

とができる。³⁾ 結晶低分子マトリックスとして、2,5-ジヒドロキシ安息香酸などいくつかあり、⁴⁾ 試料に適したマトリックスの選択が、よいマススペクトルを得るために重要である。⁵⁻⁷⁾ 質量分析部は、イオン飛行中の他の気体分子による散乱を防ぐため、質量分析部内部をターボ分子ポンプや拡散ポンプで高真空にする。筆者らは、最も一般的な飛行時間型質量分析計 (time-of-flight mass spectrometer; TOF MS) を使用している。パルス状に生成したイオンは真空の分析管を通過する間に質量によって検出器に到達するまでの飛行時間が異なることを利用して重さとして計測される。特定のイオン化した分子のみを選択し、その分子に希ガスなどを衝突させることで分解・断片化し、生成した断片イオンの質量数パターンから構造を特定することで構造解析が可能である。この構造解析は MS を複数回行うことから MSⁿ 解析と呼ばれる。化合物の質量数や構造解析で得られた断片イオンの質量数を用いて、データと既存のデータベースを参照することで化合物の同定が可能である。タンパク質のような大きな分子でも、酵素処理により断片化したペプチドやアミノ酸の構成を解析対象とすることで、分子を同定することができる。

3. 質量顕微鏡法の原理

質量顕微鏡法は、二次元平面上で位置情報を保つ

たまま前述の質量分析を行う手法である。通常、質量分析は分離・精製した溶液中の生体分子を対象とするが、質量顕微鏡法では主に生体組織切片を対象とする。生体組織切片を観察し、着目した部位に正確に微小径のレーザー光を照射し、微小領域のイオン化を行う。Figure 1 に質量顕微鏡法の一連の流れを示す。⁸⁾ 凍結させた生体組織から凍結マイクロームにより組織切片を作製する。作製した凍結切片を導電性の素材で表面をコートされた支持素材に載せ、融解させることで組織を接着する。解析を目的とする分子種に応じて適切な前処理を施し、マトリックス溶液を組織切片上に塗布し、質量分析計で各測定点におけるマススペクトルを検出する。測定領域は任意の間隔によって測定点を設定可能であるが、現在ではレーザー収束技術と装置制御能の向上により 10 μm 以下の間隔を設定することが可能になっている。測定点をレーザーで二次元走査することによって、測定点毎のマススペクトルが取得される。⁹⁾ そのマススペクトルの中から任意の分子情報を選択的に抽出して、測定点毎のシグナル強度比に応じて対象分子の組織切片における分布を可視化する。マススペクトルの数は1つの試料において測定点数に応じて数万以上にもなり、その情報量は膨大になるため、効率よく高速に解析するソフトウェアが開発されている。得られたスペクトルから生体分

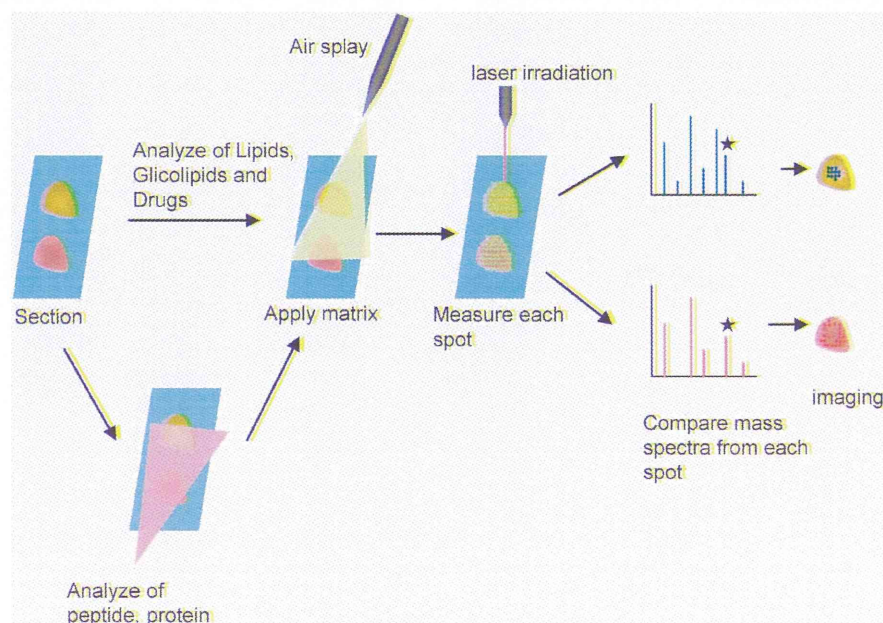


Fig. 1. Steps Involved in Profiling and Imaging MS of Tissue Slice Samples

子の存在量を色の濃淡で表現し、分子分布の可視化を行う。

4. 質量顕微鏡法の実際

細胞内の生体分子の分布を測定するとき、1つの細胞内にある生体分子の量は極めて微量である。このような超微量分子を検出するためには、効率よく各段階にイオンを移行させなければならない。試料の適切な前処理法と装置の高感度化が必要である。高効率イオン化を実現する試料前処理の1つに、最適な厚さの生体組織が10 μm 以下となったときに高効率イオン化と低ノイズを示す測定結果が得られる。¹⁰⁾ 切片を接着する導電性を有する支持素材には、酸化インジウムスズ (indium-tin-oxide; ITO) を表面にコートした ITO スライドガラスが用いられることが多い。一般的に、生体分子の位置情報を保持したうえで分子同定のための試料前処理法が必要になる。例えばタンパク質の場合、組織上におい

て試料の拡散を最小限に抑えるタンパク質変性法、酵素消化法が施される。これを on-tissue digestion 法という。¹¹⁻¹³⁾ 組織内タンパク質を変性させた後に、ケミカルインクジェットプリンター (島津製作所) を用いて微量のトリプシン溶液を分注し、タンパク質を消化することにより、分子量が大きく、そのままではイオンとして検出され難いタンパク質もトリプシン消化産物として検出できる。¹⁴⁾ 一方、リン脂質やコレステロールのような中性脂質、さらに糖脂質のような低分子量有機化合物の測定では、組織切片上で位置情報が失われ易いため切片の洗浄工程は行わない。マトリックス溶液の組織切片上への塗布は、マトリックスの結晶が均一かつ微細に生成されることが測定感度の向上のために重要である。霧状にして組織切片上へ噴霧するスプレーコーティング法や、組織切片上のあらかじめ定められた領域に正確な量のマトリックスを滴下するドロップ

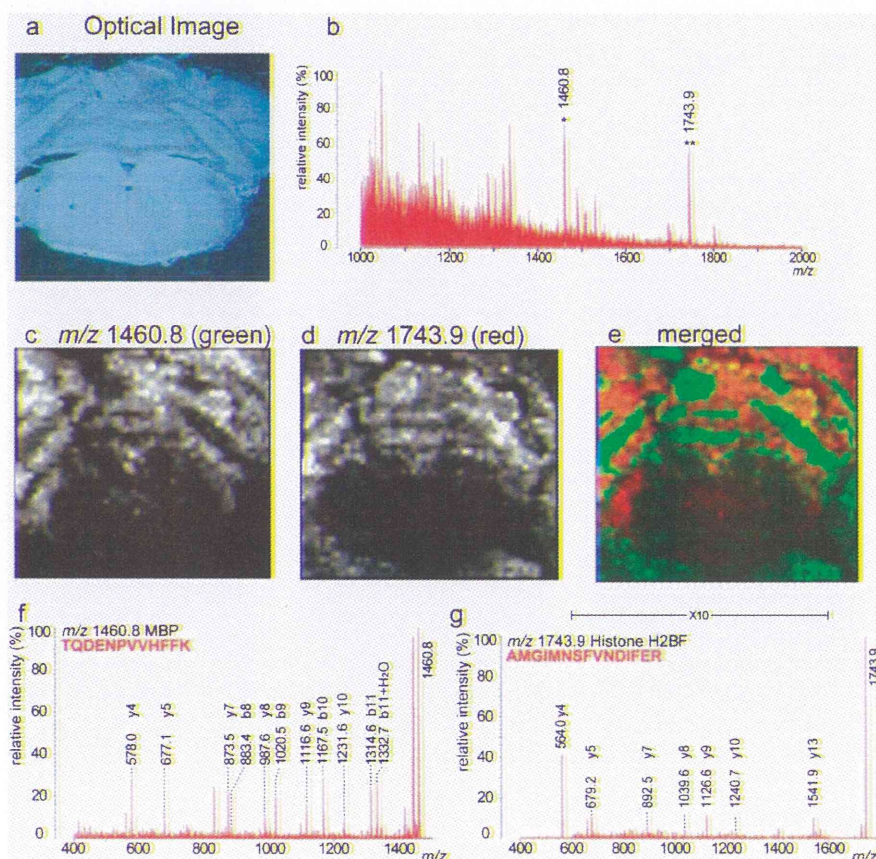


Fig. 2. Example of Tryptic-digested Protein Imaging and Precursor Ion Mass Spectra with Positive Ion Detection Mode

(a) Optical image of imaging region and (b) accumulated mass spectrum from imaging region. (c) and (d) are imaging results of m/z 1460.8 and 1743.9, which are labeled by asterisks in (b). Merged image (red, m/z 1460.8; and green, m/z 1743.9) is shown in (e). These peaks were identified by direct MSⁿ and were identified as the fragment ions of myelin basic protein (MBP) (f) and histone H2B (g). Partially adapted from Ref. 13.

レット法が用いられる。この2つのマトリックス塗布法を組み合わせたスプレッドロップレット法も使われる。¹⁴⁾ またナノ微粒粒子はその大きさが数ナノメートルオーダーであることから、その質量顕微鏡法への適用は、数十 μm 大の結晶を形成するマトリックスよりも高解像度で生体分子の分布を可視化するだけでなく、マトリックスではイオン化され難い生体分子のイオン化を可能にする。¹⁵⁾

5. ペプチドの解析

次に、筆者らが発表してきた質量顕微鏡法の生体組織への応用研究をいくつか紹介する。島津製作所が製造している AXIMA-QIT-TOF MS は、試料中の分子をイオン化する MALDI、イオン化された分子を溜めこむ四重極型イオントラップ (quadrupole ion trap; QIT) と、イオン化された分子を質量に応じて飛行分離を行う TOF から構成される。そのため、検出感度が高く、MS/MS 解析だけでなく MSⁿ 解析も可能である。この装置を用いてマウス小脳におけるリン脂質、糖脂質、トリプシン消化したペプチドの可視化を行った。¹³⁾ Figure 2 にペプチドの解析結果を示す。Figure 2(a) は小脳切片の光学写真、Fig. 2(b) はトリプシン消化処理を施したマウス小脳から得られた積算マススペクトルである。このマススペクトルから、イメージング画像描出のためのソフトウェアである BioMap (<http://www.mald-msi.org>) を用いて、任意の m/z における質量分布のイメージング画像を描出した。 m/z 1460.8 [Fig. 2(c)] と m/z 1743.9 [Fig. 2(d)] の2つの質量ピークのイメージを構成したところ、これらは相補的な関係にあることを見出した [Fig. 2(e)]。 m/z 1460.8 は白質と延髄、 m/z 1743.9 は灰白質に局在していた。これらの質量の生体分子を特定するため、直接切片上で MS/MS 解析による構造解析を行ったところ、 m/z 1460.8 はミエリン塩基性タンパク質 (myelin basic protein; MBP) [Fig. 2(f)]、 m/z 1743.9 はヒストン H2B (histon H2B) [Fig. 2(g)] であることが明らかになった。

6. リン脂質の解析

マウス網膜の組織切片を対象として質量顕微鏡法により生体分子の局所的な分布を示した。¹⁶⁾ マウス網膜は幅 150 μm もの微小領域内に 9 層もの膜構造を有している。この試料に対して 50 μm の間隔で測定を行った。その結果、組織切片上から多数のシ

グナルが検出された。それらのシグナルについて MS/MS 解析を行ったところ、リン脂質の一種であるホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) と同定された。PC には 2 本の脂肪酸が結合しており、その脂肪酸の違いにより生体内での働きが異なることが知られている。網膜上における PC の分布を解析したところ、結合している脂肪酸の種類によって分布が異なることが示され、3 つの層に分類・可視化することに成功した (Fig. 3)。特に網膜における光神経伝達に重要な役割を果たす膜タンパク質であるロドプシンと脂肪酸の一種であるドコサヘ

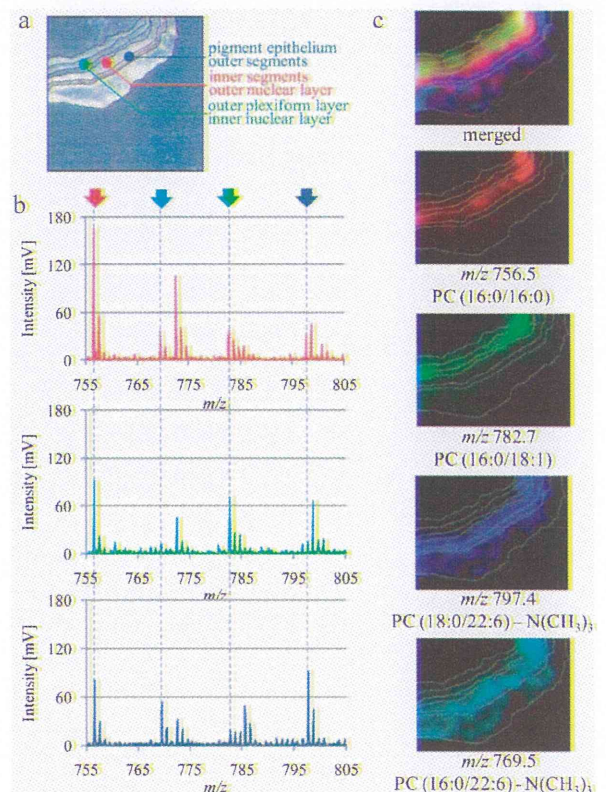


Fig. 3. Distribution of PC Molecular Species in a Mouse Retinal Section

(a) Each area can be roughly distinguished in this optical image of the mouse retinal section, and three colored dots are shown. (b) Three spectra between m/z 755 and 805 from the measurement areas at the red dot (outer nuclear layer and inner segment), green dot (inner nuclear layer and outer plexiform layer), and blue dot (outer segment and pigment epithelium) in the mouse retinal section are compared. The signal intensities at m/z 756.5 ($[\text{PC}(\text{diacyl-16:0/16:0})+\text{Na}]^+$) and m/z 782.7 ($[\text{PC}(\text{diacyl-16:0/18:1})+\text{Na}]^+$) were the highest in the red dot and in green dot, respectively. The signal intensities at m/z 797.4 ($[\text{PC}(\text{diacyl-18:0/22:6})+\text{Na-N}(\text{CH}_3)_3]^+$) and m/z 769 ($[\text{PC}(\text{diacyl-16:0/22:6})+\text{Na-N}(\text{CH}_3)_3]^+$) were the highest in the blue dot. (c) The ion image merged from $[\text{PC}(\text{diacyl-16:0/16:0})+\text{Na}]^+$ (red), $[\text{PC}(\text{diacyl-16:0/18:1})+\text{Na}]^+$ (green), and $[\text{PC}(\text{diacyl-18:0/22:6})+\text{Na-N}(\text{CH}_3)_3]^+$ (blue) revealed the three-zone distribution of the retinal section. $[\text{PC}(\text{diacyl-16:0/22:6})+\text{Na-N}(\text{CH}_3)_3]^+$ (light blue) was distributed in the same region as $[\text{PC}(\text{diacyl-18:0/22:6})+\text{Na-N}(\text{CH}_3)_3]^+$. Reprinted with permission from Ref. 16.

キサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA) の係わりについては過去にも報告があるが, 本研究により両者の局在が一致したことから, 質量顕微鏡法の有用性を示すうえで非常に興味深い結果となった. 現在までのところ, このようなリン脂質の脂肪酸組成が異なる分子種の分布イメージングが可能なのは, 質量顕微鏡法だけである.

7. 高解像度質量顕微鏡の開発

既存の質量分析装置よりも微細な領域の高精度な分析と, より高い質量分析能の実現を目指し, 筆者らは JST 先端計測分析技術・機器開発事業の支援の下, 島津製作所, がん研究会, 理化学研究所, 三菱化学生命科学研究所, 及び大阪大学との産学連携で新たな質量顕微鏡を開発してきた.¹⁷⁾ 顕微質量分析装置 (質量顕微鏡) の最終プロト機では, 光学観察系は大気圧下 MALDI を採用し, デジタルイオントラップ (digital ion trap: DIT) を搭載することで高効率にイオンを集め, 高分解能マルチターン飛行時間型 (multi-turn TOF: mTOF) を用いて, 質量分解能を向上させることに成功した. $1\ \mu\text{m}$ 以下のレーザー照準精度, $5\ \mu\text{m}$ 以下のレーザースポット径, $10\ \mu\text{m}$ 以下の空間的分解能を実現し, 分析感度も改善された. 上述の技術のうち, 光学顕微鏡, 大気圧 MALDI, 四重極型イオントラップ, そして TOF で構成された質量顕微鏡が製造されており, 浜松医科大学に 1 号機が設置されている (Fig. 4).

8. 高解像度質量顕微鏡を用いた薬物動態の解析

生体の臓器は形状や機能によって組織学的に分類され, 各組織がそれぞれの役割を担っている. したがって, 組織特異的な分布を期待する医薬品を評価

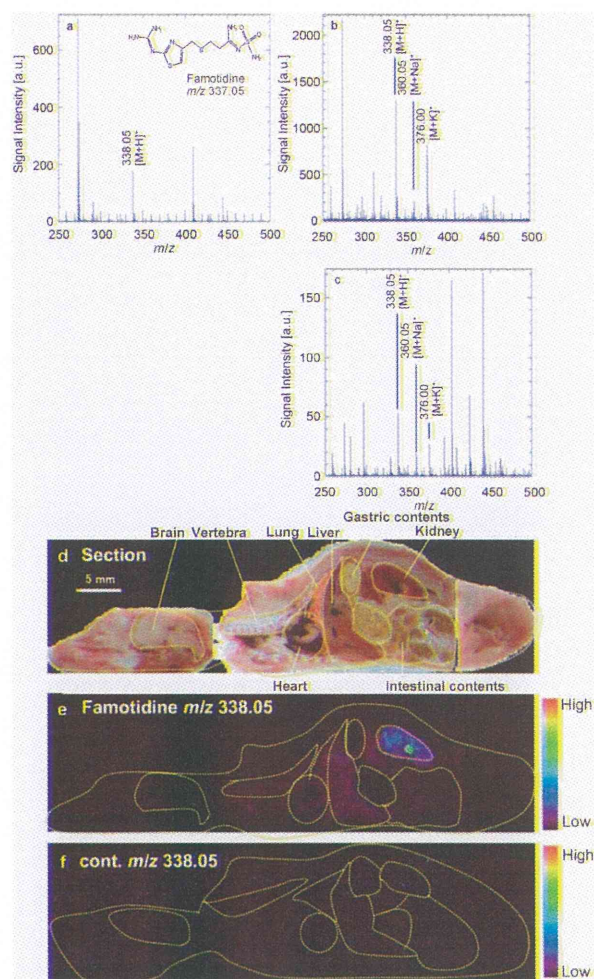


Fig. 5. Mass Spectrum of Famotidine and MS Ion Image on the Whole-body Section

(a) Structure and mass spectrum of Famotidine. (b) Mass spectrum of Famotidine detected on the tissue section. (c) Mass spectrum of Famotidine detected on the kidney in the tissue section. (d) Optical image of the mouse tissue section. (e) MS ion image of Famotidine (m/z 338.05) on the mouse tissue section at 3 min after injection. The Famotidine is observed to be distributed with significantly localization in the kidney. (f) MS ion image at m/z 338.05 on Control mouse tissue section. Partially adapted from Ref. 18.

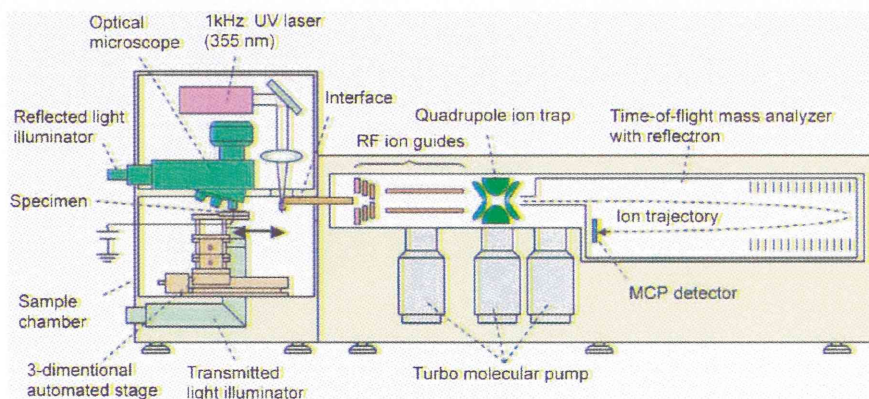


Fig. 4. Scheme of the Atmospheric-Pressure MALDI Mass Spectrometry Imager "Mass Microscope"
Reprinted with permission from Ref. 17.

する際、更なる空間的分解能が必要とされている。ファモチジンを尾静脈内から投与し、3分後の体内分布を質量顕微鏡を用いて解析した。¹⁸⁾ マウス断面図を Fig. 5 (d) に示す。全身の輪郭と主要な臓器 (脳、脊椎、肺、肝臓、胃、腎臓、心臓、腸) を点線で示している。ファモチジンのピークと考えられる m/z 338.05 ($[M+H]^+$), m/z 360.05 ($[M+Na]^+$), m/z 376.00 ($[M+K]^+$) の中で最も強度の高かった $[M+H]^+$ m/z 338.05 に着目し、その全身分布を Fig. 5 (e) に示した。各測定点におけるイオン強度の違いを色で示している。ファモチジンを投与したマウスでは腎臓に一致する領域に相対的に高い強度が得られ、肝臓、心臓、肺、消化管にも分布がみられたが、他の臓器からは分布は認められなかった。比較対象としてコントロールマウス全身切片上の m/z 338.05 の分布を Fig. 5 (f) に示した。コントロールマウス全身切片では m/z 338.05 の分布は全く認められなかったことから、投与したファモチジンが主に腎臓に分布していることが示唆された。この結果は過去に報告されている、ファモチジンを筋肉内投与した5分後に腎臓、ついで肝臓に未変化体で分布しているという全身オートラジオグラフィーの結果と同様であり、¹⁹⁾ 被検体をラベル化することなく検出できる質量顕微鏡を用いることが、薬物動態の解析にも有効であることを示すことができた。さらに Fig. 5 (e) の腎臓を示す領域では中心部に強い強度を示したことから、腎臓の組織内でも分布の違いが生じていると考えられた。

ファモチジンのような主に腎臓で排出される薬物は腎臓によって濃縮を受け、最終的に尿中へ排出される。マウス腎臓断面図を Fig. 6 (a) に示した。腎臓は組織学的に外側から腎皮質、腎髄質、腎盂と呼ばれる構造からなり、全身から血液に乗って集められた薬物はこの順で血液中からろ過され、水分の再吸収による濃縮を受けながら尿路へ向かい膀胱に蓄積され排泄される。中央に位置する白色の部分は濃縮を受けた尿が集まる腎盂である。ここでは点線で示した領域を $50\ \mu\text{m}$ 間隔で MS 及び MS/MS イメージング測定を行った。Figure 6 (b), (c) はそれぞれファモチジンの MS イメージング測定によるイオンイメージ (m/z 338.05) と MS/MS イメージング測定によるイオンイメージ (m/z 259.08) を示している。この実験結果から、質量顕微鏡の高い解像度を用いて腎臓内の薬物分布を示すことができた。(b), (c) いずれの場合も皮質や髄質と比べて腎盂に高い分布強度が認められた。また、血管に合致する領域では相対的に低い分布強度を示した。これは腎臓における排泄過程でファモチジンが濃縮を受けているため、周りの髄質、皮質と比較して腎盂で高い強度を示したと考えられる。

このように、高解像度で薬物の組織分布を示すことができる質量顕微鏡法を、治療を目的とした薬物の体内やがん等の病変部位への分布の評価に応用していけば、医薬品開発の発展に貢献できると考えている。

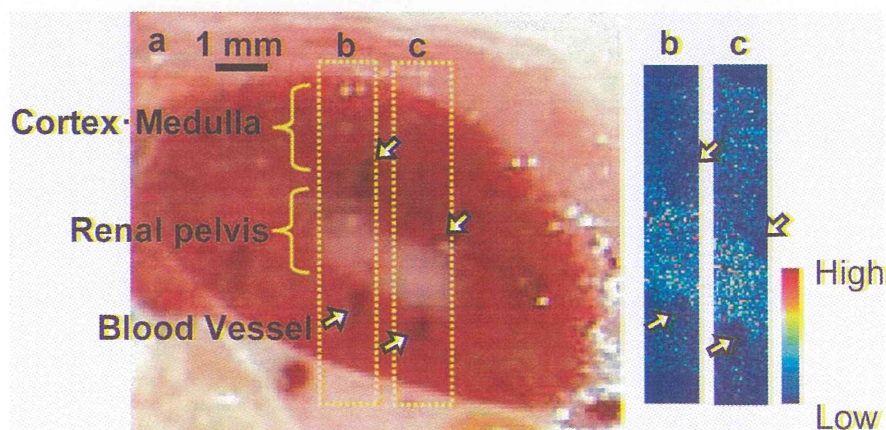


Fig. 6. High Resolution Ion Image of Famotidine in the Kidney

(a) Optical image of kidney in whole-body section. (b), (c) MS (m/z 338.04, b) and MS/MS (m/z 338.05 \rightarrow 259.08, c) images of Famotidine. It is suggested that Famotidine is concentrated on the renal pelvis. Arrows indicate vessels. Partially adapted from Ref. 18.

9. おわりに

筆者らは質量顕微鏡法を開発し、生体組織研究へ適用して多くの成果を報告してきた。²⁰⁻²⁷⁾ 質量顕微鏡法は一度に数千から数万の分子の量的・位置的な挙動を、ターゲットを絞らずにモニターできる手法であることから、薬物動態、さらに薬物投与などの操作を加えたときの反応など、創薬の面でも既に各製薬メーカーで使用され始めている。さらに、今後は質量顕微鏡法が生物医薬に限らず、食品²⁸⁾や環境、有機材料分析などの様々な分野にも応用され、数多くの問題を解決することを期待している。

謝辞 原稿作成に協力頂いた瀬藤研の早坂孝宏先生、齋藤祐介先生に感謝します。

REFERENCES

- 1) Carl-Ove A., *Acta Chem. Scand.*, **10**, 1353 (1958).
- 2) Yamashita M., Fenn J. B., *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451-4459 (1984).
- 3) Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151-153 (1988).
- 4) Strupat K., Karas M., Hillenkamp F., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **111**, 89-102 (1991).
- 5) Schwartz S. A., Reyzer M. L., Caprioli R. M., *J. Mass Spectrom.*, **38**, 699-708 (2003).
- 6) Lemaire R., Tabet J. C., Ducoroy P., Hendra J. B., Salzet M., Fournier I., *Anal. Chem.*, **78**, 809-819 (2006).
- 7) Moritake S., Taira S., Sugiura Y., Setou M., Ichianagi Y., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **9**, 169-176 (2009).
- 8) Zaima N., Matsuyama Y., Setou M., *J. Oleo Sci.*, **58**, 267-273 (2009).
- 9) Caldwell R. L., Caprioli R. M., *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 394-401 (2005).
- 10) Sugiura Y., Shimma S., Setou M., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 45-48 (2006).
- 11) Shimma S., Furuta M., Ichimura K., Yoshida Y., Setou M., *Surf. Interface Anal.*, **38**, 1712-1714 (2006).
- 12) Groseclose M. R., Andersson M., Hardesty W. M., Caprioli R. M., *J. Mass Spectrom.*, **42**, 254-262 (2007).
- 13) Shimma S., Sugiura Y., Hayasaka T., Zaima N., Matsumoto M., Setou M., *Anal. Chem.*, **80**, 878-885 (2008).
- 14) Sugiura Y., Shimma S., Setou M., *Anal. Chem.*, **78**, 8227-8235 (2006).
- 15) Goto-Inoue N., Hayasaka T., Sugiura Y., Taki T., Li Y. T., Matsumoto M., Setou M., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **870**, 74-83 (2008).
- 16) Hayasaka T., Goto-Inoue N., Sugiura Y., Zaima N., Nakanishi H., Ohishi K., Nakanishi S., Naito T., Taguchi R., Setou M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3415-3426 (2008).
- 17) Harada T., Yuba-Kubo A., Sugiura Y., Zaima N., Hayasaka T., Goto-Inoue N., Wakui M., Suematsu M., Takeshita K., Ogawa K., Yoshida Y., Setou M., *Anal. Chem.*, **81**, 9153-9157 (2009).
- 18) Saito Y., Hayasaka T., Onoue K., Takizawa Y., Kajihara S., Ogawa K., Setou M., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **59**, 79-84 (2011).
- 19) Esumi Y., Ueda T., Jin Y., Tsutsumi S., Takiie S., Yokoshima T., Imasaki H., Matsui H., *The Clinical Report*, **21**, 111-119 (1987).
- 20) Morita Y., Ikegami K., Goto-Inoue N., Hayasaka T., Zaima N., Tanaka H., Uehara T., Setoguchi T., Sakaguchi T., Igarashi H., Sugimura H., Setou M., Konno H., *Cancer Sci.*, **101**, 267-273 (2010).
- 21) Onoue K., Zaima N., Sugiura Y., Isojima T., Okayama S., Horii M., Akai Y., Uemura S., Takemura G., Sakuraba H., Sakaguchi Y., Setou M., Saito Y., *Circ. J.*, **75**, 221-223 (2010).
- 22) Takizawa Y., Mizuta K., Hayasaka T., Nakanishi H., Okamura J., Mineta H., Setou M., *Audiol. Neurootol.*, **16**, 315-322 (2011).
- 23) Goto-Inoue N., Hayasaka T., Zaima N., Setou M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1811**, 961-969 (2011).
- 24) Kaneko Y., Obata Y., Nishino T., Kakeya H., Miyazaki Y., Hayasaka T., Setou M., Furusu A., Kohno S., *Exp. Mol. Pathol.*, **91**, 614-621 (2011).
- 25) Matsumoto J., Sugiura Y., Yuki D., Hayasaka T., Goto-Inoue N., Zaima N., Kunii Y., Wada A., Yang Q., Nishiura K., Akatsu H., Hori A., Hashizume Y., Yamamoto T., Ike-moto K., Setou M., Niwa S., *Anal. Bioanal.*

-
- Chem.*, **400**, 1933–1943 (2011).
- 26) Miyamura N., Nakamura T., Goto-Inoue N., Zaima N., Hayasaka T., Yamasaki T., Terai S., Sakaida I., Setou M., Nishina H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 120–125 (2011).
- 27) Shrivastava K., Hayasaka T., Goto-Inoue N., Sugiura Y., Zaima N., Setou M., *Anal. Chem.*, **82**, 8800–8806 (2010).
- 28) Zaima N., Goto-Inoue N., Hayasaka T., Enomoto H., Setou M., *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1865–1871 (2011).

Imaging Mass Spectrometry (質量顕微鏡法)

Imaging Mass Spectrometry

稲見 勝朗・瀬藤 光利

Key Words: IMS, on-tissue digestion method, MALDI-IMS, nano-PALDI-IMS

■ Abstract ■

生体内に存在する物質の形態を観察する事は、人体組織の理解や、疾病メカニズムの解明・治療に欠かせないものである。しかし生体分子を観察するには、まず標的分子の特定・解析や分子標識の作成が必要であるので、未知の物質を発見し直接解析するのは困難であった。質量顕微鏡法では、生体分子の質量を測定、局所におけるマススペクトルで表し、これを解析して組織における特定質量分子の分布を可視化する。この手法により、性質が未知の物質を発見するだけでなく、直接解析することができるのである。

■ Imaging Mass Spectrometry, IMS

(質量顕微鏡法)の特性と原理

IMS (質量顕微鏡法)は、従来の光や電子を検出する観察方法とは異なり、生体分子の質量を検出・可視化することで、その局在情報を含めた形態を直接観察し、同時に生化学的な情報の獲得を可能にするものである。観察にあたり抗体など特定の標識体は不要なので、生体内の未知の物質を発見・解析するための強力な手段となる。医学分野においては疾病組織のバイオマーカー探索や、特定分子の発現解析などに用いられている。

IMSでは、二次元平面上で分子群の位置情報を保ったまま質量分析を行うことができる。通常、質量分析は分離・精製した溶液中の生体分子で行うが、この手法では主に生体組織切片を対象とする。生体組織切片の観察では、着目した部位に正確に微小径のレーザー光を照射し、微小領域のイオン化を行う。数万点に及ぶ測定点をレーザーで

二次元走査することによって、各点でのマススペクトルが取得される。それらのマススペクトルの中から任意の分子情報を選択的に抽出して、測定点ごとのシグナル強度比に応じて対象分子の組織切片における分布を可視化する。マススペクトルの数は1つの試料において測定点数に応じて数万以上にもなり、この膨大な情報量を効率良く高速に解析するソフトウェアが開発されている¹⁾。

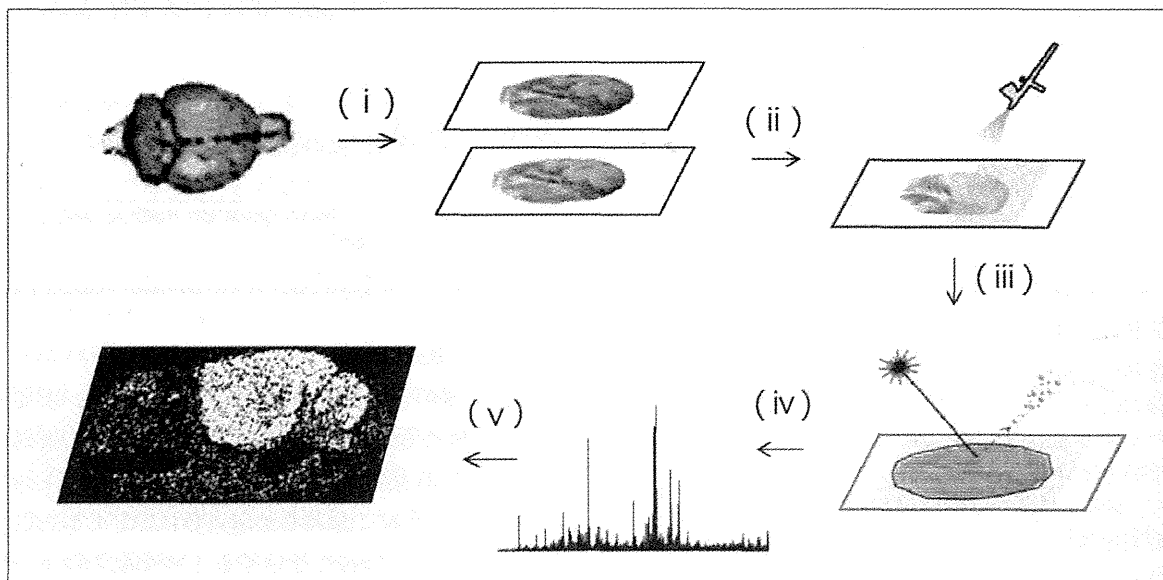
■ IMSの実際 (図参照)

まず凍結させた生体組織から凍結マイクロームにより組織切片を作製する (i)。作製した凍結切片を導電性の素材で表面をコートされた支持素材 (ITOスライドガラスなど) に載せ、融解させることで組織を接着し、解析を目的とする分子に適した前処理を施す (ii)。マトリクス溶液を組織切片に塗布して (iii)、質量分析計で各測定点におけるマススペクトルを検出する (iv)。得られたマススペクトルから生体分子の存在量を色の濃淡で表現し、分子分布の可視化を行う (v)。

生体内に存在する微量な分子を測定するためには、試料に適した様々な前処理が必要である。特に高分子量タンパク質の計測においては、切片の厚さが10 μm 以下となったときに高効率イオン化と低ノイズを示す測定結果が得られる。また生体分子、たとえばタンパク質の位置情報を保持して固定するための処理法として on-tissue digestion 法がある。これは組織内タンパク質を変性させた後に、微量のトリプシン溶液でタンパク質を消化することにより、イオンとして検出されにくい高分子量のタンパク質をトリプシン消化産物として検出するものである。対して、リン脂質やコレステロ

Katsuaki Inami, Mitsutoshi Setou
浜松医科大学 解剖学講座 細胞生物学分野
Hamamatsu University School of Medicine, Department
of Cell Biology and Anatomy

New Technology



図は、MALDI-IMSを行うときの一連の流れを示したものである。冷凍生体組織からの切片作成・前処理を経て、目的分子のイオン化とその分布の解析を行う。LDI-IMSでは (iii) を省略し、nano-PALDI-IMSでは (iii) でマトリクスではなくナノ微粒子を用いる。

ールのような中性脂質、さらに糖脂質のような低分子量有機化合物の測定では、組織切片上で位置情報が失われやすいため切片の洗浄工程を行わないという工夫がなされる²⁾。

マトリクス支援レーザー脱離イオン化によるIMS (MALDI-IMS) ではマトリクスの塗布が測定感度向上の点で重要である。図に示したものはこのMALDI-IMSを行うときの一連の流れである。これに限らず、マトリクスを使用しないレーザー脱離イオン化によるIMS (LDI-IMS)、ナノ微粒子を用いたIMS (nano-PALDI-IMS) などがある。ナノ微粒子の適用は、微粒子の大きさが数nmオーダーであることから、数十 μm 大の結晶を形成するマトリクスよりも高解像度で生体分子の分布を可視化し、マトリクスではイオン化されにくい生体分子のイオン化を可能にする^{3), 4)}。

■IMS解析の応用

筆者らはFabry病患者の心筋生検を対象として測定を行い、検出したシグナルを異なる4種類の脂質を含むスフィンゴ糖脂質Gb3と同定した。またGb3

分子の組織内局在が、液胞変性をきたしている細胞の分布と一致する事を解明した⁵⁾。このような脂肪酸組成が異なるスフィンゴ糖脂質分子種の分布イメージングを行える手法は、IMSだけである。

またIMSは医学・薬学のみならず、農学分野における植物体内の農薬動態調査、工学分野におけるポリマーの分解挙動の解析などにも幅広く応用されている。今後も装置や試料調整法が改良され、応用の幅が広がっていくことを期待したい。

文献

- 1) Hayasaka T, et al: Anal Bioanal Chem (2011) 401(1): 183-93.
- 2) 「質量顕微鏡法 イメージングマスペクトロメトリー実験プロトコール」(瀬藤光利/著) シュプリンガー・ジャパン, 2008
- 3) Goto-Inoue N, et al: J Am Soc Mass (2010) 21(11): 1940-3.
- 4) 「Imaging Mass Spectrometry Protocols for Mass Microscopy」(M.Setou Editor) Springer, 2010.
- 5) Onoue K: Circ J. (2010) 24; 75(1):221-3.

生物物理の最前線 質量顕微鏡法の新展開

瀬藤光利

質量顕微鏡法は、生体物質の局在解析と同定を同時に、しかも網羅的に行うことを可能とする新しい映像手法である。これにより、これまで解析が困難だった分子種も可視化できるようになり、分野を超えて応用されるようになった。

質量分析イメージング(imaging mass spectrometry, IMS)とは、質量分析を用いて物質の分布を可視化する手法であり、そのなかでも肉眼以上の解像度をもつものをとくに質量顕微鏡法とよぶ。組織切片をそのままに、生体分子の局在を光学顕微鏡で見ることのように可視化し、その分子種を明らかにすることが質量顕微鏡法の狙いである。現在、生体物質のイメージングに用いられるおもな手法には、免疫染色と蛍光タンパク質標識がある。免疫染色では抗原抗体反応を利用するため、使用する抗体と反応する物質しか観察することができず、一時に多種類の物質を可視化することも困難である。また、遺伝子改変により、緑色蛍光タンパク質などを用いて目的タンパク質を標識する手法でも、あらかじめ見る対象を同定しておく必要がある。一方、生体物質を解析し、同定するための従来の質量分析では、組織から目的分子を抽出する作業を行う必要があった。しかし、この過程で、組織内での物質の分布についての情報は失われてしまい、抽出されない分子は見落とされてしまう。一方、質量顕微鏡法では、標識をせずに特定物質を可視化することができ、同定されていない分子の局在も知ることができる。しかも原理的には、多種類の分子を同時に可視化することも可能である。つまり、既存の手法で

は同時に行うことができなかった、物質の可視化と同定を同時に行うことができるという、大きな利点がある。

質量分析とは、原子や分子をイオン化し、その質量と電荷の比を利用して分子量を分析する手法である。生体物質の質量分析に適用できる、さまざまなイオン化法が開発されているが、質量顕微鏡ではマトリクス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)を用いるのが一般的である。この手法では試料と試料のイオン化を助けるマトリクスを混合し、レーザーを照射してマトリクスと試料を気化させることにより、分子をイオン化させる。非常に汎用性の広いイオン化法で、低分子からタンパク質や合成ポリマーまで、気体を除く広範な試料を解析することができる。イオン化した分子は、飛行時間型質量分析計(time of flight mass spectrometry, TOF-MS)で分析する。TOF-MSでは、イオン化した分子に高電圧をかけ、検出器に向かって一定の距離を飛行させる。電荷が同じなら質量の小さい分子イオンほど検出器に早く到達するため、質量と電荷の比(質量電荷比 m/z)によって分離される。測定された分子イオンの m/z を横軸に、縦軸にイオン強度をとったものを質量スペクトルという。 m/z は物質ごとに異なるため、既知の物質であれば質量スペクトルをもとに同定することができ、分子種によってはそのためのデータベースも作成されている。また、質量分析装置内で試料のイオンと希ガス原子を衝突させ、分解した試料イオン断片の分子量から構造解析を行うこともできる(タンデム質量分析法)。この場合、たとえ対象

が未知の化合物であっても、その構造を決定することができる^{1), 2)}。

質量顕微鏡の構造を(図1)に示す³⁾。解析対象の組織は、急速凍結させてから10 μm 以下の厚さに薄切りし、支持体に乗せる。解析時のレーザー照射によって生じた余剰電荷を逃がすため、支持体は導電性素材で、しかも顕微鏡法としての用途を満たすため透明でなければならない。一般にこの2つの条件を満たす素材として、有機ELディスプレイにも用いられる酸化インジウム・スズ(indium tin oxide, ITO)を表面に被覆したスライドガラスが用いられることが多い。MALDIを用いた従来型の質量分析では、試料とマトリクスをあらかじめ混合してしまうが、質量顕微鏡法では組織切片の物質の局在情報が攪乱されるのを防ぐため、微量のマトリクスを切片上に均一に散布する必要がある。そのため、エアスプレーでマトリクスを切片上に噴霧するスプレーコーティング法や、インクジェットプリンターの要領で、微量のマトリクスを切片上に滴下する液滴法などが開発されている。MALDI-TOF-MSを用いたIMSでは、組織上でレーザー照射位置を徐々に移動させていって、組織切片上を走査し、位置情報をもった多数の質量スペクトル群を得る。得られたスペクトル群から、注目する分子の質量スペクトルを抽出し、その分子の各測定点での信号強度分布を色分布などに変換することで、その分子が試料上のどの部位に多く存在するのかが可視化することができる。

医学・生物学分野への応用

質量顕微鏡法を用いることで、これまで