

令和元年6月12日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05852

研究課題名(和文)細胞内共生成立過程の解析のための多元素同時マイクロイメージング質量顕微鏡法の開発

研究課題名(英文) Development of multi-element micro-imaging mass microscopy for analysis of intracellular metal compartmentation

研究代表者

青木 元秀 (Aoki, Motohide)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30418917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアや葉緑体といったオルガネラを生み出した細胞内共生は、細胞の中に細胞が共生することにより新たな機能と構造を獲得する機会を生物にもたらす細胞進化の大きな原動力となっている。本研究では、細胞内共生成立過程における元素挙動解析への応用を視野に、先進的多元素同時マイクロイメージング質量顕微鏡法による細胞内元素マッピング解析技術基盤の構築に取り組んだ。構築した質量マイクロイメージングシステムを用いて、ミドリゾウリムシ細胞中の元素局在情報を2 μm分解能で取得を試み、マグネシウムが細胞内に一様に分布し、またリンが核に高濃度で存在する様子のイメージの取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内共生成立過程で金属元素が果たす役割を解明する上で、元素の局在を明らかにすることは、真核細胞の進化過程を解き明かす上できわめて興味深いテーマであったが一細胞中の微量にしか存在しない元素の局在を測定することは容易ではなかった。本研究で開発したLA-ICP-MS細胞内元素イメージング法は、ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立過程における金属元素局在解析に応用することで、情報が限られている細胞内共生成立過程における金属元素の果たす役割の解明に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The intracellular symbiosis that has produced organelles such as mitochondria and chloroplasts is a great driving force of cell evolution that provides the organism with an opportunity to acquire new functions and structures by symbiont in the host cell. In this research, with the aim of application to elemental behavior analysis in the process of establishment of intracellular symbiosis, we worked on the construction of the elemental localization mapping analysis technology base by advanced multi-element simultaneous micro-imaging mass microscopy. Using the constructed mass micro-imaging system, we try to acquire elemental localization information in Paramecium bursaria cells with 2 μm resolution. In this study, we succeeded in acquiring an image that magnesium was uniformly distributed in cells and that phosphorus was present at high concentration in the nucleus.

研究分野：生命分析化学

キーワード：質量顕微鏡 元素マイクロイメージング LA-ICP-MS 細胞内金属元素分布

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

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内共生は、現在でも多くの生物細胞同士で観察される現象である。ゾウリムシと近縁の原生動物であるミドリゾウリムシは、長径約 100-200  $\mu\text{m}$  ほどの細胞内に多数のクロレラを二次共生させる能力をもつ<sup>1)</sup>。共生クロレラは、Perialgal vacuole (PV)膜と呼ばれる宿主のリソソームが融合しない共生胞に包まれており、宿主による消化から守られている。ミドリゾウリムシは細胞内に取込んだクロレラに栄養分や二酸化炭素を供給し、入り込んだクロレラは光合成により生じる糖や酸素をミドリゾウリムシに供給する相利共生の関係にある。一方で、両者はまだそれぞれが単独で増殖できる能力を維持していることから、両者の関係が動物細胞と藻類の細胞内共生による新しい真核細胞誕生の初期段階であると考えられている。このミドリゾウリムシとクロレラは、培養や再共生が容易であることから細胞内共生の初期過程を解析するのに適したモデル生物となっている。

細胞内共生成立メカニズムに関する細胞生理学的・形態学的な知見が集積され、遺伝子発現レベルでの解析が進みつつある今、次なるステップとして、共生成立過程における物質代謝と生体物質の局在についての詳細を定量的かつ視覚的に理解したいという要求が生じる。先行研究で得られた知見に基づくと、特に、酸化還元や抗酸化に関わるタンパク質の活性中心となる金属元素が、細胞内共生成立過程において細胞内で重要な役割を果たしているものと推測されたが、その細胞内局在や機能の詳細は未解明であった。

### 2. 研究の目的

ミトコンドリアや葉緑体といったオルガネラを生み出した細胞内共生は、細胞の中に細胞が共生することにより新たな機能と構造を獲得する機会を生物にもたらす細胞進化の大きな原動力となっている。真核細胞の進化過程を解き明かす上で、細胞共生がどのように成立し、維持されているのかを分子レベルで詳細に理解することが求められる。ミドリゾウリムシとクロレラの共生メカニズムの解析の先行研究から酸化還元や抗酸化に関わるタンパク質の活性中心となる金属元素が、細胞内共生成立過程において細胞内で重要な役割を果たしているものと推測される。本課題では、細胞内共生成立過程における元素挙動解析への応用を視野に、先端的多元素同時マイクロイメージング質量顕微鏡法による細胞内元素マッピング解析技術基盤の構築に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

一般に、生体試料中の多元素同時定量は、誘導結合プラズマ(ICP)発光分光光度計 (ICP-AES) や同質量分析計(ICP-MS)により行われる。これらの手法は高感度かつ迅速に生体内金属元素の網羅的な元素プロファイルを得る(メタロミクス)手段としてはきわめて有効である。しかし、測定には試料を溶液化前処理する必要がある為に、元素の細胞内局在に関する情報が失われてしまうという問題を抱えている。一方で、水分を多く含む生体試料の元素含量を前処理なしに局的に捉えるためには、レーザー光の制御により微小域(2  $\mu\text{m}$  ~)の試料の微粒化が可能なレーザーアブレーション(LA)と ICP-MS を組み合わせた LA-ICP-MS 法が実用的な方法といえる。本研究では、四重極型 ICP-MS (iCAPQc, Thermo Fisher Scientific)に接続した ArF エキシマレーザー(スポット径 2  $\mu\text{m}$ )を装備したアブレーション(LA)装置(NWR193, ESI)に試料を導入した後に、試料上をレーザー光で走査して、元素シグナルを連続して取得した(図1)。レーザー走査中に取得される LA-ICP-MS の連続データから二次元マッピングイメージの再構成には、iQuant2<sup>2)</sup>を用いた。LA-ICP-MS 細胞内金属元素イメージング法を新たにミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立過程における金属元素局在解析に適用した。

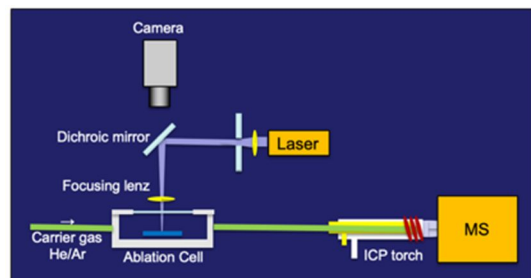


図1 LA-ICP-MSの構成スキーム

### 4. 研究成果

細胞内の主要元素を測定する際の、レーザーアブレーション用の専用試料台表面への細胞の整列化技術について検討した。従来、細胞を試料台に細胞を積載すると、無秩序に固定化されるため、連続して細胞を分析することが困難であった。そこで、多数の細胞を1細胞ずつに分画、整列させる新規なマイクロデバイスを新規に作製し、レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析計(LA-ICP-MS)を用いてマイクロデバイス上に配列させた細胞試料中の多元素同時検出を試みた。清浄なシリコンウェハー上にリソグラフィ技術により細胞をトラップする微細構造を構築し、専用アプリケーションを用いることで細胞を試料台上に効率よく整列させることに成功した(図2)。

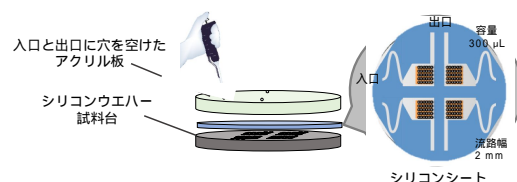


図2 LA-ICP-MS用細胞トラッピングデバイス

ミドリゾウリムシの細胞培養液を試料ステージに導入して、超純水で水洗した後に、風乾して細胞を固定したものを分析試料とした。ミドリゾウリムシ細胞中のリン、マグネシウムおよび亜鉛の元素局在情報を 2 μm 分解能で取得を試みたところ、マグネシウムが細胞内に様に分布し、またリンが核に高濃度で存在する様子のイメージの取得に成功した(図3)。さらに、亜鉛は細胞内で数 μm の多数の顆粒として存在することが示唆された。

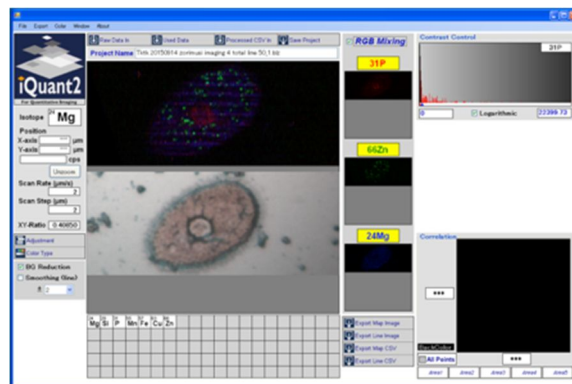


図3 ミドリゾウリムシの細胞内元素イメージング

これまで、細胞内共生成立過程で金属元素が果たす役割を解明する上で、元素の局在を明らかにすることは、真核細胞の進化過程を解き明かす上できわめて興味深いテーマであったが一細胞中の微量にしか存在しない元素の局在を測定することは容易ではなかった。本研究で開発した LA-ICP-MS 細胞内元素イメージング法は、ミドリゾウリムシとクロレラの細胞内共生成立過程における金属元素局在解析に応用することで、情報が限られている細胞内共生の成立過程における金属元素の果たす役割の解明に貢献できると期待される。

#### 引用文献

- 1) Kodama and Fujishima, *International Review of Cell and Molecular Biology*, **279**, 33-77 (2010)
- 2) Aoki *et al.*, *J. Asian Earth Sci.*, **97**, 125-135. (2014)

#### 5 . 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Murota, C., Fujiwara, S., Tsujishita, M., Urabe, K., Takayanagi, S., Aoki, M., Umemura, T., Eaton-Rye, J.J., Pitt, F.D., Tsuzuki, M. (2019) Hyper-resistance to arsenate in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is influenced by the differential kinetics of its pst-ABC transporters and external phosphate concentration exposure, *Algal research*, **38**, 101410.
- 2) Hirose, A., Kasai, T., Aoki, M., Umemura, T., Watanabe, K., Kouzuma, A. (2018) Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nat Commun* **9**:1083.
- 3) Aoki, M., Sato, N. (2018) Fatty Acid Content and Composition of Triacylglycerols of *Chlorella kessleri*. *Bio-Protocol* **7**:1-9.

##### 〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 青木 元秀, 末永 祐磨, 守屋 翔平, 梅村 知也, 沖野 晃俊, 同軸型光ファイバーピックアップ内蔵 DBD プラズマ源の応用, 第 79 回分析化学討論会, 2019/5/18-19, 北九州国際会議場 (福岡)
- 2) 吉田 真優子, 末永 祐磨, 青木 元秀, 沖野 晃俊, μ-TAS 用微小プラズマ励起源のためのインバータ電源開発と特性評価, 第 79 回分析化学討論会, 2019/5/18-19, 北九州国際会議場 (福岡)
- 3) 谷口 紀恵, 熊田 英峰, 内田 達也, 青木 元秀, 梅村 知也, シアノバクテリアの脂質プロファイリングに基づく化学物質の生態影響評価手法の開発, 第 29 回クロマトグラフィー科学会議, 2018/11/7-9, 穂の国とよはし芸術劇場プラット (愛知)
- 4) 谷口 紀恵, 熊田 英峰, 内田 達也, 青木 元秀, 梅村 知也, シアノバクテリアのリピドミクスに基づく金属ストレスバイオマーカーの探索 ~メタロミクスとリピドミクスを融合した統合オミックスへの新展開に向けて~, 第 6 回メタロミクス研究フォーラム, 2018/11/1-2, 東京薬科大学 (東京)
- 5) Motohide Aoki, Kie Taniguchi, Erika Hagiuda, Hidetoshi Kumata, Tatsuya Uchida, Tomonari Umemura, Lipid Profiling of a Cyanobacteria *Synechocystis* PCC6803 Exposed to Hazardous Chemicals and Pharmaceutical and Personal Care Products, The 23rd International Symposium on Plant Lipid (ISPL2018), 2018/7/8-13, Osanbashi Hall, Yokohama.
- 6) 青木 元秀, 谷口 紀恵, 萩生田 絵里佳, 熊田 英峰, 内田 達也, 梅村 知也, 化学物質の生態系影響評価のためのシアノバクテリア脂質 バイオマーカーの探索, 第 60 回日本脂質生化学会, 2018/5/31-6/1, 八王子 (東京)
- 7) 青木 元秀, 高月 駿, 横納 好岐, 片山 由美子, 塚原 美紀, 平田 岳史, 梅村 知也, レーザーアブレーション ICP-MS によるミドリゾウリムシの単一細胞元素イメージング, 第 5 回メタロミクス研究フォーラム, 2017/11/25-26, 京都薬科大学 (京都)

- 8) 岡部 すみれ, 朱 彦北, 河本 梨夏, 熊田 英峰, 内田 達也, 青木 元秀, 梅村 知也, LA-ICP-MSによる単一細胞メタロミクス解析手法の開発, 第5回メタロミクス研究フォーラム, 2017/11/25-26, 京都薬科大学(京都)
- 9) Motohide Aoki, Nanako Matsumoto, Kaho Bessho, Hidetoshi Kumata, Tatsuya Uchida, and Tomonari Umemura, Preparation and Characterization of Organic Polymer-Based Adsorbent with Phenylboronic Acid Functionality for Capturing Biological Cis-Diol-Containing Compounds, The 13th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII), 2016/12/8-11, Makuhari Messe, CHIANG MAI, Thailand.
- 10) 片山 由美子, 高月 駿, 榎納 好岐, 塚原 美紀, 青木 元秀, 梅村 知也, 平田 岳史, レーザーアブレーション ICP-MS によるミドリゾウリムシの元素イメージング, プラズマ分光分析研究会 2016 筑波セミナー in 幕張, 2016/09/06, 幕張メッセ(千葉)

〔図書〕(計 1件)

- 1) T. Umemura, Y. Matsui, S. Sakagawa, T. Fukai, E. Fujimori, H. Kumata, M. Aoki, Metallomics, Recent Analytical Techniques and Selected Applications (Edited by Y. Ogra and T. Hirata), Chapter 11: Comprehensive Element Analysis of Prokaryotic and Eukaryotic Cells as well as Organelles by ICP-MS, pp. 219-237, Springer (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: サンプル中の元素の質量分析方法、該質量分析方法に用いる分析用デバイス、および、サンプル捕捉用キット

発明者: 安井 隆雄, 馬場 嘉信, 青木 元秀, 梅村 知也

権利者: 安井 隆雄, 馬場 嘉信, 青木 元秀, 梅村 知也

種類: 特許

番号: 2018-210123

出願年: 2018

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ls.toyaku.ac.jp/~bioanalchem/aoki/research/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

研究代表者氏名: 青木 元秀

ローマ字氏名: Motohide Aoki

所属研究機関名: 東京薬科大学

部局名: 生命科学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 30418917

### (2) 連携研究者

連携研究者氏名: 梅村 知也<sup>1</sup>, 沖野 晃俊<sup>2</sup>, 安井 隆雄<sup>3</sup>, 馬場 嘉信<sup>3</sup>, 平田 岳史<sup>4</sup>

ローマ字氏名: Tomonari Umemura, Akitoshi Okino, Takao Yasui, Yoshinobu Baba, Takafumi Hirata

所属研究機関名: <sup>1</sup>東京薬科大学, <sup>2</sup>東京工業大学, <sup>3</sup>名古屋大学, <sup>4</sup>東京大学

### (3) 研究協力者

研究協力者氏名: 榎納 好岐<sup>1</sup>, 高月 駿<sup>2</sup>

ローマ字氏名: Yoshiki Makino, Syun Takatsuki

所属研究機関名: <sup>1</sup>東京大学, <sup>2</sup>京都大学

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。