

シロキサンフィルムを用いたレーザー脱離イオン化質量分析

常盤野哲生¹, 伊藤一志², 尾崎紀昭¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科² 秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科

生体分子の直接分析を目的として、培養容器に適合したポリジメチルシロキサン (PDMS) 薄膜をレーザー脱離イオン化質量分析 (LDI-MS) の基盤に適用した。シロキサンポリマーは成形が容易で、生体培養にも適合しているが、質量分析基盤として用いられた例はほとんどない。本研究では、イオン化促進のためカーボンナノチューブを塗布した PDMS を実験に使用した。調製したシロキサン薄膜は、その表面に水溶液中の有機分子を吸着し、カーボンナノチューブ存在下、LDI-MS で脂質やポリフェノール配糖体、ペプチド等の分子イオンが検出され、吸着分子のイメージング画像を得ることができた。ペプチドと比較して、疎水性の化合物はより高いイオン強度を与えた。またグリセリドのリパーゼ反応生成物を定量的に分析可能であることを示した。

キーワード: レーザー脱離イオン化, 質量分析, ポリジメチルシロキサン, カーボンナノチューブ

質量分析法 (MS) は、生体分子のソフトなイオン化法との組み合わせによって、プロテオミクスやメタボロミクス分析に展開されている。質量分析は分子の質量を決定して生体分子の同定を行い、また、現在では分子の空間的情報を得るための分子イメージングにも利用されている (Seeley, 2008)。タンパクやペプチド、炭水化物、脂質、その他の代謝産物のソフトなイオン化法で重要なものは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) やエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) である。そのうち MALDI は飛行時間型 (TOF) の質量分析装置との組み合わせにより、生体組織の直接的イメージングに使われる、最も一般的なイオン化法の一つである。しかしながら MALDI は、適切な有機マトリックスの選択や、効率的なイオン化のためのマトリックスの均一な塗布が必要とされ、またマトリックスに由来して低分子領域にバックグラウンドピークを与えといった側面がある。近年、いくつかのマトリックスフリーなレーザー脱離イオン化法が開発されており、そのうち表面支援レーザー脱離イオン化法

(SALDI) は分析基盤表面のナノ分子構造をイオン化促進に利用する手法であり、多孔質シリコン基盤の DIOS (Wei, 1999)、ナノワイヤー構造の NALDI® (Kang, 2005)、酸化グラフェン/カーボンナノチューブ (CNT) 多層基盤 (Lee, 2010 ; Kim, 2011) などが報告されている。これらの素材に対して、有機ポリマーのようなソフトマテリアルを利用した LDI 基盤は、生体への適合性も高く、生体分子の直接分析に新たなステージを開く可能性があるものの、その研究報告例は少ない。培養細胞等の代謝産物の直接分析を目指して、我々はポリジメチルシロキサン/カーボンナノチューブ複合素材の LDI-MS 基盤への適用を検討した。同複合素材は共同研究者によって細胞培養容器としての利用開発が行われているが (伊藤, 2014)、今回、LDI プレートとして使用したときに種々の有機分子の LDI-MS 分析可能性について調査した。

材料と方法

材料

各分析試料は Sigma-Aldrich 社, メタノールおよびエタノール溶媒 (HPLC グレード) は和光純薬の市販品を使用した。カーボンナノチューブは株式会社 ATR より購入した。

PDMS/CNT 複合素材

PDMS 薄膜は, PDMS と触媒 10wt% (SILPOT 184, Dow Corning Toray) を混合して厚さ約 70~80 μm になるよう 12 ウェルプレート (3.6 cm^2/well) に注入し, 70°C, 4 時間で硬化させて調製した。PDMS 膜の上面に多層カーボンナノチューブ懸濁液 (80%エタノール) を供して超音波で分散し, エタノール洗浄後, 真空下で乾燥した。

LDI-TOF-MS 分析

調製した PDMS/CNT 基盤表面に試料溶液 1mL (1~10 μM 水溶液, 10%アセトニトリル) を供し, 12~24 時間放置した。溶液を除去した後に水で洗浄し, 真空下で乾燥後, 装置専用のステンレスプレートに乗せ, LDI-TOF-MS 分析に供した。装置は Autoflex II Speed (ブルカー・ダルトニクス社) を使用し, 固体レーザー (355nm, 50~200 Hz) 照射によりイオン化し, リフレクションモードで検出した。

リパーゼ反応

基質としてトリオレイン溶液 (100 mg/mL in dioxane) 10 μL , 種々の濃度の Orlistat®溶液 10 μL を 0.1M HEPES 緩衝液 (pH 7.0) と混合し, 37°C で 5 分間プレインキュベートした。豚膵リパーゼ (Sigma-Aldrich) の懸濁液 (1.0 mg/mL in HEPES 緩衝液) 100 μL を加えて 37°C で 1 時間インキュベート後, アセトニトリルまたはエタノール 900 μL を加えて反応停止した。混合物を等量の緩衝液と混合し, 直接 PDMS/CNT 基盤表面に供し, 内部標準としてモノパルミトイルグリセロールを加えて LDI-TOF-MS 分析を行った。

結果と考察

PDMS/CNT 基盤の作成

PDMS 薄膜は厚さ約 70~80 μm になるよう調製し, 走査型電子顕微鏡で確認した。一般的な LDI-MS 分析では, 試料の有機溶媒溶液をスポットして風乾後, 分析に供するが, 本研究では生体環境への適合性を考慮し, 水溶液中から試料が PDMS 膜表面に吸着することを期待して実験を行った。PDMS 膜のみを LDI-MS 基盤に使用しても, 試料のイオンは全く検出されなかった。これに対して PDMS 膜上に CNT を塗布した場合, 約 50~150 ng/mm^2 の塗布量でイオンが検出された。PDMS 表面は撥水性であり, 当初は CNT 存在下に試料水溶液を供してもイオン強度が弱いと検出されなかったが, 表面の濡れ性を高めるため, カルボキシル基修飾されたカーボンナノチューブを使用したところ, 検出感度が改善された。

PDMS/CNT 基盤を用いた LDI-TOF-MS 分析

各種化合物分析の結果, トリグリセリド脂質ではナトリウム付加イオンが検出され ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), ルチンやリトコール酸は脱プロトン化イオン ($[\text{M}-\text{H}]^-$) を与えた。またマクロライド配糖体のエバメクチンも明瞭な $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ピークが得られた (図 1, (A))。ペプチドのアンジオテンシン I は比較的弱い強度のプロトン付加イオン ($[\text{M}+\text{H}]^+$) を与えた (図 1, (B))。酸性プロトンをも有する化合物では脱プロトン化した負イオンが, それ以外の正イオンはナトリウム付加体が検出される傾向があり, 特に正イオンの場合は溶液中にアルカリ金属塩を添加する必要がある。また 5mm 径の円内に溶液をスポットした後にイメージング MS を行ったところ, 対応する領域のイメージング画像を得ることができた (図 2)。

アンジオテンシン I は他の化合物に比較してピーク強度および S/N も低いものとなったため, PDMS/CNT 基盤に供した水溶液中の化合物濃度を測定した。濃度 10 μM から開始し, リトコール酸では 1 時間後で 6 μM , 24 時間後で 2 μM と濃度低下が見られたが, アンジオテンシンでは 24 時間後でも 9 μM を維持しており, わずかな濃度低下にとどまったことから, PDMS 表面への吸着量の差がイオン検出の感度に影響したことが示唆された。またアンジオテンシン I は水溶液中濃度 1 μM 以上で検出可能であったが, 2,000 Da 以上のタンパクや, 単純な糖類は

同分析条件下では検出されず、親水性化合物の基盤表面への吸着量の検討が必要である。

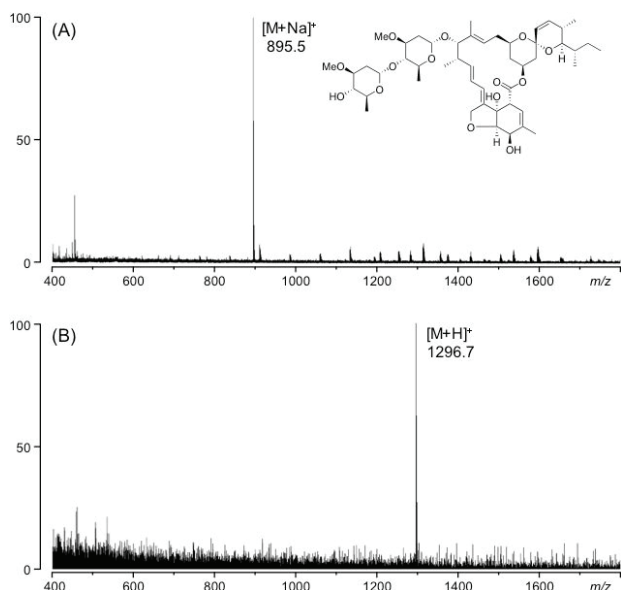


図 1 (A) エバメクチン, および(B) アンジオテンシン I のマススペクトル

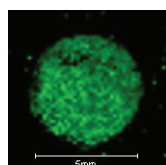


図 2 アンジオテンシン I のマスイメージ

グリセリドのリパーゼ反応分析

PDMS/CNT 基盤は、脂質分析の感度が比較的良好であったことから、グリセリド脂質のリパーゼによる加水分解反応の分析への応用を試みた。トリオレイン基質に対して Orlistat® を酵素阻害剤として使用した。反応後、分解産物のモノアシルグリセロールについて $[M+Na]^+$ ピークが検出され、Orlistat® 濃度に依存した阻害曲線の計算から文献値 (Kato, 2013) に近い IC_{50} 値 ($0.34 \mu M$) を与えたので、酵素の阻害アッセイに応用できることが示された (図 3)。一般的なアッセイ法では、蛍光基質を用いてプレートリーダーで検出・定量を行う、または分解産物の脂肪酸を LC-MS 分析する方法が報告されている (Hao, 2007)。本法は蛍光検出が使えないトリグリセリドを基質としたとき、LC-MS に比較してより簡便で迅速な定量法として期待できる。

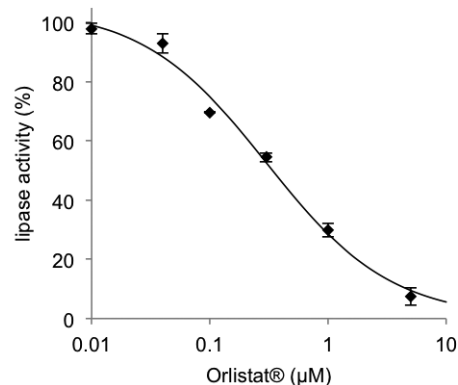


図 3 Orlistat® によるリパーゼの濃度依存的阻害

文献

伊藤一志, 横尾正樹, 特開 JP-A-2014-023461.

Hao, G., Yang, L., Mazsaroff, I., Lin, M. Quantitative Determination of Lipase Activity by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18: 1579-1581, 2007.

Kang, M. J., Pyun, J. C., Lee, J. C., Choi, Y. J., Park, J. H., Park, J. G., Lee, J. G., Choi, H. J. Nanowire-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry for quantitative analysis of small molecules [1]. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 3166-3170, 2005.

Kato, E., Nakagomi, R., Gunawan-Puteri, M. D. P. T., Kawabata, J. Identification of hydroxychavicol and its dimers, the lipase inhibitors contained in the Indonesian spice, *Eugenia polyantha*. *Food Chem.* 136: 1239-1242, 2013.

Kim, Y. K., Na, H. K., Kwack, S. J., Ryoo, S. R., Lee, Y., Hong, S., Jeong, Y., Min, D. H. Synergistic effect of graphene oxide/MWCNT films in laser desorption/ionization mass spectrometry of small molecules and tissue imaging. *ACS Nano* 5: 4550-4561, 2011.

Lee, J., Kim, Y. K., Min, D. H. Laser desorption/ionization mass spectrometric assay for phospholipase activity based on graphene oxide/carbon nanotube double-layer films. *J. Am. Chem. Soc.* 132: 14714-14717, 2010.

Seeley, E. H., Oppenheimer, S. R., Chaurand, D. Mi, P.,
Caprioli, R. M. Enhancement of Protein Sensitivity
for MALDI Imaging Mass Spectrometry After
Chemical Treatment of Tissue Sections. *J. Am. Soc.
Mass Spectrom.* 19: 1069-1077, 2008.

Wei, J., Buriak, J. M., Siuzdak, G. Desorption-ionization
mass spectrometry on porous silicon. *Nature* 399:
243-246, 1999.

〔 平成 28 年 7 月 20 日受付 〕
〔 平成 28 年 7 月 31 日受理 〕

Laser desorption/ionization mass spectrometry of organic compounds on siloxane films

Tetsuo Tokiwano¹, Kazushi Ito², Noriaki Ozaki¹

¹ Faculty of Biological Resource Sciences, Akita Prefectural University

² Faculty of Systems Science and Technology, Akita Prefectural University

To directly detect biomolecules from a culture device by mass spectrometry (MS), we used polydimethylsiloxane (PDMS) films as a laser desorption/ionization (LDI) platform. Siloxane polymer is readily manufactured and molded and is commonly used under culture conditions; however, its use as an MS platform has been limited. In this study, we used carbon nanotube-coated PDMS to assist ionization. The prepared siloxane films adsorbed organic molecules in an aqueous solution onto their surface, and ion peaks were observed in the presence of carbon nanotubes. Lipids, phenolic glycoside, and peptide were detected via LDI-MS, and detection of glycerides in a lipase assay was demonstrated. Hydrophobic compounds showed more intense mass peaks than hydrophilic peptides.

Keywords: LDI-TOF-MS, polydimethylsiloxane, carbon nanotubes