

1)大阪大学大学院 工学研究科
2)エスピー食品株式会社

顕微質量分析イメージングによる乾燥ターメリック におけるクルクミン類の分布の可視化

Microscopic Mass Spectrometry Imaging Reveals
Specific Distributions of Curcumin Species Insides Dried Turmeric

新聞 秀一¹、佐川 岳人²

キーワード：質量分析イメージング、iMScope、ターメリック、クルクミン、硬組織、前処理



Foods

■要旨

植物体には様々な二次代謝物が含まれます。それら植物体内に含まれた二次代謝物は、スパイスや生薬に代表されるように様々な有用物質として知られているものが多く、その一方で、それらの物質がどのような3次元分布を形成しているのかについて、これまで報告された例は少ないのが現状です。本アプリケーションノートでは、乾燥ターメリックを試料として、その主要成分の一つであるクルクミンの空間分布を可視化しました。乾燥ターメリックは非常に硬質な試料であるため、既存のクライオミクロトームによる切片作成は不可能であり、切片化する手法を新たに構築しました。本手法で得られた異なる方向における断面の二次元分布結果を解析した結果、クルクミンはターメリック体内で管状のコンパートメントを有することが示唆されました。また、クルクミンの類縁体についても分布を取得し、同様な分布であることを示しました。このような植物学における二次代謝産物の分布という新たな視点を質量顕微鏡iMScope™ (図1は新型iMScope QT)を用いた高空間分解能質量分析イ

メージングにより明らかにすることが可能になりました。また、将来このような植物体内での分布を知ることにより、有効成分の抽出方法改善をはじめとする、生産プロセスの改良に貢献できると期待されます。



図1 iMScope™ QT

1.はじめに

植物内部の構造は顕微鏡を用いることで可視化することが可能です。しかし植物体内に含まれる分子分布を見るという技術的な問いに回答を与えることはそれほど簡単ではありません。この問いに顕微鏡だけで回答することは困難です。内部構造を見る一つの方法として、断層撮像法（CT）が考えられます。実際にX線CTを用いてターメリックを撮影した例を図2に示します。図2Aの生のターメリックでは内部構造は均一に見えます。一方図2Bの乾燥ターメリックでは内部に節状の構造が見え、実際に切断して断面を確認すると確かにその様子が見えてきます。しかし得られる情報は構造情報のみにとどまり、成分分布については分かりません。

質量分析イメージング法（MSI: Mass Spectrometry Imaging）とは、試料中の成分を直接イオン化させて質量分析を行い、この分析的を2次元的に展開し、複数個所の分析データを基に成分の分布情報を得る手法です。近年、動物試料以外への拡張が広がっており、植物¹⁻⁴、昆虫⁵⁻⁷、微生物⁸⁻¹³など様々な対象にMSIを応用した例が報告されています。例えば、平らは朝鮮人参中でのジンセノサイドの詳細な分布を報告しており、ジンセノサイドは根の先端で濃縮されることを見出しました¹⁴。このように植物体における二次代謝産物の蓄積についての報告は多いですが¹⁵⁻²¹、それが3次元的にどのように分布をしているかを調べた報告はありません。本アプリケーションノートでは、乾燥スパイスにMSIを適用し二

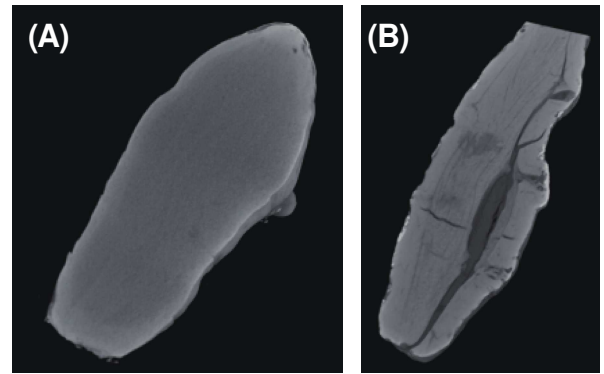


図2 X線CTによるクルクミン内部構造の観察結果
(A) 生ターメリック (B) 乾燥ターメリック

次代謝物の3次元空間分布について推定する以下のような手法を提案しています²²。スパイスや生薬原料の形態は、ターメリックに代表されるような生姜様の複雑な形態など様々な形態が存在します。組織中での空間分布を検証する場合、様々な角度の断面でMSIを行うことが必要です。これまで原田らは、生の生姜を用いて6-gingerolの分布が顆粒状であることを報告している²³。実際、長軸方向（axial section）の切片（図3A）と短軸方向（radial section）の生姜切片（図3B）で6-gingerolの分布を比較すると、同じ顆粒でも面積値が異なることがわかります（図3C）。このことから、完全な球状顆粒ではなく楕円状顆粒であることが示唆されます。すなわち得られた異なる角度からの断面像を用いた解析を行

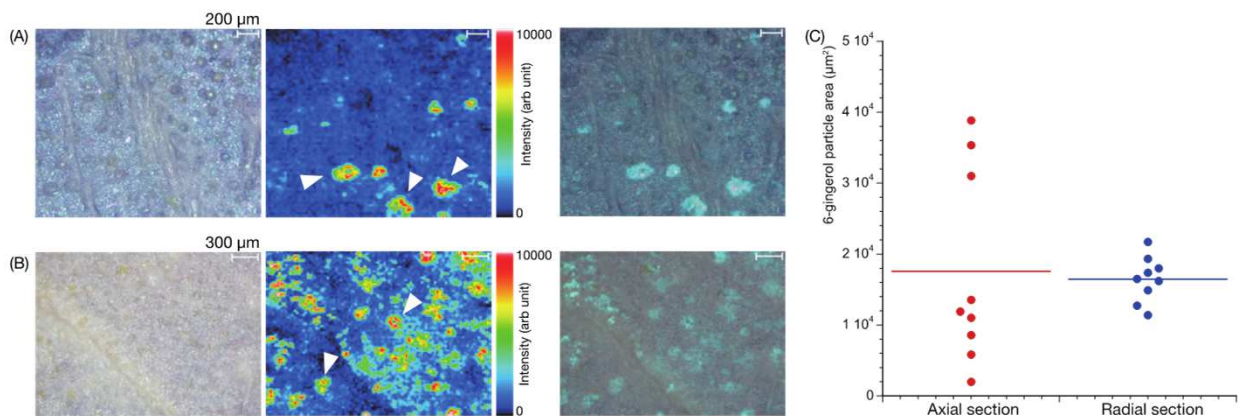


図3 生ショウガ中における6-gingerolの分布

(A) 縦切りにおける分布 (B) 輪切りにおける分布 (C) 得られた粒子形状の面積値プロット

縦切りでは非常に大きな粒子から小さな粒子が広く分布する一方、輪切りでは比較的均一な面積を持つ粒子が分布している。

矢頭：6-gingerol蓄積部

うことで、植物体内中での二次代謝物がどのような3次元分布を示すかが分かります。

本研究では乾燥スパイスに対する新たな試料前処理法についても提案しています。乾燥スパイスをターゲットとする理由は生の状態で入手可能な原料に限られるからです。乾燥試料を用いる場合、試料が極めて硬質でありMSIで必須となる切片化が困難という問題を解決する必要があります。本アプリケーションノートでは、この問題の解決法として、2種類の切片作成法を試み最適手法を提案しています。

2.実験

2-1：試薬

9-アミノアクリジン (9-AA) は東京化成 (東京) より購入しました。メタノールは富士フィルム和光純薬 (大阪) より購入しました。超純水はGenPure™ UV-TOC xCAD PLUS (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で製造したものを使用しました。

2-2：切片試料作成

乾燥ターメリックはエスピー食品より提供を受けました。本アプリケーションノートでは、硬質の乾燥ターメリックの切片作製のためダイサー (YACDAStech, 埼玉) とカンナ (松作商店, 静岡) を用いました (図4Aおよび4B)。ダイサーを用いた場合、試料の厚みは500 μm であり、カンナを用いた場合は75 μm (マイクロメーターを用いた測定値) でした。得られた切片はITO

スライドガラス (MASコート無し、表面抵抗100 Ω/m^2 、松浪ガラス、大阪) に導電性両面テープを用いて固定しました。導電性両面テープは3M (米国) より購入しました。

2-3：マトリックス供給

ターメリック中のクルクミンを検出するにあたり、9-AAを試料表面にiMLayer™ (島津製作所) を用いて蒸着した後、再結晶化を行いました²⁴⁻²⁵。蒸着したマトリックスの膜厚は0.5 μm とし、再結晶化の溶媒には5%メタノールを用いました。

2-4：質量分析イメージング

MSIはiMScope (島津製作所) を用いて実施しました。レーザー照射回数は1スポット当たり100回とし、ネガティブイオンモードで測定しました。測定範囲は m/z 250-450 とし、クルクミンの確認のために[M-H]⁻ 367.11のMS/MSも行いました (data not shown)。レーザー強度は45とし、全ての測定において検出器電圧は2.1 kVとしました。

2-5：画像再構成と解析

画像再構成はImaging MS Solution™ (島津製作所) を用いて行い、得られた画像の粒子形状解析はImage Jと解析ソフトウェアRを用いました。また、得られた分布画像は全イオン強度 (TIC: Total Ion Current) で規格化を行いました。



図4 本研究で利用した乾燥ターメリックの切片作成方法

(A) ダイサー (B) カンナ

3.結果

3-1：切片作成手法の評価とクルクミン分布の評価

MALDIによるイオン化の確認にあたり、データベース (METLIN <https://metlin.scripps.edu/>) にてクルクミンのマススペクトルを検索したところ、ネガティブイオンでの検出が良好であると考えられました。したがって、本研究では9-AAを用いてネガティブイオンのクルクミンの検出を試みました。なお、他の一般的なマトリックスである α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) や2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) でもピーク強度の確認を行いました。9-AAを用いた場合のピーク強度の方が良好でした。

図5に対象としたクルクミンの構造ならびに切片作成評価結果および画像解析結果を示します。クルクミンは図5Aに示される構造をしており、9-AAを用いたネガティブイオンモードによる測定ではプロトン脱離イオンの m/z 367.11が検出されます。この m/z 367.11をダイサーおよびカンナで作製して得られた切片内における分布を図5Bおよび図5Cに示しました。図5Bにおいて、ダイサーでは試料表面全体にクルクミンが分布している一方で、カンナでは顆粒状の分布が得られました。図5Cではいずれの切片からも顆粒状の分布を得ることができました。ダイサーでの切片では縦切り、輪切り共に分布が不明瞭になりました。

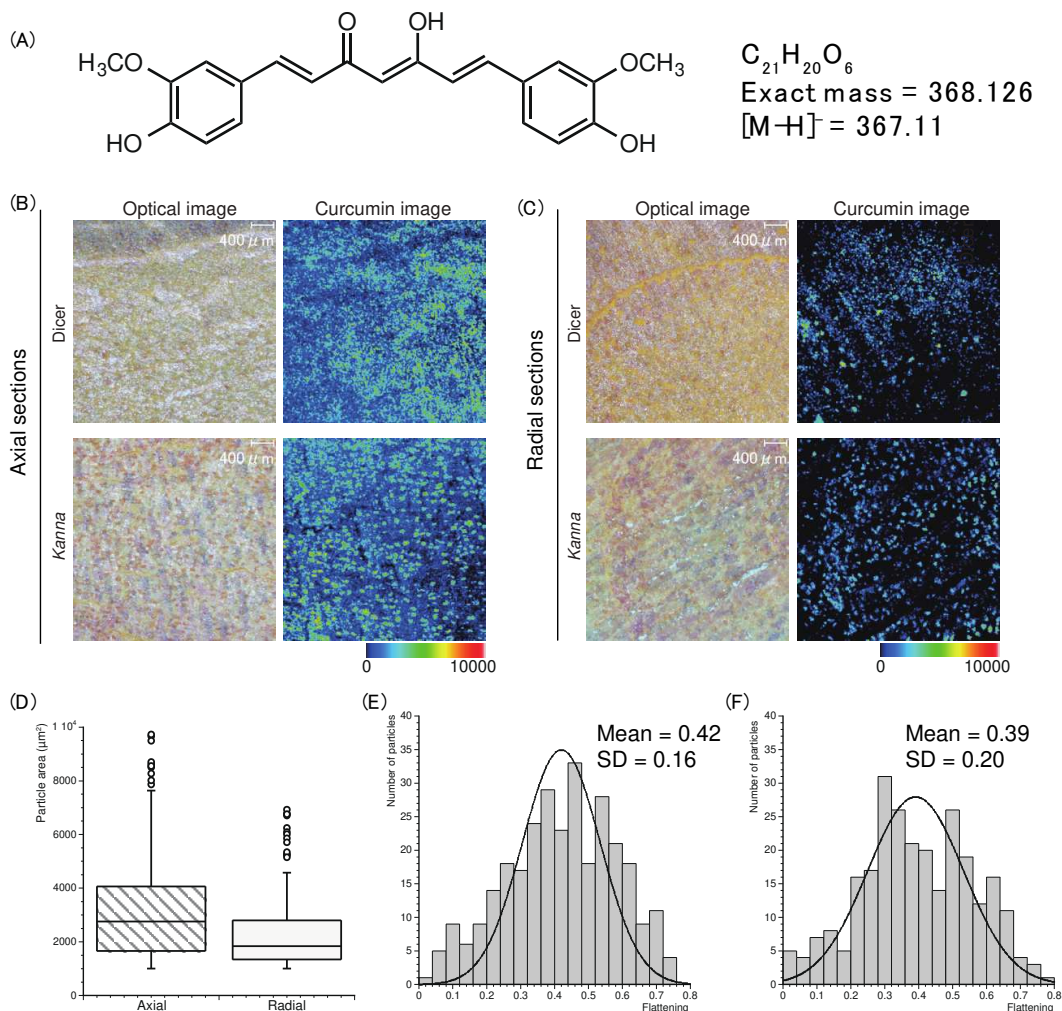


図5 クルクミンの化学構造式とダイサーおよびカンナをもちいた切片作成評価ならびに画像解析

- (A) クルクミンの化学構造式
- (B) 縦切りにおけるダイサーとカンナ比較
- (C) 輪切りにおけるダイサーとカンナ比較
- (D) カンナにより作製された縦切りおよび輪切り切片で得られた粒子の面積比較
- (E) 縦切り切片で得られた粒子の扁平率分布
- (F) 輪切り切片で得られた粒子の扁平率分布

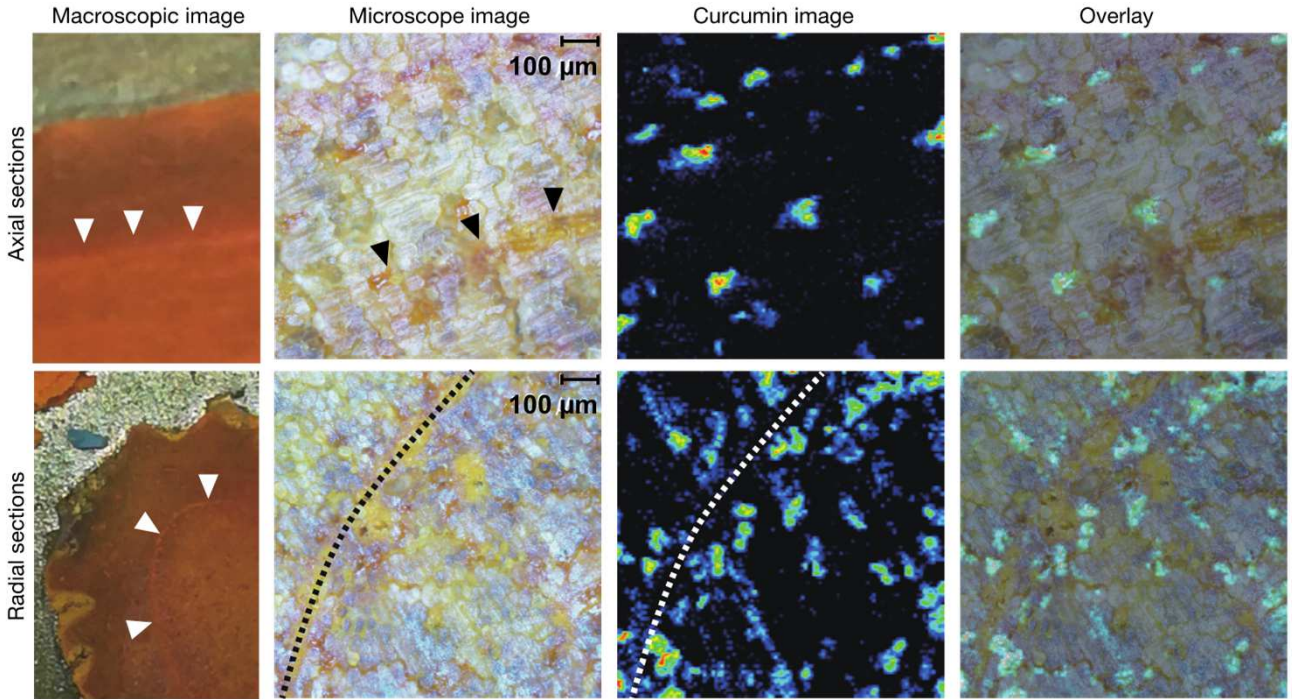


図6 高解像度クルクミン分布

(上段)：縦切りにおけるクルクミン分布 (下段)：輪切りにおけるクルクミン分布図 (ピクセルサイズ：5 μm)
縦切りにおいて、クルクミン粒子の規則的な配置と輪切りにおいて円環内側にそってクルクミン粒子が分布している。

カンナで得られた縦切りおよび輪切り切片での分布結果を見ると、得られた粒子形状が両者で異なることが分かります。定量的に評価するために粒子形状の画像解析を行いました。具体的には図5Dに示す通り粒子面積は縦切りの方が輪切りよりも大きい傾向を持っています。また、粒子形状から扁平率を計算した場合、縦切りでは平均値0.42 (標準偏差：0.16) の分布を持ち、輪切りでは平均値0.39 (標準偏差：0.20) という分布を持つ粒子が切片中に含まれていることが分かります。

3-2：高空間分解能MSIによるクルクミン分布の評価

iMScopeでは5 μmでのイメージングを行うことが可能であるため、ターメリックの微小領域におけるクルクミン分布を可視化しました。得られた結果を図6に示します。図6上段は縦切りにおける低倍率画像 (広視野) と高倍率画像 (狭視野)、ならびに高倍率画像におけるクルクミン分布を示しています。図6下段は輪切りでの結果です。縦切りの光学像において、横方向に走る特徴的な構造が見られますが (矢頭)、クルクミンはその構造とは関係なく規則的に並んでいるように見えます。

一方、輪切りにおいても同様に特徴的な円環構造 (点線で示した) が見られますが、クルクミンはこの円環上には分布しておらず、この円環の内側でクルクミンの粒子密度が非常に高くなっていると考えられます。

3-3：縦切り切片における特徴的クルクミン粒子配置

縦切り切片においてクルクミンは規則的な配置をしていることが示唆されます。これを定量的に評価するために、図6で得られた縦切り切片におけるクルクミン分布のピクセル情報を座標に投影し、粒子の重心となるピクセル位置を算出し近似曲線を描きました。その結果を図7に示します。得られた重心ピクセルの近似曲線の決定係数より、これらの粒子は直線上に並んでいることが示唆されます。また得られた傾きも非常に近接した値であり、ターメリック組織内部で非常に規則的な構造があることが示唆されました。長軸方向の切片のうち、表皮に近い部位で得られたイメージング結果を図8に示します。粒子状の分布のみならず、線状の分布を示す部位があることが分かります。

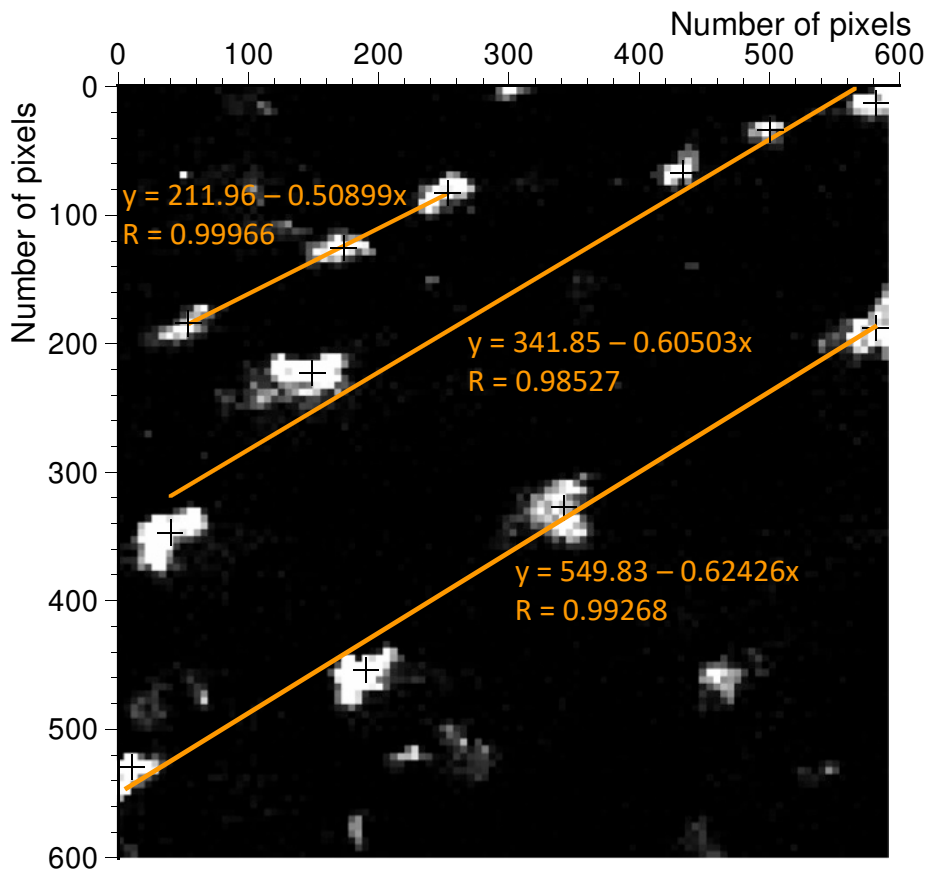


図7 縦切り切片で得られた高解像度クルクミン分布の解析

得られた粒子の重心を計算し、その重心を通る直線回帰を行ったところ、高い決定係数でクルクミン粒子が直線に並んでいることが示された。画像内部の十字マークは重心位置を表す。

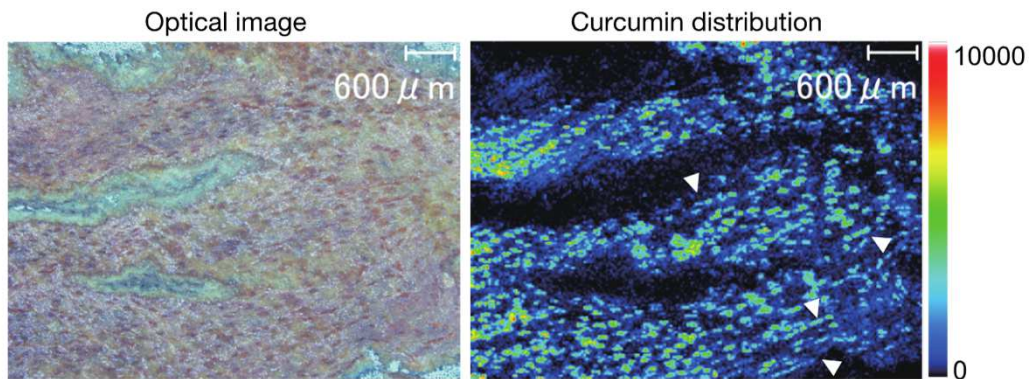


図8 長軸方向クルクミン分布

試料表面に近い切片では長軸方向で、粒子状の分布だけではなく線状のクルクミン分布も見られる（矢頭）。

3-4 縦切り切片におけるクルクミン類縁体および ビスクロン分布

本実験では $C_{21}H_{20}O_6$ のクルクミンを中心に議論してきましたが、図9Aに m/z 251.16のビスクロン、図9B-9Dに側鎖構造の異なるクルクミン類縁体についても分布の情

報を得ることができました。またターメリック切片から得られるマスペクトルを図9Eに示します。ビスクロンを除く全ての分子について、縦切り切片では同様の分布

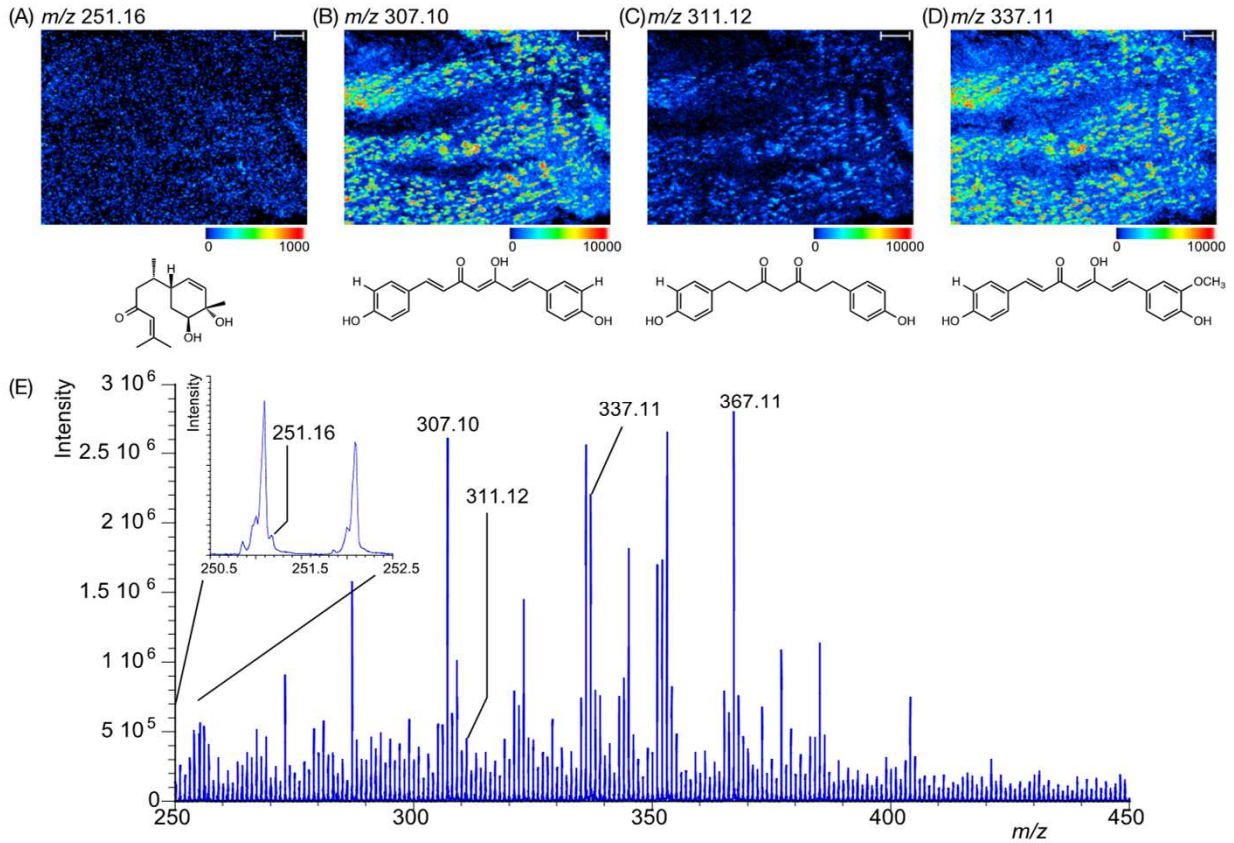


図9 長軸方向切片におけるビスクロンならびにクルクミン類縁体の分布結果

(A) ビサクロンの分布 (B-D) 側鎖構造の違いのクルクミン類縁体の分布 (E) ターメリック切片上で得られるマスペクトル
 クルクミンは一部線状な分布を示す部分も見られることから、ターメリック内部には管状のコンパートメントが存在し、その中にクルクミンが封入されている事が示唆される。一方、ビスクロンでは特徴的な分布は見られず、一様な分布となった。

を示し、クルクミン類縁体は線状の分布を示す部位の存在が確認されました。このことから、クルクミン類縁体もまた管状コンパートメントに封入されていることが示唆されます。その一方でビスクロンは特徴的な蓄積は示さないことが明らかとなりました。

4.まとめ

本研究では、乾燥ターメリックの分布情報可視化のために工業材料を切断するためのダイサーとカンナを用いました。ダイサーにおいて、短軸方向の断面ではクルクミン分布が保たれましたが、長軸方向で分布が消失してまいりました。ただし、短軸方向においてもカンナで作製した切片では粒子状の分布が不明瞭になっていることが分かります。

この理由は、ダイサーにおいて切片作成時に高速に回転する刃が試料表面に接触し続けるため、常に摩擦が生

じることが原因で、この継続的な摩擦により詳細な分布構造が消失したものと考えられます。この結果より、試料作製法としてダイサーではなくカンナによる切片作製が有効であると言えます。

カンナを用いて作成した切片で、得られた粒子状領域の面積値を計測したところ図5Dに示すように長軸方向において中央値が大きくなる傾向が分かります。すなわち、図3に示す6-gingerolでの結果と同様、完全な球状顆粒ではないことが示唆されます。また、得られた分布を見ると、粒子の大きさのみならず形状も異なることが分かります。この形状の違いについて扁平率を用いて評価したところ、長軸方向の粒子において扁平率が0.42であることが分かりました。短軸方向においては、二相性の分布にも見えますが扁平率0.3付近にピークがあることが分かります。すなわち、短軸方向では円形に近く、長軸方向では楕円に近い形状の粒子であると言えます。

また、図6に示す5 μmのイメージング結果から長軸方

方向ならびに短軸方向で非常に規則的な分布を示すことを述べました。すなわち、長軸方向では規則的な楕円が並んでおり、短軸方向ではターメリックの中心部分で粒子分布密度が高くなっていました。これはターメリック内部で、クルクミン分布が特徴的な構造を有していることを支持する結果であると言えます。特に、長軸方向における規則的な粒子の整列は、図7に示した画像解析の結果からも結論づけられます。得られたフィッティング結果から、極めて興味深い点は、粒子が構成する直線の傾きが一定であるという点です。長軸方向においては図5から楕円状の粒子であり、図6から直線に整列しているという点から、ターメリック内部には中央部分に管状の構造を有していることが示唆されます。この結果をサポートするように、図8の結果では、長軸切片のイメージング結果に線状の分布を示す部分が多数見られました。また、クルクミン類縁体についても同様の分布を示す一方、ビスクロンについては特徴的な分布は示しませんでした。したがって、短軸方向のイメージング結果と長軸

方向のイメージング結果を考慮してクルクミンを含む管状の構造がターメリック内部に存在することが示唆されます。

以上、本研究では、乾燥ターメリック試料を用いてクルクミンの分布可視化手法の開発ならびにクルクミンの分布に関する詳細な解析を行いました。縦切り切片と輪切り切片をカナナで作製できたことにより、ターメリック内部には非常に規則的な構造体、すなわち管状の構造がありその中にクルクミンが封入されていることが示唆されました。本研究は、MSIを硬質な乾燥試料に適用した初めての例であり、様々な試料における二次代謝物の分布情報を可視化することが可能であることを示唆しています。このように有効成分の空間分布情報を得ることにより、対象とする有効成分の含有率が高い粉砕物を得ることも可能となります。このような情報は、粉砕物を原材料として直接使用する場合に限らず、特定の有効成分を抽出する際の前処理工程としても有用なものであると考えられます。

参考文献

1. Taira, S et al. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (27), 6109-12.
2. Shroff, R et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (16), 6196-201.
3. Grassl, J. et al. *Plant Methods* **2011**, *7* (1), 21.
4. Mullen, A. K et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (18), 2507-16.
5. Ohtsu, S et al. *Analytical Sciences* **2018**, *34* (9), 991-996.
6. Niehoff, A. C et al. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (22), 11086-92.
7. Urban, P. L et al. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (10), 3918-25.
8. Nguyen, T. B et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84* (9).
9. Dunham, S. J. B et al. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (1), 96-104.
10. Kompauer, M et al. *Nat. Methods* **2017**, *14* (1), 90-96.
11. Moree, W. J et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109* (34), 13811-13816.
12. Phelan, V. V et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, *26* (6), 873-7.
13. Yang, Y. L et al. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5* (12), 885-7.
14. Taira, S et al. *Am. J. Chin. Med.* **2010**, *38* (3), 485-93.
15. Miyoshi, K et al. *Analytical Sciences* **2018**, *34* (9), 997-1001.
16. Franceschi, P et al. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63* (3), 1123-33.
17. Crecelius, A. C et al. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (17), 3559-3568.
18. Dalisay, D. S et al. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (6), 1231-42.
19. Holscher, D et al. *Plant J.* **2009**, *60* (5), 907-18.
20. Soares, M. S et al. *Phytochemistry* **2015**, *115*, 161-170.
21. Taira, S et al. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* **2012**, *1* (1), 61-65.
22. Shimma, S et al. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67* (34), 9652-9657.
23. Harada, T et al. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (21), 9153-9157.
24. Nakamura, J et al. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (6), 1697-1706.
25. Yang, J et al. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (14), 5728-34.

iMScope、iMLayerおよびImaging MS Solution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。GenPureは、Thermo Fisher Scientificの商標です。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9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

[> 食品・飲料](#)

[> 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](#)