

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02763

研究課題名(和文) 周波数分割多重化LC-MS/MSによるラベルフリーディファレンシャル解析の迅速化

研究課題名(英文) Development of Frequency Division Multiplex HPLC-MS/MS for High Performance Label Free Differential Analysis

研究代表者

北川 慎也 (Kitagawa, Shinya)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50335080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、6並列導入分析が可能である質量分析システムの開発に成功し、適切な内部標準物質を用いることで定量比較を高い精度で行うことが可能であることを実証した。また、周波数分割多重化MS法をMS/MS測定、および、通常のMS測定と衝突誘起解離を伴うMS測定を交互に繰り返す交互測定モードへの拡張が可能であることを実証した。すなわち、6LC-1MS/MSにおける定量比較が可能であることを示すことに成功した。さらに、6並列LC分析を行うための試料注入・送液システムの検討、イオン化効率・試料導入効率の安定化を目的としたLCのミクロスケール化、交互測定モードの信号処理の迅速化法についても開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オミクス解析では、疾患の有無などのサンプル群間における化合物量(タンパク質発現量など)の差異を明らかにするディファレンシャル解析(定量比較解析)が必須である。近年、液体クロマトグラフと質量分析器(MS/MS)を用いるディファレンシャル解析の重要性は増大しておりその高効率化が求められているが、本研究はこれに貢献するものである。また、本研究の根幹は並列導入型MS/MSであるため、MS(/MS)を用いるすべての分析(臨床分析、環境分析、生体分析など)の高効率化に貢献できる。MS(/MS)が必要とされる大規模調査の高効率化・低コスト化にも貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully developed a multiplex mass spectrometry system capable of six samples, and demonstrated that quantitative differential analysis can be made with high accuracy by using suitable internal standards. We also demonstrated that the frequency division multiplex MS method can be expanded to MS/MS measurements and to an alternating measurement mode in which MS measurements with and without collision induced decay are performed alternately. That is, we succeeded in demonstrating that quantitative comparison in 6LC-1MS/MS is possible. In addition, we also investigated on a sample injection system and a pump system for 6-parallel LC analysis, a micro-scale LC system to improve the stabilities of ionization efficiency and ion introduction efficiency, and a procedure for high performance signal processing in the alternating measurement mode.

研究分野：分析化学

キーワード：質量分析 液体クロマトグラフィー ラベルフリー ディファレンシャル解析 周波数分割多重化 並列分析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

オミクス解析では、タンパク質や代謝物の網羅的な同定が行われるだけでなく、疾患の有無などのサンプル群間における化合物量(タンパク質発現量など)の差異を明らかにするディファレンシャル解析(定量比較解析)が必須である。近年の液体クロマトグラフ(LC)および質量分析器(MS)の発展、および、解析ソフトの充実は著しく、LC-タンデム型質量分析法(LC-MS/MS)を用いるディファレンシャル解析の重要性は増大している。

ディファレンシャル解析では、複数のサンプル群の比較を行う必要があるため、比較・解析の前段階である「測定」に膨大な時間が必要となる。例えば、一般的なLC-MS/MSによるタンパク質分解ペプチド群の網羅的分析には100分程度の時間がかかるため、健常者群と疾患患者群の統計解析を行うために、それぞれ $n = 3$ で測定を行うだけでも600分超の測定時間が必要になる(図1A)。また、LCで精密分離を行う場合は「測定」に要する時間はさらに膨大になる。

一方、MSでは同位体を区別することができることを利用し、1台のLC-MS(/MS)で複数のサンプルを同時に分析する方法も開発されている。例えば、 $-CH_3$ でラベル化されたサンプルと重水素で置換された $-CD_3$ でラベル化されたサンプルを用意し、その混合物をLC-MS(/MS)で分析すると、同一化合物は同一の溶出時間に観測されるが、質量数の違い($\Delta m/z=3$)によりMSでは区別され、両者の同時分析が可能になる(図1B)。プロテオミクスではLC-MS/MS分析用の、最大10個までのサンプルの並列分析が可能なラベル化試薬が市販されている。

しかしながら、ラベル化反応は煩雑であり、また、試薬も安価ではない。そのため「ラベルフリー法でのディファレンシャル解析」の重要性が増している。しかし、上述の通りラベルフリー法では、サンプルごとにLC-MS/MS測定が必要であり、迅速な解析が困難であるという問題点がある。最も簡単な解決法は、複数台のLC-MS/MSを用いた並列分析であるが、MS/MSは高価であり、コスト面から現実的ではない。

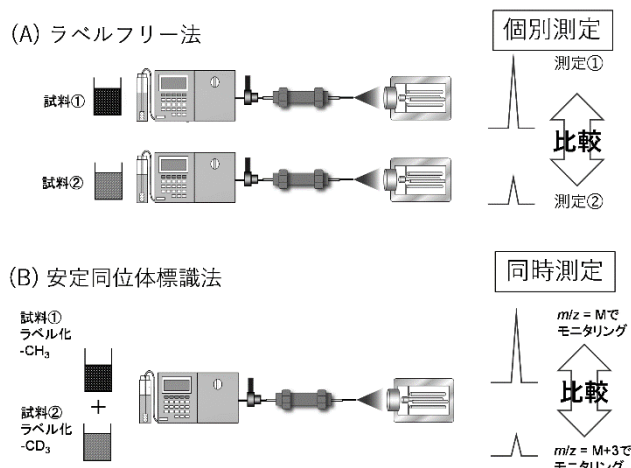


図1 ラベルフリー法および安定同位体標識法による定量比較

2. 研究の目的

上述の通り、LC-MS/MS分析の並列化を実現することができれば、ディファレンシャル解析の迅速化に貢献することができる。本研究では、当研究室で開発中の「多重通信技術である周波数分割多重化法を応用した並列LC-MS分析法」をさらに発展させることで、「ラベルフリー法での迅速なディファレンシャル解析」すなわち「ラベルフリー法でのLC-MS/MS分析の並列化」が可能であると確信し、本研究を立案した。

当研究室で、現在開発中の「周波数分割多重化LC-MS」の原理を図2に示した。開発中の装置は1台のMSと複数台のLC(図2では3台)から成り立つ。複数の試料は、並列的かつ同時にLCで分離されMSに導入される。そのため、MSでは複数のクロマトグラムが混合されたデータが観測される。単純にMSに並列導入するだけでは混合したクロマトグラムがMSで観測されるだけであるが、MS導入時にLCごとに固有の周波数で変調を行うことで、混合クロマトグラムをフーリエ変換することにより得られるパワースペクトル(周波数空間)で信号分離することが可能となる。分離抽出した信号を逆フーリエ変換することで、個別のマスクロマトグラムを得ることが可能である。我々は、すでに2台のLCと1台のMSを組み合わせた2LC-1MSの開発に成功している(Analyst,

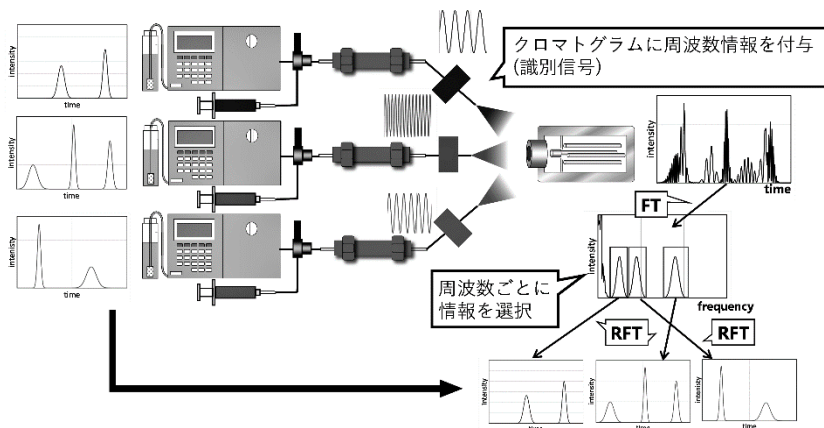


図2 周波数分割多重化法を用いた並列導入型LC-MSの概略

2019, 114, 2922-2928)。なお、提案する方法は「安定同位体」ではなく「周波数情報」でサンプルのラベル化を行う並列分析手法とみなすことができる。

本研究では、開発中の方法を(1) 並列分離を行う LC 数の増大し、さらに(2) MS/MS への拡張、(3) 定量性に関する信頼性の向上を図ることで、ラベルフリー法での迅速なディファレンシャル解析を実現するための並列 LC-MS/MS 分析法の確立を目指す。

3. 研究の方法

統計的に二群間の差異を解析するには、最低でも各群において $n = 3$ で測定、すなわち 6 サンプルの測定を行うことが望ましい。そこで本申請では、6 サンプルの同時分析、すなわち 6 並列 LC-MS/MS 手法 (6LC-1MS/MS) の開発を目的とする。

上述の通り、既に 2 系統の同時分析法については開発済みであり、論文発表を行っている。また、別途 4 系統の同時分析法についても一定の成果が得られている。そこで本研究では、(1) 4 系統の同時分析法を確立させるとともに、その 6 並列分析システムへの拡張、(2) MS 測定から MS/MS 測定への本法の拡張が可能であることの実証、(3) ディファレンシャル解析に重要な定量性能の向上を目的として検討を行った。

4. 研究成果

(1) 6 並列分析システムの開発

2 系統同時分析では Y 字型のインターフェイスを自作し測定を行った。Y 字型インターフェイスの 2 つの試料導入口側には、それぞれ円筒状の電極 (イオンゲート) が設置されており、このイオンゲートに異なる周波数の電圧を印加することで、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 源から放出されたイオンの導入を阻害し、周波数空間で信号分離を行うための識別信号を付与 (変調) を行うことが可能にしている。4 系統分析への適用として図 3 に示す 4-1 型インターフェイスを自作し、その性能の検討を行った。4 系統の電極に対して、それぞれ、0.3/0.5/0.7/1.0 Hz, 3/6/13/15 Hz, 10/20/30/40 Hz の電圧を印加し変調を行ったところ、いずれの周波数の組み合わせでも、得られたデータのフーリエ変換により得られたパワースペクトル (周波数空間) 上で信号分離

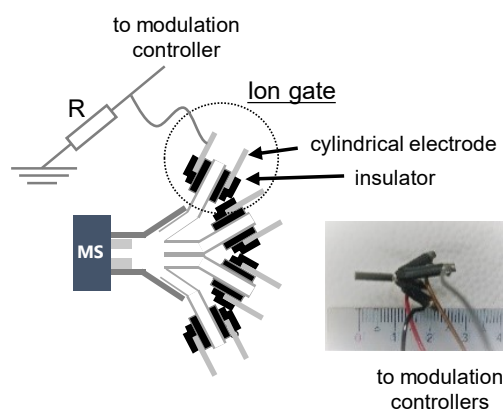


図 3 自作の 4-1 型インターフェイス

を行うことに成功した。しかしながら、40 Hz での変調については、パワースペクトルに予期せぬ複数の信号を与えることが分かった。これは MS のサンプリングレートである 160 Hz が 40 Hz の変調に対応するには不十分であるためであることが分かった。利用できる変調周波数に上限があることが示されたが、この問題に抵触しない場合は 4 系統同時導入が周波数空間上で、明確に信号分離することが可能であることが示された。

次に 6 系統同時分析のためのインターフェイスの作成を行った。自作の 6-1 型インターフェイスを用いて検討を行ったところ、2 つの導入口からは試料導入が確認できたが、残り 4 つの試料入口からの試料導入は確認できなかった。詳細な検討を行ったところ、自作のインターフェイスでは、工作精度が不十分であり、試料導入を適切に行うことが難しいことが明らかとなった。この問題を解決するため、新たに 3D プリンタを用いて 6-1 型インターフェイスの作成を行った。3D プリンタにより作成した 6-1 型インターフェイスの中心部を図 4 に示した。また、別途 EIS 源を固定するためのパーツも適宜設計を行い、3D プリンタで作成した。



図 4 3D プリンタで作成した 6-1 型インターフェイスの心臓部

作成した 6-1 型インターフェイスを用いて、並列導入を行ったところ(1)一つの ESI 源から放出されたイオンが複数の導入口へ導入されることにより生じる干渉 (inlet-inlet 干渉) と、(2) ESI に印加した電圧が隣接する ESI に影響を与える干渉 (ESI-ESI 干渉) が発生することが明らかとなった。そのため、イオンゲートのデザインを再考し、新たに設計を行った 6-1 型インターフェイスの作成を行った。新しい 6-1 型インターフェイスを用い、3, 6, 10, 13, 16, 20 Hz での変調を行い、得られた結果を解析した結果、新インターフェイスでは干渉が抑制されていることが確認された。

6 つの ESI 源を用いフローインジェクションモードで 6 並列導入をおこなった。イオンゲートには 3, 6, 10, 13, 16, 20 Hz の周波数で電圧印加を行ったところ、周波数空間中で信号分離を完全に行うことに成功した。分離された信号を抽出し逆フーリエ変換を行ったところ、それぞれの ESI から導入されているフローインジェクションプロファイル (ピーク形状) を復元することに

成功した。すなわち、6 並列導入・信号分離・信号復元を 6-1 型インターフェイスでも行うことに成功した。

(2) MS/MS への展開

提案する並列導入型 MS を MS/MS に展開は、2 並列導入型システムを用いて行った。2 並列導入を行うために Y 字型 (2-1 型) インターフェイスを新たに設計し、3D プリンタで作成した。まずは、MS 測定を用いてイオンゲートが機能するかどうかを確認取ったところ、2.0, 4.0 Hz の印加において周波数空間での信号分離・信号抽出・復元が問題なく復元することが可能であることを確認した。次に、試料としてロイシンエンケファリンを用いて、MS/MS 測定への展開を試みた。まずは、1 系統導入モードにおいて四重極 MS で、プレカーサーイオンとして m/z 556 を通過させたのちに 16 V の電圧で衝突誘起解離 (CID) を起こし、後段の飛行時間型質量分析系で測定を行った。その結果、プロダクトイオンとして m/z 425, 397, 278 のフラグメントイオンが観測された。イオンゲートに 0.37 Hz の周波数を有する電圧を印加した際に得られたデータについて、

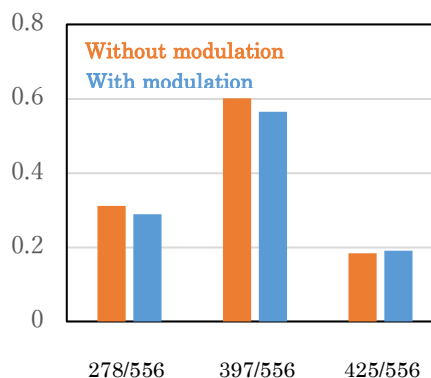


図 5 変調周波数印加時と非印加時の MS/MS スペクトルの相対信号強度比

フーリエ変換処理を行ったところ、パワースペクトル上に 0.37 Hz のシグナルが観測された。すなわち、MS/MS 測定においても問題なく識別信号が付与されていることが確認された。更に、イオンゲートに周波数を印加条件と非印加条件における CID 後の相対フラグメント強度を比較したところ、図 5 に示されるように、両者に大きな違いはなかった。また、0.37 Hz と 0.17 Hz で識別信号を付与し二並列分析により得られた情報を解析したところ、 m/z 556, 425, 397, 278 のすべてのシグナルに対して、0.37 Hz と 0.17 Hz の周波数情報が付与されていることが示された。以上このことから、提案する方法が MS/MS にも適用可能であることが示された。

さらに通常の MS/MS モードの他に、近年利用が進んでいる、通常の MS 測定と CID により得られたフラグメントイオンの MS 測定を交互に繰り返す測定モード (交互測定モード) への展開についても検討を行った。ウシ血清アルブミンのトリプシン分解ペプチドを LC-MS/MS 分析を行ったところ、観測されるペプチドフラグメント種は、識別信号付与の有無により違いが生じることはなかった。並列導入型 MS が交互測定モードにも展開することが可能であることが確認された。

(3) 定量性能向上に関する検討

ディファレンシャル解析を行う際には定量性の担保が重要となる。並列導入型システムにおける定量性の評価を、6 並列導入型並列導入型 MS を用いておこなった。なお、識別信号としては 2, 5.2, 9.2, 11.6, 16.4, 20 Hz の 6 種類を用いた。5 回の連続測定を行い、それぞれの測定結果に対してフーリエ変換を行い、それぞれのパワースペクトルを得た。得られたパワースペクトル上に観測される各周波数における信号強度の再現性を確認したところ、図 6 に示す平均信号強度、および、標準偏差が得られた。5.2 Hz のように再現性が低い結果も得られたが、その他の結果では、ある程度の再現性が得られていることが分かる。一方、信号強度の平均値に関しては、今回のケースでは印加周波数が高くなれば高くなるほど信号強度が減少しているという結果が得られた。信号強度と印加周波数の関係についてはさらなる検討が必要ではあるが、図 6 に示す結果は、ESI-導入口毎に信号強度が異なることを示している。これは、主として各 ESI でのイオン化効率が異なることと、ESI-導入口の位置関係によりイオン導入効率が異なることに由来すると考えられる。すなわち、各 ESI 間での定量比較を行うためには、適切な規格化が必要であることが示された。そこで、内部標準法として安定同位体を用いた際の各 ESI 間の信号強度比較を行った。

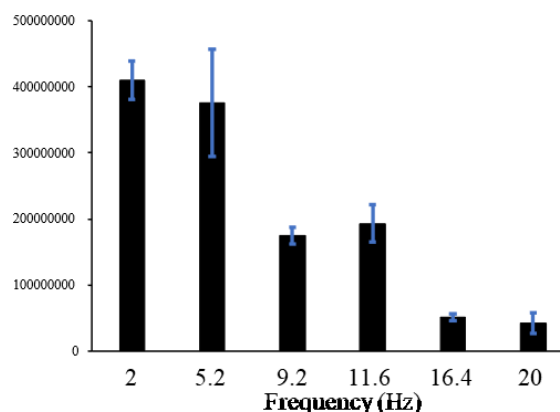


図 6 繰り返し測定より得られた異なる変調周波数を印加した ESI の平均信号強度と標準偏差

試料としては L-アルギニンと (m/z 175) その安定同位体標識 L-アルギニン ($^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$, m/z 185) を用い、内部標準法によって定量性の評価を行った。ESI1~6 を用いて、異なる濃度の L-アルギニンと一定濃度の安定同位体標識 L-アルギニンの混合溶液を同時分析し、得られた結果のパワースペクトルを得たところ、図 6 と同様に各 ESI の信号強度には、著しいバラツキが観測された。しかしながら、安定同位体を基準とする相対強度を算出したところ図 7 に示す様に、相関係

数 0.9958 の高い直線性が得られた。すなわち、適切な内部標準物質を用いることで、ESI間での定量比較が高い精度で行うことができることが示された。

(4)まとめ

以上の通り、本研究においては6並列導入が可能である質量分析システムの開発に成功し、さらに適切な内部標準物質を用いることで各導入口間の定量比較を高い精度で行うことが可能であることを実証した。また、並列導入手法をMS/MS測定、および、通常のMS測定とCIDにより得られたフラグメントイオンのMS測定を交互に繰り返す測定モード（交互測定モード）へ応用することが可能であることを、ペプチド試料をもちいて実証することに成功した。すなわち、6LC-1MS/MSにおける定量比較が可能であることを実証することに成功した。また、6並列LC分析を行うための試料注入システム・送液システムに関する検討、イオン化効率・試料導入効率の安定化を目的としたLCシステムのマクロスケール化に加えて、特に交互測定モードの信号処理の迅速化のための手法についても検討を行った。6LC-1MS/MSによる応用実施例を示すため、現在も研究を継続している。

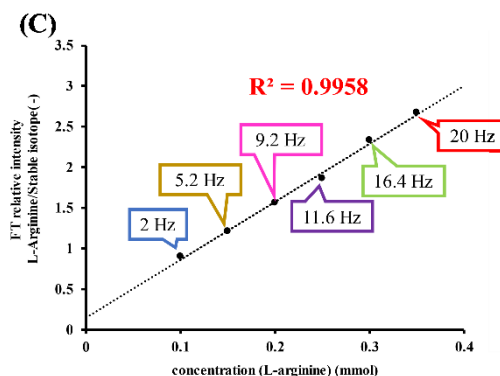


図7 内部標準法により補正を行った各ESI間での定量性能の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 SAKITA Ren, KISHI Hiroka, IIGUNI Yoshinori, KITAGAWA Shinya, OHTANI Hajime	4. 巻 43
2. 論文標題 Fundamental Study for Increasing Multiplicity of Frequency Division Multiplex HPLC-MS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 67～71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15583/jpchrom.2022.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北川慎也, 先田 廉, 岸 博香, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化LC-MSの多重度増大に関する研究
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 先田 廉, 岸 博香, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化法を用いた HPLC-MS における多重度増大に関する研究：6HPLC-1MSの開発
3. 学会等名 第27回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 先田 廉, 岸 博香, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化法を応用した新規マルチプレックス6HPLC-MSの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川慎也, 先田 廉, 札谷実穂, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化LC-MSの開発とその多重度増大に関する検討
3. 学会等名 第81回分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 先田 廉, 札谷実穂, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化法を応用した新規マルチプレックス6LC-1MSの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷彩江, 札谷実穂, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 プロテオミクス解析のための周波数分割多重化LC-MS/MSの基礎検討
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第21回高山フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 札谷実穂, 先田 廉, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化LC-MSにおける干渉抑制に関する基礎検討及びLC-MS/MSへの応用
3. 学会等名 第32回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Kitagawa, R. Sakita, M. Satsutani, H. Ohtani
2. 発表標題 Frequency division multiplex HPLC-MS for simultaneous analyses of six samples
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷彩江, 札谷実穂, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 プロテオミクス解析を志向した周波数分割多重化LC-MS/MSの基礎検討
3. 学会等名 第39回分析化学中部夏期セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北川慎也, 先田 廉, 札谷実穂, 神谷彩江, 牧野良亮, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化LC-MS/MSの開発
3. 学会等名 第42回キャピラリー電気泳動シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北川慎也
2. 発表標題 周波数分割多重化 LC-MS(/MS)の開発とそのプロテオミクス解析への展開の検討
3. 学会等名 第53回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野良亮, 先田 廉, 北川慎也, 大谷 肇
2. 発表標題 周波数分割多重化法を応用した新規マルチプレックスLC-MSの安定性・再現性向上のための基礎検討
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会第22回高山フォーラム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

並列同時試料導入型質量分析法の開発(nLC-1MSの開発) http://cec.ach.nitech.ac.jp/researches/kitagawa/kitagawa_files/kitagawa_FDMLCMS.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大谷 肇 (Ohtani Hajime)		
研究協力者	飯國 良規 (Iiguni Yoshinori)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------