

質量分析統合利用による網羅的時空間分解代謝変動の解析

入江 美穂¹、藤村 由紀²、三浦 大典²、大和 真由美²、割石 博之^{2,3}

¹九州大学大学院 生物資源環境科学府、²九州大学 先端融合医療レドックスナビ研究拠点、³九州大学 基幹教育院

〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

E-mail: daipon@agr.kyushu-u.ac.jp

hirowari@agr.kyushu-u.ac.jp

Home Page: <http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/group2/>

近年、飛躍的な技術革新が見られるメタボロミクス技術は、分析手法として定量性・網羅性の高い GC-MS や LC-MS などが広く用いられている。しかしこれらの手法には、組織抽出物中の代謝物を対象としているため局在情報が失われるという問題点がある。一方我々は、MALDI-MS を用いた質量分析イメージングにより、組織切片上にある様々な代謝物の分布を直接可視化する技術を開発した。本研究では、一過性中大脳動脈虚血再灌流ラットをモデルとして用い、質量分析イメージングと LC-MS データを組み合わせることで、ラット脳内における病態進展に伴う代謝動態の包括的な時空間分解的解析手法の構築を試みた。

1. はじめに

メタボロミクスはゲノムの物質的最終表現型である代謝物を対象とするため、バイオマーカー探索や創薬ターゲットの同定、疾病発症メカニズム解明における重要性が強く指摘されている[1]。一方、近年飛躍的に向上しつつあるメタボロミクス技術は、測定における種々の制約により組織からの代謝物の抽出・濃縮が不可欠である。結果的に得られる情報は生体組織全体の平均値となり、局所的なメタボローム変動情報は完全に消失してしまう。組織から二次元情報を保持しつつ直接代謝物を検出する技術があれば、疾患メタボロミクスにおける大きなブレイクスルーとなるであろう。

近年、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化

(MALDI) 質量分析を用いた生体分子の *in situ* マッピング（質量分析イメージング; MSI）が盛んに行われている。しかしながら、MALDI 法自体の持つ欠点（定量性・再現性の悪さ、マトリックスイオンによる妨害）のため、細胞膜脂質や骨格タンパク質など、組織中に圧倒的の多量に存在し、かつ分子量が比較的大きな分子群の定性的な分布観察のみにその適用は制限されている[2]。一方我々は、MALDI 法に用いるマトリックスの最適化およびサンプル調製法の最適化を徹底的に行うことで、生体代謝物質の超高感度（attomole レベル）測定法を開発し、本手法を用いた代謝物分析技術の開発に成功した[3]。さらに、本技術を MSI に応用した結果、マウス脳切片から核酸誘導体、アミノ酸、中央代謝系（解糖系、TCA 回路）中間体などを同時に検出し、そ

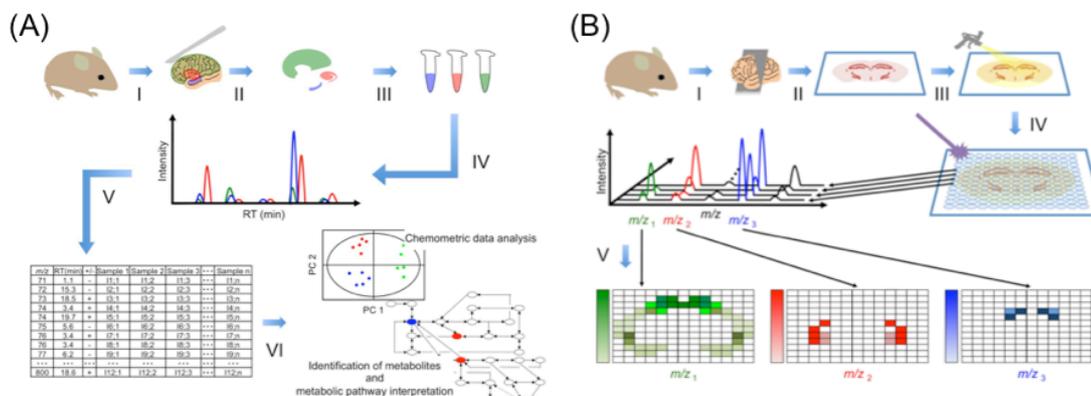


図 1. 本研究で行う実験スキーム。(A) 抽出した脳組織を大脳皮質・海馬・線状体の 3 部位を切り分け、代謝物を抽出後 LC-MS に、(B) 冠状断面切片を作製後、質量分析イメージングにそれぞれ供した。

の組織内分布を可視化することに成功した[4]。一方で、MALDI 法を用いた MSI では現在使用可能なマトリックス（イオン化助剤）が限られており、数十種程度の代謝物しか検出できない。従って、組織内で起こる複雑な代謝変動を包括的に捉える事は難しい。

そこで我々は、そこで本研究では、一過性中大脳動脈梗塞（MCAO）虚血再灌流ラットをモデルとして用い、MSI と LC-MS のデータを組み合わせることで、ラット脳内における代謝動態の包括的な時空間分解的解析手法の構築を試みた。

2. 解析データおよび方法

虚血再灌流後のラット脳内の代謝変動を明らかにするために、左脳側中大脳動脈に対し虚血処理を施したラットを作製し、1 時間虚血後に再灌流（0、3、24 時間）処理を行った。所定時間後、ラットから全脳を摘出し、皮質・海馬・線条体を含む脳切片を作製後、MSI に供した（図 1A）。一方、皮質・海馬・線条体それぞれの詳細な代謝変動について検討するために、各領域を切り出し代謝物を抽出後、LC-MS 分析に供した（図 1B）。得られたデータはそれぞれ多変量解析、およびパスウェイ解析に供した。

3. 結果と考察

はじめに、LC-MS データを用い、大脳皮質・海馬・線条体における再灌流時間に伴う代謝プロファイルの変動を検討した。本研究では、MCAO ラットの脳から大脳皮質・海馬・線条体を採取し、得られたデータを主成分分析に供した。その結果、虚血半球では大脳皮質・海馬・線条体それぞれがクラスターを形成することが示され、領域ごとに代謝状態が異なることが示唆された。さらに大脳皮質と線条体では再灌流 0 時間・3 時間・24 時間で異なる分離を示した。これは虚血再灌流処置により虚血半球の大脳皮質および線条体にて時間依存的に代謝が大きく変化している事を示している。

次に、大脳皮質・海馬・線条体を含む厚さ 10 μm の冠状断面薄切片を作成し、スプレーコーティング法にてマトリックスを塗布後、MSI 供した。MSI では、中央代謝系、アミノ酸、核酸誘導体など、様々な代謝物の脳内分布を同時に可視化する事に成功した。また、病態進展に伴うそれぞれの代謝物の分布変化を定量的に捉えることに成功した。さらに、LC-MS および MSI 両方で検出された代謝物の強度データを元に heatmap 解析を行った結果、どちらの分析法でも各代謝物に対

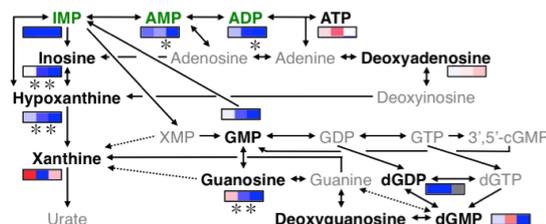
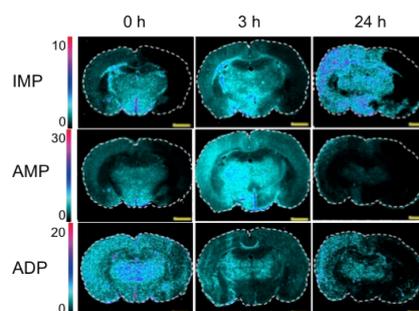


図 2. MCAO ラットの虚血再灌流時における脳内核酸代謝変動の時空間分解可視化

して同様の変動プロファイルを得ることが可能であることが明らかとなった。以上のことから、LC-MS ではより網羅的・包括的な代謝変動を捉えることが可能であり、MSI では代謝変動に空間情報を付与できる事が示された。また、これらの手法を相補的に利用することで、組織内微笑領域における代謝変動をより包括的に捉えることが出来ると考えられる。

4. 今後の展望

質量分析イメージングと LC-MS データを組み合わせることで、微小領域における詳細な代謝変動を可視化することができ、病態レベルに応じた特異的な代謝物の動態を明らかにすることに成功した。本手法は様々な組織に適応でき、これまで明らかとなっていない生命現象を理解する画期的手法になると期待される。さらに本技術と同時に他の非侵襲イメージング画像を重畳することで、生体分子解析に新たな modality を提供すると共に、空間情報を持つ画期的なバイオマーカー探索技術として利用することも期待できる。

参考文献

- [1] 福崎英一郎 監修「メタボロミクスの先端技術と応用」シーエムシー出版
- [2] Sugiura Y, *et al.*: *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5, 31-43 (2010)
- [3] Miura D, *et al.*: *Anal. Chem.* 82, 498-504 (2010)
- [4] Miura D, *et al.*: *J. Proteomics*, 75, 5052-5060 (2012)