

氏 名 新聞 秀一

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1075 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Novel Approach to *In Situ* Analysis Using Mass Spectrometry

論文審査委員 主 査 教授 池中 一裕  
助教授 瀬藤 光利  
教授 永山 國昭  
客員教授 田口 良（東京大学）

In this thesis, he describes the exploration of mass spectrometry (MS)-based morphology. Using an up-to-date biochemical MS analysis technique [1], he applied imaging MS techniques and improved sample preparation procedures at various steps: optimization of sample sectioning [2], matrix application [3], amino acid sequencing of digested proteins on PVDF membrane transfer [4], direct tissue digestion on PVDF membrane [5], and imaging of digested proteins on a conductive film [6]. Further, he succeeded in developing techniques to visualize metabolites that could not be visualized by the conventional immunohistochemical approaches: phospholipid imaging of mouse brain [7], lipid imaging of colon cancer [8], heme B imaging of liver with colon cancer metastasis [9], and imaging of gangliosides in hippocampus [10]. With these new techniques, a distinct distribution of each ganglioside molecular species was revealed for the first time. Thus, he developed a molecular imaging technique using MS and showed the feasibility of imaging MS in physiological research into a broad range of metabolites, such as proteins, peptides, lipids, heme B, and oligosaccharides.

Chapter 1 describes post-translational modifications (PTMs) in  $\alpha$ -tubulin using a conventional proteomics approach. The carboxy-termini of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin can undergo different PTMs including polyglutamylation, which is particularly abundant within the mammalian nervous system. Using a matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole-ion-trap time-of-flight mass spectrometer (MALDI-QIT-TOFMS), he analyzed ROSA22 mice that lack functional PGs1, a subunit of  $\alpha$ -tubulin-selective polyglutamylase. By comparing mass spectra between ROSA22 and wild-type mice, he detected only monoglutamylated forms of  $\alpha$ -tubulin in brains of ROSA22 mutants. This result was reported in [1].

Chapter 2 describes the influence of tissue thickness on ionization efficiency. MS is generally used for analyzing separated and purified specimens. Recently, however, techniques for *in situ* analysis using MS, called direct tissue MS, have appeared. These techniques are becoming popular, because ion intensity maps as a function of the mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) are available from the spectrum set acquired from two-dimensional direct tissue MS. The visualization technique is called imaging MS. The thickness of tissue slices became an important factor for spectrum quality, but hardly any studies describe the correlation. He evaluated peak intensity and signal-to-noise ratio (S/N) by changing tissue thickness. Experiments showed that the use of a thinner tissue section ( $< 10 \mu\text{m}$ ) dramatically improved both signal intensity and S/N. These results were reported in [2].

Chapter 3 describes a matrix application procedure to improve spectrum quality. In conventional proteomics studies using MALDI-TOFMS, several matrix applications to make tiny and uniform matrix crystals were reported. These high-quality matrix crystals provide high-quality mass spectra. However, in direct tissue MS, such procedures have scarcely been reported. He developed a new matrix application protocol, called the spray-droplet method, to make tiny and uniform matrix crystals on the tissue surface. The effect of the spray-droplet method was such that, the peak intensity of  $m/z$  5440 in the spray-droplet spot was about 30.6 times higher than in the conventional spot on the mouse cerebrum section. These results were reported in [3]. A patent application was completed [P1]. An international patent application (PCT) was supported by the Japan Science and Technology Agency.

Chapter 4 describes the procedures of direct amino acid sequencing. Chapters 2 and 3 focus on protein analysis on the tissue surface. MS<sup>n</sup>, which performs fragmentation through collision, successfully provides the detailed structural features of ions of interest. To perform amino acid sequencing by MS<sup>2</sup> on the tissue surface, the enzymatic digestion of proteins is essential. It is difficult, however, to obtain tissue digestion conserving the spatial information. He applied an on-membrane digestion method to tissue analysis. On-membrane digestion was originally used to analyze PVDF membranes blotted from SDS-PAGE gel or 2D-PAGE gel. This method was reported as an application

for a chemical inkjet printer (CHIP-1000, Shimadzu). He considered that direct sequencing was available if proteins in the tissue section could be transferred onto PVDF membrane. He described a transfer protocol to accomplish above requirement. As a result of the experiment, he succeeded in protein digestion and amino acid sequencing. These results were reported in [4]. A patent application was completed [P2].

Chapter 5 describes another procedure of sample preparation to identify amino acid sequences. He found denaturation with heat and SDS was very effective for enzymatic digestion. He developed an improved digestion procedure conserving the positional information. The procedure was designated the on-tissue digestion method. The on-tissue digestion method was literally performed on the tissue surface prepared on PVDF membrane. These results were reported in [5].

Chapter 6 features on-tissue digestion on a conductive film having a thin indium-tin-oxide (ITO) layer on 125- $\mu\text{m}$  thick polyethylene terephthalate film. The ionization efficiency was suppressed by the nonconductive characteristic of PVDF membrane. Due to the nonconductive characteristic, imaging MS could not be obtained. Since the ITO has metal characteristics, the electrical conductivity was improved. As a result of on-tissue digestion on the ITO film, he succeeded in direct identification of myelin basic protein, histone,  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin, neurofilament, and so on. Furthermore, imaging MS of digested proteins was also successfully obtained by AXIMA-QIT. The imaging results using AXIMA-QIT were reported for the first time in this study. The setting manual of AXIMA-QIT as the imaging instrument is also described in the appendix. These results were reported in [6]. A patent application was completed [P3].

Chapter 7 describes the imaging of phospholipids in a mouse cerebellum section. Lipid analysis with positional information *in situ* is one of the most important subjects in lipid research. Lipids have two fatty acids, which are variable. It is difficult for antibodies to distinguish between fatty acids. In imaging MS, the difference was detected as the difference between  $m/z$  value; therefore he has succeeded in the visualization of phosphatidylcholines whose fatty acid structures were (C16:0-C18:1) and (C18:0-C18:1). These results were reported in [7].

Chapter 8 describes phospholipid imaging and structural analysis in colon cancer liver metastasis. After two-dimensional laser scanning, the images were reconstructed as a function of  $m/z$  from a few hundred obtained spectra. In a feasibility study, he picked up a localized signal,  $m/z$  725, in a cancerous area. The  $\text{MS}^2$  and  $\text{MS}^3$  results suggested that  $m/z$  725 was sphingomyelin (16:0)+Na. This result was reported in [8].

Chapter 9 describes cancer imaging; however, he focused on the low-intensity signal in the cancerous region. The signal was  $m/z$  616. To identify the molecule of  $m/z$  616, he performed  $\text{MS}^n$  on the liver section. Considering the  $m/z$  value and peak pattern in  $\text{MS}^2$  and  $\text{MS}^3$  data, it was suggested that  $m/z$  616 was heme B. Heme B consists of an iron atom and porphyrin, and is known as a prosthetic group of hemoglobin, which is a protein in erythrocytes. The results indicate the difference between the blood-rich liver and the ischemic metastatic colon cancer. This result was reported in [9].

Chapter 10 describes the imaging of glycosphingolipid in a rat hippocampus. Glycosphingolipids each have a ceramide. The differences in the ceramide structures of glycosphingolipids containing sialic acids have been successfully visualized by imaging MS. As a result of  $\text{MS}^2$  and  $\text{MS}^3$  on the hippocampus, the differences were derived from d18:1 and d20:1, which were sphingosines. The double-layer structure with d18:1 and d20:1 can be clearly observed in the molecular layer of dentate gyrus. This unreported distribution suggests that d20:1 reflects a projection of pyramidal cells from the entorhinal cortices. This result was reported in [10].

Through this thesis, specimens shifted away from the use of purified specimens to the use of tissue sections, and the concept of measurement shifted from one-point analysis to two-dimensional analysis. The novel approach using MS can determine the existence (what is it?) and location (where is it?) of several biomolecules *in situ*.

本論文は質量分析を用いた生体組織の解析手法および生体分子可視化法について述べられている。これまでの生化学的な手法と質量分析を用いた解析では、目的物質を抽出し、分離・精製をした物質に対し分析を行ってきた。しかし、この手法では、目的物質の生体内分布や局在という位置情報が失われてしまう。これに対し、生体試料を直接、位置情報を保ったまま質量分析をする技術、すなわち質量分析イメージングでは、任意の分子の生体組織上における位置情報を抽出することができる。本論文は 10 章より構成されている。

まず  $\alpha$ -チューブリンヘグルタミン酸を付加する酵素(PGs1)が失われたミュータントマウス(ROSA22)の質量スペクトルと野生型マウスの質量スペクトルを比較することにより、ROSA22 において翻訳後修飾が野生型マウスと全く異なっていることを示した。この一般的な質量分析法から組織の直接質量分析を行うに当たり、試料前処理は非常に重要である。次に生体組織を直接質量分析する際の試料前処理法について検討した。まず、試料として用いる組織切片の厚みが質量スペクトルへ与える影響について調べており、厚い試料では導電性の問題からスペクトルのシグナルノイズ比(以下 SN 比)およびシグナル強度が低下し、組織切片は 10  $\mu$ m 未満で作成することが望ましいことが分かった。次にイオン化補助剤であるマトリックスの供給法が組織の直接質量分析の際に与える影響について検討し、生体組織上で SN 比およびシグナル強度を向上させるマトリックス供給法であるスプレードロップレット法を開発した。スプレードロップレット法で SN 比、シグナル強度が向上したことにより、これまでの手法では検出できなかった生体分子の質量分析イメージングに成功した。さらに、蛋白質のアミノ酸配列を生体組織上で直接同定する手法について検討した。質量分析ではタンデム質量分析(MS/MS)という手法を用いて蛋白質のアミノ酸配列を解析することが可能であるが、その際蛋白質はトリプシン等、基質特異性のある消化酵素で消化されている必要がある。質量分析イメージングでは生体組織内で位置情報を保ったまま消化を行うため、生体組織を PVDF 膜へ転写する手法を考案した。転写膜上で消化酵素を分注することにより蛋白質の消化が達成され、マルディイ四重極イオントラップ飛行時間型質量分析装置(島津製作所 AXIMA-QIT)における MS/MS 測定によってアミノ酸配列を同定することが可能となった。また、この実験を元に、PVDF 膜上の生体組織を直接消化する手法を考案した。On-tissue digestion 法により、生体組織から直接蛋白質消化物のアミノ酸配列を同定することが可能となった。最後に組織支持材としての導電性フィルムの導入に関して検討した。上記の研究では組織支持材として PVDF 膜を用いたが、膜の非導電性によりイオン化効率が金属表面へ生体組織を載せた場合に比べ低下していることが分かった。PVDF 膜のように薄く取扱が容易な素材としてポリエチレンテレフタレート表面に、金属の 1 種であるインジウムスズ酸化物が蒸着された ITO フィルムを導入した。ITO フィルム上でも on-tissue digestion 法は適用可能であることが分かり、イオン化効率低下の問題が解消されたことで初めて AXIMA-QIT を用いた蛋白質消化物の質量分析イメージングが可能となった。

このように質量分析イメージングが実験可能となったので、その応用について研究した。質量分析では脂質内の脂肪酸の構造の違いを解析することが可能であり、質量分析イメージングでは、その構造の異なる脂質の生体内分布を可視化することが可能である。このようなイメージングは質量分析イメージング以外では困難であると考えられる。本実験ではマウス小脳を用いて脂肪酸の構造が異なる sn-1 位における脂肪酸の炭素鎖が異なる 2 種のフォスファチジルコ

リン, PC(16:0-18:1)および PC(18:0-18:1)の分布を示すことに成功した。次にヒト転移性肝臓癌(大腸癌転移)の質量分析イメージングを行った。癌表面におけるスフィンゴミエリンは(C16:0)であることが明らかになった。また癌部において、ヘモグロビンのサブユニットであるヘムの量が低下していることが明らかとなった。この結果は転移性固形癌である大腸癌が乏血性である性質を反映していると考えられる。最後に、ラット海馬におけるガングリオシドが有するセラミド構造の違いについて可視化を行った。ガングリオシドはセラミドにシアル酸を含む糖鎖が付加した構造を持つスフィンゴ糖脂質である。この糖鎖の構造に対する抗体により細胞内分布を可視化することが可能である。しかしセラミド内の脂肪酸やスフィンゴシンも構造可変であるが、この構造の違いは抗体を用いた手法では可視化は不可能である。本実験では2種類のスフィンゴシンの構造(d18:1 と d20:1)についてラット海馬での分布を可視化した。この結果、海馬歯状回最外層に d20:1 が局在していることが分かった。

以上のように新聞君は今まで理論上のテクニックでしかなかった質量分析イメージングを現実のものとし、本テクニックを駆使してしか得られない貴重なデータを得ることに成功した。これにより、新しい領域を開発したので、学位授与に充分値する。