

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14360

研究課題名(和文)重水素化アルキントグラマンイメージングを用いた共培養時の細胞増殖評価法の確立研究

研究課題名(英文) Study on the Establishment of a Method for Evaluating Cell Proliferation in Co-culture Using Deuterated Alkyne

研究代表者

江越 脩祐 (Egoshi, Syusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・基礎科学特別研究員

研究者番号：60755932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、二種類の細胞の区別が可能となる重水素化化合物を設計・合成し、そのラマンシフトの計測と細胞への適用を中心に検討を行った。さまざまな重水素化化合物を合成して生物検定を続けた結果、アルキンのラマンシフトは重水素化により低波数側に大きくシフトすることが明らかになった。さらに、長鎖の不飽和脂肪酸を基盤とした重水素化プローブを用いることで、2種の細胞を区別して観察可能な結果が得られた。本研究で開発したラマンタグは複数の小分子を細胞内で区別するという1細胞を用いた研究に、ラマンプローブは細胞種の識別など複数の細胞研究に有用であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤などの薬剤開発には正常細胞とがん細胞を共培養した条件下で活性試験が行われるが、それぞれの細胞を区別する必要がある。本研究で開発したラマンプローブは、関連する細胞を共培養して細胞の分化や増殖を評価できることが強く示唆され、薬剤開発時の細胞標識に用いることが期待された。

また本研究では、構造がほとんど変化せず細胞内でも区別して検出できる2つのラマンタグの組み合わせを見出した。この2種のタグを用いることで、構造が非常に類似した2つの化合物を細胞内でも区別して観察できると期待された。

研究成果の概要(英文)：We designed and synthesized deuterated compounds that can distinguish between two types of cells by Raman imaging. After several bioassays, we found that deuterated alkyne was found to be a useful Raman tag and distinguished from terminal alkyne in cells. Furthermore, deuterated probes, which were developed based on long-chain unsaturated fatty acids, showed different localization between two types of cells. The Raman tags developed in this study are useful for studies using a single cell, such as distinguishing multiple small molecules in a cell. On the other hand, the Raman probes developed in this study are useful for multiple cell studies, such as distinguishing cell types.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ラマンイメージング アルキン 重水素

1. 研究開始当初の背景

細胞や組織はそれぞれ独自の機能を有している。生物は、それらが相互に作用しあい、あるいは補完しあい、その体を存続させている。そのため、細胞や組織の機能を研究するには、生体に近い状況が望ましく、例えば抗がん剤の研究では正常細胞およびがん細胞を共培養した条件が必要である。現在は、各々の細胞を蛍光標識化して共培養することでどの細胞が分化・分裂したのか等を判別しているが、この手法では細胞増殖時や単純拡散によって、蛍光試薬の細胞外への漏れ出しと細胞内への再取り込みを引き起こすため、長時間実験では細胞識別ができず、共培養における各細胞の増殖の差を評価するのが難しい。これは、抗がん剤などのがん細胞特異的な細胞増殖阻害効果を持つ薬剤スクリーニングを行う上での重要な問題となっており、より簡便かつ正確な細胞認識法が望まれていた。

2. 研究の目的

細胞標識においては、膜脂質や核 DNA などその構成成分に導入することができれば安定的な標識が期待される。しかしながら一般的に用いられる蛍光試薬の分子量は 300 以上であり、細胞組織の構成成分として組み込むことが難しい。そのため、現状では疎水性を利用して取り込ませるなど細胞内外への流動が起こりうる人工的な蛍光標識試薬を使用する必要があった。そこで申請者は、この問題を解決するためにラマン分光法を用いて細胞を観察する手法に着目した。観察に必要なラマンタグは蛍光標識試薬の 1/10 倍以下の分子量に抑えることができる。そのため、ラマンタグを導入した細胞組織の構成成分(ラマンプローブ)による細胞への不可逆的な標識が可能であり、長時間の培養実験にも適用できると考えられた。しかし、既存のラマンプローブは共培養実験に適用できていない。そこで本研究で共培養実験に最適化された新たなラマンプローブの開発を行い、それぞれの細胞の増殖率を解析できる手法の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究では長時間共培養した細胞の識別法として、申請者の所属する研究室で開発されたアルキンタグラマンイメージング法を応用した。観測するラマン散乱光は分子の振動に応じて生じる光である。アルキン(C≡C)の分子振動は極めて特異的な振動であり、生体内の分子振動が全く重ならないサイレント領域(1800-2600 cm^{-1})内にラマンシグナルを示すため、アルキンのラマンシグナルは生体内でも特異的に検出することが可能である。また、C-D結合のラマンシグナルもアルキン同様にサイレント領域に検出される(図1)。申請者はアルキンやC-D結合をタグとして、2種の細胞を区別するためのラマンプローブの開発とそれらを用いた細胞識別法を検討した。

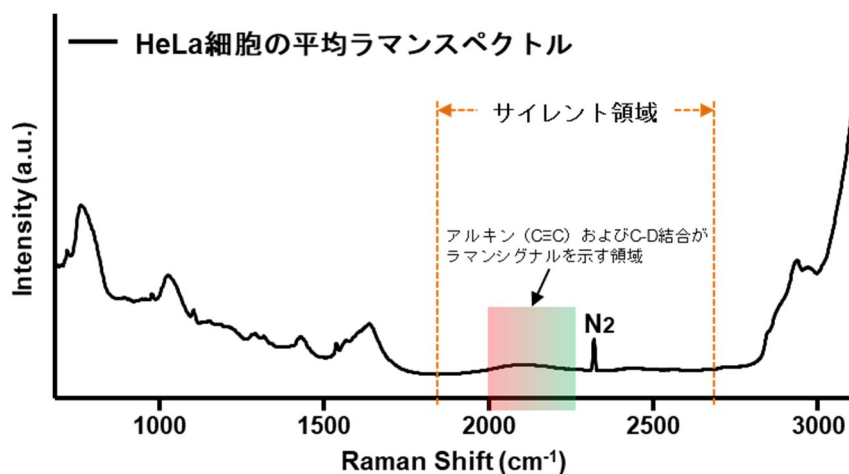


図1. 細胞内の分子がラマン振動を示さない領域とアルキンおよびC-D結合がラマンシグナルを示す領域の比較図

4. 研究成果

申請者はまず、アルキンが導入された DNA 構成成分アナログである EdU およびその重水素化体という、分子構造がほぼ変わらず検出波数の異なる 2 つのラマンプローブで 2 種の細胞をそれぞれ標識して区別する手法を試みた。重水素で置換した化合物のラマンシグナルは低波数側にシフトすることが知られていたが、アルキンについてはその報告例はなかった。そこで、EdU の重水素化を行い、そのラマンタグとしての性能を評価した。その結果、申請者の期待通りに、アルキンのラマンシグナルが 130 cm^{-1} 程度低波数側にシフトすることが明らかになった。EdU および重水素化 EdU でそれぞれ標識化した 2 種の細胞を共培養することで、本研究目的が達成できると考えられたが、残念ながら重水素化 EdU は水溶液中では短時間で EdU へと変換されてし

まい、薬剤試験のような長時間インキュベーションが必須の実験には適さないと結論付けられた。

続いて申請者は、重水素化した長鎖不飽和脂肪酸を用いて、2種間で大きく異なる細胞内局在を示すラマンプローブの開発を行った。長鎖脂肪酸は、脂肪滴の構成、生体膜の構成、エネルギー代謝、生理活性物質の生産や制御など様々な生命現象に大きくかかわっている小分子である。また、不飽和脂肪酸のビスアリル位の重水素化により生理活性物質への代謝を阻害することが報告されている。そこで申請者は、長鎖脂肪酸を重水素化したラマンプローブを用いれば、生理活性物質の生産やエネルギー代謝は抑えることができ、生体膜などの細胞組織の構成成分として細胞内のラマンプローブの集積分布を観察しやすくなると考えた。また、がん細胞と正常細胞では細胞内の環境が大きく異なるため、ラマンプローブの細胞内分布の差からそれぞれの細胞を区別できると考えて各種検討を行った。その結果、重水素化 γ -リノレン酸 (GLA) が、正常細胞である WI-38 細胞では細胞全体で検出され、WI-38 細胞をがん原性の SV40 ウイルスに感染させた VA-13 細胞では脂肪滴にのみで検出されることを見出した (図 2)。この重水素化 GLA の細胞内集積は投与から 48 時間後でも変化しないため、このラマンプローブは長時間の試験にも使用でき、また、蛍光標識で問題になっていた標識化合物の漏れ込みや再取り込みも解決できると考えられた。本研究結果を元にして今後、正常細胞とがん細胞での集積部位の差が大きい重水素化脂肪酸を開発することでより簡便に 2 種の細胞を識別できると期待された。

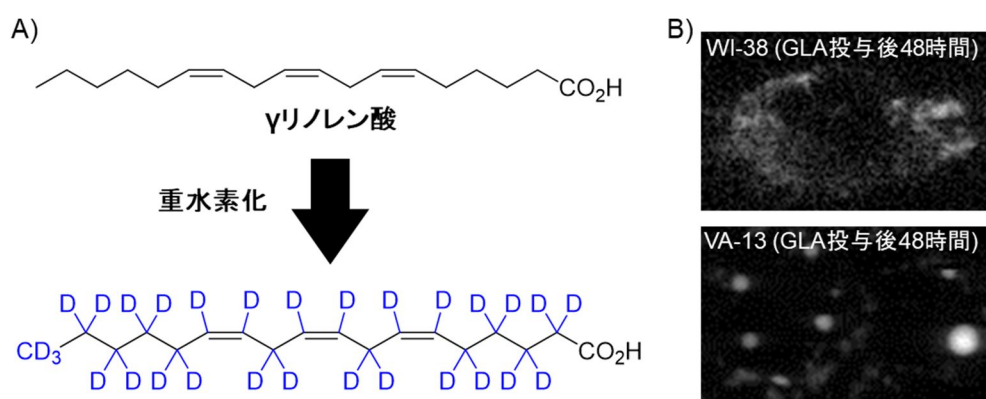


図 2 . A) GLA および重水素化 GLA の構造。 B) 重水素化 GLA の脂肪内集積分布図 (投与後 48 時間経過した各細胞内の C-D 結合のラマンシグナル強度でイメージング)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0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 Kosuke Dodo, Ayato Sato, Yuki Tamura, Syusuke Egoshi, Koichi Fujiwara, Kana Oonuma, Shuhei Nakao, Naoki Terayama and Mikiko Sodeoka	4. 巻 57
2. 論文標題 Synthesis of deuterated c-linolenic acid and application for biological studies: metabolic tuning and Raman imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 2180-2183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0cc07824g	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Toshitaka Okamura, Syusuke Egoshi, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Yoshiharu Iwabuchi and Naoki Kanoh	4. 巻 25
2. 論文標題 Highly Chemoselective gem-Difluoropropargylation of Aliphatic Alcohols	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 16002-16006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/chem.201904366	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 江越脩祐、どど孝介、袖岡幹子	4. 巻 36 (20)
2. 論文標題 生体イメージングに用いるラマンプローブ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 176-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 江越脩祐、どど孝介、大金賢司、袖岡幹子
2. 発表標題 アルキンと重水素を用いたラマンイメージング研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江越脩祐、とど孝介、大金賢司、袖岡幹子
2. 発表標題 重水素化アルキンを用いたDual Raman Imaging研究
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Syusuke Egoshi, Kosuke Dodo, Hiroyuki Yamakoshi, Yasuhiro Ishimaru, Yousuke Takaoka, Kengo Hayashi, Mikiko Sodeoka, Minoru Ueda
2. 発表標題 A novel scenario of bacterial infection in plant: Coronatine induces stomatal opening through two different target proteins in guard cells
3. 学会等名 International Chemical Biology Society (ICBS) 7th Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------