

トリプル四重極 ICP-MS を用いた ラット血清中のセレノプロテインの分析

アプリケーションノート

プロテオミクス/メタロミクス

著者

阿南 弥寿美
畠山 佳子
徳本 真紀
小椋 康光

昭和薬科大学
生命薬学系衛生化学研究室



はじめに

セレン (Se) は、動物の血漿中の主なタンパク質に含まれる重要な微量栄養素として知られています。Se をセレンシステイン (SeCys) として一次構造に含む細胞外グルタチオンペルオキシダーゼ (eGPx、GPx-3) およびセレノプロテイン P (Sel P) という 2 つのセレノプロテインは、動物中の血漿から検出されます (参考文献 1~3)。動物では、セレノメチオニン (SeMet) とメチオニン (Met) が区別されないため、Se が SeMet としてペプチド配列に組み込まれた他の Se 含有タンパク質も検出されます (参考文献 4)。ヒトの血漿中で最も存在比が多い Se 含有タンパク質はアルブミンです (参考文献 5) が、いくつかの研究では、実験動物の血漿中では、ヒトの血漿中に比べ Se 含有アルブミンがごくわずか、または検出されないという報告がされています (参考文献 6~8)。これは、ヒトが SeMet として Se を摂取するのに対し、実験動物の餌に含まれる主な Se 種は亜セレン酸やセレン酸塩など無機 Se であるからだと考えられます。



Agilent Technologies

HPLC-ICP-MS は、その高感度および高選択性よりしばしば Se 種の同定に用いられます (参考文献 9)。あらゆる研究において、HPLC-ICP-MS を用いたヒトおよび実験動物の血漿/血清中のセレノプロテイン/Se 含有タンパク質の分離分析が報告されています (参考文献 4、10、11)。我々の研究グループでは、ラット血清中の 2 つの主要なセレノプロテインを、マルチモードサイズ排除 HPLC カラムを用い分離を行いました (参考文献 12)。

ICP-MS は Se 分析の際に用いられ、Se の主要な同位体である ^{80}Se (49.6 %)、 ^{78}Se (23.8 %)、 ^{76}Se (9.37 %) が Ar プラズマ起因の多原子イオン、 $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ 、 $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$ 、 $^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$ とそれぞれ干渉します。さらに、 ^{77}Se は、生物サンプルなどサンプルマトリクスに塩化物が存在する際に $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ からの干渉を受けます。そのため、ICP-MS での Se 分析の際は、 ^{82}Se (同位体比 8.73 %) を用います。多原子イオンの干渉を低減するためには、ICP-MS に搭載されるコリジョン・リアクションセル (CRC) を用います。CRC を用いての Se の測定はいくつかの論文で紹介されています (参考文献 13)。例えば、水素 (H_2)、ヘリウム (He)、メタン (CH_4) ガスを個別で用いるメソッドや、コリジョン・リアクションガスを組み合わせるメソッドもあります (参考文献 14~16)。 H_2 セルガスを用いると、主な Se 同位体に干渉する Ar 起因の多原子イオンの強度を大幅に減少させ、ng/L レベルの Se の検出下限を得ることができます。しかし、血漿、血清、尿など細胞外液中の Se の測定は、 H_2 ガスを用いると新たな干渉物を生み出してしまう可能性があります。これは、細胞外液は臭素 (Br) を多く含むため、Br と H_2 ガスからなる新たな干渉イオンが形成されてしまうためです。これらの多原子イオン $^{79}\text{Br}^1\text{H}^+$ と $^{81}\text{Br}^1\text{H}^+$ は、それぞれ ^{80}Se と ^{82}Se に干渉します。これらは、Se リッチの同位体又は同位体希釈 (ID) を用いた Se ペプチドおよび Se タンパク質などの Se 含有化合物の測定に影響を及ぼします。以前の研究にて、ICP-MS にて D_2 ガスを用いることにより ^{80}Se および ^{82}Se にかかる BrH の干渉を低減できることが分かっています (参考文献 17)。しかし、トリプル四重極質量分析計 (ICP-QQQ) がリリースされたことにより、従来のシングル四重極装置 (ICP-QMS) で不可能であったことが可能になりました。ICP-QQQ の O_2 マスシフトモードは、その名の通り、酸素を用いたマスシフトモードにて、分析対象物の質量数を M+16 にシフトさせます。例えば、 $^{78}\text{Se}^+$ は 94 amu にて $^{78}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ として測定され、 $^{80}\text{Se}^+$ は 96 amu にて、 $^{82}\text{Se}^+$ は 98 amu にて測定されます。これにより、ICP-QQQ は ICP-QMS よりも Se の精密な測定を行うことができます。本研究では、ラット血清中の Se の分離を行い、ICP-QQQ による分析パフォーマンスを評価しました。

実験方法

試薬

関東化学株式会社 (東京、日本) より Se の標準溶液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を購入し、0.1 M 硝酸にて希釈しました。Sigma 社 (セントルイス、ミズーリ州、米国) よりトリシヒドロキシメチルアミノメタン (TRIZMA ベースおよび TRIZMA HCl) を購入しました。昭和電工株式会社 (東京、日本) より重水素ガス (>99.6 atom %) を購入しました。

動物実験

全ての動物実験は、「Principles of Laboratory Animal Care (実験動物管理の原則)」(NIH バージョン、1996 年改定) に遵守して行われ、昭和薬科大学の動物調査委員会の承認を得て行いました。特定の微生物や寄生虫が存在しない (SPF) オスのウィスターラット (5 週齢) を三協ラボサービス株式会社 (東京、日本) より購入しました。ラットは、室温 22~25 °C で湿度管理された部屋にて 12 時間毎に電気の消灯を行い、市販の餌と水道水を自由に飲食できる環境にて飼育しました。環境順化を一週間行った後、軽いエーテル麻酔下にて血液を採取し、凝固血を 1600 x g にて 10 分遠心分離を行い、血清を分離しました。血清サンプルは使用直前まで -30 °C にて保管しました。

HPLC-ICP-MS および HPLC-ICP-QQQ 分析

オクタポールリアクションシステム (ORS) を搭載した Agilent 7500ce ICP-MS および Agilent 8800 トリプル四重極 ICP-MS を使用しました。動作条件を表 1 に示します。

表 1. Se のスペシエーションにおける ICP-QMS および ICP-QQQ の動作条件

	Agilent 7500ce ICP-QMS	Agilent 8800 ICP-QQQ
プラズマ設定		
RF 出力 (W)	1450	1550
ネブライザタイプ	Babington	MicroMist
ネブライザガス流量 (L/min)	1.15	0.90
メイクアップガス流量 (L/min)	0.11	0.25
プラズマガス流量 (L/min)	15.0	14.0
リアクション/コリジョンセル		
D_2 ガス流量 (mL/min)	3.0	-
O_2 ガス流量 (mL/min)	-	0.3
データ採取		
モニターした m/z	76~84	
		78 からシフトされた 94
		80 からシフトされた 96
		82 からシフトされた 98

HPLCには、オンラインデガッサー、HPLCポンプ(PU713、GLサイエンス、東京、日本)、200 μ L サンプルループ付き Rheodyne 製 6 ポートインジェクター、カラムを搭載しました。カラムは、昭和電気株式会社のマルチモードゲルフィルターカラムである Shodex Asahipak GS-520HQ (内径 7.5 x 300 mm、ガードカラム内径 7.5 x 75 mm) を用いました。カラムに血清サンプル 200 μ L を注入し、50 mmol/L Tris-HCl 溶液、pH 7.4、流量 0.6 mL/分にて溶離しました。溶離液を ICP-QMS 又は ICP-QQQ のネブライザに直接導入し、ICP-QMS は D_2 リアクションモードを用いて m/z 78、80、82 を、ICP-QQQ は O_2 マスシフトモードを用いて m/z 94、96、98 の信号をモニターしました。

結果と考察

分離した Se のピークがそれぞれ 11.7 分と 14.3 分に見られました (図 1 参照)。以前の研究 (参考文献 19) より 2 つのピークはそれぞれ eGPx および Sel P であると分かりました。また、アルブミンは、使用したカラムで保持時間 15.0~16.0 分にて溶離することが分かっていた (参考文献 12) が、本測定においては保持時間 15.0~16.0 分に Se のピークを検出しませんでした。これは、アルブミン内の Met のあるべき場所に SeMet が存在していなかった可能性があります。

ICP-MS にて血清中の Se を測定する際に一番問題となる干渉物は、ICP のプラズマガスより形成される $^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$ 、 $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ 、 $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ 、 $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ など Ar 起因の多原子イオンです。

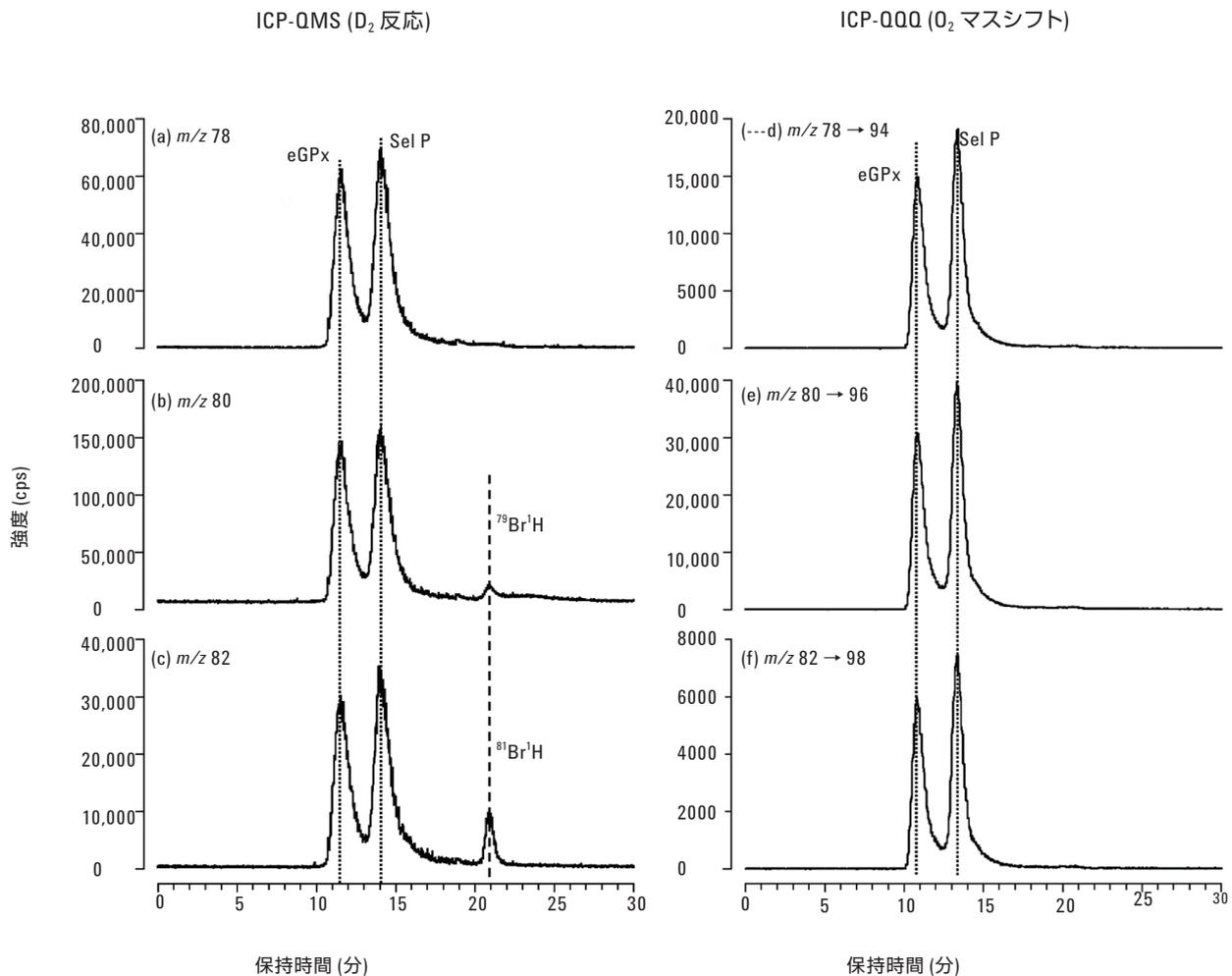


図 1. ラット血清中の Se の溶離液プロファイル。ラット血清の 200 μ L を GS-520HQ カラムに注入し、ICP-MS (a から c) および ICP-QQQ (d から f) を用いて、 m/z 78 (a)、80 (b)、82 (c)、94 (d)、96 (e)、98 (f) の溶離をモニターしました。

CRC なしの ICP-MS の測定においては、 ^{82}Se が最も影響の少なかった同位体となりました (図 2a)。 H_2 ガスは Se の測定時に於いてリアクションガスとして頻りに用いられます。しかし、血清などの細胞外液の Se の分析では Br 由来の干渉物が生成されます (図 2b)。 H_2 リアクションモードにて、複数の同位体リッチトレーサーを使用しての尿および血清に含まれる Se の定量および分離は、BrH が存在するため不可能です。干渉物を避ける他の手法としては、 H_2^{17} の代わりに D_2 をリアクションガスとして使用し、Br の干渉を低減することです。しかし、市販の D_2 ガ

スには H_2 がかなりの量で含まれており (<0.5 %)、BrH など Se の干渉物を完全に除去することはできません。図 1b や 1c にある通り、BrH のピークは 2 つのセノプロテインから完全に分離しています。図 2c に示した通り、 D_2 ガス起因の干渉 (SeD) が発生してまい、避けられるものではありませんでした。 m/z 80 では $^{78}\text{SeD}^+$ の信号と干渉し、 m/z 82 では ^{80}Se が ^{78}Se よりも存在比が高いため、更に深刻な影響を受けます (図 3a)。

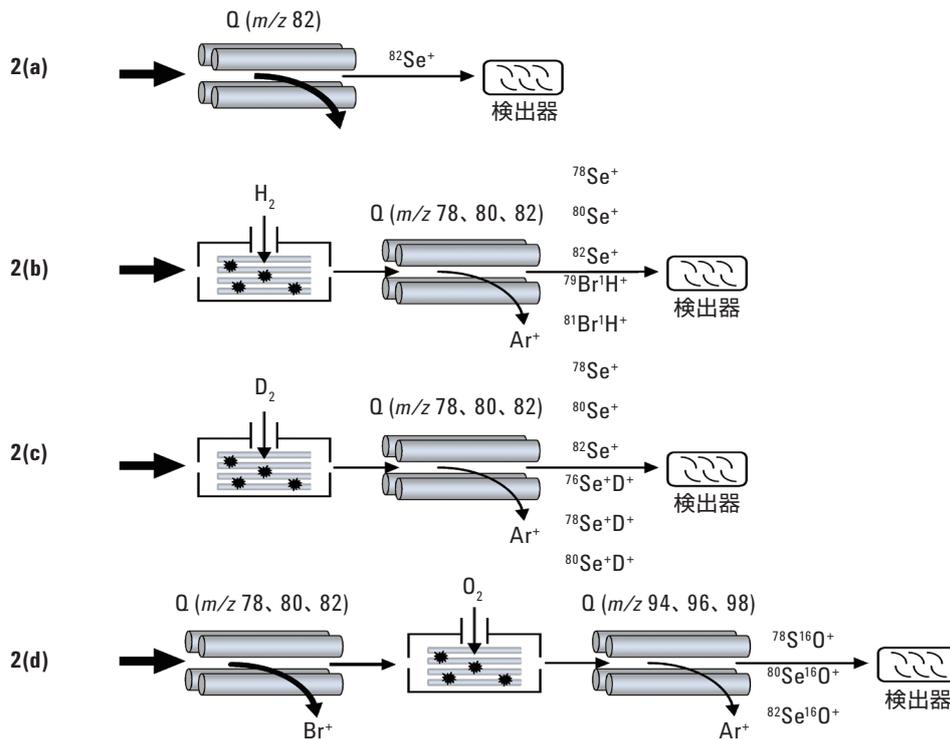


図 2. ノーマルモード (a)、 H_2 ガスモード (b)、 D_2 ガスモード (c) を使用した ICP-MS、および ICP-QQQ の O_2 マスシフトモード (d) にて細胞外液の Se を測定したときの図

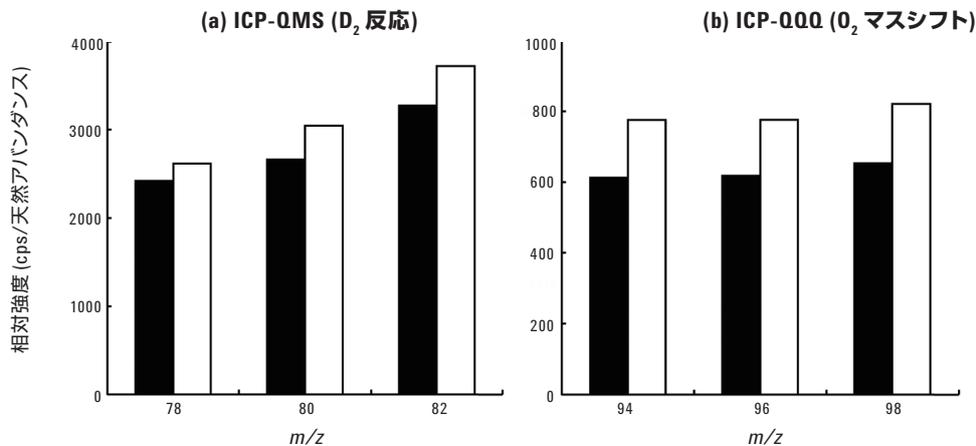


図 3. Se 分離の際の ICP-QQQ の O_2 マスシフトモードの効果。強度は、GPx (クローズカラム) および SeI P (オープンカラム) のピーク高さの 1 秒あたりのカウント (cps) を各 Se の同位体比で割って算出しました。

O₂ マスシフトモードを用いた ICP-QQQ の測定では、硫黄およびリンを低レベルで検出することができます (参考文献 19)。本研究では、ICP-QQQ の O₂ マスシフトモードを Se 分離に使用しました (図 2d)。最初の四重極 (Q1) にて *m/z* 78、80、82 のみを CRC に通過するように設定し、*m/z* 81および 83 に存在する Br を排除しました。よって、ICP-QQQ の O₂ マスシフトモードにて分離を行った際、BrH 起因の干渉物は検出されませんでした (図 1d~1f)。更に、2 つのセレノプロテインのピーク高さは、ICP-QMS よりも ICP-QQQ で測定したときのほうが一貫性が高くなりました (図 3b)。よって、ICP-QQQ は、Se の測定において ICP-QMS よりも強力な分析装置であると言えます。

結論

主要なセレノプロテインである eGPxおよび Sel P を、ラットの血清中より HPLC カラムにて分離することができました。ICP-QQQ を用いると、ICP-QMS に比べセレノプロテインの分離精度が高くなりました。これは、プラズマから発生する Ar およびマトリクス元素からの干渉がなかったためです。

謝辞

ICP-QQQ の分析をサポートしていただいた、アジレント・テクノロジー・インターナショナル株式会社の杉山尚樹氏に謝辞申し上げます。本研究は文部科学省 科学研究費補助金 (Nos. 23390032、24659022 から Y. O.、25870739 から Y.A.)、および公益財団法人 武田科学振興財団の支援により実施しました。

参考文献

1. M. Borglund, A. Akesson, and B. Akesson, *Scand J Clin Lab Invest*, 1988, 48, 27.
2. B. Akesson, and B. Martensson, *J Inorg Biochem*, 1988, 33, 257.
3. M. Persson-Moschos, W. Huang, T. S. Srikumar, B. Akesson, and S. Lindeberg, *Analyst*, 1995, 120, 833.
4. P. Jitaru, H. Goenaga-Infante, S. Vaslin-Reimann, and P. Fisicaro, *Anal Chim Acta*, 2010, 657, 100.
5. L. A. Daniels, *Biol Trace Elem Res*, 1996, 54, 185.
6. P. Óscar, and R. Łobiński, *Talanta*, 2007, 71, 1813.
7. Y. Kobayashi, Y. Ogra, and K. T. Suzuki, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 2001, 760, 73.

8. H. Koyama, Y. Kasanuma, C. Y. Kim, A. Ejima, C. Watanabe, H. Nakatsuka, and H. Satoh, *Tohoku J Exp Med*, 1996, 178, 17.
9. Y. Ogra, and Y. Anan, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, 24, 1477.
10. G. A. Jacobson, A. M. Featherstone, A. T. Townsend, R. Lord, and G. M. Peterson, *Biol Trace Elem Res*, 2005, 107, 213.
11. K. T. Suzuki, M. Itoh, and M. Ohmichi, *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995, 666, 13.
12. Y. Tsuji, T. Mikami, Y. Anan, and Y. Ogra, *Metallomics*, 2010, 2, 412.
13. J. J. Sloth, and E. H. Larsen, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, 15, 669.
14. J. J. Sloth, E. H. Larsen, S. H. Bügel, and S. Moesgaard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 317.
15. J. Darrouzès, M. Bueno, G. Lespès, and M. Portin-Gautier, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, 88.
16. W. Guo, S. Hu, Y. Wang, L. Zhang, Z. Hu, and J. Zhang, *Microchem. J.*, 2013, 108, 106.
17. Y. Ogra, K. Ishiwata, and K. T. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 2005, 554, 123.
18. S. Diez Fernandez, N. Sugishama, J. Ruiz Encinar, and A. Sanz-Medel, *Anal Chem*, 2012, 84, 5851.
19. Y. Anan, Y. Hatakeyama, M. Tokumoto, and Y. Ogra, *Anal. Sci.*, 2013, 29, 787.

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2013
Published October 3, 2013
5991-2750JAJP



Agilent Technologies