

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25600051

研究課題名(和文)細胞質内単粒子運動の直接観察

研究課題名(英文)Direct observation of single particle movements in the cytoplasm

## 研究代表者

佐甲 靖志 (Sako, Yasushi)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・主任研究員

研究者番号：20215700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の化学反応において、分子やオルガネラなど細胞内粒子の運動と衝突は最も基本となる現象である。細胞構造・細胞環境の複雑性のため、細胞内粒子の運動は単純なブラウン運動(熱拡散)からは、相当地逸脱していると予想される。本研究では、生細胞に直径50 nmの蛍光粒子を導入し、単一粒子運動計測を行った。その結果は、細胞質の粘性は水の粘性の1/10程度に過ぎないが、50 nm粒子の約4割の運動は100 nm程度の範囲に制限され、細胞内の空間が細かく区画されていることを示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：Movements and collision of the particles in the cytoplasm regulate chemical reactions inside cells. Because of complicated structure and environments in the cytoplasm, the movements of cytoplasmic particles must be largely deviated from simple thermal diffusion. Here, we analyzed movements of 50-nm single fluorescent particles introduced in living cell cytoplasm. The results indicated that the viscous drag in the cytoplasm is only ten times larger than that in water, however, 40% trajectories of the particles were confined within ~100 nm regions, suggesting fine compartmentalization of the cytoplasm.

研究分野：総合理工

キーワード：1粒子追跡 ナノプローブ 細胞内環境

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内の反応ネットワークは、分子やオルガネラなど細胞内粒子の運動と衝突に基盤を置いており、粒子の運動は細胞機能発現の最も基本となる現象である。

細胞質内は蛋白質やオルガネラ粒子で非常に混雑した状況にあるため、粒子運動は自由なブラウン運動からはほど遠く、極度に制限されているという主張がある。たとえば Yum らが直径 20 nm の Q-dot を利用して計測した細胞質の粘性は水の 200 倍にも登っており (NanoLett. 9: 2193, 2009)、Hui らが直径 150nm のダイヤモンド粒子を使って FCS 計測した結果も同程度である (OptExpress 18:5896, 2010)。

しかし、我々が単量体 GFP や直径 50 nm の SiO<sub>2</sub> コロイド粒子を使って FCS 計測した結果は全く異なっていた。両者とも 1 成分の自由拡散運動で記述でき、拡散係数と粒子の直径から計算した細胞質の粘性は、水の 3~4 倍に過ぎない。我々の計測でも Q-dot の拡散係数は遅く、また、GFP を種々の機能性蛋白質に融合させると、ほとんどの場合、拡散係数は球状を仮定した予測の数倍から数十倍小さくなる。ただし、これらの場合でも計測結果は 1~2 成分の単純拡散運動で記述できる (Pack, Sako et al. JContRel, 163: 315, 2012)。この結果は、細胞質内成分との特異的あるいは非特異的、かつ遷移的な相互作用が粒子の運動を制御していることを示唆するが、従来の計測結果との整合性を含め、詳細は明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

細胞構造・細胞環境の複雑性のため、細胞内粒子の運動は単純なブラウン運動 (熱拡散) からは、相当に逸脱していると予想される。そのような逸脱は、粒子間の反応キネティクスに様々な影響を与え、細胞機能に影響する可能性がある。

たとえば、分子混雑やマイクロメートルサイズの微小空間への閉じ込めのため、再結合反応が加速されることによって、希薄溶液あるいはバルクでは非線形性を持つ 2 段階酵素反応が線形に近くなるといったことが、理論的にも予想され (Takahashi et al. PNAS

107;2473, 2010)、それを示唆する実験データもある (Aoki et al. PNAS 108; 121675, 2011)。

微小空間への閉じ込めは、分子の少数性を通じて、たとえば酵素量をデジタル的に変動させ、反応非線形性をもたらす可能性が示唆されている (Togashi, personal communication)。

植物細胞やアメーバ細胞などでは大規模かつ高速な原形質流動が知られている。本研究で対象とする哺乳類培養細胞でも、局所的にはモーター蛋白質やそれに駆動されたオルガネラ輸送などに引きずられた細胞質の流れが存在すれば、反応キネティクスに影響を与える。

ある種の細胞では、代謝活性化に伴って細胞全体で 0.5 度もの温度上昇が観察され、最近では細胞内に局所的な温度変動があることも報告されている (Okabe et al. 第 50 回日本生物物理学会, 2012)。我々が細胞内で FCS 計測した粒子の拡散運動には大きな分布の広がりがある。分布の原因には、微小構造の違いの他に、局所的な濃度ゆらぎや化学反応に伴う熱の発生があるかもしれない。

細胞内のナノメートルサイズの粒子運動の複雑さを実証的に明らかにすることが本研究の目的であった。

## 3. 研究の方法

細胞質内粒子運動の詳細を明らかにするには、単一粒子運動の直接観察が必要である。本研究では、細胞内取り込ませた直径 50 nm の蛍光シリカ粒子の運動をヒト肺癌由来の培養細胞 MCF-7 に電気穿孔法により導入し高速・高感度カメラで直接計測し、運動解析を行った。

細胞質内粒子運動は、これまで光褪色回復法 (FPR, FRAP) や、蛍光相関分光法 (FCS) といった、多数分子の平均計測法で研究されてきた。これらの方法では、平均化によるボケや空間分解能の低さ、計測時空域の小ささのため、単純拡散運動からのズレや、局所的な輸送、遷移的な結合・解離などの検出能が低い。単一粒子運動の直接観察ができれば、これらの問題を解決できる。

## 4. 研究成果

細胞質内の 1 粒子運動を 1 ms のフレーム

レートで観測した。FCSによる可動粒子の平均運動計測では、この粒子は  $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  の側方拡散係数を持って、 $\sim 0.1 \mu\text{m}^3$  の計測空間近傍を単純拡散運動していることが分かっている。(Pack, Sako et al. 2012)

1 粒子可視化計測では、何らかの細胞質内構造に固く吸着したと考えられる約 3 割の静止成分 (計測ノイズ成分を除けば  $1 \text{ nm}$  程度の運動範囲しか示さないもの) を除外して、6 個の細胞の細胞質内で 994 個の可動粒子の運動を  $10 \sim 1,000 \text{ ms}$  の間 (平均  $60 \text{ ms}$ ) 観測できた。

運動軌跡から、それぞれの粒子運動が 4 つの運動モード、すなわち、単純拡散、輸送速度を持つ拡散、限られた運動領域内での単純拡散、弾性成分に結合した拡散、のいずれかに属すると仮定し、平均 2 乗変位の時間発展を表す運動モデル式に対する fit の良さ (赤池情報量基準に基づく) に従って、各粒子の運動モードとパラメータ値を推定した。比較的短時間かつ微小領域内の運動計測であるので、運動モードの遷移については考慮していない。

その結果は、単純拡散成分が 56% で拡散係数が  $0.86 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 。運動追跡ができた時間は平均  $50 \text{ ms}$  であり、この間に差し渡し  $410 \text{ nm}$  の範囲を運動する。これらの粒子は、3 次元的な運動などにより観察時間が限られることで、見かけ上単純拡散に分類されている可能性もあるが、以下に示すように、単純拡散モードの観測時間が特に短い訳ではない。

他の 25% は  $100 \text{ nm}$  の範囲に閉じ込められた単純拡散運動に分類され、平均観測可能時間は  $97 \text{ ms}$  であった。拡散係数の値として  $17 \mu\text{m}^2/\text{s}$  が得られたが、この値から推定される溶液粘性は水の粘性の半分程度しかなく、拡散係数が計測ノイズに引きずられて、大きく見積もられ過ぎている可能性が高い。より正確な値を知るには、将来的な位置精度の向上が必要である。

残りの 20% の粒子は半値全幅  $80 \text{ nm}$  のポテンシャル中で  $0.3 \text{ pN/nm}$  のバネに繋がれていると見なし得る拡散運動を行っていると推定された。この運動モードの平均観察可能時間は  $47 \text{ ms}$  であった。バネ定数の値は、細胞

骨格径の曲げ弾性として従来報告されている値に近い。

輸送速度を持つ拡散運動に分類される粒子は存在しなかった。

単純拡散およびバネ拡散運動から細胞質の粘度は  $0.011$  および  $0.0074 \text{ Ps}\cdot\text{s}$  と求められ、水の  $7\sim 10$  倍の値であった。この値は、我々が同じ蛍光粒子の細胞内 FCS 計測から求めた水の  $3\sim$  倍に近く、水の数百倍という報告例とは大きく異なっている。少なくとも  $100 \text{ nm}$  程度の空間で見ると細胞質の粘性はそれほど高くない。

一方で FCS 計測が全体として単純拡散を予想したのに対し、単粒子計測では 4 割の粒子が制限された運動を示していた。単粒子で計測された運動範囲、約  $100 \text{ nm}$  は FCS の計測範囲に近く、局所運動を見ている FCS では運動制限が検出できていなかった可能性がある。25% の粒子が示した  $100 \text{ nm}$  の運動範囲制限は、細胞質の少なくとも一部分がサブミクロンの微小領域に区画されている可能性を示唆している。弾性成分への結合は、実験に使用したシリカ粒子の示す人工的な性質であり、本来の細胞内粒子の振る舞いとは異なっているであろうが、細胞内粒子の中にも弾性成分への結合を示すものは存在すると思われる。

以上の結果は、細胞質内の構造・環境の多様性を示している。今後様々なプローブを使って、同様の計測を行うことにより、細胞質内微小環境が明らかになっていくと期待される。

## 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)

1. Park, H., Han, S.-S., Sako, Y., and Pack, C.-G. Dynamic and unique nucleolar microenvironment revealed by fluorescence correlation spectroscopy. *FASEB J.* 29, 837-848, DOI: 10.1096/fj.14-254110 (2015) 査読有
2. Pack, C.-G., Yukii, H., Toh-e, A., Kudo, T., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Sakata, E., Murata, S., Yokosawa, Y., Sako, Y., Boumeister, W., Tanaka, K., and Saeki, Y. Quantitative live-cell imaging

- reveals spatio-temporal and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. Nat. Commn. 5, DOI:10.1038/ncomms4396 (1-10) (2014) 査読有
3. Sultana, T., Takagi, H., Morimatsu, M., Teramoto, H., Li, C. B., Sako, Y., and Komatsuzaki, T. Non-Markovian properties and multiscale hidden Markovian network buried in single molecule time series. J. Chem. Phys. 139, 245101-1-12, DOI: 10.1063/1.4848719 (2013) 査読有
  4. Arai, C., Kurahashi, H., Pack, C.-G., Sako, Y., and Nakamura, Y. Clearance of yeast eRF-3 prion [PSI<sup>+</sup>] by amyloid enlargement due to the imbalance between chaperone Ssa1 and cochaperone Sgt2. Translation. 1, e26574 (1-6), DOI:10.4161/trla.26574 (2013) 査読有
  5. Iwai, M., Pack, C.-G., Takenaka, Y., Sako, Y., and Nakano, A. Photosystem II antenna phosphorylation-dependent protein diffusion determined by fluorescence correlation spectroscopy. Sci. Rep. 3, 2833-1-7, doi: 10.1038/srep02833 (2013) 査読有
- [学会発表] (計 8 件)
1. Sako, Y. Single-molecule measurements of biological systems. (2015.4.8) “RIKEN-NCBS joint meeting for theoretical biology”, RIKEN (Wako, Saitama).
  2. Sako, Y. Experimental aspects of intracellular dynamics of cell fate decision (2014.7.30) The Joint Annual Meeting of The Japanese Society for Mathematical Biology and The Society for Mathematical Biology 2014, Osaka International Convention Center (Osaka)
  3. Sako, Y. Single-molecule analysis of cell signaling reactions (2014.4.25) Single Protein Dynamics in Cellulo SPDC 2014, OIST (Onna, Okinawa)
  4. Sako, Y. Single-molecule analysis of intracellular reaction networks. (2014.3.28) KHUPO 14th Annual International Proteomics Conference “Translational Proteomics”, Busan (Korea)
  5. Arata, Y., Hiroshima, M., Pack, C.-g., Kobayashi, T. J., Shibata, T., and Sako, Y. Measurement-based mathematical modeling of PAR/aPKC-dependent cell polarization in animal development. (2013.10.30) 日本生物物理学会 第 51 回年会 京都国際会議場 (京都)
  6. Sako, Y. Single-molecule imaging of

- ErbB-Ras-MAPK systems. (2013.8.13) 1st Korea Symposium on Current Trends in Biophysics, Jeju (Korea)
7. Sako, Y. Single-molecule imaging of intracellular reactions. (2013.7.26) Kyoto University Cell Biology, Developmental Biology, and Systems Biology Course Meeting. Kyoto University (Kyoto)
  8. Arata, Y., Kobayashi, T., Hiroshima, M., Pack, C.-G., Shibata, T., and Sako, Y. C. elegans meets single-molecule detection technologies; The embryonic polarization system is driven by state transition of PAR-2 protein molecules. (2013.6.28) 19th International C. elegans Meeting, Los Angeles (USA)

[図書] (計 1 件)

1. Pack, C.-G., Jung, M.-K., Song, M.-R., Kim, J.-S., Han, S.-S., and Sako, Y. (2014) Use of engineered nanoparticle-based fluorescence methods for live-cell phenomena. “Fluorescence Microscopy: Super-Resolution and Other Novel Techniques.” pp.153-170. Cornea, A. and Conn, P. M. eds. Elsevier.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称: 光学顕微鏡システムおよびスクリーニング装置  
発明者: 柳田敏雄、上田昌宏、佐甲靖志、廣島通夫、小塚淳  
権利者: 独立行政法人理化学研究所  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-113244  
出願年月日: 2014.5.31  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

1. [http://www.riken.jp/research/labs/chief/cell\\_inf/](http://www.riken.jp/research/labs/chief/cell_inf/)
2. <http://www.riken.go.jp/cell-info/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐甲 靖志 (SAKO, Yasushi)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・主任研究員

研究者番号: 20215700