

質量分析イメージングを用いた 酵素組織化学

新聞 秀一^{1, 2, 3}、竹尾 映美¹、中川 薫、山本 卓志、福崎 英一郎^{1, 2, 3}



■ 要旨

酵素反応を検出するには、一般的に基質と酵素を反応させた後、得られた反応生成物をさらに呈色反応させ、吸光度などを測定することが多いです。既存の手法では、基質と酵素の一次反応および呈色のための二次反応が必要となります。新たな手法では、呈色反応に代わり質量分析計で反応生成物を検出します。さらにこれを組織表面上で行うことにより、酵素活性の可視化が可能となります。本稿では、高い解像度で質量分析イメージングが可能な*iMScope*TMを新しい酵素組織化学に適用した事例についてご紹介します。

1. はじめに

組織内での酵素分布を知る方法として、免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC) が一般的に用いられています。IHCでは、酵素タンパク質としての存在は可視化できません。IHCでは得られない、酵素活性分布を可視化する手法として酵素組織化学が古くから知られています^{1), 2)}。酵素組織化学では、試料切片表面上で酵素活性に基づく化学反応を起こさせる

ため、酵素活性の有無やその強弱のイメージを得ることが可能です。組織切片上に基質を供給し、内在性の酵素による触媒反応により産生された物質に対し、呈色反応を行うことで可視化するのが一般的です。この手法では、可視化のための呈色反応のステップを化合物毎に構築する必要があります。その結果、基質供給のみで簡単に酵素活性分布を得ることができないことが多いです。本研究では、従来の酵素組織化学における呈色反応の代わりに質量分析イメージング (mass spectrometry imaging: MSI) 技術を活用し、酵素反応の生成物を直接検出する方法を検討し、マウス脳切片ならびにショウジョウバエ全身切片に適用しました³⁾。

2. 実験

本研究では野生型マウス脳切片と野生型ショウジョウバエ全身切片を用いて、アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholine esterase: AChE) の活性分布の可視化を試みました。AChEは、アセチルコリンを基質としてコリンと酢酸に分解する酵素です。したがって、アセチルコリンを試料表面に供給し、分解産物であるコリンを検出しました。内在性のコリンと区別するために、基質として重水素ラベル化されたアセチルコリン-d9を使用し、コリン-d9を検出しました (図1)。なお基質の供給はエアブラシを用いたマニキュアスプレーで行いました。本研究では、反応時間の検討及び半定量的な解析を行うための手法も検討しました。

¹大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻

²大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所

³大阪大学先導的学際研究機構

マトリックスは α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸（ α -CHCA、シグマアルドリッチ）を用い、その供給にはマトリックス蒸着装置iMLayer™（図2）による蒸着と α -CHCA溶液のスプレー噴霧を組み合わせた二段階蒸着法（特許：6153139）を用いました⁴。

MSI測定はイメージング質量顕微鏡iMScope（図3）を用い、データ解析にはMSイメージングデータ解析ソフトウェアのIMAGEREVEAL™ MS（図4）を用いました。なお、iMScopeでのデータ取得の際には表1の分析パラメータを設定しました。

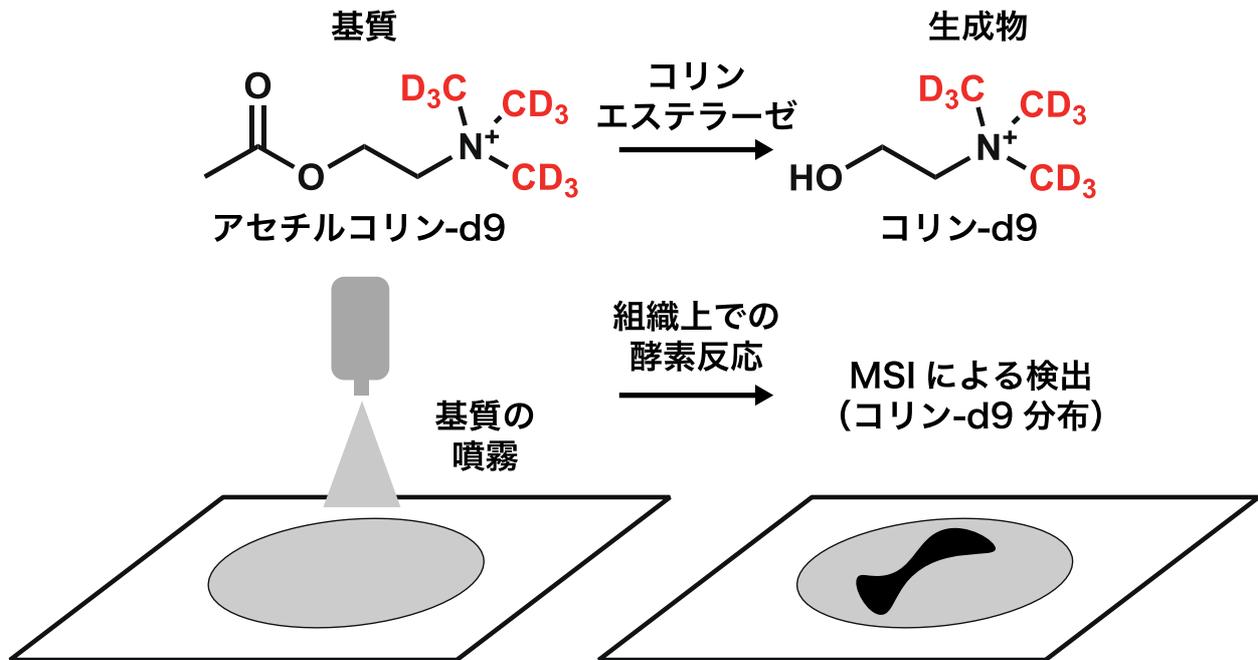


図1 MSIを用いた酵素組織化学のコンセプト
ラベル化された基質を試料表面に供給し、酵素反応後の産生産物を質量分析で検出し可視化します。



図2 マトリックス蒸着装置iMLayer™



図3 イメージング質量顕微鏡 iMScope™ QT

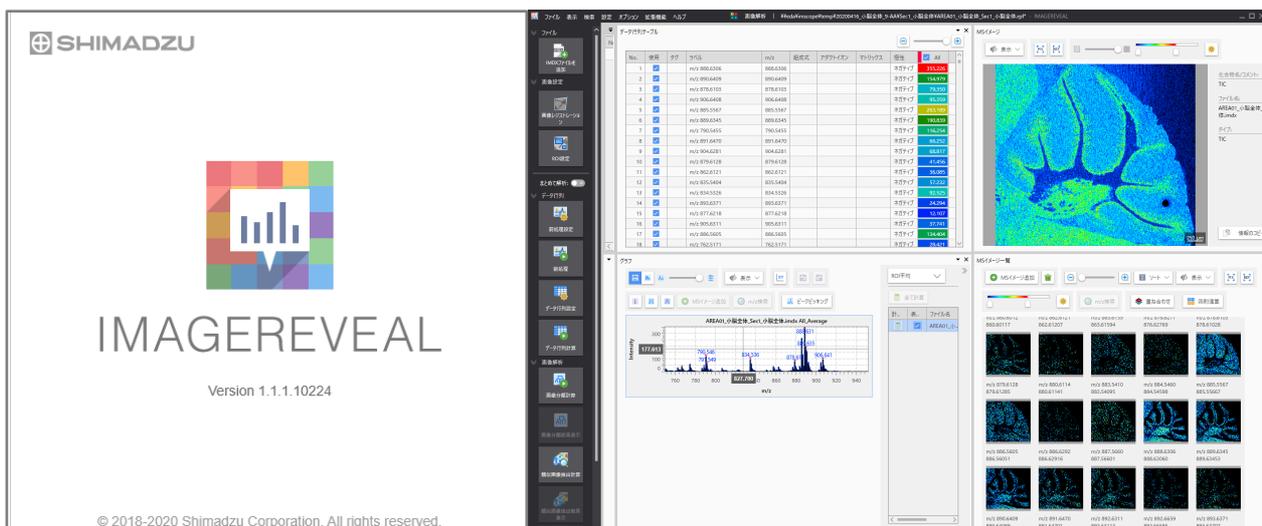


図4 MSイメージングデータ解析ソフトウェアIMAGEREVEAL™ MS

表1 MS分析パラメータ

MS分析条件	
イオン種	正イオンモード
<i>m/z</i> 測定範囲	100-160
積算回数	1回
サンプル電圧	3.50 kV
検出器電圧	2.10 kV
MS段数	1
レーザー照射条件	
照射回数	100回
繰り返し周波数	1000 Hz
照射径設定値	0 (約5 μm) or 1 (約10 μm)
レーザー強度	20 or 45

$$\text{Conversion rate (\%)} = 100 \times \frac{I_{\text{choline-d9}}}{I_{\text{ACh-d9}} + I_{\text{choline-d9}}} \quad \dots \textcircled{1}$$

$$\text{Relative ChE activity (au)} = 100 \times \frac{\varepsilon I_{\text{choline-d9}}}{I_{\text{ACh-d9}} + \varepsilon I_{\text{choline-d9}}} \quad \dots \textcircled{2}$$

I : Intensity
 $\varepsilon = 3$

図5 基質の変換率の演算式と酵素活性の演算式

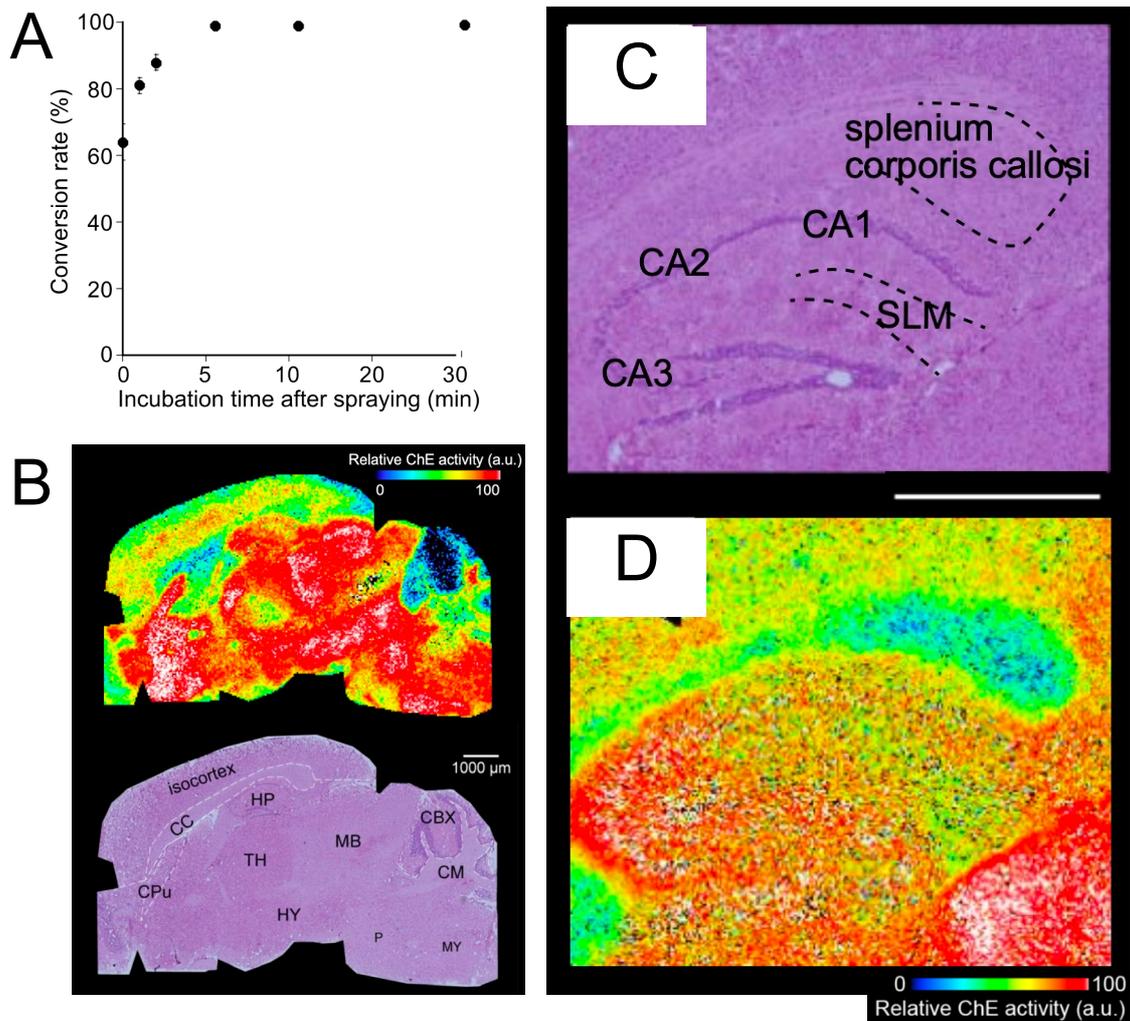


図6 (A) 組織上における酵素反応時間に対する、基質変換割合
スプレー噴霧後を0分としてプロットを行ったところ、5分以内で全てのアセチルコリン-d9 (基質)
がコリン-d9に変換されることが確認できた。
(B) マウス脳組織におけるコリンエステラーゼ活性分布
HE染色結果と比較すると線条体 (CPu)、海馬 (HP)、視床下部 (TH) では活性が高く、
脳梁 (CC) および小脳皮質 (CBX) で活性が低い傾向が分かった。
(C, D) マウス海馬におけるHE染色結果と高解像度活性イメージング結果
CA3領域で高い酵素活性を示していることがわかる。スケールバー: 1 mm

3. 結果・考察

図5の①の演算式に基づいて反応時間における基質変換率を計算し、これらをグラフにプロットしたところ、アセチルコリン-d9は試料表面に噴霧後速やかにコリン-d9に分解することが確認され、反応時間5分でプラトーに達し、アセチルコリン-d9が枯渇することが確認されました (図6A)。したがって、酵素活性を測定するには、5分以内の反応で十分であることを確認しました。半定量的な解析を行うにあたり、組織の部位によるマトリクス効果は問題となります。このことから、アセチルコリン-d9とコリン-d9のイオン化効率を考慮した規格化方法として、図5の②の算出式を考案しました。

MSイメージングデータ解析ソフトウェアIMAGEREVEAL MSを用いて、 m/z 155.17と m/z 113.16のピークからアセチルコリン-d9およびコリン-d9のMSイメージを作成し、IMAGEREVEAL MSの四則演算機能によりこれらのMSイメージを算出式②に挿入し、コリンエステラーゼ活性の強度分布として図6Bと図6Dの酵素活性イメージを得ました。その結果、AChE活性は線条体 (CPu)、海馬 (HP) ならびに視床下部 (TH) で高くなり、脳梁 (CC) 並びに小脳皮質 (CBX) では低い傾向を示すことが分かりました (図6B)。

この結果を、既存の酵素組織化学の結果と比べたところ、非常に良い一致が得られたため本手法の概念実証を確認することができました。また、iMScopeでの高空間分解能イメージングという特長を生かし、脳の海馬領域における酵素活性も可視化することができました (図6C、6D)。

哺乳類のコリンエステラーゼには、AChEとブチリルコリンエステラーゼ (BuChE) が存在します。そのため、それぞれのコリンエステラーゼに由来する活性分布の可視化を試みました。BuChEは、アセチルコリンを含め、様々なコリンエステルをコリンに変換するという特徴を持っています。BuChE活性を阻害するテトライソプロピルホスファミド (iso-OMPA) を基質であるアセチルコリンと共に供給してMSIを実施することで、AChE由来の活性分布を特異的に可視化しました。さらに、連続切片を用いてAChE活性を阻害するGalantamineを基質であるアセチルコリンと共に供給してMSIを実施し、BuChE由来の活性分布を特異的に可視化しました。その結果、阻害剤無しで検出された脳梁での活性が、iso-OMPAの存在下で大きく阻害されていることがわかり、脳梁でのChEの多くはBuChE由来であることが示唆されました (図7A)。

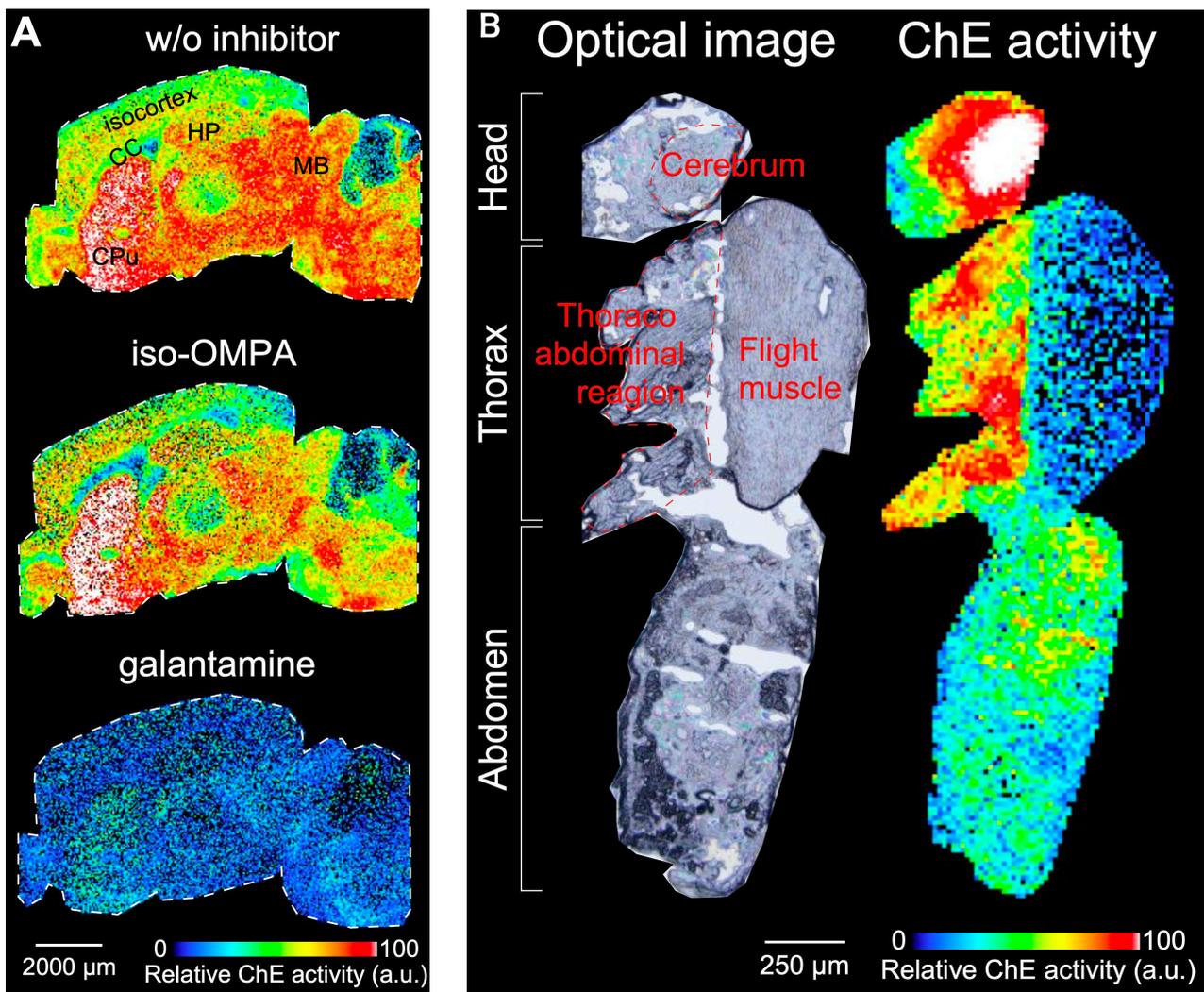


図7 マウス脳切片における阻害剤を用いた酵素活性可視化結果とショウジョウバエ全身切片におけるコリンエステラーゼ活性分布のMSI
 (A) 阻害剤を用いた酵素活性可視化結果
 iso-OMPAはブチリルコリンエステラーゼ活性を阻害するため、アセチルコリンエステラーゼの活性を特異的に検出していることになる。
 Galantamineはアセチルコリンエステラーゼ活性を阻害するため、ブチリルコリンエステラーゼ活性を特異的に検出していることになる。
 (B) ショウジョウバエにおけるコリンエステラーゼ活性分布
 異種動物であるショウジョウバエにおいても本法は適用可能であり、脳および腹部において酵素活性を認めた。
 特に腹部においては、可溶性酵素活性を検出していることになり、既存の手法では達成困難であった可視化が本法で達成できた。

5

このように、試料表面に安定同位体基質を供給するとともに、阻害剤などを供給することでより詳細な酵素組織化学法が確立できたと言えます。

また本手法を異種動物であるショウジョウバエにも適用しました。図7Bに示したように、ChE活性はショウジョウバエ体内中で偏在しており、頭部の大脳部において非常に高い活性、胸腹部において高い活性が確認できました。頭部において特に高い活性が見られるという結果は先行研究の報告とも一致しており⁹⁾、これは中枢神経系の頭部神経節におけるコリン作動性神経中のAChEによるものであると示唆されます。一方、腹部におけるChE活性は中枢神経系のAChEによるものではないと考えられます。AChEは神経系以外にも血リンパに存在することが報告されており⁹⁾、さらに、Zador et al. は神経細胞上に存在する膜結合型AChE以外に構造の異なる可溶性AChEが存在すると述べています⁷⁾。今回確認された腹部AChE活性の存在は、これらの報告と一致しており、本手法によって得られたChE活性局在の妥当性を示しています。

4. まとめ

本アプリケーションノートではMSIを用いた新しい酵素組織化学について紹介しました。MSIを用いることで呈色反応を介することなく、半定量的な酵素活性分布が得られることを示しました。また、本手法をショウジョウバエ切片に対しても適用し、膜結合型AChEと可溶性AChEのいずれの活性も可視化できることを示しました。特に可溶性酵素の活性分布は既存の手法では得ることができないため、本アプリケーションノートで紹介した手法の優位性を示すことができました。今後、他の様々な酵素（加水分解酵素だけでなく転移酵素など）に対して、手法を確立していきたいと考えています。

謝辞

本アプリケーションノート執筆にあたり、ショウジョウバエサンプルを提供いただきました、京都工芸繊維大学 応用生物学系 染色体工学分野 山口政光教授（研究時）に心より御礼申し上げます。

<参考文献>

- 1) Takamatsu, H. Histochemische Untersuchungen der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. Trans. Soc. Path. Japan 29, 429 (1939)
- 2) Gomori, G. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 42, 23 (1939)
- 3) Takeo E, Fukusaki E, Shimma S. A mass spectrometric enzyme histochemistry method developed for visualizing in situ cholinesterase activity in *Mus musculus* and *Drosophila melanogaster*. Anal. Chem. 92, 12379 (2020)
- 4) Shimma S, Takashima Y, Hashimoto J, Yonemori K, Tamura K, Hamada A. Alternative two-step matrix application method for imaging mass spectrometry to avoid tissue shrinkage and improve ionization efficiency. J Mass Spectrom. 48, 1285 (2013)
- 5) Toutant, J. P., Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. Prog Neurobiol. 32, 423 (1989)
- 6) Chadwick, L. E., Actions on Insects and Other Invertebrates. In Cholinesterases and Anticholinesterase Agents, Koelle, G. B., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1963; pp 741-798.
- 7) Zador, E., Tissue specific expression of the acetylcholinesterase gene in *Drosophila melanogaster*. Mol Gen Genet. 218, 487 (1989)

iMLayer、iMScope、およびiMAGEREVEAL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。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原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。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>
会員制情報サービス Shim-Solutions Club に登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

初版発行：2021年9月
© Shimadzu Corporation, 2021