生体分子ロボットの創製

Preparation of Biomolecular Robot

鈴木 隆平

北海道大学総合化学院

〒060-0810

北海道札幌市北区北10条西8丁目

Ryuhei SUZUKI
Graduate School of Chemical Sciences
and Engineering, Hokkaido University
Kita 10 Nishi 8 Sapporo, Hokkaido
060-0810, Japan

佐田 和己

北海道大学理学研究院

〒060-0810

北海道札幌市北区北10条西8丁目

Kazuki SADA
Faculty of Science,
Hokkaido University
Kita 10 Nishi 8 Sapporo, Hokkaido
060-0810, Japan

Arif Md. Rashedul Kabir

北海道大学理学研究院

〒060-0810

北海道札幌市北区北10条西8丁目

Arif Md. Rashedul Kabir
Faculty of Science,
Hokkaido University
Kita 10 Nishi 8 Sapporo, Hokkaido
060-0810, Japan

角五 彰

北海道大学理学研究院

〒060-0810

北海道札幌市北区北10条西8丁目

Akira KAKUGO
Faculty of Science,
Hokkaido University
Kita 10 Nishi 8 Sapporo, Hokkaido
060-0810, Japan

論文要旨: 微小管／キネシン系に代表される生体分子モーターはアデノシン三リン酸 (ATP) を加水分解することにより得られるエネルギーを使って運動するタンパク質である。これらの生体分子モーターはナノメートルサイズでありながら、高いエネルギー変換効率、高い比出力を有する。本項では生体分子モーターを動力源とした生体分子ロボットの開発を目的とした研究を紹介する。

Abstract: Biomolecular motor system microtubule-kinesin can perform mechanical work by using chemical energy of 'adenosine-5'-triphosphate' (ATP) which is the fuel that provides energy to all living things. Using this fuel, biomolecular motors can produce a huge amount of energy almost 100 times larger than that of widely used electric motors. Modern technology is still far away from producing such a powerful molecular machine. By making the best use of this natural machine, we are aiming to design an artificial robot where biomolecular motors will be working as the central power generating unit.

Key words: microtubule, kinesin, biomolecular motor, robot

1 はじめに

ロボット工学の発展に伴い、魚が群れをなし泳ぐ習性を模倣し、障害物を回避可能なロボットや、蛇のように体幹構造を複雑に変化させ、様々な環境に適応可能なロボットなど、生物の習性や構造を模倣したロボットが近年、盛んに開発されている。生体に見られるような複雑な動きをロボットに再現させるためには従来の金属などのハードな素材よりも柔軟性に富んだソフトな素材より

ロボットを構成するほうが望ましい。さらにソフトな材料より構成される複数のロボットが協調的に行動する「群ロボット」が実現されたならば、単体時には困難であった作業が実行可能なロボットの作製が期待される。そこで本項では、これらの要素を満たす材料として微小管／キネシン系に代表される生体分子モーターを紹介する。

2 生体分子モーター

微小管／キネシン系に代表される生体分子モーターはアデノシン三リン酸 (ATP) の化学エネルギーを運動

連絡者: 鈴木 隆平
E-mail: mft-cewf0420@frontier.hokudai.ac.jp

Fig. 1 キネシン基板上で並進運動をする微小管の模式図(左) 並進運動する微小管の蛍光顕微鏡画像(右)

エネルギーへと効率良く変換し運動する生体由来の分子機械である。これらの分子機械はナノメートルサイズでありながら高いエネルギー変換効率(～90%)、高い比出力(～10000 W/kg)を有するだけでなく、水中で駆動可能、遺伝子工学による改質が可能であるなどの利点を有することから、近年、ATP駆動型の運動素子ナノデバイスとしての応用が期待されている¹⁾。生体外において生体分子モーターの運動を発現させる際には、*in vitro* Motility Assay と呼ばれる手法が広く用いられている。具体的にはガラス上に固定したキネシンの上に微小管、ATPを添加すると微小管はそのマイナス極性端を先頭にし、並進運動を発現する(Fig. 1)。しかし、この手法により発現する運動はランダムであるため、ナノデバイスへの応用が困難であった。さらに実際の生体システムに着目すると、生体分子モーターは高次元にわたって階層的に組み上げられることで細胞分裂や原形質流動、筋収縮など、高度に制御された多様な機能を発現している^{2,3)}。そこで、生体外において生体分子モーターの並進運動を制御し、集積させることが可能となれば、ATP駆動型のナノデバイスの創製に一步近づくと期待される。

3 微小管の能動的自己組織化

生体システムではエネルギーや物質の出入りがある非平衡系で構成要素が自発的に組み上げられることで複雑かつ秩序立った構造を生み出している⁴⁾。このような生体特有の自己組織化に着目し、微小管/キネシンを非平衡系において集積させる能動的自己組織化法が開発された^{5,6)}。具体的には*in vitro* Motility Assayを基盤として、ビオチン(Bt)を修飾した微小管がランダムに運動する系中にストレプトアビジン(St)を添加することで、Bt-St間の高い結合定数により微小管同士を架橋させ、極性を揃え運動させる手法である。これにより微小管はバンドル状、リング状、ネットワーク状の多様な微小管集合体を形成し、これらの多様な集合体は微小管濃度やSt濃度を様々に変化させることで選択的に形成が可能である(Fig. 2)。

Fig. 2 微小管能動的自己組織化により形成される多様な微小管集合体

3・1 リング状微小管集合体のサイズ制御

多様な微小管集合体のうち、リング状微小管集合体は重心移動を伴わない回転運動を発現することから、連続的に仕事を取り出すことが可能である⁷⁾。これまでに、エンジンや磁気モーターなど、様々な人工の回転運動素子が開発されてきたが、エネルギー変換効率の向上や素子の更なる小型化が課題となっている。生体分子モーターにより構築されるリング状集合体は高いエネルギー変換効率を有する世界最小の回転運動素子として応用が期待される。そこで、本項ではリング状微小管集合体のサイズ制御法について述べる。

リング状微小管集合体のサイズ制御を行うため、能動的自己組織化の際に長さの異なる微小管を用いることでリング状微小管集合体のサイズを制御する手法が開発された⁸⁾。GTPを用いて重合された微小管に対してシリンジを用いてせん断することで微小管の長さを調整可能である。この手法より、長さの異なる微小管を用いて能動的自己組織化を行ったところ、長い微小管から直径の大きなリング状微小管集合体が、短い微小管から直径の小さなリング状微小管集合体が形成された(Fig. 3)。このことより、微小管の長さを調整することでリング状微小管集合体のサイズ制御が可能であることが明らかとなった。

微小管の長さだけでなく、微小管の曲げ剛性も微小管

Fig. 3 GTPより調製された異なる長さの微小管 (a, e) $17.3 \pm 11.7 \mu\text{m}$, (b, f) $10.8 \pm 7.1 \mu\text{m}$, (c, g) $5.7 \pm 3.3 \mu\text{m}$, (d, h) $3.6 \pm 2.1 \mu\text{m}$ により形成されるリング状微小管集合体とサイズ分布。

Fig. 4 GMPCPP より調製された長さの異なる微小管（長さ：(a, e) $10.3 \pm 5.8 \mu\text{m}$, (b, f) $7.3 \pm 3.7 \mu\text{m}$, (c, g) $6.0 \pm 3.1 \mu\text{m}$, (d, h) $3.4 \pm 1.7 \mu\text{m}$ ）により形成されるリング状微小管集合体とそのサイズ分布。

の性質を決定付けるパラメータとなる。GTP アナログであるグアノシン 5'- α,β -メチレン二リン酸 (GMPCPP) より調製された微小管は GTP より調製された微小管に比べ、高い曲げ剛性を有することが知られている。そこで GMPCPP より調製された微小管を用いて、微小管の曲げ剛性がリング状微小管集合体のサイズに及ぼす影響を検討した。さらにシリンジを用いてこの微小管をせん断することで、微小管の長さの影響についても同時に検討された。その結果、GTP より調製された微小管と同様に、長い微小管から直径の大きなリング状微小管集合体が、短い微小管から直径の小さなリング状微小管集合体が形成される様子が観察された。さらに GMPCPP より調製された微小管から形成されるリング状微小管集合体は GTP より調製された微小管と比べ、直径の大きなものが得られた (Fig. 4)。

以上の結果より、微小管の曲げ剛性が形成されるリング状微小管集合体のサイズに影響することが明らかとなった。

4 集団運動

集団運動は自然界において鳥や魚の群れ、細菌の集団移動など様々なサイズスケールにて観察される⁹⁻¹²⁾。各構成要素は集団化により、並列性や柔軟性、頑強性を獲得する。このような機能は「創発」と呼ばれ、生命現象の一つとして捉えられている。集団運動の発現により単体では困難であった作業を可能とする群ロボットの創製が期待される。そこで本項では微小管／キネシン系を用いた集団運動について述べる。

4・1 微小管／キネシン系を用いた集団運動

集団運動の発現には、単体同士が運動方向を揃えるために短距離相互作用が必要である。そのため微小管及びキネシンが存在する系中にメチルセルロース (MC) を加えることで、短距離相互作用として枯渇効果が生じるシステムとした¹³⁾。枯渇効果が運動する微小管に及ぼす効果を検討するため、MC 存在下での *in vitro*

motility assay が行われた。ATP 添加後、ランダムに運動する微小管には、互いに接近した微小管同士は運動しながら相互作用する Snuggling (Fig. 5 (A)) と一方の微小管がもう一方の微小管を飛び越え相互作用せずに交差する Crossing over (Fig. 5 (B)) の2種類の衝突モードが観察された。

これらの衝突モードの割合は MC 非存在下では Crossing over が優勢であり (Snuggling : $\sim 20\%$, Crossing over : $\sim 80\%$)、基板の微小管密度による割合の変化は観察されなかった。一方、MC 存在下では MC 濃度の上昇に伴い、Snuggling の割合が上昇し、0.1 wt% MC 存在下では Snuggling $\sim 30\%$ 、0.3 wt% MC 存在下では Snuggling $\sim 50\%$ となり (Fig. 6)、MC 濃度の上昇に伴い微小管の集団運動に関わる衝突モードである Snuggling の発生頻度が高まることが明らかとなった。さらに微小管濃度を変化させ、微小管の配向度を示す下記の nematic order parameter S を算出することで集団運動を発現する条件について検討を行った。

nematic order parameter $S =$

$$\frac{1}{N_{MT}} \sqrt{(\sum_{i=0}^{180} R_i \cos 2\theta_i)^2 + \sum_{i=0}^{180} R_i \sin 2\theta_i^2}$$

(N_{MT} : 総ピクセル数 (総微小管数), R_i : 各角度におけるピクセル数 (各角度における微小管数), θ_i : i 番目の角度 ($i = 0 \sim 180^\circ$))

微小管濃度から算出した密度に対して S をプロットしたところ、微小管の配向度が高い値を示す微小管密度には臨界点 (ρ_c) が存在し、それ以上の微小管密度において高い配向度を示すことが明らかとなった (Fig. 7)。

さらに微小管集合体の時間経過に伴う挙動を観察したところ、集合体を形成していた微小管は1時間ほどでランダムに運動するようになり、 S の値が低下する様子が観察された。微小管集合体の時間経過に伴う挙動をより長時間観察するため、微小管結合タンパク質 (MAPS) を加えることで、微小管間へ引力的な相互作用を導入した。その結果、微小管集合体は30分ほどで形成され、2時間以上安定性を維持することが明らかとなった。

5 微小管／キネシン系を用いた応用研究

微小管・キネシンを用いた応用技術として、従来、測定が困難であった柔らかい材料 (ソフトマター) 表面のわずかな変形を検出する新しい手法を開発した。ソフトマターである伸縮可能なシリコーンゴム基板表面にキネシンを配置し、その上で微小管を並進運動させながら、ソフトマターに伸び縮みさせると、ソフトマターの変形の方に応じて微小管の運動方向が変化すること (Fig. 8) 及びその変形量に応じて微小管の運動速度が変化す

Fig. 5 メチルセルロース (MC) 存在下で運動する微小管, (A) Snuggling, (B) Crossing over (scale bar : 10 μm)。

Fig. 6 微小管の Snuggling と Crossing over の割合, (A) MC 非存在下, (B) 0.1 wt% MC 存在下, (C) 0.3 wt% MC 存在下。

Fig. 7 (A) 異なる濃度における微小管の蛍光画像 (scale bar : 50 μm), (B) 微小管密度と算出した nematic order parameter S_n 。

ること (Fig. 9) を見いだした。つまり、微小管の運動を観察することで、ソフトマター表面の微小な変形を容易にかつリアルタイムに観測することが可能となった¹⁴⁾。

6 生体分子モーターの長寿命化

生体分子モーターの実用化において、その耐用時間の延長が必要となる。生体分子モーターは熱変性や圧力などの物理的要因、分解酵素による生物学的要因、pH 変化や酸化などの化学的要因などによりその運動機能を失ってしまう。特に高い酸化力を持つ活性酸素種 (ROS) による運動性の低下は深刻な問題となってきた。これまでに酵素反応を用いた酸素除去系を用いることで生体分子モーターへの ROS の影響を軽減することが可能と

Fig. 8 基盤の変形方向を指し示す微小管の顕微鏡写真とその模式 Fig. (スケールバー : 10 μm)

Fig. 9 シリコンゴム基板の変形量に応じた微小管の運動速度の変化

Fig. 10 Inert chamber system (ICS) の写真 (a) とその内部構造の模式図 (b), ICS と従来の酵素反応を用いた条件での生体分子モーターの稼働時間の比較 (c)。

なっている。しかし、この酵素反応の過程で酸化力の強い過酸化水素が生じ、生体分子モーターの耐用時間は数時間程度にとどまっていた。そこで、活性酸素の元となる酸素を系中から除去するため、窒素雰囲気下で生体分子モーターを運動させる嫌気チャンバーシステム (Inert chamber system (ICS)) が考案された (Fig. 10)^{15, 16)}。

その結果、これまで数時間程度であった生体分子モーターの連続稼働時間は週単位にまで向上し、能動的自己組織化により形成されるリング状微小管集合体の回転寿命は 4 万回転に達した。このシステムにより、生体分子モーターの運動素子としての可能性が開かれることが期

待される。

7 おわりに

微小管／キネシン系に代表される生体分子モーターは優れた運動性、エネルギー変換効率を有することから、ナノデバイスとしての応用が期待されている。これまでに並進運動を発現した微小管に対し、相互作用を導入することでリング状微小管集合体を選択的に形成させることが可能となり、ICSを用いることで生体分子モーターの運動を長時間にわたって発現させることが可能となった。今後はATP駆動型の運動素子を目指し、能動的自己組織化により微小管の運動方向の制御を試みる。

文 献

- 1) D. V. Val and R. A. Milligan, *Science*, **288**, 5463 (2000).
- 2) B. Alberts, J. Lewis, M. Raff, P. Walter, K. Roberts, A. Johnson and K. Nakamura, *Molecular Biology of the Cell 5E.*, Garland Science, New York, pp. 965-1052 (2008).
- 3) F. G. Woodhouse and R. E. Goldstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 14132 (2013).
- 4) D. E. Ingber, L. Dike, L. Hansen, S. Karp, H. Liley, A. Maniotis, H. McNamee, D. Mooney, G. Plopper, J. Sims and N. Wang, *Int. Rev. Cytol.*, **150**, 173 (1994).
- 5) H. Hess, J. Clemmens, C. Brunner, R. Doot, S. Luna, K. H. Ernst, V. Vogel, *Nano Lett.*, **5**, 629 (2005).
- 6) R. Kawamura, A. Kakugo, K. Shikinaka, Y. Osada, J. P. Gong, *Biomacromol.*, **9**, 2277 (2008).
- 7) A. M. R. Kabir, S. Wada, D. Inoue, Y. Tamura, T. Kajihara, H. Mayama, K. Sada, A. Kakugo, J. P. Gong, *Soft Matter*, **8**, 10863 (2012).
- 8) S. Wada, A. M. R. Kabir, M. Ito, D. Inoue, K. Sada, A. Kakugo, *Soft Matter*, **11**, 1151 (2015).
- 9) T. Vicsek, A. Zafeiris, *Phys. Rep.*, **517**, 71-140 (2012).
- 10) X. Chen, X. Dong, A. Beer, H. L. Swinney, H. P. Zhang, *Phys. Rev Lett.* **108**, 148101 (2012).
- 11) M. H. Wilson, E. L. F. Holzbaur, *J. Cell Sci.*, **125**, 4158-4169 (2012).
- 12) C. Cui, X. Yang, M. Chuai, J. A. Glazier, C. J. Weijer, *Dev. Biol.* **284**, 37-47 (2005).
- 13) D. Inoue, A. M. R. Kabir, T. I. Farhana, K. Tokuraku, K. Sada, A. Konagaya, A. Kakugo, *Nanoscale*, **7**, 18054-18061 (2015).
- 14) D. Inoue, T. Nitta, A. M. R. Kabir, K. Sada, J. P. Gong, A. Konagaya, A. Kakugo, *Nature Commun.* **7**, 12557 (2016).
- 15) A. M. R. Kabir, D. Inoue, A. Kakugo, A. Kamei, J. P. Gong, *Langmuir*, **27**, 13659 (2011).
- 16) A. M. R. Kabir, D. Inoue, A. Kakugo, K. Sada, J. P. Gong, *Poly. J.*, **44**, 607 (2012).