



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Effect of Stepwise Feeding and External Mechanical Stimuli on Active Self-organization of Microtubules [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	井上, 大介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11911号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59044
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Inoue_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(理学) 氏名 井上 大介

学 位 論 文 題 名

Effect of Stepwise Feeding and External Mechanical Stimuli on Active Self-organization of Microtubules

(微小管能動的自己組織化における逐次的材料供給および外部力学刺激の影響)

繊維状タンパク質である微小管(Microtubule)は相補的な生体分子モーターであるキネシンを固定した基板上においてアデノシン三リン酸(ATP)を分解することによって並進運動を発現する(*in vitro* motility assay: 図1)。微小管/キネシンは最も小さい運動素子として機能することから、マイクロデバイスの構成要素として期待され、近年、研究が盛んに行われている。これまでに *in vitro* motility assay とマイクロ流路を組み合わせた微小分析チップのプロトタイプや電場および磁場による微小管の運動制御系を組み込んだ物質輸送・分離デバイスも試作されている。

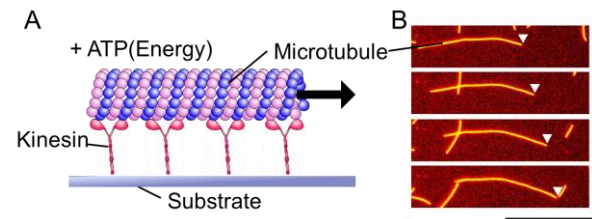


図1 (A) *In vitro* motility assay の模式図と(B) 並進運動する微小管の蛍光顕微鏡像。スケールバー: 10 μm 。

微小管はその密度や微小管間に分子間相互作用による引力を導入することにより、並進運動を伴いながら自己組織化(能動的自己組織化)し、自発的にその運動方向が揃うことが見出されている。さらに、自己組織化の条件を微妙に変化させることにより、微小管はバンドル状やリング状、ネットワーク状集合体、大規模なストリームや渦状のパターンなど多様な秩序構造を形成する。これは、個々の微小管の運動の同調性を高め、複数の微小管の力の集積や運動モードの多様化といった利点をもたらし、微小管の運動素子としての応用性をさらに高めることができる。しかしながら、能動的自己組織化により形成される微小管の秩序構造体を実用的に用いるには、構造形成およびその運動性を制御する手法を確立することが課題とされている。また、微小管をより大規模なスケールで利用するための手法の開発も必要である。

そこで、本論文では材料の逐次的供給下および外部刺激の存在下において、微小管の能動的自己組織化を行い、秩序構造の形成とその制御を目的として研究を行った。

本論文は5章からなり、第1章序論に続き、第2章では能動的自己組織化の過程において逐次的に微小管を供給することで、より多数の微小管をリング状微小管集合体に取り込ませ、リングの厚さおよびサイズを拡大させることを検討した(図2A(i))。具体的にはビオチン(biotin)を修飾した微小管をキネシン基板上で並進運動させ、分子間相互作用であるストレプトアビジン(St)を用いて微小管能動的自己組織化を行い(図2A(ii))、集合体形成過程において安定な定常状態へ到達する前に、新たに微小管およびATPを加える操作を繰り返し行った。この手法により従来よりも多重のリング状微小管集合体の形成が可能となった(図2B)。リング状微小管集合体はマイクロデバイスの回転運動素子としての利用が期待される。

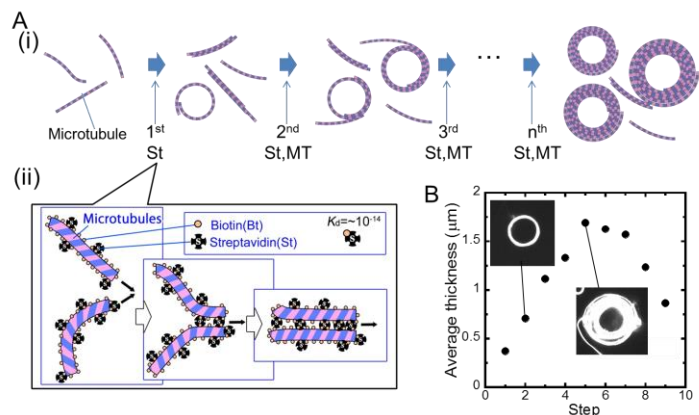


図2 (A)(i) 微小管の逐次的能動的自己組織化の全体の模式図。(ii) 能動的自己組織化の模式図。(B) リング状微小管集合体の厚さ変化と蛍光顕微鏡像。スケールバー: 25 μm 。

第3章では、エラストマー (poly (dimethylsiloxane) (PDMS))を基板として、*in vitro* Motility Assay を行い、独自開発した顕微鏡上伸展装置(Stretch chamber)を用いて、PDMS 基板を伸縮させることで、伸縮刺激下における微小管の運動挙動(運動方向・速度)を評価した。微小管は基板の伸展により、伸展軸に対して平行方向に配向した。伸展した基板を初期長まで弛緩(収縮)すると、逆に収縮軸に対して垂直に配向した(図 3)。微小管の配向は基板の伸展または収縮直後に観察され、一定時間が経過した後、並進運動は再びランダムな方向に戻った。微小管の配向メカニズムについては、微小管は自身の長軸方向に対してかかる収縮ストレスの影響を緩和する方向に配向すると考察した。この仮説を裏付けるため、コンピューターシミュレーションを用いて、基板の収縮方向に対して、自身の曲げエネルギーが最小になる方向を明らかにした。さらに、基板の伸縮に伴い微小管の運動速度を制御することが可能であることも見出した。基板の伸縮による微小管の速度変化は基板表面のキネシンの密度変化に依存するものであることが明らかとなった。

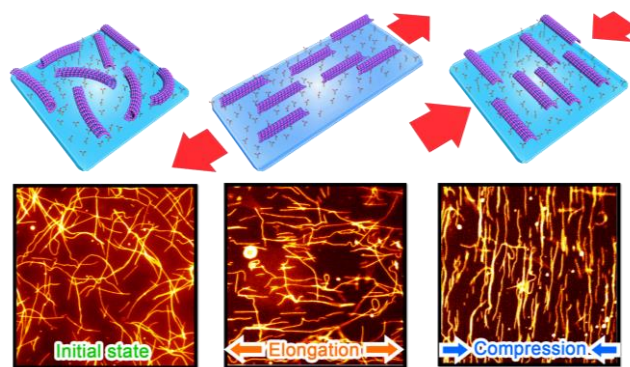


図3 基板の伸展・収縮による微小管の配向。スケールバー: 10 μm .

第4章では、微小管を高密度にし、協調運動を発現させ、そこへ伸縮刺激を印加することで微小管の協調運動の制御を検討した。協調運動によってストリーム状秩序構造が形成されるが、その方向はランダムであり、ストリームの方位に優勢性は見出されなかった。しかしながら、伸縮刺激を印加すると、この秩序構造は一度崩壊するものの、次第に伸縮軸に対して垂直方向にストリームが形成された (図 4)。微小管の配向状態は長時間に渡り維持された。また、微小管は一定の歪(臨界伸展歪)以下では、伸縮刺激に対して応答を示さなかったが、繰り返し伸縮刺激を印加することで、伸縮軸に対して特徴的な配向角度(60° , 120°)を有するジグザグ状の秩序構造を形成した(図 4)。基板の伸縮による

微小管の弾性変形を考慮すると、この配向角度は刺激に対して、棒状分子である微小管の変形が最小限になる角度であることが明らかになった。また、PDMS 基板の一点を押し上げることで、

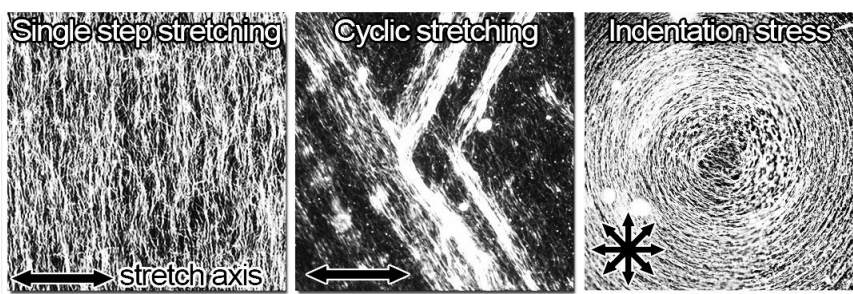


図4 伸縮刺激により創発する多様な微小管集団のパターン。スケールバー: 50 μm , 1 mm

微小管に対して等方的な伸縮刺激(押し込み刺激)を印加したところ、直径 15 mm 程度の巨大な渦状秩序構造を形成することを見出した(図 4)。このように、伸縮刺激のモードに応じて多様な秩序構造と協調運動が創発することを明らかにした。

第5章では総括を述べた。

以上のように本論文では、微小管の運動性および自己組織化を制御することに成功し、微小管を大規模なスケールで秩序構造を形成させる技術確立した。特に外的因子として、力学(伸展)刺激を用いる手法は様々な秩序構造を形成するための画期的な方法であり、これらの秩序構造を用いることで、運動素子および輸送素子としての微小管のナノテクノロジーへの応用がさらに広がると期待できる。