

博士論文

汎用的な細胞内温度計測を目指した蛍光高分子の合成と
褐色脂肪細胞内の熱産生測定への応用

辻 俊一

目次

第1章 緒言	3
参考文献.....	8
第2章 自発的に細胞内に移行するカチオン性蛍光高分子温度計の開発	10
第1節 序論	10
第2節 材料と実験手法	14
第3節 結果	20
1. 蛍光高分子(共重合体)の合成とキャラクタリゼーション.....	20
2. 酵母細胞への蛍光共重合体の導入結果	20
3. カチオン性蛍光共重合体の温度変化に対する蛍光応答.....	28
4. NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 の哺乳類細胞内温度計測への応用	35
第4節 考察.....	39
第5節 小括.....	45
第6節 参考文献.....	46
第3章 蛍光強度比で細胞内温度を計測可能な蛍光高分子の開発	50
第1節 序論	50
第2節 材料と実験方法	54
第3節 結果	65
1. DBThD-IA と BODIPY-IA の蛍光特性評価.....	65
2. カチオン性蛍光高分子温度計 1-3 の合成と 150 mM KCl 水溶液中での温度変化に対する蛍光応答.....	68
3. カチオン性蛍光高分子温度計 1 の機能独立性	70
4. カチオン性蛍光高分子温度計 1 の非接着性 MOLT-4 細胞内温度計測への応用	72
5. カチオン性蛍光高分子温度計 1 の接着性 HEK293T 細胞内温度計測への応用.....	75

第4節 考察	79
第5節 小括	82
第6節 参考文献	83
第4章 蛍光高分子温度計による褐色脂肪細胞内の熱産生計測法の開発	86
第1節 序論	86
第2節 材料と実験方法	91
第3節 結果	99
1. 初代培養褐色脂肪細胞の特徴	99
2. 褐色脂肪細胞への R-CFPT 導入法の最適化と毒性評価	102
3. 脱共役剤刺激により誘導される褐色脂肪細胞内温度変化	106
4. β 3-AR アゴニスト刺激により誘導される褐色脂肪細胞内温度変化	112
第4節 考察	116
第5節 小括	122
第6節 参考文献	123
総括	128
参考文献	133
発表論文	135
謝辞	137

第1章 緒言

温度は、我々の生活の中で非常に馴染み深い最も重要な物理因子の一つである。例えば、人は季節の移り変わりを気温の変化という形で感じることができ、植物の中には温度を感じて花を咲かせるものもある。また、我々は体温の上昇によって病気かどうかを簡単に判断でき、わずか数°Cの体温変化を重要な差と捉えている。もちろん、科学の世界においても、温度は重要なパラメータであり、化学反応や生理的応答は温度によって制御されている。

科学の進歩により、多くの現象がマイクロなレベルで理解されるようになってきた。その技術進歩は、温度という物理学的パラメータですらもマイクロなレベルへと発展させてきた。近年になり、温度を捉える技術が、細胞内の温度を計測する技術へと応用され、一つの研究分野となりつつある。細胞の中で起こっている(行われている)ことは、複数の反応の複雑な組み合わせである。その反応は必ず熱の放出もしくは吸収を伴うものであり、結果的に細胞内の局所的な反応が、局所的温度変化を引き起こし、次の反応へとつながっていく。つまり局所的な温度変化、もしくは熱産生が、代謝活性、遺伝子発現、タンパク質安定性といった多くの生物学的プロセスに影響を与えているはずである^{1,2}。その点で、細胞内の温度計測は、細胞の生理状態を把握する一つの強力なツールになりうると大きな期待が寄せられている。実際に細胞内温度計測法が登場する以前には、マイクロカロリー法によって病態細胞の異常な熱産生が示唆されている³。そして、興味深いことに細胞内温度計測法が登場して以降は、細胞内部には温度の不均一性があり、細胞分裂などの細胞活動によって細胞内温度が変化する様子が明らかとなってきた⁴。細胞のような小さなサイズの物体の中に、温度勾配があることは非常に驚きであるが、このような現象を見つけ出すには、分析手法として細胞のような複雑環境下でも温度のみを検出するセンサーがなければ先に進まない。

そのような状況の中、近年多くの研究者が細胞内の温度を計測するセンサーを開発し始めている。その技術の中でも本研究では、蛍光性分子を使った計測技術、いわゆる蛍光温度計

(Fluorescent thermometer)について主に扱っていきたい。蛍光温度計にはいくつかのメリットがある。一つは、計測機器の汎用性の高さであり、蛍光顕微鏡を使うことで細胞内温度が計測できる。分子生物学や細胞生物学的実験手法を主とするバイオ研究者が今後の主なユーザーと考えると大きな利点であろう。また、顕微鏡を用いた観測が可能なることから高い空間分解能(200 nm ~)と高い時間分解能(最高 ms オーダー)を持って、空間内の温度分布とその変化を計測できることもメリットの一つである。

細胞内温度の蛍光計測は古くから行われており、初期の研究は細胞膜を温度応答性の蛍光色素ユーロピウム錯体 **Eu-TTA** で染色し、アセチルコリン受容体の活性化に伴う細胞膜発熱時の温度変化イメージングを行った実験であった^{5,6}。その後、**Eu-TTA** の蛍光強度が pH に依存するという問題点を解決すべく、**Eu-TTA** をガラスキャピラリーに封入したマイクロ温度計が作製され、細胞分裂前の丸い **HeLa** 細胞の発熱に伴う温度上昇の計測にも成功した⁷。一方で、従前の細胞内温度計測で用いられていた **Eu-TTA** を含めた蛍光色素では、細胞内の微小な温度変化を捉えられる感度が足りないのではないかという根本的な懸念があり、定性的な計測はできても定量評価は難しいと考えられた。また、上記研究のように蛍光色素そのものに温度以外の応答性があるものが多く、温度応答への選択性というも課題のひとつであった。その両課題を解決できる蛍光温度計として、**Uchiyama**らは、温度応答性ポリマーと環境応答性蛍光色素を組み合わせることで、数°Cの温度変化で蛍光強度が 10 倍以上変化するという温度に対する高い応答性を示す蛍光高分子温度計(**Fluorescent Polymeric Thermometer, FPT**)を合成し、2003年に報告した⁸。**FPT** の基本構造と、温度応答原理を以下に示す。**FPT** は感温性ユニット、蛍光性ユニットから構成されており、これらのユニットがランダムに並んだ高分子である(図 1-1)。感温性ユニットは **N**-アルキルアクリルアミド系高分子が用いられることが多いが、その 1 種である **NNPAM** ユニッは、周囲が低温環境の時には伸張した構造をとり、周囲の温度上昇に伴い、高分子周りに配位していた水分子が解離し、小さく丸まった構造へと変化する。蛍光性ユニットの 1 種であるベンゾフラザン骨格を有する **DBD-AA** は周囲に水が存在すると量子収率が下がることで蛍光強度が低

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もつ。この蛍光性ユニットを少量、感温性ユニットに組み入れることで、感温性ユニットの温度依存的な構造変化を蛍光性ユニットが蛍光強度の変化という形で表現できる。その後、細胞内での凝集抑止や精度向上に寄与するイオン性ユニットの導入⁹や蛍光寿命計測による高感度化¹⁰を経て、世界で初めて、細胞内の温度分布を可視化するという結果が報告された⁴。そして、その研究開発の間、他の様々な原理に基づいた蛍光温度計が開発されてきた。代表的な蛍光温度計を表 1-1 に示した。これらはいずれも細胞内での温度応答性が確認されている細胞内温度計測用の蛍光温度計である。上記で紹介した感温性分子^{4,11-14}を始め、Eu 錯体^{6,15-17}、蛍光タンパク質¹⁸⁻²¹、Nanodiamond²²、低分子化合物²³⁻²⁵などが材料として使われている。本論文では、これら細胞内温度計測技術を温度計の感度と細胞内への導入方法という 2 点から整理し、計測技術としての汎用性を高めることを技術開発の目的とした。なぜならば、高い感度と細胞内の導入法の簡便さの両方を兼ね備えることは、分析技術ツールとして汎用性が高く、実用性が高いことを意味するからである。感度は、その温度計が統計学的に区別できる最小の温度差である「温度分解能」という指標を使って整理し、同じく表 1-1 に示した。言い換えれば、この数値が低ければ低いほど、わずかな温度差を蛍光値の差として返すことができる。今まで報告されている中で最も温度分解能が高いのは Nanodiamond を用いた計測技術である²²。一方で、Nanodiamond 法では計測粒子が細胞内に点在するために細胞内全体の温度分布を計測することは難しいという課題もある。

一方、導入方法の簡便さという点で見ると、細胞との培養によって物質を取り込ませる方法が圧倒的に利用しやすく、Eu 錯体^{6,15-17}、低分子化合物²³⁻²⁵、あるいは蛍光タンパク質¹⁸⁻²¹(プラスミドで発現させるため、導入の手間がない)が優位にある。しかしながら、培養によって温度計を取り込ませる場合には、その多くがエンドソームを介しての細胞内取り込みに依存するために、細胞内局在がエンドソーム、リソソームなどに限定されてしまうことも多い。その点も考慮に入れると、蛍光タンパク質以外の高分子もしくは粒子形状の蛍光温度計は、細胞質内への導入が難しいという点での課題を残している。

そこで、本論文では、高い感度、世界に先駆けて細胞内温度マッピングを実現した実績⁴、そして高分子で機能改良がしやすいという特徴から、Uchiyamaらが開発した感温性高分子を用いた蛍光高分子温度計 FPT^{4, 8-10, 14}をベースに、その技術の汎用性を高めることを目的に研究を行った。上述のように FPT の温度変化に対する高い感度は、細胞内温度計測技術において非常に魅力的な特性であるものの、その開発初期^{4,11,12}にはマイクロインジェクション法と呼ばれる微小な針を使って直接細胞内に温度計を打ち込む方法が採用されており、導入方法に課題を残していた。その課題を、モノマーの組み合わせで FPT の機能改変ができるという特徴を活かし、構成ユニットの追加や改良を通じて解決し、最終的に高い感度と細胞内への導入法の簡便さを兼ね備えた実用的で汎用性の高い細胞内温度計測技術へと磨き上げることを試みた。その一連の研究開発結果が本論文に関する内容になる。

本論文の構成は主に 3 つの章から構成される。第 2 章では、汎用性の高い FPT の創出に最も大きな課題を残していた細胞内への導入方法を改善すべく、新たにカチオン性ユニットを追加した FPT を開発した。これにより初めて酵母細胞内温度計測に成功した。続く第 3 章では、汎用性における残された課題であった、温度依存的に変化するパラメータの改良に取り組んだ。温度変化に伴う FPT の蛍光特性の変化をより正確に検出するために、従前は蛍光寿命を選択していた。しかしながら、蛍光寿命装置は biological な研究では、誰もが保有しているような汎用性の高い機器ではない。そこで蛍光強度比計測で温度変化を検出できるように、新たに蛍光性ユニットを開発し、FPT に組み込むことで、より汎用性の高い細胞内温度計測手法を構築することができた。第 4 章では、第 3 章で開発した蛍光強度比検出型の FPT を、熱産生を主機能とする褐色脂肪細胞に適用した。βアドレナリン受容体刺激によって誘導される褐色脂肪細胞の熱産生を、細胞内温度の変化という形で検出できる系を構築した。この刺激による温度変化は、分化前の細胞では認められず、細胞機能と細胞内温度との関係を実証した一例となった。

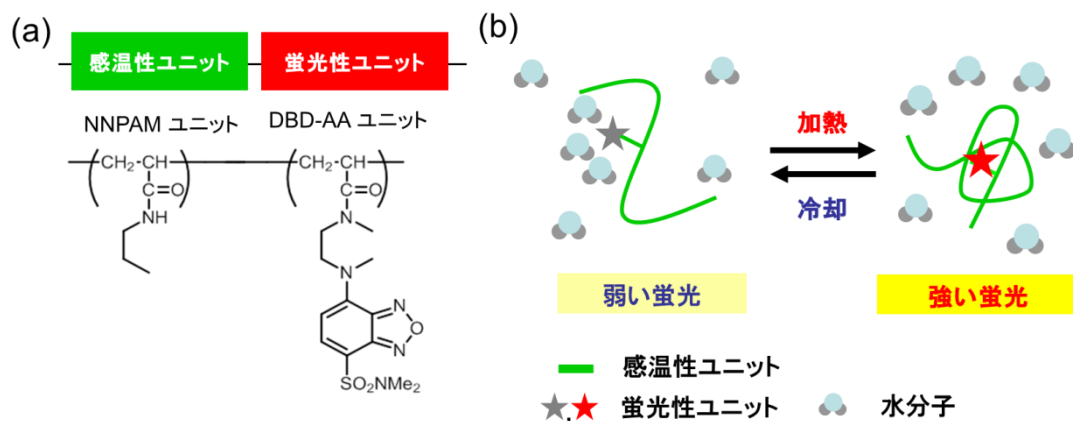


図 1-1. 蛍光高分子温度計 FPT の基本構造及び原理

(a) NNPAM: *N*-*n*-propylacrylamide, DBD-AA: *N*-{2-[(7-*N,N*-dimethylaminosulfonyl]-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)}(methyl)aminoethyl-*N*-methylacrylamide と (b) 蛍光高分子温度計が温度に応答して蛍光を発するメカニズム

表 1-1. 代表的な蛍光温度計の細胞への応用例と各々の温度計の性能

ベース材料	用いた細胞種	温度分解能 (°C)	導入方法	文献
感温性高分子 (ex. <i>N</i> -アルキルアクリルアミド) と環境応答性蛍光色素との共重合体	COS7	0.29–0.50	マイクロインジェクション	11
	HeLa	-	マイクロインジェクション	12
	COS7, HeLa	0.18–0.58	マイクロインジェクション	4
	HeLa	0.3–0.5	培養(細胞質)	13
	HeLa, COS7, NIH/3T3	0.05–0.54	培養(細胞質)	14
Eu錯体またはそれを含んだナノ粒子	CHO	-	培養(細胞膜)	6
	HeLa	0.3	培養(エンドソーム/リソソーム)	15
	HeLa	1	培養(エンドソーム)	16
	OK	0.5	培養(核)	17
蛍光タンパク質	HeLa, U-87 MG	1.2	プラスミドからの発現	18
	HeLa, brown adipocyte, C2C12 myotube	-	プラスミドからの発現	19
	<i>C. elegans</i>	0.8	プラスミドからの発現	20
	HeLa, medaka embryo	0.5	プラスミドからの発現	21
Nanodiamond	WS1	0.044	ナノワイヤとの共培養	22
	onion skin	<1.8	色素溶液への浸透	23
低分子化合物	NIH/3T3, HeLa, C2C12, Chang, BAT	0.4	培養(ER)	24
	HeLa	0.6	培養(ミトコンドリア)	25

参考文献

1. McCabe, K. M. & Hernandez, M. Molecular thermometry. *Pediatr. Res.* **67**, 469-475 (2010).
2. Inada, N. & Uchiyama, S. Methods and benefits of imaging the temperature distribution inside living cells. *Imaging Med.* **5**, 303-305 (2013).
3. Monti, M., Brandt, L., Ikomi-Kumm, J. & Olsson, H. Microcalorimetric investigation of cell metabolism in tumour cells from patients with non-Hodgkin lymphoma (NHL). *Scand. J. Haematol.* **36**, 353–357 (1986).
4. Okabe, K. *et al.* Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* **3**, 705 (2012)
5. Chapman, C. F., Liu, Y., Sonek, G. J. & Tromberg, B. J. The use of exogenous fluorescent probes for temperature measurements in single living cells. *Photochem. Photobiol.* **62**, 416-425 (1995).
6. Zohar, O. *et al.* Thermal imaging of receptor-activated heat production in single cells. *Biophys. J.* **74**, 82-89(1998).
7. Zeeb, V., Suzuki, M. & Ishiwata, S. A novel method of thermal activation and temperature measurement in the microscopic region around single living cells. *J. Neurosci. Methods* **139**, 69-77 (2004).
8. Uchiyama, S., Matsumura, Y., de Silva, A. P. & Iwai, K. Fluorescent molecular thermometers based on polymers showing temperature-induced phase transitions and labeled with polarity-responsive benzofurazans. *Anal. Chem.* **75**, 5926–5935 (2003).
9. Gota, C., Uchiyama, S. & Ohwada, T. Accurate fluorescent polymeric thermometers containing an ionic component. *Analyst* **132**, 121-126 (2007).
10. Gota, C., Uchiyama, S., Yoshihara, T., Tobita, S. & Ohwada, T. 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 (2008).
11. Gota, C. *et al.* Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2766-2767 (2009).
12. Tseeb, V. *et al.* Highly thermosensitive Ca²⁺ dynamics in a HeLa cell through IP3 receptors. *HFSP J.* **3**, 117-123 (2009).
13. Qiao, J. *et al.* Intracellular temperature sensing by a ratiometric fluorescent polymer thermometer. *J. Mater. Chem. B* **2**, 7544-7550 (2014).
14. Hayashi, T., Fukuda, N., Uchiyama, S. & Inada, N. A cell-permeable fluorescent polymeric thermometer for intracellular temperature mapping in mammalian cell lines. *PLoS One* **10**, e0117677 (2015).

15. Oyama, K. *et al.* Walking nanothermometers: spatiotemporal temperature measurement of transported acidic organelles in single living cells. *Lab Chip* **12**, 1591-1593 (2012).
16. Takei, Y. *et al.* A nanoparticle-based ratiometric and self-calibrated fluorescent thermometer for single living cells. *ACS Nano* **8**, 198-206 (2014).
17. Piñol, R. *et al.* Joining time-resolved thermometry and magnetic-induced heating in a single nanoparticle unveils intriguing thermal properties. *ACS Nano* **9**, 3134-3142 (2015).
18. Donner, J. S. *et al.* Mapping intracellular temperature using green fluorescent protein. *Nano Lett.* **12**, 2107-2111 (2012).
19. Kiyonaka, S. *et al.* Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. *Nat. Methods* **10**, 1232-1238 (2013).
20. Donner, J. S. *et al.* Imaging of plasmonic heating in a living organism. *ACS Nano* **7**, 8666-8672 (2013).
21. Nakano, M. *et al.* Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. *PLoS ONE* **12**, e0172344 (2017).
22. Kucsko, G. *et al.* Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature* **500**, 54-58 (2013).
23. Paviolo, C., Clayton, H. A. A., McArthur, L. S. & Stoddart, R. P. Temperature measurement in the microscopic regime: a comparison between fluorescence lifetime - and intensity - based methods. *J. Microsc.* **250**, 179-188 (2013).
24. Arai, S. *et al.* A Molecular Fluorescent Probe for Targeted Visualization of Temperature at the Endoplasmic Reticulum. *Sci. Rep.* **4**, 6701 (2014).
25. Homma, M. *et al.* A ratiometric fluorescent molecular probe for visualization of mitochondrial temperature in living cells. *Chem. Commun.* **51**, 6194-6197 (2015).

第 2 章 自発的に細胞内に移行するカチオン性蛍光高分子温度計の開発

本章では、酵母細胞を用いた細胞内移行型の蛍光高分子温度計の開発結果について述べる。

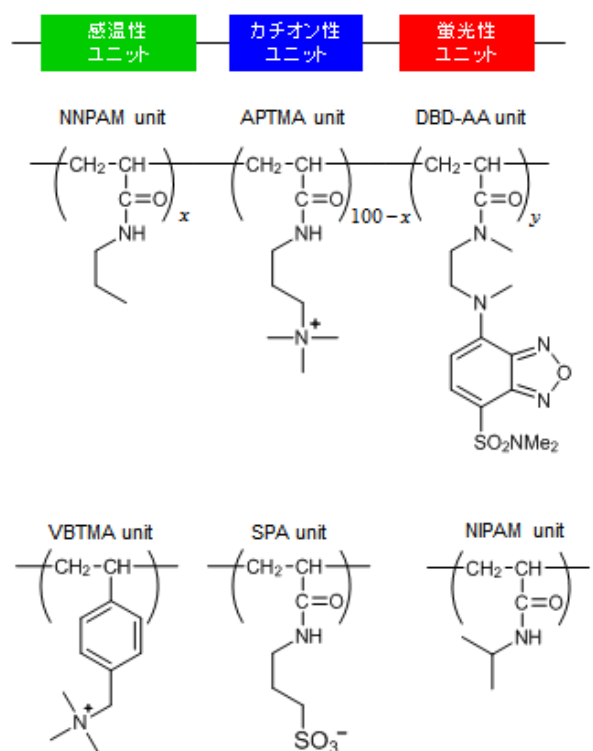
第 1 節 序論

酵母は、パンやアルコールの製造に関わる食品産業において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。それに加え、ヒトを始めとする真核生物のモデル生物としても、酵母は長年研究対象とされてきた¹。ビールやワインなどの醸造、そしてバイオエタノール生産といった酵母を産業利用する場合、用いる酵母の「活性」を予め把握しておくことが重要な検査項目となる。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るためには、高い活性を示す酵母を用いる必要がある。例を挙げると、ビール醸造、特に回分式を用いた製造においては、酵母は主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²。ワイン醸造のように主に乾燥酵母を復水して醸造に用いることもある。いずれの場合においても、使用する酵母の活性は、ビールやワインという最終発酵製品の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³、あるいは細胞内 pH(ICP)⁴といった幾つかの手法が頻繁に用いられている。しかしながら、cfu 評価は計測に長時間を有するという課題があり、細胞内還元力では、生死(viability)を判別できるが、生きている細胞の活性(vitality)の微妙な差を評価することは難しいという課題がある。ICP 法は、他の 2 つの方法に比べて生細胞のわずかな活性の違いを見分けられる高い精度を持った技術であり、広く利用されているが⁵、低温保存や酵母の繰り返し利用というストレス条件下の酵母の異変を如実に反映する⁵一方、他のストレス条件に対して全く応答を示さない可能性もある。そこで、新たな活性計測手法として細胞内の温度に着目した。「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ため、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、酵母細胞の発酵効率とカロリメトリー法によって計測した酵母細胞からの発熱量に相関があることを見出している⁶。以上より、細胞内の温度変化を感度よく、簡便に計測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りうると考えられた。しかしながら、酵母細胞は一般的な哺乳類細胞のサイズ(10–30 μm)と比較して小さく(< 10 μm)、かつキチンとグルカンから構成される硬い細胞壁に覆われているため、今まで哺乳類細胞で行われていた蛍光高分子温度計を直接細胞内に微小針で打ち込む(マイクロインジェクション法)方法を活用することは極めて難しい。実際にマイクロインジェクションを使った酵母細胞内への物質導入は、特殊な装置を使った分裂酵母での報告⁷など極めて限られた系に限られている。そこで本研究では、酵母に導入できる新規蛍光高分子温度計の開発を通じて、新たに酵母細胞内温度計測手法を確立することを目的とした。

まず、感温性を示す poly(N-alkylacrylamide) ユニット、イオン性ユニット、疎水環境に応答して蛍光を発する DBD-AA ユニットの 3 ユニットからなる既知の蛍光高分子温度計⁷の構造に基づいて、新規カチオン性蛍光共重合体 NN-APx (x = 2.5, 5, 7.5, 25) と NN-VB2.5 を合成した(図 2-1)。酵母細胞内へ自発的に蛍光高分子が導入されるように、pH 非感受性の第四級アンモニウム基を有するカチオン性モノマー APTMA および VBTMA をイオン性ユニットとして採用した。カチオン性モノマーは、ポリエチレンイミン⁸、カチオン性リポソーム⁹、arginine-rich peptides¹⁰、およびカチオン性脂質¹¹ などのカチオン性化合物が、細胞外から生細胞へタンパク質や遺伝子を自発的に取り込ませるキャリアとして利用されている実績があることから採用することとした。また採用した両カチオン性モノマーは市販されている化合物でもあり、コスト面でも優位性があると考えられた。さらに、酵母以外での幅広い分野への応用を考え、NN/NI-AP2.5 という感温性の poly(N-*n*-propylacrylamide-co-N-isopropylacrylamide) ユニットとカチオン性ユニット APTMA を含んだカチオン性蛍光高分子温度計も合成した(図 2-1)。NN/NI-AP2.5 は、感温性ユニットの一部置換により温度応答範囲が高温領域へとシフトすることが見込まれた^{12a}。

次に、合成した蛍光共重合体の酵母細胞への導入条件を、処理時間、温度、溶液の化学組成の面から検討した。さらに蛍光共重合体の毒性をメチレンブルーアッセイにて評価した¹³。蛍光共重合体の温度変化に対する蛍光応答(蛍光強度および蛍光寿命)を、150 mM KCl 水溶液および酵母細胞(*in vivo*)で試験した。最後に、非接着性哺乳類細胞 MOLT-4 および接着性細胞 HEK293T における NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 の温度応答機能を確認することで、マイクロインジェクション法を必要としない新規のカチオン性蛍光高分子温度計を開発するに至った。



copolymer	monomer		A:B:DBD-AA in feed [°]
	A ^ª	B ^º	
NN-AP2.5	NNPAM	APTMA	97.5:2.5:1
NN-AP5	NNPAM	APTMA	95:5:1
NN-AP7.5	NNPAM	APTMA	92.5:7.5:1
NN-AP25	NNPAM	APTMA	75:25:1
NN-VB2.5	NNPAM	VBTMA	97.5:2.5:1
NN	NNPAM	none	100:0:1
NN-SPA5	NNPAM	SPA	95:5:1
NN/NI-AP2.5	NNPAM and NIPAM	APTMA	47.85:47.85:2.5:1 [¶]

^ª 感温性ユニット. ^º カチオン性もしくはアニオン性ユニット.
[°] モル比. [¶] NNPAM:NIPAM:APTMA:DBD-AA.

図 2-1. 本研究で合成した蛍光高分子の化学構造.

APTMA: (3-acrylamidopropyl)trimethylammonium; DBD-AA: *N*-{2-[(7-*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl]}(methyl)aminoethyl-*N*-methylacrylamide; VBTMA: vinylbenzyltrimethylammonium; SPA: 3-sulfopropyl acrylate; NIPAM: *N*-isopropylacrylamide. Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

第2節 材料と実験手法

1. 試薬

VBTMA chloride と SPA potassium salt は Sigma-Aldrich から購入した。NIPAM は和光純薬工業から購入し、*n*-hexane で再結晶して使用した。NNPAM は *N*-alkylacrylamides の一般的な合成法に従い、合成・精製を行った¹⁴。 α,α' -Azobisisobutyronitrile (AIBN) は和光純薬工業から購入し、メタノールで再結晶して使用した。APTMA chloride は東京化成工業から購入した。水は Millipore 社の Milli-Q を使用した。その他の試薬は、市販特級品を精製せずにそのまま使用した。

2. 共重合体の合成

N-Alkylacrylamide (NNPAM と NIPAM の両方またはどちらか一方) とカチオン性モノマー (APTMA chloride または VBTMA chloride) は併せて 2.5 mmol になるように設定し、その比を図 2-1 に示した。DBD-AA (25 μ mol)^{12b}、AIBN (25 μ mol) を *N,N*-dimethylformamide (DMF, 5 mL) に溶解し、30 分間アルゴンガスを吹き込むことにより溶存酸素を除いた。その溶液を 60°C で 12 時間反応させた後、室温まで冷やした。反応溶液をジエチルエーテル (200 mL) にそそぎ、析出した共重合体をろ取して、透析により精製した。収量、収率は表 2-1 に示した。

3. 合成した共重合体のキャラクタリゼーション

合成した共重合体に含まれる NNPAM、NIPAM、APTMA、SPA、VBTMA の各ユニットの割合は、共重合体の ¹H-NMR (Bruker AVANCE400) 上の強度比から決定した。蛍光高分子温度計に含まれる DBD-AA ユニットの割合は、メタノール溶液中の 444 nm における吸光度を、モデルの蛍光物質として DBD-IA (*N*,2-dimethyl-*N*-(2-(methyl[7-(dimethylsulfamoyl)-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl]amino)ethyl) propanamide)¹⁵ のメタノール溶液中における吸光度 ($\epsilon = 10,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 444 nm) と比較することにより決定した。合成した蛍光高分子温度計の各ユ

ニット構成比は、表 2-1 に示した。蛍光高分子温度計の分子量は、gel-permeation chromatography (GPC) によって求めた^{12b}。装置には JASCO PU-2080 ポンプ、JASCO RI-2031 示差屈折率検出器、JASCO CO-2060 カラム温度自動調節器と Shodex GPC KD806-M カラムを用いた。移動相には 5 mM LiBr を含む 1-methyl-2-pyrrolidinone を用いた。分子量の校正にはポリスチレン標準試料を用いた。得られた重量平均分子量(M_w) と数平均分子量(M_n) の値は表 2-1 に示した。

4. 酵母細胞への蛍光高分子の導入法

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* SYT001 株¹⁶、もしくは BY4742 株、そのエンドサイトーシス欠損株である BY4742 *end4* 株¹⁷を YPD (Yeast extract Peptone Dextrose; 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)培地 3 mL に植菌し、30°Cで OD₆₀₀ (GeneQuant1300、GE Healthcare)が 6–8 になるまで好気振とう培養した。培養液を遠心分離(800 x g, 5 min)し、水で 1 回洗浄後に、再度遠心分離を行い、1.2 M sorbitol 水溶液で洗浄を 1 回行った。十分に洗浄した後、OD₆₀₀ が 1 となるように 1.2 M sorbitol 水溶液、水、0.28 M グルコース水溶液、0.3 M sorbitol 水溶液、50 mM KCl 水溶液、PBS(Phosphate buffered saline)緩衝液、もしくは YPD 培地を添加し、懸濁した。100 μ L の酵母細胞懸濁液に、5 w/v%で純水に溶かした蛍光高分子を終濃度が 0.05 w/v%となるように添加し、4°Cもしくは 25°Cで、1 分、10 分もしくは 20 分静置した。その後、遠心分離(9,100 x g, 1 min)し、速やかに上清を除き、1.2 M sorbitol, 50 mM KCl の混合水溶液 500 μ L で洗浄を 1 回を行い、細胞壁に付着した蛍光共重合体を除去した。洗浄した酵母細胞を PBS 緩衝液に懸濁し、共焦点レーザー顕微鏡もしくは各種光度計に供した。

表 2-1. 合成した共重合体の物性

共重合体	収率(%)	共重合体の構成比		M_w^c	M_n^d
		x^a	y^a		
NN-AP2.5	66	96.9	0.95	21,600	10,100
NN-AP5	74	94.1	0.91	15,200	8,170
NN-AP7.5	76	90.4	0.92	11,600	6,580
NN-AP25	70	70.3	0.95	5,460	4,040
NN-VB2.5	22	96.2	1.1	18,400	10,100
NN	58	100	1.1	92,000	36,000
NN-SPA5	52	94.9	1.0	39,200	17,600
NN/NI-AP2.5	50	50.3/47.4 ^b	0.81	19,700	10,400

^a 図 2-1 参照 ^b NNPAM / NIPAM ユニット ^c 重量平均分子量 ^d 数平均分子量

Adapted with permission from ref. 18. Copyright 2017 American Chemical Society.

5. 哺乳類細胞 MOLT-4 と HEK293T 細胞への NN-AP2.5 と NN/NI-AP2.5 蛍光高分子温度計の導入法

非接着性細胞 MOLT-4(ヒト急性リンパ芽球性白血病 T 細胞)¹⁹ を RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 培地(10% fetal bovine serum (FBS), Gibco)で、100 mm ディッシュにて培養した(播種 1×10^6 cells/mL)。1 日後、培養液 3 mL を遠心分離(400 x g, 3 分)し、培地を取り除き、5%グルコースで洗浄後、再度 5%グルコース 1 mL で懸濁し、 1×10^6 cells/mL の細胞濃度に調製した。5 w/v%で純水に溶かした NN-AP2.5 もしくは NN/NI-AP2.5 を終濃度 0.05%となるように細胞懸濁液に添加し、15°C、10 分処理後、遠心(400 x g, 3 分)し、上清を取り除き、PBS で洗浄後、再度 PBS に懸濁した。

また、HEK293T 細胞を DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)培地(Gibco No. 11965, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin)、35 mm ガラスボトムディッシュにて培養した(播種 1×10^6 cells/mL)。培養 1 日後、培地を 5%グルコースに置換し、NN-AP2.5 もしくは NN/NI-AP2.5 を終濃度 0.05 w/v%となるように添加した。15°C、10 分処理後、PBS で洗浄し、1 mL の phenolred-free の DMEM 培地(Gibco No. 21063 を上記 No. 11965 の代わりに使用)に置換し、ライブセルイメージングを行った。

6. 細胞の蛍光顕微鏡観察

酵母細胞と MOLT-4 細胞の観察では、約 10 μ L の細胞懸濁液をスライドガラス(スーパーフロスト、松浪硝子工業)に載せ、カバーガラス(松浪硝子工業)で封をした後、スライドガラスをステージ(Olympus)に載せ、共焦点レーザー顕微鏡(FV1000、Olympus)、100 倍油浸対物レンズ(UplanSApo NA 1.40, Olympus)を用いて観察した。HEK293T 細胞の場合は、ガラスボトムディッシュに培養した細胞を直接観察した。蛍光高分子温度計(DBD-AA)を観察する際には、細胞に 473 nm のレーザー(Multi Ar レーザー)を照射し、500 nm から 600 nm までの蛍光波長に対する蛍光像を観察し、1 枚の像を 0.52 秒掛けて撮影した。得られた像は FluoView (Olympus)で

解析を行った。培地温度は、顕微鏡用チャンバー(Water Jacket Top Stage Incubator H101、Okolab)で制御した。

細胞に導入された蛍光共重合体の割合を示す導入効率(%)は以下の式1によって算出した。

$$\text{導入効率 (\%)} = \text{蛍光共重合体を含んだ細胞数} / \text{総細胞数} \times 100 \quad (\text{式 1})$$

酵母細胞壁の観察には、Calcofluor White M2R (Invitrogen)²⁰ を使用し、10 μL の Calcofluor White M2R 水溶液(1 mg/mL) を 1 mL の NN-AP2.5 処理をした酵母細胞懸濁液と混合し、室温下で 10 分インキュベートした。MOLT-4 の核の観察には、Hoechst 33342 (Dojindo)²¹ を使用した。1 μL の Hoechst 33342 水溶液(1 mg/mL) を 100 μL の NN-AP2.5 処理した MOLT-4 細胞懸濁液と混合し、室温下で 30 分インキュベートした。Calcofluor White M2R と Hoechst 33342 の観察は、DM405/473 の励起用ダイクロイックミラーを介して 405 nm で励起、SDM473 の蛍光用ダイクロイックミラーを通じて蛍光波長 405-450 nm (可変フィルタ) で観察し、上述の蛍光高分子(DBD-AA)との同時観察を行った。

7. 蛍光共重合体の細胞毒性評価法

1.2 M sorbitol 水溶液にて各種蛍光共重合体(0.05 w/v%)で処理(25°C, 10 分)した酵母細胞懸濁液に、等量の 2%クエン酸三ナトリウムを含んだ 0.02%メチレンブルー水溶液を添加し、25°C, 30 分間インキュベートした。蛍光共重合体が導入された 100 細胞の内の非染色細胞数(生細胞)を顕微鏡観察下でカウントし、viability を算出した^{13b}。

8. カチオン性蛍光共重合体の蛍光強度および蛍光寿命計測法

カチオン性蛍光共重合体の蛍光強度計測には FP-6500 分光蛍光光度計(JASCO)を、蛍光寿命計測には FluoroCube 3000U 時間相関単一光子計数法蛍光寿命計測装置(Horiba Jobin

Yvon)を用いた。溶液の温度制御には ETC-273T 水冷ペルチェ式恒温セルホルダ(JASCO) を使用し、付属の熱電対によりセルホルダ内の温度を計測した。

細胞内の蛍光共重合体の応答を計測する場合には、蛍光共重合体を導入処理した細胞を PBS に懸濁し、キュベット(0.8 もしくは 4 mL)に入れ、さらに 2 mm 直径の球状の攪拌子も入れた。キュベットを各分光計にセットし、約 800 rpm の速度で回転させ、細胞が沈むのを防ぎながら、計測を行った。温度を変化させる場合には、細胞内部の温度と外部の温度を一定にするよう温度上昇後 5 分以上静置し、計測を開始した。

蛍光寿命計測は励起波長 456 nm LED(NanoLED-456, Horiba)、蛍光波長 560 nm で、パルス繰り返し数を 1 MHz で計測を行った。得られた蛍光減衰曲線を以下に示す式 2 により近似し、2 成分の蛍光寿命を得た。

$$I(t) = B_1 \exp(-t/\tau_1) + B_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (\text{式 2})$$

さらにその 2 成分値から蛍光寿命値 (τ_f) を以下の式 3 から算出した。

$$\tau_f = (B_1\tau_1^2 + B_2\tau_2^2)/(B_1\tau_1 + B_2\tau_2) \quad (\text{式 3})$$

NN-AP2.5 と NN/Ni-AP2.5 の温度分解能 (δT) は、以下式 4 に基づき、評価した。

$$\delta T = \left(\frac{\partial T}{\partial \tau_f} \right) \delta \tau_f \quad (\text{式 4})$$

ここで $\partial T / \partial \tau_f$ は蛍光寿命 - 温度の相関を示したグラフの傾きの逆数を、 $\delta \tau_f$ は蛍光寿命の標準偏差 SD を示す。その SD は、1 サンプルの 3 回計測から求めた。

第3節 結果

1. 蛍光高分子(共重合体)の合成とキャラクタリゼーション

蛍光共重合体は、ランダム重合により合成し、感温性ユニットとイオン性ユニットの化合物名とイオン性ユニットの feed 量比を用いてポリマー名を表現した。例えば、NN-AP2.5 は NNPAM と APTMA の両ユニットからなり、NNPAM:APTMA = 97.5:2.5 である。合成した共重合体に含まれる各ユニットの組成は、¹H-NMR および吸光度計測によって決定した。表 2-1 に示すように、共重合体中のユニット比は feed 原料のモノマー比によく一致した(図 2-1)。

2. 酵母細胞への蛍光共重合体の導入結果

蛍光共重合体で処理した酵母 *S. cerevisiae* 細胞の代表的な微分干渉像と共焦点蛍光像を図 2-2 に示す。カチオン性ユニットを含んだ NN-APx(x = 2.5, 5, 7.5, 25)、NN-VB2.5、および NN/NI-AP2.5 由来の蛍光は、酵母細胞内にて一様に検出されたのに対し、カチオン性ユニットを含まない NN および NN-SPA5 の両共重合体は、酵母細胞内での蛍光を観察することはできなかった。図 2-3 に、NN-AP2.5 および Calcofluor White M2R で同時染色した酵母細胞の蛍光画像を示す。Calcofluor White M2R で染色された細胞壁は、NN-AP2.5 由来の蛍光と全く重ならないことから、図 2-2 で観察されたカチオン性蛍光共重合体は、細胞質膜または細胞壁のいずれにも付着しておらず、カチオン性蛍光共重合体は細胞質に直接的に導入されることがわかった。また、酵母細胞の形態は、カチオン性蛍光共重合体の取り込みによって大きく変化しなかったことから顕著な毒性はないと示唆された。導入されたカチオン性蛍光共重合体は、2 時間経っても酵母細胞内にとどまっていた(図 2-4)。

次に、処理時間による酵母細胞への蛍光性共重合体の導入効率の変化を共焦点蛍光像から、算出した。表 2-2 に示したように、カチオン性蛍光共重合体である NN-APx(x = 2.5, 5, 7.5, 25)、NN-VB2.5 および NN/NI-AP2.5 は、処理後に速やかに酵母細胞に自発的に移行し、1 分の処理時間でも細胞内に移行していた。一方、NN および NN-SPA5 は、条件を変えても自発的に酵

母細胞に移行する機能は全く認められなかった。NN-AP2.5 を除く全てのカチオン性蛍光共重合体の酵母細胞への取り込みは、10 分以内で取り込み量が飽和していた。処理時間 1 分で比較した場合、一連の NN-APx (x = 2.5, 5, 7.5 および 25) の結果から、蛍光共重合体中のカチオン性ユニット APTMA の割合が増加するにつれ、酵母細胞への導入効率が増加することが明らかとなった。また、NN-AP2.5 と NN-VB2.5 を比較したところ、両者のカチオン性ユニット比率はほぼ同じであるにも関わらず、NN-VB2.5 は NN-AP2.5 よりも酵母細胞内に導入されやすかった。

表 2-3 は、1.2 M および 0.3 M sorbitol 水溶液、0.28 M のグルコース水溶液、水、50 mM KCl 水溶液、PBS 緩衝液 (pH7.5) そして YPD 培地を用いて酵母細胞への NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 の導入効率をまとめたものである。酵母細胞におけるカチオン性蛍光共重合体の導入効率は、処理溶液の組成によって著しく影響されることがわかった。興味深いことに、NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 の酵母細胞への移行は、電解質を含む溶液中で完全に阻害された。表 2-3 に示すように、1.2 M sorbitol 水溶液は、カチオン性蛍光共重合体の酵母細胞への導入に適していた。取り込みに影響を与えるもう一要因として温度があることも明らかとなった。1.2 M sorbitol 水溶液中での 4°C での NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 の酵母細胞への導入効率は、NN-AP2.5 で 25°C と同程度であったが、NN/NI-AP2.5 では、4°C で 25°C よりも導入効率が低下した (表 2-3)。また、蛍光共重合体の酵母細胞内移行におけるエンドサイトーシスの寄与を明らかにするために、エンドサイトーシス欠損株 BY4742 *end4* を用いて、NN-AP2.5 の細胞内導入効率を評価した結果 (1.2 M sorbitol 水溶液中、10 分、25°C の処理条件)、親株の BY4742 株は 25 ± 2.3 (%) であったのに対し、BY4742 *end4* 株は 31.7 ± 0.7 (%) であった。エンドサイトーシス欠損株での有意な導入効率の低下が認められなかったことから、NN-AP2.5 の細胞内移行に関して、細胞のエンドサイトーシスの寄与は小さいと考えられた。

最後に、カチオン性蛍光共重合体の細胞毒性を、メチレンブルーアッセイを用いて評価した。メチレンブルーアッセイは、細胞内の還元活性を生存率の指標に利用した方法である。表 2-4 に

示すように、全てのカチオン性蛍光共重合体は、酵母細胞に対して一定程度の細胞毒性を示した。また、表 2-4 の結果は、共重合体中のカチオン性ユニットが増加するにつれて、カチオン性蛍光共重合体の細胞毒性が増加することを示している。特に、**NN-AP25** は、本研究で試験した高分子の中で最も高い細胞毒性を示したが、一方で、カチオン性ユニットがこれより低い蛍光共重合体は許容可能な生存率を示した。

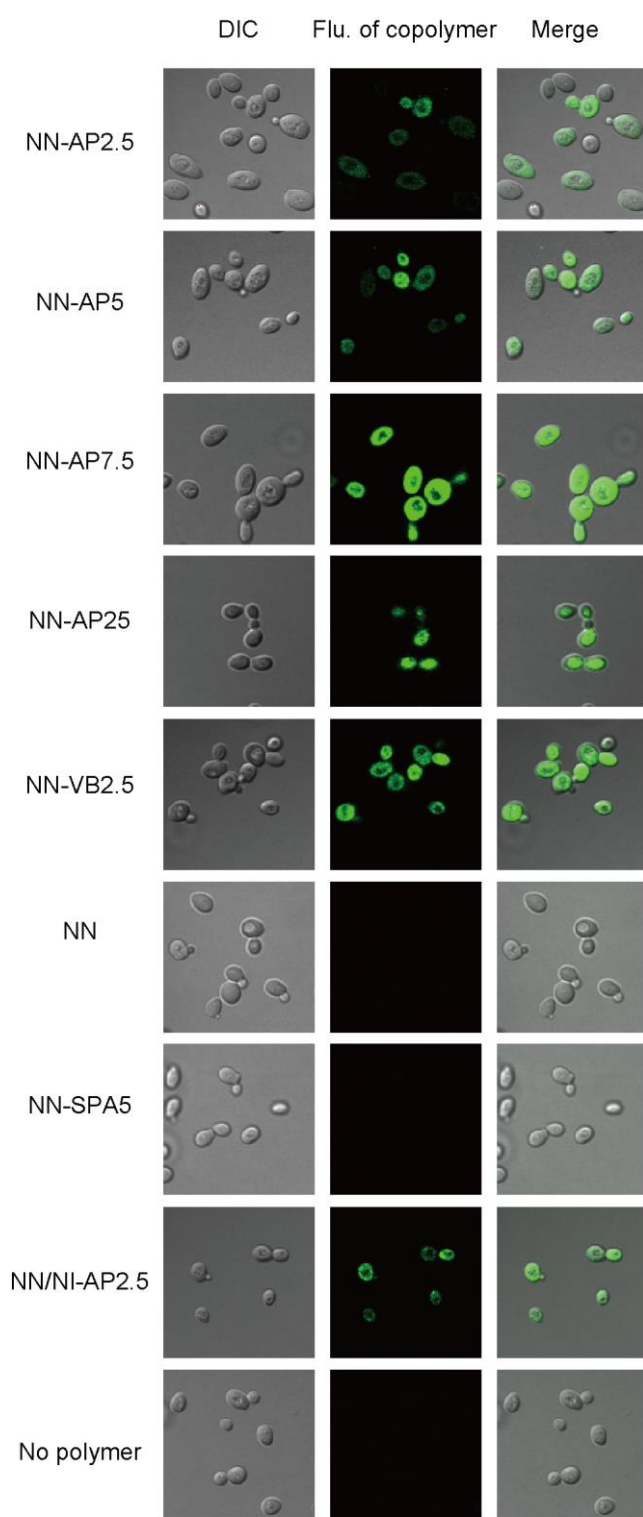


図 2-2. 蛍光共重合体で処理した酵母細胞の蛍光顕微鏡像

左から微分干渉像、共焦点蛍光像、重ね合わせ (merge) 像。Bar, 5 μm 。

Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

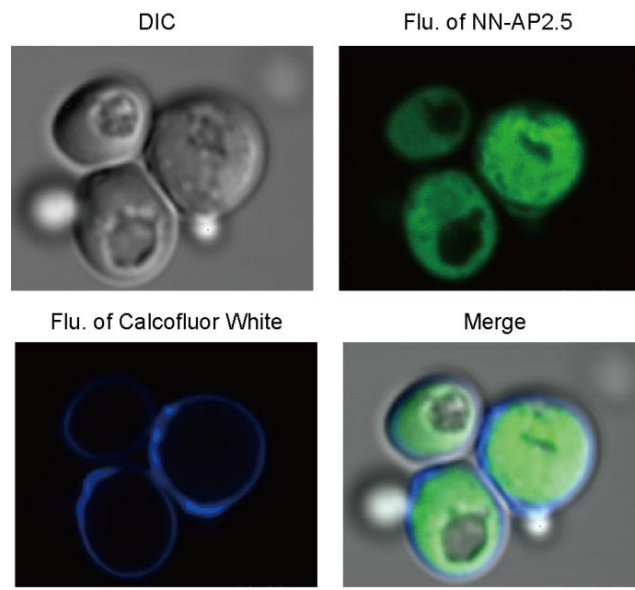


図 2-3. NN-AP2.5 を導入した酵母の微分干渉像(左上)および蛍光像(右上)
 左下図は、同一の酵母を CalcofluorWhite によって細胞壁を染色した像で、重ね合わせ (merge)
 像(右下)。Bar, 2 μ m。Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American
 Chemical Society.

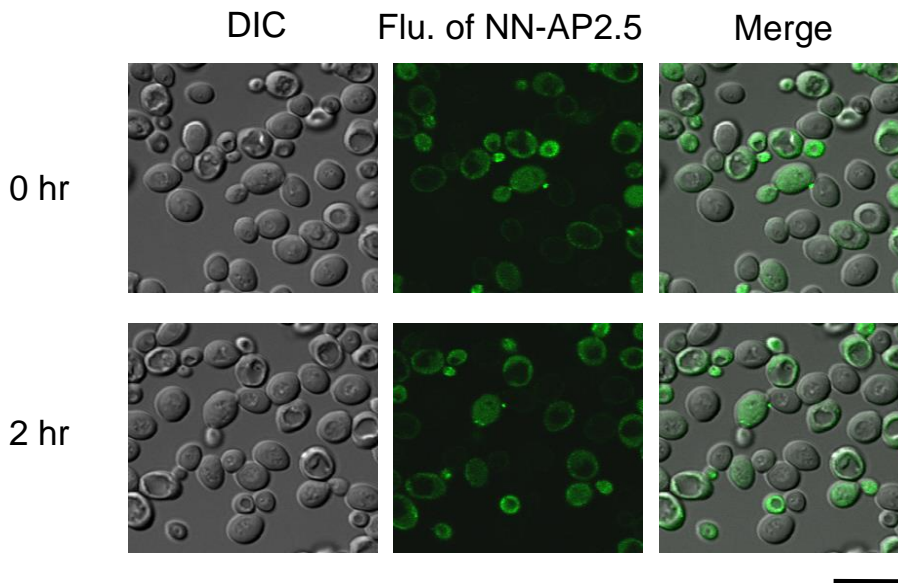


図 2-4. NN-AP2.5 で処理した酵母細胞の形態
 微分干渉像(Differential interference contrast (DIC)、左)、共焦点蛍光像(中央およびそれら
 の重ね合わせ像(右)を同一視野で 2 時間観察した。時間(0hr および 2hr)は、NN-AP2.5 を酵
 母細胞に導入した後の経過時間を示す。Bar, 5 μ m。Adapted with permission from ref.18.
 Copyright 2017 American Chemical Society.

表 2-2. 処理時間毎の蛍光共重合体の 25°Cにおける酵母細胞への導入効率

共重合体	導入効率(%) ^a		
	1 min ^b	10 min ^b	20 min ^b
NN-AP2.5	14.0 ± 4.2	49.1 ± 4.5	71.7 ± 4.2
NN-AP5	65.3 ± 4.2	90.0 ± 1.7	88.2 ± 2.6
NN-AP7.5	96.9 ± 1.0	99.6 ± 0.5	100 ± 0.0
NN-AP25	97.5 ± 1.8	96.0 ± 3.4	94.9 ± 1.7
NN-VB2.5	97.4 ± 1.0	95.6 ± 1.3	96.0 ± 2.3
NN	0	0	0
NN-SPA5	0	0	0
NN/NI-AP2.5	22.6 ± 1.9	65.7 ± 3.5	67.7 ± 9.5

^a Mean ± SD, *n* = 3. 細胞は 1.2 M sorbitol で処理した。^b 処理時間

Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

表 2-3. NN-AP2.5 と NN/NI-AP2.5 の酵母細胞への導入効率に及ぼす溶液組成と温度の効果

細胞懸濁液	温度 (°C)	導入効率 (%) ^a	
		NN-AP2.5	NN/NI-AP2.5
1.2 M sorbitol	25	49.1 ± 4.5	65.7 ± 3.5
1.2 M sorbitol	4	46.4 ± 4.0	19.0 ± 3.6
0.30 M sorbitol	25	59.4 ± 5.9	19.0 ± 2.5
0.28 M glucose	25	6.4 ± 2.1	3.4 ± 2.7
water	25	12.4 ± 1.9	11.9 ± 1.4
50 mM KCl	25	0	0
PBS	25	0	0
YPD	25	0	0

^a Mean ± SD, *n* = 3.

Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

表 2-4. メチレンブルー法による蛍光共重合体の毒性評価結果

共重合体	細胞生存率(%) ^a
NN-AP2.5	68.3 ± 3.9
NN-AP5	42.0 ± 2.2
NN-AP7.5	23.3 ± 7.4
NN-AP25	9.3 ± 3.1
NN-VB2.5	50.0 ± 0.8
NN/NI-AP2.5	83.7 ± 1.2

^a Mean ± SD, *n* = 3.

Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

3. カチオン性蛍光共重合体の温度変化に対する蛍光応答

まず初めに、カチオン性蛍光共重合体の 150 mM KCl 水溶液中における温度変化に対する蛍光応答を調べた。図 2-5A に示すように、NN-AP2.5 および NN-AP5 の蛍光強度は、温度が上昇するにつれて増加した。対照的に、NN-AP7.5 および NN-AP25 は温度変化に応答しなかった。一連の NN-AP x ($x = 2.5, 5, 7.5, 25$) を比較すると、共重合体中のカチオン性ユニット APTMA の割合が増加すると、温度変化に対する蛍光強度変化が小さくなり、応答し難くなることが示された。蛍光寿命に関して同様の計測を行うと、NN-AP2.5 および NN-AP5 の蛍光寿命は、温度が上昇するにつれて延長し、NN-AP2.5 が最も高い感度を示した(図 2-6A)。また、NN-VB2.5 の蛍光応答は、NN-AP2.5 の蛍光応答と同程度であることがわかった。(図 2-5B および 2-6B)。NN/Ni-AP2.5 も温度変化に応答したが、その温度応答範囲は NN-AP2.5 の応答範囲より約 5°C 程度高温側にシフトしており、期待通りの結果となった(図 2-5B および 2-6B)。次に、イオン強度および pH 変化が、NN-AP2.5 および NN/Ni-AP2.5 の温度応答性に及ぼす影響を調べた。酵母細胞の細胞質におけるイオン強度は、主にカリウムに起因して約 0.26–0.34 であり²²、pH は 7.1–7.2 である²³と報告されていることから、十分に生理的条件を考慮して図 2-7 のようなイオン強度、pH の試験範囲を設定した。その結果、温度変化に対する NN-AP2.5 および NN/Ni-AP2.5 の蛍光応答は、イオン強度 0.2–0.5 の範囲、および pH 4–10 の範囲で、影響をほとんど受けなかった(図 2-7)。

次に、カチオン性蛍光共重合体の *in vivo* での蛍光応答を、酵母細胞内に導入した共重合体の蛍光を分光光度計で計測して調べた。酵母細胞内の NN-AP2.5 の温度上昇に伴う蛍光スペクトルの変化を図 2-8A に示した。酵母細胞が正常に増殖する温度範囲である 15–35°C における酵母細胞内の NN-AP x ($x = 2.5, 5, 7.5$ および 25) の蛍光強度変化を図 2-8B に示す。NN-AP2.5、NN-AP5 そして NN-AP7.5 は、温度変化に対して蛍光強度も変化した。カチオン性蛍光高分子温度計中のカチオン性ユニット APTMA 比率の増加は、温度変化に対する蛍光強度の変化率の低下を引き起こし、それは 150 mM KCl 溶液中の結果と一致した。NN-VB2.5 もま

た温度変化に応答したが(図 2-8C)、NN-AP2.5 より感度は低かった。NN-VB2.5 および NN-AP2.5 の 15 °C から 35 °C へ変化したときの蛍光強度変化の増加率 (fluorescence-enhancement factors) はそれぞれ 1.8 倍および 2.2 倍であった。酵母細胞中の NN/NI-AP2.5 もまた、温度変化に対して反応し、NN-AP2.5 の温度応答範囲よりも高い温度領域で応答した(図 2-8C)。さらに酵母細胞における NN-AP2.5 の蛍光強度の変化は、加熱および冷却の少なくとも 5 サイクルにわたって可逆的であった(図 2-9)。

酵母細胞内におけるカチオン性蛍光高分子温度計の温度変化に対する蛍光寿命応答を図 2-10A と B に示した。NN-AP2.5、NN-AP5、NN-VB2.5、および NN/NI-AP2.5 の蛍光寿命は、温度変化に依存して延長した(図 2-10A, B)。これらのカチオン性蛍光共重合体の中で、NN-AP2.5 は 15–35°C の間で温度変化に対して最も応答性が高く、酵母細胞の細胞内温度計測に最も適したカチオン性蛍光高分子温度計であった。蛍光寿命の繰り返し計測における標準偏差から区別可能な最小温度(温度分解能)を算出した結果、酵母細胞内の NN-AP2.5 は、20–35°C の温度範囲で 0.09–0.62°C の温度分解能と評価された(図 2-10C)。

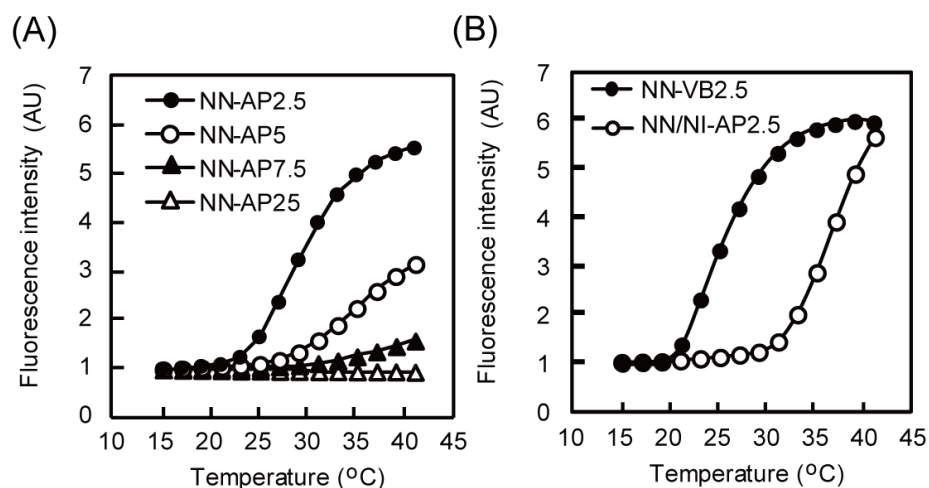


図 2-5. カチオン性蛍光共重合体の蛍光強度応答

(A, B) NN-AP x ($x = 2.5, 5, 7.5$ または 25) (A)と NN-VB2.5 と NN/NI-AP2.5 (B)の温度変化に対する蛍光強度変化。150 mM KCl 水溶液に 0.01 w/v%濃度で共重合体を溶かした。励起波長は 456 nm で、蛍光波長は 567 nm。全ての蛍光強度は 15°Cにおける蛍光強度で正規化して表現した。Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

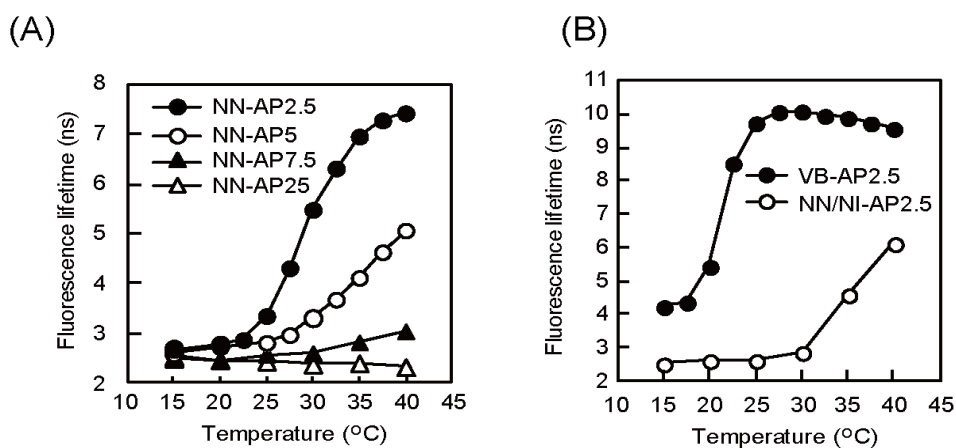


図 2-6. カチオン性蛍光共重合体の蛍光寿命応答

(A, B) NN-AP x ($x = 2.5, 5, 7.5$ または 25) (A)と NN-VB2.5 と NN/NI-AP2.5 (B)の温度変化に対する蛍光寿命変化。150 mM KCl 水溶液に 0.001 w/v%濃度で共重合体を溶かした。励起波長は 456 nm で、蛍光波長は 565 nm。Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

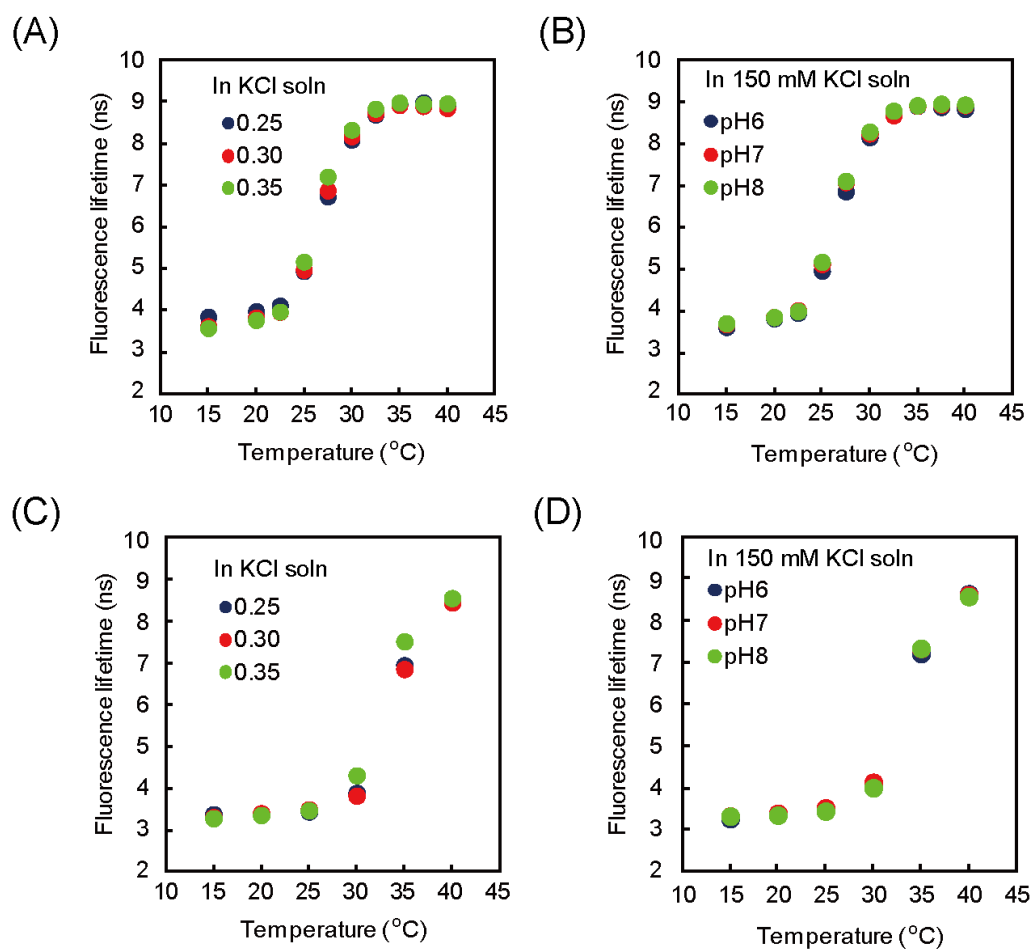


図 2-7. NN-AP2.5 と NN/Ni-AP2.5 の温度応答性の他の因子の影響

NN-AP2.5 (A, B) と NN/Ni-AP2.5 (C, D) (0.001 w/v%)の蛍光寿命応答に対するイオン強度(A, C)と pH (B, D)変化の影響。励起波長は 456 nm で蛍光波長は 565 nm で計測を行った。pH 調整は HCl と KOH で行った。Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

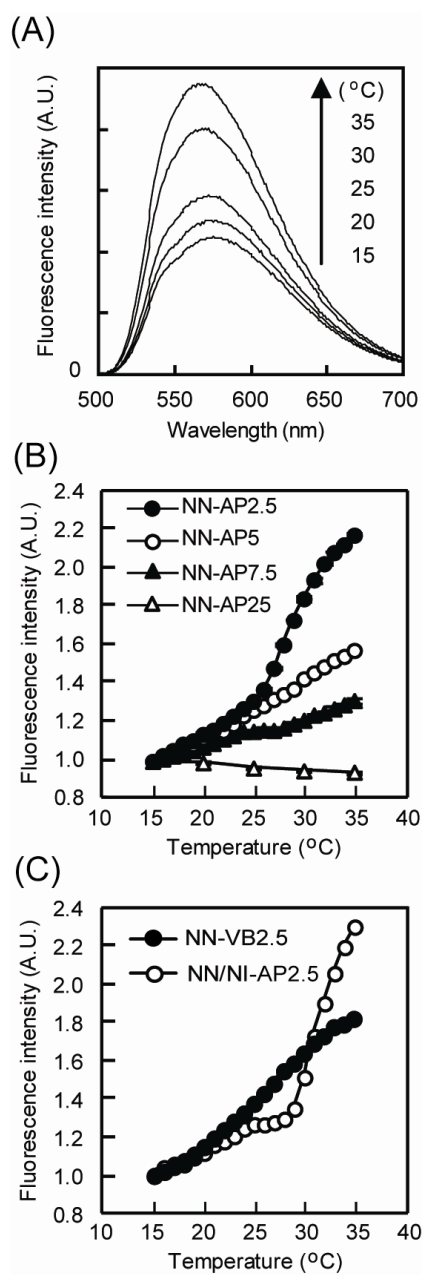


図 2-8. 酵母細胞内のカチオン性蛍光共重合体の蛍光強度応答

(A)酵母細胞内の NN-AP2.5 の蛍光スペクトル。励起波長は 456 nm。(B, C) 酵母細胞内の(B) NN-APx ($x = 2.5, 5, 7.5$ または 25) と (C) NN-VB2.5 および NN/NI-AP2.5 の温度に対する蛍光強度変化(mean \pm SD, $n = 3$)。励起波長は 456 nm で、蛍光波長は 565 nm。エラーバーは、標準偏差 SD を示しており、本グラフでは、値が小さくて見えない。Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

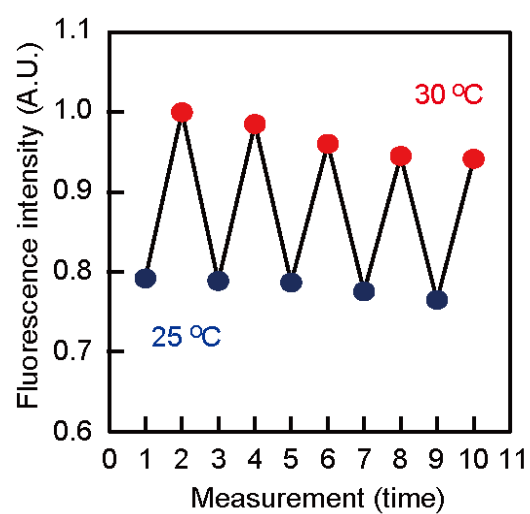


図 2-9. 酵母細胞内の NN-AP2.5 の蛍光強度応答の可逆性

励起波長は 456 nm で、蛍光波長は 565 nm (mean \pm SD, n = 3)。エラーバーは、標準偏差 SD を示しており、本グラフでは、値が小さくて見えない状態である。Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

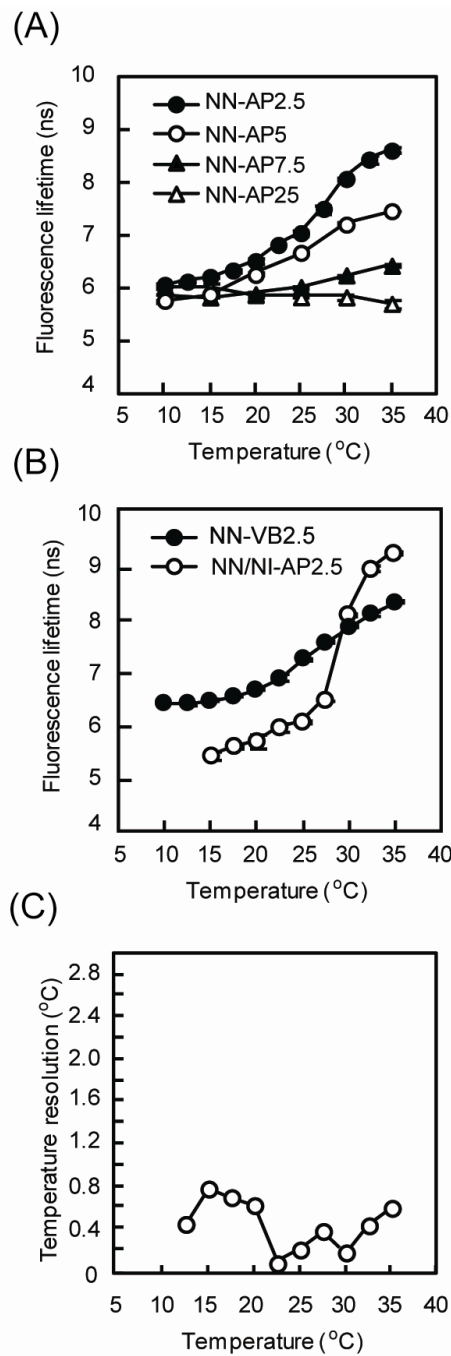


図 2-10. 酵母細胞内のカチオン性蛍光共重合体の蛍光寿命応答

(A, B) 酵母細胞内の(A) NN-AP x ($x = 2.5, 5, 7.5$ および 25) と (B) NN-VB2.5 および NN/NI-AP2.5 の温度に対する蛍光寿命変化(mean \pm SD, $n = 3$)。 (C) 酵母細胞中の NN-AP2.5 の温度分解能。(A)より算出した。励起波長は 456 nm で、蛍光波長は 565 nm。 Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

4. NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 の哺乳類細胞内温度計測への応用

哺乳類細胞 MOLT-4 および HEK293T を 5%グルコース水溶液中で NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 と混合し、25°C、10 分間処理した。酵母細胞ではカチオン性蛍光高分子温度計の導入の際に、sorbitol 水溶液を用いていたが、sorbitol は白血病細胞においてアポトーシスを誘導するとの報告²⁴も有り、NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 を哺乳動物細胞に導入する際には、グルコース水溶液を使用した。図 2-11A に示すように、NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 は非接着性 MOLT-4 細胞にも導入され、どちらの蛍光高分子温度計においても、それらの蛍光高分子温度計を含んだ細胞では、形態学的変化や明らかな細胞損傷は観察されなかった。核を染色する蛍光色素 Hoechst²¹ を用いた共染色の結果から、MOLT-4 細胞に導入された NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 は細胞質に局在し、核には導入されていないことがわかった(図 2-11B)。さらに NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 の蛍光高分子温度計としての機能を確認するために、MOLT-4 にこれら蛍光高分子温度計を細胞に導入し、細胞懸濁液の状態での蛍光強度および蛍光寿命計測を行い、温度応答性を確認した(図 2-12)。同様に、NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 は、接着性 HEK293T 細胞にも取り込まれ、形態学的変化や明らかな細胞損傷は観察されなかった(図 2-13A)。続いて、HEK293T 細胞における NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 の温度に対する蛍光応答を共焦点顕微鏡下で観察した。その結果、HEK293T 細胞内でも温度上昇に従って、蛍光強度が上昇する様子が確認された(図 2-13B)。これらの結果から、NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 は、自発的に哺乳類細胞内に入りこみ、細胞質内温度を計測できるカチオン性蛍光高分子温度計であると結論付けられた。

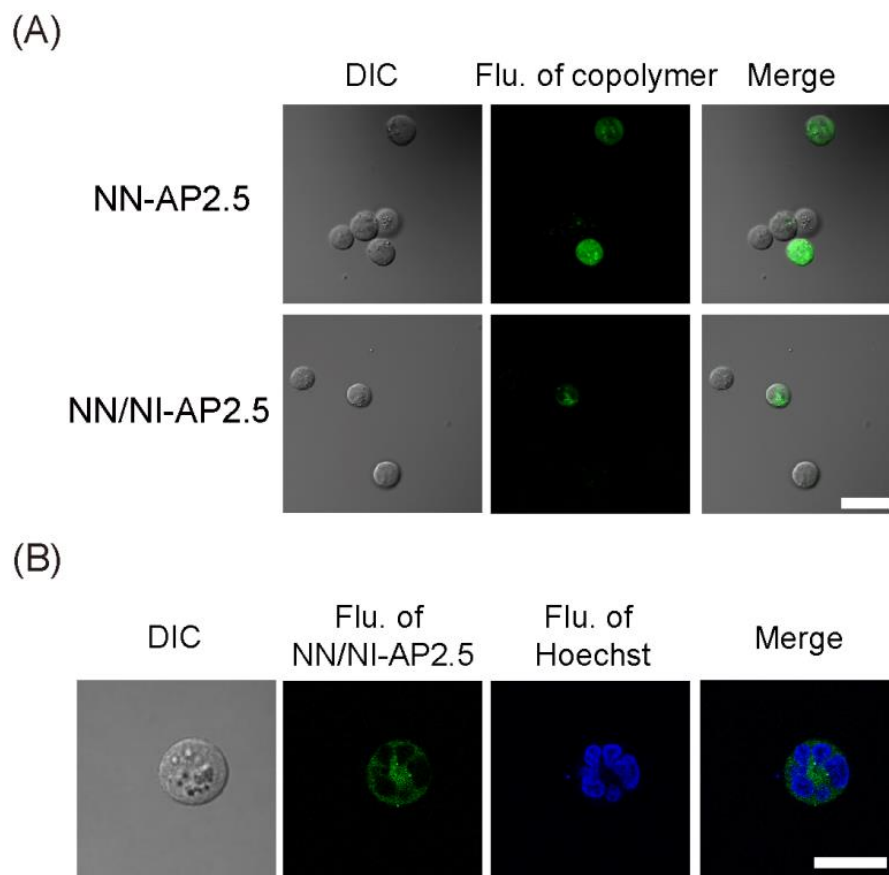


図 2-11. MOLT-4 細胞内への NN-AP2.5 と NN/NI-AP2.5 の導入

(A) MOLT-4 細胞への取り込み。微分干渉像(左)、蛍光高分子温度計の共焦点蛍光像(中央)、および重ね合わせ像(右)。(B) NN/NI-AP2.5 を導入した MOLT-4 細胞の核染色との共染色像。微分干渉像(左)、NN/NI-AP2.5 の共焦点蛍光像(緑色、左から二番目)、Hoechst 33342 による核染色像(青色、右から二番目)および重ね合わせ像(右)。Bars, 10 μm . Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

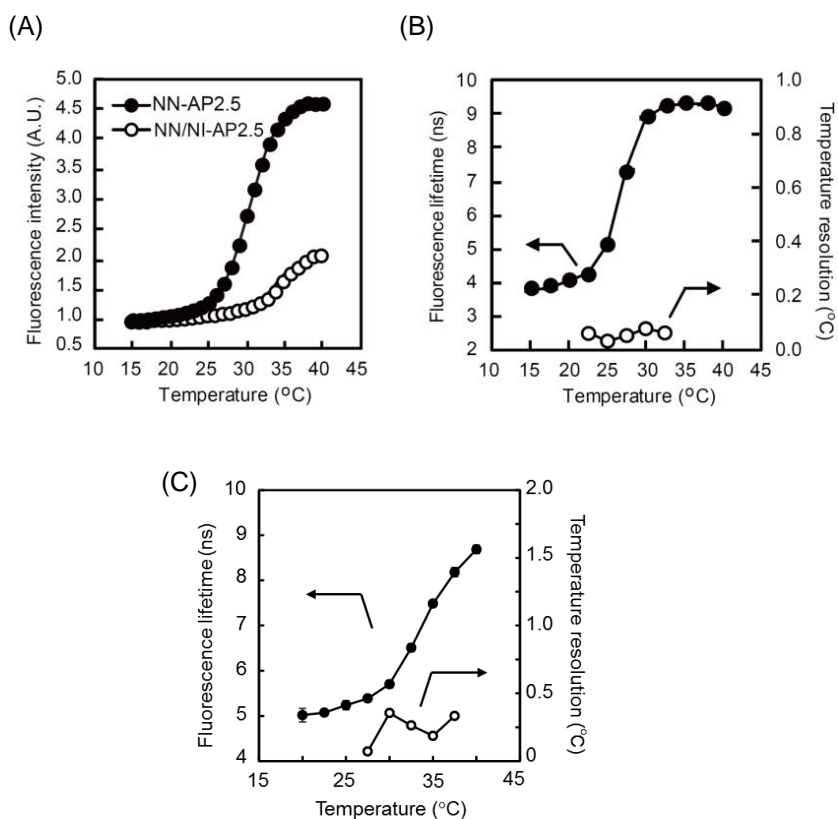


図 2-12. MOLT-4 細胞内の NN-AP2.5 と NN/Ni-AP2.5 の温度応答性

(A) MOLT-4 細胞に導入した NN-AP2.5 と NN/Ni-AP2.5 の温度変化に対する蛍光強度 (励起波長 456 nm、蛍光波長 565 nm) の変化。(B, C) (B) NN-AP2.5 と (C) NN/Ni-AP2.5 の MOLT-4 細胞内における蛍光寿命の温度応答性とそのグラフから算出した温度分解能。励起波長 456 nm、蛍光波長 565 nm。Mean \pm SD (n = 3). Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

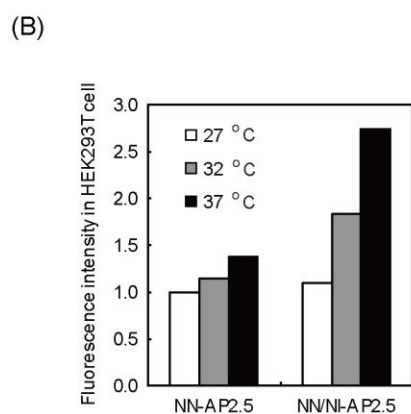
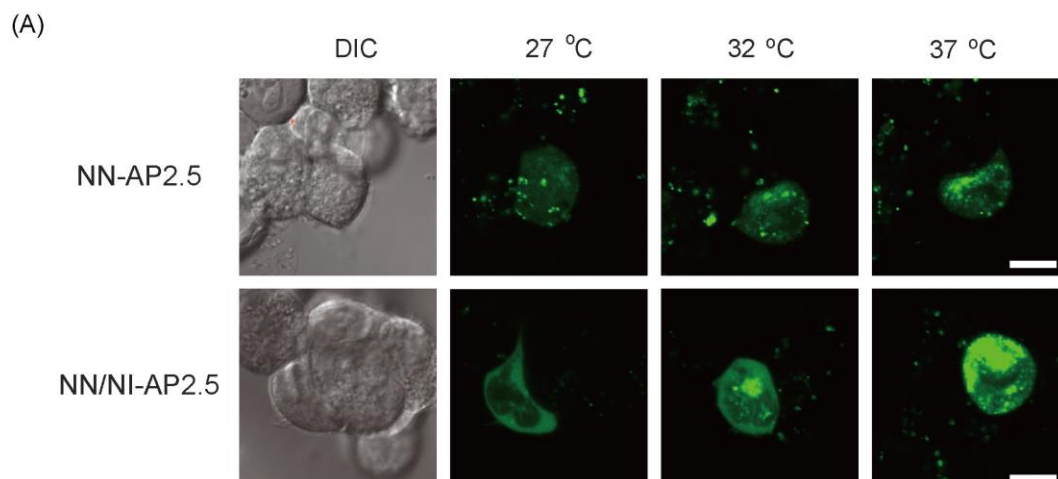


図 2-13. HEK293T 細胞内の NN-AP2.5 と NN/NI-AP2.5 の蛍光応答

(A) 微分干渉像(左)と共焦点蛍光像。Bars, 10 μ m. (B) 共焦点蛍光像から解析した細胞内の蛍光強度。蛍光強度は 27°C の NN-AP2.5 の値で正規化した。Adapted with permission from ref.18. Copyright 2017 American Chemical Society.

第4節 考察

1. カチオン性蛍光高分子温度計の酵母細胞と哺乳類細胞への導入メカニズム

この研究の目的は、マイクロインジェクション手法を必要とせずに、細胞外溶液から酵母細胞および哺乳類細胞に自発的に導入できる蛍光高分子温度計を開発することであった(図 2-2、2-11 および 2-12 参照)。酵母細胞には、環境変化からの防御を目的とした硬い細胞壁が備わっている。Nobel らは、相対分子量 70 kDa の FITC-デキストランが酵母細胞壁を透過することを報告している²⁵。今回合成したカチオン性蛍光高分子温度計の分子量は、表 2-1 に記載したように分子量(M_n) 40,000 以下であったので、FITC-デキストランが透過することができる細胞壁孔よりも小さい分子量である。したがって、カチオン性蛍光高分子温度計は、分子量的にも酵母細胞の細胞壁を通過することが出来る充分な大きさの高分子だったと考えられる。

細胞壁の網目を通過したカチオン性蛍光高分子温度計は細胞膜と接触する。細胞膜を通過して細胞内へ高分子が移行する方法は、以下の2経路が知られている。一つは、「エンドサイトーシス」と呼ばれる生物学的な細胞の取り込み経路、もう一つは化学的に細胞質膜に浸透し通過する経路である。酵母細胞では、clathrin-mediated pathway がエンドサイトーシスの唯一の形態として知られており、phagocytosis や macropinocytosis といった他のエンドサイトーシス経路は報告されていない²⁶。この clathrin-mediated pathway の活性は、細胞の活動に依存するため、低温下で有意に低下する²⁷。表 2-3 に示すように、NN-AP2.5 の 1.2 M sorbitol 水溶液中での酵母細胞への導入効率は、処理温度を 4°C に下げてもほとんど変化しなかった。一方、NN/NI-AP2.5 では顕著な導入効率の低下が観察されたが、完全に導入されなくなることはなかった。さらに、clathrin 依存性エンドサイトーシスは、化合物を細胞内に取り入れるために少なくとも約 30 分を必要とするが、カチオン性蛍光高分子温度計の酵母細胞内への移行はわずか 1 分の処理後でも観察された。加えて、カチオン性蛍光高分子温度計の酵母細胞への移行は、エンドサイトーシス欠損酵母変異体 *end4* でも観察された。したがって、これらの考察を踏まえると、カチオン性蛍光高分子温度計の酵母細胞への移行は、カーボンナノチューブの細胞内移行で考

えられているメカニズムと同様に、主に化学的浸透およびエンドサイトーシスによるものであり²⁸、特に化学的な膜透過が主な移行経路だと考えられた。4°C処理で認められた低温下での細胞への移行量の現象は、脂質二重層の流動性の低下に関与していると考えられる。

エンドサイトーシスが利用されるかどうかに関わらず、カチオン性蛍光高分子温度計が細胞に移行する最初のステップは、その蛍光高分子温度計のカチオン性部位と細胞質膜の表面にあるリン脂質もしくはスルホン化多糖類などのアニオン性基との結合によることから始まる²⁹。したがって、カチオン性ユニットをより多く含んだ蛍光高分子温度計の方が、酵母細胞への導入効率もより高い(表 2-1)。さらに、カチオン性蛍光高分子温度計と細胞表面のアニオン性基との結合は、イオン性溶質つまり電解質で阻害された。これは蛍光高分子温度計のカチオン性基と細胞膜表面のアニオン性基が KCl 水溶液や PBS 緩衝液等に含まれる Na イオンや Cl イオンに静電遮蔽されたことが原因と推測している。これは、表 2-3 に示したカチオン性蛍光高分子温度計の酵母細胞への導入効率に対する溶液組成の影響に共通するメカニズムであると考えられ、例えば YPD 培地での蛍光高分子温度計の酵母細胞への移行が妨げられてしまうことも同様の原因が関わっていると考えている。

カチオン性蛍光高分子温度計は細胞質膜の表面に結合した後、細胞膜を透過できるように構造を変化させる。NN-AP2.5 と NN-VB2.5 は、感温性ユニットに対するカチオン性ユニット比が同程度であるが、NN-VB2.5 は NN-AP2.5 よりも有意に高い導入効率を示した(表 2-2)。NN-AP2.5 と NN-VB2.5 の違いは、カチオン性ユニットの疎水性にある。ベンゼン環を有する VB-TMA ユニットは、APTMA ユニットよりも疎水性が高い。APTMA と VB-TMA の log P_{ow} 値が、それぞれ-3.08 と-2.11 と計算された³⁰ことから VB-TMA の疎水性が高いことがわかる。細胞質膜はリン脂質といった両親媒性脂質によって形成されるため、疎水性の高いカチオン性蛍光共重合体は脂質二重層の内部に取り込まれやすいと考えている。

一旦、酵母細胞に導入されたカチオン性蛍光高分子温度計は細胞外に漏出することなく、細胞質に残った(図 2-4)。カチオン性蛍光高分子温度計とアニオン性の核酸もしくはタンパク質と

の間の静電的な相互作用が、細胞質からの蛍光高分子温度計の漏出防止を担っていると推測している。もしくは、カチオン性蛍光高分子温度計が細胞質内の高いイオン強度環境で細胞の内側から細胞質膜に結合することができない可能性がある。この可能性は、カチオン性蛍光高分子温度計がイオン強度の高い溶液中で、細胞内に移行できなかったという結果(表 2-3)からもサポートされる。

2. 酵母細胞内におけるカチオン性蛍光共重合体の蛍光温度計としての機能

次に、酵母細胞内におけるカチオン性蛍光共重合体の蛍光温度計としての性能について議論する。酵母細胞における実用的な細胞内温度計測のためには、蛍光高分子温度計は、理想的には以下のような特性を備えるべきである。つまり、温度変化に対する高い応答性、酵母細胞への高い導入効率、低い細胞毒性、温度応答性の可逆性、そして化学的な高い安定性を有すべきと考えられる。この研究で合成された一連のカチオン性蛍光共重合体について検討した結果、共重合体の化学構造、すなわちモノマーユニットの化学構造とその組成比に、温度変化に対する応答性、細胞への導入効率、細胞毒性は依存することが示された。温度応答性(図 2-8, 2-10, 2-12, 2-13)、導入効率(表 2-2)および細胞毒性(表 2-4)のデータを相互に比較すると、共重合体中のカチオン性ユニット量が増加すると、温度に対する応答性が低下し、細胞毒性が増加する一方で、導入効率が改善することが明示された。高精度な生きた酵母細胞内の温度計測には、高い温度応答性と低い細胞毒性がより重要であることを考慮すると、NN-AP2.5 は 20–35°C という一般的な酵母細胞の培養温度範囲で細胞内温度計測をする上では、高感度、低毒性という点から、最も有用なセンサーになると結論付けられる。35°C より高い温度で酵母細胞内温度を計測する必要がある場合、より高温領域で温度に応答する NN/NI-AP2.5 が良い候補となる。

酵母細胞の細胞内温度計測のために NN-AP2.5 の蛍光寿命計測結果に対する温度分解能を評価した(図 2-10)。なぜならば、蛍光強度(図 2-8)は実験における他の変動因子(例えば、励

起レーザーの強度や NN-AP2.5 の濃度)に影響を受けるが、蛍光寿命はこのような変動因子と無関係であるため、蛍光寿命は高精度計測に適したパラメータだからである¹⁵。NN-AP2.5 の温度分解能は、20–35°Cの温度範囲で 0.09–0.62°Cであり、この分解能の高さは、今までに 0.5–1°Cの細胞内温度変化が検出されている過去の報告^{7, 31}を鑑みると、十分な感度であると考えられた。NN-AP2.5 の温度分解能は、他の蛍光温度計、例えば、QD/QRod (0.2°C)³²、GFP (0.4°C)³³、Eu³⁺-containing nanoparticle (0.3°C)³⁴、そして L-DNA molecular beacon (0.2–0.7°C)³⁵などと比べても同程度の感度であった。さらに、NN-AP2.5 の温度分解能は、他の非蛍光の細胞温度計測手法、例えば、温度感受性酵素発現 (0.7°C)³⁶、photoacoustic thermometry (0.2°C)³⁷、resonant thermal sensors (0.0016°C)³⁸、そして thermocouples (<0.1°C)³⁹などと比較しても近い感度を示していた。

酵母細胞内に移行する NN-AP2.5 の機能は、以前に報告された蛍光高分子温度計からの明確な改善点として注目すべきである。酵母細胞に蛍光高分子温度計を導入する際の、推奨する処理時間は、1.2 M sorbitol 水溶液中でわずか 10 分である。20 分など、より長い時間の処理を行えば、より高い導入効率が達成できる。以前に報告された細胞内温度計測用の蛍光温度計は、対象とする細胞への温度計の導入のために、マイクロインジェクション^{7, 31}、トランスフェクション試薬^{35, 40}、またはより長い処理時間^{32, 34, 35, 40, 41}を必要とする。NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 の自発的な細胞内への移行は、マイクロインジェクション法なしで、哺乳類非接着性 MOLT-4 細胞(図 2-11)および接着性 HEK293 細胞(図 2-13)の両方で観察された。したがって、これらの結果から、この研究で開発された新規カチオン性蛍光高分子温度計は、細胞内温度計測をより実用的にし、より一般的に使用できる可能性を秘めているとも言える。

表 2-3 に示したように、NN-AP2.5 は酵母細胞に対していくらか細胞毒性がある。以前報告された細胞内温度計測用の蛍光高分子温度計の中では、蛍光高分子温度計の細胞毒性は詳細に調べられなかった^{7, 31, 35}。今回の結果に基づき、メチレンブルーアッセイのような生存性試験

は、酵母細胞内の生物学的応答による細胞内温度の変化を調べるような場合には行うべきであると考えられた。

最後に、150 mM KCl 水溶液(*in vitro*)と酵母細胞内 (*in vivo*)における NN-AP2.5 の蛍光応答の差について議論する。NN-AP2.5 の *in vitro*(図 2-6)および *in vivo*(図 2-10)における蛍光寿命は、酵母細胞の細胞内環境が 150 mM KCl 水溶液と有意に異なることを示しているが、酵母細胞の細胞内 K⁺濃度は、130–170 mM の KCl 水溶液と同等であると報告されている²²。対照的に、哺乳類 MOLT-4 細胞(図 2-12)では、150 mM KCl 水溶液(図 2-6)との差が、酵母と比較して小さかった。150 mM KCl 溶液と酵母細胞の間で認められた差は、酵母の細胞質の粘性であると考えており、高度に濃縮された核酸およびタンパク質の存在で、水よりも粘性が高いことが報告されている⁴²。したがって、将来、酵母内の細胞内温度計測においては、例えばリン酸緩衝液などの栄養のない溶液に NN-AP2.5 を導入した酵母細胞を懸濁した液を用いて検量線を作製する必要があると考えている。

3. 本研究で開発したカチオン性蛍光高分子温度計による細胞内温度計測の展望

序論でも述べたように、酵母は発酵産業における基本材料や基礎研究におけるモデル生物として広く利用されており、様々な温度で培養することができる特徴を持っている。酵母細胞の代謝研究では、培養温度は典型的には 25–30°C である。ビール発酵は 15°C 以下の低温で行われ²、白ワイン発酵は香りの元になる揮発性化合物の生成を増加させるために 15°C で行われる⁴³。図 2-8 や 2-10 に示すように、本研究で開発した新規の蛍光高分子温度計 NN-AP2.5 は、20–35°C の範囲で機能する。上記の発酵のような、より低温下での使用が望まれる場合には、より低い温度範囲で使用できるカチオン性蛍光高分子温度計を調製する必要があるだろう。そのために、poly(*N*-*t*-butylacrylamide)を polyNNPAM ユニットの代わりに使用すれば、より低温下で温度応答するような蛍光高分子温度計が合成できるはずである^{12b}。工業的には、酵母を繰り返し使用してアルコールを効率的に生産させることが多い²。最初に発酵に使った酵母を再利用す

る場合、この酵母の活性を評価した上で次の工程に使用されることが多い。酵母の活性を評価するための新しいパラメータとして細胞内温度は一つの候補であり、**NN-AP2.5**をこの評価プロセスで利用できる可能性がある。同様に、**NN-AP2.5** を導入した酵母細胞の生理活性は、顕微鏡はもちろんのこと、フローサイトメトリーなどによって多検体処理も可能と考えられることから、より定量的な評価も可能になるであろう。

カチオン性蛍光高分子温度計 **NN-AP2.5** および **NN/NI-AP2.5** は、哺乳類 **MOLT-4** および **HEK293T** 細胞にも自発的に導入され、細胞質で温度計として機能した。したがって、**NN-AP2.5** および **NN/NI-AP2.5** は、哺乳類細胞の細胞内温度計測にも拡張可能だと言える。第4章では、第3章での更なる蛍光高分子温度計の改良を経て、褐色脂肪細胞の温度計測法へと展開した。褐色脂肪組織は、人体の熱発生に関わる主要組織であり、褐色脂肪細胞の温度変化を計測することによって行われるアゴニストスクリーニングは、痩身薬開発にもつながる細胞内温度計の有望な応用法であると考えられる。

第5節 小括

高い感度を誇る蛍光高分子温度計は、細胞内に温度分布があることを初めて明らかにするなどの画期的な蛍光分子ツールであった。しかしながら、その細胞内への導入にはマイクロインジェクションを必要とし、酵母のような小さな細胞や細胞壁を持つ細胞には使用できないという課題があった。本研究では、NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 を含むいくつかの新規カチオン性蛍光共重合体を開発した。この共重合体は、酵母細胞への自発的かつ迅速な移行能(≤ 20 分)を持ち、その後、安定的に細胞質に保持された。酵母細胞内の NN-AP2.5 の蛍光寿命は、温度依存的に応答(15°C で 6.2 ns、 35°C で 8.6 ns)し、この温度範囲内での温度分解能は $0.09\text{--}0.78^{\circ}\text{C}$ であった。蛍光高分子温度計の特徴である高い感度を持ち合わせたまま、細胞内への移行能が備わったことが明らかとなった。さらに、NN-AP2.5 および NN/NI-AP2.5 は、酵母以外にも容易に哺乳類細胞に導入でき、温度変化に対してそれらの蛍光強度や蛍光寿命を変化させ、温度計として機能した。これらの結果は、今回開発した新規カチオン性蛍光高分子温度計が、マイクロインジェクションを必要としないことから、多くの一般的な研究施設において実施可能であることを示しているとも言える。つまり今回の研究によって、広範囲の細胞において正確かつ実用的な細胞内温度計測を実現させたことを示している。

第6節 参考文献

1. Gouw, J. W., Krijgsveld, J., & Heck, A. J. R. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 11-24 (2010).
2. Kunze, W. *Technology brewing and malting*, 3rd international ed.; VBL: Berlin, 2004.
3. Sami, M., Ikeda, M. & Yabuuchi, S. Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. *J. Ferment. Bioeng.* **78**, 212-216 (1994).
4. Imai, T. & Ohno, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3604-3608 (1995).
5. 今井健夫 最近の酵母活性測定技術の進歩とその応用. *醸協*, **103**, 230-237 (2008).
6. Dejean, L. *et al.* The calorimetric-respirometric ratio is an on-line marker of enthalpy efficiency of yeast cells growing on a non-fermentable carbon source. *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 329-340 (2001).
7. Okabe, K. *et al.* Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* **3**, 705 (2012)
8. Godbey, W. T., Wu, K. K., Hirasaki, G. J. & Mikos, A. G. Improved packing of poly (ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene Ther.* **6**, 1380-1388 (1999).
9. Lappalainen, K., Jääskeläinen, I., Syrjänen, K., Urtti, A. & Syrjänen, S. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm. Res.* **11**, 1127-1131 (1994).
10. (a) Futaki, S. *et al.* Arginine-rich peptides An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836-5840 (2001). (b) Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G. & Futaki, S. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 598-607 (2008).
11. Aberle, A. M. *et al.* A novel tetraester construct that reduces cationic lipid-associated cytotoxicity. Implications for the onset of cytotoxicity. *Biochemistry* **37**, 6533-6540 (1998).
12. (a) Uchiyama, S., Matsumura, Y., de Silva, A. P. & Iwai, K. Modulation of the sensitive temperature range of fluorescent molecular thermometers based on thermoresponsive polymers. *Anal.Chem.* **76**, 1793-1798 (2004). (b) Gota, C., Uchiyama, S. & Ohwada, T.

- Accurate fluorescent polymeric thermometers containing an ionic component. *Analyst* **132**, 121-126 (2007).
13. (a) European Brewery Convention. Methylene blue staining. *J. Inst. Brew.* **83**, 109–118 (1977). (b) Boyd, R. A. *et al.* A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Res.* **3**, 11–16 (2003).
 14. Maeda, Y., Nakamura, T. & Ikeda, I. Changes in the hydration states of poly (N-alkylacrylamide) s during their phase transitions in water observed by FTIR spectroscopy. *Macromolecules* **34**, 1391–1399 (2001).
 15. Gota, C., Uchiyama, S., Yoshihara, T., Tobita, S. & Ohwada, T. 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 (2008).
 16. Yoshida, S. *et al.* Development of bottom-fermenting *Saccharomyces* strains that produce high SO₂ levels, using integrated metabolome and transcriptome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2787–2796 (2008).
 17. Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. & Riezman, H. *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **120**, 55–65 (1993).
 18. Tsuji, T., Yoshida, S., Yoshida, A. & Uchiyama, S. Cationic fluorescent polymeric thermometers with the ability to enter yeast and mammalian cells for practical intracellular temperature measurements. *Anal. Chem.* **85**, 9815-9823 (2013).
 19. Drexler, H. G., Gaedicke, G. & Minowada, J. T-leukemia cell lines CCRF-CEM, HPB-ALL, JM and MOLT-4: changes in isoenzyme profiles during induction of differentiation. *Blut.* **54**, 79–87 (1987).
 20. (a) Darken, M. A. Absorption and transport of fluorescent brighteners by microorganisms. *Appl. Microbiol.* **10**, 387–393 (1962). (b) Hoch, H. C., Galvani, C. D., Szarowski, D. H. & Turner, J. N. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia* **97**, 580–588 (2005).
 21. Latt, S. A. & Stetten, G. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* **24**, 24-33 (1976).

22. Ogino, T., Den Hollander, J. A. & Shulman, R. G. ^{39}K , ^{23}Na , and ^{31}P NMR studies of ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5185–5189 (1983).
23. (a) Melvin, B. K. & Shanks, J. V. Influence of aeration on cytoplasmic pH of yeast in an NMR airlift bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **12**, 257–265 (1996). (b) Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S. & Smits, G. J. *In vivo* measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology*, **155**, 268–278 (2009).
24. Kang, C.-D. *et al.* The inhibition of ERK/MAPK not the activation of JNK/SAPK is primarily required to induce apoptosis in chronic myelogenous leukemic K562 cells. *Leukemia Res.* **24**, 527–534 (2000).
25. De Nobel, J. G., Dijkers, C., Hooijberg, E. & Klis, F. M. Increased cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2077–2084 (1989).
26. Engqvist-Goldstein, Å. E. Y. & Drubin, D. G. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 287–332 (2003).
27. Marsh, M & McMahon, H. T. The structural era of endocytosis. *Science* **285**, 215–220 (1999)
28. Kostarelos, K. *et al.* Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 108–113 (2007).
29. (a) Ruan, G., Agrawal, A., Marcus, A. I. & Nie, S. Imaging and tracking of tat peptide-conjugated quantum dots in living cells: new insights into nanoparticle uptake, intracellular transport, and vesicle shedding. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14759–14766 (2007). (b) Patel, L. N., Zaro, J. L. & Shen, W. C. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm. Res.* **24**, 1977–1992 (2007).
30. By ALOGPS 2.1 software. <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>
31. Gota, C. *et al.* Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2766-2767 (2009).
32. Albers, A. E. *et al.* Dual-emitting quantum dot/quantum rod-based nanothermometers with enhanced response and sensitivity in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9565-9568 (2012).
33. Donner, J. S. *et al.* Mapping intracellular temperature using green fluorescent protein. *Nano Lett.* **12**, 2107-2111 (2012).
34. Oyama, K. *et al.* Walking nanothermometers: spatiotemporal temperature measurement of transported acidic organelles in single living cells. *Lab Chip* **12**, 1591-1593 (2012).
35. Ke, G. *et al.* L-DNA molecular beacon: a safe, stable, and accurate intracellular nano-thermometer for temperature sensing in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18908-18911 (2012).

36. McCabe, K. M., Lacherndo, E. J., Albino-Flores, I., Sheehan, E. & Hernandez, M. Lacl (Ts)-regulated expression as an in situ intracellular biomolecular thermometer. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2863–2868 (2011).
37. Gao, L. *et al.* Single-cell photoacoustic thermometry. *J. Biomed. Opt.* **18**, 026003 (2013)
38. Inomata, N., Toda, M., Sato, M., Ishijima, A. & Ono, T. Pico calorimeter for detection of heat produced in an individual brown fat cell. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 154104 (2012).
39. Wang, C. *et al.* Determining intracellular temperature at single-cell level by a novel thermocouple method. *Cell Res.* **21**, 1517–1519 (2011).
40. Yang, J. M., Yang, H. & Lin, L. Quantum dot nano thermometers reveal heterogeneous local thermogenesis in living cells. *ACS Nano* **5**, 5067-5071 (2011).
41. Vetrone, F. *et al.* Temperature sensing using fluorescent nanothermometers. *ACS Nano* **4**, 3254–3258 (2010).
42. (a) Williams, S. P., Haggie, P. M. & Brindle, K. M. ¹⁹F NMR measurements of the rotational mobility of proteins *in vivo*. *Biophys. J.* **72**, 490–498 (1997). (b) Fujino, T., Hirota, K., Ohta, K. & Tahara, T. In-cell viscosity measurement using a fluorescence up-conversion microscope. *Chem. Lett.* **37**, 1240–1241 (2008).
43. Sablayrolles, J. M. Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Res. Int.* **42**, 418–424 (2009).

第3章 蛍光強度比で細胞内温度を計測可能な蛍光高分子の開発

本章では、第2章で開発した細胞内移行型の蛍光高分子温度計の検出原理を蛍光強度比へと改良した検討結果について述べる。

第1節 序論

細胞内温度計測が着目されている研究領域であることは序論でも述べたとおりである。その中でも蛍光温度計は高い温度分解能と高い空間分解能(原理的には分子レベル)を有していることから数多くの研究が進んでいる¹⁻¹⁷。その中でも感温性ポリマー(NIPAMやNNPAMなど)と環境応答性蛍光色素(DBD-AAなど)を組み合わせた蛍光高分子温度計は、感度の高さと温度以外の因子に測定が影響されにくいといった点から、優れた計測・分析ツールの一つであった。例えば、アニオン性ユニットを組み込んだ蛍光高分子温度計を用いて、蛍光寿命イメージング顕微鏡法(FSIM)による哺乳類細胞の細胞内温度マッピングが実現できることが示された³。また、第2章で述べたように、カチオン性ユニットを組み込んだ蛍光高分子温度計は、細胞内に自発的に移行し、酵母や哺乳類細胞の温度を検出することができた。この研究により、蛍光高分子温度計が抱えていた課題の一つであった、細胞への導入に特殊な手法が必要という分析手法としての制約条件をなくし、生きた細胞内の温度計測をより汎用的なツールへと発展させた^{4a}。第2章では、温度に依存して変化する蛍光高分子温度計の蛍光パラメータとして、蛍光寿命を選択したことを説明した。再掲になるが、蛍光寿命は、蛍光色素の濃度や励起光の強度などの実験条件の変動に影響されないため、蛍光寿命は蛍光色素が置かれた環境のみに応答する、つまり温度変化によって生じる感温性ポリマーの疎水環境場へのみ応答すると言える。

しかしながら、実際のところ、蛍光寿命はこの細胞内温度計測を実際に行うバイオ研究者にとって、そうなじみの深いものではない。GFPなどの蛍光タンパク質が発見され、蛍光計測がバイオテクノロジーの一般的な手法になった昨今、蛍光光度計や蛍光顕微鏡、そして蛍光プレートリー

ダーなどは多くのバイオ研究施設で設備として保有していることが多いが、これらすべては基本的に蛍光強度計測を主としており、蛍光寿命をパラメータとして選択できる設備を持っている施設は大幅に減るであろう。カチオン性蛍光高分子温度計の開発により、汎用化が促されたが、計測部分での汎用性に欠けているようでは、一般的なツールとしての魅力には欠ける。そこで、本研究では、蛍光寿命と同じく、蛍光色素の濃度や励起光の強度などの実験条件の変動に影響されないパラメータとして蛍光強度比¹⁸を採用した新規のカチオン性蛍光高分子温度計を開発することを目的とした。2つの異なる波長での蛍光強度比が温度依存的なパラメータとして使用できるように設計を行った。

今回開発を目指した新規カチオン性蛍光高分子温度計の化学構造を図 3-1a に示す。高分子温度計は、以下の4つのユニットからなるランダム共重合体である。(i)低温で伸長構造をとり、高温で球状構造に収縮し、疎水環境場を作り出す感温性ユニット NNPAM、(ii)細胞への自発的移行を可能にし^{4a}、さらにイオン性基によって分子間凝集を防止する¹⁹カチオン性ユニット APTMA、(iii) NNPAM ユニットの構造変化の結果としての疎水性/親水性の変化を感知し、結果として温度依存的に蛍光を発生する蛍光性ユニット DBThD-AA²⁰。DBThD-AA は第2章で使用した DBD-AA と比較して光退色性しにくい²⁰。(iv)温度変化が起こった場合でも、一定の蛍光を発生するもう一つの蛍光性ユニット BODIPY-AA。いわゆる DBThD-AA の reference 色素として機能する。なお、BODIPY-AA の蛍光特性は、文献で報告されている pyromethene 546 の蛍光特性から推定し、今回採用した(図 3-1b)²¹。

本章の研究では、蛍光性モノマー BODIPY-AA とそのモデル蛍光物質と考えられる BODIPY-IA(図 3-1c)の新規な合成法を開発した。この研究における蛍光高分子温度計の新規性は、2つの蛍光団(すなわち、DBThD-AA ユニットと BODIPY-AA ユニット)の使用にある。DBThD-AA ユニットは環境感受性の蛍光を示すが、BODIPY-AA ユニットは環境非感受性の蛍光を示すはずである。この特性を確認するために、モデル化合物 DBThD-IA²² および BODIPY-IA の光物理学的特性を調べた。そして、異なるユニット組成で3つの蛍光高分子温度

計を合成し、それらの温度変化に対する感度を水溶液中で評価し、最適な蛍光高分子温度計を選択した。最も応答性の高い蛍光高分子温度計を、非接着性 **MOLT-4** (ヒト急性リンパ芽球性白血病由来) 細胞²³ および接着性 **HEK293T** (ヒト胎児腎由来) 細胞²⁴ の細胞内温度計測に適用した。蛍光高分子温度計の機能は、**MOLT-4** および **HEK293T** 細胞を用いて、細胞内の温度変化に対する応答性ならびに温度計の導入効率、そして細胞毒性に対する影響といった点から評価を行った。

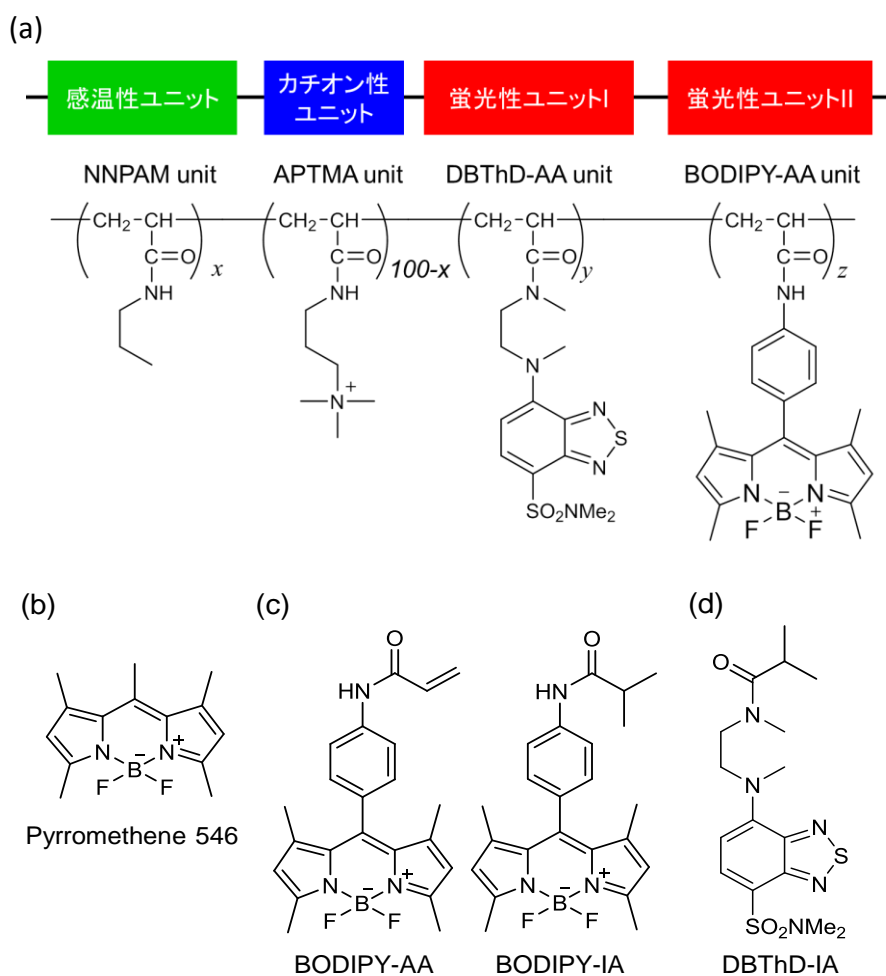


図 3-1 本研究で用いた化合物の化学構造

(a) カチオン性蛍光高分子温度計の構造 (b) pyromethene 546, (c) BODIPY-AA と BODIPY-IA、(d) DBThD-IA. の化学構造。DBThD-AA, *N*-(2-[[7-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzothiadiazol-4-yl]-(methyl)amino]ethyl)-*N*-methylacrylamide; BODIPY-AA, 8-(4-acrylamidophenyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene; pyromethene 546, 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene; BODIPY-IA, 4,4-difluoro-8-(4-isobutylamidophenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene; DBThD-IA, *N*,2-dimethyl-*N*-(2-{methyl[7-(dimethylsulfamoyl)-2,1,3-benzothiadiazole-4-yl]amino}ethyl)propanamide.

第2節 材料と実験方法

1. 試薬

NNPAM は *N*-alkylacrylamides の一般的な合成法に従い、合成・精製を行った²⁵。AIBN は和光純薬工業から購入し、メタノールで再結晶して使用した。Acryloyl chloride と APTMA chloride は東京化成工業から購入した。水は Millipore 社の Milli-Q を使用した。その他の試薬は、市販特級品を精製せずにそのまま使用した。

2. 合成

BODIPY-AA

図 3-2 に示すスキームに従って合成した。なお、図 3-2 における化合物 1c: 8-(4-Aminophenyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene は Koutaka らの報告に従って合成した²⁶。Ar 雰囲気下、4-acetamidobenzaldehyde (200 mg, 1.23 mmol)、2,4-dimethylpyrrole (253 μ L, 2.45 mmol) をジクロロメタン (70 mL、モレキュラーシーブス 4A で脱水) に溶解し、トリフロオロ酢酸を 1 滴加えて室温で 6 時間攪拌した。この反応液に 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) (278.3 mg, 1.23 mmol) をジクロロメタン (5 mL、モレキュラーシーブス 4A で脱水) に懸濁させて加え、容器を 3 mL ジクロロメタンで洗浄し、それも加えた。室温で 30 分攪拌した後、反応液を水 (100 mL \times 2 回)、飽和食塩水で洗い、 Na_2SO_4 で乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物をアルミナクロマトグラフィー (1 回目—ジクロロメタン \rightarrow ジクロロメタン:メタノール=100:1 \rightarrow 50:1、2 回目—ジクロロメタン \rightarrow ジクロロメタン:メタノール=100:1、3 回目—ジクロロメタン:メタノール=200:1) で精製し、薄茶色結晶として目的物 (化合物 1a) を得た (31 mg, 収率 7.5%)。化合物 1a の ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) は以下の通り。

δ 7.61 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.29 (br, 1H), 7.24 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 5.89 (s, 2H), 2.34 (s, 6H), 2.21 (s, 3H), 1.34 (s, 6H)

得られた化合物 1a (66 mg, 0.20 mmol) をメタノール 10 mL に溶解し、1N 塩酸を 10 mL

加え、4 時間加熱還流した。室温まで冷却した後、2N NaOH 溶液で中和した。ジクロロメタンで抽出(100 mLx3 回)後、有機層を水、そして飽和食塩水で洗い、Na₂SO₄ で乾燥させて溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物をアルミナクロマトグラフィー (ジクロロメタン:メタノール=20:1)により精製することで、薄茶色結晶として目的物(化合物 1b)を得た(46 mg, 収率 79%)。化合物 1b の ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)は以下の通り。

δ7.05-7.03 (m, 2H), 6.75-6.73 (m, 2H), 5.89 (s, 2H), 3.76 (br, 2H), 2.34 (s, 6H),
1.42 (s, 6H)

Ar 雰囲気下、化合物 1b (20 mg, 0.069 mmol)をジクロロメタン 25 mL に溶解し、これにトリエチルアミン(200 μL)、Boron trifluoride-diethyl ether complex (200 μL)の順に加え室温で 2 時間攪拌した。反応液を水 80 mL に注いで反応を停止し、2N NaOH 溶液を加えてアルカリ性にした。これをジクロロメタンで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗い、Na₂SO₄ で乾燥させて溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物をアルミナクロマトグラフィー (ジクロロメタン:ヘキサン=1:1)により精製することで、赤色結晶として目的物(化合物 1c)を得た(22 mg, 収率 96%)。化合物 1c の ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)は以下の通り。

δ7.02-7.00 (m, 2H), 6.79-6.77 (m, 2H), 5.97 (s, 2H), 3.83 (br, 2H), 2.55 (s, 6H),
1.50 (s, 6H).

化合物 1c の ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)は以下の通り。

δ155.0, 147.0, 143.2, 142.6, 132.0, 129.0, 124.7, 120.9, 115.4, 14.6, 14.5.

最後に、化合物 1c (10 mg, 0.029 mmol)をアセトニトリル 2 mL に溶解し、トリエチルアミン(4.1 μL, 0.029 mmol)を加えた後、0°Cで Acryloyl chloride (3.1 μL, 0.038 mmol)を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、K₂CO₃を加えて、塩をろ過した。ろ液を減圧留去して得られた粗生成物を、シリカゲルクロマトグラフィー (ジクロロメタン:ヘキサン=3:1→ジクロロメタン 100%)により精製することで橙色結晶として目的の化合物(BODIPY-AA)を得た(11 mg, 収率 97%)。BODIPY-AA の ¹H NMR (400 MHz, メタノール-d₄)の結果は以下の通り。

δ 7.88-7.86 (m, 2H), 7.31-7.29 (m, 2H), 6.51-6.37 (m, 2H), 6.07 (s, 2H),
5.81 (dd, 1H, J = 2.4, 9.6 Hz), 2.49 (s, 6H), 1.48 (s, 6H).

BODIPY-AA の ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3)の結果は以下の通り。

δ 163.5, 155.5, 143.1, 141.1, 138.6, 131.6, 130.9, 128.8, 128.5, 121.2, 120.1, 14.6.

HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 394.1897. Found: 394.1900.

BODIPY-IA

化合物 1c (10 mg, 0.029 mmol)を 1 mL アセトニトリルに溶解し、0°Cでトリエチルアミン(3.6 mg, 4.9 μL , 35 μmol)、イソ酪酸無水物(7.0 mg, 7.4 μL , 0.044 mmol)の順に加え、50°Cで5時間攪拌後、室温で一晩攪拌した。この反応液に Na_2SO_4 を加えてからろ過し、ろ液を減圧留去して得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(ジクロロメタン)にて精製することにより、赤色結晶として目的物を得た(11.5 mg, 収率 95%)。BODIPY-IA の ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)の結果は以下の通り。

δ 7.69 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 7.31 (br, 1H), 7.22 (d, 2H, 8.2 Hz), 5.98 (s, 2H), 2.55 (s, 6H),
1.43 (s, 6H), 1.29 (d, 6H, J = 6.8 Hz), 1.25 (br, 1H).

BODIPY-IA の ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3)の結果は以下の通り。

δ 175.3, 155.5, 143.1, 141.3, 138.9, 131.6, 130.5, 128.8, 121.2, 119.9, 36.9, 19.6, 14.64,
14.56.

蛍光共重合体

NNPAM および APTMA chloride (合計 5.0 mmol。表 3-1 に 2 つのユニットの組成比を示す)、DBThD-AA (25 μmol)²⁰、BODIPY-AA (5 μmol) および AIBN (50 μmol) を N,N-ジメチルホルムアミド (10 mL) に溶解し、溶液を乾燥 Ar ガスで 30 分間バブリングして溶存酸素を除去した。溶液を 60°C で少なくとも 4 時間加熱し、次いで室温に冷却した。反応混合物をジエチルエーテル

(300 mL)に注ぎ、析出した共重合体を濾過によって回収し、透析により精製した。合成した共重合体に含まれる NNPAM、APTMA の各ユニットの割合は、共重合体の $^1\text{H-NMR}$ (Bruker AVANCE400) 上の強度比から決定した。共重合体中に含まれる DBThD-AA および BODIPY-AA ユニットの割合は、モデルとなる蛍光物質のメタノール溶液中の吸光度と比較することにより、決定した。DBThD-AA のモデル蛍光物質として DBThD-IA²² のメタノール溶液中における吸光度 ($\epsilon = 7,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 447 nm, $\epsilon = 1,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 498 nm)、BODIPY-AA のモデル蛍光物質として BODIPY-IA²² のメタノール溶液中における吸光度 ($\epsilon = 4,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 447 nm, $\epsilon = 83,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 498 nm)を選択した。合成した共重合体の分子量は、GPC によって求めた。GPC 装置には JASCO PU-2080 ポンプ、JASCO RI-2031 示差屈折率検出器、JASCO CO-2060 カラム温度自動調節器と Shodex GPC KD806-M カラムを用いた。移動相には 5 mM LiBr を含む 1-methyl-2-pyrrolidinone を用いた。分子量の較正にはポリスチレン標準試料を用いた。反応収率、共重合体の各ユニットの組成および分子量は表 3-1 に示す。

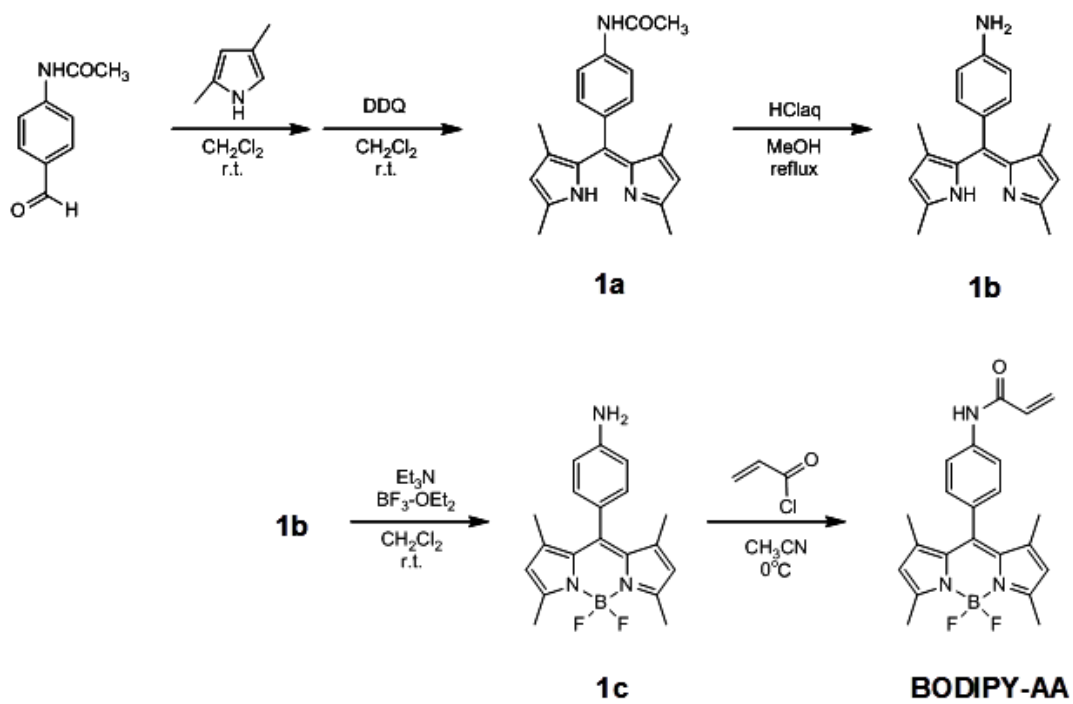


図 3-2. BODIPY-AA の合成スキーム

表 3-1. 本研究で用いた蛍光高分子温度計の物理特性

共重合体	原料中のモノマー比 ^a	収率/%	共重合体のユニット比 (x : y : z) ^b	M _w ^c	M _n ^d	M _w /M _n	応答感度 /%°C ^{-1,e}
1	96 : 4 : 0.5 : 0.1	42	94.5 : 0.58 : 0.071	20,300	10,800	1.88	4.1
2	96 : 4 : 1 : 0.2	34	93.1 : 1.2 : 0.18	18,600	10,100	1.84	2.9
3	96 : 4 : 1.5 : 0.3	25	94.4 : 1.8 : 0.36	22,300	11,400	1.96	2.3

^aNNPAM : APTMA : DBThD-AA : BODIPY-AA. ^bx, y, z は共重合体の構成比で図 3-1 参照。 ^c重量平均分子量 ^d数平均分子量 ^e 150 mM KCl 水溶液中での蛍光強度比の平均的な変化率

3. BODIPY-IA の蛍光特性評価

UV/Vis 吸収スペクトルは、JASCO V-550 UV/Vis 分光光度計を用いて 25°C で計測を行った。蛍光スペクトルは化合物の濃度を 100 nM の濃度に溶かし、Hamamatsu R7029 optional 光電子増倍管 (operating range, 200–850 nm) を備えた JASCO FP-6500 分光蛍光光度計を用いて 25°C で計測した。絶対蛍光量子収率 (Φ_f) は、Hamamatsu R928 optional 光電子増倍管 (operating range, 200–850 nm) と JASCO 積分球ユニット ILF835 を備えた JASCO FP-8500 分光蛍光光度計を用いて計測を行い、以下の式 5 に基づき算出した。計測の際の蛍光スペクトルは JASCO ESC-333 標準光源 (タングステン、20 W) を使用して補正した。

$$\Phi_f = S_f / (S_{ex} - S_{ex'}) \quad (\text{式 5})$$

ここで S_f は、458 nm 励起時の BODIPY-IA 水溶液の補正された蛍光スペクトルの下の面積であり、 S_{ex} は、BODIPY-IA がいない状態で試料がない状態での入射光面積であり、 $S_{ex'}$ は、試料散乱光面積である。

4. 共重合体の KCl 水溶液中での蛍光スペクトルの計測

蛍光共重合体は KCl 水溶液に溶かし、各温度にて FP-6500 分光蛍光光度計 (JASCO) を用いて蛍光スペクトルを計測した。溶液の温度制御には ETC-273T 水冷ペルチェ式恒温セルホルダ (JASCO) を使用し、付属の熱電対によりセルホルダ内の温度を計測した。

5. 蛍光高分子温度計 1 の MOLT-4 と HEK293T 細胞への導入法

非接着性細胞 MOLT-4²³ を RPMI1640 培地 (10% FBS, Gibco)、100 mm ディッシュにて培養した (播種 1×10^6 cells/mL)。1 日後、培養液 1 mL を遠心分離 (400 x g, 3 分) し、培地を取り除き、5% グルコースで洗浄後、再度 5% グルコース 1 mL で懸濁し、 1×10^6 cells/mL の細胞濃度に調製した。5 w/v% で純水に溶かした蛍光高分子温度計 1 (冷凍保存) を終濃度 0.05% となるように細

胞懸濁液に添加し、25°C、10分処理後、遠心(400 x g, 3分)し、上清を取り除き、PBSで洗浄後、再度1 mLのPBSに懸濁した。

また、HEK293T細胞への蛍光高分子温度計**1**の導入は細胞を剥がさずに行った。DMEM培地(5% FBS, 1% penicillin-streptomycin)にて、poly-L-lysineコートした35 mmガラスボトムディッシュ(Matsunami glass Ind.)にて培養した(播種 1×10^6 cells/mL)。培養後、培地を5%グルコース水溶液に洗浄、置換し、蛍光高分子温度計**1**を終濃度0.05 w/v%となるように添加した。25°C、10分処理後、PBSで洗浄し、1 mLのphenolred-freeのDMEM培地(Gibco No. 21063を上記No. 11965の代わりに使用)に置換し、ライブセルイメージングを行った。

6. フローサイトメトリー

MOLT-4細胞中の蛍光高分子温度計**1**の蛍光強度は、フローサイトメーター(FACSCalibur、Becton Dickinson)を用いて計測し、488 nmで励起し、FL1 bandpass(530 ± 15 nm)を通した蛍光を検出した。各ヒストグラムは、約10,000個の細胞を分析した結果として示した。

7. MOLT-4細胞中の蛍光高分子温度計**1**の蛍光スペクトルの計測

MOLT-4細胞における蛍光高分子温度計**1**の蛍光スペクトルを、JASCO FP-6500分光蛍光光度計を用いて様々な温度で計測した。蛍光高分子温度計**1**で処理した細胞をPBSに懸濁し、4 mLキュベットに入れ、2 mm直径の球状の攪拌子も入れた。キュベットを分光計にセットし、約800 rpmの速度で回転させ、細胞が沈むのを防ぎながら、計測を行った。サンプル温度は、JASCO ETC-273T温度コントローラを用いて制御した。蛍光高分子温度計**1**の温度分解能(δT)は、以下の式**6**を用いて評価した²⁸。

$$\delta T = \left(\frac{\partial T}{\partial F_{ratio}} \right) \delta F_{ratio} \quad (\text{式 } 6)$$

ここで $\partial T / \partial F_{\text{ratio}}$ は蛍光強度比—温度の相関を示したグラフの傾きの逆数を、 δF_{ratio} は蛍光強度比の標準偏差 SD を示す。その SD は、1 サンプルの 3 回計測から求めた。

8. MOLT-4、HEK293T 細胞の蛍光イメージング

蛍光高分子温度計 **1** を導入した MOLT-4 細胞、HEK293T 細胞の観察は、共焦点レーザー顕微鏡(FV1000、Olympus)と UPLS APO x100 lens (Olympus, N. A. 1.4) と UPlan x60 lens (Olympus, N. A. 1.35) を用いて行った。細胞に 473 nm のレーザー(Multi Ar レーザー)を照射し、500 nm から 600 nm までの蛍光波長に対する蛍光像を取得した。MOLT-4 細胞の蛍光イメージングの場合、約 10 μL の細胞懸濁液をスライドガラス(スーパーフロスト、松浪硝子工業)に載せ、カバーガラス(松浪硝子工業)で封をした後、スライドガラスを顕微鏡ステージ(Olympus)に載せ、すぐに観察した。HEK293T 細胞の場合は、ガラスボトムディッシュに培養した細胞を直接観察した。蛍光高分子温度計 **1** の蛍光スペクトルを取得する際には、473 nm の励起光を 80/20 reflector を介して細胞に照射した。スペクトルスキャンは、幅 10 nm で 490–740 nm の波長範囲で 10 nm 毎に取得した。得られた像は FluoView (Olympus)で解析を行った。各波長における蛍光強度は、取得した HEK293T 細胞の蛍光画像から、1 細胞におけるすべてのピクセルの蛍光強度を合計・平均化することにより算出した。培地温度は、顕微鏡用チャンバー(Water Jacket Top Stage Incubator H101、Oko-Lab)で制御した。細胞に導入された蛍光高分子温度計 **1** の割合を示す導入効率(%)は、式 7 を用いて決定した。

$$\text{導入効率 (\%)} = \text{蛍光高分子温度計 1 を含んだ細胞の数} / \text{総細胞数} \times 100 \quad (\text{式 7})$$

総細胞数は約 100 であり、最大自家蛍光強度を閾値として、その値を超える蛍光強度を示す細胞を、蛍光光度計 **1** を含む細胞として計数した。HEK293T 細胞の細胞内温度計測における

温度分解能は、HEK293T 細胞抽出物 (0.01 w/v%) 中の蛍光高分子温度計 **1** の平均蛍光強度比を用いて評価した。HEK293T 細胞抽出物は、以前報告の方法を用いて調製した³。

また、HEK293T 細胞の細胞内温度分布を調べるために、473 nm 励起で 490-530 nm (BODIPY-AA 由来)、570-610 nm (DBThD-AA 由来) の蛍光を観察した。MetaMorph (Molecular Devices、USA) を使って intensity-modulated display (IMD) 法により、細胞内の温度分布を可視化した。上記 2 蛍光波長由来の 2 つの画像をそれぞれ median フィルタとバックグラウンド処理した後、2 画像の各ピクセル除算することによって、ratio 像を作成した。

9. 細胞毒性評価

propidium iodide (PI、Sigma) アッセイを用いて、細胞毒性として細胞生存率を計測した。MOLT-4 細胞の生存率評価では、PBS に溶解した 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の PI 溶液 15 μL を蛍光高分子温度計 **1** で処理した細胞懸濁液 30 μL と混合した。HEK293T 細胞の評価では、PBS に溶解した 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の PI 溶液 0.5 mL を、蛍光高分子温度計 **1** および Hoechst 33342 で処理した細胞に添加した (1 mL DMEM 培地)²⁹。全細胞数の計数のために、生細胞と死細胞の核が染まる Hoechst 33342 を用いた。両細胞株共に PI 添加後、37°C、30 分間インキュベートした。PI の蛍光画像は、559 nm で励起し、励起ダイクロイックミラー DM405/473/559 を通して、655-755 nm の蛍光を検出することで取得した。以下式 **8** を用いて細胞生存率 (%) を決定した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \text{PI 陰性の細胞数} / \text{蛍光高分子温度計 } \mathbf{1} \text{ を含む細胞の数} \times 100 \quad (\text{式 } \mathbf{8})$$

10. 細胞周期の同期実験

MOLT-4 細胞は、以前に報告された手法である double thymidine block 法³⁰を用いて、その周期を同調させた。細胞を 2 mM thymidine (和光純薬) を含む RPMI 1640 培地で 12 時間培養した。細胞を遠心 (400 x g, 3 分) 回収し、PBS で洗浄し、次いで thymidine を含まない RPMI

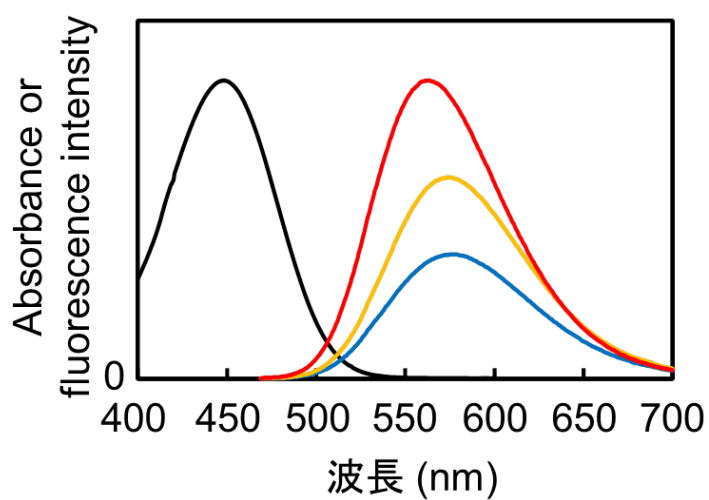
1640 培地中でさらに 12 時間培養した。再び、細胞を 2 mM thymidine を含む RPMI 1640 培地で 12 時間培養し、次いで、細胞を 2 回洗浄し、thymidine を含まない培地中に再懸濁し、細胞周期を完全に同調させた。

第3節 結果

1. DBThD-IA と BODIPY-IA の蛍光特性評価

DBThD-IA および BODIPY-IA の代表的な吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを図 3-2 に示した。加えて、様々な極性および水素結合能を有する 5 種類の溶媒 (n-ヘキサン、酢酸エチル、アセトニトリル、メタノール、そして水と 1,4-ジオキサンが 3:1(v:v)の割合で混ざった混合溶媒)における光物理学的特性を表 3-2 にまとめた。以前の報告²⁰で示したように、DBThD-IA の蛍光特性は、分子が置かれた環境の極性と溶媒分子との水素結合の両方に影響を受けることがわかった。DBThD-IA は、無極性環境および非プロトン性溶媒中に置かれると、より短い波長でより強い蛍光シグナルを放出した。対照的に、BODIPY-IA の蛍光特性は、その置かれている環境に対して比較的非感受性であった。BODIPY-IA は、本研究で試験した 5 種類の溶媒において、ほぼ同一の蛍光特性を示した。これら結果より、DBThD-IA と BODIPY-IA の蛍光特性の違いから、これら 2 つの蛍光色素の蛍光強度比は、疎水環境依存的に変化することが示唆された。すなわち、これら 2 つの蛍光色素を蛍光高分子温度計の蛍光団として用いることで、これらの蛍光強度比が温度依存的に変化することが期待された。

(a) DBThD-AA



(b) BODIPY-AA

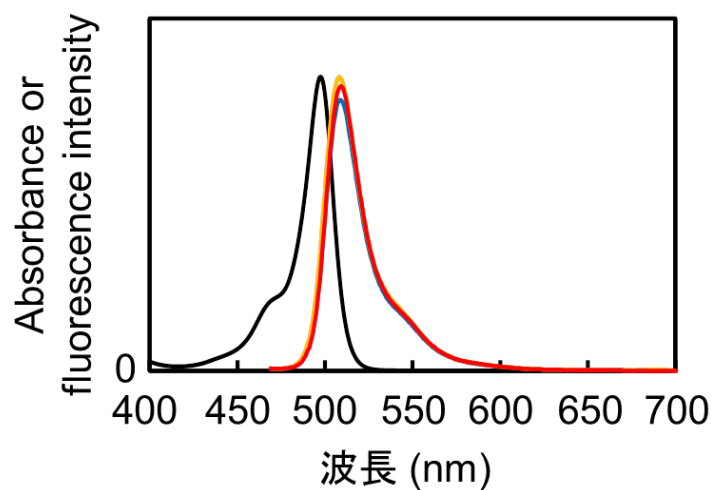


図 3-2. DBThD-IA および BODIPY-IA の代表的な吸収および蛍光スペクトル

アセトニトリル(黒色)中の吸収スペクトル(30 μ M:DBThD-IA および BODIPY-IA)を計測した。酢酸エチル(赤色)、アセトニトリル(オレンジ色)およびメタノール(青色)中 458 nm で励起して、蛍光スペクトル(DBThD-IA については 1 μ M、 BODIPY-IA については 100 nM)を計測した。

表 3-2. DBThD-IA と BODIPY-IA の光物理学的特性 (25°C)

最大吸収波長 (λ_{abs}), モル吸光係数 (ϵ), 最大蛍光波長 (λ_{em}), そして量子収率(Φ_f)を示す。

化合物	溶媒	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Φ_f
DBThD-IA ^a	<i>n</i> -hexane	449	8,100	529	0.81
	ethyl acetate	449	7,600	563	0.68
	acetonitrile	448	8,000	574	0.49
	methanol	447	7,900	575	0.27
	water–1,4-dioxane (3:1, v/v)	450	8,100	595	0.089
BODIPY-IA	<i>n</i> -hexane	502	86,000	512	0.35
	ethyl acetate	499	86,000	509	0.43
	acetonitrile	497	83,000	508	0.38
	methanol	498	83,000	509	0.39
	water–1,4-dioxane (3:1, v/v)	500	81,000	512	0.53

^a ref. 20.より引用

2. カチオン性蛍光高分子温度計 **1-3** の合成と 150 mM KCl 水溶液中での温度変化に対する蛍光応答

カチオン性蛍光高分子温度計 **1-3** を、ランダム共重合体としてラジカル重合により合成した。反応原料中の NNPAM と APTMA のモノマーモル比率は、Hayashi らがカチオン性蛍光高分子温度計を哺乳類細胞用に最適化した報告^{4b}に基づいて、96:4 に固定した。また、DBThD-IA のモル吸光係数が、BODIPY-IA のモル吸光係数よりも小さい(表 3-2 参照)ことから、おおよそこれらの 2 蛍光色素の最大蛍光強度が同じ程度になることを目指して、DBThD-AA と BODIPY-AA のモル比は 5:1 に固定した。その上で、DBThD-AA と BODIPY-AA を NNPAM と APTMA に対して様々に変化させた共重合体を合成し、そのキャラクタリゼーションの結果を表 3-1 に示す。どの共重合体もほぼ同程度の分子量で、原料における各ユニットのモル比率を反映した一連の共重合体を揃えることができた。

次に、哺乳類細胞の細胞質イオン濃度に相当する 150 mM KCl 水溶液中で **1-3** の蛍光応答を調べた。図 3-3 に示すように、温度を 25°C から 45°C まで変化させると、蛍光高分子温度計 **1-3** の蛍光スペクトルもパターンが変化し、580 nm (主に DBThD-AA 由来) と 515 nm (主に BODIPY-AA 由来) の蛍光強度比は、外部温度変化に応じて変化した。蛍光高分子温度計 **1-3** のうち、カチオン性蛍光高分子温度計 **1** は、温度変化に対して最も感度高く応答する(4.1%°C⁻¹、表 3-1 参照)ことがわかった。今後、蛍光高分子温度計 **1** を用いて、哺乳類細胞を用いた細胞内温度計測を行った。

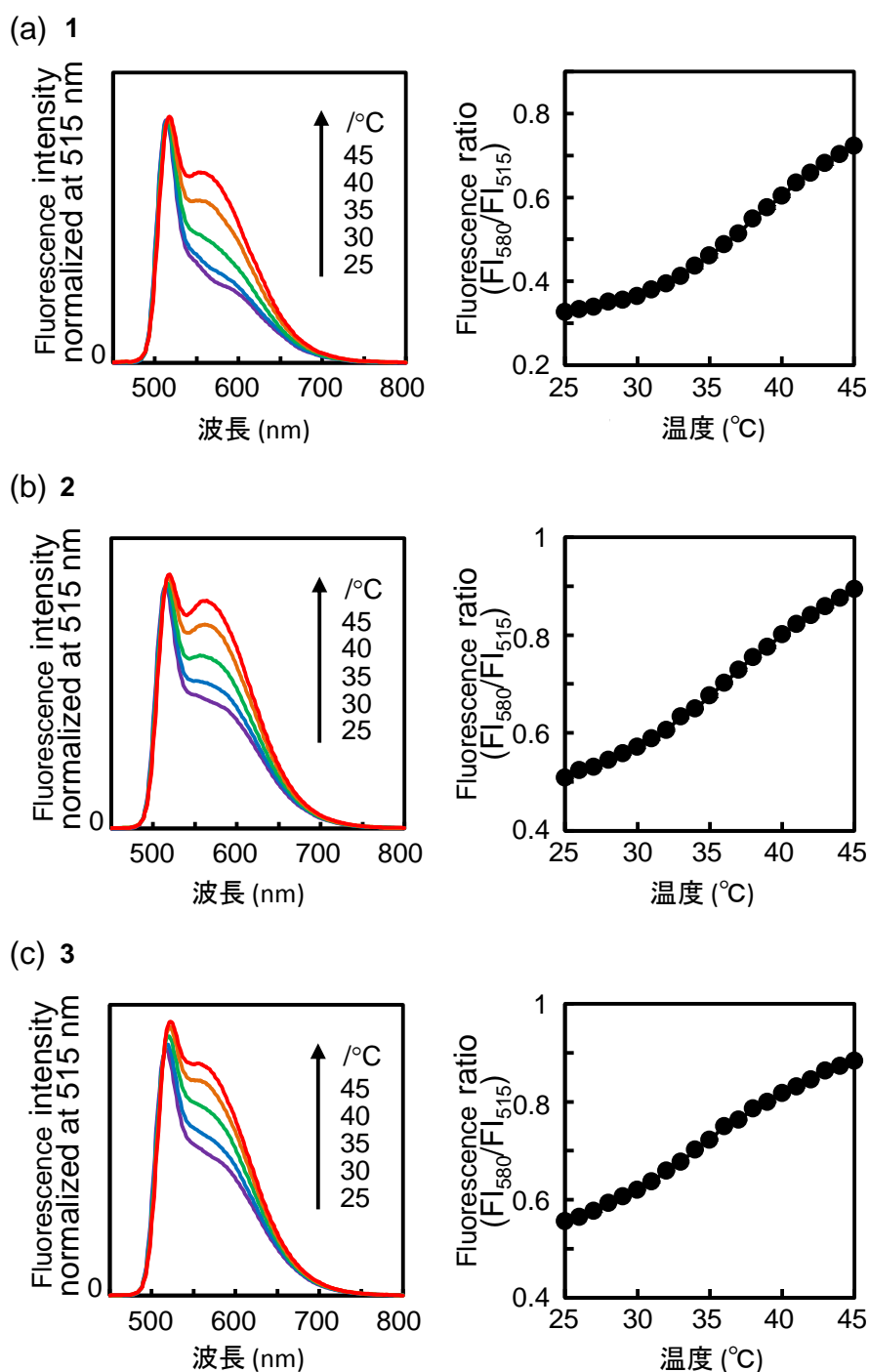


図 3-3. カチオン性蛍光高分子温度計 1-3 の 150 mM KCl 水溶液中での蛍光応答

(a) 蛍光高分子温度計 1、(b) 2 および (c) 3 の代表的な標準化した蛍光スペクトル(左)および 580 nm と 515 nm の蛍光強度比 (F_{580}/F_{515} , 右)。全てサンプル濃度は 0.005 w/v% で、458 nm で励起した。蛍光強度比のエラーバーは標準偏差 SD ($n = 3$) を示しており、今回の場合、誤差が小さくて見えない状態である。

3. カチオン性蛍光高分子温度計 1 の機能独立性

次に、カチオン性蛍光高分子温度計 1 の温度に対する蛍光強度比 (F_{I580}/F_{I515}) の変化が、温度計 1 の濃度、イオン強度および pH の影響をどの程度受けるかを図 3-4 に示した。図 3-4 に示すように、温度計 1 の濃度は 10 倍変化しても大きく応答は変化せず、イオン強度や pH 変化といった外部環境変化に対しても、いずれもほぼ同一の蛍光応答曲線が得られた。調べたイオン強度範囲は、0.25-0.35 であり、細胞内のイオン強度が 0.26–0.30 程度 (KCl 濃度で約 130–150 mM 程度) であること^{33a}を考慮すると、十分な範囲で機能性を評価したと言える。また、pH も同様に 6–9 の範囲で応答を調べたところ、細胞質内の pH は 6–8 程度で一般的にほとんど変化しない^{33b}ことから、こちらも細胞内環境での温度応答に pH 変化は無関係であると示唆された。

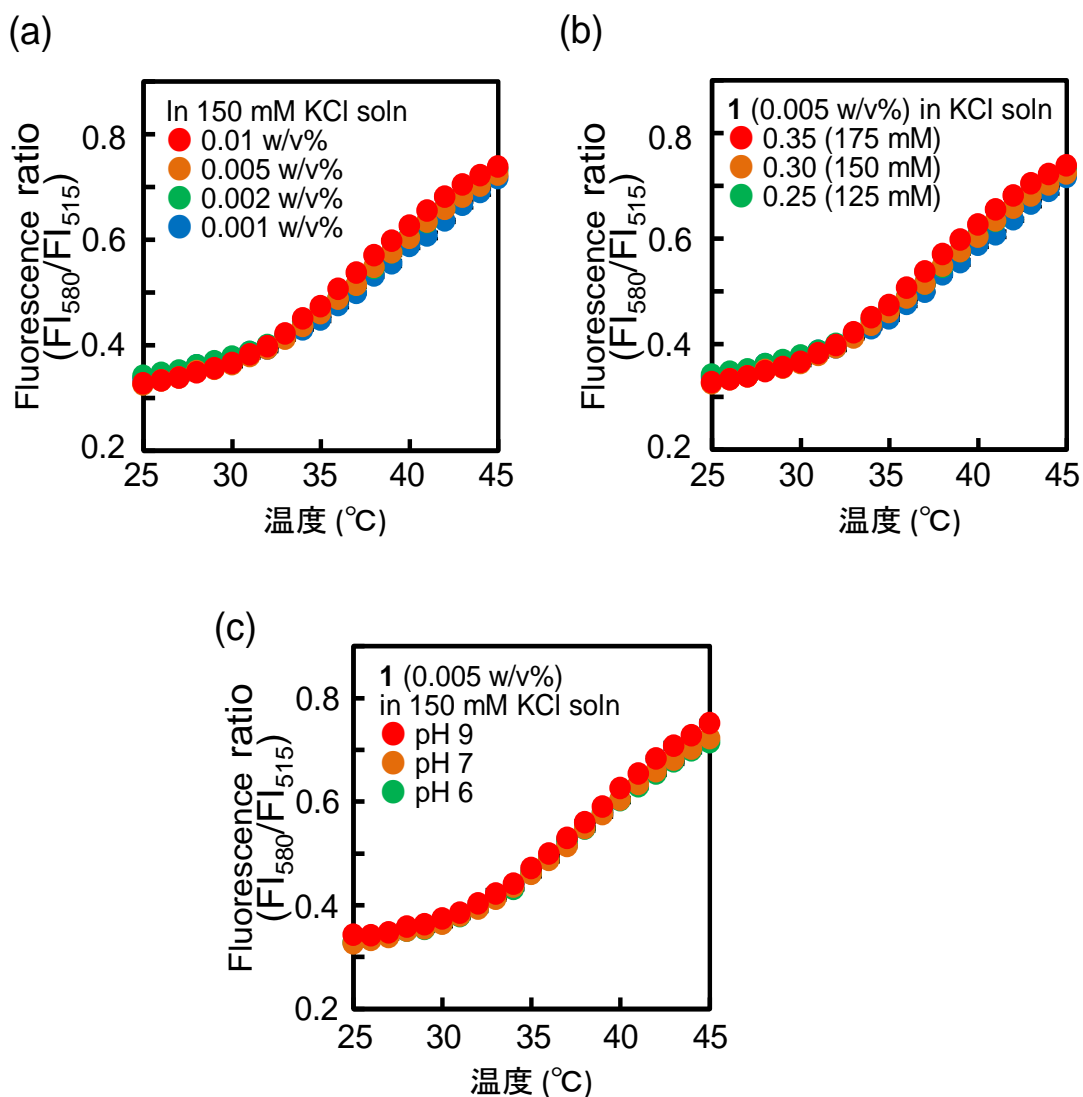


図 3-4. 蛍光高分子温度計 1 の機能の独立性

蛍光高分子温度計 1 の KCl 水溶液中における蛍光強度比の温度応答 (FI_{580} / FI_{515}) に対する (a) 1 の濃度、(b) イオン強度および (c) pH の影響。サンプルは 458 nm で励起した。蛍光強度比のエラーバーは標準偏差 SD ($n = 3$) を示しており、今回の場合、誤差が小さくて見えない状態である。イオン強度は KCl の濃度で調整した。pH を調整するために、HCl (0.1 mol/L) および KOH (1 mol/L) を使用した。

4. カチオン性蛍光高分子温度計 1 の非接着性 MOLT-4 細胞内温度計測への応用

カチオン性蛍光高分子温度計 1 を、第 2 章で述べた非 ratio 型のカチオン性蛍光高分子で確立した方法^{4a}を用いて、非接着性 MOLT-4 細胞に導入した。すなわち、細胞を 5%グルコース水溶液に置換し、0.05 w/v%の蛍光高分子温度計 1 で処理し、25°Cでインキュベートした。図 3-5 は、MOLT-4 細胞に蛍光高分子温度計 1 を適用した結果をまとめたものである。図 3-5a に示すように、カチオン性蛍光高分子温度計 1 は、ほぼ全て(導入効率:99.2 ± 1.1%)の MOLT-4 細胞に導入された。ただし全ての細胞に均一に導入されるわけではなく、一部の細胞は他の細胞よりも蛍光を強く発しており、細胞間で導入量に差があった。そこで、細胞に取り込まれた蛍光高分子温度計 1 の量をより定量的に評価することを目的としてフローサイトメトリーによる解析を行った。図 3-5b に示すように、MOLT-4 細胞を double thymidine block 法によって、細胞周期を G1/S 期に同調させると、強い蛍光を示す細胞の割合が 23%から 89%に増加した(図 3-5b、下)。つまり、MOLT-4 細胞に導入された蛍光高分子温度計 1 の量の違いを説明する一つの理由は、細胞周期によって細胞への移行量が異なるからだと示唆された。また、ヨウ化プロピジウム(PI)によって細胞生存率の評価³⁵を行うと、蛍光高分子温度計 1 を含んだ MOLT-4 細胞のほぼ全てが PI で染色されず、生存率は 97.9 ± 1.7%と、ほぼすべての細胞が生きた状態だと確認できた。

次に、MOLT-4 細胞内の蛍光高分子温度計 1 の温度変化に対する蛍光強度比の変化を、蛍光高分子温度計 1 を導入した MOLT-4 細胞を懸濁液の状態にして、キュベットにセットし、分光蛍光光度計を用いて計測した。MOLT-4 細胞内の温度計 1 の蛍光スペクトルは、外部温度変化に応答して変化した(図 3-5c)。具体的には温度が上昇すると、DBThD-AA 由来の 560–580 nm 近傍の蛍光強度が上昇する結果となった。さらに、図 3-5c で観測された蛍光シグナルが、細胞内に導入された蛍光高分子温度計 1 によるものだと確認するために、MOLT-4 の自家蛍光、懸濁液の溶媒として使っている PBS、そして蛍光高分子温度計 1 を導入した MOLT-4 細胞を遠心し回収した上清の 3 つのコントロールを用いて蛍光スペクトルを計測したところ、図 3-5c で観察された蛍光シグナルは、主に MOLT-4 細胞内に導入された蛍光高分子温度計 1 由来であることが

示された(図 3-5d)。最後に、MOLT-4 細胞内の蛍光高分子温度計 **1** の温度変化に対する蛍光強度比の変化を調べた(図 3-5e)。MOLT-4 細胞内においても 150 mM KCl 水溶液中と同様、580 nm の蛍光強度と 515 nm の蛍光強度の比(FI_{580}/FI_{515})をとると、この値は温度上昇に伴い大きくなった(図 3-5e、左軸)。つまり、蛍光強度比は温度依存的なパラメータであることがわかった。3 回の繰り返し計測により、MOLT-4 細胞内の蛍光高分子温度計 **1** の細胞内温度計測における温度分解能を算出すると、25–44°Cの温度範囲で 0.01–0.25°Cと決定された(図 3-5e、右軸)。

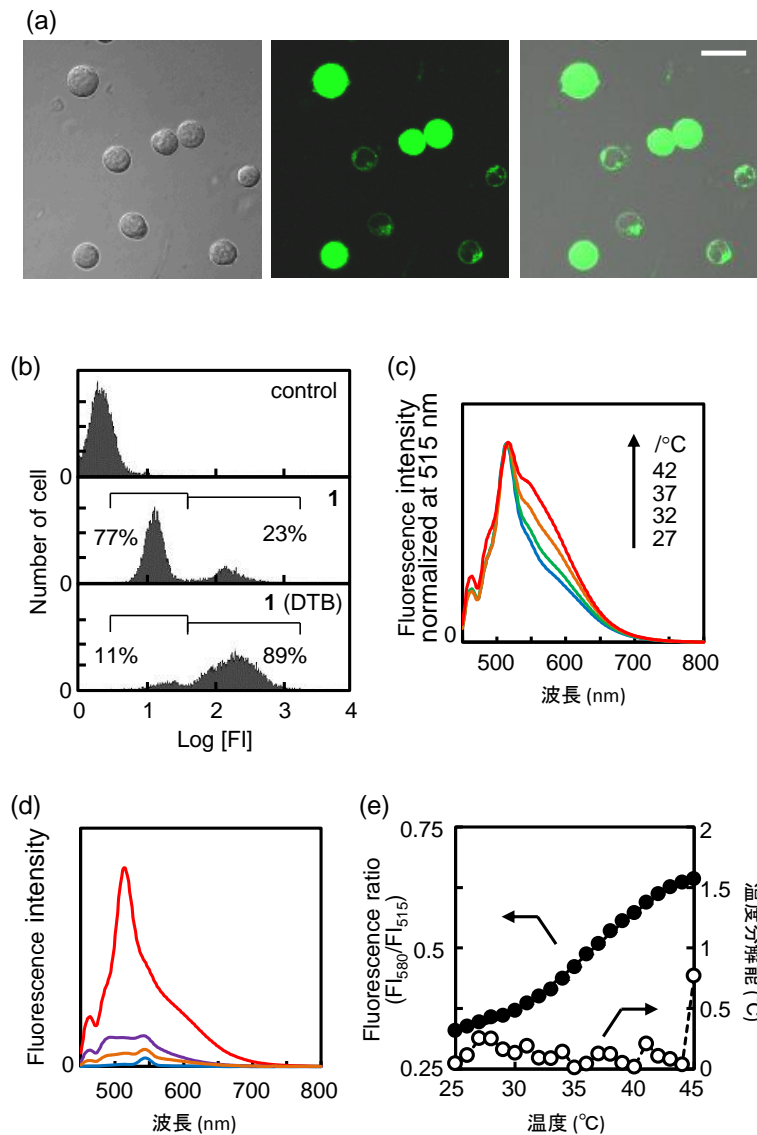


図 3-5. MOLT-4 細胞におけるカチオン性蛍光高分子温度計 1 の機能

(a) 蛍光温度計 1 で処理した MOLT-4 の DIC 像(左)、共焦点蛍光像(中央)、重ね合わせ像(右)。Bar: 20 μm 。(b) 細胞周期依存的な蛍光高分子温度計 1 の導入量の変化を FACS で解析した。未処理(上)、蛍光温度計 1 処理群(中)、double thymidine block (DTB)処置した MOLT-4 に蛍光温度計 1 を処理した群(下)。なお、3 回計測により各集団の比率を算出した。示したパーセンテージの SD ($n = 3$)は 2.5%(中)と 0.5%(下)であった。(c) 27, 32, 37 および 42°Cでの MOLT-4 細胞内の蛍光温度計 1 の蛍光スペクトル(515 nm で正規化)。(d) 蛍光温度計 1 を含む MOLT-4 細胞(赤色)、MOLT-4 細胞(自己蛍光、紫色)、蛍光温度計 1 で処理した MOLT-4 細胞懸濁液の上清(オレンジ)および PBS(青色)の蛍光スペクトル(25°C、458 nm 励起)。(e) MOLT-4 細胞内の蛍光温度計 1 の蛍光強度比の温度応答(●、左軸)および温度分解能(○、右軸)。蛍光強度比の温度応答のエラーバーは SD($n = 3$)を示すが、見えないほど値は小さかった。

5. カチオン性蛍光高分子温度計 1 の接着性 HEK293T 細胞内温度計測への応用

最後にカチオン性蛍光高分子温度計 1 を接着細胞である HEK293T 細胞に応用した。MOLT-4 細胞の場合と同様にして、蛍光高分子温度計 1 を HEK293T 細胞に導入処理(5% グルコース水溶液下、0.05 w/v% 蛍光高分子温度計 1 を 25°C、10 分インキュベート)した。その結果、図 3-6a に示すように、自発的に蛍光高分子温度計 1 は細胞内に移行した。毒性評価に PI アッセイを用いたところ、死滅した HEK293T 細胞は認められなかった。また、図 3-6a に示すように、HEK293T 細胞に導入された蛍光高分子温度計 1 の量は細胞毎に異なっていた。ただし、励起光を強くすると、他の細胞からの蛍光高分子温度計 1 のシグナルを捉えることが出来、結果的にほとんどの HEK293T 細胞でシグナルが観察された(導入効率:92.9 ± 2.4%)。また、蛍光高分子温度計 1 は核を含む HEK293T 細胞全体に拡散していた(図 3-6a 拡大図)。蛍光高分子温度計 1 の導入量が多かった HEK293T 細胞では、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞内の蛍光高分子温度計 1 の蛍光スペクトルを計測することができた(図 3-6b)。図 3-6b に示すように、蛍光高分子温度計 1 は、HEK293T 細胞内でも温度依存的な蛍光スペクトルを示し、細胞内温度を蛍光強度比で可視化できることが示唆された。この蛍光スペクトルにおける偏差(エラーバーを参照)は、細胞間変動(n = 9 細胞)によるものであり、実験誤差ではない。

HEK293T 細胞抽出液中における蛍光高分子温度計 1 の蛍光強度比の温度応答曲線を用いて、顕微鏡観察における温度分解能を評価した。図 3-6c は、27.5–37.5°Cの間で 2.5°C刻みに温度を変化させたときの $585 \pm 25 \text{ nm} / 510 \pm 10 \text{ nm}$ の蛍光強度比の変化を示したものである(左軸)。応答曲線から評価した温度分解能は、検討した温度範囲で 0.29–1.0°Cであった。共焦点顕微鏡を使用した場合の温度計測の温度分解能は、分光蛍光光度計を使用した場合(図 3-5e)よりも低かった。顕微鏡での低い温度分解能は、室温との解離が大きくなる 35°Cと 37.5°C に大きなエラーバーがあることから、理由の一つとして、ステージ温度を維持することの困難さに起因していると結論付けた。

さらに、蛍光高分子温度計と蛍光寿命顕微鏡の組み合わせで細胞内の温度マッピングを達成した以前の研究^{3,4b}では、COS7 細胞における核の温度が細胞質の温度よりも高いことが明らかになっている。そこで HEK293T 細胞において、核と細胞質に局在している蛍光高分子温度計 **1** の蛍光スペクトルを解析したところ、核内の蛍光スペクトルの方が高温側にシフトしており、核と細胞質との間の温度差は、HEK293T 細胞における本蛍光温度計測系でも観察された。図 3-6d に示されているように、核内と細胞質内における約 585 nm (DBThD-AA 単位由来) の平均蛍光強度の差から、おおよその温度差を図 3-6c の検量線より算出すると、約 1°C の温度差に対応していた。さらに、この結果から、細胞内の温度分布を可視化した。結果を図 3-7 に示す。培地温度 32°C において、細胞質に比べて核の温度が高い様子が認められた。また一方で核への蛍光高分子温度計 **1** の導入量が少ない細胞もあり、図 3-7 に示す全ての細胞で核温度が高いかどうかは確認できなかった。

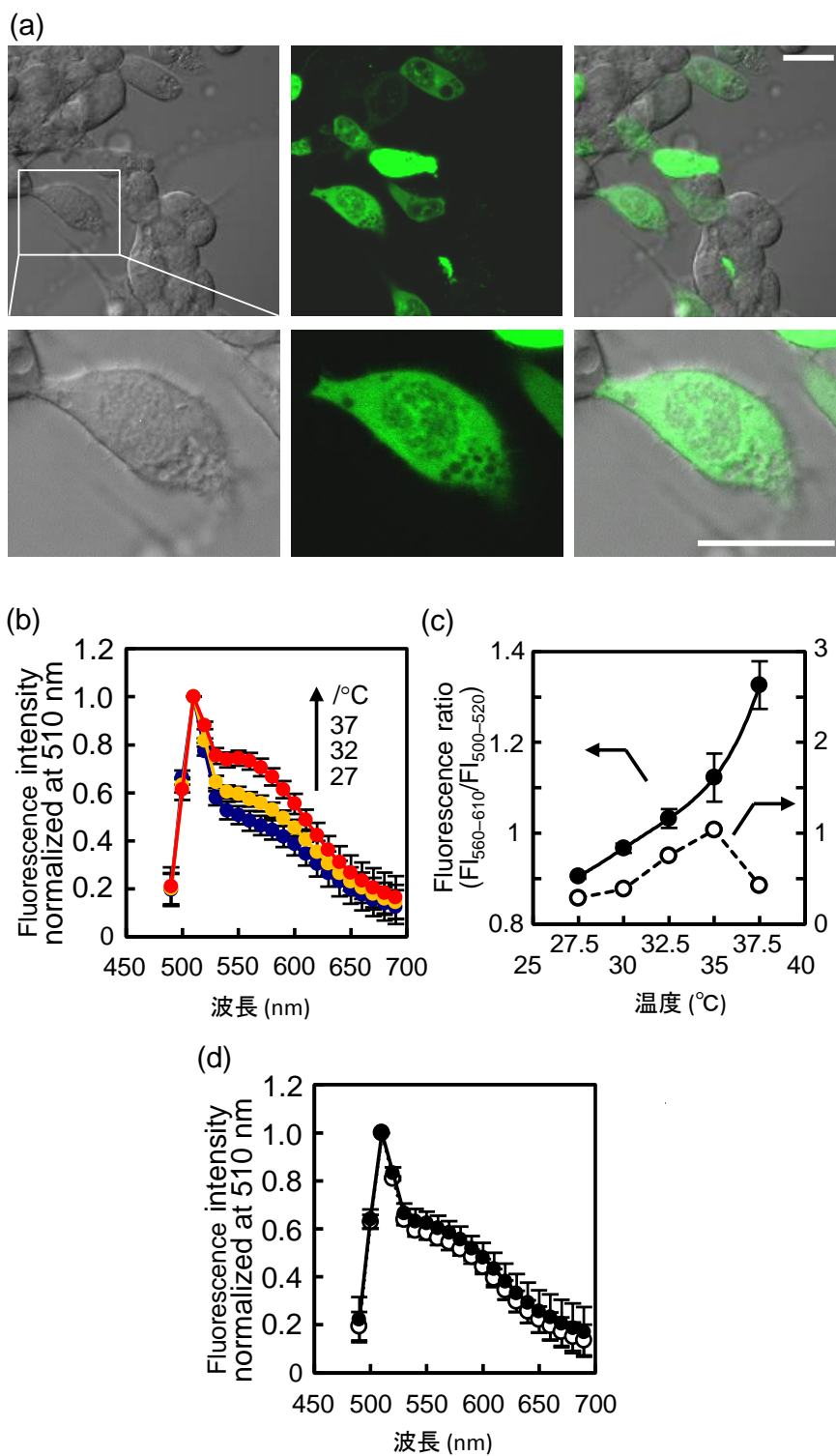


図 3-6. HEK293T 細胞におけるカチオン性蛍光高分子温度計 1 の機能

蛍光高分子温度計 1 で処理した HEK293T 細胞の (a) 微分干渉像 (左)、共焦点蛍光像 (中) および重ね合わせ像 (右)。左側の上部パネルの白四角で示した領域を、下部パネルで拡大している。蛍光像の取得において、蛍光高分子温度計 1 を多く含んだ HEK293T 細胞で蛍光強度値が飽和しないよ

うに、レーザーの励起力を最適化したため、他の細胞では蛍光が見えにくくなっている。スケールバーは 20 μm を表す。(b) 27°C, 32°C および 37°C での単一の HEK293T 細胞における蛍光高分子温度計 1 の平均蛍光スペクトル (n = 9 細胞、平均 \pm SD)。(c) HEK293T 細胞抽出物における蛍光高分子温度計 1 の蛍光強度比の温度応答性 (●、左軸、n = 3、平均 \pm SD) および温度分解能 (○、右軸)。FI₅₆₀₋₆₁₀ および FI₅₀₀₋₅₂₀ は、それぞれ 560-610 nm および 500-520 nm における観察視野の平均蛍光強度である。(d) 培地温度 32°C での単一の HEK293T 細胞 (n = 9、平均 \pm SD) における核 (●) および細胞質 (○) に局在する蛍光高分子温度計 1 の平均蛍光スペクトルの違い。培地温度は観察視野近くの熱電対の値である。蛍光スペクトルは 510 nm で標準化した。

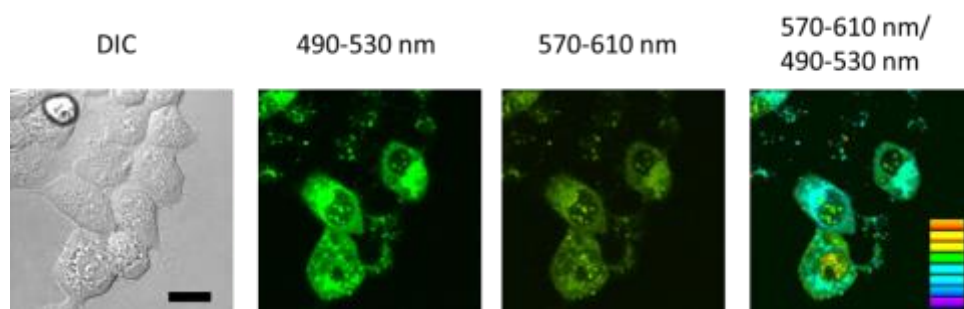


図 3-7. HEK293T 細胞でのカチオン性蛍光高分子温度計 1 による細胞内温度分布の可視化
 蛍光高分子温度計 1 で処理した HEK293T 細胞。左から、微分干渉像、BODIPY-AA 由来蛍光
 像、DBThD-AA 由来蛍光像、ratio 像。培地温度は 32°C。励起波長は 473 nm。Bar: 20 μm 。

第4節 考察

1. ratio 型カチオン性蛍光高分子温度計の合成

本研究では、蛍光強度比を温度依存的なパラメータとする新規のカチオン性蛍光高分子を開発した。従来の蛍光高分子温度計に新たなモノマーユニットとして、温度に応答しない新規の reference 蛍光団として BODIPY を選択し、それをアクリルアミド誘導体のモノマーとして設計、合成した。この BODIPY は以下のような基準で選ばれた。①高分子温度計に組み込んだ場合の温度、すなわち疎水性の変化によって蛍光強度が変化しないこと。②既存の蛍光高分子温度計で用いていた蛍光色素 DBThD-AA と同じ波長で励起できること。③DBThD-AA との蛍光スペクトルの重複がないこと。これらの条件を満たす候補蛍光団として BODIPY が選抜され、実際にこの 3 条件を満たす蛍光性モノマーとして使えることがわかった(図 3-1 および表 3-2)。課題としては、BODIPY-AA ユニットの合成収率の低さにあり、特に図 3-2 に示す化合物 1b を合成するところまでの収率が低い(原料→化合物 1a:収率 7.5%, 化合物 1a 物化合物 1b :収率 79%、図 3-2 と実験手法の項参照)。この化合物の合成には、既知の別途収率の高い合成法³⁶も知られており、その報告では、4-nitrobenzaldehyde と 2,4-dimethylpyrrole から、化合物 1c を 2 段階で得ている。1 段階目の合成で収率 40%、2 段階目の合成で収率 83%であり、本研究と比較するとより安価な原料(4-nitrobenzaldehyde)から高収率で目的物が得られるため、今後改善は可能であろう。上記の 3 つの条件を満たす蛍光団として BODIPY-AA を合成したため、合成した蛍光高分子温度計 1 は、458 nm もしくは 473 nm の励起波長で、DBThD-AA と BODIPY-AA の両ユニットを励起することができた(図 3-3 および 3-6)。これは、モデル蛍光団である DBThD-IA と BODIPY-IA が重複した吸収波長帯を持つことから示唆された(図 3-1)。

蛍光高分子温度計の最適化の一つとして、2 つの蛍光性ユニットを NNPAM と APTMA に対して様々な比率で混合した蛍光高分子温度計 1-3 を合成して評価した。この蛍光高分子温度計の中で、蛍光高分子温度計 1 が最も感度の高い蛍光高分子温度計($4.1\%^{\circ}\text{C}^{-1}$)であった(表 3-1)。

蛍光性ユニット量が高くなるにつれて、感度は低くなったが、これは DBThD-AA ユニット量比が多くなるにつれて、自己消光作用が大きくなることに起因していると考えている³²。

2. ratio 型カチオン性蛍光高分子温度計の機能

本研究で、MOLT-4 細胞と HEK293T 細胞の細胞内温度計測に応用した、最も感度の高い蛍光高分子温度計 **1** は、MOLT-4 細胞内において、25–44°C の温度範囲で 0.01–0.25°C の温度分解能があると評価された (図 3-5e)。この温度分解能は、今までに報告のあった各種蛍光温度計 (蛍光高分子温度計 (0.18–0.58°C)³、蛍光ナノゲル温度計 (0.29–0.50°C)⁵、ユーロピウム錯体を含むナノ粒子 (1.0°C)^{7c}、蛍光タンパク質 (1.2°C)^{9a}、quantum dot/quantum rod complex (1.0°C)¹⁰、molecular beacon (0.2–0.7°C)¹¹、gold nanocluster (0.3–0.5°C)¹²、そしてナノダイヤモンド (0.44°C)¹³) と比較しても、同程度に高いものであった。

蛍光高分子温度計 **1** の空間分解能は、顕微鏡の回折限界 (約 240 nm) であり、これは従来の蛍光温度計によって達成された最高の値に等しい。以前の研究で使われた非温度応答性の N-アルキルアクリルアミド蛍光高分子温度計は、生細胞内で非局在化していたことから、均質な極性を示していることが示唆された^{4b}。したがって、蛍光高分子温度計 **1** の蛍光強度は、局所温度のみに感受性であると考えられる。

最後に、蛍光高分子温度計 **1** の機能を以前に報告した蛍光高分子温度計の機能と比較することにより、蛍光強度比計測値と蛍光寿命計測値との差異について議論する。これら 2 つの計測値は、蛍光団の濃度や励起光強度等に影響を受けないパラメータであるが、大きな違いもある。蛍光強度比計測は、計測装置が入手しやすい (顕微鏡、光度計やプレートリーダーといった選択性も高い) ことと時間分解能の観点から、蛍光寿命計測と比較して明らかに利点がある。本実験では、細胞内温度を計測する上で、1 枚の蛍光強度比像を取得するのに掛かった時間は 1 秒以内であったが、一般的に蛍光寿命像を得るには十分な数の光子を収集するために 1 分程度を要す

る。今後、細胞内の素早い生体応答を捉える上では、時間分解能が高いことは、欠かせない機能となるであろう。

3. カチオン性蛍光高分子温度計の哺乳類細胞への導入メカニズム

第2章においても、カチオン性蛍光高分子の酵母細胞への導入メカニズムを述べた。さらに以前の報告^{4b}で、本研究の蛍光高分子温度計**1**の基になったカチオン性蛍光高分子温度計の哺乳類細胞の導入メカニズムを議論している。本節ではそれに加えて、新たに細胞周期と関連した導入メカニズムに関して議論したい。Hayashiらの報告によれば、カチオン性蛍光高分子温度計が生きた細胞に移行するメカニズムは、エンドサイトーシス依存性移行経路と化学的膜透過であると報告しているが、エンドサイトーシス経路は化学的膜透過と比較して寄与が小さいと考察している。これは酵母細胞におけるカチオン性蛍光高分子温度計の移行メカニズムとも類似している。今回新たに、細胞周期に依存して、細胞へのカチオン性蛍光高分子温度計の移行量が変化することを示した(図 3-5b)。G1/S 期におけるカチオン性蛍光高分子の細胞への高い導入効率、細胞自身の取り込み活性が促進した可能性があるが、G1/S 期は細胞の代謝活性が盛んな時期でもあり、細胞質膜のミクロな環境での粘性の減少と、それに呼応した膜透過性の増加が報告されている³⁴ことから、上記のカチオン性蛍光高分子温度計の細胞への移行メカニズムを考えると、G1/S 期で細胞膜の膜透過性が上昇していることが細胞内への蛍光高分子温度計の移行量を増加させているのだと推測している。

第5節 小括

本研究では、**benzothiadiazole** および **BODIPY** ユニットの両方を、それぞれ環境感受性(温度応答性)蛍光団および **reference** の蛍光団として使用した新しいカチオン性蛍光高分子温度計を開発した。開発した蛍光高分子温度計は、温度依存的に蛍光スペクトルを変化させ、哺乳類細胞内でも蛍光強度比が温度に応答して変化した。その感度は非常に高く、細胞内への自発的な移行能と併せて、実用的な蛍光強度比計測による細胞内温度計測が可能になった。新規のカチオン性蛍光高分子温度計を用いると、非接着性 **MOLT-4** 細胞および接着性 **HEK293T** 細胞の細胞内温度を高温分解能($0.01 - 1.0^{\circ}\text{C}$)で計測することが可能であり、一般的な蛍光顕微鏡を用いて細胞内温度を計測、さらには温度分布を可視化することも可能になった。

第 6 節 参考文献

1. McCabe, K. M. & Hernandez, M. Molecular thermometry. *Pediatr. Res.* **67**, 469-475 (2010).
(b) Inada, N. & Uchiyama, S. Methods and benefits of imaging the temperature distribution inside living cells. *Imaging Med.* **5**, 303-305 (2013).
2. (a) Jaque, D. & Vetrone, F. Luminescence nanothermometry. *Nanoscale* **4**, 4301-4326 (2012). (b) Brites, C. D. S. *et al.* Thermometry at the nanoscale. *Nanoscale* **4**, 4799-4829 (2012). (c) Wang, X.-d., Wolfbeis, O. S. & Meier, R. J. Luminescent probes and sensors for temperature. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7834-7869 (2013).
3. Okabe, K. *et al.* Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* **3**, 705 (2012).
4. (a) Tsuji, T., Yoshida, S., Yoshida, A. & Uchiyama, S. Cationic fluorescent polymeric thermometers with the ability to enter yeast and mammalian cells for practical intracellular temperature measurements. *Anal. Chem.* **85**, 9815-9823 (2013). (b) Hayashi, T., Fukuda, N., Uchiyama, S. & Inada, N. A cell-permeable fluorescent polymeric thermometer for intracellular temperature mapping in mammalian cell lines. *PLoS One* **10**, e0117677 (2015).
5. Gota, C. *et al.* Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2766-2767 (2009).
6. Chapman, C. F., Liu, Y., Sonek, G. J. & Tromberg, B. J. The use of exogenous fluorescent probes for temperature measurements in single living cells. *Photochem. Photobiol.* **62**, 416-425 (1995).
7. (a) Zohar, O. *et al.* Thermal imaging of receptor-activated heat production in single cells. *Biophys. J.* **74**, 82-89 (1998). (b) Oyama, K. *et al.* Walking nanothermometers: spatiotemporal temperature measurement of transported acidic organelles in single living cells. *Lab Chip* **12**, 1591-1593 (2012). (c) Takei, Y. *et al.* A nanoparticle-based ratiometric and self-calibrated fluorescent thermometer for single living cells. *ACS Nano* **8**, 198-206 (2014).
8. Yang, J. M., Yang, H. & Lin, L. Quantum dot nano thermometers reveal heterogeneous local thermogenesis in living cells. *ACS Nano* **5**, 5067-5071 (2011).
9. (a) Donner, J. S. *et al.* Mapping intracellular temperature using green fluorescent protein. *Nano Lett.* **12**, 2107-2111 (2012). (b) Donner, J. S. *et al.* Imaging of plasmonic heating in a living organism. *ACS Nano* **7**, 8666-8672 (2013).
10. Albers, A. E. *et al.* Dual-emitting quantum dot/quantum rod-based nanothermometers with enhanced response and sensitivity in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9565-9568 (2012).

11. Ke, G. *et al.* L-DNA molecular beacon: a safe, stable, and accurate intracellular nano-thermometer for temperature sensing in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18908-18911 (2012).
12. Shang, L., Stockmar, F., Azadfar, N. & Nienhaus, G. U. Intracellular thermometry by using fluorescent gold nanoclusters. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 11154-11157 (2013).
13. Kucsko, G. *et al.* Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature* **500**, 54-58 (2013).
14. Kiyonaka, S. *et al.* Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. *Nat. Methods* **10**, 1232-1238 (2013).
15. Wang, C. *et al.* Determining intracellular temperature at single-cell level by a novel thermocouple method. *Cell Res.* **21**, 1517-1519 (2011).
16. (a) Inomata, N., Toda, M., Sato, M., Ishijima, A. & Ono, T. Pico calorimeter for detection of heat produced in an individual brown fat cell. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 154104 (2012). (b) Sato, M. K. *et al.* Temperature changes in brown adipocytes detected with a bimaterial microcantilever. *Biophys. J.* **106**, 2458-2464 (2014).
17. (a) Gao, L. *et al.* Single-cell photoacoustic thermometry. *J. Biomed. Opt.* **18**, 026003 (2013) (b) Gao, L., Zhang, C., Li, C. & Wang, L. V. Intracellular temperature mapping with fluorescence-assisted photoacoustic-thermometry. *Appl. Phys. Lett.* **102**, 193705 (2013).
18. (a) Lakowicz, J. R. in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 3rd edn., 2006, pp.624. (b) Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. in *Molecular Fluorescence*, Wiley, Weinheim, 2nd edn., 2012, pp.411.
19. Gota, C., Uchiyama, S. & Ohwada, T. Accurate fluorescent polymeric thermometers containing an ionic component. *Analyst* **132**, 121-126 (2007).
20. Uchiyama, S. *et al.* Environment-sensitive fluorophores with benzothiadiazole and benzoselenadiazole structures as candidate components of a fluorescent polymeric thermometer. *Chem. – Eur. J.* **18**, 9552-9563 (2012).
21. Arbeloa, F. L., Arbeloa, T. L. & Arbeloa, I. L. Electronic spectroscopy of pyrromethene 546. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **121**, 177-182 (1999).
22. Gota, C., Uchiyama, S., Yoshihara, T., Tobita, S. & Ohwada, T. 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 (2008).
23. Drexler, H. G., Gaedicke, G. & Minowada, J. T-leukemia cell lines CCRF-CEM, HPB-ALL, JM and MOLT-4: changes in isoenzyme profiles during induction of differentiation. *Blut.* **54**, 79–87 (1987).
24. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-72 (1977).

25. Maeda, Y, Nakamura, T. & Ikeda, I. Changes in the hydration states of poly (N-alkylacrylamide) s during their phase transitions in water observed by FTIR spectroscopy. *Macromolecules* **34**, 1391–1399 (2001).
26. Koutaka, H. *et al.* A Novel Fluorescent Probe for Zinc Ion Based on Boron Dipyrromethene (BODIPY) Chromophore. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 700-703 (2004).
27. Suzuki, K. *et al.* Reevaluation of absolute luminescence quantum yields of standard solutions using a spectrometer with an integrating sphere and a back-thinned CCD detector. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 9850-9860 (2009).
28. Baker, S. N., McCleskey, T. M. & Baker, G. A. An Ionic Liquid-Based Optical Thermometer. in *Ionic Liquids IIIB: Fundamentals, Progress, Challenges, and Opportunities: Transformations and Processes*. (ed. Rogers, R.D. & Seddon, K.R.) 171-181 (ACS Symposium Series, 2005).
29. Latt, S. A. & Stetten, G. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* **24**, 24-33 (1976).
30. Gong, J., Traganos, F. & Darzynkiewicz, Z. Growth imbalance and altered expression of cyclins B1, A, E, and D3 in MOLT-4 cells synchronized in the cell cycle by inhibitors of DNA replication. *Cell Growth Diff.* **6**, 1485-1493 (1995).
31. Lodish, H. *et al.*, in *Molecular Cell Biology*, Freeman, New York, 7th edn., 2013, pp.485.
32. In ref. 18a, pp.69.
33. (a) Bright, G. R., Fisher, G. W., Rogowska, J. & Taylor, D. L. Fluorescence ratio imaging microscopy: temporal and spatial measurements of cytoplasmic pH. *J. Cell Biol.* **104**, 1019-1033 (1987). (b) Ohtsuka, K. *et al.* Fluorescence imaging of potassium ions in living cells using a fluorescent probe based on a thrombin binding aptamer–peptide conjugate. *Chem. Commun.* **48**, 4740-4742 (2012).
34. (a) De Laat, S. W., Van der Saag, P.T. & Shinitzky, M. Microviscosity modulation during the cell cycle of neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4458-4461 (1977). (b) Niikura, K., *et al.* Influence of hydrophobic structures on the plasma membrane permeability of lipidlike molecules. *Langmuir* **26**, 9170-9175 (2010).
35. Jones, K. H. & Senft, J. A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 77-79 (1985).
36. Matsumoto, T *et al.* A thiol-reactive fluorescence probe based on donor-excited photoinduced electron transfer: key role of ortho substitution. *Org. Lett.* **9**, 3375-3377(2007).

第4章 蛍光高分子温度計による褐色脂肪細胞内の熱産生測定法の開発

本章では、第3章で開発した蛍光強度比による細胞内温度計測が可能な細胞内移行型蛍光高分子温度計を用いて、熱産生を主の生理機能とする褐色脂肪細胞へと応用した検討結果について述べる。

第1節 序論

哺乳動物では、褐色脂肪細胞(Brown adipose cell: BAC)が、非震え熱産生によって、全身のエネルギー消費を調節し、安定した体温を維持するのに重要な役割を果たしている^{1,2}。他の組織はわずか1 W/kg程度しか発熱しないのに対し、褐色脂肪組織(Brown adipose tissue: BAT)は300 W/kgまで熱産生することができる³。それ故、世界中の公衆衛生上の重大な懸案事項になっている肥満および肥満に関連する代謝障害を治療するための効果的な戦略として、最近の研究ではBAT活性を増大させることに焦点を当てている。例えば最近の医学研究では、PRDM16およびC/EBP- β を発現する線維芽細胞または外因性遺伝子(PPARG2、CEBPBおよびPRDM16)を導入したヒト誘導性多能性幹細胞をマウスに移植すると、そのマウスBATのグルコース取り込みが高くなり、高活性BATとして機能したことを示した^{4,5}。また、遺伝子導入せずともヒト多能性幹細胞から機能を有するBACを分化誘導し、そのBACをマウスに移植したところ、耐糖能や耐脂質能を増大させることにより、肥満症状が改善することを示した⁶。さらに、食品科学研究では、例えばカプサイシン、魚油、Thai black ginger抽出物、ホップエキスなどの食品由来成分が、交感神経系を刺激することによってBATの活性を向上させ、エネルギー消費を増加させることが示されている⁷⁻¹⁰。

BATの熱産生は、交感神経末端から放出されるノルエピネフリン(NE)によって調節される。は、 β -アドレナリン受容体(β -AR)を活性化し、細胞内cAMPの蓄積およびホルモン感受性リパーゼの誘導をもたらす、細胞内のトリグリセリドを加水分解する。トリグリセリドから分解して生じた脂肪

酸は、ミトコンドリア内膜に位置する **BAC** 特異的分子マーカーである脱共役タンパク質 **UCP1** を活性化し、電気化学的プロトン勾配を熱エネルギーとして放散させる¹¹。

様々な研究により、**BAC** 分化に関与する重要な転写調節因子およびシグナル伝達経路が決定されている。近年、白色脂肪組織に点在する **beige** または **brite** 脂肪細胞と呼ばれる新しい系統の **BAC** が注目を集めている^{12,13}。慢性的な寒冷曝露および $\beta 3$ -AR アゴニスト刺激は、成人において、これら **beige/brite** 脂肪細胞を活性化するとされている¹⁴。白色脂肪組織由来の多能性幹細胞を独自のハイドロゲルと共にマウスに移植すると、その幹細胞は **beige** 細胞に分化し、その結果、移植マウスの呼吸数が上昇、体重増加が抑えられた¹⁵。しかし、褐色脂肪細胞または **beige/brite** 脂肪細胞の分化を制御する正確な分子メカニズムおよびシグナル伝達経路は、未だ知られていないことも多い。

褐色脂肪細胞の分化に関する多くの研究があるにもかかわらず、褐色脂肪細胞の機能を評価するための正確な方法は、例えば **UCP1** タンパク質発現、**BAC** 特異的遺伝子発現または酸素消費量の計測などに限られている。従って、着目している遺伝子がどのようにして熱産生に影響を及ぼすのかを評価することは困難であった。一方、褐色脂肪細胞懸濁液¹⁶ および単離されたミトコンドリア¹⁷ を用いたカロリメトリーなど、熱産生を直接評価するためのいくつかのアプローチが報告されている。しかしながら、これらの技術は計測装置の感度が低いため、多くの細胞を必要とするという課題もある。加えて、熱源は細胞内にあるにも関わらず、細胞内の熱産生を直接的に測っているわけではない。したがって、細胞内温度計測のような細胞内熱産生を直接的に検出する方法は重要な技術だと考えられる。

近年、いくつかの細胞内温度計測用蛍光プローブが報告されている。蛍光プローブは、温度分解能が高く(1°Cより小さい温度差も測れる)、高い空間分解能(原理的には分子レベル)を持つことが利点である。例えば、温度応答性高分子¹⁸⁻²⁰、温度応答性高分子を含むゲル^{21, 22}、量子ドット²³⁻²⁵、緑色蛍光タンパク質²⁶⁻²⁸、ユーロピウム錯体含有ナノ粒子²⁹、molecular beacon³⁰、gold nanocluster³¹、ナノダイヤモンド³² および有機低分子化合物^{33,34}などが代表

的な細胞内温度センシング用の蛍光プローブである。記載した各蛍光プローブの概要は表 4-1 にまとめた。その中で、褐色脂肪細胞内温度を計測した 3 つの報告(改変 GFP²⁷、高分子ナノゲル²² および BODIPY ベースの有機低分子化合物³⁴)について、その技術の限界という点から詳しく説明する。改変 GFP は、他の 2 つの温度計、そして本研究で用いる第 3 章で開発した蛍光強度比で温度計測可能な ratio 型カチオン性蛍光高分子温度計 (Ratiometric Cationic Fluorescent Polymeric Thermometer: R-CFPT)³⁵ (図 4-1 参照)と比較して、感度が低い。また、高分子ナノゲルは、細胞に導入するためにマイクロインジェクション法が必要であり、BODIPY ベースの有機低分子化合物は、褐色脂肪細胞内の小胞体(ER)温度しか検出できない。従って、現在の細胞内温度計測用の蛍光温度計の中でも、R-CFPT は、高感度、生細胞への移行能、細胞全体の温度分布の検出という点で利点がある。

本研究では、初代培養褐色脂肪細胞および R-CFPT の顕微鏡観察に基づいて褐色脂肪細胞内の温度を計測する方法を確立した。Isidor らが報告しているように、成熟した脂肪細胞への siRNA (分子量約 14,000)の取り込みは、効率が低く困難とされている³⁸。したがって、成熟褐色脂肪細胞への高分子 R-CFPT (数平均分子量 10,800)の応用は、比較的難しい課題であり、R-CFPT を細胞に導入する方法を最適化する必要があった。最適化した褐色脂肪細胞内の温度計測法を用いて、脱共役剤刺激、もしくは既知の β -AR アゴニスト NE および既知の β 3-AR 選択的アゴニスト CL316.243³⁹ 刺激時の成熟した褐色脂肪細胞と未分化線維芽細胞との間の細胞内温度変化の差異を決定した。

表 4-1. 近年報告された蛍光温度計の特徴(～2017年5月)

ref	Parameter ^a	Cell line	Temperature resolution (°C)	Temperature sensitivity (%/°C)	Distribution within cell	Introduction method	Acquisition time for an image
18	τ_f (500-700 nm)	COS7, HeLa	0.18–0.58	6.3 (35-40°C)	whole cell	microinjection	~1 min
19	τ_f (565 nm)	yeast, MOLT-4, HEK293T	0.09–0.78		cytoplasm (or whole cell)	20 min, 25°C	< 1 s
20	τ_f (500-700 nm)	HeLa, COS7, NIH/3T3	0.05–0.54		whole cell	10 min	~1 min
21	FI (515-550 nm)	COS7	0.29–0.50		dotted in cytoplasm	microinjection	< 0.5s
22	FI (515-550 nm)	mouse primary brown adipocyte	0.29–0.50		cytoplasm	microinjection	< 0.5s
23	FI ratio (630-640/664-674 nm)	HeLa, NIH/3T3	0.2			assisted by cationic polymer	
24	λ_{em}	NIH/3T3	(0.105 nm/°C)	0.016	dotted within a cell	1 h, 37°C, assisted by Qtracker	
25	FI ratio (650-670/630-650 nm)	SH-SY5Y	0.8-0.9	6.3	dotted in cytoplasm	1 h, 37°C	< 20 s
26	Fluorescence anisotropy	HeLa, U-87 MG	1.2		whole cell	genetically expressed	> 1 min
27	FI ratio (ex 400/480 nm)	HeLa, brown adipocyte, C2C12 myotube		3 (30-40°C)	cytoplasm, mitochondria, ER	genetically expressed	< 2 s
28	FI ratio (509/425 nm)	HeLa, medaka embryo	0.1-0.4	2.6	cytoplasm, mitochondria, nucleus	genetically expressed	< 2 s
29	Em ratio	HaLa	1		endosome	2 h, 37°C	
30	FI (505-535 nm)	HeLa	0.2–0.7		nucleus	4 h, 37°C by liposome transfection	
31	τ_f (655-725 nm)	HeLa	0.3–0.5		dotted within a cell	2 h, 37°C	
32	FI with microwave excitation	WS1	0.044		dotted within a cell	assisted by nanowire	
33	FI ratio (590-690 nm)	NIH/3T3, HeLa, C2C12, Chang, BAT	0.4		endoplasmic reticulum	30 min, 37°C	< 2s
34	FI (555-655 nm)	WT-1 and human brown adipocyte		4.8 (35.7-42.8°C)	endoplasmic reticulum	30 min, 37°C	< 2 s
35	FI ratio (580/515 nm)	HEK293T, MOLT-4	0.01–0.25	5.3 (30-40°C)	whole cell	10 min	< 1 s

^a τ_f : Fluorescence lifetime, FI : Fluorescence intensity

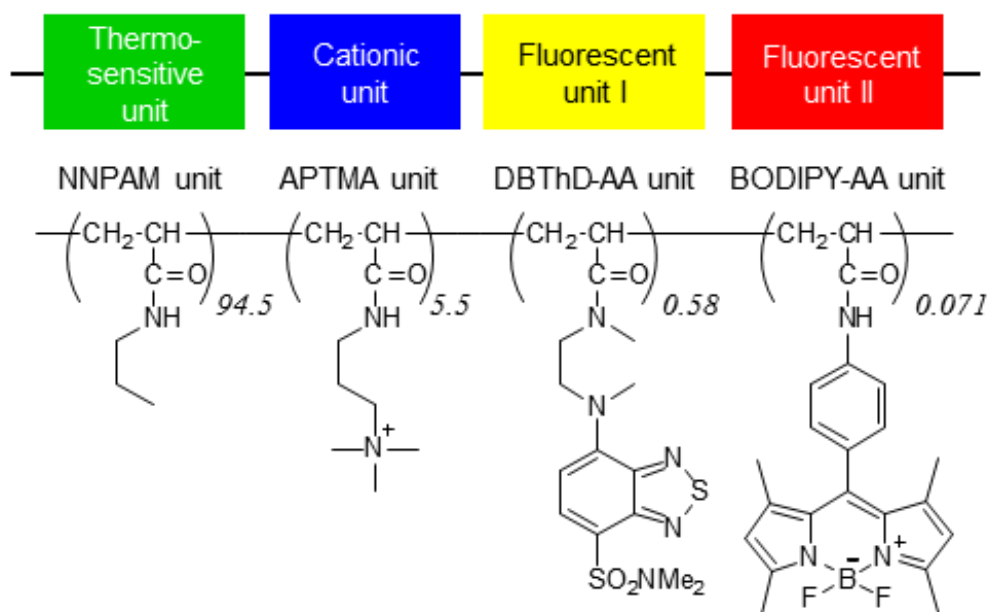


図 4-1. 細胞内温度計測のためのカチオン性蛍光高分子温度計(R-CFPT)

R-CFPT の化学構造。Mw = 9260、Mn = 4540、Mw / Mn = 2.0。第 3 章も参照。

第2節 材料と実験方法

1. 材料

DMEM 培地は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から購入した。Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) そして insulin (bovine pancreas) は、Sigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。

2. 褐色脂肪細胞の初代培養法

初代培養に関する動物実験のすべては、キリン株式会社の動物実験委員会によって承認されたものであり、国際的および日本のガイドラインに基づいて作成した社内ガイドラインに準拠して、動物を取扱い、初代培養を行った。3 週齢の雄性 Wistar ラットは Charles River Japan (Tokyo, Japan) から購入した。未分化細胞である pre-BAC の単離および培養は、過去の報告⁶¹を改変して実施した。ラットをジエチルエーテル麻酔下で放血し、背部の皮膚をはがした後、背部皮下脂肪組織を除き、肩甲骨間の褐色脂肪組織を採取した。採取した組織を細かく刻み、3 mg/mL のコラゲナーゼを含有する Krebs-Ringer bicarbonate HEPES 緩衝液中で 37°C、30 分間振盪した。消化した組織を、100 μm のポアサイズを有するナイロンフィルターで濾過した。濾液を室温で 400 x g, 5 分遠心分離し、沈殿を複数回の Krebs-Ringer bicarbonate HEPES 緩衝液による洗浄を行い、溶血処理をした後、70 μm のポアサイズを有するナイロンフィルターで濾過することで stromal-vascular fraction (SVF) を得た。この沈殿を増殖培地 (DMEM (4.5 g/L glucose, L-glutamine, sodium pyruvate) に 10% fetal calf serum (FCS), 17 μM D-pantothenic acid, 33 μM d-biotin, 100 μM ascorbic acid, 1 μM octanoic acid, 100 units/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin, 50 nM 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3) を添加) に懸濁し、コラーゲン子 t ーティングした 100 mm ディッシュに播種した。3~4 日間培養 (5% CO₂, 37°C) した後、semi-confluent 状態の線維芽細胞状の未分化細胞を得た。さらに分化誘導を行うために、0.5 mM IBMX, 2.5 μM DEX, 10 ng/mL insulin を含む増殖培地に置換して、2 日間培養した後、

増殖培地から FCS を抜いた上で 0.1 nM insulin を添加した培地(成熟培地)に交換し、さらに 3 日間培養 (5% CO₂, 37°C) することによって成熟した褐色脂肪細胞を得た。

3. 定量リアルタイム PCR

TRIzol (Life Technologies) を用いて初代培養褐色脂肪細胞から全 RNA を抽出し、RNeasy キット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてプロトコールに基づき、RNA を精製した。PrimeScript™ RT Master Mix (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて逆転写により全 RNA から cDNA を合成した。SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) を使用して、LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) にて、定量リアルタイム PCR を実施した。mRNA の量は、18S rRNA で標準化した。用いた sense そして antisense primer を表 4-2 に示す。

4. ウェスタンブロット分析

細胞抽出液は、培養した細胞を Halt protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) と 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を添加した RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 25 mM Tris/HCl, pH 7.6) で処理することで調製した。タンパク質含量は、BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて計測した。所定量のタンパク質抽出液を SDS-PAGE によって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。Anti-UCP1 (32 kDa) rabbit polyclonal antibody (1:1000, catalog number 662045, Calbiochem, Darmstadt, Germany) と anti- α -tubulin (52 kDa) rabbit polyclonal antibody (1:1000, catalog number 2125, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を 1 次抗体として用い、anti-rabbit IgG, HRP-linked whole antibody (1:5000, catalog number NA934-1ML, GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK) を 2 次抗体として用いた。反応した抗体は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE

Healthcare Life Science)で呈色し、LAS4000(GE Healthcare Life Science)にて検出、バンドの定量は ImageJ software (NIH, USA)にて行った。

5. 用いた蛍光高分子温度計

本研究で使用した R-CFPT は、第 3 章で合成したものであり、方法は第 3 章第 2 節を参照³⁵。

6. pre-BAC および BAC への R-CFPT の導入

R-CFPT は細胞を剥がすことなく、pre-BAC および BAC に導入処理した。ラット肩甲骨間褐色脂肪組織から単離した SVF を、collagen-coated 35-mm glass-bottom dish (Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan)上で増殖培地にて培養した。その後、上記2項の初代培養の方法に従って、成熟した褐色脂肪細胞を得た。培養した pre-BAC および BAC 細胞を 5%グルコース水溶液で洗浄し、次に 0.05 w/v% (pre-BAC) または 0.04 w/v% (BAC) R-CFPT を含む 5%グルコース水溶液で処理した。25°C、10 分間インキュベートした後、細胞を HBSS で穏やかに 2 回洗浄した。生細胞イメージングには、FluoroBrite™ DMEM (Life Technologies) に 15 mM HEPES を加えた培地を使用した。培地の温度の計測(図 4-9)では、15 mM HEPES を添加した FluoroBrite DMEM 培地に終濃度 0.05 w/v% の R-CFPT を溶かすことで計測した。

表 4-2. リアルタイム PCR 分析に使用したプライマー

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
CPT1 β	AGCTGCTGCTTTCCTATCATGGGT	TGCGGAAATAGGCTTCGTCATCCA
FABP4	GGACTTGGTCGTCATCCGGTC	CGTAAACTCTTGTAGAAGTCACGCC
PGC-1 α	CACAACCGCAGTCGCAACATGCTC	GGCTTCAGCTTTGGCGAAGCCTTG
PPAR α	GCTCACGGAATTTGCCAAGGCTAT	TGATGTCGCAGAATGGCTTCCTCA
PPAR γ	AGCATCAGGCTTCCACTATGGAGT	ATTCGCCCAAACCTGATGGCATTG
UCP1	CGAGCCAAGATGGTGAGTTCGACA	GTGGTGATGGTCCCTAAGACACCT
18S rRNA	TGGGGTTCAGCCACCGAGATTGA	TTGCAATCCCGATCCCATCAC

7. 共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング

UPlanSApo 40x レンズ (Olympus, NA 0.95) または UPlanSApo 60x レンズ (Olympus, NA 1.35) を用いて、R-CFPT を導入した褐色脂肪細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000、Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。BAC への R-CFPT 導入効率を評価するために、R-CFPT は 473 nm で励起し、485-585 nm の蛍光を観察した。蛍光強度比による細胞内温度の計測のために、500-520 nm および 560-610 nm の蛍光を計測した。培地の温度は、顕微鏡用チャンバー (Water Jacket Top Stage Incubator H101、Okolab, Pozzuoli, Italy) を用いて制御した。Okolab H101 システムでは、培地温度は、顕微鏡視野から約 5 mm 離して配置した type K 熱電対を用いて毎分モニタリングし、 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ の温度精度でフィードバックモードによって制御した (図 4-2)。

化学的刺激は、観察している細胞の培地 2 mL に、1 mL の化合物が溶解した培地 (0.3% DMSO を含有) を迅速に添加することで行った。添加する 1 mL の化合物含有培地は予め温めておいた。培地の温度安定性を高めるために、室温と培地温度との差を少なくし、本研究では 30°C に設定した。また、校正曲線の直線応答範囲内で実験を行ったことを確認した (図 4-6a)。

導入効率は、式 9 を用いて求めた。

$$\text{導入効率 (\%)} = \text{R-CFPT を含んだ細胞数} / \text{総細胞数} \times 100 \quad (\text{式 9})$$

BAC の核、脂質滴、ミトコンドリアを可視化するために、それぞれ Hoechst33342 (Dojindo, Japan)⁶⁶, NileRed (TCI, Japan)⁶⁷, MitoTrackerDeepRed FM (Life Technologies) を用いた。BAC を、0.01 mg/mL Hoechst33342, 1 $\mu\text{g/ml}$ NileRed, そして 1 μM MitoTrackerDeepRed FM (いずれも終濃度) で処理し、 37°C で 15 分間インキュベートした。染色後、R-CFPT を細胞に導入した。Hoechst33342 は 405 nm レーザーで励起し、410-510 nm の蛍光を計測した。NileRed は 559 nm で励起し、570-625 nm の蛍光を観察した。MitoTrackerDeepRed FM は、

635 nm で励起し、650-750 nm の蛍光を観察した。各蛍光色素との同時染色のために R-CFPT は、励起を 473 nm で行い、480-510 nm の蛍光を観察した。

8. 画像解析

Fluoview (Olympus) および MetaMorph (Molecular Devices, USA) を用いて画像を解析した。intensity-modulated display (IMD) 法で、細胞内温度を可視化する場合は MetaMorph を用いて行った。median filter およびバックグラウンド処理した後の 2 蛍光色素由来の画像を、各ピクセルで除算することによって、蛍光強度比像を作成した。刺激後に蛍光強度が半分以下になった細胞を解析対象から除いた後、細胞内温度変化の解析を行った。

9. BAC 抽出液中の R-CFPT の蛍光応答の計測

R-CFPT (0.01 w/v%) の BAC 抽出液における蛍光応答を、共焦点レーザー顕微鏡下で評価した。BAC 抽出液は、以前に報告されたプロトコールに基づいて、調製した¹⁸。

蛍光高分子温度計 **1** の温度分解能 (δT) は、以下の式 **10** を用いて評価した⁶⁴。

$$\delta T = \left(\frac{\partial T}{\partial F_{ratio}} \right) \delta F_{ratio} \quad (\text{式 } 10)$$

ここで $\partial T / \partial F_{ratio}$ は蛍光強度比—温度の相関を示したグラフの傾きの逆数を、 δF_{ratio} は蛍光強度比の標準偏差 SD を示す。その SD は、1 サンプルの 3 回計測から求めた。

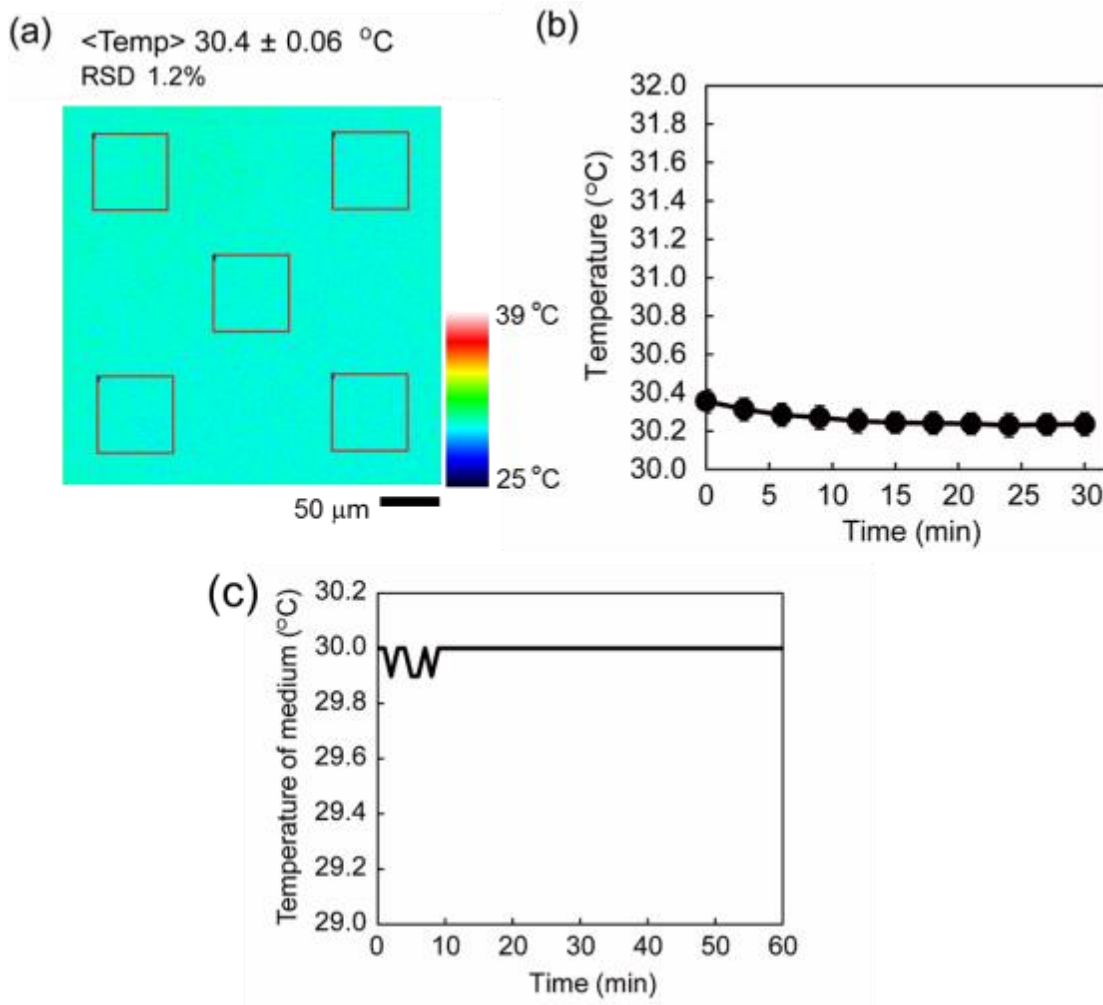


図 4-2. 顕微鏡視野内の内部温度変動

(a) 30°Cにおける0.01 w/v% R-CFPTの培地(15 mM HEPESを含むFluoroBrite DMEM)における蛍光強度比像(Em.560-610 nm/Em.500-520 nm)を擬似色で示した。レンズ倍率は40倍であり、観測したROIの温度変動を評価した。5つのROI(赤い四角)の平均温度および相対標準偏差(RSD)を計算し表示した。Bar, 50 μm。(b) R-CFPT(0.01 w/v%)によって計測した顕微鏡視野温度の経時変化。(a)における5つのROIの平均とSDを示した。(c) 顕微鏡視野から約5 mm離して配置したtype K熱電対を用いて経時的に計測した温度。これらの実験では、培地の温度を30°Cに維持した。

10. 細胞毒性アッセイ

第 3 章で述べた PI アッセイに基づいて細胞毒性を評価した³⁵。簡潔に以下方法を記す。R-CFPT を導入した細胞に 1 mL の FluoroBrite DMEM (+15 mM HEPES 緩衝液)培地を入れた状態で、0.5 mL の PI 溶液(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS)を添加し、細胞を 37°C、30 分間培養した。PI の蛍光画像は、559 nm で励起し、励起ダイクロイックミラーDM405/473/559 を通して、655-755 nm の蛍光を計測することで取得した。以下式 11 を用いて細胞生存率(%)を決定した。

$$\text{細胞生存率(\%)} = \text{PI 陰性の細胞数} / \text{R-CFPT を含む細胞の数} \times 100 \quad (\text{式 11})$$

11. 脂質分解アッセイ

成熟した褐色脂肪細胞を FluoroBrite DMEM 培地で洗浄した後、0.5 μM NE で 1 時間刺激した。細胞を接着させたままの状態を上清を回収し、グリセロール含有量を free glycerol assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA)を用いて、付属のプロトコールに従い計測を行った。

12. 統計分析

統計的差異は、図の凡例に記載した適切な統計的方法により分析した。 P 値が 0.05 未満の場合を統計的に有意とした。統計分析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan)を用いて行った⁶⁵。

第3節 結果

1. 初代培養褐色脂肪細胞の特徴

SVF 由来の未分化細胞 pre-BAC は線維芽細胞様の形態を示した一方で、分化・成熟した褐色脂肪細胞は多胞脂肪滴を有していた(図 4-3a)。分化誘導したシャーレ内のほとんどすべての細胞には脂質滴が存在し、脂肪蓄積が認められ、高効率で分化誘導出来ていることがわかった。肩甲骨間褐色脂肪組織由来 SVF からの褐色脂肪細胞への分化は、qRT-PCR 法によって UCP1 および成熟褐色脂肪細胞の他の遺伝子マーカーの mRNA 発現量を計測することによって確認した。褐色脂肪細胞特異的遺伝子マーカーとして PGC-1 α を選択した。PGC-1 α は、ミトコンドリアの生合成および UCP1 の発現を誘導し、熱産生を誘導する⁴⁰。主要な脂肪細胞マーカーである FABP4 と PPAR γ 、そして褐色脂肪細胞の既知のマーカーである CPT-1 β と PPAR α の mRNA 発現量を計測した。図 4-3b に示すように、UCP1 および PGC-1 α の mRNA の発現量は、成熟褐色脂肪細胞において未分化細胞 pre-BAC よりもはるかに高い値を示した。さらに、CPT-1 β 、FABP4、PPAR α および PPAR γ の mRNA 発現量は、成熟褐色脂肪細胞で pre-BAC よりも少なくとも 2 倍以上高い値を示した。UCP1 タンパク質の発現量が成熟褐色脂肪細胞において増加したことを確認するために、ウェスタンブロット分析を行い、UCP1 タンパク質発現が成熟褐色脂肪細胞で強く誘導されていることも確認した(図 4-3c および図 4-4a)。さらに、100 nM NE で褐色脂肪細胞を刺激すると、UCP1 遺伝子およびタンパク質(図 4-3d, 4-4b および 4-3e)が強く発現誘導され、今回用いた初代培養系で培養した褐色脂肪細胞が、褐色脂肪細胞の本質的な機能的特徴⁴¹を備えていることも確認できた。

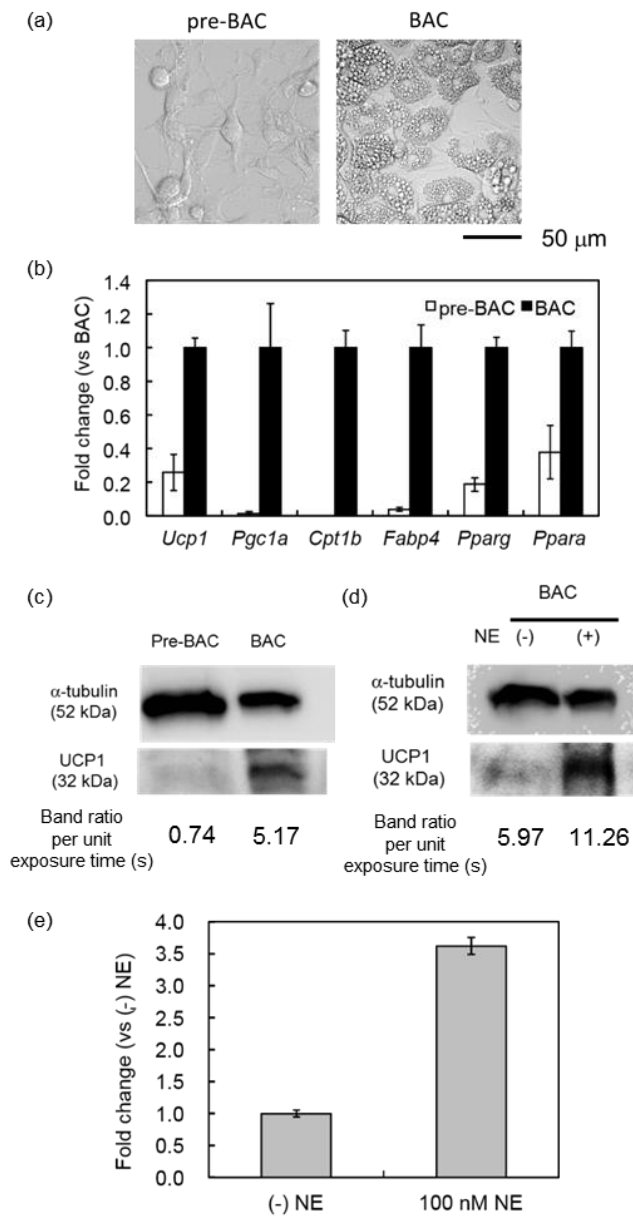


図 4-3. 初代培養褐色脂肪細胞(BAC)の生理的性質

(a) pre-BAC および BAC の微分干渉像による形態。Bar, 50 μ m。 (b) RT-PCR 法で計測した pre-BAC および BAC の UCP1、PGC-1 α 、CPT-1 β 、FABP4、PPAR γ および PPAR α mRNA 発現量 (n=3、平均 \pm SD)。mRNA 量は 18S rRNA の量で正規化した。 (c) pre-BAC および BAC の UCP1 タンパク質発現量を評価するためのウェスタンブロット分析。タンパク質量 20 μ g の細胞抽出液を用いた。 α -tubulin および UCP1 のバンド検出の露光時間は、それぞれ 8 秒および 60 秒であった。 (d) BAC への NE 刺激応答時の UCP1 タンパク質発現増加。タンパク質量 10 μ g の細胞抽出液を用いた。 α -tubulin および UCP1 のバンド検出の露光時間は、それぞれ 15 秒および 240 秒であった。 (e) BAC への NE 刺激応答時の UCP1 mRNA の発現量増加。RT-PCR 法 (n=3、平均 \pm SD) で計測し、18S rRNA の値で標準化した。

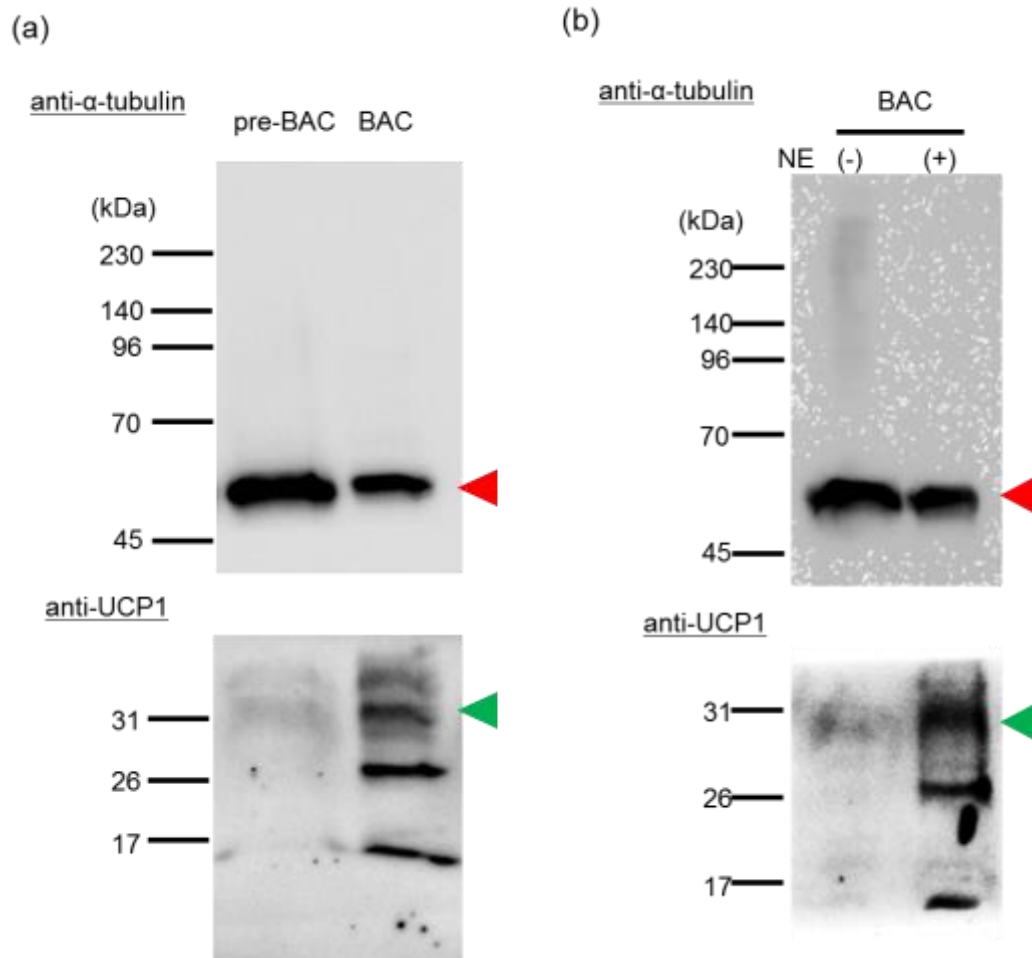


図 4-4. ウェスタンブロット分析結果の詳細

(a) 図 4-3c で示した pre-BAC および BAC における UCP1 タンパク質発現を調べたウェスタンブロットのメンブレン全体像。(b) 図 4-3d で示した NE 刺激時の褐色脂肪細胞の UCP1 発現量増加を調べたウェスタンブロットのメンブレン全体像。赤と緑の矢印はそれぞれ α -tubulin と UCP1 を示す。

2. 褐色脂肪細胞への R-CFPT 導入法の最適化と毒性評価

次に、第 3 章で述べた MOLT-4 (ヒト急性リンパ芽球性白血病由来) および HEK293T (ヒト胎児腎由来) 細胞で以前に確立したプロトコール³⁵を参考に、褐色脂肪細胞への R-CFPT の導入を試みた。5% グルコース水溶液中、0.04 w/v% R-CFPT を褐色脂肪細胞と接触させ、25°C、10 分間インキュベートした。R-CFPT 導入処理した後の褐色脂肪細胞の R-CFPT、Hoechst33342 (核)、NileRed (脂質)、および MitoTrackerDeepRed (ミトコンドリア) の共焦点蛍光像を図 4-5a に示す。HEK293T および MOLT-4 細胞で述べた³⁵ように、R-CFPT は自発的に褐色脂肪細胞内へ取り込まれた。R-CFPT で染色された領域は、NileRed で染色された脂肪滴や MitoTracker で染色されたミトコンドリアとは重複せず、R-CFPT が細胞質および核全体に拡散したことを示した。

次に、R-CFPT の褐色脂肪細胞への導入効率および細胞毒性を最適化するために、5% グルコース水溶液下、褐色脂肪細胞を様々な濃度の R-CFPT (0.01, 0.03, 0.04 または 0.05 w/v%) で処理(25°C, 10 分間インキュベート)した。そして種々の R-CFPT 濃度で処理した細胞の共焦点蛍光像を取得し、R-CFPT の導入効率を計算した。表 4-3 に示すように、R-CFPT 濃度が 0.01 w/v% から 0.05 w/v% に上昇するにつれて、導入効率が増加した。細胞毒性は、細胞質膜の傷害性を評価するヨウ化プロピジウム⁴²を用いて、細胞死を評価した。細胞毒性は、R-CFPT を導入した 30 分後に評価を行った。表 4-3 に示すように、R-CFPT 未処理細胞と 0.04 w/v% 以下の R-CFPT 濃度で処理した細胞との間に細胞生存率の有意差はなかった。一方、0.05 w/v% R-CFPT 処理群では、細胞質膜が障害を受け、いくつかの細胞が死滅してしまった。これらの結果に基づいて、十分な細胞導入効率と細胞毒性の低さから、今後の細胞内温度計測実験では、0.04 w/v% R-CFPT 処理を選択することとした。

pre-BAC の場合、0.05 w/v% R-CFPT 処理でほとんどの細胞(95.0 ± 4.7%)にプローブが取り込まれた(図 4-5b)。この条件下で PI アッセイにおいて死滅した細胞は観察されなかった。

加えて、顕微鏡観察できる十分な量の R-CFPT が取り込まれていたため、さらなる最適化は行われなかった。

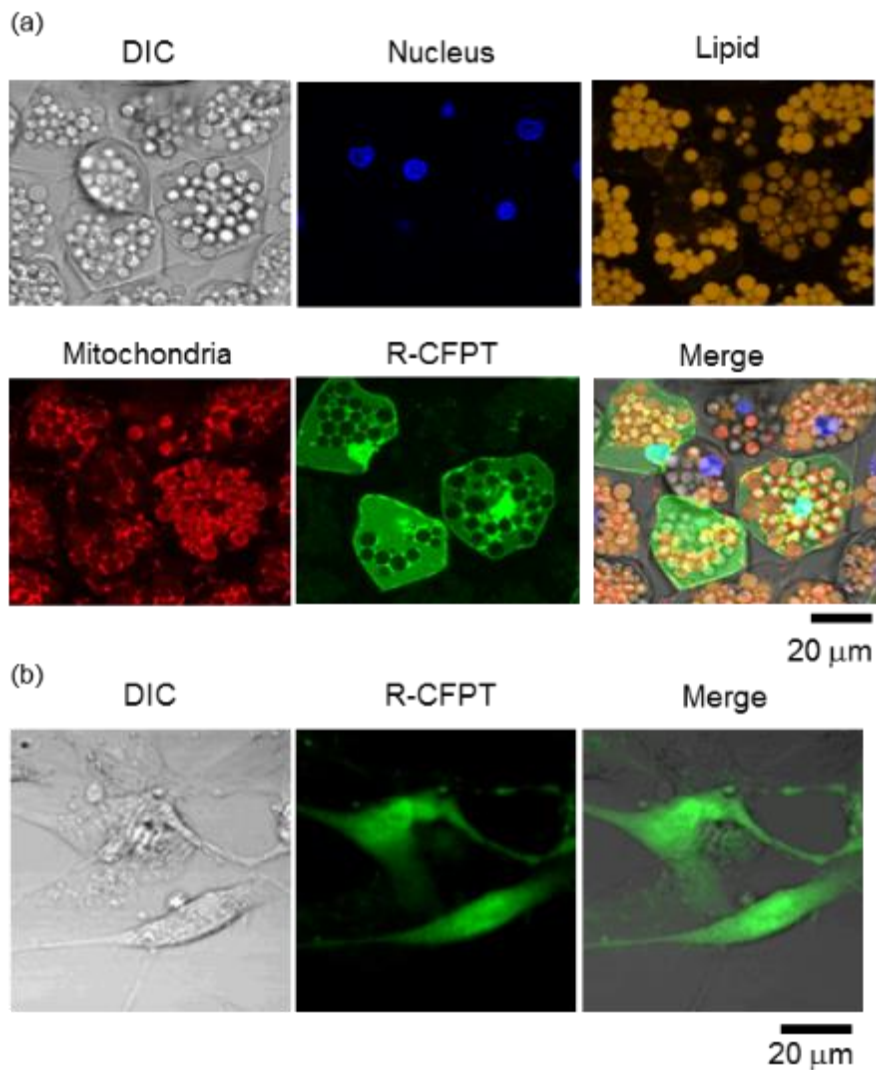


図 4-5. 褐色脂肪細胞への R-CFPT の導入

(a) 0.04 w/v% R-CFPT で処理した褐色脂肪細胞の共焦点蛍光顕微鏡写真。左から微分干渉像、核染色像 (Hoechst33342), 脂質染色像 (NileRed), ミトコンドリア染色像 (MitoTrackerDeepRed), R-CFPT 蛍光像, そして重ね合わせ像を示す。(b) 0.04 w/v% R-CFPT で処理した未分化 pre-BAC の共焦点蛍光顕微鏡写真。左から微分干渉像、R-CFPT 蛍光像, そして重ね合わせ像を示す。Bars, 20 μm。

表 4-3. 褐色脂肪細胞への導入効率および細胞毒性に対する R-CFPT 濃度の影響

R-CFPT concentration (w/v%)	Incorporation efficiency (%) ^a	Viability of cells (%) ^a
0.01	5.2 ± 1.6	100.0 ± 0
0.03	27.4 ± 3.2	96.7 ± 4.7
0.04	36.2 ± 6.2	94.2 ± 3.4
0.05	40.9 ± 2.8	76.1 ± 3.5
none (control)	-	95.8 ± 0.5

^a Mean ± SD., *n* = 3.

3. 脱共役剤刺激により誘導される褐色脂肪細胞内温度変化

次に、R-CFPT の共焦点顕微鏡観察により、褐色脂肪細胞内温度変化を計測した。褐色脂肪細胞抽出液中の R-CFPT の 2 つの蛍光色素に由来する蛍光強度の比は、温度依存的に増加した(図 4-6a)。有意に識別できる統計的最小温度差を意味する温度分解能(算出は実験方法の項参照)は、共焦点顕微鏡下で計測した場合、32–38°Cの範囲内で 0.06–0.56°Cであった(図 4-6a)。これらの結果は、温度変化が温度分解能よりも大きい場合にのみ、計測された温度変化が生物学的現象として論じることができることを意味している。

褐色脂肪細胞内の R-CFPT の機能を確認するために、ミトコンドリアの熱産生を促進する¹⁸ことが知られているミトコンドリア脱共役剤 carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)⁴³ によって誘発された熱産生を計測した。DBThD-AA (560-610 nm) および BODIPY-AA (500-520 nm) 由来の 2 つの同時に取得した蛍光像の強度比をとることで細胞内温度イメージングを行い、FCCP 処理前後の温度変化を pseudocolor にて図 4-6b に示し、また細胞の形態変化の様子を図 4-7 に示した。コントロールの DMSO 処理群では、蛍光強度比はほとんど変化しなかったが、FCCP 処理によって蛍光強度比は上昇し、細胞内全体の温度が上昇したことが明らかになった。さらに、褐色脂肪細胞において 30 μ M FCCP によって誘発された細胞内温度の上昇は、10 μ M FCCP によって誘発された温度上昇よりも高かった。また、図 4-6c に示すように、褐色脂肪細胞内温度は、FCCP 刺激直後に上昇していることを示した。未分化 pre-BAC 細胞においても、10 μ M FCCP 刺激による熱産生を確認した(図 4-6d)が、30 μ M の FCCP は、明らかな細胞形態変化を引き起こし(図 4-8)、細胞死が誘発されてしまったため、細胞内温度計測ができなかった。図 4-6c および図 4-6d に示すように、10 μ M FCCP によって誘導される最大細胞内温度変化値は、褐色脂肪細胞で $1.60 \pm 0.11^\circ\text{C}$ (刺激後 22 分、 $n = 9$ 細胞、平均 \pm SE)および未分化 pre-BAC で $1.20 \pm 0.11^\circ\text{C}$ (刺激後 31 分、 $n = 16$ 細胞、平均 \pm SE)であった。BAC と pre-BAC の最大温度上昇は、*t* 検定によって有意な差であると確認された($P = 0.0268$)。さらに、培地の温度を 30°C に維持した場合の、pre-BAC および BAC の細胞内温度は、

それぞれ $32.3 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (平均 \pm SE、 $n = 22$) および $34.4 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ($n = 50$) であり、こちらも t 検定によって有意な差であると確認された ($P < 0.001$)。対照的に、これら FCCP 刺激実験中の培地の温度を R-CFPT および熱電対によって計測したところ温度変化は検出されなかった (図 4-9)。この結果は、褐色脂肪細胞内の温度上昇が内因性熱産生によるものであり、培地全体的な加熱によるものではないことを示している。

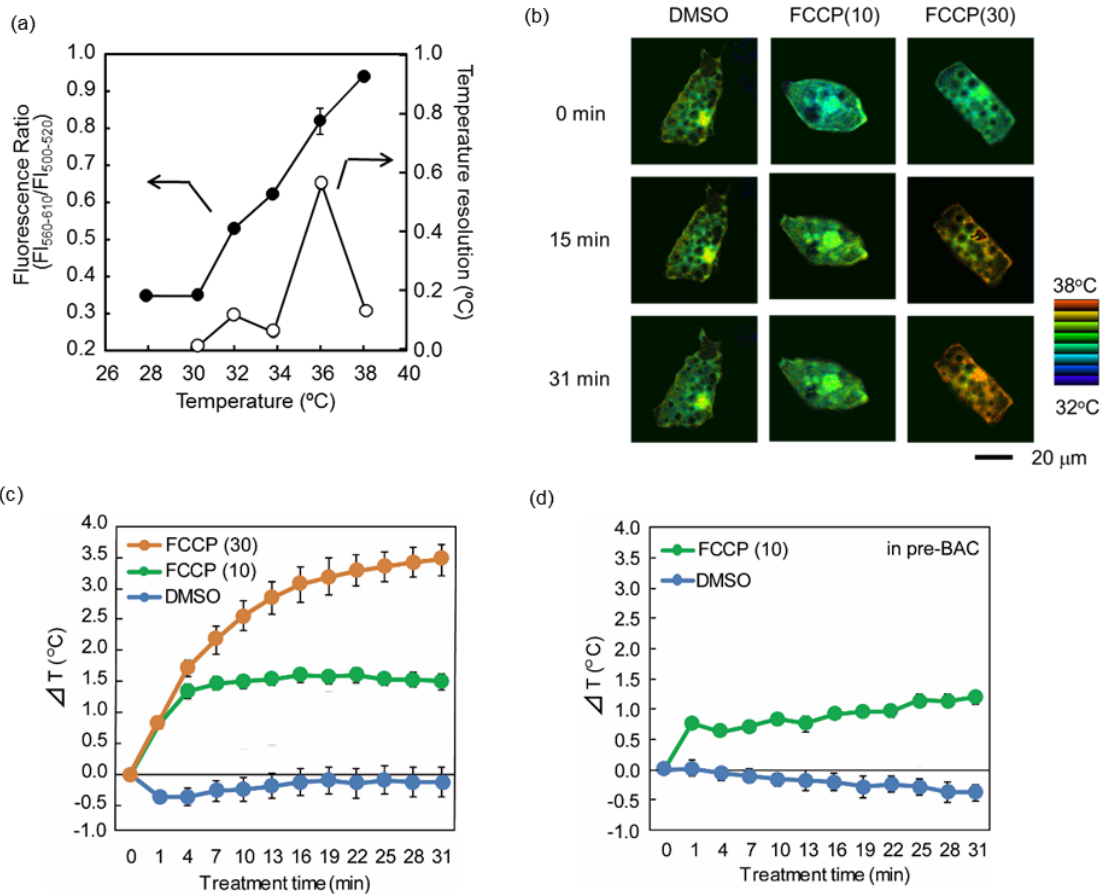


図 4-6. 脱共役剤刺激時の BAC および pre-BAC 細胞内温度解析

(a) 褐色脂肪細胞抽出液中での R-CFPT の蛍光強度比の温度応答性(●、左軸、 $n = 3$ 、平均 \pm SD) および温度分解能(○、右軸)。 $F_{I_{560-610}}$ および $F_{I_{500-520}}$ は、それぞれ 560-610 nm および 500-520 nm における観察視野の平均蛍光強度である。エラーバーは 3 回の独立した実験に基づく標準偏差を示す。(b) 10 μ M または 30 μ M FCCP 処理 15 分後および 31 分後の R-CFPT による褐色脂肪細胞内温度像。コントロールとして 0.1% DMSO 処理を用いた。細胞内温度像は、蛍光強度比 (Em. 560-610 nm / Em. 500-520 nm) を pseudocolor で表し、IMD mode で表示した。pseudocolor bar の温度の値は、(a) で示す温度応答曲線より算出した。Bar, 20 μ m。(c) FCCP 刺激時の褐色脂肪細胞温度変化(平均 \pm SE)。0.1% DMSO, 10 μ M FCCP または 30 μ M FCCP 処理群はそれぞれ $n = 8$, 9 または 9 細胞を解析に用いた。(d) FCCP 刺激時の未分化 pre-BAC 細胞温度変化(平均 \pm SE)。0.1% DMSO または 10 μ M FCCP 処理群はそれぞれ $n = 7$ または 16 細胞を解析に用いた。これらの実験では、培地の温度を 30°C に維持した。

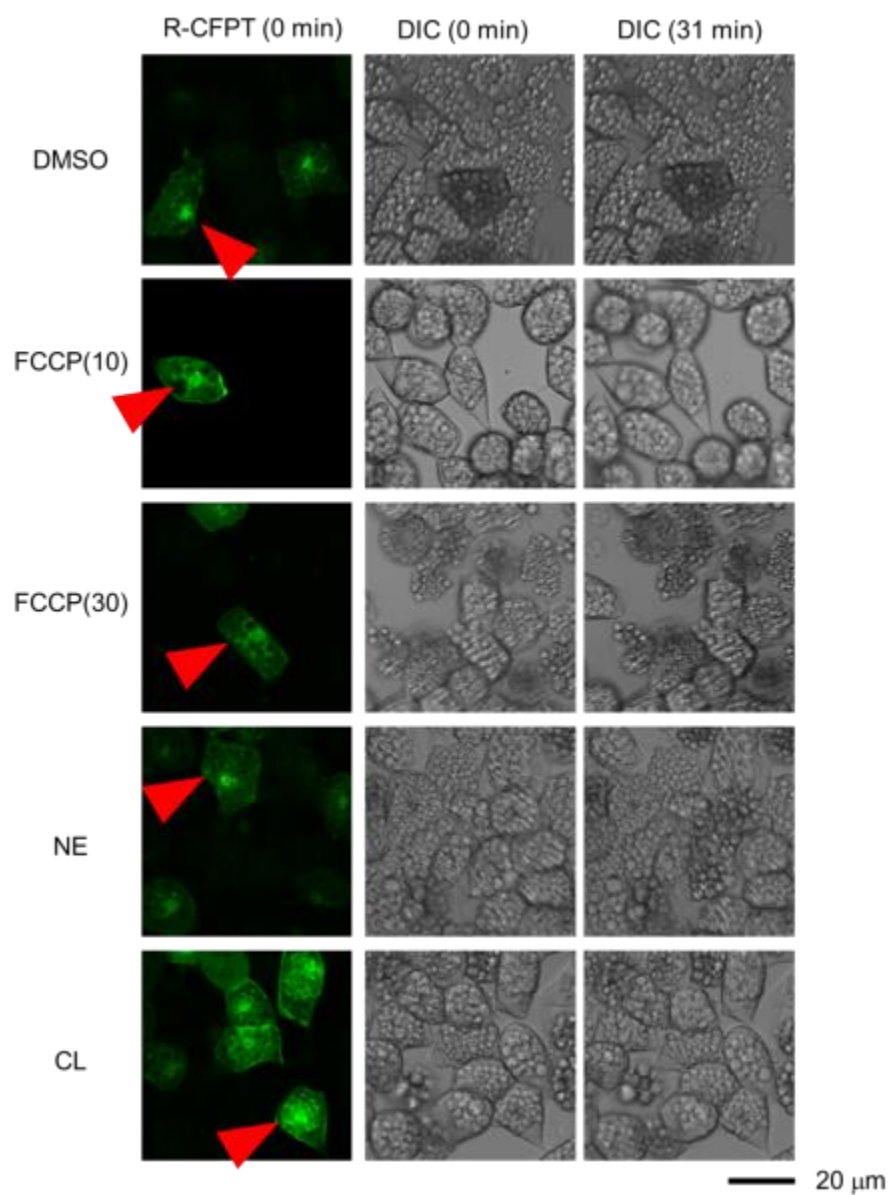


図 4-7. 各種薬剤刺激前後の成熟褐色脂肪細胞の広視野像
赤矢頭は、図 4-6b と 4-10a で示した細胞である。Bar = 20 μm.

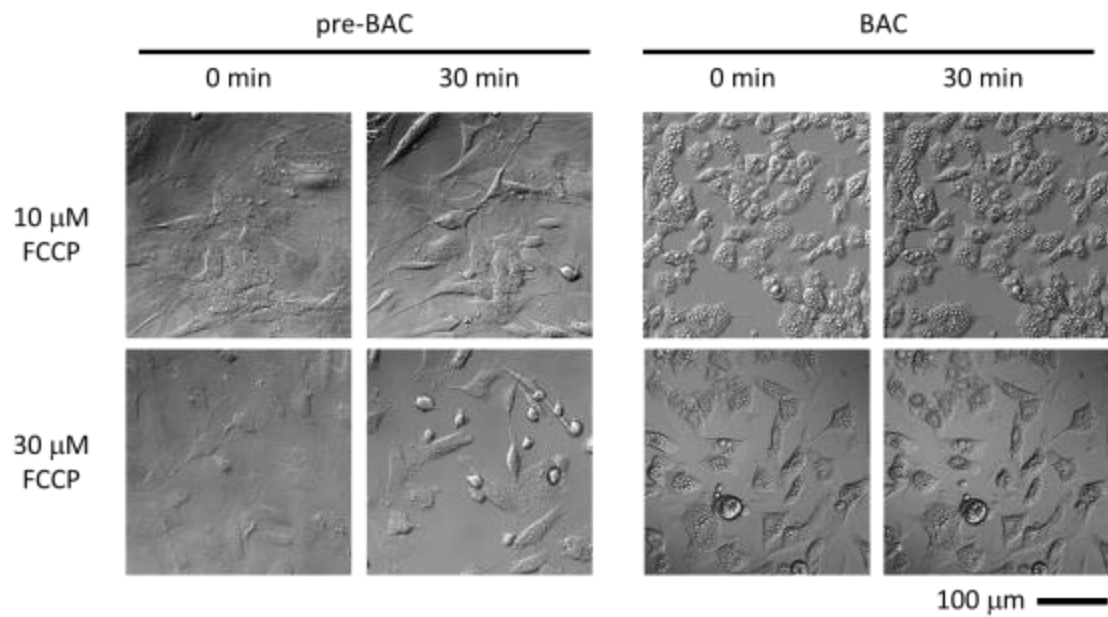


図 4-8. FCCP 刺激前後の pre-BAC および BAC の形態変化
 刺激前および刺激 30 分後の微分干渉像を示す。Bar = 100 μ m.

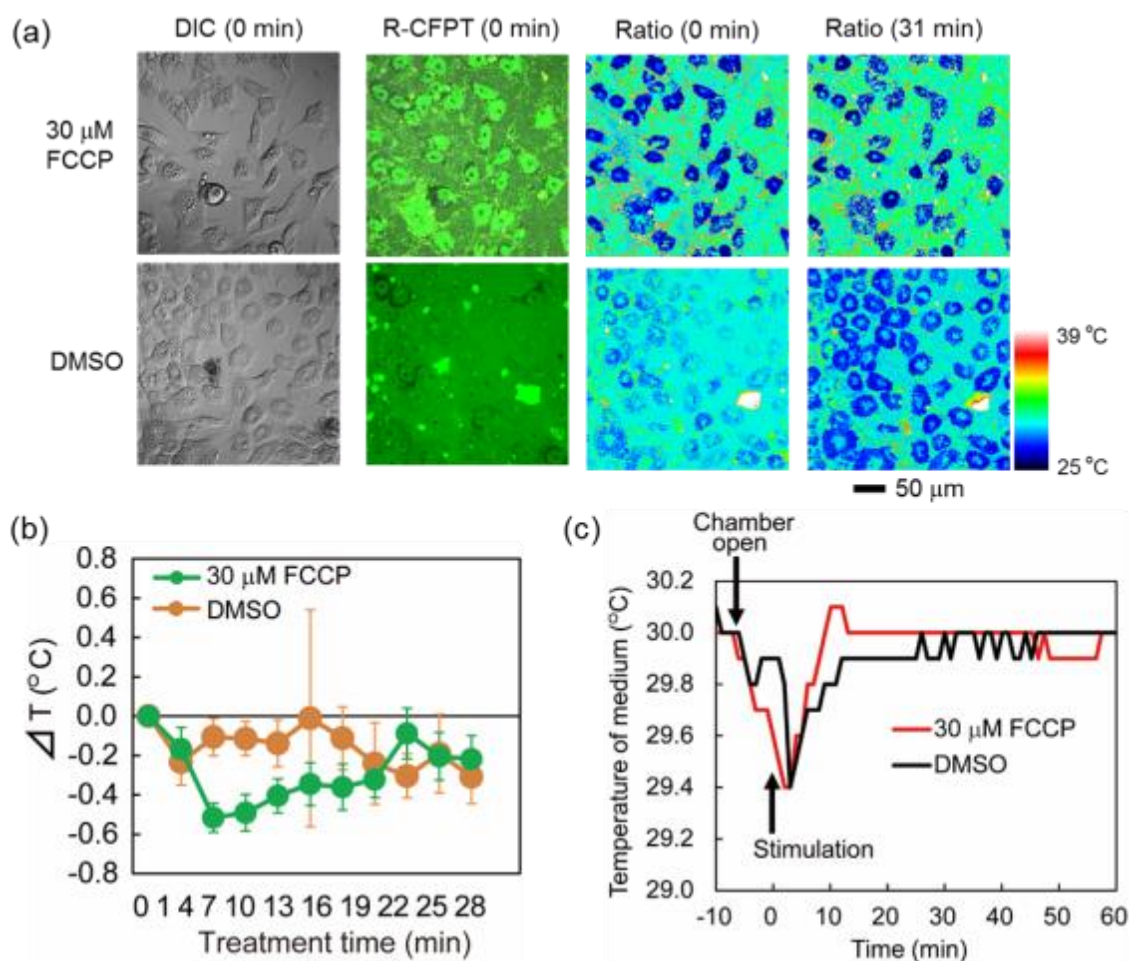


図 4-9. FCCP 刺激実験時の褐色脂肪細胞の培地温度変化

(a)褐色脂肪細胞の外に R-CFPT(0.05 w/v%)を置き、FCCP 刺激時の培地(15mM HEPES を含む Fluorobrite DMEM) 温度変化を計測したときの代表的な図。左から微分干渉像、刺激前の R-CFPT 共焦点蛍光像、刺激前の温度を示す蛍光強度比(Em. 560-610 nm / Em. 500-520 nm) 像、刺激 31 分後の蛍光強度比像。蛍光強度比像は、pseudocolor で表した。pseudocolor bar の温度の値は、図 4-6(a)で示す温度応答曲線より算出した。Bar, 50 μm 。(b) (a)から算出した FCCP 刺激中の培地温度変化(30 μM FCCP または 0.1% DMSO 刺激でそれぞれ $n = 19$ または 10 の ROI; 平均 \pm SE)。(c) 顕微鏡視野から約 5 mm 離して配置した type K 熱電対を用いて経時的に計測した FCCP 刺激中の培地温度。これらの実験では、培地の温度を 30°C に維持した。

4. β -AR アゴニスト刺激により誘導される褐色脂肪細胞内温度変化

次に、 β -AR アゴニスト刺激が褐色脂肪細胞内の温度変化を誘導するかどうかを検討した。 β -AR アゴニスト NE および CL316.243 刺激前後の細胞内温度を表した像を図 4-10a に、またその細胞の形態変化の様子を図 4-7 に示した。図 4-10a より、これらの β -AR アゴニストが細胞内で熱産生を誘導することが示唆された。図 4-10b に示すように、NE および CL316.243 刺激 31 分後の平均細胞内温度上昇値は、それぞれ $1.25 \pm 0.25^\circ\text{C}$ (平均 \pm SE) および $1.39 \pm 0.38^\circ\text{C}$ であった。これら 2 化合物の刺激による細胞内温度上昇値の間には、有意な差は認められなかった。対照的に、 β -AR アゴニスト刺激時の未分化細胞 (pre-BAC) 内温度変化は認められず (図 4-10c)、 β -AR 活性化によって誘導される細胞内熱産生は、成熟した褐色脂肪細胞に特異的であることが示唆された。

β -AR 活性化による熱産生誘導を確認するために、 β -AR 選択的アンタゴニストで細胞を前処理し、同様に、 β -AR アゴニスト刺激時の細胞内温度を計測した。前処理条件を決めるため、脂質分解アッセイを行い、 $10 \mu\text{M}$ SR59230A を 4 時間処理することで、NE で誘起される脂肪分解を適切に抑制することがわかった。2 時間処理では十分な抑制効果がでないことも示され (図 4-11)、この結果は Tonello らの結果と一致した⁴⁴。SR59230A で前処理した褐色脂肪細胞内温度は、NE 刺激しても、ほぼ一定のままであった (図 4-10d)。統計学的解析を行った結果、NE および CL316.243 刺激 31 分後に観察された細胞内温度変化は、対照 (0.1% DMSO) 刺激後のものと有意に異なることがわかった。一方、SR59230A 前処理後の NE 刺激時と対照刺激時の細胞内温度変化を比較しても、有意差は認められなかった (図 4-10e)。まとめると、これらの結果は、褐色脂肪細胞において、NE によって誘導される熱産生が β -AR 活性化を介して生じることを強く示している。最後に、刺激前の細胞温度と刺激による細胞内温度変化量との間に相関があるかどうかを評価した (図 4-12)。FCCP、NE および CL316.243 を含む任意の刺激でこれら 2 変数に明確な相関は観察されなかった。

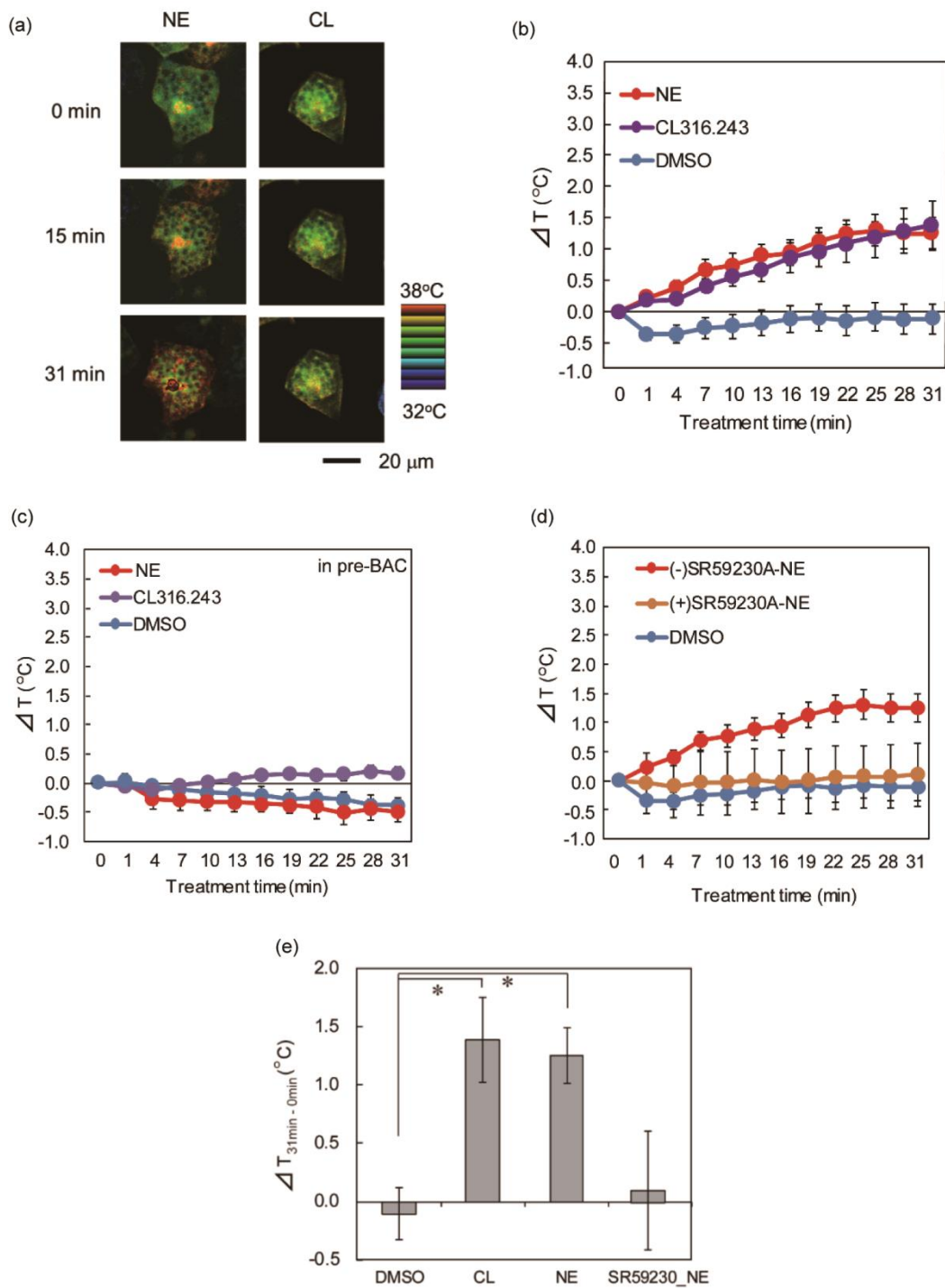


図 4-10. β -AR アゴニスト刺激時の BAC および pre-BAC 細胞内温度解析

(a) $0.5 \mu\text{M}$ NE または $0.5 \mu\text{M}$ CL316.243 処理 15 分後および 31 分後の R-CFPT による褐色脂肪細胞内温度像。細胞内温度像は、蛍光強度比 (Em. 560-610 nm / Em. 500-520 nm) を pseudocolor で表し、IMD mode で表示した。pseudocolor bar の温度の値は、図 4-6a で示す温度応答曲線より算出した。Bar, 20 μm 。(b) β -AR アゴニスト刺激時の褐色脂肪細胞温度変化(平均 \pm SE)。

0.1% DMSO, 0.5 μ M NE または 0.5 μ M CL316.243 処理群はそれぞれ n = 8, 12 または 16 細胞を解析に用いた。(c) β -AR アゴニスト刺激時の未分化 pre-BAC 細胞温度変化(平均 \pm SE)。0.1% DMSO, 1 μ M NE または 1 μ M CL316.243 処理群はそれぞれ n = 7, 7 または 22 細胞を解析に用いた。(d) β 3-AR アンタゴニスト SR59230A での前処理による β -AR アゴニスト刺激時の褐色脂肪細胞温度変化(平均 \pm SE)。0.1% DMSO, SR59230A を含まない 0.5 μ M NE または SR59230A を含む 0.5 μ M NE 処理群はそれぞれ n = 8, 12 または 14 細胞を解析に用いた。SR59230A の前処理は、10 μ M 濃度で 4 時間行った(図 4-11 参照)。これらの実験では、培地の温度を 30°C に維持した。(e) NE 刺激時の褐色脂肪細胞の熱産生の統計分析。 β -AR アゴニスト刺激による細胞内温度変化量は、パネル(b) – (d) から抽出した(平均 \pm SE)。**P* < 0.05 (n = 8–16)。one-way ANOVA に続いて Dunnett's test による有意差検定で 2 群を比較した。

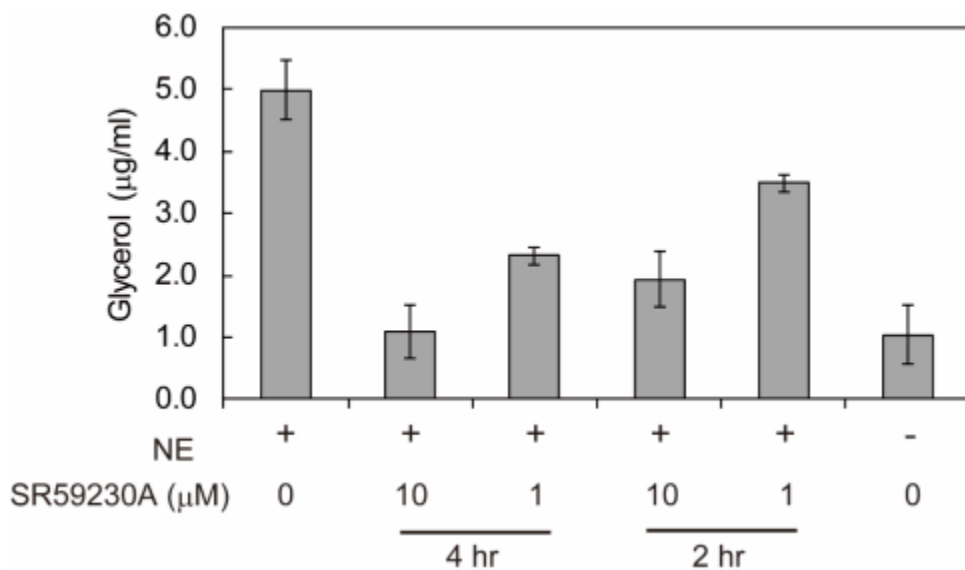


図 4-11. β 3-AR アンタゴニスト SR59230A による NE 刺激時の脂肪分解活性の阻害

図中に示した量の SR59230A を褐色脂肪細胞に処理した。処理は、NE 刺激 2 時間もしくは 4 時間前から実施した。培地上清の一部を回収し、褐色脂肪細胞から放出されたグリセロールの量を材料および実験方法に記載の手法で計測した。結果は、3 回計測の平均 \pm SD として示した。

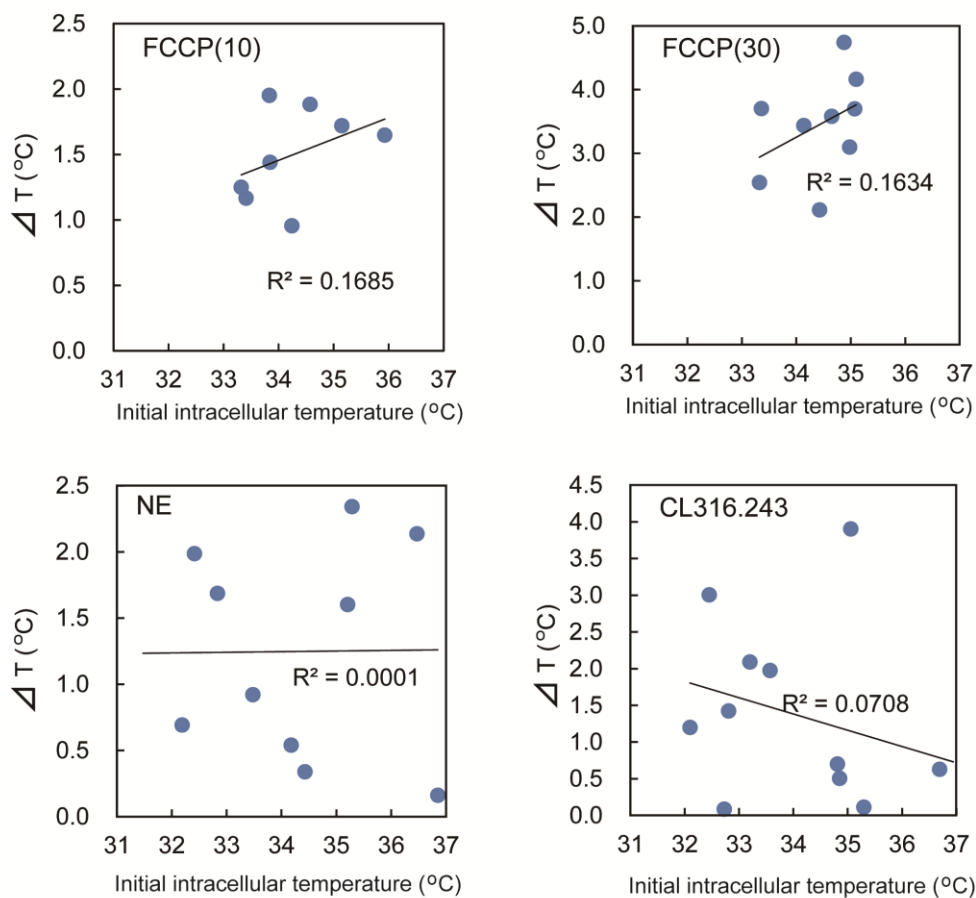


図 4-12. 化学刺激前の細胞内温度と化学刺激時の細胞内温度変化との関係

ΔT は 10 μM FCCP (FCCP(10)), 30 μM FCCP (FCCP(30)), 0.5 μM NE (NE) そして 0.5 μM CL316.243 (CL316.243) の処理前後 (31 分間) の細胞内温度の差を示す。 R^2 は、刺激前の細胞内温度と化学刺激時の細胞内温度変化の 2 つの変数間のピアソン相関係数を示す。

第4節 考察

1. ratio 型カチオン性蛍光高分子温度計を用いた初代培養褐色脂肪細胞内温度計測法

本研究では、初代培養褐色脂肪細胞内温度を R-CFPT による蛍光強度比イメージングで計測する方法を開発した。初代培養褐色脂肪細胞の表現型は、培養条件および前駆細胞の起源に大きく依存する。例えば、最適化されていない条件下では、NE 刺激しても UCP1 発現は検出されないこともわかっている⁴⁵。本研究で使用した初代培養褐色脂肪細胞は、十分な UCP1 タンパク質の発現(図 4-3c)、BAC 特異的遺伝子発現(図 4-3b)および NE 刺激後の UCP1 のタンパク質および mRNA レベルでの発現増加を示した(図 4-3d および e)。これら結果は本試験が十分に機能を保有する褐色脂肪細胞を用いて行われたことを示すものである。

R-CFPT を褐色脂肪細胞へ適用するために導入条件の検討を行った結果、36.2%の褐色脂肪細胞にはほぼ毒性なく、R-CFPT が取り込まれることがわかった(表 4-3)。第2章で述べたカチオン性蛍光高分子温度計を哺乳類細胞に展開した過去の報告²⁰によれば、NIH3T3 細胞および COS7 細胞の約 50%の細胞に蛍光高分子温度計は導入された。一方、第3章で述べたように R-CFPT は、ほぼすべての MOLT-4 および HEK293T 細胞に導入できた³⁵。今までの結果を踏まえると、蛍光高分子温度計を初代培養褐色脂肪細胞に導入することは、他の細胞への蛍光高分子温度計導入よりも難しかったと言える。

褐色脂肪細胞抽出液中での R-CFPT の温度分解能は、顕微鏡下において 32–38°C の温度範囲で 0.06–0.56°C と評価された(図 4-6a)。この温度分解能は、褐色脂肪細胞内の熱産生を検出するのに十分な感度であった。なぜなら、細胞温度の上昇値は、FCCP または NE による刺激でほぼ 1°C 以上であり(図 4-6c および 4-10b)、温度分解能の最低値 0.56°C よりも大きな温度変化量があった。また、温度分解能の高さは、褐色脂肪細胞と未分化細胞との間の定常状態における細胞内温度の差異を明らかにすることにも役立った。

2. 脱共役剤刺激時の褐色脂肪細胞と未分化細胞との細胞内温度変化の比較

R-CFPT の機能を調べる目的で、まずミトコンドリア膜電位を解消する脱共役剤が細胞内の温度上昇をもたらすかどうかを調べた。褐色脂肪細胞における平均細胞温度の経時変化は、脱共役剤 FCCP で刺激した直後に発熱が誘導されることを示した(図 4-6c)。この結果は、FCCP が刺激後 5 分以内にミトコンドリア内膜電位の有意な低下を引き起こし、その後 30 分間持続的に膜電位が低下するという以前の報告とも時間スケールが一致する⁴⁶。さらに、最近の研究では、FCCP アナログである脱共役剤 CCCP が、刺激後 1 分以内に神経細胞内温度を上昇させることも示された。従って、脱共役剤は、他の細胞で認められた現象と同様に、褐色脂肪細胞においても急速な発熱を惹起することを明らかにした。

原理の異なるいくつかの細胞内温度計測法で、これまでも脱共役剤刺激が細胞内温度を上昇させることが示されている^{18,21,25,27,28,34,47}。本研究では、30 μ M FCCP 刺激 31 分後の褐色脂肪細胞内温度上昇値は平均 3.46°C(図 4-6c)で、今まで報告のあった他の細胞や本研究で用いた未分化細胞 pre-BAC と比較して、はるかに高い値であった。この大きな温度上昇は、成熟褐色脂肪細胞中にある多数のミトコンドリアによるものと推測される。なぜなら、脱共役剤は ATP 合成を阻害することによってミトコンドリアからの熱放出を促進する働きを持つからである⁴⁸。また、ミトコンドリアタンパク質の濃度は、成熟褐色脂肪細胞において未分化細胞よりも 20–30 倍高いことも報告されている⁴⁹。しかしながら、本研究で認められた細胞内温度の変化の差は数倍程度であった。ミトコンドリア量と細胞内温度上昇値が、そこまで強く相関しない一つの理由は、褐色脂肪細胞においてミトコンドリアで発現する UCP1 タンパク質の機能によるものと推察している。本研究で調製した褐色脂肪細胞のミトコンドリアは、UCP1 タンパク質が発現しているために非刺激状態であってもミトコンドリアを適度に脱分極状態にし、穏やかに熱を放散している。実際、成熟褐色脂肪細胞の未刺激時の細胞内温度は、pre-BAC の細胞内温度より約 2°C 高かった。そのため、ミトコンドリア量の差ほど脱共役剤の影響が出なかったと考えた。細胞内温度に対する

UCP1 の寄与の解明は、UCP1 ノックアウトまたはノックダウン細胞を用いた研究が今後必要であろう。

3. β -AR アゴニスト刺激時の褐色脂肪細胞と未分化細胞との細胞内温度変化の比較

次に、 β 3-AR 刺激時の細胞内温度変化に焦点を当てる。選択的 β 3-AR アゴニストである CL316.243 は、NE 刺激と同程度に細胞内温度を上昇させた(図 4-10b)。さらに、NE は BAC の細胞膜表面上に発現する β 1-、 β 3-および α 1-AR を活性化するとされている⁵⁰が、 β 3-AR アンタゴニスト SR59230A によって、NE で惹起される熱産生は阻害された(図 4-10d)。したがって、この結果は β 3-AR 活性化が熱産生を誘導したことを示している。これは以前の報告の結果とも一致する^{51,52}。さらに、 β 3-AR アゴニストによって誘導された温度上昇は、成熟褐色脂肪細胞においてのみ起こり、pre-BAC では認められなかった(図 4-10b, c)。つまり、 β 3-AR アゴニスト刺激に応じた熱産生が成熟褐色脂肪細胞に特異的であることを実証した。

最近の研究では、 β 3-AR 活性化によって生じる褐色脂肪細胞温度の変化を、様々な方法で捉えている^{22,27,34,53}。Satoらは、60分以上の1 μ M NE 刺激で、褐色脂肪細胞内の温度が0.2°C 上昇することを温度応答性マイクロカンチレバーと細胞を直接接触させる方法により示した⁵³。本研究で得られた結果は、NE 刺激 30 分後で約 1.2°Cの細胞内温度上昇であった(図 4-10b)。Satoらは、上記マイクロカンチレバーを用いた研究において比較的溫度変化が小さかったとも述べており、それが比較的低温(25 \pm 1°C)下での実験にならざるを得なかったためだと推察している。これは本研究と Sato らの研究結果との差を説明する大きな理由の一つになる。加えて、本研究と Sato らの違いは、誘導された褐色脂肪細胞内の生理学的状態にも起因する可能性がある。例えば、O₂ 消費は、褐色脂肪細胞に NE を添加した場合、5 分以内でピークに達する⁵⁴。しかし、マイクロカンチレバーを用いた実験⁵³では、30 分後の発熱も比較的lowかった。

Kriszt らは、小胞体(ER)に蓄積する蛍光低分子を用いて、ヒト褐色脂肪細胞における熱産生イメージングを報告した³⁴。成熟褐色脂肪細胞における ER の温度も β 3-AR 活性化にตอบสนองして上昇したが、前駆細胞の ER 温度は、 β 3-AR 活性化に対して変化を示さなかった。Hattoriらは、

細胞質に局在する親水性蛍光ナノゲル温度計を用いて、**CL316.243** 刺激に応答して褐色脂肪細胞内温度が約 1.3°C 上昇することを報告している²²。この温度上昇値は、核および細胞質に局在する **R-CFPT** を用いて観察された実験値(図 4-10b)に匹敵する。つまり、これらの結果は、**CL316.243** に応答した細胞内温度変化が核を含めた褐色脂肪細胞全体で起こったことを示唆している。**Kiyonaka** らが改変 **GFP** を用いて報告しているように、褐色脂肪細胞ミトコンドリア内の温度も $10\ \mu\text{M NE}$ 刺激によって上昇する²⁷。この報告では定量的な温度上昇値についての記述がほとんどないが、示された校正曲線から判断すると、ミトコンドリアの温度は数 $^{\circ}\text{C}$ 上昇することが示唆されている。透過型電子顕微鏡で観察されるように、成熟褐色脂肪細胞のミトコンドリア体積密度は、細胞体積あたり約 30%である⁵⁵。さらに、本研究では、1 細胞全体の平均蛍光強度比変化から細胞内温度を算出した(実験方法を参照)。つまり細胞全体の 30%を占めるミトコンドリアの温度が数 $^{\circ}\text{C}$ 高くなった場合、細胞全体としては 1°C 程度のオーダーになるのではないかと推察である。方法論的差異(マイクロカンチレバー⁵³、有機蛍光低分子³⁴、高分子ナノゲル²²、**GFP**²⁷)にもかかわらず、 β 3-AR 刺激による数 $^{\circ}\text{C}$ 程度の褐色脂肪細胞内温度上昇が確認されたことは、細胞内温度上昇が **artifact** な現象ではないことを示唆している。

細胞内温度分布に関して、本研究の結果は、核の温度(図 4-6b および 4-10a)が細胞質のそれよりも高かったことを示している。これは他の蛍光高分子温度計と 2 つの蛍光タンパク質からなる蛍光温度計によって、**COS7** および **HeLa** 細胞でも確認されている現象である^{18,20,28}。過去の研究では、**COS7** 細胞におけるミトコンドリア近傍の温度および褐色脂肪細胞における **ER** の温度も、**FCCP** および **forskolin** による刺激後 30 分以上高くなることを示した^{18,34}。これらの知見は、本研究における観察結果と一致する(図 4-6b および 4-10a)。一定の熱力学的定常状態がミトコンドリアからの継続的な熱産生により維持され、細胞内の温度分布として可視化できているのだと推測している。

4. R-CFPT を用いた細胞内温度計測の妥当性

最後に、R-CFPT を用いた細胞内温度計測の妥当性について議論する。本結果は、褐色脂肪細胞内温度が化学刺激 (FCCP および NE) によって最大約 3°C 上昇したことを示した。細胞外の温度計測結果は、細胞内温度上昇が内因性熱産生によるものであり、外部熱源によるものではないことを示した (図 4-9)。Baffou らは、古典的な熱力学法則 (式 12) に基づいて、単一生細胞は、細胞内温度を 1°C 上げるのに必要な十分なエネルギーを有しないと主張している。

$$\Delta T = \frac{P}{\kappa L} \quad (\text{式 12})$$

ここで、 P は熱源の出力、 κ はセルの熱伝導率、 L は熱源の直径である⁵⁶。細胞内温度計測による実験値と式 12 に起因する理論値との間の乖離の理由は、細胞内温度計測研究分野での議論の的である。事実、単一生細胞の温度上昇は、様々な細胞種で確認され、そして異なる機能メカニズムを持つ温度計を用いて認められている現象である。例えば、褐色脂肪細胞ミトコンドリアが数°C 上昇 (GFP センサー)²⁷、褐色脂肪細胞が 0.2°C 上昇 (マイクロカンチレバー)⁵³、U251 細胞が 0.6°C 上昇 (熱電対)⁵⁷、NIH/3T3 細胞で 1.8°C 上昇 (量子ドット)²⁴、HeLa 細胞 ER で 1.7°C 上昇 (有機蛍光分子)³³ などが報告されている。細胞内温度上昇が共通して認められるということは、細胞内で観察される温度上昇が artifact ではないことを強く示唆している。さらに、Baffou らは、蛍光計測で認められた細胞内温度変化は、温度以外の要因、例えば pH およびイオン強度を反映してしまっているとも述べている。しかし、脱共役剤と $\beta 3$ -AR 刺激の両方において、細胞内イオン強度の急激な変化を引き起こす褐色脂肪細胞の細胞サイズの変化は観察されなかった (図 4-6b および 4-10a)。また、以前の研究で、NE 刺激は褐色脂肪細胞内の pH をわずかに変えるのみと報告されている⁵⁸。R-CFPT の蛍光特性が pH およびイオン強度から独立していることを考慮する³⁵と、本研究で計測した褐色脂肪細胞の温度変化は、細胞内 pH およびイオン強度変化の影響は受けていないと考えられる。式 12 中の各定数の慎重な評価が、実験研究者と理論研究者の両者を満足させるに違いない。Baffou らは、単一細胞の熱源の値として 0.1 nW を使用し

た⁵⁶が、褐色脂肪細胞は、より多くの熱(約 1.6 nW)を産生するとも報告されている^{59,60}。また、細胞の熱伝導率は、Baffou らが議論で用いた水の熱伝導率よりも大きいと推定されており、理論値からの解離の可能性が捨てきれない。細胞熱力学に関するさらなる実験データの取得が、単一細胞が内因性熱産生によって実質的にその温度を上昇させているとの理論的な裏付けに寄与すると考えられる。

第5節 小括

褐色脂肪細胞は、熱産生によって体温を維持するように機能する。しかしながら、単一細胞レベルでの熱産生の直接計測は依然として困難である。本章では、カチオン性蛍光高分子温度計を用いて初代培養褐色脂肪細胞内の温度を計測する方法を開発した。成熟した褐色脂肪細胞および未分化細胞内に蛍光高分子温度計を導入する方法を見出し、脱共役剤刺激時の熱産生の計測が可能になった。ミトコンドリア脱共役剤刺激による細胞内温度の上昇幅は、成熟した褐色脂肪細胞の方が未分化細胞よりも高かった。 β -AR アゴニストである NE 刺激は、褐色脂肪細胞内温度を、 β 3-AR 特異的アゴニストである CL316.243 刺激時と同程度に上昇させた。対照的に、 β -AR アゴニストはいずれも、未分化細胞における細胞内温度上昇を誘導しなかった。さらに、褐色脂肪細胞の β 3-AR アンタゴニストによる前処理は、NE 刺激による温度上昇を阻害した。つまり、NE 刺激による細胞内温度上昇は β 3-AR 刺激の寄与によることが示唆された。これらの結果より、開発した褐色脂肪細胞内の熱産生計測法は、成熟褐色脂肪細胞と未分化細胞との間で、脱共役剤および β -AR アゴニスト刺激に対する細胞内温度応答が異なることを明らかにし、細胞の表現型の差異として細胞内温度の差異があることを明らかにした。

第 6 節 参考文献

1. Lowell, B. B. & Spiegelman, B. M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652-660 (2000).
2. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277-359 (2004).
3. Power, G. G. *et al.* Umbilical cord occlusion but not increased plasma T3 or norepinephrine stimulate brown adipose tissue thermogenesis in the fetal sheep. *J. Dev. Physiol.* **11**, 171-177 (1989).
4. Kajimura, S. *et al.* Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* **460**, 1154–1158 (2009)
5. Ahfeldt, T. *et al.* Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 209–219 (2012)
6. Nishio, M. *et al.* Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. *Cell Metab.* **16**, 394-406 (2012).
7. Yoneshiro, T. *et al.* Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the activation of brown adipose tissue in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**,845-850 (2012).
8. Kim, M. *et al.* Fish oil intake induces UCP1 upregulation in brown and white adipose tissue via the sympathetic nervous system. *Sci. Rep.* **5**, 18013 (2015).
9. Matsushita, M. *et al.* Kaempferia parviflora extract increases whole-body energy expenditure in humans: roles of brown adipose tissue. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **61**, 79-83 (2015).
10. Morimoto-Kobayashi, Y. *et al.* Matured Hop Bittering Components Induce Thermogenesis in Brown Adipose Tissue via Sympathetic Nerve Activity. *PLoS One* **10**, e0131042 (2015).
11. Ricquier, D. & Bouillaud, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* **345(2)**, 161-179 (2000).
12. Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **19**, 1252-1263 (2013).
13. Shinoda, K. *et al.* Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nat. Med.* **21**, 389-394 (2015).
14. Klingenspor, M. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp. Physiol.* **88**, 141-148 (2003).
15. Tharp, K. M. *et al.* Matrix assisted transplantation of functional beige adipose tissue.

- Diabetes* **64**, 3713-3724 (2015)
16. Nedergaard, J., Cannon, B. & Lindberg, O. Microcalorimetry of isolated mammalian cells. *Nature* **267**, 518-520 (1977).
 17. Ricquier, D., Gaillard, J. L. & Turc, J. M. Microcalorimetry of isolated mitochondria from brown adipose tissue. Effect of guanosine-di-phosphate. *FEBS Lett.* **99**, 203-206 (1979).
 18. Okabe, K. *et al.* Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* **3**, 705 (2012).
 19. Tsuji, T., Yoshida, S., Yoshida, A. & Uchiyama, S. Cationic fluorescent polymeric thermometers with the ability to enter yeast and mammalian cells for practical intracellular temperature measurements. *Anal. Chem.* **85**, 9815-9823 (2013).
 20. Hayashi, T., Fukuda, N., Uchiyama, S. & Inada, N. A cell-permeable fluorescent polymeric thermometer for intracellular temperature mapping in mammalian cell lines. *PLoS One* **10**, e0117677 (2015).
 21. Gota, C. *et al.* Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2766-2767 (2009).
 22. Hattori, K. *et al.* ASK1 signalling regulates brown and beige adipocyte function. *Nat. Commun.* **7**, 11158 (2016).
 23. Albers, A. E. *et al.* Dual-emitting quantum dot/quantum rod-based nanothermometers with enhanced response and sensitivity in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9565-9568 (2012).
 24. Yang, J. M., Yang, H. & Lin, L. Quantum dot nano thermometers reveal heterogeneous local thermogenesis in living cells. *ACS Nano* **5**, 5067-5071 (2011).
 25. Tanimoto, R. *et al.* Detection of Temperature Difference in Neuronal Cells. *Sci. Rep.* **6**, 22071 (2016).
 26. Donner, J. S. *et al.* Mapping intracellular temperature using green fluorescent protein. *Nano Lett.* **12**, 2107-2111 (2012).
 27. Kiyonaka, S. *et al.* Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. *Nat. Methods* **10**, 1232-1238 (2013).
 28. Nakano, M. *et al.* Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. *PLoS ONE* **12**, e0172344 (2017).
 29. Takei, Y. *et al.* A nanoparticle-based ratiometric and self-calibrated fluorescent thermometer for single living cells. *ACS Nano* **8**, 198-206 (2014).
 30. Ke, G. *et al.* L-DNA molecular beacon: a safe, stable, and accurate intracellular nano-thermometer for temperature sensing in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **134**,

- 18908-18911 (2012).
31. Shang, L., Stockmar, F., Azadfar, N. & Nienhaus, G. U. Intracellular thermometry by using fluorescent gold nanoclusters. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 11154-11157 (2013).
 32. Kucsko, G. *et al.* Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature* **500**, 54-58 (2013).
 33. Arai, S. *et al.* A Molecular Fluorescent Probe for Targeted Visualization of Temperature at the Endoplasmic Reticulum. *Sci. Rep.* **4**, 6701 (2014).
 34. Kriszt, R. *et al.* Optical visualisation of thermogenesis in stimulated single-cell brown adipocytes. *Sci. Rep.* **7**, 1383 (2017).
 35. Uchiyama, S. *et al.* A cationic fluorescent polymeric thermometer for the ratiometric sensing of intracellular temperature. *Analyst* **140**, 4498-4506 (2015).
 36. Uchiyama, S. *et al.* Environment-sensitive fluorophores with benzothiadiazole and benzoselenadiazole structures as candidate components of a fluorescent polymeric thermometer. *Chem. – Eur. J.* **18**, 9552-9563 (2012).
 37. Gota, C., Uchiyama, S. & Ohwada, T. Accurate fluorescent polymeric thermometers containing an ionic component. *Analyst* **132**, 121-126 (2007).
 38. Isidor, M. S. *et al.* An siRNA-based method for efficient silencing of gene expression in mature brown adipocytes. *Adipocyte* **5**, 175-185 (2016).
 39. Umekawa, T., Yoshida, T., Sakane, N. & Kondo, M. Effect of CL316,243, a highly specific beta 3-adrenoceptor agonist, on lipolysis of human and rat adipocytes. *Horm. Metab. Res.* **28**, 394-396 (1996).
 40. Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885-896 (2006).
 41. Mercader, J., Palou, A. & Bonet, M. L. Induction of uncoupling protein-1 in mouse embryonic fibroblast-derived adipocytes by retinoic acid. *Obesity* **18**, 655-662 (2010).
 42. Krishan, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* **66**, 188-193 (1975).
 43. Heytler, P. G. & Prichard, W. W. A new class of uncoupling agents--carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 272-275 (1962).
 44. Tonello, C. *et al.* SR59230A blocks beta3-adrenoceptor-linked modulation of uncoupling protein-1 and leptin in rat brown adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **352**, 125-129 (1998).
 45. Kajimoto, K. *et al.* Identification of possible protein machinery involved in the thermogenic function of brown adipose tissue. *J. Med. Invest.* **51**, 20-28 (2004).
 46. Mignen, O. *et al.* Carboxyamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium

- import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells. *J. Cell Sci.* **118**, 5615-5623 (2005).
47. Homma, M. *et al.* A ratiometric fluorescent molecular probe for visualization of mitochondrial temperature in living cells. *Chem. Commun.* **51**, 6194-6197 (2015).
 48. Nakamura, T. & Matsuoka, I. Calorimetric studies of heat of respiration of mitochondria. *J. Biochem.* **84**, 39-46 (1978).
 49. Wilson-Fritch, L. *et al.* Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1085-1094 (2003).
 50. Lafontan, M. & Berlan, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* **34**, 1057-1091 (1993).
 51. Tanaka, E. *et al.* Regulation of heat production of brown adipocytes via typical and atypical beta-adrenoceptors in the rat. *Jpn. J. Physiol.* **45**, 1043-1051 (1995).
 52. de Souza, C. J. & Burkey, B. F. Beta3-adrenoceptor agonists as anti-diabetic and anti-obesity drugs in humans. *Curr. Pharm. Des.* **7**, 1433-1449 (2001).
 53. Sato, M. K. *et al.* Temperature changes in brown adipocytes detected with a bimaterial microcantilever. *Biophys. J.* **106**, 2458-2464 (2014).
 54. Prusiner, S. B., Cannon, B. & Lindberg, O. Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. 1. Catecholamine and fatty acid stimulation of respiration. *Eur. J. Biochem.* **6**, 15-22 (1968).
 55. Uldry, M. *et al.* Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* **3**, 333-341 (2006).
 56. Baffou, G., Rigneault, H., Marguet, D. & Jullien, L. A critique of methods for temperature imaging in single cells. *Nat. Methods* **11**, 899-901 (2014).
 57. Wang, C. *et al.* Determining intracellular temperature at single-cell level by a novel thermocouple method. *Cell Res.* **21**, 1517-1519 (2011).
 58. Civelek, V. N. *et al.* Intracellular pH in adipocytes: Effects of free fatty acid diffusion across the plasma membrane, lipolytic agonists, and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10139-10144 (1996).
 59. Johannessen, E. A. *et al.* Micromachined Nanocalorimetric Sensor for Ultra-Low-Volume Cell-Based Assays. *Anal. Chem.* **74**, 2190-2197 (2002).
 60. Suzuki, M. *et al.* The 10^5 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry. *Nat. Methods* **12**, 802-803 (2015).
 61. Forest, C. *et al.* Expression of the mitochondrial uncoupling protein in brown adipocytes. Absence in brown preadipocytes and BFC-1 cells. Modulation by isoproterenol in adipocytes. *Exp. Cell Res.* **168**, 233-246 (1987).

62. Latt, S. A. & Stetten, G. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* **24**, 24-33 (1976).
63. Greenspan, P., Mayer, E. P. & Fowler, S. D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* **100**, 965-973 (1985).
64. Baker, S. N., McCleskey, T. M. & Baker, G. A. An Ionic Liquid-Based Optical Thermometer. in *Ionic Liquids IIIB: Fundamentals, Progress, Challenges, and Opportunities: Transformations and Processes*. (ed. Rogers, R.D. & Seddon, K.R.) 171-181 (ACS Symposium Series, 2005).
65. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* **48**, 452-458 (2013).

総括

細胞内温度は、古くより細胞の複雑な機能と密接な関係にあると考えられている。例えば、お酒などの発酵品の製造工程では、微生物の働きを制御するために細かな温度調整をしており、細胞温度の重要性は経験的に理解されている。また、医学分野においても、ガン細胞などの病態細胞は、正常細胞と比較して高温であることが指摘されている¹。このように細胞内温度計測は生物を扱う多くの学問に新しい視点をもたらす技術である。そのような期待から、近年多くの細胞内温度計測用のセンサーが開発されている。特に蛍光性分子を使った計測技術、いわゆる蛍光温度計は、計測機器の汎用性が高いこと、高い空間分解能(200 nm～)と高い時間分解能(最高 ms オーダー)で、空間内の温度分布とその変化を計測できることに魅力がある。その中でもアクリルアミド系高分子を用いたの蛍光高分子温度計は、非常に優れた感度と温度のみに応答するという高い温度応答選択性の両方を持ち合わせており、世界に先駆けて細胞内の温度分布を高精度で可視化することに成功した細胞内温度計測における画期的な分析技術である²。しかしながら、分析技術としての重要な機能である汎用性に関しては、蛍光温度計の導入に特別な装置・技術を要するマイクロインジェクション法を必要としていることや、精度の高い計測に蛍光寿命計測装置を使わなければならないなど、幾つもの改良の余地があった。

まず初めに蛍光高分子温度計の細胞内への導入に関する課題に取り組み、この研究成果について第 2 章で述べた。特殊な装置を必要としない導入法として、混ぜるだけで自発的に細胞内移行する機能を持った蛍光高分子温度計の創出を目的とした。対象の細胞として、マイクロインジェクション法を使うことのできない酵母細胞を選択した。細胞内への移行能を高める目的で、感温性モノマー *N-n-propylacrylamide* と環境応答性蛍光団ベンゾフラザン骨格を有した蛍光性モノマーを基本構成とした蛍光高分子温度計に、新たにカチオン性ユニットを組み込んだ。合成したカチオン性蛍光高分子温度計は、細胞懸濁液に混ぜるだけで 10 分以内に酵母細胞質内へ移行し、そこに留まった。そして、その蛍光高分子温度計の一つである NN-AP2.5 は、25°Cか

ら 35°C で蛍光強度が約 2 倍、蛍光寿命も 6.2 ns から 8.6 ns へと変化し、最高で 0.09°C ものわずかな酵母細胞の温度差を検出できた。さらにカチオン性蛍光高分子温度計は、哺乳類浮遊細胞である MOLT-4 細胞 (ヒト T 細胞系白血病細胞) や接着性 HEK293T 細胞 (ヒト胎児腎由来細胞) にも酵母と同様に応用可能であった。自発的に起こるカチオン性蛍光高分子温度計の細胞内への移行は、細胞の活性が抑えられた低温条件下でも常温条件下と同程度に起こり、エンドサイトーシスに関与する遺伝子を欠損させた酵母株でも認められた。加えて、10 分以内という短時間でもカチオン性蛍光高分子温度計が細胞内に移行したことから、カチオン性蛍光高分子温度計の細胞内への導入は、化学的な細胞膜の透過による寄与が大きいと考えられた³。

続いて、第 2 章で合成したカチオン性蛍光高分子温度計を基に検出法を改良した結果を第 3 章で述べた。以前の蛍光高分子温度計では、濃度や励起強度の影響を受けない計測パラメータとして蛍光寿命の選択が不可欠で、高価な蛍光寿命計測装置が必要となるなど汎用性に課題が残っていた。そこで温度変化によって二波長における蛍光強度比が変化する、いわゆるレシオ型蛍光高分子温度計の開発を行った。蛍光高分子温度計に用いた蛍光性ユニット DBThD の対照となる新たな蛍光性ユニットを選択、導入することとした。条件検討の結果、温度が変化しても一定の蛍光強度を放出し、既存の DBThD と同波長で励起でき、さらに DBThD と蛍光スペクトルが重複しない BODIPY 骨格を有した新規の蛍光性モノマー BODIPY-AA を設計、合成した。第 2 章で合成したカチオン性蛍光高分子温度計の構成ユニットに加え、BODIPY-AA を追加ユニットとして高分子合成を行い、レシオ型蛍光高分子温度計を完成させた。このレシオ型蛍光高分子温度計は 2 つの蛍光色素 (BODIPY と DBThD) の蛍光強度比を計測することで温度を検出することができ、MOLT-4 細胞内での温度分解能 (区別できる最小の温度差) は、28–44°C の温度範囲で 0.03–0.20°C と非常に高い値を示した。また、接着性 HEK293T 細胞にも 90% 以上の高効率で取り込まれ、蛍光顕微鏡観察により核内が細胞質よりも高温であることを示す像も得られた。これにより、一般的な蛍光光度計や蛍光顕微鏡を用いて、生細胞内温度や温度分布の高精度計測が可能になった⁴。

最後に、第 3 章で開発したレシオ型蛍光高分子温度計を用いて、褐色脂肪細胞の細胞内温度計測法の構築を試み、その結果を第 4 章で述べた。褐色脂肪細胞は、熱産生によって体温を維持するように機能するが、単一細胞レベルでの熱産生の直接計測は依然として困難であった。成熟した褐色脂肪細胞および未分化細胞内にレシオ型蛍光高分子温度計を導入する方法を最適化し、脱共役剤刺激時の熱産生計測を可能にした。ミトコンドリア脱共役剤刺激による細胞内温度の上昇幅は、成熟した褐色脂肪細胞の方が未分化細胞よりも高かった。 β -AR アゴニストである NE 刺激は、褐色脂肪細胞内温度を、 β 3-AR 特異的アゴニストである CL316.243 刺激時と同程度に上昇させた。対照的に、 β -AR アゴニストはいずれも、未分化前駆細胞における細胞内温度上昇を誘導しなかった。このように、細胞内温度という観点から、褐色脂肪細胞内の熱産生を捉えることに成功し、成熟褐色脂肪細胞と未分化細胞との間で、脱共役剤および β -AR アゴニスト刺激に対する細胞内温度応答が異なることを明らかにした。これは、細胞の表現型の一つとして、細胞内温度の差異があることを明らかにした一例でもある。レシオ型蛍光高分子温度計は、特殊な装置なしで複数の生細胞へ蛍光高分子温度計を導入できるという点で機能的利点を有している。したがって、褐色脂肪細胞の熱産生能力を増強させる抗肥満薬の候補物質のハイスループットスクリーニングなどに適用することは比較的容易であり、今後の活用が期待できる⁵。

これらの研究を踏まえた上で、細胞内温度計測の課題と今後の展望について述べたい。まず、細胞内温度計測における課題である。その課題の大きなものの一つは、本当に細胞内で温度が変化するのか、という Baffou らの主張⁶に端を発した議論⁷⁻¹⁰の解決である。これは第 4 章の考察でも議論に挙げた。Baffou らの主張は古典的な熱力学に従っているが、まずその理論式が細胞へ適用してもよいかどうか不明であり、またその証明も難しい。実験科学者および理論科学者の双方がお互いの結果や理論を精緻化させていくことが必要であるが、実際に細胞内温度計測を行っている実験科学者からの視点で、今後必要なデータの議論をしていきたい。本論文における研究では、汎用的な細胞内温度計測を目指してきたが、実はまだ汎用性という観点からは、検討すべき問題もある。それは蛍光温度計から得られたシグナルを温度に直す際の検量線の正

しさの問題である。実際には、多くの研究者が悩んでいる可能性もあるが、決して正解がない問題でもあり、多くの研究論文であまり積極的に触れられていない側面もある。細胞内温度計測に限らない蛍光計測一般的な課題であり、細胞をターゲットにした場合、その細胞内環境の複雑さ故、どんな溶媒、もしくはどんな環境で取得した検量線が正しいのかは誰にもわからない。一つの方向性としては細胞に蛍光色素を導入した上で、計測したい変数に関わる環境を強制的に外部から変化させ、シグナルを得て、それを検量線とする方法がある。一見、これは正しくもあるが、生きている細胞に外部刺激を加えた場合、外部刺激を加えた分だけ細胞内環境も変化するのかわからず、やはり曖昧な部分が残ってしまう。検量線取得法の中には、蛍光タンパク質を発現している細胞で、計測後に細胞を固定して、その細胞毎に検量線を描くという方法もある。これは装置誤差が少なくなるというメリットがあるが、固定化しても蛍光色素が漏出しない場合にしか使えず、そして上記と同じく固定細胞は生きた細胞と環境が同じなのかという問いに答えることが難しい。このように必ず解決できないと理解した上で、よりシンプルな系に落とすことも一つの重要な方向性である。細胞の抽出液や細胞環境を模倣した溶液での検量線計測がその一例であろう。実験系における限界を理解した上で、より細胞環境を模した状態の検量線を作る方法を探っていく必要がある。

この検量線の課題を踏まえた上で、細胞内の温度が本当に変化するのか、そして細胞内に温度分布があるのかという課題について、少し議論を加えたい。蛍光温度計によって得られた細胞内温度計測結果の全ては、細胞内の温度が変化することは真実だとしても、その温度変化の値が絶対的ではないことに留意しなくてはいけないことは上記の議論からも明らかである。それ故、何°C変化することが正しいかは時間のかかる難しい議論だが、温度が変化すること、そして細胞内に温度分布があるのかということに対しては、これからの研究の蓄積で徐々に証明されていくに違いない。その根拠は、蛍光計測によらない方法、つまり微小熱電対^{11, 12}やマイクロカンチレバー^{13, 14},そしてマイクロセンサー¹⁵など 1 細胞の温度を直接的にダイレクトに計測した研究においても、細胞内の温度変化が認められていることであり、細胞内温度変化があることを強くサポー

トしている結果であろう。また、蛍光温度計に限ってみても、その計測原理、対象細胞、そして蛍光物質の細胞内局在は様々であるにも関わらず、未だ大きな齟齬があるような結果が報告されていないことも、少なくとも細胞内での温度変化があること、そして細胞内の温度に分布があることを保証している。

今後の細胞内温度計測が貢献できる分野は、抗肥満薬の開発、ガン細胞・組織の診断、温熱療法の高度化、細胞培養産業における品質管理といった各産業分野にまたがると推測している。特に本研究で構築した褐色脂肪細胞の細胞内温度計測法は抗肥満薬の開発などに役立つツールになるであろう。他の蛍光温度計と比較して、混ぜるだけで細胞に導入できる点、そして蛍光強度比で正確計測ができる点などがハイスループット性の求められる創薬領域では活かされると考えている。加えて、今後の産業活用に向けて、様々な装置における温度の安定性を高めていく必要性もある。現状、顕微鏡には高い精度の恒温装置が付属していることも少なくないが、プレートリーダーやスクリーニング装置は well 間の温度差も大きく、顕微鏡レベルでの高精度な恒温装置は少ない印象である。今後、センサーの開発に伴い、同じく装置の開発も進んでいくことが望まれ、蛍光色素と装置の組み合わせが出来て、本当の意味での汎用性の高い細胞内温度計測技術になるのだと考えている。本研究で開発した蛍光高分子温度計が細胞内温度研究の一つの技術ツールとして多くの研究者に使用され、生物学的現象との関連が明らかになっていくことを期待している。

参考文献

1. Monti, M., Brandt, L., Ikomi-Kumm, J. & Olsson, H. Microcalorimetric investigation of cell metabolism in tumour cells from patients with non-Hodgkin lymphoma (NHL). *Scand. J. Haematol.* **36**, 353–357 (1986).
2. Okabe, K. *et al.* Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* **3**, 705 (2012)
3. Tsuji, T., Yoshida, S., Yoshida, A. & Uchiyama, S. Cationic fluorescent polymeric thermometers with the ability to enter yeast and mammalian cells for practical intracellular temperature measurements. *Anal. Chem.* **85**, 9815-9823 (2013).
4. Uchiyama, S., Tsuji, T., Ikado, K., Yoshida, A., Kawamoto, K., Hayashi, T. & Inada, N. A cationic fluorescent polymeric thermometer for the ratiometric sensing of intracellular temperature. *Analyst* **140**, 4498-4506 (2015).
5. Tsuji, T., Ikado, K., Koizumi, H., Uchiyama, S. & Kajimoto, K. Difference in intracellular temperature rise between matured and precursor brown adipocytes in response to uncoupler and β -adrenergic agonist stimuli. *Sci. Rep.* **7**, 12889 (2017).
6. Baffou, G., Rigneault, H., Marguet, D. & Jullien, L. A critique of methods for temperature imaging in single cells. *Nat. Methods* **11**, 899-901 (2014).
7. Kiyonaka, S. *et al.* Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors. *Nat. Methods* **12**, 801-802 (2015).
8. Suzuki, M. *et al.* The 10^5 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry. *Nat. Methods* **12**, 802-803 (2015).
9. Baffou, G. *et al.* Reply to: "Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors" and "The 10^5 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry". *Nat. Methods* **12**, 803-803 (2015).
10. Uchiyama, S., Gota, C., Tsuji, T. & Inada, N. Intracellular temperature measurements with fluorescent polymeric thermometers. *Chem. Commun.* **53**, 10976-10992 (2017).
11. Tian, W. *et al.* A high precision apparatus for intracellular thermal response at single-cell level. *Nanotechnol.* **26**, 355501 (2015).
12. Wang, C. *et al.* Determining intracellular temperature at single-cell level by a novel thermocouple method. *Cell Res.* **21**, 1517-1519 (2011).
13. Inomata, N., Toda, M., Sato, M., Ishijima, A. & Ono, T. Pico calorimeter for detection of heat produced in an individual brown fat cell. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 154104 (2012).
14. Sato, M. K. *et al.* Temperature changes in brown adipocytes detected with a bimaterial microcantilever. *Biophys. J.* **106**, 2458-2464 (2014).

15. Yamada, T., Inomata, N. & Ono, T. Sensitive thermal microsensor with pn junction for heat measurement of a single cell. *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**, 027001 (2016).

発表論文

本論文に関する著者の発表論文は以下の通りである。

○原著論文(査読あり)

1. **Tsuji, T.**, Yoshida, S., Yoshida, A. & Uchiyama, S. Cationic fluorescent polymeric thermometers with the ability to enter yeast and mammalian cells for practical intracellular temperature measurements. *Anal. Chem.* **85**, 9815-9823 (2013).
2. Uchiyama, S., **Tsuji, T.**, Ikado, K., Yoshida, A., Kawamoto, K., Hayashi, T. & Inada, N. A cationic fluorescent polymeric thermometer for the ratiometric sensing of intracellular temperature. *Analyst* **140**, 4498-4506 (2015).
3. **Tsuji, T.**, Ikado, K., Koizumi, H., Uchiyama, S. & Kajimoto, K. Difference in intracellular temperature rise between matured and precursor brown adipocytes in response to uncoupler and β -adrenergic agonist stimuli. *Sci. Rep.* **7**, 12889 (2017).

○総説(査読有り)

1. **Tsuji, T.** Measurement of Intracellular Temperature by Fluorescent Polymeric Thermometers. *Thermal Med.* **33**, 19-28 (2017).
2. Uchiyama, S., Gota, C., **Tsuji, T.** & Inada, N. Intracellular temperature measurements with fluorescent polymeric thermometers. *Chem. Commun.* **53**, 10976-10992 (2017).

○総説(査読無し)

1. 辻俊一、内山聖一: 自発的に細胞に入り込む細胞用ナノ蛍光温度プローブの開発, バイオサイエンスとインダストリー, 72(3):227-229, 2014
2. 辻俊一: 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-, 化学と生物, 52(6):359-360, 2014
3. 辻俊一、内山聖一: 細胞内温度の測定という新たな酵母活性評価技術の可能性, 日本醸造協会誌, 109(7):487-493, 2014
4. 内山聖一、辻俊一、稲田のりこ: 蛍光ライブセルイメージングの課題, 現代化学, 537:44-47, 2015
5. 辻俊一、内山聖一: 汎用的な細胞内温度計測を目指したレシオ型蛍光プローブの開発, バイオサイエンスとインダストリー, 74(2):124-125, 2016

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇切なるご指導を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科 上田卓也教授に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、感温性蛍光高分子の合成に始まり、論文として研究を形にするところまで、研究の全てを御指導頂きました東京大学大学院薬学系研究科 内山聖一助教に厚く御礼申し上げます。内山聖一助教には、長きに渡り、企業研究所とは違った場で研究の考え方や物事の捉え方をご指導賜り、人生の糧となる時間を与えてくださりました。

また、本研究の遂行にあたり、共同研究者として御指導・御助言頂きました奈良先端大学 稲田のりこ博士、甲子園大学栄養学部 林晃之講師、東京大学大学院薬学系研究科 河本恭子氏に感謝申し上げます。

褐色脂肪細胞を用いた研究で、初代培養の実験方法を快く御指導頂き、その後論文作成の議論での御助言賜りました産業総合技術研究所 梶本和昭主任研究員に感謝申し上げます。

本研究を遂行する機会を与えてくださり、そして多くの面で御指導・御助言頂いた、キリン(株) (当時)基盤技術研究所所長 水谷悟博士、飲料技術研究所所長 吉田有人博士、ワイン技術研究所 吉田聡博士、基盤技術研究所所長 出内桂二博士、副所長 小西豊博士、小泉英樹博士に感謝申し上げます。特に吉田有人博士、吉田聡博士、小泉英樹博士には、上司として、そして優れた先輩研究者として、非常に多くのことを学ばせて頂き、貴重な財産となりました。

共に実験を行い、研究テーマを強く推進して下さったキリン(株)基盤技術研究所 故・井門久美子氏にも深く感謝いたします。優れた技術とその人柄の良さにいつも助けられ、そして今後の研究の一步を踏み出すような仕事を数多く手掛けてくださいました。

さらに会社での研究を公私共に支えてくださった、キリン(株)基盤技術研究所、健康技術研究所の皆様にも感謝いたします。

最後に、常に楽しさと刺激を与えてくれ、支えとなってくれた妻 愛と長女 真生子に心から感謝します。