

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02750

研究課題名(和文) 超高感度プログラマブル温度センサーによる1細胞の絶対温度計測

研究課題名(英文) Single-cell thermometry using highly sensitive programmable temperature sensors

研究代表者

新井 敏 (Arai, Satoshi)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授

研究者番号：70454056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の精密な温度測定を達成するために、優れた定量性と高い検出感度を兼ね備えた蛍光温度センサーの開発に取り組んだ。これを実現するために、蛍光センサーが温度変化を読みだす物理量として、アーティファクトの影響を受けにくい蛍光寿命を導入した。開発した一連の蛍光センサーを駆使して、高速蛍光寿命顕微鏡での観察下、ミクロスケールで発生させた人工的な温度勾配や、褐色脂肪細胞の熱産生を検出することに成功した。特に、細胞内の様々な場所の温度を測定しながら、細胞内の熱伝搬に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までの生物学は、「温度」を動物個体の体温や、細胞培養の培地の温度として取り扱うことが多く、細胞1個、小器官1個の温度という視点は見落とされてきた。顕微鏡下で使用できる定量性・感度が高い細胞温度計測用のセンサーは、温度に関わる基礎生物学の分野に新しい知見をもたらす。更に、熱を積極的に用いる温熱療法(がんや筋肉)分野などに、精密温度測定技術が活かされる。

研究成果の概要(英文)：To achieve more accurate thermometry in a live cell, we developed fluorescent sensors that allow the quantitative analysis of temperature with high sensitivity. To achieve this, the fluorescence lifetime was introduced as a robust physical parameter for the readout of temperature with the fluorescent sensor. Using a series of fluorescent sensors, we succeeded in the visualization of temperature gradient occurring at microscale using fluorescence lifetime microscopy. We further demonstrated this in the detection of temperature increment in brown adipocyte. In particular, we could obtain the insight regarding the heat transfer in the thermogenesis through the thermometry in several organelles.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光温度センサー 熱産生 蛍光寿命 蛍光タンパク質 色素

## 1. 研究開始当初の背景

私達は、細胞のエネルギーバランス(収支)という視点で、アデノシン三リン酸(ATP)と熱の2つの因子の時空間情報を1細胞レベルの解像度で検出できる蛍光センサーを開発してきた。ATPについては、遺伝子コード型の赤、緑、青の蛍光センサーを開発、細胞内の異なる場所のATPの相対的な濃度変化を同時に可視化することに成功している。一方、より重点的に研究を展開してきたのは蛍光温度センサーである。細胞内の熱源として知られているER(小胞)やミトコンドリアなど、区画化された小器官の内部に分子サイズの蛍光温度センサーを置き、小器官で起きる相対的な温度変化( $\Delta T$ )を計測する技術を開発してきた。この蛍光センサーを用いて、特に褐色脂肪や筋肉などの熱産生細胞に着目し、小器官、細胞、個体レベルの異なる階層における高解像度の温度マッピングの成果を報告してきた。

しかしながら、これらの蛍光センサーは「劇的な温度変化が起きた際に限って、定性的な温度変化の情報を取得できる」程度に適用範囲が限定されていて、温度計測技術の検出感度・定量性は、生物学分野で求められているスペックからは大きく乖離している。そのため、特に、細胞の中でどれくらいの温度変化が起きて、それが生物学的な機能とどう結びついているのか。この点に、直接的に介入した研究事例はほとんどない。

## 2. 研究の目的

本申請では、今までの蛍光温度センサーの設計を大きく変更する。具体的には、温度変化に敏感な温度感受性モジュール分子を蛍光タンパク質に導入し、劇的な感度の向上を目指す。また、今まで開発してきた低分子タイプの蛍光温度センサーについても、温度感受性のメカニズムを解明しながら、その感度の改善を目指す。これらの中から、様々な生物種において至適温度域の異なる複数の温度計を生み出す(プログラマブル温度計)、ミトコンドリア熱産生の時空間動態の解明、及び、様々な細胞種の定常状態における温度マップの作成などを通して、細胞温度計測技術の最終形を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛍光タンパク質型の蛍光温度センサーの探索

蛍光タンパク質のアミノ酸配列の適切な部分に、温度にตอบสนองして構造が大きく変化するモジュールを挿入した設計を施す。具体的には、幾つかの温度感受性のモジュールとなるポリペプチド(エラスチンやロイジンジッパーなど)を選び、これを蛍光タンパク質の一部に挿入した変異体を作製した。なお、温度感受性のモジュール分子と蛍光タンパク質の接続部のリンカーの長さや種類が、センサーの機能を大きく規定することから、この部分のランダムスクリーニングを行った。変異を加えた様々な変異体が大腸菌に発現させ、温度変化に対する蛍光シグナルの変化幅が大きなコロニーを見つけ、解析することを繰り返した(図1)。

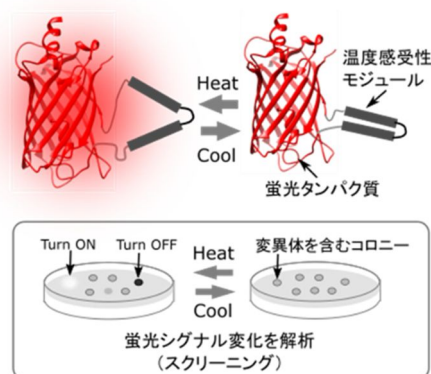


図1 蛍光温度センサーのスクリーニング系の確立

### (2) 低分子型の蛍光温度センサーの探索

(1)の手法に加えて、今まで開発してきた低分子型の蛍光温度センサーの一群(及び、その開発の過程で合成した複数の色素)から、温度に対して感受性の高い構造の情報を抽出することを試みた。ここで見出された母骨格の色素を軸に、細胞内のターゲットしたい場所へ集積できるシグナル分子を化学合成で導入した。特に、ミトコンドリアの熱産生がどのように伝播していく

のかを詳細に解析するために、今まで対象としていなかった細胞小器官を含め、検討した（細胞膜や脂肪油滴など）。

### （3）蛍光寿命イメージングの実験系の構築

細胞内の温度測定の定量性を担保する取り組みとして、蛍光寿命を基にした計測手法へ移行する。蛍光寿命は、蛍光センサーの濃度（数）、観察サンプルのモルフォロジーの変化、焦点面のズレ、励起光の強度などに依存しにくい頑強な物理量である。そのため、温度情報と蛍光寿命の値を1対1で紐づけすることができれば、極めて定量性の高い手法となることが期待される。詳細なセンサーの作動原理は割愛するが、上述の（1）（2）の両方のアプローチに共通して、蛍光輝度と蛍光寿命の両方が変化する設計を施している。ここで、細胞内の温度変化に対して蛍光寿命が変化する様子を簡便に観察するために、高速蛍光寿命顕微鏡（ピコカウント社、FAST-FLIM）に、近赤外線のレーザーシステムを導入した。これにより、対物レンズを通して導入する近赤外光を吸収する光熱変換材料を観察用のディッシュ中央に配置し、顕微鏡観察下で、ミクロスケールの温度勾配を作る。なお、光熱変換材料としては、グラファイトを導入した（図2）。

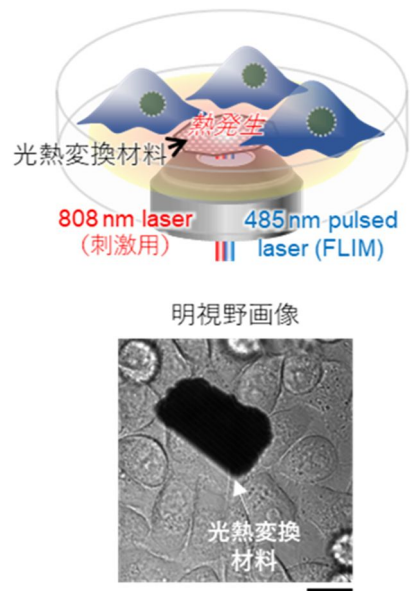


図2 蛍光寿命顕微鏡のセットアップ

### （4）様々な細胞種を用いた細胞内温度測定

熱産生細胞である褐色脂肪細胞や骨格筋細胞、非熱産生細胞である通常のがん細胞のセルラインなどを導入して細胞内の温度測定の実験を行った。熱産生が確実に起きることが分かっている系については、発生した熱が細胞内をどのように伝播していくか、複数の温度計を導入して解析を試みた。また、熱産生を惹起するためのカスケードに関わる他の因子（cAMP など）の同時イメージングも検討した。更に、薬剤刺激に加えて、刺激を加えない定常状態での温度測定も行った。

## 4. 研究成果

前述の3の（1）の蛍光温度センサーの開発において、ベースの温度を細胞応用の37に設定し、温度を50まで変化させて、それに伴う蛍光強度変化の大きさを解析した結果、ある種の変異体について、温度変化に応答して、蛍光シグナルが大きく変化する変異体を見出した。感度について、1変化あたり何%蛍光強度が変わるかを指標としたとき（%/）目標とする感度からは遠いが、今までに開発してきた従来の4%/を超える蛍光温度センサーの候補になり得る変異体が見つかった。また、当初の狙い通り、この変異体は、温度変化に対して蛍光寿命も変化させることが分かった。

一方、（2）のアプローチからも、従来のセンシング感度を超えるセンサーが見つかってきた。これを元に、熱源として知られているミトコンドリアやERに加えて、核、細胞膜や油滴といった場所をターゲットできる蛍光温度センサーを開発することに成功した（国際共同研究による成果を含む）。特に、油滴に関しては、今まで開発されてきた他のタイプの蛍光温度センサーは到達することが難しい場所であるため、本科研費の1つの大きな成果と言える。

上記で開発した一連の蛍光温度センサーと、近赤外線レーザー（細胞加温用）を搭載した高速FLIMシステムを組み合わせ、細胞を局所加温しながら、それに伴って生じる温度勾配を検出できることを確認した。更に、熱産生細胞である褐色脂肪細胞の熱産生を、様々なオルガネラで測定した。特に、低分子型のセンサーを駆使することで、熱源であるミトコンドリアからの相対

的な距離によって、温度計測の結果に差異が見られた。また、細胞種によって定常状態での温度が異なるどうか、様々な細胞の温度測定にも取り組んだが、明確な差は見られず、温度測定の感度に限界を示す結果となった。

結果的には、当初目標として掲げていた、「どんな日に、どんな顕微鏡を使って計測しても、世界中で同じ温度を指し示す細胞内の温度を計測するためのセンサーを開発する」という目標には到達できなかった。一方で、今までにない感度と定量性を担保できたこと、更に、温度測定の事例のない細胞内の場所の温度測定に成功したことは1つの強調すべき成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ferdinandus, Madoka Suzuki, Cong Quang Vu, Yoshie Harada, Satya Ranjan Sarker, Shin'ichi Ishiwata, Tetsuya Kitaguchi, Satoshi Arai	4. 巻 in press
2. 論文標題 Modulation of Local Cellular Activities using a Photothermal Dye-Based Subcellular-Sized Heat Spot	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnano.2c00285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新井 敏
2. 発表標題 細胞熱工学の深化：色素を巧みに利用する温度計測と制御
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新井 敏
2. 発表標題 生体分子濃度の時空間動態を定量可視化・自在制御するケミカルバイオロジー
3. 学会等名 第6回ソフトマター工学分科会講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井 敏
2. 発表標題 1細胞のエネルギーフローを可視化するための蛍光センサーの創製
3. 学会等名 日本生体医工学大会（岡山：オンライン開催）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新井敏
2. 発表標題 細胞熱力学エンジニアリングの未来展望
3. 学会等名 日本メカノバイオロジー研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井敏
2. 発表標題 細胞内動態をサブセルレベルで制御する温和なNanoHeating技術
3. 学会等名 第54回生物物理学会年会, 宮崎
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 新井敏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 838-842
3. 書名 月刊細胞	

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関

韩国	POSTECH			
----	---------	--	--	--