

MALDI-TOF MS 解析におけるガングリオシドのイオン化条件探索**Optimization of ionization condition for ganglioside analysis with MALDI-TOF MS**

○岡本明¹⁾、鈴木佑典²⁾、石田佳佑³⁾、堀江亜矢³⁾、上宮悠⁴⁾、Anila Mathew⁵⁾、櫛泰典²⁾
○Akira Okamoto¹⁾、Yusuke Suzuki²⁾、Keisuke Ishida³⁾、Aya Horie³⁾、Hisashi Kamimiya⁴⁾、
Anila Mathew⁵⁾, and Yasunori Kushi²⁾

Abstract: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) provides detailed structural information of biomolecules including gangliosides with simpleness and high sensitivity, therefore it is widely used in research laboratories. However, the weak carbohydrate bonds of gangliosides, especially neuraminic acid, are readily cleaved during the ionization and molecular related ions are often hard to be detected. In this study, we have examined the optimal condition for the detection of $[M+Li]^+$ of ganglioside GM3 by adjusting matrix and alkali metal salt combinations and concentrations on the MALDI target plate.

1. 目的

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)は、簡便且つ高感度に物質の詳細な構造情報を得ることが可能であることから、複合糖質の構造解析においても広範に用いられてきた^[1,2]。しかしながら、ガングリオシドの測定においては、レーザー照射によるイオン化の際に生じるシアル酸の脱離に伴い、分子関連イオンが検出されにくいことが問題であった^[3]。本研究では、これまでに報告されている糖鎖の脱離抑制法^[4,5]を改良し、その後の MS/MS 解析において詳細な構造解析が可能であるリチウム付加分子関連イオン検出条件の確立を目的とする。

2. 方法**GM3 及びアルカリ金属塩の最適混合量の確認**

まず、GM3 の最適量を確認するため、1 pmol～1 μmol の希釈倍列を作製し、マトリックスに 2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)水溶液を用いて MS スペクトル測定を行った。また、糖鎖の断片化を促進することが知られている塩化リチウム(LiCl)及び抑制する塩化セシウム(CsCl)の添加量の条件を検討した。

マトリックスの条件検討

使用するマトリックスの性質は、シアル酸の脱離やイオン化効率に大きく影響する。このことから、**本研究では**、比較的酸性度の異なる CHCA、DHB、Norharman、及び 6-Aza-2-thiothymin の 4 種のマトリックスの内、最も目的に適したマトリックス調製条件を検討した。

LiCl と CsCl の混合割合の検討

上記で検討した最適なマトリックス条件、及び LiCl と CsCl の添加後の MS スペクトルデータを

基に、シアル酸の脱離を抑制し、且つ詳細な構造解析が可能な $[M+Li]^+$ イオンとしてピークを検出可能な条件を検討した。

3. 結果・考察

本研究で用いる GM3 の最適量を検討した結果、100 pmol であった。次に、GM3(100 pmol)に LiCl 及び CsCl を 4 nmol ずつ添加し、広範に用いられている DHB をマトリックスとして使用した MS スペクトル測定結果では、分子関連イオンは検出されず、分子からシアル酸が脱離した LacCer 由来及びセラミド由来のリチウム付加イオンが検出された(図 1A)。一方、マトリックスを Norharman に変更し、同様の実験を行った結果、シアル酸の脱離は抑制され、 $[M+Li]^+$ イオンが検出されることを確認した(図 1B)。以上の結果から、GM3 に LiCl 及び CsCl の 2 種のアルカリ金属塩を加え、且つ Norharman をマトリックスとして用いることで、シアル酸の脱離を抑制し、且つ $[M+Li]^+$ イオンとして検出可能な条件を確立することが出来た。現在、分子内にシアル酸を複数含むガングリオンシド GD1a、GD1b、及び GT1b について上記方法が応用できるかの確認を進めている。

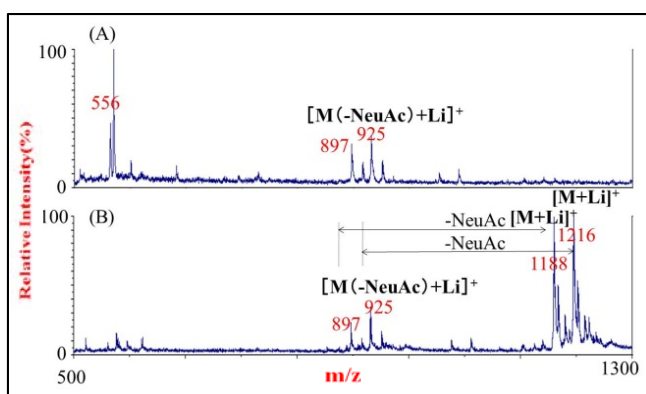


Fig.1 MALDI-TOF MS spectra of GM3 were obtained with DHB (A) or Norharman (B).

参考文献

- [1] Palmberger, D., et al., Plos one, **7**, e34226, (2012)
- [2] Colsch, B., et al., ACS Chem. Neurosci., **2**, 213-222, (2011)
- [3] Suzuki, Y., et al., J. Biochem., **139**, 771-777, (2006)
- [4] Laremore, TN., and Linhardt RJ. Rapid commun. Mass spectrom., **21**, 1315-1320, (2007)
- [5] Karas, M., et al., Anal. Chem., **67**, 675-679, (1995)