

# Application News

MALDI-TOF質量分析法 MALDI-8020/MALDI-8030

### 卓上型MALDI-TOFMSを用いた タンパク質およびペプチドのMSイメージング

Catherine Rawlins<sup>1</sup>、山崎雄三
<sup>1</sup>KRATOS ANALYTICAL LTD.

#### ユーザーベネフィット

- ◆ 手頃な価格で使いやすい卓上装置でラット脳内のペプチド/タンパク質のMSイメージングが可能です。
- ◆ クラス最高性能のMS分解能と感度により詳細なイメージング画像を得ることができます。
- ◆ 別途用意されているマトリックス塗布法を用いるワークフローで、様々なタイプの組織切片測定が可能です。

#### ■はじめに

MALDI-TOFMSによる質量分析イメージングは、サンプル上のさまざまな位置で数千の個々のマススペクトルを収集可能な質量分析計を用いたパワフルな技術です。測定に続いて、専用のソフトウェアを使用すると、検出されたイオンを二次元の擬似カラー画像として空間的に表現することが可能で、試料/組織内における重要な分子の分布を可視化することができます。

卓上型リニアモードMALDI-TOFMSであるMALDI-8020 (図1) は、ラット脳内の脂質などに関して良質なMSイメージを生成することができます。本装置ではサンプルプレートの迅速な交換が可能であり(3分未満)、また電圧印可など測定準備時間が短いため、スペクトルの積算スタートまで時間を要しません。この点は、マトリックス塗布などイメージング実験条件の最適化をする際に有利です。この卓上型装置を用いて、指紋、大豆およびPETフィルムなどの分析を行い(アプリケーションニュース01-00389-JP、01-00392-JP)、多様な標的分析物に対するMALDIイメージングの例が示されています。本稿では、このリニアモード専用機を用いたラット脳組織分析を例として、組織切片中のタンパク質およびon-tissue消化後のペプチドに関して、クオリティの高いマススペクトルとMSイメージを容易に得ることができる一連のプラットフォームの能力を示します。



図 1 卓上型リニアモード専用MALDI-TOFMS: MALDI-8020

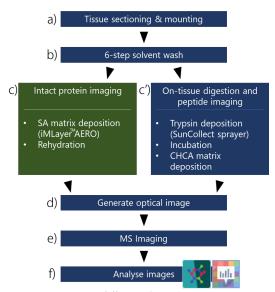


図 2 本稿で用いたワークフロー タンパク質にはシナピン酸(SA)、ペプチドには*α-*cyano-4hydroxycinnamic acid (CHCA)をそれぞれ用いた

#### ■測定条件と測定試料

CMC(カルボキシメチルセルロース)に包埋したラット 脳切片はMALDI-8020専用のFlexiVision-mini ITO Slides上に 調製し、-80で保存しました(AMSBIO, Oxford, UK)。このスライドガラスを、減圧乾燥下で室温にした後、前処理を施しました。

ペプチドとタンパク質の分析準備として、組織切片の脂質と塩を除去する必要があります(図 2-b))。これら脂質や塩はマススペクトル上で優先的に現れ、かつタンパク質などのシグナルを抑制するためです。脱脂のために、スライドを以下のような6段階の溶媒洗浄プロトコルルを用いて洗浄しました:(1)70%エタノール中で30秒、(2)100%エタノール中で30秒、(3)カルノア溶液(60:30:10エタノール:クロロホルム:酢酸)中で2分、(4)100%エタノール中で30秒、(5)H<sub>2</sub>O中で30秒、および(6)100%エタノール中で30秒。洗浄後、マトリックスを塗布する前に、スライドを真空乾燥しました。

On-tissue消化のために、トリプシン(67 ng/ $\mu$ L; 20 mM 炭酸水素アンモニウム:アセトニトリル、90:10に溶解)を、SunCollect sprayer(SunChrom, Germany)を用いて組織上に塗布しました。次いで、スライドを50:50のアセトニトリル:水を含む再結晶化チャンバーに37℃で18時間静置しました。その後、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg/mL, 50:50のアセトニトリル:0.1%トリフルオロ酢酸溶液)を、再びSunCollect sprayerで塗布し、次いで85℃の再結晶化を溶媒なしで2分間、さらに5%酢酸で3分間実施し、抽出物を表面に抽出させました。

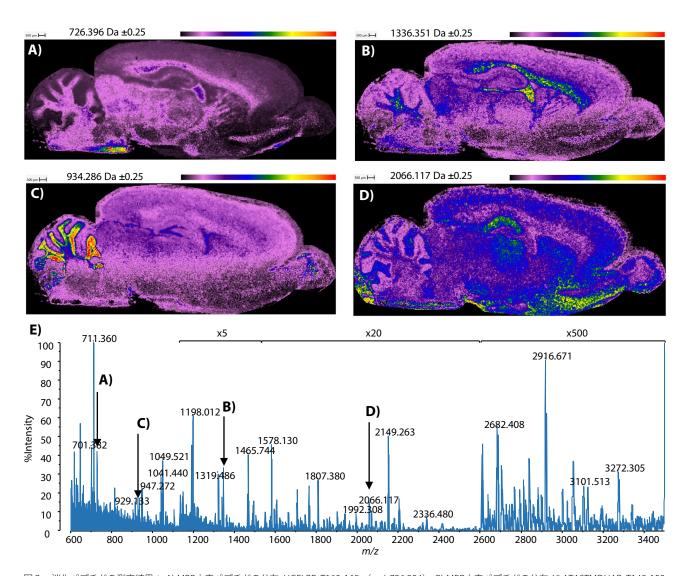


図3 消化ペプチドの測定結果: A) MBP由来ペプチドの分布: HGFLPR, T160-165 (m/z726.394), B) MBP由来ペプチドの分布: YLATASTMDHAR, T148-159 (m/z1336.633) 、C) & D) それぞれ未帰属のペプチドの分布, E)ラット脳切片のTIC スペクトル \*A),およびB) は白質に4, C) および D) はそれぞれ小脳および灰白質に局在している

インタクトタンパク質分析のために、シナピン酸(10 mg/mL; 70:30のアセトニトリル:0.1% TFAに溶解)を iMLayer<sup>TM</sup> AERO を用いて組織に噴霧しました。組織切片に は50 mm/sで8層、30 mm/sで4層の条件でマトリックスを 塗布しました。マトリックスの塗布後、スライドガラスを 5%酢酸を含む再結晶化チャンバー内に85°Cで3.5分間静置 しました。

サンプルは、卓上型リニアモード専用機MALDI-8020を用いて、50μmの空間分解能 (ステージ移動間隔) で分析しました。

ペプチドのデータ取得条件を最適化し、30ショット/プロファイル、200Hzのレーザー繰返し周波数、質量範囲*m/z* 300~3000、遅延引出し2700Daで実行しました。合計67,482プロファイルを取得し、測定時間は2時間50分でした。インタクトタンパク質のデータは、20ショット/プロファイル、100Hzのレーザー繰返し周波数、質量範囲*m/z* 3000~30000、遅延引出し22000Daで取得しました。合計68,836個のプロファイルを取得し、取得期間は3時間47分でした。

すべてのデータはIonView™ソフトウェアで分析しました。

#### ■結果

今までのMSイメージング測定の検討において、我々のon-tissue消化およびタンパク質イメージングのプロトコルが成功裏に機能することは、リフレクトロンを搭載した上位機種であるMALDI-7090で検証されていました(データ非開示)。本応用例では、これらの方法を卓上型リニア

モード専用機MALDI-8020に移行しました。

MS/MSを有しないMALDIリニアモードのシステムにおいても、トリプシン消化物のMSイメージングは、検出したペプチドの質量をラット脳由来タンパク質に暫定的に帰属可能であることを示しました。例えば、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)は白質に局在する特徴的なタンパク質で、今回得られたMALDIイメージングの結果はこの知見と一致しました(図3)2)。

同様にインタクトタンパク質のMSイメージングも、検出した質量がラット脳中の一般的なタンパク質に対応することを明らかにしました(図4)。図4の暫定的なタンパク質同定は、参考文献で確認された観測質量に基づいて行われました $^{3,4}$ )。図4では、ルーチン的な脂質のMSイメージングにくらべ非常に高質量の測定が可能であり、これは今回のワークフローがタンパク質のイメージングに適していることを示しています。使用したラット脳組織は、標本の切断を容易にし、保存を改善するための樹脂に包埋されていたため、 $^{16}$  kDa より大きいタンパク質を検出することは困難でした $^{5}$ )。

全ラット脳のペプチド及びインタクトタンパク質イメージングの取得時間それぞれ2時間50分及び3時間47分と迅速であり、前処理の最適化など実験条件の検討を容易に実行できます。

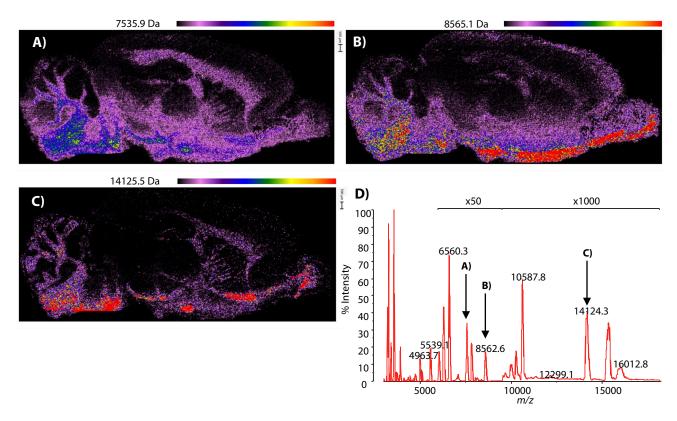


図4 インタクトタンパク質のMSイメージ: A) Neurogranin (*m/z* 7537), B) Ubiquitin *(m/z* 8565), C) Myelin Basic Protein (*m/z* 14124), D) ラット脳切片の TICスペクトル

#### ■まとめ

本稿ではローコストな卓上型MALDI-TOFMSを用いたMS イメージングによるペプチドおよびタンパク質の*in situ*分析 の適用可能性が示されました。

この卓上型装置における迅速なプレート交換時間(<3分)と速い積算時間(ラット脳切片全体に対して、200Hzのレーザー周波数にて2時間50分、67,482プロファイル)はMSイメージングの手法開発を容易にします。

また、分子量16kDaまでのタンパク質が容易に検出されているおり、本ワークフローがタンパク質イメージングに適していることを示しています。

On-tissue消化により検出されたペプチドのMSイメージは、その由来となる脳内タンパク質の特徴的な分布と一致することが示され、ペプチド・イメージングおよび組織中の比較的高質量分子種のイメージングを標的とする用途に対する適合性が示されました。

このように本アプリケーションニュースは、MALDI-8020 上のタンパク質およびペプチドMSIがスクリーニング用途に 有用であることを適切に示しています。

この経済的、コンパクト、かつ堅牢な装置はMALDIイメージングの初心者にとって理想的であり、大学や教育研究室にとって卓越した設備になると考えられます。

#### ■参考文献

- 1) Yang et al (2011) Matrix sublimation/recrystallization for imaging proteins by mass spectrometry at high resolution. Anal. Chem. 83, 5728-5734.
- 2) Heijs et al (2015) Brain region-specific dynamics of on-tissue protein digestion using MALDI Mass Spectrometry Imaging. J Prot. Research 14, 5348-5354.
- 3) Schmitt et al (2019) Genetically Encoded Fluorescent Proteins Enable High-Throughput Assignment of Cell Cohorts Directly from MALDI-MS Images. Anal. Chem., 91, 6, 3810–3817
- 4) Groseclose et al (2007) Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 42, 254–262
- 5) Franck & Rawlins et al (2010) MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30000 Da. Med. Sci. Monit., 16(9): BR293 299.

iMLayerおよびlonViewは、株式会社島津製作所またはその関係会社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

12-MO-492-JP 初版発行: 2023年 1月

島津コールセンター 🔟 0120-131691