

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440062

研究課題名(和文) タンパク温度を1分子レベルで光制御するナノヒーターの開発

研究課題名(英文) Development of nanoheater to control temperature of single protein molecules

研究代表者

井上 裕一 (Yuichi, Inoue)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：50323499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子の局所的な温度制御および温度計測を行うことで、生体分子機能を操作することを目指し、カーボンナノチューブ(CNT)へのレーザー局所照射を用いた温度制御をシステム開発した。リニア型の生体分子モーターを用いた計測では、レーザー照射に伴う速度変化を可逆的に誘導することに成功した(平均で約10 Kの温度上昇に相当)。CNTに沿った速度分布結果と有限要素法による熱拡散計算から三次元的な温度分布を計算し、水中におけるCNTの熱伝導率を見積もることに成功した。また、バクテリアべん毛モーターを用いた計測では、CNTへのレーザー光照射は、活性酸素の局所濃度制御にも有用であることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：Single carbon nanotubes (CNTs) were developed as a new tool for regulating local temperature and activity of single proteins. Sliding of single actin filaments along single myosin-coated CNTs was observed under fluorescence microscopy. Then one end of the CNT was irradiated by the red laser to produce local temperature jump that induce activation of the motor speed. The speed change was comparable to the temperature jump of 10 K in average. From the measured distribution of temperature along single CNT, calculation of heat transfer with the finite element method suggested the temperature profile around the CNT and high thermal conductivity of ~1540 W/(m.K) in solution. Laser irradiation CNTs could be also used to regulate local change in concentration of reactive oxygen species that induce various diseases including cancer. Therefore, the flexible control of protein function and local targeting on single CNT, will be useful in future applications of CNTs in biophysics and biomedicine.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

温度は代表的な熱的パラメータであり、生物にとっては回避不可能な環境因子である。そのため、様々な生体分子や細胞の温度応答が長年調べられてきた。細胞膜上の受容体のように温度センサとして機能するものも知られているが、一般的に化学反応速度は温度に依存するため、あらゆる分子が熱的ゆらぎの中で機能し、その機能も温度によって変化する。したがって、単純に細胞レベルの温度依存性を調べても、どの分子のどのような化学反応による応答か、どのような組み合わせか、と解釈は困難である。しかし反面、もし温度制御を細胞内の局所領域のみに限定させることができれば、それが1分子レベルで実現可能であれば、狙った分子だけの温度やゆらぎ、機能を個々に制御するという新しい実験系が期待される。近年、赤外線レーザー照射によって水を直接加熱することで、温度上昇を誘導できることはよく知られており、遺伝子発現の制御に利用できることも報告されている(Kamei et al., 2009, nature methods)。しかし、レーザーの集光限界(~2μm)のため、局所性は分子レベルのnmオーダーには遠く及ばない。そこで、水を加熱するのではなく、逆に水の吸収が小さい(<1100 nm)レーザーを用いて、光熱変換効率の高いナノ粒子を熱プローブとして利用すれば、より局所的な温度変調が期待される。金ナノ粒子を用いた場合、金粒子表面上で100以上の温度が、水中でわずか10nm離れると半減する温度勾配を定常的に形成できることが実験的にも理論的にも示された(Bendix et al., 2010, AcsNano)。したがって、熱伝導率のよい微小熱プローブの導入や、レーザー光のパルス化等によってさらに局所化を狙うことで、nmオーダーの局所的な温度勾配を形成することは夢ではない。

2. 研究の目的

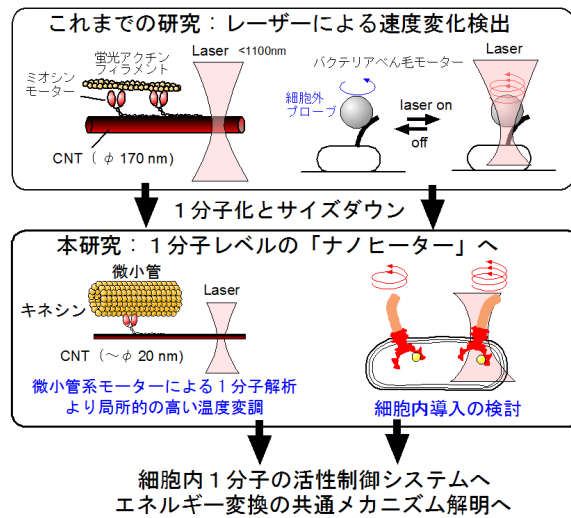
本研究では、分子レベルでの局所温度制御系を開発することを研究目的とする。具体的には、

1) 熱変調を分子レベルで実現するためには、理論的に熱プローブをスケールダウンすることが必要であるため、より微小なナノプローブを用いて、局所的な温度変調を与え、温度変化を生体分子モーター活性変化などから測定する。

2) 1分子計測に適した微小管系モーターであるキネシンを導入することによって、1分子レベルでの温度制御およびモーター機能制御の実現を目指す。

3) 「細胞内での1分子機能制御」を目指して、微小熱プローブを用いた1細胞中における局所温度変調および分子機能制御の実験を行う。サンプルとしてはバクテリアべん毛

モーターの回転運動を指標として計測を行う。細胞外へのナノプローブだけでなく、細胞内導入も検討する。



3. 研究の方法

1本のカーボンナノチューブ(CNT)を基盤とした蛍光顕微鏡を用いたアクトミオシンの運動速度計測、およびビーズをプローブとしたバクテリアべん毛モーターの回転運動計測を行う。これらの計測系に赤外線レーザーのナノプローブ(カーボンナノチューブや金ナノ粒子)への局所照射を利用して、局所的な温度変調を導入し、生体分子モーター速度変化や蛍光強度から温度分布を検証する。誘導された温度分布は、ナノプローブのサイズに依存するため、できるだけ小さいことが必要であるが、実験的には限界があると予想される。このため実験だけでなく、有限要素法を用いた熱伝導シミュレーションも行って局所性を検討する。

また、キネシンは微小管上を連続的に解離することなく運動できるため、1分子計測に適している。ミオシンだけでなくキネシンについても、カーボンナノチューブや金ナノ粒子を用いた局所温度が誘導可能か、検討する。

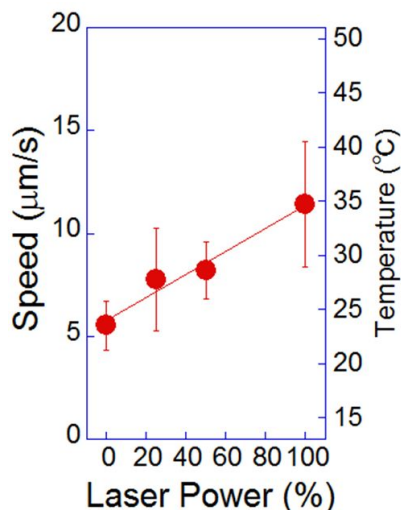
また、バクテリアべん毛モーターは細胞レベルの超分子モーターであり、モーター速度変化をモニターすることで、細胞内局所温度の検討が期待される。まずは細胞外に結合させたカーボンナノチューブを用いた計測を行うが、将来的には細胞内へのプローブ導入も重要な課題である。

4. 研究成果

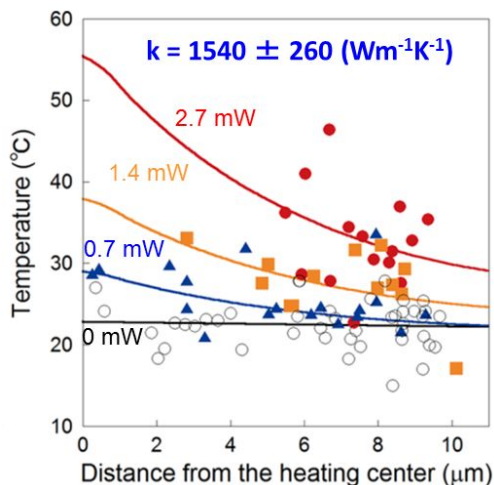
カーボンナノチューブ1本を用いた局所温度制御

赤レーザーのCNT照射システムによる局所温度変調システムを構築し、アクトミオシンによる速度変化を計測した。直径170 nmのCNTを用いた計測ではレーザー照射時に速度変化を検出し、平均で約10の温度上昇に相当することから、CNT近傍に形成される

温度分布を明らかにする手がかりを得た。



より局所的な温度制御を実現するためには、さらに微小な熱プローブの導入が必要不可欠である。そこで、直径 170 nm から 2 nm までの CNT20 種類を検討した。このうち、アクトミオシン実験に必要な長さ ~ 10 μm が得られたのは 4 種類のみであり、その中でも水溶液中で 1 本ずつ観察できるものは、3 種類であった。この 3 種類について、アクトミオシン実験を行ったところ、CNT 上での運動が観察され、レーザー照射による活性化が検出された最小の CNT は直径 59 nm の CNT であった。



有限要素法による局所温度分布計算

赤外レーザー照射時において CNT 近傍に形成される温度の時間的変化および空間的分布を定量化するために、有限要素法を用いた熱拡散計算を行った。実験では対流の影響は小さいと予想されるが、対流の影響も含めて計算できる系を開発した。具体的には COMSOL Multiphysics を用いて、アクトミオシンでの実験結果を最適化させる定常解を計算した。この結果、水溶液中におけるカーボンナノチューブ 1 本の熱伝導率の見積もることに成功した。また、直径 170 nm カーボンナノチューブの場合、長軸方向の温度分布が数 μm オーダー、断面方向が数 100 nm

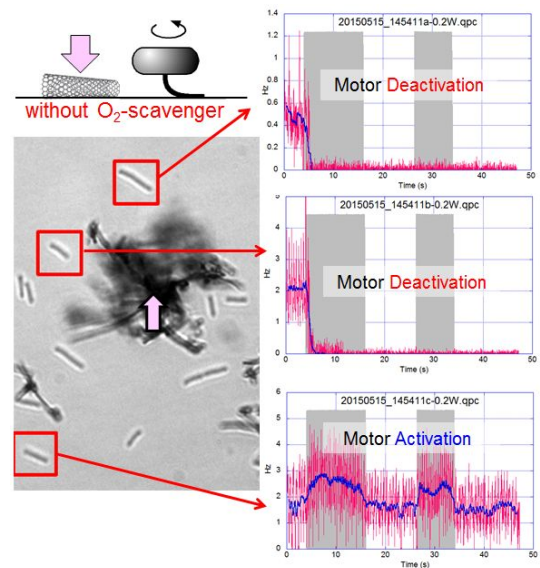
オーダーであった。

キネシンを用いた温度変調実験

ブタ脳から精製した微小管およびキネシンを用いた計測も開始した。まず溶液全体の温度を変えながら、ガラス上のキネシンが微小管を動かす速度変化を計測し、速度の温度依存性を確認した。次に CNT 上にキネシンを吸着させ、CNT 上で微小管の運動が観察可能であることを確認した。この実験系を用いて、CNT をレーザー照射すると微小管運動の速度変化が検出され、温度上昇は約 10 と見積もられた。将来的には 1 分子レベルでの計測・運動制御が期待される。

バクテリアべん毛モーター活性の抑制的制御

細胞レベルのモーターとして、大腸菌膜上の回転モーターであるバクテリアべん毛モーターを用いた計測・制御を試みた。大腸菌を用いた計測においては CNT の細胞内導入は困難であったため、まずは細胞外の CNT を用い、ガラス上の CNT 近傍の細胞回転 (Tethered cell と呼ばれる回転運動観察) を指標とした。



この実験では蛍光観察が不要なため、退色防止用の脱酸素剤を与えずに実験を行ったところ、CNT へのレーザー照射によって、(速度上昇ではなく)速度低下あるいは回転停止が見られた。また、同じ実験において、レーザー照射位置から 20 μm 以上離れた細胞では速度上昇が見られた。退色防止用の脱酸素剤を与えずに実験を行ったところ、速度上昇が観察された。このため、レーザー照射された CNT において、熱と同時に活性酸素が発生し、モーターを不活性化させたと考えられる。活性化と不活性化は、レーザー照射強度や、照射位置からの距離に大きく依存していたため、これら进行操作することによって、本研究で開発したシステムは、積極的に不活性化制御を行うことも可能であることが示唆された。活性酸素は多くの病気や老化等の生

命現象の主要原因と考えられているため、本研究で開発したシステムは、医学的応用を考える意味でも重要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Yuichi Inoue, and Akihiko Ishijima
Local heating of molecular motors using single carbon nanotubes. Biophysical Reviews, 査読有, Volume 8, 2015, 25-32. DOI: 10.1007/s12551-015-0185-3.

Yuichi Inoue, Mitsunori Nagata, Hiroshi Matsutaka, Takeru Okada, Masaaki K. Sato, and Akihiko Ishijima
Single Carbon Nanotube-Based Reversible Regulation of Biological Motor Activity. ACS Nano, 査読有, Vol 9, 2015, 3677-3684. DOI: 10.1021/nn505607c

Masaaki K. Sato, Masaya Toda, Naoki Inomata, Hisataka Maruyama, Yuko Okamatsu-Ogura, Fumihito Arai, Takahito Ono, Akihiko Ishijima, and Yuichi Inoue.
Temperature changes in brown adipocytes detected with a bimaterial microcantilever. Biophysical Journal, 査読有, Vol 106, 2014 2458-2464. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.04.044.

Yuichi Inoue, Matthew A. B. Baker, Hajime Fukuoka, Hiroto Takahashi, Richard M. Berry, and Akihiko Ishijima.
Temperature dependences of torque generation and membrane voltage in the bacterial flagellar motor. Biophysical Journal, 査読有, Vol 105, 2013, 2801-2810. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.09.061.

〔学会発表〕(計 16 件)

井上裕一, 新しい熱プローブを用いた細胞発熱計測および分子モーター活性制御, 第53回 日本生物物理学会年会, 2015年9月15日, 金沢大学(石川県・金沢市)

井上裕一, 永田光範, 石島秋彦, 局所レーザー照射による生体分子モーターの活性制御, 生体運動合同班会議 2015, 2015年1月7日, 学習院大学(東京都・豊島区)

井上裕一, カーボンナノチューブ1本を用いて生体分子モーター活性を操る, 第14回 東北大学多元物質科学研究所研究発表会, 2014年12月5日, 東北大学(宮城県・仙台市)

〔図書〕(計 2 件)

井上裕一, 石島秋彦
化学同人, 化学, 生体分子モーター機能を操る - 生体分子活性のリアルタイム可逆制御を目指して, 70, 2015, 68-69.

井上裕一, 石島秋彦
化学同人, 1 分子生物学, ナノ計測, 2014, 228-237.

〔その他〕
ホームページ
<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/ishijima/Index-J-tate.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
井上 裕一 (Inoue, Yuichi)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号: 50323499

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
石島 秋彦 (ISHIJIMA, Akihiko)
研究者番号: 80301216
東北大学・多元物質科学研究所・教授

福岡 創 (FUKUOKA, Hajime)
研究者番号: 50447190
東北大学・多元物質科学研究所・助教