクレオソームとの相互作用を調べたところ、ATP存在下においてDrRad54とヌクレオソームとの相互作用が強くなることが分かった。これらの結果から、DrRad54がヌクレオソームと安定に結合するためには、ATPが必要であることが考えられた。

### (2) DNA構造特性によるヌクレオソーム多様性の解析

DNAの構造特性がヌクレオソームの安定性と構造の多様性に及ぼす影響を調べることを目的として、10種類のトリヌクレオチドリピート配列をそれぞれ含む147 bp DNAをデザイ

ンした。36 bpのリピート配列は、147 bp DNAの中でヌクレオソームの形成と安定性に最も影響すると考えられる中央の位置に導入した。この10種類のDNAをそれぞれ大量調製するために、平成28年度に確立したオリゴDNAを用いたOne-Pot反応系を使用した。調製したDNAはそれぞれリコンビナントヒトヒストン（H3.1、H4、H2A、H2B）より再構成したヒストン八量体と混合し、塩透析法によるヌクレオソームの再構成を行なった。再構成したヌクレオソームは、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Prep Cell）により、高純度に精製した。

再構成したヌクレオソームの安定性を調べるために、蛍光分光光度計を用いた塩耐性試験を確立した。この方法では、ヒストン八量体の内部に位置するチロシン残基から発せられる蛍光を検出しており、塩濃度の上昇に伴い、147 bp DNAがヒストン八量体から外れて、蛍光強度が上昇する様子を測定する。10種類のトリヌクレオチドリピート配列をそれぞれ含むヌクレオソームについて塩耐性試験を行った結果、トリヌクレオチドリピート配列によって蛍光強度の上昇に違いが見られた。得られたデータから、それぞれのヌクレオソームの安定性について考察を行った。

### (3) *In vivo*でのヌクレオソームのポジションを決定するパラレルマッピング法の確立

ゲノムにおけるヌクレオソームの配置の解析には、従来、micrococcal nuclease (MNase) が広く用いられているが、その塩基配列特異性のために、得られた結果の解釈に問題が指摘されてきた。本研究において、MNase法と併用して、ヒストンH4のDNA部位特異的の化学切断法を核に適用したパラレルマッピング法を確立した。本法は、従来のMNase法のみよりも精度が高く、正確にヌクレオソームの位置を決定することを可能にした (Fuse et al., *PLoS One* 2017)。この方法を用いて、マイクロサテライト配列の形成するヌクレオソームの構造的特徴を新たに見いだした (投稿論文準備中)。

### (4) ヒストンのDNA結合部位特異的切断によるヌクレオソーム解析法の開発

*In vivo*での多様なヌクレオソーム構造と動態を明らかにするために、酵母遺伝学・分子生物学的手法に化学的アプローチを組み合わせ、全ヒストンのDNA結合部位を特異的に切断する方法の開発を目的とした。出芽酵母ヌクレオソームのX線結晶構造に基づいて、4種類のコアヒストンH2A、H2B、H3、H4のDNA接触部位を予測し、それらをCys残基に置換した各ヒストンの変異株7種を作製した。また、各ヒストンのN末端またはC末端テールにもCys残基を導入した株の作製に成功した (投稿論文準備中)。現在、各ヒストンのさまざまなDNA結合部位を次世代シーケンサー (NGS) によって解析しているところである。これらの結果に基づいて、個々のヒストンの結合部位の全てについてゲノムアトラスの作成を進めている。

## 4. 研究の反省・考察

本研究は、全長Rad54とヌクレオソームとの相互作用を生化学的に解析し、それらの安定な相互作用に必要な条件を明らかにした。この情報は、今後Rad54とヌクレオソームとの複合体の立体構造解析を成功させるために、重要であると考えられる。また本研究では、様々なDNA配列を含むヌクレオソームを大量調製することに成功した。今後、ヌクレオソーム構造の多様性を明らかにする研究が進むことが期待される。*In vivo*の解析においては、ヌクレオソームの解析法として、部位特異的の化学切断法を、MNaseを用いた方法と併用するパラレルマッピングを確立し、ヒストンのDNA結合部位特異的切断による新規ヌクレオソーム解析法の実現性を示した。今後、*in vivo*でのヌクレオソームマッピングの結果と*in vitro*での結果を相互検証することにより、クロマチンダイナミクスを統合的に理解できることが期待される。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Yasuda, T., Kagawa, W., Ogi, T., Kato, T. A., Suzuki, T., Dohmae, N., Takizawa, K., Nakazawa, Y., Genet, M. D., Saotome, M., Hama, M., Konishi, T., Nakajima, N. I., Hazawa, M., Tomita, M., Koike, M., Noshiro, K., Tomiyama, K., Obara, C., Gotoh, T., Ui, A., Fujimori, A., Nakayama, F., Hanaoka, F., Sugasawa, K., Okayasu, R., Jeggo, P. A., Tajima, K. Novel function of HATs and HDACs in homologous recombination through acetylation of human RAD52 at double-strand break sites.

*PLoS Genet.* 14, e100727. (査読あり)

- ② Fuse, T., Katsumata, K., Morohoshi, K., Mukai, Y., Ichikawa, Y., Kurumizaka, H., Yanagida, A., Urano, T., Kato, H., **Shimizu, M.** Parallel mapping with site-directed hydroxyl radicals and micrococcal nuclease reveals structural features of positioned nucleosomes *in vivo*. *PLoS One* 12, e0186974. (査読あり)

(2) 口頭発表

- ① **香川亘**、五月女美香、齋藤健吾、安田武嗣、杉山修正、胡桃坂仁志、ヒトRAD52が促進するDNAアニーリングの分子機構、第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会、蒲郡（愛知県）、2017年12月20日～22日
- ② 布施智博、勅使川原裕太、林俊樹、今井洸志、**香川亘**、胡桃坂仁志、浦野健、加藤太陽、**清水光弘**、ヌクレオソームDNA座標特異的切断法の開発、第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会、蒲郡（愛知県）、2017年12月20日～22日
- ③ **清水光弘** (依頼講演) ヒストンのDNA結合部位特異的切断によるヌクレオソームの解析、平成29年度年度国立遺伝学研究所研究会「エピジェネティクスの基盤となるクロマチン・細胞核の動的構造変換」、三島（静岡県）、2017年10月26日～27日
- ④ **香川亘**、ヌクレオソームの多様な構造を解析する技術の開発、第5回 科研費 新学術領域 クロマチン動構造 班会議、留寿都（北海道）、2017年7月13日～15日
- ⑤ 五月女美香、齋藤健吾、安田武嗣、胡桃坂仁志、**香川亘**、相同組換えタンパク質RAD52とssDNAとの複合体のX線結晶構造解析、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台（宮城県）、2017年6月20日～22日
- ⑥ 讓原秀隆、相澤由有希、横山浩、近重裕次、原口徳子、平岡泰、胡桃坂仁志、**香川亘**、分裂酵母Bqt1-Bqt2複合体の大量調製と結晶化、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台（宮城県）、2017年6月20日～22日
- ⑦ 浦野一輝、堀越直樹、鯨井智也、田口裕之、胡桃坂仁志、**香川亘**、多様なヌクレオソーム構造を決定するためのX線結晶構造解析、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台（宮城県）、2017年6月20日～22日

(3) 出版物

なし

学 校 名	光産業創成大学院大学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	動いている生体分子1分子の高時間分解能蛍光検出 －一定常蛍光検出と蛍光寿命測定－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①1分子計測 ②高時間分解能蛍光検出 ③ナノバイオサイエンス ④生体分子の動態			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
横 田 浩 章	光産業創成大学院大学・ 光産業創成研究科	准 教 授	研究代表者 総括・実験・データ処理・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
平 野 美 奈 子	光産業創成大学院大学・ 光産業創成研究科	講 師	実験・データ処理・論文作成
井 出 徹	岡山大学大学院・ 自然科学研究科	教 授	実験・論文作成
瀧 口 義 浩	光産業創成大学院大学・ 光産業創成研究科	教 授	実験・論文作成

# 動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出 — 一定常蛍光検出と蛍光寿命測定 —

## 1. 研究の目的

### (1) 本研究の背景

生命科学の研究現場において生体分子を生きたままイメージングできる蛍光顕微鏡はなくてはならないツールとなっている。とりわけ、蛍光標識した生体分子 1 分子を実時間で直視できる蛍光 1 分子検出技術は、個々の生体分子の運動・相互作用・構造変化などのダイナミクスを集団平均することなく実時間で観察できる強力な蛍光顕微鏡法である。生体内で通常動き回って機能している生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出が、そのダイナミクスや関連する生命現象の生体分子間相互作用の機序を理解する上で重要であるにもかかわらず、光検出器の性能上の制約から、同一の動いている生体分子 1 分子の継続した高時間分解能蛍光検出の報告はない。蛍光 1 分子検出によく使われる電子増倍型 CCD (EMCCD) は広視野観察ができるが時間分解能は数 ms に制限される。一方、それ以上の高時間分解能検出が可能であるアバランシエホトダイオード (APD) は受光面が小さいため広視野観察はできない。

そこで我々は広視野高時間分解能蛍光 1 分子検出が可能な HPD を用いて研究を行っている。HPD は APD と同等の高い時間分解能の特長をもちながら、CCD なみの広い受光面をもつ。HPD は光電子増倍管にまさる光検出器として高エネルギー物理学の研究用に開発されたため、生命科学の分野ではほとんど知られていない。

### (2) 本研究の目的

本研究では、ハイブリッドホトディテクタ (HPD) と呼ばれる微弱光検出器を用いて生命機能で重要な役割を果たしている動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出を達成することを目的とした。この蛍光検出から対象とする生体分子の運動様式や構造変化を解き明かしたい。

#### ① 本研究で対象とする蛍光検出技術

蛍光検出技術はその励起光の性質によって連続した励起光を用いる定常蛍光検出とパルス状の励起光を用いる時間分解蛍光検出に大別される。従来の蛍光 1 分子検出のほとんどは定常蛍光検出である。本研究では、時間分解蛍光測定光学系を構築し、蛍光寿命測定にも取り組む。研究期間である 3 年間で以下の系を構築する。

- ア 偏光 2 成分同時時間分解蛍光検出系
- イ 蛍光 2 色同時時間分解蛍光検出系

#### ② 本研究で対象とする動く生体分子

- ア 2 次元自由拡散する脂質
- イ ミオシン上で滑走するアクチンフィラメント
- ウ DNA 上で運動する DNA 修復タンパク質

#### ③ 本研究で用いる蛍光プローブ

- ア 蛍光色素
- イ 半導体超微粒子 (Qdot)
- ウ 蛍光ダイヤモンドナノ粒子

### (3) 本研究から期待できる波及効果

本研究で行う動いている生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光検出は、さまざまな生体分子への適用が想定できる。本研究は、蛍光 1 分子検出系の高度化と生体分子のダイナミクスの解明に貢献し、様々な病態の発現機構などの分子レベルでの理解に通じる。

## 2. 研究の計画

平成 29 年度は、定常蛍光検出の計測対象を脂質からタンパク質に広げる。また、Qdot や研究代表者が取り扱ってきた蛍光ダイヤモンドナノ粒子を生体分子に標識する蛍光プローブとして用い定常蛍光検出を行う。蛍光ダイヤモンドナノ粒子は、高い発光安定性をもち褪色やブリンキング (明滅) を起こさない。このため強い励起光で照射して長時間明るく観察できる。さらに、

時間分解蛍光検出の系の立ち上げに取り組む。

(1) 動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出

①2次元自由拡散を行う脂質分子

本研究開始前に、我々は動いている脂質に標識したQdotの蛍光強度を、HPDを使って 0.1 msの高時間分解能で観察できることを実証し、ブリンキング（明滅）現象を詳細に解析している。そこで平成29年度は蛍光ダイヤモンドナノ粒子を表面修飾し脂質に標識し、その脂質を用いて同様の検出をし、さらなる時間分解能の向上をはかる。

②モータータンパク質ミオシン上を運動するアクチンフィラメント

モータータンパク質の一種であるアクチンフィラメントはガラス基板上に固定したミオシンとの相互作用によってATP存在下で滑り運動することが知られている。ここでは蛍光色素でまばらに標識したアクチンフィラメントを用いて滑り運動中の蛍光検出を行う。また蛍光ダイヤモンドナノ粒子で標識したアクチンフィラメントで同様の蛍光検出を行う。

③DNA上で1次元拡散を行うDNA修復タンパク質

研究代表者は、蛍光色素やQdotで部位特異的に標識した大腸菌のDNA修復で損傷部位を切除するヘリカーゼUvrDなどのDNA修復タンパク質を用いて研究を行っている。ここではこれらDNA修復タンパク質の1本のDNA上での動きを蛍光検出する。蛍光ダイヤモンドナノ粒子で標識したDNA修復タンパク質についても同様の蛍光検出を行う。

(2) 時間分解蛍光検出系の構築

時間分解蛍光検出に使う励起パルス光は、学内共同利用施設に設置している大出力フェムト秒レーザー（7 mJ・800 nm・1 kHz）を用いて取り出す。

### 3. 研究の成果

(1) 動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出

①2次元自由拡散を行う脂質分子

蛍光ダイヤモンドナノ粒子を表面修飾し、ビオチン-アビジン系を利用して脂質の蛍光ダイヤモンドナノ粒子標識を行った。そして、HPDによるサブmsの蛍光1分子強度検出とEMCCD（時間分解能33 ms）による蛍光強度と軌跡追跡の同時観察を行った。

②モータータンパク質ミオシン上を運動するアクチンフィラメント

蛍光色素、蛍光ダイヤモンドナノ粒子で蛍光標識を行った。そして、蛍光色素でまばらに標識したアクチンフィラメントを用いて滑り運動中の蛍光検出を行った。また、蛍光ダイヤモンドナノ粒子で標識したアクチンフィラメントのミオシン上での滑り運動の蛍光検出も行った。

③DNA上で1次元拡散を行うDNA修復タンパク質

UvrDについて蛍光色素、Qdot、蛍光ダイヤモンドナノ粒子で蛍光標識を行った。蛍光ダイヤモンドナノ粒子による標識については、直径100nmおよび20nmのストレプトアビジンPEGコート蛍光ダイヤモンドナノ粒子をヘリカーゼUvrDに標識した。標識に用いた直径100nmの蛍光ダイヤモンドナノ粒子の1つを調べてみたところ、UvrDに特異的に蛍光標識した色素の褪色段階数の解析から、複数（4分子）のUvrDが結合していることがわかった。

(2) 時間分解蛍光検出系の構築

時間分解蛍光検出に使うパルスレーザー（515nm・繰り返し周波数最大 100 MHz）と、時間相関単一光子計数モジュールを、それぞれ顕微鏡と計測用 PC に導入した。当初計画していた大出力フェムト秒レーザーを用いたパルス光の取り出しは断念した。繰り返し周波数が低く、パルス光の取り出しが煩雑であり、1 パルスあたりのエネルギーが大きすぎることから、本研究で行う蛍光寿命測定に適さないと判断したためである。

(3) 生体分子 1 分子の時間分解蛍光検出

当初は平成 30 年度に計画していた生体分子 1 分子の時間分解蛍光検出に着手した。

①2次元自由拡散を行うQdot標識脂質分子の蛍光寿命測定（図1）

Qdot標識した脂質について、HPDによる蛍光寿命測定とEMCCD（時間分解能33 ms）による蛍光強度と軌跡追跡の同時観察を行った。我々が知る限り動いている蛍光分子1分子の蛍光寿命を計測した初めての例である。

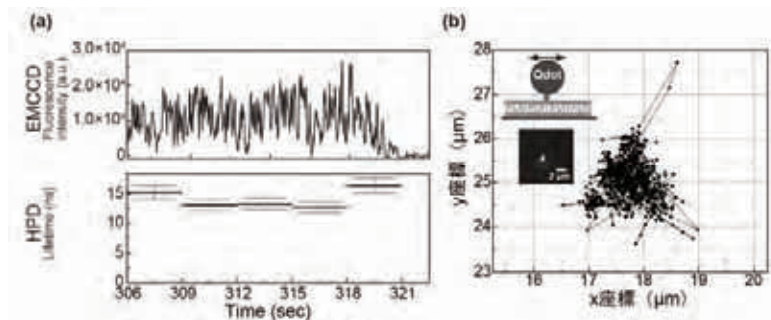


図 1: 平面上を 2 次元自由拡散する Qdot 標識脂質分子の蛍光寿命測定 (3 秒ごと・320 秒付近で視野外に移動). (a) 上: 蛍光強度変化 (EMCCD). 下: 蛍光寿命の時間経過 (HPD). (b) 軌跡.

## ② 蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光寿命測定

基板に固定した蛍光ダイヤモンドナノ粒子 (直径100 nm) について、HPDによる蛍光寿命測定とEMCCD (時間分解能33 ms) によるイメージングの同時観察を行った。我々が知る限り蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光寿命を計測した初めての例である。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) 動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出

#### ① 2次元自由拡散を行う脂質分子

脂質はタンパク質と異なり活性を気にする必要がないので、比較的スムーズに計画通りの研究を遂行することができた。ただ、ガラス基板表面への蛍光プローブの非特異吸着があり、蛍光検出の妨げになった。今後はPEG修飾したガラス基板などを用いて、この非特異吸着を抑制し、より効率的な蛍光検出ができるようにしたい。

#### ② モータータンパク質ミオシン上を運動するアクチンフィラメント

蛍光ダイヤモンドナノ粒子標識したアクチンフィラメントの運動を観察することができたが、アクチンフィラメントに標識した蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光検出には至っていない。蛍光ダイヤモンドナノ粒子のアクチンフィラメントへの標識率を上げ、より効率的な蛍光検出ができるようにしたい。

#### ③ DNA上で1次元拡散を行うDNA修復タンパク質

蛍光ダイヤモンドナノ粒子でDNA修復タンパク質を標識はできたが、まだそのDNA結合活性は確認していない。DNA結合活性がある標識したDNA修復タンパク質のみをアフィニティカラムなどで単離する必要性が出てくるかもしれないと考えている。

### (2) 時間分解蛍光検出系の構築

当初計画していた大出力フェムト秒レーザー (7 mJ・800 nm・1 kHz) を用いたパルス光の取り出しを断念し、より小型で顕微鏡に導入が容易なパルスレーザーを用いたことで、時間分空き蛍光検出系の構築を加速し完了させることができた。将来的には、より高出力のパルスレーザーを導入して、単位時間あたりの蛍光の光子数を増やし、より高時間分解能の検出ができるようにしたい。

### (3) 生体分子 1 分子の時間分解蛍光検出

#### ① 2次元自由拡散を行うQdot標識脂質分子の蛍光寿命測定

動いている生体分子1分子の蛍光寿命の時間経過検出の原理検証実験に成功した。今後は背景光を下げるなどして、より高精度な蛍光検出をめざす。また、蛍光寿命測定が有効な生体分子局所領域での環境変化検出に応用したい。

#### ② 蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光寿命測定

今後は動いている生体分子1分子に標識した蛍光ダイヤモンドナノ粒子1個の蛍光寿命の時間経過をとらえる予定である。また、蛍光寿命測定が有効な生体分子局所領域での環境変化検出に応用したい。



## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

なし

### (2) 口頭発表

- ①横田浩章：生体分子1分子の蛍光イメージング～1分子直視と高精度化～. 第14回バイオオプティクス研究会, 北海道大学(札幌市), 2017年9月. (招待講演)
- ②Yokota, H.: Single-molecule imaging and manipulation. 浙江大学研究交流会, 浜松ホトニクスシステム中央研究所(浜松市), 2017年8月. (招待講演)
- ③横田浩章：過渡的に形成されるDNA結合タンパク質多量体の動的構造の蛍光1分子イメージング. 科研費・新学術領域「動的構造生命」第3回班会議, ザ・ルイガンズ(福岡市), 2017年6月.
- ④横田浩章：最新型微弱光検出器による生体分子1分子の高時間分解能蛍光検出. 東海産業技術振興財団第29回研究助成金交付決定通知書伝達式, ホテルアークリッシュ豊橋(愛知県豊橋市), 2017年4月. (招待講演)

### (3) 出版物

なし

学 校 名	立 命 館 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	圧力が拓く生命科学の新領域「圧力生命科学」 －タンパク質の離合集散の圧力応答研究－		研 究 分 野	理 学
キ ー ワ ー ド	①圧力 ②生物リズム ③細胞分裂 ④タンパク質			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
北 原 亮	薬 学 部	教 授	研究代表者総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 村 浩 由	生 命 科 学 部	教 授	実験、解析、論文作成
寺 内 一 姫	生 命 科 学 部	教 授	実験、解析、論文作成
北 沢 創 一 郎	薬 学 部	助 教	実験、解析
吉 澤 拓 也	生 命 科 学 部	助 教	実験、解析

# 圧力が拓く生命科学の新領域「圧力生命科学」 ータンパク質の離合集散の圧力応答研究ー

## 1. 研究の目的

- (1) 生命の圧力応答に関する研究は、温度や他の環境因子に比べ圧倒的に不足している。本課題では、生命現象の圧力に対する応答を解明し、「圧力生命科学」という特徴ある学術領域を発展させる。とりわけ、「生物リズム」の圧力研究から、他の環境因子の研究では得られない新しい情報を収集する。シアノバクテリアの Kai タンパク質群が織りなす概日周期のメカニズムを解明する。
  - ① 周期長の圧力依存性を解明する。
  - ② KaiCのATPase活性の圧力依存性を解明する
- (2) 圧力はタンパク質の多様なコンフォメーションを探索するための優れた環境因子である。溶液 NMR 測定、X 線結晶構造解析の手法と組み合わせることにより、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の FtsZ についてコンフォメーション選択的医薬品開発を実践する。
  - ① FtsZについて立体構造の多型性をX線結晶構造解析により解明する。
  - ② 抗菌阻害薬の候補化合物とFtsZの複合体構造を解明する。

## 2. 研究の計画

- (1) シアノバクテリア KaiC の野生型に加え、周期長が異なる変異体についても研究を展開し、周期長に関わる立体構造変化を突き止める。
  - ① 高圧蛍光法を用いて概日周期の周期長の圧力依存性を調べる。
  - ② KaiCのATPase活性の圧力依存性を調べる。酵素活性の圧力効果から、活性化体積を求める。
- (2) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬開発に向けた FtsZ の圧力応答研究する。
  - ① FtsZ-構造選択的阻害剤複合体の構造解析を行うとともに、高圧力技術を用いて生理条件下では僅かにしか存在しない不安定なコンフォメーション (高エネルギーコンフォメーション) のタンパク質を結晶化する手法 (高圧結晶成長法) の開発を進める。
  - ② NMR法 (常圧、高圧)、蛍光法を用いて、FtsZの構造多型性を解明する。(FtsZのコンフォメーション平衡の圧力依存性に基づいて、1~7000気圧までの範囲で、FtsZの結晶化を行う。

## 3. 研究の成果

- (1) 概日周期のメカニズムに関する研究
  - ① 高圧蛍光法を用いて、野生型KaiCのリン酸化周期に伴う蛍光強度の周期的な変化を測定した。各圧力における周期長測定を複数回行い精度を高めた (9thIMBP 口頭発表)。KaiA, KaiB, KaiCの高圧力下の蛍光スペクトル測定を行った。
  - ② KaiC野生型およびその変異体 (A251V, R393Cなど) についてATPase活性の圧力依存性を調べた。KaiC野生型については、活性化体積を求めた。
- (2) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の FtsZ についてコンフォメーション選択的医薬品開発に関する研究
  - ① 新規阻害剤が構造選択的にMRSA FtsZに結合し、その構造のやわらかさによって薬剤耐性菌にも効果を示すという、新たな知見を得た (*ACS Chem. Biol.*, 2017、2017年7月プレスリリース、京都新聞掲載)。
  - ② 細胞分裂タンパク質FtsZの異なる立体構造の存在を初めて明らかにし (*J. Struct. Biol.*, 2017)、FtsZの構造変換が膜分裂の駆動力となる可能性を示した。
  - ③ トリプトファンを導入したFtsZ変異体を作成し、高圧蛍光測定を行った。スペクトル変化から、会合状態や立体構造の圧力依存性を調べた。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) 概日周期のメカニズムに関する研究

- ①周期長測定には、KaiA, KaiB, KaiCの全てが十分な活性を示す必要がある。精製後の品質についてはゲルろ過クロマトグラフィーにより評価しているが、周期を示さない場合があった。精製したそれぞれのタンパク質について活性評価、周期長測定を行い、品質を把握する必要がある。
  - ②KaiCのATPase活性においては、活性を $k_{cat}$ により評価した。1回の高圧活性測定で必要なタンパク質量が多く、実験回数が限られた。より経済的でより再現性の高い $k_{cat}$ を得るために、高圧力実験方法やタンパク質の精製手法の検討が必要である。
- ### (2) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の FtsZ についてコンフォメーション選択的医薬品開発に関する研究

- ①新規阻害剤が構造選択的にMRSA FtsZに結合すること、また細胞分裂タンパク質FtsZの異なる立体構造の存在の発見という新たな知見を得た。この成果をもとに、高圧下でのタンパク質を結晶化する手法（高圧結晶成長法）の開発を行っているが、結晶が得られているものの、圧力実験の特徴を生かした技術の確立には至っていないため、今後の検討課題である。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ①Junso Fujita, Ryuhei Harada\*, Yoko Maeda, Yuki Saito, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Yasuteru Shigeta, Hiroyoshi Matsumura\*, Identification of the key interactions in structural transition pathway of FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *J. Struct. Biol.*, 198(2), 65-73 (2017).
- ②Junso Fujita, Yoko Maeda, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Malvika Kaul, Ajit K. Parhi, Edmond J. LaVoie, Daniel S. Pilch\*, Hiroyoshi Matsumura\*, Structural flexibility of an inhibitor overcomes drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* FtsZ, *ACS Chem. Biol.*, 12(7), 1947-1955 (2017).
- ③寺内一姫, 大山克明, 浅井智広, ブルーネイティブ電気泳動による時計タンパク質 KaiCの動的構造解析, 電気泳動 61, 107-110 (2017).
- ④Katsuaki Oyama, Chihiro Azai, Jun Matsuyama, and Kazuki Terauchi\*, Phosphorylation at Thr432 induces structural destabilization of the CII ring in the circadian oscillator KaiC. *FEBS Lett.*, 592(1), 36-45 (2018).

### (2) 口頭発表

- ①藤田純三, 原田隆平, 杉山翔吾, 吉澤拓也, 溝端栄一, 井上豪, 内橋貴之, 重田育照, ○松村浩由, 細菌の細胞分裂タンパク質の動的秩序解析, 平成29年度日本蛋白質科学会年会, 2017年6月22日(木), 仙台国際センター, 仙台市
- ②○松村浩由, 細胞分裂タンパク質の構造研究, 大阪大学蛋白質研究所セミナー SPring-8先端利用技術ワークショップ 「SPring-8における蛋白質構造生物学研究の現状と将来」, 2017年8月3日(木), 大阪大学蛋白質研究所, 大阪市
- ③Katsuaki Oyama, Takahiro Kawamura, Megumi Fujimoto, Takuro Wakamoto, Soichiro Kitazawa, Kazuki Terauchi, ○Ryo Kitahara, Pressure shortens an oscillatory period of the cyanobacterial circadian clock, The 9th International Meeting on Biomolecules under Pressure, 2017年8月21日, 青蓮会館, 京都市
- ④○寺内一姫, ブルーネイティブ電気泳動による時計タンパク質KaiCの動的構造解析, 第68回日本電気泳動学会総会シンポジウム, 2017年11月25日, 広島大学広仁会館, 広島市
- ⑤○寺内一姫, 時計タンパク質KaiCの探究, 藍藻の分子生物学2017, 2017年12月1日, かずさアカデミアホール

### (3) 出版物

なし

学 校 名	東 北 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	睡眠覚醒リズムを持つヒトiPS細胞由来神経ネットワークの創生 －生体概日リズムを模倣した薬効評価系の構築－		研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①ヒトiPS細胞由来ニューロン ②睡眠 ③覚醒 ④概日リズム ⑤生体脳モデル ⑥新規薬効評価系			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
鈴 木 郁 郎	工 学 部	准 教 授	研究代表者総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
辛 島 彰 洋	工 学 部	准 教 授	データ解析

# 睡眠覚醒リズムを持つヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの創生 — 生体概日リズムを模倣した薬効評価系の構築 —

## 1. 研究の目的

我々はヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を長期間モニタリングできる機能評価技術を開発し、薬剤応答性を見出すとともに、開発技術を用いた医薬品の開発および安全性・毒性評価法への展開を目指している。本研究では、開発した評価系の薬効評価精度を更に向上させるために、培養細胞であるヒト iPS 細胞由来ニューロンに生体脳で見られる現象である睡眠・覚醒状態を惹起させ、そのメカニズムを検証するとともに、生体概日リズムを模倣したヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの新規薬効評価系を構築することを目的とする。

## 2. 研究の計画

生体脳の睡眠において、脳幹のアミンニューロン（ノルアドレナリン・ヒスタミン・セロトニン）やコリンニューロンが睡眠-覚醒状態を制御していること、睡眠-覚醒状態依存的に大脳皮質内アミン・コリン濃度が変化することが明らかとされている。初年度は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンに睡眠-覚醒のリズムを惹起するために、(1) 脳内物質であるアミン、コリン濃度を 12 時間周期で変化させる「液性因子刺激」と、(2) 1 Hz の「電気刺激」によりノンレム睡眠時の「徐波」を模倣して概日リズムを惹起させる方法について検討した。

## 3. 研究の成果

### (1) 液性因子刺激による睡眠-覚醒リズムの惹起

#### ① 神経伝達物質投与による自発活動の変化

平面微小電極アレイ上にヒト iPS 細胞由来大脳皮質ネットワーク (Xcell 社)、ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン (CDI 社)、ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン (Axol 社) を培養し、神経伝達物質であるセロトニン、ヒスタミン、アセチルコリン、オレキシン、ノルアドレナリンの用量依存的な自発活動変化を調べた。CDI 社のヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンにおいて、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、オレキシン、ノルアドレナリン投与で、用量依存的に同期バースト発火の個数が増大する神経ネットワークの興奮応答が認められた。このことから、ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン (CDI) は、各種受容体を有し、電気生理学的な機能を示すことが確かめられ、その後の実験において、CDI 社の細胞を主に用いることとした。

#### ② 長期計測の評価

ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンの電気活動における概日リズムを培地交換なしで安定的に評価できるかを検討した。培養 18~21 日目、培養 34~37 日目に自発活動を培地交換なしで 72 時間連続計測した。培養 18~21 日目では、時間経過に伴い発火数が増加していることがわかり、培養 34~37 日目では計測 30 時間後から徐々に発火頻度が減少し、72 時間後には発火数が 20% まで減少した。培養 18 日目は神経ネットワークの成長期であるため、計測期間中に発火数が増加することが明らかとなり、培養 34 日目の成熟した神経ネットワークでは、培地交換後の発火数は安定しているものの、培地成分の消費により、30 時間後から発火数が減少してしまうことがわかった。次に、培養 1 か月以上のサンプルに対して、12 時間毎に培地交換をしたところ、自発活動の頻度が保たれることがわかった。これらの結果により、神経伝達物質投与による概日リズムの惹起を検証する実験において、12 時間毎に培地交換することとした。

#### ③ セロトニン投与による概日リズムの惹起

同期バースト発火の増加が顕著に見られたセロトニンを用いて、培地のみでの計測を 12 時間、セロトニン 100nM を投与した計測を 12 時間、これらを交互に行い 72 時間の計測を行った。セロトニン投与後には、同期バースト発火数が増大し、6 時間程度顕著な増加が観察された。3 回のセロトニン投与で繰り返し同様の増加が観察され、培地のみの場合は見られなかった。これらの結果により、セロトニンの周期的な投与により覚醒期

を模倣した概日リズムの惹起に成功したと言える。

#### ④ステロイド投与による概日リズムの惹起

脳スライスの実験で、ステロイドを投与するとPeal遺伝子の発現がリセットされ、同調した概日リズムが遺伝子レベルで見られるとの報告がある。この方法をヒトiPS細胞由来ニューロンに適応できれば、自発的な概日リズムを形成させることができると考え、デキサメタゾン100nMを12時間投与し、投与前48時間と投与後48時間のリズム変化を調べた。しかしながら、CDI社およびAxol社のヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンどちらにおいてもステロイド暴露前後で変化は見られなかった。

#### (2)電気刺激による睡眠-覚醒リズムの惹起

ノンレム睡眠のうち、最初の15分は周波数の低い成分(1Hz)の脳波が中心となる。この睡眠は徐波睡眠と言われる。徐波睡眠時の状態を模倣するために、ヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンに徐波の周期を模倣する電気刺激を行い、自発活動の変化を調べた。具体的には、自発活動を3時間計測後、1Hzの電気刺激を15分間行い、その後75分間の自発活動計測を4セット行った。セロトニン100nMを暴露した状態でも同様の電気刺激を行い、応答性の違いを調べた。CDI社およびAxol社のヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンどちらにおいても、電気刺激前後で発火数や同期バースト発火頻度の減少などの顕著な変化は見られなかった。刺激条件および解析法の検討が示唆された。

### 4. 研究の反省・考察

- (1)概日リズムで変化する5種類の神経伝達物質に対して、ヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンは同期バーストが増加する興奮作用を示した。セロトニンの周期的な投与により、同期バーストが増減する概日リズムモデルを惹起することができた。神経伝達物質の組み合わせによる効果の検証は今後の課題である。ステロイド暴露によるリズムの変化は見られなかったため、遺伝子発現リズムの同調確認および暴露濃度の検討が必要である。また、リズム変化を検出するための解析パラメータの検討は必須であると考えている。
- (2)電気刺激によって惹起する方法については、刺激入力電流値、刺激電極数の検討および1Hz刺激の追従性などを検討する必要がある。また、ノンレム睡眠時のスピンドル波を模倣する14Hz刺激などの刺激周波数を検討する必要がある。液性因子刺激と同様、電気刺激前後の自発活動パターンの違いを見出す解析パラメータを検討する必要がある。

### 5. 研究発表

#### (1)学会誌等

#### (2)口頭発表

- ①岡部美穂, 小田原あおい, 松田直毅, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, *in vitro*ヒトiPSC由来中枢神経ネットワークに睡眠・覚醒リズムを惹起させる為の基礎検討, 平成29年 電気学会電子・情報・システム部門大会, 2017年9月
- ②岡部美穂, 石橋勇人, 奥山夏輝, 松田直毅, 小田原あおい, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, 培養ヒトiPS細胞由来中枢神経ネットワークに睡眠・覚醒リズムを惹起させる為の基礎検討, 第33回ライフサポート学会大会, 2017年8月
- ③岡部美穂, 石橋勇人, 奥山夏輝, 松田直毅, 小田原あおい, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, ヒトiPS細胞由来中枢神経ネットワークに概日リズムを惹起させる為の基礎検討, 平成30年東北地区若手研究者研究発表会, 2018年3月

#### (3)出版物

鈴木郁郎, “ヒトiPS細胞由来神経細胞の機能評価と創薬応用”, 創薬のための細胞利用技術の最新動向と市場, 第II編 創薬・新薬への応用, 第2章 薬剤安全性評価への応用, シーエムシー・リサーチ, P222-229, 2018

学 校 名	青 山 学 院 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	層状超伝導物質の3D微細加工と生体高分子検出への応用		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①高温超伝導体 ②微細加工 ③生体高分子検出 ④固有ジョセフソン効果			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
北 野 晴 久	理 工 学 部	教 授	研究代表者総括、素子の設計・実験

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
三 井 敏 之	理 工 学 部	教 授	実験方法の検討



# 層状超伝導物質の3D微細加工と生体高分子検出への応用

## 1. 研究の目的

- (1) 本研究では、液体窒素温度 (77 K) を超える高い超伝導転移温度により、動作温度の飛躍的増大が期待される  $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{CaCu}_2\text{O}_y$  (以下 Bi2212 と略記) 銅酸化物超伝導体を用いた生体高分子の検出方法を研究する。特に、この物質の特徴である超伝導層と絶縁体層が交互に積層する結晶構造に起因する固有ジョセフソン効果 (超伝導状態で発現する量子トンネル効果が結晶内部で自発的に発現する効果) に着目し、単結晶試料への3次元(3D)微細加工技術およびイオン衝突により発生する格子振動 (フォノン) が固有ジョセフソン接合と強く相互作用する特性を組み合わせた、従来にない新しい検出原理を探求し、層状超伝導体を用いた高分子検出の道を拓く。基本原理の検証までを3年間の研究目標とし、具体的目標を以下に挙げる。
  - ①フォノンとの相互作用効果が現れやすい3D微細構造の決定
  - ②固有ジョセフソン接合素子を用いたフォノン検出の原理検証実験の実施
- (2) 上記の固有ジョセフソン接合素子との組み合わせや上記以外の検出原理の可能性を追求するために、Bi2212単結晶の良好なへき開性を用いて作製される単結晶薄膜を微細加工し、飛行時間型質量分析法に従来から用いられている超伝導ストリップ線路型イオン検出器と類似のストリップ線路構造を作製する。スプリット線路素子と固有ジョセフソン接合素子の特性比較や組み合わせを検討することにより、上記以外の検出原理も含めた新しい生体高分子イオン検出技術の可能性を探る。

## 2. 研究の計画

- (1) 3D微細加工を駆使した固有ジョセフソン接合素子の作製と3D形状観察
  - ①本研究代表者が所属する理工学部の共同利用設備である集束イオンビーム(FIB)加工装置と研究室現有のアルゴン(Ar)イオン照射装置を用い、微小ブリッジの側面部に2つのスリットを設けた3D微細構造を有するBi2212系固有ジョセフソン接合素子を作製する。
  - ②加工後の3D形状をFIB装置に付属する走査イオン顕微鏡(SIM)と共同利用設備である走査電子顕微鏡(SEM)、および本研究予算で導入するデジタル顕微鏡を用いて観察する。デジタル顕微鏡は、SIMやSEM観察時の電荷蓄積効果によりBi2212単結晶部分と絶縁体基板部分の境界観察が困難になる問題点を回避し、FIB未加工部分の検出精度を高めるために用いる。
  - ③透過型電子顕微鏡(TEM)を用いてFIB加工に伴う加工断面部のダメージを調べる。
  - ④作製した固有ジョセフソン接合素子の電気抵抗特性および電流電圧特性を測定し、フォノンとの相互作用に起因する電流電圧特性の微細構造について検証する。
- (2) スプリット線路素子作製に向けたBi2212単結晶薄膜の微細加工
  - ①Bi2212単結晶の良好なへき開性を利用して、良質かつ大面積のBi2212単結晶薄膜を作製し、FIBまたはArイオン照射を用いてスプリット線路構造を作製する。
  - ②これまでの研究から、膜厚の減少に伴い、低温実験時に微細加工部が断裂する事故が増えることが分かっている。これは、薄膜試料部を基板に固定する際に用いる絶縁性樹脂の熱硬化工程で発生する微小気泡の影響と考えられるため、デジタル顕微鏡を用いて微小気泡の発生を抑制する熱硬化条件を探る。
  - ③得られたBi2212薄膜に対して、光リソグラフィによるフォトマスク形成とArイオン照射を用いて微細加工を試み、スプリット線路構造を作製する。
- (3) 生体高分子イオンの検出原理の検証に向けた実験方法の検討
  - ①作製した素子を用いて生体高分子イオンの検出実験を行うには、通常、ソフトレーザー脱離法を用いて高分子イオンを作製するための真空チャンバーとレーザー光源を整備する必要がある。現有装置ではスパッタ法による超伝導薄膜の作製用とArイオン照射用の真空チャンバーがあるが、レーザー光源はなく、本研究で予定する3年間の研究期間では間に合わない可能性も考えられる。このため、別な検証方法として、高分子イオンの衝突時と類似の振動刺激を固有ジョセフソン接合素子に加えた場合の応答から検

出原理を検証する方法を検討する。

### 3. 研究の成果

- (1) Bi2212 単結晶の 3 次元微細加工により作製される固有ジョセフソン接合素子において、FIB 加工時のダメージを TEM 観察から評価した結果、加工表面から少なくとも 30nm の領域が照射ダメージで非晶質化すること、および FIB で用いられる Ga イオンビームとは別の Ar イオンビーム照射によって非晶質領域が除去できること、さらに FIB 加工後の Ar イオン照射の追加工により、固有ジョセフソン接合素子の電流電圧特性におけるスイッチング電流密度が増大することを見出した。
- (2) スプリット線路素子の作製に向け、Bi2212 単結晶の良好なへき開性と粘着テープ剥離法を用いて Bi2212 単結晶薄膜を作製した。粘着テープによる薄膜剥離の成否が、単結晶試料を石英基板に固定する際に用いる絶縁性樹脂に混入する微小気泡に影響されること見出し、デジタル顕微鏡を用いて微小気泡の生成条件を探索した。その結果、真空容器中での絶縁性樹脂の脱泡処理が薄膜試料の大面积化に有効であることを見出し、Ar イオンビーム照射によるストリップ線路（線幅  $20\mu\text{m}$ 、厚さ  $0.3\text{--}0.4\mu\text{m}$ ）の試作に成功した。
- (3) 生体高分子イオンの検出原理検証に向けた実験方法について、従来の手法では実験環境の整備のため、3 年間の研究期間では間に合わない事態も想定されるため、別手段として、高分子イオンの衝突時と類似の機械的振動刺激を素子に加える手法を検討した。分担者の三井が成功した鶏胚から取り出した心臓組織片へ機械的振動刺激を加える実験を参考に、ピエゾステージまたはバイモルフ型振動子に連結させた微小な針を外部信号によって駆動させ、その応答を調べるための実験インサートの設計に着手した。

### 4. 研究の反省・考察

- (1) 上記した研究成果の(1)および(2)についてはほぼ予定通りであるが、本研究の具体的目標の2つ目として挙げた、イオン衝突に伴うフォノン検出の原理検証実験については、現有の装置環境で実施するのはかなり困難との見通しを得て、別な検証方法を検討するに至った。
- (2) 2017年11月に参加した超伝導の「渦糸物理国内会議」で別の超伝導体  $\text{MgB}_2$  薄膜で生体高分子イオン検出を目指す産総研グループの研究者（全伸幸氏）と議論する機会を得た。素子の完成後に従来の方法でイオン衝突実験を共同で実施する可能性を打診し、共同実験の実施に前向きな感触を得たが、まずは自分たちで検証できる方法を再検討し、上記研究成果の(3)で述べた新しい検証方法の着想を得た。これにより、本格的な衝突実験に必要な素子構造の最適化や測定分解能に関する情報が得られると期待される。
- (3) 以上より、現時点での達成度は計画をやや上回っていると判断される。

### 5. 研究発表

#### (1) 学会誌等

- ① Y. Kakizaki, J. Koyama, A. Yamaguchi, S. Umegai, S. Ayukawa, H. Kitano, “Transmission electron microscopy study of focused ion beam damage in small intrinsic Josephson junctions of single crystalline  $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{CaCu}_2\text{O}_y$ ”, Japanese Journal of Applied Physics, **56**, 043101 (2017).
- ② S. Umegai, A. Yamaguchi, Y. Kakizaki, D. Kakehi, H. Kitano, “Fabrications of Small and High-quality Intrinsic Josephson Junctions by Combinatorial Method of Ar-ion and Focused Ga-ion Etchings”, Journal of Physics: Conference Series (in press).

学 校 名	東 京 理 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新規の高分子網目ゲルを用いた間葉系幹細胞からの硝子軟骨再生		研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①再生医療 ②軟骨 ③分化 ④細胞足場 ⑤間葉系幹細胞 ⑥相互侵入高分子網目ゲル ⑦ペプチド ⑧キトサン			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 塚 英 典	理 学 部 第 一 部	教 授	高分子設計、細胞機能の評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
橋 詰 峰 雄	工 学 部	教 授	細胞機能の評価、材料物性評価
松 隈 大 輔	理 学 部 第 一 部	平成29年2月 28日退職	
飯 島 一 智	工 学 部	助 教	遺伝子発現解析、免疫染色

# 新規の高分子網目ゲルを用いた間葉系幹細胞からの硝子軟骨再生

## 1. 研究の目的

### (1) 背景

加齢に伴う軟骨の磨耗により膝関節の炎症・変形が引き起こされる変形性膝関節症は超高齢社会を迎えた我が国における最重要課題の一つである。現在は人工関節への置換が広く行われ、本邦の市場規模は 1000 億円にも上るが、約 9 割を海外に依存しているのが現状である。人工関節は、置換手術後の QOL の低下や 10 年～20 年で再置換の手術が必要となるなどの問題がある。本研究の目標は、人工関節に替わる自律再生軟骨の開発であり、これにより海外品シェアを国産再生組織製品に移行でき、大きな社会・経済効果が期待される。組織再生を目指した細胞移植において、一般に細胞は細胞足場材料とともに患部へ移植されるが、細胞足場材料に求められる機能は対象とする組織により異なる。関節軟骨においては、高い治療効果を得るために線維軟骨化を抑制し、耐摩耗性に優れた本来の硝子軟骨として修復・再生させることが重要であり、細胞の分化状態の制御・維持機能が求められる。さらに、膝関節軟骨では移植部位に対して常に大きな負荷がかかるため、十分な力学的強度も必要とされる。

申請者らは天然由来多糖のキトサン (CHI) と生体適合性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) からなる化学架橋ネットワークと自己会合性ペプチド RADA16 (Ac-RADARADARADARADA-CONH<sub>2</sub>) からなる物理架橋ネットワークにより構造化した、相互侵入高分子網目 (IPN) 型ゲルを開発した。化学架橋ネットワークが十分な力学的強度を、物理架橋ネットワークが細胞外マトリックスの構造を模倣することで播種された細胞の高機能化に寄与する。CHI/PEG/RADA16 IPN ゲル内に軟骨細胞を播種し培養すると、CHI/PEG ゲルや軟骨移植用足場材料として臨床応用されているアテロコラーゲンゲルと比べて高いグリコサミノグリカン (GAG) 産生と細胞増殖性を示した。さらに、ヒト軟骨細胞を IPN ゲルとともにマウスへ移植すると、炎症反応はほとんどみられず、アテロコラーゲンゲルと比較してより良好な GAG などの軟骨基質の蓄積がみられ、本 IPN ゲルの軟骨再生用足場材料としての有効性が示された。

一方、近年、再生医療における細胞ソースとして体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞が注目を集めている。間葉系幹細胞は患者本人の骨髄液や脂肪組織などから低侵襲に採取し生体外で増幅することができる。間葉系幹細胞は軟骨や骨、脂肪、心筋など間葉系に属する種々の細胞に分化することができ、軟骨再生においては軟骨底部の骨組織との連続的な再生も可能になると期待される。間葉系幹細胞を用いた組織再生は広く検討されているが、軟骨に関しては硝子軟骨への選択的分化手法が未だ確立されておらず、膝関節軟骨再生の大きな障壁となっていた。

### (2) 目的

成熟軟骨細胞の優れた足場材料である CHI/PEG/RADA16 IPN ゲルは間葉系幹細胞からの軟骨再生における足場材料としても有効であると考えた。本研究では、IPN ゲルを用いた間葉系幹細胞による軟骨再生法の開発を目指す。まず、IPN ゲル内における間葉系幹細胞の軟骨分化挙動を解析し、IPN ゲル中で間葉系幹細胞から誘導された軟骨組織の評価を行う。さらに、IPN ゲル内における間葉系幹細胞の軟骨分化機序を明らかにするとともに、IPN ゲルへの軟骨分化誘導因子の担持や分解ドメインの導入による分解性の付与など IPN ゲルの高機能化とそれが軟骨分化に与える影響について評価し、臨床利用可能な関節軟骨再生足場材料の開発へと展開する。

## 2. 研究の計画

### (1) IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨組織の評価

これまでの軟骨マーカー遺伝子発現解析より、IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨は硝子軟骨と推測される。凍結切片の免疫化学染色により、その組織構造と軟骨基質の蓄積について評価する。具体的には軟骨分化誘導後のゲルより薄切片を作製し、

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色より組織構造について評価するとともに、アルシアンブルー染色によりグリコサミノグリカンを、免疫染色により I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンをそれぞれ検出する。また、間葉系幹細胞から軟骨への分化に伴う軟骨基質の産生により IPN ゲルの力学特性が変化すると推測される。そこでレオメーターを用いて軟骨分化に伴う弾性率の変化についても解析する。

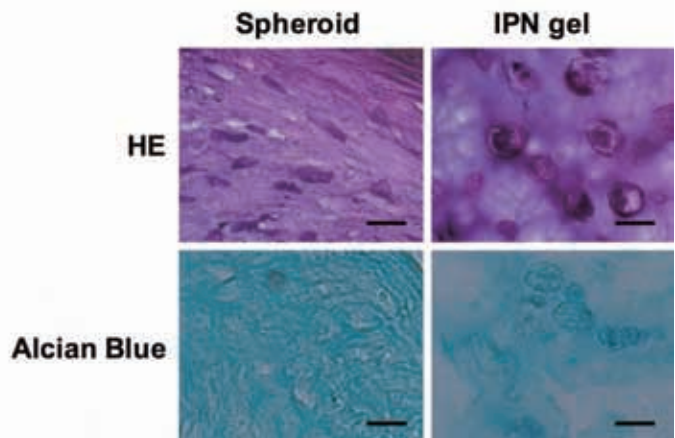
(2) 脂肪組織由来間葉系幹細胞の軟骨分化特性の解析

間葉系幹細胞は骨髄のみならず脂肪組織中にも存在し、低侵襲かつ大量に採取可能であることから、脂肪組織由来間葉系幹細胞は移植用間葉系幹細胞ソースとして重要である。一方で間葉系幹細胞はその由来により分化特性が異なることも報告されている。そこで、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いて IPN ゲル中での軟骨分化について、軟骨分化マーカー遺伝子の発現解析とグリコサミノグリカン産生の定量により評価し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞との比較を行う。

### 3. 研究の成果

(1) IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨組織の評価

遺伝子発現解析より、IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨は硝子軟骨と推測されていた。本年は化学染色によりその組織構造と軟骨基質の蓄積について評価を行なった。軟骨分化誘導後のゲルより薄切片を作製し、HE 染色より組織構造について評価するとともに、アルシアンブルー染色によりグリコサミノグリカンを検出した。結果、スフェロイドによる軟骨組織が線維軟骨様の構造であったのに対し、IPN ゲル中において軟骨小腔様の構造と周囲への GAG や II 型コラーゲンなど軟骨基質の蓄積が観察された (図 1)。以上より、IPN ゲル中において間葉系幹細胞より誘導された軟骨組織は関節軟骨本来の硝子軟骨でと考えられ、スフェロイド培養に対する優位性が示された。



(2) 分解性 IPN ゲルの作製と軟骨細胞への効果

IPN ゲルは軟骨再生に伴って分解・吸収され、最終的には間葉系幹細胞より分化した軟骨細胞によって産生された軟骨基質と完全に置換されることが望ましい。本年は、分解ドメインとして乳酸を導入した PEG (図 2A) を合成し、それより IPN ゲルを作製した。ゲル単体での評価において非分解性ゲルと比較して大きな重量減少が見られ、分解ドメインの導入の効果が確認された (図 2B)。

図 1 軟骨分化培地にて 30 日培養後のスフェロイド培養および IPN ゲルの HE 染色組織学的像。スケールバー：20μm

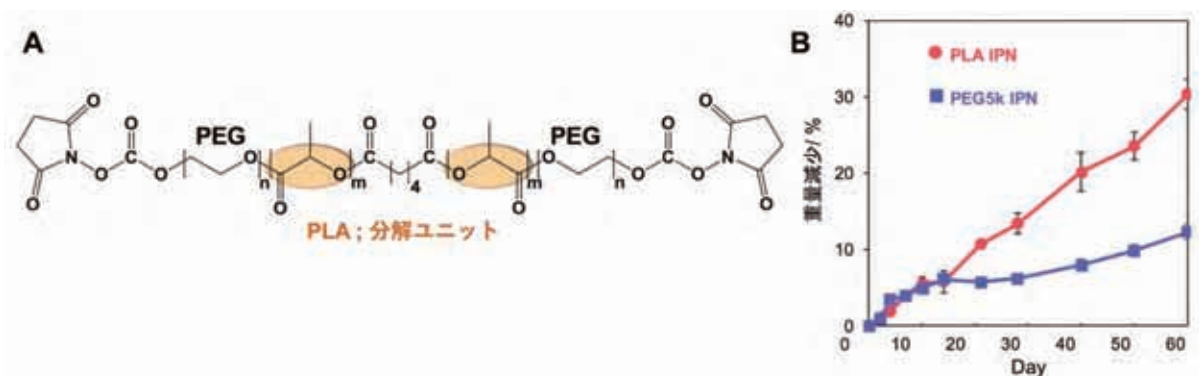


図 2 (A)ポリ乳酸 (PLA) 分解ユニットを導入した PEG の化学構造, (B) PEG および分解ユニット導入 PEG を用いて作製した IPN ゲルの分解挙動

### (3) IPN ゲル中への分化誘導因子の担持

IPN ゲル中にインスリン様成長因子 (IGF-1) や線維芽細胞増殖因子 (FGF)、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) など軟骨分化誘導に関連する増殖因子を安定に担持させることで、培地中への添加と比較してより高効率に軟骨への分化を誘導することができると期待される。本年はゲル形成時に混合する方法にて IPN ゲル中への IGF-1 の担持を検討し、IPN ゲルおよび分解性 IPN ゲル中に IGF-1 が担持されること、ゲルの分解に伴って放出されることが明らかとなった (図 3)。

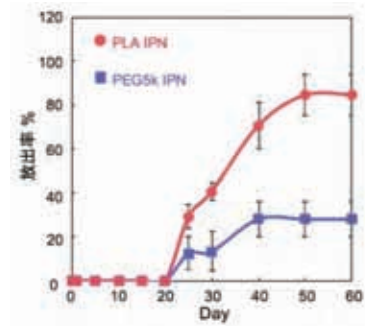


図 3 PEG および分解ユニット導入 PEG を用いて作製した IPN ゲルからの IGF-1 の放出挙動

### (4) 分解性の付与と分化誘導因子の担持が関節軟骨細胞へ与える影響の解析

(2), (3) で示したゲルへの分解性の付与と IGF-1 の担持について、予備検討としてウシ関節軟骨細胞への影響を解析した。IGF-1 担持 IPN ゲル中においてグリコサミノグリカン (GAG) 産生の向上がみられ (図 4)、IGF-1 の担持およびゲル内細胞への効果が示された。

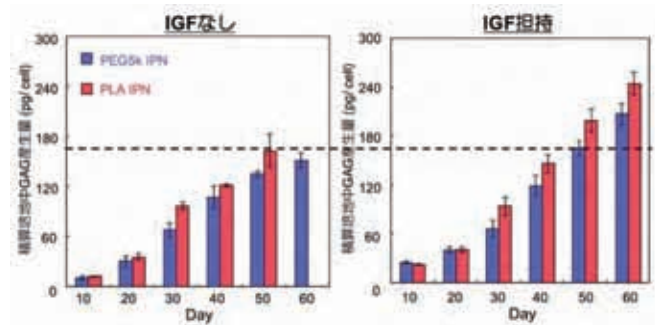


図 4 PEG および分解ユニット導入 PEG を用いて作製した IPN ゲルからの IGF-1 の放出挙動

## 4. 研究の反省・考察

IPN ゲル中において間葉系幹細胞から誘導された軟骨が組織構造的にも硝子軟骨であることが確認され、さらに PEG への分解性ユニットの導入によるゲルへの分解性付与や IGF 担持など IPN ゲルの高機能化についての実証を進めており、本研究は当初の研究計画を上回るペースで進捗している。一方、間葉系幹細胞の由来による軟骨分化能の評価のための脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた検討については、今後、分解性ゲルと分化誘導因子の担持が間葉系幹細胞からの軟骨誘導に与える影響を明らかにすることで、硝子軟骨再生足場としての IPN ゲルの有効性を示すことができる。さらに、医学部との共同研究により移植臨床実験に着手しており、IPN ゲルを用いた軟骨再生の実用化に向けた研究体制が整いつつある (長崎大学医学部、東京大学医学部)。本研究の継続により、臨床利用可能な関節軟骨再生足場材料の開発が期待される。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ①Ishikawa S, Iijima K, Sasaki K, Kawabe M, Otsuka H, Improvement of hepatic functions by spheroids coculture with fibroblasts in 3D silica nonwoven fabrics, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, in press.
- ②Daisuke Matsukuma, Taketomo Sambai, Hidenori Otsuka. UCST-type phase transition driven by protein-derived polypeptide employing gelatin and chitosan. *Polymer. Adv. Technol.* Volume28, Issue12, December 2017, Pages 1636-1641.
- ③飯島一智, 鈴木彩未, 橋詰峰雄, 多糖と支持基材からなる膨潤性と高い操作性を併せ持つ複合フィルムの作製, *高分子論文集*, **75**, 195-202 (2018).
- ④Iijima K, Iizuka A, Suzuki R, Ueno-Yokohata H, Kiyokawa N, Hashizume M, Effect of protein adsorption layers and solution treatments on hydroxyapatite deposition on polystyrene plate surfaces in simulated body fluids, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **28**, 193 (10 pages) (2017).
- ⑤Iijima K, Tsuji Y, Kuriki I, Kakimoto A, Nikaido Y, Ninomiya R, Iyoda T, Fukai F, Hashizume M, Control of cell adhesion and proliferation utilizing polysaccharide composite film scaffolds, *Colloids. Surf. B*, **160**, 228-237 (2017).
- ⑥Iijima K, Kimura T, Sato R, Takahashi T, Hashizume M, Kinetic analysis of molecular permeabilities of free-standing polysaccharide composite films, *Macromol. Chem.*

*Phys.*, **218**, 1600391 (2017).

(2) 口頭発表

- ① Iijima K, Ishikawa S, Matsukuma D, Hashizume M, Otsuka H, Regeneration of hyaline cartilage from mesenchymal stem cells in interpenetrating polymer network gels consisting of chitosan, polyethylene glycol and peptides, 第27回日本MRS年次大会, 横浜市開港記念会館他, Dec. 2017
- ② 石川昇平, 飯島一智, 松隈大輔, 橋詰峰雄, 飯島道弘, 大塚英典, ペプチド繊維と糖鎖から形成される相互侵入高分子網目 (IPN) ゲルへの生分解性付与と組織再生足への応用, 第68回コロイド・界面化学討論会, 神戸大学鶴亀キャンパス, Sep. 2017
- ③ 石川昇平, 飯島一智, 松隈大輔, 橋詰峰雄, 飯島道弘, 大塚英典, ペプチドと糖鎖からなる再生組織置換型生分解性インジェクタブルゲルの創製, 第66回高分子討論会, 愛媛大学城北キャンパス, Sep. 2017
- ④ Ishikawa S, Iijima K, Matsukuma D, Hashizume M, Iijima M, Otsuka H, Fabrication of biodegradable and injectable IPN hydrogel consisting of self-assembling peptide and chitosan, 日本化学会第97春季年会, 日本大学船橋キャンパス, Mar. 2018

(3) 出版物

- ① 飯島一智, 橋詰峰雄, 第25章 “タンパク質含有多糖複合フィルムの作製とその保持能の評価”, in “ドラッグデリバリーシステム”, CMC出版, in press
- ② Ishikawa S, Iijima K, Yahagi Y, Otsuka H, (Ed. Rosa S), Chapter 3 “Fabrication of Stimuli-Triggered Polypeptide-Based Hybrid Biomaterials for Biomedical Application” pp.77-108 in “Advances in Chemistry Research, Volume 45”, Nova Science Publishers, U.S.A. (2018)
- ③ Ishikawa S, Iijima K, Otsuka H, (Ed. Taylor JC) Chapter 17 “Nanofabrication Technologies for Controlled Cell Tissue Engineering and Bioapplication”, pp. 385-409 in Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications, Elsevier Ltd. (2017)

学 校 名	東 洋 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	無細胞マイクロ生体モデルを用いたナノ薬剤の血管透過性解析		研究分野	工 学
キ ー ワ ー ド	①マイクロ流体デバイス ②ナノ薬剤 ③血管			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐々木直樹	理 工 学 部	准 教 授	研究代表者 総括 実験・データ整理・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐藤香枝	日 本 女 子 大 学 理 学 部	教 授	実験・データ整理・論文作成



# 無細胞マイクロ生体モデルを用いたナノ薬剤の血管透過性解析

## 1. 研究の目的

厚生労働省の平成 28 年人口動態統計によれば、日本人の死因の第 1 位はがん（悪性新生物）であり、全体の 28.5%を占める。かつては結核や脳卒中が第 1 位であったが、医療の発展に伴い、これらの病気で亡くなる人が減ったため、結果としてがんで亡くなる人が増えていると考えられている。従って、さらなる長寿健康社会を実現するには、従来法に比べて優れたがんの診断・治療法を開発し、超早期診断や低侵襲治療へと展開していく必要がある。

これまでのがんの診断・治療では、主に低分子の薬剤を血管に投与するため、これらが体内の腫瘍組織のみならず正常組織においても血管外に漏出する。このため、造影剤で患部を効果的に造影できない、或いは抗腫瘍剤が正常組織を攻撃し重篤な副作用が避けられない、などの問題が起こる。これを解決するために、ナノメートルサイズの粒子に薬物を封入した「ナノ薬剤」を血管に投与し、患部にピンポイントに送り届け薬効を発揮させる技術が盛んに研究されている。

ナノ薬剤を用いた患部選択的な薬物送達の原理は、Enhanced permeability and retention effect (EPR 効果)として知られている。すなわち、がん周囲の腫瘍血管は正常血管に比べて血管壁の構造が疎であり物質透過性が高い。よって、ナノ薬剤は正常血管からは漏出せず、腫瘍血管からのみ効果的に漏出すると考えられている。従って、このような血管透過性を調べる技術は、有効なナノ薬剤の設計・開発に不可欠である。

これまでのナノ薬剤開発では、培養細胞や実験動物を用いてその効果を検証していた。しかし、培養皿などセンチメートルサイズの空間で静置培養される細胞は、マイクロメートルサイズの空間で血流にさらされている血管の細胞と環境が大きく異なる。また実験動物はブラックボックスであり、一般に体内の深部で起こるナノ薬剤の血管からの漏出を観察できず、薬剤が集積したか否かの結果でしか判断できない。加えて、ナノ薬剤が透過する血管壁の孔は形状・サイズが不均一であり、これらの物理的パラメータが透過性に与える影響を評価できない。すなわち、ナノ薬剤の血管透過性を精密評価する方法は現在のところ存在しない。

研究代表者は微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイスを用い、細胞を組み込んだ新たな血管モデルを構築すると共に (Electrophoresis, 33, 1729 (2012); PLOS ONE, 10, e0137301 (2015))、細胞を用いずに構築した擬似血管構造からのナノ粒子の漏出を評価してきた (Proc. MicroTAS 2013, 1818 (2013); Anal. Biochem., 458, 72 (2014))。細胞を用いないことで、血管壁の孔のサイズを始めとする物理的パラメータが透過性に与える影響を評価可能となる。そこで、これらの研究を更に推し進めることで、現在は不明であるナノ薬剤の血管透過性を生体外で明らかにするための新たな実験系が構築できると考えた。

## 2. 研究の計画

本研究ではマイクロ流体デバイスを用い、ナノ薬剤の血管透過性を評価するための無細胞生体モデルを開発する。マイクロメートルサイズの流路内に腫瘍血管構造を再現し、血流を模擬する流れの存在下でナノ薬剤に見立てた蛍光標識ナノ粒子の透過性を評価する。

昨年度までの経過を踏まえ、本年度は以下の 2 点を検討することとした。

### (1) 間質の弾性率を考慮したデバイスの作製

血管内皮細胞の足場となる間質の弾性率がナノ薬剤の血管透過性に与える影響を調べるために、弾性率の異なる間質模擬物質をデバイスに組み込む。ゲルに架橋剤を加えたものを用い、架橋度によって弾性率を制御する。対照実験においては、内皮細胞が間質模擬物質に接触した状態で培養するためにデバイスの形状を工夫し、そこに内皮細胞を導入して培養する。

### (2) 弾性率制御下でのナノ粒子透過試験

上で作製したデバイスを用いナノ粒子透過試験を行う。

### 3. 研究の成果

#### (1) 間質の弾性率を考慮したデバイスの作製

弾性率を制御可能な間質模擬物質として、ゲニピン架橋コラーゲンを選定した。コラーゲンは間質の主成分であり、その溶液を生理的温度に保つとゲル化する。ゲルの弾性率はコラーゲン濃度を変えることで制御できるが、ゲルの網目構造のサイズが変わってナノ粒子の透過性も変化するため、弾性率の影響のみを評価できない。そこで本研究では架橋剤の一種であるゲニピンでコラーゲンを架橋することで、架橋度によって弾性率を制御可能な系の構築を目指した。

デバイスの鑄型はアクリル板をレーザー加工機で加工して作製した。これをポリジメチルシロキサン (PDMS) でかたどりして、流路パターンをもつ基板を作製した。この基板を別のパターンをもたない基板と接合し、流路の一部に孔径 3  $\mu\text{m}$  の多孔膜を、流路を区切るように挟み込むことで、疑似血管および疑似間質となるマイクロ流路を有するマイクロ流体デバイスを作製した。これを 3°C に設定した温調プレートに置き、疑似間質側の流路に 8 mM ゲニピン/0.5 % ペプシン可溶化コラーゲン溶液を注入した。これを 37°C で 1 時間インキュベートして溶液をゲル化させた。インキュベート後のデバイスを顕微鏡で観察したところ、ゲルが疑似間質側の流路にのみ形成されていること、および後述のナノ粒子透過試験の際にゲルが流路内に安定して保持されていたことから、ゲニピン架橋コラーゲンのデバイスへの組み込みに成功したと結論付けた。

内皮細胞が間質模擬物質に接触した状態で培養するためのデバイスには、デバイスの材料として間質模擬物質であるゼラチン (コラーゲンの熱変性物質) を用いた。ゼラチンは培養温度である 37°C ではゲル化しないため、トランスグルタミナーゼで架橋した。ゼラチンの流路は型取り法で作製した。PDMS の加工と異なり流路の導入孔を後から開けることは困難なため、あらかじめ導入部となる PTFE のチューブを流路の鑄型の両端に立てた状態でゼラチンを流し入れた。ゲル化したゼラチンデバイスをカバーガラスと貼り合わせ、PTFE のチューブとシリンジポンプと接続し、送液培養可能な流路とした。流路に培地を送液したところ、PTFE チューブの配管部やカバーガラスとの貼り合わせ部から培地が漏れることなく、PDMS のデバイスと同様の流量で送液できることが示された。このデバイス中に血管内皮細胞を導入したところ、流路にコンフルエントに近い状態で細胞を培養でき、間質模擬物質に細胞が接触した状態での培養が可能なデバイス作製に成功したと結論付けた。

#### (2) 弾性率制御下でのナノ粒子透過試験

デバイスの疑似血管側の流路に、異なる分子量の蛍光標識デキストラン溶液を送液し、ゲルへ透過する様子を蛍光顕微鏡で一定時間ごとに撮影し、蛍光強度から透過量を求めた。透過量は時間と共に増加し、かつ分子量が小さいほど多くなった。これは分子量が大きいほどゲルの網目を透過しにくくなるためと考えられる。透過量の経時変化から透過係数を算出したところ、分子量から求まる流体力学半径と高い相関を示し、粒子のサイズが透過性に与える影響を定量評価できた。一方、血管内皮細胞を培養した系では、細胞を一定の密度で培養できたものの、流路全体に隙間なく培養された状態ではなかったため、ナノ粒子透過試験に応用するにはデバイス形状等の更なる工夫が必要であると結論付けた。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) 間質の弾性率を考慮したデバイスの作製

本研究ではコラーゲン濃度 0.5% の条件で主に実験を行ったが、生体内の腫瘍間質のコラーゲン濃度は、腫瘍の種類によってはさらに高いことが報告されている。今後は弾性率のみならず、より高いコラーゲン濃度での検討も進めることで、包括的な知見を得る必要があると考えられる。

#### (2) 弾性率制御下でのナノ薬剤透過試験

本研究では主にサイズの影響の評価にとどまったが、これ以外の種々の実験条件の影響を検討することで、腫瘍に到達しやすいナノ薬剤の条件が明らかとなり、より効果的なナノ DDS によるがん治療が可能になると考えられる。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

なし

### (2) 口頭発表

- ① 佐々木直樹、ナノ薬剤開発のための無細胞マイクロ血管モデル、第27回日本MRS年次大会、横浜市開港記念会館、2017年12月.
- ② Yumi MORIYA, Miki ODANAKA, Naoki SASAKI, “Simulation of nanoparticle extravasation using an easy-to-observe membrane-integrated microfluidic device”, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), Savannah, USA, 2017. 10.
- ③ 守谷侑美、小田中美希、佐々木直樹、“マイクロ流体デバイスと疑似血液を用いるナノ粒子の血管透過性評価”、第7回CSJ化学フェスタ2017、タワーホール船堀、2017年10月.
- ④ 守谷侑美、小田中美希、佐々木直樹、“無細胞血管-間質マイクロモデルを用いるナノ粒子の透過性評価”、化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会、桐生市民文化会館、2017年10月.
- ⑤ 守谷侑美、小田中美希、佐々木直樹、“マイクロ流体デバイスとヒト全血を用いたナノ粒子の血管透過性評価”、日本分析化学会第66年会、東京理科大学葛飾キャンパス、2017年9月.
- ⑥ Yumi MORIYA, Miki ODANAKA, Naoki SASAKI, “Evaluation of vascular permeation of nanoparticles by using a membrane-integrated microfluidic device”, RSC Tokyo International Conference 2017, Makuhari, JAPAN, 2017. 09.

### (3) 出版物

- ① 佐々木直樹、生体に「まねぶ」バイオ分析、工業技術(東洋大学工業技術研究所報告), 40, 22-26 (2018).

学 校 名	愛 知 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	高機能形状記憶材料の開発とスマート素子への応用		研 究 分 野	工 学
キ ー ワ ー ド	①形状記憶合金 ②傾斜機能材料 ③粉末冶金 ④塑性加工 ⑤不動態皮膜 ⑥腐食疲労 ⑦窒素イオン注入 ⑧超音波ショットピーニング			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
松 井 良 介	工 学 部	准 教 授	総括、実験・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
武 田 亘 平	工 学 部	講 師	実験・データ整理・論文作成
服 部 兼 久	東 洋 製 鋼 株 式 会 社	部 長	実験・データ整理・論文作成
半 田 充	東 洋 製 鋼 株 式 会 社	課 長	実験・データ整理・論文作成

# 高機能形状記憶材料の開発とスマート素子への応用

## 1. 研究の目的

形状記憶合金 (shape memory alloy、以下 SMA) は大きな変形が加熱または除荷のみで元の形状を回復する特徴を持つ。これまでに様々な合金系で形状記憶特性の発現が見出されているものの、広く実用化されている合金系が TiNi 系である。しかし TiNi SMA においても応用は発展途上にあり、普及を妨げる主な原因は機能特性を十分に生かすことができない点にある。例えば医療用ガイドワイヤは、外科手術の際、様々な曲率を持つ血管に沿ってカテーテルを案内する役割を持つものであり、形状記憶合金の機能特性を発揮できる用途である。しかし、先端を軟らかく、他端を硬くすることが要求されるため積極的な実用化はなされておらず、それぞれの部位に応じて材料を選択し、これらを複雑に組み合わせて製造されたものが現状の主流である。さらに、ステント等の医療デバイスに用いる場合には Ni イオンの溶出や腐食疲労強度も懸念材料となる。

### (1) 傾斜機能 TiNi 形状記憶合金の開発と応用

以上の現状を踏まえ、本研究者らは、曲げ剛性が長手方向に徐々に変化する傾斜機能 TiNi SMA ワイヤをその製造方法とともに考案した。この材料は、材料中で変態温度 (または曲げ剛性) が徐々に変化する特徴を有しており、医療用ガイドワイヤに要求される変形特性を満足できる。さらに、自己ストローク制御式アクチュエータも実現できる。自己ストローク制御式アクチュエータは傾斜機能 SMA をばね形状に成形したもので、ばね全体を加熱で形状回復する形状記憶効果を発現するように設定し、形状回復温度 (変態温度) を傾斜化させることで温度に応じたストロークに自ら形状変化する、温度センサ機能を備えた全く新しいアクチュエータである。この製造のために本研究者らは粉末冶金プロセスと塑性加工を組み合わせる方法を既に提案しているが、粉末冶金と塑性加工を組み合わせる方法で作製した SMA について微視組織や変態・変形特性を詳細に明らかにした結果は報告されていない。

本研究者らがこれまでに提案してきている新規プロセスで得られた傾斜機能 TiNi SMA ワイヤについて、自己ストローク制御式アクチュエータや医療用ガイドワイヤに必要な、長手方向に変形抵抗 (ひずみ分布) の傾斜機能特性を有する TiNi 形状記憶合金の微視組織、変態・変形特性を解明することを目的とする。

### (2) 高耐食性 TiNi 形状記憶合金の開発

本研究では、耐食性および腐食疲労寿命を生体材料である純 Ti や Co-Cr 合金同等以上に引き上げるべく、純窒素ガス雰囲気下での熱処理 (熱窒化処理、thermal nitridation process、以下 TN 処理) によって生成される皮膜の耐食性および腐食疲労特性への効果検証に取り組む。これまでの研究で、表面性状が良好である (表面粗さが小さい) ほど均質な皮膜を生成できることを示唆する結果が得られており、系統的な実験からこのメカニズムを明らかにする。TiNi SMA において TN 処理の耐食性および曲げモードにおける腐食疲労寿命向上への効果を明らかにし、TiNi SMA を用いた血管内治療デバイスの長寿命化に向けた指針を示すことを目的とする。

## 2. 研究の計画

### (1) 傾斜機能 TiNi 形状記憶合金の開発と応用

TiNi SMA ビレットはガスアトマイズ Ti 粉末とカルボニル Ni 粉末から成る混合粉末を焼結して作製した。まず、合金化後に Ti-49.8at%Ni から Ti-51.0at%Ni の組成比となるよう各粉末を秤量・混合し、混合粉末を黒鉛型に積層・充填した。これに真空環境下でパルス通電加圧焼結を施すことによって焼結体を作製した。この TiNi SMA の Ni 濃度は材料の一端では 49.8at% であり、他端では 51.0 at% に設定し、その間は 0.2 at% ごとに段階的に変化させてある。この後 Ti と Ni の相互拡散を促すための溶体化処理を 1273 K で 43.2 ks 施し、高さ約 29 mm の TiNi SMA 焼結体を得た。その後、焼結体の軸方向に沿ってワイヤ放電加工にて幅 5 mm、厚さ 1 mm のビレットに切り出した。ワイヤ放電加工後には材料に酸化物が付着し、さらに表面の凹凸

が大きくなるため、1000番の軸付砥石で表面研磨を施した。また、熱間圧延時には加熱したピレットの急激な温度低下を防ぐため、ピレットケース内にピレットを挿入し、加工温度に設定した電気炉内で共に加熱した。加熱温度は1073 Kに設定し、酸化皮膜の生成を防ぐためAr雰囲気中で加熱した。加熱時間は1回の圧延につき1.5 ksとし、熱間圧延は圧下率を変更して2回行った。また圧延時に生じるスプリングバックを考慮した最終的な圧下率(厚さの減少割合)は熱間および冷間圧延についてそれぞれ $5\pm 2\%$ および $10\pm 2\%$ とした。本研究ではこの方法で作製したTiNi SMAについて、デジタル画像相関法(digital image correlation method、以下DIC)によって引張変形中のひずみ分布を測定して局所ひずみの傾斜機能特性を明らかにした。除荷後は試験片を逆変態終了温度以上まで加熱し、非回復ひずみを調べた。

#### (2) 高耐食性 TiNi 形状記憶合金の開発

供試材として株式会社古河テクノマテリアル製のTiNi SMA線材(Ti-49.7at%Ni、直径0.7 mm)を用いた。この線材に研磨を行い、TN処理を施して窒化物皮膜を生成した。TN処理は673 Kを3.6 ks保持し、炉冷する条件で行った。各材料の耐食性を評価するために、アノード分極試験を行った。対極にはPtを用い、電解液には3% NaCl水溶液を使用した。掃引速度は10 mV/minとし、電流密度が $10^{-3}$  mA/cm<sup>2</sup>を示す電位を腐食開始電位とした。

### 3. 研究の成果

#### (1) 傾斜機能 TiNi 形状記憶合金の開発と応用

熱間および冷間圧延を施した傾斜機能TiNi SMA帯板材について、DICを用いて応力-ひずみ曲線を求めた。その結果、負荷過程ではNi濃度が低い位置において局所ひずみが優先的に大きくなることが明らかとなり、変形抵抗の傾斜機能化を確認することができた。

次に、Ni濃度の違いに伴う局所的な変形特性を明らかにするために、50.2および50.6 at%のNi濃度に対応する位置における応力-局所ひずみ曲線を調べた。その結果、Ni濃度が50.2 at%に対応する位置においては局所ひずみの最大値が約5.3%であり、除荷後の加熱においても3.1%のひずみが残留することがわかった。一方で、50.6 at%に対応する位置においては局所ひずみの最大値が4.3%であり、除荷後の加熱でほとんどのひずみが消滅した。これはNi濃度の違いによる逆変態終了温度の違いによるものである。以上のように、Ni濃度の違いに伴う非回復ひずみの変化は、一般的な溶製材のTiNi 形状記憶合金と同様に、Ni濃度が比較的高い位置では部分超弾性が現れ、低い位置では形状記憶効果が現れることに起因していると考えている。

#### (2) 高耐食性 TiNi 形状記憶合金の開発

各材料のアノード分極曲線から、TN材では未処理材に対して分極曲線が貴方向にシフトしており、腐食開始電位が高いことを明らかにした。これは、TN処理によって生成した皮膜の耐食性への効果が認められることを示している。TN処理を施した試験片では材料表面に窒化物層が生成され、これが不動態皮膜として働き耐食性が大きく向上したと考えられるが、今後詳細な検討が必要である。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) 傾斜機能 TiNi 形状記憶合金の開発と応用

当初の狙い通り、本提案プロセスで作製したTiNi SMAは変形抵抗(局所ひずみ)の傾斜機能化を有することを明らかにすることができた。しかしながら局所ひずみ分布に揺らぎが認められ、この原因は微視的なNi濃度のばらつきによるものと考えている。従い、今後は微視的な領域での成分分析などを行ってこの点を明らかにする必要がある。

#### (2) 高耐食性 TiNi 形状記憶合金の開発

本研究によって、TN処理がTiNi SMA表面に不動態皮膜を生成することを明らかにすることができた。そこで今後は腐食環境下での疲労試験を行い、腐食疲労特性に対するTN処理の効果を明らかにする必要がある。

### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Matsui, R., Takeda, K., Tobushi, H. and Pieczyska, E. A., Mechanical Properties and Advanced Subjects in Shape-Memory Alloy and Polymer, *Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, Vol. 56, No. 2, pp. 447-456, DOI: 10.15632/jtam-pl.56.2.447.

(2) 口頭発表

- ① 山田和希、松井良介、不動態皮膜を生成させたTiNi形状記憶合金の腐食疲労寿命、日本機械学会M&M2017材料力学カンファレンス、北海道大学（北海道札幌市）、2017年10月  
② 山田和希、松井良介、熱窒化処理を施したTiNi形状記憶合金の腐食疲労特性、日本機械学会東海支部第67期総会・講演会、名古屋大学（愛知県名古屋市）、2018年3月  
③ 藤田裕介、松井良介、圧延加工を施したTiNi形状記憶合金焼結体の力学的特性、日本機械学会東海学生会第49回学生員卒業研究発表講演会、名古屋大学（愛知県名古屋市）、2018年3月  
④ 奥村雅斗、松井良介、窒化皮膜を生成したTiNi形状記憶合金の腐食疲労特性、日本機械学会東海学生会第49回学生員卒業研究発表講演会、名古屋大学（愛知県名古屋市）、2018年3月

(3) 出版物

なし