



Title	オービトラップ質量分析計を用いたアミノ酸解析の可能性
Author(s)	島村, 繁; 澄田, 智美; 布浦, 拓郎
Citation	低温科学, 79, 37-42
Issue Date	2021-03-20
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.79.37
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81350
Type	departmental bulletin paper
File Information	08_p037-042_LT79.pdf



オービトラップ質量分析計を用いた アミノ酸解析の可能性

島村 繁^{1)*}, 澄田 智美¹⁾, 布浦 拓郎¹⁾

2020 年 11 月 6 日受付, 2021 年 1 月 23 日受理

キャピラリー電気泳動インターフェイス (ZipChipTM) を備えたオービトラップ搭載質量分析計 (Orbitrap Fusion) をアミノ酸分析へ適用すると, ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) での分析と同程度あるいはそれ以下の試料量でも測定が可能だけでなく, 非常に簡便かつ短時間で解析することができる. 更に, 菌体を超音波破碎し得られた溶液に含まれる遊離アミノ酸を, ほとんど未調整のまま測定する事も可能である. これにより GC-MS 法における技術的課題: 試料調製における (1) 加水分解過程でのアスパラギン, グルタミンからのアスパラギン酸, グルタミン酸への変換 (2) 試料調製におけるプロリンの低い回収率, (3) GC-MS 解析におけるアルギニン, システイン, ヒスチジン, トリプトファンの検出不可, などの改善が期待される. 本報では一般的なバクテリア培養菌体を用いて, 遊離アミノ酸と総アミノ酸, それぞれの基本的な試料調整方法や測定条件等を紹介する.

Analysis of amino acids by Orbitrap mass spectrometry.

Shigeru Shimamura, Tomomi Sumida and Takuro Nunoura

Combination of a capillary electrophoresis interface ZipChipTM and Orbitrap Fusion mass spectrometer (Fusion MS) is applicable to amino acid analysis even from tiny amounts of biological samples, in the similar sensitivity to the conventional method using a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS). Moreover, Fusion MS analysis can achieve simple preparation of samples and rapid detection of amino acids, which allow us to access cellular free amino acids with almost no preparation. Fusion MS analysis indeed potentially resolve the technical issues associated with the conventional GC-MS analysis, such as (1) conversion of asparagine and glutamine to asparaginate and glutamate, respectively, in protein hydrolysis and (2) low recovery of proline in sample preparation and no detection of arginine, cysteine, histidine, and tryptophan in GC-MS analysis. Here, we introduce sample preparation procedure for the analysis of free and total amino acids in bacterial cells and analytical conditions for the amino acid measurement in the Fusion MS method.

キーワード: アミノ酸, 同位体, キャピラリー電気泳動, 質量分析

Amino acid, Stable isotope, Capillary electrophoresis, Mass spectrometry

1. はじめに

オービトラップ (Orbitrap) 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 社製) は, イオントラップ質量分析計の一種であり, イオンを中心電極の周りで回転, 振動運動させることでより長い距離を飛行させ, その際の荷電粒子の回転運動を高速フーリエ変換によって解析する超高分解能フーリエ変換型質量分析装置である. m/z 200 で最大 500,000 FWHM という極めて高い質量分解能を持つとともに, サブ 1 ppm (内部標準による LockMass 機

能使用時) の質量精度で容易に分析対象物の精密質量を得ることが可能である (窪田, 2007; MÄOHRING, 2018).

*連絡先

島村 繁

国立研究開発法人海洋研究開発機構 (JAMSTEC)

〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2 番地 15

e-mail: shimas@jamstec.go.jp

1) 海洋研究開発機構 (JAMSTEC)

Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology



図1: OrbitrapFusion と ZipChip システム

1) 分析機器全体像

- a OrbitrapFusion 本体, b ZipChip インターフェイス,
c ZipChip オートサンプラー&送液ユニット

2) ZipChip 電気泳動チップ

- d BGE reservoir, e ESI pump, f Sample reservoir, g Sample waste

また、研究対象の試料に合わせた分離機器やイオンソースを組み合わせることが可能であることから、化合物同定に留まらず、プロテオーム解析を含む様々な分野で、分析対象物の質量分析に広く利用されている。

一方、試料を塩酸加水分解し、得られたアミノ酸を誘導体化を経てガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) により分析する手法は、簡便で高感度な解析手法として知られる (高野ら, 2016)。この手法は、本誌3章 (安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法—2: ガスクロマトグラフ-質量分析計と MassWorks) に詳述されるように、GC-MS で得たデータを質量キャリブレーション用ソフトウェア MassWorks により解析することで、アミノ酸分子内の安定同位体標識を定量することが可能である。そして、この解析技術は、これまで代謝解析が困難であった難培養微生物の代謝機構の研究への適用が可能である (Nunoura et al., 2018)。さらに、GC-MS の質量分析装置にオービトラップを採用した機種では、精密質量による化合物同定は勿論、MassWorks を用いなくとも、分子内の安定同位体標識を同定することが可能となる。しかし、これら GC-MS を用いた生物試料の解析には、試料を塩酸加水分解する過程で、アスパラギン、グルタミンがそれぞれアスパラギン酸、グルタミン酸に変換されてしまうこと、前処理過程におけるプロリンの回収率が10%以下になってしまうこと、そして GC-MS 解析自体がアルギニン・システイン・ヒスチジン・トリプトファンなどのアミノ酸が検出できないなどの技術的課題も内包する。 (力石ら, 2009)

一方で、今回紹介するキャピラリー電気泳動インターフェイス ZipChip™ (908 devices 社製) と、オービトラップ搭載機種 Orbitrap Fusion (図1) を組み合わせた分析手法では、精密質量による分子同定が可能だけでなく、アミノ酸を誘導体化することなく、簡便かつ短時間で測定することが可能である。特に、菌体を超音波破碎して得た細胞内の遊離アミノ酸を測定する場合、塩酸加水分解や誘導体化に伴う技術的な課題の多くを改善できる。また、測定に必要な試料量が最小 10 μL と非常に少ない為 (実際に解析ラインへ導入される量は 5 nL 程度であるため、測定後に試料を回収して別の分析の為に再利用する事も可能)、GC-MS を用いる手法と同様に微量試料への適用が可能である。なお、本誌6章にある通り、この手法で塩酸加水分解した試料を解析する場合は、GC-MS より少ない試料での解析が可能となる。本報では、この新たな解析手法の概要と共に、従属栄養細菌をモデルとして用い、塩酸加水分解して得た総アミノ酸と、細胞の超音波破碎により得た細胞内遊離アミノ酸についての解析結果を比較して紹介する。

2. 試料調整と測定

2.1 塩酸加水分解による総アミノ酸分析試料の調整

リアクティブバイアル 1.0 mL (GL サイエンス) に塩酸 (アミノ酸自動分析用, 富士フイルム和光純薬) 300 μL にて懸濁した菌体を入れて、クローズドトップスクリューキャップ (GL サイエンス) で蓋をし、ドラフト内

で 110℃ のヒートブロック上で一晩反応させる。

塩酸加水分解後のバイアルをヒートブロックから取り出して室温に戻し、ジクロロメタン（ダイオキシン類分析用、富士フイルム和光純薬）200 μ L、ヘキサン（ダイオキシン類分析用、富士フイルム和光純薬）400 μ L（ジクロロメタン：ヘキサン = 1：2）を加え、フタを締めて良く混ぜた後、バイアルから上層の溶媒層を除き脂質の除去を行う。この操作を計 3 回繰り返した後、メタノール（ダイオキシン類分析用もしくは LC/MS 用、富士フイルム和光純薬）400 μ L を加え、窒素ガスの吹き付けを用いて乾固する。得た総アミノ酸は超純水（QTofMS 用、富士フイルム和光純薬）50 μ L にて再懸濁し、ZipChip Metabolites Assay Kit（Thermo Fisher Scientific 社）のサンプルバッファにて 10 倍に希釈して解析試料とした（高野ら、2016 を改変）。しかし、澄田らの解析結果（本誌 6 章、Orbitrap Fusion を用いた CE-MS と四重極 GC-MS でのアミノ酸分析の比較）に示されるように、メタノールを加えて乾固する過程において、非特異的な反応が起こることが判明しており、改変後の試料調整方法は澄田ら（本誌 6 章）を参照されたい。

2.2 細胞内の遊離アミノ酸分析試料の調整

菌体を 70% メタノール 700 μ L に懸濁後、超音波ホモジナイザー Q 700（水冷チラー付きカップホーンタイプ、QSonica 社）にて循環水温度 2℃、Amplitude：40、Process Time：3 分、Pulse-OFF Time：15 秒の条件で破碎した。そして、菌体破碎液にクロロホルム 400 μ L を加えて 5 分間しっかりと攪拌した後、20,000 g、-8℃ で 10 分間遠心し、上層（水層）を 2 mL チューブに移した。さらに、回収率向上のため、残った下層（有機溶媒層）へ超純水 200 μ L を加えて、同条件で攪拌、遠心し、さらに上層を回収した。その後、回収液へ窒素ガスを吹き付けて乾固し、ZipChip Metabolites Assay Kit のサンプルバッファ 30 μ L にて懸濁して測定試料とした。

2.3 キャピラリー電気泳動

BGE (*background electrolyte*) 及び、サンプルバッファは ZipChip Metabolites Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。なお、自身で調製する場合は、LC/MS グレードの試薬を用い、それぞれ以下の組成の BGE、サンプルバッファを準備する。BGE (超純水：イソプロパノール：アセトニトリル：ギ酸 = 68：20：10：2 (% , v/v))、サンプルバッファ (超純水：メタノール：酢酸アンモニウム = 80：19：1 (% , v/v))。電気泳動は ZipChip HS チップ (Thermo Fisher

Scientific 社) を用い、Field Strength Start 1000 V/cm, Injection Volume 5 nL, Pressure Assist “Disabled” の条件にて、3 分間の設定で行った。

2.4 質量分析

試料の測定は Orbitrap Fusion を用いて、MS 及び MS/MS それぞれ下記の条件にて測定した。Targeted Mass リストをフィルターとして登録し、Scan Priority を高く設定することで、¹³C を含む全パターンの各アミノ酸 m/z を優先的に MS/MS 測定を実施した。また、MS および MS/MS は Data Dependent Mode を Cycle Time 0.6 秒にて測定した。

[MS 測定条件] Detector：Orbitrap, Resolution：15,000, Quadrupole Isolation：ON, Scan Range (m/z)：70-500, RF Lens (%)：60, AGC Target：Standard, Maximum Injection Time Mode：Custom (50 ms), Polarity：Positive, EASY-IC™：ON

[MS/MS 測定条件] Isolation Mode：Quadrupole, Isolation Window (m/z)：0.7, Activation Type：HCD, Collision Energy Mode：Stepped (25,35,50), Detector Type：Orbitrap, Resolution：15,000, Scan Range Mode：Define First Mass (m/z 50), AGC Target：Standard, Maximum Injection Time Mode：Dynamic

3. 従属栄養細菌より抽出したアミノ酸の測定結果

一般的な従属栄養細菌の菌体を、塩酸加水分解して得た総アミノ酸と、超音波破碎で得た細胞内遊離アミノ酸の各試料それぞれのマスキロマトグラムを図 2 に示す。また、表 1 に各アミノ酸の検出の有無と保持時間 (RT)、MS/MS 時に得られるプロダクトイオンピークなどの情報をまとめた。

総アミノ酸測定では、アスパラギン、グルタミンが検出されていないが、これは、塩酸加水分解の過程で、アスパラギン、グルタミンがそれぞれアスパラギン酸、グルタミン酸に変換されたことによる。一方、プロリン、アルギニン、ヒスチジンはピーク強度も高く検出されている。システインは、検出はされるもののピーク強度は低く、また、トリプトファンは検出されなかった。システイン及びトリプトファンにおける低い検出効率、測定系における検出感度だけでなく、今回解析した従属栄養細菌における利用頻度が低いことも影響しているのではないかと推察される。

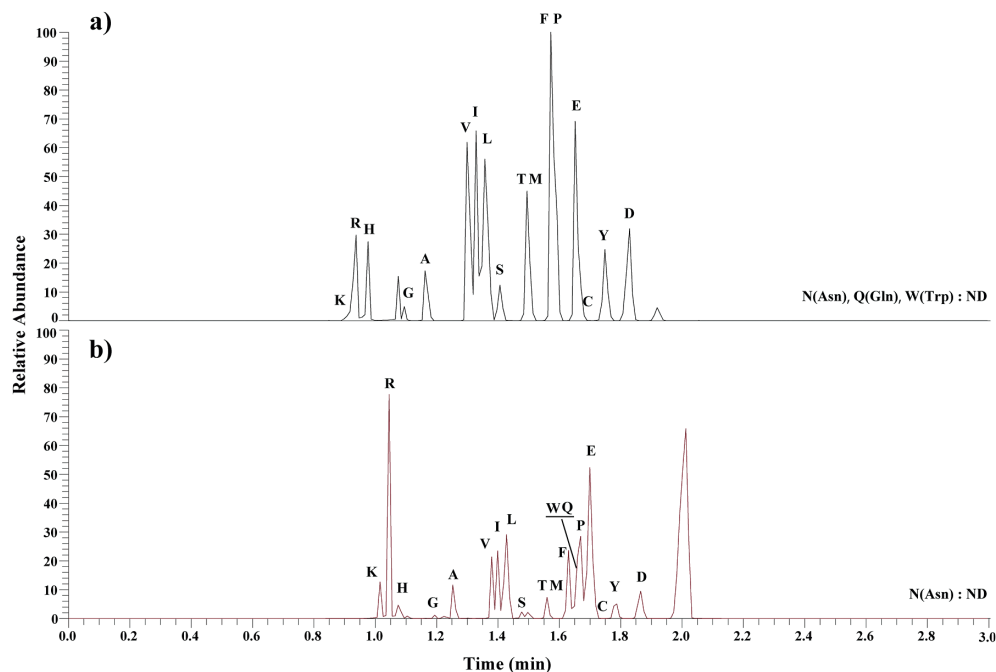


図 2：バクテリア培養菌体から抽出したアミノ酸測定結果のマスキロマトグラム
a) 総アミノ酸測定結果
b) 遊離アミノ酸測定結果, ND (未検出), 各アミノ酸の一文字標記は表 1 参照.

表 1：CE-MS 測定時の各アミノ酸保持時間とプロダクトイオン

AminoAcid	Abbreviation	Formula	Calculated Exact mass	Calculated Precursor ion [M + H] (m/z)	Retention time (min)		Measured accurate Product ions (m/z)
					Total amino acid	Intracellular Free amino acid	
Lysine	Lys (K)	C6H14N2O2	146.1050	147.1128	0.89	1.02	56.0490, 67.0536, 84.0801, 130.0852, 147.1126
Arginine	Arg (R)	C6H14N4O2	174.1111	175.1190	0.94	1.05	60.0553, 70.0648, 116.0701, 130.097, 158.0919, 175.1201
Histidine	His (H)	C6H9N3O2	155.0689	156.0768	0.98	1.07	56.0491, 81.0442, 82.0520, 83.0598, 93.0441, 110.0705, 156.0767
Glycine	Gly (G)	C2H5NO2	73.0315	76.0393	1.09	1.19	76.0392
Alanine	Ala (A)	C3H7NO2	89.0471	90.0550	1.16	1.25	60.1084, 90.0547
Valine	Val (V)	C5H11NO2	117.0784	118.0863	1.30	1.38	53.0382, 55.0539, 56.0491, 57.0569, 59.0488, 72.0802, 118.0862
Isoleucine	Ile (I)	C6H13NO2	131.0941	132.1019	1.33	1.40	55.0540, 56.0495, 69.0695, 86.0960, 132.1017
Leucine	Leu (L)	C6H13NO2	131.0941	132.1019	1.36	1.43	55.0538, 56.0493, 69.0694, 86.0957, 132.1017
Serine	Ser (S)	C3H7NO3	105.0420	106.0499	1.41	1.48	60.0439, 70.0283, 88.0386, 106.0499
Threonine	Thr (T)	C4H9NO3	119.0577	120.0655	1.49	1.50	56.0492, 57.0332, 74.0597, 84.0441, 102.0544, 120.0655
Methionine	Met (M)	C5H11NO2S	149.0505	150.0583	1.49	1.56	56.0492, 61.0103, 74.0232, 84.0439, 85.0278, 87.0258, 102.0544, 104.0523, 133.0311, 150.0589
Asparagine	Asn (N)	C4H8N2O3	132.0529	133.0608	ND	ND	—
Phenylalanine	Phe (F)	C9H11NO2	165.0784	166.0863	1.57	1.63	79.0637, 93.0694, 103.0533, 120.0797, 166.0866
Tryptophan	Trp (W)	C11H12N2O2	204.0893	205.0972	ND	1.66	91.0536, 115.0534, 118.0643, 146.0591, 159.0903, 170.0591, 188.0696, 205.0971
Proline	Pro (P)	C5H9NO2	115.0628	116.0706	1.59	1.67	70.0647, 116.0704
Glutamine	Gln (Q)	C5H10N2O3	146.0686	147.0764	ND	1.68	84.0438, 130.0490, 147.0763
Glutamic Acid	Glu (E)	C5H9NO4	147.0526	148.0604	1.65	1.70	56.0491, 84.0438, 102.0543, 130.0490, 148.0602
Cysteine	Cys (C)	C3H7NO2S	121.0192	122.0270	1.69	1.76	58.9945, 76.0209, 86.9893, 104.9997, 122.0270
Tyrosine	Tyr (Y)	C9H11NO3	181.0733	182.0812	1.75	1.79	91.0536, 95.0485, 107.0485, 119.0483, 123.0433, 136.0748, 147.0431, 165.0538, 182.0822
Aspartic Acid	Asp (D)	C4H7NO4	133.0370	134.0450	1.83	1.87	70.0283, 74.0231, 88.0387, 116.0334, 134.0446

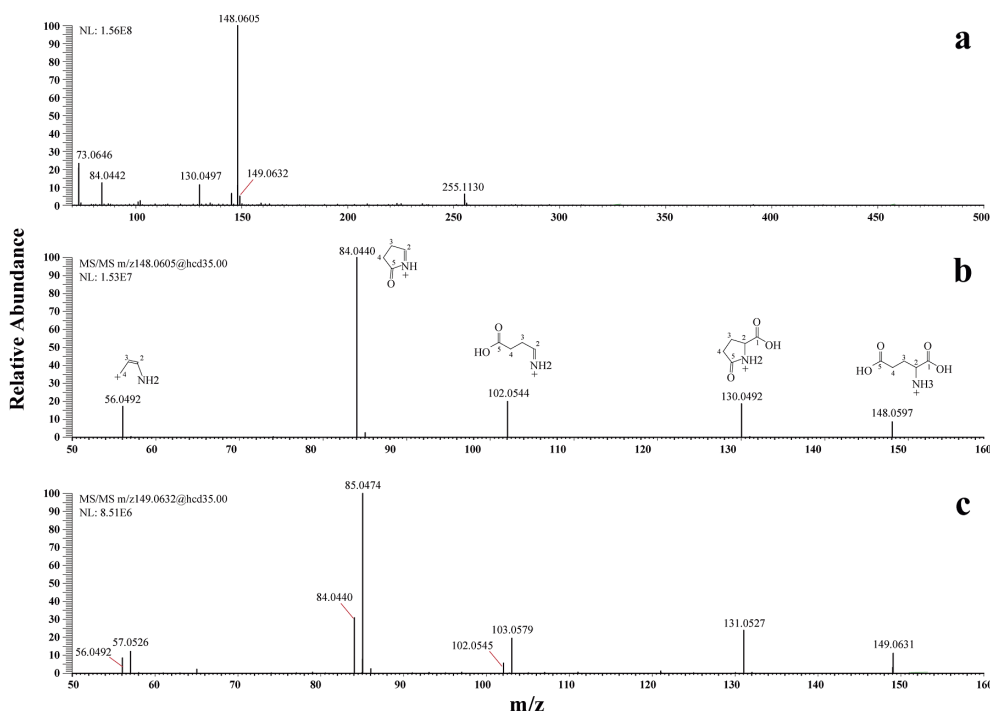


図3：グルタミン酸のMSおよびMS/MS スペクトル

a：グルタミン酸 MS スペクトル，b：グルタミン酸 MS/MS スペクトル，c： ^{13}C を1つ含むグルタミン酸 MS/MS スペクトル，NL (Normalized Level)，hcd (Higher energy Collisional Dissociation)

一方で、遊離アミノ酸の測定では、アスパラギンを除く全てのアミノ酸が検出された。但し、保持時間が総アミノ酸の測定に比べ、全体的に遅くなる現象がみられた。これは、遊離アミノ酸解析における試料調製が破碎処理のみによる為、総アミノ酸試料に比べて、アミノ酸以外の有機化合物が解析試料に混在し、それらが電気泳動時に干渉した結果であると考えられる。

今回の解析結果は、Orbitrap Fusion を用いた遊離アミノ酸の分析は、従来のGC-MSを用いた解析における技術的課題を克服しうることを示す。ただし、微生物試料を取り扱う場合には、菌体内の化合物の多様性は培養条件や使用する菌種により変化し、それらがMSにおけるイオン化時に競合することにより検出感度の低下に繋がる事がある。従って、新たな生物試料を測定する際には、まず総アミノ酸と遊離アミノ酸を予察的に解析し、それぞれの解析手法に由来する技術的課題を考慮の上で、解析対象・手法を選択することが望ましい。

4. アイソトポマーの検出

図3に総アミノ酸の測定におけるグルタミン酸 ($[\text{M} + \text{H}]^+ m/z 148.0602$ ：有効数字は小数点以下3桁であるが、本報では炭素の同位体ピークの質量差 $m/z 1.003$ を扱う上で、敢えて実測の数値をそのまま表記す

る事とする)のMSスペクトル(図3-a)と、そこに検出された自然存在度の同位体ピーク $m/z 149.0634$ 、それぞれのMS/MSスペクトル(図3-b, c)を示した。

両ピークの差は ^{12}C と ^{13}C の質量差($m/z 1.0032$)であり、まさに同位体のピークを検出している。更にそれぞれをMS/MS測定した結果の構造情報から(Thermo Fisher Scientific社提供のmzCloudスペクトルライブラリーを参照, <https://www.mzcloud.org/>), $m/z 149.0634$ のグルタミン酸には1つの ^{13}C が構造中のいずれかに導入されており、さらに図3-cのピーク情報から1位の炭素が抜けた $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{HCOOH}]^+ m/z 84.0440$, $[\text{M} + \text{H} - \text{HCOOH}]^+ m/z 102.0545$ にそれぞれ $m/z 85.0474$, $m/z 103.0579$ の同位体ピークが見られていることから、1位の炭素が ^{12}C と ^{13}C になっているものが、どちらも存在していることがわかる(高野ら, 2015)。また、5位の炭素が抜けた $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{HCOOH} - \text{HCOOH}]^+ m/z 56.0492$ にも $m/z 57.0526$ がみられるため、同様に5位の炭素にも ^{12}C と ^{13}C どちらも存在していることがわかる。同時に2~4位の炭素に関しては個々が抜ける分子構造に該当するピークは検出されていない為、いずれの炭素が ^{13}C であるか判別できないが、 $m/z 57.0526$ の数値からいずれか1つが ^{13}C であることが示唆される。つまり、この天然同位体を含むグルタミン酸では、特定の炭素が ^{13}C となっている訳ではなく、各位の炭素にラン

ダムに ^{13}C が入っていることが明らかになった。

5. まとめ

本章にて紹介した結果は、CE-MS を用いた分析手法が、安定同位体で標識した基質を用いたトレーサー代謝解析を行う上で、非常に有用なデータをもたらす可能性を示す。試料調製の簡便さと短時間での測定が可能なおことから、CE-MS を用いた分析手法は、今後、GC-MS を用いた従来法と合わせて、トレーサー代謝解析法の重要な手段の一つとなっていくことが期待される。なお、本報の結果から概算すると、一般的な従属栄養細菌の細胞内遊離アミノ酸を測定する場合、必要な菌体は $10^6 \sim 10^7$ 細胞であると推定される。更に、細菌細胞を構成する総蛋白質の塩酸加水分解によって得た総アミノ酸を測定する場合、 $10^4 \sim 10^5$ 細胞程度でも良好な結果を得ることができると推定される。実際に同位体を用いた培養した菌体での詳細な解析については本誌 6 章を参照されたい。

更に、Thermo Fisher Scientific 社提供の低分子解析用ソフトウェア Compound Discoverer がバージョン 3.1 からトレーサー代謝解析に対応したことにより、より広範囲な代謝系を対象としたトレーサーメタボロミクス解析の可能性が広がった。高感度・高分解能であり、かつ精密質量が取得できるオービトラップ搭載の質量分析計は、アミノ酸だけではなく解糖系や TCA 回路（クエン酸回路）など有機酸を直接対象とするトレーサー代謝解析においても、非常にパワフルなツールとなる可能性が高い。なお、現在、我々は、CE や UPLC などの分離手法を併用し、中央代謝系に関わる有機酸のトレーサー代謝解析法のより高感度・高精度な手法を確立すべく条件検討を進めている。今回紹介したアミノ酸トレーサー代謝解析と共に、生物の代謝機構の研究における有力な選択肢の一つとなることを期待している。

謝辞

本研究を進めるにあたり、福山宥斗ポスドクトラル研究員（海洋研究開発機構）に一部のサンプル調整にご協力頂いた。また、技術的な助言を頂くと共に、本稿執筆の機会を頂いた、力石嘉人教授（北海道大学低温科学研究所）に深くお礼を申し上げます。

本項で紹介した研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「超地球生命体を解き明かすポストコッホ機能生態学」（課題番号：19H05684）、日本学術振興会化学研究費補助金・基盤研究(A)「TCA 回路の多様性とその起源の解明」（課題番号：19H00988）で行われた。

参考文献

- 窪田雅之 (2007) 電場型フーリエ変換質量分析計 Orbitrap の仕組みと性能, そして LTQ Orbitrap について 生物物理科学, **51**, 53-58
- Thomas MÄÖHRING, Tomoko Vincent (2018) 「オービトラップ型イオントラップを有する質量分析計の原理と応用研究」, ぶんせき, **12**, 526-531
- Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T., Harada, T., Mori, K., Kato, Y., Miyazaki, M., Shimamura, S., Yanagawa, K., Shuto, A., Ohkouchi, N., Fujita, N., Takaki, Y., Atomi, H. and Takai, K. (2018) A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science*, **359**, 559-563.
- 高野淑識, 力石嘉人, 大河内直彦 (2016) アミノ酸 (ピバロイル/イソブチルエステル誘導体) の GC/MS による解析. *Res. Org. Geochem.*, **32**, 1-18.
- 力石嘉人・高野淑識・大河内直彦 (2009) アミノ酸 (N-ピバロイル-イソプロピルエステル誘導体) の GC/MS による解析. *Res. Org. Geochem.*, **25**, 61-70.
- 高野淑識, 力石嘉人, 大河内直彦 (2015) イオンペアクロマトグラフィー/電子スプレーイオン化質量分析法 (LC/ESI-MS) によるアミノ酸のマススペクトル解析. *Res. Org. Geochem.*, **31**, 33-49.