

人工細胞による細胞構成要素のミクロ熱パラメータの直接計測

Direct measurement of microscopic thermal properties of cellular components using the artificial cell

(日本生物物理学会推薦)

代表研究者 大阪大学 鈴木 団 Osaka University Madoka SUZUKI

This research focused on elucidating the mechanism of thermal regulation at the cellular level. Specifically, we addressed the following three challenges; (1) experimental verification of the low thermal conductivity in living cells using hybrid-type nanoprobe with higher precision and functionality and artificial cellular systems, (2) analysis of elementary processes of chemical and mechanical energy conversion by protein molecules using molecular dynamics simulations, and (3) experimental exploration of the response of biomolecules and molecular assemblies to heat and its physiological significance. The following results were obtained for each of the challenges: (1) The surface of fluorescent nanodiamond particles were successfully modified to reduce their size and to increase dispersibility. Liposomes encapsulating fluorescent nanodiamond particles were prepared. (2) The characteristics during the initial stage of the ATP hydrolysis process were elucidated in myosin. (3) The difference in temperature sensitivity between skeletal and cardiac muscle contractions were clarified. The current project provides important insights into the mechanism of thermal regulation at the cellular level. We would like to continue to develop and utilize the experimental systems at each spatial scale that we were able to initiate as a result of this project.

研究目的

細胞の熱産生は、ヒトのようにある程度大きな体積を持つ生物が、外部環境よりも体温を高く維持できる仕組みの根源である。また生物は外部環境の温度変化に影響され、応答し、それは自身の熱産生に対しても同様である。では細胞レベルの空間スケールで、熱が細胞に与える効果をどうすれば検証できるだろうか。その実験的な検証は、一般に難しい。難しい理由は単純で、熱は熱源の内部で産生され、熱源表面から周囲へ散逸することによる。つまり熱源が小さくなると、体積が表面積より素早く減少するために(例えばスケールが半分ならば表面積は1/4、体積は1/8になる)、微小な細胞で期待される熱的な現象は、大きな生物個体の温度上昇に比べて桁違いに小さく、かつ速くなるためである。幸いにして、細胞スケールで熱を扱うことの難しさは、近年に開発される細胞温度計測法や熱励起法によって解消されてきた。一方で、細胞で得られる実験結果の解釈

には、細胞内熱パラメータの理解が不可欠である。しかし、これらの物性値が実験的に計測されないまま研究が進められており、この点が当該領域に共通の課題として、強く認識されるようになってきた。

申請者らは以前に、頑強な温度プローブとして機能する蛍光ナノダイヤモンドの表面を、生体適合性が高く、光を吸収し熱を放出する性質を持つ高分子で被覆することで、光によって発熱の出力を制御できる温度計測・発熱のハイブリッド型ナノプローブを新規に開発した。これを用いて、細胞内の熱伝導率計測に成功した。細胞内の熱伝導率は、従来の仮説とは異なり平均で水の1/6と小さく、値には大きなばらつきが認められた。しかし、いまだ次の課題が未解決である。①細胞を構成するタンパク質分子や脂質分子などの因子が熱伝導に及ぼす影響。②細胞の熱源の一つと考えられるタンパク質分子のATP加水分解過程における熱の放出過程の詳細、および③熱産生に優れた細胞内における生体分子の熱応答

の検証。そこで本研究はこれら各課題について、①高精度化・高機能化したハイブリッド型ナノプローブと人工細胞系を用いた実験的検証、②タンパク質分子による化学・力学エネルギー変換素過程の分子動力学 (MD) シミュレーションを用いた解析、および③熱に対する生体分子・分子集合体の応答と生理的意義の実験的探索、を目的とし、これらを適宜並行して推進した。

研究経過

設定した課題①～③について、以下に経過を報告する。

①高精度化・高機能化したハイブリッド型ナノプローブと人工細胞系を用いた実験的検証 細胞内で、異なる生体分子群が形成しうる不均一な熱伝導率を計測しようとするとき、計測の局所性の高いことが求められる。熱伝導率計測の局所性は、ナノプローブ体積程度の平均値として計測される。局所性を高めるためには、ナノプローブをより小さくする必要があった。これまでに蛍光温度計として利用してきた市販の蛍光ナノダイヤモンド粒子は平均粒径約 100 nm であり、これを用いて調製されるナノプローブの粒径は平均 200 nm 程度となる。「平均」と述べたように実際には粒径のバラつきが大きい。そこで本研究ではまず、粒径がより小さく、かつ粒径分布がより狭い蛍光ナノダイヤモンド粒子を調製するプロトコルの開発を行った。その結果、50 nm より小さく、また粒径の揃った粒子を得る条件を見出すことに成功した。続いて、基本的な材料物性および光学特性を決定したのち、細胞での利用可能性の検討を開始した。また細胞へ利用するにあたり、ナノ粒子で一般に見られる凝集性を低減し、分散性を高めるための表面修飾についても合わせて検討した。その結果、hyperbranched polyglycerol (HPG) による修飾が適当であることがわかった。これらの成果の一部について 2022 年に学会ポスター発表を行い (ポスター発表 3)、2024 年にも学会発表を予定している。

また実験計測系となる人工細胞系の調製を行った。ナノプローブを内包するベシクルを調製することから検討を開始した。まずプレート上に均一な脂質二重膜を用意する。次にこの脂質二重膜を、ナノプローブを分散した液中ではがすことで、ナノプローブ内包ベシクル (リポソーム) が自発的に形成される (キャストリング法)。その結果、多層になったリポ

ソームや、蛍光ナノダイヤモンド粒子 (まずナノプローブの代わりに蛍光ナノダイヤモンド粒子で条件検討を進めた) を内包するリポソームのできていることが、蛍光顕微鏡を用いて確認された。しかし内包される粒子に対してリポソームが大きいことが多く、また粒子を内包したリポソームの数が少ないなどの問題も見いだされた。調製時の温度および電場強度を変えることで、粒径の制御が可能であることが分かっており、適切な条件の検討を進めている。条件が決められた後には、本項目の前半で述べた改良型ナノプローブを用いた計測に進むことを予定する。

②タンパク質分子による化学・力学エネルギー変換素過程の分子動力学 (MD) シミュレーションを用いた解析 ATP 加水分解するタンパク質分子は、加水分解により ATP の化学エネルギーを力学的な仕事に変換する分子エネルギー変換酵素の一種である。エネルギー変換の効率が不完全であるために、利用できなかったエネルギーの一部がとして周囲へ散逸し、組織レベルではマクロスコピックな温度上昇として体温維持に利用されると考えられている。エネルギー変換の過程で生じる構造変化や力学的仕事の生理的意義に関する研究は重点的に進められ、各ヌクレオチド状態におけるタンパク質立体構造の原子分解能での決定や、細胞内で機能発現を制御するメカニズムが多く明らかにされてきた。ところが、ATP 加水分解過程のメカニズムは十分に解明されていない。そこで本項目では、典型的な ATP 加水分解酵素であるミオシンによる ATP 加水分解の初期段階に着目し、MD シミュレーションを用いて、エネルギー変換過程の微視的メカニズムを検討した。その結果、ミオシンの機能的ループのポテンシャルエネルギーが数 kcal/mol 変化し、ループ内への力学的仕事の蓄積が観察された。興味深いことに、ATP 加水分解によって供給される反応熱の放出が抑制された状態でも、同様の観察結果が得られた。ミオシンは、ATP や ADP-無機リン酸との原子間相互作用の違いによって、化学エネルギーを力学的な仕事に変換することができる。タンパク質は細胞内で常に熱ノイズにさらされているため、このようなメカニズムが強固に働き、生物学的プロセスを安定的に制御している可能性があることが示唆された。本成果について 2023 年に学会口頭発表を行った (口頭発表 1)。できるだけ速やかに論文として報告できるよう、内容を取りまとめ

ている。また本課題について、生体分子による熱産生と散逸過程の研究を対象とする MD シミュレーション手法について取りまとめた総説を、2023 年に発表した（誌上発表 3）。

③熱に対する生体分子・分子集合体の応答と生理的意義の実験的探索 研究代表者らは以前に、心臓を構成する筋肉（心筋）の収縮が体温変化によりどのような影響を受けるかを調べ、心臓が体温範囲内で効率的に機能することを示した（参考文献 1）。本研究では、骨格筋と心筋の収縮の温度感受性の違いについて、局所加熱顕微鏡法を用いて検討した。局所加熱顕微鏡法とは、水による吸収率の高い波長約 1.5 μm のレーザー光を顕微鏡対物レンズを通して試料面に集光することで、集光点を熱源とし、その熱源を中心に形成される局所的な温度勾配を利用して、生体分子や細胞等を光学顕微鏡下で熱刺激する手法である。熱源が小さいために、レーザー光照射をやめれば温度勾配は速やかに消失し、局所的な温度場を加熱前の状態に戻すことが可能である。まず、2 秒以内の急速加熱（25°C から 41.5°C の範囲）により、単離した骨格筋筋原線維において、筋弛緩の状態となる溶液条件においても収縮が可逆的に誘導されることが見いだされた。次に精製タンパク質系を用いて体温範囲内（40°C まで）で評価した。ここでは精製タンパク質により筋収縮を 2 次元平面で再現する *in vitro* 滑り運動系を利用することで、再構成した骨格筋および心筋の筋タンパク質フィラメント（細いフィラメント）が、骨格筋または心筋由来のミオシンの上を滑り運動するときの速度について、その温度依存性を計測した。その結果、（1）骨格筋ミオシン上で滑り運動する骨格筋の細いフィラメントの滑り速度の温度依存性は、骨格筋筋原線維の収縮で得られた温度依存性と同等であったこと、（2）どちらのタイプの細いフィラメントも、心筋ミオシン上よりも、骨格筋ミオシン上の方が低い温度で滑り始めること、（3）心筋の細いフィラメントは、どちらのタイプのミオシン上でも、骨格筋の細いフィラメントよりも低い温度で滑ること、がわかった。従って、哺乳類の骨格筋および心筋は、様々な状況における生理学的要求に応じて、ミオシンとトロポミオシン・トロポニンによって相補的に調節されながら、体温が変動する範囲内で効率よく収縮するように微調整されている可能性が示唆された。本研究に関連する成果について、2023 年に学会口頭発表を行い（口頭

発表 2；ポスター発表 1,2）、また原著論文として発表した（誌上発表 1）。

考察

細胞内の生化学反応は内因性の熱源として機能し、生物個体の体温恒常性の維持に利用される。このプロセスには適切な制御が必要なはずである。なぜなら生化学反応は熱への応答を避けられず、適切に制御されない場合は深刻な結果が生じる可能性があるからである。この考察について、研究代表者らはこれまでに、研究代表者ら及び他グループから報告される結果に基づき、「トランススケール熱シグナリング」という概念を提案してきた。いっぽう本研究では設定課題①～③を通して、生体系による熱産生と、熱に対する生体系の様々な反応について、原子から分子集合体、細胞までの異なる空間スケールを対象に解析と考察を行った。これら二つの強く関連した内容について、一部を総説として 2023 年に発表した（誌上発表 2）。本支援課題を契機として開始することができた各空間スケールの実験系を、今後も発展的に利用して行きたい。

参考文献

1. S. Ishii, K. Oyama, T. Arai, H. Itoh, S.A. Shintani, M. Suzuki, F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Terui, N. Fukuda, S. Ishiwata: Microscopic heat pulses activate cardiac thin filaments, *J. Gen. Physiol.*, **151(6)**, 860-869, 2019.

研究の発表

口頭発表

1. Kurisaki, I., Suzuki, M.: Mechanical work generation at the early stage of ATP hydrolysis by myosin, The 61st Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, 名古屋、2023 年 11 月 14 日～16 日 招待講演
2. 鈴木 団: 筋肉で Ca^{2+} と収縮を巻き込む熱シグナリング, 生理研研究会「細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線」、岡崎、2023 年 9 月 14 日～15 日

ポスター発表

1. 鈴木 団: 光学的局所加熱・温度計測を用いた熱シグナリング解析, 量子生命科学先端フォーラム 2023 夏の研究会, 北海道大学 2023 年 9 月 13 日

～15日

2. Madoka Suzuki: Heat-hypersensitivity and its mechanism in mutants of Ca²⁺ release channel RyR1 revealed by nanothermometry and opto-thermal technology, International Conference on Biological Physics (ICBP2023), Seoul, Korea, August 14-18, 2023
3. H. Okita, S. Sotoma, S. Chuma, M. Suzuki, Y. Harada, Research on the development of localized highly dispersed surface modified nanodiamond and their cellular uptake, The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Hakodate, Japan, September 28-30, 2022

誌上発表 (*責任著者)

1. *S. Ishii, K. Oyama, F. Kobirumaki-Shimozawa, T.

Nakanishi, N. Nakahara, *M. Suzuki, S. Ishiwata, *N. Fukuda: Myosin and tropomyosin-troponin complementarily regulate thermal activation of muscles, *J. Gen. Physiol.*, **155(12)**, e202313414, 2023.

大阪大学、東京慈恵会医科大学、量子科学技術研究開発機構 (QST) より共同プレスリリース。掲載誌にコメントリー掲載 (A. Månsson: Changing face of contractile activation in striated muscle at physiological temperature, *J. Gen. Physiol.*, **155(12)**, e202313494)。

2. *M. Suzuki, C. Liu, K. Oyama, T. Yamazawa: Trans-scale thermal signaling in biological systems, *J. Biochem.*, **174(3)**, 217-225, 2023.
3. *I. Kurisaki, *M. Suzuki: Simulation toolkits at the molecular scale for trans-scale thermal signaling, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **21**, 2547-2557, 2023.