

下から見た寄附講座



者

和 沢 鉄 一*

A Company-Endowed Laboratory from Below

Key Words : thinking naively, single molecule detection, nano imprinting,

1. 結 言

筆者は生命機能研究科において開設されたオムロン社の寄附講座であるナノデバイス基礎講座に所属している。当寄附講座は平成14年11月に設立し、本稿執筆現在で1年数ヶ月経過したばかりであり、これまでは研究室機能の立ち上げと当講座が取るべき研究の方向性などを定めることに我々は集中してきた。当講座の構成は、オムロン株式会社先端デバイス研究所から赴任した青山客員教授、同じくオムロンからの駐在研究員、事務補佐員、そして筆者からなる。

筆者は、基礎工学研究科生物工学分野から科学技術振興事業団1分子過程プロジェクトの研究員を経て、このナノデバイス基礎講座における研究に誘っていただいた。その意味で、どちらかという、寄附講座にいながらも筆者は基礎系の研究者であり、当寄附講座において企業研究者らとともに、(ヘテロジニアスな集団ならではの)刺激を受けて研究を遂行している途上である。この小文のタイトルはどこかで見たような...と感じる人がいるかもしれない。当寄附講座の大きな目標や意義、そして社会的効果などを論じることも重要ではあるが、本稿ではむしろ研究や実験の現場からの視点で、これまで筆者が見た、あるいは行った研究などにも触れながら筆者が感じていることをいくつか思い切って図々しく記述してみたい。

2. お気に入りの実験

十年以上前、筆者は大学院生として大阪大学基礎工学部の柳田教授(現・生命機能研究科教授)の研究室に入門した。柳田研は、生物屋が思いもしない自作の凝った計測装置群、実験における器用さ、ガッツ、そして忍耐力などがウリのユニークな実験によって当時すでに有名になっていた。同研究室のそういう先達たちが行った数々の実験のなかで筆者のお気に入りが入りいくつかあるが、その一つが『アクチンフィラメントの破断力測定』である(Kishino & Yanagida, 1988)。

アクチンフィラメントとは、アクチンという直径5.5nmの蛋白質が自己集合して形成される繊維であり、真核細胞中に普通に見られる細胞骨格の一種である。フィラメントの直径は約7nmである。同研究室では(水溶液中に懸濁している)再構成したアクチンフィラメント1本1本を蛍光顕微鏡下で観察する技術を確立していたが(Yanagida et al., 1984), 『破断力測定』においては、蛍光顕微鏡の観察下にあるアクチンフィラメントを2本の(マイクロマニ

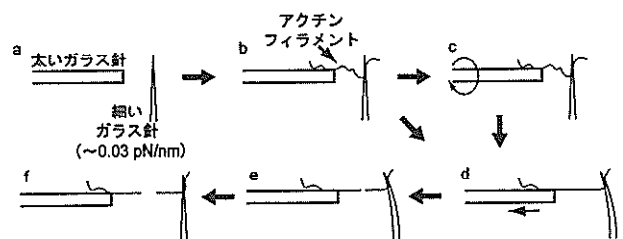


図1 アクチンフィラメントの破断力計測
 蛍光顕微鏡下で太いガラス針と細いガラス針をマイクロマニピュレータで操作してアクチンフィラメントをガラス針に捕捉する(b)。その後、太いガラス針をゆっくり引いてフィラメントを引っ張り(d)、アクチンフィラメントを破断させる(e, f)。回転破断力計測では、アクチンフィラメントを捕捉した後(b)、太いガラス針を回転させてから(c)、引っ張る(d-f)。破断力は、フィラメントが破断した瞬間の細い針のたわみ(e)より求められる。



* Tetsuichi WAZAWA
 1967年8月生
 1997年大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学分野修了
 現在、大阪大学大学院生命機能研究科・ナノデバイス基礎(オムロン)寄附講座、客員助教授、理学博士、生物物理学
 TEL 06-6879-7970
 FAX 06-6872-7969
 E-Mail wazawa@fbs.osaka-u.ac.jp

ピュレータで操作する)ガラス針の間に捕捉して、アクチンフィラメントが切断するまで引っ張り、切れる瞬間の力を測定した(図1)。アクチンフィラメントの破断力は200-400pNと計測された。

この破断力はフィラメントを構成するアクチン単量体同士の結合力を意味するものである。蛋白質集合体におけるサブユニット間に働く力はいくらか?という問いかけに対して、今であればこそAFMで計測すればよいと多くの人は思うかもしれないが(岸野らがとった方法は原理的にはAFMと全く同じであるが、現状のAFMでは操作性の問題からこの実験はより一層困難だと思われる)、当時あるいは現在の蛋白質の専門家が常識的にインテリジェンスを働かせて求めようとした場合、アクチンのX線結晶構造やアクチンフィラメントのモデル構造を基にして、アクチン単量体同士の界面に存在するアミノ酸残基間に働く静電相互作用、水素結合、そして分散力などから計算しようとするであろう。一方、この『破断力測定』の実験においては、サブユニット間の力について難しく考えるのをやめて、「ガラス針で操作すれば、直接測れるんじゃないか?」とナイーブに考え、とりあえず実験をトライしてみたら、さくっと結果が出てしまったわけである。また、計測装置は、蛍光顕微鏡、高感度ビデオカメラ、テレビモニター、ビデオレコーダ、そしてガラス針を操作する油圧マニピュレータ2台で構成され、昨今のAFMとは比べものにならないくらいシンプルかつ安価であり、そこがまた良い!

本誌の同コラムによると線状物体操作のモデリングはup-to-dateな話題らしいが(若松, 2003), そういう意味ではアクチンフィラメントの顕微操作は結構難しいものなのであろう。この『破断力測定』においては、水溶液中のアクチンフィラメントを、蛍光顕微鏡の粗動ステージとマニピュレータの操作によって、ガラス針の先に捕捉する。冷静になって考えてみれば、長さ10 μ m以下、直径7nmで、ブラウン運動により水中をゆらゆらと漂っているアクチンフィラメントを、粗動の顕微鏡ステージや油圧マイクロマニピュレータの遠隔操作で捕まえたり引っ張ったりするのは大変な作業である。自分の指先を操るようにガラス針を操作してアクチンフィラメントを捕まえるには、それこそ細い縫い糸や釣り糸などを意のままに操ることに通じる小器用さと辛抱強

さが必要であるが、この実験を行った岸野氏は大変器用な体育系の人であつたらしい。この実験を始めてから間もなく計測に成功してしまったそうだ。ちなみに、不器用な筆者も柳田研に入門した当初ひと月ばかりこの破断力測定に挑戦したが、数個しかデータを取ることができず、この実験を断念した。毎年春、新入生が同研究室に入るたびに、新入生が『破断力測定』をしばらくトライすることもしばしばあったが、たいてい場合は長続きせず、柳田研のある院生は「『破断力』は春の季語」と言っていた。

この破断力の実験は発展し、2本のガラス針の間に捉えたアクチンフィラメントをねじったときに破断力がどう変わるかを評価する実験も行われた(図1)。このように曲芸じみた難易度の『回転破断力計測』が柳田研の院生であった尾首と安武によって行われた。その結果、アクチンフィラメントはねじり方向に対して自由度がきわめて少なく、一旦フィラメントをねじってしまうと著しく切れやすくなることが分かっている(Tsuda et al., 1996)。柳田教授やこれらの仕事から教えられたのは、ナイーブになって考え直してみることに、そして自分の経験の無いことや困難なことであってもあえて挑戦してみるというガッツが、本質を鋭く突いた研究を可能にするということだ。そういう意味でこれらの仕事は筆者のお気に入りである。

さて、柳田教授は、1992年から2002年にかけて、科学技術振興事業団の柳田生体運動子プロジェクト、そして1分子過程プロジェクトの代表研究者としてプロジェクト研究を指揮しておられたが、筆者も大学院生からPDの頃にかけてこれら2つのプロジェクトに厄介になった。蛍光顕微鏡を使って水溶液中の活性ある蛋白質分子の1分子イメージングを世界に先駆けて成功したのがこの柳田生体運動子プロジェクトであり(Funatsu et al., 1995)、これらのプロジェクトにおける成果はその後の1分子生理学やナノバイオロジーの潮流を生み出す一翼となった。筆者が柳田研究室へ大学院生としてやってきたのはちょうどその黎明期であり、非常にエキサイティングな場面に立ち会うことができ筆者はラッキーであった。

モーター蛋白質研究を集中的に行うために発足した柳田生体運動子プロジェクトにおける1分子計測への動機付けは、従来行われていた研究の多くが

(変な言い方かもしれないが)多分子計測であったということから来ている。モーター蛋白質の張力発生メカニズム研究は、蛋白質溶液、結晶、あるいは筋原繊維を使って行われるのが通常であったが、結局のところ、それらの実験は極めて多数の分子の平均値を求めるものであった。そして、そこから得られたデータ(多数分子の平均値)を基にモデル化をすることによりモーター蛋白質分子1個1個の挙動を推察するのが従来の方法なのだが、平均値から個々の分子の挙動へという過程において仮定やモデル化による任意性が生じるために、実験結果に対する解釈の仕方が研究者に強く依存していて、モーター蛋白質動作の分子メカニズムを巡る論争が続いていた(今なお続いている)。そのような任意性を排除するために柳田研究グループが採用した方法が『1分子を観察する』であった。まさに、ナイーブに考えることによって導き出されたことである。

柳田生体運動子プロジェクトや1分子過程プロジェクトにおける顕微鏡をベースにした数々の測定装置は、プロジェクト内で製作されたものである。1分子蛍光顕微鏡が生体運動子プロジェクトで開発された当時、現在顕微鏡メーカーが販売しているごく簡単な1分子顕微鏡セットなどは当然無く(最近になって各メーカーが1分子顕微鏡を販売し始めた理由の一つは、1分子イメージングによる研究の成功を受けてのことである)、またその種の顕微鏡開発を顕微鏡メーカーに委託できる程度に方法論が確立してもいなかった。そういう状況下で、柳田生体運動子プロジェクトの船津らは自ら顕微鏡開発に取り組み、成功させた。顕微鏡の製作にあたって行った作業は、顕微鏡筐体のゴム足をはずして防振台にネジ止めすることから、レーザーや光学素子の配置まで、そしてフランジなどの金属切削加工部品の作成にまで及んだ。後に、船津氏(現・早稲田大理工学部教授)は、「(柳田プロジェクトで購入した備品の中で)一番『元』が取れたのは、フライス盤だ」と言っている。その後現在に至るまで、柳田研究グループでは、1分子蛍光顕微鏡と組み合わせることにより、光ピンセットとナノメータ変位測定、蛍光分光測定、蛍光偏光測定、チャンネル電流計測などを行う測定装置群が開発されてきた(一例を図2に示した)。一見『ものづくり』に通じる仕事を我々は行ってきたが、その技術的な側面をまとめた総説を目下準備中である

(Wazawa & Ueda, 2004)。このように、他人が観たことがないことを観ようと願い、しかも測定方法や測定装置が現存していないのであれば自ら開発してしまおうという精神には、筆者も非常に大きく影響された。

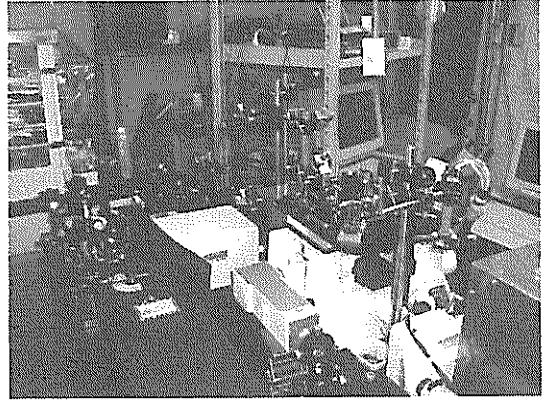


図2 1分子蛍光分光測定装置を組み合わせた全反射蛍光顕微鏡(Wazawa et al., 2000)

3. 寄附講座にて

筆者が現在勤務する生命機能研究科・ナノデバイス基礎講座は、オムロン株式会社の寄附講座である。当講座の大目標として、生命機能研究科におけるライフサイエンスのノウハウや大阪大学がもつ研究リソースを活用し、さらにオムロンの半導体プロセスやマイクロ素子のアレー化技術などを融合して、ナノテクノロジーやナノバイオロジーにおける新技術開発や基礎研究を行うことが狙いである。もちろん、そのような研究活動に加えて、オムロン先端デバイス研究所から来ている研究者らにも生命科学や蛋白質科学に親しんで頂くということも当講座の目的に含まれる。

我々が取り組んでいる研究課題のひとつは、蛋白質を鋳型としたナノ形状の転写・複製である。いくつかの種類は、ナノメーターオーダーの周期の規則性構造を自己集合によって形成する。蛋白質の自己集合体を調製し、何らかの基板上にそのような規則的構造を転写・利用することによって、機能性ナノデバイスを創成しようとするのがこの研究課題の狙いである。そのようなデバイスをどの方面へ応用していくかについては今後検討していくことになるが、例えば、フォトニック結晶の製作などを我々は案として考えている。

蛋白質を使って調製した自己集合体からのナノ形状の転写については、オムロン先端デバイス研究所においてよく行われている半導体プロセスを使っている。蛋白質自己集合体を基板の上に固定・乾燥し、その表面にニッケルスパッタによって金属層を形成し、その金属層を蛋白質固定化基板から剥離させることによって、蛋白質の金型を得る。その金型を、プラスチック樹脂に押しつけることにより、蛋白質によるナノ形状の複製を行った。オムロンからの研究者らと比較すれば、筆者はどちらかというとな蛋白質が専門ということになるが、小さく柔らかく壊れやすい蛋白質集合体に金属粒子をスパッタによって衝突・堆積させて製作した鋳型を使ってプラスチック樹脂表面に蛋白質の微細形状を転写するなんて、筆者から見れば、ずいぶん無茶しよと思ったものだ。しかし、筆者自身もそれが無駄だという根拠も見あたらず、スタッフ・関係者一同議論の上、とりあえず実施することになった。

当講座において最初にナノ形状転写に取り組んだのは、ミオシンフィラメントである。ミオシンも真核生物の細胞にごく普通に見られる蛋白質であるが、筋収縮を行う蛋白質であり筋肉組織に非常に多く含まれるものである。ミオシンは、低イオン強度の条件において重合してフィラメントを形成する。その大きさは重合の条件に非常に強く依存するが、我々の手始めの実験として、直径数10nm、長さが1-10 μ m程度、全長が長く特徴的なものを調製した。これだけ顕著な特徴のある形状のフィラメントを使えば、形状転写後にAFMや電子顕微鏡で実験が成功したかどうかを容易に判断することができるというのがその意図である。ミオシンフィラメントの懸濁液を調製し、実験の成否には甚だ疑問を抱きながらオム

ロン先端デバイス研の研究者(西川, 松下)に試料を渡して形状転写実験を進めてもらったところ、彼らが間もなく結果を出してきた。ミオシンフィラメントから剥離した金型のAFM像が図3a, その金型を使ってPMMA樹脂上にミオシンフィラメント形状の転写に成功したもののAFM像が図3bである(Nishikawa et al., 2004)。

実験開始当初、筆者自身はとても無茶な実験だと思ったのだが、実際にこうして結果が出てしまうのを目の前にして、異分野からの視点は研究には非常に重要であるということを再び認識させられた。また、当講座のように異分野の研究者と共に研究する場においては、このようにナイーブに考え直す機会がより多いと思われる。当寄附講座における研究スタイルは、研究・実験の現場レベルで考えたときには、結局のところ共同研究と言うのが非常に近い。寄附講座の大きな目標は、寄付金を支出しているオムロンや、オムロンから来ているスタッフ、そして大阪大学にとってプラスになる研究活動を行うことであろう。そこから、実験研究を実施している現場レベルへ視点を移した場合、モーター蛋白質研究や1分子蛍光検出などを行ってきた筆者と、半導体プロセスを行っているオムロンの研究者が、それぞれ持っている技術や知識を活かし、研究課題達成に向かって合わせ込むべく研究を進めており、そのスタイルは共同研究と思って違和感はない。また、このナノ形状転写実験から考えるに、ナノテクノロジーにおけるオムロンが持つ技術の潜在的能力は非常に大きい違いなく、将来の新規商品のための技術シード開発と同様に、ナノバイオロジーにおいて興味深い実験や研究を今後行えるであろうと筆者自身楽しみにしているところである。

謝 辞

良き研究の場を筆者に提供して下さっているオムロン株式会社および生命機能研究科ナノデバイス基礎講座のスタッフに謝意を表す。また、これまで筆者の研究を辛抱強く支えて下さった生命機能研究科の柳田敏雄教授、刺激的な様々な議論や研究を共に展開した新旧・柳田研究グループのスタッフ・学生一同に、そして筆者の意見を紹介する場を紹介してくださった生命機能研究科の乗岡茂巳教授に感謝する。

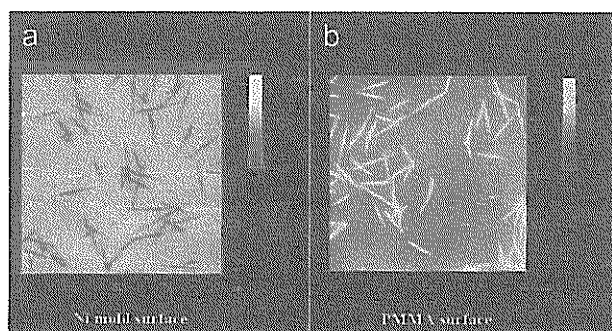


図3 ミオシンフィラメントから作成した金型(a)と複製(b)のAFM像。

文 献

- Kishino, A. & Yanagida, T. Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature*. (1988)334 : 74-76.
- Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K., Oosawa, F. Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature*. (1984)307 : 58-60.
- 若松栄史 結び・結ぶ・結べ. 生産と技術. (2003) 55 : 20-22.
- Tsuda, Y., Yasutake, H., Ishijima, A. Yanagida, T. Torsional rigidity of single actin filaments and atin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1996)93 : 12937-12942.
- Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., Yanagida, T. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*. (1995) 374 : 555-559.
- Wazawa, T., Ishii, Y., Funatsu, T., Yanagida, T. Spectral fluctuation of a single fluorophore conjugated to a protein molecule. *Biophys. J.* (2000)78 : 1561-1569.
- Wazawa, T. & Ueda, M. Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience. submitted to *Adv. Biochem. Engin. Biotech.* (2004)
- Nishikawa, T., Wazawa, T., Matsushita, T., Norioka, S., Aoyama, S. Nano imprinting of a protein assembly on metal surface. *Biophys. J.* (2004)86 : 161a.

