

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18782

研究課題名（和文）微小管運動の剥離現象に対する熱的要因の検証と剥離制御技術への応用

研究課題名（英文）Verification of thermal factors for detachment of gliding microtubules and application to detachment control

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：光照射箇所での微小管運動の剥離および再進入の要因を明らかにするために、本研究では光熱効果が生じるAu/Cr薄膜付きサンプルを製作した。製作したサンプル上に微小管運動を構築し、光を照射したときの微小管を観測した結果、温度上昇量の増加に伴い剥離が生じる時間が減少することを確認した。また、キネシンの駆動源となるアデノシン三リン酸の有無が剥離現象に影響していることを明らかにした。さらに、一度剥離した領域に別の微小管が再進入し、初期密度に比べて約30%まで復元することを確認した。今後は微小管の剥離現象が生じる詳細なメカニズムを検証するとともに、剥離制御技術を用いたアプリケーションを開発する計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、微小管運動の剥離要因としてキネシンの付着密度や微小管長さ等の影響について評価した例は報告されているが、熱による影響を検証し、微小管の剥離現象を制御技術として応用した例は報告されていない。本研究では光熱効果によって生じる微小管剥離の要因と、剥離させた領域へ別の微小管が再進入する要因を検証し、温度上昇量の大きさとキネシンの運動が影響していることを明らかにした。また、任意の光照射領域において最小10 sで微小管を剥離させることができたため、本技術は将来、微小管運動を輸送機構として応用する際、輸送対象を特定の位置で選別できるツールになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the factors behind the detachment and re-entry of gliding microtubules at the irradiated areas, samples with Au/Cr thin films that induce photothermal effects were fabricated in this study. We constructed gliding microtubules on the fabricated samples and observed the microtubules when excitation light was irradiated. As a result, it was confirmed that the detachment time of the microtubules decreased with the increase in rise of temperature. Additionally, it was revealed that the presence or absence of adenosine triphosphate, which serves as the driving source for kinesin, influences the detachment phenomenon. Furthermore, we confirmed that another microtubule re-entered the region once it had been detached, restoring the microtubule density to about 30% of its initial level. In the future, we plan to investigate the detailed mechanisms of the microtubule detachment phenomenon and develop applications using detachment control technology.

研究分野：BioMEMS

キーワード：キネシン 微小管 光熱効果 MicroTAS BioMEMS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

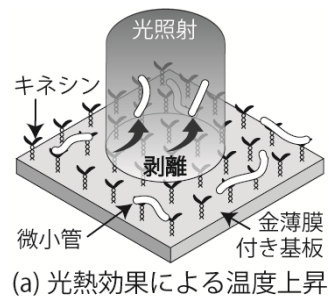
生物は多様なタンパク質から構成されており、生体分子モータと呼ばれるタンパク質は、筋肉の収縮や精子の鞭毛運動、DNAの合成などを担っている。生体分子モータの一つであるキネシンは、細胞の骨格となるタンパク質(微小管)の上を歩くように移動することで、細胞内の物質輸送や細胞分裂時の動力源として機能している。近年では、キネシンと微小管の運動系を体外で再構築し、ナノスケールのツールとして応用する研究がおこなわれている。



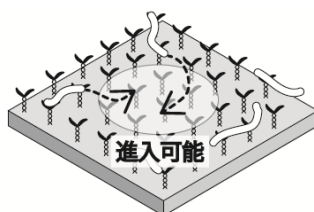
図1 キネシンと微小管の運動系

図1は生体外におけるキネシン・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。1本の微小管が多数のキネシンに支えられる形となるため、長距離の安定した移動が可能であり、将来は輸送機構としての応用が期待されている。

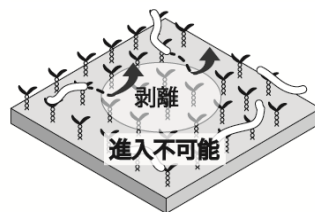
輸送機構として応用するために、微小管の移動方向や速度の制御技術、輸送対象物質の修飾技術に関する研究がこれまでに報告されている(文献)。微小管の移動速度は温度変化に応答することが知られており、研究代表者も金薄膜への光照射によって熱が生じる現象(光熱効果)を用いて微小管の速度制御技術を開発してきた(文献)。その過程において、基板上を移動する微小管が光の照射範囲内で剥離する様子を観察した(図2(a))。また、光の照射時間が短い場合は微小管を剥離させた領域に別の微小管が進入し(図2(b))、光の照射時間が長い場合は別の微小管が進入しないことを観察した(図2(c))。これまでに、微小管運動の剥離要因としてキネシンの付着密度や微小管長さ等の影響について評価した例は報告されているが(文献)、熱による影響を検証し、微小管の剥離現象を制御技術として応用した例は報告されていない。



(a) 光熱効果による温度上昇



(b) 光の照射時間が短い場合



(c) 光の照射時間が長い場合

図2 光の照射範囲内における微小管の剥離現象

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本研究では光照射箇所での微小管運動の剥離および再進入の要因を明らかにするとともに、本特性を用いた微小管運動の剥離制御技術を確認することが目的である。

3. 研究の方法

研究目的の達成に向けて、本研究では光熱効果によって生じる微小管剥離の要因と、剥離させた領域へ別の微小管が再進入する要因の検証、および剥離制御技術としての有用性を評価した。

微小管の剥離要因については、光熱効果で生じた熱によってキネシンが変性(機能消失)し、移動する微小管が移動先のキネシンと結合できずに剥離していると考えられる(図3)。本現象による影響を明らかにするために、本研究では基板材料として熱伝導率が小さいアクリル板を使用し、アクリル板の上にCrとAuを成膜することで、光熱効果が生じるAu/Cr薄膜付きサンプルを製作した。事前実験として、Au/Cr薄膜付きサンプルに黒体樹脂を塗布し、光が照射される微小領域($\sim 0.01 \text{ mm}^2$)の温度変化をサーモグラフィカメラで計測し、光の照射強度と温度上昇量の関係性を評価した。実験には倒立型顕微鏡を使用し、蛍光観察に使用する励起光(波長520-550 nm)を照射した。光の照射強度は4、8、14、29、61、108 W/cm^2 とし、室温(25)と計測した最高温度との差を温度上昇量と定義した。なお、本実験においてはキネシンの変性が生じる25以上の温度上昇量を目標値とした。

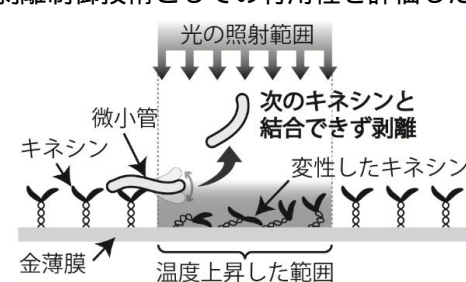


図3 キネシンの変性による微小管の剥離

図4に微小管運動の評価に用いた実験系の概念図を示す。製作したAu/Cr

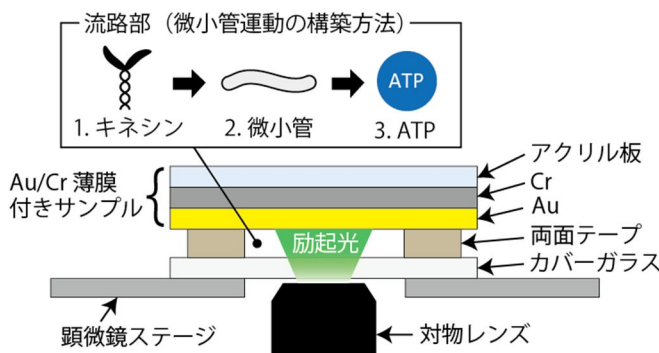


図4 微小管運動の評価系の概念図

薄膜付きサンプル上に両面テープとカバーガラスを貼り合わせて簡易流路を形成した。その後、簡易流路内にキネシン、微小管、および駆動源となる ATP 溶液を導入し、微小管運動を構築した。本研究では微小管の剥離現象に対する温度上昇量の影響を調査するために、光の照射強度を 61 W/cm^2 と 108 W/cm^2 の 2 条件で照射したときの様子を観察および評価した。また、キネシンの駆動源となる ATP の有無による影響を評価することで、キネシンの活性との相関を調査した。

剥離させた領域へ別の微小管が再進入する要因については、タンパク質が一定の温度と処理時間によって機能が可逆的に変化すると報告されているため（文献 ）、本研究においても光の照射強度と経過時間、剥離領域への微小管の再進入の割合を調査することで、微小管の再進入に関する熱の影響を評価した。具体的には、微小管運動の構築後、照射強度 108 W/cm^2 を 30 s 照射して微小管を剥離させた後、照射強度を 4 W/cm^2 に変更し、剥離領域への微小管の再進入の割合（復元性）を評価した。ここで、復元性とは剥離領域において周囲から微小管が再進入することで微小管密度が復元することと定義した。復元性の評価にあたっては、剥離領域内の微小管本数を計測し、該当領域の面積で除することで微小管密度を算出した。

上記の実験を通して得られた結果より、所望の位置で微小管を剥離させる操作性と、剥離までにかかる時間応答性、および剥離領域へ微小管が再進入する復元性をもとに、微小管運動の剥離技術としての有用性を検証した。

4. 研究成果

図 5 に昇温特性評価の結果を示す。温度上昇量は、照射強度が 4、8、14、29、61、 108 W/cm^2 のときに、それぞれ 4、9、19、39、80、134 であった。照射強度の増加に伴い温度上昇量は増加し、大気中において最大 134 の温度上昇量を示した。微小管運動は溶液中での現象となるため、大気中よりも温度上昇量は小さくなると考えられるが、目安となる目標値（25）よりも大きな温度上昇量が得られたため、製作したデバイスは微小管運動の剥離評価実験に使用できると考えられる。

簡易流路内に微小管運動を構築後、励起光を照射したときに微小管が剥離する様子を図 6 に示す。励起光照射時間 0 s の時点では 2 本の微小管を観察したが、5 s 時点では 2 本とも剥離することを確認した。図 7 に励起光の照射強度に対する微小管剥離の評価結果を示す。照射強度が 108 W/cm^2 および 61 W/cm^2 のとき、80%以上の微小管が剥離するまでに要した時間はそれぞれ 10 s および 90 s であった。また、図 8 に ATP の有無による微小管剥離の評価結果を示す。ATP を導入した場合、剥離率 80%に達するまでに要した時間は 5 s であったが、ATP を導入しなかった場合は 30 s を要した。本実験より、微小管の剥離挙動には温度上昇量の大きさが影響しており、ATP の有無によって剥離までにかかる時間に差が見られたことから、キネシンの運動も影響していることを明らかにした。

図 9 は一度剥離させた領域へ別の微小管が再進入する様子を捉えた観察写真である。照射強度 108 W/cm^2 の励起光を照射したとき、多くの微小管が剥離する様子を観察した。図中の黄色の丸は微小管の剥離領域を示しており、面積は $4980 \mu\text{m}^2$ であった。その後、照射強度を 4 W/cm^2 に変更し、観察を継続した結果、時間経過に伴い、剥離させた領域へ別の微

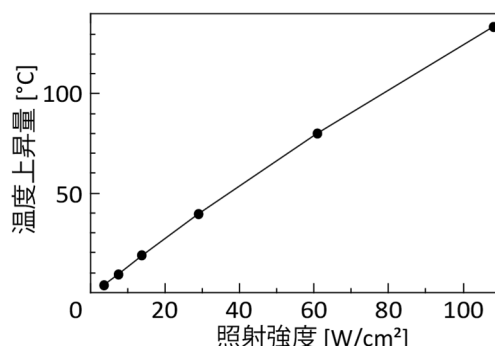


図5 照射強度に対する温度上昇量



図6 微小管剥離の観察写真

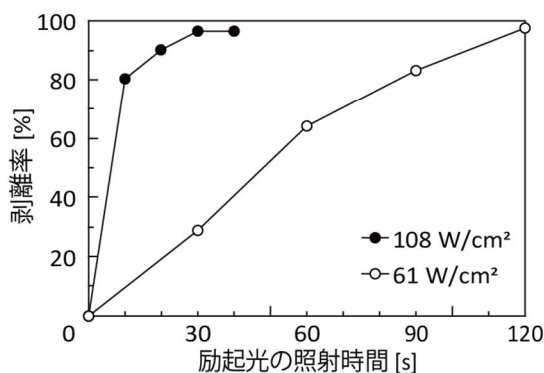


図7 微小管剥離に対する照射強度の影響評価

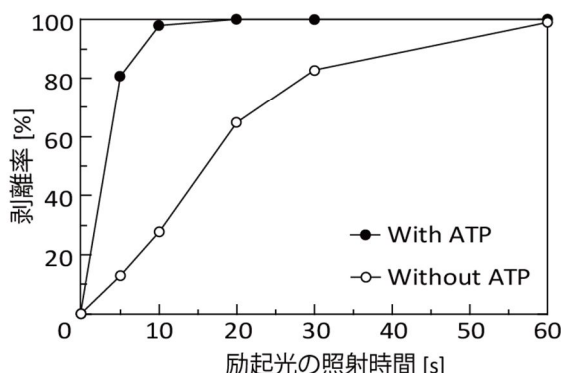


図8 微小管剥離に対するATPの影響評価

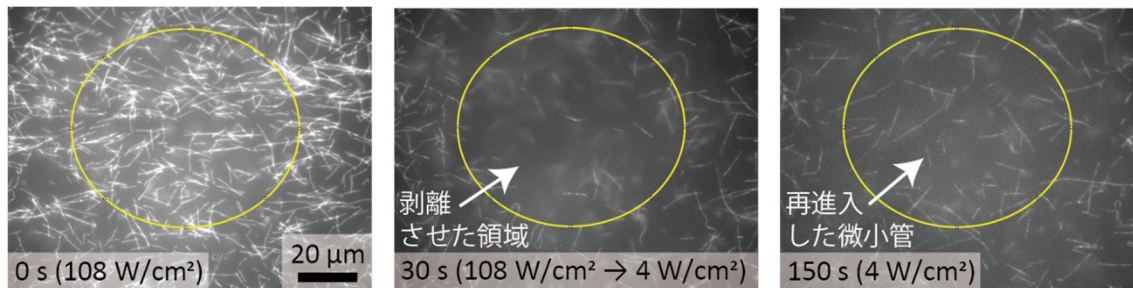


図9 剥離させた領域へ再進入する微小管の観察写真

小管が再進入し、微小管の本数が増加することを確認した。図10は、0 s時点での微小管密度を1.0として正規化し、励起光の照射時間に対する微小管密度を評価した結果である。微小管の密度は、照射強度 108 W/cm^2 の励起光を30 s照射することで0.1以下に減少した。一度微小管を剥離させた後、照射強度を 4 W/cm^2 に変更した結果、時間経過に伴い微小管の密度は増加し、270 s時点で0.3まで復元した。本実験より、微小管が剥離する程度の温度上昇量を加えた場合においても、基板に付着したキネシンの機能は維持されており、一度微小管を剥離させた領域においても微小管運動が継続して構築されていることを確認した。微小管密度が初期値である1.0まで復元しなかった要因は、一部のキネシンの不可逆的な変性(機能消失)による微小管の剥離、および観察領域周辺における微小管本数の減少が考えられる。

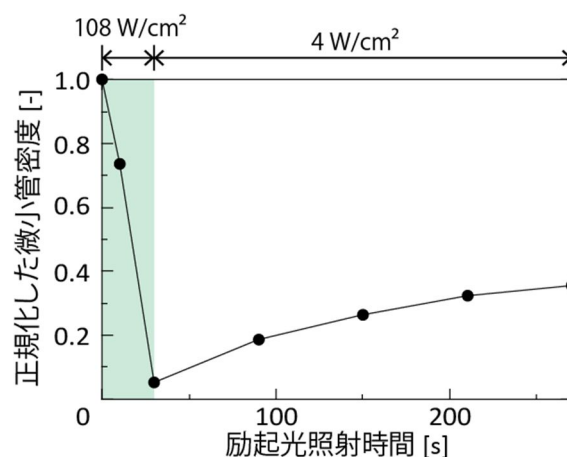


図10 励起光照射時間と微小管密度の関係

以上の結果より、光熱効果による剥離制御技術は任意の光照射領域において最小10 sで実施できることを確認した。より高い空間分解能が得られれば、将来、微小管運動を輸送機構として応用する際、輸送対象を特定の位置で選別できるツールになると考えられる。また、一度剥離させた領域に別の微小管が再進入する特性は、微小管付着領域の復元性と捉えることができ、一度の実験で複数回の評価を実施することが可能となる。そのため、微小管の剥離率を判定基準とした応用先を考案できれば、高い信頼性を有する評価方法になると考えられる。今後は微小管の剥離現象が生じる詳細なメカニズムを検証するとともに、剥離制御技術を用いたアプリケーションを開発する計画である。

<引用文献>

- G. Saper and H. Hess, Synthetic Systems Powered by Biological Molecular Motors, Chemical Reviews, 120 (1), 2020, 288-309.
- T. Nakahara, H. Shintaku, H. Kotera, and R. Yokokawa, IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, 136 (3), 2016, 77-82.
- N. M. B. Kazeruni, J. B. Rodriguez III, G. Saper, and H. Hess, Microtubule Detachment in Gliding Motility Assays Limits the Performance of Kinesin-Driven Molecular Shuttles, Langmuir, 36 (27), 2020, 7901-7907.
- 油谷克英, タンパク質の立体構造は何度まで熱安定か? 安定性研究の現状と展望, 生物物理, 49 (5), 2009, 226-231.

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, Ono Sora, Minami Kazuyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Fabrication of a Magnetically Driven Cell-Stretching Device for Predefined Cell Alignment <i>in Vitro</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Robotics and Mechatronics	6. 最初と最後の頁 1143 ~ 1150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20965/jrm.2023.p1143	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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

1. 発表者名 江上恒志, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 細胞振動用磁気駆動型デバイスの開発
3. 学会等名 第14回 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山大輝, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 顕微観察系の励起光を用いた光熱駆動型マイクロヒータの開発
3. 学会等名 第14回 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樋口真輝, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 SU-8/Cu 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40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 2023年

1. 発表者名 星川雄紀, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 光熱効果を用いた微小管剥離制御デバイスの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 樋口真輝, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 SU-8/Cu複合材料製マイクロデバイスを用いた微小管運動の方向および速度制御
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星川雄紀, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 顕微観察系の励起光を用いた微小管剥離制御デバイスの開発
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山大輝, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 光熱駆動型マイクロヒータの製作およびマイクロポンプへの応用
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江上恒志, 中原佐, 南和幸
2. 発表標題 細胞振動実験に向けた磁気駆動型デバイスの製作
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオフィロンティア講演会
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
---------	---------