

Application News

No. C186A

LC/MS

四重極飛行時間型質量分析計LCMS™-9030を用いた網羅的細胞培養プロファイリング

発酵による有用物質の生産や抗体医薬品の製造において、培養工程の最適化や管理のために、培地の pH、溶存ガス、炭素源（グルコース）、窒素源（グルタミン）等のモニターが実施されています。細胞培養中の培地成分はグルコースやグルタミン以外にもビタミンや核酸関連化合物、さらには細胞から分泌される代謝物など様々な化合物から構成されます。そのため、培地に含まれる化合物の網羅的分析は、バイオプロセスを考察する上で有用な情報を与えることが期待されます。アプリケーションニュース No.C106A では、トリプル四重極（TQ）型の高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）と細胞培養プロファイリングメソッドパッケージを用いて、ハイブリドーマの培養経過に伴う培養上清成分の変化をモニターした事例をご紹介しました。本アプリケーションニュースでは、四重極飛行時間（QTOF）型の LC-MS を用いた iPS 細胞の培養経過に伴う培養上清成分の変化をモニターした事例をご紹介します。QTOF 型の LC-MS によるターゲット SIM とノンターゲットフルスキャン分析を組み合わせることにより、培養上清中の成分の変化を網羅的にモニターできます。

T. Hattori

■ LC-QTOF-MS

LC-QTOF-MS は、高速液体クロマトグラフと四重極型質量分析計および飛行時間型質量分析計（TOF）を結合させた高速液体クロマトグラフ質量分析計です。当社初の四重極飛行時間型質量分析計 LCMS-9030（図 1）は、TQ 型の LC-MS である LCMS-8000 シリーズで培われた高速性能と高いイオン収束力を継承し、新たに TOF の技術を開発、融合しました。高強度微細格子電極 UFgrating™、理想リフレクトロン iRefTOF™、高精度温度コントロールシステムといった当社独自の技術が搭載されています。常に安定した質量精度を保ちながら、感度と分解能を両立したデータ取得が可能です。また、最速 100 Hz の高速測定により、QTOF では一般的なスキャン分析と同時に、多数の SIM の設定が可能です。これにより、一度の分析で網羅的なノンターゲットフルスキャン分析とともに、高感度なターゲット SIM 分析ができます。



図 1 LCMS™-9030

■ 培養条件および前処理

iPS 細胞を播種後、24 時間毎にその培養上清をサンプリングし、6 日間培養しました。²⁾ 培養条件を表 1 に示します。サンプリングした培養上清は、アセトニトリルを添加し除蛋白を行いました。有機溶媒沈殿後、遠心上清を超純水で 10 倍希釈したものを試料として一斉分析しました。

表 1 培養条件

Cell line	: Feeder-free iPS cells 1231A3
Passage number	: OP30
Seeding number	: 1.3×10^4 cells/well
Period	: 6 days
Medium	: AK02N
Cell substrate	: iMatrix (0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

■ 分析条件

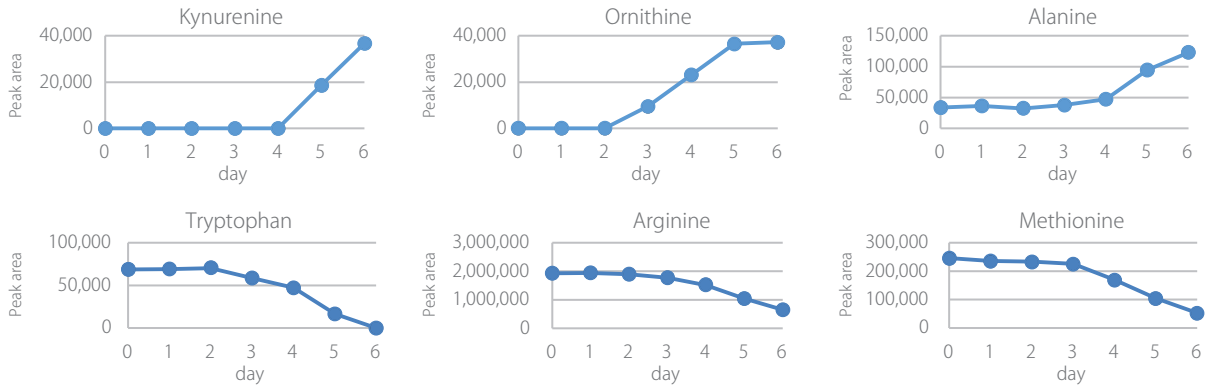
HPLC および MS の分析条件を表 2 に示します。LCMS-9030 の特長である最速 100 Hz の高速測定を利用し、68 化合物の SIM 分析とスキャン分析 (m/z 50-500) を同時に行いました。

表 2 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	
Column	: Reversed-phase column
Mobile phases	: A) 0.1 % Formic acid in water B) 0.1 % Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.35 mL/min
Injection volume	: 1 μL
[MS conditions] (LCMS-9030)	
Ionization	: ESI (Positive mode)
Mode	: SIM, Scan (m/z 50-500)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

■ SIM によるターゲット分析

培養上清を SIM 分析した結果、アミノ酸やビタミン等 27 成分が検出されました。各サンプリング時間におけるピーク面積をプロットした結果の一部を図 2 に示します。キヌレニンやオルニチン、アラニンなどが培養時間経過に伴い増加し、トリプトファンやアルギニン、メチオニンなどが減少する傾向が見られました。本分析で使用した HPLC 条件は TQ 型質量分析計で実績のある「LC/MS/MS メソッドパッケージ 細胞培養プロファイリング」の条件であるため、SIM 分析によるターゲット成分では、その保持時間情報を利用することができます。これにより、図 2 で示したように培養上清中の成分変化を確実にモニターできます。



培養経過に伴う培養上清成分のピーク面積変化

■ フルスキャンによるノンターゲット分析

SIM のターゲット化合物以外で量的変動が見られる化合物を探索するために、フルスキャン分析したデータからノンターゲット解析を実施しました。データ解析には、ライフィクス社のノンターゲット用解析ソフトウェア Signpost MS™ を使用し、量的変動が見られた未知化合物解析を探索しました (図 3)。解析の結果、SIM のターゲットには含まれない化合物で量的変動があった成分が複数確認されました。ここでは一例として、保持時間 5.25、 m/z 237.0870 の未知代謝物 (図 4) の化合物推定事例をご紹介します。まず、組成推定ソフトでこの未知代謝物の組成推定を行ったところ、スコア 99.53、理論値との誤差 0.111 mDa と高精度で $C_{11}H_{12}N_2O_4$ と組成推定されました。次に、Human Metabolome Database で $C_{11}H_{12}N_2O_4$ をデータベース検索した結果、ホルミルキヌレニンという化合物がヒットしたため、この未知代謝物の MS/MS スペクトルと N'-ホルミルキヌレニンの理論 MS/MS スペクトルを比較しました。理論 MS/MS スペクトルとの比較には、ACD/Labs の MS Workbook Suite を用いました。

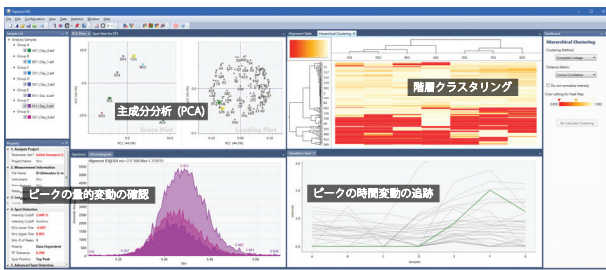


図 2 Signpost MS によるノンターゲット解析

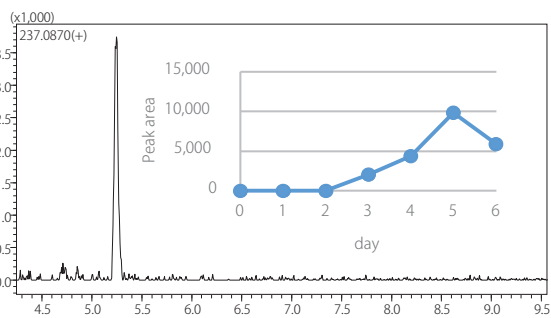


図 3 培養経過に伴って量的変動した未知代謝物

注) iPS 細胞の培養は、株式会社 iPS ポータルで実施しました。LCMS、UFgrating、iRefTOF および Nexera は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。Signpost MS は、ライフィクス株式会社の商標です。なお、本文中には TM、®マークを明記していない場合があります。

その結果、図 5 で示すように、主要なフラグメントピークが理論的に得られたフラグメントピークと一致し (理論 MS/MS スペクトルと一致したフラグメントピークが赤色)、またその理論値との誤差も 1 mDa 以下でした。以上の結果、この未知代謝物が N'-ホルミルキヌレニンと推定されました。

N'-ホルミルキヌレニンはキヌレニン経路におけるトリプトファンとキヌレニンの中間代謝物です。SIM で分析したトリプトファンとキヌレニンの結果とノンターゲット分析した N'-ホルミルキヌレニンの結果から、培養経過に伴ってトリプトファンが培地から細胞内に取り込まれることで培地中濃度は減少し、その代謝物である N'-ホルミルキヌレニンやキヌレニンは細胞外へ分泌されることで培地中濃度が増加したと考えられます (図 6)。6 日目まで N'-ホルミルキヌレニンが減少したのは、培地中のトリプトファンが枯渇したためと考えられます。以上のように、ターゲット SIM とノンターゲットフルスキャン分析を組み合わせることで、網羅的な細胞培養プロファイリングが可能となります。

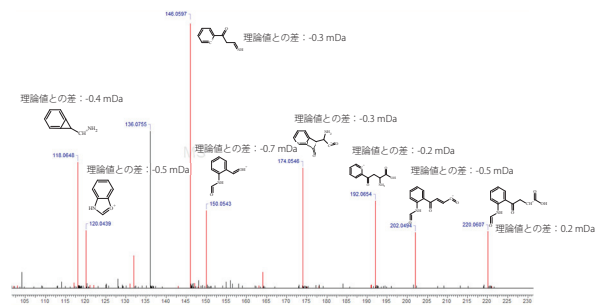


図 4 理論 MS/MS スペクトルとの一致確認

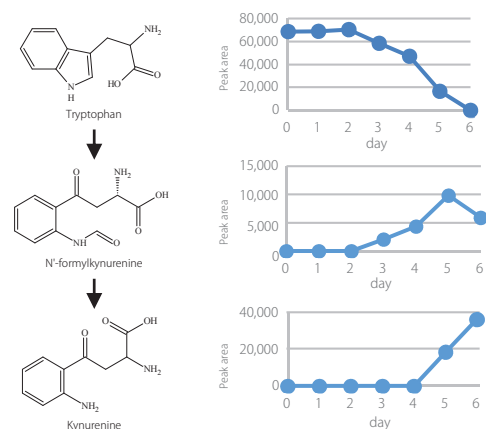


図 5 キヌレニン経路における代謝変動

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年2月
A改訂版発行：2019年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。