

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： カーボンナノチューブを用いた単一生体分子ダイナミクスの計測

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

中山 喜萬 (大阪大学大学院工学研究科 教授)

主たる共同研究者

秋田 成司 (大阪府立大学大学院工学研究科 教授)

吉村 成弘 (京都大学大学院生命科学研究科 准教授) (～平成 23 年 3 月)

竹安 邦夫 (京都大学大学院生命科学研究科 教授) (平成 23 年 4 月～)

荒川 秀雄 ((独)物質・材料研究機構ナノ有機センター グループリーダー) (～平成 21 年 3 月)

石島 秋彦 (東北大学多元物質科学研究所 教授)

3. 研究実施概要

生体内反応の多くは、それに関与する生体分子の構造変化や相互作用、エネルギー移動を伴って、連続した時間軸の中で進行する。本研究は、タンパク質一分子の連続した反応過程の解明に資するために、数ミリ秒の時間分解能でzeptogram精度の質量とpiconewton精度の2次元力、attojoule精度の熱量を計測する技術を構築することを目的とした。具体的には、これまでにない優れた電氣的機械的性質をもち、タンパク質より充分小さな直径をもつカーボンナノチューブ(CNT)を用いてアームを製作し、その変位、振動数、熱流の計測を行うための技術を確立することである。研究は、質量・力計測グループと熱量計測グループの2つに分かれて進めてきた。その結果次の成果を得た。

質量・力計測では、1) 高真空の透過電子顕微鏡内で CNT アームを基材に取り付けるため、新規に発見した電子線照射による C₆₀ 分子の泳動現象と構造変化を用いた技術を開発した。

2) 剛直性を確保するために太めの CNT をアームとし、その先端径をタンパク質のサイズより小さくするために、先端を先鋭化する技術と先端に細い CNT を合成する技術を開発した。

3) タンパク質間の相互作用力計測のために、プラットフォームとして多数の細い CNT を突出した状態で配置した CNT シートを開発した。

4) CNT 先端を開端して化学的に活性化する技術、タンパク質の特定部位を遺伝子操作によりラベル化し、その部位を CNT 先端に結合する技術を開発した。

5) CNT 先端にカジルモジュリンタンパク質を基質結合部位を避けて捕捉し、基質との結合能力を調べ、CNT に捕捉されたタンパク質が活性を失わないことを確認した。

6) CNT アーム先端にインポータイン α を、CNT シートの CNT 先端にインポータイン β を、それぞれの結合部位を顕わにあるいは隠すように結合し、インポータイン α と β 間の相互作用力を調べ、タンパク質間の特異的な相互作用力を選択して計測できることを示した。

7) CNT の振動と変位の計測法として、当初計画していた電子的手法(CNT 電界効果トランジスタを用いる方法)については、デバイスを開発し大気中動作を確認した。

8) さらに、有効な方法として、このプロジェクトで新たに光学的手法(散乱光の検出法)を考案しデバイス開発を行った。これにより計測を行い、当初目標に近い精度(300 ミリ秒で 50 zeptogramの質量計測(大気中)、4 piconewtonの力計測(液中))が達成できることを確認した。

熱量計測では、9) バイメタル型振動センサーデバイスを微小化することにより、水溶液中(バイオ応用に必須)でフェムトジュールオーダーの熱量分解能を実現した。

10) 水溶液中の試料から熱量を真空内に輸送し、水溶液の影響を受けず検出する真空封入型熱センサーを考案・製作し、ピコジュールオーダーの熱分解能の見込みを得た。

11) 水溶液中で熱検出用 CNT アームを試料に近づけるなどハンドリングを容易にするために可視化技術

を構築した。1 つは蛍光を背景としたクエンチング現象を用いる方法であり、他の 1 つは界面活性剤のツイン 20 を用いた蛍光修飾法である。

12) マニピュレータを搭載した走査電子顕微鏡を用いてバイメタル型センサー先端に CNT アームを固定する方法を確立した。CNT で熱をとらえバイメタル型センサーで検出するデバイス組み立てを効率的に行うことが可能になった。

13) 水溶液中の CNT の拡散運動を可視化技術を用いて調べ、理論と一致しない現象を見いだした。また、水溶液中で CNT の熱伝導を調べる方法を新たに提案した。

14) ピコジュールレベルの測定精度をもつ振動型熱量センサーを製作し、褐色脂肪細胞 1 個からの発熱を直接計測することに成功し、発熱現象に関する新しい知見を得た。

15) ミオシン分子でコーティングした CNT 上のアクチンフィラメントの運動が、CNT を介した熱供給により活性化することを見いだした。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

CNT を使ってタンパク質の反応過程の解明のためのさまざまな 1 分子物理計測のデバイスを開発した。CNT の変位及び共振の計測法として光学的手法を導入して粘性流体中での振動・変位の計測を可能とした。また CNT の側壁でなく、先端にタンパク質を結合させることにより、タンパク質の活性を損なうことなく、支持体に結合させる技術を開発した。さらに真空封入型カンチレバーを開発し、水溶液中の試料の熱量を計測する技術を開発し、生体 1 分子熱量計測実現の道を拓いた。これらは世界的にトップレベルの研究成果である。タンパク質 1 分子の質量変化や、タンパク質間の相互作用における力を溶液中で経時的に高精度測定することを可能にして、当初の目標を達成し大きな成果を得ている。大気中では可能でも溶液中では困難なことを明らかにし、デバイス作製での努力は大いに認められる。生体分子への応用が始まったところである。

一方、単一分子から発生する熱の測定を目指した技術開発に面白いものが見られている。単一細胞レベルでの熱測定は意義深い。新しい発見につながる可能性も得られており、今後再現性を確認しながら研究を進めてほしい。1 分子での計測にまでは至っていない。

論文発表について、積極的に多数の外部発表が行なわれた。特許出願については、技術指向性の研究であり、計測法やセンサ・デバイスの開発において種々改良やアイデアを創出できており、研究開発の成果が出ていることからみればもっと知的財産権は出ても良いかと思われた。

研究の進め方については、もともと独立に提案された 2 つの研究課題を 1 つにまとめた構成チームであったが、CNT を用いた単一生体分子計測として、質量・力計測と熱量計測の体制で互いに情報交換を行なって、グループがそれぞれ成果を出すべく努力し、研究代表者及びグループリーダーのリーダーシップのもとに研究が推進された。最初の技術的アイデアが必ずしも常にうまくいったわけではないが、一歩ずつ問題を解決していったことで望ましい展開となった。研究の途中で、課題の修正及び体制の変更を行い効率的に研究遂行を図った。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

非常に高い数値目標を掲げた挑戦的課題であり、目標に到達できていない項目もあったが、技術的には大きく進展しており、科学的・技術的インパクトは現状でも高い。

質量・力計測については、個々の反応過程を質量変化と言う側面から明らかにできる可能性を示しており、本方法は生体反応のみならず、様々なスケールの反応過程を調べるのに大きく貢献するであろう。Importin α 8 に関する成果も出始めており、今後単一分子に対する計測等で応用できるものと期待できる。手法の改良により誰でもが使えるレベルに達すれば、生物を対象に大いに展開が期待される。また、熱計測については水溶液中での CNT の熱伝導を調べる方法の提案や単一褐色脂肪細胞からの発熱測定等と興味ある成果を得ている。一分子測定による生体反応の解析は、一分子分光による研究が圧倒的な中で、ユニークな成果を生み出すものと期待できるものであり、実現化へ向かって着実に進歩している。

CNTの研究は多いと思われるが、この研究開発はユニークなアプローチで攻めているのでレベル、重要度は高いと判断される。CNTの加工技術など生命現象の計測技術としての技術ばかりでなく、CNTの研究技術への貢献も見られる。

戦略目標について、単一生体分子の質量・力計測と熱量計測及び単一細胞レベルの熱計測と酸素消費量計測で優れた成果を得ているが、生体計測と物性計測の新しい展開を拓くことができるかどうか、これからの課題として残されている。実際生体分子へこの手法が適応され、本領域の戦略目標を意識しながら生体分子ダイナミクスへの計測に活用され、生物研究者からも評価が得られるよう望まれる。

4-3. 総合的評価

生体分子反応を1分子レベルで計測するため、CNTの特性を利用しそれを使った水溶液中での1分子質量計測、1分子間相互作用の力計測のデバイスの作製に成功した。1分子熱計測では1分子レベルまで到達できなかったが技術的には進展が見られ、1細胞からの熱計測が可能となり評価される。個々の技術開発においては目覚ましい成果が得られており、様々な分野で利用可能と思われる。しかし生物試料を使っての検証の時間がなかった。開発したデバイスが実際の生物分子を使って1分子ダイナミクスに対しどれだけ計測ができるのか見てみたかった。将来実際に生体分子で計測され、生命現象の解明のために使われ、多くの生物研究者から利用される装置となることが望まれる。