

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006-2008

課題番号：18550163

研究課題名（和文）分子認識光固定法を利用した生体分子型アクチュエーターの創製

研究課題名（英文）The new construction of biomolecule type actuator using photo-induced immobilization method with molecular recognition

研究代表者

渡邊 修（WATANABE OSAMU）

株式会社豊田中央研究所・環境材料研究部・有機材料研究室・室長・主席研究員

研究者番号：20374085

研究成果の概要：光誘起変形による生体分子の基板上への固定技術をコア技術として、生体内分子モーターの構成タンパクであるアクチンとミオシンを人為的に配向・配列制御して運動を制御できるアクチュエーターの創製を試みた。キャップタンパク質を利用することにより、アクチンフィラメントの極性を揃えて基板上に配列、配向させることに成功した。また、光誘起変形で形成されたテンプレートを用いてミオシンフィラメントの配向固定化にも成功し、その表面でのアクチンフィラメントの方向制御された運動を実現した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	630,000	4,130,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能材料

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体分子モーター

生体内で重要な生命活動を担う生体内分子モーターは筋肉におけるアクチン-ミオシン系、F_oF₁ATPアーゼ等いずれもタンパク質が自己組織的に集合構造を形成することにより発現する。生物学的にはその構造体の役割を解明していく努力が多く、研究者により進められており、徐々にではあるがその構造、機能の関係が明らかになりつつある。一方、これらの生体分子モーターは、温和な条件下で高効率の作動が可能であり、従

来の機械的なモーターにはない優位性が期待できる。これを人工の構造体として有効に利用する技術を確立することはエネルギー、環境への不可低減の観点から今後ますます重要な課題となる。この技術確立にはその機構解明と同時に我々が人為的にタンパク質の配向、配列を制御して新たに構造体を創製していかなければならない。

(2) 分子認識光固定法

この研究を進めるためには、配向・配列と同時にその組織化構造体を基板等の上に固定する必要がある。タンパク質の固定化技術

であり、いかに簡便に、タンパク質を失活させることなく、安定に固定できるかがポイントである。我々は光異性化反応を起こし得るアゾ色素を含有したいわゆるアゾポリマーを用いることにより、タンパク質、DNAを表面に載せて光照射するとその物質をアゾポリマー表面に強く固定できることを発見した。この光による生体分子の固定の基本的メカニズムは、図1に示した様に生体分子を認識してアゾポリマーが変形することによるものである。光により生体分子が認識され、同時に光によりアゾポリマー表面が変形し、光照射停止後には物体が固定される新規性のある方法論を提供したといえる。さらに単に固定されるだけでなく固定された生体分子がその機能を、基板上で生体内と同様に発現できることを抗原-抗体反応あるいは酵素反応においても確認し、本手法がバイオ固定技術としてさまざまな応用展開が可能であることを示してきた。

新しい微小物体(たんぱく質)固定原理

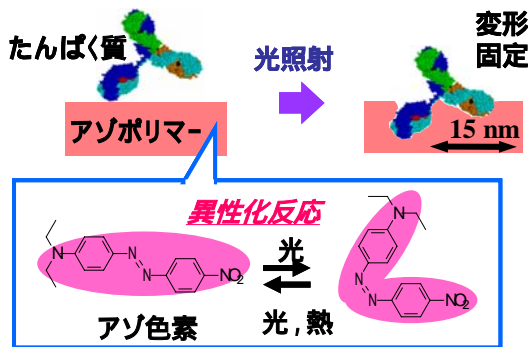


図1. 「分子認識光固定法」の固定原理

2. 研究の目的

代表的な生体分子モーターである筋肉はアクチン、ミオシンいずれもが配列した構造体を形成して機能している。機能を発現する上で重要なことはアクチンが重合したフィラメントアクチン(F-アクチン)が方向性(+端と-端)を有していることで、+端の方向に沿ってのみ力が発生するという点で

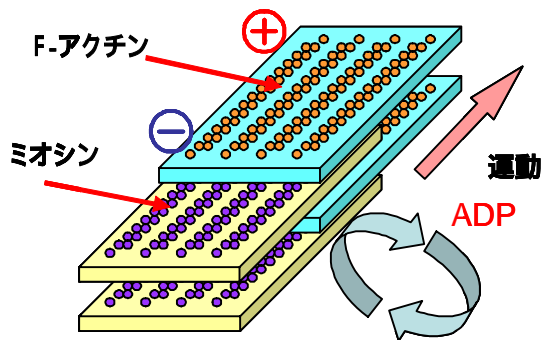


図2. 人工的に方向が揃うように基盤上に構築されたF-アクチン構造体とミオシン構造体

ある。今回の研究ではこのアクチン・ミオシン系的を絞り、アクチュエーターとして動作可能な、+と-の方向制御を行い、一方向に配向させた構造体の創製をめざすものである。この配向・配列制御からのアプローチにより方向の揃った運動が実現できるタンパク質構造体の実現をめざす。本研究の期間内において、人間の筋肉を模倣したアクチン、ミオシンの人為的配列構造体をそれぞれ作製し、その構造体をATPの添加により設計された一方向に運動制御することを最終的に目指す。最終的なイメージを図2に示した。

3. 研究の方法

本研究計画で解決すべき第1の課題は、F-アクチンの方向性、すなわち+端と-端を揃えた状態で配向させることである。この課題を解決するためにアクチンの重合特性と分子認識光固定法と組み合わせることにより達成可能と考えた。以下にその考え方を述べる。

F-アクチンはアクチンモノマーがらせん状に重合したものであるが、アクチンモノマー自身形状の非対称性から、+と-を有している。その+と-の方向に応じて重合ならびに解離の平衡が大きく異なることは周知である。そこで、アクチンモノマーをアゾポリマー上に光固定法によって固定する。この場合、固定される方向はある程度ランダムと考えられる。この状態で、アクチンモノマー溶液中で重合反応を実施する。重合の長さは固定されたアクチンモノマーの方向に依存すると考えられる。すなわち、重合が成長する方向が+端の面を表面露出して固定した場合、長く重合するが、反対に-端が表面露出する形で固定した場合は短い重合体しか得ることはできないと予想される。結果として、+端方向に方向の揃ったF-アクチン重合体の重合物を表面に伸張した状態を作り出すことができる。

この手法は、タンパクの変性等の課題が多く、後述するようにキャップタンパク質を固定してその後F-アクチンをトラップする方法に研究途中において切り替えた。この状態で、せん断力等を利用して一方向に配列させた状態を作り出し、その上で再度光照射によりアゾポリマー表面に全体を固定することにより、目的とする配向・配列構造体を得ることができると考えた。光固定を2回利用する手法である。

ミオシンの組織構造体の形成は次に解決すべき課題である。アクチンが+と-の方向性を制御して構造体を形成させることができるならば、本課題ではアクチンのような+と-の方向性を特に考慮することなく自己組織的に出来上がった組織構造体を平行方向に配列させることが課題となる。

アゾポリマーの特徴として、表面に2光束干渉露光を行うことにより、周期的凹凸構造を形成できる性質がある。また、偏光を照射すると、その偏光方向と直交する方向にアゾ部分が再配向する性質を有している。この異方的表面構造がその長軸方向に沿ってミオシン組織体を配向させる駆動力になることが期待できる。誘起された表面の異方的性質をうまく利用することにより、ミオシンの線状組織体の面内配向制御を試みる。この配向がうまく成功すれば、アクチンと同様に組織体ごと光固定によって、基板上に固定することができる。(図3)こちらはアゾポリマーの性質を2回(光変形(配向)と光固定)利用した方法である。

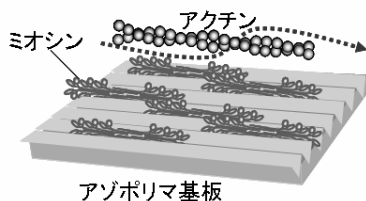


図3. 格子構造上に配列したミオシンフィラメントとその上を運動するF-アクチン

4. 研究成果

(1) F-アクチンの配列・配向構造体

F-アクチンの相構造

F-アクチンの会合体の相構造が2価カチオン Mg^{2+} の濃度に応じて変化する様子を、光固定法を利用して評価した。

カチオン高濃度側では各種F-アクチンのバンドルがコイル状に三つ編みに構造を形成していることが、中間濃度では2次元のネマチックラフト構造を形成していることが明らかとなった。これまで小角X線を利用した研究で発見されていた構造を直接観察することができた。アクチンのアゾポリマー上への固定が有効であることが示された。

基板表面からの直接重合

方法で記載したコンセプトに従って、アゾポリマー上に光固定したアクチンモノマーからの重合を試みた。

固定部以外のアゾポリマー表面へのフィラメントの吸着を抑制する条件について検討した結果、BSAによるブロッキング処理および界面活性剤の添加の有効性が見出せた。アゾポリマー上に光固定したアクチンモノマーからの重合では、溶液中に生成する様々な重合度のアクチンフィラメントが表面からの重合に影響を与えることがわかった。課題としてアクチンを重合する条件、タンパク質変性等の制御が困難であることが上げられる。配向固定に関して、本手法は断念し、次に述べる新たな手法に切り替えた。

ゲルゾリンの利用による配向制御

F-アクチンの極性の一方に特異的に結合するキャプションパク質を利用した新たな配向固定法を考案し、キャプションパク質の一種であるゲルゾリンを用い検討を行った。

本提案の概念図を図4に示した。最初にゲルゾリンをアゾポリマー上に光固定する。そこへF-アクチンを導入するとゲルゾリンによってF-アクチンがトラップされる。ゲルゾリンは+端を残してF-アクチンを切断する。結果として、アゾポリマー表面に-端が固定されたF-アクチン集合体を得ることができる。最後に、ディップ法によって一方向に揃えて配向し、再度光照射により固定化する。

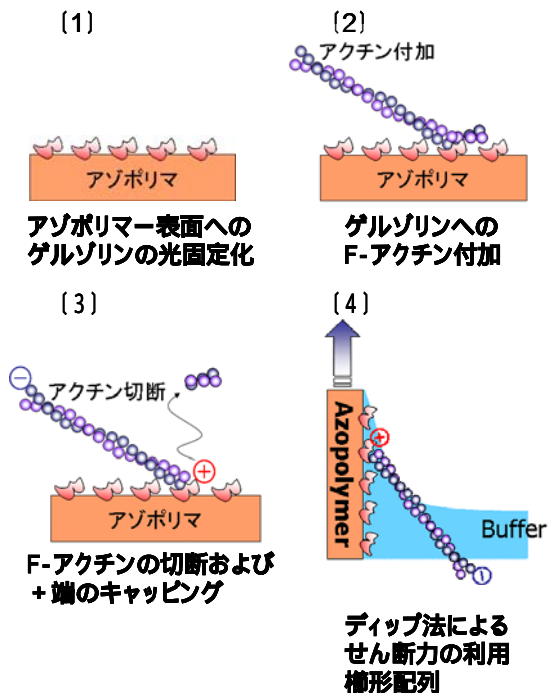


図4. キャプションパク質を利用したF-アクチンの極性制御とディップ法に配列制御プロセス

F-アクチンのアゾポリマー表面への非特異的吸着抑制におけるBSAのブロッキング処理においても光照射による固定効果が有効であることが見出された。また、変性等の課題に対して、全てのプロセスを溶液状態で行うことが重要であることが示された。

ゲルゾリンを固定したアゾポリマー表面にF-アクチン溶液を作用させた基板表面の状態を蛍光顕微鏡で観察した結果、ゲルゾリンを固定していない表面ではF-アクチンの付着しなかったのに対し、ゲルゾリンを固定した表面ではF-アクチンが末端で付着している様子が確認された。ゲルゾリンの光固定化濃度およびF-アクチン濃度を変化させたところ、ゲルゾリンの固定化濃度に対しては濃度が高くなるに従いF-アクチンの付着量の増加が見られたが $30 \mu\text{g/ml}$ 前

後で最大となることがわかった(図5)。また反応させるF-アクチン溶液の濃度については同様に濃度を高くすることで付着量の増加がみられたが200 $\mu\text{g/ml}$ 前後で最大となることがわかった(図5)。以上、アゾポリマー上にゲルゾリンの活性を保持したまま光固定することができ、この表面にF-アクチンを反応させることにより基板表面へのF-アクチンの付着が定量性良く制御できることが明らかとなった。

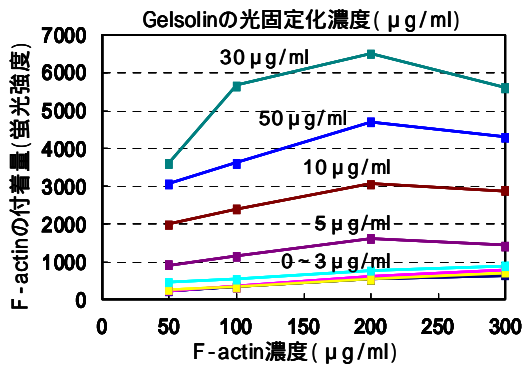


図5. F-アクチンの付着量

配列固定化

ディップ法により、得られたF-アクチンの配列を試みた。

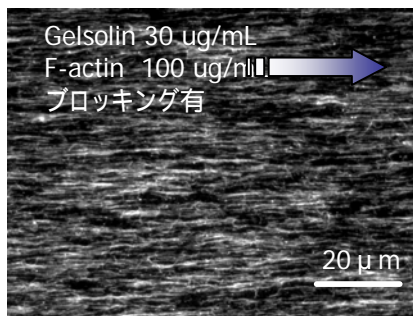


図6. ディップ後方向の揃ったF-アクチン

ディップによるせん断力を利用することで、アゾポリマー上にF-アクチンの方向を制御することができた(図6)

配向の証明

最初に一つ色素で染色されたアクチン(A)を重合し、そのあと2つ目の色素で染色されたアクチン(B)を重合することによ

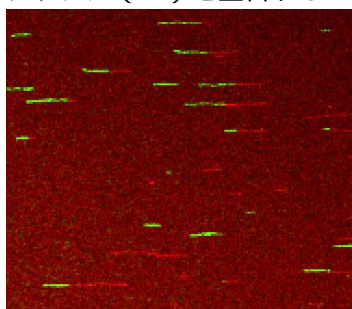


図7. アゾポリマー上に方向を揃えて固定化されたF-アクチン

り、極性を特定できるF-アクチン(\ominus A A A B B B \oplus)を作製することができた。このF-アクチンを用いて、配向固定基盤を作製し配向状態を観察したところ、90%のF-アクチンが方向を揃えて配向していることを確認できた(図7)。

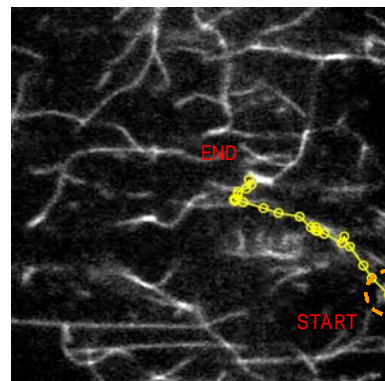
(2) アクチン基板上での運動

ミオシンコートビーズの運動観察

直径1 μm のポリスチレン微小球の表面にMyosinを吸着させた微小球を作製した。この微小球を表面に蛍光標識F-アクチンを吸着させたアゾポリマー基板上に導入し顕微鏡で観察を行ったところATPを添加する前は基板表面に完全に吸着していたが、静止していた微小球がATPを添加することで微小球のわずかな運動が観察された。

ヘビーメロミオシン(HMM)コートアゾポリマービーズの作製と運動観察

アゾポリマーで作製した微小球の表面にHMMを吸着させた微小球を作製した。この微小球を表面に蛍光標識F-アクチンを吸着させたアゾポリマー基板上に導入しATPを添加した。ATPを添加する前には基板表面に吸着、静止していた微小球がATPを添加することで複数のF-アクチンのフィラメント上を連続的に移動しながら滑り運動をする様子が観察された。微小球の平均移動速度: 1.1 $\mu\text{m/s}$ (35)であった。(図8)



(Time Interval 1s, 40 $\mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$)

図8. 微小球の移動の軌跡

配向基板上での運動

HMM-アゾポリマービーズを用いて上述F-アクチン配向固定した基板上での運動を検討したところ、ほとんど運動が観察されなかった。配向プロセスに劣化、光固定プロセスでのアクチンの運動阻害の可能性が考えられる。

(3) ミオシン配列構造体

ミオシンフィラメント構造

生体分子モーター「ミオシン」はイオン強

度に応じて自己組織化し、フィラメントを形成する。自己組織化させたミオシンを水溶液中でアゾポリマーに光固定し、水溶液中におけるミオシンフィラメントの構造を液中観察用原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観察した。大気中との比較から、大気中、液中ともに構造は変化しないこと、イオン強度により変化したその構造を維持したままアゾポリマー表面に光固定できる事を明らかにした。

レリーフ上での配向制御

アゾポリマーへの光加工により作製した格子構造を用いて分子モーター「ミオシンフィラメント」を配向固定した。特定の格子構造(ピッチ約 1000 nm、深さ 100-300 nm)において、F - ミオシンが配向することがわかった。(図 9)

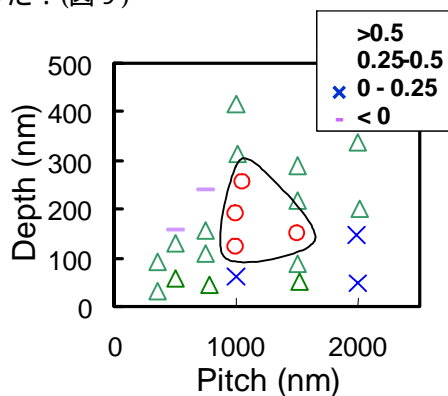


図 9 . 配向に及ぼす格子の深さとピッチの影響

(4) ミオシン基板上での運動

運動方向制御

アゾポリマーフィルムにピッチ 1 μm 、深さ 300nm の格子構造を作製し、その格子構造に生体分子モーターたんぱく質ミオシンを光固定化した。その表面での F - アクチンの運動を調べたところ、フィラメントが格子構造に沿ってすべり運動することを確認した。その運動速度は約 2 $\mu\text{m/s}$ であった

F - アクチンの運動方向は、特定の格子構造に F - ミオシンを固定した表面において沿って運動することがわかった。(図 10)

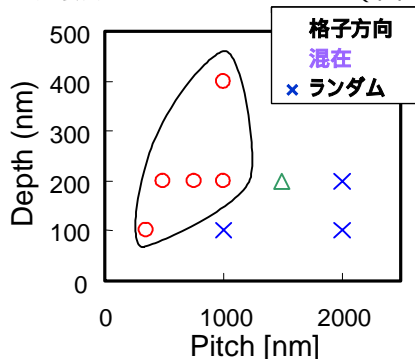


図 10 . 運動に及ぼす格子の深さとピッチの影響

それ以外では、運動方向はランダムとなった。興味深いことに F - アクチンの運動方向と F - ミオシンの配向度には有意な相関はなく、F - アクチンの運動方向は格子構造のピッチの影響が大きいことを明らかになった

運動速度制御

各種官能基を導入したアゾポリマーにミオシンを光固定した基板表面でのアクチンフィラメント(F - アクチン)のすべり運動を比較検討した。水酸基とカルボキシル基の導入により F - アクチンのすべり運動速度が向上した。

各種官能基を導入したアゾポリマーにヘビメロミオシン(HMM)を光固定した基板表面での F - アクチンのすべり運動を比較検討した。PEG 鎖の導入がフィラメントのすべり運動速度向上に効果的であった。すべり運動速度が約 2 倍に向上することがわかった

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 6 件)

渡邊 修 , アゾベンゼンポリマーによる微小物体の配向・配列技術とその応用, 応用物理, 78 巻, 145-148, 2009, 査読有

成田麻美子, 井川泰爾, 毛利誠, 土森正昭, 星野文彦, 渡邊 修, Aminoazopolymers with the Capacity of Photoinduced Immobilization Developed for Protein Arrays with Low Phooluminescence, Jpn. J. Appl. Phys., 47 巻, 1329-1332, 2008, 査読有

井川泰爾, 星野文彦, 渡邊 修, Youli Li, Philip Pincus, Cyrus R. Safinya, Molecular scale Imaging of F-Actin Assemblies Immobilized on a Photopolymer Surface, Phys.Rev. Lett., 98 巻, 018101, 2007, 査読有

成田麻美子, 星野文彦, 毛利 誠, 土森正昭, 井川泰爾, 渡邊 修, Photoinduced Immobilization of Biomolecules on the Surface of Azopolymer Films and Its Dependence on the Concentration and Type of the Azobenzene Moiety, Macromolecules, 40 巻, 623-629, 2007, 査読有

[学会発表] (計 13 件)

井川泰爾, アゾポリマの光誘起変形機能を用いた細胞骨格フィラメントの運動制御, 第 46 回(2008 年度)日本生物物理学会, 2008/12/3, 福岡国際会議場

塩澤真人, アクチンフィラメントを配向固定した光応答性アゾポリマー表面でのミオシン固定化微粒子の運動, 第 46 回 (2008 年度) 日本生物物理学会 2008/12/3, 福岡国際会議場

井川泰爾, アゾベンゼン含有高分子表面の格子構造を用いた細胞骨格フィラメントの運動方向制御, 第 45 回 (2007 年度) 日本生物物理学会, 2007/12/23, パシフィコ横浜

塩澤真人, アゾベンゼン含有高分子を用いた細胞骨格フィラメントの配向固定, 第 45 回 (2007 年度) 日本生物物理学会, 2007/12/23, パシフィコ横浜

〔図書〕(計 4 件)

渡邊 修, John Wiley & Sons Inc., Smart Light-Responsive Materials Chap9 Photoinduced immobilization of molecules on the surface of azobenzene polymers: principles and application, 2009, 303-328

渡邊 修, シーエムシー出版, 情報・s 通信光有機材料の最新技術「第 4 章アゾポリマーの光機能性を利用したフォトニクス応用」, 2007, 132-141

星野文彦, 建帛社, 食品の生理機能評価法 実験系とツールの新展開を目指して「分子認識光固定化法を用いた抗体チップの開発」, 2007, 167-177

星野文彦, シーエムシー出版, 抗肥満食品・素材の開発と応用展開「抗体チップを利用した抗肥満評価法の開発」, 2007, 67 - 74

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 修 (WATANBE OSAMU)

株式会社豊田中央研究所・環境材料研究部・有機材料研究室・室長・主席研究員

研究者番号: 20374085

(2) 連携研究者

井川 泰爾 (IKAWA TAIJI)

株式会社豊田中央研究所・環境材料研究部・有機材料研究室・研究員

研究者番号: 20394786

塩澤 真人 (SHIOZAWA MASAHITO)

株式会社豊田中央研究所・電池研究部・二次電池第 3 研究室・研究員

研究者番号: 20394851

星野 文彦 (HOSHINO FUMIHIKO)

株式会社豊田中央研究所・環境材料研究部・有機材料研究室・主任研究員

研究者番号: 60394730