

# 研究終了報告書

## 「光熱変換の積極利用による細胞機能のアクティブ制御」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：大山 廣太郎

### 1. 研究のねらい

本研究では光熱変換を積極利用し、細胞機能の時空間制御、さらには機能の限界突破を目指します。「光で温度を操る&視る」顕微システムを構築し、単一細胞の局所温度を巧みに変調することで、生体分子の熱応答を活用した細胞機能のアクティブ制御を実現します。

既存の細胞機能の光操作技術は、光応答性のタンパク質や人工物を細胞に導入し、光照射することで細胞機能を ON-OFF 制御するものが大半を占めます。これらの手法は標的となる細胞やタンパク質の機能解明に有効です。一方で、細胞の機能発現には多種多様なタンパク質が連携しています。そのため、細胞機能の向上を目指した場合、複数種のタンパク質を同時に変調させる手法が適していると考えられます。

そこで本研究では、一般に生体分子の活性は温度上昇に伴い上昇することに着目し、光熱刺激によって細胞機能を制御・向上させる顕微システムの開発を目指します。本研究では、水に吸収されやすい近赤外の光(波長 1455 nm)を対物レンズで集光することで、水中や細胞内に熱源を形成する光熱変換技術を活用します。この光による温度変調は、迅速かつ局所的に行うことができるという利点を有します。照射光強度の時間操作、強度分布操作により、時間的・空間的な温度勾配を自在に操作する顕微システムを開発し、細胞や生体分子の光熱刺激応答を明らかにすることで、次世代の光治療への扉を開きます。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では「光で温度を操る&視る」顕微システムを構築し、細胞の温度感受性や発熱に関する知見を得ることができました。生体分子の複合的な熱応答を明らかにした主要成果①では、光熱変換技術と精製タンパク質で筋収縮を再現する「*in vitro* 滑り運動系」を組み合わせることで、筋収縮の温度特性をタンパク質レベルで評価できる顕微解析法を開発しました。その結果、カルシウムイオン濃度が変動せずに熱だけで筋収縮する「加熱筋収縮」を、4種類のタンパク質のみを用いて再現することに成功し、加熱筋収縮の仕組みに関する知見を得ることができました。さらに、哺乳類の心臓には、体温を利用し、カルシウムイオン濃度上昇に応じて効率よく収縮する仕組みが備わっていることを示唆する知見も得ました。また、局所温度の光計測技術を細胞発熱イメージングに展開した主要成果②では、「光で温度を視る」を細胞の温度を2次元マッピングできる「蛍光温度計ナノシート」を開発しました。温度計ナノシート上にはがん細胞や心筋細胞、神経細胞などを、生理的な活動(細胞分裂や筋収縮、神経興奮など)を維持したまま培養することができました。細胞内部の温度計測と比較することで、発熱時の細胞で形成される局所的な温度勾配を明らかにしました。

## (2) 詳細

### ① 筋収縮システムの温度感受性をタンパク質レベルで解明

本研究では、近赤外レーザー光を用いた局所加熱顕微システム(光熱変換顕微鏡)と、ガラス基板上の精製タンパク質で筋収縮を再現する「*in vitro* 滑り運動系」を組み合わせることで、筋収縮機能の温度特性を精製タンパク質レベルで評価できる顕微解析法を構築しました(図 1A)。レーザー集光点を中心に 100  $\mu\text{m}$  程度の範囲に約 20°C の同心円状の温度勾配を形成することによって、光学顕微鏡の同一視野内で、様々な温度のもとで動き回るフィラメントを観察することができます(図 1B,C)。加熱用レーザー光照射中の局所的な温度勾配の形成と、照射終了後に温度勾配が消失する過程は約 1 秒で完了するため、レーザー光照射を素早く切り替えることで、同一フィラメントの温度特性を連続的に評価することができるようになりました。筋肉が弛緩する低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度(pCa9)では、再構成した細いフィラメント(アクチンフィラメント、トロポニン、トロポミオシンの複合体)の滑り運動は加熱前(25°C)では観察されません(図 1D 左)。そこに近赤外光を集光して加熱すると、細いフィラメントの滑り運動が開始しました(図 1D 右、図 1E)。これは、加熱筋収縮( $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が変動せずに熱だけで筋収縮する現象)を精製タンパク質で初めて再現したものでした。フィラメントの動きは熱源に近いほど(温度が高いほど)速く、レーザー光照射を終えて温度が元に戻るとすぐに停止しました。滑り運動の温度特性を評価したところ、体温付近の温度(37°C)に加熱されたフィラメントの滑り運動も観察され、その速度は 100%活性化したときの 3 割程度であることが分かりました(図 1F)。この結果は、細いフィラメントは体温付近において低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度であっても部分的に活性化されており、 $\text{Ca}^{2+}$  上昇に応じて効率よく筋収縮を起せる状態にあることを示唆しています。

本成果は The Journal of General Physiology に掲載(代表論文 1 参照)、プレスリリースし、日本経済新聞等で紹介されました。

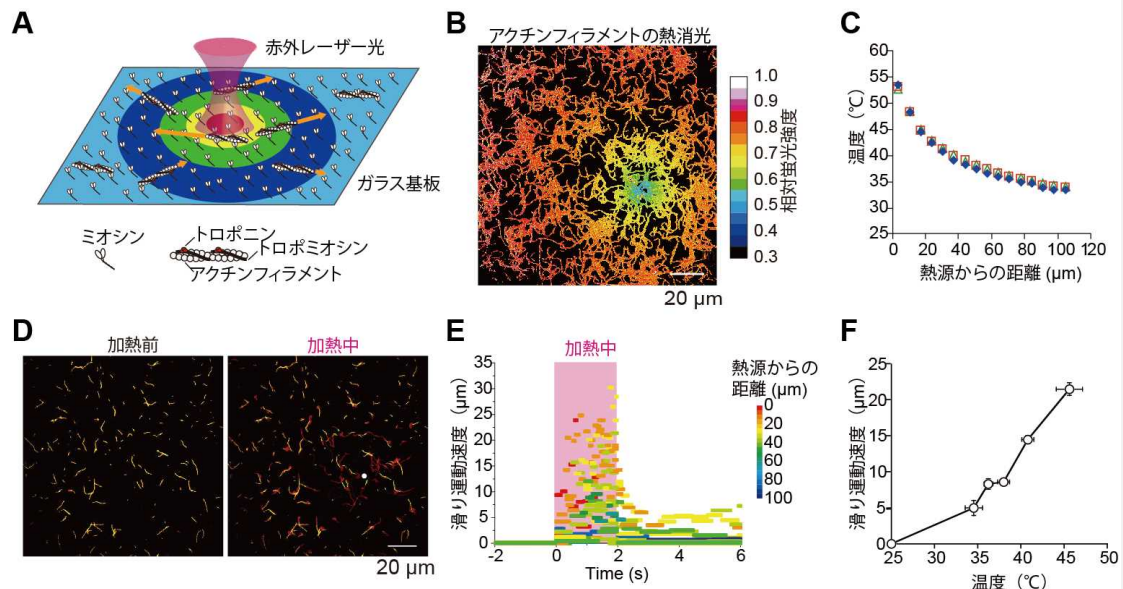


図 1: 光熱変換顕微鏡による筋収縮システムの温度感受性の解明。(A) 実験系の概要図。(B) 温度感受性蛍光色素で染色したアクチンフィラメントの蛍光強度変化(熱消光)で可視化した光熱刺激時の温度分布。蛍光強度が低いところほど温かい。(C) 蛍光アクチンフィラメントの熱消光から計測した温度勾配。3色のプロットは3回の計測結果をそれぞれ示している。(D) 低  $\text{Ca}^{2+}$

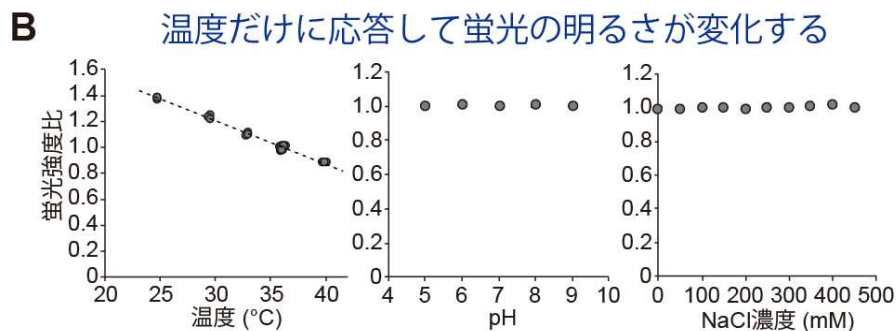
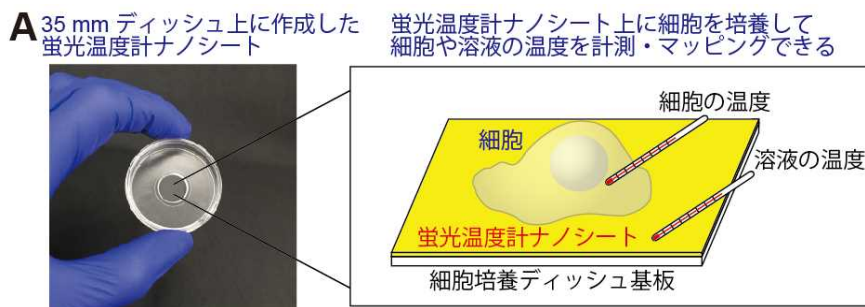
濃度(pCa9)における加熱前(25°C)(左)および加熱中(右)における細いフィラメントの滑り運動の様子。緑は撮影開始時のフィラメント、赤は加熱前および加熱中 2 秒間での各フィラメントの軌跡を示す。緑と赤が重なる点は黄色になる。加熱前(左)に滑り運動していないフィラメントが加熱中に滑り運動を開始したことが分かる。白丸は熱源(レーザー集光点)。(F)光熱変換顕微鏡で明らかにした低 Ca<sup>2+</sup>濃度における細いフィラメントの滑り運動速度の温度依存性。

## ② 細胞の温度を2次元マッピングできる「蛍光温度計ナノシート」を開発

細胞の温度計測技術は、細胞の発熱機構や温度感受性を解明するために必要不可欠なものです。これまで、温度感受性の蛍光ナノ粒子や蛍光タンパク質、量子ドットや蛍光ナノダイヤモンドといった蛍光温度計を細胞内に導入し、蛍光の明るさや色の变化などから、温度を計測・可視化する技術が開発されてきました。一方、正確な温度計測を行う上で、蛍光温度計に対する温度以外の環境因子の影響が問題となります。細胞内の酸性度(pH)やイオン濃度は不均一であり、細胞の活動にともなって変動しています。そのため、温度計測結果(=蛍光温度計の蛍光変化)が他の環境因子に依存していないことを慎重に確認する必要があります。しかしながら、細胞内で生じる環境変化を全て計測・予測することは難しいのが現状で、細胞の外側から温度を計測・画像化する手法が待ち望まれていました。

そこで本研究では、温度によって明るさが変わる蛍光色素と、温度に明るさが依存しない蛍光色素の 2 種類の蛍光色素を混ぜ込んだポリメタクリル酸メチル樹脂(透明性の高い合成樹脂)を、細胞培養用ディッシュの上にスピコートすることで、蛍光シートを作成しました(図 2A)。温度に依存しない蛍光色素は、観察中の焦点変動や、細胞をシート上に培養したときに生じる光干渉の影響を補正するために有用です。原子間力顕微鏡で計測したシートの厚みは約 50 ナノメートルで、細胞の厚みのおよそ 100 分の 1 程度しかありません。この蛍光温度計ナノシートは pH やイオン強度に影響されず、温度だけに応答する理想の蛍光特性を有していることが分かりました(図 2B)。この蛍光温度計ナノシートの上に、HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん)や HEK293 細胞(ヒト胎児腎細胞)、マウス褐色脂肪細胞、ラット心筋細胞、ラット海馬神経細胞を培養することができました。シート上培養での細胞毒性は見られず、細胞分裂や脂肪細胞への分化、筋収縮や神経細胞の興奮といった生理的な細胞機能が正常に保持されていることが確認されました。これにより、様々な細胞機能を対象とした温度計測が可能となりました。蛍光温度計ナノシートは橙色に発光するため、緑色蛍光タンパク質(GFP)や蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬 Fluo4 に代表される緑色蛍光プローブを用いた細胞の構造やイオン濃度変化と温度の同時観察も可能です。心筋細胞や神経細胞の電気刺激応答時の細胞温度計測や、薬剤刺激に対する HeLa 細胞の温度計測などを実施し、細胞内にある小胞体では 2°C以上の局所的な温度上昇が見られるのに対し、細胞全体の温度が±0.2°C を超えて変化することはないことを明らかにしました。

本成果は The Journal of General Physiology に掲載(代表論文 2 参照, 表紙に採択)、同雑誌の Commentary や JSTnews で紹介されました。



**図 2: 蛍光温度計ナノシートの概要と特性。**(A)細胞培養用ディッシュの上に作成した蛍光温度計ナノシート(左)と概念図(右)。温度感受性の蛍光色素を薄膜にした蛍光温度計ナノシート上に細胞を接着培養することで、細胞や周囲の温度の違いを蛍光の明るさの違いで計測・可視化することができる。(B)蛍光温度計の蛍光の明るさ(蛍光強度)は温度が上昇すると暗くなる。一方、溶液の pH や NaCl 濃度が変化しても蛍光強度は変わらない。

### 3. 今後の展開

本開発システムと得られた知見は、生体内局所における熱・温度の生理的意義を細胞レベルで解明することにつながり、生命システムの理解に大いに役立つと期待しています。また、光熱刺激によって細胞機能を迅速に制御する次世代医療技術の基盤を形成し、革新的医療機器の開発につながるものと期待できます。代表論文 1 では、「体温が細いフィラメントを活性化状態へシフトさせる」という新しい視点から、生体内の心筋が  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化に効率よく応答して収縮できる仕組みを明らかにしました。この成果は、心臓における体温の生理的意義の理解を深めるとともに、温度に着目した新しい治療法の開発への展望が開かれました。たとえば、制御系タンパク質における変異は心筋の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を下げ、十分な収縮力が発揮できない拡張型心筋症の原因になることが知られています。弱い心筋収縮を適切な強度とタイミングで光熱刺激することで正常な収縮力を維持するという、新しい心臓治療法開発への展開が期待されます。また、心臓の制御系タンパク質(トロポニン・トロポミオシン)で再構成された細いフィラメントを研究対象としました。同様に、骨格筋の制御系タンパク質で再構成した細いフィラメントを用いた研究に展開することで、骨格筋の 2 つの役割である筋収縮と熱産生の相乗効果(例えばウォーミングアップが細いフィラメントを活性化することで筋肉のパフォーマンスを高める可能性)に関する知見が得られるかもしれません。また、体温の異なる動物や、環境に応じて体温が大きく変化する変温動物、生育温度の異なる魚といった、様々な生物に由来するタンパク質を用いることで、生物が周囲の温度や体内の温度をどのように有効利用しているかを明らかにできると期待しています。代表論文 2 で開発した蛍光温度計ナノシート

は、様々な細胞種・細胞機能の研究に応用することができると考えています。大きな温度上昇が見込まれる組織切片やスフェロイド(多数の細胞が集まった凝集体)、オルガノイド(幹細胞から作られるミニ臓器)といった多細胞系にも有用であると考えられます。今後も「光で温度を操る&視る」顕微システムを活用し、生命の感温機構と発熱機構、両者の相互作用の解明を目指します。

#### 4. 自己評価

##### ①研究目的の達成状況

「光で温度を操る&視る」顕微システムを構築し、生体分子の熱応答を活かした細胞光操作技術や光治療につながる発見、細胞の温度感受性や発熱に関する新たな知見を得ることができたので、研究目的は概ね達成できたと考えます。

##### ②研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

研究代表者が主体となり顕微システムの構築や顕微解析を実施しました。複数種類の細胞実験を同時並行で進めるために、研究補助員 2 名に細胞培養や遺伝子工学実験を協力していただきました。この他、材料科学から生物物理学、生理学にわたる様々な研究分野の専門家と共同で研究を推進しました。研究費は主に顕微鏡システムの構築、研究補助員の雇用に費やしました。予算計画の変更や追加予算を活用し、研究 2 年目の現所属先への異動による研究の遅延を抑えました。

##### ③研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本開発システムは、生命システムの温度感受性や熱産生の仕組みの解明に有用であり、今後も様々な細胞機能を対象とした幅広い展開、新しい光治療・温熱療法につながる発見が期待されます。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1)代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:2件

1. S. Ishii, K. Oyama (共同筆頭著者), T. Arai, H. Itoh, S.A. Shintani, M. Suzuki, F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Terui, N. Fukuda, S. Ishiwata.

“Microscopic heat pulses activate cardiac thin filaments”

*J Gen Physiol* (2019) 151(6):860-869.

光熱変換顕微鏡を用いて筋収縮の温度特性を精製タンパク質レベルで評価できる顕微解析法を開発。1 秒程度の加熱によって筋肉の細胞が可逆的に収縮する「加熱筋収縮」を、筋収縮に関わる主要なタンパク質(アクチン・ミオシン・トロポミオシン・トロポニン)で再現することに成功し、加熱筋収縮の仕組みに関する知見を得ました。また、心臓は体温を利用してカルシウムイオン濃度上昇に応じて効率よく収縮する仕組みが備わっていることを明らかにしました。

2. K. Oyama, M. Gotoh, Y. Hosaka, T.G. Oyama, A. Kubonoya, Y. Suzuki, T. Arai, S. Tsukamoto,

Y. Kawamura, H. Itoh, S.A. Shintani, T. Yamazawam, M. Taguchi, S. Ishiwata, N. Fukuda.  
“Single-cell temperature mapping with fluorescent thermometer nanosheets”  
*J Gen Physiol* (2020) 152(8):e201912469.

2種類の蛍光色素の明るさの違いから細胞の温度を2次元マッピングできる「蛍光温度計ナノシート」を開発。温度計ナノシート上にはがん細胞、腎細胞、褐色脂肪細胞、心筋細胞、神経細胞を、生理的な活動(細胞分裂や筋収縮など)を維持したまま培養できることを実証しました。薬剤刺激を加えた際の細胞温度計測を行い、発熱時の細胞には局所的な温度勾配が形成されていることを明らかにしました。

(2)特許出願

なし

(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)

国内招待講演(11件)

大山廣太郎、新谷正嶺、小比類巻生、塚本精一、下澤東吾、鈴木団、石渡信一、福田紀男  
「サルコメア収縮を視て操作する光技術」  
日本筋学会第4回学術集会 2018年8月10日 川崎医科大学

大山廣太郎 「光熱刺激に対する細胞応答の顕微解析」  
第58日本生体医工学会大会 2019年6月7日 沖縄コンベンションセンター

大山廣太郎 「光熱変換顕微鏡を利用した細胞機能の光操作」  
レーザー学会学術講演会第40回年次大会 2020年1月21日 仙台国際センター

他8件

著作物(総説)

S. Ishii, K. Oyama(共同筆頭著者), S.A. Shintani, F. Kobirumaki-Shimozawa, S. Ishiwata, N. Fukuda.  
“Thermal Activation of Thin Filaments in Striated Muscle”  
*Front Physiol* (2020) 11:278.

プレスリリース 記事掲載

「体温において心臓が効率良く拍動するメカニズムの一端を解明」  
プレスリリース 2019年4月23日

「体温に反応して心臓の収縮変化」  
日本経済新聞 2019年5月6日朝刊9面

「細胞温度の変化や分布から生命現象に迫る 明るさの違いで測るシート状温度計」  
JSTnews 2020年7月号 p.6