

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05251

研究課題名(和文) 生きた細胞の熱特性と素現象

研究課題名(英文) Microscopic thermal property in a cell

研究代表者

鈴木 団 (SUZUKI, Madoka)

大阪大学・蛋白質研究所・講師

研究者番号：40350475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：熱産生のしくみの理解を目的に、熱産生を1細胞レベルの温度変化として計測しようとする温度計測技術の開発と応用が進められているいっぽう、マクロスケールで測られる値と、細胞を均一な水とする単純化したモデルとを用いても、1細胞を対象としたこれまでの報告が説明できない。我々はこれを「10の5乗ギャップ問題」と名付け、計測における技術的な問題点の可能性、および単純化したモデルにおいて決定的に欠けている要素を、実験とモデルの両方向から議論してきた。本研究ではこの10の5乗ギャップの所在を明らかにすることを目的とし、細胞内に特有の環境は希薄な水系と異なるかどうか、実験的に確かめることを目的として研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱産生を生理的な役割とする細胞を用いた研究から、各種の細胞に特有の熱産生様式を見いだした。また細胞内温度変化を顕微解析する新しい手法の開発に成功した。さらに筋肉の細胞が、人工的な微小熱源からの放熱により収縮を誘導できることも新たに発見した。総説を含む8報の論文として公開に至り、所属機関からのプレスリリースや一般紙による特集記事として取り上げられるなど、当該分野のみならず、広く関連分野からの注目を集める成果として公開できた。

研究成果の概要(英文)：Single cell thermometry has been challenged by calculations that are based on macroscopic parameters and simplified models. We have named it as the "10(5) gap issue" between calculation and measurement in single-cell thermometry. In this study, we aimed at experimentally solving the issue, which nobody has managed so far. We were successful in studying brown adipocytes and myotubes, both of which are responsible for endogenous heat release, or thermogenesis. Our results have been published in eight papers including review articles, and some of them gained attention by less-specialized journals that have wider audiences including non-scientists.

研究分野：生物物理学

キーワード：生物物理 ナノ材料 熱工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物による熱産生は生物学、生理学分野における研究テーマとして、ふるえ熱産生、非ふるえ熱産生といった主要な熱産生メカニズムについての分子的な説明が可能になりつつある。しかしその多くは個体、もしくは多細胞の平均的描像による理解を主とし、たとえばある細胞に着目したとき、いつどこでどのくらいの熱が放出されるのか、といった知見は、これまで主要な研究対象ではなかった。そこで熱産生の細胞内メカニズム解明を目的に、熱産生を1細胞レベルの温度変化として計測しようとする細胞内温度計測技術の開発と応用が、研究代表者らを始め様々なグループによって進められている。いっぽう、マクロスケールで測られる値と、細胞を均一な水とする単純化したモデルとを用いても、1細胞を対象としたこれまでの報告が再現されない、もしくは説明できない。我々はこれを「10の5乗ギャップ問題」と名付け、計測における技術的な問題点の可能性、および単純化したモデルにおいて決定的に欠けている要素を、実験とモデルの両方向から議論してきた。

2. 研究の目的

本研究では、この10の5乗ギャップの所在を明らかにすることを目的とし、細胞内に特有の環境は希薄な水系と異なるかどうか、実験的に確かめることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

まず2015年度は、定量性に優れる細胞内温度計測技術の開発を計画した。我々はこれまでに、ERおよびミトコンドリアへ選択的に集積する蛍光分子型の温度プローブを報告してきた。これらは蛍光強度の温度依存性から温度変化を求める方法であった。当該年度はこれらを含む候補物質について蛍光寿命の特性を調べた。

2016年度は、骨格筋からの熱産生に由来する温度変化を1細胞レベルで定量イメージングする研究を、細胞の系から動物個体の系へと発展させた。ここでは赤外線カメラでも見られるほど大きな温度変化を体表面で生じる甲虫の飛翔筋に着目した。

2017年度は、熱産生に特化した褐色脂肪組織を構成し、多くの脂肪滴を内包する特徴的な細胞内構造を有する褐色脂肪細胞を、計測の対象として実験を進めた。

2018年度は、昨年度の途中で所属研究機関を異動したことで遅延の生じていた実施予定項目として、発熱と温度計測を行える新規ナノ材料の開発に着手し順調に進捗した。

4. 研究成果

2015年度は、蛍光寿命の温度特性を利用した新規温度計測法の開発に成功した。まず低分子蛍光温度計の1つと、蛍光タンパク質の1つの蛍光寿命に、温度依存性(温度が上がるにつれて、蛍光寿命が短くなる)があることを発見した。そして、骨格筋様に分化した培養細胞(筋管細胞)をカフェインで刺激した際の、筋小胞体や細胞質におけるこれら蛍光温度計の蛍光寿命変化を観察することにより、それぞれの細胞器官における温度変化を測定した。すると、筋管細胞の筋小胞体では温度上昇が見られたものの、細胞質では大きな温度変化が見られなかった。この結果は、骨格筋での非ふるえ熱産生による温度変化が、筋小胞体近傍の極めて局所で起こることを示唆している。ここで開発された方法は、生きた細胞の内部において、特に定常的な温度場のイメージングに適すると考えられる。

2016年度は、骨格筋を用いた初年度の研究を引き継ぎ、動物個体での1細胞温度イメージング、および細胞内微小熱源による細胞内温度変化の定量イメージングと新しい細胞応答(熱による筋収縮の誘導)の発見に成功した。紫外から青い光をあてると紫外域から緑に至る蛍光

を発する物質が、筋肉には多く含まれる（自家蛍光）。この強い自家蛍光を避ける目的で、赤から近赤外域で発光する温度計色素を利用し、さらに温度感受性の低い色素を合わせて用いることで、動物の動きに由来する計測誤差を、これら二つの蛍光色素の強度比を計測する（レシオ計測）ことでキャンセルする新しい定量温度イメージングの手法を開発した。この新しい手法を用いて、生きている甲虫からの自発的な熱産生に由来した体表面での温度変化を、筋線維1本ずつの空間分解能で検出することに初めて成功した。甲虫での応用に限らず、動物個体モデルへと応用可能な1細胞定量温度イメージング技術として広く展開できると期待される。また細胞内の微小熱源を開発する過程で、ナノ材料に近赤外光を照射して細胞内の微小熱源として利用すると、細胞内の温度が上昇し、これが、Ca²⁺濃度変動を経由せずに骨格筋の収縮を誘導できることを新たに見いだした。電極を利用した骨格筋刺激の欠点を克服できる可能性がある新しい筋刺激の手法として、Nature Nanotechnology 誌をはじめ注目を集めた。

2017年度は、まず褐色脂肪細胞における熱産生に由来する細胞内の温度変化を、1細胞で定量イメージングする新しい手法を開発した。次にこの手法を用いて検討を進めていたところ、活性化した褐色脂肪細胞のミトコンドリア pH 変化に特徴のあることが見いだされ、さらに熱産生と時間的に相関していた。そこでこの研究をさらに進めた。ミトコンドリア Ca²⁺濃度変化、ならびに小胞体（ER）の pH 変化、Ca²⁺濃度変化を合わせてイメージングすることで各パラメータ変化の時間的相関を得た。この解析から、褐色脂肪細胞のミトコンドリアと ER による細胞内小器官間のコミュニケーションが、褐色脂肪細胞が効率よく熱産生するのに重要であることが強く示唆された。褐色脂肪細胞の細胞内温度変化を安定して検出できる蛍光イメージング法を確立した点で、計画通りであった。この手法を用いて細胞内環境の特異性を追究していたところ、褐色脂肪細胞による熱産生の分子メカニズムにかかわる研究へと思いがけず発展した。

2018年度は新規ナノ材料について、溶液系による特性の評価のほか、電子顕微鏡を用いた一通りの確認をほぼ終え、細胞を用いた実験へと移行した。細胞毒性の評価と細胞内局在の確認を終え、さらに細胞内での計測へ利用した。より質の高い成果とするべくコントロール実験を含む計測一式を進めており、途中の成果を本年度に論文として発表することは控えた。現在に予定する実験の全てを終え次第、成果をまとめ、論文とすることを計画している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)(*Corresponding authors)

1. Fujita, H., Zhong, C., Arai, S. and Suzuki, M. Bright dots and smart optical microscopy to probe intracellular events in single cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **6**, 204 (2019). 査読有 DOI: 10.3389/fbioe.2018.00204
2. Ca²⁺-associated triphasic pH changes in mitochondria during brown adipocyte activation. Hou, Y., Kitaguchi, T., Kriszt, R., Tseng, Y.-H., Raghunath, M. and Suzuki, M.* *Mol. Metab.*, **6(8)**, 797-808 (2017). 査読有 DOI: 10.1016/j.molmet.2017.05.013
3. Kriszt, R., Arai, S., Itoh, H., Lee, M.H., Goralczyk, A.G., Ang, X.M., Cypess, A.M., White, A.P., Shamsi, F., Xue, R., Lee, J.Y., Lee, S.-C., Hou, Y., Kitaguchi, T., Sudhaharan, T., Ishiwata, S., Lane, E.B., Chang, Y.-T., Tseng, Y.-H., *Suzuki, M.* and Raghunath, M.* Optical visualisation of thermogenesis in stimulated single-cell brown adipocytes. *Sci. Rep.*, **7**, 1383 (2017) (早稲田大学よりプレスリリースされた。), 査読有 DOI: 10.1038/s41598-017-00291-9
4. Marino, A., *Arai, S., Hou, Y., Degl'Innocenti, A., Cappello, V., Mazzolai, B., Chang, Y.-T., Mattoli, V., Suzuki, M.* and Ciofani, G.* Gold nanoshell-mediated remote myotube activation. *ACS Nano*, **11(3)**, 2494-2508 (2017) (早稲田大学よりプレスリリース。Nature Nanotechnology 誌でハイライト。「Gold nanoparticles: A warm-up for muscle cells.」 *Nature Nanotech.*, **12**, 188 (2017)), 査読有 DOI: 10.1021/acsnano.6b08202
5. Ferdinandus, Arai, S., Takeoka, S., Ishiwata, S., Suzuki, M.* and Sato, H.* Facilely-fabricated luminescent nanoparticle thermosensor for real-time microthermography in living animals. *ACS Sens.*, **1(10)**, 1222-1227 (2016) (Chemical & Engineering News 誌でハイライト(2016年11月3

日「Nanosensor reveals temperature variation in the muscles of live creatures」)、査読有 DOI: 10.1021/acssensors.6b00320

6. 鈴木 団、新井敏、佐藤裕崇 蛍光センサーを食べさせる！？ - 昆虫生体機能の可視化の取り組み - *昆虫と自然*, **51(8)**, 44-47 (2016)、査読無
7. 鈴木 団 あなたの昆虫、熱がありませんか？ *アグリバイオ*, **1(1)**, 69-71 (2017)、査読無
8. Itoh, H., Arai, S., Sudhaharan, T., Lee, S.-C., Chang, Y.-T., Ishiwata, S., * Suzuki, M. * and Lane, E. B. * Direct organelle thermometry with fluorescence lifetime imaging microscopy in single myotubes. *Chem. Commun.*, **52**, 4458-4461 (2016) (Outside back cover) 早稲田大学よりプレスリリース。シンガポール科学技術庁 (A*STAR) からの研究広報でハイライト。査読有、DOI: 10.1039/C5CC09943A

〔学会発表〕(計 26 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。