

シンポジウム：プロテオミクス技術の最前線 テクニカルレポート

相間移動溶解剤を用いたショットガンプロテオミクス用試料調製法

増田 豪^{*1}, 石濱 泰²

^{*}E-mail: masudt2@uw.edu

¹Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Washington: 1705 NE Pacific Street, Seattle, WA 98195, USA

²京都大学大学院薬学研究科 : 606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29

(受付 2016 年 4 月 19 日, 改訂 2016 年 5 月 25 日, 受理 2016 年 5 月 26 日)

筆者らは相間移動溶解剤 (Phase Transfer Surfactant, PTS) を用いたショットガンプロテオミクス用の前処理方法を報告してきた。本方法の特徴は、酸性条件化で PTS の疎水性度が上昇することを利用して酢酸エチルを用いた液液分配で PTS を試料溶液から除去できる点である。PTS として陰イオン性界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウムおよびラウロイルサルコシン酸ナトリウムを用いており、これら溶解剤は脂溶性の高い膜タンパク質でも細胞質基質タンパク質と同等に定量的に可溶化できるほど溶解能が高い。興味深いことに、これら溶解剤は消化酵素の活性を促進する効果を併せ持っている。PTS 法は Filter-aided sample preparation や酸分解性界面活性剤である RapiGest を用いた方法よりも多くのタンパク質を同定できることが示された。PTS 法はこれまで多様な試料に適用されており、膜プロテオミクスだけでなく通常のショットガンプロテオミクスにも効果的な前処理方法である。

1 序 論

近年のプロテオミクス分野では、液体クロマトグラフィーや質量分析計の発展が目覚しく、1 回の分析で 6,000 種類以上のタンパク質を安定的に同定できるようになった¹⁾。その一般的な試料調製方法は、先ず細胞や組織などからタンパク質を抽出し、リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C) やトリプシンなどで消化する。断片化されたペプチドを LC-MS/MS で測定し、得られたペプチドのマススペクトルやマスキロマトグラムを元に、タンパク質や翻訳後修飾の種類の同定と定量が行われる。試料調製において、タンパク質の抽出ステップは特に重要である。ヒトのゲノムには 22,000 種類以上の遺伝子がコードされており、そこから発現されるタンパク質の物理的特性や細胞内外の局在は多様である。細胞質基質で機能する酵素や細胞膜内に局在する受容体など、タンパク質の疎水性度は幅広く、網羅的にタンパク質を定性・定量するにはそれらを高効率かつ再現性高く抽出する必要がある。タンパク質溶解剤として、これまでアセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒²⁾、オクチルグルコシドやドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などの界面活性剤^{3),4)}、尿素やグアニジン塩酸などのカオトロピック試薬^{3),5)} が利用されてきた。一般的に、界面活性剤のタンパク質可溶性は有機溶媒やカオトロピック試薬に比べて高い。しかしながら、可溶性の高い界面活性剤はトリプシンや Lys-C などのプロテアーゼ活性

を阻害してしまうものが多い。さらに、界面活性剤は試料溶液から完全に除去することは難しく、LC-MS に悪影響をおよぼす。つまり、疎水性の高いタンパク質でも可溶化でき、消化酵素の活性を阻害せず、なおかつ LC-MS 前に除去できる溶解剤がショットガンプロテオミクスに適している。そこで、我々はこれら 3 点を満たす溶解剤の探索を行い、27 種類の中からデオキシコール酸ナトリウム (SDC) を選択した⁶⁾。SDC の膜タンパク質可溶性は SDS と同等でありながらも、消化酵素の活性を促進する効果を持ち合わせていた。さらに、我々は酸性条件化で SDC の疎水性度が上昇する点に着目し、LC-MS 前に液液分配で SDC を試料溶液から除去する方法を考案した。水相から有機相へ移動する溶解剤を我々は相間移動溶解剤 (Phase Transfer Surfactant, PTS) と名づけた。本テクニカルノートでは、PTS を用いた前処理方法およびトラブルシューティングについて詳細に紹介する。

2 方法

2-1 実験デザイン

PTS 法は当初、膜プロテオーム解析の網羅性を改善することを目的として開発された。PTS 法は疎水性度の高い膜タンパク質でも、親水性タンパク質と同等に偏りなく可溶化および消化できる方法であり⁷⁾、飛躍的に膜タンパク質の同定効率が改善した。PTS は消化後の試料溶液から液液分配で除去されるが、この時ペプチドが有機相に移

動せずなおかつ高効率に PTS を除去できる有機溶媒を選択する必要がある。我々は酢酸エチル、クロロホルム、ジエチルエーテルおよびオクタノールを比較した結果、PTS 除去に必要な溶剂量が少なく、沸点の比較的低い酢酸エチルを選択した。酸性条件下の水-酢酸エチルにおけるデオキシコール酸の分配係数の対数は 1,669 であり 1 回の液液分配で約 99.9% の PTS が有機相へ移動する。また、液液分配においてペプチドがほとんど有機相へ移動しないことは確認している (Table 1)。

PTS 法はこれまで、培養細胞⁶⁾、組織⁹⁾や微生物⁷⁾、口腔メタプロテオーム¹⁰⁾など幅広い試料に使用されてきた。また、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片からでも高効率にタンパク質を抽出できるだけでなく、液液分配時にパラフィンも試料溶液から除去できる⁸⁾。さらに、PTS 法は細胞膜、ミトコンドリアや核などの細胞分画後の試料にも使用できるが、分画時に PTS 以外の界面活性剤 (Triton X-100 や NP-40 など) を使用している場合は、別途それらを除去する必要がある¹¹⁾。また、細胞からタンパク質を抽出する際に、ゲノム DNA が試料溶液の粘性を上げる場合があるが、超音波や DNase などでゲノム DNA を断片化することで粘性を下げるができる。SDC は可溶性の高い陰イオン性界面活性剤だが、興味深いことに 1% SDC 存在下における Lys-C およびトリプシン活性は、50 mM 炭酸水素アンモニウム存在下に比べて約 4 倍促進される⁶⁾。デオキシコール酸は胆汁酸の一種であり体内では胆汁から分泌され、トリプシンによるタンパク質性食物の消化を助ける働きがある。そのため、デオキシコール酸存在下でもトリプシン活性を阻害せず逆に促進するものと考えられる。PTS 法以外に試料溶液から除去できる溶解剤として RapiGest が知られている¹²⁾。RapiGest は酸性条件化で親水性と疎水性部分に分解される。親水性部分は逆相カラムを用いた脱塩時に、疎水性部分は沈殿物として除去できる。RapiGest のタンパク質溶解能はデオキシコール酸よりも高いものの、同定数は PTS 法よりも低い⁶⁾。

Table 1 Number of proteins and peptides identified in aqueous or organic phase separated by liquid-liquid extraction.

	Aqueous phase	Organic phase
Number of proteins	361	4
Number of peptides	1283	14

E. coli membrane proteins were digested with Lys-C and trypsin in the presence of trifluoroethanol. Equal volume of ethyl acetate with sample solution was added, and the acidified mixture was mixed for 1 minutes by vortex. Aqueous and organic phase were separated by centrifugation. Peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS with QSTAR-XL. Unique peptides were used for data analysis. Duplicate data were merged. Four proteins observed in the organic phase were commonly identified in the aqueous phase.

これは RapiGest 存在下におけるトリプシン活性が PTS 存在下に比べて低いこと、RapiGest 分解後に生成される疎水性部分を除去する時にペプチドが巻き込まれ回収率が低下するためだと考えられる。

2-2 実験材料

デオキシコール酸ナトリウム (SDC), N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (SLS), トリス, (±)-ジチオトレイトール (DTT), ヨードアセトアミド (IAA), 炭酸水素アンモニウム, リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C), 酢酸エチル, トリフルオロ酢酸 (TFA) およびアセトニトリルは和光純薬工業から購入した。BCA タンパク質アッセイキットおよび遠心濃縮機は Thermo Scientific から入手した。シーケンスグレードトリプシンは Promega より購入した。

2-3 PTS 法

2-3-1 タンパク質の抽出および消化

- 1) 1 mL の PTS 溶液 (12 mM SDC, 12 mM SLS, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0)) を 1E7 個の HeLa 細胞に添加し、ボルテックスで懸濁する。
※ PTS 溶液の液量および試料量はあくまで目安であり、これらの適正な量は研究目的によって異なる。
- 2) 細胞懸濁液を 95°C で 5 分間加熱する。
※ 試料の粘性が高い場合は、粘性がなくなるまで超音波処理を行う。
- 3) タンパク質の濃度を BCA assay Kit で定量する。
- 4) 分析に使用する一部の試料を新しい 1.5 mL チューブに移す。
- 5) 終濃度が 10 mM となるように 100 mM DTT 溶液を試料に添加する。
※ 4) の液量が 100 μ L だった場合、10 μ L の 100 mM DTT 溶液を添加する。
- 6) 30 分間、室温に静置する。
- 7) 終濃度が 50 mM となるように 550 mM IAA 溶液を試料に添加する。
※ 4) の液量が 100 μ L だった場合、10 μ L の 550 mM IAA 溶液を添加する。
- 8) 暗所で 30 分間、室温に静置する。
- 9) SDC および SLS の濃度がそれぞれ 2.4 mM となるように 50 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を添加する。
※ 4) の液量が 100 μ L だった場合、400 μ L の 50 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を添加する。
- 10) 試料重量に対して 1/100 量の Lys-C を添加して、室温で 3 時間静置する。
※ 4) のタンパク質重量が 10 μ g の場合、0.1 μ g の Lys-C を添加する。
- 11) 試料重量に対して 1/100 量のトリプシンを添加して、

室温で一晩静置する。

※4) のタンパク質重量が 10 µg の場合, 0.1 µg のトリプシンを添加する。Promega のトリプシン (V5113) は 50 mM 酢酸に溶けている。原液を試料溶液に添加するとチップの先に脂溶化した PTS が沈着しペプチドの損失につながる。したがって, 原液 (0.5 µg/µL) を 50 mM 炭酸水素アンモニウム溶液で 5 倍希釈したものを使用する。

2-3-2 PTS の除去

- 1) 試料溶液と等量の酢酸エチルを添加し, 終濃度 0.5% となるように TFA を添加する。

※4) の液量が 100 µL の場合, 500 µL の酢酸エチルおよび 5 µL の TFA を添加する。試料溶液に TFA を添加すると, チップの先に脂溶化した PTS が沈着しペプチドの損失につながる。したがって, まず酢酸エチルを試料溶液に添加し, その酢酸エチル層に TFA を添加すること。

- 2) ボルテックスで 1 分間攪拌する。
- 3) 15,700xg, 25°C で 2 分間遠心し, 上層 (酢酸エチル層) をピペットで除去する。

※上層と下層の境目に白い膜状のものができることがある。この膜は除去しなくてもその後の操作および分析に問題はない。

- 4) 試料中に溶けている酢酸エチルを除去するために, 遠心濃縮機で溶液を除去する。
- 5) 100 µL の Buffer A (5% アセトニトリル, 0.5% TFA) で試料を懸濁する。
- 6) C18-StageTip ※で脱塩する。
- 7) C18-StageTip から溶出させた溶液を遠心濃縮機で除去した後, Buffer A で再懸濁したペプチドを LC-MS/MS で分析する。

※StageTip の詳細は別報¹³⁾を参考にさせていただきたい。

2-3-3 データ解析

Mascot v2.2 を用いてフラグメントスペクトルからピークリストを作成した。プリカーサーイオンの質量誤差は 3 ppm (LTQ-Orbitrap) もしくは 0.25 Da (QSTAR) に, フラグメントイオンの質量誤差は 0.8 Da (LTQ-Orbitrap) もしくは 0.25 Da (QSTAR) に設定した。消化酵素にトリプシンを選択し, ミス切断の許容数は最大 2 箇所とした。Fixed modification にシステインの Carbamidomethylation を, variable modification にメチオニンの oxidation を設定した。リン酸化ペプチドを同定するときは, variable modification にセリン, スレオニンおよびチロシンの phosphorylation を追加で設定した。Mascot スコアが 95% confidence よりも高いペプチドおよび 7 残基以上のペプチドが 2 つ以上帰

属されたタンパク質をその後の解析に使用した。

2-4 トラブルシューティング

問題点 1. ペプチドの同定数が少ない。

解決策

1. タンパク質の消化が不十分な場合が考えられる。消化酵素を添加する前に試料溶液を 50 mM 炭酸水素アンモニウムで 4 倍希釈する。SLS はタンパク質の変性作用が高いため, 消化前に適正な濃度まで希釈する必要がある。
2. 酢酸エチル層を除去した後に, 遠心濃縮機で溶液を乾燥除去すること。酢酸エチルが試料溶液中に溶存していると, ペプチドが逆相カラムに保持されない。
3. C18-StageTip の保持許容量を超えてペプチドを導入している可能性がある。適正な量のペプチドを導入すること。

問題点 2. StageTip が詰まる。

解決策

1. 試料溶液を 10,000xg で 5 分間遠心分離した上清を脱塩に使用する。

問題点 3. PTS が試料溶液から除去されない。

解決策

1. 液液分配時の pH を確認する。PTS を酢酸エチル層に分配させるには pH を 2 以下にする必要がある。

問題点 4. 脂質修飾ペプチドが同定されない。

解決策

1. 脂質修飾を受けた疎水性の非常に高いペプチドは, 液液分配時に酢酸エチル層に移動する可能性がある。

3 ラウロイルサルコシン酸の効果

筆者らは pH を下げることで疎水性度が上昇する溶解剤 (PTS) をデオキシコール酸以外に 7 種類確認している⁶⁾。SDS はカリウム塩を形成し不溶化するため PTS 法で除去可能だが, Lys-C およびトリプシン活性を著しく低下するためにショットガンプロテオミクスの前処理には適さない。一方, SLS は直鎖状の陰イオン性界面活性剤であり, SDC と同様に酸性条件化でカルボニル基が分子型となり疎水性度が上昇する。また, 変成作用は SDC よりも高く, 3 mM SLS 溶液中ではトリプシンは失活する。しかしながら, SDC と混合した場合, 2.4 mM SLS 中でも Lys-C およびトリプシンの活性は維持される。さらに, 12 mM SDC と 12 mM SLS の混合溶液のタンパク質可溶化能は 120 mM SDC 溶液に比べて高く, 膜プロテオミクスだけでなくリン酸化プロテオミクスにおいても同定数が増加した (Fig. 1)。

4 FASP 法との比較

Wiśniewski らは限外ろ過フィルターを用いた前処理方

法 (Filter-aided sample preparation, FASP) を報告している¹⁴⁾。FASP 法は, SDS で可溶化した試料溶液を消化前に尿素溶液に置換できるため, タンパク質の強力な可溶化, 消化酵素の活性維持および LC-MS/MS への競合性をクリアした方法である。FASP 法を評価するためにマウス乳腺上皮細胞株 (Eph4 細胞) から抽出した 40 μ g のタンパク質を用いてショットガンプロテオミクスを行い, PTS 法と同定結果を比較した。Eph4 細胞から抽出されたタンパク質の総量は PTS 法および FASP 法でそれぞれ 871 μ g および 874 μ g だった。PTS 法および FASP 法において, それぞれ 3,006 および 824 種類のペプチド (Fig. 2-a), 543 および 254 種類のタンパク質が同定された (Fig. 2-b)。同定されたペプチドの量を比較したところ (Fig. 3), 親水性のペプチドの回収率は FASP 法の方が高かったものの, 全体的に回収率は PTS 法の方が約 3 倍高かった。FASP 法で

は, 限外ろ過フィルターへの吸着によりペプチドの回収率が PTS 法よりも低かったものと考えられる。試料量が少ないときほど吸着による損失の割合は高く, 限られた試料から包括的なプロテオミクスデータを得るには PTS 法が適していると考えられる。

5 結 論

Kim ら¹⁵⁾ および Wilhelm ら¹⁶⁾ は 2014 年にヒトプロテオームのドラフトを発表した。彼らはヒト遺伝子がコードするタンパク質の 80% 以上を同定しており, それらを達成するには膨大な試料と測定時間が必要だった。現状として試料量や質量分析計の使用時間に制限があることが多く, 細胞の異種性などを考えると少ない試料から効率よくプロ

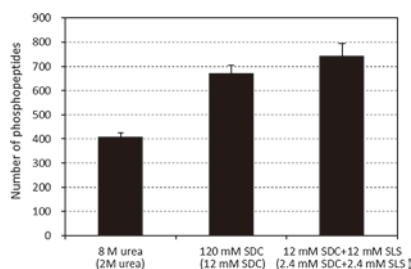


Fig. 1 Comparison of different digestion protocol for phosphoproteomics

HeLa whole cell lysate extracted with 8 M urea, 120 mM SDC or 12 mM SDC and 12 mM SLS (100 μ g) were digested with trypsin in triplicate analysis. SDC and SLS were eliminated according to the PTS protocol, and purified peptides were applied to HAMOC¹³⁾ for enrichment the phosphopeptides followed by analysis with nanoLC-MS/MS (LTQ-Orbitrap). Triplicate results were averaged for comparison. Digestion condition in each protocol is indicated in parenthesis. Unique peptides were used for data analysis.

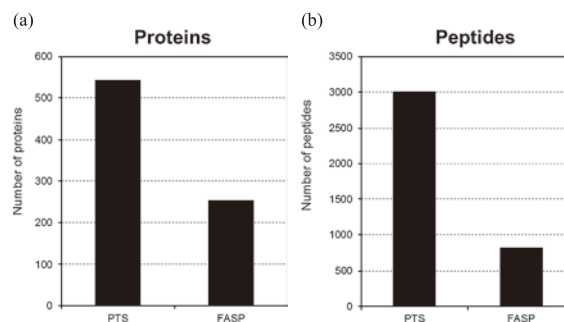


Fig. 2 Comparison of the PTS protocol and the FASP for the analysis of Eph4 cells

Eph4, a mouse mammary epithelial cell line, proteins were extracted with 5% SDC for PTS or 4% SDS for FASP, then 40 μ g of proteins were used for digestion with Lys-C and trypsin. Peptides purified with C18-StageTip were resuspended in 400 μ L of 0.1% TFA in 5% acetonitrile. Five microliter of sample was used for analysis with LTQ-Orbitrap XL, and proteins (a) and peptides (b) were identified by MASCOT. Unique peptides were used for data analysis. Duplicate data were merged for comparison.

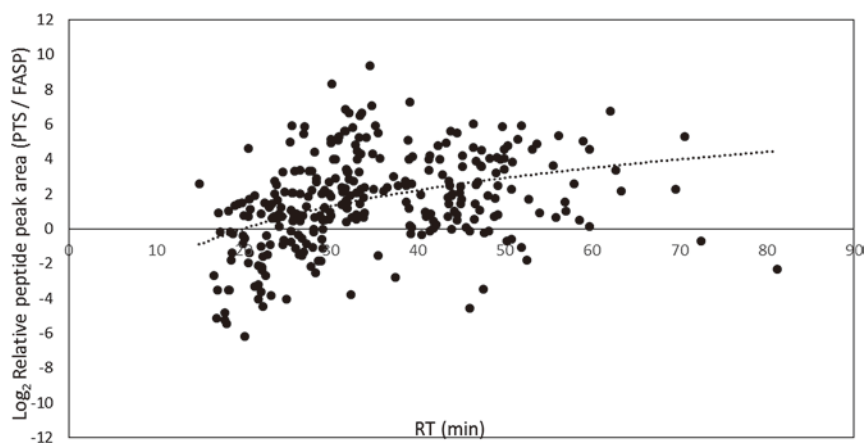


Fig. 3 Comparison of the recoveries of peptides identified by use of the PTS and FASP protocols

Peptides identified in both protocols were used for the comparison. Peak area were measured from the mass chromatograms. Unique peptides were used for data analysis. For details, see the legends to Fig. 1.

テオミクスデータを取得できるワークフローが必要である。それを遂行するには、質量分析計の改良だけでなく質量分析計に導入するまでの前処理およびLCシステムの改良が特に重要であろう。PTS法はタンパク質の抽出効率および消化効率も高い。また、界面活性剤存在下でタンパク質を消化できるので、タンパク質およびペプチドの容器への吸着を抑えられる。PTS法は微量試料の前処理にも適しており、改良したLCシステムと組み合わせることで、筆者らは10,000個の細胞から約1,000種類のリン酸化ペプチドを同定した¹⁷⁾。SDCとSLS以外にも利用可能なPTSはあり、それらを複数混合することでタンパク質の溶解性が改善することを筆者らは確認している。最適化されたPTS法を用いることで、より高効率にプロテオーム情報を取得できると期待している。

著者らに開示すべき利益相反状態は無い。

文 献

- 1) Yamana R, Iwasaki M, Wakabayashi M, Nakagawa M, Yamanaka S, Ishihama Y. Rapid and deep profiling of human induced pluripotent stem cell proteome by one-shot NanoLC-MS/MS analysis with meter-scale monolithic silica columns. *J Proteome Res.* 2013;12:214–221.
- 2) Russell WK, Park ZY, Russell DH. Proteolysis in mixed organic-aqueous solvent systems: applications for peptide mass mapping using mass spectrometry. *Anal Chem.* 2001;11:2682–2685.
- 3) Zhang N, Chen R, Young N, Wishart D, Winter P, Weiner JH, Li L. Comparison of SDS- and methanol-assisted protein solubilization and digestion methods for *Escherichia coli* membrane proteome analysis by 2-D LC-MS/MS. *Proteomics.* 2007;7:484–493.
- 4) Zhou J, Zhou T, Cao R, Liu Z, Shen J, Chen P, Wang X, Liang S. Evaluation of the application of sodium deoxycholate to proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane. *J Proteome Res.* 2006;5:2547–2553.
- 5) Washburn MP, Wolters D, Yates JR III. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* 2001;19:242–247.
- 6) Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res.* 2008;7:731–740.
- 7) Masuda T, Saito N, Tomita M, Ishihama Y. Unbiased quantitation of *Escherichia coli* membrane proteome using phase transfer surfactants. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8:2770–2777.
- 8) Wakabayashi M, Yoshihara H, Masuda T, Tsukahara M, Sugiyama N, Ishihama Y. Phosphoproteome analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections mounted on microscope slides. *J Proteome Res.* 2014;13:915–924.
- 9) Narumi R, Murakami T, Kuga T, Adachi J, Shiromizu T, Muraoka S, Kume H, Kodaera Y, Matsumoto M, Nakayama K, Miyamoto Y, Ishitobi M, Inaji H, Kato K, Tomonaga T. A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J Proteome Res.* 2012;11:5311–5322.
- 10) Belda-Ferre P, Williamson J, Simón-Soro Á, Artacho A, Jensen ON, Mira A. The human oral metaproteome reveals potential biomarkers for caries disease. *Proteomics.* 2015;15:3497–3507.
- 11) McCarthy FM, Burgess SC, van den Berg BH, Koter MD, Pharr GT. Differential Detergent Fractionation for Non-electrophoretic Eukaryote Cell Proteomics. *J Proteome Res.* 2005;4:316–324.
- 12) Yu YQ, Gilar M, Lee PJ, Bouvier ES, Gebler JC. Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal Chem.* 2003;75:6023–6028.
- 13) Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc.* 2007;2:1896–1906.
- 14) Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;6:359–362.
- 15) Kim MS, Pinto SM, Getnet D, *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature.* 2014;29:575–581.
- 16) Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature.* 2014;29:582–587.
- 17) Masuda T, Sugiyama N, Tomita M, Ishihama Y. Microscale phosphoproteome analysis of 10,000 cells from human cancer cell lines. *Anal Chem.* 2011;83:7698–7703.

Sample Preparation for Shotgun Proteomics by Using Phase Transfer Surfactants

Takeshi Masuda*¹, Yasushi Ishihama²

*E-mail masudt2@uw.edu

¹ Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Washington, 1705 NE Pacific Street, Seattle, WA 98195, USA

² Graduate School of Pharmaceutical Science, Department of Molecular & Cellular BioAnalysis, Kyoto University,
46-29 Yoshida-Shimo-Adachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received: April 19, 2016; Revised: May 25, 2016; Accepted: May 26, 2016)

We have reported a phase transfer surfactants (PTSs)-aided sample preparation protocol for shotgun proteomics. The PTS protocol using deoxycholate and lauroylsarcosine increases the solubility of membrane proteins and enhances trypsin and lysyl endopeptidase activities. The PTSs become more hydrophobic at acidic pH. Based on this property, PTSs are removable from sample solutions by the liquid-liquid extraction method with ethyl acetate as organic solvent, while peptides are remained in the aqueous phase. Compared with protocols using a RapiGest or a filter-aided sample preparation protocol, the number of identified proteins and the recovery of peptides are significantly increased in the PTS protocol, suggesting that the PTSs protocol is more effective for the large-scale unbiased proteomics than these protocols.

Keywords: phase transfer surfactants; phosphoproteomics; protein extraction; shotgun proteomics; trypsin activity.