

研究課題別評価書

1. 研究課題名
生体分子モーターを動力源としたマイクロマシン

2. 氏名
平塚祐一

3. 研究のねらい

生命は長い進化の過程で非常に多様な機能を作り上げてきた。その一つに、筋収縮、心筋拍動、バクテリアの遊泳など生命活動に必須な「動き」に関わる機能がある。これらは、モーター蛋白質と呼ばれる大きさ数ナノメートルの蛋白質が集積してマイクロメーター(バクテリア)からメーター(筋肉)サイズの運動装置を作り上げている。モーター蛋白質は水中に溶けた化学エネルギーを高効率で力学的な仕事に変換する分子機械で、従来的人工モーターにはない優れた特徴を持つ。本研究では、この生体由来のモーターと半導体微細加工技術で作成した微小構造を融合させたマイクロマシン(微小機械)の作成に挑戦してきた。ナノメートルの蛋白質分子が駆動する微小機械は、従来の電氣的に作動するモーターと比べより小型に、さらにエネルギーの面など質的にも異なり、物質工学、機械工学の分野に大きな変革をもたらすと期待している。

4. 研究成果

キネシンは神経軸索から発見された大きさ数ナノメートルのモータータンパク質の一種で、微小管と呼ばれる直径 25 nm のチューブ状タンパク質をレールとし神経伝達物質を細胞内で運搬する(図1)。このキネシンおよび微小管を生体外に単離し、エネルギー源で

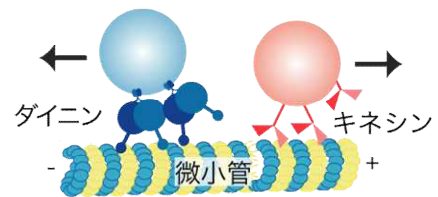


図1. 微小管上を動くモーター蛋白質模式図

あるATP(アデノシン3リン酸)を添加するとキネシン・微小管を生体外に再構築することができる。本研究では、この分子の動きをリソグラフィ技術で作製した微小構造と連結し、モータータンパク質で駆動するマイクロマシン、特に微小回転モーターの作製を試みた。

[戦略]:キネシン・微小管で駆動する回転モーターは次の3つの主要部品を組み合わせることで構築した(図2)。

1) 微小管運動方向を制御するマイクロトラック: キネシンをガラス等の基板に結合させ、その上に微小管とATPを添加すると、微小管をガラス表面上で動かすことができる。しかし、その運動はランダムな方向になり有効な仕事を取り出すことが困難であった。そこで微細加工技術を利用しマイクロトラックを作製しマイクロパターンにより微小管運動方向を一方向回転運動とする。

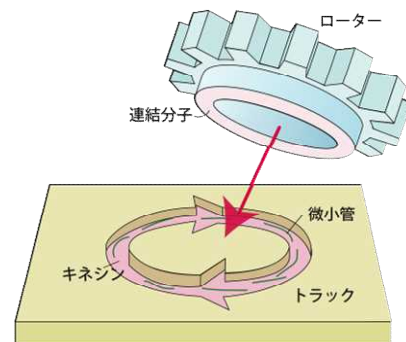


図2. キネシン・微小管で駆動する回転モーター概念図

2) 微小管とローターを連結するリンカー分子: 微小管を人工的に作製した材質と安定に結合し微小管の動きを伝達させるためのリンカー分子を構築する。

3) マイクロローター: 回転モーターの回転部(ローター)をMEMS技術の応用により作製する。一方向回転している微小管にこのローターを連結することで微小回転モーターを作製した。

次に各項目の詳細について説明する。

1) マイクロトラックの材質と形状の最適化

a. 我々は以前マイクロパターンを利用することで微小管の運動方向を制御可能なことを示した。ガラス基板上にフォトレジスト(SAL601, Shipley社)で凹凸構造を作製し、レジストの付いていないガラス面のみキネシン分子を結合させることで微小管の運動をマイクロパターン内に限定することに成功させた。しかしこの方法はキネシンのレジストまたはガラスに対する選択的な結合に再現性が低く問題があった。そこで、本研究ではレジスト材料および選択性を向上させるために添加する界面活性化剤を網羅的に試験し、キネシン微小管運動の運動方向制御に最適な条件を探し出した。その結果、AZ5214E(クラリアント社)及びBrij-35の組み合わせで選択性良くキネシン分子をマイクロパターンに結合させ、微小管の運動を制御できることを見いだした。この方法はキネシンのみならず、BSA, GFPなど一般のタンパク質にも利用でき、タンパク質の簡便なパターンニング方法として利用できる可能性がある(図3A)。

b. 曲率半径が $10\mu\text{m}$ 以下の小さい円形トラック上では、微小管の運動はトラックの外側の円縁に沿って動く現象が観察された。これは、微小管の運動の直進性が高いためと予想される。今回利用したフォトレジストは性質上オーバーハング構造を作りやすいことが知られており、微小管はガラス面とレジストと隙間を運動している可能性があった。そのため、このままでは上からローターをのせてもローターと微小管は接触できず、微小管の運動をローターに連結できないという問題があった。そこで微小管の運動を円の縁から離れるようなパターン形状を探索した。その結果、一例として図3のような、円形トラックに凹部を付けたパターンが微小管の運動をトラック中心に移動させるのに有効であることが分かった。

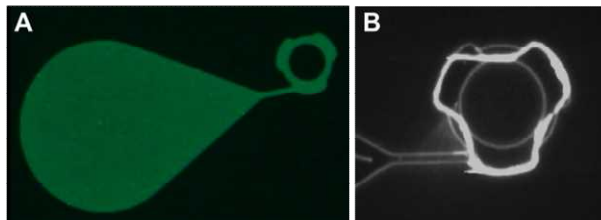


図 3. 微小管マイクロトラックの最適化 パターン形状により微小管運動 方向を制御した。A) マイクロトラック 部のみキネシン GFP を結合(緑)、 B) トラック外円に沿った微小管の運動を凹部パターン付加によりトラックの中心に向かわせた(白線)

2) 微小管と人工物質のリンカー分子の開発:

微小管と人工材料を安定に繋ぐリンカー分子を開

発した。リンカー分子として変異キネシン(T93N)を利用した。T93NはキネシンのATPの β リン酸と結合するスレオニンをアスパラギンに置換した変異体で、ATPの結合を阻害するため、ATP加水分解反応が進まず微小管と常に強く結合することが知られている。この変異キネシンを遺伝子工学的に人工材料および微小管に結合できるように設計し(図4A)、フォトリソグラフィ法で作製した微小構造に結合させた。この微小構造をキネシンにより運動中の微小管に付加させることで微小構造の輸送に成功した(図4B)。この運動は少なくとも数十分間安定で、移動距離としてはサブミリメートルにおよび本手法が微小管と人工物質を連結する方法として有効であることを示した。

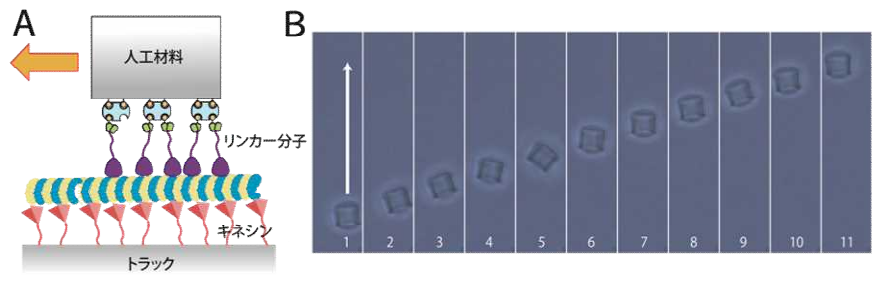


図 4. 微小管と人工物質を繋ぐリンカー分子模式図 (A), キネシン・微小管による微小物体の輸送 (B)

3) マイクロローターの作製:

マイクロローターは2種の形状を試作した。形状Aは図5のような直径30ミクロン、微小管が運動するトラックの溝にちょうどはまる突起構造をもったマイクロローターを有機ポリマーであるパリレンを用いて作製した。突起部の頂点のみにリンカー分子が結合するように、ローターの作製プロセスを設計した(図5)。

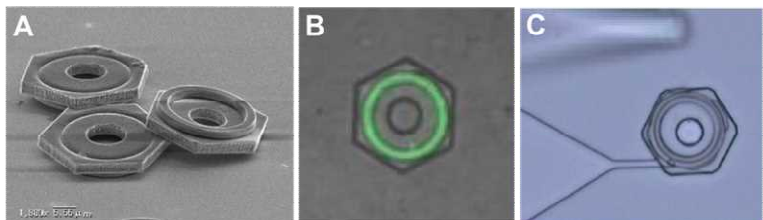


図 5. マイクロローター パリレン 製マイクロローター (形状A)、ローターにはトラックの溝にはまる突起が付けてある (A)、突起の先端部のみにリンカー蛋白質を結合 (B)、ローターとトラックにドッキング (C)

形状Bは、より単純な形状で、図6のような円柱ディスク型で、フォトレジストSU8を材料として作製した。リンカー分子はディスクの両面にコートした。このローター用のトラックとしては図6のようなループ上のパターンを利用した。

形状Aはローターとトラックの摩擦を最小限にするためにローターと基板の接触面積を少なくしたタイプである。一方向回転運動している微小管のトラック上へマイクロニュービレータを使ってこれらのローターを持っていき、ローターをトラック内にドッキングさせた。当初、形状Aの方が摩擦抵抗が少なく容易に回転すると思われたが、何度同じ実験を繰り返してもローターを回転させることができなかった。一方、ディスク型のローターでは、ローターをトラック上に乗せるとローターの動きが観察され、多くの場合一方向の回転運動を始めた。これまで約10分間安定に回転運動させることに成功させている。

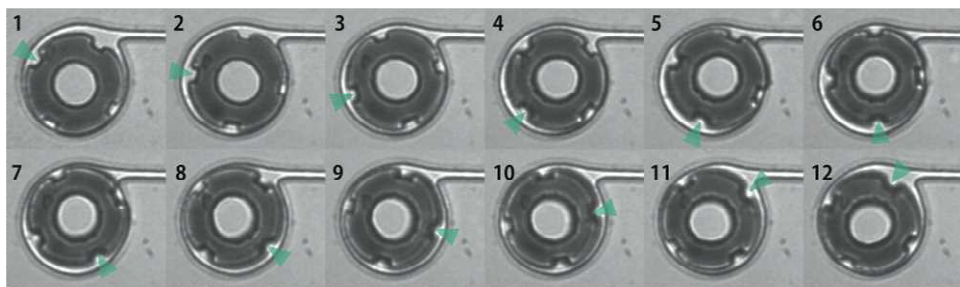


図6. 世界初のモータータンパク質で回転する微小回転モーター(形状B)

回転を分析したところ、回転方向はすべてトラックの形状から決定される計画通りの回転方向となり、逆向きは全く観察されなかった。また回転速度は0.3回転/分で、キネシン・微小管の運動速度から予想される回転速度とほぼ一致した。このことからローターの回転による負荷があまりないことが予想される。理論計算から見積もられる摩擦抵抗 T は、

$$T = \frac{\pi \cdot \mu \cdot \omega \cdot R^4}{2h}$$

μ : 水の粘性抵抗、 ω : 回転速度、 R : ディスク半径、 h : 表面からの距離

ディスクが液体中で基板から50 nm離れた位置で回転すると仮定すると、負荷は $T=1.3 \times 10^{-18} \text{N} \cdot \text{m}$ と予想される。一方、キネシン分子が発生する力は6pNであることが報告されており、1分子が発生するトルクは $6 \times 10^{-17} \text{N} \cdot \text{m}$ でキネシン分子ですら十分粘性抵抗に打ち勝つことができることがわかる。実際には数千分子がローターの回転に働いていると予想される。当初、摩擦抵抗を少なくするために凸構造のついた複雑な形状のローターを作製していたが、ローターと表面の接触面積が少なくなると同時にローターと微小管の接触数の減るためうまくローターが回転しなかったと予想される。ローターに作用する微小管の数が多い単純なディスク型(形状B)の方が安定な回転には適していることが分かった。

まとめ

本研究ではモータータンパク質により駆動する微小回転モーターの作製に世界にさきがけて成功した。この微小モーターは溶液中に溶けたATPの化学エネルギーを力学的仕事に直接変換する生体分子で駆動する世界初のモーターで、従来の静電、電磁モーターとは質的に異なりマイクロマシン分野の新展開となる。

5. 自己評価

本研究では、モータータンパク質で駆動するマイクロマシンの作製に挑戦してきた。当初の計画では、マイクロマシンとして基本部品となる回転モーターを研究の早い段階で完成させ、それを利用したマイクロポンプやマイクロロボットなどの応用技術に展開する予定であったが、回転モーターの作製にほとんどの時間をとられてしまった。本研究を通し、マイクロロボット作製のため基本技術である微小回転モーターに関し多くの知見を得ることができた。微小回転モーターを利用した、タンパク質を動力源としたマイクロトラクター等を開発したい。

6. 研究総括の見解

モーター蛋白質であるキネシン・微小管と半導体微細加工技術で作製した微小構造を連結させた、生体分子モーターを動力源としたマイクロマシンを構成することに挑戦した。レジスト材料と界面活性剤により、キネシン分子をマイクロパターンに結合させ微小管の運動を制御できること、凹部を設けた円形トラックが、微小管運動をトラック中心に移動させるのに有効であることを見出した。さらに微小管と人工材料を安定に繋ぐリンカー分子として、変異キネシンを利用することで微小管の動きを伝達させることに成功し、微小構造の輸送を実現させた。最終的に10分間程度安定に回転する微小回転モーターを世界で初めて実現させたことで、当初目標をクリアし、生体分子モーターを動力源としたマイクロマシン実用化への第一歩を踏んだ意義は非常に大きく評価できる。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

① 主な論文等(原著論文)

1. Y. Hiratuska and S. Takeuchi, "Towards a Microrotary Motor Driven by Motor Proteins." *MEMS2007*, 695-698 (2007)

② 著書

[総説・解説]

1. 平塚祐一「Topics/Review バクテリアが駆動する微小回転モーター」Bionics, 26, pp. 62-64, (2007)
2. 平塚祐一「マイコプラズマが駆動するマイクロマシン」日本マイコプラズマ学会雑誌, 34, pp 32-34 (2007)
3. 平塚祐一、「バイオハイブリッド型のマイクロマシンの開発」日本薬学会学会誌、128, 1623-1630 (2008)
4. 平塚祐一、超分子サイエンス(NTS 出版)、第4章バイオ超分子: 第1節生態系に見る超分子構造とナノバイオ応用:「モータータンパク質で駆動するマイクロマシン」 pp. 860-868 (2009)

③学会発表

[国際発表]

(招待講演)

1. Y. Hiratsuka "A Microrotary motor powered by bacteria" *4th Annual Conference on FOUNDATIONS OF NANOSCIENCE: SELF-ASSEMBLED ARCHITECTURES DEVICES (FNAN007)*, (April 20, 2007 Utah USA)

(一般講演)

1. Y. Hiratsuka "Micro-rotary motor driven by bacteria", NT2008 pp.31-32 (Oct 26, 2008 Ishikawa) Symposium Oral
2. Y. Hiratsuka, M. Miyata, T. Tada, T.Q.P. Uyeda, "Micro-machine powered by Motor Proteins." Japan Nano 2007 (Feb, 17, 2007, Tokyo Big Sight) Poster
3. M. Shimoike and Y. Hiratsuka "Toward a Bio-Display - Optical device to mimic a fish melanophore cell system", NT2008 (Oct 26, 2008 Ishikawa) Poster

[国内招待講演]

1. NPO IMAGINE セミナー 世界と共に発展するための中核技術 II -美と技の創造物「バイオモーターを利用した夢のデバイス」、平塚祐一 (2008年4月18日, 大阪)
2. 第128回日本薬学会年会、一般シンポジウム S16:若手研究者が生み出す新しい分析科学-生体分子の補足と利用-「バイオハイブリッド型のマイクロマシンの開発」平塚祐一 (2008年3月27日、パシフィコ横浜)
3. 第34回日本マイコプラズマ学会年会、シンポジウム1:やわらかい・思考ではじめる・マイコプラズマ、「マイコプラズマが駆動するマイクロマシン」、平塚祐一 (2007年5月18日 和歌山)
4. 産業技術総合研究所 関西センター研究講演会~医工連携の潮流と人材養成~「生体モーターを原動力としたマイクロマシンの開発」、平塚祐一 (2007年3月6日、千里ライフサイエンスセンター)
5. 第82回日本細菌学会 「細菌の運動と走化性」シンポジウム 「マイコプラズマで駆動するマイクロモーター」、平塚祐一 (2009年3月12日、名古屋)

[国内学会・研究会 一般発表]

1. 服部真典、青山晋、平塚祐一「キネシン・微小管を駆動源とした微小回転素子の構築」2010年 生体運動研究合同班会議(中央大学)(2010/1/10)
2. 青山晋、平塚祐一「モーター蛋白質で駆動するバイオディスプレイの開発」第47回生物物理学会(徳島)(2009/11/1)
3. 平塚祐一、竹内昌治「モーター蛋白質で駆動する回転モーター」第46回生物物理学会(福岡)(2008/12/3)
4. 下池正彦、平塚祐一「微小管モーター蛋白質で駆動するバイオディスプレイ」第46回生物物理学会(福岡)(2008/12/3)
5. 阿久津純一、下池正彦、平塚祐一「モーター蛋白質により自走する微小素子の開発」応用物理学会 (2008年春期) 29P-R7