

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14705

研究課題名(和文)細胞内の特定の生体分子の温度を測定する

研究課題名(英文)Measure the temperature of specific biomolecules in cells

研究代表者

船津 高志(Funatsu, Takashi)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：00190124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：水分子O-H伸縮振動のラマンスペクトルは幅広いスペクトルとなり、大きく分けて2つのピークが観測されること、isosbestic pointが3419 cm<sup>-1</sup>にあることが知られている。高温になるほど低ラマンシフト側のピークが小さくなり、高ラマンシフト側のピークが大きくなるため、この性質を利用して温度を計測できた。また、C-C-N変角振動(458 cm<sup>-1</sup>)、ジフェニルジテレンイドのTe-Te伸縮振動(150 cm<sup>-1</sup>)などの低周波振動のラマンスペクトルを計測し、ストークス光とアンチストークス光も強度比を計算することによりマイクロメートルの微小領域の温度を計測することができた。

研究成果の概要(英文)：The Raman spectrum of O-H stretching vibration of water molecule is broad, and it is well known that two peaks are observed and that the isosbestic point is 3419 cm<sup>-1</sup>. As the temperature gets higher, the peak on the low Raman shift side becomes smaller and the peak on the high Raman shift side becomes larger, so we could measure the temperature using this property. We also measured Raman spectra of low frequency oscillations such as C-C-N bending vibration (458 cm<sup>-1</sup>) and Te-Te stretching vibration (150 cm<sup>-1</sup>) of diphenyl ditelluride. We could measure the temperature in the microscopic region (in the order of micrometers) from the ratio of Stokes and anti-Stokes light intensities. It is expected that Raman temperature measurement within a cell will be possible by synthesizing a probe combining a compound exhibiting low frequency Raman oscillation and a compound accumulating in specific organelle.

研究分野：生物物理学

キーワード：ナノバイオ 細胞・組織 生体分子 分析科学

### 1. 研究開始当初の背景

細胞が機能を発揮する上で、温度は重要な物理的パラメータである。酵素反応速度は温度によって大きな影響を受けるほか、温度によってタンパク質の3次構造が影響を受けることが知られている。そのため、細胞が熱ショックにさらされた場合は、ヒートショックタンパク質がタンパク質の変性を防いだり、ストレス顆粒が生成されタンパク質の合成が抑制されたりする。病気になった細胞、例えばガン細胞では温度が上昇している例が知られており、診断や治療という観点からも1細胞や細胞内温度を計測することは重要な意義を持っている。しかし、1~100 μmの小さな領域の温度を1以下の高分解能で測定することは困難だった。我々は、温度感受性蛍光ポリマーを合成し、上記の測定を可能にした(図1; Okabe et al., *Nat. Commun.* 2012)。その結果、G1期では細胞の核が細胞質より0.7℃温度が高いこと、TCCP刺激によりミトコンドリアで熱発生が起ることをFluorescence Lifetime Imaging Microscopyにより明らかにした。この研究成果により、細胞内の温度分布が世界中の研究者に意識されるようになった。しかし、温度計測の空間分解能は光の回折限界の~500 nmに留まっているという問題がある。

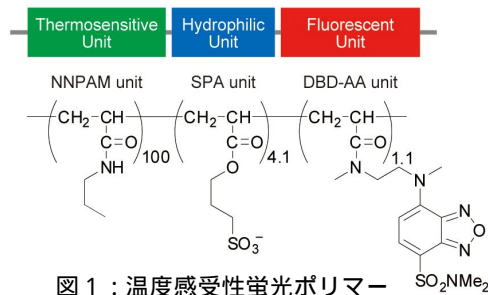


図1: 温度感受性蛍光ポリマー

### 2. 研究の目的

細胞が機能を発揮する上で、温度は重要な物理的パラメータである。我々は、細胞内では核や中心小体の温度が細胞質よりも約1℃高いことを示し、細胞内に温度分布が存在することを世界で初めて明らかにした(*Nat. Commun.* 2012)。しかし、温度感受性蛍光プローブが温度以外の化学的な環境要因の変化を検出していないことを確実にする必要があります。また、温度計測の空間分解能は光の回折限界のため~500 nmに留まっており、発熱している生体分子を同定することが困難であるという問題がある。本研究は、細胞内の生体分子のラマン散乱光を測定することにより、生体分子の温度を直接計測する技術を開発することを目的とする。この手法は純粋に物理的な手段で生体分子の温度を直接に測定できるという利点がある。ナノメートルサイズのラマンプローブを用いることにより、ナノメートルの空間分解能で、1分子レベルで生体分子の温度計測を可能にする技術開発である。

### 3. 研究の方法

従来、1細胞レベルで温度を測定することは困難だった。しかし、温度感受性蛍光ポリマー(図1)やナノダイヤモンド、GFPなどを用いて温度を1以下の分解能で測定することができるようになった。しかし、これらのプローブは温度以外の化学的な環境要因の変化により蛍光特性が変わる可能性を否定できず、純粋に物理的な手段で温度を測定する方法を開発することが待ち望まれていた。我々は、物理的に温度を測定する手段としてラマン散乱光に注目した。生体分子に光を照射するとラマン散乱光が発生する。その散乱強度  $I$  は以下の(式1)で与えられる。

$$I = A (v_0 \pm v_R)^4 \exp\left(\frac{-E_i}{kT}\right) \quad (\text{式1})$$

ここで、 $A$  は定数、 $v_0$  と  $v_R$  は入射光の振動数とストークシフトの振動数である。 $+$  はアンチストークス光、 $-$  はストークス光の場合である。 $E_i$  は  $i$  番目の振動エネルギー準位である。また、 $k$  と  $T$  はボルツマン定数と絶対温度である。

次に、ある振動エネルギー準位に分子が存在する確率はボルツマン分布に従うと仮定する。すると、アンチストークス光とストークス光の強度比  $R(T)$  は(式2)となる。

$$R(T) = \left(\frac{v_0 + v_R}{v_0 - v_R}\right)^4 \exp\left(\frac{-\Delta E_i}{kT}\right) \quad (\text{式2})$$

$R$  は  $T$  のみの関数なので、 $R$  を測定することにより、分子の絶対温度  $T$  を求めることが可能である。 $v_R$  によって異なるが、可視光を用いて1%の変化を約1%の  $R$  の変化として計測することが可能である。生体分子の種類によってラマン散乱光の波長は異なるので、生体分子ごとに温度を測定することが可能である。

### 4. 研究成果

#### 4-1 装置の組み立て

現有の1分子蛍光顕微鏡システムに分光システムを組み込み、ラマン散乱光を分光できるようにした。まず、細胞を明視野または位相差顕微鏡で観察し、ラマン散乱光を測定する領域を決定した。次に光路を分光側に切り替え、球面レンズまたはシリンドリカルレンズを用いて、レーザーを一点または線上に照射した。試料から出た光のうちレイリー散乱光をノッチフィルターで除き、ラマン散乱光をポリクロメーターに導入し、回折格子によって分散した光を、高感度EMCCDカメラを用いて撮影した。これにより、細胞の一点または線上に沿ってラマン散乱光のスペクトルを取得することができた。

#### 4-2 水のラマンスペクトルの温度依存性

水分子 O-H 伸縮振動のラマンスペクトルは幅広いスペクトルとなり、大きく分けて2つのピークが観測されること、isosbestic point が  $3419 \text{ cm}^{-1}$  にあることが知られてい

る。高温になるほど低ラマンシフト側のピークが小さくなり、高ラマンシフト側のピークが大きくなるため、この性質を利用して温度を計測できる(図2、図3)。インキュベータで試料(水)の温度を変えながら水分子のラマンスペクトルを測定し、分光装置の校正を行った。次に、COS7細胞のラマンスペクトルを測定した。20 mWの出力、60秒の露光でラマンスペクトルを取得し、温度を計測することができた(図4)。

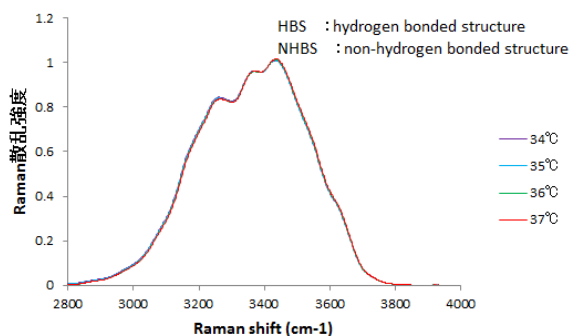


図2: 水のラマンスペクトル

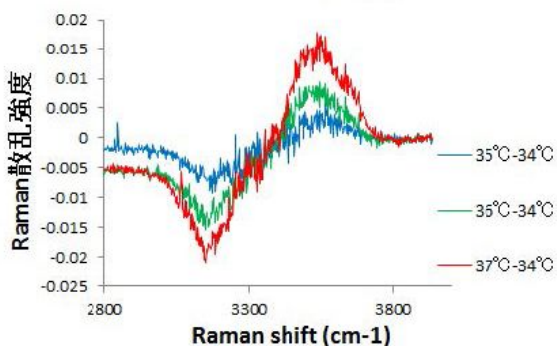


図3: 各温度における水分子のラマンスペクトルの差

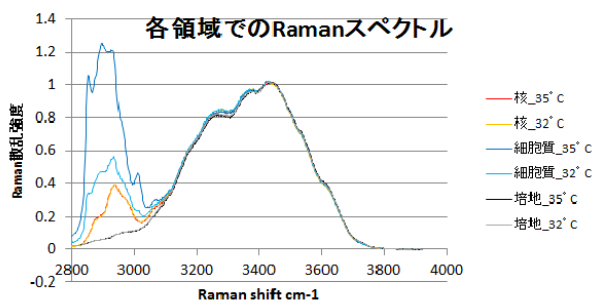


図4: 細胞のラマンスペクトル

#### 4-3 低周波ラマンスペクトルの温度依存性

前項では、水分子のO-H伸縮振動のラマンスペクトルに注目したが、この場合は約3400 cm<sup>-1</sup>となり、アンチストークス光がストークス光に比べて著しく微弱であり、正確な温度計測が困難だった。また、シトクロムcを用いてミトコンドリアの温度を計測するため、シトクロムcに特徴的なヘムの伸縮振動に注目した。しかし、シトクロムcに特徴的な伸縮振動も指紋領域にあるため、アンチストークス光が微弱であるという点が問題とな

った。これらの問題点を解決するため、ブラッググレーのノッチフィルターを使用してテラヘルツ領域でのラマン散乱測定を可能にした。この顕微鏡装置を用いて指紋領域の境界における低周波ラマン散乱測定を行うことにした。培養細胞のラマン散乱を計測した結果、数百カイザーまでは特徴的なラマン散乱は見られず温度計測に適していた。ただし、100 cm<sup>-1</sup>までは種々の分子に由来するベースラインの増加が見られた。検討の結果、250 - 400 cm<sup>-1</sup>が細胞内局所温度の測定に適していた。標準試料として、アセトニトリルのC-C-N変角振動(458 cm<sup>-1</sup>)、ジフェニルジテレンドのTe-Te伸縮振動(150 cm<sup>-1</sup>)を計測した。この場合、式2のRは約0.1となり、試料の温度を23、28、33と変化させた場合、温度変化をラマン散乱で捉えることが出来た(図5)。

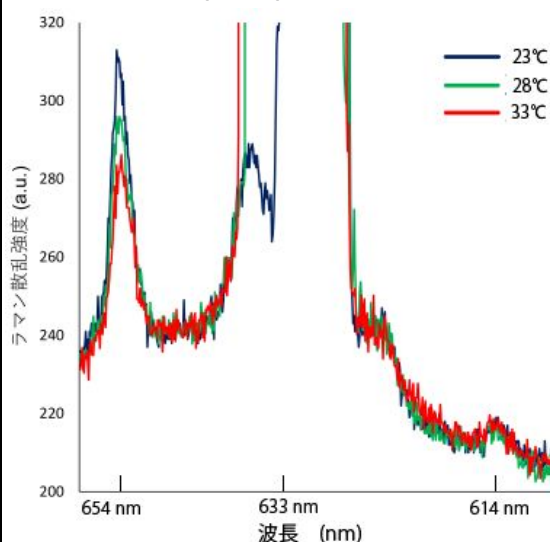


図5: 低周波ラマン散乱の温度依存性

低周波ラマン振動を示す化合物とミトコンドリアなどの細胞小器官に集積する化合物を結合させたプローブを合成することにより、細胞内のナノスペースにおけるラマン温度計測が可能になると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Muneki Isokawa, Kanki Nakanishi, Takahiro Kanamori, Huiqi Zhuang, Hayate Yamazaki, Takuo Sugaya, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Takashi Funatsu, Shuichi Shoji, Makoto Tsunoda “A micromachined liquid chromatography chip with a pillar array mixer for post-column derivatization in the analysis of neurotransmitters” The proceedings of  $\mu$ TAS 2017, pp.1318-1319. 査読無

坂本明彦、船津高志「全反射蛍光顕微鏡による細胞膜受容体MPL二量体の1分子イメージング」生体の科学 vol.68, No.5,

〔学会発表〕(計 15 件)

Ryo Iizuka, Shoichi Tsuchiya, Taro Ueno, Takanori Ichiki, Takashi Funatsu “Development of an automated microarray system for rapid microRNA profiling” 第55回日本生物物理学会年会、2017年9月19日～21日、熊本大学黒髪北地区、熊本市、熊本県

Shunsuke Yamashiro, Ryo Iizuka, Takashi Funatsu “Photo-control of the ribosome movement along mRNA using a reversible photo-crosslinking probe” 第55回日本生物物理学会年会、2017年9月19日～21日、熊本大学黒髪北地区、熊本市、熊本県

Kai Saito, Ryo Iizuka, Eiji Shigihara, Wataru Kawakubo, Dong Hyun Yoon, Tetsuji Sekiguchi, Shuichi Shoji, Yuji Hatada, Takashi Funatsu “Microdroplet-based screening method for microbes producing polymer-degrading enzymes” 第55回日本生物物理学会年会、2017年9月19日～21日、熊本大学黒髪北地区、熊本市、熊本県

Soichiro Fujii, Ryo Iizuka, Masamichi Yamamoto, Makoto Tsunoda, Takashi Tani, Takashi Funatsu “Single-molecule analysis of actin polymerization mechanism using linear zero-mode waveguides” 第55回日本生物物理学会年会、2017年9月19日～21日、熊本大学黒髪北地区、熊本市、熊本県

Tomoki Shinozawa, Ryo Iizuka, Zhuohao Yang, Takashi Funatsu “Action of release factors on the stalled ribosome during translation of TnaC” 第55回日本生物物理学会年会、2017年9月19日～21日、熊本大学黒髪北地区、熊本市、熊本県

Soichiro Fujii, Ryo Iizuka, Masamichi Yamamoto, Makoto Tsunoda, Takashi Tani, Takashi Funatsu “Single-molecule analysis of actin polymerization using linear zero-mode waveguides” 第26回日本バイオイメージング学会学術集会、2017年9月16日～17日、東京薬科大学、八王子市、東京都

飯塚怜、中村和貴、西真郎、吉田尊雄、秦田勇二、高木善弘、井口彩香、尹棟鉉、関口哲志、庄子習一、船津高志「環境中の微生物を培養することなく「見える化」して酵素遺伝子を取得する」第26回日本バイオイメージング学会学術集会、2017年9月16日～17日、東京薬科大学、八王子市、東京都

飯塚怜、土屋章一、上野太郎、一木隆範、船津高志「簡便かつ迅速にマイクロRNAのプロファイリングを実現する」第30回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2017)、2017年8月28日～29日、東京大学大学院薬学系研究科、文京区、東京都

船津高志「マイクロ・ナノデバイスを用いた生体分子の機能解析と有用遺伝子の探索・回収」新分野開拓研究会「有機・バイオエレクトロニクスにおける先端計測技術の進展」2017年8月24日、明治大学駿河台キャンパス、千代田区、東京（招待講演）

Kazuki Nakamura, Ryo Iizuka, Shinro Nishi, Takao Yoshida, Yuji Hatada, Yoshihiro Takaki, Ayaka Iguchi, Dong H. Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu “Culture-Independent Method for Identification of Microbial Enzyme-Encoding Genes by Single-Cell Sequencing Using a Water-in-oil Microdroplet Platform” Single-Cell Biophysics: Measurement, Modulation, and Modeling. June 17-20, 2017, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

Takashi Funatsu, Mikiyoshi Muta, Ryo Iizuka “Identification of residues in SecM important for stabilizing translation arrest” International Symposium on Protein Quality Control, June 4, 2017, Todaiji Culture Center, Nara, Japan

Soichiro Fujii, Ryo Iizuka, Masamichi Yamamoto, Makoto Tsunoda, Takashi Tani, Takashi Funatsu “Single-molecule observation of actin polymerization using linear zero-mode waveguides” Joint Symposium on Bioimaging between Singapore and Japan, May 20-21, 2017, National University of Singapore, Singapore

Takashi Funatsu, Kohki Okabe “Development of fluorescent thermometers for mapping intercellular temperature” The 12<sup>th</sup> IUPAC International Conference on Novel Materials and their Synthesis (NMS-XII), October 14-19, 2016, Huna Agricultural University, Changsha, China (Keynote lecture)

船津高志「3つの生命現象を見えるようにする挑戦：細胞温度、アクチン重合、ストレス顆粒」レーザー顕微鏡研究会 第42回講演会(SLM-42)2016年7月7日、理化学研究所和光キャンパス、和光市、埼玉県(招待講演)

Takashi Funatsu “Single-molecule fluorescence imaging by zero-mode waveguides” Energy, Material & Nanotechnology Meeting On Light Matter Interactions, May 10-13, 2016, Peninsula Excelsior Hotel, Singapore (invited)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~funatsu/>

6．研究組織

(1)研究代表者

船津 高志 (FUNATSU, Takashi)  
東京大学・大学院薬学系研究科・教授  
研究者番号：00190124

(2)連携研究者

岡部 弘基 (OKABE, Kohki)  
東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：20455398