



Direct profiling of the phospholipid composition of adult *Caenorhabditis elegans* using whole-body imaging mass spectrometry

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Hameed, Saira メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2902

博士(医学) Saira Hameed

論文題目

Direct profiling of the phospholipid composition of adult *Caenorhabditis elegans* using whole-body imaging mass spectrometry

(全身イメージング質量分析を用いた成体 *Caenorhabditis elegans* のリン脂質直接プロファイリング)

論文の内容の要旨

[はじめに]

マトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析法 (MALDI-IMS) は、生体組織に含まれる多様な分子種の分布を網羅的に解析する手法である。これまでに、微生物、植物、哺乳動物、さらにはヒト病理組織中の分子分布解析に利用され、部位特異的な差異を明らかにしてきた。特に、特異的な抗体の生産が困難である脂質分子の分布解析に威力を発揮し、生物学、医学、薬学などの生命科学分野の発展を後押ししてきた手法である。さらに近年、高解像度での測定が可能になり、より微小な個体レベルでの解析も盛んになってきた。

体長 1 mm 程度の微小な個体である *Caenorhabditis elegans* (線虫) は、短い寿命、遺伝子操作の容易さなどの利点から、生命科学研究に欠かせない多細胞モデル生物であり、メタボロミクス、リポドミクス、ゲノミクス、プロテオミクスなどの網羅的解析にも使用されている。網羅的解析を得意とする MALDI-IMS を用いた線虫解析は生命科学において大変有用と考えられる。しかし、線虫は不浸透性の頑強な角質からなる外骨格に覆われており、MALDI-IMS による生体分子のイオン化が困難であった。

本研究では、フリーズクラック法を用いて線虫の角質を取り除き、MALDI-IMS による線虫生体内リン脂質のイオン化を試みた。さらに遺伝学的解析と組み合わせたトランスオミクス解析を企図し、野生型および遺伝子変異体を用いて、それぞれの線虫個体間におけるリン脂質発現パターンを比較した。

[材料ならびに方法]

野生型および *n-3* 脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子が欠損している *fat-1* 変異体の線虫を用いた。酸化インジウムスズでコートされた導電性スライドガラス上の 2 か所に水と共に培地から回収した線虫を滴下した。フリーズクラック法を行う試料滴下部位をカバーガラスで覆い、その上から指で押すことで線虫試料を軽く固定し、液体窒素で冷却したアルミニウムブロック上で凍らせた。その後、カバーガラスを除去し 1 時間真空乾燥させ、電界放出形走査電子顕微鏡 (SEM) および MALDI-IMS により観察、解析した。

SEM による線虫試料の表層観察は、四酸化オスミウムを用いて試料表面をコーティングし、日立 S-4800 (日立テクノロジーズ) を用いて行った。

MALDI-IMS のマトリックスとして 2,5-ジヒドロキシ安息香酸を陽イオン測定に、9-アミノアクリジン水和物を陰イオン測定に用い、手動スプレー法および自動蒸着装置を用いて試料表面に塗布した。その後、ultraflex II (Bruker Daltonics 社製) を用いてデータを取得し、解析には専用ソフトウェアである flexImaging を使用した。

液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化-タンデム質量分析 (LC-ESI-MS/MS) 用試料は、野生型および *fat-1* 変異体のリン脂質をホルチ法にて抽出し、ACQUITY (Waters 社製) および 4000Q-TRAP (AB Sciex 社製) にて測定を行った。また、脂肪酸同定には、Q Exactive (Thermo Scientific 社製) を使用した。

[結果]

フリーズクラック法を用いた線虫試料と凍結のみの対照試料の表層を SEM で観察した。対照試料は非常に滑らかな表面であったのに対し、フリーズクラック法を用いた試料は、表層が削れている様子が観察された。MALDI-IMS によりこれらの試料を測定したところ、フリーズクラック法を用いた試料から得られた平均マススペクトルのシグナル強度が対照試料と比較して増加していた。分子のシグナル強度を統計解析したところ、フリーズクラック法を用いた試料のシグナル強度が対照試料と比較して有意に高かった。また、フリーズクラック法により線虫組織分子が形状に反した分布を示さないことを評価した結果、生体内で検出される分子は線虫個体外のガラス表面からほとんど検出されなかった。さらに、自動蒸着装置によるマトリックスの塗布を行った結果、線虫個体内の複数の分子種の異なる組織内分布が評価できた。

次に、野生型および *fat-1* 変異体のリン脂質組成を比較した。LC-ESI-MS/MS により *fat-1* 変異体において顕著な組成変化が見いだされたホスファチジルコリン (PC) の脂肪酸組成について、陽イオン測定により MALDI-IMS 解析を行った。*fat-1* 変異体では、エイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5) 含む PC 分子種である PC(20:5/20:5)、PC(20:4/20:5) が有意に減少する一方で、EPA を含まない PC 分子種である PC(20:4/20:4)、PC(20:3/20:4)、PC(20:3/20:3) が有意に強く検出された。さらに、陰イオン測定を行い、ホスファチジルイノシトール (PI) の脂肪酸組成を解析した結果、*fat-1* 変異体において、EPA を含む PI 分子種、PI(18:0/20:5) に相当する分子の消失、EPA を含まない PI 分子種、PI(18:0/20:4) に相当する分子の代償的な蓄積が観察された。

[考察]

フリーズクラック法は、線虫の頑強な角質を取り除くことで、容易に構成脂質分子を検出することが可能であり、MALDI-IMS 前処理法に適していると考えられた。さらに、野生型と *fat-1* 変異体のリン脂質を比較し、遺伝的変異と生成脂質の変化を評価可能であった。今後、この技術を用いることで線虫を用いた多彩なオミックス解析、トランスオミックス解析が可能になり、生命科学の発展につながると考えられた。

[結論]

線虫生体内および生体間レベルでのリン脂質を MALDI-IMS で容易に解析可能に

する前処理法を見つけ出した。さらに、線虫遺伝学と組み合わせることに成功し、トランスオミックスも可能にする、生命科学の発展に貢献し得る手法の開発を実現した。