

博士論文（要約）

論文題目 金ナノ粒子による単一生細胞内の局所加熱

氏名 本多 孝明

【背景・目的】

温度は基本的な物理量の 1 つであり、細胞内のすべての生化学反応は温度による影響を受けるため、生物の活動に大きな影響を及ぼしている。温度感受性イオンチャネルや熱ショック応答など細胞が環境の温度変化に応答する生命現象が報告されている。また、癌や感染症などの特定の疾患では細胞での熱発生が亢進することも知られている。最近の研究では、ミトコンドリアを化学的に刺激することにより、細胞内温度が平均 1K 上昇することが報告されている。さらに、核とミトコンドリアの温度は、周囲の温度よりも約 1K 高くなっていて、細胞内に不均一な温度分布が存在することも示されている。これらの事実から、細胞内の局所的な温度または熱発生は細胞機能と密接に関連していることが考えられる。細胞内温度、特にナノ空間の熱が生理学的機能に重要な役割を果たす可能性がある。

局所領域または細胞小器官の細胞内温度と細胞機能との関係を解明するためには、細胞内局所領域を加熱する必要があると考えた。細胞内の温度が不均一に分布し、さまざまな細胞小器官に関連している可能性を考慮すると、微小空間での熱の役割を調べることが求められる。細胞を加熱する赤外線レーザーを利用する従来の方法は、熱源の分布は半径約 5 μm であり、細胞小器官などの細胞の局所領域を加熱する方法としては大きすぎる。そこで、本研究では、ナノメートルオーダーの熱源として金ナノ粒子を用いた。金ナノ粒子は光のエネルギーを吸収し効率よく熱に変換することができる。金ナノ粒子を細胞内に導入してレーザーを照射することで微小な単位の熱源として機能させることを試みた。

【方法・結果】

細胞への金ナノ粒子の導入

実験には COS7 細胞を用いた。金ナノ粒子は赤色の領域の吸収が多い 60×25 nm のロッド状の粒子を用いた。細胞を培養している培地に金ナノ粒子を混ぜ、2 時間共培養することで細胞内に取り込ませた。金ナノ粒子が細胞に取り込まれる様子を共焦点顕微鏡により観察した (図 1)。その結果、培地に fetal bovine serum (FBS) が存在すると取り込みの効率が良かった。FBS がいない場合は金ナノ粒子が凝集しやすく、凝集した塊が多くみられ

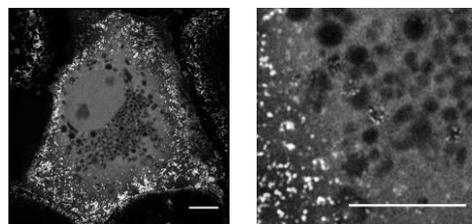


図 1 : 金ナノ粒子の細胞内への取り込み

細胞の概形をわかりやすくするために蛍光標識したデキストランを細胞内に導入している。白い点が金ナノ粒子である。右図は左図の一部を拡大した図。

スケールバー : 10 μm

た。以降の実験は FBS 含有の条件で行った。また、細胞内の金ナノ粒子は小胞の中に存在するものも観察された。一部の金ナノ粒子はエンドソーム内に存在した。これらの金ナノ粒子はエンドサイトーシスなどによって細胞内に取り込まれていると考えられる。

金ナノ粒子による細胞の加熱

細胞内の温度の測定には蛍光性ナノゲル温度センサー（fluorescent nanogel thermometer, FNT）と蛍光性ポリマー温度センサー（fluorescent polymeric thermometer, FPT）の2種類のプローブを用いた。FNT と FPT は共に温度が上昇すると、蛍光強度と蛍光寿命が増大する。これらのプローブをマイクロインジェクション法により細胞内に導入することで、細胞内の温度を測定した。本研究では、FNT は一細胞全体の温度を測定するのに用いた。FPT は細胞内に分散して広がる利点があるため、細胞内の温度の分布を測定するのに用いた。

まず、金ナノ粒子を取り込ませた細胞にレーザーを照射して加熱した。FNT を用いて、その時の細胞

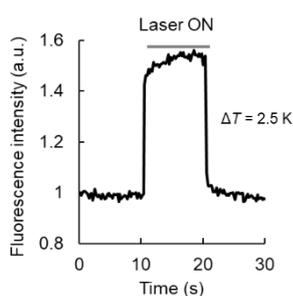


図 2：加熱時の細胞内温度変化

30 秒間、FNT の蛍光強度を観測した。10 秒間加熱している。

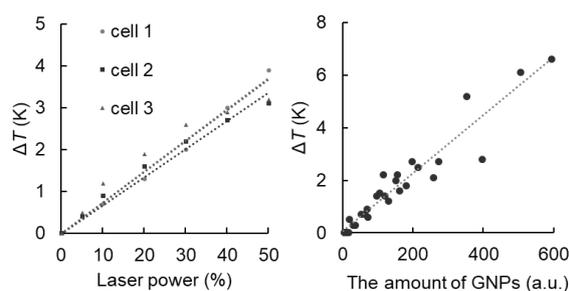


図 3：金ナノ粒子による生細胞の定量的加熱

左図は温度上昇とレーザー強度との関係。右図は温度上昇と金ナノ粒子の量との関係。

内の温度変化を測定した。その結果、加熱をしているときに一過的に細胞内の FNT の蛍光強度が上昇している様子が観察された（図 2）。これにより、金ナノ粒子を利用して細胞内の温度を上昇させることが可能であることが示された。また、温度上昇の制御の定量性について調べた。照射するレーザーの強度に応じて細胞内の温度上昇が大きくなった。細胞内に取り込ませる金ナノ粒子の量にも応じて細胞内の温度上昇が大きくなった。このことから、定量的に制御が可能であることが確認された。

金ナノ粒子の熱源としての広がり

次に、FPT を用いて金ナノ粒子の細胞内での熱源としての広がりを観察した。加熱時の金ナノ粒子周辺の蛍光寿命を蛍光寿命イメージング顕微鏡法 (fluorescence lifetime

imaging microscopy, FLIM) により測定した。細胞質内に存在する金ナノ粒子の周辺の微小な領域において、FPT の加熱時の蛍光寿命イメージングを行った。金ナノ粒子のある領域の蛍光寿命が上昇していることが観測できた。また、その温度が上昇している領域の大きさをガウシアン分布でフィッティングすることで概算した。その結果、細胞内で熱源の大きさは、せいぜい $0.47 \mu\text{m}$ 程度であることが分かった。このことから、金ナノ粒子が細胞内において微小な大きさの熱源として機能することが示された。

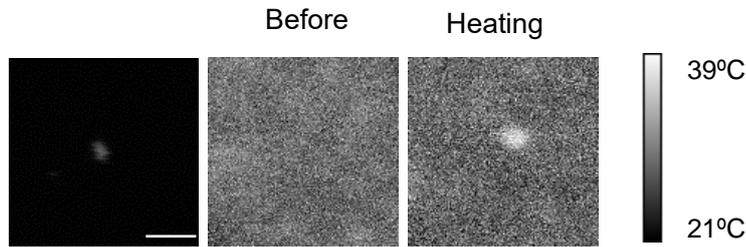


図 4：金ナノ粒子による生細胞の局所的加熱

左図は、金ナノ粒子の像。中央は、加熱前の FPT の蛍光寿命像。右図は、加熱中の FPT の蛍光寿命像。

スケールバー： $1 \mu\text{m}$

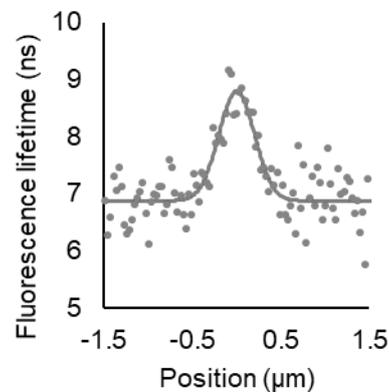


図 5：金ナノ粒子による加熱の局所性

加熱領域の一直線状の蛍光寿命をプロットして、ガウシアン分布でフィッティングした。

金ナノ粒子によるストレス顆粒の形成の誘導

細胞内温度の上昇が駆動する細胞応答の一つとしてストレス顆粒の形成が挙げられる。本加熱法により、実際にこの応答を誘導することができるかを調べた。ストレス顆粒は mRNA やタンパク質からなる細胞質に形成される顆粒である。ストレス時に特定遺伝子の mRNA 翻訳を抑制する機能を有する。本研究では、poly(A)鎖を標的とした Cy3 で蛍光標識したアンチセンスプローブを用いて細胞内の mRNA を可視化することで、ストレス顆粒の形成を観察した。ストレス顆粒が形成されると mRNA も取り込まれるので顆粒が観察できる。細胞を金ナノ粒子で加熱した

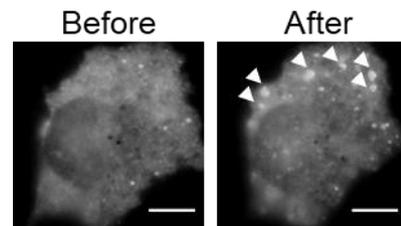


図 6：金ナノ粒子の加熱によるストレス顆粒の形成

加熱前後の細胞内の mRNA の像。

前後の細胞内の mRNA を観察することで金ナノ粒子による加熱でストレス顆粒の形成が誘導されることを確認した。図 6 に示すように細胞内に顆粒が形成された。以上の結果から、金ナノ粒子を細胞内温度変化に駆動される現象の解明に応用することができる可能性が示された。

さらに、加熱する領域を細胞の一部に限定した時のストレス顆粒の形成についても検討した。その結果、ストレス顆粒は加熱した領域とは異なる領域に形成された。つまり、細胞内の温度がより低い領域でストレス顆粒が形成された。この結果は、ストレス顆粒の形成には発熱だけでなく液液相分離が関与しており、低温のほうが顆粒の成長に有利であるという報告とも一致する。この結果は、細胞内の温度の勾配が細胞機能において役割を持つことを示唆している。

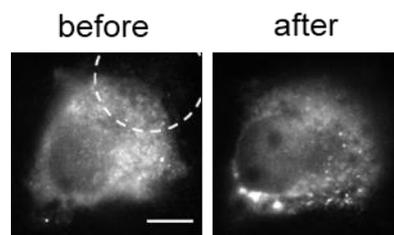


図 7：細胞内を部分的に加熱した時のストレス顆粒の形成

加熱前後の細胞内の mRNA の像。左図の細胞の右上の点線の円内を加熱した。右図は加熱後の図。

【総括・展望】

本研究では、金ナノ粒子を COS7 細胞に組み込ませ、レーザーを照射することによって加熱した。細胞内温度を測定することで、加熱を定量的に制御できることを示した。また、細胞内での熱源の広がりや微小な大きさであることを確認した。さらに、本加熱手法により、細胞の熱応答の一つであるストレス顆粒の形成を誘導した。

本加熱法は、例えば、特定の細胞小器官を加熱することで、微小空間での熱の役割を調べることができる。今後、微小空間での熱伝達と分子応答のメカニズムを明らかにする研究に寄与することが期待される。