

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19285

研究課題名（和文）細胞内ナノスペースにおける特定の生体分子の温度計測

研究課題名（英文）Temperature measurement of specific biomolecules in intracellular nanospace

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内には局所温度の分布がある。しかし、現状では、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。この限界を開くため、細胞内の生体分子のラマン散乱光（アンチストークス光とストークス光）を測定することにより、生体分子の温度を計測することを目指した。低周波顕微ラマン分光システムの性能を確かめるため、Acetonitrileを顕微ラマン分光した。Stokes/Anti-stokes 比の温度依存性を利用して、約1<sup>°</sup>Cの分解能で温度測定することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。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 $\mu$ mの小さな領域の温度を1<sup>°</sup>C以下の高分解能で測定することは困難だった。この限界を開くため、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、生体分子の温度を計測する技術を開発した。この手法は純粋に物理的な手段で生体分子の温度を測定できるという利点がある。

研究成果の概要（英文）：There is a distribution of local temperature within the cell. However, the spatial resolution of temperature measurements is currently limited to ~500 nm, which is the diffraction limit of light. To overcome this limitation, we aimed to measure the temperature of biomolecules by measuring the Raman scattering light (anti-Stokes and Stokes light) of biomolecules in the cell. To confirm the performance of the low-frequency micro-Raman spectroscopy system, acetonitrile was subjected to micro-Raman spectroscopy, and the temperature dependence of the Stokes/Anti-stokes ratio was used to measure the temperature with a resolution of about 1<sup>°</sup>C.

研究分野：生物物理学

キーワード：生物物理学 ナノバイオ 細胞・組織 生体分子 分析科学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 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  $\mu\text{m}$  の小さな領域の温度を1°C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(Okabe et al., *Nat. Commun.* **3**: 705, 2012)。その結果、G1期では細胞の核が細胞質より0.7°C温度が高いこと、FCCP(4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon)刺激によりミトコンドリアで熱発生が起こることを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。一方、約1°Cの細胞内温度分布は、水の熱伝導率( $1\text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ )から予想される値 $10^{-5}\text{ }^\circ\text{C}$ と著しく乖離している(Baffou et al., *Nat. Methos*, **11**: 899-901, 2014)。この原因を調べるうちに、細胞内のナノスペースにおける発熱がナノスペースの局所温度上昇を引き起こしていることに気づいた。しかし、現状では、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。この限界を打開するため、細胞内の生体分子のラマン散乱光(アンチストークス光とストークス光)を測定することにより、生体分子の温度を計測する技術を開発することを目指した。この手法は純粋に物理的な手段で生体分子の温度を測定できるという利点がある。

### 2. 研究の目的

細胞が機能を発揮する上で、温度は重要な物理量である。そのため、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が、1~100  $\mu\text{m}$  の小さな領域の温度を1°C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(Okabe et al., 2012)。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。一方、約1°Cの細胞内温度分布は、水の熱伝導率( $1\text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ )から予想される値である $10^{-5}\text{ }^\circ\text{C}$ と著しく乖離している(Baffou et al., 2014)。この原因を調べるうちに、細胞内のナノスペースにおける発熱がナノスペースの局所温度上昇を引き起こしていることに気づいた。しかし、現状では、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。この限界を打開するため、本研究では、細胞内の生体分子のラマン散乱光(アンチストークス光とストークス光)を測定することにより、生体分子の温度を計測する技術を開発した。

### 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やナノダイヤモンド、GFPなどを用いて温度を1°C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。アンチストークス光とストークス光の強度比  $R(T)$ は(式1)となる。

$$R(T) = \left( \frac{\nu_0 + \nu_R}{\nu_0 - \nu_R} \right)^4 \exp\left(\frac{-\Delta E_i}{kT}\right) \quad (\text{式1})$$

ここで、 $\nu_0$  と  $\nu_R$  は入射光の振動数とストークシフトの振動数である。 $\Delta E_i$  は  $i$  番目の振動エネルギー準位の差である。また、 $k$  と  $T$  はボルツマン定数と絶対温度である。 $R$  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。 $\nu_R$  を THz にすることにより、1  $^\circ\text{C}$  以下の変化を計測することが可能である。また、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できる。

### 4. 研究成果

まず、顕微ラマン分光装置を組み立てた(図1)。ラマン散乱光をモノクロメータによって分散し、高感度デジタル CMOS カメラによって撮影した。自作したラマン分光装置の校正(主としてカメラの量子効率や光学部品の透過率の波長依存性の補正)を行うため、標準溶液を用いて温度測定を行った。

本研究では、低周波領域( $378\text{ cm}^{-1}$ )にピークを持つアセトニトリルのラマンスペクトルを取得した(図2)。次に、アセトニトリルをインキュベータで温め、熱電対で温度を管理し、25°C、30°C、35°C、40°Cに達した後に、ストークス/アンチストークス光のピーク高さを測定した。これらの比は温度に依存して変化した(図3、●)。これより、 $R$  の値から温度を求めることができた。また、傾きと測定値のばらつきから、ラマン顕微法による温度測定の分解能を求めたところ約1°Cだった(図3、□)。

次に、細胞内でのラマン測定対象として、dimethyl sulfoxide (DMSO)に着目した。この理由は、低周波領域にピークを持つだけでなく(図4)、10%の濃度までは細胞毒性を示さないことが知られているからである。前述のアセトニトリルと同様に DMSO のラマンスペクトルの温度依存的なラマンスペクトルの温度依存性を確認した。DMSO を毒性の現れない低濃度で細胞内に拡散させ、細胞内の温度を測定できると期待される。

これらの研究と並行して、低周波ラマン散乱プローブに Halo-tag を結合させ、特定の細胞内小器官の温度を測定する準備をした。まず、細胞では低周波ラマン散乱が見られなかった。プローブを適切に

選択すれば、種々の細胞内小器官の温度を測定できるだろう。

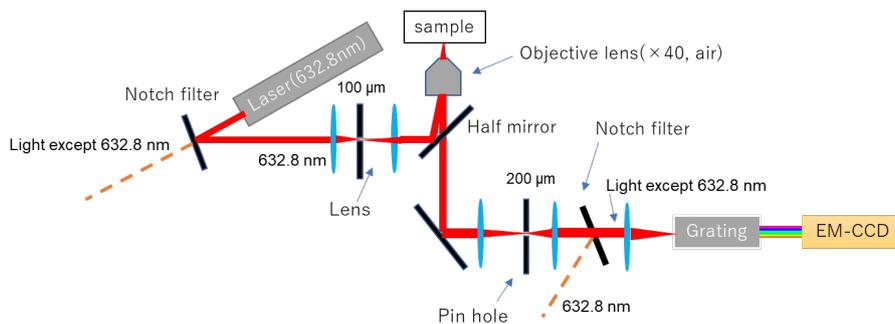


図1: 顕微ラマン分光装置の模式図

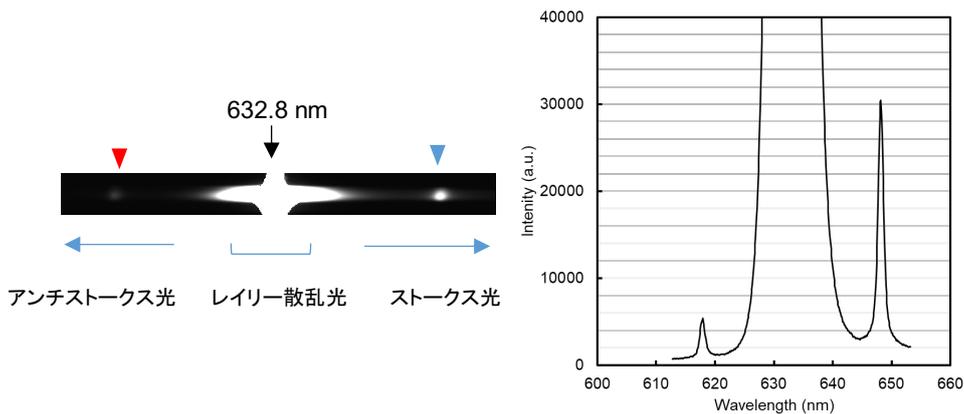


図2: アセトニトリルのラマンスペクトル

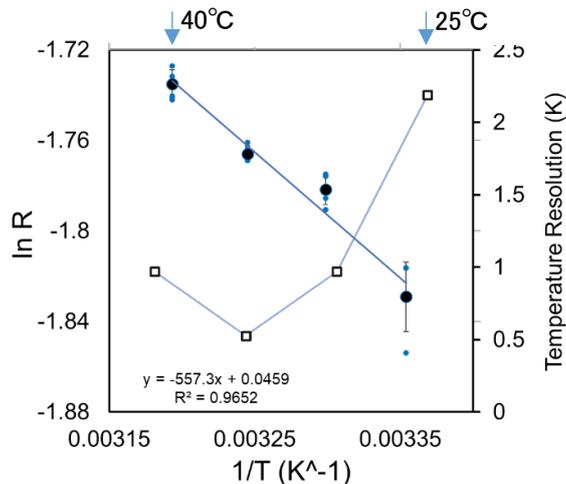


図3: R の温度依存性

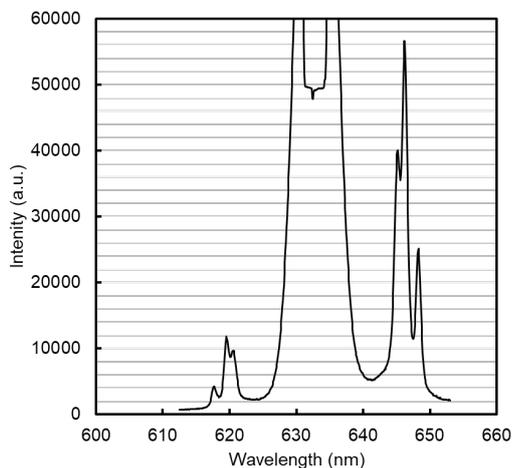


図4: DMSO のラマンスペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Funatsu
2. 発表標題 Culture-Independent Method for Identification of Microbial Enzyme-Encoding Genes by Single-Cell Sequencing Using a Water-in-oil Microdroplet Platform
3. 学会等名 Microfluidics & Organ-on-a-Chip Asia 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 船津高志
2. 発表標題 核酸・蛋白質をマイクロ・ナノデバイスで分析する
3. 学会等名 第78回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船津高志
2. 発表標題 一分子蛍光イメージング法による生命機能の解明
3. 学会等名 超分子研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船津高志
2. 発表標題 一分子生理学
3. 学会等名 第27回日本バイオイメーキング学会学術集会公開講座 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----