

小角 X 線散乱による生きた細胞の微細構造センシング

中田 克*¹
Nakada Masaru

松村 和明*²
Matsumura Kazuaki

1. はじめに

細胞は細胞膜や細胞質、細胞小器官等様々な部分から構成されている。このような構造を「細胞の微細構造」と呼び、細胞の様々な機能を発現するために重要な役割を果たしている。これまで細胞の微細構造を観察するためには、電子顕微鏡や蛍光顕微鏡が用いられており、重要かつ広範な細胞微細構造に関する知見が得られている。

電子顕微鏡では nm スケールの高解像度観察が可能である。しかし、電子線を用いる都合から超高真空下、あるいは凍結環境での観察が必須であり、また、化学的な固定や切片作製等煩雑な前処理を要することが一般的である。したがって、生きたままの細胞を観察することは不可能である。

他方、蛍光顕微鏡は生きた細胞をそのまま培養環境下で観察することが可能である。しかし、可視光の光学的限界から解像度はサブ μm スケールに限定される。また、生体分子が自家蛍光を発するケースは限られており、一般的には蛍光分子で特定の生体分子を標識することが求められる。温度や pH、イオン強度等、特殊な環境下でも活性を維持した蛍光標識を探索・選定することは困難な場合もあり、更に多くの場合で蛍光標識分子は生体分子に対して大きく、かつ親水的であるため、細胞の微細構造を変化させていないかは慎重に検証される必要がある。

前述のような顕微鏡観察の課題を解決するために、非染色、nm スケール、様々な環境下での生きた細胞の構造解析を目指し、筆者らは、小角 X 線散乱法 (Small-angle X-ray Scattering (SAXS)) による細胞の微細構造解析の技術開発を行っている。

2. 小角 X 線散乱法による生体構造解析

生きた細胞への SAXS は、1983 年に Langmore らによって行われており、約 30 nm の大きさの構造体が検出された¹⁾。当初、この構造はクロマチン線維由来である可能性が示唆されていたが、Joti らが行った抽出・分画した細胞核の SAXS の研究から、リボソームタンパク質由来ということが明らかになった²⁾。顕微鏡のような実空間での画像が得られる直接観察法と比べて、SAXS では位相問題によって実空間の情報は得られず、データの解釈は困難であることが多く、また、細胞内の多様かつ複雑な微細構造のため、SAXS による生細胞の研究は Langmore ら以降ほとんど例がなかった。

しかしながら、SAXS は多くの生体材料や組織の構造解析に用いられており、例えば、タンパク質の溶液中でのサイズや形状³⁾、筋肉⁴⁾ や骨⁵⁾、皮膚⁶⁾ 等の繊維構造や層構造の研究は盛んに行われている。また、近年ドラッグデリバリーシステム (DDS) で注目されているリボソームや脂質ナノ粒子、エクソソーム等のベシクル粒子の脂質膜構造の密度分布解析にも有効に活用されている⁷⁾。更には明瞭な形状を持たない相分離や濃度ゆらぎのような構造的特徴の評価にも強力なツールである。

したがって、細胞内におけるタンパク質や核酸等の生体分子の溶液構造や細胞膜、更には近年新たな細胞生物学として注目されている相分離生物学の観点⁸⁾ から、筆者らは SAXS には細胞の微細構造を観察できるポテンシャルがあることを期待している。

3. 細胞の浸透圧応答

細胞周囲の浸透圧が変化すると、細胞はその大きさを変化させて外部環境になじむように調節することはよく知られている細胞応答である。浸透圧変化は、単純で様々な状況で起こり得る現象であるにもかかわらず、未だに浸透圧が細胞に及ぼす影響の研究が行われており、細胞膜の張力⁹⁾や細胞内のタンパク質の凝集状態¹⁰⁾が変化することが報告されている。更に近年発展が目覚ましい新規モダリティ医薬品分野において、浸透圧が抗体タンパク質の産生や細胞成長の促進にも寄与し、浸透圧による細胞への影響は未だに重要な研究対象である。

そこで筆者らは、浸透圧によって細胞の微細構造がどのように変化するのかを対象として、SAXSを用いた構造解析を行った¹¹⁾。

4. 生きた細胞の小角 X 線散乱

SAXS 実験は、兵庫県播磨の大型放射光施設 SPring-8 の BL08B2 を用いて行った。BL08B2 は兵庫県が保有する専用ビームラインで、偏光電磁石で発生する放射光（ペンディング光）を光源としている。SPring-8 には、より高輝度なアンジュレータ光源のビームラインも設置されているものの、筆者らが対象とする細胞懸濁液のような溶液や生体試料では、試料の放射線ダメージが避けられないため、このようなケースでは試料ダメージ抑制の点からペンディング光源は依然として有効に活用できると考える。

細胞は抗体医薬品の生産に広く利用されているチャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO 細胞）を用いた。培養フラスコで培養した CHO 細胞をビームラインに搬送し、現地で細胞を回収した。回収した CHO 細胞を、イオン強度を変えたリン酸緩衝液（PBS）に懸濁して懸濁液試料を調製し、直径 2 mm φ の X 線回折用石英キャピラリーに注入した。ここで、測定に用いた細胞の量は 10^5 cells 程度であった。波長 1 Å の X 線を細胞懸濁液に 10 s 照射することで明瞭な小角散乱像を取得することができた。図 1 に SAXS 実験の模式的なイメージと散乱像を示した。SAXS からは 1~10 nm オーダーの構造情報が得られるが、より大きい構造スケール

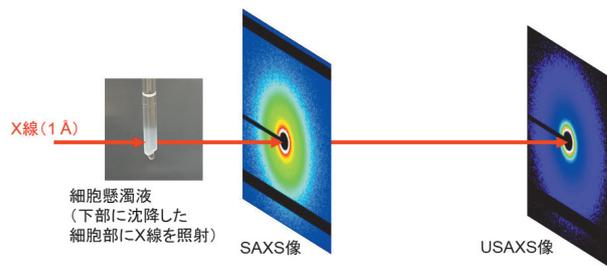


図 1 SAXS 実験の模式図

SAXS は試料-検出器間距離が約 2 m、USAXS は約 16 m で設定した

（<数百 nm）の情報も取得するため、極小角 X 線散乱（Ultra SAXS (USAXS)）も別途実施した（以降、便宜上特に区別せずに両者合わせて SAXS と記載する）。

ここで、前述のように細胞懸濁液での放射線ダメージを懸念するのであれば、中性子線を用いることも考えられるが、中性子は放射光 X 線に比べて散乱感度が低いため、 10^8 cells 程度の細胞量や、数 10 分~1 時間程度の積算時間を要することが想定され、試料準備コストや測定中の細胞の状態の検証が課題となる。ただし、中性子線では同位体でコントラストが変えられることや、ps~ns の動的構造解析も可能であり、X 線散乱では得られないユニークな情報も得られるため、将来的には中性子散乱の活用も重要であると考えられる。

5. 細胞の微細構造の浸透圧応答

SAXS 像を 1 次元化した散乱強度プロファイルを見ると、細胞の nm スケールの構造由来の散乱を明瞭に観測することができ、浸透圧に応じて敏感に変化していることが確認できた（図 2）。最も特徴的な散乱ベクトル q ($=4\pi \sin \theta / \lambda$; θ は散乱角 2θ の半値、 λ は X 線波長 (1 Å)、 q が小さいほど大きい構造を反映) $\sim 0.2 \text{ nm}^{-1}$ のピークは Joti ら²⁾によってリボソームと帰属されたピークであると類推され、浸透圧が高くなるにしたがって高い q 側にシフトしていることからリボソームの大きさが小さくなっていると考えられる。慣性半径について、等張圧 ($\times 1$) では 10.4 nm と見積もられ、一般的な哺乳動物の 25 nm (半径で 12.5 nm) と同等の値であった¹²⁾。低張圧 ($\times 0.25$) と高張圧 ($\times 4$) ではそれぞれ 11.5 nm, 7.6 nm と見積もられ、高浸透圧では約 3 nm も小さくなっていることが示唆された。リ

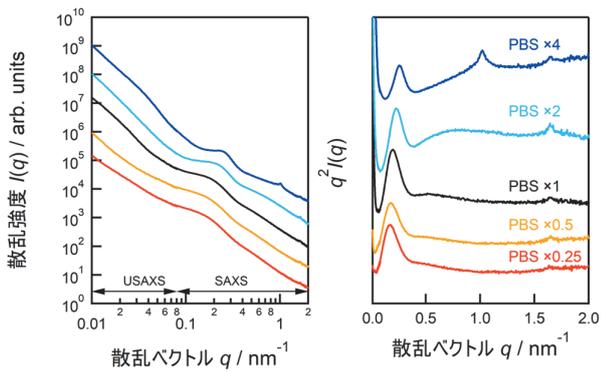


図2 浸透圧によるCHO細胞のSAXSプロファイルの比較

左は対数-対数プロット、右はピークの特長を見やすくするため Kratky プロットで表示した。PBS× n の n はイオン強度の大きさであり、 $n=1$ が等張、1より大きいと高張圧、小さいと低張圧である

ボソームピークの詳細な解析から、浸透圧が等張圧以上の環境では、リボソームの大きさだけでなく、リボソーム間の干渉による散乱信号も含まれていることが分かった。このリボソームのサイズ低下やリボソーム間の干渉構造の出現は、高浸透圧ストレス下におかれた細胞内でリボソーム衝突^{10,13})が起こっていることを観測できた可能性があり興味深い結果である。今後、この現象をより詳細に解析することで、細胞内外の環境変化によるストレス応答や、それに関連する疾患メカニズムの解明に貢献が期待される。

次に特徴的な散乱信号は、 $q \sim 1.7 \text{ nm}^{-1}$ のピークとPBS×4の高浸透圧下でのみ $q \sim 1.0 \text{ nm}^{-1}$ に観測されたピークである。前者のピークは、約4 nmの周期間隔を持つ周期的な構造に由来しており、DNAの二重らせんの周期構造であると考えられる。このピーク位置は浸透圧による変化が認められなかったことから、DNA二重らせん構造は、浸透圧に対して鈍感な応答を示すと推定される。この結果は、従来のDNAの高次構造評価方法が、DNAを細胞核から抽出したり、化学的に標識したりする必要があることを考慮すると、細胞内で非破壊的に細胞外環境によるDNA構造を評価できる点で有望であると考えられる。

後者の $q \sim 1.0 \text{ nm}^{-1}$ のピークは、約6 nmの周期的構造に由来する。このような散乱は、例えばリボソームがマルチラメラ構造を呈したときにそのラメラ周期を反映して観測される⁷⁾ことから、高浸透圧下で収縮した細胞膜が折り畳まれたことでラメラ構造

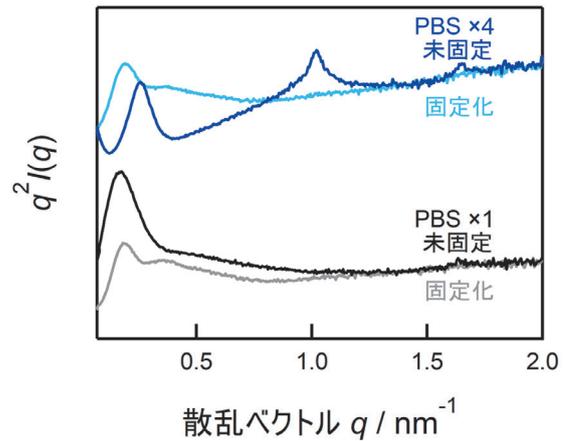


図3 ホルムアルデヒド固定したCHO細胞のSAXSプロファイル

を形成していると推察した。この検証のため、筆者らは1)ホルムアルデヒド固定(図3)、2)凍結、あるいは加熱(図4)したCHO細胞について同様にSAXS測定を行った。

両者の検証の結果から、1)ホルムアルデヒド固定したCHO細胞では、細胞膜も固定化されており浸透圧による収縮が起こらず、細胞膜の折畳みラメラ構造のピークも出現せず、2)凍結、あるいは加熱によって細胞膜の折畳みラメラ構造が破壊され、それぞれ融解や冷却後には当該ピークが消失していることを確認でき、期待どおり $q \sim 1.0 \text{ nm}^{-1}$ のピークが細胞膜の折畳みラメラ構造由来であることを傍証することができた。

両検証において、前述の細胞膜のラメラ構造の変化以外にSAXSプロファイルが顕著に変化していることが認められた。これはホルムアルデヒド固定や凍結、加熱による細胞の微細構造変化をSAXSで検出できることを示唆しており、このような特殊環境下での細胞の微細構造解析法としてのSAXSの優位性を期待させる結果である。

最後に、細胞内相分離による構造が $q < 0.08 \text{ nm}^{-1}$ や $q > 0.3 \text{ nm}^{-1}$ にブロードな散乱信号(両対数プロットでは単調減少)として検出されており、前者は100 nm、後者は数nmの相分離の相関長を有している。100 nmの相分離は浸透圧が高くなるにしたがって散乱強度が増強し、高浸透圧下で誘起される相分離構造であると考えられる。一方、数nmの構造は高浸透圧下で高 q シフトが認められ、浸透圧効果で

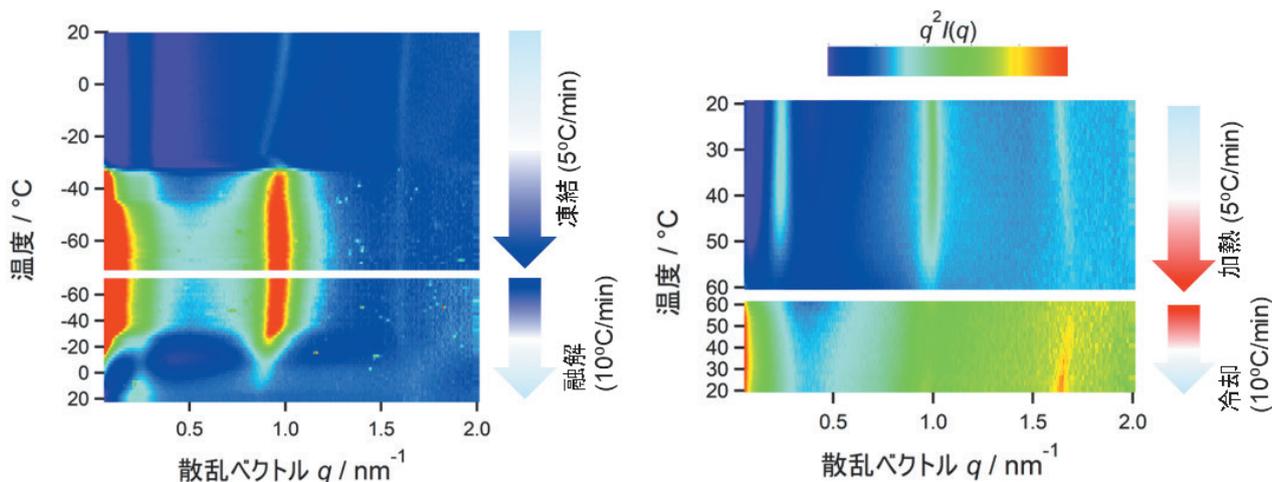


図4 高浸透圧下 (PBS×4) のCHO細胞のSAXSプロファイルの温度依存性

左は凍結-融解過程, 右は加熱-冷却過程である。凍結-融解過程において, $-30\sim-70^{\circ}\text{C}$ と $-70\sim0^{\circ}\text{C}$ の散乱強度が強い温度帯では, 試料が凍結 (氷晶形成) している

圧縮される構造であることが想起される。これらの相分離構造は, 細胞内のタンパク質や核酸等の凝集・分散によると推察される。

6. まとめ

筆者らは, 生きた細胞内の様々な微細構造がどのような浸透圧応答を呈するかについて, SAXSを用いることでその構造変化のセンシングに成功した。SAXSから得られるデータが1次元的な散乱強度プロファイルであるため, 顕微鏡観察のように直感的な解釈は困難であろう。しかしながら, 細胞内のnmスケール微細構造を, 生きたまま, かつ非標識で観察できること, 更には温度やpH等細胞外環境に依らずに観察・比較できることは非常にユニークである。細胞外環境の変化による細胞微細構造の応答を俯瞰的に調べられることは特に有用であろう。従来の顕微鏡法と組み合わせることで新たな細胞生物学の知見が得られると期待される。

CHO細胞の浸透圧応答として, タンパク質や核酸の大きな相分離の発現や細胞膜のラメラ構造の形成に関する知見は, 抗体や核酸, エクソソーム等新

規モダリティ医薬品の産生メカニズムや製造プロセスに関連する知見の可能性がある。興味深い結果であり, 今後の新規モダリティ医薬品や再生医療分野での貢献を期待したい。

参考文献

- 1) Langmore JP., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **96**(4), 1120-1131 (1983)
- 2) Joti Y., *et al.*, *Nucleus*, **3**(5), 404-410 (2012)
- 3) Xu AY., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **16**, 4319-4338 (2019)
- 4) Ma W., *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(6), 3052 (2022)
- 5) Wang X., *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, **31**, 2010068 (2021)
- 6) Hallan SS., *et al.*, *Nanomaterials*, **11**, 171 (2021)
- 7) Komorowski K., *et al.*, *Biophys. J.*, **114**, 1908-1920 (2018)
- 8) Brangwynne GP., *et al.*, *Science*, **324**, 1729-1732 (2009)
- 9) Roffay C., *et al.*, *PNAS*, **118** (47), e2103228118 (2021)
- 10) Yasuda S., *et al.*, *Nature*, **578**, 296-300 (2020)
- 11) Nakada M., *et al.*, *Biophys. Chem.*, **312**, 107287 (2024)
- 12) Freitas RA., *et al.*, *Kinematic Self-Replicating Machines*, *Landes Bioscience, Georgetown* (2004)
- 13) Best K., *et al.*, *Nat. Commun.*, **14**, 921 (2023)

(*¹(株)東レリサーチセンター 構造化学研究部,

*²北陸先端科学技術大学院大学)