

わたしたちの研究 (8) ナノメトリックス工学研究室

横川隆司 (H12/2000卒)



1 本研究室の概要と教員紹介

マイクロエンジニアリング専攻ナノシステム創成工学講座ナノメトリックス工学研究室は、現在、教授・横川隆司、特定准教授・Ramin BANAN SADEGHIAN、特定准教授・Stanislav L. KARSTEN、助教・藤本和也、博士研究員2名、技術・教務補佐員4名、事務補佐員2名、博士後期課程学生7名、修士課程学生6名、学部生6名が所属しています。機械工学に立脚したマイクロ・ナノ加工技術を活用して、いかにライフサイエンス分野にブレイクスルーをもたらすかを念頭に、学際領域の研究をおこなっています。

まず、本研究室の系譜とご関係の先生方についてご紹介したいと思います。機械設計制御工学講座加工プロセス工学分野を島進教授と共に担当されていた小寺秀俊助教が、赤松映明教授が担当されていた機械システム工学講座の後任として2000年に教授として着任されました。2004年には、機械システム工学講座として小寺教授に加え、神野伊策助教、桑島修一郎講師、宮野公樹特任講師、鈴木孝明助手の陣容となりました。(注:2007年の学校教育法改正により、助教は准教授に、助手は助教に職階名変更。)2005年、機械専攻群の改組によってマイクロエンジニアリング専攻が新設され、ナノシステム創成工学講座ナノメトリックス工学分野となりました。2008年に鈴木助教が香川大学准教授(現・群馬大学教授)として栄転後、2009年に横川が後述の立命館大学より助教として着任いたしました。2011年に神野准教授が神戸大学教授として栄転後、横川が准教授に昇任、2012年には新宅博文助教が大阪大学から着任し、小寺教授、横川准教授、新宅助教の体制となりました。この間、小寺教授は2008年から副理事・総長室長、2012~2014年は理事・副学長として工学研究科を一度離れ大学本部の業務に携わり、2014年に研究室に戻られました。2018年に小寺教授が理化学研究所理事として、新宅助教が理化学研究所チームリーダーとして異動後、2019年から横川が教授として研究室を運営しております。また、プロジェクト特定教員として2015~2019年に鳥澤勇介特定准教授、2015~2019年に梨本裕司特定研究員・助教、2017年に劉莉特定准教授、2018~2019年に劉楊特定研究員・助教が在籍し、現メンバーとしては2017年からBANAN SADEGHIAN特定助教・准教授、2020年からKARSTEN特定研究員・

准教授が加わりました。2020年には、当研究室で博士の学位を取得した藤本和也氏が、企業経験を積んだ後、助教に着任して現在に至ります。

本研究室の特徴は、上記の系譜でご紹介した通り、多くの教員が本研究室の運営に協力してくださっていることです。特に、特定教員や特定研究員は、工学に留まらず異分野から参入して頂くことによって、機械系の教員や学生との連携により新たな融合研究が生まれることを強みとしてきました。その結果、直近20年では、実に30名以上が本研究室に教員、博士研究員、あるいは博士後期課程の学生として参画した後、国内外のアカデミアにおいて活躍しています。

私自身も、このような土壌で育ったため学際融合研究を推進するスタイルを確立してきました。ここで、自己紹介をさせて頂こうと思います。私は、富士山の麓、静岡県富士市で生まれ育ちました。富士山と新幹線が映ったお決まりの構図がありますが、あの写真を思い出して頂くと、新幹線の向こう側くらいがちょうど私の生活範囲でした。北海道、東北などでも生活しましたが、出身は？と言われると静岡です。2000年に本学物理工学科機械システム学コースを卒業後、2002年に機械工学専攻博士前期（修士）課程を修了しました。卒業研究では、島研において粉末成形における振動充填法について研究しました。島先生、小寺先生だけでなく、北條正樹先生、松久寛先生からも装置をお借りして実験しました。修士課程進学時に、小寺先生が独立され、Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)の研究に携わりたいと考えるようになりました。海外での研究生活にも興味があったため、M1の途中からUniversity of California, Los Angeles (UCLA) のC. J. Kim研究室に一年間滞在し、クリーンルームでのフォトリソグラフィなどMEMSプロセスを勉強し、 Al_2O_3 aerogelのプロセス開発と物性評価の研究をしました。今から20年も前ですが、クリーンルームに専門スタッフが常駐し、装置のメンテナンスから学生指導、実習講義まで組織的に行われていることに感銘を受けました。当時、一緒にクリーンルームで実験していた多くのメンバーが、世界各国の大学や企業でMEMSやその応用分野を牽引し、今でも学会運営や共同研究を通して交流があります。UCLA留学中に様々な講義を受け、また毎月開催されるDepartment seminarに参加するうちにMEMSの応用範囲の広さを知り、中でもバイオ応用に興味を持つようになりました。同時期にUCLAに滞在されていた東京大学生産技術研究所の年吉洋先生の紹介で博士後期課程から東大に移り、藤田博之先生の下でモータタンパク質を用いたナノシステムの開発に取り組み、2005年に博士（工

学)の学位を取得しました。その後、立命館大学工学部マイクロ機械システム工学科において研究室を主宰させていただき、2009年に本学に戻りました。また、2011年にはUniversity of Michigan, Biomedical EngineeringのS. Takayama研究室に滞在し、MEMSでバイスの細胞応用について研究の幅を広げてきました。このような経緯から、近年の本研究室における研究内容は多岐にわたります。それらを、動くタンパク質であるモータタンパク質を駆動源として用いたナノシステムと臓器細胞の機能を再構築するMicrophysiological System (MPS) にわけて、次項にてご紹介させていただきます。

2 モータタンパク質を用いたナノシステム

2.1 物質輸送システム

我々が使っているモータタンパク質は、アデノシン三リン酸 (ATP) を加水分解して動くキネシンおよびダイニンです。これらは、長さ数10 nmのタンパク質であり、細胞骨格である微小管に対し結合解離を繰り返しながら、歩くように動くためこのような名前で呼ばれています。大腸菌などを用いた遺伝子工学的技術が確立しており、1分子計測によりその機能や構造解析が進んでいるため、生体材料になじみのない我々のような異分野の研究者にも扱いやすく、様々な融合システムが提案されてきました。機械工学の研究者からすれば、このナノ駆動源を用いて何か有用なシステムを作れないかということになるわけです。

このナノ駆動源を用いて何か有用なシステムを作れないかということになるわけです。

微小管はチューブリンの重合体であり、生細胞内では核のある中央部にプラス端が向き、マイナス端が周辺部に向かって伸びています。キネシンは、微小管上をマイナス端からプラス端（細胞の中心から周辺部）へ、ダイニンはプラス端からマイナス端（細胞の周辺部から中心）へと物質輸送をおこなっています。この細胞内物質輸送系を生体外で再構築する場合、[図1a](#)のように対象物をモータにより輸送する「ビーズアッセイ系」、[図1b,c](#)のようにキネシンあるいはダイニンを基板上に固定して、相対的に微小管が運動する「グライディングアッセイ系」が使われています。

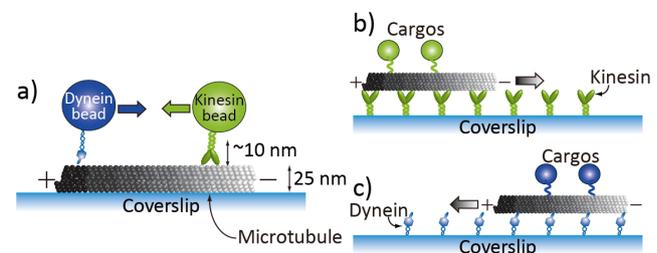


図1: 基本となる分子系。a: ビーズアッセイ系。b: グライディングアッセイ系。

ビーズアッセイ系を用いたシステムでは、微小管の極性が規定できると輸送される物質の方向が決まり、細胞内物質輸送を生体外で工学的に再構築した系と捉えることができます。しかし、モータは連続運動距離が数 μm と短く（時間にして数秒）、常に熱揺らぎにさらされるため安定したシステム構築が困難です。そこで我々は、短時間の分子反応を可視化するためのシステムへの

活用を着想しました。幅数100 nmのナノトラック内に微小管の極性を配向後、分子輸送と結合を可視化するシステムを提案しました（図2a）。プラス端に向かって動くキネシンにはGSTとQ-dot655を、逆向きに動くダイニンにはGSHとQ-dot525を付加して微小管上を運動させると、微小管の極性に従ってQ-dotが逆方向に動き、ちょうど2つが重なるところでGST-GSHのタンパク質特異的な結合を観察することができます（図2b,c）。同等の分子結合は、アビジン-ビオチン結合についても可視化することに成功しました。

グライディングアッセイ系を用いたシステムでは、電界印加により微小管の運動方向を制御する技術を活用し、マイクロ流体デバイス内に分子分離システムを開発しました（図2d）。微小管の表面電荷密度に加え、微小管の曲げ剛性を変化させることで電界に応じて微小管の運動曲率を変えることができますので、微小管重合方法を最適化することで曲げ剛性を設計する技術を開発しました。その結果、最も剛性の高い（曲がりにくい）微小管と最も剛性の低くかつ表面電荷密度の高い（曲がりやすい）微小管を2方向に分離するシステムを実証できました（図2e）。

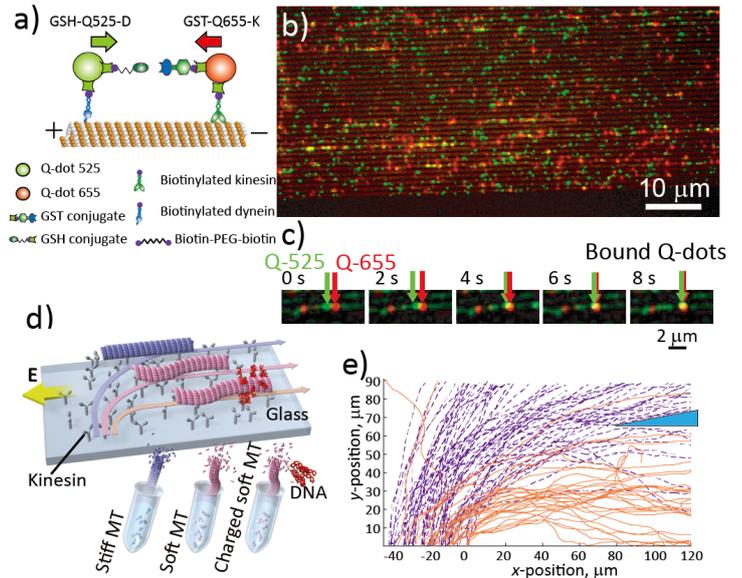


図2: 物質輸送システムの例。a-c: 微小管アレイ上で分子輸送・結合。d-e: 分子分離システムの実証。

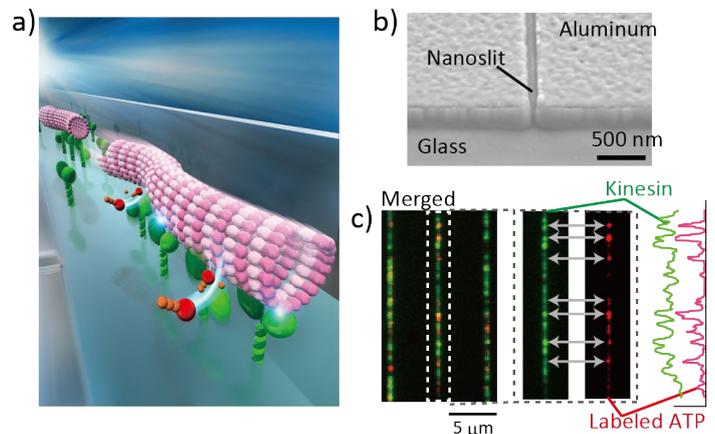


図3: モータ機能計測用デバイスの例。LZMWsを用いたATPとキネシンの1分子同時計測系。

2.2 モータタンパク質機能計測用デバイスの開発

上記のようなシステム開発を通して、我々はモータタンパク質の運動機能計測においてもナノ構造が有用だと考え、デバイス開発を進めてきました。例えば、微小管の極性配向を幅100 nm程度のナノスリット構造Linear Zero-Mode Waveguides (LZMWs) 内で実施し、その上を動くキネシンがATPを加水分解する様子を1分子蛍光観察しました (図3)。これは、ZMW効果により背景光を大幅に低減することにより実現した計測であり、微小管に結合することでキネシンが

ATPと結合する時間が短くなることを可視化した初めての例です。さらに、キネシンを一分子ずつパターンニングする技術を開発し、kinesin-1 と kinesin-14 (ncd) という2種類のキネシンについて、協働的な運動特性が異なることを明らかにしました (図4)。モータタンパク

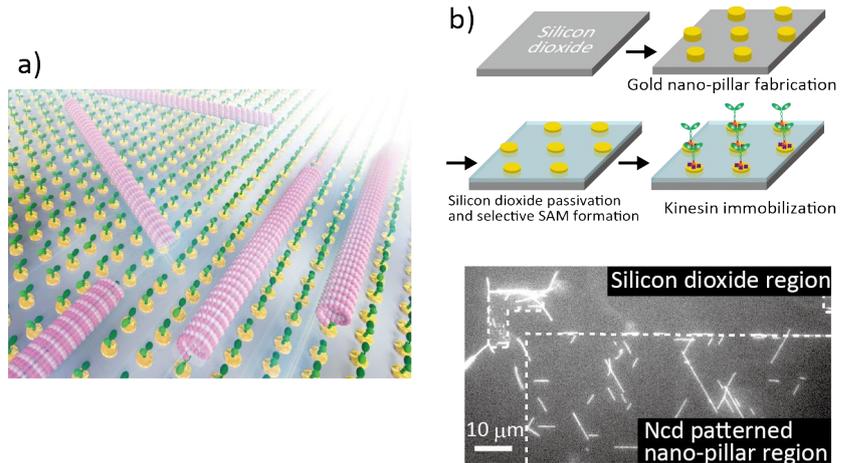


図4：モータ機能計測用デバイスの例。ナノピラーによりパターンニングしたキネシンの協働性の評価系。

質の分子数と分子間距離を、ナノ加工技術により規定する新たな計測系を開発することで、これまで知られていなかったモータタンパク質の特性を明らかにすることができたわけです。マイクロ・ナノ加工学からのモータタンパク質を利用したシステム創成というアプローチを通して、生物物理学的なモータタンパク質の新たな側面が見えるという研究サイクルが回ることで、相補的に研究が展開されたと考えています。

3 細胞を用いたマイクロシステム

マイクロスケールのデバイスを生体医工学に応用する取り組みも進めてきました。チップ内に対象の細胞を培養することで生体組織を構築し、in vivoにおける細胞ニッチを再定義して生理学的な機能を獲得させようという試みがMicrophysiological System (MPS) です。最初のMPSとして知られる、肺胞のガス交換機能や免疫機能を再現したLung-on-a-Chipが2010年に報告されてから10年余り、各種臓器への展開や複数の臓器間連携の再現により、分子生物学や発生生物学など生命科学分野における学術的な実用に加え、MPSは製薬企業との連携により創薬研究におけるツールとして産業界へ展開され始めました。さらに、ヒトiPS細胞

を用いることにより、さらにヒトの生体内機能に近い高機能MPSの開発が始まっています。

生体内の各所には、基底膜を挟んで上皮組織と血管内皮を覆う内皮組織の構造が存在します。この上皮組織側と内皮組織側の相互作用をin vitroで、かつ実時間で観察や測定することができれば効率的に臓器機能を計測することが可能になります。我々は、腎臓の近位尿細管を対象としたMPS開発を進めてきました。

図5aのような上下

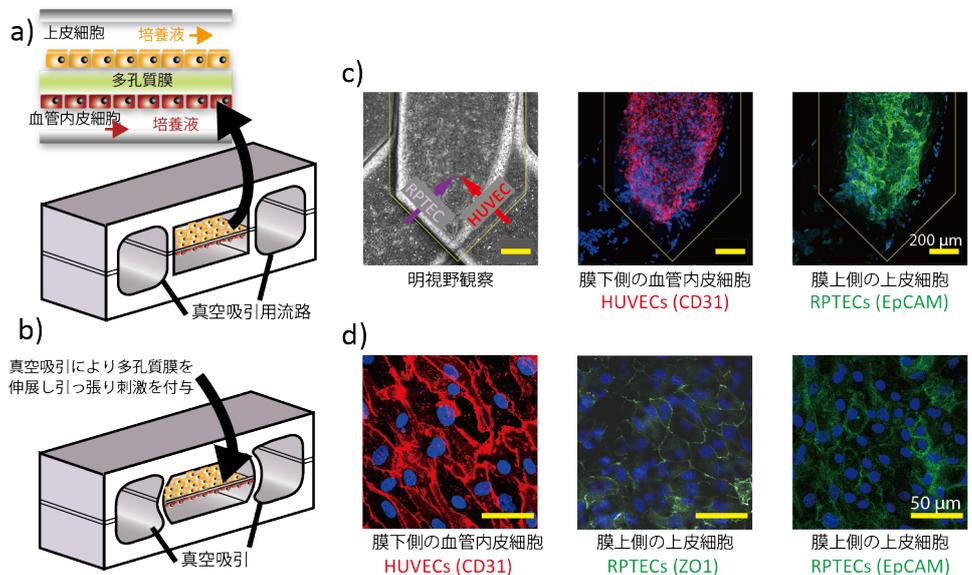


図5 : (a)多孔質膜の上側を上皮組織、下側を内皮組織とした平面培養。(b)空気圧制御により多孔質膜を伸展しせん断刺激を付与できる。(c)近位尿細管上皮細胞と血管内皮細胞を共培養した例。共培養や灌流刺激により、細胞機能の向上が見られる。

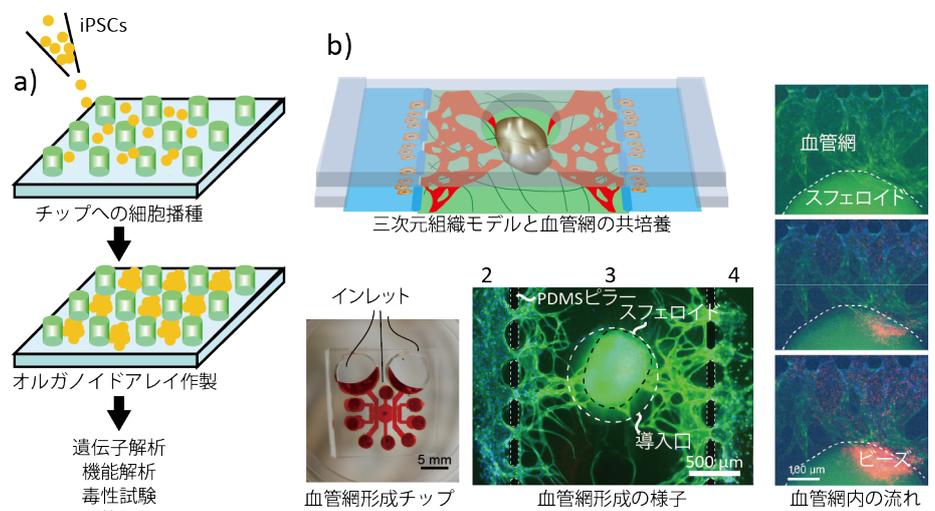


図6 : (a)オルガノイドをチップ上で大量並列に培養し、各種アッセイに用いるチップ。(b)三次元組織モデルの血管化の例。細胞ニッチを定義することで、灌流可能な血管網をチップ内に構築できる。

のマイクロチャネルに近位尿細管上皮細胞と血管内皮細胞を培養すると、灌流によりせん断応力刺激を与えたり、チャネルを変形することで引っ張り刺激を与えたりすることができます（図5b）。このような細胞への働きかけは、従来の培養皿を用いた細胞培養では実現できません。力学刺激を与えることで、刷子縁や側低膜に局在する各種トランスポーターの発現が亢進し、デバイスを用いることでそれらを容易に計測することが可能になります。図5c,dには、実際に近位尿細管上皮細胞と血管内皮細胞を培養することで、細胞接着タンパク質の発現が見られることを示しています。さらに、デバイス内に電極を組み込むことで、経上皮電気抵抗計測を実施して、上皮組織に対する腎毒性のモニタリングにも成功しています。まだ、人工透析を置き換えるようなことはできませんが、腎臓病の理解や創薬の一助となればと考えています。現状では、薬物代謝能まで有する細胞株がないため、現在ヒトiPS細胞から分化誘導した尿細管細胞を用いることでより高機能化を図っております。

上記の培養法では、各細胞が平面的に配置されます。我々の生体内では、様々な臓器が3次元的に配置されていますので、その細胞配置を再現するというアプローチも進めています。近年、幹細胞からミニ臓器を作製するオルガノイド技術が確立してきましたが、その組織内部に養分や酸素供給を行うための血管網を三次元的に作製する技術が求められています。オルガノイドやex vivo培養の組織に血管網が含まれている場合、マイクロチャネルを介して内部にアクセスすることができれば、長期的に灌流培養することが可能になります。我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）とヒト肺線維芽細胞（hLF）を用いることで、細胞塊であるスフェロイド内に灌流可能な血管網を導入することに成功しました（図6）。また、ヒト乳癌培養細胞（MCF-7）を含む主要スフェロイドに対しても血管網を導入し、薬剤投与の際に灌流の効果を考慮してドーズを決めることの重要性を示しました。現在は、なぜこのような微小環境で血管化が進むのか、あるいは進まないのかを明らかにするため、トランスクリプトーム解析等の生物学的なアプローチも活用しながらその理解を進めています。

4 おわりに

マイクロ・ナノ加工技術を分子から細胞スケールの生体材料と融合した研究についてご紹介しました。一般に、この分野では生命科学・医学・理学分野の研究

者のWhy?に貢献できる計測デバイス開発が主眼となってきました。これに対し、我々はWhy?にまで自ら踏み込んだ研究テーマを重視しています。ナノテクノロジーハブ拠点などクリーンルームが整備され、装置の共有により研究者が装置管理に要する時間が減りました。これにより、ナノメトリクス工学研究室では、マイクロ・ナノ加工技術を流体力学や材料力学のように一つの基盤領域と見なすことによって、新たな研究分野の創出を目指しています。最新の研究内容や研究成果などは下記HPで随時、報告しておりますのでご参照ください。

(研究室HP: <http://www.ksys.me.kyoto-u.ac.jp/>)