

DNP-SANS による細胞内氷晶の構造解析(トライアルユース)

株式会社東レリサーチセンター 中田 克

1. Introduction

細胞や臓器の凍結保存は、畜産、食品および再生医療分野において、貴重な細胞や食料資源を長期・安定的に保管・使用するために重要な技術である。凍結保存における細胞障害としては、主に細胞内での氷晶形成による細胞内構造や細胞膜が物理的に破壊されることが懸念されている。凍結保存時における細胞保護を目的として使用される凍結保護剤は、主に細胞内氷晶形成を抑制することをターゲットとして研究・開発が進められている。しかし、細胞の凍結保存過程においては凍結保護剤そのものの細胞毒性や細胞内外の浸透圧バランスによる細胞の体積変化・脱水、酸化ストレスなどによる障害などさまざまな物理的、生物的な要因が競合的に細胞障害を引き起こしていると考えられ、凍結保存における細胞障害の詳細メカニズムは未解明の課題である。

凍結保護剤は 1949 年の Polge ら(Nature, 164(1949)666)によるグリセロールの凍結保護効果の発見を契機にジメチルスルホキシド(DMSO)、エチレングリコールやプロピレングリコールなど低分子系保護剤、さらにはポリエチレングリコールやポリビニルピロリドン(PVP)などの高分子系保護剤の研究・開発が行われている。凍結保存は実施者の経験・手技によるところが多く、またいかなる細胞をも対象とした保護剤や保存法開発には至っていないのが現状である。その研究の多くは実際に細胞を凍結保存し、融解後の生存率や機能発現を調べるという試行錯誤によるところが多く高コストなものである。凍結保護剤の開発促進のためには、保護剤による細胞障害抑制効果の物理的な評価法を確立し、保護メカニズムを解明することが重要である。申請者は保護剤として PVP を用いた凍結細胞について、SPring-8 BL24XU の μ -ビーム X 線回折により細胞内外の氷晶構造解析を行い、細胞内の氷の結晶子サイズが細胞外に比べてわずかに小さいことを見出した(低温生物工学会誌, in press)。しかし、 μ -ビーム X 線回折では 1 個の細胞のみを対象としており、統計精度に不安が残っている。

そこで本課題では細胞懸濁液中の多数の細胞を対象としながら、細胞内の氷晶構造情報を選択的に抽出することを目的として動的核スピン偏極小角中性子散乱(DNP-SANS)を実施した。

2. Experiment

培養したマウス胎仔胚由来の C3H10T1/2 細胞を回収し、TEMPOL とラジカルクエンチャー(Mn-EDTA)を添加した 50wt% PVP/PBS 溶液で懸濁し、懸濁液試料を調製し、4 K と 1.2 K で DNP-SANS/WANS 実験を実施した。加速器出力は 650 kW であり、各条件で 1.5 時間積算した。また、予備実験として細胞無しの PVP/PBS 溶液についてクエンチャー有無による DNP-NMR で H 偏極率(PH)を測定し、4 K においてクエンチャー無溶液では ± 10 %程度偏極された一方で、クエンチャー有溶液では ± 3 %程度に偏極を抑制できていることを確認した。1.2 K ではクエンチャー有溶液でも 60 %程度偏極され、クエンチャー無溶液では 70 %程度と依然として一定のクエンチャーによる偏極抑制効果があると考えられる。

なお、ESR 予備実験で TEMPOL は細胞内外に均一分布できるが、クエンチャーは細胞内に侵入できず、細胞外の TEMPOL はクエンチャーによってスピンの失活していることを確認している。

3. Results

DNP-SANS データを Fig. 1 に示す。偏極率に応じて非干渉性散乱や小角散乱強度が変化しており、

偏極コントラスト変調できていることがわかる。ESR と DNP-NMR の予備検討から、4 K では細胞内のみ偏極コントラスト変調されているとすると、顕著な散乱強度の変化は確認されておらず、細胞内では数 10 Å オーダーの氷晶は存在していない可能性が示唆された。一方で 1.2 K では顕著な小角散乱強度の変化が確認されており、細胞外では数 10 Å オーダーの氷晶が形成されている可能性が示唆された。

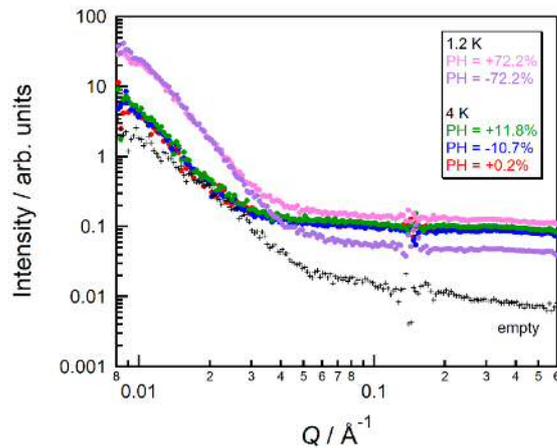


Figure 1. SANS data for cell suspensions of 50wt% PVP/PBS solution with TEMPOL and Mn-EDTA at various PH.

4. Conclusion

本課題では、ラジカルクエンチャーを用いて TEMPOL などラジカルの電子スピンを失活させることで、DNP を抑制できることが確認できた。細胞内の氷晶構造については、散乱コントラストを詳細に評価し、偏極率が異なる SANS データの差し引きした解析を継続する。

細胞無の溶液でクエンチャー有無による偏極率の評価を行ったが、細胞懸濁液において細胞内外がそれぞれどのように厳密には検討できておらず、散乱コントラストの評価が困難なことが予想される。今後、偏極率の懸濁液の細胞濃度依存性を評価することが重要であると考えられる。