





質量分析イメージングにおける 組織上アミノ基誘導体化法の検討

新間秀一1,2.3、斎藤裕美1、中川薫4、山本卓志4



Life Science

本イメージの一部はAdobe illustratorの生成AI機能を用いて作成しました。

■要旨

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメー ジング (matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging: MALDI-MSI) において神経伝達物 質やアミノ酸の可視化を行うことは一般に困難であるとさ れています。この問題を解決するために、組織上化学誘導 体化 (OTCD: on-tissue chemical derivatization) が有効で あることが報告されています。これまで、化学構造におい て特定の官能基を誘導体化する手法が数多く報告されてい ます。本アプリケーションノートでは、その中の4つの手法 について紹介し、それらを比較・検討した結果、 iMScope™ QTで最も有効と考えられる手法をご提案します。

1. はじめに

近年さまざまな分野においてMALDI-MSIが応用されてき ており、数多くの分子が可視化のターゲットとなりつつあ りますが、脳内の神経伝達物質やアミノ酸など、生体内で 重要な働きをする分子を可視化することを考えた場合、実 際は簡単にイオン化できない分子も存在します。イオン化 しにくい分子を可視化する場合、試料前処理の工夫により 問題を解決できることもあります。近年、化学構造の中の 特定の官能基を誘導体化するOTCDという手法が数多く報 告されており、筆者らのグループでも、それらを応用した ステロイドホルモンのイメージング¹⁻³⁾やアセトアミノフェ ン代謝物の薬剤性肝障害への影響⁴⁾などを報告しています。

すでに述べた神経伝達物質やアミノ酸においては、一級 アミンやフェノール性水酸基をターゲットとした誘導体化 試薬として代表的な以下の4種が知られています。

- (1) TPP: 2,4,6-Triphenylpyrylium tetrafluoroborate^{5, 6)}
- (2) FMP-10: 4-(Anthracen-9-yl)-2-fluoro-1methylpiridin-1-ium iodine⁷)
- (3) CA: 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde⁸⁾
- (4) Py-Tag: 2,4,6-Triethyl-3,5-dimethyl pyrylium trifluoromethanesulfonate⁹⁾

本アプリケーションノートでは、それぞれの誘導体化試 薬を用いてマウス脳組織表面でOTCDを行い、 iMScope QT で網羅的な神経伝達物質とアミノ酸のイメージングを試み、 iMScope QTに最適な誘導体化法を検討しました。

2大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所

¹ 大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻

³ 大阪大学先導的学際研究機構

⁴ 島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

分類	試薬名	略称	メーカー
誘導体化試薬	2,4,6-triphenylpyrylium tetrafluoroborate		Merck
	4-(Anthracen-9-yl)-2-fluoro-1-methylpyridin-1-ium iodine		Tag-on
	4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde		Merck
	Trans-ferulic acid		Merck
	2,4,6-Triethyl-3,5-dimethyl pyrylium Trifluoromethanesulfonate	Py-Tag	大陽日酸
マトリックス	2,5-Dihydroxybenzoic acid	DHB	Sigma-Aldrich
	a-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid	CHCA	Sigma-Aldrich
カチオン化剤	Trifluoroacetic acid (LC/MSグレード)	TFA	富士フイルム和光純薬
pH調整試薬	Triethylamine	TEA	富士フイルム和光純薬
溶媒	Acetonitrile (LC/MSグレード)	ACN	富士フイルム和光純薬
	Methanol (LC/MSグレード)	MeOH	富士フイルム和光純薬
	2-propanol (LC/MSグレード)	IPA	富士フイルム和光純薬

表1 実験に用いた試薬と溶媒

2.実験

2-1【試薬調製】

本実験で用いた誘導体化試薬ならびに溶媒を表1に示しま す。また、OTCD溶液およびマトリックス溶液を表2のよう に調製しました。CA溶液と*trans*-FA溶液は等量混合して OTCDに用いました。

2-2【試料作成】

購入したマウス脳の新鮮凍結ブロック(C57BL、フナコ シ)をクライオミクロトーム(CM1950、LEICA)で切片厚 8 µmで作製し、ITOガラス(SI0100N、松浪ガラス工業)上 に載せました。その後、シリカゲル入り50 mLチューブ内 に封入して室温で乾燥させました。

2-3【OTCD条件】

OTCD溶液はエアブラシ (PROCON BOY SQ LIGHT、GSIク レオス)を用いて、切片1枚に対し均一に噴霧しました。1 切片あたりの噴霧量は、TPPとCAが200 μ L、FMP-10が800 μ L、Py-Tagが150 μ Lとしました。噴霧後、室温、遮光下で 30分静置し、OTCD反応を完了しました。Py-Tagについて は60℃の湿潤条件で反応時間は10分としました⁹。

2-4【マトリックス供給】

OTCD反応終了後、速やかにマトリックスを組織上に供給 しました。標準品での検討により、TPPの誘導体化にはDHB を採用し、Py-Tagの誘導体化にはCHCAを採用しました。こ れらのマトリックス供給は、1切片に対して500 µLの溶液を マニュアルスプレーを用いて噴霧しました。FMP-10とCAの 誘導体化については、これらのOTCD試薬自身がマトリック スの役割を果たすため、追加のマトリックス供給は実施し ませんでした。

2-5【MSI測定】

MSI測定はイメージング質量顕微鏡iMScope QT(図1)を 用いて空間分解能60 µmの測定を行いました。なお、 iMScope QTでのデータ取得の際には、表3の分析パラメー タを設定しました。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2)を用いまし た。



図1 イメージング質量顕微鏡 iMScope™ QT

表2 調製したOTCD溶液とマトリックス溶液の濃度と溶媒組成

	溶液	濃度	溶媒組成
	TPP 溶液	1.3 mg/mL	MeOH/H2O/TEA: 80/20/0.6 (v/v/v)
	FMP-10溶液	1.8 mg/mL	70% ACN
OTCD溶液	CA溶液	11.5 mg/mL	80% MeOH
	trans-FA溶液	4.25 mg/mL	80% MeOH
	Py-Tag溶液	5.8 mg/ mL	MeOH/H2O/TEA: 70/25/5 (v/v/v)
マトリックス溶液	CHCA	10 mg/mL	ACN/IPA/H2O/TFA: 30/10/59/1 (v/v/v/v)
	DHB	30 mg/mL	70% MeOH

MS分析条件		
イオン種	正イオンモード	
m/z 測定範囲	TPP : 365-500 FMP-10 : 340-475 CA : 235-370 Py-Tag : 250-380	
積算回数	1回	
サンプル電圧	4.50 kV	
検出器電圧	2.20 kV *	
DL温度	250℃	
CIDガス圧	150 kPa	
MS段数	1	
レーザー照射条件		
照射回数	80回	
繰り返し周波数	1000 Hz	
照射径設定値	2(直径約25 µm)	
レーザー強度	62	

表3 MSI分析パラメータ

※:参考値

(A)

(最適な検出器電圧は、検出器の劣化具合とサンプルのイオン化のしやすさにより異なります。検出器電圧の設定によっては検出器の劣化を早める可能性があります。詳しくは取扱説明書をご参照ください。)



図2 MSイメ―ジングデータ解析ソフトウェアIMAGEREVEAL[™] MS

3.結果·考察

図3にドーパミン(DA:図3A)を例として、各OTCD試 薬の構造と誘導体化DAの構造について記しました。図3Bは TPP による反応を示しています。TPPはピリリウムの2位、4 位および6位をフェニル基に置換した構造を有します。ドー パミンの1級アミンと反応することで、[M]+ = 444.20のシグ ナルが得られます。なお、反応後の構造において赤字で示 したN+により[M]+としてピークが得られます。

図3CはFMP-10による反応を示しています。FMP-10の特 徴の一つは、2-fluoro-1-methylpiridinの構造とともにアン トラセンを有しており、このアントラセンの存在により、 OTCDを実現すると同時にマトリックスとしての役割も果た していると言われています⁷⁾。FMP-10がDAと反応する場合、 主にフェノール性水酸基での反応が優勢となります。なお、 FMP-10は分子中の1級アミンとも反応が起こります。

さらに、 1分子に複数のFMP-10が反応することも知られ ています。本アプリノートでは、 $[M]^+ = 421.19$ に注目して いますが、文献7ではFMP-10が2つのOH基(もしくは1つの -OHと-NH₂)に反応したピークも得られています。



 図3 各OTCD試薬の構造とドーパミンを例とした反応後の構造
(A) ドーパミン(DA)、(B) TPP、(C) FMP-10、(D) CA、(E) Py-Tag 反応後の構造のうちプラス電荷が固定されている部分は赤字。
また、各OTCD反応後のピーク値について、[M]+もしくは[M+H]+として表記。
なお、この図においてカウンターイオンの構造は省略。



図4 マウス脳組織上(ROIとして線条体を選択した)における誘導体化ドーパミンの強度比較と得られたマススペクトル (A) 誘導体化ドーパミンの強度比較

(B) TPP-DAのマススペクトル

(C) FMP-10-DAのマススペクトル

(D) CA-DAのマススペクトル

図3DはCAによる反応を示しています。CAは*trans*-FAと混合して用いることで、OTCDとマトリックスの両方の役割を 果たします。CAについては、他のOTCD試薬と異なりプラ ス電荷が固定された構造を持ちません。したがって、 MALDIによるイオン化を行った場合、[M+H]+ = 314.14の ピークが得られます。また図3EはPy-Tagの場合を示してお り、[M]+ = 328.23のピークが得られることを示しています。

図4に誘導体化DAのマウス脳内における強度の比較(図 4A)とOTCD試薬との反応で得られるDA由来シグナル(図 4B-4E)についてマススペクトルを示しました。図4Aは、 マウス脳内でDAが蓄積することが知られている線条体領域 でROI (region-of-interest)を設定し、強度比較を行いまし た。その結果、CA-DAは組織上でシグナルが極めて弱く、 Py-Tag-DAではバックグラウンドが高い傾向が見られまし た。また、TPPは他のOTCD試薬と比較して極めて高い強度 を示すことがわかります。また、TPPはFMP-10よりも安価 で、コストパフォーマンスの面でも非常に優れていると考 えられます。



図5 各OTCD試薬に対するDAおよびGABAのマウス脳切片における分布 スケールバー:1mm

図5に各OTCD試薬を用いた時のマウス脳矢状切片におけ るDAおよびγ-アミノ酪酸(GABA)の分布を示しました。 DAについては、線条体に蓄積している様子が分かりますが、 図4で既に示した通りTPPで最も強度が高くなっており、コ ントラストも非常に高いことが示されました。FMP-10につ いても局在が見られますが、TPPと比較するとコントラスト が弱くなっていることがわかります。Py-Tagについても弱 いながら線条体への局在が見られましたが、CAについては、 マススペクトル中にシグナルピークが得られていますが、 明瞭な分布は確認できませんでした(図4D)。一方、 GABAではそれぞれのOTCD試薬で非常に興味深い分布を示 していることがわかります。まず、GABAが主に局在する部 位は視床下部と中脳であるということがわかります。また、 TPPとPy-Tagでは大脳皮質でシグナル強度が弱くなっていま すが、CAでは中脳と同程度の強度でGABAのシグナルが分 布しています。

この現象の原因として考えられることは、CAでは誘導体 化後のシグナルピークが低いために、GABA由来ピーク周囲 のノイズの影響を受けている可能性があるということです。 十分なピーク強度が得られているTPPとPy-Tagではコントラ ストが高くなる傾向が見られました。このような点から神 経伝達物質の誘導体化には、TPPが最も優れていると考えら れ、さらにコストを抑えることができる点でも魅力的な試 薬だと考えられます。

次のページからは、アミノ酸と他の神経伝達物質も含め た各OTCD試薬でのイメージング結果を示します。この実験 では最も分子量の小さいグリシンから最も分子量の大きい トリプトファンを含むように、それぞれのOTCD試薬に応じ た質量範囲を設定して測定を行い(表3参照)、一度に多数 の分子を検出することを試みました。なお、プロリンにつ いては、誘導体化を行うことができる官能基が存在しない ため誘導体化はできませんが、便宜的にピークリストに含 めました(ピークとしては検出されていません)。

⁽E) Py-Tag-DAのマススペクトル

Gly	Ala	GABA	Ser	histamine
366.14942	380.16506	394.18072	396.15998	402.19703
creatinine	Pro	Val	Thr	Cys
404.17629	406.18072	408.19637	410.17564	412.13713
taurine	creatine	lle/Leu	Asn	Asp
416.13205	422.18687	422.21202	423.17089	424.15490
spermidine	Gln	Lys	Glu	Met
436.27528	437.18654	437.22292	438.17056	440.16844
DA	His	Phe	3-MT	NE
444.19637	446.18687	456.19637	458.21202	460.19129
Arg	5-HT	Tyr	spermine	Trp
465.22906	467.21235	472.19129	493.33313	495.20727

図6 TPPをOTCD試薬として用いた場合の神経伝達物質、アミノ酸の網羅的イメージング結果

図6はTPPを用いた場合の結果です。主要な神経伝達物質 であるGABA、DA、3-メトキシチラミン(3-MT)及びノル エピネフリン(NE)などが検出されるとともに、いくつか のアミノ酸および、それ以外の小分子代謝物(タウリン、 スペルミジンやスペルミン)が検出されています。特にス ペルミジンとスペルミンは逆転した分布を示すことがわか ります。アミノ酸についてはTPPを用いたとしても、検出で きるアミノ酸のピーク強度にばらつきがあり、全てのイ メージングができているわけではありません。この点につ いては、TPP誘導体化の今後の課題になると考えています。



図7 FMP-10を用いた場合の神経伝達物質、アミノ酸の網羅的イメージング結果

図7のFMP-10については、TPPと比べてコントラストが向 上しており、クレアチニン、タウリン、スペルミジンなど の様々な低分子代謝物やグリシン、グルタミン、トリプト ファン、フェニルアラニンなどの多くのアミノ酸を検出で きています。しかし高価な試薬であるため積極的に選択す るのは難しいOTCD試薬であると考えられます。

Gly	Ala	GABA	Ser	histamine
236.09230	250.10800	264.12360	266.10290	272.13990
creatinine	Pro	Val	Thr	Cys
274.11920	276.12360	278.13930	280.11850	282.08000
taurine	creatine	lle/Leu	Asn	Asp
286.07490	292.12980	292.15490	293.11380	294.09780
spermidine	Gln	Lys	Glu	Met
306.21820	307.12940	307.16580	308.11350	310.11130
DA	His	Phe	3-MT	NE
314.13930	316.12980	326.13930	328.15490	330.13420
Arg	5-HT	Tyr	spermine	Trp
335.17200	337.15520	342.13420	363.27600	365.15020

図8 CAを用いた場合の神経伝達物質、アミノ酸の網羅的イメージング結果

図8のCAについては反応効率が低いこととOTCD後の構造 でプラス電荷が固定されていないことから、イオン強度が 全体的に低く、グリシン、アラニン、GABAなど一部の化合 物においてのみ分布が見られました。但し、バックグラウ ンドノイズの影響を受けていると考えられます)。この結 果よりCAはiMScope QTで積極的に選択するOTCD試薬では ないと言えます。

		dina:		
Gly	Ala	GABA	Ser	histamine
250.18072	264.19636	278.21202	280.19128	286.22833
creatinine	Pro	Val	Thr	Cys
288.20759	290.21202	292.22767	294.20694	296.16843
taurine	creatine	lle/Leu	Asn	Asp
300.16335	306.21817	306.24332	307.20219	308.18620
spermidine	Gln	Lys	Glu	Met
320.30658	321.21784	321.25422	322.20186	324.19974
DA	His	Phe	3-MT	NE
328.22767	330.21817	340.22767	342.24332	344.22259
Arg	5-HT	Tyr	spermine	Trp
349.26036	351.24365	356.22259	377.36443	379.23857

図9 Py-Tagを用いた場合の神経伝達物質、アミノ酸の網羅的イメージング結果

最後に、図9のPy-Tagを用いた場合の神経伝達物質、アミノ酸の網羅的イメージング結果を見ると、CAと比較すれば分布が得られている分子数は増加しました。しかし、Py-Tagの誘導体化は、反応時に湿潤状態を保つ必要があるため、

場合によっては分子の拡散が生じる恐れがあると考えられ ます。 iMScope QTでも使用できると思われる反面、実験操 作が煩雑になると考えられます。

4. OTCD適用における戦略

これまで4つの代表的なOTCD法について紹介しました。 それぞれについて、コスト面も含め長所と短所があると述 べました。以下では、どのようなOTCD手法を選択するかを 検討する際の2つの指標について解説をしたいと思います。

1. OTCD試薬に電荷が固定される構造であること

電荷が固定されているということは、反応が終了した段 階で既に電荷を有することを意味します。このような構造 はMALDIにおいて非常にイオン化しやすい構造であり、高 感度で測定を行えることが期待されます。実際に、これま で報告されている多くのOTCD試薬はピリリウム環を有して いました。また、文献7のsupplementary Informationでは 11種の誘導体化試薬を合成し、得られる強度について比較 をしています。11種のうち2種については2-fluoro-1methylpiridinを有しているにもかかわらず、イオン強度の 向上が見られていませんが、報告されている大多数の試薬 については高感度化が達成されていることから、電荷固定 が重要な要素の一つであると考えられます。

2.反応操作が簡便であること

反応操作が簡便であるということは、試薬を試料表面に 供給すれば反応生成物が得られることを意味します。これ は別の見方をすれば、試薬の反応効率が非常に高いことを 意味します。試薬を供給し、反応が室温で湿潤状態を保た ずとも進行することは、図9でも述べたとおり分子の拡散を 減少させるためにも重要であると考えられます。また、拡 散を減少させることで、より高い空間分解能のMSI結果を得 ることが可能となります。

また文献1-3で紹介されているジラール試薬Tも非常に反 応性の高い試薬であり、試料表面に試薬を供給するだけで 速やかに誘導体化反応が進みます(ジラール試薬はステロ イドホルモンのうち、3位のカルボニル基に主に反応しま す)。このように、反応操作が簡便であることによって、 前処理条件検討のパラメーターを減らし、最適化すること が可能になると考えられます。

筆者らのグループでは、前処理条件検討の際に、反応温 度は室温を基本条件とし、(湿潤状態にせず)試薬濃度、 溶媒pHおよび反応時間のみを条件として、最適条件を検討 するようにしています。

5.まとめ

近年様々な分子に対するMALDI-MSIを用いたイメージン グに期待が集まっています。様々な分子を可視化したい、 という要望に応えていくためには、試料前処理法の改良が 必須であると考えられます。本アプリケーションノートで は、試料前処理法の一つの手段として、神経伝達物質やア ミノ酸のイメージングで用いることが可能な代表的な4つの OTCD試薬について詳細を解説しました。サンプル調製の最 適条件(試薬の塗布方法や反応時間)などを変更すること で、それぞれのOTCD試薬でさらに感度を上げることも可能 になると考えられますが、現状でiMScope QTを用いた場合 に、最もコストを抑えて、最も簡便に使えるOTCD試薬は TPPが最適であると考えられます。今後、自動試薬噴霧装置 であるiMLayer™ Aeroと組み合わせることで、より様々な分 子に対して高感度で再現性の高いアプリケーションになる ことが期待されます。また、本アプリケーションノートで 取り上げた神経伝達物質やアミノ酸以外にも、誘導体化の ターゲットとなる分子種が存在します。それらの分子種も 将来可視化できるよう、今後もOTCD手法の開発を進めてい きたいと考えています。

<参考文献>

- 1) Sugiura Y, Takeo E, Shimma S et al. Aldosterone and 18-Oxocortisol Coaccumulation in Aldosterone-Producing Lesions. Hyertension, 72, 1345 (2018)
- Shimma S et al. Microscopic visualization of testosterone in 2) mouse testis by use of imaging mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 408, 7607 (2016)
- Takeo E et al. Tandem Mass Spectrometry Imaging Reveals 3) Distinct Accumulation Patterns of Steroid Structural Isomers in Human Adrenal Glands. Anal Chem. 91, 8918 (2019)
- Matsuyama R, Okada Y, Shimma S. Metabolite alteration 4) analysis of acetaminophen-induced liver injury using a mass microscope. Anal Bioanal Chem. 414, 3709 (2022)
- Lanaia I.L.M et al. A new approach for the analysis of amino 5) acid neurotransmitters in mouse brain tissues using DESI imaging. Int J Mass Spectrom, 471, 116730 (2022)
- 6) Nagano E, Odake K, Shimma S. An Alternative Method for Quantitative Mass Spectrometry Imaging (q-MSI) of Dopamine Utilizing Fragments of Animal Tissue. Mass Spectrom (Tokyo), 12, A0128 (2023)
- 7) Shariatgorji M et al. Comprehensive mapping of neurotransmitter networks by MALDI-MS imaging. Nat Methods, 16, 1021 (2019)
- 8) Manier M.L et al. A derivatization and validation strategy for determining the spatial localization of endogenous amine metabolites in tissues using MALDI imaging mass spectrometry. J Mass Spectrom., 49, 665 (2014)
- Shikano H et al. Optimization of the use of Py-Tag for next 9) generation derivatization reagents in imaging mass spectrometry. J Biosci Bioeng., 134, 264 (2022)

iMScope、iMLayer、およびIMAGEREVEAL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。



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、体外診断用医薬品として 承認・認証等を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその 手続き上で使用することはできません。

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。 本文中に記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 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。

初版発行:2024年9月