

## 質量分析装置による金ナノ粒子免疫プローブ

鹿児島大院理工

向 大輝, 西 朋紀, 新原旺志, ○新留康郎

### Gold Nanoparticles as an Immunohistochemical Mass Probe Detected by a Conventional Mass Spectrometer

Daiki Muko, Tomoki Nishi, Oji Niihara, ○Yasuro Niidome

*Department of Chemistry and Bioscience, Kagoshima University, Japan*

**【Abstract】** For analysis of minor peptides in a tissue section, immunohistochemical staining through antibody-antigen interaction is a usual technique. Gold nanoparticles, which show excellent chemical stability and variation of surface modifications, are expected to act as a sensitive mass probe to desorb gold ions that are distinguishable from organic ion fragments. Here, green fluorescent proteins (GFP) in a tissue section of a transgenic zebrafish was detected by the gold mass probe conjugated with antibodies. Due to the efficient ionization and desorption of gold ions, imaging mass spectrometry of  $Au_2^+$  ions indicated the distribution of gold nanoparticles stained in a tissue section, and the mass signal distribution was consistent with the area where the GFP-expressing cells were distributed. Conventional immunofluorescence techniques showed intense autofluorescence that come from intrinsic fluorophores in the tissue section. In contrast, the gold nanoparticles acted as an immunostaining mass probe that displayed significantly lower background signals.

**【序】** 金ナノ粒子は金ナノ粒子は、波長 500 nm 以下にバンド間遷移に伴う吸収を有するため、紫外レーザー光照射による金イオン ( $Au^+$ ,  $Au_2^+$ ,  $Au_3^+$ ) の脱離イオン化が高効率に起こる。質量分析装置の検出感度が極めて高いことと、さらに生体内において金のバックグラウンドは非常に低いことから、金ナノ粒子はバックグラウンドシグナルの妨害を受けにくい超高感度なマスプローブとして機能することが期待されている。これまでに、マウスに投与した金ナノ粒子が肝臓や腫瘍に集積する様子を明らかにした[1, 2]。Imaging Mass Spectrometry(IMS)による組織切片の2次元分析は 1 mm 以下の空間分解能を有しており、臓器内に金ナノ粒子がどのように分布するかを明らかにできた。また、ドットブロッキング (メンブレン上にキャストした抗原を評価する) の検出方法としても金ナノ粒子マスプローブが利用可能であることも報告した[3]。一方で、金ナノ粒子のイオン化効率には切片の厚みやナノ粒子の形状や凝集状態にも依存することも明らかになっている[4, 5]。金ナノ粒子をマスプローブとして用いて定量的な分析を行うには、現状ではまだ多くの要素に配慮する必要がある。本研究では GFP を発現した遺伝子改変ゼブラフィッシュの組織切片を抗体修飾金ナノ粒子を用いて染色した。IMS によって得られたナノ粒子の分布と蛍光像による GFP の発現位置を照合し、金ナノ粒子のマスプローブとしての機能性を評価した。さらに、金ナノ粒子を均一に分散したゼラチン切片を作製し、ナノ粒子の形状やサイズが金イオンの脱離イオン化に与える影響を評価することを試みた。

### 【方法 (実験・理論)】

クエン酸還元法で作製した球状粒子溶液(0.9 mL, 粒径  $28 \pm 3$  nm, 金原子濃度 12.5 mM)に  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液 (pH = 8, 50 mM, 0.1 mL) と Cy3 ラベル Donkey anti-rat IgG (H+L) 溶液 (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0.5 mL) を加えた。10 分後 PEG 溶液 (Mw 20,000, 1 wt.%, 50  $\mu\text{L}$ ) と BSA 溶液 (10 wt.%, 0.1 mL) を加え、遠心分離によって精製し抗体修飾金ナノ粒子とした。網膜に GFP を発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュ (Tg(isl2b: GFP)<sup>z7</sup>) の眼球の組織切片を作製し、Rat anti-GFP IgG で染色した。さらにその後、抗体修飾金ナノ粒子溶液に浸漬した。質量分析には汎用の MALDI-MS 装置 (Autoflex Speed, Bruker) をイメージングモードで用いた。

### 【結果・考察】

図 1 に眼球組織切片の蛍光像(A)と、光学像とマスシグナル強度分布( $\text{Au}^+$ )を重ねた像(B)を示す。蛍光像(A)の真ん中付近で折れ曲がって点々と光っている部分が網膜である。野生種でも網膜に加えて最外層の強膜に強い蛍光が観察された。眼球は自家蛍光が強く、蛍光像だけから GFP の発現位置を特定することは難しいことがわかる。一方、IMS 像(B)では金ナノ粒子の分布が網膜部分から脈絡膜の方 (眼球の外側) へ広がっていることがわかる。強膜部分を含め眼球の周辺部分にはほとんどマスシグナルは見られない。質量分析では  $10^{-18}$  mol/ $\text{mm}^2$  程度の極めて少量の金ナノ粒子を検出可能であることを考えると、図 1 の試料では非特異的に吸着した金ナノ粒子は極めて少ないことがわかる。ゼラチン切片に分散した金ナノ粒子から得られるシグナル強度と濃度との相関は良い直線性を示すことも明らかになった。すなわち、少なくとも網膜の部分についてはマスシグナル強度分布は金ナノ粒子の密度分布、すなわち GFP の発現密度を示していると考えられる。

金ナノ粒子は免疫染色に利用可能なマスマスプローブとして機能し、蛍光イメージングよりも高感度かつ選択的に網膜に発現した GFP の存在を明らかにすることができた[6]。

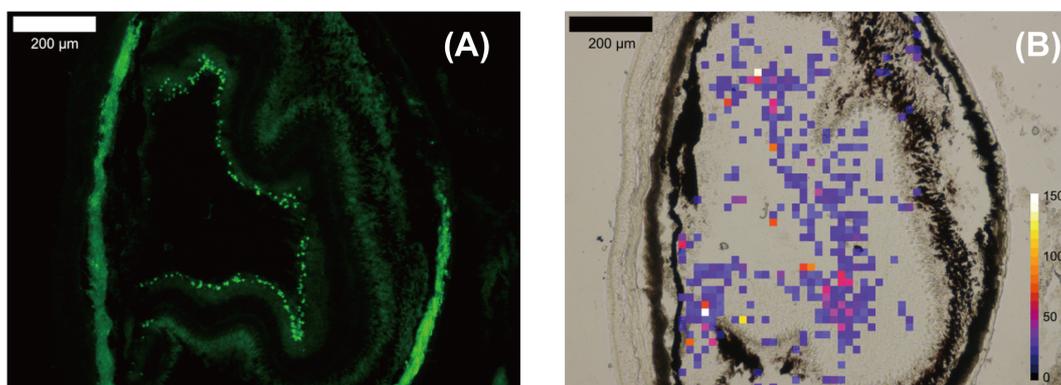


Fig. 1. Fluorescence (A) and an overlap of the optical and the mass image images (B).

### 【参考文献】

- [1] T. Niidome, M. Fujii, N. Nakashima, Y. katayama, Y. Niidome, Chem. Lett., 44, 931, (2015).
- [2] M. Fujii, N. Nakashima, T. Niidome, Y. Niidome, Chem. Lett., 43, 131, (2014).
- [3] D. Muko, Y. Niidome, Chem. Lett., in press.
- [4] Y. Niidome, M. Fujii, N. Nakashima and T. Niidome, *MRS Proceedings*, 1719 (2015).
- [5] D. Muko, Y. Inoue, A. Nishitani, Y. Niidome, Analytical Methods, 9, 1177, (2017).
- [6] D. Muko, T. Ikenagara, M. Kasai, J. B. Rabor, A. Nishitani, Y. Niidome, J. Mass Spectrom., submitted.