

Application News

No. B87

探針エレクトロスプレーイオン化質量分析計

DPiMS™-8060 によるマウスの脳内メタボローム直接分析法の構築

アミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類などの内因性代謝物（メタボライト）を網羅的に解析する手法である「メタボローム解析」は、近年、生命科学分野において広く活用されています。PESI（Probe Electro Spray Ionization）は超極細で低侵襲な探針が試料をサンプリングし、かつ針先に高電圧を付与することにより、サンプリングした対象成分をイオン化させる直接イオン化法であり、クロマトグラフを介さずに試料の分析が可能です。PESI をタンデム質量分析計と組み合わせた探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析計 DPiMS-8060（図 1）を用いることで、生体試料中のメタボロームの直接分析が可能です。

一方、脳試料のメタボローム解析を行う場合、脳内には脂質類が豊富に存在し、それらの脂質類が分析時の妨害成分となることから、一般的に前処理操作が不可欠です。しかし、DPiMS-8060 を脳試料に適用した結果、前処理操作を行うことなく、脳内メタボライトを直接かつ迅速に分析することに成功しました。

本アプリケーションニュースでは、PESI とタンデム質量分析計による脳内メタボライト分析法についてご紹介します。

T. Murata



図 1 DPiMS™-8060

■ マウス脳内のメタボローム分析

超微細な探針を用いた新規イオン化法である「探針エレクトロスプレーイオン化法（PESI）」と「タンデム質量分析」を組み合わせた新規質量分析法 DPiMS-8060 を用いて、煩雑な前処理操作を行うことなく、脳内のメタボライトの直接分析を試みました。

まず、50%エタノール溶液で希釈したアミノ酸、有機酸、糖類などのメタボライト標準試料（25 成分）を液体試料分析専用サンプルプレートに 10 μ L 滴下した後、各化合物の MRM トランジションの選択および Collision energy（CE）などの質量分析計の条件を最適化しました。その結果を表 1 に示します。

表 1 メタボライト 25 成分 MRM トランジション

Name	Polarity	Transition (m/z)	Collision Energy (V)
3-hydroxybutyrate	(-)	103.1>59.0	35
Citric acid/isocitric acid	(-)	191.3>111.2	20
D-glucose	(-)	179.0>89.1	20
Glucose-6-phosphate	(-)	259.1>96.9	20
Glutaric acid	(-)	131.0>87.3	20
Glycine	(-)	74.2>74.2	20
L-aspartic acid	(-)	131.9>88.1	20
L-glutamic acid	(-)	146.0>102.1	20
L-lactic acid	(-)	89.0>43.2	20
L-malic acid	(-)	133.0>114.9	20
L-serine	(-)	103.9>74.2	20
N-acetyl-L-aspartate	(-)	174.0>88.2	20
Pyruvic acid	(-)	87.1>43.1	20
Succinic acid	(-)	117.1>73.0	20
Uracil	(-)	111.0>41.8	20
α -ketoglutaric acid	(-)	144.6>100.8	20
L-histidine	(-)	154.0>93.1	20
L-methionine	(-)	147.9>46.9	20
L-phenylalanine	(-)	164.2>147.0	20
L-threonine	(-)	118.1>74.1	20
L-tryptophan	(-)	203.3>116.0	20
2-aminobutyric acid	(+)	104.1>58.1	35
GABA	(+)	104.2>45.0	20
L-glutamine	(+)	147.1>84.2	20
L-leucine/L-isoleucine	(+)	132.1>86.2	20

次に、前処理操作を行うことなく、脳内メタボライトの迅速（1分析当たり0.2分）分析を行いました。大脳内でエネルギー代謝を低下させる薬剤（AM-2201）を投与したマウスと、コントロールマウスの大脳皮質内のメタボライトを DPiMS/MS で分析し、多変量解析（PLS-DA）を行った結果を図2に示します。図2(a)に示すように投与群とコントロール群が良好に分離したことから、メタボロームのプロファイルが両群で異なることがわかります。また、図2(b)に示すローディングプロットでは、2群間での差が大きく異なる成分をピックアップすることが出来ます。ここでは、グルタミン酸、コハク酸などの成分が2群間で大きく異なることがわかりました。これらの結果は既報において、GC/MS/MS を用いたメタボローム解析から得られている結果とよく一致しており、DPiMS-8060 が前処理操作を一切行うことなく、既存のメタボローム解析法と同等の結果を得ることが可能であることを示しています。

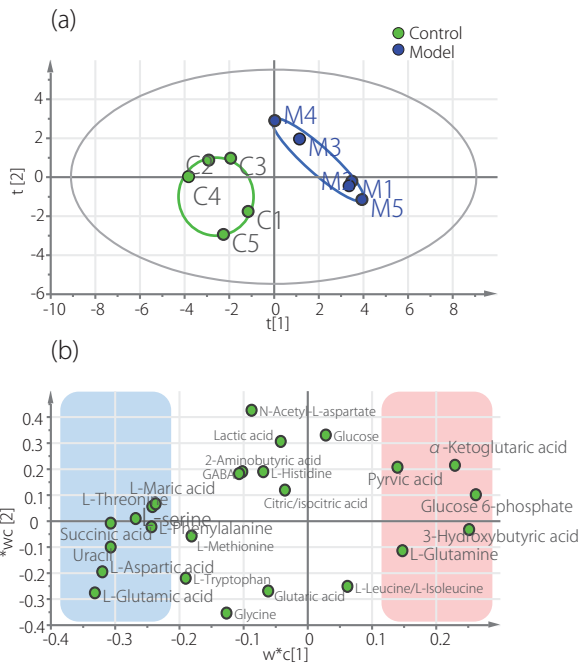


図2 コントロール群と薬剤投与群の大脳皮質内メタボライトの多変量解析結果

さらに、本手法では先端直径が700 nmの極微細針を試料採取およびイオン化の機構に用いることから、非常に微細な局所の分布解析に応用できる可能性があります。そこで、大脳皮質と海馬におけるメタボライトの分析をDPiMS-8060で行った結果を図3に示しました。本手法を用いることで前処理操作を行わずに、大脳皮質と海馬のメタボライトの局所分布差を直接捉えることができました。さらに、安定同位体標識されたグルタミン酸を用いて、大脳皮質と海馬におけるマトリクス効果の影響について評価したところ、両者に有意な差は観察されませんでした（図4）。

謝辞

本データは名古屋大学大学院医学系研究科の財津桂准教授、林由美講師との共同研究により取得されたものです。データをご提供いただいたことに深い謝意を表します。

参考文献

Hayashi, Y.; Zaitzu, K.; Murata, T., et al. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *983*, 160-165.

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

DPiMS は、株式会社 島津製作所の商標です。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年1月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。

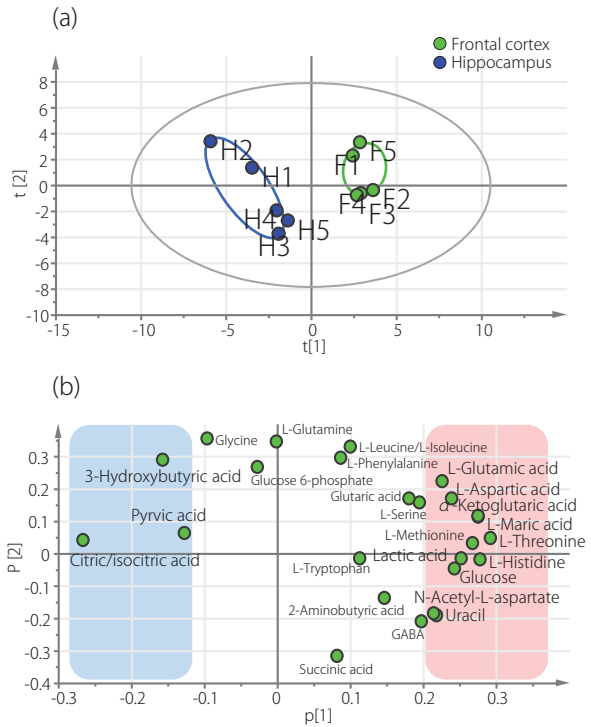


図3 大脳皮質と海馬におけるメタボライトの多変量解析結果

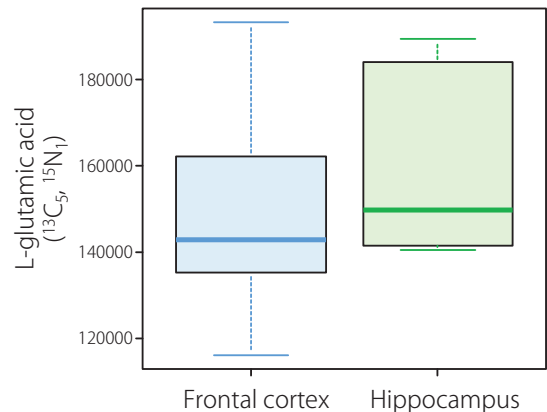


図4 大脳皮質と海馬におけるマトリクス効果の比較

■ 結論

新規質量分析法である DPiMS-8060 を用いることで、脂質含有率の高い脳試料であっても、煩雑な前処理操作を行うことなく、極めて簡便かつ迅速に、脳内メタボライトの検出が可能であることを確認できました。

また、極微細針の特性を最大限に利用することで、脳内メタボライトの局所解析が可能であると確認できました。