

カーボン量子ドットによる蛍光寿命型の細胞温度計測

外 間 進 悟*

Fluorescence Lifetime Cellular Temperature Sensing Using Carbon Quantum Dots

Shingo SOTOMA*

Temperature significantly influences biomolecular structures and enzymatic activities, making accurate intracellular temperature measurement essential for understanding biological phenomena. Carbon quantum dots (CQDs) were developed as low-toxicity, photostable thermometers that combine with fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to achieve non-invasive, precise intracellular temperature sensing. CQDs were synthesized using a hydrothermal method with 1,4-diaminoanthraquinone and L-cysteine (180°C, 12 hours). They exhibited strong fluorescence at 450–550 nm, and temperature-sensitive fluorescence lifetimes with a sensitivity of $-1\%/^{\circ}\text{C}$. CQDs demonstrated high environmental stability across pH, ionic strength, and protein-rich conditions. Using FLIM, intracellular temperature changes in HeLa cells were successfully measured.

1. 緒言

温度は生体分子の構造や酵素活性などに影響を与える重要な物理パラメータである。ゆえに細胞内の温度分布を可視化し定量的に計測することは生命現象を理解する上で必要となる。これまでに蛍光性タンパク質や蛍光性ポリマーの信号強度が温度依存性を示すことを応用した細胞温度センサーが開発されてきたが、これらのセンサーでは光褪色を起こすため正確かつ長時間の温度計測が困難であった。そのような中、光褪色の影響がない量子ドット (QD: Quantum dot) を細胞温度計測に応用する技術が開発されている¹⁾。しかし、QDによる細胞温度計は、構成因子である重金属 (カドミウムなど) が細胞に対して強い毒性を示すこと、また、蛍光信号が温度以外の細胞内環境 (pH, 塩強度など) の影響を受けるため得られる温度計測の結果が不正確である可能性がある (Baffou, Nat. Methods, 2014), という問題があげられている。ゆえに、褪色性・毒性・温度以外に対する頑強性の問題が解決された新しい細胞温度センサーの開発が望まれている。

カーボン量子ドット (CQD) は炭素を主な構成成分とする量子ドットであり、生体毒性や環境汚染の影響が小さい新規量子ドットとして注目されている²⁾。本研究では、CQDと蛍光寿命イメージング技術を組み合わせることにより、細胞計測可能な可視光領域において、光褪色を起こさず、細胞に毒性を与えず、細胞内の温度のみを正確に計測する新規細胞温度計測技術を開発する。

2. CQDの合成と温度応答性の評価

CQDは、1,4-ジアミノアントラキノンとL-システインをブリーカーとして水熱合成法 (180°C, 12時間) により合成した (図1)。得られたCQDは、450 nmの励起によって450–550 nmの蛍光を発した。フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) を用いて表面官能基の構造を解析した結果、アミノ基やカルボキシル基が存在することが確認された。このような表面官能基が、蛍光特性や温度応答性に寄与していると考えられる。また、CQDの蛍光量子収率は11.7%と測定され、光安定性が非常に高いことが示された。

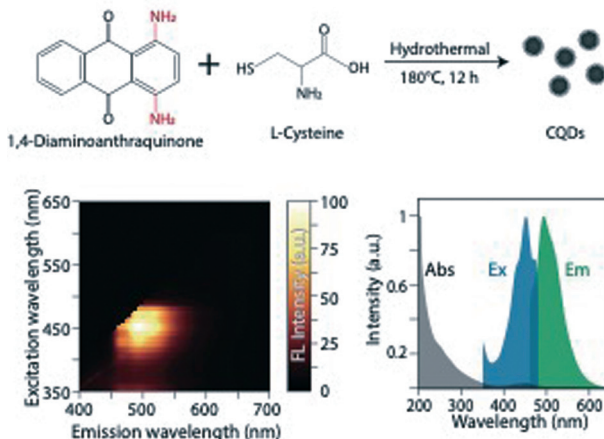


図1 CQDの合成と蛍光特性。

2025年2月7日 受理

* 豊田理研スカラー

京都工芸繊維大学分子化学系

CQDの温度応答性を調べるため、25℃から60℃の温度範囲における蛍光寿命の変化を測定した（図2a）。その結果、蛍光寿命は温度に応じて直線的に減少し、感度は $-1\%/^{\circ}\text{C}$ であった（図2b）。また、この応答性は、温度を繰り返して上昇・下降させるサイクル実験においても再現性良く維持された（図2c）。

次に、CQDの環境耐性を検証した。蛍光寿命は、CQDの濃度が $10\sim 1000\mu\text{g/ml}$ の範囲で変化しないことが確認された。また、最大2 MのNaCl濃度やpH 5～10の範囲においても、蛍光寿命は安定しており、環境要因に対する耐性の高さが示された。さらに、タンパク質濃度が300 mg/mlの条件下でも、CQDの蛍光寿命は温度に応じた応答性を維持しており、これにより生体環境での有用性が示された。

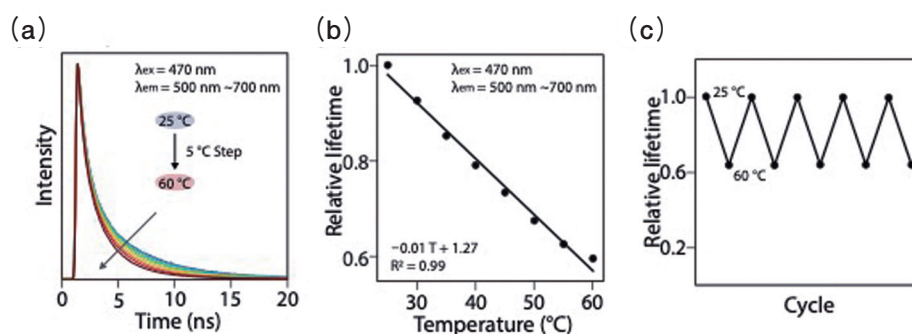


図2 CQDの (a) 蛍光寿命スペクトルおよび (b) 蛍光寿命の温度依存性、
(c) 温度計測の繰り返し耐性。

3. 細胞温度計測

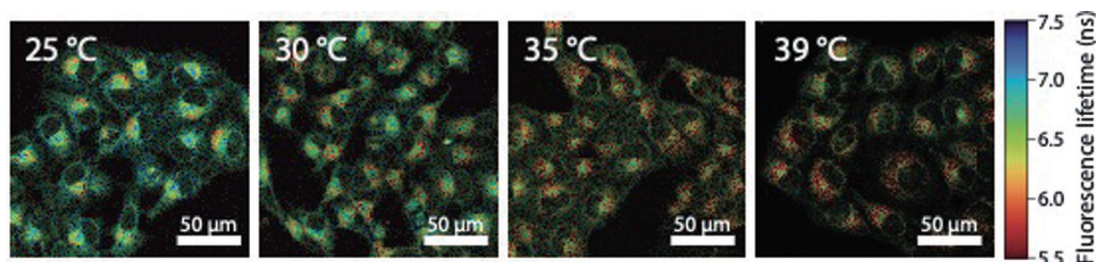


図3 CQDの蛍光寿命を用いた細胞内の温度計測。

CQDの細胞内温度計測性能を評価するために、ヒト子宮頸がん細胞（HeLa細胞）を用いた実験を行った。CQDは、その低い細胞毒性と高い細胞取り込み効率を生かして、ウォッシュフリーで生細胞内温度を測定できる。まず、CQDの細胞毒性を評価するため、 $10\sim 70\mu\text{g/ml}$ の濃度でHeLa細胞を培養し、24時間後にCCK-8アッセイを用いて細胞生存率を測定した。 $10\mu\text{g/ml}$ の濃度では95%、 $70\mu\text{g/ml}$ では80%の細胞が生存していた。実験では細胞への影響を最小限に抑えるため、 $10\mu\text{g/ml}$ の濃度を標準条件として採用した。次に、CQDを添加したHeLa細胞を用いて、細胞内の温度計測を実施した。CQDは細胞内に迅速に取り込まれ、蛍光寿命の測定が可能であることが示された。この際、細胞の温度を25℃、30℃、35℃、39℃の順に変化させ、各温度での蛍光寿命を測定した（図3）。その結果、CQDの蛍光寿命は温度に応じて直線的に減少することが確認された。また、同じ細胞を対象に繰り返し測定を行ったところ、蛍光寿命の応答が一貫しており、細胞内においてもCQDの温度計測の再現性の高さが示された。今後は開発したCQDを利用して、生命現象に関与する温度変化を計測する。

REFERENCES

- 1) T. Nakamura, J. Sakamoto, K. Okabe, A. Taniguchi, T. G. Yamada, S. Nonaka, Y. Kamei, A. Funahashi, M. Tominaga and N. F. Hiroi, *Optics Continuum*, **1** (2022) 1085-1097.
- 2) D. Ozyurt, M. Al Kobaisi, R. K. Hocking and B. Fox, *Carbon Trends*, **12** (2023) 100276.