

COMMENTARY

プロテオミクス解析用ナノ液体クロマトグラフィー
質量分析システムOptimization of Nano-Liquid Chromatography Coupled with
Mass Spectrometry Systems for Proteomics石濱 泰^{1,2}Yasushi ISHIHAMA^{1,2}¹慶應義塾大学先端生命科学研究所 *Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, YAMAGATA, JAPAN*²科学技術振興機構 さきがけ *PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, SAITAMA, JAPAN*

Current proteomics technologies based on miniaturized on-line liquid chromatography (LC) coupled with mass spectrometry (MS) allow us to analyze protein expression profiling with a high throughput. Compared to genome sequencing and microarray-based transcriptomics, however, proteomics is still under development to achieve coverage of the entire proteome. In this commentary, the optimization of proteomic nanoLC/MS systems is described. In addition, future development of the analytical systems to achieve the coverage of the entire proteome is discussed.

(Received February 8, 2007; Accepted February 9, 2007)

1. はじめに

タンパク質の網羅的発現解析は、近年の質量分析計 (mass spectrometry: MS) の高性能化およびマイクロ液体クロマトグラフィー (liquid chromatography: LC) とのオンライン接続 (LC/MS) により今日では比較的簡単に行えるようになった^{1),2)}。しかし、ゲノム配列解析や DNA microarray によるトランスクリプトミクスと比較すると依然としてプロテオミクス技術でカバーできる測定対象範囲は限られており、真の「オミクス」レベルでの網羅的解析は達成されていない。それは、一つには試料の複雑性と濃度のダイナミックレンジの広さに起因している³⁾。すなわちトリプシンなどの消化酵素で処理された細胞内プロテオーム試料には、最大 1,000,000 倍の濃度差をもつ 300 万種以上の分析対象ペプチドが含まれており、これらのものは LC で分離されながらタンデム質量分析計に送り込まれ、プロダクトイオンマスマスペクトルが測定されることになる。その際、ペプチド当たりに費やされる時間は通常 1

秒前後しかなく、すべてのペプチドについて、同定に十分な高質のプロダクトイオンスペクトルを取得することは非常に難しい²⁾。

またそもそも質量分析計の検出におけるダイナミックレンジは 1,000~10,000 程度であるので、試料をそのまま液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry: LC/MS/MS) システムに注入しても全プロテオームを検出することは困難である。現状では、さまざまな分画法で前もって試料の複雑性やダイナミックレンジを軽減させた後、LC/MS/MS が行われているが、現在の技術レベルでは上記の問題を根本的に解決するには至っていない³⁾。むしろ、全プロテオームではなく、その一部に焦点を絞ったターゲットプロテオームもしくはフォーカスドプロテオーム解析にプロテオミクス技術は用いられ、細胞内小器官ごとのプロテオームであるオルガネラプロテオーム⁴⁾やタンパク質複合体に焦点を絞ったプロテオーム^{5)~7)}などセミ網羅的解析例が数多く報告されている。本稿では、大規模発現解析に用いられるナノ LC/MS/MS システムについて、筆者が行ってきた主にナノ LC に関する最適化と現状での限界について主に紹介するとともに、全プロテオームを分析するためのさらなる高性能化への展望についても述べたい。

Correspondence to: Yasushi ISHIHAMA, *Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Nipponkoku 403-1, Daihouji, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, JAPAN*, e-mail: y-ishi@ttck.keio.ac.jp

石濱 泰, 慶應義塾大学先端生命科学研究所, 〒997-0017 山形県鶴岡市大宝寺日本国 403-1

2. ナノ LC におけるトラップカラム

LC のマイクロ化を進めていけばカラム体積に比例させて当然試料溶液の注入体積も減らしていかなければならない。しかし数十 nL レベルにまで試料溶液の液量をコントロールしながら濃縮するのは困難であるし、またそのレベルの液を定量的に扱うことはきわめて難しい。幸いなことに、C18 カラムを用いたペプチドのグラジエント分析においては、イソクラティック溶出系で理論的・実験的に要求されているような試料溶液のマイクロ化は必要ではなく、数十 μL の試料溶液でもカラムの先端で十分にトラップ、濃縮することが可能である。しかし現実的には、毎分 $1\ \mu\text{L}$ 以下の流量で数十 μL の試料溶液を注入するとそれだけで数十分から 1 時間かかってしまうことになる。したがって市販のナノ LC システムのほとんどはトラップカラムを利用したカラムスイッチングシステムを採用している。通常、トラップカラムには分析カラムよりも径が大きく、長さが数ミリのものが用いられ、フロールーがそのまま廃液へつながるよう、バルブが設定されているため高流速での試料注入が可能となっている。試料注入後はバルブを切り替え、ナノ LC 用ポンプからのグラジエント溶離液がトラップカラムを経て分析カラムへつながるようにするの

で、トラップカラムでの保持が分析カラムの保持よりも強くないよう注意する必要がある。しかしこのようなトラップカラムシステムは大量の試料溶液を処理する場合には有効であるものの、トラップカラムへのロード時間や、トラップカラムやその周辺のセッティングにかかる死体積のため、必ずしも時間の短縮にはつながらない。Fig. 1 には市販のトラップカラムシステム (システム A) とトラップカラムを用いずに直接分析カラムに注入するシステム (システム B) の比較を示す。分析カラムにはどちらも内径 $100\ \mu\text{m}$ 長さ $15\ \text{cm}$ の C18 シリカカラムを用い、 $5\ \mu\text{L}$ の試料溶液を注入し、流速 $500\ \text{nL}/\text{min}$ で分析を行った。トラップカラムやその周辺のセッティングにかかる死体積のため、システム A はシステム B に比べて $500\ \text{nL}/\text{min}$ の流速下において $10\sim 20$ 分の総分析時間の増加につながっている。また、二つのシステムによる同定結果を比較すると、システム B において 30 分以内に溶出する成分数が、システム A では約 5 分の 1 になっており、親水性の高い成分が分析カラムでうまくトラップされていないことがわかった。もう一つ強調しておきたいことは、システムにおけるコネクタの数である。ナノ LC においてはコネクタの数は増えれば増えるほどそのシステムの安定性は落ちる。流量が非常に少ないので、コネクタ部分から液が

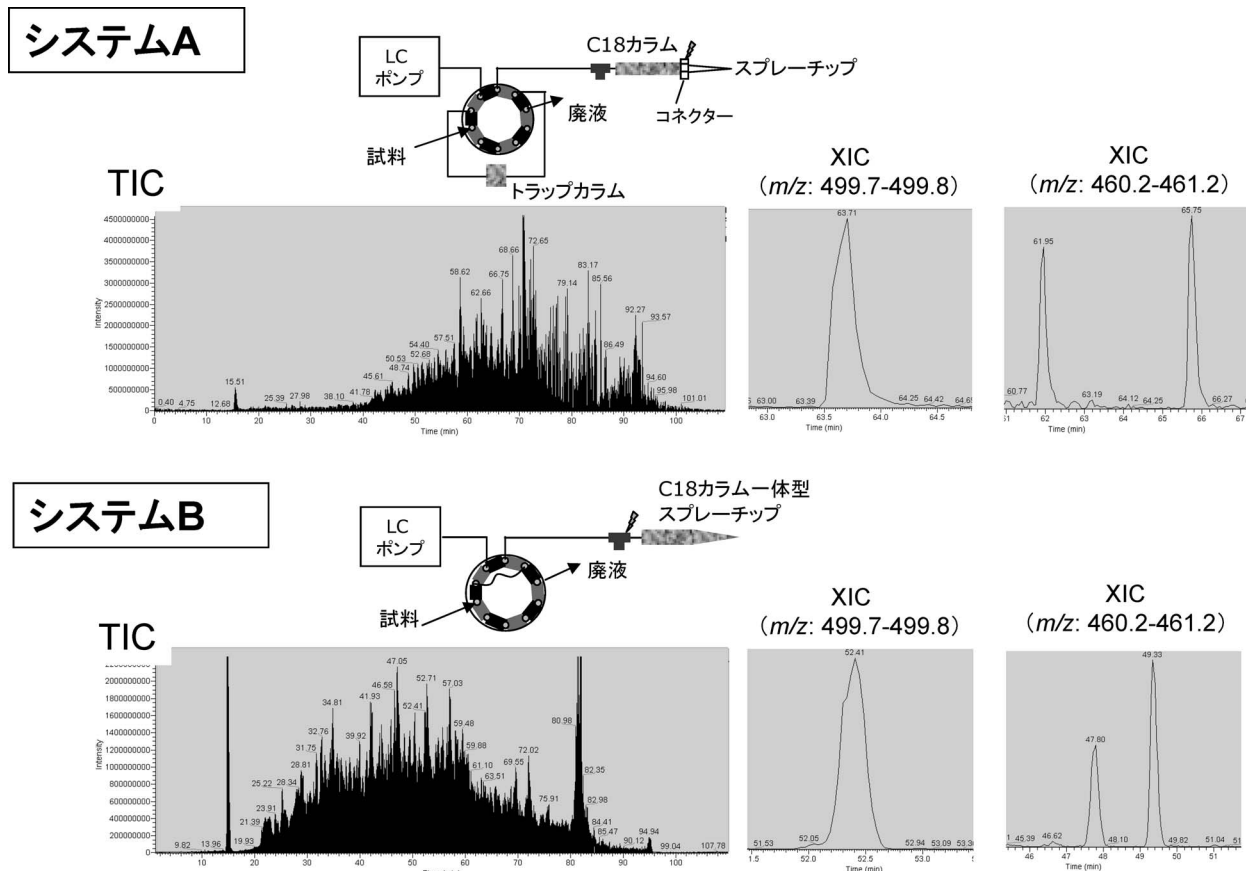


Fig. 1. ナノ LC/MS/MS システムと典型的な分析例

(上段) トラップカラムを用いたシステム (システム A)。 (下段) 直接注入システム (システム B)。 試料: ヒト由来培養細胞 (HCT116) タンパク質 $1\ \mu\text{g}$ のトリプシン消化物, 流速: $500\ \text{nL}/\text{min}$, カラムサイズ: 内径 $100\ \mu\text{m}$, 長さ $150\ \text{mm}$, 充填剤 C18 シリカ ($3\ \mu\text{m}$ 径), 質量分析計: LTQ-Orbitrap (サーモフィッシャー), スキャンレンジ: m/z $300\sim 1,500$, プロダクトイオンスキャン: data dependent top 6 モード。

漏れていても目視でそれに気づくまでには非常に時間がかかり、トラブルシューティングに多大な時間を費やすことになる。また標準タンパク質の混合物を分析している間にはいいが、実際の組織由来のタンパク質などを分析し始めると、トラップカラムでのトラブルがシステム全体の安定性を著しく下げることが筆者の経験上明らかである。これを解決するために、筆者は2001年以来、システムBに代表されるようなトラップカラムレスシステムを用いている^{8)~10)}。しかしトラップカラムを用いず、直接分析カラムに注入する場合には試料は前もって脱塩しクリーンアップし、ある一定量までは濃縮しておく必要がある。当初はZipTipに代表されるピペットチップ型の使い捨て脱塩濃縮チップを用いていたが、組織由来の試料を用いた場合には試料をクリーンアップしきれない場合があったこと、およびローディングキャパシティーや微量試料に対する回収率が悪かったことから、もう少し充填剤の充填密度が高く、クリーンアップ効果の高いものを、ということで、StageTip (stop and go extraction tip) と呼んでいる使い捨てのマイクロ固相抽出チップ (μ -SPE-Tip) を開発した^{11), 12)}。これは3M社のエムポアディスクというテフロン繊維にクロマトグラフィー用充填剤が高密度に充填された膜をピペットチップに埋め込んだもので、従来のもののようにピペッターで試料を行き来させてペプチドをトラップするのではなく、一方向から注入と溶出を行うので、フィルターとしての役割も付加したものである。このStageTipによる前処理と組み合わせることによって、複数の試料溶液を並行処理で数マイクロリットル程度までにあらかじめろ過、濃縮し、分析カラムに直接注入することで、総分析時間の短縮、システムの安定性の著しい向上、試料間のキャリーオーバーの低減化を実現した。

もちろんトラップカラムを詰まらせる実試料中の成分は当然このマイクロ固相抽出チップに対しても、同様に詰まらせる原因となる。しかしマイクロ固相抽出チップの場合は1試料につき1本しか用いないので、複数試料分析による積み重ねがない分、詰まる可能性は低い。また、途中で詰まってしまった場合でも、未注入の液はそのまま他のマイクロ固相抽出チップに移すことが可能であるし、詰まったチップも有機溶媒リッチな溶出液に対しては数マイクロリットルの通液が可能であることがほとんどであるので、回収不可能となることはほぼない。1.5 mLのポリプロピレンチューブの蓋に穴をあけ、StageTipを突き刺せば、そのまま遠心機にかけることができ、最大10,000×g程度までなら適用可能であるので、見かけ上詰まってしまったチップでも、10,000×g、1時間遠心することにより、ほとんどの場合回収が可能となる。LC/MSシステムの安定稼働のためには詰まる原因をこの前処理段階で取り除いておくことが絶対条件であり、ここさえしっかりしていれば、2週間程度の連続運転であれば組織由来の実試料であっても問題なく行うことができるようになった。

もう一つ、我々が工夫している点は、分析カラムである。エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization:

ESI) スプレーニードルと一体化させたフリットレスカラムを自作して用いており¹⁰⁾、やはりスプレーニードル間の接続がないので、システムの安定性に寄与しているだけではなく、Fig. 1からもわかるように、ピーク形状についてもより対称性の高いものが得られている。このカラムもフューズドシリカ管の加工から自作しており、先端径と充填剤径をきちんとコントロールすれば、数カ月は安定して使えるカラムを30分ほどで作製できる¹³⁾。我々の場合は質量分析計の入り口を洗浄するのに合わせて2週間から1カ月に1回は交換するようにしている。なお、StageTipも一体化カラムも現在は市販されている¹⁴⁾。

3. LC条件の最適化

3.1 移動相条件の最適化

プロダクトイオンスペクトルによる同定を効率的に行うためには、通常はプリカーサーイオンを選択するためのスキャン (サーベイスキャン) を行い、そこである一定値以上の強度をもつピークをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行う。その際、一度選ばれたプリカーサーイオンについてはある一定の時間内はプロダクトイオンスキャンを行わないという、動的排除機能を用いたData Dependent Scan または Information Dependent Acquisition (呼び方は質量分析計メーカーによって異なる) と呼ばれる手法がとられる。高質なプロダクトイオンマススペクトルをより効率的に取得するためには、サーベイスキャンサイクルおよびプロダクトイオンスキャンサイクルにどのくらいの時間をかけるか、サーベイスキャン1回当たりに最大何種類のプロダクトイオンスキャンを行うか、プロダクトイオンスキャンを行うためのプリカーサーイオンの最低強度値をいくつに設定するかなどが重要である。それには、それぞれの成分の時間軸に対するピーク幅が密接に関係する。LC分離においては、より細いピーク幅でより多くの成分を分けることが求められるが、この場合には必要以上に鋭敏なピークは、スキャンが間に合わないためにかえってプロダクトイオンマススペクトル取得の効率を低下させることにつながってしまう。ここでは、大腸菌の可溶タンパク質画分 (2,000~3,000種のタンパク質混合物と考えられる) のトリプシン消化物を試料溶液として、移動相のグラジエント溶出の傾きを変えた場合のタンパク質同定効率の変化を示す (Fig. 2)。グラジエント勾配を緩やかにし、分析時間を長くすることでプロダクトイオンマススペクトルの取得数は増加し、それに伴い、同定ペプチド数も増加するが、ある程度のところでその増加が頭打ちになった。これはグラジエント勾配の減少によって個々のピークが広がり、プロダクトイオンマススペクトル取得のための最低強度に達しなくなるピークが増えたため、もしくは十分な量のプロダクトイオンが得られなくなったためと考えられる。ここで試料注入量を増やしても同定数増加にはつながらなかった。これは、試料溶液自体のダイナミックレンジは変化しないため、もともと存在量の多いピークがさらに増大し、イオン化抑制効果を引き起

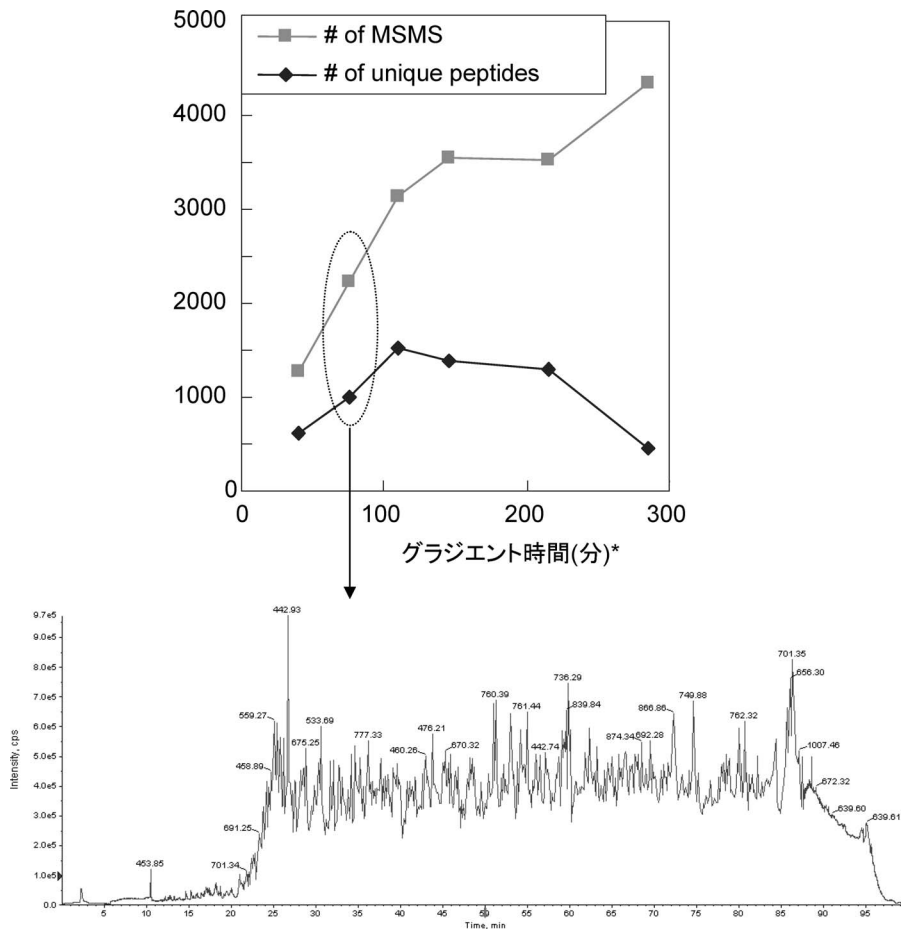


Fig. 2. グラジエント勾配とペプチドの同定効率
 (上段) グラジエント時間*とプロダクトイオンマススペクトルの取得数および同定ペプチド数との関係。(下段) グラジエント時間60分におけるトータルイオンカレントクロマトグラム。試料: 大腸菌タンパク質可溶画分 0.5 μ g のトリプシン消化物, カラム: 内径 100 μ m, 長さ 150 mm, チップ径 6 μ m, 充填剤: Reprosil C18 (3 μ m 径), 流速: 500 nL/min, 移動相 A: 0.5% 酢酸水溶液, 移動相 B: 0.5% 酢酸, 80% アセトニトリル, グラジエントプログラム: B 濃度 5~10% (5 分間), 10~25% (X 分間), 25~100% (5 分間), 100% (10 分間), 5% (20 分間), 質量分析計: QSTAR pulsar i (ABI-Sciex 社), MS scan 350~1,400 (1 s/scan), 4 MSMS scans 85~1,400 (1.5 s/scan).
 * グラジエント時間は上記グラジエントプログラムにおける X に対応.

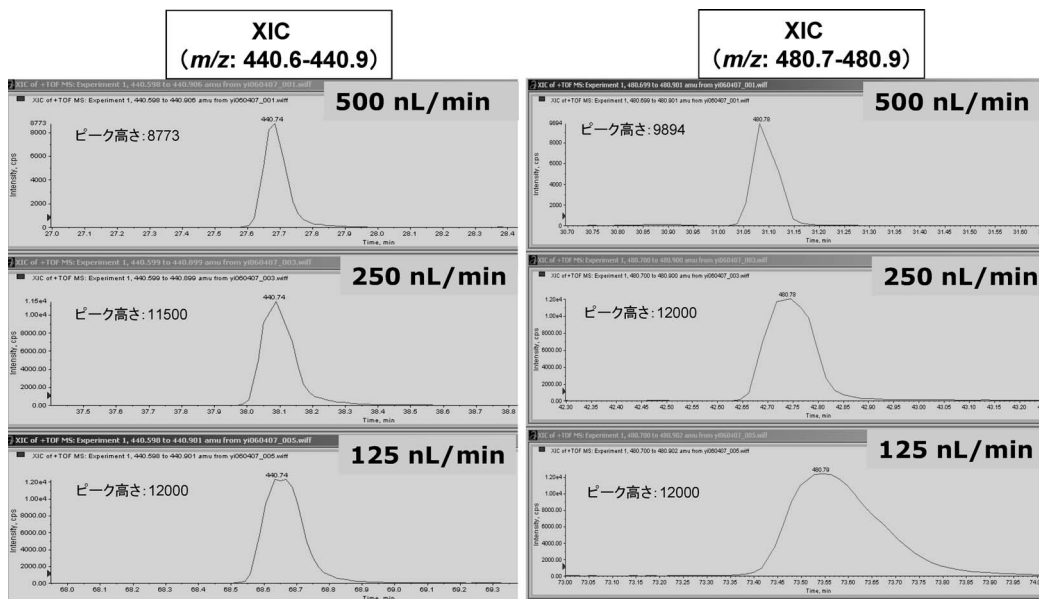


Fig. 3. 流速の感度に対する効果
 試料: ヒト血清アルブミンのトリプシン消化物 50 fmol, 分析条件: グラジエント: B 濃度 5~25% (15 分間), 25~80% (5 分間), 5% (60 分間), 流速: 図中表示. その他の条件は Fig. 2 と同じ.

こしたためと考えられる。またこの影響はイオントラップ型の質量分析計でより顕著であった。この条件下では2時間程度のグラジエント勾配が最も効率がよく、それ以上分析時間を長くしても大幅な性能向上は望めないことがわかった。

3.2 カラム径・流速・粒子径の影響

カラム径とグラジエントプログラムを一定にして、流速を下げると、500 nL/min から 250 nL/min までは感度の向上が認められたが、125 nL/min まで流量を下げるとそれ以上の感度向上は認められなかった (Fig. 3)。次に、線流速を一定にし、カラム径を 150 μm , 100 μm , 75 μm と小さくし、それに対応させて、流速を 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, 450 nL/min, 250 nL/min と下げ、感度の変化を調べたところ、カラム径の減少に従い、明らかな感度の上昇が確認された (Fig. 4)。しかしカラム径を 50 μm 以下にし、流速を 120 nL/min 以下にしても感度の上昇は認められなかつ

た。これは径がマイクロ化するにつれ、カラム充填の不均一性や密度が低下し、マイクロ化による試料ゾーンの濃縮効果がほとんど得られないうえ、この領域では低流速化による感度上昇も頭打ちになっているからと考えられる。このタイプのカラムは 20 μm 径程度のもまでは調製することが可能であるが¹⁰⁾、残念ながらこれ以上のマイクロ化による感度上昇は期待できず、分析時間が長期化するのみであった。

粒子径を小さくすることによるカラム性能の向上を評価するため、5 μm と 3 μm 径の同じブランドの C18 シリカゲルを同じ長さのキャピラリーに充填し、分離効率および感度への影響を検討した。Fig. 5 に示すように、カラム径が小さいほうが確かにピーク幅が減少し、感度の向上が認められた。しかし 3 μm 径の充填剤を 30 cm の長さで充填すると背圧が約 300 bar となり、通常の HPLC (high-performance liquid chromatography) システムでは耐圧

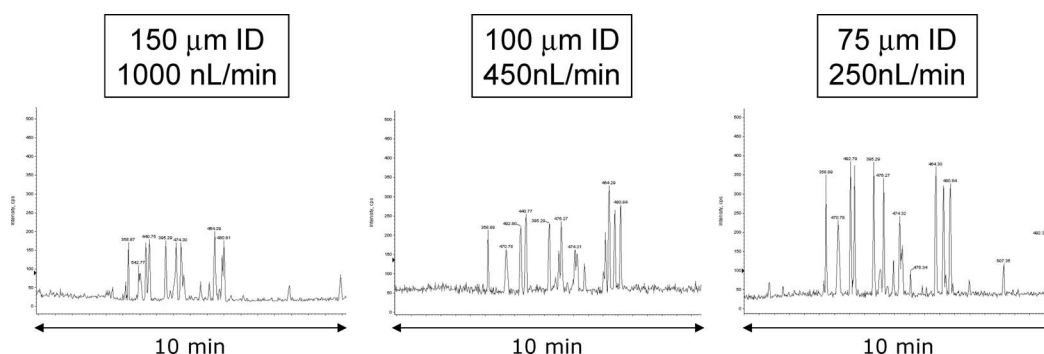


Fig. 4. 一定線流速条件下における異なる径のカラムを用いた LC/MS/MS ベースピーククロマトグラム

試料: ヒト血清アルブミンのトリプシン消化物 20 fmol, 分析条件: グラジエント: B 濃度 5~60% (25 分間), 5% (25 分間). カラムサイズ, 流速は図中表示 (線流速は 3 条件で同じ). その他の条件は Fig. 2 と同じ.

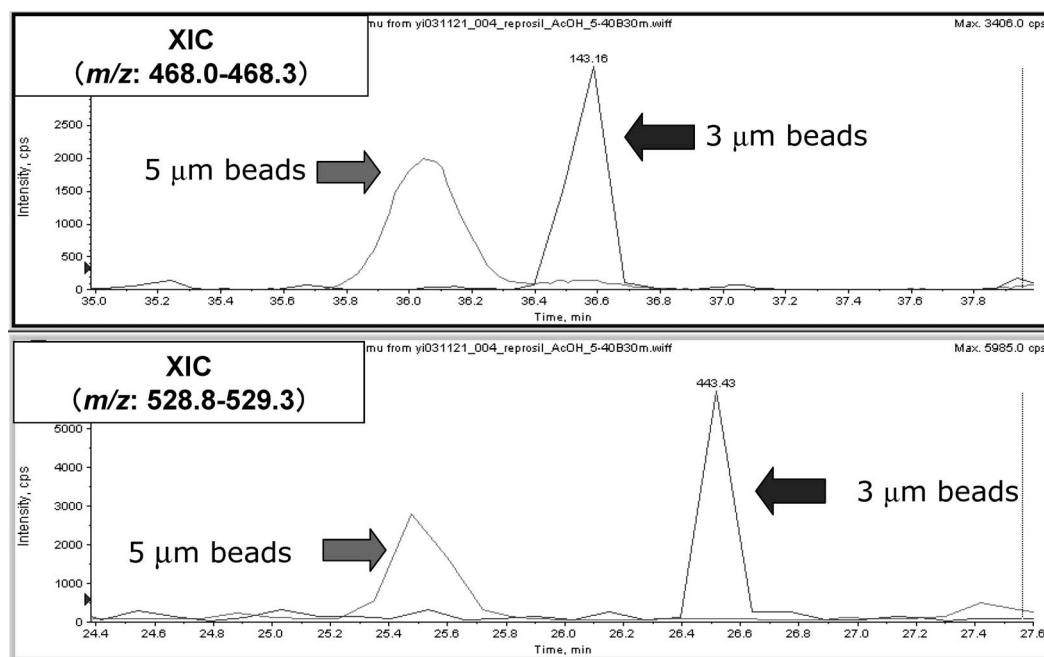


Fig. 5. カラム充填剤径の効果

グラジエント: B 濃度 5~40% (30 分間), 40~80% (10 分間), 5% (20 分間). 充填剤径は図中表示. その他の条件は Fig. 2 と同じ.

限界となってしまう、このシステムでこれ以上充填剤をマイクロ化することは困難であった。さらなる高感度化のためには後述のUPLCやモノリスによる展開が必要であると考える。

4. LC/MS/MSの分析前の分画法について

上述のとおり、プロテオーム試料の複雑性と広いダイナミックレンジの問題をある程度解決するためには、LC/MS/MSの分析の前に分画することは有効な手段である。特にダイナミックレンジの問題を軽減するためにはタンパク質レベルで分画を行うほうがより効果的である²⁾。タンパク質の分離法はいろいろあるが、溶解性の悪いものや塩基性・酸性タンパク質にも使えること、分離力や回収率に大きな欠点がないこと、バラレルで、しかも低コストで行えること、コンタミネーションの可能性が低いことなどを考慮して、筆者は sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を多用している^{9), 15)}。SDS-PAGEで分離後にレーン全体を5~20個に均等にスライス化し、ゲル内消化している。その後のLC/MS/MSによる分析と組み合わせて、筆者らは Gel-enhanced LC/MS, 略して GeLCMS と呼んでいる。もちろんペプチドレベルの分画をゲル内消化後に加えたほうがより効果的であるが、分画数だけトータルの分析時間がかかるので、全体として効率が落ちてしまわないよう、分画数にも注意する必要がある。筆者らの場合は、GeLCMSの

あるスライスを試しに分析してみて、まだ試料量が十分にあり、試料が十分に複雑であったら、ペプチドレベルでさらに3~5分画くらいするようにしている。この分画には、前述のイオン交換モードのStageTipを用いることが多い¹¹⁾。バラレルで処理ができ、コンタミネーションを考慮する必要がないのが大きな魅力である。そのほかには、移動相に少量のイオンペア試薬(トリフルオロ酢酸やヘptaフルオロ酪酸を0.005~0.02%程度)を加え、ペプチドの溶出パターンを変化させたり¹⁵⁾、繰り返し分析の際に前に同定されたものを排除しながら分析を繰り返す方法¹⁶⁾などがあり、これらは分画法というわけではないが、より多くのペプチドを同定するという目的には有用である¹⁵⁾。

数回繰り返し分析ができるくらいの試料量がある場合に、同定の効率を上げる最も効果的な手段は、筆者の経験では違う質量分析計を使うことである。例えば Applied Biosystems社のQSTARとThermo Fisher Scientific社のLTQでは、得意とする *m/z* 領域が違うだけではなく¹⁷⁾、衝突誘起解離 (collision-induced dissociation: CID) パターンも違うことから、同じ試料で、同じLC条件を用いても、同じペプチドを同定する確率を低くすることが可能であるが、これはすべての研究室で可能なわけではないので、一般的ではない。そのほかには、最近市販化された電子移動解離を使う方法¹⁸⁾、MS³まで組み合わせる方法¹⁹⁾などは同定数を増加させたり、同定の信頼性を向上させたりするのに役に立つと考えられる。

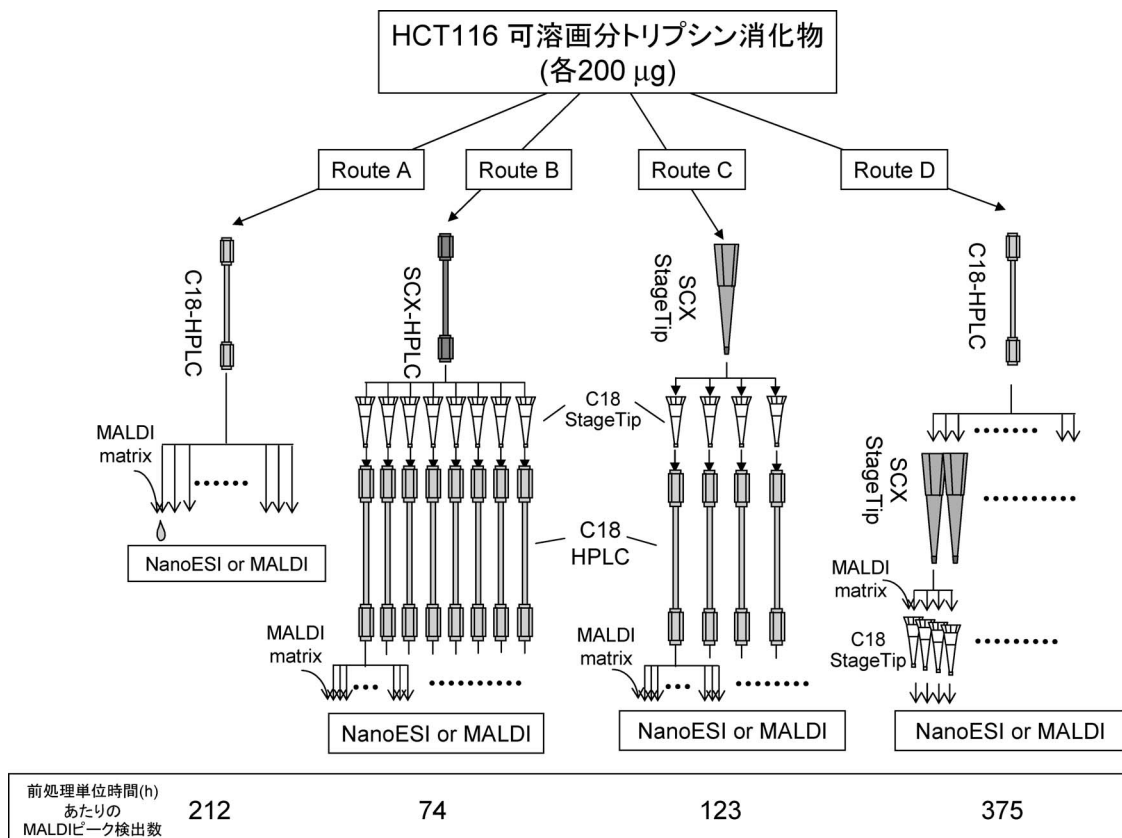


Fig. 6. オフライン2次元LC/MSにおけるLCシステムの比較
分析条件の詳細は文献22参照。

5. オフライン LC/MS/MS

LC と MS をオフライン化し、LC からの溶離液を順にプレート上にスポットし、プロダクトイオンスキャンを行うことは matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) では一般的に行われてきた^{20), 21)}。この方法にはオンラインの LC/electrospray ionization MS/MS (LC/ESI MS/MS) にはないいくつかのメリットがある。すなわち LC におけるピーク幅とは独立に MS の測定に十分時間がかけられ、また再測定も可能である。MS と MS/MS を交互に溶出順に行う必要がないので、より効率的な data-dependent scan が可能となる。ただしトータルの測定時間は LC/ESI MS/MS に比べると、高速パルスレーザーを用いても現実的には 5~10 倍くらい時間がかかる。また MALDI 法のデメリットでもあるが、プリカーサーイオンが 1 価であることがほとんどなので、高エネルギー CID であってもフラグメント効率が悪く、一般的に ESI に比べ定量性が悪いなどの問題がある。さらに、ポストカラム体積が大きいことやスポットの際に分離を損ねる可能性がある。ESI でのオフライン LC/MS の報告例は少ないが、例えば Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS) ではスキャン時間をかければかけるほど感度も精度もあがるので LC と切り離すメリットは大きいと考える。筆者らは、オフライン LC/MS 系のための効率的な分画法を開発し、MALDI MS/MS および nanoESI FTICR MS に適用した²²⁾。これは C18-HPLC で精密に分離した各分画を Multiplex 化したイオン交換 StageTip でさらに同時分画し、単位時間当たりの効率を高めたものである (Fig. 6)。オンラインシステムでは MS に試料を送り込む際にはより細かいゾーンに濃縮する必要があるため、逆相クロマトグラフィーが使われ、分離効率の悪いイオン交換クロマトグラフィーは、その前段階で使う必要があるが、オフライン系の場合はその順序はどちらでもよい。しかし簡単に multiplex 化できるが分離効率は低い StageTip をうまく使うことを考えると、上述のシステム (Fig. 6 ルート D) が最適であった。オンライン LC/MS/MS システムの場合のスキャンサイクルの 5 倍時間をかけてスキャンすることにより、FTICR MS における質量精度は 2 倍向上し、90% 以上の同定ペプチドの質量について、観測値と計算値との差は 1 ppm 以下となった。

6. 質量精度とキャリブレーション

ペプチドの質量の実測値の精度は高ければ高いほど、同定精度は高くなる。特に翻訳後修飾の解析をする場合には、タンパク質同定検索エンジン (例えば Mascot) において、その検索スペースが通常の解析よりも広がってしまうが、質量精度を向上させることで検索スペースを限定できる。質量精度は質量分析計の性能を現す目安の一つとして使われるが、測定条件によって変わるので、どのような条件下での値なのかを見極める必要がある。プロテオーム解

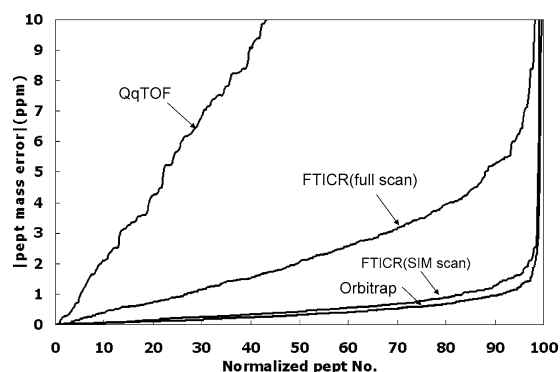


Fig. 7. プロテオーム試料のペプチドの実測質量値の精度を指標とした質量分析計の精度比較プロット
質量分析計: 図中に表示, Q-TOF: QSTAR, FTICR: LTQ-FT, Orbitrap: LTQ-orbitrap (lock mass 機能 on). Mascot 検索後、スコア 50 以上のペプチドのみを採用。その他の条件は Fig. 1 のシステム B と同じ。

析に必要な質量精度値は、キャリブレーションに使う標準品数種についての計算値とのずれとか、数個の標準物質の測定結果から推定されるものではなく、検索エンジンの入力において必要とされる、数百個、数千個のペプチドを測定した際の「最大エラー値」である。最近、提案された論文²³⁾によると、これは distribution of mass deviation をガウス分布でフィットさせた場合の 2σ もしくは 3σ に相当するパラメータで、“maximum mass deviation (MMD)” と定義されている。しかし、上記 distribution of mass deviation は、mass deviation のデータポイントをいくつかでプロットするかで、ずいぶん分布は変わってしまう。そこで、横軸にペプチド数 (全体を 100 として正規化したもの)、縦軸に mass deviation の絶対値をセットし、mass deviation の絶対値を昇順にソートしてプロットしたものをを使うことを推奨したい (Fig. 7)。このプロットであればデータポイントに依存しないし、また、例えば「同定ペプチドの 95% は 2 ppm 以内の精度で測定されている」といった情報は簡単にグラフから読み取ることができる。Fig. 7 には Q-TOF 型、FT-ICR (full scan), FT-ICR (SIM), Orbitrap (w lock mass) の質量精度をこのプロットで評価したものを示す。Orbitrap は最も高い精度でプロテオーム試料を分析できていることがわかる。

実測 m/z 値は、測定後に同定結果から得られる計算 m/z 値を用いて再校正することが可能である。これは室温の変化によって容易に校正値がずれてしまう TOF で非常に有効であり、ヒト感染マラリア *Plasmodium falsiparum* プロテオーム解析でも用いられた⁹⁾。再校正による質量精度の向上は宿主由来のタンパク質とマラリアタンパク質を見分けることに非常に有効であった。

筆者の経験では、測定前に校正値が大きくずれていると、測定後に再校正しても、測定直前に校正したものに比べると、最終的な精度は悪くなる傾向にあるので、測定後に再校正できるからといって、日常の装置校正をおろそかにすべきではない。ESI の場合には必ずポリジメチルシロ

キサンの一連のピークがバックグラウンドに出るので²⁴⁾, 我々は LC/MS の連続運転の前には必ずポリジメチルシロキサンピークを用いて m/z 値校正を行うことにしている. LC/MS の測定直前に装置のセッティングを変えることなしに 1, 2 分で行うことができるので非常に便利である. ただし, 文献 24 の記載計算値は間違っているので注意されたい.

7. 今後の展望

以上, プロテオーム解析のための LC/MS システムについて, 筆者の検討してきた最適化の過程についてまとめた. 最後に, 今後の展望について述べる.

ハイブリッド Q-TOF 型, IT-TOF 型, LIT-FTICR 型, LIT-Orbitrap 型などが登場したことによって, ここ数年で質量分析計は大きく性能が向上し, 高速スキャンやより広いダイナミックレンジ, 高い質量精度などを実現している. 一方, LC 側では UPLC やモノリス型のカラムなど新しい技術がでてきているものの, その性能はまだまだ質量分析計に追いついていない. UPLC はペプチドのグラジエント分析ということに限れば, 今までのシステムにおいて 10 分程度グラジエント勾配を緩やかにした程度の効果しか得られていないし²⁵⁾, モノリスカラムについても高速分離系への適用が先行したためか, プロテオミクス nanoLC/MS に適用した例はわずかであり²⁶⁾, 筆者の試した限りでは現状では充填剤カラムのほうが同定効率が良い. 一方で充填剤タイプの HPLC 用カラムのマイクロ化は限界にきており, サブミクロン充填剤相当の骨格をもったモノリスでの分離の向上が期待される. またインターフェイス付近での工夫によるさらなる高感度化も期待できる. いずれにせよ, 全プロテオームの解析という目的にはまだまだあらゆる部分での技術開発が必要とされているが, その一方ですでに現状の技術を用いた生命科学への応用研究もどんどんされている. 今後もこの分野は技術革新と生命科学への応用という両輪でバランスをとりながら, ますまです発展していくと思われる.

文 献

- 1) R. Aebersold and M. Mann, *Nature*, **422**, 198 (2003).
- 2) Y. Ishihama, *J. Chromatogr. A*, **1067**, 73 (2005).
- 3) L. M. de Godoy, J. V. Olsen, G. A. de Souza, G. Li, P. Mortensen, and M. Mann, *Genome Biol.*, **7**, R50 (2006).
- 4) J. S. Andersen and M. Mann, *EMBO Rep.*, **7**, 874 (2006).
- 5) A. C. Gavin, *et al.*, *Nature*, **415**, 141 (2002).
- 6) Y. Ho, *et al.*, *Nature*, **415**, 180 (2002).
- 7) Z. Zhou, L. J. Licklider, S. P. Gygi, and R. Reed, *Nature*, **419**, 182 (2002).
- 8) Y. Ishihama, T. Sato, T. Tabata, N. Miyamoto, K. Sagane, T. Nagasu, and Y. Oda, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 617 (2005).
- 9) E. Lasonder, Y. Ishihama, J. S. Andersen, A. M. Vermunt, A. Pain, R. W. Sauerwein, W. M. Eling, N. Hall, A. P. Waters, H. G. Stunnenberg, and M. Mann, *Nature*, **419**, 537 (2002).
- 10) Y. Ishihama, J. Rappsilber, J. S. Andersen, and M. Mann, *J. Chromatogr. A*, **979**, 233 (2002).
- 11) Y. Ishihama, J. Rappsilber, and M. Mann, *J. Proteome Res.*, **5**, 988 (2006).
- 12) J. Rappsilber, Y. Ishihama, and M. Mann, *Anal. Chem.*, **75**, 663 (2003).
- 13) 石濱 泰, “できマス! プロテオミクス 質量分析によるタンパク質解析のコツ”, 小田吉哉, 夏目 徹編, 中山書店, 東京 (2004), p. 57.
- 14) URL: <<http://www.nikkyo-tec.co.jp>>
- 15) M. J. Kerner, D. J. Naylor, Y. Ishihama, T. Maier, H. C. Chang, A. P. Stines, C. Georgopoulos, D. Frishman, M. Hayer-Hartl, M. Mann, and F. U. Hartl, *Cell*, **122**, 209 (2005).
- 16) D. B. Kristensen, J. C. Brond, P. A. Nielsen, J. R. Andersen, O. T. Sorensen, V. Jorgensen, K. Budin, J. Matthiesen, P. Venø, H. M. Jespersen, C. H. Ahrens, S. Schandorff, P. T. Ruhoff, J. R. Wisniewski, K. L. Bennett, and A. V. Podtelejnikov, *Mol Cell Proteomics*, **3**, 1023 (2004).
- 17) 石濱 泰, “できマス! プロテオミクス質量分析によるタンパク質解析のコツ”, 小田吉哉, 夏目 徹編, 中山書店, 東京 (2004), p. 93.
- 18) J. E. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, and D. F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9528 (2004).
- 19) J. V. Olsen and M. Mann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13417 (2004).
- 20) H. Lee, T. J. Griffin, S. P. Gygi, B. Rist, and R. Aebersold, *Anal. Chem.*, **74**, 4353 (2002).
- 21) S. J. Hattan, J. Marchese, N. Khainovski, S. Martin, and P. Juhasz, *J. Proteome Res.*, **4**, 1931 (2005).
- 22) H. Saito, Y. Oda, T. Sato, J. Kuromitsu, and Y. Ishihama, *J. Proteome Res.*, **5**, 1803 (2006).
- 23) R. Zubarev and M. Mann, *Mol Cell Proteomics*, in press, M600380MCP200 (2006).
- 24) A. Schlosser and R. Volkmer-Engert, *J. Mass Spectrom.*, **38**, 523 (2003).
- 25) J. Finch, H. Liu, K. Fadgen, G. Gerhardt, J. Murphy, and J. Gebler, *54th ASMS conference*, Seattle, WA, USA (2006), p. A062113.
- 26) Q. Luo, K. Tang, F. Yang, A. Elias, Y. Shen, R. J. Moore, R. Zhao, K. K. Hixson, S. S. Rossie, and R. D. Smith, *J. Proteome Res.*, **5**, 1091 (2006).

Keywords: NanoLC-MS, Proteomics, LC fractionation, LC optimization, Mass accuracy