

PRESS RELEASE (2024/09/06)

タンパク質が吸着しない微小デバイスで生体ナノマシンの動きを操る ～ダブルポリマー処理したマイクロ流体デバイスが微小管の動きを高効率に制御～

ポイント

- ① 光で固まるレジン「NOA」を使って、簡便な方法でマイクロ流体デバイスを作成
- ② 2種類のポリマーでデバイス表面を処理、NOA表面へのタンパク質吸着を抑制する技術を開発
- ③ このデバイスを用いて、生体ナノマシンの動きを高効率に制御することに成功

概要

九州大学大学院芸術工学研究院の井上大介助教は、簡便な手法でマイクロ流体デバイスを作成し、その材料表面の改質を行うことで、効果的にタンパク質製ナノマシンの運動を制御することに成功しました。

繊維状タンパク質の微小管¹は、キネシンというモータータンパク質によって動く生体材料です。微小管は直径が髪の毛の約4000分の1という極小サイズでありながら、強力な力を生み出すため、生体ナノマシンとしてナノテクノロジーの分野で非常に注目されています。この特性を利用して、微小物質の輸送や感知、分離など、人間が製造する機械では実現できない機能を提供することが可能です。しかし、微小管はランダムな方向に動いてしまうため、これを技術応用するにはその動きを制御する必要があります。

これまで、微小管の動きを制御するためにマイクロ流体デバイスが使われてきましたが、その作成には高度な装置や技術が必要でした。今回の研究では、紫外線で固まるレジン（NOA）を用いることで、簡単にマイクロ流体デバイスを作成できる方法が開発されました。しかし、NOA製のマイクロ流体デバイスの表面には、微小管を動かすキネシンが非特異的に吸着してしまい、微小管が流路壁を登ってしまうため、その動きが流路形状により制御できない問題がありました。

そこで、NOAの表面を2種類のポリマーで不活化処理し、キネシンの吸着を防ぐ手法が導入されました。NOA表面の不活化処理により、微小管はデバイスの壁を登らず、流路に沿った動きをほぼ完全に制御できることが明らかになりました。この技術により、微小管を利用したナノテクノロジーの応用範囲がさらに広がると期待されます。また、今後はこの技術を使って、他の細胞や材料を制御する新たなデバイスの開発も視野に入れています。

本研究成果は、2024年9月4日(現地時間)にアメリカ化学会発行 Nano Letters 誌に掲載されました。

【研究の背景】

繊維状タンパク質である微小管は、キネシンモータータンパク質²を固定した基板の上で動く特殊な生体材料です(図 1 a,b)。微小管は全長数十ミクロン、直径 25 ナノメートル(人の髪の毛の 4000 分の 1 程度の太さ)という極小のサイズでありながら、強い力を発揮することから、以前から生体由来のナノマシンとしてナノテクノロジー分野における応用が期待されています。主な用途としては、微小物質の輸送や濃縮、分離、材料の微小変形を感知するセンサーなど、人間が作る機械ではできない仕事をさせることが可能です。

しかし、個々の微小管は好き勝手な方向に動いてしまうため(図 1 c)、これを制御する必要があります。そのため、マイクロ流体デバイスを用いて、デバイス内流路の幾何学形状により、微小管の動きを任意に制御する研究が 20 年ほど前から開発されています。これまでに、マイクロ流体デバイスを用いて、微小管の動きを制御することに成功した研究例は山のようにあります。しかし従来、デバイスを構築するには、特殊な微細加工設備やデバイスの元となる小型の鋳型を予め作成しておく必要があります。

【研究の内容と成果】

今回、井上助教は光硬化性レジン(Norland Optical Adhesive, NOA; Edmund)³を用いて、微小管の動きを制御するためのマイクロ流体デバイスを作成しました。NOA は紫外線(UV)を照射することで硬化するレジンで、光を部分的に透過させるフォトマスクを通して、NOA に UV 照射することで、マイクロ流体デバイスを僅か数分程度で作成することができます(図 2a)。今回使用したマイクロ流体デバイスは、扇状の部位と直線流路状部位から構成され、扇状部位の壁に沿って微小管が動き、直線状流路に誘導されるデザインになっています(図 2b)。このマイクロ流体デバイス底面のガラス基板にキネシンを固定し、微小管と ATP(燃料)を加えることで、微小管の運動を発現させています(図 2c,d)。しかし、NOA はマイクロ流体デバイスを簡便に作れる反面、微小管の動力であるキネシンが、NOA 製デバイスの流路壁にも吸着し、流路壁を微小管がよじ登ってしまうため、微小管の運動を制御できないことが分かりました(図 3)。実は、過去の類似研究でも、同様の問題が確認されており、NOA は微小管の運動制御には使えない材料として結論づけられていました(Clemmens, J. *et al.*, Langmuir 2003)。

今回の論文では、NOA の表面をポリエチレングリコール⁴と Pluronic F-127⁵というポリマーで不活化処理する技術を開発し(図 4)、この二つのポリマーを併用して用いることで、NOA 表面へのキネシンの吸着を抑制しました。それぞれのポリマーは以前からタンパク質との相互作用が弱いポリマーとして知られています。今回、ポリエチレングリコールは、チオール-エンクリック反応⁶という反応を利用して NOA 基板に共有結合しています。他方、Pluronic F-127 は分子内に疎水的なドメインを持ち、疎水的な相互作用により疎水的な性質を持つ NOA 表面に吸着させています。

不活化していない NOA で作成したデバイスでは、微小管の運動は全体の 10%程度しか制御できないのに対し、NOA 表面を不活化したデバイスでは、微小管は壁をよじ登らず、ほぼ 100%近い微小管が流路の形状に従って動くことが分かりました(図 3c, 図 5a-d)。また、不活化した NOA マイクロ流体デバイスでは、流路幅が 50 μm 以下の直線状流路で、微小管が高効率に濃縮されることが分かりました(図 5e-g)。この結果から、不活化した NOA 製マイクロ流体デバイスを用いることで、微小管の動きを高効率に誘導し、微小管に輸送させた微量物質を濃縮する技術としても応用できるかもしれません。

【今後の展開】

今回の成果により、NOA を使い、その表面の不活化処理を行うことで、非常に簡単に微小管の運動を制御できるようになりました。このことは、微小管/キネシンという特殊な生体動力材料を応用する可能性を広げると期待されます。また、本技術は微小管だけでなく、他の培養細胞の動きの制御への応用

や、今回用いたポリマー以外の材料で NOA 表面を修飾することで、より高次の機能を持つマイクロ流体デバイスを簡単に設計できるようになるかもしれません。

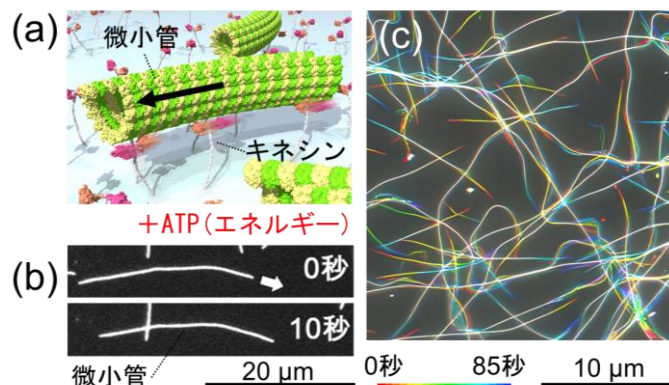


図 1. (a) キネシンで動く微小管の模式図と (b) その蛍光顕微鏡写真、(c) タイムオーバーレイ画像。微小管は蛍光色素で標識され、キネシンを固定したガラス基板上で並進運動する。図(c)中のカラーバーの色は顕微鏡動画の時間フレームを示す。

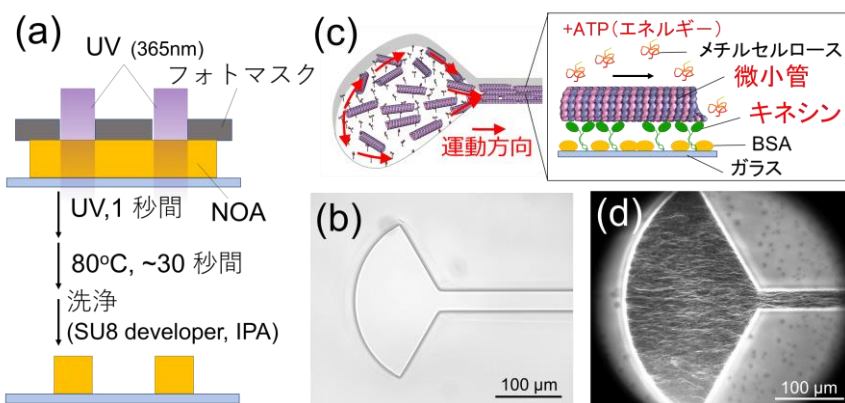


図 2. (a) NOA マイクロ流体デバイスの作成手法のスキームと (b) 作成した NOA 製マイクロ流体デバイスの顕微鏡写真、(c) NOA 製マイクロ流体デバイス内における微小管の運動発現系と流路形状に沿った誘導プランの模式図、(d) デバイス内の微小管の蛍光顕微鏡画像

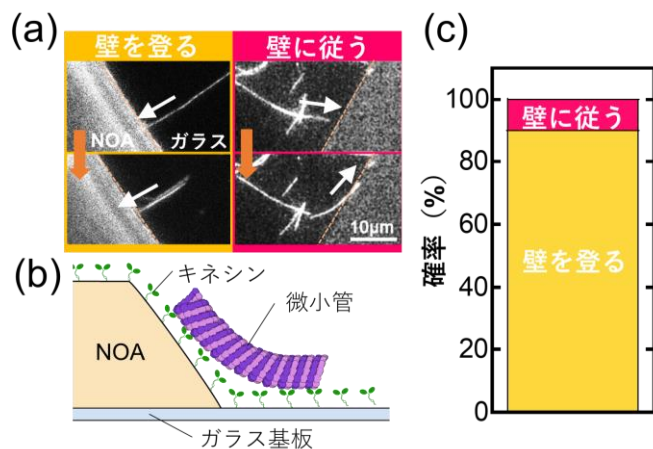


図 3. (a) NOA 壁衝突時に微小管が示す運動挙動パターンの蛍光顕微鏡画像、(b) NOA 壁を登る微小管の模式図、(c) 流路壁に従って動く微小管と壁を登る微小管の割合を示すグラフ

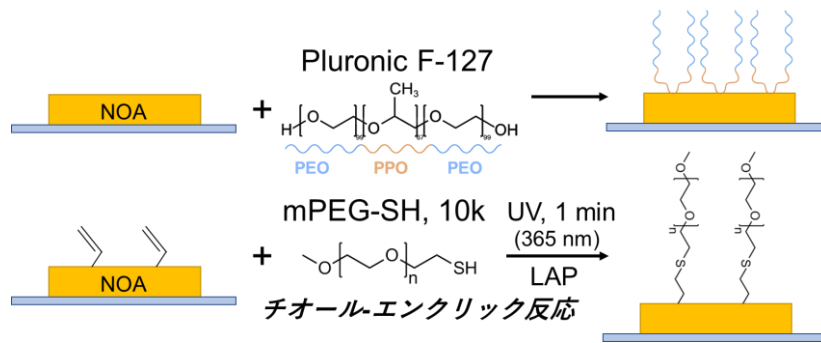


図 4. NOA 表面のポリマー修飾法の模式図

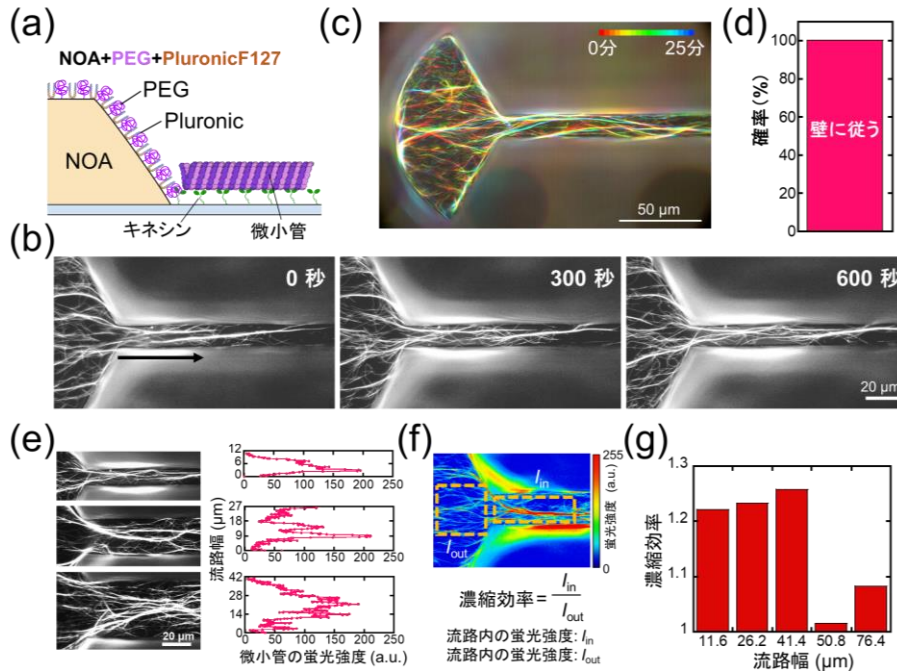


図 5. (a) 不活化した NOA 壁の模式図、(b) 不活化した NOA 製マイクロ流体デバイス内で動く微小管のタイムラプス蛍光顕微鏡写真と(c)そのタイムオーバーレイ:カラーバーの色は顕微鏡動画の時間フレームを示す、(d) 流路壁に従って動く微小管と壁を登る微小管の割合を示すグラフ、(e) 異なる流路幅の NOA マイクロ流体デバイスにより、直線状流路に濃縮される微小管の蛍光顕微鏡写真と、流路内の蛍光強度分布を示したグラフ、(f) 流路内の微小管濃縮効率の算出方法と、(g) 異なる流路幅ごとの微小管濃縮効率を比較したグラフ

【用語の解説】

1. 微小管： 微小管は構成材料である $\alpha\beta$ -チューブリンというタンパク質が連なってできる直径 25 ナノメートル、長さ約数十マイクロメートルの中空状の生体繊維。細胞内の物質輸送のレールとしてだけでなく、細胞の形態維持や染色体分離、繊毛運動など、細胞内で様々な役割を果たしている。
2. キネシンモータータンパク質： 数十ナノメートル程度のタンパク質で、2つの微小管結合部位を有する。生体のエネルギー通貨であるアデノシン三リン酸(ATP)を高効率に消費して、2つの微小管結合部位を交互に繰り出すことで、微小管上を2足歩行する。高い比出力特性を有する。微小管結合部位と反対側の部位に、輸送物質を結合させ、微小管を道路として細胞内輸送を担う。本研究では、逆にキネシンをガラス基板に固定し、その上で微小管を動かしている。

3. Norland Optical Adhesive, NOA: Edmund 社から販売されているポリウレタン系の光硬化性レジン。紫外線(UV)照射により、チオール-エンクリック反応により迅速に硬化する。同様にマイクロ流体デバイス作成に広く使用されている SU8 などの光硬化性レジンと異なり、ガラス基板との接着性が良いため、基板の前処理なども必要ない。TOPPAN ホールディングス株式会社から購入したフォトマスクを使って、任意の形状のマイクロ流体デバイスを作ることが可能である。
4. ポリエチレングリコール(PEG): エチレングリコールの重合体で、水溶性、中性のポリマー。タンパク質との相互作用が弱く、マイクロ流体デバイスやプラスチック微粒子などの表面不活化に用いられる。
5. Pluronic F-127: ポリプロピレンオキサイド(PPO)からなる中央の疎水性ブロックと、その両側にあるポリエチレンオキサイド(PEO)の親水性ブロックからなるトリブロック共重合体。PPO の疎水性ブロックは疎水的な材料基板と相互作用しやすく、PEO 部位がタンパク質などの生体材料が材料基板に非特異的吸着することを抑制。
6. チオール-エンクリック反応: チオール基(-SH)とアルケン(=エン)の共有結合、ラジカル(不対電子をもつ分子)存在下で反応促進(※)。NOA の材料表面には、ビニル基 (-CH=CH₂) が露出しており、チオール基を持つ PEG を反応させることで、NOA 表面への PEG 修飾を達成した。(※今回、ラジカルの生成には、光開始剤である Lithium phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl) phosphinate(LAP)を使用)

【謝辞】

本研究は JSPS 科研費 (JP20K15141, JP23H04425)、JSPS 卓越研究員事業(RAHJ290002)、公益財団法人吉田学術教育振興会「令和 4 年度学術奨励金贈呈事業」、AMED Seeds-H(H26)の助成を受けたものです。また本研究は、九州大学芸術工学部バイオフィードラボの施設を利用して実施されました。

【論文情報】

掲載誌: Nano Letters

タイトル: Surface Passivation of Norland Optical Adhesive Improves the Guiding Efficiency of Gliding Microtubules in Microfluidic Devices

著者名: Daisuke Inoue

DOI: 10.1021/acs.nanolett.4c02015

【お問い合わせ先】

九州大学大学院芸術工学研究院 助教

井上 大介 (イノウエ ダイスケ)

TEL: 090-2968-3785

Mail: dinoue1@design.kyushu-u.ac.jp

<報道に関すること>

九州大学 広報課

TEL: 092-802-2130 FAX: 092-802-2139

Mail: koho@jimu.kyushu-u.ac.jp