

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：22702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440082

研究課題名(和文) 高解像度質量分析イメージングによる線虫C.エレガンスの細胞構造解析

研究課題名(英文) Application of TOF-SIMS imaging to C. elegans

研究代表者

木村 芳滋 (Kimura, Yoshishige)

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：90274703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は高解像度な質量分析イメージング法(IMS)であるTOF-SIMS法を線虫C.エレガンスに応用して生体分子の細胞内分布を解析することを目的とし、アルバックファイ社TRIFT Vシステムでイメージング解析を行った。再現性高く、かつ簡便に高解像度のイメージを得るためにはパラホルムアルデヒド固定した線虫の凍結切片が最適であった。また、Arガスクラスターイオンビーム(Ar-GCIB)で切片表面のクリーニング(スパッタリング)をしてやることにより、ステアリン酸(SA)、オレイン酸(OA)、エイコサペンタエン酸(EPA)などの多数の脂肪酸の検出感度が大幅に上昇し、高解像度のイメージが得られた。

研究成果の概要(英文)：Imaging mass spectrometry (IMS) is a two-dimensional mass spectrometry to visualize the spatial distribution of biomolecules, which does not need either separation or purification of target molecules. In this study, our goal is to reveal the cellular distribution of biomolecules of C. elegans (a commonly used model organism for the life science) by application of IMS approach. Since C. elegans is a small animal, we have used TRIFT V, TOF-SIMS (Time-of-Flight Secondary Mass Spectrometry) system (ULVAC-PHI, Inc), which enables us to obtain nanoscale microstructure. By comparison of several sample preparation methods, the frozen sections of C. elegans fixed by paraformaldehyde (PFA) were most suitable for TOF-SIMS analysis. By sputtering of Ar gas cluster ion beam (Ar-GCIB), the sensitivity to fatty acids (e.g. stearic acid (SA), oleic acid (OA), and eicosapentaenoic acid(EPA)) was significantly enhanced, and high resolution images of biomolecules were successfully acquired.

研究分野：解剖学，細胞生物学，分子遺伝学

キーワード：質量分析イメージング法 TOF-SIMS 線虫 メタボローム

1. 研究開始当初の背景

(1) 質量分析イメージング法(IMS)は質量分析法を二次元に応用した新しいイメージング技術である。免疫染色や蛍光タンパク質によるラベリングと比較し、

1)抗体や蛍光蛋白質などによるラベリングを必要としない。

2)解析物質の精製を必要としない。

などの画期的な利点をもつ。

IMSには生体分子のイメージング手法からマトリックス支援レーザー脱イオン化法(MALDI法)、飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS法)などがあり、それぞれ特性が異なる。MALDI法は高分子の安定性に優れており、解析できる分子量の幅が広い、TOF-SIMS法は解析できる分子量はMALDI法より小さいものの1 μ m以下の圧倒的な解像度を持つ。しかし、TOF-SIMS法の装置は1億円以上と非常に高価であるため、基礎生物学分野の応用例はまだほとんど知られていなかった。

(2) 研究代表者はこれまでモデル生物線虫C.エレガンスを用いた感覚行動の環境応答の分子メカニズムについて研究してきたが(Kimura, 2002, 2010)、新しいイメージング手法の線虫への応用に興味をもち、2008年より連携研究者である瀬藤が統括する浜松医科大学で研究を開始した。研究室のオリジナルな技術であるMALDIイメージングの線虫へ応用する試み、脂質のイメージングに成功した(Kimura, 2009; Hameed, Kimura, 2015)。しかし、微小な線虫の内部構造を解析するには、より高解像度でのイメージングが可能であるTOF-SIMS法の導入が最適であると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では約1000個の全細胞が特定されているモデル生物C.エレガンスを用いて細胞レベルの脂質局在を解析し、これまで不可能であった微細な細胞構造を明らかにする。本研究によって将来の複雑な高等動物を用いた解析の基盤技術を確立する。

(2) 質量分析法の技術を二次元に応用したイメージング技術であるイメージングマスマスペクトロメトリー(IMS)の中でも、飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS法)は特に解像度に優れており、1 μ m以下の解像度で生体分子の局在情報が得られる。本研究ではすべての細胞の位置と形が特定されている線虫C.エレガンスを用いてこれまで不可能であったシングルセルレベルで脂質の局在情報を明らかにすることで微細な細胞構造の理解を目指す。本研究の進歩により、将来の複雑な構造をした高等動物やヒトを用いた医学応用のための基礎技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 線虫C.エレガンスを用いたTOF-SIMSイメージングの条件の最適化を行う。これまで凍結破砕法で行ってきた線虫の前処理準備法を高解像度イメージングに適した凍結超薄切片法に変更し、TOF-SIMS法に最適な条件を決定する。

(2) TOF-SIMSの装置はアルバックファイ社TRIFT Vのシステムを用いる。本装置にはArガスクラスタイオンビーム(Ar-GCIB)で表面をスパッタしてクリーニングすることができる。このような機器の調整により、より高解像度、高画質のイメージが得られるように調整する。

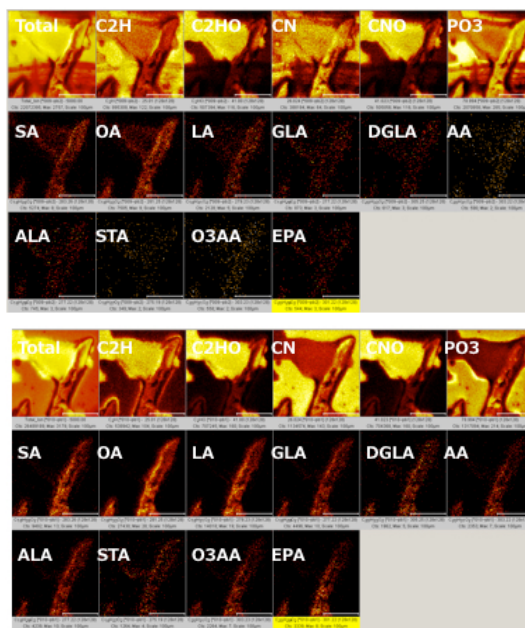


図1 線虫 TOF-SIMS イメージング. スパッタリングの影響. PFA 固定したサンプルのイメージング像. スパッタリングなし(上段), スパッタリングあり(下段). スパッタリングで明瞭なシグナルの上昇が見られる。

4. 研究成果

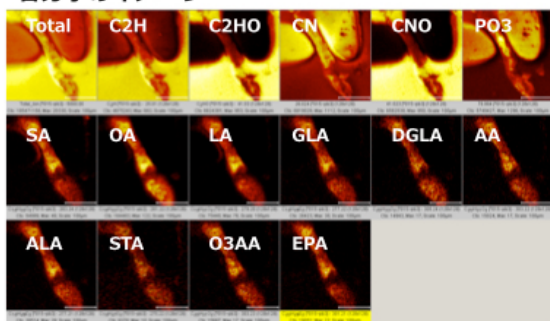
(1) 線虫サンプルの準備の条件検討。

①フリーズクラック法

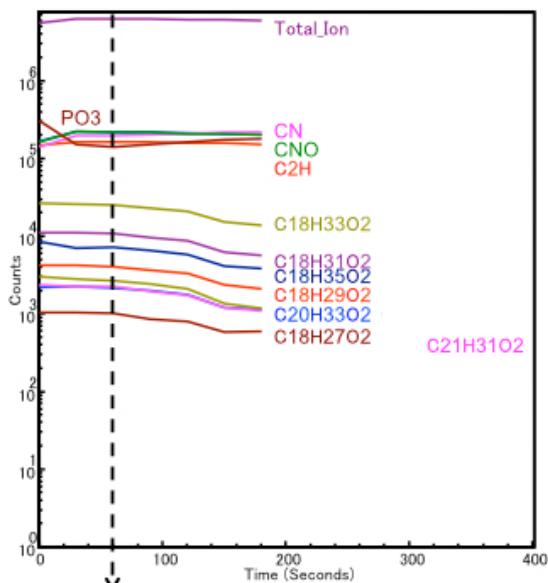
線虫表面の硬いクチクラ構造を除去し、線虫の内部構造を露出させるためMALDI法で用いられてきたフリーズクラック法がTOF-SIMS方に応用できるか検討を行った。フリーズクラック処理の有無でのイオン強度を比較し、同処理で個体内部の生体分子の露出がなされていることを確認した。フリーズクラック処理を施した線虫サンプルをTRIFT Vシステムを用いてTOF-SIMSイメージングを行った結果、非常に解像度のイメージング像が得られ、腸管に沿ってステアリン酸(SA)、エイコサペンタエン酸(EPA)などの脂肪酸が特徴的な分布を示していることがわかった。またネガティブコントロールとして用いたEPAなど ω 3脂肪酸を合成できないfat-1変

異体ではEPAの発現が消失していることを確認し、本手法の信頼性を確認した。

各分子のイメージ



各分子のプロファイル



1分のスパッタクリーニング

図2 線虫 TOF-SIMS イメージング. 各分子のプロファイル. 各分子のシグナルの足し合わせ(上段). 各分子のスパッタリングによる影響.

②凍結切片法

フリーズクラック法は線虫の形態保持には優れているが、切断面の制御が難しく結果を安定させることが難しいため通常の免疫染色法等で広く利用されている凍結切片法を導入して条件検討することにした。

組織の保持の観点から、

- 1) パラホルムアルデヒド固定の有無
 - 2) 凍結切片作成法: 通常法と川本法
- 以上の2点に注目し、これらの条件を組み合わせることで4種類のサンプルを作成し、TOF-SIMS イメージングを行った。その結果、固定の有無については、検出できるピーク(分子種)を限定されるものの、固定は必要であり、行わないと形態の維持が不十分であることがわかった。また凍結切片作成法については形態の保持については川本法がやや優れている

ものの、フィルムを用いるためシグナルの低下が顕著であり、通常法が優れていることが明らかになった。以上の結果から、凍結切片法をもちいた *C. elegans* の TOF-SIMS 解析には固定した線虫を通常法で切片にすることが最適であると結論した(図1, 図2)。

(2) スパッタリングの影響の検討.

Ar ガスクラスターイオンビーム (Ar-GCIB) で線虫サンプルの表面をスパッタして表面のクリーニングをしてやることにより、ステアリン酸(SA)、オレイン酸(OA)、リノレン酸(LA)、 γ -リノレン酸(GLA)、ジホモ- γ -リノレン酸(DGLA)、アラキドン酸(AA)、 α -リノレン酸(ALA)、ステアリドン酸(STA)、 ω -アラキドン酸(O3AA)、エイコサペンタエン酸(EPA)などの脂肪酸の検出感度が大幅に上昇し、高解像度のイメージング像の取得に成功した(図1, 図2)。

<引用文献>

- Kimura *et al.* EMO rep. 3 巻, p962-p966. (2002)
- Kimura *et al.* J. Biol. Chem. 285 巻, p22936-p22941. (2010)
- Kimura *et al.* Worm Breeder's Gazette 44 巻, p837-p848. (2009)
- Hameed, Kimura *et al.* Anal Bioanal Chem. 407 巻: p7589-p7602. (2015)

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1件)

- ① Hameed S, Ikegami K, Sugiyama E, Matsushita S, Kimura Y, Hayasaka T, Sugiura Y, Masaki N, Waki M, Ohta I, Hossen MA, Setou M. Direct profiling of the phospholipid composition of adult *Caenorhabditis elegans* using whole-body imaging mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 査読有, 407 巻: p7589-p7602. 2015年.

DOI: 10.1007/s00216-015-8932-7.

[学会発表] (計6件)

- ① Kimura Y, Konno, A., Tsutsumi, K., Hameed, S., Ikegami, K., Setou, M. Intraflagellar transport in sensory cilia is tuned by environmental stimuli by tubulin polyglutamylolation. 第53回北米細胞生物学会. ニューオーリンズ. 米国. 平成25年12月16日.

② Kimura, Y., Hameed S., Setou, M.
Visualizing the spatial distribution of
biomolecules in *C. elegans* by imaging
mass spectrometry. 第13回慶北一浜松合
同医学シンポジウム. 大邱. 韓国. 平成
25年9月11日.

③ Kimura, Y., Tsutsumi, K., Konno, A.,
Ikegami, K., Hameed, S., Kaplan, O. I.,
Teramoto, T., Fujiwara, M., Kunitomo,
H., Ishihara, K., Iino, Y., Blacque,
O. E., Setou, M.
Starvation-responsive behavioral
plasticity is tuned by tubulin
polyglutamylation in sensory cilia.
第19回国際線虫ミーティング. ロサン
ゼルス 米国. 平成25年6月28日.

④ Kimura, Y., Tsutsumi, K., Konno, A.,
Ikegami, K., Hameed, S., Kaplan, O. I.,
Teramoto, T., Fujiwara, M., Kunitomo,
H., Ishihara, K., Iino, Y., Blacque,
O. E., Setou, M. Environmental
stimulus-responsive behavioral
plasticity is regulated by
intraflagellar transport of sensory
cilia. FASEB ミーティング. ナイアガラ
フォールズ. 米国. 平成25年6月24日.

⑤ 木村芳滋, 紺野在, Saira Hameed, 瀬藤光
利. Environmental responsiveness in
intraflagellar transport is
regulated by tubulin
polyglutamylation. 第65回日本細胞
生物学会. ウィンクあいち(愛知県・名
古屋市) 平成25年6月20日.

⑥ Kimura, Y., Tsutsumi, K., Konno, A.,
Ikegami, K., Hameed, S., Kaplan, O. I.,
Teramoto, T., Fujiwara, M., Kunitomo,
H., Ishihara, K., Iino, Y., Blacque,
O. E., Setou, M. Environmental
stimulus-responsive behavioral
plasticity is regulated by
intraflagellar transport of sensory
cilia. RIKEN CDB ミーティング. 理化
学研究所 発生・再生医学総合研究セン
ター(兵庫県・神戸市) 平成25年6月17
日.

6. 研究組織

研究組織

(1) 研究代表者

木村 芳滋 (KIMURA, Yoshishige)
神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・
准教授
研究者番号：90274703

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
瀬藤 光利 (SETOU, Mitsutoshi)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：20302664

(3) 研究協力者
サイラ ハミード (HAMEED, Saira)
後藤 健介 (GOTO, Kensuke)
石崎 逸子 (ISHIZAKI, Itsuko)
真田 則明 (SANADA, Noriaki)
鈴木 真由美 (SUZUKI, Mayumi)