

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870817

研究課題名(和文)細胞小器官の熱産生ダイナミクスを可視化するケミカルプローブの創製

研究課題名(英文)Development of molecular fluorescent probes to visualize the dynamics of heat production at subcellular level

研究代表者

新井 敏 (ARAI, SATOSHI)

早稲田大学・重点領域研究機構・シンガポールシニア研究員

研究者番号：70454056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトや鳥などの恒温動物にとって熱産生プロセスは、生命活動を維持するために極めて重要である。しかしながら、現在まで、サーモグラフィや熱電対温度計を用いた動物個体レベルの研究が中心であり、細胞や小器官レベルで熱産生がどのように生じているのか、そのダイナミクスの理解はほとんど進んでいない。本提案では、熱産生に関わる小器官として知られるERやミトコンドリアへターゲットできる低分子の化学プローブ型蛍光温度センサー(オルガネラ蛍光温度計)を開発した。これを用いて、熱産生が起きる細胞小器官の「その場で」の温度測定、及び蛍光温度マップの取得が可能になった。

研究成果の概要(英文)：Thermogenesis is fundamentally important for endothermic animals to maintain various cellular activities in the living system. Up to date, the studies at animal level using an infrared thermography and a thermocouple thermometer has been mainly focused, however, the dynamics of thermogenesis at cellular or subcellular level still remains elusive. Herein, we first developed small molecule fluorescent thermosensors capable of sensing temperature as the change in fluorescence. What we stress as an advantage of our concept here is that they can target to endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria as organelles to generate heat. By its virtue of this target ability, they allow the temperature measurement at nearly-zero distance from the heat source. Using these dyes, we succeeded to visualize temperature in a single cell.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光温度計 蛍光色素 イメージング スクリーニング 熱産生 褐色脂肪細胞 骨格筋細胞

1. 研究開始当初の背景

生命システムは、食物をアミノ酸やグルコース等に分解することで化学エネルギーを獲得し、エネルギーの通貨といわれる ATP に変換、これを燃料として細胞内の生物学的な仕事に消費している。一方、使われなかった余剰のエネルギーは細胞熱として放出される。生体の熱産生を計測する従来技術として、熱電対を用いる手法や赤外線を用いたサーモグラフィがある。しかしながら、前者の手法は1細胞に熱電対を複数導入することが困難なことから空間情報を取得するのは適しておらず、また、現在のサーモグラフィの感度では、細胞レベルの画像情報を得ることはできない(10ミクロン程度の解像度)。

近年、これらの問題を克服するために、温度変化を蛍光強度や蛍光寿命、波長などの蛍光シグナルの変化としてとらえる蛍光プローブが注目されている。温度変化によって波長が変化する半導体粒子 Q-dot (Yang et al. ACS Nano 2011)、温度によって相転移するポリマーを用いたナノゲル粒子 (Uchiyama et al. Nat. Commun. 2012)、温度変化に対して蛍光強度が変化する色素をポリマーに封入したナノ粒子などがある (Wolfbeis et al. Adv. Mater. 2010)。これらのプローブの開発によって、細胞内の微小な温度変化を捉えることが可能になりつつあるが、生物分野に普及するには至っていない。その要因として、1) 細胞内へプローブを導入する際にマイクロインジェクション等の煩わしい作業が必要、2) ねらった細胞小器官の内部へ蛍光温度計を配置することが困難、3) 蛍光寿命測定やスペクトルの分解ができる必ずしも汎用性の高く無い顕微鏡システムが必要、などが挙げられる。

最近、Kiyonaka らによって、遺伝子コード型の先駆的な蛍光温度センサーが報告された (Nat. Methods, 2013)。この手法の利点は、細胞内のねらった小器官にターゲット化が自在にできる点で、生物学分野での相性が良く、今までの蛍光温度センサーの中では最も普及する可能性の高い手法の一つである。しかしながら、プローブを効率よく生体試料に導入するためには、ウイルスによる煩瑣な作業が必要であり、初代培養細胞や将来的な動物個体、組織への導入には、未だ高いハードルがある。

2. 研究の目的

本提案では、標的の細胞小器官での温度変化の情報を蛍光強度の変化として変換でき

る低分子の化学プローブ型の蛍光温度計(以下、オルガネラ蛍光温度計と略称)を開発することを目的とした。低分子の化学プローブは膜透過性に優れ、ターゲットとする核、細胞質、リソソーム、ER、ミトコンドリア等の小器官への集積を可能にする。特に、ER やミトコンドリアは、過去の動物個体を用いた先行研究により、細胞内のナノサイズの熱源として機能している可能性が示唆されている。研究初期は、重点的にこの2つの小器官へ集積するプローブを探索することを目指した。更に、研究後半では、得られたプローブ群を様々な細胞へ応用し、細胞内の熱産生を惹起する刺激を加えた際の温度変化のダイナミクスを可視化することを目指した。

3. 研究の方法

(1) オルガネラ蛍光温度計の探索

標的とする細胞小器官特異性を有する低分子のオルガネラ蛍光温度計を探索した。蛍光色素ライブラリーを96ウェルプレートに置き、マイクロプレートリーダーで昇降温を繰り返して、温度に応答して蛍光強度が変化する色素を探索した。色素ライブラリーには、申請者自身が今までに合成してきたポルフィリン、ローダミン誘導体に加え、研究協力者からの提供を受けることで研究を効率よく進めた(約1500化合物)。温度に対して、可逆的に応答した蛍光色素に関して、集積する細胞小器官ごとに、色素を分類した。

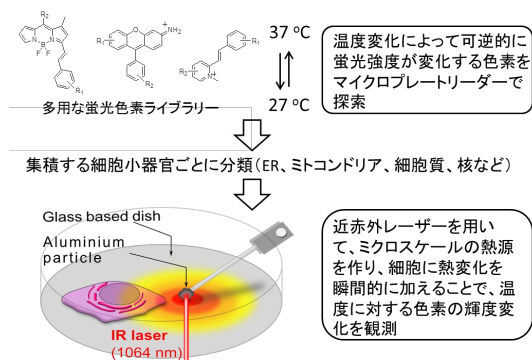


図1 近赤外レーザーを用いた色素の温度感受性評価

次に、各小器官に集まる色素に関して、細胞内での温度に対する感受性を評価した。細胞は NIH3T3 を用いた。細胞に温度変化を加える手法として、近赤外レーザー(1064 nm)を導入した(図1)。縦軸に相対蛍光強度変化、横軸に温度変化をプロットし、得られた傾き(%/)を温度感受性の指標として定義した。また、より正確なバリデーションを行うために、固定化細胞を用いて、温度感受

性の値も算出した。

(2) 1細胞レベルでの熱産生可視化実験

得られたオルガネラ蛍光温度計を用いて、細胞の熱産生の可視化実験を行った。申請者らの従来の粒子タイプの蛍光温度計による知見により、温度に対する蛍光温度計の感受性が2(%/°C)以上あれば、細胞内での熱産生の観測は可能であることが分かっていたことから、2(%/°C)以上の値を示す色素を選択した。細胞は HeLa を用いた。具体的には、ER へのターゲット能を持つ蛍光温度計 (ER thermo yellow)、また、ミトコンドリアへターゲット能をもつ蛍光温度計 (Mito thermo yellow) を用いた。また、がん細胞以外にも、筋肉の細胞、肝臓の細胞、褐色脂肪細胞などにも応用し、温度感受性の評価や熱産生イメージングの実験を行った。

4. 研究成果

(1) 見出されたオルガネラ蛍光温度計

研究方法に示したスクリーニング手法により、温度変化を可逆的に蛍光強度変化に変換できる、オルガネラ蛍光温度計を見出すことに成功した (ER、ミトコンドリア、核の3つ)。特に、ER 指向性を有するオルガネラ蛍光温度計 (ER thermo yellow) は、1度の温度変化に対して、細胞内にて 4.0% 近くの蛍光強度変化を示した (図2)。この値は、細

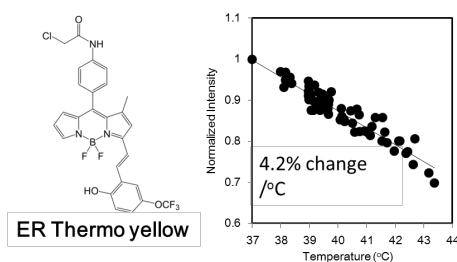


図2 ER 指向性の蛍光温度計

胞内の水中条件下で、単一の蛍光分子として働く温度計の中で、世界最高値である。また、この値は、様々な異なる生細胞 (褐色脂肪、HeLa、C2C12、Chang) においても、ほとんど同じ値を示した。更に、固定化した細胞と生細胞の間でも、感受性の値に差はなかった。従来報告されている蛍光温度計は、生細胞内では、その感受性の値が議論されてこなかった。しかし、生細胞に外部からの温度変化を加えて蛍光強度を観測する際、その細胞が温度に対して抵抗する、あるいは、細胞内の活動に著しく変化がある場合、蛍光温度計の機能に影響を与える可能性を否定できず、

その機能の指標となる検量線 (横軸温度、縦軸蛍光シグナル変化) の正確性には疑問が残ることになる。今回、固定化細胞を用いて、検量線を作成し、生細胞内で得られた検量線とほとんど差がないことを示せたことは、蛍光温度センサーの開発分野における学術的な意味が大きい成果と言える。

温度に対する感受性の値は、ER thermo yellow を超えることは出来なかったが、ミトコンドリア (2.7 %/°C) と核 (3 %/°C) に指向性をもつ、オルガネラ蛍光温度計を見出した。それぞれ、ER thermo yellow と同様、細胞内にて、可逆的に温度変化を捉えることに成功した。

(2) 1細胞レベルの蛍光温度イメージング

近年、マイクロカロリーメトリーを用いた実験により、ER の Ca^{2+} ATPase が細胞内の熱源になっていることが明らかになっている (Carvalho et al. Biosci. Rep. 2005)。そこで、細胞内のカルシウム濃度を強制的に上昇させるイオノマイシンを用いて、それに伴う ER 内部での熱産生の可視化を試みた。細胞は HeLa 細胞を選び、これを ER thermo yellow と、カルシウム指示薬 (Fluo4) で染色した。染色した細胞を、共焦点蛍光顕微鏡を用いて、タイムラプスイメージングを行った (5秒/フレーム)。途中、イオノマイシンで細胞を刺激したところ、これに対応してカルシウム濃度の一過的な上昇が観測された (図3上段)。これに数10秒遅れて、ER thermo yellow の蛍光強度が6%ほど減少した後 (1.6に相当)、数分後には、元の蛍光強度値に戻った (図3下段)。これは、急激な細胞質内のカルシウムの上昇によって、ER 膜上の SERCA ポンプが空回りすることで、まず、余剰の ATP が生じ、これが加水分解して熱源となり、カルシウム上昇から遅れて ER の温

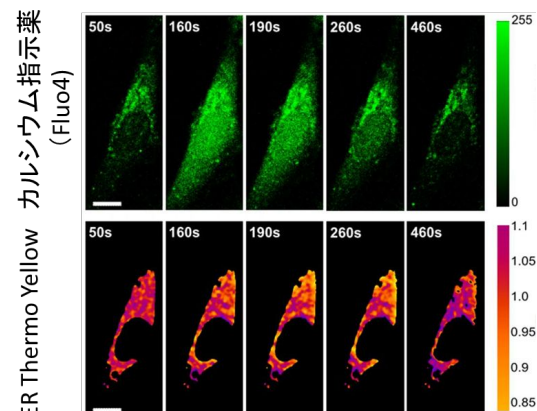


図3 イオノマイシンによる熱産生 (HeLa 細胞)

度上昇を引き起こしたものと考察している。熱産生の始まりから終わりまでのダイナミクスを1細胞レベルで捉えた世界初の報告事例である(マイナビニュースに掲載)。

研究後半では、この ER thermo yellow を用いて、褐色脂肪細胞や筋肉の細胞の熱産生の可視化も成功し、次の研究へ発展的につながる結果を得ることが出来た。続いて、ミトコンドリアヘターゲットできる蛍光温度計(Mito thermo yellow)を用いて、蛍光温度イメージングを試みた。HeLa 細胞にふりかけると10分程度で十分な蛍光強度が得られた。続いて、ミトコンドリアでの熱産生を誘起させるために、FCCPなどの脱共役剤を加えて、タイムラプスイメージングを行った。結果、ミトコンドリアの脱共役に伴い、膜電位が解消することで、蛍光プローブがミトコンドリア内部から漏れ出し、これにより、熱産生(蛍光強度の減少に相当)と区別することができなかった。

また、前述の図1の手法に従って、近赤外レーザーを用いて、様々な細胞の中での検量線を描き、Mito thermo yellow の温度感受性を算出した。結果、HeLa、C2C12、mESC、Chang、NIH3T3 では、2.7 %/ 程度のほぼ同じ値を示したのに対し、褐色脂肪細胞では、2.0 %/ と低い値であった。これは、熱産生細胞である褐色脂肪細胞のミトコンドリア内部の化学的な環境(温度以外にもpH、粘度、活性酸素濃度など)が、他の細胞と異なるものによるものと考察している。

更に、がん細胞を用いて、スフェロイダル形状の Multi-cellular な細胞塊を作り、固形ガンのモデルとした。これを Mito thermo yellow で染色したところ、10分程度の短時間で効率よく、染めることができた。この細胞塊を、外からの近赤外レーザーにより細胞を加熱し、蛍光温度イメージングを行ったところ、同じ凝集塊の中で、ある細胞は42以上に上昇した一方、40以下の部分も存在した。暫く加熱を続けると、42以上の細胞は、細胞の形が大きく変形していったのに対し、40以下の細胞はそのままの形状であった。

現在、がん治療の第4の手法として、温熱療法が臨床でも導入されている。今回得られた結果は、加温に細胞レベルでムラがあると、がん細胞を十分に殺しきれずに取り残してしまう可能性があることを示唆する重要な知見である。

以上、ERとミトコンドリアにターゲットできるオルガネラ蛍光温度計の成果である。現在、その他の小器官についても、蛍光温度計

が得られており、応用展開を進めている。

近年、脂肪燃焼等のメカニズムについての研究分野において、熱産生がどのように生体の恒常性に寄与しているか解明が進んでいる(Periasamy et al. Nat. Med. 2012, Kahn et al. Nat. Commun. 2012など)。しかしながら、細胞の局所レベルでの熱産生については十分に理解が進んでいるとは言えない状況である。本研究で行った、従来の技術では困難である、細胞小器官内部の熱産生ダイナミクスを計測するという試み事体が、今までにない独創的な研究と言える。更に、本申請の蛍光プローブは温度によって輝度が変化するタイプのため、特殊な顕微鏡を必要とせず、遺伝子工学的な手法と比較して様々な細胞への導入が簡便であり、当該分野の研究を大きく加速させる学術的に重要なツールの開発につながるものである。

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1件)

1. A Molecular Fluorescent Probe for Targeted Visualization of Temperature at the Endoplasmic reticulum, S. Arai, S-C. Lee, Z. Duanting, M. Suzuki, Y-T. Chang, Sci. Rep. 4, 6701 (2014). doi:10.1038/srep06701 査読有。

[学会発表](計2件)

1. (口頭発表) S. Arai, M. Suzuki, Y-T. Chang, Fluorescent Probes for Targeted Visualization of Temperature at Organelles in single living cells, Asian Chemical Biology Conference 3, 2014.12, Singapore.
2. (招待講演) S. Arai, Fluorescent Sensors to Visualize Energy Status at the Microscopic Level, International Union of Materials Research Society (IUMRS) International Conference in Asia, 2014.8, Fukuoka (IUMRS-ICA2014若手奨励賞受賞).

6. 研究組織

(1)研究代表者

新井 敏 (ARAI SATOSHI)

早稲田大学・重点領域研究機構・シンガポールシニア研究員

研究者番号: 70454056

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者
無し