

2016年度 生物工学奨励賞（斎藤賞） 受賞



セルフリータンパク質合成系を用いた 進化分子工学技術の開発

松浦 友亮



In vitro evolution of proteins using cell-free protein synthesis system

Tomoaki Matsuura (*Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871*) *Seibutsu-kogaku* **95**: 121-126, 2017.

はじめに

細胞を構成する多くの分子が明らかになってきた現在、*in vitro*で生体分子を組み合わせて細胞もしくは生命システムを再構成する試みがある。この構成的アプローチ (*in vitro*合成生物学)により何が明らかになる、もしくは達成できるだろうか¹⁾。生命システムを再構成することができれば、そのシステムを構築するための必要十分条件が明らかになる。また、既知の部品を組み合わせているにもかかわらず、生命システムを構築するプロセスで新しい現象や性質が見いだされることもある。さらに、上記のような解明型の研究とは異なり、新しいテクノロジーが生まれることもある。

筆者はさまざまな生命システムを生物の主要構成成分である低分子、タンパク質、核酸、脂質から再構成してきた。本稿ではそのうち再構成システムを用いることで生まれた新しいテクノロジーを紹介する。約100種類の分子を組み合わせてできるリポソームディスプレイ法と呼ばれるこのテクノロジーは、これまでは困難であった膜タンパク質の進化分子工学を可能とした(図1)。

リポソームディスプレイ法では、細胞サイズのリポソーム内でセルフリータンパク質合成系により1分子のDNAを鋳型として膜タンパク質を合成する。次にリポソーム膜上に存在する膜タンパク質の機能をハイスループットに計測・スクリーニングする。これらを達成するために必要であった二つの要素技術開発：(1)再構成型セルフリータンパク質合成系の合成活性の最適化、

(2)細胞サイズのリポソームの調製法とその内部でのセルフリータンパク質合成技術の確立、について解説し続いてリポソームディスプレイ法で得られた成果を紹介する。最後に本技術の展望を議論する。

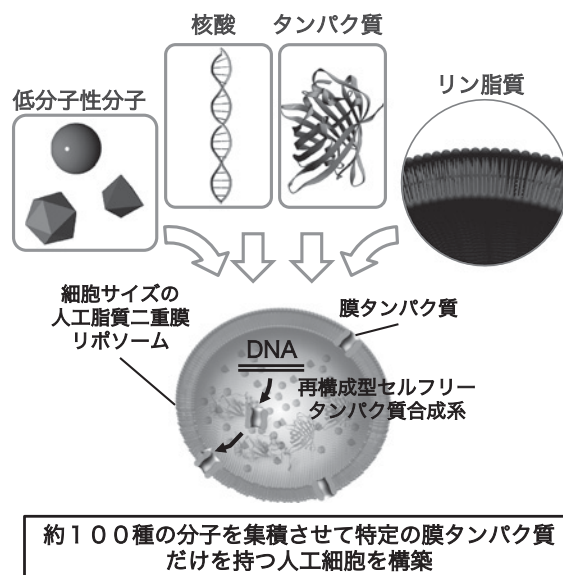


図1. リポソームディスプレイ法の概略図。再構成型セルフリータンパク質合成系を用いてリポソーム内部で膜タンパク質を1分子のDNAから合成する。これにより膜に特定の膜タンパク質を局在させ、加えて進化分子工学に必要な遺伝型と表現型のリンクを確立する。特定の膜タンパク質をリポソーム膜上に提示(ディスプレイ)できることからリポソームディスプレイ法と名付けた。

著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物工学コース (准教授)
E-mail: matsuura_tomoaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

再構成型セルフリータンパク質合成系の 合成活性の最適化

タンパク質合成反応は、細胞内でもっとも重要な反応の一つであり古くから研究されてきた。その結果、バクテリアのタンパク質合成反応に関してこれを構成する基本成分は明らかになった。しかしながらこれらの成分を組み合わせるだけで本当にタンパク質合成反応が進行するのは自明ではなかった。2001年東京大学の上田卓也教授らは、大腸菌の翻訳反応の必須成分を単離精製し、これを試験管内で再構成することによりタンパク質合成反応が行える再構成型セルフリータンパク質合成系PURE systemを開発した^{2,3)}。構成成分のいずれを取り除いてもタンパク質合成活性が低下したことから、PURE systemを構成する成分が翻訳反応の最小成分であることが実験で明らかになった。

一方で、再構成型セルフリータンパク質合成系の合成量やタンパク質合成速度は大腸菌のそれに遠く及ばないものであった。リポソームディスプレイ法ではリポソーム内で1分子のDNAを鋳型としてタンパク質を合成する。このときより多くのタンパク質が合成されるほうがタンパク質の機能検出が容易になる。再構成系はすべての構成成分濃度を自在に変えることが可能である。筆者らはこの性質を利用して、主に二つの手法で再構成型セルフリータンパク質合成系のタンパク質合成活性の最適化を目指した^{4,5)}。その後、二つの成果に基づき翻訳速度を10倍以上向上させ4 mg/mLのタンパク質を合成する世界最高レベルの再構成型セルフリータンパク質合成系の開発に成功した(図2)⁶⁾。

一つ目として、新たに成分を添加することで合成活性

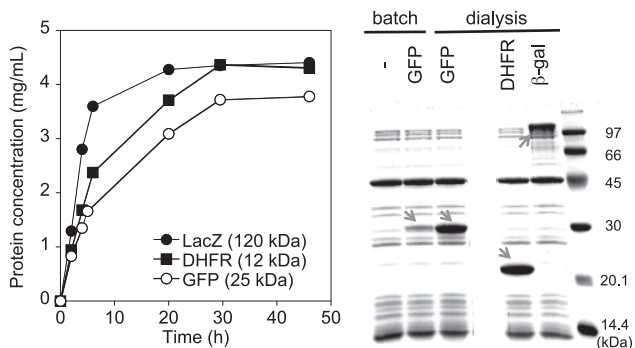


図2. 開発した再構成型セルフリータンパク質合成系を用いたタンパク質合成。要素間相互作用の情報をもとに構成成分の濃度を調整することで合成活性を向上させた反応系を開発した。(左)透析法で合成するとさまざまなサイズのタンパク質が4 mg/mL程度合成できる。(右)合成された産物はクマシー染色でも明瞭に確認できる。

の向上を図ることを目指した。具体的には、再構成型セルフリータンパク質合成系に全大腸菌ORF約4200種類をそれぞれ加え、GFP合成反応に与える影響を網羅的に調べた。その結果、約7%の遺伝子産物がGFP合成反応を促進する効果があることを明らかにした⁵⁾。二つ目として、69種の構成成分の濃度を調整することで合成活性の向上を図ることを目指した。具体的には、69成分の相互作用解析を行い、3体相互作用以上が活性に及ぼす影響は無視できるほど小さいことを実験データと数理モデルにより解析することで明らかにし、その結果をもとに合成活性の向上を達した⁴⁾。これらの成果を合わせて大腸菌に近い合成活性を示すシステムを人工的に構成することに成功した⁶⁾。最適化の末に構築した再構成型セルフリータンパク質合成系でタンパク質を合成すると、反応後に反応系に含まれるタンパク質量の30%は合成されたタンパク質由来となった。これはタンパク質を過剰発現させた大腸菌に匹敵する割合である。本成果をもとに開発された再構成型セルフリータンパク質合成系はPUREflex2.0の製品名で販売されている。最近、筆者らのグループでは最小成分からなるタンパク質合成反応(つまり再構成型セルフリータンパク質合成系)の全成分大規模数理モデルの開発に成功した⁷⁾。これにより計算機上で再構成型セルフリータンパク質合成を完全にシミュレーションできるようになった。現在、これを用いてタンパク質合成反応のさらなる理解と再構成型セルフリータンパク質合成系の高機能化を進め、PUREflex3.0, 4.0の開発へとつなげていきたいと考えている。

細胞サイズのリポソームの調製法と その内部でのセルフリータンパク質合成技術の確立

人工脂質二重膜リポソームは、一般にそのサイズや形状によって異なる名前と呼ばれる⁸⁾。具体的には、単層膜(unilamellar)か多重膜(multilamellar)であるかを示す膜多重性、もう一つはサイズによってsmall(直径~20 nm), large(~200 nm), giant(>1 μm)と呼び名が分かれている。本研究では、内部にセルフリータンパク質合成系を内包し、かつ膜タンパク質を機能ある形で調製する必要があるため細胞サイズ(1 μm以上)の単層膜リポソームであるgiant unilamellar vesicle(GUV)を用いてきた。

従来のGUV調製法の問題は内部に物質を内包させることが難しい点にあった。2003年にアメリカのグループが初めてwater-in-oil(W/O)エマルションをもとにGUVを調製する方法を報告し^{9,10)}、その後、別のグループがこの方法によりセルフリータンパク質合成系を内包

させたGUVを用いて膜タンパク質を合成できる成果を報告した^{11,12}。このGUVの調製法はW/Oエマルション界面通過法と呼ばれ、現在多くの研究で用いられている(文献13など)。GUV調製は、図3に示すようにリン脂質を溶解させたオイル層にリポソームに内包したい水溶液(リポソームの内液になる)を分散させW/Oエマルションを調製するところから始まる。次に、エマルションを別の水溶液(リポソームの外液になる)の上に重層後、通常遠心機にかけることで、エマルションはオイル-水溶液界面を通過し脂質二重膜が形成する。しかし従来法では調製できる粒子数が大変少ない(数百粒子/mL程度)という問題のため進化分子工学に使えなかった^{11,12}。

そこで東京大学の豊田太郎先生らとの共同研究によりリポソーム内液と外液に比重差をつけることで、遠心

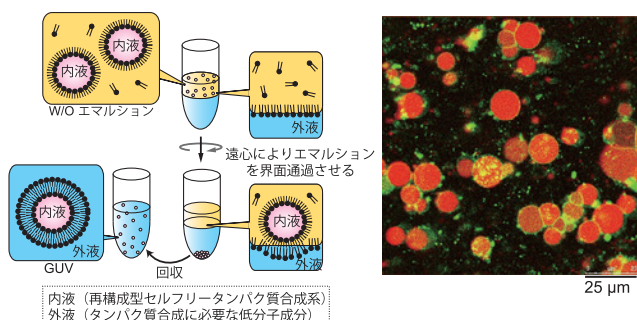


図3. W/Oエマルション界面通過法の概略図と調製されたりポソームの共焦点顕微鏡写真(写真:清崎若菜さん提供)。

により沈降しやすくなり大量のGUVが調製可能となった¹⁴。加えて外液にタンパク質合成反応の基質である低分子成分(アミノ酸やNTPs)を添加しておくことも必須であることがわかった^{15,16}。その結果、 10^8 粒子/mLものリポソームがわずか30分程度で、かつ特殊な装置を用いることなく調製できる手法が構築された。こうして確立された実験系を用いてリポソーム内でGFPを合成してみるとリポソーム内(フェムトリットルfL)と試験管(マイクロリットルμL)ではそのサイズが 10^9 倍も異なるにもかかわらず同様にGFP合成反応が進行することがわかった(図4)¹⁶。

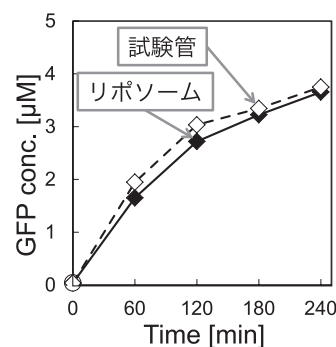


図4. GFP合成反応のタイムコースデータの反応容器による違い。GFP合成はフェムトリットルの容器であるリポソームでも、マイクロリットルの容器であるエッペンチューブでも同じように進行する。

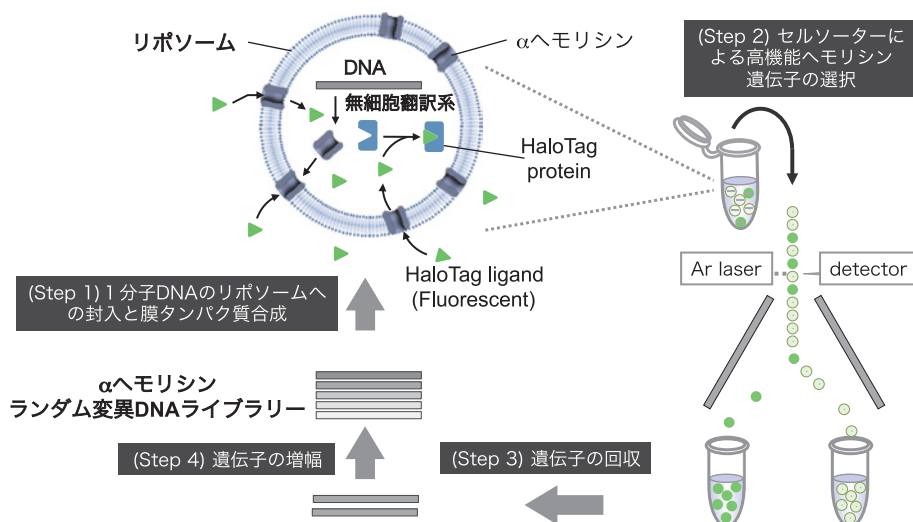


図5. リポソームディスプレイ法による膜タンパク質の進化分子工学の概略図。

1. 膜タンパク質変異体DNAライブラリーを各リポソームに約1分子DNAずつ再構成型セルフリータンパク質合成系とともに封入し、内部で膜タンパク質を合成する。ここではαヘモリシンを例に図示している。
 2. 膜タンパク質が外部の蛍光物質を取り込んだリポソームをセルソーター(FACS)で回収する。
 3. リポソームから遺伝子を回収する。
 4. 回収した遺伝子を増幅し、再び最初の遺伝子封入ステップに戻り、操作を繰り返す。
- この操作を繰り返す行うことで、αヘモリシンの機能を30倍向上させた変異体の取得に成功した。

セルフリータンパク質合成系を用いた 膜タンパク質進化分子工学

筆者らは現在までに、上記で紹介した細胞サイズのリポソーム内で複数の異なる膜タンパク質を合成してきた¹⁷⁻¹⁹⁾。リポソームの表面に膜タンパク質を提示（ディスプレイ）できることから、本手法をリポソームディスプレイ法と命名した²⁰⁾。本節ではリポソームディスプレイ法を用いた膜タンパク質の進化分子工学について紹介する。

進化分子工学的手法は、変異と選択のステップを繰り返すことで生体高分子の性質を改良、進化させる方法である。本手法は、有用タンパク質の創出やタンパク質の機能解析に大きく貢献してきた²¹⁻²⁵⁾。本手法が使われ始めた1990年代の当初は有機溶媒中で働く酵素の創出²⁶⁾、最近では製剤の大量生産²⁷⁾、生体内のドーパミンを可視化²⁸⁾、神経ガスを分解する酵素の創出^{29,30)}などが報告されている。また、得られた多数の変異体の配列-機能相関解析などから、タンパク質の機能発現メカニズムの解明にも寄与してきた。

これまでの進化分子工学の標的タンパク質のほとんどは可溶性タンパク質（酵素）であり、膜タンパク質を対象とした例は非常に少ない³¹⁾。細胞がコードする遺伝子の20-30%、製剤のターゲット分子の50%以上は膜タンパク質であるともいわれている。しかし、一般に不溶性であり、かつ異種細胞での発現が困難な膜タンパク質は、少数の例を除いて、進化分子工学の標的タンパク質として扱われてこなかった。膜タンパク質を標的とする手法が構築できれば、タンパク質工学領域におけるイノベーションとなり、膜タンパク質研究だけでなく、創薬、膜タンパク質の産業利用など多方面への波及効果が期待される。

筆者らはリポソームディスプレイ法により *in vitro* で膜タンパク質の進化分子工学を達成した(図5)^{19,20)}。この手法では、GUV内に約1分子のDNAを封入し、内部で再構成型セルフリータンパク質合成系を用いて膜タンパク質を合成することで、進化分子工学に必要な遺伝型と表現型のリンクを達成する。さらに、リポソーム内部で合成された膜タンパク質の機能をセルソーターで評価、スクリーニングすることで、 10^8 程度の多様性を持つライブラリーを扱える。この手法を用いて α ヘモリシンの進化分子工学を行った。

α ヘモリシンは黄色ブドウ球菌から分泌される水溶性膜タンパク質であり、脂質膜上で会合して7量体のナノポアを形成する。野生型 α ヘモリシンは、POPC:cholesterol = 1:1で調製した人工脂質二重膜にポアを形

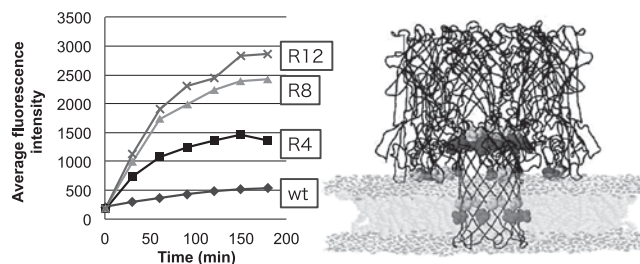


図6. α ヘモリシンの進化分子工学：形成膜タンパク質 α ヘモリシンの実験室進化に成功し、高機能変異体を取得した。FACSを用いて、野生型 α ヘモリシン (wt) に変異と選択を12ラウンド (R12) 繰り返し、ポア形成能の高い変異体を取得した。左図は各ラウンド後の変異体のポア形成活性、右図はR12後に見つかった固定変異を野生型の立体構造にマップしたものの、変異が膜-タンパク質界面に局在していることがわかる。

成する活性が弱い。筆者らは、野生型遺伝子にランダム突然変異を導入したライブラリーからスタートし、スクリーニングを20ラウンド繰り返すことで、人工脂質二重膜上でのナノポア形成活性が30倍程度向上した変異型 α ヘモリシンの作製に成功した(図6)。さらに高機能型変異体の変異箇所を野生型 α ヘモリシンの立体構造上にマップしたところ変異がタンパク質-膜界面に局在していることがわかった。このことから導入された変異が脂質との相互作用に寄与している可能性が示唆された(図6)。

リポソームディスプレイ法の他のタンパク質の 機能進化への応用

リポソームディスプレイ法では、リポソーム内部で合成されたタンパク質の機能を蛍光シグナルに変換する仕組みさえあれば、膜タンパク質に限らず他のタンパク質の機能進化も実行できる。たとえば、北陸先端大の芳坂先生のグループと共同で可溶性タンパク質の一つであるアミノアシル化合成酵素の実験室進化にも成功している³²⁾。また、大腸菌由来多剤排出トランスポーターの一つであるEmrEをモデル膜タンパク質として用い、これがGUV膜上に機能発現可能な形で局在させることが可能であること¹⁸⁾、加えてリポソームディスプレイ法がEmrEの実験室進化にも適用可能であることを示した³³⁾。このように可溶性タンパク質だけでなくポア形成膜タンパク質、トランスポーターなど従来は進化分子工学の対象となり得なかった分子の実験室進化を達成している。

膜タンパク質の機能とリポソームのサイズの関係性

ここまで紹介したリポソームディスプレイ技術は、生体高分子を組み合わせたシステムを用いている。よって、人為的にシステムを構成する要素などを変更・調整する

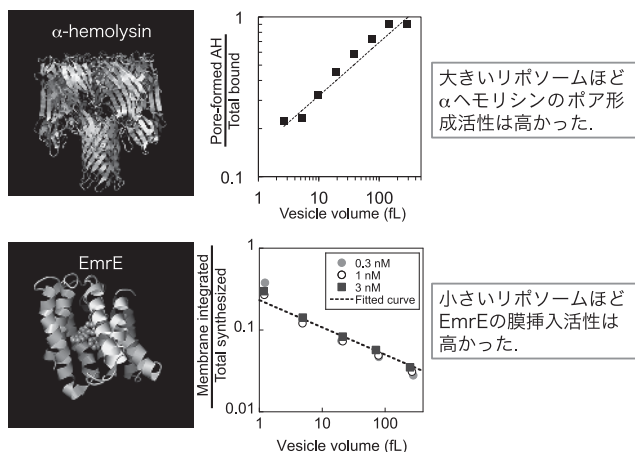


図7. 膜タンパク質活性のリポソームサイズ依存性：(上段)ポア形成膜タンパク質であるαヘモリシンの実験結果, (下段)多剤排出トランスポーターEmrEの実験結果.

ことが可能である. 本節では, このような再構成システムが持つ性質を利用した研究を紹介する.

細胞の多くはマイクロメートルのサイズを持つが, 微小なサイズは内部の反応にどのような影響を与えるだろうか? これを構成的に検証することを目指した. 生細胞では細胞のサイズを変えることは難しいが, 再構成システムではサイズの異なる反応容器を用意し, その内部に生化学反応を封入することが可能である(図1). 具体的には, サイズの異なるリポソーム(脂質二重膜)^{16-18,34}, W/Oエマルション³⁵⁻³⁷, マイクロチャンパー(石英マイクロウェル)^{38,39}を用意し, 内部の生化学反応に反応場のサイズが与える影響を測定した.

ここではリポソーム内部で再構成型セルフリータンパク質合成系を用いて膜タンパク質を合成した例を紹介する(図7). 大腸菌由来の多剤排出トランスポーターEmrEを合成した際には, リポソームが小さいほどEmrEの膜挿入効率が低いことが分かった¹⁸(図7下段). これに対して, ポア形成膜タンパク質であるαヘモリシンを合成した場合には, リポソームが大きいほどポア形成効率が低いことが分かった¹⁷(図7上段). このように膜タンパク質によって小さいサイズを好むものと大きいサイズを好むものが存在することを明らかにした.

おわりに

進化分子工学を用いた可溶性タンパク質の機能改変のため, 1990年代からさまざまなディスプレイ技術(phage display, ribosome displayなど)が開発されてきた. 筆者らの結果は, それらに加えて膜タンパク質を対象とするリポソームディスプレイ法がディスプレイ技術として新たに加わったことを意味する. リポソームディスプレ

イ法は, タンパク質工学領域におけるイノベーションとなり, 創薬, バイオセンサーなどの膜タンパク質の産業利用に展開できることが期待される. 現在, 膜タンパク質を膜へと輸送する装置であるトランスロコンをリポソーム内に再構成することにも成功し⁴⁰, これを用いてリポソームディスプレイ法を真核生物由来膜タンパク質のスクリーニング・進化分子工学に発展させることを目指して研究を進めている.

相互作用する多数の分子から構成されている生命システムを理解するため, 個々の分子を取り出しその性質を調べてもわからない点も多い. 部品から生命システムを再構成しこれを調べることで, システムを創り出すために必要なルールおよびシステムの動作原理を明らかにする. このような構成的生物学(*in vitro*合成生物学)と呼ばれる分野の研究を中心に行ってきた. 本稿を通してこのような構成的アプローチの有用性・おもしろさを少しでも感じ取っていただけると幸いである.

謝 辞

本稿で紹介した研究成果は大阪大学大学院工学研究科, 大阪大学大学院情報科学研究科で行われたものです. 研究する場と機会を与えていただいた専攻・教室の先生方, 直接ご指導いただいた先生方をはじめとして共に研究をしてきた同僚, 研究員, 研究補助員, 学生さんに深く感謝します. 多くの良い出会いなしには本研究は成立できませんでした. 本研究の一部は科学技術振興機構, 日本学術振興会の支援を得て行われたものです.

文 献

- 1) Kaneko, K.: Life: an introduction to complex systems biology, Springer-Verlag New York Inc (2006).
- 2) Shimizu, Y., Kanamori, T., and Ueda, T.: *Methods*, **36**, 299-304 (2005).
- 3) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T.: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751-755 (2001).
- 4) Matsuura, T., Kazuta, Y., Aita, T., Adachi, J., and Yomo, T.: *Mol. Syst. Biol.*, **5**, 297 (2009).
- 5) Kazuta, Y., Adachi, J., Matsuura, T., Ono, N., Mori, H., and Yomo, T.: *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 1530-1540 (2008).
- 6) Kazuta, Y., Matsuura, T., Ichihashi, N., and Yomo, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 554-557 (2014).
- 7) Matsuura, T., Tanimura, N., Hosoda, K., Yomo, T., and Shimizu, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E1336-E1344 (2017).
- 8) Walde, P. and Ichikawa, S.: *Biomol. Eng.*, **18**, 143-177 (2001).
- 9) Pautot, S., Frisken, B. J., and Weitz, D. A.: *Langmuir*, **19**, 2870-2879 (2003).
- 10) Pautot, S., Frisken, B. J., and Weitz, D. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 10718-10721 (2003).

- 11) Noireaux, V., Bar-Ziv, R., Godefroy, J., Salman, H., and Libchaber, A.: *Phys. Biol.*, **2**, P1–8 (2005).
- 12) Noireaux, V., Bar-Ziv, R., and Libchaber, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12672–12677 (2003).
- 13) Yanagisawa, M., Iwamoto, M., Kato, A., Yoshikawa, K., and Oiki, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 11774–11779 (2011).
- 14) Nishimura, K., Hosoi, T., Sunami, T., Toyota, T., Fujinami, M., Oguma, K., Matsuura, T., Suzuki, H., and Yomo, T.: *Langmuir*, **25**, 10439–10443 (2009).
- 15) Nishimura, K., Matsuura, T., Sunami, T., Fujii, S., Nishimura, K., Suzuki, H., and Yomo, T.: *Rsc Adv.*, **4**, 35224–35232 (2014).
- 16) Nishimura, K., Matsuura, T., Nishimura, K., Sunami, T., Suzuki, H., and Yomo, T.: *Langmuir*, **28**, 8426–8432 (2012).
- 17) Fujii, S., Matsuura, T., and Yomo, T.: *ACS Chem. Biol.*, **10**, 1694–1701 (2015).
- 18) Soga, H., Fujii, S., Yomo, T., Kato, Y., Watanabe, H., and Matsuura, T.: *ACS Synth. Biol.*, **3**, 372–379 (2014).
- 19) Fujii, S., Matsuura, T., Sunami, T., Kazuta, Y., and Yomo, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16796–16801 (2013).
- 20) Fujii, S., Matsuura, T., Sunami, T., Nishikawa, T., Kazuta, Y., and Yomo, T.: *Nat. Protoc.*, **9**, 1578–1591 (2014).
- 21) Lutz, S.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21**, 734–743 (2010).
- 22) Tracewell, C. A. and Arnold, F. H.: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**, 3–9 (2009).
- 23) Romero, P. A. and Arnold, F. H.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 866–876 (2009).
- 24) Jackel, C., Kast, P., and Hilvert, D.: *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 153–173 (2008).
- 25) Matsuura, T. and Yomo, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 449–456 (2006).
- 26) Moore, J. C. and Arnold, F. H.: *Nat. Biotechnol.*, **14**, 458–467 (1996).
- 27) Fox, R. J., Davis, S. C., Mundorff, E. C., Newman, L. M., Gavrilovic, V., Ma, S. K., Chung, L. M., Ching, C., Tam, S., Muley, S., and other XXX authors: *Nat. Biotechnol.*, **25**, 338–344 (2007).
- 28) Shapiro, M. G., Westmeyer, G. G., Romero, P. A., Szablowski, J. O., Kuster, B., Shah, A., Otey, C. R., Langer, R., Arnold, F. H., and Jasanoff, A.: *Nat. Biotechnol.*, **28**, 264–270 (2010).
- 29) Goldsmith, M., Ashani, Y., Simo, Y., Ben-David, M., Leader, H., Silman, I., Sussman, J. L., and Tawfik, D. S.: *Chem. Biol.*, **19**, 456–466 (2012).
- 30) Gupta, R. D., Goldsmith, M., Ashani, Y., Simo, Y., Mullokandov, G., Bar, H., Ben-David, M., Leader, H., Margalit, R., Silman, I., Sussman, J. L., and Tawfik, D. S.: *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 120–125 (2011).
- 31) Magliery, T. J., Lavinder, J. J., and Sullivan, B. J.: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15**, 443–451 (2011).
- 32) Uyeda, A., Watanabe, T., Kato, Y., Watanabe, H., Yomo, T., Hohsaka, T., and Matsuura, T.: *ChemBiochem*, **16**, 1797–1802 (2015).
- 33) Uyeda, A., Nakayama, S., Kato, Y., Watanabe, H., and Matsuura, T.: *Anal. Chem.*, **88**, 12028–12035 (2016).
- 34) Sunami, T., Hosoda, K., Suzuki, H., Matsuura, T., and Yomo, T.: *Langmuir*, **26**, 8544–8551 (2010).
- 35) Matsuura, T., Hosoda, K., Kazuta, Y., Ichihashi, N., Suzuki, H., and Yomo, T.: *ACS Synth. Biol.*, **1**, 431–437 (2012).
- 36) Bansho, Y., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Matsuura, T., Suzuki, H., and Yomo, T.: *Chem. Biol.*, **19**, 478–487 (2012).
- 37) Urabe, H., Ichihashi, N., Matsuura, T., Hosoda, K., Kazuta, Y., Kita, H., and Yomo, T.: *Biochemistry*, **49**, 1809–1813 (2010).
- 38) Okano, T., Matsuura, T., Suzuki, H., and Yomo, T.: *ACS Synth. Biol.*, **3**, 347–352 (2014).
- 39) Okano, T., Matsuura, T., Kazuta, Y., Suzuki, H., and Yomo, T.: *Lab Chip*, **12**, 2704–2711 (2012).
- 40) Ohta, N., Kato, Y., Watanabe, H., Mori, H., and Matsuura, T.: *Sci. Rep.*, **6**, 36466 (2016).