

生細胞内部の温度分布を画像化できる 蛍光試薬

チームリーダー 内山 聖一（東京大学大学院薬学系研究科・助教）

Keyword 温度、細胞、蛍光、イメージング

タイプ 要素技術タイプ

開発課題名 細胞内温度計測用プローブの開発

■参画機関：奈良先端科学技術大学院大学

■開発期間：平成22～25年度

課題概要

細胞内で起こるさまざまな生命現象を温度の視点から詳細に解明するため、高い温度分解能と空間分解能を備えた細胞内温度計測用蛍光プローブを開発する。また、簡便で誰にでも使用可能な細胞内温度計測技術の確立を目指し、これらの分解能を備え、さらに培地から細胞質への移行能、各細胞内小器官への移行能を付加したプローブを開発する。

得られた開発成果の概要

■開発の背景／経緯

生きた細胞の複雑な機能は、細胞温度と密接な関係にあると考えられている。細胞の温度は、細胞の内部で起こるさまざまな化学反応に由来する生命現象に影響を及ぼす。実際に、がん細胞などの病態細胞は、正常細胞と比較して高温であることが指摘されており、医学分野においても細胞の温度計測に興味が持たれている。しかしながら細胞のサイズは数～数十 μm と非常に小さいため、熱電対やサーモグラフィーといった既存の温度計測技術を利用することが困難だった。

本開発チームは、2009年に細胞1個を測定可能な温度計測用蛍光プローブを開発してきた。しかしながら、この蛍光プローブは細胞内部で互いに集まって凝集体を形成してしまい、細胞内部の小器官や、より小さな領域の温度や温度の分布を測定することはできなかった。

今回新たに、細胞内で凝集しづらい温度計測用蛍光プローブを開発することで、温度測定の空間分解能を劇的に向上させることに成功した。さらに、蛍光の強度ではなく、その寿命を測定することで、プローブの濃度や照射光強度といった測定条件の影響を受けにくくし、生きた細胞内部の温度分布の計測を実現した。

■開発の成果

はじめに、細胞内に広く分散しうる温度計測用蛍光プローブ（図1）を合成した。本蛍光プローブは、温度変化を感知するユニット、細胞内での凝集を防ぐユニット、蛍光シグナルを発するユニットで構成され、水溶液中にて温度依存的な蛍光寿命を示す（28℃にて4.6 ns、40℃にて7.6 ns）。この蛍光プローブは温度の変化に敏感で、0.18℃ものわずかな温度差を検出可能である。また、本プローブの温度検出性能は、pH、イオン強度など、細胞内部で局所的に大きく変化する要因には影響を受けない。次に、合成したこのプローブを、先端径が0.7 μm のガラス製針を通してCOS7細胞（アフリカミドリザル腎臓由来）に導入し、蛍光寿命イメージング顕微鏡を用いて蛍光寿命像を取得した。その結果、細胞核や中心体が細胞質と比較して温かいこと（図2）、ミトコンドリアの近くで局所的に温度が上昇していること（図3）などを鮮明にとらえることに成功した。同様の細胞内温度分布は、HeLa細胞（ヒト子宮頸がん由来）を使用した実験においても観測された。

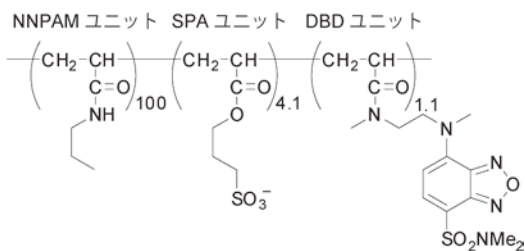


図1 細胞内温度分布計測を可能にする蛍光プローブ

本蛍光プローブは、温度変化を感知するNNPAMユニット、細胞内での凝集を防ぐSPAユニット、蛍光シグナルを発するDBDユニットで構成され、平均分子量は約19,300である。

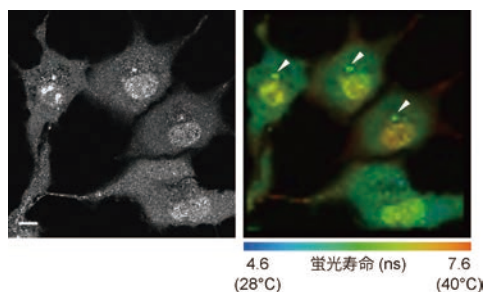


図2 生細胞内の温度分布計測（細胞全体）

蛍光プローブを導入したCOS7細胞（4個）の蛍光像（左）および蛍光寿命像（右）。蛍光寿命像では、蛍光寿命の長い（温度が高い）ところを赤く、短い（温度が低い）ところを青く示している。この蛍光寿命像より、

細胞核（細胞内の丸円部分）の温度が細胞のほかの部分（細胞質）に比べて高いことがわかる。62個の細胞に対してデータ解析を行ったところ、これらの細胞において細胞核と細胞質の平均温度差は0.96℃だった。また同様に、中心体（矢頭で示す）も細胞質より平均0.75℃高温であることが明らかとなった（細胞35個に対する解析より）。なお、蛍光像内の白線は10 μmを表している。

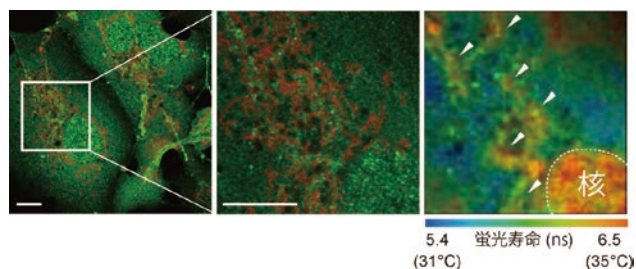


図3 生細胞内の温度分布計測（ミトコンドリア付近）

蛍光プローブを導入したCOS7細胞の蛍光像（左および中）および蛍光寿命像（右）。右2つの画像は蛍光像（左）内の四角内に対応する拡大像。また、蛍光像（左および中）において温度計測用蛍光プローブは緑色、ミトコンドリアは赤色で示している。蛍光寿命像より、ミトコンドリアの近くで局所的に熱が発生している様子が確認できる（矢頭で示す）。なお、蛍光像内の白線は10 μmを表す。

細胞の温度を測る

今回開発した細胞内の温度分布計測法は、どのような種類の細胞にも応用可能である。本成果は、さまざまな細胞の機能や病態化のメカニズムを、細胞内の局所的な温度とその分布から解明する可能性をもたらした。これは、従来の生物学や医学では考慮することができなかった観点であり、本成果が、生物学や医学分野における研究の発展に寄与するものと期待される。すでに、アメリカ、イギリスを始めとする世界各国の

さまざまな分野の研究者から今回開発した温度計測用蛍光プローブの提供を要請されており、日本発の新技术が世界中の研究者によって広く利用されることが期待される。現在、開発チームは、この蛍光プローブにさらなる改良を行うことによって、より正確で、かつ針を通して細胞内へ注入する操作を必要としない簡便な細胞内温度分布計測法の確立を目指している。

上記成果の科学技術的根拠

【発表論文等】

1. Kohki Okabe, Noriko Inada, Chie Gota, Yoshie Harada, Takashi Funatsu, Seiichi Uchiyama, "Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy" Nature Communications, 3, 705 (2012).
2. 内山聖一、郷田千恵、大和田智彦、特願2008-533148、「蛍光性分子温度計」