

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 2日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770158

研究課題名（和文） 気管上皮細胞による流れのナノ計測に基づく計算流体力学研究

研究課題名（英文） Nano-scale analysis and computational fluid mechanics of the flow on the surface of tracheal lumen

研究代表者

上野 裕則（UENO HIRONORI）

東北大学・国際高等研究教育機構・助教

研究者番号：70518240

研究成果の概要（和文）：空気中のウィルスや細菌は気管の繊毛運動により体外へ排出されるが、詳細な繊毛運動や効率的な異物排除機構は現在まで謎であった。本研究では、高空間分解能光学顕微鏡を用い気管繊毛の非対称性運動を詳細に解明した。また、クライオ電子線トモグラフィ法により繊毛の3次元構造を世界に先駆けて解明する事が出来た。さらに異物細菌の集団遊泳における流動特性を明らかにした。最後に、異物排除機構のシミュレーション解析に向け、コードの開発、GPGPU実装コンピューターシステムの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Mucociliary clearance on the surface of the tracheal lumen is an important component of lung defense against viruses and bacteria. We analyzed the detail of ciliary movement with high spatial precision by labeling the ciliary tip using quantum dots, and axonemal structure by cryo-electron tomography. We revealed the overall directional flow from the lungs to the oropharynx on tracheal lumen by effective ciliary motion with the asymmetric axonemal structure. Moreover, we discovered that collective swimming of microorganisms is the most energy-efficient way of moving. And also, we developed new program code and GPGPU computational system to analyze the fluid flow mechanism on the surface of tracheal lumen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：運動・輸送

キーワード：繊毛・鞭毛、気管、ダイニン、クライオ電子線トモグラフィ法

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む哺乳類は呼吸によってたくさんの空気を体内へ取り込んでいますが、この空気中には風邪や病気の原因となるウイルス・細菌が含まれています。我々は日々の生活を営む上で、感染の脅威に曝されていますが、気管表面の繊毛運動によって、これら異物を体外へ放出しています。しかし、この繊毛運動がどのように駆動され、効率的に異物を排除しているのかは謎でした。真核生物の繊毛・鞭毛は、基本的に9+2構造と呼ばれる特徴的な構造をしており、分子モーター・ダイニンとそのレールである微小管の滑り運動によって引き起こされます。この繊毛運動の結果、細胞表面に一定方向の流れを生み出し、生体内での「移動」、「循環」、「物質輸送」などに関わります。これら繊毛・鞭毛運動の欠失は原発性線毛機能不全症(PCD: primary ciliary dyskinesia)と総称される疾患の原因となります。本研究で扱う気管上皮細胞には、繊毛細胞と腺細胞の2種類があり、腺細胞によって分泌される粘液に細菌やウイルスなどをトラップし、粘液と共に繊毛運動によって体外へ輸送・排出されます。しかし、詳細な繊毛運動や繊毛構造、効率的な異物排除機構は現在まで謎でした。気管の繊毛運動による流体の理論解析についてはいくつか論文発表がなされていますが、このような詳細な実験系と計算流体力学解析を組み合わせた形での研究はほとんど進んでいませんでした。

2. 研究の目的

気管繊毛の構造は、9+2構造と呼ばれる特徴的な構造をしており、この中に含まれる分子モーター・ダイニンが力を発生することにより、高速な振幅運動を可能にしています。本研究の目的は、気管の繊毛運動のメカニズ

ムを解明すること、及びその運動によって引き起こされる流体を解析し、どのように気管表面でウイルスなどの異物を排出しているかを解明することです。さらに、実測値に基づく数値シミュレーションを行い、気管での異物排除機構を再現する事によって、将来的には効率的な創薬の開発や医療に貢献したいと考えています。具体的には、(1) 気管繊毛の詳細な運動、(2) 気管組織表面の流体解析、(3) 繊毛内部の3次元構造、(4) 異物バクテリアの集団流動特性、(5) 気管表面の流体の数値シミュレーションの系の構築、以上4点に着目し、研究を行いました。

3. 研究の方法

本研究では、気管での異物排除機構の解明に向け、2. 研究の目的に上げた5点(1)~(5)に着目して研究を行いました。以下、それらの具体的な方法について記述します。(1) 気管繊毛の一本一本の運動を解析するため、繊毛の先端に量子ドット付加し、粒子の中心位置を追跡することによって、繊毛一本一本の運動を詳細に解析しました。(2) 繊毛運動によって、気管上皮表面にどのような流体が形成されるのかを調べるため、気管組織表面に直径1マイクロメートルの蛍光粒子を加え、それらがどのように輸送されるのかをそれぞれの粒子の挙動を追跡することによって解析しました。(3) 気管上皮細胞に存在する繊毛の内部構造がどのようなものであるかを確認するため、電子顕微鏡解析によりその詳細な3次元構造を解明し、高速振幅運動の発生メカニズムを理解しようと考えました。本研究では、クライオ電子線トモグラフィー法を用い、分子そのものの3次元電子密度解析を行いました。主に力を発生するのに必要なダイニン分子を中心に構造解析を行いました。

(4) 異物バクテリアの挙動を解析するため、バクテリアと蛍光粒子を含む液滴内に現れる流動構造を粒子画像流速測定法 (PIV 法) によって測定しました。

(5) 繊毛運動、流体構造、繊毛の内部構造を考慮に入れた数値シミュレーションを行うため、プログラムコードの開発、大規模計算のための GPGPU 実装システムを構築しました。

4. 研究成果

(1) 気管繊毛の詳細な運動解析

気管組織表面に存在する繊毛の先端に量子ドット(蛍光粒子)を付加させ、繊毛の1本の軌跡を、高分解能共焦点蛍光顕微鏡を用い観察しました。この粒子の輝度中心を追跡する事によって、約 8nm の空間分解能で1本繊毛運動を記録する事に成功し、気管繊毛1本の運動は振幅運動を通して非対称的であることが分かりました (図1)。

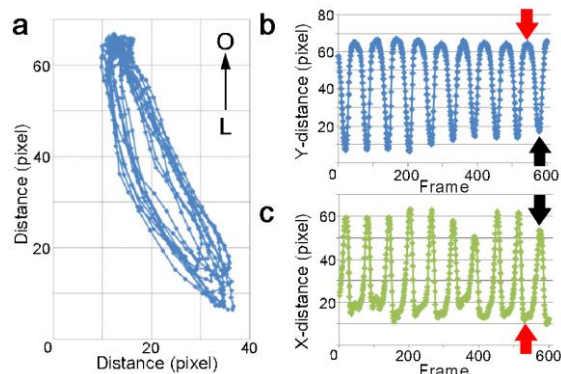


図1 気管繊毛の運動波形

a. 繊毛波形の軌跡 (図の上が喉側)、b. aの波形のY軸成分、c. aの波形のX軸成分

(2) 気管組織表面の流体解析

次に、(1)で示されたような非対称的繊毛運動により、気管表面ではどのような流動構造が形成されているのかを調べました。その結果、気管表面の流体は多少振動しながらも、確実に肺側から喉の方へ輸送されていくことが分かりました。

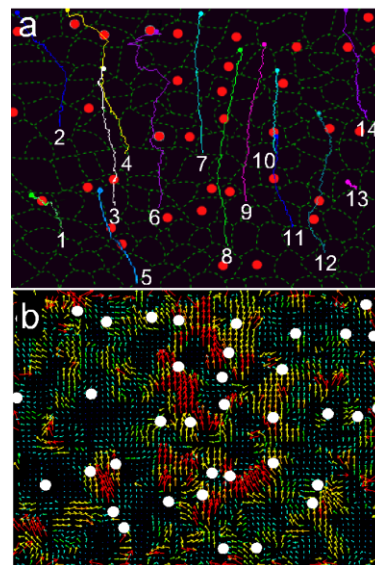


図2 気管上皮における粒子の軌跡(a)とPIV解析による流体の速度ベクトル分布(b)

(3) 繊毛内部の3次元構造

気管繊毛内部の3次元構造を調べるためにクライオ電子線トモグラフィー法をおこないました。その結果、気管繊毛内に複数種類あるモータータンパク質・ダイニン、特に内腕ダイニンの分布に非対称性があることが分かりました。

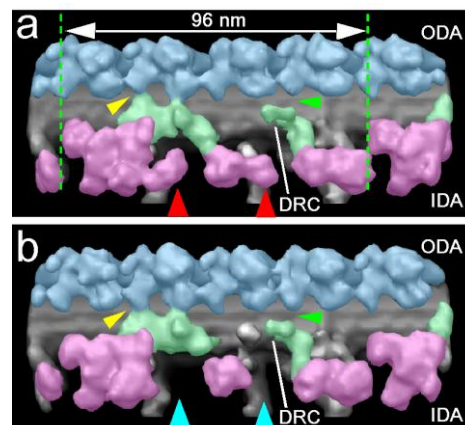


図3 気管繊毛の3次元構造

a. 繊毛内の微小管上の構造 (青: 外腕ダイニン、ピンク: 内腕ダイニン、緑: その他の構造)、b. 繊毛内の1部の微小管上の構造 (水色矢印の内腕ダイニンが欠失している。)

(4) 異物バクテリアの集団流動特性

異物バクテリアを含む液滴内の流動構造を解析した結果、異物バクテリアは集団で遊泳する事により、より高いエネルギー効率で運動することが分かりました。

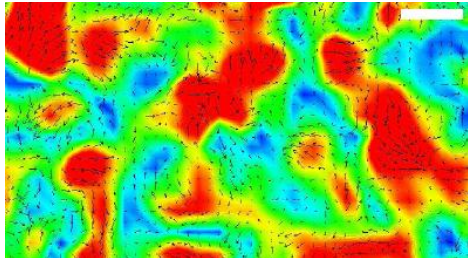


図4 異物バクテリアを含む液滴内の PIV 解析による流動構造

(5) 気管表面の流体の数値シミュレーションの系の構築

(1)～(4)の研究で得られた実測値を基に、繊毛運動とそれによって形成される流体を数値シミュレーションにより再現するため、そのコードの開発、及びGPGPU実装の大規模計算装置を構築しています。現在まで、2次元の気管内腔流体シミュレーション用のコードを開発、及び繊毛内部構造を考慮に入れた繊毛運動シミュレーション用のコード開発に取り組んでいる。将来的にはGPGPU実装のスーパーコンピュータによる大規模計算機を用いて、3次元流体・繊毛運動解析を行う予定である。



図5 GPGPU実装計算システム

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 2 件)

1). Hironori Ueno, Takuji Ishikawa, Khanh Huy Bui, Kohsuke Gonda K, Takashi Ishikawa, Yamaguchi T. Mouse respiratory cilia with the asymmetric axonemal structure on sparsely distributed ciliary cells can generate overall directional flow. **Nanomedicine - Nanotechnology, Biology, and Medicine**. 査読有. 2012 In press.

2). Takuji Ishikawa, Naoto Yoshida, Hironori Ueno, M.Wiedeman, Yosuke Imai, and Takami Yamaguchi. Energy Transport in a Concentrated Suspension of Bacteria. **Physical Review Letters**. 査読有, 2011, Vol. 107, No. 2, pp. 028102-1-028102-4

[学会発表] (計 18 件)

1). Hironori Ueno. Nano-imaging of respiratory cilia with light and electron microscopy. 5th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2011), 15-17 May, 2012, the University of Nagoya, Japan.

2). 上野 裕則, マウス気管繊毛の運動とクライオ電子線トモグラフィ法による軸糸構造. 第24回 日本機械学会 バイオエンジニアリング講演会、2012年1月7日～8日、大阪大学、(招待講演)

3). 石川 拓司、吉田 尚人、上野 裕則、Wiedeman M.、今井 陽介、山口 隆美. 大腸菌懸濁液内のエネルギー輸送. 第24回 日本機械学会 バイオエンジニアリング講演会、2012年1月7日～8日、大阪大学

4). 塩入 達也、石川 拓司、沼山 恵子、今井 陽介、上野 裕則、山口 隆美. バクテリアの遊泳能を利用したソーティングデバイスの開発. 第24回 日本機械学会 バイオエンジニアリング講演会、2012年1月7日～8日、大阪大学

5). 上野 裕則, マウス気管における繊毛運動・流体解析、及びクライオ電子線トモグラフィ法による軸糸構造解析、2012 年生体運動研究合同班会議、2012 年 1 月 6 日～8 日、筑波大学

6). Koki Kiyota, Hironori Ueno, Takuji Ishikawa, Keiko Numayama-Tsuruta, Yosuke Imai, Noriaki Matsuki and Takami Yamaguchi. Analysis of fluid flow on the surface of tracheal lumen through effective ciliary motion. 5th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, Singapore, 12-14 December, 2011, National University of Singapore (NUS)

7). Tatsuya Shioiri, Takuji Ishikawa, Keiko Numayama-Tsuruta, Hironori Ueno, Yosuke Imai and Takami Yamaguchi. Development of a micro fluidic device to separate motile bacteria. 5th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, 12-14 December, 2011. National University of Singapore (NUS), Singapore.

8). Jonathan Ferracci, Takuji Ishikawa, Hironori Ueno, Keiko Numayama-Tsuruta, Yosuke Imai and Takami Yamaguchi. Entrapment of fresh water ciliates at the interface fluid-air. 5th East Asian

Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, 12-14 December, 2011. National University of Singapore (NUS), Singapore.

9). Hironori Ueno. Analysis of ciliary motion and the axonemal structure in the mouse respiratory cilia.

International Symposium on Mechanobiology (The Fifth Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular biology). 4-8 November, 2011. Shanghai - Hangzhou, China. (招待講演).

10). Tatsuya Shioiri, Takuji Ishikawa, Keiko Numayama-Tsuruta, Hironori Ueno, Yosuke Imai and Takami Yamaguchi. Development of a microdevice for sorting motile bacteria. ASME, 6th Frontiers in Biomedical Devices Conference, 26-27 September, 2011. Irvine, CA, USA.

11). Hironori Ueno. Analysis of ciliary motion and fluid flow on the surface of tracheal cells. Workshop of Microscale Modeling in Biomechanics and Mechanobiology. 30 May - 1 June, 2011. Hotell Vila Gale, ericeria, Portugal. (招待講演).

12). Hironori Ueno. Analysis of ciliary motion and fluid flow on the surface of tracheal cells. Japan-Portugal Nano-BME Symposium, Faculty of Engineering of the University of Porto, Polytechnic Institute of Braganca, 3-6 June, 2011. (招待講演).

13). Hironori Ueno. Dynein generates force by winch mechanism. ESF-EMBO, (Emergent Properties of the Cytoskeleton: Molecules to Cells), Hotel Eden Roc, Sant Feliu de Guixols, Spain, 3-8 October, 2010

14). 松浦 亮、石川 拓司、上野 裕則、今井 陽介、松木 範明、山口 隆美. 大腸菌を用いたバイオマイクロミキサーの基礎研究. 第45回 総会・講演会 日本機械学会 東北支部会、2010年3月12日 東北大学

15). 吉田 尚人、石川 拓司、上野 裕則、今井 陽介、松木 範明、山口 隆美. 共焦点マイクロPIVシステムによる大腸菌溶液のメゾスケール流動構造の計測. 第45回 総会・講演会 日本機械学会 東北支部会、2010年3月12日 東北大学

16). Hironori Ueno, Takuo Yasunaga, Chikako Shingyoji, Takami Yamaguchi and Keiko Hirose. Structural changes in dynein molecules accompanying force generation. アステイ徳島 (徳島) 2009年10月30日~11月1日

17). Hironori Ueno. Fluid flow analysis on the surface of tracheal ciliary cells. International Dynein Workshop 2009, 神戸ファッション美術館 オルビスホール 1-5 November, 2009

18). Hironori Ueno, Dynein pulls microtubules without rotating its stalk. ASME Summer Bioengineering Conference, Lake Tahoe, CA, USA, 17-21 June, 2009

[図書] (計1件)

1). 広瀬恵子、上野裕則
ダイニン・微小管複合体の高分解能構造解析
顕微鏡(特集: 生体高分子の高分解能構造解析) Vol.44, No.2, pp 93-97, 2009年6月30日発行

[その他]
ホームページ等

http://www.pfsl.mech.tohoku.ac.jp/content/press_ueno/ueno_press_jp.html (研究室HP、プレスリリース関連)

<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2012/02/press20120213-03.html> (東北大学HP、プレスリリース)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 裕則 (UENO HIRONORI)

所属: 東北大学 国際高等研究教育機構 助教
研究者番号: 70518240

(2) 研究協力者

石川 拓司 (Ishikawa Takuji)

所属: 東北大学大学院 工学研究科

研究者番号: 20313728

石川尚 (Ishikawa Takashi)

スイス: ポールシェラー研究所