

クライオ質量分析による単一細胞内物質分布直接観察法の研究

●内藤 康秀¹⁾ ◆高橋 勝利²⁾

1) 北陸先端学術大学院大学材料科学研究科 2) 産業技術総合研究所生命情報科学研究センター

研究の目的と進め方

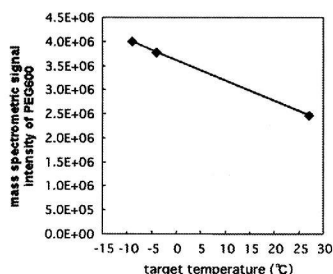
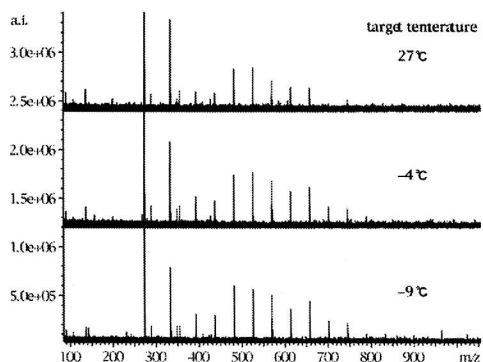
単一細胞を対象にして、抽出・精製の過程を経ずに、細胞内に局在する様々な分子の挙動を直接観察できる技術の開発を目的とする。

- (1) 細胞試料のマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)を実現するため、試料を極低温に保持できる試料台(クライオステージ)を備えたイオン源を製作する。
- (2) 広範囲にわたる細胞内物質を、超高精度・超高分解能で同定するため、このイオン源をフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(FTICR)質量分析計に接続する。
- (3) 極微量の細胞内物質を検出・同定するため、イオン源から分析部へ高効率でイオン輸送する四重極イオンガイドを製作し、FTICR測定を超高感度化する。
- (4) 極低温におけるマトリックス候補化合物とMALDI条件の探索を行う。
- (5) 冷凍細胞薄片試料をマトリックス化合物で置換し、クライオMALDI-FTICR質量分析によりイオンを生成・同定する。
- (6) 未精製混合物の複雑なスペクトルからのイオン同定を可能にするため、各種データベースの加工および解析アルゴリズムの検討を行う。

2001年度の研究の当初計画

- (1) クライオMALDIの開発
- (2) 四重極イオンガイドによるFTICR質量分析の超高感度化

Effect of target temperature on mass spectra of MALDI-generated PEG600



2001年度の成果

(1) クライオMALDIの開発

ペルチエ素子を用いてMALDIサンプル面を瞬時に冷却し、最低温度-30℃を達成した。製作したイオン源をFTICR質量分析計に実装し、Methylene Blue, 2,5-DHB, PEG600を評価用試料としてクライオMALDIの動作確認を行った。サンプル面の冷却にともないUV-MALDI生成イオン信号強度が増大する効果を確認した。

(2) FTICR質量分析の超高感度化

イオン源から検出部へ高効率にイオンを輸送できる、イオン透過質量範囲の広い四重極イオンガイドを開発し、FTICR質量分析計に実装した。四重極に印加するRF高電圧波形を発生させる高周波昇圧トランスを設計、製作した。バイポーラ型電力増幅器と併用することで1MHzにおいて約1kVの振幅を得ており、理論上はm/z(質量電荷比)5,000程度までのイオン輸送が可能になる。

(3) 波長可変赤外レーザー光源を用いたMALDI条件の探索

生体組織の直接観察に適したIR-MALDIの諸条件を検討するため、TOF質量分析計に自由電子レーザー光を導入し、MALDIの赤外波長依存性を評価するシステムを構築した。赤外域での代表的なマトリックスであるフマル酸を用いて評価予備測定を行った。

国内外での成果の位置づけ

MALDI-TOFを用いた冷凍細胞薄片試料のイメージング研究は広がりつつあるが、TOF質量分析計の性能上の制限から、脱離イオンの同定には至っていない。今回世界で初めてクライオMALDIによるFTICR測定を実施し、精密質量イメージングの可能性を示した。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

- (1) クライオステージの目標到達温度-200℃(放熱側冷却が不十分なため)
- (2) 四重極イオンガイド実装後のFTICR質量分析計の調整(開発期間の延長により)

今後の課題

- (1) 装置の調整、夾雑物質存在下でのクライオMALDI-FTICR測定の高感度化
- (2) マトリックス化合物の選定、マトリックス添加方法を含めた試料調整法の検討
- (3) リモートアクチュエータによるレーザー照射位置の自動走査と精度向上
- (4) 顕微モニタ光学系の開発、試料照射領域の可視化