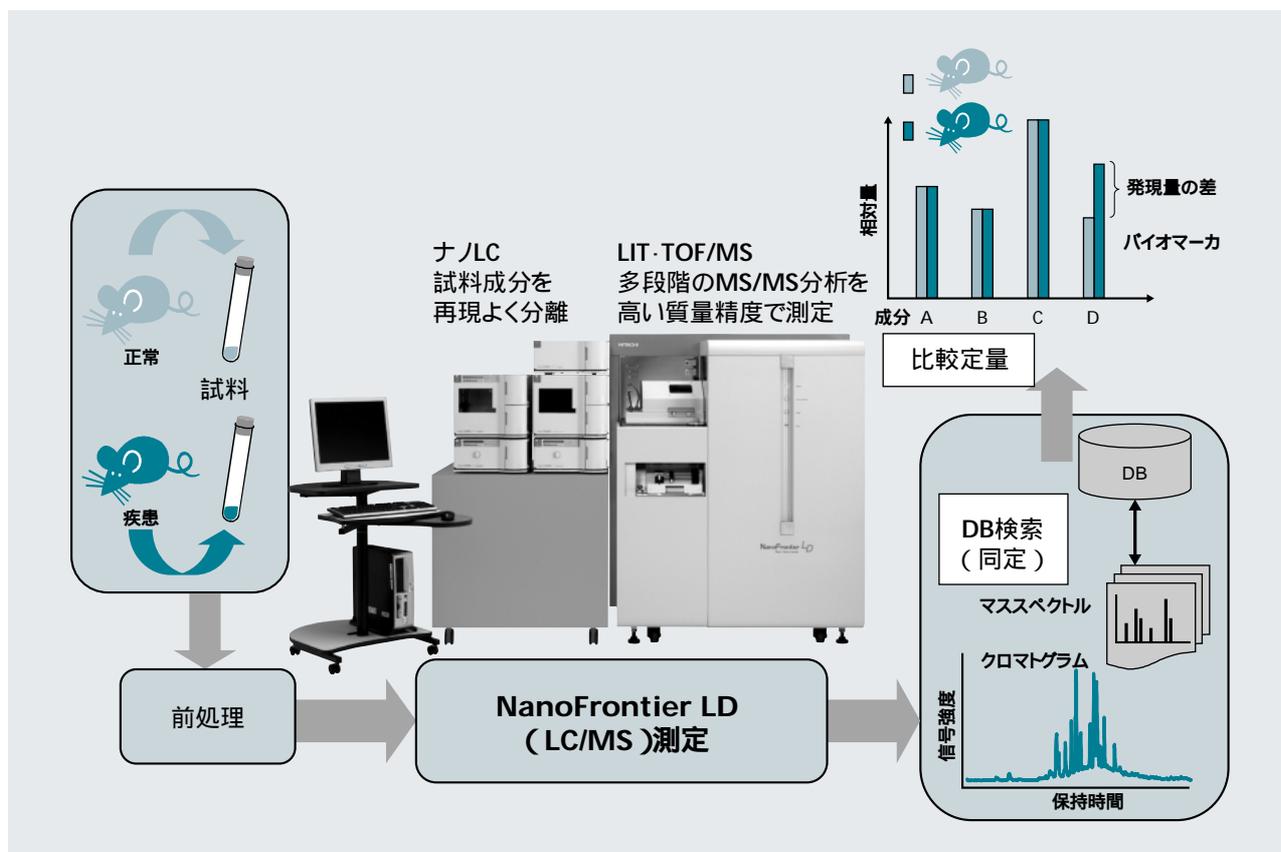


タンパク質の変動解析を実現する 液体クロマトグラフ質量分析装置の開発

Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer for Search of Biomarker Proteins

緒方いずみ Izumi Ogata
師子鹿司 Tsukasa Shishika

大和田章 Akira Owada
吉岡信二 Shinji Yoshioka



注:略語説明 LC/MS(Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer:液体クロマトグラフ質量分析装置), LC(Liquid Chromatograph:液体クロマトグラフ)
LIT-TOF/MS(Linear Ion Trap-Time of Flight/Mass Spectrometer:リニアイオントラップ/飛行時間型質量分析装置), DB(Database:タンパク質検索エンジン)

図1 液体クロマトグラフ質量分析装置「NanoFrontier LD」を用いたバイオマーカー探索の流れ
 疾病メカニズムの解明や疾患関連マーカー(バイオマーカー)の探索は、生体から採取した試料を、精製・酵素消化などの前処理を行い、NanoFrontier LDで分離測定する。測定して得られたマススペクトルをタンパク質検索エンジンで検索し、試料に含まれるタンパク質・ペプチドの同定を行う。また、信号強度を元に各タンパク質、ペプチドを比較定量し、疾病の有無による発現量の差から疾患試料特有のバイオマーカーを求める。

1.はじめに

創薬や体外診断の分野で、疾病(しっぺい)メカニズム解明および疾患関連マーカー以下、バイオマーカーと言う。探索のために、細胞、血清、尿などに含まれるタンパク質や代謝物解析が盛んに行われている。また、近年は疾病の有無によるバイオマーカータンパク質の発現量の変化が注目されており、同定解析だけでなく量的な変動解析のニーズも高くなってきた。

株式会社日立ハイテクノロジーズは、タンパク質解析用分析装置として「NanoFrontier L」を2005年4月に製品化し、好

評を得ている。今回は、「NanoFrontier L」に定量機能を加え、変動解析を可能にした新形「NanoFrontier LD」を開発した。

ここでは、従来機「NanoFrontier L」の特長と、「NanoFrontier LD」で新規に搭載した機能、およびNanoFrontier LDを用いたタンパク質の変動解析の例について述べる。

2.NanoFrontier Lの特長

NanoFrontier Lは、流量50~250 nL/minでのダイレクトフローによるグラジエント送液が可能なナノLC(Liquid Chro-

質量分析装置はバイオマーカー探索において有効なツールの一つである。株式会社日立ハイテクノロジーズは、バイオマーカータンパク質の量的変動解析への注目が年々高まる中、未知タンパク質の同定機能に加え、同定したタンパク質、ペプチドの比較定量も可能な液体クロマトグラフ質量分析装置「NanoFrontier LD」を開発した。

NanoFrontier LDは、当社従来機の検出系を改良し、ダイナミックレンジ5,000以上を達成して測定試料の量的変動解析を可能にした。また、試料構造解析の新方式を開発し、試料の構造情報をいっそう多く得ることができる。

さらに、ソフトウェア部は構造解析効率を向上させる機能を充実させた。

同定と定量が可能となったNanoFrontier LDは、バイオマーカータンパク質探索への多大な貢献が期待されている。

matograph)、および、リニアイオントラップ(以下、LITと言う。)と飛行時間型(以下、TOFと言う。)の2種類の質量分析部を結合した質量分析装置(以下、MSと言う。)搭載の液体クロマトグラフ質量分析装置(LC/MS)である。

ナノLC部は、日立独自の送液方法DEGS(Dual Exchange Gradient System)¹⁾²⁾により、流量50 nL/minというナノ流量域での高安定・高再現グラジエント送液を可能にした。また、質量分析部はLITとTOFの搭載により、多段階のMS/MS分析を高い質量精度で測定することが可能である(図1参照)。

3. NanoFrontier LDの新機能

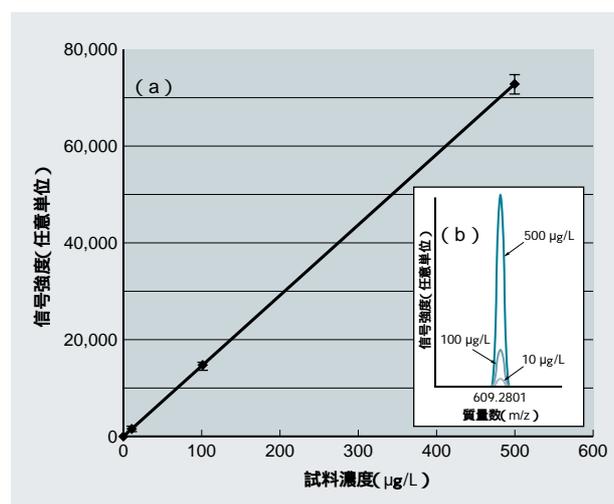
3.1 高速ADCの搭載による定量機能

NanoFrontier LDの最大の特長である定量機能を実現するため、この装置では従来機NanoFrontier Lの検出系の改良を行った。従来機の検出系には、検出器へ到達したイオンをパルスで検出するTDC(Time to Digital Converter)を搭載していた。TDCによる検出系は質量分解能が高く、また検出器へ到達したイオンが仮に1個であっても検出が可能である。しかし、同時に複数のイオンが検出器へ到達した場合、それらを1パルスとして検出するため、高濃度試料などではイオンの数え落としが発生し、試料濃度に対する信号強度の追従がよくない場合があった。

NanoFrontier LDでは、TDCに替えてADC(Analog to Digital Converter)を新たな検出系として搭載した。ADCは、検出器へ同時に到達したイオン量をアナログ検出するため、TDCのようなイオンの数え落としがない。また、広い測定ダイナミックレンジが実現するという特長もある。NanoFrontier LDでは、日立製作所生産技術研究所が、TOF/MS検出系として、2 GHzでのサンプリングが可能な高速ADC基板を新たに開発した。

また、ADCによる検出系はTDCと比較して質量分解能が理論上低下する。これを改善するため、NanoFrontier LDはTOFを改良し、分解能10,000を実現している。

NanoFrontier LDでレセルピンを測定した際の測定試料濃度に対する信号強度の変化を図2に示す。試料濃度0.1から



注:略語説明 m/z 質量/電荷)

図2 レセルピン濃度の変化に伴う信号強度の変化

各濃度の試料を1 μL注入した際の信号強度変化を(a)に示す。試料濃度0.1~500 μg/mLまで高い直線性を示している。(b)にはレセルピンの分子イオン(m/z 609.2801)の信号強度変化を示す。

500 μg/Lの範囲において、試料濃度と信号強度は高い直線性を示し、ダイナミックレンジ5,000以上を実現している。

ダイナミックレンジの拡大により、NanoFrontier LDは従来機と比べ、より正確に試料イオンの量的変動を検出することが可能である。

3.2 サーマライザの機能向上による構造解析の新方式

NanoFrontier LDでは、従来機の特長であったLITでの多段階のMS/MS測定に加えて、LITとTOF間の衝突減衰器(以下、サーマイザと言う。)でのMS/MS測定が可能である。

サーマイザは、LITから排出されたイオンをHe分子と衝突させ、イオンビームを収束させてTOFへ導入するために搭載した四重極レンズ³⁾である。サーマイザでのMS/MS測定の特長は、LITによるMS/MS測定と比べ、より低い質量数のフラグメントイオンが生成することである。

試料ペプチド[Glu]-Fibrinopeptide Bを、LITとサーマイザによる2種類のMS/MS測定を行った結果のマスペクトルを図3に示す。LITによるMS/MSスペクトルでは検出されない低

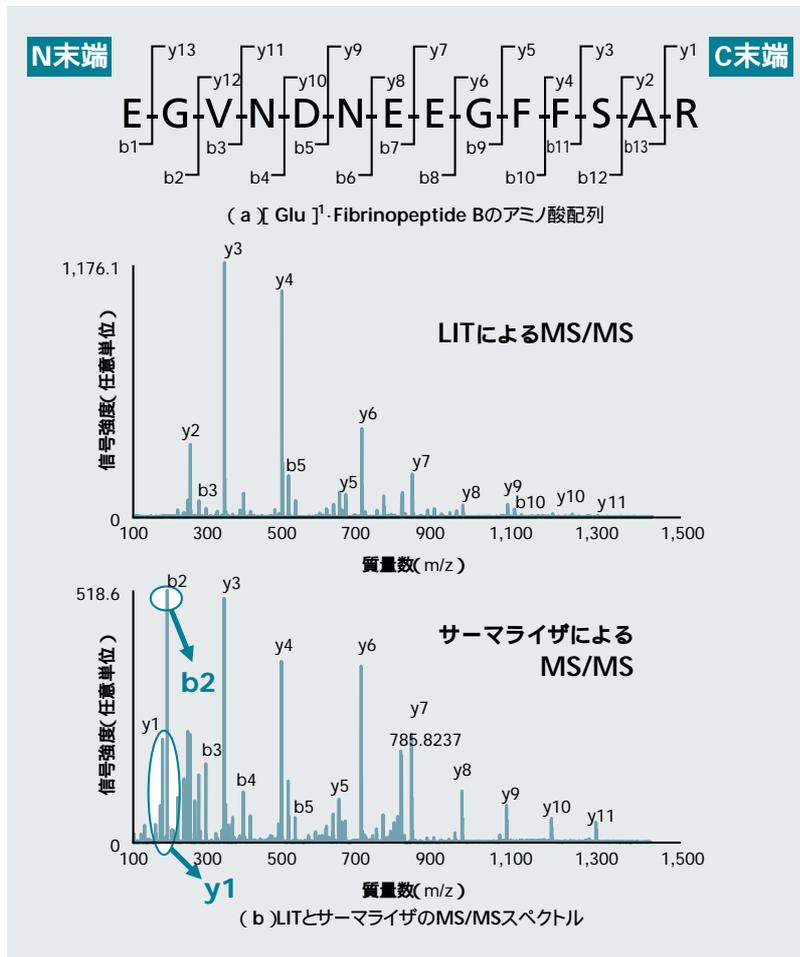


図3 LITとサーマイライザによる[Glu]-Fibrinopeptide BのMS/MSスペクトルの違い
 [Glu]-Fibrinopeptide Bのアミノ酸配列(a)に示す。N末端を含むフラグメントイオンをb系列、C末端を含むフラグメントイオンをy系列と呼ぶ。LITとサーマイライザの各MS/MSスペクトルを(b)に示す。サーマイライザによるMS/MSでは、LITによるMS/MSで検出されないb2、y1フラグメントイオンが検出された。

質量数側のイオンが、サーマイライザでのMS/MS測定では検出された。これらのイオンはそれぞれ、試料ペプチドのN末端から2番目のペプチド結合が開裂したb2イオンと、C末端のペプチド結合が開裂したy1イオンであり、同図の測定結果では、サーマイライザによるMS/MSスペクトルの方がLITより多くのアミノ酸配列情報を与えた。低質量のフラグメントイオンが多く観測されることから、タンパク質より小さい代謝物などの構造解析への応用が考えられる。

NanoFrontier LDでは、測定試料や目的に応じてLITによる多段階のMS/MS測定と、サーマイライザによるMS/MS測定の選択が可能である。

3.3 IBA機能の充実による構造解析効率向上

ソフトウェアは、IBA(Information Based Acquisition)機能をさらに充実させた。

従来のIBAは、同一試料を繰り返し測定する際にMS/MS測定したターゲット成分の情報(質量数と保持時間)をリアルタイムに内部データベースへ記憶し、複数回の測定でMS/MS測定する成分の重複を防ぐ機能である⁴⁾。これにより、

測定回数増加に伴い測定試料中のタンパク質、ペプチドの同定数が増加する。

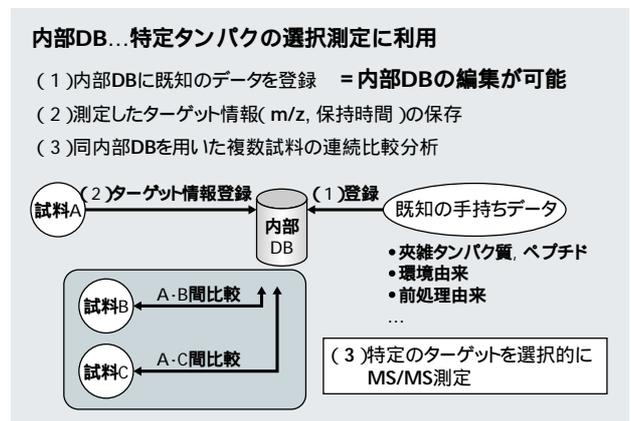
NanoFrontier LDでは、IBA機能に内部データベースの編集機能を追加した。この新IBAでは、あらかじめ測定試料に混在、または前処理や環境によって混入する夾(きょう)雑成分などの既知情報を内部データベースへ登録する。その後、試料Aの測定でターゲット情報が同データベースに登録され、試料B、Cの測定では、このデータベースとの比較を行いながら、試料Aに存在しない特定ターゲット成分の選択的なMS/MS測定を行う(図4参照)。

なお、この機能は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)助成事業の成果の一部である。

4 NanoFrontier LDによる測定例

NanoFrontier LDによるタンパク質消化物の変動量測定を行った。

4種のタンパク質(酵母エノラーゼ(Yeast Enolase)、ホスホリラーゼ(Phosphorylase b)、酵母アルコール脱水素酵素(Yeast Alcohol Dehydrogenase)、ウシヘモグロビン(Bovine Hemoglobin))のトリプシン消化物の混合試料A、Bを用意した。各試料のタンパク質濃度は、ホスホリラーゼb、酵母アルコール脱水素酵素、ウシヘモグロビンについてはそれぞれ100 nmol/L、酵母エノラーゼはAが100 nmol/L、Bが200 nmol/Lである。それぞれの試料1 μLをNanoFrontier LDで分析し、結果をタンパク質



注:略語説明 IBA(Information Based Acquisition)、DB(Database)

図4 IBA機能の概念図

既知の手持ちデータがリアルタイムに登録される。このDB情報を参照しながら試料B、CのMS/MS測定を行い、試料B、Cに含まれる特定ターゲットを選択的にMS/MS測定する。

検索エンジンMASCOT³⁾で検索して各タンパク質の同定を行った。また、各タンパク質について、ウシヘモグロビンを内部標準として各成分の相対定量を試みた。

NanoFrontier LDのLC/MS測定した結果のトータルイオンクロマトグラムを図5(a)に示す。クロマトグラム上に各成分の消化ペプチド断片ピークが多数検出された。このMS/MS測定結果をMASCOTで検索すると、試料中の4種のタンパク質すべてが検索された。

同定されたペプチドピークを由来するタンパク質ごとに抽出し、各ピークの信号強度を元に相対定量を行った。試料Aの測定結果中の各タンパク質由来ペプチドの信号強度に対する、試料Bの同じペプチドの信号強度の比を計算した。その結果を同図(b)に示す。ホスホリラーゼb、酵母アルコール脱水素酵素については、試料A、Bの量比は約1、酵母由来エノラーゼのみ試料BでAの約2倍の信号強度で検出され、実際のタンパク質量の相違とよく一致した。

5. おわりに

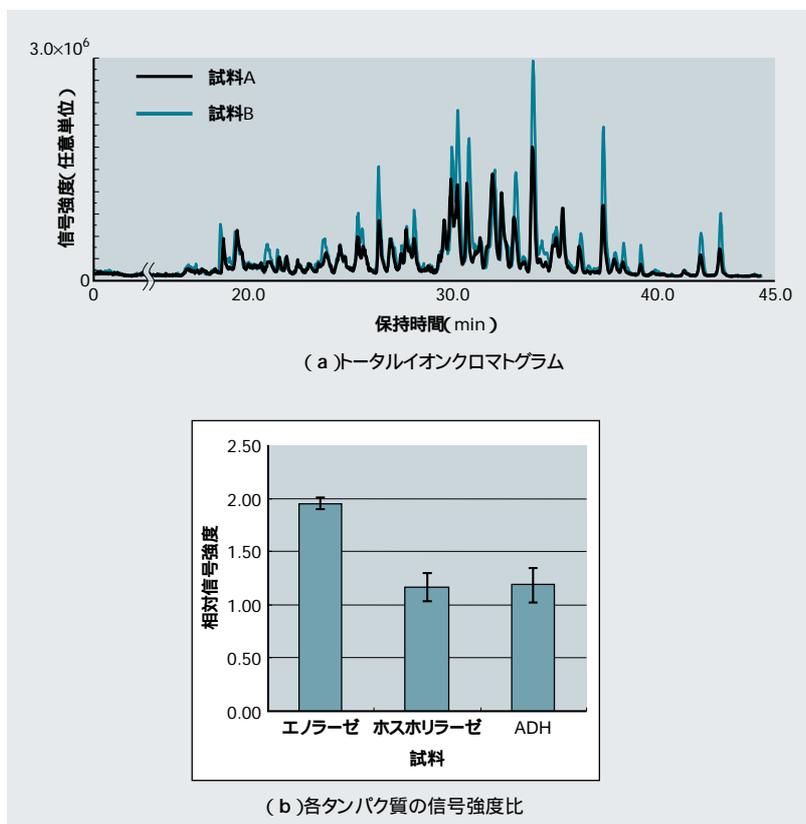
ここでは、液体クロマトグラフ質量分析装置「NanoFrontier LD」の新たな機能と特長について述べた。

同定・定量機能共に従来機に比べて向上したNanoFrontier LDは、バイオマーカータンパク質探索への多大な貢献が期待される。

参考文献

- 1) K. Deguchi, et al.: Nanoflow Gradient Generator for Capillary High-Performance Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 76, 1524(2004)
- 2) 出口, 外: ナノ高速液体クロマトグラフィー・質量分析法のナノ流量グラジエント装置の開発, *日立評論*, 86, 10, 733~736(2004.10)
- 3) Y. Hashimoto, et al.: Orthogonal trap time-of-flight mass spectrometer using a collisional damping chamber, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2, 221(2005)
- 4) T. Yokosuka, et al.: Information-Based-Acquisition(IBA) Technique with an IonTrap/Time-Of-Flight Mass Spectrometer for High-Throughput and Reliable protein profiling, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, in press(2006)

) MASCOTは、Matrix Science Ltd.の登録商標である。



注:略語説明 ADH Alcohol Dehydrogenase:アルコール脱水素酵素)

図5 タンパク質混合試料の相対定量結果

試料A、Bのトータルイオンクロマトグラムを(a)に示す。溶出パターンが一致する一方、試料Bのクロマトグラムにエノラーゼ由来と推測される強度の高いピークが観測できる。試料に含まれる各タンパク質の信号強度比(試料B/試料A)を(b)に示す。試料Bのエノラーゼを、Aの約2倍の強度で検出することができた。

執筆者紹介



緒方 いずみ

2001年日立製作所入社,株式会社日立ハイテクノロジーズ
ナノテクノロジー製品事業本部 那珂事業所 バイオシステム設計部 所属
現在,LC/MSの設計開発に従事



師子 鹿司

1999年日立製作所入社,株式会社日立ハイテクノロジーズ
ナノテクノロジー製品事業本部 那珂事業所 バイオシステム設計部 所属
現在,LC/MSの設計開発に従事



大和田 章

1992年日立製作所入社,株式会社日立ハイテクノロジーズ
ナノテクノロジー製品事業本部 那珂事業所 バイオシステム設計部 所属
現在,LC/MSの設計開発に従事



吉岡 信二

1996年日立計測エンジニアリング株式会社入社,株式会社日立ハイテクノロジーズ
ナノテクノロジー製品事業本部 那珂事業所 那珂アプリケーションセンタ 所属
現在,LC/MSのアプリケーション開発に従事
日本分析化学会会員