

令和元年6月22日現在

機関番号：22702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07355

研究課題名(和文) 質量分析イメージング法による線虫C.エレガンスのシングルセルレベル脂質マッピング

研究課題名(英文) Lipid mapping on single-cell level by imaging mass spectrometry (IMS)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： アルバックファイ社TRIFT VおよびION-TOF社のTOF-SIMSシステムを用いて線虫C.エレガンスの高解像度質量分析イメージング解析を行った。パラホルムアルデヒドで固定した線虫の凍結切片をITOスライドにマウントし、表面をArガスクラスターイオンビーム(Ar-GCIB)でスパッタリングすることで、シングルセルレベルでの脂肪酸、アミノ酸など生体分子の局在を解析できるようになった。また、主成分分析によりTOF-SIMSのイメージと、顕微鏡像を融合することで、より高解像度のイメージが得られた。また画像のピクセル数を減らすことで重要な低強度の二次イオンのイメージ強化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質、アミノ酸などのタンパク質以外の生体分子はこれまで可視化する方法が少なく、分子の局在情報の取得が困難であった。本研究の研究成果により、生命科学の分野で広く用いられているモデル動物で質量分析イメージング法が利用できるようになった。今後、細胞レベルでの多くの生体分子の局在プロファイルの決定機構とその役割を明らかにすることが可能になり、将来的にはヒトを含めた高等動物に還元され、疾病の発病機構の解明や創薬などにつながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)： 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) and TOF-SIMS (IONTOF GmbH), which enables us to obtain nanoscale microstructure. Distribution images of fatty acids and amino acids on single-cell level were obtained using the frozen sections of *C. elegans* fixed by paraformaldehyde (PFA) cleaned by sputtering of Ar gas cluster ion beam (Ar-GCIB). The images with higher resolution were successfully obtained by the principal component analysis image fusion of TOF-SIMS and microscopic images. In addition, important secondary ions with lower intensity were effectively detected by pixel reduction.

研究分野：生物学

キーワード：質量分析イメージング法 C.エレガンス モデル生物 生体分子 メタボローム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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イメージング技術である。従来の発現解析と比較し、1)標的分子の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、3)脂質などこれまで発現パターンの解析が困難であった生体分子の解析ができる、などの画期的な利点をもつ。

IMSには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。一方、TOF-SIMS法は解析できる分子量はMALDI法より小さいものの1 μm 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遅れている。

研究代表者はこれまでモデル動物線虫 *C.エレガンス*を用いた環境応答の分子メカニズムについて研究してきた(Kimura, 2002, 2010), 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MALDIイメージングの線虫へ応用を試み、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、2012~2015年度に基盤研究C「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」のテーマで研究を行った。同研究ではアルバックファイ社との共同研究でTOF-SIMS法を線虫に応用する条件を検討した。

本研究では上記の研究成果をより発展させ、すべての細胞が同定されている線虫の利点を生かしたIMSによるシングルセルレベルでの生体分子マッピングを試みた。

2. 研究の目的

本研究では特にIMSでのイメージングに適した脂肪酸やアミノ酸に注目し、細胞レベルでの発現レベルのマッピングを行う。これらの生体分子の医学生物学的機能・役割は近年次々に報告されている。例えば神経の高次機能と特定の脂肪酸、アミノ酸との関連などが注目を集めているが、その作用機序はほとんどわかっていない。その理由の1つはこれらの生体分子には抗体染色など従来の方法で分布パターンがわからない点である。しかしながら、連携研究者である瀬藤らによりヒトの病理組織、マウス脳などのMALDIイメージングから脂質など生体分子はその種類ごとに特有のパターンが存在し、癌などの病的な状態ではパターンが変化することを明らかにしてきた(Hayasaka, Kimura, 2010)。一方、その生物学的意味はいまだ明らかになっていない。これら哺乳動物を用いた実験結果から線虫においても個々の細胞レベルで生体分子ごとに独自のプロファイルを持っていることが予想される。線虫のシングルセルレベル分子マップはその豊富な遺伝学的資源と組み合わせることにより、細胞レベルでの分子プロファイルの決定機構とその役割を明らかにすることが可能になる。将来的にはヒトを含めた高等動物に還元され、生体分子の局在と関連した疾病の発病機構の解明や創薬などにつながることを期待される。

3. 研究の方法

線虫 *C.エレガンス*は成虫でも体長1ミリ前後と、これまでIMSで解析されてきた材料としては非常に小さく、MALDI法によるイメージングでは発現組織や細胞の特定が困難であった。そこでアルバックファイ社 TRIFT VおよびION-TOF社のTOF-SIMSシステムを用いて、より解像度の高いTOF-SIMS法で横断面、縦断面から線虫TOF-SIMS法で測定を行った。装置で得られた質量スペクトラムの中からいくつかの生体分子に注目し、それらの2次元配置をマッピングした。

サンプルである線虫 *C.エレガンス*の準備は以下の方法で準備した。

- 1)パラホルムアルデヒド固定後、クライオスタットを用いて作製した凍結切片をITOスライドガラスにマウントする。
- 2)不活化ガスArガスクラスタライオンビーム(Ar-GCIB)を強く当てることで表面を削るスパッタリングを行い、サンプル表面をクリーニングした後に、本解析を行った。

4. 研究成果

(1)成蹊大学青柳里果教授との共同研究でION-TOF社のシステム(TOF.SIMS5, ION-TOF GmbH)でTOF-SIMSイメージング解析を行った。10 keV Ar₁₀₀₀⁺をスパッタリングイオンビームとして、表面をクリーン

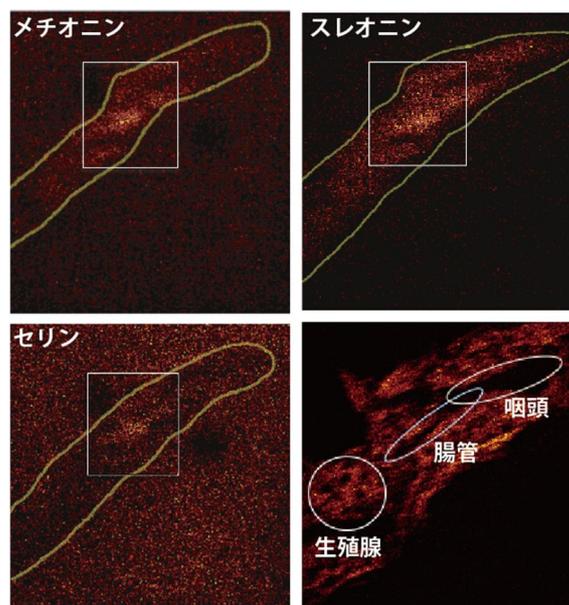


図1 線虫のTOF-SIMSイメージングによって得られたアミノ酸の局在。3種類のアミノ酸の局在と線虫の輪郭。右下図は線虫の組織の位置関係を示す。

グしたのち, 60 keV の Bi_3^{++} を一次イオンとして測定した. その結果, 線虫をシングルセルレベルで区別するために十分な解像度が得られた(図 1).

(2)野生型と $\omega 3$ 脂肪酸合成に異常のある *fat-1* 変異体で生体分子の発現パターンを比較した結果, MALDI イメージングと同様に異なるイメージを得ることができた.

(3)メチオニン, セリン, スレオニンなどアミノ酸由来と想定されるフラグメンイオンが, 腸など特定の組織(細胞)に局在していること, またその発現パターンは重複が見られるものの, 異なっていることが観察された(図 1).

(4)得られた IMS イメージをより, 高解像度, 好感度にするために解析法の改良を検討した. 測定データを主成分分析(PCA)で解析し, 高空間分解能イメージと高質量分解能イメージを融合させることで, 元の TOF-SIMS データよりも空間分解能の向上したイメージを得ることができた. また画像のピクセル数を減少させることで低強度の二次イオンのイメージを効果的に増強することに成功した(図 2) (Takahashi, Kimura 2018). 以上の結果から, 本研究の目的とする細胞レベルでのイメージングに成功した.

このように本研究で当初予定していた通りシングルセルレベルでの生体分子イオン局在解析が可能になった. 一方で, 線虫は微細であるため, 生体分子が局在する細胞・組織の解剖学的位置をより明確にかつ迅速に確定するための基礎的な技術開発が必要であることも明らかになった. 本研究の成果をもとに今後そのような方向に研究を発展させる予定である.

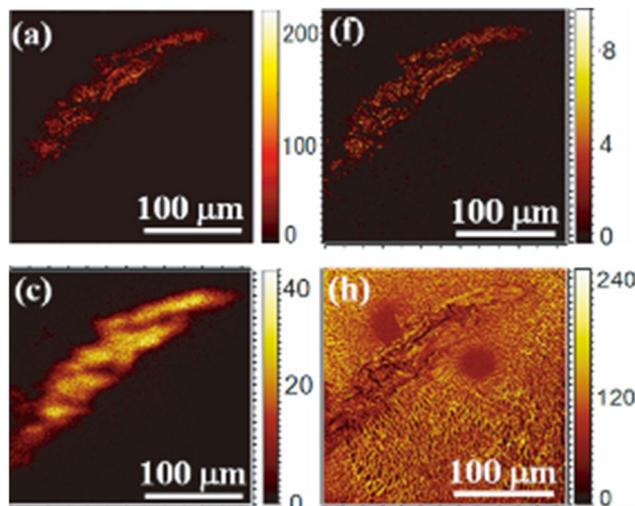


図2 C.エレガンスの高空間分解能イメージと高質量分解能イメージを組み合わせることによって得られた高解像度像($m/z = 70$). (左上)融合して得られた高解像度像 $m/z = 70$, (右下)高質量分解能像 $m/z = 70$, (右上)高空間分解能像 $m/z = 70$, (右下) 高空間分解能像全イオン.

<引用文献>

Kimura, Y. et al. *EMBO rep.* 第 3 巻, 2002, 962-966.

Kimura, Y. et al. *J. Biol. Chem.* 第 285 巻, 2010, 22936-22941.

Kimura, Y. et al. *Worm Breeder's Gazette* 第 44 巻, 2009, 837-848.

Hameed, S., Kimura, Y. et al. *Anal Bioanal Chem.* 第 407 巻, 2015, 7589-7602.

Hayasaka, T., Kimura, Y. et al. *Lipids* 第 44 巻, 2009 837-848.

Takahashi, K., Kimura, Y. et al. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 36 巻, 2018, 03F113.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Takahashi, K., Yamagishi, T., Aoyagi, S., Aoki, D., Fukushima, K., Kimura, Y. Principal component analysis image fusion of TOF-SIMS and microscopic images and low intensity secondary ion enhancement by pixel reduction. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 査読有, 第 36 巻, 2018, 03F113. <https://avs.scitation.org/doi/pdf/10.1116/1.5013218>.

Kimura, Y., Tsutsumi, K., Konno, A., Ikegami, K., Hameed, S., Kaneko, T., Kaplan, OI, Teramoto T, Fujiwara M, Ishihara T, Blacque OE, Setou M. (2018) Environmental responsiveness of tubulin glutamylation in sensory cilia is regulated by the p38 MAPK pathway. *Sci.Rep.*, 査読有, 第 30 巻 2018, 8392.

doi: 10.1038/s41598-018-26694-w.

[学会発表] (計 4 件)

木村芳滋, 金子朋未, 青柳里果, 瀬藤光利. 質量分析イメージング法(IMS)を応用した線虫 *C.elegans* の構造解析. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術総会. 会場: 朱鷺メッセ (新潟). 2019 年 3 月 28 日(木).

Kimura, Y., Kaneko, T., Aoyagi, S. Application of Imaging mass spectrometry for *C. elegans*. EMBO Workshop: *C. elegans* development, cell biology and gene expression. 会場: ワールドトレードセンター (バルセロナ, スペイン). 2018 年 6 月 13 日(水).

Kimura, Y., Tsutsumi, K., Konno, A., Ikegami, K., Hameed, S., Kaneko, T., Kaplan, OI., Teramoto, T., Fujiwara, M., Ishihara, T., Blacque OE., Setou, M. Environmental responsiveness of tubulin glutamylation in sensory cilia is regulated by the p38 MAPK pathway., 第 70 回日本細胞生物学会・第 51 回日本発生生物学会合同大会. 会場: タワーホール船堀, 東京. 2018 年 6 月 6 日(水).

Kimura, Y., Kaneko, T., Aoyagi, S. Imaging mass spectrometry for *C. elegans.*, 21st International *C. elegans* Conference. 会場：UCLA , USA . 2017年6月24日(土).

〔図書〕(計 1件)

木村芳滋 , 金子朋未 「脱グルタミン酸化」生体の科学 2018 第 69 巻 480-481.

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)連携研究者

連携研究者氏名：瀬藤 光利

ローマ字氏名：SETOU, Mitsutoshi

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20302664

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石崎 逸子

ローマ字氏名：ISHIZAKI, Itsuko

研究協力者氏名：眞田 則明

ローマ字氏名：SANADA, Noriaki

研究協力者氏名：金子 朋未

ローマ字氏名：KANEKO, Tomomi

※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、研究者個人に帰属されます。