

質量分析装置を用いたメタボライト定量における 前処理方法の検討

高垣 さとこ (名古屋市立大学 共用機器センター)

TAKAGAKI Satoko :

Consideration of Pre-Treatment Methods for Quantitative Metabolome analysis using LC-MS

As a staff of the Core Facility Center at Nagoya City University, I conduct contracted analysis using mass spectrometry (SHIMADZU LC-MS 8050) to support clinical research. One of the most important things to ensure accurate results in metabolome analysis is to remove proteins during pre-treatments. In the paragraphs below, I present some issues regarding removing proteins and a successful case of column washing to improves peak shapes in the chromatogram.

1. 目的

本学はコアファシリティ構築支援プログラムの一環として受託解析事業を立ち上げ、質量分析による臨床研究支援に主に取り組んでいる。

メタボロームの受託分析を行うにあたり、前処理の除タンパクがうまくいかず変性したタンパクがカラムに吸着しピーク形状を悪くした経験をもとに除タンパクを確実にするための同時前処理サンプル本数等の検討を行った。またピーク形状の改善のためカラム洗浄を行い成功した事例も合わせて紹介する。

2. 方法

(1)前処理

2つの前処理方法①アセトニトリル・胆汁酸用、②メタノール・一次代謝物用(Bligh & Dyer法)を用いて以下のとおり上清採取までの経過時間を変えて処理、窒素乾固をしたサンプルにTris-HCl, pH7.8を50 μ L加え溶解したものを準備し、DCプロテインアッセイキット(BIO RAD)を用いて吸光マイクロプレートリーダー(SpectraMax340PC384、吸光度750 nm)で総タンパク量を測定した。

① アセトニトリル・胆汁酸用

Plasma (QC用) 50 μ Lに塩酸 (1mol/L) 15 μ L、アセトニトリル500 μ Lを加え攪拌し遠心分離 (14,000g,15min,室温)した後、上清採取までの経過時間0, 15, 30, 60, 90, 120minの6通りのサンプルと、手技不良を想定したサンプル、元々のサンプルの総タンパク量を確認するために塩酸と有機溶媒を添加したのみのサンプルを加えた、全8通りを準備し最後に窒素乾固を行った。

② メタノール・一次代謝物用 (Bligh & Dyer法)

Plasma (QC用) 50 μ Lにメタノール500 μ L、超純水250 μ Lを加え攪拌し懸濁液を600 μ L採取したものにクロロホルム400 μ Lを加えて攪拌し遠心分離 (15,000rpm,15min, 4°C) した後、上清採取までの経過時間0, 15, 30, 60, 120minの5通りのサンプルと、①同様、手技不良を想定したサンプル、元々のサンプルの総タンパク量を確認するために懸濁液にクロロホルムを添加したサンプルを加えた全7通りを準備し最後に窒素乾固を行った。

(2)カラム洗浄

カラム (Ace Excel C18 Amide, 2.1 mmI.D.x 75 mmL, 1.7 μ m) を通常の流路方向とは逆にして表1.のグラジエント条件とタイムプログラムで洗浄を行った。

表 1. カラム洗浄用グラジエント条件

移動相A : 0.01% (v/v) Formic acid-Water 移動相B : Acetonitrile / Methanol 90/10 (v/v) T flow rate (通常) : 0.65 mL/min 初期B相 (通常) conc. 27.3%							
time	T flow rate (mL/min)	A相 conc. (%)	B相 conc. (%)	time	T flow rate (mL/min)	A相 conc. (%)	B相 conc. (%)
0.00-0.25h	0.05	100	0	2.75-3.00h	0.1	70	30
0.25-0.50h	0.05	90	10	3.00-3.25h	0.1	50	50
0.50-0.75h	0.05	80	20	3.25-3.50h	0.1	20	80
0.75-1.00h	0.05	70	30	3.50-3.75h	0.1	0	100
1.00-1.25h	0.05	50	50	3.75-4.00h	0.2	100	0
1.25-1.50h	0.05	20	80	4.00-4.25h	0.2	70	30
1.50-1.75h	0.05	0	100	4.25-4.50h	0.2	50	50
1.75-2.00h	0.1	100	0	4.50-4.75h	0.2	20	80
2.25-2.50h	0.1	90	10	4.75-5.00h	0.2	0	100
2.50-2.75h	0.1	80	20				

3. 結果

(1)前処理

上清採取までの経過時間の差による総タンパク量の大きな差はいずれの前処理方法においてもなかった

(図1)。また手技不良を想定し、タンパク部分を大きく舞い上げて上清を取り直したサンプルにおいても、大きな差はみられなかった。

表2. 上清採取後の総タンパク量

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	BA (アセトニトリル:胆汁酸用) / PM (メタノール:一次代謝物)							total protein
	上清採取までの経過時間							
Sample	0min	15min	30min	60min	90min	120min	Mistake	
BA-1	424	451	423	443	397	443	1,362	74,135
BA-2	385	393	444	401	431	261	5,787	71,028
PM-1	8,612	8,126	6,133	5,593	-	6,687	7,403	86,817
PM-2	6,781	5,593	7,687	4,998	-	6,390	10,233	56,018

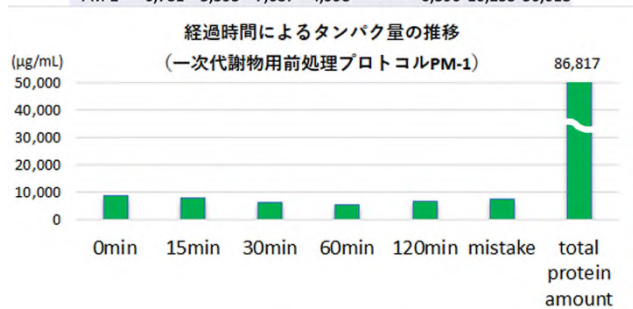


図1. 時間経過による総タンパク量の推移

(2)カラム洗浄

今回の条件によるカラム洗浄によりピーク形状は大幅に改善された (図2)。

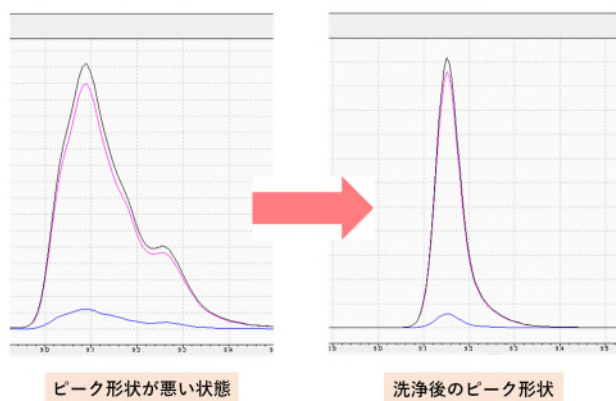


図2. 上清採取後の総タンパク量

4. 考察

時間経過による除タンパク不良の可能性について確認実験を行った結果、経過時間による上清タンパク量に差がないことがわかった。仮説では経過時間によってタンパク質が浮遊するのではないかと考えたが、浮遊することはないことがわかった。また手技不良によるタンパク量の増加も考え検討したが、大きな数値の差は認められなかった。アセトニトリルでの前処理については実際に沈殿したタンパクの剥離を細いチップの先で試みたが非常に硬く剥離困難であったため、手技によるタンパク質付着の可能性は低いと考えられる。

従って、サンプルの同時前処理本数はタンパク量の観点からみれば、特に限定しなければならないもので

はない。ただし時間経過による化合物の代謝の観点で考えた場合はさらに検討する必要がある。

今回2つの前処理方法による総タンパク質量を比較したが、メタノール・一次代謝物用 (Bligh & Dyer法) では、アセトニトリル・胆汁酸用前処理方法の10倍以上のタンパク質が残留していることが明らかとなり、このBligh & Dyer法については、決して安価ではないフィルタで限外ろ過をするという工程の重要性が示唆された。

また、除タンパクを行う有機溶媒 (アセトニトリル・メタノール) の違いで上清残留総タンパク量に差が生じるということは書籍や技術者からのアドバイスにより認識していたものの、ここまで大きく差が出るということは想定していなかった。メタノール・一次代謝物用 (Bligh & Dyer法) 以外でタンパク質を除去する手法についても今後検討したい。

このピーク改善に成功したカラムは胆汁酸分析用 (アセトニトリルでの前処理) であり、確認実験の結果から残留する総タンパク量が一次代謝物前処理 (Bligh & Dyer法) と比較して1/10以下と少ない。また通常分析のグラジエント条件は移動相Bの初期濃度が27.3% (表1.上段:初期B相(通常)conc.) となっており有機溶媒率がやや高い。今回試した洗浄用グラジエント条件では移動相Bの初期濃度を0%から始めているため、ピーク形状の改善はそこに起因している可能性がある。またピーク形状は突然悪くなったというよりは、分析回数が増える毎に少しずつ悪くなったという印象があったため、付着した汚れはタンパク質以外の水溶性化合物による析出ではないかと推測される。これまで分析後は装置全体の洗浄のためBlank (水もしくはメタノール) 分析を1時間程度行っていたが、これでは不十分の可能性があり、今後はBlank分析後、移動相B conc.を0-100%、かつ通常流速で1時間程度流す工程を追加で行い、ポンプ圧力も分析前後で変化がないことを確認したい。

5. 謝辞

本研究はコアファシリティ構築支援プログラムの支援を受け、名古屋市立大学共用機器センターの機器を利用して行いました。当発表において、名古屋市立大学大学院医学研究科機能組織学植田高史様、呼吸器・免疫アレルギー内科学伊藤圭馬様、細胞生化学橋本寛様、藤田医科大学オープンファシリティセンター前田康博様他、多くの方々のご協力に感謝申し上げます。