

論文の内容の要旨

論文題目 生体分子モータを用いたナノ搬送デバイスの製作

氏名 横川 隆司

Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) 技術は、誕生から 20 年余りが経過し、それを用いた多くの製品が生まれてきた。これまで、MEMS は光技術、バイオ技術、無線通信技術など様々な分野との融合が図られ、デバイス製作のための加工技術としての位置付けが大きくなってきた。特に化学、医学、薬学、生化学と MEMS を融合し、デバイス内で流体を扱うマイクロフルイディクスと呼ばれる研究が近年注目を集めている。たとえば、Micro Total Analysis Systems (microTAS) は、化学反応やその検出をマイクロチップ上で行うことを実現しようとする分野である。化学実験に限らず流体を扱った反応検出システムでは、チップの微小化によって分析や反応に要する試薬の量を減らし、反応の高速化やコスト削減を図ることができる。近年では、微細加工技術の発達によりナノスケールにチャンネルを微細化することで、チップ全体の更なる小型化を目指す研究が進められている。ここで問題となるのが、流体を流す際の圧力損失増大による溶液導入の難しさや、微量の目的分子を検出する手法の検討などである。そこで、目的分子をマイクロビーズなどに固定することにより、溶媒中での分散状態よりも高濃度に分子を集合させる。さらに、溶液駆動を用いることなくチップ上で一連の処理を行うことができれば、これらの問題を解決することができる。

このような背景から、抗原抗体反応を用いて目的分子を濃縮固定し、反応や検出を行うイムノアッセイ（酵素免疫測定法）がビーズを用いて行われるなど、ビーズを利用したアッセイが盛んに研究されている。チップ上でビーズを操作する方法としては送液によるものが支配的であったが、より自由にビーズを扱うために誘電泳動、磁場、レーザーピンセット等を用いた方法が提案されている。しかし、誘電泳動や磁場を用いた方法では集団としてビーズを操作するため、より少数の目的分子を扱うためには限界がある。レーザー照射においては、対象とする物質の生化学的な機能を奪ってしまうことも危惧される。よって、個々のビーズを直接かつ穏やかに運ぶ方法が望ましい。例えば、生体内の様々な分子は細胞内輸送によって個々の分子が目的の場所から場所へ運ばれている。

そこで、本研究ではビーズなどのナノスケールの対象をタンパク質生体分子モータにより操作する手法を提案する。この手法を microTAS などのチップ上で応用することができれば、送液に代わる新規な目的分子の搬送方法となることが期待される。従来のマイクロフルイディクス技術と生体分子モータを融合することで、新たなハイブリッドナノ搬送システムの創成を目指した。

本研究では、生体分子モータの中でリニアに駆動する微小管-キネシン系生体分子モータを用いた。モータ分子であるキネシンは、ヘッド部分が 10 nm、全長が 80 nm 程度のタンパク質分子である。レール分子である微小管は、モノマーであるチューブリンを重合することによって得られる直径 25 nm、長さ数 10 μm のフィラメントである。本研究で用いた従来型キネシンは、微小管のマイナス端からプラス端に向かって一方向に運動するため、微小管をチャンネル内に配向させて付着すれば所望の方向へ物体搬送を行うことができ、いわば線路と電車のような関係を微小流体デバイス内で実現することができる。このキネシンの運動は、溶液中のアデノシン-3-リン酸 (ATP) を加水分解する際に生じるタンパク質の三次元構造変化に伴ってもたらされ、キネシンは化学エネルギーから運動エネルギーを取り出すことのできるナノマシンとみなすことができる。従来の電気・機械的なビーズ操作方法では、デバイス外部にビーズ駆動システムを設置し操作する必要があった。しかし、生体分子モータによるビーズ操作においては、エネルギー源である ATP が溶液内に存在するためデバイスの微細化にも貢献する。このため、試薬に満たされた microTAS 中での物体搬送を考えた場合、溶液中で駆動する生体分子モータの方が有利である。

キネシン-微小管系生体分子モータを工学的な搬送システムに利用するため、まずタンパク質精製方法を確立した。キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) 由来のキネシン (GST (Glutathione S-Transferase) タグ付き全長キネシン (分子量 136 kDa)) が発現した大腸菌 (*E. coli*) を大量培養した。そして、得られた大腸菌からのキネシン精製方法の最適化を行った。異なる 2 つの精製方法を確立し、精製方法 1 により精製したキネシンはビーズアッセイなどの物体搬送用に、精製方法 2 で精製したキネシンはグライディングアッセイ用に用いた。チューブリンは共同研究者から供給してもらい、本研究ではチューブリンの蛍光ラベルや微小管への重合を行い研究を進めた。これらのタンパク質は、理学分野において 20 年以上研究されてきたため生物物理的な特性は明らかになりつつあるが、工学的応用に関する研究は近年始まったばかりであり検討すべき問題は多い。そこで、本研究ではハイブリッド搬送システムの実現に至る要素技術の検討を行った。

第一に、キネシン-微小管系生体分子モータを微小流体デバイスと組み合わせることによって、その機能の評価を行った。微小管は、一般にガラスと親和性がないためポリ-L-リジンを用いてガラスに付着させる方法を用いた。Polydimethyl siloxane (PDMS) レプリカを用いたソフトリソグラフィにより、ポリ-L-リジンをパターンニングすることで微小管のパターンニングも実現することができた。さらに、SOI ウエハからリリースしたシリコン構造にキネシンを付着させることにより、搬送速度 308 nm/s でその搬送を実現した。これによって、PDMS とガラスによって作られた一般的な微小流体デバイス内において、またマイクロマシーニングによって人工的に製作したマイクロ・ナノ構造と組み合わせた場合にも、生体分子モータが活性を失うことなく搬送機構の駆動源として働くことが示された。

次に、生体分子モータをデバイス設計者の意図通りに工学的に制御するため、駆動停止制御性技術の確立を行った。エネルギー源である ATP に加え、ATP をグルコース-6-リン酸

(glucose-6-phosphate) とアデノシン-2-リン酸 (ADP) に分解するヘキソキナーゼを使用した。停止状態から駆動状態にするために最適化した ATP 濃度は $10^2 \mu\text{M}$, 駆動状態から停止状態に遷移させるために最適化したヘキソキナーゼ濃度は 10^3 U/l であった。これらの濃度の ATP とヘキソキナーゼを繰り返し用いることによって、応答性良く駆動状態と停止状態を切り替えることに成功した。

さらに、マイクロ・ナノ構造をデバイス内の目的の場所へ一方向に搬送するために、微小管の極性を配向し、固定する技術を確立した。まずグライディングアッセイとバッファの流体力を利用して微小管の極性を配向し、その配向状態を保ったままグルタルアルデヒドを用いて化学的に固定した。その後、活性のあるキネシンが付着したビーズを微小管の固定されたチャンネル内に導入すると、キネシンと微小管の相互作用によりビーズは微小管上に捉えられる。最後に ATP を導入すると、約 97% のビーズが微小管のプラス端に向かって一方向に搬送されることを確認した。

異なる微小管配向方法として、微小管一分子をナノスケールチャンネル内に配向・固定する方法も確立した。グライディングアッセイにより、幅 500 nm のチャンネルに微小管を導入し、水銀ランプを照射しキネシンを失活させることで固定を行った。グライディングアッセイ時に動いている微小管の先端はマイナス端であるから、アッセイによってチャンネルに誘導された微小管の極性は自明である。微小管が固定されたナノチャンネルに直径 320 nm のキネシンビーズを導入すると、数個のビーズが一方向に搬送された。これは、ナノスケールのチャンネル内で溶液交換を行うことなく、少数のビーズを扱うための基礎技術である。

以上の基礎技術を用いて、微小流体デバイス内でのアプリケーションの例として以下の技術を検討した。微小管を配向しておいたチャンネル内で、ATP とヘキソキナーゼを交互に注入することで搬送途中の所望の位置で停止駆動を実現した。また、十字チャンネルを用いた目的分子の搬送実験を行った。交差するチャンネルの一方に微小管を配向しておき、それに直交するチャンネルからキネシンビーズを導入し微小管上に付着させる。さらに、目的分子を含む溶液を交差部分に導入することによってキネシンビーズ上に付着させた。このチャンネルに ATP を加えると、ビーズは微小管上を一方向に目的分子を搬送した。目的分子を特異的にビーズに付着させたり、さらに長距離輸送し反応や検出を行うといったシステムの構築までには至らなかった。しかし、これらの技術は、微小流体デバイス内において自在に搬送を行うための要素技術として重要である。

本研究では、キネシン-微小管系生体分子モータの工学応用に向けたタンパク質の準備、微小管のパターニング、マイクロ・ナノスケールのシリコン構造の搬送、キネシンモータの駆動停止制御技術、微小管の配向による搬送方向の制御等の基礎技術を検討した。さらに、デバイス内での要素技術を検討することにより、より複雑な微小流体デバイスの実現可能性の一端を示すことができたと考える。