

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770143

研究課題名(和文)非平衡統計力学による細胞内ゆらぎ測定

研究課題名(英文)Non-equilibrium statistical mechanics for fluctuations in cells

研究代表者

林 久美子 (Hayashi, Kumiko)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00585979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：PC12細胞内で、細胞小器官であるミトコンドリアを蛍光色素で染色し、重心運動を観察した。ミトコンドリアは微小管に沿ってキネシンやダイニンなどのタンパク質モーターに輸送される。この非平衡定常状態に対し、揺動散逸定理を調べた。ミトコンドリアの重心揺らぎと人工的にエレクトロポレーションで細胞内に導入したビーズの揺らぎを比較し、ミトコンドリアの重心運動における揺動散逸定理の破れの程度を測定した。

研究成果の概要(英文)：We measured the motion of mitochondria in PC12 cells by using fluorescent observation. A mitochondrion is transported by motor proteins such as kinesin and dynein along microtubules. We investigated the fluctuation-dissipation theorem for this non-equilibrium phenomenon. Comparing motion of Brownian beads incorporated into the cells by electroporation method, we experimentally found that the fluctuation-dissipation theorem was not valid for the motion of a mitochondrion.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子計測・操作

1. 研究開始当初の背景

1990年代の非平衡統計力学のブレークスルーである Fluctuation Theorem (FT)は揺らぎの大きいミクロな系(ナノ・マイクロサイズの系)の発熱に関する法則である。例えば、ミクロな系として電場で駆動される荷電コロイド粒子を考える。微小時間 Δt に生じる熱 Q は、この系の場合、 $Q=力 \times 移動距離$ であるが、このような熱ノイズの影響の大きい系では熱力学第二法則に代わって FT が成立し、

$$P(Q)/P(-Q) = \exp[Q] \quad (1)$$

(1)式では Q の単位は $k_B T$ とした (T は温度、 k_B は Boltzmann 定数)。FT は 1993 年 Evans らによって提唱され 2002 年コロイド粒子の実験で検証された [Wang et al., Phys. Rev. Lett. (2002)]。FT には状況に応じたバリエーションがあり、例えば Crooks が導出した仕事に関する FT は 2005 年 Bustamante らによって RNA ヘアピンの実験で検証された [Collin et al., Nature (2005)]。

申請者らの研究では、一定の駆動力 F で一方向運動する生体モーターを念頭に、(1)式を変形し(2)式を導出した。

$$\ln[P(\Delta X)/P(-\Delta X)] = F \Delta X / k_B T \quad (2)$$

$\Delta X = X(t+\Delta t) - X(t)$ は重心の変位、 $P(\Delta X)$ は ΔX の分布。(2)式の利用を F_1 モーターを例に考える。

F_1 は ATP を加水分解して得たエネルギーで回転するタンパク質モーターである。 F_1 が約 10nm と小さいため 200nm 程度のビーズを付けて回転運動を光学顕微鏡で観察する(図 1a)。ATP 高濃度で F_1 は連続的に回転する(図 1a)。カメラの画像からビーズの重心を計算し、回転角 $\theta(t)$ を測定する。 F_1 の回転トルク(駆動力)を N 、 $\Delta\theta = \theta(t+\Delta t) - \theta(t)$ として、(2)式は F_1 の場合

$$\ln[P(\Delta\theta)/P(-\Delta\theta)] = N \Delta\theta / k_B T \quad (3)$$

$\ln[P(\Delta\theta)/P(-\Delta\theta)]$ を計算し $\Delta\theta/k_B T$ に対してプロットすると、異なる Δt に対してもグラフの傾きは全て同じになり、(3)式よりこの傾きが N である(図 1b)。(3)式はタイムコース $\theta(t)$ だけから駆動力を測定でき、余計な仮定を入れないため、以前より良い測定値を与えた。2005 年に RNA ヘアピンで FT が検証されたが、申請者らは初めて自律的に非平衡である分子モーターに FT を利用した [2,15,若手奨励賞受賞(2010)]。また FT の検証を超えた実用性が評価され、STATPHY24 (統計物理学の国際会議)の Plenary Talk で紹介され、国際的に知られるようになった [Ciliberto et al., J. Stat. Mech (2010)]。

2. 研究の目的

本研究では、非平衡統計力学を用いて生細胞内の揺らぎ測定を行う。揺らぎは、近年の計測に求められるニーズ「非破壊」「定量性」を兼ね備えている。非平衡統計力学の揺らぎの理論から新しい測定理論を構築し、

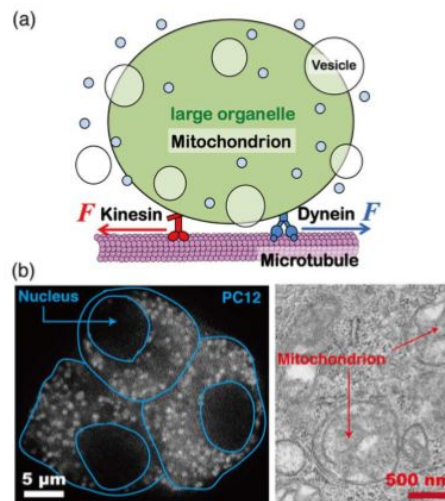
非平衡状態にある生細胞内のタンパク質実験に応用する。これまでに分子モーターの *in vitro* 実験で揺らぎによる非破壊測定 (Fluctuation Theorem) を研究してきた。この研究を生きている細胞内の小器官の輸送に応用する。

3. 研究の方法

Fluctuation Theorem による駆動力測定を軸索中のミトコンドリア輸送を対象に行う。生細胞中でミトコンドリアがキネシンやダイニンに輸送される際の駆動力を揺らぎから測定する。タンパク質等の重心を追跡して揺らぎから拡散係数がよく測定されるが、申請者等は揺らぎから力を測る。

4. 研究成果

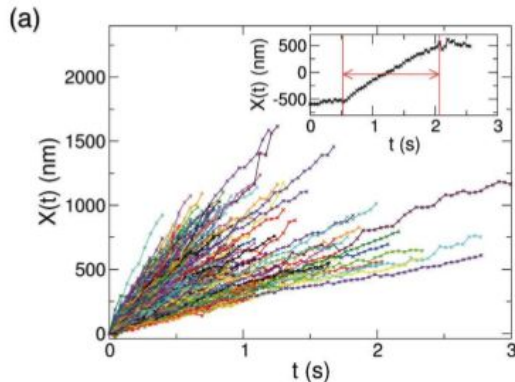
神経細胞の分化のモデル細胞である PC12 細胞内で、細胞小器官であるミトコンドリアを蛍光色素で染色し、重心運動を観察した(図 1)。細胞内でミトコンドリアはレールである微小管に沿ってキネシンやダイニンなどのモータータンパク質によって輸送される。この非平衡定常状態の重心運動(図 2)に対し、非平衡統計力学分野の代表的な関係式である揺動散逸定理を調べた。ミトコンドリア重心の揺らぎと、人工的に細胞内に導入したビーズの揺らぎ(図 3)を比較し、ミトコンドリアの重心揺らぎに関する Einstein 関係式の破れの度合いを調べた(図 4)。混み合った細胞の中では熱揺らぎに起因しない様々な揺らぎが存在するため、物理法則が成立しない。このことを蛍光顕微鏡観察によるミトコンドリア重心の揺らぎ解析と蛍光相関分光法による細胞内に導入したビーズの粘性測定から定量的に明らかにした。



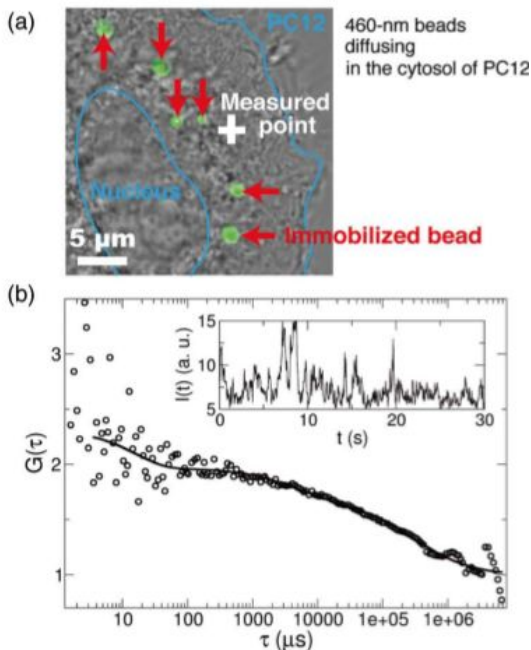
(図1) PC12細胞で、タンパク質モーターに輸送されるミトコンドリアを蛍光顕微鏡で観察する(左下)

後続の神経細胞を用いた研究では、PC12細胞で観察された揺動散逸定理の破れと揺らぎの定理を組み合わせた新しい理論で、ミトコンドリアやエンドソームなどの細胞

小器官を輸送するモータータンパク質の力と数を非踏襲に測定する計画である。先行研究では光ピンセットを用いた細胞内小器官のストール力測定からモータータンパク質の数を議論しているが、本研究では蛍光顕微鏡観察による重心揺らぎ解析だけからこれを目指す。本研究によりpreliminaryなデータを得たので、結果の検証が今後の課題となっている。



(図2) 多数のミトコンドリアについて重心位置の軌跡。これから拡散係数を計算する。



(図3) エレクトロポレーション法で蛍光ビーズをPC12細胞に導入する。蛍光相関分光法でビーズの拡散係数(揺らぎ)を調べる。

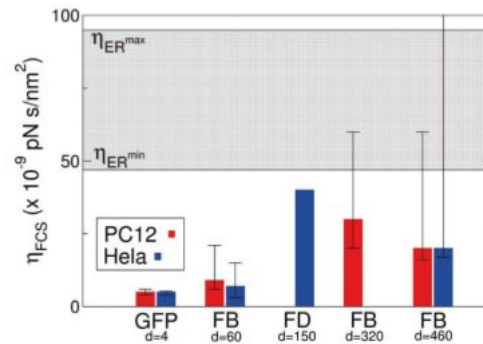
5. 主な発表論文等

(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 5件) 全て査読有り

- (1) Viscosity and drag force involved in organelle transport: Investigation of the fluctuation dissipation theorem
K. Hayashi*, C. G. Pack, M. K. Sato, K. Mouri, K. Kaizu, K. Takahashi, Y. Okada, Eur. Phys. J. E 36 136 (2013).

DOI: <http://dx.doi.org/10.1140/epje/i2013-13136-6>



(図4) ミトコンドリアの運動に対して揺動散逸定理を利用して見積もった粘性(η_{ER})は蛍光ビーズの粘性(η_{FCS})に一致しない(定理の破れ)。

- (2) Catalysis enhancement via rotary fluctuation of F_1 -ATPase,
R. Watanabe, K. Hayashi, H. Ueno and H. Noji*
Biophys. J. 105 2385-2391 (2013).

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.09.050>

- (3) Protein motor F_1 as a model system for fluctuation theories of non-equilibrium statistical mechanics

K. Hayashi* and R. Hayashi

Fluct. and Noise Lett. 11 124001 (2012).

DOI: 10.1142/S0219477512410015

- (4) Single-molecule stochastic resonance

K. Hayashi, S. de Lorenzo, M. Manosas, J. M. Huguette and F. Ritort*

Phys. Rev. X, 2 031012 (2012).

DOI: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevX.2.031012>

- (5) Measurements of the driving forces of bio-motors using the fluctuation theorem

K. Hayashi*, M. Tanigawara and J.

Kishikawa,

BIOPHYSICS, 8 67-72 (2012).

DOI: <http://dx.doi.org/10.2142/biophysics.8.67>

[学会発表](計 7件)

- (1) F-subunit reinforces torque generation in V-ATPase

J. Kishikawa, A. Seino, A. Nakanishi, N. E. Tirtom, H. Noji, K. Yokoyama, K.

Hayashi*

第51回日本生物物理学会年会

(2013. 10. 30., 京都)

- (2) Giant Acceleration of diffusion in F_1 -ATPase

R. Hayashi, S. Nakamura, S. Kudo, K.

Sasaki, H. Noji, K. Hayashi*

第51回日本生物物理学会年会

(2013. 10. 29., 京都)

- (3) Transport of beads by kinesin in highly viscous environment

N. Sawairi, T. Ariga, M. Tomishige, K.

Hayashi*

第51回日本生物物理学会年会

- (2013. 10. 29., 京都)
- (4) Measuring the numbers of kinesin and dynein on neuronal cargo transport by using the fluctuation theorem
K. Hayashi*, Y. Okada
第 51 回日本生物物理学会年会
(2013. 10. 29., 京都)
- (5) Estimation of driving force acting on a mitochondrion transported in a living cell: Application of the fluctuation theorem
K. Hayashi*, M. K. Sato, K. Mouri, C. G. Pack, K. Kaizu, K. Takahashi, Y. Okada
第 50 回日本生物物理学会年会
(2012. 9. 23., 名古屋)
- (6) Application of new step finding algorithm to F_1 -ATPase
A. Seino, T. Nakagawa, K. Sasaki, K. Hayashi*
第 50 回日本生物物理学会年会
(2012. 9. 22., 名古屋)
- (7) Giant acceleration of diffusion in single-molecule experiments
R. Hayashi, S. Nakamura, S. Kudo, K. Sasaki, H. Noji, K. Hayashi*
第 50 回日本生物物理学会年会
(2012. 9. 22., 名古屋)

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 300 号記念特集「生物物理の未来に寄せて」--非平衡統計力学による細胞内ゆらぎ測定
林 久美子, 生物物理 52 118 (2012).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 久美子 (HAYASHI, Kumiko)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 00585979