

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21740316

研究課題名(和文) 細胞内局所温度変化と細胞機能のクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between the local temperature change inside single living cells and the cellular functions

研究代表者

鈴木 団 (SUZUKI MADOKA)

早稲田大学・総合研究機構・講師

研究者番号：40350475

研究成果の概要(和文)：

本研究の最終的な目的は、Ca<sup>2+</sup>濃度変化が機能の発現と密接に結びついている脳と心臓で、機能と温度の関係をミクロな視点から明らかにすることである。まず細胞の熱的特性を定量化することに重点を置いた。次に、局所的な温度勾配が細胞に対してどのような影響を与えるかを、分裂期の HeLa 細胞に着目することで調べた。さらに移動性細胞を用いて、局所的な温度勾配やパルス状熱刺激が運動能に与える影響を調べた。他に、心筋細胞の拍動メカニズムを明らかにしようとする研究へと展開した。

研究成果の概要(英文)：

The purpose of this study is to clarify the relationship between the temperature and the functions of the brain and the heart in which the [Ca<sup>2+</sup>] strongly coupled with their function in the microscopic view point. We first focused on clarifying the thermal properties of single living cells. Then the effect of the local temperature gradient was studied with the use of dividing single HeLa cells. Furthermore, the response of the single motile cells to the local temperature gradient and the heat pulse was analyzed. In the meantime, the research was expanded to the studies to elucidate the mechanism of the oscillatory movement of the cardiac cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	2,200,000	660,000	2,860,000
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学、生物物理・化学物理

キーワード：生物物理

## 1. 研究開始当初の背景

生きている細胞にとって、物理・化学的過程を決定する「温度」は非常に本質的なパラメータである。しかし従来の研究では大抵の場

合、細胞内部の温度は、細胞を取り巻く巨大な系の巨視的パラメータとして扱われてきた。すなわち、細胞内温度は空間的に均一で、時間的にも一様に変動するとみなされてき

た。その一つの理由は、たとえ細胞内部で局所的に熱発生があったとしても、水溶液中では熱が非常に速く拡散するので単一細胞内部の温度は一定に保たれる、と信じられてきたことにある。加えて、水中ではサブミクロンレベルまで小さくしても理論的には温度を定義することが可能であるにも関わらず、局所的に熱パルスを与えたり単一細胞レベルで温度を測定する手法がほとんど開発されてこなかったことも原因だろう。

そこで申請者らはまず、上記の温度測定条件を全て満たす「マイクロ温度計」を開発した (Zeeb *et al.* 2004) (図 1A)。このマイクロ温度計を細胞一個からの熱発生を検出することに応用したところ、 $\text{Ca}^{2+}$ 担体であるイオノマイシンを用いて細胞外から細胞内へ強制的に  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させると、それよりやや時間的な遅れをもって細胞の温度が上昇することを見出した。温度上昇は最大で約  $1^\circ\text{C}$  で、また細胞外  $[\text{Ca}^{2+}]$  が高いほど、この時間的遅れは短くなることも分かった。本研究は、熱発生が小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の酵素活性と結びつくことを強く示唆している。また、細胞の機能と熱産生の時間的相関が初めて明らかにされた (Suzuki *et al.* 2007)。

そして最近、微小領域に限定した熱パルス (図 1) を HeLa 細胞に与えたところ、加熱中に  $\text{Ca}^{2+}$  の小胞体への取り込みを促進し、再冷却直後に  $\text{Ca}^{2+}$  放出を引き起こすことを見出した。 $\text{Ca}^{2+}$  放出を引き起こす温度変化には閾値が存在し、実験温度を  $22^\circ\text{C}$  から  $37^\circ\text{C}$  に上げると閾値は  $1.5^\circ\text{C}$  から  $0.2^\circ\text{C}$  まで減少した。さらに小胞体膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase による  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みと、イノシトール三リン酸受容体 ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出とのバランスが熱パルスで一時的に崩壊することで、この非常に高い温度感受性をもつ  $\text{Ca}^{2+}$  ダイナミクスが生まれることが分かった。 $\text{IP}_3\text{R}$  は非常に広範に発現するタンパク質である。よって以上の結果は、多くの細胞種における  $\text{Ca}^{2+}$  を介した機能発現が、特に体温付近で、僅かな温度変化に非常に敏感であることを強く示唆する。

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化が機能の発現と密接に結びついている脳と心臓で、機能と温度の関係をマイクロな視点から明らかにすることである (図 2)。小胞体上に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルのリアノジン受容体 (Protasi *et al.* 2004) と  $\text{IP}_3\text{R}$  (申請者ら) の両方が、急速な温度冷却に反応して一過的に  $\text{Ca}^{2+}$  を放出することが分かった。ということは、細胞は内部の各箇所で行われる酵素反応から産生される熱を無駄に拡散させることなく、細胞内の別の反応へ効率的に再利用しているかもしれない。本研究では、この仮

説の検証にアプローチする。

## 3. 研究の方法

初年度においては、まず細胞の熱的特性を定量化することに重点を置いた。そのために、細胞内の局所的な温度変化の測定とその解析を目標とし、単一細胞で温度分布イメージングができるよう細胞質および核内に蛍光色素を導入した。さらに細胞内に直径数  $\mu\text{m}$  の熱源を置いた。

次年度においては、昨年度までの研究をさらに進めた。またそれと並行して、さらに移動性細胞である WI-38 を用いて、局所的な温度勾配やパルス状熱刺激がそれらに与える影響を調べ、非移動性細胞である HeLa 細胞で見られたように、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度変動を人為的に誘導できるかを検討した。

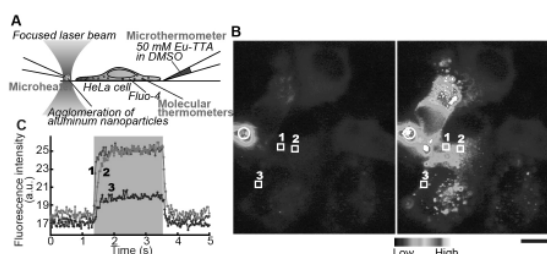


図 1. (A)実験系模式図。(B)熱パルス前(左)と後(右)の温度感受性蛍光ポリマー像。ポリマーは細胞質にマイクロインジェクションした。スケールバー:10 $\mu\text{m}$ 。(C)細胞内温度変化。熱パルスの幅をグレーの領域で表した。

## 4. 研究成果

初年度においては、細胞内で熱拡散係数が不均一であることを示唆する結果を得た。さらに高速イメージングの手法と組み合わせることで、希薄な水溶液と細胞質との違いを定量化することができた。次に、局所的な温度勾配が細胞に対してどのような影響を与えるかを、分裂期の HeLa 細胞に着目することで調べた。これまでの研究から、高温にさらされた細胞の分裂は異常を来すことが分かっている。本研究では局所熱励起の手法を用いて、非常に急な温度勾配にさらされた細胞の分裂の様子を調べた。これにより、温度勾配の方向に対し垂直となるように紡錘体が回転していくことが分かった。以上の研究成果を、日本生物物理学会第 47 回年会において発表した。また心筋細胞の拍動メカニズムを明らかにしようとする研究へと展開し、分子モーターと細胞骨格タンパク質とが自己集合的に集合体を形成することで拍動が生み出されることを示唆する結果を得て、これをレビューとして HFSP J 誌に発表した (図 2)。

初年度に、分裂期の HeLa 細胞に局所的な温度勾配を与えると、紡錘体が回転することを見いだした。そこで次年度においてはその分子メカニズムを解明するために、この研究

をさらに進めた。その結果、紡錘体の回転が微小管の重合・脱重合速度の温度依存性によるものであることを示唆する結果を得た。さらに WI-38 を用いた研究に熱パルスを与える研究においては、HeLa と同様の  $Ca^{2+}$  振動が見られた。また各種阻害剤を作用させたときの応答を調べることで、膜小胞体上に存在する  $Ca^{2+}$  ポンプと  $Ca^{2+}$  チャネルとの温度依存性の違いが、このような応答を生み出していることを示唆する結果を得た。以上の両方の研究成果を、第 48 回日本生物物理学会及び第 55 回米国生物物理学会年会において発表した。

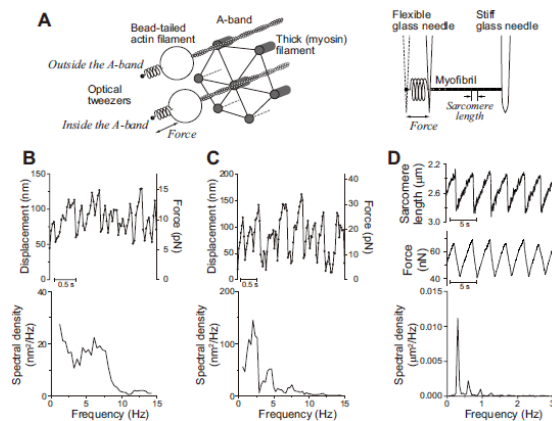


図2. A 帯滑り運動系及び骨格筋筋原線維で見られる自律的張力振動の解析。(A)A 対滑り運動系(左)及び筋原線維系(右)の模式図。(B-D)筋フィラメントの振動現象及び張力発生。A 帯の外側(B)及び内側(C)での波形、および筋原線維の典型的な SPOC 振動(D)。(上段)アクチンフィラメント一本(B,C)、及び筋節長(D の上段)の経時変化;対応する張力変化は右縦軸(B,C)及び D の中段に記載。(下段)上段のスペクトル図。B,C のデータは Suzuki, Fujita, Ishiwata (2005) *Biophys J* 89,321-328 より。SPOC のデータは Shimamoto et al. (2007) *Biophys J* 93, 4330-4341 より。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Ishiwata, S.\*, Shimamoto, Y.\* and Suzuki, M.\* (\*Equal contribution) Molecular motors as an auto-oscillator. *HFSP J.* 4(3), 100-104 (2010)、査読有り

[学会発表] (計 19 件)

1. Itoh, H., Suzuki, M., Oyama, K., Motoyoshi, M. and Ishiwata, S. Microscopic heat pulse induced calcium dynamics in a migratory cell. 米国生物物理学会第 55 回年会 (Biophysical Society the 55th Annual Meeting), Baltimore, Maryland, USA, March 5-9, 2011

2. Motoyoshi, M., Suzuki, M., Oyama, K., Itabashi, T. and Ishiwata, S. Rearrangement of mitotic spindle in HeLa cell under steep temperature gradient. 米国生物物理学会第 55 回年会 (Biophysical Society the 55th Annual Meeting), Baltimore, Maryland, USA, March 5-9, 2011
3. 鈴木 団 レーザー誘起気泡で生じる温度変化の時空間分布, 第 3 回 FBT (生物学・化学・情報科学融合のための戦略的研究基盤形成支援事業) シンポジウム、早稲田大学、東京、2011 年 1 月 22 日
4. Suzuki, M. and Ishiwata, S. Microscopic measurement of periodic rigor cross-bridge formation and their unbinding force in rabbit skeletal myofibril. The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sendai, September 20-22, 2010
5. Oyama, K., Suzuki, M., Tseeb, V., Seto, K., Motoyoshi, M., Itoh, H., Iwai, K. and Ishiwata, S. High-speed imaging of heat transfer in single living cells. The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sendai, September 20-22, 2010
6. Itoh, H., Suzuki, M., Oyama, K., Motoyoshi, M., Seto, Y. and Ishiwata, S.  $Ca^{2+}$  response to microscopic heat pulses in a migrant cell. The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sendai, September 20-22, 2010
7. Motoyoshi, M., Suzui, M., Oyama, K., Itabashi, T. and Ishiwata, S. Rotation of mitotic spindle in HeLa cell under steep temperature gradient. The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sendai, September 20-22, 2010
8. Ishiwata, S., Shimamoto, Y., Ohtaki, M., Sato, K. and Suzuki, M. Mechanobiology in Muscle Contraction. The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sendai, September 20-22, 2010
9. Suzuki, M. Investigation of the role of micro-level physical parameters in biological systems. The 1st Anniversary Symposium of

- Waseda Bioscience Research Institute in Singapore (WABIOS), Singapore, September 15, 2010
10. Oyama, K., Suzuki, M., Tseeb, V., Seto, Y., Motoyoshi, M., Itoh, H., Iwai, K. and Ishiwata, S. Fluorescence imaging of a heat transfer in single HeLa cells. The 1st Anniversary Symposium of Waseda Bioscience Research Institute in Singapore (WABIOS), Singapore, September 15, 2010
  11. Suzuki, M. and Ishiwata, S. Microscopic measurement of periodic cross-bridge formation in skeletal myofibril. 米国生物物理学学会第54回年会 Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, CA, 02/2010S. Ishiwata, Y. Oguchi, S. V. Mikhailenko, M. Suzuki, K. Sato, M. Ohtaki, Y. Shimamoto, K. Suzuki, J. Takagi, and T. Itabashi, Self-organization in Biomotile Systems - Molecular motors, Auto-oscillation (SPOC) in muscle and Meiotic spindle -, 1st POSTECH Workshop on Physics of Self-Organization in Bio/Nano-Systems, Asia Pacific Center for Theoretical Physics (APCTP), Pohang, S. Korea, January 27-29, 2010
  13. Suzuki, M., Oyama, K., Seto, Y. and Ishiwata, S. Development of microscopic imaging techniques and study into cell structure, physical properties and function. 第2回 FBT (生物学・化学・情報科学融合のための戦略的研究基盤形成支援事業)、PBL (大学院教育改革支援プログラム) ジョイントシンポジウム、早稲田大学、東京、2010年1月23日
  14. 瀬戸祐介、大山廣太郎、新谷正嶺、福田紀男、鈴木団、石渡信一、拍動に伴う心筋細胞の熱発生イメージング、2010年生体運動研究合同班会議プログラム、中央大学、東京、2010年1月9日～11
  15. S. Ishiwata, Y. Oguchi, S. V. Mikhailenko, M. Suzuki, K. Sato, M. Ohtaki, Y. Shimamoto, K. Suzuki, J. Takagi, and T. Itabashi, Chemo-mechanical Feedback Loop in Biomotile Systems, International Conference on Physics Biology Interface, Saha Institute of Nuclear Physics, Kolkata, India, December 13-16, 2009
  16. Suzuki, M. and Ishiwata, S. Direct observation of interaction between single actin filament and myosin in skeletal myofibril. The 3rd Mechanobiology Workshop, National University of Singapore, Singapore, November 3-5, 2009
  17. Motoyoshi, M., Suzuki, M., Oyama, K., Itabashi, T. and Ishiwata, S. 分裂期のHeLa細胞への局所温度勾配の効果 Effect of local temperature gradient on HeLa cells in mitotic phase. 日本生物物理学学会第47回年会、徳島、2009年10月30日-11月1日
  18. Ono, F., Suzuki, M., Oyama, K., Strukova, S. and Ishiwata, S. 肥満細胞の脱顆粒メカニズム：アクチン骨格再構成での活性化タンパク質Cの役割 Mechanism of mast cell degranulation: Roles of activated protein C in the rearrangement of actin cytoskeleton. 日本生物物理学学会第47回年会、徳島、2009年10月30日-11月1日
  19. Oyama, K., Suzuki, M., Tseeb, V., Ono, F., Seto, Y., Motoyoshi, M., Iwai, K. and Ishiwata, S. 細胞内の局所的な温度変化の測定とその解析 Measurement and analysis of local temperature change inside living cells. 日本生物物理学学会第47回年会、徳島、2009年10月30日-11月1日
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
鈴木 団 (SUZUKI MADOKA)  
早稲田大学・総合研究機構・次席研究院  
研究者番号：40350475
  - (2) 研究分担者  
該当しない
  - (3) 連携研究者  
該当しない