

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05785

研究課題名（和文）細胞内局所パラメトリック翻訳における物理化学的調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Physicochemical Regulatory Mechanisms in Intracellular Local Parametric Translation

研究代表者

原田 慶恵 (Harada, Yoshie)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：10202269

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 29,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内局所において翻訳速度を制御する機構は不明である。翻訳は最大の細胞内エネルギー消費反応であることから、本研究では、翻訳速度に与える物理化学的機構として細胞内温度に着目し、細胞内局所のパラメトリックな翻訳速度調節の駆動力として細胞内局所での発熱および温度不均一性の関与を検証した。蛍光性ポリマー温度センサーを用いた細胞内温度計測法を用いて翻訳が細胞内温度に与える影響を詳細に調査し、細胞内温度が翻訳に密接に関与することを見出した。また、遺伝子発現の大きな変化を伴う神経分化において転写や翻訳が発熱を示すこと、また加熱により分化が促進されることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳速度変化は注目を集めているにも関わらず、その物理化学機構は一切不明であった。これに対し、本研究では細胞内温度変化という独自の技術と発見に基づいた視点でその謎に挑戦した。学術的創造性、翻訳速度と細胞内温度変動の関連を解明することは、細胞微小空間における温度変化が細胞機能に貢献する「温度シグナリング」の作用点を明らかにすることにもつながり、細胞内における適応的遺伝子発現調節に関する新機軸となる。従来知られている化学シグナリングやmRNAの配列による翻訳速度調節原理とは異なり、細胞内物理化学環境の変化による緩やかかつダイナミックな翻訳制御機構が、遍く難解な生命現象を紐解く新たな鍵となる。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms that regulate translation rate locally in the cell are unknown. Since translation is the largest intracellular energy-consuming reaction, this study focused on intracellular temperature as a physicochemical mechanism that affects translation rate and examined the involvement of localized intracellular heat generation and temperature heterogeneity as driving forces for parametric translation rate regulation locally within the cell. Using fluorescent polymer temperature sensors to measure intracellular temperature, we investigated the effect of translation on intracellular temperature in detail and found that intracellular temperature is closely related to translation. We also found that transcription and translation are exothermic during neuronal differentiation, which is accompanied by major changes in gene expression, and that heating promotes differentiation.

研究分野：生物物理学

キーワード：パラメトリック 細胞内温度計測 細胞内局所加熱 翻訳速度

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、細胞内における温度計測を初めて達成し、細胞内局所における時空間的な温度の変動を発見した。さらに、細胞内局所温度変化が生体分子の状態変化を介して細胞機能に貢献する現象である「温度シグナリング」を見出した。この結果は、細胞内局所発熱と細胞機能をつなぐ興味深い現象であり、生物学における斬新なメカニズムである。しかし、このような細胞内局所温度変化の実体とその生物学的意義については完全に謎であった。

一方、Ribo-seq をはじめとする生化学研究から、細胞内で最大の化学反応である翻訳が一過的な停止や再開により連続的かつダイナミックに制御されること、また翻訳因子が熱力学状態である液液相分離であるとの複数の報告がされた。これを温度シグナリングの結果と合わせることで、パラメトリックな翻訳の駆動力として温度変化が担う分子機構の存在を仮説立てた。もし細胞内局所温度変動と翻訳調節の関連を証明し、その分子機構が解明できればパラメトリックな細胞反応の原理の解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内局所温度変化を切り口に、細胞内翻訳速度変化の物理化学メカニズムを解明することを目的とする。翻訳速度変化は注目を集めているにも関わらず、その物理化学機構は一切不明である。これに対し、本研究では細胞内温度変化という独自の技術と発見に基づいた視点でその謎に挑戦する。翻訳速度と細胞内温度変動の関連を解明することは、細胞微小空間における温度変化が細胞機能に貢献する「温度シグナリング」の作用点を明らかにすることにもつながり、細胞内における適応的遺伝子発現調節に関する新機軸となる可能性がある。従来知られている化学シグナリングや mRNA の配列による翻訳速度調節原理とは異なり、細胞内物理化学環境の変化による緩やかかつダイナミックな翻訳制御機構が、遍く難解な生命現象を紐解く新たな鍵となる。

3. 研究の方法

1. 細胞内翻訳の熱力学解析

蛍光性ポリマー温度センサーによる細胞内温度分布イメージング法、蛍光ナノダイヤモンドによる局所温度計測法を用いて、薬剤等により翻訳活性を変調した細胞内温度測定から翻訳反応の熱特性を解明する。予備的検討で翻訳が発熱反応であることを見出した。次に、細胞内の局所温度を人工操作した際の翻訳活性・速度の変化を観察する。細胞内局所温度操作法としては、いずれも独自の IR レーザー照射や金修飾蛍光ナノダイヤモンドへの可視レーザー照射に加えて、高熱容量の熱スポンジ分子による温度勾配抑制法を用いる。翻訳活性の評価は、従来の翻訳因子の可視化やレポーターの観察に加えて、本領域が強みとするリボソーム渋滞の検出や特定 mRNA の翻訳速度迅速定量法を駆使する。

2. 細胞内局所における翻訳一分子イメージングによる分子動態解析

細胞内局所で mRNA-リボソーム複合体を一分子レベルで直接観察し、温度変化が翻訳複合体に与える状態変化を記述する。蛍光性 RNA プローブに光安定性に優れた蛍光ナノダイヤモンドないし明滅色素 2MeSiR を連結し、蛍光プローブの光子分布から重心位置を解析することで mRNA1 粒子を追跡する方法を開発した。この方法を用いて翻訳活性を阻害した細胞や局所加熱を行なった細胞内で mRNA の一分子追跡を行うことにより細胞内温度変化依存的な翻訳調節機構を考察する。

3. 温度シグナリングによる翻訳速度調節の分子機構の解明

翻訳速度調節のメカニズムを調べるため、1 と 2 の技術を組み合わせて発熱性オルガネラや人工熱源と関連した翻訳状態の変化やリボソーム渋滞時の mRNA の振る舞いを一分子レベルで観察する。特に、翻訳中 mRNA の拡散定数の変化、会合状態の解析から温度応答の実体を捉え、その温度依存機構を解明する。

4. 研究成果

遺伝子発現に可変性をもたらす翻訳速度制御の細胞内機構はどのようなものだろうか？これまでに翻訳が障害された際に mRNA 上で停滞したリボソームを脱落させる機構が知られているが、昨今の次世代シーケンサーを用いたリボソームプロファイリングの結果から、翻訳異常時だけでなく、定常的に mRNA-リボソーム複合体には種々の状態が存在し、翻訳速度がダイナミックに変動するパラメトリックな翻訳現象が示唆された。このことから、翻訳速度変化は翻訳異常への応答だけでなく、環境適応やストレス応答、神経機能など臨機応変かつ劇的な生命機能を担うと考えられてきた。しかし、細胞内局所において翻訳速度の変動を駆動・制御する機構は分かっていない。この原因は、これまで細胞内で翻訳速度調節を担う物理化学的な要因を解明した研究がほとんどなかったためである。

我々はこれまでに細胞内局所に時空間的な温度変動があることを見出した。翻訳は最大の細胞内エネルギー消費反応であることから、本研究では、翻訳速度に与える物理化学的機構として細胞内温度に着目した。そこで、細胞内局所のパラメトリックな翻訳速度調節の駆動力として細胞内局所での発熱および温度不均一性の関与を検証する。我々独自の細胞内局所温度の計測法や局所温度操作法を用いて、翻訳反応の熱収支や翻訳複合体の状態やダイナミクスに与える細胞内温度変動の影響を解析すること、及びその機構の解明を目的とした。

本研究で必要となる蛍光性ポリマー温度センサーによる細胞内温度マッピング法や蛍光ナノダイヤモンドによる細胞内局所温度計測法の改良と応用により、細胞内局所の温度変化を高速かつ高精度に計測する方法を構築した。この方法を用いて、翻訳が細胞内温度に与える影響を詳細に検討した。まず、一定温度環境において培養した細胞内の定常的温度とそれぞれの細胞内における翻訳活性に正の相関があることを発見した。さらに、神経分化の進行に伴って細胞内の定常的温度が上昇することを見出した。これらの結果は、前年度に解明した翻訳阻害が定常的細胞内温度の低下や神経分化に起因する温度上昇を抑制する結果と良好に合致し、細胞内温度が翻訳と密接に関与することを示している。

次に、細胞内発熱が翻訳に与える役割を解明するために、細胞内の選択的加熱法の開発に取り組んだ。細胞内局所の加熱法として、金ナノ粒子への可視光レーザー照射を選択し、金ナノ粒子の細胞内への導入法の検討および加熱時の細胞内温度変化の定量的評価を行った。続いて、構築した金ナノ粒子による細胞内加熱法を用いて翻訳の操作を検討した。細胞内の mRNA を可視化した細胞において、金ナノ粒子による局所加熱を行ったところ、mRNA が顆粒状に集合する様子を観察した。免疫染色によりこれらの RNA 顆粒は翻訳調節能が知られているストレス顆粒であることを示したことから、細胞内局所加熱により、翻訳が制御可能であることを発見した。

さらに、細胞内発熱が翻訳反応に直接影響を与えるかどうかを検討するために、細胞内の温度勾配を阻害する方法の開発と細胞内の特定 mRNA の加熱法の開発にも取り組んだ。その結果、生理的温度領域において吸熱的構造変化を示すポリマーを細胞内に導入することで、濃度依存的に細胞内温度分布を攪乱することを見出した。温度勾配を阻害した細胞内において翻訳活性を評価したところ、細胞内温度勾配阻害時に翻訳活性が著しく低下した。一方、赤外レーザーによる細胞内局所加熱時の翻訳活性の変化は検出できなかった。現状の加熱法である数マイクロメートルサイズの細胞質加熱では翻訳速度の変化は誘導できないと考えられる。さらに、温度シグナリングによる翻訳制御の生理的意義を解明するため、神経組織・細胞を用いて機能発現に伴う翻訳活性と細胞内温度の関係を調査した。特に、遺伝子発現の大きな変化を伴う神経分化において転写や翻訳が発熱を示すこと、また加熱により分化が促進されることを見出した。以上の結果は、翻訳活性が温度シグナリングによる正の制御を受けること、さらにそれが神経分化等の生理的意義を有することを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shingo Sotoma, Yoshie Harada	4. 巻 4
2. 論文標題 Composite Quantum Sensors Based on Fluorescent Nanodiamonds for Intracellular Controlled Heating in Living Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 3969-3976
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.1c00334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuko Okamoto, Tomonobu M Watanabe, Masanobu Horie, Masayoshi Nishiyama, Yoshie Harada, Hideaki Fujita	4. 巻 10
2. 論文標題 Pressure-induced changes on the morphology and gene expression in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio058544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.058544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akira Murakami, Kohjiro Nagao, Reiko Sakaguchi, Keisuke Kida, Yuji Hara, Yasuo Mori, Kohki Okabe, Yoshie Harada, Masato Umeda	4. 巻 38
2. 論文標題 Cell-autonomous control of intracellular temperature by unsaturation of phospholipid acyl chains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110487
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110487	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kohki Okabe, Seiichi Uchiyama	4. 巻 4
2. 論文標題 Intracellular thermometry uncovers spontaneous thermogenesis and associated thermal signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02908-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masatoshi Wakamori, Kohki Okabe, Kiyoe Ura, Takashi Funatsu, Masahiro Takinoue, Takashi Umehara	4. 巻 48
2. 論文標題 Quantification of the effect of site-specific histone acetylation on chromatin transcription rate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 12648-12659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa1050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ivana Ducic, Hisashi Tadakuma, Yoshie Harada, Ryo Yamaue, Katashi Deguchi, Yuki Suzuki, Shige H Yoshimura, Hiroki Kato, Kunio Takeyasu, Takashi Fujita	4. 巻 48
2. 論文標題 Viral RNA recognition by LGP2 and MDA5, and activation of signaling through step-by-step conformational changes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11664-11674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shingo Sotoma, Chongxia Zhong, James Chen Yong Kah, Hayato Yamashita, Taras Plakhotnik, Yoshie Harada, Madoka Suzuki	4. 巻 7
2. 論文標題 In situ measurement of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd7888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd7888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 外間進悟、鈴木団、原田慶恵
2. 発表標題 細胞内熱伝導率の計測
3. 学会等名 光・量子デバイス研究会 超スマート社会の構築に繋がる革新的材料創出に向けた光・量子ビーム応用技術調査専門委員会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shingo Sotoma, Madoka Suzuki and Yoshie Harada
2. 発表標題 Measurements of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensors
3. 学会等名 17th International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田慶恵
2. 発表標題 ナノダイヤモンドを用いた細胞内イメージング
3. 学会等名 第38回医用高分子研究会講座～生体イメージングの最前線～ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shingo Sotoma, Shunsuke Chuma, Koki Okabe and *Yoshie Harada
2. 発表標題 Intracellular thermometry with fluorescent polymer sensor and nanodiamond
3. 学会等名 Pacifichem (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中馬俊祐、岡部弘基、原田慶恵
2. 発表標題 細胞内温度イメージングを用いた神経分化機構の解明
3. 学会等名 2022年生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡部弘基・竇田雅治・船津高志
2. 発表標題 細胞内温度イメージングによる細胞内伝熱工学
3. 学会等名 日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡部弘基
2. 発表標題 Intracellular thermal signaling facilitates translation control
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡部弘基
2. 発表標題 細胞内温度シグナリングによる翻訳活性制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunsuke Chuma, Kohki Okabe, Yoshie Harada
2. 発表標題 Involvement of intracellular temperature in neuronal differentiation
3. 学会等名 第15回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福本 紘大, 宮園 侑也, 多田隈 尚史, 原田 慶恵
2. 発表標題 DNAオリガミを用いたキネシン-1の空間配置が輸送複合体の協調運動に与える影響の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会 第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外間進悟, 仲崇霞, 鈴木 昶, 張 煥正, 原田 慶恵
2. 発表標題 高度に機能制御されたダイヤモンド量子センサによる細胞内センシングの実績
3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡部弘基
2. 発表標題 細胞内温度イメージングによる温度シグナリング研究
3. 学会等名 東京理科大学 ニューロ・ナノ懇談会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学蛋白質研究所原田慶恵研 研究概要 http://www.protein.osaka-u.ac.jp/nanobiology/research/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	岡部 弘基 (Okabe Kohki) (20455398)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関