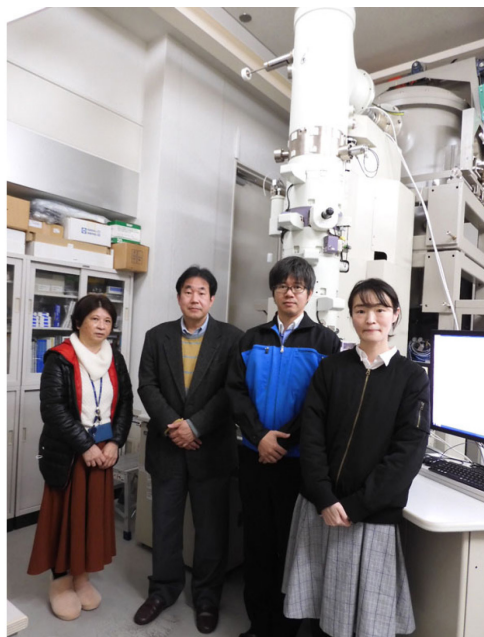


文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム 令和2年度秀でた利用成果 光圧によるアミロイド線維の人工作製

台湾国立陽明交通大学 杉山 輝樹氏，
奈良先端科学技術大学院大学 藤原 正裕氏，藤田 咲子氏，大野 智子氏に聞く



(左) 杉山 輝樹氏
(右) 左から、大野 智子氏、廣田 俊氏、藤原 正裕氏、藤田 咲子氏

ナノテクノロジーに社会変革への貢献がもとめられている。持続可能な社会、安心・安全なスマート社会実現のためのソリューション創出の鍵技術とみなされており、応用分野の異分野融合の中で活かされて新技術を創出し、新製品、新サービスの新市場を生み出すことが期待されている。文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム（NPJ）事業はそうした研究・開発に必要な諸設備共用や技術支援を行っている。

NPJ 事業では、全国 25 拠点の 37 プラットフォーム（NPJ は微細構造解析プラットフォーム、微細加工プラットフォーム、分子・物質合成プラットフォームに分類され、各拠点はこれらの 1～3 プラットフォームに参画している）の共用設備利用成果の中から毎年秀でたものを選定して表彰を行っている。表記「光圧によるアミロイド線維の人工作製」は令和2年度の6件の表彰の一つとして、2020年12月9日に nano tech 2021 第20回国際ナノテクノロジー総合展・技術会議のセミナー会場で表彰された [1]。

アミロイド線維が沈着することはアルツハイマー型認

知症やパーキンソン病などの疾患と深く関係しており、「アミロイド線維の人工作製」はその疾病の原因の究明や治療薬の創出への貢献が期待される。この研究では、奈良先端科学技術大学院大学（NAIST）のナノテクノロジープラットフォーム（分子・物質合成プラットフォーム）の共用施設 [2] を利用しており、利用者は同大学と台湾国立陽明交通大学の共同研究チームで代表者は杉山 輝樹氏である。技術の詳細、成果達成の経緯等を伺うため、オンライン会議で、台湾国立陽明交通大学 理学院応用化学系 教授、兼 NAIST 先端科学技術研究科 客員教授 杉山 輝樹氏からアミロイド線維の人工製作技術や研究経緯などプロジェクト全体の説明を、NAIST ナノテクノロジープラットフォーム 技術専門職員 藤原 正裕氏、技術専門職員 藤田 咲子氏、技術補佐員 大野 智子氏からは本件について評価支援活動状況の説明を頂いた。なお、上記集合写真中の廣田 俊氏（NAIST 先端科学技術研究科 教授）は、杉山氏と共に本研究立ち上げの当初からの共同研究者である。



1. 背景

1.1 光圧とは！光ピンセットとは！

本研究の主役は光圧である。光圧は極めて弱い圧力で、人々の生活においてその存在は全く意識されることはない。しかし、光圧に関する議論の歴史は古く、17世紀にドイツの天文学者 Johannes Kepler（ヨハネス・ケプラー）が彗星の尾のたなびきの説明に光圧の概念を用いたのが最初と言われている。更に、20世紀初頭には理論的にも、実験的にもその存在が実証されている。その後、太陽光の光圧を帆で受けて宇宙を旅する帆船のイメージなどが発表されている。

光圧を微小な物質・物体の運動を制御する技術として取り上げ、新しい学術分野を拓いたのは、次の二つのノーベル物理学賞を受賞した研究成果である [3][4][5][6][7][8][9]。

- ・1997年ノーベル物理学賞：「レーザー光による原子の冷却と捕捉法の開発」Steven Chu（スティーブン・チュー）（米国）、Claude Cohen-Tannouji（クロード・コーエン・タヌージ）（フランス）、William D. Phillips（ウィリアム・ダニエル・フィリップス）（米国）
- ・2018年ノーベル物理学賞：「光ピンセットとその生物系への応用」Arthur Ashkin（アーサー・アシュキン）（米国）[10]

特に Ashkin 氏の光ピンセットは 1986 年の発明以来、多くの注目を集め、物理やバイオの分野でその技術の研究、活用が盛んになった。

図 1 は光ピンセットの機能を説明する模式図で、強いレーザー光を対物レンズにより溶液中に強く集光させる。溶液中に予め粒子（図では例としてタンパク質）を分散させておくと、ブラウン運動で集光点内に入った粒子は

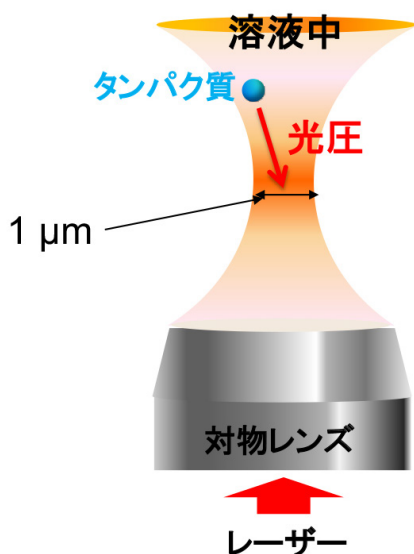


図 1 光ピンセットの模式図

勾配力により集光点内の電場の最も強い部分に引き寄せられる。即ち粒子を集光部に捉えることができる。光圧はピコニュートン～フェムトニュートンという極めて弱い力であるが、その力が粒子のブラウン運動に打ち勝つことにより、光ピンセットが機能する。

光圧によって溶液中の粒子が集光点に捉えられる現象については、次のように説明されている [10]。粒子の大きさが光の波長より大きい場合は、幾何光学的に理解できる。光線が粒子表面を通過する際に屈折しその運動量が変化すると、運動量保存則によりその反作用の力が粒子に光圧として加えられる。集光レーザービームを用いることにより、屈折の反作用の合力は光集光点を向くことになる。一方、粒子の大きさが光の波長より十分に小さい場合は、粒子は一つの電子双極子とみなすことができる。この電気双極子は光の電磁場からローレンツ力を受け、粒子の屈折率が媒質の屈折率よりも大きいときには光強度の最も強いところ（集光点）に引き付けられる。

Ashkin 氏の光ピンセットの発明は 1986 年で、レーザービーム（ $\lambda = 514.5\text{nm}$ ）を高い開口数の対物レンズで集光したものを、誘電体（ガラスや高分子）の微粒子を分散した水に照射し、微粒子を集光領域に捕捉することに成功している。この時の微粒子サイズは、 $10\mu\text{m} \sim 25\text{nm}$ を試みて成功している [5][10]。

この後 Ashkin 氏は生体組織に吸収が少ない近赤外光（ $\lambda = 1064\text{nm}$ ）を用い、イースト菌、大腸菌、ヒト赤血球などの補足に成功している [6][7]。光ピンセットは、微小物を非接触で物理的に制御できるので、対象物を傷つけることもない。画期的技術として、生物学やライフサイエンスの分野で、多くの研究者が取り上げている。日本国内での研究活動がアクティブで、特に杉山氏の上司であった増原 宏氏（元大阪大学教授、奈良先端大特任教授を経て現台湾国立陽明交通大学講座教授）は、1990 年頃からまだだれも手掛けていない光ピンセットの化学分野への応用に先鞭をつけている。また、国内では、2016 年から科学研究費補助金 新学術領域「光圧によるナノ物質操作と秩序の創生」（領域代表：大阪府立大学 大学院工学研究科 石原 一教授）の 5 年間のプログラムが行われており、本研究もこのプログラムに参加している。現在、光圧による微小物質の操作や新構造・機能創出などの学術分野では日本が圧倒的にリードしていると杉山氏は語った。

1.2 本研究立ち上げの経緯

研究テーマ「光圧によるアミロイド線維の人工作製」の開始は 2009 年～2010 年に遡る。博士課程の時に結晶の研究をしていた杉山氏は、光圧の化学への応用の先駆者増原氏の下で光圧に興味を持ち、2007 年より光圧による結晶化の研究を始めた。即ち、「光圧」により溶液中の分子やクラスターを集光点に集め、局所濃度を高めて結

晶を生成する研究を行った。対象とする化合物には有機化合物、無機化合物や高分子化合物などいろいろあるが、その一つとして、タンパクも頭に入っていた。2008 年増原氏と共に奈良先端大に移った杉山氏は、研究室が近い廣田 俊氏と出会い同氏が手掛けているタンパクの話をよく聞くようになった。そうした話のなかで、廣田氏が扱っているタンパク質を対象に柚山氏（現大阪市立大学 理学部化学科 講師）とともに光圧実験を行うことになり、これまでに光圧実験では観測したことのない新しい構造体を得た。多数のタンパク質が集まった場合に、タンパク質が単に凝集しただけのものと結晶化するものがあるが、更にその他に、タンパク質が変性してアミロイド線維化するものがあることを知った。しかも、そのアミロイド線維が、アルツハイマー認知症やパーキンソン病と深く関わっており、その生成メカニズムを究明することが急務であることを知った。そこで、杉山氏は廣田氏との共同研究をさらに推し進めた。2009 年から 2010 年に替わる頃である。

なお、上司の増原氏が 2008 年台湾国立交通大学（2021 年 2 月に台湾国立陽明交通大学に改名）に講座教授として招聘された。2011 年には杉山氏も台湾に渡り、2015 年から同大学に移り、廣田氏との共同による本研究プロジェクトは国際共同研究に形は変わったが、杉山氏は奈良先端大の客員教授を兼務しており、継続して遂行された。



2. アミロイド線維の形成過程と人工作製

2.1 アミロイド線維とは

タンパク質の結晶とアミロイド線維の違いは、結晶の場合はタンパク質からそのまま成長するのに対して、ア

ミロイド線維ではタンパク質が変性したあと凝集することである。変性とはタンパク質などを構成する高分子の立体構造が壊れ高次機能が変化することで、変性して凝集したアミロイド線維は、疎水性が高く、高い均一性と剛直性を有している。金属並みに硬く、原子間力顕微鏡（AFM）の探針に利用した例もあるとか。また、非常に安定した物質で、一度生成されると容易に溶けない。人体では、永い年月の間にアミロイド線維が沈着して、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、牛海綿状脳症（狂牛病）、2 型糖尿病など多くの疾患と密接に関連している。

図 2 はアミロイド線維形成メカニズムの模式図である。水溶性のタンパク質が密集して長い時間が経つ間に変性してアミロイド線維前駆体が形成され、それが積み重なって不溶性のアミロイド線維が形成される。アミロイド線維生成過程を説明して、上記疾病に対応する医薬の開発に結び付けるため、図 2 の工程を実験室で行おうとすると、容易なことではない。強いアルカリまたは酸性の溶液中で時には数日静置してようやくアミロイド線維前駆体ができるほどである。さらに、これまでアミロイド線維の生成場所と時間を予期したり、制御したりすることは不可能とされていた。これが、アミロイド線維形成メカニズム解明の障壁であった。

2.2 アミロイド線維作製に光圧を利用

杉山氏が廣田氏と共同で進める本研究は、上記形成メカニズム解明の障壁の打破への挑戦である。

図 3 に光圧によりアミロイド線維が形成される過程を示す。タンパク質を分散させた溶液に、図 1 に示すように強いレーザー光（強度 1W）を対物レンズを介して照射し図 3 左端のように溶液中に集光領域（面積当たりの光

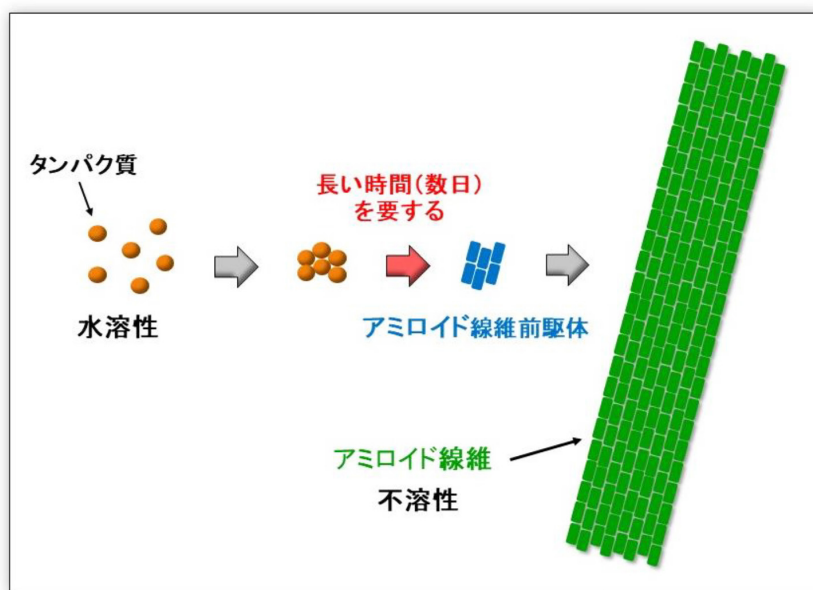


図 2 アミロイド線維の生成過程

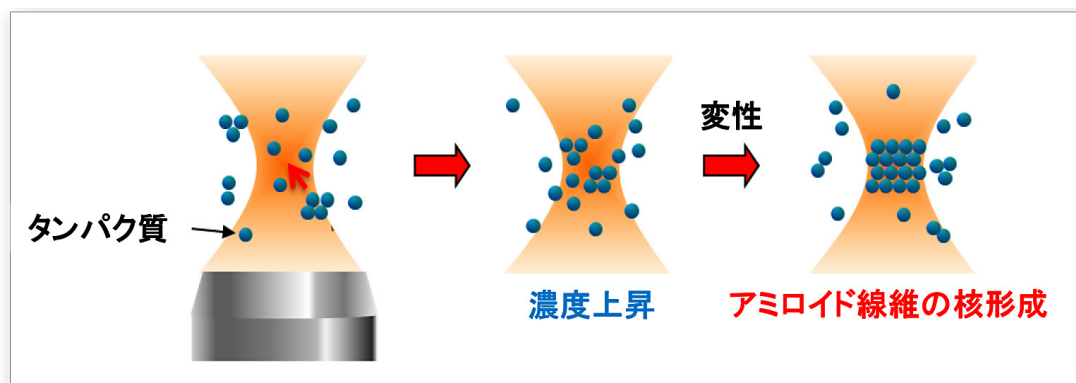


図3 光圧を用いたアミロイド線維の作製過程

強度は数百 W/cm^2) を作る。使用したレーザー光は波長 1064nm の赤外光であり、生体系物体には損傷を与えない。溶液中でブラウン運動しているタンパク質のうちレーザー光の照射領域に入ったものは光ピンセットの原理で約 $1\mu\text{m}^3$ の集光領域に集められる (図3中央)。高密度に凝集した状態でタンパク質の変性が起こり、アミロイド線維の核となる図2のアミロイド線維前駆体が形成される (図3右端)。変性が起こる要因としては密度が高まることによる応力とレーザー光の集中による若干の温度上昇が考えられている。この核を基にアミロイド線維が成長する。次に紹介する実験結果が示すように、この方式により、レーザー光の集光領域という設定領域に、30分から1時間でタンパク質の集合・変性・アミロイド線維を形成の工程を実行することが可能になり、アミロイド線維形成メカニズム解明に向けた道が拓けることになる。

2.3 実証実験

本方式の実証実験では、タンパク質としてシトクロム *c* を使用した。このタンパク質は心臓に多く存在し一般的に研究に使われており、廣田氏の研究でも使用している。

アミロイド線維化が困難なタンパク質と言われている。シトクロム *c* は、図4に構造を示すように通常分子1個の単量体の状態であるが、分子2個が組み込むように結合した2量体を作ることができる。この両者について光圧によるアミロイド線維作製を試みた。シトクロム *c* 単量体の場合、レーザー照射で比較的早く $1\mu\text{m}$ 程度の集合体を形成できたが、それ以上には成長しなかった。一方、2量体の場合はその後もレーザー照射により成長を続けた。その様子を図5に示す。

図5でレーザー照射時間23分から急激に成長し、29分では約 $10\mu\text{m}$ のサイズに達している。この凝集体がアミロイド線維を含むかどうかを確認するために、アミロイド線維が存在すると蛍光を発する色素マーカーのチオフラビン T (ThT) (図6) を、凝集体を含む溶液中に混入し 405nm 波長のレーザーを照射したところ、図5の過程の23分以降の凝集体において強い蛍光が確認された (図7)。その蛍光の強さは、集合体が大きくなる以上の割合で急激に高まっており、シトクロム *c* の変性が進みアミロイド線維の成長が進んでいることを予想させるものであった。

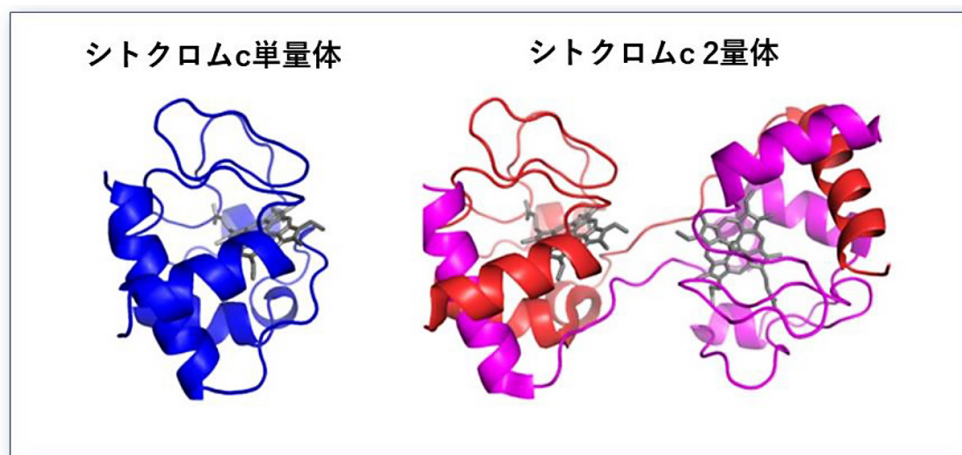


図4 シトクロム *c* の単量体および2量体の構造 (出典：参考文献 [12])

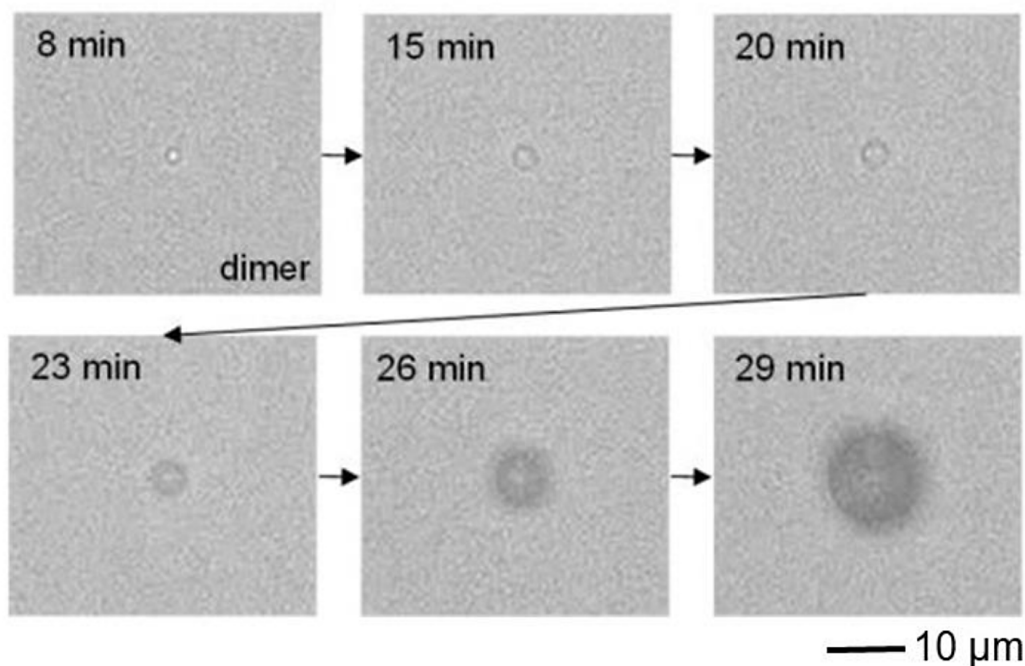
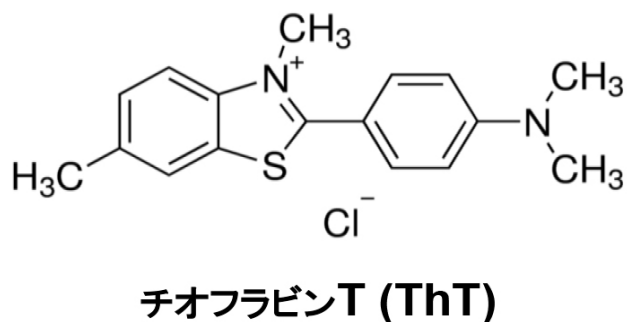


図5 光圧によるシトクロムc2量体の凝集体形成過程のCCD像



チオフラビンT (ThT)

図6 アミロイド線維の色素マーカー

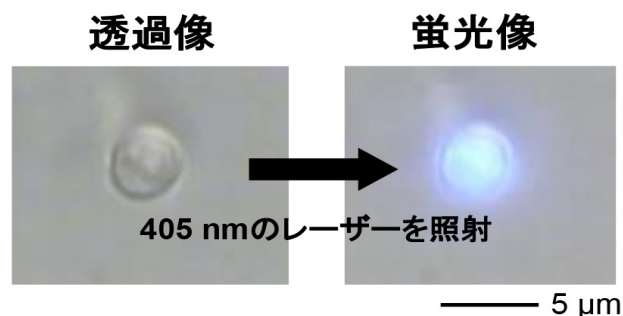


図7 シトクロムc2量体の凝集体からの蛍光確認

2.4 透過電子顕微鏡 (TEM) 観察によるアミロイド線維の確認：～NAIST ナノテクノロジープラットフォームの利用～

上述の通り光圧によるシトクロムc2量体の凝集体は、蛍光像によりアミロイド線維である可能性が高まったが、それだけでアミロイド線維であると断定はできない。杉山氏、廣田氏の共同研究チームは、NAIST ナノテクノロジープラットフォームに依頼して透過電子顕微鏡 (TEM) により集合体の構造を観察し、構造的にアミロイド線維の特徴を備えているかを確認することとした。

NAIST ナノテクノロジープラットフォームは、分子生物学領域のサンプル観察経験が豊富であり、上記ユーザー要求に対してクライオ電子顕微鏡法というサンプルを凍らせて観察する方法や、電子染色法を用いて染色剤添加濃度を振るなどの種々の方法を試みた。その結果、クライオ電子顕微鏡法による観察ではアミロイド線維の詳細

までをクリアに見ることができなかったが、電子染色法では、添加色素の濃度を最適化することで、アミロイド線維の特徴を確認することができた。以下に色素添加によるアミロイド線維の確認過程を紹介する。

使用したTEMは日本電子社製JEM-3100FEF (図8)で、加速電圧300kV、倍率100～2,000,000倍、解像度0.19nm (格子像)である。

アミロイド線維の構造上の特徴として図9の①長い枝分かれのない線維の束、②5～20nmの線維径、③線維の高次よじれが挙げられており、TEM観察の目的は作製したシトクロムc2量体の凝集体がこの3条件を満たすかどうかの判断データを得ることであった。

評価する凝集体は杉山氏が光圧により作製し、溶液に超音波振動を加えて凝集体を分解した状態で廣田氏に渡され、廣田氏のところで必要に応じて超音波振動を追加してアミロイド線維を観察可能な状態にした。

NAISTでは分子生物学領域のTEM観察の豊富な経験を



図8 透過型電子顕微鏡 JEM-3100FEF

活かして、染色法の検討を行った。染色剤としてリンタングステン酸（PTA）を採用し、その濃度を2%から0%の範囲で変えて最適濃度を求めることで、アミロイド線維を観察することができた。

図10はTEM観察のサンプル作製の様子を示している。ピンセット先で抓んだ朱色円形状のグリッド上に超音波で塊をほどこいた試料を含む液を載せ、その上に染色剤（リンタングステン酸）を滴下し、1分染色後、余剰液を濾紙で除去し、乾燥した状態でTEMに挿入した。試料作製は室温（20℃）で行った。

TEM観察の結果を図11と図12に示す。図11は、染色剤濃度を一般的な2%としたもので、模式図に示すような長くて枝分かれのない線維の束が確認された。しかし、この染色剤濃度では、超音波でよりばらした試料での線維の太さや supertwist した状態を確認することができなかった。図12に示すのは、染色剤濃度を0.5%に薄めてよりばらした状態を観察したもので、線維に supertwist しているようなうねりが観察され、太さもそれらしい値を示している。以上のTEM観察の結果から、作製した凝集体がアミロイド線維の構造的特徴を有していることが

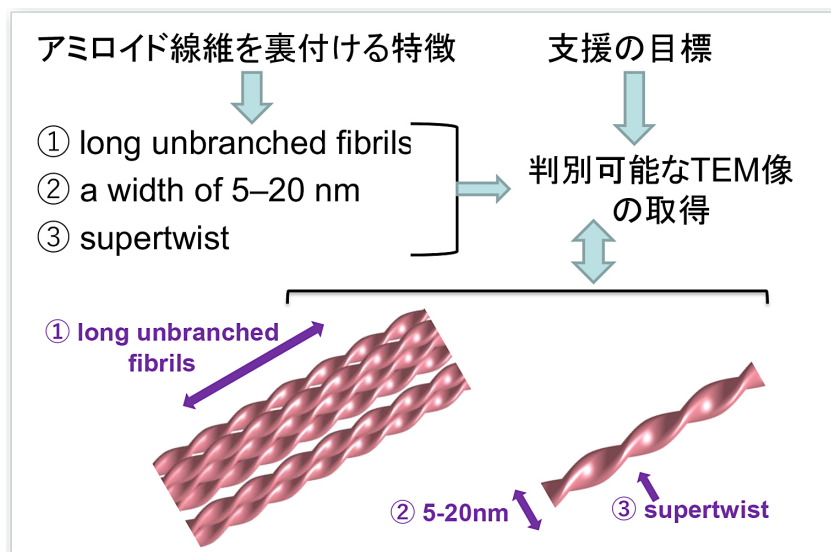


図9 NAIST プラットフォームでのTEM観察の目標

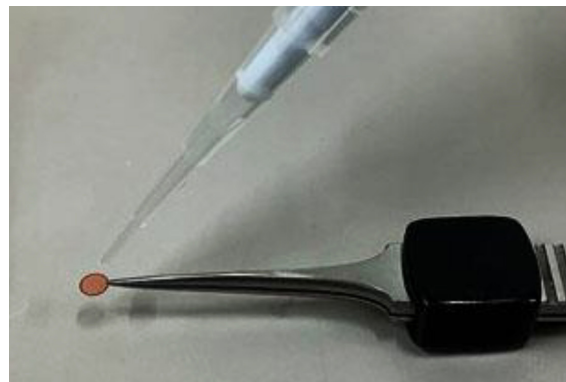


図10 TEM用サンプル作製の様子

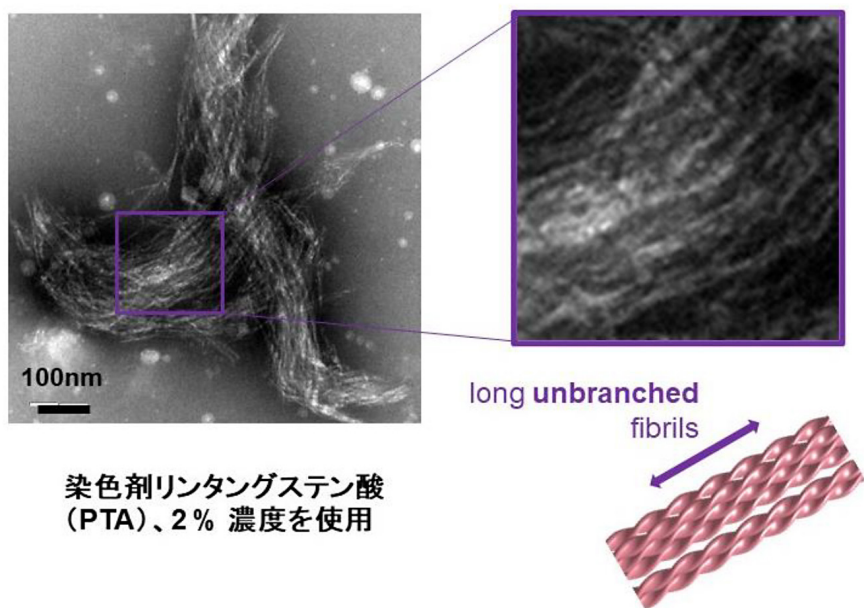


図 11 一般的な染色剤濃度 (2%) でのアミロイド線維の束の TEM 像

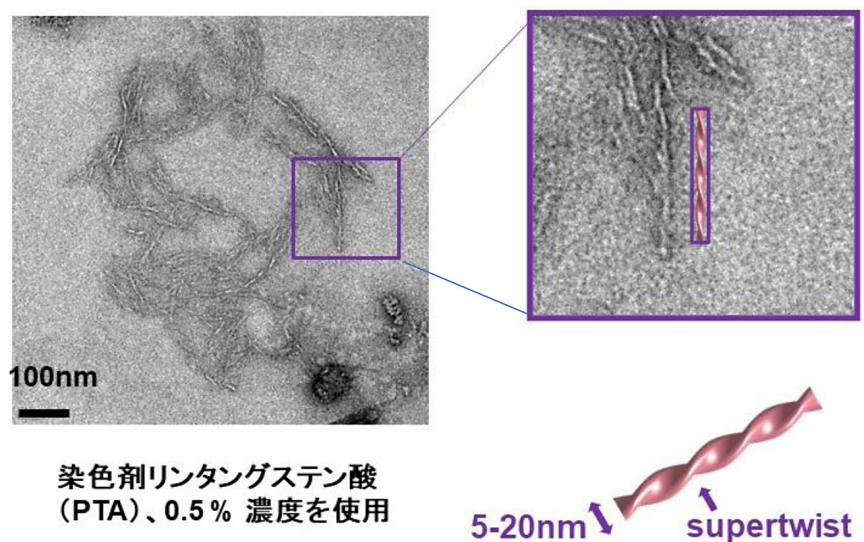


図 12 薄い染色剤濃度 (0.5%) でのアミロイド線維の TEM 像

明らかとなった。前節で説明した色素マーカーによる蛍光試験の結果と合わせることで、光圧により作製された凝集体がアミロイド線維であることが実証された。

この評価結果を踏まえて、光圧によるアミロイド線維の作製の成果を化学分野の最高位の国際論文誌 *Angewandte Chemie International Edition* に発表し [11], *Hot paper* にも選出された。同時に NAIST からプレスリリースしている [12]。



3. その後の研究展開

上述のようにシトクロム *c* 2 量体を用いて光圧によりアミロイド線維を作製できることが分かったので、次のス

テップとして杉山氏は次の 2 点の検討を進めている。

- 1) シトクロム *c* 以外の種々のタンパク質を対象を広げて光圧活用の本方式によるアミロイド線維の作製を試みている。
- 2) 高密度なタンパク質の集合体およびその集合体に変性が起こっている状態を分光学的に調べて、物理化学的観点から現象を議論する。

更に今後の展開としては、シトクロム *c* 2 量体の結合状態を通常のイオン結合から共有結合に換えたり、結合の箇所を変えたりしてアミロイド線維ができる場合とできない場合の情報を集める。最終目標は、アミロイド線維の生成を阻止する薬剤の創出に貢献することである。また、個人的には光圧の生物科学分野の進化への貢献を期待したいと杉山氏は語った。



4. おわりに

その昔、壮大な宇宙の果てで認識された光圧が、近年、真逆のミクロの世界で光ピンセットとして注目されてきた。米国ベル研究所アシュキン氏により発明されたその技術は、今では日本が一番積極的に研究に取り上げていると杉山氏は語った。研究の主流は、物理あるいはバイオの分野で、微粒子の動きの制御にあった。杉山氏の元上司の増原氏が化学分野への適用の先導者となり、杉山氏はその流れを継いで、溶液中に分散しているタンパク質などの粒子を、光圧により特定領域に凝集させ反応を起こさせるという、効率の良い物質創出手法を提言し、廣田氏と共にアミロイド線維の人工作製に挑戦している。新物質創出手法の効率の良さは、タンパク質の種類や構造など取り換えた多くの試行による情報収集を可能とする。新しい解を見つければチャンスを作り出すことになる。これは当然 NAIST プラットフォームの支援あつてのことである。不治の病への光明となることを期待したい。



参考文献

- [1] 物質・材料研究機構, 「令和2年度「秀でた利用成果」の発表について～文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム」, プレスリリース, 2020.11.17.
<https://www.nims.go.jp/news/press/2020/11/202011171.html>
- [2] 奈良先端科学技術大学院大学, 「NAIST Nanotechnology Platform 事業」, ホーム, ナノテクノロジープラットフォーム.
<https://mswebs.naist.jp/nanopla/>
- [3] A. Ashkin, "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure", Phys. Rev. Lett., Vol. 24, p. 156 (1970)
- [4] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, "Optical Levitation by Radiation Pressure", Appl. Phys. Lett., Vol. 19, p. 283 (1971)
- [5] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm & S. Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles", Opt. Lett., Vol. 11, p. 288 (1986)
- [6] A. Ashkin & J. M. Dziedzic, "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria", Science, Vol. 235, p. 1517 (1987)
- [7] A. Ashkin, J. M. Dziedzic & T. Yamane, "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams", Nature, Vol. 330, p. 769 (1987)
- [8] S.Chu, L. Hollberg, J. Bjorkholm, A. Cable, A. Ashkin, "Three-dimensional viscous confinement and cooling of atoms by resonance radiation pressure", Phys. Rev. Lett., Vol. 55, p. 48 (1985).
- [9] S.Chu, "The manipulation of neutral particles", Rev. Mod. Phys., Vol. 70, p. 685 (1998).
- [10] 東海林 竜也, 坪井 泰之, 「ノーベル物理学賞 2018 : アシュキン博士が開拓した光ピンセットとその科学」, 科学, Vol. 89, No. 2, pp. 0138-0141 (2019).
<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/advanachem/pdf/KAGAKU-iwanami.2019.89.2.138-141.pdf>
- [11] K. Yuyama, M. Ueda, S. Nagao, S. Hirota, T. Sugiyama, H. Masuhara, "A Single Spherical Assembly of Protein Amyloid Fibrils Formed by Laser Trapping", Angewandte Chemie International Edition, 2017, Vol.56, p. 6739.
<https://doi.org/10.1002/anie.201702352>
- [12] 奈良先端科学技術大学院大学, 「アルツハイマー型認知症などに関与するアミロイド線維を光により人工作製することに初めて成功」プレスリリース, 2017. 5. 16.
<http://www.naist.jp/pressrelease/2017/05/003768.html>

2. 4 節の図は NAIST から、それ以外は図 4 を除いて杉山氏から提供された。

(向井 久和)



【お問い合わせ】

分子・物質合成プラットフォーム
奈良先端科学技術大学院大学
☎ 0743-72-6185
E-mail nano-net@ms.naist.jp

ホームページ

<https://mswebs.naist.jp/nanopla/>