

令和 6 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19286

研究課題名（和文）細胞内ナノスペースにおける生体分子の低周波ラマン温度計測

研究課題名（英文）Low Frequency Raman Temperature Measurement of Biomolecules in Intracellular Nanospaces

研究代表者

船津 高志（Funatsu, Takashi）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・教授

研究者番号：00190124

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：細胞が機能を発揮する上で、温度は非常に大きな影響を及ぼす。細胞内には局所温度の分布があるが、現状では、温度計測の空間分解能は光の回折限界の～500 nmに留まっている。本研究では、この限界を打開するため、表面増強ラマン散乱のアンチストークス光とストークス光を高感度で検出することのできるナノメートルサイズの低周波ラマン散乱プローブ（金ナノシェル粒子）を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が機能を発揮する上で、温度は非常に大きな影響を及ぼす。病気になった細胞、例えばガン細胞では温度が上昇している例が知られており、診断や治療という観点からも1細胞や細胞内局所温度を計測することは重要な意義を持っている。しかし、1 μmの小さな領域の温度を高分解能で測定することは困難だった。本研究は、低周波ラマン散乱プローブ（金ナノシェル粒子）を開発し、表面増強ラマン散乱を用いてナノメートル領域の温度を計測する手段を提供する。

研究成果の概要（英文）：Temperature has a very significant impact on the function of cells. Although there is a local temperature distribution in the cell, the spatial resolution of temperature measurement remains at about 500 nm due to the diffraction limit of light. To overcome this limitation, we have developed a nanometer-sized low-frequency Raman scattering probe (gold nano-shell particles) that can detect the anti-Stokes and Stokes light of surface-enhanced Raman scattering with high sensitivity.

研究分野：生物物理学

キーワード：温度生物学 ナノバイオ 表面増強ラマン散乱

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が機能を発揮する上で、温度は非常に大きな影響を及ぼす。酵素反応速度は温度によって大きな影響を受けるほか、温度によってタンパク質の3次構造が影響を受けることが知られている。そのため、細胞が熱ショックにさらされた場合は、ヒートショックタンパク質がタンパク質の変性を防いだり、ストレス顆粒が生成されタンパク質の合成が抑制されたりする。病気になった細胞、例えばガン細胞では温度が上昇している例が知られており、診断や治療という観点からも1細胞や細胞内温度を計測することは重要な意義を持っている。しかし、1~100 μm の小さな領域の温度を1°C以下の高分解能で測定することは困難だった。我々は、温度感受性蛍光ポリマーを合成し、上記の測定を可能にした(Okabe et al., *Nat. Commun.* 3: 705, 2012)。その結果、G1 期では細胞の核が細胞質より0.7°C温度が高いこと、FCCP (4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine) 刺激によりミトコンドリアで熱発生が起こることを Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy により明らかにした。この研究成果により、細胞内の温度分布が世界中の研究者に意識されるようになった。一方、約1°Cの細胞内温度分布は、水の熱伝導率 ($1 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) から予想される値 $10^{-5} \text{ }^\circ\text{C}$ と著しく乖離している(Baffou et al., *Nat. Methos*, 11: 899-901, 2014)。この原因を調べるうちに、細胞内のナノスペースにおける発熱がナノスペースの局所温度上昇を引き起こしていることに気づいた。しかし、現状では、温度計測の空間分解能は光の回折限界の~500 nm に留まっているという問題がある。この限界を打開するため、ナノメートルサイズのラマン散乱プローブを開発し、そのラマン散乱光(アンチストークス光とストークス光)を測定することにより、生体分子の温度を計測する技術を開発することを目指した。挑戦的研究(萌芽)(課題番号:18K19285)において、低周波領域の振動を持つアセトニトリルや dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて、この手法による温度測定が可能であることを示した。そして、10% DMSO を用いて細胞内の温度を計測することに成功した。しかし、ラマン散乱光は極めて微弱であり、細胞内の局所領域の温度を計測することは困難だった。低周波ラマン散乱を高感度化し、ナノスペースでの温度測定を可能にする技術開発が求められていた。

2. 研究の目的

現状では、温度計測の空間分解能は光の回折限界の~500 nm に留まっている。この限界を打開するため、ラマン散乱のアンチストークス光とストークス光を高感度で検出することのできるナノメートルサイズの低周波ラマン散乱プローブを作製し、細胞内のナノスペースの温度計測を可能にすることを目指した。

3. 研究の方法

従来、1細胞レベルで温度を測定することは困難だった。しかし、温度感受性蛍光ポリマーやナノダイヤモンド、GFP などを用いて温度を1°Cの分解能で測定することができるようになった。しかし、これらのプローブは温度以外の化学的な環境要因の変化により蛍光特性が変わる可能性を否定できず、純粋に物理的な手段で温度を測定する方法を開発することが待ち望まれていた。我々は、物理的に温度を測定する手段としてラマン散乱光に注目した。生体分子に光を照射するとラマン散乱光が発生する。アンチストークス光とストークス光の強度比 $R(T)$ は(式1)となる。

$$R(T) = \left(\frac{\nu_0 + \nu_R}{\nu_0 - \nu_R} \right)^4 \exp\left(\frac{-\Delta E_i}{kT}\right) \quad (\text{式1})$$

ここで、 ν_0 と ν_R は入射光の振動数とストークシフトの振動数である。 ΔE_i はi番目の振動エネルギー準位の差である。また、 k と T はボルツマン定数と絶対温度である。 R を測定することにより、分子の絶対温度 T を求めることが可能である。 ν_R を THz の低周波数にすることにより、1°C以下の変化を計測することが可能である。また、生体分子の種類によってラマン散乱光の波長は異なるので、生体分子ごとに温度を測定することができる。10% DMSO を用いて細胞内の温度を計測することに成功したが、この手法の問題点は、ラマン散乱光が非常に微弱なことである。レーザーを回折限界まで集光させてラマン散乱を計測した結果、照射領域に約 10^6 個の分子が必要であると見積られた。この欠点を克服するために表面増強ラマン散乱を利用することにした。

金ナノ粒子にオリゴDNAを結合させ、金イオンを還元成長させることにより、金コアと金シェル間に、約1 nmの中空ギャップを持った金ナノシェル粒子を作製できることが報告されている(Lim et al., *Nat. Commun.* 6: 452, 2011)(図1)。この中空ギャップに低周波ラマン散乱プローブを入れることにより表面増強ラマン散乱が起こると期待した。

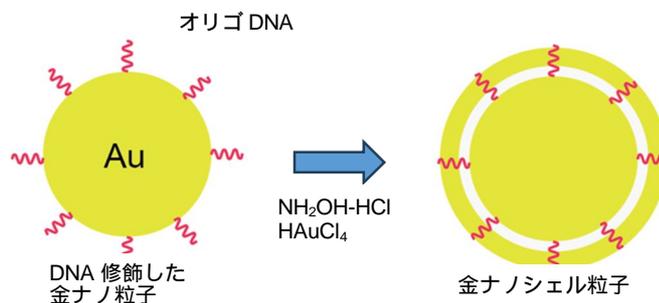


図1 金ナノシェル粒子の合成法

4. 研究成果

中空ギャップに低周波ラマン散乱プローブを入れて表面増強ラマン散乱を起こすため、以下の方法で研究を進めた。

(1) オリゴDNAの調製

アデニン 20mer のオリゴ DNA が金ナノシェル粒子の調製に適している。また、Aminoacetonitrile が低周波ラマン散乱の観察に適している(図2)。そこで、Cy3-A10-Amino-A10-SH を受託合成し、これとAminoacetonitrile を、Disuccinimidyl suberate を用いて化学架橋した。

(2) DNA 標識した金ナノ粒子の調製

前項目で調製したオリゴ DNA を金ナノ粒子(直径 15 nm) にチオールを介して結合させた。金ナノ粒子に結合したオリゴ DNA の量を測定するため、試料溶液に Dithiothreitol を加え、外れたオリゴ DNA の量を Cy3 の蛍光から見積もったところ、金粒子 1 個あたり約 100 分子のオリゴ DNA が結合していた。

(3) 金ナノシェル粒子の調製

DNA 標識した金ナノ粒子に HAuCl_4 と $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ を加え、金イオンを還元成長させて金ナノシェル粒子を調製した。これをカバーガラスに吸着させ、632.8 nm のレーザー(出力 0.3 mW) を照射してラマン散乱を顕微分光した(図3)。

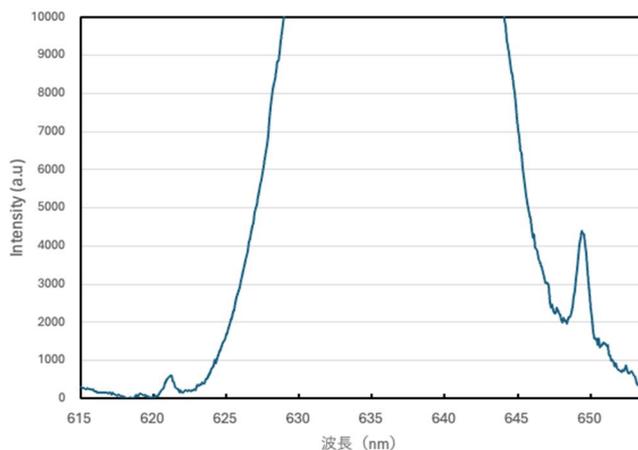


図2 2M Aminoacetonitrile のラマン散乱スペクトル

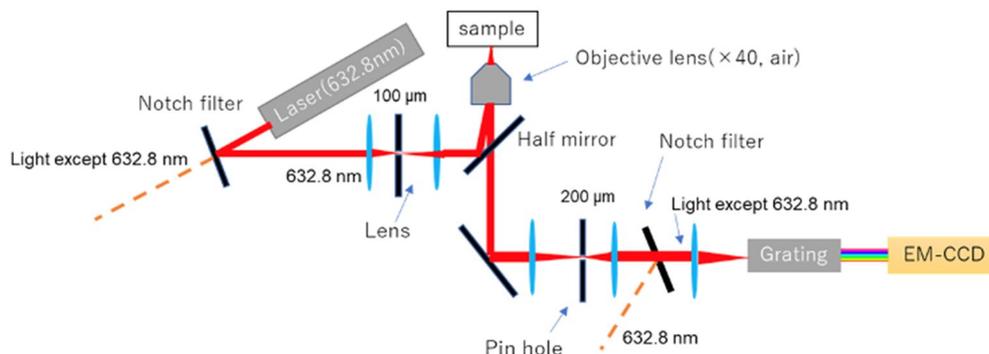


図3 ラマン顕微鏡の光学系

(4) 表面増強ラマン散乱の測定

HAuCl_4 と $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ の濃度を様々に変えてシェルの生成度合いをコントロールしながら表面増強ラマン散乱を観察したところ、シェルが完成する途中で、Aminoacetonitrile に由来する 649 nm のピークが観察された。金のナノギャップによるラマン散乱の増強が見られたが、このピークは再現性に乏しく、シェルが完全に形成されると消滅した。その代わりに、643 nm のピークが再現性よく見られた(図4)。このピークは Cy3-A10-Amino-A10-SH の場合だけでなく、Cy3-A20-SH, A20-SH, T20-SH (チミン 20mer) などのオリゴ DNA を用いて調製した金ナノシェル粒子に共通して見られ、ナノギャップに特定のラマンプローブを閉じ込めなくても図1の方法で作製した金ナノシェル粒子自体が低周波ラマン散乱プローブとして機能することが分かった。

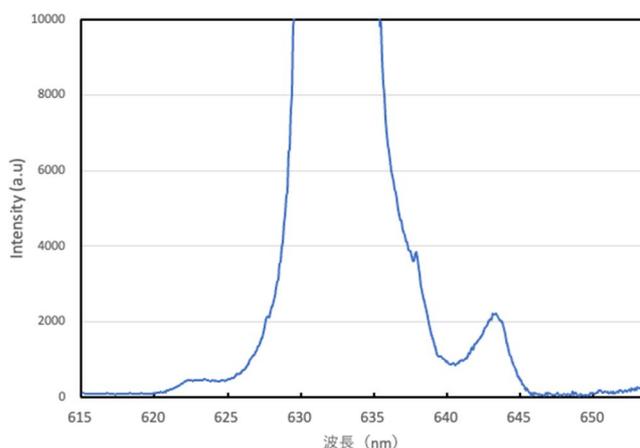


図4 A20 で作製した金ナノシェル粒子のラマン散乱スペクトル

このピークは DNA または Au-S に由来すると考えられ、どの化学結合の振動を反映しているか、今後明らかにする必要がある。また、金ナノシェル粒子は 632.8 nm の光を吸収するため、785 nm のレーザーに変更することが望ましい。この改善を行った後に、金ナノシェル粒子の温度プローブとしての性能を評価したい。また、金ナノシェル粒子の表面にチオール基を持つ分子を結合させることができるので、特定の細胞小器官に局在化させ、局所温度を測定したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寶田雅治、岡部弘基、船津高志
2. 発表標題 細胞内高速マッピングが細胞内の非伝導性の熱散逸の存在を明らかにする
3. 学会等名 量子生命科学会第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤佑、村上光、岡部弘基、船津高志
2. 発表標題 Measuring the heat flux of intracellular reactions using differential scanning calorimetry
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神谷奈央子、岡部弘基、船津高志
2. 発表標題 真核細胞における翻訳活性変化の温度シグナリング機構の解明
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寶田雅治、岡部弘基、船津高志
2. 発表標題 High-speed Intracellular Temperature Mapping Reveals the Existence of Non-Conductive Heat Dissipation within Cells
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木陽也、村上光、船津高志、岡部弘基
2. 発表標題 Identifying species-dependent mechanisms of temperature adaptation at the cellular level
3. 学会等名 日本生物物理学会第61回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 船津高志
2. 発表標題 赤外レーザーの生命科学への応用
3. 学会等名 Biothermology Workshop 2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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