

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760203

研究課題名(和文) モーター蛋白質によって駆動されるサルコメア様マイクロアクチュエータの開発

研究課題名(英文) Development of sarcomere-like microactuators driven by motor proteins

研究代表者

新田 高洋(Nitta, Takahiro)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：20402216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に存在する天然の分子機械であるキネシンやミオシンといったモーター蛋白質を用いて、マイクロマシン及びLab-on-a-Chipデバイスの駆動に利用を目指した研究が行われている。本研究では、モーター蛋白質と細胞骨格を、微細加工技術によって作製した足場に結合させ、マイクロアクチュエータの開発を試みた。このために、足場となる円柱形微粒子を作製し、蛋白質を結合させた。また、このアクチュエータの設計を支援するシミュレーションを作成した。

研究成果の概要(英文)：Motor proteins, such as kinesin and myosin, are biological molecular machines working in cells, and have been integrated into MEMS and lab-on-a-chips as their driving forces. Here, we aimed at developing a microactuator with motor proteins and cytoskeletal filaments anchored onto microfabricated scaffolds. To this end, we fabricated microscopic cylindrical particles serving as the scaffolds, and bound them with motor proteins and cytoskeletons. In addition, we developed a computer simulation which aids the development of the microactuator.

研究分野：応用物理

キーワード：モーター蛋白質 細胞骨格 微細加工 マイクロアクチュエータ シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

モーター蛋白質は、細胞内での物質輸送や、筋収縮などの運動を担う蛋白質である。これらのモーター蛋白質は、天然に存在する分子機械である。この分子機械は、アデノシン三リン酸をアデノシン二リン酸に加水分解する際に得られるエネルギーを、力学的な運動に変換する。このエネルギー変換効率 η は50%程度と見積もられており、非常に効率的である。このモーター蛋白質のサイズとエネルギー供給方法およびエネルギー変換効率の高さは、工学的観点から魅力的である。実際、このモーター蛋白質と細胞骨格を細胞外に取り出して、その運動を再構成することが可能である。しかし、適切な配置や足場構造がないと有用な運動を取り出すことが出来ない。そこで、微細加工技術で作製したマイクロ構造体とともに用いることで、モーター蛋白質と細胞骨格をマイクロマシン及びLab-on-a-Chipデバイスの駆動に利用することが目指されている。

このような試みのなかでもモーター蛋白質による物質輸送を用いたLab-on-a-Chipデバイスについて、盛んに研究が行われている。Lab-on-a-Chipデバイスでの物質輸送にモーター蛋白質を利用する利点は、ポンプや電極、電源といった外部装置がいらぬことである。また、モーター蛋白質による能動輸送は、拡散による輸送よりも効率的に物質輸送を行うことができる。この方向の研究は、プロトタイプのデバイスが開発されるに至った。

一方、モーター蛋白質のもう一つの重要な役割である力発生を利用して物体を駆動する研究例は限られている。これまでに行われているのは、マイクロメートルスケールの構造体にモーター蛋白質を結合させて駆動した研究である。しかし、モーター蛋白質を利用して、ミリメートルスケールや巨視的な力や変形を取り出す研究例はないのが現状である。

2. 研究の目的

生体内では、骨格筋に代表されるように、モーター蛋白質を用いて、巨視的な運動が取り出されている。筋収縮の素過程は、ミオシン分子の10 nm程度の構造変化である。この微小な構造変化は、モーター蛋白質と細胞骨格が組織的に空間配置されていることと、骨格筋の階層構造により巨視的な運動に変換される。

本研究の目的は、骨格筋に着想を得て、モーター蛋白質と細胞骨格を用いたマイクロアクチュエータを作製することである。特に、筋肉の収縮単位である、サルコメアを模倣したマイクロアクチュエータを作製することである。このために、微細加工により円柱形微粒を作製し、これにモーター蛋白質や細胞

骨格を結合させる。モーター蛋白質が結合した円柱形微粒と、細胞骨格が結合した円柱形微粒を配列させるために、 λ -DNAを用いる。

(1) マイクロ構造体の作製

フォトリソグラフィ法によって、フォトレジストSU-8で円柱を作製する。この際に、この円柱の異なる面に選択的に蛋白質や核酸を配置するために、SU-8円柱の上面にのみ金薄膜をつけることを目指した。

(2) マイクロ構造体へのタンパク質や核酸の結合

円柱微粒子の上面にのみ金をつけ、その面に特異的にチオール基を結合させる。また、側面には蛋白質を結合させる。

(3) シミュレーションによる設計支援

足場となる円柱形微粒子のサイズや細胞骨格の長さなどを最適に設計するために、細胞骨格やモーター蛋白質の運動のシミュレーションを作成し、微細加工構造体と細胞骨格やモーター蛋白質の相互作用を再現する。

また、作成したシミュレーションを用いて、円柱形微粒子のサイズなどについて構造最適化を行う。

3. 研究の方法

(1) マイクロ構造体の作製

プロセス1

シリコン基板の上にスピコートしたSU-8を露光し(図1(A))、直径約10 μm 、高さ約10 μm の円柱を作製した(図1(B))。このSU-8円柱に金をスパッタした。このとき、SU-8と金薄膜との接着性を向上させるために、SU-8にクロムをスパッタし、その上に金をスパッタした。その後、SU-8円柱とシリコン基板の上にOFPRをスピコートした(図1(C))。SU-8円柱の上面以外のOFPRを露光し(図1(D))、OFPRを現像した(図1(E))。SU-8とシリコン基板上の金とクロムをエッチングした(図1(F))。最後に、SU-8円柱上面のOFPRを除去した後、SU-8円柱をシリコン基板から剥がした。

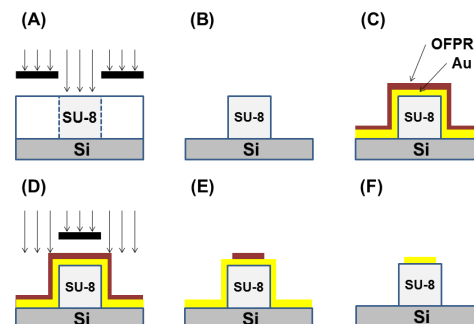
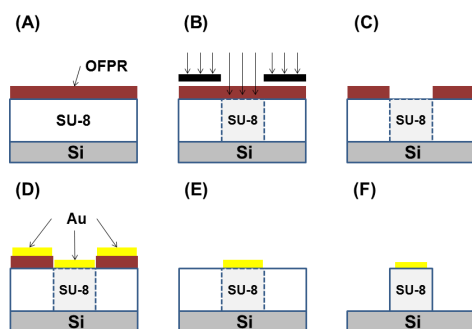


図1 プロセス1の概略図

プロセス2

シリコン基板上にSU-8をスピコートし、さらにその上にOFPRをスピコートした(図2(A)).その後、クロムマスクを通して、OFPRとSU-8を露光した(図2(B)).その後、OFPRを現像してから(図2(C)),金をスパッタした(図2(D)).金をスパッタした後、OFPRと、未露光のSU-8を除去した。最後に、SU-8円柱をシリコン基板から剥がした。

図2 プロセス2の概略図



(2) マイクロ構造体への蛋白質や核酸の結合

核酸は末端にチオール基をつけ、金と結合させる。

蛋白質は、SU-8表面を水酸化ナトリウムと塩酸で処理して、SU-8のエポキシ基を開環し、水酸基を形成させる。その後、グリシンを結合させた後、EDC/NHSカップリングを使い、タンパク質を結合させた。

(3) シミュレーションによる設計支援

マイクロアクチュエータの開発を支援するためのシミュレーションを開発した。

細胞骨格を弾性棒としてモデリングした。すなわち細胞骨格を連結した剛体棒とし、隣り合う剛体棒の間の曲げに対して曲げ剛性による復元力が働くようにした。曲げ剛性は、実験報告の値を用いた。細胞骨格の形状の時間発展は、剛体棒の連結点の座標をブラウン力学によって計算した。このとき計算した連結点の座標に、各セグメントの長さが一定であるという条件と、構造体内の領域に連結点の座標が入らないという条件を課したもとの時間発展を行った。モーター蛋白質は、線形バネとしてモデリングした。キネシンの場合は、キネシン頭部は、細胞骨格に結合した後、キネシン頭部に加わる負荷に依存した速度で微小管のプラス端に向かって移動するものとした。キネシン頭部に7 pNより大きな負荷が加わると、キネシンは微小管から解離するものとした。キネシンの微小管からの自発的解離は無視した。ミオシンの場合は、他グループによって同定されたミオシンの加水分解反応サイクルのモデルとそのパラメータ値を用いてシミュレーションを行った。

また、モーター蛋白質や細胞骨格の足場と

なるマイクロ構造体の適切な大きさや形状を最適化するために、実数型の遺伝的アルゴリズムのプログラムを作成した。

4. 研究成果

(1) マイクロ構造体の作製

プロセス1

図1に示した過程で作製したマイクロ構造体を示す。この結果、SU-8で直径約10 μm、高さ約10 μmの円柱を作製することが出来た。しかし、SU-8円柱上部に金薄膜を残すことが出来なかった。この理由を調べるために、OFPRを除去していない基板についても金をエッチングしたところ、この基板でも金薄膜がエッチングされてしまった。このことから、金薄膜をスパッタしたSU-8円柱表面に、OFPRがコートされなかったと考えた。

プロセス2

本研究で、図1(C)までのプロセスを実行したところ、露光部分のOFPRが現像されなかった。このため、図1(D)以降のプロセスを実行できなかった。OFPRが現像されなかった原因としては、OFPRをSU-8の上にスピコートした際に、OFPRの溶剤により、SU-8が溶出し、OFPRと混合し、混合したSU-8が露光した際に硬化したためではないかと考えた。

(2) マイクロ構造体への蛋白質や核酸の結合

図3に、SU-8で作製した円柱形微粒子に結合した微小管の画像を示す。微小管をSU-8表面に結合させることが出来た。ただし、円柱上部のみに金薄膜を残すことが出来なかったため、円柱微粒子を配列させることが出来なかった。また、微小管も円柱表面にランダムに結合していた。

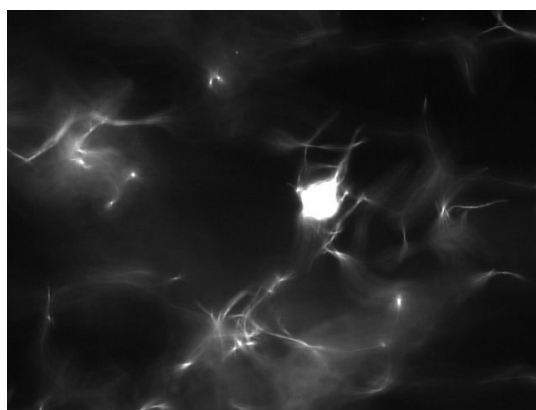


図3 円柱形微粒子に結合した微小管の蛍光画像。

(3) シミュレーションによる設計支援

作成したシミュレーションが実際の現象

を再現するかどうかを確認するために、これまでに実験報告が多数ある、微細加工基板上でモーター蛋白質によって駆動される細胞骨格の運動についてシミュレーションを行い、その結果を実験結果と比較した。比較の結果、作成したシミュレーションは実験結果を定量的によく再現しており、作成したシミュレーション方法の妥当性が示された。

また、このシミュレーションを用いて、微細加工基板上でモーター蛋白質によって駆動される細胞骨格の運動について、微細加工壁の形状と細胞骨格の運動の関係や、モーター蛋白質のパターン境界での細胞骨格の運動、細胞骨格の運動の軌跡について、新たな知見が得られた。

また、構造最適化のための実数型の遺伝的アルゴリズムのプログラムを作成し、その最適化手法の有効性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Ishigure, Y.; Nitta, T. Simulating an Actomyosin In Vitro Motility Assay: Toward the Rational Design of Actomyosin-Based Microtransporters. IEEE Transactions on NanoBioscience 2015 DOI 10.1109/TNB.2015.2443373 (掲載決定) 査読有り

Ishigure, Y.; Nitta, T. Understanding the Guiding of Kinesin/Microtubule-Based Microtransporters in Microfabricated Tracks. Langmuir 2014, 30 (40), 12089-12096. 査読有り

Sunagawa, T.; Tanahashi, A.; Downs, M. E.; Hess, H.; Nitta, T. In silico evolution of guiding track designs for molecular shuttles powered by kinesin motors. Lab On A Chip 2013, 13 (14), 2827-2833. 査読有り

〔学会発表〕(計 10件)

石樽祐貴, 新田高洋, 「アクチン・ミオシンの工学利用に向けた in vitro 運動アッセイのシミュレーション」2015 年生体運動合同班会議, 2015 年 1 月 8 日, 学習院大学 (東京都・目白)

Takahiro Nitta and Yuki Ishigure, “A Computer Simulation of Reconstituted Systems of Motor Proteins Revealed Biological Phenomena Relevant to Biomedical Engineering”, 2014 International Symposium on

Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2014 年 11 月 10 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋)

(招待講演) Takahiro Nitta, “Computer-aided Design of Microdevices Powered by Biological Molecular Machines”, IUMRS-ICA 2014, 2014 年 8 月 28 日, 福岡大学 (福岡県・博多)

(招待講演) Takahiro Nitta, “Simulating microtransporters driven by biological molecular machines” Micro- and Nanomachine 2014, 2014 年 7 月 2 日, Hannover (Germany)

Yuki Ishigure and Takahiro Nitta, “Guiding of Molecular Shuttles Driven by Kinesin Motor Proteins for Applications to Nanobiosensors: A Simulation Study” Biosensors 2014, 2014 年 5 月 30 日, Melbourne (Australia)

(招待講演) Takahiro Nitta, “Designing microdevices powered by motor proteins” International Workshop for Motor Proteins toward Emerging Nanosystems, 2014 年 4 月 30 日, 京都大学 (京都府・京都)

新田高洋, 石樽祐貴「モーター蛋白質の工学利用へ向けたキネシン・微小管 in vitro motility assay のシミュレーション」2013 年度生物物理学会中部支部講演会, 2014 年 3 月 6 日, 分子科学研究所 (愛知県・岡崎)

新田高洋, 石樽祐貴「微細加工基板上のキネシンによって駆動される微小管の滑り運動をシミュレーションする」2014 年生体運動合同研究班会議, 2014 年 1 月 12 日, 千葉大学 (千葉県・千葉)

Yuki Ishigure and Takahiro Nitta, “Analyzing Three-Dimensional Movements of Molecular Shuttles Driven by Kinesin with Computer Simulation” 24th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2013 年 11 月 12 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋)

Yuki Ishigure and Takahiro Nitta, “Three-Dimensional Movements of Microtubule Driven by Kinesin on Microfabricated Tracks Revealed with a Computer Simulation” 第 51 回生物物

理学会年会,2013年10月28日,国立京
都国際会議場(京都府・京都)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新田 高洋(Takahiro NITTA)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号:20402216

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし