

新たな蛍光ナノ温度計との出会いと成長



研究ノート

鈴木 団*

My Journey with a New Fluorescent Nanothermometer

Key Words : Fluorescent nanodiamond, Optical microscopy,
Thermal conductivity, Thermal signaling

はじめに

2023年も、北半球は猛暑の夏であった。それでも多くの生物は暑さを乗り越え、しかも、緯度の高い地域では寒い季節にも適応する。特に我々ヒトが寒冷地でも生存できる理由の一つは、体温を高く維持できるためである。高い体温を維持できるのは体内から熱を常時放出しているからに他ならず、生理学ではこれを「熱産生」と呼ぶ。熱産生の制御の破綻は生死に直結し、操作できれば肥満の抑制が期待される。熱産生とはつまるところ、細胞内の生化学反応の副産物である。そこで熱産生をより良く理解するための手段として、細胞未満のスケールで温度変化を検出しようと、技術的な挑戦が進められてきた。

細胞を対象とした計測技術は、細胞への影響が少なく、水に浸った試料で利用できなくてはならない。細胞生物学で標準的な手法となった光学顕微鏡は、これらの点でうってつけである。そこで光学顕微鏡、特に蛍光顕微鏡を利用する温度（変化）計測手法に、筆者らは着目してきた。ここでは光学的特性が温度に依存して変化し、その変化を定量的に計測することで温度変化を知る材料、即ち蛍光温度計が用いられる。細胞内で利用できる蛍光温度計は、大きさが数nmから100nm前後であることが多く、これらをまとめて「蛍光ナノ温度計」と呼ぶことにする。蛍光ナノ温度計は、ウェットな環境下において高空間

分解能で温度分布を計測する一般的な手段として、生命科学に限らず工学的な用途でも利用できる。様々な材料を用いた蛍光ナノ温度計が世界中から報告されるが、大阪大学では産業科学研究所の永井健治^{1,2)}や蛋白質研究所の原田慶恵³⁾らが、蛍光ナノ温度計を開発し、生命科学分野へ応用している。なお2023年のノーベル化学賞の対象となった量子ドットも蛍光ナノ温度計になる⁴⁾。

さて、筆者も共同研究者と共に独自の開発を進めていた（各技術については総説を参照されたい^{5,6)}）。そのうちに、ある事情からダイヤモンドナノ粒子に強い興味を持つようになった。本稿では、このプロジェクトについて説明する。原田教授、基礎工学研究科の山下隼人助教、および Human Frontier Science Program という国際グラントの支援も得てオーストラリアおよびシンガポールの研究者らと行った国際共同研究である。

はじめ

当時、熱は細胞内をどのように拡散するのかといった問題が、蛍光ナノ温度計に関わる研究者の間で高い関心を集めていた。熱拡散のパラメータが、熱源の周囲に形成される温度勾配や温度変化の時間経過を予測する上で必須なためである。単純化された物理モデルにおいては、細胞内を水とほぼ同程度であると仮定するのが一般的であった。しかし、細胞内で直接計測した例は無かった。読者の皆様ならば、どのように計測するだろうか。

筆者のアイディアは、微小な熱源に温度計の機能を足すことであった。ごく単純な系として、時間的に変化しない均一な三次元空間に置かれた、半径 r [m] の球状の固い点熱源を考える。定常状態では、熱源の中心から距離 r の点（熱源と空間との境界）での温度上昇 ΔT [K] は、単位時間あたりに放出さ



* Madoka SUZUKI

1976年6月生まれ
早稲田大学大学院 理工学研究科 生命
理工学専攻 (2004年)
現在、大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質
物理生物学研究室 准教授 博士(理学)
専門/生物物理学
TEL : 06-6879-8628
FAX : 06-6879-8629
E-mail : suzu_mado@protein.osaka-u.ac.jp

れる熱量 Q [W] に比例し、 r および、空間における熱の拡散を規定するパラメータ、即ち熱伝導率 κ [$\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$] に反比例する； $\Delta T \propto Q/r\kappa$ 。よって、 Q を制御しながら ΔT を決定できれば局所的な κ が得られるはずである (図 a)。このアイデアを実現するために、これまでに開発してきたナノ粒子型の蛍光ナノ温度計を利用できると良かったのだが、難しかった。なぜなら、低分子蛍光色素や蛍光タンパク質は褪色しやすい。そのために、安定した持続的な計測が困難であるためである。

新材料との出会いと改造

諦めかけていた頃、細胞の中で、ダイヤモンドナノ粒子を蛍光ナノ温度計として用いる、という論文が出た⁷⁾。このダイヤモンドナノ粒子には、炭素原子 C で構成される結晶格子の中に、不純物である窒素原子 N と、N に隣接する格子欠陥とがペアとして存在しており、このペアが緑色の光を吸収して赤色の蛍光を発する性質を持つ。温度変化によって生じる結晶格子のわずかな変化が蛍光の特性を変化させることから、この変化を読み取れば、一つ一つのダイヤモンドナノ粒子が蛍光ナノ温度計として機能する。特筆すべきはその光安定性で、励起光に長時間暴露されても褪色しないことが知られており、まさに筆者の求める性質を備えていた。さらにちょうど同じ頃に、ダイヤモンドナノ粒子を扱う原田研究室へ着任する機会を得て、プロジェクトを開始した。

次の課題は、ダイヤモンドナノ粒子を熱源にする方法である。ここでは熱源の操作も光学顕微鏡下で行うことを前提とした。即ち、光を吸収して熱を放出する光熱変換の特性を持った材料の利用である。いくつかの材料を試し、最終的にポリドーパミンにたどり着いた。ポリドーパミンはムール貝などが作り出す接着タンパク質を模倣した高分子材料で、木材から金属に至るまで様々な物質の表面を、ごく簡単な操作によって均一にコーティングできるユニバーサルな生体適合材料として報告されていた⁸⁾。光熱変換の特性も報告されていたのを文献で見つけた筆者らは、ダイヤモンドナノ粒子の表面もコーティングできるだろうと期待した。はたして、化学を専門としない筆者であっても安全かつ簡便な方法で、再現性高くコーティングできることが分かった。期

待した通り、励起光強度を変えれば ΔT を変えることができた。こうして、温度計と熱源の機能を併せ持つハイブリッド型ナノ粒子が完成した (図 b,c)⁹⁾。

計測と、得られた値の意義

道具が得られたので、計測である。まず空気と水、さらにミネラルオイルをコントロールとした実験から、計測に必要なパラメータを決定した。広く使われるヒト細胞株で、子宮頸癌由来の HeLa 細胞で計測した結果、細胞内の熱伝導率は $0.11 \pm 0.04 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (平均値 $\pm 95\%$ 信頼区間) であることが分かった。水の 6 分の 1 程度であり、「細胞内の熱の拡散は水中のそれとほぼ同程度である」という一般的な仮説が実験によって初めて否定された。確認のために、ハイブリッド型ナノ粒子を改めて別バッチとして調製し直し、別の培養細胞の MCF-7 細胞で計測してもほぼ同じ値であった。即ち、少なくともこれら細胞内における局所的 (ナノ粒子の平均直径である 200 nm 程度の領域) な熱伝導率は $0.11 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ で、細胞内ではばらつきが大きいことも初めて明らかとなった⁹⁾。

ここで計測された細胞内の熱伝導率にはどのような意味があるだろうか。まず発熱するナノ粒子の開発 (例えば特定の細胞に対する温熱療法を狙ったドラッグデリバリーシステム) にあたっては、水中で

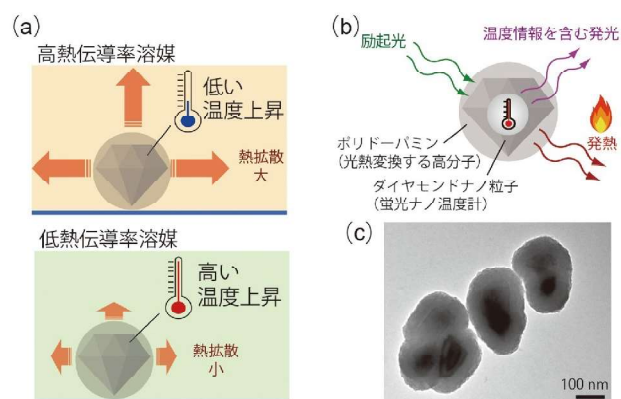


図. (a) 熱伝導率を計測する原理。熱伝導率の高い環境では、熱の拡散が大きく熱源の温度は上がりにくい。熱伝導率が低ければ高温になる。温度計と熱源の機能を併せ持つハイブリッド型ナノ粒子の温度上昇から、細胞内の熱伝導率を決められる。(b) 光熱変換の特性を持つポリドーパミンでコーティングされたダイヤモンドナノ粒子が温度計・熱源のハイブリッド型ナノ粒子として働く。(c) ハイブリッド型ナノ粒子の電子顕微鏡写真。大阪大学の研究専用ポータルサイト ResOU (https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2021/20210116_1) 掲載のプレスリリースを改変。

評価した温度上昇が、細胞内では一桁大きくなる危険性のあることがわかる。意図せず加熱し過ぎることへの注意が必要であろう。

生命科学の点ではどうだろうか。例えば細胞内にある微小な熱源がエネルギー総量 0.1 nJ を連続して放出する場合、熱源の中心から 1 μm の地点では、1 K 程度の温度上昇が 50 μs ほど持続すると計算される¹⁰⁾。これはタンパク質のフォールディング速度と同程度である。また 0.1 nJ とはちょうど、細胞内の半径 1 μm の球体に平均的に含まれる ATP やグルコースのような「燃料」物質を酸化して得られるエネルギーに等しく、しかも拡散によって 2 ms 未満で完全に入れ替わる。即ち 50 μs 間持続する 1 K の温度上昇が少なくとも 2 ms 毎に繰り返し生じることが示唆される¹⁰⁾。このような局所的な熱源の周囲では、翻訳過程（タンパク質の合成）や細胞内の物質輸送といった酵素反応が加速しているかもしれない。

おわりに

本稿では、蛍光ナノ温度計として利用できるダイヤモンドナノ粒子に光熱変換の機能を付与したハイブリッド型ナノ粒子の開発について。またこのハイブリッド型ナノ粒子を利用して、局所的な熱伝導率を光学顕微鏡下で計測する方法について。そして生きた細胞内部の熱伝導率を初めて決定することに成功し、そこから考察した、細胞内の微小熱源の周囲に生じる局所的な温度勾配とその時間経過、およびそれらの影響について紹介した。

前節の終わりで、熱源の周囲で影響されうる細胞内の物理化学的過程の例として酵素反応を挙げた。たった数 K の温度上昇が、絶対温度で効く物理化学的過程に大きな変化を与えるとは考えにくいかもしれない。ところが実際には、筋肉や神経系の細胞は、わずかな温度変化に対してかなり鋭敏に応答する^{5,11)}。これらの例から、たとえ素過程の温度依存性が小さくても、それらが複雑に絡み合うとき温度依存性は非線形的に増大し、わずかな温度変化が思いがけず大きな影響を与えることがわかる。やってみないとわからないことが多い。

熱産生は生物個体の内部で起こり、個体の外部へ散逸して失われる過程で体温が上昇する。それだけでなく、細胞内の熱流は、定常的な温度勾配もしく

は一過的な温度上昇を介して細胞内の様々な物理化学的過程に影響しているかもしれない。ホルモンやカルシウムイオンのように物質としての実体を持たない熱もまた、シグナル伝達機構としての役割を持っているかもしれない、という仮説である。筆者らはこれを「熱（サーマル）シグナリング」と呼び⁹⁾、実験的な検証を続けている^{12,13)}。18世紀～19世紀の産業革命では、蒸気機関の効率を最大化する試みの過程で熱力学が誕生した。同様に、細胞が熱を効率的に利用する仕組みの解明を目指す過程から、「細胞熱力学」が生まれてくるかもしれない。

参考文献

- 1) M. Nakano, et al. Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. *PLoS One* 12(2): e0172344 (2017)
- 2) C. Q. Vu, et al. A highly-sensitive genetically encoded temperature indicator exploiting a temperature-responsive elastin-like polypeptide. *Sci. Rep.* 11(1): 16519 (2021)
- 3) K. Okabe, et al. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* 8(3): 705 (2012)
- 4) J.-M. Yang, H. Yang, L. Lin. Quantum dot nano thermometers reveal heterogeneous local thermogenesis in living cells. *ACS Nano* 5(6): 5067-5071 (2011)
- 5) K. Oyama, S. Ishii, M. Suzuki. Opto-thermal technologies for microscopic analysis of cellular temperature-sensing systems. *Biophys. Rev.* 14: 41-54 (2022)
- 6) 大山廣太郎・石井秀弥・鈴木団. 光熱変換を利用した細胞機能の光操作. *生物工学会誌* 100(8): 433-436 (2022)
- 7) G. Kucsko, et al. Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature* 500: 54-58 (2013)
- 8) H. Lee, et al. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science* 318: 426-430 (2007)
- 9) S. Sotoma, et al. *In situ* measurements of intracellular thermal conductivity using

- heater-thermometer hybrid diamond nanosensors. *Sci. Adv.* 7: eabd7888 (2021)
- 10) M. Suzuki, T. Plakhotnik. Opportunities for hybrid diamond nanosensors targeting photothermal applications in biological systems. *Appl. Phys. Lett.* 119: 190502 (2021)
- 11) K. Oyama, et al. Heat-hypersensitive mutants of ryanodine receptor type 1 revealed by microscopic heating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119(32): e2201286119 (2022)
- 12) I. Kurisaki, M. Suzuki. Simulation toolkits at the molecular scale for trans-scale thermal signaling. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 21: 2547-2557 (2023)
- 13) M. Suzuki, et al. Trans-scale thermal signaling in biological systems. *J. Biochem.* 174(3): 217-225 (2023)

