新規蛍光プローブと蛍光寿命イメージング顕微鏡を用いた細胞内温度計測イメージング

稲田のりこ¹, 岡部弘基², 林 晃之¹, 内山聖一²

¹ 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物グローバル教育プロジェクト
〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

² 東京大学大学院薬学系研究科 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

要旨：温度は細胞にとって最も重要な物理量であり、細胞が示す多様な機能と密接な関係にある。しかしながらこれまで、細胞内の局所的な温度変化を正確に測定する手法は報告されていなかった。筆者らは、細胞に導入した新規蛍光温度プローブの蛍光寿命をイメージング解析することによって、生きている細胞内の局所的な温度分布を可視化する手法を確立し、細胞内に1℃近くの温度差があることを世界で初めて明らかにした (Okabe et al. 2012)。本稿ではその手法、特に蛍光寿命イメージング顕微鏡システムの原理と特徴について詳しく解説する。尚、本稿で紹介する細胞内温度イメージングの解析は、全て動物培養細胞を用いて行われたものであるが、植物細胞への応用も現在課題として取り組んでおり、それを含めた現在の取り組みについても紹介したい。

Intracellular Temperature Imaging with a Fluorescent Polymeric Thermometer and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Noriko Inada¹, Kohki Okabe², Teruyuki Hayashi¹, Seiichi Uchiyama²

¹ Plant Global Education Project, Grad. Schl. of Biol. Sci., Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama-cho, Ikoma-shi, Nara, 630-0192 Japan

² Grad. Schl. of Pharmaceutical Sci., Univ. of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan

Author for correspondence: N. Inada, norikoi@bs.naist.jp

Summary: Cellular functions are fundamentally regulated by intracellular temperature. However, the method to analyze intracellular temperature had been completely lacked. We have developed a novel method to visualize temperature distribution inside living cells using a novel fluorescent thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. Here, we describe the detail of this intracellular temperature imaging method, particularly about the fluorescence lifetime imaging microscopy. We also discuss the results obtained from the intracellular temperature imaging and briefly introduce our current efforts in aim to have this method easily available to other researchers and to introduce a new point of view – temperature – into the biological research.

Key words: Imaging, Temperature, Fluorescent thermometer, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

はじめに

生物にとって温度は重要な物理量である。私たち恒温動物にとっては、体温は健康のバロメーターであるし、植物にとっては環境温度が発生の様々な過程を誘導する引き金となる。私たちの健康状態や植物の発生などの生物現象は、生物の基本単位である細胞の機能に、更に細胞の機能は無数の生化学的反応に還元される。個々の生化学的反応は熱収支を伴っており、発散された熱とそれによる局所的な温度の変動は、遺伝子発現やタンパク質の安定性、酵素へのリガンド結合能や活性に影響を与える (Somero 1995)。つまり、体温の計測によって健康状態を知ることができるように、細胞内の温度変化を計測することによって細胞の機能や状態に関する多くの知見を得ることができると思われる。

生きている細胞の温度変化を計測するには、高い温度選択性・空間分解能・温度応答性を有し、細胞を健康な状態に保ったまま温度を計測できる温度計が必要である。温度選択性については、温度以外の細胞内変動要因—pH・イオン強度・タンパク質濃度など—による影響が最小限に抑えられていることが、精度の高い温度計測の条件として求められる。また空間分解

能については、顕微レベルの細胞サイズ (数μm—数十μm) に対応できることが必要である。温度応答性について、具体的な必要条件是測定対象や用途によって異なるが、例えば恒温動物ではその体温の変動領域である35℃から40℃の温度変化を大きな応答の変化率で示すことができる温度計が望ましい。

細胞内の温度を測る手段として現在注目されているのが、蛍光プローブを使った方法である。高い空間分解能を持つ蛍光プローブは、言うまでもなくイメージング解析に欠かせないツールであり、微小空間内の温度計測ツールとしても高い注目を集めている (Brites et al. 2012, Jaque and Vetrone 2012)。生細胞内の温度計測例としては、温度上昇に伴う量子ドット (Yang et al. 2011)・ユーロピウム錯体 (Oyama et al. 2012) の蛍光強度の低下を指標に用いた例、GFPの蛍光偏向性の低下を指標に用いた例 (Donner et al. 2012) がごく最近報告された。しかし量子ドットおよびユーロピウム錯体は、細胞自身による細胞外物質の取り込み能を利用して細胞内への導入が行われているため、細胞内での局在は小胞内部に限定され、多くの生化学的反応の場である細胞質の温度は測定できない。GFPは空間分解能や使いやすさの点では非常に優れているものの、

20℃から60℃の間での異方性の変化率がおよそ1.2倍と温度応答性の点で問題が残る。

蛍光プローブによる生細胞内温度測定のためとて、内山らは2009年に高分子ポリマーを基本構造に持つナノゲル状蛍光温度プローブを用いた測定例を報告した(Gota et al. 2009)。この蛍光温度プローブによる温度測定の詳しい機構は次の項で説明するが、上述の量子ドットやユーロピウム錯体、GFPを含む蛍光プローブが一般的に温度上昇に伴う蛍光強度の低下を示すのに対して、内山らの蛍光温度プローブは反対に蛍光強度が上昇するという特徴を示す。また、pH・イオン強度・タンパク質濃度変化による影響が殆ど見られない高い温度選択性、30℃から40℃の間での蛍光強度の変化がおよそ5倍という高い温度応答性を有している。

一方このナノゲル状蛍光温度プローブは、ポリマーが収縮していないときの直径がおよそ250 nm、収縮したときで50 nmとプローブとしてのサイズが比較的大きく、細胞内では高温で自己凝集するため、温度変化を検出できる最小単位(空間分解能)が細胞1個(およそ50 μm)に限られていた。そこで私たちは細胞内の局所的な温度変化を検出する系の確立を目標とし、まず新しい蛍光温度プローブの開発から研究をスタートさせた。

細胞内の温度分布を測定する蛍光温度プローブ

今回用いた蛍光温度プローブは図1Aに示すように、温度応答性ユニット・イオン性ユニット・蛍光性ユニットの3つのユニットから成る平均分子量19300の高分子ポリマー状蛍光プローブである。温度応答性ユニットpoly-*N*-propylacrylamide (NNPAM)は、水溶液が低温の際は伸長した柔軟な構造を取るが、水溶液の温度上昇に伴い小さく丸まった構造へと変化する。蛍光性ユニットであるDBD-AA (*N*-{2-[(7-*N*,*N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl]}(methyl)amino}ethyl-*N*-methylacrylamide)は、周囲に水が存在すると蛍光強度が低下し、周囲の水が排除されると蛍光強度が上昇するという特徴を持つ。この蛍光性ユニットDBD-AAを温度応答性ユニットNNPAMに組み込むことにより、温度応答性ユニッ

トの温度依存的な構造変化を蛍光強度の変化という形で検出することが可能となる(図1B; Uchiyama et al. 2003)。更にイオン性ユニットの付与により、イオン強度の高い細胞内でも沈殿することなく機能する(Gota et al. 2009)。

このポリマー状蛍光温度プローブは励起スペクトルのピークが450 nm、蛍光スペクトルのピークが560 nmという蛍光特性を持ち(図1C)、水溶液中では20℃から50℃にかけておよそ5倍の蛍光強度変化を示す(図1C, D)。またその温度応答性は細胞内で生じると考えられるイオン強度・pH・タンパク質濃度変化の影響を殆ど受けないことが確認された。以上のことから本ポリマー状蛍光温度プローブの高い温度選択性および温度応答性が確かめられた。更にこのポリマー状蛍光温度プローブをマイクロインジェクション法によりサル腎臓由来の培養細胞COS-7に導入したところ、細胞核を含む細胞全体に分布し、培地を高温にしても自己凝集を起こさないことがわかった。以上のことから本蛍光温度プローブが細胞内温度測定に必要な3つの条件—温度選択性・空間分解能・温度応答性—を兼ね備えていることが示された。

ポリマー状蛍光温度プローブの細胞内への導入によって直ちに明らかになったのが、プローブの蛍光強度が細胞内で不均一であること、特に細胞核において蛍光強度の上昇が見られることであった。しかしながら蛍光強度は蛍光物質の濃度にも大きな影響を受けるパラメーターであり、この観察結果が本プローブの細胞核特異的な蓄積を意味する可能性は排除できない。このため本蛍光温度プローブを用いた細胞内温度の計測には、蛍光物質の濃度に依存しない、蛍光強度変化以外のパラメーターを使用する解析手法が必要とされた。

蛍光物質の濃度による影響を受けない蛍光特性変化の解析法としては、レシオ解析と蛍光寿命解析の2種類の方法が知られている。レシオ解析は、環境の変化に伴う励起スペクトルや蛍光スペクトルの変化を2つの波長の蛍光強度の比により解析するもので、通常の蛍光顕微鏡で解析が可能な汎用性と利便性を有している。しかし全ての蛍光物質が環境変化によって大きくスペクトルを変化させる訳ではなく、その利用は一部

図1. ポリマー状蛍光温度プローブの構造と蛍光特性。A. ポリマー状蛍光温度プローブは、温度応答性ユニット・イオン性ユニット・蛍光性ユニットの3つのユニットからなる。B. 温度によるポリマー状蛍光温度プローブの構造変化とそれによる蛍光強度変化の模式図。C. 本蛍光温度プローブの励起(破線)・蛍光スペクトル(実線)。D. 本蛍光温度プローブ水溶液の温度と蛍光強度との関係を示したグラフ。ここでは励起456 nm, 564 nmの蛍光を測定した。

のレゾ解析用蛍光プローブに限られる。一方蛍光寿命解析は、蛍光物質が励起状態にとどまる時間の長さを計測するものであり、時間の長さという絶対量を用いるため定量的な解析に大きな威力を発揮する。しかしながらそのイメージング解析には特殊な（そして高価な）機器を必要とするため、国内での導入台数も少なく、広く利用されるには至っていない。

奈良先端大には、ライカ社の共焦点レーザー走査型顕微鏡TCS-SP5にBecker&Hickl社の蛍光寿命イメージング解析システムSPC830が連結した蛍光寿命イメージング顕微鏡（Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM）が導入されており（図2A）、筆頭著者である稲田はその運用に携わっている。また、本ポリマー状蛍光温度プローブと基本構造を同じくする蛍光寿命プローブで、温度上昇に伴う蛍光寿命の延長が明らかにされていた（Gota et al. 2008）ことから、本プローブによる細胞内温度イメージングにはFLIMを用いることにした。

蛍光寿命イメージング顕微鏡

FLIMの細胞内温度イメージングへの適用について話を進める前に、まずFLIMの特徴、原理について説明したい。前項からの繰り返しになるが、蛍光寿命とは、蛍光物質が励起された後、蛍光を発して基底状態に戻るまでの励起状態にとどまっている時間の長さのことであり（Berezin and Achilefu 2010）、例えば蛍光タンパク質GFPでは2.5〜3ナノ秒程度である。蛍光寿命の長さは蛍光物質が置かれている環境に依存して変化するため、蛍光寿命を画像化することにより、微小空間の環境変化を解析することができる（図2B, C）。どのような環境変化によって蛍光寿命が変化するかは、その蛍光物質がどの

ような環境要因に影響をうけやすいかによって異なる。

生物学におけるFLIMの応用例として最も一般的なのが、タンパク質の相互作用を可視化するFRET（Fluorescence Resonance Energy Transfer, 蛍光共鳴エネルギー移行）解析である（Wallrabe and Periasamy 2005）。FRETでは、2つの目的タンパク質に蛍光波長がオーバーラップする2つの蛍光物質をそれぞれ結合させ、波長の短いほうの蛍光物質（ドナー）から長いほうの蛍光物質（アクセプター）への共鳴エネルギー移行により目的タンパク質の相互作用を解析する。共鳴エネルギー移行の結果、ドナー蛍光物質の蛍光寿命が短くなることから、ドナー蛍光物質の蛍光をFLIMで解析することによって、目的タンパク質の細胞内局所的な相互作用を明らかにすることができる。蛍光強度をパラメーターとして用いるFRET解析と異なり、FRET-FLIMではアクセプター蛍光物質との蛍光スペクトルの重なりを補正する必要がなく、また細胞内という限られた空間で蛍光物質を過剰発現させた際に起きる偽FRET（ドナー蛍光の再吸収によりアクセプター蛍光物質が励起される現象）による影響がないことから、より正確にFRET解析を行うことができる。植物細胞でも多数の報告があり（e.g., Taoka et al. 2011）、FLIMをFRET解析の一手法としてのみ認識されている方も多いかと思う。

しかしながらFLIMは、上述のように蛍光物質の濃度による影響を受けないという特徴、それからもう一つ、同じ蛍光波長内に存在する複数の成分を別々に解析することができるという他の顕微鏡システムにはない特徴を持っている。これらの特徴は現在ますます必要性が高まっているイメージングの定量解析に大きな威力を発揮するものであり、まだ一般的ではないもの

図2. 蛍光寿命イメージング顕微鏡 (FLIM). A. 奈良先端大のFLIMシステム. B. 時間相関単一光子計測法による蛍光寿命の測定法. パルスレーザーによる励起後の蛍光光子数が初期値の1/eまで減衰したときの時間の長さがその蛍光物質の蛍光寿命 (τ) であると定義されている. C. FLIMでは、共焦点レーザー顕微鏡によって取得された画像のそれぞれのピクセルについて蛍光寿命を求め、その蛍光寿命の長短を擬似カラーで示すことによって細胞内の蛍光寿命分布図を得る. 図はタマネギ表皮細胞で一過的に発現させた蛍光タンパク質TFP1の蛍光像 (左) と蛍光寿命イメージング像 (右). ここでは短い蛍光寿命を赤、長い蛍光寿命を青で擬似カラー化してある. このFLIM像から細胞内でTFP1がほぼ均一に2.5ナノ秒程度であることがわかる.

のFRET以外の多くの解析に応用できる可能性を持っている。

例えば蛍光物質の濃度依存性が低いという特徴を活用する例としては、蛍光pHセンサーであるBCECFによる細胞内pH変化の定量解析が挙げられる。通常BCECFによる細胞内pHの定量解析には、pHに応じたBCECFの励起スペクトルの変化を利用し、2つの異なる励起波長で励起された蛍光強度の比を求めるレシオ解析が行われている(e.g., Matsuoka et al. 1997)。しかし、取り込まれる蛍光色素の量が細胞ごとに大きく異なる植物組織のような試料では、励起光の出力条件や検出器の感度などの画像取得条件を一定にして定量比較解析を行うことが非常に困難である。一方FLIM解析においては蛍光光子数を十分数集めることが重要であり(内山ら, 2012)、そのための画像取得条件を均一にする必要はない。BCECFではアルカリ性にシフトするにつれ蛍光寿命が延長することが知られているが(Hille et al. 2008, 稲田, 未発表)、蛍光物質における蛍光寿命の延長と蛍光強度の上昇はほぼ対応していることから、BCECFに限らず市販の多くの環境応答型蛍光プローブについてFLIMの適応が可能であると考えられる。

同じスペクトル内に含まれる複数成分の同時解析の例としては、筆頭著者が直接携わった単細胞緑藻クラミドモナスにおける光化学系アンテナ複合体構造変化のライブイメージング解析例を紹介する(Iwai et al. 2010)。この論文では、生細胞のクロロフィル自家蛍光をFLIMで解析する方法を確立し、クロロフィル自家蛍光に含まれる複数の蛍光寿命成分が*in vivo*における光化学系アンテナタンパク質の異なる状態をそれぞれ示していることに着目して、光条件の変化に伴う光化学系複合体の構造変化を解析した。クラミドモナス変異体のタイムラプスFLIM解析、精製した光化学系複合体溶液のFLIM解析の結果、クロロフィル自家蛍光に含まれる170ピコ秒の成分が光化学系II反応中心とアンテナタンパク質との超複合体に、250ピコ秒の成分が光化学系IIから解離し自己凝集したアンテナタンパク質にそれぞれ由来することが明らかになり、光条件の変化に伴って光化学系IIからアンテナタンパク質が解離し更に自己凝集するとい

う現象をライブで捉えることに成功した。

蛍光寿命の測定法としては幾つかの方法があるが(Berezin and Achilefu 2010)、その中でBecker&HicklのFLIMシステムでは時間相関単一光子計測法という最も精度の高い方法を採用している。この手法では励起光源としてパルスレーザーを用い、パルスにより蛍光物質が励起された時間を0として、次のパルスが来るまでの間(例えば80 MHz多光子レーザーの場合パルス間隔は12.5ナノ秒)に蛍光物質から放出され検出された光子を、縦軸に光子数、横軸に時間を取ったグラフにプロットしていく。何千、何万という光子について計測を繰り返しプロットすると、パルス照射後、時間の経過に伴って、検出される光子数(蛍光量)が減少するというパターン(減衰曲線)が描かれる(図2B)。減衰曲線は、蛍光寿命を1成分しか持たない蛍光物質では単独の指数関数で、2つの成分を示す蛍光物質では2つの指数関数の和でそれぞれ近似され、この近似関数式から、初期値(励起直後の光子数)の1/eまで光子数が減少したときの時間をその蛍光物質の蛍光寿命として算出する。FLIMでは、1つ1つのピクセルについて蛍光寿命を測定し、その寿命の長さを擬似カラーで示すことによって蛍光寿命の分布を可視化する(図2C)。

FLIMによる細胞内温度イメージングの手法確立のため、励起レーザーのパルス頻度、スキャン時間や画像サイズなどの画像取得条件、減衰曲線のフィッティングなどについて最適化し(内山ら, 2012)、この条件を用いてポリマー状蛍光温度プローブの溶液中の蛍光寿命を測定した。COS-7細胞抽出液に溶解した本蛍光温度プローブの蛍光寿命と温度との関係を示したのが図3Aである。この解析の結果、本蛍光温度プローブの温度分解能は0.18〜0.58℃であることが示された。また、細胞内に本蛍光温度プローブを導入した状態で培地の温度を上昇させていったところ、培地の温度上昇に伴って細胞内における本蛍光温度プローブの蛍光寿命が延長した。温度応答性を持たないコントロールプローブ(図1Aに示した温度応答性ユニットのプロピル基をエチル基に変換したプローブ)では、

図3. FLIMによる細胞内温度分布の解析. A. COS-7細胞抽出液中に0.02 w/v%で溶解したポリマー状蛍光温度プローブ溶液を用いて溶液温度と蛍光寿命(黒丸)との関係について調べ、この結果から温度分解能(白丸)を算出した。B. マイクロインジェクションによりCOS-7細胞に導入された本蛍光温度プローブは、細胞核を含む細胞全体に分布する(左、蛍光強度像)。同じ細胞をFLIMにより解析すると(右)、細胞核における蛍光寿命の延長が確認された。ここでは短い蛍光寿命(温度が低い状態)を青、長い蛍光寿命(温度が高い状態)を赤の疑似カラーで示している。また中心体(矢頭)周辺での蛍光寿命の延長が認められた。C. ミトコンドリア周辺の温度解析。ミトコンドリア染色色素と蛍光温度プローブの両方で染色したCOS-7細胞(左、中)をFLIMにより解析し(右)、ミトコンドリア周辺での温度上昇を明らかにした。

溶液系においても細胞内においても温度依存的な蛍光寿命の延長は確認されなかった。これらの結果から、生細胞内の温度を可視化解析する系が確立したと判断し、更に細胞内の局所的温度分布について詳細に解析した。

細胞内温度イメージングによる細胞内局所的な温度分布の計測

まずは蛍光強度の上昇が確認されていた細胞核に着目して FLIM 像を解析したところ、細胞核内における本蛍光温度プローブの蛍光寿命が細胞質のそれよりも顕著に長いこと、つまり細胞核が細胞質よりも高温であることが確かめられた (図 3B)。多数の細胞からの測定結果を平均化してみると、細胞核の温度は細胞質の温度と比較して平均 0.96°C 、およそ 1°C 近くも高かった。また、G1 期では比較的温度差が大きい (平均 0.7°C) のに対し S/G2 期ではほぼ温度差なし (平均 -0.03°C) と、細胞周期依存的に温度差が変化することがわかり、細胞核と細胞質との温度差が細胞の機能を反映したものであることが示唆された。

次に着目したのが中心体である。蛍光像・FLIM 像の観察を通して私たちは、多くの細胞で細胞核の横に点状の高温構造が見られることに気づいた (図 3B、矢頭)。その形状・位置からこの構造が中心体であろうと予想し、免疫染色を行ったところ、中心体マーカーである抗 γ -チューブリン抗体によるラベルとこの高温構造が一致すること、つまり中心体付近が高温であることが確かめられた。また中心体付近と細胞質の他の部分との温度差は平均 0.75°C であった。

最後に細胞内の熱発生器官として知られるミトコンドリアと細胞内温度との関係について解析した。ミトコンドリア染色剤 MitoTracker DeepRed でミトコンドリアを可視化した細胞に本蛍光温度プローブを導入し観察したところ、ミトコンドリア周辺での温度上昇が確認された (図 3C)。また、ミトコンドリアの脱共役剤である FCCP による処理 (Heytler and Prichard 1962) を行った結果、処理後の細胞のミトコンドリア周辺温度は処理前に比べて 1°C 程度上昇していた。これは脱共役剤処理により ATP 合成に使われなくなったエネルギーが、熱として放出された結果を捉えたものであると考えられる。この実験から、ミトコンドリア周辺での温度上昇がミトコンドリアの機能に由来するものであることが確かめられた。

今後の展望

今回の私たちの報告は、細胞内の局所的な温度変化を解析する世界で初めての温度計として、複数の総説 (Brites et al. 2012, de Silva 2012, Jaque and Vetrone 2012) やニュース (Evanko 2012)、国内の新聞 (東京新聞など 6 社) に取り上げられた。また 2010 年からは JST の研究成果展開事業「先端計測分析技術・機器開発プログラム」の支援もいただき、現在、蛍光温度イメージング法の普及を目指して更なる蛍光温度プローブの開発を進めている。以下、現在の取り組みについて紹介したい。

(1) 新規蛍光プローブの開発

上述のポリマー状蛍光温度プローブは細胞内の温度分布を高感度に検出できるという画期的なプローブであるが、より高い汎用性を目指して現在更なる改良を試みている。改良点の 1 つ、蛍光褪色性については、蛍光性ユニット DBD の改変型である DBThD (DBD の 2,1,3-benzoxadiazole 骨格を 2,1,3-benzothiadiazole 骨格に変換したもの) を代わりに組み込

むことによって褪色耐性のより高い蛍光温度プローブを作り出すことに成功した (Uchiyama et al. 2012)。この改良により、1 つの画像の取得に長い時間がかかる FLIM 解析 (この系では 1 分のスキャンで光子数を蓄積している) でも、褪色を気にせずタイムラプス解析をすることが可能になり、現在新規に開発した蛍光温度プローブにはこの褪色性の低い蛍光ユニットを応用している。また、インジェクションによるプローブ導入が難しい実験系への応用や実験の簡便化のため、膜透過性を有するプローブの開発にも現在取り組んでおり、既にこの膜透過型プローブが培地添加後 10 分以内で動物培養細胞内に導入されることを確かめている (林・稲田・内山、論文投稿準備中)。しかしながら膜透過型蛍光温度プローブは、インジェクション型のプローブと比較して細胞核への導入量が低下するなど、細胞核に注目した研究にはデメリットとなるような現象も確認されている。全ての条件を満たし全ての実験に対応するスーパー蛍光温度プローブの作出は難しいと思われるが、様々な実験系に対応出来るよう、プローブの選択肢を増やすことによって、細胞内温度イメージングの普及に努めていきたい。

(2) 様々な細胞種への細胞内温度イメージング法の応用

本稿では動物培養細胞の結果について述べてきたが、筆頭著者の興味は植物細胞機能にあり、植物細胞への蛍光温度プローブの応用についても手法の確立を進めている。残念ながらこれまでに開発された蛍光温度プローブは植物細胞に対して強い毒性を発揮することが確かめられており (林・稲田、未発表)、植物用に全く構造の異なる新規プローブの開発も視野に入れて現在研究を進めている。

(3) 細胞内温度イメージングのための計測システムの改良

ここで紹介した温度計測システムは、 0.2°C という非常に高い温度分解能を誇るものであるが、測定誤差や減衰曲線へのノイズなど、測定精度に影響を与える問題点も明らかになっている。測定誤差については、温度応答性のないコントロールプローブや蛍光色素の解析結果と比較して、ポリマー状蛍光温度プローブ溶液の FLIM 測定値は日間誤差・視野内誤差が有為に大きいことがわかっている (稲田・内山、未発表)。本稿で行った実験では、倒立顕微鏡のステージを温度制御機能付きのものに交換して、35 mm ガラスボトムディッシュ内の溶液や培地の温度制御を行なっているが、設定温度が室温から離れるにつれ、温度制御の安定性が損なわれることを確認しており (内山ら、2012)、日間・視野内の誤差もこの顕微鏡ステージの温度制御精度に由来するものと考えている。また減衰曲線のノイズに関しては、顕微鏡の検出器 (光電子増倍管) に由来するものと考えているが、これについては現在 FLIM 測定条件について改めて検討し、その原因を追求しているところである。

このような誤差やノイズが実際にシステムのハードに由来するものであったとして、すぐに問題点の解決を図ることができる訳ではないが、まずは私たちのシステムにおける限界を見極め、今後の改善策を探ることが重要だと考えている。また現在上述の問題点について温度制御装置メーカーや検出器メーカーとの話し合いも進めており、将来的に、誰でも簡単に高精度な細胞内温度イメージングが行えるような系を確立する基盤になればと考えている。

おわりに

今回筆者たちが開発した細胞内温度イメージングは、細胞の中で 1°C 近くの温度差が存在すること、その温度差は細胞

機能に由来していることを明らかにした。これらの知見は非常に興味深いものであるが、そのような細胞内局所的な温度差を生み出す機構は一切明らかになっていない。

細胞内で熱を生み出す要因としてすぐに思いつくのはATPの加水分解であり、この観点から中心体の例について考察してみたい。中心体は微小管伸長の起点であり(Doxsey 2001)、ATPの加水分解を移動の原動力とするモータータンパク質が沢山集まっていると考えられる。中心体付近で見られた0.75℃の温度上昇を達成するために必要なATP量を計算すると、 $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi} + 30 \text{ kJ/mol}$ 、細胞の比熱を4.184 J/gK、細胞の容量を8 pL (平均的な細胞のサイズを20 μmとし、細胞を立方体を仮定)としたとき、840 フェムトモルとなる。中心体を含む発熱部分の体積が細胞全体の1/1000程度と仮定すれば、必要なATP量は更にその1/1000の0.84フェムトモルである。一方、ATP特異的蛍光センサーを用いて推定されている細胞質中のATP濃度は2 mM (ミリモル/L) (Ando et al. 2012)、この値に基づいて計算した細胞内のATP量は16フェムトモルであり、上記の0.75℃の温度上昇を引き起こすために必要なATP量は、中心体付近のATP量としては十分可能と推測される。

では中心体付近の温度上昇は、本当にモータータンパク質によるATPの加水分解によってのみ引き起こされているのか。他の要因が寄与しているとしたらその要因とは何なのか。これを検証し明らかにするためには、異なる原理に基づいた細胞内温度計の開発とそれによる筆者たちの結果の検証、ATP加水分解による熱放出を検証するための*in vitro*測定系、中心体の機能と温度上昇の相関についての生理学的検討、中心体構成因子や中心体の機能に関わる因子についての分子遺伝学的・生化学解析、などなど、多様な解析が必要であるとされる。言い換えれば私たちの研究成果は、温度という物理的な観点を導入することによって、細胞機能に関する新たな問題を提起したものであり、これを基盤とした今後の研究の展開が期待される。

私たちの研究成果が、多くの研究者が細胞内温度に興味を持つきっかけとなり、温度生物学という新たな研究分野の発展や細胞機能解明への新展開につながることを願って、今後も新規蛍光温度プローブの開発やその応用に取り組んでいきたい。

謝辞

細胞内の温度を計測する新規蛍光温度プローブの開発は、平成22年10月よりJST研究成果展開事業「先端計測分析技術・機器開発プログラム」(開発課題名「細胞内温度計測用プローブの開発」代表：内山聖一)の支援を受けている。また、細胞内温度イメージングで使用した蛍光寿命イメージング顕微鏡は、文部科学省特別支援教育事業(「植物科学研究教育推進事業」平成17年度から21年度、「植物グローバルトップ教育推進プログラム」平成22年度から26年度)の支援により導入・運営されているものである。

引用文献

Ando, T., Imamura, H., Suzuki, R., Aizaki, H., Watanabe, T., Wakita, T., and Suzuki, T. (2012) Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog* 8: e1002561.

Berezin, M. Y., and Achilefu, S. (2010) Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev* 110: 2641-2684.

Brites, C. D., Lima, P. P., Silva, N. J., Millan, A., Amaral, V. S., Palacio, F., and Carlos, L. D. (2012) Thermometry at the nanoscale. *Nanoscale* 4: 4799-4829.

de Silva, A. P. (2012) Fluorescent sensors: bright ideas. *Nat Chem* 4: 440-441.

Donner, J. S., Thompson, S. A., Kreuzer, M. P., Baffou, G., and Quidant, R. (2012) Mapping intracellular temperature using green fluorescent protein. *Nano Lett* 12: 2107-2111.

Doxsey, S. (2001) Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 688-698.

Evanko, D. (2012) A thermometer for cells. *Nat methods* 9: 328.

Gota, C., Uchiyama, S., Yoshihara, T., Tobita, S., and Ohwada, T. (2008) Temperature-dependent fluorescence lifetime of a fluorescent polymeric thermometer, poly(N-isopropylacrylamide), labeled by polarity and hydrogen bonding sensitive 4-sulfamoyl-7-aminobenzofurazan. *J Phys Chem B* 112: 2829-2836.

Gota, C., Okabe, K., Funatsu, T., Harada, Y., and Uchiyama, S. (2009) Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *J Am Chem Soc* 131: 2766-2767.

Heytler, P. G., and Prichard, W. W. (1962) A new class of uncoupling agents--carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Biochem Biophys Res Commun* 7: 272-275.

Hille, C., Berg, M., Bressel, L., Munzke, D., Primus, P., Lohmannsroben, H. G., and Dosche, C. (2008) Time-domain fluorescence lifetime imaging for intracellular pH sensing in living tissues. *Anal Bioanal Chem* 391: 1871-1879.

Iwai, M., Yokono, M., Inada, N., and Minagawa, J. (2010) Live-cell imaging of photosystem II antenna dissociation during state transitions. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2337-2342.

Jaque, D., and Vetrone, F. (2012) Luminescence nanothermometry. *Nanoscale* 4: 4301-4326.

Matsuoka, K., Higuchi, T., Maeshima, M., and Nakamura, K. (1997) A vacuolar-type H⁺-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell* 9: 533-546.

Okabe, K., Inada, N., Gota, C., Harada, Y., Funatsu, T., and Uchiyama, S. (2012) Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat Commun* 3: 705.

Oyama, K., Takabayashi, M., Takei, Y., Arai, S., Takeoka, S., Ishiwata, S., and Suzuki, M. (2012) Walking nanothermometers: spatiotemporal temperature measurement of transported acidic organelles in single living cells. *Lab Chip* 12: 1591-1593.

Somero, G. N. (1995) Proteins and temperature. *Annu Rev Physiol* 57: 43-68.

Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y. A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C., and Shimamoto, K. (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* 476: 332-335.

Uchiyama, S., Matsumura, Y., de Silva, A. P., and Iwai, K. (2003) Fluorescent molecular thermometers based on polymers showing temperature-induced phase transitions and labeled with polarity-responsive benzofurazans. *Anal Chem* 75: 5926-5935.

Uchiyama, S., Kimura, K., Gota, C., Okabe, K., Kawamoto, K., Inada, N., Yoshihara, T., and Tobita, S. (2012) Environment-sensitive fluorophores with benzothiadiazole and benzoselenadiazole structures as candidate components of a fluorescent polymeric thermometer. *Chem Eur J* 18: 9552-9563.

内山聖一, 岡部弘基, 稲田のりこ (2012) 蛍光寿命測定による細胞内温度分布イメージング. *光化学* 43: 24-27.

Wallrabe, H., and Periasamy, A. (2005) Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr Opin Biotechnol* 16: 19-27.

Yang, J. M., Yang, H., and Lin, L. (2011) Quantum dot nano thermometers reveal heterogeneous local thermogenesis in living cells. *ACS nano* 5: 5067-5071.

Received: 13 February 2013