

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655151

研究課題名(和文) 蛍光性サーモセンサーを用いた生体内温度の恒常性を担う熱産生機構の解明

研究課題名(英文) Visualization of subcellular thermoregulation in live cells using fluorescent coiled-coil proteins

研究代表者

清中 茂樹 (Kioynaka, Shigeki)

京都大学・地球環境学堂・准教授

研究者番号：90422980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：体温調節は、哺乳類をはじめとした恒温動物の生命維持に必須である。生体内の温度制御機構に関しては、複数のオルガネラにおいて異なる機構が提案されているが、未だに物議をかもしている。今回、我々は、蛍光性温度センサー-tsGFPを用いて、細胞内の熱産生および温度分布について評価し、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアからの熱産生、および骨格筋細胞の小胞体からの熱産生の可視化に成功した。興味深いことに、ミトコンドリア移行型tsGFPを用いることで、HeLa細胞におけるミトコンドリアの温度不均一性を確認し、その不均一性はミトコンドリア膜電位と相関があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In mammals and birds, thermoregulation to conserve body temperature is vital to life. Multiple mechanisms of thermogenesis localized in different subcellular organelles have been proposed. However, previous studies have failed to observe thermogenesis directly in intact organelles. Here, we have visualized intracellular thermogenesis by using a fluorescent thermosensor, tsGFP. Specific targeting of tsGFPs enables visualization of thermogenesis in discrete organelles, notably mitochondria in brown adipocytes and the endoplasmic reticulum in myotubes. Strikingly, in HeLa cells, targeted tsGFP reveals heterogeneity in mitochondrial thermogenesis that is well correlated with the electrochemical gradient. Thus, tsGFPs directly demonstrate subcellular thermotransduction, and will serve as powerful tools to assess thermogenesis in vivo.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：サーモセンサー 蛍光タンパク質 coiled-coil tsGFP

1. 研究開始当初の背景

生体内温度の維持は、我々が生命活動を遂行する上で極めて重要であり、恒温動物では体温は約 35~40°C に保たれる。生体内の熱産生メカニズムに関しては、筋肉の摩擦を利用した“ふるえ熱”や熱産生組織として知られる褐色脂肪細胞が挙げられる。しかし、これらは寒さに対する適応応答として考えられており、生体温度の恒常性に対する寄与は小さい。温度維持の恒常性を担う熱産生は、骨格筋、ミトコンドリア全般、肝臓で行われると考えられているが、その温度産生を具体的に評価した例はなく、またその温度産生メカニズムについては未開拓である。その主な原因として、細胞内微小空間の温度分布を測定できる方法が知られていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

生体内温度の維持は、我々が生命を維持する上で不可欠な生命活動である。恒温動物では体温は約 35~40°C に保たれるが、温度恒常性のメカニズムは解明されておらず、未開拓な研究領域と言える。褐色脂肪細胞は唯一同定されている熱産生場であるが、主に寒さに対する適応応答として考えられ、恒常的な熱産生に対する寄与は小さい。温度維持の恒常性を担う熱産生は、骨格筋、ミトコンドリア全般、肝臓等で行われると提唱させているが、その熱産生を直接的に評価した例は知られていない。本研究では、著者らが開発した細胞内蛍光性サーモセンサーを用いることで、生体内の温度分布を可視化し、熱産生機構を明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

著者は、細胞内蛍光性サーモセンサーの開発を進めている。これまでに、サルモネラ菌が有する coiled-coil 性タンパク質 TlpA と蛍光タンパク質 GFP を融合させることで、生体内温度付近の温度変化を鋭敏に測定できる蛍光性サーモセンサー (tsGFP) を開発した (図 1)。本研究においては、このセンサーを用いて細胞内熱産生機構の評価を行った。

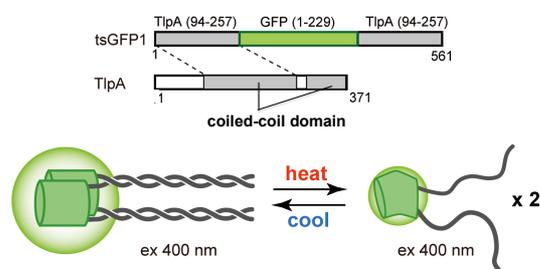


図 1. tsGFP 蛍光性サーモセンサー

筆者はこれまでに、蛍光性サーモセンサー (tsGFP) を HeLa 細胞のミトコンドリアに発現させることで、定常状態においても温度分布が存在するという初期的な結果を得てい

た。そこで、ミトコンドリアにおける熱産生機構を評価するために、ミトコンドリア膜電位、ATP 濃度と熱産生の相関関係について評価した。具体的には、HeLa 細胞内に tsGFP を発現させ、蛍光顕微鏡を用いて tsGFP の蛍光レシオの変化を可視化した。

生体の熱産生組織として知られる褐色脂肪細胞を用いて熱産生を行うことを検討した。褐色脂肪細胞での遺伝子導入のための tsGFP 発現用アデノウィルスを作成し、褐色脂肪細胞内に tsGFP を発現させ、蛍光レシオの変化から温度変化について評価した。

近年、骨格筋においても非ふるえ熱熱産生が起こっている可能性が示されつつある。そこで、tsGFP を発現させた C2C12 細胞を筋管細胞へと分化させて、蛍光レシオの変化から熱産生の有無を評価した。

4. 研究成果

ミトコンドリアの ATP 濃度と熱産生の相関関係については、細胞内の ATP 濃度変化を可視化できる ATeam を用いて評価した。その結果、ミトコンドリア温度と ATP 濃度に相関関係があることがわかった。

ミトコンドリア膜電位と熱産生の関連に関しては、プロトン透過させることでミトコンドリア膜電位を解消する脱共役剤 (CCCP) を投与して、tsGFP で熱産生を評価し、ミトコンドリアからの熱産生を確認した (図 2)。一方、ミトコンドリア膜電位形成自体を阻害する脱共役剤であるロテノン処置した後に CCCP を投与しても、熱産生は確認できなかった。さらに、ミトコンドリア膜電位の変化を可視化できる色素である JC1 と tsGFP の蛍光変化を可視化したところ、膜電位と蛍光変化に相関関係が存在した。以上の結果から、ミトコンドリアにおける温度分布および熱産生には、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が関与することが示唆された。

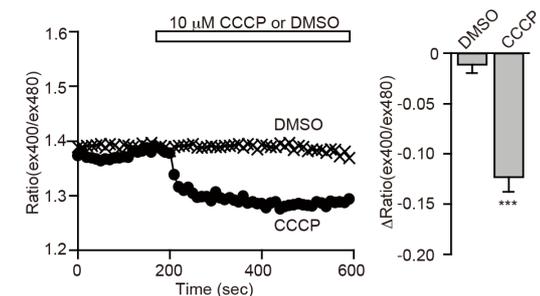


図 2. HeLa 細胞における熱産生の可視化

次に、生体の熱産生組織として知られる褐色脂肪細胞を用いて熱産生を行うことを検討した。ミトコンドリアに発現する tsGFP1-mito を褐色脂肪細胞に発現させて、各種刺激に伴う熱産生を評価した。まず、ミトコンドリア脱分極剤 (CCCP) を投与したところ、温度上昇に相当する蛍光変化が得られた。また、褐色脂肪細胞は UCP1 の活性化に伴い熱産生を起こすと知られるので、UCP1 の

活性化に必須な遊離脂肪酸の産生を引き起こす β アドレナリン受容体刺激を行ったところ、温度上昇に相関する蛍光変化が得られた(図3)。このことから、褐色脂肪細胞における熱産生の可視化に成功したと言える。

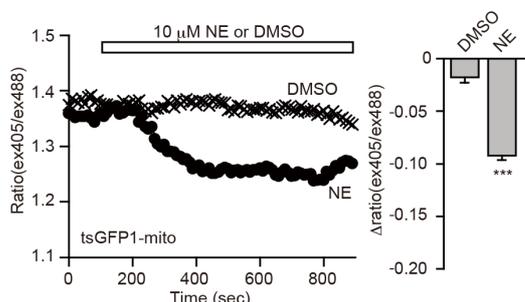


図 3. 褐色脂肪細胞における熱産生の可視化 (NE: ノルアドレナリン)

近年、骨格筋も熱産生を起こすことが報告された。しかし、骨格筋からの熱産生に関しては、主に膜画分を用いた生化学的な方法で評価されており、細胞内での寄与に関しては相反する報告がなされていた。そこで、筋繊維芽細胞である C2C12 に小胞体に発現する tsGFP-ER を発現させて、筋管細胞へと分化させて熱産生を評価した。骨格筋においては、小胞体に発現する Ca^{2+} ポンプである SERCA の ATPase 活性が熱産生を引き起こすと考えられている。そこで、tsGFP-ER を発現させた筋管細胞に SERCA 阻害剤 (CPA) を添加したところ、温度降下に相当する蛍光変化が得られた。一方、SERCA 阻害剤を wash-out した際には、元の蛍光状態に戻った。すなわち、筋管細胞における SERCA を介した恒常的な熱産生を可視化したと言える。

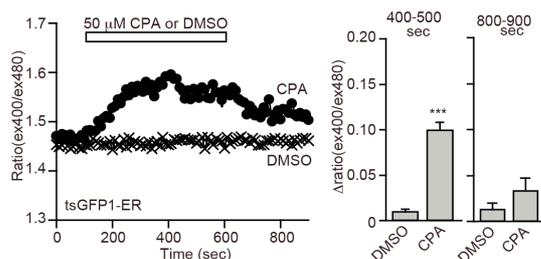


図 4. 筋管に分化させた C2C12 細胞における熱産生の可視化

以上、蛍光性サーモセンサー tsGFP を用いることで、著者らは、細胞内の熱産生を可視化するだけでなく、細胞内や細胞内小器官の局所に温度分布が存在することを確認した。tsGFP サーモセンサーは、未開拓な研究領域である温度生物学研究において有用な研究ツールになると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kozai D, Kabasawa Y, Ebert M, Kiyonaka S, Firman, Otani Y, Numata T, Takahashi N, Mori Y, Ohwada T. Transnitrosylation directs TRPA1 selectivity in N-nitrosamine activators. *Mol. Pharmacol.* 85, 175-185 (2014). DOI: 10.1124/mol.113.088864
2. Kiyonaka S, Kajimoto T, Sakaguchi R, Shinmi D, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Imamura H, Yoshizaki T, Hamachi I, Morii T, Mori Y. Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. *Nat. Methods* 10, 1232-1238 (2013). DOI: 10.1038/NMETH.2690
3. Ronjat M, Kiyonaka S, Barbado M, De Waard M, Mori Y. Nuclear life of the voltage-gated Cacnb4 subunit and its role in gene transcription regulation. *Channels* 7, 119-225 (2013). DOI: 10.4161/chan.23895
4. Shi J, Geshi N, Takahashi S, Kiyonaka S, Ichikawa J, Hu Y, Mori Y, Ito Y, Inoue R. Molecular determinants for cardiovascular TRPC6 channel regulation by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II. *J. Physiol.* 591, 2851-2866 (2013). DOI: 10.1113/jphysiol.2013.251249
5. Tadmouri A, Kiyonaka S, Barbado M, Rousset M, Fablet K, Sawamura S, Bahembera E, Pernet-Gallay K, Arnoult C, Miki T, Sadoul K, Gory-Faure S, Lambrecht C, Lesage F, Akiyama S, Khochbin S, Baulande S, Janssens V, Andrieux A, Dolmetsch R, Ronjat M, Mori Y, De Waard M. Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO J.* 31, 3730-3744 (2012). DOI: 10.1038/emboj.2012.226
6. Kiyonaka S, Nakajima H, Takada Y, Hida Y, Yoshioka T, Hagiwara A, Kitajima I, Mori Y, Ohtsuka T. Physical and Functional Interaction of the Active Zone Protein CAST/ERC2 and the β -subunit of the Voltage-dependent Ca^{2+} Channel. *J. Biochem.* 152, 149-159 (2012). DOI: 10.1093/jb/mvs054

[学会発表] (計 5 件)

1. Shigeki Kiyonaka, Taketoshi Kajimoto, Reiko Sakaguchi, Daisuke Shinmi, Mariko Omatsu-Kanbe, Hiroshi Matsuura, Hiromi Imamura, Takenao Yoshizaki, Itaru Hamachi, Takashi Morii and Yasuo Mori Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells, the 58th Annual Meeting of the Biophysical Society, February 15-19, 2014.
2. 若山 翔、清中 茂樹、浜地 格、神経

細胞における内在性グルタミン酸受容体のケミカルラベル、第7回バイオ関連化学シンポジウム、2013年9月27-29日

3. 清中 茂樹、梶本 武利、坂口 怜子、森井 孝、森 泰生、蛍光性サーモセンサーの開発と生体の恒常性を担う熱産生機構の可視化、生理学研究所研究会「新規シグナル伝達分子とその生理学的可能性」、2013年9月26日
4. 若山 翔、清中 茂樹、浜地 格、神経細胞における内在性グルタミン酸受容体の蛍光ラベル化法の開発、第86回日本生化学会大会、2013年9月11-13日
5. 若山 翔、清中 茂樹、浜地 格、神経伝達物質受容体のケミカルラベル、日本化学会第93春季年会、2013年3月22-25日

〔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：

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清中 茂樹 (KIYONAKA, Shigeki)

京都大学・大学院地球環境学堂・准教授

研究者番号：90422980

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし