

イメージング質量分析法による新しい局在解析



平 修

1 はじめに

「百聞は一見に如かず」と言うように、「見る」ことは理解しやすく、情報の共有度も高い。また、「見る」ことは、科学の発達と密接に関連しているように思える(図1)。16世紀頃に解剖学が始まり、17世紀になり光学顕微鏡が発明された。これにより、我々生物を構成している「細胞」1個(マイクロメートル)を視認できるようになった。その後、20世紀に電子顕微鏡によりウイルス(ナノメートル)が発見され、現在では、走査トンネル顕微鏡(STM)などで、分子(オングストローム)の解析が可能である。他にも、免疫染色や、近赤外線(IR)イメージングなど多くの可視化技術・手法がある。技術の進歩で見たのか、その逆なのかは議論するところではあるが、「見る」ことで、数々の発見がなされ、科学界も大きく前進したのは間違いない。

今回、新しい「見る」技術として、質量分析(MS)を用いて、物質の局在を可視化する「イメージングMS法」を、その原理、歴史を踏まえながら簡単ではあるが紹介させていただく。

2 イメージング質量分析

MSとは分子(群)をイオン化、分離、検出することで物の重さ(質量)を測定する分析方法である。横軸に質量電荷比(m/z)、縦軸に測定強度を示したMSスペクトルを解析する。現在では、物質の同定手法として一般的に用いられている。近年では、測定精度、分解能も向上したことから、混合物の解析にも威力を発揮し、各種オミクス研究にも応用されている。

MSと可視化を結びつけたのは、1997年、Caprioliらによって、ラット^{すいぞう}膵臓の凍結切片(厚さ: 50 μm)上から直接タンパク質をマトリックス支援型レーザー脱離イオン化(MALDI)法でイオン化したことから始まる。組織切片上の1点でMS測定(一次元MS)した後、一定間隔(10~200 μm)をおいて再度同条件でMS測定を行う。それをイメージングしたい切片領域内で行う(二次元的MS)、多数のMSスペクトルから注目するシ

Imaging Mass Spectrometry: What is it? Where is it?

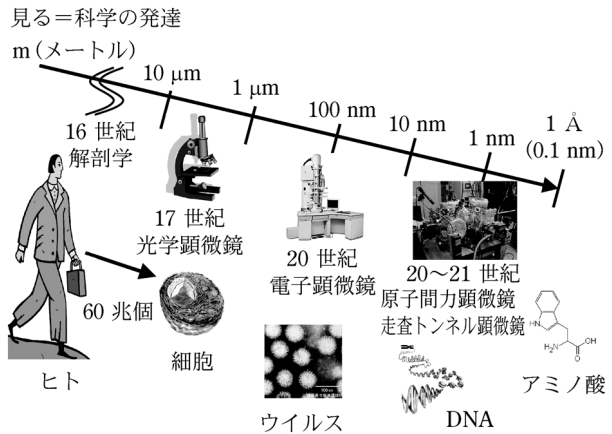


図1 可視化技術の歩み

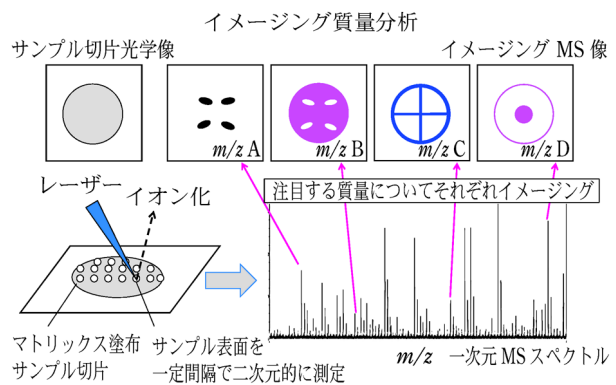


図2 イメージング質量分析の原理

グナル(標的物質)のみを抽出し、二次元画像とする。標的物質と同質量が検出された位置と、検出されない位置ではコントラストが異なるため、標的物質の局在解析が可能になる(図2)。生体組織のMALDI-MSによるイメージングMS法の概念が示された¹⁾。特徴として、一度の測定で、一枚の切片から抗体や染色剤を必要とせず、複数の標的物質群の局在を解析できることが挙げられる。また、特に特殊なMS装置を必要とせず、MALDI-MS装置と専用ソフトがあればよい。それまで、飛行時間二次イオン質量分析(TOF-SIMS)を用いた合成高分子のイメージングは報告されていたが、生体分子の局在を質量分析でイメージングしたのは初である。

2001年にStoekliらによって、マウス大脳のタンパク質群局在が視覚的に解析された。タンパク質A(m/z 8, 258)は、大脳皮質と海馬付近に、タンパク質B(m/z 6, 716)は黒質、内側膝状核、またはペプチドA(m/z 2, 564)は中脳と、部位特異的に生体物質が局在していることを示している。さらに、がん組織部位で増殖するといわれるThymosin B4の局在を明らかにすることで正常細胞部位との境界を可視化している²⁾。これは手術時に、異常組織をすべて除去したか否かの確認法として期待される。本報告が、生体組織の可視化方法としてイメージングMSを最も有名にしたものである。その後、様々な研究者によってイメージングMSを用いた生体内物質の局在解析がなされている。

2011年、Sugiuraらは、‘てんかん’発作発症30分後の急性期に脳（海馬のCA3神経細胞）でATP産生が亢進しているエネルギー代謝状態をモデルマウスでイメージングしている³⁾。このことは病気のメカニズム解明、薬剤開発において、標的物質がどの部分に存在するかを理解する手がかりとなる。

医学分野から出発したイメージングMS法であるため、その研究例は前述のように解剖学的なものが多いが、近年では食品分野にも応用されるようになった。Zaimaらは、コメの代謝物成分の局在を調べている。ビタミンEは胚盤、脂質（LPC）は胚乳など種々の代謝物の分布を可視化している⁴⁾。本法による穀物の品種同定、品質保証を検討している。食品などは、実際に我々が口にする物であるから、その品質や安全性を示すことは必要である。イメージングMSは食品（農産物、畜産物、海産物）の一部を切片とし測定するだけでよいので、群ではなく個体の検査に用いられる。また、栄養成分、機能性成分が豊富に含まれている部分はどこなのか、食品の付加価値となる根拠を視覚的に表現できる。また、希少価値の高い食品、生薬原料などは偽物が市場に出回ることもあり、本法を視覚的な品質保証データとして添えることも一計であると考えられる。残留農薬検査、新規加工・修治（栄養、機能性成分リッチな部分のみを残し、他の部分を切りとること）部分の決定法など、食品分野においても本手法が目ざされている。

3 イメージングMSの今後

近年、イメージングMSを用いた論文が増えている。確かに、MALDI-MS装置があれば実験は可能であるし、新規に装置を購入する際にはほとんどのメーカーが、イメージングMSに対応している。

切片上を二次元的に質量分析することで、測定後に画像を構築するため、画像解像度は、①レーザー照射径、②照射ステップ間隔、③塗布するマトリックス結晶の大きさに依存することになる。これらの値が小さいほど、画像解像度は高くなる。①、②は装置の性能に依存するが、レーザー照射径を小さくするほど一度の測定で得られるイオン量が減少するため、S/Nが悪くなる。③に関しては、いかに有機マトリックスを切片表面に均一に塗布し、切片表面でできるだけ小さな共結晶を作れるかが重要である。多くはエアブラシを用いて手で塗布するが、熟練の技術を要する。特に、有機マトリックスの結晶は50 μm以上になることが多く、このことは、画像解像度が50 μm以下は望めないことを示す。近年では、有機マトリックス塗布装置が各社から販売されており、最小で20 μmの結晶が切片上で作成可能である。SIMSイメージングは、有機マトリックスを使用せず、画像解像度100 nmが可能であるため、細胞内イメージングも行われているが⁵⁾、イオン化効率がMALDIに比べて低いことと、測定質量限界が $\sim m/z$ 800程度などいくつか制限がある。SIMSのビームエネルギーをkeVからMeVにすることで、切片上から安定にイオンを生成する手法⁶⁾や、イオン化支援剤をナノ微粒子にして切片に塗布することで、高解像度イメージ

ングを行うことも可能である⁷⁾。また、測定時間は、切片の大きさ、画像解像度に応じて異なるが、数時間から終夜運転で測定することが多い。試料全面に均一な強度でレーザーを照射・イオン化し、静電イオンレンズによって拡大・検出し蛍光板に投影する方法も提案されている⁸⁾。前述した組織検査を実現するためには測定時間の短縮が課題であるため、投影型イメージングMS法はその点非常に期待される。そのほか、切片作製においても非常にスキルを要する⁴⁾。可視化するということがインパクトが強い反面、標的物質が多量に存在するかどうかのような誤解を招くこともある。イメージングMSで作成された画像は相対強度であり、定量性は今後の課題である。同じ物質の局在を比較することは問題ない。しかし、他の物質とその存在比を単純には比較できない。イオン化効率が異なるためである。内部標準などを入れて慎重に解析する必要がある。クロマトグラフィーや他の実験結果と総合的に判断することは常住坐臥必要である。これらのように、論文には記述のない細かいノウハウ、課題があるのも確かである。

4 おわりに

本稿では、質量分析を用いた可視化法を紹介させていただいた。見えないものを見るという試みは今後も様々な技術で発展していくと考えられる。試料表面の情報を直接取り出し、複数物質の局在を見て理解できるイメージングMS法も医学、農学、工学だけでなく、あらゆる分野で社会還元されることを期待して欄筆させていただく。

文 献

- 1) R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile : *Anal. Chem.*, **69**, 4751 (1997).
- 2) M. Stoeckli, P. Chaurand, D. E. Hallahan, R. M. Caprioli : *Nat. Med.*, **7**, 493 (2001).
- 3) Y. Sugiura, R. Taguchi, M. Setou : *PLoS One*, **6**, e17952 (2011).
- 4) N. Zaima, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, M. Setou : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 2723 (2010).
- 5) M. L. Steinhauser, A. P. Bailey, S. E. Senyo, C. Guillemer, T. S. Perlstein, A. P. Gould, R. T. Lee, C. P. Lechene : *Nature*, **481**, 516 (2012).
- 6) Y. Nakata, Y. Honda, S. Ninomiya, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo : *J. Mass Spectrom.*, **44**, 128 (2009).
- 7) H. Ageta, S. Asai, Y. Sugiura, N. Goto-Inoue, N. Zaima, M. Setou : *Med. Mol. Morphol.*, **42**, 16 (2009).
- 8) H. Hazama, J. Aoki, H. Nagao, R. Suzuki, T. Tashima, K. Fujii, K. Masuda, K. Awazu, M. Toyoda, Y. Naito : *Appl. Surf. Sci.*, **255**, 1257 (2008).



平 修 (Shu TAIRA)

福井県立大学生物資源学部(〒910-1195 福井県吉田郡永平寺町松岡兼定島4-1-1)。北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科博士後期課程修了。博士(材料科学)。《現在の研究テーマ》ナノ微粒子支援型質量分析法による生体物質一斉検出。《趣味》ギターつま弾き。