

HILIC LC/MS による哺乳類細胞培地の モニタリング

著者

Jordy J. Hsiao,
Genevieve van-de-Bittner,
Te-Wei Chu, Oscar G. Potter,
and Hongfeng Yin
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z カラムと Agilent 6545 Q-TOF LC/MS を用いて、哺乳類細胞培地における栄養素の取り込みと排出された老廃物の 6 日間のモニタリングをしました。HILIC-Z カラムの使用により、高塩濃度を含むサンプル (細胞培地など) に対する耐性が得られ、良好なピーク形状とリテンションタイムの再現性が得られました。移動相、グラジエント、機器パラメータを最適化することで、このメソッドを用いて培地の栄養素 (グルコースおよびアミノ酸) や代謝産物 (老廃物、乳酸や TCA サイクルに関連する他の有機酸) をネガティブイオンモードでの 1 回の分析でモニタリングできました。

はじめに

質量分析 (MS) は、種々の低分子化合物を対象とするメタボロミクス研究において高感度の分析技術として日常的に用いられます¹。哺乳類細胞におけるメタボロミクスは、多くの研究分野で活用が見込まれる有望なツールとして注目されているため、細胞培地内の細胞によって消費および分泌される多くの代謝物の研究がますます重要になっています^{2,3}。分析上の課題もいくつか残っており、これには、アニオン性代謝物の保持⁴、サンプルマトリックス効果⁵、およびキレート有機酸やリン酸化合物の分析性能⁶などがあります。

こうした課題を解決するために、堅牢性と再現性に優れた親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) LC/MS メソッドを開発しました。移動相調整剤として InfinityLab 不活性化添加剤を用いるこのメソッドにより、金属キレート有機酸およびリン酸化合物のピーク形状とシグナル強度が向上しました。クロマトグラフィーの最適化や HILIC カラムの試験の一環として、サンプルマトリックス中の塩濃度の影響についても調べました。細胞培地で消費、排出される代謝物のプロファイリングが可能なメソッドを開発しました。

実験方法

メソッド

塩濃度耐性の検討: リン酸化合物や糖リン酸の異性体を含む一連の標準代謝物を選んで、HILIC LC/MS メソッドを開発しました。分析対象物の原液は 5 mg/mL で、Milli-Q 純水で調製しました。次に原液を 80:20 のアセトニトリル (ACN)/水で 1 ng/μL (ppm) に希釈しました。高塩濃度原液 (4 M 尿素と 2 M 塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液) は塩の添加実験に用いました。高塩濃度溶液は標準代謝物 (3 ng) に 20 % (80 mM 尿素、40 mM NaCl) および 40 % (160 mM 尿素、80 mM NaCl) の割合で塩を添加しました。塩はサンプルマトリックス (80 % ACN) に溶解しないため、40 % を超える高塩濃度は使用しませんでした。

細胞培地の検討: 10 % ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で K562 白血病細胞を培養しました。細胞と培地の一部を直後 (0 日目)、および 24 時間 (1 日目)、48 時間 (2 日目)、72 時間 (3 日目)、または 6 日後 (6 日目) に採取しました。サンプルは 250 × g で 5 分間遠心分離し、細胞を沈殿させました。培地 (100 μL) を別の遠心分離チューブに移し、400 μL の 50 % ACN と混合して、さらに 10,000 × g で 5 分間遠心分離しました。次に、上澄み 1 μL を HILIC LC/MS で分析しました。結果を Agilent MassHunter Qualitative Analysis で解析しました。

分析対象物の分離: クロマトグラフィー分離には InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラム (2.1 mm × 50 mm, 2.7 μm, PEEK ライナ付 (p/n 679775-924)) を使用しました。移動相は 10X の緩衝液原液 (100 mM 酢酸アンモニウム水溶液、pH 9.0) をまず調製し、水 (溶媒 A) または ACN (溶媒 B) を用いて 1X 溶媒にしました。InfinityLab 不活性化添加剤 (p/n 5191-4506) を水系と有機溶媒系の両方の移動相に添加し、グラジエント溶出中、一定の濃度を保つようにしました。

装置構成

LC/MS 分析は、Agilent Jet Stream イオン源付の Agilent 6545 Q-TOF に Agilent 1290 Infinity LC を組み合わせて実施しました。LC は次のモジュールで構成されています。

- シールウォッシュ付 Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- サーモスタット (G1330B) 付 Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A)
- Agilent カラムコンパートメント (G1316C)

ダイナミックマス軸キャリブレーションは、リファレンスマス溶液を連続注入することにより実施しました。表 1 および 2 に、LC と MS の最適条件を示します。データの取り込みと解析には Agilent MassHunter ソフトウェアを用いました。

表 1. LC の最適パラメータ

1290 Infinity LC システム	
カラム	InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 mm × 50 mm, 2.7 μm (p/n 679775-924)
移動相	A) 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液、pH 9、5 μm 不活性化添加剤入り (p/n 5191-4506) B) 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液/ACN 10:90 (v/v)、pH 9、5 μm 不活性化添加剤入り (p/n 5191-4506)
流量	0.25 mL/min
グラジエント	0 から 2 分、95 %B 2 から 12 分、95 %B ~ 50 %B 12 から 13 分、50 %B ~ 95 %B 13 から 21 分、95 %B
カラム温度	25 °C
注入量	1 μL
オートサンプリング温度	10 °C

表 2. MS の最適パラメータ

6545 Q-TOF LC/MS	
イオン化モード	Agilent Jet Stream
イオン化極性	ネガティブ
ガス温度	200 °C
ドライガス	10 L/min
ネプライザ圧力	40 psi
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	3,000 V
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ	125 V
スキマ電圧	65 V
オクタポール 1 RF 電圧	750 V
取り込み範囲	m/z 50~1,000
MS 取り込みレート	1 スペクトル/秒
リファレンスマス	m/z 980.01638

結果と考察

InfinityLab Poroshell HILIC-Z カラムの幅広い pH 範囲の安定性と高分離能という利点を活かして、シンプルで堅牢な HILIC LC/MS メソッドを開発しました。本研究のクロマトグラフィー分離は、pH 9.0 の移動相で最良の結果が得られました。さらに、InfinityLab 不活性化添加剤の添加により、キレート有機酸とリン酸化合物のピーク形状とシグナル強度が大幅に向上しました。最もよく使われる 2 種類の細胞培地、DMEM と RPMI 1640 には、塩化ナトリウム (NaCl、約 100 mM)、塩化カリウム (KCl、約 5 mM)、および硝酸カルシウム (Ca(NO₃)₂、約 0.4 mM) などの無機塩類が

高濃度で含まれます。この塩類により浸透圧の平衡が維持され、培養細胞の膜電位を調節します。リテンションタイムの再現性や代謝物のピーク形状に対する塩の影響を確認するために、尿素と NaCl を濃度を変えてサンプルに添加し、HILIC LC/MS メソッドで分析しました (図 1)。その結果、ターゲットのヌクレオチド (AMP、ADP、ATP、GTP) および糖リン酸の異性体 (グルコース-1-ホスフェート、グルコース-6-ホスフェート) は、高塩濃度サンプル中でイオン抑制を最小限にして検出され、リテンションタイムの再現性が得られることが示されました (図 1)。

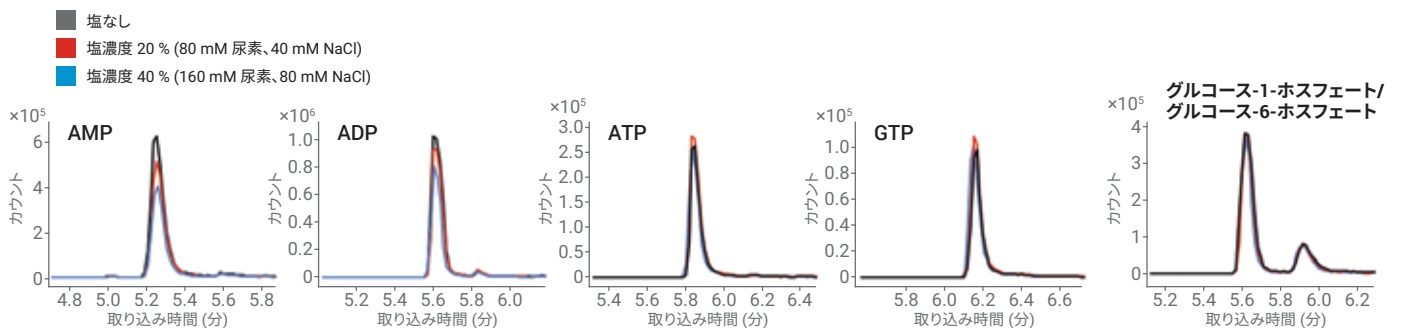


図 1. HILIC-LC/MS を用いた塩類サンプル中の分析対象物のリテンションタイムの再現性

次に細胞培地中の栄養素の消費と代謝産物(老廃物)の排出を調べるために6日間の実験を実施しました(図2)。予測したとおり、時間が経つにつれ、培地中に代謝産物(老廃物)として乳酸が蓄積されました(図3、1列目)。さらに、TCAサイクルに関連する他の有機酸(リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸(α -KG)、グルタミン酸、クエン酸)が排出され、調べた時間内で

は細胞培地に蓄積されることが分かりました(図3)。一方、グルコースレベルは時間とともに減少します(図3、2列目)。これはグルコースが完全に枯渇する(図3、2列目、6日目)まで細胞代謝によって細胞が糖を消費するためです。アミノ酸レベルも時間とともに減少しますが、これは細胞が培地から栄養素を消費することに関連しています(図4)。これらの結

果から、哺乳類細胞培地中の有機酸やアミノ酸を含む幅広い代謝物におけるプロファイリングとモニタリングが1回のHILIC LC/MS分析で可能であることが実証されました。



図2. 哺乳類細胞培地中の代謝物モニタリングの実験計画

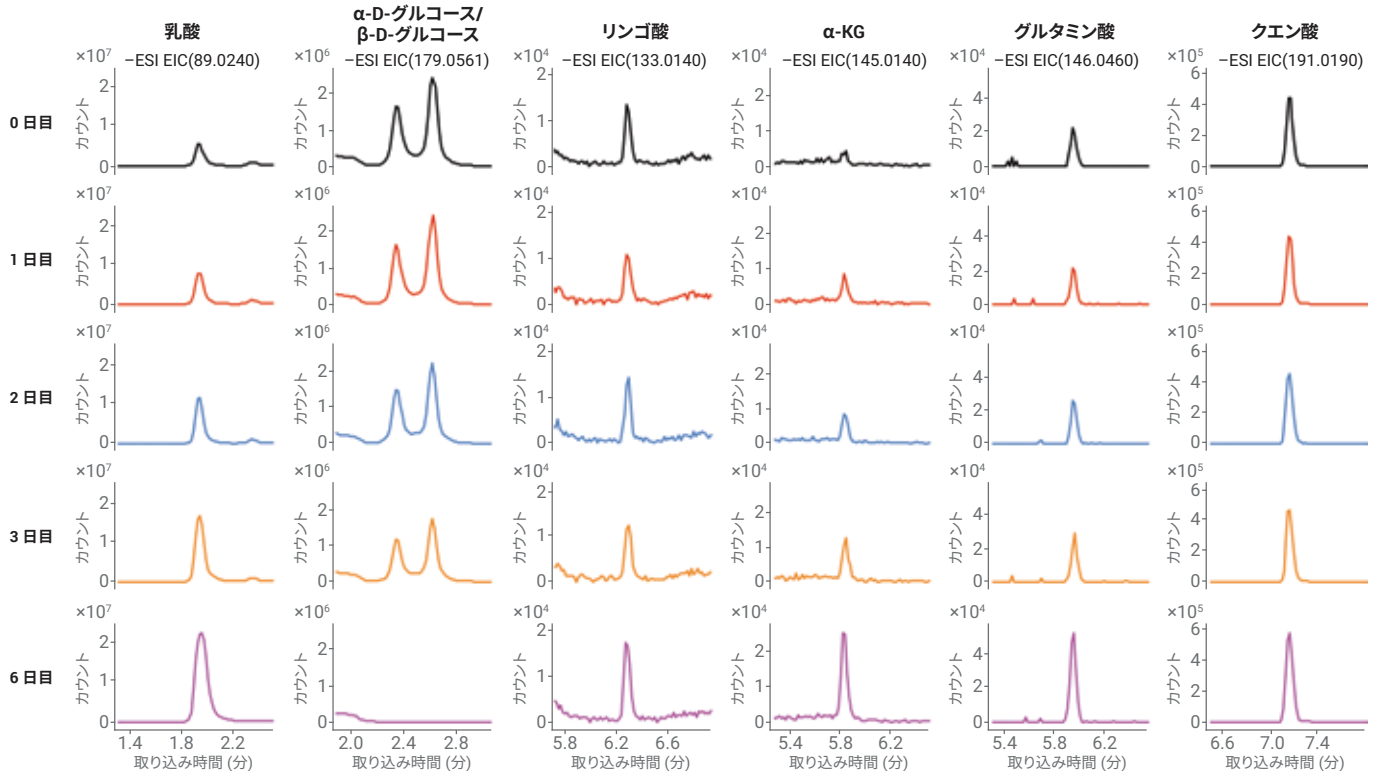


図3. 細胞培地中の細胞代謝産物(老廃物)の蓄積と分泌のモニタリング



図 4. 細胞培地中におけるアミノ酸栄養素の消費のモニタリング

結論

6545 Q-TOF LC/MS を組み合わせた HILIC ベースのクロマトグラフィーメソッドは、哺乳類細胞培地中の幅広い代謝物クラスのプロファイリングにおいて優れた分析性能を示されました。PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell HILIC-Z カラムを用いることにより、高塩濃度サンプルについてリテンションタイムの再現性および感度を高い信頼性で得られました。PEEK ライナ付 HILIC-Z カラムは、1290 Infinity LC システムと 6545 Q-TOF システムと組み合わせることにより優れた性能を発揮し、メタボロミクスプロファイリングに最適なプラットフォームとなります。これらの特徴により、アニオン性および疎水性の高い代謝物の両方の検出と分離ができ、バイオ製造プロセスのモニタリングに用いることができます。

参考文献

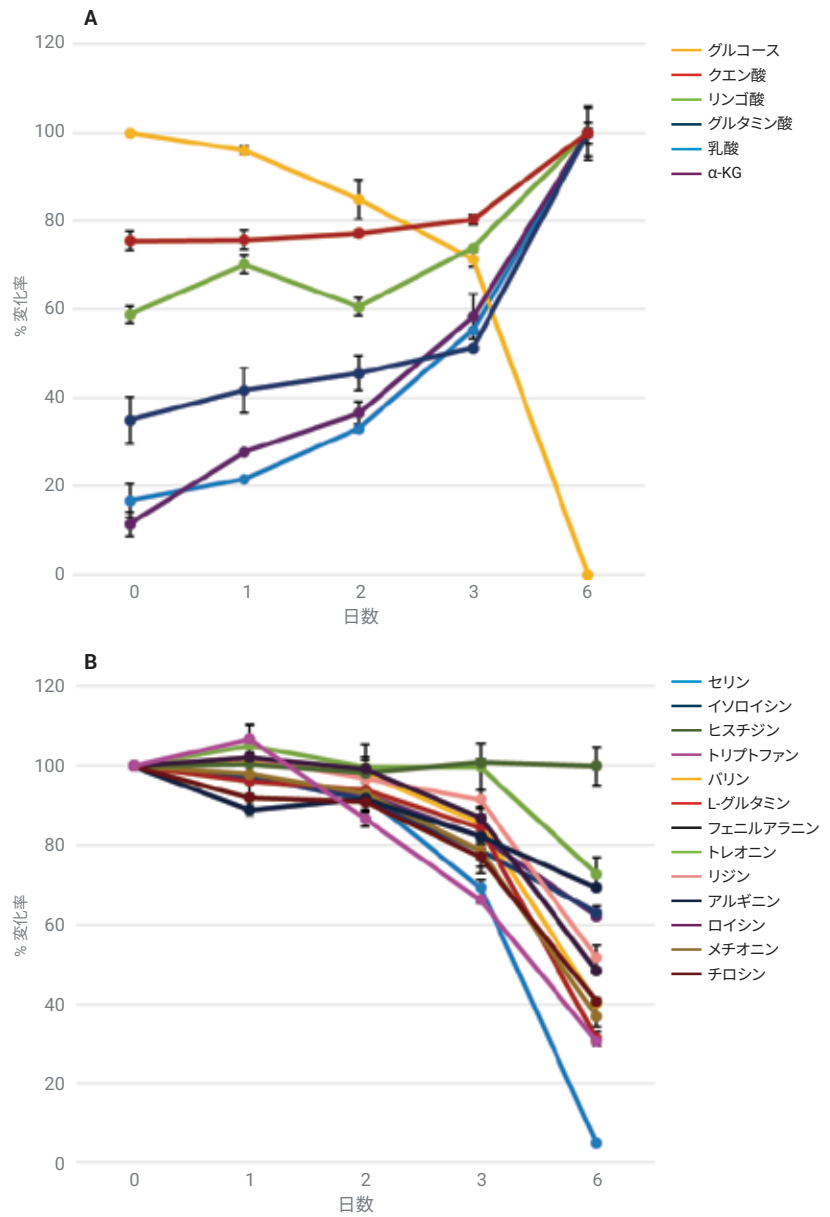


図 5. 哺乳類細胞培地における栄養素の消費と代謝産物分泌の定量分析

1. Wishart, D.S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*(7), 473-484.
2. Silva, L. P.; *et al.* Exometabolomics and MSI: deconstructing how cells interact to transform their small molecule environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *34*, 209-216.
3. Garcia-Manteiga J. M.; *et al.* Metabolomics of B to plasma cell differentiation. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*(9), 4165-76.
4. Zhang, Z.; *et al.* Evaluation of coupling reversed phase, aqueous normal phase, and hydrophilic interaction liquid chromatography with Orbitrap mass spectrometry for metabolomic studies of human urine. *Anal. Chem.* **2012**, *84*(4), 1994-2001.
5. Panuwet, P.; *et al.* Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *46*(2), 93-105.
6. Pesek, J. J.; *et al.* Improvement of peak shape in aqueous normal phase analysis of anionic metabolites. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*(24), 3509-3516.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、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. 2018
Printed in Japan, June 27, 2018
5994-0024JAJP

