SHIMADZU
Excellence in Science

Application Note

No. 59

植物

質量分析イメージングを用いた ビオラ花弁におけるフラボノイド類の可視化

菅原孝太郎*1、山垣 亮*1、緒方是嗣*2、山本卓志*3

Plants

要旨

生体内の化合物の局在を可視化する質量分析イメージング（MSI）の技術に注目が集まっています。本手法によりラベルフリーで複数の物質の局在を同一切片から解析することが可能です。また、切片に存在する化合物の量が微量であっても局所に集積していれば発見できる可能性があります。そのため、局在情報を指標として効率的に生体試料から機能性物質を探索することで、大きなブレークスルーをもたらすことが期待されています。

イメージング質量顕微鏡 iMScope *TRIO*™は顕微鏡観察によって得られる光学画像から正確にレーザ照射位置を決定できることに加え、イオントラップにより花弁のような微小なサンプルの凹凸の影響を受けにくいという特長を持っています。また、イオントラップは MS/MS 分析の際にも正確なプリカーサイオンの選択を可能にします。

ここでは、ビオラの花弁をサンプルとして、植物色素として知られるアントシアニンと共局在するフラボノイド類の MSI を実施した例を紹介します。

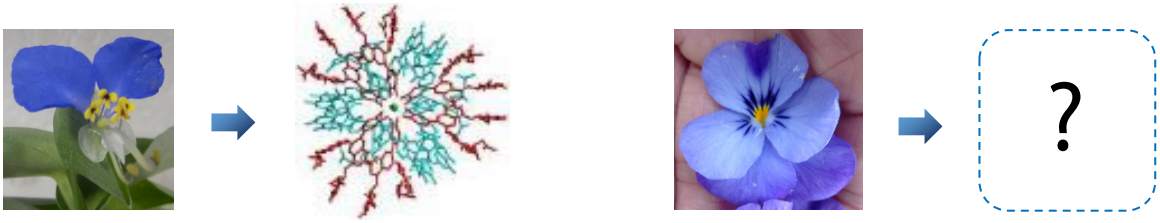
1. はじめに

花の色は花弁の細胞に色素が蓄積することにより発現します。色素の種類や量、さらには色素成分のおかれている環境に依存して大きく色調が変化します。アントシアニンはバラなどに含まれる植物色素として知られており、酸性下で赤色、アルカリ性下で青色を示しますが、多くの青色花で花弁の細胞内 pH は弱酸性であることが知られています。つまり、青色花の細胞内では特別な仕組みが存在し、アントシアニンの青色発色が保持されていると考えられます。このような背景のもとアントシアニンが関与する花弁の青色化は古くから研究の対象とされてきました。

＊1 公益財団法人 サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所 構造生命科学研究部
＊2 株式会社 島津製作所 分析計測事業部 MS ビジネスユニット
＊3 株式会社 島津製作所 分析計測事業部 GADC

近年、生化学的手法や機器分析技術の発展に伴って様々なアプローチで花弁の青色発色メカニズムが解明されるようになりました。たとえばツユクサの場合（図 1 左）、花弁のなかでアントシアニンと金属が錯体を形成するために青色になることがわかってきました [1)]。

一方で、今回の研究対象であるビオラ（図 1 右、スミレの一種）が青色になる理由については詳細がわかっていなかったため、ビオラの青色化メカニズムの研究を始めました。研究が進むに連れ、ビオラではアントシアニンとフラボノイドが共存することで青色に発色することが分かってきました。ところが、この花には模様があるために花弁全体を抽出し内容物を分析すると青色模様と物質の紐づけを失います。そこで、花弁上でアントシアニンと共局在を示すフラボノイドを探索するためにイメージング質量顕微鏡 iMScope *TRIO*（図 2）を用いました。



ツユクサ　　アントシアニン-金属錯体の形成　　ビオラ（三色スミレの一種）

図 1　花弁の青色化メカニズムの例

2. 実験

2-1. フラボノイドの MSI

図 3 のように、ビオラの花弁を導電性両面テープを介して ITO スライドガラスに固定し、専用のサンプルホルダーに装着し、分析サンプルとしました。装置内蔵の光学顕微鏡で観察し、分析ソフトウェア（Imaging MS Solution™）で光学画像を取得しました。サンプルホルダーを一度取り出し、メタノール/水=70/30（v/v）中に 50 mg/mL となるように調製した 2,5-dihydroxybenzoic acid（DHB）を模型用のエアブラシを用いて花弁一枚あたり 500 µL 噴霧しました。

Imaging MS Solution には位置合わせ機能が備わっているため、試料の高さ調整や位置合わせのための目印の設定などが不要で、サンプルをセットするだけでそのまま測定を開始することができます。Imaging MS Solution を使って取得した画像上で分析領域を指定し、表 1 に示した分析条件を用いて大気圧下で MSI を実施しました。

光学画像を基に測定範囲を任意に設定でき、かつ、1 ピクセル当たり 170 ミリ秒で分析できるので、本サンプル（4355 ピクセル）を 150 µm の空間分解能で分析する場合であれば分析時間はわずか約 12 分です。今回は、ネガティブイオンモードの測定にてクエルセチンやミリセチンの配糖体、アントシアニン色素である violanin を検出することを目的としました。

図 2　分析に用いた iMScope *TRIO*™

図 3　専用ホルダに装着したサンプル（ITO スライドガラス）

表 1　MSI の分析条件

測定ピッチ（空間分解能）	：150 µm
ピクセル数	：4355（65×67）ピクセル
イオン種	：ネガティブイオン
測定質量範囲	：*m/z*500 – 1000
測定時間	：約 12 分

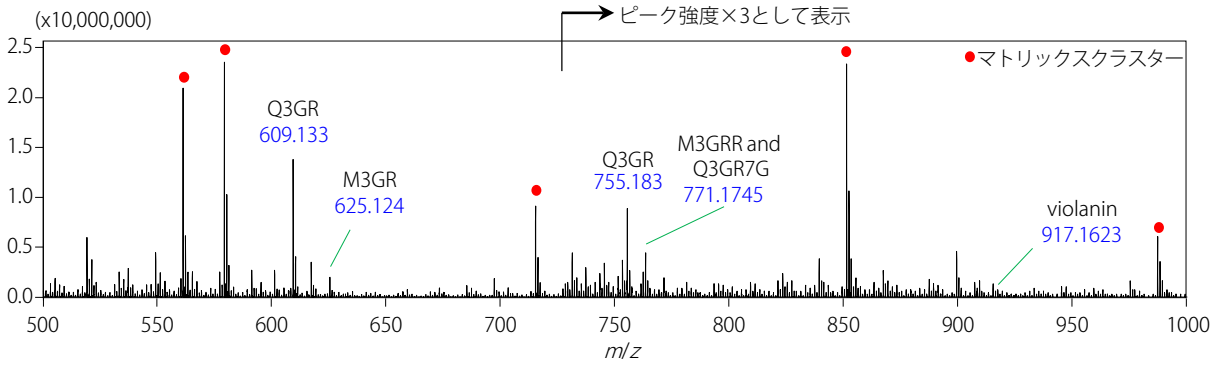


図 4　分析領域の積算平均マススペクトル

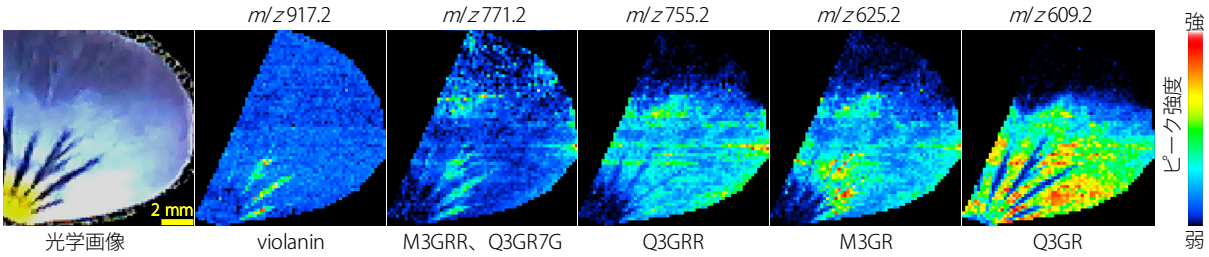


図 5　ビオラ花弁に含まれるフラボノイド類の MS イメージ（bar：2 mm）

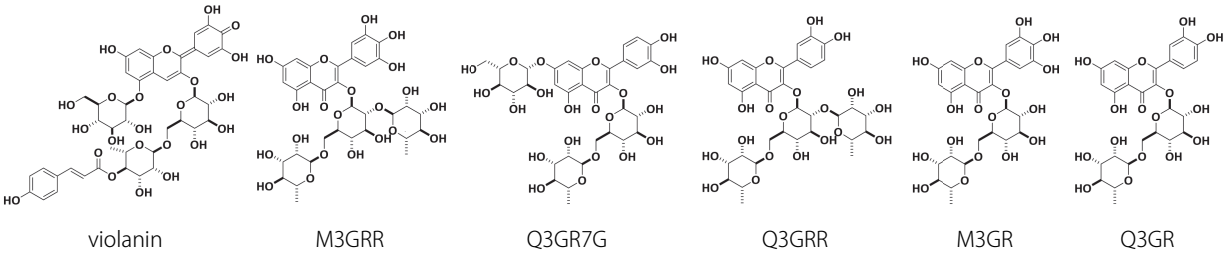


図 6　ビオラに含まれるフラボノイド類の構造 [2)]
Q：quercetin、M：myricetin、G：*O*-*β*-d-glucopyranose、R：*O*-*α*-l-rhamnopyranose、3：3-*O*-glycoside、7：7-*O*-glycoside

図 4 に分析領域の積算平均マススペクトルを示しました。ビオラに含まれる主要なフラボノイドに対応する *m/z* 917.2、771.2、755.2、625.2、609.2 のピークについて図 5 に MS イメージを示しました。図 4 および図 5 で用いたフラボノイドの略称と構造については図 6 に示しました。

図 5 に示した MS イメージのとおり、花弁の色調に対応して含まれるフラボノイドの種類が異なることがわかりました。nectar guide と呼ばれる花弁のつけ根付近のひげ状で青色の濃い部分（図 5 光学画像）ではアントシアニン色素である violanin が検出されました。violanin の存在する部位に *m/z* 771.2 に対応する物質と M3GR が共局在していると考えられます。他方、Q3GR や Q3GRR といったクエルセチン配糖体は花弁の色調の薄い部位に多く分布していました。このように、MSI は花弁に含まれる物質と模様を紐付けるために非常に効果的に機能しました。

2-2. MS² および MS³ による分子の確認

マトリックスクラスターを除いたピークのうち、最も強度の高かった *m/z* 609.2 が図 6 に示す Q3GR（Quercetin-3-(6″-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl-*β*-D-glucopyranoside)）であることを確認するため、*m/z* 609.2 の MS イメージから Q3GR 含有量が多いと予想される部分について、MS² および MS³ の測定を行いました。プリカーサイオンとして MS² では *m/z* 609.2 を、MS³ では *m/z* 301.0 を選択しました。対応する MS² のマススペクトルおよび MS³ のマススペクトルをそれぞれ図 7、および図 8 に示します。観測されたフラグメントピークを図 9 に示すように帰属することで、*m/z* 609.2 が Q3GR に対応することを確認しました。

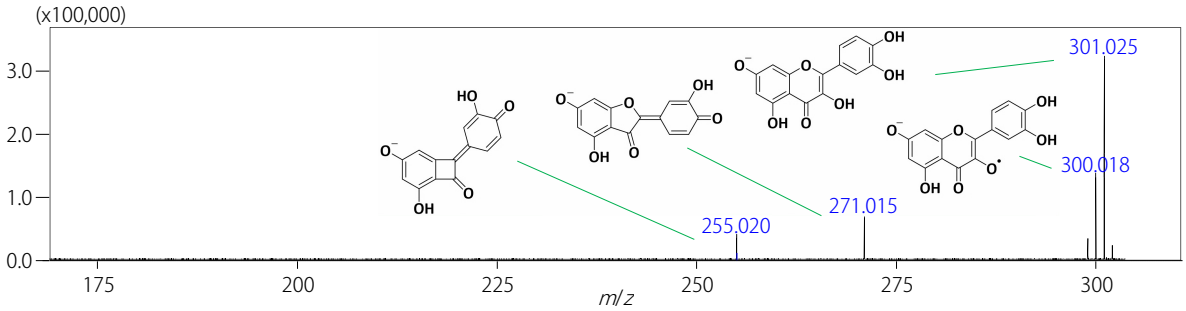


図 7　*m/z* 609.2 に対する MS² のマススペクトル

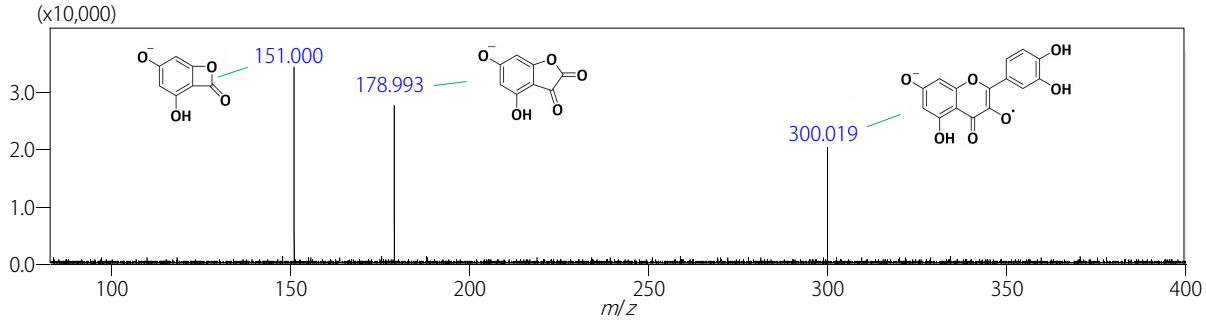


図 8　*m/z* 301.0 に対する MS³ のマススペクトル

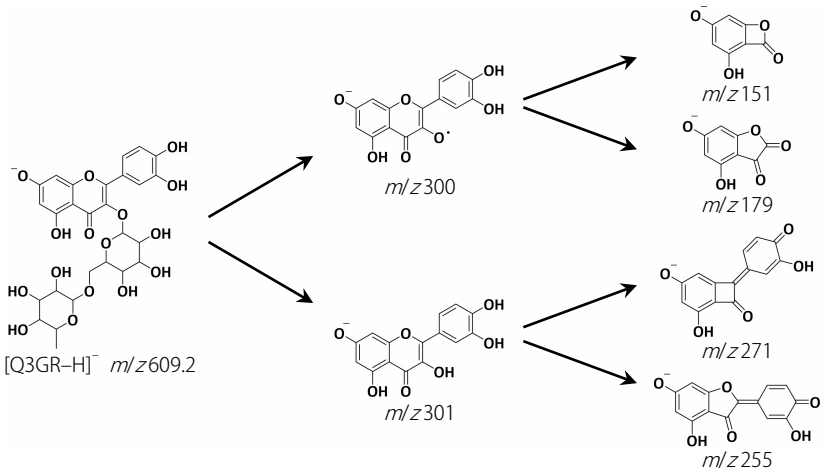


図 9　Q3GR から生じるプロダクトイオンの推定構造 [3)]

続いて nectar guide（図 5 光学画像）部分の *m/z* 771.2 をプリカーサーイオンとする MS^2 測定を行ったところ、図 10 に示したように少なくとも二種類の化合物に由来するプロダクトイオンが *m/z* 301 と *m/z* 316 に観測されたため、これらに対しても分子構造の確認を行いました。

図 10 の *m/z* 609 と *m/z* 301 のピークは図 11 に示したようにそれぞれ$[Q3GR–H]^-$、および$[Q3GR–H]^-$から糖が脱離した$[Quercetin–H]^-$に帰属できます。これらの情報をもとに *m/z* 771.2 に対応する分子の一つは Q3GR7G であると考えました。

一方で、*m/z* 316 のピークは *m/z* 771.2 からひとつのヘキソースとふたつのデオキシヘキソースが脱離して生じた$[myricetin–H]^-$であり、同時に観測された *m/z* 287、271 の両ピークは$[myricetin–H]^-$がさらに分解して生じたイオンであると考えました。実際に *m/z* 316.0 をプリカーサーイオンとする MS^3 測定を行うことでこれらのピークが観測されました（図 12、13）。以上の結果から、ビオラ花弁の nectar guide の *m/z* 771.2 に対応するフラボノイドとして Q3GR7G と M3GRR の 2 種類が存在することがわかりました。

ここで、図 10 における Q3GR7G と M3GRR から生じるプロダクトイオンである *m/z* 301 と *m/z* 316 の強度比に着目すると、M3GRR に由来するピークは Q3GR7G よりも高いことがわかります。これらの化合物のイオン化効率が等しいと仮定すると花弁の青色部分には M3GRR の含有量が多いと考えられます。つまり、花弁の青色部分にはアントシアニン色素である violanin と M3GRR が共局在していると考えられます。したがって、M3GRR は violanin と共存することで、花弁の青色発色を補助していることが示唆されました。

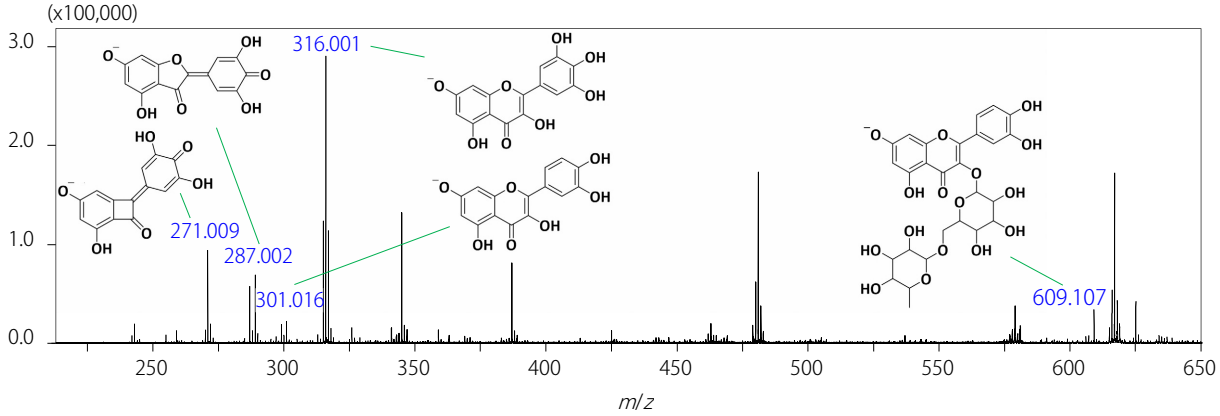


図 10　*m/z* 771.2 に対する MS^2 のマススペクトル

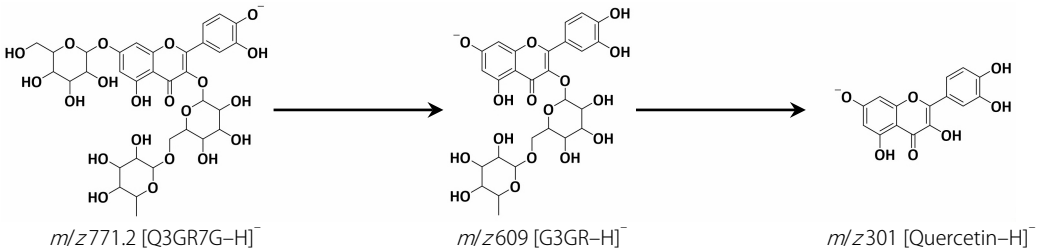


図 11　Q3GR7G に対する MS^2 測定で生じるプロダクトイオンの推定構造

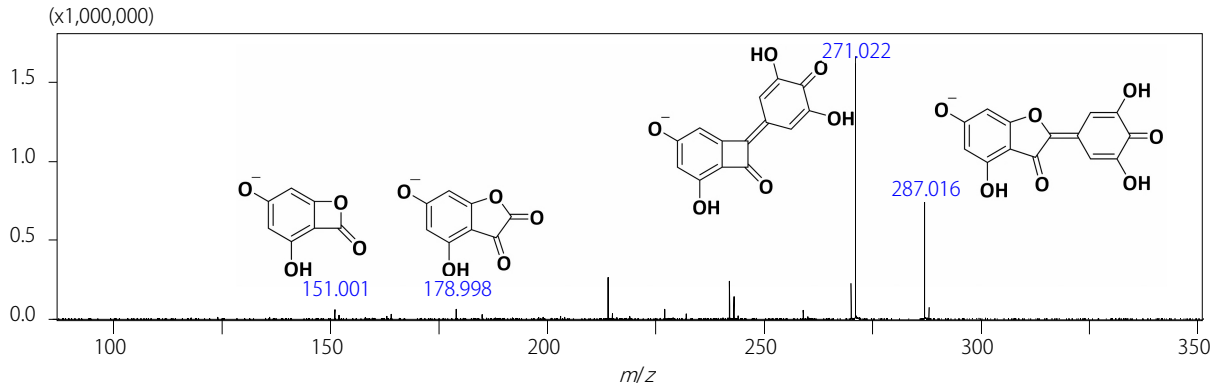


図 12　*m/z* 316.0 に対する MS³ のマススペクトル

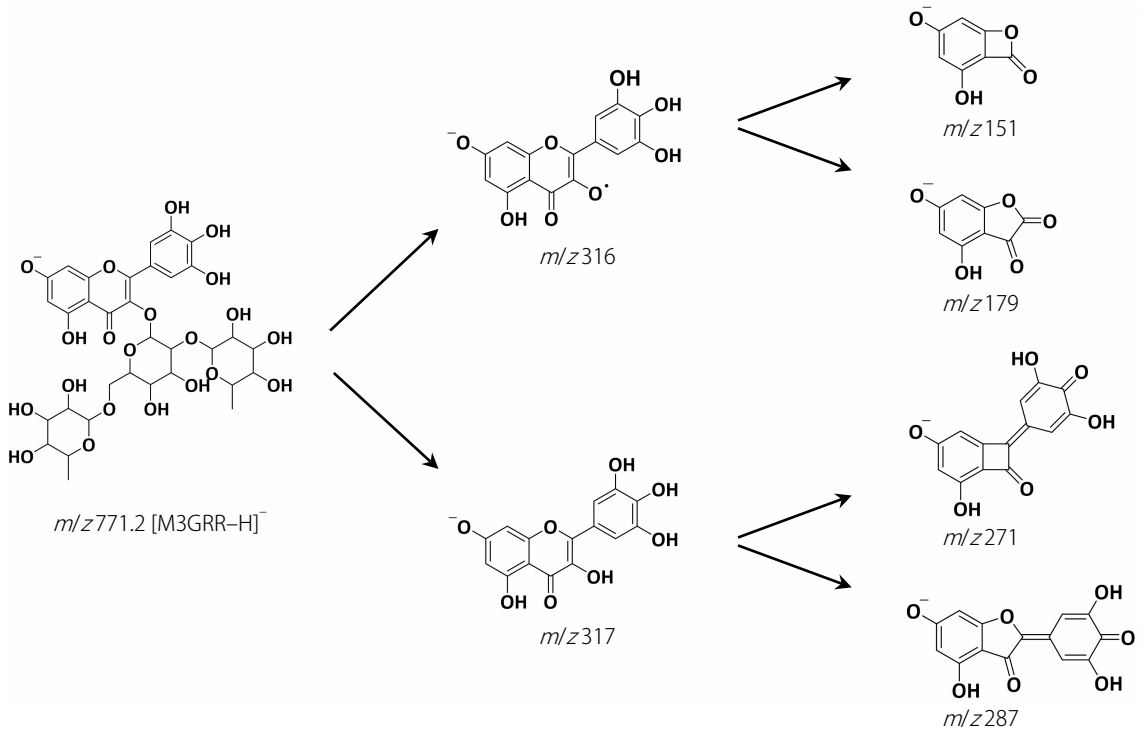


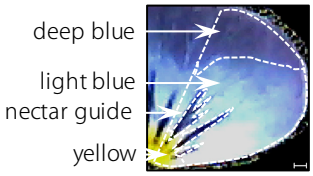
図 13　M3GRR から生じるプロダクトイオンの推定構造

2-3. MSI と LCMS による定量を組み合わせた定量的 MSI 実験

MSI から得られる化合物の分布図は注目する物質の MS ピーク強度で示されます。しかしながら、生体物質の機能研究においては注目する物質が、“どの程度の量で特定の領域に含まれるか”、といった定量的情報が重要となります。近年、このギャップを埋めるために MS ピーク強度を物質量で示すための方法論が盛んに研究されています。この項では MSI と LC-MS 定量実験を組み合わせる手法を用いて [4]、ビオラに多く含まれている Q3GR が花弁上で色調の異なる領域に分布する様子を定量的に算出した例を示します。

1. LC-MS定量
組織内の化合物重量（W_t）

2. MSI
全測定領域のイオン量（I_t）
注目領域のイオン強度（I_i）



3. 注目領域の物質量（W_i）を下の関係式から計算

$$W_i = \frac{I_i}{I_t} W_t$$

図 14　定量的 MSI の模式図 [2)]

図 14 に今回行った定量的 MSI の模式図を示しました。試料として開花後 2 週間の花弁を 2 セット準備します。一方を定量 LC-MS 実験に用いて花弁半分に含まれるフラボノイドの物質量を求めます（図 14-1 W_t）。次に、もう一方の花弁サンプルを用いて MSI 実験を行います。このとき、ビオラ花弁の色調に従って deep blue、light blue、nectar guide、yellow という 4 つの注目領域（region of interest：ROI）を定義します。MSI データからは、ROI ごとのフラボノイドのイオン量と測定領域全体のイオン量（図 14-2 I_i および I_t）を求めます。注目領域内の物質量（W_i）は図 14-3 の関係式に示したように、注目する領域のイオン量に対して定量 LC-MS で求めたフラボノイドの総量を比例配分することで注目する領域に含まれているフラボノイドの物質量を求めます。

今回、花弁半分に含まれる Q3GR の定量 LC-MS 実験は、三連四重極型質量分析計を備えた LCMS™-8030plus を用いて表 2 および表 3 に示した条件で行いました。

MSI 測定を行った花弁と定義した 4 つの ROI を図 15 に示しました。各 ROI に含まれる Q3GR 量を白い棒グラフで示しました。図 5 の MS イメージから Q3GR は花弁の light blue の部位に多く含まれていることがわかりますが、これに定量的な解析を加えた結果、1 枚の花弁の light blue に 163 nmol、すなわち 100 µg の Q3GR が含まれていることがわかりました。図 5 からは定性的に light blue に比べて nectar guide には Q3GR は少ないという情報が得られましたが、定量化を行うことで nectar guide にも 16 nmol の Q3GR が含まれていることがわかりました。

さらに、このようにして得た定量的 MSI の結果に対して信頼性を評価しようと考えました。そこで、図 16 に示すように生花弁を MSI 実験で定義した ROI と同様に切り出して定量 LC-MS 分析を行い、各 ROI あたりの Q3GR 量を算出しました（図 15 黒い棒グラフ）。定量的 MSI で得た定量値は、生組織を切り出した LC-MS 定量値と良い相関を示していることがわかりました。これは、花弁の個体差を考慮すると良好な結果であると考えられます。

表 2　LCMS-8030plus の分析条件

カラム	: Cosmosil® 5C18-AR-II 2.0×150 mm
移動相 A	: 0.1 % Formic acid-Water
移動相 B	: 0.1 % Formic acid-Acetonitrile
流速	: 0.15 mL/min
カラム温度	: 40 ℃
注入量	: 3 µL

表 3　グラジエントプログラム

時間 [min.]	B conc [%]
0	10
15	25
20	80
20.1	10
27	Stop

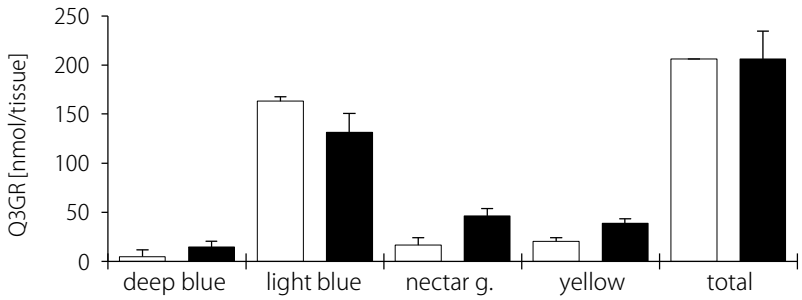


図 15　各 ROI に含まれる Q3GR の物質量。白い棒グラフは定量的 MSI から得た物質量（mean±SD、N=3）、黒い棒グラフは生の花弁を ROI に従って切り出して定量 LC-MS 分析を行って得た物質量（mean±SD、N=5）[2)]

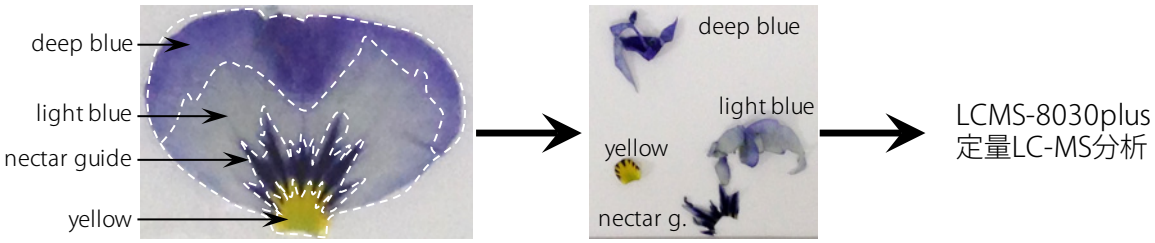


図 16　生花弁を MSI で定義した ROI と同様に切り分けて色調の異なる組織を調製した様子

3. まとめ

MSI により、ビオラ花弁に含まれるアントシアニンである violanin が青色の濃い nectar guide に分布することがわかりました。また、花弁の色調によって含まれるフラボノール類、すなわち Q3GR、M3GR、Q3GRR の分布が異なることも確認できました。

MS^2、MS^3 を実施することで、*m/z* 609.2 のピークをクエルセチン配糖体 Q3GR に帰属できました。さらに、*m/z* 771.2 のピークはクエルセチン配糖体 Q3GR7G とミリセチン配糖体 M3GRR に由来することがわかりました。

さらに、MSI と LCMS 定量を組み合わせることで、MSI よる分布の情報を定量的に解釈できることを Q3GR を例として示しました。本手法を応用することで、ビオラ花弁上でアントシアニンと共局在するフラボノイドを定量的に分析することができると考えられます。

質量顕微鏡 iMScope *TRIO* のもつイオントラップ MS^n 構造解析技術と定量的な MSI 技術を組み合わせることで、ビオラの青色化に影響を与える未知の因子の発見に繋がると期待されます。

<参考文献>
1) Yoshida K, Mori M, Kondo T. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 884–915.
2) Sugahara K, Kitao K, Watanabe T, Yamagaki T. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 896–902.
3) Davis B D, Brodbelt J S. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1045–1052.
4) Hattori K, Kajimura M, Hishiki T, Nakanishi T, Kubo A, Nagahata Y, Ohmura M, Yachie-Kinoshita A, Matsuura T, Morikawa T, Nakamura T, Setou M, Suematsu M. *Antioxid. Redox Signaling* **2010**, *13*, 1157–1167.

iMScope *TRIO*、Imaging MS Solution、および LCMS は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
Cosmosil は、ナカライテスク株式会社の登録商標です。
その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。
なお、本文中には TM、®マークを明記していない場合があります。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部　http://www.an.shimadzu.co.jp/

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。
掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2020 年 7 月

© Shimadzu Corporation, 2020

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

iMScope™ QT

関連分野

ライフサイエンス

価格お問い合わせ

製品お問い合わせ

技術お問い合わせ

その他お問い合わせ