

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12754

研究課題名(和文) 一細胞三次元質量分析イメージングのための試料前処理法の開発

研究課題名(英文) Development of sample preparation for single cell 3D mass spectrometry imaging

研究代表者

正木 紀隆 (Masaki, Noritaka)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・特任研究員

研究者番号：80614073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：すでに確立しているガスクラスターイオン銃と飛行時間型二次イオン質量分析を組み合わせた一細胞内の3次元質量分析イメージング(Masaki et al 2015)のための試料前処理法を開発する。先行研究により細胞内脂質分布が従来の新鮮凍結法では保持できないという問題を明らかにしたが、分子量に影響があるため化学固定をそのままもちいることはできない。そこで、分子量に変化がないことが確認されている最小濃度でのグルタルデヒド固定の構造保持能を検討した。この固定法をもちいることで脂肪細胞の脂肪滴におけるパルミチン酸とパルミトレイン酸を側鎖にもつトリアシルグリセロールの3D-TOF-SIMS解析に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題によって開発した試料固定法は、培地組成をほとんど変えることなく室温で比較的短時間で行うことができる。毒性も低いことから通常の実験環境でも行えるため、培養条件や薬剤刺激、発生における特定の時期や細胞の質量分析イメージング解析や各種顕微鏡観察との比較を可能にするという学術的な意義をもつ。疾患や薬剤の効果などを分子組成の変化としてとらえるなど、安心安全な社会の実現へも貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：A pretreatment method for subcellular 3D mass spectrometry imaging (MSI) was developed. Previously, by combining gas cluster ion beam (GCIB) with time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS), I could successfully reveal sub-nuclear chemical map with 3D-MSI. On the other hand, it was also revealed that subcellular lipid distribution cannot be maintained with fresh frozen fixation conventionally used for matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-MSI. To overcome this problem, fixation with minimal concentration glutaraldehyde was opted. By the minimal fixation, 3D distribution of triacylglycerol with palmitic acids and palmitoleic acids in lipid droplets of adipocytes was successfully visualized.

研究分野：分析化学

キーワード：質量分析 質量分析イメージング TOF-SIMS 脂質分析 脂肪酸 脂肪滴 イオン化効率 トリアシルグリセロール

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

質量分析イメージング(MSI)は脂質を脂肪酸組成まで区別して可視化できる唯一の手法である。代表者はマトリクス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)-MSI をもちいて疾患にともなう脂質の変化や異常を明らかにしてきた。その中で、より高い空間分解能で測定ができればと思うことがあった。特に重要なのは脳や脊髄の研究だろう。神経の炎症による脂質の変化はミクログリアやアストロサイトの集積をとともなう。これらの細胞と脂質変化との関係性が明らかになれば高齢化社会における健康問題の解決にもつながる。しかし5 $\mu$ mという空間分解能は免疫染色像との細胞間および細胞内分布を比較するには用をなさない。そこでMALDI-MSIのイオン化の改善(Sugiyama *et al.* 2014)とTOF-SIMSをもちいた光学限界の突破(Masaki *et al.* 2015)という二つのアプローチでその解決を試みた。それぞれを達成した今、これらを組み合わせるという着想は自然なものである。さらにTOF-SIMSイオン像とDAPI染色像の比較に苦労した経験から、固定法にも改良を加える。これにより、より「生きた」状態に近い細胞およびその内部構造を解明する。本法によって今まで理解できなかった病態や薬物動態などの解明にもつなげたい。

## 2. 研究の目的

TOF-SIMSを用いて細胞内生体分子の「生きた」状態に近い3次元分布を可視化することが目的である。試料を真空状態に置くTOF-SIMSでは実際に生きた細胞を調べることはできず、表面分析法であるためナノスーツのような手法も使えない。最近グラフェンシートをもちいて生細胞測定を実現した例もあるが、三次元分布には至っていない。そのため、本研究では「生きている」のに近い状態で固定することを目指す。光学限界を突破してMSIを実現するTOF-SIMS測定に適した固定法として、同じ真空測定である電子顕微鏡用の固定法をTOF-SIMS用に改良する。さらにMALDI-MSIで開発したイオン化向上前処理をTOF-SIMSに応用する。硫酸アンモニウム処理を行うことで高感度化を試みる。これらを組み合わせるとこれまでTOF-SIMSで検出できなかった細胞内構造をとらえる。

## 3. 研究の方法

ITOコートスライドガラス上で培養、および脂肪細胞への分化を誘導した3T3-L1細胞を解析にもちいた(Masaki & Okazaki 2018)。TOF-SIMSにおいて分子量への影響を与えない固定法(Nagata *et al.* 2014)が報告されており、これによって細胞の内部構造がどの程度保持できるのかを検証する。固定は室温において0.25%グルタルデヒド溶液で15分間行い、0.15M酢酸アンモニウム溶液で三度洗浄し風乾した後に測定した。試料表面をガスクラスターイオン銃(GCIB)をもちいてスパッタクリーニングした後、正・負両イオンモードでTOF-SIMSデータを取得した。測定にはBi<sub>3</sub><sup>2+</sup>液体金属イオン銃とArガスクラスターイオン銃を搭載したPHI TRIFT V nanoTOF (ulvacphi)をもちいた。また、固定後に脂肪滴構造が保持されていることは走査型電子顕微鏡S-4800(Hitachi)をもちいた形態観察によって確認した。

## 4. 研究成果

### (1) Triacylglycerol (TG) の検出と同定

負イオンとして脂肪滴内部のTG(16:0/16:0/16:1)とTG(16:0/16:0/16:0)に相当する $m/z$  802, 804のシグナルを検出することができた(図1)。これらのTGの側鎖であるパルミチン酸( $m/z$  255)とパルミトレイン酸( $m/z$  253)もそれぞれ検出された。また、正イオンとしてこれらの脂肪酸が外れた多段階質量分析における断片化イオンとして知られている $m/z$  549のシグナルも検出できたことから、TG(16:0/16:0/16:1)とTG(16:0/16:0/16:0)であると同定することができた。細胞膜を構成するリン脂質であるphosphatidylcholine(PC)種についても同様に検出、同定に成功した。これによって、本法はTGの分子量および立体構造に影響を与えるような化学変性を伴わないことを示すことができた。

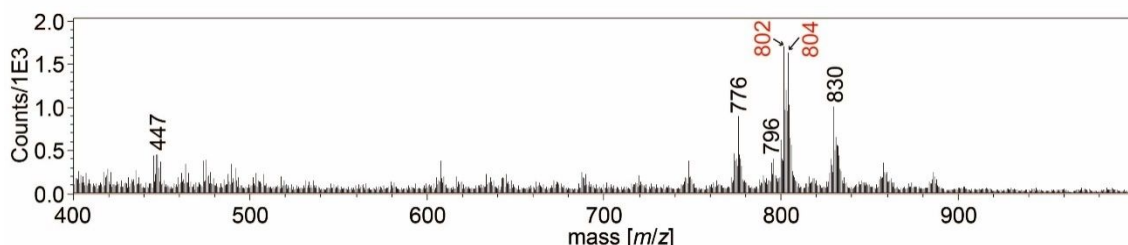


図1 負イオンモードで取得した固定試料の質量分析スペクトル( $m/z$  400 - 1000)

$m/z$  802と804のピークはそれぞれTG(16:0/16:1/16:1)とTG(16:0/16:0/16:1)に相当する。

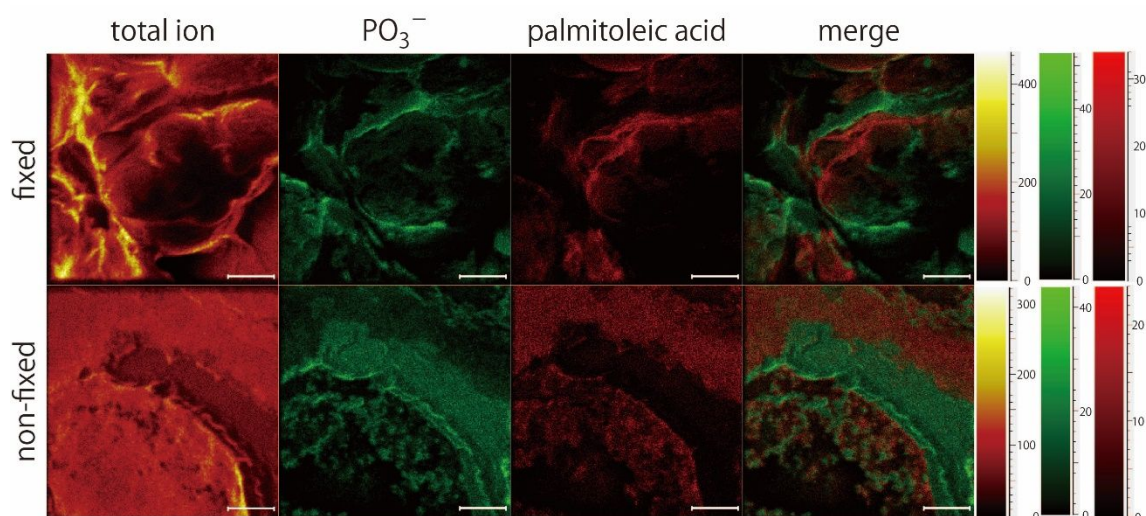


図 2 固定試料と未固定試料の負イオン像

細胞の形状を total ion で、リン脂質の分布を  $\text{PO}_3^-$  ( $m/z$  79)、TG の分布をパルミトレイン酸 ( $m/z$  253) のシグナルでそれぞれ示した。未固定の細胞では脂肪滴がつぶれ、漏出した TG がリン脂質と混ざりあっている様子が merge 像に反映されている。scale bars = 10  $\mu\text{m}$ 。

#### (2) 脂肪滴内部における TG の検出

パルミチン酸とパルミトレイン酸のシグナルで構築したイオン像は、細胞膜に由来するリン酸イオン ( $m/z$  79) と異なる分布を示した (図 2)。このことから、これらの脂肪酸は PC などのリン脂質ではなく、TG 由来のものであることがその局在からも示された。これらのイオン像が示す形状は球体状であり、その大きさからも脂肪滴に相当するものであった。未固定の脂肪細胞ではこの球体状の構造は崩壊し、内部の TG も漏出していることから脂肪滴であると結論付けた。

#### (3) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

0.25% グルタルデヒドが脂肪滴の構造を保持するのに十分であることを確認するために、この本法を前固定として SEM 観察を行った。SEM 像における脂肪滴は TOF-SIMS 像 (図 2) と類似しており、前固定を行わなかった脂肪滴も TOF-SIMS 像同様につぶれて内部の TG が漏出するという特徴を示したことから、本法によって脂肪滴構造が保持できていることが示された。

#### (4) 硫酸アンモニウム添加によるイオン化促進処理

50% メタノール水溶液で 125 mM に調製した溶液 1 mL をスプレー塗布した試料を同様に TOF-SIMS 解析した。スプレー後も脂肪滴構造は保持されており、正イオンモードではプロトン付加体の PC に特徴的な断片である  $m/z$  184 のシグナルが向上したことから TOF-SIMS 測定においても硫酸アンモニウムがプロトン付加体を増強することに成功した。一方で負イオンモード測定においては total ion count が二倍程度向上し、プロトンを引き抜く形でのイオン化も向上した。

#### (5) 脂肪滴の 3D-TOF-SIMS 測定

最後に GCIB をもちいたスパッタと TOF-SIMS 測定を組み合わせた三次元解析を試みた。最小限の固定であるため、脂肪滴を大きく破れてしまうと内部の TG が漏出してしまおうがある程度の深さまでは三次元解析が可能であることを確かめることができた。

#### < 引用文献 >

- Sugiyama E., Masaki N., Matsushita S., Setou M., Ammonium sulfate improves detection of hydrophilic quaternary ammonium compounds through decreased ion suppression in matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal. Chem.* Vol. 87 No. 22 (2015)
- Masaki N., Ishizaki I., Hayasaka T., Fisher G. L., Sanada N., Yokota H., and Setou M., Three-Dimensional Image of Cleavage Bodies in Nuclei Is Configured Using Gas Cluster Ion Beam with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Sci. Rep.* Vol. 11 No. 5 (2015)
- Masaki N. and Okazaki S., Selective delivery of laser energy to ester bonds of triacylglycerol in lipid droplets of adipocyte using a quantum cascade laser. *Biomed. Opt. Ex.* Vol. 9 No. 5 (2018)
- Nagata Y., Ishizaki I., Waki M., Ide Y., Hossen A., Ohnishi K., Sanada N., Setou M., Glutaraldehyde fixation method for single-cell lipid analysis by time-of-flight secondary ion-mass spectrometry. *Surf. Interf. Anal.* Vol. 46 Issue S1 (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 正木紀隆
2. 発表標題 脂肪細胞内脂質分布のTOF-SIMS解析
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2022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
---------	---------