

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19511

研究課題名(和文)細胞内一分子揺動計測による非平衡温度の計測

研究課題名(英文)Single-molecule measurement of the effective temperature in living cells

研究代表者

岡田 康志(Yasushi, Okada)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：50272430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来のin vitroでの力学的特性からは細胞内の小胞の運動特性が説明できない。細胞内で輸送される小胞に働く力を計測する手法の開発した結果、細胞内を輸送される小胞には、in vitroの約1000倍もの粘性抵抗を受けていることが示された。しかし、小胞輸送の速度は、細胞内の方が、1000倍もの負荷を受けながら、むしろ速く、ときには4倍以上の速度に達する。細胞内の混雑環境がstaticな混雑環境ではなく、細胞内でのエネルギー消費にともなってactiveに揺らぐ非平衡環境であるためではないかと考え、これを定量的に計測することを目標として、その指標である「非平衡温度」の計測のための技術開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞の軸索輸送の速度の低下は、さまざまな神経変性疾患の発症に関係している。一方、細胞の中は満員電車並みの混雑環境であり、in vitroの1000倍もの負荷がかかっているにもかかわらず、健康な神経細胞での輸送速度はin vitroの4倍に達する。本研究では、そのメカニズムの候補として、細胞内のアクティブなゆらぎに注目し、その定量的な計測方法の開発に取り組んだ。このような計測によって、「細胞の元気さ」を定量化できる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The motile properties of the transporting vesicles in living cells are beyond our expectations from those measured with in vitro experiments. The crowded cytoplasmic environment poses about 1000 times stronger viscous resistance on the transporting vesicles than in vitro, but still they move even four times faster. We have surmised that the active fluctuations in the living cytoplasm would play some roles. In this study, we have focused on the "effective temperature" as the quantitative measure for the active fluctuations in the living cytoplasm, and have developed methods to measure it.

研究分野：生物物理学、細胞生物学

キーワード：軸索輸送 細胞内混雑 キネシン ゆらぎ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちは、これまで、細胞内物質輸送を担う分子モーターであるキネシンスーパーファミリー分子の同定と細胞および個体レベルでの機能解析(Cell 1994, 1995, 1998a, 1998b, 2005; Nature 2005 など)および、1分子計測と構造生物学的解析の組合せによる運動原理の解明(Science 1999, 2004; Cell 2000, 2004; Nature 2001, 2003 など)を行ってきた。その過程で、*in vitro*での力学的特性からは細胞内の小胞の運動特性が説明できないことに気がつき、細胞内で輸送される小胞に働く力を計測する手法の開発に着手した。その結果、細胞内を輸送される小胞には、*in vitro*の約1000倍もの粘性抵抗を受けていることが示された。この結果自体は、従来から言われている所謂「細胞内混雑環境」の反映として理解することが出来る。しかし、細胞内での小胞輸送の速度は、*in vitro*と比べてむしろ速く、ときには4倍以上の速度に達する。*In vitro*の1000倍もの負荷を受けながら、むしろ速い速度で動くのは何故か？私たちは、細胞内の混雑環境がstaticな混雑環境ではなく、細胞内でのエネルギー消費にともなってactiveに揺らぐ非平衡環境であるためではないかと考えた。そこで、本研究では、細胞内混雑環境がどのように、そしてどの程度激しく揺らいでいるのかを定量的に計測することを目標として、その指標である「非平衡温度」の計測のための技術開発を行った。

2. 研究の目的

細胞は非平衡系であるとよくいわれるが、では、どの程度非平衡なのだろうか。これまで、細胞1個あるいは細胞内の局所を対象にした熱力学的計測は技術的に困難であったため、この問いに定量的に答えることは出来なかった。本研究では、2000年代に大きく発展した非平衡統計物理学の知見を細胞内の計測に応用することで、細胞内での非平衡温度を計測する方法論を確立し、その分子機構さらには生理的意義まで追求することで、この問題を発展的に解決することを目的とする。

3. 研究の方法

*In vitro*のブラウン運動のように平衡に近い系では、アインシュタイン関係式

$$\gamma = k_B T / D$$

が成り立ち、粘性抵抗と揺らぎの間には比例関係があり、その比例係数が温度である。

これを非平衡系に拡張した揺らぎの定理からは、

$$F_d = k_B T_{eff} \frac{\ln[P(\Delta x)/P(-\Delta x)]}{\Delta x}$$

と、やはり粘性抵抗と揺らぎの比例関係が導かれる。ただし、その比例係数は、熱力学的な温度ではなく、非平衡系を特徴付ける「有効温度」となる。そこで、本研究では、まず、細胞内での小胞運動などを計測し、そのゆらぎの解析から、上記式で定義される有効温度を推定する。

さらに、細胞内での非平衡揺らぎを直接的に計測することを目標として、細胞内分子および微粒子の高速3次元追跡を行うための顕微鏡開発を行う。

4. 研究成果

まず、揺らぎの定理を用いた有効温度計測のために、神経細胞でのエンドソームの輸送に着目し、時間分解能10ms、位置精度8nmでの計測を行った。とくに、一定速度で一方向にエンドソームが一定時間運動した直後に停止するというイベントに注目し、等速運動中の速度 v とそのゆらぎ χ 、停止した後の位置の揺らぎとそのパワースペクトル(から計算される粘性抵抗係数 Γ)を解析した(Hayashi et al, 2018)。

これにより、たとえば $v = 2.9 \mu\text{m s}^{-1}$ 、 $\chi = 0.24 \text{ nm}^{-1}$ 、 $\Gamma = 3.7 \mu\text{N s m}^{-1}$ という結果が得られ、揺らぎの定理 $\Gamma v / \chi = k_B T_{eff}$ から、有効温度は $4 \times 10^3 \text{ K}$ と細胞の実際の温度(300 K)の14倍にも相当する高い値が得られ、細胞内が強い非平衡状態にあることが定量的に示された。

また、細胞内での蛍光一分子高速3次元追跡のため、マルチフォーカス光学系を用いた輪帯照明全反射顕微鏡を作成した。これにより、1msの時間分解能で蛍光一分子を10nm程度の位置精度で追跡することが実現した。非平衡統計力学からは、非平衡揺らぎにはスケール依存性が予想され、細胞内ではサブミリ秒から数十秒の時間スケールでのマルチスケール計測が必要となる。そこで、本研究では、1)高速化のための技術開発、2)数十秒以上の長時間にわたって追跡し続けるための技術開発を行った。



図. 輪帯照明全反射
マルチフォーカス顕微鏡

高速化に対して律速となっているのは、カメラのフレームレートである。そこで、高速カメラの導入と並行して、新しく PSD(位置検出素子)を用いた位置計測のための高速高精度検出系の開発を行った。

また、長時間追跡における課題は 2a) 蛍光分子の褪色、 2b) 対象分子が視野外に出てしまう、の 2 つである。2a) については、超耐光性近赤外蛍光色素 PREX710 を新規に開発し、褪色を 1/10 以下に抑えることに成功した (Gzrybowski et al., 2018)。

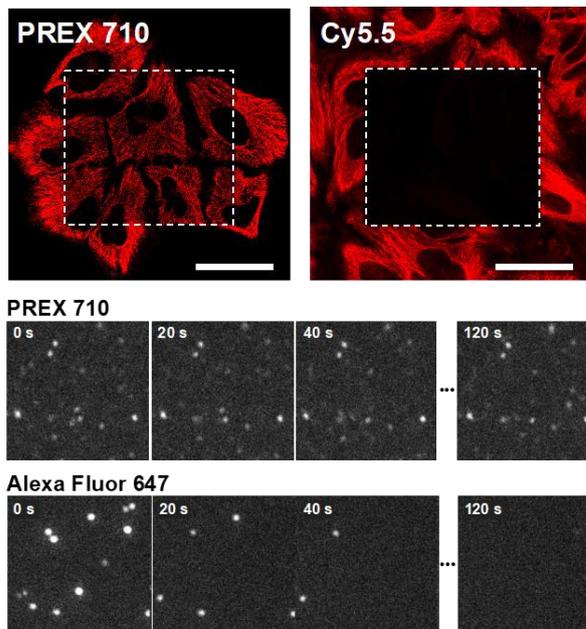


図. 超耐光性近赤外蛍光色素 PREX710 と
既存色素との耐光性の比較

また、2b) については、1) の PSD からの出力を利用して、対象分子の移動に追従してステージを動かすフィードバックシステムの構築に着手した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Hasegawa S, Sagawa T, Ikeda K, Okada Y, Hayashi K. Investigation of multiple-dynein transport of melanosomes by non-invasive force measurement using fluctuation unit χ . Sci. Rep 9: 5099, 2019 査読あり doi:10.1038/s41598-019-41458-w
2. Hayashi K, Tsuchizawa Y, Iwaki M, Okada Y. Application of the fluctuation theorem for non-invasive force measurement in living neuronal axons. Mol Biol Cell, 29:3017-3025, 2018 査読あり doi: 10.1091/mbc.E18-01-0022
3. Gzrybowski M, Taki M, Senda K, Sato Y, Ariyoshi T, Okada Y, Kawakami R, Imamura T,

Yamaguchi S. A highly photostable near-infrared labeling agent based on a phosphorhodamine for long-term and deep imaging. Angew. Chem. 57:10137-10141, 2018. 査読あり doi:10.1002/anie.201804731

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：測定方法、力測定装置、力測定システム、力測定プログラム及び記録媒体

発明者：林久美子、岡田康志

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2017-210698

出願年：2017

国内外の別：PCT

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。