

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25709018

研究課題名(和文)自律的な微小管輸送によるパッシブ型分子分離システム

研究課題名(英文)Passive molecular separation system using microtubule transport

研究代表者

横川 隆司(Yokokawa, Ryuji)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10411216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究の目的は、分子修飾により電荷量を局所的に改変した複数種の微小管を製作する技術を確認し、それらの電荷量に応じたキネシンによる輸送を自律的におこなうことで微小管の運動方向を制御して、「パッシブ型分子分離システム」の実現を目指すことである。当該研究期間内に、1)微小管シードの長さ制御と各種荷電粒子の付加技術、2)微小管シードの電気泳動移動度の測定と電界中での運動曲率の算出、3)微小管運動軌跡の評価、4)微小流体デバイスの製作と微小管分離の実証を実現した。微小管のマイナス端の電荷量に応じた分子分離を実証することで、キネシン-微小管系の分子ロボティクスとしての制御性向上を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop an autonomous molecular separation system using several different microtubules modified by molecular labeling. Short seed microtubules were modified with DNA to have different surface charge densities. Electrophoretic mobilities of seed microtubules were measured and their radius of gliding trajectories in an electric field was calculated. A microfluidic device was developed to separate two groups of microtubules. Results demonstrated the improved controllability of microtubule gliding directions driven by kinesin motors, which is applicable to molecular robotics.

研究分野：BioMEMS, MicroTAS

キーワード：分子ロボティクス ナノマシン ナノバイオ マイクロ・ナノフルイディクス 生物物理 分子モーター
— 分子操作 電気泳動

1. 研究開始当初の背景

従来型キネシンは細胞骨格である微小管上をプラス端に向かって動くモータタンパク質であり、その *in vivo* での生理学的な機能理解と、*in vitro* での一分子生物物理によるケモメカニカルな運動機構の理解により理学的な知見が十分蓄積されてきた。その後、キネシン-微小管系の駆動力をナノアクチュエータとして利用する研究が盛んに行われるようになってきた。これは、理学的知見の蓄積によりタンパク質を工学的なシステムの構成要素ととらえることができるようになったこと、およびマイクロアクチュエータの微細化の限界を突破するツールが必要とされるようになったことに起因する。さらに、MicroTAS の研究においても扱う溶液量の減少とともに、「極微量溶液の操作」＝「分子の直接操作」というニーズが高まっていることもその要因である。

キネシン-微小管系を用いた工学的な応用研究へのアプローチは、理学的な未知の現象を解明するものではなく、一方で工学的な応用が短期的に見込めないことから国内ではその重要性が認知されていない。しかし、海外に目を向けると工学ベースの研究グループが増えており、日本においても理学研究のみに固執せず工学的な分子システム創製の立場から当該分野の設計論を確立することは喫緊の課題であった。

申請者らは上記の課題に対し、キネシンにより対象物を微小管上で搬送する“ビーズアッセイ系”を用いて取り組んできた。例えば、オンチップでモータにより反応分子を輸送・結合させることに成功している (*ACS Nano*, 2013)。もう一方の分子系として、キネシンコートガラス上を動く微小管により対象物を搬送する“グライディングアッセイ系”を用いた研究も展開してきた。この分子系は、

複数のモータが微小管運動をサポートするため分子系が安定であり、ほとんどの研究グループが採用している。しかしながら、運動方向の制御という観点からは“ビーズアッセイ系”に決定的に劣る。つまり、微小管運動はマイクロ構造により制御するか、電場や磁場などの場によって制御することしかできず、場に存在する微小管が全て同じ軌跡を取ることになる。よって従来の研究ではキネシンというナノアクチュエータを用いながら、その操作はマイクロスケールで大量かつ同時並列におこなうことしかできていない。

そこで、申請者は“グライディングアッセイ系”においても微小管自体に異なる機能を持たせれば、単一場においても個別の機能を自発的に発現させることができると考えた。本研究では、その一例として微小管の持つ電荷をあらかじめ分子設計により操作しておくことで、ありながら微小管それぞれの電荷に依存した自律的な運動を発現させられるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子修飾により電荷量を局所的に改変した複数種の微小管を製作する技術を確認し、それらの電荷量に応じたキネシンによる輸送を自律的におこなうことで微小管の運動方向を制御して、「パッシブ型分子分離システム」の実現を目指すことである。微小管のマイナス端のみに各種荷電粒子を付加する技術を確認し、それにより微小管に働く電気泳動力の違いを評価する。最終的に、微小流体デバイス内の均一電界中での運動方向の違いを利用して、電荷量に応じて微小管を自律的に分離するシステムを製作する。これにより、分子運動を工学的に制御する技術とマイクロマシンングを融合した分子機械システムの設計論を提案する。

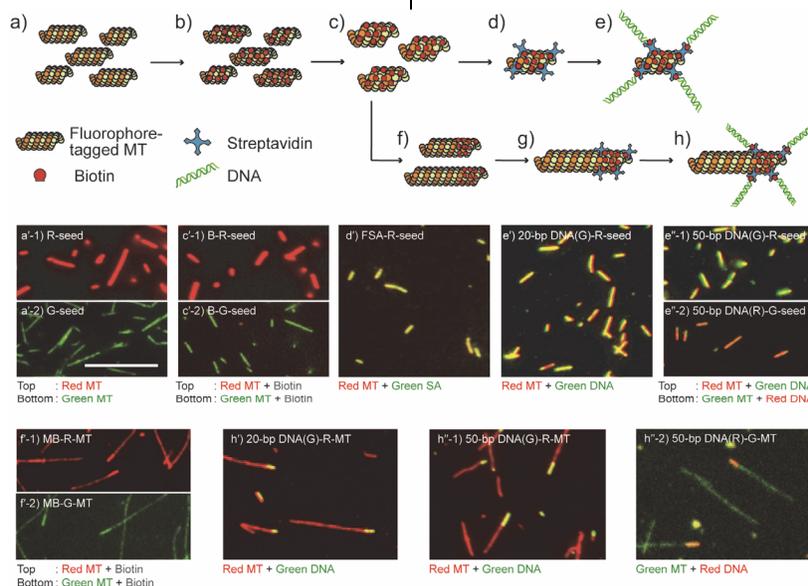


図 1 : 作製した微小管シードとその伸長方法.

3. 研究の方法

(1) 微小管シードの長さ制御と各種荷電粒子の付加技術

GMPCPP 存在下で重合した短い微小管シードを biotin-XX succinimidyl ester を用いてビオチン化した。チューブリンダイマーに対するビオチン量は, biotin quantitation assay kit を用いて定量した。また, 微小管の長さを揃えるために, 30G のシリンジを用いてせん断力により切断した。

微小管に付加する荷電粒子として, 20 bp, 50 bp の DNA を準備した。5'端をビオチン化した ssDNA および AlexaFluor488 あるいは TAMRA を導入した相補的な ssDNA から dsDNA を作製した。ここで用いた塩基配列は, 20 bp の DNA には 5'-TGT TGT CGA AAA TGT CAA CG-3', 50 bp の DNA には 5'-GAG GTC TTA ACG GTC GAG GAT GGG GGT TAG TCC GGG GCG CAG ATT CGA AT-3'である。得られた dsDNA はアビジン-ビオチン結合を用いて微小管に付加した。

(2) 微小管シードの評価

dsDNA を付加した微小管シードの電気泳動移動度をゼータ電位・粒径・分子量測定システムにより測定した。この際, AlexaFluor488, TAMRA, アビジンのみを付加した微小管も用意し, 電気泳動移動度が DNA により支配的に決まることを確認した。得られた電気泳動移動度から, 微小管のカンチレバーモデルを適用することで, 電界中での運動軌跡を導出した。

(3) 微小管運動軌跡の評価

キネシンコートガラス上での微小管運動を評価するため, ビオチン化した微小管シードをさらに伸張することで, マイナス端のみがビオチン化された微小管 (MB-R-MT) を作製した。この微小管に対し, 20 bp または 50 bp の dsDNA を付加することで, マイナス端の表面電荷密度を改変した微小管を準備した。DNA を付加していない微小管を含め, 三種類の微小管を運動させ, 電界中での運動軌跡を

評価した。ここで, 運動をトラッキングし曲率を導出するアルゴリズムを用いて解析した。

(4) 微小流体デバイスの製作と微小管分離の実証

微小管運動時の曲率の差を最大に利用するためには, 微小管運動の方向と電界印加方向が垂直でなければならない。そこで, 微小管のランダム運動を制御し, 電界に対して垂直に微小管を導入するデバイス開発をおこない, その中でのアッセイ技術を確認した。微小管のランダム運動を可能にするリザーバ部分, その運動を配向し電界に導入するための導入チャンネル, 電圧を印加する分離チャンネルからなる PDMS 製の流体デバイスを製作した。

表面電荷密度の測定結果と導出した曲率の値から, ソーティングに適した二種類の微小管を用いてデバイス内でのアッセイをおこなった。

4. 研究成果

(1) 微小管シードの長さ制御と各種荷電粒子の付加技術

チューブリンダイマーに対するビオチンのラベル率は 3.2 であった。また, せん断前後の微小管長さを測定した結果, せん断前が $3.09 \pm 1.81 \mu\text{m}$ ($n = 801$), せん断後が $2.28 \pm 0.99 \mu\text{m}$ ($n = 726$)であり, t 検定をおこなったところ, 有意水準 1%で有意差があった。さらに, ばらつきを表す指標である PDI は, せん断前 1.34, せん断後 1.19 であり, シリンジ処理により微小管の長さを均一化できたことを確認した。また, TAMRA と AlexaFluor 488 の蛍光位置が重なっていることから, DNA の修飾を確認した (図 1)。

(2) 微小管シードの評価

7 種類の微小管シードの電気泳動移動度を図 2 に示す。それぞれの平均値は, TAMRA-tagged seeds (R-seeds), AlexaFluor 488-tagged seeds (G-seeds), Biotinylated seeds

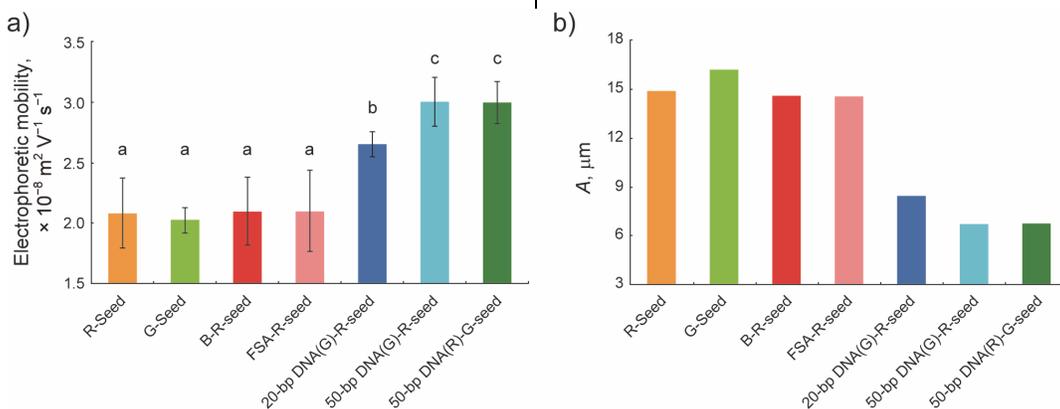


図 2 : 微小管シードの電気泳動移動度と曲率。

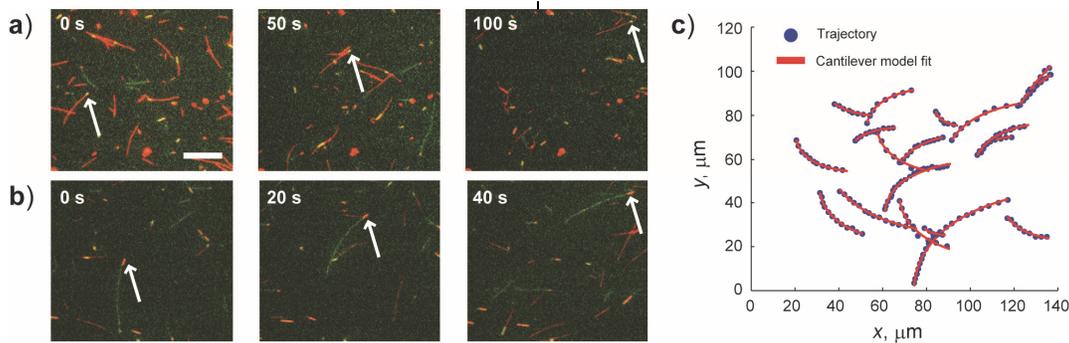


図3 : (a) 20-bp DNA(G)-R-MT (b) 50-bp DNA(R)-G-MT の運動の様子. 右側がカソード側. (c) 20-bp DNA(G)-R-MTs の軌跡とカンチレバーモデルを用いてフィッティングした結果.

(B-seeds), AlexaFluor 488-tagged SA (FSA)-labeled R-seeds (FSA-R-seeds), 20-bp DNA(G)-R-seed, 50-bp DNA(G)-R-seed, 50-bp DNA(R)-G-seed について, 2.09, 2.03, 2.11, 2.11, 2.66, 3.02, $3.01 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった.

Tukey-Kramer 法による有意差判定をおこなった結果, コントロール群の電気泳動移動間には有意差なかったが, コントロール群の電気泳動移動と DNA 修飾微小管の電気泳動移動との間には有意水準 1% で有意差があった. また, DNA 修飾微小管のそれぞれ電気泳動移動間にも有意水準 1% で有意差があった. このことから, 電荷量の異なる分子を微小管に修飾することで, 電荷応じて表面電荷密度が変化し, それに伴って電気泳動移動度を改変することができた.

以上の電気泳動移動度と電気浸透流移動度 μ_{EOF} , キネシン分子間距離 $\langle d \rangle$ 等を測定し, 電界 7 kV m^{-1} を印加した際の微小管の運動曲率は R-seeds, G-seeds, B-R-seed, FSA-R-seeds, 20-bp DNA(G)-R-seed, 50-bp DNA(G)-R-seed, 50-bp DNA(R)-G-seed について, $14.9 \mu\text{m}$, $16.2 \mu\text{m}$, $14.6 \mu\text{m}$, $14.5 \mu\text{m}$, $8.48 \mu\text{m}$, $6.71 \mu\text{m}$, $6.74 \mu\text{m}$ となった. このことから, 微小管の表面電荷密度を改変することによって電界中での曲率が大きく変わることを示唆する結果が得られた.

(3) 微小管運動軌跡の評価

ビオチン化したシード微小管を伸張り, ビオチン化したマイナス端にのみ DNA がラベルされたことを確認した. ここでは, 伸張部が TAMRA ラベルの場合は, DNA を AlexaFluor488 でラベルして, あるいは逆のラベルを用いて区別した. 作製した微小管のうち MB-R-MT と 20-bp DNA(G)-R-MT を用いて曲率を計測したところ, それぞれ $24.6 \pm 10.8 \mu\text{m}$ と $16.4 \pm 6.7 \mu\text{m}$ であった. 一方, MB-R-MT と 50-bp DNA(G)-R-MT を用いた場合は, それぞれ $21.0 \pm 7.5 \mu\text{m}$ と $10.3 \pm 4.1 \mu\text{m}$ であった (図3). いずれの実験においても, 曲率の差が有意であることを確認した. しかし, 実

験のロット差が生じるため, MB-R-MT の曲率を用いて規格化することで dsDNA の長さの違いによって曲率が違うことも確認した.

(4) 微小流体デバイスの製作と微小管分離の実証

上記 (3) の結果から, 最も曲率差が大きくなる MB-R-MT と 50-bp DNA(G)-R-MT を分離するためのデバイス設計をおこなった. 電界に対して垂直に微小管が侵入する位置から約 $70 \mu\text{m}$ の位置に分離壁を設けたデバイスを用いて分離実験をおこなった. その結果, 約 80% の微小管をそれぞれ分離壁の上下に分離することに成功した.

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 9 件)

- ① K. Fujimoto, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa*, "Pneumatically-driven Microfluidic Device for Evaluating Active Transport by Kinesin Motor Protein," *IEEJ-SMAS*, 136, 9, 384-389 2016.
- ② S. Subramaniyan Parimalam, M. C. Tarhan, S. L. Karsten, H. Fujita, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa*, "Microtubule density and landing rates as parameters to analyze tau protein in the MT-kinesin "gliding" assay," *Sens. Actuators, B*, 238, 954-961, 2017.
- ③ S. Subramaniyan Parimalam, M. C. Tarhan, S. L. Karsten, H. Fujita, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa*, "On-chip microtubule gliding assay for parallel measurement of tau protein species," *Lab Chip*, 16, 1691-1697, 2016.
- ④ T. Nakahara, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa*, "Velocity Control of Microtubules with High Spatial Resolution on an Au-coated Surface with an SU-8 Thermal Isolation Layer," *IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines*, 136, 77-82, 2016.
- ⑤ K. Fujimoto, M. Nagai, H. Shintaku, H.

Kotera, R. Yokokawa*, "Dynamic formation of a microchannel array enables kinesin-driven microtubule transport between separate compartments on a chip," *Lab Chip*, 15, 2055-5063, 2015.

⑥ N. Isozaki, S. Ando, T. Nakahara, H. Shintaku, H. Kotera, E. Meyhofer, R. Yokokawa*, "Control of microtubule trajectory within an electric field by altering surface charge density," *Sci. Rep.*, 5, 7669, 2015.

⑦ T. Nakahara, J. Ikuta, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa*, "In situ velocity control of gliding microtubules with temperature monitoring by fluorescence excitation on a patterned gold thin film," *Mater. Res. Express*, 1, 045405, 2014.

⑧ J. Ikuta, N. K. Kamisetty, H. Shintaku, H. Kotera, T. Kon, R. Yokokawa*, "Tug-of-war of microtubule filaments at the boundary of a kinesin- and dynein-patterned surface," *Sci. Rep.*, 4, 5281, 2014.

⑨ T. Nakahara, N. Isozaki, S. Ando, N. K. Kamisetty, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa*, "Fabrication of a perfusable glass microfluidic channel for microtubule manipulation using an electric field," *IEEE Transactions on Sensors and Micromachines*, 134, 64-69, 2014.

[学会発表] (計 21 件)

[1] N. Isozaki, H. Shintaku, K. Hidetoshi, T. L. Hawkins, J. L. Ross, and R. Yokokawa, "Microtubule Sorting by Persistence Length and Surface Charge Density of Microtubules," *Biophysical Society 61st Annual Meeting*, pp. 565a, New Orleans, Louisiana, USA, February 11-15, 2017, 2017.

[2] N. Isozaki, H. Shintaku, H. Kotera, T. L. Hawkins, J. L. Ross, R. Yokokawa, "Designing Mechanical and Electrical Properties of Microtubules to Modulate Gliding Trajectories," *The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016)*, 120-121, Dublin, Ireland, 2016/10/9-13, 2016.

[3] S. S. Parimalam, R. Yokokawa, H. Kotera, H. Shintaku, "Massively Parallel Quantification of Mirna in Single Cells Via Duplex-Specific Nuclease Reaction in Pico-Liter Wells," *2016 International Conference of Microfluidics Nanofluidics and Lab-on-a-chip*, 643, Dalian, China, 2016/06/10, 2016.

[4] N. Isozaki, S. Erickson, H. Shintaku, H. Kotera, T. L. Hawkins, J. L. Ross, R. Yokokawa, "Controlling Gliding Trajectories of Microtubules by Altering Microtubule Flexural Rigidity," *Biophysical Society 60th Annual Meeting*, 504a, Los Angeles, USA, 2016/02/27-03/02, 2016.

[5] S. Subramaniyan Parimalam, M. C. Tarhan, S.

L. Karsten, H. Fujita, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "On-chip detection of tau mutants and 3R:4R tau ratio based on tau's binding affinity to taxol stabilized microtubules," *The 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SfN)*, 366.13/UU54, Chicago, USA, 482.06, 2015/10/17-21, 2015.

[6] K. Fujimoto, M. Nagai, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Dynamic formation of a microchannel array enables kinesin-driven microtubule transport between separate compartments on a chip," *The 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2015)*, Anchorage, USA, June. 21-25, 2015.

[7] N. Isozaki, H. Shintaku, H. Kotera, E. Meyhofer, R. Yokokawa, "Directional Control of Microtubules by Designing Their Biophysical Properties," *2015 MRS Spring Meeting & Exhibit*, 186, San Francisco, USA, 2015/04/06-10, 2015.

[8] S. Subramaniyan Parimalam, M. C. Tarhan, S. L. Karsten, H. Fujita, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Identification of Tau Isoforms and Mutants through Kinesin - Microtubule Molecular System," *The 3rd International Conference on Nanoscience and Nanotechnology*, Chennai, India, 2015/02/04-06, 2015.

[9] S. Subramaniyan Parimalam, M. C. Tarhan, S. L. Karsten, H. Fujita, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "On-Chip Detection of Wild 3R, 4R and Mutant 4R Tau through Kinesin-Microtubule Binding," *The 28th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2015)*, 455-458, Estoril, Portugal, 2015/01/18-22, 2015.

[10] T. Nakahara, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "A Method for Controlling Microtubule Velocity Using Light Irradiance on a Patterned Gold Surface," *The 28th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2015)*, 694-697, Estoril, Portugal, 2015/01/18-22, 2015.

[11] N. Isozaki, H. Shintaku, H. Kotera, E. Meyhofer, R. Yokokawa, "Microtubule Sorting within a Given Electric Field by Designing Flexural Rigidity," *The 28th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2015)*, 238-241, Estoril, Portugal, 2015/01/18-22, 2015.

[12] S. Subramaniyan Parimalam, M. C. Tarhan, S. L. Karsten, H. Fujita, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Kinesin-Microtubule Molecular System in Microchip Format for Detection of Tau Isoforms and Mutants," *The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SfN)*, 366.13/UU54, Washington DC, USA, 2014/11/15-19, 2014.

[13] T. Nakahara, J. Ikuta, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Optical Velocity Control of Microtubules Driven by Kinesin Motors," *The*

14th International Conference on Nanotechnology (IEEE NANO 2014), Toronto, Canada, 2014/08/18-21, 2014.

[14] K. Fujimoto, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Microfluidic Valve Technology Produces Microchannel Array to Evaluate Kinesin-Driven Molecular Transport," *The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2014)*, San Antonio, TX, USA, 2014/10/26-30, 2014.

[15] S. Subramaniyan Parimalam, M. C. Tarhan, S. L. Karsten, H. Fujita, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Detection of Mutations in the Binding Domain of Tau Protein by Kinesin-Microtubule Gliding Assay," *The 27th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2014)*, 314-317, San Francisco, USA, 2014/01/25-30, 2014.

[16] K. Fujimoto, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Transition of Q-Dot Distribution on Microtubule Array Enclosed by Pdms Sealing for Axonal Transport Model," *The 27th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2014)*, 1107, San Francisco, USA, 2014/01/25-30, 2014.

[17] T. Nakahara, N. Isozaki, S. Ando, N. K. Kamisetty, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Microtubule Manipulation by an Electric Field in a Fused Silica Channel," *The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013)*, 161-163, Freiburg, Germany, 2013/10/28-31, 2013.

[18] N. K. Kamisetty, J. Ikuta, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Manipulation of Microtubules Motility Using Electrical Filed on Kiensin/Dynein Coated Surfaces," *The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013)*, 811-813, Freiburg, Germany, Oct. 27-31, 2013.

[19] N. Isozaki, T. Nakahara, S. Ando, N. K. Kamisetty, H. Shintaku, H. Kotera, E. Meyhöfer, R. Yokokawa, "The Influence of Molecular Charges on Microtubule Curvatures in an Electrical Field," *The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducer2013)*, 2126-2129, Barcelona, Spain, 2013/06/16-20, 2013.

[20] J. Ikuta, N. K. Kamisetty, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Microtubule Gliding at the Boundary of Kinesin and Dynein Patterned Surface," *The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013)*, 1454-1456, Freiburg, Germany, 2013/10/28-31, 2013.

[21] T. Ikeuchi, S. Subramaniyan Parimalam, M. C. Tarhan, S. L. Karsten, H. Fujita, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Detection of Tau

Pproteins through Microtubule Gliding," *International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB2013)*, 184-185, Marina del Rey, USA, Apr. 10-12, 2013.

[その他]

<http://www.ksys.me.kyoto-u.ac.jp/ry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 隆司 (YOKOKAWA, Ryuji)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10411216

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし