

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02117

研究課題名(和文)表面粗さ構造を用いた微小管運動の制御とナノ輸送システムへの応用

研究課題名(英文)Control of gliding microtubules using surface roughness structure and its application to nano transportation system

研究代表者

中原 佐(Nakahara, Tasuku)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：00756968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：表面粗さに対する微小管運動の特性変化を明らかにするために、本研究では微小管運動を連続的に捉えることができる階段状の表面粗さ構造を製作した。製作した構造上に微小管運動を構築し、移動する微小管を観測した結果、表面粗さの増加に伴い微小管の移動速度は減少し、停止している微小管の割合が増加することを確認した。また、階段状構造の段差を越えて移動し、運動を継続する微小管を一部で観察した。表面粗さ構造を用いて、微小管運動によるナノ輸送システムとしての有用性を実証するためには、対象分子の濃縮または分別など、特定のアプリケーションに向けた定量評価が今後必要になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小管運動の制御方法について、これまでに多くの方法が提案されてきたが、予め製作しておいた構造によって受動的に速度を制御する方法は極めて少なく、ナノスケールの表面粗さ構造に対する運動特性の詳細なメカニズムについては明らかにされていなかった。本研究では、微小管の移動速度および停止や剥離といった挙動が表面粗さの大きさによって変化することを観測した。また、階段状構造の段差を越えて運動を継続する微小管を一部で観察したことから、粗さ構造を用いた微小管運動によるナノ輸送システムの実現に向けて、基礎的な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we fabricated a stepwise surface roughness structure to observe a gliding microtubule continuously for investigating change of characteristics in gliding microtubule on the surface roughness. The motility assay of gliding microtubules were constructed on the fabricated structure. The observed results showed the gliding speed of microtubule was decreased with increase of surface roughness. The stopped microtubules were increased with increase of surface roughness. In addition, a part of gliding microtubules moved over the step on the step-wise structure. To demonstrate a utility as nano transport system by gliding microtubules using the surface roughness structure, quantitative evaluations for a specific application such as concentration or separation of target molecules would be required.

研究分野：BioMEMS

キーワード：キネシン 微小管 MicroTAS BioMEMS 表面粗さ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体分子モータのキネシンと細胞骨格の微小管による運動系を体の外で再構築し、ナノスケールの駆動機構として応用する研究が行われている (文献①)。図 1 は生体外におけるキネシンと微小管の運動系の概念図である。微小管は、エネルギー (ATP: アデノシン三リン酸) の供給によって、基板上に固定されたキネシン上を移動する。この運動系では、微小管に荷物を修飾することで貨物車のような輸送体として機能させることが可能であり、また、1本の微小管を多数のキネシンが支える形となるため、長距離の安定した輸送が可能である。一方、運動系の環境が変化しない場合、微小管の移動方向は不規則となり、その移動速度は一定となる。したがって、貨物車のように目的の場所へ迅速に荷物を輸送するためには、微小管の移動方向および速度制御が必要となる。

微小管運動の制御方法については、外力を作用させる能動的な方法 (アクティブ型) と、基板上に予め製作しておいた構造によって受動的に制御する方法 (パッシブ型) が報告されている。アクティブ型の制御方法としては、微小管が負に帯電していることを利用し、電界によって移動方向および移動速度を制御する方法が提案されている (文献②)。パッシブ型の制御方法については、微細加工技術で製作されたマイクロ構造によって微小管の移動方向を壁面に沿わせる形で物理的に制御する方法が提案されている (文献③)。しかし、移動速度については、ATP 濃度やキネシン密度、溶液の温度を変化させる必要があるため、構造によって制御することが難しい。そのため、研究代表者の知見では、ナノスケールの間隙において ATP 濃度に変化が生じ、微小管の移動速度が変化した、という報告例に限られている (文献④)。パッシブ型の制御方法は、外部電源などの装置を必要とせず、小型化や低コスト化に繋がるため、将来、微小管運動をナノスケールの輸送体として応用する上で重要な技術になると考えられる。

そこで研究代表者は、新たなパッシブ型の速度制御方法として、ナノメートルオーダーの表面粗さ構造に着目した。動力源となるキネシンの大きさと同程度の表面粗さ構造を製作することで、微小管の運動が阻害され、運動特性に変化が生じると考えたためである (図 2)。研究代表者らはこれまでに、表面粗さの異なるシートを用意し、その上で微小管運動を構築した際、表面粗さの増加に伴い停止した微小管の割合が増加することを見出している (文献⑤)。しかし、その詳細なメカニズムについては明らかに出来ておらず、その特徴を工学的に応用した技術は確立出来ていない。

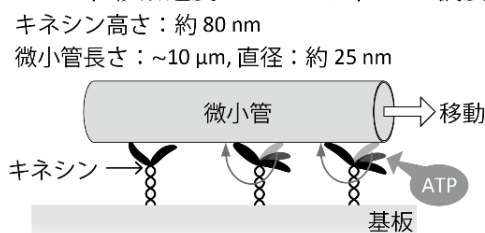


図 1 キネシンと微小管の運動系

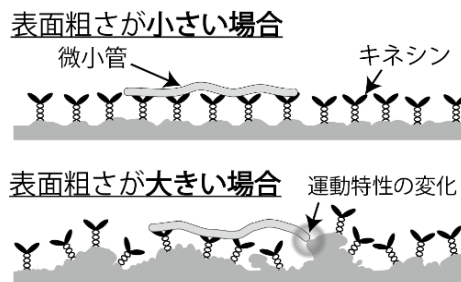


図 2 粗さ構造に対する運動 (仮説)

### 2. 研究の目的

本研究は、表面粗さ構造に対する微小管運動の特性変化のメカニズムを明らかにするとともに、その特性を利用したパッシブ型の輸送システムを構築することが目的である。

### 3. 研究の方法

異なる表面粗さに対する微小管運動の特性変化を連続的に捉えるために、図 3 に示すような階段状の構造を製作した。材料にはポリイミドフィルムを使用し、加工には反応性イオンエッチングを用いた。幅 2 mm、長さ 19 mm 程度のパターンから始め、幅を 2 mm ずつ増やすことで徐々に加工範囲を広げる加工方法とし、本研究では運動特性の変化要因として考えられるキネシンの大きさ 80 nm を算術平均粗さの目標値とした。また、製作した構造の観察および表面粗さの計測には、それぞれ走査型電子顕微鏡 (SEM) および原子間力顕微鏡 (AFM) を使用した。また、表面粗さの評価指標として、算術平均粗さ  $Ra$  に加えて、要素 (凹凸) の平均長さ  $RSm$ 、および最大高さ  $Rz$  を測定した。

表面粗さ構造における微小管運動の特性評価では、製作した表面粗さ構造の上に簡易的な流路を製作し、流路内に試薬を導入して微小管運動を構築後、倒立型顕微鏡と CMOS カメラを用いて運動の様子を観察した。また、画像処理ソフトウェア (ImageJ) を用いて、得られた連続写真から微小管の移動速度を算出した。また、微小管の挙動を①停止しているもの、②一部が剥離した状態で停止しているもの、③停止していたが途中で剥離したものの、④運動していたが途

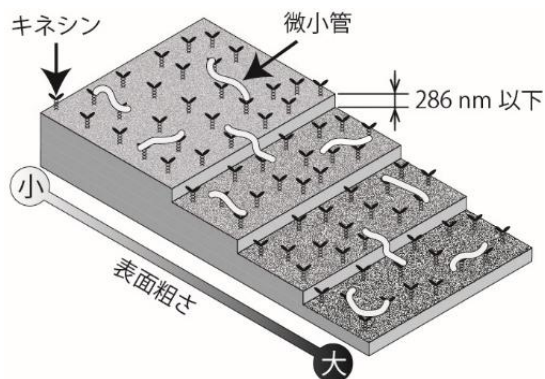


図 3 表面粗さ構造の概念図

中で剥離したものの、⑤一部が剥離した状態で運動しているもの、⑥運動しているものに分類し、挙動変化の割合を評価した。

分子修飾した微小管を濃縮させるなど、表面粗さ構造による工学的応用を見据えて、特定の領域で微小管の速度を低下させるパッシブ型輸送システムの構築を試みた。段差が 286 nm 以上の場合、微小管は移動先のキネシンと結合出来ず、運動を継続出来ないことが報告されている(文献④)。そのため、本実験ではフォトリソグラフィによるパターンの形成と反応性イオンエッチングの加工を複数回に分けておこない、1 回あたりの加工時間を 2 min とし、1 段あたりの加工深さが 286 nm 以下となる方法でマイクロスケールの微小な階段状表面粗さ構造を製作した。製作したマイクロパターンは  $100 \times 30 \mu\text{m}$  の長方形を幅が 30, 45, 60, ... 165  $\mu\text{m}$  のように、一方に 15  $\mu\text{m}$  ずつ拡大するものであり、合計 10 段の構造とした。製作した構造を SEM および AFM で観測した後、構造上での微小管運動を倒立型顕微鏡と CMOS カメラで観察した。本実験では、輸送システムとしての基礎的知見を得るために、段差を越えて移動する微小管を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 階段状表面粗さ構造の製作

図 4 に 1, 3, 4, 7, 8, 10 段目の SEM 観察写真(すべて 40000 倍)を示す。加工時間が最も長いものが 1 段目であり、最も短いものが 10 段目である。図 4 中の赤丸に示すようなポリイミドフィルムの残渣物は 1 段目に向かうほど大きくなり、密度は小さくなった。

図 5 に AFM で計測した各段の算術平均表面粗さ( $Ra$ )の平均値、最大高さ粗さ( $Rz$ )の平均値、要素の平均長さ( $RSm$ )の平均値を示す。算術平均粗さ( $Ra$ )は、1 段目で最大 58.33 [nm]、10 段目で最小 1.791 [nm]となり、10 段目に向かい減少する傾向を示した。また、最大高さ粗さ( $Rz$ )は、2 段目で最大 327.6 [nm]、10 段目で最小 14.96 [nm]となり、要素の平均長さ( $RSm$ )は、1 段目で最大 606.3 [nm]、9 段目で最小 138.0 [nm]となっており、段数の増加に伴い減少する傾向がみられた。算術平均粗さ( $Ra$ )は目標値である 80 [nm]に達していなかったが、1 段目に向かい増加する傾向があり、42 nm 以上の場合においても微小管の運動特性に影響を与えると考えられるため(文献⑤)、製作した構造は微小管運動の特性評価実験に使用できると考えた。

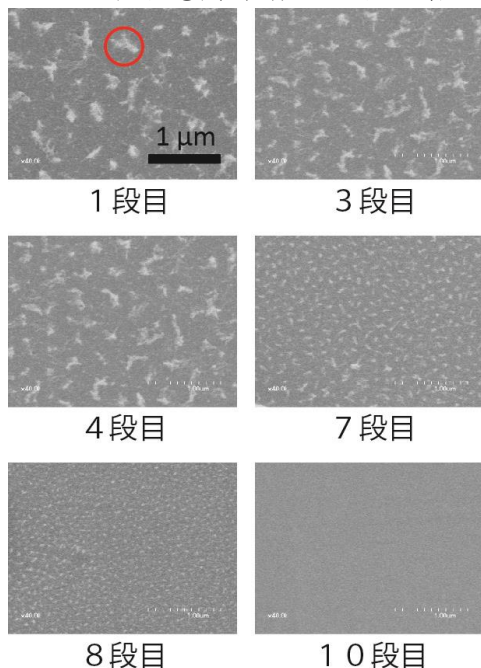


図 4 表面粗さ構造の SEM 観察写真

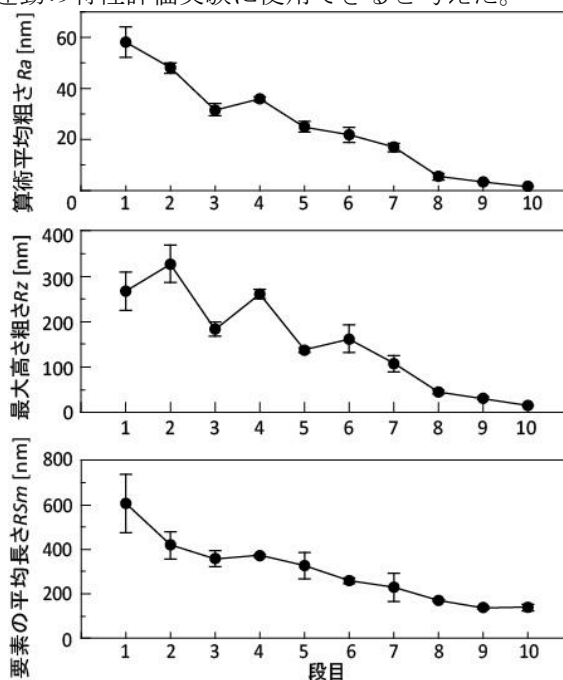


図 5 AFM による表面粗さの計測結果

##### (2) 表面粗さに対する微小管運動の特性変化

図 6 に 10 段目の微小管観察写真を示す。図中矢印は微小管の先端を示しており、10 段目においては時間経過とともに微小管が移動する様子を観察した。図 7 に各段の微小管平均速度を示す。10 段目で微小管速度は最大 0.329 [ $\mu\text{m/s}$ ]となり、10 段目から 6 段目に向かい微小管速度は低下する傾向が見られた。また、5 段目から 4 段目では微小管速度が増加し、2 段目では微小管速度が最小 0.083 [ $\mu\text{m/s}$ ]となった。5 段目から 4 段目においては、観察中に微小管が褪色したため、新たにキネシン、ATP、蛍光微小管を流路内に導入しており、その影響によって 4 段目の微小管速度が上昇したと考えられる。図 8 は、算術平均粗さ( $Ra$ )、最大高さ粗さ( $Rz$ )、要素の平均長さ( $RSm$ )に対する微小管平均速度の評価結果である。算術平均粗さ( $Ra$ )、最大高さ粗さ( $Rz$ )、および要素の平均長さ( $RSm$ )の増加に伴い、それぞれ微小管の平均速度は減少する傾向が確認された。特に、最大高さ粗さ( $Rz$ )が最大のときに微小管速度が最小となり、速度変化の傾向も近いことから、微小管速度の変化は最大高さ粗さ( $Rz$ )による影響が大きいと考えられる。また、微小



管の移動速度が減少した要因については、粗さの増加に伴い、微小な間隙に到達する ATP 分子の頻度が減少したことで、キネシンの運動サイクルが減少したためだと考えられる（文献④）。

図 9 は、各段における微小管の挙動（6 分類）の評価結果である。段数の減少に伴い停止や剥離する微小管の割合が増加する傾向が見られた。算術平均粗さ ( $Ra$ )、最大高さ粗さ ( $Rz$ )、要素の平均長さ ( $RSm$ ) と微小管の挙動変化の間には、明確な相関はみられなかったが、1 段目と 2 段目の粗さ構造上においては 60[%] 以上の微小管が停止していたことから、キネシンの大ききの半分程度（約 40 [nm]）の粗さ構造上では、キネシンの付着密度の減少等により、微小管運動の継続性が阻害されたと考えられる。

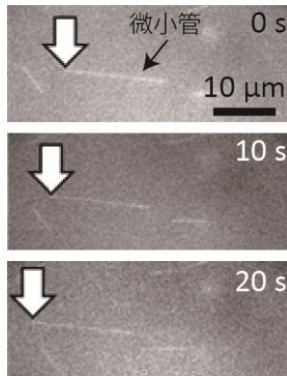


図 6 微小管運動の観察写真

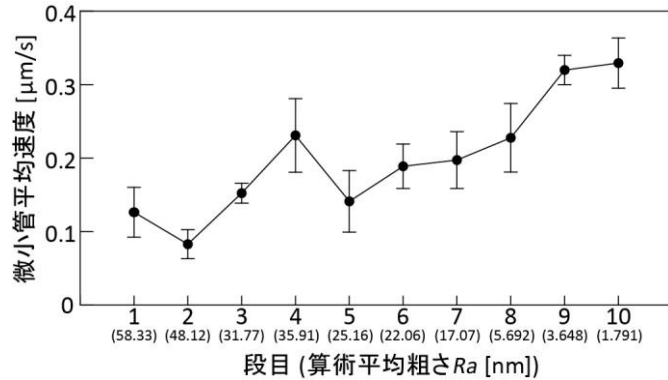


図 7 各段における微小管平均速度

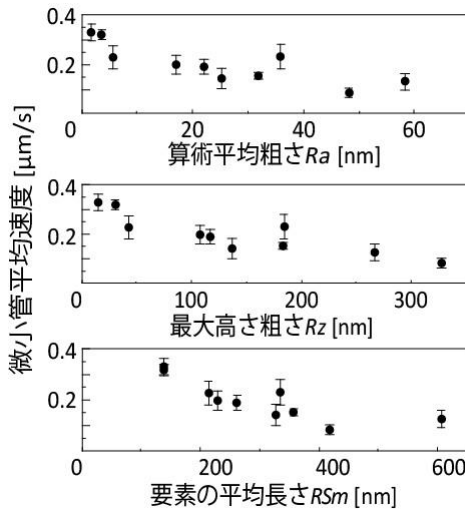


図 8 表面粗さに対する平均速度

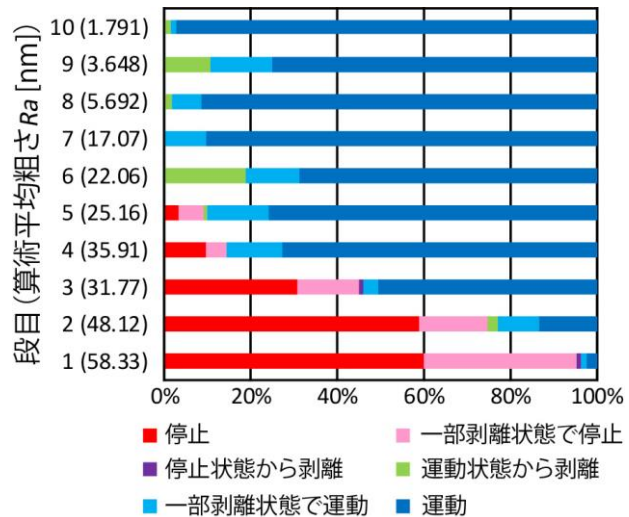


図 9 微小管運動の挙動評価結果

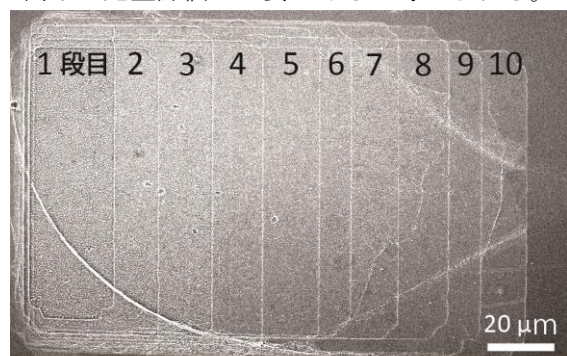
### (3) マイクロスケールの微小な階段状粗さ構造における微小管運動の観察

図 10 に、製作した微小な階段状粗さ構造の SEM 観察写真を示す。600 倍の観察写真より、加工されたパターンが約 15  $\mu\text{m}$  間隔で拡大していることを確認した。また、1, 4, 7, 10 段目の 40000 倍の観察写真より、製作したパターンの表面粗さは加工時間が長いものほど、ポリイミドフィルムの残渣物の大きくなっていることを確認した。図 11 は AFM を用いて計測した算術平均粗さと、各段の段差をまとめたグラフである。算術平均粗さは 7 段目で最小 16.9 nm となり、4 段目で最大 38.9 nm となることを確認した。7 段目から 4 段目にかけて粗さが増加する傾向にあったが、4 段目から 1 段目では大きな変化がみられなかった。また、10 段目から 6 段目においても増加する傾向が見られなかったことから、ポリイミドフィルムの加工工程において、フォトリソグラフィで使用したフォトレジストの残渣物がエッチングマスクとして働き、所望の加工がおこなわれていなかったと考えられる。各段の段差については、4 から 5 段目を除き、高さ 286 nm 以下で製作できていることを確認した。以上の結果より、所望の表面粗さ構造は得られなかったが、算術平均粗さの増加傾向が一部見られたことと、各段の段差が概ね 286 nm 以下で製作できていたことから、本実験で製作した構造は、輸送システムとしての基礎的知見として、段差を越えて移動する微小管の観測実験に使用できると考えた。

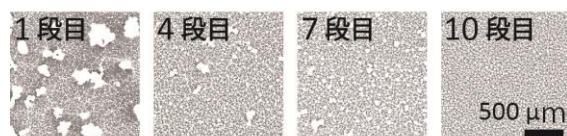
図 12 は、製作した構造上に微小管運動を構築後、段差を越えて移動する微小管を観察した写真である。2~3, 5~6, 6~7, 8~9, 9~10 段目の段差では、微小管が段差を越えて移動する様子を観察した。8 段目~9 段目の段差では、段差を移動した後、しばらく運動を継続する微小管と移動中に剥離する微小管が見られた。本実験では、段差を越えて運動を継続する様子を一部観察したが、構造上を移動する微小管の数が少なく、多くの微小管が 10~15 s で剥離したため、速度計測には至らなかった。剥離の要因として、微小管運動の継続に必要なキネシン密度が粗さ構

造上で十分に得られておらず、移動の途中で微小管がキネシンと結合できず、剥離に至ったと考えられる。

今後、輸送システムとしての有用性を実証するためには、微小管運動の特性評価に加えて、粗さ構造による運動特性変化を用いた対象分子の濃縮または分別など、特定のアプリケーションに向けた定量評価が必要であると考えられる。

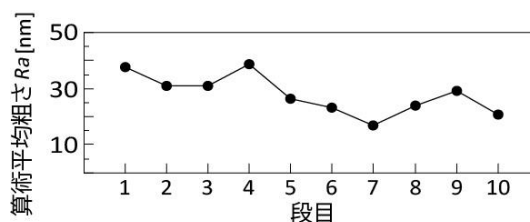


(a) 全体の SEM 写真 (600 倍)

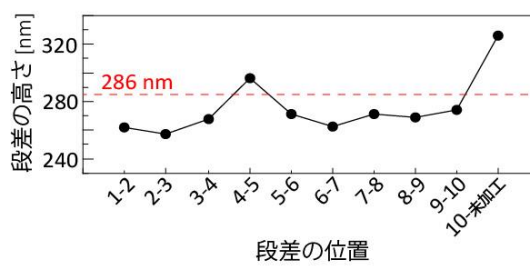


(b) 1, 4, 7, 10 段目の拡大写真 (40000 倍)

図 10 マイクロパターンの SEM 観察写真



(a) 各段の算術平均粗さ



(b) 段差の高さ

図 11 表面粗さと段差の計測結果

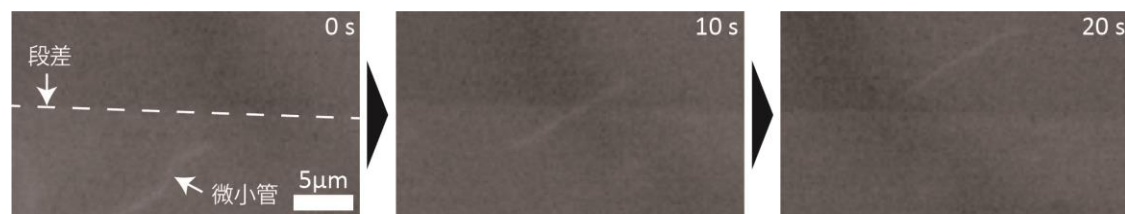


図 12 段差上を移動する微小管の観察写真

<引用文献>

- ① G. Saper and H. Hess, Synthetic Systems Powered by Biological Molecular Motors, Chemical Reviews, 120 (1), 2020, 288-309.
- ② M. G. L. van den Heuvel and C. Dekker, Motor Proteins at Work for Nanotechnology, Science, 317, 2007, 333-336.
- ③ Y. Hiratsuka, T. Tada, K. Oiwa, T. Kanayama, T. Q. P. Uyeda, Controlling the Direction of Kinesin-Driven Microtubule Movements along Microlithographic Tracks, Biophysical Journal, 81 (3), 2001, 1555-1561.
- ④ R. Stracke, K. J. Böhm, J. Burgold, H. J. Schacht, E. Unger, Physical and technical parameters determining the functioning of a kinesin-based cell-free motor system, Nanotechnology, 11 (2), 2000, 52-56.
- ⑤ 中原 佐, 宮崎 勇, 小寺 秀俊, 横川 隆司, 南 和幸, 表面粗さ構造における微小管運動の特性評価, 電気学会論文誌E (センサ・マイクロマシン部門誌), 138 巻, 11 号, 2018, 503-508.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakahara Tasuku, Ise Kazuki, Minami Kazuyuki	4. 巻 31
2. 論文標題 Fabrication of photothermally actuated microheater with SU-8/Cu composite	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Micromechanics and Microengineering	6. 最初と最後の頁 095007 ~ 095007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6439/ac1996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中原佐, 伊勢一貴, 南和幸
2. 発表標題 感光性複合材料を用いた微小管運動制御デバイスの開発
3. 学会等名 第38回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野 颯良, 中原 佐, 南 和幸
2. 発表標題 細胞整列用磁気駆動型デバイスの開発
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第60期総会・講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中原佐, 伊勢一貴, 南和幸
2. 発表標題 SU-8/Cu複合材料のヒータ特性評価および微小管運動への応用
3. 学会等名 2020年度 電気学会E部門 バイオ・マイクロシステム研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊勢一貴, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 SU-8/Cu複合材料を用いたデバイス製作と微小管運動制御への応用
3. 学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Ise, T. Nakahara, K. Minami
2. 発表標題 Velocity and direction control of gliding microtubules by using photosensitive composite
3. 学会等名 33rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野颯良, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 細胞整列に向けた磁気駆動型細胞伸展デバイスの開発
3. 学会等名 第13回 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西江葵, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 階段状粗さ構造における微小管運動の速度評価
3. 学会等名 第39回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山大輝, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 SU-8/Cu複合材料を用いた光熱駆動型マイクロポンプの開発
3. 学会等名 IIP2023 情報・知能・精密機器部門 (IIP 部門) 講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山口大学大学院創成科学研究科 微小生体機械学研究室ホームページ  
<http://mems.mech.yamaguchi-u.ac.jp/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関