

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22360103

研究課題名（和文） 生体ナノモーターで駆動する光学素子とその制御機構の開発

研究課題名（英文） Development of optical device and its regulation system driven by bio nano-motors.

研究代表者

平塚 祐一（HIRATSUKA YUICHI）

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・准教授

研究者番号：10431818

研究成果の概要（和文）：

生物の保護色細胞メラノフォアでは微小管が放射状ネットワークを構成しており、モータータンパク質により色素顆粒がそのネットワークに沿って運搬され、凝集・分散することで細胞の色変化を作り出している。本研究では、モータータンパク質の作用による色素の凝集・分散をより実際の細胞よりより単純な原理で実現し、素子の制御機構を含めた光学システムの応用展開を図った。

研究成果の概要（英文）：

In melanophore, a cell functioned as a camouflage, microtubules form aster-like networks, and a color of the cell body is changed by transporting pigment granules along the network by motor proteins. In this study, we realized the aggregation and dispersion of the pigments by motor protein in the micro-chamber using more simple principle and system from the native melanophore, and challenged to create the regulation system of its optical device driven by protein molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：ナノバイオ工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：モータータンパク質、マイクロマシン、マイクロデバイス、bioMEMS

## 1. 研究開始当初の背景

生物には体表を周囲の環境に応じ変化させる保護色機能を有するものが存在する。この生体機能はほぼすべての場合において、モータータンパク質と呼ばれるタンパク質の力学的な作用によって引き起こされている。代表的なものとして、魚類の色素細胞（メラノフォア）があげられる。メラノフォアは色素を

持った細胞で、色素顆粒が細胞内でモータータンパク質により運搬され凝集・分散することによりその色変化を作り出しており、大きさ50ミクロン程の細胞で、内部に微小管とよばれる繊維状タンパク質が存在し、細胞中心から微小管が放射線状に伸びた星状体構造という細胞骨格ネットワークを作っている。一方、生体内にはモータータンパク質と呼ば

れる細胞内物質を運搬するタンパク質が存在し、メラノフォアの場合、色素顆粒を上述の微小管ネットワークに沿って細胞中心に運搬（凝集）または逆に、細胞全体分散させ細胞の色を変化させている。

これまで、われわれはこの細胞システムを生体外に再構築した光学素子の構築に取り組んできた。微細加工技術とモータータンパク質技術を応用し、ガラス基板上にメラノフォアに見られる微小管ネットワークと同等の構造を作り出した。さらに、人工色素をモータータンパク質によって微小管ネットワーク上で輸送させたメラノフォアを模倣した光学素子のプロトタイプを作製に成功している。こうした分子レベルから構成される微小機械は今後のマイクロマシン技術の発展に大きく寄与すると期待している。しかし、この研究をさらに応用展開させるには技術的な問題がある。一つは、この放射線状の微小管ネットワークを生体外に作り出すには再現性・安定性の面で問題がある。微小管には線維内部に極性があり、その極性を含めた放射線状構造を作らなくてはならないが、再現性よく作製するのは困難である。第二に、凝集反応は容易に達成できるが、分散反応は原理的に難しい点が挙げられる。生物学の教科書では、凝集反応にはダイニンと呼ばれるタンパク質が色素顆粒を細胞中心へ、一方、分散はキネシンと呼ばれる別種のモータータンパク質の反対方向に色素を運搬すると語られてきた。しかし、このままでは色素顆粒は細胞全体に分散せず細胞周辺に分布することになる。近年、分散機構にはキネシンの他にミオシンVと呼ばれるモータータンパク質も寄与し、さらにアクチンフィラメントと呼ばれる微小管とは別のネットワークが必要であることが報告された。それらを含めるとシステム自体がかなり複雑になる。第三は、この光学システムを可逆的に制御するためには、この3種のモータータンパク質の各々を制御する必要があるが、これを人工的に操作するにはかなりの困難が予想される。そこで、より単純なシステムを考案する必要があった。

## 2. 研究の目的

メラノフォアの分子機構の基本原理は、色素顆粒であるナノ粒子が微小空間内で凝集・分散することである。モータータンパク質の研究分野では、「超沈殿」と呼ばれるモータータンパク質と繊維タンパク質によるATP依存的な凝集現象が古くから知られてきた。これは、モータータンパク質が複数本の繊維タンパク質と会合し、それらをモーター機能

により手繰り寄せるため、モータータンパク質同士の相対距離が縮まり凝集する現象である。Nedelecらは、キネシン・ストレプトアビジン複合体を使ってこの現象をマイクロチャンバ内でおこない、モータータンパク質をチャンバ中心に凝集させることが可能な事を雑誌Natureで報告した。本機構を利用すれば、色素顆粒の凝集・分散機構を単純化できる。つまり、モータータンパク質を結合した色素顆粒と繊維タンパク質をガラス基板上に作成したマイクロチャンバに密封し、ATPの添加により分散している色素顆粒をチャンバ中心に凝集させ色変化を作り出す。逆反応である分散反応は、モータータンパク質を微小管から解離させ、自由拡散により色素顆粒をチャンバ内に均一に分散させる。

本研究では以下の3点に力点を置きモータータンパク質で駆動する光学デバイスの研究開発を進めた。

- 1) 遺伝子工学によるキネシン分子の人工制御機構の導入（拡散・凝集スイッチ機構の開発）
- 2) 制御機能付きキネシンを用いたアスターの形成
- 3) 効率的な凝集・拡散反応のコンピュータシミュレーションによる探索

本研究では、上記の要素技術を開発し、色素の凝集・分散を実際の細胞より、より単純な原理で実現し、素子の制御機構を含めた光学システムの応用展開を図る。

## 3. 研究の方法

本研究の最終目標は、ディスプレイサイズ数センチ、可逆的に映像を映し出す生体ナノモーターで描画される光学デバイスを開発・開拓することである。最終目標達成に向け、以下の4つの要素技術の開発および小到達点を設定した。

(1) 単純素子の試作（凝集反応）： 外部刺激（光照射）により色変化を起こす光学素子のプロトタイプを作製する。微小管と色素顆粒・モーター分子複合体と、さらに光により活性化するcagedATPをマイクロチャンバに密封し、光照射により色素顆粒が凝集し色変化をする単純な光学素子を試作する。高効率な密封方法などを探る（図1）。

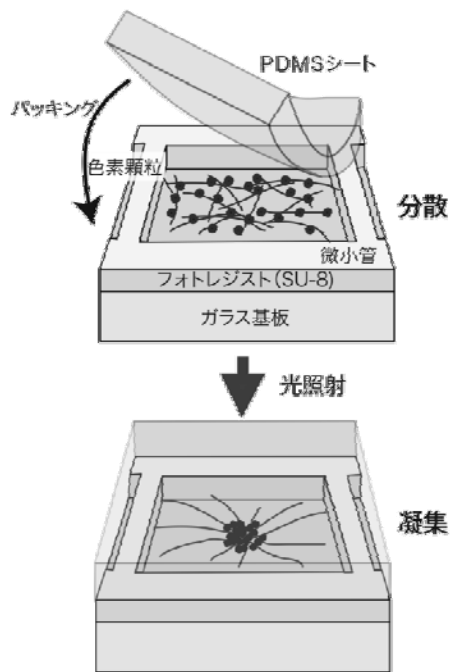


図1. マイクロチャンバ内の色素の凝集模式図

(2) 運動活性の人工制御可能なキネシン分子の開発：キネシン分子は生体内ではリン酸化などの複雑な制御によりその運動活性が制御されている。本研究では人工的に運動機能を制御できるよう、キネシンを遺伝子工学的に改変した人工キネシンを作成した。本研究では外部刺激によりキネシンが4量体を形成する人工キネシン (K465m13 / CaM-CFP) を作成し、4量体形成に伴い微小管アスター構造を作る分子システムの開発に取り組んだ (図2)。

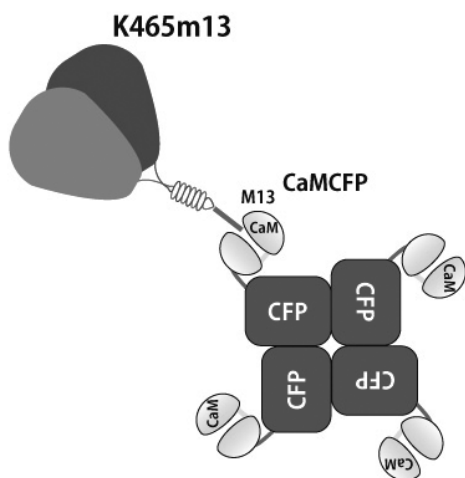


図2. カルシウム制御によるキネシン複合体の形成 (模式図)

(3) Ca/CaMの光による制御法の開発：前出の人工キネシンはカルモジュリンと呼ばれるカルシウム結合タンパク質を介して制御される。カルモジュリンはタンパク質としては低分子で機能が単純なため活性の制御機構の導入が容易な可能性がある。そこでカルモジュリンに光スイッチを導入を検討した。HahnらはRacと呼ばれる細胞運動の制御タンパク質と光応答タンパク質を結合させた光応答性Rac (PA-Rac)の作製に成功し、細胞の運動を光により制御した。この制御方法を応用し光応答性のカルモジュリンの作製を試みた。

(4) コンピュータシミュレーションによる系の最適化：凝集・拡散反応の応答性や再現性を向上させるために、マイクロチャンバの大きさ、拡散速度に関わる微小管の長さ・色素顆粒の大きさなどの至適パラメータをコンピュータにより予測しつつ最適条件を見いだした。

#### 4. 研究成果

(1) 微小管アスター構造のマイクロチャンバ内での形成と密封法の確立：本研究で重要な要素技術であるマイクロチャンバ内での微小管の密封方法の探索を行った。マイクロチャンバはソフトリソグラフィ法により作製し、微小管とキネシン複合体

(K465avitag-streptavidin 複合体) を添加後、チャンバを密閉し、アスター形成の観察を行った。チャンバの密封方法は様々な手法が知られているが、数万個以上のマイクロチャンバに蛋白質溶液を一度に密封し、且つ長時間の蛍光観察可能な手法は知られていない。そこで、非蛍光性の特殊フィルムを利用することでこれを容易に実現できる系を模索した。フィルムの密着のための最適な圧力や、フィルムの毒性を除く処理等を検討し、再現性よくチャンバ内に微小管を形成させることに成功させた。

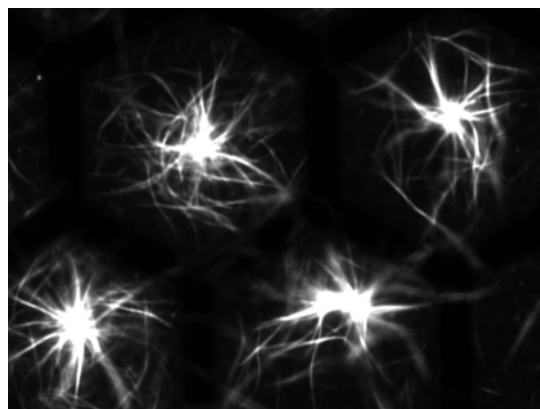


図3. マイクロチャンバ内に微小管アスターを安定の形成させることに成功

(2) カルシウム制御によるキネシン複合体の形成とアスター形成のカルシウム制御：キネシンのC末端にカルモジュリンと特異的に結合する m13 (MLCK の CaM 結合サイト) 配列を連結し、一方 CFP (蛍光タンパク質) の N 末端に CaM を遺伝子工学的に融合させた。我々が用いた CFP (AmCyan) は 4 量体タンパク質であることが報告されており、そのため、カルシウム存在下では CaM が活性化され m13/CaM 結合を形成するため、キネシンが CFP を核とした 4 量体を形成すると予想された。この 4 量体形成をゲル濾過法に確認したところ、K465-m13 及び CaM-CFP の混合液はカルシウム非存在下 (EGTA 存在下) では小さな分子量の位置に溶出し (Ve=1.96ml)、カルシウム添加によりその溶出位置は高分子量にシフト (Ve=1.73ml) した (図 4)。これはカルシウムにより、キネシンが多量体 (4 量体) を形成したことを示唆する。

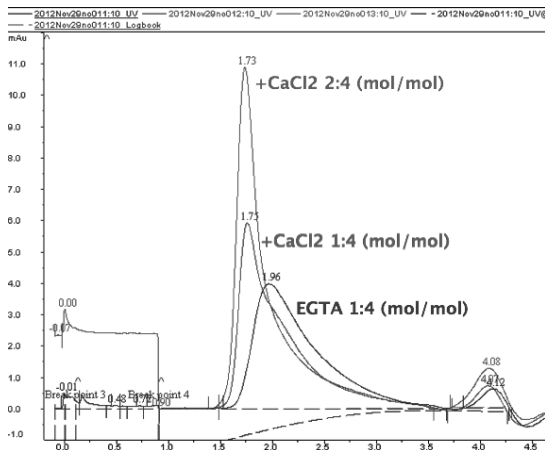


図 4. カルシウムイオン有無によるキネシン複合体の形成変化 (ゲル濾過法による分子量見積) カルシウム存在下では複合体を形成し大きな分子として溶出されている。

さらにこの複合体に微小管を加えたところ、1~2分間の間に微小管のアスター構造が形成され、この人工キネシンでも十分に機能することが確認された。さらに面白いことにカルシウム非存在下では、複合体を形成しないため、微小管ネットワークを作らないと予想していたが、驚いたことに微小管は線維状のネットワークを形成し、アクチンのストレスファイバーのような細胞骨格に似た収縮性の微小管ネットワークを形成した (図 5)。これはキネシンの会合の程度により様々なネットワーク構造が形成される可能性をしさししており、工学的な応用ばかりではなく細胞生物学的にも興味深い成果である。

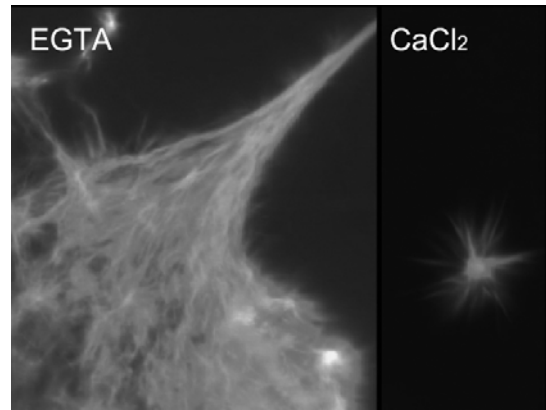


図 5. K465-m13/CaM-CFP による微小管ネットワーク形成 カルシウムイオン存在下ではアスター構造を形成した (右図)。一方非存在下ではストレスファイバー状の収縮性ネットワークを形成した (左図)。

(3) キネシン会合体形成の光制御：キネシンの会合体の形成を光照射により制御するシステムを開発を試みた。植物の光屈性現象を司る phototropin (光センサータンパク質) の LOVJa ドメインを遺伝子改変し、光照射の有無により会合体形成をする蛋白質モジュールの作成に取り組んだ。LOVJa の C 末端に CaM と結合する m13 ペプチドを付加し、光照射有無によりこれらの蛋白質が結合・解離する光制御モジュールの作成に成功した (図 6)。今後、この光制御モジュールを使って光によってキネシン会合体の形成する分子システムを開発し可逆的な色素の凝集・拡散系を構築する。こうした人工的な光制御モジュールの報告例は少なく、特にタンパク質の結合解離を光により制御する報告例はない。このタンパク質モジュールは本研究のみではなく、タンパク質の立体構造の光制御や細胞機能の光制御などタンパク質工学の分野での発展が期待できる。

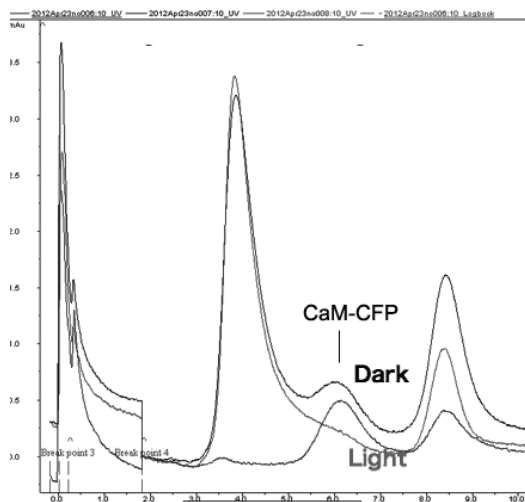


図 6. LOVJa-m13 と CaM-CFP の結合の光制御 光照射の有無により結合を複合体形成を制御可能。

(4) コンピュータシミュレーションによる系の最適化：マイクロチャンバ内での微小管の自己集積をブラウン動力学法を用いてシミュレーションにより可視的に予想可能にした。微小管の長さ、色素顆粒の大きさや数、モータータンパク質の運動速度や濃度、温度、粘性、マイクロチャンバの大きさ、形状など、アスター形成に影響を及ぼす因子を自由に変更できるシミュレータを作成した。

#### 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1件)

1. 平塚祐一、モータータンパク質で駆動するマイクロマシン---生体分子機械とMEMSの融合に関する研究事例---、日本ロボット学会誌 (査読無)、28、2010、36-38

[学会発表] (計9件)

1. 新田高洋、宮田歩、宇佐見嘉康、青山晋、平塚祐一、色素細胞を模倣した光学デバイスの開発に向けて、2012年度生物物理学会中部支部講演会、2013年02月19日~2013年02月19日、名古屋市

2. Takahiro Nitta, Ayumu Miyata, Yoshiyasu Usami, Susumu Aoyama and Yuichi Hiratsuka, Designing microdevices operated through self-organizations of microtubules and kinesin motors, Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013年02月02日~2013年02月06日、Philadelphia, USA

3. 平塚祐一、青山晋、新田高洋、生体分子モーターによって駆動する光学デバイス：タンパク質工学による分子光スイッチの開発、日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会、2012年05月27日~2012年05月29日、浜松市

4. 宇佐見嘉康、宮田歩、平塚祐一、新田高洋、生体分子モーターによって駆動する光学デバイス ---タンパク質部品からのデバイス組み立て---、日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会、2012年05月27日~2012年05月29日、浜松市

5. 新田高洋、平塚祐一、生体分子モーターによって駆動する光学デバイス ---シミュレーションによる設計指針---、日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会、2012年05月27日~2012年05月29日、浜松市

6. Takahiro Nitta, Ayumu Miyata, Yoshiyasu Usami and Yuichi Hiratsuka, SIMULATING SELF-ORGANIZATION OF MICROTUBULES INTERACTING WITH MOTOR PROTEIN-COATED BEADS IN MICROSCOPIC CHAMBERS, Biophysical Society 56th Annual Meeting, 2012年2月25日~29日、San Diego, USA

7. Takahiro Nitta, In Silico Design of Guiding Tracks for Molecular Shuttles Powered by Motor Proteins, IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2011), 2011年11月6日~9日、Nagoya, Japan

8. 青山晋、下池正彦、平塚祐一、モーター蛋白質で駆動する光学素子、2010年 生体運動研究合同班会議、2011年1月8日、大阪市立大・杉本キャンパス

9. 青山晋、下池正彦、平塚祐一、モーター蛋白質で駆動する光学素子、第48回日本生物物理学会年会、2010年9月21日、東北大学・川内キャンパス

[図書] (計1件)

1. 平塚祐一、シーエムシー出版、ナノ融合による先端バイオデバイス 監修：民谷栄一 「生体分子モーターデバイス」 71-77、2011、全267頁

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hiratsuka/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 祐一 (HIRATSUKA Yuichi)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・准教授

研究者番号：10431818

(2) 研究分担者

新田 高洋 (NITTA Takahiro)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：20402216