

培地成分の定性分析(LC-TOFMS)

培養細胞による多くの研究において培養培地や培養上清に含まれる成分の定性や定量は、近年注目され活用の場が増えてきています。培地に含まれる成分を知ることは、細胞培養の効率向上のための有用な情報となります。ここでは、市販培地を例に液体クロマトグラフィー - 飛行時間型質量分析計(LC-TOFMS)を用いたライブラリー検索による培地成分のノンターゲット分析と、その結果を解析した試料間比較や主成分分析をご紹介します。

【分析試料】 市販培地 A、市販培地 B、市販培地 C (市販品)

【分析装置】 SCIEX TripleTOF® 6600 システム (LC-TOFMS)

【ノンターゲット分析】

市販培地 A~C をメタノールで希釈した後、LC-TOFMS 測定を行いました。市販培地 A のライブラリー検索による成分同定結果を表 1、検出された成分の MS クロマトグラムを図 1 に示します。

表 1 ライブラリー検索結果 (一部抜粋)

Name	Formura
L-Arginine	$C_6H_{14}N_4O_2$
L-Glutamic acid	$C_5H_9NO_4$
L-Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$
L-Histidine	$C_6H_9N_3O_2$
L-Methionine	$C_5H_{11}NO_2S$
L-Proline	$C_5H_9NO_2$
L-Isoleucine	$C_6H_{13}NO_2$
L-Leucine	$C_6H_{13}NO_2$
L-Valine	$C_5H_{11}NO_2$
Niacinamide	$C_6H_6N_2O$
L-Tyrosine	$C_9H_{11}NO_3$
L-Phenylalanine	$C_9H_9NO_2$
L-Tryptophan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$
L-Lysine	$C_6H_{14}N_2O_2$
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$
Pantothenic acid	$C_9H_{17}NO_5$

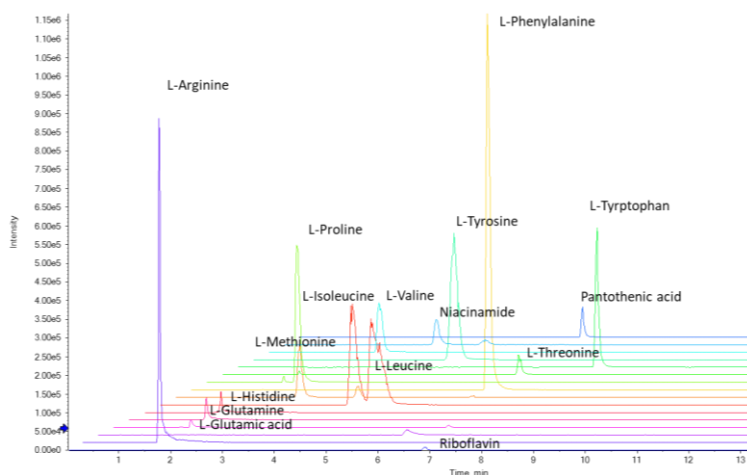


図 1 市販培地 A に含まれる成分の MS クロマトグラム

【試料間比較】

試料が複数種ある場合は、試料間の相対量比を棒グラフで可視化してその特徴を把握することができます。市販培地 A、B、C のライブラリー検索結果とその成分の相対量を比較した例を図 2 に示します。培地の種類によって培養成果が異なるとき、試料間で差がある成分がわかることでその要因となる成分が判明する一助となります。

成分名	Graph		
	A	B	C
L-Proline	■	■	■
L-Valine	■	■	■
Nicotinamide	■	■	■
Pyroglutamic acid	■	■	■
L-Isoleucine	■	■	■
L-Leucine	■	■	■
Glutamine	■	■	■
L-Lysine	■	■	■
Glutamic acid	■	■	■
L-Phenylalanine	■	■	■
L-Arginine	■	■	■
L-Tyrosine	■	■	■
L-Tryptophan	■	■	■
Pantothenic acid	■	■	■
BIOTIN	■	■	■

図 2 市販培地 A、B、C のライブラリー検索結果と成分の相対量比較(一部抜粋)

【主成分分析による特徴的な成分の探索】

市販培地 A、B、C の測定結果から、主成分分析 (PCA) を実施した結果を図 3 に示します。

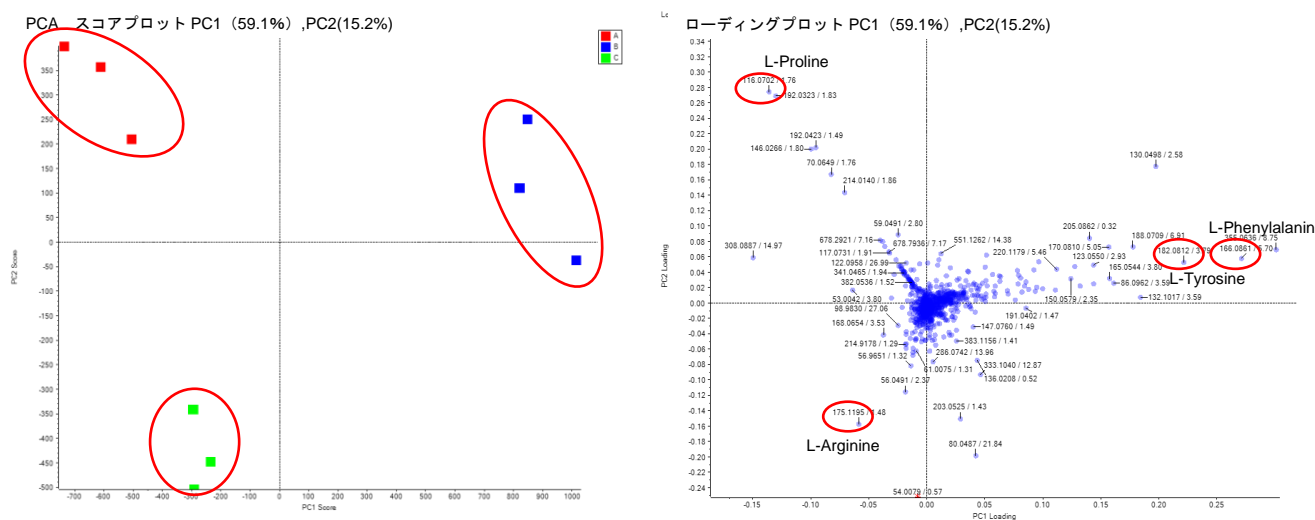


図 3 市販培地 3 種の主成分分析 (左: スコアプロット 右: ローディングプロット)

スコアプロットにより市販培地は製品の違いによってグループを形成することがわかりました（図3左）。グループの差を示す成分を解析した結果、ローディングプロットから、これら市販培地の違いによる特徴的な成分は L-Proline、L-Phenylalanine、L-Tyrosine、L-Arginine、と同定されました（図3右）。

LC-TOFMS のデータベース登録化合物はアミノ酸類、有機酸、核酸類、ビタミン類、その他の成分を含め 500 成分以上が収録されています。登録成分を一部抜粋したリストを示します。

アミノ酸類			
1-Methylhistidine	Glutathione	L-Cysteine	L-Tyrosine
2-Furoylglycine	Glycine	L-Glutamic acid	L-Valine
3-Methylhistidine	Homo-L-arginine	L-Glutamine	Methionine sulfoxide
4-Hydroxyproline	Hydroxykynurenine	L-Histidine	N-Acetyl-L-alanine
5-Hydroxylysine	Hydroxyphenyllactic acid	L-Histidinol	N-Acetyl-L-methionine
5'-Methylthioadenosine	Indoleacetic acid	L-Isoleucine	N-Acetyl-L-phenylalanine
Acetylcysteine	L-3-Phenyllactic acid	L-Leucine	N-Acetylputrescine
Acetylglycine	L-Acetylcarnitine	L-Lysine	N-Acetylserotonin
Alpha-Hydroxyisobutyric acid	L-Alanine	L-Methionine	N-Formyl-L-methionine
Amino adipic acid	L-Alloisoleucine	L-Norleucine	Ornithine
Argininosuccinic acid	L-Alpha-aminobutyric acid	L-Phenylalanine	Pipecolic acid
Citrulline	L-Arginine	L-Proline	Urocanic acid
D-Alpha-aminobutyric acid	L-Asparagine	L-Serine	
Dimethylglycine	L-Carnitine	L-Threonine	
Gamma-Aminobutyric acid	L-Cystathionine	L-Tryptophan	

ビタミン類		
(R)-lipoic acid	Glycerophosphocholine	Pantothenic acid
2-Aminobenzoic acid	m-Aminobenzoic acid	Phosphorylcholine
6-Hydroxynicotinic acid	Niacinamide	Pyridoxal 5'-phosphate
Ascorbic acid	Nicotinic acid	Riboflavin
Dehydroascorbic acid	p-Aminobenzoic acid	

酸類			
1,1-Dimethylbiguanide	6-Methyladenine	Deoxyinosine	Nicotinic acid
1,3,7-Trimethyluric acid	7-Methylguanine	Deoxyuridine	N-Methyl -a-aminoisobutyric acid
1,3-Dimethyluracil	7-Methylxanthine	Dihydrouracil	Orotic acid
1,3-Dimethyluric acid	9-Methyluric acid	Ethenodeoxyadenosine	Ribothymidine
1,9-Dimethyluric acid	Adenosine 2',3'-cyclic phosphate	FAPy-adenine	Thymidine
1-Methyladenosine	Adenosine monophosphate	Guanidinosuccinic acid	Thymidine 5'-triphosphate
1-Methylguanine	Adenosine triphosphate	Guanosine	Thymine
2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	Alpha-Hydroxyhippuric acid	Guanosine diphosphate	Uracil
2-Methylhippuric acid	Alpha-Hydroxyhippuric acid	Guanosine monophosphate	Uridine
2-Phenylaminoadenosine	Cytidine monophosphate	Guanosine triphosphate	Uridine 5'-diphosphate
3-Methyladenine	Cytidine triphosphate	Hippuric acid	Uridine 5'-monophosphate
4-Aminohippuric acid	Cytosine	Inosine	Uridine diphosphate glucose
4-Guanidinobutanoic acid	Deoxyadenosine monophosphate	Inosine triphosphate	Xanthosine
5-Hydroxymethyluracil	Deoxycytidine	L-Dihydroorotic acid	
5'-Methylthioadenosine	Deoxyguanosine	Methylguanidine	

【まとめ】

培地成分のノンターゲット分析による定性分析とその結果を用いた試料間比較、主成分分析により培地の特性や培養の成果に寄与の高い成分を見つけることが可能です。これらの情報は、細胞培養の成果向上のために有用な情報となることが期待されます。