

NIKON JOICO AWARD

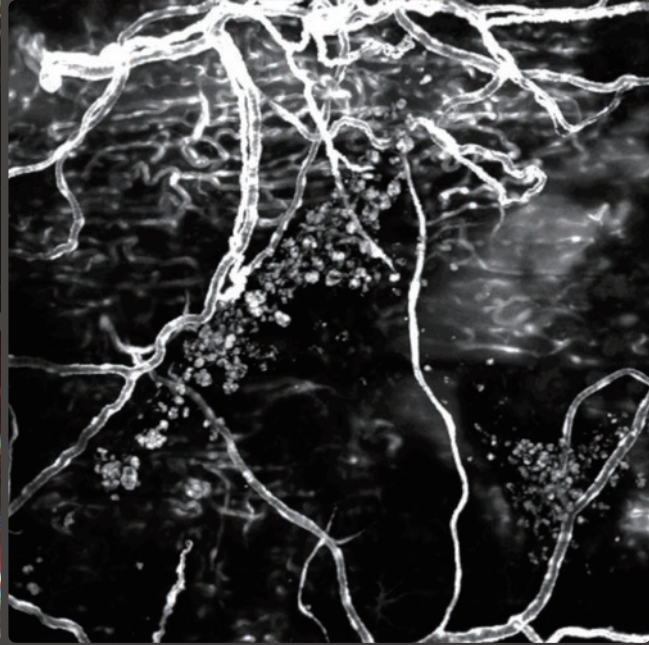
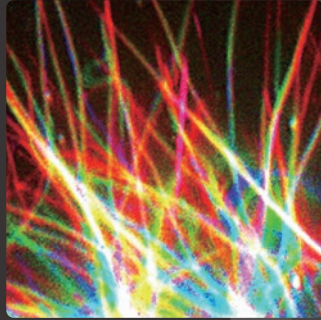
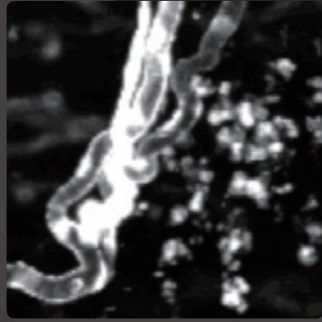
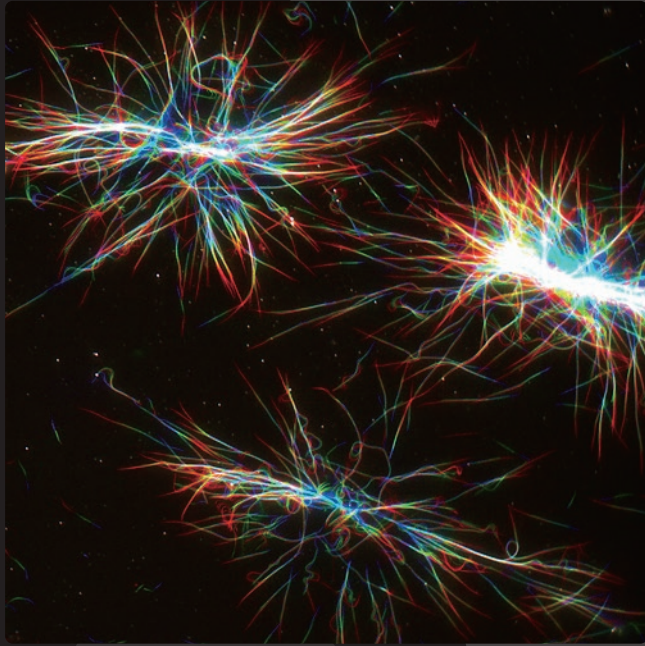
2022

顕微鏡を通して

広げる世界

広がる世界

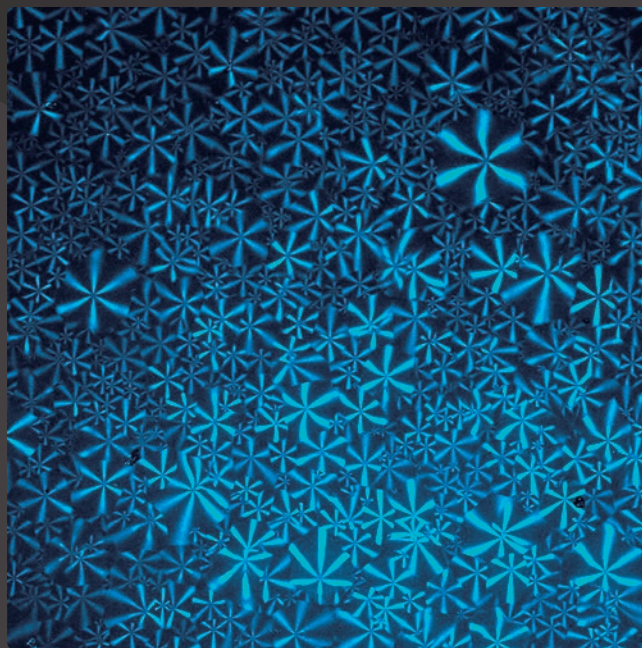
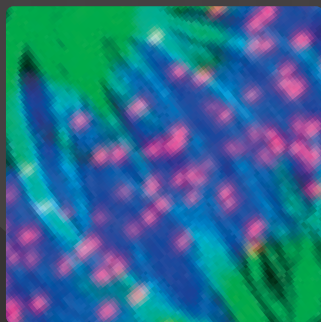
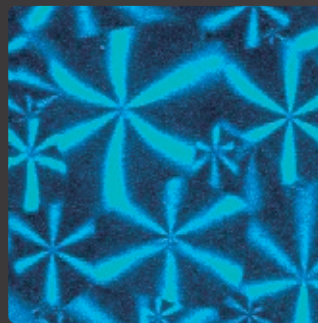
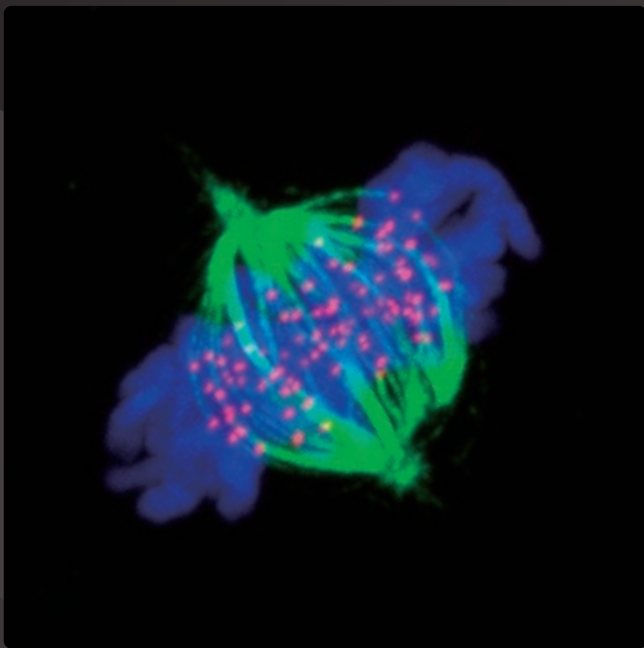




顕微鏡を通して

広げる世界

広がる世界



科学に基づく顕微鏡画像は、芸術性と学術性を兼ね備えている
こうした画像に触れた人々には新たな価値や創造がもたらされるのではないかと

もっと多くの方々に顕微鏡を通して見える世界に触れてほしい、
そういう思いで2019年 NIKON JOICO AWARD をスタートさせました。

顕微鏡を通して見える世界は、想像ではなく、科学に基づいて広がる世界です。

この世界は、研究者一人一人異なる世界であっても、
顕微鏡画像に秘められた最先端の科学、
そして何よりも研究者がワクワクしながら取り組んでいる科学の世界は、
見るものを刺激し、新たな世界に導いてくれると信じています。

研究者の方々には、顕微鏡画像を通して、科学そして芸術を伝える場として
NIKON JOICO AWARD を訪れていただいた方々には、
顕微鏡を通して見える世界に触れていただく場として

顕微鏡を通して 世界が広がる 世界を広げる

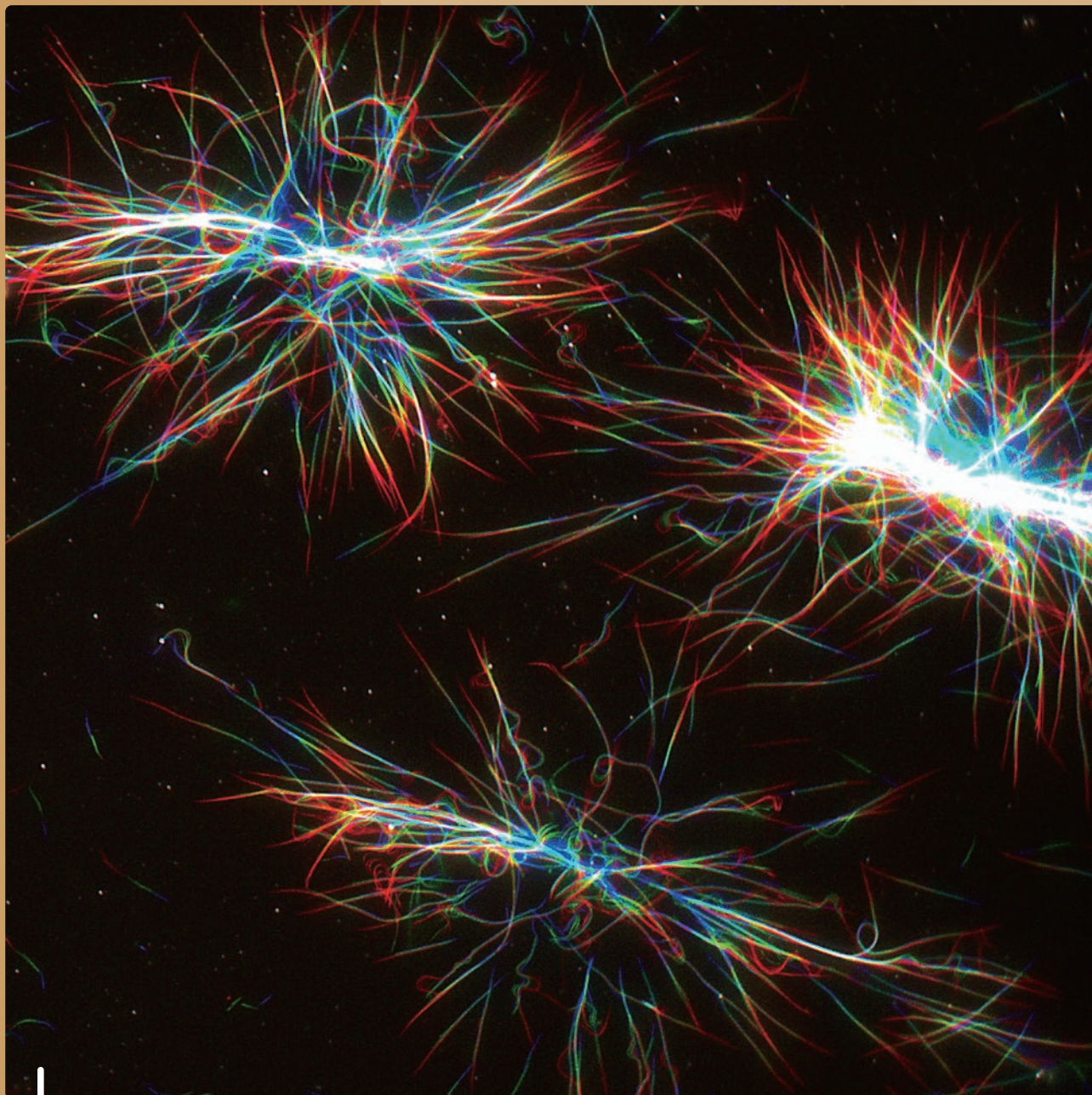
を目指して活動してまいります。

最優秀
JOICO 賞

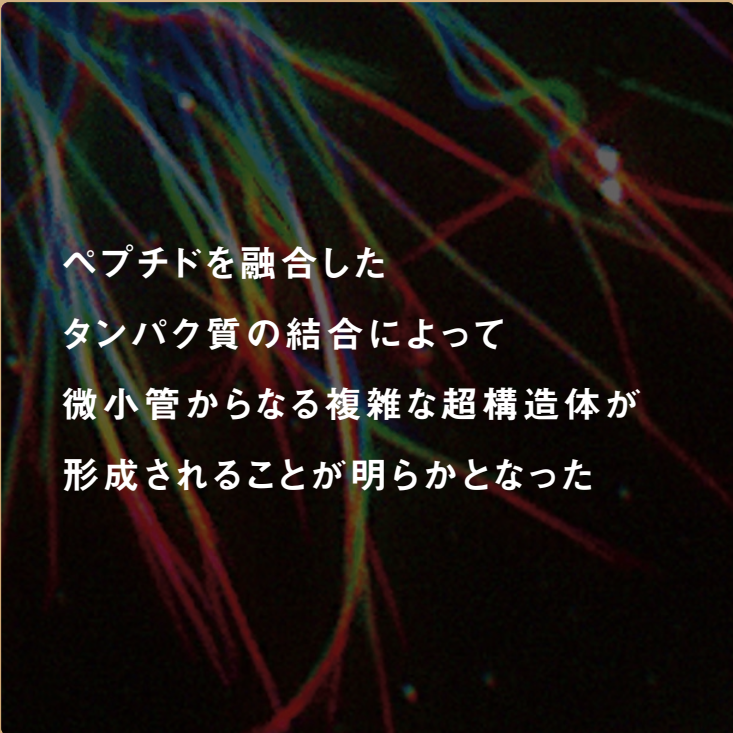
微小管からなる超構造体

— 無生物から作る動的アスター構造 —

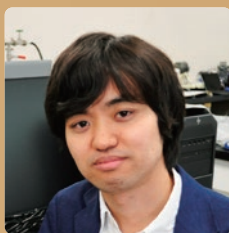
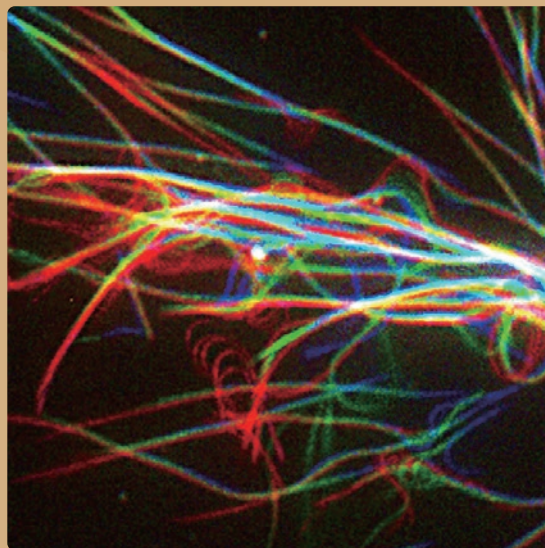
Microtubules superstructures - Dynamic aster structures made from inanimate materials



由来種 : ブタ
器官 / 組織 / 細胞 (株) 名 : 脳から単離した微小管
染色・ラベル方法等 : Tau 由来ペプチド融合 Azami-Green を複合化した微小管 (赤色蛍光色素修飾)
撮影時間ごとに異なる色で画像を重ね合わせ
観察手法 : 蛍光
対物レンズ : Lambda S 60x
作品画像取得年 : 2021



ペプチドを融合した
タンパク質の結合によって
微小管からなる複雑な超構造体が
形成されることが明らかとなった



いなば ひろし
稲葉 央

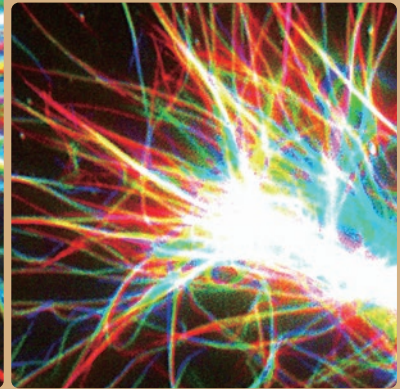
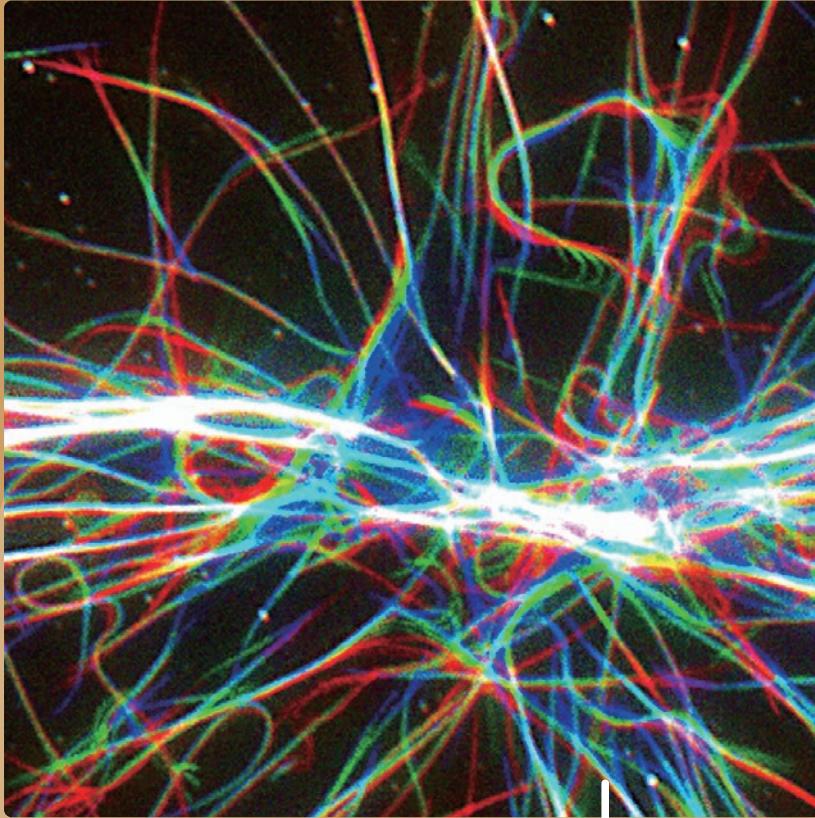
鳥取大学 学術研究院工学系部門
准教授

受賞コメント

この度は NIKON JOICO AWARD 最優秀 JOICO 賞という名誉ある賞をいただき、誠に有難うございます。

受賞した作品はタンパク質ナノチューブである微小管が集まって運動性を有するアスター構造を形成したものです。共同研究先から送られてきた動画を見たときに、花火のような美しさと生き物を感じさせる不思議を感じたのを覚えています。

個人的に美しさは科学の重要な要素だと考えており、今回の受賞を糧に自然の美しさを模倣・超越するようなものづくりを行っていきたいと思います。



研究概要

論文

Hiroshi Inaba, Yurina Sueki,
Muneyoshi Ichikawa, Arif Md. Rashedul Kabir,
Takashi Iwasaki, Hideki Shigematsu,
Akira Kakugo, Kazuki Sada,
Tomoya Tsukazaki, Kazunori Matsuura
Generation of stable microtubule
superstructures by binding of peptide-fused
tetrameric proteins to inside and outside.
Science Advances. 2022, 8(36), doi: 10.1126/
sciadv.abq3817

細胞骨格の一種である微小管¹は一般的に一巻きからなるシングルレット型の構造を取ります。一方天然ではより複雑な微小管超構造体が存在しますが、これまでこれら超構造体を人工的に構築することは困難でした。本論文では、研究グループが開発した微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド (TP)²を四量体蛍光タンパク質 Azami-Green (AG)³に連結することで、微小管外部への結合によりダブルレットや分岐、アスターなどの多様な微小管超構造体を構築することに成功しました。

ペプチド融合タンパク質を用いた 微小管「超」構造体の構築

概要

細胞骨格の一種であるタンパク質ナノチューブ「微小管」は一般的に一巻きからなるシングレット型の構造を取りますが、天然では繊毛⁴や鞭毛⁴中に見られるダブルレット構造や枝分かれした分岐構造、微小管形成中心⁵から微小管が伸びるアスター（放射状集合）構造など、様々な超構造体を形成することが知られています（図1）。しかし、これら超構造体を人工的に構築することは困難でした。本研究では、研究グループが以前開発した微小管内部に結合するTau由来ペプチドを四量体蛍光タンパク質 Azami-Green に連結することで、微小管内部への結合による微小管の極めて高い安定化と、外部への結合によるダブルレット、分岐、

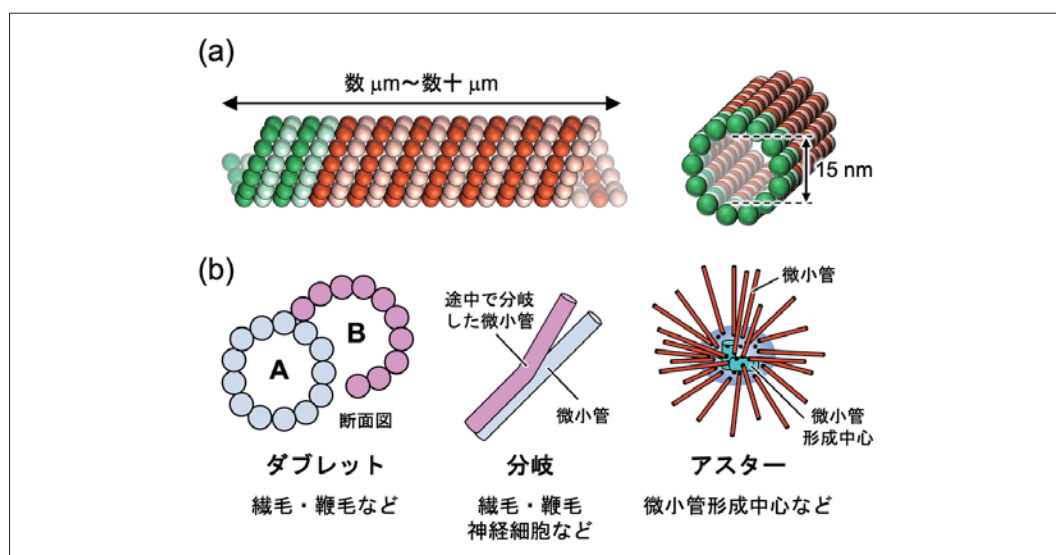


図1 (a) 一般的なシングレット微小管。(b) 天然に存在する微小管超構造体。

完全な A 小管と不完全な B 小管からなるダブルレット微小管。ダブルレットから 2 つのシングレット微小管に分かれる分岐構造。微小管形成中心から微小管が伸びて形成されるアスター。

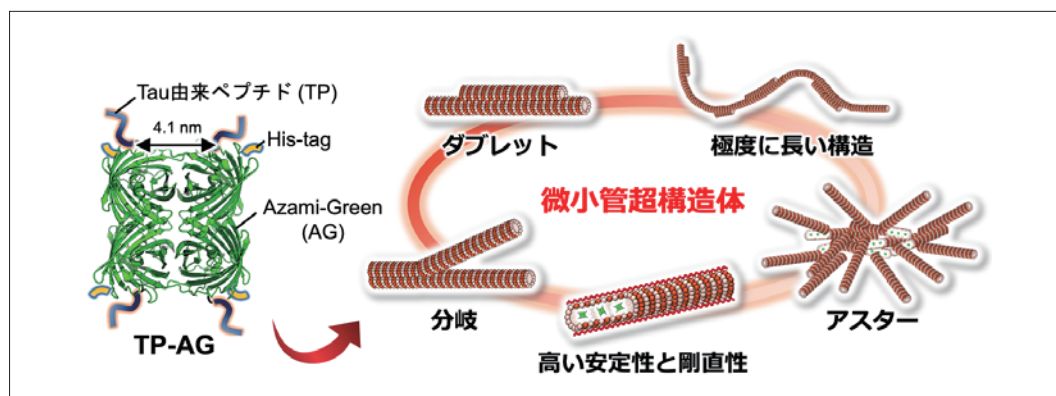


図2 本研究の概念図。

TP を融合した AG (TP-AG) により多様な微小管超構造体が形成できた。

P10 に用語解説があります（上付き番号に対応）

100 マイクロメートル近い長い微小管、アスターなどの多様な超構造体の構築を世界で初めて達成しました (図 2)。本成果により、微小管からなる分子ロボットなどのナノ材料としての応用や、繊毛・鞭毛の形成原理の解明につながると期待されます。

微小管からなる超構造体の形成

微小管内部に結合する TP を AG の C 末端に連結した TP-AG を作製しました。その N 末端には His-tag⁶ が導入してあり、これが微小管外部への結合モチーフとして機能します。微小管を形成する前に TP-AG を添加すると微小管の内部に、微小管を形成した後に TP-AG を添加すると微小管の外部に結合することがわかりました。TP-AG を複合化すると微小管形成が大幅に促進され、安定な微小管が形成されました。この微小管の形成促進・安定化は、微小管を安定化して機能する抗がん剤タキソール⁷ を超える効果でした。さらに、TP-AG は微小管構造を補強し、通常の微小管に比べ剛直な構造を形成することが確認されました。

TP-AG 複合化微小管をネガティブ染色電子顕微鏡⁸ で観察したところ、通常は見られないダブルット型の微小管や分岐構造、多層構造などが確認されました (図 3a)。微小管を形成してから TP-AG を添加すると

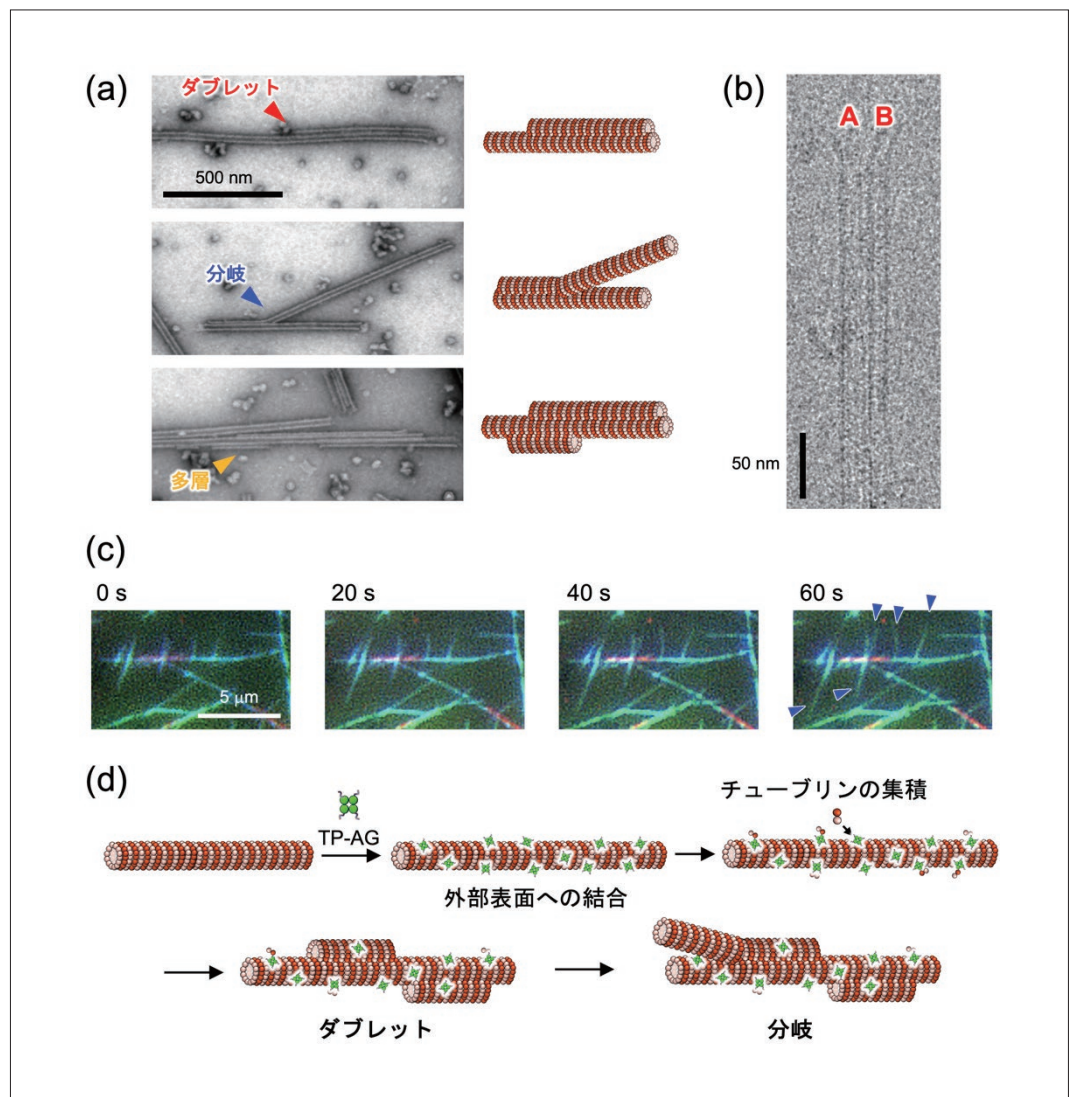


図 3 TP-AG の複合化による微小管超構造体の (a) ネガティブ染色電子顕微鏡像および (b) クライオ電子顕微鏡像⁹。 (c) 全反射照明蛍光顕微鏡¹⁰ による分岐構造の成長過程追跡。青矢頭は成長した分岐構造を表している。 (d) ダブルットおよび分岐の推定形成メカニズム。

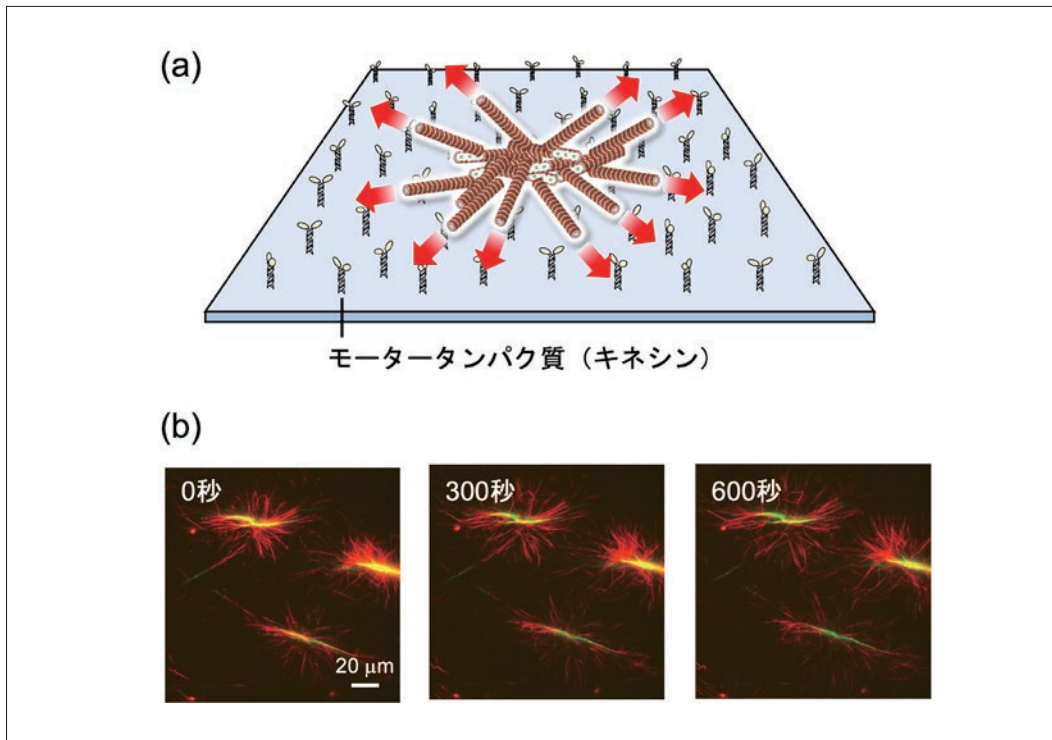


図4 (a) TP-AGによって誘起されたアスター（放射状集合）構造。(b) 蛍光顕微鏡像。
中心から外側に微小管が運動している様子が確認された。

このような構造が多く確認されたことから、微小管外部に TP-AG が結合することでこれら超構造体の形成が誘起されたと考えられます。クライオ電子顕微鏡解析により、TP-AG によって誘起されたダブルレット構造は明確に A 小管と B 小管と思われる構造が確認でき、その直径は繊毛から単離したダブルレット微小管とほぼ一致しました (図 3b)。さらに、全反射照明蛍光顕微鏡を用いることで、分岐構造が成長する過程を追跡することに成功しました (図 3c)。これらの結果から、TP-AG が微小管外部に結合することで、露出した TP に新しいチューブリングが結合して集積し、ダブルレットや分岐構造の形成が誘起されたと推定されます (図 3d)。これらに加え、TP-AG の量やその複合法などの条件を変えることで、100 マイクロメートル近い極めて長い微小管構造の形成にも成功しています。また、モータータンパク質であるキネシン¹¹ を固定した基板の上に TP-AG 複合化微小管を導入し、エネルギー源として ATP¹² を添加したところ、アスター型の集合構造が確認され、中心から外側に微小管が運動する様子が確認されました (図 4)。今回応募した顕微鏡画像は、時間ごとに異なる色をつけて重ね合わせることでこのアスターの運動を表現したものです。このように、一種類のペプチド融合タンパク質にも関わらず、条件を変えることで多様な微小管超構造体が形成されることが明らかとなりました。

今後の展望

本研究は外来タンパク質によって微小管超構造体を形成した初めての例であり、これまで未解明であった天然の微小管超構造体の形成メカニズムや物性の解明に大きく寄与すると考えられます。将来的には繊毛病¹³などの微小管超構造体が関与する病態の理解につながる可能性があります。また、本研究で得られたダブルレット微小管や分岐構造は通常微小管とは異なる構造や性質を有するため、分子デバイス、分子ロボットなどのナノ材料への応用が期待できます。微小管構造を極めて安定化することを利用した抗がん剤への展開も考えられ、幅広い分野への応用が期待されます。

用語解説

1 | 微小管

チューブリンタンパク質から構成される、一般的に内径約 15 nm、長さ数 μm ～数十 μm のチューブ状集合体。細胞の形態維持や変化、細胞分裂、細胞内物質輸送、鞭毛や繊毛の運動などの多様な細胞機能に重要な役割を果たす。

2 | Tau 由来ペプチド (TP)

本研究グループによって開発された、微小管内部に結合するペプチド (CGGGKHKHVPGGGSVQIVYKPVLD) (*Chem. Eur. J.*, 2018, 24, 14958)。微小管関連タンパク質の一種である Tau¹⁴ から設計され、微小管内部に相当するチューブリンのポケットに結合する。

3 | Azami-Green (AG)

アザミサンゴより単離された、四量体構造を形成することで緑色蛍光を生じるタンパク質 (A. Miyawaki et al., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 34167)。TP-AG は AG の C 末端に TP を導入したものであり、AG 1 つあたり 4 つの TP を有する。

4 | 繊毛・鞭毛

真核生物の細胞から突出している微細な毛のような構造。波打ち運動をすることで、精子の運動などを可能とする。内部の中央に中心対微小管があり、周辺微小管 (ダブルレットなどの多重微小管) がそれらを取り囲むように並んでいる。

5 | 微小管形成中心

動物細胞における細胞小器官の 1 つ。細胞内では微小管形成中心から微小管が伸長してアスター型構造を形成し、紡錘体形成などに関与する。

6 | His-tag

アミノ酸で一種であるヒスチジン (His) が連続した配列。タンパク質精製に汎用される。His-tag は微小管外部表面に結合することが示唆されており、今回は His が 6 個連続した配列を用いた。

7 | タキソール (別名パクリタキセル)

抗がん剤の一種であり、TP の結合部位と同じ微小管内部のポケットに強く結合する。タキソールの結合により微小管は極めて安定化され、脱重合が抑制されることで細胞が正常に分裂できず抗がん活性を示す。

8 | ネガティブ染色電子顕微鏡

試料そのものではなく、その背景を染色して電子顕微鏡で観察する手法。染色剤としてタンパク質よりも強く電子線を散乱させる重金属溶液 (今回は酢酸ウラニル溶液) が用いられる。

9 | クライオ電子顕微鏡

溶液中の試料を急速凍結し、電子顕微鏡によって観察することで、生体内に近い状態での構造を観察することができる手法。ネガティブ染色電子顕微鏡と異なり染色を行う必要がない。

10 | 全反射照明蛍光顕微鏡

カバーガラス上で励起光を全反射させることで生じるエバネッセント光を光源とした蛍光顕微鏡。背景に光ノイズの少ない状態での観察が可能であり、今回は微小管の分岐構造の形成をリアルタイムで追跡するために用いた。

11 | モータータンパク質 (キネシン)

ATP の加水分解により生じる化学エネルギーを運動に変換するタンパク質の総称。細胞内の物質輸送や細胞分裂などに重要な役割を果たしている。微小管上を動くモータータンパク質としてキネシンやダイニンなどが知られている。今回はキネシンを固定した基板上における微小管の運動を解析した。

12 | ATP

アデノシン三リン酸。地球上の生命のエネルギー通貨として知られ、その化学エネルギーは力学的な仕事や情報に変換される。モータータンパク質の運動以外に、物質を濃度勾配に逆らって輸送する農道輸送や生体物質の合成などの多様な用途に使用される。

13 | 繊毛病

繊毛や鞭毛に関係するタンパク質の異常によって引き起こされる病気の総称。内臓逆位や不妊症、腎臓病なども繊毛病の一種として知られる。繊毛や鞭毛の成分であるダブルレット微小管など、微小管超構造体の異常が繊毛病を引き起こしている可能性がある。

14 | Tau タンパク質

微小管に結合してその構造や機能を調節する微小管関連タンパク質の一つ。神経細胞に豊富に存在し、微小管に結合してその構造を安定化することが知られている。

Q&A

- Q1** 微小管、というチューブ内部にペプチド結合タンパク質を詰め込む、という画期的なアイデアはどこから生まれたのですか？
また結合することで微小管の機能阻害は生じないのでしょうか？

これまで微小管の外側に人工分子を導入した例は多くありましたが、内部に入れた例はないのでやってみたら面白いんじゃないか、新しい現象が見られるのではないかと松浦教授と相談して始めました。例えば微小管の外側に分子を導入するとキネシンによる運動速度が低下してしまいますが、内部に導入するとむしろ速度が増大することがわかっています。このように、内部を使うことで微小管の機能を損なわずにその性質を制御できると考えています。

- Q2** 今回4量体のAzami-Greenを用いていますが、他の蛍光タンパク質や単量体蛍光タンパク質を用いた場合はどのような結果が得られるのでしょうか？

Azami-Greenに変異導入を入れると単量体にすることができそうですが、その場合微小管への結合が弱くなり、安定化効果や微小管超構造体を作る能力はAzami-Greenに劣ることがわかっています。このことはタンパク質の種類に応じて微小管の性質が変化することを示しており、現在様々なタンパク質を用いて微小管への影響を調べています。詳細はまたご報告できればと思います。

- Q3** TP-AGを生体内で発現して、本来の微小管をコントロールすることは可能ですか？
また自然に存在する微小管の多様性は、微小管内部になんらか結合し剛直性を高めていることによる、といった報告はあるのでしょうか？

TP-AGを用いた生体内の微小管のコントロールはとても興味があり、現在トライしているところです。繊毛や鞭毛中のダブルレット微小管は、タンパク質が内部から裏打ちすることで丈夫で安定な構造となっています。また、神経細胞や寄生虫などのある種特殊な細胞の微小管内部にもタンパク質が結合していることがわかっており、内部への結合を利用してその場に応じた微小管が作られていると考えることができます。このような生体内の現象を我々の系で再現することが次の目標です。

審査員より

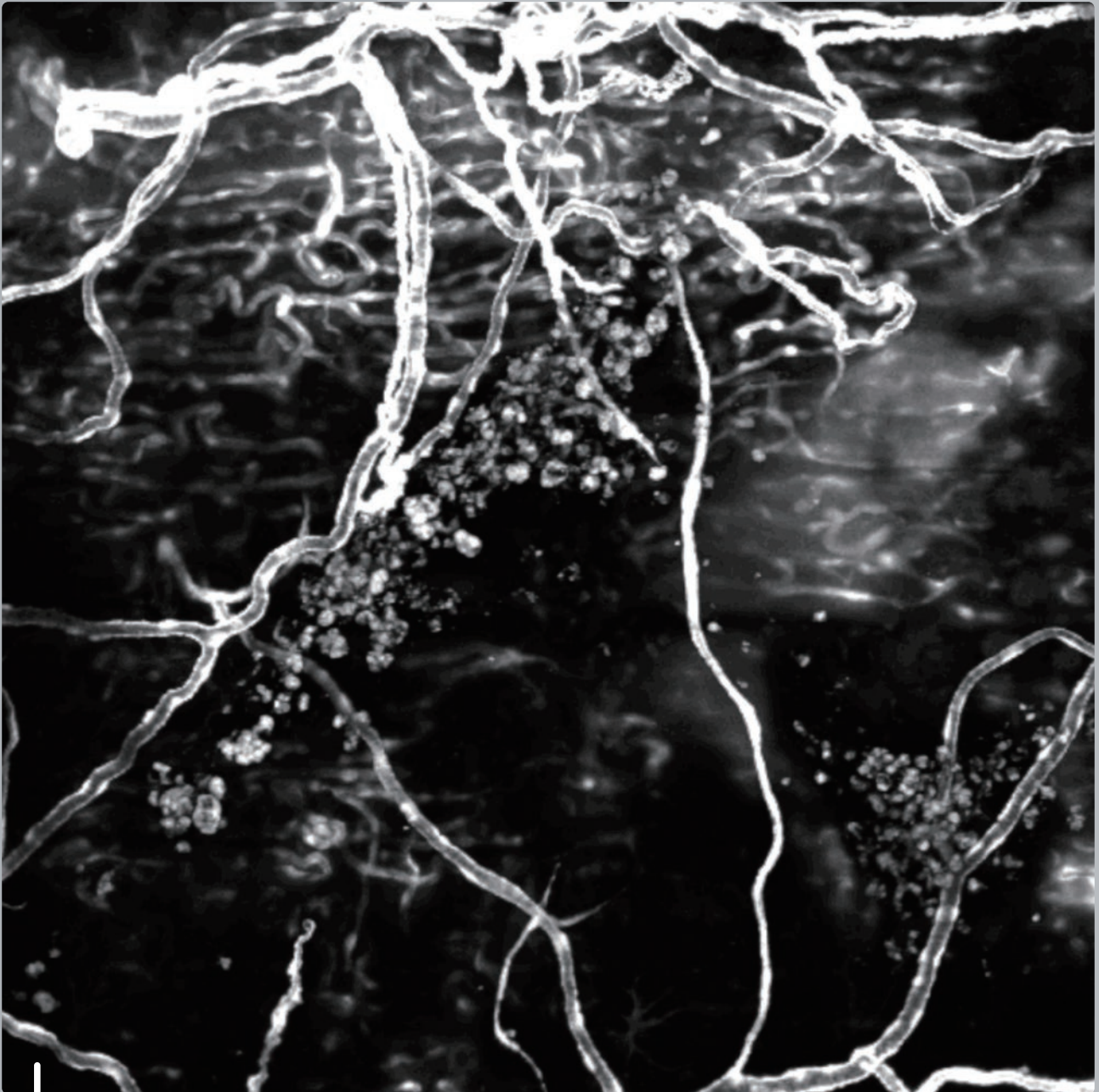
- 動的アスター構造を超構造体と捉えることに賛成。
- さまざまな微小管超構造体を人工合成することに成功した点は学術性が高い。夜空に打ち上げられた花火のようで美しい。
- 学術的には、多様な微小管の超構造体の作製に成功しており、ナノ材料研究分野を大きく進展させる画期的な研究成果である。芸術的には、銀河や宇宙、または電気的なものを彷彿させる非常にインパクトのある顕微鏡画像である。
- 芸術的にも生物物理学的にも意義がある。
- 不思議な形で美しい、学術的にも価値がある。
- 繊細にスパークするデジタル線香花火のよう。
- 線香花火のような繊細さを感じた。
- 色の交差と鋭い広がり的魅力を感じる。
- 綿帽子のような柔らかなラインと光のシャープさの対比が綺麗。
- 微細な光線の有する鋭さや柔らかさ、繊細さが共存していて美しい。
- 輝度が凄いい、スパークした感じが力強い。

優秀賞

ゼブラフィッシュ成魚の皮膚創傷部位の

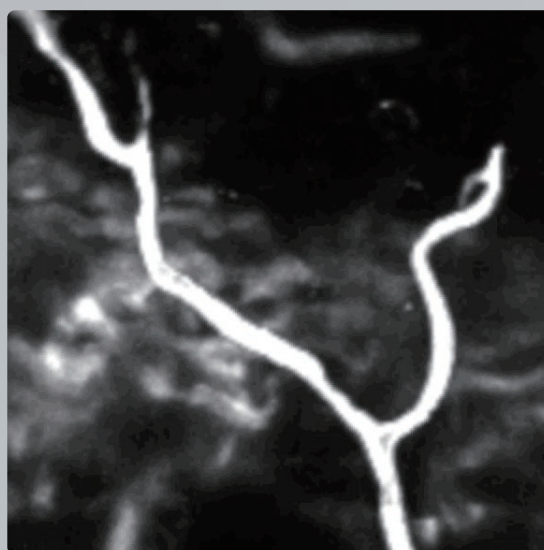
血管新生のライブイメージング

Live imaging of angiogenesis in a cutaneous wound of adult zebrafish



由来種 : ゼブラフィッシュ
器官 / 組織 / 細胞 (株) 名 : 皮膚
染色・ラベル方法等 : 血管特異的 *kdrl* (*vegfr-1*) プロモーター下で EGFP を発現する
トランスジェニックゼブラフィッシュ
観察手法 : 共焦点
対物レンズ : 20 倍 XLUMPlanFL N, 1.00 NA, 水浸
作品画像取得年 : 2015

顕微鏡蛍光ライブイメージングにより
生きている動物の成体の
創傷皮膚で損傷した
血管の伸長が活発に起こる過程を
初めて詳細に示した



ゆげ しんや
弓削 進弥

日本医科大学 先端医学研究所
病態解析学部門 / 分子細胞構造学分野
助教

ふくはら しげとも
福原 茂朋

日本医科大学 先端医学研究所
病態解析学部門 / 分子細胞構造学分野
先端医学研究所所長、大学院教授

にしやま こういち
西山 功一

宮崎大学 医学部
医学科 機能制御学講座 血管動態生化学分野
教授

受賞コメント

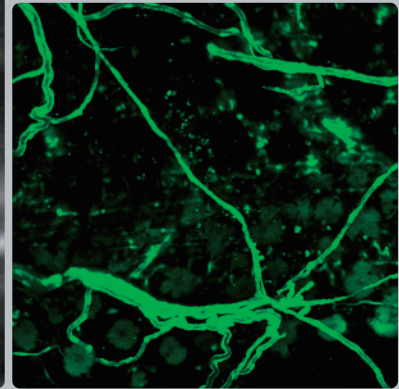
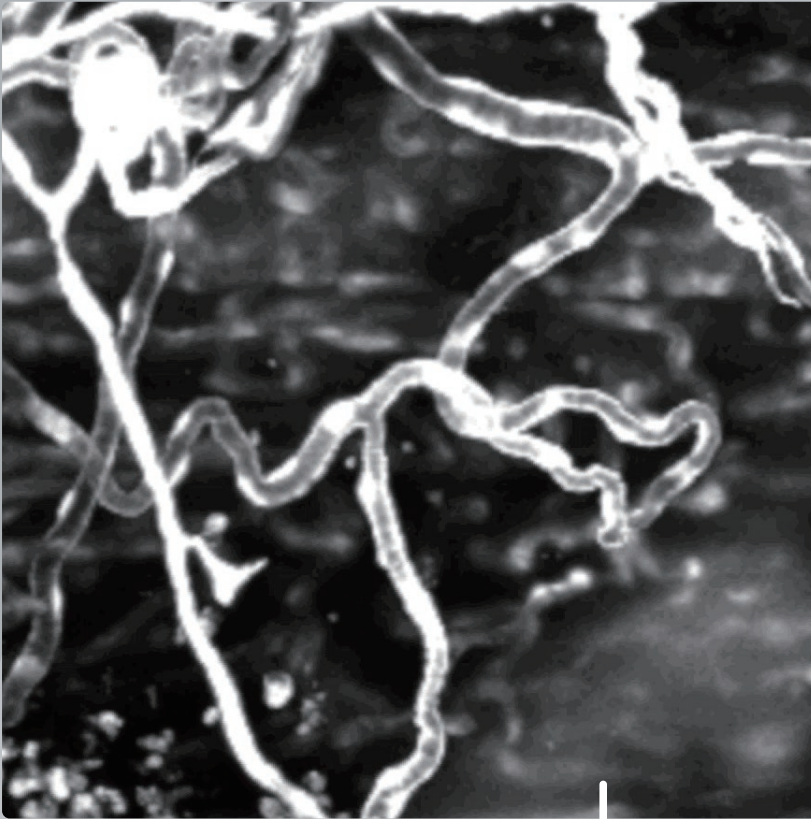
大変光栄です。研究成果の中で Supplemental になってしまう動画をアピールさせていただける機会は貴重です。

また、私は、自作した装置でゼブラフィッシュの成魚を麻酔で固定して、14-21 時間の連続撮影を毎日繰り返して 9 日間行いまして、当時他に例が無かった成体のライブイメージングに成功しましたため、その動画に注目していただけに感慨深いです。

審査員の先生方、関係者の皆さま、論文の共著者・協力者の先生方皆さまにお礼申し上げます。

ゼブラフィッシュ成魚の皮膚創傷部位の血管新生のライブイメージング

Live imaging of angiogenesis in a cutaneous wound of adult zebrafish



研究概要

論文

Yuge, S., Nishiyama, K. (equal contribution), Arima, Y., Hanada, Y., Oguri-Nakamura, E., Hanada, S., Ishii, T., Wakayama, Y., Hasegawa, U., Tsujita, K., Yokokawa, R., Miura, T., Itoh, T., Tsujita, K., Mochizuki, N., and Fukuhara, S. Mechanical loading of intraluminal pressure mediates wound angiogenesis by regulating the TOCA family of F-BAR proteins. *Nature Communications*. 2022, 13(1):2594, doi: 10.1038/s41467-022-30197-8

血管新生¹は、既存の血管から新たな血管枝が出芽・伸長する現象で、化学的にも力学的にも調節される。しかし後者については不明な点が多い。私たちは、独自に確立した蛍光ライブイメージング手法を用いて、ゼブラフィッシュ成魚の創傷皮膚で、残存した血管から活発な伸長が起こることを示し、損傷血管の伸長は血流の方向に対して上流側で抑制的で下流側で活発であることを発見した。そして同手法と、独自に改良した培養血管内皮細胞の3次元培養微小流路デバイス²手法の両方を用いて、損傷血管の上流側が伸長しにくい原因が心臓から血流が来て生じる内腔圧³であることを示した。さらに、その制御機構として以下を解明した。損傷血管の下流側の先端では、細胞膜に結合したTocaファミリーBARタンパク質がN-Wasp⁴とArp2/3複合体⁴を介してアクチン重合による先端の形成を促進させて内皮細胞の遊走による血管の伸長を活発にさせていた。いっぽう上流側の先端では、内腔圧によって血管が拡張して、構成する内皮細胞が伸展して、伸展した細胞膜からTocaファミリー分子が離れてしまい、同分子による血管伸長作用が抑制されていた。私たちは、創傷治癒では損傷血管の伸長を内腔圧が調節するという血管新生の新しい現象と力学的制御機構を初めて明らかにした。

創傷治癒で起こる血管新生の 新たな現象と制御機構を解明

－ 損傷した血管は下流側から活発に伸長し上流側では内腔圧によって伸長が抑えられる －

概要

血管新生は、既存の血管から新たな血管枝が出芽・伸長する生命現象で、化学的にも力学的にも調節されます。しかし、後者の制御機構には不明な点が多いです。私たちは、創傷治癒の際に血管新生によって血管が再生する過程を解析して、創傷皮膚では、損傷後に残存した血管が伸長再生すること、そして損傷血管は血流に対して下流側から活発に伸長して上流側（心臓側）からは伸長しにくいという興味深い現象を発見しました。さらに、損傷血管の上流側の伸長が抑えられる原因が、上流側には心臓から血流が来て血管の先端の内腔側に力がかかる、すなわち内腔圧が生じるためであることを示して、その制御機構を分子レベルで解明しました。創傷治癒での血管新生が血流による力によって制御されるという、この新たな血管新生の力学的制御機構は、創傷皮膚やがんが形成された組織で血管を正常に修復させる治療に応用できるのではないかと期待に胸をふくらませております。

背景・目的

血管新生は、既存の血管から新たな血管枝が出芽・伸長する生命現象です（図1）。血管新生は、血管内皮増殖因子（VEGF）⁵などによる化学的な制御と、血流によって生じるずり応力（シアストレス）⁶や圧力などによる力学的な制御を受けます。後者については、近年さまざまな報告が出てきて注目されていますが、依然不明な点が多く残されています。

血管新生の研究は、モデル動物のゼブラフィッシュの血管を可視化して、生きている動物で生命現象を解析できる「蛍光ライブイメージング」手法によって飛躍的に発展してきました。しかし、同手法による研究は、胚・稚魚でのものがほとんどで、成体では技術的な困難さにより非常に少なかったです。そこで私たちは、ゼブラフィッシュ

の成魚の蛍光ライブイメージングと顕微鏡下で微小針で血管1本1本を創傷する手法を独自に開発して（図2左写真）（Noishiki & Yuge *et al.* *Angiogenesis* 2019）、成体の血管新生の研究に取り組みました。私たちは、前の研究で（Noishiki & Yuge *et al.* *Angiogenesis* 2019）、魚の皮膚の基本血管網を初めて明らかにして、創傷皮膚で血管網が修復する過程の全容を示しました。また、この時創傷組織の収縮も観られたため、創傷治癒の血管新生にも組織の伸展・収縮などが関与する可能性も推測しました。

以上の背景から、本研究では、血管網の修復の中で顕著であった、損傷後に残存した血管の伸長に注目し、そこに何か特別な現象や調節があるのではないかと考えて、この現象の過程と制御機構を詳細に解明することを目指しました。

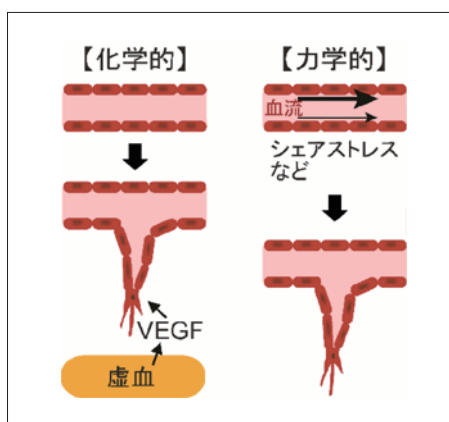


図1 血管新生は化学的にも力学的にも制御される。

P18 に用語解説があります（上付き番号に対応）

成果

私たちは、発見した血管新生の現象の原因を明確に解明するために、日本医科大学の福原研究室グループがゼブラフィッシュを用いた *in vivo*⁷ 実験を、宮崎大学の西山研究室グループが微小流路デバイスを用いた *in vitro*⁷ 実験を行って、*in vivo* と *in vitro* の両方から本研究に取り組みました。

最初に、ゼブラフィッシュの成魚の創傷皮膚で、切れて残存した血管（損傷血管）の伸長をタイムラプスイメージングで解析しました。魚を 14-21 時間麻酔で固定して顕微鏡タイムラプス撮影を行い、3-10 時間蘇生させて休憩・摂餌を行うことを連日 8 晩繰り返しました（応募動画）（論文中の S. Movie 1）。成体の皮膚の血管でこのような長時間・長期間蛍光ライブイメージングを行ったのは世界で初めてでした。この結果から、血管網が修復する時に損傷血管の伸長が活発であることを確かめました。なお、9 日間連続でこのような実験をした後でも蘇生して普通に生きていたゼブラフィッシュには驚きました。

現象を詳細に解析するために、今度は 1 本の血管だけ損傷してその後の伸長を解析しました（図 2）。すると驚いたことに、**損傷血管は血流の方向に対して下流側から活発に伸長して上流側からは伸長しにくかった**です。そして、もう一度上述の結果（応募動画）を見直してみたところ、**活発に伸長している損傷血管はどれも下流側**でした。さらに、同現象は、動脈・静脈どちらでも観られて、稚魚の節間血管⁸を損傷した際にも起こったため、創傷治癒で普遍的な生体反応であると考えられました。

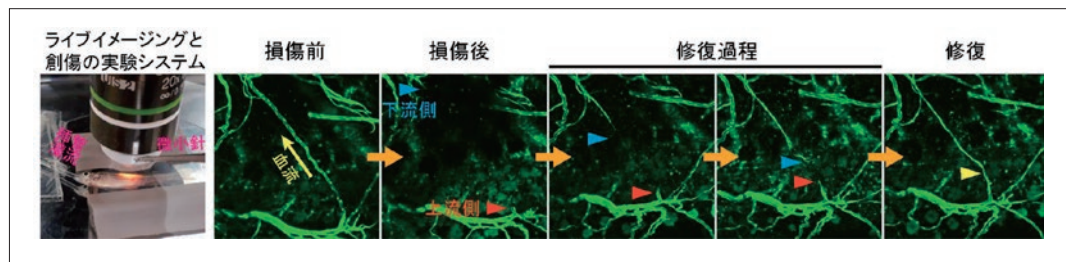


図 2 損傷した血管は血流の方向に対して下流側から活発に伸長し上流側からは伸長しにくい。

私たちは、損傷血管の上流側の伸長が抑えられるのは、上流側に心臓から血流が供給されて内腔圧がかかるためであるという仮説を立てて、それを検証しました。まず、損傷血管の上流側のさらに上流を損傷して血流を遮断して内腔圧を消失させたところ、上流血管は下流血管と同じ程度に伸長しました。独自に改良した微小流路デバイスを用いて、培養血管内皮細胞 HUVECs で 3 次元の血管新生を再現して、新生血管に内腔圧を負荷したところ、血管の伸長は抑制されました（図 3）。さらに損傷血管の上流側とデバイス上の内腔圧を負荷した血管の先端の構造を解析したところ、両者ともに拡張していて、構成する内皮細胞は円周方向に伸展していました。これらの結果から、**損傷血管の上流側では、血流によって生じる内腔圧によって血管が拡張して、内皮細胞が伸展させられて、伸長が抑制される**ことが示唆されました。

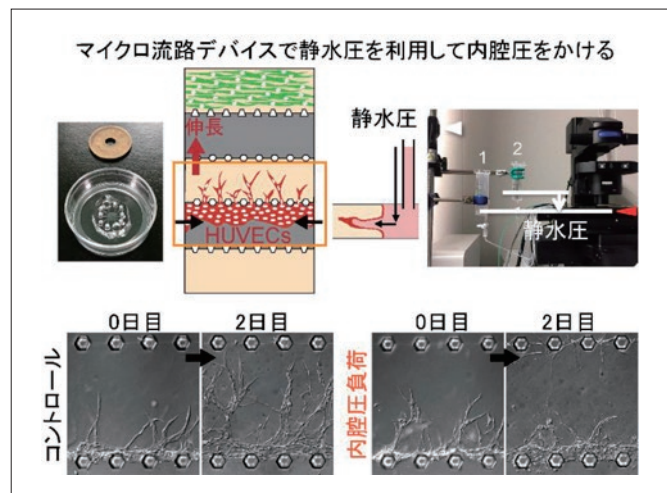


図 3 血管の伸長は内腔圧の負荷により抑制される。

さらに私たちは、損傷血管の先端の内皮細胞で内腔圧による伸展刺激を受容するメカノセンサーとして TOCA ファミリー⁹ BAR タンパク質を同定して、上流側では内腔圧が同分子による血管伸長の調節を阻害していることを明らかにしました。下流側の先端では、細胞膜に結合した Toca1 が、N-Wasp、Arp2/3 複合体の動員を介して先端でのアクチン重合を誘導して(図 4 右の下流側)、先端からの内皮細胞の遊走による血管の伸長を促進すると考えられました。いっぽう上

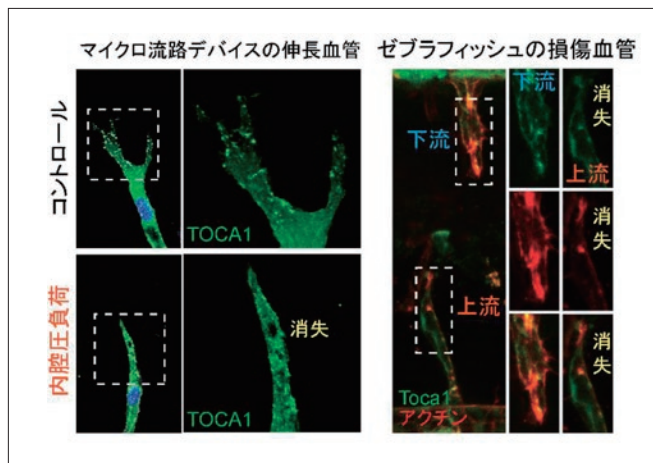


図 4 内腔圧が負荷された血管では TOCA ファミリー BAR タンパク質が消失する。

流側の先端では、内腔圧で伸展させられた細胞膜に Toca1 が結合できなくなって Toca1 の同調節機構が阻害された結果(図 4 右の上流側)、血管の伸長は抑制されると考えられました。微小流路デバイスの新生血管でも、内腔圧を負荷すると、先端でこれらの分子の局在およびアクチン重合は減少していました(図 4 左)。

私たちは、創傷皮膚では損傷血管は上流側で伸長しにくく下流側で活発に伸長することを発見し、上流側では、血流による内腔圧がかかると、伸展した細胞膜に内腔圧センサーの TOCA1 が結合できなくなって、TOCA1 の調節機構が阻害されるために血管の伸長が抑制されるという、**血管新生の新たなメカノバイオロジー機構**を解明しました(図 5)。私たちは、本研究成果を、糖尿病など創傷治癒が遅延する疾患で内腔圧の負荷を軽減して血管新生を促進する治療、腫瘍の未熟な新生血管の形成を内腔圧の負荷で阻害する治療などに応用できるのではないかと考えて、研究を続けております。

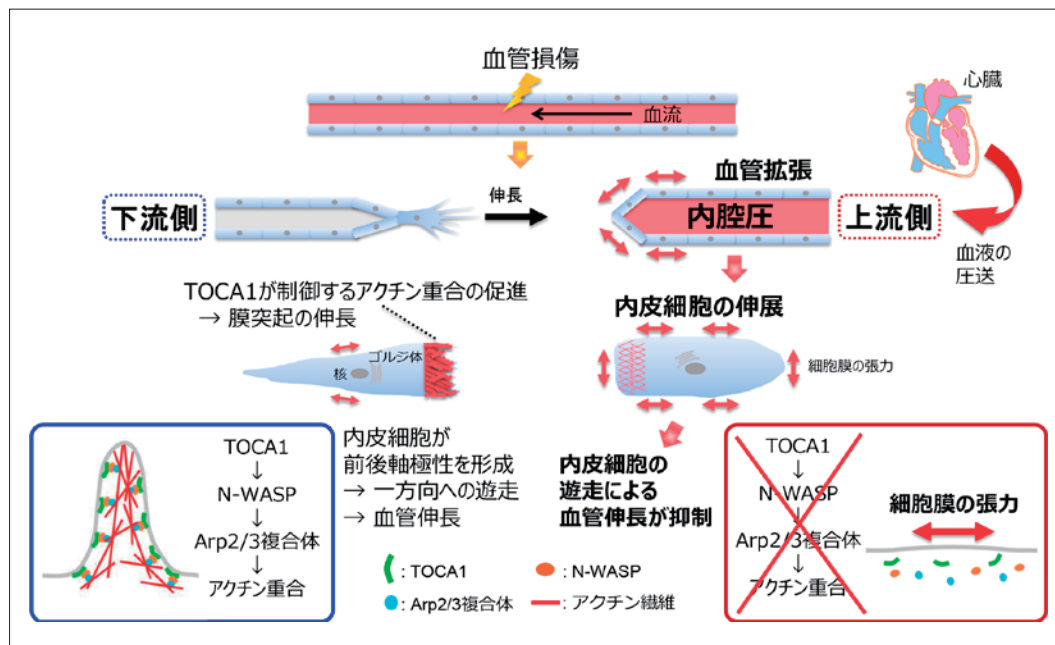
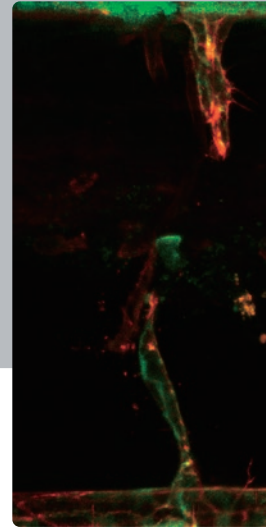
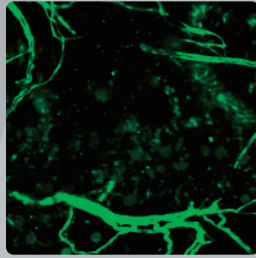


図 5 損傷した血管では、メカノバイオセンサー TOCA ファミリー分子が、内腔圧による血管壁の伸展を受容し、その調節シグナルによって血管の伸長の促進・抑制を制御する。



用語解説

1 | 血管新生

既存の血管から新しい血管枝が出芽・伸長する生命現象。既存の血管が嵌入して複数に分断する現象も含めて言うことが多い。本研究では、前者の新しい制御機構を解明しました。

2 | 微小流路デバイス

樹脂・ガラス・シリコンなどを用いて、nm～mmのスケールで平面上ながらも3次元に入り組んだ構造に加工した装置。本研究では、本装置で血管新生を3次元で再現できる実験系を確立しました。

3 | 内腔圧

管状・袋状の器官・構造物の内側の空間に液体や気体などが入り込んで内側から押す圧力。本研究の血管管腔では血液が流れ込んで押す力が内腔圧。風船が空気で膨らんでいる状態も内腔圧が生じていると言える。

4 | N-Wasp, Arp2/3 複合体

細胞内シグナル伝達をアクチン重合へと仲介する分子。Cdc42やRac、本研究のTocaファミリー分子などがN-Waspに結合して、N-Waspがアクチン重合促進因子Arp2/3複合体を活性化して、Arp2/3複合体が枝状のアクチン重合を促す。このアクチン重合により、細胞の遊走に必要なフィロポディア(糸状仮足)やラメリポディア(葉状仮足)が形成される。

5 | 血管内皮増殖因子 (VEGF)

血管新生を促すタンパク質の液性因子。創傷や癌で虚血に陥って低酸素状態になった組織では、低酸素誘導因子HIF-1が活性化されて、HIF-1によって転写が促進されたVEGFが血管新生を促す。本研究では、創傷時の血管新生では、そのような化学的な制御だけでなく、内腔圧による力学的な制御も働くことも示しました。

6 | ずり応力 (シアストレス)

血管内で、血流が流れて、流れる方向と水平に血管壁に加わる摩擦力。心拍動により血管壁に垂直に作用する圧力と異なる。本研究で示した、損傷後に先端が閉じた血管に血流が来てかかる内腔圧とも異なる。

7 | *in vivo*, *in vitro*

一般的に*in vivo*は「生体内」、*in vitro*は「試験管内」です。本研究では、生きているゼブラフィッシュで血管新生を解析した実験を*in vivo*、微小流路デバイスで再現して血管新生を解析した実験や培養細胞で血管内皮細胞の動態を解析した実験を*in vitro*としました。

8 | 節間血管

体の中心を走る背側大動脈・後部主静脈・尾部静脈とより背側にある背側縦断血管を結ぶ血管。血液が背側大動脈から背側縦断血管に流れるものを動脈系節間血管、血液が背側縦断血管から後部主静脈・尾部静脈に流れるものを静脈系節間血管として区別することもあります。

9 | メカノセンサー TOCA ファミリー

分子内に細胞膜と結合するBAR domainを持つBAR領域含有タンパク質の一種。遊走している細胞の細胞膜に結合してアクチン重合による先端の形成を調節する分子ファミリー。TOCA1、CIP4、FBP17の3つ、そのうちTOCA1とCIP4が血管内皮細胞で多く発現している。これらの分子は、伸展している細胞膜には結合できずに機能を失うため、内腔圧による伸展刺激を感知できる分子、すなわち内腔圧メカノセンサーだと考えられた。本研究では、TOCA1とCIP4が血管内皮細胞で多く発現して内腔圧を感知するメカノセンサーであることを示しました。

Q&A

Q1 | 内腔圧、とは動脈と静脈によって異なるのでしょうか？ また内腔圧センサーの TOCA ファミリーが感知する圧力は、 血管の場所や動脈、静脈による違いはあるのでしょうか？

本研究での内腔圧という概念は、動脈でも静脈でも同じです。血管が切断されて血流が遮断された後に損傷血管の先端に血流が来て負荷される圧力であるため、動脈でも静脈でも損傷後では同じです。ですが、負荷される内腔圧は動脈側で損傷した血管より大きくなっているかもしれません。TOCA ファミリー分子が内腔圧の大きさに応じて機能を変動させるかどうかは、血管が損傷した場所によって負荷される内腔圧の程度は異なるでしょうから、今後研究してみたいです。

Q2 | 内皮細胞の前後軸極性の形成と内腔圧の関係はあるのでしょうか？ また下流から伸びる血管の方向性はどのように制御されているのですか？

内腔圧は内皮細胞の前後軸極性の形成に影響すると考えられます。損傷血管の先端で、内腔圧が血管壁を拡張させ、血管壁を構成する内皮細胞を伸展させることで、内皮細胞の前後軸極性が消失します。ただし、内腔圧が負荷されても伸展刺激が生じない血管では、内皮細胞の前後軸極性には変化が起こりにくいです。これは重要な点ですので、微小流路デバイスを用いた *in vitro* 実験で示しました。

損傷血管が下流側から伸びて上流側と出会って吻合する現象がスムーズに起こることは、実は単純ながらも大きな疑問で、どのように制御される結果なのか、現在のところ不明ですが、非常に興味を持っております。

Q3 | 今後「血管新生」という研究テーマを通して、 さらに先生が明らかにしたいことは何でしょうか？

本研究で「創傷組織で内腔圧が血管新生を制御する現象と機構」を初めて示しましたが、その生命現象にどんな意味があるかはまだ分かっていないため、まずその生理的意義を明らかにしたいです。創傷部位が潰瘍化すると血管新生も起こりにくくなります。この時周辺の血管に負荷される内腔圧は高くなっているかもしれません。癌では、未熟で透過性が高く血液が漏れる血管が無秩序に形成されます。この時これらの血管には内腔圧が負荷されなくなっているかもしれません。内腔圧が生理的で秩序ある血管新生を維持することに貢献するかもしれません。もしそうであれば血管の内腔圧を調節して創傷や癌を治療する新しい方法を確立できるかもしれません。

審査員より

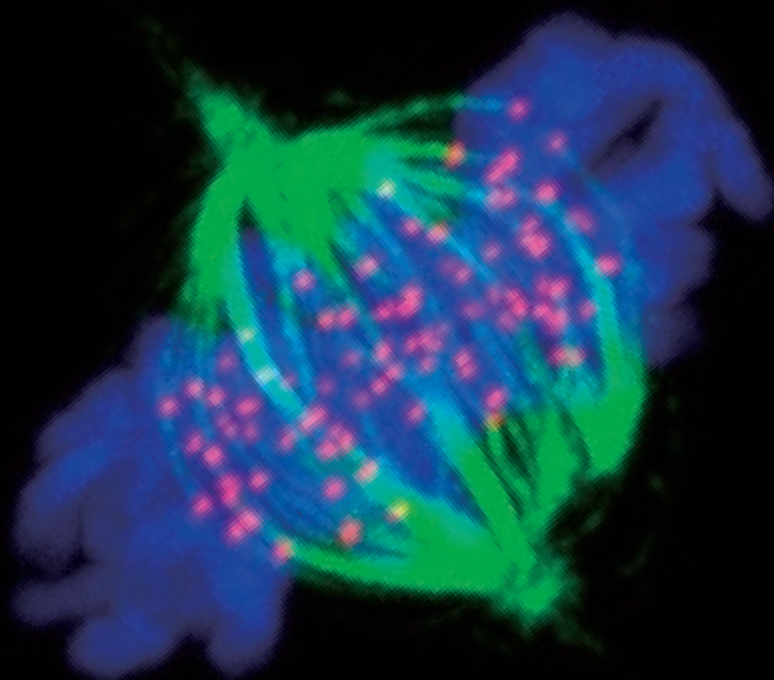
- 血管新生のメカニズムを化学的及び力学的に解明し、その過程を捉えた動画で学問的価値は高い。
- 学術的には、損傷時の血管新生のメカニズムの一端を解明し、当該分野を進展させる重要な研究成果である。芸術的には、生体内の暗闇の中を血管が元通りの場所を見つけて修復する様子は、生命の力強さを感じさせる。
- 草木のように生命感ある血管の動き。水墨画のようなモノクロで描かれている点がユニーク。
- モノクロの表現がより神秘的なイメージを増しています。
- 力強さに加えラストにアートを感じた。
- 再生する生命の力強さがダイナミックに表現されていて見入ってしまう。

特別賞

動原体がつなぐ

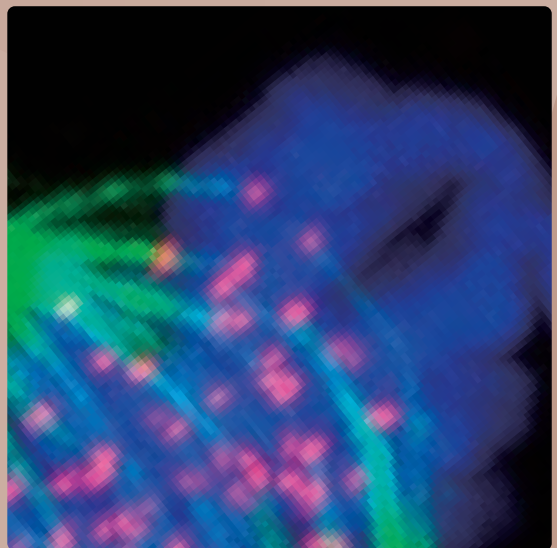
染色体と紡錘体微小管

Chromosome–spindle microtubule interactions connected by kinetochores



由来種 : ヒト
器官 / 組織 / 細胞 (株) 名 : RPE-1 細胞
染色・ラベル方法等 : 緑: 微小管 (α -tubulin)
赤: 動原体 (mScarlet-Dsn1)
青: DNA (DAPI)
観察手法 : 蛍光、共焦点
対物レンズ : Plan Apo lambda 100 \times /1.45 NA
作品画像取得年 : 2021

染色体上の動原体が
紡錘体微小管と結合する
分子メカニズムが明らかになった



たけのした ゆうすけ
竹之下 憂祐

大阪大学
大学院生命機能研究科・染色体生物学研究室
特任研究員

受賞コメント

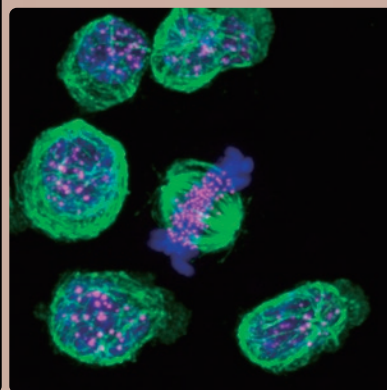
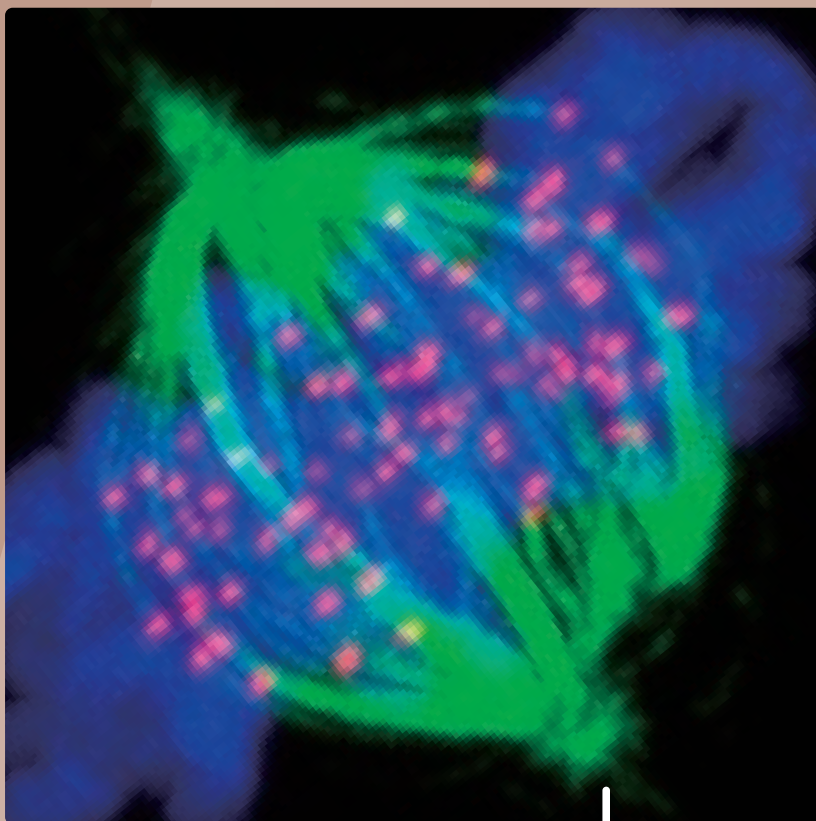
この度は、NIKON JOICO AWARD 特別賞に
選出いただき、大変光栄に思います。

正常細胞と変異体細胞の紡錘体や染色体を蛍光
標識し観察することで、「水中を泳ぐ夜光性プラン
クトンのよう」というコメントをいただいた美しい紡錘
体構造がどのようにできるのか、その一部を明らか
にすることができました。

今後も、蛍光顕微鏡による観察を楽しみながら研
究を進めていきたいと思えます。

動原体がつなぐ染色体と紡錘体微小管

Chromosome–spindle microtubule interactions connected by kinetochores



研究概要

論文

Yusuke Takenoshita, Masatoshi Hara,
Tatsuo Fukagawa

Recruitment of two Ndc80 complexes via the CENP-T pathway is sufficient for kinetochore functions.

Nature communications. 2022, 13(851), doi:
10.1038/s41467-022-28403-8

細胞が分裂する際に遺伝情報を担う染色体を等しく分配するためには、“動原体”¹とよばれるタンパク質複合体が染色体と紡錘体²微小管³とを正しくつなぐことが必須です。動原体の構造は、100種類以上のタンパク質が複雑に相互作用しあい作られています。さらに、これらの構成因子の中には、同じような機能を持ち、お互いの機能を補うものもあることから、それぞれの因子の詳細な機能を調べることは困難でした。本研究では、多様なゲノム工学技術を組み合わせて、動原体の複雑なタンパク質間相互作用を操作することで、染色体と紡錘体微小管をつなぐ中心となる CENP-T⁴と KMN ネットワークの詳細な役割を明らかにしました。この手法は、動原体のような複雑な構造をもつ、他の巨大タンパク質複合体を構成する因子の機能解析にも有用であると考えられます。

動原体と紡錘体微小管との結合の分子基盤

私たちのからだは、ひとつの細胞である受精卵が分裂を繰り返し、発生・成長していくことでつづられます。この繰り返される細胞分裂の際には、遺伝情報を運ぶ染色体を次世代の細胞に正確に分配することが必須です(図1上)。この過程に異常が生じると、胚発生異常や細胞のがん化などが引き起こされることから、どのようにして正確に染色体を分配するのかを理解することは非常に重要です。染色体の分配は、細胞分裂の際に、細胞の両側から伸びてきた紡錘体微小管が染色体のセントロメア⁵とよばれる領域をとらえ、次世代の細胞に染色体を分けることによっておこなわれます。この時に、セントロメア領域と紡錘体微小管をつなぐ役割をもつのが動原体とよばれるタンパク質複合体です(図1下)。染色体が正確に次世代の細胞へ分配されるメカニズムを知るためには、動原体がどのようにして染色体と紡錘体微小管をつないでいるのかを詳細に理解する必要があります。

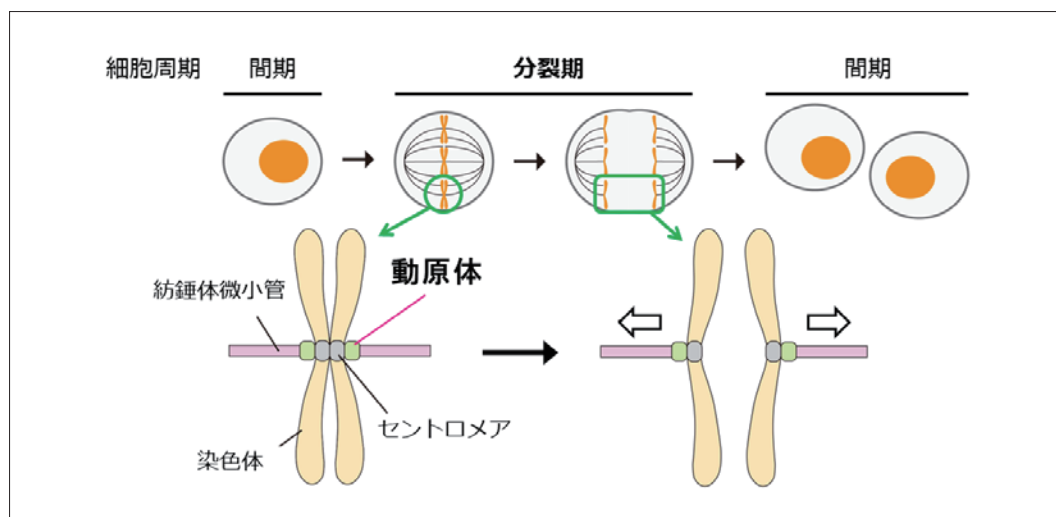


図1 細胞周期とそれに伴う染色体分配⁵。

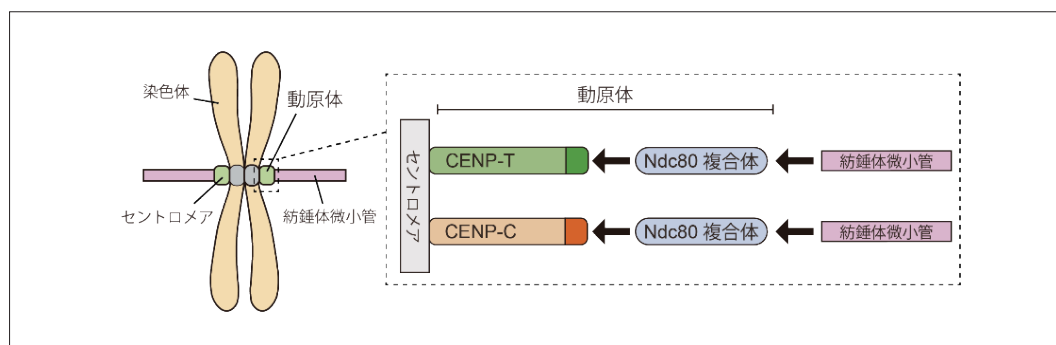


図2 染色体と紡錘体微小管をつなぐ2つの経路。

P26 に用語解説があります(上付き番号に対応)

動原体が紡錘体微小管と結合するためには、紡錘体微小管と結合する機能をもつタンパク質複合体である Ndc80 複合体⁷ を動原体上にリクルートする必要があります。これまでの研究から、Ndc80 複合体を動原体上にリクルートする経路には、動原体を構成するタンパク質である CENP-C⁸ を介した経路と CENP-T を介した経路の 2 つがあり、CENP-T の経路が主要であることがわかっていました (図 2)。本研究では、どのようにして CENP-T が紡錘体微小管と安定的に結合しているのか、そのメカニズムの解明をおこないました。

CENP-T の詳細な機能を調べる際に問題となったことは、同じような役割を持つ CENP-C がその機能を部分的に補ってしまうことでした。そこで、ゲノム編集⁹ 技術をもちいて CENP-C の Ndc80 複合体のリクルートに必要な領域を除いた細胞を作成しました。この細胞では CENP-C の経路による相補が起こらないため、CENP-T の経路の詳細な機能を調べるのが可能となりました。

CENP-T 上には、2 セットの Ndc80 複合体がリクルートされます。1 セットは CENP-T 上に直接リクルートされ、もう 1 セットは Mis12 複合体¹⁰ と呼ばれるタンパク質複合体を介してリクルートされます (図 3 正常細胞)。まずは、Mis12 複合体を介した Ndc80 複合体のリクルートが紡錘体微小管との結合に必要なのかを調べるために、Mis12 複合体と Ndc80 複合体との結合を特異的に欠損した変異体細胞を作成しました (図 3 変異体細胞 -1)。正常細胞と変異体細胞 -1 の紡錘体形成について、チューブリン抗体を用いた免疫染色により微小管を蛍光標識し解析すると、正常細胞では両側から動原体に向かって紡錘体微小管がまっすぐ伸びているのに対して、変異体細胞 -1 では紡錘体微小管が曲がるような異常がみられ、紡錘体形成に異常がおこることが分かりました (図 4)。さらに、この変異体細胞 -1 は染色体分配異常をおこし、致死となりました。これらのことから、Mis12 複合体を介した Ndc80 複合体のリクルートが紡錘体微小管との安定的な結合に必要であることが示唆されました。

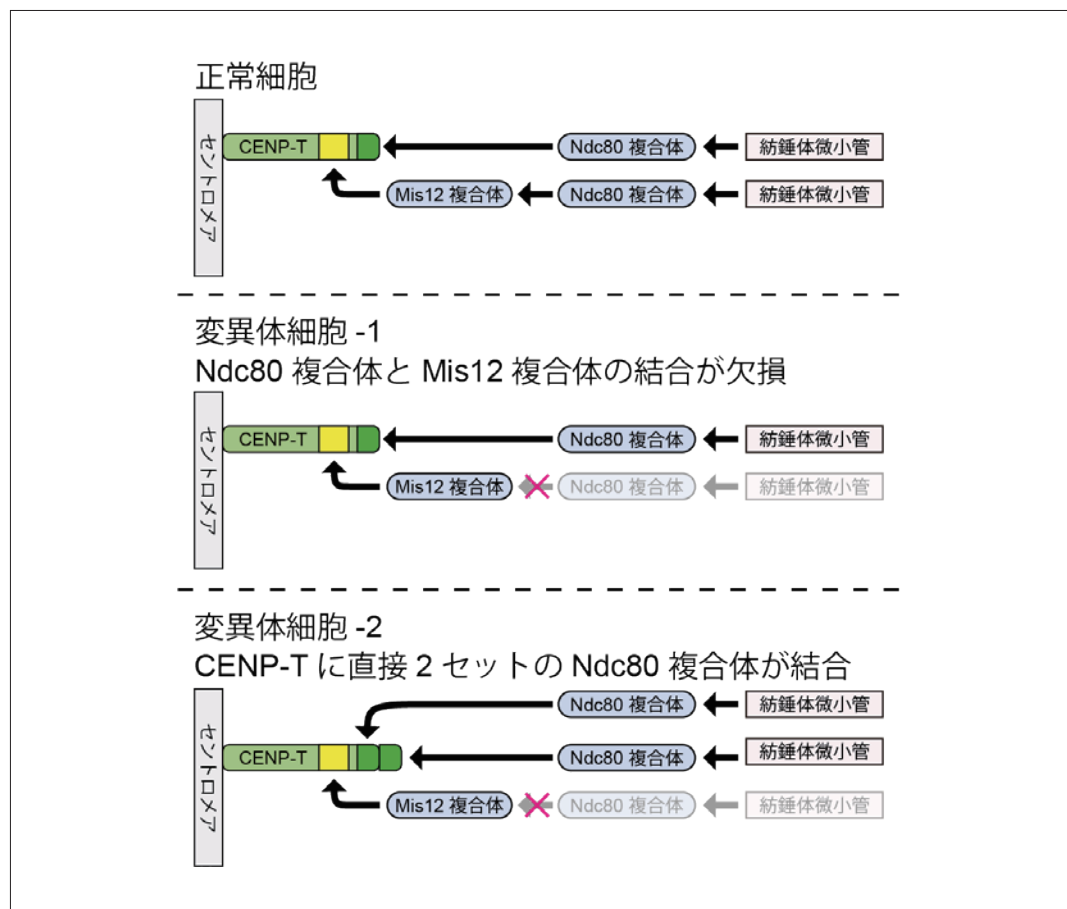


図 3 CENP-T による Ndc80 複合体のリクルート方法とその変異体。

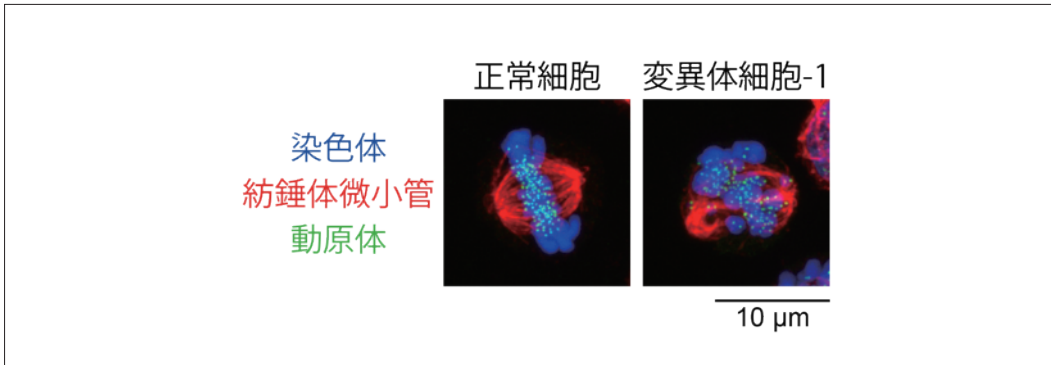


図4 Ndc80 複合体と Mis12 複合体の結合を阻害すると紡錘体形成の異常が観察される。

次に、なぜ Mis12 複合体を介した Ndc80 複合体のリクルートが必要なのかを調べました。その可能性としては、Mis12 複合体と Ndc80 複合体の結合そのものが重要であること、もしくは、CENP-T 上に 2 セットの Ndc80 複合体がリクルートされることが重要であることが考えられました。そこで、これらを検証するために、Mis12 複合体と Ndc80 複合体との結合は欠損した一方で、CENP-T に直接 2 セットの Ndc80 複合体をリクルートできる変異体細胞を作成しました (図 3 変異体細胞 -2)。正常細胞・変異体細胞 -1・変異体細胞 -2 の紡錘体形成について、チューブリン抗体を用いた免疫染色により微小管を蛍光標識し観察すると、Mis12 複合体と Ndc80 複合体との結合を特異的に欠損した変異体細胞 (変異体細胞 -1) でみられた微小管がまがるという異常が、CENP-T に直接 2 セットの Ndc80 複合体をリクルートする状況をつくることで補われ (変異体細胞 -2)、正常な紡錘体が形成されました (図 5)。このことから、動原体と紡錘体微小管との安定的な結合には CENP-T 上に 2 セットの Ndc80 複合体がリクルートされることが重要であることがわかりました。本研究により、本アワードに応募した蛍光顕微鏡画像で観察されるような、動原体の点状のシグナルと紡錘体微小管の線状のシグナルが接する構造が形成される詳細なメカニズムがあきらかになりました。

動原体は、100 種類以上のタンパク質が複雑に結合しあうことで構成されます。さらに、CENP-T と CENP-C のように、複数のタンパク質が同じような機能を持つことがあるため、それぞれのタンパク質がどのように機能しているかを解明することが非常に困難でした。本研究では、CENP-T の機能を部分的に補う CENP-C の機能をあらかじめ欠損させた細胞を使うことで、CENP-T の詳細な機能をあきらかにすることができました。この手法は、動原体のような複雑な結合ネットワークをもつ、他の巨大タンパク質複合体を構成する因子の機能解析にも有用であると考えられます。

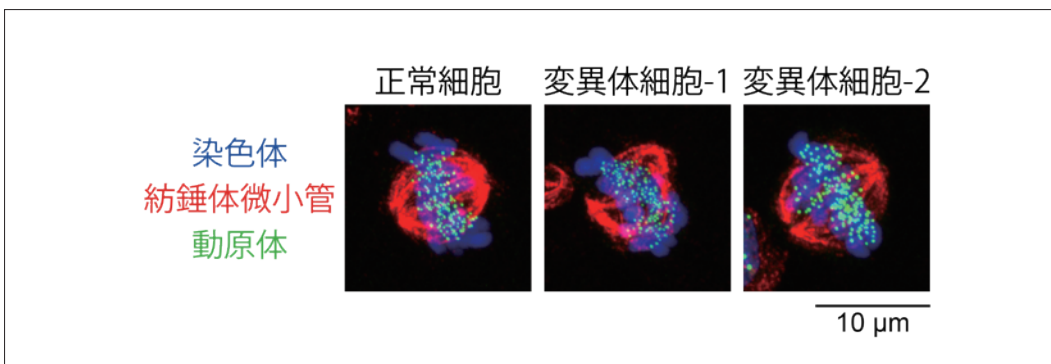


図5 CENP-T 上に 2 セットの Ndc80 複合体が結合することが正常な紡錘体形成には重要である。

用語解説

1 | 動原体 (キネトコア)

染色体上のセントロメア領域につくられる巨大なタンパク質複合体で、細胞分裂の際に、染色体を引っ張る糸(紡錘体微小管)と結合する。このことにより染色体と紡錘体微小管とがつながり、染色体分配が可能になる。

2 | 紡錘体

細胞分裂期に構成される紡錘状の構造体。主に微小管からつくられ、染色体上の動原体をとらえ両極に引っ張る機能を持つ。

3 | 微小管

細胞内に形成される直径約 25 nm の管状の構造体。主にチューブリンと呼ばれるタンパク質からつくられる。細胞分裂の際には、染色体分配に必須な装置である紡錘体を形成する。

4 | CENP-T

動原体の構成因子。セントロメア DNA と結合する機能と、Ndc80 複合体と結合する機能とをもつため、染色体と紡錘体微小管とをつなぐことができる。

5 | セントロメア

動原体が構成される染色体上の特定の領域。細胞分裂期にくびれた構造を形成し、動原体を介して紡錘体微小管と結合する。

6 | 染色体分配

細胞内には、遺伝情報を含んだ染色体が複数存在する。染色体は、1つの親細胞が2つの娘細胞に分裂する前に2セットにコピーされる。このコピーされた染色体を、細胞が分裂する時に次世代の細胞へ受け渡すことを染色体分配という。

7 | Ndc80 複合体

動原体の構成因子で、4種類のタンパク質から構成される。酵母からヒトまで機能的にも構造的にも保存され、紡錘体微小管と直接結合する機能をもつ。

8 | CENP-C

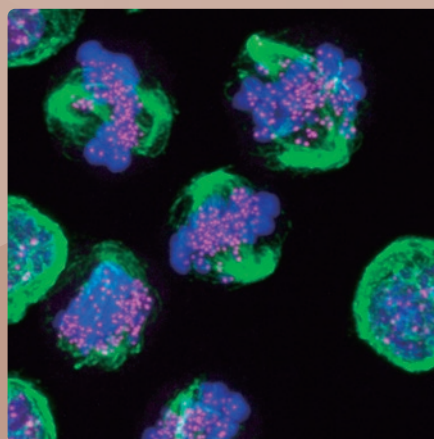
動原体の構成因子。セントロメア領域と Mis12 複合体の両方に結合することから、CENP-T と同様に染色体と紡錘体微小管とをつなぐために必須と考えられていた。しかし最近の研究で、CENP-C の染色体と紡錘体微小管とをつなぐ機能は、染色体分配に必須ではないことが示された。

9 | ゲノム編集

ゲノム DNA 上の特定の塩基配列を狙って改変する技術。この技術を応用し、外来の遺伝子と元々のゲノム配列とを入れ替えることで、変異タンパク質を発現する細胞を作成できる。

10 | Mis12 複合体

動原体の構成因子で、4種類のタンパク質から構成される。Ndc80 複合体とサブ複合体を形成し、CENP-T や CENP-C に結合することで、Ndc80 複合体との結合を仲介する。



Q&A

- Q1** | **CENP-T が 2 セットの Ndc80 複合体と結合することが染色体分配に重要という今回の成果ですが、CENP-C の役割はなんのでしょうか？
また CENP-T 経路を断ち切ると染色体分配は行われませんか？**

CENP-C を欠損した細胞は死んでしまいますが、細胞の生存に必須な CENP-C の役割は明らかになっていません。CENP-C には、既に細胞の生存に必須でないことが分かっている Ndc80 複合体のリクルートに関わる領域だけでなく、他の動原体構成因子と結合する領域があるので、この領域が細胞の生存に必須な CENP-C の役割を担っている可能性があります。

CENP-T 経路を断ち切ると、染色体分配が途中で停止し、細胞は死んでしまいます。

- Q2** | **100 種類以上のタンパク質が結合している巨大な protein complex である動原体には、CENP-T, CENP-C のように類似の機能をもつと考えられているタンパク質は多くあるのでしょうか？
またなぜ動原体にはこれだけ多くのタンパク質が結合していると考えられるのでしょうか？**

動原体の構成因子には、互いに類似の機能を持つタンパク質がいくつか知られていて、これらのタンパク質の中には、お互いの機能をほぼ完全に補うことができるものもあります。

動原体の染色体と紡錘体微小管とを正しくつなぐという機能は単純そうに思えますが、実際は複雑です。ただつなぐだけでなく、紡錘体微小管との間違った結合を修正したり、動原体の構造を安定的に維持したりなど、動原体は複数の機能を緻密に制御しています。これらの複雑な機能の制御のために、多くのタンパク質が動原体には必要だと考えられます。

- Q3** | **染色体分配の異常による疾患で、CENP-T 経路が関与するような知見は得られているのでしょうか？**

小頭症と低身長を示す患者さんのゲノム解析を行ったところ、CENP-T に変異が見つかったという報告があります。詳細な解析は行われていませんが、この患者さんの症状の原因は、CENP-T の変異による部分的な染色体分配異常の可能性があると見られます。ただ、このような報告は稀なので、ほとんどの場合、CENP-T に変異が入ると染色体分配異常により細胞が死んでしまうのではないかと考えています。

審査員より

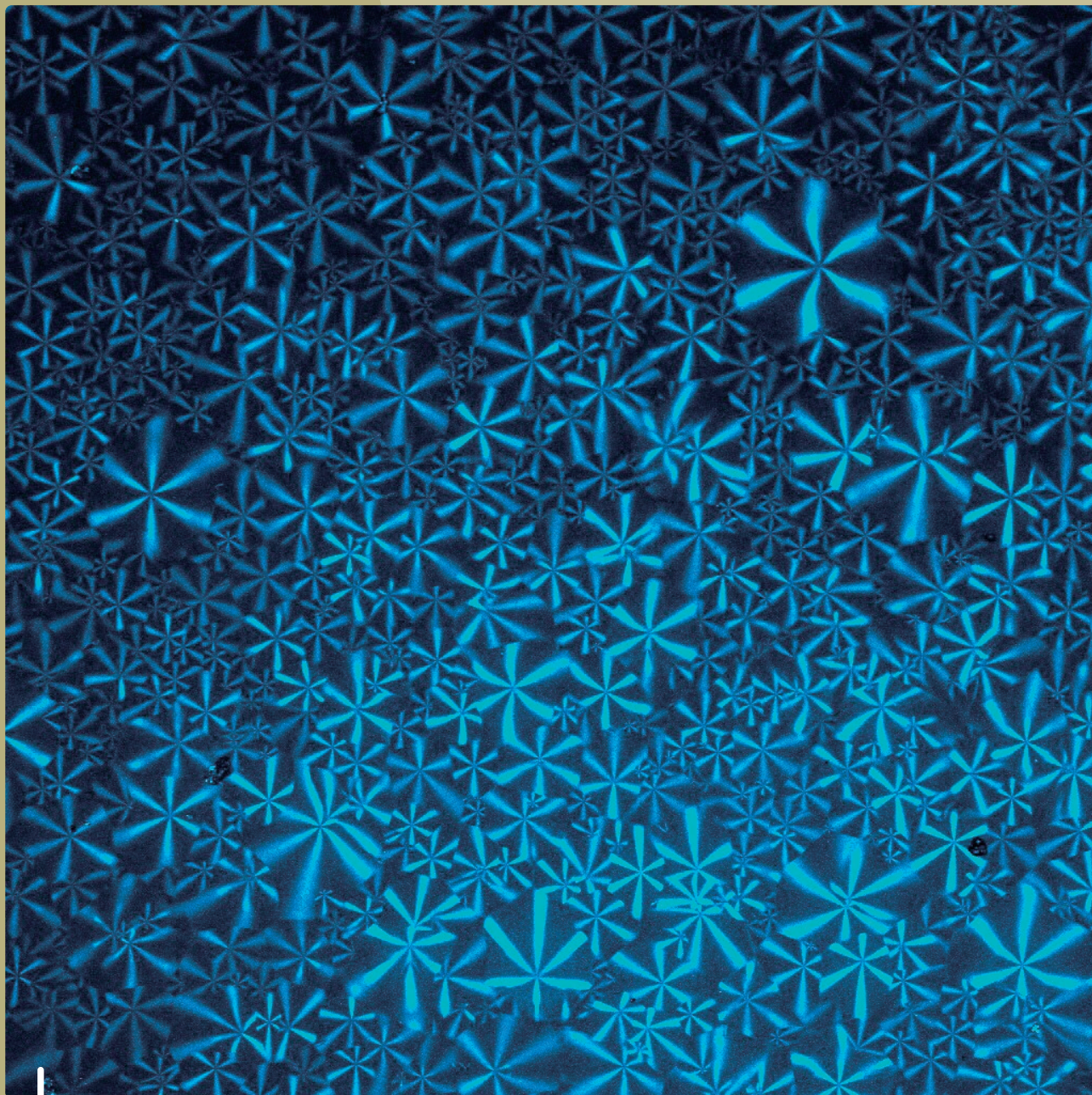
- 水中を泳ぐ夜光性プランクトンのようで生命の神秘を感じる。
- 分子生物学的には重要な知見である。

芸術
特別賞

OVPE-GaN 結晶に見られる

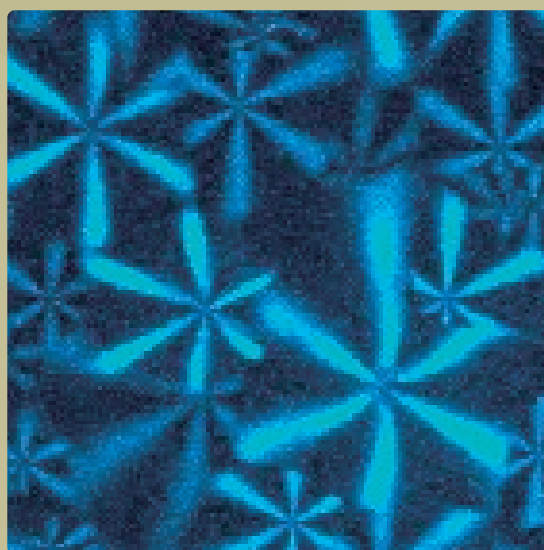
花卉模様

Floral pattern in the OVPE-GaN crystal



由来種 : 窒化ガリウム
器官 / 組織 / 細胞 (株) 名 : 窒化ガリウム
染色・ラベル方法等 : 染色はしていませんが、PC で青系色に色味を変更しています。
観察手法 : 多光子
対物レンズ : 10 倍
作品画像取得年 : 2022

OVPE 法特有の
3次元成長によって生じた
ファセットを反映して育成した
GaN 結晶中に不純物濃度分布を
生じていることがわかりました



う さ み し げ よ し
宇佐美 茂佳

大阪大学 工学研究科
助教

い ま に し ま さ ゆ き
今西 正幸

大阪大学 工学研究科
准教授

も り ゆ う す け
森 勇介

大阪大学 工学研究科
教授

グループ名: 阪大 OVPE

受賞コメント

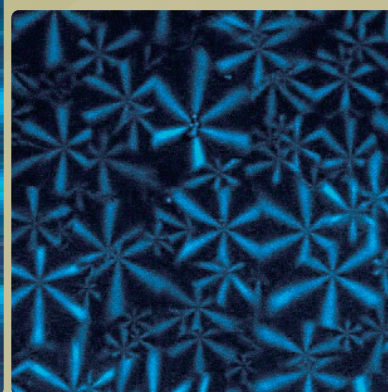
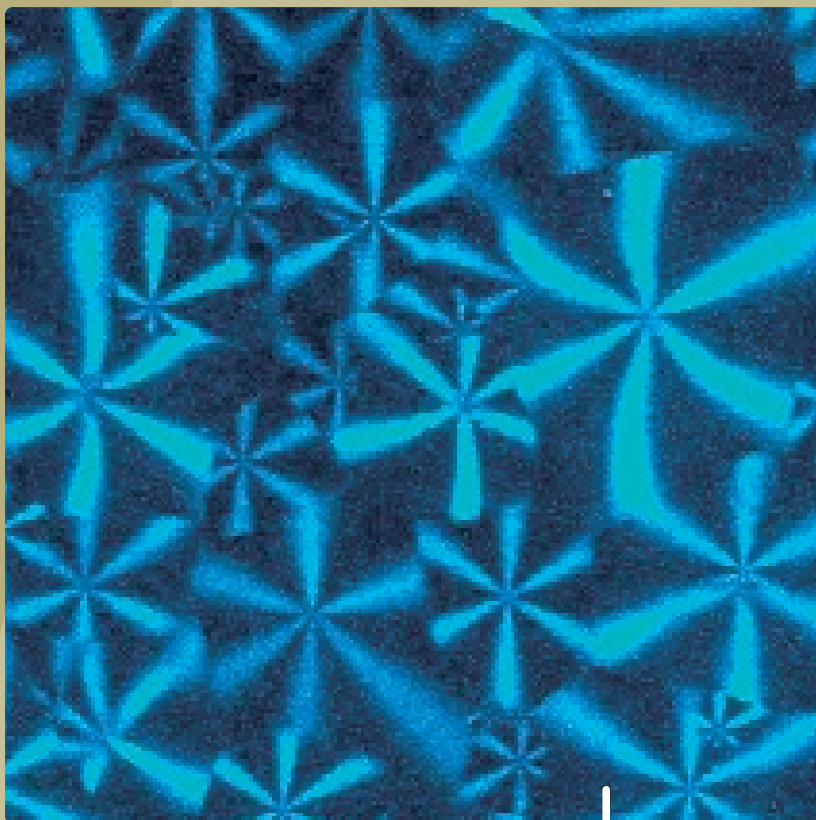
このような栄えある賞にご選出いただきありがとうございます。
ごます。

OVPE 法において特定の条件下で成長した GaN 結晶の発光像を観察すると雪の結晶のような、花びらのような模様が見られます。最初に観察したときにとても美しいと思い、この企画に応募させていただきました。冬の季節にぴったりな画像を提供できたのではないかと思います。

審査員の皆様に共感いただけたこと大変嬉しく思います。

OVPE-GaN 結晶に見られる花卉模様

Floral pattern in the OVPE-GaN crystal



研究概要

論文

Ayumu Shimizu¹, Shigeyoshi Usami^{1*},
Masahiro Kamiyama¹, Itsuki Kawanami¹,
Akira Kitamoto¹, Masayuki Imanishi¹,
Mihoko Maruyama¹, Masashi Yoshimura²,
Masahiko Hata³, Masashi Isemura⁴, and
Yusuke Mori¹

High-rate OVPE-GaN crystal growth at a very
high temperature of 1300 °C.

Applied Physics Express. 2022, 15(3), doi:
<https://doi.org/10.35848/1882-0786/ac4fa8>

次世代パワー半導体¹材料として注目されている窒化ガリウム (GaN)²の実用化にあたっては高品質かつ低コストの自立基板が必須である。大阪大学では、原理的に高速成長が可能であり低コスト化に有望な成長手法として酸化物気相成長 (OVPE) 法³の開発に取り組んでいる。しかしながら、本手法は成長中に多結晶⁴を生じやすく高品質ウェハを得ることが困難であった。我々は他成長手法との差を精査することで多結晶の生成要因が OVPE 法で用いる化学反応の高い反応性にあることを突き止めた。熱力学解析によって気相核生成を抑制するように供給ガスの構成を変更したところ、低成長レートではあるものの多結晶が低減されることがわかった。しかし、成長レートの高速化で再び多結晶が増加することが新たな課題として浮上したため、新たなパラメータとして成長温度に着目した。熱力学解析の予想をもとに成長温度を従来の 1200°C から 1300°C と GaN では通常用いられない温度にまで上昇させることで多結晶を抑制しつつ 200 μm/h の高速成長が実現可能であることを示した。

高温成長による OVPE-GaN の多結晶抑制

背景

大阪大学では、2010年ごろより10年以上にわたってGaNの高速成長技術の1つである酸化物気相成長(OVPE)法の開発に着手している。概略図を図1に示すように、OVPE法は酸化ガリウム(Ga_2O_3)とアンモニア(NH_3)の気相反応によってGaNを生成する手法である。図1中の化学反応式に示すように、式の右辺の副生成物は水蒸気および水素のみとなっているため、未反応 NH_3 との反応によって固体の副生成物を生じない。ゆえに、当手法は従来技術の水素化物気相成長(HVPE)法において課題となる NH_4Cl による排気管閉塞を解消し、バルク成長を実行可能なポテンシャルを有している。しかしながら、実際に当該手法でGaN育成を行うと基板の上に多くの多結晶が観察され、開発当初は単結晶を得ることが困難と思われた(図2)。ここでいう多結晶とは、種基板から配向のずれた微結晶領域を指す。OVPE法では種となるGaN基板を用意し、その結晶情報を引き継がせて同種材料を成長させるホモエピタキシャル成長法を利用しているため、多結晶との粒界には結晶欠陥が密集し、半導体デバイスの性能を著しく低下させる。そのため、ウェハ全域で単結晶を得ることは高品質・高性能なパワー半導体を作製するうえで重要である。本稿ではOVPE法の多結晶低減と高速成長の取り組みについて近年の研究成果を紹介する。

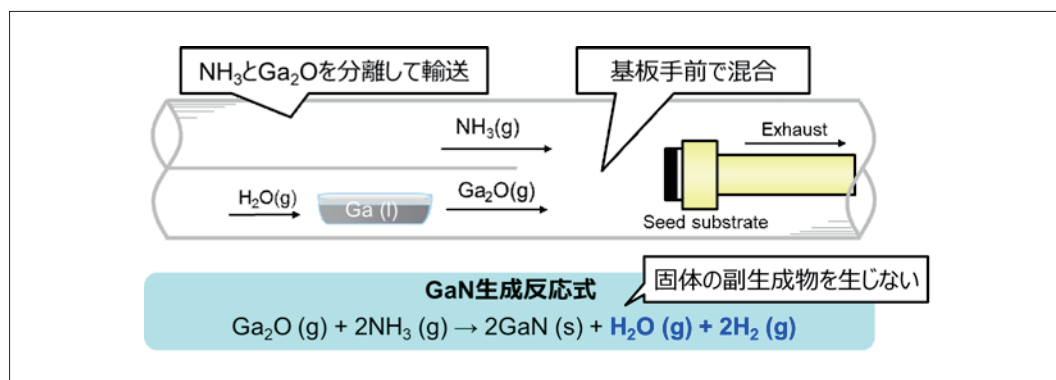


図1 OVPE法の概略図。

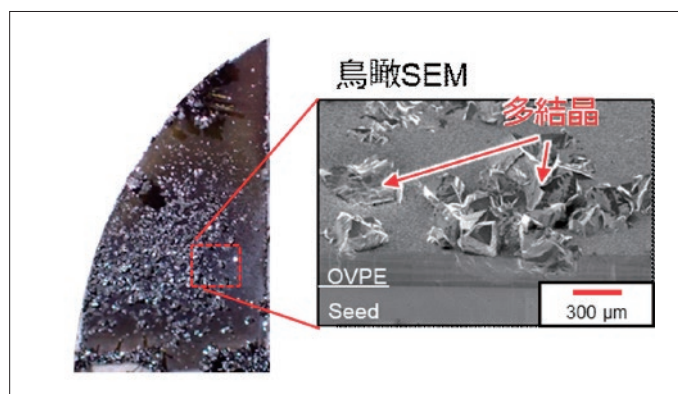


図2 多結晶を生じたOVPE-GaN結晶写真と多結晶の鳥瞰SEM像。

P34に用語解説があります(上付き番号に対応)

OVPE 法における多結晶の抑制

我々は、第一段階として多結晶抑制に取り組んだ。多結晶を発生させる要因について他の気相成長手法との差について精査したところ、GaN 生成の化学反応自体にたどり着いた。化合物半導体の気相成長法⁵では、原料輸送中に化学反応が進行することを防ぐため原料を分離して輸送し、基板手前で混合させることが一般的に行われる。しかし、混合されたガスの化学反応が激しく進展する場合、基板上空で微結晶を生じ、それらが基板に飛来・付着することで多結晶を発生しうる。化学反応が微結晶を生じやすいかどうかは原料の「過飽和比」から推定可能であるため^[1]、まずは OVPE 法において Ga₂O の過飽和比が一体どの程度であるのかについて熱力学解析より算出した。その結果、多結晶を生じた成長条件では、Ga₂O の過飽和比が HVPE 法の 100 倍程度と非常に高く、多結晶を生じやすい条件であったことがわかった。次に、同計算によって多結晶を抑制可能な低過飽和比となる成長条件を探索したところ、総ガス流量に対して NH₃ の割合を相対的に下げ、キャリアガスとして H₂ を導入することで多結晶が抑制されると示唆された。実際にその方向へ成長条件を移行させたところ、図 3 に示すように狙い通り多結晶の発生が抑制され、60 μm/h と低速ではあるものの OVPE 法で初めて厚膜成長が可能となり、OVPE 自立基板を得るに至った^[2]。

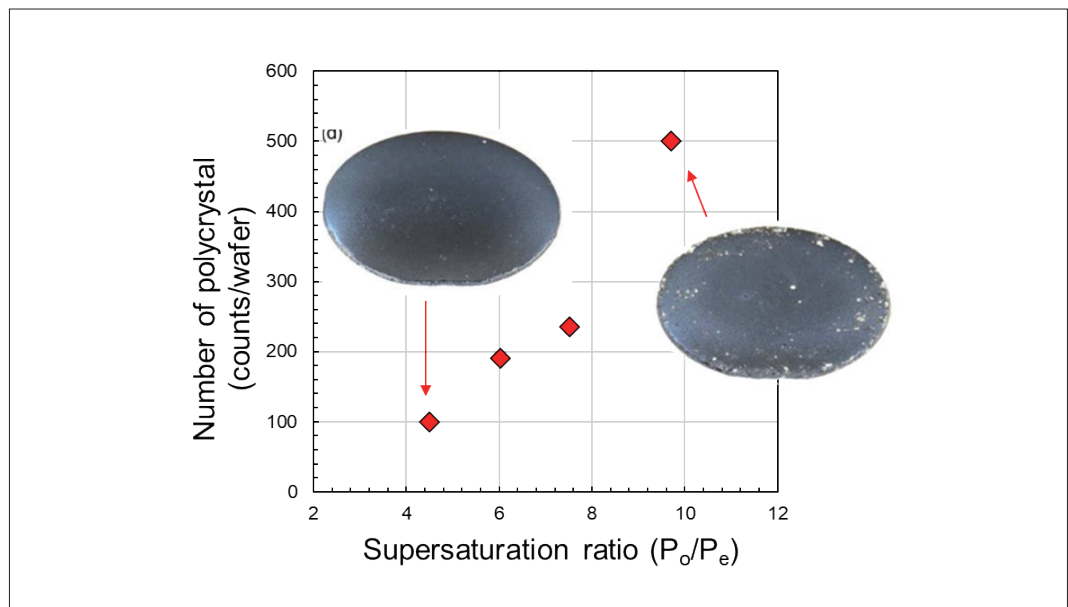
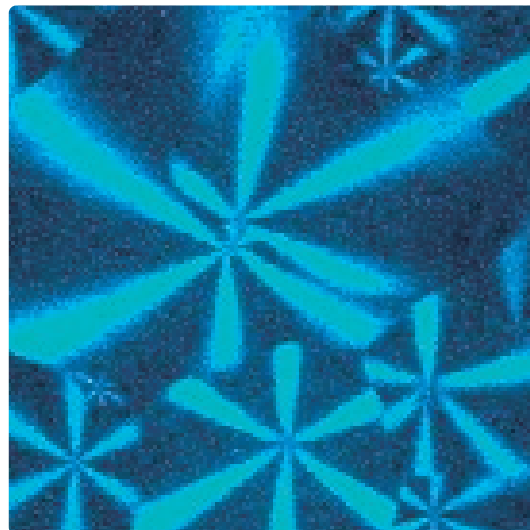


図 3 Ga₂O 過飽和比と多結晶量の関係。



OVPE 法における高速成長と多結晶抑制

GaN 基板を低コストで製造するには多結晶抑制に加え、成長速度の高速化による生産性の向上が必須である。そこで OVPE-GaN の高速成長に取り組むこととした。しかしながら、Ga 源の供給量を増やして高速成長を行うと、多結晶が再び増加に転じ高速成長と多結晶抑制の両立が新たな課題として浮上することとなった。ガス条件の変更のみでは成長速度の向上に限界を迎えたため、成長温度のパラメータを含めて熱力学解析より条件探索を行った。その結果、成長温度を上昇させることで高速成長条件下においても多結晶を抑制できることが示唆されたため、我々は 1300°C という GaN 成長では通常用いられない温度帯にて育成を試みたところ、図 4 に示すように 200 $\mu\text{m}/\text{h}$ と量産に十分な成長速度において多結晶を抑制することに成功した^[3]。

また、本成長条件で作製した結晶の酸素濃度を分析したところ、酸素は 10^{20} cm^{-3} と超高濃度に混入していることがわかった。しかしながら、結晶の品質は種結晶と同等であり、高濃度ドーピング下においても OVPE-GaN は結晶品質の劣化を生じないという他の結晶材料には見られない稀有な特性を有していることが明らかとなった。酸素は GaN 結晶中でドナー（電子供給源）として働くため、基板抵抗率が $10^{-4} \Omega \text{ cm}$ 台とパワー半導体材料の中で最も低く、OVPE 法によって超低抵抗な自立基板の作製が可能となることがわかった^[2]。

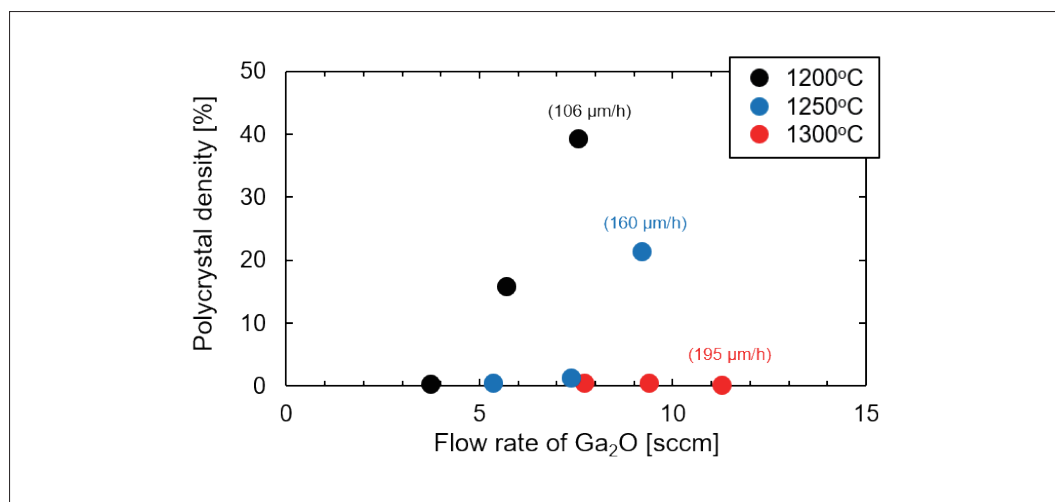


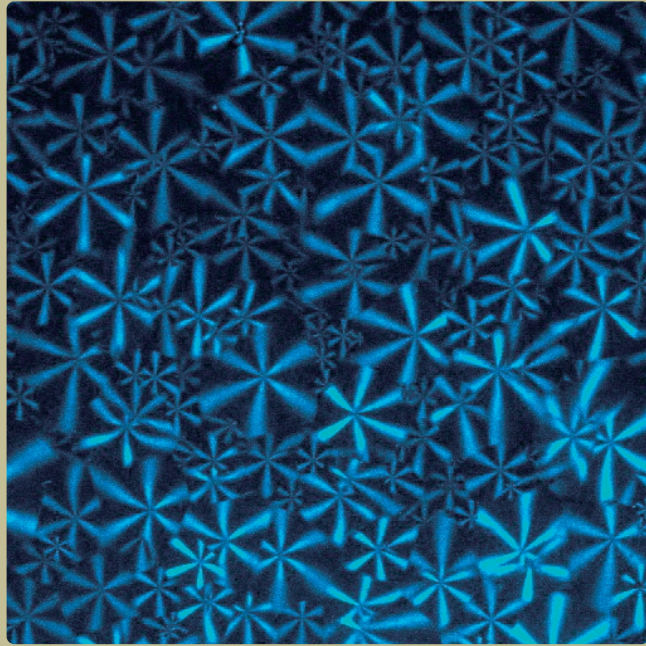
図 4 成長温度と多結晶量の関係。

まとめ

本稿では OVPE 法における GaN 成長の進展について紹介した。OVPE 法では多結晶生成と高速成長の両立に課題があったが、気相反応を抑制する方向にガス構成を移行し、成長温度を上昇させることで解決され、200 $\mu\text{m}/\text{h}$ の高い成長レートを実現した。OVPE 法は高品質かつ低抵抗な GaN 自立基板を低コストに作製可能な手法として有望と言える。

参考文献

- [1] 後藤芳彦著, (2003 年) 『結晶成長』内田老鶴圃, pp. 29-35.
- [2] J. Takino et al., *Jpn. J. Appl. Phys.* 58, SC1043 (2019).
- [3] A. Shimizu et al., *Appl. Phys. Express* 15, 035503 (2022).



用語解説

1 | 次世代パワー半導体

炭化ケイ素 (SiC) や窒化ガリウム、酸化ガリウムなど Si よりも優れた物性値を有する半導体材料です。炭化ケイ素は近年、電気自動車への採用が拡大しています。また GaN は携帯充電器に採用されるなど身近になってきています。

2 | GaN

窒化ガリウム。青色 LED の材料であり、2014 年に赤崎勇先生、天野浩先生、中村修二先生がノーベル物理学賞を受賞されたことでも知られています。

3 | OVPE (Oxide Vapor Phase Epitaxy) 法

酸化物気相成長法。ガリウムと水蒸気の反応から Ga_2O ガスを生成し、基板上で NH_3 と反応させることで GaN 結晶を得る気相成長法です。

4 | 多結晶

気相成長法では、元となる基板の結晶情報を引き継がせて所望の結晶を成長させるエピタキシャル成長法が用いられます。多結晶は元となる結晶から配向がずれてしまった結晶を指します。多結晶は最終的に半導体デバイスの不良につながりますので、多結晶の発生を抑制して単結晶を得ることが重要となります。

5 | 気相成長法

気相成長は、その名の通り気相 (気体) 中で結晶を合成する手法です。液体中で合成する場合は液相成長法と言います。

Q&A

- Q1** | **なぜ次世代パワー半導体の研究開発が進められているのでしょうか。
また次世代パワー半導体の実用化にはどういった課題があるのでしょうか。**

脱炭素社会の実現に向け低消費電力社会の実現は急務と言えます。現在主流の Si 半導体は効率の限界に近づいており、我々は次世代パワー半導体材料である窒化ガリウム (GaN) の研究を行っております。GaN の実用化にあたって結晶品質の低さや高い製造コストがこれまで大きな課題でしたが、多くの研究者の努力によって高品質結晶が実現され、製造コストについても克服されつつあります。

- Q2** | **次世代パワー半導体の研究開発において
多光子励起顕微鏡が用いられているのはなぜでしょうか？
また多光子励起顕微鏡を用いて先生がすでに取り組まれている研究はなんのでしょうか。**

これまで結晶欠陥の観察はカソードルミネセンス法やエッチピット法などが主であり、表面の転位分布を見ることができても転位の追跡評価は困難でした。そのため、転位がどこで生じてどのように貫通してくるのか成長履歴に対する転位伝搬挙動は不明でした。多光子励起顕微鏡を用いることで GaN 結晶内部の欠陥を 3 次元的に可視化できるようになり、結晶の欠陥をなくすにはどのようにすれば良いのか、次の一手を考える極めて強力なツールとなっています。

- Q3** | **これからの産業をリードすると期待される本テーマを研究されていますが、
研究を進めていくうえでの難しさ、
そして先生にとって研究を推し進めていく原動力はなんのでしょうか。**

GaN パワーデバイスの一刻も早い社会実装が望まれており、現在国家プロジェクトとして他大学や企業と連携して研究を推進しております。結晶に求められるスペックを達成することに難しさを感じることもありますが、日々進化する GaN 結晶をこの目で見ていること、また社会からの期待を常に感じながら研究できることが楽しく、研究を進める原動力となっています。

審査員より

- 無機質の金属である GaN が、結晶になると美しい花模様を形成している。大きさだけでなく形も微妙に異なっており、自然に咲き乱れた花畑のようで美しい。
- まるで万華鏡を彷彿とさせる結晶の顕微鏡画像である。強いインパクトと美しさが共存しており、驚かせられる。
- 非生物学的なテーマで十分な意義も認められるが、芸術性は最も高いと思う。
- 雪の結晶のようで美しい。
- 結晶の光が放つ静謐で緻密な美しい世界。印象画やテキスタイルの柄を想起させる。
- 結晶の形と青の色彩に不思議な魅力を感じます。
- 結晶の広がりにも不思議な感覚を覚えた。
- 結晶の重なりや色味に深みがあり、純粋に美しい。
- 花びらのように舞い広がる結晶の世界がただただ純粋に美しい。
- メルヘンな世界が美しい。

2021 受賞者



【最優秀 JOICO 賞】

広視野 2 光子顕微鏡が明らかにした
大脳新皮質神経細胞の
ネットワークダイナミクス

太田 桂輔

東京大学大学院医学系研究科
脳神経医学専攻 神経生化学分野 助教/
理化学研究所 脳神経科学研究センター
客員研究員



【優秀賞】

マウス精巣上体における
分泌プロテアーゼ OVCH2 の発現

浄住 大慈

大阪大学微生物病研究所
遺伝子機能解析分野 助教



【特別賞】

細胞核、ミトコンドリア、色素体の
3 種類のゲノムを 1 つの色素で区別する
DNA 染色色素 (Kakshine) による
蛍光寿命イメージング像

佐藤 良勝

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
ライブイメージングセンター 特任准教授/
名古屋大学院理学研究科生命理学専攻
光生物学グループ



【特別賞】

ヒトの筋膜構造
- 拡がるネットワーク -

西澤 志乃

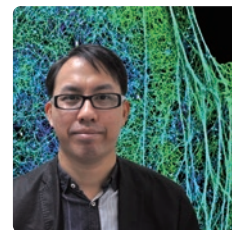
株式会社ファンケル 総合研究所
研究員

2020 受賞者



佐田 亜衣子

熊本大学国際先端医学研究機構
皮膚再生・老化学講座 特任准教授



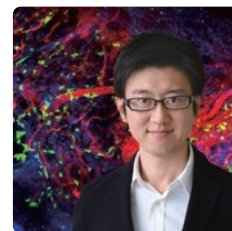
タムケオ ディーン

京都大学 医学研究科
創薬医学講座 特定准教授



石川 智愛

慶應義塾大学 医学部・薬理学
助教



長谷川 哲雄

慶應義塾大学 医学部
リウマチ膠原病内科 助教
川崎市立川崎病院 リウマチ膠原病内科
副医長

2019 受賞者

【最優秀 JOICO 賞】

皮膚再生を司る
上皮幹細胞コンパートメント
～見ることで見えてくる幹細胞の不思議～



豊田 正嗣

埼玉大学大学院 理工学研究科 准教授

【最優秀 JOICO 賞】

植物の長距離・
高速カルシウムシグナル

【優秀賞】

セルトリ細胞皮質下アクチン繊維
ナノアーキテクチャーの
超解像イメージング



水多 陽子

名古屋大学
高等研究院・トランスフォーマティブ生命分子研究所
特任助教

【優秀賞】

花のなかの秘密

【特別賞】

高精度な配線が実現する
記憶再生時のシークエンス入力



江川 遼

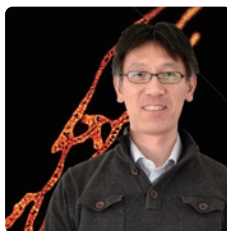
名古屋大学大学院 医学系研究科
細胞生理学分野 特任助教

【特別賞】

両耳間時差を検出する
脳幹聴覚神経回路

【特別賞】

関節破壊を惹起する
悪玉破骨細胞の同定



多喜 正泰

名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所
特任准教授

【特別賞】

細胞飢餓状態で発達した
ミトコンドリア内膜の
超解像画像

審査員



石井 優 先生

大阪大学大学院
教授



小原 圭吾 先生

関西医科大学
講師



根本 知己 先生

自然科学研究機構
生命創成探究センター長
生理学研究所・教授



平井 宏和 先生

群馬大学大学院
教授



宮脇 敦史 先生

理化学研究所
チームリーダー

記念品・参加特典



受賞者の方々への記念品、そしてご応募いただいた方へお送りする参加特典は、ニコンでデザイン、またできる限りニコンで制作をしています。

記念品となる盾は、ニコンの金属 3D プリンター Lasermeister を用いて造形、受賞者の方々のお名前をレーザー刻印しています。最優秀 JOICO 賞は、ニコンが 1925 (大正 14) 年に発売されたニコン設計による初の顕微鏡“JOICO”をイメージした盾を立体的に作成、優秀賞、特別賞もまた“JOICO”をデザイン、造形しています。また参加特典となるワッペンも、毎年 NIKON JOICO AWARD をイメージし、異なるデザイン、色で表現しています。

NIKON JOICO AWARD だけでなく実現できない記念品や参加特典。ぜひ研究者の皆様方に手に取っていただきたく、来年のご応募をお待ちしております。

“JOICO (ジョイコ)”とは、当時の社名である日本光学工業株式会社を直訳した“Japan Optical Industry Co.”の頭文字をとってつくられた商標です。

株式会社ニコン デザインセンター

橋本 信雄

センター長

斎藤 久美子

コーポレートブランディンググループ
グループ長

岩村 暢彦

エクスペリエンスデザイングループ
グループ長

馬場 健司

IDグループ
グループ長

前川 明哉

UI & インタラクションデザイングループ
グループ長

今野 純

コミュニケーションデザイングループ
グループ長

制作・デザイン：株式会社ニコン

望月 みちる

デザインセンター

鳴嶋 弘明

デジタルソリューション事業部

内山 千聖

デザインセンター

NIKON JOICO AWARD

発行責任者：株式会社ニコンソリューションズ

バイオサイエンス営業本部 営業企画部 営業戦略課

〒140-0015 東京都品川区西大井 1-6-3

TEL : 03 (3773) 8138

E-mail : Nsl-bio.Marketing@nikon.com

Website : <https://www.healthcare.nikon.com/ja/ss/joicoaward/>

株式会社ニコンソリューションズ





NIKON SOLUTIONS CO., LTD.