

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840108

研究課題名(和文) 質量分析イメージングによるホヤ神経ペプチドの3次元脳内マッピング

研究課題名(英文) Three dimensional mapping of Ciona neuropeptides based on the imaging mass spectrometry

研究代表者

大杉 知裕 (Osugi, Tomohiro)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・研究員

研究者番号：50507986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではカタユレイボヤの脳におけるペプチドミクスデータに基づき、イメージングMSを用いて多種神経ペプチドの分布を明らかにした。本研究ではさらに、神経細胞で蛍光タンパクを発現するトランスジェニックホヤの脳切片と情報処理的操作を併用した高解像度イメージングMS解析法を新たに開発し、通常の組織学では難しい14つの神経ペプチドの多重検出を細胞レベルの解像度で達成した。さらに高解像度イメージングMSの結果は、神経ペプチドの特異的抗体による免疫染色と類似する結果となったことから、この方法により高精度でペプチドの分布を解析できることが示唆され、脳内マッピングのための基盤が形成された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the distribution of neuropeptides in the Ciona brain using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) imaging mass spectrometry (MS) based on our previous peptidomics data. Major Ciona neuropeptides were detected on a single brain section, and the images of their distributions were acquired with a spatial resolution of 20 micrometers. We further developed a method for high-resolution imaging MS by a combination of fluorescent microscope and imaging MS in the brain sections of transgenic Ciona that expresses fluorescent protein in neurons. The high-resolution imaging MS for the first time showed the distribution of four peptides in a single brain section at single-cell resolution. Both the high-resolution imaging MS and immunohistochemistry using specific antiserum against the neuropeptide Ci-TK-I yielded similar results, suggesting that the high-resolution imaging MS has a potential to serve as a new platform for histology.

研究分野：神経内分泌

キーワード：ホヤ 神経ペプチド 質量分析イメージング

1. 研究開始当初の背景

神経ペプチドは神経伝達物質や神経調節因子として、あるいは末梢へ運ばれホルモンとして働き、動物の生体調節に極めて重要な働きを担っている。神経ペプチドの機能解明には、ニューロンがどのような神経ペプチドを産生しているかという情報は必須である。近年の例では哺乳類の視床下部において、キスペプチン、ニューロキニン B、ダイノルフィンが共局在していることが免疫染色により示され、生殖を制御するキスペプチンニューロンの発火がニューロキニン B とダイノルフィンによって制御されていることが明らかにされた (Wakabayashi et al. J. Neurosci. 30: 3124-3132, 2010)。このように多種の神経ペプチドの局在情報を一度に明らかにすることができれば、生体調節の新たな制御機構の解明へとつながることが期待されるが、局在解析で一般に用いられる免疫染色法では数十種類のペプチドの局在を同時に解析するには技術的・時間的な限界があり、神経ペプチドの包括的な局在情報はいかなる動物でも未だに明らかになっていない。

ホヤは原索動物の中でも脊椎動物に最も近い動物であり、摂食や生殖といった生物にとっての本質的な機能をシンプルな体構造の中に備えた脊椎動物のプロトタイプと考えられている。ホヤは脊椎動物の脳に相当する「神経複合体」を持っており、申請者の所属する研究室では近年、カタユレイボヤの神経複合体から、ペプチドミクス解析により脊椎動物のホモログや新規のペプチドを含む約 30 種の主要な神経ペプチドを世界で初めて同定した (Kawada et al. Endocrinology 152: 2416-2427, 2011)。これらのホヤ神経ペプチドの機能を明らかにすることにより、ホヤに限らず脊索動物に広く一般化できる神経ペプチドの新たな生体調節機構の解明が期待される。従って、カタユレイボヤは神経ペプチドの研究において理想的なモデルであると言える。しかし、カタユレイボヤから同定した約 30 種の神経ペプチドの多くは機能未知であり、その局在も明らかにはなっていない。

質量分析 (MALDI-TOF MS) は生体分子をマトリックスの結晶で保護しレーザーを照射することで、生体分子を破壊することなくイオン化し、検出器に到達するまでの飛行時間から質量を測定する分析法である (図 1)。

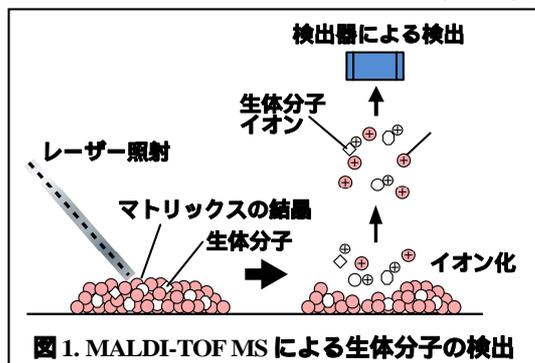


図 1. MALDI-TOF MS による生体分子の検出

このような原理のため、MALDI-TOF MS は質量の異なる多種の生体分子を同時に検出することができる。この技術を応用して、組織切片中の生体分子を検出し画像化する質量分析イメージング (イメージング MS) が近年発展しつつある (Hanrieder et al. ACS Chem Neurosci. 4: 666-679, 2013)。申請者はこれまでの研究で質量分析を使用して、様々な脊椎動物の脳から神経ペプチドを同定してきた実績を多く持つ。そこで、申請者はホヤ神経複合体の組織切片において、イメージング MS の利点を最大限に生かし、ペプチドミクスによって同定された多種の神経ペプチドの局在を分析することを着想した。さらにイメージング MS による 2 次元データを立体構築することで、カタユレイボヤの主要な神経ペプチドの 3 次元的な脳内マッピングを行い、ホヤにおけるペプチド性神経制御機構の全貌を明らかにするための基盤を構築することを着想した。

2. 研究の目的

脳内における神経ペプチドの分布はそれが「どこで」「どのように」働くかを知るために重要な情報であるが、免疫染色では数十種のペプチドを同時に可視化するには技術的な限界がある。また、イメージング MS は多種の生体分子を同時に検出することができるが、脳神経系においては組織中に豊富に含まれイオン化しやすい特定の分子に着目した研究、例えば脂質 (Wang et al. Anal. Bioanal. Chem. 404:113-124, 2012) やアセチルコリン等の神経伝達物質 (Sugiura et al. Anal. Bioanal. Chem. 403:1851-1861, 2012) のイメージングなどが多く、多種の神経ペプチドを同時に分析した例はない。また、分解能についても現状では数百 μm 程度と低く、大まかな分布解析にとどまっており、細胞レベルでの高解像度分析は今後の課題である。そこで、本研究では原索動物の中でも脊椎動物に最も近い動物のホヤをモデルに、ペプチドに最適化した分析法の確立 高解像度分析のための切片処理法の確立 多種神経ペプチドの解析 イメージングデータの 3 次元的解析を目的として以下の研究を実施した。

ホヤの主要な神経ペプチドを神経複合体の切片上で検出する質量分析法の確立

イメージング MS によるホヤ神経ペプチド分布の 2 次元画像化

析イメージング MS から得られた局在イメージの立体構築による神経ペプチドの 3 次元脳内マップの作成

3. 研究の方法

(1) 組織上でのペプチド分析に最適なマトリックスの探索

質量分析における分子のイオン化効率はマトリックスの種類によって影響を受ける。そこで、本年度はホヤ神経複合体の組織切片上でのペプチド分析に最適なマトリックス

の探索を行った。これまでの予備的な実験により、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)をマトリックスとして使用した場合に、ホヤ1個体の神経複合体の抽出液から数種の内因性ペプチドを検出したため、組織切片上でDHBを使用した場合にも同程度のペプチドを検出できるかを検証する。DHBを使用しても組織切片上でのペプチドのイオン化効率が悪い場合は α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)やクルクミン、ノルハルマンなどのマトリックスを用いて、脳神経複合体切片において高い検出強度でホヤ神経ペプチドを検出できるマトリックスを探索した。

(2) ペプチド以外の夾雑物を除去する切片処理法の確立

組織切片中にはペプチドと同程度の質量を持つ脂質や多糖など様々な生体分子が含まれており、質量分析においてイオン化の競合因子となる、あるいはバックグラウンドノイズを上げる要因となっている。そこで本研究ではペプチドを切片上に残し、かつその他の夾雑物を除く切片の処理方法として、メタノールや石油エーテル等の有機溶媒による切片の洗いを検討した。また、pHを調整したバッファーを用いて切片を洗うことで、イオン化を妨げる低分子化合物や塩類を除去する方法が報告されている (Shariatgorji et al. *Anal. Chem.* 84:4603-4607, 2012) ことから、これらを組み合わせ、最適な切片処理法を探索した。また、ペプチドの検出感度を下げる要因として、プロテアーゼによるペプチドの分解が考えられるため、マイクロウェーブによる熱処理やプロテアーゼインヒビター処理等によるペプチドの分解抑制処理も検討した。

(3) 高分解能と高再現性を可能にするマトリックス塗布法の最適化

組織切片上でペプチドの局在を画像化するためには、高い再現性と分析領域をどれだけ細かくできるか、すなわち空間分解能の向上が重要なポイントである。再現性については組織へのマトリックスの均一な噴霧が必要であり、ケミカルプリンタやエアブラシ、真空蒸着などの複数の塗布法を検討する。空間分解能はマトリックスの結晶サイズに左右されるため、微細なマトリックスの結晶が組織切片上で出来るようなマトリックス溶液の溶媒組成を検討し、個々のニューロンを識別できる10~20 μ m程度の空間分解能を目指した。

(4) イメージングMSによるホヤ神経ペプチド分布の2次元画像化

上記方法により多種のペプチドを効率よく検出する質量分析法を確立したのち、過去に当グループが行ったペプチドミクスにより同定されたホヤ神経ペプチドをターゲットとして、ホヤ神経複合体の組織切片上でイメージングMSを行った。イメージングMSの分析にはBruker社のFlex ImagingソフトウェアとFlex Analysisを使用し、脳神経節と神

経腺から構成される脳神経複合体のそれぞれの組織から検出される分子のスペクトル解析を行った。さらにそれらのスペクトルを基盤として、検出した分子の2次元分布像を作成し、脳神経節と神経腺に共通に見られる分子やそれぞれの組織に特異的に見られる分子の発現分布を解析した。

(5) 高解像度イメージングMS解析法の確立

3次元化を目的としたイメージングMS像の立体構築を進める過程で、20 μ mの空間解像度で行う通常のイメージングMSでは解像度が不足することが判明した。そこで、イメージングMSの空間解像度を細胞レベルまで向上させることを目的として、脳神経節のニューロンで蛍光タンパクを発現するトランスジェニックホヤと情報処理的操作を併用した高解像度イメージングMS解析法を新たに開発した。トランスジェニックホヤの脳神経節の切片を蛍光顕微鏡で撮影することでニューロンの分布像を得たのち、同一の切片をイメージングMSで解析することで、ペプチドの分布像を得る。これら二つのデータを線形補完により融合させることで、細胞レベルの解像度を持ったイメージングMS像の構築を目指した。また、線形補完によるデータの融合には市販のソフトウェアが使用できないため、新規の画像処理プログラムを構築した。この方法により、ホヤ脳神経節の切片において、細胞レベルの空間解像度でホヤ神経ペプチドの局在解析を行った。

4. 研究成果

ホヤ神経ペプチドのイメージングMS解析法構築において、マトリックスによるペプチドのイオン化を比較した結果、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)が最も安定的にペプチドをイオン化することを決定した。マトリックスの塗布は70~75%程度のメタノールを溶媒として、エアブラシにより塗布することで比較的細かいマトリックス結晶で組織切片を均一に覆い、安定したイメージングMS像の取得が可能となった。凍結切片の作製に関しては、組織の状態によりクリオスタット内で冷やしたスライドガラスに切片を貼り付ける方法、もしくは室温のスライドガラスに切片を貼り付ける方法を使い分けることで、切片の組織形態を可能な限り保ったままイメージングMS解析を行った。これにより生体分子の組織分布の精度が向上した。また、イメージングMSに用いる切片は通常組織学のように固定処理ができないため、生体分子の分解が起きる可能性があるが、切片を速やかにデシケーターで乾燥させることで分解を防ぎ比較的高い感度で神経ペプチドを検出することが可能となった。組織切片における神経ペプチド以外の夾雑物としては主に脂質分子が挙げられる。本研究では石油エーテルによる切片の短時間の洗いにより、脂質分子を可能な限り除去することで、ペプチドがよりイオン化しやすくなる状態を作り、

効率の良いイメージング MS 解析が可能となった。

上記成果により構築したイメージング MS の実験系において、脳神経節と神経腺で構成されるホヤ神経複体を解析した結果、MS スペクトルの分析から、質量値 500~950 の範囲では脳神経節と神経腺に共通して検出される質量ピークに加え、それぞれの組織に特異的に検出されるピークの存在が確認された(図2)。一方、質量値 950~1400 の範囲では、脳神経節に特異的に質量ピークの存在が確認された。質量値 500~950 に検出されたピークの一部は脂質と思われる分子であったが、その他のピークは未知の低分子化合物であった。一方、質量値 950~1400 に検出されたピークは、過去に我々が行ったペプチドミクスデータに照合した結果、神経ペプチドであることが確認された。これらの MS スペクトルに基づき MS イメージを解析した結果、脳神経節と神経腺において、神経ペプチドを含む多数の分子の 2 次元分布を明らかにした(図3)。一方、本研究におけるイメージング MS 解析は空間解像度 20 μm で行ったが、この解像度では細胞レベルには及ばず、3 次元マップ作成が難しいことが示唆された。そこで、本研究では神経系で蛍光タンパクを発現するトランスジェニックホヤと画像情報処理的操作を組み合わせたイメージング MS 解析法を構築し、イメージング MS の空間解像度向上を目指した。新たに開発した画像処理プログラムを用いて、線形補完による画像処理を適用し、蛍光顕微鏡で撮影した神経細胞像にイメージング MS によって得られたペプチド情報を融合させた。その結果、1 枚の切片において通常の組織学では技術的に難しい4つの神経ペプチドの局在を細胞レベルの解像度で示すことに成功した。また、それらの局在から多くの神経細胞は単一の神経ペプチドを産生しており、一部の神経細胞は複数の神経ペプチドを産生していることが示唆された。続いて、高解像度イメージング MS の正確性を検証するため、ホヤ神経ペプチド(Ci-TK-I)の特異的抗体を作製し、免疫染色との比較を行った。その結果、Ci-TK-I の高解像度イメージング MS と免疫染色は、解像度、細胞体の分布共に類似の結果を得たことから、高解像度イメージング MS は免疫染色に比して遜色ない正確性でペプチドの分布を解析できることが示唆された。本研究により細胞レベルの解像度で神経ペプチドの分布を示すことが可能となったことから、現在は神経ペプチドマップの3次元化に向けた取り組みを進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Tomohiro Osugi, Yasunori Sasakura,

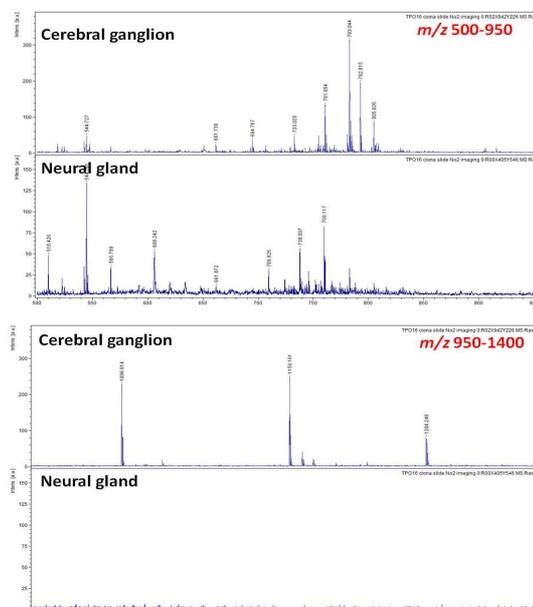


図2. イメージング MS によって得られた脳神経節(cerebral ganglion)と神経腺(neural gland)における MS スペクトル

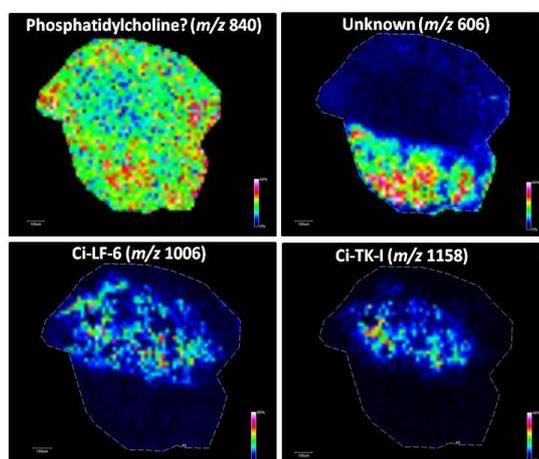


図3. 脳神経節と神経腺におけるイメージング MS 解析

Honoo Satake. The nervous system of the adult ascidian *Ciona intestinalis* Type A (*Ciona robusta*): insights from transgenic animal models. PLOS ONE. in press.

Tomohiro Osugi, You Lee Son, Takayoshi Ubuka, Honoo Satake, Kazuyoshi Tsutsui. RFamide peptides in agnathans and basal chordates. Gen Comp Endocrinol. 227: 94-100, 2016. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.06.012.

Toshio Sekiguchi(1 番目), Tomohiro Osugi I(6 番目), Honoo Satake(10 番目) 計 10 人. Evidence for conservation of the calcitonin superfamily and activity-regulating mechanisms in the basal chordate *Branchiostoma floridae*: Insights into the molecular and functional evolution in chordates. J Biol Chem. 291:

2345-2356, 2016. doi:
10.1074/jbc.M115.664003.

Kazuyoshi Ukena, Eiko Iwakoshi-Ukena, Tomohiro Osugi, Kazuyoshi Tsutsui. Identification and localization of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) orthologs in the hypothalamus of the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. Gen Comp Endocrinol. 1;227:69-76, 2016. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.06.009.

Shin Matsubara, Tsuyoshi Kawada, Tsubasa Sakai, Masato Aoyama, Tomohiro Osugi, Akira Shiraishi, Honoo Satake. The significance of *Ciona intestinalis* as a stem organism in integrative studies of functional evolution of the chordate endocrine, neuroendocrine, and nervous systems. Gen Comp Endocrinol. 227:101-108, 2016. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.05.010.

Kazue Nagasawa, Tomohiro Osugi, Iwao Suzuki, Naoki Itoh, Keisuke G. Takahashi, Honoo Satake, Makoto Osada. Characterization of GnRH-like peptides from the nerve ganglia of Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. Peptides. 71:202-210, 2015. doi: 10.1016/j.peptides.2015.07.022.

〔学会発表〕(計 4件)

Tomohiro Osugi, Tsuyoshi Kawada, Honoo Satake. The distribution of multiple neuropeptides were visualized in the brain of *Ciona intestinalis* by imaging mass spectrometry. 第39回日本比較内分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会合同大会. 2014年11月7-9日、岡崎コンファレンスセンター(岡崎市)

太杉 知裕、川田 剛士、菅原 孝太郎、渡辺 健宏、佐竹 炎、ホヤ神経ペプチドのイメージングMS、第86回日本動物学会大会、2015年9月17-19日、新潟コンベンションセンター(新潟市)

太杉 知裕、白石 慧、佐竹炎、ホヤ卵巣におけるコレシストキニン/ガストリンホモログ cionin の機能解析、第40回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第37回大会 合同大会、2015年12月11-13日、アステールプラザ(広島市)

太杉 知裕、イメージング MS によるホヤ神経ペプチドの分布解析、第22回国際動物学会議・第87回日本動物学会大会 合同大会、2016年11月14-20日、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

〔図書〕(計 1件)

Tomohiro Osugi, Takayoshi Ubuka, Kazuyoshi Tsutsui. Elsevier. Handbook of Hormones. Chapter 1C: PQRamide Peptide. 2015, 3.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sunbor.or.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大杉 知裕 (OSUGI, Tomohiro)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・研究員

研究者番号: 50507986

(3)研究協力者

白石 慧 (SHIRAIISHI, Akira)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・研究員

佐竹 炎 (SATAKE, Honoo)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・主幹研究員

菅原 孝太郎 (SUGAHARA, Kohtaro)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・構造生命科学研究所・研究員

山垣 亮 (YAMAGAKI, Tohru)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・構造生命科学研究所・主席研究員

末松 誠 (SUEMATSU, Makoto)

慶応義塾大学・医学部・教授

陰山 聡 (KAGEYAMA, Akira)

神戸大学大学院システム情報学研究科・教授

坂本 尚久 (SAKAMOTO, Naohisa)

神戸大学大学院システム情報学研究科・講師