

マウス大脳皮質におけるグリア新生の解析法の開発

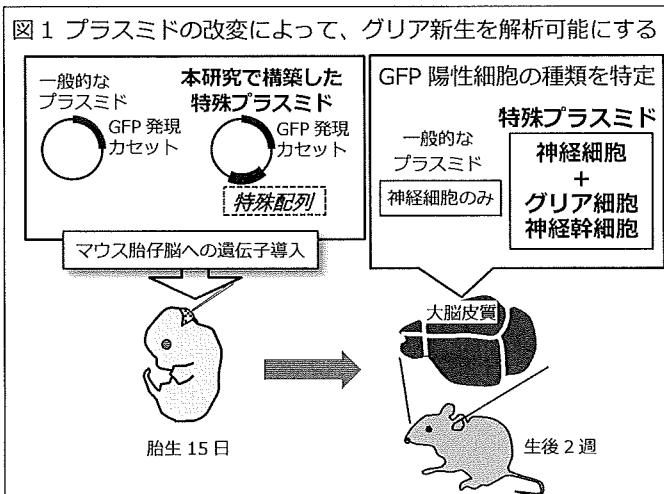
横浜市立大学大学院生命医科学研究科 特任助教
佐竹 智子

(研究目的)

我々の高度な認知機能を担う大脳皮質は、主に「神経細胞」と「グリア細胞」によって構成され、いずれも起源は同じ側脳室帯に存在する「神経幹細胞」の分裂によって生み出される。胎生期には神経幹細胞は神経細胞を産生するが、出生後にはグリア細胞を産生するようになる（グリア新生）。グリア新生によってグリア細胞の数は出生後に急速に増加し、それに伴って脳サイズも増大することから、グリア新生の不全は知的・精神障害を伴う先天性小頭症の原因と考えられている。しかし、グリア新生の機構はほとんど未解明で、その理由は「神経幹細胞を長期に渡って標識し遺伝子発現を操作する方法が無い」ことにある。本研究では、生後のマウスの大脳皮質において、神経幹細胞からのグリア細胞の産生機構を解析可能にすることを目的とし、広く普及している「子宮内マウス胎仔脳への電気穿孔によるプラスミド導入法」に用いるプラスミドに改変を加えることで、出生後のマウス大脳皮質で神経幹細胞やグリア細胞の遺伝子発現を操作する方法の開発を行った。

(研究方法)

「子宮内マウス胎仔脳への電気穿孔によるプラスミド導入法(in utero electroporation, IUE)」は、極細に加工したガラス管でマウス胎仔の脳室にプラスミドを注入し通電することで、非侵襲的に神経幹細胞へプラスミドを遺伝子導入する方法で、近年急速に普及した。IUEにより胎生期の脳形成における神経幹細胞からの神経細胞の産生やその発達の機構の解明が飛躍的に進んだ。プラスミドは、導入した細胞が分裂すると希釈・脱落するため、分裂を繰り返す神経幹細胞では遺伝子導入効果が持続しない。そのため、長期にわたって蛍光タンパク質の発現などで追跡したり、遺伝子発現を操作したりすることができず、グリア新生の解析に応用できない。これを克服するため、本研究では、プラスミドに「細胞分裂期にゲノムDNAと一緒に複製され、非分裂時にも積極的に維持されるための特殊な配列」を組み込んでIUEに使用し、生後のマウス大脳皮質において、神経幹細胞やグリア細胞で遺伝子導入効果が持続するかを検証した（図1）。更に、このプラスミドにGFAPプロモーターで蛍光タンパク質の発現を誘導するカセットを組み込み、神経幹細胞とグリア細胞に限定した遺伝子発現操作が可能かを検証した。

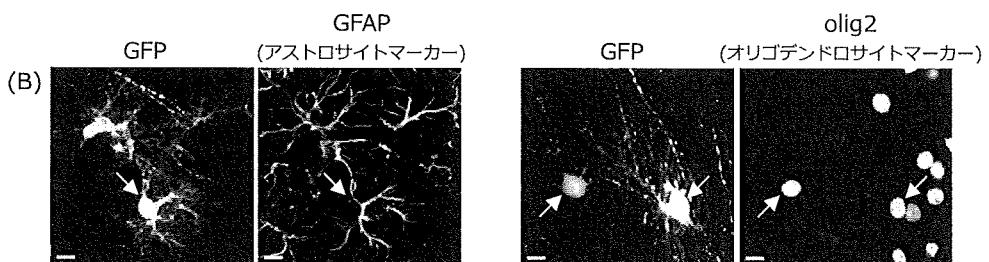
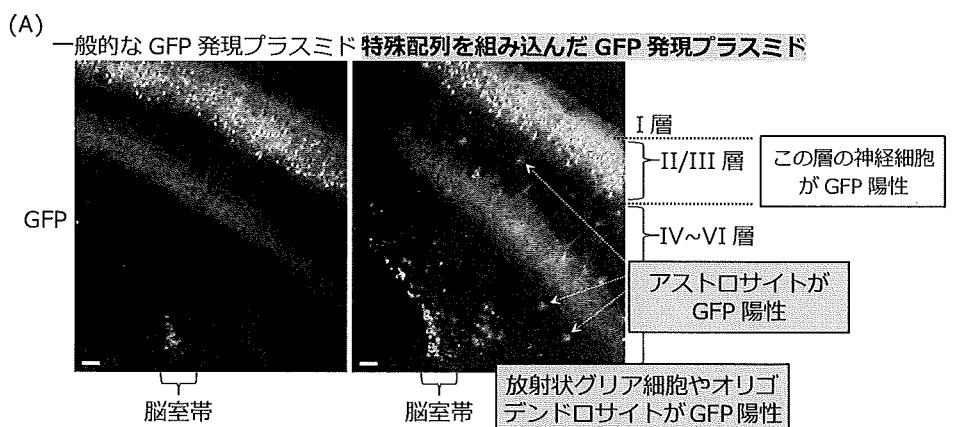


(結果)

(1) 特殊配列を組み込んだプラスミドは、グリア細胞で遺伝子導入効果を持続させる。

細胞種を問わず普遍的な遺伝子発現を誘導する CAG プロモーターで GFP (緑色蛍光タンパク質) を発現する一般的なプラスミドと、これに特殊配列を組み込んだプラスミド (特殊プラスミド) を、胎生 15 日のマウス胎仔へ IUE し、生後 2 週で、GFP 陽性の細胞種を比較した。その結果、一般的なプラスミドでは、多くの既報に一致して、皮質上層の神経細胞が GFP 陽性であり、同時に脳室に面した脳室帯にも GFP 陽性細胞が観察された(図 2A 左)。一方、特殊プラスミドでは、一般的なプラスミドと同様に皮質上層の神経細胞が GFP 陽性であることは共通だったが、脳室帯の GFP 陽性細胞の数は一般的なプラスミドよりも多く、蛍光が強かった(図 2A 右)。これに加え、皮質内には特有の形態をした抗 GFAP 抗体陽性のアストロサイトが多数観察された(図 2A 右、2B 左)。更に、脳梁に繋がる白質部分には、GFP 陽性のオリゴデンドロサイト (抗 olig2 抗体陽性、図 2B 右) も観察された。脳室帯の細胞は、抗 GFAP 抗体陽性であることと、細胞の形態から、神経幹細胞である放射状グリア細胞とそれが形質転換した、あるいは產生した未熟なアストロサイトだと考えられた。こうした GFP 陽性のグリア細胞は、特殊配列プラスミドの IUE でのみ観察されたことから、特殊配列を組み込んだプラスミドは、神経細胞はもちろん、神経幹細胞とグリア細胞でも遺伝子導入効果を持続させられると結論づけた。

図 2 特殊配列を組み込んだ GFP 発現プラスミドは、グリア細胞でも遺伝子導入効果が持続する。

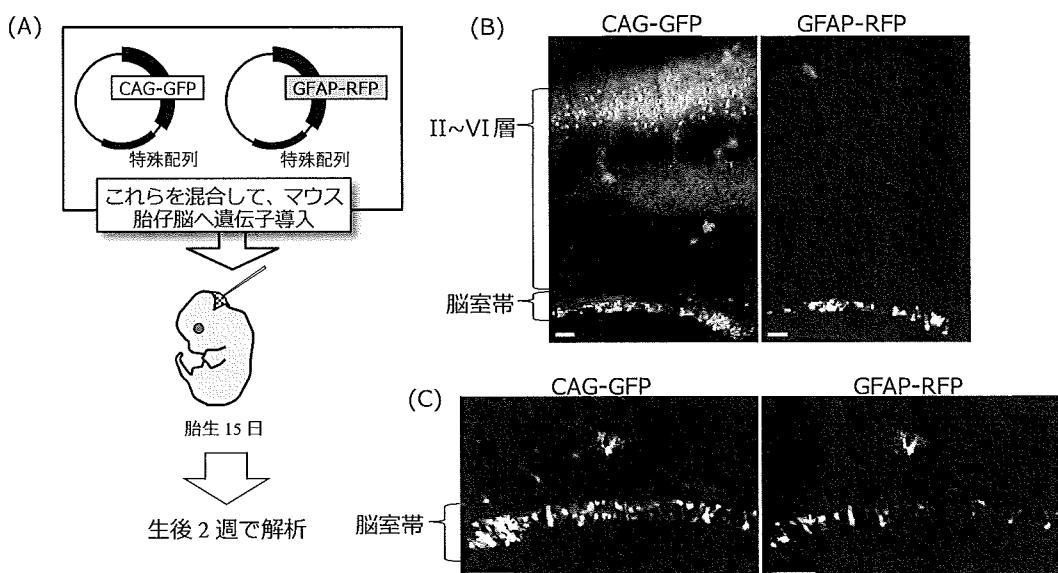


(A) マウス胎生 15 日に IUE し、生後 2 週で大脳の冠状断切片を作製して蛍光顕微鏡で GFP 陽性細胞を観察した。一般的な GFP 発現プラスミドでは神経細胞と脳室帯の一部の放射状グリア細胞 (神経幹細胞) と考えられる細胞が GFP 陽性であった。一方、特殊プラスミドでは、I~VI 層において 抗 GFAP 抗体陽性のアストロサイトや(B, 左)、脳室帯付近の抗 olig2 抗体陽性のオリゴデンドロサイト (B, 右)においても、多数の GFP 陽性細胞が観察された(矢印)。(スケールバー: (A) 100 μm, (B) 10 μm)

(2) 特殊プラスミドに細胞種特異的プロモーターによる遺伝子発現カセットを組み込むことで、細胞種特異的な遺伝子発現操作が可能になる。

続いて、特殊プラスミドを用いて「細胞種を限定した遺伝子発現操作が可能か」を検討した。とくに本研究では、神経幹細胞からのグリア細胞の産生を解析可能にすることを目的としているため、神経幹細胞である放射状グリア細胞とアストロサイトに特異的な遺伝子発現操作を目指した。これを実現するために、GFAP プロモーター（放射状グリア細胞やアストロサイトで遺伝子転写活性がある）で RFP（赤色蛍光タンパク質）を発現させるカセットを特殊プラスミドに組み込み（図 3A）、CAG プロモーターで GFP を発現する特殊プラスミドと混合して胎生 15 日に IUE を行い、生後 2 週で観察した。その結果、図 2A と同様に、CAG プロモーターにつないだ GFP は皮質上層の神経細胞と皮質層のアストロサイトおよび脳室帯の細胞が発現したのに対し（図 3B 左）、GFAP プロモーターにつないだ RFP は脳室帯の細胞のみが発現した（図 3B 右）。脳室帯を詳しく観察すると、その形状から、放射状グリア細胞とその周囲の未熟なアストロサイトが RFP 陽性であった（図 3C）。皮質層内に観察された GFP 陽性のアストロサイトでは、RFP 陽性のものもわずかにあったが、ほとんどが脳室帯の細胞に比べて蛍光が非常に弱く、検出が困難であった。これらの結果から、GFAP プロモーターを利用した遺伝子発現カセットを組み込んだ特殊プラスミドは、「放射状グリア細胞と未熟なアストロサイト」に対して特異性の高い遺伝子発現操作を可能にしうると考えられた。

図 3 特殊プラスミドに、GFAP プロモーターで RFP を発現するカセットを組み込むと、脳室帯の細胞に特異的に RFP を発現させられる。



(A) CAG プロモーター（普遍的プロモーター）で GFP を発現する特殊プラスミドと、GFAP プロモーター（グリア細胞特異的プロモーター）で RFP を発現する特殊プラスミドを、同量ずつ混合してマウス胎生 15 日に IUE し、生後 2 週で大脳組織切片を作製して蛍光顕微鏡で観察した。

(B と C) RFP 陽性細胞は脳室帯にほぼ限定して存在し、皮質層にはほとんど観察されなかった。脳室帯の RFP 陽性細胞の形態から(C)、これらは放射状グリア細胞と、それが分化あるいは產生した未熟なアストロサイトと考えられた。(スケールバー, 100 μm)

(成果・考察)

本研究では、一般的な GFP 発現プラスミドに「細胞分裂期にゲノム DNA と一緒に複製され、非分裂時にも積極的に維持されるための特殊な配列」を組み込んで IUE に使用すると、生後のマウス脳においても、非分裂性の神経細胞はもちろん、分裂性の細胞である神経幹細胞(放射状グリア細胞) やそれから產生されるグリア細胞(アストロサイトとオリゴ денドロサイト) で、遺伝子導入効果の継続を示す GFP の発現が検出されることを示した。更に、特殊プラスミドに GFAP プロモーターによる RFP 発現カセットを組み込むことで、放射状グリア細胞と一部のアストロサイトに限定して RFP を発現させることができることを示した。これらは、本研究目的である「生後のマウスの大脳皮質において、神経幹細胞からのグリア細胞の产生機構を解析可能にする」ことが、特殊プラスミドと GFAP プロモーターなどの細胞種特異的プロモーターによる遺伝子発現カセットの組み合わせによって達成可能であることを示した、重要な成果である。

現在普及している一般的なプラスミドを使った IUE では、解析対象にできる細胞種は、遺伝子導入後 48 時間程度の神経幹細胞とそれから產生された神経細胞に限定され、その時期は専ら胎生期である。IUE の普及により「胎生期の脳の形成」における様々な遺伝子の働きが調べられ、同時に、先天性小頭症の発症機構が解明してきた。その一方で、「出生後の脳の発達」に対しては、非侵襲的かつ安定的に遺伝子導入する方法が無く、機構の解明は取り残されている。この課題に対し、特殊配列を組み込んだプラスミドを IUE に用いた本研究の成果は、「生後の脳の発達」における様々な遺伝子の働きを調べることを可能にするものである。特殊配列は、一般的なプラスミドコンストラクションの手法で、簡単にプラスミドに組み込むことができることを強調しておきたい。

特殊プラスミドを用いた IUE は、後天性小頭症の発症機構の解明に応用できると考えられる。後天性小頭症は、胎生期の脳形成はほぼ正常だが、出生後に脳のサイズの増大が停滞し、精神障害やてんかんなど、多様な症状が現れる。原因遺伝子が複数報告されているにもかかわらず、これまで発症機構が解明できなかった。しかし、特殊プラスミドと細胞種特異的な遺伝子発現カセットの組み合わせた IUE によって、後天性小頭症の原因遺伝子の発現を様々な細胞種で操作すれば、疾患の発症に関わる細胞種が特定できると期待される。

IUE での遺伝子導入効果を長期に維持するという点で、プラスミドにトランスポゾンシステムを搭載して IUE に用い、神経幹細胞のゲノムにプラスミドを組み込むことで、その子孫細胞のすべてを蛍光タンパク質の発現で追跡可能にする方法が報告されている。しかし、細胞毎にゲノムの異なる領域へ外来遺伝子が組み込まれるため、予期しない異常を生じる可能性がある。本研究で用いた特殊配列プラスミドは、細胞のゲノムには組み込まれない。ただ、特殊配列は(論文での発表の前のため、詳細に記述することは控えさせていただきます)、ウイルス由来のもので、タンパク質の発現を伴うため、このタンパク質が遺伝子導入した細胞(神経幹細胞、神経細胞、グリア細胞)の性質を変化させてしまう可能性が残る。この点を検証することが、次の課題である。

LOTUSによる神経突起伸長の作用機序の解明

横浜市立大学 大学院 生命医科学研究科
栗原 裕司

【研究目的】

脳や脊髄の外傷性損傷等による神経機能喪失に対する機能再建は非常に重要な課題である。神経機能再建を目指した再生医療戦略として、ES 細胞や iPS 細胞などの多分化能を有する細胞の移植が特に注目されているが、補填した神経細胞による神経回路網の再形成も必須である。しかしながら、成体の中核神経系には、神経突起を伸長させる因子が乏しいことに加え、神経突起伸長を阻害する因子（神経再生阻害因子）が存在するため、神経回路網再形成の実現は困難となっている。神経再生阻害因子の代表格である Nogo は、Nogo receptor-1 (NgR1)^[1]および Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB)^[2]に結合することによって、神経細胞の突起伸長を阻害する。このことから、NgR1 および PirB は損傷や障害を受けた中枢神経系の再生を妨害する主要因の一つであると考えられている^[3,4]。

申請者らは、新規の神経回路形分子 Lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) を発見し、LOTUS は NgR1 に結合し、Nogo-NgR1 結合を抑制し、Nogo の作用を抑制することを明らかにした^[5,6]。さらに、申請者は、LOTUS が PirB にも結合することを発見し、LOTUS は Nogo-PirB 結合を抑制することによって、Nogo の作用を抑制することを見出した (Kurihara *et al.*, 未発表)。また一方で、申請者は、LOTUS が神経細胞の突起を伸長させることを発見し、この機能が NgR1 以外の未同定の LOTUS 結合分子によって媒介されることも見出した。本研究では、LOTUS の神経突起伸長作用を媒介する結合分子を探査・同定し、その同定分子を介した LOTUS の神経突起伸長作用の分子機序を解明することを目的とした。

【研究方法】

(1) LOTUS 基質上における野生型マウスの網膜神経節細胞の突起伸長に対する PirB 機能阻害抗体の効果の検討

申請者は、LOTUS 相互作用分子として PirB を同定した (Kurihara *et al.*, 未発表) ことから、LOTUS は網膜神経細胞上に発現する PirB を介して神経突起を伸長させると予測した。そこで、LOTUS-PirB 結合を阻害する抗 PirB 抗体を用いて、LOTUS の神経突起伸長作用を検討した。

胎生 13 日目のマウスから眼球を摘出し、網膜神経節細胞を採取した。採取した神経節細胞を精製 LOTUS タンパク質をコートした培養皿に培養した。その後に LOTUS-PirB 結合阻害抗体を添加して、48 時間培養した。このように処置した神経節細胞を培養後に固定し、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) とプロモクロロインドリルりん酸 (BCIP) を添加し、内在性のアルカリホスファターゼ (AP) 反応により神経突起を可視化して神経突起の長さを計測した。

(2) LOTUS 基質上における *Lotus* 遺伝子欠損マウスの網膜神経節細胞の突起伸長作用の検討

申請者は、LOTUS は網膜神経細胞上に発現する LOTUS と結合し、神経突起を伸長させると予測した。そこで、*Lotus* 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて、LOTUS の神経突起伸長作用を検討した。

胎生 13 日目の *Lotus*-KO マウスから眼球を摘出し、網膜神経節細胞を採取した。この神経節細胞を精製 LOTUS をコートした培養皿に 48 時間培養した。このように処置した神経節細胞を培養後に固定し、NBT と BCIP を添加し、内在性の AP 反応により神経突起を可視化して神経突起の長さを計測した。

(3) Neuro2A に発現する、LOTUS 相互作用分子の探索

申請者は、レチノイン酸処理により神経細胞様に分化したマウス神経芽細胞腫由来の細胞株 Neuro2A に対して、精製 LOTUS タンパク質が結合すること、および精製 LOTUS 基質上で神経突起が伸長することを明らかにしている。そこで、Neuro2A を用いて、LOTUS と相互作用する分子の同定を試みた。

Neuro2A に対して、streptavidin-binding protein (SBP) タグ融合の LOTUS (SBP-LOTUS) を強制発現させ、細胞を可溶化した。ストレプトアビジン樹脂を用いて、これらの細胞可溶化液から LOTUS と相互作用する分子を精製した。この精製産物を SDS-PAGE により分離し、SYPRO Ruby 染色により可視化された各々のバンドを切出し、そのアクリルアミドゲル片から各々の分子を抽出してプロテオーム解析した。

【結果】

(1) LOTUS 基質上における野生型マウスの網膜神経節細胞の突起伸長に対する PirB 機能阻害抗体の効果

精製 LOTUS をコートした培養皿にマウスの網膜神経節細胞を、LOTUS-PirB 結合阻害抗体を添加し培養して、神経突起の長さを計測したところ、神経突起伸長にほとんど影響しなかった（図 1）。

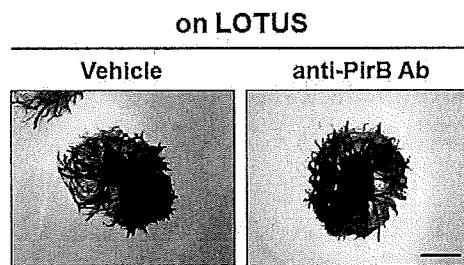


図 1 LOTUS の神経突起伸長作用に対する PirB 機能阻害抗体の効果。
Scale bar, 200 μm.

(2) LOTUS 基質上における *Lotus* 遺伝子欠損マウスの網膜神経節細胞の突起伸長作用

精製 LOTUS をコートした培養皿に *Lotus*-KO マウスの網膜神経節細胞を培養し、神経突起の長さを計測したところ、神経突起の伸長は野生型マウスとほぼ同様であった（図 2 A、B）。

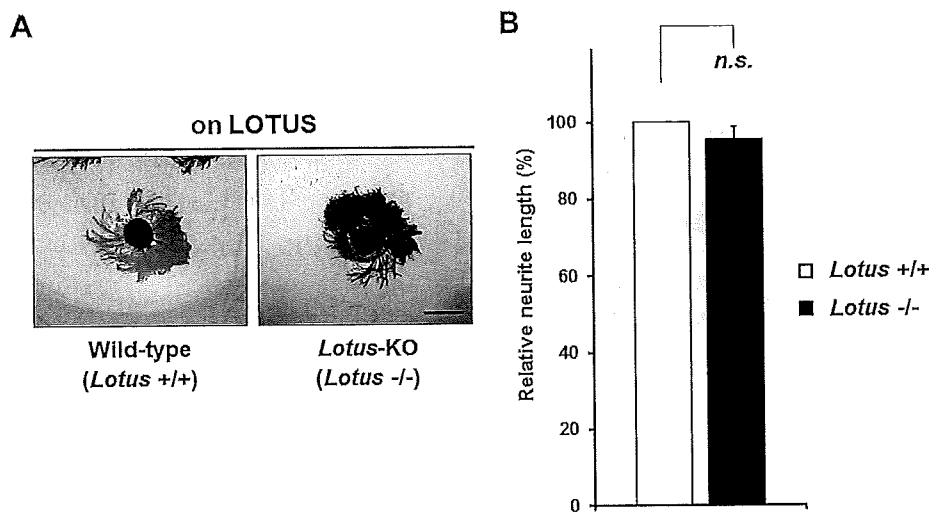


図 2 *Lotus*-KO マウスの網膜神経節細胞における LOTUS の神経突起伸長作用

A LOTUS 基質上に培養した *Lotus*-KO マウスの網膜神経節細胞。

Scale bar, 200 μ m.

B 神経突起の長さの定量化。野生型マウスの神経突起の長さを 100 とし、その相対値で示した。平均値土標準誤差 ($n = 4\cdot6$ explants、three littermates、Welch's t test；n.s., not significant)。

(3) Neuro2A に発現する、LOTUS 相互作用候補分子

SBP-LOTUS を強制発現させた Neuro2A の細胞可溶化液から精製した LOTUS と相互作用する分子を SDS-PAGE により分離し、SYPRO Ruby 染色したところ、複数のバンドが検出された（図 3）。各々のバンドを切出し、そのゲル片からの抽出物を質量分析で測定したところ、種々の接着分子、トランスポーター、タンパク分解酵素、上皮成長因子ファミリータンパク質および免疫系に関与するタンパク質などが LOTUS と相互作用する候補分子として検出された。

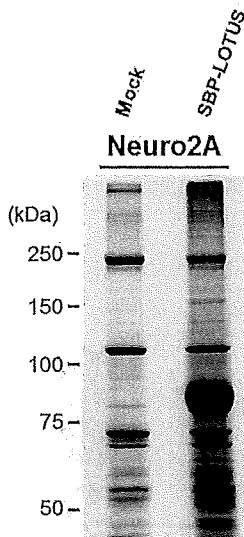


図3 SBP-LOTUS を強制発現させた Neuro2A の細胞可溶化液をストレプトアビジン樹脂で精製し、SDS-PAGE による分離した LOTUS 相互作用分子の SYPRO Ruby 染色。

【成果・考察】

申請者は LOTUS の新たな機能として神経突起伸長作用を発見し、この作用は NgR1 以外の LOTUS 結合分子によって媒介される。本研究により、LOTUS の神経突起伸長作用は PirB および LOTUS 以外の未同定の LOTUS 相互作用分子によって媒介されることが示された。さらに、神経突起伸長作用を媒介する LOTUS 相互作用候補分子として、様々な膜タンパク質を見出した。これらの成果は LOTUS の神経突起伸長作用の分子機序解明に重要な知見となる。

現在、質量分析の解析結果が示す LOTUS と相互作用する候補分子が LOTUS と相互作用するか否か、および神経突起伸長を媒介するか否かを検証する実験を遂行中である。

【学会発表】

- 栗原 裕司, 川上 裕, 竹居 光太郎. 神経回路形成因子 LOTUS は神経突起伸長を促進する. 第 60 回日本神経化学会大会 仙台, 9, 2017.

【参考文献】

- [1] Fournier *et al.*, Nature, 409, 341-346. 2001.
- [2] Atwal *et al.*, Science, 322, 967-970. 2008.
- [3] Kim *et al.*, Neuron, 44, 439-451. 2004.
- [4] Adelson *et al.*, Neuron, 73, 1100-1107. 2012.
- [5] Sato *et al.*, Science, 333, 769-773. 2011.
- [6] Kurihara *et al.*, Mol Cell Neurosci., 61, 211-218. 2014.

天然変性タンパク質 Hef の揺らいだ構造と機能の解明

横浜市立大学大学院生命医科学研究科 特任助教
小田 隆

(研究目的)

天然変性タンパク質は「タンパク質はポリペプチド鎖が一定の構造に折れ疊まることで機能する」というこれまでの考えを根底から覆し、タンパク質研究に大きなパラダイムシフトをもたらした。天然変性タンパク質は構造の柔軟性により様々な相手と相互作用し、細胞内シグナル伝達のハブとして機能する。天然変性タンパク質は様々な細胞内シグナル伝達経路に見られ、例えばクロマチン形成、転写、翻訳、DNA修復、複製等の様々な生命現象に関与し、その異常はがん等様々な疾病の原因ともなる。折れ疊まって立体構造をとるいわゆる通常のタンパク質ではX線結晶構造解析やNMRによりこれまでに多くの立体構造が原子レベルで決定され、生体内での機能発現における重要な発見がなされてきた。しかし、天然変性タンパク質では構造の柔軟性ゆえに立体構造をとらえることが難しく、従って機能発現の分子機構を理解するには大きな困難が伴う。本研究ではDNA損傷の修復にかかわる天然変性タンパク質Hefを例に、X線小角散乱法と計算科学的手法を合わせた解析を行うことでこの問題を解決し、構造の柔軟性と機能発現機構の解明を目指した。Hefは好熱性古細菌由来のタンパク質でN末端側にヘリカーゼドメイン、C末端側にヌクレアーゼドメインを持ち、その間が天然変性領域(IDR)でつながれている。Hef IDRにはDNAクランプ(PCNA 3量体)結合モチーフ(PIP-box)があり、DNA損傷で停止したPCNAに結合することで機能すると考えられる(図1)。この時Hef IDRはPCNA上でヘリカーゼ、ヌクレアーゼの両ドメインが機能するための適切な配向を調整する役割や、他のDNA修復タンパク質が結合するための足場としての役割があるものと想像しているが、その詳細は全くわかっていない。また我々は先行研究からHef IDRがDNA上でのPCNAのスライドを抑制し、損傷部位に留めておくことでHefを含む修復タンパク質が安定に機能するという新たなモデルも提唱している。これらのHef IDRの多彩な機能は構造の柔軟性と複合体形成に伴う高次構造変化によって発現すると考えられるため、その機構を解明することを目的として解析を行った。

(研究方法)

好熱性古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来のHefの天然変性領域 (Hef IDR)とPCNAは大腸菌で発現させ精製した。得られた両タンパク質と15塩基対の二重鎖DNAを混合し、ゲルfiltrationクロマトグラフィーにより3者複合体を分取した。タンパク質濃度約5 mg/ml (PCNA 3 mg/ml, Hef IDR 2 mg/ml) の複合体試料を用いてX線小角散乱装置 BioSAXS-1000 (Rigaku)により測定を行った。X線発生装置はMicroMax007 (Rigaku)、検出器はPILATUS 100k (DECTRIS)を用い、20°Cで4時間露光した(図2A)。試料のBuffer 組成は0.1 M NaCl, 10 mM HEPES pH7.5, 0.1 mM EDTAとした。得られた散乱強度データはSAXS Lab (Rigaku) を用いて散乱ベクトル q の関数である一次元の散乱曲線 $I(q)$ へ変換した。ここで q は $q=4\pi\sin\theta/\lambda$, 2θ は散乱角、 λ はX線の波長1.5418 Åである。得られた $I(q)$ から溶媒由来の $I(q)$ を差し引き、試料分子

由来の $I(q)$ を得た。天然変性領域が水溶液中で取り得る様々な構造は平均化された $I(q)$ として観測される。従ってこの試料分子由来の $I(q)$ の $q = 0.011 - 0.500 (\text{\AA}^{-1})$ の領域を用いて、Ensemble Optimization Method (EOM)により水溶液中のHef IDRの揺らいだ構造を構築した。PCNAとPIP-boxの立体構造は古細菌由来PCNA-FEN1 PIP-box複合体構造(PDB ID 5DAI)を鋳型とし、PIP-boxの前後のIDRの立体構造はランダムに10,000構造作製した後、実測の $I(q)$ を再現できるアンサンブル構造の探索を行った。得られたアンサンブル構造をもとに、Hef IDRの機能的に重要と思われる領域を欠失させた変異体を作製し、Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)により3者複合体の形成能を評価し、構造と機能の相関を確認した。

(結果)

X線小角散乱実験により得られた $I(q)$ を図2Bに、EOMにより得られた立体構造モデルのアンサンブルを図2Cに示す。3者複合体が水溶液中で取り得る構造は5つの代表構造のアンサンブルとして再現された。各構造の水溶液中での存在比率は図2Cに示すとおりである。モデル構造アンサンブルから計算される $I(q)$ と実測の $I(q)$ はよく一致しており(図2B)、得られた構造アンサンブルが実測データをよく再現できていることがわかる。

5つの構造のうち、最も存在比率の高い構造 (Model 2 : 50%) ではHef IDRのN末端側がPCNAの中心を通るDNAに極めて接近していた。このことはHef IDRがDNAと直接相互作用していることを示唆する。Hef IDRには多数の塩基性残基が存在しており(図2C Model 2 拡大図)、DNAのリン酸基と静電的相互作用していると推測され、これによりPCNAのスライドが抑制されると推測される。EMSAではHef IDRのN末端側20残基を欠失させると($\Delta N20$)3者複合体の形成能が著しく低下することが示された(図3)。我々の先行研究からHef IDRとPCNA、PCNAとDNA、DNAとHef IDRはそれぞれ2者間での相互作用は弱く、3者が集まることで安定な複合体が形成されることが示されている。従って、N末端側20残基の欠失によりHef IDRとDNAの間の相互作用が失われ3者複合体が不安定化したものと判断された。

一方で、C末端側21残基を欠失させた変異体($\Delta C21$)はEMSAでは3者複合体形成能の大きな低下は見られなかった(図3)。アンサンブル構造ではC末端側がDNAに接近している構造 (Model 4)の存在比率は13%でN末端側が接近している構造(50%)と比べて低い。つまり、C末端側はN末端側ほどDNAとの相互作用に寄与していないと判断される。但し、本稿には記載しないがゲルろ過クロマトグラフィーによる解析結果では $\Delta C21$ 変異体も野生型と比較するとやはり3者複合体形成能は低下していた。従ってC末端側とDNAの相互作用も少ないながらあり、アンサンブル構造の存在比率を反映した結果となった。

また、N末端側やC末端側がDNAと相互作用している構造(Model 2, 4)のほかに、どちらともいえない構造も見られた(Model 1, 3, 5)。Hef IDRとDNAの相互作用はこれらの構造を行き来する非常にダイナミックな状態であると推測される。一般に、天然変性領域はターゲット

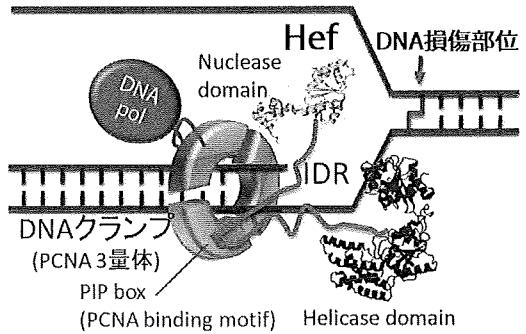


図1. Hefの機能モデル
Hefは損傷部位で停止したPCNA上に結合し、ヌクレアーゼドメイン、ヘリカーゼドメインがフォーク構造DNAに作用することでDNA修復が開始されると考えられている。

と結合することで特定の構造に折れ疊まることにより特異的な相互作用を可能にするとされている(結合と連結した折れ疊まり機構)。しかし、Hef IDRでは複合体を形成しても一つの構造に収束しておらず、必ずしも上記の機構に当てはまらないことが示された。このように複合体を形成しても柔軟な構造を保っていることは他のDNA修復因子の結合にとって有利であるのかもしれない。またHefのヘリカーゼドメインとヌクレアーゼドメインはどちらも複製フォークDNAに作用するため、2つのドメインの配置を柔軟に切り替える役割があるのかもしれない。

さらに、Hef IDRはDNAだけではなく、PCNAの表面にも接近している構造が複数見られた(Model 1,3,4,5)。PCNAの表面には酸性残基が多く配置しており、これらと相互作用してい

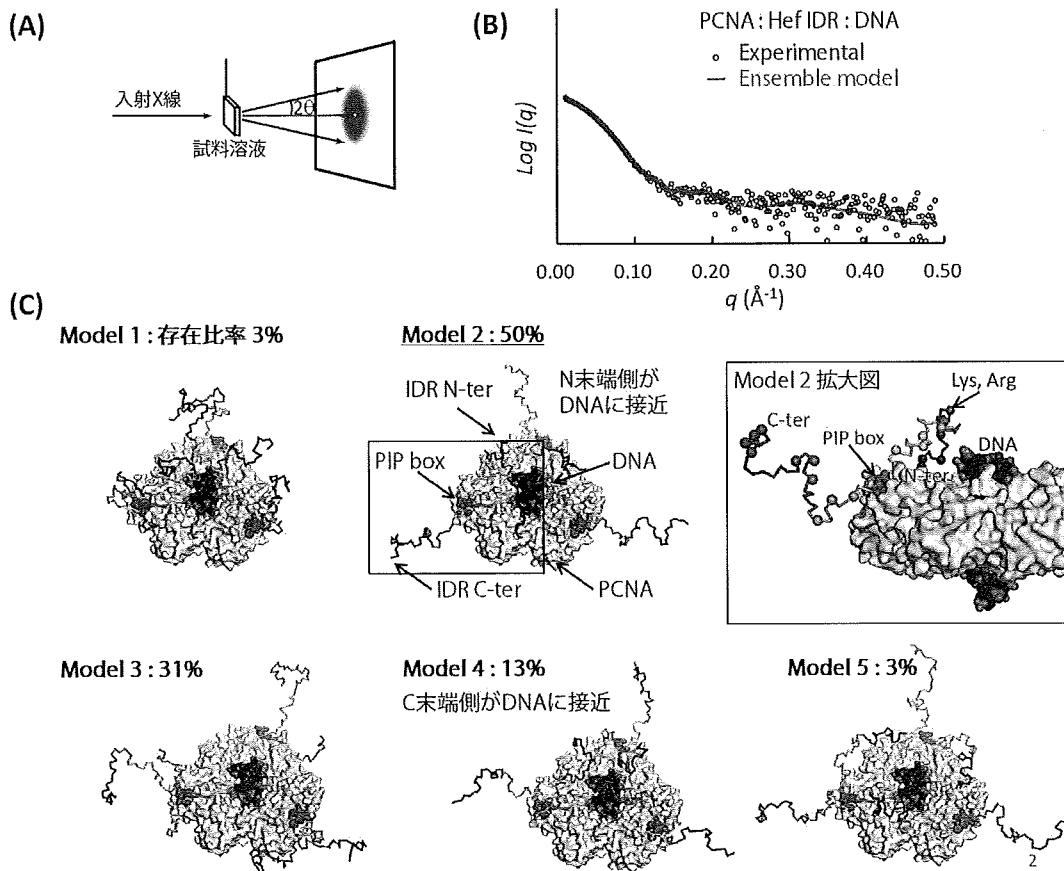


図2.3者複合体のX線小角散乱解析

(A) X線小角散乱実験の模式図。(B) 実測およびアンサンブル構造から計算された散乱曲線 $I(q)$ 。(C) EOMにより得られたアンサンブル構造。Hef IDRをribbon、PCNA3量体をsurface、DNAをsphereで示す。Hef IDRはPIP box (sphereで表示)でPCNA表面に結合し、PCNA 3量体に対して3分子結合している。Model 2については向きを変えた拡大図も示す。拡大図ではHef IDRの塩基性残基のCa原子をsphereで示す。

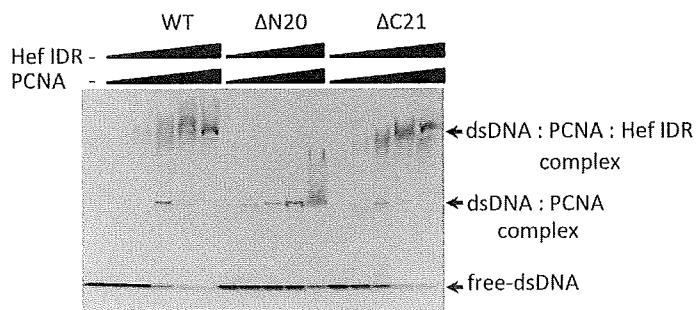


図3. EMSAによる3者複合体の形成能の評価
EMSAは3者を混合し、非変性ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。シフトバンドは15bpのDNAに標識したカルボキシフルオレセイン(FAM)の蛍光により検出した。

る可能性もある。この相互作用にどのような意味があるのかはわからないが、PCNAとDNAポリメラーゼとDNAの3者複合体の構造解析ではDNAポリメラーゼはPIP boxでのPCNAとの相互作用に加えて、触媒ドメインが直接PCNAに接触しており、この相互作用が機能に必要であることが示されている。従って、Hefにおいても、PIP box以外の部位での相互作用が機能的な意味を持つ可能性は十分に考えられる。

(成果・考察)

本研究では、PCNA : Hef IDR : DNA 3者複合体をX線小角散乱法と計算科学に基づいた手法で解析し、Hef IDRの揺らいだ構造モデルを構築した。得られた構造からHef IDRの特にN末端側の領域がDNAとの相互作用に重要であることが示され、PCNAのスライド抑制に重要なことが示唆された。PIP boxは古細菌から真核生物まで保存されており、DNAの複製・修復に関わる様々なタンパク質に見いだされる。それらのタンパク質ではPIP boxの前後は折れ疊まつた構造ドメインの場合もあるが、天然変性領域の場合も多く、Hef IDRのような機能を持つことが考えられる。しかし、PIP boxの前後のフレキシブルな領域も含めて機能を解析した例はほとんどなく、今回得られた結果はPIP box の前後の天然変性領域が機能を持つことを示した重要な発見である。

Hef IDRが溶液中で取り得る構造は膨大な数になると推測されるが、今回の解析手法ではわずか5つの構造で代表させるという非常に粗視化したモデルを使用した。また、Hef IDRはC α 原子のみのモデルとしてランダムに構築されており、静電的な効果や自由エネルギー等は全く考慮されていない。にもかかわらず、得られた構造は生化学的な解析結果ともよく一致し、生物学的な意義を十分議論できるものであった。このようにX線小角散乱法と計算科学的手法を組み合わせることが天然変性タンパク質の解析に非常に有効であることを示すことができた。

しかし、今回の解析結果から粗視化した手法の有効性と同時に限界も明らかとなった。Hef IDRの場合、塩基性アミノ酸を多数持つため、DNAとの相互作用が主に静電的相互作用であることが容易に推測できたが、天然変性領域一般に拡張した場合、そのような推測が容易でないケースも考えられる。従って、本手法をより一般化するためにはこれらの物理化学的性質を考慮した手法の開発が必要と考えられる。また、X線小角散乱法ではわずか一本の散乱曲線に対して、アンサンブル構造を最適化している。今回の解析ではPCNAやDNAはすでに構造が明らかで複合体形成に伴う大きな構造変化はなく、Hef IDRのみをモデリングすればよいため、本手法の適用が可能であった。しかし、複合体形成に伴い、各タンパク質が大きく構造変化するような、より複雑な系に適用するためにはさらなる工夫が必要である。これらは今後の課題である。

学会発表

1. 天然変性タンパク質によるDNAクランプのスライド調節機構の構造基盤. 小田 隆, 関野絢子, 石黒あかり, 石野園子, 石野良純, 佐藤 衛. 2017.6.20-22 第17回日本蛋白質科学会年会 (仙台市)
2. X線小角散乱による天然変性タンパク質の構造研究. 小田隆. 2017.7.1. 第2回生物資源セミナー (立命館大学)

バイタルサインを常時検出できるイヤラブルデバイスの開発

横浜国立大学大学院工学研究院 准教授
太田 裕貴

(研究目的)

ヒトのバイタルサイン(深部体温・脈拍・血中酸素飽和度)を常時リアルタイム検出できる耳装着型ウェアラブルデバイス(イヤラブルデバイス)の開発を本研究の目的とする。

現在、数多くのヘルスケアウェアラブルデバイスが提案されている。生体情報で、第一に重要なことは心拍、血中酸素飽和度、体温のバイタルモニタリングである。近年報告されているほとんどの体温検出のウェアラブルデバイスは皮膚温度から体温を類推する。スポーツ医学及び医療現場において上述の皮膚温度ではなく生体の深部体温を直に計測することはアスリートの運動消費量の検出や患者の状態観察において非常に重要である。しかし今までに対象の深部体温及びその他バイタルサインを常時リアルタイム計測できるようなウェアラブルデバイスは存在しない。そこで、本研究では生体の深部体温の一つである鼓膜温、血中酸素飽和度、心拍をリアルタイムで計測することができる耳装着型ウェアラブルデバイス、イヤラブルデバイス(Ear+Wearable=Earable)を実現するための鼓膜音のための深部体温計測装置と二波長によるパルスオキシメータの装置開発を行う。(図1)

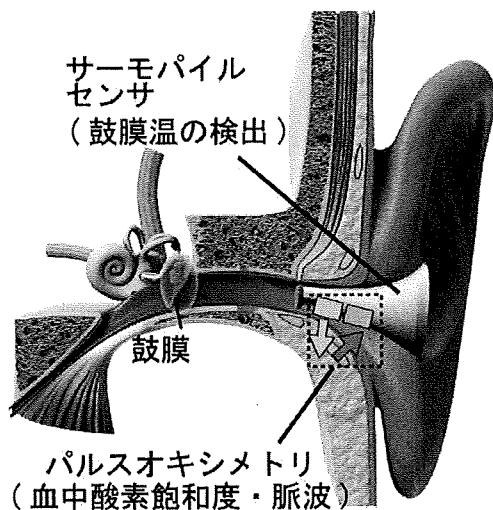


図1 バイタルサインの常時
検出イヤラブルデバイス

(研究方法)

基本的には耳式体温計およびパルスオキシメーターの小型化・ポータブル化によりデバイスを実現する。そのために、大きく2つ課題を行った。

1. サーモパイルセンサの信号処理回路と特性評価

鼓膜温を計測するために、一般にはサーモパイルセンサが使用される(図2, 3)。サーモパイルセンサは赤外線(IR)センサとサミスタ抵抗(図3)の二つのセン

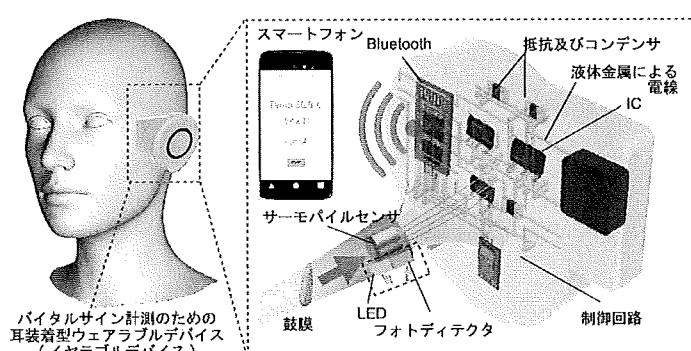


図2 イヤラブルデバイスの構成

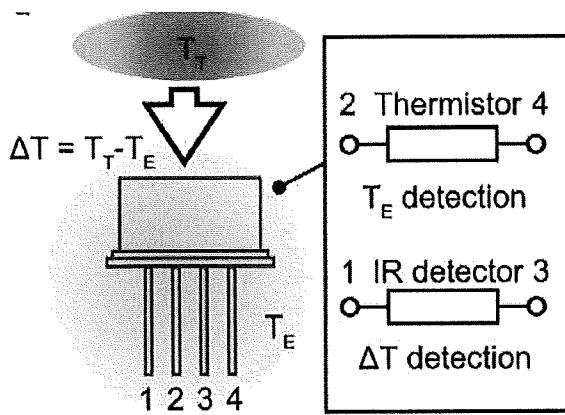


図3 サーモパイルセンサ

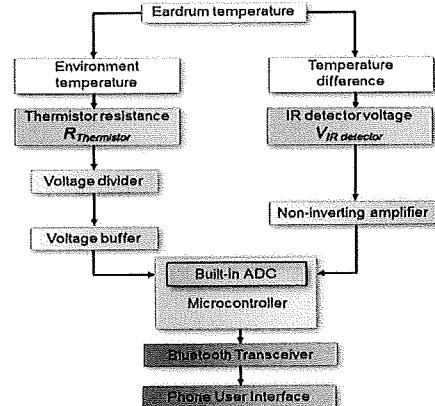


図4 サーモパイルセンサの制御回路

サが一つになったセンサである。図3において2, 4はThermistorと呼ばれるセンサに接続しており、センサ周辺の外部気温(T_E)を計測する。さらにセンサ温度と外部気温の二つの温度差(ΔT)を計測する。その二つのセンサから取得した情報をもとに対象の温度(T_T)を決定する。そのためセンサごとの特性評価が必要である。加えて、サーモパイルセンサから出力される電圧(mV)の転送のための信号增幅回路とノイズ除去のための回路が必要である(図4)。そこで、それぞれのセンサのキャリブレーションと、無線伝送の回路を作製した。

2. 血中酸素飽和度と脈波検出のためのパルスオキシメーターの基本原理の確立

パルスオキシメーターは、赤と緑(もしくは近赤外)の二波長の反射光により脈波を検出し、その二波長の反射光の差分から血中酸素飽和度を計測する。まず第一に、赤・緑それぞれの脈波を検出できるような基礎原理を確立した。その上で、それぞれの脈波から血中酸素飽和度が検出できるように回路及び装置構成の開発を行った(図5)。最終的に脈波及び血中酸素飽和度をスマートフォンに無線伝送できる装置を開発した。

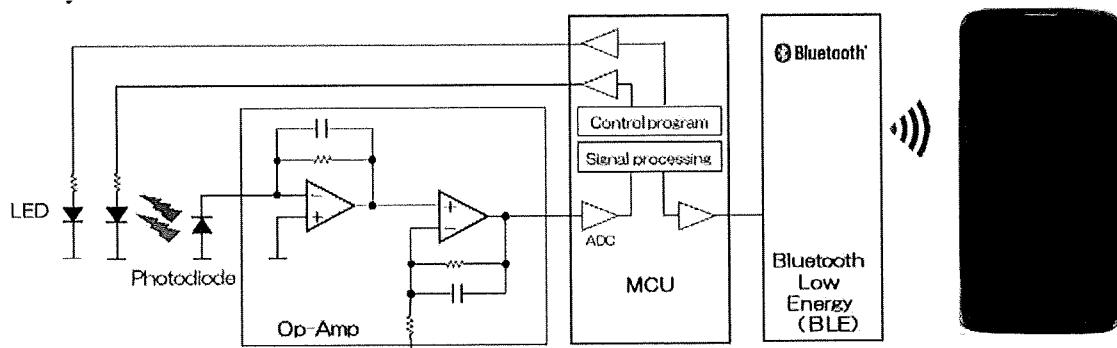


図5 二波長反射光から血中酸素飽和度を検出し、無線伝送できる装置

(結 果 及び 考 察)

1. サーモパイルセンサの特性評価

図6にサーモパイルセンサのセンサ周囲の温度(T_E)と電圧(V)との関係を示す。図6にあるように、センサ周辺の温度に対応する形で電圧が変化していることがわかった。この温度を基準

温度とした。更に、対象温度を変化させたときのIRセンサの時間ごとの数値変化を計測した値を図7に示す。図7にあるように温度に応じてIRセンサの値がプラトーに達することがわかる。この図7にある結果と図6の脚気と照らし合わせることで、図8にセンサ周囲の温度と対象の温度との温度差(ΔT)と検出電圧との関係を示した。図8にあるように、温度差とIRセンサからの電圧値は線形の関係があることが分かった。

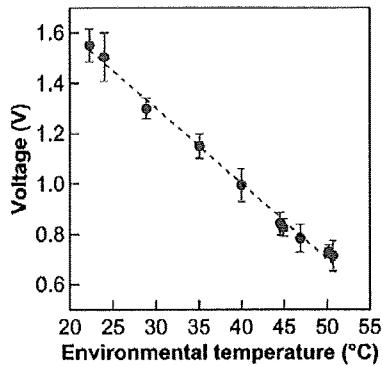


図6 センサの周囲温度(T_E)とThermistorからの電圧値の関係

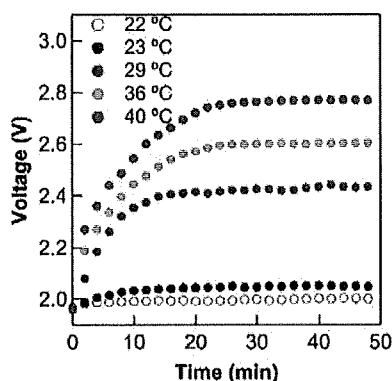


図7 IRセンサからの電圧値の変化度と対象温度(T_T)の関係

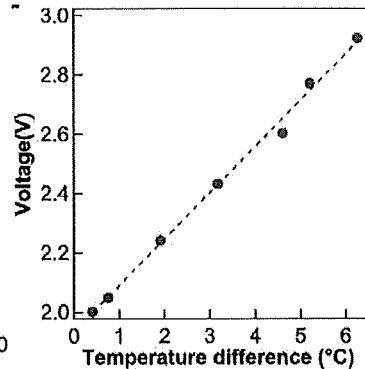


図8 IRセンサからの電圧値と温度差(ΔT)の関係

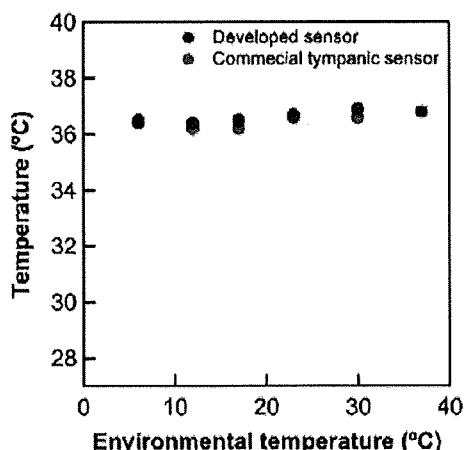


図9 開発したデバイスから示された温度と、実際に商用の鼓膜温計測装置による計測結果の比較。

図6と図8の結果から、開発したデバイスでの実際のヒトを対象とした鼓膜温の温度と商用の鼓膜温の計測結果を示した結果が図9である。図9にあるように開発したセンサは商用の鼓膜温と同様の温度を示した。以上より、開発したセンサは動作していることが確認できた。



図10 パルスオキシメータの基盤技術確認のためのデバイス

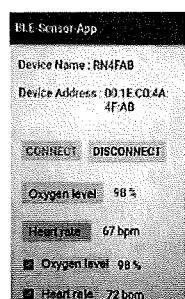


図11 血中酸素飽和度表時アプリ

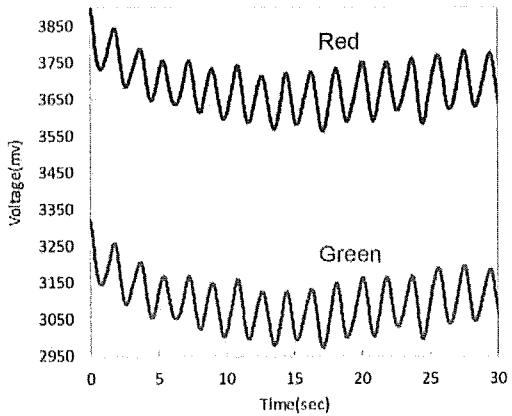


図 12 緑・赤の反射光によるそれぞれの脈波検出

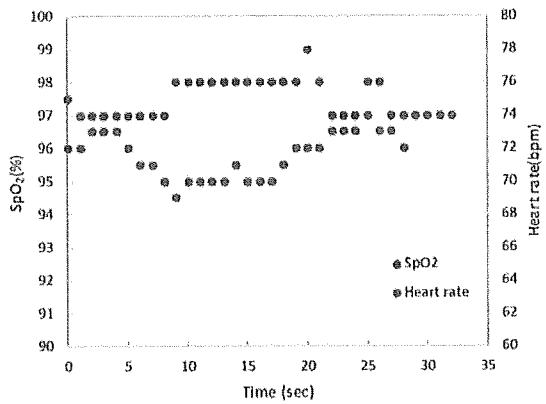


図 13 緑・赤の反射光による脈波検出と血中酸素飽和度の検出

2. 血中酸素飽和度と脈波検出のためのパルスオキシメータの基本原理の確立

血中酸素飽和度と脈波検出のためのパルスオキシメータの基本原理の確立させるために、まずは比較的検出が容易なおでこでの血中酸素飽和度検出装置を構築した(図 10)。その結果を表示できるようにスマホ上に脈波、血中酸素飽和度の検出アプリを作製した(図 11)。緑と赤の LED からの反射光で脈波を検出した結果を図 12 に示す。図 12 にあるように、赤及び緑の LED 光によって脈波が検出できていることがわかる。図 12 から、脈波及び血中酸素飽和度を算出したを示した結果を図 13 に示す。図 13 にあるように、血中酸素飽和度及び脈波を無線で検出することに成功した。

(謝 辞)

本研究を遂行するにあたり多大なご援助を賜りました横浜学術教育振興財団に厚く御礼申し上げます。

強磁性が重要な役割を担う4f電子系新奇超伝導体の探索

横浜国立大学大学院工学研究院 助教
脇舎 和平

(研究目的)

希土類セリウム(Ce)を含む金属間化合物では、磁気秩序を安定化させるRKKY相互作用と局在磁気モーメントを伝導電子が遮蔽する近藤効果が競合する。この競合の様子はDoniachの相図により定性的に説明されることが知られている[1]。圧力などによりCeの4f電子と伝導電子の混成(c-f混成)強度を調整すると、RKKY相互作用と近藤効果が拮抗する量子臨界点近傍で反強磁性と超伝導の共存などの興味深い現象が発現する[2]。しかし、Ce化合物では強磁性と近藤効果が共存する化合物が少ないため、強磁性体での競合関係についてはほとんど調べられていない。そこで本研究では、 $T_c=3\text{ K}$ で強磁性を示すことが最近報告された Yb_3CoSn_6 型構造をもつ Ce_3RuSn_6 に着目した[3]。我々がこの化合物について圧力下で電気抵抗を測定したところ、圧力1 GPaまで圧力印加に伴って磁気転移温度が上昇することがわかった。このことは、量子臨界点近傍の電子状態を調べるには、非常に高い圧力が必要であることを示唆する。そこで、Ruよりも原子半径が小さなCoを置換することで化学的な圧力を加え、より低い圧力で量子臨界点近傍の電子状態を調べることを試みた。また、この化合物では、多結晶試料でのみ物性報告があるため、チョクラルスキー法により単結晶試料を作製し、その磁気異方性を調べた。さらに、 Ce_3RuSn_6 は直方晶 Yb_3CoSn_6 型構造をとるため、RuをすべてCoで置換した Ce_3CoSn_6 という化合物相の存在が期待された。そこで、新たな強磁性Ce化合物を探索するため、 Ce_3CoSn_6 の作製も試みた。

(研究方法)

Ce_3RuSn_6 とRuをCoに置換した化合物の単結晶試料は仕込み比を $\text{Ce}:\text{Co}/\text{Ru}:\text{Sn}=3:1:6$ としてチョクラルスキー法により作製した。また、Ruを部分的にCoに置換した $\text{Ce}_3(\text{Ru}_{0.9}\text{Co}_{0.1})\text{Sn}_6$ の多結晶試料をアーケ溶解法により作製した。得られた試料について結晶構造を粉末X線回折実験と単結晶X線構造解析により同定した。電気抵抗は直流4端子法により無冷媒冷凍機を用いて2 Kから280 Kの温度範囲で測定した。磁化は2 Kから300 Kの温度範囲でSQUID磁束計(Quantum Design MPMS)を用いて測定した。

(結果と考察)

1. Ce_3RuSn_6 の磁気構造

図1は Ce_3RuSn_6 の電気抵抗率 ρ の温度依存性を示す。ここで、電流方向はc軸に平行している(I||c)。 ρ は室温から150 K付近まで単調に減少した後、100 K付近でプロードな山を示す。さらに温度を下げると20 K付近で極小を示し、増大に転ずる。この ρ の増大は近藤効果で期待される特徴的な振る舞いの一つである。図1の内挿入図に示すように、 $T_c=3\text{ K}$ 付近

で ρ に折れ曲がりが観測されるが、これは磁気転移に起因する。これら ρ の温度依存性は先行研究で報告された多結晶試料の振る舞いとよく一致している[3]。

図2にCe₃RuSn₆の磁化 M を磁場 B で割った M/B の温度依存性を示す。磁場を b 軸に対して平行に印加した場合($B \parallel b$)、磁化は $T_c = 3$ Kで強磁的な増大を示すが、 $B \parallel c$ では反強磁的なカスプを示す。また、 $B \parallel a$ では T_c での M の値が $B \parallel b$, $B \parallel c$ と比較して一桁以上小さく、顕著な異常を示さない。この結果は、 $T < T_c$ ではCeがもつ局在磁気モーメントがbc面内にほぼ完全に配向し、磁気構造が単純な強磁性体と異なることを示唆する。

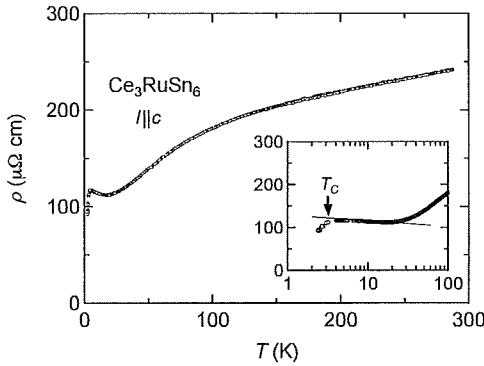


図1 Ce₃RuSn₆の電気抵抗率 ρ の温度依存性

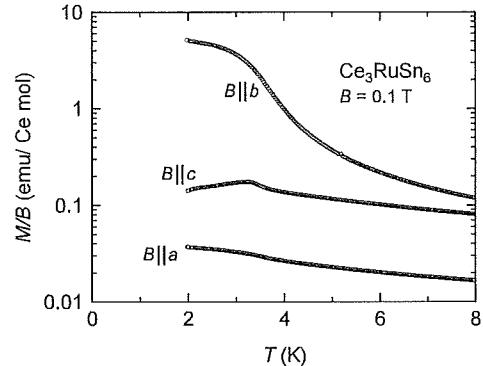


図2 磁場 $B = 0.1$ Tで測定したCe₃RuSn₆の M/B の温度依存性

2. CeCo_xSn₂の単結晶育成と物性測定

Ce₃RuSn₆のRuをすべてCoに置換した化合物の合成を試みたが、得られた試料はYb₃CoSn₆型構造ではなく、直方晶CeNiSi₂型構造をもつCeCo_xSn₂[4]であることが単結晶構造解析からわかった。この化合物は多結晶試料による物性報告があり、Co量 x は $0.35 < x < 0.5$ の幅広い値をとることが報告されている[5]。本研究で作製した試料のCo量は単結晶構造解析から $x = 0.39$ と見積もられ、組成比はCeCo_{0.39}Sn₂となった。この組成比は3:1:6 (=1:0.33:2)に比較的近い。格子定数は $a = 4.5434$ Å, $b = 17.0401$ Å, $c = 4.4715$ Åと決定され、先行研究で報告された $x = 0.4$ の試料の格子定数とほぼ同じであった。また、 c 軸長を3倍($3c = 13.4145$ Å)にすると、Ce₃RuSn₆の格子定数($a = 4.6744$ Å, $b = 16.8542$ Å, $c = 13.3227$ Å)と近い値になる。これは偶然ではなく、CeNiSi₂型構造とCe₃RuSn₆型構造が互いによく似た構造であるためであることがわかった。

図3はCeCo_{0.39}Sn₂の磁化率 χ の温度依存性を示す($B \parallel c$)。2 Kまで磁気転移による異常は観測されなかった。先行研究では、多結晶試料を用いた磁化測定から、CeCo_xSn₂の磁気転移温度がCo量 x に依存することが報告されている。 x の減少に伴って磁気転移温度は低下し、 $x = 0.4$ では磁気転移によるカスプ状の異常が観測されているが、 $x = 0.35$ の試料では2 Kまで磁気秩序を示さない。したがって、本研究で得られた $x = 0.39$ の試料で磁気秩序が2 Kまで観測されないことは先行研究の結果と矛盾しない。Co量 x が0.4以上の多結晶試料では、磁気転移によるカスプを示した後、低温に向かって磁化は増大する[5]。これは一般の反強磁性体とは異なる振る舞いであり、CeCo_xSn₂もCe₃RuSn₆と同様に磁気転移温度以下で複雑な磁気構造をもつことが期待される。

3. $\text{Ce}_3(\text{Ru}_{0.9}\text{Co}_{0.1})\text{Sn}_6$ の電気抵抗測定

$\text{Ce}_3(\text{Ru}_{0.9}\text{Co}_{0.1})\text{Sn}_6$ の電気抵抗率 ρ の温度依存性を図4に示す。全体的な振る舞いは Ce_3RuSn_6 と似ているが、 ρ が極小を示す温度はCoを置換することで約20 Kから10 Kへ低下した。この結果は、近藤温度が低下した(近藤効果が弱められた)ことを示唆し、Co置換では化学的圧力以外の効果もc-f混成強度に影響を与えている可能性がある。また、4 K以下で不純物のSnによる超伝導が検出されたため、磁気転移に対するCo置換効果の検証は困難であった。今後置換効果を検討する上で、不純物Snの混入を抑える必要がある。

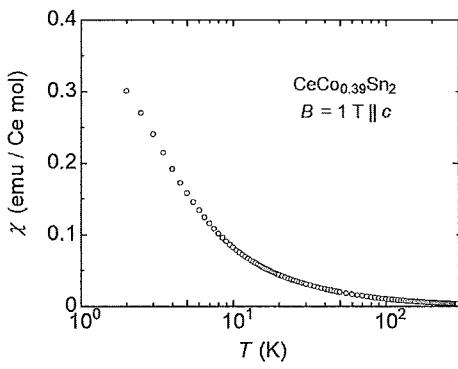


図3 磁場 $B = 1$ Tで測定した $\text{CeCo}_{0.39}\text{Sn}_2$ の
磁化率 χ の温度依存性

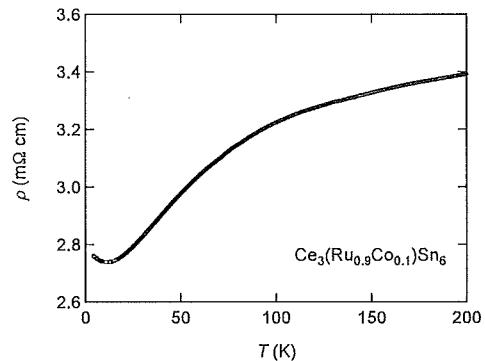


図4 $\text{Ce}_3(\text{Ru}_{0.9}\text{Co}_{0.1})\text{Sn}_6$ の電気抵抗率 ρ の
温度依存性

(結論)

Ce_3RuSn_6 の単結晶試料をチョクラルスキー法により世界ではじめて作製し、磁化測定から T_c 以下の磁気異方性が極めて大きく、磁気構造が単純な強磁性体と異なることを発見した。さらに、 Ce_3RuSn_6 のRuを部分的にCoに置換した $\text{Ce}_3(\text{Ru}_{0.9}\text{Co}_{0.1})\text{Sn}_6$ の多結晶試料を作製した。電気抵抗測定から、Coを置換すると予想に反して近藤温度が低下することがわかった。また、RuをすべてCoに置換した Ce_3CoSn_6 の単結晶育成を Ce_3RuSn_6 と同様に試みたが、比較的近い組成と構造をもつ直方晶 $\text{CeCo}_{0.39}\text{Sn}_2$ が得られた。磁化を測定したところ、2 Kまで磁気転移は観測されなかった。しかし、先行研究で報告された多結晶試料を用いた磁化測定の結果を考慮すると、 CeCo_xSn_2 は2 K以下で Ce_3RuSn_6 と同様に、ある軸方向にのみ強磁性成分がある複雑な磁気構造をもっている可能性がある。今後より低温での磁化測定を進め、強磁性と超伝導共存の可能性を探りたい。

参考文献

1. S. Doniach, Physica B 91, 231 (1977).
2. J. Flouquet, in Progress in Low Temperature Physics, edited by W. P. Halperin, Elsevier, Amsterdam, 2005, Vol. 15, p. 139.
3. V. Gribanova, D. Gnida, E. V. Murashova, A. V. Gribanov, and D. Kaczorowski, J. Alloy. Compd. **671**, 114 (2016).

4. M. Franqois, G. Venturini, B. Malaman and B. Roques, J. Less-Comm. Met. 160 (1990) 197.
5. A. Demourgues, B. Chevalier, F. Fourgeot, J. Darriet, J. Etourneau,
Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B 97 460 (1995).

(成果公表)

・学術論文

- (1) K. Wakiya, T. Tomaki, M. Kimura, M. Uehara, J. Gouchi, Y. Uwatoko, I. Umehara,
“Pressure effects on the magnetic and transport properties of the Kondo lattice system Ce₃RuSn_{6”}
Physica B 536, 492 (2018).
 - (2) K. Wakiya, T. Tomaki, M. Kimura, M. Uehara, J. Gouchi, Y. Uwatoko, I. Umehara,
“Magnetic anisotropy of single-crystal ferromagnetic Ce₃RuSn_{6”} under review.
 - (3) M. Kimura, K. Wakiya, T. Tomaki, J. Gouchi, Y. Uwatoko, M. Uehara, I. Umehara
“Magnetic and transport properties of single crystalline RCo_xSn₂(R = Ce and La)”
under review.
- ・学会発表
- (1) K. Wakiya, T. Tomaki, M. Kimura, M. Uehara, J. Gouchi, Y. Uwatoko, I. Umehara
“Pressure effect on the magnetic and transport properties of the Kondo lattice system Ce₃RuSn_{6”}
International Conference on Strongly Correlated Electron Systems, SCES2017, We-4-17
 - (2) 脇舎和平, 木村美波, 戸巻健, 郷地順, 上床美也, 上原政智, 梅原出
「近藤格子化合物Ce₃RuSn₆の圧力下電気抵抗・磁化測定」
日本物理学会 2017年秋季大会 21pF21-6
 - (3) 木村美波, 脇舎和平, 戸巻健, 郷地順, 上床美也, 上原政智, 梅原出
「強磁性を示す近藤格子系Ce₃RuSn₆の圧力効果」
第58回高圧討論会 1P10
 - (4) 梅原出, 戸巻健, 木村美波, 郷地順, 上床美也, 脇舎和平, 上原政智
「直方晶Ce₃TSn₆(T=Ru, Co)の単結晶育成と物性」
日本物理学会 第73回年次大会 23aPS-57

摺動部へのマイクロディンプル形成による 円すいころ軸受の超低トルク化

関東学院大学理工学部理工学科 助教
堀田 智哉

(研究目的)

円すいころ軸受は、同サイズの玉軸受に比べて3倍程度の大きな負荷容量を有し、ラジアル方向と一方向のアキシャル方向荷重の支持が可能であり、高い剛性を持つ軸受である。そのため、円すいころ軸受は自動車のディファレンシャルギアボックスや新幹線、工作機械など産業機械の回転軸支持部に幅広く使用されている。しかし、円すいころ軸受は玉軸受と比較すると発熱が大きく、回転トルクが高いという欠点を有している。過去の研究においては、定位置予圧で使用される場合、円すいころ軸受の発熱によって軸受の寸法が変化することで予圧量が増加し、軸受寿命が設計寿命から大幅に低下することも明らかになっている¹⁾。また、近年、CO₂排出量削減を目的に、産業機械の省エネルギー化、小型軽量化への要求が高まっており、円すいころ軸受の発熱、回転トルクを低減することは非常に重要な課題である。一般に円すいころ軸受における回転トルクは以下の4つが挙げられる。

- ①ころ大端面と内輪大つば面の滑り抵抗
- ②ころと内輪・外輪軌道面の転がり抵抗
- ③潤滑油の攪拌抵抗
- ④ころと保持器間の滑り抵抗

通常、③と④の抵抗は非常に小さく、①および②が支配的である。軸の回転速度によって抵抗の支配率が変化し、低速域では滑り抵抗が、高速域では転がり抵抗が支配的となる。これは、軸受の回転数が早くなるほど、円すいころ大端面と内輪大つば面への潤滑油供給圧力が上昇し、固体潤滑から境界潤滑、流体潤滑へと変化していくためだと一般的にいわれている。軸受メーカーにおいては軸受の内部寸法や転動体個数などの設計を最適化することによって、主に②・③・④の抵抗を低減させることによって低トルク化を行っているが^{2~4)}、①の抵抗の低減に関しての研究・開発の例は少ない。そこで本研究では、ころ大端面にマイクロ

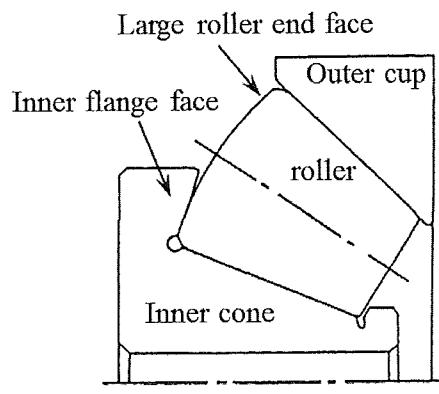


Fig. 1 Structure of tapered roller

ディンプルを付与することにより、ころ大端面と内輪大つば面間（図1）の潤滑状態を改善することで、円すいころ軸受の低トルク化を試みた。

(研究方法)

本研究で使用した軸受は円すいころ軸受30306C（内径：30 mm, 外径：72 mm, 高さ：20.75 mm, 接触角：20°）である。この軸受の円すいころ大端面にピコ秒レーザーを用い、直径14 μm, 深さ1.4 μm（ねらい値）で、マイクロディンプルを形成した。ディンプルの間隔は、30, 40, 50, 70, 100 μmの5種類を作製した（表1）。図2に加工後のころ大端面表面の写真（図2(a)）および穴深さの測定結果（図2(b)）を示す。

各パターンによるトルク低減効果の評価にはトルク試験機を用いた。本装置のトルク測定概略図を図3に示す。回転トルク測定は試験軸受内輪を回転させ、外輪の連れ回りトルクをロードセルにて測定する。測定条件は回転数500 min⁻¹, アキシャル荷重10 kNとし、潤滑はVG32, 4 Lを500 ml/minで循環させている。本試験においては、試験軸受のならし運転を2時間を行い、2時間経過後10分の平均トルクを軸受の回転トルクとして評価した。

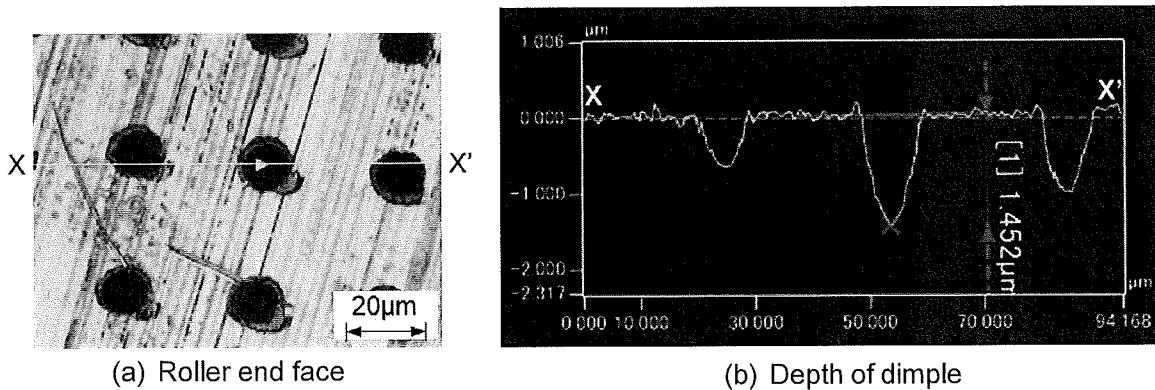


Fig. 2 dimple size (Distance of dimple 40μm)

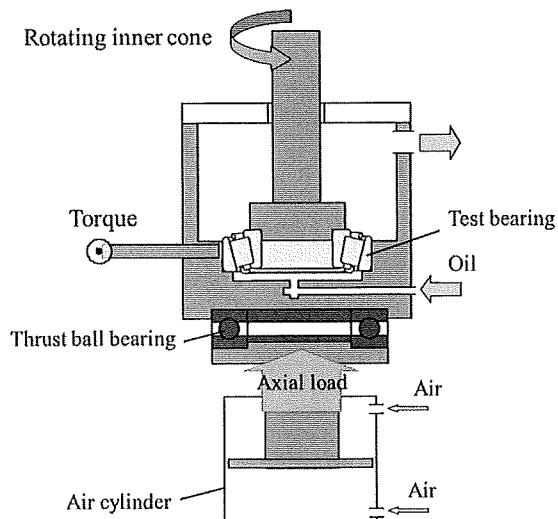


Table 1 Conditions of dimple pattern

Distance of dimple [μm]	Area ratio [%]
30	17
40	9.6
50	6.2
70	3.1
100	1.5

Fig. 3 Schematic diagram of torque test

(結 果)

各パターンのトルク試験結果を図4に示す。現行品のトルクを緑色で示し、ディンプル付与した軸受のトルクを青色で示し、左から右へ行くに従ってディンプル間隔が広くなるように並んでいる。本研究で用いたディンプル間隔が30~100 μmの軸受はすべて現行品のトルクよりも低くなつた。最もディンプル間隔の狭い30 μmでのトルクは1.15 N·m程度であり、間隔の広くしていくと40 μmでトルクは極小値をとる。その際のトルクは0.9 N·mであり、これは現行品のトルクの約60 %である。さらにディンプル間隔を広くしていくとトルクは大きくなつていき、最も間隔の広い100 μmでのトルクは約1.2 N·mとなつた。図5は試験後のころ大端面の状態である。ディンプル間隔が狭いほど摩耗痕が薄くなり接触状態が良くなつてゐることが確認できる。

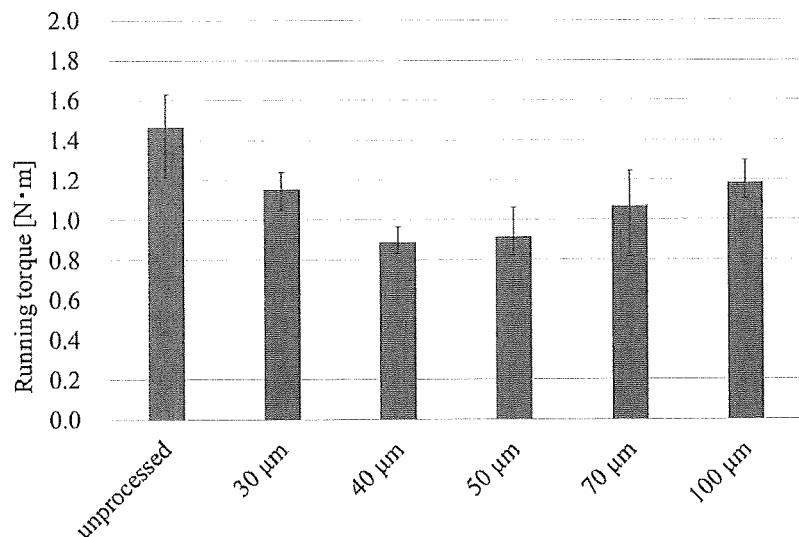


Fig. 4 Running torque

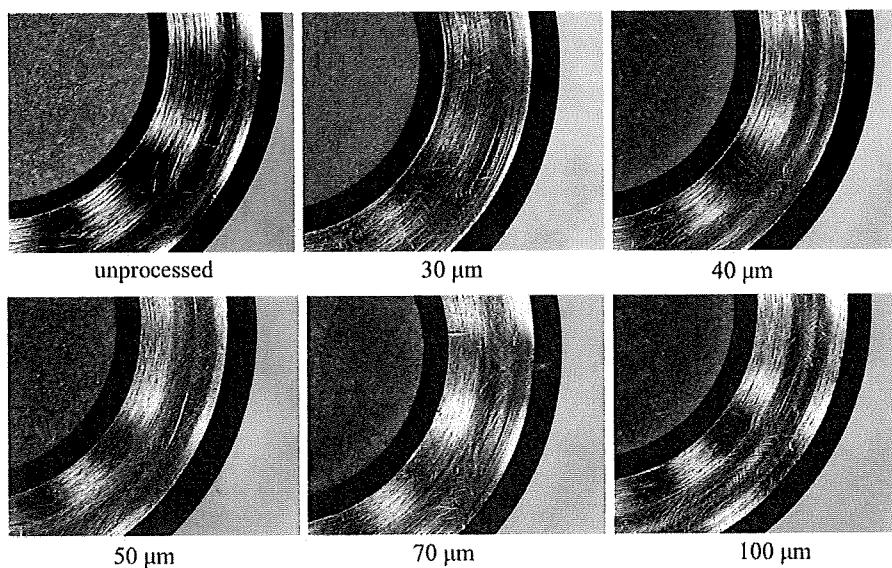


Fig. 5 Roller large end face after test

(成果・考察)

円すいころ軸受の円すいころ大端面に、直径 $14\text{ }\mu\text{m}$ 、深さ $2.6\text{ }\mu\text{m}$ のディンプルを形成し、回転トルクの測定をおこなったところ、ディンプルの間隔が $40\text{ }\mu\text{m}$ で最もトルクが小さく、現行品の約60%のトルクとなった。この結果の原因としては、ディンプル間隔が小さいほどディンプルが油を攪拌する攪拌抵抗が大きくなり、逆に間隔が大きくなるほど接触面に存在するディンプルが少なくなるため、ディンプルの効果が小さくなり、この結果として $40\mu\text{m}$ で極小値を取ったのではないかと考えられる。

(今後の展望)

今後は、更なる低トルク化を目指して新たなパターンの試験と様々な運転条件での試験が必要である。とくに、本研究の試験条件は回転数が 500min^{-1} のみの実施であり、低速域、高速域での試験をおこなっていない。そのため、本研究の試験条件において低トルクであったとしても、その他の速度領域で低トルクであるとは限らない。したがって、他の速度領域も試験をおこない、実用可能であるかを検証する必要がある。

(参考文献)

- 1) Tomoya Hotta, Shoji Noguchi, Tohru Kanada : Fundamental Study on Preload Loss in Tapered Roller Bearings, Tribology Online, Vol.11, No.2 (2016), pp.326-332.
- 2) 辻本 崇, 望月 次郎 : 高負荷容量円すいころ軸受, NTN TECHNICAL REVIEW, No.73(2005), pp. 30-39.
- 3) Matsuyama, H., Dodoro, H., Ogino, K., Ohshima, H., Toda, K. : Development of Super-Low Friction Torque Tapered roller Bearing for Improved Fuel Efficiency, SAE Technical Paper, no. 2004-01-2674(2004).
- 4) 松山 博樹 : 超低トルク円すいころ軸受の開発, 日本フルードパワーシステム学会誌, Vol.38, No.E1(2007), pp. E42-E49.

(研究公表)

- 1) Tomoya HOTTA, Shoji NOGUCHI, Kazuyuki YAOI , Eiji SHIMODAIRA : Study of develop a low torque tapered roller bearing by micro dimple of the sliding surface, Sustainable Tribology Conference 2017 AMAMI Japan-Taiwan International Tribology Symposium 2017, 13-16 October 2017.
- 2) 堀田智哉, 野口昭治, 矢追和之, 下平英二 : しゅう動部へのマイクロディンプル形成による円すいころ軸受の低トルク化, 第8回 トライボロジー秋の学校 in 愛知, 2017年12月7-8日.

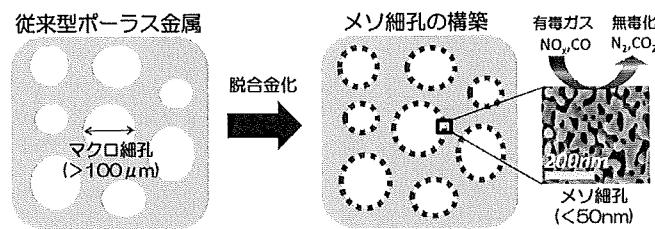
メソ・マクロ孔の共存による多機能性ポーラス金属の開発

神奈川大学工学部 特別助教

田邊 豊和

(研究目的)

本研究は、軽量化構造材として実用展開されているポーラス金属に対して、金属表面が潜在的に有している触媒機能を引き出すことで、構造材であると同時に周囲の有毒ガスを無毒化する環境浄化機能を備えた軽量化構造材の開発を目的とする。具体的には、従来のマクロ孔を有するポーラス金属の表面に、常温・常圧下での脱合金化反応によってメソ細孔ポーラス金属(Cu)を自己組織化させることにより、触媒機能を発現させる(下図)。本研究により、他材質の多孔体では実現困難な、自動車排気ガス浄化やシックハウス症候群の原因物質除去機能付きの外壁や遮音壁など新規の多機能構造材として応用展開が可能となる。



(研究方法)

ポーラス金属として有用なAl-Fe系に触媒機能を有するCuを少量含むAl-Fe-Cu系の各合金組成をメソポーラスCu構築のターゲット合金系として選定し、5wt%NaOHaq. を用いて室温の条件下において脱合金化(リーチング)を行い、Al-Fe-Cu合金の表面にメソポーラスCuの構築を試みた。Al, Fe, Cu元素の所定量を秤量した後、Ar雰囲気中でアーク溶解したインゴットを融点の約80%の温度でアニールすることで均質なAl-Fe-Cu系合金を得た。触媒反応としてメタノール水蒸気改質反応を選択し、常圧固定床流通式反応装置を用い、前処理として水素還元(240°C-1h)、メタノール-水混合液(2 : 3モル比)はマイクロポンプを用いて触媒層に導入した(LHSV=65 h⁻¹)。脱合金化後の結晶構造変化は粉末X線回折測定、表面組織は走査型電子顕微鏡、脱合金化による金属溶出量はICP分析、メソポーラスの細孔径の測定はBET比表面積測定などを適宜用いた。

(結果)

• Al-Fe-Cu系合金の脱合金化処理条件の検討

図1に各Al-Fe-Cu系合金における脱合金化処理(5wt%NaOHaq.)におけるAl溶出率を示す。各Al合金組成におけるAl溶出率の温度依存性を調べたところ、前駆物質のAl組成が55at%以下ではどの脱合金化温度においてもAl溶出率が30%未満なのに対し、前駆物質のAl組成が67at%以上ではどの処理温度においてもAl溶出率が90%近くであった。Al63at%合金(QC相Al₆₃Cu₂₅Fe₁₂)の組成のみ、脱合金化温度によって溶出率が25%~87%まで大きく変化していた。また、この時CuやFeの溶出はICP分析では観察されなかった。

脱合金化処理後の結晶構造変化を調べるために粉末X線回折(XRD)測定を行った結果を図2に示す。Al溶出率が90%程度のAl合金組成においては元の結晶構造は維持されておらず

ずCu, Feの金属または酸化物と帰属できる回折图形が観察された。すなわち、 λ Al₇₆Fe₂₄合金ではFe₃O₄, Feに帰属できる回折ピークが観察された。 λ Al₇₃Cu₅Fe₂₂合金ではFe₃O₄, Feの回折ピークが観察されるがCuの回折ピークは明確に観察されずCuは高分散に存在していると推察される。 ω Al₇₀U₂₀Fe₁₀合金ではCu₂O, Cuに帰属され、Feは高分散に存在している。 θ Al₆₇Cu₃₃合金ではCu₂O, CuO, Cu, Al(OH)₃に帰属される回折ピークが観察された。Al溶出率が30%以下のAl合金組成では

元の結晶構造が維持されており一部の組成では脱合金化処理により新たに回折ピークが観察された。すなわち、 β Al₅₅Cu₃₀Fe₁₅合金ではCu₂Oが形成されている。 ϕ Al_{47.6}Cu_{47.6}Fe_{4.8}では脱合金化処理後もXRDに変化は観察されなかった。XRD測定の結果をまとめると、脱合金化処理によって前駆物質から切り離されたCuは、ほとんどアモルファスに近い状態であり、Cu₂O・CuO・Cuの混合で存在する。Cuの少ない λ Al₇₃Cu₅Fe₂₂ではCu種に該当するピークは見られず、より高分散状態であった。一方でCuの多い θ Al₆₇Cu₃₃はFeが含まれているサンプルよりCuは結晶化している。Fe種は、Feの多い λ Al₇₆Fe₂₄, λ Al₇₃Cu₅Fe₂₂のみで確認され、それもアモルファスに近いFe₃O₄やFeの状態で存在していた。それ以外のCuの多いサンプルではFe種は確認できずFeが高分散に存在していると推察される。

構造保持されていないサンプル
(λ Al76Fe24, Al73Cu5Fe22, ω Al70u20Fe10, θ Al67Cu33)
Leach condition: 25°C-4h

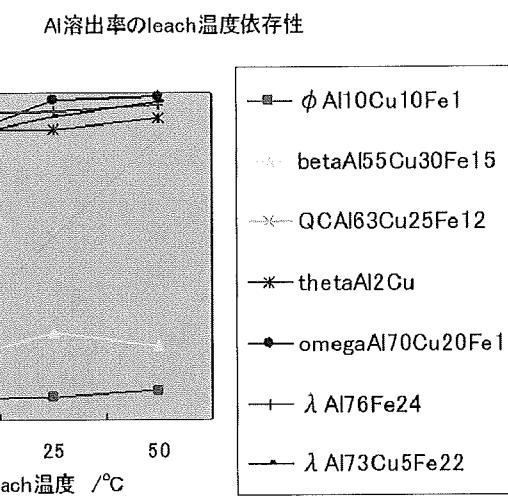


図1 Al-Fe-Cu系合金の脱合金化処理(5wt%NaOH)によるAl溶出率

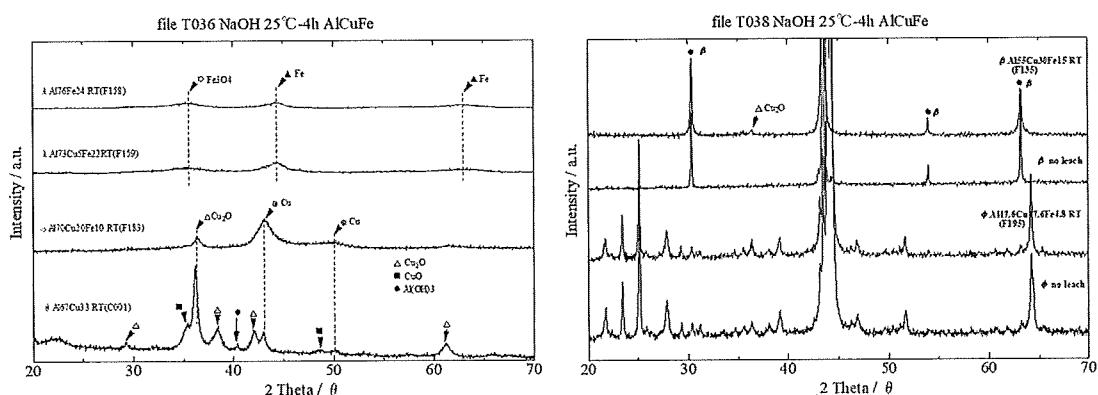


図2 Al-Fe-Cu系合金の脱合金化処理(5wt%NaOHaq.)後の試料における粉末X線回折図形

図3に各Al合金組成における脱合金化処理後の平均細孔径および細孔容積を示す。Al溶出率の90%程度の合金は脱合金化後に細孔径が数ナノ程度のメソ細孔が新たに形成されていることが確認された。平均細孔径の序列は、AlCu系(θ) > AlCuFe系(QC, ω , β , ϕ)

> AlFe系 (λ) であり、Al組成が多くかつFe組成が多い方が細孔径が小さくなる傾向があった。一方で、細孔容積は、AlFe系 (λ) > AlCu系 (θ) > AlCuFe系 (QC、 ω 、 β 、 ϕ) であり、Al組成が多いと細孔容積が大きい傾向がみられた。

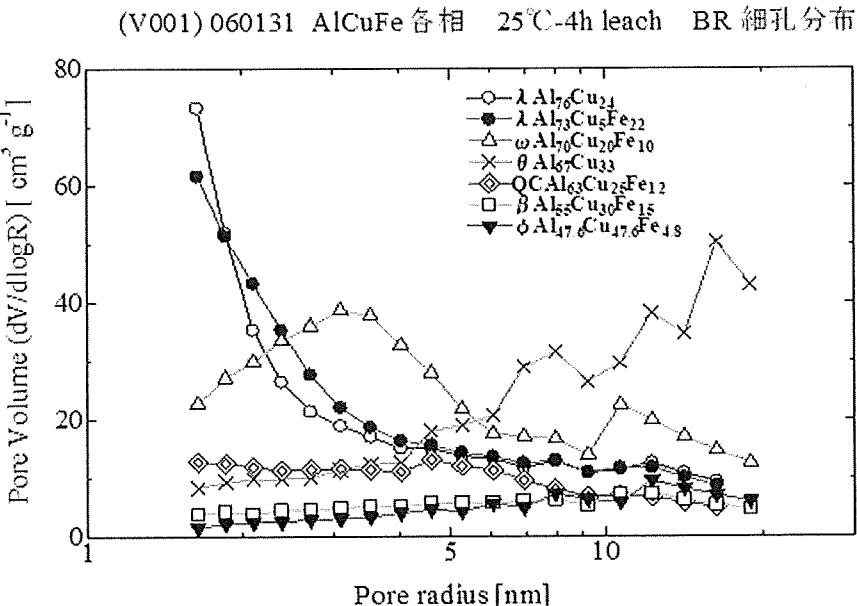


図3 Al-Fe-Cu系合金の脱合金化処理(5wt%NaOHaq. 室温条件下)後の試料における細孔

図4に脱合金化後の走査型電子顕微鏡像(SEM)を示す。平均細孔径が小さい λ 合金の脱合金化後にはFe酸化物のメソポーラス組織が形成されていた、また明らかなCu微粒子は見えずFe酸化物メソポーラス組織中に高分散状態でCu微粒子が形成されていると推察される。また、触媒反応後には新たな生成物の形成などは観察されなかった。Feの入っていない θ 相では、脱合金化後に金属CuからなるメソポーラスCuが形成されていることが分かった。触媒反応後には表面のCuが凝集している様子が観察された。Cuが20at%存在している ω 相においてはファイバー状の酸化鉄と共にメソポーラスCuの形成が観察された。一方で、Al溶出率の低い β 相合金では、メソポーラス組織は観察されずCuやFe酸化物の微粒子が点在している微細組織が観察された。

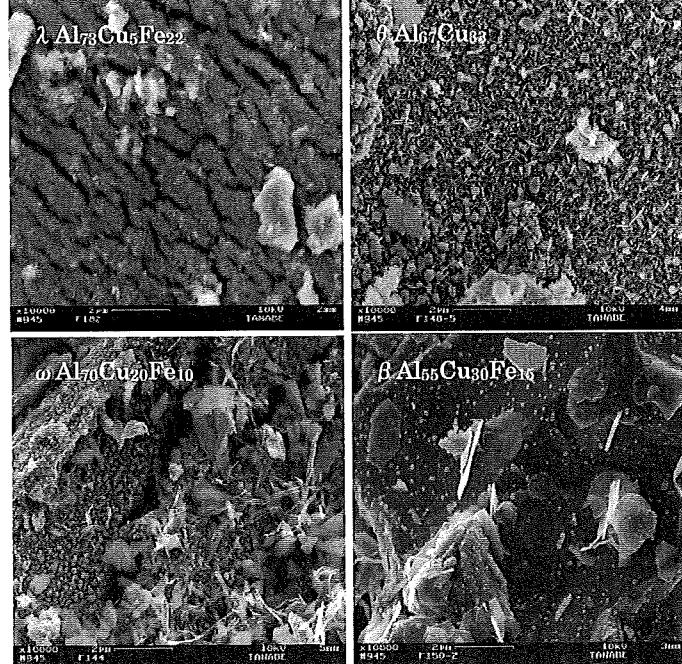


図4 Al-Fe-Cu系合金の脱合金化処理(5wt%NaOHaq. 室温条件下)後の試料における走査型電子顕微鏡像

・Al-Fe-Cu系合金の脱合金化処理後の触媒活性評価

図5にAl-Fe-Cu系合金の脱合金

處理後の試料におけるメタノール水蒸気改質による水素生成反応の触媒活性評価を示す。縦軸に触媒重量当たりの水素生成速度、横軸に単位g触媒あたりのCu molを示している。すべてのCuを含む試料において水素生成を確認し、脱合金化後に表面露出したメソポーラスCuあるいはCu微粒子が触媒活性を有していることを確認した。図5の傾向より、単位g触媒あたりのCu量が多いほど水素生成速度が高い傾向が見られた。また、Cu量と活性がほぼ直線的な傾向を持っていることが分かった。このことより、触媒表面層のCuだけでなく、触媒粒子全体に含まれるCuが反応

に寄与している可能性がある。QC相は単位g触媒のCu量が少ないにもかかわらず水素生成活性が高い。また、 λ Al₇₃Cu₅Fe₂₂の各温度での脱合金化後もまたCu量あたりの活性が高いことが分かった。

(成果・考察) 等

・脱合金化処理による結晶構造変化とメソポーラスCu形成の相関

Al-Fe-Cu系合金の各温度における脱合金化処理では、Al組成67at.%以上の結晶相ではメソポーラスCuが形成される。しかし、温度に関係なく結晶構造が保持されず、ほぼすべてのAlが溶出してしまう。逆に、Al組成が55at.%以下の結晶相ではメソポーラスCuは形成されずCu微粒子が形成されるが、脱合金化温度に関係なく、Al溶出が少ないため結晶構造が残る。また、触媒活性金属であるCuが表面にほとんど露出せず触媒活性も低い。一方で、QC相(Al63at.%)では、脱合金化温度によってAl溶出率が制御可能であり、メソポーラスCuの形成と元の結晶構造の維持を両立可能であることが示唆される。

・脱合金化後の触媒機能の発現について

脱合金化後にはすべての試料においてメタノール水蒸気改質による水素生成反応において触媒活性が観察された。単位g触媒あたりのCu量が多いほど水素生成速度が高い傾向が見られた。これはCu量が少ない場合にはメソポーラスCuではなくCu微粒子を形成するためであり、メソポーラスCuの形成が触媒活性の向上に寄与していると考えられる。触媒重量あたりの活性、触媒サンプル中のCuあたりの活性評価から、QC相を25°Cで脱合金化したサンプルが最もAl-Fe-Cu系合金の中でメソポーラスCu形成及び触媒機能発現に最適であると考えられる。

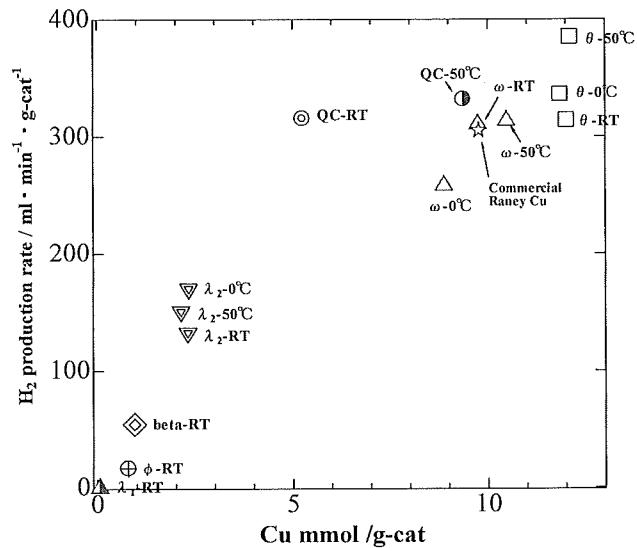


図 5 Al-Fe-Cu 系合金の脱合金化処理 (5wt%NaOH 室温条件下) 後の試料におけるメタノール水蒸気改質による水素生成反応の触媒活性評価

精原細胞分化における Notch シグナル伝達系の機能解析

横浜市立大学生命ナノシステム科学研究所 共同研究員
岡田 龍

(研究目的)

日本では不妊に悩むカップルは6組に一組と言われており、不妊原因の半分は男性不妊である。男性不妊患者の82%は造精機能障害であることから[湯村らの調査(2016)]、精子形成メカニズムの詳細な解明は少子化が叫ばれる昨今益々必要になるだろうと思われる。精子形成は最も細胞の生産量が高い生命現象の一つで、成人男性では一日平均1億個もの精子が生産される。この生産量の多さは、精子の元となる精原細胞が自らの未分化性を保ちつつ、頻繁に細胞分裂を行う事により保障されている(図1A)。

我々は、マウスの精原細胞においてNotchシグナル受容体の一つであるNOTCH3が特異的に発現される事を見いだした。Notchシグナルは昆虫から脊椎動物まで高度に保存されたシグナル伝達系のひとつで、様々な組織幹細胞の未分化維持や増殖に関わることが知られている。隣接細胞で発現するNotchシグナルリガンドとの結合により受容体発現細胞のNOTCH受容体は活性化され、 γ -セクレターゼにより切断されたNotch細胞内ドメイン(NICD)は核内へとシグナルを伝える。核内移行したNICDは転写因子群と複合体を形成し、Hes/Hey family遺伝子などの標的遺伝子の発現を促進する(図1B)。

現在までにマウスで行われた研究により、Notchシグナルが正常な精子形成に必須であることが分かっているが、その詳細なメカニズム、特に精原細胞における未分化状態の維持および増殖の制御にNotchシグナルが関与するかは明らかとなっていない。今回私は、精原幹細胞株(Germline Stem cell; GS細胞)を用いたloss-of / gain-of-function実験により、未分化な精原細胞におけるNotch3シグナルの機能を検証した。

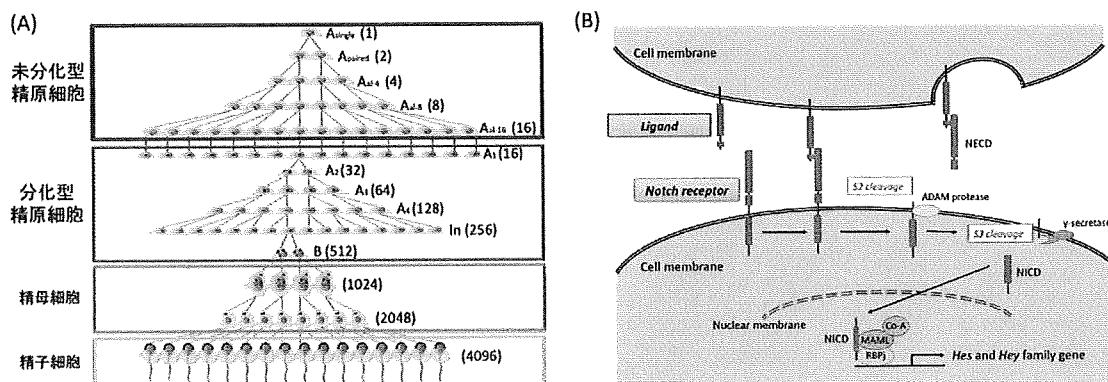


図1：精子形成とNotchシグナル

(A) マウスにおける精子形成の概要図。精原細胞は未分化型と分化型に区別される。未分化型精原細胞の集団は自らの未分化性を保ちつつ自己複製と分化を行う幹細胞を含んでいる。1つの未分化型精原細胞から細胞分裂により最終的に4096個もの精子細胞が生産される。(B) Notchシグナル概要図

(研究方法)

精原幹細胞株(以下GS細胞)に対し、Notchシグナルリガンド添加 / Notchシグナル阻害剤添加 / Notch3ノックダウンを行い、遺伝子発現変化や増殖への影響を解析した。

(結果)

1. GS細胞へのNotchシグナルリガンド添加

GS細胞におけるNotchシグナルを活性化させるため、Notchシグナルリガンドの一つであるJAGGED1のリコンビナントタンパクを培養皿に固定化し、GS細胞を播種した(図2A)。培養3日後に細胞からRNAを抽出し、cDNAに逆転写した後、定量RT-PCRにて各遺伝子の発現量を測定した(図2B)。Notchリガンドの添加によりNotchシグナル標的遺伝子である Hes1, Hes5, Hes6およびHes7の発現が上昇傾向であることが分かった。未分化型精原細胞マーカーであるOct3/4, Gfra1の発現はほとんど変化しないが、Plzf発現は添加により上昇傾向であった。一方、分化型精原細胞マーカーのcKitはリガンド添加により発現が上昇傾向を示した。

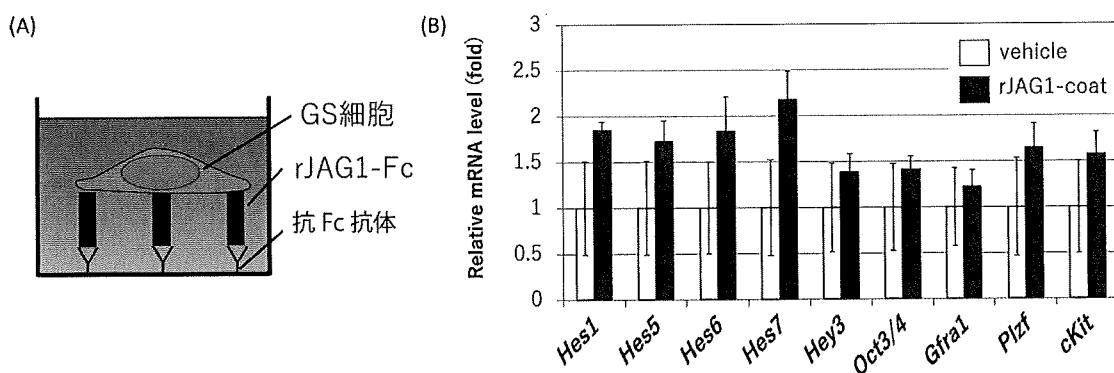


図2：Notchシグナルリガンド添加による遺伝子発現変化

(A) Jagged1リコンビナントタンパク(rJAG1-Fc)の培養皿への固定化法。抗Fc抗体のコート後にrJAG1-Fc(終濃度10 μ g/ml)を添加することにより、培養皿底面にrJAG1-Fcが固定化される。rJAG1-Fc固定化後にGS細胞を播種し、培養三日後に回収、RNA抽出した。(B) Notchシグナル標的遺伝子および精原細胞関連遺伝子の遺伝子発現レベル。リアルタイムRT-PCR法により発現量を定量した。各遺伝子発現レベルは内在性コントロールGapdhにより補正した。エラーバーは標準誤差を示す。(n=3)

2. GS細胞におけるNotchシグナル阻害

GS細胞におけるNotchシグナルを抑制するため、 γ -セクレターゼ阻害剤であるDAPTを培地に添加し、遺伝子発現および細胞増殖への影響を解析した。終濃度10 μ M DAPTの添加により未分化型精原細胞マーカーPlzfおよび分化型精原細胞マーカーKitの発現量は変化しなかった(図3A)。一方、未分化型精原細胞から分化型精原細胞への分化転換時に発現上昇するNgn3の発現がDAPT添加により有意に増加することが明らかとなった(図3A)。DAPT添加による細胞増殖への影響を調べるため継日的に細胞数を計測した結果、Notchシグナルの阻害により細胞増殖は変化しないことが分かった(図3B)。

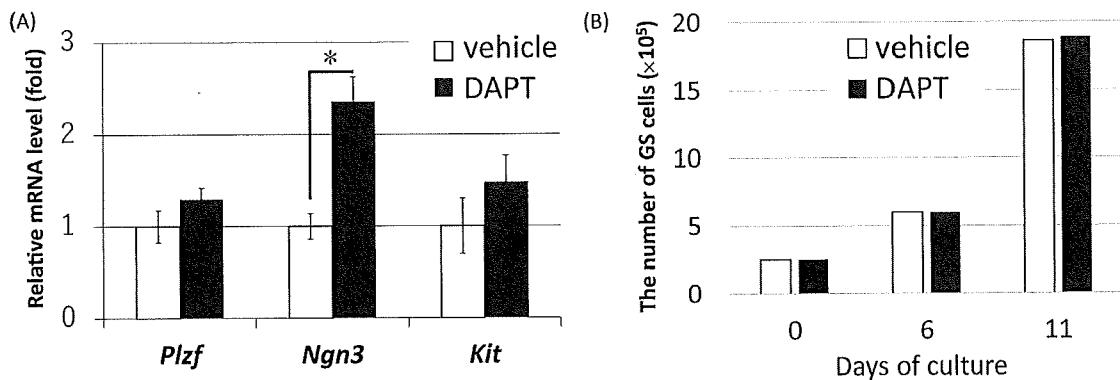


図3：Notchシグナル阻害剤DAPT添加による遺伝子発現変化および細胞増殖への影響

(A) GS細胞に終濃度 $10\mu\text{M}$ DAPTを添加し、培養3日後に回収。リアルタイムRT-PCR法にて精原細胞関連遺伝子の発現量を定量した。各遺伝子発現レベルは内在性コントロール*Gapdh*により補正した。エラーバーは標準誤差を示す。(n=3) (B) GS細胞を播種後6日目、11日目の細胞数を測定した。

3. GS細胞におけるNotch3ノックダウン

精原細胞におけるNotch3シグナルの機能を調べるため、GS細胞を用いたNotch3ノックダウンを行った。GS細胞はリポフェクション法による遺伝子導入率が非常に低い細胞であるため、電気穿孔法による遺伝子導入を試みた。まず電気穿孔法における遺伝子導入率の至適条件検討を行った。GS細胞に対しpEF1 α -DsRedプラスミドを種々の条件で電気穿孔し、翌日顕微鏡観察によりDsRed陽性GS細胞を検出(図4A)、遺伝子導入効率を導出した(図4B)。その結果、電気穿孔条件は電圧1150V、通電時間20ms、パルス回数2回において至適な生存率と遺伝子導入率を得られる事が明らかとなり、以降この条件を用いて遺伝子導入を試みた。

Notch3の発現をRNA干渉により抑制するため、Notch3 mRNAを標的とするようデザインされた2種類のsiRNA(siNotch3 #1 / #2)を用いてGS細胞に遺伝子導入を行なった。ノックダウン効率を調べるために遺伝子導入後1日目、3日目のGS細胞を回収し、定量RT-PCRによりNotch3 mRNAの発現量を調べた所、1日目にはsiRNAの導入によりNotch3発現が抑制されるが、3日目にはその抑制効率が減少しており、siRNAによる発現抑制効果は一過的である事が分かった(図4C)。siRNA導入後3日目のGS細胞における精原細胞関連遺伝子の発現変化を調べた結果、Gfra1, Ngn3, Kitの発現が上昇傾向を示した(図4D)。また、Notchシグナル標的遺伝子の発現を調べたところ、Notch3ノックダウンによりHes7発現は減少した一方で、Hes1, Hes5発現は上昇し、Hes6発現は変化しなかった(図4D)。

(成果・考察)

本研究により、精原細胞におけるNotchシグナルの役割の一端が明らかとなった。DAPTによるNotchシグナル阻害によりGS細胞の増殖率は変化しない一方、Ngn3発現の有意な上昇を示した。さらに、Notch3 siRNAを用いたノックダウンにより分化型精原細胞関連遺伝子であるNgn3およびKit発現が上昇した。Ngn3は未分化型精原細胞が分化する際に発現促進される遺伝子であることから、精原細胞におけるNotch3シグナルはNgn3を発現抑制することにより分化阻害し、未分化性維持に寄与する可能性が考えられた。

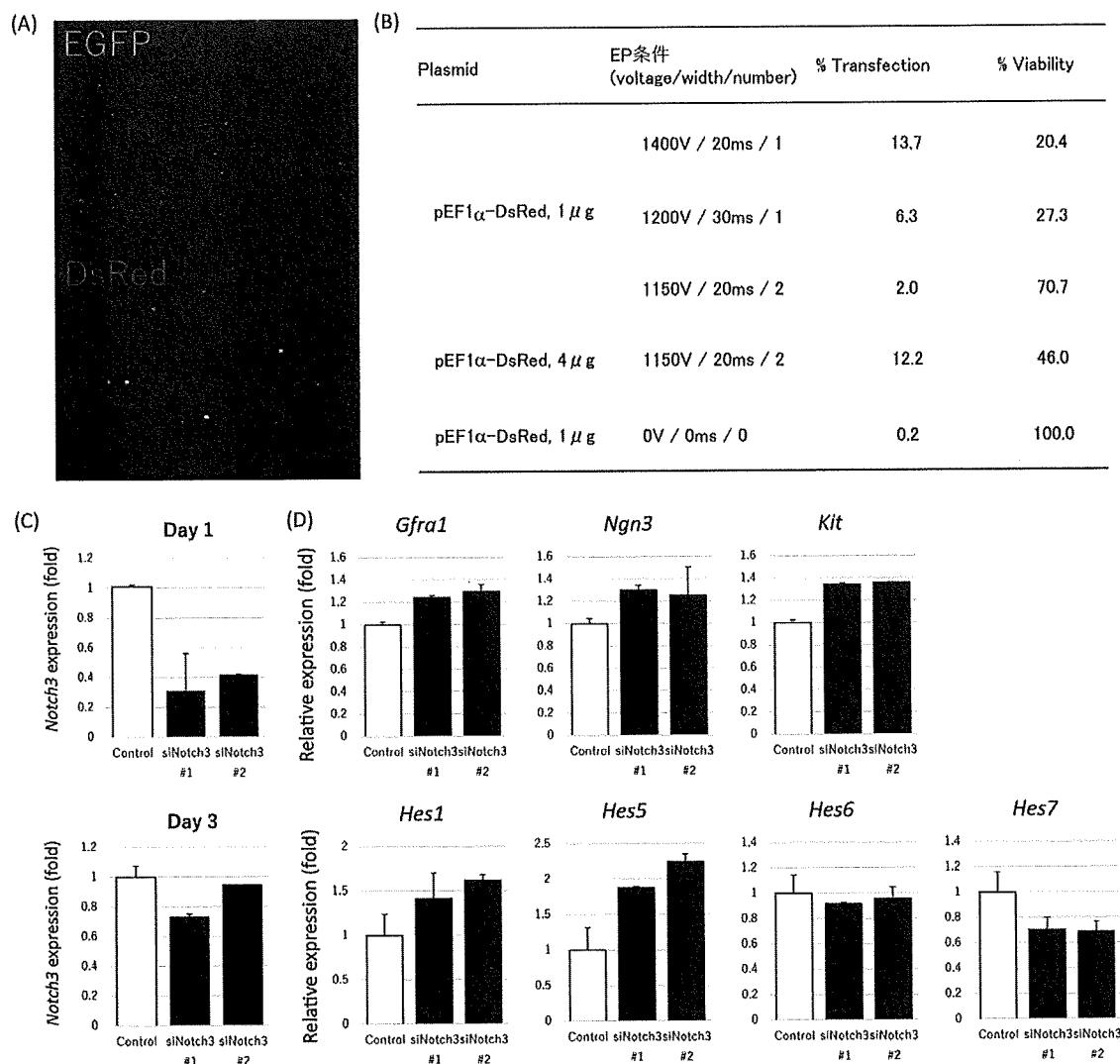


図4：GS細胞への遺伝子導入検討とNotch3ノックダウンによる遺伝子発現変化

(A) Neonエレクトロポレーション装置を用いてGS細胞にpEF1 α -DsRedプラスミドを遺伝子導入した。EGFP陽性は全GS細胞、DsRed陽性細胞は遺伝子導入されたGS細胞を示す。(B)導入プラスミド量および電気穿孔条件の検討結果。(C)GS細胞にNotch3標的のsiRNA(siNotch3)を遺伝子導入し、Notch3 mRNA量をリアルタイムRT-PCR法にて測定した。発現レベルは内在性コントロールGapdhにより補正した。エラーバーは標準誤差を示す。(n=2)

(D) siRNA導入後3日目のGS細胞を用いて、リアルタイムRT-PCR法にて精原細胞関連遺伝子およびNotchシグナル標的遺伝子の発現量を定量した。各遺伝子発現レベルは内在性コントロールGapdhにより補正した。エラーバーは標準誤差を示す。(n=2)

さらに、Notch3ノックダウンによりHes7発現が減少を示したことから、精原細胞におけるNotch3シグナルの標的遺伝子はHes7である可能性が考えられた。一方、リガンド添加により発現上昇傾向を示したHes1、Hes5はNotch3ノックダウンにより発現上昇を示したことから、他のNotchファミリーがNotch3ノックダウンを補填している可能性が考えられる。本研究によりNotch3シグナルはNgn3を介して精原細胞分化を制御している可能性が示唆されたが、精子形成メカニズムをより詳細に明らかとするために、今後はHes7などNotchシグナル標的遺伝子のノックダウンにより機能解析を進める必要がある。

精神科病棟看護師における自傷患者との関わりで生じる 陰性感情への対処法

横浜市立大学附属 市民総合医療センター
若杉慶嗣

I. 研究目的

リストカットなどの自傷行為は、切傷以外の刺傷、熱傷、挫傷などの方法も含した直接的損傷(松本, 2011)として定着されつつある。自傷者が自殺未遂により医療機関で医療を施され退院しても、次に自傷行為に及ぶ際には、さらに致死性の高い手段を用いることで、自殺できると確信しやすい問題がある(高橋, 2006)。Owens ら(2002)の自傷行為に関する先行研究によると、自傷患者の2%が1年後に自殺しており、9年後は7%に達する。

亀山ら(2016)は、自傷患者へ抱く精神科看護師の陰性感情として疑念や諦め、失望、不快感などを挙げており、自傷患者を遠ざけることが看護師の自信低下を招く恐れがあると述べている。看護師が抱く陰性感情の問題について青木ら(2016)は、看護師は感情が揺さぶられることでコントロールに苦慮し、その後のケアで共感的に患者に関わることができないと述べている。先行研究の研究対象者は、精神科看護師の経験年数が2年以上や3年以上と設定され、もしくは明確に設定されていなかった。そこで本研究の目的は、精神科病棟において自傷患者に抱いた陰性感情に、達人レベルの看護師がどのように対処しているかを明らかにすることとした。

II. 研究方法

1. 研究デザイン

質的記述的デザイン

2. 研究対象者

精神科病棟での勤務年数が15年以上あり、自傷患者2名以上との関わりがある看護師

3. データ収集

データ収集期間は、平成29年8月1日から9月30日であった。研究協力への同意を得た研究対象者に対して、研究対象者が所属する施設内のプライバシーを保つことのできる個室にて、インタビューガイドを用いながら45分程度の半構造化面接を実施した。面接内容は研究対象者の同意を得た上でICレコーダーに録音した。

4. 分析方法

面接で得られた内容について質的記述的分析を行った。

5. 倫理的配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成 29 年 2 月 28 日施行)」に従って実施した。また、公立大学法人横浜市立大学ヒトゲノム・遺伝子研究等倫理委員会の承認(A170600010)を得た。

III. 結 果

1. 研究対象者の基本属性

研究対象者は精神科病棟での勤務年数が 15 年以上の女性看護師 8 名であった。研究対象者 8 名の年齢は 30-50 歳代であり、看護師の経験年数の平均は 20.6 年、精神科病棟の経験年数の平均は 19.1 年であった。面接時間は 1 人につき 35-45 分であった。

2. 分析結果

分析の結果、6 カテゴリーと 21 サブカテゴリーが抽出された。以降文中では、抽出されたカテゴリーは【 】、サブカテゴリーは〈 〉にて示した。

【患者と距離を置く】は 2 サブカテゴリーから構成された。〈対応頻度のコントロール〉では、自傷患者に対して陰性感情を抱くことを自覚し、対応頻度をコントロールしていることが語られた。〈心理的距離の確保〉では、自傷患者に対して関わりはするものの、心理的に距離を確保し、看護師自身の感情を抑圧していることが語られた。

【同僚看護師からの支援を受ける】は 4 サブカテゴリーから構成された。〈患者への陰性感情を同僚看護師と共有する〉では、自傷患者への陰性感情を同僚看護師と共有していた。

〈患者への不満を同僚看護師に表出する〉では、自傷患者との関わりで生じた陰性感情以外の出来事や患者の行動化に対する看護師自身の思いを同僚看護師に表出していることが語られた。〈患者への不満を同僚看護師に表出する〉には、相性が合わない、次も関わるのがつらいなどの語りが含まれており、これらは陰性感情に該当しないと判断して区別した。〈陰性感情を同僚看護師に共感してもらう〉では、安心感や救われている思いがあることについて語られた。〈患者対応を同僚看護師に委任する〉では、自傷患者への対応を同僚看護師に委任することで協力し合えていることが語られた。

【患者を了解する】は 5 サブカテゴリーから構成された。〈患者に关心を寄せる〉では、対象看護師は自傷患者の症状が安定している時間帯を選択し、患者に关心を寄せることで理解につなげていることが語られた。〈患者の行動化を理解する〉では、行動化する患者の背景には何があるのだろうかという考察をしていることが語られた。〈対話から患者のつらさを理解する〉では、自傷患者の行動化するつらさを対話により理解しようと試みることが語られた。〈患者の健康的側面を理解する〉では、患者の訴えや行動から健康的側面があることを再認識すると、意外性を感じることや愛着を持つことが語られた。〈対処行動としての自傷を了解する〉では、看護師として自傷患者と関わった経験を重ねたことによって、自傷は仕方がないという思いに至ったことについて語られた。

【これまでの患者対応を見直す】は 4 サブカテゴリーから構成された。〈陰性感情に気づく〉では、湧き出た陰性感情に疑問を持ち、看護師自身が行動変容できるように振り返っていることについて語られた。〈陰性感情の回避は不可能と認識する〉では、陰性感情を抱かないように注意するのではなく、看護師自身が陰性感情の回避は不可能と認識していること

について語られた。〈陰性感情を肯定的に捉え直す〉では、陰性感情を抱くことは、患者と関わっているためであるという肯定的な体験として捉え直していることが語られた。〈患者の行動化で生じた陰性感情を合理化する〉では、自傷を繰り返す患者だから陰性感情を抱くことは仕方がないというように自身を納得させ、合理化していることが語られた。

【様々な立場の人にアドバイスを求める】は4サブカテゴリーから構成された。〈患者のケース検討をする〉では、カンファレンスをすることが、看護師が1人で陰性感情を抱え込まないで済むように検討する場となっていることが語られた。〈多職種の助言を得る〉では、多職種による多角的な視点を取り入れることで自傷患者の理解を深化させていることが語られた。〈看護師長に相談する〉では、所属病棟の看護師長に自傷患者の対応がつらいことを打ち明けたことについて語られた。〈精神看護専門看護師の協力を依頼する〉では、精神看護専門看護師に話を聞いてもらうことが精神的支柱になっていることが語られた。

【職場を離れたら仕事のことを考えない】は2サブカテゴリーから構成された。〈陰性感情を家庭に持ち込まない〉では、子どもを遅くまで家で待たせることが、母親としての役割と仕事を見直すきっかけになっていることについて語られた。〈余暇時間を持つ〉では、趣味やスポーツなど余暇時間を用いて自傷患者との関わりで生じた陰性感情に対処していることが語られた。

IV. 考察

単に陰性感情の問題を回避しているだけではなく、今後も患者と関わる機会や関わり続ける可能性を予測し、それを生かすために距離を置いていたと考える。対象看護師は長期的展望を持って看護ケアを継続していくために、自傷患者から距離を置いていたといえよう。加藤ら(2011)は看護師が患者との関わりで関係性を悪化させたくないと思った時に、心理的に線を引くと述べていることから、対象看護師は心理的距離を確保していたと推察する。

木元ら(2013)は看護師が自らの陰性感情に気づき、適切に処理することはケアを提供する上で欠かすことができないと述べている。すなわち、陰性感情に気づくことは自己一致へつながる一歩であると考える。看護師が自己開示することにより、患者も自身の感情や考えを表現しやすいと考える。また、患者自身の感情や考えが表現された際には、看護師の患者理解につながるため、陰性感情に気づくことはケアをする上で欠かすことができないといえる。自傷は社会一般的に、自分自身の身体を傷つけ健康を損なうような理解しがたい行為や周囲の気を引くための行為としてのイメージ(松本, 2011)がある。自傷を了解することは突き放した関心ともいえる。対象看護師は妥協できる部分を冷徹に判断しながらも、患者へ関心を向ける姿勢は変えずに、自傷患者に抱く陰性感情に対処していたと推察する。

看護師は自らの陰性感情に気づくことなくして、またその後の看護師自身の感情の客観視なくして、感情のコントロールは不可能といえよう。対象看護師は自傷患者に抱く陰性感情の否定的側面のみに着目するのではなく、陰性感情を肯定的に捉え直していたと考える。加藤ら(2011)は、患者と距離を置く関わりがある場合は、のちに患者との関係性において良い方向へ発展していく傾向がある一方で、患者と距離を置く関わりが続く場合は患者との関係性の発展が停滞する傾向があると述べている。すなわち、対象看護師は自傷患者と距離を置

くことで、関係性の発展が停滞することを危惧した時期があったため、陰性感情を肯定的な感情体験として捉えることで、患者対応を見直していたと考える。

同僚看護師との語りは、陰性感情に対処する方策として有益であると考える。看護チームは患者に抱く陰性感情の共有や不満を表出できる職場環境の保証が重要と考える。精神看護専門看護師にはコンサルテーションとしての役割があるが、精神看護専門看護師のサポートがあれば、看護師は安心して陰性感情を表出することができると考える。精神看護専門看護師に相談して陰性感情を了解してもらうことは、コンサルテーションを依頼してきた看護師自身のメンタルヘルス支援につながるといえよう。

V. 結論

【患者と距離を置く】では、看護師は自傷患者に対応する機会を減らし、心理的にも距離を確保することで看護師自身の感情を抑圧していた。【同僚看護師からの支援を受ける】では、看護師は自傷患者への陰性感情を同僚看護師に共感してもらうことで安心感を得ていた。

【患者を了解する】では、看護師は患者に关心を寄せ、自傷の行動化やつらさを理解し、自傷患者の健康的側面を認識するという対処法をとっていた。【これまでの患者対応を見直す】では、看護師は陰性感情の否定的側面のみに着目するわけではなく、自身の陰性感情を肯定的に捉え直すことを試みていた。【様々な立場の人にアドバイスを求める】では、精神看護専門看護師はコンサルティである看護師の精神的支柱となり、それが看護師自身のメンタルヘルス支援にもつながっていた。【職場を離れたら仕事のことを考えない】では、看護師は仕事や家庭を分けることや余暇時間を活用して陰性感情に対処していた。

文献

- 青木好美, 片山はるみ(2016) : 自傷患者に対する反感態度尺度の日本語版の信頼性と妥当性, 日本看護科学会誌, 36, 255-262.
- 亀山麻衣子, 香月富士日(2016) : 自傷患者に対する精神科看護師の感情反応と情緒的態度との関連, 日本精神保健看護学会誌, 25(1), 29-37.
- 加藤隆子, 渡辺尚子, 堀内ふき(2011) : 脊髄損傷患者の看護に関わる看護師の感情体験, 日本看護科学会誌, 31(2), 60-68.
- 木元司, 東修(2013) : 精神科の地域支援に関わる看護師が抱く陰性感情とその処理過程-精神科外来・訪問看護・デイケアに勤務する看護師へのインタビューを通して-, 日本看護学会論文集 精神看護, 43, 124-127.
- 松本俊彦(2011) : アディクションとしての自傷 「故意に自分の健康を害する」 行動の精神病理, 星和書店, 東京.
- Owens D., Horrocks J., House A. (2002) : Fatal and non-fatal repetition of self-harm, Systematic review, British journal of psychiatry, 181, 193-199.
- 高橋洋友(2006) : 自傷の予後, こころの科学, 127, 84-89, 日本評論社, 東京.

自己炎症性疾患における遺伝学的な病態解明の試み

横浜市立大学医学部 血液免疫感染症内科 講師
桐野 洋平

(研究目的)

自己炎症性疾患とは、自己抗体の産生は明らかではなく、好中球やマクロファージなどの自然免疫系細胞の機能異常に伴って引き起こされる周期性発作性炎症性疾患である。既知の遺伝性自己炎症性疾患の多くは自然免疫に関わる分子に変異を来す小児期発症例がほとんどであり、尿酸などの結晶を感知するパターン認識受容体*NLRP3*の変異によって引き起こされるクリオピリン関連周期性発熱、細菌毒素によるRhoGTPaseの構造変化を検知する受容体*MEFV*の変異によって生じる家族性地中海熱が代表格である。一方、成人の自己炎症性疾患にはベーチェット病、痛風、成人スティル病などが含まれている。自己炎症性疾患の疾患概念の歴史は浅く、1997年にKastnerらが提唱して以降(Kastner et al, Cell, 1997)、ようやく最近になって本邦でも認知されるようになってきた。

申請者は家族性地中海熱の原因遺伝子*MEFV*がベーチェット病の感受性遺伝子でもあることを報告した(Kirino et al, PNAS, 2013)。この成績は小児発症の自己炎症性疾患と、成人の炎症性疾患の間に連続的な関係があることを示している。最近では成人の自己炎症性疾患が疑われる周期性発熱例が数多く紹介されている。これらの患者は、既知の膠原病の診断基準は満たさず、多くの症例が孤発例で、典型的な自己炎症性疾患の臨床像とも異なり、診断までに時間がかかり、治療にも難渋している。例えば20歳台の原因不明の出血性膀胱炎の患者は、免疫抑制療法に反応せず膀胱摘出を要した。やはり20歳台のAOSDを疑った患者は多発冠動脈瘤を呈して心筋梗塞となつた。これらの患者に治療法を提供するには、根本的な病態を解明する必要がある。

そこで本研究ではこれらの診断未確定の成人自己炎症性疾患疑い例(周期性発熱・ベーチェット病・成人スティル病などの希少疾患・その他膠原病の重症型(extreme-phenotype)の患者に焦点を当てて、次世代シーケンサーを用いた全エキソーム解析、そして単球からのマクロファージ分化系を用いた機能解析を通じて、病態解明に迫り、新しい疾患概念を提唱することを目的として研究を推進した。

(研究方法)

対象患者

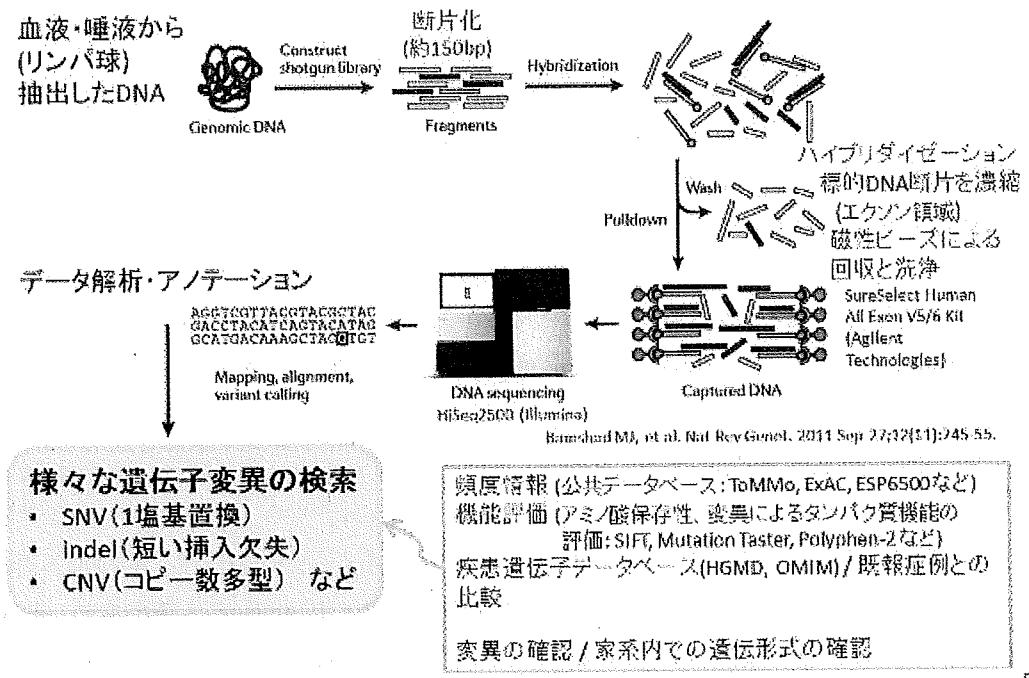
横浜市立大学附属病院血液免疫感染症内科に通院している家族歴を有するベーチェット病などの自己炎症性疾患患者を対象とした。患者および同胞（両親、兄弟など）より同意書を得た後に、血液もしくは唾液より体細胞DNAを抽出した。一部の症例では、白血球細胞をEBウィルスによって株化し、凍結保存を行った。

シーケンス

Agilent社の全エクソームシーケンス(WES)キットを用いてgDNAからエクソン領域（タンパ

ク質翻訳領域) を濃縮した。Illumina社のHiSeq 2500次世代シーケンサーを用いて、これを網羅的に調べた。横浜市立大学遺伝学講座のWESパイプラインを用いて、患者および同胞から網羅的に遺伝子変異を検出した。同講座の575例の健常日本人エキソームデータおよび1000 Genomesなどの公共データベースに存在しない新規変異に絞り込んだ。下図にシーケンスのワークフローを提示する。

全エクソーム解析(WES: whole exome sequencing)



倫理面での配慮

本研究はヒト遺伝子解析研究に相当し、個人情報の取り扱いに細心の配慮を必要とした。そのため、「炎症性・腫瘍性疾患における遺伝子と炎症の関連研究」の研究課題にて、横浜市立大学附属病院ゲノム倫理委員会の承認を得た（承認番号A121129002）。患者にはゲノム倫理委員会によって承認された説明文書による説明を行い、書面による同意を得た後に検体を採取した。検体は個人識別符号を伴わない状態にして保管した。採血は臨床検査必要時に同時行うことにより、患者への負担は最低限とした。希望する患者には院内の遺伝カウンセリング外来を案内して、社会的配慮を十分に期した。

末梢血白血球の分離・培養

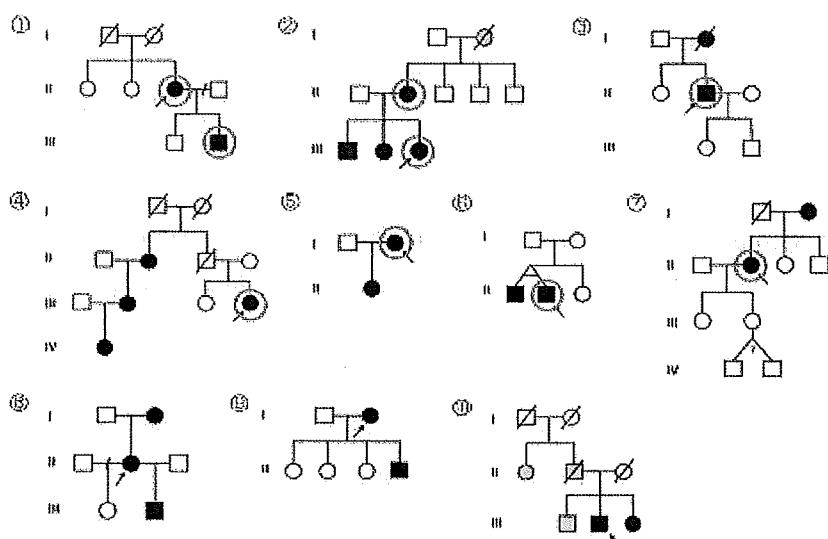
一部の患者からはヘパリン加末梢血を得て、Ficoll法で末梢血単核細胞を分離した。さらにMACSを用いて末梢血单球を単離した。これをM-CSFもしくはGM-CSF存在下で9-10日間培養することで、M1/M2マクロファージへ分化させた。分化した細胞中のmRNAや培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。

(結果)

家族性ベーチェット病におけるWES解析

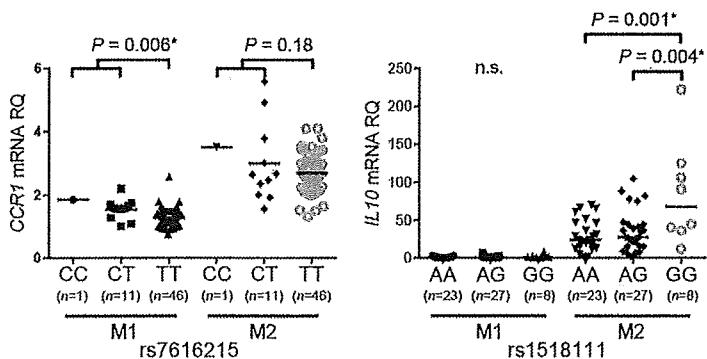
下記の家系図に示すように、10家系よりDNA検体を得てWES解析を進めた。矢印で示したのが発端者であり、赤丸で囲ったものがWES解析患者である。遺伝形式としては常染色体優性遺伝形式を想定したが、compound heteroの可能性も考慮した。下記に示す②、⑥家系では炎症経路に存在する遺伝子変異を複数検出した。結果、②および⑥の家系より自己炎症性疾患で変異が報告されている遺伝子に、複数の変異を検出した。これらの遺伝子変異はサンガーシーケンスによっても確認された。現在さらなる *in vitro*による機能解析を行つて、遺伝子変異の病的意義を確認作業中である。

現在解析中のベーチェット病家系



ベーチェット病患者の遺伝子多型とe-QTL解析

ベーチェット病のゲノムワイド関連解析によって複数の疾患感受性遺伝子座が検出されたが、CCR1 というケモカイン受容体と抗炎症性サイトカイン IL-10 に注目して機能解析を行つた。CCR1 はマクロファージに多く発現していることから、健常人の末梢血単球を M1 および M2 マクロファージに分化させて、機能解析を行つた。下図に CCR1 と IL10 のベーチェット病関連 SNPs rs7616215 および rs1518111 の遺伝子型と、*CCR1* と *IL10* mRNA の発現との関連を示す。ベーチェット病発症のリスクと関連する rs7615215 T と rs1518111 A で M1/M2 マクロファージでの発現量の差を確認した（仲野、桐野ら、投稿中）。



(成果・考察) 等

自己炎症性疾患に含まれる疾患は急速に増えてきている。次世代シーケンサーを用いた遺伝学的解析は国内外で広く行われており、新しい疾患と原因遺伝子が次々に発表されている。家族性BDではNFkBの抑制因子であるA20(*TNFAIP3*)の機能低下型変異が検出された(Zhou et al, Nat Genet, 2015)。小児期発症の血球貪食症候群ではパターン認識受容体*NLRC4*の機能獲得型変異がマクロファージの異常活性化を来すことが報告された(Canna et al, Nat Genet, 2014)。家族性結節性動脈炎ではアデノシンデアミナーゼ(ADA)2の変異が同定された(Zhou et al, N Engl J Med, 2014)。全身性エリテマトーデス様の皮疹と間質性肺炎を呈する家族例からはI型インターフェロン産生に関わるSTINGの変異が見つかった(Liu et al, N Engl J Med, 2014)。このように成人でも発症しうる炎症性疾患の家族例の解析によって、自然免疫系の遺伝子変異との関連が次々に発見されている。原因遺伝子が同定されれば、疾患特異的な治療戦略に直結する。例えばADA2欠損症では凍結血漿輸血や遺伝子治療によるADA2補充による治療効果が期待できる。Deficiency of IL-1 receptor antagonist (DIRA)ではIL1RNを含む遺伝子座の欠損によってIL-1 β の機能過剰によって生後間もなく発熱・皮膚炎・関節症状などを来すが、IL-1受容体阻害抗体Anakinraによって炎症が抑制できる(Aksentijevich et al, N Engl J Med, 2009)。一方、NIHにおいて集積した約3000例のAIDの約30%でしか原因遺伝子が同定できていないとから、今後も症例を蓄積して解析を継続することが重要であると考えており、本研究もこれらの先行研究に習って研究する必要があると考えて本研究を遂行した。

その結果、家族性ベーチェット病より自己炎症性疾患とも関連する遺伝子に変異を複数検出したことから、成人の自己炎症性疾患でも自然免疫系の遺伝子変異が病態を修飾している可能性が示された(土田、桐野ら、投稿準備中)。またベーチェット病の疾患感受性遺伝子座のmRNAの発現量は感受性SNPの遺伝子型と関連していた(仲野、桐野ら、投稿中)。これらの成績より、遺伝子解析が炎症性疾患の病態解明に有用であることが示された。今回提示したデーターはまだpreliminaryなものであり、今後の研究継続・症例の蓄積によって確固たるエビデンスを提示できるよう努力していきたい。

学会発表

土田奈緒美、桐野洋平ら、成人自己炎症性疾患における全エキソーム解析の試み. 第1回日本免疫不全症・自己炎症学会総会、2018年1月、東京.

仲野寛人、桐野洋平ら、ベーチェット病のゲノムワイド関連解析で関連が示された CCR1・IL10 遺伝子座は M1 マクロファージ優位の炎症病態に関与する. 第1回日本免疫不全症・自己炎症学会総会、2018年1月、東京.