

2016年度 生物工学功績賞 受賞

短鎖ペプチドの 新機能発現に関する研究

本多 裕之



Provision of new function for short-chain peptide

Hiroyuki Honda (*Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603*) *Seibutsu-kogaku* **95**: 64-70, 2017.

はじめに

ペプチドはアミノ酸のポリマーである。その配列はきわめて重要であり、その配列を最適化することでさまざまな機能を持つペプチドがデザインでき、ペプチドは配列置換によって改良・改変が可能である。筆者らは、ペプチド固相合成法という手法で、ペプチドをアレイ状にスポット合成する装置を使っている(図1)。これで数百種類のペプチドを合成し、機能性ペプチドを精力的に探索している。ペプチドはアミノ酸20種類の組合せであることから6-merであっても6400万種類にも及ぶ多様性をもつ。19-merでは20の19乗種類になる。これらの種類の分子が、すべて1分子ずつ合成できたとすると、約40 kg、37-merでは 6×10^{27} gとなり、地球と同じ重

量となる。また単分子膜が形成できるとすれば1 gで1000 m²に達し、17-merのワールド(約45 g)で、野球場のグラウンドの面積(13,000 m²)の3倍に達する。このような膨大なバリエーションをもつペプチドワールドは、医薬品原薬や機能性食品素材のリード化合物探索のためのライブラリーにふさわしいと考えられる。

10数年前より、このペプチドの多様性に魅了され、細胞やタンパク質・酵素に作用することで機能性食品素材あるいは医薬品原薬として利用価値のある機能性短鎖ペプチドの探索を進めるとともに、ターゲット分子との相互作用に関する学理の探索を目指している。特に、私たちは、タンパク質などの生体分子と結合して機能するペプチドを多数探索している。細胞に結合して細胞死や増殖分化シグナルを伝えるペプチドも探索した。たとえば、コレステロールの吸収は、腸管内でコレステロールを巻き込んだ胆汁酸ミセルを形成し吸収される。筆者らが探索したコレステロール吸収阻害ペプチド(たとえばPWWMY)は、疎水性分子である胆汁酸の一種、タウロコール酸(log*P*値=2.2の疎水性分子)に結合できる比較的疎水性の高い分子である¹⁾。胆汁酸ミセルの形成阻害やミセル崩壊活性を示すことでコレステロール吸収を阻害する。アミラーゼ阻害ペプチド(RHWYYRYW)はαアミラーゼの多糖結合ポケットに対して基質である多糖に先回りして結合できる多糖構造を模倣できるペプチドである²⁾。タンパク質分子を形成するL型のアミノ酸に限ってみても、その等電点は、10.76(アルギニン)から2.77(アスパラギン酸)、疎水度は、log*P*=-4.2(アルギニン)から-1.05(トリプトファン)である。さら

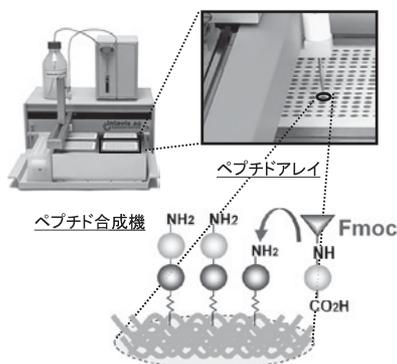


図1. ペプチドアレイ作製装置と合成法。合成機はシリンジポンプにつながったX-Yスポットター。コンピュータ制御で目的の位置にアミノ酸をスポットティングできる。

著者紹介 名古屋大学工学研究科(教授) E-mail: honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

にペプチド結合でポリマーになれば、疎水性は大きく増大し、有機溶媒の疎水度に到達する。物理化学的性質だけでもケミカルライブラリーとしての高い可能性が感じられる。さらに、生物学的相互作用も期待できるため、“生体内分子と結合して機能を発揮するリード化合物の探索”という場面ではよりいっそう魅力的である。

実際に、ペプチドは短鎖でも機能性を持つものが知られている。血圧安定化作用を示すペプチド（ラクトリペプチド）や細胞接着ペプチド（RGD）はその好例である。筆者らは、この魅力的な、そして非常に膨大なワールドを探索フィールドにするため、①まず数百種類の短鎖ペプチドをペプチドアレイにより合成し、機能性ペプチドを探索する、②次にそれらの機能性ペプチドの特徴を、特定位置のアミノ酸の特徴で説明するという探索法を提案している^{3,4)}。創薬や機能性食品素材の探索系として“ペプチドケミカルライブラリー”の高い可能性を感じている。その探索結果を使って、配列機能解析を推し進めることにより分子認識の学理の解明に近づきたいと考えている。またペプチドの新規機能を発見するため、光解裂するフォトリンカーを使った遊離ペプチド探索系や細胞を使った評価系、細胞内機能性ペプチドの探索系も構築している。ナノ微粒子の凝集作用や光誘起電子移動機構を利用した分析プローブの開発も研究している。本稿では最近の筆者らのペプチド研究の一端を紹介する。

ファージディスプレイとの比較

機能性ペプチドの探索では、多くの研究者がファージディスプレイ法を試みている。この方法はキット化されていて利用しやすい。しかし一方で、ファージディスプレイ法でのスクリーニングに不安を感じている研究者は少なくない。確かに結合するペプチドは得られたけれど、果たして本当にこれが最良のペプチドなのか（検出漏れの危険性）、これ以外に同様の活性をもつペプチド配列はないのか（類似性の危険性）という不安である。

筆者らは、ファージディスプレイ法で得られた金属微粒子ZnOを認識するペプチドEAHVMHKVAPRPをシード配列にして、組成が同じで配列の異なる類縁体ペプチドをペプチドアレイに合成し、ZnOとの認識能を評価した。その結果、HPVPRHMVAEAKやKAEAHVPMHVPRがシード配列より高い認識能を持つことを発見した⁵⁾。また、シード配列をもとにして6-merのペプチドを探索したところ、2種類の重要部位HVMHKV、HKVAPRの特定に成功し、さらにHKVAPRの残基置換によりHCVAPRという非常に高結合を有するペプチドの探索に成功した。これは、(i)ファージディスプレイ法による探索が万能ではなく、スクリーニング

漏れがあり、また(ii)同程度の機能をもつ短鎖ペプチドが実際に存在することを示している。検出漏れは、発現困難なペプチドであったためかもしれないし、ファージ表面タンパク質と発現ペプチドとの相互作用が無視できないためかもしれない。短鎖でもよいものがあるのは、酵素-基質の認識が3から4個のアミノ酸残基で起きることにつながると考えている。

短鎖機能性ペプチドの探索

受容体ライブラリーによる探索 注目するタンパク質に結合して機能を発揮するペプチドをどのように探索するかは重要である。受容体（レセプター）が知られているタンパク質では、そのリガンド機能を代替するペプチドを探索するため、受容体のアミノ酸配列から探索するのが適切であろう。

筆者らは、アンジオテンシン結合ペプチドの探索のために、アンジオテンシン受容体のアミノ酸配列を網羅した8-merのペプチドライブラリーを作製した。アンジオテンシンをFITCで蛍光ラベルし、結合するペプチドを探索した結果、46から56残基目までの領域、NSLVVIVIFYが特に強く結合した。さらに絞り込んだ結果、6残基のVVIVIVYで十分であり、ラット大動脈組織を使った血管収縮作用を84%抑制できることを明らかにした⁶⁾。

抗体は生化学検査だけでなく、抗体医薬として注目される重要な生体分子である。筆者らはそのFc領域に結合するペプチドをFcγ受容体配列から探索することを試みた。細胞表面に存在するFcγ受容体はI、II、IIIの3種類があるため、それらの配列を網羅した全740種類の6-merペプチド受容体ライブラリーを作製し、IgG-Fc認識ペプチドを探索した。その結果、図2に示すように、3種類の高結合配列が探索できた⁷⁾。

ペプチドアレイ細胞機能アッセイ法 上記のように、リガンドの結合を*in vitro*で評価することが可能な

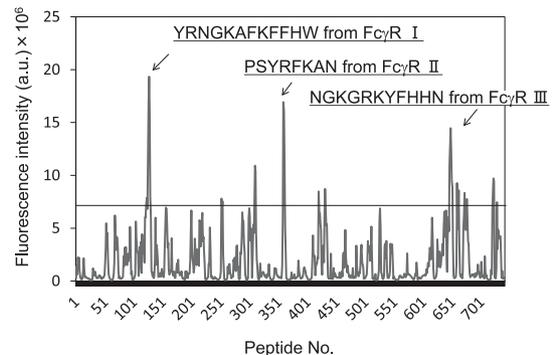


図2. 6-merからなるFcγ受容体ペプチドライブラリーの作製とIgG-Fc認識ペプチドの探索

場合は、蛍光ラベルしたリガンドが利用できるため探索しやすい。しかし、単離精製が困難なレセプターで容易に *in vitro* アッセイ系が構築できない場合や、ターゲットになるレセプターが特定されていない場合は、細胞を使って直接評価する方法が必要である。そこで筆者らは、アレイ表面のペプチドと細胞表面上の受容体 (ex. インテグリン) を直接相互作用させることで、シグナル伝達に伴って引き起こされる細胞の変化 (ペプチドの機能) を直接検出できる “Peptide array-cell assay system” を開発した⁸⁾。これは、合成したペプチドアレイを、Biopsy punchを用いてディスク状にくりぬき、96穴の培養プレートに沈め、細胞を播種した後一定時間後の生細胞数をカルセインAMで検出する方法である。

がん細胞選択的にアポトーシス (周囲の正常な組織に影響を与えない細胞死) を誘導するタンパク質として TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) が知られている。TRAIL 配列ライブラリーを作製し、上記の方法で探索を行ったところ、TRAILと同様な機能を持ったペプチドとしてRNSCWSKD配列を発見した⁹⁾。これ以外に、FASリガンドを代替する細胞死誘導ペプチドCNNLPの探索にも成功している¹⁰⁾。

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) は骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞・筋細胞などに分化することができる分化能と自己複製能を合わせ持つ細胞で、再生医療に有効な細胞である。しかし、MSCは骨髄中にわずかしか存在しないため、少量の細胞を効率よく接着・増殖させることが重要である。筆者らはフィブロネクチンのアミノ酸配列をもとに6残基ペプチドライブラリーを作製し、細胞接着ペプチドとして知られているRGDと同等の活性を持ったMSC接着ペプチドALNGRを探索することに成功した¹¹⁾。

コラーゲンタイプIV (ColIV) は、動物の組織において上皮細胞層と間質細胞層を分ける基底膜に存在する主要な細胞外マトリックスである。そこで、血管内皮細胞 (Endothelial cell, EC) と平滑筋細胞 (Smooth muscle cell, SMCs) に選択的に接着するペプチドを探索した。ColIVに存在するトリペプチドのペプチドライブラリーを作製し評価した結果、配列CAGのトリペプチドがもっともEC選択性が高いことがわかり、CAGを含浸させたPCL (poly-ε-caprolactone) のシートを作製したところ、EC接着性が非常に高いシートであることがわかった¹²⁾。

これらの結果からペプチドアレイを用いた細胞アッセイ法が機能性ペプチド探索手法として有用であることが確認できた。

アミノ酸配列の残基置換 上述の機能性ペプチドは

いずれも生体内に存在するタンパク質由来のアミノ酸配列である。ペプチドのバリエーションから考えると生体内に存在しない機能未知のペプチドは無数にあると考えられる。そこで、探索した実在のタンパク質上のアミノ酸配列を置換して、まったく新規の機能性ペプチドの探索を試みた。

上述のIgG-Fc結合ペプチドとして探索した配列に関して、アミノ酸組成を変えずに配列置換したペプチドを合成して結合活性を評価した。FcγRI由来のYRNGKAFKFFHWという12-merの高結合配列からは8-merペプチドNARKFYKGが、またFcγRIII由来のNGKGRKYFからはNKFRGKYKという高結合活性を示すペプチドが得られた。NKFRGKYKおよびNARKFYKGのIgGへの結合定数は、 8.9×10^6 および $6.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と非常に高いことを明らかにした⁷⁾。

上述の細胞死誘導ペプチドRNSCWSKDについても改変ペプチドを合成し、評価した。各アミノ酸残基をそれぞれ他の19種類に置換した配列 (たとえばANSCWSKDなど)、全152配列を作製した (19種類 × 8箇所 = 152種類)。細胞死活性を評価した結果、さらに高い活性を持つ配列CNSCWSKDを得た。この配列は元の配列RNSCWSKDより5倍程度活性が高かった¹³⁾。

配列-機能相関解析による学理の追究

筆者らのペプチドアレイを使うと上記のようにさまざまな機能性ペプチドが得られる。また合成したすべての配列が、どれくらいの活性を示すのかがすべて定量的に明らかになる。配列と機能の特徴を明示することが “機能性ペプチド” を理解するうえできわめて重要であろう。そこで筆者らは、情報解析の方法を用いて、構成するアミノ酸残基の特徴量とペプチドの機能との相関を調べた。アミノ酸残基の特徴量としては、疎水度、電荷、サイズ、高次構造の安定性などのアミノ酸インデックスを使用した。

1) コレステロール吸収抑制ペプチドのルール コレステロールは胆汁酸ミセルに取り込まれて小腸壁から吸収される。大豆由来のペプチドVAWWMYは、胆汁酸に結合し、ミセル崩壊を促すことでコレステロールの吸収を抑制できる。この原理に基づき、2212種類のペプチドライブラリーを作製し、胆汁酸との結合活性を調べ、その配列の特徴を解析した。その結果、胆汁酸結合ペプチドでは、「N末端3残基目のアミノ酸のサイズが大きく、4残基目のタンパク質安定化指標が大きいと胆汁酸結合活性が高い」、さらに「N末端2残基目のアミノ酸のタンパク質安定化指標が大きいと胆汁酸結合活性が

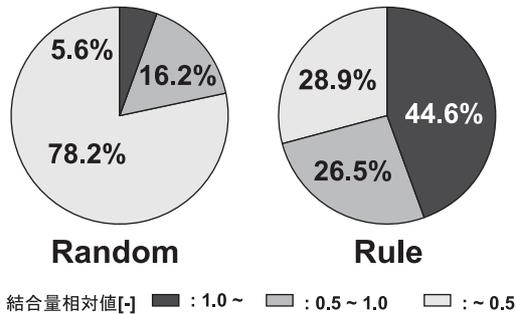


図3. コレステロール吸収阻害ペプチドの配列-機能相関

高い」というルールが得られた。ルールに合致したライブラリーを作製して評価したところ、約45%が高活性のペプチドであった(ランダムライブラリーではわずか6%) (図3)¹⁾。また、既知の大豆グリシニンタンパク質由来VAWWMYペプチドよりも高結合性を示す28配列が得られた。VIWWFKやPWWMYという高活性ペプチドをラットに投与したところ、血清、肝臓、小腸でのコレステロール吸収量が1/2から1/3に低下することがわかった。

2) 細胞接着ペプチドのルール 上述の“Peptide array-cell assay system”を使って線維芽細胞接着ペプチドを探索した。643種類の5merランダムペプチドライブラリーを作製して評価した結果、「N末端アミノ酸のサイズが小さく、2残基目の電荷が大きく、3残基目のサイズと電荷が大きく、4残基目のサイズが小さければ細胞接着ペプチドとして機能する」、さらに「3残基目のサイズと電荷が大きければ細胞接着ペプチドになる」というルールが得られた。このルールに従ってペプチドを作製したところ、活性の高い配列は84%と約4倍以上含まれることがわかり、線維芽細胞の接着に重要なルールであることが実証できた³⁾。このペプチドは、再狭窄を防ぐ人工血管表面修飾分子として使える可能性がある。

このように配列-機能相関(ルール)を組み合わせれば、最初からライブラリーが網羅されていなくても高機能性ペプチドが探索できることがわかる。

3) Rationalな探索法の構築 ライブラリーサイズをどこまで広げればさまざまな分子認識に対してロバストな探索法になるのかは、探索法の構築では重要な問題である。そこで20種類のアミノ酸を疎水度と電荷で4グループに分けて合成する方法を考案した(図4)。この方法では4残基では原理的に256種類のペプチドライブラリーで良い。2セット512ペプチドで、インターロイキン2(IL2)とIgG抗体に対して結合する4残基ペプチドの探索を試みた。図5に示すように、IL2ではGroup1(疎水性アミノ酸)およびGroup4(負電荷アミノ酸)で

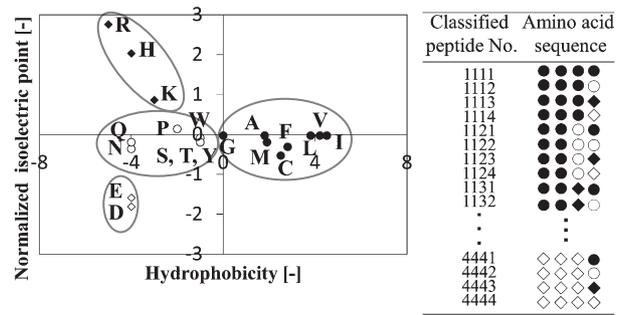


図4. アミノ酸の4グループ化と256種類の4残基ライブラリー。各グループから1アミノ酸を代表として選出しライブラリーを合成し評価する。

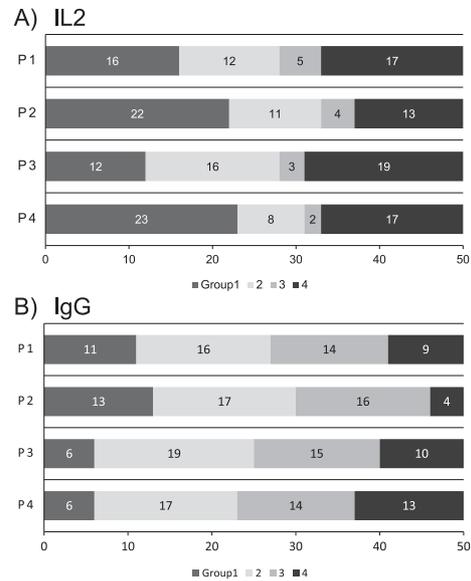


図5. 高結合ペプチド50種類のアミノ酸グループの偏り

構成されるペプチドが多く(特に2残基目P2, 4残基目P4のGroup1と3残基目P3のGroup4が多く、どの位置でも正電荷アミノ酸Group3が少ない)、IgG高結合ペプチドはGroup2(親水性アミノ酸)が多くGroup1とGroup4が少ない(特に3残基目P3のGroup2が多く、1残基目P1, 2残基目P2ではGroup4が少なく、3残基目P3, 4残基目P4ではGroup1が少ない)ことがわかった。これはIL2の等電点が7.7であり、実験条件(pH 7.4)ではタンパク質表面が正電荷をもっているためと考えられる¹⁴⁾。

この方法は、4残基のペプチドに対して256種類のペプチドライブラリーで高活性ペプチドが得られる方法であり、一定の成果が得られた。しかし、残基数が一つ増すごとにライブラリーサイズは4倍ずつ大きくなる。長さの長い高機能性ペプチドを探索するためには、短鎖のペプチドで得られたルールの拡張を目指すほうが良い。このため、IL2とIgGに対して得られた4残基ペプチド

の特性を8残基に拡張する方法について検討した。4残基での解析結果を主成分分析で配列-機能相関を試み、8残基ペプチドの機能解析に応用した。その結果、アミノ酸残基の電荷、疎水度、サイズなど物理的因子の平均値、最大値、最小値といった16ないし18種類のパラメータを使って4残基ペプチドの主成分分析を行ったところ、高活性と特定できる領域があることがわかった。使用したパラメータはN末端からの位置情報を含んでいないため、同じ主成分を使うと8残基に拡張可能である。その結果、8残基でも、同じ領域に高活性ペプチドが集まっていることを明らかにした¹⁵⁾。この方法は長鎖機能性ペプチドの探索法として期待できる。

機能性ペプチドの開発に必要な技術

上述のペプチドは、固相合成法でありC末端が拘束されているライブラリーでの機能性ペプチド探索である。実際には遊離分子での機能発現や複数のペプチド分子での機能発現も価値がある。このため、これらの新規機能を探索するための技術開発も進めている。

1) 遊離ペプチドライブラリー C末端拘束ペプチドは、遊離のペプチドに比べるとタンパク質との結合に不利に働く。多くのペプチドは遊離で使用されるので、最初から遊離で探索できたほうが良い。このため紫外線照射で解裂・遊離できるフォトリンカー (4-[4-(1-(Fmoc amino)ethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy]butanoic acid) を合成し²⁾、紫外線照射でペプチドが遊離できるライブラリーを作製した。対象として、糖尿病の症状を改善するため実用化されているアミラーゼ阻害剤の探索を試みた。ペプチドアレイを合成した後、光解裂させ、96穴プレートにパンチアウトし、緩衝液を加えて遊離ペプチドとした。このライブラリーに唾液アミラーゼを添加し、合成基質を用いた酵素活性測定で、ペプチドの阻害活性を評価した。その結果、RHWYRYWという8-merペプチドが探索できた²⁾。このペプチドの阻害様式は拮抗阻害であり、その阻害定数は4.65 μM であり、アカルボースの阻害定数8.9 μM より高い阻害活性を示した。消化管での加水分解の問題が解決できれば、糖尿病治療薬として利用できる可能性が高い。

2) 分岐鎖ペプチドライブラリー タンパク質分子を2種類組み合わせることでシグナルが伝わることもある。アレルギー反応の2量体化もその一つである。そこで、2種類のペプチドを組み合わせることで合成する分岐鎖ペプチドライブラリーの合成を試みた。これは主鎖をFmoc基、側鎖をivDde基で保護したリジンを用い、主鎖と側鎖に別々のアミノ酸を合成することで実現できる。この方法により、2種類のIgEエピトープを1リジ

ン残基に合成し、RBL-2H3細胞によるヒスタミン放出が検出できた¹⁶⁾。この方法はヘテロ2分子でもホモ2分子でも可能であり、ペプチドの組合せ効果を検証するためにユニークなツールになるものと期待できる。

ペプチド間相互作用に基づく分析プローブの開発

生体分子の非標識分析は合成が容易で分析ステップも単純化できる。ナノ微粒子は凝集状態で色調が変化する。このため、ナノ微粒子を凝集させる機能(可視化機能)と分子認識機能をもつペプチドの探索を行った。

銀ナノ微粒子(AgNP)は正電荷を持つペプチドで凝集する。アンジオテンシン(Ang)受容体由来のライブラリーを使い、Ang結合能を持ち、正電荷アミノ酸を多く含むペプチドを探索した。その結果、上述のVVIVIVYよりAng結合能は劣るがK、Rを多く含むペプチドKGKNKRRRを発見した。Angを含まないAgNP分散溶液中にこのペプチドを添加すると溶液がピンク色に変化するが、Ang存在下では凝集が阻害され黄色のままである(図6)。この方法により、10 μM までのAngを15分で検出できることがわかった¹⁷⁾。この方法は上述の抗体認識ペプチドNKFRGKYKにも応用できた。このペプチドも2機能性ペプチドであり、実際の抗体生産ハイブリドーマの培養液を使ったところ、100から500 nMまでの抗体を含む溶液から2分間で検出できることを明らかにした¹⁸⁾。

蛍光色素は近傍にクエンチャー分子があると光誘起電子移動(PeT)機構により消光する。Atto655とトリプトファン(Trp)の組合せはよく知られている。まず上述の抗体Fc領域認識ペプチドに対して相補するペプチドを探索した。クエンチャー付き相補ペプチドと蛍光分子付きFc認識ペプチドを合成したところ、抗体の有無を検出できる2分子分析系が構築できた(図7)¹⁹⁾。次に1分子で生体分子の検出が可能なペプチド誘導体の開発を目指し、上記の両者をタンデムに連結した。C末端にトリプトファン4残基、N末端にAtto655を結合させた分子を

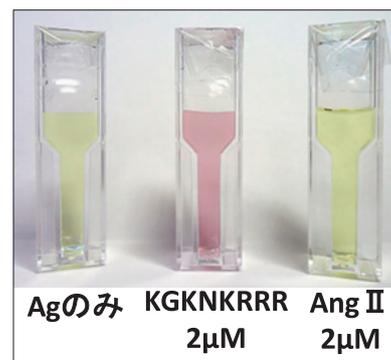


図6. 銀ナノ微粒子を使ったアンジオテンシンの検出

が多くの研究者の対象分子になることを期待したい。

文 献

- 1) Takeshita, T., Okochi, M., Kato, R., Kaga, C., Tomita, Y., Nagaoka, S., and Honda, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 92–97 (2011).
- 2) Ochiai, M., Sugita, T., Kato, R., Okochi, M., and Honda, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 819–824 (2012).
- 3) Kaga, C., Okochi, M., Tomita, Y., Kato, R., and Honda, H.: *Biotechniques*, **44**, 393–402 (2008).
- 4) 本多裕之：生物工学, **87**, 280–282 (2009).
- 5) Okochi, M., Sugita, T., Furusawa, S., Umetsu, M., Adschiri, T., and Honda, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **106**, 845–851 (2010).
- 6) Kato, R., Kunimatsu, M., Fujimoto, S., Kobayashi, T., and Honda, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 22–29 (2004).
- 7) Sugita, T., Katayama, M., Okochi, M., Ichihara, T., Kato, R., and Honda, H.: *Biochem. Eng. J.*, **79**, 33–40 (2013).
- 8) Kato, R., Kaga, C., Kunimatsu, M., Kobayashi, T., and Honda, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 485–495 (2006).
- 9) Okochi, M., Nakanishi, M., Kato, R., Kobayashi, T., and Honda, H.: *FEBS Lett.*, **580**, 885–889 (2006).
- 10) Kato, R., Okuno, Y., Kaga, C., Kunimatsu, M., Kobayashi, T., and Honda, H.: *J. Peptide Res.*, **66** (Suppl 1), 146–153 (2006).
- 11) Okochi, M., Nomura, S., Kaga, C., and Honda, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 85–89 (2008).
- 12) Kanie, K., Narita, Y., Owaki, J., Zhao, Y., Kuwabara, F., Satake, M., Honda, S., Kaneko, H., Yoshioka, T., Okochi, M., Honda, H., and Kato, R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 1808–1816 (2012).
- 13) Kaga, C., Okochi, M., Nakanishi, M., Hayashi, H., Kato, R., and Honda, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 1063–1068 (2007).
- 14) Kume, A., Okochi, M., Shimizu, K., Yoshida, Y., and Honda, H.: *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **21**, 119–127 (2016).
- 15) Kume, A., Kawai, S., Kato, R., Iwata, S., Shimizu, K., and Honda, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, in press (2017).
- 16) Sugiura, H., Okazaki, N., Sugiura, T., Honda, H., and Okochi, M.: *Biochem. Eng. J.*, **87**, 8–14 (2014).
- 17) Okochi, M., Kuboyama, M., Tanaka, M., and Honda, H.: *TALANTA*, **142**, 235–239 (2015).
- 18) Okochi, M., Kamiya, T., Omasa, T., Tanaka, M., and Honda, H.: *Anal. Sci.*, **32**, 93–97 (2016).
- 19) Sugita, T., Okochi, M., and Honda, H.: *Chem. Lett.*, **43**, 550–552 (2014).
- 20) Okochi, M., Sugita, T., Tanaka, M., and Honda, H.: *RSC Adv.*, **5**, 91988–91992 (2015).
- 21) Matsumoto, R., Okochi, M., Shimizu, K., Kanie, K., Kato, R., and Honda, H.: *Sci. Rep.*, **5**, 12884 (2015).