



Title	A Study on Single-cell Analysis by a Stigmatic-type Imaging Mass Spectrometer using Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization Technique
Author(s)	Brijesh
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/76362">https://hdl.handle.net/11094/76362</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## Abstract of Thesis

Name ( BRIJESH )	
Title	A Study on Single-cell Analysis by a Stigmatic-type Imaging Mass Spectrometer using Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization Technique (ナノ粒子支援レーザー脱離・イオン化法を用いた投影型イメージング質量分析装置による一細胞分析に関する研究)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) imaging is a powerful and successful tool to visualize the distribution of biomolecules in the biological tissues and cells. However, a sub-cellular scale lateral resolution is still difficult to obtain by the conventional scanning-type MALDI imaging mass spectrometer because of the dependence of spatial resolution on the laser spot size, which is usually in the range of 10–100 <math>\mu\text{m}</math>. One more issue is the extremely long measurement time. Many researchers have optimized MALDI laser to smaller spot sizes, but the issue of long measurement time remains. To address this problem, a stigmatic-type imaging mass spectrometer equipped with a position- and time-sensitive detector, in which the spatial resolution is not dependent on the laser focus diameter was used in this study. In a stigmatic-type imaging mass spectrometer, the spatial distribution is determined by the combination of the magnification of the ion distribution by the ion optics and the pixel size of the detector. Thus, it has the potential to achieve a high spatial resolution. Furthermore, the measurement time can also be reduced by analyzing a large sample area in a single shot.</p> <p>Other issues in MALDI are associated with organic matrices. The organic matrices, when deposited on the sample after mixing in a solution, forms large matrix-analyte co-crystals, which reduces the image resolution. Also, organic matrices are easily ionized, so they produce many interference peaks. Moreover, the deposition of the matrix in wet form can cause the migration of the analytes in the sample which results in the reduction of the image quality.</p> <p>SALDI (Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization) MS is an alternative technique to MALDI MS where inorganic nanoparticles and nanostructured surfaces are used as a matrix instead of traditional MALDI matrices. SALDI MS is getting popularity over the last decade because of the unique properties of nanoparticles and some of its advantages over MALDI MS advantages such as easier sample preparation, low background noise.</p> <p>The nanoparticles, if applied as a matrix in dry form, increases the shot-to-shot reproducibility because</p>	

of better homogeneity as compared to the conventional organic MALDI matrix applied in wet form. The use of nanoparticles can solve the problem of reduced image quality caused by the large size of matrix crystals. And, the deposition of the organic matrix by sublimation or deposition of the nanoparticles by sputtering can remove the wet deposition problem. The deposition of the nanoparticles by sputtering is rather straightforward than the sublimation deposition of the organic matrix. Considering all these advantages of nanoparticles over the traditional organic matrix, nanoparticles were used as a matrix in this study.

A standard lipid 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) using 7 nanoparticles ( $TiO_2$ ,  $CeO_2$ ,  $WO_3$ , Ag,  $ZnO$ , CaO,  $Fe_2O_3$ ) and organic DHB matrix and, amoeba cells using the same 7 nanoparticles ( $TiO_2$ ,  $CeO_2$ ,  $WO_3$ , Ag,  $ZnO$ , CaO,  $Fe_2O_3$ ) were analyzed by a scanning-type MALDI Spiral-TOF mass spectrometer for the selection of the appropriate nanoparticle for single-cell analysis. The metal oxide nanoparticles were deposited on the sample in the wet form after mixing in a solution using a pipette and, the Ag NPs were deposited in dry form using an ion sputtering instrument. After screening all these nanoparticles, the  $Fe_2O_3$  NPs were found to be most effective for the analysis of lipids in the amoeba cells.  $Fe_2O_3$  NPs and Ag NPs were selected for further analysis.  $Fe_2O_3$  NPs were selected because they were most suitable and Ag NPs were also selected because they can be deposited in dry form which is suitable for imaging analysis. Then the imaging analyses of amoeba cells were performed using  $Fe_2O_3$  NPs and Ag NPs. However, the spatial resolution of the images was reduced when  $Fe_2O_3$  NPs were used because they were deposited in the wet form which may have caused the migration of the cells or the analytes in the cells.

HeLa cells were analyzed using Ag nanoparticles, which can be deposited in the dry form, by the scanning-type MALDI Spiral-TOF mass spectrometer and, a spatial resolution of  $30\mu m$  was achieved. Then, single HeLa cells were analyzed by a stigmatic-type imaging mass spectrometer using Ag nanoparticles and, a spatial resolution of  $2\mu m$  was obtained as a result.

The stigmatic-type imaging mass spectrometer equipped with a position- and time-sensitive detector and in combination with nanoparticle-assisted laser desorption/ionization technique showed the potential for high spatial resolution single-cell imaging. Since single-cell analyses are very important for understanding cell metabolism, cellular functions, and disease states, this study will be of great importance for the single-cell biologist and mass spectrometry researchers and inspire them to adopt stigmatic-type imaging mass spectrometer for single-cell analysis.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 ( Brijesh )		氏名
論文審査担当者	主査 教授	豊田岐聰
	副査 教授	兼松泰男
	副査 教授	松野丈夫
	副査 教授	上田昌宏
	副査 准教授	久富修

## 論文審査の結果の要旨

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 質量分析イメージングは、生体組織および細胞内の生体分子の空間分布を視覚化する強力なツールになっている。しかし、従来の走査型 MALDI イメージング質量分析計では、レーザー集光径 (10–100  $\mu\text{m}$ ) が空間分解能を制限するため、細胞レベル以下の空間分解能で生体分子を視覚化することはできない。また、もう 1 つの問題は、測定時間が非常に長いことである。これらの問題を解決するために、位置と時間を同時に計測可能な検出器を備えた投影型イメージング質量分析計が当研究室で開発されてきている。この装置では、空間分解能はレーザー集光径に依存せず、空間分布は、イオン光学系によるイオン分布の拡大率と検出器のピクセルサイズの組み合わせによって決まる。したがって、高い空間分解能を達成することが可能である。さらに、1 回のレーザー照射で広い領域のイメージを取得でき、測定時間も短縮できる。

一方で、MALDI では、イオン化の補助剤として有機マトリックス用いることが、空間分解能に悪影響を与えている。溶媒に溶かしたマトリックスをサンプルターゲットに滴下すると、マトリックスと被分析物の  $\mu\text{m}$  以上のサイズの大きな共結晶を形成し、この結晶サイズが画像の解像度を低下させる。また、有機マトリックスは、低分子量域の多くの干渉ピークの原因となる。これらの問題を解決するために、本研究では、まず有機マトリックスの代わりにナノ粒子をマトリックスとして用いることにし、最適なマトリックスの探索を行った。

走査型 MALDI Spiral-TOF 質量分析計により、金属酸化物ナノ粒子  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CeO}_2$ ,  $\text{WO}_3$ ,  $\text{Ag}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  を用いて、アーベバ細胞を分析した。金属酸化物ナノ粒子は、溶媒に混合した後、サンプル上に液体状態で滴下した。 $\text{Ag}$  ナノ粒子は、イオンスパッタリング装置を使用して乾燥状態で蒸着した。その結果、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ナノ粒子がアーベバ細胞の脂質の分析に最も効果的であることがわかったが、液滴を滴下した際に液滴中で分子の移動が起こってしまうことが確認された。そこで、イオン化効率も比較的良好で、かつ乾燥状態でナノ粒子を付着可能な  $\text{Ag}$  ナノ粒子の蒸着が有効であるという結論に達した。そこで、HeLa 細胞を、 $\text{Ag}$  ナノ粒子を用いて分析した。走査型 MALDI Spiral-TOF 質量分析計では、空間分解能は 30  $\mu\text{m}$  であった。

次に、HeLa 細胞を、 $\text{Ag}$  ナノ粒子を用いて投影型イメージング質量分析計で分析した。その結果 2  $\mu\text{m}$  以下の高い空間分解能が得られることが実証できた。ナノ粒子支援レーザー脱離イオン化技術と組み合わせた投影型イメージング質量分析計は、高空間分解能の単一細胞イメージングの可能性を有することを、本研究により実証した。一細胞分析は、細胞代謝、細胞機能、および疾患状態を理解するために非常に重要な分析手法であり、本研究は、これらの研究への道を拓くものである。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として、十分価値あるものと認める。