

## Technical Review

# Dual Exchange Gradient SystemによるナノLCを使用した タンパク質解析用LC / Linear Ion Trap–Time of Flight MSの測定

緒方いずみ、石井公彦、山下絵理、吉岡信二、照井 康

## LC / Linear Ion Trap–Time of Flight Mass Spectrometer for Protein Analysis Using Nano LC With Dual Exchange Gradient System

Izumi Ogata, Kimihiko Ishii, Eri Yamashita, Shinji Yoshioka and Yasushi Terui

Hitachi High–Technologies Corporation, 882, Ichige, Hitachinaka, Ibaraki, 312–8504, Japan

### Abstract

“NanoFrontier LD”, a new LC/Linear Ion Trap (LIT)– Time of Flight (TOF) MS for protein analysis has developed by Hitachi High–Technologies Corp. One of its remarkable features is NanoLC with Dual Exchange Gradient System (DEGS). DEGS offers great reproducibility of nano–flow gradient elution. Connecting NanoLC and LIT–TOF MS which MS<sup>n</sup> analysis with high mass accuracy is available, Information Based Acquisition (IBA) is also available. With IBA, the efficiency of protein identification by MS/MS improves.

*Keywords* : LC/MS ; nanoLC ; proteomics

### 緒言

創薬や体外診断において、疾病メカニズム解明および疾患関連マーカー(以下、バイオマーカー)探索のために、細胞、血清、尿などに含まれるタンパク質や代謝物の解析が盛んに行われている。株式会社日立ハイテクノロジーズでは、2006年5月にタンパク質解析用液体クロマトグラフ/リニアイオントラップ飛行時間型質量分析装置(以下、LIT–TOF MS)「NanoFrontier LD」を発売した(Figure 1)。

NanoFrontier LDは、スプリットレスのナノLCによる優れたグラジエント再現性、またLITとTOFを結合したMSの多段階MS/MS分析による構造解析と高質量数精度計測に加え、検出系を改良、ダイナミックレンジ5,000以上を達成し、測定試料の量的変動解析を可能にした。また、複数のMS/MS分

析法を搭載し、試料の構造情報をより多く得る事が可能となった。さらにソフトウェアは独自機能Information Based Acquisition(以下、IBA)を実装し、タンパク質の同定精度が向上した。

本稿では、NanoFrontier LDの特長の一つであるナノLCの送液方式と、ナノLCの保持時間再現性の高さを活用した独自機能IBAについて述べる。

### Dual Exchange Gradient System (DEGS)

NanoFrontier LD搭載のナノLCは、当社独自のDual Exchange Gradient System(以下、DEGS)[1][2]により、流量10~250 nL/minでの安定したグラジエント送液を実現した。

DEGSの概略構成図をFigure 2に示す。このシステムは、

(株)日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジー製品事業本部  
那珂事業所 バイオシステム設計部 緒方いずみ  
〒312 8504 茨城県ひたちなか市市毛882



Figure 1. NanoFrontier LD

セミマイクロ流量の低圧グラジエントポンプ（以下、グラジエントポンプ）、ナノ流量で単一溶媒を送液するイソクラティックポンプ（以下、ナノフローポンプ）容量の等しい2つのループを備えた10方バルブで構成している。

送液を開始すると、グラジエントポンプとナノフローポンプは同時に送液を開始し、10方バルブが一定時間（例えば1分）毎に流路を切り替える。グラジエントポンプが作製するグラジエント溶液は10方バルブの片方のループへ送液され、ループを満たしドレインへ排出される。また、ナノフローポ

ンプが送液するナノ流量の溶媒も、10方バルブのもう一方のループへ送液される。10方バルブの切り替えに応じ、それぞれのループに満たされたグラジエント溶液は、ナノ流量の溶媒によりサンプルインジェクタ、カラムへと押し出される。

このようにDEGSは、グラジエント再現性をセミマイクロポンプ、ナノ流量の送液安定性をイソクラティックポンプが担う事により、スプリットレスで再現の良いナノグラジエント送液を実現した。

Figure 3に、BSAトリプシン消化物を流量50 nL/minで測定したクロマトグラムを示す。また、Table 1に同試料を6回繰り返し測定した保持時間の再現性評価結果を示す。主なペプチド4成分のピーク保持時間RSDが0.3~0.6%と、良好な結果を示した。

### Information Based Acquisition (IBA)

バイオマーカー探索では生体試料中のタンパク質・ペプチドを網羅的に解析し、その中からマーカーとなる成分を見出す。生体試料中に存在するタンパク質・ペプチドは種類も量も様々であり、いかに分離の良いクロマトグラフィーでもそれらを完全に分離する事は不可能である。

IBAは、LCでの分離が不十分で、ほぼ同時にカラムから溶出する複数成分を出来る限り多く同定するために開発した。

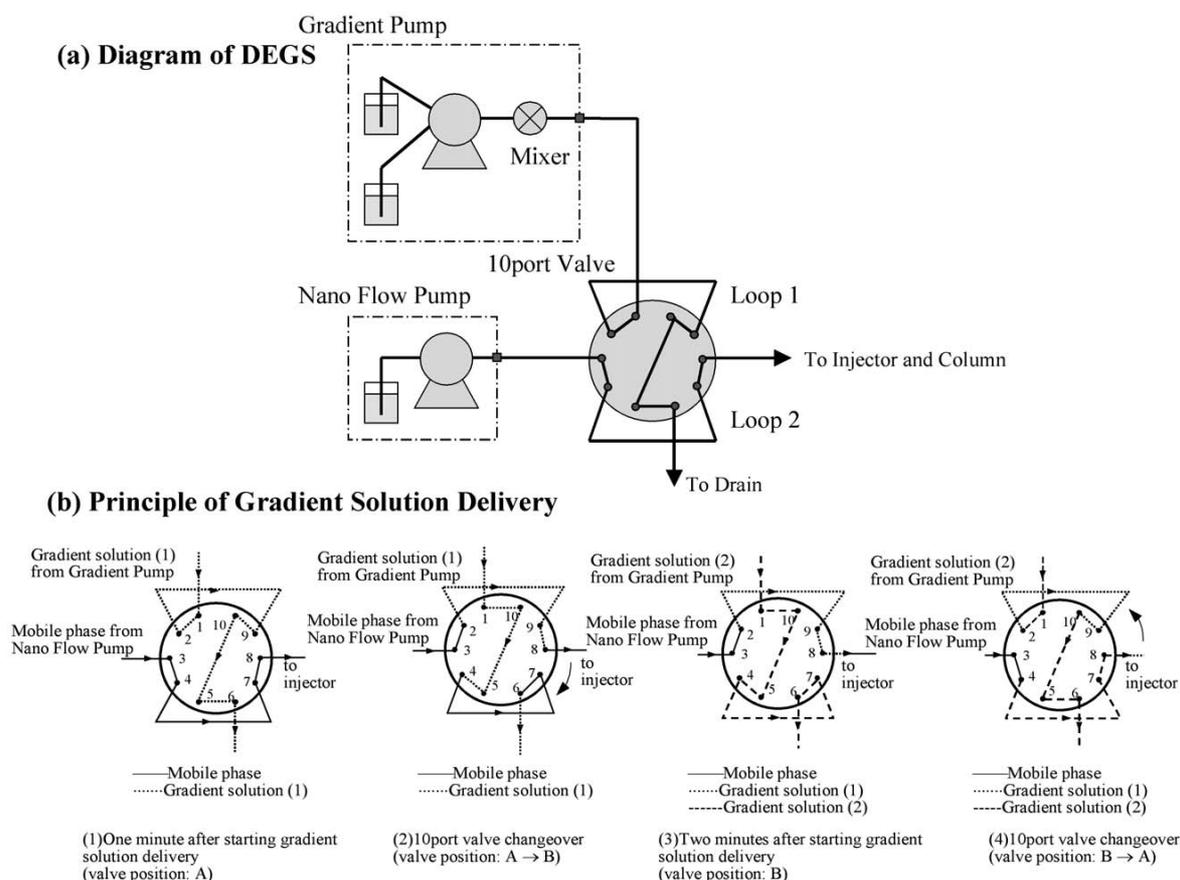


Figure 2. Schematic diagram of Dual Exchange Gradient System

IBAは、同一試料を繰り返し測定する際にMS/MS測定したターゲット成分の情報（質量数と保持時間）をリアルタイムに内部データベースへ記憶し、複数回の測定でMS/MS測定する成分の重複を防ぐ機能である[2]。また、同内部データベースは編集可能であり、測定試料に混在、又は前処理や環境により混入する夾雑成分等の既知情報の追加が可能である。NanoFrontier LDは、この内部データベースを参照しながら繰り返し測定を行うため、特定ターゲット成分を選択的に効率良くMS/MS測定可能である。

IBAを用いた、大腸菌抽出サンプル酵素消化物の4回繰り返し測定の結果を示す。Figure 4は試料のトータルイオンクロマトグラム（以下、TIC）である。4つのクロマトグラムの感度および溶出パターンに大きな変動は無い。次に、MS/MSのみのTIC（Figure 5）を見ると、4つのクロマトグラムのパターンがそれぞれ変動している事が判る。これは、IBA

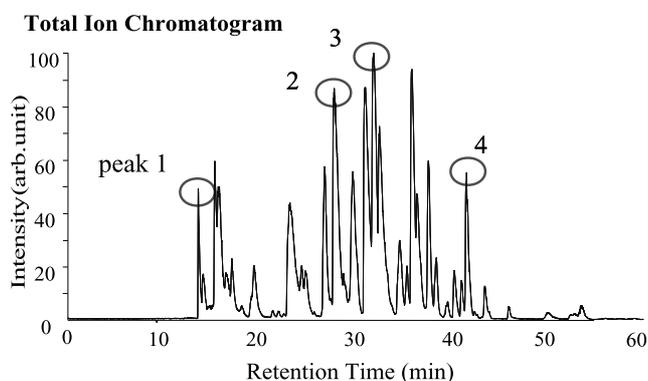


Figure 3. Total Ion Chromatogram of BSA tryptic digest at 50 nL/min.

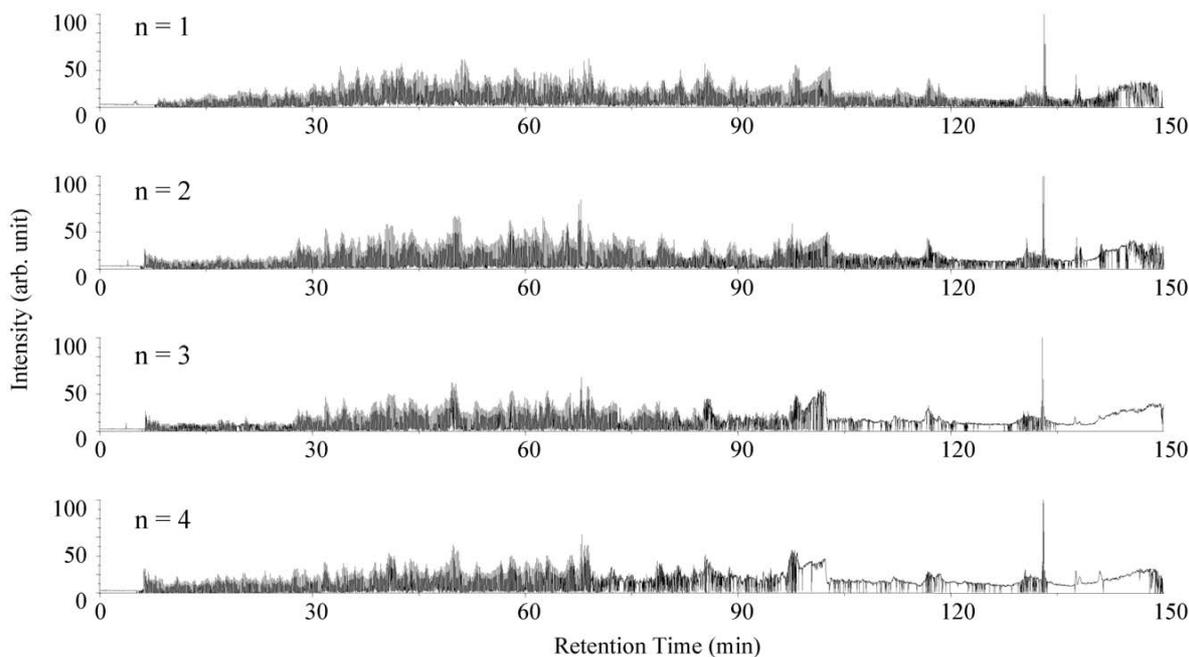


Figure 4. Total Ion Chromatograms of E.coli digest at 200 nL/min.

Table 1. Reproducibility of peak retention times of BSA tryptic digest

	Retention time (minutes)			
	peak 1	peak 2	peak 3	peak 4
exp. 1	15.4	27.4	31.4	40.9
exp. 2	15.3	27.2	31.4	40.8
exp. 3	15.4	27.3	31.2	40.9
exp. 4	15.3	27.3	31.4	40.5
exp. 5	15.6	27.3	31.0	40.9
mean	15.4	27.3	31.3	40.8
std. dev	0.095	0.090	0.188	0.172
rsd (%)	<b>0.618</b>	<b>0.331</b>	<b>0.601</b>	<b>0.421</b>

により同一成分のMS/MS測定が回避された為である。これらの測定結果をタンパク質検索エンジンMASCOT<sup>®</sup>で検索し、ヒットしたタンパク質数の変化をFigure 6に示す。タンパク質数は測定回数に応じて増加した。（本機能はNEDO助成事業の成果の一部です。）

#### 結論

DEGSにより、セミマイクロLC同等のグラジエント送液安定性と保持時間再現性がナノLCで得られるようになった。また、保持時間再現性の高いナノLCをLIT-TOF/MSと接続する事でIBAが実現し、MS/MSによる構造解析効率の向上を達成した。

上記独自技術による優れた同定機能と、定量機能を兼ね備えたNanoFrontier LDは、バイオマーカータンパク質探索への

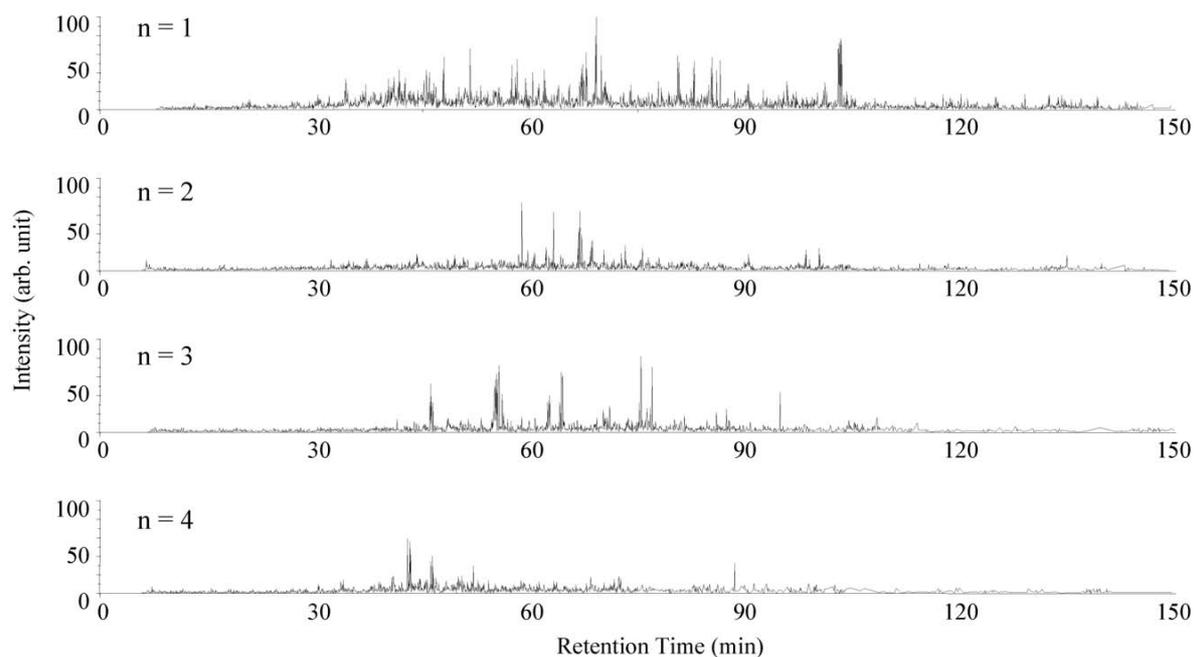


Figure 5. MS/MS Chromatograms of E.coli digest at 200 nL/min.

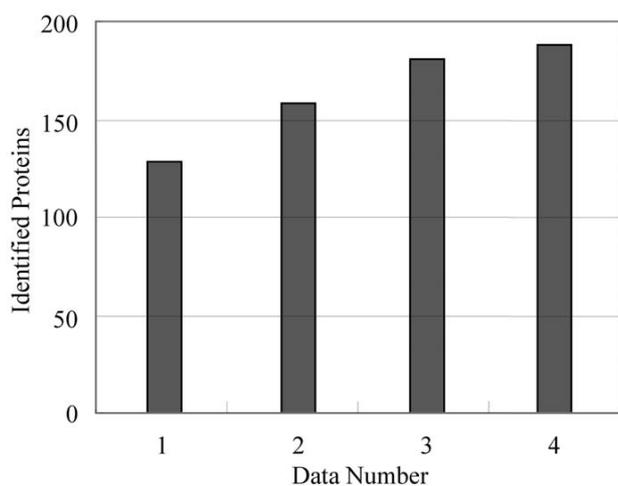


Figure 6. Statistics showing identified proteins for data number

多大な貢献が期待される。

#### 参考文献

- [1] Deguchi, K. ; Ito, S. ; Yoshioka, S. ; Ogata, I. ; Takeda, A. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1524–1528.
- [2] Ito, S. ; Yoshioka, S. ; Ogata, I. ; Takeda, A. ; Yamashita, E. ; Deguchi, K. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1051*, 19–23.
- [3] Yokosuka, T. ; Yoshinari, K. ; Kobayashi, K. ; Ohtake, A. ; Hirabayashi, A. ; Hashimoto, Y. ; Waki, I. ; Takao, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, in press.