

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687021

研究課題名(和文)メゾスコピック領域で見られる生物の機械的で熱的な動作のしくみと操作

研究課題名(英文)Mechanical and thermal properties of living organisms at the mesoscopic scale

研究代表者

鈴木 団 (Suzuki, Madoka)

早稲田大学・重点領域研究機構・准教授

研究者番号：40350475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,200,000円、(間接経費) 6,360,000円

研究成果の概要(和文)：メゾスコピック領域の「力」は、近年のメカノバイオロジーの興隆により再認識されはじめた。しかし熱、そして温度は、いまだにマクロなパラメータとして扱われることが多い。(1)「仕事(力)」と(2)「熱(温度)」という2つのエネルギー量を、メゾスケールで扱える技術を開発し、新規で生物学的に重要な事象の発見を目的として研究を行った。(1)細胞シートを調製し、負荷刺激系を組み合わせた顕微観察系を用いて細胞シートの外部負荷応答を解析した。(2)細胞の熱パルス応答を見出した。1細胞の温度変化を検出するプローブおよび手法を新規に開発し、これを応用した。

研究成果の概要(英文)：(i) Force (work) and (ii) temperature (heat) are frequently considered as macroscopic parameters. Here we developed novel methods to handle these physical parameters at the single cell scale, and tried to discover biologically important phenomena. (i) A novel cell-sheet system was developed. We examined the response of a cell-sheet to external mechanical stimulus under an optical microscope. (ii) We found the cells respond to heat pulses. Also, we developed novel temperature probes to study single cell thermogenesis.

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：共焦点顕微鏡 生物物理 分子モーター 細胞・組織 生体分子

1. 研究開始当初の背景

細胞の力学知覚に関する最近の研究から、細胞が力学刺激を感じて応答することが明らかとなり、その知覚メカニズムの鍵となるタンパク質群について基礎的な理解が進んだ。そしてメゾスコピック領域の「力」は、近年のメカノバイオロジーの興隆により再認識されるようになった。しかし熱、そして温度は、いまだにマクロなパラメータとして扱われることが多い。水中では、メゾスコピック領域でも理論的には温度を定義できる。しかし従来の研究では、細胞内部の温度は、細胞を取り巻く巨大な系の巨視的パラメータとして扱われてきた。

2. 研究の目的

従来の生物学では多くの場合にマクロスケールのパラメータとして捉えられる(1)「仕事(力)」と(2)「熱(温度)」という2つのエネルギー量を、メゾスケールで扱える技術を開発し、新規で生物学的に重要な事象の発見を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アクチン-GFP、-RFP を発現する細胞を用いて細胞シートを調製し、負荷刺激系を組み合わせた顕微観察系の最適化を進め、蛍光タンパク質が外部不可に応答する様子を確かめた。さらに RFP-アクチンと共に GFP と融合した接着結合タンパク質、および接着斑タンパク質を共発現する細胞を作成し、これらを用いて細胞シートを調製した。負荷刺激系を組み合わせた顕微観察系により、細胞シートの外部負荷応答について解析した。(2) 複数種の細胞を対象として、その近傍に集光した赤外レーザーで局所的な温度勾配を短時間だけ発生させ(熱パルス)、細胞の応答を解析した。またポリマーナノ粒子の

内部に蛍光色素を封入する方法を用いて細胞用のナノ温度計を新規に作成し、細胞内の局所的かつ僅かな温度変化の測定を可能にする新たな手法を開発した。さらにレーザーを使った入れ墨の除去など医療の現場で利用されている「キャビテーション・バブル」という現象を光学顕微鏡下で再現した。この時に生じると予想されていた一過的な温度上昇を、超高速で画像化した。

4. 研究成果

2011年度は、(1)本研究成果に関する予備的結果について、EMBO Meeting 2011において学会発表を行った。また(2)単離したラット心筋細胞の近傍に熱パルスを発生させたところ、この熱パルスが心筋細胞の収縮を誘導することを見出した。この収縮中に Ca^{2+} 濃度変化は見られず、また細胞膜を除去した心筋細胞でも収縮は誘導された。このことから、熱パルスが Ca^{2+} の変動無しに筋収縮を制御できることを見出した。この現象は、 Ca^{2+} ダイナミクスに異常のある心疾患において、拍動を誘導する新たな手法につながる可能性がある。本研究成果について、Biochemical and Biophysical Research Communications 誌に論文発表した。さらに細胞内の局所的かつ僅かな温度変化の測定を可能にする新たな手法を開発した。ここで開発した蛍光ナノ温度計粒子の蛍光強度(明るさ)は温度によって変化し、他の環境因子(pH とイオン強度)には影響されない。そのため、環境が時々刻々変化する細胞内の局所的な温度を、正確に素早く測定することが可能となった。さらにこのナノ温度計は細胞内で分子モーターによって輸送され、「細胞内を歩くナノ温度計」として働くことが見いだされた。本成果について Lab on a Chip 誌に論文発表した。

2012年度は、(1)外部負荷によるタンパク質の局在変化とリン酸化を確認した。応答

の分子メカニズムの一端を解明したことを報告する論文の準備を開始した。(2) 温度を測定する一方で、他の環境因子(pH、イオン強度、粘性、タンパク質濃度)に測定値が影響されない性能は、今年の粒子と同等以上であった。このレシオ型ナノ温度計を培養細胞へ導入し、一つの細胞からの発熱を検出することを試みた。

2013年度は、(1) 昨年度までに準備を進めていた論文について、追加の実験を行った。また(2) 昨年度までに改良に成功していたナノ温度計を培養細胞 HeLa へ応用した。HeLa 細胞にはふりかけるだけで自発的にとりこまれること、エンドサイトーシスで取り込まれた後は酸性オルガネラであるエンドソームに存在すること、エンドソーム内と細胞外とに温度差の無いことが確認された。さらに一つの細胞からの発熱を検出する試みに成功した。細胞内 Ca²⁺濃度を強制的に急上昇させると、細胞内の各部位で温度の上昇が観察された。温度上昇の時間変化は、部位毎に異なっていた。また細胞全体の Ca²⁺濃度上昇と温度変化とを比較すると、正の相関が見られた。これは個々で見られた発熱現象の熱源が、Ca²⁺によって活性化される分子または機構であることを示唆している。本研究結果について ACS Nano 誌に論文発表した。またキャビテーション・バブル現象の背景にある物理法則を明らかにした。本研究結果について Scientific Reports 誌に論文発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Fast temperature measurement following single laser-induced cavitation inside a microfluidic gap. Quinto-Su, P.A., Suzuki, M. and Ohl, C.-D. *Sci. Rep.* (*in press*)
A Nanoparticle-Based Ratiometric and

Self-Calibrated Fluorescent Thermometer for Single Living Cells. Takei, Y., Arai, S., Murata, A., Takabayashi, M., Oyama, K., Ishiwata, S., Takeoka, S.* and Suzuki, M.* (*Corresponding authors) *ACS Nano*, **8(1)**, 198-206 (2014) DOI: 10.1021/nn405456e

歩くナノ温度計 鈴木 団、大山廣太郎、石渡信一 *生物物理*, **53(3)**, 158-159 (2013)

Oyama, K., Takabayashi, M., Takei, Y., Arai, S., Takeoka, T, Ishiwata, S.* and Suzuki, M.* (*Corresponding authors) Walking nanothermometers: Spatiotemporal temperature measurement of transported acidic organelles in single living cells. *Lab Chip*, **12**, 1591-1593 (2012)

Arai, S., Hirose, S., Oguchi, Y., Suzuki, M., Murata, A., Ishiwata, S. and Takeoka, S. Mass Spectrometric Screening of Ligands with Lower Off-rate from a Clicked-based Pooled Library. *ACS Comb. Sci.*, **14(8)**, 451-455 (2012)

Oyama, K., Mizuno, A., Shintani, S.A., Itoh, H., Serizawa, T., Fukuda, N., Suzuki, M.* and Ishiwata, S.* (*Corresponding authors) Microscopic heat pulses induce contraction of cardiomyocytes without calcium transients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 607-612 (2012)

[学会発表](計45件)

Suzuki, M. Microscopic thermometry in a living cell by fluorescent nanoprobes. Japan-A*STAR Advanced Diagnostics Forum,

Singapore, March 24, 2014 **招待講演**
Suzuki, M. Thermometry in aqueous solution at single cell-scale using fluorescent nanothermometers. 第91回日本生理学会大会 (The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan), Kagoshima, Japan, March 16-19, 2014 **招待講演**

Suzuki, M. Single cell-scale thermometry by fluorescent temperature reporters. 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM 2013), Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu, Japan, November 7-9, 2013 **招待講演**

Suzuki, M. Temperature measurement in the scale of single cell with fluorescent temperature reporters. MBI Seminar, Mechanobiology Institute, National University of Singapore, Singapore, September 17, 2013 **招待講演**

鈴木 団 一匹の細胞で温度を扱うこと & 擬似組織系で細胞の力学負荷応答を見ること 「細胞機能究明の最前線3」理研セミナー、東京、2013年6月20日 **招待講演**

鈴木 団 光学顕微鏡を用いた局所熱励起・局所温度測定 第10回国際バイオ EXPO、東京、2011年6月29日(水)~7月1日(金)(7/1) **招待講演**

[その他]

報道関連情報

早稲田大プレスリリース「水中で触れずに細胞の中の温度を測れるレシオ型ナノ温度計を開発 ミクロンサイズの温度変化を測定するナノ温度計の手法を発展」 2014年1月17日
日経産業新聞「水中の細胞温度

触れずに正確測定 早大が装置開発」 2014年1月21日
マイナビニュース「早稲田、水中で触れずに細胞の温度を測定する「レシオ型ナノ温度計」開発」 2014年1月28日
早稲田大プレスリリース「細胞内を歩くナノ温度計を開発 ミクロンサイズの細胞内小器官内部の温度変化を世界で初めて測定」 2012年3月15日
マイナビニュース「早大、細胞内の局所的で微小な温度変化を測定可能な「歩くナノ温度計」開発」 2012年3月14日
日刊工業新聞「細胞内で0.3度C差測定 早大 ナノ粒子の温度計」 2012年3月19日
科学新聞「細胞内を歩く「ナノ温度計」開発 ミクロンサイズの細胞内小器官内部の温度変化 - 早大が世界で初めて測定 - 」 2012年3月23日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 団 (SUZUKI, Madoka)

早稲田大学・重点領域研究機構・主任研究員 (研究院准教授)

研究者番号: 40350475