



Glutaraldehyde and uranyl acetate dual fixation
combined sputtering /unroofing enables
intracellular fatty acids TOF-SIMS imaging with
organelle-corresponding subcellular distribution

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2022-10-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 張, 弛 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004196

論文審査の結果の要旨

細胞膜やオルガネラ膜の主要構成成分である脂肪酸は、これらの膜の生物物理学的特性に直接的な影響を与えている。また脂肪酸はシグナル伝達分子として、炎症反応を始めとした様々な生化学反応において重要な役割を果たしている。脂肪酸の働きについて理解を深めるためには、細胞内の脂肪酸の可視化技術の開発が必要である。質量顕微鏡は、脂肪酸種の網羅的な分子情報とその空間分布を同時に取得できる。特に、飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)は、脂肪酸種を一細胞レベルでイメージングできるポテンシャルを有するが、既存のグルタルアルデヒド(GA)による化学固定法を用いた測定においては、細胞内オルガネラ構造に対応した脂肪酸分布が画像化できないという問題があった。

本研究では、電子顕微鏡で用いられている試料調整法を参考にして試行錯誤を行い、細胞内のオルガネラ構造を保存したまま脂肪酸を固定可能な TOF-SIMS 用化学固定法プロトコルを探索した。探索した化学固定法を用いて培養細胞を固定し、既存のフラッシュ凍結スパッタリング技術もしくは物理的アンルーフ法と組み合わせて、培養細胞中の脂肪酸の *in situ* TOF-SIMS イメージングを行った。

申請者は、電子顕微鏡の超微細構造の観察に用いられる酢酸ウラニル(UA)を GA 固定と組み合わせることにより、質量イメージングのための新たな化学固定法として提案した。新たに開発した GA+UA 固定法を用いて実際に培養細胞の固定を行い、既存のフラッシュ凍結スパッタリング技術を用いて細胞膜を除去した後に、TOF-SIMS イメージングを行うことで、脂肪酸の細胞内分布の可視化が行えることを示した。また GA+UA 固定サンプルを GCIB(gas cluster ion beam)-TOF-SIMS で測定することにより、細胞内脂肪酸の多層イメージングを行えることも示した。さらに、GA+UA 固定法を物理的アンルーフ法と組み合わせると、スパッタリングなしで細胞内脂肪酸をイメージングできることも明らかにした。開発手法は、細胞内脂肪酸をサブセルレベルで網羅的にイメージングし、脂肪酸分布の生理的意義やその制御メカニズムの理解に役立つことが期待される。

審査委員会では、オルガネラ構造を反映した細胞内の脂肪酸分布を質量イメージングで決定するための新たな試料調整法を世界で初めて開発したこと、開発手法を用いて実際に培養細胞の脂質イメージングを実証した点を高く評価した。以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 長島 優

副査 前田 達哉

副査 河崎 秀陽