

質量顕微鏡の開発

瀬藤 光利^{a, b, c*}, 松本 峰男^b, 細川 直史^{b, c}, 杉浦 悠毅^{b, c}, 早坂 孝宏^a^a大学共同利用機関法人自然科学研究機構生理学研究所, ^b三菱化学生命科学研究所・分子加齢医学研究グループ^c東京工業大学大学院生命理工学研究科

キーワード：質量顕微鏡法, イメージング質量分析, マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法, プロテオーム, メタボローム

1. はじめに

1590年頃オランダのヤンセン親子が顕微鏡を發明して以来今日まで、肉眼では見えない小さなものを見たいという思いを持つ科学者が、顕微鏡そのものやその周辺の技術に数多くの改良を施してきた。また研究者の欲求がより小さなものを見たいということから、観察対象が何であるか知りたいという思いへと変わっていくにつれて、さらに数多くの観察手法や同定手法が開発されてきた。これらに携わった先人達の苦勞や業績は偉大なものであり^{1,2)}、筆者もその恩恵を多分に受けてきた。

しかしこれら従来の手法には未だ多くの問題点が存在する。例えば顕微鏡を用いる際に、実は多くの場合我々は知っているものしか“見る”ことが出来ない。それを示す良い例が、胃潰瘍にまつわるエピソードである。現在では胃潰瘍はヘリコバクターピロリ菌によって生じると判明しており、胃の中に細菌がいることは広く知られるようになった。しかし、オーストラリア人のバリー・マーシャル氏とロビン・ウォレン氏の両名が、ピロリ菌によって胃潰瘍が生じるということを発見するまでは、病変組織にピロリ菌が存在し、我々の網膜には映っていたのにもかかわらず、誰もピロリ菌を“見る”ことができなかったのである。これは胃の中は塩酸によって強酸性であり、殺菌されているという当時の常識によるところが大きい。誰もが細菌などいるはずがないと無条件に信じこんでしまい、そこにいる細菌を見ることが出来なくなっていたのである。一方、ひとたび菌が存在することが常識になってからは、見えなかったところとまったく同じ装置と処理を用いているのにもかかわらず、誰にでもそれを見ることが可能となった。不思議な事実であるが、このことは見るということの難しさを端的に示す良い例である。このような、見えているのに見えていないといった事態を防

ぐためには先入観のない確かな観察が必要であると同時に、形態学だけに頼らずに生化学等を用いた解析からの知見と統合して理解を深めていくことが重要であると考えられる。本稿では物質の生化学情報とその局在情報を同時に知るための新たなツールとして我々が開発した質量顕微鏡について以下に説明する。

2. 背景

2.1 分子を同定しつつイメージングする顕微技術への期待の高まり

ヒトゲノムプロジェクトが完了し、ヒトや他の生物を構成する分子について多くの情報をもたらされた現在において、次の課題はそれら分子の生体における分布を分析することである。こうした欲求は医療現場においても強い³⁻⁵⁾。

2.2 従来の観察手法の問題点

顕微鏡を用いて生体分子の同定観察を行おうとする場合、現在主に二種類の手法が汎用されている。一つは抗体を用いる方法で、免疫反応を利用して観察したい対象に結合する物質（抗体）を作製し、その抗体を蛍光で標識することによって対象物質の局在を明らかにする手法である⁶⁾。もう一つは、遺伝子改変手法を用いて対象遺伝子にオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) を結合させることによって観察する手法である。

筆者もこれらの手法を駆使して顕微鏡による生体分子の観察を行ってきた⁷⁾。これまでに、ニューロン樹状突起シナプス部に NMDAR2 サブユニットを輸送するモータータンパク質 KIF17 の解析⁸⁾を行い、最近では微小管を構成するチューブリンタンパク質に対する翻訳後修飾の一つであるポリグルタミン酸化を司る酵素を同定し、ポリグルタミン酸化のニューロン内での機能を明らかにした^{8,9)}。

しかしこれらの抗体や GFP を利用した手法、さらには、ナノバイオテクノロジーを用いたラベル法¹⁰⁻¹³⁾も、あくまで間接的な観察法、つまり実際に観察しているのは抗体や GFP、ナノプローブが発する蛍光であり、意図する観察対象を直接見てはいないのである。そのため真に観察したい分子は、得られた顕微鏡像と違った挙動をしていたという事例には事欠かない。さらに本質的な問題としては、観察のために

Mitsutoshi Setou, Mineo Matsumoto, Naofumi Hosokawa, Yuki Sugiura and Takahiro Hayasaka: Development of mass microscopy

〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1

TEL: 0564-59-5267; FAX: 0564-59-5291

* E-mail: setou@nips.ac.jp

2007年11月2日受付

は対象分子がすでに同定されていないからという制約がある。抗体を作るにせよ、GFPをつけるにせよ、当然ながらこれらは分かっているモノに対しては行えない。初めて見るモノ、あるいは未知のモノに対して、従来の抗体やGFPを用いた観察手法は一般に無力である。そのため、電子顕微鏡を用いて“ありのままに”高解像度で物質同定を伴った観察ができないかという試みが期待を集めてきた^{14,15}。無染色試料を高コントラストで観察するヒルベルト微分コントラスト電子顕微鏡を初めて哺乳類細胞の観察に適用し、その細胞内ナノ構造をとらえた¹⁶などの事例もあるが、今の段階では生物試料は電子線ダメージの問題から、原子分解能には程遠く、微小管のような巨大かつ特徴的な構造物の同定にとどまっている。また分析電頭は原子同定ができる有効な手段であるが、今のところ有機分子の分子構造の観察は困難である。

3. 質量顕微鏡とは

以上の問題を解決する顕微鏡として我々が開発を進める質量顕微鏡とは、これまでの光を検出する光学顕微鏡や、電子を検出する電子顕微鏡と異なり、質量を検出することで可視化を行う手法である(図1)。以下に詳細を説明する。

3.1 質量分析法 (Mass Spectrometry; MS)

質量分析法(以下MS)とは原子・分子・クラスターなどの粒子を何らかの方法で気体状のイオンとし、それらイオンの質量と電荷の比に応じて分離・検出し、質量数を分析する手法である。また単純な質量の分析だけでなく分子の構造解析も可能である。構造解析の原理は質量分析装置内でイオン化した分子を分解し、断片イオンの質量数を測定するという

ものである。この構造解析はMSを複数回行うことからMSⁿ解析と呼ばれる。化合物の質量数や構造解析で得られたデータとデータベースを参照することで化合物の同定も可能である。タンパク質のような大きな分子でも断片のペプチドやアミノ酸の構成から複雑なタンパク質の分子配列の構造を解析することが出来る。これらを行う分析装置の一つで我々が使用している装置に飛行時間型質量分析計(time-of-flight (TOF) mass spectrometer, 以下TOF-MS)がある。これは高質量範囲測定、精密質量測定で他の装置より優れている。質量分析技術は、例えば、プロテオミクスと呼ばれるタンパク質の網羅的解析において革新的な発展をもたらした。プロテオミクスとはタンパク質をプロテアーゼで消化し、MSで得られた情報をタンパク質・核酸配列データベースで検索して同定するボトムアップ方式の解析法である。分析精度の向上とデータベースの発達も相まって、質量分析は生体物質の同定やタンパク質の翻訳後修飾を始め実に様々な目的に用いられるようになった。

3.2 イオン化法

質量分析法においてはいくつかのイオン化法が用いられるが、本項の主題である質量顕微鏡法においては二次イオン化とマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI; matrix-assisted laser desorption/ionization)による質量分析が一般的である。二次イオン化質量分析法(SIMS)は解像度の点で優れているが原子レベルに分解が起きるため生体分子の解析には不向きであった。ただし、ごく最近クラスターSIMSの登場により改善しつつある。MALDIは観察対象にマトリックスを塗布し結晶を作り、そこにレーザーを照射し短時間に急激に熱を発生させ対象分子をイオン化させるという手法である。田中耕一((株)島津製作所)氏が、MALDIの発見で2002年のノーベル化学賞を受賞したことは記憶に新しい。従来のイオン化法では壊れやすかった分子量 $\sim 10^5$ Da領域のタンパク質などの生体分子までイオン化することが出来る。

3.3 質量顕微鏡法 (Mass Microscopy)

質量顕微鏡法とは質量分析の解析の次元を、これまでの一次元から二次元へと上昇させた手法である。通常、質量分析法では前処理として解析対象分子を分離・精製しなければならず、組織細胞内での分布や局在という位置情報が失われてしまうという欠点が残されていた。これを対象分子の位置情報が得られる状態で解析出来るようにしたのがイメージング質量分析、質量分析イメージング、マスイメージング等と呼ばれる手法である。どれも同じものを指すが、日本語の特性として、後に来る言葉の方に重点が置かれる。イメージング質量分析は分析法の一種という意味合いが強く、分析化学や質量分析の立場の人が好み、質量分析イメージングはイメージングという意味合いが強く、より画像化技術に力点が置かれている傾向がある。イメージング質量分析では対象分子の同定および局在情報の取得を同時に行うために、薄切片とした生体試料にマトリックスを噴霧して均一な微細結晶を作り、レーザーで二次元走査することによってイオン化を行

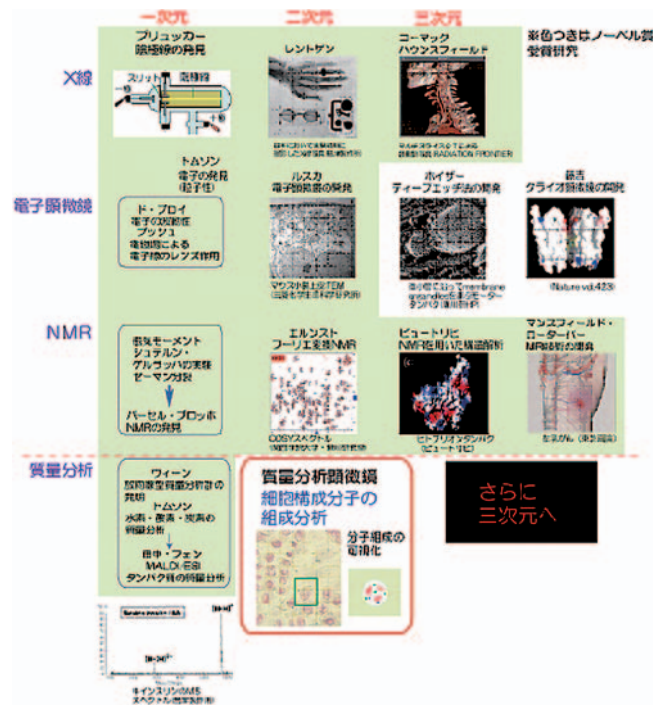


図1 多彩な顕微鏡法の物理的源流。

い、レーザーを照射した場所ごとに発生したイオンをTOF-MSで検出する手法が一般に用いられる¹⁷⁾。1990代にスタートした初期のイメージング質量分析の解像度は0.1mm～1mm程度と肉眼解像度程度であった。

それらが21世紀に入ってより進化して肉眼解像度を超えるようになり、顕微鏡の定義（肉眼解像度を超える解像度を持つイメージング手法）を満たすようになった。生体組織の切片上において数千点に及ぶ質量分析を行うことになるため、膨大な情報を取り扱うことになる。この手法によりタンパク質・ペプチド・脂質を生体組織上で位置情報を保持したまま解析する事が可能になり、病理組織への応用が報告されるようになってきた。質量顕微鏡および質量顕微鏡法の誕生である。

質量顕微鏡は現在までに、日本で筆者らのグループ（自然科学研究機構を中核とした島津製作所、癌研究会、理化学研究所、大阪大学、三菱化学生命科学研究所との開発チーム）、米国でCaprioliらのグループ¹⁸⁾、欧州でHeerenらのグループ¹⁹⁾が主導して研究を進めてきた。

ちなみに、筆者はこの装置を名付けるにあたって、以前に使用されていないことを確かめた上で、質量分析顕微鏡、略して質量顕微鏡と名付けた。ところが科学技術振興機構の予算をいただく際に、分析家の先生から、顕微質量分析装置の方がよいのではないかと、との指導が入り一度は顕微質量分析装置と改名した。その後、日経バイオテクノロジーの宮田氏にこれらの名前をお話したところ、質量顕微鏡が今後使われるでしょう、ということであった。実際、その後数年が経ち、使用頻度をGoogleで調べると、たしかに宮田氏の予言どおり質量顕微鏡が圧倒的に多く、数万件がヒットする。どうすべきか日本質量分析学会および国際質量分析学会の用語委員である内藤先生と相談するが、科学的にどれも正しい場合、皆が一番使っている用語が正しい言葉ではないか、というのが今のところの我々の結論である。先日のイメージング質量分析と質量顕微鏡法に関する初の国際会議、第一回サニベルカンファランスでも同様の結論であった。英語圏ではMass Microscopyという単語が我々とほぼ同時にオランダ、オーストリアで使われ始めている。Imaging Mass Spectrometry, Mass Spectrometry Imagingの両者ではImaging Mass Spectrometryの方が良く使われているが、Ionmobility Mass Spectrometryと同じIMSと略されるために嫌がる研究者も多く、結論には達していない。いずれにせよ、日本語圏、特に顕微鏡学会の諸兄には質量顕微鏡で良さそうである。

4. 質量顕微鏡法の実際

細胞内の生体分子の分布を測定しようとした場合、一つの細胞内にある生体分子の量はきわめて微量である。当然ながら、このような超微量分子を検出するためには高感度検出技術が必要となる。そのためにはイオンを高効率で発生させ、そのイオンを高効率で捕集し、さらに高効率で質量分析計に搬送しなくてはならない。これらを達成するために、装置の高感度化と試料の適切な前処理法の開発を行った。

4.1 装置開発のポイント

開発した実験機は光学観察系、レーザー照射系、イオン捕集・搬送系、質量分析系およびデータ処理系で構成されている(図2)。それぞれの重要な開発項目について概要を紹介する。

4.1.1 光学観察系

試料を置く光学観察系は大気圧も可能なシステムである。大気圧下でイオン化が可能なMALDI法をベースとした質量顕微鏡を開発中である。実際に我々は解像度10 μm 以下のレベルにて、この大気圧型質量顕微鏡のプロトタイプ機を製作することができた(原田および瀬藤, 2007年度アメリカ質量分析学会)。

4.1.2 レーザー照射系

レーザー照射系は、観察で着目した部位を正確に分析するために微小径のレーザー光を試料に照射し、微小領域のイオン化を行うシステムである。観察光軸とレーザー光軸を別々に制御することにより、レーザー照準精度を1 μm 以下、照射スポット直径を5 μm に抑えることが出来た。標準的な市販装置のレーザー照射スポット直径は約50 μm であり飛躍的に改善した。

4.1.3 イオン捕集・搬送系

本装置では、試料のイオン化は大気圧付近の圧力領域で行われる。このために質量分析部は高真空中で動作させる必要がある。イオン捕集・搬送系では差動排気システムとなっている。質量顕微鏡法において生体組織から直接生成される分子の情報をより正確に得るためには、従来型よりも広範囲の質量を持つイオンを捕集する必要がある。また、生体組織からは多種のイオンが生成するが、これらを分離検出できなければならない。もしも選択分離能(=質量分解能)が十分でない場合には、得られた質量スペクトル内で隣接するピークが一体化してしまい、分析精度が低下してしまう。本装置では、この問題への対応としてデジタルイオントラップ装置を

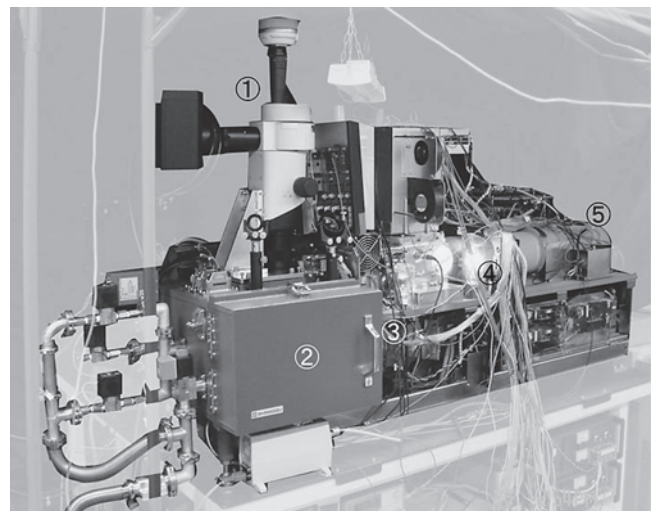


図2 質量顕微鏡プロトタイプ機の概観。①顕微鏡部 ②試料チャンバー(以上、大気圧) ③イオン搬送系 ④デジタルイオントラップ ⑤リフレクター型飛行時間質量分析計。

開発、搭載した。これは印加電圧の周波数をデジタルに変化させ、高電圧にせずイオンをトラップすることができる装置で、従来のイオントラップの問題点であった高電圧下の放電によるイオン収率の低下を防ぎ、高効率でイオンを集められるようになった。

4.1.4 質量分析系

さらに2008年完成予定の次世代の質量顕微鏡においては、質量分解能を向上させるために、新開発の高分解能マルチターン飛行時間型 (multi-turn TOF; mTOF) 質量分析器を用いることを計画している。通常のTOFでは質量分解能が飛行時間に比例するため分解能の向上には装置を大型化する必要があるが、mTOFではイオンを周回飛行させることにより装置を大型化せずに高い分解能を得られることが期待される。

4.1.5 データ処理系

試料のイメージングの際には顕微鏡で取得した試料画像内で、任意の測定領域を指定し、任意の解像度で自動2次元スキャンを行える。一回の測定で得られる質量分析スペクトルの数は数万に達しその情報量は膨大なものとなるため、効率的かつ高速に解析する必要がある。このため、データ処理系では得られた情報から有効なデータだけを効率良く抽出する技術開発を行った。

4.2 試料の適切な前処理法

高効率イオン化のためのサンプル処理などの手法開発を、既存の質量分析装置を用いることで行っている。以下に我々がここ数年取り組んできた手法の開発の歩みについて説明する。

4.2.1 高効率イオン化のための、試料切片厚みの最適化

まず我々は高効率イオン化を狙って生体組織切片の厚さの最適化を行った。特に高分子量タンパクの計測においては、切片の厚さが10 μm 以下となった時に高効率イオン化と低ノイズを示す測定結果が得られることを明らかにした²⁰⁾。

4.2.2 生体分子の位置情報を保持した上で高分子同定のための、試料処理法

さらに生体組織上で、通常ではイオン化が困難な巨大タンパク質の解析を行うため (<100kDa)、組織上において試料の拡散を最小限に抑えるタンパク質変性法、酵素消化法を考案し、これを on-tissue digestion 法と名付けた²¹⁾。これは組織内タンパク質を変性させた後に、微量量のトリプシン溶液をケミカルインクジェットプリンター (島津製作所) を用いて分注し、タンパク質を消化するというものである。我々は既存の四重極イオントラップ飛行時間型質量分析計 AXIMA-QIT (島津製作所, MALDI-QIT-TOF MS) によりこの方法の評価を行った。ケミカルインクジェットプリンターとはピコリットルレベルの微量溶液分注機能を備えた装置で、酵素消化やマトリックス添加等の処理を微細なスケールで実施できるものである。on-tissue digestion 法により、分子量が大きくそのままではイオンとして検出されにくいタンパク質もトリプシン消化産物として検出できるようになった。さらにこれらの消化産物を生体組織上で直接 MS² 解析により同定す

ることも可能となった²¹⁾。

4.2.3 MSⁿ 解析の感度上昇のための、生体試料処理法

さらに、on-tissue digestion 法を適用する対象として、PVDF (ポリビニリデンフロライド) 膜上の組織切片を、変性・還元作用を持つ緩衝液を用いて新たな PVDF 膜へ転写する手法も考案した²²⁾。この手法では、組織内タンパク質を変性させ還元することで酵素消化効率が向上し、さらに組織内の塩を除くことができる。これにより組織内での MSⁿ 解析をより効率よく行えるようになった。

4.2.4 顕微鏡観察をするために、透明かつ電気導電性を有する膜の探索

続いて我々は特殊フィルムの使用に着手した²³⁾。PVDF 膜は確かに観察したその場所での物質同定を可能にしたものの、光の透過性がないことから試料観察が困難であった。我々は生体試料を観察しながら MSⁿ 解析を行えるように透明導電性シートを使用し、そのシート上における試料前処理法を開発した²³⁾。これには非常に薄い PET (ポリエチレンテレフタレート) 基板上に金属酸化薄膜を形成した素材を新規試料支持材として採用した。この素材は 75 ~ 125 μm の PET 基板に、酸化インジウムスズ (ITO) を 5 ~ 15nm 程度蒸着したものである (ITO フィルム)。試料前処理法の適用後に組織上で MS² 解析を行い、得られたスペクトルよりタンパク質同定に成功した²³⁾。

4.2.5 高効率イオン化とノイズの低減をするための、マトリックス塗布法の開発

一方、スプレードロップレット法と命名したマトリックスの塗布方法も新たに開発した。元来はスプレーコーティング法および滴下法といった別個に採用されていたマトリックス塗布法を、二段階連続で行うというものである²⁴⁾。すなわちマトリックス溶液をスプレーコーティングした後、より高濃度の同種マトリックス溶液の液滴をそこに滴下し微細結晶で覆われたマトリックススポットを作製するものである。ラット脳切片に対する処理を例にとれば、この方法によりそこから検出され得るピークのシグナル強度は従来法に比べ約 30 倍となりシグナル/ノイズ比が飛躍的に向上した²⁴⁾。

さらに我々はこのスプレードロップレット法によるマトリックス塗布を、培養細胞を用いた実験系に対しても適用した。ITO フィルム上に直接 HEK293T 細胞の培養を行い、これらにスプレードロップレット法を用いることで生体試料の直接質量分析用試料として調整できることを示した²⁵⁾。また HEK293T 細胞に対して on-tissue digestion 法を行い、得られた細胞由来タンパク質のトリプシン消化産物の中で特に強いピークを示す二つのものに対して MS² 解析を行ったところ、これらはそれぞれ histone H2A.2, nucleophosmin のトリプシン消化産物と同定された²⁵⁾。今回取り上げた培養細胞の測定系においては、簡便かつ迅速なタンパク質分子種の同定を伴った解析が十分可能であると示された。このようなアプローチは、遺伝子発現などの形質転換した培養細胞の発現タンパク質や培養細胞の系を用いた細胞間シグナルにおい

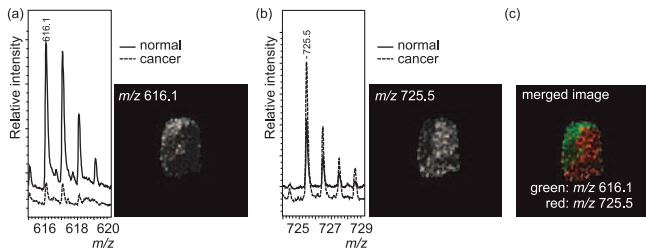


図3 癌組織に対するイメージング質量分析の例。

て、新たな視点からの解析法を提供するものであり、質量顕微鏡の応用範囲を拡張する。

5. 展望

まず、メタボロームのマッピングがすぐにも可能である。またプロテオーム領域、すなわちタンパク質においても、ユビキチン化^{26~28}やグルタミン酸付加⁹などのタンパク質の翻訳後修飾の様相を解析するには、今のところ質量分析以外に方法がなく、位置情報の取得が困難であるが、今後質量顕微鏡ではこうした翻訳後修飾を受けたタンパク質の細胞内分布の違いをも検出できることが期待される。

病理学的な試料を用いた分析に質量顕微鏡を用いることで、その病理に対して大きな影響を及ぼしているマーカーを探索することも可能である。胃がんの背景にヘリコバクターが、肝癌の背景に肝ウイルスが、進行麻痺の背景に梅毒がいたように、思わぬ微生物由来物質が探索され、病原菌が同定され、それまで不治と思われていた病気に治療法や予防法が出来るかもしれない。我々は様々な腫瘍組織^{29,30}(図3)、あるいは実際に糖尿病などの生活習慣病に罹患した患者組織や、統合失調症の死後脳において構成物質や物質の変化を解明し、異常部位の物質的背景が何であるかを明確にしたいと考えている。

また、一度に数千から数万の分子の量的・位置的な挙動を、ターゲットを絞らずにモニターできる革命的な手法であることから、薬物動態、さらに薬物投与などの操作を加えたときの反応等、創薬の面でもすでに必須の技術として各製薬メーカーで使用されている。今後はさらに質量顕微鏡による疾患の解析から得られた知見に基づいて新薬も開発されるだろう。

謝 辞

この研究は科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業の支援を得て行ったものです。澤田研究総括、島津製作所基盤研究所吉田所長をはじめとする共同研究者の皆様へ感謝いたします。

文 献

- 1) Ishitani, T. and Sato, M.: *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **55**, 261-263 (2006)
- 2) Kondo, H.: *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **55**, 231-243 (2006)
- 3) Moriya, T., Ohno, S., Tanaka, K. and Fujita, Y.: *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **55**, 69-73 (2006)

- 4) Hemmi, A., Tabata, M., Homma, T., Ohno, N., Terada, N., Fujii, Y., Ohno, S. and Nemoto, N.: *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **55**, 89-95 (2006)
- 5) Fujii, Y., Ohno, N., Zilong Li, Terada, N., Baba, T. and Ohno, S.: *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **55**, 113-122 (2006)
- 6) Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D.H. and Hirokawa, N.: *Science*, **288**, 1796-1802 (2000)
- 7) Setou, M., Seog, D.H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M. and Hirokawa, N.: *Nature*, **417**, 83-87 (2002)
- 8) Ikegami, K., Mukai, M., Tsuchida, J., Heier, R.L., Macgregor, G.R. and Setou, M.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 30707-30716 (2006)
- 9) Ikegami, K., Heier, R.L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., Campbell, P.K., Yuasa, S., Janke, C., Macgregor, G.R. and Setou, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3213-3218 (2007)
- 10) Moritake, S., Taira, S., Hatanaka, T., Setou, M. and Ichiyangi, Y.: *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, **5**, 23-28 (2007)
- 11) Taira, S., Hatanaka, T., Moritake, S., Kai, Y., Ichiyangi, Y. and Setou, M.: *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, **5**, 23-28 (2007)
- 12) Narita, I., Oku, T., Tokoro, H. and Suganuma, K.: *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*, **55**, 123-127 (2006)
- 13) Moritake, S., Taira, S., Ichiyangi, Y., Morone, N., Song, S.Y., Hatanaka, T., Yuasa, S. and Setou, M.: *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **7**, 937-944 (2007)
- 14) Hata, S., Shiraishi, K., Itakura, M., Kuwano, N., Nakano, T. and Umakoshi, Y.: *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*, **53**, 537-540 (2004)
- 15) 松井良夫：物質の構造III，回折，丸善，2006
- 16) Setou, M., Radostin, D., Atsuzawa, K., Yao, I., Fukuda, Y., Usuda, N. and Nagayama, K.: *Med. Mol. Morphol.*, **39**, 176-180 (2006)
- 17) Shimma, S. and Setou, M.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **53**, 230-238 (2005)
- 18) Caprioli, R.M., Farmer, T.B. and Gile, J.: *Anal. Chem.*, **69**, 4751-4760 (1997)
- 19) Klinkert, I., McDonnell, L.A., Luxembourg, S.L., Altelaar, A.F., Amstalden, E.R., Piersma, S.R. and Heeren, R.M.: *Rev. Sci. Instrum.*, **78**, 053716 (2007)
- 20) Sugiura, Y., Shimma, S. and Setou, M.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 45-48 (2006)
- 21) Shimma, S., Furuta, M., Ichimura, K., Yoshida, Y. and Setou, M.: *Surf. Int. Anal.*, **38**, 1712-1714 (2006)
- 22) Shimma, S., Furuta, M., Ichimura, K., Yoshida, Y. and Setou, M.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 133-140 (2006)
- 23) Shimma, S., Sugiura, Y. and Setou, M.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 210-211 (2006)
- 24) Sugiura, Y., Shimma, S. and Setou, M.: *Anal. Chem.*, **78**, 8227-8235 (2006)
- 25) Sugiura, Y., Shimma, S., Moriyama, Y. and Setou, M.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 25-31 (2007)
- 26) Hatanaka, K., Ikegami, K., Takagi, H. and Setou, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 610-615 (2006)
- 27) Hatanaka, T., Hatanaka, Y. and Setou, M.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 35922-35930 (2006)
- 28) Yao, I., Takagi, H., Ageta, H., Kahyo, T., Sato, S., Hatanaka, K., Fukuda, Y., Chiba, T., Morone, N., Yuasa, S., Inokuchi, K., Ohtsuka, T., Macgregor, G.R., Tanaka, K. and Setou, M.: *Cell*, **130**, 943-957 (2007)
- 29) Shimma, S. and Setou, M.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 145-148 (2007)
- 30) Shimma, S., Sugiura, Y., Hayasaka, T., Hoshikawa, Y., Noda, T. and Setou, M.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **855**, 98-103 (2007)