

[21003]

MeV 級の C_{60} イオン照射によるペプチド薄膜のイメージング質量分析

Transmission SIMS Imaging of Peptide Films Using MeV C_{60} Ions

中嶋薫^{#A)}, 竹内伸志^{A)}, 中村圭介^{A)}, 澤村建太^{A)}, 種市泰河^{A)},
Kaoru Nakajima^{#A)}, Shinji Takeuchi^{A)}, Keisuke Nakamura^{A)}, Kenta Sawamura^{A)}, Taiga Taneichi^{A)}

^{A)} Department of Micro Engineering, Kyoto University

Abstract

Transmission SIMS imaging using MeV C_{60} primary ions, which was developed by our group, can provide a sensitive molecular imaging for organic materials including biological samples with sub-micron lateral resolution. In this work, test samples consisting of Des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin as the analyte were analyzed using 9 MeV C_{60}^{2+} ions. Clear images of the lateral distribution of Bradykinin molecules were obtained for samples with a micropattern and the lateral resolution was found to be better than 1.8 μm . The efficiency of imaging significantly depended on the sample thickness, which indicates that it is quite important for the thickness to be appropriately controlled for IMS with high sensitivity.

Keyword: Imaging Mass Spectrometry, transmission SIMS, Fullerene, peptide

1. はじめに

薬剤や代謝物の動態解析や疾病の診断等のために、それらが生体組織や生体細胞内のどこに局在しているかを調べる分析手法が必要とされている。特定の分子を染色したり蛍光物質で修飾したりせずに、多種多様な物質の空間分布やそれらの相関を可視化できる手法として、イメージング質量分析 (IMS) に対する期待は大きい。高分子に対する高い感度を持つため現在主流となっている、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) を用いた IMS は、横方向分解能が数 10 μm 程度であるが、この分解能では 1 細胞内の局在情報を得るには十分ではない。

当研究室では、透過型の二次イオン質量分析 (透過型 SIMS) ^[1,2] を用いた、原理的にサブ μm の横方向分解能を実現可能なイメージング装置を開発した。本装置では、Fig. 1 に示すように極薄のアモルファス窒化シリコン (SiN) 自己支持膜に担持された薄膜状の試料を用いる。試料の支持膜 (SiN) 側から高速の C_{60} イオンを一次イオンとして照射し、1 個の一次イオンごとに、試料の下流側の表面から前方に放出される二次イオンと、上流側の表面から後方に放出される二次電子を同時計測する。二次イオンを質量分析してイオン種を特定するとともに、その試料上の発生位置を裏面の二次電子の放出位置から決定する。

前年度までに、アミノ酸 (フェニルアラニン) の

マイクロパターンを持つ評価用試料について、一次イオンとして 9 MeV の C_{60} イオンを用いたイメージング実験を実施し、フェニルアラニン分子を高感度かつ高い横方向分解能 ($\leq 1 \mu\text{m}$) でイメージングできることを実証した^[3]。

本研究では、さらに高質量の生体分子の高感度・高空間分解能イメージングに向けて、ペプチド (ブラジキニン) のマイクロパターンを持つ評価用試料のイメージング実験を行った。横方向分解能 ($\sim 1 \mu\text{m}$) でイメージングでき、試料の厚さによってブラジキニン由来の高質量イオン種の収率が大きく変化することも分かった。

2. 実験方法

2.1 試料の作製

試料は SiN 自己支持膜 (薄膜サイズ $4 \times 4 \text{ mm}^2$ 、厚さ 50 nm、Silson 社製) の両面に各種物質を真空蒸着することで作製した。イメージング実験時の一次イオンの入射面 (上流側の面) に、帯電防止のために金 (上面、厚さ $\sim 5 \text{ nm}$) とアルミニウム (下面、厚さ $\sim 15 \text{ nm}$) の二層膜を蒸着した。また一次イオンの出射面 (下流側の面) に、分析対象として Des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin (ブラジキニン、厚さ $\sim 40 \text{ nm}$) を蒸着した。さらにブラジキニン薄膜の上に、マイクロパターンを作製するために TEM 用の銅グリッドメッシュ (300 mesh) をマスクにしてアルミニウム (厚さ $\sim 15 \text{ nm}$) を蒸着した。

2.2 透過型 SIMS イメージング実験

9 MeV の C_{60}^{2+} イオンを一次イオンとして、試料表面に対して 45° の角度で入射した。試料を透過したイオン (入射した C_{60} イオンは試料中で解離して単原子の C イオンの集団として出射する) を試料の下流に設置したシリコン表面障壁型検出器 (SSBD) で検出し、その信号を同時計測のトリガー信号、および二次イオンの飛行時間質量分析のための start 信号として使用した。透過イオンによって試料の下流側表

Secondary electrons $\rightarrow$ position

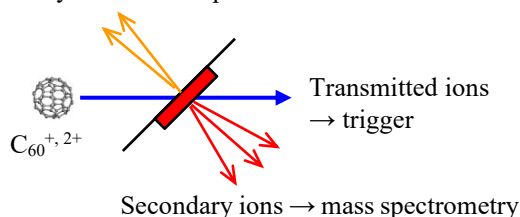


Figure 1. Schematic of the concept of transmission SIMS imaging.

#nakajima.kaoru.4a@kyoto-u.ac.jp

[21003]

面から放出された二次正イオンを、飛行時間型質量分析計で質量分析した。それと同時に、試料の上流側表面のイオン照射点から放出された二次電子を、二次電子顕微鏡によって蛍光アノードを組み込んだマイクロチャンネルプレート (MCP) 上に拡大・結像させて、イオン照射点に対応する蛍光アノードの輝点を高速 CMOS カメラで写真撮影した。写真の PC への保存が終了したことを示す信号を含めて、各信号にタイムスタンプを付与してリストモードで収録することで、オフラインで各信号を結合したデータを得ることができる。すなわち、1 個の透過イオンの検出に対して、二次電子の放出位置 (= 一次イオンの照射位置、二次イオンの放出位置) と二次イオンの飛行時間スペクトルが得られる。なお、本顕微鏡は Focus 社製の光電子顕微鏡 (PEEM) を本装置用に一部改造した物である。顕微鏡の主な運転パラメータは、引出電圧: 10 kV、コントラストアパーチャ径: 150 μm 、視野径 (公称値): 138 μm であった。また CMOS カメラの露光時間は 1.6 ms で、写真は 750×750 pixel の画像ファイルとして保存した。

3. 結果および考察

3.1 二次正イオンのマススペクトル

二次正イオンのマススペクトルの例を Fig. 2 に示す。無傷のブラジキニン分子 (分子量 870.1) のイオンは検出されなかったが、ブラジキニン由来の特徴的なフラグメントイオンのピークが多数観察された。無傷の分子イオンが検出されなかった原因は、試料作製時において真空蒸着によって薄膜を作製した時に分子が熱分解したためだと考えられる。

3.2 ブラジキノンのイメージング

ブラジキニン由来と特定される二次イオン種 (m/z 167, 196, 254, 283, 333) の検出と同時に撮影された顕微鏡写真を抽出し、輝点の重心を 1 枚の画像に重ねてプロットすることにより、ブラジキノンの面内分布を表すイメージを作成した。Fig. 3 が得られたイメージの例である。明るく表示されている点がブラジ

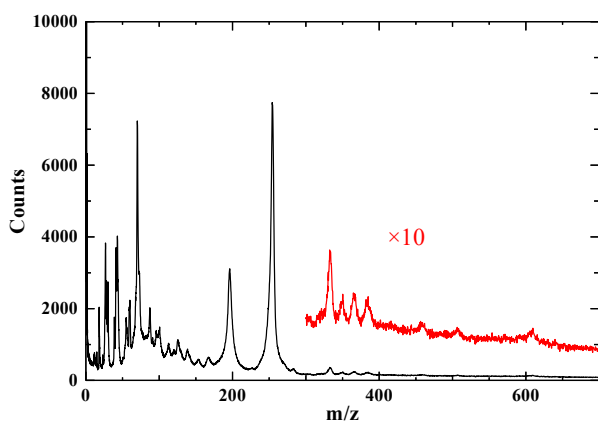


Figure 2. An example of the observed mass spectrum of positive secondary ions.

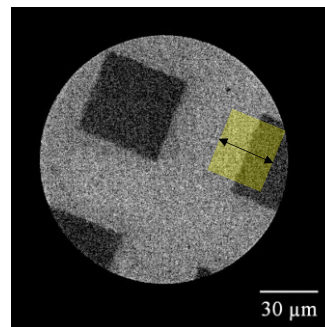


Figure 3. An example of the observed mass spectrum of positive secondary ions (Total Counts: 293623, Maximum Counts: 11).

キニン由来の二次イオンが放出された位置、すなわち試料表面のブラジキノンの分布を表している。正形状の暗い部分は試料の下流側表面にアルミニウムが蒸着された領域に対応している。本イメージについて、得られたパターンのエッジの幅から横方向分解能を評価した。図中で黄色の網掛けを施した領域に関して、エッジに直角な方向の強度プロファイルを作成し、エッジ部分を相補誤差関数でフィッティングすることでエッジの幅を求めた。その結果、約 $1.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ の値が得られた。ただし、実際のフェニルアラニンの分布が完全に急峻なエッジを持たないことや、エッジのラインが完全に直線的でないことを考慮すると、本来の横方向分解能はこの値よりかなり小さい可能性がある。

3.3 イメージングの効率に対する試料膜厚の影響

Fig. 3 に示したイメージでは、透過イオンの検出数が 2568474 であるのに対して、293623 の輝点の重心がプロットされている。したがって、透過イオン検出の総イベントのうち、ブラジキノンの面内分布を得るのに有効に利用されたイベントの割合 (イメージングの効率) は約 0.114 であった。この値は昨年度に同じく透過型 SIMS イメージングを行ったフェニルアラニンの試料の場合とほぼ同程度である。一方で、同じ設計値で作製した別の評価用試料を使って実験した場合、試料によってはイメージングの効率が約 0.017 まで低下することがあった。この効率低下の原因は、試料膜厚が設計値より厚かったためだと考えられる。また試料膜厚が薄すぎても効率が少し低下することも分かった。高エネルギーの C_{60} イオンを用いた透過型 SIMS では、試料の膜厚が分析対象の分子の特定に利用できる二次イオン収率に大きな影響を与え、それがイメージングの効率にそのまま反映される。このため、今回の評価用試料に限らず、試料の膜厚を正確に調整することが重要であることが分かった。

4. まとめ

当グループで開発した透過型 SIMS イメージングを用いた、さらに高質量の生体分子の高感度・高空間分解能イメージングに向けて、ペプチド (ブラジ

[21003]

キニン) のマイクロパターンを持つ評価用試料のイメージング実験を行った。明瞭なイメージング結果が得られ、横方向分解能は $1.8\ \mu\text{m}$ より良いことが示された。試料の厚さによってブラジキニン由来の高質量イオン種の収率が大きく変化し、イメージングの効率が変化することも分かり、試料の膜厚を最適に近い値に正確に調整することが重要であることが示された。

参考文献

- [1] K. Boussofiane-Baudin, et al., “Non-linear sputtering effects induced by MeV energy gold clusters”, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B **88** (1994) 61.
- [2] K. Nakajima, et al., “Transmission secondary ion mass spectrometry using 5 MeV C_{60}^{+} ions”, Appl. Phys. Lett. **104** (2014) 114103.
- [3] S. Kitamura et al., QST Takasaki Annu. Rep. 2019, **QST-M-29** (2021) 131.