J S M *Mycotoxins*

www.jstage.jst.go.jp/browse/myco

The application of mass spectrometry imaging for metabolite analysis in agricultural products

Hirofumi Enomoto

JSM Mycotoxins, **70**(2):75-82 (2020)

<http://doi.org/10.2520/myco.70-2-1>

JSM Mycotoxins is issued twice a year, one volume a year, by the Japanese Society of Mycotoxicology and the purpose of the journal is to publish results and technical information regarding mycotoxins. *JSM Mycotoxins* publishes Reviews, original results (Research Papers, Technical Notes, Notes, and Letters), Proceedings of special lectures, symposia, and workshops of the meeting of Japanese Society of Mycotoxicology

Japanese Society of Mycotoxicology
(http://www.jsmyco.org/MYCONTENTS/Eng/index_eng.html)

農畜産物中の代謝物の分布解析への質量分析イメージングの応用

榎元 廣文^{1,2}

¹帝京大学理工学部バイオサイエンス学科 (〒320-8551 栃木県宇都宮市豊郷台1-1)

²帝京大学先端機器分析センター (同上)

キーワード

イチゴ；インゲンマメ；質量分析イメージング；代謝物；豚肉；マトリックス支援レーザー脱離イオン化

連絡先

榎元 廣文, 帝京大学理工学部バイオサイエンス学科, 〒320-8551
栃木県宇都宮市豊郷台1-1
電子メール：
enomoto@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp

要旨

質量分析イメージング (MSI) は農畜産物中の代謝物の分布可視化法として期待されている。私たちは、これまで主にマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) -MSIを用いた農畜産物中の代謝物の分布解析を行っている。本稿では、MALDI-MSIを用いた農畜産物中の代謝物解析のための試料調製法の概要、および近年私たちの研究室で実施したイチゴ中の美味しさ関連成分である糖、有機酸、アントシアニン、豚肉中の主要な機能性脂質であるスフィンゴミエリン、およびインゲンマメ未熟種子中の植物ホルモンであるアブシシン酸と12-オキシフィトジエン酸の分布解析について解説する。

(2020年3月10日受付,
2020年3月11日受理)

JSTAGE早期公開日：2020年3月27日

はじめに

農産物中の代謝物の解析に用いられているガスクロマトグラフ質量分析および液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) などは、代謝物の定性や定量には有効な手法であるが、試料からの抽出処理が必要なため、代謝物の空間分布情報を調べることは困難である。これに対して、質量分析イメージング (Mass Spectrometry Imaging, MSI) は組織切片上を二次元的に質量分析し、得られたマススペクトルから生体分子のイメージを再構成することで生体分子を可視化する手法である¹⁾。プローブ無しで一度に多数の生体分子を可視化することが可能であり、特にプローブの作製が困難な低分子代謝物の可視化手法として利用されている。1997年にCaprioliら²⁾がMSIを用いた生体組織の解析について発表して以降、MSIのための質量分析装置、解析ソフト、イオン化法および試料調製法などが進歩し続けている³⁾。また、それに伴って、日々、解析可能な代謝物および生体試料の種類も増え続けている。利用分野としても、しばらくは医薬分野が主であったが、現在では、農学および理学などの研究分野にも

拡大してきている。代謝物の解析のためのイオン化法としては現在、主にソフトイオン化法であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)²⁾および脱離エレクトロスプレーイオン化 (DESI)⁴⁾が用いられている。MALDIおよびDESIは、お互いに測定対象分子が相補的な関係にある。私たちの研究室では、2013年度にMALDI-MSI装置を導入してから、これまで、主にMALDI-MSIを用いた農畜産物の解析に取り組んできた。そこで本稿では、始めに試料調製を中心としたMALDI-MSIの概要について解説する。次に、私たちの研究室で近年行ってきた、MALDI-MSIを用いたイチゴ、豚肉、およびインゲンマメ未熟種子の解析について紹介したい。

MALDI-MSIの試料調製

図1にMALDI-MSIの実験手順を示す。MALDI-MSIの実験を成功させるためには、試料の切片化、およびマトリックスの選択と塗布法といった試料調製が重要である⁵⁾。試料の切片化には凍結マイクロトームが用いられ、数 μm ～数十 μm の切片が作製される。通常、筋肉や臓器のような動物組織では凍結固定のみで本来の構造を保った切片化が可能であ

図1 MALDI-MSIの実験手順。

誘導体化はマトリックスの塗布のみで検出が困難な場合に利用。

る。しかし、果実のような水分が多くやわらかい植物組織の場合、凍結固定のみでは組織が壊れてしまうため、カルボキシメチルセルロース (CMC) やゼラチンなどに包埋して、切片化が行われる。なお、骨や玄米のような乾燥した脆い組織の場合も凍結のみでは切片化が難しいが、川本法という粘着性のフィルムに張り付ける手法で切片化が可能である。しかし、川本法では、測定対象分子の検出感度が低くなる場合がある。作製した切片を、使用する質量分析装置のタイプによって導電性あるいは通常のスライドガラスに接着後、イオン化を補助するマトリックスを塗布するが、この際、測定対象分子の検出に適したマトリックスを選択することが必要である。図2に代謝物の分析に用いられる主なマトリックスを示した。マトリックスの選択は、既報の文献を参考にするか、あるいは測定対象分子の標準品を様々なマトリックスで測定して検出感度の高いものを選択する。

最後に切片上へのマトリックスの塗布を行う。切片上のマトリックスの結晶サイズおよび均一性は、空間分解能および検出感度に影響する。現在、マトリックスの塗布には主にスプレー法、蒸着法およびこの二つを組み合わせた方法が用いられており、それらの塗布法のための装置も開発されている（図3）。塗布の際、装置ではなくエアブラシおよび蒸着容器を用いた場合、データの質および再現性は実験者の手技によるところが大きくなるため、相応の習熟が必要となる。スプレー法より蒸着法の方がマトリックスの結晶サイズが小さくなるため、特に20 μm 以下の高空間分解能のイメージングを行う際に

は蒸着法が適している。しかし、蒸着法ではマトリックスと測定対象分子の共結晶化が十分に起きにくいいため、スプレー法より検出感度は低くなる傾向にある。したがって、必要に応じて、蒸着後に高湿度の容器内に放置してマトリックスを再結晶化させる処理が行われる。なお、測定対象分子が微量あるいはイオン化効率が低いなどの理由で、マトリックスの供給のみでの検出が困難な場合の解析手法として、ここ数年、切片上での直接誘導体化法が用いられるようになってきた。誘導体化試薬として、主にLC-MS用のものが使用され、組織切片上にエアブラシでスプレー塗布して測定対象分子を誘導体化後、マトリックスを塗布するという流れになる（図1）。誘導体化試薬ごとに反応可能な官能基が異なるため、測定対象分子の持つ官能基の種類によって適切な誘導体化試薬を選択する。発展途上の技術であるため、使用する誘導体化試薬によっては、組織切片上での誘導体化反応を効率的に進行させる反応条件の最適化が必要となる。また、エアブラシで塗布中に測定対象分子の位置が変わりやすいといった問題がみられるため、今後、スプレー装置を用いた手法の開発が期待される。なお、本稿では、後に紹介するインゲンマメ中の植物ホルモンの可視化に誘導体化を利用している。

MALDI-MSI装置およびデータ解析

使用するMALDI-MSI装置の選択も重要である。かつては高質量分解能の飛行時間型 (time of flight, TOF) /TOFタイプの質量分析装置が主流であったが、現在は、高質量分解能でタンデム質量分析 (MS/

図2 MALDI-MSIに使用される主なマトリックスのイオンモードと測定対象分子。

本稿の分析例にはDHBを使用。

図3 MALDI-MSIに用いられる主なマトリックスの塗布法, および使用される器具と装置。

赤の点線で囲んでいるものは, 本稿で紹介した分析例に使用。

MS) に優れた四重極 (Q)・TOF, 多段階質量分析 (MSⁿ) が可能なQ-イオントラップ (IT)・TOF, 超高質量分解能のQ-オービトラップ (Orbitrap), および超々高質量分解能のフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FT-ICR) タイプに加え, 蛍光顕微鏡やイオンをその衝突断面積で分離するイオンモビリティ機能を備えたタイプも開発されている (図4)。

イオンモビリティは, 異性体など構造が異なり質量電荷比 (m/z) が同じ化合物をMS/MSやMSⁿ無しで分離できる可能性があり, 特にLC-MSのようなカラムでの分離が無いMSIでは, 今後その活用が重要になっていくものと考えられる。なお, MALDI部も真空タイプあるいは大気圧タイプがある。測定対象分子が揮発性の場合は大気圧タイプの方が適

図4 市販の主なMALDI-MSI装置。

大気圧と表記されていないものはMALDI部が全て真空タイプ。
赤の点線で囲んでいるものは、本稿で紹介した分析例に使用。

しているほか、一部のマトリックスは大気圧タイプでしか使用できないなどの違いがみられる。本稿で紹介する農畜産物の解析には、MALDI部が真空タイプ、質量分析部がTOF/TOFタイプの質量分析装置(図4, ultrafleXtreme)を用いている。測定後、専用の解析ソフトを用いてマススペクトルから測定対象分子のイオンイメージを再構成し、組織切片の顕微鏡画像と比較して、その分布を調べることになる。また、組織間での代謝物の違いを抽出して統計解析できるソフトも開発されている。なお、定量的なイメージングを実施する場合、別途、検量線を作成する必要がある。検量線の作成法はいくつか考案されているが、その中でも測定対象分子の安定同位体標識化標準品を添加したホモジネート試料の凍結切片を測定して検量線とする方法が適切であると考えられる。

イチゴの解析 –アントシアニン、糖、有機酸–

イチゴの美味しさにおいては、甘味成分である糖、および酸味成分である有機酸のバランスが、また、イチゴの外観や機能性においては、色素成分であり抗酸化作用を有するアントシアニン類が重要である。しかし、イチゴ果実全体におけるこれらの代謝物の分布は十分に調べられていなかったため、MALDI-MSIによる分布解析を試みた。切片化では、

CMCに凍結包埋することにより本来の構造を保った切片の作製が可能であった。次に、マトリックスのスプレー装置、TMスプレイヤーを用いて2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)を塗布し、ポジティブイオンモードで測定したところ、アントシアニンとしてペラルゴニジン配糖体を3種、シアニジン配糖体を2種、およびデルフィニジン配糖体を1種、また、有機酸としてクエン酸、糖類としてヘキソースおよびスクロースを検出することができた⁶⁾。次に、検出された代謝物の分布を調べるため、イオンイメージを作成したところ、ペラルゴニジン配糖体は全て表皮、皮層、および髄に分布していたのに対し、シアニジン配糖体およびデルフィニジン配糖体は全て表皮に局在していた(図5)。このことから、イチゴの外観は、ペラルゴニジン配糖体、シアニジン配糖体およびデルフィニジン配糖体のバランスによること、また、アントシアニンの分布の違いは、配糖体の違いではなくアグリコンの違いによることが示唆された。クエン酸は主に皮層の先端側に分布していた。興味深いことに、ヘキソースは果実全体に分布していたのに対し、スクロースは主に皮層の先端側および維管束に分布していた。これまでイチゴの先端側で甘みが強いことが知られていたが、本研究により、先端側の甘みが強い理由が、維管束を通して転流してきたスクロースが先端側に多く蓄

図5 イチゴ中のアントシアニン，糖，および有機酸のイオンイメージ。

分子種の同定はMS/MSにより行った。

積しているためであることが示唆された。本研究で得られた情報，およびMALDI-MSI手法が今後，イチゴの品種改良や品質劣化メカニズムの解明に貢献することが期待される。

豚肉の解析 —スフィンゴミエリン (SM) —

SMは豚肉中の主要なスフィンゴ脂質の一種である。近年の研究から，抗ガン，肌保湿改善，および免疫賦活作用が示唆されており，豚肉の機能性に影響すると考えられる。しかし，豚肉中での空間的な分布はほとんど知られていなかったため，MALDI-MSIを用いた分布解析を試みた。豚肉を凍結固定して，ロース，脂肪，透明組織，および棘筋を含む切片を作製し，エアブラシを用いてカリウムを添加したDHBを塗布した後，ポジティブイオンモードによる測定を行った。DHBにカリウムを添加した理由は，DHBのみでは一つのSM分子種から，プロトン，ナトリウムイオン，およびカリウムイオンの3種の付加体が検出されるのに対し，カリウムを添加することでカリウム付加体のみにピークを取束させることができるためである。この結果，パルミチン酸，ステアリン酸，ネルボン酸，およびリグノセリン酸を含むSM分子種が同定された⁷⁾。イオンイメージを再構成したところ，パルミチン酸，ネルボン酸，およびリグノセリン酸を含むSMは主に透明

組織に分布していたのに対し，ステアリン酸を含むSMはロースおよび棘筋に分布していた(図6)。また，SMの含量は棘筋よりロースの方が約1.8倍多いことが示唆された。これらの結果から，SMに由来する機能性は豚肉中の組織ごとに異なることが示唆された。近年，WHOは豚肉が大腸ガンのリスク因子となる可能性を報告しているが，本解析結果は，SM含量の多いロースが大腸ガンのリスクとなりにくい可能性を示している。以上より，食肉中の組織ごとのSMに由来する機能性を評価する上で，MALDI-MSIは有効な手法であると考えられた。

インゲンマメの解析 —アブシシン酸 (ABA)，12-オキソ-フィトジエン酸 (OPDA) —

植物ホルモンの一種であるABAおよびジャスモン酸関連分子であるOPDAは，種子の成長制御において重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし，ABAおよびOPDAの分布解析のための有効な可視化手法は開発されていなかった。そこで，ABAおよびOPDAが比較的多く含まれているインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) 未熟種子を試料として，MALDI-MSIを用いたこれらの植物ホルモンの可視化手法の構築を試みた。MALDI-MSIでは，LC-MSのようなカラムでの分離が無い場合，相対的に微量あるいはイオン化効率の低い代謝物は

図6 豚肉中のSMのイオンイメージ.

脂肪酸組成の異なる4種のSM分子種の同定はMS/MSにより行った.

ど、イオンサプレッションなどの影響により、検出が急激に困難になる。実際、いくつかのマトリックスを試したが、インゲンマメ未熟種子中のABAおよびOPDAを検出することはできなかった。そこで、誘導体化試薬の一種であるジラル試薬T (GirT) を用いてABAおよびOPDAを選択的に誘導体化し、検出することを試みた。GirTはヒドラジン構造を有し、ケトン基と反応してヒドラゾンを形成する。また、GirTはプラスに帯電したトリメチルアミン構造を有しているため、ポジティブイオンモードでの測定において、イオン化効率の改善による検出強度の向上が期待できる。ABAおよびOPDAの標準品を用いてGirTによる誘導体化条件を最適化した結果(図7)、誘導体化によってABAおよびOPDAの検出感度が大幅に向上することが示唆された⁸⁾。そこで、エアブラシを用いてGirT試薬をインゲンマメ未熟種子切片上に塗布して誘導体化後、DHBを塗布したところ(図1)、GirTで誘導体化されたABA (ABA-GirT) およびOPDA (OPDA-GirT) のピークが検出された。イオンイメージを作成したところ、ABAは主に胚に分布しており、その中でも特に幼芽および幼根内の維管束に局在しているのに対し、OPDAは種皮内の胚側に局在していることが示唆された(図7)。以上より、GirT誘導体化処理後のMALDI-MSI解析は、ABAおよびOPDAの可視化に有効な手法となると考えられた。

まとめ

以上、私たちは、MALDI-MSIは様々な農畜産物中の代謝物の分布解析に有効な手法であることを示してきた。将来的にMALDI-MSIが食の安全性など、農学分野の様々な研究課題の解決に広く貢献するようになることを期待しつつ、今後も引き続き、MALDI-MSIを用いた農畜産物の解析を進めていきたいと考えている。なお、本稿では割愛させていただいたが、私たちの研究室では最近、MALDI-MSIを用いてイチゴ中のフラバン-3-オール分布可視化⁹⁾、および豚肉中のジアシル、アルキルアシル、およびアルケニルアシル-ホスファチジルコリンの分布可視化¹⁰⁾にも成功している。また、DESI-MSIを用いて、誘導体化などの複雑な処理無しでのインゲンマメ未熟種子中のABAおよびOPDAの可視化に成功もしている¹¹⁾。興味がある方は、記載の文献をご一読いただけると幸いです。

帝京大学宇都宮キャンパスには2018年度より先端機器分析センターが設立されており、2013年度に導入されたMALDI-TOF/TOF-MSI (図4, ultrafle Xtreme) に加え、本年度よりイオンモビリティ機能を搭載したDESI/MALDI-Q-TOF-MSI (図4, Synapt XS) が導入されている。これらのMSIを用いた共同研究に興味がある方は、著者にご連絡いただけると幸いです。

なお、本稿は2019年8月23日に帝京大学宇都宮

図7 アブシジン酸 (ABA) と 12-オキソ-フィトジエン酸 (OPDA) のジラル試薬 T (GirT) を用いた誘導体化およびインゲンマメ未熟種子中のイオンイメージ。

キャンパスにて開催された日本マイコトキシン学会 第84回学術講演会 特別講演S-2の内容をまとめたものである。

謝 辞

本学術講演会にて貴重な講演の機会を与えていただいたマイコトキシン学会会長 作田庄平先生、および学会関係者の皆様に深く御礼申し上げます。また、本プロシーディングの作成において、ご助言をいただいた鹿児島大学農学部 名誉教授 青木孝良先生および本学科の博士研究員 古川智宏氏に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Cornett, D.S., Reyzer, M.L., Chaurand, P., Caprioli, R.M.: MALDI imaging mass spectrometry: Molecular snapshots of biochemical systems. *Nat. Methods*, **4**, 828-833 (2007)
- 2) Caprioli, R.M., Farmer, T.B., Gile, J.: Molecular imaging of biological samples: Localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.*, **69**, 4751-4760 (1997)
- 3) Setou, M., Shrivastava, K., Sroyraya, M., Yang, H., Sugiura, Y., Moribe, J., Kondo, A., Tsutsumi, K., Kimura, Y., Kurabe, N., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Zaima, N., Ikegami, K., Sobhon, P., Konishi, Y.: Developments and applications of mass microscopy. *Med. Mol. Morphol.*, **43**, 1-5 (2010)
- 4) Wiseman, J.M., Ifa, D.R., Zhu, Y., Kissinger, C.B., Manicke, N.E., Kissinger, P.T., Cooks, R.G.: Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18120-18125 (2008)
- 5) Morisasa, M., Sato, T., Kimura, K., Mori, T., Goto-Inoue, N.: Application of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging for food analysis. *Foods*, **8**, 633 (2019)
- 6) Enomoto, H., Sato, K., Miyamoto, K., Ohtsuka, A., Yamane, H.: Distribution analysis of anthocyanins, sugars, and organic acids in strawberry fruits using matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 4958-4965 (2018)
- 7) Enomoto, H., Takeda, S., Hatta, H., Zaima, N.: Tissue-specific distribution of sphingomyelin species in pork chop revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *J. Food Sci.*, **84**, 1758-1763 (2019)

- 8) Enomoto, H., Sensu, T., Yumoto, E., Yokota, T., Yamane, H.: Derivatization for detection of abscisic acid and 12-oxo-phytodienoic acid using matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **32**, 1565-1572 (2018)
- 9) Enomoto, H., Takahashi, S., Takeda, S., Hatta, H.: Distribution of flavan-3-ol species in ripe strawberry fruit revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging. *Molecules*, **25**, 103 (2019)
- 10) Enomoto, H., Furukawa, T., Takeda, S., Hatta, H., Zaima, N.: Unique distribution of diacyl-, alkylacyl-, and alkenylacyl-phosphatidylcholine species visualized in pork chop tissues by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging. *Foods*, **9**, 205 (2020)
- 11) Enomoto, H., Sensu, Y., Sato, K., Sato, F., Paxton, T., Yumoto, E., Miyamoto, K., Asahina, M., Yokota, T., Yamane, H.: Visualisation of abscisic acid and 12-oxo-phytodienoic acid in immature *Phaseolus vulgaris* L. seeds using desorption electrospray ionisation-imaging mass spectrometry. *Sci. Rep.*, **7**, 42977 (2017)

The application of mass spectrometry imaging for metabolite analysis in agricultural products

Hirofumi Enomoto^{1,2}

¹Department of Biosciences, Faculty of Science and Engineering, Teikyo University, Utsunomiya 320-8551, Japan

²Advanced Instrumental Analysis Center, Teikyo University, Utsunomiya 320-8551, Japan

Mass spectrometry imaging (MSI) is a promising visualization technique for metabolite distribution analysis in agricultural products. Here, we introduce the workflow of the matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-MSI analysis, followed by our recent studies on strawberry fruit, pork meat, and immature *Phaseolus vulgaris* L. seed metabolites using MALDI-MSI. We anticipate that the use of MSI will further expand towards the analysis of various agricultural products.

Keywords: mass spectrometry imaging, matrix-assisted laser desorption/ionization, metabolites, *Phaseolus vulgaris* L., pork meat, strawberry