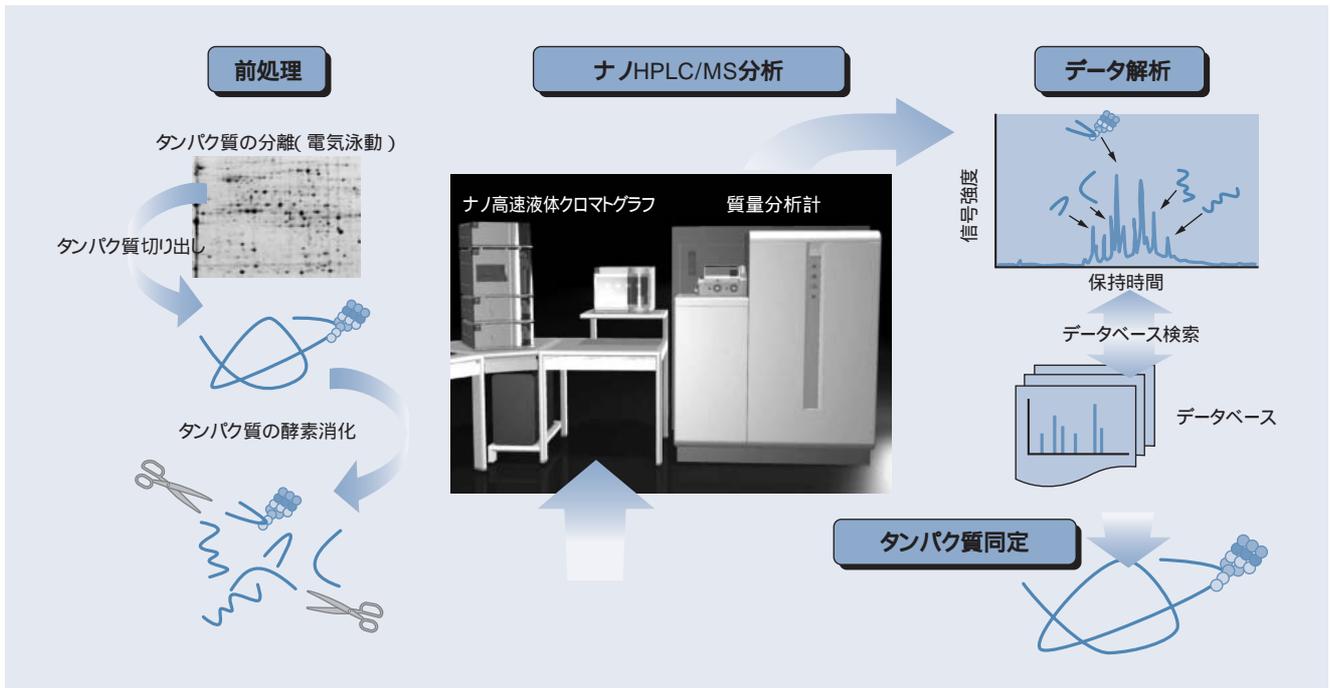


# ナノ高速液体クロマトグラフィー・質量分析法の ナノ流量グラジエント装置の開発

## Development of Nanoflow Gradient Generator for Nano High-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry

出口喜三郎 *Kisaburō Deguchi* 吉岡 信二 *Shinji Yoshioka*  
伊藤 伸也 *Shin'ya Itō* 緒方いずみ *Izumi Ogata*



注：略語説明 HPLC( High-Performance Liquid Chromatography ; 高速液体クロマトグラフィー ), MS( Mass Spectrometry ; 質量分析法 )

### ナノHPLC/MSを用いたプロテオーム解析の流れ

生体試料から電気泳動で分離した個々のタンパク質スポットを切り出し、消化酵素でペプチドへ断片化する。これをナノ流量の液体クロマトグラフで分離し、質量分析計で検出する。得られたデータをタンパク質のマススペクトルデータベースで検索し、目的のタンパク質を同定する。

2003年は、ヒトゲノムシーケンスが終了し、生命科学にとって記念すべき年となった。また、その翻訳により、生体内で合成されるタンパク質や代謝系を網羅的に解析する「プロテオーム(グライコプロテオームやメタロームを含む。)」や「メタボローム」の新たな幕開けともなった。ハイスループットDNA(Deoxyribonucleic Acid)シーケンサーがゲノム解析に大きな役割を果たしたのと同様に、複雑で極微量の試料を対象とするプロテオーム解析やメタボローム解析では、ナノ高速液

体クロマトグラフィーエレクトロスプレー質量分析法(ナノHPLC-ESI MS)への期待が高まっている。

日立グループが開発したナノ流量グラジエント装置は、このような研究ニーズに対応するものである。この装置は、複雑な生体試料の高感度、高分離ナノHPLC-ESI MSシステムの構築と、安定で再現性のよいプロテオームやメタボローム解析に不可欠となるものと期待されている。

## 1 はじめに

サブマイクロリットルの微量サンプルを高分離、高感度で分

析するHPLC( High-Performance Liquid Chromatography : キャピラリー( マイクロ )高速液体クロマトグラフィー )の研究は、1970年代後半に日米欧の3グループによってスタートし、約30年の歴史がある<sup>1)~3)</sup>。中でも、名古屋大学の石井

大道教授が率いるグループが果たした役割は大きい。当時のUV( Ultraviolet Ray )吸収検出器や蛍光検出器をベースとしたマイクロHPLCを「第一世代」とすれば、汎用性の高いESI( Electrospray Ionization : エレクトロスプレーイオン化法 )が開発された後のMS( Mass Spectrometry : 質量分析法 )と結合したマイクロ・ナノHPLC-ESI MSは「第二世代」と言える。後者は、今や複雑で極微量の生体成分( 核酸, タンパク, ペプチド, 糖鎖, 脂質など )の分析には必要不可欠になりつつある。しかし、ルーチン的に使用できる成熟した分析装置の域にはまだ到達しておらず、幾つかの解決すべき技術的課題が残っている。その一つが、ナノフロー領域( nL/min )での安定したグラジエント( 勾配 )の実現である。

ここでは、このような研究課題にこたえるために日立グループが開発した、新たなナノ流量グラジエント装置の原理、特徴、性能、ナノHPLC-ESI MSへの応用、および今後の展望について述べる。

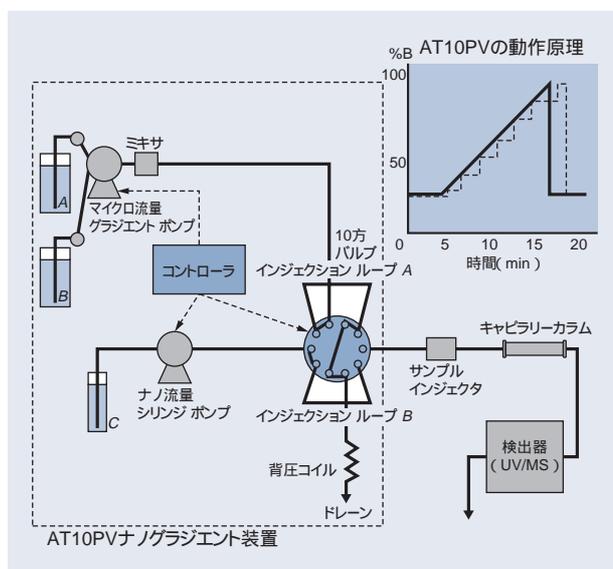
## 2 研究ニーズ

低マイクロ流量やナノ流量域でも、多成分を効率よく分離するためには、複数の溶媒やバッファ組成を時間とともに変えながらキャピラリー( マイクロ )カラムに送液する、いわゆるグラジエント溶出法が必要である。それをどのように行うかは、「第一世代」からの大きな懸案であった。当時、幾つかの原理的方法が提案され、「第二世代」でも、それらの方法がそのままの形や、少し改良された形で使用されている。中でも、スプリット法は、最も簡便な方法として現在でも多用されている。しかし、キャピラリーカラムなどの圧力変動がそのまま流量変動となるため、再現性のよいデータを連続して収集するには不安がある。そのために、スプリットに頼らない新たな方法が長年求められてきた。

## 3 ナノ流量グラジエント装置の原理と特徴

ナノ流量グラジエント装置を用いたキャピラリーHPLCの構成を図1に示す。点線枠で示した部分が、今回開発した「AT10PV( Asymptotic Trace 10-Port Valve )ナノグラジエント装置」と呼んでいるものの構成である<sup>5)</sup>。この装置は、(1)マイクロ流量の低圧(または高圧)グラジエントポンプ、(2)ナノ流量のインクテック シリンジ ポンプ、(3)10方バルブ(2インジェクションループと背圧用コイルも含む。)、および(4)コントローラで構成している。

グラジエント溶液は、マイクロ流量の低圧グラジエントポンプで作製されてから、10方バルブに送られる。図1の流路では、



注：略語説明 AT10PV( Asymptotic Trace 10-Port Valve ), UV( Ultraviolet Ray ), MS( Mass Spectrometer )

図1 ナノ流量グラジエント装置を用いたキャピラリーHPLC(高速液体クロマトグラフィー)の概略構成

右上部のAT10PVナノグラジエント装置の動作原理図では、元のマイクロ流量のグラジエントカーブ(実線)と、それをステップ状で追隨するナノ流量グラジエントカーブ(点線)を模式的に示している。

インジェクションループAにロードされた後、背圧用コイルを通してドレーンに排出される。この間、インジェクションループBにロードされていた混合液は、ナノ流量のインクテック(シリンジ)ポンプにより、キャピラリーカラムに送り出されている。ここで10方バルブを切り替えれば、今までインジェクションループAにロードされていた混合液が送り出され、インジェクションループBには、新たな混合液がロードされる。10方バルブの切り替えを一定時間(例えば、1~2分)ごとに繰り返すことにより、ナノ流量でのグラジエントが実現できる。図1右上のカーブは、その様子を模式的に示したものである。

実線はマイクロ流量の低圧グラジエントポンプで作製されるグラジエントカーブであり、点線は、ナノ流量でキャピラリーカラムに送り出されるグラジエントカーブである。すなわち、10方バルブの切り替え時間(図1では2分)ごとにステップ状で元のグラジエントカーブに追隨していくことになる。もし、切り替え時間間隔をさらに短くすれば、元のグラジエントカーブに「漸近的に(Asymptotically)追隨(Trace)」していくことは容易に理解できる。一方、背圧用コイル(またはカラム)の役割は、10方バルブの切り替え時の圧力ショックによるナノ流量の変動を最小限にすることである。

## 4 ナノ流量グラジエント装置の性能

元のグラジエントカーブへの追隨性がどの程度あり、また、再現性があるのかについて、実際のデータを使って以下に述べる。

低圧グラジエントポンプによって流量100  $\mu\text{L}/\text{min}$ で作製したグラジエントカーブと、流量500 nL/minと200 nL/minで追従したナノグラジエントカーブを重ね、比較したものを図2に示す。同図の挿入部分は、30分付近を拡大したものである。500 nL/minのカーブには 上述の「ステップ」が見えるものの、200 nL/minの低流量では、拡散効果によって「ステップ」は完全に消失し、元のグラジエントカーブ並みにスムーズである。しかし、この「ステップ」を、10方バルブ切り替え時間を1分から0.5分に早めることで完全に消失する。

流量50 nL/minでのナノグラジエントカーブの再現性を調べた結果を図3に示す。同図の挿入部分は、25~30分付近を拡大したものである。6回の連続したデータを重ねていても、流量50 nL/minでのグラジエント再現性が非常によいことがわかる。

BSA( Bovine Serum Albumin  $\chi$  150 fmol)のトリプシン消化ペプチドを、キャピラリーカラム( ODS( オクタデシル基 ) , 75  $\mu\text{m}\times$ 150 mm )を使用し、流量200 nL/minで分析したUVクロマトグラムを図4に示す。ここでも連続6回のデータを

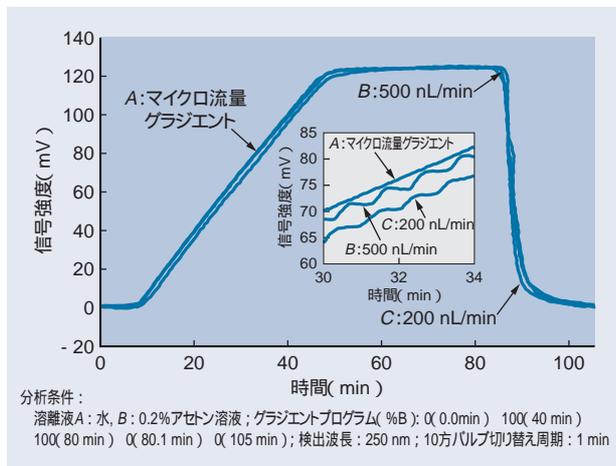


図2 ナノ流量グラジエントの追従性と性能

Aはマイクロ流量グラジエントポンプによって流量100  $\mu\text{L}/\text{min}$ で作製した元のグラジエントカーブを、BとCは、AT10PVナノグラジエント装置で作製された流量500 nL/minと、200 nL/minでのナノ流量グラジエントカーブをそれぞれ示す。

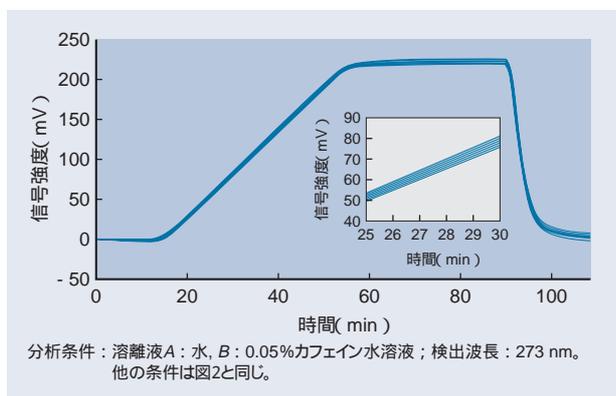
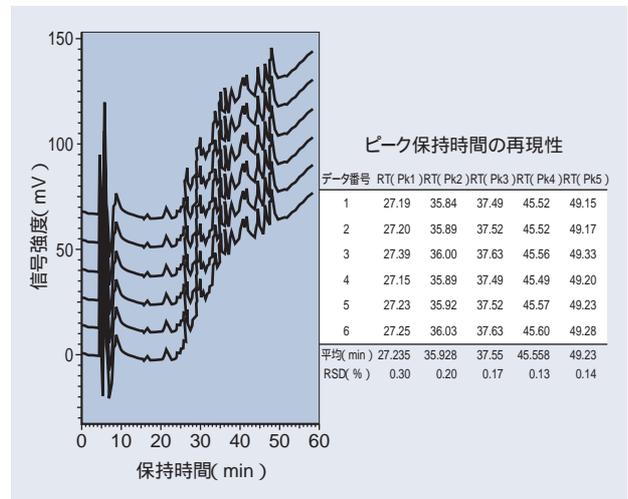


図3 流量50 nL/minでのグラジエントカーブの再現性 (N = 6)

溶離液はAが水、Bが0.05%カフェイン水溶液、検出波長は273 nm、他の条件は図2と同じである。挿入図は25~30分付近の、6回のナノ流量グラジエントカーブの拡大を示す。



注：略語説明 RT( Retention Time ; 保持時間 ) , PK( Peak ) , RSD( 相対標準偏差 )

図4 BSAトリプシン消化ペプチド分析の再現性

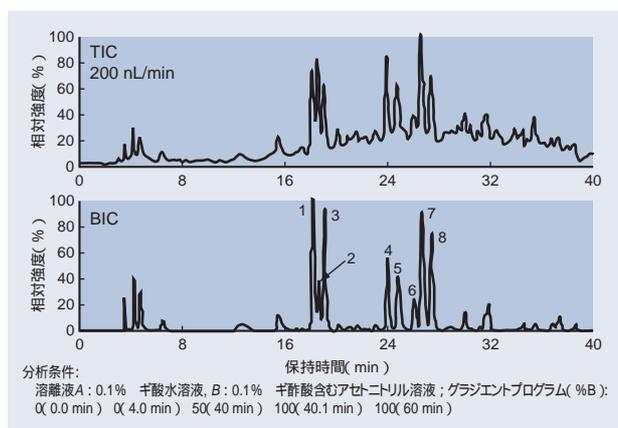
キャピラリーカラムを用いてBSA( Bovine Serum Albumin)のトリプシン消化ペプチドを流量200 nL/minで分析したUVクロマトグラムを示す。

重ねて比較しており、同図の表に主なピークの保持時間の再現性をまとめたものを示す。流量200 nL/minでのRSD ( Relative Standard Deviation : 相対標準偏差 ) 0.3%以下は、通常のマイクロ流量でのHPLCの再現性結果と比較しても、まったく遜( そん ) 色がないと言える。

## 5 キャピラリーHPLC-ESI MSへの応用

1章に述べたように、1984年にESIが開発されてすぐに、ESIはLC( Liquid Chromatography )とMSを結び有力なインターフェースになるであろうと期待された<sup>4)</sup>。すなわち、「第二世代」の幕開けである。その後、いっそうの高感度化を目指してマイクロ・ナノESIが開発され<sup>6)7)</sup>、今やマイクロHPLC-MSが主流になりつつある。前述のナノ流量グラジエント装置をマイクロ・ナノESI MSに应用した例について以下に述べる。

BSA( 150 fmol )をトリプシン消化後、キャピラリーHPLC-ESI MSで分析した例を図5に示す。使用したキャピラリーカラムは、ESIニードルを一体化させたNewObjective社製ProteoPep C18( ODS , 75  $\mu\text{m}\times$ 50 mm : 先端径15  $\mu\text{m}$  )である。TIC( Total Ion Chromatogram )やBIC( Base Ion Chromatogram )からわかるように、UVでは検出できない多くのピークが見られる。主なピークのMS( 質量スペクトル )とペプチドシーケンス帰属を図6に示す。このように感度( SN比 )のよいIMSスペクトルが得られるのと同時に、1価イオンは先2、3価イオンが強く検出されるのもナノESIの特徴である。大腸菌( E.coli )プロテオーム解析で流量を50 nL/minにすることにより、同定されるタンパク数が4、5倍増加するという最近の報告がある<sup>8)</sup>。この装置でも、流量50 nL/minにおいて保持時間の再現性のよい( RSD 1%以下 )データが得られている<sup>9)</sup>。



注: 略語説明 TIC( Total Ion Chromatogram ), BIC( Base Ion Chromatogram )

図5 BSA( 150 fmol )トリプシン消化ペプチドのマイクロHPLC-MS分析例( 流量200 nL/min )

TICとBICでUV( 紫外吸収検出器 )では検出できない多くのピークが見られる。

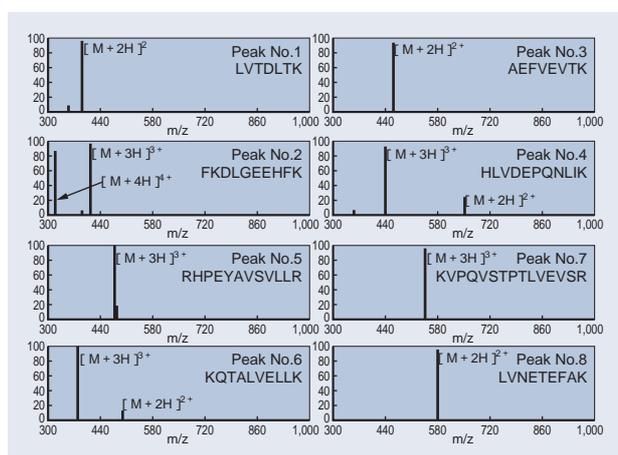


図6 BSA( 150 fmol )トリプシン消化ペプチドのMSと同定例( 図5の8ピーク )

主なピークのMS( 質量スペクトル )とペプチドシーケンス帰属例を示す。

## 6 おわりに

ここでは、日立グループが開発したナノ流量グラジエント装置について述べた。

複雑で極微量のサンプルを対象とするプロテオーム( グライコプロテオームやメタロームを含む )解析やメタボローム解析におけるキャピラリー( マイクロ )HPLC-ESI MSへの期待は、今後さらに高まっていくものとする。特に、ダイナミックレンジが5けた以上にも及ぶ多成分サンプルを分析対象とするこの分野では、キャピラリーカラムだけでなく、分離システム全体の性能向上がいっそう重要になる。そのため、1種の分離モードから複数の分離モードを組み合わせた「多次元HPLCとHPCE( High-Performance Capillary Electrophoresis )」が分離分析科学の分野で盛んに議論されており、また、近い将来、「第三世代」の到来を予感させるような勢いもある。日立グループのナノ流量グラジエント装置がそれに貢献できるように努めていく考えである。

## 参考文献

- 1) R. P. W. Scott, et al. : The Elution Properties of Some Commercially Available Silicagels, *J. Chromatogr.*, 251, 125( 1976 )
- 2) D. Ishii, et al. : A Study of Micro-High-Performance Liquid Chromatography I, *J. Chromatogr.*, 144, 157( 1977 )
- 3) T. Tsuda, et al. : Studies of Open-Tubular Micro-Capillary Liquid Chromatography II, *J. Chromatogr.*, 158, 227( 1978 )
- 4) C. M. Whitehouse : Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers, *Anal. Chem.*, 57, 675 ( 1985 )
- 5) K. Deguchi, et al. : Nanoflow Gradient Generator for Capillary High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, 76, 1524( 2004 )
- 6) M. S. Wilm, et al. : Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole's Beam of Macromolecules at Last?, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 136, 167( 1994 )
- 7) M. R. Emmett, et al. : Micro-Electrospray Mass Spectrometry: Ultra-High-Sensitivity Analysis of Peptides and Proteins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5, 605( 1994 )
- 8) T. Natsume, et al. : A Direct Nanoflow Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry System for Interaction Proteomics, *Anal. Chem.*, 74, 4725-4733( 2002 )
- 9) S. Ito, et al. : Nanoflow Gradient Generator for Nanoscale LC/MS System, *Proceeding of 52nd ASMS*( 2004 )

## 執筆者紹介

### 出口喜三郎



1984年日立計測エンジニアリング株式会社入社、北海道大学大学院理学研究科 特任助教授  
 現在、LC-MSによる糖鎖分析の研究に従事  
 理学博士  
 日本分析化学会会員、日本質量分析学会会員、アメリカ質量分析学会会員  
 E-mail : deguchi @ glyco. sci. hokudai. ac. jp

### 伊藤伸也



1995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部 所属  
 現在、LC/MSの設計開発に従事  
 日本分析化学会会員、日本質量分析学会会員  
 E-mail : ito-shinya @ naka. hitachi-hitec. com

### 吉岡信二



1996年日立計測エンジニアリング株式会社入社、株式会社日立サイエンスシステムズ 那珂カスタマーセンタ 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  
 E-mail : yoshioka-shinji @ naka. hitachi-hitec. com

### 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部 所属  
 現在、LC/MSの設計開発に従事  
 E-mail : ogata-izumi @ naka. hitachi-hitec. com