

リポドミクスで用いるチューブに由来する夾雑ピークの評価

蔵本技術部門 研究開発支援グループ^a

先端酵素学研究所 細胞情報学分野^b

西野 耕平 (NISHINO Kohei)^a 茂谷 康 (MOTANI Kou)^b

1. はじめに

リポドミクスは、生物系における脂質の多様性とその動態を網羅的に分析することであり、病態生理学や代謝研究において重要な役割を果たしている。この分野における主要な分析技術の一つに、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) がある。LC-MS の高感度化に伴い微量なコンタミや夾雑物が検出されることがある。LC-MS に限らず実験で使用するプラスチック由来の可塑剤が結果に影響するという報告もある^[1,2]。

一般的に実験用製品に使われているチューブからの可塑剤や製造工程における残存物が、リポドミクスにおいて不要な夾雑ピークを引き起こす可能性があるが、どの程度影響するか不明である。一例としてポリプロピレン (PP) に対してクロロホルムの使用は推奨されていない^[3,4]。我々が参考にしてしている論文ではリポドミクスの前処理にガラス製のチューブを用いている^[5]。しかしながら、ガラスチューブはコストが高く、洗浄して再利用することは洗剤の残存物や手間を伴う。そこで、プラスチック製チューブをリポドミクスで使用する場合どの程度分析を阻害する可能性があるか調べる必要がある。

本稿では、異なるメーカーのプラスチック製チューブを用いて、メタノールとクロロホルムによる脂質の1層抽出を行い、LC-MS/MS を用いてチューブごとの夾雑ピークを評価した。

2. 実験材料・実験方法

2. 1 実験材料・器具

分析カラム ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 column (Waters, 186003554, 50×2.1 mm; 1.7 μm), 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), LC-MS グレードメタノール (富士フィルム和光純薬, 138-14521), LC-MS グレードイソプロパノール (富士フィルム和光純薬, 168-25531), Ethylenediamine-N,N,N',N' -tetraacetic acid, diammonium salt (EDTA 2NH₄) 50g (同仁化学研究所, 346-01971), クロロホルム (ナカライテスク, 08402-84), 広口スクリュートトップバイアル (Agilent 社, 5184-3550), スクリューキャップスリット入 PTFE/赤シリコン (Agilent 社, 5183-2076)

2. 2 実験に用いたチューブ一覧

実験に使用するチューブは表1の通りであり、各メーカーの製品番号も記載している。

2. 3 有機溶媒を用いた脂質抽出作業

サンプル番号3以降は各チューブに 200 μL のメタノールを添加し Biorupter で1分間超音波処理した。次に、100 μL のクロロホルムを添加し、25°C で2時間インキュベートした。最後に20 μL の MillQ を加えて、15,000×g, 4°C で10分間遠心し、上清をガラスバイアルに移して5 μL を LC-MS/MS に打ち込んだ。

2. 4 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/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 Data-Dependent-Acquisition (DDA) を用いた。

ピーク検出および MS/MS フラグメントのアノテーションには MS-DIAL (ver. 4.9.221218) ソフトウェアを用いた^[6]。クロマトグラムと比較には MZmine 3 (ver. 3.7.2) を用いた^[7]。

表1 サンプル情報一覧

サンプル番号	チューブ製品番号	メーカー	容器素材	備考
1	-	-	-	移動相を測定
2	-	-	-	ガラスチップで移した抽出溶媒を測定
3	2-463-02	アズワン	ホウケイ酸ガラス	
4	RC-0150	INA・OPTIKA	PP	
5	ST-0150F	INA・OPTIKA	PP	
6	CF-0150	INA・OPTIKA	PP	
7	131-815C	WATOSON	PP	
8	131-715C	WATOSON	PP	
9	131-7155C	WATOSON	PP	
10	131-8155C	WATOSON	PP	
11	TOHO 0300100	TOHO	PP	
12	QSP 509-GRD-Q	QSP	PP	
13	0030120086	Eppendorf	PP	
14	0030108116	Eppendorf	LoBind 材料	
15	616201	グライナー	PP	
16	PS Tube	AMR	TPX	

3. 実験結果

3. 1 検出したピーク数の比較

表1に記載しているサンプル1はガラスバイアルに水のみを入れたサンプルであり、サンプル2はガラスチップを用いて抽出溶媒(メタノール/クロロホルム/水)をガラスバイアルに移したサンプルである。サンプル3以降は各チューブに抽出液を添加し、2時間のインキュベーション後にプラスチックチップを用いてガラスバイアルに移したサンプルである。これらのサンプルをLC-MSへ打ち込んでチューブ由来の夾雑物を評価した。特に記載がない限り溶液の移し替えにはプラスチックチップを用いた。

各サンプルを測定して得られた生データをMS-DIAL4ソフトウェアに読み込ませてピーク検出およびリピドミクスのスペクトルライブラリに対してアノテーションを行った。

移動相や装置に起因すると思われるピークとしてサンプル1で検出されたピークを除くと、残りは2,336ピークであった。それらのピークのうちエリア面積30,000以上のピーク数

をサンプルごとに数えた(図1)。サンプル3がガラスのチューブを用いた結果であり、抽出溶媒を直接測定したサンプル2と同程度のピーク数であった。このことから、ガラス製のチューブを用いることで容器からの溶出を抑えることができたと考えられる。プラスチック製のチューブの中ではサンプル13のチューブ(Eppendorf社, 0030120086)が検出されたピーク数が少なかった。一方、サンプル9, 10, 15, 16のチューブから検出されたピーク数は多く、製品によって検出されたピークに差が出る結果となった。

3. 2 クロマトグラムの比較

次に、検出されたピークの強度および保持時間について調べた。チューブ由来のピークが実サンプルの測定に影響を与えるか評価するために、今回の結果と以前に測定した培養細胞からの脂質抽出物の結果を比較した。

具体的にはMZmine3ソフトウェアを用いて培養細胞の総脂質クロマトグラム(黒線)とサンプル9, 10, 15および16のクロマトグラ

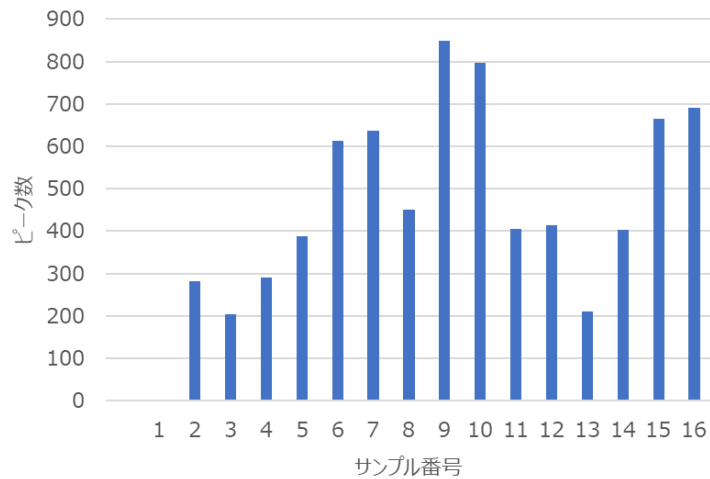


図1 各サンプルで検出されたピーク数

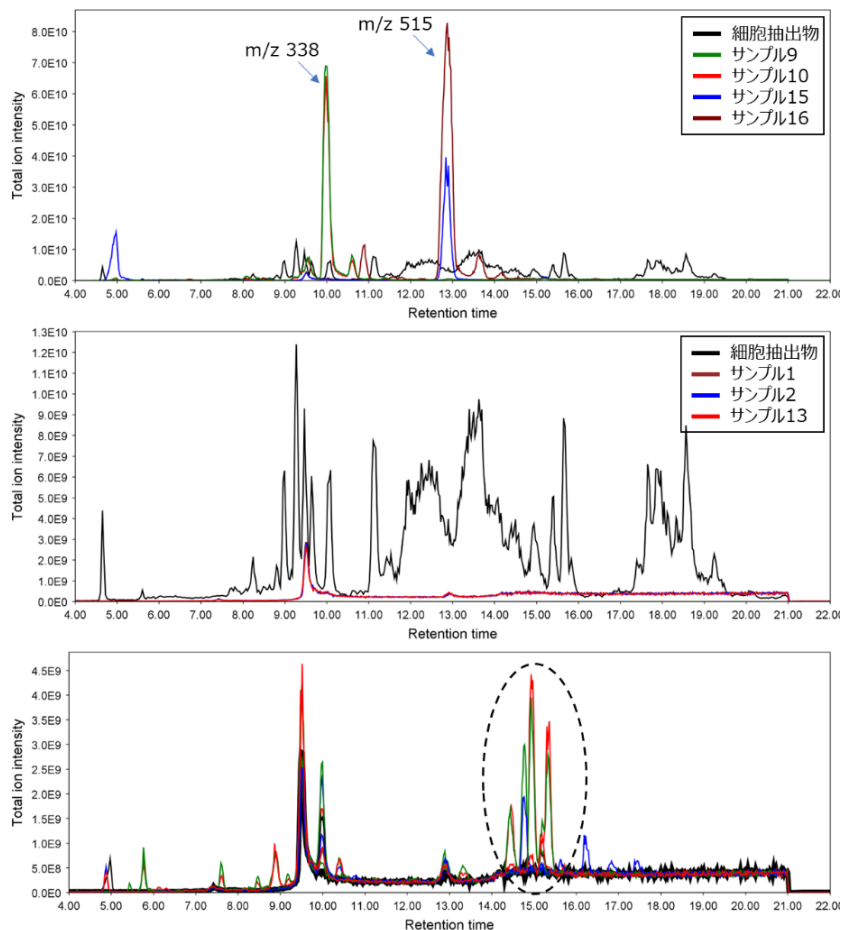


図2 各サンプルのTICクロマトグラム

上段：細胞抽出物およびピーク数の多い4サンプルのクロマトグラム 矢印は強度の高い夾雑ピーク2つを指し示している。中段：細胞抽出物ピーク数の少ない3サンプルのクロマトグラム 下段：残りの9サンプルのクロマトグラム 点線の枠内はチューブ由来の夾雑ピークを示している。

ムを重ねて描画し、比較した(図2上段)。チューブ由来のピークの中には細胞抽出物由来のピークよりも強度が高く、保持時間が近似

しているものが観察され、これらは脂質の検出や定量を阻害する可能性がある。特に、サンプル9および10では10分付近に m/z 338.3416

のピークとサンプル 15 および 16 では 13 分付近に m/z 515.4124 のピークが顕著である。

次に、最もピーク数が少なかったサンプル 13 とサンプル 1 およびサンプル 2 と比較すると、クロマトグラムのパターンは似ていた(図 2 中段)。この結果は検出されたピークが少ないという 3. 1 の結果とも一致する。この結果からサンプル 13 のチューブはリピドミクスの分析を阻害する夾雑物が溶出されにくいという点においては、ガラスチューブと同程度の性能を示すと考えられる。それ以外のサンプルのクロマトグラムでは培養細胞の脂質ピークよりは低いが 15 分付近に複数のピークが観察された(図 2 の下段の点線部分)。これらは、培養細胞由来の微量な脂質の検出や定量を阻害する可能性がある。2 つ結果から本稿ではサンプル 13 の Eppendorf 社製の「0030120086」が最もリピドミクスに適していると結論付けた。

4. 本稿の補足事項

ただし、本稿では以下の点が未検証であり、今後の課題として残った：①製造ロットの影響を調べていない ②負イオンモードでの夾雑ピークの影響 ③実サンプルからの抽出比較実験

本稿の意図は、リピドミクスにおけるガラスチューブの必須性を再考することであり、実際にリピドミクスを始める方は各自の実験環境下で検証することを推奨する。

本稿の執筆にあたり生成 AI を補助的に用いた。

謝辞

本稿の実験を行うにあたり、拠点(藤井・細胞情報学分野)解析料を利用させていただき感謝いたします。また、チューブメーカー各位には各種のチューブを試供品として提供いただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

[1] Yao C-H, Liu G-Y, Yang K, Gross RW, Patti GJ, “Inaccurate quantitation of palmitate in metabolomics and isotope tracer studies due to

- plastics” *Metabolomics.*, vol. 12, 143, 2016
- [2] McDonald, G. R.; Hudson, A. L.; Dunn, S. M. J.; You, H.; Baker, G. B.; Whittall, R. M.; Martin, J. W.; Jha, A.; Edmondson, D. E.; Holt, A, “Bioactive Contaminants Leach from Disposable Laboratory Plasticware” *Science* 2008, 322 (5903), 917
- [3] 夏目 雅裕, “プラスチック製実験器具の耐薬品・耐溶媒性”, *化学と生物*, vol 24, no. 12, pp. 808-810, 1962
- [4] アズワン 耐薬品性一覧 https://axel.as-1.co.jp/contents/ks/cr_list
- [5] Okahashi, N.; Ueda, M.; Yasuda, S.; Tsugawa, H.; Arita, M., “Global Profiling of Gut Microbiota-Associated Lipid Metabolites in Antibiotic-Treated Mice by LC-MS/MS-Based Analyses” *STAR Protoc* 2021, 2 (2), 100492.
- [6] Tsugawa, H.; Ikeda, K.; Takahashi, M.; Satoh, A.; Mori, Y.; Uchino, H.; Okahashi, N.; Yamada, Y.; Tada, I.; Bonini, P.; Higashi, Y.; Okazaki, Y.; Zhou, Z.; Zhu, Z.-J.; Koelmel, J.; Cajka, T.; Fiehn, O.; Saito, K.; Arita, M.; Arita, M, “A Lipidome Atlas in MS-DIAL 4” *Nat. Biotechnol.* 2020, 38 (10), 1159–1163.
- [7] Schmid, R.; Heuckeroth, S.; Korf, A.; Smirnov, A.; Myers, O.; Dyrland, T. S.; Bushuiev, R.; Murray, K. J.; Hoffmann, N.; Lu, M.; Sarvepalli, A.; Zhang, Z.; Fleischauer, M.; Dührkop, K.; Wesner, M.; Hoogstra, S. J.; Rudt, E.; Mokshyna, O.; Brungs, C.; Ponomarov, K.; Mutabdzija, L.; Damiani, T.; Pudney, C. J.; Earll, M.; Helmer, P. O.; Fallon, T. R.; Schulze, T.; Rivas-Ubach, A.; Bilbao, A.; Richter, H.; Nothias, L.-F.; Wang, M.; Orešič, M.; Weng, J.-K.; Böcker, S.; Jeibmann, A.; Hayen, H.; Karst, U.; Dorrestein, P. C.; Petras, D.; Du, X.; Pluskal, T, “Integrative Analysis of Multimodal Mass Spectrometry Data in MZmine 3” *Nat. Biotechnol.* 2023, 41 (4), 447–449.