

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 8 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780257

研究課題名(和文)卵黄脂質の時空間的な解析

研究課題名(英文)Spatiotemporal analysis of lipids in avian yolk

研究代表者

榎元 廣文(ENOMOTO, Hirofumi)

帝京大学・理工学部・講師

研究者番号：30609392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ウズラ卵をモデル卵として、質量顕微鏡法により卵黄切片中のホスファチジルコリン以外の脂質の可視化を行った。すると、黄色卵黄部において、ホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルイノシトールもまた、濃黄色卵黄と淡黄色卵黄からなる層状構造とは異なる新規の層状構造を形成していることが明らかとなった。さらに、それらの層状構造は、含有する脂肪酸の違いによって異なっていることが明らかとなった。また、スフィンゴミエリンは主にラテブラと胚盤に分布していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the previous study, we visualized phosphatidylcholine (PC) molecular species by MALDI imaging mass spectrometry (IMS). They formed characteristic ring structures in the quail yellow yolk that were categorized by the type of fatty acid contained in the PC molecular species. The ring structures formed by the PC molecular species were distinct from the known ring structure formed by dark and light bands.

In this study, we attempted to visualize other phospholipids by MALDI-IMS. Phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), lysophosphatidylcholine (LPC), lysophosphatidylethanolamine (LPE), and sphingomyelin (SM) molecular species are visualized. PE and PI molecular species also formed characteristic ring structures in the quail yellow yolk. Furthermore, most of SM molecular species are distributed in the germinal vesicle and latebra.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：卵黄 脂質 質量顕微鏡法 鶏 胚

1. 研究開始当初の背景

卵黄中には、胚の発生に必要な不可欠な代謝物が含まれている。その中でも脂質は卵黄中に最も多く含まれる代謝物である。近年、脂質は細胞膜の構成成分やエネルギー源としての役割の他、シグナル伝達やアポトーシスなどの生理的な役割を果たすことが明らかとなってきた。これらのことから、脂質は胚発生においても重要な役割を果たしていると考えられる。

これまでの研究で、申請者は鶏卵をモデル卵として、質量顕微鏡法により卵黄に含まれる脂質の可視化を試みたところ、卵黄のリン脂質の中で最も多く含まれているホスファチジルコリンが分子種(含有する脂肪酸が異なる)ごとに、濃色卵黄や淡色卵黄から形成される既知の層状構造とは異なる新規の層状構造を形成していることを発見した。申請者は、ホスファチジルコリン以外の脂質もまた、卵黄部において分子種ごとに特徴的な層状構造を形成しており、これら層状構造が胚発生の各ステージにおいて形成される各器官への脂質の供給を調節しているのでは、と推察した。

2. 研究の目的

卵黄中のホスファチジルコリン以外の主要な脂質は、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンといったリン脂質、およびトリアシルグリセロールなどがある。しかし、これらの脂質の卵黄中での分布は明らかになっていない。

液体クロマトグラフ質量分析などの分析法は脂質を高感度かつ分子種レベルで詳細に解析することが可能であり、脂質分析において主要な機器となっている。しかし、この分析法には抽出処理が必要であり、組織中での脂質の局在情報は失われてしまう。質量顕微鏡法は、2次元に質量分析することによって、動物や植物の組織切片中の代謝物を可視化する手法である。これまで、様々な動物・植物組織において、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、糖、脂質、揮発性成分、色素成分、農薬や薬物、および神経伝達物質など種々の代謝物の可視化が報告されている。特に現在、質量顕微鏡法は、脂質を分子種レベルで可視化できる唯一の手法である。

そこで本研究では、鶏卵をモデル卵として、質量顕微鏡法により、卵黄中のホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンの可視化を試みた。また、リン脂質の層状構造が胚発生過程において形成される各器官へのリン脂質の供給を調節しているかどうか調べるためには、胚発生中の卵黄より胚を取り出し、含まれる脂質成分を詳細に解析することが必要である。そのための前

段階として、胚発生中の鶏種卵の卵黄からの胚のみの取り出し条件の検討を行った。

3. 研究の方法

質量顕微鏡法

鶏卵をドライアイス中で凍結後、卵黄を取り出し、クライオスタット (CM1850、Leica Microsystems) を用いて、ラテブラと胚の中心を含む 10 μ m 厚の凍結切片を作成した。この切片を導電性の Indium-tin-oxide をコートされたスライドガラスへ接着後、エアースプレーを用いてマトリックス溶液を塗布した。なおマトリックス溶液としてホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルエタノールアミンの測定には 9-アミノアクリジン を 70% エタノールに溶解した溶液を、リゾホスファチジルコリン、およびスフィンゴミエリンの測定には 2,5-ジヒドロキシ安息香酸を 70% メタノールに溶解した溶液を用いた。マトリックスを塗布した卵黄切片を質量顕微鏡装置 (ultraflextreme TOF/TOF、bruker dartomics) にセットし測定を行った。なお、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、およびリゾホスファチジルエタノールアミンはネガティブイオン検出モード、リゾホスファチジルコリン、およびスフィンゴミエリンはポジティブイオン検出モードで測定を行った。質量電荷比 (m/z) 400-1000 でマススペクトルデータを取得し専用の解析ソフト (fleximaging、bruker dartomics) を用いて、各種脂質の分子種レベルでの可視化を行った。

また、各種脂質の分子種の同定は組織切片上を直接タンデム質量分析することで行った。さらに、卵黄の連続切片より Bligh & Dyer 法により総脂質を抽出後、逆相 C18 カラムを取り付けた液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (Agilent 6430、Agilent Technologies) を用いてのプレカサージオンスキャンやニュートラルスキャンモード測定によっても各種脂質の分子種の定性を行った。

鶏種卵の卵黄からの胚の分離条件の検討

新鮮な鶏の種卵を孵卵器に入れ 1 日おきに採卵し、割卵して中身をシャーレに出した。次に、胚上の卵黄膜をハサミでカット後、ピンセットを用いて胚のみ取り出し、New の培養法に用いられるリング状の濾紙を用いた胚の取り出し、およびマイクロシリンジを直接胚に刺しての成分のみの吸い取りによる分離を検討した。

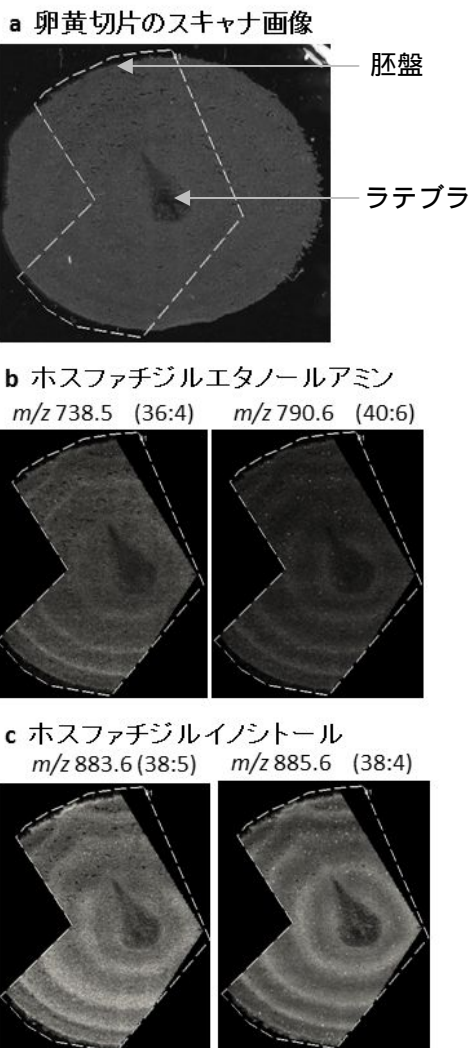
鶏種卵の卵黄脂質の薄層クロマトグラフィ分析

新鮮な鶏の種卵を孵卵器に入れ 0、24、48 時間後に採卵し、割卵後、卵黄のみを分離した。この卵黄に蒸留水を加えホモジナイザーを用いて均質化後、Bligh & Dyer 法により総

脂質を抽出した。この脂質溶液を、シリカゲルをコートしたガラスプレートにスポットし、中性脂質、およびリン脂質展開用溶媒を用いて薄層クロマトグラフィーを行った。中性脂質およびリン脂質を分離後、よう素蒸気法により染色した。この薄層クロマトグラフィープレートの画像イメージをスキャナーで取り込み ImageJ 分析を行った。なお、各脂質の強度は、3 スポットの平均値から求めた。

4. 研究成果

質量顕微鏡法により、鶏卵黄切片中のホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンを含有する脂肪酸ごとに可視化することができた。ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールもまたホスファチジルコリンと同様に、含有する脂肪酸の種類によって異なる特徴的な層状構造を形成していることが明らかとなった(図1)。また、スフィンゴミエリンでは、スフィンゴミエリン(d18:1/16:0)およびスフィンゴミエリン(d18:1/18:0)の2種類が同定され、どちらも主に胚盤とラテブラに局在していることが明らかとなった。



相対強度
0% 100%

図1 卵黄切片のスキャナイメージ(a)、ホスファチジルエタノールアミン(b)およびホスファチジルイノシトール(c)の各 m/z 値のイオンイメージ。エラーバー = 5mm。

これら脂質の層状構造が胚発生における胚への脂質の供給を調節しているかどうか調べるためには、胚発生の各ステージにおいて胚中に形成される各器官と卵黄部で増減する各種脂質を詳細に解析することが必要である。そのための前段階として、胚発生中の卵黄からの胚のみの最適な分離条件の検討を行った。初めに、鶏種卵を孵卵器中に保持し、1日おきに採卵後、割卵して中身をシャーレに出した。すると保温から3日目の種卵では中身をシャーレに出すと卵黄膜が即座に破れ、胚との区別が難しかった。そこで、保温0、24、48時間後の種卵からの胚の分離を試みることにした。方法としては、胚を包む卵黄膜をハサミでカット後、ピンセットで杯のみの取り出し、Newの培養法で用いられるリング状の濾紙を用いての胚の取り出し、および卵黄表面の胚にマイクロシリンジを刺して内容物の取り出しを試みたが、どの方法も胚のみを取り出すことが難しかった。今後は、胚を含む卵黄凍結切片からレーザーマイクロダイセクション(LMD7000、Leica Microsystems)を用いて胚のみの取り出しを試みることを検討している。

卵黄から胚のみを分離することが困難だったため、孵卵器中で0、24、48時間保持した鶏種卵の全卵黄より総脂質を抽出し、ハクソウクロマトグラフィー分析により胚発生におけるトリアシルグリセロール、ホスファチジルコリン、およびホスファチジルエタノールアミンの変化を調べた。結果、0~2日の期間ではトリアシルグリセロールの総量はほとんど変化していなかったのに対し、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンの総量は明らかに減少していた。このことから、胚発生の0、24、48時間において、ホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンは分解されて利用されていると予想された。今後、液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析装置や液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置を用いて分子種レベルでの詳細な解析を行う予定である。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Hirofumi Enomoto, Nobuhiro Zaima.
MALDI imaging mass spectrometry
reveals novel structures in quail
yolk.
4th AOMSC & 10th TSMS Annual Conference.
2013年7月10-12日.
Taipei International Convention
Center.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎元 廣文 (ENOMOTO, Hirofumi)
帝京大学・理工学部・講師
研究者番号：30609392

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：