

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 辻 俊一

第1章-序論-

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、がん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。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測定技術、いわゆる蛍光温度計は、測定機器の汎用性が高いことに加え、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測定できることに特徴がある。その中でも、アクリルアミド系高分子を用いた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温度分布を高精度で観察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。しかしながら、分析技術の重要な機能である汎用性に関しては、蛍光高分子温度計の細胞内導入に特別な装置・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測定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。

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-

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んだ。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導入され、そこに留まった。そして、その蛍光高分子温度計の1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 細胞系白血病由来)にも酵母と同様に応用可能であった。機能する温度範囲が **NN-AP** よりも高温になる **NN/NI-AP2.5** は、**MOLT-4** 細胞内で **30°C** から **40°C** で蛍光強度が約 2 倍、蛍光寿命も **5.4 ns** から **8.1 ns** へと変化することを確認した。そして、**HEK293T** 細胞(ヒト胎児腎由来)を用いた顕微鏡観察により、カチオン性

蛍光高分子温度計の蛍光強度が細胞内温度の上昇に伴って強くなることが確認され、接着細胞でも利用できることが明らかとなった。

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移行は、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。

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-

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、検出法の改良を行った。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測定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。以前の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) の蛍光強度比を測定することで温度を計測することができ、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、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。

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-

第 3 章で開発したレシオ型蛍光高分子温度計を用いて、健康機能の維持や肥満解消・予防に深く関係すると考えられている褐色脂肪細胞の細胞内温度計測法の構築を試みた。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。しかしながら、単一細胞レベルでの熱産生の直接測定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測定が可能になった。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 -アドレナリン受容体 (β -AR) アゴニストであるノルエピネフリン (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、未分化細胞において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 $\beta 3$ -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測定法は、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、細胞の表現型として細胞内温度の差異があることを明らかにした。

総括

以上、感温性モノマーと環境応答性蛍光団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の細胞内への導入方法や温度の検出方法を改良することにより、蛍光高分子温度計が持ち合わせていた高い感度や温度への高い選択応答性という特徴を維持しつつ、より汎用性の高い蛍光高分子温度計を創出することができた。細胞内温度計測の研究分野は、理論科学者の参加もあり、細胞内の温度がなぜこんなにも変わるのかという根本的な疑問の解明に議論の焦点が移っている。この疑問の解決には装置も含めた分析技術の向上と生物学的知見の蓄積が不可欠である。今回開発した蛍光高分子温度計は、数多くの研究者が利用できる分析ツールとして、その疑問解明に役立つと期待している。そういった課題解決を通じて、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での、細胞内温度計測の活用が促されることを期待したい。