

質量顕微鏡

1 はじめに

顕微鏡を利用したイメージングは、昨今注目を集める技術である。生体分子のイメージングは蛍光標識抗体や遺伝子改変を利用して行われるが、これらの方法は間接的な観察手法であり、観察対象を直接見ているわけではない。加えて、観察対象が何であるかがあらかじめ判明していなければならない。質量顕微鏡は、これらの制約を受けずに生体分子のイメージングを可能にする。

2 原理

図1に質量顕微鏡の構造を示す。質量顕微鏡は顕微鏡部と質量分析部からなる。顕微鏡部では、3軸ステージにより試料プレートを動かして観察する。試料の画像を撮影して分析する領域を指定し、これをもとに質量分析部での分析を行う。質量分析部では、試料切片表面をレーザーで二次元的に走査し、表面の物質をイオン化する。イオン化された分子は、イオントラップへ導かれる。イオントラップとは高周波電圧を利用して、荷電粒子を限られた空間に捕捉する装置である。続いてリフレクトロン型飛行時間検出器により、トラップから出たイオンが検出器に到達するまでの飛行時間を測定し、質量電荷比 (m/z) を検出する。検出されたすべてのイオンについて、試料表面上の二次元分布情報が得られる。得られた m/z をデータベースで検索することで、分子の同定を行うことができる。

上記のような分子イメージングだけではなく、質量顕微鏡を用いて分子の構造を解析することが可能である。質量分析部内でイオン化した分子を分解し、断片イオンの m/z を測定するという方法である。この方法は質量分析を複数回行うことからタンデム質量分析 (MS^n 解析) と呼ばれる。一回の質量分析では詳細な構造や配列を解析できない、タンパク質のような大きい分子に関しても、断片のアミノ鎖やペプチドの構成を解析することで、分子配列の構造を解析することが可能である。

イオン化の方法で一般的なものは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI; matrix assisted laser desorption/ionization) である。マトリックスとは試料表面上の生体分子のイオン化を補助する化合物である。MALDI 質量顕微鏡法のワークフローを図2に示す。MALDI 質量顕微鏡法は、サンプルの採取、冷凍試料切片の作成とイオン化前処理、マトリックス塗布・蒸着、レーザー照射による表面物質のイオン化と検出、各測定点におけるマススペクトルの取得、イオンの二次元分布のイメージングという一連の手順からなる。イオン化前処理では、分析の対象とする試料表面上の分子がイオン化しやすい条件となるように、試料切片を有機溶媒やバッファーにより処理する。

3 特徴 (長所・短所)

まず質量顕微鏡の長所をあげる。質量顕微鏡を用いることで、標的分子を標識することなしに分子の分布情報を画像化することができる。標的分子を一種類に限定せず、多種の分子の分布情報を同時に取得することが可能である。加えて従来の質量分析器では表面分子の局在情報は失われていたが、質量顕微鏡は試料表面分子の局在を保持して解析することができる。またタンデム質量分析を行うことにより分析対象物質の分子構造を調べることができる。

次に短所をあげる。今のところ質量顕微鏡は生きたままの状態の生物を直接解析することができない。加えて解像度の点では電子顕微鏡などに劣る。また質量顕微鏡自体新しく、広く普及した機器ではないため、初期費用・維持費などのコストは他の顕微鏡に比べて高くなっている。

4 得られる画像とその解釈

質量顕微鏡を利用した解析で得られる画像の一例を示す。図3Aはマウスの肝臓の凍結組織切片のマッソン・トリクローム染色像である。図3Bは図3Aの切片を質量顕微鏡で解析して得られたイメージング像であり m/z

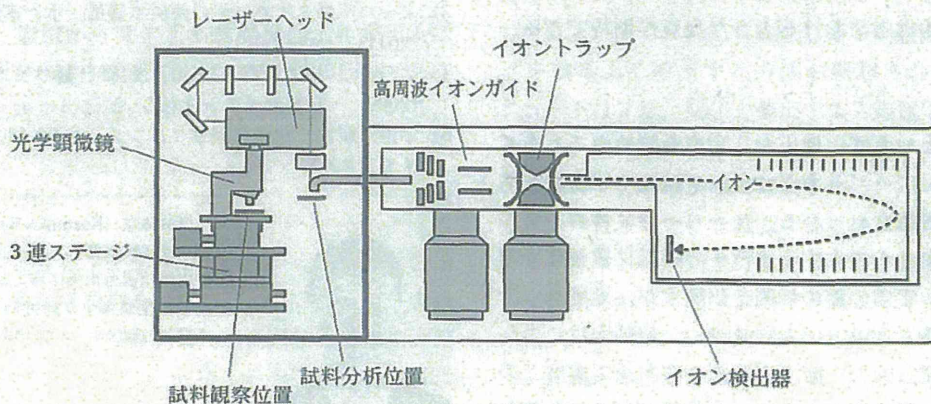


図1 質量顕微鏡の構造

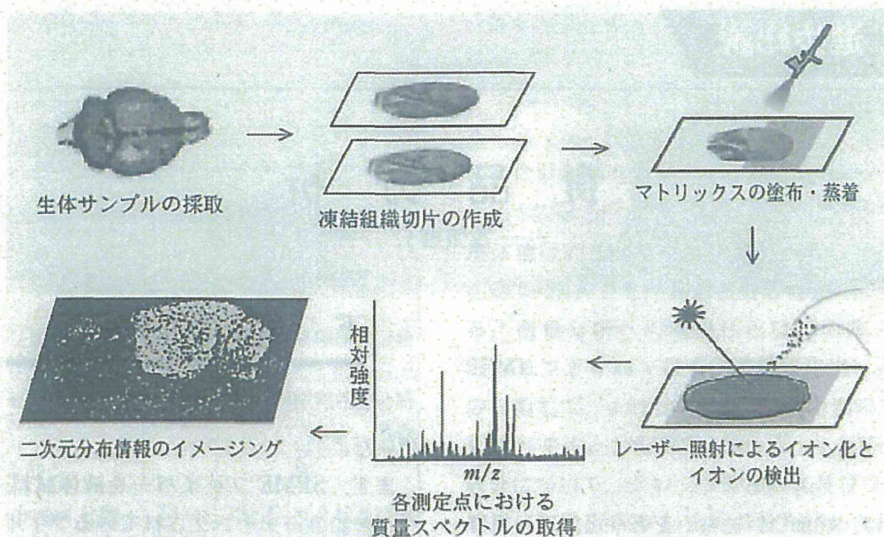


図2 MALDI質量顕微鏡法のワークフロー

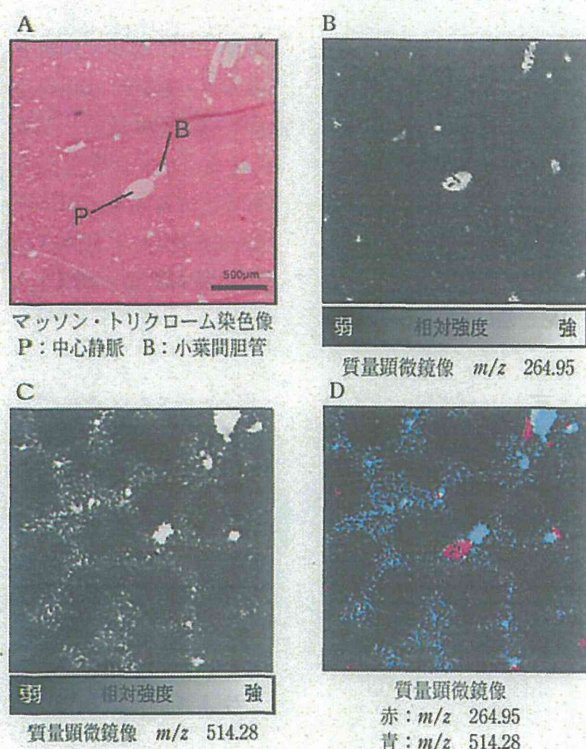


図3 質量顕微鏡を利用した解析で得られる画像例

264.95のイオンの分布を表している。図3Cは、図3Bと同様に m/z 514.28のイオンの分布を表している。図3Dは、二つのイオンの分布を同時にイメージングした図である。各測定点の色は相対的なイオンのシグナル強度を示している。図3Bにおいて、 m/z 264.95のイオンは中心静脈と門脈領域に強く分布している。また図3Cにおいて、 m/z 514.28のイオンは小葉間胆管を中心に微小胆管に強く分布している。データベースから、 m/z 264.95は2,3-ビスホスホグリセリン酸(2,3-BPG)、 m/z 514.28はタウロコール酸として帰属された。2,3-BPGは赤血球に豊富な分子であり、またタウロコール酸は門脈近傍の細胞で合成され胆管に排出されるので、この結果は理に適っていると考えられる¹⁾。

5 アプリケーション事例

アプリケーションの例をいくつか紹介する。

久保らは、ヒト結腸癌細胞株HCT116を免疫不全モデルであるNOGマウス脾臓に移植し、癌の転移先臓器である肝臓について解析を行った。転移巣領域では肝実質領域に比べてATPの相対強度が高く、UDP-N-アセチルグルコサミンとグルタチオンの分布の相対量が大きいとわかった。さらに個々の転移巣に注目すると、UDP-N-アセチルグルコサミンとグルタチオンの分布は分離していた。このことから、癌の転移巣が個々で異なる形質を持つことが考えられる¹⁾。

斎藤らは、ファモチジンを尾静脈内投与したマウスの全身切片を解析した。ファモチジンは腎臓に最も多く分布しており、他にも肝臓・心臓・肺・消化管に分布していることが観察された。結果はオートラジオグラフィによる解析で得られる情報と一致しており、質量顕微鏡を用いて薬物動態を解析できることを示している²⁾。

原田らは、細胞小器官レベルの解像度でショウガ切片を解析した。タンデム質量分析を利用した分析により、ショウガの辛み物質の主成分である6-ギンゲロールは細胞内に存在する黄色の油滴に分布し、また匂い物質のモノテルペンとは異なる油滴に存在する事が明らかになった³⁾。

6 おわりに

質量顕微鏡は日進月歩で改良されている。質量顕微鏡の解析対象は、もはや生体分子に限定されない。質量顕微鏡が読者の分析研究に貢献することを願う。

文 献

- 久保亜紀子, 大村光代, 涌井昌俊, 小河 潔, 瀬藤光利, 末松 誠: *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1895 (2011).
- 齋藤祐介, 早坂孝宏, 尾上健児, 滝澤義徳, 梶原茂樹, 小河 潔, 瀬藤光利: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **59**, 79 (2011).
- 原田高宏, 久保亜紀子, 杉浦悠哉, 財満信宏, 早坂孝宏, 井上菜穂子, 涌井昌俊, 末松 誠, 竹下建悟, 小河 潔, 吉田佳一, 瀬藤光利: *Anal. Chem.*, **81**, 9153 (2009).

[浜松医科大学 稲見勝朗・瀬藤光利]

質量顕微鏡を用いたホメオスタシス破綻の可視化

浜松医科大学解剖学講座細胞生物学分野 特任助教
早坂 孝宏

同 解剖学講座細胞生物学分野 教授
瀬藤 光利

イメージング技術によるホメオスタシス破綻の可視化

われわれの体は無数の分子の働きにより恒常性が維持され、健康を保つことができる。このホメオスタシスがストレス等の外的刺激により崩壊し、疾患を発症するということがわかってきている。分子レベルでのホメオスタシスの破綻については、これまでに各疾患に関する研究が行われてきた。分子には核酸、脂質、ペプチド、蛋白質などさまざまな種類が存在し、それらが相互に働くことで恒常性を維持する。これらの分子の変化を調べるために生化学、分子生物学、免疫組織学などの手法を駆使し、疾患の発症機序に関してキーとなる分子があげられてきた。とりわけ分子生物学や免疫組織学ではイメージング技術が発展し、研究分野で主流となっている蛋白質の局在を高解像度観察で解明することが可能になってきた。しかし脂質については細胞内シグナルの働きをもち、ホメオスタシスへ関与していることが知られているにもかかわらず、イメージング技術が発展してこなかった。マトリクス支援レーザー脱離・イオン化法(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization; MALDI)というイオン化法を開発した島津製作所の田中耕一氏に対して2002年にノーベル賞が贈られ、MALDIを用いた研究がさらに加速した。その応用例の1つとして本稿で紹介する質量顕微鏡法¹⁾があり、そこから脂質のイメージング技術が生まれ、今まさに急速に普及しようとしているところである。

質量顕微鏡法とは

通常のMALDIを用いた質量分析法では、組織や細胞のような生体試料から対象分子を抽出および必要に応じた精製を行う。精製した試料をマトリクスとよばれる有機化合物と混合した上で金属プレート上にドロップし、乾燥させる。質量分析装置へ導入し、試料上へレーザーを照射すると、そのエネルギーを吸収した試料中の分子はマトリクスを緩衝材として分解されることなくイオン化し、質量分析部へ搬送される。質量分析部の構成は各装置で異なり、一般的にはMALDIの後部に飛行時間型質量分析計(Time-Of-Flight; TOF)が結合される。TOFへ運ばれた分子イオンは加速電圧により真空中を飛行し、その先の検出器への衝突によってシグナルとしてカウントされる。その飛行時間は分子の大きさによって異なり、小さな分子ほど検出器への到達が早く、逆に大きな質量を有する分子は検出器への到達が遅い。既知の質量を有する分子を用いてあらかじめTOFを較正することにより、正確な質量を測定することが可能になる。このようにしてイオンの質量とシグナル強度をもとにした

〈最先端可視化技術がもたらすサイエンスへのインパクト
— Visualization does not need legends —〉

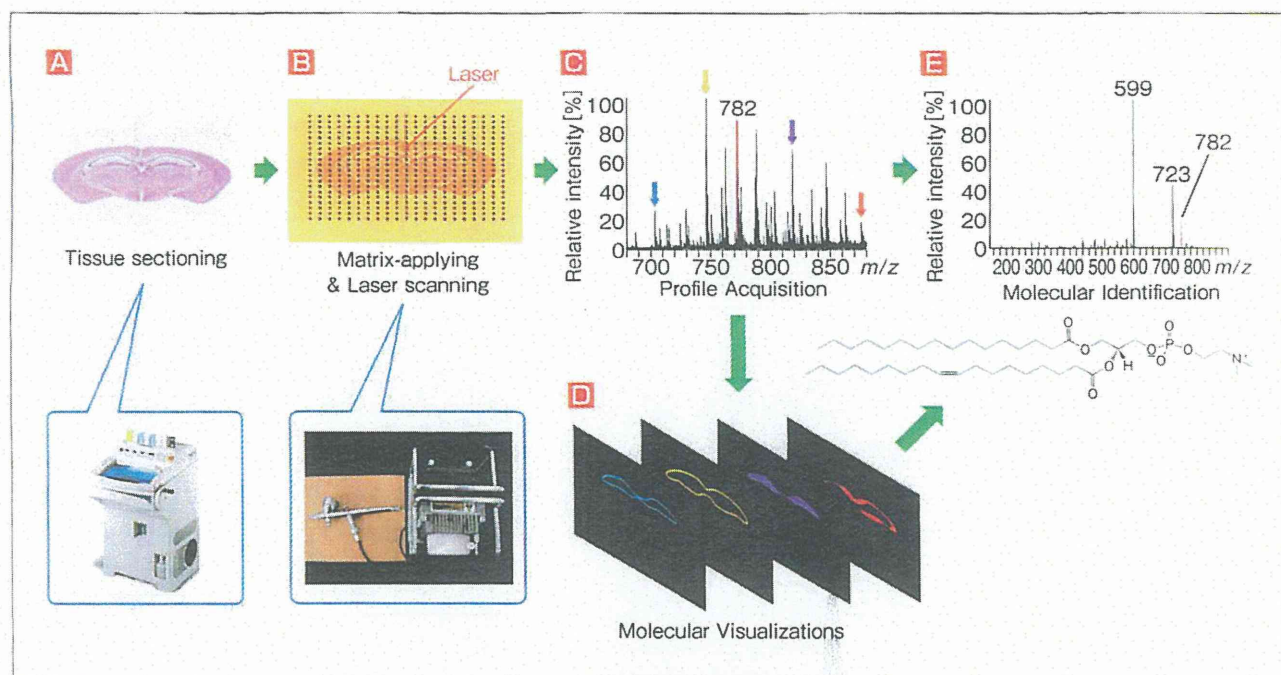


図1 質量顕微鏡法の流れ

A: 試料から切片を作製し、専用のスライドガラスへ載せる。B: マトリクスを均一に塗布し、各点にレーザーを照射する。C, D: 取得したマスペクトルから各シグナルの分布を可視化する。E: 任意のシグナルの断片化パターンから分子構造を明らかにする

マスペクトルを取得することが可能になる。

質量顕微鏡法は、組織をすり潰すことなく切片に対して直接レーザーを照射し、各点から取得したマスペクトルをもとに分子の分布と存在量をイメージ化する手法である。その1例としてマウス脳の質量顕微鏡法への適用を説明する(図1)。まずマウスから脳を摘出し、速やかに脳を凍結させる。凍結した脳組織からの切片作製には、ミクロトームを用いる。切片の厚さを薄くするほど試料から得られるシグナルのS/N比が向上することが明らかになっているが、解析では形状を維持した組織切片をコンスタントに作製することが必要となるため10 μm前後の厚さの切片が一般的に用いられる。この凍結組織切片を専用のスライドガラスへ貼り付け、乾燥後にマトリクスとよばれる有機化合物を塗布する。塗布方法には大きく分けて2通り存在し、有機溶媒に溶解したマトリクス溶液をスプレーヤーにより塗布する方法、マトリクスパウダーを真空中で昇華させることにより組織上へ蒸着する方法がよく用い

られる。マトリクス塗布後に試料を載せたスライドガラスを質量分析装置へ導入し、レーザー照射を等間隔に移動させることにより各測定点からマススペクトルを取得することができる。各マススペクトルを統合したデータセットを専用ソフトウェアへ適用し、任意のシグナルに関する各測定点におけるシグナル強度比を計算し、その値に応じた色の濃淡で示すことにより分子の分布と存在量をイメージ化することが可能になる。さらには任意の分子イオンを選択し、アルゴン等のガスとの衝突により断片化させ、この断片化パターンから分子構造を決定することができる。

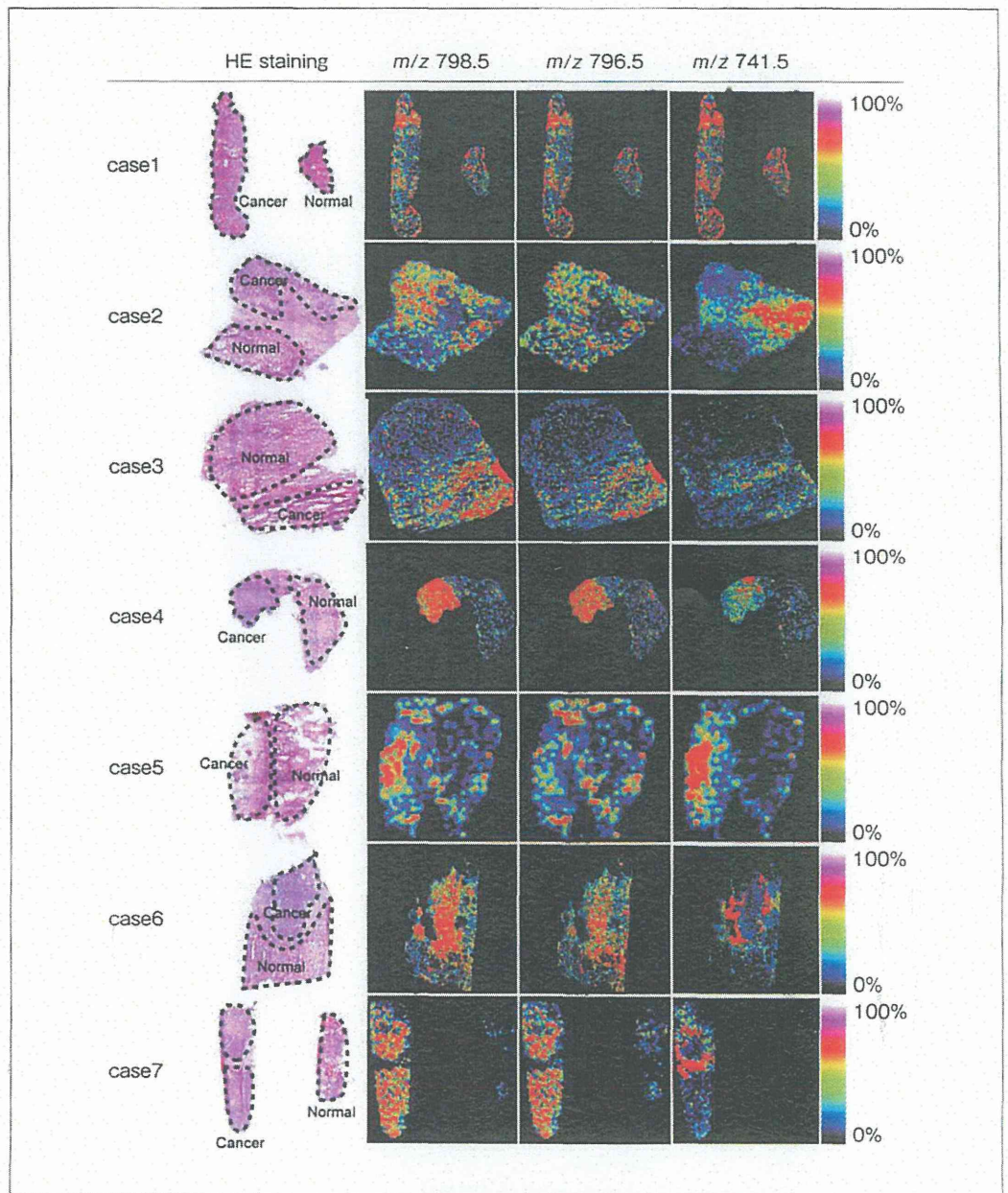
質量顕微鏡法の医学応用

質量顕微鏡法の開発により脂質をはじめとした分子イメージングが可能になり、医学分野への応用が始まった。医学の分野ではいまだ詳細な発症機序が解明されない疾患が多く存在する。その中で質量顕微鏡法への期待は高まっている。特に癌は生活習慣の変化から国内において発症率が高く、三大死因の1位を続けている。図②に示すのは、7名の甲状腺乳頭癌患者から手術中に摘出された検体を解析した際の脂質分布を可視化したものである²⁾。HE染色像のように正常と癌に識別されており、各領域から取得されたシグナルを比較したところ、 m/z 798.5, m/z 796.5, そして m/z 741.5のシグナルがすべての検体の癌領域に共通して多く分布していることがわかった。これらの分子はホスファチジルコリン(phosphatidylcholine; PC) (16:0/18:1), PC (16:0/18:2), スフィンゴミエリン(sphingomyelin; SM) (d18:1/16:0)として同定された。SM (d18:1/16:0)については、大腸癌肝転移など、ほかの癌組織解析においても増加が確認されており、すべての癌において重要な役割を担っていると考えられる。質量顕微鏡法では抗体などのラベリングを行う必要がないことから、組織中に存在する分子を網羅的に検出・比較することが可能である。ここであげた3つの分子以外にも、癌特異的に多く分布する分子がみついている。この質量顕微鏡を用いた解析結果をもとにして、さらに上流もしくは下流で働く酵素群の活性変動を調べることにより、癌の発症機序を解明することが期待できる。

iMScopeの開発

現在までに島津製作所、ブルカー・ダルトニクス、AB SCIEX、ウォータース、サーモ・サイエンティフィック、日本電子の各メーカーから質量顕微鏡法を実践可能な装置が販売されている。われわれは島津製作所らと質量顕微鏡法に特化した装置、iMScopeを共同開発してきた(図③)。本装置では観察部に6種類の対物レンズを搭載し、解析する試料の大きさと構造に応じて使い分けることができる。MALDI環境

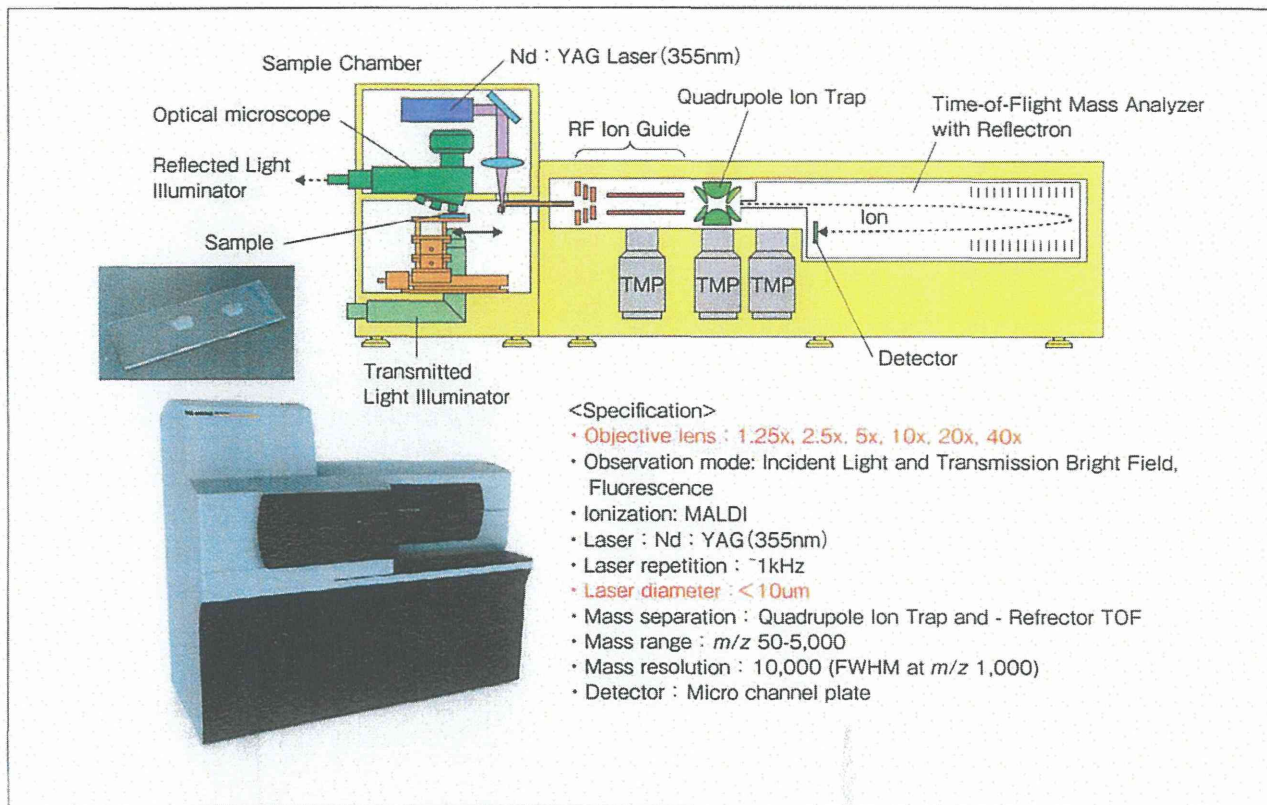
〈最先端可視化技術がもたらすサイエンスへのインパクト
— Visualization does not need legends —〉



図② 甲状腺乳頭癌の解析結果

7名の患者から抽出した試料を解析したところ、3つの分子が共通して癌領域に多く分布していることが明らかになった
(文献2より引用)

◆見る脂質のページ◆



図④ iMScopeの概要および外観

高解像度顕微鏡を搭載し、詳細な観察の結果をもとに測定領域を選択することができる

は一般的に用いられる真空ではなく大気圧にしているため、より自然な環境で試料を解析することが可能である。MALDIに搭載されているレーザー径は5 μ mまで収束されており、1細胞からのシグナル検出も可能である。質量分析部は四重極イオントラップ(Quadrupole Ion Trap; QIT)とTOFの組み合わせにより、高精度・高分解能な測定が可能である。特にQITは高精度なイオン選択性を有していることから、より正確な分子構造解析が可能である。

本装置は、通常の装置では解析が難しい微小かつ複雑な構造を有する試料の解析に優れている。これまでに微小かつ複雑な組織構造を有する試料の脂質組成は、レーザーマイクロダイセクションによって組織を切り出した試料を解析することにより

〈最先端可視化技術がもたらすサイエンスへのインパクト
— Visualization does not need legends —

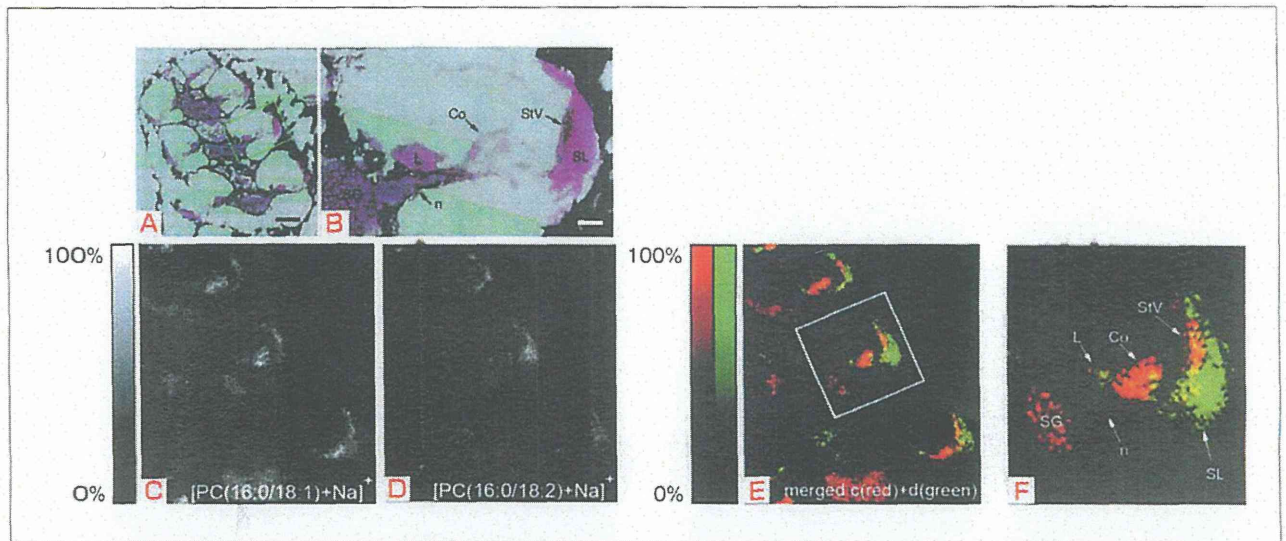


図4 モルモット蝸牛の解析結果

A: 頂回転から基底回転, Bar = 500 μm . B: 蝸牛管の拡大図. SG: らせん神経節, n: 骨らせん板, L: らせん板縁, Co: コルチ器, StV: 血管条, SL: らせん靱帯, Bar = 100 μm . C: CoやStVに分布するPC(16:0/18:1). D: SLに分布するPC(16:0/18:2). E: CとDの重ね合わせ. F: Eの拡大図. 本測定は10 μm 解像度で解析された (文献3より引用)

明らかにされてきた。哺乳類の聴覚を司る内耳の蝸牛は、その障害により難聴などの聴力低下を引き起こす。蝸牛内の構造は微小かつ複雑であり、これまでに脂質解析が進められなかった。図4に示すようにモルモット内耳から切り出された蝸牛切片をIMScopeで解析した³⁾。その結果、脂肪酸組成の異なるPCのシグナルを検出した。これらのうちPC(16:0/18:1)とPC(16:0/18:2)についてイメージを構築したところ、らせん神経節、骨らせん板、らせん板縁、コルチ器、血管条、らせん靱帯の各構造を明確に明らかにするとともに、各分子の存在量の違いを明らかにすることに成功した。

また最近ではヒト網膜の解析も行っている。網膜組織もまた微小な層構造を有する試料の1つである。その層構造は9つにも分類され、それぞれの厚さは数十 μm 程度しかなく、質量顕微鏡のようにレーザー径を収束した装置でないと解析が非常に困難である。われわれはヒト網膜から正イオンおよび負イオンに帯電した分子の分布を明らかにした。図5に示すように正イオンではSM(d18:1/16:0)が視細胞に多く分布し、網膜内ではPC(16:0/16:0)が外顆粒層(outer nuclear layer)と

◆見る脂質のページ◆

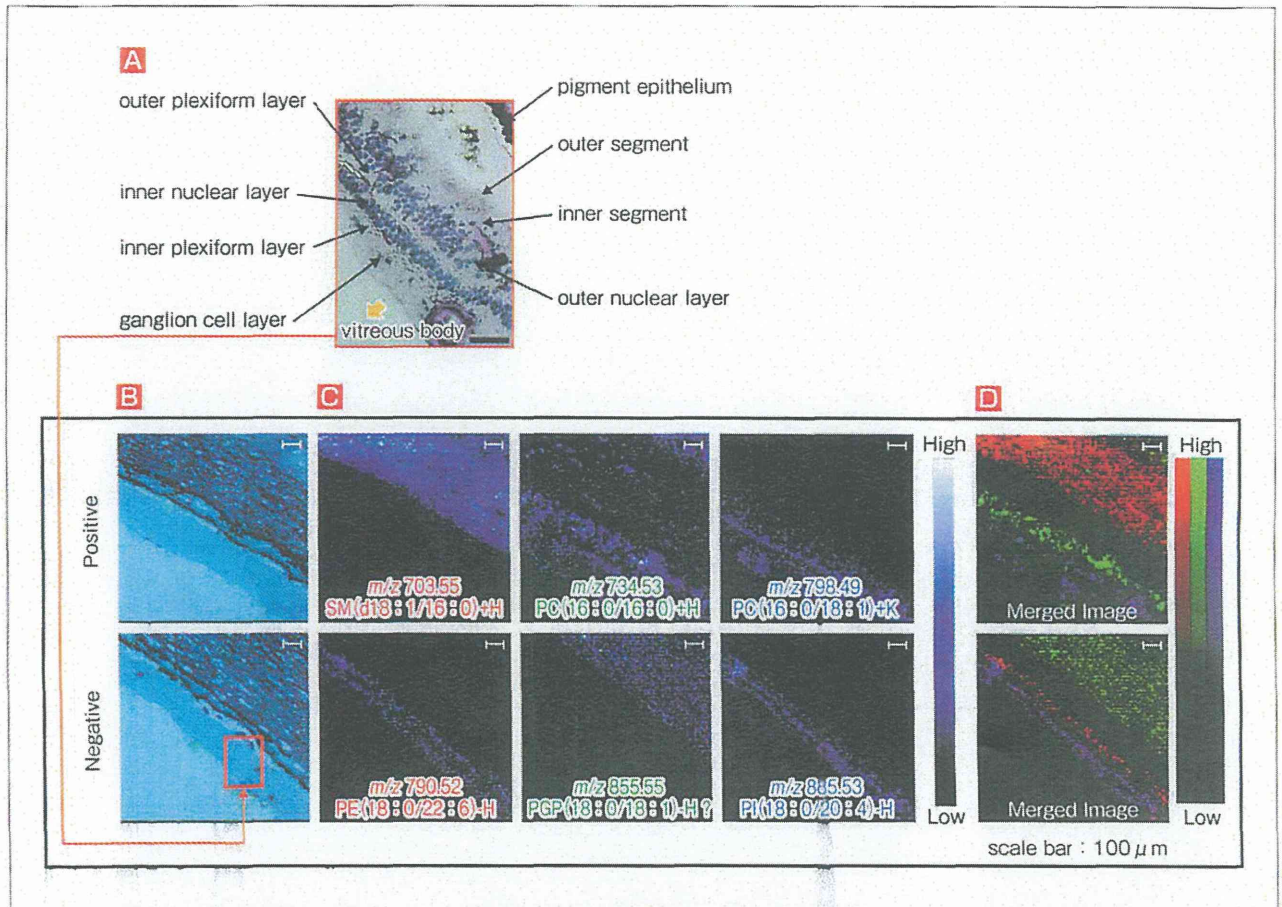


図6 ヒト網膜組織の解析結果

A: 解析した組織のHE染色像, Bar = 50 μ m. B: 解析した組織領域. C: 検出されたシグナルの分布イメージ. D: 同一領域で検出された分布イメージの重ね合わせ. B~D: Bar = 100 μ m

外網状層(outer plexiform layer), PC(16:0/18:1)が内網状層(inner plexiform layer)に分布することがわかった. また負イオンではホスファチジルエタノールアミン(phosphatidylethanolamine; PE)(18:0/22:6)が外網状層と内外節(inner and outer segment), ホスファチジルグリセロホスフェイト(phosphatidylglycerophosphate; PGP)(18:0/18:1)が視細胞, スルファチド(sulfatide)(d18:1/24:1)が内外網状層に分布することがわかった. 以上の

ように複数の種類のリン脂質を検出するだけでなく、その脂肪酸組成の違いによって分布が異なることを明らかにしている。今後さらに加齢黄斑変性や糖尿病網膜症などの試料を解析することによって、網膜上における各リン脂質とその脂肪酸組成の変化と疾患発症機序の関係を明らかにしたい。

おわりに

質量顕微鏡法は世界的に普及が進んできており、医学をはじめとしたさまざまな分野へ応用されている。また各メーカーも装置の開発に力を入れている。われわれもこれまで以上に試料前処理法などの開発に力を入れ、より高感度に多くの分子を検出できるように努めているところである。ここで紹介した分子以外にも糖脂質⁴⁾や中性脂質⁵⁾、また薬物動態⁶⁾の研究も行えるようになってきている。今後、これらの開発が医学のみならず、多くの分野の発展に貢献できたら幸いである。

謝 辞

質量顕微鏡法およびIMScopeを開発するにあたり、JST先端計測分析技術・機器開発プログラム(現研究成果展開事業)に多大なる支援をいただきました。また共同研究を推進していただいた島津製作所、三菱化学生命科学研究所、岡崎統合バイオサイエンスセンター、理化学研究所、大阪大学、がん研究会、慶應義塾大学、関西医科大学の関係者の皆様へ御礼申し上げます。

●文 献●

- 1) 瀬藤光利(編): 質量顕微鏡法-イメージングマスマスベクトロメトリー実験プロトコール。シュプリンガー・ジャパン, 2008
- 2) Ishikawa S, Hayasaka T, Masaki N et al: Increased expression of phosphatidylcholine (16: 0/18: 1) and (16: 0/18: 2) in thyroid papillary cancer. *PLoS One* 7 (11): e48873, 2012
- 3) Takizawa Y, Mizuta K, Hayasaka T et al: Specific localization of five phosphatidylcholine species in the cochlea by mass microscopy. *Audiol Neurootol* 16 (5): 315-322, 2011
- 4) Sugiura Y, Shimma S, Konishi Y et al: Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study: visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PLoS One* 3 (9): e3232, 2008
- 5) Hayasaka T, Goto-Inoue N, Zaima N et al: Organ-specific distributions of lysophosphatidylcholine and triacylglycerol in mouse embryo. *Lipids* 44 (9): 837-848, 2009
- 6) 齋藤祐介, 早坂孝宏, 尾上健児ほか: 高解像度質量顕微鏡を用いた薬物動態の解析. *J Mass Spectrom Soc Jpn* 59 (4): 79-84, 2011