

研究報告書

「分子による分子の操作を可能にする Molecular Total Analysis Systems」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 20 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 横川 隆司

1. 研究のねらい

本研究では Molecular Total Analysis Systems (MTAS) の基本原理を提案しそれを用いた分子計測事例を示すことを目標に研究を推進してきた。これにより、従来の医学・生命科学分野での既定概念である「分子認識は濃度とその反応をよりどころにしておこなう」に対して、新たに「1分子によるその場観察による計測」の世界を拓くことが目的である。

本研究では、確定的で信頼性の高いトップダウンのデバイス製作技術のナノスケール化および生体適合性向上と、ボトムアップによるタンパク質の分子設計技術が相補的に機能した複数のナノシステムを提案した。これらの成果によって、MicroTAS における従来の統計的な分子の取扱いから分子レベルでの分子操作、分離、結合などの各機能をオンチップで実現することができた。同時に、擬似的に *In vivo* 空間を実現することで、細胞内物質輸送を分子レベルで制御して行うことができるようになった。この技術は、今後生命科学・医学・創薬分野において新たな技術として展開することが期待される。このように本研究で得られた成果を通して、生命科学や MEMS・MicroTAS 分野における新たな方法論を開拓することが本研究のねらいである。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、トップダウンのマイクロ・ナノマシニング技術とボトムアップのモータタンパク質の分子設計技術の相補的な補完によってナノシステムを提案するとともにそれに必要な力学的な解析もおこなった。選択的にタンパク質を吸着するナノトラック内にキネシン-微小管系を再構築する手法を用いて、2.5 次元的に制約された空間内で分子の輸送、結合現象をリアルタイムで可視化することに成功した(成果1)。さらに、2.5 次元から3次元へと制約するデバイス開発をおこない、キネシン-微小管関係を完全にチャンネル内に封じ込めることで *in vitro* 細胞内物質輸送モデルの提案をおこなった(成果2)。一方で、よりボトムアップ的な分子設計を利用した運動制御手法も提案した。表面電荷を操作した微小管を複数設計することにより電界中での微小管の運動方向を自律的に制御することに成功した(成果3)。また、従来指摘されているマイクロチャンネル内でのモータタンパク質アッセイの難しさを、圧力送液におけるビーズへのせん断力の影響という観点から評価をおこなった(成果4)。これらの成果をベースに複数モータによる生体内物質輸送を模倣した、微小管の Tug-of-war 分子系を提案した(成果5)。以下に各項目についての詳細を述べる。

(2) 詳細

成果1: 微小管アレイ上における分子輸送、結合観察システム

1-1) ナノトラックの製作と微小管の極性配向・配置固定

ナノスケールで微小管を配置するためのナノ・マイクロ構造(ナノトラック)製作(図A)、および Pluronic を用いた化学的な表面処理により選択的に微小管を配置できるようになった。また、アルミ薄膜とEBレジストからなるナノトラックの製作では、オーバハング構造の最適化により物理的にも微小管運動を 2.5 次元的に制約することを可能にした。この構造を利用して微小管の運動アッセイをおこないナノトラックに一方向的に微小管を導入することで、極性の揃った微小管が多数並列に配置された「微小管アレイ」が実現した(図 B,C)。また、ナノトラックアレイ内の微小管密度は入り口部分と出口部分の微小管密度の時間変化によってあらわされることを利用して、極性配向効率の数値解析をおこない実験結果と合わせて検討した。

1-2) ラジカル発生による極性配向の高効率化

我々のグループでは、ラジカルの発生によりキネシンが失活することを以前報告しているが、本研究ではこれを蛍光微小管のみに応用して意図的かつ局所的に微小管速度の分解(除去)に利用する技術を確立した。従来、ラジカルの影響はアッセイエリア全体に広がってしまい照射部分のみを局所的に処理することが難しかった。そこで、バッファ条件や照射波長を最適化することで照射エリアの微小管のみを分解する技術を確立した。この技術を用いることにより微小管の極性配向効率が最大 90%まで上昇した。

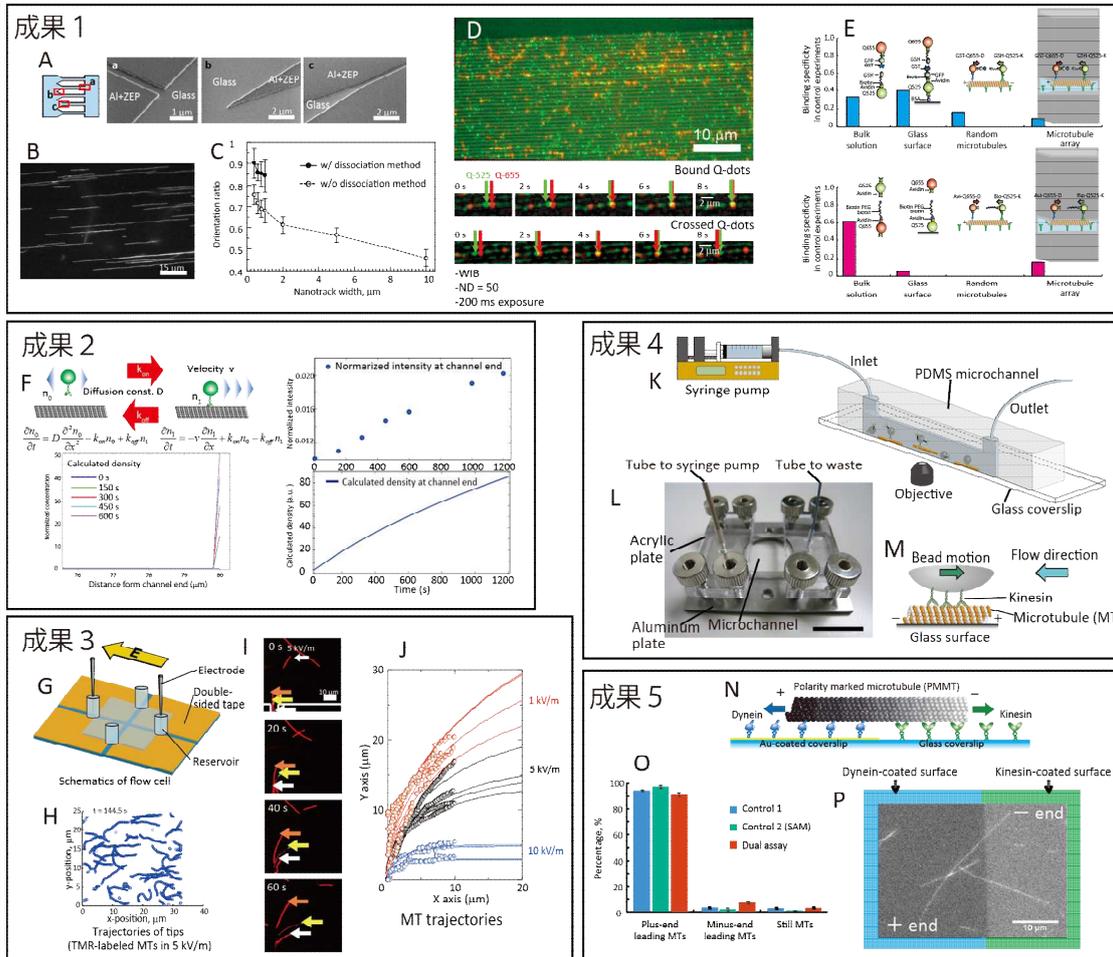
1-3) 分子輸送および結合観察システムの構築

モータタンパク質-Q-dot-結合分子という複合分子系を設計し、その輸送と結合を観察することで MTAS の実証をおこなった。まず、構築した分子系が微小管アレイ上でナノ構造等の影響を受けずにモータが運動することを確認し、極性に従って所望の方向にキネシンとダイニンがそれぞれ運動することを評価した。連続運動距離(Run Length)と運動速度を測定し、二種類のモータが同時にかつその特性を失わずに運動しその方向が前節で極性配向した設計通りであることを確認した。設計した結合分子である GST-GSH あるいは Streptavidin-biotin に特異的に Q-dot の局在が見られることを確認した(図 D)。バルク溶液中での同等の分子系の結合に比べ、微小管アレイ上での結合が 3-4 倍の効率で観察された(図 E)。これによりバルク溶液中で対象分子を「濃度」として認識するよりも、「個別」の分子として操作、検出することが検出効率の点からも良いことが示された。この成果は、キネシンとダイニンという極性の異なるモータタンパク質の動きを同時に利用して分子結合をリアルタイムで可視化した世界で初めての成果である。

成果2: 2.5次元から3次元封入デバイスによる *in vitro* 細胞内物質輸送モデル

マイクロチャネル内でのバイオアッセイには圧力送液を利用できるが、サブマイクロスケールにスケールダウンした際、圧力損失を補って無理な圧力送液をおこなうとモータタンパク質のアッセイ系が構築できないことが知られている。このため、成果1のように構造の上部が解放したナノ「トラック」を利用して2.5次元的な制約を与えて分子系の制御をおこなってきた。これは、複数回の溶液交換を必要とするタンパク質アッセイの要求に応えながらも、ナノスケールの分子配置を可能にする効果的な構造であった。しかし *in vivo* においては細胞膜によって閉鎖された

ナノ～マイクロ空間内で細胞内物質輸送をおこなっており、*in vitro* でもその輸送モデルを再構築することが求められている。本成果では、これまでに用いてきた「ナノトラック」を利用して「ナノチャネル」化するデバイスを開発した。これにより、チャネル内の Q-dot の分布がキネシンの運動により変化することを可視化できた。また、微小管-キネシンの結合乖離モデルをベースに Q-dot 分布をモデリングすることも可能になった(図 F)。



成果3: 表面電荷密度の操作による微小管運動方向の制御

微小管が負の表面電荷を有しているため、電界中では電気泳動力が支配的に働きキネシコート表面上の微小管がアノード方向に運動することが知られている。本研究では、微小管の表面電荷を分子設計により操作することによって、電気泳動力に差を与えることで運動方向を制御することが可能になった(図 G)。具体的には、まず微小管のマイナス端のシード部分を 1.3 μm 程度に調整した上でビオチン化し、さらにプラス端方向に重合してマイナス端のみがビオチン化された微小管を得た。Streptavidin-biotin 結合を利用して、荷電分子としての DNA をマイナス端のみにラベルし、電界強度 5 kV/m のときの微小管の動きを評価した結果が図 I である。微小管のトラッキングルーチンを Matlab でプログラムし(図 H)、運動曲率を導出したところ(図 J)、設計通り DNA の長さつまり電荷量に応じて曲率が異なることが示された。並行して、マイナス端を DNA ラベルしたシード部分の電気泳動移動度を測定することで理論的に運動軌跡を導

出したところ、上記の実験結果とよく一致することがわかった。以上の成果により、ボトムアップ的に分子設計をおこなうことで微小管自体に機能を付与することができた。従来は場に存在するすべての微小管が同じ方向に動くことが常識であったが、本研究では初めて同一場において異なる運動方向を持つ微小管を創出することができた。

成果4: マイクロチャンネル内におけるビーズ輸送の力学的挙動解析

マイクロチャンネル内での分子輸送にモータタンパク質を利用する場合、分子系構築のための送液は圧力送液によるところが大きい。しかし、分子輸送の担体であるマイクロビーズが送液時のせん断力によってチャンネル表面から剥離してしまうことが多い。そこで、分子系設計の際の指針を得るため、マイクロチャンネル内におけるビーズの付着力を導出するための実験系(図 K,L)およびモデルを構築した(図 M)。得られた結果は、複数のモータタンパク質による *in vivo* での発生力とよく一致しており、*in vitro* においてもモータタンパク質の特性がよく保たれていることがわかった。

成果5: 異種モータタンパク質のパターニングによる微小管の Tug-of-war

本さがけ研究の視点の一つに「キネシンとダイニンの併用」という点がある。これらの運動性を持つタンパク質を同時に *in vitro* で利用することは凝集や失活の原因となるが、*in vivo* においてそれらは共存して細胞内物質輸送を双方向に実現するという重要な役割を担っている。そこで、本研究ではキネシンとダイニンをマイクロファブリケーション技術により特定の領域にパターニングして、その境界における微小管の振る舞いを調べた。その結果、二種類のモータをパターニングする技術を世界で始めて開発し(図 N,O)、境界にまたがって配置された微小管がキネシンとダイニンによってそれぞれ逆方向に引っ張られる tug-of-war が起こることを確認した(図 P)。これは、*in vivo* の tug-of-war 現象を *in vitro* で再現したことになり、現象に関わる分子数の計測、微小管運動速度とモータ発生力の関係などの評価に利用でき、細胞内物質輸送の理解につながることを期待される。

3. 今後の展開

研究成果をふまえて、今後の研究の展開等について記載してください。公開項目です。

今後も、トップダウンとボトムアップの相補的な分子集積システムを新たに提案していきたいと考えている。特に、課題2, 3については発展途上の課題であり今後も引き続きシステム創成に取り組む。また、課題2のような *in vivo* システムの評価のための *in vitro* モデルの製作では、今後、細胞内物質輸送の分子生物学的評価に利用することを検討する。さらに、課題5では従来の生物物理学的アプローチでは取られてこなかった新たな分子系を提案することができている。このため、マイクロ・ナノファブリケーションを用いた新たな分子系による生物物理学研究への貢献も視野に入れる。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、トップダウンのマイクロ・ナノ構造によりモータタンパク質の運動場を提供し、ボ

トムアップの分子設計によりモータタンパク質駆動の分子輸送と結合をおこなう、トップダウンとボトムアップの相補的な分子集積システムを提案してきた。当初の目標である極性配向した微小管アレイの製作、結合分子系の設計、分子輸送と結合のリアルタイム可視化を実現できた(成果1)。この成果を元に、よりトップダウン側の技術改良で細胞内物質輸送モデルを提唱したり(成果2)、逆にボトムアップ側の分子設計を取り入れることで微小管に自律的な機能を付加することに成功した(成果3)。さらに、より生物物理学的なアプローチとして微小管の Tug-of-war 解析においても、一定の成果を得られた(成果5)。以上の点から、ナノシステム MTAS の創製という提案においては、分子特異的な結合反応という一つの機能を提示することができたと考える。また、工学的なナノシステムの枠を超えて、現有の技術をより理学的なアプローチにも展開することができた点は、このさきがけ研究の枠組みの柔軟さによるものと感謝している。ただし後者についてはまだ成果がまとまっていない課題もあり、今後も引き続き検討を進めたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

トップダウン手法でマイクロ・ナノ構造を有する運動場を提供し、そこにボトムアップ的に設計改質したモータタンパク質を配置して、タンパク駆動の輸送システムを提案し、これにより、「1分子によるその場観察による計測」の可能性を拓くことを目標に研究を推進してきている。具体的には選択的にタンパク質を吸着するナノトラック内にキネシン-微小管系を再構築して、2.5 次元的に制約された空間内で分子の輸送、結合現象をリアルタイムで実現し、それをチャンネル内に封じ込めることで *in vitro* 細胞内物質輸送モデルの提案をおこなった。また、表面電荷を操作した微小管を設計することにより電界中での微小管の運動方向を制御し複数モータによる生体内物質輸送を模倣した微小管の Tug-of-war 分子系を提案した。

機械工学を専攻する研究者が運動タンパクを用いて輸送システムを作るという意欲はさきがけ研究の趣旨に沿っており、研究のねらいもまた挑戦的である。様々な技術的工夫によって、ある程度制御された運動システムが得られたものの、その成果は、残念ながら個別的性格をもつ現象が多く、研究者が目指すところの「MicroTAS における従来の統計的な分子の取扱いから分子レベルでの分子操作、分離、結合などの各機能をオンチップで実現」というレベルまで達成されたとは言い難い。しかしながら、擬似的に *In vivo* 空間を実現することで、細胞内物質輸送を分子レベルで制御するモデルは具体的に提案できたものと考えられ、この技術は、将来にわたって生命科学・医学・創薬分野においてユニークな技術として展開される可能性もある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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," *電気学会E部門誌*, Accepted, 2013.
2. N. K. Kamisetty, J. Ikuta, H. Kotera, and R. Yokokawa, "Microtubule Motility Powered by

Dual Motor Protein System and Their Electrical Docking," <i>Asian J. Chem.</i> , 25, pp. S308-S310, 2013.
3. K. Fujimoto, M. Kitamura, M. Yokokawa, I. Kanno, H. Kotera, R. Yokokawa*, "Colocalization of Quantum Dots by Reactive Molecules Carried by Motor Proteins on Polarized Microtubule Arrays," <i>ACS Nano</i> , 7, 447-455, 2013.
4. M. C. Tarhan, Y. Orazov, R. Yokokawa, S. L. Karsten, H. Fujita*, "Biosensing MAPs as "roadblocks": kinesin-based functional analysis of tau protein isoforms and mutants using suspended microtubules (sMT)," <i>Lab Chip</i> , 13, 3217-3224, 2013.
5. R. Yokokawa, Y. Sakai, A. Okonogi, I. Kanno, and H. Kotera, "Measuring the Force of Adhesion between Multiple Kinesins and a Microtubule Using the Fluid Force Produced by Microfluidic Flow," <i>Microfluidics and Nanofluidics</i> , vol. 11, pp. 519-527, 2011.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件

発明者: 横川 隆司、藤田博之、Tarhan Mehmet Cagatay、Stanislav L. Karsten
 発明の名称: Method of Detecting Protein and Detection Device
 出願人: 生産技術研究奨励会
 出願日: 2013/6/3(非公開希望)
 出願番号: 61/492,832(米国出願)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[1] K. Fujimoto, H. Shintaku, H. Kotera, and R. Yokokawa, "Transition of Q-dot Distribution on Microtubule Array Enclosed by PDMS Sealing for Axonal Transport Model," *The 27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2014)*, San Francisco, USA, Jan. 25-30, 2014. (Poster)

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

[3] M. C. Tarhan, Y. Orazov, R. Yokokawa, S. L. Karsten, and H. Fujita, "A Comprehensive Study on Detecting Tau Isoforms and Mutations Using Kinesin Motility Assay and Suspended Microtubules," *The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience*, pp. 394.09/NNN36, San Diego, USA, 2013/11/9-13, 2013. (Poster)

[4] J. Ikuta, N. K. Kamisetty, H. Shintaku, H. Kotera, and R. Yokokawa, "Microtubule Gliding at the Boundary of Kinesin and Dynein Patterned Surface," *17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2013)*, pp. 1454-1456, Freiburg, Germany, Oct. 27-31, 2013. (Poster)

[5] T. Nakahara, N. Isozaki, S. Ando, N. K. Kamisetty, H. Shintaku, H. Kotera, and R. Yokokawa, "Microtubule Manipulation by an Electric Field in a Fused Silica Channel," *17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2013)*, pp. 161-163, Freiburg, Germany, Oct. 27-31, 2013. (Poster)

[6] N. K. Kamisetty, J. Ikuta, S. Shintaku, H. Kotera, and R. Yokokawa, "Manipulation of Microtubules Motility Using Electrical Field on Kinesin/Dynein Coated Surfaces," *17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2013)*, pp. 811–813, Freiburg, Germany, Oct. 27–31, 2013. (Poster)

[7] N. Isozaki, T. Nakahara, S. Ando, N. K. Kamisetty, H. Shintaku, H. Kotera, E. Meyhöfer, and 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 (TRANSDUCERS2013)*, pp. 2126–2129, Barcelona, Spain, Jun. 16–20, 2013. (Poster)

[8] K. Fujimoto, M. Kitamura, M. Yokokawa, H. Shintaku, H. Kotera, and R. Yokokawa, "Manipulation and Observation of Binding of Molecules Driven by Motor Proteins," *The 6th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (NANOMED2012)*, pp. 66–69, Bangkok, Thailand, Nov. 04–07, 2012. (Oral)

[9] K. Fujimoto, M. Kitamura, M. Yokokawa, H. Kotera, and R. Yokokawa, "Colocalization of Q-Dots Carried by Motor Proteins on Microtubule Array in Nanotracks," *16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2012)*, pp. 22–25, Okinawa, Japan, Oct. 28–Nov. 1, 2012. (Oral)

[10] R. Yokokawa, M. Kitamura, M. Yokokawa, I. Kanno, and H. Kotera, "Parallel Microtubule Array with Defined Polarity by Nanotracks and Selective Microtubule Immobilization," *2011 MRS Spring Meeting and Exhibit*, pp. AA5.1, San Francisco, USA, Apr. 25–29, 2011. (Poster)

[11] R. Yokokawa, M. Kitamura, M. Yokokawa, I. Kanno, and H. Kotera, "Experimental and Numerical Analysis of Polar Oriented Microtubule Array in Nanotracks," *8th Annual Conference on Foundations of Nanoscience (FNANO2011)*, pp. 44–45, Snowbird, USA, Apr. 11–15, 2011. (Poster)

[12] R. Yokokawa, Y. Sakai, A. Okonogi, I. Kanno, and H. Kotera, "Number of Kinesin Molecules Involved in a Bead Transport Measured by Microfluidics and Mechanical Modeling," *The 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2011)*, pp. 1365–1368, Cancun, Mexico, Jan. 23–27, 2011. (Poster)

[13] M. Yokokawa, K. Fujimoto, M. Kitamura, R. Yokokawa, and H. Kotera, "Dual Q-Dot Transport on Microtubule Array with Polarity Defined by Nanotracks and Microtubule Motility Control," *The 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2011)*, pp. 1349–1352, Cancun, Mexico, Jan. 23–27, 2011. (Poster)

[14] H. Kotake, R. Yokokawa, I. Kanno, and H. Kotera, "Selective Kinesin and Dynein Immobilization and Electrical Microtubule Manipulation for Bidirectional Microtubule Motility," *The 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2011)*, pp. 1373–1376, Cancun, Mexico, Jan. 23–27, 2011. (Poster)

[15] R. Yokokawa, Y. Sakai, A. Okonogi, I. Kanno, and H. Kotera, "Force Measurement and Modeling for Motor Proteins between Microsphere and Microfluidic Channel Surface," *14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2010)*, pp. 372–374, Groningen, The Netherlands, Oct. 3–7, 2010. (Poster)

[16] Y. Sakai, R. Yokokawa, A. Okonogi, and H. Kotera, "Adhesion Force Measurement of Protein-Coated Microspheres Using Shear Stress in a Microfluidic Channel," *The 5th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro-Nano Technology (APCOT2010)*, pp. 101, Perth, Australia, Jul. 6-9, 2010. (Poster)

[17] M. Kitamura, R. Yokokawa, and H. Kotera, "Parallel Microtubule Array with Defined Polarity and Selective Microtubule Immobilization in Nanochannels," *20th Annual ASME Conference on Information Storage and Processing Systems (ISPS2010)*, pp. MI-B5, Santa Clara, USA, Jun. 14-15, 2010. (Oral)

[18] K. Wada, M. C. Tarhan, C. Bottier, D. Collard, H. Fujita, and R. Yokokawa, "Fabrication and Characterization of Multiple Nanowires Using Microtubule Structures," *The 15th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS2009)*, pp. 1337-1340, Denver, USA, Jun. 21-25, 2009. (Poster)

<受賞>

2011年9月27日

電気学会センサ・マイクロマシン部門主催 第28回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 奨励賞

2012(平成24)年11月7日

Best Student Paper Finalist, The 6th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering (IEEE-NANOMED 2012).

2013年6月21日

Outstanding Poster Presentation Award Finalist, The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS2013).