

# Specific localization of five phosphatidylcholine species in the cochlea by mass microscopy

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-09-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 瀧澤, 義徳 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/00003412">http://hdl.handle.net/10271/00003412</a>

博士(医学) 瀧澤 義徳

論文題目

Specific localization of five phosphatidylcholine species in the cochlea by mass microscopy

(質量顕微鏡による5つのホスファチジルコリンの蝸牛における特異局在)

論文の内容の要旨

[はじめに]

蝸牛のコルチ器は基底板の機械的振動を電氣的に変換し、蝸牛管外側壁の血管条は内リンパに電位やイオンを供給している。蝸牛の精緻な構造と機能は解剖学、電気生理学、分子生物学などの様々な方法で研究されている。近年は特にイオンチャネルやトランスポーター、セルジャンクションといった生体分子の解析が進んでいるが、これらはすべてタンパク質に関するものである。

タンパク質に加えて脂質も生体膜の基本的な構成成分であるが、その役割はまだ十分に解析されていない。ホスファチジルコリン(以下 PC)はリン脂質の一つで、蝸牛では加齢性難聴を予防するという報告もある。しかし PC には結合する脂肪酸によりさまざま種類があり、これらの局在や機能についてはまだ検討されていない。

これまで、質量分析イメージングを用いて PC を含めた多くの生体分子の局在が脳や網膜などにおいて明らかにされてきた。最近、我々はより高い解像度と精密な質量分析精度をもつ質量顕微鏡を開発した。今回申請者はこの質量顕微鏡を用いてモルモット蝸牛における PC の局在を明らかにした。

[材料ならびに方法]

プライエル反射正常の3週齢オスのモルモットを十分に麻酔して除痛した後に、断頭して側頭骨から蝸牛を摘出した。液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結し、2%カルボキシルメチルセルロース Na に包埋をして $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。薄切する直前に $-20^{\circ}\text{C}$ で20分間おいてから厚さ $15\mu\text{m}$ の切片を作成し導電性のあるスライドグラスに貼り付けた。

この切片に生体分子をイオン化するため 2,5-dihydroxybenzoic acid を主成分としたマトリックスを噴霧した後に、我々が島津製作所と共同開発した質量顕微鏡で解析した。同じ切片を用いて、質量分析(mass spectrometry 以下 MS)を二回繰り返して行い(MS/MS 測定)、PC の脂肪酸組成を同定した。蝸牛管の各部位における PC のシグナルを合計5つの切片を用いて統計学的に解析し、局在を明らかにした。尚、当研究は本学動物実験委員会の承認を受けて行った。

[結果]

無固定の蝸牛凍結切片を HE 染色して、らせん板縁、コルチ器、血管条、らせん靭帯、骨らせん板、らせん神経節、蝸牛軸の蝸牛神経が同定可能であることを確認した。

質量顕微鏡により各部位で得られたマススペクトルは、コルチ器と血管条では  $m/z$  782.55、らせん靭帯では  $m/z$  780.54 が強く測定された。

MS/MS 測定では、 $m/z$  782.55 の生体分子から、トリメチルアミン(59 Da)が外れた  $m/z$  723.50、さ

らにシクロホスファンリング (124 Da) が外れた  $m/z$  599.48、そこから Na イオンが外れて H イオンが付加した  $m/z$  577.53 というピークが測定された。また 16:0 と 18:1 の脂肪酸が外れたピークも測定され、 $m/z$  782.55 の生体分子は PC(16:0/18:1)+Na と同定された。同様に 5 種類の PC が同定された。

これらの 5 つの PC は蝸牛において、PC(16:0/16:0)は骨らせん板の神経線維と蝸牛軸の蝸牛神経に、PC(16:0/16:1)はコルチ器、PC(16:0/18:1)はコルチ器と血管条、PC(16:0/18:2)はらせん靭帯に有意差を持って局在することが示された。

#### [考察]

今回の質量顕微鏡は生体分子をイオン化するレーザー径を絞り空間解像度を 50  $\mu\text{m}$  から 10  $\mu\text{m}$  へ、また、matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight を用いて質量分析精度を高めた。この方法は脂質のような低質量の生体分子の解析に優れ、蝸牛のように小さく精緻な器官の解析が可能となった。

Seideman らは PC が蝸牛のミトコンドリアの機能を保護し、加齢性難聴を予防したと報告しており、PC は蝸牛の恒常性維持やストレス反応からの保護に何らかの役割を果たしていると考えられた。

今回蝸牛管で明らかになった 5 つの PC について、蝸牛と類似性を持つ他の臓器 (神経系としての脳とイオン循環系としての腎臓) と比較検討した。Mikawa らによると、PC(16:0/16:0)と PC(16:0/18:1)は嗅球の顆粒層や小脳の分子層など、神経的に可塑性の高い部分に局在を認め、蝸牛において前者は蝸牛神経や神経線維に、後者はコルチ器に局在していた。これらの PC は神経系との関連性が示唆された。

Sugiura らによると腎臓では、PC(16:0/18:2)は近位尿細管やヘンレループ、集合管などがある髄質に局在していた。この部位は腎臓における K イオンが循環する部位として知られている。蝸牛において PC(16:0/18:2)が局在するらせん靭帯には、ギャップジャンクションで連絡された線維細胞が存在し、K イオンチャネルやトランスポーターにより K イオンが循環している。PC(16:0/18:2)がらせん靭帯に局在することは、イオン循環という点で、腎臓との相同性が示唆された。蝸牛管外側壁において血管条に局在する PC(16:0/18:1)とらせん靭帯に局在する PC(16:0/18:2)がはっきりと区別できたことは、二つの PC の何らかの機能的な差異を示す可能性があると考えられた。また PC(16:0/16:1)はコルチ器に局在し、中枢神経や腎臓では示されていないものであった。

#### [結論]

質量顕微鏡を用いて、5 つの PC の蝸牛における局在を明らかにした。このような PC の局在の違いは、蝸牛のそれぞれの部位の構造の違いと関連していると考えられた。今後病変モデル動物での解析が進めば、その役割が明らかになると期待された。