

令和元年5月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15356

研究課題名(和文)近赤外光を用いた、糖異性体のin vivo測定法の確立

研究課題名(英文) Establishment of in vivo measurement of glucose anomers using near-infrared spectroscopy

研究代表者

田中 冴 (Tanaka, Sae)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60770336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エネルギー源であるグルコースは、水溶液中では2つの異性体が4:6の割合で混ざり合った状態で存在する。この割合は、温度やイオンの存在、酵素反応によって変化するが、生体や反応溶液中での異性体比の変化をその場で検出する方法はこれまで存在しなかった。本研究では、生体透過性が高く非侵襲の測定が可能な近赤外光を用いて、グルコース異性体水溶液の近赤外光波形の解析と異性体比の定量化を行った。その結果、グルコースの2つの異性体は、異性体割合と相関の最も高い1742nmを含めた、複数の波長領域で波形の違いを示した。この波形の違いを用いて、生体様環境でも安定的な定量法を確立した。今後、生体への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの近赤外光を用いた研究では、二つの異性体の存在を無視して、グルコースを一つの化学物質として扱っていた。しかしながら、近赤外光は分子の構造に依存して波形が変わることから、各異性体は異なる波形を示す可能性があった。本研究はその可能性に着目して解析を行うことで、これまでの研究が見逃していた異性体間の波形変化を明らかにした。この成果は、波形中に現れる分子の正確な情報を提供することで、血糖値の非侵襲測定をはじめとする糖の測定システム構築の発展を促すことが期待される。さらに、本研究の成果から、異性体割合の検出系を構築することで、がん細胞などの糖代謝の異なる細胞を検出できる可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glucose, which is used as energy source, exists in an aqueous solution in a state in which two isomers are mixed in a ratio of 4:6. This ratio may change depending on the temperature, the presence of ions, and the enzyme reaction, but there has been no method for detecting the change in isomer ratio in the living body or the reaction solution in situ. In this study, near infrared spectroscopy that has a high bio-permeability was used to analyze the near-infrared spectra of glucose isomer in an aqueous solution and quantify the isomer ratio. As a result, the two isomers of glucose showed differences in spectra at multiple wavelength regions, including 1,742 nm, which is the highest correlation with the isomer ratio in PLS regression analysis. In addition, it was shown that quantification of the isomer ratio using spectra around 1,742 nm is effective even under the influence of temperature change and ions.

研究分野：分光学

キーワード：近赤外光 グルコース 異性体 糖類 多変量解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖類は主要な生体成分のひとつであり、組織や細胞によってさまざまな代謝経路が存在する。環境に応じて変化する糖の代謝システムを理解することは、生体全体の状態を把握する上で大変重要である。

溶液中の単糖類や多くの二糖類において、その構造異性体同士は平衡状態にある。例えば、グルコース溶液では2種類の構造異性体が4:6の比率で存在していることが知られている(図1)。しかしながら、生体中の異性体比についての知見はほとんどなく、実際の生体における異性体比や、その比がどのように変化しているのかは明らかになっていない。

糖の異性体の安定性は、糖分子と水分子間のできる水素結合により影響を受けるため、糖異性体の平衡点は、温度・pH・イオン強度によって変わることが知られている。また、生体中には異性体の一方にのみ高い特異性を示す酵素やトランスポーターが存在しており、これらの発現量や活性量により生体中の糖の異性体比は大きく変わりうる。実際、植物の葉においては、昼夜の代謝変化に伴い、一方の異性体のみが蓄積することが報告されている。こういった異性体比の変化は生体内の各所で起こっていると考えられる。しかし、これまでの生体における糖異性体の検出には、抽出液に対する酵素反応法が主であり、実際の生体における糖異性体をそのままの状態で検出することは不可能だった。生体中の糖代謝を異性体レベルで理解することで、これまで見逃されてきた糖代謝システムの一面を明らかにすることが期待される。本研究では、生体透過性の高い近赤外光を用いて、生体中のグルコースの異性体を非破壊的かつ *in vivo* で検出する方法の確立を目指す。

2. 研究の目的

グルコースの異性体比は、細胞の状態や酵素の反応に影響を及ぼすと考えられる。しかしながら、生体中における糖異性体を *in vivo* で検出する方法は今まで存在せず、この可能性について検証することもできなかった。本研究では、生体透過性の高い近赤外光を用いて生体情報を取得し、その中から糖異性体の情報のみを抽出することで、生体中の糖異性体の検出法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、生体における糖異性体の検出を目指し、まず溶液中における糖異性体の近赤外光波形の違いを詳細に解析した。

(1)グルコースの構造とスペクトルピークとの相関関係を解析する

予備実験において見出した、「1700 nm 付近の最大吸光度」と「環に対して平行な C-H 結合の数」との相関関係をさらに詳しくかつ正確に調べるために、スペクトル測定と同環境・同時点における異性体の存在量を旋光計で測定し、平衡過程の異性体比および最大吸光度の変化を解析する。

また、糖のスペクトルでは、O-H の吸収帯である 1400 nm 付近や、1700 nm のピークとは正負が逆転している 1200 nm 付近など、他の特徴的なピークも観察されている。これらと異性体比の相関関係についてもあわせて解析をおこない、有用な情報をもったピークかを判断する。これらのデータの解析は主に、旋光度を用いた PLS 回帰分析法を用いて、異性体比と相関の高い波長領域を統計学的に探索する。その後、統計学的に高い相関を示した波長について、個別に標準化を行うことで、異性体比を予測できるような単一波長を探索する。

次に、さまざまな条件下でのグルコース水溶液のスペクトルがどのような変化を示すかを調べる。温度・pH を変化させたり、Ca²⁺イオンなどを添加すると平衡溶液中の異性体比が変化することが知られている。さまざまな溶液環境下でグルコース異性体比を変化させたとき、近赤外光スペクトルがどのように変化するかを調べるため、温度・pH・イオン強度を段階的に変化させたときのスペクトルの変化を解析する。近赤外光スペクトルの O-H 吸収帯は温度などによって大きく影響を受けることが知られているため、各吸収帯における変化幅や安定性を調べ、モニタリングに適しているかを検証する。また、近赤外光によりモニタリングが可能な温度幅や pH など決定する。

(2)グルコースの重水素置換体を用いて、スペクトルピークの由来を明らかにする

グルコース溶液中の平衡状態

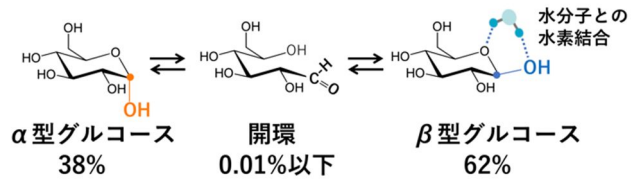


図1. 溶液中におけるグルコースの構造異性体と存在比率

OH基が環平面に対して垂直に結合したものがα型、平行に結合したものがβ型である。

分子振動は原子の質量に依存して変化するため、水素を重水素に置換することで、置換部位に由来するピーク位置が変化する。この重水素と近赤外スペクトルとの関係を利用して、グルコースのスペクトルに現れるピークの由来を明らかにする。用いる置換体は、3種類。A) すべてのCH基の水素を重水素に置換したもの、B) 一位炭素に結合した水素を重水素に置換したもの、C) 環外の-CHCH₂OH基の水素を重水素に置換したもの (図2)。Aは-CHと-OHの重なりが疑われる領域を区別するために、Bは一位炭素の水素と他の-CHを区別するために、Cは-CHと-CH₂を区別するために用いる。他にも、いくつか重水素置換体が存在するため、解析の進行に合わせて追加解析をおこなう。また、重水素だけではスペクトルの帰属が上手くいかない場合は、炭素や酸素の放射性同位体に置換したグルコースを用いる。場合により、分子シミュレーションを用いて、分子振動とスペクトルの説明が妥当かを検証する(分子シミュレーションは同大学理工学部の学生に依頼する)。

また、溶媒由来の-OH振動と糖由来の-OHの違いを明確にする目的で、溶媒を重水にして同様の測定・解析をおこなう。重水中では、糖のOHと水素-重水素交換が起き得るので、その影響については時間変化と旋光度変化の両方を解析することで、異性体比と相関する波形変化のみを抽出する。

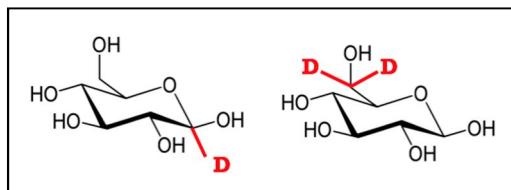


図2. グルコースの重水素置換体の例
本解析に用いる予定の一部。近赤外領域では、HをDに変えることにより、波数が1.35倍の位置にシフトするため、元の波形との比較で置換部位の同定が可能になる。
左)グルコース 1-d1 右)グルコース-6,6-d2

(3)異性体変換酵素を欠損させた培養細胞において異性体の検出を試みる

ムタロターゼ(EC 5.1.3.3)は、α型グルコースとβ型グルコースとの変換を促進する酵素である。この酵素はほとんどの組織・細胞に発現しており、生体内の異性体比の調節に役立っていると考えられる。この酵素をゲノム編集技術により欠損させ、細胞内の異性体比が異常な環境を作り上げ、野生型との異性体比の違いが検出可能かを検証する。異性体比の確認には酵素反応法を用いる。培養細胞には、接着性の動物培養細胞を用い、ボトム石英ディッシュまたは特殊キュベットを用いて近赤外光を測定する。

4. 研究成果

(1) グルコースの二つの異性体それぞれについて、旋光度と近赤外光波形を同時に測定し、PLS回帰解析をおこなうことで、溶液中の異性体比と高い相関を示す波長領域を特定することに成功した。これまでの研究においては、時間経過における波形変化を、単純に異性体比と結びつけていたが、時間経過による他の変化を含んでいる可能性を否定できなかった。本研究では、異性体比を直接旋光度計で測定し、その値を目的変数にすることで、統計学的に有意な相関を示すことができた(図3)。この回帰解析において、最も高い相関を示した1,742nmという波長は、室温と37℃でも相関に変化はなく、また生理食塩中でも同様の高い相関を示した。近赤外光の波形は温度などの変化に鋭敏であるが、この1,742nmの波長は温度変化やイオンの存在下であっても安定であることが示された。これにより、本解析によって見出した1,742nmの波長を用いることで、生体中のグルコース異性体比を検出できる可能性を示した。今後の生体中の計測に有効であることが期待される。以上の結果は、査読付き国際誌に発表し、また、複数の国際学会で発表した。2018年にアメリカで行われた国際学会 International Diffuse Reflectance Conferenceでは、最優秀ポスター賞を受賞した。

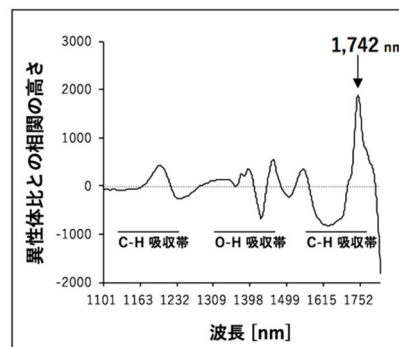


図3. 近赤外光の波形における糖異性体間の違い

(2) 次に、この1,742nmの波長の由来を明らかにするため、重水素置換体を用いた測定・解析をおこなった。近赤外光で検出する分子振動は、原子の質量に依存して変化するため、水素を重水素に置換することで、置換部位に由来するピーク位置が変化する。目的の1,742nm周辺では、C-H振動由来のピークが多く観測されることから、まずは一位炭素C1に結合した水素を重水素に置換したものと、環外の-CHCH₂OH基の水素を重水素に置換したものの二種類を用いて測定・解析をおこなった。まずは、溶解後180分において、通常のグルコースの波形と比較することで、置換部位のピークを同定した。また、PLS回帰分析により旋光度と相関の高い波長領域の変化を調べることで、重水素置換による相関の変化を解析した。この結果、一位炭素C1におけるC-Hは吸光度としては大きなものではないが、旋光度との相関は高い一方で、環外の-CH₂は波形の

変化は大きいですが、旋光度との相関は比較的小さいということがわかった。環上のC-HはC2からC4のC-Hとピーク位置がほぼ同じであるため、C1の重水素置換では吸光度の変化は小さいが、異性体の構造としては最も顕著に異なる部位であるため、旋光度との相関が高くなっていると考えられる。1,742nmのピークも一位炭素C1における重水素置換によって影響を受けた。また、グルコースには他に-CH₂が存在しないため、重水素置換によってピークの大きな変化が認められたのだと考えられる。環外の-CH₂の安定的な角度が各異性体において異なることはNMRなどの他の手法においても示唆されていたが、近赤外光によって捉えたのは本研究が初めてである。(1)の成果段階では、1300nm付近の二つのピークが環外の-CH₂に由来すると考えていたが、実際に重水素置換体を用いた解析によってその可能性は否定され、-CHの短波長側に出現するピークが環外の-CH₂に由来することが判明した。

重水素置換体だけでは1,742nmのピークの由来を完全に説明できなかったことから、溶媒を重水素に変えて測定・解析をおこなった。重水素において得られた近赤外光波形は、溶解後5分における各異性体間の差分と、旋光度に対するPLS回帰分析における回帰ベクターのピーク位置がほぼ一致しており、重水素中では溶質であるグルコース由来の波形を容易に抽出できることがわかった。これは、グルコース中の水素と重水の重水素との交換はほとんど無視して良いということを示唆している。この重水を用いた解析から、1,742nmのピークは、溶質のグルコースではなく、溶媒の水分子に由来している可能性が浮上した。現在、この可能性について検証中である。

これらの途中結果については、2018年の国際学会、2019年の国内学会の2つの招待講演において発表した。

(3) 異性体変換を起こすムタロターゼ欠損体では、培地中の糖質を調整した際に細胞増殖に影響がでることが知られている。これは細胞内の異性体比が異常になっているために糖代謝系、ひいては細胞増殖系に影響がでたのだと考えられる。このような異性体変換を起こすムタロターゼを用いた実験系を立ち上げるため、複数の培養細胞におけるムタロターゼの発現をウェスタンブロットにより確認した。この結果を元に、ヒト培養細胞HEK293T・HEK293・Hep2においてCRISPR Cas9システムを用いてムタロターゼ欠損株の作成を試みた。結果として、HEK293T細胞において二種類の欠損株を作成することに成功した。今後は、この細胞を用いて近赤外光波形を測定し、野生型との比較によって、細胞内のグルコース異性体比を検出することができるかを検証していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Tanaka S, Kojic D, Tsenkova R, Yasui M., Quantification of anomeric structural changes of glucose solutions using near-infrared spectra., *Carbohydr Res.*, 査読あり, 2018, 463 40-46, 10.1016/j.carres.2018.04.012

〔学会発表〕(計7件)

1. 田中冴, 糖異性体の in vivo 測定法確立に向けた解析, 日本分光学会近赤外部会シンポジウム(招待講演), 2019
2. Sae Tanaka, Analysis of Interaction between Glucose Anomers and Water Molecules, The 3rd Aquaphotomics International Symposium(招待講演)(国際学会), 2018
3. 田中冴, Quantitative Analysis of the Ratio of Glucose Anomers in Solution, 近赤外フォーラム, 2018
4. Sae Tanaka, Quantitative Analysis of the Ratio of Glucose Anomers in Solution, International Diffuse Reflectance Conference(国際学会), 2018
5. Sae Tanaka, Quantitative Analysis of the Ratio of Glucose Anomers in Solution, The 6th Asian NIR Symposium(国際学会), 2018
6. 田中冴, 近赤外分光法を用いたグルコース異性体水溶液の解析, Aquaphotomics Forum, 2017
7. Sae Tanaka, Analysis of Interaction between Glucose Anomers and Water Molecules, International Conference of Near-infrared Spectroscopy(国際学会), 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。