

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K12762  
研究課題名(和文) 単一細胞内質量イメージング実現へのチャレンジ

研究課題名(英文) Challenge towards single-cell MS imaging

## 研究代表者

高橋 勝利 (Takahashi, Katsutoshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：単一細胞内の質量イメージングを実現するために自作MALDI-FTICRMSの紫外パルスレーザー集光光学系を大幅に改良した。対物レンズの倍率とビームエキスパンダーの倍率及び真空チャンバーの設計も見直すことにより、従来10ミクロンにとどまっていた試料表面でのレーザースポットサイズを5ミクロン以下に縮小し、質量イメージングの空間分解能を格段に向上させることに成功した。  
また、異なるレーザーを同軸で異なるタイミングで照射することにより、これまで測定が困難であった非常に厚い非導電性試料に対する測定感度を大幅に向上させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The laser focus optics of current in-house built MALDI-FTICRMS was improved so as to decrease the laser focus spot size onto the specimen to less than 5 micron from 10 micron.

The laser optics was also modified to enable the on-axis irradiation of different wavelength laser light with precisely controlled different timing to burn through-hole on the non-conductive thick sample specimen to prevent charging-up on the sample specimen during MS imaging measurement.

研究分野：質量分析学

キーワード：質量イメージング 単一細胞分析 MALDI FTICR-MS

### 1. 研究開始当初の背景

レーザーを用いた質量イメージング技術では、導電性の基板上に貼り付けた生体試料薄切切片に小さく絞ったレーザー光を照射して、レーザースポットから生じるイオンの質量分析を行う。レーザーを照射する位置を生体試料全体または測定したい範囲でラスタースキャンしながら行うことで、生体試料中にどのような物質が含まれるのか、物質の種類を検出と物質の空間分布の検出を同時に行う画期的なイメージング技術であり、近年製薬企業を中心に盛んに分析が行われるようになってきた。

本研究代表者は、2014 年度に終了した文部科学省科学研究費・新学術領域研究「植物環境感覚」の計画研究班代表として、レーザーを用いた質量イメージング技術をこれまで適用が難しかった植物試料の測定に応用するため、試料調製法・質量イメージング装置開発・データ解析ソフトウェアの開発等を行ってきた。その結果、10 ミクロン以下の径に波長 355nm の紫外パルスレーザー光を集光し、10 ミクロンの空間分解能で植物組織中に局在する代謝物質の分布を標識無しで測定することに成功した。

### 2. 研究の目的

レーザーを用いて生体試料中に含まれる代謝物・糖類・脂質類・ポリペプチド類の質量イメージングを行い、生体組織の機能や病変部位の特定や薬物動態に関する情報を得ることが、一般的に行なわれるようになってきた。しかし、レーザーの集光スポットサイズや用いられるイオン化補助剤(マトリクス)の結晶サイズの問題などから、空間分解能は数ミクロンから数 10 ミクロンに限定されている。本研究課題ではこの問題を根本的に解決し、サブミクロンレベルの空間分解能で質量イメージングを行うための基盤技術を確立することを目的にチャレンジを行う。この技術の実現により、これまで不可能であった単一細胞内部における物質の分布状況を非標識でマップすることを可能にし、細胞診や細胞レベルでの薬物動態に関する知見を得ることが期待できる。

### 3. 研究の方法

波長 355nm の紫外パルスレーザーを石英ガラスウインドを介して真空中に配置した測定試料表面に集光するための集光光学系を一から見直すことにより、これまで 10 ミクロン程度のサイズであったレーザー集光スポットのサイズを半分の 5 ミクロン以下にすることにより、単一細胞をターゲットとした質量イメージングを可能とする。レーザーのスポットサイズの微小化に伴い、検出感度の低下が予想されるが、これを防ぐ目的で、特にこれまで植物組織切片をはじめとした厚手の測定試料のシグナル強度を減少させる要因である「チャージアップ現象」を抑え

るための新しい手法の開発を行う。

### 4. 研究成果

単一細胞内の質量イメージングを実現するために、紫外パルスレーザーの集光光学系の大幅な改良を行った。具体的には紫外レーザーを集光するための対物レンズの倍率の見直しと新しい対物レンズに光を入射するためのビームエキスパンダー倍率の見直しを行った。

従来、倍率 3 倍の UV 対物レンズを使用していたがこれを倍率 5 倍の UV 対物レンズに置き換えた。また、対物レンズに入射するレーザービーム径を対物レンズの瞳径ギリギリにまで拡大し、スポット径を設計限界に近づけるため、ビームエキスパンダーの倍率を 10 倍とし、再設計したビームエキスパンダーを対物レンズとレーザーとの間に配置した。

これにより、集光焦点におけるレーザースポット径を従来の 10 ミクロンから 5 ミクロンに改善することに成功した(図 1)。レー

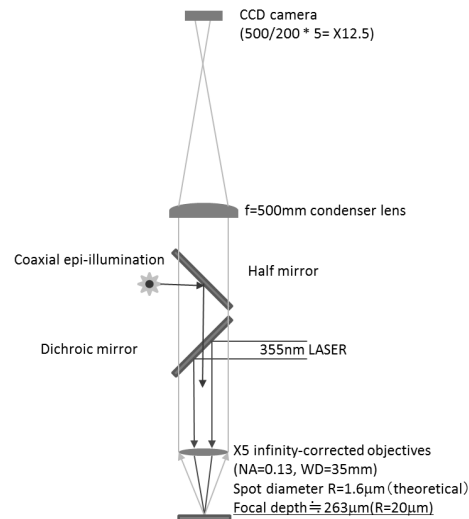


図 1 : 5 ミクロン以下のレーザースポットサイズを実現するレーザー集光光学系の設計

ザースポットサイズを 2 分の 1 に縮小したため、試料のイオン化に最低限必要なレーザー強度を 4 分の 1 に低減できることを確認した。この分、今後の研究において微小アパチャーを介して試料表面にレーザー光を照射する際に見込まれるレーザー強度低下を補償するに十分なレーザー強度を確保することに成功した。

レーザースポットサイズを微小化した後にシロイヌナズナの葉の切片を作成して、DHBA を表面に蒸着した試料の質量イメージングを実施した。その結果、空間分解能 10 ミクロン設定で行ったイメージング結果に関して、スポット径 10 ミクロンの場合と比較してスポット径 5 ミクロンで行ったイメージングの方が空間解像能が高いことを確認した。しかしその一方で、スポット径を小

さくした影響でシグナル強度が減少していることも観察された。

紫外パルスレーザーの集光光学系を大幅に改良して、従来倍率3倍であった対物レンズを倍率5倍にするとともにビームエキスパンダーの倍率を10倍とすることにより、レーザースポット径を従来の10ミクロンから5ミクロンに改善することに成功したが、その反面、レーザー照射にともないイオン化に供される試料の量がレーザースポット径の2乗に反比例して減少するため、これを補償するために検出感度を向上させるための方策を取った。

厚みを持つ非導電性植物組織の質量イメージング分析において、致命的な分析感度低下の原因となるチャージアップを防止する目的で、アブレーション能力の高い波長266nmの(Nd:YAG4倍波)パルスレーザーを同軸照射し、物質のイオン化とアブレーションによる厚みを持つ非導電性組織への貫通孔形成によるチャージアップ防止により、植物組織の単一細胞質量イメージングに向けての基礎技術の開発に成功した。

波長266nmの強力なパルスレーザー光を試料や生成した分子イオンに照射すると、その高い光子エネルギーに起因して断片化イオンを生成することが明らかになった。これをぼうしすつために、イオン化用の355nmパルスレーザーと266nmパルスレーザーの照射タイミングをマイクロ秒オーダーで精密に制御する戸の工夫を行い、断片化イオンの精製を抑制したうえで、厚い非導電性試料によるチャージアップを効果的に抑え、分析感度を大幅に向上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)

1) K.Takahashi, T.Kozuka, A.Anegawa, A.Nagatan, T.Mimura, "Development and application of a high resolution imaging mass spectroscope for the study of plant tissues, PLANT AND CELL PHYSIOLOGY 56 (2015) p.p. 1329-1338

2) K.Yamamoto, K.Takahashi, H.Mizuno, A.Anegawa, K.Ishizaki, H.Fukaki, M.Ohnishi, M.Yamazaki, T.Masujima, T.Mimura, "Cell-specific localization of alkaloids in Catharantus roseus stem tissue measured with Imaging MS and Single cell MS," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113 (2016) p.p. 3891-3896

3) J.Nakamura, T.Morikawa-Ichinose, Y.Fujimura, E.Hayakawa, K.Takahashi, T.Ishii,

D.Miura, H.Wariishi, "Spatially resolved metabolic distribution for unraveling the physiological change and responses in tomato fruit using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI)," Bioanalytical chemistry 409 (2017) p.p. 1697-1706

4) J.Ide, M.Ohashi, K.Takahashi, Y.Sugiyama, S.Piirainen, P.Kortelainen, N.Fujitake, K.Yamase, N.Ohte, M.Moritani, M.Hara, L.Finer, "Spatial variations in the molecular diversity of dissolved organic matter in water moving through a boreal forest in eastern Finland," Scientific Reports (2017) 10.1038/srep42102.

[雑誌論文](計 4件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
高橋 勝利 (TAKAHASHI, Katsutoshi)  
産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員  
研究者番号: 00271792

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )