

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710108

研究課題名（和文） 極微量物質輸送のための MEMS ピンセットによる微小管ネットワークの自動構築

研究課題名（英文） Automated construction of microtubule networks using MEMS tweezers for transporting extremely small amount of analytes

研究代表者

タルハン メフメット チャータイ (TARHAN MEHMET C)

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

研究者番号：50582839

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞内で分子を輸送するキネシン・微小管のシステムを、微小管 1 本ずつの個別操作方法を確立してシステムの再構成を実現することを目的とした。MEMS 技術で製作したピンセットにより微小管一本を捕獲して、チップ上に並べ望みの形の搬送路を組み上げる手法を自動化するとともに、再構築した微小管ネットワーク上でキネシンを付加したビーズを動かす技術を開発した。ビーズを介して対象物質を運ぶことで、微量物質反応システムの実現を目指した。

研究成果の概要（英文）：Intracellular transport is based on motor protein, e. g. kinesin, motion along rail structures, e. g. microtubules. This works aims at building an *in vitro* reconstruction of the intracellular transport with single microtubules filaments to use for the handling of extremely small amount of analytes in a microfluidic chip. To achieve this goal, MEMS tweezers were used to capture a single microtubules filament and then relocated to a pre-designated area. Repeating the capturing and relocation steps, a microtubule network could be assembled for kinesin motion to use beads for carrying extremely small amounts of analytes in a chemical detection system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・ナノ構造科学

キーワード：分子移動システム、直接分子操作、イメージプロセス、MEMS ピンセット、微小管

### 1. 研究開始当初の背景

生体細胞においては、細胞膜の外部と細胞内の微小器官の間や、微小器官相互の間で物質輸送を行うため、対象物質を閉じ込めた小胞を生体モータ分子で運搬している。

一方で、現在のマイクロ化学システムは、単分子レベルの検出感度や秒単位の短い反応時間を実現しており、微量血液分析など様々の応用が開けようとしている。しかし、全体のサンプル量としては、細胞内で扱っている量に比べて格段に多量が必要である。この解決として、流体チップ内に生体モータ分子を用いた物質輸送システムを作り、極微量

の化学処理を可能にすることが切望されている。

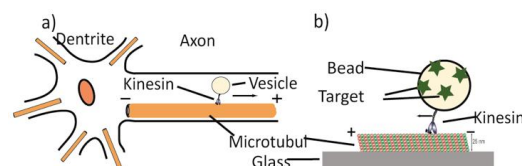


図 1. a) 生体内での微小管-キネシンモータ分子による物質搬送, b) 生体外へ取りだして任意の物質の搬送を行う

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞内で生体分子を輸送するキネシン・微小管のシステムを、微小管1フィラメントずつの個別操作方法を確立してシステムの再構成を実現することで、極微量の化学物質の処理が可能なチップの創製を目指す研究を提案する。すなわち、物質輸送に係る生体モータ分子であるキネシン・微小管系を対象に、微小管一本をMEMS技術で製作したピンセットにより捕獲してチップ上に並べ望みの形の搬送路をくみ上げる手法を元に、微小管ネットワーク上でキネシンを付加したビーズを動かす技術を開発し、ビーズを介して対象物質を運ぶことで、微量物質反応システムの実現を目指す。

### 3. 研究の方法

生体輸送システムを、チップの上に再構成することをめざして、本研究では、次の5つの課題に沿って研究を進めた。課題1は、微小管一本を捕獲して、チップ上の望みの位置と方向並べる手法の開発である。MEMS技術で2本の微小なプローブ先端が1~10 $\mu\text{m}$ 程度の間隔で並んだデバイスをピンセットのように用いて、あらかじめマイクロの溝の上に架橋しておいた微小管を捕獲し、他の場所に再度付着させた。課題2は、捕獲すべき微小管の+端(キネシンが進む方向)と-端の区別ができるように、微小管にラベルを付加した。課題3では、微小管配置に用いるピンセットとステージをフィードバックコントロールし、微小管ネットワークの形成を自動的に行うシステムを開発する。課題4では、複数の微小管の極性を認識し、捕捉、配置する微小管を選定するアルゴリズムの確立を目指す。最後に、課題5では、対象物質をビーズ表面に捕獲し、微小管で構築した搬送路ネットワーク上で運び、微量物質輸送デバイスを実証した。

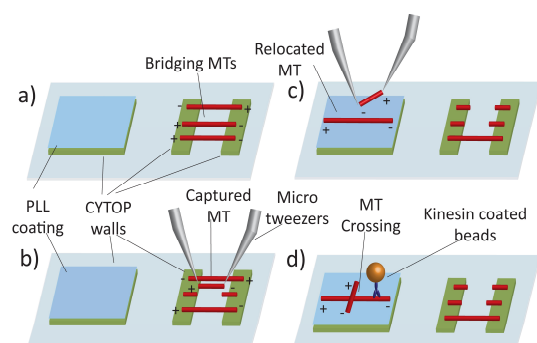


図2. ナノピンセットを用いた微小管の再配置を土台とする微量物質輸送の概念図

### 4. 研究成果

#### 課題1：微小管の個別捕獲と再配置

微小管をあらかじめ固定する方法として、SU8ポリマーのマイクロ構造をガラス上に構築した。2つの構造物の間に、白い微小管

一分子を橋渡しさせた。ここに、ポリL-リジン をコートしたシリコンナノピンセット先端をあてて、微小管一分子を捕捉した。そのままナノピンセットを移動させて、微小管を他の場所に再配置できることを示した。

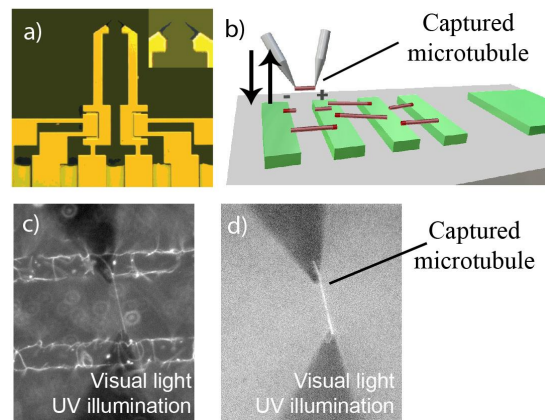


図3. 左上:シリコンナノピンセット, 右上:マイクロ構造物からの微小管の引き上げの概念図, 下段:実際の、ナノピンセットによる微小管一分子の引き上げ

#### 課題2：微小管の極性ラベリング

微小管の極性の向きは、蛍光染色をほどこしたチューブリンから微小管を重合させることにより、微小管の片側末端のみ蛍光を持たせることに成功した。

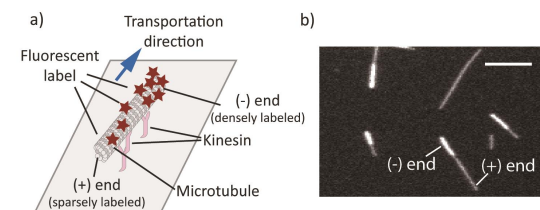


図4. a)キネシンと微小管の移動の関係, b)極性ラベリングした微小管. 蛍光が強い(白色が強い)方向が(-)極性であり、キネシン分子モータは、(-)端から(+)端へ移動する

#### 課題3：微小管ネットワークの構築

ナノピンセットにより単一微小管の捕捉、再配置を繰り返すことによって、微小管ネットワークの構築ができることを示した(図5)。

#### 課題4：微小管選定アルゴリズム

微小管ネットワーク構築のための一連の操作(微細構造物に架橋した微小管の検出、微小管向きの検出、MEMSピンセットのアプローチ(下降)、微小管の捕捉、引き上げ、移動、微小管の再配置)を自動化するために、顕微鏡ステージの蛍光シャッターと電動モータを1台のコンピュータに接続とし、ソフトウェアで全ての動きを制御できるようにした。これにより、微小管の劣化をとまなわず

に、マイクロ構造物上の微小管の画像取得が可能となった。さらに作成したアルゴリズムによって微小管の位置と向きを検出、取得した画像のトレース、マッピングを高い成功率において達成した。

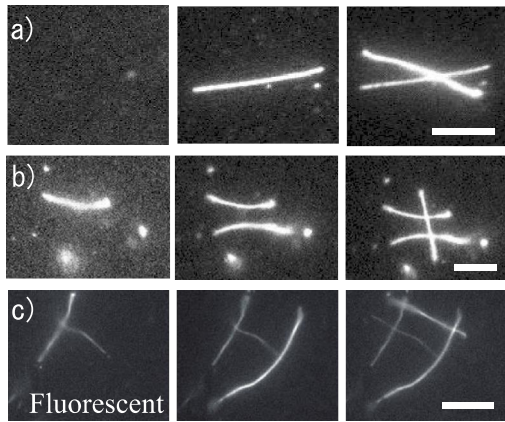


図5. ガラス基板上に再配置した微小管  
白いスケールバーは  $10 \mu\text{m}$

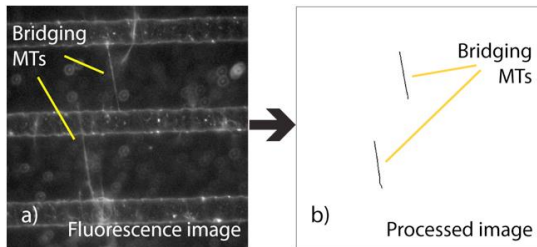


図6. a) 微小管の蛍光画像, b) ソフトウェアにより自動的に判別・取得した画像

図7. 微小管の個別操作によるネットワークの自動形成プロセス

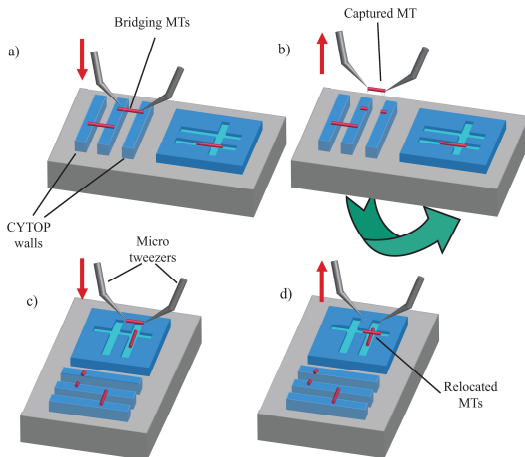


図7. 微小管の個別操作によるネットワークの自動形成プロセス

ナノピンセットのアプローチ、微小管捕捉、引き上げ、については、ピンセット側でZ駆動マニピレータを使って行った。ピンセット先端は鋭い形状になっているために、下降時に、先端と微細構造物が接触してしまい、先

端が壊れる場合があった。この課題については、期間中に完全に確立することはできなかったが、降下スピードの制御最適化によって達成できると考える。

#### 課題5：微量物質輸送デバイスの実証

課題4で構築したアルゴリズムを用いて、架橋された微小管をマイクロチャンネル内に移動させる検証実験を行った。捕捉した微小管を、幅数百マイクロメートルのチャンネル内の、望みの位置へ搬送することができた。さらに、平面上ではあるが、本研究で開発したシステムを用いて再配置した微小管上に、モータータンパク質のキネシンを加え、キネシンが移動する様子を観察できた。

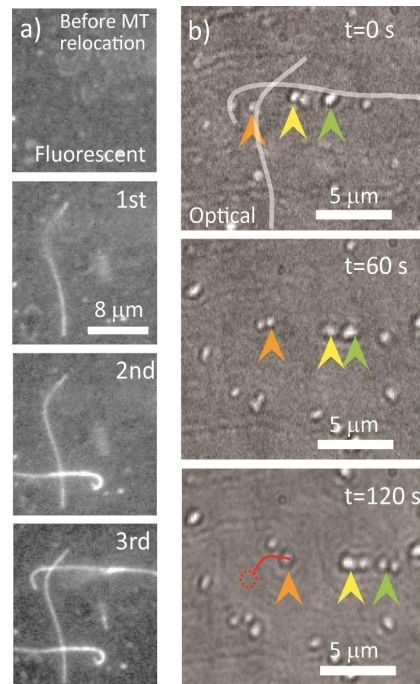


図8. ネットワーク上を移動するキネシン分子モーター, キネシンにはマイクロビーズを付加

本研究で開発した微小管ネットワークの自動構築手法は、生物・化学の分野で有効に利用できると考える。特に、最先端バイオ実験において望まれる、様々な分子を含む生体サンプル中のわずかな量の分子の振り分けも可能と考える。図9のように、分子が混合して入った中央の容器から、それぞれの分子を選択的にキネシン付加ビーズに付くようにし、微小チャンネル内部に配置した微小管に沿って、特定の分子のみを輸送する。チャンネルの端は、分子の検出場や他の分子との反応場とすることもできる。

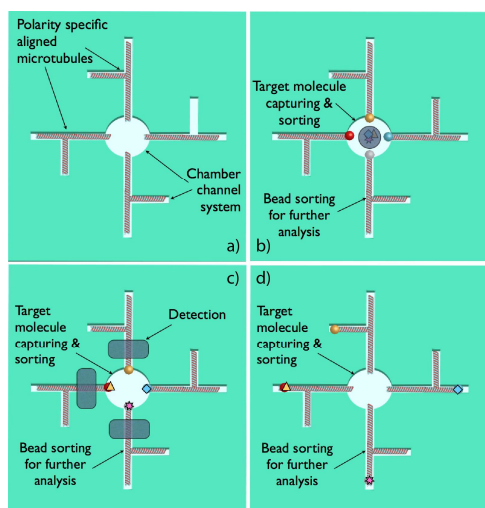


図9. 任意の極微量分子の輸送システム概念図. 中央の丸い場所に複合サンプルを入れた後、任意の分子をキネシンビーズに付け、チャンネル内に配置した微小管上を輸送する。望みの分子だけがチャンネル末端まで運ばれる。

#### 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2件)

(1) M. C. Tarhan, R. Yokokawa, F. O. Morin and H. Fujita, Specific Transport of Target Molecules by Motor Proteins in Microfluidic Channels, ChemPhysChem, Vol.14, 2013, 1618-1625, 査読有  
DOI: 10.1002/cphc.201300022

(2) M. C. Tarhan, Y. Orazov, R. Yokokawa, S. L. Karsten and H. Fujita, Suspended Microtubules Demonstrate High Sensitivity and Low Experimental Variability in Kinesin Bead Assay, Analyst, Vol.138, 2013, 1653-1656, 査読有  
DOI: 10.1039/c3an36545j

[学会発表] (計3件)

① M. C. Tarhan, D. Collard, L. Jalabert, M. Kumemura, N. Lafitte, Q. Delouee, S. L. Karsten, H. Fujita, Continuous Real-Time Monitoring of Molecular Detection by Silicon Nanotweezers-Integrated Microfluidic Device, 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2012年10月28日~2012年11月01日, Okinawa, Japan

② M. C. Tarhan, R. Yokokawa, L. Jalabert, D. Collard and H. Fujita, A MOTOR PROTEIN-BASED ENZYMATIC DETECTION SYSTEM, 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and

Life Sciences, 2011年10月4日, Seattle, WA, USA

③ M. C. Tarhan, R. Yokokawa, F. O. Morin and H. Fujita, Molecular Sorting Based on Motor Protein Powered Direct Transport, Foundations of Nanoscience Meeting (FNANO), 2011年4月12日, Snowbird, UT, USA

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

タルハン メフメット チャータイ  
(TARHAN MEHMET C)

東京大学・生産技術研究所・特任研究員  
研究者番号：50582839