

## 研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		生物の熱産生メカニズムの解明			
研究テーマ (欧文) AZ		Elucidation of heat synthesis mechanism in organisms			
研究氏 代 表 名 者	カナ CC	姓)ナガイ	名)タケハル	研究期間 B	2009 ~ 2010 年
	漢字 CB	永井	健治	報告年度 YR	2011 年
	ローマ字 CZ	Nagai	Takeharu	研究機関名	北海道大学電子科学研究所
研究代表者 CD 所属機関・職名		北海道大学電子科学研究所・教授			
<p>概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)</p> <p>&lt;目的&gt;</p> <p>我々、哺乳類を含む恒温動物の体温はどのようにして一定に保たれているのか？どのようにして熱を産生しているのか？実はこの疑問に対する物理化学的かつ明かな答えはまだない。本研究は測定対象の温度を高い時間・空間分解能で可視化観察することができる技術を開発し、これまで不可能であった細胞内で産生される熱を直接可視化することで本問題を解決することを目的とした。</p> <p>&lt;結果&gt;</p> <p>1. 蛍光性温度プローブの開発</p> <p>最初に遺伝的にコードされた蛍光性温度プローブの開発を行った。緑色蛍光タンパク質 (GFP) などの蛍光タンパク質の温度感受性とフェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理を用いて、20℃から 50℃においての変化率が約 50%のレシオメトリ型蛍光性温度プローブの開発に成功した。また蛍光性温度プローブを構成する蛍光タンパク質にランダム変異アミノ酸変異と部位特異的アミノ酸変異を導入することで、目的の蛍光タンパク質の明るさ (モル吸光係数×蛍光量子収率で定義される) を約 60%上昇させることに成功した。このことにより、励起光の照射強度と照射時間を軽減でき、細胞毒性の減少とデータ取得の高速化が期待できる。</p> <p>2. 蛍光性温度プローブの細胞への導入</p> <p>次に蛍光性温度プローブの細胞への導入を試みた。現在までに株化培養細胞の HeLa 細胞の細胞質及びミトコンドリアでの発現を確認している。また培養皿内溶液の温度変化に伴い、蛍光強度のレシオメトリックな変化を観察することに成功した。以上の研究成果を論文投稿準備中である。</p> <p>&lt;今後の展望&gt;</p> <p>開発したレシオメトリ型蛍光性温度プローブを HeLa 細胞だけでなく熱産生に関わっていると考えられている褐色脂肪細胞の初代培養細胞の細胞質やミトコンドリアに発現させ、ノルアドレナリンやインシュリンを含む様々な刺激に伴う熱産生の変化を可視化する。また、熱産生に関わっていると考えられているタンパク質 UCP1 を RNA 干渉法によりノックダウンした細胞や、逆に UCP1 を過剰発現させた細胞における熱産生の動態を可視化することで、UCP1 と熱産生の関係を解明していきたい。</p>					
キーワード FA	熱産生	蛍光プローブ	細胞		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>	～	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

欧文概要<sup>EZ</sup>

The aim of this study is to develop technology which enables visualization of temperature or heat generation in living cells thereby we could address how homeothermal animal including mammal maintains its body temperature as well as how heat is generated in living organisms.

To this aim, I invented a genetically-encoded fluorescent temperature indicator which is based on Forster resonance energy transfer between two fluorescent proteins with different temperature sensitivity. In addition, I performed random mutagenesis of the fluorescent proteins by the error-prone PCR in combination with site-directed random mutagenesis thereby I obtained mutant a fluorescent protein which shows 60% brighter fluorescence than that of original one. This improvement is quite important because we could reduce both time and power of illuminated light so that we expect reduction of photo-toxicity and improved throughput to get data.

Next, I tried expression of the temperature indicator in living cells. So far, I successfully expressed in both cytoplasm and mitochondria of HeLa cells. In addition, I could observe FRET signal change upon changing in temperature of culture medium. I'm now preparing a manuscript reporting these results for paper submission.

In future, I plan to visualize temperature change induced by noradrenaline as well as insulin in brown adipocyte which is known to be involved in heat generation. Also, I plan to make cell lines which are depleted or overexpressed UCP1, a possible candidate protein which are responsible for heat generation, then visualize dynamics of heat generation to investigate UCP1 function in heat generation.