

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22120009

研究課題名（和文）質量顕微鏡による高空間分解能分子動態解析

研究課題名（英文）Development and application of high resolution imaging mass spectrocope

研究代表者

高橋 勝利 (Takahashi, Katsutoshi)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・主任研究員

研究者番号：00271792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 63,100,000円

研究成果の概要（和文）：従来、レーザーを用いた質量顕微鏡測定は動物組織内での代謝物・糖類・脂質類・タンパク質類などの空間分布を計測することに用いられており、植物組織に対して適用することは難しかった。本研究課題では、植物組織に質量顕微鏡技術を適用することを目的として、高分解能高精度質量顕微鏡装置（ハードウェア及び制御ソフトウェア）の開発を実施した。その結果、植物組織切片だけでなく、これまでに適用がさらに難しかった肉厚の植物組織を直接分析することに成功した。質量顕微鏡測定から生ずる数百GBにも及び巨大なデータをプロセスし、そこから代謝物などの分布と種類に関する情報を抽出するためのソフトウェアの開発にも成功した。

研究成果の概要（英文）：Imaging mass spectroscopy technique was used to map spacial distribution of metabolites, sugars, lipids and proteins on a thin slice of animal tissues, but it was very difficult to apply to the plant tissue analysis. In this study, the hardware and software was implemented to enable to map spacial distribution of metabolites, sugars and lipids on a intact plant tissue, not only on a thin sliced tissue, The special software to pick up the spacial distributions of the ions from several hundreds giga bytes of the data produced by the imaging mass spectrocope was also successfully developed.

研究分野：質量分析学

キーワード：質量顕微鏡 フーリエ変換質量分析 植物組織 代謝物 空間分布

1. 研究開始当初の背景

質量分析法はライフサイエンス分野において、超高感度(例えばフェムトモルからアトモルレベルの検出感度)な物質検出法として頻繁に用いられるようになっていた。この方法を使って、さまざまな条件下の生体組織中に含まれる様々な物質(タンパク質、代謝物等)を検出し、条件の違いにより検出できる物質の違いを議論することで、条件の変化に伴う様々な物質の動態変化を解析することが行われていた。しかし、それらの大部分は、組織をすり潰して必要な物質を抽出したのちに分析を行うため、組織や細胞内で物質がどのように分布し、条件の変化に応じてその分布状況がどのように変化するかをとらえることはできなかった。

このような状況下で、小さく絞ったレーザー光をサンプルに照射して、照射部位に存在する物質をイオン化・質量分析する手法を利用して、レーザー照射部位をスキャンさせながら質量分析を行い、それを画像化することにより、さまざまな物質の空間分布を計測する「質量顕微鏡」が開発され、利用されるようになった。この質量顕微鏡を使って得られる質量スペクトル情報から、あらかじめ存在が想定される物質を検出することは可能であるが、植物組織に含まれる2次・3次代謝物を含む未知化合物を同定し、同時に空間分布を明らかにすることは難しかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、研究代表者がこれまでに開発に成功した超微小領域 MALDI-FTMS 装置を使って、これまで測定が困難であった植物組織・植物細胞の質量顕微鏡観察を行うために必要なハードウェア・ソフトウェア技術を確立することを目的に研究を行った。また、領域内の植物科学研究者及び細胞解析技術研究者と連携することにより、多角的に植物細胞内における物質動態を解析する技術を開発し、植物の環境感覚の仕組みを明らかにすることを目指した。具体的な研究の目標は次の通りである。

a) 超高分解能高精度質量顕微鏡装置の確立

顕微 MALDI-FTMS 装置を改造して、試料表面上の特定の範囲の点にシステムティックにレーザー光を照射して超高分解能高精度質量分析を行える装置を実現する。

b) 植物組織の質量顕微鏡観察技術の開発

植物組織・植物細胞に最適の質量顕微鏡装置及び測定方法を確立する。この際、技術開発に用いる植物組織や培養細胞の提供及び実験条件の検討等、領域内の研究者と密な連携を行う。

c) 植物組織の分子動態解析法の確立

開発した質量顕微鏡を実サンプルに適用して、分子動態解析を実施する。他の計画研

究班と有機的に連携し、これまで明らかでなかった植物細胞内部での物質分布の変化を検出し、植物の環境感覚における植物細胞場、という概念を確立することを狙う。

3. 研究の方法

研究目標を実現するために、下記各項目に関して以下の研究方法を実施した。

1) 高空間分解能 MALDI-FTMS 質量顕微鏡装置の開発

顕微 MALDI-FTMS 装置内部の試料ステージを高分解能化すると共に、超高精度エンコーダーを組み込み、試料位置の位置制御再現性を大幅に向上させる。また、試料表面へ紫外パルスレーザー光を集光する光学系を一から設計・実装し、高空間分解能質量顕微鏡測定を実現させる。

2) 高空間分解能 MALDI-FTMS 質量顕微鏡制御ソフトウェアの開発

上記研究方法により、試料位置制御能力を大幅に向上させた顕微 MALDI-FTMS ハードウェアを用いて、植物組織の質量顕微鏡測定を行うための制御ソフトウェアを開発する。

植物組織切片の形状は、組織の部位にも依るが、一般に矩形からは外れた形状をしている。このため、従来のように矩形領域をラスタースキャンすると、大部分の測定点がバックグラウンドとなり、測定効率が著しく低下する。このため、植物組織切片の形状により、任意形状の測定範囲を指定し、その領域をラスタースキャンするための植物組織質量顕微鏡測定ソフトウェアを開発する。

3) 植物組織の凍結切片作成法及び質量顕微鏡測定のための試料調製法の確立

シロイヌナズナの葉を試料に用いて、それを氷温下で10~20マイクロメートル厚に切り出し、氷温化で真空凍結乾燥するためのプロトコルを確立する。さらに、切片を導電性コートした板ガラス上に貼り付け、質量顕微鏡測定を行うために様々なマトリクスを噴霧またはコートするためのプロトコルを確立する。

切片を作成することなしに、直接植物組織を導電性コートした板ガラス上に貼り付け、マトリクス物質を一様にコートして上で質量顕微鏡測定を行うための試料調製プロトコルも確立する。

4) 質量顕微鏡データ解析ソフトウェアの開発

FTMS による超高分解能質量顕微鏡データは、一回の測定につき、数百ギガバイトもの巨大なファイルとなる。これをそのまま分析し、様々な分子イオンの空間分布を表示することは、これまでに入手可能な市販・フリーの解析ソフトウェアでは不可能であった。このため、独自に解析ソフトウェアを開発し、

数百ギガバイトのプロファイルデータを直接解析する。

5) 他計画研究班および公募研究班との連携による植物組織の質量顕微鏡測定

複数の他計画研究班および公募研究班と有機的に連携し、様々な植物試料の超高分解能・高精度質量分析および質量顕微鏡測定を実施し、これまで明らかでなかった植物細胞内部での物質分布の変化を検出し、植物の環境感覚における植物細胞場、という概念を確立することを狙う。

4. 研究成果

研究方法の各項目に関して以下の成果を得た。

1) 高空間分解能 MALDI-FTMS 質量顕微鏡装置の開発

顕微 MALDI-FTMS 装置内部の試料ステージを高分解能化すると共に、超高精度エンコーダーを組み込み、試料ステージ位置をフィードバック制御することにより、150nm の分解能で試料位置を精密に制御することを可能とした。また、市販のゲームパッドを用いた試料ステージ位置制御、iPad を用いた装置制御などを実現した。

また、イオン化に用いる紫外パルスレーザーを 100Hz のモデルから 1kHz のモデルに変更した。これに伴い、これまでに用いてきた光ファイバーとカセグレン鏡を用いたレーザー集光光学系は使えなくなったため（光ファイバーが焼き切れる）、ミラーと集光対物レンズを用いた空間伝搬型の集光光学系を新たに設計し実装した。これにより、これまでボトルネックであったレーザー照射時間を 10 分の 1 に短縮し、トータルのスループットとして従来の 3 倍程度の高分解能測定速度を実現した。

開発途中の質量顕微鏡用イオン源では、11mm x 11mm x 0.7mm サイズで片面に導電性 ITO コートを施したガラス上に特殊な糊を使って試料を貼り付けたものを XYZ ステージに取り付けた腕の先端に装着し、イオン源を構成する電極群の内部に挿入する構造であり、一度に装着できる試料ガラスは一枚に限られていた。これに伴い、異なる試料に切り替える際には、イオン源の真空を立ち下げて大気解放したうえで試料を交換し、再度測定が可能になるレベルまで真空を立ち上げなければならず、これに 1 から 2 時間を要していた。高繰返し型 LASER を導入して測定自体のスループットが大幅に向上したため、試料交換に伴う真空の立ち下げ・立ち上げ時間が測定に必要な時間に対して無視できなくなり、このため XYZ ステージに取り付けた腕の先端にコンピュータ制御により精密に回転をコントロールできる特殊なモーター（超音波モーター）を取り付け、それにより円周上に最大 8 つの試料ガラスを装着した円盤を

真空中で回転させて試料を切り替えることにより、真空を落とさずに試料を切り替えられる機構を設計・制作し、質量顕微鏡装置に実装した。これにより 8 枚のサンプル一度に交換する事以外は、真空を落とすことなく全ての操作をコンピュータ制御により行うことが可能となった。

2) 高空間分解能 MALDI-FTMS 質量顕微鏡制御ソフトウェアの開発

植物組織切片の形状は、組織の部位にも依るが、一般に矩形からは外れた形状をしている。このため、従来のように矩形領域をラスタースキャンすると、大部分の測定点がバックグラウンドとなり、測定効率が著しく低下する。このため、植物組織切片の形状により、任意形状の測定範囲を指定し、その領域をラスタースキャンするための植物組織質量顕微鏡測定ソフトウェアを開発した。このソフトウェアでは、11mm x 11mm x 0.7mm の導電性コートを施したガラス板の上にサンプルを貼り付けたものを、市販のイメージスキャナーまたは実体顕微鏡により撮影した画像ファイルを用い、この画像ファイル上の位置マーカーと、質量顕微鏡の顕微鏡上で観察した位置マーカーとをマッチングさせ、画像ファイル上で質量顕微鏡測定を行う領域とラスタースキャンする測定スポット位置を設定する。そしてそれに合わせて質量顕微鏡内のサンプルステージを XYZ 方向に動かした上でサンプル上に紫外パルスレーザーを照射し、生成したイオンの質量分析を実施することを可能とした。

3) 植物組織の凍結切片作成法及び質量顕微鏡測定のための試料調製法の確立

シロイヌナズナの葉を試料に用いて、それを急速に氷包埋し、クライオミクロトームにより 10 ~ 20 マイクロメートル厚の切片を切り出し、氷温で真空凍結乾燥するためのプロトコルを確立した。植物組織の凍結切片を作成することは非常に難しいことが知られているが、一旦植物組織を氷に包埋したのち凍結切片作成用のカッティングメデイウムに包埋したのちにトリミングを行い、川本法に用いる特殊な接着剤を塗布したフィルムを貼り付けた後に薄切する。これにより薄切切片は崩壊することなくフィルム上に保持される。これを氷温を保ったまま真空引きして凍結乾燥させるためのプロトコルも確立した。

また、切片を導電性コートした板ガラス状に貼り付け、質量顕微鏡測定を行うために様々なマトリクスを噴霧またはコートするためのプロトコルを確立した。低分子有機酸を効率的に検出するために 9-aminoacridin を、そのほかの低分子を検出するために DHBA をマトリクス物質として用い、その適用法を研究した。その結果、当該研究において開発した MALDI-FTMS 質量顕微

鏡装置では、マトリクスを試料表面に蒸着する方が良いことが明らかになった。

凍結切片を作成せず、導電性コートをしたガラス板の上に川本法で用いる接着剤を薄く塗布し、芽生えや根や葉などの植物組織を直接貼り付けた後に真空凍結乾燥を行ったうえで、マトリクスを真空蒸着して質量顕微鏡測定を行うという、これまでは実現できなかった質量顕微鏡測定のプロトコルの確立にも成功した。

4) 質量顕微鏡データ解析ソフトウェアの開発

FTMS による超高分解能質量顕微鏡データは、一回の測定につき、数百ギガバイトもの巨大なファイルとなる。これをそのまま分析し、様々な分子イオンの空間分布を表示することは、これまでに入手可能な市販・フリーの解析ソフトウェアでは不可能であった。このため、独自に解析ソフトウェアを開発し、数百ギガバイトのプロファイルデータを直接解析することに成功した。既存のソフトウェアと同様に、巨大なプロファイルデータをプロセスして作成した小さなセントロイドデータの解析を行うことも可能であるが、既存のソフトウェアでは扱えなかった FTMS による超高分解能質量データを扱える。

このソフトウェア (LabMSI) では、質量顕微鏡による測定データ (imzML フォーマット) を読み込み、全測定ポイントに関する平均質量スペクトルを計算してそこからピークをピックアップして特異な分布を示すイオンを探索することができる。各ピークに対応するイオンの分布を画面上に表示するだけでなく、全ピークに対応するイオン分布画像を自動生成させることが可能である。それだけでなく、試料上の特定の箇所のみ平均質量スペクトルを計算し、全体平均質量スペクトルと比較することにより、特定の局在性を示すイオンを抽出しやすくすることに成功した。また、そのイオンの精密質量をファイル出力し、米国スクリプス研究所の METLIN サーバを検索することにより、精密質量情報から化合物同定を行いやすくした。

5) 他計画研究班および公募研究班との連携による植物組織の質量顕微鏡測定

複数の他計画研究班および公募研究班と有機的に連携し、シロイヌナズナ、ニチニチソウ、ヒメツリガネゴケをはじめとした様々な植物試料の超高分解能・高精度質量分析および質量顕微鏡測定を実施した。その結果得られた質量分析データおよび質量顕微鏡データの解析を行い、様々な環境変化に伴う植物組織内での代謝物質の分布変化を検出することに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

(雑誌論文)(計 6 件)

Takahashi K., Kozuka T., Anegawa A., Nagatani A. and Mimura T.: Development and application of a high resolution imaging mass spectroscope for the study of plant tissues, *Plant and Cell Physiology*, accepted (2015). [査読有]

Nagao T., Yukihiro D., Fujimura Y., Saito K., Takahashi K., Miura D. and Wariishi H. (2014) Power of Isotopic Fine Structure for Unambiguous Determination of Metabolite Elemental Compositions: in silico Evaluation and Metabolomic Application, *Analytica Chimica Acta*, 813:70-76[査読有]

高橋勝利, 質量顕微鏡の植物組織観察への適用, *News Letter of Perceptive Plants* 5, 11-14 (2013)[査読無]

Fukui K. and Takahashi K.: Infrared multiple photon dissociation Spectroscopy and Computational Studies of O-Glycosylated Peptides. *Anal. Chem.* 84-5, 2188-2194 (2012) [査読有]

Miura, D., Tsuji, Y., Takahashi, K., Wariishi, H., Saito, K.: A Strategy for the Determination of the Elemental Composition by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Based on Isotopic Peak Ratios. *Analytical Chemistry*, 82, 5887-5891. (2010) [査読有]

Yukihiro D., Miura D., Saito K., Takahashi K., Wariishi H.: MALDI-MS-Based High-Throughput Metabolite Analysis for Intracellular Metabolic Dynamics, *Analytical Chemistry*, 82, 4278-4282 (2010) [査読有]

(学会発表)(計 18 件)

Takahashi, K., Anegawa, A. and Kozuka, T.: "High Resolution MALDI/LDI FTICR Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues", The 2nd International Symposium on Plant environmental Sensing, Tokyo, 13th-15th of March (2015) [招待講演]

高橋勝利: 質量顕微鏡による植物組織内代謝物のマッピング, シンポジウム「植物の繁殖戦略を考える」, 名古屋, 11月4日 (2014) [招待講演]

Takahashi K.: MALDI/LDI-FTICR Mass Spectrometry Imaging for Plant Tissue Analysis to Distinguish Changes in Metabolite Distributions

under Different Stimulus Environments, OurConII, Antalya (Turkey), November 19th, 2014

Takahashi K.: MALDI/LDI-FTICR Mass Spectrometry Imaging for Plant Tissue Analysis to Distinguish Changes in Metabolite Distributions under Different Stimulus Environments, IMSC2014, Geneva (Swiss), August 24th-29th, 2014

Takahashi K.: MALDI/LDI-FTICR Mass Spectrometry Imaging for Plant Tissue Analysis to Distinguish Changes in Metabolite Distributions under Different Stimulus Environments, 62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, Baltimore (MD. USA), June 15th-19th, 2014

Takahashi K.: "MALDI/LDI-FTMS imaging of intact plant tissues", Desorption2014, Montreal, 14th-16th of April (2014) [招待講演]

高橋勝利: 植物を対象とした質量顕微鏡装置開発と植物の代謝物解析への応用, 第55回日本植物整理学会年会、富山大学 (2014.3.18-20) [招待講演]

Takahashi K.: "High Resolution MALDI-LDI FTICR Mass Spectrometry Imaging of Plant Tissues", InnMassSpec2013, Saint Petersburg, 14th-18th of July, 2013 [招待講演]

Takahashi K.: Direct Mass Spectrometry Imaging of Intact Tissues of Arabidopsis Thaliana, ICAR2013, Sydney (Australia) June 24th, 2013

高橋勝利: Imaging mass spectrometry for identifying and locating unknown molecular species in tissue slices, 第53回日本植物生理学会年会, 京都産業大学 (2012.3.16-18) [招待講演]

Takahashi K.: Imaging Mass Spectrometry of Plant Tissue Slices using FTICR-MS, Desorption2012, Marburg, Germany June 3rd-7th, 2012 [招待講演]

Takahashi K.: AISTimzML viewer developed for viewing Hi-res. and big FTICR MSI data, 1st imzML workshop Rauschholzhausen, Germany September 23rd - 27th, 2012 [招待講演]

Takahashi K., Miura D.: Imaging Mass Spectrometry of Plant Tissue Slices: Comparison of MALDI-TOF MSI and MALDI-FTICR MSI, IMSC2012, Kyoto September 17th, 2012.

Takahashi K.: MALDI-FTMS Imaging:

a powerful tool for imaging plant tissue sulices, OurCon2012, Orence(Espania) September 3rd, 2012.

Takahashi K., Miura D.: Imaging Mass Spectrometry of Arabidopsis Leaf Slices, ICAR2012, Wien (Austria) July 4th, 2012

高橋勝利: FT-MS を用いた植物代謝物のイメージング、第7回メタボロームシンポジウム、鶴岡市(山形県) 2012.10.12 [招待講演]

高橋勝利: 植物組織の質量イメージング分析、日本分析学会第61年会、金沢 2012.9.21

高橋勝利: Imaging Mass Spectrometry Technique for Identifying and Locating Unknown Molecular Species in Tissue Slices, 第52回日本植物生理学会年会, 仙台(2011.3.20-22) [招待講演]

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bio-image.org/LabMSI/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋勝利 (Katsutoshi Takahashi)
独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・主任研究員
研究者番号: 00271792