

Application News

酸素付着解離MS/MSオプションキット OAD RADICAL SOURCE I
高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-9050

OAD-TOFシステムCID/OAD同時分析による マウス肝臓中脂質の二重結合位置解析

荒尾 洋平、岡本 真美、青野 佑亮、高橋 秀典

ユーザーベネフィット

- ◆ 正負高速極性切替機能とCID/OAD同時分析機能の組合せにより、LCMS 1ラン分析で脂質の詳細構造解析に必要な多様な情報を一度に取得することができます。
- ◆ 共溶出した脂質の構造異性体も二重結合位置の同定を行うことが可能です。

■はじめに

脂質は、細胞膜の成分、シグナル伝達物質、エネルギーの貯蔵、上皮バリアの形成など、さまざまな生理機能を果たす生体にとって必須の化合物です。脂質恒常性の破綻は様々な疾患との関わりがあるとされており、体内での脂質の変化を理解するための特異的バイオマーカーの同定や病理理解明を目的としたノンターゲットリピドミクスはマルチオミクス研究における強力な技術となります。脂質中の炭素間二重結合(C=C)の位置異性体は酵素選択性、生体膜の物性などに有意に影響しますが、衝突誘起解離(CID)ではこの異性体を区別することが難しいことが知られています。そのため、C=C位置異性体を区別するための技術は、各組織における脂質恒常性の機構および様々な疾患におけるその変化を理解するために非常に重要となります。

■OADについて

脂質C=C位置の同定は、生体への影響を研究するという観点から、リピドミクスの新しい切り口として急速に発展してきています。島津製作所はOxygen Attachment Dissociation[®](OAD)という独自の新しいフラグメンテーション技術を搭載したOAD-TOFシステム*により、誘導体化などの前処理無しでC=C位置特異的なフラグメントイオンを生成し、化合物のC=C位置を同定する技術を開発しました。OADの原理を図1に示します。

本アプリケーションでは、OAD-TOFシステムを用いてマウス肝臓抽出物から検出されたホスファチジルコリン(PC)のC=C位置を含む化学構造の詳細解析を行った例をご紹介します。

■マウス肝臓抽出物の前処理

本アプリケーションニュース作成に当たり、試料は理化学研究所の有田 誠先生よりご提供いただきました。前処理は参考文献1)に記載の下記の手法と同様に処理されています。

約160 mgのマウス肝臓を1500×gの金属コーンを用いたマルチビーズショッカーを用いて15秒間均質化し、800 μLのMeOHをホモジネートに添加しました。溶媒を同じ条件下で再び均質化した後、適量のMeOH (200 μL当たり組織重量30 mg) を2 mLのガラス管に移しました。溶媒を試料の全体積の95%まで除去した後、CHCl₃ 200 μLを溶媒に加え、10秒間ボルテックス処理しました。溶媒を氷上で1時間インキュベートした後、超純水20 μLを加え、混合物を10秒間ボルテックスしました。氷上で10分間インキュベートした後、溶媒を2000×gで20℃で10分間遠心分離し、上清をLCMSバイアルに移しました。

■分析条件

分析にはNexera™ X3とLCMS-9050にOAD RADICAL SOURCE Iを搭載したOAD-TOFシステムを使用しました。

LCMS-9050の正負高速極性切替機能を用いて、正イオンでCIDとOAD由来、負イオンでCID由来のフラグメントイオンをLCMS 1ラン分析で検出することでPCの詳細構造解析を行いました。



表1 OAD-TOFシステムの分析条件

System	: Nexera X3 + OAD-TOFシステム
HPLC Conditions	
Flow rate	: 0.3 mL/min
Column	: Shim-pack Scepter™ Claris (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm)*
Mobile phase A	: 20mM Ammonium formate
Mobile phase B	: ACN/IPA = 1/1 (v/v)
Column oven temp.	: 40 °C
MS Conditions	
Mode	: CID/OAD
Polarity	: Positive/Negative switching
Collision Energy (CE)	: 25 V (Positive), 35 V (Negative)
DL temp	: 250 °C
Heat block temp	: 50 °C
Interface Voltage	: 4 kV (Positive), -3 kV (Negative)
MS Scan Range	: m/z 100-1000
Measurement Time	: 20 min

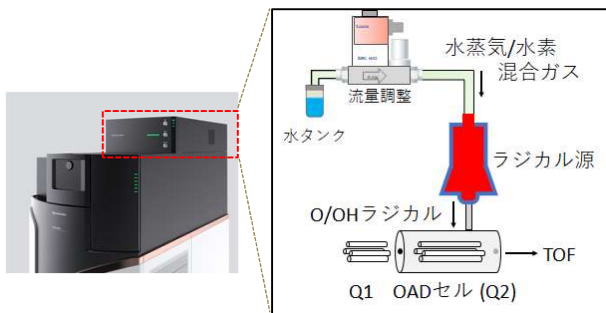


図1 OADの原理

* OAD-TOFシステム: OAD RADICAL SOURCE Iを搭載したLCMS-9050

■ 構造推定を行うMSクロマトグラム

マウス肝臓抽出物を正負高速極性切替によるData Dependent Acquisition (DDA)分析をOADモードをONにして行いました。今回は、プリカーサーイオンが正イオンモードで m/z 782.5695[M+H]⁺、負イオンモードで m/z 826.5604[M+HCOO]⁻として検出されたピークに着目し構造推定を行いました。図3にLCMS 1ラン分析で取得したMS1の正イオンおよび負イオンモードで得られた抽出イオンクロマトグラム(XIC)をそれぞれに示しました。

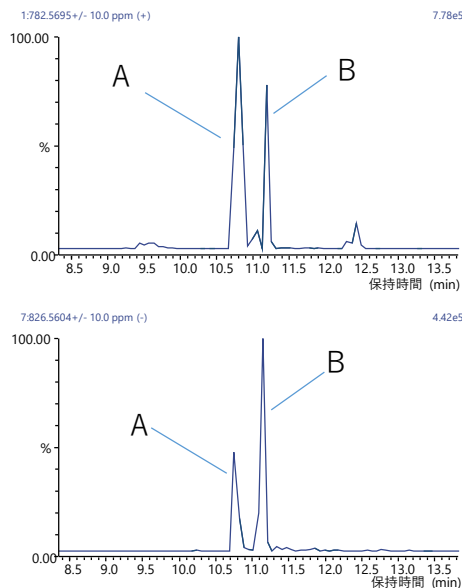


図3 PC 36:4のMSクロマトグラム
 m/z = 782.5695[M+H]⁺(上)および m/z = 826.5604[M+HCOO]⁻(下)

■ MS/MSスペクトルの解析(負イオンモード)

負イオンモード(CE = 35V)で取得された図3のピークAおよびピークBに相当するMS/MSスペクトルを図4に示しました。負イオンモードでは従来のCIDでも観測される脂肪酸鎖由来のフラグメントが確認されました。得られたフラグメントイオンから、脂肪酸鎖長およびC=C数を同定することができ、ピークAではC18:3、C18:2、C18:1の3種類の脂肪酸の組合せで構成されていることが確認でき、ピークBではC20:4およびC16:0の2種類の脂肪酸で構成されていることが確認できました。このようにOADモードで分析中であってもCEを高く設定することでCID由来のフラグメントイオンが観測されます。

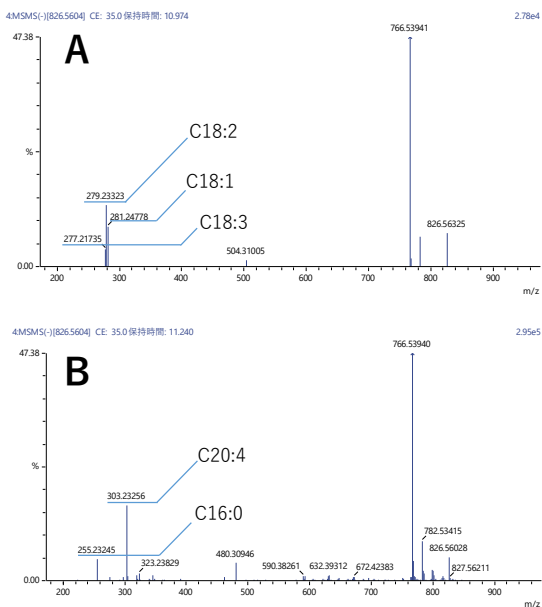


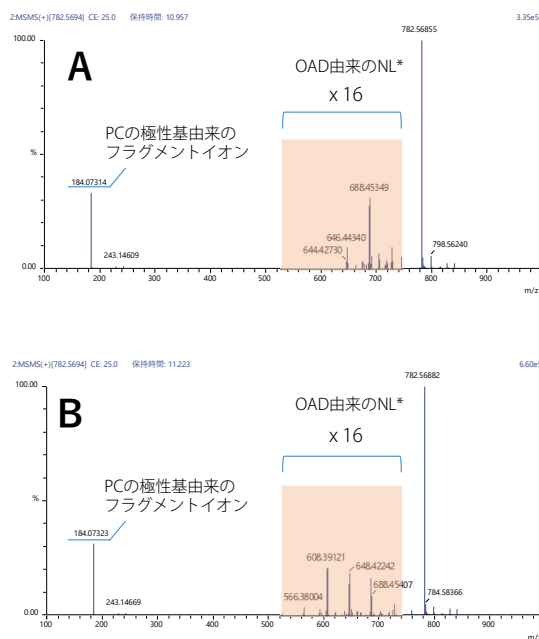
図4 負イオンモード(CE = 35 V)で取得されたPC 36:4のMS/MSスペクトル(上段)ピークA、(下段)ピークB

■ MS/MSスペクトルの解析(正イオンモード)

正イオンモード(CE = 25V)で取得された図3のピークAおよびピークBに由来するMS/MSスペクトルを図5に示しました。

図5から、CIDでは検出されないC=C位置に関連するOAD由来のニュートラルロス(NL)が検出されました。加えて、従来のCIDでも検出されるホスファチジルコリン(PC)の極性基に由来するフラグメントイオンである m/z 184.0731が確認され、ピークAおよびピークBはいずれもPCであることがわかりました。

OADモードをONにして分析している場合でも、CEの値を最適化することでCIDおよびOAD由来のイオン開裂を同時に検出でき、一度の分析でより詳細な構造情報が得られます。



*OAD由来のNLが検出された範囲のみ拡大倍率16倍

図5 正イオンモード(CE = 25 V)で取得されたMS/MSスペクトル(上段)ピークA、(下段)ピークB

■ sn-位の推定

負イオンモードのCID分析において、sn-2位の脂肪酸断片イオンはsn-1位の脂肪酸断片よりも強く観測されることが知られています²⁾。これに基づき図4のMS/MSスペクトルを解析した結果、ピークAおよびBに結合している脂肪酸のsn-位は表2に示した組合せになると推定されました。リン脂質はsn-1位に飽和脂肪酸、sn-2位に不飽和脂肪酸を持つものが多いことが知られており本結果と矛盾しませんでした。

表2 ピークAおよびBに含まれる脂肪酸の組合せ

PC:36:4	R1 (sn-1位)	R2 (sn-2位)
A	C18:2	C18:2
	C18:3	C18:1
B	C16:0	C20:4

■ OADにより得られるニュートラルロス(NL)

脂質に対してOADでイオン開裂を起こすと、図6に示すようにC=C位置に関連したNLが生成され、構造中に含まれるC=C位置を同定することが可能となります。また、多価不飽和脂肪酸が含まれる場合も各C=C位置に関連したNLが生成されるため、全てのC=C位置を同定することが可能です。OADにより得られるC=C位置に関連したNLを表3に示しました。

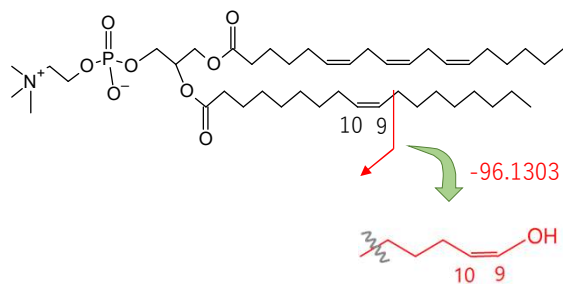


図6 OADにより得られるNLの例

表3 OADにより得られるNLの予測

First Double bond	n-	NL [Da]
n-3	3	-12.0364
	6	-52.0687
	9	-92.1012
	12	-132.1335
n-6	6	-54.0833
	9	-94.1157
	12	-134.1481
	15	-174.1805
n-9	9	-96.1303
	12	-136.1626
	15	-176.1951
	18	-216.2274

■ OAD由来NLの抽出クロマトグラム(XIC)

表3に示したOAD由来NLのXICを、ピークAおよびBに対して描写したのが図7の結果です。ピークAでは表2に示したように2種類のPCが共溶出していますが、それぞれのC=C位置を表4(A)の通り同定することができました。一方、C=C位置がn-3を示すNL-12.0364はピークA、Bともに観測されませんでした。

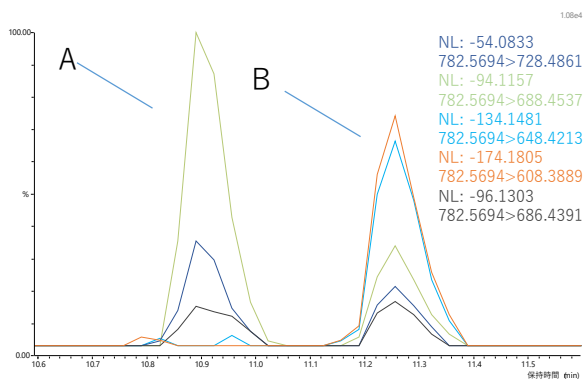


図7 PC 36:4から得られたOAD由来のMS/MSクロマトグラム

■ PC 36:4の詳細解析結果

表2および図7の結果から、最終的にPC 36:4として帰属された化合物は、表4に示す同一の精密質量を持つ3種類の構造異性体として同定することができました。

表4 PC 36:4の構造推定結果

PC(36:4)	R1	R2	Fragmentation	C=C position
A	18:2	18:2		18:2(n-6, n-9) Linoleic acid
	18:3	18:1		18:3(n-6, n-9, n-12) Gamma-Linolenic acid 18:1(n-9) Oleic acid
B	16:0	20:4		16:0 palmitic acid 20:4(n-6, n-9, n-12, n-15) Arachidonic Acid

■ まとめ

OAD-TOFシステムの正負高速極性切替機能とCID/OAD同時分析機能の組合せにより、CIDとOAD由来の異なるフラグメントイオンを正負両極性においてLCMS 1ラン分析で取得することができました。その結果、マウス肝臓抽出物に含まれる脂質の構造を詳細に解析するために必要な極性基、脂肪酸鎖長およびC=C数に関する情報をCID由来のフラグメントイオンから、C=C位置に関する情報をOAD由来のフラグメントイオンから得ることでき、ホスファチジルコリン(PC)の詳細構造情報を一度の分析で取得することができました。

<謝辞>

本アプリケーションの作成にあたり、理化学研究所の有田 誠先生、津川 裕司先生および内野 春希先生には、試料のご提供やデータ解析に多大なるご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

<参考文献>

- 1) H. Uchino, H. Tsugawa, Takahashi, M. Arita, Computational mass spectrometry accelerates C=C position-resolved untargeted lipidomics using oxygen attachment dissociation, *Communications Chemistry*, **5**, 162 (2022)
- 2) K. Ekroos, *et al.*, Charting molecular composition of phosphatidylcholines by fatty acid scanning and ion trap MS³ fragmentation, *Journal of Lipid Research*, **44**, 2181 (2003)

LCMS、NexeraおよびShim-pack Scepterは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00678-JP 初版発行：2023年12月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

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、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

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。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

＞ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ OAD-TOFシステム



＞ DPiMS™ QT
探針エレクトロスプレーイオン化キット



＞ LCMS-9050
四重極飛行時間型質量分析計



＞ MUP-3100
抗体糖鎖自動前処理装置

関連分野

＞ ライフサイエンス

＞ 脂質分析/リポドミクス

＞ 臨床研究・法科学

＞ 臨床研究

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ