

令和元年6月13日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06044

研究課題名（和文）分子温度計の機能拡張と多細胞社会の温度マッピング

研究課題名（英文）Temperature mapping of multicellular system using functional molecular thermometers

研究代表者

新井 敏 (Arai, Satoshi)

早稲田大学・理工学術院・次席研究員（研究院講師）

研究者番号：70454056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,300,000円

研究成果の概要（和文）：今までの温度に関わる生物学研究は、マクロな温度変化である体温を扱うことに限定されていた。本研究課題では、ミクロな細胞世界で起きる熱産生が、どのように多細胞組織に伝播していくのか、そのダイナミクスに着目して研究を行った。具体的には、開発した高機能性の蛍光温度センサーを用いた生体組織の高解像度温度マップの取得、及び、細胞レベルで起きる熱産生のシグナル伝達経路の丸ごと可視化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の中に、均一ではない温度分布が存在できるか否か、現在、学术界において論争になっている。本研究課題で開発した一連の温度イメージング技術は、生物学的な視点で、この論争に終止符を打つ、非常に強力なツールとなり得ることから、基礎的な温度生物学研究の発展に大きく貢献するものである。また、細胞の中のエネルギーバランスに関わるATPや熱の可視化技術は、創薬・食品栄養分野等に広く貢献するものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Previous studies in thermal biology has only focused on the physiological temperature at macroscopic level. The study supported by this grant was aimed at revealing the dynamics of how heat production occurring at microscopic level spreads from single cell to multi-cellular tissues. More specifically, we achieved to obtain the temperature mapping of tissue samples at high spatial resolution using the developed functional fluorescent thermometer. In addition, we succeeded to visualize the signalling story of thermogenesis in single brown adipocyte.

研究分野：化学と生物の融合研究。合成化学や遺伝子工学を駆使し、生物学・医学分野へ貢献する材料の創出。

キーワード：バイオイメージング 蛍光温度センサー ATP 細胞熱産生 褐色脂肪細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

恒温動物は、筋肉や褐色脂肪が積極的に熱産生し、周りの環境よりも高い温度で体温を一定に保ち生命活動を維持している。こうした積極的な熱産生は、恒温動物の専売特許と理解されてきたが、これらの知見は覆されつつある。一例をあげると、水温と体温が同じと言われてきた魚類の中で、深海を生息域とする赤マンボウは、捕食の準備のために自ら熱産生を行い、ウォームアップしていることが分かっている(N. C. Wegner, Science, 2015)。この知見は、従来の恒温・変温動物という枠組みは極めて単純化され過ぎたものであること示唆している。私達が想像している以上に、生命システムは、熱産生を積極的に採用して、多様な細胞機能を発揮しているのかもしれない。従って、生物種に囚われる事無く、生体組織の温度分布を高い時間分解能で知ることは極めて重要な試みである。

今までに、当該課題の研究代表者も含む複数の研究グループが、それぞれ分子設計の異なる蛍光温度センサーを開発し、「細胞内の温度分布は不均一である」というモデルを提唱している(Kiyonaka et al., Nat. Methods, 2015; Suzuki et al., Nat. Methods, 2015)。直感的には、納得しやすいモデルであるが、熱産生細胞において、「細胞小器官で 1 - 2 近くの温度上昇が観測されるが、細胞質全体ではほとんど上がっていない」ことを直接観察した、という実験的事実に裏打ちされている点で学術的な意義が深い。しかしながら、上記は、あくまで、孤立化環境における細胞の温度測定結果に基づく考察である。「木を見て森を見ず」で、培養細胞の培地に浸った 1 細胞が見せる姿と、複数の細胞が連動しているダイナミックな生体システムの中での 1 細胞の振る舞いとは埋め難いほどの溝がある。個々の細胞が小器官レベルで熱産生しながら、細胞同士がどのように協奏的に関わりあい、多細胞からなる組織全体の温度の上昇をどのように引き起こしているのか。また、細胞内の局所でしか温度上昇が見られないことは、細胞機能にとってどんな意味を持つのか。こうした生物学的な問いに答えるための頑強な技術が、そもそも、十分に確立されていない。

2. 研究の目的

本提案では、今まで開発してきた分子サイズの温度計を、温度センサーの感度を改善しながら、組織・個体での温度イメージングに適した形に機能拡張することを主たる目的とする。これらを駆使して、熱産生細胞である褐色脂肪や骨格筋などの組織試料を対象に、小器官から始まる熱産生が多細胞社会へ拡散していく、その温度イメージングに取り組む。また、細胞の中に、擬似的に熱源を作る手法を開発し、熱産生細胞の機能を再現することで、細胞内の局所で温度上昇が見られる生物学的な意味を解明するための足がかりを作る。

3. 研究の方法

以下の 4 つの視点で研究を遂行した。

3.1) 温度感受性が高い蛍光温度センサーの開発とターゲット小器官の種類の拡張

本研究課題の達成には、基本的な蛍光温度センサー性能の向上、とりわけ、感度の改善が必要である。そこで、研究期間を通じて、蛍光温度センサーの感度の向上に取り組んだ。温度が 1 変わるとき、どれくらい蛍光強度(或いは蛍光寿命)が変化するか(%/度)を感度の指標とした。今まで得られている分子サイズの蛍光温度計(ER Thermo yellow、Mito Thermo yellow)に関して、骨格となる色素の官能基の変換を行い、その化学構造と温度感受性の相関解析を共同研究を通して行った。また、色素単独の性質ではなく、色素を封入してナノ粒子化することで、ナノ粒子を構成するマトリックス材料を生かした新しいセンサーの開発も実施した。更に、熱産生の細胞小器官レベルでの理解を深めるために、今まで得られている ER やミトコンドリア以外の小器官をターゲットできる温度センサーを探索した。

3.2) in vivo イメージングのための分子温度計の機能拡張(近赤外励起・多光子励起)と組織・個体のイメージング

3.1 の温度の感受性と共に、in vivo で使うために分子温度計を機能拡張した。具体的には、3.1 で得られたものの中から、可能な限り長波長側(望ましくは近赤外領域)を選ぶことにした。また、得られている蛍光温度センサーに、2 光子吸収を促進するための補助用の色素や、近赤外吸収用の色素(FRET タイプ)をコンジュゲートすることで、生体組織のイメージングに適した仕様のセンサーを合成した。

3.3) 温度変化以外の因子(ATP)との同時イメージングによる熱産生の丸ごと可視化

細胞小器官で起きる熱産生の生物学的な意義を検証する上で、ATP 動態を観察することは必須である。熱産生小器官としては、ミトコンドリアや ER がよく知られている。前者は、ミトコンドリアの膜電位の解放(脱分極)で、ATP 合成に使われていた化学エネルギーの散逸が熱産生の源であると言われ、後者は、ER 膜上の ATPase の ATP の加水分解が熱源と理解されている。本研究課題では、温度変化を蛍光イメージングで計測することを主眼としているため、顕微鏡観察と相性の良い、独自の蛍光 ATP センサーを導入した。特に、褐色脂肪細胞の熱産生に関わる因子の同時イメージングを行った。

3.4) ナノサイズの光熱変換粒子による熱源の作成

細胞の局所で生じる熱源の意義を理解するために、光を照射して熱を生み出すナノ材料を用いて、細胞内に疑似的な熱源を積極的に作る技術を開発した。

4. 研究成果

以下、研究の方法3)に即して、成果を記述する。

4.1) 温度感受性が高い蛍光温度センサーの開発とターゲット小器官の種類の拡張

様々な官能基を持つ蛍光温度センサーの候補の合成と併行して、共同研究者からも合成色素の提供を受け、温度感受性と構造の相関解析を行った。結果、温度感受性の鍵となる構造をある程度把握することができた。しかしながら、今まで到達している感受性の3.9(%/度)から、その値は幾分向上したものの、大幅な改善には至らなかった。そこで、色素分子が持つ元々の感度(温度変化に対してどれくらい蛍光強度が変化するか(%/))を増幅するようなマトリックスを探索し、これを色素と組み合わせてナノ粒子化に取り組んだ。結果、今までに無い高い温度感受性を持つセンサーを作ること成功した。

もう一つの試みの小器官ターゲットの種類の拡張については、今までのミトコンドリア、ERに加えて、更に2種類の小器官にターゲットできる蛍光温度センサーを見出した。特に、世界中で開発されている他のタイプの遺伝子コード型やポリマーナノ粒子型の蛍光温度センサーでは、到達できない場所であることから、この知見はとても意義が深いものである。更に、今までの蛍光温度センサーの蛍光波長は、TRITCチャンネルでの使用に限られていたが、色素の波長の多様性を拡張することにも成功した。

4.2) in vivo イメージングのための分子温度計の機能拡張(近赤外励起・多光子励起)と組織・個体のイメージング

3.1で開発した色素を封入するマトリックスに工夫を施してナノ粒子化した温度センサーが、極めて高い温度感受性を示すと同時に、生体組織サンプルの自家蛍光が少ない波長域であったことから、これを用いて、細胞・組織のイメージングを行った。十分な蛍光輝度が担保できた一方で、細胞や組織の中で、比較的短い時間で、マトリックスから色素が漏れ出してしまふことが分かった。高い温度感受性とトレードオフで、センサー自体の安定性に問題があることが分かり、それ以上の動物個体イメージングへ進むことを中止した。

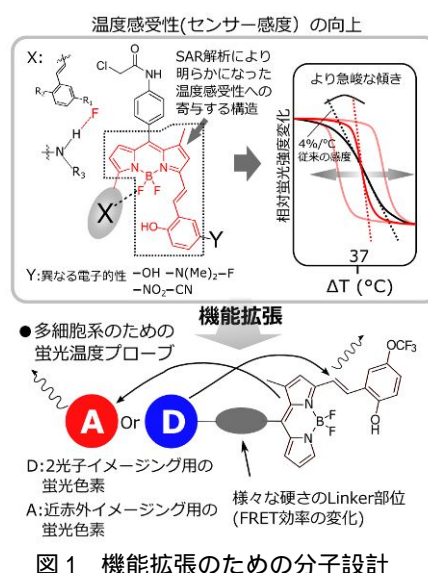
一方、生体組織のイメージングのために、多光子・2光子励起できる分子の合成を行った。具体的には、蛍光温度計とFRETペアになる2光子吸収用の色素を結合した。結果、設計のねらい通り、2光子吸収用の色素から効率よく、エネルギー移動が生じる温度計分子の合成に成功している。しかしながら、同時に、2光子吸収用の補助色素が無い状態でも、実用的には問題が無い程度の2光子励起効率が担保されていることも分かったため、イメージング用途に応じて、色素を柔軟に選択した。現在、これを用いて、国際共同研究においてex vivo、国内共同研究においてin vivoのイメージングを行い、高い解像度の温度イメージングに成功している(論文執筆中)。低分子の温度センサーは、生体組織を染色し易い利点もあり、in vivoにおける高解像度蛍光温度イメージングの1つの成功例となった。イメージングの際は、蛍光輝度だけではなく、定量性に優れる蛍光寿命による解析も可能であることが明らかになった。

また、細胞の凝集塊を作ることができる特殊なガラスボトムの培養皿を研究協力者から提供を受け、高倍の対物レンズを用いて高解像度での温度イメージングにも成功した。本実験系は、今後、個体でのイメージングの前段階の試験として、有効な手法となり得る。

研究開始当初には想定していなかったが、開発した蛍光色素の誘導体の中に、光音響効果にすぐれる分子を見出した。光音響イメージングは、蛍光による手法と比べ、空間解像度の点で劣るが、組織のより深い場所をイメージングできる点で大きな利点がある。そこで、将来的な光音響イメージングによる温度マップの取得の可能性について、その光音響効果を持つ分子を用いた動物イメージングの実験系を、海外共同研究者と確立した(関連の研究については論文投稿中)。

4.3) 温度変化以外の因子(ATP)との同時イメージングによる熱産生の丸ごと可視化

一連の取り組みにおいては、温度以外の因子を同時に観察することも重要であり、特に、熱産生に際して、ATPが最も重要な分子の1つである。このATPと熱の両面から細胞内のエネルギー状態を議論した。熱産生細胞として、もっとも扱いやすい褐色脂肪細胞をモデルとした(八



ーバード大学 Yu-Hua Tseng からの提供)。この細胞は、取り入れた化学エネルギーを熱に変換する機能をもつ。まず、褐色脂肪細胞をその前駆細胞より分化させ（シンガポール国立大学、ハーバード大学との共同）、細胞質に青色カルシウムセンサー(B-GECO)、緑色 cAMP センサー(Flamindo2)、ミトコンドリアに赤色 ATP センサー(MaLionR)を導入し、イメージング実験を行った。顕微鏡観察中に、アドレナリン受容体を薬剤刺激したところ、cAMP が上昇(Flamindo2 の蛍光強度が減少。Flamindo2 は Turn-off 型)、続いて、ミトコンドリアの ATP 濃度が緩やかに減少した(mitoMaLionR の蛍光強度が減少)。更に、反応の最後、カルシウムイオンの上昇が観察された(B-GECO の蛍光強度の上昇)。褐色脂肪細胞は、受容体の刺激によって活性化された細胞膜上のアデニル酸シクラーゼが cAMP を合成、これが、cAMP 依存性の PKA を活性化する。その後、脂肪酸を遊離、ミトコンドリア膜上の脱共役タンパク質と作用して、ミトコンドリア膜の膜電位の元となるプロトン勾配を解消させ ATP 合成を阻害、最後、ミトコンドリアからカルシウムイオンが流れ出てくること知られており、この一連のカスケードを「丸ごと見る」ことに成功した(本成果は論文発表)。ATP のセンサーと同時に、蛍光温度センサーを組み合わせてイメージングを行うと、ATP 減少と共に、温度上昇が始まることも確認されたことから、確かに、ATP 合成に使われなくなった化学エネルギーの散逸過程と熱産生が同期していることが分かった。

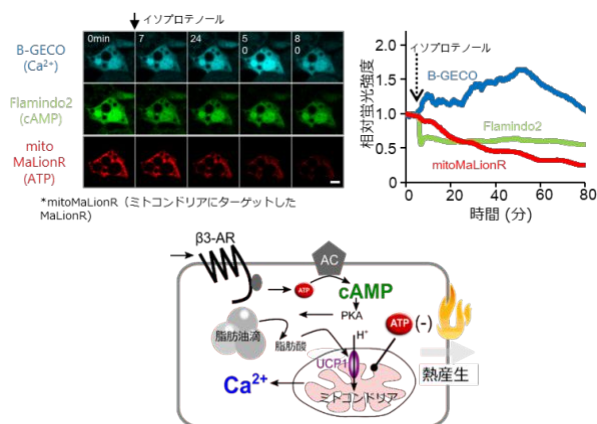


図2 褐色脂肪細胞のシグナル伝達図

4.4) ナノサイズの光熱変換粒子による熱源の作成

様々な光熱変換材料と蛍光温度センサーの組み合わせのスクリーニングを行い、細胞の中に疑似的な熱源を作ること成功した。極小のナノサイズの熱源を、ミトコンドリアと同等のサイズと見立てて、細胞の中に広がる温度分布の大きさ等を解析し、小器官サイズの熱源が存在しうるかどうかを物理化学的な視点で議論した(論文執筆中、及び、特許出願検討中のため、詳細を省く)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

RGB-Color Intensiometric Indicators to Visualize Spatiotemporal Dynamics of ATP in Single Cells, *S. Arai, R. Kriszt, K. Harada, L-S. Looi, S. Matsuda, D. Wongso, S. Suo, S. Ishiura, Y-H. Tseng, M. Raghunath, T. Ito, T. Tsuboi, T. Kitaguchi, **Angew. Chem. Int. Ed.**, vol.57, pp.10873-10878 (2018). doi.org/10.1002/anie.201804304.
 Ferdinandus, *S. Arai, The ABC Guide to Fluorescent Toolsets for the Development of Future Biomaterials, **Front. Bioeng. Biotechnol.** 7:5. (2019) doi: 10.3389/fbioe.2019.00005.

(その他、光音響効果と近赤外温度センサーに関して原著論文2報、査読中)

[学会発表](計5件)

新井敏、北口哲也、RGB カラーの蛍光 ATP センサーが切り拓くエネルギー代謝研究、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、横浜。
 新井敏、細胞機能を自在に制御・改変する技術~ Nano-heater による細胞熱力学エンジニアリング~, BioJapan2017, 2017 年 10 月 11 日、横浜。
 新井敏、細胞機能の自在な制御・改変を可能にするナノ熱源作成技術, ConBio2017, 12 月 9 日、神戸。
 S. Arai, Thermodynamic control of single-cell functions using an organic dye-based nanoheater, 2018. 3, 3D Lab Exchange Symposium, Bonn, Germany.
 【招待講演】Satoshi Arai, An organic dye-based nanoheating system toward medical applications, Smart tools for caring: Nanotechnology meets medical challenges, 2018. 3, Pontedera, Italy.

[図書](計3件)

*S. Arai, T. Kitaguchi, 細胞内 ATP の同時計測を可能にする 3 色の蛍光センサー, バイオサイエンスとインダストリー (B&I), 77 巻 2 号 (2019)
 Satoshi Arai (責任著者), Madoka Suzuki. Nanosized Optical Thermometers, Smart Nanoparticles for Biomedicine (Elsevier), page 199-217 (2018).

新井敏、鈴木団、生物にとって「温度」とは何なのか？細胞 1 個の“アツイ”熱の研究最前線、5月25日、Academist Journal (Web Magazine)

〔産業財産権〕

無し

〔その他〕

本科研費課題の内容を含む研究紹介（アウトリーチ活動）

2016年8月31日 北海道大学の学生に講義（20名）

2016年10月4日 大宮北高校の学生の講義（18名）

2016年12月22日 土佐塾高校の学生に講義（18名）

2017年1月11日 熊本北高校の学生に講義（10名）

2017年3月13日 高知工科大学の学生に講義（21名）

2017年9月27日 早稲田渋谷シンガポール高校で講演（300名）

6．研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

シンガポール A*STAR、リューベック大学、南洋理工大学、大阪大学など。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。