



Title	質量分析イメージングによる新規酵素組織化学手法の開発
Author(s)	竹尾, 映美
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82196
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (竹尾 映美)	
論文題名	質量分析イメージングによる新規酵素組織化学手法の開発
論文内容の要旨	
<p>第一章 緒論</p> <p>酵素活性は酵素の働きおよび生理的役割を知る上で重要な指標である。酵素組織化学は組織切片上で酵素活性の局在を可視化する手法であり、酵素反応の一次反応産物を二次反応により検出可能な最終産物に変換して顕微鏡下で観察する。従来の方法に加え、近年質量分析イメージング(MSI)が酵素組織化学の新規検出法として着目を浴びている。基質と様々な生成物を個別に検出可能であり二次反応を必要としない利点を有し、MSIを用いた酵素組織化学はこれまでペプチドおよび脂質を基質とした酵素反応の特異的可視化に応用されてきた。しかしながらMSIによる酵素組織化学は未だ発展途上であり、以下のような課題は未知のままである：(1)低分子基質での応用可能性、(2)定量的議論の不足、(3)従来の酵素組織化学で困難な酵素反応への適用可能性。本博士研究では、以上の課題を解決すべく、神経伝達物質アセチルコリンの代謝に関与する二つの酵素を対象としたMSIによる定量的酵素組織化学手法の開発を目的とした。</p> <p>第二章 MSIを用いたコリンエステラーゼ(ChE)の定量的酵素組織化学手法の開発</p> <p>本章では、MSIを用いてChE活性を定量的に可視化可能な酵素組織化学手法の開発を試みた。生体内濃度が高いアセチルコリン・コリンを対象とするにあたり、重水素標識されたアセチルコリンd9を基質に使用した。さらにイオン化効率を考慮した画像補正式を導入して、組織部位特異的なマトリックス効果の補正を行った。初めに、開発した手法によりマウス脳矢状断面における相対的ChE活性分布画像を取得し、先行研究での部位抽出による酵素活性測定との比較によって手法の定量性・妥当性が評価された。また、高解像度分析によりマウス脳の海馬・小脳・視床下部における詳細なChE活性分布の取得に成功し、2種類のChEに特異的な阻害剤の添加により各ChEの脳内分布報告と対応する結果が得られた。最後にキロシヨウジョウバエに本手法を適用すると、異種動物間での汎用性を確認したと共に、可溶性酵素を含む様々な形態のChE活性分布を定量的に可視化するのに本手法が有用であることが示された。本章におけるMSIによる定量的ChE活性可視化手法の開発により、ChE活性の「直接」かつ「定量的な」可視化が可能になった。</p> <p>第三章 コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)を対象とした酵素組織化学による<i>de novo</i>アセチルコリン合成の可視化</p> <p>本章では第二章で開発したMSIによる定量的酵素組織化学手法を応用し、従来困難であったChAT活性の可視化を試みた。基質にはコリンd9を用い、生成物の分解を防ぐためにChE阻害剤フィソスチグミンを添加した。初めに、基質濃度・溶媒・反応時間を検討して組織切片上でのChAT反応を達成し、マウス脳においてChAT活性の定量的分布画像の取得に成功した。線条体と橋において強いChAT活性と共に、線条体および小脳の微細構造における特徴的なChAT活性が新たに明らかになり、開発した手法がChAT活性の半定量的検出および可視化に有用であることが示された。さらに、ラット脊髄では前角と前根を繋ぐ腹側白質部の軸索中ChAT活性が初めて可視化された。最後に手法を脊髄損傷モデルマウスの脊髄に適用して一次損傷と二次損傷のChATおよびChE活性への影響を調べた結果、一次損傷と二次損傷がChAT活性に与える影響は部位特異的かつ異なる形で現れることが明らかになった。齧歯類の脊髄は小さく灰白質や前角などの部位毎の酵素活性測定は困難であったが、本手法の開発により組織切片一枚の中でChAT活性の議論が可能になった。また、従来の酵素組織化学では可視化困難な酵素反応に対しても応用可能であることが世界で初めて示された。</p> <p>第四章 総括と展望</p> <p>本研究では、重水素標識された基質の使用およびMSI結果の補正を行うことで、ChEおよびChATを対象としたMSIによる半定量的酵素組織化学手法を開発した。組織内での詳細なChE活性を定量的かつ包括的に明らかにし、さらに齧歯類の脳および脊髄において特徴的なChAT活性分布を初めて可視化することに成功した。本研究によってMSIによる酵素組織化学が持つ更なる可能性が検証されたことで、今後もMSIによる酵素組織化学が様々な酵素反応へ応用されると期待される。組織切片上での「直接」かつ「定量的な」酵素活性の可視化が微小・微量な試料において有用であることを示唆しており、今まで理解し得なかった生命現象の解明や疾患の基礎解明に大きく貢献可能であると考えられる。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (竹 尾 映 美)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	内山 進
	副 査	教授	栗栖 源嗣
	副 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	本田 孝祐
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	渡邊 肇
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>酵素組織化学は組織切片上で酵素活性の局在を可視化する手法であり、酵素反応の一次反応産物を二次反応により検出可能な最終産物に変換して顕微鏡下で観察する。従来の方法に加え、近年質量分析イメージング(MSI)が酵素組織化学の新規検出法として着目を浴びている。基質と様々な生成物を個別に検出可能であり二次反応を必要としない利点を有し、MSIを用いた酵素組織化学はこれまでペプチドおよび脂質を基質とした酵素反応の特異的可視化に応用されてきた。しかしながら MSI による酵素組織化学は未だ発展途上であり、以下のような課題は未知のままである：(1)低分子基質での応用可能性、(2)定量的議論の不足、(3)従来の酵素組織化学で困難な酵素反応への適用可能性。第一章では、以上のように従来の MSI による酵素組織化学の課題を述べた上で、神経伝達物質アセチルコリンの代謝に関与する二つの酵素を対象とした MSI による定量的酵素組織化学手法の開発を本博士論文研究の目的としている。第二章では、コリンエステラーゼ(ChE)を対象として MSI による定量的な酵素組織化学手法の構築を行っている。重水素標識されたアセチルコリン d9 を基質として使用し、イオン化効率を考慮した画像補正式を導入することによって、マウス脳内の相対的 ChE 活性画像を取得している。先行研究での部位摘出による酵素活性測定結果との比較により手法の定量性・妥当性が評価され、マウス脳の各部位における詳細な ChE 活性分布像の取得および異種動物としてキイロショウジョウバエへの手法の応用を行っている。以上の結果は、手法の開発によって ChE 活性の「直接」かつ「定量的な」可視化が可能になったことを示しており、MSI を用いた酵素組織化学の新たな利点を切り開いたと言える。第三章では、第二章で開発した手法を応用し、従来困難であったコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)活性の可視化を達成している。健常なマウス脳および脊髄における ChAT 活性を初めて可視化して特徴的な ChAT 活性の局在を明らかにしただけでなく、手法を脊髄損傷モデルマウスに適用し、脊髄損傷における一次損傷と二次損傷の ChAT 活性へのダメージの違いを明らかにしている。げっ歯類の脊髄のような小さい試料では ChAT 活性の測定が困難であったが、手法の開発によって脊髄損傷の解明に繋がる新たな知見が獲得できており、手法の有用性を示している。さらに、本結果は MSI を用いた酵素組織化学がアセチル基転移酵素に対して初めて適用された例である。以上のように、本論文の成果は MSI による酵素組織化学が持つ更なる可能性を検証しており、今後も MSI による酵素組織化学が様々な酵素反応へと応用され、生命現象の理解や疾患の基礎解明に大きく貢献可能であることを示唆している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。</p>			