

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23760161

研究課題名(和文)流動ダイナミクスに基づく微生物識別法の開発と大偏差力学の展開

研究課題名(英文)Development of evaluation method for bacterial motility based on the flow dynamics and the large deviation mechanics

研究代表者

花崎 逸雄 (HANASAKI, Itsuo)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：10446734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ブラウン運動はナノ・マイクロスケールの代表的な現象であり、近年、学術・産業両面での応用上の重要性からも一分子追跡の計測技術が大きく発展してきている。また、微生物の自発的運動はランダム性を有しており、その種や状態を特徴づける特徴として重要である。しかし、ランダムな軌跡の解析技術は計測技術自体に比べるとあまり研究されていない。本研究では、統計数理の大偏差原理を基にして軌跡データを解析することにより、時々刻々の粒子配向が不明でも棒や楕円体のような微粒子の拡散異方性を評価できることを明らかにし、また、E. coli のような微生物の自発的運動の特徴の差異を拡散係数が等しくとも明らかにする方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Brownian motion is a fundamental phenomenon of nano/micro scale fluid dynamics. On the other hand, bacterial motility is known to show some stochasticity while essentially different from Brownian motion. Recently, there have been drastic developments in the techniques of single particle tracking (SPT) or single molecule tracking (SMT) due to the importance in the medical and biological applications as well as material processing. However, the analysis of the obtained trajectory data has not been addressed intensively compared to the measurement technology. In this study, we have developed the evaluation methodology based on the large deviation principle. In particular, we have shown that it is possible to elucidate the diffusion anisotropy of a prolate particle without the information of particle orientation. Furthermore, we have shown that the finite-sample effect can be useful in the characterization of bacterial motility.

研究分野：機械工学

科研費の分科・細目：流体工学

キーワード：応用力学 ナノ・マイクロ流体 統計力学 力学系 揺らぎ ブラウン運動 大偏差原理 時系列データ解析

1. 研究開始当初の背景

微小な機械システム MEMS の一種である深さ数 $10\mu\text{m}$ 以下の流路を用いて微量の流体サンプルを活用する Lab on a Chip の研究情勢において、細胞などの微粒子を流れ場により回収する技術の開発が盛んである。その背景には医学関連分野での効率的な細胞処理技術の需要が挙げられる。また、製薬業界における研究開発では、自然環境中で採取したサンプルの中から特定の機能を有する微生物を見つけ出すことが、新薬の開発に重要な役割を担うこともある。したがって、流体中の微生物や細胞を識別する技術は、医学・製薬関連の学術・産業界でとても重要である。しかし、Lab on a Chip 関連分野においては流体中微粒子の識別よりも回収や操作に重点が置かれてきた。そして、既存の識別技術の多くは微生物や細胞に大きな影響を与えがちである。拡散係数の違いを利用した流れ場による分類回収法は無侵襲ではあるが、有用な微生物や細胞の挙動の違いは拡散係数の違いとしては明確に表れない場合も少なくない。よって、流体工学的に一段進んだ無侵襲の革新的識別技術が必要であった。

微生物や細胞の運動の特徴を評価することは生物学的な研究において重要であるが、より普遍的な視点から見ればランダム性を有する広い意味でのブラウン運動の特徴を客観的にとらえることの重要性が年々増している。その理由の一つは、いわゆる一分子追跡 (Single Molecule Tracking; SMT) や一粒子追跡 (Single Particle Tracking; SPT) と呼ばれる実験計測技術の著しい発展である。これにより、生体分子にマーカーとして結合させた蛍光分子を追跡したりすることによって、その分子のダイナミクスを観察したり、その生体分子が置かれている場の特徴を調べたりする研究が盛んになってきた。さらに、SPT 技術は細胞や生体分子等の医学・生物学関連分野だけではなく、材料科学などの人工物を取り扱う分野でも少しずつ注目されるようになってきた。例えば、メタマテリアルと呼ばれる分類の機能性材料を開発する際には、溶媒中にいったんナノ粒子を分散させておいて、そこからナノ粒子群を集積させることによって固体材料を作製するプロセス技術が用いられる。流れ場とブラウン運動が共存する状況下で個々の微粒子がどのような挙動を示すのかを明らかにすることができれば、その材料のプロセス技術開発における設計指針を手に入れることができる。このように、SPT 技術の著しい発展と、それを必要とする分野や場面の増大は、媒質中でブラウン運動を行う粒子の特徴を的確に評価する方法論の必要性を著しく高めた。

しかし、現状では最先端の顕微鏡技術を駆使して高度な計測を行う研究事例でも、注目している粒子の運動を評価する方法はあまり顧みられていないのが実状であった。ランダムさを含むブラウン運動を評価する際に

はもっぱら自己拡散係数が用いられている。自己拡散係数は粒子の軌跡データから時間の関数として表した平均二乗変位に線形性が見られる場合にその傾きを通じて抽出される量である。拡散係数はランダムな運動を評価する最も基礎的な量であり重要であることは間違いない。しかしながら、例えば微生物の運動を観察すれば拡散係数が等しい場合でも運動の特徴が異なることが直観的にも理解できる場合は少なくない。これは、拡散係数で表しきれない運動の特徴が存在するからである。しかし、客観的にその特徴を評価するためには、拡散係数以上の運動の特徴を評価するための理論的な手法が必要である。また、直観的には差異が確認できない場合であっても、もし仮に高解像度・高精度・大容量の計測データが手に入った場合には、そこから重要な特徴を抽出できる可能性がある。しかし、現状ではそのような可能性自体も十分に顧みられていない。したがって、理論的な技術革新があれば、最先端の高度な実験計測技術を最大限に活かすことができるようになると思われる。さらに、理論的な観点から原理的なレベルで可能性を示すことができれば、それを実現するためのハードウェア開発の意義や方向性が明確になり、優れたハードウェア技術が将来的により効果的な形で結実するようになる。

2. 研究の目的

本研究では、微生物や細胞などの自己駆動粒子や、生体分子、さらにメタマテリアルをはじめとする材料開発などで工学的に活用される微小な粒子の流動現象に注目する。そして、それらが流体中で示す多様なランダム性を有する運動を評価する新たな方法論を確立して、拡散係数を超えるダイナミクスの特徴をとらえることを可能にする。また、大偏差原理を基点としながら有限個の時系列データを対象とする数値解析の試みを通じて、解析対象の特徴に依存した事柄と普遍的な事柄を整理し、中心極限定理を超えて統計力学的にダイナミクスの特徴をとらえるために重要な事柄について考察する。

3. 研究の方法

本研究では、大数の法則や中心極限定理を包含する統計数理の基本原則である大偏差原理に注目する。大偏差原理は、有限サンプル平均が期待値以外の値を取る確率がサンプル数の増加につれてどのような速さでゼロに収束するかを記述できる。中心極限定理は、元々のダイナミクスを生成する法則がガウス分布に従っていないくとも、独立同分布な確率変数であればそのサンプル平均の分布がガウス分布に収束してゆくことを示している。逆に言えば、元々の異なるダイナミクスの個別的な特徴に関する情報は有限サンプル平均を中心極限定理の範囲内で平均や分散の形で取り扱うだけでは十分に捉えき

れないことを示唆している。大偏差原理を応用することにより、そのような特徴について議論することを可能にする。ただし、大偏差原理は本来、サンプル数無限大の極限を取る形で記述されるものである。これに対して、実験値は無限個存在することはない。本研究では、大偏差原理を基にして、そこから有限サンプル数においてある種の近似として定義できる新たな統計量を取り扱う。したがって、大偏差原理の数学をそのまま使うということではなく、有限サンプル数によって生じる影響に常に注意し、その有限サンプル効果をむしろ逆手にとって有効活用することを試みる。すなわち、極限を取らない形で定義した統計量が示す有限サンプル効果のサンプル数依存性それ自体に、解析対象が持っているダイナミクスの特徴が反映されている可能性に着目する。

具体的には、特に2つの解析対象系を中心に研究を進める。一つは、研究課題のタイトルにも挙げた微生物の自発的運動である。微生物には極めて多様な種が存在し、そのうち自発的運動を行う種も膨大な数になる。しかし、自発的運動を行う微生物の代表的な存在として *E. coli* のダイナミクス本研究では考える。それは、ダイナミクスについて個別具体的な特徴が過去数10年の実験計測による既往研究事例によって定量的に明らかにされており、様々な目的で行われる微生物研究における最も代表的な存在だからである。基本的には、*E. coli* は鞭毛を回転させることにより推進する走行運動を行い、また、その鞭毛の回転方向を逆にすることによって走行運動を止めて推進方向をランダムに定める。走行状態でのスピードはあまり変化が無く、走行方向には周囲流体の熱揺らぎによるブラウン運動によって変動が生じる。推進方向をランダムに変化させる時にはおよそガンマ分布に従うような選択を行い、そのイベントの間隔すなわち連続走行時間は最も大まかなモデルでは指数分布と見なされている。既往研究事例によるこのような知見に基づいて単純な *E. coli* の自発的運動に関する数理モデルを定義し、数値計算に基づいて軌跡を生成する。時間刻みは 10^{-2} s として 10^6 ステップのデータを1セットとする。そして、走行スピードや連続走行時間を変えた条件でも計算を行い、同じ拡散係数に対応しながらも異なる運動の特徴を持つ軌跡の生データを得る。これらに対して大偏差原理に基づく解析を行い、拡散係数を超える運動の特徴がどのように統計量に反映されるか検証する。特に、*E. coli* が自発的運動を行うことによってブラウン運動とどのような点が根本的に異なるのか数理モデルに基づいて基本的特徴を明らかにする。

そして、もう一つの解析対象としては、最も単純化したブラウン運動の数理モデルに比較的近い、異方性粒子のダイナミクスを取り扱う。ここで言う異方性粒子とは、例えば

回転楕円体や棒のような形状の粒子のことである。楕円体粒子は長手方向とそれに垂直な方向に2種類の拡散係数を持つので、最も対称性の高い球体とは異なる拡散挙動を示す。ただし、そのような異方性は十分に細かい時間解像度でのみ観測され得る特性である。その特徴的な時間スケールは回転運動に関する拡散係数によって定まる。このような粒子は上述のメタマテリアルを構成するための原料の微粒子を代表するものとして意味があり、微粒子群の集積過程を一粒子追跡して素過程についての特徴が明らかにできれば、その特徴を踏まえて粒子そのものの設計やプロセス条件の設計にフィードバックすることができるようになる。さらに、異方性粒子は必ずしもマクロな意味で楕円体や棒のみを代表しているモデルというわけではない。いわゆる持続長より十分に短い生体分子はやはり長手方向とそれに垂直な方向に異なる拡散係数を定義する余地があり、また、幾何学的な対称性が高い場合であっても、その電荷分布に著しい偏りがあれば溶液中において分子の特定の方向における拡散係数がそれに垂直な方向とは異なる可能性が考えられる。すなわち、2方向に並進拡散係数を定義した異方性粒子とは、対称性の低い拡散粒子一般を表す汎用性のあるモデルである。それぞれの方向に関する並進のブラウン運動は基本的にはウィーナー過程として定義する。計測者側に固定した座標軸方向の拡散挙動は、回転ブラウン運動を通じて時々刻々変化していく。微粒子が十分に大きな場合には実験的にも時々刻々の粒子配向を特定することができるが、生体分子を TIRF 等の顕微鏡技術を駆使して追跡するような場面では生体分子自体が全体的に直接可視化できるわけではなく、生体分子に結合させたマーカーとなる分子の位置を追跡することになる。そこで本研究では、時々刻々の粒子配向が不明である状況を考える。そして、粒子の位置の時間発展のみから、粒子の方向に依存した拡散係数の違いの大きさを抽出することを試みる。異方性粒子のブラウン運動に関する数理モデルから軌跡を生成し、その時系列データに対して大偏差原理に基づく解析を行う。時間刻みは、回転の拡散係数の逆数から定まる時定数を100分割した大きさとし、 10^6 ステップの時系列データを1セットとして扱う。粒子に付けた座標軸の2方向に定めた拡散係数の違いを表す無次元量の大きさが異なる条件間での特徴の違いを明らかにする。研究を行う順番としては、まず単なるウィーナー過程に近い異方性粒子のダイナミクスを評価した上で、より複雑な *E. coli* の数理モデルの解析をおこなった。

4. 研究成果

まずは異方性ブラウン運動に関する解析結果について述べる。有限時間刻み幅において、すなわち実験で言えば顕微鏡に接続した

ビデオカメラのフレーム間隔において、顕微鏡に固定した座標系で得られる2次元の変位の時系列データから、等価なそれぞれの方向に関して大偏差原理を基にして有限サンプル数において定義した統計量を計算し、最後にそれらを平均した結果を評価した。その結果、同じ全体拡散係数に対応しながら粒子の長軸・短軸方向の拡散係数異方性パラメータが異なるダイナミクスに対して、大偏差原理に基づく統計量に違いが生じることを確認できた。同じ時系列データを基にして、拡散係数の抽出に用いる平均二乗変位では見出せない違いを、大偏差原理の応用によって検出できることを示した。特に、拡散異方性が軌跡の目視によっては識別困難な場合でも、生データの解像度・精度・総量が十分であれば大偏差統計量によって客観的な相対比較が可能であることを示した。

一方で、定義した統計量はダイナミクスの時間刻みに依存することも確認した。実験であればカメラのフレームレートは任意ではなく、特定の離散的な時刻における情報だけが得られる。したがって、時間刻みをそろえた条件下において他の条件を変えた場合の比較を行う必要がある。時間刻みが粗いほど、1ステップの間に粒子のブラウン運動による回転が大きく生じるため、空間側に固定した座標軸から見た拡散係数の時間に対する不均一性がわかりにくくなり、ブラウン運動の異方性に関する差異は検出しにくくなる。つまり、ブラウン運動による回転の時定数によって、拡散異方性評価に必要な時間解像度が決まるということがわかる。

しかしながら、統計量を定める上で決める必要のある有限時間スパンの取り方を変えた場合でも、この数理モデルで表されるダイナミクスに関しては、最も代表的な量であるレート関数の近似的な値はほとんど影響を与えないという結果が得られた。これは、ブラウン運動による回転拡散係数によってダイナミクスの特徴的な時間スケールが定まることからすると自明ではなく意外性のある結果である。また、本研究ではレート関数を求める方法について、確率分布関数を經由する方法ではなく、有限時間スパンの平均値に基づく方法を用いた。これは、取り扱っているのが時系列データであり、何らかの意味で時間相関を持つ可能性がある場合、その特徴を統計量に反映することが対象の特徴をとらえることになるからである。実際、時間刻みが粗くなると、定義した統計量で拡散異方性を検出することは困難になる。同じ確率分布関数であっても、そのダイナミクスとしての違いを反映する方法を考えることが、特徴をとらえることになるという事実を具体的な形で確認することになった。また、前述のように、拡散異方性の検出が、時々刻々の粒子配向に関する情報が無くとも可能であることを示した意義は大きい。

次に、微生物の代表例として *E. coli* を定

め、前述のように自発的運動の最も基本的な特徴を再現する数理モデルを構築した。そのモデルによって生成される軌跡から得られる平均二乗変位に基づく自己拡散係数は、走行状態時の推進スピードと走行を止めて次の推進方向をランダムに選択する時間間隔の両者に大きく依存する。つまり、標準的な条件に対して推進スピードが小さい場合と平均連続走行時間が短い場合の二通りの異なる状況が、標準条件よりも小さな拡散係数の等しい値に帰着し得る。このようなダイナミクスの特徴を、大偏差原理に基づいて定義した有限サンプル数に対する統計量を通じて評価した。

その結果、統計量を定義する際に必要なアンサンブル平均と時間平均のサンプル数をそろえた条件において、走行スピードと持続時間の違いを検出できることを明らかにした。また、前述の異方性ブラウン運動の解析では異方性パラメータはレート関数にほとんど影響を与えなかったのに対して、*E. coli* モデルによる自発的運動の軌跡はレート関数の特性に大きな影響を及ぼすことがわかった。ウィーナー過程のブラウン運動による軌跡ではアンサンブル平均や時間平均に割り当てるサンプル数の比率はレート関数の表示範囲に影響するもののレート関数の形状には大きな影響を与えない。これに対して、微生物モデルの自発的運動では、有限サンプル数の割り当て方を変えると、極限を取らないレート関数に対応する統計量の形状が大幅に変化することがわかった。このような依存性の有無はブラウン運動と自己駆動による運動の違いを顕著に表すものである。

さらに、レート関数とは別の関連する統計量を定義して、その値のサンプル数依存性自体を系統的に評価することにより、ブラウン運動と自己駆動による運動の違いをより明確に表すことに成功した。しかも、このサンプル数依存性を評価することにより、上述の同じ拡散係数に帰着する走行スピードと持続時間の違いを識別し得ることが明らかになった。大偏差原理の理論それ自体は極限を取る形で展開されるものであり、サンプル数が有限であることはその厳密な取り扱いができないという否定的事実として認識される。しかし、有限であっても十分なサンプル数が十分な解像度と精度と共に得られれば、有限サンプル数依存性をスケーリング則として積極的に活用できることを示すことができた。実用の上では、軌跡を得るために走化性を用いていないため、栄養となる物質などの濃度勾配場を作製する必要もない。また、多種多様な微生物の運動形態に対して事前の知識無しに、つまり *E. coli* で言えば走行状態かどうかを判定するための閾値などを用いずに解析できることが利点である。これらは普遍的な数理を用いていることによる利点でもある。

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 2 件)

Itsuo Hanasaki and Satoyuki Kawano,
“Evaluation of bacterial motility from non-Gaussianity of finite-sample trajectory by the large deviation principle”, Journal of Physics: Condensed Matter, Vol.25, 465103 (9 pages), 2013, 査読有り.
DOI:10.1088/0953-8984/25/46/465103

Itsuo Hanasaki and Yoshitada Isono,
“Detection of diffusion anisotropy due to particle asymmetry from single-particle tracking of Brownian motion by the large-deviation principle”, Physical Review E, Vol.85, 051134 (9 pages), 2012, 査読有り.
DOI: 10.1103/PhysRevE.85.051134

[学会発表](計 3 件)

花崎逸雄, 川野聡恭,
“水溶液中の高分子の熱揺らぎに関する大偏差数値解析”, 日本機械学会第 5 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, pp.149-150, 仙台, 2013 年 11 月 6 日.

花崎逸雄, 川野聡恭
“大偏差原理に基づく微生物の自発的運動の検出”, 日本機械学会 2013 年度年次大会, No.13-1, 岡山, 2013 年 9 月 9 日.

花崎逸雄, 磯野吉正,
“大偏差統計理論に基づく楕円体粒子のブラウン運動異方性の評価”, 日本機械学会第 90 期流体工学部門講演会講演論文集, 京都, 2012 年 11 月 18 日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

花崎 逸雄 (HANASAKI, Itsuo)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 10446734