

令和 2 年 8 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0105

研究課題名（和文）1細胞熱力学の確立と応用の上下展開（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Establishment of single-cell thermodynamics and its expansion(Fostering Joint International Research)

研究代表者

鈴木 団 (Suzuki, Madoka)

大阪大学・蛋白質研究所・講師

研究者番号：40350475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：基課題は、生物の「階層構造」のうち1細胞レベルの階層で順調に進捗していたが、これをさらに階層の上下方向へ展開することで、1細胞レベルでの理解を超えた包括的な理解に到達できると期待し、これを本基金の枠組みを通して実現することを目指した。細胞内・細胞間シグナル伝達機構としての熱利用（「熱シグナル」）を仮説とし、その検証を目的とした研究を行った。上下方向のいずれにおいても当初の目的が達成され、上の階層では眼組織を対象とした新規実験系に開発し、下の階層では新規機能性ナノ粒子の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本国際共同研究課題では、最終的に、1細胞レベルの温度を、組織・個体から細胞内小器官レベルまで、広いスケールで扱う技術の開発と、1細胞レベルの温度がこれらスケールで果たす生理的な役割について検討を進め、「熱シグナル仮説」を強く裏付ける結果を得ることができた。研究代表者を中心として、将来にわたってアジアとヨーロッパをつなぐ研究連携が構築されたと考える。

研究成果の概要（英文）：The "base-project" has been going as planned at the single-cell level. The current project aimed to expand the base-project to both larger and smaller scales. The biological significance of the heat as a mean of intra- and intercellular communications ("thermal signaling" hypothesis) has been tested by the project. We have successfully achieved the goal of individual objectives set at the beginning of the current project.

研究分野：生物物理学・細胞生物学

キーワード：生物物理 ナノ材料 ナノバイオ タンパク質 細胞 組織 蛍光顕微鏡

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

生物による発熱を1細胞レベルで計測し、そのメカニズム解明を目的とした細胞内温度計測の技術開発が進められているいっぽうで、マクロスケールで測られる値では1細胞から得られた結果を説明できない(「 10^5 ギャップ問題」)。研究開始当初に実施中であった基課題は、この 10^5 ギャップの所在を明らかにすることを目的としていた。生きた細胞で、細胞内部の熱物性を光学顕微鏡の手法を用いて計測し、希薄な水系とは異なる性質を与えうる、細胞内に特有の仕組みを解明することを目指して実施してきた。

2. 研究の目的

上述の基課題は、生物の「階層構造」のうち1細胞レベルの階層で順調に進捗していたが、これをさらに階層の上下方向へ展開することで、1細胞レベルでの理解を超えた包括的な理解に到達できると期待し、これを本基金の枠組みを通して実現することを目指した(図1)。細胞内・細胞間シグナル伝達機構としての熱利用(「熱シグナル」)を仮説とし、その検証を目的とした。

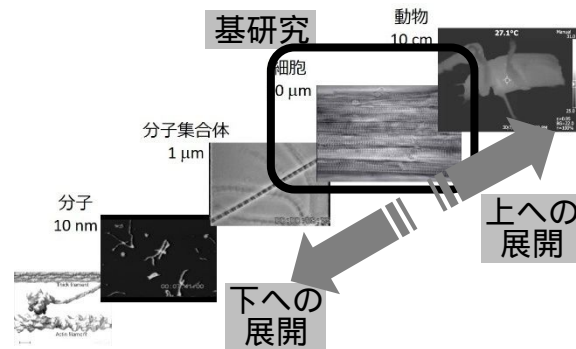


図1.基課題を、生物の階層構造の中で上(動物個体スケール)下(分子スケール)両方向へ展開する。

(1) 上(動物個体スケール)方向への展開

本項目では、1細胞よりも大きな組織、個体においても、1細胞レベルで温度を扱う。個々の要素(1細胞)の分解能で集合体(組織、個体)を見てはじめて、集合体効果、あるいはある細胞からの発熱が周囲の細胞へ及ぼす生理的な影響の可能性を検討できると考えた。

(2) 下(分子スケール)方向への展開

研究代表者らは基課題を進めるにあたり、微小な熱源を利用してきた。さらに細胞内で、任意の位置に局所的な温度勾配を発生することができれば、たとえば細胞内小器官の位置ごとに熱物性値を計測することも可能となるため、 10^5 ギャップ問題を解決しようとする基課題への大きな貢献が見込まれる。ミトコンドリアのような、アポトーシスと強く結びついた機能の示唆される細胞内小器官を、特異的に狙う新規温熱療法としての発展も期待できる。しかしその実現には、期待する特性を持つ、熱源となるためのナノ材料が必要である。そこで本項目では、光学的に On/Off できる微小熱源を得ることを目指した。

3. 研究の方法

以下に2つのテーマそれぞれについて、指示に従い簡潔に述べる。

(1) 上(動物個体スケール)方向への展開

研究代表者らはこれまでに、海外共同研究者と共に、昆虫個体を用いて、筋肉の Ca^{2+} 濃度変化や体内温度分布を蛍光顕微鏡下で *in vivo* イメージングすることに成功して来た。本課題のうち本項目では、これらの知見と技術をさらに発展、利用して、個体および組織内の細胞機能から産生される熱が(おそらく不均一に)拡散する過程の1細胞解析と生理的機能との関連の

解明を目指した。個体および組織の系を扱う海外共同研究者のもとで新規生物実験系の扱いを習得し、また予備的検討を進めるとともに、海外共同研究先および国内に準備した光学顕微鏡系により研究を進めた。

(2) 下(分子スケール)方向への展開

大きさ、形、表面処理を駆使して細胞内の任意の局所領域を加熱し、かつそのときの上昇温度を計測できるナノデバイスの調製を目的とした。そのために、海外共同研究者の得意とするナノ材料技術を活用した。海外共同研究者のもとで材料調製を習得し、溶液系での計測と培養細胞系での簡単な評価を行い、国内で顕微計測系を用いた実験を実施した。

4. 研究成果

本国際共同研究課題では1細胞レベルの温度を、組織・個体から細胞内小器官レベルまで、広いスケールで扱う技術の開発と、1細胞レベルの温度がこれらスケールで果たす生理的な役割について検討を進めることができた。研究代表者を中心として、将来にわたってアジアとヨーロッパをつなぐ研究連携が構築されたと考える。

2つの研究テーマそれぞれについて、研究内容での成果は次の通りである。

テーマ(1)については、海外共同研究者のもと、新たに眼組織試料を用いる顕微実験系の調製に成功した。眼組織の調製法と、温度感受性色素によるその染色法を確立したうえで、試料に適した顕微観察系のセットアップを行った。ここで得られた実験プロトコルに基づいて実験を進め、温度と眼組織内の細胞活動との相関を示すデータを初めて得ることができた。ここまでで、研究成果を論文としてまとめられるだけのデータがすでに得られたと考えられたが、結論をさらに補強できる他の実験も追加すべく、研究後半において新たな実験系を確立し、顕微鏡観察の裏付けとなる全く異なる実験系からの結果を追加することに成功した。国際共著論文としてできるだけ速やかな投稿を見込んでいる。

テーマ(2)でも、目的の機能性蛍光ナノ粒子の調製に成功した。海外共同研究者とともに複数の候補ナノ材料を新規に調製し、まず分散液系と培養細胞系とを用いて評価した。これら候補群から最適なものを選定し、さらに詳細な調製条件を検討した。次にナノ粒子表面の状態や電子顕微鏡を用いた構造の確認といった、ナノ粒子についての基本的な情報を確認し、また細胞毒性、細胞内局在といった、細胞実験へ応用するにあたっての基本的な情報について確認した。そして、細胞を用いた本格的な計測へと移行し、細胞内局所的な熱物性値の計測とその値のばらつきを得て、完了した。詳細な成果は国際共著論文としてまとめ、bioRxivに発表を済ませており、引き続き論文雑誌への投稿を見込む。ほか、本課題の主要なテーマの一つである1細胞温度計測について、現在の問題点(温度は細胞スケールで定義できるか? 測れる値になりうるか?)についてまとめた総説を発表した。ここで得られた実験結果は、「熱シグナル」仮説を強く裏付けるものであり、本国際共同研究課題の主目的が達成された。

本プロジェクトの最終年度には、研究成果の一部を含む内容を、2件の国際会議において発表した。1件(2020年1月7-10日)は細胞内温度計測の分野で活発に研究を進めるスペインのグループから招かれた招待講演であり、またもう1件(2020年2月14-21日)は米国生物物理学会でのPlatformにおいて抄録が口頭発表に選出されるというもので、いずれも、当該分野に

おける本プロジェクトの注目度が高いことを示す。さらに2020年1月11-14日には、特にテーマ(1)について、これまでに得られた結果の解釈、および細胞温度計測の技術や知見の展開先を検討する目的で、オルガノイド研究を主な研究テーマに掲げる、スペイン・バルセロナにある研究所 EMBL Barcelona を招待講演後に訪問して議論することができた。これら一連の成果は、本プロジェクトの国際的な認知度の向上と、当該研究分野の最新動向の把握といった点においても、最終年度における総まとめとしてふさわしい成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki, M., Plakhotnik, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 The challenge of intracellular temperature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophys Rev	6. 最初と最後の頁 593-600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-020-00683-8	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 該当する

1. 著者名 Sotoma, S., Zhong, C., Kah, J.C.Y., Yamashita, H., Plakhotnik, T., Harada, Y., Suzuki, M.	4. 巻 -
2. 論文標題 In situ measurement of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.06.03.126789	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Nanothermometry using luminescent molecules and nanoparticles in cell biology and physiology.
3. 学会等名 Three Wise Men Winter School on Luminescent Nanothermometry for Biomedical Applications（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chongxia Zhong, Shingo Sotoma, James Chen Yong Kah, Taras Plakhotnik, Yoshie Harada, Madoka Suzuki
2. 発表標題 Dual-functionalized fluorescent nanodiamonds as nanoheaters and nanothermometers in cells
3. 学会等名 Biophysical Society the 64th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	サトウ ヒロタカ (Sato Hirotaka)	シンガポール南洋理工大学・航空宇宙工学科・准教授	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ブリンクマン ラルフ (Brinkmann Ralf)	リュベック大学・生物医療光学研究所・上席研究員	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	カー ジェームス (Kah James Chen Yong)	シンガポール国立大学・バイオメディカル工学科・助教	