The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	蛍光ナノダイヤモンドの光検出磁気共鳴・ゆらぎの定理を用いて細胞内のエントロピーを計測する
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2024
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/95165
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式６

申請先学部　理学部　採択番号　No.　５

令和５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	2 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の光検出磁気共鳴・ゆらぎの定理を用いて細胞内のエントロピーを計測する				
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

“生命とは何か？”という問いは生物学において、最大のミステリーと言える。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、彼の著書で「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。[1] この指摘は 2023 年現在においても盛んに議論されている。このように**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**と考えられる。近年、非平衡状態の系のゆらぎから熱力学的情報を導出する理論である**ゆらぎの定理**の発見により、非平衡系における熱力学の理論が確立されつつある。この進展により、熱力学の理論を細胞内の非平衡な系に対して適用できるようになった。[2] さらに、細胞内のナノ領域の熱力学的な状態量を観測する手法も確立されてきている。**蛍光ナノダイヤモンド(FND)**は窒素-空孔中心という格子欠陥（NV センター）を持ち、**その量子状態は光検出磁気共鳴（ODMR）を通じて読み取り可能**である。[3] 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 ODMR を計測することで、FND 周辺の熱力学的な状態量を観測することができる**。これらの進展により、従来困難であった細胞内の非平衡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。そこで私は、**細胞内のナノ領域での熱力学的情報を得ることを目標に研究を行った。**

2. 研究方針

NV センターの量子状態は FND 周辺の温度に依存するため、FND の蛍光のゆらぎは温度のゆらぎに結びつくと考えられる。本研究では、温度のゆらぎに着目し、細胞内のナノ領域での熱力学的情報を得ることを目指す。最初に**非平衡なナノ領域の温度を定義**する。次に**非平衡な温度のゆらぎを計測する方法について議論**する。さらに、実際に実験系を組み、**非平衡な温度のゆらぎを測定**することを目指した。

3. 結果

3-1 非平衡なダイヤモンドの温度 $\hat{T}$ を定義する

本研究では、非平衡な温度のゆらぎについて議論する。非平衡な温度には、広く受け入れられた定義は存在しない。そこで、我々は、以下の手順で定義された非平衡な温度を用いることにする。

NV センターの共鳴周波数 f_r の熱浴の温度(T_r)依存性

今回用いる非平衡な温度を定義する前に、まずは「平衡な温度T_rと NV センターの共鳴周波数 f_rの関係式」を導出する。FND が平衡な温度T_rの熱浴内に存在すると仮定する。FND の格子の膨張により、NV センターの共鳴周波数 f_r は FND が属する系の熱浴の温度T_rが上昇すると一次関数的に下がることが知られている。[4]

$$f_r = AT_r + B$$

ここでA, Bは定数。A, Bは実験で測定可能なパラメータである。

今回用いる非平衡な温度$\hat{T}$を定義する

前節で求めた、「平衡な温度T_rと NV センターの共鳴周波数 f_rの関係式」が非平衡な系でも成立すると仮定して、以下のように非平衡な温度 $\hat{T}$ を定義する。

$$\hat{T} = \frac{f_r - B}{A}$$

この定義のもとで議論を進めることにする。

非平衡な温度$\hat{T}$は何を表しているのか

今回定義した非平衡な温度 $\hat{T}$ のもつ意味を考える。平衡な温度で成立する関係式を拡張し、以下の関係式が成立する系を考える。

$$\frac{3}{2}k_B\hat{T} = \frac{1}{N}\sum_{n=1}^{N} K_E$$

k_Bはボルツマン定数。K_E は分子の運動エネルギー。N は FND に影響を与える周辺の分子の数とする。ここで右辺は FND の周辺の N 個の分子の運動エネルギーの平均である。この式が成立する系では、非平衡な温度 $\hat{T}$ は FND の周辺の分子の運動エネルギーを反映していることがわかる。FND に影響を与える周辺の分子の数 N の値は、測定時間や FND の周辺の物性によって決まると考えられる。N が十分に小さいとき非平衡な温度 $\hat{T}$はゆらぎ、一方 N が十分に大きいとき $\hat{T} = T_r$ に収束する。($\because$ 3/2 $k_B T_r = < K_E >$)

3-2 $\hat{T}$ のゆらぎをどのように測定するか

前節より、非平衡な温度 $\hat{T}$ は FND の周辺の分子の運動エネルギーなどを反映していると考えられ、非平衡な温度 $\hat{T}$ のゆらぎは FND の周辺の熱力学的情報を含んでいると考えられる。そこで、今節では温度 $\hat{T}$ のゆらぎをどのように測定するかについて議論する。

$\hat{T}$のゆらぎが FND の蛍光のゆらぎにどのような関数で伝搬するか

まず、$\hat{T}$のゆらぎが蛍光のゆらぎにどのように伝搬するかを導出する。共鳴周波数 f_rの NV センターをもつ FND に、532 nm のレーザーと、周波数f_mのマイクロ波を常時照射している系を考える。この時、FND の蛍光強度 $I(f_m, f_+, f_-)$ は以下の式で与えられることが知られている。[5]

$$I(f_m, f_+, f_-) = I_{off}\left(1 - A_+\frac{c}{4(f_m - f_+)^2 + c} - A_-\frac{c}{4(f_m - f_-)^2 + c}\right)$$

$$f_r = \frac{f_+ + f_-}{2}$$

ここで、A_+, A_-, c は実験で測定可能な定数。I_{off} はマイクロ波を照射しなかった時の FND の蛍光強度である。また、f_+は$|+>$準位と$|0>$準位の共鳴周波数、f_-は$|->$準位と$|0>$準位の共鳴周波数である。これまでに導出した式をまとめる。

$$\hat{T} = \frac{f_r - B}{A}$$

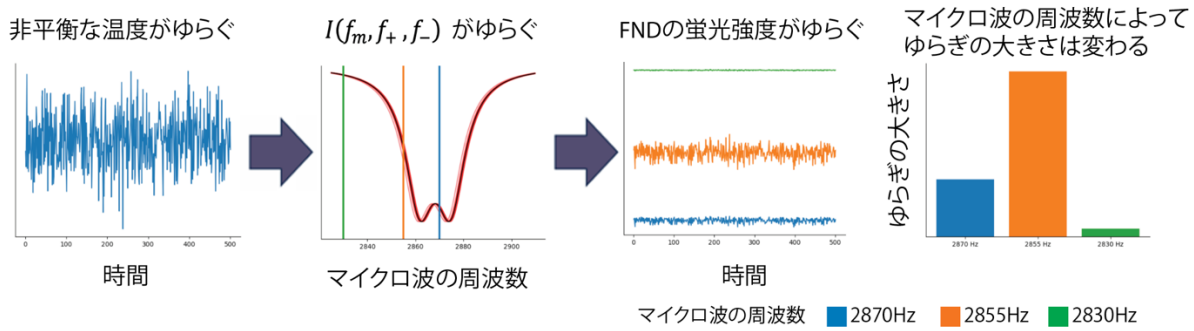
$$f_r = \frac{f_+ + f_-}{2}$$

$$I(f_m, f_+, f_-) = I_{off}\left(1 - A_+\frac{c}{4(f_m - f_+)^2 + c} - A_-\frac{c}{4(f_m - f_-)^2 + c}\right)$$

これらの関係式から、非平衡な温度$\hat{T}$のゆらぎが、FND の蛍光のゆらぎにどのように伝播するかを導出することができる。

<u>$\hat{T}$のゆらぎが FND の蛍光のゆらぎにどのようなに伝播するかについてのシミュレーション</u>

具体的に$\hat{T}$のゆらぎがランダムノイズであると仮定した時に、どのように FND の蛍光のゆらぎに伝播するかのシミュレーションを行った。以下に結果を示す。



このように、$\hat{T}$のゆらぎが FND の蛍光のゆらぎに伝播することがわかった。さらに、FND の蛍光のゆらぎの大きさは FND に照射するマイクロ波の周波数に依存することもわかった。

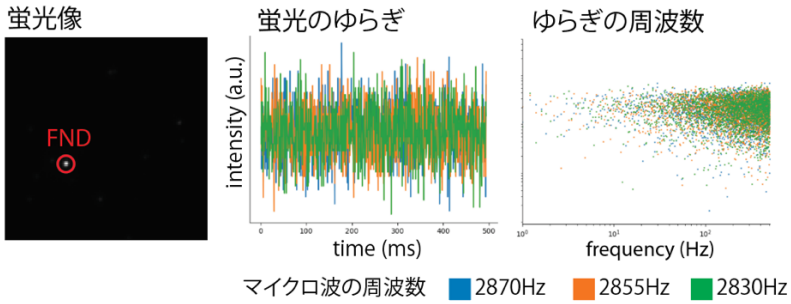
3-3 FND の蛍光のゆらぎを計測するためのセットアップ

直径 100 nm と 70 nm の FND を用いた。スライドガラス上の FND、細胞内の FND の蛍光のゆらぎを測定した。測定には、蛍光顕微鏡を用いた。FND に 532 nm の緑色レーザーと 2830 nm, 2855 nm, 2870 nm のマイクロ波を常に照射した。CCD カメラを用いて FND の蛍光を計測した。得られた蛍光強度を Python 上でフーリエ変換して、ゆらぎの周波数を求めた。

3-4 測定結果

ガラス上の FND の蛍光のゆらぎの測定結果

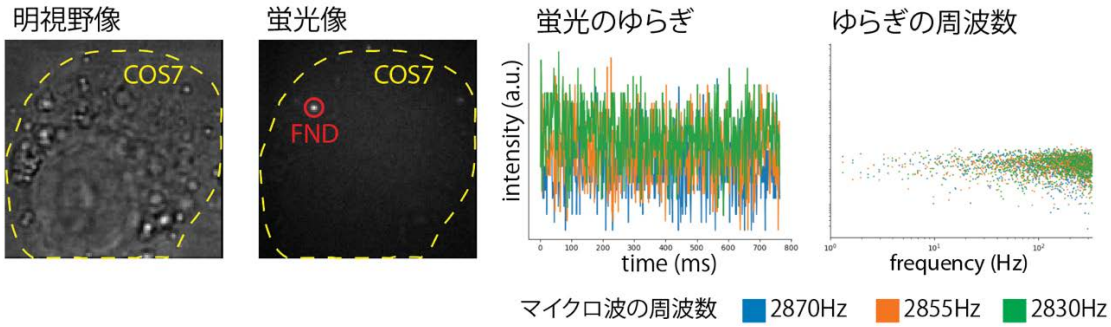
FND をガラス上に単粒子で分散させた。露光時間 0.00001 秒、1010.1 Hz で測定した。ガラス上の単粒子 FND の蛍光のゆらぎの測定結果を以下に示す。



ランダムノイズを観測し、ノイズから特徴的な周波数を抽出することができなかった。

細胞内の水中の FND の蛍光のゆらぎの測定結果

細胞内に導入した FND の蛍光のゆらぎを測定した。COS7 細胞を用いた。露光時間 0.001 秒、653.59 Hz で測定した。以下に結果を示す。



ランダムノイズを観測し、ノイズから特徴的な周波数を抽出することができなかった。

4.　研究成果

FND によって測定される非平衡な温度について定義することができた。この定義は、今後の FND を用いた細胞内局所温度計測に役立つ可能性がある。また非平衡な温度のゆらぎを測定する方法について立案することができた。しかし、本プロジェクトでは、実際に非平衡な温度のゆらぎを観測することはできなかった。

5.　将来展望

非平衡の温度のもつ意味を非平衡物理学の知見から明らかにする。また、FND の蛍光のゆらぎを測定する条件等を再検討して、非平衡な温度のゆらぎを観測することを目指す。

[1] Schrödinger, E. (1944). *What is life? The physical aspect of the living cell and mind*. Cambridge: Cambridge university press.

[2] Hayashi, M., Ieda, J. I., Yamane, Y., Ohe, J. I., Takahashi, Y. K., Mitani, S., & Maekawa, S. (2012). Time-domain observation of the spinmotive force in permalloy nanowires. Physical review letters, 108(14), 147202.

[3] Kucsko, G., Maurer, P. C., Yao, N. Y., Kubo, M. I. C. H. A. E. L., Noh, H. J., Lo, P. K., ... & Lukin, M. D. (2013). Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature*, *500*(7460), 54-58.

[4] Sotoma, S., Okita, H., Chuma, S., & Harada, Y. (2022). Quantum nanodiamonds for sensing of

biological quantities: Angle, temperature, and thermal conductivity. *Biophysics and Physicobiology*, *19*, e190034.

[5] Sotoma, S., Zhong, C., Kah, J. C. Y., Yamashita, H., Plakhotnik, T., Harada, Y., & Suzuki, M. (2021). In situ measurements of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensors. *Science advances*, *7*(3), eabd7888.