



Ammonium sulfate improves detection of hydrophilic quaternary ammonium compounds through decreased ion suppression in matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-06-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉山, 栄二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3189

博士(医学) 杉山 栄二

論文題目

Ammonium sulfate improves detection of hydrophilic quaternary ammonium compounds through decreased ion suppression in matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry

(硫酸アンモニウムはマトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析法においてイオン化抑制軽減を介して親水性第四級アンモニウム化合物の検出を改善する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

親水性第四級アンモニウム化合物(QACs)に属するカルニチン(Car)やコリンの代謝物はエネルギー産生や神経伝達等に必須の生理活性を有し、これらの動態は種々の病態において大きく変化する。例えば近年、低酸素性虚血性脳症モデルにおいて、異常なアセチルコリンの蓄積と Car の枯渇が同じ脳局所に生じることが明らかにされた。このような動態変化の根底にある機序を明らかにするためには、組織内の局所動態を一斉に解析する必要がある。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化-イメージング質量分析法(MALDI-IMS)は、多様な分子の局所動態を一斉に解析できる比較的新しい手法である。ただし、他の質量分析法と比べて感度が低く、特に親水性 QACs の一つであるアセチルカルニチン(AcCar)は脳試料からの検出が困難な代表的分子として知られていた。したがって、親水性 QACs の一斉解析を達成するためには、有効な高感度化手法の開発が急務であった。

硫酸アンモニウム(AS)は、ペプチドや脂質の解析に用いられてきたイオン化促進剤である。親水性 QACs の解析に有効か否かは不明であったものの、マトリックスと同時に塗布できるため、標的分子の分布を損なうことなく高感度化を達成することが期待された。そこで本研究では、MALDI-IMS を用いた脳内親水性 QACs の解析における AS の有用性を検証した。

[材料ならびに方法]

全ての動物実験は浜松医科大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。

まず、8 週齢の C57BL/6J マウス(オス)から脳を採取し、ホモジネート(100 mg tissue/mL)を調製した。続いて、マトリックス溶液として各種濃度(0、16、31、63、125、250 mM)の AS を含む 2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)溶液 (50 mg/mL in 50% methanol)を調製した。その後、これらを等量混合して酸化インジウムスズ(ITO)コートスライドガラス上に滴下し、乾燥させ測定に供した。また、多段階質量分析による同定を行った後、同定した分子の 5 μ M 標準溶液とマトリックス溶液(DHB 50 mg/mL in 50% methanol with/without 250 mM AS)を用いてホモジ

ネートと同様に測定した。

次に、同様に採取したマウス脳をドライアイス粉末上で凍結し、 -20°C の庫内で作製した厚さ $10\text{ }\mu\text{m}$ の矢状切片を ITO コートスライドガラスに貼付した。貼付した切片にマトリックス溶液(DHB 50 mg/mL in 50% methanol with/without 250 mM AS)を手動で塗布し、切片全体を縦横 $150\text{ }\mu\text{m}$ のレーザー照射間隔で測定した。

[結果]

脳ホモジネートから得られた親水性 QACs 由来のシグナル強度は AS 添加により顕著に増強した。この効果は 63 mM 以上で顕著に現れ、 250 mM においては Car、AcCar、グリセロホスホコリン(GPC)由来のシグナル強度がそれぞれ約 300、700、2500 倍増強した。対照的に、DHB やホスファチジルコリンのカリウム付加イオン由来のシグナル強度は AS 添加により顕著に減弱し、この効果は 63 mM 未満でほとんど飽和した。一方、標準溶液から得られた Car、AcCar、GPC 由来のシグナル強度は AS 250 mM の添加によりそれぞれ約 7、2、8 倍増強した。

脳切片全体から得られた Car、AcCar、GPC 由来の平均シグナル強度は AS 250 mM の添加によりそれぞれ約 10、20、40 倍増強し、従来法で解析できなかった脳部位の解析が可能となった。また、AS 添加による明らかな局在変化は認められなかった。

[考察]

親水性 QACs を高感度に検出する新たな手法の開発に成功した。本手法を応用し、様々な病態で生じる局所的な親水性 QACs の動態変化を明らかにすることが期待できる。また、本手法を他のマトリックスや高感度化手法と組み合わせることで、より高感度な解析を実現することが期待できる。

AS は 63 mM 未満で飽和したカリウム付加イオン生成阻害効果と 63 mM 以上で顕著に現れた親水性 QACs イオン生成促進効果についてそれぞれ異なるメカニズムを持つと考えられる。カリウム付加イオン生成阻害効果は他のアンモニウム塩でも認められており、アンモニウムイオンに起因すると考えられる。一方、親水性 QACs イオン生成促進効果は過去に報告がなく、AS に特徴的な効果と考えられる。この効果は標準溶液よりもホモジネートで顕著に現れたため、AS は親水性 QACs 以外の分子がもたらすイオン化抑制を軽減したと考えられる。また、AS を構成するアンモニウムイオンと硫酸イオンはいずれもタンパク質等を効率よく塩析させることが知られている。したがって、 63 mM 以上の過剰な AS は試料中に含まれるタンパク質等の塩析をもたらすことで親水性 QACs の抽出や親水性 QACs とマトリックスとの共結晶形成を促進したと考えられる。

[結論]

本研究により、AS は MALDI-IMS において脳試料に含まれる親水性 QACs 由来のシグナルを顕著に増強し、高感度な解析を可能にすることが示された。