

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02106

研究課題名(和文) 外部環境制御による生体分子モーターの自己組織化ネットワークの形態制御と機能発現

研究課題名(英文) Morphology controls and function emergence of self-organized biomolecular motor networks through controls of external environments

研究代表者

新田 高洋(Nitta, Takahiro)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：20402216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞の設計指針に着想を得て、外部環境を操作することにより、パーツの結合した高次構造の形態形成を誘導し、多様な機能を発現させる方法論を確立するものためのものである。このために、微細加工基板により作製したマイクロウェル内に生体分子モーターおよび細胞骨格を封入し、形成されるネットワークパターンを実験およびシミュレーションにより研究した。またネットワークの基本構成要素である微小管細胞骨格の力学物性について調べた。さらにネットワークを金属化するために、細胞骨格に金ナノ粒子を結合させ、金ナノワイヤー化に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体分子モーターを用いることにより高機能のマイクロロボットの開発を目指すものであり、実験およびシミュレーションによりこの可能性を探った。本研究で発展させた手法や得られた知見は、今後の細胞骨格と生体分子モーターからなるネットワークをマイクロロボットに導入する際に有益であるとともに、マイクロロボットの高機能化に資するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Inspired by the principle which biological organisms use proteins and protein assemblies to build up higher order structures, the purpose of this study is to establish a methodology of inducing network morphology having designated emerging functions via external controls. To this end, experimental and computational studies were performed on pattern formations of networks consisting of biomolecular motors and cytoskeletal filaments confined in microfabricated chambers. Mechanical properties of microtubules, which are main components of the networks, were studied. In addition, to utilize the networks for electronics, microtubules were conjugated with gold nanoparticles.

研究分野：知能機械

キーワード：生体分子モーター マイクロロボット 自己組織化 機能発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、磁気コイル型マイクロロボットに代表されるように、細胞サイズのマイクロロボットが開発されており、医療への応用が期待されている(Nelson et al., 2010)。生体内ではマイクロロボットが置かれた環境が様々に変化するために、マイクロロボットが自律的に環境に適応することが理想的であるが、現在のマイクロロボットは比較的単純で固定された機能を有するものに限られている。これは現在の設計指針ではマイクロロボットに多様な機能を持たせるにはより多くの機構を導入しなければならないが、マイクロロボットに多くの機構を導入することは空間的にも材料的にも難しいからである。

一方、細胞は環境に応じて自律的に多様な機能を実現する。細胞が多様な機能を実現する方法は、ロボットとは大きく異なる。細胞は、同じ材料を用いて、その高次構造を組み替えることによって、限られたリソースで多様な機能を実現している。例えば、細胞骨格は、細胞内物質輸送、力発生、細胞の形状維持など様々な機能に関与している。各機能を担うために、細胞骨格は特徴的なネットワークを形成する。例えば、張力を発生するためにアクチンフィラメントはストレスファイバーを形成し、細胞分裂の際に微小管は紡錘体を形成する。これらのネットワークは、細胞がおかれた環境や細胞周期に依存して、自己組織化により柔軟に組み替えられる。このように同じ部品を用いて、高次構造を組み替えることで様々な機能を実現させている。

この細胞骨格のネットワークの組み替えには、細胞骨格結合タンパク質といった内的因子が関与していることが知られているが、細胞の幾何学的形状といった外部環境も細胞骨格ネットワークの形成に影響していることが知られている。例えば、細胞が接着できる領域を非対称な形状に制限すると、非対称な細胞骨格ネットワークが形成され、特定の方向へ運動することが示されている(Jiang et al., 2005)。これは細胞形状という外部環境を操作することによって、特定の方向への運動という機能を発現させた例である。

本研究は、細胞の設計指針に着想を得て、外部環境を操作することにより、パーツの結合した高次構造の形態形成を誘導し、多様な機能を発現させる方法論を確立するものためのものである。これにより、外部環境に適応して多様な機能を発現するマイクロロボットの実現を目指す。

### 2. 研究の目的

細胞骨格のネットワーク形態形成は、細胞骨格結合タンパク質など様々な因子が関与した複雑な過程であるが、Nedelecらは、キネシンの4量体と微小管を混合した単純な細胞外再構成系で、微小管が自己組織化することを示した(Nedelec et al., 1997)。本研究の目的は、微小管ネットワークの形態形成をマイクロウェルやマイクロ構造体の形状を調整することにより、微小管ネットワークの形態形成を誘導し、多様な機能を発現させることである。これまでに行った予備実験をより系統的に実施することにより、マイクロウェルやマイクロ構造体を用いて、様々な機能を発現させる手法を開発する。

再構成系を用いた細胞骨格ネットワークの形態形成の研究については、細胞生物学や生物物理学的な関心からリボソームなどの微小空間に封入した実験も行われている。しかし、微小空間の形状は球形などの単純な構造に限られており、多様な形状を扱うものではない。また、本研究計画のように、外部環境の操作によって、細胞骨格ネットワークの形態形成を誘導し、望みの機能を発現させるといった視点に立った研究はこれまでに行われていない。

本研究から得られた知見は、単純なパーツを自己組織化によって組み立て、機能を実現するための一般的手法の開発に役立つとともに、形状と機能との関係について知見を与えると考える。またネットワークの基本構成要素である微小管の力学物性やアクチン・ミオシン系の利用の可能性について調べた。

### 3. 研究の方法

外部環境を操作することにより、どのように生体分子モーターと細胞骨格からなる高次構造の形態形成が誘導されるかを調べた。マイクロウェル中で形成される細胞骨格ネットワークを観察するために、マイクロウェルを有する基板は、シリコンゴム製の鋳型からUV硬化樹脂で型取りすることで一度に多数のマイクロウェルを作製した。シリコンゴム鋳型はフォトリソグラフィ等の微細加工技術を用いて作製した。マイクロウェルにタンパク質溶液を封入する手法は、リアルタイムPCR用粘着シールを用いて、一度に大量のマイクロウェルを再現性よく簡単に密閉した。多様な形状のマイクロウェルを単一の基板上に作り、顕微鏡用自動電動ステージを利用して効率的に多数のマイクロウェルを観察した。

細胞骨格ネットワーク形成のメカニズムを理解することと、特定の機能を誘導するマイクロウェルを設計するために、細胞骨格ネットワーク形成を再現するシミュレーションを開発した。シミュレーションでは、キネシンと微小管からなる収縮性ネットワークの振る舞いを再現する粗視化したシミュレーションを行った。実際のネットワークの振る舞いを再現するため、ネットワークの構成要素間に斥力を導入した。このために実験を再現する斥力モデルを探索した。

ネットワークを電気回路として利用する可能性を検討するために、微小管に金属ナノワイヤー化する手法を開発に取り組んだ。ピオチン化したチューブリンを重合することにより作製し

た微小管に、直径 10 nm の金ナノ粒子を結合させた。金ナノ粒子には、ストレプトアビジンと蛍光色素が結合しており、ビオチン化したチューブリンにビオチン・アビジン結合により結合すると、蛍光顕微鏡で観察できる。金ナノ粒子の微小管上での被覆率などの詳細を観察するために、金ナノ粒子が結合した微小管を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。このために試料の洗浄方法や乾燥方法、観察条件について様々な条件で実験を重ね、走査型電子顕微鏡観察に適した条件を探索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 顕微鏡観察の自動化

多数のマイクロウェルを効率よく観察するために、 $\mu$ Manager (<https://micro-manager.org/>) というソフトウェアを用いて、電動顕微鏡ステージ、カメラ、LED 光源を自動制御した。 $\mu$ Manager は、ユーザーがプログラミング出来る機能があり、これを利用することで (1) 高倍率で広視野を観察するためのタイリング、(2) 蛍光観察における蛍光色素の退色を低減するためのカメラ撮影と LED 照明を同期させた動画撮影、(3) カメラ撮影と LED 照明を同期させたタイリング動画の撮影、を行えるようにした。

タイリングについては、電動顕微鏡ステージのバックラッシュのため、画像の継ぎ目に 1  $\mu$ m 程度のずれが生じた。バックラッシュを最小化するためステージの走査方向を一定にしたが、画像の継ぎ目に 1  $\mu$ m 程度のずれが残った。そこで画像の 10%-30% 程度領域が重なるようにし、重なった領域の画像相関が最大になるように調整することで、継ぎ目がスムーズな画像を作成できるようになった (図 1)。

蛍光観察における蛍光色素の退色を低減するためのカメラ撮影と LED 照明を同期させた動画撮影や、カメラ撮影と LED 照明を同期させたタイリング動画の撮影も可能となった。ただし、タイリング動画の撮影では、物体が移動する場合、画像の継ぎ目でずれが顕著であった。

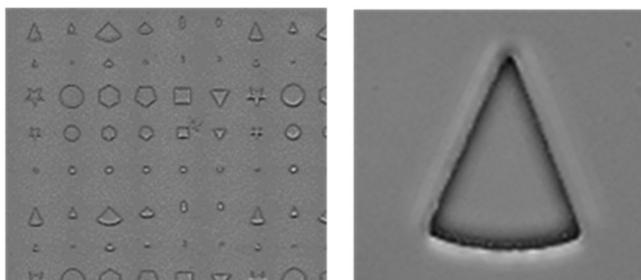


図 1  $\mu$ Manager のプログラミングによるタイリング画像。タイリングした全体画像 (左) と個別画像 (右)。

##### (2) ネットワーク形成

当初カバーガラスを基板として SU-8 3005 を用いて微細加工を行ったが、十分な精度の微細加工が行えなかった。考えられる原因として、透過光がステージで反射し、意図していない部分を感光させているのではないかと考え、基板をシリコン基板に変更した。シリコン基板上に SU-8 3005 を用いた微細加工により、十分な程度で細胞サイズのチャンバーを大量に作製することが出来た。この SU-8 3005 で作製したパターンをマスターとして PDMS スタンプを作製し、UV 硬化樹脂をソフトリソグラフィによってパターンを複製した。走査型電子顕微鏡での観察によるとマスターも UV 硬化樹脂で作製したマイクロウェルも十分な精度を有しており、意図した形状のマイクロウェルを大量に作製することが出来た (図 2)。

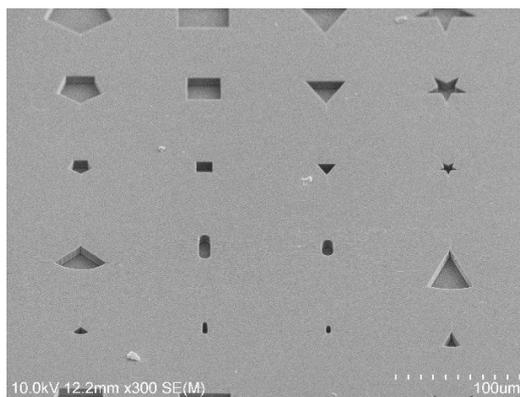


図 2 作製したマイクロウェルの電子顕微鏡画像。

また密封用フィルムを用いて、細胞骨格ネットワークと生体分子モーターの封入を行った。大半のマイクロウェルは密封されていたものの、密封出来ていないマイクロウェルも散見された。細胞サイズのマイクロウェルではネットワークの形態形成が良くなかったため、大きなパターンでの収縮実験を行った。

ネットワークの挙動を再現するシミュレーションでは、様々な形状のマイクロウェルやフォトマスク内でのネットワークの挙動をシミュレーションするために、マイクロウェルやフォトマスクの画像ファイルを読み込み、その画像上の形状を境界とするシミュレーションを行えるようにした。このために、ビットマップ形式の白黒画像を読み込み、1 ピクセルを実際の寸法に変換する係数を指定した。現在は、ネットワークの初期配置を指定している。このシミュレーションを用いてネットワークの特徴探索を行った。

我々がこれまでに開発したシミュレーションではネットワーク構成要素間の斥力を無視して

いた。このため、ネットワークの収縮率が実験観察よりも大きくなるという問題があった。そこでネットワーク構成要素間に斥力を導入することにより、より実験観察に近いネットワークの収縮挙動を再現することを目指した。斥力のポテンシャルの形としては、ソフトマテリアルのシミュレーションで使用される代表的な斥力ポテンシャルとして、ソフトコアポテンシャルとガウシアンコアポテンシャル、ブラウン動力学で使われている線形ソフトポテンシャル(Kim et al., 2009)、線形ソフトポテンシャルを改善した非線形ソフトポテンシャルを試した。

ソフトコアポテンシャルとガウシアンコアポテンシャルでは、ポテンシャルの広がりがあるため、収縮開始前に流動性を有し、収縮後に実験で観察された収縮率を再現するパラメーター値を見出すことは出来なかった。

線形ソフトポテンシャルでは、ネットワークサイズに依存して収縮率が変化した。一方、実験ではネットワークサイズに依存せず、一定の収縮率が得られており、この振る舞いを再現することは出来なかった。

最後に、線形ソフトポテンシャルの結果を踏まえて、非線形ソフトポテンシャルを導入した。非線形ソフトポテンシャルを導入したネットワークでは、ネットワークの初期サイズには依存しない収縮率が得られ、実験結果を再現した。ただし、シミュレーションの実行には長い時間を要してしまうため、今後の改善が必要である。

### (3) 細胞骨格ネットワークの金属ナノワイヤー化

形成させた細胞骨格ネットワークの応用のひとつとしてエレクトロニクスを検討した。ネットワーク形状を外部環境により制御し、このネットワークをテンプレートとすることにより様々な機能を有する電気回路をつくることを目指した。このような電気回路の作製方法は、従来のリソグラフィーによる方法とは異なり、ネットワークの自己組織化によって配線されることと、将来的には3次元の配線を行える可能性がある。

蛍光顕微鏡で観察した結果、微小管の長さ程度の線状の領域に蛍光が観察され、微小管に金ナノ粒子が結合していることが示唆された。作製した金属ナノワイヤーを走査型電子顕微鏡を用いて観察した結果、長さ数マイクロメートルで、太さが約50 nmの線状の物体が確認出来た。この長さは微小管の長さと同程度であり、太さについては、微小管と金ナノ粒子の直径がそれぞれ25 nmと10 nmであることを考慮すると、走査型電子顕微鏡によって観察された線状の物体は金ナノ粒子が結合した微小管であることが示唆される(図3)。

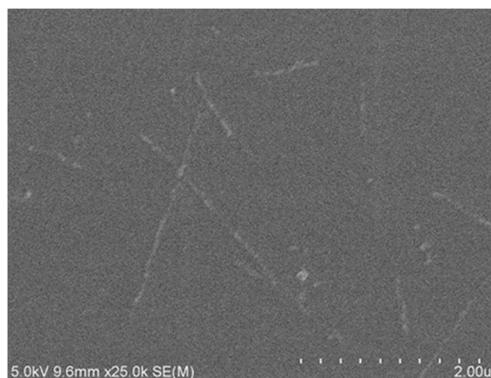


図3 走査型電子顕微鏡で観察した線状の構造

### (4) 微小管の力学物性(Sweet et al., 2022)

ネットワークの基本構成要素である微小管の力学物性を調べた。微小管の曲げ剛性については、古くから測定が行われてきたが、報告された値には大きな開きがある。また、この原因のひとつとして考えられているのは、曲げ剛性が微小管の長さ依存する可能性である。この微小管の長さ依存性は、長さの異なる微小管の曲げ剛性を直接測定する他、キネシンを用いた *in vitro* 運動再構成系での微小管の軌跡の相関長を測ることによっても測定が行われている。これは、微小管の相関長と微小管の軌跡の相関長の値が一致するという理論予測がある一方、実験観察では両者の値に50倍程度の違いがあることが知られており、この違いは曲げ剛性の長さ依存性によって説明できると主張されている。今回我々は、このキネシンを用いた *in vitro* 運動再構成系を用いた微小管の曲げ剛性測定をシミュレーションによって再現し、微小管の曲げ剛性の長さ依存性が測定できるかどうかを調べた。シミュレーションを用いる利点は、実験では微小管の相関長と軌跡の相関長を同じ条件で測定する必要があるものの、微小管の曲げ剛性は微小管の合成条件などに依存するため、両者を正確に同条件で比較することが難しい。一方、シミュレーションでは、微小管の相関長をパラメーターとして入れ、軌跡の相関長を測定するため、両者を比較することが出来る。

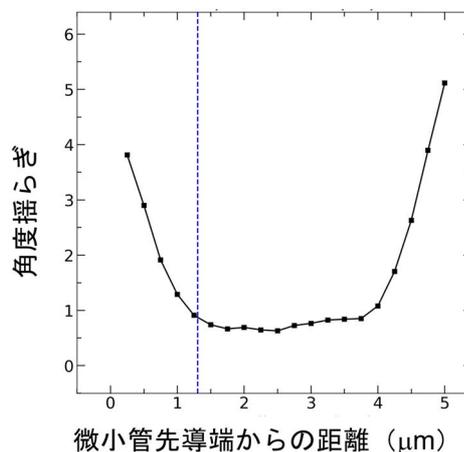


図4 微小管の方向揺らぎ。

シミュレーションはブラウン動力学を用いた。微小管は長さ依存性のない曲げ剛性を有する弾性棒としてモデリングし、キネシンは線形バネとしてモデリングした。先行研究と比較するため、微小管に垂直に作用する外力を印加し、その後の微小管の軌跡の曲がりの曲率半径を測定し、これを梁の曲げとして考えて得られる式と比較することで微小管の曲げ剛性を測定した。このとき、理論で仮定されているように、微小管の顕著に曲がっている部分の長さを微小管先端端と最も前方にあるキネシンとの間の距離であると仮定して解析を行うとともに、微小管の方向揺らぎを測定した。

軌跡の相関長を測定したところ 0.2-0.5 mm 程度の値が得られ、実験と同程度の値を得た。なお、外力が大きくなると、微小管が基板から解離する現象が見られた(Sweet and Nitta, 2021)。以下の結果は、解離が顕著には起こらない外力でのシミュレーション結果である。軌跡の相関長は、外力には依存しないが、モーター密度とともにわずかに減少した。

移動中の微小管の方向揺らぎを測定したところ、微小管の両端から 1-2  $\mu\text{m}$  程度の領域で顕著な揺らぎが見られた。一方、微小管に結合しているキネシンの間隔は 0.3-0.6  $\mu\text{m}$  程度であり、理論で仮定されているよりも方向揺らぎの顕著な領域の長さが長いことがわかった(図4)。

この結果は、上記の微小管の相関長と軌跡の相関長との違いは、微小管の曲げ剛性の長さ依存性を仮定しなくても説明可能であることを示している。

#### (5) アクチン・ミオシン系利用の検討(Kang'iri et al., 2022)

これまでに我々が使用してきたキネシンよりも移動速度の大きいミオシンを使用することを検討した。ミオシンはキネシンに比べて移動速度が大きいので、アクチン・ミオシン系のネットワークでは収縮速度が、キネシン・微小管系に比べて大きく出来る可能性がある。しかし、アクチン・ミオシン系の *in vitro* 運動アッセイ系の観察では、失活したモーターによる影響が大きいことが予想される。そこで失活したモーターの影響を調べるために、シミュレーションを用いて、アクチンフィラメントが連続的に運動するための条件を探索した。

シミュレーションはブラウン動力学に基づいたシミュレーションで、アクチンフィラメントを弾性棒としてモデリングし、ミオシンは線形バネとしてモデリングした。ミオシンは活性のある分子と、失活した分子を様々な割合で基板の上に配置し、その上を運動するアクチンフィラメントの移動速度を調べた。

シミュレーションの結果、アクチンフィラメントの持続的な運動が起こるためには、9割以上のミオシンが活性を有している必要があることが分かった(図5)。このように高い割合のミオシンが活性でなければならない理由は、活性なミオシンに比べて、失活したミオシンの結合時間が長いからであることがわかった。

この結果は、アクチン・ミオシン系を利用することにより、高速な応答が期待できるものの、アクチン・ミオシン系を利用するためには、キネシン・微小管系に比べて、入念に失活したモーターを取り除く必要があることを示している。

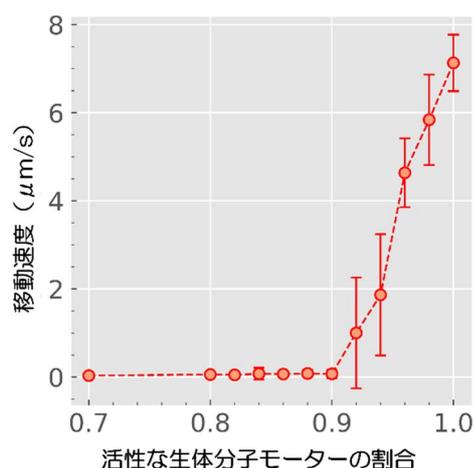


図5 微小管の方向揺らぎ。

#### <引用文献>

- Jiang, X., Bruzewicz, D.A., Wong, A.P., Piel, M., Whitesides, G.M., 2005. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 975–978. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408954102>
- Kang'iri, S.M., Salem, A., Nicolau, D. V, Nitta, T., 2022. Effects of defective motors on the active transport in biosensors powered by biomolecular motors. *Biosens. Bioelectron.* 114011. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114011>
- Kim, T., Hwang, W., Lee, H., Kamm, R.D., 2009. Computational analysis of viscoelastic properties of crosslinked actin networks. *PLoS Comput. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000439>
- Nedelec, F.J., Surrey, T., Maggs, A.C., Leibler, S., 1997. Self-organization of microtubules and motors. *Nature* 389, 305–308. <https://doi.org/10.1038/38532>
- Nelson, B.J., Kaliakatsos, I.K., Abbott, J.J., 2010. Microrobots for Minimally Invasive Medicine. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 12, 55–85. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-010510-103409>
- Sweet, M., Kang'iri, S.M., Nitta, T., 2022. Linking path and filament persistence lengths of microtubules gliding over kinesin. *Sci. Rep.* 12, 3081. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06941-x>
- Sweet, M., Nitta, T., 2021. Detachment of Microtubules Driven by Kinesin Motors from Track Surfaces Under External Force. pp. 199–206. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-92163-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-92163-7_16)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sweet May, Kang 'iri Samuel Macharia, Nitta Takahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Linking path and filament persistence lengths of microtubules gliding over kinesin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 --
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06941-x	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 -
1. 著者名 Kang'iri Samuel Macharia, Salem Andrew, Nicolau Dan V., Nitta Takahiro	4. 巻 203
2. 論文標題 Effects of defective motors on the active transport in biosensors powered by biomolecular motors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 114011 ~ 114011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2022.114011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kang'iri Samuel Macharia, Nitta Takahiro	4. 巻 in press
2. 論文標題 Motility resilience of molecular shuttles against defective motors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEE Transactions on NanoBioscience	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/TNB.2022.3170562	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sweet May, Nitta Takahiro	4. 巻 403
2. 論文標題 Detachment of Microtubules Driven by Kinesin Motors from Track Surfaces Under External Force	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lecture Notes of the Institute for Computer Sciences, Social Informatics and Telecommunications Engineering	6. 最初と最後の頁 199 ~ 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-92163-7_16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kang 'iri Samuel Macharia, Nitta Takahiro	4. 巻 403
2. 論文標題 A Mathematical Model Predicting Gliding Speed of Actin Molecular Shuttles Over Myosin Motors in the Presence of Defective Motors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lecture Notes of the Institute for Computer Sciences, Social Informatics and Telecommunications Engineering	6. 最初と最後の頁 207 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-92163-7_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 新田高洋
2. 発表標題 生体分子モーターの工学利用：バイオセンサー，人工筋肉
3. 学会等名 第32回「電磁力関連のダイナミクス」シンポジウム (SEAD32) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yurino Aoyama, Yuichi Hiratsuka, Takahiro Nitta
2. 発表標題 Computer simulation of printable artificial muscles composed of engineered kinesins and microtubules
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kang 'iri Samuel Macharia, Nitta Takahiro
2. 発表標題 A Mathematical Model Predicting Gliding Speed of Actin Molecular Shuttles Over Myosin Motors in the Presence of Defective Motors
3. 学会等名 BICT2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sweet May、Nitta Takahiro
2. 発表標題 Detachment of Microtubules Driven by Kinesin Motors from Track Surfaces Under External Force
3. 学会等名 BICT2021
4. 発表年 2021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	平塚 祐一 (Hiratsuka Yuichi) (10431818)	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  (13302)	
研究分担者	森島 圭祐 (Morishima Keisuke) (60359114)	大阪大学・工学研究科・教授  (14401)	

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		
カナダ	McGill University		