

ナノリソグラフィとタンパク質1分子パターンニングによる 分子計測基盤の創製

Platform of molecular measurement by nano-lithography and single-molecule protein patterning

2171903



研究代表者

京都大学大学院 工学研究科
マイクロエンジニアリング専攻

准教授

横川 隆 司

[研究の目的]

本研究の目的は、細胞内運動を司るモータータンパク質（以下、モータ）の協働的な運動機能を理解するための分子計測プラットフォームをマイクロ・ナノ加工技術により製作し、複数のモータについてその運動機能を評価することである。本研究で対象とする有糸分裂に関わるキネシンモータは、ガン細胞の増殖を理解する上で重要であり、その分裂抑制を対象とした抗がん剤のスクリーニングもおこなわれており、その重要性は大きい。これらのモータは集団的な運動機能が重要とされているが、1分子での運動機能がそのまま集団的な運動機能に反映されないと考えられている。分子数と運動速度の変化や外力に対する応答性の相関についての報告があるが（例えば Ikuta et al., Sci. Rep., 2015）、分子数は溶液中の濃度から推定することしかできていない。そこで、我々が専門とするマイクロ・ナノ加工技術を用いてその配置を任意に規定して、細胞内におけるモータの集団的機能に関する学術的な理解を深めることを目指した。

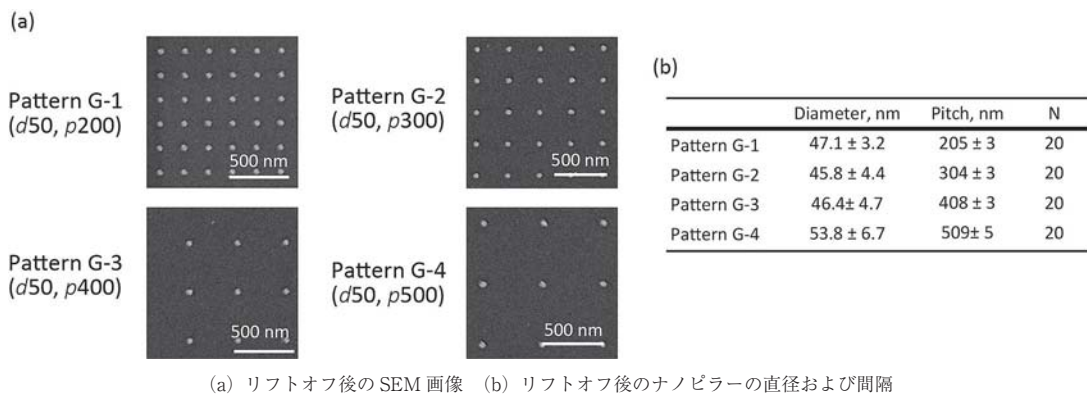
[研究の内容, 成果]

具体的な目標は、基板上に製作したナノピラーアレイを用いてモータの配置間隔を規定し、その上を動く微小管の運動特性から協働性の機能を評価することである。金ナノピラーヘモ

ータ分子を選択的に固定することで、一分子パターンニング技術を確立した。このために、脂質二重膜によるタンパク質の非特異吸着のブロッキングと自己組織化単分子膜（SAM）によるモータの特異吸着の併用を検討した。モータの運動機能は、基板上を動く微小管の運動速度を測定することで評価し、配置間隔の違いや配置密度の変化、運動に関わる分子数の違いによって、その集団的な運動機能にどのような変化が現れるかを評価した。測定対象として細胞内輸送に関わる kinesin-1 に加え、マルチモータでの機能が重要と言われる有糸分裂キネシンである Ncd について評価した。

1. 金ナノピラーの作製

ガラス基板および Si/SiO₂ 基板に、金ナノピラーを作製した。ホウ珪酸ガラス（厚さ 0.17 mm）への金ナノピラーの作製のために、電子線描画におけるドーズ量の条件出しをおこなった。30 mm×30 mm のホウ珪酸ガラス基板をピラニア溶液（H₂SO₄:H₂O₂=7:3）で洗浄後、ポジレジスト ZEP-520A をスピコートした。電子線描画装置（F7000S-KYT01, アドバンテクト）をもちいて、直径 50 nm, 間隔 200, 300, 400, 500 nm のピラーアレイのパターンを描画した。この際、ドーズ量は 90-200 μC/cm² の範囲で 10 μC/cm² 刻みに 12 パターンの条件で描画をおこなった。現像した後、真空蒸着で Cr を 3 nm, Au を 20 nm 成膜した。レジスト剥



(a) リフトオフ後のSEM画像 (b) リフトオフ後のナノピラーの直径および間隔

図1 ホウ珪酸ガラス上への金ナノピラーの作製

離液 (ZDMAC, ゼオン) に浸潤することでリフトオフをおこない、金ナノピラーのアレイを得た。リフトオフ後の金ナノピラーを、SEM (SU8000, 日立) により観察した。画像計測によりリフトオフ後のピラーの直径と間隔を計測した。また、同様のプロセスを用いて熱酸化 SiO₂膜付きの Si 基板にも金ナノピラーアレイを作製した。

図 1a にガラス上に作製した金ナノピラーの SEM 観察像を示す。SEM 観察の結果、ドーズ量 90 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ で欠損のない良好な金ナノピラーアレイを得られることが分かった。図 1b はドーズ量 90 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ で作製した金ナノピラーの、直径と間隔の実測値である。設計通り、直径約 50 nm のピラーが得られた。これらの結果より、以降は最適化したドーズ量 90 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ でガラス上への金ナノピラーのパターン描画をおこなう。また、Si/SiO₂基板にもドーズ量 310 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ で良好な金ナノピラーアレイを作製できた。

2. 金ナノピラーによるモータ数・間隔の規定

Electro-formation 法によるリポソームの作成およびホウ珪酸ガラス上への展開実験と、展開した脂質二重膜による kinesin-1 および微小管のブロッキング能力の確認をおこなった。DOPC およびローダミンでラベルした DOPC を混合してクロロホルム溶液に溶かし、ITO とゴムシートで構成したチャンバー内で交流電圧を 2 時間与えることにより、直径 10-100 μm

のジャイアント・リポソームを作成した。作成したリポソーム溶液を多孔質の膜に通すことにより、直径約 100 nm に均一化した。これをホウ珪酸ガラスのフローセルに流すことにより、表面に脂質二重膜を展開した。続いて、フローセルに kinesin-1 と Alexa488 でラベルした微小管の溶液を順に導入した。ATP 溶液を導入し、部分的に脂質二重膜が展開したガラス上での微小管の運動を蛍光観察した。結果、脂質二重膜が展開された領域には微小管は付着せず、またグライディングする様子もみられなかった。これより、脂質二重膜はガラス表面へのキネシンの非特異吸着を抑制する能力があると考えられる。

金ナノピラーを作製した Si/SiO₂基板において、脂質二重膜を SiO₂表面に選択的に展開する実験をおこなった。金ナノピラー基板とガラス基板を両面テープで貼り合わせて、フローセルを作製した。蛍光リポソームをフローセルに導入し、基板表面を蛍光顕微鏡で観察した。結果、SiO₂表面に脂質二重膜が展開されていることが確認できた。しかし一方で、金のパターン表面にリポソームが吸着してしまっていることが確認された。このようなリポソームは金ナノピラーへのキネシンの固定を阻害してしまうので、金表面には脂質が吸着しない表面処理をおこなう必要がある。

そこで金ナノピラーの表面に Thiol-PEG-Biotin の自己組織化単分子膜 (Self-

Assembled Monolayer, SAM) の形成をおこない、続けて SiO_2 表面への脂質二重膜の展開をおこなった。金ナノピラーを作製した Si/SiO_2 基板を、ピラニア溶液で洗浄した。Thiol-PEG-Biotin を終濃度 1 mM になるようにエタノールに溶かした溶液に基板を浸漬し、窒素雰囲気下で 24 h 静置した。エタノール中で超音波洗浄をおこなうことで、余分な Thiol-PEG-Biotin の分子を除去した。これにより、金ナノピラー表面に Thiol-PEG-Biotin の SAM を形成した。SAM を形成した金ナノピラー基板を用いてフローセルを構築し、蛍光リポソームを導入して脂質二重膜を展開した。続けてストレプトアビジン溶液、末端に biotin をラベルした kinesin-1 の溶液、蛍光微小管溶液を順に導入した。ATP 溶液を導入し、微小管が運動する様子を蛍光顕微鏡で観察した。結果として、脂質二重膜は SiO_2 表面のみに展開しており、金表面には展開していないことが確認された。しかし、脂質二重膜によって覆われているにも関わらず、 SiO_2 表面で多くの微小管がグライディングしている様子が観察された。これは Thiol-PEG-Biotin が SiO_2 表面にも吸着しており、これを介して kinesin-1 分子が SiO_2 表面にも固定されてしまったことを示している。以上の結果より、Thiol-PEG-Biotin の SAM と脂質二重膜の組み合わせは、本研究の目的を達成するための手段として不適であることが分かった。

Silane-PEG の SAM を SiO_2 表面に形成することにより、金ナノピラーアレイに kinesin-1

または Ncd を選択的に固定する実験をおこなった (図 2a)。金ナノピラー基板をピラニア溶液で洗浄した後、終濃度 3 mM の Silane-PEG および 0.8 mL/L の塩酸を混合したトルエン溶液に浸漬し、窒素雰囲気下で 24 h 静置した。トルエン、エタノール、超純水の順でリンスした後、超純水中で超音波洗浄をおこなうことで、余分な Silane-PEG の分子を除去した。これにより、金ナノピラー以外の SiO_2 表面に Silane-PEG の SAM を形成した。SAM を形成した金ナノピラー基板を用いてフローセルを構築し、ストレプトアビジン溶液、末端に biotin をラベルした kinesin-1 または Ncd の溶液、蛍光微小管溶液を順に導入した。ATP 溶液を導入し、微小管が運動する様子を蛍光顕微鏡で観察した (図 2b)。

図 3a に Ncd を固定した金ナノピラー上での蛍光微小管の観察像を示す。蛍光微小管は Silane-PEG SAM を形成した SiO_2 表面には付着しなかった。これは Silane-PEG SAM が SiO_2 表面に選択的に形成し、タンパク質の非特異吸着を抑制していることを示している。一方で金ナノピラーの領域には微小管が付着し、滑らかに動く様子が観察された。kinesin-1 を固定した金ナノピラー上においても、同様の観察結果が得られた。

金ナノピラーに固定された kinesin-1 上では、微小管が特定の方向に配向する様子が観察された (図 3b 上)。微小管の運動方向は、ピラーの中心を結ぶ直線の方と一致していた (図 3b 下)。Ncd を固定した金ナノピラー上におい

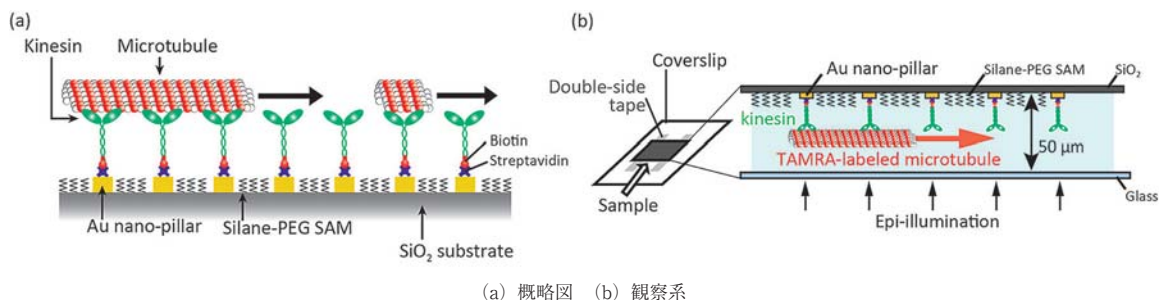


図 2 Silane-PEG SAM によるキネシンのパターンニング

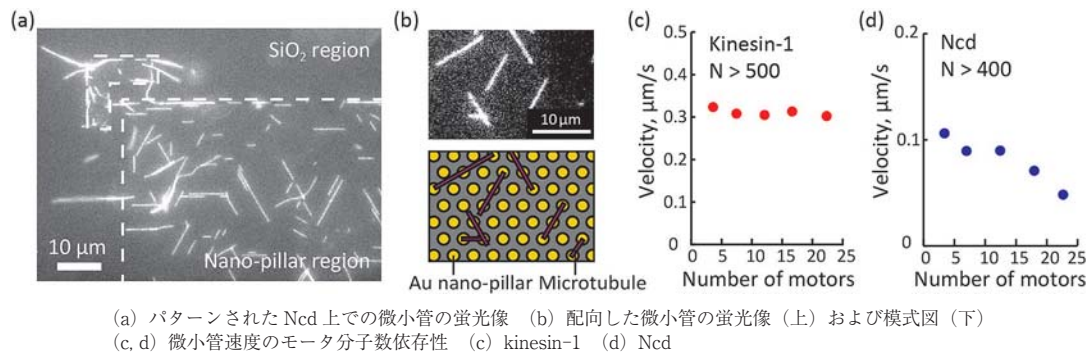


図3 パターニングされたキネシン上での微小管の運動

でも、同様に微小管が配向する様子が見られた。これは、キネシン分子が金ナノピラー上のみ存在していることを示す。以上の結果より、キネシン分子が金ナノピラーの上に選択的に固定されて、またその運動能を失うことなくアッセイ系を構築できたことを確認した。

3. モータの協働性評価

微小管速度のモータ数およびモータ間隔依存性を測定し、速度の観点からモータの協働性について考察をおこなった。パターニングされた kinesin-1 または Ncd 上を運動する微小管の様子を、sCMOS カメラにより記録した。撮影条件は、露光時間 200 ms, 撮影間隔 2 fps, ビニング 2 (1024×1024 pixel) でおこなった。Mark2 (画像処理ソフト) を用いて、微小管後端の位置座標を kinesin-1 の場合は 2 s 毎に、Ncd の場合は 30 s 毎に取得し、微小管の速度を算出した。ImageJ で微小管の長さを計測し、ピラーの間隔で割ることで、微小管の輸送に関わっているキネシンの分子数を算出した。

図 3c, d に微小管速度のキネシン分子数依存性を示す。kinesin-1 の場合では、微小管速度はモータ分子数に依存しなかった (図 3c)。一方で Ncd の場合では、速度はモータ分子数の増加とともに減少した (図 3d)。また、微小管速度のモータ間隔依存性を調べたところ、速度は kinesin-1 の分子間隔には依存しなかった。対照的に、速度は Ncd の分子間隔に顕著に依存し、間隔が大きくなると速度が大きくなり、

600 nm のモータ間隔で速度が最大となることが分かった。以上の結果は、モータ分子の種類、分子数および分子間隔が、集団運動に影響を与える重要な要素であることを示している。

[今後の研究の方向, 課題]

本研究で得られた計測技術を用いることで、kinesin-1 と Ncd の違いだけでなく様々なモータタンパク質の運動機能の違いを計測することができる。今後は、さらにその応用範囲を広げ従来生物物理学的な手法のみでは得られない知見を得られるよう、計測対象を広げていきたい。また、一分子パターニング技術はモータタンパク質に限らず、様々な分子に応用することでその一分子での挙動を解析することができる。工学的な基盤技術を如何に生物学的な「発見」に繋げていくか、今後も検討を続けたい。

[成果の発表, 論文等]

- [1] J. -H. Liu, K. -C. Hsia, R. Yokokawa*, Y. -W. Lu*, "Microtubule Polymerization in Alignment by an On-Chip Temperature Gradient Platform," **Sens. Actuators, B.**, 298, 126813, 2019.
- [2] T. Kaneko, S. Ando, K. Furuta, K. Oiwa, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa*, "Transport of microtubules according to the number and spacing of kinesin motors on gold nano-pillars," **Nanoscale**, 11, 9879-9887, 2019.
- [3] T.I. Farhana, T. Kaneko, R. Yokokawa, "Investigation of Collisions of Microtubules Driven by Nano-Patterned Kinesins," *63rd Annual Meeting*

- of *Biophysical Society*, Baltimore, Maryland, USA, 2019/03/02–03/06 (Oral)
- [4] T. Kaneko, S. Ohba, K. Furuta, K. Oiwa, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, “Investigating Coordination of Kinesin Motor Proteins Using Their Selective Immobilization on Gold Nano-Pillars,” *The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2018)*, pp.2256–2257, Kaohsiung, Taiwan, 2018/11/11–11/15 (Poster)
- [5] T. Kaneko, S. Ohba, K. Furuta, K. Oiwa, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, “Different coordination of kinesin-1 and Ncd revealed by their selective immobilization on gold nano-pillars,” *Biophysical Society 62nd Annual Meeting*, San Francisco, California, USA, 2018/02/17–2/21 (Poster)
- [6] T. Kaneko, K. Sasakura, K. Furuta, K. Oiwa, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, “Integration of Au Nano-Pillars and Sam Enables Protein Patterning with Designed Spacing at Single Molecule Level,” *The 17th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE NANO 2017)*, pp.311–314, Pittsburgh, PA, USA, 2017/07/25–28 (Oral)