

資 料



ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器
(第四シリーズ)

IV. 加速器質量分析 (AMS) のトレーサ研究での利用
——生化学分野における応用例——

宮下正弘

Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol. 52, No. 6
June 2003

社団法人 日本アイソトープ協会

資 料



ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器 (第四シリーズ)

IV. 加速器質量分析 (AMS) のトレーサ研究での利用
——生化学分野における応用例——[†]

宮下正弘

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻
606-8502 京都市左京区北白川追分町Key Words : accelerator mass spectrometry, biochemical study, Edman degradation
radioimmunoassay, carbon-14 tracer

1. はじめに

モル (mol) は物質量を表す単位として一般的に用いられている。物質量を分子の個数で表しては数が大きすぎて不便であることから 1 mol という単位を 6.02×10^{23} 個の原子あるいは分子に対して定義したわけである。最近、アトモル (amol), ゼプトモル (zmol) という表現を論文などで見かけることがあるが、これらはそれぞれ 10^{-18} mol, 10^{-21} mol を意味している。先に物質量を表すためにはモルを用いないと不便であると書いたが、1 zmol は分子 602 個に相当し、もはや個数で表すほうがわかりやすいかもしれない。このような超微量物質を定量する分析技術が現実的なものとなろうとしている。

Accelerator Mass Spectrometry (AMS) は amol レベルという超高感度での測定が可能な

質量分析計である^{1), 2)}。質量分析計という名が付いてはいるが、この装置から得られるデータは一般的に連想される質量分析計とは異なる。AMS では「分子量」を測定するわけではなく、分子を構成する、ある特定の「元素」の同位体の量比のみを精密に測定する。代表的な測定元素である ^{14}C の場合、従来の質量分析法では、 ^{14}C とほとんど質量が同じである ^{13}CH や $^{12}\text{CH}_2$ などを区別することができないため、 ^{14}C だけを特異的に測定することは不可能であった。それに対し、AMS では加速器をはじめとした妨害イオンを除去するさまざまな工夫により、ノイズとなるバックグラウンドをほとんど排除できる。その結果として、元素の同位体、特にその自然存在比が極めて低い放射性同位体を高感度で測定することが可能となった。AMS によって測定可能な主な同位体元素を表 1 に挙げた。AMS は考古学研究における年代測定や、地球環境解析における ^{14}C 濃度測定など、主に微量試料から高精度に同位体比を測定する必要がある目的に用いられ、これまでは得ることのできなかった多くの情報がもたらされている。

放射性同位体標識は特異的かつ高感度による検出が可能であることから多くの生化学実験で用いられ、現在では欠くことのできない重要な手法となっている。一方で、使用の簡便さなど

[†] Instruments for Radiation Measurement in Life Sciences (4). IV. Accelerator Mass Spectrometry in Tracer Studies—Applications to Biochemical Studies—.

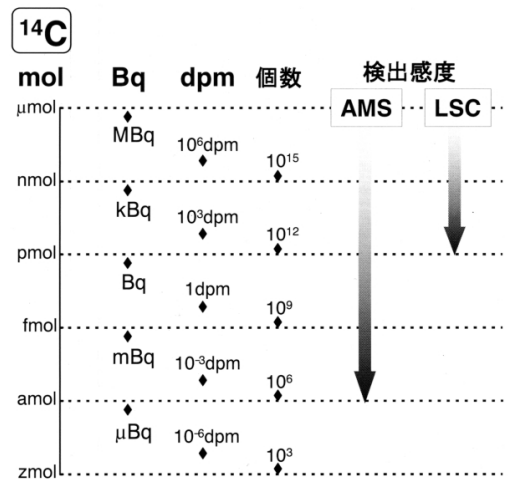
Masahiro MIYASHITA: Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Oikawa-cho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8502, Japan.

表 1 AMS によって測定できる主な同位体元素

同位体	半減期 (年)	感度 (parts per 10 ¹⁵)	イオン源での 試料の形
³ H	12.3	0.1	TiH ₂
¹⁰ Be	1.6 x 10 ⁶	5	BeO
¹⁴ C	5730	2	Graphite
²⁶ Al	720,000	3	Al ₂ O ₃
³⁶ Cl	300,000	5	AgCl
⁴¹ Ca	105,000	2	CaF ₂ , CaH ₂
¹²⁹ I	16 x 10 ⁶	10	AgI

から、蛍光や化学発光などを利用した標識法も多く用いられている。しかしながら、これらの標識は放射性同位体標識に比べると検出の特異性が低く、バックグラウンドノイズが測定を妨害する可能性があり、放射性同位体標識に完全に取って代わるものではない。

放射性同位体元素は³H, ¹⁴C, ¹²⁵Iなどが主に用いられるが、なかでも¹⁴Cは半減期が長いため長期の保存が可能であることや、ほとんどの化合物の骨格に含まれているため化合物の性質に影響を与えず、目的外の交換反応も起こらないなどの理由から生化学実験でしばしば用いられる。しかしながら、半減期の長い¹⁴Cは、崩壊数を計測する液体シンチレーションカウンター(Liquid Scintillation Counter:LSC)の測定にとっては感度の面で不利である。例えば、¹⁴Cは半減期が5730年であるので、単純に計算すると試料に含まれる0.1%の¹⁴Cの崩壊数を測定するのにも8.3年かかることになる。一方、AMSは崩壊数ではなく原子そのものの量を“直接的”に測定するので、¹⁴Cの長い半減期は測定に影響しない。図1に示したように、感度の点ではAMSはLSCに比べはるかに高く、¹⁴C標識化合物の高感度検出が可能である。このようなAMSの利点を生かすべく、米国ローレンス・リバーモア国立研究所(Lawrence Livermore National Laboratory:LLNL)のグループは、年代測定が主な使用用途であった

図 1 AMS と LSC の ¹⁴C 測定感度の比較

AMSを生医化学研究の領域へ初めて持ち込み、その有用性を示してきた³⁾。特に、AMSを用いたヒトに対する放射性同位体標識化合物の体内動態研究は製薬会社の注目を集め、現在では受託測定を行う会社もある。ここでは、AMSの生化学分野への応用例として、著者が米国においてB. D. Hammock 教授(University of California, Davis)及びJ. S. Vogel (LLNL)らのグループと行った研究の一端について紹介する。

2. LLNL における AMS 測定の実際

LLNLにおけるAMSの装置の概略を図2に示した。ここでは¹⁴Cの測定を例に挙げて、

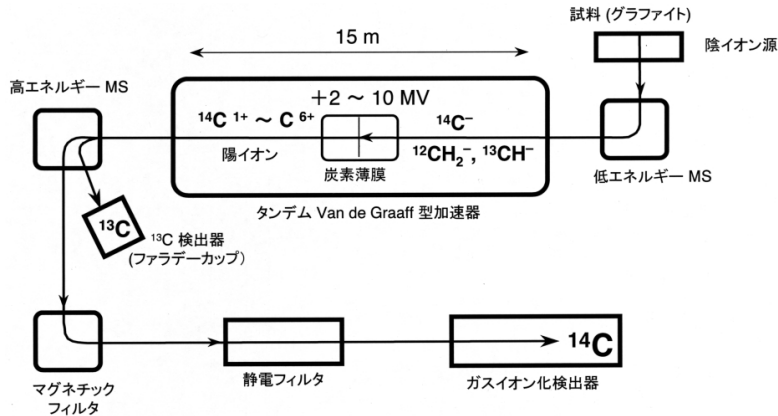


図 2 LLNL における AMS の概略

その測定法の概略のみ説明する。AMS では試料はそのままの状態では測定できないので、あらかじめ燃焼・還元してグラファイト化しておく。グラファイト化された試料は、イオン源においてセシウムイオンビームの照射により陰イオンとして放出される。生じた陰イオンは通常の磁場型質量分析計と同様の手法により質量数 14 のみが選択される。このとき、内部標準となる ^{13}C を測定するために質量数 13 もごく短時間だけ選択される。この段階では ^{14}C に加えて、ほとんど質量数の変わらない ^{13}CH や $^{12}\text{CH}_2$ など含まれている。これらの妨害イオンを含む陰イオンは続いて加速器に導入される。LLNL の AMS には図 2 に示したようなタンデム Van de Graaff 型加速器が用いられている。この加速器は中央部分で高電圧 (2 ~ 10 MV) で正に荷電しており、陰イオンは中央に向かって引きつけられ加速される。中央部分には炭素薄膜が存在し、陰イオンはこれに衝突することによって電子がはぎ取られ、陽イオン ($\text{C}^{1+} \sim \text{C}^{6+}$) へと変換される。この際、 ^{13}CH や $^{12}\text{CH}_2$ などの分子イオンは結合が切断されて原子イオンとなることで妨害イオンではなくなる。 ^{14}C (主に $^{14}\text{C}^{4+}$) は、さらにマグネチック及び静電フィルタを通った後、最終的にガスイオン化検出器によって測定される。AMS では ^{14}C の絶対量は測定できないので、同じ試料に

含まれる ^{13}C を内部標準として用いている。 ^{13}C の量は加速器を出た後ファラデーカップによって測定され、最終的には $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$ として測定値が得られる。試料に含まれる全炭素の量が分かっているならば ^{13}C の量は決まるので、 ^{14}C の量を決定することができる。測定感度は極めて高く、試料としては炭素として 1 mg あれば十分で、1 amol ~ 10 fmol (およそ 0.0001 dpm ~ 1 dpm) の ^{14}C を定量することが可能である。AMS による ^{14}C の測定では、試料はグラファイトでなければならないが、グラファイト化は熟練を要する作業が多く AMS 測定の信頼性及びスループットにとって重要な段階である⁴⁾。LLNL においてはグラファイト化を専門に行う技術者がいるため、1 週間で数百サンプルの測定が可能となっている。

現在の地球上の生物圏では 1 mg の炭素中に約 100 amol の ^{14}C が含まれており、ほんのわずかな生物由来の物質の混入でも、AMS 測定にとって致命的である。用いる器具や手袋、実験台の汚染 (といっても普通なら汚染とはいえないレベルではあるが) に気をつけることはいうまでもないが、部屋中の空気における ^{14}C 濃度にまで注意する必要がある。ちなみに、多くの試薬類は石油を原料として作られており、 ^{14}C をほとんど含まない“Dead Carbon”で構成されているため、測定には影響しない。

3. 超高感度蛋白質シーケンシングへの応用

さまざまな生物のゲノムの解読が終わろうとしている中で、研究者たちの興味はその転写産物である蛋白質の網羅的な解析（プロテオミクス）に移っている。ハイスループットが何よりも重要視されるプロテオーム解析では、比較的高感度（fmol オーダー）かつ迅速である MS によるアミノ酸配列決定法が主に用いられている。しかしながら、MS 法におけるアミノ酸配列の解釈の基礎となるフラグメント化は常に理想的に起こるというわけではなく、また等しい質量数を有するイソロイシンとロイシンは区別できないなど、新規蛋白質の解析に MS 法を適用することは難しい。一方、エドマン分解法はスループット及び感度に関しては MS 法にはるかに劣るが、最も確実なアミノ酸配列決定法であり、新規蛋白質の同定には今日においても必要不可欠な手法である⁵⁾。感度の面では、エドマンによる発明以降さまざまな工夫が行われ、その向上がはかられてきた。中でも、エドマン分解反応によって得られる phenylthiohydantoin (PTH)-アミノ酸(図 3)の検出を、UV 検出器を装備した高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) 法で行えるようになってから格段に感度が上昇した⁶⁾。現在の基本的なシステムは 20 年ほど前とほとんど変わりはなく、改良は主に HPLC システムに対して行われた。このことはまた、エドマン分解法の分析限界が主に PTH-アミノ酸の検出感度に依存していることを意味している。現在では数百 fmol の試料の解析が可能となってきているが、それでも多くの生化学実験では十分とはいえない。

HPLC が導入される前、PTH-アミノ酸の検出感度を上げることを目的として、放射性同位体 (^{14}C , ^3H , ^{35}S) による標識エドマン試薬 (phenylisothiocyanate: PITC) が用いられたことがあった⁷⁾。この方法は、当時としては高感度であったが、HPLC の登場以後は感度の面

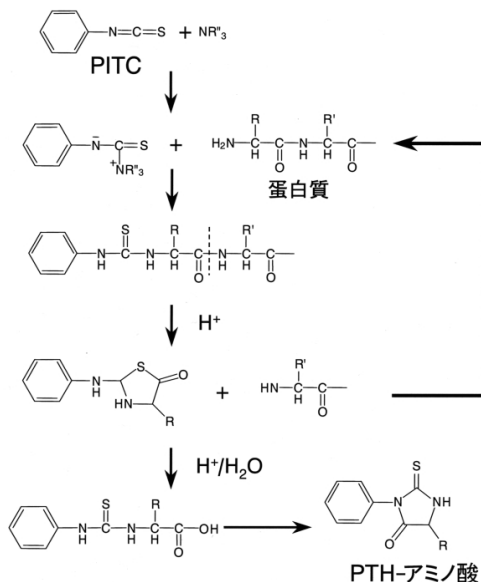


図 3 エドマン分解反応

だけでなく、簡便さにおいても劣るため用いられなくなった。しかしながら、AMS を検出器として用いれば、 ^{14}C 標識した PTH-アミノ酸を極めて高感度に検出できるとの考えのもと、全てのアミノ酸を ^{14}C 標識した蛋白質を用いてその検討が行われた⁸⁾。 ^{14}C 標識化蛋白質は大腸菌を用いた発現系において合成された。まず、1.8 fmol の蛋白質を用いて、配列決定が試みられた。この量は従来のエドマン分解法では分析不可能な量であることはいうまでもないが、MS 法においても容易ではない。エドマン分解を 10 サイクル行い、それぞれ得られた PTH-アミノ酸を HPLC によって分離し、AMS 測定を行った。その結果、 ^{14}C PTH-アミノ酸由来の HPLC ピークにのみ ^{14}C が観測され、10 残基の N 末端配列を同定することができた(図 4)。UV 検出の場合、溶媒を含め、さまざまなものに由来する UV 吸収性物質が解析の邪魔をすることが多く、得られたデータの解釈には経験を要する。AMS による ^{14}C 測定の場合、ほとんどバックグラウンドのノイズがなく、極めて容易にピークを同定することができた。微量蛋白質の分析では、測定以前に試料が器壁に

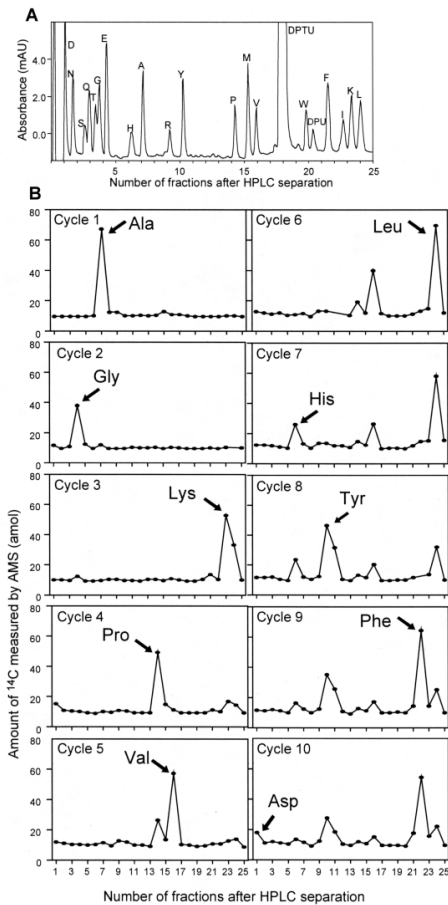


図 4 1.8 fmol の ^{14}C 標識化蛋白質を用いたエドマン分解反応後の PTH-アミノ酸の AMS による同定。A) 標準 PTH-アミノ酸混合物の UV 検出による HPLC 分析。B) AMS による HPLC フラクシオンの ^{14}C 量の測定結果。矢印は同定されたアミノ酸のピークを示す

吸着するなどしてほとんど失われてしまうことがしばしば問題となる。この研究では、非特異的な吸着による試料の損失を防ぐため、対象とする蛋白質とは無関係の非標識蛋白質が大過剰、試料の調製の段階から添加されている。AMS では、 ^{14}C を特異的に検出しているため、添加された非標識の蛋白質は測定に影響しない。実際、試料を希釈する際に非標識蛋白質を入れなかった場合、大幅なシグナルの減少が見られた。更に、amol レベルでの解析が行われた結果、

100 amol においても有意に HPLC ピークが観測され、AMS を用いたエドマン分解法が amol レベルにおいてもアミノ酸配列を決定できることが示された。

この研究では、 ^{14}C 標識された蛋白質を用いており、その比放射活性もかなり高い (112 GBq/mmol, $^{14}\text{C}/\text{C}=0.043$) ものである。しかしながら、一般的な生化学実験における未知蛋白質に対して、このような高い比放射活性になるよう標識化を行うのは容易ではない。ここで挙げた方法は、限られた用途にしか適用できないが、エドマン分解法の高感度化の可能性が示された。今後は、蛋白質自身を標識化しておくのではなく、 ^{14}C 標識した PITH を用いて [^{14}C]PTH-アミノ酸を得ることができるようになれば、適用範囲が広がるであろう。

本稿では、amol レベルの蛋白質の解析法について述べてきたが、電気泳動ゲル上では amol レベルの微量蛋白質は銀染色法を用いても検出すらできない。蛋白質が ^{14}C で標識されておれば、AMS によって超高感度で微量蛋白質の検出が可能であるだけでなく、更にはその厳密な定量も行うことができる⁹⁾。蛋白質の解析においてはより高感度で定量的な分析法が求められており、今後もこの分野での AMS の応用は広がっていくであろう。

4. ラジオイムノアッセイへの応用

抗原抗体反応を利用したイムノアッセイは操作の簡便さと高い検出感度により、さまざまな分野において活用されている重要な分析手法である。開発初期におけるイムノアッセイでは放射性同位体によって標識された抗原あるいは抗体を用いるラジオイムノアッセイが盛んに行われた。 ^{14}C や ^3H などによって抗原を標識する場合、抗原の構造を変えずに導入が可能であるため、より厳密に抗原と抗体との相互作用が測定できる。しかし、これらの同位体は LSC による測定では検出感度があまり良くない。AMS は ^{14}C を amol レベルという高感度

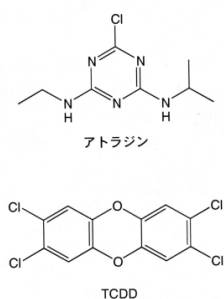


図 5 アトラジンおよび TCDD の構造

で検出することができるため、これまでの¹⁴C標識化合物を用いたラジオイムノアッセイの欠点である、感度の問題を克服することができる。

AMSを用いたラジオイムノアッセイとして、農薬のアトラジン、ダイオキシン類の2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (図5)について検討された¹⁰⁾。まず、¹⁴C-アトラジン (655 MBq/mmol) に対する検量線がAMS測定により求められた。その結果、AMSによる定量は3桁以上にわたって直線性を有しており、定量限界はわずか12 amolであった。AMSによるラジオイムノアッセイの方法の概略を図6に示したが、一つの反応にはアトラジン、TCDDはそれぞれわずか8.9 mBq (0.53 dpm) が用いられるのみである。もちろん、この量はLSCでは検出不可能であるだけでなく、放射性廃棄物としての基準以下である。AMSを用いてアトラジン、TCDDのラジオイムノアッセイが行われた結果、検出感度が酵素標識法と比較して10倍程度向上した。この検出感度は、抗体の K_d 値から推測される理論値に近く、AMSを用いるラジオイムノアッセイが非常に優れていることを示している。酵素標識法によってもある程度高感度なイムノアッセイを構築することは可能であるが、さまざまな抗原と抗体との組み合わせについて検討する必要がある。一方、AMSを用いるラジオイムノアッセイでは、標識抗原は¹⁴Cを含む以外は測定対象となる化合物と同じ構造であるため、このよ

うな最適化が必要ではなく、その感度は抗体の性質によってのみ決まる。このように、AMSを用いるイムノアッセイでは、これまでにない高感度での検出が可能であるだけでなく、比較的簡単に実験系を構築できることや、放射性廃棄物が出ないといった利点がある。最近では、腫瘍マーカーの一つである、副甲状腺ホルモン関連蛋白質 (PTHrP) に対して、AMSを用いたラジオイムノアッセイを構築した例が報告されている¹¹⁾。今後、放射性廃棄物を出さない“非放射性”ラジオイムノアッセイとして確立された手法となるかもしれない。

5. おわりに

AMSの生化学研究への応用例について述べてきたが、AMSはまだ一部の人にしか使えない特殊な装置である。図1にも示したように、LLNLに設置されているAMSは加速器部分だけでも15メートルもの長さを有しており、装置全体を含めると、体育館ほどの広さが必要である。また、ほとんどのAMSは特注であり、その製造コストは莫大 (LLNLのもので約700万ドル、\$1 = ¥120として8億4千万円) である。しかしながら、これらの問題は技術の進歩と需要の増加により克服されるものであろう。最近では生医化学分野専用の小型AMSがLLNLにおいて既に稼働している¹²⁾。この装置は¹⁴C測定に限定することにより、同じ性能を有しながらも、およそ5×5mの設置面積にまで小型化され、製造コストも従来の装置よりも大幅に削減されている。

AMSが誰にでも使える一般的な分析装置となるには、もう一つ克服すべき問題がある。¹⁴C測定では、試料をあらかじめグラファイト化しなければならないが、この作業は経験を要するだけでなく、時間もかかるものであり、測定の効率化のボトルネックとなっている。もし、この煩雑な試料調製過程が自動化されたり、HPLCやGCによる分離後、直接試料をAMSに導入したりすることができれば、より一層の

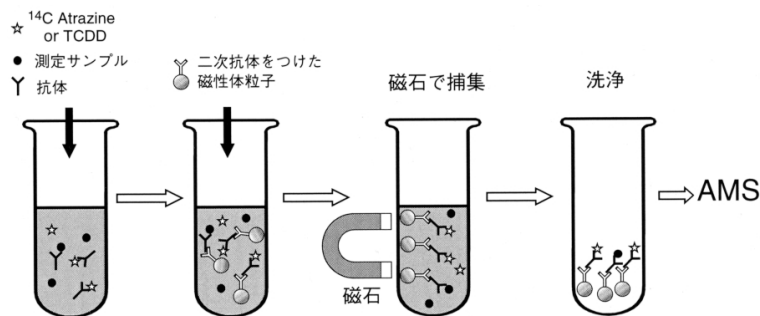


図 6 AMSを用いたラジオイムノアッセイの方法の概略

効率化が図れるであろう。

上に挙げた問題点は技術の進歩により必ず克服できるものであり、AMSの発展を妨げるほどの致命的なものではない。現時点でAMSは、生化学分野での有用性がようやく認識されはじめたところであり、装置の性能・使用用途などはまだまだ発展・進歩する可能性がある。大きな可能性を秘めたAMSが近い将来、生命科学研究にとってなくてはならない分析装置になるかもしれない。

文 献

- 1) Vogel, J. S., Turteltaub, K. W., Finkel, R. and Nelson, D. E.: Accelerator mass spectrometry: isotope quantification at attomole sensitivity, *Anal. Chem.*, **67**, 353A-359A (1995)
- 2) Fifield, L. K.: Accelerator mass spectrometry and its applications, *Rep. Prog. Phys.*, **62**, 1223-1274 (1999)
- 3) Freeman, S. and Vogel, J. S.: Biomedical accelerator mass-spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **143**, 247-256 (1995)
- 4) Vogel, J. S.: Rapid production of graphite without contamination for biomedical AMS, *Radiocarbon*, **34**, 344-350 (1992)
- 5) Edman, P. and Begg, G.: A protein sequenator, *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80-91 (1967)
- 6) Zimmerman, C. L., Appella, E. and Pisano, J. J.: Rapid analysis of amino acid phenylthiohydantoin by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, **77**, 569-573 (1977)
- 7) Jacobs, J. W. and Niall, H. D.: High sensitivity automated sequence determination of polypeptides, *J. Biol. Chem.*, **250**, 3629-3636 (1975)
- 8) Miyashita, M., Presley, J. M., Buchholz, B. A., Lam, K. S., Lee, Y. M., Vogel, J. S. and Hammock, B. D.: Attomole level protein sequencing by edman degradation coupled with accelerator mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 4403-4408 (2001)
- 9) Vogel, J. S., Grant, P. G., Buchholz, B. A., Dingley, K. and Turteltaub, K. W.: Attomole quantitation of protein separations with accelerator mass spectrometry, *Electrophoresis*, **22**, 2037-2045 (2001)
- 10) Shan, G., Huang, W., Gee, S. J., Buchholz, B. A., Vogel, J. S. and Hammock, B. D.: Isotope-labeled immunoassays without radiation waste, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 2445-2449 (2000)
- 11) Lu, C. Y. M., Burton, D. W., Fitzgerald, R. L., Deftos, L. J., Buchholz, B. A., Vogel, J. S. and Herold, D. A.: Mass spectrometric immunoassay for parathyroid hormone-related protein, *Anal. Chem.*, **74**, 5507-5512 (2002)
- 12) Ognibene, T. J., Bench, G., Brown, T. A., Peaslee, G. F. and Vogel, J. S.: A new accelerator mass spectrometry system for ^{14}C -quantification of biochemical samples, *Int. J. Mass Spectrom.*, **218**, 255-264 (2002)