

E. 顕微鏡観察技術の新しい展開

質量顕微鏡法

早坂 孝宏, 杉浦 悠毅, 瀬藤 光利

Key words : 質量顕微鏡法 (imaging mass spectrometry: IMS), マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI), タンパク質 (protein), 脂質 (lipid)

はじめに

これまで生体中における分子の分布およびその挙動は、免疫染色やGFP融合などを用いて明らかにされてきた。しかしながら免疫染色法では、標識抗体を介した間接的な観察であるために抗体の結合特異性に過度に依存しているなどの問題がある。また抗体が意図しない別の分子に結合してしまうことが場合によっては起こりうる。GFP融合法の場合は、観察対象分子と同程度の大きさのGFPを結合させるので、場合によっては観察対象分子の細胞内での機能や局在を異常な状態へ変化させてしまう恐れがある。そこでラベルせずに観察する方法を模索し、物質の質量を厳密に計測する質量分析計 (MS) と細胞組織を解剖学的に観察する光学顕微鏡を組み合わせた質量顕微鏡法を開発し、使用している。ここでは質量分析を実際に扱っていない方々にも理解して頂けるように、質量顕微鏡法について述べたい。

I. 質量顕微鏡法 (imaging mass spectrometry: IMS)

質量分析は生体物質の同定やタンパク質の翻訳後修飾をはじめ、実に様々な目的に用いられている。しかしながら質量分析では、本来その解析対象となる生体試料を分離・精製しなければならず、必然的に目的物質の組織細胞内分布や局在という位置情報

が失われてしまうという弱点が残されている。したがって質量分析の次なる課題として、複雑な組織細胞構造の各領域を構成する生体分子の同定と分布情報を同時に取得できる技術、すなわち質量顕微鏡法が必要である。

その原理 (図1) は、生体組織から凍結切片を作製し (図1a)、イオン化補助剤であるマトリックスを塗布して (図1b)、その表面をレーザーで二次元走査することによってイオン化を行い (図1c)、発生したイオンを質量分析で検出する。この操作によって組織切片上の各測定点から個々のスペクトルが得られる。検出されたスペクトルから任意のピークに注目し、仮にそれが m/z (質量電荷比) 760 という分子だとしよう (図1d)。組織構造の違いによりその分子は異なる分布を持つため、各測定点において異なるシグナル強度として数値化されるはずである。ソフトウェアを用いてその数値を相対的に比較させ、色の濃淡で示すことによって、その分子の分布を二次元マップとして可視化することができる (図1e)。さらには二次元マップ上でROI (region of interest) を指定して、ROIごとのスペクトルを比較することも可能である。この比較によって例えば組織構造により検出される分子種の違いや病理組織上における病理部と正常部からバイオマーカーを探索することも可能である (図1f)。現在までにタンパク質、脂質、薬物などが検出されている^{1,2)}。我々のグループだけでなく世界中の研究グループがさらなるアプリケーション開発を進めており、今後さらに新たな分子種

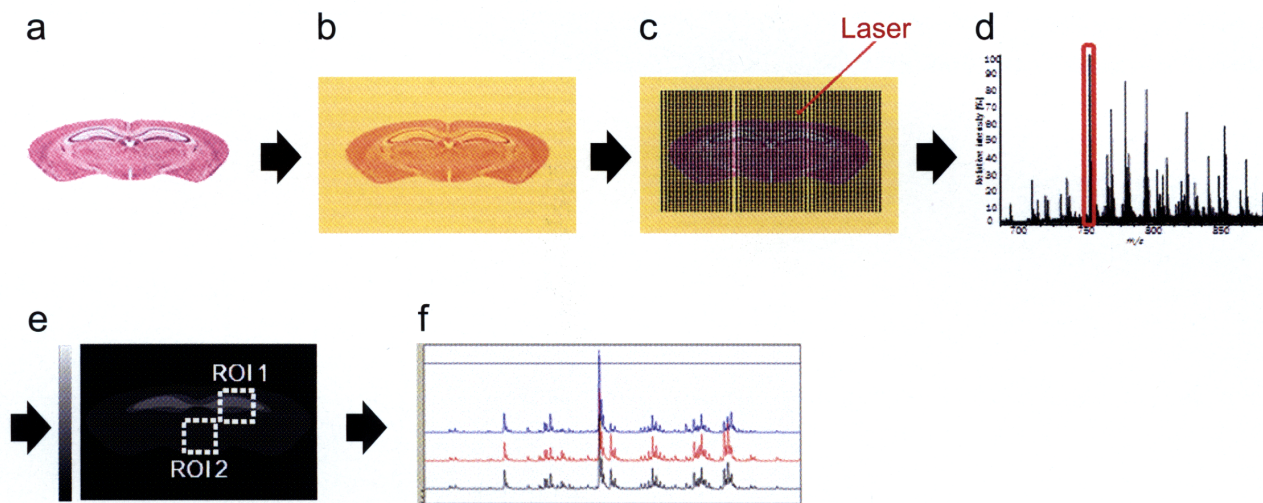


図1 IMSの流れ

(a) 生体組織から凍結切片を作成する。(b) 切片に対してマトリックスを塗布する。(c) 切片表面をレーザーで二次元走査する。(d) 任意のピークに着目し、(e) その分子分布を示す二次元マップを作成する。さらにROIを指定して、(f) ROIごとのスペクトルを比較することにより組織構造により検出される分子種の違いを明らかにすることができる。

が検出されることが期待されている。ここでは臓器からのサンプル調製、ペプチド・タンパク質と脂質・薬物の検出方法について述べ、その画像描出の方法について説明する。

II. サンプル調製

1. 臓器摘出から凍結まで

動物を安楽死させた後、対象とする臓器を摘出し、速やかに凍結させる。生前の状態を反映させるためには、できるだけ急速に凍結させることが望ましい。急速に凍結させることで、細胞内にできる氷晶の大きさをできるだけ小さくし、凍結・融解時の細胞膜の破壊を最小限に留めることができる。凍結方法としてはパウダードライアイスを用いる³⁾。液体窒素では表面が急速に凍結されてしまうため、内部との膨張率の差で組織が割れたり、歪みができたりする場合があるので望ましくない。凍結させた臓器は密閉可能なビニール袋やチューブなど臓器の大きさに合わせた容器に入れ、切片化に使用するまでは -80°C にて保存する。

2. 凍結切片の作成

通常の組織染色の切片作成ではoptimal cutting

temperature (OCT) などのポリマー溶剤へ包埋することにより、組織切片の作成を容易にし、さらには組織形状を維持する。しかしながらOCTによる包埋は、質量分析によりOCT自体がイオン化されやすいことから生体分子のイオン化を抑制する問題がある(図2)³⁾。そのため一部の包埋剤を除いては包埋をせずに凍結切片として試料が用意される。

臓器は -80°C から予め温度設定しておいたクライオスタットの庫内へ移す。最適な温度設定に関しては臓器によって異なり、クライオスタットの取扱説明書に記述されているので参考にして頂きたい。また臓器は20分から30分ほど庫内に放置し、温度を慣らすと良い。クライオスタットへの試料台への固定はOCTを用いる。ここでのOCTの使用は固定のためだけであり作成する切片に含まれることの無いようにしたいので、試料の大きさに合わせて最小限のOCTを乗せる。試料は切片作成を考慮した向きにした状態でOCTの上に乗せ、速やかにクライオスタット庫内で凍結させる。完全に凍結したら、試料チャックに装着し、目的とする断面まで粗削りを行う。切片の厚さであるが、切片が薄いほどシグナル強度及びS/N比が良く、 $5\sim 10\ \mu\text{m}$ あたりの厚さが適当である(図3)⁴⁾。Bruker Daltonicsではindium-tin-oxide (ITO) という導電性素材をコートしてあるスライド

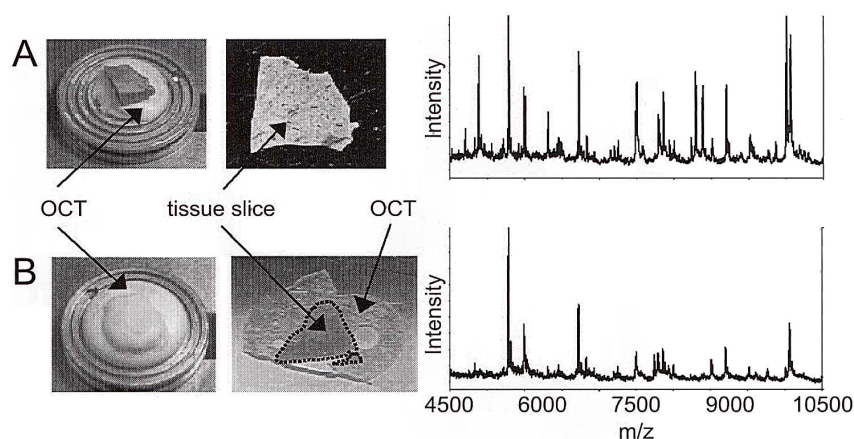


図2 OCTのコンタミネーションによるタンパク質由来イオン検出感度の低下
組織切片にOCTが付着することにより検出可能なピークが減少している。(A) OCTを組織支持のみに用いた場合。(B) OCTにより組織ブロックを完全に包埋した場合。

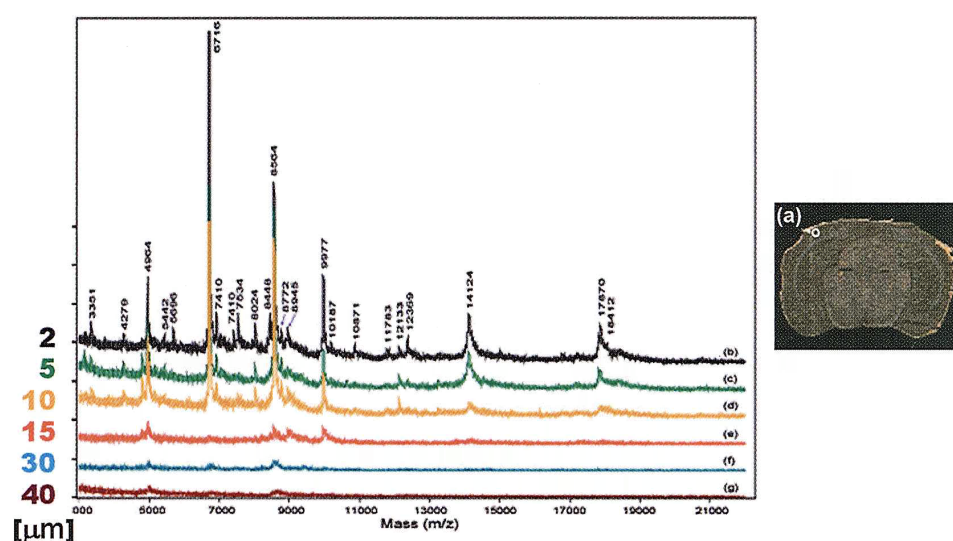


図3 マウス大脳皮質領域 (a) から得られたスペクトル
薄切片からはS/Nの良好なシグナルを検出することができた。

ガラスを提供している。このスライドガラスの導電面に対して切片を乗せる。またBruker DaltonicsやShimadzuではスライドガラスを装着できるターゲットプレートを提供している。実際に測定する際には切片が乗ったITOスライドガラスをターゲットプレートに装着した状態でレーザーを照射することになる。ここから検出する分子種（ペプチド・タンパク質・脂質・投与薬物等）によって処理方法が異なるので次に説明する。

III. 質量顕微鏡測定

1. ペプチド・タンパク質

1) 洗浄

ペプチド・タンパク質を測定対象とする場合は、組織切片の有機溶媒洗浄が必要である。有機溶媒洗浄は、主に切片中の脂質を洗浄することでペプチ

ド・タンパク質のイオン化を促進する。また、マトリックスの結晶化に干渉する塩を洗い流す役割もある。組織切片の洗浄は文献によって報告されているように、いくつかの方法が取られている。我々が行っている印象として強い脱脂作用を持つ方法は、以下にまとめたような洗浄方法である。また他にもクロロホルム、キシレン、トルエン、ヘキサン、アセトンの6種類の有機溶媒による洗浄も他のグループにより検討されており、未処理の場合よりも検出されるタンパク質由来のシグナルが増加することを見出している。

洗浄直後の切片をマトリックス塗布の前に十分に乾燥させる必要がある。乾燥が不十分な場合、切片が質量分析計の真空チャンバー内で剥がれてしまうことがある。乾燥方法としては室内での自然乾燥を行ったりするが、減圧下の真空デシケーター内もしくは窒素ガスを吹き付ける方法が望ましい。

[主な洗浄方法の例]

- 例① 70% エタノール (30 秒浸漬) × 2 回
 例② 70% エタノール (30 秒浸漬),
 100% エタノール (15 秒浸漬)
 例③ 70% エタノール (30 秒浸漬),
 100% エタノール (15 秒浸漬)
 例④ 90% エタノール / 1% 氷酢酸 (30 秒浸漬)

2) on-tissue digestion 法

現行の質量顕微鏡法において通常測定できるタンパク質は、生体組織上でのイオン化効率から、30 kDa 程度までである。しかし生体内にはこれより高分子量のタンパク質が多数存在し、生命現象に重要な役割を果たしている。これらのタンパク質を検出方法として on-tissue digestion 法と呼ばれる、組織上でのタンパク質変性法、酵素消化法を考案した^{5,6)}。

on-tissue digestion 法を始め、マトリックス塗布にも言えることであるが、質量顕微鏡法においては溶液を均一に塗布することが重要となってくる。その問題を解決する装置として、島津製作所が開発したピエゾ素子を用いたインクジェットプリンタ様の微量溶液分注装置であるケミカルインクジェットプリンタ (Chemical Inkjet Printer : ChIP-1000) を用いたトリプシン消化酵素溶液とマトリックス溶液の切片への滴下方法を紹介したい (図4)⁵⁾。0.083 mg/ml に調製したトリプシン酵素溶液を各スポットに対して、滴下するドロップ1滴の容量を 100 pl に設定し、1 回に 5 ドロップ (0.5 nl) を滴下する。各スポットを順に滴下して周回すると、同一スポットにおいて約 8 分間隔で滴下することになる。この間に滴下されたスポットは乾燥する。各スポットに合計 15 nl 滴下するまで、上記の工程を 30 回繰り返す。合計で約 4 時間を要するが、この経過時間中にトリプシンによるタンパク質消化反応が進行する。

3) マトリックス滴下

次にイオン化補助剤 (表1) であるマトリックスを塗布する。ペプチドを検出対象とする場合には 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を、タンパク質の場合にはシナピン酸 (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid : SA) を用いている。まずペプチドを検出対象とする場合、DHB の濃度を 25 mg/ml として、溶媒組成は 50% メタノール / 0.25% トリフルオロ酢酸

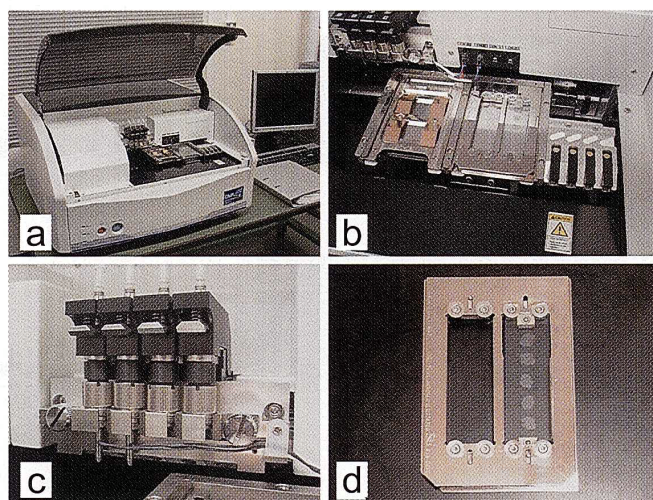


図4 (a) ChIP-1000, (b) 試料ステージ部, (c) プリントヘッド部, (d) マウス小脳切片が乗ったITOスライドガラスをBruker Daltonics社製ターゲットプレートのソケットに固定した様子。

(TFA) である。このDHB溶液を上記と同様の滴下条件で20回繰り返す、各スポットに対して合計10 nlを滴下する。またタンパク質を検出するためのSAの濃度は15 mg/mlとして、溶媒組成は60%アセトニトリル / 0.2% TFAである。滴下条件はDHB溶液と同様であり、各スポットに対して合計10 nlを滴下する。以上まででペプチド・タンパク質を検出するための試料に対する前処理が完了し、後は質量分析計を用いたイメージング測定を行うことになる。これについては後述するとして、先に脂質・薬物を検出するための方法について述べる。

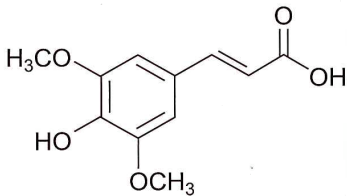
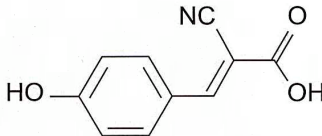
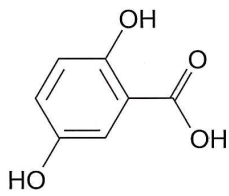
2. 脂質・薬物

脂質や薬物などは先に紹介した切片の洗浄工程により消失しやすい。また仮に消失しなかったとしても、元の位置から分子が移動し、切片上での位置情報が失われやすい。そのため洗浄工程は行われたい。これがペプチド・タンパク質の前処理法とは異なる点である。つまり測定前の試料に対する処理としてはマトリックス溶液を塗布するだけで良いのである。ペプチド・タンパク質の検出方法においてChIP-1000を紹介したので、ここではエアブラシを用いたスプレーコーティング法を紹介する。

1) スプレーコーティング法

スプレーコーティング法は非常に簡便であるが、

表1 組織切片のIMSに用いられる代表的なマトリックス

種類	SA	CHCA	DHB
別名	<ul style="list-style-type: none"> ・シナピン酸 ・sinapinic acid ・3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid 	<ul style="list-style-type: none"> ・α-シアノ-4-ヒドロキシ-ケイ皮酸 ・α-cyano-4-hydroxycinnamic acid 	<ul style="list-style-type: none"> ・2,5-ジヒドロキシ-安息香酸 ・2,5-dihydroxy benzoic acid
構造式			
分子量	224.21	189.17	154.12
化学式	$C_{11}H_{12}O_5$	$C_{10}H_7NO_3$	$C_7H_6O_4$
溶媒	<ul style="list-style-type: none"> ・水に微溶 ・メタノール / 水に可溶 ・極性有機溶媒に可溶 	<ul style="list-style-type: none"> ・水に微溶 ・メタノール / 水に可溶 ・極性有機溶媒に可溶 	<ul style="list-style-type: none"> ・水に可溶 ・メタノール / 水に可溶 ・極性有機溶媒に可溶
特徴	シグナル / ノイズ比が高いマススペクトルが得られる。		マトリックス結晶の質が、マススペクトルに大きく影響する。
測定対象	タンパク質 (4 ~ 30 kDa 程度)	脂質やペプチド (~ 8 kDa 程度)	脂質やペプチド (~ 5 kDa 程度)

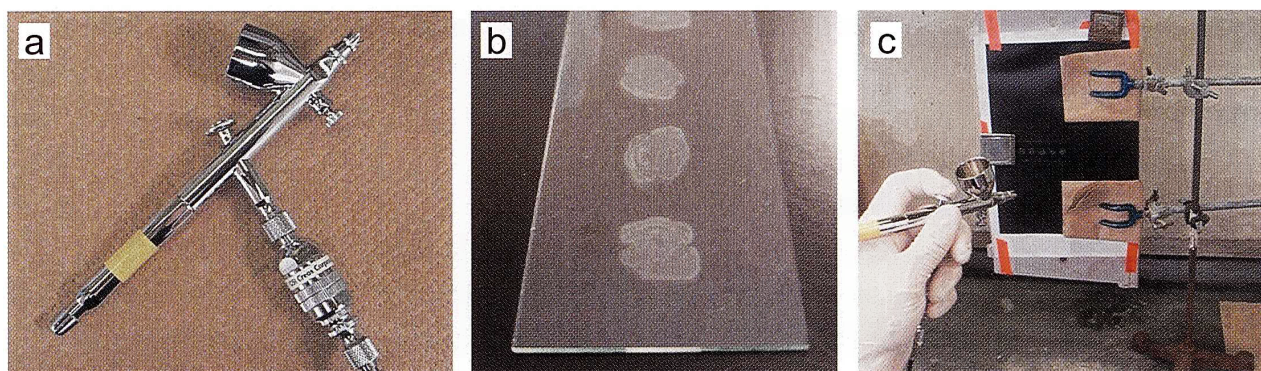


図5 (a) エアブラシ, (b) マウス小脳が乗ったITOスライドガラス, (c) ドラフト内で垂直に立てたボードに留められたITOスライドガラスにスプレーする様子。

手動であるがために実験者のスプレー方法により実験結果が左右される問題がある。つまりスプレーの粒子径や飛散量を定量的に制御することが困難である。液量が過剰であれば浸漬法で見られるような測定対象分子の組織切片上における位置情報の劣化が起り得る。一方、液量が不足すれば噴霧された液滴が飛行中に乾燥してしまい、組織切片上に到達した際、十分に組織を濡らすことができない結果として組織中の測定対象分子の抽出が不十分になり、イ

オン化に最適な測定対象分子とマトリックスの結晶を形成することが困難になる。その結果、マトリックスのコーティングにムラが生じて、そこから得られるシグナルの再現性が乏しくなることがある。

実際にスプレーコーティング法の説明に入る(図5)。脂質・薬物などの測定には低分子を検出しやすいDHBもしくは α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid : CHCA)をマトリックスとして用いる。ここではDHBを用いる場合に

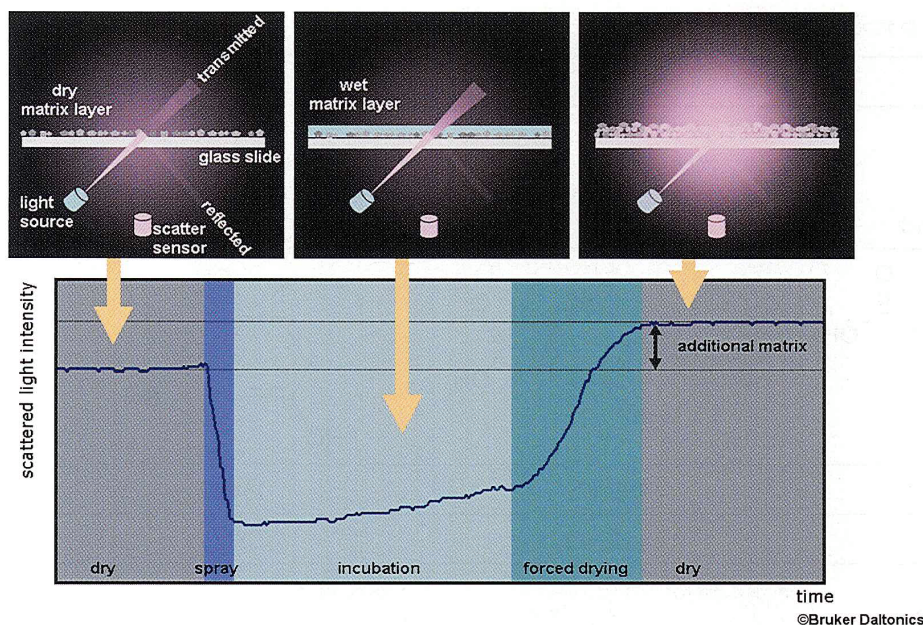


図6 ImagePrepに装備された光学センサーとマトリックス厚さ制御機能

について説明する。その濃度は30 mg/mlとして、溶媒組成は70%メタノール/0.1%TFAとする。これらの組成は一般的な目安であり、上記スプレー方法で制御しきれない粒子径や飛散量によって結果が左右されるので、実験者の操作によって調節が必要である。またエアブラシについては、ほとんどの実験者が未経験であると思われる。初めのうちは粒子径と飛散量の調節が困難であるため、適当な溶媒を用いて操作に慣れることも必要である。組織切片へのスプレー方法で注意する点であるが、いくつか自分でチェックポイントを作っておくとよい。例えば、スプレーのノズル先端と切片の距離である。我々は10～15 cmと決めてスプレーするようにしている。次にスプレーノズルから放たれるスプレーのラインの見え方である。どれくらいラインが見えた状態でスプレーしたかを覚えておき、切片上に形成されたマトリックス結晶の状態と測定から得られた結果を照らし合わせることで最適なスプレー方法を見出すことが可能となる。

2) 装置を用いたマトリックス塗布の制御

以上のようにエアブラシを用いたマトリックス塗布では経験的な要素が多いため、早急にIMSによるデータを取得する必要がある場合には各メーカーから提供されている自動塗布装置を用いることをお勧めする。前述のChIP-1000やBrukerから提供されているImagePrepを適用することは、DHB塗布量

に定量的な制御を持たせることができるため、再現性に優れた実験結果を得ることが可能になる。特にImagePrepについては予めインストールされているメソッドを実行させるだけで、十分に測定可能なマトリックス結晶の形成を実現する。また光学センサーを有しているため、そのマトリックスの厚さ制御まで行うことができる優れた装置である(図6)³⁾。

3. 測定

ここまでに試料に対する前処理が終了しており、測定を行う状態が整っている。現在までに質量顕微鏡測定が可能な装置は各社から提供されている。我々はAXIMA-QIT (Shimadzu), ultraflex II (Bruker Daltonics), QSTAR XL (Applied Biosystems) など、いくつかの装置を使用できる環境にある。また我々自身もJSTの先端計測技術・分析技術事業の支援を受けて、既存の装置のスペックを上回る次世代の装置を開発している。

どの装置においても測定で問題となるのはレーザーのパワーと一箇所あたりの照射回数である。このパラメータは個々の装置の状態とマトリックス結晶の状態が影響する。そのため質量顕微鏡測定をする前に何点か組織切片上をテストショットすることで最適なシグナルを得る条件を検討すべきである³⁾。また具体的な質量顕微鏡測定の実行方法については各メーカーによって異なるため、ここでは省略させ

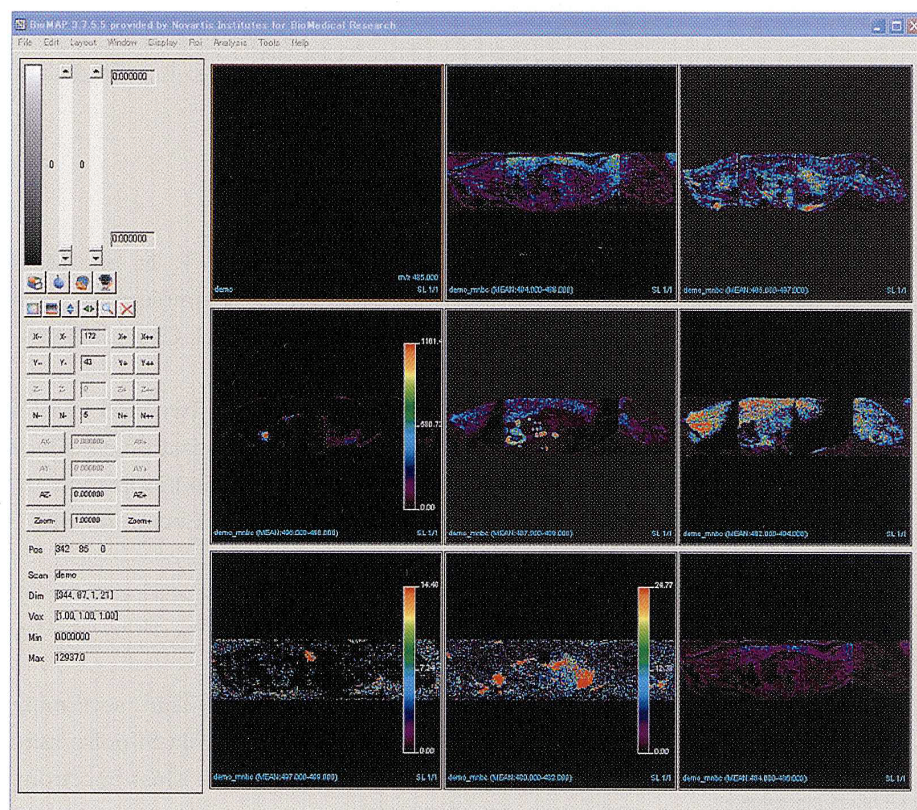


図7 BioMapで作成されたラット全体断面上における生体分子の分布画像

ていただく。基本的に共通するパラメータとしては、レーザーパワー、一ヶ所あたりのレーザー照射回数、レーザーの照射間隔、切片上の測定領域、 m/z の測定領域などである。

上記パラメータの中で質量顕微鏡測定を行う上で重要なパラメータはレーザーの照射間隔である。この間隔が後述する画像描出における解像度に相当するのである。もちろん10～20 μm などのように細かい数値を設定しておけば、いつでも非常に美しい画像を描出することが可能である。しかしながら画像が美しいということは、それだけ細かく、多くの情報がその画像に詰まっているということであり、測定時間に10時間以上を要することや、取り扱うデータ容量が非常に膨大になるということである。実験者が解明しようとする事象に見合った間隔を設定すべきである。

IV. 画像描出

画像描出についても各メーカーが独自にソフトウェアを開発していることが多い。Applied BiosystemsではoMALDI Server, Bruker Daltonicsではflex-

Imagingというソフトウェアを提供している。データ形式はそれぞれ異なり、各メーカーが独自に進めているのが現状である。BioMap (<http://www.maldi-msi.org/>) はそれらのデータを一括して導入可能なフリーのソフトウェアである。BioMapは元来CT (computed tomography), MRI (magnetic resonance imaging), PET (positron emission tomography) で得られたデータを表示するためのソフトウェアであった。それがMarkus Stoeckli博士によって質量顕微鏡法で得られたデータの解析にも適用できるように改良された。BioMapのダウンロードサイトからは、ソフトウェアと同時にデモンストレーションデータもダウンロードできるので、質量顕微鏡法とはどのようなものを体感したい方にお勧めする。なおBioMapの実験にはIDLあるいはIDL VM (IDL virtual machine) のインストールが必要である。

インストールが完了したら、[File]－[Import]－[MSI]をクリックし、BioMap Demo Data内の“demo.img”を開く。[Analysis]－[Plot]－[Point]をクリックするとwindow 1に点線の十字が現れ、その交点に対応したスペクトル情報がPlot Toolウィンドウに表示される。その交点はマウス操作によっ

て移動させることが可能である。スペクトルは左クリックで領域選択することによって拡大することができる(図7)。その中で興味のあるピークについてはホイールボタンで領域選択することによって、そのピークを示す生体分子の分布画像を描出することができる。以上が一般的な画像描出の方法である。

さらにBioMapにはROI (region of interest) の機能が装備されている。[Roi]—[draw]をクリックし、画像内で領域を選択し、“Done”をクリックすることでROI 1を設定する。同様の操作を比較したい領域に対して行いROI 2を設定する。[Analysis]—[Plot]—[Roi]をクリックすると、それぞれのROIにおけるスペクトルが重ねて表示され、比較することが可能になる。この機能を使用して臓器の構造的な違いを明らかにすることや、病理組織上における病理部と正常部を分けるバイオマーカーの探索が可能になる。

おわりに

新規のイメージング手法として我々が開発してきた質量顕微鏡法は未だ発展途上の段階にある。ここでは紹介出来なかったが、切片上でのMS/MS解析を行うことにより、検出された分子の詳細な構造解析も可能である。特に既存の免疫染色やGFP融合では解析できなかった脂質のような代謝産物の詳細な分子構造までを明らかにすることができる。今後この

質量顕微鏡法が既存の方法では解明されなかった諸問題へ適応され、新たな発見をもたらし、社会に貢献できれば大変うれしく思う。

文 献

- 1) Shimma S, Sugiura Y, Hayasaka T, et al.: Mass imaging and identification of biomolecules with MALDI-QIT-TOF-based system. *Anal. Chem.* **80**: 878–885, 2008.
- 2) Sugiura Y, Shimma S, Setou M: Two-step matrix application technique to improve ionization efficiency for matrix-assisted laser desorption/ionization in imaging mass spectrometry. *Anal. Chem.* **78**: 8227–8235, 2006.
- 3) 瀬藤光利：質量顕微鏡法。イメージングマススペクトロメトリ実験プロトコル，シュプリンガー・ジャパン，東京，2008.
- 4) Sugiura Y, Shimma S, Setou M: Thin sectioning improves the peak intensity and signal-to-noise ratio in direct tissue mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **54**: 45–48, 2006.
- 5) Shimma S, Furuta M, Ichimura K, et al.: A novel approach to in situ proteome analysis using a chemical inkjet printing technology and MALDI-QIT-TOF tandem mass spectrometer. *Surf. Int. Anal.* **38**: 1712–1714, 2006.
- 6) Setou M, Hayasaka T, Shimma S, et al.: Protein denaturation improves enzymatic digestion efficiency for direct tissue analysis using mass spectrometry. *Appl. Surf. Sci.* **108**: 364–371, 2008.