

巻頭言

先端分析技術・計測機器開発に思うこと



東京農工大学工学部教授
澤田 嗣郎

小生、30余年勤めた東京大学工学部を定年で終え、今は東京農工大学にて教鞭をとる職についている。大きな総合大学から東京の郊外にあるこぢんまりした大学の2箇所の教育現場を経験させていただき、それぞれの文化の違いに戸惑いながらもすばらしい先生方に囲まれて楽しく過ごさせていただいているわが身の幸せを日々感じている。昨年は、日本分析化学会会長職を仰せつかり、時代の変化に対応した体制変革に向けて微力ながら努力させていただいた。

ご存知のとおり、総合科学技術会議で議論されていた第3次科学技術基本計画がスタートすることになり、従来の4つの柱に加えて“ものづくりと計測”が重要課題になろうとしている。すでに科学技術推進機構(JST)では先端計測・分析機器開発プロジェクトが開始されて3年が経過し、まもなく3期目の採択課題が決定されようとしている。小生もこのプロジェクトをプロジェクトオフィサーとして微力ながらお手伝いしている。この

プロジェクトは、“作ってノーベル賞、使ってノーベル賞”のキャッチフレーズで開始されたが、具体的な中身の議論となると産業界、官界、学界それぞれ立場によって見解が異なるようだ。先端分析機器開発は息の長い事業であることは多くの関係者たちの共通の理解ではあるが、開発に要する期間については省庁間や産業界、いろいろな分野の研究者によって認識の違いは大きい。採択テーマをみると、バイオテクノロジーのための先端計測機器開発を目指しているものが極めて多い。いわゆる出口が先端医療・診断技術のための分析機器開発の類である。それほどバイオテクノロジーは計測機器に渴望していたのかと驚かされる。一方エレクトロニクスやナノテクノロジーのために必要な計測・分析技術は前者と比べると、その重要性を鑑みるにいささか数少なく感じられるのは筆者だけではないだろう。

よくみると前者のバイオのための計測・分析機器はイメージング技術開発が多い。いわゆる顕微

C O N T E N T S

巻頭言

- ・先端分析技術・計測機器開発に思うこと
澤田嗣郎1

報 文

- ・質量分析計を用いたリン酸化プロテオーム解析
松本雅記 / 中山敬一3

解 説

- ・液体クロマトグラフ質量分析装置 NanoFrontier LD
緒方いずみ / 師子鹿司

安田博幸 / 竹田明弘

大和田章 / 吉岡信二

照井 康8

- ・TEMトモグラフィー用3D再構成システムとその応用

中澤英子 / 小笠原光雄

橋本隆仁 / 四辻貴文11

学会発表ミニファイル14

新製品紹介

- ・「液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier LDの紹介」17

- ・ナノフロー液体クロマトグラフ

NanoFrontier nLC18

- ・分光蛍光光度計 F-7000用

マイクロプレート付属装置 発売19

- ・平沼オンライン全有機炭素(TOC)

測定装置19

ご挨拶20

U.D.C.621.384.8 : 543.51 : 543.645.6 : 546.185-325

質量分析計を用いたリン酸化プロテオーム解析

Phosphoproteome analysis by MS-based proteomics

松本 雅記* 中山 敬一**



松本 雅記



中山 敬一

1. はじめに

タンパク質のリン酸化は細胞内シグナル伝達において極めて重要な役割を担っていることから最も注目されている翻訳後修飾の一つである。例えば、細胞膜受容体への刺激はチロシンキナーゼを活性化することで、下流分子をリン酸化し、最終的には核内の転写活性化や細胞骨格の再構築などを引き起こす。このように、タンパク質リン酸化はまさに細胞内シグナル伝達機構のメインイベントであり、『どのタンパク質』の『どの部位』が、『いつ』、『どれぐらい』リン酸化しているかを知ることがシグナル伝達経路を総合的に理解する上で重要な課題である。

ヒトゲノムにはタンパク質のリン酸化を担う酵素であるプロテインキナーゼが581種類コードされている¹⁾。一つのプロテインキナーゼは複数の基質タンパク質をリン酸化することや、一つの基質タンパク質の中には異なるプロテインキナーゼによってリン酸化を受ける部位が複数箇所存在することから、細胞内では実に莫大な数のリン酸化タンパク質(およびリン酸化部位)の存在が推定される。これらのリン酸化部位を大規模に解析するためには、近年発展が目覚ましい質量分析計を用いたプロテオミクス的手法が最も有効である²⁾。

リン酸化を含めタンパク質翻訳後修飾のほとんどは、アミノ酸残基の質量変化をもたらすことから、質量分析計は比較的古くからタンパク質の翻訳後修飾の解析に用いられてきた。近年の装置の高感度化・高性能化も追い風となって、さらに大きな期待が寄せられている。しかしながら、細胞抽出液消化物を直接質量分析計で解析しても、翻訳後修飾を含むペプチドはほとんど検出できない。まずは翻訳後修飾を受けたタンパク質あるいはペプチドを濃縮する必要がある²⁾。翻訳後修飾のほとんどはアミノ酸の側鎖に化学的変化、すなわち、修飾基の導入が起きる。これらの翻訳後修

飾基によるアミノ酸側鎖の変化を天然の‘タグ’として利用することにより、修飾されたタンパク質を選択的に濃縮することが可能である²⁾。本稿では質量分析計を用いてリン酸化プロテオーム解析を行うためのわれわれの試みを紹介したい(図1)。

2. IMACを用いたリン酸化ペプチドの濃縮

質量分析計を用いて、効率よくリン酸化ペプチ

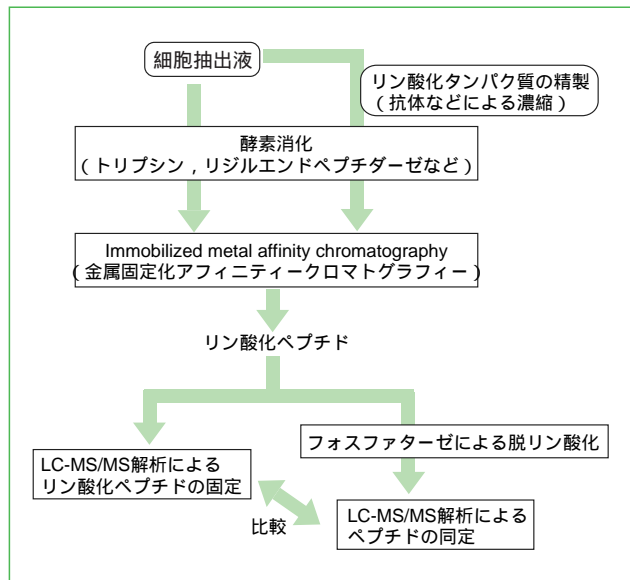


図1 リン酸化ペプチド同定法の概略

細胞抽出液を酵素消化し得られたペプチドからIMACによってリン酸化ペプチドを精製する。精製されたリン酸化ペプチド混合物は二分して一方をフォスファターゼにて脱リン酸化処理を施し、LC-MS/MSに解析を行う。脱リン酸化処理を施すことでより効率よくペプチド配列の同定が可能となる。

鏡の類である。生体を計測するとき、一点計測や平均値的計測では不十分であることは素人にもわかる。そこで現行の分析技術を画像化し、たとえば正常組織と異常組織の存在状態を計測分析し、できれば診断しようというわけだ。これらは、専門外の多くの人々にわかりやすいし、興味も引く。もちろん重要な課題であることはいうまでもない。

しかし後者の“ものづくり”(ナノマテリアルズ)のための先端分析技術・計測機器開発に求められる要件は、前者に比べると、はるかに厳しいものがある。1個のナノ粒子や1分子計測からナノ領域におけるそれらの存在状態を計測しようとする開発課題は前者に比べるとはるかに難易度が高い。まったく新しい発想による計測機器の開発がいま求められているといってもいいだろう。

このように、同じ開発プロジェクト内の採択課題間でも開発に要する期間は大きく異なってくるし、始めてみないことには予想すらできないこともあり得るということであろう。バイオテクノロジーのための機器開発課題がナノテクノロジーのためのそれと比べて相対的に多いのは、前者は出口が近くに見えかつわかりやすいからにほかならない。

かつてメーカーでは汎用性の高い原子吸光光度計や分子分光光度計あるいはクロマトグラフ等は必死にOA化に取り組み、いわゆる“Easy Operation”化に取り組んだ経緯がある。一方、ナノテク対応分析機器類は高価なうえ、それほど数多く出回るわけでもないので熟練技術者を養成し、機器のメンテナンスを彼らに任せすぎた嫌いがある。狭い日本のような国ではそれで十分であった機器のメンテナンスはグローバル化の進む昨今では“Easy Operation”化の進んだ外国製品に太刀打ちできなくなっている。地味だが重要な基礎工学とも呼ぶべきこのような仕事は先端工学と車の両輪のようにあわせて取り組むべきであり産官学間で真剣に議論を進める必要があると思う。

著者略歴

澤田 嗣朗(さわだ つぐお)

1941年生まれ。

昭和40年 東京大学工学部工業化学科卒
昭和45年 東京大学大学院工学系研究科工業化学専攻 博士課程修了
昭和45年 東京大学工学部助手
昭和54年 テキサス工科大学博士研究員
昭和56年 東京大学工学部講師
昭和61年 東京大学工学部助教授
昭和62年 東京大学工学部教授
平成10年 東京大学大学院新領域創成科学研究科教授
平成16年 東京大学定年退官
平成16年 東京農工大学工学部教授(現在に至る)
平成16年 東京大学名誉教授
平成16年 独立行政法人 科学技術振興機構 開発総括(現在に至る)
平成17年 社団法人 日本分析化学会 会長

* 九州大学生体防御医学研究所 特任助手, 理学博士

** 九州大学生体防御医学研究所 教授, 医学博士

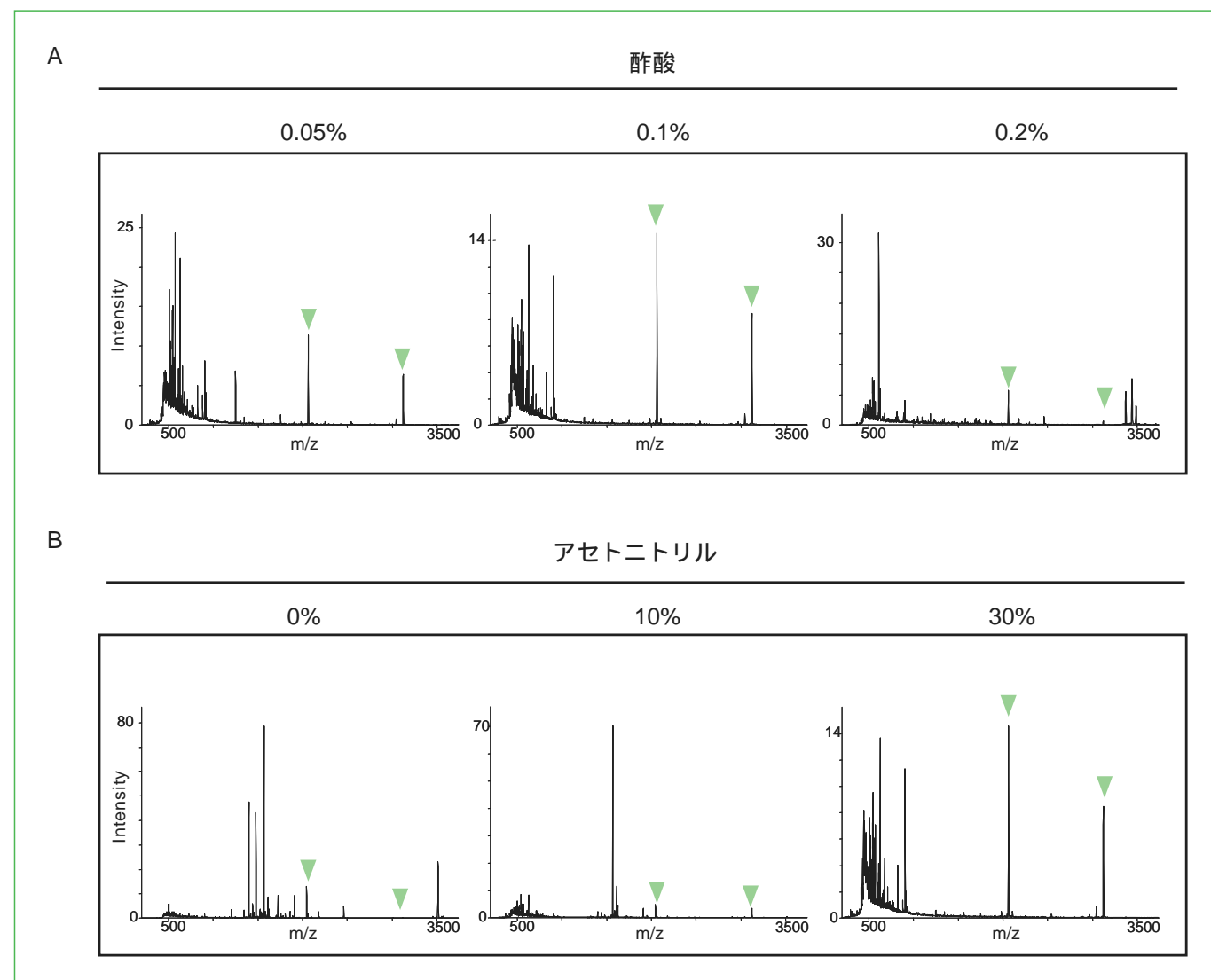


図2 IMACの最適化

-caseinとウシ血清アルブミンの消化物をモル比1：10で混合した試料を用いてIMACの最適化を行った。酢酸およびアセトニトリルの濃度を変えたいくつかの条件下でIMACへの結合および洗浄を行った。回収されたペプチドはMALDI-TOF/MSによって精製度の確認を行った(リン酸化ペプチドは矢頭で示す)。

ドを同定するためにはリン酸化ペプチドのみを濃縮することが要求される。リン酸化ペプチドの濃縮法としては鉄やガリウムなどの金属がリン酸と選択的に結合することを利用した固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(immobilized metal affinity chromatography: IMAC)が有用である^{5,6)}。IMACによる精製は操作が簡便であることや、全てのリン酸化(S/T/Yに関わらず)に適応可能であることから応用範囲が広い。その反面、リン酸に対する選択性は厳密ではないため、しばしば非リン酸化ペプチドの非特異的混入が問題となる。従って、非特異的吸着を防ぐために精製条件の最適化を慎重に行う必要がある。また、カルボキシ末端やアスパラギン酸残基およびグルタミン酸残基をメチルエステル化すること

で、リン酸化ペプチドに対する選択性を上げる努力もなされているが⁵⁾、エステル化によるペプチドの損失(おそらく不溶化による)や不均一なエステル化などによって同定効率が下がることもあるので注意が必要である。筆者らは、エステル化などの前処理なしにIMACによって選択的にリン酸化ペプチドを精製するための条件検討を詳細に行った。-casein消化物(リン酸化タンパク質)とウシ血清アルブミン(非リン酸化タンパク質)の消化物の混合物(モル比 1：10)を用いて、Ga-IMAC(Poros MC)によるリン酸化ペプチドの精製を様々な条件下で行った(図2A)。Ga-IMACは酢酸濃度に非常に敏感であり、0.2%以上では回収率が非常に悪く、0.1%酢酸存在下が最も精製効率が良かった(図2A)。また、30%以上のアセ

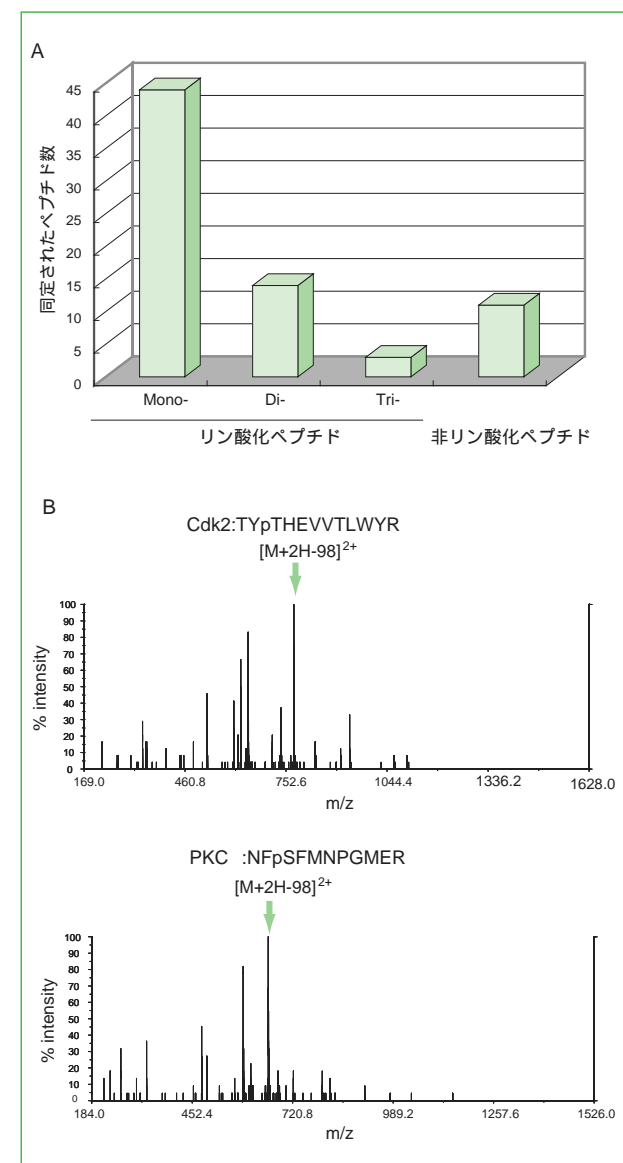


図3 質量分析計によるリン酸化部位の同定

(A)ヒトB細胞抽出液をトリプシン消化後、Ga-IMACによる精製を行った。濃縮されたリン酸化ペプチドはNanoFrontierLを用いることで60種類以上のリン酸化ペプチドの同定が可能であった。(B)細胞周期やシグナル伝達に関わる分子のリン酸化ペプチドのMS/MSスペクトル。

トニトリル等の有機溶媒を添加することで非特異的結合を著しく低減させることができた(図2B)。

3. 質量分析計によるリン酸化部位決定

最適化したIMACを用いて、ヒトB細胞株の全細胞抽出液トリプシン消化からリン酸化ペプチドを濃縮し、NanoFrontierLにて測定を行ったところ、約60種類以上におよぶリン酸化ペプチドを同定することができた(図3A)。非リン酸化ペプチドの混入は全体のわずか15%程度であり、高い選択性でリン酸化ペプチドの濃縮が可能であった。しかしながら、強度不足で同定に十分な

MS/MSスペクトルが得られていないイオンや十分なMS/MSスペクトルが得られているにも関わらずデータベース検索において有意なヒットが得られないイオンが多数存在することが判明した。一般にリン酸化したペプチドはイオン化効率が低いことや、LC-MS解析においてHPLCの配管等を使用されている金属への吸着によって質量分析計への導入効率が低下すると考えられている。また、セリン・スレオニンがリン酸化したペプチドの場合、CID(collision induced dissociation)を用いたMS/MS解析ではリン酸の脱離(ニュートラルロス)がペプチド結合の解離より優先的に起きる。すなわち、プリカーサーイオンから-32.6(3価)、-49(2価)、-98(1価)のペプチドに相当するシグナルが著しく強く観測され、多くの場合同定の妨げとなる⁵⁾。今回同定されたリン酸化ペプチドのMS/MSスペクトルの例を図3Bに示すが、ニュートラルロスに起因する強いピークが顕著に認められる。

このようにリン酸化ペプチドを濃縮ができたとしても、上述したようなリン酸化ペプチドの特性によって同定が困難な場合が多い。この問題点を克服する方法として、われわれはIMACによる精製後、解析の妨げになるリン酸基を除去することを提唱している。データベースサーチを行っても同定ができなかったリン酸化ペプチドも、脱リン酸化処理を施すことで、MS/MSスペクトルの質が改善し容易にペプチド配列が同定できた(図4A)。また、リン酸化ペプチドと対応する脱リン酸化ペプチドのMASCOTスコアを比較したところ、多くのペプチドにおいて脱リン酸化処理によってスコアの上昇が認められ、同定の信頼性を向上させる効果も認められた(図4B)。さらに、脱リン酸化処理を施した試料にのみ検出されるペプチドが160以上同定された。これらのペプチド配列に対して、典型的なリン酸化部位のコンセンサスモチーフの有無を確認したところ、85%以上のペプチドにおいていずれかのリン酸化モチーフが存在することが判明した(図5)。一方、非リン酸化ペプチド(非特異的吸着)の30%程度にのみリン酸化モチーフが認められた。このように、脱リン酸化処理によって特異的に検出されたペプチドの多くが実際にリン酸化していたと推定される。

4. おわりに

質量分析計を用いた方法論は非常に強力で、生

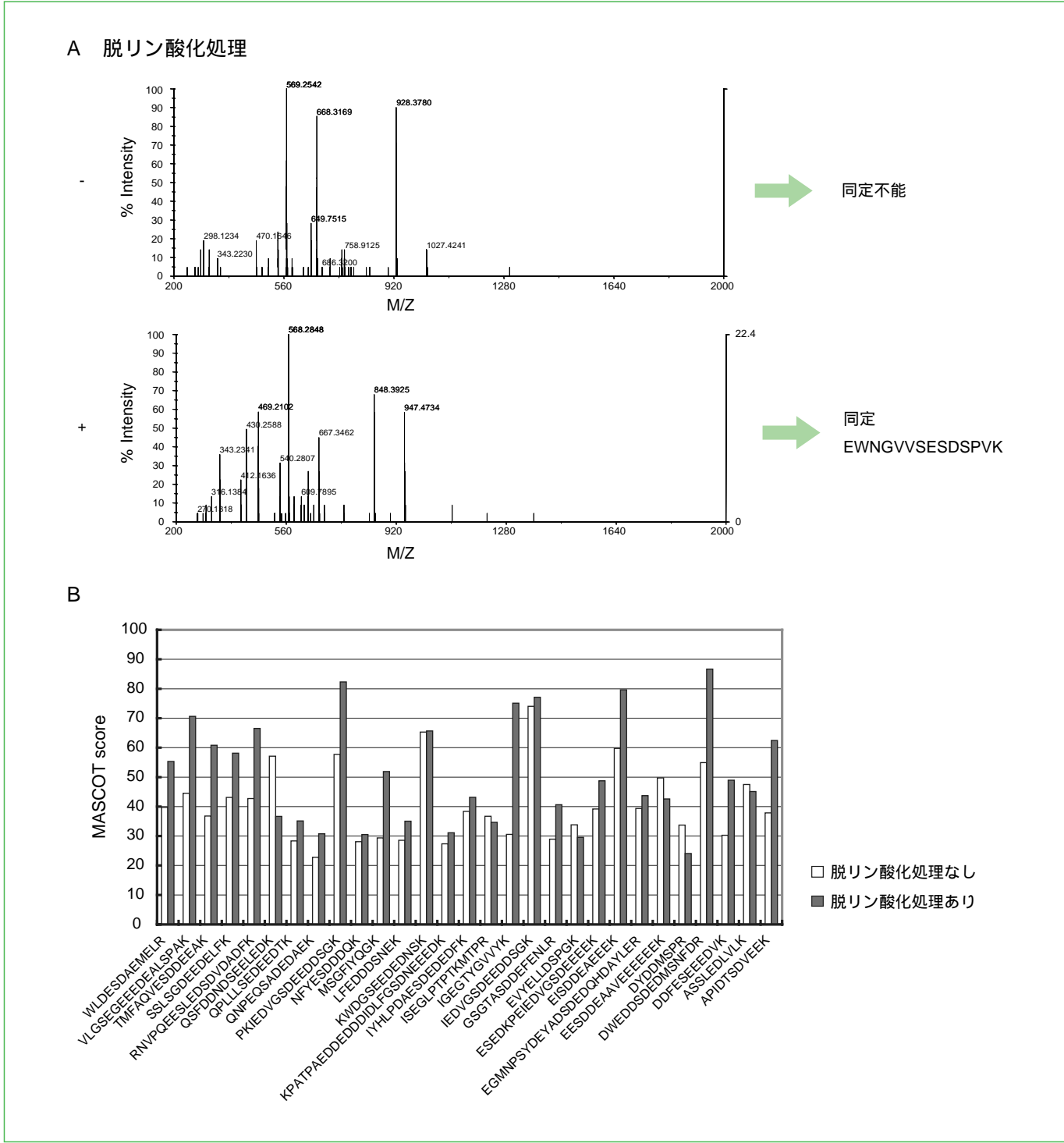


図4 脱リン酸化処理法によるリン酸化ペプチド同定の改善

(A) Mascotによる同定が不能だったリン酸化ペプチドでも脱リン酸化処理によってリン酸基を除去することで同定可能なスペクトルを得ることができる。(B) 脱リン酸化処理の有無における、同一配列ペプチドのMascotスコアの比較。脱リン酸化処理によって有意にスコアの上昇が認められる。

命科学において革命をもたらしたことは周知の通りである。高感度な質量分析計の普及によって、もはや微量タンパク質の同定は以前ほど敷居の高い技術ではなくなっている。しかしながら、リン酸化などの翻訳後修飾の網羅的解析は未だに挑戦的な領域である。チロシンリン酸化と比較して、

セリンおよびスレオニンのリン酸化は細胞骨格タンパク質やシャペロンタンパク質などの量的に豊富なタンパク質から転写因子や細胞周期関連分子のように微量なタンパク質にいたるまで、広範なタンパク質において起きることが知られている。すなわち、リン酸化プロテオームも総プロテオーム

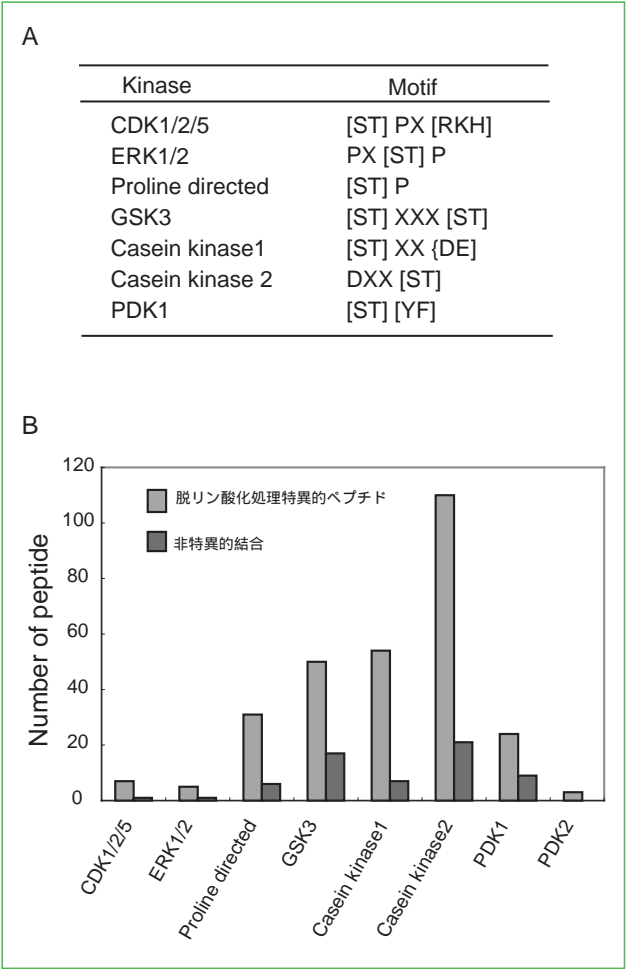


図5 モチーフスキャンによる脱リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの比較

脱リン酸化処理を施した試料特異的に同定されたペプチドと非特異的ペプチドの配列においてリン酸化の標的配列の有無を確認した。

ムと同様広いダイナミックレンジを有することになる。従って、全細胞抽出液の消化物からリン酸化ペプチドを濃縮しても、現時点の質量分析計のダイナミックレンジでは量的に多いものから順に数百が同定されるに過ぎない。この問題を克服するためには、質量分析計のダイナミックレンジの向上が切望される。また、タンパク質を前分画することで試料側のダイナミックレンジを狭めることも必須であるが、前分画による試料数の増大による処理速度の低下が大きな課題である。われわれは、現在、前分画からIMACによるリン酸化ペプチド精製までの処理をハイスループットに行うための技術開発を行っている。今後、ハードウェア(質量分析計)とアプリケーション(試料調製法)の協調的発展によって、真のリン酸化プロテオーム解析が実現することを期待したい。

謝辞

本研究の実施にあたって日立ハイテクノロジーズに多大なご協力いただいた。末尾ながら関係者の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- (1) Manning G, et al : Science 298 : 1912-1934.. 2002.
- (2) Mann M & Jensen ON : Nature Biotech 21 (3) : 255-261, 2003.
- (3) Salomon AR, et al. : Proc Natl Acad Sci USA 100 : 443-448, 2003.
- (4) Blagoev B, et al. : Nat Biotechnol 22 : 1139-1145, 2004.
- (5) Ficarro SB, et al : Nat Biotechnol 20 : 301-305, 2002
- (6) Posewitz MC, & Tempst P : Anal Chem 71 : 2883-2892, 1999
- (7) Gygi S.P. et al : Nat Biotech 17, 994-999, 1999
- (8) Oda Y, et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 6591-6596, 1999.
- (9) Ong SE, et al. : Mol. Cell Proteomics 1 : 376-386, 2002.

U.D.C.621.384.8 : 543.544.52 : 547.86 : 612.398 : 641.12 : 681.3.02

液体クロマトグラフ質量分析装置 NanoFrontier LD

Liquid Chromatograph / Mass Spectrometer for Search of Biomarker Proteins

緒方 いずみ* 師子鹿 司* 安田 博幸* 竹田 明弘*
大和田 章* 吉岡 信二* 照井 康*

1. はじめに

創薬や体外診断の分野にて、疾病メカニズム解明および疾患関連マーカー(以下、バイオマーカー)探索のために、細胞、血清、尿などに含まれるタンパク質や代謝物解析がさかに行われている。また、近年はさらにバイオマーカータンパク質の発現量の変化が注目されており、同定解析のみならず変動解析のニーズも高くなってきた。

株式会社日立ハイテクノロジーズでは、従来機の検出系を改良し、新たに比較定量を可能にした液体クロマトグラフ質量分析装置「NanoFrontier LD」を2006年5月に発売した(図1)。

2. NanoFrontier LDの特長

NanoFrontier LDは、スプリットレスで流量10~250nL/minのグラジエント送液が可能なナノLQ(Liquid Chromatograph)、およびリニアイオントラップ(以下、LIT)と飛行時間型(以下、

TOF)の2種類の質量分析部を結合した質量分析装置(以下、MS)を搭載した液体クロマトグラフ質量分析装置(LC/MS)である。

ナノLC部は、日立独自の送液方法DEGS(Dual Exchange Gradient System)^{1,2)}によりスプリットレスでナノ流量域での高安定・高再現グラジエント送液を可能にした。また、二次元ナノLCシステム(オプション)が接続可能であり、従来機では分離が困難であった複雑なタンパク質の分離が可能である。

質量分析部はLITとTOFの搭載により、多段階のMS/MS分析を高い質量数精度で測定することができる。また、複数のMS/MS分析法を搭載し、試料の構造情報をより多く得ることが可能となった。さらに、定量機能を実現するために検出系を改良、ダイナミックレンジ5,000以上を実現した。

ソフトウェアは、独自のIBA(Information Based Acquisition)機能をさらに充実させており、

複雑な混合試料中の特定ターゲット成分を選択的に効率良くMS/MS測定することが可能である。

3. NanoFrontier LDによる測定例

(1) IBAによる同定効率の向上

IBAは、LCでの分離が不十分で、ほぼ同時にカラムから溶出する複数成分をできる限り多く同定するために開発した。

IBAは、同一試料を繰り返し測定する際にMS/MS測定したターゲット成分の情報(質量数と保持時間)をリアルタイムに内部データベースへ記憶し、複数回の測定でMS/MS測定する成分の重複を防ぐ機能である³⁾。また、同内部データベースは編集可能であり、測定試料に混在、または前処理や環境により混入する夾雑成分等の既知情報の追加が可能である。NanoFrontier LDは、この内部データベースを参照しながら繰り返し測定を行うため、特定ターゲット成分を選択的に効率良くMS/MS測定可能である。

IBAを用いた、大腸菌抽出サンプル酵素消化物の4回繰り返し測定の結果を示す。図2は試料のトータルイオンクロマトグラム(以下、TIC)である。4つのクロマトグラムの感度および溶出パターンに大きな変動は無い。次に、MS/MSのみのTIC(図3)を見ると、4つのクロマトグラムのパターンがそれぞれ変化していることがわかる。これは、IBAにより同一成分のMS/MS測定が回避された為である。これらの測定結果をタンパク質検索エンジンMASCOT[®]で検索し、ヒットしたタンパク質数の変化を図4に示す。タンパク質数は測定回数に応じて増加した。(本機能はNEDO助成事業の成果の一部です。)

(2) タンパク質消化物の比較定量

4種のタンパク質(Yeast Enolase, Phosphorylase b, Yeast Alcohol Dehydrogenase, Bovine Hemoglobin)のトリプシン消化物の混合試料“ A ”、“ B ”を用意した。各試料のタンパク質濃度は、Phosphorylase b, Yeast Alcohol Dehydrogenase, Bovine Hemoglobinについてはそれぞれ100 nmol/L, Yeast Enolaseは“ A ”が100 nmol/L, “ B ”が200 nmol/Lである。それぞれの試料1μLをNanoFrontier LDで分析し、結果をMASCOT[®]で検索して各タンパク質の同定を行った。また、各タンパク質について、Bovine Hemoglobinを内部標準として各成分の相対定量を試みた。

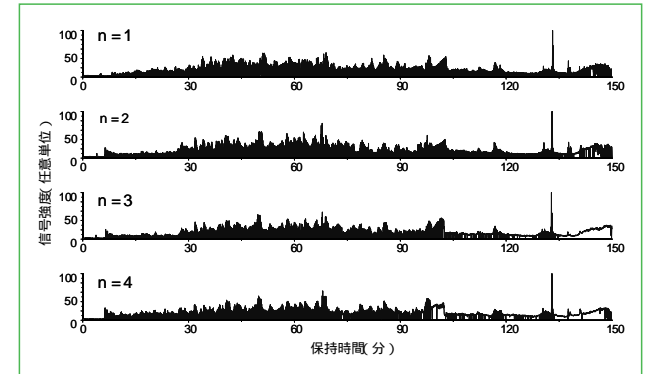


図2 大腸菌抽出サンプル酵素消化物のトータルイオンクロマトグラム

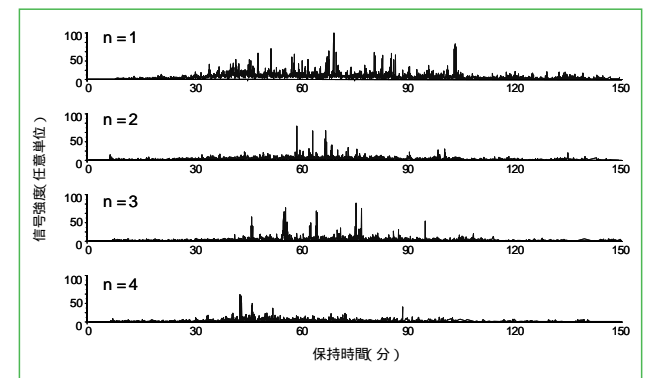


図3 大腸菌抽出サンプル酵素消化物のトータルイオンクロマトグラム(MS/MS)

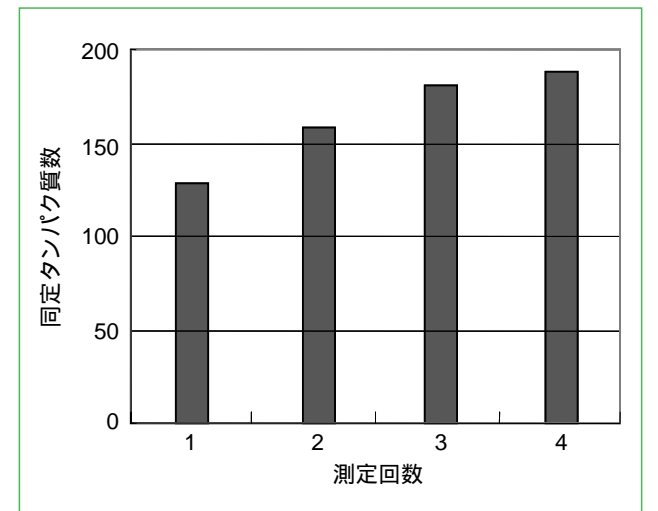


図4 測定回数に対する同定されたタンパク質数の変化

NanoFrontier LDのLC/MS測定した結果のトータルイオンクロマトグラムを図5(a)に示す。クロマトグラム上に各成分の消化ペプチド断片ピークが多数検出された。このMS/MS測定結果をMASCOT[®]で検索すると、試料中の4種のタンパク質すべてが同定された。一致したペプチド断片のMS/MSスペクトルの例を図5(b)に示す。

同定されたペプチドピークを由来するタンパク



図1 NanoFrontier LD外観

U.D.C.621.385.833.22 : 678.078 : 681.3.02.004.14

TEMトモグラフィー用 3D再構成システムとその応用

3D reconstruction system of H-7650 TEM for tomography and its application to biological specimen

中澤 英子* 小笠原 光雄** 橋本 隆仁** 四辻 貴文***

機能タンパク質や特殊な高分子材料などさまざまな物質のナノレベルでの微細構造は、それらの機能と密接に関連していることが明らかにされるようになり、高解像度での観察が可能な透過電子顕微鏡（以下、TEM）が構造的な機能解析のための重要なツールとして位置づけられつつある。特に、三次元的な立体構造が機能解析に重要な鍵となっているが、TEMで得られる像は、物体の二次元情報の投影像である。そこで、最近、二次元のTEM像から三次元情報を得るための手法として、電子線によるトモグラフィーが注目されている。この手法は、試料をTEM内で傾斜し、得ら

れたさまざまな方向の投影像をコンピュータ上で再構成するものである。我々は試料の傾斜から像取得までのプロセスを自動化し、さらに、ミッシングゾーンによるアーティファクトを軽減させるための再構成ソフトウェアを導入したシステムを開発した。本稿ではTEMトモグラフィーのための3D再構成システムの概要とその応用について報告する。

【TEMトモグラフィーのための 3D再構成システムの概要】

本システムは自動試料傾斜機能および三次元再構成用ソフトウェアとで構成されている。図1に本システムを搭載した120 kV TEM H-7650の外観を示す。

1. 自動試料傾斜機能

本システムでは、±60度の試料傾斜範囲を最小ステップ0.5度間隔で自動的に連続傾斜が可能なモータ駆動式ユーセントリックステージを採用している。試料傾斜に伴う視野位置のずれは、試料ステージの機械的補正に加え、位相限定相関法に基づく画像処理を用いた電磁的な調整によって補正される。さらに、TEM本体内蔵のデジタルカメラによる画像取得とリンクさせることによって、試料ステージの傾斜から傾斜像の位置補正、焦点合わせから画像記録まで、傾斜シリーズ取得に関する全プロセスが自動化されている。特に、H-7650では高角度傾斜時の焦点ずれによる倍率誤差がわずか±0.5%以下に抑えられているので、試料傾斜による焦点ずれ補正のための機械的な試料高さ調整が不要であり、さらには補正のための金コロイド粒子のようなマーカを試料に塗布する必要がない。



図1 3D再構成システムを搭載した120 kV TEM H-7650の外観

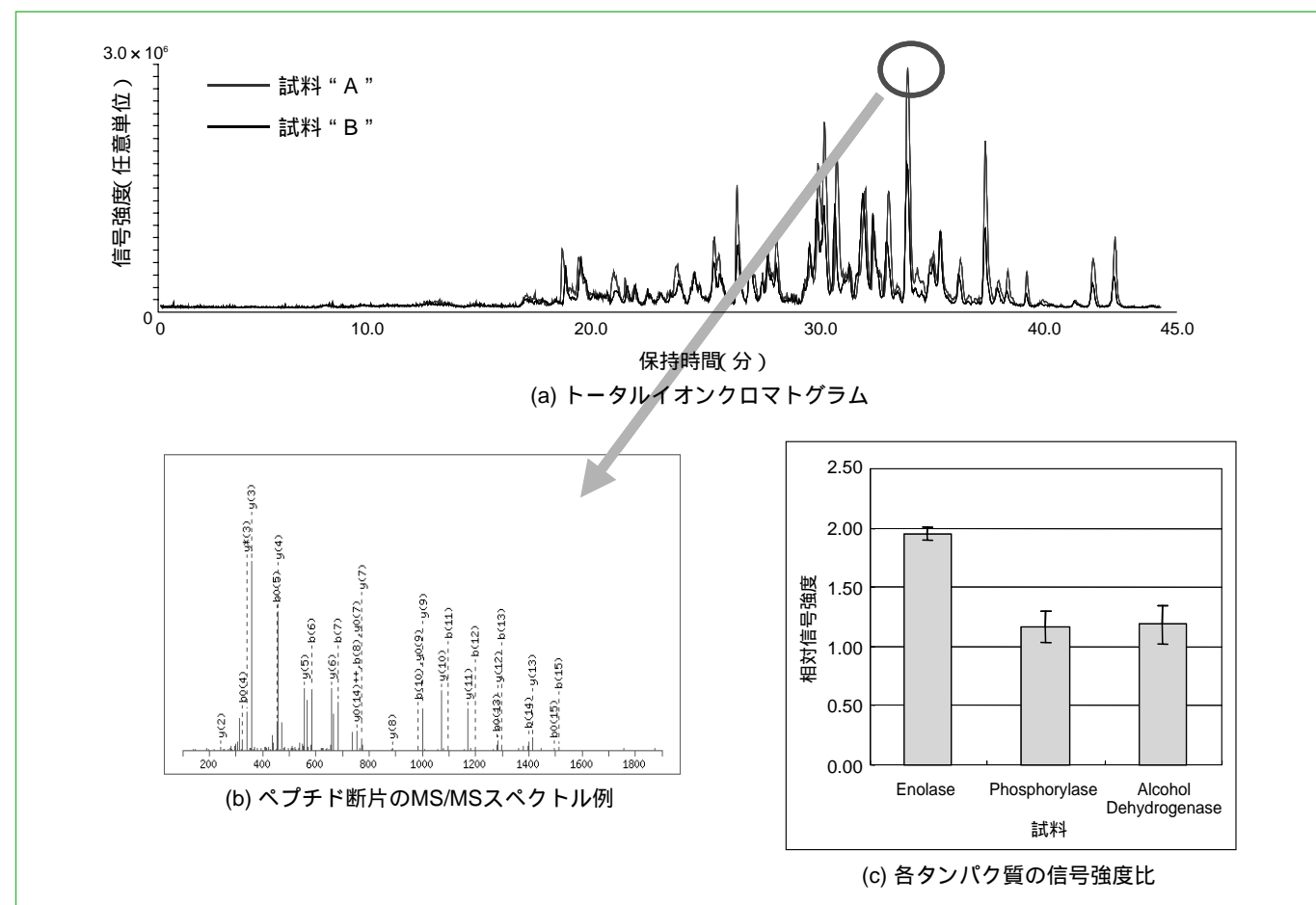


図5 タンパク質混合試料の相対定量結果

質毎に抽出し、各ピークの信号強度をもとに相対定量を行った。試料“ A ”の測定結果中の各タンパク質由来ペプチドの信号強度に対する、試料“ B ”の同じペプチドの信号強度の比を計算した。結果を図5(c)に示す。Phosphorylase b, Yeast Alcohol Dehydrogenaseについては試料“ A ”, “ B ”の量比は約1, Yeast Enolaseのみ試料“ B ”で“ A ”の約2倍の信号強度で検出され、実際のタンパク質量の相違とよく一致した。

4. おわりに

独自技術による優れた同定機能と、定量機能を兼ね備えたNanoFrontier LDは、バイオマーカータンパク質探索への多大な貢献が期待される。

参考文献

- 1) Deguchi, K. ; Ito, S. ; Yoshioka, S. ; Ogata, I. ; Takeda, A. Anal. Chem. 2004, 76, 1524-1528.
- 2) Ito, S. ; Yoshioka, S. ; Ogata, I. ; Takeda, A. ; Yamashita, E. ; Deguchi, K. J. Chromatogr. A 2004, 1051, 19-23.

- 3) Yokosuka, T. ; Yoshinari, K. ; Kobayashi, K. ; Ohtake, A. ; Hirabayashi, A. ; Hashimoto, Y. ; Waki, I. ; Tokao, T. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006, in press.
(MASCOT®は、Matrix Science Ltd.の登録商標です。)

* 日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジー事業本部 那珂事業所 那珂アプリケーションセンタ
 ** 日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジー事業本部 那珂事業所 先端解析システム設計部
 *** 日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジー事業本部 那珂事業所 ソフトウェア設計部

2. 三次元再構成用ソフトウェア

トモグラフィーによる三次元再構成は、さまざまな角度に傾斜した試料の投影像を逆投影法などの画像再構成アルゴリズムを用いて演算処理することによって行われる。正確なトモグラフィーには、観察対象を360度回転して全方向からの情報を得ることが必要である。ところが、TEMによる電子線トモグラフィーの場合、試料傾斜角度に制限があるため、観察不可能な部分が生じ、それがミッシングゾーンとして再構成像の解像度を劣化させるという問題がある。特に、グリッドに載せたTEM試料では、試料を真横から見るができないため、試料の奥行き方向の解像度が極端に劣化してしまう。そこで、本システムでは東京大学医科学研究所 片山栄作教授と工学院大学 馬場則男教授らとの共同開発により、ミッシングゾーンの影響を最小限に抑える手法を導入した^{1,2)}。この手法のポイントは、傾斜画像のステレオ計測結果から試料の高さ方向の濃度分布モデルを構築し、このモデルに合致するように、反復法によって、試料の濃度分布を三次元的に再現するものである。このステレオ計測による1次モデルの算出がトポグラフィーの手法に基づくものであるところから、Topography-based reconstruction technique (TBR)と呼んでいる。この手法では、より正確な再構成結果を得るための工夫がなされていて、特に、レプリカ試料専用の演算処理をモデリング名からDSM (Dynamic Shell Modeling)と呼んでいる。ちなみに、一般切片試料用の演算処理にはTBRが適応される。また、本システムには高精度な再構成を行うための前処理として不可欠な傾斜シリーズの位置合わせに画像相関法と対応点探索法を併用している。さらに、再構成像の任意断面像表示やボリュームレンダリングなどの三次元表示が可能となっている。

【応用例】

図2は急速凍結・ディープエッチング法で作製したウシ小脳レプリカ試料を用いて、従来法 (SIRT)とDSMで処理した結果を比較したものである。ここで示した従来法は、いろいろな演算処理の中でも比較的高精度な手法として知られている反復法を用いた。傾斜角度0度方向から観察した結果では、従来法とDSMとに明瞭な差は認められない(図2A, B)。しかし、再構成結果を真横方向から観察すると、従来法では、ミッシングゾーンによるファントムの影響で、再構成の結果

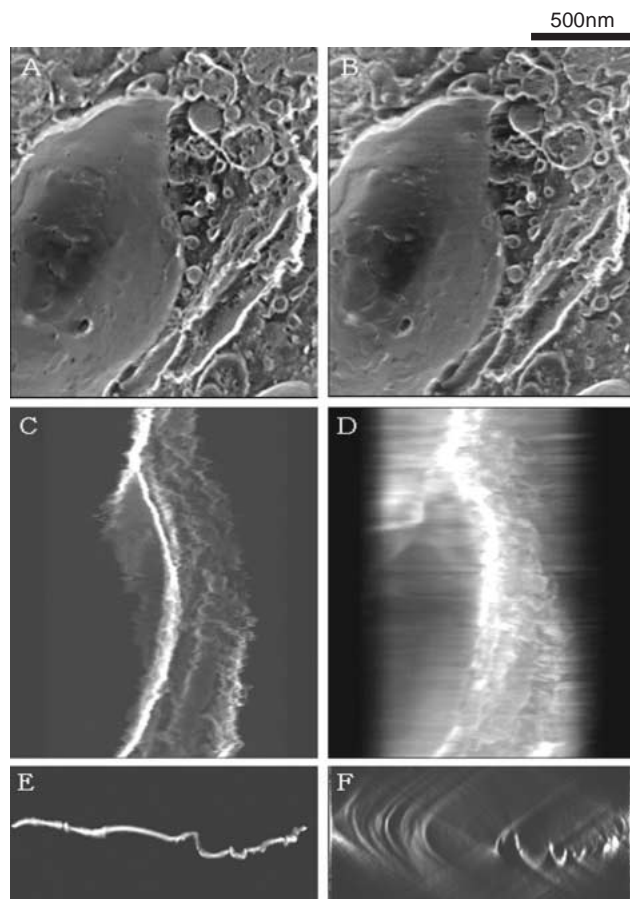


図2 DSMと従来法(SIRT)との比較
(A) DSM, (B) SIRT (傾斜角度0度方向からの観察例)
(C) DSM, (D) SIRT (傾斜角度90度方向からの観察例)
(E) DSM, (F) SIRT (X-Z断面)

試料: 急速凍結・ディープエッチング処理したウシ小脳レプリカ
直接倍率: 3,500倍
加速電圧: 100 kV
オリジナル傾斜シリーズ: +60 ~ -57度, 3度ステップ
試料ご提供: 東京大学医科学研究所 片山栄作教授

がぼやけているのに対して(図2D), DSMでは、鮮明な断面が観察されている(図2C)。さらに、X-Z断面で見ると、従来法にファントムが縦にすじ状に伸びた像として観察されているが(図2F), DSMではファントムの影響がない鮮明な断面が観察されている(図2E)。

図3は、DSMによる再構成結果を、本システムの三次元表示機能を用いて観察した例である。この三次元表示機能を用いることによって、再構成結果を多角的に観察し、その断面を任意に抽出することが可能である。さらには、その結果について、任意2点間の距離を計測することもできる。ミッシングゾーンの影響を最小限に抑えて、再構成の精度を向上させることは試料の三次元計測など、定量的な解析には特に重要である。

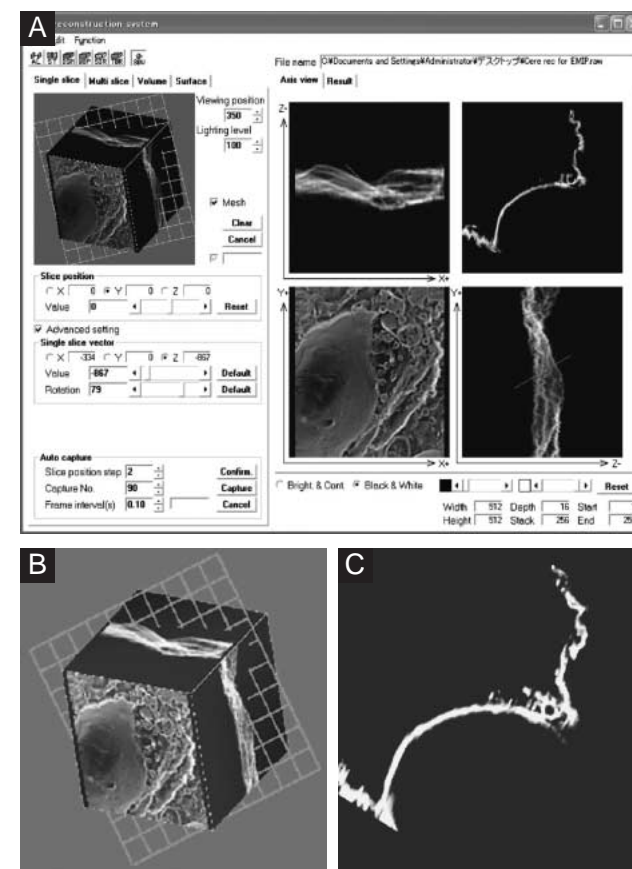


図3 3D再構成システムの三次元表示例

(A) 3D ViewerのGUI画面
(B) 再構成結果の立体表示
(C) (B)にメッシュプレートで表示された断面観察例

試料: ウシ小脳レプリカ

図4は、TBRで再構成したヒトリンパ球である。この試料は銀染色を施した厚さ約0.5μmの厚切り切片である。ファントムのない鮮明な切片の断面やリンパ球の表面の突起が三次元的に配列している状態が明瞭に観察できる。

謝辞

本稿の執筆にあたり、試料をご提供いただいた、東京大学医科学研究所教授 片山栄作先生、富山大学医学部教授 大谷修先生に心から感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Baba, N. et al.: Proc. 30th NIPS Int. Symposium, p84 (2003)
- 2) Katayama, E., et al.: Proc. 4th Fujihara Seminar on "Molecular and Cellular Aspects of Muscle Contraction"; Kluwer/Plenum Press (2003)

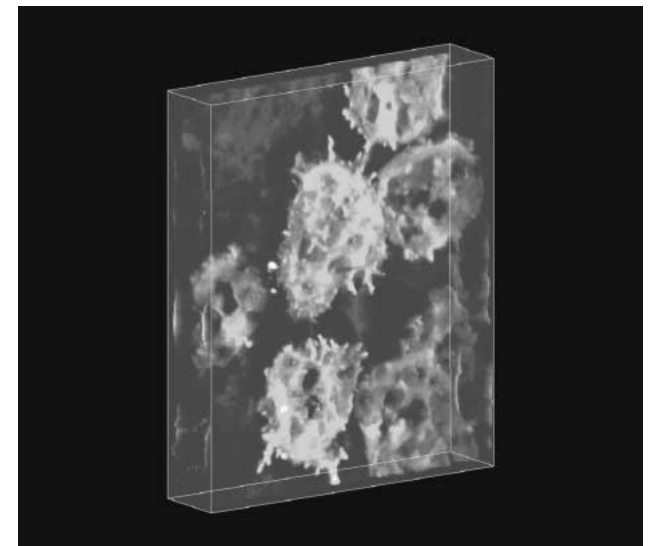


図4 TBRで再構成したヒトリンパ球
直接倍率: 4,000倍
加速電圧: 120 kV
オリジナル傾斜シリーズ: ±60度, 2度ステップ
試料ご提供: 富山大学医学部医学科解剖学第1講座教授 大谷修先生

学会発表 ミニファイル

1. 第11回LCテクノプラザ(2006/2/1~2 千葉県)

谷川(日立ハイテクノロジーズ): これから始めるLC/MSの正しいイロハ
源(日立ハイテクノロジーズ), 他: ツインカラムを用いたアミノ酸分析法の開発

2. 液体クロマトグラフィー研究懇談会 第193回例会講演(2006/4/28 千葉県)

甲田(日立ハイテクノロジーズ), 他: キャピラリーLCシステムのタンパク質同定への応用

3. 日本分析化学会第67回討論会(2006/5/13~14 秋田県)

河原井(日立ハイテクノロジーズ), 他: 非放射線電子捕獲検出器の応用; 親水性GPC樹脂を用いた農産物中残留農薬の簡易前処理法の検討

【要旨】農産物中の残留農薬分析は、厚生労働省残留農薬迅速分析法をはじめとする一斉分析法により行われてきたが、この方法は煩雑な前処理が必要な場合がある。すなわち、試料の精製にはGPCと固相抽出が用いられるが、GPCは溶媒使用量が多く、溶媒転溶・濃縮過程で長い

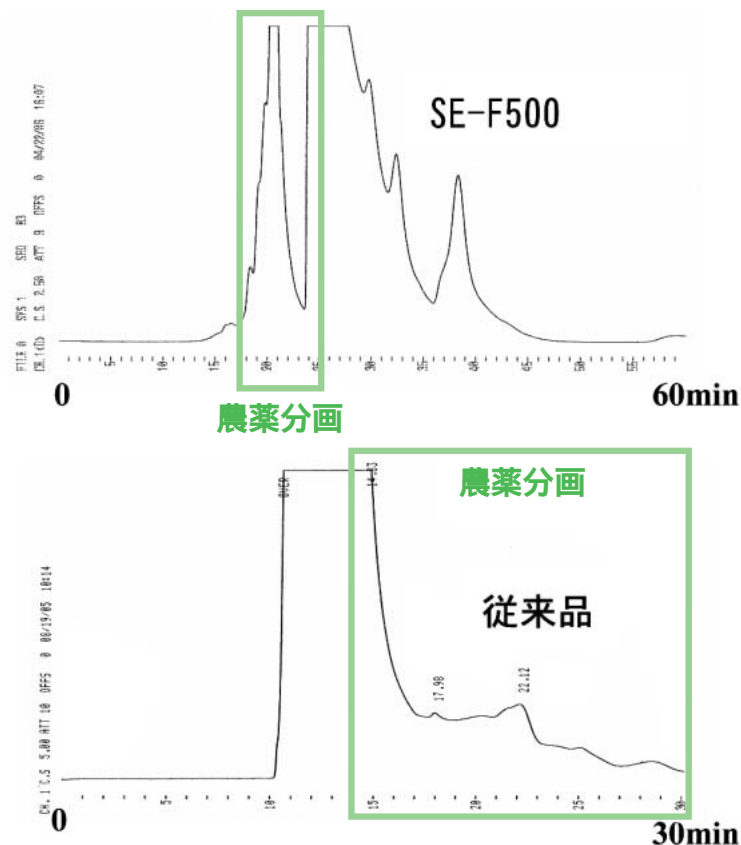


図1 ホウレンソウのGPCクロマトグラムと農薬溶出位置

処理時間と労力を要した。また、固相抽出精製では固相のロット間品質のばらつきや人的誤差、極性農薬が回収されにくいなどの問題がある。これらの課題解決のために、親水性GPC樹脂SE-F500シリーズ(仮称)を農産物抽出後の精製に用い、前処理の簡略化を検討し、さらに、Nr-ECDによる農産物中の残留塩素系農薬分析の精度を確認した。残留農薬26成分を分析したところ、再現性 1.6~7.5%, 回収率 91~120%(農産物中濃度0.5ppm), 検出限界0.13~1.2ppb(農産物中濃度0.6~6.0ppb)が

得られ、この方法が実用可能であることがわかった。また、従来の迅速分析法に比べ、前処理時間1/5, GPC分取容量1/15, 溶媒使用量1/10であった。また、迅速分析法, ポジティブリスト制度GC/MS一斉分析法に比べ, SE-F520によるGPC精製を行うと, Nr-ECDのベースラインがフラットとなり, 精製効率が向上していることがわかった。本法により農産物中の有機りん系農薬, 窒素系農薬27成分を分析したところ, 塩素系農薬同様の精製効率が得られた。

岩瀬(日立ハイテクノロジーズ), 他: 糖・糖アルコールの一斉分析法

【要旨】糖, 糖アルコールは自然界に広く分布し, 種類も多いことが知られており, 一部の糖アルコールは, 甘味料や医薬品, 化粧品などに利用されている。糖の分析方法としては, リン酸フェニルヒドラジンを用いたポストカラム誘導体化法があるが, 糖アルコールとの同時分析は困難である。そこで, 糖と糖アルコールの一斉分析が可能, グアニジン+過ヨウ素酸ポストカラム誘導体化法を検出系に用いる分析法を検討した。反応試薬には, 60mM塩酸グアニジン, 1.5mM過ヨウ素酸ナトリウム, 200mMホ

ウ酸を用いた。反応コイルは0.5mm I.D. x 10m(反応温度140度)を用いた。検出波長は, Ex 320nm Em 420nmを用いた。分離系として, ホウ酸錯体陰イオン交換法を用いるとピニトールとフルクトースの分離が改善され, この時のピニトールのピーク面積再現性はCV=0.96%(濃度23mg/L n=6(20μL)), 検出限界は, S/N=3で6.7ngであった。検量線は2.3~115mg/Lの濃度範囲で相関係数が0.9997となり, 良好であった。

山本(日立ハイテクノロジーズ), 他: 逆相系固相抽出剤を前処理に用いるセレンの高感度電気加熱原子吸光分析

4. 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry(2006/5/28~6/1 米国)

伊藤裕(日立ハイテクノロジーズ), 他: Structural Assignments of N-glycans and identification of peptide sequence of N-glycopeptides using nanoESI/Linear-IT-TOF MS and MSn spectral matching

5. 液体クロマトグラフィー研究懇談会 第195回例会講演(2006/6/16 東京都)

源(日立ハイテクノロジーズ), 他: 高分離アミノ酸分析計の紹介

6 . 30th Symposia on High Performance Liquid Chromatography and Symposia on Column Liquid Chromatography(2006/6/18 ~ 22 米国)

伊藤正(日立ハイテクノロジーズ), 他 : Amino Acid Analysis by Ion-exchange Chromatography Using New 3-Micrometer Resin

【要旨】新規の陽イオン交換樹脂の特性を詳細に検討し、この結果に基づき高速高分離のアミノ酸分析方法を開発した。高速分析実現のための分離性能指標としてセパレーションインピーダンスを評価し、圧力損失が低くかつ分離性能が高い良好な結果が得られた。この結果により新規の樹脂が、高速化を図ることのできる高性能の樹脂であることが確認された。

また、実際に生体液分析法に60分高速分析法および130分高分離分析法(図)を開発することができた。

イソロイシン(Ile)とロイシン(Leu)の分離度で分離性能を評価する場合、前者は1.2が得られ、後者は1.8の良好な結果が得られた(従来法に比較し、それぞれ分離度でプラス0.3向上している)。

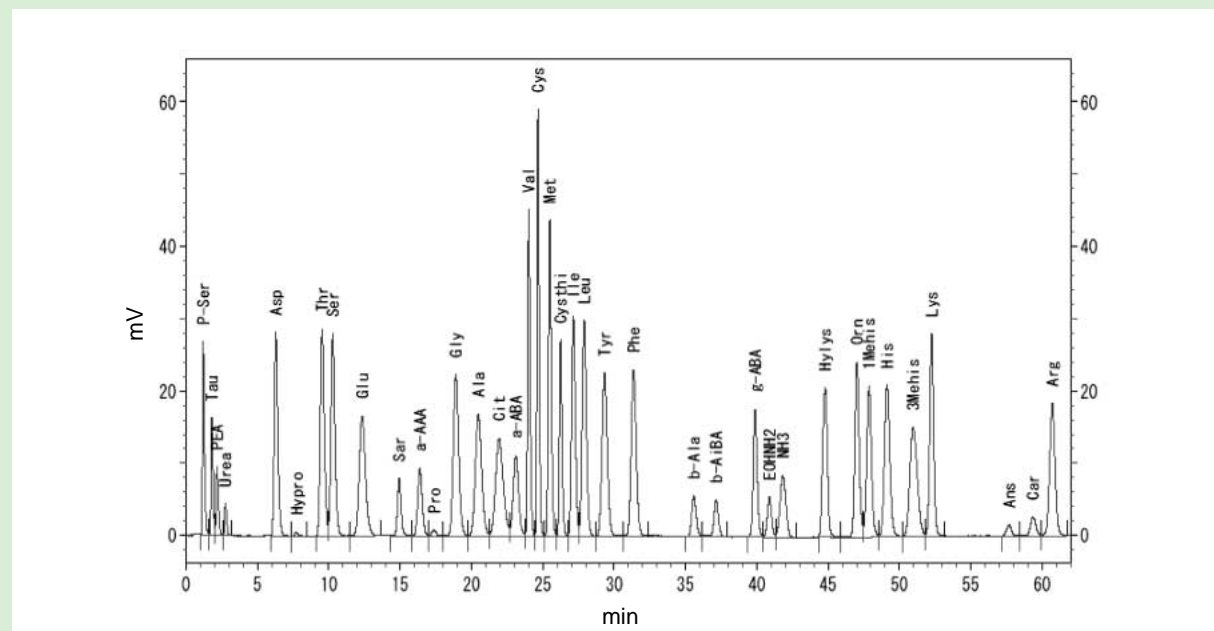


図2 ノルロイシン(Nle)を含む高分離生体液法クロマトグラム

7 . 第20回国際生化学・分子生物学会議(2006/6/18 ~ 23 京都府)

野上(日立ハイテクノロジーズ), 他 : An Automated Proteomics Platform by On-line 2D-nanoLC/LIT-TOFMS and Information Based Acquisition Techniques

8 . ガスクロマトグラフィー研究懇談会 第274回例会講演会(2006/6/30 宮城県)

河原井(日立ハイテクノロジーズ), 他 : 農産物中の有機塩素系残留農薬分析

新製品紹介

NEW PRODUCTS

「液体クロマトグラフ質量分析計 NanoFrontier LDの紹介」

タンパク質の解析は、疾病マーカーの同定を行う定性解析から、特定された疾病関連マーカーの発現量について解析を行う量的変動解析へと移行してきています。日立ハイテクノロジーズでは、2006年5月にタンパク質の量的変動解析に対応したNanoFrontier LDを発売しました。

特長

- 量的変動解析を実現するためAnalog-to-Digital (ADC)方式のデータ収集システムを搭載しました。
- コリジョンチャンバーでのCID機能の追加を行うことにより、Linear Ion Trapで測定できなかった低質量数側のフラグメントの測定を可能としました。
- IBA機能に、内部データベースの編集を追加し、特定成分の構造解析が容易に行えます。



新製品紹介

NEW PRODUCTS

ナノフロー液体クロマトグラフ
NanoFrontier nLC

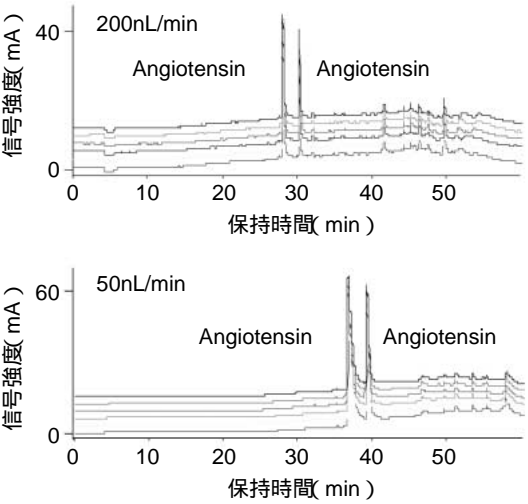
株式会社日立ハイテクノロジーズは、独自のグラジエント送液技術「DEGS (Dual Exchange Gradient System)」を採用して、流量200nL/minで1 %RSD以下の高い保持時間再現性を実現し、タンパク質の機能や構造を解析するプロテオミクス分野向けの高性能ナノフロー液体クロマトグラフを2006年4月に発売しました。本装置を質量分析計と組み合わせることで、より微量なタンパク質の同定と、多数のサンプルを迅速に処理することが可能となることから、生命現象や病理現象を解明する上での重要な分析装置として、バイオ・医療・農学環境分野での利用が期待されています。

特長

- 独自のスプレットレス送液(DEGS)による低流量領域での高い再現性
- フロントアクセスによる操作性・メンテナンス性の向上
- 各社質量分析計への接続が可能(質量分析計へのコントロールはできません)



連続測定再現性



200nL/min保持時間再現性(n = 6)	
Angiotensin	0.12%
Angiotensin	0.11%

50nL/min保持時間再現性(n = 6)	
Angiotensin	0.13%
Angiotensin	0.14%

50nL/min : 200nL/min 面積比	
Angiotensin	2.47倍
Angiotensin	3.61倍

Angiotensin , 繰り返し測定データ(n = 6)

新製品紹介

NEW PRODUCTS

分光蛍光光度計 F-7000用
マイクロプレート付属装置 発売

このたび、蛍光分光光度計のバイオ分野向けアクセサリとして、マイクロプレート付属装置を発売いたします。F-7000の高感度、高速波長スキャンの基本性能をベースに励起側・蛍光側の波長スキャン、スペクトル取得が可能のため、未知物質に対する測定条件パラメータの検討な

ど、従来のマイクロプレートリーダーとは異なるユーザーの多様な要望に応えます。

1. 対応マイクロプレート：96ウェル 1枚
2. スループット：60秒/プレート()
3. 感度：フルオレセイン 10^{-10} mol/L
4. 温度調節機能：無

定量演算モード



平沼オンライン全有機炭素(TOC)測定装置

全有機炭素(TOC)は水中に含まれる有機物総量の指標として、廃水処理の原水管理から処理後の排水や放流水の管理、上水、冷却水、洗浄水の有機不純物量の監視に用途が広がっています。

平沼オンラインTOC測定装置は、光触媒酸化チタン酸化方式(特許) 採用によりクリーンで高効率な酸化を行い、さらにコンパクトサイズでタッチパネルによる優れた操作性と、容易なメンテナンス、低ランニングコストを実現しました。

酸化方式	光触媒酸化チタン酸化方式	
検出方式	非分散赤外吸収方式	
測定項目	TC, TOC, TIC, NPOC	
試料採取量	20 ~ 2,000 μ L	
TC測定範囲	100ppbC ~ 1,000ppbC	
TC測定所要時間	8 ~ 10分 / 1分析(濃度による)	
外部信号入出力	DC4-20mA 出力	4出力
電源	AC100V, 50/60Hz	
消費電力	約300VA	
大きさ	350W \times 350D \times 1450H(mm)	約80kg



ご挨拶



大林 秀仁*

日頃より、日立ハイテクノロジーズの分析機器をご利用いただき、また本SINews(Scientific Instrument News)をご愛読いただき、誠にありがとうございます。私は、本年4月よりライフサイエンス営業統括本部長に就任いたしました。どうぞよろしくお願い申し上げます。

当社は、2001年10月に日製産業(株)と(株)日立製作所の計測器グループ及び半導体製造装置グループとの事業統合により「(株)日立ハイテクノロジーズ」として出発し、本年の10月で満5年を迎えます。この間に皆様からいただいたご支援のお陰で順調に業容を伸ばすことが出来ました。またこの間、半導体チップマウント装置事業(株)日立ハイテクインスツルメンツ)や液晶製造・ハードディスク検査装置事業(日立ハイテク電子エンジニアリング(株)を吸収合併)などの分野への進出をいたしております。このような状況下であり、電子顕微鏡、分離分析装置、光度計などが

らなる分析機器事業は堅実な成長をしており、当社の主要事業の一翼を担っております。

近年、分析機器をとりまく国際環境は激変しております。ナノ材料、ナノエレクトロニクス及びナノバイオなどのナノテクノロジーの各分野、エネルギーや環境問題に対応するための新型電池の実用化などにより、新しい産業分野が生まれております。

これらの分野で、基礎科学の発展を支えると同時に、産業を支える基盤としての理科学機器の重要性が増しています。科学・技術の進歩のために不可欠な、観察・分析・解析のニーズが高度化しているのです。私どもは、今後とも「見えないものを見る。計れないものを計る」ことにこだわりを持ち続け、ニーズにお応えする汎用及び専用の分析機器をご提供させていただきたいと考えております。

今年度からSINewsの構成を発展的に分割し、分析・バイオ・医用関係を網羅するSINewsと、電子顕微鏡及び半導体製造装置を網羅するEMNewsとの2部構成といたしました。それぞれの分野でより詳細な情報をご提供して参ります。

どうか皆様方には今迄同様ご愛読いただきますよう、また引き続きのご指導とご支援を賜りますようお願い申し上げます。

* 代表執行役執行役専務兼取締役

株式会社日立ハイテクノロジーズ

北海道支店	札幌	(011) 707 - 3347	本社サポートセンタ	東京	(03) 3504 - 7211	四国営業所	高松	(087) 825 - 9977
東北支店	仙台	(022) 264 - 2219	中部支店	名古屋	(052) 219 - 1881	中国支店	広島	(082) 221 - 4511
筑波支店	土浦	(029) 825 - 4801	関西支店	大阪	(06) 4807 - 2511	九州支店	福岡	(092) 721 - 3511
			京都営業所	京都	(075) 241 - 1591			

分析機器に関する各種お問い合わせは...

お客様サポートセンタ 電話(03)3504-7211

受付時間 8:50~11:50 12:45~17:30(土・日・祝日および弊社休日を除く)

本ニュースは会員制情報検索サイト「SINAVI」でもご覧になれます。

ご入会は無料ですので、下記URLにアクセスください。

http://www.hitachi-hitec.com/science/member/sinavi_info.html

編集後記

今年も暑い夏が過ぎようとしています。この編集後記の締切り間際に秋篠宮妃紀子様にご親王ご出産のお目出度いニュースが伝わり、日本中が祝いムードになったのは本当に良かったと思います。あの幸せそうな笑顔を見て、「これをきっかけに日本の少子化に歯止めがかかれば」と感じたのは私一人ではないと思います。

さて、本号は、巻頭言に東京農工大学の澤田先生(前日本分析化学会会長)に「先端分析技術・計測機器開発に思うこと」と題する巻頭言を、九州大学の中山先生、松本先生には「質量分析計を用いたリン酸化プロテオーム解析」と題する報文をいただきました。

澤田先生の巻頭言にもあります先端分析技術・計測機器開発プロジェクトには日本

分析化学会の会長を務められました合志先生、二瓶先生が技術評価委員を、同じく高木先生、澤田先生が開発統括を務められておられ、分析化学会がその主導的立場にあることが伺えます。世界に冠たる先端機器や分析技術が日本から世界に発せられることを期待しております。

現在、もっと読みやすくを目標に小誌の内容の見直しを行っております。ご意見等ありましたら、ご一報くださるようお願いいたします。

(原田 記)

インターネットホームページ

日立ハイテクノロジーズ

ライフサイエンス関連

URL: <http://www.hitachi-hitec.com/science/>

本ニュースに関するお問い合わせは 右記 または、(株)日立ハイテクノロジーズの上記各事業所へご連絡ください。

日立ハイテクノロジーズ 販売促進部

〒105-8717 東京都港区西新橋1-24-14

電話(03)3504-7811 FAX(03)3504-7756

日立ハイテクノロジーズ

那珂アPLICATIONセンター

〒312-0057 茨城県ひたちなか市石川町11-1

電話(029)354-1970(代)

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

SEPTEMBER, 2006 VOL. 49 No. 2

発行 2006年9月20日

編集人 原田 勝仁

発行人 小林 紀雄

発行 株式会社日立ハイテクノロジーズ

〒105-8717

東京都港区西新橋1-24-14

電話(03)3504-7811(ダイヤルイン)

印刷 日立インターメディアックス株式会社