

iMScope QTを用いたミカン皮中の 抗菌活性物質スコパロンのMSイメージング

中川 薫、山本 卓志

ユーザーベネフィット

- ◆ MS/MSイメージングを行うことで、より信頼性の高い目的成分の分布を確認することができます。
- ◆ 目的に応じた空間分解能の光学画像とMSイメージを取得することができます。
- ◆ 光学画像とMSイメージを意図的な操作なく重ね合わせることで、目的成分の正確な分布を確認することができます。

■はじめに

ミカンが病原菌に感染した時に植物が生成する低分子抗菌活性物質であるファイトアレキシンの1つにスコパロン(図1)があります。スコパロンは、ミカンへの紫外線処理によりオレンジ色の外皮の部分に生成が促進され、腐敗を抑制する効果が知られています。この効果を利用して、ミカンの腐敗を抑制する装置が開発されています。このように、スコパロンの効果についての調査は進んでいますが、生成機構については不明な点が多くあります。ミカン皮中のスコパロンの分布を可視化することは、生成機構の解明に繋がることが期待できます。そこで、紫外線照射により生成されたスコパロンが皮のどの領域に分布しているかをMSイメージングで確認しました。

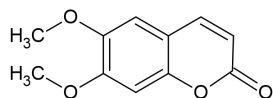


図1 スコパロンの構造式

■ミカン皮切片的の作成

清見オレンジにかんきつ腐敗抑制装置(雑賀技術研究所)を用いて紫外線照射し、スコパロンの生成を促進させたミカン皮の一部を凍結しました。ミカン皮切片の作成は、粘着性を持たせたアルミホイルをミカン皮凍結ブロックに貼り付けて薄切することで形態を維持しました。そして、形態が保たれた切片が付着しているアルミホイルの裏側に接着剤を塗り、ITOスライドガラスに貼り付けました。ミカン皮の深さ方向断面と、油胞が表面に出るようにした横方向断面の2種類の切片を作成しました。

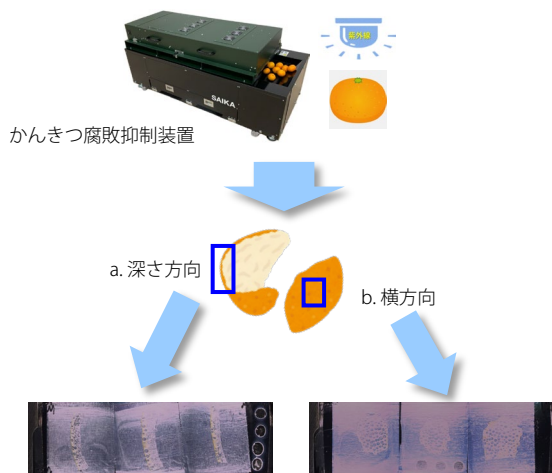


図2 ミカン皮切片の作成手順

■MSイメージング分析条件

イオン化補助剤であるマトリックスにはCHCAを用いました。マトリックス塗布には、マトリックスを自動で均一に再現良く蒸着することができるマトリックス自動蒸着装置 iMLayer™ (図3)を用いました。質量分析には、微細部位の顕微鏡観察から質量分析までをシームレスに行うことができるイメージング質量顕微鏡iMScope QT (図4)を用いました。MSイメージングの分析条件を表1に示します。



図3 iMLayer™



図4 iMScope™ QT

表1 分析条件

マトリックス種	: CHCA
マトリックス厚	: 0.7 μm
測定ピッチ(空間分解能)	: 10 μmまたは40 μm
イオン種	: 正イオン
測定範囲	: 10-210
MS段数	: 2 (MS/MS)
プリカーサイオン	: m/z 207.065
幅/Q1分解能	: 5.0
CE	: 40
レーザー照射回数	: 50 [shots]
レーザー繰り返し周波数	: 1 [kHz]
レーザー照射径設定値	: 1または3
レーザー強度	: 50.0または80.0

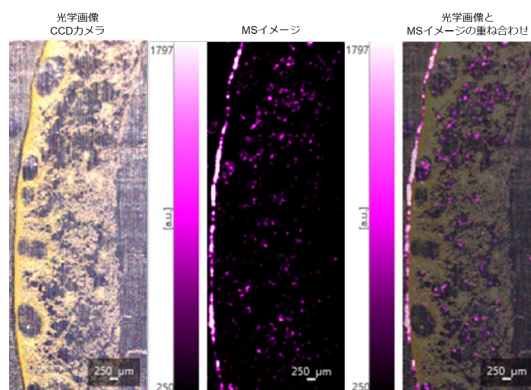


図6 空間分解能 40 μmでの深さ方向ミカン皮切片におけるスコパロンのMS/MSイメージ

■スコパロン標準品のMS/MS分析結果

MSイメージングは切片をそのまま分析するため夾雑イオンが多く検出され、目的物質のイオン検出が妨げられることがあります。そのような時は、MS/MS分析により得られたフラグメントイオンのMSイメージを描くことで、より信頼性の高い分布情報を得ることができます。そこで、スコパロンの標準品の[M+H]⁺をプリカーサーイオンに設定し、MS/MS分析を行いました。その結果、 m/z 107.049にフラグメントイオンが検出されることを確認しました(図5)。このイオンを用いて、ミカン皮中のスコパロンのMSイメージングを行うことにしました。

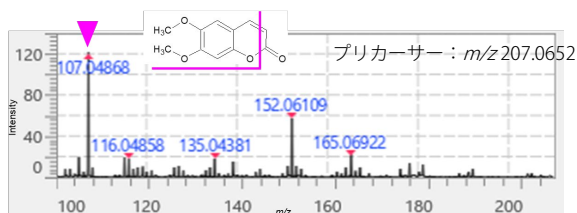


図5 スコパロン [M+H]⁺のMS/MSスペクトル

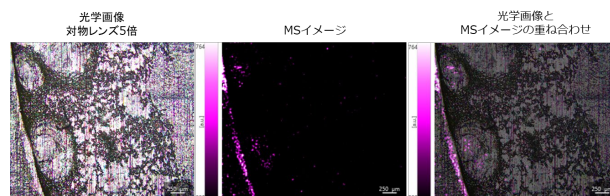


図7 空間分解能 10 μmでの深さ方向ミカン皮切片におけるスコパロンのMS/MSイメージ

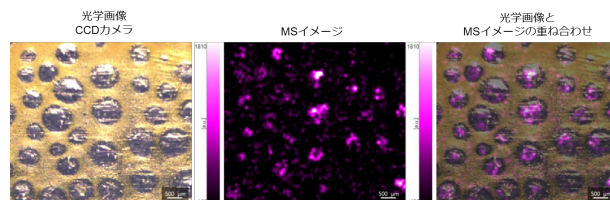


図8 空間分解能 40 μmでの横方向ミカン皮切片におけるスコパロンのMS/MSイメージ

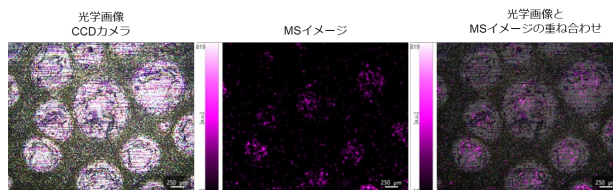


図9 空間分解能 10 μmでの横方向ミカン皮切片におけるスコパロンのMS/MSイメージ

■深さ方向ミカン皮切片のMSイメージング

はじめに、深さ方向のミカン皮切片の広い領域を、空間分解能 40 μmでMSイメージングを行いました。その結果、スコパロンが皮の表面に多く分布し、油胞にも分布していることが示唆されました(図6)。そこで、顕微鏡で観察した領域を空間分解能 10 μmでMSイメージングを行いました。すると、同様の結果が確認されました(図7)。

■横方向ミカン皮切片のMSイメージング

油胞の深さ横方向のミカン皮切片のMSイメージングを行いました。まずは、広い領域を空間分解能 40 μmでMSイメージングを行いました。その結果、油胞中にスコパロンが分布していることが確認されました(図8)。次いで、顕微鏡観察した領域を空間分解能 10 μmでMSイメージングを行ったところ、同様の結果が確認されました(図9)。

■まとめ

MSイメージングの結果から、スコパロンはミカン皮の表面および油胞に分布しているという詳細な分布情報を得ることができました。このような結果は、スコパロンの生成機構の解明への貢献が期待できます。

iMScope QTは、光学顕微鏡と質量分析計 (MS) が一体となった唯一の装置であるため、光学画像とMSイメージを完全に重ね合わせることができます。そのため、このような目的化合物の正確な詳細分布を確認することができました。

本アプリケーションニュースに関するデータ取得および原稿作成において、多大なるご協力をいただきました。一般財団法人雑質技術研究所の前田千枝子様、ならびに稲垣江梨様に、心よりお礼申し上げます。

iMLayerおよびiMScope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 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00544-JP 初版発行：2023年 3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

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。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。