総説

蛍光性センサータンパク質による細胞内温度分布の可視化

清中茂樹^{1,2}, 坂口怜子³, 森 泰生^{1,2}¹京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻²京都大学大学院地球環境学堂³京都大学物質-細胞統合システム拠点

Thermoregulation to conserve body temperature is vital to life in all animals. Multiple mechanisms localized in subcellular organelles have been proposed for thermogenesis. However, direct observation of thermogenesis in intact organelles has not been achieved yet. Recently, we developed genetically-encoded thermosensors 'tsGFPs'. In tsGFPs, a tandem formation of coiled-coil structures of the *Salmonella* thermosensing protein, TlpA, transmits conformational changes to the inserted GFP to convert temperature changes into visible and quantifiable fluorescence changes. In mammalian cells, specific targeting of tsGFPs visualized thermogenesis in discrete organelles, notably mitochondria in brown adipocytes and the endoplasmic reticulum in myotubes.

Thermosensor / coiled-coil / GFP / TlpA

1. はじめに

動物や鳥類をはじめとする内温性動物（恒温動物）には、外気温の変化によらず体内を一定温度に保つ仕組みが備わっている。このためには、外環境に応じて体内の熱産生を制御する分子機構が必須であり、その解明が生体恒常性の理解において不可欠である。生体内の熱産生に関しては、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアからの熱産生など、異なる複数の機構が提唱されている。しかし、各々の機構がどれだけ熱産生に寄与しているか、あるいはどのように制御されているかは未解決である。これは、細胞内の温度計測方法が知られていなかったため、酸素消費などといった間接的な評価方法で熱産生が評価されてきたことが原因となっており、細胞における熱産生を定量的に評価可能なセンサーの開発が急務であった。

2. 合成分子型温度センサー

一般的な温度センサーとしては、赤外線サーモグラフィが挙げられる。この手法は汎用的であるが、空間分解能が 10 μm 程度と低く、測定対象の表面温度しか評価できないため、細胞内や体深部の温度計測には応用できない。そのような状況のもと、蛍光性温度セ

ンサーが着目されつつある。蛍光性高分子や量子ドットを用いた温度センサーが着目され、細胞内への導入について評価されてきた¹⁾⁻³⁾。代表例としては、アクリルアミドを骨格とした合成高分子の温度に依存した凝集特性と環境応答性蛍光色素の蛍光特性を利用した温度センサー¹⁾が挙げられ、ごく最近、細胞内温度計測が報告された⁴⁾。アクリルアミド型高分子の分散時と凝集時においては、高分子に連結させた環境応答性蛍光色素の蛍光寿命が異なり、蛍光寿命顕微鏡を用いて細胞内温度分布を評価したところ、細胞質に比べて核内の温度が高いことが可視化できている。温度分解能という観点では、ごく最近、窒素不純物を含むナノダイヤモンドを用いた温度センサーが報告された⁵⁾。この方法は温度分解能が非常に高く、1.8 mK（ケルビン）程度の細胞内温度変化を検出できる。以上のように、細胞内温度の可視化は可能となりつつある。しかし、上記合成分子を用いた方法だと、エレクトロポレーション等の侵襲的な手法で温度を感知するセンサーを細胞内に直接的に導入する必要がある。また、センサーを細胞内の狙ったオルガネラにターゲットすることはできない。細胞内の熱産生はオルガネラ単位の局所で起こると考えられており、熱産生機構を明らかにするためには、熱産生が起こっている場である細胞内オルガネラ単位で温度計測を行うことが必要である。

Visualization of Intracellular Temperature Distribution Using A Thermoresponsive Fluorescent Protein

Shigeki KIYONAKA^{1,2}, Reiko SAKAGUCHI³ and Yasuo MORI^{1,2}¹Department of Synthetic Chemistry & Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University²Department of Technology and Ecology, Hall of Global Environmental Studies, Kyoto University³World Premier International Research Initiative-Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University

3. 遺伝子工学的な温度センサータンパク質tsGFP⁶⁾

上記の研究グループと並行して、我々は温度センサーの開発を進めていた。温度センサーの非侵襲的な導入および細胞内オルガネラの標的が可能になるという理由から、遺伝子工学的な手法を用いることとした。遺伝子工学的なセンサーを作製する際には、温度を感知して可逆的に構造変化を起こすモジュールが必須となるが、サルモネラ菌に存在する温度依存的な転写制御タンパク質である TlpA に着目した⁷⁾。TlpA の coiled-coil 領域は、生体温度 (37°C) 付近で可逆的な構造変化を起こすことが知られる。そこで、GFP の N 末端および C 末端に TlpA の coiled-coil 領域を融合させた温度センサータンパク質 (thermosensor GFP, tsGFP) を設計した (図 1a)。TlpA の coiled-coil 領域はその遷移温度前後で二量体化と単量体化が遷移する。tsGFP においては、低温 (遷移温度以下) では coiled-coil 形成 (二量体形成) により GFP 側の構造が安定化される。一方、遷移温度以上では coiled-coil が解消され、その摂動が GFP 側にも伝搬され、蛍光団近傍の構造の乱れに伴った蛍光変化が起こることを我々は期待した (図 1b)。実際に、大腸菌で発現・精製して得られた tsGFP1 は、緩衝液中において温度に依存したシグモイダルな蛍光変化を示し、その遷移温度は 37.6°C であった (図 1c)。また、coiled-coil の構造を変えることで感知温度を調節可能である。長い coiled-coil 長を有する tsGFP2 の遷移温度は、tsGFP1 より高温の 42.3°C であった。また、温度に依存した蛍光変化は可逆的に起こり、細胞内を模倣した溶液環境においても同様の

蛍光変化を示したことから、tsGFP は細胞内温度センサーへと十分に展開できると考えられた。

4. tsGFP1 による細胞内温度変化の可視化

細胞内における tsGFP 温度センサーの機能評価は、まず生体温度付近の遷移温度を有する tsGFP1 を HeLa 細胞に発現させることにより行った。その際には、オルガネラ移行シグナル配列を tsGFP1 の N 末端あるいは C 末端に修飾することで、細胞膜、小胞体、細胞質、ミトコンドリアなど複数のオルガネラに tsGFP1 をターゲットし、各オルガネラの温度を計測した。tsGFP1 は、細胞内においても、緩衝液の場合と同様に温度に依存したシグモイダルな蛍光変化を示した。興味深いことに、細胞外液の温度を変えた際に、各オルガネラにターゲットさせた tsGFP1 が感知する温度領域が異なった。この結果は、HeLa 細胞のオルガネラ間において温度分布が存在することを示唆しているのかもしれない。

次に外部刺激による温度変化の計測を行った。その際には、ミトコンドリア脱共役剤投与によるミトコンドリア膜電位の解消時に起こると報告されている熱産生に着目した⁸⁾。ミトコンドリアにターゲットできる温度センサー tsGFP1-mito を HeLa 細胞に発現させて、脱共役剤 (CCCP) 投与による蛍光変化を評価した (図 2a)。CCCP 投与時に温度上昇を示す蛍光変化が起こったが、ロテノン処置によりミトコンドリアの膜電位形成をあらかじめ阻害した場合には、同様の蛍光変化は起こらなかったことから、ミトコンドリア膜電位解消に伴う熱産生を可視化できたと言える。一方、細胞質に発現する tsGFP1 を発現させて同様に CCCP を投与したが、有意な蛍光変化は確認できなかった。細胞内で発生する温度を計測するためには、熱産生が起こるまさにその場にセンサーをターゲットする必要性を示した結果と言える。

我々の研究と並行して、GFP 単体の温度に依存した微弱な蛍光偏光の変化を細胞内温度変化の可視化に応用した研究が報告された^{9), 10)}。しかし、我々が TlpA を有していない GFP-mito を用いて蛍光観察した際には、CCCP 投与による有意な蛍光変化を確認できていない。すなわち、外部刺激による微弱な温度変化を蛍光変化として観測するためには、GFP 単体ではセンサーとしての感度が不十分であり、coiled-coil を融合して温度に対する蛍光変化の感受性を高めた tsGFP 型温度センサーが有用性である。

tsGFP1-mito の HeLa 細胞内における蛍光レシオ (温度) 分布に関して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に解析したところ、同一のミトコンドリア内においても、蛍光レシオ値が異なることがわかった (図 2b)。

図 1 a) tsGFP 温度センサーの分子デザイン。b) tsGFP の温度変化に伴った構造変化の模式図。c) 温度に依存した tsGFP の蛍光励起スペクトルおよび蛍光レシオ変化。蛍光波長: 510 nm。

図 2

a) tsGFP1-mito を発現させた HeLa 細胞において CCCP を投与した際の蛍光レシオ変化。b) tsGFP1-mito を発現させた HeLa 細胞の共焦点顕微鏡観察結果。

この結果は、通常の培養状態において、ミトコンドリアの温度分布に不均一性が存在することを示唆する。また、ミトコンドリアの温度分布は膜電位や ATP 濃度と相関があり、温度分布が ATP 合成と関連していることも示された。ミトコンドリアに関しては、膜電位などの不均一性がすでに報告されているが、その生理的意義はわかっていない¹¹⁾。今回の発見は、ミトコンドリアの細胞内局在性の生理的意義解明および分子メカニズム解明にも繋がると考えている。

5. tsGFP1 による細胞内熱産生の可視化

tsGFP1 を用いることで外部刺激による細胞内温度変化の計測に成功したので、次に生理的に起こると言われている熱産生を検証した。動物の熱産生においては、骨格筋の振動によって引き起こされる**震え熱産生**と、それを伴わない**非震え熱産生**が知られる。主な非震え熱産生源として、褐色脂肪組織が挙げられる¹²⁾。褐色脂肪細胞は、げっ歯類や幼児期にしか存在しないと考えられてきたが、最近の PET 診断により、成人においてもその存在が確認されており、代謝の観点からも注目される細胞である¹³⁾。従来、褐色脂肪細胞からの熱産生に関しては、酸素消費量計測などの実験手法で間接的に評価されており、熱産生を細胞レベルで直接的に評価した例はない。そこで、寒冷曝露したラットから褐色脂肪細胞を単離し、アデノウィルスを用いて tsGFP1-mito を褐色脂肪細胞に発現させて、温度変化観察を行った (図 3a)。褐色脂肪細胞からの熱産生機構に関しては、ミトコンドリア内膜に発現して

図 3

a) tsGFP1-mito を発現させた褐色脂肪細胞の共焦点顕微鏡観察結果。b) tsGFP1-mito を発現させた褐色脂肪細胞にノルアドレナリンを加えた際の蛍光レシオ変化。

いる uncoupling protein 1 (UCP1) がミトコンドリア膜電位を解消することで熱産生を起こすと考えられている¹⁴⁾。そこで、tsGFP1-mito を発現させた褐色脂肪細胞にミトコンドリア脱共役剤 (CCCP) を処置したところ、熱産生に対応する蛍光変化を確認できた。また、UCP1 は β アドレナリン受容体の下流で産生する脂肪酸により活性化すると知られている¹⁵⁾ ので、ノルアドレナリンを投与したところ、褐色脂肪細胞からの熱産生を確認できた (図 3b)。これは、褐色脂肪細胞内のミトコンドリアから熱産生が行われていることを直接的に示した初めての例である。

非震え熱産生に関しては、褐色脂肪細胞に加えて骨格筋の関与も報告されている¹⁶⁾。そのメカニズムは褐色脂肪細胞とは異なり、小胞体に発現する Ca^{2+} ポンプ (Ca^{2+} -ATPase, SERCA) による、 Ca^{2+} ポンプ活性とは共役しない ATP 加水分解 (uncoupled ATPase 活性) に基づくと報告されている¹⁷⁾。しかし、この熱産生機構に関しては、骨格筋から精製した膜画分を用いた試験管内実験からしか評価されておらず、骨格筋から実際に熱産生が行われているかどうかについては、論争の的になっている^{18), 19)}。そこで、我々は小胞体に発現する温度センサー tsGFP1-ER をマウス筋芽細胞 C2C12 に遺伝子導入し、C2C12 細胞を筋管細胞へと分化させて熱産生を評価した。分化させた筋管細胞に対して Ca^{2+} -ATPase に対する可逆的な阻害剤である CPA を投与したところ、小胞体の温度が下がったことを示す蛍光変化を示し、その細胞から阻害剤を除いたところ、小胞体の温度は阻害剤投与前と同様の値を

図 4

a) tsGFP1-ER を発現させた筋管細胞に Ca^{2+} -ATPase 阻害剤 (CPA) を投与した際の蛍光レシオ変化。b) C2C12 細胞から筋管細胞への分化誘導に伴う SERCA1 の発現量変化。

示した (図 4a)。一方、分化させていない C2C12 細胞に CPA を投与してもこのような温度変化は確認できなかった。Western blotting で SERCA の発現量を確認したところ、高い uncoupled ATPase 活性を示すことが知られる SERCA1 が分化後のみに発現していたことから (図 4b)、SERCA1 が骨格筋での熱産生に寄与していると考えられる。すなわち、tsGFP1-ER を用いることで、論争的になっていた骨格筋小胞体からの熱産生の直接的な可視化に成功した。

6. おわりに

我々は、非侵襲的に細胞内局所の温度変化を可視化できる温度センサーを開発し、細胞内小器官における温度分布、および細胞内熱産生の可視化に成功した。これらの熱産生経路が生体内の熱産生にどれくらい寄与するかを定量すること、細胞内温度の絶対値を算出することが、今後の大きな課題である。以上、本研究を通じて開発した tsGFP 温度センサーは、未開拓な研究領域である温度生物学研究において有用な研究ツールになると期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、サルモネラ菌由来のプラスミドをご分与頂きました北里大学 岡田信彦先生、褐色脂肪細胞の単離・培養をご教授頂きました滋賀医科大学 尾松万里子先生をはじめとした共同研究者の皆様にこの場を借りてお礼を申し上げます。

文 献

- Gota, C. *et al.* (2009) *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2766-2767. DOI: 10.1021/ja807714j.
- Yang, J.-M. *et al.* (2007) *ACS Nano*. **5**, 5067-5071. DOI: 10.1021/

- nn201142f.
- Oyama, K. *et al.* (2012) *Lab Chip* **12**, 1591-1593. DOI: 10.1039/c2lc00014h.
- Okabe, K. *et al.* (2012) *Nat. Commun.* **3**, 705. DOI: 10.1038/ncomms1714.
- Kucsko, G. *et al.* (2013) *Nature* **500**, 54-58. DOI: 10.1038/nature12373.
- Kiyonaka, S. *et al.* (2013) *Nat. Methods* **10**, 1232-1238. DOI: 10.1038/nmeth.2690.Hu.
- Hurme, R. *et al.* (1997) *Cell* **90**, 55-64. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80313-X.
- Paulik, M. A. *et al.* (1998) *Pharm. Res.* **15**, 944-949. DOI: 10.1023/A:1011993019385.
- Donner, J. S. *et al.* (2012) *Nano Lett.* **12**, 2107-2111. DOI: 10.1021/nl300389y.
- Donner, J. S. *et al.* (2013) *ACS Nano* **7**, 8666-8672. DOI: 10.1021/nn403659n.
- Kuznetsov, A. V. *et al.* (2009) *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1911-1929. DOI: 10.3390/ijms10041911.
- Cannon, B., Nedergaard, J. (2004) *Physiol. Rev.* **84**, 277-359. DOI: 10.1152/physrev.00015.2003.
- van Marken Lichtenbelt, W. D. *et al.* (2009) *N. Engl. J. Med.* **360**, 1500-1508. DOI: 10.1056/NEJMoa0808718.
- Enerbäck, S. *et al.* (2001) *Nature* **387**, 90-94. DOI: 10.1038/387090a0.
- Matthias, A. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 25073-25081. DOI: 10.1074/jbc.M000547200.
- Arruda, A. P. *et al.* (2008) *Endocrinology* **149**, 6262-6271. DOI: 10.1210/en.2008-0564.
- de Meis, L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 25078-25087. DOI: 10.1074/jbc.M103318200.
- Cannon, B., Nedergaard, J. (2011) *J. Exp. Biol.* **214**, 242-253. DOI: 10.1242/jeb.050989.
- Bal, N. C. *et al.* (2012) *Nat. Med.* **18**, 1575-1579. DOI: 10.1038/nm.2897.

<p>清中茂樹 (きよなか しげき)</p> <p>京都大学大学院地球環境学学准教授、大学院工学研究科准教授 (両任)</p> <p>九州大学大学院大学府修了、博士 (工学)。京都大学工学研究科助教を経て、2011 年から現職。</p> <p>研究内容: ケミカルバイオロジー</p> <p>連絡先: 〒 615-8510 京都市西京区京都大学桂</p> <p>E-mail: kiyonaka@sbchem.kyoto-u.ac.jp</p>	<p>坂口怜子 (さかくち れいこ)</p> <p>京都大学物質・細胞統合システム拠点 (iCeMS) 特定拠点助教</p> <p>京都大学エネルギー科学研究科修了、博士 (エネルギー科学)。トーマスジェファーソン大学を経て、2013 年から現職。</p> <p>研究内容: 生体関連化学</p> <p>連絡先: 同上</p> <p>E-mail: rsakaguchi@icems.kyoto-u.ac.jp</p>
<p>森 泰生 (もり やすお)</p> <p>京都大学大学院地球環境学学教授、大学院工学研究科教授 (両任)</p> <p>京都大学大学院医学研究科修了、博士 (医学)。シンシナティ大学、生理学研究所を経て、2003 年から現職。</p> <p>研究内容: 分子生理学</p> <p>連絡先: 同上</p> <p>E-mail: mori@sbchem.kyoto-u.ac.jp</p> <p>URL: http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/mori-lab/</p>	