

LC/MS における前処理用サンプルチューブの検討

○瀧健太郎^{A)}

^{A)} 医学系技術支援室 生物・生体技術系

概 要

生体試料等を液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) で分析するには、試料の前処理が必要となる。前処理の方法は、分析の対象となる物質の物性により異なるが、いずれの場合も分析結果の質に大きく影響する重要な過程である。本稿では、前処理に使用するサンプルチューブへの有機溶剤耐性試験およびタンパク質・ペプチドの吸着試験について報告する。

1 緒 言

各研究分野において多種多様な分析機器が活躍する中、質量分析計はその圧倒的な物質の同定能力から、近年、医学・生物学などのより幅広い分野への参入が際立ってきている。例えば、医学分野の研究では LC/MS による疾病関連分子の探索 (バイオマーカー探索)、特に組織・細胞・培養上清や免疫沈降法・ブルダウンアッセイなどによるアフィニティー精製サンプルに含まれるタンパク質の網羅的なスクリーニング (ショットガンプロテオーム解析) が盛んに進められており、病態形成や分子機構の解明へと活かされている。

ところで、LC/MS で生体試料を分析するには前処理が必要となり、試料の内容や分析対象となる物質の物性、およびそれらの試料中濃度などの状況に応じて、適した調整方法や器具類を選択しなければならない。特に、nanoLC/MS によるプロテオーム解析を行う場合は、試料中に含まれるタンパク質の量がピコグラムからナノグラムオーダーであることも多く、いかに効率良く前処理を行うかが良い分析結果を得るための重要なポイントとなる。

基本的に前処理は、容量が 1.5 mL 程度のプラスチック製サンプルチューブ内で行うことが多いが、前処理を行う際に最初に気を付けたいのがサンプルチューブの選択である。選択の基準には、内壁からの溶出成分が少ないこと (低溶出) と分析の対象となる物質の内壁への吸着が少ないこと (低吸着) の 2 つの点が挙げられる。「低溶出」の観点では、前処理に使用する有機溶剤によりサンプルチューブ内壁から素材成分が溶出し、試料の精製効率の低下や分析結果に悪影響をもたらす可能性が考えられる。例えばタンパク質の精製ではしばしばクロロホルムとメタノールを使用した沈殿法が用いられるが、その際クロロホルム耐性でないピペットを使用していたが故に溶出した素材成分がタンパク質の再溶解を阻害するといった、分析者を悩ます事例が過去に何度かあった。また「低吸着」の観点では、分析対象物質のサンプルチューブ内壁への吸着量が多ければ、当然ながら分析結果の低下につながる。特に、タンパク質・ペプチドの含有量が少ないサンプルでは吸着量に対して非常にシビアになり、場合によっては分析しても何も検出されないといったことも起こり得る。

そこで今回は、前処理に使用するプラスチック製サンプルチューブを複数種取り揃え、「低溶出」および「低吸着」の点について試験を行い分析結果への影響を評価し、LC/MS プロテオミクス用の前処理に最適なサンプルチューブの選定を目的とする。

2 方 法

2.1 サンプルチューブの選出

市販の 1.5 mL プラスチック製サンプルチューブの中で、特に質量分析用或いは LC/MS の前処理用として推奨されている 7 種類の製品を取り揃えて、「クロロホルム耐性試験」、「ペプチド吸着試験」、「In-solution digestion 試験」を行った。それぞれのサンプルチューブの名称を、Tube I, II, III, IV, V, VI, VII とした。

2.2 クロロホルム耐性試験

5 種類のサンプルチューブ (Tube I, II, III, IV, V) に、ガラス製ピペットを使用してクロロホルムを 100 μ L 注ぎ、室温で一晩、静置した。その後、サンプルチューブからクロロホルムをガラス製バイアルに全量回収し減圧下でクロロホルムを蒸発させた。乾燥したところでガラス製バイアルに 0.1% トリフルオロ酢酸溶液を 100 μ L 注ぎ、これらをクロロホルム耐性試験用のサンプルとした。また、ガラス製バイアルにガラス製ピペットを使用して直接クロロホルムを 100 μ L 注ぎ、減圧下でクロロホルムを蒸発させ、乾燥したところで 0.1% トリフルオロ酢酸溶液を 100 μ L 注いだものをコントロールとした。

2.3 ペプチド吸着試験

5 種類のサンプルチューブ (Tube I, II, III, IV, VI) に、トリプシンで消化処理した 10 fmol/ μ L の BSA (Bovine serum albumin) 溶液を注ぎ、室温で一晩、静置した。その後、BSA 溶液をガラス製バイアルに回収し、これらをペプチド吸着試験用のサンプルとした。

2.4 In-solution digestion 試験

5 種類のサンプルチューブ (Tube I, II, III, VI, VII) を使用して、次の通りに BSA 溶液の In-solution digestion を行った。

各種サンプルチューブにグアニジン塩酸塩を計量し、そこに 10 μ g/mL の BSA 溶液を各 100 μ L 注ぎタンパク質を変性させた。続いて、0.1 M Dithiothreitol と 0.2 M Iodoacetamide を加えて、還元化・アルキル化処理を行った。この溶液を、クロロホルム・メタノール沈殿法により脱塩し溶液の置換を行い、これにトリプシン溶液を加えて 37°C で 16 時間インキュベーションし、酵素消化処理した。最後に、ペプチド断片化した BSA 溶液を C18 脱塩チップに通して、ガラス製バイアルに回収し、これらを In-solution digestion 試験用のサンプルとした。

2.5 LC/MS 分析条件

各試験のサンプルは、イオントラップ型質量分析装置 LCQ Advantage (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA) およびナノ流速液体クロマトグラフィー Paradigm MS4 HPLC System (Michrom BioResources Inc., Auburn, CA) からなる nanoLC/MS システムを使用して分析した。分析カラムには化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (0.1mm i.d. x 50 mm) を使用し、逆相クロマトグラフィーを行った (Linear gradient 0 min, 5% B; 45 min, 100% B, Solution A : 2% acetonitrile with 0.1% formic acid, Solution B : 90% acetonitrile with 0.1% formic acid. Flow rate : 1 μ L/min)。

更に、ペプチド吸着試験および In-solution digestion 試験では、タンパク質同定解析ソフト Mascot (Matrix Science Inc., Boston, MA), version 2.4.1 を使用して、MS/MS の結果を解析した。Mascot score および Peptide coverage をペプチド吸着における評価の指標とした。

3 結果および考察

クロロホルム耐性試験の結果を図 1. に示す. (a) の blank と比較すると, (b) の control ではほぼ同様のクロマトグラムとなっており, クロロホルム自体或いはガラス製バイアルからの成分は検出されていない. 一方, (c) ~ (f) に示した各サンプルチューブのクロマトグラムからはそれぞれに特異的なピークが検出されており (☆印), 各サンプルチューブの素材成分由来と考えられる. (a) の blank で見られる background のピークと比べそれぞれで検出された素材成分由来のピークのイオン強度は, (c) Tube I ではやや小さく, (d)

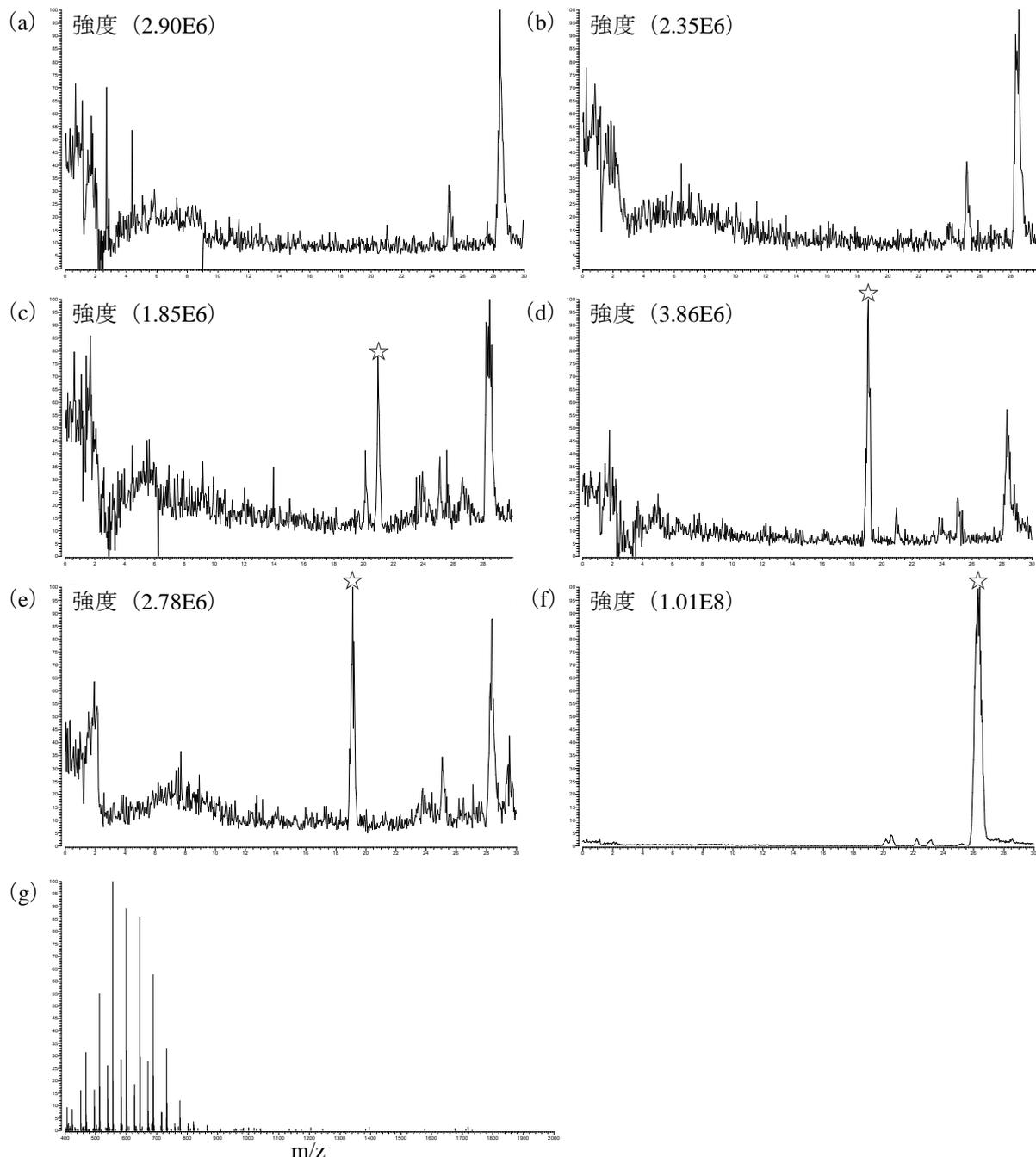


図 1. クロロホルム耐性試験における各サンプルのクロマトグラム (a) ~ (f) およびマススペクトル (g) 縦軸にイオンの相対強度, 横軸に Retention time (min) (a) ~ (f), または m/z (g) を示す. (a) blank (background), (b) control, (c) Tube I, (d) Tube II, (e) Tube III, (f) Tube IV, (g) Tube IV の Retention time 26.3 min におけるマススペクトル.

Tube II では約 2 倍, (e) Tube III ではやや大きくなっており, 特に (f) Tube IV では非常に高いレベルで検出されている. 更に, Tube IV のピークのマススペクトル (g) を見ると, 44 u ごとにピークが観測されていることから, Tube IV の素材成分にポリエチレングリコール系の可塑剤が含まれていることが推測される. これらの結果より, Tube I, Tube III, Tube II, Tube IV の順にクロロホルムによる素材成分の溶出が強くなっており, 特に Tube IV はクロロホルムの使用には不向きであることが分かる. なお, Tube V のクロロホルム耐性試験については, サンプルチューブにクロロホルムを注ぎ静置している際に, 著しくサンプルチューブが変形したため, その後の LC-MS 分析は行わなかった.

続いて, ペプチド吸着試験における LC/MS クロマトグラムの結果を図 2 に示す. 本試験では, サンプルチューブへのペプチドの吸着量が少ないほど, より多くの種類のペプチドなおかつより多くの量のペプチドがサンプル内に残り, LC/MS にて検出されるはずである. つまり, クロマトグラム上でより多くのピークが強く検出されているサンプルが, 低吸着のサンプルチューブと評価することができる. BSA のペプチド由来の主なピークは, クロマトグラム上で Retention time 12~18 min くらいに検出されており (青色網掛部分), 各サンプル間で比較すると (b) Tube II では比較的多くのピークが検出されており, (e) Tube VI では他の 2 倍以上のピーク強度で検出されている. また各サンプルの MS/MS データを, タンパク質同定解析ソフト Mascot を使用して解析し, その結果 (Mascot score および Peptide coverage の値) を表 1 に示す. Mascot score は, サ

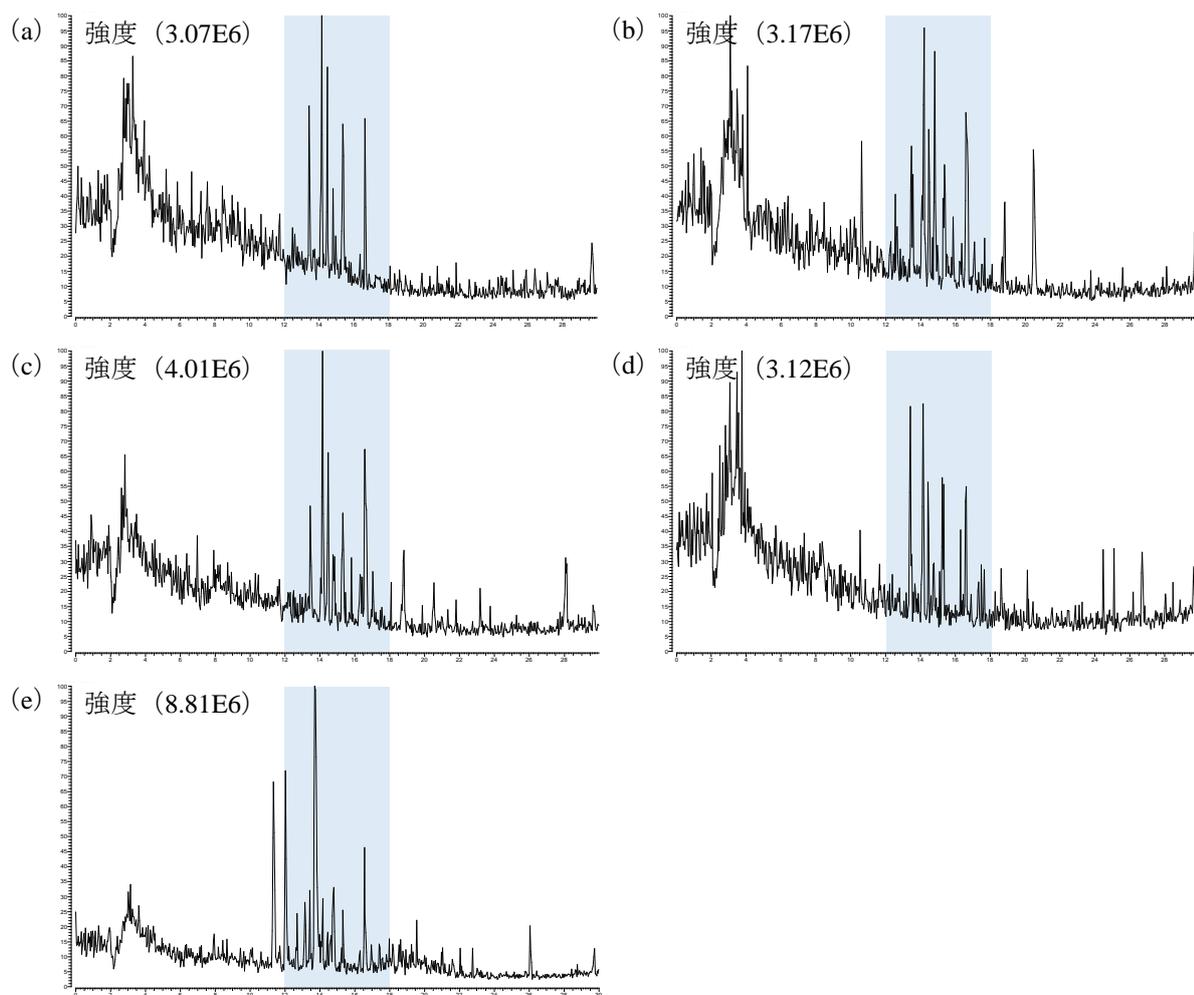


図 2. ペプチド吸着試験における各サンプルのクロマトグラム

縦軸にイオンの相対強度, 横軸に Retention time (min) を示す. (a) Tube I, (b) Tube II, (c) Tube III, (d) Tube IV, (e) Tube VI.

サンプル内にタンパク質 (BSA) が存在している可能性を数値化しており, score が高いとその可能性が高いことを示している. また Peptide coverage は, LC/MS で検出されたペプチドのアミノ酸残基数の総和がタンパク質 (BSA) 全長のアミノ酸残基数に占める割合を示している. 従ってサンプルチューブへのペプチドの吸着量が少ないと, サンプル内にタンパク質が存在している可能性 (Mascot score) が高くなり, より多くの種類のペプチドが検出される (High peptide coverage) と予想される. 各サンプル間で結果を比較すると, Tube II と Tube III の Mascot score と Peptide coverage が有意に高くなっており, サンプルチューブへのペプチド吸着が少ないことが分かる. また Tube I と Tube IV と Tube VI では Peptide coverage がほぼ同じ値であるが, 検出されたピークのイオン強度の違いが Mascot score の差に影響していると考えられる.

表 1. ペプチド吸着試験における各サンプルの Mascot 解析結果

Sample name	Tube I	Tube II	Tube III	Tube IV	Tube VI
Mascot score	163	255	258	188	211
Peptide coverage (%)	25	37	33	26	26

n=3

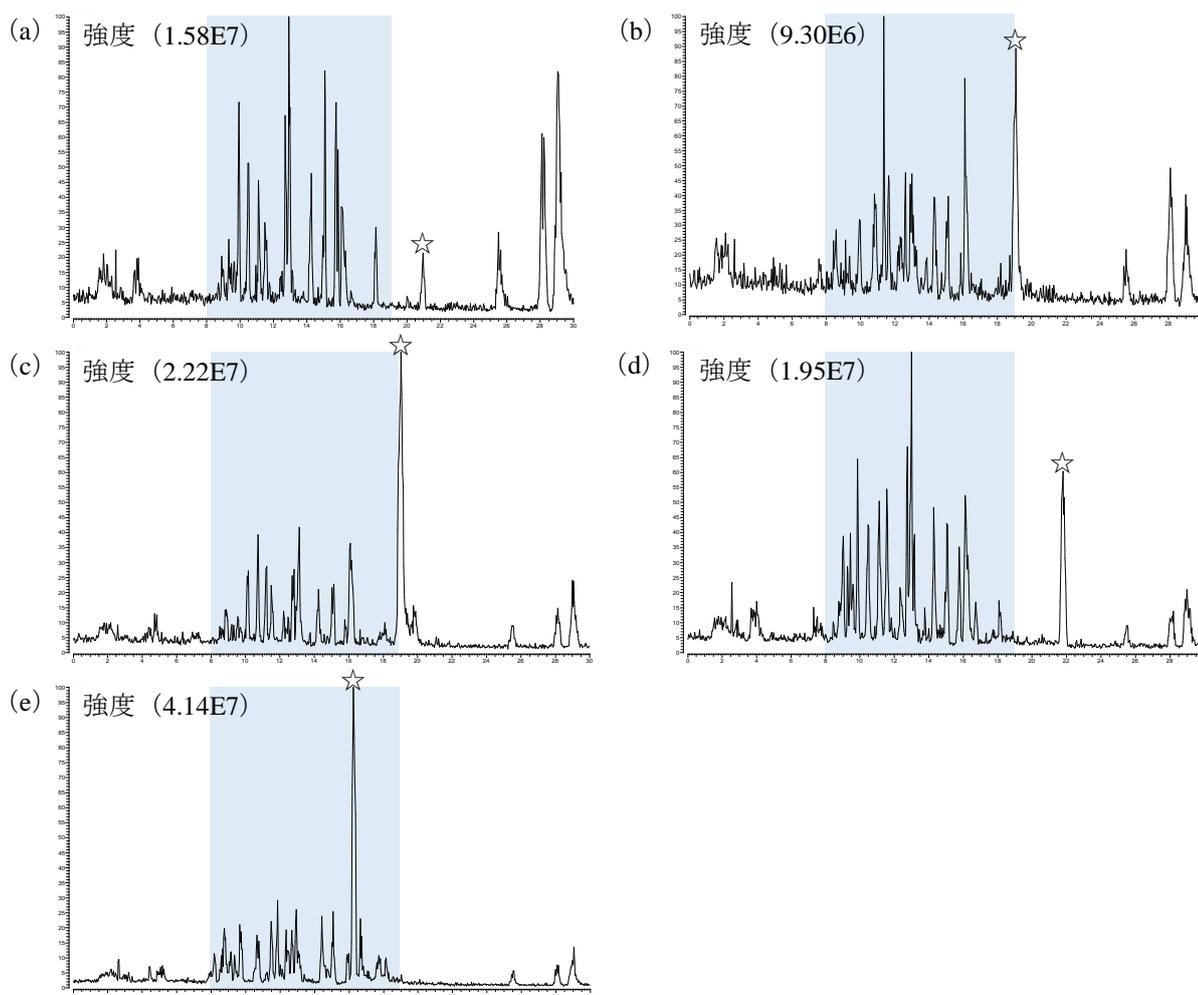


図 3. In-solution digestion 試験における各サンプルのクロマトグラム

縦軸にイオンの相対強度, 横軸に Retention time (min) を示す. (a) Tube I, (b) Tube II, (c) Tube III, (d) Tube VI, (e) Tube VII.

最後に、In-solution digestion 試験では各サンプルチューブを使用して実際に前処理を行い、有機溶剤耐性およびタンパク質・ペプチドの吸着を同時に評価する。図 3 の LC/MS クロマトグラムに、サンプルチューブの素材成分由来と考えられるピーク（☆印）、および BSA のペプチド由来の主なピーク（青色網掛部分）を示す。素材成分由来と考えられるピークの強度は、(a) Tube I がもっとも弱く、(b) Tube II, (d) Tube VI, (c) Tube III, (e) Tube VII の順に強くなっている。一方、ペプチド由来のピークは、サンプル間でピークの数に大きな差は見られないが、(a) Tube I と (d) Tube VI はどのピークもバランスよく検出されている。またピークの Retention time について、(b) Tube II, (c) Tube III, (e) Tube VII は素材成分由来のピークの Retention time が短く、特に (e) Tube VII ではペプチド由来のピークの Retention time と重なって検出されている。つまり、素材成分由来のピークとペプチド由来のピークの Retention time が全く同じで素材成分由来のピークの強度が強く検出された場合は、解析結果に悪影響をもたらすことが考えられる。また表 2 に示した Mascot 解析の結果から、Tube I と Tube VII は他のサンプルと比較して Mascot score と Peptide coverage が有意に高く、クロマトグラムの結果と合せると In-solution digestion を行う際には Tube I が適していることが分かる。

表 2. In-solution digestion 試験における各サンプルの Mascot 解析結果

Sample name	Tube I	Tube II	Tube III	Tube VI	Tube VII
Mascot score	1150	985	1035	993	1115
Peptide coverage (%)	72	64	68	66	71

n=3

以上、今回の試験結果を評価すると Tube I と Tube III は比較的高評価を得られており、LC/MS プロテオミクス用の前処理に適したサンプルチューブであることが分かる（表 3）。更に、表 3 に示したサンプルチューブ 1 本あたりの価格から、実際に消耗品として購入することを考慮すると Tube I は価格面でのアドバンテージがある。

その他に興味深い点として、サンプルチューブ 1 本あたりの価格に注目すると、各製品間に非常に大きな差が見られるが、試験結果の評価と価格の間に相関関係は認められない。また今回、試験の対象とした 7 種のサンプルチューブの内、Tube III と Tube IV と Tube VI は外観が全く同じであり、これら 3 種のサンプルチューブは試験を行うまでは同製品の可能性があると考えていた。しかし、試験の結果（特にクロマトグラムのピークパターン）から、3 種のサンプルチューブは形状が同じであるが素材や可塑剤などの成分が異なっていることが予想される。従って、サンプルチューブの価格や外観からは、薬品耐性や吸着等のサンプルチューブ本来の性能評価は難しいと思われる。

表 3. 各試験結果およびサンプルチューブの価格

Sample name	クロロホルム 耐性試験	ペプチド 吸着試験	In-solution digestion 試験	価格 (円/1 本)
Tube I	5	2	5	6
Tube II	3	5	2	18
Tube III	4	5	3	20
Tube IV	1	3	-	17
Tube V	1	-	-	150
Tube VI	-	4	2	35
Tube VII	-	-	2	6

試験評価：1（不適）～5（最適）、-：未試験

4 結 語

本稿では LC/MS プロテオミクスを行う際の前処理に用いるサンプルチューブについて、「低溶出」および「低吸着」の観点で試験を行い、最適なサンプルチューブを選定した。もちろん今回の結果は、タンパク質を扱う実験やクロロホルムの処理を施す生化学実験等の LC/MS プロテオミクス以外の分野でも応用することができる。またサンプルチューブの他にも、ピペットのチップや試薬の保管容器について適切な試験を行い最適な製品を選択することで、より良い実験ができると期待される。

研究に関わる基礎的な事項は枚挙にいとまがなく、検証には多くの時間と手間が必要である。しかし今回の結果からも、場合によっては実験結果に非常に大きな影響をもたらすことがある。こういった基礎的な情報の蓄積が、研究者への支援へと繋がれば幸いである。