

講演番号：3C25p03

講演日時、会場：3月28日 14:22～ C校舎25会場

汎用的な細胞内温度計測を目指したレシオ型蛍光プローブの開発

A cationic fluorescent polymeric thermometer for the ratiometric sensing of intracellular temperature

○辻 俊一¹、井門 久美子¹、河本 恭子²、林 晃之³、稲田 のりこ³、吉田 有人¹、内山 聖一² (1キリン基盤研、²東大薬、³奈良先端大)

○Toshikazu TSUJI¹, Kumiko IKADO¹, Kyoko KAWAMOTO², Teruyuki HAYASHI³, Noriko INADA³, Aruto YOSHIDA¹, Seiichi UCHIYAMA² (1Kirin Co. Ltd., ²Tokyo Univ., ³NAIST)

細胞機能は、細胞内の温度と密接に関連しており、最近の研究で、核分裂を担う中心体が細胞質と比べて高温であることや、細胞分裂依存的に核と細胞質に温度差が生じるといった興味深い現象がわかってきている。我々は、このような生細胞内の温度計測をより正確かつ簡便とする高分子蛍光プローブの開発に取り組んでおり、昨年度本大会で、新たな蛍光プローブ“CFPT”を報告した。CFPTは、酵母細胞や動物細胞に自然に取り込まれる優れた性質をもち、かつ高い温度分解能（最高 0.1℃）の計測が可能である。しかし、CFPTの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。

そこで本研究では、細胞内温度計測法の汎用性向上を目指し、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プローブの開発を行った。これにより、一般的な蛍光光度計や蛍光顕微鏡を用いても細胞内温度や温度分布の高精度計測が期待できる。

レシオ型蛍光プローブは CFPT を改良して作製した。具体的には、CFPT 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。必要条件としては、①蛍光特性が周囲の環境因子に影響されないこと、②DBThD と同じ波長で励起できること、③DBThD と蛍光スペクトルが重複しないこと、を設定した。これら条件を満たす蛍光色素として BODIPY 骨格を選択し、新規の蛍光モノマー-BODIPY-AA を設計、合成した。続けて CFPT 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、レシオ型蛍光プローブ R-CFPT を完成させた。

この R-CFPT の浮遊性ヒト細胞 MOLT-4 への導入を試みたところ、25℃、10 分間の条件下で 90 %以上の細胞に取り込まれることが分かった。さらに、蛍光プローブが導入された MOLT-4 細胞懸濁液について、外部温度を変化させたところ、2つの蛍光色素（BODIPY と DBThD）の蛍光強度比と温度との間に高い相関関係が確認できた。温度分解能は、28～44℃の温度範囲で 0.03～0.20℃の非常に高い値を示した。この応答温度範囲の広さと精度は、現在までに報告されている細胞内温度計測用蛍光プローブの最高レベルである。また、R-CFPT は接着性ヒト細胞 HEK293T 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既報と同様に核内が細胞質よりも高温であることを示す像が得られた。

以上のように、本研究で開発した新規レシオ型蛍光プローブ R-CFPT は、一般的な蛍光検出装置であっても幅広い温度応答範囲で高精度な温度計測を実現できることが明らかとなった。既に筋肉細胞等の他の細胞についても温度イメージングに成功しており、今後、様々な分野での利用が期待される。

Intracellular temperature, ratiometry, fluorescent thermometer