COMMENTARY

LC-MSによる高感度ペプチド定量分析の問題点と解決法： 極微量ペプチド標品の吸着と検量線作成

Practical Protocol for Optimization of Suppression of Peptide Adsorption in the Sensitive Quantitative LC-MS Using Calibration Curve Parameters

山垣 亮*・木村優佳・山崎堯嗣

Tohru YAMAGAKI, Yuka KIMURA, and Takashi YAMAZAKI

公益財団法人サントリー生命科学財団 *Suntory Foundation for Life Sciences*

We optimized the suppression method of peptide adsorption of neuropeptide Y (NPY) in the experimental tubes for the sensitive quantitative LC-MS analysis. A large peptide of Orexin-B and small tryptic digested bovine albumin (BSA) peptides suppressed effectively the adsorption of NPY in 35–50% acetonitrile with 0.1% trifluoroacetic acid aqueous solution. Orexin-B adsorbed on the experimental tubes competitively to NPY, and the tryptic digested BSA peptides suppressed the aggregation of NPY inducing the adsorption or the deposition of NPY on the tube in the solution.

(Received December 4, 2020; Accepted December 15, 2020)

1. はじめに

ペプチドは生体内でさまざまな情報伝達物質として機能しており、例えばヒトの食欲や愛情もペプチド分子が関与しますし、アミロイド・ペプチドなどは認知症やアルツハイマー病の原因にもなります。ペプチドは薬にもなっており、その動態も含め生体内での極微量定量分析が必要とされています。それぞれのペプチド特異的な抗体による定量分析もありますが、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)による定量分析は選択性が高く、簡便で広く用いられている手法です。

本稿では新たにペプチドのLC-MS定量分析系を立ち上げる際、分析系をどのように高感度化するかを具体的な実験例から紹介しようと思います。高感度というと狭義には質量分析の高感度検出だけを言うかもしれませんが、ここでは研究全体の中でいかに微量の物を定量的に検出するかという内容です。

LC-MS定量分析系の高感度化には二つあり、一つは生体組織に含まれる極微量の目的物を如何に検出するかという課題と、もう一つは定量分析に必要な検量線作成を如何に低濃度領域まで精度よく検出し行うかという二つの課題があります。前者は生体組織からの抽出物にはいろいろな夾雑物があり、目的ペプチドの検出を妨げています。前処理でいかに目的ペプチドだけを集めてくるかが問題になります。例えばマウスの脳組織から神経ペプチドを抽出し

LC-MSで検出する場合、大量の脂質成分を除く必要があります。前処理として低温下での遠心分離操作や固相抽出、ゲルろ過クロマトグラフィー分離などの処理が必須となります。その後の画分にも多くのペプチドや夾雑物が存在するので、LC分離部でもできるだけ分離を行ったり、質量分析部でも高分解能MSの利用やMS/MSを利用した多重反応モニタリング(Multiple Reaction Monitoring; MRM)により質量で分離を行う必要があります。まず生体組織からの試料で目的ペプチドを検出できる前処理プラスLC-MS検出系を立ち上げる必要があります。後者は定量用の検量線作成ですが、目的ペプチドの標品を使って濃度の異なる希釈系列試料を作成し、その試料のLC-MS分析したデータを並べるだけと考えるかもしれません。極微量濃度範囲のペプチド試料では普通に希釈系列を作成して分析しても思ったほど微量分析ができない場合も多いです。極微量ペプチド分析で困難な問題として、「吸着」があります。

ペプチド試料の「吸着」の問題ですが、低濃度領域の検出ができない(高感度化が必要)、データの再現性やばらつきを引き起こす、キャリアオーバーが現れる、といった問題を引き起こします。極微量ペプチドの高感度LC-MS定量分析には、当たり前ですが再現性やばらつきを抑えた安定した分析系も必要です。実験系を検討する際、検量線に含まれるいくつかのパラメーターを詳細に検討することで、後に述べるように高感度化の方策や結果の評価を行うことができます。

われわれは前報として本誌2020年68巻6号にLC-MSへ

*連絡先: yamagaki@sunbor.or.jp

のキャリアオーバー問題を取り上げました^{1),2)}。分析するペプチドがLC-MS装置の中に残存してしまい、次の分析にも影響を及ぼすものでした。これもペプチドの吸着が原因です。安定した分析系を立ち上げる際は参考にしてください。本稿ではキャリアオーバーの問題は解決した分析系で実施します。定量LC-MSの検量線を作成する際、標品を調製しますが、試料ペプチドは容器にも吸着が起きます。ペプチドの種類にもよりますが、吸着がひどい場合は正確な濃度の標品を調製・分析することができません。一方、吸着は溶媒条件や濃度範囲、調製してから経過時間により、刻々と変化しますので、気が付かずに分析してしまうことも多いです。きちんとしたデータと思っていても、実は吸着が進んでいて定量分析した値を見誤ってしまうこともあります。自分の分析するペプチドがどの程度吸着するのか？ 分析してもどう評価したらよいかわからない場合も多いかもしれませんが、それも後に述べるように検量線作成パラメーターにより評価することができます。

吸着を克服しながらペプチドLC-MS定量分析の高感度化のためにどのような方策が有効か？ そしてその結果をどのように評価するか？ について、検量線の基本的パラメーターを説明しながら紹介します。なおこの内容はTechnical Reportとして*Mass Spectrom.*, **9**, A0087 (2020) に報告した内容に基づいています³⁾。

高感度定量LC-MSプロトコルの開発手順には、検量線のX切片、Bias (%), 相対標準偏差などの数値が指標になります。検量線のX切片が高ければ、それ以下の低濃度では測定できません。LC-MSの検出限界値を下げるために、吸着への対策を行い、X切片値が低下するかどうかを確認します。この作業を繰り返すことで、極微量での定量検量線を作成することができます。吸着を示す値としてBias (%) 値も参考になります。吸着して試料の量が減少していれば、Bias (%) 値はマイナスの値を示します。低濃度領域にいくに従ってその値はさらにマイナス方向へ下がります。相対標準偏差は実験の再現性を示します。吸着は経時的に徐々に進行することが多く、ペプチドの種類にもよりますが、繰り返し測定を行っている間に容器内の試料吸着が進み、繰り返し測定のばらつきの原因にもなります。吸着がばらつきの原因であれば、繰り返し測定ごとにMSシグナルが減少します。このように定量LC-MSの検量線を作成することで、試料の吸着や不安定化を検出、モニターすることができます。

ここではいくつかの神経ペプチドをLC-MS分析しています。神経ペプチドY (NPY) について吸着メカニズムを詳しく解析することで、どのような吸着阻害剤が必要なのかを評価することができました。さらに吸着阻害剤としてNPY稀薄溶液に添加した2種類のペプチドが、別々のメカニズムでNPYの吸着を阻害している興味深い現象を明らかにすることができました。

図1. 神経ペプチドY NPYの構造 (文献3より内容を変更して転載)。

2. 実験

2.1 試料ペプチド

実験にはNPY, Orexin-B, α -MSHを用いました (図1)。NPYは36残基アミノ酸からなる神経ペプチドでC-末端がアミド化されています (図1)。

NPYは水に可溶であり、疎水性度の指標GRAVY (grand average of hydropathicity) はC-末端がアミド化されていない配列でも-1.194であり、親水性を示す負の値です⁴⁾。この値からは吸着を予想できず、先に述べた通り、装置内に吸着し、キャリアオーバーを引き起こす厄介なペプチドです。ただし、疎水性度GRAVYをあらかじめ見積もり、自分の分析するペプチドがどの程度疎水性が高いのか、吸着する可能性が高いのかを知っておくことは大切です。GRAVYはタンパク質関連のデータ検索ソフトウェアを公開しているExpasyのウェブサイトにてProtoParamソフトウェアとして利用できます^{4),5)}。

10.0 μ MのNPY, Orexin-B, α -MSHを含む水溶液をストック溶液として調製しました。マトリックス溶液として利用しているトリプシン処理BSAはプロテオーム解析用の標品として市販しており、10 fmol/ μ Lに水で調製しました。さまざまなマトリックス溶液を調製していますが、マイクロピペッターのチップやバイアル容器にも吸着が進むので、各マトリックス溶液で丁寧に洗浄し容器表面をブロッキングしてから利用しています。

2.2. LC-MS

LCにはNexera UPLC/HPLC (島津製作所) を使用しました。キャリアオーバーを避けるため、オートサンプラー内のサンプル・ニードル洗浄溶液として50%アセトニリル水溶液を使用しています。分析した標準溶液およびサンプル溶液はすべて1 μ LをLC-MS装置に注入して分析しています。LCの逆相カラムは図1の分析にAeris Peptide XB-C18 (ID 2.1 mm $\times$ 250 mm, 2.6 μ m)とSecurity Ultra guard column (Phenomenex Inc.) を利用し、流速0.3 mL/minで使用しました。それ以外のデータはすべてYMC Triart C8 metal-free column (ID 2.1 mm $\times$ 250 mm, 2.6 μ m) を利用し、流速は0.2 mL/minで使用しました。グラジェント溶出液、グラジェントのプログラムは前報³⁾のとおりです。

MS装置にはFT-Orbitrap MS (Thermo Fisher Scientific社) を利用しました。実験パラメーターは以下の通りです。ESI-positive mode, 解像度: 120,000, スキャン範囲: m/z 350-2,000, キャピラリー温度250°C, ソースヒーター温度500°C, シース・ガスフロー速度: 50 (単位は機器に特有の値です), AUXガスフロー速度: 15 (単位は機器に特有の値です)。検量線はMS装置に付随しているソフトウェア

表1. NPY, Orexin-B, α -MSHペプチド混合水溶液中のNPY検量線データ.

pmol	0.4	0.5	1	2	3.0	4.0	5.0
run1	1,341,435	2,901,846	7,563,526	19,659,526	32,465,846	46,129,607	64,582,131
run2	1,289,424	2,784,674	7,854,728	20,018,785	32,636,601	46,428,878	65,958,699
run3	1,292,378	2,834,302	7,606,358	20,048,353	32,041,437	48,535,814	64,734,702
run4	1,309,210	2,784,646	7,629,543	20,482,323	32,162,329	48,622,286	66,918,689
run5	1,314,321	2,740,069	7,445,986	20,312,752	32,988,855	48,155,686	64,329,921
平均	1309353.70	2809107.48	7620028.25	20104347.75	32459013.45	47574454.20	65304828.27
SD	20852.23	61638.00	149034.04	314094.02	379047.49	1199992.08	1098848.52
RSD(%)	1.59	2.19	1.96	1.56	1.17	2.52	1.68
SE	9325.40	27565.35	66650.05	140467.12	169515.19	536652.77	491420.00
理論値	5224386	6530483	13060966	26121931	39182897	52243863	65304828
Bias(%)	-74.94	-56.98	-41.66	-23.04	-17.16	-8.94	0.00

(文献3より内容を変更して転載).

XcaliburとQuanBrowserで解析しました. MSピーク強度は最も強度が大きいピーク (the most abundant peak) の面積から検量線を作成しています. 各ターゲット・ピークは, NPYは m/z 712.8547 ($[M+6H]^{6+}$), Orexin-Bは m/z 734.9128 ($[M+4H]^{4+}$), α -MSHは m/z 555.6055 ($[M+3H]^{3+}$) です. NPYのMSスペクトルは前報で表示しました.

3. 検量線

まず, 定量分析を行うために, 検量線を引く必要があります. 試料NPY, Orexin-B, α -MSHそれぞれは水溶性ペプチドとして知られているので, 水に溶解しました. 一斉に分析できれば手間が省けると考えて, 三つのペプチドの混合試料として調製しました. 分析する試料は0.4–5.0 pmol/ μ Lで調製し分析を行いました. 分析データと検量線を表1と図2に示します.

3.1 相関係数 (R) と決定係数 (R²)

検量線の相関係数 (R) と決定係数 (R²) は検量線の直線性を示し, 定量分析を行う場合その値は0.998以上であることが望ましく, 精密定量を行う場合は0.9998以上が理想的です. 直線に一致している場合は1.0000になります. 三つのペプチド混合サンプルの場合, 表1に示すようにNPYのR値は0.99655, Orexin-Bは0.99600, α -MSHは0.99165であり, それぞれの検量線は0.40–5.00 pmol/ μ Lの濃度範囲で正確な定量分析で要求される基準に達していませんでした.

3.2 標準偏差と変動係数

標準偏差 (Standard deviation; SD) は実験データのばらつきを示し, 変動係数 (Relative standard deviation; RSD) は標準偏差を平均値で割った値 (%) で, 百分率で表示されます. 0.500 pmol-NPYのRSD値は2.19%であり (表1), ばらつきが数%の範囲ですので, 再現性も良いと考えています.

3.3 X-切片

理想的な検量線は原点を通過するのですが, 実験で得られたNPY, Orexin-B, α -MSHの検量線ではX-切片が0.30–0.40 pmolになりました. この検量線ではそれ以下の濃度の標品は検出できず, 微量測定ができません. ここで調製していたマウス脳組織内の神経ペプチドが0.010 pmol/ μ L以下でしたので, さらに微量の標品での検量線を作成でき

図2. NPY, Orexin-B, α -MSHペプチド混合水溶液中のNPY検量線.

(文献3より内容を変更して転載).

るLC-MS分析プロトコルを開発する必要がありました.

3.4 バイアス (%)

バイアスは理論値と実験上の平均値との相違であり, ここでは次の式で計算されています.

$$\text{バイアス (\%)} = (\text{実験上の平均値} - \text{理論値}) / \text{理論値} \times 100$$

一般にはバイアス値は定量分析においては $\pm 20\%$ 範囲内に収まるような実験プロトコルが必要です. NPYの場合 (表1), 5.00 pmolサンプルのMSシグナル強度を100%として原点を通る理想的な検量線を正規化しています. バイアス (%) は3.00 pmolまでは -17% 程度であり, マイナス (減少する) 方向へ 17% ずれていることを示しています. さらに低濃度領域では理想的なMSシグナルよりも20%以上減少していることがわかります.

4. 高感度定量LC-MSの最適化戦略

図2に示すNPYの検量線は低濃度領域における「吸着」が典型的に表れています. 標品を調製する容器が同じなら, その表面積は一定で吸着される分子の量も一定なので, 濃度が高いときには分子全体に対する吸着した分子の量は小さく, 低濃度になればなるほど, 吸着する分子の量の全体量に対する割合は大きくなります. NPYの検量線では, 高い濃度5.00 pmolに合わせた理想的な検量線 (破線) から実際の検量線 (実線) は低い濃度で減少方向にずれています. ずれて減少した分が吸着した分と考えられます. X-切片が高いことやバイアス (%) が低濃度領域で

図3. トリプシン処理後BSA ペプチドを含む水溶液中のNPY 検量線。
(文献3より内容を変更して転載)。

あればあるほどマイナスにずれていることは分子の吸着を示しています。さらに極微量領域での分析を行うには、これらの吸着の問題を解決しなければなりません。

4.1 ブロッキング剤の検討

一般に生化学的実験では、容器等への非特異的吸着を回避するため、実験中にブロッキング剤としてウシ血清アルブミン (BSA) やカゼインを混ぜることが行われています。例えば免疫染色、ELISA法などでは非特異的相互作用を軽減させるためブロッキング剤が用いられています。ペプチドのLC-MS分析では、LCに逆相クロマトグラフィーを用いることから吸着性の高いタンパク質をブロッキング剤として過剰に添加することはできません。カラムにブロッキング剤が吸着して剥がれなくなってしまう、分析ができなくなるからです。一方、有機低分子の添加は、イオン化効率の高い低分子によるMS検出低下を招く恐れがありました。

最初の実験ではNPY, Orexin-B, α -MSHの混合試料を分析しました。その後、NPY, Orexin-B, α -MSHをそれぞれ別々に一つの試料ごとに検量線作成実験を行ったところ、混合試料とは比べものにならないぐらい、ひどい吸着の影響を受けました。つまり、たまたま分析ペプチド同士を混合させたことが互いの吸着抑制に働き、それぞれの分析ペプチドは自身の吸着が軽減されていたことがわかりました。そこで、試料を溶解させるマトリックス溶液に別のペプチドを添加してみることにしました。BSA自体はブロッキング剤として機能するので、ここではBSAをトリプシン消化して生成する混合ペプチドを利用することとしました。ペプチド断片であってもブロッキング剤としての機能を期待しました。

図3はトリプシン処理BSA (10 fmol/ μ L) を添加した水溶液中で調製したNPY標品の検量線で、そのデータが表2です。図2と比べると、X-切片が0.40 pmolから0.18 pmolと効果的に低濃度まで観測が広がっています。一方、データのばらつきについては、図2と表1のときと同じ濃度0.5 pmolまではRSD (%) が5%以下でばらつきが抑えられているものの、さらに低濃度領域では、RSD (%) が20%を超えるようなデータのばらつきが見えます (表2)。

表2. トリプシン処理後BSA ペプチドを含む水溶液中のNPY 検量線データ。

pmol	0.1250	0.2500	0.5000	1.0000	2.0000
run 1	64656	419698	5335556	20271071	37334270
run 2	44124	298397	5287572	21222916	38033965
run 3	34786	305973	5273383	19953304	40767359
run 4	38821	295382	4990088	19968446	41399218
run 5	38883	284644	5093212	19634758	38588179
Average	44253.79	320818.80	5195962.24	20210098.92	39224598.20
SD	11877.48	55802.81	147321.39	609276.82	1768124.80
RSD(%)	26.84	17.39	2.84	3.01	4.51
SE	5311.77	24955.78	65884.13	272476.88	790729.45
Ideal value	2451537	4903075	9806150	19612299	39224598
Bias(%)	-98.19	-93.46	-47.01	3.05	0.00

(文献3より内容を変更して転載)

4.2 吸着と経時変化

表2の測定データでばらつきの大きかった0.125 pmol, 0.250 pmolについて、繰り返し測定実験run 1-5を見ると、run1はMSシグナルが高いにもかかわらず、run 2-5についてはMSシグナルが顕著に減少しています。LC-MS分析時間の間には、ニードル洗浄やカラムの洗い、安定化、などの工程を含めると30分程度の時間がかかります。その経過時間の間に吸着が進行していると思われます。繰り返し実験は30~60分ごとの経時的吸着測定を行っている実験になります。容器への吸着には時間の要素もあり、時間を置けば置いた分だけ吸着が進む場合もあります。図3, 表2の場合は、run1とrun2-5との間に大きな差があり、run2-5の分析には微量ながら吸着が進行していました。

4.3 有機溶媒の添加

ペプチドの精製過程、例えばゲルろ過クロマトグラフィーを行う際は、アセトニトリルなど有機溶媒を添加してペプチドの吸着を抑えることがあります。ただし、逆相クロマトグラフィーによる分離やLC-MS分析では、有機溶媒を供すると試料がカラム担体に保持されず、分離分析することができません。そのため、LC-MS分析の標品はできるだけ水系で調製をしていました。ペプチド濃度が高い場合は全体の試料量に対する吸着量が低いので問題はないのですが、ペプチドの稀薄溶液では吸着の割合が高く、分析にばらつきが起こっています (表2)。この吸着を抑制するため、表3では標品を調製する溶媒に有機溶媒を添加しました。トリプシン処理BSAを含む50%アセトニトリル/0.5%TFA水溶液を用い調製を行いました。注意する点として分析に供するサンプル溶液量をできるだけ少量に抑える必要があります。ここでは分析注入量を1 μ Lの一定量と固定化しました。全体の溶出プロファイルにも大きな影響がないことを確認いたしました。

表3では、表2と比較して0.50 pmol以下の濃度でもrun1-5分析間のばらつきが抑えられ、RSDが5%以下に抑えられていました。ここには示しませんが、有機溶媒の濃度を検討し、10%のアセトニトリル添加では吸着抑制効果がなく、35, 50%のアセトニトリルの添加で吸着抑制作用が効果的であり、再現性の向上が見られました。35%と50%のアセトニトリル添加では差がありませんでした。このように標品調製のマトリックス溶液への有機溶媒の添

表3. トリプシン処理BSAを含む50%アセトニトリル/0.1% TFA水溶液中のNPY検量線データ.

pmol	0.05	0.25	0.50	1.00	2.00
run 1	5,958,059	26,290,241	49,976,892	106,203,465	191,836,528
run 2	5,646,309	25,771,693	47,908,604	98,950,655	191,066,184
run 3	5,757,907	26,579,344	49,424,093	97,028,111	196,022,792
run 4	5,729,540	25,133,530	49,593,576	100,864,203	193,003,463
run 5	5,229,032	24,545,452	48,239,358	96,182,477	194,254,474
Average	5664169.18	25664052.14	49028504.69	99845782.26	193236688.18
SD	240455.62	744872.77	806494.06	3567005.52	1762055.24
RSD(%)	4.25	2.90	1.64	3.57	0.91
SE	107535.02	333117.23	360675.11	1595213.36	788015.06
Ideal value	4830917	24154586	48309172	96618344	193236688
Bias(%)	17.25	6.25	1.49	3.34	0.00

(文献3より内容を変更して転載)

表4. トリプシン処理BSAおよび0.5 pmol/μL Orexin-Bを含む50%アセトニトリル/0.1% TFA水溶液中のNPY検量線データ.

pmol	0.05	0.25	0.50	1.00	2.00
run 1	5,627,869	25,172,972	49,120,680	96,396,203	182,219,944
run 2	5,746,266	25,756,127	50,189,079	98,538,027	182,803,507
run 3	5,556,831	25,774,547	49,067,571	98,474,773	182,251,890
run 4	5,577,659	24,620,331	49,188,634	100,848,603	181,806,813
run 5	5,695,441	25,371,713	48,848,730	99,381,324	188,180,298
Average	5640813.04	25339138.22	49282938.92	98727786.22	183452490.35
SD	71152.56	426337.27	467168.30	1446463.26	2385045.35
RSD(%)	1.26	1.68	0.95	1.47	1.30
SE	31820.39	190663.82	208924.02	646878.04	1066624.71
Ideal value	4586312	22931561	45863123	91726245	183452490
Bias(%)	22.99	10.50	7.46	7.63	0.00

(文献3より内容を変更して転載)

加は有効でした.

4.4 吸着阻害剤ペプチドの検討

表3では、0.25, 0.05 pmolにおいて有機溶媒の添加によりRSD (%)が5%以下になったものの、繰り返し分析の後半では、MSシグナルの減少がまだ十分には抑えられませんでした。表3では分析ペプチドの容器壁面への吸着阻害剤としてトリプシン処理BSAを添加していました。しかし消化された小さな断片は分析対象のNPYよりも低分子と考えられることから、BSA断片が競争的に優位に容器壁面を覆うことは可能性が低いと考えました。そこで、NPYと同じ程度の鎖長のあるペプチド、Orexin-Bを0.5 pmol/μL濃度で吸着阻害剤として標品調製溶媒に添加しました。表4に示すようにOrexin-Bの添加により低濃度領域、0.25, 0.05 pmolでもRSD (%)は2.0%以下に抑えられました。これはOrexin-Bが効果的に容器壁面に競争的に吸着し、NPYの吸着を阻害したと考えました。

一方で、マトリックス溶液は単純な組成のほうが良いので、Orexin-Bが吸着阻害剤として十分機能するのであれば、トリプシン処理BSAは不要と考えました。0.5 pmol/μL Orexin-Bのみを含む35%アセトニトリル/0.1%TFA溶液をマトリックス溶液とし、NPY標品を調製して検量線を作成したのが表5になります。表5の測定範囲は0.001-0.020 pmolであり、表4のOrexin-Bとトリプシン処理BSA両方を含むマトリックス溶液で調製された測定範囲内(0.050-2.000 pmol)では良好なデータが得られました。しかし、Orexin-Bとアセトニトリル/TFAのみを吸着阻害剤としたマトリックス溶液の場合(表5)、低濃度領域0.010 pmol以下の濃度範囲では経時的にMSシグナルの減少がみ

表5. Orexin-Bを含む35%アセトニトリル/0.1% TFA水溶液中のNPY検量線データ.

pmol	0.0010	0.0025	0.0050	0.0100	0.0200
run 1	95,571	231,604	185,846	258,394	1,909,577
run 2	82,921	200,302	122,742	154,581	1,818,852
run 3	84,698	140,734	89,226	115,194	1,883,228
run 4	101,866	86,822	56,819	106,471	1,885,598
run 5	98,675	51,056	50,942	64,152	1,885,594
Average	92746.34	142103.68	101115.14	139758.48	1876569.64
SD	7584.40	67446.30	49533.59	65911.90	30423.81
RSD(%)	8.18	47.46	48.99	47.16	1.62
SE	3391.85	30162.90	22152.09	29476.70	13605.94
Ideal value	93828	234571	469142	938285	1876570
Bias(%)	-1.15	-39.42	-78.45	-85.10	0.00

(文献3より内容を変更して転載)

表6. トリプシン処理BSAおよび0.5 pmol/μL Orexin-Bを含む35%アセトニトリル/0.1% TFA水溶液中のNPY検量線データ.

pmol	0.005	0.010	0.020	0.040	0.100
run 1	640,962	1,278,583	2,452,413	4,686,883	11,236,089
run 2	606,295	1,267,468	2,307,427	4,555,776	11,493,135
run 3	653,525	1,252,076	2,279,434	4,663,105	11,653,077
run 4	639,365	1,228,029	2,344,665	4,594,333	11,114,902
run 5	614,441	1,092,739	2,363,082	4,741,919	11,161,726
Average	630917.71	1223778.99	2349404.15	4648403.35	11331785.61
SD	17669.94	67679.44	59123.97	66250.13	207064.43
RSD(%)	2.80	5.53	2.52	1.43	1.83
SE	7902.24	30267.17	26441.04	29627.96	92602.03
Ideal value	566589	1133179	2266357	4532714	11331786
Bias(%)	11.35	8.00	3.66	2.55	0.00

(文献3より内容を変更して転載)

られ、NPYが容器への吸着が経時的に進んでいました。

吸着阻害剤としてOrexin-Bとトリプシン処理BSAの両方を含む35%アセトニトリル/0.1%TFA水溶液をマトリックス溶液としてNPYの標品を調製し、再度検量線を作成しました。表6では測定範囲が0.005-0.100 pmol/μLの範囲で5回の繰り返し測定を行ったところ、0.010, 0.005 pmolの範囲でもRSD (%)が抑えられて測定が可能であった(表6)。この実験から、極微量NPY溶液中NPYの容器への吸着を効果的に抑制するには、35-50%程度の有機溶媒と酸に加え、分子量が3 kDaと比較的大きな吸着性の高いOrexin-Bとトリプシン処理BSAペプチド断片の添加が必要でした。最終的に0.002-1.000 pmol (2-1,000 fmol)/μLの範囲でNPYの良好な検量線作成が可能となりました。

5. 吸着阻害のメカニズム

4.2 kDaの神経ペプチドNPYを稀薄溶液として安定に調製するにはOrexin-Bとトリプシン処理BSAの両方の添加が必要でした。この結果はそれぞれのペプチドが別々にNPYの安定性に関与していることを示唆する面白い現象を表しています。ここではNPYの安定化メカニズムを考察したいと思います。

生化学的実験で用いられるBSAやカゼインなどのブロッキング剤は一般に非特異的に吸着しやすい物質として知られています。ブロッキング剤として容器壁面に非特異的に吸着し、サンプルとは競争的に吸着することでサンプルの吸着を抑制しています。NPY溶液中のOrexin-Bはこれに当たります。一方、トリプシン処理BSAは容器へ吸着するというよりは、NPY自体の安定性に寄与している

図4. NPYの容器壁面吸着阻害におけるOrexin-Bとトリプシン処理BSAペプチドの作用メカニズム (A)とNPYの吸着メカニズム (B)。

と考えられます。

NPYの容器への吸着メカニズムを考えてみます(図4)。NPYは36残基と比較的長い鎖長を持つペプチドで、全体として親水性のペプチドです。また、疎水性アミノ酸であるチロシン(Y)も5残基含まれているペプチドなので、最初は水に溶けていますが、分子内、分子間同士で相互作用するなどして不安定化し凝集します(図4)。安定な水溶性タンパク質などは疎水性残基を内側にして折り畳まれることで安定化されますが、比較的長い鎖長のペプチドは中分子であり、全体として不安定化されやすいです。NPYの凝集は容器壁面への吸着する核となり、水和した単分子よりも容易に吸着されやすいです(図4)。

トリプシン処理BSA断片は、NPY分子に直接作用して、NPY分子同士の凝集を抑制させ壁面への吸着を抑制していると考えています。タンパク質の安定化、凝集・変性・抑制としてアミノ酸のアルギニンの添加が知られています^{6),7)}。例えば、アルギニンを添加したリゾチームでは、同じ条件で熱変性に対して凝集が抑制されます⁶⁾。また、高濃度抗体医薬では、アルギニン添加により抗体同士の会

合を抑制させ、その粘度を抑える効果が知られており、実際の製剤現場でも利用されています⁷⁾。アルギニンや類縁の有機低分子はカーボンナノチューブといった非常に疎水性の高い化合物を可溶化させる機能もあります。われわれはトリプシン処理したBSAは上述のようなアルギニンと同じような働きをしていると考えています。すなわちトリプシン処理したBSAは短いペプチド群ですので、NPYに作用して凝集を妨げると推測しています。最近ではBSAを酸加水分解した短いペプチド断片群がNPYや疎水性の高いアミロイド・ペプチドなどの吸着を阻害するといった報告もあります⁸⁾。BSAの酸加水分解したペプチド群も試料ペプチドに直接作用して吸着を阻害していると考えられます。

6. まとめ

容器へのペプチド試料の吸着は、ペプチドが水溶性のものであっても進行するので、LC-MSによるペプチドの微量定量分析には必ず対策が必要です。特に標品を用いて検量線を作成する際には容器への吸着は致命的な影響を及ぼすので注意が必要です。また、LC-MS分析において吸着抑制のためのマトリックス溶液利用は、本稿でも述べた通り、有機溶媒の添加であったり、別の夾雑物質あるいはペプチド等の添加といった、通常タブーとされることをあえて行う必要があるのです。文献や研究では明確に示されなかったりします。研究の本質というよりは実験のノウハウ的な部分でもあるので、明示されないのかもしれませんが、再現性を左右するなど実験データの質を担保する部分では非常に重要な部分です。ペプチドごとに物性は異なりますので、対象とするペプチドごとに、吸着抑制マトリックス溶液を最適化する必要があります。本稿では検量線のパラメーターを指標に吸着の程度をモニターしながら、マトリックス溶液の最適化を行いました。詳細な条件等より、どうやって吸着を抑える方策を導き出すかを詳しく解説したつもりです。新しくLC-MS微量定量分析を行う研究者の方々の参考になれば幸いです。

技術的な内容を詳しく突き詰めた結果ですが、最終的にはNPYの溶液中での安定性のメカニズムを明らかにするような内容も見ることができました。単離されたNPYを分析する研究の中で、徐々に別のペプチドを添加したりしています。恐らく生体内でのペプチドも単純系で存在する訳ではなく、他の代謝物や他のペプチド、アミノ酸、無機塩の存在下で存在しています。その中での挙動が本来の生体内での挙動と思われます。ペプチド、タンパク質の機能については、最近クラウディング効果や相分離生物学など複雑系での振る舞いが重要になっています。今回の研究も単純系ではありますが、NPYの本来の挙動を垣間見ることができたと思っています。

文 献

- 1) 山垣 亮, 山崎堯嗣, 木村優佳, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **68**, 99-105 (2020).

- 2) T. Yamagaki and T. Yamazaki, *Mass Spectrom.*, **8**, S0083 (2019).
- 3) T. Yamagaki and T. Yamazaki, *Mass Spectrom.*, **9**, A0087 (2020).
- 4) J. Kyte and R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132 (1982).
- 5) <https://web.expasy.org/protparam/>
- 6) 白木賢太郎, 生物物理, **44**, 87-90 (2004).
- 7) 荒川 力, 薬学雑誌, **130**, 793-800 (2010).
- 8) F. Verbeke, N. Bracke, N. Debunne, E. Wynendaele, and B. D. Spiegeleer, *Anal. Chem.*, **92**, 1712-1719 (2020).