

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19273

研究課題名（和文）細胞内熱伝導率の局所的低下の起源の探索と再現

研究課題名（英文）Finding origins of the thermal conductivity lowered locally in a cell

研究代表者

鈴木 団（Suzuki, Madoka）

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：40350475

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）：本研究では、細胞レベルでの熱制御機構の解明に焦点を当てた。(1)高精度・高機能化したハイブリッド型ナノプローブと人工細胞システムを用いた生細胞内の低熱伝導性の実験的検証、(2)分子動力学シミュレーションを用いたタンパク質分子による化学的・力学的エネルギー変換の素過程の解析、(3)生体分子や分子集合体の熱に対する応答とその生理的意義の実験的探索、の3つの課題に取り組み、細胞レベルでの熱流調節機構に重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の生化学反応から生じる熱の放出、すなわち熱産生は、生物個体の体温恒常性の維持に必須の役割を果たしている。いっぽう生化学反応それ自体も熱流から影響を受ける。本研究から、細胞レベルで熱流がどのような影響を与え、どのように調節されているのかについて、重要な知見が得られた。これらの成果は、生命維持に果たす熱産生の役割を理解するうえで重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this project, we focused on elucidating the mechanism of thermal regulation at the cellular level. The three issues addressed in this study were (1) experimental verification of low thermal conductivity in living cells using hybridized nanoprobe with high precision and functionality and artificial cellular systems, (2) analysis of elementary processes of chemical and mechanical energy conversion by protein molecules using molecular dynamics simulations, and (3) experimental exploration of the response of biomolecules and molecular assemblies to heat and its physiological significance, which have provided important insights into the mechanisms of heat flow regulation at the cellular level. We have obtained important insights into the mechanisms of heat flow regulation at the cellular level.

研究分野：生物物理学

キーワード：構成的手法 細胞内熱物性 熱産生 光熱変換 MDシミュレーション

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物にとって、熱は生命活動を維持する上で不可欠な要素である。しかし、外部環境の変化によって体温が大きく変動すると、細胞レベルで様々な影響が生じる。従来、細胞レベルで熱発生や熱流への応答を実験的に検証するのは困難だった。微小な細胞内の温度変化は、大きな生物個体の温度変化に比べて桁違いに小さく、かつ速いため、既存の計測方法では捉えることが難しかったためである。近年、細胞内の温度計測や熱励起を可能とする技術開発が進み、細胞スケールでの研究が飛躍的に発展してきた。一方、細胞内の熱に関連した現象を理解するためには、細胞内熱パラメータの詳細な情報が必要不可欠である。それにもかかわらず、これらの物性値は実験的に測定されていないことが多く、研究の進展を阻む課題となっていた。そこで研究代表者らは以前に、蛍光ナノダイヤモンドと生体適合性高分子を組み合わせたハイブリッド型ナノプローブを開発し、細胞内の熱伝導率を測定することに成功した。その結果、従来の仮説とは異なり、細胞内熱伝導率は水の1/6と低く、かつ大きなばらつきがあることが明らかになった。

しかし当該研究分野には、少なくとも以下の課題が残されている。

- (1) 細胞構成要素の影響: タンパク質や脂質といった生体分子およびその集合体などの細胞構成要素が熱伝導に与える影響を明らかにする必要がある。
- (2) ATP加水分解過程: 細胞内熱源の一つと考えられるATP加水分解過程における熱の放出メカニズムを詳細に解明する必要がある。
- (3) 熱応答: 熱発生に優れた細胞において、細胞内部における生体分子の熱応答を検証する必要がある。

2. 研究の目的

そこで本研究は上述の各課題について、それぞれ次の目的を設定し、これらを適宜並行して推進した。

- (1) ハイブリッド型ナノプローブと人工細胞系を用いた実験的検証
- (2) タンパク質分子による化学・力学エネルギー変換過程の解析
- (3) 熱に対する生体分子・分子集合体の応答の実験的探索

3. 研究の方法

(1) 本課題の達成には、局所的な熱伝導率を計測する微小プローブとして用いる蛍光ナノダイヤモンドの性能を、さらに向上させる必要があった。特に、より小さく、明るく、環境変化に対して頑強で、かつ調製した単一ロット内におけるナノ粒子間の性質にバラつきが少なくなることを目指した材料開発を進めた。熱伝導率計測の局所性は、ナノプローブ体積程度の平均値として計測される。これまでに蛍光温度計として利用してきた市販の蛍光ナノダイヤモンド粒子は平均粒径約100 nmであり、また粒径のバラつきが大きい。そこで本研究ではまず、局所性を高めるためには、粒径がより小さく、かつ粒径分布がより狭い蛍光ナノダイヤモンド粒子の調製を試みた。

(1) ナノプローブを内包するベシクルを人工細胞系として調製した。プレート上に用意した均一な脂質二重膜を、ナノプローブを分散した液中ではがすことで、自発的に形成されるナノプローブ内包ベシクル(リボソーム)を得る手法(キャストリング法)を利用した。

(2) ATP加水分解するタンパク質分子ではエネルギー変換の効率が不完全であるために、利用できなかったエネルギーの一部が熱として周囲へ散逸し、最終的にマクロスコピックな温度上昇として体温維持に利用されると考えられている。エネルギー変換の過程で生じる構造変化や力学的仕事の生理的意義に関する研究は重点的に進められ、各ヌクレオチド状態におけるタンパク質立体構造の原子分解能での決定や、細胞内で機能発現を制御するメカニズムが多く明らかにされてきた。ところが、ATP加水分解過程のメカニズムは十分に解明されていない。本項目では、生体分子において生化学反応から放出される熱の分子内伝導が分子機能に与える影響を原子分解能で理解するため、ミオシンによるATP加水分解の初期段階に着目し、MDシミュレーションを用いて、エネルギー変換過程の微視的メカニズムを検討した。

(3) 研究代表者らは以前に、心臓を構成する筋肉(心筋)の収縮が体温変化によりどのような影響を受けるかを調べ、心臓が体温範囲内で効率的に機能することを示した(引用文献1)。本研究では、骨格筋と心筋の収縮の温度感受性の違いについて、局所加熱顕微鏡法を用いて検討した。局所加熱顕微鏡法とは、水による吸収率の高い波長約1.5 μmのレーザー光を顕微鏡対物レンズを通して試料面に集光することで、集光点を熱源とし、その熱源を中心に形成される局所的な温度勾配を利用して、生体分子や細胞等を光学顕微鏡下で熱刺激する手法である。熱源が小さいために、レーザー光照射をやめれば温度勾配は速やかに消失し、局所的な温度場を加熱前の状態に戻すことが可能である。

4. 研究成果

(1) より小さく、粒径の揃った粒子を得る条件を見出した。基本的な材料物性および光学特性を決定したのち、細胞での利用可能性の検討を開始した。細胞へ利用するために、ナノ粒子で一般に問題となる凝集性を低減できる表面修飾についても合わせて検討した。その結果、hyperbranched polyglycerol (HPG) による修飾が適当であることがわかった。本課題に関連して、ハイブリッド型ナノプローブの開発についての総説を発表した(引用文献2)

(1) 多層になったリポソームや、蛍光ナノダイヤモンド粒子を内包するリポソームが確認された。しかし多くのリポソームは内包される粒子に対して径が大きく、また粒子を内包したりリポソームの数が少ない問題も見いだされた。調製時の温度および電場強度を変えて、適切な条件の検討を進めている。

(2) ミオシンのPループのポテンシャルエネルギーが約 10 kcal/mol 変化し、Pループ内への力学的仕事の蓄積が観察された。興味深いことに、ATP加水分解によって供給される反応熱の放出が抑制された状態でも、同様の観察結果が得られた。ミオシンは、ATPやADP-無機リン酸との原子間相互作用の違いによって、化学エネルギーを力学的な仕事に変換することができる。タンパク質は細胞内で常に熱ノイズにさらされているため、このようなメカニズムが強固に働き、生物学的プロセスを安定的に制御している可能性があることが示唆された。以上に加え、本課題について、生体分子による熱産生と散逸過程の研究を対象とするMDシミュレーション手法について取りまとめた総説を発表した(引用文献3)。

(3) 2秒以内の急速加熱(25°Cから41.5°Cの範囲)により、単離した骨格筋筋原線維において、筋弛緩の状態となる溶液条件においても収縮が可逆的に誘導されることが見いだされた。次に精製タンパク質系を用いて体温範囲内(40°Cまで)で評価した。ここでは精製タンパク質により筋収縮を2次元平面で再現する*in vitro*滑り運動系を利用することで、再構成した骨格筋および心筋の筋タンパク質フィラメント(細いフィラメント)が、骨格筋または心筋由来のミオシンの上を滑り運動するときの速度について、その温度依存性を計測した。その結果、(1)骨格筋ミオシン上で滑り運動する骨格筋の細いフィラメントの滑り速度の温度依存性は、骨格筋筋原線維の収縮で得られた温度依存性と同等であったこと、(2)どちらのタイプの細いフィラメントも、心筋ミオシン上よりも、骨格筋ミオシン上の方が低い温度で滑り始めること、(3)心筋の細いフィラメントは、どちらのタイプのミオシン上でも、骨格筋の細いフィラメントよりも低い温度で滑ること、がわかった。従って、哺乳類の骨格筋および心筋は、様々な状況における生理学的要求に応じて、ミオシンとトロポミオシン・トロポニンによって相補的に調節されながら、体温が変動する範囲内で効率よく収縮するように微調整されている可能性が示唆された。本課題について論文として発表した(引用文献4)。大阪大学、東京慈恵会医科大学、量子科学技術研究開発機構(QST)より共同プレスリリースを行い、また掲載誌にコメントリーが掲載された(引用文献5)。この成果により筆頭著者がCranefield postdoctoral fellow awardを受賞した。またプレスリリースを日本語および英語の両方で行った。Altmetric Attention Scoreが250を超え、国際的に広く注目を集めた。さらに(2)と(3)の両課題を包括して議論する総説を発表することもできた(引用文献6)。

<引用文献> (*Corresponding authors)

1. S. Ishii, K. Oyama, T. Arai, H. Itoh, S.A. Shintani, M. Suzuki, F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Terui, N. Fukuda, S. Ishiwata, Microscopic heat pulses activate cardiac thin filaments, *J. Gen. Physiol.*, **151**(6), 860-869 (2019)
2. 鈴木 団 新たな蛍光ナノ温度計との出会いと成長 *生産と技術*, **76**, 76-79 (2023)
3. *I. Kurisaki, *M. Suzuki, Simulation toolkits at the molecular scale for trans-scale thermal signaling, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **21**, 2547-2557 (2023)
4. *S. Ishii, K. Oyama, F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Nakanishi, N. Nakahara, *M. Suzuki, S. Ishiwata, *N. Fukuda, Myosin and tropomyosin-troponin complementarily regulate thermal activation of muscles, *J. Gen. Physiol.*, **155**(12), e202313414 (2023)
5. A. Månsson, Changing face of contractile activation in striated muscle at physiological temperature, *J. Gen. Physiol.*, **155**(12), e202313494 (2023)
6. *M. Suzuki, C. Liu, K. Oyama, T. Yamazawa, Trans-scale thermal signaling in biological systems, *J. Biochem.*, **174**(3), 217-225 (2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishii Shuya, Oyama Kotaro, Kobirumaki-Shimozawa Fuyu, Nakanishi Tomohiro, Nakahara Naoya, Suzuki Madoka, Ishiwata Shin'ichi, Fukuda Norio	4. 巻 155
2. 論文標題 Myosin and tropomyosin-troponin complementarily regulate thermal activation of muscles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 e202313414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1085/jgp.202313414	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 Suzuki Madoka, Liu Chujie, Oyama Kotaro, Yamazawa Toshiko	4. 巻 174
2. 論文標題 Trans-scale thermal signaling in biological systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 217 ~ 225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad053	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 鈴木 団	4. 巻 76
2. 論文標題 新たな蛍光ナノ温度計との出会いと成長	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 76-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kurisaki Ikuo, Suzuki Madoka	4. 巻 21
2. 論文標題 Simulation toolkits at the molecular scale for trans-scale thermal signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 2547 ~ 2557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.csbj.2023.03.040	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 鈴木 団	4. 巻 76
2. 論文標題 新たな蛍光ナノ温度計との出会いと成長	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 76～79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 11件)

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 光学的局所加熱・温度計測を用いた熱シグナリング解析
3. 学会等名 量子生命科学先端フォーラム 2023夏の研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 筋肉でCa ²⁺ と収縮を巻き込む熱シグナリング
3. 学会等名 生理研研究会「細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 階層をまたぐ熱シグナリングの顕微解析
3. 学会等名 日本体力医学会特別大会 - 2023東京シンポジウム - (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ikuo Kurisaki, Madoka Suzuki
2. 発表標題 Mechanical work generation at the early stage of ATP hydrolysis by myosin
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会（招待講演）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Complementarily regulated thermal activation of cardiac and skeletal muscles revealed by optical nanothermometry and heating microscopy.
3. 学会等名 16th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2023)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 骨格筋と心筋のタンパク質複合体システムとしての温度応答の妙
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 カルシウムイオンによらない熱による筋収縮の活性化
3. 学会等名 定量生物学の会第11回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 局所加熱法があらわにする細胞内温度センサーとしての酵素活性とその操作
3. 学会等名 電気化学会第91大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 筋肉の熱産生・熱暴走と筋サルコメアの温度依存的な活性化
3. 学会等名 情報物理学と定量生物学の融合とその展開
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ishii, S., Oyama, K., Kobirumaki-Shimozawa, F., Nakanishi, T., Nakahara, N., Suzuki, M., Ishiwata, S., Fukuda, N.
2. 発表標題 ミオシンと制御タンパク質は骨格筋と心筋において加温による活性化を相補的に制御する
3. 学会等名 第101回日本生理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 熱で活性化し熱産生もする筋収縮の顕微理解
3. 学会等名 第101回日本生理学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 熱伝導率の低い細胞内で繰り返し形成される局所的な高温場
3. 学会等名 量子生命科学会第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大喜多弘隆, 外間進悟, 中馬俊祐, 鈴木 団, 原田慶恵
2. 発表標題 高分散化表面修飾ナノダイヤモンドの細胞移行と細胞内標的部位への局在化の試み
3. 学会等名 量子生命科学会第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 局所熱パルス法で見いだされた1型リアノジン受容体変異体の高熱感受性
3. 学会等名 2022年度生理研研究会「細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirotaka Okita, Singo Sotoma, Shunsuke Chuma, Madoka Suzuki, Yoshie Harada
2. 発表標題 Research on the development of localized highly dispersed surface modified nanodiamond and their cellular uptake
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Thermal runaway in muscles studied using a local heat pulse method.
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 団
2. 発表標題 骨格筋と飛翔筋の震えない熱産生と暴走
3. 学会等名 第11回分子モーター討論会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 R. Brinkmann, X. Zhang, L.-M. Fruehauf, L. Hoffmann, E. Seifert, M. Mordmueller, D. Theisen-Kunde, M. Suzuki, Y. Miura
2. 発表標題 Time-resolved 2D-temperature monitoring on RPE explants during laser irradiation by means of a fluorescent dye.
3. 学会等名 ARVO 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Heat-sensitive mutants of Ca ²⁺ release channel RyR1 identified by nanothermometry and opto-thermal technology.
3. 学会等名 15th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2022) joint with 11th Taiwan-Japan-Korea Nanomedicine Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Studies on muscle cells heating up.
3. 学会等名 The 100th Anniversary Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Studies on muscle cells heating up.
3. 学会等名 The 100th Anniversary Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	宮崎 牧人 (Miyazaki Makito) (40609236)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究セン ター・チームリーダー (82401)	

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		
オーストラリア	クイーンズランド大学		