

# 研究報告書

## 「摂動と計測による個体のエネルギーフローの1細胞分解能解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 鈴木 団

### 1. 研究のねらい

細胞間のばらつきは個体に至る生物の階層でどのように統合され、高次生体機能を実現するのだろうか。その理解は、オミクスの生物学的な究極目標の一つである。本研究では光学顕微鏡を用いて、動物個体系と細胞集団系で、エネルギーの流れを1細胞の分解能で解析する基盤技術を開発することをねらった。階層をまたぐ物理パラメータを1細胞の分解能で計測して、階層を越えた統合的な理解と、細胞が個体に統合される仕組みの理解を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

生物の階層構造を縦断する研究の展開が本さきがけ研究では必要であったことから(図1)、階層構造を大きく3つに分ける研究テーマを設定して、研究を遂行した。最も小さなスケールの階層では、研究テーマA「生きた細胞の熱応答の計測」を設定し、1細胞未満のスケールで加熱するための技術開発と、開発した新規技術で熱刺激した細胞で見られる熱応答の解析を行った。次に大きなスケールの階層として研究テーマB「スフェロイドにおける温度と熱シグナルの1細胞解析」を設定し、1細胞から細胞集合体に至るスケールを対象に、細胞から放出された熱が細胞集合体でどのようにふるまうのかの検証を目指した研究を実施した。最後に最も大きなスケールの階層では研究テーマC「個体における温度と熱シグナルの1細胞解析」を設定し、動物個体における1細胞未満の空間分解能を持った温度イメージング技術の開発と、細胞の熱産生が個体で利用される過程の理解を目指した。

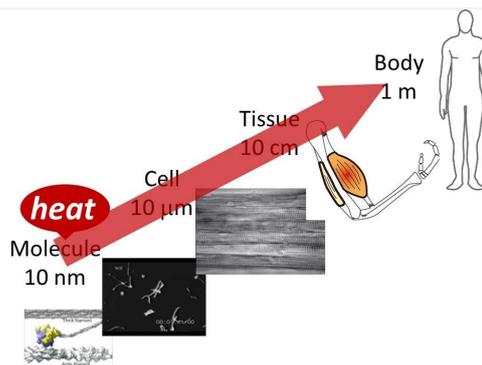


図1. エネルギー代謝によりタンパク質分子レベルで放出される熱が、分子集合体、細胞、細胞集合体を経て生物個体に至り、生命のインフラとして機能する様子を可視化して、ときには外部から熱刺激して、外部から摂取したエネルギーが生物の階層構造を縦断するしかけを理解する。熱は、周囲に拡散して体温を維持する以外に、局所的な酵素反応場の制御や分子の離合集散の制御といった、シグナルとしての役割も持つ可能性(「熱シグナル仮説」)について、検証する。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマA「生きた細胞の熱応答の計測」

生細胞内の任意の部位へ、一本鎖アビジンにビオチン化 DBCO と細胞内クリック反応を介して、アジド化した蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 fura-2 をラベルする手法を開発し、細胞質および ER の細胞質側で選択的に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を計測する新規技術として論文発表した[Y. Hou, et al., Focal

calcium monitoring with targeted nanosensors at the cytosolic side of endoplasmic reticulum. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 17, 293-299 (2016)]. ■近赤外レーザー光を C2C12 由来筋管へ取り込まれた金ナノ材料へ照射して細胞内の微小熱源とし、生じた温度上昇によって骨格筋を  $\text{Ca}^{2+}$  非依存的に、非接触に収縮できることを確かめ、新規手法として開発することに成功した。細胞内温度変化を、代表者らが開発した細胞内温度計で直接計測して定量化したほか、熱刺激がヒートショックタンパク質の発現の促進やミトコンドリア発生を促す遺伝子の発現を促進することを確かめた[論文2]。■さらにこの熱による収縮誘導を精製タンパク質系で確認する目的で研究を進める過程で、光ピンセットを用いたタンパク質 1 分子顕微計測系における新たな力計測の方法を新規に開発することに成功した[論文5]。■この新規顕微計測系を利用して、筋収縮制御系タンパク質の点変異に由来する心筋症の発症メカニズムについて、タンパク質分子による力発生様式の違いとして精製タンパク質系で検証できることを見いだした[S. Ishii, *et al.*, *Biophys. Physicobiol.*, *in press*]

#### 研究テーマB「スフェロイドにおける温度と熱シグナルの 1 細胞解析」

薬剤刺激により活性化した、ヒトおよびマウス由来の褐色脂肪細胞からの熱産生を、1 細胞でイメージングする技術を新規に開発した[論文3]。■活性化した褐色脂肪細胞のミトコンドリアと ER において生じる pH と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を計測した。さらに上述の新規技術を応用して、熱産生との時間的相関を解析した。その結果、褐色脂肪細胞において、他の細胞種よりも多くの放熱が可能となるメカニズムが提案でき、論文発表した[論文4]。■研究開始当初から検討していたスフェロイドの調製が上手く進まない一方で、項目Cとして進めている臓器、個体での観察で進捗があるため、期間の中ほどに項目 A,C へ重点を移した。

#### 研究テーマC「個体における温度と熱シグナルの 1 細胞解析」

筋肉からの熱産生は主要な熱産生手段として多くの生物で共通するが、産生した熱の個体への影響を評価するため、体積に占める割合の大きい飛翔筋を持つ甲虫をモデルとし、その微細構造について光学顕微鏡による計測と SPring-8 施設でのシンクロトロンX線回折実験との組み合わせた解析の実施、ならびに *in vivo* 1 細胞温度イメージング技術の新規開発を行い、それぞれ論文発表した[論文1; Ferdinandus, *et al.*, Facilely fabricated luminescent nanoparticle thermosensor for real-time microthermography in living animals. *ACS Sens.* 1, 1222-1227 (2016)]。

### 3. 今後の展開

本さがけ研究では、局所熱刺激(摂動)と局所温度計測(計測)の技術を開発・発展させ、様々な生物実験系への応用を加速的に拡大することができた。また筋肉を対象とした一連の研究成果は、本さがけ研究での検証を目的とした「熱シグナル」仮説を部分的に裏付けるものであった。

今後は、基礎研究を進めるとともに、より応用志向の協同プロジェクトへの展開も広げる。上記「2\*. 非公開の研究成果」で述べた各プロジェクトを完遂するとともに、扱う生物学的課題を広げることで、当該仮説の一般性について検討を進める。またそれぞれの技術項目は単独

モジュールとして様々な目的に適用可能である。ナノ粒子を利用する温熱療法や高熱変換材料を利用した細胞分化誘導の研究といったバイオエンジニアリング分野のプロジェクトとの協同へと展開する。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

研究目的の達成状況、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)について、以下に各項目ごと述べる。

##### ・研究目的の達成状況

熱シグナル仮説の検証と、各プロジェクト固有の研究目的が、当初に計画した研究目的である。このうち、スフェロイドを用いたものは途中で取りやめたが、その分の時間と研究費を別プロジェクトへ回した。それらが非常に良く進展したことから、優れていたものとして評価する。

##### ・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

研究実施体制は、必要な時に必要な能力を持つ人材を最低限確保でき、当初に計画した以上の成果に結びついたことから、優れていたと評価する。また人件費の一部を設備・備品費に充当でき、本さきがけ研究のコア技術の一つである光学顕微鏡系を充実させることができた。結果として、開発した技術を広い生物実験系で評価することが可能となった。また期間中に所属機関の異動が生じたため、研究費の一部は遅れての執行にならざるを得なかった。しかし期間後半より進めた新たな技術開発(「2\*. 非公開の研究成果」の#5)とタイミングが揃ったことで、当初の予定を超える展開となったことから、結果として優れていたと評価する。

##### ・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本さきがけ研究により、本さきがけ研究で開発した技術を利用する国内外の共同研究を広く呼び込むことに成功したことから、研究成果の科学技術への波及効果は高いと評価する。いっぽうで社会・経済への波及効果は、今後の見込みとして「3\*. 非公開の今後の展開(参考情報)」に述べた範囲においては、期待できると考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

熱という物理量を、生細胞内の細胞質やERなどの特定の細胞内器官から、組織・個体まで広いスケールにおいて精密に計測・解析する基礎技術の確立やプローブの開発することに成功しています。さらに、金ナノ粒子を細胞に取り込ませて、細胞内の熱分布を操作する技術を確立し、生体の筋管細胞が  $\text{Ca}^{2+}$  の変動なしに熱によって収縮することを確かめ、さらにこの熱

による収縮誘導を光ピンセットを用いたタンパク質1分子顕微計測系における新たな力計測によって確認しました。この時の細胞内温度変化を細胞内温度計で直接計測して定量化したほか、この熱刺激がヒートショックタンパク質の発現の促進やミトコンドリア発生を促す遺伝子の発現を促進することを確認しています。これらの成果は生命科学に新しい視点をもたらす可能性があり、高く評価できます。

この他の研究成果も含め、研究成果は順調に論文発表されており、プレス発表も実施しています。確立した技術の応用展開も進んでいるようです。是非、細胞での熱伝導率の実測までぜひ達成して欲しいと期待しています。

## 5. 主な研究成果リスト

記入要領に従い、本研究課題に関連して研究者主導で得られた成果について、代表的なものを中心に各項目5つ程度を記載する。

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Toshiki Shimomura, Hiroyuki Iwamoto, Tat Thang Vo Doan, Shin'ichi Ishiwata, Hiroataka Sato, Madoka Suzuki. A beetle flight muscle displays leg muscle microstructure. *Biophysical Journal*. 2016, 111, 1295-1303
2. Attilio Marino\*, Satoshi Arai, Yanyan Hou, Andrea Degl'Innocenti, Barbara Mazzolai, Young-Tae Chang, Virgilio Mattoli, Madoka Suzuki\*, Gianni Ciofani\* (\*Corresponding authors). Gold nanoshell-mediated remote myotube activation. *ACS Nano*. 2017, 11(3), 2494-2508, *Nature Nanotechnology* でハイライト。早稲田大学よりプレスリリース。日経産業新聞で紹介(2017年3月30日)。
3. Rókus Kriszt, Satoshi Arai, Hideki Itoh, Michelle H. Lee, Anna G. Goralczyk, Xiu Min Ang, Aaron M. Cypess, Andrew P. White, Farnaz Shamzi, Ruidan Xue, Jung Yeol Lee, Sung-Chan Lee, Yanyan Hou, Tetsuya Kitaguchi, Thankiah Sudhakaran, Shin'ichi Ishiwata, E. Birgitte Lane, Young-Tae Chang, Yu-Hua Tseng\*, Madoka Suzuki\* and Michael Raghunath\* (\*Corresponding authors). Optical visualisation of thermogenesis in stimulated single-cell brown adipocytes. *Scientific Reports*. 2017, 7, 1383
4. Yanyan Hou, Tetsuya Kitaguchi, Rókus Kriszt, Yu-Hua Tseng, Michael Raghunath, Madoka Suzuki.  $Ca^{2+}$ -associated triphasic pH changes in mitochondria during brown adipocyte activation. *Molecular Metabolism*. 2017, 6(8), 797-808
5. Shuya Ishii, Masataka Kawai, Shin'ichi Ishiwata, Madoka Suzuki. Estimation of actomyosin active force maintained by tropomyosin and troponin complex under vertical forces in the in vitro motility assay system. *PLoS ONE*. 2018, 13(2), e0192558, *PLOS Collections of Editor's Picks: Cell Biology - Cell Motility and Migration* でハイライト。

### (2) 特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)(代表的なもの)

学会招待講演

1. Imaging of heat production and heat-mediated contraction in single muscle cells. Biophysical Society the 62th Annual Meeting, San Francisco, California, February 17-21, 2018
2. Single-cell thermometry under optical microscope for the physiology of thermogenesis. 第95回日本生理学会大会、高松、2018年3月28-30日

著作物、総説

3. 鈴木団、新井敏, 1 細胞の温度がなんだというのか, バイオマテリアル—生体材料—, **34(3)**, 216-223 (2016)
4. 鈴木団 細胞の熱産生イメージングのための温度プローブ 生体の科学, **68(5)**, 456-457 (2017)
5. Arai, S. and Suzuki, M. Nano-sized optical thermometers. In *Smart nanoparticles for biomedicine*. (ed. by G. Ciofani), Elsevier, 199-217 (2018)