

研究報告書

「細胞内局所温度が司る細胞機能発現の解明」

研究タイプ: 大挑戦型(※大挑戦型課題として延長有/増額有)

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 岡部 弘基

1. 研究のねらい

これまでに、独自に開発した蛍光性ポリマー温度センサーと定量的イメージング法を用いた細胞内温度計測から、わずか数 10 μm 程度の細胞内部において、1-2 $^{\circ}\text{C}$ もの時間・空間的な温度の変動を報告した。この細胞内部の局所的な温度変動の発見は、古典的生化学における系中の緩慢な温度変化とは本質的に異なり、細胞内温度に大きな注目を集める端緒となった。しかし、細胞内の温度変化を誘起する発熱反応の実体や、温度変化が細胞内反応の単なる結果であるのか、もしくはそれに応答して別の反応が影響を受けている、すなわち情報伝達としての効果を有するのかは全く不明であった。しかし、発見した細胞内温度変動が細胞小器官や細胞活動と密接に関連していたことから、細胞内局所の温度変動はダイナミックな生命現象におけるシグナリングとしての機能が示唆された。そこでこれらの結果に基づき、細胞の局所温度が細胞機能の制御機構として機能していると仮説を立て、これを実証するため、本研究では細胞内温度変化が制御する細胞機能の存在を探り、その分子機構を解明することを目的とした。特に、本研究では単なる細胞内温度の計測だけでなく、細胞内局所加熱、すなわち細胞内温度の操作から細胞内局所の熱と細胞機能の関連を探ることで、両者の本質的な因果関係を解明し、細胞内温度変動により駆動される細胞機能を構成的に理解することにより、温度変化の物理的・生理的意義の解明を目指した。

細胞内温度変化により駆動される細胞機能の担い手としては RNA を選択した。RNA は細胞内において豊富に存在するだけでなく、タンパク質との複合体(RNP)を形成し遺伝子発現において主たる機能を担っている。また、複合体形成や線状構造といった特徴から拡散が遅く、細胞内においても一分子レベルで振る舞いを捉えることが可能である。ストレス時における mRNA の顆粒形成はダイナミックかつ臨機応変な遺伝子発現調節を担う重要な細胞機能である。とりわけ、種々の刺激により誘起する RNA 顆粒であるストレス顆粒(Stress granule, SG)は脂質膜を持たない構造や一時的にのみ形成される構造体といったユニークな特徴を有する。そこでこの形成に細胞内発熱が関与するという作業仮説を立てた。本研究では、細胞内における温度計測や加熱法と細胞内 RNA の直接イメージング解析による SG 形成や内部構造の詳細な観察を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、細胞内の局所温度変化に着目し、細胞機能、特に RNA が関与するダイナミックな細胞機能にいかに関与しているかを解明することを目指した。そこで、研究の前半では細胞内局所加熱法や細胞内 mRNA・microRNA の一分子観察法の開発に取り組んだ。さらに研究の後半では、開発した方法を用いて、ストレス顆粒形成と細胞内発熱の関係の調

査とそのメカニズムの解明を行なった。以上のさきがけ研究において、発熱依存的な RNA 顆粒形成や温度操作に対する細胞の応答など、新規性の高い現象を解明し、さきがけ延長期間においてこれらの検証や新規法への応用研究に取り組んだ。

まず、細胞内のネイティブな mRNA の詳細な観察を行うため、内在性 mRNA の一分子イメージング法の開発を行った。蛍光アンチセンスプローブの標的 mRNA との結合に伴う拡散速度の変化を検出することで、定量的に mRNA を解析する方法を開発した。これを用いて、mRNA の転写や分解を実時間で追跡することに成功した。さらに、明滅型色素で標識したアンチセンスプローブをレーザーにより少数分子のみ蛍光状態へと誘導することで、細胞内 mRNA の一分子追跡法の開発へと発展させた。この方法を用いてストレス環境の細胞内の mRNA を可視化したところ、ストレス顆粒(SG)を形成する mRNA の一分子追跡を達成した。次に、翻訳抑制の担い手である miRNA の直接観察を行うため、細胞内における miRNA の蛍光標識法を開発した。これにより細胞内において可視化した miRNA を一分子レベルで追跡することにより、細胞内におけるユニークな輸送経路やストレス顆粒への蓄積を発見した。

さらに、蛍光性ポリマー温度センサーと高感度顕微鏡を用いたストレス環境にある細胞内温度の計測や、ミトコンドリアからの発熱による SG 形成の観察から、ストレス時の細胞内では温度上昇により mRNA が顆粒を形成することを発見した。そこで、赤外レーザーを用いて細胞内の水分子を直接加熱することで局所的な発熱を人工的に誘起したところ、一細胞レベルにおいて一過的に SG を形成させることに成功した。以上の結果は、ストレスを受けた細胞内で SG を形成する現象の初期過程は細胞内局所温度変化が担っていることを示している。

本研究では、mRNA の顆粒形成に着目して、細胞内の局所的な温度変化が翻訳活性を迅速かつ一過的に変化させうることを示した。細胞機能発現に温度変化が因子として関与する現象は新しく、細胞の働く仕組みの解明に新たな視点となると期待される。

(2) 詳細

研究テーマ 1.「内在性 mRNA の定量的検出法の開発」

生細胞内におけるアンチセンスプローブの mRNA との相補結合に伴う拡散運動の変化に着目した新規検出法を開発し、これを蛍光相関分光法(FCS)により定量的に解析することにより、生細胞内における内在性 mRNA の定量化・追跡法を開発し(図 1)、これまで困難であった生細胞内での mRNA 分解の実時間追跡に成功した。

研究テーマ 2.「明滅型色素を利用した一分子 mRNA 追跡法の開発」

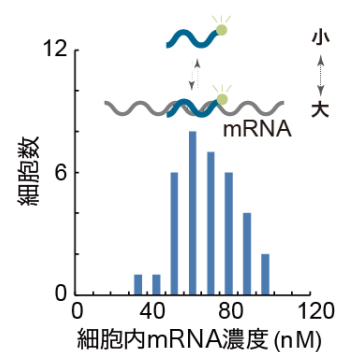


図1. アンチセンスプローブを用いた細胞内GAPDH mRNAの定量解析

生細胞内の内在性 mRNA 一分子の検出には、高親和性アンチセンスプローブによる可視化に加えて、高いシグナル／ノイズ比での検出が必要である。そこで、mRNA 一分子の選択的検出を検討した結果、蛍光色素の明滅現象を利用した一分子検出が非常に有効であることを発見した。従来の色素を明滅させるには酸素除去分子および強い励起光が必要であり、生理的環境では適応不可能であるため、自発的に明滅する色素を開発した。この明滅型色素群の主たる応用例は確率的光学再構築顕微鏡法 (STORM) による超解像イメージングであるが、明状態が安定な色素をアンチセンスプローブに結合させ、大部分の分子を暗状態へと誘導することにより、生細胞内において 20 ミリ秒程度の時間分解能で一分子 mRNA の検出を達成した。本法による細胞内在性 GAPDH mRNA の一分子追跡の結果、ストレス顆粒内部において mRNA が運動している様子の観察(図 2)に成功した。

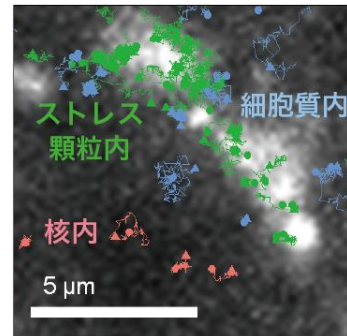


図2. 細胞内mRNAの一分子追跡

研究テーマ 3.「生細胞内マイクロ RNA (miRNA) の生細胞イメージング技術の開発」

生細胞内において miRNA を可視化する方法を開発するため、特定の箇所を蛍光標識した miRNA 前駆体を生細胞内に直接導入して細胞に内在する miRNA 生合成過程により成熟型 miRNA へと誘導する新規法を開発した。生細胞内での miRNA 生合成過程の進行は蛍光イメージングによる局在観察、蛍光(相互)相関分光法 (FCS, FCCS) による二本鎖解離の定量的検出により精査し、最適な前駆体と生合成の時定数を決定した。次に、明滅型色素を用いた一分子追跡 (SPT) により標的 mRNA との結合を確認した後、成熟型 miRNA の一粒子追跡を行った(図 3)。この結果、miRNA の細胞内でのユニークな輸送経路やストレス時のストレス顆粒への蓄積を発見した。

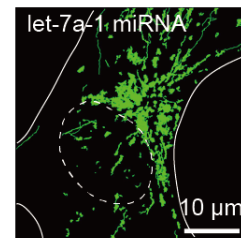


図3. 細胞内マイクロRNAのイメージングと一粒子追跡

研究テーマ 4.「細胞内局所発熱のリアルタイムイメージング」

細胞内における主要な発熱器官はミトコンドリアである。そこで、ミトコンドリアでの発熱を誘起する脱共役剤により刺激した際の細胞内温度変化を定量的に検討した。その結果、細胞内温度は刺激後 10-15 分程度で最大 1.0 °C 上昇した。一方、グルコース含有量を低減した培地にて培養した細胞内において同様の検討を行なったところ、脱共役依存的発熱は大きく抑制されていた。次に、発熱メカニズムを解明するため、脱共役能を有しながら、膜電位の脱分極を誘起しない新規脱共役剤を開発し(論文 2)、これを作用させた際の温度を計測したところ、温度上昇は通常の脱共役時と比較して抑えられていたことから、発熱はミトコンドリア内外膜間の脱分極に起因することを発見した。

研究テーマ 5.「細胞内局所加熱法の開発」

細胞内局所発熱と細胞機能の関係を探るために生きた単一細胞内に適応可能な人工加熱法として、赤外(IR)レーザーの照射による加熱法および金ナノ粒子(GNP)への可視光レーザー照射による加熱法の二種を開発した。集光させたIRレーザー(1480 nm)を細胞内の任意の場所に照射することにより、細胞内局所を一過的に加熱することが可能となった。また、IRレーザー照射時の温度イメージングにより校正することにより、定量的な温度変化の誘起を達成した。また、IRレーザーにより形成した人工熱源による温度勾配のイメージングも可能であった(図4)。金ナノ粒子を用いた熱法開発では、細胞内へのGNPの導入法の検討、細胞内局在の観察、可視光レーザー照射時の細胞内温度変化の計測から、GNPを導入した細胞選択的な局所加熱法として確立した。開発した細胞内局所加熱法を用いて、人工熱源による細胞内の温度分布やそのダイナミクスを検討するとともに、局所加熱に対する細胞応答の観察も行った。

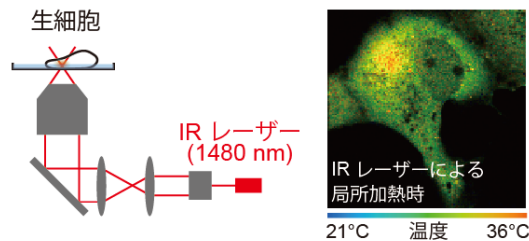


図4. 赤外レーザー照射を用いた細胞内局所加熱

研究テーマ6「ストレス時の細胞内局所発熱依存的なmRNA 応答の解明」(挑戦的取りくみ)

細胞のストレス応答において主要な役割を担うストレス顆粒(SG)はRNAとタンパク質の一時的凝集体であり、迅速な会合・離散や膜を持たない構造などユニークな特性が知られているが、SG形成開始のメカニズムは不明であった。本研究では、SG形成機構として細胞内温度変化に着目した。まず、ストレス時の細胞内の温度計測を行った結果、細胞内温度は1.4°Cの上昇を示した。次に、過剰の温度センサーを導入した細胞内ではSG形成が阻害されることを発見した。温度センサーの熱容量や阻害に必要な濃度、作用時間を詳細に検討した結果、SG形成の初期過程に発熱が必要であることを発見した。さらにミトコンドリアの脱共役やIRレーザー、金ナノ粒子を用いた局所加熱によりストレス顆粒を人工的に形成できることを示した。(図5)以上は、細胞内の局所温度変化がシグナル伝達機構として働いているという細胞生物学における新しい概念の発見である。

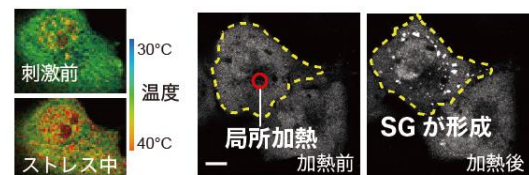


図5. 細胞内発熱依存的なストレス顆粒(SG)形成

3. 今後の展開

本研究で発見した細胞内温度シグナリングは、生体分子の機能解析を主とする従来の生物学において、温度が細胞機能調節を担う因子であるとの新奇概念であり、生物学において新潮流を生み出すと期待される。温度変化は生体分子の状態変化を効率良く誘起できるため、臨機応変な細胞機能発現に有利である。そこで、発生などの短時間に細胞運命が大きく変化するダイナミックな現象において温度シグナリングの貢献を実証することにより、本現象の普遍性と生理的意義が解明されるだろう。また、RNA顆粒形成以外にも種々の細胞機能が温度変化により担われていると考えられる。本研究で開発した細胞内温度の観察・操作法を発展、応用することで、細胞機能と局所温度変化の関係を幅広く解き明かし、温度シグナリングによる温度生物学を発展させたい。

さらに、温度シグナリングは熱を利用した細胞機能の調節法や細胞状態の革新的指標として難治疾患治療、再生医療、人工細胞の創成にも貢献すると期待される。特に、がんについては古くから温熱療法など熱との関連が示唆されており、がん細胞内の代謝異常や発熱亢進と細胞内温度シグナリングの関係を解明することで熱を利用したがん細胞進展制御が可能となるかもしれない。また、本研究で研究した RNA 顆粒の異常は筋萎縮性側索硬化症(ALS)やアルツハイマー病(AD)における神経変性の原因と考えられているため、細胞内発熱と RNP の異常繊維化の関連を解明することで、発熱による神経変性の抑制が可能となるかもしれない。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、目標としていた細胞内局所温度が司る細胞機能発現の解明を達成した。これを遂行するために、まず細胞内局所における(IR レーザーや金ナノ粒子を用いた)局所加熱法と RNA 分子(mRNA と miRNA)の一分子イメージング法の開発に成功した。次に独自の細胞内温度計測法、開発した局所加熱法、RNA イメージング法を用いて細胞のストレス時において RNA が顆粒を形成して一過的に翻訳活性を調節する現象の開始機構として局所発熱が機能している「温度シグナリング」を発見した。この現象における特徴として、細胞内の局所的な熱と細胞内分子応答のユニークな特徴を見出した。これは予想外の発見であり、細胞内における温度と生体分子の関係には従来の知見とは大きく乖離したメカニズムが介在することが示唆された。そこで、さきがけ研究延長期間においては、これらの技術と発見の物理化学的・生物学的洞察を深めるため、および応用性の高い新規細胞内温度操作法を開発するため、温度シグナリングに関する物理化学的メカニズムの検討、個体や組織における温度シグナリングの検証等にも取り組んだ。これまでに概ね目標とした解析結果や方法開発を達成できる見込みだけでなく、温度シグナリングに関する新しい研究の方向性を示唆する結果を得ている。

本さきがけ研究は、主として研究者本人とそのグループの大学院生とともに進めた。一方で、細胞内温度の原理や生理的意義の解明を目指した検討では、これまで不慣れであった異分野における技術や解析を活用する機会に恵まれた。まず、これまで細胞内温度の研究は培養細胞のみで進めてきたが、領域アドバイザーの杉本亜砂子教授によるご指導のもと、線虫における検討を開始した。これまでに方法開発と基礎的な検討を達成しており、今後温度シグナリングの生理的意義の理解に大きく貢献すると期待している。また、細胞内温度や RNA の関与する現象として細胞質を主たる標的に検討してきたが、梅原崇史研究者とのクロマチンや転写を標的とした共同研究を通して、細胞機能にとって重要な核機能についても検討を開始する機縁を得た。細胞内における熱ダイナミクスの検討においては、人工細胞創生の技術の活用を開始した。瀧ノ上正浩研究者とリボソームの作成と人工細胞様構造体における温度計測を行うとともに、熱移動の解析や高分子の相分離の検討を進めている。田端和仁研究者とはマイクロチャンネルアレイを用いた人工微小空間における一過的加熱法を開発し、種々の検討に用いている。さらに、温度シグナリングの分子機構を探索するにあたり、加納ふみ研究者と共同して細胞内分子組成を劇的に操作した際の温度変動や細胞熱応答の解析を開始した。このほか、他の多くの領域研究者との共同研究を構想ないし開始しており、今後の細胞内温度生物学や関連する新規学問の展開に貢献するだろう。これらは当初予定していなかった検討であるが、本研

究で提唱する細胞内温度シグナリングを理解・発展する上で必須の研究展開となった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

まず、細胞内局所加熱法や細胞内mRNA・microRNAの一分子観察法の開発に取り組み、開発した方法を用いて、発熱依存的なRNA顆粒形成や温度操作に対する細胞応答などの新たな現象を見出した点は評価したい。

更に、さきがけ大挑戦の延長期間においては、これらの事象の個体における検証のため、線虫個体内の温度イメージング法開発などに取り組んだ結果、線虫組織等における興味深い現象も捉えつつあり、大挑戦型として延長／増額した目標の達成も間近と思われる。

また、国際会議(生理学・量子生命)への招待、バイオサーモロジー研究会や量子生命研究会への主要メンバーとしての参画など、「温度生物学」として提唱している研究分野が認知されつつあり、研究活動も拡がりを見せていることから、今後ますますの活躍が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nakano M., Arai Y, Kotera I, Okabe K, Kamei Y, Nagai T, “Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response” (2017). *PLoS One*, 12, e0172344.
2. Hattori K, Naguro I, Okabe K, Funatsu T, Furutani S, Takeda K, Ichijo H., “ASK1 signalling regulates brown and beige adipocyte function” (2016) *Nat. Commun.*, 7, 11158.
3. Uno S, Kamiya M, Yoshihara T, Sugawara K, Okabe K, Tarhan MC, Fujita H, Funatsu T, Okada Y, Tobita S, Urano Y. “A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging” (2014) *Nat. Chem.*, 6, 681–689.
4. Kenwood BM, Weaver JL, Bajwa A, Poon IK, Byrne FL, Murrow BA, Calderone JA, Huang L, Divakaruni AS, Tomsig JL, Okabe K, Lo RH, Coleman GC, Columbus L, Yan Z, Saucerman JJ, Smith JS, Holmes JW, Lynch KR, Ravichandran KS, Uchiyama S, Santos WL, Rogers GW, Okusa MD, Bayliss DA, Hoehn KL “Identification of a novel mitochondrial uncoupler that does not depolarize the plasma membrane” (2013) *Mol. Metab.*, 3, 114–123.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な招待講演

1. “Imaging and Manipulation of Temperature in Living Cells: Uncovering Unique Intracellular Microenvironments”, Kohki Okabe, 1st QST International Symposium “Quantum Life

Science”, Jul 26, 2017, Chiba, Japan.

2. “Imaging and manipulation of temperature in single living cells”, Kohki Okabe, 114th International Titisee Conference, Nov 17, 2016, Titisee, Germany

主な学会発表

“Intracellular local temperature as a novel variable in cell biology” Kohki Okabe et al., 19th IUPAB congress and 11th ESBA congress, Jul 17, 2017, Edinburgh, UK

受賞

第 37 回 内藤コンファレンス「バイオイメージングがめざすもの」優秀発表賞

著作物

岡部弘基『蛍光性ポリマー温度センサー』生体の科学、Vol.66 No.2, p163-168 (2015)