

グリセロ脂肪酸エステル類の質量分析イメージング解析条件の確立およびその応用

Establishment of mass spectrometric imaging analysis condition of glycerol fatty acid esters and its application

○平岡 真里奈¹⁾、向後 光亨¹⁾、中村 亜紀²⁾、櫛 泰典²⁾、小嶋 芳行²⁾、鈴木 佑典²⁾○Marina Hiraoka¹, Mitsuaki Kougo¹, Aki Nakamura², Yasunori Kushi², Yoshiyuki Kojima², and Yusuke Suzuki²

1: 日大理工・院(前)・応化 2: 日大理工・教員・応化

Abstract: Lipid composition in tissues or organs is well known to be regulated by high fat diet. Their distributions of lipids are estimated to be regulated by sexual dimorphism or metabolism. Recently, imbalance of the lipid composition on plasma membrane is high risk factors in various neurodegenerative or life-style related diseases are reported. To elucidate the lipid functions in detail, analyses of precise distributions, localizations, quantifications of lipids on tissues or thin-layer chromatographic (TLC) plate are required. In this study, matrix-assisted laser desorption ionization/imaging mass spectrometry (MALDI IMS) with tandemly connected two time-of-flights (TOF/TOF) was used to analyze tri-, di-, and monoacylglycerols on TLC plate. We tried various conditions of doped-time and ampere of gold deposition, or dope-method of sodium salts on TLC, we finally found that the bands and peaks in MS spectra derived from TG, DG, and MG on TLC were clearly obtained after gold deposition and addition of sodium salts.

1. 目的

近年、特定の細胞や組織の脂質組成が食餌によって大きな影響を受けており、神経変性疾患や糖尿病などをはじめとする様々な疾患の病態や発症機序において極めて重要である可能性が示唆されている⁽¹⁾。そして、詳細な構造情報から脂質の機能を明らかにしていく必要があるため、多くの構造解析法が開発されている。その中で、質量分析 (MS) イメージング法は、ある一定の間隔で網羅的に得た多くの MS スペクトルから目的の質量数のピークのみが検出された位置とイオン強度情報を抽出し、二次元画像を作成する方法であり、二次元薄層クロマトグラフィー(TLC)上に展開・分離された脂質の構造情報や網羅的かつ詳細な組織切片上の脂質の局在情報が得られる非常に強力な解析ツールであることが報告されている^(2,3)。TLC または TLC から転写された PVDF 膜上の脂質の MS イメージング解析では、複数の脂質を同時に解析可能であることに加え、各種試薬による TLC 染色画像と Rf 値を比較することにより簡便に分子構造を推定することができるため、誘導体化が必要なガスクロマトグラフィー法などの他の汎用的脂質解析手法と比較して、簡便、迅速、且つ網羅的に脂質を解析可能である。先行研究において、ブタ大脳由来の粗脂質を用いて網羅的 MS イメージング解析を行ったところ、多くのスフィンゴ脂質やリン脂質の構造情報が得られている一方で、グリセロ脂肪酸エステル類(トリグリセリド(TG)、ジグリセリド(DG)、およびモノグリセリド(MG))やシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドの一部は PVDF 膜への転写効率やイオン化効率由来のピークが得られにくいことから、MS イメージングによる解析が困難であった。以上の問題を解決するため、本研究では TLC-MS イメージング解析における転写およびイオン化条件の検討を行った。

2. 方法

TLC-MS および TLC-blot MS イメージング測定

TLC 上にブタ大脳由来粗脂質を分離後、冷風にて 5 分間乾燥した。PVDF 膜への転写は、温度および時間を変えた熱転写条件を検討し、PVDF 膜および TLC 上のグリセロ脂肪酸エステル類およびガングリオシドの転写効率を確認した。その後、MS ターゲットプレート上に展開後の TLC または転写後の PVDF 膜を導電性のテープにて固定後、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)を 50%エタノール溶液に調製したものを滴下または噴霧した後、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装置 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF/TOF MS, JEOL) にて MS イメージング解析を行った。

TLC-Gold MS イメージング解析

展開後の TLC プレートアンペア数及び蒸着時間を変えて金蒸着処理を行った。その後、酢酸ナトリウムを含む塩溶液を調製後、TLC プレート上に滴下、噴霧、および浸漬により処理を行った。冷風により 15 分間乾燥後、MS イメージング解析を行った。

3. 結果・考察

TLC プレートから PVDF 膜へのグリセロ脂肪酸エステル類の転写効率を確認するため、TG, DG, MG の標準品の混合物(各々 10 μg)を TLC 上で分離した後、先行研究と同じ 180°C, 30 秒の熱転写条件で PVDF 膜に転写した。その結果、大部分が TLC 上に残存しており、また、PVDF 膜の MS イメージング解析を行ってもグリセロ脂肪酸エステル類由来のバンドを得ることができなかった(data not shown)。以上から、他の脂質と比較してグリセロ脂肪酸エステル類の転写効率が悪い可能性が考えられたため、次に(転写を行わず)脂質を分離後の TLC プレートを直接 MALDI プレートに貼付し、MS イメージング解析を行った。MS イメージング解析による脂質解析において汎用されているマトリックスである DHB を用いて解析した結果、DG および TG 由来のバンドを確認することができたが、MG 由来のバンドを確認することはできず、また、得られたピークのイオン強度は低く、かつ S/N 比が低かった(Fig. 1A)。それ故、組織切片上のグリセロ脂肪酸エステル類のイオン化効率を改善する方法である金蒸着法を応用することを検討した⁽⁴⁾。金蒸着を行う時間・電流値、および TLC プレート上への塩溶液のアプライ条件を変えて検討した結果、MS イメージング画像上で明瞭な TG 由来のバンドを確認した(Fig. 1B)。そして、金蒸着法と DHB を用いてそれぞれイオン化した際の MS スペクトルを比較した結果、TG 由来のピークの S/N 比が 19.7 倍程度改善されることが明らかになった(Fig. 1)。以上の結果から、金蒸着法は組織切片上のみならず TLC 上のグリセロ脂肪酸エステル類の大幅なイオン化効率を改善可能であることがわかった。今後は、TLC 上またはブロット後の PVDF 膜上の脂質の MS イメージング解析において、さらなるイオン化効率の改善のため、金属ナノ粒子を用いた方法を検討する予定である。

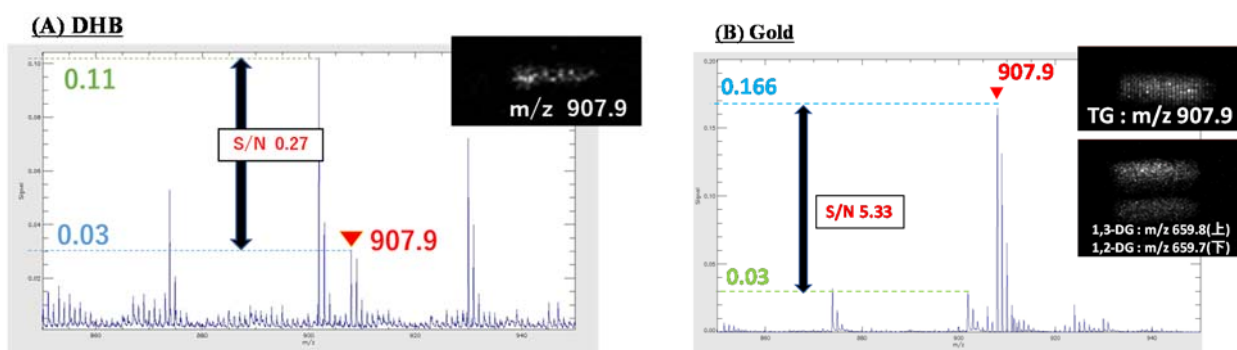


Fig. 1. MALDI-TOF MS spectra and MS imagings of TG, DG, and MG on TLC plate using DHB (A) and Gold deposition (B).

4. 参考文献

- (1) Rodriguez-Navas, C., *et al.*, 2016, *Mol. Metab.*, **5**, 680-689.
- (2) Nakamura K., *et al.*, 2006, *Anal. Chem.*, **78**, 5736-5743.
- (3) Seeley EH and Caprioli RM., 2008, *PNAS.*, **105**, 18126-18131.
- (4) Dufresne M., *et al.*, 2016, *Anal. Chem.*, **88**, 6018-6025.