Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

血漿中アポリポタンパク質 A1 LC-MS/MS定量のための迅速なキットベースアプローチ

Hua Yang, Mary Lame, Sherri Naughton, and Erin Chambers
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- 迅速な消化(30分以下)、全サンプル調製時間1.5時間以下
- バイオマーカーおよび内因性タンパク質定量のための、シンプルで標準化されたアプローチ
- 優れた直線性、真度と精度

ウォーターズのソリューション

ProteinWorks™ eXpress Direct消化 キット
(製品番号176003688)

ACQUITY UPLC® Peptide BEH C_{18}、300 Å、1.7 µm、2.1 mm×150 mmカラム
(製品番号186003687)

ACQUITY UPLCシステム

Xevo® TQ-S質量分析計

キーワード

ProteinWorks eXpress 消化、
アポリポタンパク質A1、タンパク質定量、
バイオマーカー定量、内因性タンパク質定量

はじめに

アポリポタンパク質A1 (Apo A1)は高密度リポタンパク質 (high density lipoprotein, HDL)の主要な構成成分で、他のリポタンパク質と共に脂質代謝の鍵となる役割を担っています[1]。典型的なApo A1の濃度は男性1.2 mg/mL以上、女性1.4 mg/mL以上[2]で、いくつかのタイプの心臓病リスクを持つ患者で血漿中濃度が低下することが報告されています[3-6]。加えてタンジア病は、HDL濃度の顕著な低下やApo A1の血漿中濃度が健常人の1%程しか無い(10 µg/mLオーダー)ことで特徴付けられます[7]。このようにApo A1および他のリポタンパク質の測定は循環器疾患のバイオマーカー候補として注目されています。タンパク質は従来リガンドバインディングアッセイ(LBAs)で定量されてきましたが、これらの免疫測定法には交叉反応や信頼性、および抗体作成に長時間を要するなどの課題があります。

MSとバイオアナリシス法のメリットがMSをベースとしたバイオマーカー定量の急速な発展をもたらしました[8-10]。加えて、LC-MSが一般的なLBAの問題点を排除します。本アプリケーションノートでは、血漿中のアポリポタンパク質A1の正確で再現性の良い定量を可能にする、迅速で標準化されたキットベースのアプローチについて紹介します。

実験方法

サンプル調製

アポリポタンパク質A1の消化効率経時変化

ヒトApo A1をラット血漿に1 mg/mL添加。続いて、15 µLのApo A1添加血漿をProteinWorks eXpress Direct消化キットの3ステッププロトコール(非還元アルキル化)で消化。Apo A1の幾つかのシグネチャーペプチドにおける消化効率の経時変化を評価するために、5-60分の間で血漿消化を行い、LC-MSで測定。

血漿中Apo A1の定量

検量線用スタンダードとQCサンプルを調製するために、ヒトApo A1を様々な濃度でラットまたはヒト血漿に添加。安定同位体標識Apo A1を内標準(IS)として使用。血漿15 µLをProteinWorks eXpress Direct消化キットを使用して3ステッププロトコール(非還元アルキル化)で30分間直接消化。

分析条件

LCシステム： ACQUITY UPLCシステム

検出： Xevo TQ-S質量分析計、ESI+

LC条件

カラム： ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18}、300Å、1.7 µm, 2.1 mm × 150 mm

カラム温度： 55℃

サンプル温度： 10℃

インジェクション容量： 10 µL

移動相A： 0.1%ギ酸水溶液

移動相B： 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント：

Flow rate (mL/min)	Time (min)	Profile %A	%B	Curve
0.3	0.0	100	0	6
0.3	1.0	100	0	6
0.3	7.0	50	50	6
0.3	8.0	10	90	6
0.3	8.8	10	90	6
0.3	9.0	100	0	6
0.3	15.0	100	0	6

MS条件

キャピラリー電圧： 3 kV

コーン電圧（V）： 各ペプチドに最適化、表1参照

ソースオフセット： 50 V

イオン源温度： 150℃

脱溶媒温度： 600℃

コーンガス流量： 150 L/hr

脱溶媒ガス流量： 1,000 L/hr

データ管理： MassLynx®（v4.1）

結果および考察

アポリポタンパク質A1（Apo A1）は分子量28 KDaのタンパク質（図1）[11]で、循環器系疾患のリスクを予測するために重要なバイオマーカーとなっています[2-7]。その結果、その改善された定量ツールの開発や実行への興味が増大しています。ProteinWorks eXpress Direct消化キットとそのプロトコールを使用し、Apo A1を含む未精製血漿（15 µL）を直接消化しました。シグネチャーペプチドのLC-MS/MS定量はXevo TQ-Sタンデム四重極MSで行いました。4つのApo A1トリプシンペプチドのMRMトランジッションを表1に示しました。これらのペプチドは文献[8]を元に選択され、各々のシグナル強度と特異性において最適化されました。Apo A1ペプチドのクロマトグラフィーによる分離はACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18}、300 Å、1.7 µm、2.1 mm × 150 mmカラムで達成されました。ラットおよびヒト血漿の代表的なクロマトグラムをそれぞれ図2、A、Bに示しました。ヒト血漿中に高濃度に存在する内因性Apo A1のため、そのペプチドシグナル強度はラット血漿中より顕著に高くなっています。それぞれのペプチドに対応する内標準は、非標識ペプチドと同じ保持時間に溶出します（非表示）。

Apo A1の消化時間に対する効率を評価するために、1 mg/mLのヒトApo A1を含む血漿サンプル（15 µL）をProteinWorks eXpress Direct消化キットとその3ステッププロトコールを用いて消化しました。様々な時間において消化を停止したサンプル溶液中に生成されたApo A1トリプシンペプチドをLC-MSで定量しました。

図3に各トリプシンペプチドのシグナルを5分消化の強度を100として表示します。

MKAAVLTLAVLFLTGSQARHFWQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEG
ALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAK
VQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAH
DALRTHLAPYSDELRQRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQ
GLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

図1. ヒトアポリポタンパク質A1のアミノ酸配列。定量に用いたトリプシンペプチドを青色でハイライト

ペプチド	MRM トランジッション	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
ATEHLSTLSEK	608.3>664.4	40	*24*
DLATVYVDVLK	618.3>736.4	12	*12*
VQPYLDDFQK	626.8>1025.5	32	*12*
LLDNWDSVTSTFSK	806.9>971.5	28	*26*

表1. 定量に用いたアポリポタンパク質A1トリプシンペプチドの最終MS条件

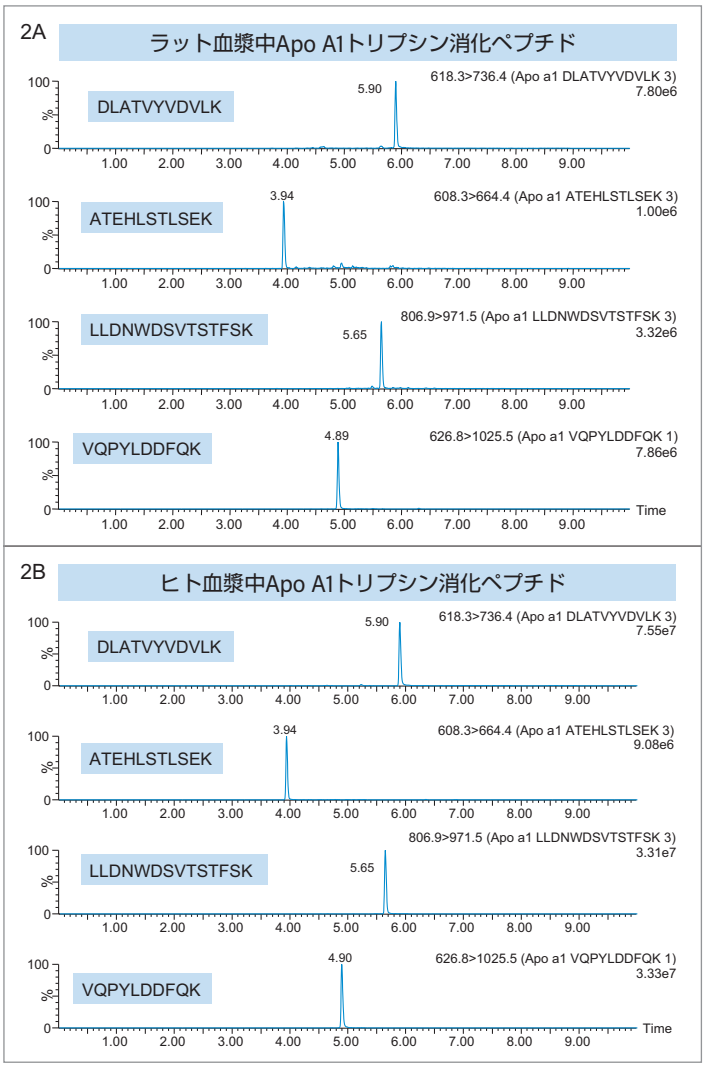

図2. ラット血漿（A）とヒト血漿（B）中のApo A1トリプシンペプチドの代表的クロマトグラム。ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18}、300 Å、1.7 µm、2.1 mm × 150 mmカラム使用

4種全てのシグネチャーペプチドにおいて、分析種のピーク面積値は15分以内に定常状態となっています。このことからApo A1定量は非常に短い消化時間(～15分-30分)で可能であることが示唆されます。

定量のために、ヒトApo A1と内標準を様々な濃度でラットおよびヒト血漿に添加し検量線サンプルとQCサンプルを調製しました。それぞれの濃度において検量線用スタンダードは2つずつ調製し、QCサンプルは3つ(ラット血漿)または4つ(ヒト血漿)ずつ調製しました。血漿サンプルはProteinWorks eXpress Direct消化キットとキットに付属している3ステップ汎用プロトコールを用いて30分間消化し、消化サンプルはLC-MSで測定しました。内標準と分析種のピーク面積比(PARs、peak area ratios)が計算され、4つのトリプシンペプチドの検量線が$1/x^2$の重み付けをした検量線サンプルのPARsによる直線回帰により作成されました。全てのQCサンプル濃度はそれぞれのPARsと検量線から計算しました。4種のトリプシンペプチド全てについてラットおよびヒト血漿におけるApo A1検量線の直線性は$R^2 > 0.98$で、各濃度の平均真度は99%以上でした。ラットおよびヒト血漿の検量線評価結果をそれぞれ表2Aと2Bに示しました。

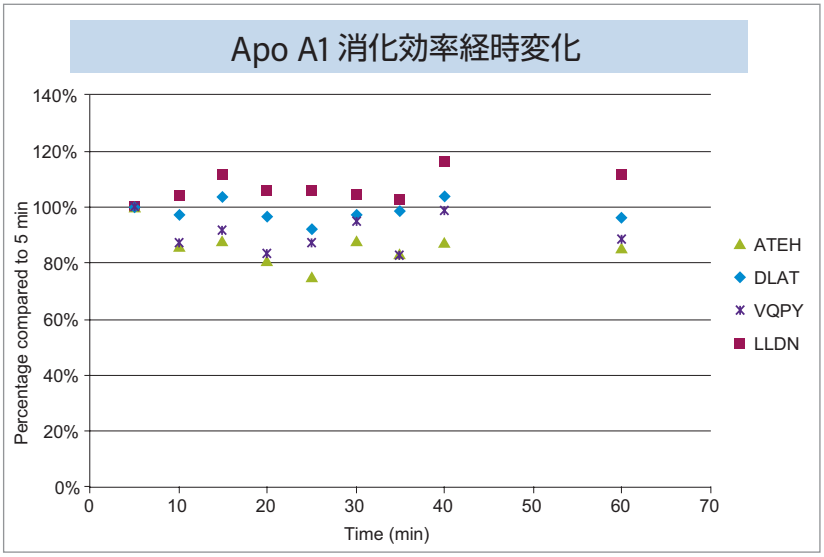

図 3. Apo A1 トリプシン消化効率経時変化. Apo A1 トリプシンペプチドのレスポンスをラット血漿消化時間に対してプロット。4 つのシグネチャーペプチド全てにおいてシグナル強度が 15 分で定常状態。

2A

ペプチド	検量線範囲 (μg/mL)	重み付け	直線性 (r^2)	全測定値の平均真度(%)
DLATVYVDVLK	5–1500	$1/x^2$	0.99	100.01
ATEHLSTLSEK	5–1500	$1/x^2$	0.98	99.99
LLDNWDSVTSTFSK	5–1500	$1/x^2$	0.99	99.99
VQPYLDDFQK	5–1500	$1/x^2$	0.98	99.99

2B

ペプチド	検量線範囲 (μg/mL)	重み付け	直線性 (r^2)	全測定値の平均真度(%)
DLATVYVDVLK	100–1000	$1/x^2$	0.99	99.98
ATEHLSTLSEK	100–1000	$1/x^2$	0.98	99.99
LLDNWDSVTSTFSK	100–1000	$1/x^2$	0.99	99.99
VQPYLDDFQK	100–1000	$1/x^2$	0.98	99.99

表 2. 定量に用いたラット血漿 (A) とヒト血漿 (B) 中の Apo A1 トリプシンペプチドの直線性および検量線の統計値。血漿サンプルは ProteinWorks eXpress Direct 消化キットにより消化。

Apo A1は、ヒト血漿中に高濃度に存在するため、定量は標準添加法により行いました。この場合、それぞれのトリプシンペプチドの検量線の傾きとy切片から内因性Apo A1濃度（x切片）が計算されます。計算された内因性Apo A1濃度をスタンダードおよびQCサンプルのApo A1添加濃度に加算することで正確なヒト血漿中Apo A1の評価が可能になります。対象とした4つ全てのトリプシンペプチド血漿中濃度における検量線は5-1500 µg/mL（ラット）、100-1000 µg/mL（ヒト）の範囲で正確で高い精度でした。この結果はそれぞれ表2A、2Bに示しています。検出下限値は2.5-5 µg/mLの範囲と推算されます。全てのQC濃度において、ラットとヒト両方の血漿で、QCサンプルは正確で相対標準偏差が15%以下と高い精度を示しました。ラットとヒト両方の血漿におけるDLATトリプシンペプチドのQC評価結果はそれぞれ表3と表4および、図4Aと4Bに示しました。ブランクラット血漿消化サンプルにはヒトApo A1ペプチドは検出されませんでした（ラットApo A1アミノ酸配列はヒトApo A1と異なります）。ヒトブランク血漿消化サンプルにおいては、高濃度の内因性Apo A1によるヒトApo A1ペプチドの大きなピークが検出されました。DLAT、ATEH、LLDNとVQPYトリプシンペプチドによる内因性Apo A1の平均濃度はそれぞれ、589.02、603.74、549.72および552.99 µg/mLと定量されました（表5）。これらの値は報告されている典型値（男性1.2 mg/mL以上、女性1.4 mg/mL以上）[2]よりも低い値でした。これは測定前のサンプル採取と保管状態が最適ではなかった事に由来するものではないかと考えられます。血漿中Apo A1の安定性は測定前のサンプル採取と保管の影響を受ける可能性があることが報告されています。例えば、Pasellaらは4℃で13日間保管した場合にApo A1量が大きく減少すると報告しています[12]。本アプリケーションで使用した市販血漿が2週間以上4℃で保管された物であることにより、上記推論が裏付けられます。以上に関わらず本メソッドはApo A1定量に優れた真度と精度を、健常人と病人両方のApo A1濃度のどちらの測定にも適応する広いダイナミックレンジと共に有している事を示しました。

ペプチド	ヒトApo A1 QC 添加濃度 (µg/mL)	ラット血漿中 ヒトApo A1 平均濃度計算値 (µg/mL)	標準偏差	相対 標準偏差	平均真度	QC適合数
DLATVYVDVLK	18	15.46	0.12	0.78%	85.90%	3 out of 3
	180	166.35	7.34	4.41%	92.43%	3 out of 3
	1200	1268.65	71.12	5.61%	105.70%	2 out of 3

表 3. ラット血漿中 Apo A1 の定量に用いた DLAT トリプシンペプチド QC サンプルの統計値

ペプチド	ヒトApo A1 QC 添加濃度 (µg/mL)	ヒト血漿中 ヒトApo A1 平均濃度計算値 (µg/mL)	平均濃度 計算値 (µg/mL)	標準偏差	相対 標準 偏差	平均真度	QC適合数
DLATVYVDVLK	0	601.48 （内因性）	589.02	12.77	2.17%	97.92%	6 out of 6
	75	676.48	723.58	26.85	3.71%	106.98%	4 out of 4
	150	751.48	777.14	39.39	5.07%	103.43%	4 out of 4
	350	951.48	924.38	33.31	3.60%	97.15%	4 out of 4
	750	1351.48	1360.39	85.60	6.29%	100.68%	4 out of 4

表 4. ヒト血漿中の Apo A1 の定量に用いた DLAT トリプシンペプチド QC サンプルの統計値

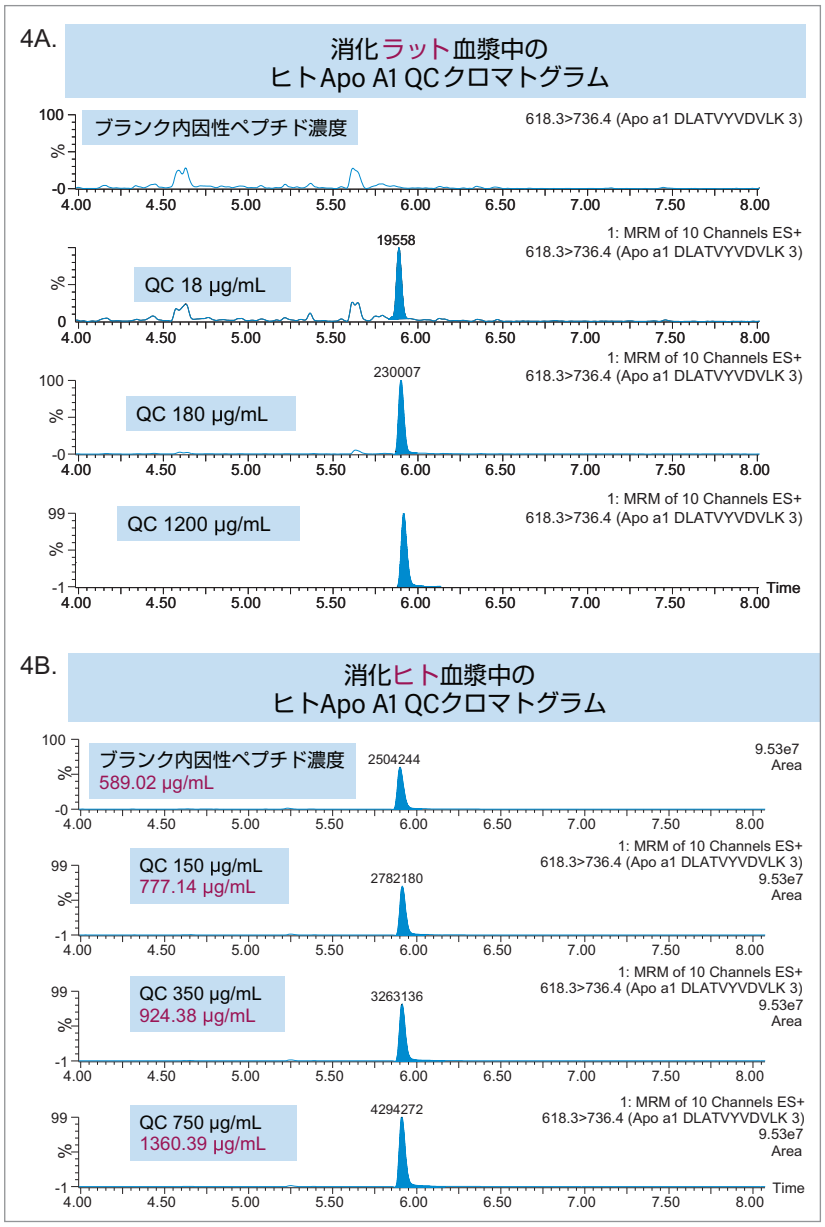

図 4. ラット血漿（A）とヒト血漿（B）中の Apo A1 DLAT トリプシンペプチド QC クロマトグラム

ペプチド	ヒト血漿中内因性Apo A1 平均濃度計算値（N=6, µg/mL）
DLATVYVDVLK	589.02
ATEHLSTLSEK	603.74
LLDNWDSVTSTFSK	549.72
VQPYLDDFQK	552.99

表 5. Apo A1 の各種トリプシンペプチドによるヒト血漿中内因性 Apo A1 濃度計算値

結論

本検討は血漿中の内因性タンパク質、アポリポタンパク質A1の正確で高精度な定量を実証しました。ProteinWorks eXpress Direct消化キットを3ステッププロトコールで使用することにより、総サンプル処理時間は1.5時間以下でした。15 µLの血漿を直接消化することで、直線性と真度および精度を維持した上で5-1500 µg/mLにおける定量が達成されました。本メソッドはラット血漿中Apo A1の5 µg/mLの変化、およびヒト血漿中Apo A1の内因性濃度における75 µg/mLの変化を簡単に識別します。本検討により、このシンプルなキットベースのアプローチの使用がメソッド開発を不要にし、バイオアナリシスラボにおいてわずかな試験だけで頑健で正確かつ高精度なデータを迅速に得ることを可能にすることが示唆されました。

参考文献

1. Wasan et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(1), 84–99, 2008.
2. Apolipoprotein A1, plasma values. May 25, 2016 from http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/80309
3. Genest et al., *JACC*, 1992, Vol. 19, No.4, 792–802.
4. Dawar et al., *International J. Pharma and Bio Sciences*, 2010, V1(2), Biological Science, No. 43.
5. Ashmaig et al., *J Vasc Bras.* 2011, 10(4): 293–297.
6. Shilpasree et al. *J Clin Diagn Res*., 2013, 7(7): 1303–1306.
7. Schaefer et al., *N Engl J Med*, 1978, 299,:905–910.
8. Wang et al., *Bioanalysis*, 2015, Vol. 7, No. 22, 2895–2911.
9. Lassman et al., *Rapid Commun. Mass Spectro.* 2012, 26, 101–108.
10. Agger et al., *Clin. Chem*., 2010, 56(12), 1804–1813.
11. UniPro, (23Jan2007). UniProtKB – P02647 (APOA1_HUMAN). Primary accession number:P02647. Retrieved from http://www.uniprot.org/uniprot/P02647
12. Pasella et al., *Proteome Science* 2013, 11:10.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、Xevo、MassLynx および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
ProteinWorks は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年9月 720005777JA PDF