

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26888021

研究課題名(和文)迅速プロテオミクス分析のための並列化CE-MSシステムの開発

研究課題名(英文)High-Throughput Proteome Analysis by Parallel CE-MS System

研究代表者

川井 隆之(KAWAI, Takayuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：60738962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドを効率的に濃縮する手法として、large-volume sample stacking法とtransient isotachopheresis法を融合したところ、分離能をそこなうことなく最大1000倍程度の高感度化を実現した。また並列化CE-MSについては500nL/min以下と流量が少なければ少ないほど高密度な並列化が容易になることが示唆されたため、低流量を実現可能なシーレス型のCE-MSシステム構築した。内径5 μ mのキャピラリーを壁厚5 μ m程度までフッ酸でエッチングすることで、約250 pL/minの超低流量で良好なESIシグナルを得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：For efficient peptide enrichment, large-volume sample stacking and transient isotachopheresis were combined. Up to 1000-fold sensitivity increase was achieved without losing separation performance. As for the parallel CE-MS, lower flow rate than 500 nL/min is required, so that 250 pL/min ultra-low flow rate CE-MS system with good ESI signal was achieved by fabricating 5 μ m ID capillary to 15 μ m OD with HF etching.

研究分野：分析化学

キーワード：キャピラリー電気泳動 質量分析

1. 研究開始当初の背景

試料中の全タンパク質をトリプシンなどでペプチドに消化し、液体クロマトグラフィー (LC)-質量分析 (MS) などの高性能分析法を用いて解析するショットガンプロテオミクス法は強力なタンパク質解析法であり、細胞や組織の機能的特性を解析する上で重要な技術である (例: iPS 細胞の評価, *J. Proteome Res.*, 2013, 12, 214)。

高性能プロテオミクスを実現するためには、検出感度の向上とイオンサプレッション*の防止が重要である (*混合試料をイオン化する際、イオン化しやすい試料がしにくい試料のイオン化を妨害する現象)。イオンサプレッションを防止するためには膨大な種類のペプチドを効率的に分離する必要があるため、一般的に強陽イオン交換 (SCX) カラムなどで分画した試料を LC で分離する二次元分析を行う。しかし分析に通常3日以上を要し (例: 24画分×2時間分析×3回繰り返し)、高価な MS 機器を長時間占有するため分析コストが極めて高く (受託解析で数十万円/試料)、予算を潤沢に有する研究グループ以外の利用は困難である。また装置を保有していても解析に時間がかかるため、数時間おきの経時変化を調べるような多試料分析は難しい。従ってプロテオミクスにおいて分析時間短縮は喫緊の課題である。

一方で近年、キャピラリー電気泳動法 (CE) は LC-MS に代わる高速・省試料な次世代プロテオミクス分析法としても注目されており、前分画無しの CE-MS により大腸菌一細胞程度の微量試料を 30 分程度で分析した例などが報告されている (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 13661)。しかし高等生物由来の複雑試料では二次元分離が必要なため、LC-MS のように各画分を順次分析する方式では時間短縮できず、また濃度感度も低い実用的でないと考えられてきた。しかし感度は申請者の培ってきた試料濃縮技術によって簡単に改善可能であり、また1つの電源に対して複数のキャピラリーを並列に結合するだけで複数画分を同時に分離できるため、総分析時間の短縮も容易である (例: 初代 DNA シーケンサー)。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究の目的は、分画した複数試料を並列化 CE で同時に濃縮・分離し、1つの MS で迅速かつ高感度に解析する次世代プロテオミクス分析法の実現とする。

3. 研究の方法

目的達成のためには、単純に CE と MS を接続すれば良いわけではなく、イオンサプレッションを起こさず CE をどのレベルまで集積・並列化できるか見極めることが不可欠であり、(1) キャピラリー並列化による CE-MS の高速化、を最初に検討し、次に前項で最適化した条件に基づくシステムの実装のため

に、(2) 試料濃縮法による CE-MS の高感度化を行い、最後に、(3) モデル生物試料のプロテオミクス解析を通じた性能評価を行う。以上3点を研究課題とする。

(1)ではまず電気泳動を行わずインフュージョンで MS 検出を行い、並列キャピラリーを利用する際の最適なイオン化条件 (キャピラリー位置関係、流量、溶媒種類等) を決定する。続いて実際に2つ以上の CE を並列化した分析装置を作製し、ペプチド分析を行って解析性能が低下しないことを確認する。(2)では逆相カラムによる前分画および試料濃縮法の最適化を行い、並列化 CE-MS 装置を動かす分析プロトコルを決定する。(3)では大腸菌溶解液をモデル試料としてプロテオミクス解析を行い、従来の LC-MS と性能を比較する。

4. 研究成果

まずイオンソースと MS との結合条件の最適化を行った。石英キャピラリーを CO₂ レーザーで引き延ばすことで先端径 10 μ m 程度の nanoESI エミッターを加工し、ウシ血清アルブミンのトリプシン消化物ペプチドを試料としてモニタリングした。nanoESI エミッターはマグネット固定型 XYZ ステージで MS 本体に固定し、シリンジポンプを用いて流量や電圧などの最適化を行ったところ、50 zmol 程度の BSA トリプシン消化物を検出することに成功した (図 1)。続いて並列化 CE-MS 条件についてソースと MS 装置との距離、角度、流速、溶媒の種類、試料などのパラメーターの最適化を行ったところ、総流量 500 nL/min 以下程度で感度を低下させずに試料を検出できることが示唆された。

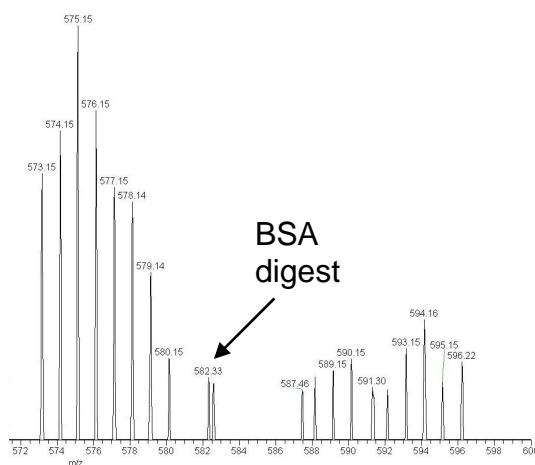


図 1. 350 zmol の BSA トリプシン消化物の nanoESI-MS 分析。

続いて CE-UV 分析条件において、申請者がノウハウを持つ large-volume sample stacking (LVSS) 法 (*Anal. Chem.* 2010, 82, 6504) と Dynamic pH junction 法 (*Anal. Chem.* 2000, 72, 1242) を組み合わせた新規濃縮法に

について検討した。結論として、様々な pH、気伝導度条件の泳動液・試料マトリクスを試用したが、100 倍以上の良好なペプチド濃縮を実現することはできなかった。そこで、既にペプチド分析で実績のある transient isotachopheresis (tITP) 法(*Electrophoresis*, **2008**, 29, 1565) に注目し、LVSS と融合を試みたところ、分離能をそこなうことなく最大 1000 倍程度の高感度化を実現できることがわかった (図 2)。また高塩濃度の試料マトリクスを許容できるため、強陽イオン交換クロマトグラフィーによる試料前処理との相性も良いことが示唆された。本法では分析開始時にキャピラリーの MS 側末端部へ液滴を付着させることで通常の CE と同様に濃縮が可能であり、アミノ酸・ペプチド・糖鎖・核酸・タンパク質などの分析に利用できることを確認した。

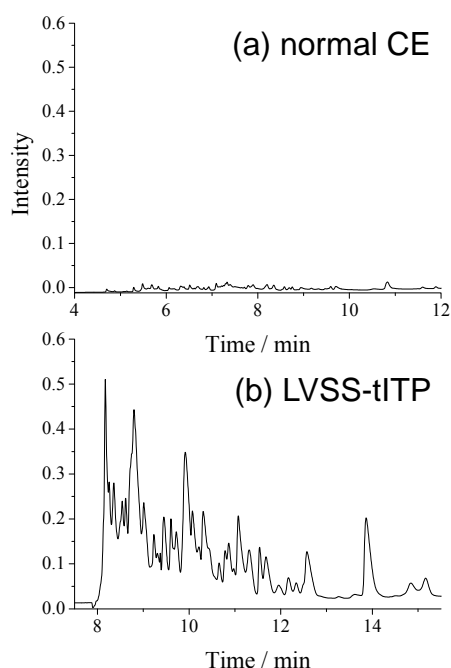


図 2. LVSS-tITP 法による BSA トリプシン消化物の濃縮。試料濃度 (a) 100 ppm, (b) 10 ppm。

CE-MS については昨年度に引き続き、並列化に最適なエレクトロスプレーイオン化 (ESI) の最適化を行った。昨年度の研究により、流量が少なければ少ないほど高密度な並列化が容易になることが示唆されたため、低流量を実現可能なシースレス型の CE-MS システム構築した。内径 5 μm のキャピラリーを壁厚 5 μm 程度までフッ酸でエッチングすることで、約 250 pL/min の超低流量で良好な ESI シグナルを得ることに成功した。またシースレス型 CE に三連四重極型の質量分析計を接続し、MS/MS 分析を行うことでモデル試料である Angiotensin II の 500 pM の検出を実現した。2015 年度の研究室移転により研究が

遅延した影響で、並列化にまで至らなかったが、今後本研究コンセプトの実用化に向けてさらに研究を推進する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Takayuki Kawai, Hiroyuki Moriguchi, Yo Tanaka, “Simple valves on a PDMS microchip bonded via patterned oxygen plasma” *IEEE Transducers*, **2015**, 18, 1782-1785 [査読有り]

Takuya Kubo, Koichi Kanemori, Risa Kusumoto, Takayuki Kawai, Kenji Sueyoshi, Toyohiro Naito, Koji Otsuka, “Simple and effective label-free capillary electrophoretic analysis of sugars by complexation using quinoline boronic acids” *Analytical Chemistry*, **2015**, 87, 5068-5073 [査読有り]

Hiroyuki Moriguchi, Takayuki Kawai, Yo Tanaka, “Simple bilayer on-chip valves using reversible sealability of PDMS” *RSC Advances*, **2015**, 5, 5237-5243 [査読有り]

〔学会発表〕(計 6 件)

Takayuki Kawai, “High performance CE-MS system for single cell analysis” 32nd International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis (MSB 2016), 2016 年 4 月 4 日, [招待有り]

川井 隆之, “ミクروسケール空間を利用した高性能バイオ分析法の開発” 2015 年度 上智大学物質生命理工学科コロキウム, 2016 年 1 月 18 日 [招待有り]

川井 隆之, “キャピラリー電気泳動を用いた高感度一細胞分析法の開発” 第 35 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2015 年 11 月 5 日 [招待有り]

川井 隆之, “オンライン試料濃縮法を利用した微量生体試料の CE 分析” 第 66 回日本電気泳動学会総会 2015 年 9 月 5 日, [招待有り]

Takayuki Kawai, “Ultra-sensitive capillary electrophoresis for single cell analysis” International Conference and Expo on Separation Techniques 2015, 2015 年 8 月 12 日 [招待有り]

Takayuki Kawai, “Sensitive and Flexible Single-Cell Analysis via Capillary Electrophoresis Coupled with an Online Sample Preconcentration Method” 1st Caparica Christmas Conference on Sample Treatment (Sample Treatment 2014), 2014 年 12 月 10 日 [招待有り]

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.qbic.riken.jp/ibd/jpn/>

6．研究組織

(1) 研究代表者

川井 隆之（KAWAI, Takayuki）

理化学研究所 生命システム研究センター

基礎科学特別研究員

研究者番号：60738962

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし