

トランスオミクス解析室だより

2023年 11月



秋も深まり、駐車場のイチョウも金色に色づきました。
暖かい日と寒い日が入り交じるこの季節、山茶花が見頃を迎えています。



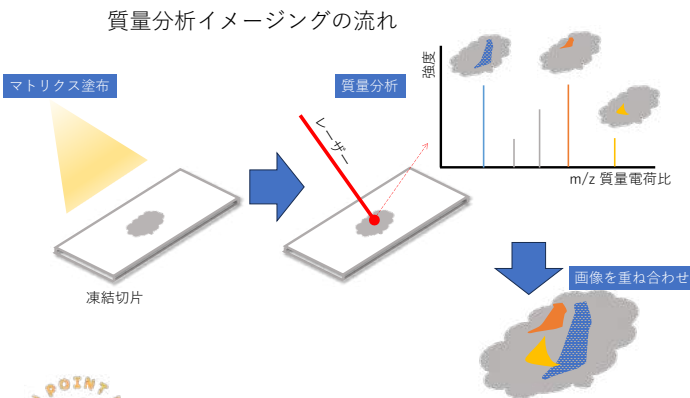
質量分析イメージング

新規導入の質量分析装置 timsTOF fleX (Bruker社) のトレーニングを一步ずつ進めています。前回の記事ではプロテオミクスの測定方法トレーニングを報告しました。今回は同じ装置を用いたイメージング測定について報告します。

これまで従来機を用いて生体内に存在する代謝物等の分子の同定・定量をしてきましたが、その分子の局在を見たい！ですよね！その夢が叶うテクノロジーが今春導入された質量分析装置 timsTOF fleXに搭載されています。その使い方のトレーニングを開始しました。

質量分析イメージングの流れ

特別な表面処理がされたITOスライドガラス上の切片にマトリックスを塗布します。そのスライドを質量分析装置の中に導入し、MALDI法によりレーザーを照射し、切片上のスキャンを行って分子を検出します。得られた分子のスペクトル毎にイメージ画像を構築することで、分子の局在を観察します。



実際の測定に際しては検討が必要なことがいくつかあります。

測定対象の分子に適したマトリックスの選択に加えて、マトリックス塗布方法の選択が大切です。

大きく分けて切片へのマトリックスの塗布方法は2種類あります。「蒸着法」と「スプレー法」です。蒸着法はマトリックスの結晶が細かく均一に形成されるために空間分解能を重視する場合に適しています。その一方で、スプレー法に比べて蒸着法では検出感度が低くなります。

両者の良いところを得るために蒸着の上にスプレー法によりマトリックスを重ねる2段階法や、蒸着後に有機溶媒雰囲気中で再結晶化する方法も知られています。

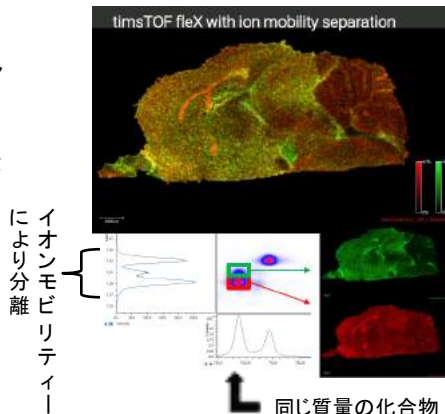
サンプルや測定目的に応じた最適化が必要と感じておりますが、蒸着装置とスプレー装置は導入を検討している段階で、まだ手元にありません。しばらくの間はプラモデルの塗装にも使うエアブラシを用いて手動スプレー法でマトリックス塗布をする予定です。技能に優れた達人の技があればスプレー装置を凌ぐ測定結果が得られると言われていますが、、、残念ながら私は初心者、、、でも、頑張ります。



凍結切片の作製の際にも注意が必要です。導電性付与されたスライドガラス (ITOスライドガラス) を用いることや凍結切片作製の際に一般的によく用いられるポリマー系のコンパウンドが使えないこと等、質量分析用に凍結切片を作製する際には通常とは違う点があります。切片を準備する前にご相談ください。

さて、これらの注意点についても情報を集めたもの、まだ実感や経験が伴っておらず、サンプルの提供者にお願いしながら知見を積み重ねていきたいと思っております。どうかご協力をお願いします。(森)

同重体または異性体イオンをイオンモビリティにより分離し、分析対象物の真の空間的な局在を知ることができます。



Bruker社資料・HPより

職員の着任

松本美和子特任専門員が着任いたしました。NGSチームの車輪が揃い全力で動き始めます。

11月1日付けでトランスオミクス解析室に配属となりました松本美和子です。
好きな事は近況報告を兼ねた食事会、苦手な事は縦列駐車です。
コロナ禍もあり外食をしばらく控えていたら、すっかり研究所近隣のお店情報に疎くなってしまいました。お勧めのお店等がありましたら、ぜひ教えていただくと嬉しいです。
業務につきましては、NGSライブラリの調製、シーケンサーのオペレーション、共同利用研究者の実験のお手伝いを担当します。
正確かつ丁寧な仕事ができるよう努めてまいります。どうぞよろしくお願いたします。
松本美和子



あとがき

数年前に大好きなミョウガを裏庭に植えました。花芽がでる前に収穫したいのですが、夏の暑さもあってこまめに見られず、気がつくと花が咲いている状態に……。それでもサラダや薬味にして美味しく頂きました。(牧野)



山口技術職員が植えてくれたひまわりが、つい先日まで共通棟の前で満開に咲いていました。今は寒さですっかりしぼんでしまった小さなひまわりでしたが、その名の通り、太陽の光の方を向いて回るように一生懸命咲いている姿に、とっても感動しました。(市川)

ナノポアシーケンサー

当室では、1分子ロングリードシーケンサーとして、PacBio社Sequel IIEとOxford nanopore社 GridIONを所有しています。ここ2年、Sequel IIEの高精度ロングリードの画期的性能により、共同利用研究の多くの非モデルを含む生物種で、telomere to telomereに極めて近いゲノムアセンブルを達成しています。やや陰に隠れた感のあるGridIONですが、ナノポアシーケンサーにはいくつか独自の解析系があります。

その1つがアダプティブサンプリングで、作製したライブラリーをシーケンスする際に、予めblack listあるいはwhite list配列を入力しておくことでwhite listに近い配列のみシーケンスする、black listに近い配列はシーケンスしない、という選択が可能です。ナノポア部位に入ったライブラリーの読み始め1秒の400baseの配列で判断し、black list配列は逆電流をかけてポアから除外します。この解析系はある生物種に共生など、別の生物種が共存する背景で威力を発揮します。

すでに幾つか論文が出ており、こちらでも検証しました。ある特定の分類群の植物は根域で菌根菌共生を行っています。どのような菌種が存在しているかを調べるのに、根を含む組織から普通にゲノムを取ってシーケンスすると、菌根菌よりゲノムサイズが格段に大きい植物のゲノムばかりが読まれてしまいます。アダプティブサンプリングで植物側の全ゲノム配列をblack listとして排除する設定で、菌根菌を濃縮しつつシーケンスが出来るか見てみます。

結果

相同性ベースで由来生物群が判断出来る41,989 readのうち、

被子植物類の配列	9,259 read
→雑草のゲノムもあるだろうから、すべてが宿主種のゲノムか確認が必要だが、かなり排除出来ている。	
担子菌類の配列	3,193 read
→読みたい菌根菌が属し、十分読めていると考えている。	
細菌類	23,338 read
→土壌細菌か？単なるコンタミなら土壌を十分に除くことを検討。	

原核生物と真核生物で、ゲノム抽出効率の差も影響している可能性もあり、まだまだ条件検討が必要ですが、実験系としては十分いけそうです。ご興味ある方はお問い合わせ下さい。(山口)