

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19417

研究課題名(和文)細胞内糖質イメージング法の確立

研究課題名(英文)Establishment of intracellular sugar imaging

研究代表者

志村 まり(Shimura, Mari)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：90226267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖質など細胞内小分子の可視化は、より大きな分子の蛍光物質などのラベルより、本来機能が失われることが多いことから、一般に困難である。本研究では、物質の最小単位である1原子をラベルした糖質を細胞に取り込ませ、独自に開発したシンクロトロンX線顕微鏡(SXFM)より、糖質の細胞内可視化に至った。また、細胞内糖質はホルマリン固定より90%近く失われてしまうことから、瞬間凍結乾燥法を開発した。最終年は装置に改善を加えることで、極力非破壊的で自然に近い、細胞内糖質の観察を目指した。今後、感染拡大により閉鎖していた放射光施設の再開を待ち、代謝抑制剤による糖質の細胞内変動を観察し、本法の有用性について発表する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖質など細胞内小分子の可視化は、一般に困難である。小分子は、より大きな分子の抗体や蛍光物質によるラベル化より、本来機能が失われることが多く、一方、ラベルしない方法(質量分析法など)では、分解能が十分得られない。そこで本研究では、物質の最小単位である1原子をラベルした糖質を細胞に取り込ませ、独自に開発した蛍光X線顕微鏡(SXFM)より、糖質の細胞内可視化に至った。本研究グループは、これまでに脂肪酸小分子の細胞内可視化にも成功している。糖質や脂肪酸の細胞内代謝の可視化法を提案することで、健康や病気予防に貢献する。

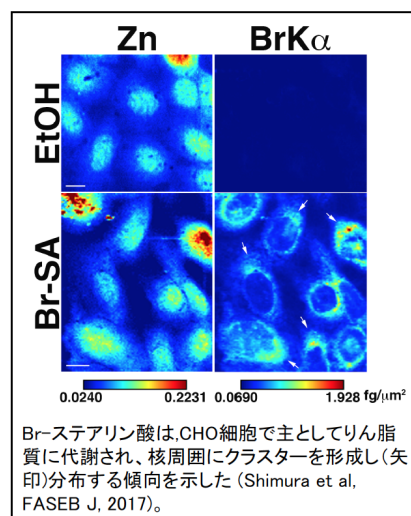
研究成果の概要(英文)：This study aimed to visualize intracellular sugar and the derivatives. Generally, imaging small molecules in cells is complicated due to hard labeling to see without alternations of cellular functions. We labelled a single element with a glucose and apply it for cells. After cellular uptake, signals from the labeled element were obtained by our developed synchrotron X-ray fluorescence microscopy (SXFM). Although we could obtain the cellular distribution of the labeled glucose, over 90% of glucose was lost due to paraformaldehyde fixation. We then established a flash freezing & drying method that can keep cellular component including glucose as close to nature as possible. Now, we are waiting for the use of synchrotron facility after the pandemic infection. Once it is opened, we will finalize this study and publishing to show the possibility of a single element labeling combined with synchrotron X-ray fluorescence microscopy for intracellular sugar derivatives.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞内糖質 イメージング 糖質代謝 放射光 一原子ラベル 蛍光X線 顕微鏡 高分解

1. 研究開発当初の背景

- ① 糖質など細胞内小分子の可視化は、より大きな分子である蛍光物質などのラベルより、本来機能が失われることが多いことから、一般に困難とされている。
- ② ラベルを伴わない質量分析顕微鏡装置などの分解能は、1細胞内を観察するには十分とは言えない。
- ③ 本研究グループで、独自に開発したシンクロトロン X 線顕微鏡 (SXF) の分解能はミトコンドリアレベルである (文献 1-10)。
- ④ また、本研究グループでは、物質の最小単位である 1 原子ラベルした脂肪酸を細胞に取り込ませ、SXF より脂肪酸の細胞内可視化に成功している (文献 3、図参照)。



2. 研究の目的

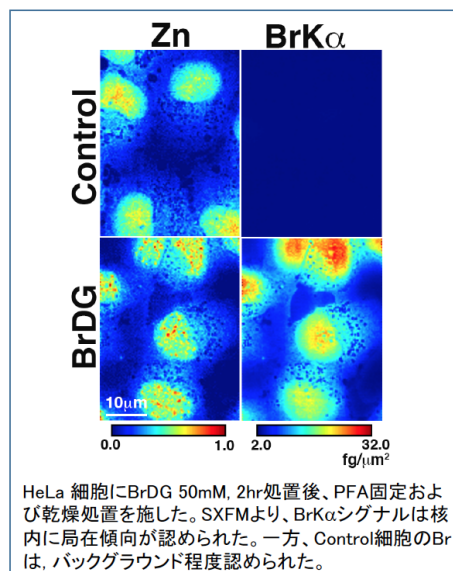
本研究では、1 原子ラベルした糖質を細胞内に取り込ませ、独自に開発したシンクロトロン X 線顕微鏡 (SXF) より細胞内糖質および代謝産物の細胞内での高分解可視化を目標とした。

3. 研究方法

- (1) 1 原子ラベル糖質の合成: 細胞内には殆ど存在しない元素、且つ直接ラベル可能なハロゲン、蛍光 X 線が 15Kev 以下で検出可能な Br を選択し、Glucose にラベルした (以下、BrDG と称する。研究協力者: 北大鈴木)。
- (2) 培養細胞での毒性機能試験を行う (研究協力者: 久留米大豊田)。
- (3) シンクロトロン蛍光 X 線解析: SXF での細胞内高分解 Br マッピングを行う (協力研究者: 阪大松山)。
- (4) BrDG の検証として、細胞処理方法による Br 量を ICP-MS で測定する。
- (5) BrDG の代謝を明らかにするために、細胞塊より質量分析を行う。
- (6) 細胞代謝阻害剤存在下での、ラベル脂肪酸、ラベル糖質の細胞内分布を明らかにする。

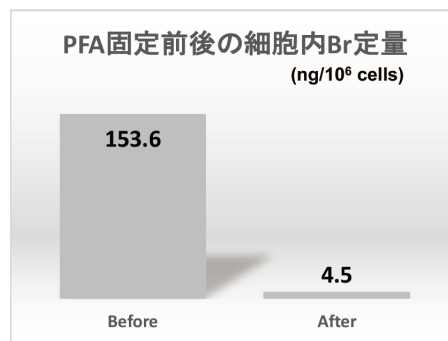
4. 研究成果

- (1) グルコース Br ラベル体の合成 (北大鈴木): グルコース C-2 の位置の水酸基が Br に置き変わった BrDG を合成した。第一に、細胞内に取り込み能、毒性試験を行った。酸素消費量を基準に、 $2\text{DG} > \text{FDG} > \text{BrDG}$ の順に代謝抑制が認められ、医療用 PET CT で使用される FDG 同様、比較的短時間内処置での可視化は可能と考えた。次に、BrDG の SXF を用いた可視化を行った (代表志村、阪大松山)。BrDG 25mM, および 50mM, 2 hr 処置後の細胞像では、Br が細胞核に集積する傾向が認められた (図参照)。



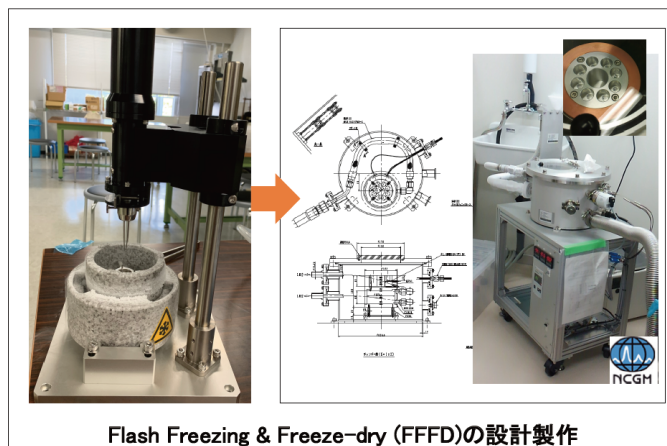
- (2) コントロール細胞では Br のシグナルはバックグラウンド程度であったことから、BrDG が細胞内に取り込まれ、核内に局在することが示唆された。しかしながら、BrDG の過剰投与から、シグナルは saturation 気味となり、詳細の観察は困難であった。そこで投与量と時間を調整し、5.6 mM, 15min 処置後では、細胞核内に島状に Br シグナルが認められた (投稿中)。特に、リン (P) が高濃度に認められる領域 (核小体と推測) と共局在する傾向が認められた。この BrDG の局在傾向は、上述 (図) の Br 脂肪酸とは全く対照的である。また、グルコースの核内局在は、過去の論文報告とも一致する。特記すべき点として、核移行ペプチドやトランスポーター類に匹敵するスピードで、核内移行することは驚きであり、今後の機序解明が期待される。

(3) 一方、パラホルムアルデヒド (PFA) 固定前後で 90% の Br が失われていることが、細胞内 Br 定量より明らかとなった (図参照)。従って、固定処置後、SXFМ で観察している Br は、BrDG が蛋白質や核酸と結合した比較的不溶性の画分と推測される。



(4) そこで昨年度より、できるだけ自然に近い状態での観察を可能にする瞬間凍結乾燥装置 (FFFD) の開発を進めた (図参照)。本研究では、FFFD の設計から行った。これまでに、FFFD より、詳細な細胞突起などの形状を失うことなく、SXFМ でのイメージングが可能となった。また、SXFМ では元素を可視化するため、余剰な最終溶液 (塩類元素) を極限まで減少させることが望ましい。最終溶液は 15nL 程度までに減らす一方で、DMSO を添加することで劇的に乾燥を改善し、操作時間が延長できるようになっている。

(5) 最終年度では、FFFD の改善を行った。実は、FFFD の成功率は 10% と低い。電顕で頻用されている基板は、金属製 (銅、モリブデン等) に対して、微量元素を測定する蛍光 X 線解析では、SiN や高分子膜を使用する。金属と比べると熱伝導率は悪いことから、成功率の低さは、概して温度制御の難しさから派生していた。具体的には、1) 瞬間凍結時の液体プロパンの過冷却による凍結、2) 試料や基板のひび割れや破壊、3) 凍結乾燥装置への移行時や、4) 真空前の温度上昇による試料の結晶化が考えられた。そこで、以下のような改善を行った。1) 冷蔵庫内で瞬間凍結を行うことで、外気温に影響せずに液体プロパン温度を安定に維持、2) 試料基板の膜厚を 200nm から 270nm に、面積を 1mm 四方から 0.5mm 四方に変更し、基板強度や熱伝導率を改善、3) 細胞基板とホルダーを可撤性の一体設計に変更し、ホルダー毎、速やかに凍結乾燥装置へ移動できるようにした。4) 凍結乾燥装置の出力を増大し、真空までの時間を短縮、液体窒素槽の設計より、凍結状態を維持できるよう改良した。以上より、予備的実験では、FFFD の成功率は改善、細胞の微細構造や脂肪酸分布では脂肪滴の観察が可能となり、より自然に近い状態を温存する傾向が見られた。



Flash Freezing & Freeze-dry (FFFD) の設計製作

(6) 予定していた本実験は、COVID-19 感染拡大後の研究自粛や SPring-8 の閉館により、実現に至っていない。再開後、速やかに本実験での FFFD の評価を SXFM により行い、細胞内糖質の可視化を確立する。また、脂質と糖質の二重可視化や、各代謝抑制試薬による細胞内局在変動の観察に展開し、ラベル糖質の代謝プローブとしての可能性について、論文や学会発表を行う。

<引用文献>

- 1) Matsuyama S, Maeshima K, Shimura M*, *JAAS*, doi.org/10.1039/D0JA00128G, 2020. 2) Shimura M*, et al, Chapter 3, *Metallomics, Recent analytical techniques and applications*, Springer, pp63-92, 2017. 3) Shimura M*, Shindou H, Szyrwiell L, et al., *FASEB J*. 2016 Sep 6. doi:10.1096/fj.201600569R. 4) Imai R, Komeda S, Shimura M, et al., *Scientific Report*, DOI: 10.1038/srep24712, 2016. 5) Szyrwiell L, Shimura M*, Shirataki J, et al. *Metallomics* 7: 1155-1162, 2015. 6) Takata H, Hanafusa T, Mori T, Shimura M, et al., *Proc One* 10, e75622, 2013. 7) Matsuyama S, Matsunaga A, Shimura M*, et al., *Metallomics* 5, 492-500, 2013. 8) Matsuyama S, Shimura M, Fujii M, et al. *X-Ray Spectrometry* 39: 260-266, 2010. 9) Matsuyama S., Shimura M, Mimura H, et al., *X-Ray Spectrometry* 38, 89-94, 2009. 8) Shimura M, Saito A, Matsuyama S, et al., *Cancer Res.* 65, 4998-5002, 2005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Matsuyama S, Maeshima K, and Shimura M | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Development of X-ray imaging of intracellular elements and structure | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 JAAS | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1039/D0JA00128G | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mari Shimura |
| 2. 発表標題 Approach to the patient survival of malignancies with trace elements |
| 3. 学会等名 International Conference of Metallomics 2019（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 志村 まり |
| 2. 発表標題 蛍光X線顕微鏡による細胞内元素高分解イメージング |
| 3. 学会等名 地球化学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 志村 まり |
| 2. 発表標題 走査型蛍光X線顕微鏡による細胞内元素イメージングと医学応用 |
| 3. 学会等名 第92回生化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 志村まり |
| 2. 発表標題 蛍光X線顕微鏡システムによる細胞内元素イメージングと生物医学応用 |
| 3. 学会等名 メタロバイオサイエンス研究会2019 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 志村まり |
| 2. 発表標題 蛍光X線顕微鏡システムによる細胞内元素イメージングと医学応用 |
| 3. 学会等名 第13回岐阜薬科大学薬物治療学セミナー (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 志村まり |
| 2. 発表標題 細胞内元素イメージングと臨床応用 |
| 3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会 2018 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 志村まり |
| 2. 発表標題 X線によりわかることー医学生物応用ー |
| 3. 学会等名 第25回SPring-8/ SACLA 施設公開 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 志村まり |
| 2. 発表標題 蛍光X線顕微鏡による細胞内元素の高分解イメージングの試み |
| 3. 学会等名 第27回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mari Shimura |
| 2. 発表標題 Imaging of Intracellular Fatty Acids by a Single Element Labeling. |
| 3. 学会等名 Metallomics(国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 志村まり |
| 2. 発表標題 X線顕微鏡で観る - 医学生物応用, 特別公演II |
| 3. 学会等名 第28回日本臨床口腔病理学会総会(招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 志村まり |
| 2. 発表標題 X線によりわかることー医学,生物応用ー |
| 3. 学会等名 JASIS(招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 志村まり |
| 2. 発表標題 走査型蛍光X線顕微鏡を用いた基礎医学研究 |
| 3. 学会等名 第9回放射光基礎講習会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mari Shimura |
| 2. 発表標題 Visualization of Intracellular Elements by Scanning X-ray Fluorescence Microscopy-Application for Cell Biology and Medicine. |
| 3. 学会等名 APWC 2017（国際学会） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mari Shimura |
| 2. 発表標題 Application in Cell Biology and Medicine using X-ray. |
| 3. 学会等名 APWC post conference（国際学会） |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 松山智至、志村まり | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 科学評論 | 5. 総ページ数 9 |
| 3. 書名 腎臓内科：元素イメージング 蛍光X線顕微鏡による細胞内元素の高分解イメージングの試み | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Shimura M, Szyrwiel L, Matsuyama S and Yamauchi K | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 Springer | 5. 総ページ数 30 |
| 3. 書名 Metallomics, Ogura and Hirata edition | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|