

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29年 4 月 28 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 奈良県立医科大学・医学部
 職 名 講師
 研究代表者名 秦野 修

下記のとおり平成 28 年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号: 281028)

1. 共同利用研究 課題名	質量分析法を用いたステロイドホルモン産生機構の研究			
2. 共同利用研究 目的	哺乳動物のステロイドホルモンは、主に副腎皮質、精巣、卵巣で、CYPs や HSDs の連携によって合成・分泌される。これらのステロイドホルモンは、組織切片上で従来の免疫組織化学法などで検出できないために、各々のステロイドホルモン産生部位(細胞)については、それらの最終合成酵素の発現部位を検出することによって、間接的に推定されていた。本研究ではステロイドホルモン産生機構の解明を目的として、本年度はステロイドホルモンのイオン化法を改良し、質量分析イメージング法を用いて、組織切片上で直接、検出する実験系の開発を行った。			
3. 共同利用研究 期間	平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 秦野 修	奈良県立医科大学・医学部	講師	研究統括と全ての実験	
(分担研究者) 岩崎哲史	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター	助教	受け入れと質量分析補助等	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル統合経路研究 部門・細胞増殖分化制 御研究分野	氏 名	岩崎哲史

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号: 281028)

6. 共同利用研究計画

質量分析法は、目的分子をイオン化することによって初めて検出が可能となる。ステロイドホルモンは一般にイオン化が困難な化合物とされており、質量分析 MALDI 法において、イオン化補助マトリックスとして通常に用いられる有機化合物類では、マトリックス物質そのものがイオン化されて、低分子領域に多数のバックグラウンドピークが検出され、ステロイドホルモンなどの低分子領域(m/z 500 以下)の解析を困難なものにする。そのため、低分子領域の高感度検出のためには、①:マトリックス化合物そのもののイオン化を極力、低くすることが求められる。あるいは、②:誘導体化等によって強くイオン化する条件の検討が必要とされる。

そのため、①SALDI 法 / Nano-PALDI 法:金属ナノ粒子は自身はイオン化せずに、他物質をイオン化するマトリックス効果があることが報告されているため、種々の金属ナノ粒子による代表的ステロイドホルモンのイオン化効果を検討した。又、②誘導体化法:より高効率な強いイオン化条件を達成するために、代表的ステロイドホルモンの誘導体化を種々の試薬を用いて行った。

これらのイオン化法の改良検討の結果、②の誘導体化法によって、①の SALDI 法より、強いイオン化と高い S/N 比が達成されたため、この誘導体化法を用いて組織切片上で、直接、ステロイドの誘導体化を行ない(On-Tissue 誘導体化)、引き続き、スキヤニングによる質量分析イメージング法を用いた解析を行った。

7. 共同利用研究の成果

ステロイドホルモンは、質量分析 MALDI 法のマトリックスとして一般的な CHCA や DHB 等の有機化合物を用いると、イオン化効率が悪く、ピーク強度が低いが、①:種々の酸化金属(酸化鉄、他)ナノ粒子等をマトリックスとして用いると(SALDI 法 / Nano-PALDI 法)、バックグラウンドが低く S/N 比の高い Na⁺付加ステロイドホルモン群の m/z ピークが得られた。又、②:ステロイドホルモンの A 環のケトン基に反応する Girard-T (GirT) 試薬を用いて、代表的なステロイドホルモン類を誘導体化することにより、強いイオン化シグナルが得られた。そこで、ラット、ウサギ等の副腎の凍結組織切片(10 μ m 厚)を作成し、スライドガラス上に貼付した切片を、①:SALDI 法によるイメージング検出、及び、②:GirT 試薬を噴霧器でスプレーし(On-Tissue 誘導体化)、引き続き CHCA マトリックスを噴霧した後に、質量分析 MALDI 法スキヤンの後、イメージング検出を行った。この際、あらかじめ切片上で MALDI レーザー試し打ちを行い、切片上で内在性の GirT 標識ステロイドホルモンのピークが観察されることを確認した後に、MALDI イメージングスキヤンを行った。

その結果、②の誘導体化法において、Corticosterone-GirT, Progesterone-GirT, Cortisol-GirT 等の誘導体化されたステロイドホルモンの m/z 値の質量分析イメージング像が、副腎皮質の束状層と網状層に検出された。この際、超高質量分解能(質量分解能 100 万)の FT-ICR MS 機を用いることによって、予想される m/z 値の ± 0.001 以内の正確さで、これらのイオン化ステロイドホルモンのイメージング検出が達成された。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

「SALDI と誘導体化によるステロイドホルモンのイオン化法の改良と質量分析イメージングへの応用」

秦野 修、磯崎勝弘、竹森 洋、大西 健、岩崎哲史、片桐昌直、川崎英也、一柳優子、荒川隆一
第 68 回イオン反応研究会/第 157 回質量分析関西談話会/第 6 回イオン移動度研究会・合同研究会
2017 年 4 月 23 日 奈良市

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究 平成 26~28 年度

「ステロイドホルモンの質量分析イメージングによる組織細胞上の直接可視化法の開発」

研究代表者: 秦野 修

科学研究費補助金 基盤研究(C) 一般 平成 29~31 年度

「質量分析イメージングと標的プロテオミクスによるステロイドホルモン産生異常の解析」

研究代表者: 秦野 修

連携研究者: 岩崎哲史、磯崎勝弘、片桐昌直