

LC-MSを用いた非誘導体化アミノ酸分析系の構築

蔵本技術部門
研究開発支援グループ

西野 耕平 (NISHINO Kohei)

1. はじめに

アミノ酸はタンパク質を構成するだけでなく、遊離アミノ酸としても生体内で重要な役割をもつ有機化合物である。アミノ酸分析の歴史は古く、1958年にはイオン交換とニンヒドリン反応を用いた分析手法が報告されている[1],[2]。アミノ酸をニンヒドリンなどの試薬と混合し、検出可能な誘導体にするのを誘導体化と呼ぶ。各種アミノ酸をカラム分離後に誘導体化するポストカラム化法は夾雑物の影響を受けにくいという利点と装置の複雑化という欠点がある。カラム分離前に誘導体化するプレカラム化法は疎水性の高い誘導体化試薬を使うことで高分離と分析時間の短縮化の利点があり、蛍光誘導体化試薬を用いることで感度の向上が期待できる。一方、プレカラム化法は試料由来の夾雑物が誘導体化を阻害することが欠点として挙げられる。キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) やイオンペア試薬を用いた液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) を使うと非誘導体のアミノ酸分析が可能である[3],[4]。しかし、CE-MSは専用装置が必要で、イオンペア試薬を使うと装置の汚染が起こるなどの欠点が存在する。

本稿では研究者自身でアミノ酸を測定できる簡便な分析系構築を目指し、インタクト社が開発した世界初のLC-MS用非誘導体化アミノ酸分析専用カラム (Intrada Amino Acid) を用いた結果を報告する。標準品を用いた移動相の検討、アミノ酸ごとの検出下限値など今後アミノ酸分析を希望する人に役立つ結果を記述する。また、研究よりの結果として培養細胞から抽出した代謝物を網羅的に調べた結果も報告する。

2. 実験材料・実験方法

2. 1 実験材料・器具

非誘導体化アミノ酸分析用分析カラム

Intrada Amino Acid (インタクト株式会社, WAA32, 50 mm×3 mm), アミノ酸混合標準液, H型 (富士フィルム和光純薬, 018-27881), 1 mol/L ギ酸アンモニウム (富士フィルム和光純薬, 011-21031), LC-MSグレード超純水 (富士フィルム和光純薬, 214-01301), LC-MSグレードアセトニトリル (富士フィルム和光純薬, 012-19851), HPLC用テトラヒドロフラン (安定剤含有) (富士フィルム和光純薬, 200-19391) を使用した。

2. 2 LC-MS/MS測定およびデータ解析

測定には Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) と Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) を繋いだ LC-MS システムを使用した。質量分析計の設定はポジティブモード、データ取得は目的に応じて Full MS, Parallel-Reaction-Monitoring (PRM), Data-Dependent-Acquisition (DDA) を使い分けた。

クロマトグラムの描画には Xcaliver Qual Browser (Thermo Fisher Scientific) および FreeStyle ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific), 定量解析には Skyline ソフトウェア, 網羅的な解析には Compound discoverer 3.1 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

3. 実験結果

3. 1 移動相の検討

最初にインタクト株式会社のアプリケーションノートを参考に移動相の検討を行った。標準アミノ酸を分析する移動相の組み合わせはテトラヒドロフラン (以下 THF) 仕様とアセトニトリル (以下 ACN) 仕様の2つが紹介されている[5]。THF仕様は移動相 A に「ACN / THF / 25 mM ギ酸アンモニウム / ギ酸 = 9 / 75 / 16 / 0.3」を移動相 B に「ACN / 100 mM ギ酸アンモニウム = 20 / 80」を使用し、流速 0.5 mL/min でグラジエント条件は 0-3 分で 0%B, 3-9 分で 0-17%B, 9-16 分で 17-100%B とした。

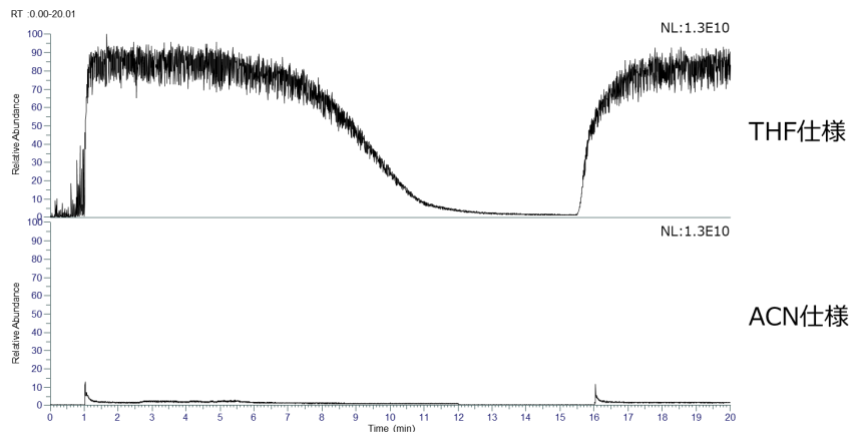


図1 THF 仕様と ACN 仕様のブランク測定比較
どちらも縦軸の高さは揃えている。

THF 仕様は高分離での分析が可能であるが、THF が酸素と反応すると爆発性の過酸化物を精製するなど取り扱いの注意が必要である。ACN 仕様は移動相 A に「ACN / ギ酸=100 / 0.3」を移動相 B に「ACN / 100 mM ギ酸アンモニウム = 20 / 80」を使用し、流速 0.5 mL/min でグラジエント条件は 0-4 分で 20%B, 4-14 分で 20-100%B, 14-16 分で 100%B とした[6]。ACN は LC-MS でよく使われている有機溶媒であり、移動相の調製も簡単である。筆者は 2 種類の仕様を①取り扱いの簡便さ②ベースライン③アミノ酸分離の観点から評価した。前述の通り有機溶媒の取り扱いおよび移動相の調製の観点から ACN 仕様を取り扱いやすい。続いて両方の移動相を用いてサンプルの溶媒である 0.1 M HCl を 5 μ L 打ち込みベースラインを比較するブランク測定を行った (図 1)。THF 仕様は ACN 仕様と比較すると 10 倍以上ベースラインが高い。MS スペクトルを見るとベースラインの高い時間帯では m/z 73.0665 と m/z 145.1220 の THF 由来と思われるスペクトルを検出した。 m/z 145 のスペクトルがグルタミン (m/z 147) の検出を阻害する可能性があるためベースラインの比較に関しては ACN 仕様が優れていると判断した。

最後に 7 種類の標準アミノ酸を測定し、保持時間から分離度を比較した (図 2)。ACN 仕様では 5 種類のアミノ酸 (フェニルアラニン、

ロイシン, イソロイシン, プロリン, バリン) が 0.52 分以内に溶出しているのに対し、THF 仕様では 5 種類のアミノ酸の溶出に 2.32 分掛かっている。異性体であるロイシン, イソロイシンも ACN 仕様より THF 仕様の方が分離できていることから THF 仕様の方がより高分離であると判断した。3 点の結果をまとめると移動相の取り扱いは ACN 仕様、ベースラインの高さは ACN 仕様、分離は THF 仕様に軍配が上がった。検出器に MS を用いるため、分離が不十分でも質量で分けることが可能であり、目的が分析の簡便さであるため ACN 仕様を選択した。異性体を分離する目的であれば THF 仕様選択するなど目的に応じて使い分けのが良い。また、ACN 仕様で高分離を実現させたい場合は分析時間が伸びてしまうが長いカラムを使うなど別の工夫も考えられる。本稿では以降のデータは全て ACN 仕様で分析した結果を報告する。

3. 2 3 回測定の再現性

18 種類のアミノ酸およびクリアチン, クレアチニンの混合物を各 6 pmol になるように LC-MS へ 3 回打ち込んだ。測定モードは PRM モードで、各標準品の分子イオンの m/z を入力し、各フラグメントイオンの XIC クロマトグラムから定量値を算出した。PRM 測定の解析には Skyline ソフトウェアを用いた。3 回測定時における保持時間のズレや定量値に大きな誤差はなく安定して測定可能と判断した。

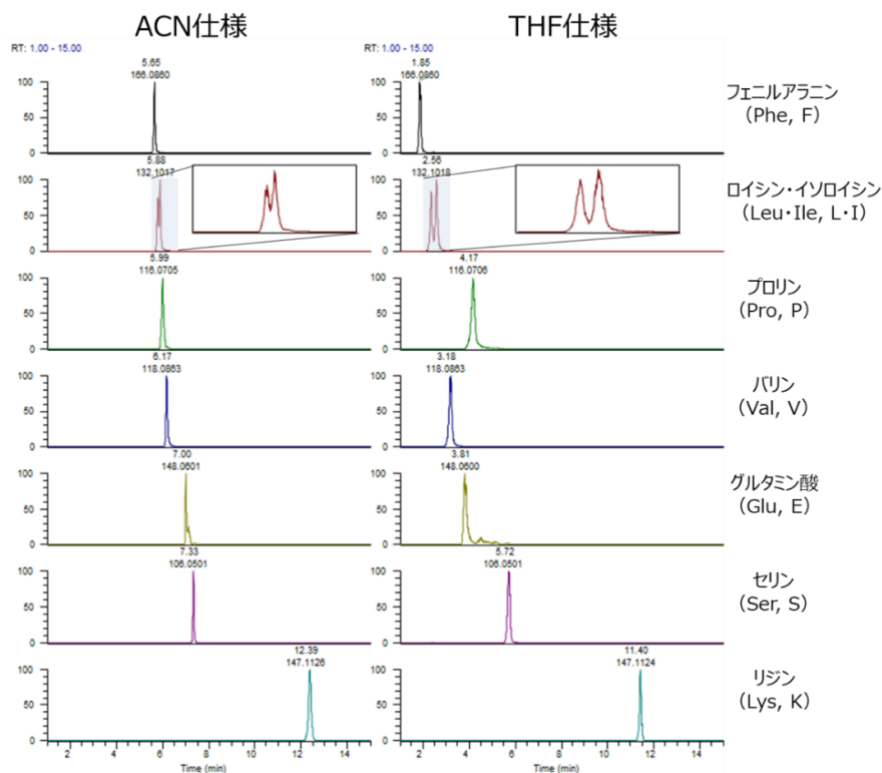


図 2 THF 仕様と ACN 仕様の 7 種類アミノ酸の XIC クロマトグラム
ロイシン・イソロイシンのピークは拡大して表示

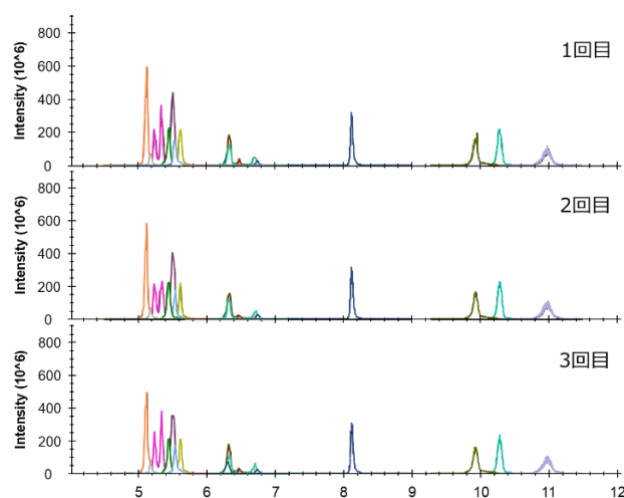


図 3 PRM モードで 3 回測定したアミノ酸標準品 XIC クロマトグラム

3. 3 アミノ酸ごとの検出下限値

3. 2 の標準品を段階的に希釈し、同様に PRM モードで測定し、化合物ごとにピークをして検出できなくなる「検出下限値」を求めた。なお、本稿における「検出下限値」の定義は厳密なものではなく「ピークとして検出できなくなった濃度の 1 段階濃い濃度」程度の意味合いでしかなく、今後の目安に使うのみである。以上の理由から「」つきの「検出下限値」

としている。また、実サンプルを測定する際は試料由来の夾雑物によりイオン化効率も変化するため検出下限値は高くなる。各アミノ酸の「検出下限値」は表 1 の通りである。グリシンやアラニンを分析対象とするときは注意が必要である。

3. 4 培養細胞のメタボロミクス

Full MS および DDA モードで測定したデ

ータはメタボロミクス解析ソフトウェアである Compound Discoverer 3.1 で解析した。このソフトウェアを使うことで抽出物に含まれている化合物を網羅的に同定・定量することが可能である。培養細胞からの抽出物を 2 回測定し、427 ピークから 281 種類の化合物を同定した。同定とはソフトウェアが過去のデータベースを対象に行ったもので誤同定も含まれている可能性があり、結果を精査する必要がある。

表 1 各種アミノ酸の検出下限値

Amino Acid	検出下限値 (fmol)
アラニン	600
アルギニン	6
アスパラギン酸	60
シスチン	6
グルタミン酸	6
グルタミン	6
ヒスチジン	6
ロイシン	60
イソロイシン	60
リジン	6
メチオニン	6
フェニルアラニン	60
プロリン	6
セリン	60
スレオニン	60
トリプトファン	6
チロシン	6
バリン	60
グリシン	6000
クレアチニン	6
クレアチン	6

4 アミノ酸分析を希望される方へ

本稿ではインタクト社の Intrad Amino Acid を使うことで LC-MS を用いた非誘導体化アミノ酸分析が可能であることを報告した。実サンプルからの親水性代謝物抽出方法は羊土社から出版されている「メタボロミクス実践ガ

イド」を参考にさせていただくと良い。安定同位体標識した標準品があればサンプル中のアミノ酸量も知ることが可能である。分析対象を増やしたい場合は対象の標準品とメソッドへの登録が必要になるため筆者にご相談頂きたい。予備的な測定を希望される方も歓迎する。

謝辞

非誘導体化アミノ酸分析系の確立に係る試薬・器材の購入にあたり、技術支援部共通経費を利用させていただき感謝いたします。実サンプルからの抽出物を提供いただいた徳島大学薬学部・創薬理論化学分野の稲垣舞助教にはこの場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- [1] S. Moore, D. H. Spackman, and W. H. Stein, "Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System," *Anal. Chem.*, vol. 30, no. 7, pp. 1185–1190, Jul. 1958.
- [2] D. H. Spackman, W. H. Stein, and S. Moore, "Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids," *Anal. Chem.*, vol. 30, no. 7, pp. 1190–1206, Jul. 1958.
- [3] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, and M. Dreux, "Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 855, no. 1, pp. 191–202, Sep. 1999.
- [4] T. Soga and D. N. Heiger, "Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 6, pp. 1236–1241, Mar. 2000.
- [5] 移動相組成比較(ACN と THF の違い). <https://www.imtakt.com/TecInfo/TI798E.pdf>
- [6] 標準アミノ酸 LC-MS 分析 (推奨メソッド ACN 仕様) <https://www.imtakt.com/TecInfo/TI770E.pdf>