

質量分析装置を用いたマウス脳の分子イメージング

玉 井 幸 恵

Molecular Imaging in Mouse Brain with MALDI-TOF-MS

Sachie ODA-TAMAI

緒 言

ヒトゲノム完全解読宣言がなされた2003年以降、ゲノムからプロテオームへと研究がシフトし、プロテオミクスの時代が幕を明けることになる¹⁾。プロテオミクスとは、何らかの条件下における細胞、組織内の全てのタンパク質の動態変化を研究対象とする技術手段であり、高分解能タンパク質分離技術と高度なマスペクトル技術に基づき、試料中のタンパク質の種類と含有量をハイスループット、系統的に分析、鑑定することができる。二次元電気泳動と併用される Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation (MALDI)-time of flight (TOF) Mass Spectrometry (MS) は、プロテオーム解析において最も普遍的に用いられる質量分析技術である。試料にマトリックス（レーザーエネルギーを吸収する物質）を混合したものにレーザーを照射し、マトリックスを励起することによりイオン化した試料を高真空中で電場を利用して飛行させその飛行時間を測定し、ペプチドまたはタンパク質スタンダードの飛行時間を元に試料の質量数を計算することができる。この結果を元に、データベースからタンパク質を同定する事が可能になり、診断や創薬ターゲットとしてのバイオマーカー探索へと応用されている^{2),3)}。さらに、病気とは直接関係ないが、ヒトの老化に関するプロテオーム解析から、皮膚の老化に関するタンパク質が発見され、化粧品開発へと生かされている⁴⁾。

近年、タンパク質分子の組織内局在性を調べる方法として、質量分析装置を利用した分子イメージングが提案され、注目を集めている⁵⁾。本学共同研究センターに設置された質量分析装置もその機能を備えている。筆者は行動異常マウス脳のプロテオーム研究を行っている。脳内におけるタンパク質分子の局在性を含めた変化を捕まえることができれば、診断、創薬研究へと発展させる事が可能である。そこで、本研究では正常マウス脳の分子イメージングを試みた。

実 験 方 法

1. 試料切片の調製と準備

Mouse Brain（フナコシ株式会社）を -80°C で保存し、クライオスタット（LEICA, CM1950, Wetzlar, Germany）で、厚さ $10\ \mu\text{m}$ の冠状断凍結切片を作成した。切片は、5枚に1枚をサンプリングし、スライドガラス1枚に3切片をのせた。質量分析用には、導電性の金コロイドスライドガラス（Bruker Daltonics, Bremen, Germany）を使用した。質量分析の前処理として、70%エ

タノール, 15 sec を 2 回, 99.9% エタノール, 15 sec で洗浄したのち, 風乾した。

2. 質量分析 Imaging Mass

導電性顕微鏡用スライドガラス上の脳切片の顕微鏡デジタル画像を作成した。その後スライドガラス上の脳組織切片にマトリックスとして, Sinapinic acid (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) を 0.1% TFA-アセトニトリル (1:1) 飽和溶液を均一に噴霧する事を 7~8 回繰り返した。デシケータ中にて乾燥させた後, スライドアダプターに装着し, Ultraflex 質量分析装置 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) にて測定した。測定ソフト Flex imaging を用いて, 測定用 method は, LP3-20kDa で, 70 μm 間隔でレーザー強度 50%, ショット数 50 で行った。脳組織 1 枚あたり 8 時間程度測定に要した。

3. 画像解析

解析ソフト (Flex imaging) に読み込んだ顕微鏡画像上に, 質量分析データを重ねて表示し, 特定の質量数, 質量グループの強度分布を視覚化した。

結 果

マウス脳冠状断切片の質量分析イメージングマスマデータの中から, 特徴的なデータが得られた顕微鏡画像の想定される脳組織の部位を図示した (図 1)。

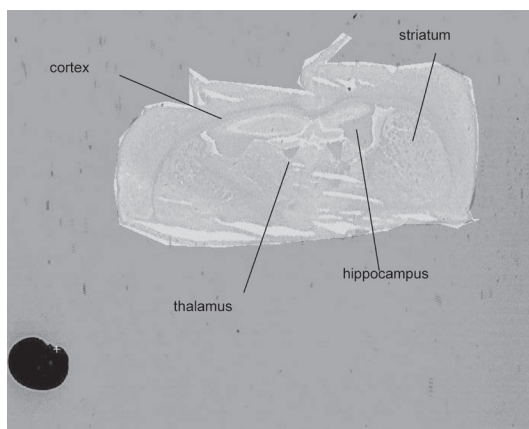


図 1 Mouse Brain overview.

この切片全体の 7500 箇所スポットから得られたスペクトル結果を比較し, 特徴的であった, 海馬 (hippocampus), 視床 (thalamus), 大脳皮質 (cortex), 線条体 (striatum) の各 1 部位から得られたスペクトルを分子サイズ 2,400–15,000 の範囲で図 2 に示した。

スペクトルデータから, 解析ソフト (Flex analysis) を用いてピークを検出し, S/N 比が 300 を超えたものを順に表 1 に示した。

検出されたピークの数, 海馬, 視床, 大脳皮質, 線条体, それぞれ, 7, 17, 9, 5 であった。各組織に特徴的な分子サイズ, 4805, 6715, 8565, 14157 の 4 ピーク範囲をスポットの濃淡

で表し、イメージングしたものを図3に示した。

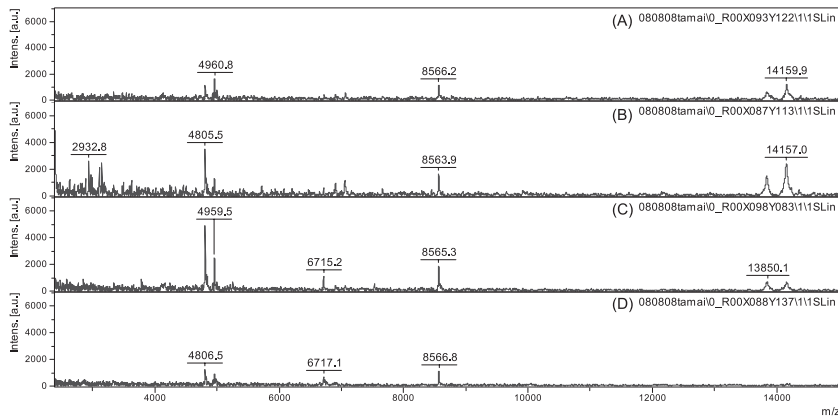


図2 MALDI-TOF-MS Spectra of hippocampus (A), thalamus (B), cortex (C), and striatum (D).

表1 Mass list of the peak (S/N >300) in MALDI-TOF-MS Spectra (m/z >2400)

No.	hippocampus	thalamus	cortex	striatum
1	4960.84	2403.19	4806.68	4806.54
2	14159.86	4805.51	4959.51	8566.79
3	4807.63	2932.85	8565.27	4960.68
4	8566.20	3145.78	4825.14	4822.59
5	4999.58	14156.97	4843.73	6717.05
6	2404.89	3108.65	6715.20	
7	3337.78	8563.88	2405.74	
8		2971.37	2846.12	
9		13841.28	3781.62	
10		4820.67		
11		2989.93		
12		4959.51		
13		2886.69		
14		2632.12		
15		7058.83		
16		3631.63		
17		2414.64		

分子サイズ 4805, 6715, 14157 の分布は、脳組織の部位と重なっており、組織特異的なタンパク質である可能性が示された。一方で、分子サイズ8565は、脳組織全体に広がっており、脳全体に存在するタンパク質である可能性が示された。ここに示した組織の他に2切片で同様な実験を行ったが、ほぼ同じ結果が得られた。

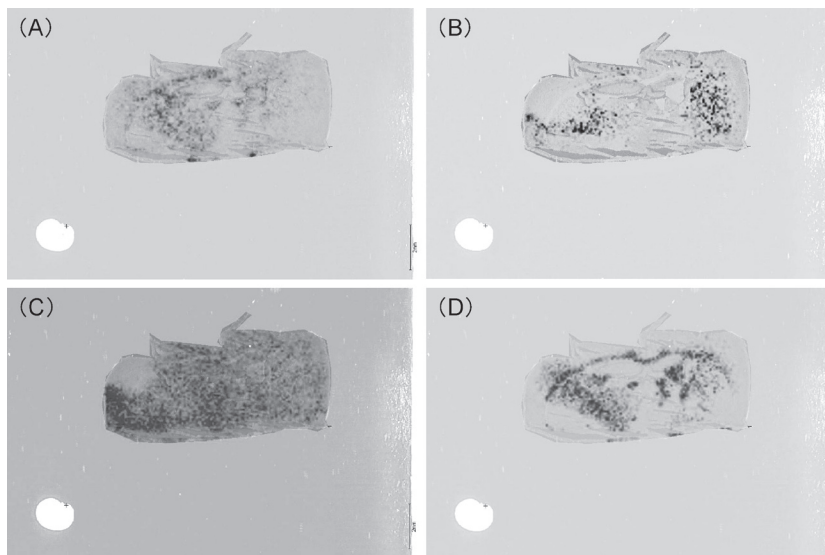


図3 Molecular Imaging of the protein detected at 4805(A), 6715(B), 8565(C), and 14157(D) m/z.

さらに、結果は示さなかったが、マウス脳ホモジネート全体を用いて質量分析した所、イメージング解析データ全体のスペクトルとは若干異なっていたが、主要なピークはほぼ検出された。現在、6,000以下の代表的なピークについて、MS/MS解析を行って、タンパク質の同定を試みている。

考 察

マウス脳組織の部位と特徴的なタンパク質分子の分布を重ねて示す事が可能となった。また、今回はモノクロ画像で示したが、各タンパク質で色を変えることにより、重ねて表示する事ができる。多重画像解析の結果からは、組織の部位とタンパク質の分布は一致しているものがある事が示された。一方で、スペクトル解析から組織特異的に見えても、画像解析では全体に分布しているように見えるタンパク質もあった。抗体を用いた組織染色に比較し、経済的、時間的に有利な方法であり、組織特異的なタンパク質を絞り込む初期スクリーニング手段として非常に有効である。

一方、マウス脳イメージング測定において、質量分析装置の限界検出分子量は2万5千程度であった。また、マトリックスを使用する限り、マトリックス分子の混入が避けられないため、分子量1000以下のペプチドの解析は困難である。今回の測定においてもこの検出限界は歴然として課題として残った。さらに、イメージングは等間隔で全データを検出して保存する方法であるため、検出域を広げる事は難しい。そのため、これまでの脳内イメージング解析は脂質に関する報告が多い⁶⁾。これらの問題点を解決するため、まず最初に、より高分子タンパク質解析の試みを現在行っている。

質量分析装置によるイメージングは、これまでの組織染色、抗体を利用したタンパク質分布同定に比べると、経済的、実験スピードの点でメリットがある。また LIFT での解析が可能な分子

量6000までに関しては、タンパク質同定まで行い、抗体では捕まえられなかった結果を得ることも可能である。今後のマウス脳プロテオーム解析における強力なツールになる分子イメージングが本学の装置で研究可能であり、検出範囲内のタンパク質に関しては、十分に同定可能であることが示された。

参 考 文 献

- 1) Anderson NL and Anderson NG: Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 19(11), 1853-61, 1998.
- 2) Wang JH and Hewick RM: Proteomics in drug discovery. *Drug Discov. Today*. 4(3), 129-133, 1999.
- 3) He QY and Chiu JF: Proteomics in biomarker discovery and drug development. *J Cell Biochem* 89(5), 868-86, 2003
- 4) Laimer M, et al: Proteomic profiling reveals a catalogue of new candidate proteins for human skin aging. *Exp Dermatol*. 19(10), 912-918, 2010.
- 5) Cornett DS, et al: MALDI imaging mass spectrometry:molecular snapshots of biochemical systems. *Nature methods* 4(10), 828-833, 2007.
- 6) Murphy RC, et al: Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry. *J. Lipid Res. Suppl.* S317-S321, 2009.

謝 辞

マウス脳の組織切片作成にあたり、ご指導、ご協力を頂いた森田泰博教授、質量分析装置使用にご協力を頂いた久保貴紀助教に深く感謝いたします。

Summary

Molecular Imaging with MALDI-TOF-MS has been emerged as a powerful technique that is particularly useful in the detection of the distribution of molecules within biological systems. Determining molecular distribution in mouse brain, Images are generated from individual spectrum data obtained from 75000 spots. Then, the spectrum data obtained from hippocampus, thalamus, cortex and striatum were compared. This allows the discovery of protein markers that are highly located within specific tissue structures. From the viewpoints of cost-effectiveness and time-consuming factor, molecular imaging with MALDI-TOF-MS is preferable in comparison to the imaging with antibody dying as a primary screening to narrow down the candidates of proteins that are located in the specific tissue.

[2011. 9. 29 受理]