

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770174

研究課題名(和文) 蛍光性温度センサータンパク質の開発と細胞内熱産生の可視化

研究課題名(英文) Monitoring temperature inside a single cell with a novel genetically encoded fluorescent temperature indicator

研究代表者

中野 雅裕 (NAKANO, MASAHIRO)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：30467617

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)：温度は様々な生体反応にとって重要な因子のひとつである。1細胞の温度状態をモニタリングする技術はその熱がいつどこで生じているかを知るうえで重要である。我々は様々な蛍光タンパク質の蛍光強度の温度依存性を測定し、蛍光強度の温度依存性が大きい蛍光タンパク質と小さい蛍光タンパク質を組み合わせることにより、細胞の形態変化に影響を受けないレシオメトリック型温度プローブタンパク質を開発した。このプローブを細胞に発現させ、細胞外液の温度を変化させたところ2つの蛍光タンパク質の蛍光強度比が温度によって変化することを確認した。そして、このタンパク質を用いてミトコンドリアでの熱産生の可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Intracellular temperature is crucial role for many cellular processes such as gene expression and cellular metabolism. In this study, we developed a new genetically encoded fluorescent temperature indicator for monitoring temperature changing in a single living cell by combination a temperature sensitive fluorescent protein and a temperature less sensitive protein. To monitor the intracellular organelle specific temperature dynamics, we succeeded in expression the temperature indicator in mitochondria, nucleus, and plasma membrane. And also, we successfully monitored heat production in mitochondria of single cell with chemical stimulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：温度 蛍光タンパク質

1. 研究開始当初の背景

これまでの多くの研究から、熱産生のシステムには心拍数の増大や筋肉の震えなどによる「ふるえ熱産生」と脂肪酸のβ酸化が関与する「非ふるえ熱産生」という全く異なるシステムが存在することが分かっている。前者は骨格筋のふるえによる摩擦熱が、後者においてはミトコンドリアにおける代謝反応の過程で生み出される反応熱が関与していると考えられている。「非ふるえ熱産生」では Uncoupling Protein (UCP) というミトコンドリア膜に存在する膜タンパク質が働き、個体レベルでのエネルギー消費や体脂肪量の調節に大きく関わっていることが明らかになってきた。UCPにはUCP1、UCP2、UCP3のサブタイプが存在し、それぞれ褐色脂肪細胞、白色脂肪細胞、そして骨格筋に多く発現している (Krauss S. et al. Nature Rev. Mol. Cell, 2005)。これらの中でも、褐色脂肪細胞は熱産生の特異的な部位としてその存在が明らかにされ、体温調節のみならず、過剰摂取エネルギーを熱として散逸させることによって生体のエネルギー平衡に関わっていることも示されており、近年注目されている。UCP1は、酸化リン酸化の脱共役によってミトコンドリア呼吸鎖が形成するミトコンドリア膜を介したプロトン濃度勾配を解消することで熱を産生すると考えられているが、「脱共役によってどれだけ熱が発生するのか」について詳細に調べた研究は皆無であり、また熱産生の動態を細胞レベルで可視化した研究もこれまでにない。

緑色蛍光タンパク質 (GFP) をはじめとした様々な蛍光タンパク質の蛍光強度温度依存性を網羅的に調べたところ、多くの生物の至適生育温度である 20°C から 50°C の範囲において、蛍光強度がほとんど変化しないものや、逆に大きく変化するものを見いだした。そこで、これら温度依存性の異なる2つの蛍光タンパク質を融合することにより、センサーの濃度変化などにシグナルの強度が左右されないレシオメトリック型蛍光性温度センサータンパク質を開発した。作製したセンサータンパク質を大腸菌発現系から精製し、蛍光分光光度計の測定キュベット内温度を変化させた時の蛍光強度を測定したところ、蛍光強度のレシオ値が温度によって変化した。

2. 研究の目的

我々、哺乳類を含む恒温動物の体温はどのようにして一定に保たれているのか？どのようにして熱を産生しているのか？この疑問に対する明快な答えはまだない。本研究は測定対象の温度を高い時間・空間分解能で可視化する技術を開発し、これまで不可能であった細胞内で産生される熱を直接可視化することで本問題に迫りたい。更に細胞内熱産生に関わるタンパク質に着目し、熱産生機構の解明を目指す。具体的に本研究では、

(1) 蛍光性温度センサータンパク質の改

良・開発、

(2) 細胞の熱産生の可視化

(3) 神経細胞の発火に伴う熱産生の可視化を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 蛍光性温度センサータンパク質の改良・開発

これまでに開発した温度センサータンパク質を改良するために、これまで開発されているさまざまな蛍光タンパク質の蛍光強度及び蛍光スペクトルの温度依存性を更に調べた。次に温度による蛍光強度の変化が大きい蛍光タンパク質と小さい蛍光タンパク質を組み合わせてレシオメトリックな蛍光性温度センサータンパク質を作成し、蛍光スペクトルの温度依存性を測定した。次に本蛍光性温度センサータンパク質を培養細胞に発現させ、温度変化によるレシオ値の変化を観察した。また、このセンサータンパク質をミトコンドリア、核、細胞膜に発現する系を作成し観察を行った。

(2) 細胞の熱産生の可視化

本温度センサーを用いて、酸化リン酸化の脱共役によってミトコンドリア呼吸鎖が形成するミトコンドリア膜を介したプロトン濃度勾配を解消するときに細胞内温度が変化するかを検証した。具体的には、温度センサータンパク質をミトコンドリアの内膜に発現させ、酸化リン酸化の脱共役剤であるカルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (FCCP) を加えたときの温度センサーのレシオ変化を観察した。

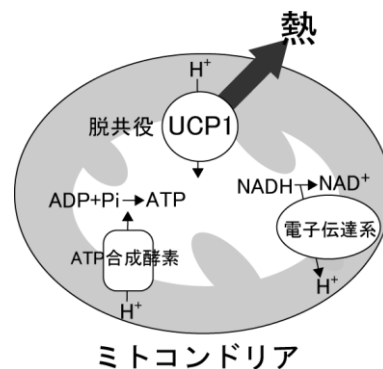


図 1 酸化リン酸化の脱共役によるミトコンドリアの熱産生の模式図

(3) 神経細胞の発火に伴う熱産生の可視化

UCP の脱共役による熱はイオンが細胞膜を通るときの「ジュール熱」により産生されるという仮説を検証するために、神経細胞にセンサータンパク質を発現させ、神経発火に伴って生じる温度変化の可視化を試みた。具体的にはラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫である PC-12 細胞に神経成長因子を加えて神経細胞様に分化させた。この細胞にチャネル

ロドプシン 2 (ChR2) と本温度センサータンパク質を発現させ、青色光刺激による ChR2 を活性化させたときに生じるイオンの細胞内流入時の温度センサーのレシオ変化を測定した。

4. 研究成果

(1) さまざまな蛍光タンパク質の温度依存性を調べた結果、蛍光強度の温度依存性が大きいタンパク質と小さいタンパク質を見つけることができた。これらの蛍光タンパク質を組み合わせることで、レシオメトリックな温度センサータンパク質を作成した。大腸菌から精製した本温度センサータンパク質の各温度 (10°C~50°C) での蛍光スペクトルを図 2 に示す。2つの蛍光タンパク質の蛍光スペクトルのピーク値の比 (レシオ) を温度に対してプロットすると、温度に対してレシオが変化することが示された (図 3)。少なくとも 5°C から 50°C の間でレシオ値が変化することを確認した。またある温度での例レシオ値について、温度が上昇するときのレシオ値と下降するときのレシオ値はほぼ同じであることから、この温度センサーは温度上昇/下降によるヒステリシスがないことが示された。

次に本温度センサーを培養細胞内に発現させて細胞を培養しているディッシュの温度を 30°C~40°C に変化させ、2つの蛍光タンパク質の画像をそれぞれ取得しレシオ値の変化を測定したところ、温度が上がるにつれてレシオ値が上昇した (図 4)。また、本温度センサーをミトコンドリア、核、細胞膜の細胞内小器官に発現することができた。これにより、細胞内の局所的な温度変化がモニタリングできるようになった。図 5 に HeLa 細胞のミトコンドリアに発現した温度センサーの蛍光画像を示す。

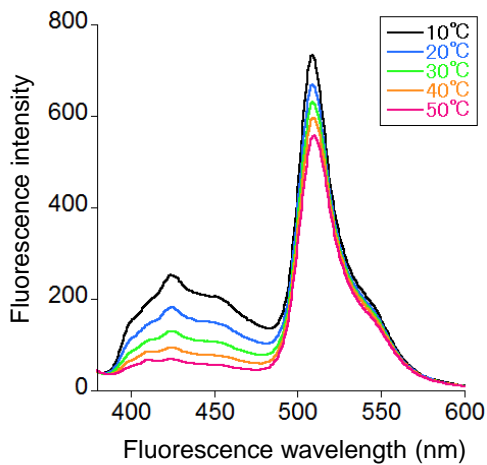


図 2 温度センサーの蛍光スペクトルの温度依存性

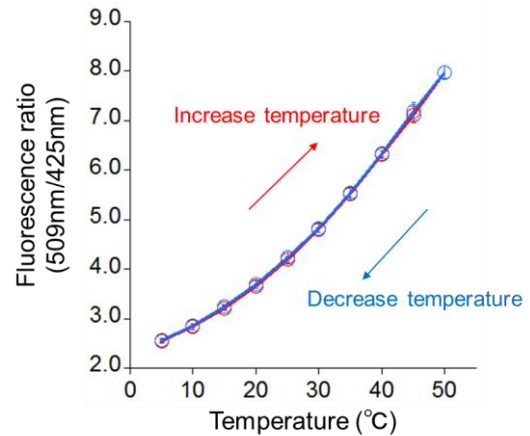


図 3 温度センサーの温度に対するレシオ値の変化

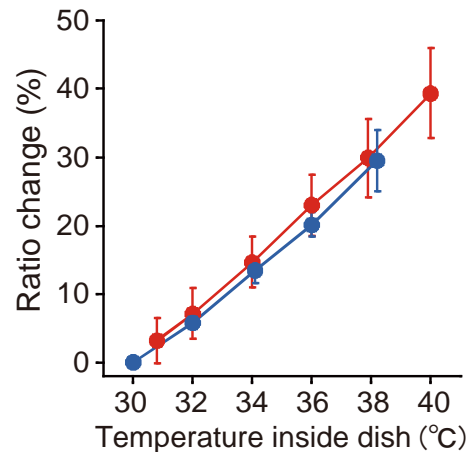


図 4 細胞内に発現させた温度センサーの温度に対するレシオ値の変化

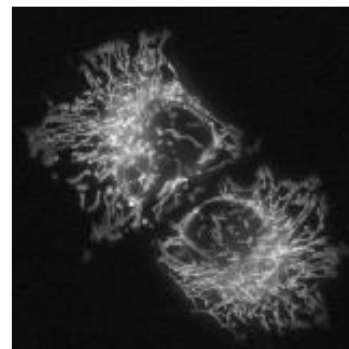


図 5 HeLa 細胞のミトコンドリアに発現した温度センサーの蛍光画像

(2) 温度センサータンパク質をミトコンドリアの内膜に発現させ、酸化リン酸化の脱共役剤である FCCP を加えたときの温度センサーのレシオ変化を観察した。その結果、

FCCPを加えたところ、温度センサーのレシオ値が上昇した(図6)。FCCPの溶媒であるジメチルスルホキシドだけを加えたときにはレシオ値の上昇が観測されなかった。以上より、酸化的リン酸化の脱共役によって細胞内ミトコンドリアの温度が上昇することを本温度センサーで示すことができた。

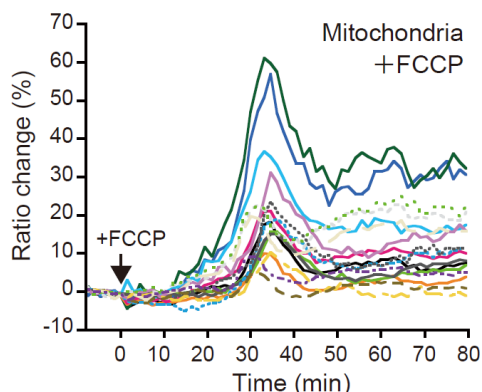


図6 ミトコンドリアに発現させた温度センサーのFCCP添加時のレシオ変化

(3) PC-12細胞に神経成長因子を加えて神経細胞様に分化させた。この細胞にChR2と本温度センサータンパク質を発現させ、青色光刺激によるChR2を活性化させたときに生じるイオンの細胞内流入時の温度センサーのレシオ変化を測定した。その結果、蛍光性Ca²⁺センサーを用いて青色光刺激によるCa²⁺の上昇を確認することはできたが、温度センサーのレシオ値の変化を観測することはできなかった。

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2件)

①Naciye Esma Uner, Daichi Okuno, Masahiro Nakano, Ken Yokoyama, and Hiroyuki Noji
“Mechanical Modulation of ATP-Binding Affinity of V1-ATPase”

J Biol Chem, 288(1), 2013, 619-23

DOI: 10.1074/jbc.M112.420729

②Naciye Esma Uner, Yoshihiro Nishikawa, Daichi Okuno, Masahiro Nakano, Ken Yokoyama, and Hiroyuki Noji

“Single-molecule Analysis of Inhibitory Pausing States of V1-ATPase”

J Biol Chem, 287(34), 2012, 28327-35

DOI: 10.1074/jbc.M112.381194

[学会発表] (計5件)

①中野 雅裕

「遺伝子にコードされた蛍光性温度センサーの開発」

第85回日本生化学会大会

2012年12月15日

福岡国際会議場(福岡市)

②Masahiro Nakano

“Monitoring Temperature inside a Single Cell with a Novel Genetically Encoded Fluorescent Temperature Indicator”

First Osaka University-EPFL International Symposium

2013年12月02日~2013年12月03日

大阪大学銀杏会館

③Masahiro Nakano

“Monitoring Temperature inside a Single Cell with a Novel Genetically Encoded Fluorescent Temperature Indicator”

The 17th SANKEN International Symposium

2014年01月21日~2014年01月22日

大阪大学銀杏会館

④中野 雅裕

「遺伝子にコードされた蛍光性温度プローブタンパク質の開発」

第9回NIBBバイオイメージングフォーラム

「物理特性のイメージング」(招待講演)

2015年01月26日~2015年01月27日

岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市

⑤Masahiro Nakano

“Monitoring temperature inside a single cell with a novel genetically encoded fluorescent temperature indicator”

Focus on Microscopy FOM 2015

2015年03月29日~2015年04月01日

Lokhall, Göttingen, Germany

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 雅裕 (NAKANO Masahiro)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号: 30467617