

学 校 名	獨 協 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	がんにおける自然免疫型T細胞の機能解明 －新規免疫療法を目指して－		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①iPS細胞 ②MAIT細胞 ③養子移入 ④抗がん活性 ⑤分化誘導 ⑥メラノーマ ⑦肺転移 ⑧生存期間		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
若 尾 宏	医 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
杉 本 智 恵	医 学 部	講 師	実験・論文作成

# がんにおける自然免疫型 T 細胞の機能解明 —新規免疫療法を目指して—

## 1. 研究の目的

- (1) MAIT 細胞は新規の自然免疫型 T 細胞であり、ヒトにおける最大の T 細胞亜集団を形成し、微生物・ウイルス感染、自己免疫疾患、生活習慣病、がん等において重要な機能を有すると考えられる。種々のがんにおいて MAIT 細胞は患者末梢血から消失し、がん浸潤リンパ球 (TIL) 中に多く存在する。しかし、がんにおける MAIT 細胞機能の詳細については未解明である。一方、実験動物モデルとして汎用されるマウスには MAIT 細胞は極微量にしか存在せず、マウスでの解析が困難であった。そこで、本研究ではがんにおける MAIT 細胞機能を解明し、新規の治療法を開発するため、
- ① マウス MAIT 細胞由来 iPS 細胞から分化誘導した MAIT 細胞を利用して「MAIT 細胞を豊富に持つ新規マウス」を構築する。
  - ② ①を利用してがんにおける MAIT 細胞機能を解明することを目的とした。

## 2. 研究の計画

- (1) マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) を用いた抗がん活性評価のための動物モデルの樹立
- ① マウス MAIT 細胞の iPS 細胞化  
移入細胞をレシピエントと区別するためコンジェニックマウス由来 MAIT 細胞から iPS 細胞を樹立する。具体的には Ly5.1 マウスから MAIT 細胞を単離し、センダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞化する。
  - ② iPS 細胞からの m-reMAIT 細胞分化誘導  
多能性細胞からの T 細胞系への標準分化誘導法に則り、m-reMAIT 細胞を分化誘導する。
  - ③ m-reMAIT 細胞の性状解析  
m-reMAIT 細胞を Ly5.2 マウスに移植し、移植細胞のレシピエントにおける生着臓器、細胞表面マーカー・サイトカイン産生能を明らかにする。
- (2) m-reMAIT 細胞養子移入による MAIT 細胞を豊富に持つ新規モデルマウスを用いた抗がん活性評価
- ① m-reMAIT 細胞養子移入によるメラノーマに対する抗がん活性評価

## 3. 研究の成果

- (1) Ly5.1 マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) の樹立
- ① マウス MAIT 細胞の iPS 細胞化

2018年の秋時点では本学における Ly5.1 マウスの繁殖の問題から、iPS 細胞化に必要な十分な MAIT 細胞を精製することができなかった。その後、繁殖の問題が解決され、マウスから MAIT 細胞を認識する試薬 (5-OP-RU loaded murine MR1-tetramer) を米国 NIH tetramer core facility (Atlanta 州) より供与を受け、広く T 細胞を認識する anti-マウス TCR  $\beta$  抗体と組み合わせることで、MAIT 細胞を染色・セルソーティングすることにより 95% 以上の純度で精製することができた。MAIT 細胞 (31,400 個) に山中因子をコードするセンダイウイルスベクターを感染させることで 36 個の iPS 細胞コロニーを得、以下の解析を行った。

iPS 細胞コロニーが MAIT 細胞から由来することの確認

得られたコロニーが MAIT 細胞から由来することを確認するため、PCR を用いて iPS 細胞が遺伝子再構成済み MAIT 細胞特有の T 細胞受容体 (TCR, V  $\alpha$  19-J  $\alpha$  33) を有するか確認した。

その結果、得られた36個のiPS細胞のうち、2個を除いたものがMAIT細胞由来であった。また、MAIT細胞TCRは $\alpha\beta$ 型であり、その $\beta$ 鎖使用はTCR $\beta$ 5, 6, 8に偏っていることが知られている。そこで本研究で得られたMAIT細胞由来iPS細胞のTCR $\beta$ 鎖をPCRによって解析したところ、TCR $\beta$ 5とTCR $\beta$ 8の2種類であることが判明した。さらこれらiPS細胞はマウス繊維芽細胞をフィーダーとして用いるとサイトカインleukemia inhibitory factor (LIF)の存在下で無限の増殖能を示した。これらiPS細胞が多能性(pluripotency)を有するか否かの証明はキメラマウスを産生する能力を測定する必要がある、現在鋭意、遂行中である。

## ② iPS細胞からのm-reMAIT細胞分化誘導

次にTCR $\beta$ 5とTCR $\beta$ 8を持つ代表的なLy5.1マウスMAIT細胞由来iPS細胞 (TCR $\alpha$ 鎖は共にV $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33)をOP9 (血液細胞の分化誘導に頻用されるフィーダー細胞)にNotch ligandであるDelta-like 1を強制発現させた細胞上(OP9/d1k1)に播種して、中胚葉・リンパ球幼若細胞を誘導した。リンパ球幼若細胞をサイトカイン(IL-7及びFlt3-ligand)の存在下で培養することによってLy5.1-m-reMAIT細胞を得た。iPS細胞を播種した時点から細胞数を測定すると、上記分化誘導によって1000倍以上の増幅が観察された。この時、Ly5.1-m-reMAIT細胞の純度はLy5.1で98%, 5-OP-RU-mMR1 Tetramer/TCR $\beta$ 染色で95%以上であった。

## ③ m-reMAIT細胞の性状解析

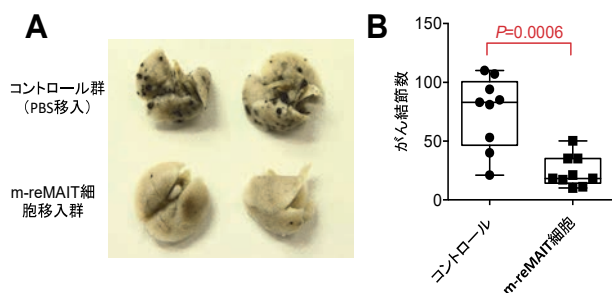
上記で得られたLy5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞がMAIT細胞のアゴニストである5-OP-RUによってin vitroで活性化されるかを検討した。抗原提示細胞としてB細胞腫瘍株にMAIT細胞への抗原提示を行うMR1を高発現させた細胞を用いた。その結果、Ly5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞は5-OP-RU濃度依存的に活性化され、CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>で定義される活性化のEC50は5 pM程度であることが判明した。また、抗原提示細胞を使用しない実験系でもLy5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞は5-OP-RUによって活性化された。Ly5.1 m-reMAIT細胞をLy5.2マウスに移植し、移植細胞のレシピエントにおける生着臓器、細胞表面マーカー・サイトカイン産生能を評価する実験は現在鋭意進行中である。

## (2) 新規モデルマウスを用いた抗がん活性評価

### ① m-reMAIT細胞養子移入によるメラノーマに対する抗がん活性評価

#### - メラノーマ肺転移抑制

in vivoにおけるLy5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞の抗がん活性を評価するため、メラノーマ移植によるがんの肺転移を解析した。予めマウス(Ly5.2)にLy5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞を腹腔内投与し、5日後にメラノーマ(B16F10)を尾静脈経由で移植する。移植後18日でマウスを安楽死させ、肺に転移したメラノーマの結節数を測定するものである。対照群としてLy5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞を移入せずにメラノーマを移植したものを用いた。その結果、Ly5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞を移入した群では対照群に比して有意に肺のがん結節数低下が観察された(図1)。この抗がん活性の細胞・分子機序を明らかにするため、メラノーマ移植/Ly5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞移入によっていかなる免疫細胞集団の数・割合が変動するのかを検討中である。



**図 1. m-reMAIT 細胞移入によるメラノーマ肺転移の抑制 :** m-reMAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞移入群) または PBS (コントロール群) 静注後、5 日後に B16 メラノーマを静注により移植した。メラノーマ移植後 18 日後に肺を摘出し、がん結節数を測定した。(A) 各群の代表的な肺。コントロール群には多数の黒色のがん結節が認められた。(B) 各群 9 匹ずつのマウスから得られた肺のがん結節数を顕微鏡下でカウントした (Mann-Whitney test による P 値=0.0006)。

#### - マウス生存期間延長

Ly5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞によるメラノーマ肺転移抑制能が担がんマウスの生存期間延長をもたらすか検討した。上記の系を用いて実験を行った。Ly5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞養子移入有無

にてがんを移植し、マウスの生存期間を測定した。この時、可能な限り動物に苦痛を与えないという人道的見地から、エンドポイントとして死亡のみならず、体重・体温・呼吸等マウスの健康状態を日々観察し、持続的低体温・体重減少・極度な衰弱・長期に渡る下痢等の極限症状が見られたらこの時点で死とみなしマウスを安楽死させた。実験の結果、Ly5.1<sup>+</sup>m-reMAIT細胞移入は担がんマウスの生存期間を有意に延長させることが判明した(図2)。

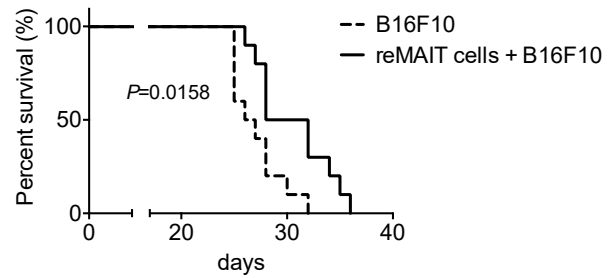


図 2. m-reMAIT 細胞移入による担がんマウス生存期間延長 (カプラン-メイヤー曲線): B16F10 メラノーマ移植マウス(破線)、m-reMAIT 細胞移入+メラノーマ移植マウス(実線)。P値は Log rank test による。

#### 4. 研究の反省・考察

##### (1) マウス iPS 細胞由来 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) を用いた抗がん活性評価のための動物モデルの樹立

###### ① マウスMAIT細胞のiPS細胞化

Ly5.1マウスを理研バイオリソースセンターから本学に導入し、繁殖させるのに1年半以上の時間がかかった。これは偏に本学の動物施設のハードの問題ではなく、Ly5.1マウスの特性によると考えられる。事実、産仔の数はしばしば2-3匹にとどまり、多い時で5匹程度、食殺もしばしば経験した。この繁殖力の弱さから、マウスMAIT細胞の精製に必要なマウス数を用意するのに相当の時間を費やした。しかし、一旦、Ly5.1<sup>+</sup>MAIT細胞が十分量精製できると以前行ったLy5.2マウス(通常、繁殖業者から購入できるマウス)からのMAIT細胞のiPS細胞化の経験が生かされ、問題なく、iPS細胞化が遂行できた。

###### ② iPS細胞からのm-reMAIT細胞分化誘導

Ly5.1<sup>+</sup>MAIT細胞由来iPS細胞からのm-reMAIT細胞への分化誘導もLy5.2<sup>+</sup>MAIT細胞由来iPS細胞からの分化誘導法に従って滞りなく、遂行できた。また、マウスMAIT細胞が使用しているTCRβ鎖の違い(Ly5.1m-reMAIT細胞のTCRはTCRβ5とTCRβ8であった)によるiPS細胞の分化能には差異がなかったことから、iPS細胞からの選択的分化誘導には遺伝子再構成済みTCRα鎖(Vα19-Jα33)が重要であることが改めて明らかになった。今後、TCRβ鎖による相違がm-reMAIT細胞の活性化、サイトカイン産生能等に影響を与えるのかを明らかにしたい。

##### (2) 新規モデルマウスを用いた抗がん活性評価

本研究は従来の研究用マウスでは解析不可能であったMAIT細胞のin vivo抗がん活性評価を新モデル構築によって可能とした。解析の結果、各種がん患者で見られるTILにおけるMAIT細胞の集積はこの細胞の抗がん活性を説明するものと解釈できる。しかし、ここで観察された抗がん活性が細胞傷害性T細胞に代表されるようにMAIT細胞がエフェクター細胞として直接がん細胞を殺傷することに起因するのか、あるいはMAIT細胞がレギュラトリー細胞として他の免疫細胞の活性・動態を制御することに起因するのかは今後の課題として残る。

###### ① m-reMAIT細胞養子移入によるメラノーマに対する抗がん活性評価

本研究の初年度で、m-reMAIT細胞のマウスへの養子移入によりメラノーマに対する肺転移阻害と担がんマウス(メラノーマ)の生存期間延長が確認できた。この詳細な分子・細胞機序解明は今後の研究に委ねられるが、本研究は従来の概念にはない、がん免疫細胞療法開発へ向けた第一歩を記すことができた。今後はメラノーマ以外の他のがん種にも

m-reMAIT細胞は有効であるのか、MAIT細胞アゴニストである5-OP-RU、他のMAIT細胞活性化方法（例えば、Toll-like ReceptorリガンドやIL-12/IL-18に代表される自然免疫型サイトカイン、ピシバニール・BCG等に代表される生菌）投与は抗がん活性に影響を及ぼすのか、を明らかにし、m-reMAIT細胞の応用範囲をさらに広げて行く。

## 5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

当該研究成果は喫緊に特許申請（本研究内容の特許性につき、既に弁理士と相談しており、特許性ありとの予備判断をいただいている）並びに論文投稿を予定しており、学会・講演など学外発表はその後となる予定である。

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 新 領 域 創 成 科 学 研 究 科	教 授	X線1分子計測(DXT)の実施
池 口 満 徳	横 浜 市 立 大 学 生 命 医 科 学 研 究 科	教 授	分子動力学(MD)計算の実施

# 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、水溶性タンパク質試料にて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、ポリグリニン化、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の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し、微小管の新しい小胞輸送機能の解明へ向けた基盤を築くことを目的とする。

## 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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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である一方で、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 分子計測による分子運動解析 (中山・佐々木・小川・池口)

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°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 Ni<sup>2+</sup> 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  $x$  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 Ni<sup>2+</sup>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分子動力学法(MD)による予測計算により isoform 間での理論的な動態変化予測を行ったところ、TUBA と TUBB の会合面におけるインターフェース領域中に存在する3つのアミノ酸残基の相違により、脳と肝臓由来の TUB 二量体間で分子運動度が変化するというシミュレーション結果が得られてきた。そこで各々の二量体について、インターフェース領域中に相違がみられるアミノ酸残基を置換した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  $\chi$  軸方向の分子運動が上昇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 のインターフェース領域中に 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、それらを構成する Tubulin 二量体のインターフェース領域中に存在する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、これらのアミノ酸配列に変異を加えた発現ベクターを構築し、培養細胞における微小管重合と小胞輸送動態に与える影響を明らかにすることを通して微小管の新しい小胞輸送機能の解明へ向けた研究を行っていく予定である。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ① Ogawa N, Yamamoto YY, Abe K, Sekiguchi H, Sasaki YC, Ishikawa A, Frydman J, Yohda M. “Time-Resolved Measurement of the ATP-Dependent Motion of the Group II Chaperonin by Diffracted Electron Tracking.” *Int J Mol Sci.* 2018 19(4). pii: E950. doi: 10.3390/ijms19040950.
- ② Sekiguchi H, Kuramochi M, Ikezaki K, Okamura Y, Yoshimura K, Matsubara K, Chang JW, Ohta N, Kubo T, Mio K, Suzuki Y, Chavas LMG, Sasaki YC. “Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions.” *Sci Rep.* 2018 8(1):17090. doi: 10.1038/s41598-018-35468-3.

##### (2) 口頭発表

- ① Nakayama T, Fukutomi T, Fujiwara T, Hamada H, Terao Y, Akagawa K. “Suppression of a neuron-specific positive regulator of the syntaxin 1A gene transcription causes unusual behavioral profile.” The 41<sup>st</sup> Ann Meeting of Japan Neuroscience Society 2018, 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

究極的な一次エネルギーが太陽光であり、光電変換技術や人工光合成技術が日に日に高まっているにも関わらず「光によるエネルギーキャリア (EC) 操作技術は未踏の域」である。EC の社会普及には、安全性や利便性、経済性や環境性能が要求される事を踏まえると、**光 EC 技術の基本駆動原理を明確化することが何よりも重要となる**。即ち、どのような EC 種がどのような光触媒により活性化できることを明らかにしつつ、熱には無い光の優位性を最大限利用する事が可能なシステムを構築する必要がある。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)。更に水素 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」することを発見した (*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 apH-3d 金属錯体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。

## 2. 研究の計画

### (1) 課題 1 : 光触媒の基本設計-活性種の光誘起発生- (主担当 : 張、松本)

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、 $\pi$ - $\pi^*$ 状態への励起に続く N-H( $\pi$ - $\sigma^*$ )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 $\cdot$ )」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、a) プロトン・電子プーリング配位子と、b) 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。

### (2) 課題 2 : 活性種の光発生効率の向上-励起状態の制御- (主担当 : 芳賀、片山、孫)

効率的な EC からの光脱水素には、高い光水素活性種 (例 : 水素ラジカル) 発生効率に加え、活性種と EC の選択的反応が必須である。よって、目的反応を阻害する励起状態からの輻射失活 (発光) や無輻射失活を抑制しつつ、活性種を発生する励起状態へ如何に高効率に励起するかが鍵となる。本年発表した報告 (*Nature Commun.*) では、アミノフェノール (光水素発生量子収率 ( $\Phi_{H_2}$ ) = 2.9%)、アミノフェノラート ( $\Phi_{H_2}$  = 3.7%) 及びその Fe(II)錯体 ( $\Phi_{H_2}$  = 4.8%、世界最高) の光 MeOH 脱水素触媒能を報告している。加えて申請者らは既に Fe(II)の代わりに、Mg(II), Mn(II), Co(II)を用いることで、それぞれ 7.8, 8.9, 4.8% の水素発生量子収率を実験により得ており、金属種の選択により量子収率が上昇することを確認している。また配位子への電子供与性

置換基の導入により、吸収極大が長波長シフトする事も実験で確認している。以上の知見を踏まえ、EC からの脱水素を引き起こす水素ラジカル・ヒドリド発生効率を向上すべく、金属種及び配位子骨格への電子供与基及び電子吸引基の導入効果を水素発生量(TON, TOF)や失活に通ずる輻射(発光)効率を測定し明らかにする(担当:芳賀)。また、これらの活性種が示す反応ダイナミクスを各種時間分解分光法により定量的に明らかにし(担当:片山・孫)高活性触媒の設計にフィードバックする。

### 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  $\text{TON}_{\text{H}_2}$  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<sub>2</sub> 類似のシグナルパターンを与えたものの、いずれも apH<sub>2</sub> よりわずかに低磁場側にシグナルを与えた。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<sub>2</sub> (2.0 mM) および MapH (M = Fe, Mn, Co, Mg, Zn) (1.0 mM) の MeOH 溶液に、紫外光 (289 ± 10 nm) 照射を行なったところ、apH<sub>2</sub> 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 1.1, 1.5, 0.7, 1.5, 1.0 当量の水素が発生し、Co を除く金属イオンの利用による発生量の増加が確認できた。

#### (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 apH 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<sub>2</sub>apH) の光水素発生量は、9.2 (5 h)、9.4 当量 (5 h) となり、いずれの場合も MnapH 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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。

#### (4) 金属中心のスピン状態が与える効果の解明

前述の様に、光反応中に apH の脱離と分解が副反応として進行することが実験的に示唆された。これは錯体中の高スピン型 Fe(II) の置換活性が影響していると考えられた。そこで本研究では、触媒の安定性並びに活性向上を目的に、強配位子場を与え得る補助配位子を用いた電子状態制御と光反応性に及ぼす効果について検討した。常磁性錯体種である Fe(II) 錯体に対しそれぞれ二当量の NBU<sub>3</sub>, PEt<sub>3</sub> および DMAP を添加した結果、MeOH-d<sub>4</sub> 中での 1H NMR スペクトルにおいて、補助配位子添加前には見られないブロードな芳香族プロトン由来のシグナルが現れた。一方、それぞれ二当量の tBuNC および AdNC を添加した錯体種においては、より先鋭化されたシグナルが確認され、反磁性錯体種の形成が示唆された。また、それぞれの錯体種の MeOH 溶液への光照射 (ex = 289 ± 10 nm) によりそれぞれ 1.1, 1.1, 0.8, 0.3, 1.3, および 0.3 当量の水素が発生し、発生量に差異が見られた。これらの結果は、補助配位子のドナー性の違いにより錯体の電子状態に影響を及ぼしていることを示し、補助配位子効果を考慮した錯体種の設計により触媒の活性および安定性を制御可能であることを示唆する結果である。

#### 4. 研究の反省・考察

これまでに我々が見いだした光レドックス活性錯体触媒を用いた MeOH の光脱水素化を実現すべく、1) 金属、2) 置換基及び、3) 金属中心のスピン状態の効果を実験的に明らかにし、高活性触媒化に向けた分子レベルの検証を行ってきた。その結果、これらの三因子がいずれも MeOH 脱水素化反応に影響する事を見いだすと共にその活性を定量的に示すことができた。一方、このような均一系にて得られた知見を不均一系へと展開する点においては今後迅速に遂行すべきと考える。本研究では本触媒を中低温での反応に応用すべく、シリカや MCM 表面のターミナル酸素、または担体への異種金属のドーピングにより固定化する。担体としては、(i)光透過性、(ii)熱的・機械的安定性、(iii)高い表面積、(iv)化学的安定性、(v)経済性に加え(vi)PRC の固定に必要な十分な量の固定化サイトが求められるため、メソポーラス担体を中心に最適化する。また HCHO の過剰酸化を化学因子の最適化により抑制しつつ、最適な担持法を探索する。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ① The Impact of Group-10 Metals on the Solvent-induced Disproportionation of o-Semiquinonato Complexes, S. Yamada, T. Matsumoto, H.-C. Chang, *Chem Eur. J.*, **2019**, *29*, 8268-8278.
- ② Direct Photochemical C-H Carboxylation of Aromatic Diamines with CO<sub>2</sub> under Electron-Donor- and Base-free Conditions, T. Matsumoto, D. Uchijyo, T. Koike, R. Namiki, H.-C. Chang, *Sci. Rep.*, **2018**, *8*, 14623.
- ③ Tuning Electron Acceptability of the [Mo<sub>6</sub>S<sub>8</sub>] Core by Decorating with Methyl Groups on Face-Bridging μ<sup>3</sup>-Sulfides, T. Matsumoto, R. Namiki, H.-C. Chang, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2018**, 3900-3904 (Front Cover).
- ④ Tuning the Mesomorphism and Redox-Response of Anionic Ligand-Based Mixed-Valent Ni(II) Complexes via Alkyl-Substituted Quaternary Ammonium Cations, Y. Nakamura, T. Matsumoto, Y. Sakazume, J. Murata, H.-C. Chang, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 7398-7409 (Inside Cover).
- ⑤ Bio-inspired Protonic Memristor Devices Based on Metal Complexes with Proton-Coupled Electron Transfer, Y. Hiruma, K. Yoshikawa, M. Haga, *Faraday Discussions*, **2019**, *213*, 99-113.
- ⑥ Humidity-controlled rectification switching in ruthenium-complex molecular junctions, H. Atesci, V. Kaliginedi, J. A. C. Gil, H. Ozawa, J. M. Thijssen, P. Broekmann, M. Haga and S. J. Molen, *Nature Nanotechnology*, **2018**, *13*, 117-121.
- ⑦ Robust Nanowrapping of Reduced Graphene Oxide by Metal-Organic Network Films between Fe Ions and Tetra(Catechol-Substituted) Porphyrin, H. Ozawa, S. Kusaba, M. Matsunaga, M. Haga, *Langmuir*, **2018**, *34*, 2952-2958.
- ⑧ Proton-Rocking-Chair-Type Redox Capacitors Based on Indium Tin Oxide Electrodes with Multilayer Films Containing Ru Complexes, K. Yoshikawa, D. Motoyama, Y. Hiruma, H. Ozawa, S. Nagano, M. Haga, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2018**, *10*,

26990-26700.

- ⑨Uncovering Photo-Excited Charge Carrier Dynamics in Hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Hidden in the Nanosecond Range by the Heterodyne Transient Grating Technique Combined with the Randomly Interleaved Pulse-Train Method, W. Y. Sohn, M. Inaba, T. Tokubuchi, J. E. Thorne, D. Wang, K. Katayama, *J. Phys. Chem. C*, **2019**, *123*, 6693-6700.
- ⑩Photoexcited charge carrier dynamics of interconnected TiO<sub>2</sub> nanoparticles: evidence of enhancement of charge separation at anatase-rutile particle interfaces, D. Shingai, Y. Ide, W. Y. Sohn, K. Katayama, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2018**, *20*, 3484-3489.
- ⑪Comparative study of photo-excited charge carrier dynamics of atomic layer deposited and solution-derived hematite films: Dependence of charge carrier kinetics on surface orientations, M. Inaba, J. E. Thorne, D. Wang, W. Y. Sohn, K. Katayama, *J. Photochem. Photobiol. A*, **2018**, *363*, 645-649.

## (2) 口頭発表

- ①Solvent-induced Disproportionation of Group 10 Metal Complexes with o-Semiquinonato, Shota Yamada, Takeshi Matsumoto, Ho-Chol Chang, 第68回錯体化学討論会, 仙台, 2018/7/28-30.
- ②Redox-active Ligands as Photo-responsive Electron/Proton Poolers, Ho-Chol Chang, 43rd International Conference on Coordination Chemistry, Sendai, 2018/7/30-8/4.
- ③CO<sub>2</sub>下においてo-フェニレンジアミン鉄(II)錯体が示す光化学的 C-H カルボキシル化反応、松本剛、内城大貴、小池拓司、阿部叶、小池翔太、張浩徹、第30回配位化合物の光化学討論会、2018/7/14-16、札幌。
- ④新規Ru(II)二核錯体と半導体から成るCO<sub>2</sub>還元ハイブリッド光触媒の開発、村越莉帆・玉置悠祐・芳賀正明・石谷治、日本化学会第99春季年会、甲南大学、2019/3/19.
- ⑤3{5}-置換ピラゾール三座配位子を有するIr(III)錯体の構造の光物理特性に与える影響、佐藤和香・小高智子・芳賀正明、日本化学会第99春季年会、甲南大学、2019/3/19.
- ⑥インジゴ誘導体配位子を有する新規ルテニウム錯体の電気化学およびCO<sub>2</sub>還元への応用、有谷一志、Madhumita Chatterjee, Goutam K. Lahiri, James Taylor, Frantisek Hartl, 谷津大気、石谷治、芳賀正明、ポーラグラフィ討論会、長崎県、2018/11/23.
- ⑦Synthesis and Electrochemical Properties of Ruthenium Complexes Containing Non-innocent Indigo Derivatives, Kazushi Aritani・Kai Yoshikawa・Madhumita Chatterjee・Goutam K. Lahiri・James Taylor・Frantisek Hartl・芳賀正明、43rd International Conference on Coordination Chemistry, Sendai, 2018/7/30-8/4.
- ⑧Lifetime mapping of photo-excited carriers on TiO<sub>2</sub> by transient grating imaging, M. Ebihara, N. Yoshinaga, W. Y. Sohn, K. Katayama, 日本化学会大99春季年会、甲南大学、2019/3/19.
- ⑨Photo-induced dynamics of photo-devices -solar cell, photocatalysis, water splitting, K. Katayama, OIST Seminar, 2019/1.
- ⑩ Photo-response analysis of photo-devices by transient grating phase imaging microscopy, K. Katayama, 日本分析化学会第67年会, 2018/9.
- ⑪Uncovering Charge Carrier Dynamics of Hematite Hidden in Nanosecond Range by Transient Grating Technique with Randomly-Interleaved-Pulse-Train Method, W. Y. Sohn, K. Katayama, 27th PhotoIUPAC, 2018/7.

## (3) 出版物

- ①分子アーキテクトニクス (CSJ Current Review 31 日本化学会編)、芳賀正明・小澤寛晃 分担執筆、化学同人、2018/12.
- ②現代界面コロイド化学の基礎、原理・応用・測定ソリューション、芳賀正明編集担当および分担執筆、丸善、2018/4.

学 校 名	帝 京 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と先天性代謝異常症への応用		研究分野 理 学
キ ー ワ ー ド	①ゲノム編集 ②メタボローム ③スフィンゴ脂質 ④高速液体クロマトグラフィー質量分析系(LC-MS) ⑤極長鎖脂肪酸 ⑥副腎白質ジストロフィー(X-ALD) ⑦新生児マススクリーニング		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
濱 弘 太 郎	薬 学 部	准 教 授	実験・データ整理・論文作製

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
藤 原 優 子	薬 学 部	助 教 授	実験・データ整理・論文作製
林 康 広	薬 学 部	助 教 授	実験・データ整理・論文作製
横 山 和 明	薬 学 部	教 授	データ整理・論文作製
山 下 純	薬 学 部	教 授	データ整理・論文作製

# スフィンゴ脂質の代謝制御機構の解明と 先天性代謝異常症への応用

## 1. 研究の目的

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド長鎖塩基を持つ脂質で、脂質ラフトなど生体膜マイクロドメインの構成を介して様々な機能を持つ。スフィンゴイド塩基と脂肪酸の鎖長や極性頭部の種類により、様々な分子種が存在する。各スフィンゴ脂質分子種は異なる物性を有し、マイクロドメインの物性の調節など、生体膜の機能を変化させる。各スフィンゴ脂質分子種の機能を明らかにする為には、各分子種の産生・代謝経路を正確に理解する必要がある。本研究ではスフィンゴ脂質の脂肪酸および極性頭部に着目し、以下4つの課題に対して、ゲノム編集技術と高速液体クロマトグラフィー-質量分析系によるメタボローム解析を用いた解析を行う。

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：スフィンゴ脂質は、リン脂質等の他の複合脂質と比較して、炭素数が24以上の極長鎖脂肪酸を含む割合が高い。申請者は、細胞内の極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質群を増加又は減少させることで、極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質代謝制御機構の細胞生物学的意義を解明する。
- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：副腎白質ジストロフィーは、極長鎖脂肪酸の蓄積を生化学的な主徴とする先天性代謝異常疾患で、約2万人に1人の頻度である。現時点で唯一の治療法は造血幹細胞移植であり、脱髄症状等を抑制する為には早期の移植が必須となる。申請者は新生児マススクリーニングに適用可能な極長鎖脂肪酸含有スフィンゴミエリン (SM) 分子種の簡便な測定系を開発する。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：スフィンゴ脂質の主要な産生・代謝酵素は同定されているが、各スフィンゴ脂質量の制御機構について定量的な議論は殆ど進んでいない。申請者はスフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法を確立する。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：SMとスフィンゴ糖脂質は、共通の基質であるセラミドに対して、ホスホコリンもしくはグルコースが結合することで合成される。SMとスフィンゴ糖脂質の生理的意義は大きく異なるが、どちらをどれくらい産生するかという制御機構は不明である。申請者はSMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け制御機構を解明する。

## 2. 研究の計画

本研究では以下4つの計画に従って行われた。

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：細胞内の極長鎖脂肪酸量は、厳密に制御される。申請者は、細胞内の極長鎖脂肪酸含有脂質量を上昇させるために、極長鎖脂肪酸の代謝に必須であるABCトランスポーターの欠損細胞株を、ゲノム編集技術を用いて確立する。さらにこの細胞に対して、さらに様々な脂質代謝酵素の機能を変動させることで、極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の変動を解析する。
- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：副腎白質ジストロフィーの診断基準は、血中の極長鎖脂肪酸値の上昇である。しかし従来の極長鎖脂肪酸の測定は、試料の前処理が煩雑であり、一検体あたりの測定時間も長い。そこで申請者は、副腎白質ジストロフィー患者では血中の極長鎖脂肪酸含有SMが上昇することに注目し、より簡便なスクリーニング技術を開発する。具体的には、試料である濾紙血から適切な溶媒によってSMを含む脂質画分を溶出し、これを直接、質量分析計に投与して極長鎖脂肪酸含有SMを検出する方法を検討する。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：スフィンゴ糖脂質の極性頭部を構成する糖鎖構造は、糖鎖の数と共に、その結合様式が非常に多様である。そのために分子種間の疎水性度が近似しており、高速液体クロマトグラフィー-質量分析系で通常用いられる疎水性カラムによる分離は困難である。申請者は、糖鎖構造の立体構造の差異に注目し、



キラルカラムを用いて各分子種を分離、測定する。

- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼのヘテロ複合体における近傍領域を同定するために、スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼのアミノ末端が近接するのかを蛍光タンパク質再構成法で調べる。具体的には蛍光タンパク質VenusのN末端側あるいはC末端側を、スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼそれぞれのN末端あるいはC末端に付加したキメラ蛋白質の発現ベクターを構築する。これらを細胞に発現させ、共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて細胞内局在および蛍光強度を解析し、スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼのヘテロ複合体における近傍領域を同定する。

### 3. 研究の成果

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：極長鎖脂肪酸の代謝に必須であるABCトランスポーター遺伝子の欠損細胞株を、ゲノム編集技術を用いて確立し、極長鎖脂肪酸を含有するリン脂質分子種が増加することを確認した。さらに、この細胞に対して、幾つかの脂質代謝酵素の機能を、ゲノム編集技術を用いてさらに欠損させることで、極長鎖脂肪酸含有脂質代謝への寄与を検証し、その候補分子を得た。
- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：有機溶媒を用いて濾紙血から極長鎖脂肪酸含有 SM を効率良く回収可能であることを確認した。また、先だって開発した SM 測定技術 (*Lipids* (2017), 図1) に関する問い合わせが多かった為、詳細な手技を公開した (*J Vis Exp* (2018))。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：マウス脳及びHeLa細胞から総脂質画分を抽出し、中性および酸性スフィンゴ糖脂質の分子種解析を行った。その過程で脳内の一部のスフィンゴ糖脂質クラスでは SM に比べて極長鎖脂肪酸を含有する割合が高いことも見出している。保有する質量分析器の検出可能域は $m/z$  2000以内であり、特に複雑な糖鎖構造を有するガングリオシド分子種は一価のイオンとして測定不可能であったが、質量分析器の各種条件検討の結果、二価イオンとして測定可能になった。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：スフィンゴミエリン合成酵素の N 末端と グルコシルトランスフェラーゼ の C 末端が近傍にあることを明らかにした (図2 AおよびB)。さらに、ラパマイシンを用いた蛋白質複合体を誘導実験によって、スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルトランスフェラーゼのヘテロ複合体が SM の産生を正に制御することを見出した (図2 C)。

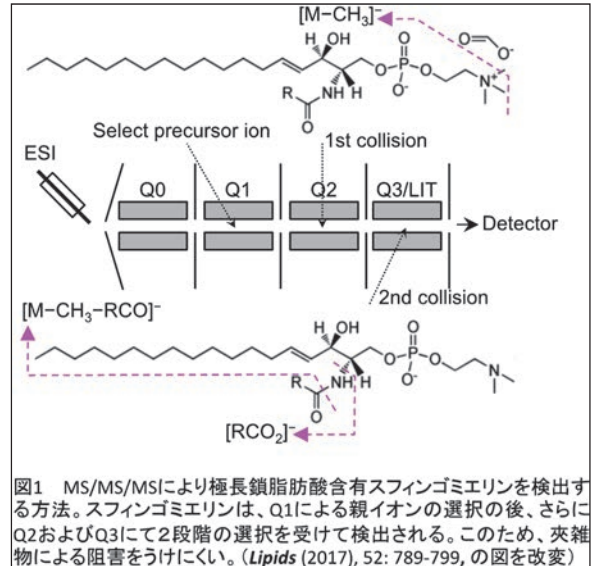


図1 MS/MS/MSにより極長鎖脂肪酸含有スフィンゴミエリンを検出する方法。スフィンゴミエリンは、Q1による親イオンの選択の後、さらにQ2およびQ3にて2段階の選択を受けて検出される。このため、夾雑物による阻害を受けにくい。(Lipids (2017), 52: 789-799, の図を改変)

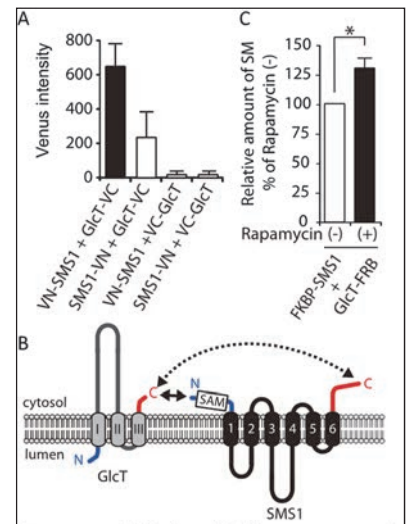


図2 (A, B) 蛍光タンパク質 Venus の N 末側 (VN), C 末側 (VC) の再構成を指標に分子間の近接を調べる BiFC 法を行い、GlcT の C 末端と SMS1 の N 末端が最接することが分かった。(C) FKBP-SM51キメラ蛋白質とFRB-GlcTキメラ蛋白質を SMS1/GlcT 欠損細胞に発現後  $^{14}C$ -ステアリン酸で代謝ラベルし、ラパマイシン存在下でヘテロダイマーを形成させると、SM 量が増加した。

### 4. 研究の反省・考察

- ① 極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ脂質の細胞生物学的意義の解明：検証した脂質代謝酵素は、極長鎖脂肪酸含有脂質代謝への関与が認められるものの、その寄与度は十分ではないことから、他の代謝酵素とのリダンダンシーが考えられた。今後は当該代謝酵素のファミリー内の分子を中心にその他の代謝酵素との相互作用を検証する必要がある。

- ② 副腎白質ジストロフィー患者早期発見を目的とする新生児マススクリーニング技術の開発：試料中の大量のホスファチジルコリンが原因と考えられるイオン化抑制効果が見られた。そこで、試料をアルカリ処理することでホスファチジルコリンを加水分解し、脱塩処理することでイオン化抑制効果を克服できるかを検証する。
- ③ スフィンゴ糖脂質の網羅的分析方法の確立：キラルカラム使用時の各スフィンゴ糖脂質分子種の溶出時間の決定が今後の課題である。その為に、グルコシルトランスフェラーゼをノックアウトすることでスフィンゴ糖脂質が減少した細胞を作出し、これと親細胞株とを比較することで、スフィンゴ糖脂質特異的なシグナルを効率良く検出し、スフィンゴ糖脂質の溶出時間決定に用いる。また、スフィンゴ糖脂質に含まれる脂肪酸には、炭素数や二重結合数だけでなく、水酸基が結合したものが分かるなど、当初の予想以上に多様なスフィンゴ糖脂質分子種が存在することが分かった。これらの分子種についても溶出時間を決定する必要がある。
- ④ SMとスフィンゴ糖脂質の産生振り分け機構の解明：本年度の研究によって、SM合成酵素は様々なタンパク質と相互作用することで、その機能を調節している可能性が示された。今後は、SM合成酵素と近傍にあるタンパク質を網羅的に探索し、SM合成酵素の制御機構の全貌を明らかにする必要がある。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Hama K\*, Fujiwara Y, Morita M, Yamazaki F, Nakashima Y, Takei S, Takashima S, Setou M, Shimozawa N, Imanaka T, Yokoyama K. Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of Abcd1-Deficient Mice. *Lipids*, 3(1):85-102, 2018 (\*corresponding author)
- ② Hama K\*, Fujiwara Y, Yokoyama K. Quantitative and Qualitative Method for Sphingomyelin by LC-MS Using Two Stable Isotopically Labeled Sphingomyelin Species. *J Vis Exp*, May 7; (135). doi: 10.3791/57293, 2018 (\*corresponding author)
- ③ Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Matsumoto N, Hama K, Tanikawa T, Oka S, Saeki T, Kumasaka T, Koizumi T, Arai S, Wada I, Yokoyama K, Sugiura T, Yamashita A. Complex formation of sphingomyelin synthase 1 with glucosylceramide synthase increases sphingomyelin and decreases glucosylceramide levels. *J Biol Chem*, 293(45):17505-17522, 2018
- ④ Fujiwara Y, Hama K, Tsukahara M, Izumi-Tsuzuki R, Nagai T, Ohe-Yamada M, Inoue K, Yokoyama K. Acyl Chain Preference in Foam Cell Formation from Mouse Peritoneal Macrophages. *Biol Pharm Bull*, 41(1):86-91, 2018
- ⑤ 山下 純, 岡 沙織, 谷川 尚, 中島 圭佑, 杉浦 隆之, ‘LPI受容体としてのGPR55’, *生化学*, 第90巻5号, 2018

### (2) 口頭発表

- ① 濱弘太郎, 藤原優子, 山下純, 横山和明 「ロレンツォオイル添加時の各種極長鎖脂肪酸脂肪酸CoAの定量」第60回日本脂質生化学会、八王子、2018年6月
- ② 藤原優子, 濱弘太郎, 横山和明 「キラルカラムを用いたヒドロキシ脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質の解析」第60回日本脂質生化学会、八王子、2018年6月
- ③ Yasuhiro Hayashi  
 “Sphingomyelin synthase 1 forms a complex with glucosylceramide synthase that is involved in the regulation of selective ceramide usage”  
 Gordon Research Conference, The Biochemistry, Biophysics and Physiology of Glycolipid and Sphingolipid Biology  
 February 11 - 16, 2018, Galveston, TX, USA (招待講演)

### (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 —原子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	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DNAの構造特性、ヒストンバリエーション、及びヒストン結合因子に着目した。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) 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、リピート配列の中で安定なヌクレオソームを形成し、筋強直性ジストロフィー症などの疾患との関係が明らかにされているCTGリピートに着目した。CTGリピートを含むヌクレオソームを再構成し、X線結晶構造解析を行い、標準的なヌクレオソームの立体構造と比較した。

### (2) 出芽酵母ゲノムにおけるH2A.Zを含むヌクレオソームの解析法の開発

出芽酵母のゲノム上でのH2A.Zを含む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、ヒストンH2A.ZのDNA結合部位特異的の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及びヒトH2A.Zを含むヌクレオソームの結晶構造に基づき、ヒストンH2A.Z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を連結して、Cu<sup>2+</sup>をキレートした後に、OHラジカルを局所的に発生させてDNAを切断する方法を開発した。

### (3) クロマチン上でのDNA修復反応の分子機構の解明に向けた構造生物学的研究

RAD52は、活性酸素やDNA複製のエラーによって発生する単鎖DNA領域に結合し、その領域と相同なDNA領域を、クロマチン構造を有する姉妹染色分体または相同染色体の中から見つけ出す。その分子機構を明らかにすることを目的として、まずRAD52と単鎖DNAとの複合体のX線結晶構造解析を行い、複合体の立体構造からRAD52が触媒するDNA修復反応のモデルを構築した。

## 3. 研究の成果

### (1) 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、CTGリピートを含むヌクレオソームの再構成を試みた。CTGリピートを含む146 bp DNAは、合成オリゴDNAをアニーリングすることにより大量調製した。CTGリピートは、146 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。調製したDNAは、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CTGリピートを含むヌクレオソームのX線結晶構造解析を行ったところ、3.6 Å程度の分解能でその立体構造を明らかにすることに成功した。これまでに決定された標準的なヌクレオソームの立体構造との比較を行った結果、ヒストン八量体の構造は両者の間でほとんど違いはなかったが、DNAの構造に違いが見られた。CTGリピート領域では、標準的なヌクレオソームの対応するDNA領域と比べてminor grooveが広がっていた (Kagawa, Shimizu et al., 投稿論文準備中)。

#### (2) 出芽酵母ゲノムにおけるH2A.Zを含むヌクレオソームの解析法の開発

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、H2A.Zを含むヌクレオソームの構造的特徴を新たに見いだした (Shimizu, Kagawa et al., 投稿論文準備中)。

#### (3) 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の作製に成功した。現在、各ヒストンの様々な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) クロマチン上でのDNA修復反応の分子機構の解明に向けた構造生物学的研究

X線結晶構造解析によりRAD52と単鎖DNAとの複合体の立体構造を3.6 Å分解能で決定した (Saotome et al., *iScience*, 2018)。RAD52と結合した単鎖DNAはB-form様構造をとり、Watson-Crick塩基対を形成する塩基の部位が溶媒側に露出していた。RAD52はこのような単鎖DNAの立体構造を誘起することで、相同なDNA同士の対合反応を促進することが考えられた。さらに、複合体の構造解析によって、単鎖DNAはRAD52が形成する溝の内側に結合することが明らかになり、その近傍に存在する第2のDNA結合領域に二重鎖DNAが結合することによって、RAD52がDNA修復反応を触媒するモデルが考えられた。

### 4. 研究の反省・考察

本研究は、CTGリピートを含むヌクレオソームの立体構造をX線結晶構造解析により決定し、CTGリピートが特徴的なDNA構造を有することを明らかにした。この情報は、今後CTGリピートの伸長と疾患との関係性を解明するために、手がかりとなる可能性が考えられる。*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、ヒストンバリエーションの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。また、RAD52が触媒するDNA修復反応の詳細な分子機構を解明し、今後クロマチン上で修復反応が起こる分子機構を解明するための重要な知見となった。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 Saotome, M., Saito, K., Yasuda, T., Ohtomo, H., Sugiyama, S., Nishimura, Y., Kurumizaka, H., Kagawa, W. Structural Basis of Homology-Directed DNA Repair Mediated by RAD52. *iScience* **3**, 50-62. (査読あり) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.04.005>
- ② Fuse, T., Yanagida, A., Shimizu, M. The Yeast Minichromosome System Consisting of Highly Positioned Nucleosomes *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* **42**, 289-294. (査読あり) DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00732>

### (2) 口頭発表

- ① 五月女美香、相澤由有希、香川亘、RAD52による不正確なアニーリング反応の生化学的解析、第36回染色体ワークショップ・第17回核ダイナミクス研究会、宝塚（兵庫県）、2019年1月23日～25日
- ② 清水光弘（依頼講演）部位特異的化学切断によるヒストン-DNA 結合部位のゲノムワイド解析への展開、平成30年度国立遺伝学研究所研究会「クロマチン・細胞核の動的構造変換とゲノム機能制御」2018年10月17～18日，国立遺伝学研究所，三島（静岡県）
- ③ 五月女美香、相澤由有希、香川亘、RAD52が触媒するDNAアニーリングにおけるミスマッチ配列の影響、第91回日本生化学会大会、京都、2018年9月24日～26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 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 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 ヘルスシステム統合科学研究科	教 授	実験・論文作成
瀧 口 義 浩	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ェホトダイオード (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 30 年度は動いている蛍光標識した生体分子 1 分子の高時間分解能蛍光測定を継続する。また、HPD を 1 台追加導入し、蛍光 2 色同時検出・偏光 2 成分同時検出の系に拡張する。

### (1) 動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出・時間分解蛍光検出

連続した励起光を用いて、動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出を行う。生体分子に



標識する蛍光プローブとして、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用いる。生体分子の構造や周囲の環境（pH・温度・疎水性）、運動性の変化を高時間分解能で検出する。

(2) 蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系の構築

HPD を 1 台追加導入し、偏光ビームスプリッターとダイクロイックミラーなどを加えて蛍光 2 色同時検出・偏光 2 成分同時検出の系に拡張する。こうすることで、蛍光を直交する 2 つの偏光成分に分けて同時検出したり、2 色の蛍光を同時検出することができるようになる。

### 3. 研究の成果

(1) 周囲環境の定常蛍光 1 分子検出・時間分解蛍光 1 分子検出

① pH 感受性蛍光色素標識 Qdot の蛍光寿命変化測定

pH 感受性蛍光色素を標識した Qdot の蛍光寿命測定を行った。そして、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を利用して、pH 変化を Qdot1 分子の蛍光寿命変化として検出した（図 1）

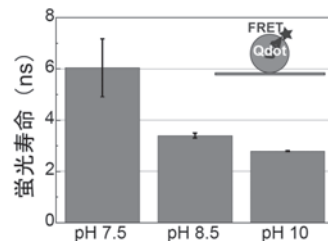


図 1：pH 感受性蛍光色素を標識した Qdot1 分子の蛍光寿命測定.

② 温度変化系の構築

顕微鏡のステージに取り付けられる加温冷却プレートを導入した。定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出によって、生体分子のすぐそばの局所的な温度や温度変化の検出を実証する準備が整った。

(2) 蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系の構築

HPD を 1 台追加導入し、偏光ビームスプリッターやダイクロイックミラーなどを加えて蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出の系に拡張した。1 台の時間相関単一光計数モジュールで 2 成分の時間分解蛍光 1 分子の同時検出を可能にするため、複数（4）チャンネルルーターモジュールも導入した。

(3) 蛍光 2 色同時検出系を用いた動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出・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

構築した蛍光2色同時検出系を用いて、2次元自由拡散を行う脂質分子に標識した Qdot585とQdot655の定常蛍光検出と蛍光寿命測定（図2）を行った。

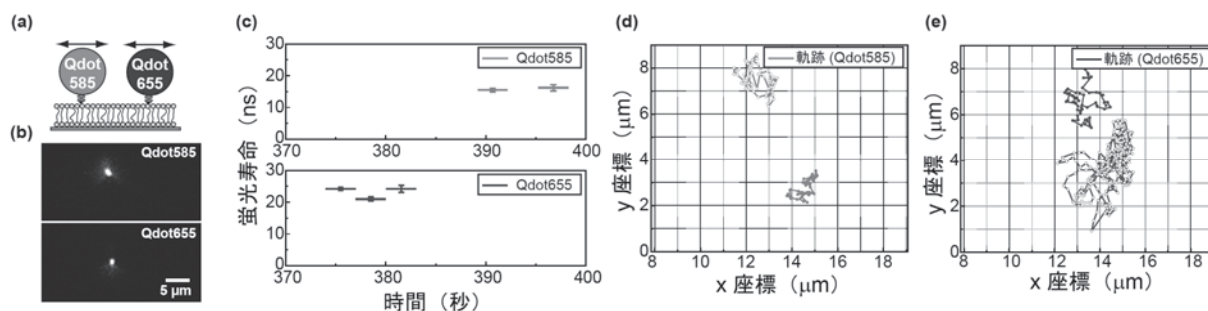


図 2：平面上を 2 次元自由拡散する Qdot 標識脂質分子に標識した Qdot585 と Qdot655 の蛍光寿命同時測定（3 秒ごと）. (a) 模式図. (b) 蛍光像 (EMCCD (デュアルビュー光学系)). (c) 蛍光寿命の時間経過 (HPD) 上：Qdot585 下：Qdot655. (d) Qdot585 の軌跡 (EMCCD). (e) Qdot655 軌跡 (EMCCD).

### 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・時間分解蛍光検出

① 生体分子の蛍光標識

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。一方、アクチンフィラメントについては、蛍光ダイヤモンドナノ粒子標識したものの運動を観察することができたが、標識され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。DNA修復タンパク質については蛍光ダイヤモンドナノ粒子による標識はできたが、まだそのDNA結合活性が確認できていない。標識率を上げ、DNA結合活性があるもの効率的に見つけられるようにできる必要がある。

(2) 周囲環境の定常蛍光 1 分子検出・時間分解蛍光 1 分子検出

ガラス基板に固定したpH感受性蛍光色素標識Qdotの蛍光寿命変化測定によって、pH変化が検出できることを実証した。次は、生体分子にこのQdotを標識し、動いている状態でもpH変化が検出できることを実証する。また、構築した温度変化系を用いて、定常蛍光1分子検出・時間分解蛍光1分子検出によって、生体分子のすぐそばの局所的な温度や温度変化が検出できることを実証する。

(3) 蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出系の構築

HPD を 1 台追加導入し、偏光ビームスプリッターやダイクロイックミラーなどを加えて蛍光 2 色同時検出・蛍光偏光 2 成分同時検出の系に拡張した。

(4) 蛍光 2 成分同時検出系を用いた動いている生体分子 1 分子の定常蛍光検出・時間分解蛍光検出

構築した蛍光 2 色同時検出系を用いて、2 次元自由拡散を行う脂質分子に標識した 2 色の Qdot の定常蛍光検出と蛍光寿命測定ができることを実証した。次は、構築した蛍光偏光 2 成分色同時検出系を、動いている生体分子に適用していく。

## 5. 研究発表

(1) 学会誌等

①横田浩章、深澤宏仁：ハイブリッドフォトディテクタ (HPD) のバイオ蛍光顕微鏡応用と広視野高時間分解能生体1分子蛍光検出 *応用物理* 87(9) 670-673, (2018)

(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と蛍光検出～1 分子直視と高時間分解能検出～ 第15回バイオオプティクス研究会 山形大学 (米沢市) 2018年12月 (招待講演)

②横田浩章：大腸菌非六量体型DNAヘリカーゼUvrD変異体の1分子イメージング 第41回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2018年11月 (招待講演)

③Yokota, H.: Single-molecule imaging of the oligomeric form of the non-hexameric *Escherichia coli* helicase UvrD mutants. 第56回日本生物物理学会年会 熊本大学 (熊本市) 2018年9月

④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4回班会議 ザ・ルイガンズ (福岡市) 2018年6月

(3) 出版物

なし

学 校 名	立 命 館 大 学	研究所名等	薬 学 部
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生物時計 ③細胞分裂 ④立体構造解析		

○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
田 中 俊 一	立命館グローバル・イノベーション 研究機構（R-GIRO）	平成30年 9月30日退職	実験、解析

# 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—

## 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、タンパク質のコンフォメーション平衡と離合集散が織りなす生命現象に注目し、圧力実験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し、そのメカニズムの解明と応用研究を行う。
- ①タンパク質の多様なコンフォメーションの構造研究を可能にする溶液NMR法とX線結晶構造解析法を開発する。
  - ②多剤耐性菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対し抗菌性を示すリード化合物の創出を行う。
  - ③圧力実験によるシアノバクテリアの生物時計の制御メカニズムの解明を行う。

## 2. 研究の計画

- (1) タンパク質の多様なコンフォメーションの観測を可能にする溶液 NMR 法と X線結晶構造解析法を開発する。
- ①超高磁場NMR装置（大阪大学 950 MHz）を用いた高圧力NMR測定を行う。
  - ②高圧力NMR法によりタンパク質のコンフォメーション平衡と水和状態の変化を観測する。
  - ③圧力を用いたコンフォメーション選択的結晶化技術の開発
- (2) コンフォメーション選択的な新たな作用機序をもつ抗 MRSA 薬の開発を目指す。
- ①圧力軸実験（高圧NMR法、高圧蛍光法）によるFtsZの多型構造の探索を行う。
  - ②圧力を用いたコンフォメーション選択的結晶化技術の開発とX線結晶構造解析による各コンフォメーションの立体構造解明を行う。
  - ③FtsZに対する阻害剤の結合様式解明に基づく抗菌剤リードの構造最適化を行う。
- (3) 圧力実験によるシアノバクテリアの生物時計の制御メカニズムの解明を目指す。
- ①KaiC周期長変異体について研究を拡張し、KaiCの「体積揺らぎ」がATPase活性、さらには周期長を制御することを立証する。
  - ②核磁気共鳴(NMR)法を用いて、KaiC内のリン酸化状態の概日変動を捉える。
  - ③高圧顕微セルを導入し、発光酵素ルシフェラーゼ-遺伝子を導入したシアノバクテリアを用いて、生物発光の変化から *in vivo*での概日周期長の圧力応答を解明する。

## 3. 研究の成果

- (1) タンパク質の多様なコンフォメーションの観測を可能にする溶液 NMR 法と X線結晶構造解析法を開発
- ①超高磁場NMR装置（大阪大学蛋白質研究所 950 MHz）に高圧力NMRシステムを構築し、2500気圧までの測定を可能にした。
  - ②高圧力NMR法を用いて、ユビキチンについて水からタンパク質アミド水素への磁化移動を捉えるCLEANEX-PM測定を行い、コンフォメーション変化に伴う水和状態の変化を観測した。
  - ③キャピラリーを用いたバッチ法により、高圧力下でタンパク質の結晶化に成功した。
  - ④様々なタンパク質を用いて、X線結晶構造解析法の技術開発を行った。
- (2) コンフォメーション選択的な新たな作用機序をもつ抗 MRSA 薬の開発
- ①圧力軸実験（高圧NMR法、高圧蛍光法）により、細胞分裂に関わるタンパク質FtsZの多型構造の探索を行った。黄色ブドウ球菌由来FtsZ (SaFtsZ) のX線構造解析を行い、構造状態の異なる二種類のFtsZの立体構造を同一結晶内から初めて明らかにした。その結果、FtsZはフィラメントを形成する構造状態 (T-state) からフィラメントから解離する構造状態 (R-state) へその構造を変化させることによって、FtsZの離合集散が制御されてい

ることが示された。遺伝子操作によってSaFtsZにトリプトファンを導入し高圧蛍光測定を行なったところ、加圧とともに長波長シフトし、2500気圧、3000気圧で波長シフトが終了している様子が確認でき、圧力によってSaFtsZの構造平衡が偏る様子が初めて観測できた。

②高圧下の結晶化を、キャピラリーを用いたバッチ法で行い、SaFtsZの結晶を得ることができたが、結晶の取り出しや凍結の際の技術的課題があり、構造解析することはできなかった。そこで、FtsZの新たなコンフォメーションを捕らえることを目的に、黄色ブドウ球菌以外の細菌FtsZの発現・精製・結晶化・構造解析に取り組んだ。これまでに、黄色ブドウ球菌と同様に院内感染の原因菌である肺炎桿菌FtsZおよび大腸菌FtsZの発現・精製・結晶化に成功し、これらのFtsZについては世界で初めて立体構造を決定することができた。構造解析の結果、これまでのFtsZの構造研究では見られなかった新しいコンフォメーションを捕らえることができた。

③FtsZに対する阻害剤の結合様式解明に基づく抗菌剤リードの構造最適化

FtsZに対する阻害剤を開発する上で、障害となっているのが、FtsZへの阻害剤の親和性を評価する方法がないことである。一般に、阻害剤の親和性は、表面プラズモン共鳴法と等温滴定カロリメトリー法が用いられるが、FtsZは自己集合する性質を有するタンパク質であるため、それらの方法を使用することができない。そこで、これまで私達が開発してきた阻害剤の結合様式を利用して、新たに阻害剤に蛍光官能基を結合させた蛍光分子を設計・合成し、阻害剤の親和性評価に挑戦した。その結果、初めてFtsZの親和性を評価することができ、さらにそれらの蛍光分子がFtsZのフィラメント形成を妨害しないことを、X線構造解析によって明らかにすることができた。

さらに、これまで開発してきた阻害剤の結合構造を元に新しく阻害剤を設計・合成し、それらの阻害剤の結合構造を2種決定することができ、構造-活性相関の解明を行った。

(3) シアノバクテリア生物時計の制御メカニズム解明

①時計タンパク質KaiCの六量体を構成する2つのリング構造解析

KaiCが有する2つのATPaseの役割を明らかにすることを目的として、KaiC六量体を構成するCIリングとCIIリングとよばれる2つのリング構造を個別に作製した。ゲル濾過クロマトグラフィーの解析により、CIリングは常に六量体構造を維持し、CIIリングは単量体へ解離する不安定な構造であることがわかった。また、その要因がCIIリングにある特定のトレオニン残基のリン酸化修飾であることを質量分析解析により明らかにした。

②時計タンパク質KaiCのC末端領域の機能解析

KaiC六量体には、リング構造から飛び出た約30アミノ酸からなるC末端領域が存在する。本研究においては、この領域を欠失させた変異型KaiC (N-Strep-KaiC487) を作製した。N-Strep-KaiC487のリン酸化状態は常に高リン酸化状態を示し、KaiAやKaiBを加えてもリン酸化状態は変化しなかった。さらに、Blue Native-PAGE解析では、N-Strep-KaiC487はKaiAともKaiBとも相互作用しないことが明らかとなった。KaiCはKaiAおよびKaiBと結合離脱を繰り返すことにより生物時計として機能が発揮されることから、N-Strep-KaiC487は時計としての機能失っていると考えられた。すなわち、C末端領域はKaiCが時計タンパク質として働くために必須の領域であることがわかった。

(4) シアノバクテリアの生物時計の圧力応答

①高圧蛍光法によるKaiCリン酸化サイクルの観察

KaiCリン酸化サイクルに伴う蛍光強度の観測を行った。1気圧と複数の高圧条件下による観測を各3回以上行い、平均値と標準偏差を求めた。

②KaiCのATP加水分解活性の圧力依存性

KaiCの野生型および変異体の高圧力下のATP加水分解実験を温度調節可能な耐圧容器と液体クロマトグラフィーを用いて行った。KaiC全体における活性に加え、CIまたはCIIの触媒能を欠如させた変異体を作製し、CIドメインとCIIドメインそれぞれの活性評価を1気圧と複数の高圧条件で行った。また、KaiC周期長変異体(R393CおよびF470Y)について、1気圧及び200気圧でATP加水分解活性の評価を行い、野生型と顕著に異なる結果を得た。それぞれ4回~17回の実験回数を重ね、平均値と標準偏差を示した。これにより、それぞれのドメインのATP加水分解に伴う活性化体積の算出に成功し、ドメイン間の差異についての定量的な解明に至った。

### ③KaiCリン酸化の圧力依存性

KaiABCおよびATPを混合した試料を、耐圧容器を用いて30°C、1気圧または高圧下で保管し、定期的なサンプリングを行った。KaiCのリン酸化率をSDS電気泳動法により定量した。1気圧及び高圧下におけるKaiCのリン酸化周期は、高圧蛍光測定により得られた蛍光強度の振動周期と良い一致を示した。KaiCのリン酸化周期が、KaiCのATPase活性と相関があることが示されているが、野生型KaiCについては高圧力下でも周期長とATPase活性に相関性があることがわかった。

④高感度NMR検出器を用いた<sup>31</sup>P-核磁気共鳴(NMR)法により、ATP由来およびADP由来のNMR信号、KaiC内のリン酸化セリン、リン酸化スレオニンの観測に成功した。

## 4. 研究の反省・考察

(1) 高圧力 NMR によるタンパク質の多様なコンフォメーションの構造、物性研究

①高圧力下で、ユビキチンやT4リゾチームなど複数のタンパク質について天然状態を逸脱した高いエネルギー状態（高エネルギー状態）を発見し、その構造やダイナミクス、水和の解析、部分モル体積変化など熱力学量の算出に成功した。

(2) コンフォメーション選択的な新たな作用機序をもつ抗 MRSA 薬の開発

①FtsZの2種類のコンフォメーションを確認でき、構造遷移を伴いながら、重合・解離サイクルが進行するという分子モデルを提案することができた。今後は、圧力下で重合サイクルの進行過程を直接観察する手法を試験する。

②高圧結晶成長法による結晶化方法を確立して、さらにトリプトファン変異体の作製・精製・結晶化にも成功したが、結晶の取り出しや凍結の際の技術的課題があり、構造解析することはできなかった。

③FtsZの親和性評価を、新たに阻害剤に蛍光側鎖を結合させた蛍光分子を設計・合成することで達成できたことは、今後抗菌剤リードの構造最適化において重要なステップである。

(3) シアノバクテリアの生物時計の制御メカニズムの解明

①KaiCの2つのリング構造の安定性の違いが明らかになった。2つのリング構造をコードするアミノ酸配列は相同性が高く、ともにATPaseとして働く。これらリング構造が互いに協同して24時間周期を刻む仕組みを明らかにするために、より詳細なKaiCのATPase活性測定、リン酸化状態の解析とともに構造解析も進める必要がある。

②KaiCのC末端領域が生物時計として機能に重要であり、特にKaiAのみならずKaiBとの結合にも関わっていることは新しい発見であった。3つの時計タンパク質の結合様式がより詳細になることで概日振動するタンパク質の制御解明が可能になると期待できる。

③高圧力下でKaiCリン酸化周期長やATP加水分解活性が変化することが分かった。周期長決定因子であるKaiCの構造や酵素活性が、進化的に温度変化に耐性を備えているのに対し（温度補償性）、圧力では比較的容易に変化することがわかった。

④シアノバクテリアの生物発光を数日間観測するためには、光と二酸化炭素の供給が必須となる。圧力下で生物発光を観測するためには、光と二酸化炭素の供給が可能な高圧顕微鏡システムの開発が必要である。

## 5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Yamashita T, Mizohata E, Nagatoishi S, Watanabe T, Nakakido M, Iwanari H, Mochizuki Y, Nakayama T, Kado Y, Yokota Y, Matsumura H, Kawamura T, Kodama T, Hamakubo T, Inoue T, Fujitani H, Tsumoto K Affinity improvement of a cancer-targeted antibody through alanine-induced adjustment of antigen-antibody interface Structure 27, 519-527 (2019).

②Tsuru Y, Maruyama M, Fujimoto R, Okada S, Adachi H, Yoshikawa H, Takano K, Murakami S, Matsumura H, Inoue T, Tsukamoto K, Imanishi M, Yoshimura M, Mori Y Crystallization of Aspirin Form II by Femtosecond Laser Irradiation Appl. Phys. Express 12, 015507(2019).

③Fujimoto R, Maruyama M, Mori Y, Okada S, Adachi H, Yoshikawa H, Takano K, Murakami

- S, Matsumura H, Inoue T, Imanishi M, Tsukamoto K, Yoshimura M, Mori Y Growth of high-quality metastable crystal of acetaminophen using solution mediated phase transformation at low supersaturation *J. Cryst. Growth* 502, 76-82 (2018).
- ④ Kobayashi N, Maruyama M, Mori Y, Fukukita S, Adachi H, Takano K, Murakami S, Matsumura H, Inoue T, Yoshimura M, Nakabayashi S, Mori Y, Yoshikawa H Atomic-scale imaging of surface and hydration structures of stable and metastable acetaminophen crystals by frequency modulation atomic force microscopy *J. Phys. Chem. C* 122, 21983-21990 (2018).
- ⑤ Sato T, Matsukawa M, Mizutani Y, Iijima T, Matsumura H Initial, transient, and specific interaction between G protein-coupled receptor and target G protein in parallel signal processing: a case of olfactory discrimination of cancer-induced odors *Arc. Med. Res.* 6, 1801(2018).
- ⑥ Nii K, Maruyama M, Okada S, Adachi H, Takano K, Murakami S, Yoshikawa H, Matsumura H, Inoue T, Imanishi M, Tsukamoto K, Yoshimura M, Mori Y Improvement of metastable crystal of acetaminophen via control of crystal growth rate *Appl. Phys. Express* 11, 035501 (2018).
- ⑦ Teramoto T., Azai C., Terauchi K., Yoshimura M., Ohta T. Soft X-ray imaging of cellular carbon and nitrogen distributions in heterocystous cyanobacterium, *Plant Physiology* 177, 52-61 (2018).
- ⑧ Oyama K., Azai C., Matsuyama J., Terauchi K., Phosphorylation at Thr432 induces structural destabilization of the CII ring in the circadian oscillator KaiC, *FEBS Lett.* 592, 36-45 (2018).
- ⑨ Kitazawa S., Aoshima Y., Wakamoto T., Kitahara R. Water-protein interactions coupled with protein conformational transition, *Biophys. J.* 115, 981-987 (2018).
- ⑩ Williamson, M.P. and Kitahara R. Characterization of low-lying excited states of proteins by high-pressure NMR spectroscopy, *BBA Proteins & Proteomics* 1867, 350-358 (2019).

(2) 口頭発表

- ① 松村浩由 「C4およびC3光合成調節タンパク質の動的構造機能解析」 新学術領域研究「新光合成」2018年度秋期領域会議 2018年11月11日
- ② 松村浩由ら、「光量変動と代謝調節をつなぐ新規分子の定量的手法を取り入れた構造機能解析」 新学術領域研究「新光合成」2018年度春期領域会議 2018年5月28日
- ③ 寺内一姫 「Kaiタンパク質による再構成系の温故知新」CyanoClock1.0、名古屋大学、名古屋市、2018年6月29日
- ④ 寺内一姫 「シアノバクテリア概日時計の周期長と環境」タンパク質研究の最前線、立命館大学、草津市、2019年3月20日
- ⑤ Kitahara R. et al. 「Pressure accelerates the circadian clock of cyanobacteria」 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology、ピオザヴェルデ、沼津市、2018年9月19日
- ⑥ Kitahara R. et al. 「High-pressure NMR spectroscopy: Tools for studying protein dynamics」 XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Dublin, Ireland (北原 招待講演) , 2018年8月21日

(3) 出版物

なし

平成30年度（第43回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	近 畿 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	非フラーレンアクセプターを用いた半透明有機薄膜太陽電池の開発		研究分野	理 学
キ ー ワ ー ド	①有機薄膜太陽電池 ②非フラーレンアクセプター ③半透明太陽電池			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大久保 貴志	理 工 学 部	教 授	研究代表者総括・実験・データ整理・論文作成 非フラーレンアクセプターを用いた高効率有機薄膜太陽電池の開発

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
田 中 仙 君	理 工 学 部	准 教 授	実験・データ整理・論文作成 カーボンナノチューブを電極とした有機薄膜太陽電池の高効率化



# 非フラーレンアクセプターを用いた 半透明有機薄膜太陽電池の開発

## 1. 研究の目的

有機薄膜太陽電池は貴金属を使用しない環境に優しい軽くフレキシブルな太陽電池である。この有機薄膜太陽電池はプラスチック基板上にロール・ツー・ロールなどの低温印刷プロセスを利用することで安価に大量生産できるため、ユビキタスな電源装置としての幅広い用途への応用が期待されている。特に、半透明有機薄膜太陽電池は、その意匠性と軽量性を生かすことで、ビルの窓ガラスやブラインド、マンションのベランダの手摺、ビニールハウスなど従来のシリコン太陽電池では困難であった場所への応用が期待されている。しかしながら、現状での有機薄膜太陽電池の光電変換効率はシリコン太陽電池の半分以下であり、実用化に向けては更なる高効率化が必要不可欠である。この様な中、最近非フラーレンアクセプター (non-fullerene acceptor) を用いた有機薄膜太陽電池が注目されている。これまで有機薄膜太陽電池には、フラーレンと呼ばれるサッカーボール構造を有する炭素材料が用いられていたが、この誘導体は伝導性に優れているものの、可視領域の光を吸収せず、光電変換にはほとんど寄与していなかった。そこで、強い光吸収特性を持つ非フラーレンアクセプターの利用が提唱され、近年有機薄膜太陽電池の高効率化に貢献している。本研究ではこの非フラーレンアクセプターを用いた半透明有機薄膜太陽電池を開発し、有機薄膜太陽電池の更なる性能の向上を目指すことを目的とした。具体的な研究テーマを以下に記す。

- (1) 非フラーレンアクセプターを用いた三元ブレンド薄膜太陽電池の開発
- (2) 新規非フラーレンアクセプターの開発
- (3) カーボンナノチューブシートを用いた透明薄膜太陽電池の高効率化

## 2. 研究の計画

本研究では上述の目的を達成するために主に以下の研究項目を実施することにした。

- (1) 非フラーレンアクセプターを用いた三元ブレンド薄膜太陽電池の開発

本研究ではこれまでPTB7という有機ドナーとPC71BM、およびITICという非フラーレンアクセプターを用いて三元ブレンド薄膜太陽電池の高効率化に関する研究を行ってきたが、本年度はより高効率かつ透明性が高いPTB7-Thを利用して三元ブレンド薄膜太陽電池の高効率化を実現する。

- (2) 新規非フラーレンアクセプターの開発

非フラーレンアクセプターとしてフェノチアジン誘導体を骨格に含む新たな非フラーレンアクセプターを合成し、有機薄膜太陽電池のn型有機半導体としての特性を評価する。

- (3) カーボンナノチューブシートを用いた透明薄膜太陽電池の高効率化

非フラーレンアクセプターを用いた太陽電池について、カーボンナノチューブシートと有機層との間のバッファ層に用いる材料の探索と作製条件の最適化を進める。

## 3. 研究の成果

平成30年度は当初の研究計画に従い主に三元系有機薄膜太陽電池の高効率化、新規非フラーレンアクセプターの開発、カーボンナノチューブ (CNT) シートを用いた半透明有機薄膜太陽電池に関する研究を行った。三元系太陽電池の開発に関しては順調に光電変換効率の向上が実現できたものの、非フラーレンアクセプターの開発に関しては当初目的としていた分子の合成には至らなかった。また、カーボンナノチューブ (CNT) シートを用いた半透明有機薄膜太陽電池に関する研究に関しては概ね順調に進捗しており、当該年度は更に、無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池にて有機

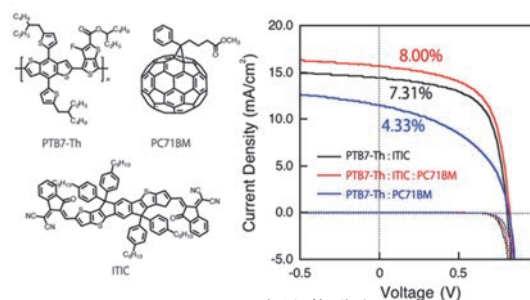


図1, 三元系有機薄膜太陽電池

薄膜太陽電池の高効率化が確認できた。各課題の具体的な進捗状況を以下に記す。

(1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化

有機薄膜太陽電池の高効率化の新たな手段として3種の有機半導体を活性層にした三元系誘起薄膜太陽電池が注目されている。本研究では新たにPTB7-Th、PC71BM、ITICという3種類の有機半導体を組み合わせた薄膜太陽電池を作製し、その特性を評価した。その結果ITICとPC71BMの重量比が7:3の時に最も高い光電変換効率を示した(図1)。

(2) 新規非フラーレンアクセプターの開発

今年度は主に新規非フラーレンアクセプターとしてベンゾフェノチアジン(BTPT)誘導体の合成を行った。ベンゾフェノチアジンは可視領域に強い吸収を示す色素であり、溶解性を向上させるためにアルキル基を導入した(図2, 0-octyl-BTPT)。この分子は560nmに吸収極大を持つ分子であり、660nmに極大を持つ強い蛍光が観測された。単結晶X線構造解析の結果、BTPT骨格が $\pi$ スタックにより一次元カラムを形成しており、溶解性が高いためスピコートによる成膜も容易であった。電界効果トランジスタ(FET)を作製し、キャリア輸送特性を調べた結果、ホール輸送性を示し、キャリア移動度は $2.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ であった。ただし、該当年度は更にアクセプター性置換基の導入を行う予定であったが、合成がうまくいかず目的の非フラーレンアクセプターの合成まで行うことが出来なかった。

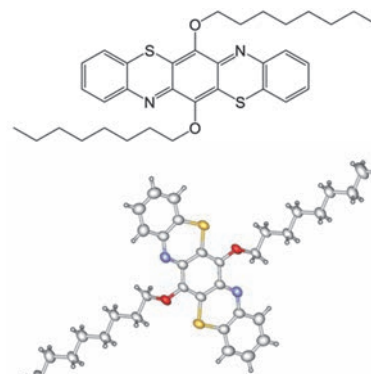


図2, 0-octyl-BTPTの構造式と単結晶X線構造

(3) 半透明太陽電池の光電変換特性評価

透明太陽電池の開発に向けて、半透明太陽電池の特性評価を実施している。上部透明電極としてカーボンナノチューブ(CNT)シート、下部透明電極にITOを用いた太陽電池について、光照射方向と光電変換特性との関係について調べたところ、照射方向による短絡電流密度に顕著な違いが見られた。この原因を明らかにするために、異なる膜厚の有機層を持つ半透明太陽電池を作製し、短絡電流密度の光照射方向による違いの膜厚依存性を調べたところ、膜厚が厚くなるにつれてCNTシート側照射時の光電流が相対的に低くなる傾向が見られた(図3)。これは、短絡電流密度の差が透明電極の透過率の違いのみによって生じているのではなく、有機層内からの電子と正孔の取り出し効率の違いによる可能性が高いことを示唆している。このことは、バルクヘテロ構造を用いた透明太陽電池の最適化において、有機層の膜厚およびドナー材料とアクセプター材料のブレンド比などを考慮する際の有益な情報となると考えている。現在さらに詳細な検証実験および理論的検討を実施している。

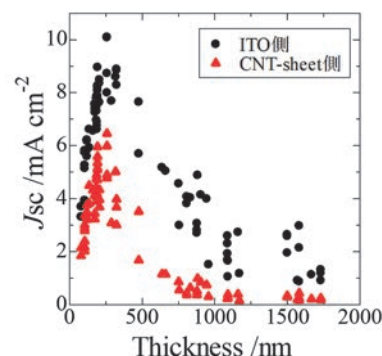


図3, 光照射方向による短絡電流密度の膜厚依存性の違い

(4) 無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池

当該年度は上記のテーマに加え、無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池の開発を行った。研究代表者はこれまで金属イオンと有機架橋配位子からなる配位高分子と呼ばれる無機・有機複合型ポリマーの研究を行っており、金属イオンと有機架橋配位子のエネルギー準位を考慮することで種々の半導体材料を合成してきた。特にホール輸送性を有するハロゲン化銅(I)と大きな $\pi$ 共役平面を有するヘキサアザトリフェニレン(HAT)誘導体からなるd- $\pi$ 複合体はバンドギャップの小さな半導体として振る舞い、更にその半導体をホール輸送層に用いた有機薄膜太陽電池が、従来のホール輸送層である $\text{MoO}_3$ を用いた太陽電池素子よりも、短絡電流密度が増大し、その結果として光電変換効率が向上することを見いだした(図4)。

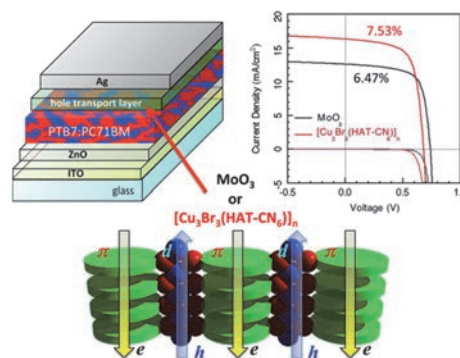


図4, 配位高分子をバッファ層とした薄膜太陽電池

## 4. 研究の反省・考察

### (1) 三元系有機薄膜太陽電池の高効率化

三元系有機薄膜太陽電池に関してはPTB7-Tを用いることで従来の三元系有機薄膜太陽電池より高効率化が実現することを見いだした。ただし、そのメカニズムの解明に関しては更なる検討が必要である。また、今後は更なる高効率化に向けてバンドギャップの小さなドナーやLUMO準位の低い非アクセプターフラレンなどを検討していく。

### (2) 新規非フラレンアクセプターの開発

今年度は主に新規非フラレンアクセプターとしてベンゾフェノチアジン (BTPT) 誘導体の合成を行いアルキル基を導入した0-octyl-BTPTを合成し、単結晶X線構造解析および基礎物性を測定したものの、アクセプター性置換基の導入には至らなかった。そこで、2019年度は有機合成を専門とする本学の須藤篤教授、松本浩一准教授にも本プロジェクトに参加してもらい非フラレンアクセプターの開発を加速することとした。

### (3) 半透明太陽電池の光電変換特性評価

カーボンナノチューブシートを用いた透明電極形成技術についてはある程度確立したが、形成時に100℃程度の加熱処理を必要とするために、有機層の種類によっては熱負荷による劣化が生じてしまい、適用が困難な場合が見られた。現在より低負荷な電極形成技術に取り組んでいるが、問題が生じる可能性がある。透明太陽電池に適した有機層の探索に加えて、電極形成技術もより発展させていく必要があるが、現状ではややこれが立ち遅れている。カーボンナノチューブ以外の透明電極材料についての探索も検討を進めていく予定である。光照射方向による光電変換特性の違いの原因については、興味深い結果が得られた。光電変換特性の照射方向依存性は透明太陽電池の最適化の指標の一つとなり得ると考えられるので、さらなるデータの蓄積と解析を進めていく。特に、現状では一種類の有機層での検討にとどまっているので、種々の有機層についても検証を進めていく必要がある。

### (4) 無機・有機複合ポリマーをバッファ層に用いた有機薄膜太陽電池

本研究において、無機・有機複合ポリマーを有機薄膜太陽電池のバッファ層に用いることで、光電変換効率が向上することを見いだした。この技術は様々な有機薄膜太陽電池に応用可能であり、今後は膜厚の最適化や、金属イオンと有機配位子の組成比の最適化などを行い、有機薄膜太陽電池における汎用的な技術となり得るか検討を行う必要がある。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① “Measuring the competition between bimolecular charge recombination and charge transport in organic solar cells under operating conditions”, M. C. Heiber, T. Okubo, S.-J. Ko, B. R. Luginbuhl, N. A. Ran, M. Wang, H. Wang, M. A. Uddin, H. Y. Woo, G. C. Bazan, T.-Q. Nguyen, *Energy Environ. Sci.*, **2018**, *11*, 3019-3032.
- ② “P3HTの臭素化による $\pi$ 共役長の短縮とP3HT:PCBMバルクヘテロ太陽電池の光電変換特性との相関”、義富 卓也、高田 謙、谷合 伯斗、安東 秀峰、松本 浩一、田中 仙君、電気学会論文誌C 2018年138巻11号 pp. 1298-1304.

### (2) 口頭発表

- ① “Conducting Properties and Application to Organic Solar Cells of Coordination Polymers Consisting of Copper(I) Halides and Hexaazatriphenylene Derivatives”, T. Okubo, W. Genno, M. Okita, S. Shimakawa, K. Nakamura, K. Himoto, M. Maekawa, T. Kuroda-Sowa, 43rd International Conference on Coordination Chemistry, Sendai, Japan, 2018年8月.
- ② “Crystal Structures and Carrier Transport Properties of Coordination Polymers Including Copper(I) Halides”, Takashi Okubo, Wataru Genno, Sanshiro Fukuda, Masahiko Maekawa, Takayoshi Kuroda-Sowa, 2018 Nankai International Symposium on Advanced Materials, Tianjin, China, 2018年11月.
- ③ “Conducting Properties and Application to Organic Solar Cells of Coordination Polymers including Copper(I) Halides”, Takashi Okubo, Wataru Genno, Misaki Ohkita, Sanshiro Fukuda, Masahiko Maekawa, Takayoshi Kuroda-Sowa, Advances in Organic and Hybrid Electronic Materials 2018 (AOHM19), Dubrovnik, Croatia, 2019年3月.
- ④ “半透明有機薄膜太陽電池の光電変換特性の膜厚依存性” 義富 卓也、田中 仙君、第79回応用物理学会秋季学術講演会、20p-PB4-7、2018年9月20日

⑤ "半透明有機太陽電池の光照射方向依存性" 義富卓也、田中仙君、有機エレクトロニクス研究会 (OME) 2018年11月28日

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	母乳中に含まれるメラトニンの乳幼児および母乳産生に対する役割 －母乳による乳児の覚醒と睡眠の制御－	研究分野	理 学
キ ー ワ ー ド	①母乳 ②メラトニン ③母乳産生制御 ④覚醒と睡眠 ⑤生理活性物質		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
前 田 智 司	薬 学 科	教 授	研究統括及び母乳中のメラトニンの定量・解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
阿 部 賢 志	医 療 ビ ジ ネ ス 薬 学 科	准 教 授	メラトニンの定量法の確立
小 林 力	薬 学 科	教 授	研究データの解析
井 上 裕 子	薬 学 科	教 授	メラトニン合成関連遺伝子の解析
千 葉 健 史	北 海 道 科 学 大 学 薬 学 部	講 師	母乳産生に対するメラトニンの役割の解析

# 母乳中に含まれるメラトニンの乳幼児および 母乳産生に対する役割 — 母乳による乳児の覚醒と睡眠の制御 —

## 1. 研究の目的

- (1) 母乳中に含まれる生理活性物質の測定法の確立および乳児に対する役割
  - ① 母乳中の生理活性物質（セロトニン、メラトニン、ノルアドレナリン等）の測定方法の確立を行う。
  - ② 母乳中の生理活性物質（セロトニン、メラトニン、ノルアドレナリン等）の乳児に対する役割の検討を行う。
- (2) メラトニン合成関連遺伝子の発現解析を行う。
  - ① 乳腺上皮細胞にメラトニン合成系が存在しているか確認を行う。
- (3) 母乳産生制御に関するノルアドレナリンの役割の解明を行う。
  - ① 母乳中のノルアドレナリンの定量を行う。
  - ② 母乳中のノルアドレナリンの役割の解明を行う。

## 2. 研究の計画

- (1) 母乳中に含まれる生理活性物質の測定法の確立および乳児に対する検討
  - ① ヒト母乳中の生理活性物質（セロトニン、メラトニン、ノルアドレナリン等）の精製方法および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた測定方法の確立を行う。
  - ② 授乳ラットまたはマウスを用いて、母乳を回収し、ヒト同様に生理活性物質の定量を行う。
  - ③ 母乳中の生理活性物質（セロトニン、メラトニン、ノルアドレナリン等）の乳児に対する役割を授乳中のラットおよびその乳児ラットを用いて検討する。
- (2) メラトニン合成関連遺伝子の発現解析を行う。
  - ① 乳腺上皮細胞およびヒト乳腺上皮初代培養細胞を用いて、メラトニン合成経路の律速酵素であるアリルアミンN-アセチル転移酵素（AA-NAT）の発現をmRNAおよびタンパク質レベルで測定する。
- (3) 母乳産生制御に関するノルアドレナリンの役割の解明を行う。
  - ① 母乳中に含まれているノルアドレナリンの機能解明を行う。
  - ② ストレスにより母乳の質変化が起こるか検討を行う。

## 3. 研究の成果

- (1) 母乳中に含まれる生理活性物質の精製法および測定法の確立
  - ① セロトニンおよびノルアドレナリンは固相抽出法により精製し、HPLCに電気化学検出器（ECD検出器）を組み合わせたHPLC-ECDで検出する方法を確立した。ヒト母乳中に含まれるセロトニンおよびノルアドレナリンの濃度はそれぞれ約30 ng/mL、500 ng/mLであった。これらの成果は論文として投稿した。メラトニンはクロロホルムを用いた液液抽出法により精製し、HPLCに蛍光検出器を組み合わせたHPLC-蛍光検出器によるメラトニンの定量法の確立を行い、現在定量中である。
  - ② マウス・ラット搾乳器を用いて、授乳中のラットより母乳の回収を行った。搾乳方法は、搾乳の4～6時間前に母親と子を隔離し、ラットにイソフルラン（40 mg/Kg）をオールインワン小動物用麻酔器を用いて吸入麻酔を行った。麻酔が効いていることを確認後、オキシトシンを0.2 U/kgで腹腔内注射し、10分間放置後、母乳の回収を行った。1匹あたり1-2 mLの回収であった。回収したラット母乳を用いて、クロロホルムを用いた液液抽出法によりメラトニンを精製し、HPLC-蛍光検出器の定量中である。
  - ③ 授乳ラットから母乳を搾乳する方法を習得でき、1回あたり、母親ラットが産生する母乳量を測定した結果、おおよそ2 mL程度であることが示された。今後、その量をもとに母乳か人口ミルクで育てたラットで学習の能力等に差がでるか検討を行う。

- (2) メラトニン合成関連遺伝子の発現解析を行う。
- ①乳腺上皮細胞およびヒト乳腺上皮初代培養細胞を用いて、メラトニン合成経路の律速酵素であるアリルアミンN-アセチル転移酵素 (AA-NAT) の発現をmRNAおよびタンパク質レベルで測定し、AA-NATの発現を確認した。
- (3) 母乳産生制御に関するノルアドレナリンの役割の解明を行う。
- ①乳腺上皮細胞にノルアドレナリンを添加し、母乳産生マーカーの1つである $\beta$ -カゼインの発現量を測定したところノルアドレナリン濃度依存的に $\beta$ -カゼインの発現量の低下が観察された。また、乳腺上皮細胞でノルアドレナリンが合成されているか、ノルアドレナリンの合成経路の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) をノックダウンし、ノルアドレナリンの量が減少していることを明らかにした。
  - ②ノルアドレナリンはストレス応答に関係しており、ストレス時にノルアドレナリンを介したストレス応答が生じているか検討を行った。その結果、マウスを狭い筒状の容器にいれ、ストレスをかけた場合、母乳中のノルアドレナリンが有意に上昇し、 $\beta$ -カゼインの発現量の低下が観察された。これらの成果は論文として投稿した。

#### 4. 研究の反省・考察

- (1) 母乳中に含まれる生理活性物質の測定法の確立
- ①セロトニン、ノルアドレナリン、ヒスタミンの精製は市販されている固相カラムを用いて精製法およびHPLCでの測定方法を確立することができた。しかしながら、メラトニンの精製には適した固相カラムがなく、クロロホルムを用いた液液抽出法を用いて行った。いくつかの固相カラムで精製可能か検討していたため、メラトニンの精製法確立までにはセロトニンやノルアドレナリンの精製法確立よりも時間がかかり、現在ヒトおよびラットの母乳中のメラトニン量を定量中である。
  - ②授乳中のラットより母乳の回収を行った。市販のマウス・ラット搾乳器を用いてラットより母乳を回収している。搾乳を行うにも経験およびコツが必要であり、授乳ラットの体重が約300-350 gの場合、2 mL弱の母乳が搾乳できる。今後は、1回搾乳したラットを再度ケージに戻し、4-6時間後に再度母乳が搾乳可能か検討を行っていく予定である。
  - ③母乳中に含まれる生理活性物質の乳児に対する役割に関しては、研究計画よりも遅れている。論文等を調査した結果、母乳中に含まれる生理活性物質のうち、メラトニンの合成酵素が自然発生的に欠損したマウスがおり、このマウスを用いてメラトニンの乳児ラットに対する役割の検討を行っていく予定である。
- (2) メラトニン合成関連遺伝子の発現解析を行う。
- ①メラトニンの合成酵素であるAA-NATのmRNAおよびタンパク質レベルの発現は観察された。これまでに、乳腺上皮細胞はセロトニン、ノルアドレナリンの生合成系も有していることが報告されており、非常に興味深い結果であると考えている。今後は、プロラクチン刺激等でも発現の変動が生じるか発現制御機構も含めて検討を行っていく予定である。
- (3) 母乳産生制御に関するノルアドレナリンの役割の解明を行う。
- 母乳中に含まれるノルアドレナリンに着目して、ストレスにより母乳産生の質の変化が起こることを今回の研究から示すことができた。しかしながら、ストレスにより母乳産生量の変化が起こるか検討することができず、今後は、ストレスにより母乳産生量の変化がおこるかヒトおよびマウス等を用いて検討を行っていく予定である。
- 本研究では、主に、母乳中に含まれる生理活性物質の母乳産生制御機構の役割を明らかにした。今後は乳児に焦点をあて、母乳中の生理活性物質の役割の解明を進めていく予定である。

#### 5. 研究発表

- (1) 学会誌等
- ①千葉健史, 前田智司, 工藤賢三, セロトニンを介した母乳産生制御メカニズム, 薬学雑誌, 138(6), 829-836 (2018).
  - ②Chiba T., Maeda T., Fujita Y., Takeda R., Kikuchi A., Kudo K. Stress-induced suppression of milk protein is involved in a noradrenergic mechanism in the mammary gland., *Endocrinology*, 160(9), 2074-2084(2019年)



(2) 口頭発表

- ① 勝治みなみ, 千葉健史, 前田智司, 藤田融, 武田リカ, 菊池昭彦, 工藤賢三, 乳腺上皮細胞にはノルアドレナリンのオートクライン機構が存在する, 第138回日本薬学会年会, 金沢, 3月 (2018)
- ② 石黒絵理香, 齋藤祐真, 千葉健史, 平船寛彦, 前田智司, 工藤賢三, 授乳中のストレスは、母乳中ノルアドレナリンを増加させる, 第138回日本薬学会年会, 千葉, 3月 (2019).

(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共に、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為に、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ることを目的としている。前年度までに、神経伝達物質及び電気刺激が有効な惹起法である可能性を示した。平成 30 年度は、(1)神経伝達物質刺激に用いるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの細胞種の同定および各種受容体刺激に対するネットワーク活動の変化、(2)ノンレム睡眠時にみられる徐波を模倣した電気刺激に対する神経ネットワーク活動の変化とシナプス結合強度の変化を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の計画

(1) 神経伝達物質刺激に用いるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの細胞種の同定および各種受容体刺激に対するネットワーク活動の変化

平面微小電極アレイ上にヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン(iCell DopaNeurons, Cellular Dynamics International)を  $8.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で培養し、細胞種の同定および受容体の機能について以下の 2 つの方法で評価した。

①ドーパミンニューロン、グルタミン酸ニューロン、GABAニューロン抗体による細胞種の同定を行い、中脳ドーパミンニューロンのマーカーであるFoxa2の発現、D1受容体、D2受容体の発現の確認を行った。

②培養したドーパミンニューロンにおける受容体の電気生理学的機能を評価する為に、D1 receptorのアゴニストであるSKF 83822、D2 receptorのアンタゴニストであるHaloperidol、セロトニン再取り込み阻害剤であるSertraline、Paroxetineを累積投与し、自発活動の変化を調べた。

(2) 徐波刺激による神経ネットワーク活動の変化とシナプス結合強度の変化

ノンレム睡眠時にみられる徐波を模倣した 1 Hz の電気刺激(LFS)をヒト iPS 細胞由来神経ネットワークに入力することで、睡眠恒常性仮説で提唱されている LTD 現象が見られるかを調べた。具体的には、培養 10 週目の Gluta neuron ネットワーク (GABA ニューロンも含む) に LFS を入力し、以下の 2 つを調べた。

①自発活動の発火数、同期バースト数(SBFs)の変化

②シナプス強度の変化

## 3. 研究の成果

(1) 神経伝達物質刺激に用いるヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの細胞種の同定および各種受容体刺激に対するネットワーク活動の変化

①グルタミン酸、GABA、TH (ドーパミンニューロンマーカー) 抗体で染色した結果、使用した Dopaminergic neuron には、TH 陽性ニューロンだけではなく、グルタミン酸ニューロンや GABA ニューロンも含有していることが判った。次に、Dopaminergic neuron の特徴づけのために、中脳の Dopaminergic neuron の発生や維持に重要な転写因子の 1 つである Foxa2 を染色した [Fig 1A(a)]。今回培養したドーパミンニューロンは中脳の Dopaminergic neuron であることが確かめられた。また、anti-dopamine D1 receptor と anti-dopamine D2 receptor の発現も確認された [Fig 1A(b)]。

②培養した DA neuronal network に D1 receptor のアゴニストである SKF 83822、を投与すると、D1 様受容体が活性化され、10  $\mu$ M で同期バースト発火数が  $184 \pm 34.3\%$  に増加した [p=0.0227, Fig 2(a)]。D2 receptor のアンタゴニストである Haloperidol を投与すると、0.1  $\mu$ M で同期バースト発火が  $137 \pm 19.6\%$  に増加し、1  $\mu$ M では  $3.33 \pm 3.33\%$  に減少した

[ $p=0.004$ , Fig 2(b)]. 3  $\mu\text{M}$ 投与時には、バースト発火が消失した。Haloperidolは、低容量時にはD1 receptorに作用し、高容量時には5-HT2 receptorに拮抗作用を示すことが報告されている。0.1 $\mu\text{M}$ では、D1レセプターの活性化により同期バースト数が増加し、1 $\mu\text{M}$ 以上の用量では5-HT2レセプターへの作用により同期バースト数が減少したものと考えられる。

セロトニン再取り込み阻害剤のSertraline、Paroxetineを投与すると、10  $\mu\text{M}$ で同期バースト発火が見られなくなった[Fig 1B(d), (e)]。SertralineとParoxetineはratのVTAのDA neuronの自発活動を阻害させることが報告されている。本実験による同期バースト発火の消失は動物実験での報告と類似した結果となった。

また、DMSOの累積投与では顕著な応答は見られなかった[ $p>0.999$ , Fig 1(c)]。以上から、培養したDA neuronal networkにはD1 receptor、D2 receptor、Serotonin receptorが存在しており、in vivoドーパミンニューロンと同様の電気生理学的特徴を有していることがわかった。

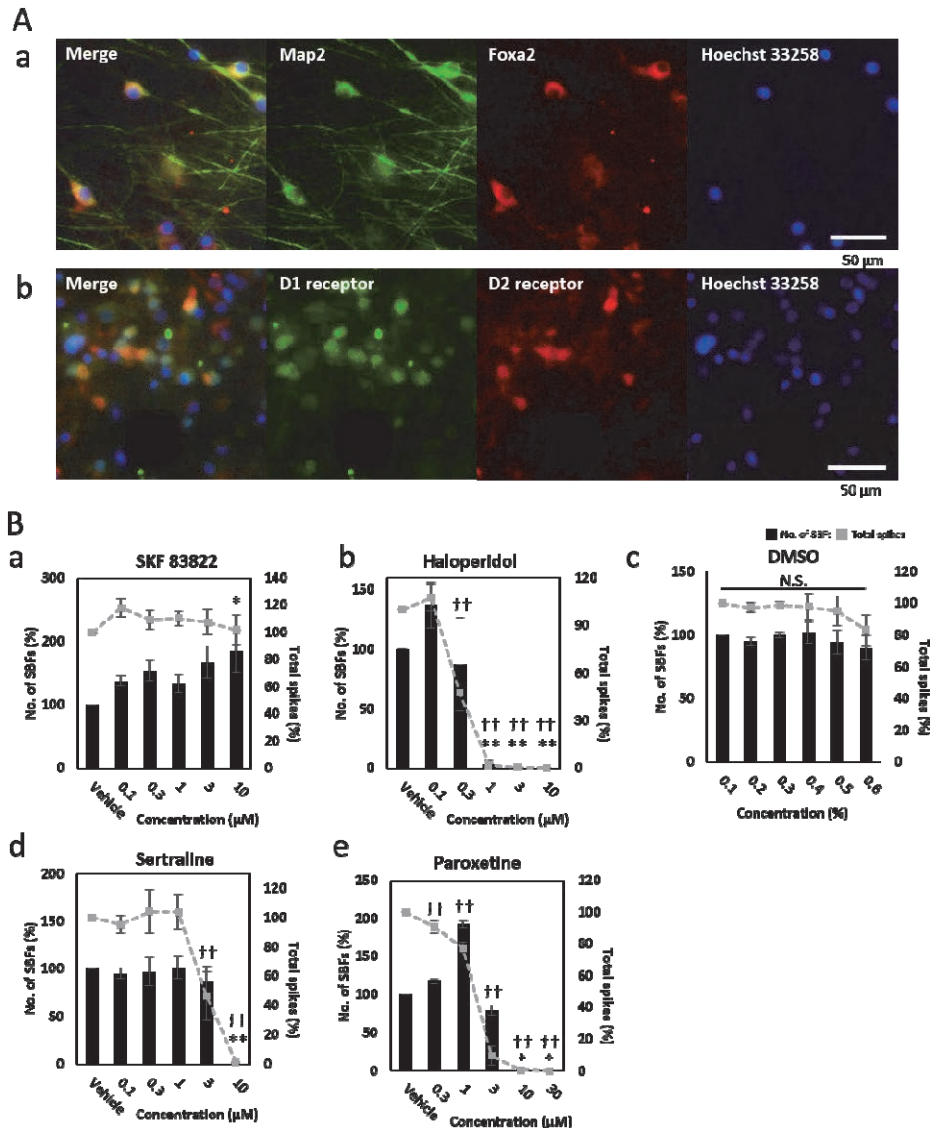


Figure 1. 神経伝達物質刺激に用いるヒトiPS細胞由来神経ネットワークの細胞種の同定および各種受容体刺激に対するネットワーク活動の変化. (A) 23WIVのiCell DopaneuronのFoxa2及びD1およびD2受容体の免疫蛍光画像. (a) Foxa2の発現. (b) ドーパミン受容体発現の確認. (B) SKF 83822, Haloperidol, DMSO, Sertraline, Paroxetine投与におけるSBFsおよび発火数の変化. One way ANOVA検定及び, Dunnett's検定を行った. [ $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  vs. vehicle (SBFs),  $\dagger p<0.05$ ,  $\dagger\dagger p<0.01$  vs. vehicle (total spikes)].

## (2) 徐波刺激による神経ネットワーク活動の変化とシナプス結合強度の変化

### ① 1 Hzの電気刺激 (LFS) による自発活動の発火数、同期バースト数 (SBFs) の変化

睡眠時に脳波で見られる徐波を模倣した1 Hzの電気刺激を外部から入力することで、培養したヒト神経ネットワークに睡眠状態が惹起できるか検証した。実験の概念図を

Fig 2A(a)に示す。まず、電気刺激入力前に3時間の自発活動計測を行い、その後、90分を1セットとした刺激セットを4回入力した。刺激セットを4回行った後、3時間の自発計測を行った。培養したヒトiPS細胞由来神経ネットワークは1 Hzの電気刺激に追従する形で誘発応答を示した[Fig 2A(b)]。電気刺激直後15分間の発火数は、4回それぞれ、 $85.7 \pm 2.74\%$ (195–210 min)、 $82.1 \pm 2.06\%$ (285–300 min)、 $80.3 \pm 2.52\%$ (375–390 min)、 $78.4 \pm 2.77\%$ (465–480 min)に減少した( $p < 0.01$ , one way ANOVA及びDunnett検定)。また、4回目の電気刺激後4時間(After、690–705 min)で刺激直前(Before、165–180 min)の状態まで回復した( $93.3 \pm 3.23\%$ ,  $p = 0.0756$ , t test)。15分間毎の同期バースト発火数(SBF数)の変動をFig 2B(b)に示す。総発火数と同様に刺激前の165–180分のデータを100%として算出し、赤は電気刺激直後の15分間のデータを示している。赤で示した電気刺激直後15分のSBF数は、stim 1の直後から順に、 $84.5 \pm 5.05\%$ (195–210 min)、 $81.6 \pm 4.86\%$ (285–300 min)、 $80.1 \pm 4.81\%$ (375–390 min)、 $78.5 \pm 3.47\%$ (465–480 min)に減少した( $p < 0.05$ , one way ANOVA及びDunnett検定)。また、stim 4の電気刺激後30分(After、480–495 min)で刺激前の状態(Before、165–180 min)に回復した( $101 \pm 4.37\%$ ,  $p = 0.899$ , t test)。以上から、睡眠時の徐波を模倣したLow frequency stimulation (LFS)後に、ヒトiPS細胞由来神経ネットワークの自発活動頻度が減少し、時間と共に回復する現象が繰り返し見られることがわかった。

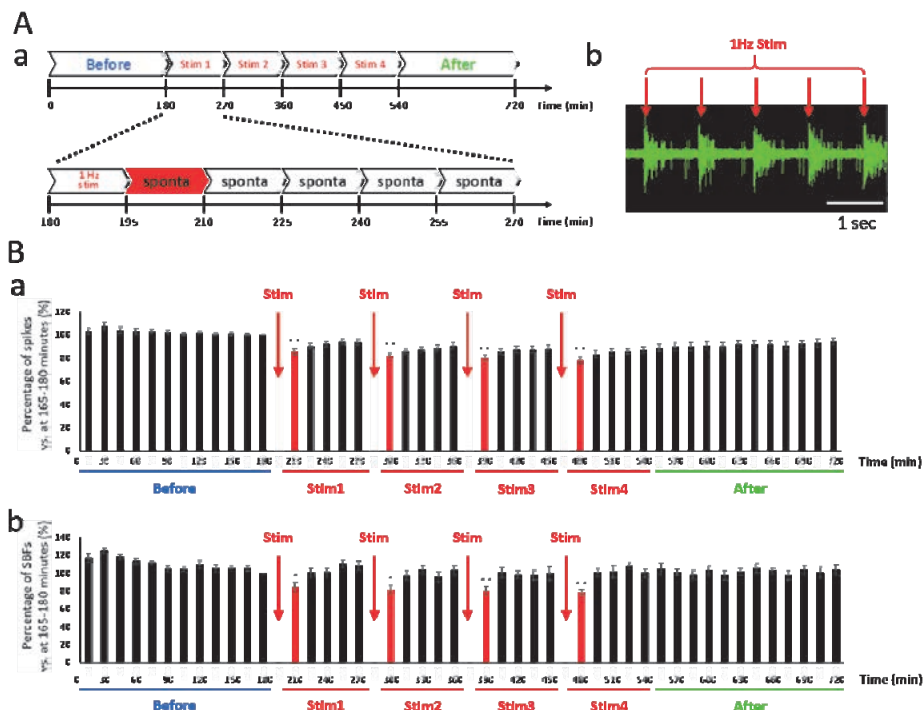


Figure 2. 徐波刺激による神経ネットワーク活動の変化. (A) 実験概要. 90周期で1 Hzの電気刺激を入力した. (a) 実験概念図. (b) 電気刺激に対する神経ネットワークの誘発応答の典型例. (B) 徐波刺激に対する神経ネットワークの応答 (n=8). 一回目の電気刺激の直前の15分間(165–180 minutes)を100%とした. (one way ANOVA及びDunnett’s test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. 165–180 minutes).

## ②LFSによるシナプス強度の変化

LFSによる細胞間のシナプス結合強度の変化を2つの電極間の電気活動の同期性で評価した。ある電極の1発のスパイクに対して100 ms以内に別の電極のスパイクがある場合、その2つのスパイクをSynchronized spikeとして、カウントした(Fig 3A(a), top)。カウントしたSynchronized spikeを定量化するために、各電極のスパイク間隔(ISI)をランダムに入れ替えたsurrogate dataを100個作成し、同じようにSynchronized spikeをカウントした(Fig 3A(a), bottom)。100個のsurrogate dataから得られたSynchronized spikeの平均と標準偏差から、実際のスパイクデータのSynchronized spikeのZスコアを算出した(Fig 3A(b))。その結果、LFS後はZスコアが減少し、神経ネットワークの結合強度が減少していた。さらに、電極同士の距離が近いほど刺激直後15分間のZスコアが優位に減少

した (Fig 3B)。また、Sporadic spikesのBeforeのZスコアが2.58を超える ( $p < 0.01$ の有意水準) 電極のペアのZスコアの減少率は85.6%、一方Zスコアが2.58以下のペアのZスコアの減少率は53.2%であった (Fig 3C)。これらの結果から、刺激前のZスコアが大きい、すなわち結合強度が強いものがZスコアの減少が大きいことが分かった。Sporadic のデータについてBeforeのZスコアの平均が2.58を超える電極のペアのみを解析の対象とし、ZスコアのLFSに対する時間変化を評価すると、電気刺激直後15分間のZスコアはStim 1から順に、 $76.4 \pm 6.53\%$ ,  $74.0 \pm 5.43\%$ ,  $71.7 \pm 7.86\%$ ,  $70.3 \pm 4.77\%$ に有意に減少した (Fig 3D)。ノンレム睡眠時にみられる徐波を模倣したLFSは神経ネットワーク内の結合強度を弱める、つまり、ネットワークの興奮性を弱める傾向が認められた。

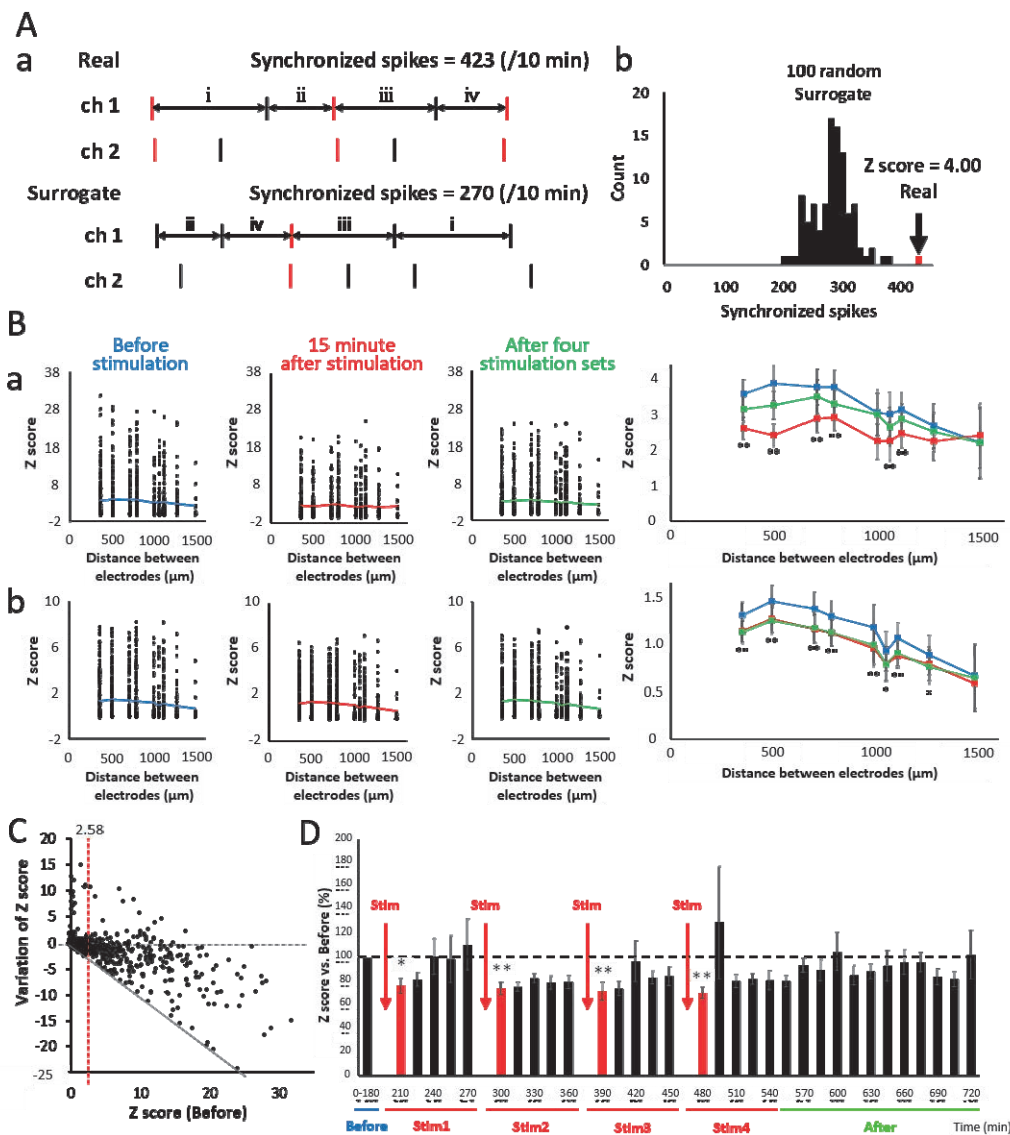


Figure 3. 徐波刺激によるシナプス結合強度の変化. (A) シナプス結合強度の定量化. (a) 2電極間の Synchronized spikes のカウント. (b) Real データと Surrogate データの Synchronized spikes の数のヒストグラム. Surrogate (black), Real (red). (B) 電極間の距離と Zスコア. SBFs 以外の spike (Sporadic spikes) と SBF 内の spike (Burst spikes) に分けてそれぞれの Zスコアを算出した. 左の3つのグラフは Before stimulation (blue), 15 minute after stimulation (red), After for stimulation sets (green) の Zスコアを示す. 点は電極ペアごとの Zスコア、実線は電極距離ごとの平均を示す. 右のグラフは電極距離ごとの平均を示す ( $n=8$  well  $\times$  120 ペア). 検定は、Before stimulation と 15 minute after stimulation とで t 検定を行った (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. Before stimulation). (a) Sporadic spikes. (b) Burst spikes. (C) Sporadic spikes の電気刺激前の Zスコアと刺激後の変動 ( $n=8$  well  $\times$  120 ペア). 検定は Before と 15 minute after stimulation とで one way ANOVA 及び Dunnett's test を行った (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. Before stimulation).

## 4. 研究の反省・考察

使用しているヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンの基礎的な性質を調べ、中脳のDopaminergic neuron であること、D1 receptor、D2 receptor、Serotonin receptorが存在しており、*in vivo*ドーパミンニューロンと同様の電気生理学的特徴を有していることがわかった。また、ノンレム睡眠時に出現する徐波に注目し、それを模擬する低頻度の電気刺激を標本に対して加えた実験からは、LFS刺激は、ヒトiPS細胞由来神経ネットワーク内の結合強度を弱めることがわかった。この結果は、シナプス結合が睡眠時に純減するという現象を再現している可能性がある。さらに、低頻度刺激を行う前のz scoreと低頻度刺激によるz scoreの変化量との関係を調べたところ、元々z scoreが大きい電極の組み合わせほど、低頻度刺激後にz scoreが減少する傾向を見出した。この結果は、全ての電極において同じ強度で刺激を加えているにも関わらず、シナプス結合の減弱は一樣ではなく一部（特に元々強い結合）にのみ誘導されることを示唆している。これは、徐波はシナプス結合を一樣に減弱させるのではなく、強い結合を減弱させる、言い換えれば結合強度のばらつきを解消させるように回路を変化させることを暗示しており、とても興味深い。

睡眠恒常性仮説では、ノンレム睡眠中に観察される特徴的な脳波である約1 Hzの徐波がニューラルネットワークのシナプス結合を弱めることが示唆されている。本研究は、培養ヒト由来神経ネットワークにおいて、睡眠恒常性仮説を支持する初の結果と言える。

睡眠関連薬剤の応答は今年度実施できなかった為、来年度に実施する予定である。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

Remi Yokoi, Miho Okabe, Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Akihiro Karashima, Ikuro Suzuki, Impact of sleep-wake-associated neuromodulators and repetitive low-frequency stimulation on human iPSC-derived neurons, *Front. Neurosci.* 13:554. 1-15, 2019

### (2) 口頭発表

横井れみ, 松田直毅, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, *in vitro*ヒトiPS細胞由来神経ネットワークへ睡眠・覚醒リズムを惹起させる為の基礎検討, 第18回日本再生医療学会, 2019, 兵庫

横井れみ, 松田直毅, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, 神経伝達物質および電気刺激は培養ヒトiPS細胞由来神経ネットワークに睡眠・覚醒様リズムを惹起する, 日本安全性薬理研究会 第10回学術年会, 2019, 東京

### (3) 出版物

なし