

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06828

研究課題名(和文) 神経細胞局所で脂質分子分布の偏りを作り・維持するシステムの分子解剖学的研究

研究課題名(英文) The study of the molecular mechanism maintaining the anisotropic distribution of lipids on neurites

研究代表者

堀川 誠 (Horikawa, Makoto)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・特任助教

研究者番号：50775997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光標識脂肪酸を用いたタイムラプス観察により、神経細胞の神経突起上には細胞体側から突起先端に向けて脂質を輸送するメカニズムがある事を明らかにした。この神経突起上1本ごとの網羅的な脂質分子分布観察を行うために質量顕微鏡法の高解像度化を試み、電子顕微鏡観察の細胞試料調製法を応用する事でTOF-SIMS観察により小胞体など細胞の超微形態に対応した脂質分子の網羅的観察や神経突起上の複数の脂肪酸分子分布の観察を200～500 nmの空間解像度で観察する事に成功した。一方、飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸と比べて多価不飽和脂肪酸の検出が困難である事などの今後の課題も明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、神経突起上の脂質分子輸送には異方性がある事が明らかとなった。また、本研究で開発された細胞試料調製法を応用したTOF-SIMS観察により神経突起1本ずつの脂質分子分布を網羅的に観察できる事を明らかにした。さらに、小胞体など細胞の微細構造に対応した脂質分子分布も数百nmの空間解像度で観察できる事を明らかにした。電子顕微鏡法と同様に、質量顕微鏡法においても試料調製が高解像度化において極めて重要である事を明らかにし、適切な前処理を行う事で神経突起のような微細構造に対しても質量顕微鏡観察が可能である事を実証した。

研究成果の概要(英文)：By time-lapse microscopy using a fluorescent-tagged fatty acid, we found there is an unknown delivery mechanism of lipid molecules from the cell body to the tip of the neurite in the nerve cells. To observe the distribution of lipid molecules on the neurites comprehensively, we developed a novel cell sample preparation method for TOF-SIMS analysis by applying the sample pre-treatment method of electron microscopy. Using this new method, we successfully observed the distribution of lipid molecules corresponding to the ultrastructure of cells such as the endoplasmic reticulum at a spatial resolution of 200 to 500 nm by TOF-SIMS. We could also visualize the distribution of multiple fatty acids on the neurites using the combination of TOF-SIMS and the new method. However, we faced another difficulty that it was harder to detect polyunsaturated fatty acids as compared with saturated- and monounsaturated fatty acids.

研究分野：分子イメージング

キーワード：イメージング 質量顕微鏡法 脂質 神経

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の顕微鏡的解剖学技術は飛躍的發展を遂げており、細胞から分子に至るまで幅広いスケールにおいて網羅的かつ空間的に観察する事を可能にしている。超解像顕微鏡技術は細胞内の分子分布に関して光学的限界を超えた解像度で捉える事を可能にし、二光子顕微鏡技術は様々な蛍光タンパク質プローブとの併用により、生体において脳深部の神経活動のライブ観察すら可能にした。組織透明化技術は、マウス脳のような巨大な神経組織内における神経細胞の配置や種類を網羅的かつ立体的に観察する事を可能にした。そして、新しい分子解剖学的技術である質量顕微鏡法により、これまで困難であったタンパク質以外の生体小分子の分布を分子標識無しに、組織レベルから細胞レベルに至る幅広いスケールで網羅的に捉える事を可能にしている (Taira et al., Anal Chem 2008; Ide et al, Surf Interface Anal 2014)。

この質量顕微鏡法を用いた先行研究により、神経細胞の神経突起上ではリン脂質の脂肪酸側鎖の違いによりその分布が異なる事が報告されている (Yang et al, J Biol Chem 2012)。さらに近年、杉山らはマイクロ流路デバイスを用いて安定同位体標識脂肪酸を神経細胞の局所に添加し、質量顕微鏡解析を行う事で、神経突起上の脂肪酸分子は細胞側から神経突起先端側に極性をもって分布する事を明らかにした (Sugiyama et al., BBRC 2018)。しかし、脂肪酸側鎖の異なるリン脂質がどのように輸送・偏在し、維持されていくのかはいまだに殆ど明らかになっていない。また、上述の研究で用いられた質量顕微鏡法の一種である MALDI-IMS (matrix-assisted laser desorption ionization-Imaging Mass Spectrometry: マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量顕微鏡法) は空間解像度が 10 μm 程度であり、太さが数 μm の神経突起の観察には解像度が十分ではない事も指摘されていた。

2. 研究の目的

(1) マイクロ流路デバイスを用いた標識化脂質の局所添加とライブイメージングの組み合わせにより脂質分子分布の動的変化を観察する事で、脂肪酸組成の異なるリン脂質分子を神経突起上に偏在させるメカニズムが輸送によるものか自然拡散によるものかを明らかにする。

(2) 質量顕微鏡法の高解像度化により神経突起一本ごとの網羅的な脂質分子分布を可能にする技術を開発し、神経突起上における脂質分子分布をより詳細に明らかにする。そして、これらの成果をまとめて神経突起上で脂肪酸組成の異なるリン脂質分子を偏在させ、維持するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) これまでの細胞局所における脂質分子分布を観察した研究では、未処理の細胞や細胞全体に脂質分子が投与された条件および脂質代謝変異を持った細胞株などが用いられてきた。しかし、近年開発されたマイクロ流路デバイスを用いる事で、神経細胞の細胞体のみまたは神経突起のみといった局所に生体分子を添加する事が可能になった (図 1)。本研究ではマイクロ流路デバイスを用いて蛍光標識脂質を細胞体側または神経突起先端へ局所添加を行い、ライブイメージングにより神経突起上での脂質輸送に異方性があるかを明らかにする。

(2) 前述したように、現在最も幅広く用いられている MALDI-IMS 法は原理的に空間解像度の限界が 10 μm 程度であり、細胞内の生体分子観察には空間解像度が不十分である事が知られている。MALDI-IMS 法よりも高空間解像度をもつ質量顕微鏡法として TOF-SIMS

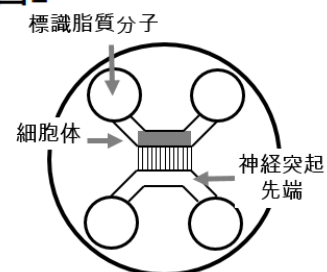
(Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: 飛行時間型二次イオン質量分析法) が知られており、理論上は光学顕微鏡と同等の 100 nm 程度まで解像度を上げる事が可能である。一方、これまでの TOF-SIMS 法を用いた観察においては細胞内小器官などの超微形態を反映した生体分子分布観察は達成できていない (Masaki et al., Sci Rep 2015)。そこで、従来の質量顕微鏡で行われてきた試料調製法とは異なる、TOF-SIMS 法に最適化された試料調製法の開発が必要であると考えた。本研究では TOF-SIMS 法と電子顕微鏡法の観察環境に類似性 (真空・ビームを対象に照射するなど) がある事に着目し、電子顕微鏡法で用いられる細胞試料調製法を応用する事で細胞内の脂質分子分布を固定したまま TOF-SIMS 観察を可能にする新しい細胞試料調製法を開発し、その有効性を実証するとともに神経突起上において nm スケールでの脂質分子分布観察を試みる。

4. 研究成果

(1) 脂肪酸は神経突起上で順行方向に輸送される

マイクロ流路デバイスの流路上に神経突起を伸長させた後、蛍光標識脂肪酸 (BODIPY-C16) を細胞体または神経突起先端にそれぞれ添加し、ライブイメージングにより神経突起上の蛍光シグナルの変化を観察した。その結果、細胞体に蛍光標識脂肪酸を添加した場合は 1 時間以内に神経突起の先端付近まで蛍光シグナルが移動する事が観察されたのに対し、神経突起先端側に蛍光標識脂肪酸を添加した場合は 3 時間以上経過しても蛍光シグナルが細胞体に達する事は無かった (図 2)。こ

図 1

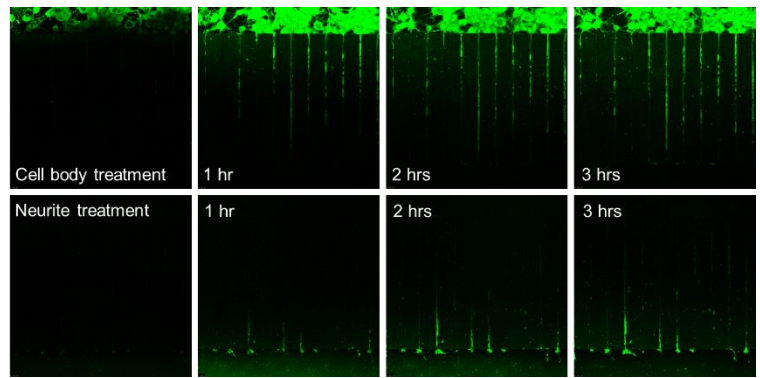


これらの事から、神経突起上の脂質分子は動的にも異方性があり、細胞体側から神経突起先端への順行方向に脂質を輸送するメカニズムが存在する事が示唆された。

(2) TOF-SIMS 法に適した細胞試料調製法の開発

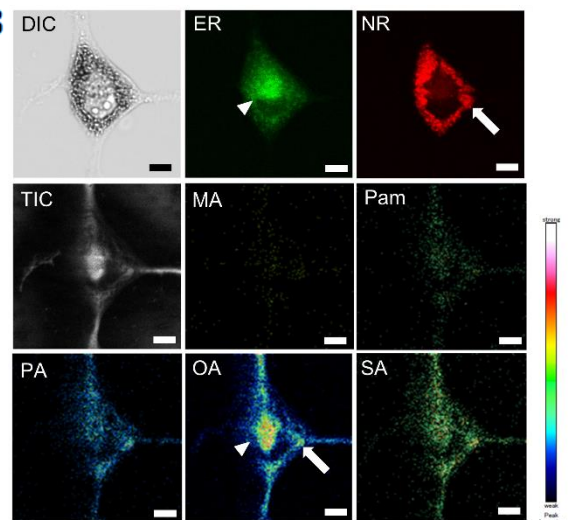
電子顕微鏡法では、前処理として細胞試料をグルタルアルデヒドや酢酸ウラニル、オスミウム酸などで固定する事により超微形態を保持したままの観察が可能となる。本研究では最初に酢酸ウラニル処理とオスミウム酸処理を各種リン脂質標品に対して行い、LDI-MS (Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry) によりそれぞれの処理が脂質標品に与える影響を調べた。その結果、リン脂質のリン酸基同士を結び付ける事で構造固定する酢酸ウラニル処理では全ての脂質標品から飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸イオンが検出されたのに対し、リン脂質に含まれる不飽和脂肪酸側鎖の二重結合と反応するオスミウム酸処理では全ての不飽和脂肪酸を含む脂質標品から不飽和脂肪酸イオンが検出されなくなった。この事からグルタルアルデヒドと酢酸ウラニルの混合液による固定 (GAUA 固定) を TOF-SIMS 法の細胞試料調製法として選択した。

図2



次に、Nile Red 染色で脂肪滴を染色した細胞を用い、GAUA 固定による細胞内脂質の分布への影響を調べた。その結果、GAUA 固定そのものは細胞内脂質の分布に影響を与えなかったものの、電子顕微鏡法と同様に固定後の乾燥処理を行った所、細胞内の脂質分布が崩壊する事が分かった。そこで、GAUA 固定した細胞を乾燥せずに TOF-SIMS 装置に導入し、装置内で凍結乾燥 (クライオエッチング) により脱水した後に TOF-SIMS 観察を行った結果、細胞内小器官の分布に対応するような脂肪酸イオンの分布像が取得できた (図3。上段は蛍光顕微鏡像。ER: 小胞体, NR: 脂肪滴。中段と下段は TOF-SIMS 像。MA: ミリスチン酸, Pam: パルミトレイン酸, PA: パルミチン酸, OA: オレイン酸, SA: ステアリン酸)。

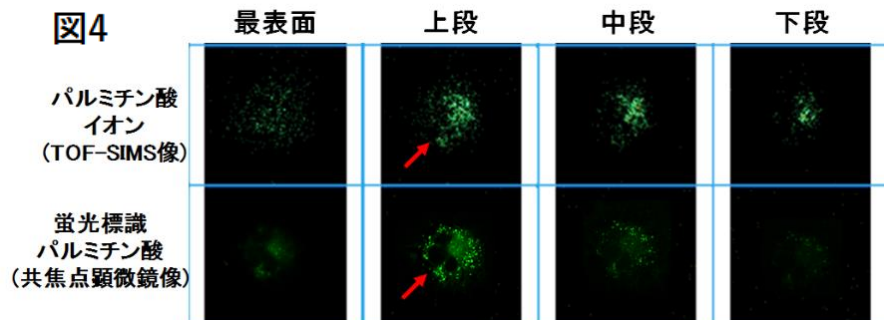
図3



(3) 蛍光顕微鏡観察と TOF-SIMS 観察の比較解析

GAUA 固定およびクライオエッチング手法の併用により、細胞の超微形態と脂質分子の分布を共に保持したまま TOF-SIMS 観察が可能になる事を明らかにした。一方、TOF-SIMS 法は表面観察技術であり、深さ方向の解像度が極めて高く、逆に細胞深部の観察は原理的に不可能である事が分かっている。図3で観察された脂肪酸分子の分布も細胞表層側のみのものであると考えられる。そこで、細胞深部における脂質分子の分布も表層と同じ様に保持されている事を明らかにするため、GCIB (Gas Cluster Ion Beam) による細胞掘削を行いながら細胞内の脂質分子分布の TOF-SIMS 像の段階的な取得を試みた。また BODIPY-C16 処理した細胞の共焦点画像との比較解析も行った。その結果、TOF-SIMS 法と共焦点顕微鏡観察では観察面が若干ずれるため正確な一致とはならなかったものの、細胞内深部においても TOF-SIMS 像と蛍光像の分布は極めて類似していた。すなわち、細胞表層だけでなく深部においても脂質分子の分布と超微形態が保持されている事が明らかになった (図4)。

図4



(4) Unroofing 法を用いた細胞内部の超微形態と脂質分子分布の TOF-SIMS 観察

GCIB による細胞掘削で細胞内の脂質分子分布と超微形態が共に保持されている事を確認できたが、GCIB 掘削では細胞を平坦に削る事は不可能であり、細胞内の超微形態と TOF-SIMS 像がどの程度の精度で一致しているかより詳細に明らかにするため、更なる検証を行った。ここでは、電子顕微鏡法で用いられる unroofing 法 (細胞膜剥離) を用いて内部構造がむき出しにされた細胞試料を調製し、TOF-SIMS 観察を行う事とした。unroofing 法 (細胞膜剥離) は Kuo et al., Nature, 2011 を参考に、剥離条件を敢えて弱める事で小胞体や核膜など細胞内の構造を部分的に残した細胞試料を調製する方法を開発し、GAUA 固定処理およびクライオエッチング後に TOF-SIMS 観察を行っ

た。その結果、検出出来た全ての飽和および一価不飽和脂肪酸のイオンのシグナルは、核膜や小胞体においてより強く観察された。一方、コリンイオンのシグナルは脂肪酸イオンとは逆に、核膜や小胞体が分布していない領域でより強く検出された(図5, 6)。これらのことから、本研究で開発された新しい試料調製法により細胞内の超微形態と脂質分子の分布を保持したままサブミクロン空間解像度での TOF-SIMS 観察を可能にする事が実証された。一方、コリンイオンのシグナルがホスファチジルコリンなどのコリン含有リン脂質の合成の場である小胞体ではなく、細胞膜側で強く検出された理由は不明であり、今後さらなる研究が必要である。

図5

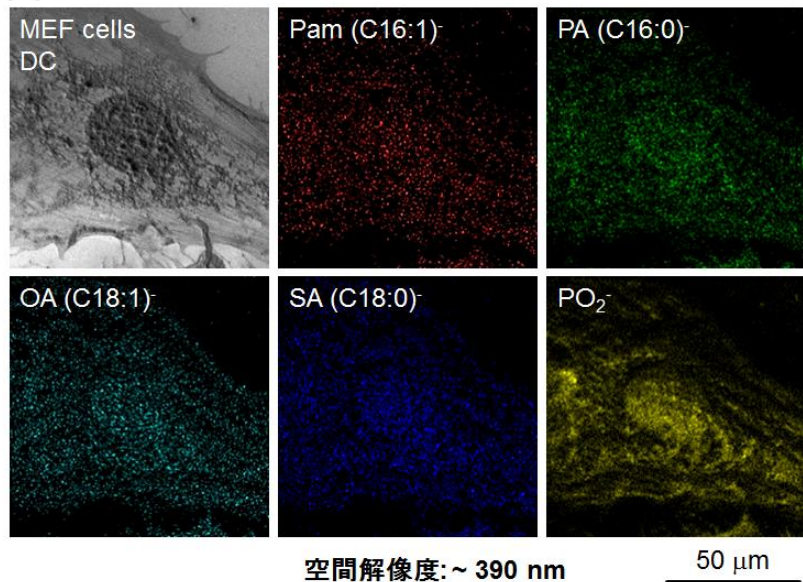
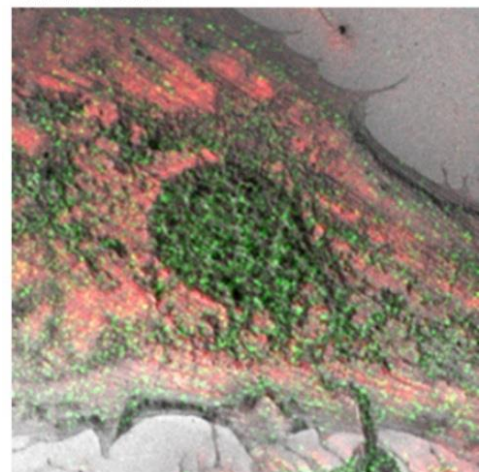


図6 MEF cells

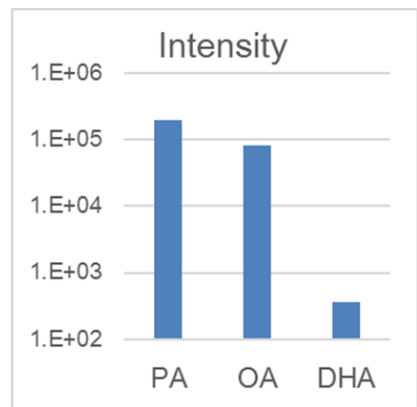
(5) 多価不飽和脂肪酸の TOF-SIMS 法による検出は相対的に困難である。

これまでの結果から、TOF-SIMS 法に適した細胞試料調製法の開発は達成できたと考えられる。一方、いずれの測定においても飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸と比べて多価不飽和脂肪酸はほぼ検出出来なかった。この事は、脂肪酸の種類ごとに検出感度が異なっている可能性を示唆していた。そこで、飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (PA)、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (OA) および多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA)、それぞれのみを含有するリン脂質標品 (DPPC, DOPC, DDPC) を用い、TOF-SIMS 法におけるそれぞれの脂肪酸イオンの検出感度比較を行った。等量の DPPC, DOPC, DDPC を測定基板の上に滴下し、細胞観察時と同一条件で TOF-SIMS 観察を行った。その結果、パルミチン酸イオンとオレイン酸イオンのシグナル強度はほとんど変わらないのに対し、DHA イオンのシグナル強度は 2 桁ほど低い事が明らかとなった(図7)。この事は、現在の測定条件では多価不飽和脂肪酸の分子分布は相対的に観察困難である事を示唆しており、今後は多価不飽和脂肪酸を飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸と同程度の感度で検出可能な手法の開発が必要であると考えられる。



Oleic acid $C_{18}H_{33}O_2^-$
Choline $C_5H_{15}NO_4P^+$

図7

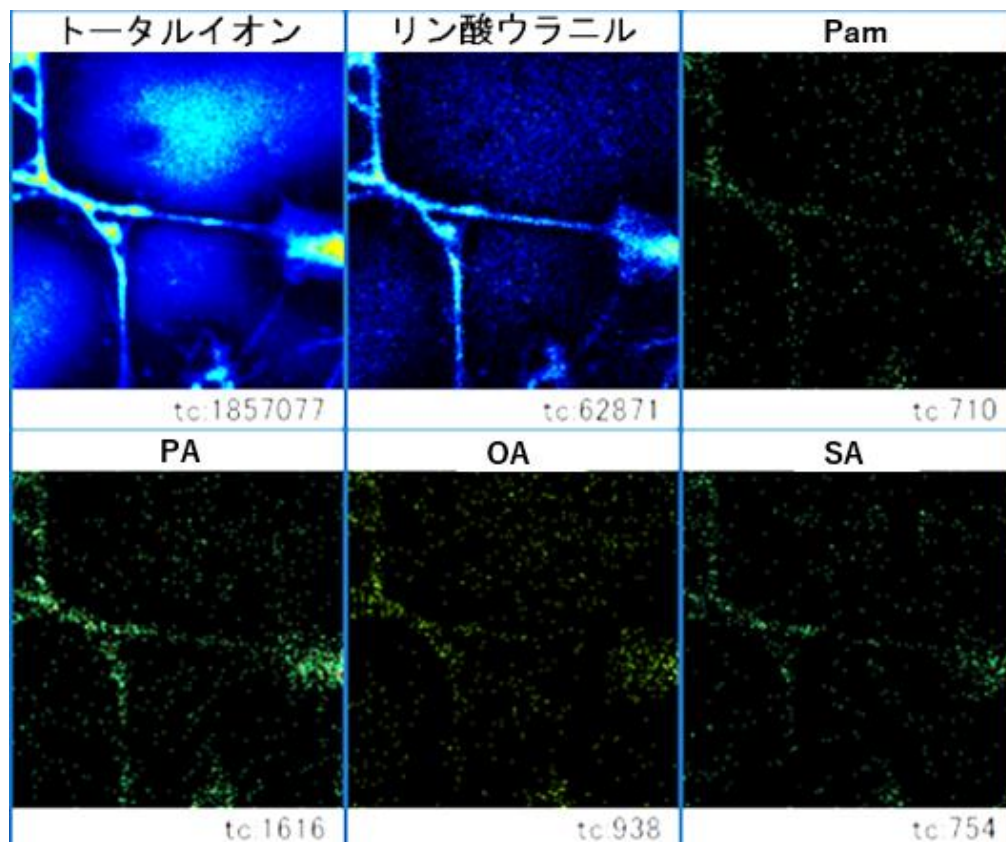


(6) 神経突起上の脂質分子分布の可視化

低細胞密度で播種した NG108-15 細胞を Dibutyryl-cAMP で処理する事により神経突起の伸長を誘導し、GAUA 固定およびクライオエッチングによる乾燥後、TOF-SIMS 観察を行った。その結果、図8で示すように神経突起の分布に対応した脂肪酸イオンの検出に成功した。また、この時の空間解像度は約 200 nm であった。一方、各測定点から検出出来た脂肪酸イオンのシグナルは数カウント以下であり、量的な比較が困難なレベルであった。

TOF-SIMS 法に限らず質量顕微鏡法は、蛍光顕微鏡法のように 1 分子からシグナルを繰り返し取得する事は出来ないため、生体分子の絶対量が検出において重要である事が知られている。すなわち、高解像度化と検出の高感度化はトレードオフの関係にある。本研究では、細胞試料調製法を開発する事で TOF-SIMS 法の高解像度化は達成できたものの、検出感度という予期しない新しい問題と直面する結果となった。今後は、空間解像度を変える事で検出感度と空間解像度の最適なバランスが保てる条件を探求していくとともに、ポストイオン化法など検出感度を高める工夫を加える事で本研究において達成できた高空間解像度での分子分布観察の改良も試みていきたいと考えている。

図8



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Makoto Horikawa, Shiro Takei, Chi Zhang, Mitsutoshi Setou
2. 発表標題 Visualization of intracellular FA- and choline-abundant regions using TOF-SIMS with unroofing and chemical fixation
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Horikawa, Shiro Takei, Chi Zhang, Mitsutoshi Setou
2. 発表標題 A combination of unroofing and chemical fixation enable TOF-SIMS to observe the intracellular fatty acid distribution
3. 学会等名 67th American Society for Mass Spectrometry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Horikawa, Shiro Takei, Chi Zhang, Mitsutoshi Setou
2. 発表標題 TOF-SIMS with unroofing and chemical fixation enables observation of the intracellular fatty acid distribution with the cellular structure
3. 学会等名 the 22nd International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 堀川 誠、瀬藤 光利	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 245(203-210)
3. 書名 実験医学増刊 脂質クオリティ	

〔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
---------	---------