

令和 元年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：16KK0091

研究課題名（和文）ソフトマテリアル表面を探索する自律走査型マルチアクティブプローブ法の開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Sensing Surface Mechanical Deformation Using Active Probes Driven by Motor Proteins(Fostering Joint International Research)

研究代表者

角五 彰（Kakugo, Akira）

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：10374224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：軟らかい材料（ソフトマテリアル）表面の力学特性変化を評価することは、内部の弾性効果の影響があるため非常に困難であった。本研究では、本研究では自走する細胞骨格繊維を探針（プローブ）とした、これまでにない全く新しいソフトマテリアル表面の力学特性評価法を提案した。ソフトマテリアルを伸張・圧縮させた際の、その表面における微小管の動的応答特性、また、不均一な歪み分布を有するソフトマテリアル表面上での微小管の動的応答特性を追跡することで、表面の力学特性評価が可能であるということを実証してきた。また本研究課題では、表面科学分野に限られていたアクティブプローブ法の適用範囲を生命科学分野にまで拡張した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小管を含めた自走性の「アクティブマター」はナノサイエンス分野および物性物理学分野から注目を集めている。しかし、マクロスコピックな視点に立った現象論的な研究に終始している。特に、ナノサイエンス分野から見たアクティブマター研究は、米国に大きく後れを取っている。双方の分野で培われた方法論や技術共有による融合研究は、基課題の飛躍的発展をもたらすとともにアクティブマター研究の新たな潮流を生み出すと期待される。特に本研究課題は、ソフトマター分野を支える測定・解析・分析技術の開発、また生物の構造や運動を力学的に探求するバイオメカニクスやメカノバイオロジー分野などにも貢献しうると期待している。

研究成果の概要（英文）：Studying mechanical deformation at the surface of soft materials has been challenging due to the difficulty in separating surface deformation from the bulk elasticity of the materials. To overcome this issue, we introduced a new approach for studying the surface mechanical deformation of a soft material by utilizing a large number of self-propelled microprobes driven by motor proteins on the surface of the material. Information about the surface mechanical deformation of the soft material is obtained through changes in mobility of the microprobes wandering across the surface of the soft material. The active microprobes respond to mechanical deformation of the surface and readily change their velocity and direction depending on the extent and mode of surface deformation. In this project we explored possible applications that could benefit not only the surface science but also the life science.

研究分野：アクティブマター、バイオメカニクス

キーワード：アクティブプローブ 微小管 キネシン メカノバイオロジー バイオメカニクス

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

本研究では、自走する多数のアクティブマター（微小管）を用いて、ゲルなどに代表される軟らかい材料（ソフトマテリアル）表面の力学特性変化（歪・応力変化）を探索する『マルチアクティブプローブ』法を開発することを目的としてきた。本研究が達成されれば、これまで困難とされてきたソフトマテリアル表面の力学特性変化を、短時間にかつ高時間分解能で評価できるようになるだけでなく、産業・医療分野で重要性を増しているソフトマテリアルの設計指針を与えるものと期待される。さらに、表面応力特性の関与が示唆される生体組織の構造形成メカニズムの解明や、細胞骨格の力学知覚機構の解明など生命科学分野にも寄与すると思われる。これまでに、1) 独自開発した顕微鏡上力学試験機の作動精度を確認するとともに弾性基盤上で微小管アクティブプローブを長時間駆動させる条件の最適化を終えている。さらに、2) 本装置を用いて弾性基盤上の力学的な環境変化が微小管アクティブプローブの動的挙動に及ぼす影響を評価してきた。これらを通して、(1) アクティブプローブである微小管は応力方向や荷重モード（引張や圧縮など）に依存して垂直方向、対角方向あるいは環状に進行方向を変化（偏向運動）させる、(2) 微小管の移動速度はソフトマテリアル基盤の伸張歪を増加させると高くなる、さらに、(3) コンピュータシミュレーション実験により微小管の偏向運動は微小管にかかる曲げエネルギーに依存するという知見を見出している。これらの研究成果は、微小管がソフトマテリアル表面の力学特性を評価するアクティブプローブとして有用であることを強く支持するものである。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまで工学的応用に向けられていた視点を、本国際共同研究を通して生命科学分野および医学分野へと広げることで、基課題の飛躍的な発展を目指すことを目的とした。具体的には共同研究先が開発してきた1分子ナノメトリー技術や高感度蛍光顕微鏡などの先進技術と、申請者らが開発してきた顕微鏡上伸展装置 (*Nat. Commun.* 2016) により得られた知見を融合しながら微小管の先進的な1分子メカノバイオロジー研究を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

軟らかい材料（ソフトマテリアル）表面で自走する多数のアクティブマター（微小管）の動的挙動を1分子レベルで理解するため高速AFMを用いたダイナミクス解析を行った(課題①)。さらに力学的な刺激により変形するソフトマテリアル上で微小管がどのように振舞うのかをコンピュータシミュレーション実験による理論的な研究を行った(課題②)。また高感度蛍光顕微鏡と顕微鏡上伸展装置を組み合わせることで先進的なメカノバイオロジー研究へと展開可能なプラットフォームを構築した(課題③)。

4. 研究成果

(1) 自走するアクティブマター（微小管）の高速AFM観察

ソフトマテリアル（脂質二重膜）上で自走する微小管を高速AFMを用いて観察した。微小管を滑走させるモーター（キネシン）は脂質二重膜表面にストレプトアビジンを介して固定した

(Figure 1a)。脂質二重膜は

1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)、

1,2-Dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane (DPTAP)、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap biotinyl) (biotin-cap DPPE)のリン脂質を用いて作成した。具体的な手順としては、まず脂質二重膜をストレプトアビジンで修飾した後、ビオチン化キネシン溶液を表面に添加した。続いて、タキソール安定化MTを適用し、次にアデノシン三リン酸 (ATP) を添加することにより、キネシンをコートした脂質二重膜で微小管を運動させた。Figure 1bは脂質二重膜で滑走する微小管のAFMイメージ像である。脂質二重膜上では太さ約25.7nmの微小管が約100nm/sec (n=8)の速度で滑走していることがわかった。さらに高速AFM観察の結果、太さ約2.3nmのフィラメントが同表面上を滑走している様子がイメージングされた (Figure 1d)。高さプロファイルから、2.3nmのフィラメントは微小管を構成するチューブリンのプロトフィラメント (PF) であると考察した。このPFは約40nm/sec (n=18)

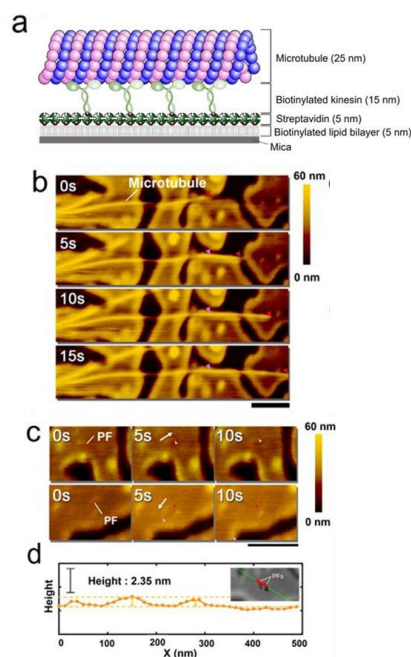


Figure1 脂質二重膜上で自走する微小管の高速AFM観察。

の速度で滑走していることが速度解析の結果わかった (Figure 2)。微小管と PF の滑走速度の違いは、表面でのキネシンの変動、そして、その結果として MT および PF でのキネシンによる力の発生程度の違いに関係しているとの考察をした。高速 AFM 観察によって得られた脂質二重膜上での微小管の滑走速度 ($\sim 100 \text{ nm/sec}$) はガラスなどのハードマテリアル上の速度 ($\sim 600 \text{ nm/sec}$) と比較すると $1/6$ 程度となる。この結果は、脂質二重膜の柔軟性がキネシンと微小管との特異的な相互作用に影響を及ぼしている可能性があることを示唆している。このようなダイナミクスの差異は微小管をアクティブプローブとして活用する際に重要な知見を与えるものと期待される。

(2) 変形するソフトマテリアル上における微小管力学応答特性の理論的研究

変形するソフトマテリアル基板上に固定された微小管の三次元立体配座の時間変化をシミュレーションにより評価した。ソフトマテリアル基板上への微小管の固定はキネシンをリンカーとして行った。微小管は伸縮性のないセミフレキシブルなビーズ/ロッドモデルとし、曲げ剛性 (EI) は文献値を参考に $22.0 \text{ pN}\mu\text{m}^2$ とした。微小管の長さは、実験値を参考に $20 \mu\text{m}$ に設定した。微小管の立体配座変化は、セグメント長を固定した条件下で、制約下でブラウン動力学によりシミュレートした。キネシンはソフトマテリアル基板上に、密度が $5\sim 50 \mu\text{m}^{-2}$ となるようランダムに分布させた。基質の変形 (収縮) は、キネシンの位置 $(x_i(t), y_i(t))$ を以下の式で変化させることで実装した。

$$x_i(t) = x_{0,i} + (\varepsilon_0 - \dot{\varepsilon} \cdot t)x_{0,i}$$

$$y_i(t) = y_{0,i} - \sigma(\varepsilon_0 - \dot{\varepsilon} \cdot t)y_{0,i}$$

where ε_0 is the initial strain, $\dot{\varepsilon}$ is the strain rate ($5.0\% \text{ s}^{-1}$), σ is the Poisson ratio, $x_{0,i}$ and $y_{0,i}$ are the positions of their tails without any strain.

キネシンはヘッドとテイル間を $100 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ のバネ定数を有するスプリングで結んだ線形バネモデルとした (Figure 2A)。また微小管に結合したキネシンは 7 pN 以上の力が加わると解離するものとした。本系を用い基質を変形 (圧縮) させると微小管が座屈する現象が観察された (Figure 1B)。座屈挙動は、オイラータイプ座屈モードではなく、実験系でも観察されているウェーブモードの座屈モデルに近くなることがわかった。実験系と比較するために、微小管の座屈挙動を異なるキネシン密度でシステムティックに調べた。低キネシン密度では、微小管は低歪条件下で長波長の座屈挙動を示した (Figure 2A(i))。一方、高密度では、短波長の座屈 (Figure 2A(v)) が観察された。座屈の変化が観察され始めたときの圧縮歪 (臨界歪) を評価したところ、低キネシン密度 ($5 \mu\text{m}^{-2}$) では、臨界歪みは $\sim 2.0\%$ であり、この値は、キネシン密度を $50 \mu\text{m}^{-2}$ まで上げると $\sim 5.0\%$ まで増加した。また圧縮歪を増加させると座屈波長は減少し、座屈の振幅は増加することがわかった。具体的には、 $\sim 2.0\%$ 臨界歪における平均座屈波長および振幅は、それぞれ $11 \pm 2 \mu\text{m}$ と $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であり、最大歪 (50%) では、それぞれ $8 \pm 1 \mu\text{m}$ と $3.9 \pm 0.8 \mu\text{m}$ となる。さらに、キネシンの密度も微小管の座屈現象に強く影響に強く影響するということがわかった。このようにシミュレーション結果は実験結果は同様の傾向を示すことがわかった。しかし、シミュレーションから得られた座屈波長および振幅の値は、実験結果と比較すると低い値となっており、これはシミュレーションでは考慮されていない実験条件が存在するというを示唆しているものと考えられる。

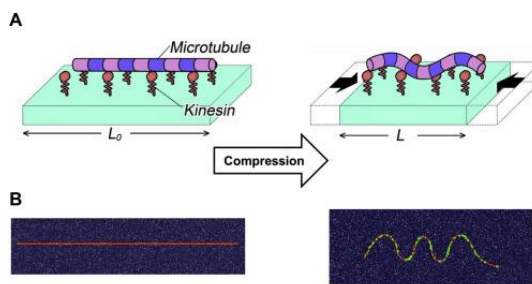


Figure 2 変形するソフトマテリアル上における微小管の力学応答特性を評価するシミュレーション実験の模式図 (A) とシミュレーション実験の結果 (B)。

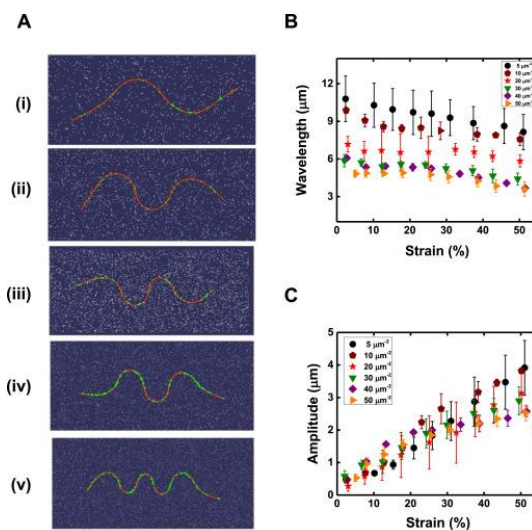


Figure 3 微小管座屈現象におけるキネシン密度の影響。キネシン密度を変化させたときの微小管の座屈挙動 (A)、波長の歪依存性 (B) および振幅の歪依存性 (C)。

(3) 1分子メカノバイオロジー研究への展開を目指したプラットフォーム構築

本課題を達成するため、これまでに開発してきた顕微鏡上伸展装置と高感度蛍光顕微鏡を組み合わることで1分子メカノバイオロジー研究へのプラットフォーム構築を目指した

(Figure 4)。力学的な刺激は既課題および課題(2)で得られている知見を基にソフトエラストマー(PDMS)を基板として採用した。高感度蛍光顕微鏡に適した厚さ50μmのPDMSは以下の手順に従い調整した。ポリマー溶液(SILPOT 184)および架橋剤(SILPOT 184, CAT)を10:1(w/w)の比率で混合し、混合物を1:10(w/w)に希釈した。少量のヘキサンを添加し、30分間振とうさせながら脱気を行ったのち、混合物をテフロン基板に塗布し1500rpm/sで30秒間スピコートした。得られた薄膜を、60℃で4~5時間硬化させPDMS(L×W×T=4.0×5.9×0.05mm)の薄膜を用意した。また高感度蛍光顕微鏡に組み込み可能な一軸軸伸展装置を新たに開発した。エンコーダー付アクチュエータ(SIGMA)を1軸上に配置し、アクチュエータは2軸コントローラー(SIGMA)を介して制御可能であるとともに密閉型の仕様とした。用意したPDMS薄膜を一軸軸伸展装置の治具に水平に固定したのち観察部位となる領域をプラズマエッチャー装置で約3分間(10Pa, 8mA)で処理することで表面のクリーニングおよび親水性を向上させた。このPDMS表面にキネシンを固定したのちに、せん断応力を利用しながら微小管を伸展軸に平行になるように並べ、次いで化学的手法を持ちいで固定した。化学的な固定には、微小管の活性を失わない濃度である0.1%のグルタルアルデヒド溶液を用いた。1分子メカノバイオロジーはキネシンのダイナミクス指標として行うものとした。キネシンのダイナミクスを評価するため、ビオチン化キネシンを作成し、これをストレプトアビジンが標識されたQ-dotと複合化することで蛍光イメージング法による観察を可能とさせた。作製したQ-dot複合化キネシンを上で用意した微小管と相互作用させたのちに、チャンバー内を湿潤な窒素ガスで置換した。その後、準備した一軸伸展装置を高感度蛍光顕微鏡へと移動させ、微小管ならびにQ-dot-キネシンのダイナミクス観察を行った。PDMS基板を变形させることで微小管に圧縮歪を与えた結果、課題(2)でも評価したように微小管の座屈現象が再現されることがわかった。さらに、座屈した微小管上でのQ-dot-キネシンの動的挙動を1mMのATP存在下で評価した。その結果、Q-dot-キネシンが微小管に沿って運動する様子を観察することに成功した。系統的な評価を行うことで、今後、1分子メカノバイオロジー研究への展開が可能であることを支持するものがある。

以上の結果を基に、自走する微小管がソフトマテリアル表面の力学特性を評価するアクティブプローブとして有用であると同時に、1分子ナノメトリック技術や高感度蛍光顕微鏡などの先進技術と融合することで1分子メカノバイオロジー研究などへの展開も可能であるとの結論を導いた。

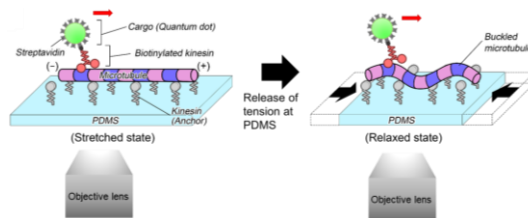


Figure 4 1分子メカノバイオロジー研究を実現する実験系の概念図。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 4件) (すべて査読あり)

① Hiroshi Inaba, Takahisa Yamamoto, Arif Md. Rashedul Kabir, Akira Kakugo, Kazuki Sada, *Kazunori Matsuura, "Molecular Encapsulation Inside Microtubules Based on Tau Derived Peptides" *Chemistry European Journal*, Vol 24, pp14958–14967 (2018) <https://doi.org/10.1002/chem.201802617>

② Yukiko Miyatake, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Yusuke Ohta, Shunji Ikeshita, Agus Subagyo, Kazuhisa Sueoka, Akira Kakugo, Maho Amano, Toshiyuki Takahashi, Takaharu Okajima, *Masanori Kasahara, "Visualising the dynamics of live pancreatic microtumours self-organised through cell-in-cell invasion" *Scientific Report*, Vol. 8, 14054 (2018) <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32122-w>

③ Jakia Jannat Keya, Daisuke Inoue, Yuki Suzuki, Toshiya Kozai, Daiki Ishikuro, Noriyuki Kodera, Takayuki Uchihashi, Arif Md. Rashedul Kabir, Masayuki Endo, Kazuki Sada, *Akira Kakugo, "High-Resolution Imaging of a Single Gliding Protofilament of Tubulins by HS-AFM" *Scientific Report*, Vol. 7, 6166 (2017) <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06249-1>

④ Tanjina Afrin, Arif Md. Rashedul Kabir, Kazuki Sada, *Akira Kakugo, Takahiro Nitta, "Buckling of microtubules on elastic media via breakable bonds" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 480(1), pp. 132-138 (2016) doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.133.

[学会発表] (計 12件)

- ① Syeda Rubaiya Nasrin, Arif Md. Rashedul Kabir, Kazuki Sada, Akira Kakugo 「Microtubule: Can they serve as a mechanotransducer?」 「Workshop on Soft and Nano Materials orchestrated with wisdom from Japan 2019」 (2019, 12-14 January, Niseko, Hokkaido, Japan)
- ② Syeda Rubaiya Nasrin, Arif Md. Rashedul Kabir, Kazuki Sada, Akira Kakugo 「Mechanobiology in Intracellular Cargo Transportation: Effect of Deformation of Microtubule on Dynein-based Cargo Transportation」 「1st Glowing Polymers Symposium」 (2018, 15 December, Tokyo, Japan)
- ③ Akira Kakugo 「Collective motion of microtubules forms unique pattern in response to external mechanical perturbation」 「Hokkaido-Strasbourg Symposium: Biotic and Abiotic Molecular Machines and Motors」 (2018, November 14, Strasbourg, France)
- ④ Syeda Rubaiya Nasrin, Arif Md. Rashedul Kabir, Kazuki Sada, Akira Kakugo 「Microtubule Deformation by External Stimuli Affects its Functionality」 「Learning Satellite Program 2018 Hokkaido University」 (2018, 11-19 November, University of Strasbourg, Strasbourg, France)
- ⑤ Syeda Rubaiya Nasrin, Arif Md. Rashedul Kabir, Kazuki Sada, Akira Kakugo 「Deformation of Microtubule by External Mechanical Stress Affect its Functionality Asymmetrically」 「6th International Symposium on Ambitious Leader's Program for Fostering Future Leaders to Open New Frontiers in Materials Science」 (2018, 29-31 October, Sapporo, Japan.)
- ⑥ Syeda Rubaiya Nasrin, Arif Md. Rashedul Kabir, Kazuki Sada, Akira Kakugo 「Microtubule Buckling Affects Cargo Transportation by Molecular Motor」 「1st International Conference on 4D Materials and Systems, Gel Symposium」 (2018, 26-30 August, Yamagata, Japan)
- ⑦ Syeda Rubaiya Nasrin, Arif Md. Rashedul Kabir, Kazuki Sada, Akira Kakugo 「Microtubule Deformation has Effect on Cargo Transportation by Motor protein」 「9th CSE (Chemical Sciences and Engineering) Summer School」 (2018, 15-16 July 2018, Sapporo, Japan)
- ⑧ Akira Kakugo 「力学ストレスに対する細胞骨格「微小管」の応答特性と生化学的機能に及ぼす影響」 「第11回ナノバイオ若手ネットワークワーキングシンポジウム」 (2018年6月15-16日・北海道大学フロンティア化学教育研究センター・札幌)
- ⑨ Akira Kakugo 「How mechanical deformation of microtubules affects their functionalities」 「The 1st “Molecules, Materials, Devices and Systems”」 (2018, May. 28-30 New York, USA)
- ⑩ Akira Kakugo 「Mechanical deformation induced modulation of biochemical functions of microtubule」 「第6回ソフトマター研究会」 (2016年10月24-26日・札幌)
- ⑪ Akira Kakugo 「Buckling of microtubules on a 2D elastic medium」 「Micro-and Nanomachines Chemical and Biological Nanomotors: MNM2016」 (2016, June, 29-July, 1, Hannover, Germany)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

北海道大学大学院理学研究院化学部門物質化学研究室
<https://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~matchemS/>

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：ヘンリー ヘス

ローマ字氏名：Henry Hess

所属研究機関名：Columbia University

部局名：Department of Biomedical Engineering

職名：Professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。