

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02586

研究課題名(和文) 生物・細胞の3次元熱動態イメージング

研究課題名(英文) Three dimensional thermal imaging in vivo for thermobiology

研究代表者

亀井 保博 (Kamei, Yasuhiro)

基礎生物学研究所・超階層生物学センター・RMC教授

研究者番号：70372563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：生命科学で扱いが曖昧な物理量としての「温度(熱)」が、生命にとってどういうものであるかを理解することが本研究の目的である。細胞内にある生体物質の熱伝導率を知ることを通じて、生命がどのように熱を活用あるいは対処しているかを考える。その目的を達成するため、本研究では赤外レーザーを用いて細胞内局所の加熱による摂動を使って熱拡散をイメージング技術で捕捉した。温度計測には、協力者である永井教授(大阪大学)との共同研究で新規温度計測用蛍光タンパク質プローブを開発した。またそれを発現する培養細胞系統を使って加温実験を行い、熱伝導に関して解析により細胞質の熱伝導率を求め論文として公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで基礎生物学分野で手を付けられていなかった温度や熱を議論するための基盤的なデータを収集することのできる計測法がある程度確立できた。今後より詳細に生体物質の熱特性データを集めることで、生物がどのように熱を活用あるいは、温度に対して適応して来たのかを議論できるようになり、生物ならびにその進化をより深く理解できるようになると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand what "temperature (heat)" means to life as a physical quantity that is ambiguous in the life sciences. Through understanding the thermal conductivity of biomaterials in cells, we will consider how life utilizes or adapts to heat. To achieve this goal, we used an infrared laser to capture thermal diffusion through perturbations caused by intracellular local heating using a new imaging technique. For temperature measurement, a novel fluorescent protein probe was developed in collaboration with a collaborator, Prof. Nagai (Osaka University). We also performed heating experiments using a cultured cell line expressing the probe, and obtained the thermal conductivity of the cytoplasm by analyzing heat conduction and published the results in a paper (Lu et al. Nano Letters 2022).

研究分野：基礎生物学

キーワード：温度 熱 イメージング 温度計測 局所加熱

1. 研究開始当初の背景

研究代表者(以降亀井)は、赤外レーザーによる局所加熱で熱ショック応答を誘導することで外来遺伝子を生体内局所で発現誘導する顕微鏡技術(Infrared Laser Evoked Gene Operator: IR-LEGO; Kamei et al. Nat. Methods 2009)を開発している。この論文では、赤外レーザー照射領域の温度上昇を評価するために、緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いたミクロの温度計測方法を初めて開発した。その後、他の研究者も様々な蛍光物質の温度依存的な特性を利用した顕微鏡下のミクロの温度計測技術を報告した。そして、これらミクロの温度計測法の細胞への応用から、「細胞の核が細胞質よりも温度が高い」という現象の報告が複数出てきた。一方で、従来の熱力学理論からは温度差はありえないという反論論文(Baffou et al, Nat Methods 2013)が公表された。亀井も、永井健治博士らと共同研究により、高感度で高速温度イメージングが可能な蛍光タンパク質温度計測プローブ(gTEMP)を開発して細胞核の温度が高いことを自らも確認した。そこで亀井は「核の温度が細胞質よりも高い」ことの生物学的理由、つまり、生命活動に有利な点について考えた。そして、熱ショック応答タンパク質(HSF1)を比較生物学的に生息温度と応答温度と、アミノ酸配列の相関を解析する研究を開始した。このテーマは挑戦的研究(開拓)に採択され、研究を進めた(2017-2022年度)。この研究で、生命の基本システムとして核酸は4種類、タンパク質は20種類を組み合わせているが、生息温度に適應する際に核酸は強い制約を受ける(自由度が小さい)点に気付き、核酸(ゲノム)を扱う場である核は温度が少しでも高いほうが有利なのではないかという仮説に至った。この仮説を裏付けるためにも、核酸(DNA)を格納する「核」が高い温度を維持できる「機構」を解明するためにも、細胞内の熱伝導率をイメージングで解析するアプローチが必要であると考え、高速な熱伝導をイメージングする方法として本課題に着手した。

2. 研究の目的

細胞の核の温度を細胞質よりも高く維持するための機構を解明するために、細胞内生体物質の熱伝導率を算出することが最終的な目標である。そこで、まず、高速で伝播する熱を観測するための温度イメージング法を確立することが本課題の目的である。熱は3次元に拡散するため、(1)自由に局所を温める、つまり熱源を作るために赤外レーザー光の局所照射系、(2)温度計測のための高速応答するレシオメトリック温度プローブの開発、(3)高速3次元レシオメトリック温度イメージング顕微鏡法を確立する、以上3点の技術融合を通じて(4)細胞の熱伝導率と将来的には他の細胞構成要素やオルガネラの熱伝導率の導出が目的となる。

3. 研究の方法

(1) 生体内局所加熱法の転用

従来は生体内遺伝子発現法としてノウハウを蓄積してきたIR-LEGO顕微鏡を転用することで局所加熱が可能である。このシステムを構築する顕微鏡に導入する。

(2) 高速応答レシオメトリック温度プローブの開発

2009年に温度計測に利用したものは緑色蛍光タンパク質(EGFP)であった(図1上段)。これを大腸菌に発現させて微小温度計として、精度が高くないため、より精度の高い温度プローブとして2017に論文発表したgTEMP(図1下段)は、レシオメトリック型のため精度は良く、また、高速応答することが分かったが、蛍光励起が紫外線域であったため、励起光強度が要求される高速撮影では細胞への光毒性が問題となると予想された。そこで、より長波長での励起が可能な温度プローブの開発を行った。既存の蛍光タンパク質の温度と蛍光強度の相関からベストな組み合わせを検討した。

(3) 開発した温度計測プローブに最適な高速イメージング顕微鏡の構築

高速撮像可能なカメラを導入し、さらに、2波長同時イメージングのためにイメージスプリット光学系を導入する。3次元高速タイムラプスのためにはライトシート光学系も検討する。

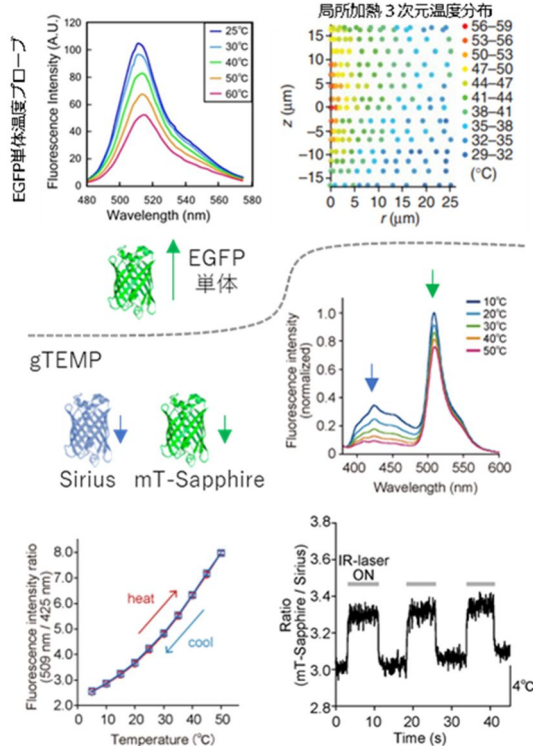


図1 温度計測蛍光タンパク質プローブ

上段: 通常のEGFPの蛍光強度の温度依存性を利用して温度計とした(Kamei et al. Nat. Methods 2009 改変)。下段: レシオメトリックタイプの温度計測蛍光タンパク質プローブ(gTEMP)により赤外レーザー加熱に高速で応答計測可能。一方で、励起は紫外を用いる(Nakano et al. PLoS One 改変)。

(4) 細胞の温度動態実測

(2)の温度プローブを培養細胞やメダカ胚に発現させ、(1)および(3)を融合した顕微鏡システムにて温度動態イメージングを行い、細胞中(細胞質)の熱伝導率を算出する。

4. 研究成果

永井博士らとの共同研究により、新規の青色光(UVよりも長波長のBlue)励起タイプのレシオメトリック温度計測蛍光タンパク質プローブを開発した(B-gTEMPと命名:図2)。この温度プローブの諸性質の検証と、同時に培養細胞に導入した安定発現株を樹立した。培養細胞の局所を加熱(今回はカーボンナノチューブを培養細胞に振りかけて、赤色レーザーにより加熱する方法に変更)し、その熱が細胞内を伝わり、細胞質温度が変化の様子を空間的・時間的に捉えることに成功した。一方で、通常の細胞培養用イメージングに使用するガラスボトムディッシュでは、ガラスの熱伝導率が高く、また、培養液も同様に熱伝導率が高い可能性があったため、熱伝導率の低いプラスチックを利用したフィルムボトムディッシュの利用や、培養液を熱伝導率の低いオイルに置換して観測を行うなど、熱が2次元的に拡散する方法を選択することで、基板あるいは培養液の熱伝導を防ぐことができ、より正確な細胞内の熱伝導動態解析を行い、細胞質の熱伝導率が、純水(Baffouらが用いた)と比較して1/3であることを示した。(Lu et al. Nano Letters 2022)。

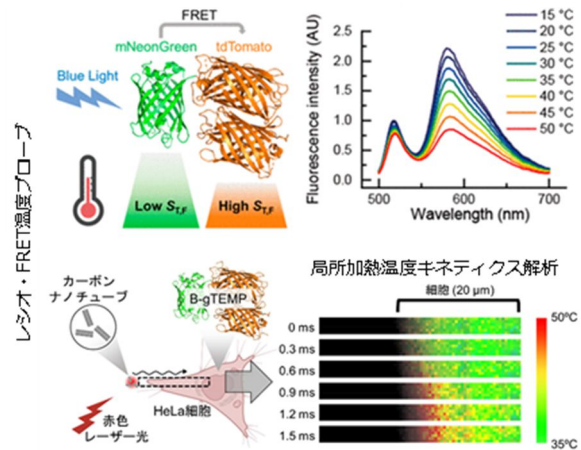


図2 新規温度計測蛍光タンパク質プローブ B-gTEMPと、局所加熱に伴う細胞内熱動態解析
上段: mNeonGreen と tdTomato を融合させ、FRET も含めて高感度・高速温度プローブを開発した。下段: B-gTEMP 発現培養細胞の局所加熱による細胞内温度変化の動態解析 (Lu et al. Nano Letters 2022 より改変)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nakamura T, Sakamoto J, Okabe K, Taniguchi A, Yamada T G, Nonaka S, Kamei Y, Funahashi A, Tominaga M, Hiroi N F	4. 巻 -
2. 論文標題 Temperature elevation was detected in migrating cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optics Continuum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Motoshi Suzuki, Akira Nukazuka, Yasuhiro Kamei, Shunsuke Yuba, Yoichi Oda, Shin Takagi	4. 巻 -
2. 論文標題 Mosaic gene expression analysis of semaphorin-plexin interactions in Caenorhabditis elegans using the IR-LEGO single-cell gene induction system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Kondow Akiko, Ohnuma Kiyoshi, Kamei Yasuhiro, Taniguchi Atsushi, Bise Ryoma, Sato Yoichi, Yamaguchi Hisateru, Nonaka Shigenori, Hashimoto Keiichiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Light sheet microscopy based 3D single cell tracking reveals a correlation between cell cycle and the start of endoderm cell internalization in early zebrafish development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 495 ~ 502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12695	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 -
1. 著者名 Zeng Chih-Wei, Kamei Yasuhiro, Shigenobu Shuji, Sheu Jin-Chuan, Tsai Huai-Jen	4. 巻 11
2. 論文標題 Injury-induced Cav1-expressing cells at lesion rostral side play major roles in spinal cord regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 200304 ~ 200304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.200304	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 該当する

1. 著者名 Lu Kai, Wazawa Tetsuichi, Sakamoto Joe, Vu Cong Quang, Nakano Masahiro, Kamei Yasuhiro, Nagai Takeharu	4. 巻 22
2. 論文標題 Intracellular Heat Transfer and Thermal Property Revealed by Kilohertz Temperature Imaging with a Genetically Encoded Nanothermometer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 5698 ~ 5707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.2c00608	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 -

1. 著者名 Udagawa Sumio, Nagai Akiko, Kikuchi Mani, Omori Akihito, Tajika Atsushi, Saito Mieko, Miura Toru, Irie Naoki, Kamei Yasuhiro, Kondo Mariko	4. 巻 492
2. 論文標題 The pentameric hydrocoel lobes organize adult pentamerous structures in a sea cucumber, <i>Apostichopus japonicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 71 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2022.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takumi Tomoi, Toshiaki Tameshige, Eriko Betsuyaku, Saki Hamada, Joe Sakamoto, Naoyuki Uchida, Keiko U Torii, Kentaro K Shimizu, Yosuke Tamada, Hiroko Urawa, Kiyotaka Okada, Hiroo Fukuda, Kiyoshi Tatematsu, Yasuhiro Kamei, Shigeyuki Betsuyaku	4. 巻 in press
2. 論文標題 Targeted single-cell gene induction by optimizing the dually regulated CRE/loxP system by a newly defined heat-shock promoter and the steroid hormone in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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) 10.3389/fpls.2023.1171531	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4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takumi Tomoi, Joe Sakamoto, Suguru Ohe, Yosuke Tamada, Yasuhiro Kamei
2. 発表標題 Application of infrared laser to living cells for manipulation of gene expression, and in vivo temperature measurement method
3. 学会等名 Optics & Photonics International Congress 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀井保博
2. 発表標題 共同利用による顕微鏡/イメージング技術提供
3. 学会等名 再生学異分野融合研究会（第3回）オンライン（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Kamei
2. 発表標題 An introduction to infrared laser mediated single-cell gene induction method in vivo, and an application of the same system for a new biological field, biothermology.
3. 学会等名 Texas University (Texas Taiwanese Biotechnology Association)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 亀井保博
2. 発表標題 生物・細胞にとっての熱とは何か？生体分子物性と進化的視点から考える
3. 学会等名 アストロバイオロジーセンター（ABC）シンポジウム 2021 太陽系内/外探査の最前線、熱と生命現象（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加藤 輝、小山 宏史（編）、亀井保博、坂本丞、野中茂紀、村田隆、谷口篤史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 達人に訊くバイオ画像取得と定量解析Q&A	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ
<https://www.nibb.ac.jp/lspectro/>
研究室ホームページ
https://www.nibb.ac.jp/lspectro/kamei_lab.html

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
研究 分 担 者	野中 茂紀 (Nonaka Shigenori) (90435529)	大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・准教授 (82675)	

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
---------	---------