

学会誌賞受賞研究

探針エレクトロスプレーイオン化法 (PESI) 及びその改良法の開発

和田 博史*・野並 浩*

Hiroshi WADA and Hiroshi NONAMI

Probe Electrospray Ionization (PESI) and Its Modified Versions: Dipping PESI (dPESI), Sheath-Flow PESI (sfPESI) and Adjustable sfPESI (ad-sfPESI)

Abstract

Prof. Dr. Hiroshi Wada and Prof. Emeritus Hiroshi Nonami at the Plant Biophysics/Biochemistry Research Laboratory, Department of Biomechanical Systems, Graduate School of Agriculture, Ehime University, Matsuyama, Japan, received The Mass Spectrometry Society of Japan (MSSJ) Excellent Article Award 2021 at the 69th Annual Conference on Mass Spectrometry, Japan held on-line on May 20, 2021. The MSSJ is the first society in the world for mass spectrometry research as established in 1953. MSSJ plays a role as a member of the International Mass Spectrometry Foundation (IMSF). The total number of the membership of the MSSJ is 1071 as of March, 2021. MSSJ contributes to the fields of mass spectrometry and analytical chemistry in education, research, development and/or technology transfer in collaboration with industry. The Excellent Article Award 2021 recognizes Prof. Drs. Wada and Nonami's outstanding research contribution in the coauthored review paper entitled, "Probe Electrospray Ionization (PESI) and Its Modified Versions: Dipping PESI (dPESI), Sheath-Flow PESI (sfPESI) and Adjustable sfPESI (ad-sfPESI)." In this study, PESI/MS developed in 2007 has been further modified to develop three analytical methods, called dPESI, sfPESI, and adjustable sf-PESI. In PESI, the needle was vertically moved down, so that the tip of the needle could be instantly touched to the sample. After making a contact with the sample at the needle tip, the needle was moved up and then a high voltage was applied to the needle at the highest position to generate electrospray. Due to the discontinuous sampling followed by the generation of spontaneous electrospray, sequential and exhaustive electrospray takes place. These methods are complementary to each other, and they can be mostly applicable to surface and bulk analysis of various samples. PESI-based methods developed here were shown to be useful for various on-site analyses in plant and food sciences, as well as another capillary-based single-cell analytical method, termed picoPPESI (picolitre Pressure-Probe Electrospray-Ionization). In this article, the characteristics of PESI-related methods and their applications was reviewed.

Key words: probe electrospray ionization (PESI), point analysis, surface analysis, robotic mass spectrometry

1. 「日本質量分析学会誌賞 2021」受賞の経緯

2021 年 5 月 19 日 (水) ~ 21 日 (金) にオンラインで第 69 回質量分析総合討論会がリモート開催され、2021 年 5 月 20 日に討論会において、日本質量分析学

会誌賞 2021 を受賞した。

日本質量分析学会は 1953 年に設立され、総会員数 1,071 名で構成されている (2021 年 3 月現在)。本会は質量分析学に関する会員相互の協力により、質量分析に関する技術の進歩、関連分野の発展に資することを目的として設立されている。

本学会では、その英文誌である Mass Spectrometry に

2022 年 7 月 22 日受領

*愛媛大学農学部植物細胞システム計測学教育分野

掲載された論文で、特に優れた論文に日本質量分析学会誌賞が授与される。

本会誌賞の受賞にあたり共著の山梨大学工学部クリーンエネルギー研究センターの特命教授であられる平岡賢三先生を始め、ご支援とご指導を頂いた諸先生方、共同研究者の皆様に深くお礼申し上げます。

本論文は、後述する科学研究費の各研究プロジェクトの推進のため、質量分析における1イオン化法として知られる探針エレクトロスプレーイオン化の開発者であられる平岡先生のグループと行った探針エレクトロスプレーイオン化法(Probe Electrospray Ionization, PESI)及び、その改良法の開発に関する成果である(Hiraoka et al., 2020)。各プロジェクトにおいて、本手法を農業・食品分野の諸課題のオンサイト質量分析法として適用すべく、探針エレクトロスプレーイオン化法の更なる改良を行った。

これら一連の研究成果について、平岡先生を筆頭著者として他の共著者ととともに、総説にとりまとめた。総説では、改良版となるディッピング探針エレクトロスプレーイオン化質量分析法(dPESI/MS)、シースフロー探針エレクトロスプレーイオン化質量分析法(sfPESI/MS)、高さ方向にタッチセンサー技術を取り入れ、連続計測可能なad-sfPESI/MS、さらにこれを96ウェルに収めた試料溶液を対象に連続的な分析ができるように、計測法の自動化も行っている。さらに、この方法を農業、食品分野の諸課題に応用したという点でも高い評価を受けた。学会総会で開催された受賞式では、会長の高山光男氏から賞状と賞碑が贈呈された。

2. はじめに

探針エレクトロスプレーイオン化質量分析法の元となるエレクトロスプレーイオン化(ESI)は、2002年ノーベル化学賞受賞者で米国の分析化学者のジョン・ベネット・フェン(John B. Fenn)教授らが開発したイオン化法である(図1)。現在、イオン化法の中で主流のイオン化法となったESIは代謝産物を含む低分子の他、高分子をフラグメント化することなくイオン化できるソフトイオン化法の一つとして知られる。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)とは対照的に、ESIは多価イオンで検出される特徴がある。

2007年、著者らの共同研究者で、本論文の筆頭著者の山梨大学の平岡先生が探針エレクトロスプレーイオン化法(PESI)を開発された(図1)(Hiraoka et al., 2007;

Chen et al., 2009)。このイオン化法は、先端の鋭いステンレス針(鍼灸針)を用い、針先端を植物及び動物の生体組織に刺した後、針先端に1-3 kVの高電圧を印加し、付着した代謝産物分子を大気圧下で脱離、イオン化する方法である。従来のESIで用いられてきた金属キャピラリー管の先端部を探針に置き換えることで、イオン化時の探針先端でフェムトリットルスケールのTaylorコーン(Taylor cone)が形成され(図1参照)、微量試料を対象にした代謝産物解析を可能にしている(Chen et al., 2009)。この様に、PESIは大気圧下でサンプル試料の前処理なしに直接イオン化し、液中に含まれる代謝産物の m/z を質量分析計で直接計測できる特長がある。ステンレス針を用いてイオン化を行うPESIの登場により、①従来のキャピラリーを用いる際の目詰まりの問題が解消された他、②分析に必要な試料採取量についても、従来のナノESI分析に必要とされる試料量である数10ナノリットル(nL)の100分の1以下、即ち、ピコリットル(pL)まで低減させることに成功している(Chen et al., 2009)。また、③探針の先端部への極薄膜試料採取と $10^8 \sim 10^9$ V/mという極限的な電場印加の組合せによりあらゆる生体試料を試料調製することなく、直接エレクトロスプレーすることが可

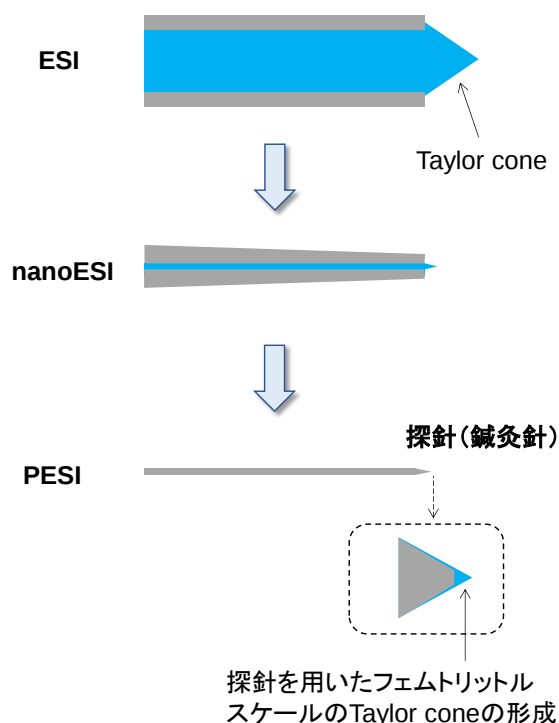


図1 ESI, nanoESI, PESI へのミニチュア化の流れ。Hiraoka et al. (2007)を参考に著者改変。PESIでは印加電圧をかけた直後に探針先端にフェムトリットルサイズのTaylorコーン(Taylor cone)が形成される。

能となっている。さらに、④金属キャピラリーを用いた ESI 法とは対照的に、PESI 法ではイオン化の過程で生じるシークエンシャルな連続分析も可能にしている (Mandal et al., 2011)。

3. ディッピング探針エレクトロスプレーイオン化質量分析法

生物学分野におけるシングルセル分析の多くは、細胞集団を対象に分析されることが多い。しかし、環境ストレス下の植物の生理応答など、組織内の一部の細胞で局所的に起こる細胞間不均一性の現象解明には、特定の細胞に的を絞った分析が求められる。このようなニーズを踏まえ、PESI 法の改良版となるディッピング探針エレクトロスプレーイオン化法 (Dipping PESI, dPESI) の開発に至った (Usmanov et al., 2018)。

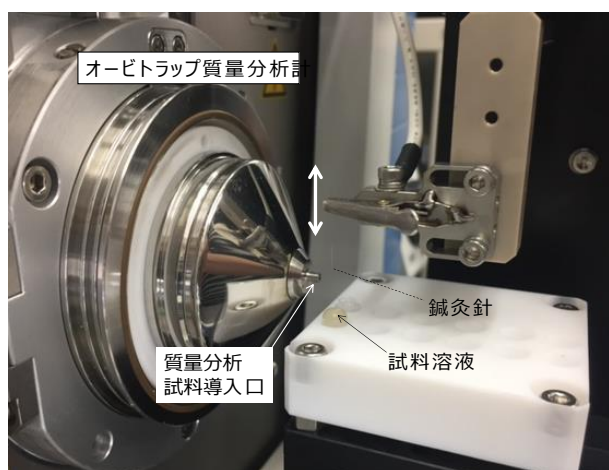


図 2 ディッピング探針エレクトロスプレーイオン化法.山梨大学平岡研究室にて著者撮影。上下の白矢印は自動制御による探針の動きを示す。

フィールドやガラス温室などの現場で、1 植物細胞等の生体試料に探針を突き刺した後、探針先端を乾燥させる。乾燥後、生体試料の付着した探針を質量分析計のある実験室に持ち込んで (試料採取した場所が遠隔地であれば、実験室まで輸送して)、その探針 (鍼灸針) を、イオン化部のモーター駆動部に繋がり、上下運動するピン (図 2 中の白矢印を参照) に垂直に取り付けた後、PESI 分析することができる (Usmanov et al., 2018a)。PESI 分析のために、50%メタノール等の溶媒を満たしたサンプルチューブを探針直下に設置し、試料の付着した針先端が溶媒に 50 ms の短時間、浸るよう調整・設定し、探針先端がその可動範囲の一番高い位置に到達した時点で、印加電圧をかけるような仕組みになっている。この方法を用いると、試料への貫入の目安として、試料表面からの深さ 0.5 mm の鍼灸針

の導入で分析が可能になる。また、この dPESI 法は、組織抽出液などの調整試料を対象にしたバルク分析にも用いることができ、その場合は 96 ウェルのマイクロプレート上に試料を設置し、鍼灸針を所定の位置に固定し、分析を行う。dPESI 法の開発により、疎水性の違いを利用し、用いる溶媒を変えることで、乾燥させた微量試料から納豆などの粘性の高い試料、生体試料及び食品まで幅広く、前処理なしの直接分析が可能になった。

4. シースフロー探針エレクトロスプレーイオン化質量分析法

試料採取とエレクトロスプレー過程とをそれぞれ独立して行う dPESI に対して、シースフロー探針エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (Sheath-flow PESI, sfPESI) は、それらの過程を統合させた分析法として開発された (Usmanov et al., 2018b)。sfPESI では、直径 120 μm 、チップ直径 $\sim$ 700 nm 大の鍼灸針を用い、それをゲルローディングチップに挿入する。さらにサンプル抽出のため、先端から 38 mm の位置まで、ゲルローディングチップの内部を 40 μL の溶媒で満たす。内部に導入する溶媒は通常、50%メタノール、あるいは、水/メタノール/アセトニトリル混合液 (混合比 1:1:1) を用いる。dPESI と同様に、ゲルローディングチップ内に収めた鍼灸針 (キャピラリー) に印加電圧をかけ、ESI 分析できるシンプルな仕様になっている。sfPESI は上記の仕様上、表面試料成分を抽出するのに、キャピラリー先端部で約 2 nL の溶媒が必要になる。sfPESI 分析時には、分析物の ESI は 3 秒ほど継続し、その間、40 nL の溶媒を消費する。ESI 時にキャピラリー先端部で形成される Taylor コーン内部では試料の対流が生じると考えられる。これまでのところ、sfPESI を使って、コーヒー豆、イネ玄米、動物試料等で分析事例がある。その他、黒、青、赤、緑色の 4 色のボールペンで文字等の書かれた紙上に、一色ずつ各色の線上に sfPESI の先端部を一瞬接触させ、直後に ESI 分析を行った。その結果、それぞれのインクの色を構成する成分の検出にも成功したことから、筆跡鑑定等への応用可能性も見出されている。

5. アジャスタブル・シースフロー探針エレクトロスプレーイオン化 (ad-sfPESI)

前節で述べた sfPESI 法にタッチセンサーを取り付けることでシステムを自動化したものが、アジャスタブル・シースフロー探針エレクトロスプレーイオン化法 (Adjustable sheath-flow PESI, ad-sfPESI) である

(Hiraoka et al., 2019). ad-sfPESI 法でも直径 120 μm の鍼灸針を用いる。この方法では、約 1 mm の貫入深さで針先端を試料に刺した後、針先端をキャピラリー内に収める機能を付与している。ad-sfPESI の試料サンプリングは遠隔で制御できる仕様になっており、dPESI 同様、簡便なオンサイトかつ、*in situ* サンプリング法であり、先端の目詰まり等も起こらない。直径 120 μm の鍼灸針を用いることで、組織中の一部分を対象にしたサイトスペシフィックなポイント分析が可能になっている。この ad-sfPESI についても、果実、野菜類などの植物試料を対象に代謝産物分析の実績がある (Hiraoka et al., 2019)。

6. おわりに

以上のように、PESI 及びその改良法である dPESI, sf-PESI, ad-sfPESI では、従来の ESI の発展形として、極微量の試料を採取した直後に、前処理なしに、大気圧下で直接イオン化し、試料中に含まれる化合物を質量分析できる特長がある。著者らは、後述する科研費研究課題において平岡先生のグループと共同研究を行った。共同研究を開始した当初、平岡先生が仰られた、「ナノリットル以下の超微量試料を対象に、前処理なしに直接、イオン化できる分析法を開発したい。」という強い思いを共有し、精力的に共同研究を推進した日々が懐かしく思い出される。平岡先生との共同研究の過程では、実に多くの課題に挑戦させて頂いた。本稿で述べた平岡先生との PESI 法の改良を通じた計測技術の進展の傍ら、著者らの研究室では、植物細胞の水分状態計測器として、1970 年代後半から用いてきたプレッシャープローブ (PP) と、精密質量を計測できるオービトラップ質量分析計とを融合させた 1 細胞スケールの代謝産物計測法、ピコリットル・プレッシャープローブ・エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (picoPPESI-MS) を開発するに至っている (Nakashima et al., 2016)。現在、picoPPESI-MS を用いて、生きた 1 植物細胞を対象にオンサイト、かつリアルタイムな 1 植物細胞・オルガネラの代謝産物計測を実現している (Nakashima et al., 2016; Wada et al., 2019; 2020; 2021; Nakata et al., 2022)。

謝辞

本業績は、日本学術振興会科学研究費助成事業の科研費基盤 S 採択研究課題「細胞膨圧計測－探針エレクトロスプレーによる細胞分子情報計測」(科研費番号 20228004, 野並浩 (研究代表者)・平岡賢三 (研究分担者), 2012 -2016 年), 科研費基盤 S 採択研究課題「オ

ンサイト・リアルタイム細胞分子計測によるスピーキング・セル・アプローチ」(科研費番号 24228004, 野並浩 (研究代表者)・平岡賢三 (研究分担者), 2017- 2020 年), 科研費基盤 A 採択研究課題「オンサイト・セルスペシフィック解析による水稻高温障害・窒素代謝改善効果の機構解明」(科研費番号 16H02533, 和田博史 (研究代表者)・野並浩・平岡賢三・恩田弥生・中島大賢 (研究分担者), 2016-2019 年) 及び、科研費基盤 B 採択研究課題「匂い成分オンサイト質量分析による水稻害虫トビイロウンカの品種選好・増殖特性の解明」(科研費番号 16H04886, 松村正哉 (研究代表者)・和田博史・平岡賢三・真田幸代 (研究分担者), 2016-2018 年) の研究成果によるところが大きく、日本学術振興会からの支援に心から感謝する。

引用文献

- Chen LC, Yu Z, Nonami H, Hashimoto Y, Hiraoka K. (2009) Application of probe electrospray ionization for biological sample measurement. *Environmental Control in Biology*. 47 (2): 73–86. DOI: <https://doi.org/10.2525/ecb.47.73>
- Hiraoka K, Ariyada O, Usmanov DT, Chen LC, Ninomiya S, Yoshimura K, Takeda S, Yu Z, Mandal MK, Wada H, Rankin-Turner S, Nonami H. (2020) Probe electrospray ionization (PESI) and its modified versions: dipping PESI (dPESI), sheath-flow PESI (sfPESI) and adjustable sfPESI (ad-sfPESI). *Mass Spectrometry*. 9(1): A0092, DOI: <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.A0092>
- Hiraoka K, Nishidate K, Mori K, Asakawa D, Suzuki S. (2007) Development of probe electrospray using a solid needle. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 21(18): 3139–3144. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.3201>
- Hiraoka K, Rankin-Turner S, Ninomiya S, Wada H, Nakano H, Matsumura M, Sanada-Morimura S, Tanaka F, Nonami H. (2019) Component profiling in agricultural applications using an adjustable acupuncture needle for sheath-flow probe electrospray ionization/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67: 3275–3283. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06424>
- Mandal MK, Chen LC, Yu Z, Nonami H, Erra-Balsells R, Hiraoka K. (2011) Detection of protein from detergent solutions by probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS). *Journal of Mass Spectrometry*. 46 (10): 967–975. DOI: <https://doi.org/10.1002/jms.1977>
- Nakashima T, Wada H, Morita S, Erra-Balsells R, Hiraoka K, Nonami H. (2016) Single-cell metabolite profiling of stalk and glandular cells of intact trichomes with internal electrode capillary pressure probe electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*.

- 88 (6): 3049–3057. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03366>
- Nakata K, Hatakeyama Y, Erra-Balsells R, Nonami H, Wada H. (2022) Dynamics and stabilization mechanism of mitochondrial cristae morphofunction associated with turgor-driven cardiolipin biosynthesis under salt stress conditions. *Scientific Reports*. 12: 9727. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14164-3>
- Usmanov DT, Mandal MK, Hiraoka K, Ninomiya S, Wada H, Matsumura M, Sanada-Morimura S, Nonami H. (2018a) Dipping probe electrospray Ionization/mass spectrometry for direct on-site and low-invasive food analysis, *Food Chemistry* 260: 53–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.003>
- Usmanov DT, Ashurov KB, Ninomiya S, Hiraoka H, Wada H, Nakano H, Matsumura M, Sanada-Morimura S, Nonami H. (2018b) Remote-sampling mass spectrometry for dry samples: sheath-flow probe electrospray ionization (PESI) using a gel-loading tip inserted with an acupuncture needle. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 32: 407–413. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.8045>
- Wada H, Hatakeyama Y, Onda Y, Nonami H, Nakashima T, Erra-Balsells R, Morita S, Hiraoka K, Tanaka F, Nakano H. (2019) Multiple strategies for heat adaptation to prevent chalkiness in the rice endosperm. *Journal of Experimental Botany*. 70(4): 1299–1311, DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ery427>
- Wada H, Hatakeyama Y, Nakashima T, Nonami H, Erra-Balsells R, Hakata M, Nakata K, Hiraoka K, Onda Y, Nakano H. (2020) On-site single pollen metabolomics reveals varietal differences in phosphatidylinositol synthesis under heat stress conditions in rice. *Scientific Reports*. 10(1): 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58869-9>
- Wada H, Nakata K, Nonami H, Erra-Balsells R, Tatsuki M, Hatakeyama Y, Tanaka F. (2021) Direct evidence for dynamics of cell heterogeneity in watercored apples: Turgor-associated metabolic modifications and within-fruit water potential gradient unveiled by single-cell analyses. *Horticulture Research*. 8: 187. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00603-1>