

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19710111
 研究課題名（和文） キネシンとダイニンを用いた分子ナノソーティングシステムの開発
 研究課題名（英文） Molecular sorting system using kinesin and dynein motor protein
 研究代表者
 横川 隆司（YOKOKAWA Ryuji）
 立命館大学・理工学部・講師
 研究者番号：10411216

研究成果の概要：モータタンパク質であるキネシンとダイニンの微小管上での運動極性を利用して、微小流体デバイス内でナノスケールの対象分子などを大量・並列に操作し、分離することのできるナノアクチュエータの創出を目指した。微小管の極性配置技術を確立し、二種類のモータタンパク質が極性に従って効率よく運動する系を微小流体デバイス内で構築した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノソーティング、キネシン、ダイニン、MicroTAS、MEMS

1. 研究開始当初の背景

マイクロマシニング技術を生化学、分析化学などの分野において活用し、反応系の微細化、高速化、オンチップ化などを旨とする研究が広く行われてきた。当該分野はすでに 20 年以上の歴史を持ち、マイクロスケールでの微細化が成熟し、更なるデバイスの微細化には新規な分子操作機構の開拓が必要である。このような背景から、生体由来のモータタンパク質（キネシン - 微小管系）をマイクロ・ナノデバイス内で駆動源として利用する研究が、近年盛んにおこなわれてきた。これによって、MicroTAS で一般的な圧力溶液駆動による分子操作から、対象となる分子を直接モータタンパク質により操作することが可能になる。

しかし、実際の分子操作にはモータタンパク質の運動を所望の位置に固定したり、方向を制御したりする基礎技術の蓄積が必須である。

2. 研究の目的

これまでの基礎研究において、マイクロ・ナノ構造を利用して微小管の運動方向を制御する手法が提案されている。これは、生体内の物質輸送機構とは逆に微小管が運動する分子系を利用するために開発された。なぜなら、方向性を有しているモータタンパク質本来の運動を利用できず、微小管がランダムに動いてしまうからである。そこで我々は、本研究では生体内での本来の分子系を利用し

て、モータタンパク質であるキネシンの運動方向を自在に制御する技術の確立を目指している。これによりナノスケールの対象分子などを自在に操作できるナノアクチュエータを創製することである。

本研究では、これまでに培った微小流体デバイスを用いた微小管極性の配向技術と二種類のモータタンパク質を融合した双方向搬送システム、それを用いた分子ソーティングシステムの開発に取り組んだ。二種類のモータタンパク質、キネシンとダイニンはそれぞれ微小管の+端と-端に向かって運動するため、微小管の極性が自明であればそれらの運動方向が確定される。各モータタンパク質分子に搬送・ソーティング対象の分子を搭載することで、複雑なマイクロ構造を準備することなく所望の分子操作が可能になる。特に、複数の分子が実験系に存在する場合、モータタンパク質の活性を維持することが必要であり、利用する分子の選択など適合性を十分に検討することが必要である。

また、分子操作にとどまらず、MicroTAS 内部における分子検出のため、全反射照明蛍光観察デバイスの開発も並行して進めた。基本的なマイクロマシニング技術と PDMS を用いたモールドニング技術により、光学系を組み込んだオンチップ検出デバイスの開発である。上記のような分子操作系とオンチップ検出系を統合して、MicroTAS のさらなるダウンスケールを目指す。

3. 研究の方法

<生体分子>

モータタンパク質を始め、分子搬送システムに用いる生体材料の準備、活性評価などを行った。これは、デバイス内で機能的に生体分子を利用する前段階の確認作業という意味合いが大きい。ここで得られた生理活性と同等の基本的機能をデバイス内で発現することが期待される。

キネシンについては、微小管配向用の His-tag を付加したキネシンとビーズ搬送用の GST-tag を付加したキネシンの二種類を準備した。また、ダイニンは連携研究者（東京大学昆氏）より提供を受けた。

<微小流体デバイス>

微小管配向用のマイクロチャネルの製作と、タンパク質溶液の灌流システムの構築を行った。PDMS-ガラスを用いた簡便な灌流システムで、タンパク質の活性を損なうことなく運動させることを目指した。

<デバイス内での分子配置と分子ソーティング>

製作したデバイス内で、微小管の配向、固定を行った。極性がそろっていることを確認し

たうえで、キネシン、ダイニンの運動方向の評価、同時運動、ビーズのソーティングなどの研究を進めた。

4. 研究成果

本研究における様々な取り組みのうち、特に下記の3点について述べる。

(1) 生体分子の検討

キネシン及びダイニンを用いて、いずれも 0.5 - 1.0 mM ATP 存在下で微小管の滑り運動とビーズの搬送を個別に確認した（図 1 参照）。さらにキネシンとダイニンを付加した直径の異なるビーズ（340 nm と 500 nm）の同時運動を確認した。それぞれの運動速度は、0.22 0.28 · m/s と 0.34 0.39 · m/s であった。この際、いわゆる一分子生物物理学に用いられる低効率なビーズ運動ではなく、微小管に付着したビーズの 50%程度が運動するようガラス表面のコーティングなどを工夫した。また、今後の研究展開のため、チューブリン（微小管）を精製する環境を学内に整備した。

(2) 目的分子結合方法の検討

本項の目的は、アビジン - ビオチン結合などの分子特異的な結合を用いて、ビーズ表面に目的分子を固定する技術を開発することである。目的分子として、ビオチン（biotin-4-fluorescein）と IgG（Rabbit anti-mouse IgG AlexaFluor 568）のビーズへの付加を確認することができた。これらの分子と同時にキネシンやダイニンを付加してビーズを搬送できることも確認した。しかし、目的分子の濃度によってビーズの搬送効率や速度が異なるという現象が観察され、モータタンパク質の活性が変化することが分

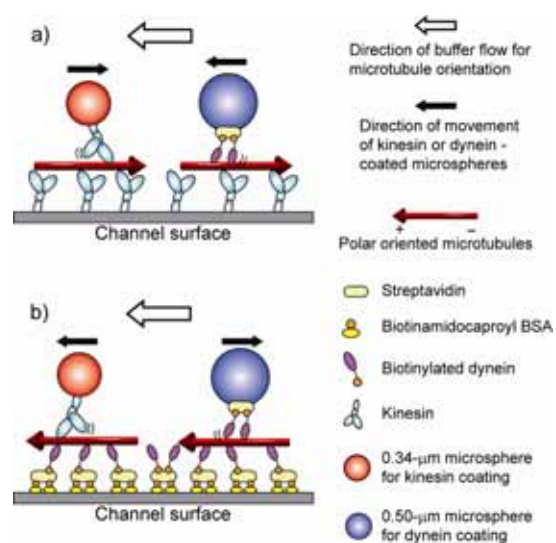


図 1：双方向搬送の概念図

かった。搬送すべき対象分子数や種類にも依存するが、今後分子ソーティングに利用する場合は検討が必要である。

(3) 分子ソーティングの実現

マイクロ流路内に配向した微小管上で、分子ソーティング技術の検討をおこなうことを目指した。これまでに、配向した微小管上でキネシンビーズの一方方向搬送を確認することができており、これをダイニンを導入した系に発展させることが必要であった。そこで、微小管を配向後、ダイニンビーズの搬送とキネシンビーズとダイニンビーズを混合した場合の搬送を試みた。上記(1)の場合に行った個別のビーズ搬送における搬送効率(約50%)よりも、効率の低下がみられた(約20%程度)。これは、複数のタンパク質がアッセイ系に導入されたことで、ビーズ同士の凝集や非特異的なガラス表面への吸着が起こったためと考えられる。しかし、運動が観察されたビーズを統計的に画像処理で運動方向を解析したところ、配向した微小管の極性に従ってキネシンビーズとダイニンビーズが所望の方向に動いていることが示された。その効率は78-98%であり、双方向搬送が行われていることを示した(論文[3]などで発表)。一方で、ビオチンやIgGを付加したビーズを大量かつ同時に搬送、ソーティングには至らなかった。今後、定量的に目的分子の付着量を評価し、ビーズの同時駆動を実

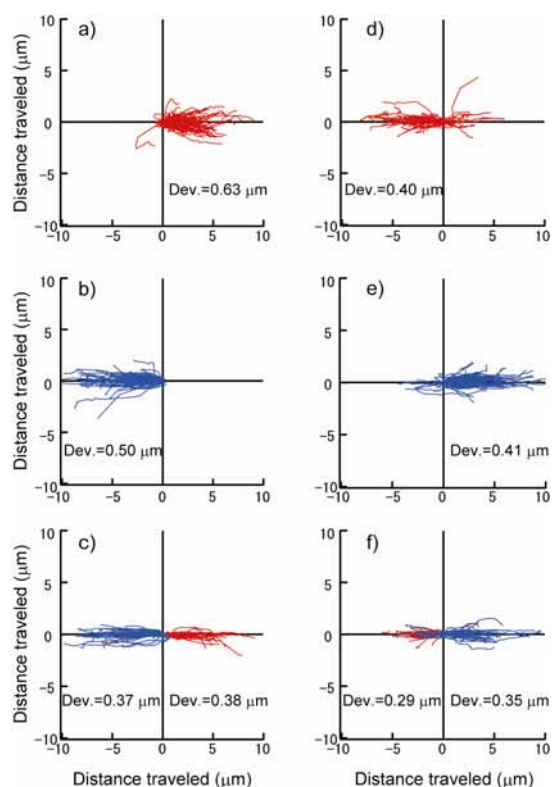


図2 : a, b, d, e) 個別搬送および c, f) 双方向搬送におけるビーズの運動方向。赤 : キネシンビーズ、青 : ダイニンビーズの動き。

現させたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

- [1] N. C. H. Le, R. Yokokawa, D. V. Dao, T. D. Nguyen, J. Wells, and S. Sugiyama, "Versatile Microfluidic Total Internal Reflection (TIR)-based Devices: Application to Microbeads Velocity Measurement and Single Molecule Detection with Upright and Inverted Microscope" Lab Chip, vol. 9, pp. 244-250, 2009. (査読あり)
- [2] R. Yokokawa, J. Miwa, M. C. Tarhan, H. Fujita, and M. Kasahara, "DNA molecule manipulation by motor proteins for its evaluation in single molecule level," Anal. Bioanal. Chem., vol. 391, pp. 2735-43, 2008. (査読あり)
- [3] R. Yokokawa, M. C. Tarhan, T. Kon, and H. Fujita, "Simultaneous and Bidirectional Transport of Kinesin-Coated Microspheres and Dynein-Coated Microspheres on Polarity-Oriented Microtubules," Biotechnol. Bioeng., vol. 101, pp. 1-8, 2008. (査読あり)

[学会発表](計17件)

- [1] C. Bottier, M.C. Tarhan, J. Fattaccioli, R. Yokokawa, D. Collard, H. Fujita, "Kinesin-based transportation of hydrophobic and hydrophilic micro-containers," International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2008), p. 29, Kyoto, Japan, Dec. 7-8, 2008. (Poster) (査読なし)
- [2] R. Yokokawa, N. C. H. Le, D. V. Dao, J. C. Wells, and S. Sugiyama, "Development and Application of Tir-Based Chip Based on Mems Technology," The first International Symposium on Micro/Nano Systems Technology, pp. 149-154, Hanoi, Viet Nam, Dec. 18-21, 2008. (査読なし)
- [3] C. Bottier, M. C. Tarhan, D. Collard, R. Yokokawa, and H. Fujita, "Kinesin-Based Transportation and Electrofusion of Lipid Vesicles," 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (TAS2008), pp.

- 871-873, San Diego, USA, Oct. 12-16, 2008. (Poster) (査読あり)
- [4] M. C. Tarhan, D. Collard, C. Bottier, R. Yokokawa, M. Hosogi, G. Hashiguchi, and H. Fujita, "Isolation and Manipulation of Single Microtubule by Silicon Microtweezers," 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (・TAS2008), pp. 862-864, San Diego, USA, Oct. 12-16, 2008. (Poster) (査読あり)
- [5] T. Nakayama, K. Tabata, H. Noji, and R. Yokokawa, "Effective Dilution of Protein for Single Molecule Assay in an Integrated Assay Device," 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (・TAS2008), pp. 766-768, San Diego, USA, Oct. 12-16, 2008. (Poster) (査読あり)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：蛍光顕微鏡用全反射バイオチップ及びその製法、並びに蛍光顕微鏡用全反射バイオチップアセンブリ

発明者：杉山 進、横川 隆司、ジョン シー ウェルズ、ナム カオ ホアイ レ、ズン ベト ダオ

権利者：学校法人立命館

種類：特願

番号：2008-119835

出願年月日：平成20年5月1日

国内外の別：国内

名称：蛍光顕微鏡用全反射バイオチップ及びその製法、並びに蛍光顕微鏡用全反射バイオチップアセンブリ

発明者：杉山 進、横川 隆司、ジョン シー ウェルズ、ナム カオ ホアイ レ、ズン ベト ダオ

権利者：学校法人立命館

種類：特願

番号：2007-121901

出願年月日：平成19年5月2日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 隆司 (YOKOKAWA Ryuji)

立命館大学・理工学部・講師

研究者番号：10411216

(3) 連携研究者

昆 隆英

東京大学大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：30332620