



Selective improvement of peptides imaging on tissue by supercritical fluid wash of lipids for matrix-assisted laser desorption/ionization 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: 松下, 祥子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3191

博士(医学) 松下 祥子

論文題目

Selective improvement of peptides imaging on tissue by supercritical fluid wash of lipids for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

(脂質の超臨界流体洗浄による組織中ペプチドの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の選択的改善)

論文の内容の要旨

[はじめに]

組織中に含まれる多種多様なペプチドの分布解析を網羅的に行うことにより、ペプチドの新規発見や機能を明らかにするための知見を得ることが期待できる。網羅的解析が可能な手法として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) が知られている。MALDI-IMS では分子の標識が不要であり、イオン化可能なペプチドが全て解析対象である。しかし、多くの場合ペプチドの検出強度は低く、分布解析や組織上での多段階質量分析による同定には不十分である。そのため、ペプチドの検出強度の改善は MALDI-IMS における重要な課題である。

ペプチドの検出強度を改善するためには、代表的なイオン化抑制分子であるリン脂質を組織中から抽出除去することが有効であると考えられている。これまでに有機溶媒を用いた組織洗浄法が試されており、用いる溶媒によって検出可能なペプチドの種類や数に差があることが明らかとなってきた。一方、クロマトグラフィー分析では脂質の分離に超臨界流体を用いた例が報告されているが、これを MALDI-IMS の組織洗浄に応用した例はなかった。メタノールを加えることでリン脂質の抽出除去が促進されるため、超臨界流体と共に MALDI-IMS の組織洗浄に用いることによってペプチドの検出強度が改善可能であると考えた。

本研究では、超臨界二酸化炭素にメタノールを混和した流体を用いた MALDI-IMS のための新規組織洗浄法を開発し、ペプチドの検出強度の改善を試みた。

[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得て実施した。試料は凍結した8週齢雌のマウス脳を10 μm厚に薄切し、導電性スライドガラスに接着した。試料を耐圧容器内に留置し40°C、20 MPaの条件下で、超臨界二酸化炭素とメタノールをそれぞれ流速10 mL/分、5 mL/分で混和した流体にて1時間洗浄し、洗浄後の試料と抽出物を回収した。各々の切片に対し、イオン化を補助するマトリックスとして2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (50 mg/mL,メタノール/水, 70/30, v/v) あるいは1,5-ジアミノナフタレン (10 mg/mL, メタノール/水, 70/30, v/v, 0.1% トリフルオロ酢酸) を1 mL塗布し、測定に供した。MALDI-IMS にはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計である solarix XR (Bruker Daltonics) を用い、 m/z 700-900 および m/z 1800-6000 の質量範囲の正イオンを測定した。多段階質量分析には、飛行時間質量分析計である

ultraflex II (Bruker Daltonics) を用いた。

[結果]

超臨界二酸化炭素とメタノールの混合流体による洗浄後の試料から得られたマスペクトルではペプチドの分子量に相当する m/z 3000-5200 の質量範囲において、検出強度が顕著に増強したシグナルが複数認められ、それらは組織構造に対応していた。最も改善が見られた m/z 4963.5 のシグナルではシグナルノイズ比が 190 倍近く向上していた。このシグナルに対して組織上での多段階質量分析を行った結果、得られたプロダクトイオンが標品から得られたものと一致したことから、 m/z 4963.5 のシグナルはチモシン β 4 であると同定できた。一方で、超臨界二酸化炭素とメタノールの混合流体による洗浄後の試料においてリン脂質の分子量に相当する m/z 700-900 の質量範囲におけるシグナルの検出強度は減少していた。さらに、回収した超臨界二酸化炭素とメタノールの混合流体による洗浄後の抽出物から得られたマスペクトルは未処理の組織におけるリン脂質由来のものと同様のシグナルを含んでいた。

[考察]

ペプチドと示唆される分子の検出強度が上昇した理由として、超臨界二酸化炭素とメタノールの混合流体による洗浄により組織からリン脂質が抽出除去されたためと考えられた。ペプチドと示唆される分子のシグナルは組織構造に対応しており、超臨界二酸化炭素とメタノールの混合流体によるそれらの分子の物理的な分布変化はないと考えられた。したがって、超臨界二酸化炭素とメタノールの混合流体による洗浄方法はペプチドを含む m/z 3000-5200 の質量範囲に含まれるシグナルの分布解析に適した前処理手法であると考えられた。

本手法で用いた超臨界二酸化炭素とメタノールの混合流体はその高い脂溶性により主なイオン化抑制分子であるリン脂質を溶出させ除去することができた。また、マトリックス溶液は水溶性が高く、チモシン β 4 のような水溶性分子がマトリックスと混和されやすいため、イオン化されやすくなったと考えられた。これらの両作用によってペプチドの検出強度が改善されたと考えられた。測定対象分子の極性を考慮し、それぞれの過程で用いる溶媒を適切に選択することで、本手法はより多様な分子種へも応用可能であると考えられる。

[結論]

超臨界二酸化炭素とメタノールの混合流体を用いることで、MALDI-IMS のための新規組織洗浄法を開発した。その結果、本手法によってリン脂質が抽出除去され、 m/z 3000-5200 の質量範囲に含まれるペプチドの検出強度が改善し、組織上での分布解析や多段階質量分析による同定が可能となった。