TECHNICAL REPORT

プロテオーム研究で満たすべき実験用水水質の検討

Investigation of Water Quality for Proteome Analysis

熊井広哉^{*a)}・石井直恵^{a)}

Hiroya KUMAI and Naoe ISHII

(Received May 29, 2003; Accepted August 4, 2003)

Proteome analysis is an effective means to identify molecules which have important roles in cells or organs. In this analysis, the electrophoresis is indispensable technology to separate proteins in details. However, the slowness of separation speed is a bottleneck for high throughput. We tried the electrophoresis with gels and buffers prepared by three type waters. As a comparison of the water, the purity shows possibility to contribute to acceleration of the electrophoresis speed. On the other hand, MALDI-TOF/MS or LC/MS analysis are performed after sample separation by 2D gel electrophoresis. In order to perform sensitive analysis especially by LC/MS, the high purity of the water used for preparing reagents is required. To estimate the effect of water, HPLC and LC/MS analysis were performed on commercially available bottled HPLC-grade waters and on water polished using Milli-Q water systems which have different purification technologies. As a result, UV oxidation on the purity of the ultra pure water was effective to reduce LC/MS backgrounds and noises.

1. 緒 言

プロテオーム解析は生命現象をとらえる有効な手段であり、試料の分離および検出方法の組み合わせにより効率的な解析を行える手段が整い、分析の流れが確立されつつある。なかでも SDS-PAGE 法は高分解能でタンパク質を分離することができることから、解析に不可欠な技術となっている。しかし、泳動に要する時間が長く、時間短縮が技術的な課題として求められている。一般に、高電圧または高電流で泳動することにより高速化が図られるが、泳動時の発熱が問題となる。これに対し、高速電気泳動装置 XV PANTERA SYSTEM (DRC) では、発熱の原因が陰極側で顕著であることに着目し、可能な限りゲル全体を下部バッファーで冷却する構造にするとともに、ゲルの組成を改良することで、短時間の電気泳動を可能にしている。一般に、電気泳動中の発熱や泳動速度に影響を与える要因として、電解質の影響が考えられている。そこで、このシステムを用いることによって電気泳動速度に与える熱の影響をできる限り抑え、バッファー調製に用いる電解質質量が電気泳動に与える影響について調査を行った。

一方、2次元電気泳動で分離した試料は適切な処理の後 MALDI-TOF/MS や LC/MS により分析される。特に LC/MS による高感度解析を行うには、移動相に用いる水や試薬の純度に十分注意を払い、バックグラウンドを低減

することが求められる。そこで、水質の違いによる結果の相違を求め、高感度な分析において満たすべき水の純度について検討を行った。

2. 実 験

2.1 水質が泳動時間に与える影響の検証

電気泳動時間に及ぼす泳動バッファー中成分の影響を調べるため、3種類の水を用いてゲルおよび泳動バッファーの作製を行い、泳動時間を測定した。

2.1.1 方法 精製方法の異なる二つの超純水と蒸留水の計3種類の水を用いて、ゲルおよび泳動バッファーを作成した。ゲルは5~20%グラジエントゲル(80×40×1.0 mm)に調製し、電気泳動装置 XV PANTERA SYSTEM (DRC 社)を用いて、定電圧(240 V)にて泳動を行った。

Fig. 1. Comparison of the time for electrophoresis. Ultra Pure Water A: Water produced from an ultra pure water system which has UV lamp. Ultra Pure Water B: Non UV lamp.

^{*a)} 日本ミリポア(株)ラボラトリーウォーター事業部 (〒108-0073 東京都港区三田 1-4-28 三田国際ビル)
Laboratory Water Div., Nihon Millipore K.K. (Mita Koku-sai Bldg., Mita 1-4-28, Minato-ku, Tokyo 108-0073, Japan)

使用水

超純水 A：精製方法に、イオン交換樹脂、活性炭、有機物酸化分解用紫外線ランプ、分画分子量 5,000 の限外ろ過膜および $0.22\ \mu\text{m}$ メンブレンフィルターを有する超純水装置 Milli-Q Synthesis（日本ミリポア社）により精製し採水。

超純水 B：精製方法に、イオン交換樹脂、活性炭および $0.22\ \mu\text{m}$ メンブレンフィルターを有する超純水装置（B 社）により精製し採水。

蒸留水：水道水を蒸留後、イオン交換樹脂を透過させる蒸留器（C 社）により精製される水を貯留タンクから採水。

Ultra Pure Water A

Ultra Pure Water B

Bottled HPLC-grade Water A

Bottled HPLC-grade Water B

Fig. 2. LC/MS DAD and MSD profiles of reagent water sources.

2.1.2 結果 電気泳動に要した時間は、超純水 A で 15 分、超純水 B で 17 分、蒸留水で 17.5 分となり、超純水 A の泳動時間が最も短くなった。

2.2 移動相作成に用いる水質の違いによる LC/MS 分析への影響

LC/MS 分析において、移動相の調整に用いる溶媒の純度は検出感度、クロマトグラム上のゴーストピークの出現、定量精度などに影響を与えることから極めて重要である。グラジエント溶離において移動相に含まれる不純物がカラムに保持され、移動相を切り替えたときにピークとして溶離し、目的試料成分との保持時間の重なりやベースラインのドリフトおよびノイズの原因となる。そこで、移動相に使用する水が分析に及ぼす影響について検討を行った。

2.2.1 方法 分析装置、分析条件は以下のとおりとした。4 種類の水を用意し、はじめに、60 分間各水を送液し、水中不純物のカラムへの吸着を行った。つづく 30 分間で移動相 B を 100% までリニアグラジエントをかけてカラムに吸着した有機物の分離を行い、ダイオードアレイおよび質量分析による検出を行った。

使用水

超純水 A：精製方法に、イオン交換樹脂、活性炭、有機物酸分解用紫外線ランプおよび 0.22 μm メンブレンフィルターを有する超純水装置 Milli-Q Gradient（日本ミリポア社）により精製し採水。

超純水 B：精製方法に、イオン交換樹脂、活性炭および 0.22 μm メンブレンフィルターを有する超純水装置 Milli-Q Academic（日本ミリポア社）により精製し採水。

HPLC グレード水 A：市販されている HPLC グレード（A 社）を開封後速やかに使用。

HPLC グレード水 B：市販されている HPLC グレード（B 社）を開封後速やかに使用。

分析装置

LC: Agilent1100（横河アナリティカルシステムズ社）

デガッサ: G1322A

ポンプ: G1312A

オートサンプラー: G1316A

検出器: G1315B（ダイオードアレイ検出器: DAD）
G1946D（質量選択検出器: MSD）

LC/MS 分析条件

カラム: ZORBAX SB-C18, 2.1 $\times$ 150 mm, 5 μm

移動層: A H_2O (0.1% CH_3COOH を含む.)

B CH_3CN (0.1% CH_3COOH を含む.)

グラジエントプログラム: B 0 $\rightarrow$ 100%（リニア）

ポストタイム: 20 min

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

DAD 検出波長: 210 nm (BW=8 nm, Ref.=off)

MSD: Ionization=Electrospray

Polarity

Mass range

Fragmentor=120 V

Nebulizer gas= N_2 (40 psi)

Drying gas= N_2 (10 L/min, 350 $^{\circ}\text{C}$)

2.2.2 結果 ダイオードアレイ検出および質量検出のどちらにおいても、紫外線照射により有機物量を低減した超純水 A を使用した場合に、最もゴーストピークの発生を抑えることができた。

3. 考 察

本検討から、ゲルおよび泳動バッファー作製に用いる水中の不純物量の低減が泳動速度の向上に貢献する可能性が示された。短距離の 1 次元ゲル電気泳動においても泳動時間に差が見られたことから、ラージサイズの 2 次元電気泳動ではより顕著に差が生じる可能性がある。超純水 A は、超純水 B と比較して精製方法が追加されており、紫外線ランプにより有機物量が低減され、限外ろ過膜により分子量 5,000 以上の分子の除去性能が向上されている。電気泳動では、タンパク質の移動に電流が消費されるが、ゲルやバッファー中のイオンなどの電解質が混入するとこれらの移動にも電力消費を伴い、タンパク質の泳動効率が低下すると考えられる。また、タンパク質の電気泳動には表面の電荷が関連するが、バッファー中の電解質量はタンパク質表面に作用し、電荷の打ち消しに関与する可能性がある。今回の検討からは、直接的な原因についての特定は不可能であるが、採水時の超純水 A と超純水 B の比抵抗値は 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ を示していたことより、用いている比抵抗計の検出感度以下の濃度（サブ ppb）の電解質および比抵抗値に反映されない有機物が影響していると考えられる。

つづく LC/MS 分析における水質の影響についての検討では、使用する水の純度は分析結果に影響を与える可能性があることが示された。精製工程で紫外線による有機物の酸分解が行われ最も有機物量が低減されている超純水 A でもピークが検出されている。これは、本試験で実施した 60 分間のカラムへの通水は 12 mL もの水試料のインジェクションに相当し、ごく低濃度の物質まで濃縮され検出されたと考えられる。一方、市販 HPLC 用水は UV 吸収、相対蛍光強度、過酸化物質などの品質管理試験が行われているが、TOC が高い値を示すことがあり、LC/MS では高いバックグラウンドが発生する場合がある。LC/MS では使用する水中の有機物によって測定に顕著に影響することから、水中の不純物が極力低減されている超純水の使用が適していると考えられる。また、適切な精製方法を導入している超純水装置から採水した超純水を移動相の作製に用いる利点として、水質センサーとして比抵抗計のみならず TOC 計により有機物量を確認できる点が挙げられる。分析では結果の信頼性を確保することが重要であり、分析装置の状態管理も重要であることから適切な装置管理が求められる。水に関しても同様に、TOC 計により LC/MS 分析に必要な水質が確保できているか確認しながら使用することが適切である。水質センサーの表示値が異常値

を示したときには、装置の不具合箇所を追求し、適切に改善し、正常値であるにもかかわらず分析結果に異常が現れたときには、用いている試薬の純度や測定中の汚染の疑いを確認することによって問題を解決することができる。

文 献

- 1) 液体クロマトグラフィー研究懇談会, 液クロ虎の巻, 筑波出版会 (2000), p. 66.

Keywords: Electrophoresis, LC/MS, TOC, Ultra pure water