戦略的創造研究推進事業 発展研究(SORST)

研究終了報告書

研究課題

「ATP駆動型ソフト&ウェット運動素子の 開発と応用」

研究期間:平成16年11月 1日~ 平成19年 3月31日



(北海道大学、教授)

1. 研究課題名

ATP駆動型ソフト&ウェット運動素子の開発と応用

2. 研究実施の概要

生物は極めて効率的な動力システムを有する。そのシステムを構成する主要成分として 動物界・植物界に広く分布しているアクチンやミオシンと呼ばれるタンパク質分子である。 そこでは ATP をエネルギー源とし、それを加水分解することで生じる化学エネルギーを直 接力学エネルギーに変換している。しかし、獲得した運動機構や分化の程度はそれぞれ種 により異なっている。細胞運動のようにアクチン分子の自己組織化を利用するシステム(ア クチン系)や、筋肉のようにアクチン-ミオシン間の滑り運動を利用するシステム(アクチン-ミオシン系)が存在する。その中でも筋肉はアクチンとミオシン二つの蛋白分子がそれぞれ フィラメント→フィブリル→サルコメアといった階層構造を作ることによって、ナノメー タオーダーのフィブリル間の滑り運動をマクロの運動に集積し、実現されている。

本研究はこれまでのさきがけ研究より得られた知見からアクチンやミオシンの自己組織 化を利用しながら人工的に再構築することで ATP 駆動型のソフト&ウェット運動素子の実 現が可能であると考え、以下の課題を推進した。

I. アクチンファイバーの3次元自己組織化を制御し、ゾルーゲル変換型運動素子を設計・ 作製する(アクチン運動系)

様々なカチオン性高分子ゲル表面でのアクチンの3次元自己集合挙動を明らかにすると ともに、ゲル表面のマイクロパターン化や光イオン化などの手法を使い、アクチンの自己 組織化を制御する。その3次元自己組織化過程から発生する推進力を取り出し、ゾルーゲ ル変換型の運動素子を設計・作成する。

Ⅱ. アクチン・ミオシン筋肉蛋白の再構築過程を制御し、様々な集合体構造を作り出すと ともに、構造と筋肉蛋白ゲルの運動特性の相関を明らかにする(アクチン・ミオシン運動 系)

ATP を介したアクチン-ミオシンゲルの運動の固有特性との相関性を明らかにし、人工運動素子の運動様式にフィードバックさせる。このようにして、人工運動素子に必要な秩序が生まれるときの時間と空間の相関を明らかにする。

筋肉蛋白分子の集合によって駆動するゲル人工筋肉は協調現象によって作動する。そこ で人工運動素子における協調現象をゆらぎの観点から動的に解析し、分子集合反応の動力 学、自己組織過程を理論と実験的に探る。これらの成果は、より高次応答性・高出力の人 工運動素子を開発するための重要な知見となって材料創製にフィードバックされる。

次に運動の動力学、自律応答性、階層構造創発(emergence)と運動様式の相互・緩和のダイナミックス過程などが生物運動を特徴づける要素であるので、これらの仕組みを解明する。これによって、生体における筋肉が高次の階層構造をもつ意味を理解する。

III) アクチンファイバーゲルの1次元及び2次元成長を制御し、運動制御可能なゲル運動 素子を設計・作製する

筋肉蛋白ゲルの構造を制御することにより、運動方向や運動様式を制御し、ゲル運動素 子を設計・作製する。マイクロ流路にアクチンと高分子の濃度勾配を作り、相互拡散を利 用して、極性を揃った1次元アクチンファイバーや2次元アクチン薄膜を作成する。

また、1次元、2次元アクチンゲルとミオシンとの滑り運動を発現させる。その際、サ ルコメアの3次元滑り構造と比較し、筋肉蛋白ゲルの1次元、2次元滑り構造の特徴を見出 す。アクチン、ミオシン自己組織化の過程、化学反応の条件、形成されたゲルの集合構造 と運動様式との関係を明かにする。

本研究で提案しているゲル運動素子はミオシン分子、アクチン分子を基本構成材料とす

るために、ATP 酵素反応、エネルギー変換機能といった生物由来の特長を備えづつ、人工 的に新たに高次構造化、スケールアップ化、化学架橋をしているので、生体機械と同じ様 のエネルギー効率やしなやかな性を有すると同時に、熱的、機械的、化学的に安定である 利点を持っている。本研究課題が実現すれば、これまで実現されたことのないATPの化 学エネルギーで駆動する人工ソフト&ウェット型の運動素子を創製することができ、生体 適応性ソフトマニュピレータやソフトアクチュエータの応用が可能となる。

3. 研究構想

生物は極めて効率的な動力システムを有する。そのシステムを構成する主要成分として 動物界・植物界に広く分布しているアクチンやミオシンと呼ばれるタンパク質分子である。 そこでは ATP をエネルギー源とし、それを加水分解することで生じる化学エネルギーを直 接力学エネルギーに変換している。しかし、獲得した運動機構や分化の程度はそれぞれ種 により異なっている。細胞運動のようにアクチン分子の自己組織化を利用するシステム(ア クチン系)や、筋肉のようにアクチン-ミオシン間の滑り運動を利用するシステム(アクチン-ミオシン系)が存在する。その中でも筋肉はアクチンとミオシン二つの蛋白分子がそれぞれ フィラメント→フィブリル→サルコメアといった階層構造を作ることによって、ナノメー タオーダーのフィブリル間の滑り運動をマクロの運動に集積し、実現されている。

本研究はこれまでのさきがけ研究より得られた知見からアクチンやミオシンの自己組織 化を利用しながら人工的に再構築することで ATP 駆動型のソフト&ウェット運動素子の実 現が可能であると考え、以下の課題を推進した。

I. アクチンファイバーの3次元自己組織化を制御し、ゾルーゲル変換型運動素子を設計・ 作製する(アクチン運動系)

Ⅱ. アクチン・ミオシン筋肉蛋白の再構築過程を制御し、様々な集合体構造を作り出すとともに、構造と筋肉蛋白ゲルの運動特性の相関を明らかにする(アクチン・ミオシン運動系)

III) アクチンファイバーゲルの1次元及び2次元成長を制御し、運動制御可能なゲル運動 素子を設計・作製する

本研究で提案しているゲル運動素子はミオシン分子、アクチン分子を基本構成材料とす るために、ATP 酵素反応、エネルギー変換機能といった生物由来の特長を備えづつ、人工 的に新たに高次構造化、スケールアップ化、化学架橋をしているので、生体機械と同じ様 のエネルギー効率やしなやかな性を有すると同時に、熱的、機械的、化学的に安定である 利点を持っている。本研究課題が実現すれば、これまで実現されたことのないATPの化 学エネルギーで駆動する人工ソフト&ウェット型の運動素子を創製することができ、生体 適応性ソフトマニュピレータやソフトアクチュエータの応用が可能となる。

本研究構想に基づき研究を行い、我々はアクチンファイバーゲルの自己組織化、及びその自己組織化メカニズムを解明した。アクチン-ミオシン運動系を構築した。その知見を生かし我々はさらに筋肉タンパク系とは異なる機構で運動を発現するモータータンパク系である微小管-キネシン系を用いて新規運動系の構築を試みた。この微小管-キネシンは、アクチン-ミオシン系同様に ATP を用いることで運動を発現するがより力強く確実に力を取り出すことが出来、その出力の集積により今までとは異なる特徴を持つ運動系を構築できることが期待される。なお本研究は北大龔グループ単体で行われた。

4. 研究実施内容

4.1 "ATP駆動型ソフト&ウェット運動素子の開発と応用"

(1) 実施の内容及び得られた研究成果の状況

(I) 様々なポリカチオンを用いた巨大アクチンゲルの運動発現とその運動特性

これまでの研究の中で、我々は筋肉タンパクであるアクチンがpoly-L-Lysine(p-Lys)など のポリカチオンとの静電的相互作用により巨大アクチンコンプレクスを形成することを 発見し、カチオン種によってその形状が異なることも明らかにした。そしてコンプレク スを化学架橋すると長さ数+µmにおよぶ巨大アクチンゲルが得られた。このアクチンゲ ルはミオシン上でNativeのアクチンに比べより速く、直線的に運動することがわかった。 本研究課題ではまず上に挙げたpoly-L-Lysine以外のポリカチオン:主鎖に電荷を持つ x,y-ionene bromide(x=3,6 y=3,4,6,10)およびp-Lysと同様に側鎖に電荷を持つpoly(quaternized dimetylamino- propylacrylamide)(PDMAPAA-Q)を相互作用させて形成したアクチンゲルの 運動発現を試みた。結果、すべてのアクチンゲルが運動発現をすることがわかった。そ こでこの運動性を詳しく調べ、これまで解析してきたアクチンコンプレクスの形状と比 較することで、ポリカチオンの化学種がその運動性に及ぼす影響を調べた。

まずこれらの運動性を比較するために運動直進性と運動速度を求めた。運動直進性は 観測時間に対し、移動距離を両対数プロットしたときに得られる直線の傾きβで評価し

た。この直線の傾きβが0.5であると 運動がランダムであり、1.0であると 直線運動であることを意味している。 運動速度は観測時間3.3秒の平均移動 距離から算出した。各アクチンゲルで の運動直進性βをTable 1に示した。

Table 1から、Nativeアクチンでは直 進性βの値が0.69であったのに対して、 アクチンゲルのそれは6.4-ionene以外 すべて0.80より大きい値を示し、特に PDMAPAA-Qは0.90と最も大きかった。 つまり、Nativeアクチンが集合し巨大 化することで運動直進性が上昇するこ とがわかった。一方、運動速度はNative では0.77µm/sに対してionene系は0.48 ~0.79µm/sとNativeと変わらないか、そ れよりも低い値を示した。しかし、 PDMAPAA-Qはp-Lysの1.1µm/sよりも さらに速く、1.3μm/sを示した。この運 動速度を透過型電子顕微鏡観察から得 られたコンプレクスの形状を表す軸比 (長さ/太さ) に対してプロットしてみ

Polymer	native	p-Lys	PDMA PAA-Q	3,3-	6,4-	6,10-
β	0.69	0.81	0.90	0.82	0.71	0.8 4

Table 1:アクチンゲルの運動における直進性β。



Figure 1:アクチンゲルの運動速度と軸比の相関

るとFigure 1のように、軸比が大きい(コンプレクスが細長い)程、運動速度が向上する ことが明らかになった。

ー本のNativeアクチンはアクチン分子が協同的に運動するため同じ方向に駆動力を生 じる。しかし、Nativeアクチンの集合体であるアクチンコンプレクスでは構成するアクチ ンフィラメント同士が互いに独立しているので、それ<u>ぞれのかず、ラメントの部分生じ</u>る駆 動力の向きが揃っていないと考えられる。したがって軸地が本点しつンのぷっ(423)はフィ ラメントの本数が少ないためこの影響をあまり受けずに速度は大きくなり、軸比の小さ いコンプレクスはフィラメ かながななが多いために運動介留書され、その結果運動速度 が小さくなると考えられる

(II) 透過型電子顕微鏡による ミオシン上を運動する7



Figure 2:HMM を修飾したアクチンコンプレクス

の極性である。そこでポリカチオンを導入したアクチンコンプレクスの極性を調べるために、ミオシンのアクチン結合部(HMM)で修飾した後、透過型電子顕微鏡観察を行った(Figure 2)。その結果全てのコンプレクス内のアクチンフィラメントで極性の向きを示す矢じり構造(Arrowhead structure)が観察された。これらの写真から、一本のアクチンフィラメントはすべて極性が揃っていることが分かり、さらにコンプレクスを形成するフィラメント同士の極性は揃っているとは限らないことが明らかになった。そこでアクチンコンプレクスの極性をファイバー内における個々のアクチンフィラメントの極性から評価した。その結果がTable 2である。ここからioneneを導入した場合は極性が比較的低い値を示しているのに対して、PDMAPAA-Qとp-Lysを導入した場合では高い値を示し、アクチンフィラメントの極性がほとんど揃っていることが明らかになった。

この極性の割合と運動性の相関を調べるために極性の割合に対して運動速度をプロットしたものをFigure 3に示した。このグラフより、極性の割合が高いほど運動速度が大きくなる傾向が見られた。

以上の結果から、主鎖に電荷を持つポリカチオンによるアクチンコンプレクスは極性 がそろっている割合が小さいために低い運

動速度を示すが、側鎖型ポリカチオンによる コンプレクスは極性が揃っているためネイ ティブアクチンと比べても高い運動性を示 すことが明らかになった。このことは、アク チンゲル中において沢山のアクチンフィラ メントが同じ方向に運動することにより、 「創発」が起こっていることを示唆する。



Figure 3:アクチンゲルの運動速度と極性 の相関。

(III) ポリカチオンと塩による巨大アクチンコンプレクスの構造制御

上記の研究で、我々は筋肉タンパクであるアクチンがp-Lysなどのポリカチオンとの静 電的相互作用により巨大アクチンコンプレクスを形成することを発見し、カチオン種に よってその形状が異なることも明らかにした。そしてコンプレクスを化学架橋すると長

さ数十µmにおよぶ巨大アクチンゲルが得 られた。このアクチンゲルはミオシン上で Nativeのアクチンに比べより速く、直線的 に運動することがわかった。これは、筋肉 タンパクの再構築過程を制御することで、 様々な集合体構造を作り出すことにより、 筋肉タンパクゲルの運動特性を制御でき ることを示唆している。本項では、コンプ レクス形成におけるポリカチオンと塩の 濃度を変化させることでアクチンとポリ カチオンの静電相互作用をコントロール し、それによるアクチンコンプレクスの構 造制御を試みた。

結果、同一のポリカチオンでもポリカチ オン濃度、塩濃度の条件によってコンプレ クスの形態に多様性が見られた。Figure 4 は種々のポリカチオン濃度(Cp)とKCl濃度



Figure 4:ポリカチオン濃度と塩濃度による アクチンコンプレクスの相図。

 (C_s) におけるコンプレクスの相図である。ここで見られるようにコンプレクスの形態には 5種類の相が存在する。 ポリカチオンの濃度が低い時には native の状態(I)であるが、 ある濃度においてコンプレクスが形成し始め native とコンプレクスが同時に存在する共 存状態(II)となる。さらにカチオン濃度が上昇すると全体がコンプレクス状態になる。そ のカチオン濃度以上で C_P と C_s が低い時にはネットワーク状態 (III)、そして C_P と C_s が 高くなるにつれ branch 状態(IV),バンドル状態(V)を取る。また,さらに C_P と C_s が高くな るとアクチンが電荷反転によって正電荷になり、コンプレクスを作れなくなることから native 状態(I*)になる。このようにコンプレクスの形態はアクチン間の反発力とポリカチ オンによる結合力のバランスによってコントロールすることが可能である。

C_Pによるコンプレクスの長さ・太さの変化を調べると最初の臨界濃度でその長さ、太さの成長は同時に起こるがその後、C_Pの増加

この成長は同時に起こるがその後、Cpの増加 によって長さは減少する。その間太さは一定 に維持されるが、Cp=0.01Mを超えるとさらに 太さ方向へ成長する。それに対し、多様な塩 濃度の条件では長さ、太さ両方ともにCsの増 加によって成長する。この結果はアクチンコ ンプレクスの構造がCpとCs、すなわち溶液全 体のイオン強度に強く依存していることを示 唆する(Figure 5)。

以上よりアクチンとポリカチオンのコンプ レクスの長さや太さはそれぞれ異なる要素、 具体的に長さは核の数によって、太さは反発 力と結合力のバランスによって決められるこ とが示唆される。このようにしてアクチンと ポリカチオンのコンプレクスを基にしたバイ オマシンの構造や大きさは静電気的相互作用 の変化で調節が可能である。



Figure 5:アクチンコンプレクスの太 さとイオン強度の相関。

(IV) アクチンとポリカチオンによる巨大アクチンコンプレクスの形成モデル考察

前項までに筋肉タンパクであるアクチンがカチオン性高分子との静電的相互作用により アクチンバンドルを形成することを発見している。本項ではアクチンがこのような集合体 を作るメカニズムを解明するために透過型電子顕微鏡等を用いて集合体の形成過程と成長 を系統的に調べた。その実験結果からアクチンバンドルの成長に関して以下の三つの傾向 が見られた。

1) バンドル形成では成長初期段階において太さ成長がほぼ完了し、太さが成長しきった 後に長さが大きくなる。

2) バンドル形成においてアクチン濃度が増加するとその長さは大きくなる、一方太さは アクチン濃度に拠らずほぼ一定である。

3) バンドルの太さはアクチンとポリカチオンの相互作用力が強くなるに従い減少する。 これらの結果から我々は、アクチンバンドルの成長は核形成過程と成長過程という二つの過程から成り、核形成(バンドル成長初期) 過程では太さ成長が主導的であるが成長過程では長さ成長が主導的であるという異方的核形成及び成長モデルを提案した。

このモデルからアクチンバンドルの 太さは臨界核の太さによって、長さは核 濃度とアクチン濃度の比によって決ま ることが予測した。Figure 6 はアクチン バンドル中における p-Lys の分布を蛍光 標識によって可視化した様子を示して いる。この結果からアクチンバンドル中 ではポリカチオンが一箇所に局在化し ていることが分かり上記した核形成-成



Figure 6:アクチンバンドル中の p-Lys 分布像 abアクチンのみ; b)p-Lys のみ; c)重ね合わせ。

長モデルに基づいてアクチンがバンドル化していることが示唆される。

(V)三次元透過型電子顕微鏡法による巨大アクチンコンプレクスの三次元構造観察

前項までにポリカチオンと塩の濃度条 件によるアクチンコンプレクスの構造 の違いを透過型電子顕微鏡(TEM)によ る観察から検討したが、TEM像から評 価できる構造は二次元的なものである。 上記で提案したモデルに従うと、コン プレクスは円柱状アクチンバンドルを 形成していると考えられる。本項では アクチンコンプレクスを三次元透過型 電子顕微鏡法 (Transmission electron micro- tomography: TEMT)を用いて観 察することで、その三次元構造を検証 した。結果、TEMT観察からコンプレク スは形成させる条件を変化させること によりその断面構造は大きく違うこと が分かった。具体的には、PDMAPAA-Q により形成されたアクチンコンプレクス では低い塩濃度(0.01M)の時はポリカチオ ン濃度によらずアクチンフィラメントが 単層で並ぶ扁平状のバンドルが形成され (Figure 7)、高い塩濃度(0.3M)になるとアク チンフィラメントがヘキサゴナルにパッ キングした円柱状のバンドルが形成され る(Figure 8)。前項の二次元TEM観察結果 とあわせて考察すると、低い塩濃度の時



Figure 8: 高塩濃度における PDMAPAA-Q-アクチ ンコンプレクスの三次元像。 左:TEMT 像、右:模式図。スケールバー: 50nm

はポリカチオン濃度の増加によってコンプレクスは太さ方向に成長するが、その成長はあ くまで二次元シートを形成するかのごとく平面的なものであり、塩濃度の増加に伴う太さ 方向の成長は、等方的な三次元成長であることが分かる。これはアクチンフィラメントに おける異方的な静電反発に起因するものであると考えられる。二本のアクチンフィラメン トが束を形成した場合を考えると、アクチンフィラメントが細長い棒であるため、その束 は帯電した長方形状の平面であると仮定できる。そのため、アクチンの束へもう一本のア クチンフィラメントが結合する際には束の側面方向(Figure 9(a))からの静電反発の方が束の 表面方向(Figure 9(b))のそれよりも小さい、よってアクチンフィラメントは束の側面方向へ 優先的に結合し、結果扁平状のアクチンバンドルを形成すると考えられる。一方塩濃度が 上昇した場合には、デバイ長の減少が起こるためアクチンフィラメントの静電反発が遮蔽 される。結果、アクチン束の表面方向・側面方向の静電反発力に差が無くなり、そのため にアクチンフィラメントは電荷反発による効果に影響されず、熱力学的に一番安定なへキ サゴナルなパッキングをもつ束を形成できると考えられる。

以上の三次元観察結果は PDMAPAA-Q添加により形成された アクチンバンドルであるがポリマー 種がp-Lysに変わるとPDMAPAA-Qの 場合に扁平なバンドルを形成する条件で三角形の断面を持つバンドルが 観察された(Figure 10)。さらにp-Lysの 鎖長を変化させて、アクチンとの静電 相互作用力を変化させても太さは静 電相互作用力と反比例するが。高さ方



Figure 10: 低塩濃度における p-Lys-アクチン コンプレクスの三次元像。 左:TEMT 像、右:模式図。スケールバー: 50nm

向の成長は影響を受けず。三角形の断面も保たれた。この結果からアクチンとポリカチオンの静電的相互作用力だけでなく、カチオン種によるアクチンに対する特異的相互作用力(カチオンに対するアクチン上の特異的相互作用部位の存在、疎水性相互作用力等)の大きさの違いも形成されるバンドルの三次元構造に影響を及ぼすことが示唆される。

TEMT観察から発見したこのようなアクチンバンドルの異方的な断面構造は、核形成-成 長モデルでは予測できていなかったものであり、今後理論モデルを更に修正していく必要 である。

(VI)コンプレクス形成モデルに習った巨大アクチンコンプレクスの極性制御

前項までにアクチンバンドルの構造はアクチンとポリカチオンからなる核によって決ま り、核はアクチンとポリカチオンの静電相互作用力、及びポリカチオンの種類によってそ の形状が左右されることが分かっている。このことから(II)項で述べたアクチンバンドルの 極性と成長の初期段階における核形成過程との関係性が示唆される。本項では上記の関係 性をアクチンに導入するポリカチオンの分子量を変化させることで検討した。

その結果アクチンバンドルを形成す る際のポリカチオンの臨界濃度と極性 に比例関係が見られた(Figure 11)。この 結果からアクチンとポリカチオンの結 合力とコンプレクスの極性に相関性が あることが分かり、アクチンコンプレク スの極性はアクチンとポリカチオンの 相互作用力の強弱により決められるこ とが示唆された。さらにポリカチオンの 鎖長が伸びるということは、ポリカチオ ン鎖一本単位で考えた際にアクチンに 対して相互作用するポリカチオン鎖の 量が減少することも意味する。他の研究 において細胞内に存在するアクチン束 化タンパクであるファスチンによるア クチンバンドル形成においては、アクチ ンに対するファスチンの量が少ないほ どより一方向に配向したアクチンバン



Figure 11:コンプレクス形成における結合定 数と極性の相関。

ドルが形成されるという報告がある(Stokes, DL. et. al. Biophys. J. 1991; 59; 456)。Figure 11 は、これと同じような現象がアクチンフィラメント-ポリカチオンによるアクチンバンドル 形成にも起こった結果であることが示唆される。

以下では(II)項で極性を検討した異種ポリカチオンによるコンプレクスについて考える。 Figure 3 のように PDMAPAA-Q, p-Lys といったカチオン性高分子で作られたアクチンバン ドルでは極性が高く、x,y-ionene といったカチオン性高分子で作られたアクチンバンドルは 極性が低い。今までの研究で PDMAPAA-Q, p-Lys とアクチンのコンプレクスでは、ionene とアクチンのコンプレクスに比ベコンプレクス形成における協同性が高いことが分かって いる。反応の協同性の大きさは相互作用の特異性に依存すると考えられるため、アクチン コンプレクスの極性はアクチンとポリカチオンの相互作用における特異性の強さに比例し て大きくなることがこの結果から示唆される。事実 ionene ポリマーは PDMAPAA-Q, p-Lys と比べアルキル鎖部分が多く疎水性が大きいため、アクチンとの相互作用における特異性 が比較的低いことが示唆される。

(VII) コンプレクス形成モデルに習ったアクチンコンプレクスの巨大ネットワーク化

前項(IV)においてアクチンとカチオン性高分子の複合体形成の核生成・成長機構を明ら かにした。本項ではこの知見を元にアクチンを、カチオン性高分子である PDMAPAA-Q と濃度勾配を用い相互拡散により混合し、アクチンとポリカチオンから形成されたコン プレクスの核を局所的に発生させることで、コンプレクスの成長の巨大化を試みた。上



Figure 12:カチオンポリマー含有ゲル表面における巨大アクチンネットワーク形成。

記のコンセプトに従い、マイクロチャネルの双方向からアクチンフィラメント溶液、及び PDMAPAA-Q 溶液を拡散することでアクチンの三次元ネットワーク形成が見られた。 そのネットワーク形成ではアクチンとポリカチオンが接する界面で核と思われるコンプ レクスが形成され、その後そこにアクチンフィラメントが結合して巨大化し、ネットワ ークを形成していくという様子が観察され、核形成モデルを支持するものであった。さ らにアクチン三次元巨大ネットワークの形成はマイクロチャネルを利用した相互拡散系 のみならず、カチオンポリマーを含有した中性ゲル上からのポリカチオンのアクチンフ ィラメント溶液への拡散によっても成功している(Figure 12)。

蛍光顕微鏡・透過型電子顕微鏡によってネットワークの構造を評価した結果、ネット ワークを構成するアクチンバンドルの太さはポリカチオン濃度には依存せず、溶液の塩 濃度増加に依存して大きくなることが分かった。この結果は単純混合系における結果と 同様である。ネットワークのメッシュサイズをの大きさはポリカチオン濃度に反比例す ることから、ポリカチオン濃度が多いほど沢山のアクチンとポリカチオンによる核が形 成される結果メッシュサイズが減少することが分かる。一方をは塩濃度増加に応じて大 きくなることから、塩濃度の増加によってアクチンとポリカチオンの相互作用が遮蔽さ れ、核の数が減少する結果メッシュサイズが増加するということが示唆される。またア クチンネットワークは主に枝分かれの無いアクチンバンドルから形成されることから長 く成長したアクチンバンドルの絡み合いによってネットワークが形成されていることが 分かる。これらの結果からマイクロチャネル等による溶液拡散を用いてアクチンコンプ レクスの形成を時空間的に制御することでコンプレクスの構造をコントロールすること が可能であることが示唆される。

中性ゲルからのポリカチオン拡散により得られた巨大アクチンネットワークの物性を 原子間力顕微鏡(AFM)を用いることで評価した。アクチンネットワークの弾性率は AFM のプローブであるカンチレバーに直径 100μm のポリスチレンビーズをつけたものでネ ットワークを押し込み、その応力と変形量の関係を Hertz model にしたがってフィッティ ングすることで評価した。その結果ネットワークの弾性率はポリカチオン濃度の増加に 依存して大きくなり、一方塩濃度変化には依存せず一定の値を示すことがわかった。 またネットワークの弾性はそのメッシュサイズ ξ とネットワークを構成するアクチン バンドルの太さ D に依存すると考えられるため、二つの要素を考慮してネットワークの 弾性率 E との関係を見たところ、弾性率 E とメッシュサイズ ξ を掛け合わせた値とバン ドル太さ D に比例関係が見られた(Figure 13)。この結果から、アクチンバンドルの太さが

小さい時はアクチンとポリカチオン の相互作用力が比較的強く、バンドル 内でアクチンフィラメントが密にパ ッキングしていると考えられるため バンドル太さ増加によるネットワー ク弾性率の増加が大きくなり、バンド ルの太さが増加した状態ではアクチ ンとポリカチオンの相互作用力が弱 まりバンドルのパッキングが疎にな るために、バンドル太さとネットワー ク弾性率の相関が弱くなることがそ れぞれ示唆される。

以上の様に生体内に比べ遥かに希 薄なアクチン溶液中で、非対称的拡散 場を用いることにより機械的に安定 な強度を持つ巨大ネットワークを得 ることに成功した。



Figure 13:アクチンネットワークの構造と強度の関係。

(Ⅶ)光異性化ポリマーを用いたアクチンコンプレクス形成の時間制御

前項においてアクチンポリカチオンとの濃度勾配形成によってコンプレクス形成を時 空間的にコントロールできることが示唆された。本項ではコンプレクス形成の時間的コ ントロールを光異性化によるポリカチオンの生成によって行うことを試みた。具体的に はアクチン溶液中において、光イオン化分子である 4-vinyl- triarylmethane leucohydroxide (Leuco hydroxide)を含む高分子への光照射を行うことで、アクチンのコンプレクス化を時 間的にコントロールすることを試みた。

Leuco hydroxide は、4-bromostyrene、Michler's ketone から Grignard 反応により合成した(Masahiro Irie and Dawan Kuntchankun, Macromol.1986,19,2476-2480)。 光照射前の Leuco hydroxide は水に対して難溶であるため、親水性で あるカチオン性モノマーN,N-dimethyl- aminoprorylacrylamide quaternaly (DMAPAA-Q) をラジカ ル共重合することで光応答性ポリカチオン poly(Leucohydroxide-co-DMAPAA-Q)を得た。この polv(Leucohydroxide-co-DMAPAA-O)溶液は 277nm と 618nm に吸収をもち、その 277nm 付近の波長 (254nm)を照射したところ、時間とともに 618nm の 吸収は増加することが分かった。その増加は約 60 分後に飽和に達する。またこの反応は可逆的であり、 光を遮ることにより 618nm の吸光度は減少し、照 射前の値に戻る。さらに、pH 測定をおこなったと ころ照射時間とともに照射前 pH6.5 から照射後 pH7.1 へと変化することが分かった。その pH 変化 のプロファイルは 618nm の吸収変化挙動と似てお り、60分後には飽和に達する。この結果は Leuco



Figure 14:光によるアクチンの集 合体形成; (a) 光 (254nm) 照射前、 (b) 光照射 30 分後。

hydroxide の OH 基の解離を意味し、ポリマー鎖のカチオン生成を示唆するものである。 次に、アクチン溶液 (5×10⁻³ mg/ml) に光応答性ポリカチオンをアクチン/ポリマー= 1.0 g/g で混合し UV (250~420nm)を 30min 照射した。Figure 14 に UV 照射前(a)と 30 分 照射後(b)の蛍光顕微鏡写真を示した。UV 照射によってアクチンが巨大なバンドル状の アクチンコンプレックスを形成している様子が見られる。このコンプレックスの最大長 は 20µm であり、照射前の 10 倍となった。さらに、この集合体形成は可逆的におこり、 光を遮断すると集合体の崩壊がみられる。このように UV でイオン化する光応答性ポリ カチオンを用いることでアクチン自己組織化を時間的に制御することに成功した。

(IX)人工脂質二重膜を用いたアクチンコンプレクス形成の空間制御

前項では光照射によりカチオンポリマーの生成 をコントロールすることでアクチンコンプレクス 形成を時間的に制御した。一方生体内を見つめると アクチンはその結合タンパクと細胞膜中に包まれ ていて、空間的に制限がある状態でアクチンの構造 体形成が行われる。本項ではアクチンコンプレクス 形成を細胞膜モデルである脂質二重膜(リポソー ム)内で行うことコンプレクス形成における空間制 限の効果を検討する。さらに限られた空間でコンプ レクス形成をさせることで、自己組織化による力を 取り出しその力により運動を発現するいわば人工 細胞を創製することも本実験の目的の一つとなる。 具体的な実験としてはリポソーム内部に水和法



Figure 15:リポソーム内における アクチンコンプレクスの蛍光像 (スケールバー:10μm)。

を用いてG-アクチンおよびカチオン性ビニルモノマーDMAPAA-Qを重合開始剤と封入 した。アクチンの集合体形成を波長 325nmのUV照射で生成するポリカチオンを介し誘 起させた。Figure 15 はUVを 30 分照射した後のアクチン内包リポソームの蛍光顕微鏡像 である。リポソームの直径が約 10 µ mのリポソーム内でアクチンバンドルが 3 次元的に ネットワークを形成しているのが確認できる (UV照射前にはこのようなネットワーク 形成は確認されない)。さらに直径が約 5 µ mのリポソームではリング状のアクチンコン プレックス形成が観察され、5 µ m以下のリポソームでは、アクチンの集合体形成に伴う 脂質膜の変形が確認される。

このようにアクチンコンプレクスの形成はリポソームのサイズに強く依存することが わかった。アクチンとリポソームという少数の構成単位から成るこの人工細胞はアクチ ンネットワークの構築が光により時空間的に制御されている点から細胞形態形成の動的 挙動におけるアクチンやリポソームの動的挙動を解析していくのに非常に有用なモデル ともなる。

(X)新規アクチュエータへの応用を目指したタンパク質自己組織化による微小管の束化

(a)

前項まででは分子機械"アクチン・ミオシン"を利用した運動素子の開発を目指して きた。アクチンはカチオン性高分子を導入することで比較的極性の揃った集合体を形成 し、さらにそれらがモータータンパク"ミオシン"との相互作用により約1µm/secの速 さで運動することがわかっている。しかし、ミオシンモーターの逐次前進性(プロセッ シビティ)が低いことや最大発生力が1pN程度とそれ程大きくないことから、その動 力機能をいかに利用するかが大きな課題であった。そこで、我々は高出力でかつ高いプ

ロセッシビティを有する分子機械"微 小管・キネシン系"に着目した。本項 では、これらの分子機械を in vitro で 秩序立てて再構築することでより実 用可能なATP駆動型アクチュエー ターの創成を目指す。

運動性の高い微小管の集合体を形 成するために、微小管の高い剛直性を 活かし、基板に固定したキネシンモー (b)



Figure 16: キネシン上における微小管の動的自己 組織化; (a) ATP 添加直後、(b) 8 時間経過後。

ターの上を微小管が滑り運動している中で、巨大化させて集合体形成させるという方法 をとった。微小管を結合させる方法としてはタンパク質の特異的な相互作用力を利用し た。具体的には微小管にタンパク質ビオチンを修飾し、微小管同士を結合させる接着剤 としてビオチンと特異的に結合する四つのサイトを持つストレプトアビジンをキネシン 上で運動させた状態で添加することでより方向性の揃った微小管束の形成を試みた。そ の結果微小管が滑り運動をする過程で、微小管同士が結合して巨大化する様子が観察さ れた(Figure 16(b))。このような動的な系での集合体形成により、開始前よりも数倍大きい 微小管集合体が観察された。さらにこの集合体が運動能を維持していることからその極 性が揃っていることが示唆された。一方で、直線形の集合体に加え、リングを形成する ものも見られた。リングの直径は数 μm のものから最大で数+μm であった。直線状に比 ベ、リング状の集合体は、同位置で運動を続けるため、直線状集合体よりも長時間の運 動性を示した。このように微小管-キネシンをもちいることでアクチン-ミオシン系とは異 なる特色を持つ新規アクチュエータの創製に成功した。

(XI)アクチンコンプレクス形成モデルに習った巨大微小管ネットワーク形成

前項において微小管を動的な条件化で結合させることで、方向性の揃った微小管束の 形成に成功した。本項では微小管により更なる高次の階層構造を作成することを目的に、 アクチン系で理解され、用いた原理を元にポリカチオン-微小管相互拡散によって微小管 の巨大ネットワーク化を試みた。まずネイティブの微小管の蛍光顕微鏡写真を Figure 17(a)に示す。マイクロチャネルを用いてこの微小管とポリカチオンを相互拡散により相 互作用させることで数 mm に及ぶ等方的な三次元ネットワークの構築に成功した。さら に微小管にタンパク質ビオチンを修飾し、これを特異的に相互作用するタンパクストレ

プトアビジンと相互拡散で混合す ることで同様の現象が確認された (Figure 17(b))。さらにネットワーク 内に微小管と相補的に作用するモ ータータンパク - キネシン-を導入 することでネットワークが一方向 に配向することもわかった。また そこへ化学エネルギーである ATP を導入するとネットワークが配向 方向にすべり運動を発現した。こ れはネットワークがある極性をも って再構築されていることを示す ものである。



Figure 17: 巨大ネットワークの蛍光顕微鏡写真 (a)微小管のみ (b) ストレプトアビジンの拡散と キネシンの運動により配向したネットワーク。 (スケールバー:10 μ m)

(2) 得られた研究成果より今後期待される効果

本研究の特色、及び独創的な点は分子機械であるミオシン・アクチン、または微小管・ キネシンを自己組織化させると同時に化学架橋して化学的・機械的・熱的に安定なゲル 構造を形成することによって人工ソフトナノマシンを創製するところにある。このよう にタンパク質特有の酵素活性を生かしながら人工的に再構築したソフトナノマシンを作 る発想はこれまでに例がなく、世界で始めてである。

またアクチン-ミオシンの収縮運動が主な駆動力となる筋収縮の研究は、阪大の柳田ら による光マニュピレータなどを用いた1分子レベルからのアプローチかまたは生理学的 な手法を用いた巨視的レベルからのアプローチが殆どである。本研究のようなメゾスコ ピックスケールのゲルマシンについての研究はその中間をつなぎ、これまでに筋肉で未 解決の問題である分子モーターによる滑り運動の機構、階層構造の役割、収縮の協同性 などを新しい視点から解決できる。 今回の課題はさきがけ研究からの継続課題であり、その研究課題からの発展として挙 げられる大きな成果としては、まず(1)-(I・Ⅱ・VI)項にあるようなアクチンコンプレク スの構造その運動特製の相関、およびコンプレクスの運動において大事な要素である極 性を決定付ける要素の解明である。この成果は今後アクチン-ミオシン系のバイオマシン の機能化に大きく寄与すると考えられる。

また(1)- (VII)項で挙げたように筋肉に匹敵するような高次の構造を持つmmオーダーの 巨大構造体を作成に成功した。この結果により応用が期待されるオーダーがより大きく なった。さらにその自己組織化を(1)- (VII・IX)項にあるような手法を用いて時空間制御す ることで自己組織化による力を取り出すことが可能となり、当初に挙げていた「ATP 駆 動型ナノバイオマシン」といったコンセプトとは違う新たな機軸での運動素子作成が期 待される。またその過程で得られる自己組織体の形成過程とその物性を比較することで、 細胞を始めとする生命体が何故ある決まった構造を形成しうるか、同調して動けるか等 の今までに未踏であった疑問に迫っていける。

またアクチンバンドルの構造形成と静電的相互作用力の関係についての研究((1)-(III・IV・V))は人工バイオマシンの設計指針になるという要素のみならず、細胞を始め とする生体内でアクチンを始めとする剛直性を持つ高分子(DNA 等)がなぜ一定の高次構 造を取りうるのかといった課題に対する答えにもなる。このように本研究は人工ソフト ナノマシンの創製という目標に根ざしているがその研究課題から得られる成果より学術 的に非常に重要な知見が与えられる。このような観点からも本研究課題の重要性がわか る。

さらに今回の研究課題においては、今まで用いてこなかった筋肉系で扱われるものと は違う分子モーターである微小管・キネシンを用いて新規人工ソフトアクチュエーター の創製を目指した((1)-(X)項)。微小管は筋肉系分子モーターに比べ逐次前進性、発生力 及び連続駆動時間が大きいことから、今までと違った利点を持つ運動素子の創製への可 能性をひらいてくれる。今回達成した微小管の動的自己組織化により、その力の集積が 期待される。そして(1)-(XI)項ではアクチン系と同じ原理で巨大ネットワーク形成に成 功している。さらにキネシン導入によりネットワーク配向方向への微小管滑り運動も観 察されていることから非対称拡散という手法を用いて形成させたネットワークの極性が



Figure 18:.本運動素子の応用予想図。

一方向に揃っていることを示している。この理由・及びネットワーク配向の原理を解明 することでバイオマシンの更なる機能化、及び生体内におけるアクチンバンドル極性の 生成原理に迫っていける。

本研究完成の暁には、これまで実現されたことのないATPエネルギーで駆動する人 エソフトマシンを創製することができ、生体適応性ソフトマニュピレータやソフトアク チュエータの応用が可能となる。これらの成果はナノバイオニクス産業への発展に画期 的な材料革命となり得る可能性を秘めている。また生物が本来備えている運動能力をも ったゲル運動素子は生体適応性・環境応答性・無公害などの特長を有しており、ナノサ イズの運動素子としてだけではなく現在用いられているエンジンのような発電装置に取って代わることで、医学・福祉・環境といった、21世紀に向けて国家的規模で取り組むべき科学技術の発展に貢献することができ、新しい視点から革新的に科学技術を開拓する契機となる可能性を持っている。Figure 18に示すように本研究で得られる運動素子は nm~m 間での応用可能性を秘めており、今後本研究を実用化に繋げることで新規材料革命を引き起こすことが出来るほどのポテンシャルを持っていると考えられる。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

今までに本研究は Advanced Material 誌に発表されてから、直ちに Nature 誌の Science Update に紹介され、大きな注目を集めた("Artificial Muscle made from natural Building Blocks", Nature, 16, Aug. 2002)。その他にも、研究成果は Biomacromolecules 誌等の学術 雑誌にも発表され、この研究に対するインパクトと将来への期待は大きく高まっている と言える。本研究のように分子モーターを新規構造体に組み上げて高機能を持つ運動単 体に組み上げるという研究は国内外で殆ど例がない。一方、本研究の成果を十二分に生 かせるであろう人工筋肉の分野は国内外でその開発が期待され、巨額の予算がつぎ込ま れているという現状である。本研究課題で得られたような人工ソフトナノマシンは人工 筋肉開発分野における大きなブレイクスルーと成りえると考えられ、非常に重要な研究 分野として今後発展していくことが期待される。

- 6. 研究実施体制
- (1)体制

龔 剣萍グループ (北大院理)

研究実施項目: ATP駆動型ソフト&ウェット運動素子の開発と応用

- 概要:ATPで駆動するソフト&ウェット運動素子を構築することを目的とする。本研 究では、次の課題を実現する。
 - 1) アクチン・ミオシン系
 - 1-1. 筋肉タンパクの再構築過程を制御し、様々な集合体構造を作り出すとと もに、構造と筋肉タンパクゲルの運動特性の相関を解明する
 - 1-2. アクチンファイバーゲルの一次元及び二次元自己組織化を制御し、運動 制御可能なゲル運動素子の設計・作製をする
 - 2) アクチン系
 - 2-1. アクチンファイバーの三次元自己組織化を利用したゾルーゲル変換型運動素子の設計・作製
 - 3) 微小管-キネシン系
 - 3-1. 微小管・キネシンの間に発生する駆動力を統合し、新規アクチュエーター の創製および生物における運動機構の新たな側面からの解明を行う
- (2)メンバー表

研究グループ名: 龔 剣萍 グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期	備考
----	----	----	----------	------	----

龔 剣萍	北大院理	教授	全般	H16,11~H19,3	
角五彰	北大院理	助手	アクチン・ミオシン運動系	H16,11~H19,3	
敷中一洋	北大院理	大学院生	アクチン・ミオシン運動系	H16,11~H19,3	
權 赫準	北大院理	大学院生	アクチン運動系	H16,11~H18,9	H18,9 離脱
川村隆三	北大院理	大学院生	微小管・キネシン運動系	H18.4~H19,3	
三栖真奈美	北大院理	大学院生	アクチン運動系	H17,4~H19,3	
浦剛博	北大院理	大学院生	アクチン運動系	H16,11~H17,3	H17,3 離脱

7. 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2005/10/15- 18	GelSympo 2005	北海道大学	158	北海道大学21世紀CO Eプログラムと共催

(2)招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

8. 発展研究による主な研究成果

(1)論文発表(英文論文 10 件 邦文論文 1 件)

(1) Akira Kakugo, Shin Sugimoto, Kazuhiro Shikinaka, Jian Ping Gong, Yoshihito Osada, "Characteristics of Chemically Cross-linked Myosin Gels", *J. Biomaterials Science Polymer*, 16, 203-218 (2005).

 \bigcirc (2) Akira Kakugo, Kazuhiro Shikinaka, Nozomi Takekawa, Shin Sugimoto, Jian

Ping Gong, Yoshihito Osada, "Polarity and Motility of Large Polymer-Actin Complexes", *Biomacromolecules*, 6, 845-849 (2005).

(3) Kazuhiro Shikinaka, Akira Kakugo, Jian Ping Gong, Yoshihito Osada, "Nano-Gel Machine Reconstructed from Muscle Protein", *e-J. Sur. Sci. Nanotech*, 3, 51-54 (2005).

(4) Hyuckjoon Kwon, Akira Kakugo, Kazuhiro Shikinaka, Yoshihito Osada, Jian
 Ping Gong, "The morphology of actin assemblies in response to polycations and salts",
 Biomacromolecules, 6(6), 3005-3009 (2005).

(5) Akira Kakugo, Kazuhiro Shikinaka, Jian Ping Gong, Yoshihito Osada, "Gel machines constructed from chemically cross-linked actins and myosins", *Polymer*, 46, 7759-7770 (2005).

(6) 敷中一洋、角五彰、龔剣萍、長田義仁、「筋肉タンパク質によるゲルバイオマシンの創 製」、現代化学、九月号、58-64 (2005).

 \bigcirc (7) Hyuck Joon Kwon, Yoshimi Tanaka, Akira Kakugo, Kazuhiro Shikinaka, Hidemitsu Furukawa, Yoshihito Osada, and Jian Ping Gong, "Anisotropic Nucleation Growth of Actin Bundle: A Model for Determining the Well-Defined Thickness of Bundles" *Biochemistry*, 45(34), 10313 – 10318 (2006).

(8) Hyuck Joon Kwon, Kazuhiro Shikinaka, Akira Kakugo, Hidemitsu Furukawa, Yoshihito Osada and Jian Ping Gong, "Growth and Morphology of Polymer-Actin Complexes" *Chinese Journal of Polymer Science*, 25(1), 47-55(2007).

○(9) Hyuck Joon Kwon, Kazuhiro Shikinaka, Akira Kakugo, Hidemitsu Furukawa,
 Yoshihito Osada, Jian Ping Gong, "Motility and Structural Polymorphism of
 Polymer-Actin Complex Gel" J. Nanosci. Nanotechnol. 7(3), 844-847 (2007).

(10) Hyuck Joon Kwon, Kazuhiro Shikinaka, Akira Kakugo, Jian Ping Gong, Yoshihito Osada, "Gel biomachine based on muscle proteins" *Polymer Bulletin*, 58(1), 43-52 (2007).

 \bigcirc (11) Hyuck Joon Kwon, Akira Kakugo, Takehiro Ura, Takaharu Okajima, Yoshimi Tanaka, Hidemitsu Furukawa, Yoshihito Osada, Jian Ping Gong, "Actin network formation by uni-directional polycation diffusion" *Langmuir*; in press.

(2)ロ頭発表
①学会
国内 16 件, 海外 13 件
②その他
国内 3 件, 海外 2 件
(3)特許出願(本研究に係わり、JST から出願したものとで研究機関から出願したもの) 無し

(4)その他特記事項

9. 結び

研究実施概要において、研究目標として既存のアクチンから成る人工運動素子の高次構 造化・スケールアップ化・構造制御の三つを挙げた。高次構造化・スケールアップはアク チンとポリカチオンの相互拡散を使用して、構造制御はアクチンに導入するポリカチオン 種・濃度、及び塩濃度のコントロールによりそれぞれ達成した。さらにアプリケーション としての発展を目指した光異性化カチオンポリマーを利用した構造体形成の時間制御、及 びコンプレクス形成の空間制御による自己組織化推進力の取り出しを試みた。そして当初 の構想には存在しなかった異種の分子モーターの動力を集積した運動素子の作成も達成し ている。得られた成果は生物が持つ分子モーターから既存の石油エンジンとは全く異なる 化学エンジンの創製に繋がるということや、得られた集合体構造の組み合わせ・作成条件 依存性を検討することで、生体内においてアクチンを始めとする剛直性を持つ高分子(DNA 等)がなぜ一定の高次構造を取りうるのかといった課題に対する答えを与えてくれるとい う観点から非常に意義のあるものである。また本課題で得られた結果を基にして、今後は 本研究課題で得られた人工運動素子をマイクロファブリケーション等の技術と融合するこ とで化学エネルギーの力学エネルギーへの直接変換で駆動するような運動担体としての利 用が期待される。

さきがけ研究の継続として、SORST プロジェクトに採択していただき、本当にありがと うございました。本研究の推進にあたり、技術参事の田村亘様から多大の助言と支援を頂 きました。また、事務員の藤本恵子から手厚くサポートして頂きました。厚く御礼を申し 上げます。



本研究で購入したレーザーピンセットを用いて実験をして いる様子。