

## 微小領域の温度を視る —細胞挙動から生命現象まで—



井上 高教

### 1 はじめに

1590年代、史上初の温度計として「空気（膨張）温度計」が誕生した。対象物と計測する物体との接触で、膨張や収縮を利用し、温度を計測するものであり、現代で使われる水銀温度計やアルコール温度計も原理はこれと同じである。また、熱電効果を原理とし、電気を計測しデジタル表示する接触温度計も多く使われている。さらに赤外線を測定する、従来の温度計とはまったく異なる非接触型の「放射温度計」が誕生し、点での測定が可能となった。2020年以降、温度計測器は我々の生活の一部となっている。さらに温度計測は一細胞・分子レベルなどの微小領域に至っており、温度イメージング（Thermography）が開発されている。

温度は、動物および植物の様々な生物学的事象・反応に影響を与える重要なパラメータであり、あらゆる化学反応に関連する物理量である。細胞内の温度分布は細胞内分子の熱力学や機能を反映しており、医学的見地からは、がん細胞などの病態細胞では亢進した熱発生があることが報告されている。単一の生細胞、特にがん細胞が温度を収集する能力について、その病理学および生理学的研究が進められている。単一細胞での温度を監視するために、さまざまな種類の細胞温度計が開発され、代表的なものに「蛍光プローブ」が使用されている。蛍光プローブは、汎用性が高く、高感度で、定量性に優れていることから、特にタンパク質の局在性や活性化の検出、タンパク質複合体の形成および立体構造変化の同定、さらに *in vivo*（生体内）における生物学的プロセスのモニターといった用途によく使用されている。

本稿では蛍光を用いた微小領域の温度測定と生物学的プロセスの温度依存性を紹介したい。

### 2 蛍光計測から見る細胞

蛍光とは、光を吸収して励起状態となった色素が元の基底状態に戻る際に、基底状態と励起状態の差に相当するエネルギーの一部を光の形で放出する現象である。ある物質が一定の光を吸収した時、蛍光強度から、蛍光物質の量を定量でき、ラベル化した mRNA の量やその他の物質の指標とすることができる。

蛍光プローブ法は、蛍光測定が可能な置換基や分子を系内に導入し、その測定結果から分子レベルの情報を得る手法である。蛍光プローブには主に、有機化合物タイプ、生体分子タイプ、量子ドットタイプの3種類がある。蛍光プローブは、感度やダイナミックレンジの広さ、定量性、種類の多様性、複数種類を同時に使用できる利便性から、バイオ研究においてさまざまな形で利用されている。その利用範囲は、タンパク質の同定や複合体（相互作用）の検出、特定のタンパク質の局在や活性検出、生体分子挙動のモニタリング、分子選択・分離など多彩である。近年ではこの多彩な解析を、特定のタンパク質や単一の細胞にとどまらず、複数の細胞の一つ一つについて自動的にデータ取得し統計学的に客観的な解析を行うことのできるハイコンテンツアナリシスも盛んに行われている。

### 3 蛍光ポリマー温度計（FPT）

多くの生化学反応は生きた細胞で起こる。余剰エネルギーは熱として放出され、温度が上昇し、遺伝子発現や代謝などの制御が誘導される。細胞をナノスケールでかつ高感度に細胞の温度を測定するのは、分野を超えて大きな課題である。ポリマーの持つ調整可能な臨界溶液温度範囲と優れた生体適合性という利点を活用することで、蛍光ポリマー温度計（fluorescence polymer thermometer, FPT）は、細胞レベルで高い空間分解能で温度を正確に監視できるため、大きな注目を集めている<sup>1)2)</sup>。

プローブは温度感受性ユニット、親水性ユニット、蛍光団ユニットから構成されている。プローブの水溶液が低温の際は、構造内の水分子の存在により蛍光性ユニットの蛍光は弱い状態となる。高温時は、水分子がプローブ外へ排除され、蛍光性ユニットが強い蛍光を発する状態になる。温度変化により蛍光強度が変化する蛍光性ユニット1と、温度変化に影響されない蛍光性ユニット2の2種類の蛍光性ユニットを有する。それらの蛍光強度比から、プローブの導入濃度非依存的に正確な温度計測が可能となる。

岡部らは、蛍光寿命イメージング顕微鏡（fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM）を用いて FPT に基づく細胞内温度マッピングを行っている<sup>3)</sup>。FPT の蛍光寿命は温度感受性を示すことが示されている。時間相関単一光子計数法ベースの FLIM を使用した空間及び温

表 温度測定技術

	アルコール温度計	放射（赤外）温度計	サーモグラフ（画像）	蛍光プローブ
原理	膨張・収縮	赤外線強度	赤外線強度	光の吸収と発光
測定領域	全体	微小領域に限界	微小領域の測定	細胞レベル
前処理	不要	不要	不要	蛍光物質の投与
校正	必要	必要	必要	必要

度分解能は、それぞれ 200 nm および 0.18~0.58 °C であった。アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞の核と中心体の両方が細胞質よりも高い温度であったこと、細胞質間の温度差が細胞周期の段階によって異なっていることを観察した。この研究は、単一細胞レベルで温度と熱産生を測定するためのベンチマーク研究のひとつとなった。

#### 4 温度応答性ポリマーへの FRET の応用

ある蛍光分子（ドナー）の蛍光スペクトルと、もうひとつの蛍光分子（アクセプター）の励起スペクトルに重なりがある場合、この二つの蛍光分子が近接し、かつ両分子の双極子モーメントが適切な方向関係にあると、ドナーからの発光が起こらないうちに、その励起エネルギーがアクセプターを励起してしまう確率が高くなる現象を蛍光共鳴エネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer, FRET）という。FRET の効率は蛍光分子間の距離と配向の変化に対して敏感に変化する。配向因子を無視すると、FRET 効率は蛍光分子間の距離の 6 乗に反比例する。タンパク質もちょうどナノメートルの大きさなので、目的のタンパク質にドナー・アクセプターを連結すれば、タンパク質の微妙な構造変化を蛍光変化として検出できる。1940 年代に T. Forster により確立され、一塩基多型の検出や定量 PCR など、生命科学研究において不可欠な技術となっている。

Xuejuan Wan は FRET 対を標識した明確な温度応答性ポリマーを合成した<sup>4)</sup>。このポリマーは、極めて希薄な条件下で温度と pH の二重レシオメトリック蛍光プローブとして機能する。このポリマーには、鎖の中間部と末端に FRET のドナー部位とアクセプター部位が標識されており、末端官能基は、pH 依存性が高く、中性またはアルカリ性媒体では非蛍光、酸性媒体では高蛍光であるため、FRET プロセスのオフ/オンの切り替えは、溶液の pH によって容易に調節することができる。酸性

や高希釈条件下では、熱による鎖の崩壊と伸長により、ドナー部位とアクセプター部位の間の空間的な距離を効果的に調節することができ、FRET 効率の顕著な変化をもたらす。

#### 4 おわりに

課題としては、プローブが大きすぎて必要な解像度が得られない、セル内に均一に分布していない、十分の感度と精度を備えていないなどがある。しかし、細胞毒性がなく、pH や対象分子の濃度により蛍光波長または蛍光強度が変わる蛍光プローブの研究は近年著しい。また、近年では、デジタルカメラの感度向上と画像解析技術の進歩により、可視化した細胞内温度分布像は細胞内の場所ごとに異なる温度を示すことが可能になってきている。今後、さらに温度と細胞機能の関連を詳細に調べることで、より深い生命のメカニズムが発見されるかもしれない。細胞内の温度分布が分かれば、細胞の機能に関する理解が深まるとともに、新規診断、治療法の開発にも貢献すると期待されている。

#### 文 献

- 1) S. Uchiyama, C. Gota, T. Tsuji, N. Inada : *Chemical Communications*, **53**, 10976 (2017).
- 2) J. Qiao, X. Mu : *Biosens. Bioelectron.*, **85**, 403 (2016).
- 3) K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada : T. Funatsu, S. Uchiyama : *Nat. Commun.*, **3**, 705 (2012).
- 4) X. Wan, S. Liu : *J. Mater. Chem.*, **21**, 10321 (2011).



井上高教 (Takanori INOUE)

大分大学理工学部 (〒870-1192 大分市  
旦野原 700)。九州大学大学院総合理工学  
研究科。博士 (工学)。「現在の研究テーマ」  
レーザー分光分析と匂いの化学。  
E-mail : tinoue@oita-u.ac.jp