



Title	蛍光ナノダイヤモンドを用いた細胞内温度と粒子拡散の同時計測による細胞内環境の解析
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2025
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101262">https://hdl.handle.net/11094/101262</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	かとうゆうき 加藤祐基	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	3年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	原田 慶恵	所属	蛋白質研究所		
研究課題名	蛍光ナノダイヤモンドを用いた細胞内温度と粒子拡散の同時計測による細胞内環境の解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。（先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。）				
1. 研究目的					
<p>“生命とは何か？”という問いは生物学において最も根源的な問いと言える。この問いに対して、量子力学の祖であるシュレディンガーは「生物は、エントロピーの増加に抗している」と指摘している<sup>1</sup>。この指摘は現在においても盛んに議論されている。このように<u>生物学に対して熱力学的な議論を行うことは生命の本質に迫ることにつながる</u>と考えられる。近年の物理学や測定技術の発展により、従来困難であった細胞内の温度などの熱力学的な状態量を観測し、議論することが現実的になりつつある。細胞内局所温度計の一つとして<u>蛍光ナノダイヤモンド(FND)</u>がある。FNDは窒素-空孔中心という格子欠陥（NV センター）を持ち、その<u>量子状態は室温で光検出磁気共鳴（ODMR）を通じて蛍光強度の変化として非常に高感度に読み取り可能</u>である<sup>2</sup>。NV センターの量子状態は FND 周辺の温度や磁場などの環境変数によって影響を受けることが知られており、NV センターの共鳴周波数は温度によって線形に変化することが知られている。したがって、FND を細胞内に導入することで <u>FND は細胞内局所温度計として機能</u>する。また、最近の研究により細胞内の環境でも FND を単一粒子の状態で拡散させることが可能になりつつある。そこで私は <u>FND で測定される細胞内の非平衡な温度と細胞内の FND の軌跡を同時計測</u>することで、細胞内で運動する FND の拡散係数が温度にどのように依存するかについて明らかにし、得られた結果が揺動散逸定理の一つの例である <u>ストークス・アインシュタイン方程式に対してどの程度適合しないか</u>を評価することを目指した。これらの測定を通して、細胞内の <u>局所環境についての理解を深めること</u>を目標に研究を行った。</p>					
2. 研究方針					
<p>細胞内に FND を非特異的かつ単一粒子の状態を導入する。その後、細胞内の FND の軌跡と FND の共鳴周波数を ODMR 顕微鏡で観測する。ODMR 顕微鏡は、NV センターの量子状態を FND の蛍光として計測できる顕微鏡であり、原田研究室で開発されたものである。得られた共鳴周波数から細胞内の温度を導出する。これにより、<u>細胞内の温度と FND の軌跡を同一細胞で同時に測定</u>することができる。</p>					

### 3. 結果

#### (1) 測定系の構築

##### (1)-1 測定系の作製

温度と粘性を同時計測するため以下の測定系を作製した(図 1)。ODMR 測定を用いた温度測定の方法は過去に原田研から報告されている方法を基盤とし<sup>3</sup>、粘性との同時計測を可能とするよう改良を施した。連続 Nd:YAG レーザー(532 nm)を FND に照射し、倒立顕微鏡を用いて蛍光を EM-CCD の露光面に結像した。マイクロ波は自作のコイルによって FND に照射した。マイクロ波高速スイッチを使用し、20 ms 間隔でマイクロ波の ON/OFF を切り替えた。マイクロ波の ON/OFF 切り替えのタイミングは、パルサーによる制御によって、EM-CCD カメラのシャッターのタイミングと同期させた。マイクロ波周波数は、NV センターの共鳴周波数範囲である 2830~2910 MHz の範囲を 0.5 MHz 刻みで変化させた。各周波数について、マイクロ波 ON および OFF の状態をそれぞれ 15 回ずつ撮影した。この結果、異なる周波数下や非照射下の条件を反映した 50 fps で撮影された蛍光像のシーケンスを得ることができた。軌跡と ODMR スペクトルの同時計測を実現するため、同一条件得られた蛍光像を積算せず、そのまま全ての蛍光像を出力できるようにした点が今回の主な変更点である。

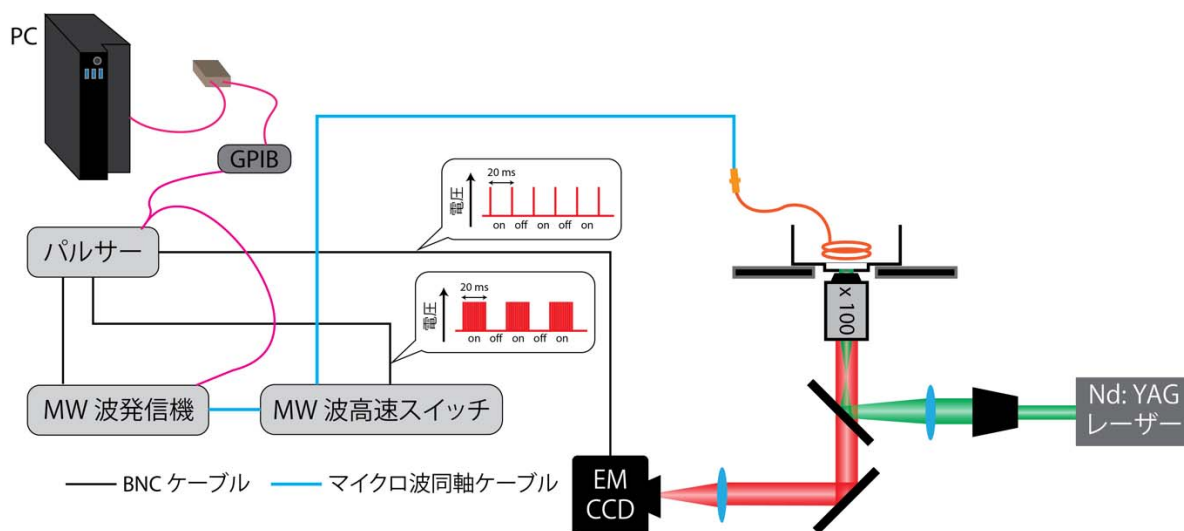


図 1 温度・粘性同時計測のための実験系

##### (1)-2 解析コードの作成

作成した解析コードの手順を図 2 に示す。得られた蛍光像から輝点を抽出した。輝点抽出には、Picasso ライブラリ<sup>4</sup>を今回の目的に合わせ一部改変したコードを利用した。得られた輝点を、最小二乗法を用いて 2 次元ガウス関数でフィッティングすることで輝点の位置情報を得た。得られた輝点の位置情報を基に、Trackpy<sup>5</sup> ライブラリを用いてトラッキングを行った。

得られた各軌跡について ODMR スペクトルを出力することを目指した。マイクロ波が ON のときの輝点の強度と、その前後でマイクロ波が OFF のときの輝点の強度の比を算出し、同じ周波数における値を平均化した。この処理により、軌跡ごとに特定の周波数のマイクロ波を照射した際の蛍光強度が、マイクロ波を照射しない場合と比較してどの程度減少するかを求めることができたようになった。任意の条件を満たした軌跡を平均化し、ODMR スペクトルを得た。得られた ODMR スペクトルは 2 成分の Voigt 関数で最小二乗法を利用してフィッティングし、共鳴周波数を決定した。

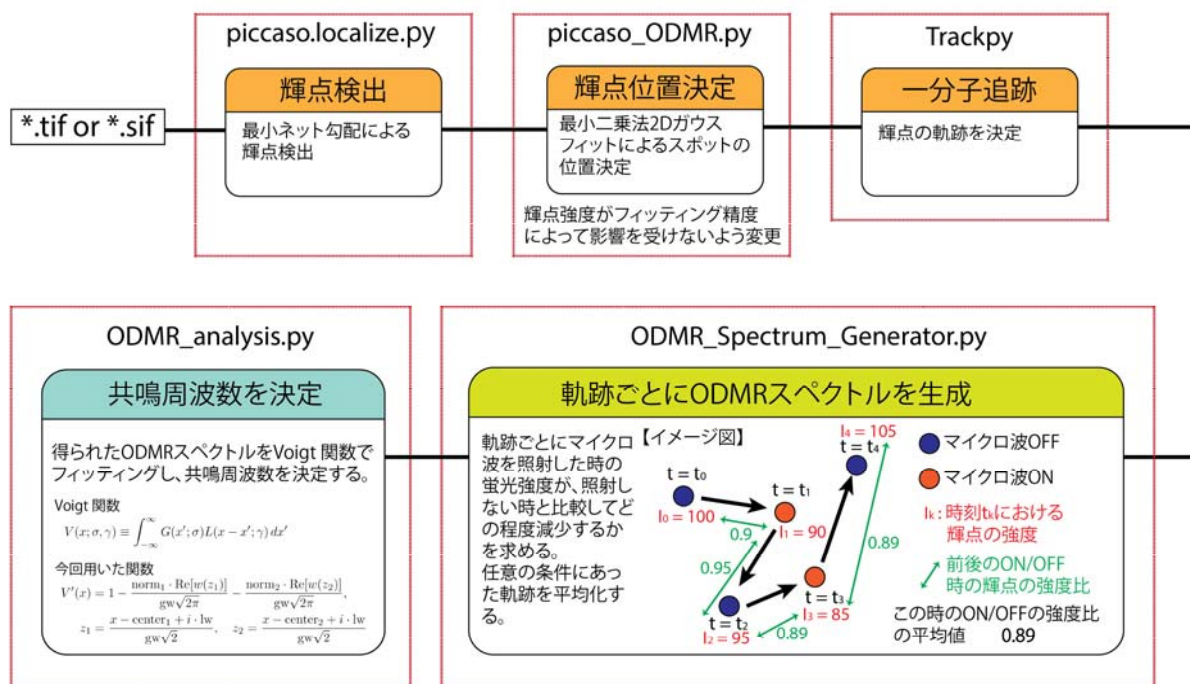


図 2 温度・粘性同時計測のための解析コード

## (2) メチルセルロース中でブラウン運動を行う FND の軌跡・ODMR スペクトル同時計測

作成した実験系・解析コードを用いて、FND の軌跡と ODMR スペクトルの同時計測が可能であることを検証した。平面内でのブラウン運動を観察するため、垂直方向のブラウン運動を抑制するメチルセルロース中で FND を計測した。メチルセルロースを 60°C 以上に加熱した Milli-Q に加え、攪拌しながら冷却した。これにより、1% (w/v) のメチルセルロース溶液を得た。メチルセルロース液中に FND 溶液を加え、測定を行った(図 3)。今回構築した実験系・解析コードによって、軌跡ごとに ODMR スペクトルを生成することができることがわかった。

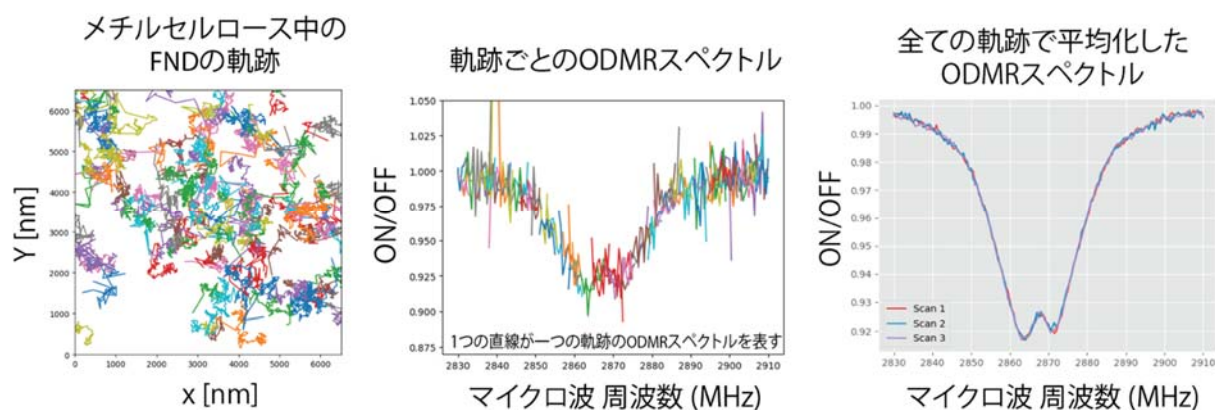


図 3 メチルセルロース中の FND での、軌跡・ODMR スペクトル同時計測

## 4. 研究成果

細胞内の FND の軌跡と ODMR スペクトルを同時計測するための実験系・解析コードを構築することができた。しかし、本プロジェクトでは細胞内の FND の軌跡と ODMR スペクトルを詳細に解析するには至らなかった。

**5. 将来展望**

本プロジェクトで作成した実験系・解析コードを用いて、細胞内の FND の軌跡と ODMR スペクトルを測定し得られたデータを解析することで、細胞内の非平衡を維持する熱力学的機構を明らかにすることを目指す。

**【参考文献】**

- (1) Schrödinger, E. *What Is Life*.
- (2) Kucsko, G.; Maurer, P. C.; Yao, N. Y.; Kubo, M.; Noh, H. J.; Lo, P. K.; Park, H.; Lukin, M. D. Nanometre-Scale Thermometry in a Living Cell. *Nature* **2013**, *500* (7460), 54-58. <https://doi.org/10.1038/nature12373>.
- (3) Chuma, S.; Kiyosue, K.; Akiyama, T.; Kinoshita, M.; Shimazaki, Y.; Uchiyama, S.; Sotoma, S.; Okabe, K.; Harada, Y. Implication of Thermal Signaling in Neuronal Differentiation Revealed by Manipulation and Measurement of Intracellular Temperature. *Nat. Commun.* **2024**, *15* (1), 3473. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47542-8>.
- (4) Schnitzbauer, J.; Strauss, M. T.; Schlichthaerle, T.; Schueder, F.; Jungmann, R. Super-Resolution Microscopy with DNA-PAINT. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (6), 1198-1228. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.024>.
- (5) <https://zenodo.org/records/12708864>. Trackpy.