

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23681019

研究課題名(和文) 内的・外的要因を取り入れた生体分子モーター能動的自己組織化法の確立

研究課題名(英文) Study on the roles of internal and external factors in active self-organization of biomolecular motor

研究代表者

角五 彰 (Akira, Kakugo)

北海道大学・理学(系)研究科(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) 21,500,000円、(間接経費) 6,450,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに生体分子モーターを集積する方法として能動的自己組織化法を提案してきた。本研究では能動的自己組織化法における内的(構成要素の立体構造)および外的(境界条件や外部摂動)要因の役割について検討した。その結果1)生体分子モーターの螺旋構造によりリング状集積体の回転方向を制御可能であることを見出した、2)気液界面のようなエネルギー的に不安定な場では微小管が高密度に集積されることを見出した、3)伸展刺激などの外部摂動の印加により高次に秩序化された生体分子モーターの集積体が得られることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method to integrate biomolecular motors system, microtubule and kinesin, into assembled structures through active self-organization. Here, we examined the roles of internal and external factors in active self-organization of microtubule. We found that 1) lattice structure of microtubule is a key factor by tuning which the rotational motion of ring-shaped microtubule assembly could be controlled, 2) interface such as boundary between air and buffer has a pronounced effect on the morphology and organization of microtubule and 3) external perturbation, e.g., stretching stimuli can be employed to regulate the morphology of microtubule assemblies which in turn resulted in highly ordered structure with a specific orientation.

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/ナノ機能材料

キーワード：生体分子モーター 能動的自己組織化 螺旋構造 気液界面 伸展刺激

1. 研究開始当初の背景

生体分子モーターは ATP の化学エネルギーを効率よく並進運動エネルギーに変換するソフトな分子機械である。これらの分子機械を利用した ナノバイオマシンやバイオアクチュエーター開発が各国で盛んに行われている。しかし、その多くは一次元並進運動という生体分子モーターの分子的機能を利用するに留まり、集積により力や速度の増幅を目指すという研究報告例はほとんどなかった。生体システムに見られる高度な機能創発の実現には、生体分子モーターの極性・空間配置を考慮した階層的集積法の確立が必要不可欠である。

2. 研究の目的

申請者は、これまで生体の自己組織化原理に習い、生体分子モーターの平衡(受動的)および非平衡系(能動的)の自己組織化法を確立してきた。それにより、生体の動力システム類似の様々な基本的駆動ユニットの創製を可能にした。本研究では、構成要素の立体構造制御(内的)や集積場に時空間的(外的)要素を取り入れた生体分子モーターの高次元集積法の確立を目指した。

3. 研究の方法

生体分子モーターの高次元集積法の確立に向け、本研究では能動的自己組織化における構成要素の立体構造や空間条件などの影響を網羅的に検討した。具体的には(1)立体構造を制御した生体分子モーターの能動的自己組織化、(2)気/液・液/液界面を利用した生体分子モーターの能動的自己組織化、(3)伸展刺激を組み合わせた生体分子モーターの能動的自己組織化、(4)自己集合体を鋳型とした生体分子モーターの逐次的能動的自己組織化に関して評価した。

4. 研究成果

(1)立体構造を制御した生体分子モーターの能動的自己組織化：能動的自己組織化法とは、ATP の化学エネルギーと生体分子モーター(微小管/キネシン)の運動機能を利用した非平衡開放系における集積法で、分子間相互作用を制御することでバンドル、リング、ネットワーク状の集合体を作り上げることができる。これまでにリング状微小管集合体には回転方向の非対称性が見出されていた。そこで本研究では、微小管の螺旋構造に着目し、リング状微小管集合体の回転方向に関する制御法の確立を目指した。微小管の螺旋構造(キラリティやピッチ)は既報に従い重合溶液の誘電率、pH や構造安定化に関わる薬剤(taxol®)、アニール時間などから検討し、その構造は TEM で評価した。その結果、リング状集合体の回転方向は微小管のらせん構造に依存することが明らかとなった。微小管は複数のプロトフィラメント(PF)が円筒状に並んだ構造を有し、その本数によりらせんの巻き方向が決定する。また、キネシンは微小管のプロトフィラメントを追従して運動する。

右巻らせんを有する微小管を用いてリング状集合体を形成させると右回転：左回転 = 10 : 90 の割合に、また左巻らせんの微小管を用いると 90 : 10 の割合となり回転方向が反転することがわかった。このように微小管のらせん構造でリング状集合体の回転方向を制御することが可能となった。

(2)気/液・液/液界面を利用した生体分子モーターの能動的自己組織化：リング状集合体を運動素子として応用する際にはリング径の低分散性も求められる。電荷を帯びた微小管がリングを形成する場合、その剛直性だけでなく静電的な相互作用および対イオンの並進エントロピーが構造決定因子となる。静電的な要因を制御する方法として微小管を気液界面で能動的自己組織化する方法を確立した(図1-1)。その結果、径の揃ったリングを作成することが可能になった(図1-2)。得られるリング状集合体の平均直径は $1.8\mu\text{m} \pm 0.4\mu\text{m}$ となり、従来の方で作成したリング ($4\mu\text{m} \pm 2.2\mu\text{m}$) と比べ分散性を大幅に抑えられることがわかった。また気液界面で形成されるリング状微小管集合体の収率はほぼ 100% となり、これまでの能動的自己組織化法の収率 0.4% に比べ格段に向上することがわかった。さらに気液界面の高さを制御することで微小管のリング形成過程をその場観察することが可能となる。それによりシングルフィラメントからバンドル形成を経由せず直接リングが形成されるという様子が初めて捕らえられた。このダイレクトな形成プロセスがサイズ分散性の低さに繋がっていると考察した。

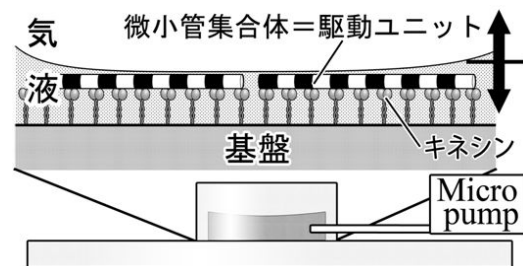


図 1-1：微小管を気液界面で能動的に自己組織化するシステム(概念図)

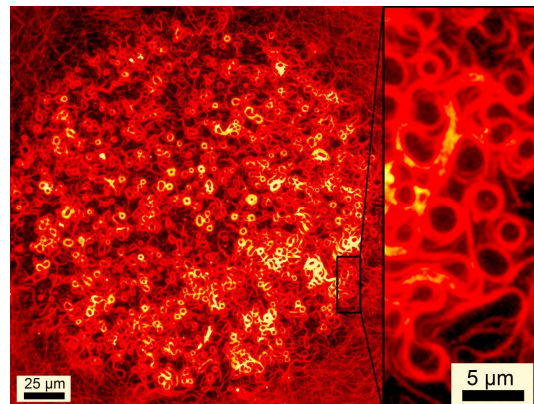


図 1-2：気液界面で形成するリング状集合体

(3)自己集合体を鋳型とした生体分子モーターの逐次的能動的自己組織化：本課題ではリング状微小管集合体のサイズ制御に加えリング幅の制御についても検討した。リング幅を制御する方法として、微小管を逐次的に供給し長時間にわたって能動的自己組織化を行う方法を着想した。この逐次的能動的自己組織化は集合体形成過程において安定な定常状態へ到達する前に、新たに微小管、架橋剤、ATPを加える操作を繰り返し行う(図3)。この手法により従来のもよりも多重のリング状微小管集合体を形成することが可能となった(図2)。この多重化により、生体分子モーターの力の集積が可能になると期待される。

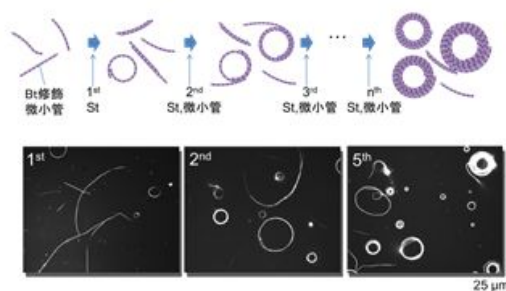


図2.: 逐次的能動的自己組織化による微小管リングの成長(上図)。リング状微小管集合体の蛍光顕微鏡像(下図) 段階的にリング幅が増大。

(4)伸展刺激を組み合わせた生体分子モーターの能動的自己組織化：本課題では生体分子モーターの集合体形成における一軸伸展刺激の影響、さらに伸展刺激に対する構造秩序の再構築機能についての検討を行った。キネシンを固定したエラストマー基板上に蛍光標識した微小管を添加し、微小管間の相互作用として微小管関連タンパク(MAP4)を添加した。ATP添加後、微小管集団は運動を開始し、時間の経過とともに配向構造を形成することを見出した(図3左)。しかし、その配向方向はランダムであった。次に、エラストマー基板を伸縮することで微小管集団に対し、伸縮刺激(伸展歪: $\epsilon=75\%$)を印加したところ、微小管集団は伸縮方向に対して徐々に垂直方向($\sim 90^\circ$)に配向することが見出された(図3右)。また、異なる伸縮歪量で微小管集団に伸縮刺激を印加したところ、微小管集団が配向しない臨界伸展歪($\epsilon=20\%$)が存在することが明らかとなった。ここでこの臨界伸展歪条件において、伸縮刺激を繰り返し微小管集団に対して印加したところ、微小管集団が伸縮方向に対して特徴的な角度($\sim 60^\circ$ および $\sim 120^\circ$)を持つジグザグ状のパターンを形成することが見出された。

このように伸縮刺激を印加することにより多数の微小管の運動方向を制御することに成

功した。

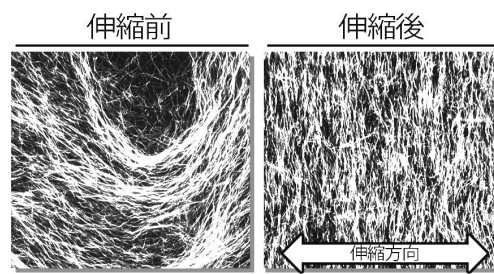


図3: 伸縮刺激印加前後の微小管集団の蛍光顕微鏡像。スケールバー: $50 \mu\text{m}$ 。

以上、構成要素の立体構造情報や境界条件、さらに外的摂動が生体分子モーターの秩序構造形成に重要な役割を果たすことを見出した。これらの成果は生体分子モーターの高次元集積法の確立に重要な知見を与えるものである。

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10件)

1. Daisuke Inoue, Arif Md. Rashedul Kabir, Hiroyuki Mayama, Jian Ping Gong, Kazuki Sada and *Akira Kakugo "Growth of Ring Shaped Microtubule Assemblies through Stepwise Active Self-Organization" *Soft-Matter*, 9, 7061-7068 (2013) (査読有)
2. Arif Md. Rashedul Kabir, Shoki Wada, Daisuke Inoue, Yoshiki Tamura, Tamaki Kajiwara, Hiroyuki Mayama, Kazuki Sada, *Akira Kakugo, JianPing Gong, "Formation of ring-shaped assembly of microtubules with a narrow size distribution at an air-buffer interface" *Soft-Matter*, 8, 10863-10867 (2012) (査読有)
3. *Akira Kakugo, Arif Md. Rashedul Kabir, Natsuki Hosoda, Kazuhiro Shikinaka, Jian Ping Gong, "Controlled Clockwise-counterclockwise Motion of the Ring-shaped Microtubules Assembly, *Biomacromolecules*, 12 (10), pp 3394-3399 (2011)(査読有)

[学会発表](計49件)

- (1) Akira Kakugo, "Active Self-organization of Biomolecular Motors" International Symposium on Advanced Soft Materials (2013/Oct./18-19, Hokkaido University, Sapporo)
- (2) 角五 彰「生体分子モーターを動力源とするアメーバ型分子ロボットの開発」分子ロボティクス研究会定例会(2013年2月2日、福岡工業大学、福岡)
- (3) Akira Kakugo, "How to Integrate Bio-molecular Motors towards

Bio-Actuators Fueled by ATP”
International Union of Materials Research
Societies (IUMRS-ICEM2012)
(2012/Sep/23-28, PACIFICO, Yokohama)
(4)Akira Kakugo, ”Organization of
molecular motor through an energy
dissipative Process” Collaborative
Conference on Materials Research (CCMR)
2012 (2012 June, Seoul Palace Hotel,
Korea)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

角五 彰 (KAKUGO AKIRA)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：10374224

(2)研究分担者「なし」 ()

研究者番号：

(3)連携研究者「なし」 ()

研究者番号：