

「生細胞内熱計測による温度シグナリング機構の解明」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：岡部 弘基

1. 研究のねらい

生命は、進化の過程で常に変動する過酷な環境温度に適応すべく複雑なシステムを作り上げてきた一方で、熱は効率的に利用すべきエネルギー源でもある。これまでに生細胞内に適応可能な蛍光性ポリマー温度センサー(FPT)を開発することで、細胞内部の局所的な温度が1-2°C程度変動するとのユニークな現象を発見した。細胞内の不均一な温度分布は、生物学において注目を集めている一方で、これまでに発見した細胞内の温度変動を細胞内の熱移動としてとらえると大きな謎がある。つまり、熱伝導方程式を用いて細胞内を水と仮定した際に単純に計算される温度変動は実際の計測値より著しく小さい。この両者の違いは、原理の全く異なる方法(数十種の蛍光性温度計・水のラマン分光・細胞表面と接触させる熱センサなど)による計測結果の一致から、温度計測法の不確定性に由来するわけではなく、細胞内熱移動が均一水溶液と本質的に異なる物理機構により生じている可能性がある。しかし、その物理機構は一切不明であり、手がかりさえない。

他方、細胞内での温度変動が大きい結果から、細胞内で発生した熱が細胞機能に貢献しているとの仮説を立てた。細胞機能としては mRNA の一過的凝集体であり、翻訳調節機能を有するストレス顆粒(Stress granule, SG)の形成を選択し、これと細胞内温度変動の関連を検討した。先行研究においてSG形成時の温度イメージング、細胞内局所加熱によるSGの人工的形成、熱吸収によるSG形成阻害といった結果から、SG形成開始機構が自発的な局所発熱であることを発見した。この結果は、細胞内 mRNA が局所的な発熱を「利用」していることを示している。このような自発的な局所温度変化が細胞機能を駆動力となる現象を「温度シグナリング」と呼ぶこととした。

温度シグナリングによるSG形成の結果は、細胞内ナノスペースにおける熱が細胞内分子の状態変化や機能に供されることで別のエネルギーに変換されていることを示唆する。ここでSG形成が完全に可逆的なプロセスであることを考慮すると、細胞内における温度シグナリング現象の存在が細胞内の熱が散逸する過程に無視できない影響を与えているとの仮説に帰着した。そこで、本研究では、温度シグナリング現象であるSG形成を担う細胞内構造体や分子群を同定し、それらが細胞の温度変動や熱特性に与える影響を調べることで、細胞内の熱輸送経路と温度変動機構を解明することを研究のねらいとした。

2. 研究成果

(1)概要

本さきがけ研究では、細胞内の温度変動機構を解明するにあたり、独自の蛍光性温度センサーを用いて研究開始までに発見していた細胞内局所発熱依存的な細胞内反応(SG形

成)に着目し、その分子機構を解明した。まず、SG を構成する mRNA を独自の蛍光性アンチセンスプローブにより標識し、一分子追跡することにより、通常リボソームと会合状態にある mRNA が局所発熱により解離し、SG 形成へと到る機構を発見した(研究テーマ A)。さらに、SG 形成に関与する分子群が細胞内温度変動に与える影響を詳細に調査した。この結果、細胞内で自発的に生じた熱により細胞内分子の状態変化が誘起されることが示唆された。

次に、温度シグナリングを担う細胞内構造や分子が細胞内温度変動や発・吸熱量に与える影響の解明に取り組んだ。まず、制御可能な人工的な熱源として、IR レーザー照射法および金ナノ粒子への可視光レーザー照射法(テーマ B)を導入した。さらに、加熱時の温度分布変化を追跡するため、高速温度マッピング法を開発した(テーマ C)。この方法を用いて細胞内を一過的に加熱した際の緩和過程における過渡的な温度分布を詳細に解析することにより、速やかな温度緩和を示すリボソーム中の水とは対照的に、細胞内には熱伝導には依存しない遅い温度変化が存在することを発見した。この細胞内に特徴的な温度緩和は細胞内の構造(核)や RNA に依存していた。さらに、分子依存的な細胞発熱を定量的に検出するとともに機構を詳細に検討するため、示差走査熱量測定(DSC)による細胞の熱量計測法を開発した。

(2) 詳細

研究テーマ A「温度シグナリングによるストレス顆粒(SG)形成機構の解明」(公開)

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。細胞内温度計測や細胞内温度操作の検討から、SG 形成の開始過程に発熱が必要であることを発見した(図 1)。さらに、細胞内の熱が SG 形成を誘起する機構を調査するため、SG を構成する mRNA を独自の蛍光性アンチセンスプローブにより標識し、一分子追跡することにより、通常リボソームと会合状態にある mRNA が局所発熱により解離し、SG 形成へと到る機構を発見した。これは、細胞内の局所温度変化がシグナル伝達機構として働くという細胞生物学における新しい概念の発見であるとともに、実際に mRNA は細胞内で発生した熱を自身の状態変化に利用していることを示した。

*達成状況: 本研究はさきがけ研究開始前から開始し、さきがけ研究期間内に完了した。論文投稿準備中

研究テーマ B「金ナノ粒子を用いた細胞内局所加熱法の開発」(公開)

従来から細胞内の人工加熱に用いられている IR レーザー照射法は加熱領域が 5 μm 程度と比較的大きいため、細胞内の局所的な加熱時の温度変化とその機能の理解は限定的であった。そこでは、金のナノ粒子を小さな熱源として用いて、生きた細胞内部の局所領域を加熱し、細胞内の反応を誘導する方法を開発した。金ナノ粒子を細胞内導入し、レーザー(640 nm)を照射すると、単一の生細胞内の平均温度変化を定量的に制御することができ

た。加熱時の細胞内温度の分布を定量的に測定したところ、金ナノ粒子の熱源の作る温度勾配の大きさは 0.5 μm 程度と測定され、従来の IR レーザーを用いた加熱方法に比べて小さかった。さらに、金ナノ粒子を用いて細胞内の局所領域を加熱すると、SG の形成が誘導されることを示した。この方法により、発熱オルガネラを含む細胞内の局所的な温度分布の機能的役割が明らかになると期待される。

*達成状況: 研究は完成し、論文投稿中

研究テーマ C「高速細胞内温度マッピング法を用いた熱伝導に依存しない細胞内温度変動の存在の発見」(公開)

従来技術による細胞内温度分布の可視化は、時空間分解能が低いために追跡への応用が困難であり、温度変動の物理的メカニズムや生理的意義の解明の妨げとなっていた。本研究では蛍光寿命イメージング顕微鏡法 (FLIM) における解析法の改良や検出器の高感度化により、蛍光性ポリマー温度センサー (FPT) を用いて細胞内温度分布を高速で追跡する方法を開発した。赤外レーザーを照射して加熱することで、細胞内の温度分布の変化を 100 ms の時間分解能かつ回折限界の空間分解能で追跡した。この結果、単一細胞の温度緩和は、同サイズのリポソームに比べて著しく遅い(約 1 秒)ことがわかった。さらに、種々の加熱条件での温度分布追跡の検討から熱伝導に依存しない細胞内温度緩和の存在を明らかにし、熱物性では解明できない温度変化のメカニズムを説明できる可能性を示した。この方法は、細胞内温度変動機構の検証に限らず、さまざまな高速生理現象の温度生物学に大きく貢献するだろう。

*達成状況: 研究は完成し、論文投稿中

3. 今後の展開

本研究では、細胞内温度に関する謎の解明に取り組んだ。独自の視点「温度シグナリング」を手がかりとして、それを担う分子が細胞内熱の運命に関与すると立てた仮説は細胞内分子に依存した温度変動の発見や高速細胞内温度マッピング法によってある程度裏付けられたと考えている。これらの結果は、今後の細胞内温度変動機構を探る研究の方向性に指針を与えるかもしれない。細胞内温度計測研究は生物医学のみならず物理学からも注目を集めており、本研究をきっかけとして、細胞内熱環境の理解が進ことで、細胞内温度計測研究における本邦が得意とする方法論開発研究、細胞生物学的新機軸の発展が期待できる。一方で、細胞内温度変動の物理機構の解明にはさらなる発展研究が必要である。本研究で示唆された細胞内の熱の運命の分子エネルギーへの変換の関与は、細胞内温度変動の謎を解くには、これまで乖離してきた関連分野(化学熱力学や非平衡熱力学)との共役や融合した分野の成熟の必要性を示した。これについては本さきがけ研究領域で交流・相識を得た伝熱工学者や理論研究者との議論を粘り強く展開していくことで、3-5 年程度で完全な解決を成し遂げたい。

本研究で発見した細胞内温度シグナリングを担う分子群とそれらの熱との相互効果は、細胞を構成する主要因子が、従来知られた知見とは一線を画した機能を有することを示唆している。これらの分子は生命現象に普遍的に関与しているため、生物学において種々の現象

や物性が見直される新潮流が生まれるかもしれない。さらに、熱を利用した細胞機能の操作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、人工細胞の創成に貢献すると期待される。これについては、5-10年で生物学的実証を、また10-15年で医学的社会的実装へと結実させたい。

4. 自己評価

本研究で設定した目的である温度シグナリング機構の解明としては、それらを担う分子群を同定し、細胞内温度変動への貢献を発見したことで達成されたと言える。しかし、領域会議や定例研究会・意見交換会における議論において、温度シグナリングの分子機構だけでは細胞内温度変動の説明として不十分であることを痛感した。そこで、細胞内温度変動の謎を物理的に説明するには、細胞内の熱と温度の関係を直接対応づけて観察する必要を感じ、細胞内温度計測の高速化とそれを用いた詳細な検討を行なった。テーマCは研究計画では想定していなかった成果であり、伝熱工学という私にとっては本さがけ領域への「留学」経験により初めて成し得たと考えている。細胞内温度変動の謎はまだ完全には解けておらず、本さがけ研究で得たこの難問題の切り口を活かしていくことで、私自身が世界にさがけを開拓した細胞内温度測定分野を今後も強力にリードして本邦を代表する研究分野として確立したい。

本さがけ研究では、研究費は消耗品に加えてDSCの購入、および温度計測高速化のための検出器の購入(追加予算含む)により執行した。また、本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、細胞内温度変動の機構に関する考察は、さがけイベント(領域会議など)に加えて領域内外の研究者との交流により達成した。

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:5

1. Okabe K, Uchiyama S, Intracellular thermometry uncovers spontaneous thermogenesis and associated thermal signaling, *Communications Biology*, 4, 1377 (2021).

本論文は、本さがけ研究で得た結果と議論を元に、細胞内温度計測研究の将来像を論じた Perspective 記事である。細胞内温度計測技術の登場により、生命と温度の関わりという古典的な生物学において細胞レベルの温度シグナリング現象という新概念の研究分野が誕生したこと、またその存在が示す細胞内温度研究において懸案となっている温度変化の 10^5 乖離問題における理論計算側の問題と解決策について解説した。

2. Inomata N, Inaoka R, Okabe K, Funatsu T, Ono T. Short-term temperature change detections and frequency signals in single cultured cells using a microfabricated thermistor. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 27, 100309 (2020).

東北大学小野崇人教授との共同研究で、流路に配置したサーミスタを用いて単一細胞からの発熱を検出した。流路内センサ上に配置した COS7 細胞内で脱共役剤によりミトコンドリアから発熱させた際の温度上昇を観察した。細胞の自発的発熱時に 1°C の温度上昇が存在することを細胞外部においても検出できたことで、細胞内温度変動の確からしさが確認された。

3. Kato H, Okabe K, Miyake M, Hattori K, Fukaya T, Tanimoto K, Shi B, Mizuguchi M, Torii S, Arakawa S, Ono M, Saito Y, Sugiyama T, Funatsu T, Sato K, Shimizu S, Oyadomari S, Ichijo H, Kadowaki H, Nishitoh, H. ER-resident sensor PERK is essential for mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissue. *Life Science Alliance*, 3 (2020).

宮崎大学西頭英起教授との共同研究で、体温上昇を担う褐色脂肪細胞における発熱を誘導する分子機構を解明した論文である。本論文では、小胞体に局在するタンパク質 PERK が隣接するミトコンドリアにおける脱共役による発熱を制御することを発見した。異なる細胞小器官同士が熱を介して活性化するという温度シグナリングの新しい原理を提案した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のもも含む)

(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)

3-1) Kohki Okabe "Imaging intracellular temperature unveils thermal signaling in single cells" 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies, March 29, 2019, Kobe Convention Center, Japan.

3-2) 岡部弘基, 船津高志「細胞内局所発熱が担う温度シグナリング現象の発見」, 第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019 年 6 月 24 日, 神戸国際会議場, 神戸市.

3-3) 岡部弘基「細胞や臓器の局所温度がなぜ重要か—温度シグナリングを利用する生命現象 概論—温度シグナリング研究への誘い」・「細胞機能を担う細胞内温度シグナリング」*実験医学* 38 (9): 1481-1487 (2020)

3-4) 岡部弘基「蛍光性ポリマー温度センサーを用いた生細胞内の温度イメージング」*細胞* 52 (14): 790-793 (2020)

3-5) 岡部弘基「Thermal Biology 温度と生命の関係を探る温度生物学」日本伝熱学会 特定推進研究「細胞内における熱・物理的環境」第 1 回ワークショップ、2020 年 9 月 28 日、オンライン

3-6) 岡部弘基「細胞内温度シグナリングによる細胞機能」*細胞* 53 (4): 140-142 (2021)