

<平成24年度助成>

## 質量分析イメージングによる生体組織内における 機能性食品因子の局在解析

立花 宏文

(九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門)

### 緒言

(-)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG、 $C_{22}H_{18}O_{11}$ 、精密質量:458.08489)は緑茶 (*Camellia sinensis* L.) 以外での植物では見出されていない特殊な成分であり、その生理活性が他のカテキン類と比べて強い。その生理活性には抗酸化作用、抗腫瘍作用、発ガン抑制作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、血圧上昇抑制作用、血糖低下作用、心疾患抑制作用等が報告されている<sup>1,2)</sup>。このような多彩な生理作用が報告されているEGCGの生理活性発現のメカニズム解明には、EGCG自身の厳密な組織内空間分布の把握が必要不可欠である。しかしながら、現状では、低分子であるEGCGの組織内における空間分布情報は明らかにされていない。これはEGCGの局在を簡単に測定できる分子イメージング技術の欠如が原因の一つである。

現在、分子イメージング、つまり、生体内での分子プロセスの可視化に関する基礎的・臨床的研究および開発された可視化手法を利用する応用研究が盛んに行われている。その中でも、細胞・組織レベルでの分子イメージングでは、Green Fluorescent Protein (GFP) などの蛍光タンパク質や他の蛍光色素を利用した光学イメージングが主に用いられている。しかしながら、生体内低分子化合物の組織微小領域での可視化は非常に難しいのが現状である。

一方、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI; Matrix Assisted Laser Desorption/

Ionization) 法を基盤とした質量分析イメージング法 (Mass Spectrometry Imaging, MSI) は、近年タンパク質、ペプチド、脂質など生体高分子の局所変動を非標識で捉える *in situ* 生体分子マッピング法であり、新たな分子イメージング法として注目を集めている分子イメージング技術である<sup>3-5)</sup>。イオン化は、サンプルとマトリックスと呼ばれる有機低分子化合物の混合物にレーザー光を照射することで起こる。その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていないが、マトリックスがレーザー光を吸収し、エネルギー仲介物質となると考えられている。また、得られるマススペクトルはサンプルとマトリックスの混晶の状態に大きく左右されることが知られている。しかしながら、MALDI法自体が持つ欠点(定量性・再現性の悪さ・マトリックスイオンによる妨害)のため、細胞膜脂質や骨格タンパク質など、組織中に圧倒的少量に存在し、かつ分子量が比較的大きな分子群の定性的な分布観察のみにその適用が制限されていた。

これに対して、我々はMALDI-MSを用いて薬剤や食品因子の新たな表現型解析を可能にし、既存の常識を覆す生体内代謝物の超高感度 (attomole レベル) 測定法および微量細胞からの非標的型代謝物検出法、ならびに細胞内代謝動態の秒スケール追跡法の開発に成功した。さらに、上記技術を応用することで、単一細胞レベルの検出感度で多彩な代謝物を二次元可視化できる超高感度MSイメージング法を開発し、生体組織微小領域における代謝ダイナミクスを明らかにして

いる<sup>6-8)</sup>。

そこで本研究では、非標識で低分子化合物を可視化できる MALDI-MSI を開発し、これまで追跡不可能であった EGCG の組織内における分布情報の可視化を試みた。

## 実験 1. MALDI-TOF-MS による EGCG イオン化に向けたマトリックスの探索

### 材料と方法

#### 1-1. 384 well MALDI サンプルプレート上における検討

100  $\mu$ M EGCG と各種のマトリックス溶液 (10 mg/mL 100 % methanol, acetone 若しくは acetonitrile) をそれぞれ等量混合し、384 well MALDI サンプルプレートに 1  $\mu$ L アプライした ( $n=5$ )。また、コントロール群として各溶媒とマトリックスをそれぞれ等量混合したものも同様にアプライした。プレート上のサンプルを風乾させた後に、MALDI-TOF-MS (AXIMA Performance, Shimadzu, Japan) に供し、positive ion mode 若しくは negative ion mode それぞれのサンプルを測定した。データ解析はマトリックスと EGCG との混合サンプルで得られた強度からコントロールとして用いたマトリックスと溶媒の混合サンプルの強度を引いた値を強度として扱った。

#### 1-2. マウス肝臓組織切片上における検討

C57BL/6J (雄性、6 週) マウスに頸椎脱臼処置を施し、頭部を液体窒素により瞬間凍結した。その後即座に、氷上においたスチールトレーの上で肝臓を摘出し、組織は OCT Compound で埋包し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。後日、クライオスタットを用いて 10  $\mu$ m の薄片を作成し、ステンレスプレートに張り付けた。そのステンレスプレートを MALDI イメージング用プレートに導電性テープで固定した。サンプルは、100  $\mu$ M EGCG と各マトリックス溶液 (10 mg/mL acetone) をそれぞれ等量混合した。それを組織上に 1  $\mu$ L アプライし

た後、MALDI-TOF-MS に供し、各スポットでの強度を測定した。

#### 1-3. マウス組織切片上における EGCG スポットの可視化検討

EGCG (5, 50, 500  $\mu$ M) をマウス肝臓、腎臓、脳組織切片上に各 0.2  $\mu$ L ずつアプライした。サンプルを風乾させた後、1,5-DAN 溶液 (10 mg/mL acetone) をスプレーコーティング法により約 500  $\mu$ L 塗布した。そのステンレスプレートを MALDI イメージング用プレートに導電性テープで固定した後に MALDI-TOF-MS に供した。サンプルのサイズに合わせて測定サイズを調節し、レーザーを照射した。また、各スポットにおいて 10 回のレーザーショットを積算したスペクトルの平均値を、それぞれのスポットの強度とした。得られたデータを Biomap で解析することで、イメージング画像を得た。

### 結果

質量分析における選択性と検出感度を決定づける最大の要因は対象物質のイオン化効率にあり、特に MALDI-MS ではマトリックスと呼ばれる物質のイオン化を促進する化合物 (イオン化助剤) が標的物質のイオン化の成否を決定づけている。しかしながら、現状では EGCG のような微量低分子化合物をイオン化できる有用なマトリックス情報はほとんど無い。そこで、EGCG のイオン化に最適なマトリックスの探索とその最適な条件を検討した。

まず、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB),  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), sinapic acid (SA), 9-aminoacridine (9-AA) など MALDI-MS へ最も汎用されているマトリックスを含む 41 種類の化合物を用いて、EGCG のイオン化に最適なマトリックスを検討した。その結果、1,5-diaminonaphtalene (DAN), Ferulic acid, Harmine, Norharmane, Harmane が EGCG に対する高い検出能 (pmol オーダー) を示した。また、

このような差は negative ion mode の場合にのみ見られた。Positive ion mode の場合には、今回用いた全ての候補分子については大変強度が弱く、EGCGを検出できなかった。このことより MALDI 法において、今回用いたマトリックス候補化合物に対しては、EGCGは負に帯電しやすくなると考えられる(表1)。

EGCGを高感度に検出できた5種類のマトリックスについて、マトリックスを溶かす溶媒の影響について検討した。その結果、それぞれのマトリックスについて各種溶媒で検出強度に大きな差が見られた。これらの中で、特に、1,5-DANを acetone へ溶かした場合顕著に EGCG に対する高い検出能を示した(図1A)。

マトリックスのさらなるスクリーニングを行うため、実際の標的組織である肝臓組織切片上での検討を行った。サンプルには EGCG とマトリックスの混合液を用いた。その結果、MALDI サンプルプレート上では強い強度を示していた Ferulic

acid, Harmine, Norharmane, Harmane, Harmine は著しくその強度が弱くなった。組織上においては、組織そのものの共雑物が非常に多くイオン化が起きにくい状態であると考えられる。また、Ferulic acid はサンプルプレート上では比較的強い強度を示していたが、今回の組織上における検討では、全く EGCG を検出することができなかった。一方、1,5-DAN のみにおいてはその強度は組織上においても強い強度を示し、EGCG を高感度に検出することができた(図1B)。

次に、実際の測定条件を想定して、1,5-DAN のマウス組織切片上に EGCG のみをスポットし、そこにマトリックスを塗布してイメージング解析を行った。その結果、マウス肝臓と腎臓では 5 pmol/spot から、脳では 50 pmol/spot の EGCG を検出し、二次元イメージング化することができた(図2)。

以上のことから、1,5-DAN が EGCG のイオン化に最適なマトリックスであることが明らかとなった。

表1. MALDI-MSを用いた各種マトリックスによるEGCGイオンの検出強度

Chemicals	Intensity		Chemicals	Intensity	
	Negative	Positive		Negative	Positive
DHB	58	0	Acridine	25,233	0
CHCA	0	0	9-AA	16	0
SA	512	0	3,6-AD	0	0
HPA	1,007	0	3-AQ	537	0
5-ASA	0	0	6-AQ	5,072	0
Salicylamide	293	0	4-AP	25	0
DHAP	262	0	4-NA	62	0
THAP	9,716	0	1,5-DAN	75,808,529	0
HABA	1,467	0	DMAN	0	0
Caffeic acid	10,581	0	2-NSA	0	0
Ferulic acid	50,736,468	0	5-FU	25	163
Anthranilic acid	0	0	MTX	1,831	0
2-AB	208,205	0	NFR	0	0
IAA	216,431	0	RB	0	2,672
Dithranol	89	0	Diamond	0	0
Norharmane	48,008,145	0	Silver	0	0
Harmane	22,721,474	0	Colloidal	0	0
Harmol	1,898	0	TiO <sub>2</sub>	0	0
Harmaline	0	0	SiO <sub>2</sub> TiO <sub>2</sub>	0	0
Harmalol	43,260	0	BaTiO <sub>3</sub> StTiO <sub>3</sub>	0	0
Harmine	25,206,089	0			

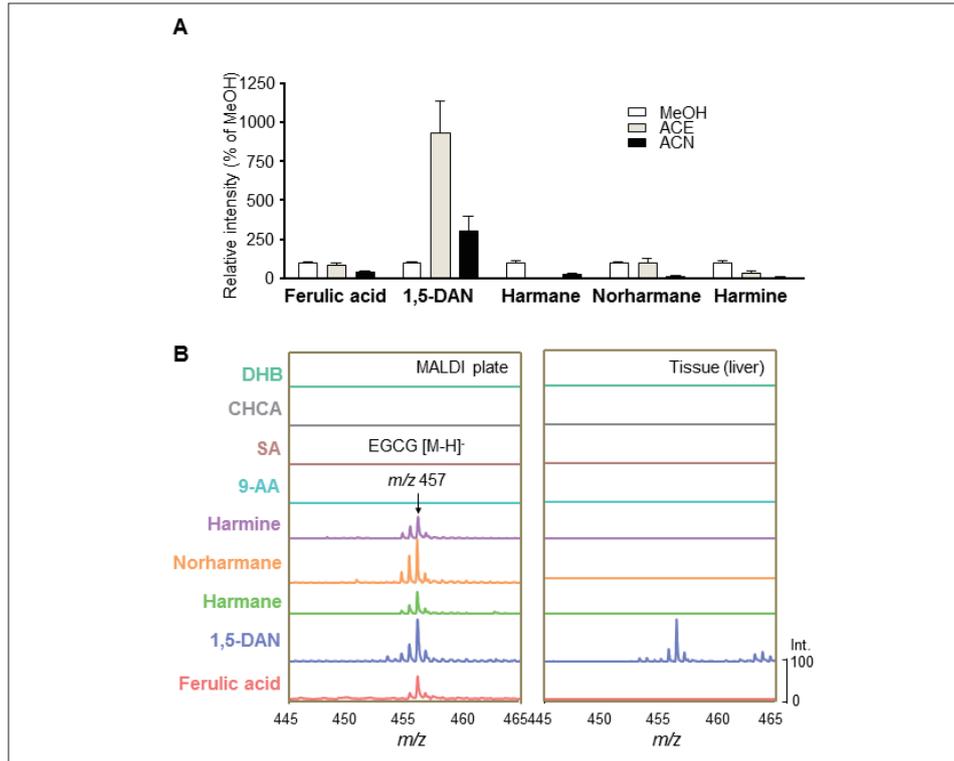


図 1. MALDI-MS による EGCG イオン化に向けた最適な条件の検討 (A) 各マトリックスにおける EGCG イオン検出強度に及ぼす溶媒の影響。10 mg/mL となるように 100% methanol, acetone, acetonitrile それぞれに溶かした各マトリックスと 100  $\mu$ M EGCG 混合物 1  $\mu$ L を MALDI サンプルプレートにアプライし、MALDI-TOF-MS により negative ion mode で測定した (mean  $\pm$  S.D., n = 5)。(B) MALDI サンプルプレートとマウス肝臓組織切片における EGCG イオン検出における影響。100  $\mu$ M EGCG と各マトリックス溶液 (10 mg/mL in acetone) をそれぞれ等量混合し、MALDI サンプルプレート若しくはマウス肝臓組織切片上にアプライし、MALDI-TOF-MS により negative ion mode で測定した。

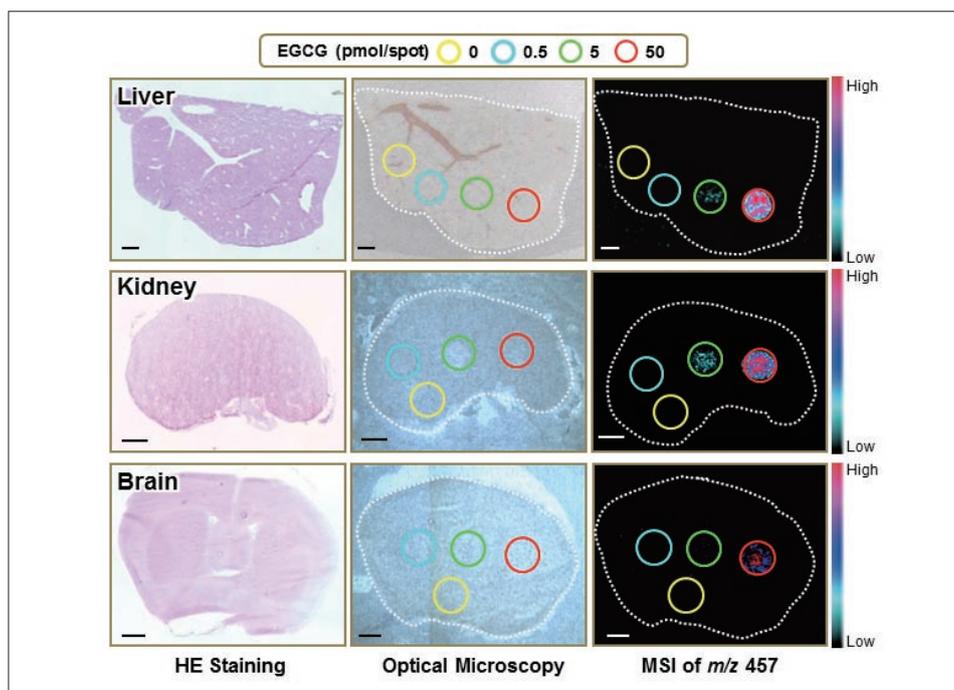


図 2. 1,5-DAN を用いた MALDI-MS によるマウス各組織切片における EGCG イオンの可視化。EGCG (5, 50, 500  $\mu$ M) をマウス組織切片上に各 0.2  $\mu$ L ずつアプライした後、1,5-DAN 溶液 (10 mg/mL acetone) を塗布し、MALDI-TOF-MS により negative ion mode で測定した。得られたデータを Biomap で解析することで、m/z 457 イオンイメージング画像を得た。

## 実験 2. EGCGを経口投与したマウス組織におけるEGCGの質量分析イメージング

### 材料と方法

#### 2-1. EGCGの経口投与とサンプルの調整

C57BL/6J (雄性、6 週齢) マウスを 6 時間の絶食後、EGCG を 2000 mg/kg body weight となるように強制経口投与した。Control 群として、生理食塩水を投与した。EGCG 投与 1 時間後、マウス肝臓、腎臓、脳を摘出し、各組織内の EGCG レベルを測定するため、一部の組織は解析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

#### 2-2. LC-IT-TOF-MSを用いた各組織におけるEGCGレベルの測定

凍結組織を約 50 mg 切り出し、ホモジナイズ用チューブにビーズとともに入れた。そこにアスコルビン酸を 50 mg/200  $\mu\text{L}$  となるように添加した。4,800 rpm, 30 秒間の条件で 2 回 (インターバルは 30 秒間) ホモジナイズした。その後、 $4^{\circ}\text{C}$ , 15,000 x g, 30 分間遠心分離した。その上清 100  $\mu\text{L}$  をエッペンに回収した。そのエッペンに等量 (100  $\mu\text{L}$ ) の酢酸エチルを添加した。 $\text{N}_2$  ガス下でドライアップし、10% acetonitrile 100  $\mu\text{L}$  に再溶解した。検量線を引くため EGCG 標品も各濃度となるよう調製した。各サンプルを注入量 3  $\mu\text{L}$  で LCMS-IT-TOF-MS (Shimadzu) に供し、測定を行った。移動相は (A) 100% 超純水、0.05% Formic acid、(B) 100% Methanol、0.05% Formic acid としグラジエント溶出を行った。流速は 0.1 mL/min で、B buffer 濃度が、0-2 min, 5%; 2-7.5 min, 5-60%, 7.5-17 min, 60-100%; 17-23 min, 100%; 23-24 min, 100-5%; 24-30 min, 5% の条件でグラジエントをかけた。カラムは Luna 5u C18 (2) 100A (Phenomenex) を用いた。UV スペクトルは 210 nm、280 nm で検出した。Electrospray ionization (ESI) によりイオン化を行い、negative ion mode でデータを得た。

#### 2-3. 1,5-DAN を用いたMALDI-MSイメージングによる組織切片でのEGCG分布の可視化

OCT Compound で埋包した組織サンプルをクライオスタットを用いて薄片を作成し、ステンレスプレートに張り付けた。組織上には positive control として 250  $\mu\text{M}$  の EGCG 0.2  $\mu\text{L}$  をスポットした (50 pmol/spot)。サンプルを風乾させた後、1,5-DAN 溶液 (10 mg/mL acetone) をスプレーコーティング法により塗布した。ステンレスプレートを MALDI イメージング用プレートに導電性テープで固定した後に MALDI-TOF-MS に供しレーザーを照射した。また、各スポットにおいて 10 回のレーザーショットを積算したスペクトルの平均値を、それぞれのスポットの強度とした。得られたデータを Biomap で解析することで、イメージング画像を得た。

#### 2-4. 1,5-DANを用いたMALDI-FT-ICR-MSによるイメージ画像の同定

組織切片上から得られたピークイメージの同定は超高分解能フーリエ変換イオンサイクロトン共鳴質量分析装置 (MALDI-FT-ICR-MS, Bruker Daltonk GmbH) にて行った。具体的には、OCT Compound で埋包した組織サンプルをクライオスタットを用いて薄片を作成し、ステンレスプレートに張り付けた。組織上には positive control として 250  $\mu\text{M}$  の EGCG 0.2  $\mu\text{L}$  をスポットした (50 pmol/spot)。サンプルを風乾させた後、1,5-DAN 溶液 (10 mg/mL 80% acetone) をスプレーコーティング法により約 500  $\mu\text{L}$  塗布した。ステンレスプレートを MALDI イメージング用プレートに導電性テープで固定した後、MALDI-FT-ICR-MS に供した。実際、サンプルから得られたピークのデータとターゲット分子の同位体 (CHONPS 要素) の天然存在比から算出された理論ピークを比較することで、ピークの同定を行った。

## 結果

EGCGを経口投与したマウス肝臓、腎臓、脳でのEGCGのイメージングを試みた。そのために、まず、EGCGを投与したマウス組織内のEGCGレベルをLC-IT-TOF-MSを用いて測定した。その結果、EGCGを2,000mg/kg body weight投与したマウスの肝臓と腎臓組織にはEGCGと思われる $m/z$  457マススペクトルピークが見られた。このサンプルに対してMS/MS解析を行ったところ、EGCG標品と同様のマススペクトルピークが見られた(図3A)。これより、EGCGを投与したマウス肝臓( $149.55 \pm 37.51$  nmol/g Liver)と腎臓( $11.17 \pm 1.82$  nmol/g Kidney)組織中には、 intactな状態のEGCGが存在していることがわかった(図3B)。

そこで、これらの二つの組織におけるEGCG

分布の可視化を1,5-DANを用いた質量分析イメージングを行った結果、両臓器でEGCGと思われる $m/z$  457のイメージ画像がEGCG投与群のみに認められた(図4A)。

次に、 $m/z$  457ピークのイメージ画像が本当にEGCGであることを確かめるためピークの同定を行った。一般的に、検出されたピークを同定するには標品のMS/MS情報が必要不可欠である。しかし、生体内で観察されるピークの多くは標品がなく、また、微量レベルであるため、たとえ標品があったとしてもMS/MSでのピーク同定が困難な場合が多い。そこで、我々は今回用いたTOF-MSのような従来の装置よりも極めて高い質量分解能( $>100,000$ )と質量精度( $<1$ ppm)での高感度測定が可能であるMALDI-FT-ICR-MSを用いて<sup>9)</sup>、 $m/z$  457ピークの同定を試みた。EGCG

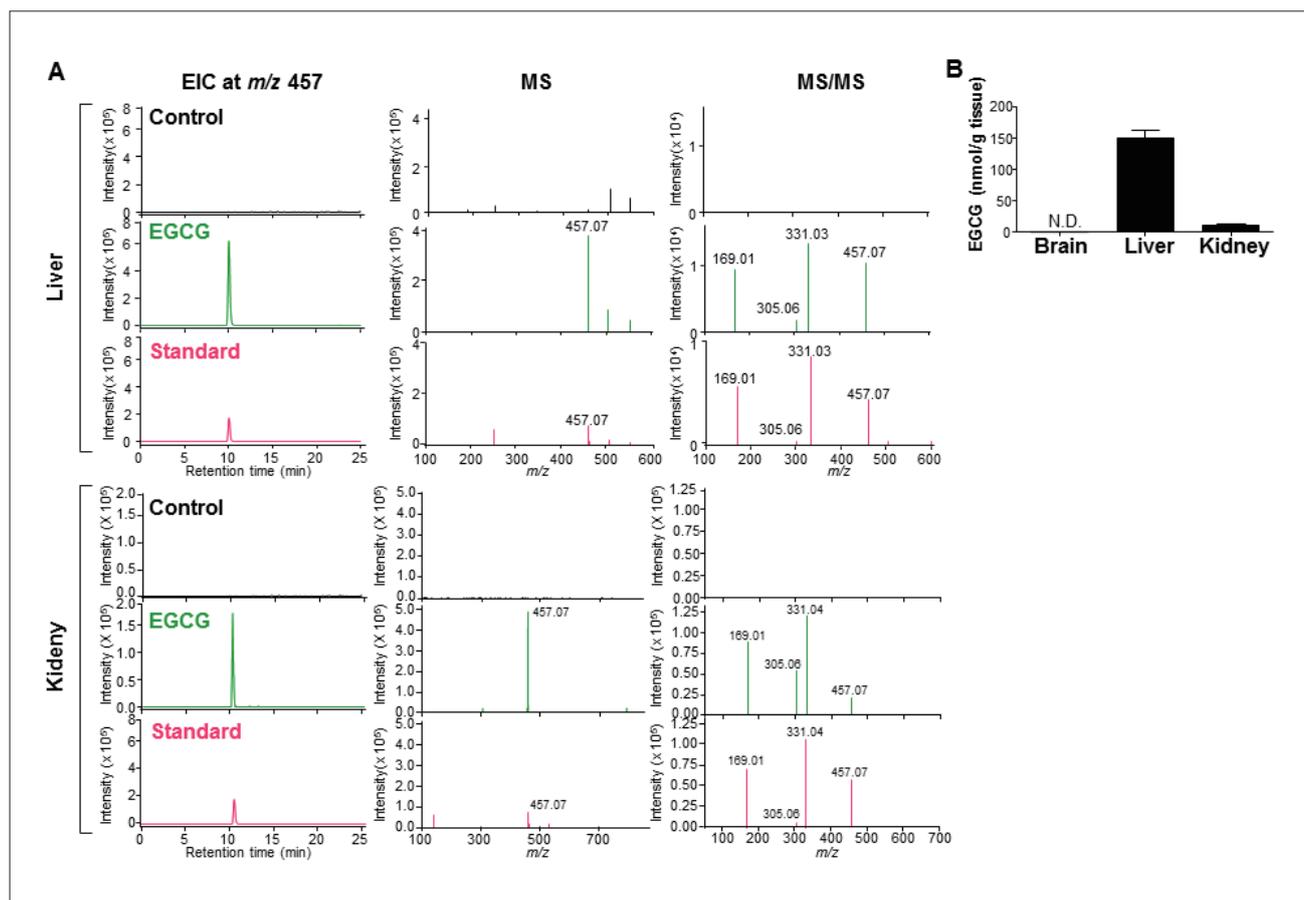


図3. EGCGを経口投与したマウス組織におけるEGCGの同定と定量化。(A)EGCGを投与したマウス肝臓と腎臓抽出物におけるLC-MSを用いた $m/z$  457ピークの同定 (B)LC-MSを用いた各組織におけるEGCGのレベル検討(mean  $\pm$  S.D., n=6)。

を投与したマウスの肝臓と腎臓組織切片から得られたピークと同位体の天然存在比から算出されたEGCGの理論ピークを比較した結果、第二同位体まで理論ピークと同様のピークが得られたことから、肝臓と腎臓組織切片から得られた  $m/z$  457 イメージ画像は確かにEGCGであることが示された(図4B)。また、興味深いことはEGCGの分布は肝臓では一様なのに対し、腎臓における分布は部位により異なることが初めて明らかになった(図4A)。

## 結 論

多彩な生理作用が報告されている緑茶カテキンEGCGの生体組織内における局在情報を可視化するため、MALDI-MSイメージング法を基盤とした質量分析イメージング法の開発を行った。EGCGをイオン化させるため、40種類以上のマトリックス候補化合物からMALDIサンプルプレート上、肝臓組織切片上におけるスクリーニングを行うことで、EGCGを高感度に検出できる

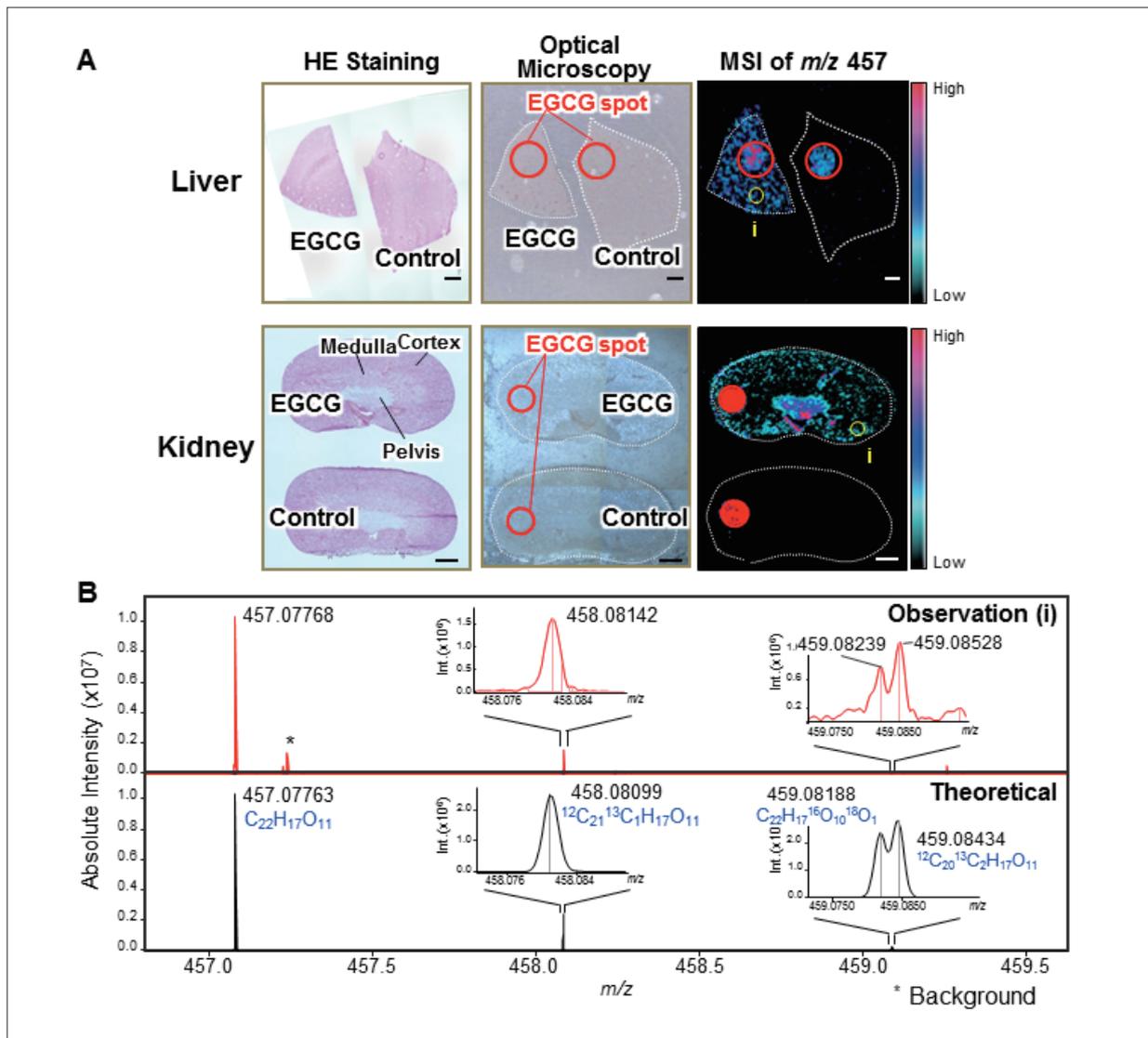


図4. 1,5-DANを用いたMALDI-MSによるEGCGを投与したマウス各組織切片におけるEGCGイオンの可視化とMALDI-FT-ICR-MSによるそのピークの同定。(A) 2,000 mg/kg body weight となるようにEGCGを経口投与したマウス肝臓と腎臓組織切片へ1,5-DAN溶液(10mg/mL acetone)を塗布し、MALDI-TOF-MSによりnegative ion modeで測定した。得られたデータをBiomapで解析することで、 $m/z$  457イオンイメージング画像を得た。(B)(A)のサンプルをMALDI-FT-ICR-MSに供し、得られたピークイメージの同定を行った。

マトリックス 1,5-DANを見出した。さらに、本マトリックスを用いることでEGCGを投与したマウス肝臓と腎臓組織切片において、EGCGの生体組織内分布情報を非標識で可視化に世界に先駆けて成功した。今後、標的組織中の緑茶カテキンEGCGの詳細な作用機構の解明につながる事が期待される。

#### 謝 辞

本研究は(公財)浦上食品・食文化振興財団の研究助成により遂行することができました。貴財団の多大なご支援に対し心より感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Yang CS, *et al.*, Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 429-439.
- 2) Tachibana H, Green tea polyphenol sensing. *Proc Jpn Acad* 2011; 87: 66-80.
- 3) Stoekli M, *et al.*, Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med* 2001; 7: 493-496.
- 4) Shimma S, *et al.*, Mass imaging and identification of biomolecules with MALDI-QIT-TOF-based system. *Anal Chem* 2008; 80: 878-885.
- 5) Khatib-Shahidi S, *et al.*, Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI-mass spectrometry. *Anal Chem* 2006; 78: 6448-6456.
- 6) Miura D, *et al.*, Highly sensitive matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry for high-throughput metabolic profiling. *Anal Chem* 2010; 82: 498-504.
- 7) Yukihiro D, *et al.*, MALDI-MS-based high-throughput metabolite analysis for intracellular metabolic dynamics. *Anal Chem* 2010; 82: 4278-4282.
- 8) Miura D, *et al.*, Ultrahighly sensitive *in situ* metabolomic imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviors. *Anal Chem* 2010; 82: 9789-9796.
- 9) Miura D, *et al.*, A strategy for the determination of the elemental composition by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry based on isotopic peak ratio. *Anal Chem* 2010; 82: 5887-5891.

## ***In situ* label-free imaging of functional food factors in mammalian tissues by mass spectrometry imaging**

**Hirofumi Tachibana**

*Division of Applied Biological Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology  
Faculty of Agriculture, Kyushu University*

**Introduction:** The spatial distribution of bioactive small molecules from dietary compound is indispensable information for elucidating their biological effects. However, there has been no analytical technique that can easily detect the localization in mammalian tissues. Therefore, in this study we present a novel *in situ* label-free imaging technique for visualizing the localization of EGCG, a major green tea polyphenol, within mammalian tissue after oral dosing by establishing a matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) technique.

**Methods:** To effectively ionize the EGCG for MALDI-MS, the optimum matrix needs to be determined. For screening candidate matrix of EGCG, mixtures of EGCG and each chemical compound solution were directly spotted onto a stainless MALDI sample plate. These spots were measured by using MALDI-TOF-MS (AXIMA performance, Shimadzu). To examine EGCG in the tissue section, normal or EGCG-administrated C57BL/6J mouse tissues (liver and kidney) were sliced with cryostat and, then, thaw-mounted onto an ITO-coated glass slide. A 1,5-DAN solution as matrix was sprayed using an airbrush. Data were acquired in negative ionization mode with 50 $\mu$ m spatial resolution (10 laser shots/data point). To identify EGCG and its metabolites in tissues, an isotopic fine structure analysis was performed by ultrahigh-resolution Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR)-MS.

**Results and Discussion:** Among 41 chemicals as the potential matrix,  $\beta$ -carboline derivatives, CHCA analogues, and 1,5-DAN could effectively ionize EGCG on MALDI sample plate in negative ionization mode. Among such matrix candidates, only 1,5-DAN was able to visualize EGCG directly spotted onto liver and kidney sections. Furthermore, by using 1,5-DAN-based MALDI-MS, EGCG was visualized within liver and kidney sections of EGCG-administrated mouse. In addition, combination of this label-free MALDI-TOF-MSI technique and an isotopic fine structure analysis using ultrahigh-resolution MALDI-FT-ICR-MS also visualized spatially-resolved biotransformation based on simultaneous mapping of EGCG.

**Conclusion:** In conclusion, we demonstrated for the first time that MALDI-MSI could visualize an orally dosed bioactive polyphenol of green tea, EGCG in mammalian tissues without any labeling.