# 脆性かつ複雑形状をもつ微小物の

# 液架橋力による精密マニピュレーション

横浜国立大学	工学研	开究院
准教授	渕脇	大海

### 1. 研究目的

近年,三次元積層造形技術の進展に伴い,様々な分野においてマイクロマニピュレーション技術の需要が高まり,さらに小型化していくと予想されている<sup>[1-3]</sup>.工業分野において 主流である空気圧によるピック&プレース技術は実装速度の速さで利点を持つが,対象物形 状に合わせたノズル形状を必要とし,異種異形の部品への適応が困難である<sup>[4-5]</sup>.

そこで本研究室は液架橋力という現象を利用したグリッパの開発を行ってきた.液架橋 力とは二つの物体間に液体が濡れ広がることで働く引力のことで,対象物の形状に合わせ て濡れ広がることから,ノズルの形状を変えずに異種異形への適応が可能である<sup>[6,7]</sup>.田中 らはダイヤフラムポンプの原理を利用した液滴吐出機構を用い,2本の直径0.51mmのノズル に形成される液滴により微小物を把持するグリッパを開発した<sup>[8]</sup>.しかしノズルの傾斜に より微小物の側面に液滴が濡れ広がり,1.0mm未満の微小物の把持が困難であった.

本研究では、田中2020よりノズルを先鋭化した機構を開発する.実験では発生力の検証 と、1.0 [mm]未満の様々な対象物のピック&プレースの位置決め精度を定量評価した.

### 2. 研究方法

### 2-1. ダブルノズル型液架橋カグリッパ

図1に開発したダブルノズル型液架橋力グリッパのCADモデル図と写真を示す. グリッパ は流路デバイス,タンク,バルブ,ダイヤフラムから構成される. 流路デバイスは左右に2 枚あり左側の流路デバイスは両方のノズルに繋がる流路が固定されている. 右側の流路デ バイスには右側のノズルに繋がる流路が固定されている. 右側の流路デバイスはxy手動ス テージに固定されており,ノズル間隔や高さを調整できる. 漏れ防止のためシリコンチュ ーブを流路として採用した.

液滴吐出方法は毛管現象とダイヤフラムポンプの原理を利用している.まずバルブとシャフトを開き,流路を開通させた状態にする事で,毛管現象によりノズル先端まで送液する.その後バルブを閉じ,タンク側への流路を遮断し,シャフトを押し込むことでノズル 先端側への流路にのみ液体を押し込み,ノズル先端に凸型のメニスカスを形成する.ダイ ヤフラムポンプの原理により高い再現性で液滴を形成できるように設計されている.



Fig. 1 Structure of double-nozzle capillary force gripper

### 2-2. 液架橋力測定

図2(a),(b)に液架橋力測定実験の流れと実験装置の構成を示す.電子天秤は1秒間ごとに測定を行なう.以下に各ステップごとの説明を記載する.

- (1) 電子天秤上に対象物を配置する. 但し,対象物単体だと,液架橋力により持ち上がって しまうため,対象物はアクリル製のプレートと接着させておく.
- (2) ノズル先端に吐出する液滴を USB カメラにより撮影.
- (3) グリッパを対象物と対象物間の距離の設定値になるまで降下.ノズル先端の液滴は対象 物上面と接触し次に液滴は圧縮に転じる,最接近時の液架橋を USB カメラで撮影.
- (4) ノズルを上昇,対象物とノズルの距離 150µm で USB カメラにより液架橋を撮影.
- (5) 液架橋が破断するまでノズルを上昇させる.





(a) Procedure

edure (b) Experimental setup Fig. 2 Measurement of capillary force

# 2-3. 自動ピック&プレース

図3(a),(b)にピック&プレース実験の流れと実験装置の構成を示す.画像による座標測 定にはOpenCVのPythonにより作成した画像FBプログラミングを使用した.

- (1) 作業面上の任意の位置に対象物を配置し、CCD カメラでxy座標を測定.
- (2) プレース位置がグリッパの真下になるように XY ステージを移動.
- (3) USB カメラでノズル液滴と床面の距離を測定, グリッパを下降, 作業面に液滴を塗布.
- (4) 微小物がグリッパの真下に位置するように XY ステージを移動.
- (5) USB カメラでノズル液滴と床の距離を測定, グリッパを下降, 対象物をピックアップ.
- (6) プレース位置がグリッパの真下になるように XY ステージを移動.
- (7) USB カメラでピックアップ中の対象物と床面の液滴の距離を測定, グリッパを下降, 対象物をプレース.
- (8) 対象物が CCD カメラの視野内に入るように XY ステージを移動し, xy座標を測定.



Fig. 3 Automatic pick & place

3. 結果

3-1. 液架橋力測定実験

対象物として、アクリル製 0.5 [mm]立方体、直径・奥行 1.0 [mm]半円柱、一辺 1.0 [mm] 三角柱、長辺 0.6 [mm]・短辺 0.3 [mm]のチップコンデンサを用いた.ただし立方体は表面 処理無しと疎水処理有りの 2 種類を使用した.

図4に測定結果を示す. 点線はノズルと対象物を近づける場合, 実線は遠ざける場合である. 図5 に0.5 [mm]とノズル間に形成される液架橋の写真を示す. 図4 より液架橋力は対象物に関わらず,距離を離している最中の100~200 [µm]において最大値を取ることが分かる. また, 扱う対象物の自重は全て 10 [µN]未満であるため, 把持するのに十分な発生力が得られていることが分かる. また, 表面特性が疎水性になることで発生力が大幅に減少することはなかった. これは図5から観察できるように表面特性が異なっても, ノズルを対象物に押し付けることで静的接触角から動的接触角に変化し, 液架橋の形状に顕著な差が生じなかったからと考えられる.



3-2. ピック&プレース実験

対象物は上記の実験の対象物に加えてアクリル製 1.0mm 立方体を使用した.全ての対象物 で試行回数は10回行い位置・姿勢の評価を行った.図6に0.5[mm]立方体としたときの実 験の様子を示し、図7にピック&プレース実験前後における対象物の分布の写真を示す.プ レース後はセルフアライメント効果により姿勢角度が一定値に揃っている事が確認できる. 図8に全対象物の xy 平面上の分布を示す.



-59-

### 4. 成果・考察

## 4-1. 立方体のピック&プレース実験

1.0 [mm]立方体ではノズル間距離を0.8 [mm], 0.9 [mm], 1.0 [mm]の三条件として実験を行った. 位置決め誤差は 0.9 [mm]で最小の77.6±73.4 [µm]となり,角度誤差の標準偏差は 1.0 [mm]で最小の4.84 [deg]となった. 0.5 [mm]立方体ではノズル間距離を 0.45 [mm]で実験を行った. 位置決め誤差は66.8±34.2 [µm],角度誤差の標準偏差は 4.11 [deg]となった. ピック&プレース成功率は 1.0 [mm]立方体で 83 [%], 0.5 [mm]立方体で 80 [%]となった. 誤差の主要因は床面に塗布した二つの液滴半径の偏差によるプレース時の液架橋力の偏差と考えられる.

### 4-2. チップコンデンサのピック&プレース実験

チップコンデンサではノズル間距離を 0.41 [mm]として実験を行った. 位置決め誤差は109±54[µm],角度誤差の標準偏差は 5.1 [deg]となった. ピック&プレース成功率は 100 [%]となった. 立方体とチップコンデンサの結果より,ノズルの右端から左端までの距離が対象物の長辺と一致している場合角度のばらつきを抑えられることが分かった.

#### 4-3.半円柱·三角柱

三角柱・半円柱の実験ではノズル間距離を 0.9 [mm]として実験した.半円柱では位置決め誤 差150±60.4 [µm],角度誤差の標準偏差は 23.8 [deg]となった.三角柱ではそれぞれ150±64 [µm],20.7[deg]となった.液滴接触面が水平でない場合,対象物の配置されている姿勢によっ てはノズルとの固体接触が発生したり,把持している最中に予期せぬ濡れ広がりが起こり,回転 したりすることで.以上により位置決め誤差や角度のばらつきが大きくなった.

#### 5 結論

先行研究<sup>[8]</sup>で開発した液架橋力グリッパの改良を行った.液架橋力測定実験では表面形状や濡 れ性に関わらずノズルを押し付けることで十分な発生力を得られることを確認した.ピック&プ レース実験では 1.0mm 以下の対象物の配置に成功し,位置決め誤差と角度誤差を定量評価した. 次の課題はノズルの先鋭化,柔軟物への適用が挙げられる.

謝辞

横浜学術教育振興財団からの研究助成により多くの成果を得ました.研究室一同謝意を表します.

#### 参考文献 (※本研究助成により成果の一部を上げた成果物)

- M. Mastrangeli et al., Self-assembly from milli to nanoscales: Methods and applications, JMM, vol. 19, no. 8, pp. 1–37, 2009
- (2) F. J. Henley, Combining engineered epi growth substrate materials with novel test and mass-transfer equipment to enable MicroLED mass-production, SID,52-3, pp. 688-691, 2018
- (3) 山本静男(2017)「さらなる高密度実装の実現に向けた 0201 サイズチップ抵抗器の開発」, 『エレクトロニ クス実装学会誌』, 20 巻 3 号, p.120-123
- (4) W. Zesch, et al., "Vacuum tool for handling microobjects with a NanoRobot", Proceeding of ICRA, vol. 2, pp. 1761-1766, 1997
- (5) S. Ruggeri et al., "Handling and manipulation of microcomponents: work-cell design and preliminary experiments", IPAS, IFIP AICT 371, pp.65-72, 2012
- ※(6) 西山優希,田中健太,伊藤貴俊,迫涼平,福知絵梨,渕脇大海,ダブルノズル型液架橋力グリッパによる 1 mmサイズの立方体,三角柱,螺旋コイルのピック&プレースの実現,日本機械学会第12回マイクロ・ナノ 工学シンポジウム,オンライン開催,MN1-09A3-2,10月,2021
- ※(7) 迫涼平,伊藤貴俊,西山優希,福知絵梨,渕脇大海,画像 FB を用いた液架橋力マニピュレータによる微小 物の精密位置決め,日本機械学会第 12 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム,オンライン開催, MN1-10P2-9,10 月,2021
- %(8) K. Tanaka, T. Ito, Y. Nishiyama, E. Fukuchi and O. Fuchiwaki, Double-Nozzle Capillary Force Gripper for Cubical, Triangular Prismatic, and Helical 1-mm-Sized-Objects, IEEE RAL, vol. 7, no. 2, pp. 1324-1331, April 2022, doi: 10.1109/LRA.2021.3138519, IF = 3.74
- %(9)Takatoshi Ito, Eri Fukuchi (Co-first author), Kenta Tanaka, Yuki Nishiyama, Naoto Watanabe, Ohmi Fuchiwaki, Vision Feedback Control for Automation of Pick-and-Place of Capillary Force Gripper, Micromachines 2022, 13, 1270. https://doi.org/10.3390/mi13081270

# オミクスとデータサイエンスで明らかにする 鶴見川の生態系構造

理化学研究所環境資源科学研究センター 特別研究員

横山 大稀

## (研究目的)

私たちが住む地球には多種多様な生態系が存在する。「地球上の多種多様な環境で、どのよう な生物が生息しているか、またどのように環境条件と関連するのか」は、環境と生物の繋がりを探る 生態学における究極的な問いである。

河川上流から下流にかけての多様な生態系を考えた場合、その場所によって母岩・土壌・土地 利用形態・河川の大きさ等の地理的条件に加えて、海水の影響の程度(塩濃度)、人間活動に由 来する栄養塩・有機物の蓄積量やその存在形態等、様々な環境条件が変化しうる。このような変化 に応じて、そこに生育する生物相にも違いが生じてくると考えられる。

生態系における環境条件や生物相を知るための非常に強力なツールとして、マルチオミクス解 析が挙げられる。次世代シーケンサーや核磁気共鳴(NMR)、高周波誘導結合プラズマ(ICP)等を 用いることで、生物相、代謝物、元素の情報を網羅的に取得することができる。また近年はオープ ンデータベースも充実してきており、例えば地理情報システム(GIS)を用いることで広域の地理的 情報を網羅的に取得することができる。これらの情報を多数集め情報科学的解析を行うことで、仮 説演繹に寄らない、データ駆動型の全く新しい生態学を展開することが期待できる。そこで研究で は鶴見川をモデルとして、多種多様な環境における表層水のマルチオミクス解析(菌叢:マイクロバ イオーム,代謝物総体:メタボローム、元素総体:イオノーム)、GISを用いた広域地理情報解析から 網羅的な環境・生物データを取得し、これらの情報科学的解析によって複雑な生態系の構成要素 の繋がりを可視化することを目的とした。

# (研究方法)

<u>サンプリング</u>

鶴見川全流域(鶴見 川、恩田川、早渕川、矢 上川の各支流と下流域) から54地点を対象に、表 層水について現場水質測 定、およびサンプリング を実施した。季節の影響 を最小化するために、サ ンプリングは2022/3/16-2022/4/2の2週間にかけて 集中的に行った。水質測



定用に表層水100mLを採取した。また代謝物・微生物群集測定用に現場連続ろ過(1.0µm→

0.2µmろ過フィルター)を行い、ろ過フィルターを回収した。採取した水およびフィルター サンプルは冷蔵で実験室まで持ち帰り、分析まで-30℃で冷凍保存した。 計測

現場環境の水質計測は、各種センサー(温度、pH、溶存酸素濃度、酸化還元電位、電気 伝導度、塩濃度、全ATP濃度、細胞外ATP濃度)を用いて行った。採取した表層水について は、実験室にてHACH試薬による比色計測(硝酸、亜硝酸、アンモニア、全窒素、リン酸、 化学的酸素要求量)およびICP-0ESの元素分析によるイオノーム計測を実施した。

メタボローム解析はNMRを用いて行った。採取したフィルターにMiliQ水を加え、膜上の 有機物を超音波剥離により剥ぎ取り、懸濁液を凍結乾燥した。凍結乾燥後の固形分をKPi溶 液の元で濃縮し、65℃15分の振とう抽出を行い、遠心分離後の上澄みをNMRチューブに入れ た。分析には700MHz-NMR(Bruker社)を用い、2D*F*-resのパルスプログラムを用いてNMRス ペクトルを取得した。rNMRを用いて、取得スペクトルの解析対象シグナル(Region of Interest; ROI)を定義し、各ROIのピーク強度を算出した。各ROIはSpinAssign, SpinCouple等の同定ツールとHMDBデータベースを用いて帰属を行った。

マイクロバイオーム解析はMiseqを用いた16S-rRNAアンプリコンシーケンス法により分析 した。採取したフィルター上のDNAをエタノール沈殿法で回収し、フォワード/リバースプ ライマーを用いたPCRによって16S-rRNA領域のDNAを増幅させた。PCR産物はAMpureの磁気ビ ーズを用いて精製した後、MiliQ水に再溶解させた。精製DNAを同一濃度に調整混合するこ とでライブラリを生成した。作成したライブラリをNaOHで変性させ、H1ハイブリタイゼー ションバッファーとPhiX溶液のもとで最終DNA濃度3.5pMになるように希釈し最終溶液を調 整した。最終溶液をMiseq Reagent Kits V2にロードし、Miseqを用いてDNAの配列情報を取 得した。分析した配列データはQiime2による処理を行い、Silvaデータベースに照合するこ とで微生物名のアノテーションを行った。

#### GIS処理

上記計測による環境情報の他、地理情報システム(GIS)を用いてサンプリング地点の情報を解析した。国交省が公開するホームページから河川構造、土地利用、地質、土壌等のGISオープンデータを取得した。各サンプリング地点で半径1000mの円形バッファを生成し、その範囲内の面的情報(土地利用、地質区分、土壌分類)を集計することで、サンプリング地点の土地情報を取得した。またGISで取得した河川ネットワーク構造を利用して、各サンプリング点の河口からの流路距離、およびサンプリングポイント間の流路距離を計算した。上記の流路距離計算の他、Shreve(1966)によるリンクマグニチュードを計算することで河川構造を数値化した。上記GIS処理は、Rのsfパッケージを用いて行った。

マイクロバイオーム・メタボロームデータについては、Bray-Curtis指標の非類似度に基づくnMDSによって多変量解析を行うことで、サンプリング地点間の差異を可視化した。また、サンプリング地点の河川ネットワーク上の距離とサンプリング地点間の非類似度をプロットし、一般化加法モデルによる回帰を行った。

ここまで取得した全データを用いたネットワーク解析を行うことで、鶴見川全域の生態 系構造の可視化を行った。相関ネットワークについては、データの階層性(各地点ろ過膜 孔サイズに応じて2データ存在すること)を考慮して、各パラメータのペアについて、一般 化線形モデルによってモデリングした。モデル式は

$$g(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2}$$
$$y_i \sim Normal(\mu_i, \sigma^2)$$

であり、 $\mu_i$ :観測パラメータAを、 $x_{i1}$ :フィルター孔径、 $x_{i2}$ :観測パラメータBの二者 で説明する線形モデルである。同じ計測機器で計測したデータはネットワーク上で 容易に繋がるため、観測パラメータのカテゴリを微生物、代謝物、水質、フィール ドデータの4つを定義し、異種カテゴリ間のリンクで回帰係数の有意水準p<0.00001 のみを抜き出してネットワーク描写を行った。上記解析は全てRで行った(nMDS: veganパッケージ、ネットワーク解析: tidygraph, ggraphパッケージ)。

### (結果・考察)

栄養塩濃度は各小流域ごとに違いがみられた。例えば、早渕川・矢上川では、鶴見川上 流・恩田川に比べて、pHが高くCODやNP濃度等が低くなっていた。また太平洋に近づくにつ れ、塩濃度や、Ca・Mg・K・Sr等アルカリ及びアルカリ土類金属量が多くなり、海水の影響 が濃くなること示唆された。

マイクロバイオーム、 メタボロームデータにつ いて、nMDS解析による多 変量解析を行った(図 2)。鶴見川河川のマイ クロバイオームは、サン プリング時のフィルター 孔径やサンプリング地点 によって大きく異なって いた。とりわけ孔径0.2µm で捕獲される微生物群集 についてサンプル地点間 の差異が顕著に表れた。 鶴見川の終着点である太 平洋、および河口の微生 物群集についてはnMDSプ ロット上の右下に配置さ





れ、上流側の群集とは大きく異なっていた。また支流域間の差異も見られ、鶴見川(上 流)・恩田川の群集と早渕川・矢上川の群集間の差異が顕著にみられた。また鶴見川・恩 田川の湧水地付近の水(といくつかの例外サンプル)はnMDSプロット右上に配置され他の 群集とは大きく異なっていた。例えば、塩分の影響が大きくなる中流から河口にかけて、 *Comamonodaceae*の優占率が減少し、*Rhodobacteraceae*, *Flavobacteriaceae*の優占率が増大 した。鶴見川・恩田川支流では早渕川・矢上川支流よりも*Rhodocyclaceae*等の優占率が高 かった。また湧水地(といくつかの例外サンプル)では他地点では出現しない *Colwelliaceae*が優占していた。これらのことは、河川の位置(湧水地・上流・下流や支流 流域等)の環境の違いや微生物の移動分散性等に影響を受けて、群集組成が大きく変化し ていることを示唆している。

河川ネットワーク上のサンプリング地点間距 離と非類似度(Bray-Curtis指数)を河川グル ープごとにプロットしたところ、すべてのグル ープにおいて距離が離れるほど群集の非類似度 は増大するものの、その増大傾向は河口および 太平洋のサンプリング地点で顕著であった(図 3)。つまり、こうした微生物群集の非類似性 は微生物自身の移動分散性以上に、上流から下 流にかけての環境の違い(塩濃度等)によって 強く影響を受けていることが示唆された。

また、メタボロームについてはマイクロバイ オームほどにサンプリング地点の差異は見られ なかったものの、フィルター孔径間の差異がみ られた(図2)。



図 3. サンプリング地点間の河川ネッ トワーク上の距離と群集の非類似度

最後に、これら取得した全てのデータを用い て偏相関ネットワークを構築し、微生物一代謝物一水質一フィールドデータ間の関連を図 示することで、鶴見川の生態系構造を可視化した。ネットワークを形成することで大きく 二つのモジュール構造が浮き彫りになった。第一に、海からの距離や、Shreve指数(リンク マグニチュード)といったパラメータは塩濃度関連パラメータや、いくつかの微生物

(e.g., *Rhodobacteriaceae*, *Porticoccaceae*, *Pseudohonfiellaceae*) とモジュールを構成しており、主に塩分濃度を介した海洋-淡水という生育環境の違いを反映していると考えられた。第二に、COD、NP濃度等水中の有機物量を反映していると考えられるパラメータは、*Xanthomonadaceae*, *Neisseriaceae*等の微生物とモジュールを構成しており、こうした微生物は河川の富栄養化と関連する微生物であると考えられた。こうしたネットワーク構造から、鶴見川全体の生態系としては主に淡水-海水といった塩濃度と有機物濃度の勾配によって多様な環境・群集構造が維持されているものと考えられた。



# 多嚢胞性卵巣症候群モデルマウス卵巣における 遺伝子発現変化の解析

横浜市立大学 理学部·助教

中島 忠章

(研究目的)

哺乳類の生殖は、視床下部一脳下垂体一性腺軸のホルモンによって制御されており、メ スの卵巣では、卵胞の成長と周期的な排卵、およびステロイドホルモン合成が行われてい

る。視床下部からのパルス状の刺激によ り、下垂体から卵胞刺激ホルモンと黄体 形成ホルモンが放出され、卵胞の発達と ステロイドホルモン合成が行われる (Fig. 1)。通常、ステロイドホルモンは 視床下部に負のフィードバックとして働 き、視床下部からの刺激を低下させる。 ステロイドホルモンであるエストロゲン の量が一定以上を超えると、視床下部へ の刺激が正のフィードバックとなり、黄 体形成ホルモンがサージ状に分泌され、 排卵に至る。



Figure 1 ホルモンによる生殖制御機構

多嚢胞性卵巣症候群(Polycystic ovary syndrome, PCOS) は性成熟期の女性の5-15%で 見られ、無排卵、高アンドロゲン症、シスト状の卵胞などの症状を伴い不妊の原因として 最も多い疾患であるが、発症原因は不明である。新生仔期のアンドロゲン投与によるPCOS モデルマウスにおいて、ステロイドホルモン合成酵素の発現調節が正常マウスとは異なっ ていることが明らかとなっている(Kakuta et al., 2018)。さらに、本モデルマウスで は、脳下垂体のホルモン(ゴナドトロピン)刺激に対して卵巣が過剰に応答する傾向にあ った。

以上のことから本研究では、PCOSモデルマウスを用いて、ゴナドトロピン投与後のマウ ス卵巣の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、ゴナドトロピンに対する過剰応答を導く原因 を解明するための基礎的な知見を得ることを目的としている。

(研究方法)

出生日から3日間、C57BL/6Jメスマウスに1 µgのプロピオン酸テストステロンを皮下投与 し、PCOSモデルマウスを作製した。対照群は新生仔期に溶媒のみ(オイル)を投与された マウスを用いた。排卵現象を誘発するホルモン環境を模倣するために、3ヶ月齢のメスマウ スに卵胞刺激ホルモン様作用を持つ妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)を投与し、その 48時間後に黄体形成ホルモン様作用を持つヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を投与した。対照群として発情期を発情間期で統一したマウスを用いた。対照群とPCOSモデルマウスについて、ゴナドトロピン投与前、PMSG投与後48時間後、hCG投与8時間後の3点、計6群より卵巣を採取し、RNAを抽出し、次世代シーケンサーによるRNAシーケンス解析を行った。個体間のバラつきを抑えるために、各実験群は3個体分の卵巣を合わせてRNAを抽出した。

### (結果)

### PCOSモデルマウスにおける、卵巣全体の遺伝子発現の傾向

RNAシーケンスの結果、33707種類の遺伝 子が同定された。PCOSモデルマウスの卵巣 において、ゴナドトロピン投与前、PMSG投 与後、hCG投与後、いずれかで2倍以上の発 現変動があった遺伝子は8617種類であっ た。横軸に発現量のlog2対数平均値、縦軸 のPCOSモデルマウスにおける発現変動の log2対数値を取ったMAプロットにおいて、 ゴナドトロピン投与前に比べて、PMSG投与 後4ではPCOSモデルマウスにおける発現変動 が抑えられており、hCG投与後では発現変動 が再び増大した(Fig. 2)。

さらに、各群の全ての遺伝子発現を用い て主成分分析を行った。主成分1と2をそれ ぞれ横軸、縦軸に取ることによって、全遺 伝子発現がどの群間で近しいかを視覚的に 捉えることができる。横軸はゴナドトロピ ン投与の影響と関連しており、縦軸はPCOS モデルによる影響と関連していた (Fig. 3)。ゴナドトロピン投与前は、対照群 とPCOSモデルマウスの全遺伝子発現パター ンは開いていたが、PMSG投与後に接近し、 hCG投与後にまた離れるということが分かっ た。これらの結果より、PCOSモデルマウス における影響はゴナドトロピン環境が異な ること(無排卵?)が大きな要因である が、一方で、黄体形成ホルモンの刺激への

応答性はPCOSモデルマウスで大きく異なっ

ていることがわかった。









• Log2(control\*PCOS)

Figure 2 PCOSモデルマウス卵巣における RNAシーケンスのMAプロット

-66-

6

4

2

0

-2

-4

-6



Figure 3 PCOSモデルマウス卵巣におけるRNAシーケンスの主成分分析

(成果・考察) 等

新生仔期のアンドロゲン投与によるPCOSモデルマウスにおいて、ステロイドホルモン合 成酵素の発現調節が正常マウスとは異なっている(Kakuta et al., 2018)。さらに、本モ デルマウスでは、ゴナドトロピン刺激に対して卵巣が過剰に反応する傾向にあった。ヒト においても、排卵誘発剤などによる刺激を受けた場合に起こる卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)が知られており、PCOSの患者では、OHSSの リスクが正常なヒトと比べて3.58倍高いという報告がある(Tang et al., 2021)。

新生仔期アンドロゲンの投与の影響は、視床下部一下垂体に働き、脳のオス化を誘導す ることによって高黄体形成ホルモン状態となり、高アンドロゲン症を発症することが、 PCOS発症の一因となっていると考えられている。今回、ゴナドトロピン投与前後のマウス 卵巣の遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、ゴナドトロピン投与前では開いていた

遺伝子発現パターンが、卵胞 刺激ホルモン投与後にはその 差が縮小した。このことか ら、ゴナドトロピン投与前の 遺伝子発現変化の大きな要因 はゴナドトロピンなどのホル モン環境の違いによる可能性 が高く、PCOSモデルにおいて も卵胞刺激ホルモンには正常 に応答し、対照群との発現パ ターンの差が小さくなったと 考えられる(Fig. 4)。



Figure 4 新生仔期アンドロゲン投与による 視床下部一下垂体一性腺軸への影響

一方で、黄体形成ホルモンへの応答性は大きく異なっていることから、ゴナドトロピン 環境を整えるだけでは新生仔期アンドロゲン投与の影響をキャンセルすることはできない と考えられる。すなわち、新生仔期アンドロゲン投与は卵巣にも直接的に何らかの作用を 与えており、その結果、対照群と同様のPMSGとhCG投与を行っても、その応答性が異なって いたと考えられる。

今回の網羅的解析により、PCOSモデルマウスにおいて、ゴナドトロピン投与前、投与後のいずれかの時点で対照群と比較して2倍以上発現が変動した遺伝子が8617個同定された。 現在はそれらの遺伝子から、どのような遺伝子群やシグナルがPCOSモデルの原因となり得るのかを解析中である。一方で、多数の遺伝子が同定されたことより、この中から重要な 遺伝子群やシグナルを同定するのは難しいと考えられる。特に、卵胞刺激ホルモンへの応 答性や、排卵前における黄体形成ホルモンへの応答性は、主に卵胞内の顆粒膜細胞が担っ ていると考えられるため、今後は顆粒膜細胞に発現する遺伝子に絞っての解析が求められ る。

本研究で行った新生仔期マウスにおける高濃度アンドロゲン曝露の網羅的解析結果は、 ヒトPCOS患者の遺伝子発現変化の参考となる可能性が高く、不妊治療における基礎的知見 を得ることができたと考えられる。今後の解析により、重要な遺伝子群やシグナルが同定 された際には、それらがPCOS患者の不妊治療の標的となる可能性もある。

# 経路積分分子動力学法を用いた超微細結合定数の精密予測: thioaceton 系分子の系統解析

横浜市立大学・量子物理化学(立川)研究室・特任助教 高木 牧人

## 【研究目的】

ミューオニウム (Mu) とは、素粒子の一種である正ミューオンと 1 個の電子から構成 される系である。正ミューオンの電荷やスピン量子数は電子と同じであるが、質量は、陽 子の約1/9であり、Muは水素原子の質量の小さい同位体とみなすことができる。Muはその 質量の小ささから内部磁場に対して非常に敏感であり、磁気測定等に利用されている。磁 気測定で測定できる重要な物理量として、超微細結合定数 (HFCC) がある。HFCCは核ス ピンとラジカル電子間の相互作用の大きさを表す物理量であるが、その値の帰属や解析に 第一原理計算に基づく高精度な予測が必要とされている。質量の小さいMuを含む系では特 に核の量子効果の考慮が重要であるが、従来の計算手法では、核の量子効を取り込んだ計 算は難しく、Muを含む系の高精度なHFCC予測はできていなかった。一方で、当研究室で 開発を進めている経路積分分子動力学法(PIMD法)では、量子粒子をバネで繋がれた古典粒 子で展開することで、効率的に核の量子効果を取り込んだ計算が可能となる。さらに、 PIMD法では温度効果を考慮した物理量の計算が可能であることもメリットのひとつであ る。近年、我々は本手法を用いることで、核の量子効を取り込んだHFCCの予測に成功した <sup>III</sup>。さらに近年、本手法の応用として、ミューオニウム(Mu)を付加したラジカル分子について、 超微細結合定数(HFCC)の精密予測に成功した。

本研究ではH/Mu付加thioaceton(図1)に 対して、PIMD法によるHFCCの精密予測 を行うことで、H/Muの周囲の環境の違い がHFCCへ与える影響を解析する。さら に、H/Mu付加thioacetonの置換基を変える ことで、非対称な環境の効果やバルキー な置換基の効果の系統的な解析を行う。

Mu付加分子に対しHFCCを系統的に予測



図 1. H/Mu 付加 thioaceton

し比較検討することで、H/Muの周囲の環境の違いがHFCCへ与える影響を解析する。この ようなこれまで計算することすら難しかったMu付加分子に関する基礎的な知見を蓄積する ことで、将来的には大きな分子やポリマーなどを容易な測定・帰属を可能するなど、ミュ ーオン科学の今後の発展へと貢献できると考えている。

[1] Y. Oba, T. Kawatsu, and M. Tachikawa, J. Chem. Phys., 145, 064301 (2016).

# 【研究方法】

H/Mu付加thioacetonに対し、PIMD法 によるHFCCの精密予測を行い比較す る。さらに、置換基を図2のように系統 的に変えた分子に対しても同様にHFCC の予測を行い比較検討することで周囲 の環境がHFCCへ与える影響を調べる。 計算条件は以下の通りである。PIMD 法のビーズ数はMu化体では64、H化体 では16とした。Step数は90000とし、時

間刻みはMu化体では0.04 fsec.、H化体で



は0.1 fsec.とした。温度は300 Kとし、温度制御にはmassive Nosé-Hoover chain 法を用いた。 PIMD法にはハウスコードを用いて計算を行った。電子状態計算には密度汎関数法(DFT)計 算を行い、計算レベルはB97D/6-31+Gを用いた。計算パッケージにはGaussian09を用いた。

## 【結果と考察】

thioaceton分子にはS原子と中心のC原 子のどちらにもH/Mu付加する可能性が ある(図3)。構造最適化計算で両者のエ ネルギーを求めたところ、C原子に付加 した構造の方が9.2 kcal/mol安定である ことがわかったため、以後はこの安定 なC原子に付加した構造について解析を 行った。

計算対象のH/Mu付加thioacetonについ て、PIMD法を用いてHFCCの計算を行 なった。計算されたHFCCはMu化体で 52.6 MHz、H化体で42.5 MHzとなり、 Mu化体の方がややHFCCが大きくなる 結果となった(図4)。

Mu化体およびH化体について thioaceton分子の左右のメチル基や硫黄 部分の構造には大きな違いはなく、左 右のメチル基上の電荷も左右でほぼ等 しく、Mu化体およびH化体で大きな差 は見られなかった(図5)。



図 3. Mu 化体および H 化体 thioaceton の HFCC



図4. Mu 化体および H 化体 thioaceton の HFCC



**図 5.** Mu 化体および H 化体 thioaceton のメチル 基上の電荷



図6. Mu/H 原子上の電荷と中心の炭素原子-Mu/H 距離(R<sub>CMu</sub>/R<sub>CH</sub>)に対する二次元分布

次に、Mu/H原子上の電荷と中心の炭素原子-Mu/H距離(R<sub>CMu</sub>/R<sub>CH</sub>)の二次元分布を作成した(図6)。カラーバーはシミュレーション中での確率密度に対応している。両者とも全体的に右肩下がりの傾向となっている。また、核の量子効果によって、Mu化体の方がH化体に比べてR<sub>CMu</sub>のより長い領域にも分布しており、H化体では結合距離の短い領域に局在化していることがわかる。Mu化体この結合長の伸長に伴い、核と相互作用する電子が増加することで、HFCCが増大していると考えられる。

このように、Mu/H付加thioacetonでは周囲の環境、特に核の量子効果による $R_{CMu}/R_{CH}$ の長さの違いがHFCCに影響を与えることが示唆された。

そこで、上記のthioaceton分子の結果

と比較を行うために、2-butanethione分 子についても同様にPIMD法を用いた 計算を現在行っている(図7)。H/Mu付 加thioacetonは付加されたH/Muに対し て分子は対称である。一方、2butanethioneではthioacetonの一方のメ

チル基がエチル基になっているため、 H/Muに対して分子は非対称であり、

これらを比較検討することで、H/Mu



図7. PIMD 法で計算中の 2-butanethione

の周囲の環境の違いがHFCCへ与える影響を解析する。非対称な環境ではH/Muの周辺の電荷などが偏っている可能性があり、これらがHFCCへ影響することも考えられる。これらの効果が大きかった場合は、電気供与基および吸引基を持つ分子に対しても将来的に同様の解析を行うことで、これらの電子的な環境の違いがHFCCに与える影響を調べる。

また、3-pentanethion(図8)はthioaceton と同様にH/Muに対して分子は対称であ るが、thioacetonと比較して置換基がバ ルキーであるため、H/Muの分布は空間 的に制限されると考えられる。これら についても同様にPIMD法を用いて HFCCの高精度予測を行い、上記の



thioaceton や2-butanethioneと比較検討することで、H/Muの周囲の環境の違いがHFCCへ 与える影響を系統的に解析する。これらの影響が大きかった場合には、より大きな置換基 を持つ分子についても将来的に同様の解析を行い、空間的な環境の違いがHFCCに与える影響を調べる。

このようなこれまで計算することすら難しかったMu付加分子に関して現在PIMD法を用い て計算を行うことで、基礎的な知見を蓄積しつつある。将来的にはより大きな分子やポリ マーなどを容易な測定・帰属を可能するなど、ミューオン科学の今後の発展へと貢献でき ると考えている。