

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770116

研究課題名（和文）イメージングマスで迫る脂質機能と疾患との関連

研究課題名（英文）Relation between the function of lipids and diseases using mass spectrometry imaging

研究代表者

新聞 秀一 (SHIMMA SHUICHI)

独立行政法人 国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30515896

研究成果の概要（和文）：生体組織の直接質量分析法であるイメージング質量分析を用いてマウス脳切片内において糖脂質であるスルファチドの詳細な構造解析を行った。その結果、これまで報告されているセラミド骨格の構造とは異なる成分が含まれていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, the structural analysis of sulfatide directly on the mouse brain section was performed using mass spectrometry imaging. As a result, the novel ceramide structure contained in the sulfatide was revealed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：イメージング質量分析、タンデム質量分析、複合脂質、高エネルギー衝突誘起解離

1. 研究開始当初の背景

ガングリオシドのセラミド骨格の違いにより、海馬内におけるガングリオシドの分布が異なることを2008年 PLoS One に報告した。ガングリオシドをはじめとする糖脂質は、細胞膜外に存在する糖鎖の構造により、抗体で蛍光観察を行うことが可能であるが、脂質二重膜内に存在する構造の違いに対しては抗体による可視化は不可能である。この可視化を行うためには、分子そのものを検出する質量分析を用いた可視化が最適であることは疑いない。例えば、申請者はこれまでがん部、非がん部における脂質分布の違いについて論文発表を行っている(Shimma S et al. J Chromtgr B 2007, 855, 98-103)。これを脳内における疾患、例えば神経変性疾患等に適用し、脂質分布の違いを明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

イメージング質量分析を用いて、脳内の脂質の分布を構造の違いで可視化することを目的とした。

3. 研究の方法

日本電子社製 JMS-S3000 を用いて、組織切片状での直接質量分析ならびに生体分子の構造解析を行った。さらにイメージング質量分析が可能な機能の搭載に携わり、マウス組織表面のイメージングを試みた。イメージング質量分析のワークフローを図1に示す。イメージング質量分析では、生体組織の凍結切片(5-10 μm)を作成し、導電性試料プレート(インジウムスズ酸化物蒸着ガラス)の上のせる。その後、イオン化補助剤であるマトリックスを供給し、装置に導入の後、データ取得点を設定し自動分析を行う。得られるデータは位置情報を含む質量スペクトルであるが、

目的イオンの強度をマッピングすることでイメージングが達成される。

4. 研究成果

主に組織表面上における直接質量分析を用いた脂質構造解析について詳細に検討を行った。本研究で用いた装置は、日本オリジナルで開発された日本電子社製JMS-S3000である。本装置はマトリックス支援レーザー脱離イオン化イオン源を搭載し、質量分離部である飛行時間型(TOF)質量分析計には、申請者が研究に携わっていたマルチターン飛行時間型質量分析計のイオン光学を応用した、17 mの非常に長い飛行距離を持つSpiralTOFと呼ばれる装置を搭載している(図2)。飛行時間型質量分析計の質量分解能(m/dm)は、飛行時間Tとピークの半値幅 dT (FWHM: full-width at half maximum)を用いて、

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{T}{2\Delta T}$$

と表される。すなわち飛行距離に比例するため、17 mの飛行距離をもつ装置では、非常に高い質量分解能を得ることが可能となる。この高い質量分解能は、生体組織の直接質量分析に有効である。なぜなら、組織表面で直接質量分析を行うと、様々な質量を持つ生体分子由来イオンが生成する。得られるスペクトルは非常に複雑なものとなり、低分解能装置では一つのピークに複数のイオンが重なり合う現象がみられ精度が落ちる。また、タンデム質量分析を行う際にも、複雑なイオンピークパターンを示すスペクトルから、高精度に1つのピークを分離し構造解析を行うことが可能となる。さらに、本装置では高エネルギー衝突誘起解離(HE-CID)が可能であることである。HE-CIDにより得られる分子の構造情報は非常に特徴的であり、特に複合脂質においては、その脂肪酸の構造までも詳細に検証することが可能となる。この装置を用いてマウス脳組織表面において高質量分解能でイメージングを行った結果を図2に示す。図2(a)は m/z 848.556であり(b)は m/z 848.645である。両者の違いは Δm 0.089であるが、明確に異なる分布を示すことが分かる。したがって、低分解能装置を用いてイメージングを行うとこれらのピークは一つのピークとして扱われるため、得られる画像は両者を重ね合わせたものとなる。組織表面上での構造解析により、(a)はPC(38:4)のカリウム付加体、(b)はガラクトシルセラミド(C24:1)のカリウム付加体であると同定した。続いて複合脂質の詳細な構造解析については、マウス組織表面で m/z 888に対して行った(図4)。組織表面でのHE-CIDを用いた詳細な構造解析例は報告がなく、研究代表者はこの成果についてPLoS Oneに報告を行った。通常 m/z 888はスルファチドST(d18:1, C24:1)として知られている(スフィンゴシン

にネルボン酸が付加した構造)。得られたプロダクトイオンスペクトルの m/z 400-850の間に14 Da間隔の規則的なピーク群が検出されていることが分かる。これらはHE-CIDにより得られたcharge-remote fragmentationにより解離したセラミドの脂肪酸由来のピーク群であり、研究者が用いている装置でのみこのようなスペクトルを得ることが可能である。このピークパターンを解析することで二重結合の位置を同定することができる(図5)。解析の結果、(d18:1, C24:1)の構造として、強度の高いピークパターンは説明できる。一方、図6に示すように強度は小さいが、14 Da間隔である別のピークパターンが存在するのを見いだした。これは(d18:1, C24:1)の構造では説明できない。研究代表者はこの構造について、二重結合の位置が異なる構造異性体であると考え、組織表面上で初めてST(d18:2, C24:0)の構造があることを示した。計画では、このプロダクトイオンの情報を用いて、ST(d18:1, C24:1)とST(d18:2, C24:0)の分布の違いを、例えば疾患モデル動物に対して示すために、検討を試みたが装置の感度上の問題から装置調整に予想以上に時間を費やし実現することができなかった。本研究では、当初の目的を十分に達成することができなかったが、このような解析の可能性を示した結果、今後は脂質と薬剤との相互作用等の解析が可能になるのではないかと考えている。例えば、近年膜表面のレセプターに作用する分子標的薬が存在するが、そのような薬剤を投与する前後における、リン脂質の分布がどのように変化するか等、新たな知見が得られる可能性があることが分かった。

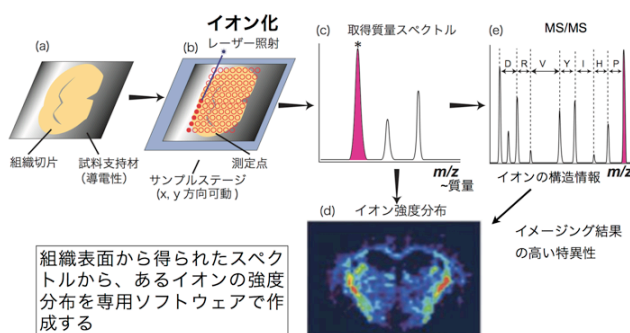


図1 イメージング質量分析のワークフロー

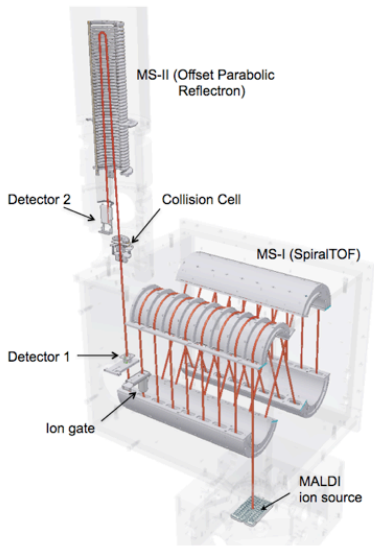


図2 JMS-S3000外観図

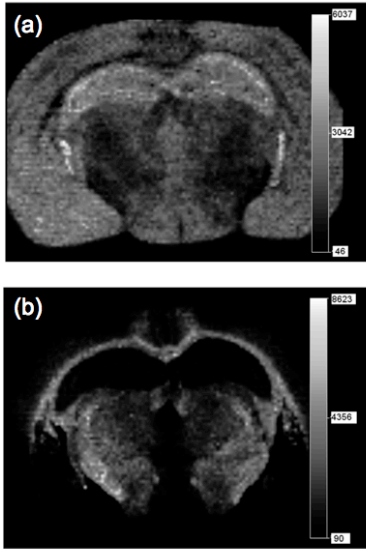


図3 脂質イメージング例

(a) m/z 848.556, (b) m/z 848.645

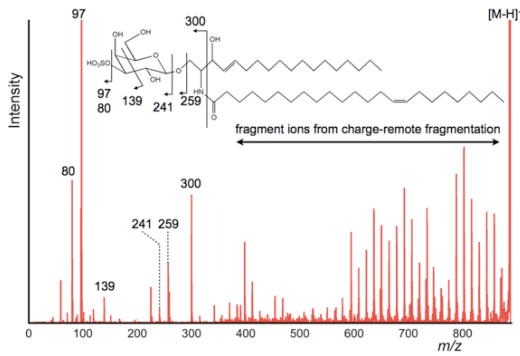


図4 m/z 888のプロダクトイオンスペクトル

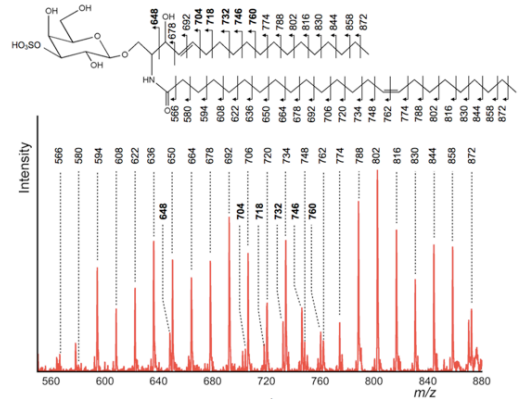


図5 m/z 888のプロダクトイオンスペクトル (拡大図)

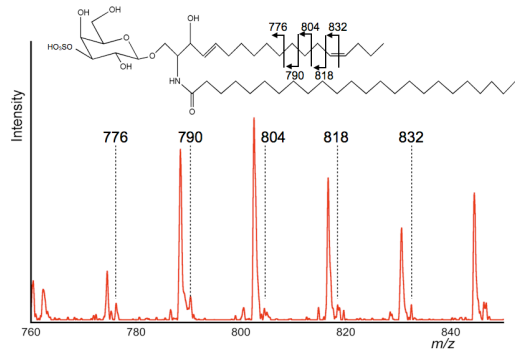


図6 新規セラミド骨格構造を持つスルファチドのプロダクトイオンスペクトル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. 新聞秀一、濱田哲暢 質量分析イメージングで抗がん剤を見る - 新規 Pharmaco-imaging 法とその応用-、*薬剤学*、73、34-39 (2013)
2. Shuichi Shimma, Ayumi Kubo, Takaya Satoh, Michisato Toyoda, Detailed structural analysis of lipids directly on tissue specimens using a MALDI-SpiralTOF-Reflectron TOF mass spectrometer. *PLoS One*, 7, e37107, 2012.
3. Takaya Satoh, Ayumi Kubo, Shuichi Shimma, Michisato Toyoda, Mass Spectrometry imaging and structural analysis of lipids directly on tissue specimens by using a spiral orbit type tandem time-of-flight mass spectrometer, SpiralTOF-TOF. *Mass Spectrometry*, 1, A0013, 2012

[図書] (計 1 件)

実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ
「見つける、量る、可視化する！質量分析実験ガイド ライフサイエンス・医学研究で役立つ機器選択、サンプル調整、分析プロトコルのポイント」杉浦悠毅、末松誠/編
基本編 (p26-54)、Leading protocol(p72-78)、1章「翻訳後修飾の検出と同定」(p69-80)、3章「"薬物動態"をイメージングする」(p194-202)担当 羊土社、2013年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新聞 秀一 (SHIMMA SHUICHI)

独立行政法人国立がん研究センター研究所・研究員

研究者番号：30515896

(2) 研究分担者

該当なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当無し

()

研究者番号：