酵母の細胞内温度を測る 細胞への移行能をもつ蛍光ナノ温度計の開発

酵母は、パンやアルコールの製造にかかわる食品産業で古くより活用されており、近年ではバイオエタノール生産などの地球温暖化対策にも欠かせない存在である。酵母を産業利用する場合には、用いる酵母の「活性」をあらかじめ把握しておくことが重要である。当然、酵母の活性は、発酵や物質生産の成否を握る重要な因子の一つであり、高品質の製品を安定して造っていくためには、高い活性を示す酵母を用いる必要がある。たとえば、ビール醸造においては、酵母は発酵終了後にタンク底（下面発酵酵母）または発酵液上面（上面発酵酵母）から回収され、再び次の発酵に用いられる。回収した酵母の活性は、ビール品質に大きな影響を与えることがわかっており、酵母活性の評価技術に関しては、コロニー形成能の評価（cfu）、細胞内還元力⁽¹⁾、あるいは細胞内pH⁽²⁾といったいくつかの手法が頻繁に用いられている。しかしながら、その活性評価技術に関して万能な技術はなく、醸造技術の多様化に従い、測定感度や測定方法の観点から新たな指標となりうる活性評価技術が求められている。

ごく最近、細胞周期による細胞内の温度変化や、ミトコンドリアからの発熱⁽³⁾など、哺乳類細胞において細胞内温度と細胞の機能との関連性が見いだされ始めており、同じ真核生物である酵母細胞でも細胞の機能と細胞内温度に関係があるのではないかと考えられた。特に、「発酵熱」という言葉が表すように、酵母は発酵の際に多量の熱を発生しているので、新たな酵母活性評価技術の確立を目指して、細胞内の温度に着目するのは自然な流れである。実際、Rigouletらが、カロリメトリー法により発酵効率と酵母細胞からの発熱量に相関があることを見いだしている⁽⁴⁾ので、細胞内の温度変化を感度良く、簡便に測定することができれば、酵母細胞に対する新たな活性評価技術になる可能性は高いと考えられた。酵母集団の詳細な活性評価をするためには、カロリメトリー法による集団の測定ではなく、酵母細胞一つひとつの状態を測定できることが求められているため、近年、注目を集めている高分子蛍光温度プローブを用いた細胞内温度測定法⁽³⁾に着目し、これを酵母に対して応用することを目指した。昨年、酵母細胞一つひとつの細胞内温度を簡便に測定できる新たな方法を開発したので、ここに紹介する⁽⁵⁾。

高分子蛍光温度プローブを含む蛍光温度センサーは、高い空間分解能をもつことから、細胞内の温度を測定する有力な手法として注目されている。生細胞用の蛍光温度センサーとして最近報告されているものに量子ドット⁽⁶⁾、ユーロピウム錯体⁽⁷⁾やGFP⁽⁸⁾を用いたものがあるが、高分子蛍光温度プローブは、これらの蛍光温度センサーと比較して3つの優れた特徴を有している。1つ目は、温度に応答して蛍光強度が上昇するため、感度良く発熱現象を捉えられることである（ほかのセンサーは一般的に温度上昇に伴い蛍光強度が低下する）。2つ目は、30℃から40℃の間で蛍光強度が約5倍も変化する高い応答性である。そして最後に温度以外の因子（pH、イオン濃度、タンパク質など）に対する応答が少ないことである。

高分子蛍光温度プローブの酵母細胞への応用において取り組むべき課題となったのが、細胞への導入法であった。今までの高分子蛍光温度プローブは、マイクロインジェクション法による細胞への導入を前提としているため、細胞サイズが小さく、硬い細胞壁に囲まれた酵母細胞にそのまま適用することはできなかった。そこで、細胞と混ぜただけでプローブを細胞内に導入できるように、感温性ユニットと蛍光性ユニットの組み合わせを基礎とした高分子蛍光温度プローブに、新たにカチオン性ユニットを挿入した（図1A）。カチオン性ユニットを適切な比率で組み込むことにより、10分という短時間で自発的に細胞内に移行する性質を付与することができた（図1B）。このプローブ周囲に温度変化が生じると、感温性ユニットであるNNPAMユニットあるいはNIPAMユニットが構造変化を起こし、環境応答性（疎水性環境中で蛍光強度が高くなる）の蛍光色素であるDBD-AAユニットが蛍光強度を変化させる（図1C）。カチオン性ユニットを挿入した蛍光温度プローブの一つであるNN-AP2.5は、酵母細胞の中で20℃から35℃の温度変化に対して約2倍の蛍光強度変化が認められた（図1D）。また、温度依存的なパラメーターであることが示されている⁽⁹⁾蛍光寿命の測定を行ったところ、20℃から35℃の温度領域で蛍光寿命も伸長し、区別可能な最小温度（温度分解能）は最大で0.09℃という高い感度を示した。なお、プローブの感温性ユニットの半分をNNPAMから

図1 ■ 酵母細胞と混ぜるだけで導入可能な細胞内温度測定用の高分子蛍光プローブ

(A) 細胞内に自発的に移行するプローブの構造 (NN-AP2.5)。各ユニットが、一つの高分子鎖の中でランダムな順番でつながっている。(B) 酵母細胞に導入された NN-AP2.5。細胞内での蛍光が観察された。バーは 2 μ m を表す。(C) 高分子蛍光プローブが温度に応答して蛍光強度を変化させるメカニズム。(D) 酵母細胞内での NN-AP2.5 の温度変化に対する蛍光強度の変化。15°C = 1 としている。

NIPAMに変化させると5°C程度高温領域で蛍光強度が上昇するようになることも確認しており⁽⁵⁾、測定したい温度領域に合わせたプローブを選択することができる。

今回の温度測定は、あくまでも細胞懸濁液全体の温度を変化させた場合に生じる酵母細胞内の温度変化を捉えたものにすぎない。今後は、発酵中の酵母細胞内の温度変化を調査し、仮説でもあった「細胞内の温度変化と細胞の発酵活動（活性）」に相関があるかどうかを検証していく必要がある。一つひとつの細胞の温度を測定することで、活性が高い細胞の特徴、あるいは酵母の活性が低下するメカニズム推定にも利用できるのではないかと期待している。また、開発したプローブに関しては、酵母細胞のみならず、浮遊細胞・接着細胞のどちらのタイプの哺乳類細胞にも利用可能なことが確認されている⁽⁵⁾。哺乳類細胞においても、特殊な装置と高い技術が必要とされるマイクロインジェクション法を使用せずに簡便に細胞内の温度を測定できるようになったことは、今後の発展研究に大きく貢献するだろう。たとえば、発熱量が多いとされている細胞には、筋肉細胞、褐色脂肪細胞、がん細胞など農芸化学分野で扱われているような細胞も多くある。細胞内温度の変化という視点から農芸化学の新たな研究が発展することを期待している。

- 1) M. Sami, M. Ikeda & S. Yabuuchi: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 212 (1994).
- 2) T. Imai & T. Ohno: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3604 (1995).
- 3) K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu & S. Uchiyama: *Nat. Commun.*, **3**, 705 (2012).
- 4) L. Dejean, B. Beauvoit, O. Bunoust, C. Fleury, B. Guérin & M. Rigoulet: *Biochim. Biophys. Acta*, **1503**, 329 (2001).
- 5) T. Tsuji, S. Yoshida, A. Yoshida & S. Uchiyama: *Anal. Chem.*, **85**, 9815 (2013).
- 6) M. J. Yang, H. Yang & L. Lin: *ACS Nano*, **5**, 5067 (2011).
- 7) K. Oyama, M. Takabayashi, Y. Takei, S. Arai, S. Takeoka, S. Ishiwata & M. Suzuki: *Lab Chip*, **12**, 1591 (2012).
- 8) S. J. Donner, A. S. Thompson, P. M. Kreuzer, G. Baffou & R. Quidant: *Nano Lett.*, **12**, 2107 (2012).
- 9) C. Gota, S. Uchiyama, T. Yoshihira, S. Tobita & T. Ohwada: *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2829 (2008).

(辻 俊一, キリン株式会社 R&D本部 基盤技術研究所)

プロフィール

辻 俊一 (Toshikazu TSUJI)

<略歴> 2006年東京大学工学部化学生命工学科卒業/2008年東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻修士課程修了/同年キリンビール(株)入社 キリンホールディングス(株)フロンティア技術研究所配属/2013年キリン(株)R&D本部基盤技術研究所<研究テーマと抱負>細胞内温度測定技術の応用<趣味>卓球, お酒を飲むこと, 料理