

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01288

研究課題名(和文) バイオ人工筋肉の制御分子パーツの開発とマイクロロボットへの実装

研究課題名(英文) Development of molecular parts for regulation of bio-artificial muscle

研究代表者

平塚 祐一 (Yuichi, Hiratsuka)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：10431818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：最近我々は生体の分子モータを遺伝子工学的に改造し照射により水溶液中の特定の部位に人工筋肉を造形させることに成功した。この人工筋肉を利用して大きさ数ミリメートルの機械構造を駆動させることに成功しており、マイクロロボットの3次元光造形の可能性を開いた。しかし、これらのデバイスは照射後の一回の収縮のみで実用的ではなかった。動力源である生体分子モータを光や電気等の人工的な信号で制御するのは困難であったため制御系は未開拓だった。本研究では、生体分子モータの運動を光信号で制御可能となる分子パーツを遺伝子工学的に設計・構築し、光造形可能で且つ光操作可能な新規の人工筋肉を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質は現在、食品や医療の分野で広く利用されている。しかしこれらは生体にある膨大な種類のタンパク質のごく一部にすぎず、タンパク質の応用技術は未発達の段階にある。タンパク質は炭素・窒素・酸素などのありふれた元素のみで構成されているにも関わらず、筋収縮に代表されるモータ機能をはじめ、従来の人工材料と類似した多様な性質を示し、将来的には幅広い分野で応用利用できる可能性を持っている。しかし単離されたタンパク質の機能は限定的で、特に人工的な制御が困難で実用に至っていない。本研究では遺伝子工学的にタンパク質を改良し光信号で制御可能な人工筋肉を開発した。本成果はタンパク質の応用を進める重要な一歩となる。

研究成果の概要(英文)：Recently, we succeeded in forming artificial muscles at specific sites in an aqueous solution using light irradiation by genetically modifying motor protein. Using this artificial muscle, we could drive a mechanical structure several millimeters in size, which open up the possibility of three-dimensional stereolithography of microrobots. However, these devices were not practical because they only contracted once after light irradiation. The regulation of motor protein was unexplored because it was difficult to control the biomolecular motor, which is the power source, with artificial signals such as light or electricity. In this research, we succeeded in constructing artificial muscle which be printable and controllable by optical signals.

研究分野：生物物理学

キーワード：人工筋肉 モータータンパク質 光遺伝学 タンパク質工学 分子ロボティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年マイクロロボット分野において注目すべき論文がいくつか発表されている。一つは心筋細胞を利用したエイ型ロボットで、遺伝子工学的に光応答性を付加された心筋細胞シートを動力として動くロボットである (Park, Science, 2016)。また3Dプリンタで構築されたタコ型ロボットはマイクロ流路を内蔵し化学反応により酸素圧力により駆動する (Wehner, Nature, 2016)。これらは従来のロボット技術とは異なる新しいコンセプト (生体材料や3Dプリンタ、マイクロ化学反応など) を持ち、マイクロロボット開発の新しい潮流が生まれつつある。

一方、我々は最近タンパク質分子モータの一種キネシンを遺伝子工学的に改造することにより、光照射により指定した特定部位に大きさ数ミリメートルの人工筋肉を形成させる分子システムの構築に成功した。この人工筋肉は、キネシンの力学的な活性により微小管 (繊維状のタンパク質) が自己集積的に折りたたまれ、筋肉のような収縮性のファイバーが形成される。予め作製した骨格構造にこの人工筋肉を形成させ、ミリメートルサイズの人工筋肉で駆動する微小ピンセットや昆虫型マイクロロボットのプロトタイプの構築が可能となった。この光照射部位のみに人工筋肉を発生させることを生かすことで人工筋肉の3次元光造形の実現の可能性が見えてきた。

2. 研究の目的

上述の人工筋肉は光照射により人工筋肉の形成と収縮が同時に起こり、収縮は一回限りという欠点があった。生体内では動力源であるキネシンは複雑な生化学反応によって制御されているが、この生体内制御を人工的な光や電気信号に接続するのは容易ではない。生体分子モータは高度な分子機械であることはよく知られているが、その制御システムも巧みな分子機械であり、それらを自由に設計することは分子レベルから構成されるデバイス設計に重要な課題となっている。そこで本研究では人工筋肉の収縮・弛緩を光で制御できる制御分子パーツの開発を行った。

3. 研究の方法

本研究では、収縮運動を可逆的に制御可能にする分子パーツを遺伝子工学的な手法を用いて開発を行った。さらに反応速度論的な解析とシミュレーションを行い、収縮制御の最適化を図った。

キネシンの運動の人工的な制御に関しては、アゾベンゼン等を用いた化学的な方法や運動方向を光照射により切り替えられる遺伝子組換え人工キネシン等が報告されている (Nakamura, Nature Nanotechnol., 2014)。しかしこれらは運動速度がキネシン本来の速度より著しく劣り実用性に乏しい。その原因は、キネシンのモータ機能部位に人為的な変異を加えたために本来の機能が損なわれたと考えられる。そこで本研究ではモータ機能部位には直接手を加えないで制御する以下の手法を開発し、運動速度・収縮力を保持したまま光信号により制御可能な分子パーツを作成した。

キネシン運動制御部位を改造したキネシン光制御分子パーツ

天然のキネシンはC末端付近に自己を制御する部位を持っている。この部位は生体内の複雑な生化学反応により制御されている。本研究ではこの部位に植物の光屈性 (光に向かって成長する性質) に関与するタンパク質 Phototropin の光制御部位 LOV を挿入したキネシン光制御分子パーツまたは、LOV、制御部位、キネシンを融合させた制御機能付きキネシンの開発を行った。

4. 研究成果

キネシンの運動活性を光で制御するために、光センサーである LOV 及びキネシンの障害部位 (KI) を融合させたいくつかのタイプの分子を構築して、その機能を測定した。測定には *in vitro* motility assay というキネシンをガラス基板に結合させ、その表面上の微小管の運動を観察するアッセイ方法を利用した。本研究では、人工筋肉の収縮と弛緩の制御可能な制御分子を得ることを目的としており、*in vitro* motility assay においては光照射により a) 微小管がガラス表面上を動く (収縮に相当)、または b) 微小管がガラス表面から外れる (弛緩に相当) となるような分子の探索を行った。

・LOV-KI 制御分子パーツ

LOV は光照射されると分子内の長い ヘリックス (J) がランダムコイルになり構造変化を示すことが知られている。この Ja にキネシンの障害部位 (KI) を連結し、光照射前は KI が LOV に覆い隠されキネシンの障害が生じないが、光照射すると KI 部が露出してキネシンが障害される分子を構築した。LOV と KI の間のリンカー長を変えてキネシンへの障害の程度を光照射有り無しで調べた。その結果、本分子は障害効果が低く数十 μM 以上を加えないとキネシンの運動活性を障害しないことが判明した。さらに *in vitro* motility assay では光照射時には微小管がガラス基板から外れるのではなく、微小管の運動が止まるという期待とは異なる結果になった。また光を消して微小管は再び動き出すのではなく、止まったままだった。これは本分子がガラス基板に非特異的に吸着して、微小管と基板の間を架橋してしまうためと思われる。

・LOV・KI・キネシン融合タンパク質

上述の LOV-KI はキネシンに対する結合力が低いと予想されたため、この分子をキネシンに直接連結した LOV-KI-キネシンを作成して、その活性を測定した。LOV と KI、KI とキネシン間のリンカーのサイズを適切にすることにより、光照射により微小管がガラス基板から外れるタンパク質分子を構築することに成功した。*in vitro* motility assay では二枚のカバーガラスまたはスライドガラスでフローセルを作成し、そこにキネシン溶液を流し込みキネシン分子や微小管をガラス表面に固定する。通常よりこのガラス間の距離を小さくする (10 μm 以下) にすると、光照射により外れた微小管は、光消灯後に 1-3 分でガラス面に再吸着して通常のカネシンの運動速度と同程度の速度で動き出した (図 1)。これは可逆的に制御可能なキネシン分子となる。さらに、この分子を人工筋肉に導入したところ、期待通りに光照射により収縮・弛緩可能になることがわかった。

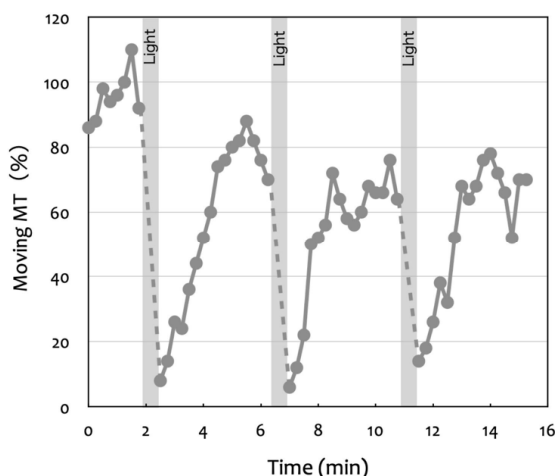


図 1 光照射による分子モータの運動制御 分子モータによる駆動していた微小管が光照射 (450nm) により分子モータから解離し OFF 状態になった。光照射を停止すると徐々に微小管の動きが戻り、2 - 3 分後に ON 状態に復帰した。

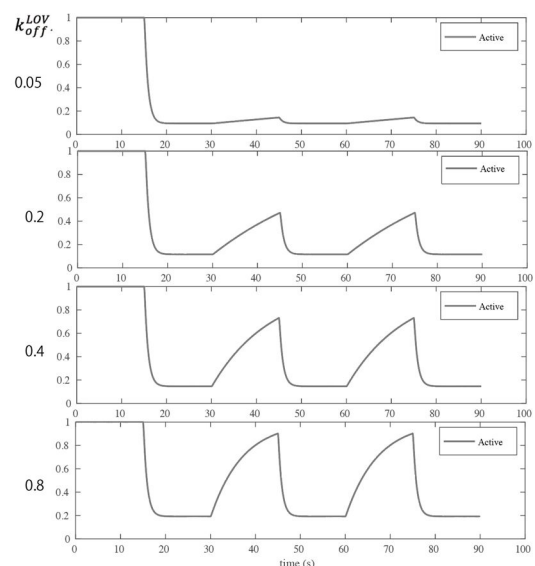


図 2 収縮弛緩制御の最適化シミュレーション 分子モータの各反応速度を調整することにより、すばやく応答する条件を検討した。

・収縮弛緩の最適化

上述の LOV・KI・キネシン融合タンパク質は光照射の有無によりキネシンの運動活性を制御可能であるが、光照射後の復帰が遅く、復帰には数分間を要した。人工筋肉の制御には、よりレスポンスの早い制御が期待される。そこで、LOV 及びキネシン阻害のそれぞれの素過程の反応速度を最適化する事により制御の最適化を図った。実験に先立ってそれぞれの時定数を計測した。その後シミュレーションにより最適な速度定数を見出した(図 2)。実際の人工筋肉を作成した結果、シミュレーションに近い、数秒以内の早いレスポンスで反応する制御機能付き人工筋肉の開発に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Pradnya Vivekanand Pise, Yuichi Hiratsuka
2. 発表標題 Study of regulation of kinesin using photo controllable kinesin auto-inhibitory domain.
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤直輝、Pradnya Pise、新田高洋、森島圭祐、平塚祐一
2. 発表標題 光照射による生体分子モーターを用いた人工筋肉の可逆的な伸縮制御
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス 講演会 2024
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	新田 高洋 (Nitta Takahiro) (20402216)	岐阜大学・工学部・教授 (13701)	

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
---------	---------