SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

イメージング質量顕微鏡
酸素付着解離MS/MSオプションキット

OAD-TOFシステムを用いたマウス脳切片中脂質のC=C位置異性体分離MSイメージング

中川 薫、笠松 郷志、高橋 秀典

ユーザーベネフィット

- ◆ OAD-TOFシステムを用いると、脂質のC=C位置の帰属を簡便・迅速に行うことが可能です。
- ◆ iMScope™ QTとOAD-TOFシステムは、スムーズに組み合わせることができます。
- ◆ iMScope QTとOAD-TOFシステムを用いると、脂質のC=C位置異性体分離MSイメージングが期待できます。

■はじめに

脂質は、細胞膜の構成要素であり、シグナル伝達、エネルギー供給、皮膚バリアとして機能する必須生体分子です。これらの機能は、脂質の多様な構造によって支えられています。特に、脂質の炭素間二重結合（C=C）の位置は、生体膜の物性や代謝反応の基質選択性、シグナル分子の機能において重要な役割を果たします。Oxygen Attachment Dissociation （OAD）[1-3]は、C=Cを特異的に解離するフラグメンテーション法です。本報告は、OAD-TOFシステムとiMScop QTを組み合わせることで、図1のようなワークフローで解析を進めて、マウス脳切片中脂質のC=C位置異性体分離イメージングを行いました。

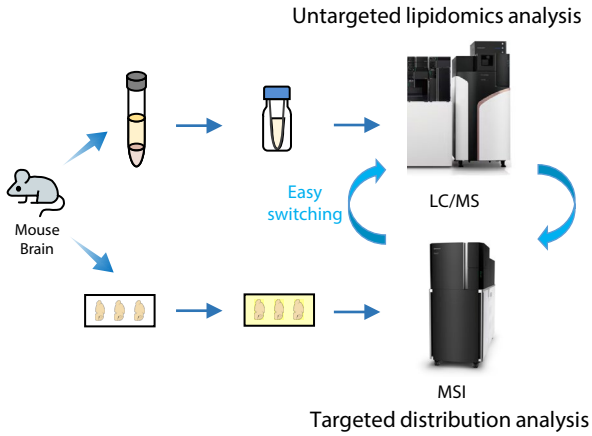

図 1　分析ワークフロー

■OAD-TOFシステム

OADは、水蒸気から生成された中性ラジカルである原子状酸素およびヒドロキシラジカル（O/OH•）を使用して、前駆体イオンのラジカルベースの断片化を誘導します。マイクロ波駆動源によって生成されたO/OH•ラジカルは、石英管を介してQ2衝突セルに導入され、OAD-MS/MSスペクトルを取得できます。酸素原子はC=Cを選択的に酸化・切断し、OAD-MS/MSはC=Cの位置情報を明確に提供します。

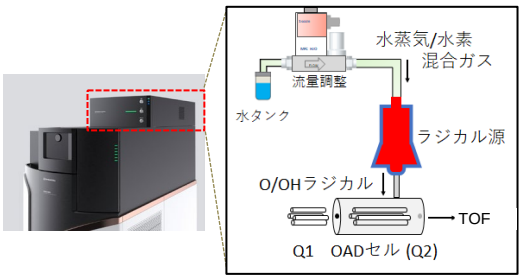

図 2　OAD RADICAL SOURCE Iを搭載したLCMS™-9050（OAD-TOFシステム）

■前処理および分析条件

新鮮凍結マウス脳をクライオミクロトームを用いて10µmの厚さに薄切し切片を、ITOコートスライドに搭載しました。

残りのマウス脳に以下の通り前処理を行い、脂質抽出液を回収しました。

①ラット肝臓を約100 mg秤量して、50 mg/mLとなるようにメタノールを添加しました。
②ジルコニアビーズ2 mmを5個添加し、BeadSmash12（冷却、3,000 rpm、30 sec×2）で破砕しました。
③遠心分離後（4℃、15K、5min）、上清を回収しました。
④メタノールで100倍希釈しました。

脂質抽出液はOAD-TOFシステムを用いてアンターゲット脂質分析を行いました（表1）。OAD-LCMSデータ解析は、MS-DIALを用いて行いました。

次に、OAD-TOFシステムにiMScope QTを組み合わせて（図3）、PC 16:0_18:1のC=C位置異性体を分離した分布解析を行いました（表2）。切片中から金属イオンを取り除くため、切片を4℃の50 mMギ酸アンモニウム水溶液で洗浄しました（5 sec×3）[4]。2,5-ジヒドロキシアセトフェノン（DHAP）は、iMLayer™ （図4）を用いて蒸着塗布しました。MSイメージングデータ解析は、IMAGEREVEAL™ MS（図5）を用いて行いました。

図 3　OAD-TOFシステムとiMScope™ QTの組み合わせ

図 4　iMLayer™

図 5　IMAGEREVEAL™ MS

表 1　LC/MS分析条件

Mass spectrometer		
System	:	OAD-TOFシステム
Polarity	:	Positive
MS/MS mode	:	OAD
Collision Energy	:	30 V
Data-Dependent MS/MS	:	Top 10 precursors from MS1
Event time	:	100 msec for MS1 and MS/MS
DL Temp	:	250 ℃
Heat Block Temp	:	50 ℃
Interface Voltage	:	4 kV
MS Scan Range	:	*m/z* 100-1000
HPLC		
System	:	Nexera™ X3
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	:	20 mM Ammonium formate
Mobile Phase A	:	ACN/IPA=1/1(v/v)
Column Oven Temp	:	40 ℃

表 2　MSI分析条件

Mass spectrometer		
System	:	iMScope QT＋OAD-TOFシステム
Polarity	:	Positive
MS/MS mode	:	OAD
Collision Energy	:	10 V
Q1 Resolution	:	5.0 Da
DL temp	:	290 ℃
Heat block temp	:	400 ℃
MS/MS Range	:	*m/z*500-850
Spatial Resolution (Pitch)	:	50 µm
Laser Diameter Setting	:	4
Laser Intensity	:	72
Laser Repetition Frequency	:	100 Hz
Matrix Coating		
System	:	iMLayer
Matrix Used	:	DHAP
Coating Method	:	Deposition for 5 min x 3 (DHAP)

■OAD-LC/MSを用いたアンターゲット脂質分析

マウス脳からの脂質抽出液は、図6のようなOAD-LC/MSワークフローで分析しました。MS/MSスペクトルはMS-DIALを使用して自動的に脂質構造が帰属されました。帰属された様々な脂質の中から、モデルとして、PC 16:0_18:1のC=C位置異性体の種類とそれぞれの相対量を図4に示しました。その結果、マウス脳中のPC 16:0_18:1はn-7とn-9が主な構造であり、n-7はn-9異性体の約半分の相対量で検出されていました（図7）。

図 6　OAD-LC/MSワークフロー

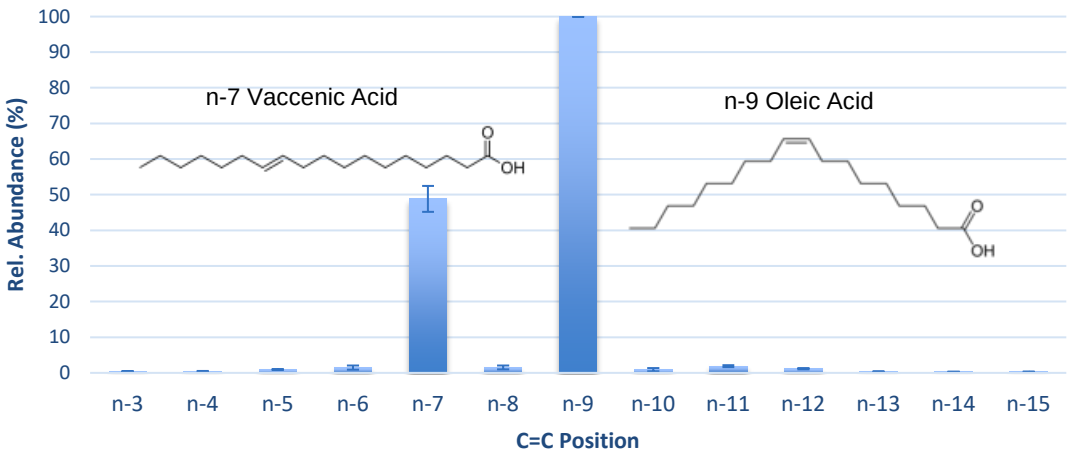

図 7　OAD-LC/MSにより同定したPC 16:0_18:1のC=C位置異性体

■マウス脳中PC 16:0_18:1のC=C異性体分離 MSイメージング

OAD-TOFシステムにiMScope QTを組み合わせて、OAD-LC/MSで同定したPC 16:0_18:1のC=C異性体の分布解析を行いました。マウス脳切片におけるOAD-MS/MSスペクトルに、n-7とn-9を示すフラグメントイオンが確認されました（図8(A)）。それぞれのフラグメントイオンでMSイメージを描くと、小脳において、相対的にn-9は白質に広く分布している一方で、n-7は灰白質に局在していました（図8(B)、(C)）。n-7とn-9のそれぞれの比をとったMSイメージ（例：n-7 / (n-7 + n-9)）を作成すると、異性体の分布の違いを明確に可視化できました（図8(D)）。

■まとめ

OAD-TOFシステムを用いると、マウス脳脂質抽出液のアンターゲット脂質C=C位置解析を簡便・迅速に行うことができました。そして、iMScope QTを組み合わせることにより、マウス脳切片中脂質のC=C位置異性体ごとに異なった分布を確認することができました。

<参考文献>

1) Takahashi.H et al. Anal. Chem. 2018, 90 (12), 7230-7238.
2) Takahashi.H et al. Mass Spectrometry. 2019, S0080.
3) Uchino.H et al. Commun Chem. 5, 162 (2022).
4) Peggi M. Angel et al. Anal. Chem. 2012, 84 (3), 1557-1564

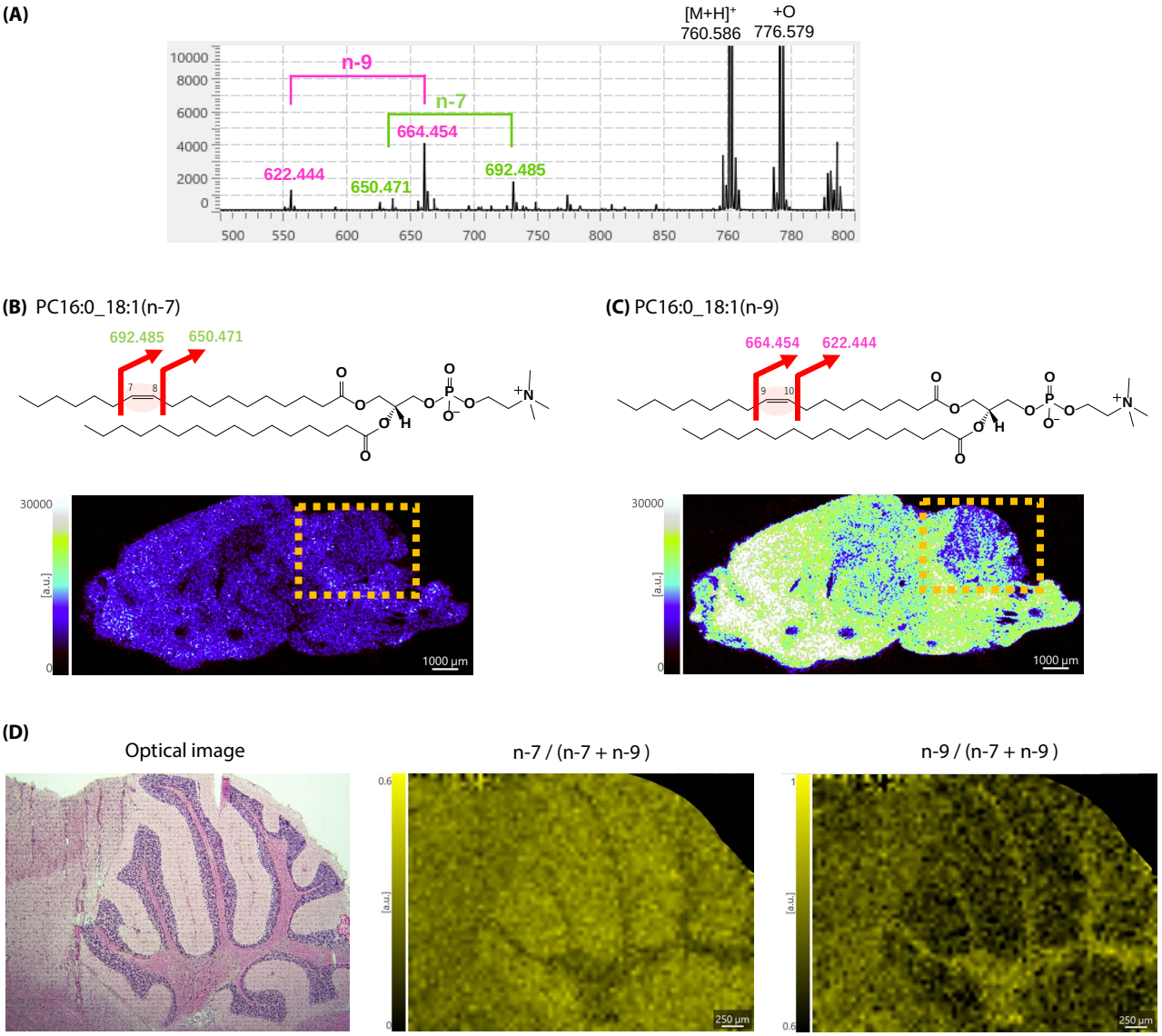

図 8　iMScope QTとOAD-TOFシステムを用いたマウス脳切片におけるPC16:0_18:1のOAD-MS/MS
(A) OAD-MS/MSスペクトル、(B) PC16:0_18:1(n-7)の構造式とOADによる切断位置、OAD-MS/MSイメージ
(C) PC16:0_18:1(n-9)の構造式とOADによる切断位置、OAD-MS/MSイメージ、(D)小脳におけるC=C位置異性体の比をとったMSイメージ

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

01-01044-JP　初版発行：2025年 9月

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。

iMScope™ QT

LCMS-9050
四重極飛行時間型質量分析計

OAD-TOFシステム

関連分野

ライフサイエンス

脂質分析/リピドミクス

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