

令和2年5月14日

報道機関 各位

東北大学大学院薬学研究科

細胞中の温度を無染色で画像化する技術の開発
～「細胞内の水」を用いる画期的方法～

【発表のポイント】

- 細胞の中にある水を測定することで、細胞内の温度を無染色で計測する新たな手法を開発した。
- 薬剤の添加に伴う細胞質内の温度上昇を、専用の色素を用いずに測定・画像化することに成功した。
- 細胞内のほぼすべての領域に水があるため、細胞内および細胞外の全領域の温度を一度に測ることができる。

【概要】

健康状態を知るために体温の計測を行うように、生物の最小単位である細胞の「健康状態」などを知るために、細胞一つひとつの温度測定が必要な場合があります。東北大学大学院薬学研究科の杉村俊紀大学院生、梶本真司講師、中林孝和教授の研究グループは、細胞の中にある水を観測することで、細胞内の温度分布を無染色で可視化する測定法の開発に成功しました。

私達は従来の単一細胞の温度測定には、温度に応答する蛍光色素を細胞内にあらかじめ導入する必要がありました。本研究では、ラマン顕微鏡と呼ばれる手法を用いて細胞内の水を観測することで、蛍光色素を用いることなく、細胞内温度をその場で測定することに成功しました。薬剤の細胞内導入に伴う細胞内温度の上昇も測定できます。本手法は、細胞の活性状態の判別だけでなく、様々な生理現象および疾患の発症機序の解明にも応用が期待できます。

本研究成果は、ドイツ化学会誌"Angewandte Chemie International Edition"に令和2年5月11日に掲載されました。

【詳細な説明】

◆ 研究の背景

体温は生物の健康状態を知る基本的なパラメータですが、それは生物の基本単位である細胞についても同じです。細胞内の温度は、細胞を理解する重要なパラメータであり、細胞の活性状態や様々な生命現象と密接に関わっています。疾病の発症とも関係しており、がん細胞が正常細胞よりも温度が高いことなどが指摘されています。これらの背景から、単一細胞内の温度測定を行う研究が近年盛んに行われています。生命現象や疾患のメカニズムの解明、疾患の新規診断法の確立、さらには温度異常を示す疾患を対象にした新薬のスクリーニングへの適用が期待されています。

細胞内温度を測定する手法としては、温度によって蛍光が変化する温度感受性蛍光色素が用いられています。そのための優れた蛍光色素が開発されていますが、この手法では、細胞を蛍光色素で染色する前処理が必要になります。また、蛍光色素は本来細胞内に存在しない分子であるために、蛍光色素の導入によって細胞内の環境が変化します。さらに、蛍光は温度以外の細胞内の様々なパラメータ（細胞内の粘性やイオン濃度など）にも依存するため、蛍光から温度を見積もるには注意が必要です。

そこで本研究では、蛍光色素を用いることなく細胞内温度を画像化する手法の開発を行いました。研究グループは、細胞内にもともと存在する「水」に着目しました。水は細胞内のほぼすべての領域で存在します。水分子の間で形成される水素結合の強さが温度に依存するため、この水素結合の強さを測定できれば、細胞内のすべての領域の温度をラベルフリーで測定できると考えました。

細胞内の水分子の水素結合の測定について、本研究ではラマン散乱（注1）を画像化するラマン顕微鏡を用いました。ラマン散乱の測定から分子の振動スペクトル（注2）を得ることができます。細胞内にある水分子のO-H伸縮振動のラマンバンドが水素結合によって変化するために、このO-H伸縮振動バンドを解析することで細胞の中の水の温度が得られると考えられます。

◆ 研究内容の詳細

水のラマンスペクトルから温度を測定するために、始めに細胞を培養する水溶液（ここではHBSS（注3））のO-H伸縮振動バンドの温度依存性を測定しました（図1）。2800から3700 cm^{-1} にブロードに存在する水のO-H伸縮振動バンドの形は温度によって変化します（図1a）。温度増加に伴い高波数側の強度増加と低波数側の強度減少が観測され（図1b）、この変化は温度上昇に伴う水素結合の結合の強さの低下によって説明できます。図1cからわかるように、水のラマンバンドの変化の大きさは、温度に比例して直線的に変化しています。この温度とラマンバンドの直線は、ラマンバンドから培養液であるHBSSの温度を得る検量線として用いることができます。

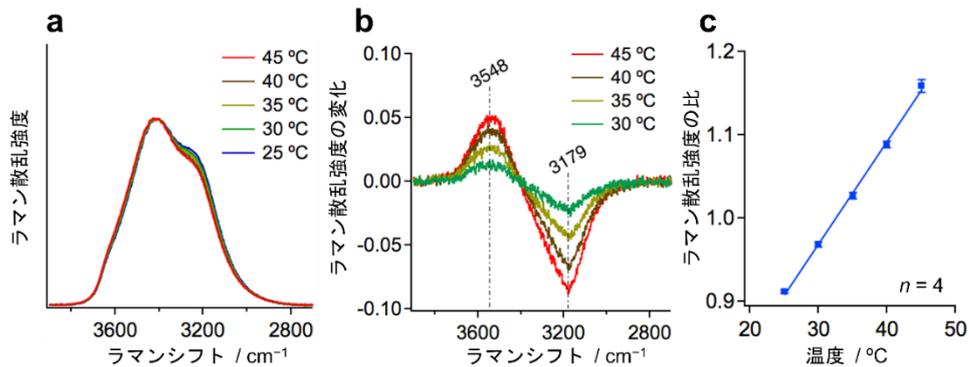


図 1. (a) 細胞を培養する水溶液 (HBSS) の温度を 25~45 °C の範囲で変化させた際の水の O-H 伸縮振動バンド。 (b) 30~45 °C の HBSS のラマンスペクトルと 25 °C の HBSS のラマンスペクトルとの差スペクトル。 (c) 各温度の HBSS のラマンスペクトルについて、3548 cm^{-1} の強度と 3179 cm^{-1} の強度の比をとり、温度に対してプロットしたもの。

HBSS 中にある単一生細胞についても温度の検量線を作成しました。細胞の O-H 伸縮振動バンドの細胞内分布 (ラマンイメージ) を様々な HBSS の温度にて測定し、ラマンバンドと温度との検量線を得ました (図 2)。細胞にはヒトの子宮頸がん由来の HeLa 細胞を用い、ラマン顕微鏡として東京インスツルメンツ社製の多共焦点ラマン顕微鏡 (注 4) (Phalanx-R) を用いて高速測定を行いました。細胞内の核と細胞質については、細胞質内にあるタンパク質シトクロム *c* のラマンバンドで判別しました。シトクロム *c* が無い領域を核、それ以外を細胞質としています。この検量線を用いて細胞内の温度をラベルフリーで測定できます。

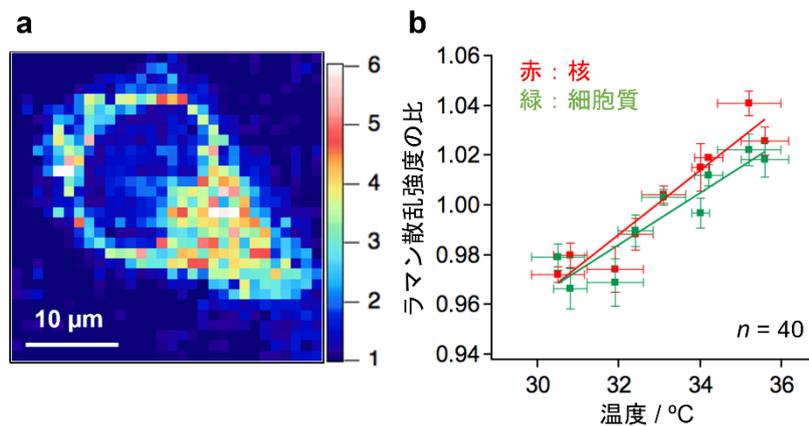


図 2. (a) HeLa 細胞内のシトクロム *c* のラマンバンドのイメージング。 (b) 細胞の温度検量線。赤色が核の検量線、緑色が細胞質の温度検量線。

得られた核、細胞質の温度検量線を使って、薬剤の導入に伴う細胞内温度変化を測定しました。細胞質の温度上昇を誘起する薬剤 FCCP（注 5）の添加前後で細胞のラマンイメージング測定を行い、作成した温度検量線を用いて細胞の温度上昇を検討しました（図 3）。FCCP 添加後において核、細胞質、培地の温度上昇を観測しました。特に細胞質においては有意な差が見られ、1.8℃の温度上昇を観測しました。この上昇値は蛍光色素を用いて得られた結果（K. Okabe, *et al. Nat. Commun.* **2012**, 3, 705.）とも一致しています。以上から、作成した温度検量線を用いることで細胞内温度をラベルフリーで測定することに成功しました。

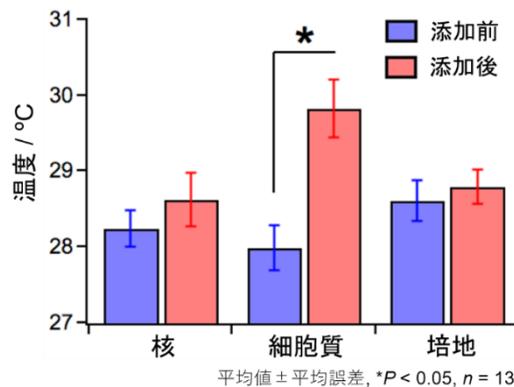


図 3. FCCP 添加前後の核、細胞質、及び細胞周辺の培地の温度。青が FCCP 添加前の温度、赤が FCCP 添加後の温度に相当する。

さらに単一細胞の温度イメージの作成にも成功しました（図 4a）。FCCP 添加後では特に細胞質の温度が上昇し、細胞内において温度分布が生じていることがわかります。FCCP 添加後と添加前の温度イメージの差をとり、温度変化のイメージも得ています。さらに、温度変化のイメージ上の(A)から(B)の方向に断面をとったところ、細胞質から細胞外にかけて温度が低下する温度変化の可視化にも成功しました（図 4b）。蛍光では細胞外の温度を測ることができないために、この断面図は蛍光を用いた方法で得ることは難しいと考えられます。

◆ 本手法の長所

水を用いた本手法には、蛍光色素の導入がないため細胞内環境が維持された状態で測定ができる上に、水の濃度が極めて高いため、温度以外の細胞内の環境変化・溶質の濃度変化の影響を受けにくいという長所があります。また、水は細胞内に広く存在するため、細胞内のほぼすべての領域の温度測定が可能で、細胞外温度の測定もできます。生体試料は水を有するため、ほぼすべての生体試料に適用でき、細胞内にあるタンパク質などのラマンスペクトルも同時測定できることから、タンパク質の構造や濃度変化などの温度以外の情報も同時に得ることができます。これらの長所をすべて満たす手法は本手法しかないと思われれます。

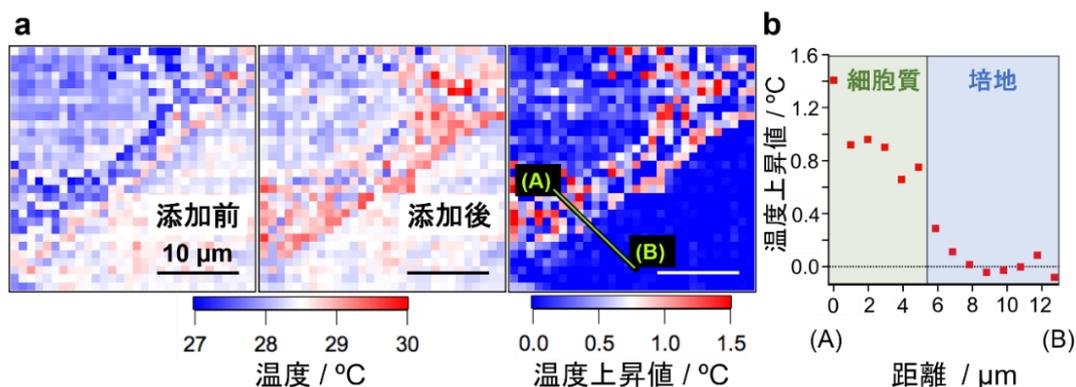


図 4. (a) HeLa 細胞の温度イメージ。左から FCCP 添加前、FCCP 添加後、温度変化のイメージ。(b) 温度変化のイメージ上の(A)から(B)にかけての断面図。

本研究は、日本学術振興会による科学研究費助成事業の支援を受けて行われました。

◆ 今後の展望

がんにおいて細胞内温度の異常が報告されていることから、がんなどの疾病のスクリーニングへの応用が期待されます。また熱産生を利用した抗肥満薬や光線力学的治療、光免疫療法などの光を用いたがん治療において、細胞内の温度測定が重要になります。薬剤や光照射による細胞内の温度変化を測定し、新薬や新たな疾病の治療手法へと展開することができます。また、細胞内の生理現象は温度変化が常に生じます。この温度変化をその場観測することによって、様々な生理現象の解明につながることを期待されます。

【用語説明】

(注 1) ラマン散乱

ある波長の光を試料に照射すると、試料から散乱された光の中に入射光の波長とは異なる波長の光が散乱光に含まれます。入射光の波長と散乱された光の波長の差が、試料分子の振動（または電子遷移、回転）エネルギーに一致する散乱光をラマン散乱光と呼びます。

(注 2) 振動スペクトル

横軸を光のエネルギー、縦軸をそれぞれのエネルギーにおいて観測した光の強度としてプロットした図をスペクトルと呼び、赤外吸収やラマン散乱などの分子振動によって光の強度が変わる場合、光の強度をエネルギーに対してプロットした図を特に振動スペクトルと呼びます。

(注 3) HBSS

ハンクス平衡塩溶液 (Hanks' balanced salt solution) の略。緩衝機能を持つ生理的塩溶液。

(注4) 多共焦点ラマン顕微鏡

ラマンスペクトルを測定する励起レーザー光を専用の光ファイバなどを用いて、100点などに分割し、分割した点数の画像を一度に得ることができる顕微技術。測定時間を大幅に短縮することができます。

(注5) FCCP

カルボニルシアニド-*p*-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン (Carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone) の略。ミトコンドリアの酸化的リン酸化において、電子伝達系により生じるプロトン濃度勾配と ATP の合成の共役を阻害する脱共薬剤としての働きを示します。

【論文情報】

English Title : Label-free imaging of intracellular temperature using O-H stretching Raman band of water.

Authors : Toshiki Sugimura, Shinji Kajimoto, Takakazu Nakabayashi

「水の O-H 伸縮振動のラマンバンドを用いた細胞内温度のラベルフリーイメージング」

著者名 : 杉村俊紀、梶本真司、中林孝和

掲載誌名 : Angewandte Chemie International Edition、2020 年、59 巻、7755–7760.
(DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201915846>)

【問い合わせ先】

東北大学大学院 薬学研究科 生物構造化学分野

中林 孝和 TEL : 022-795-6855

E-mail : takakazu.nakabayashi.e7@tohoku.ac.jp