

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

ターゲットプロテオーム解析をはじめのノウハウ

松田 史生*

*E-mail: fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻：565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-5

(受付 2016 年 4 月 20 日, 改訂 2016 年 5 月 26 日, 受理 2016 年 5 月 27 日)

ターゲットプロテオーム解析は、液体クロマトグラフィー—三連四重極質量分析を用いたペプチドの定量分析であり、低分子化合物の定量分析と基本的な考え方を共有している。一方、サンプル調製、ナノ LC の取り扱い、SRM アッセイの作成およびデータ解析など、ターゲットプロテオーム解析に特有の技術も必要とされる。近年になってサンプル調製のプロトコル化やキット化が進み、ナノ LC も定量分析に必要な安定性を持つようになった。また、SRM アッセイ法の作成およびデータ解析を支援するソフトウェアの開発も進み、ターゲットプロテオーム解析を研究に取り入れる環境が整いつつある。

1 はじめに

近年、ターゲットプロテオーム解析に注目が集まっている。もともと質量分析装置を用いたプロテオーム解析法の主流は、サンプル中に存在する全タンパク質のカタログ化を目指した発見型プロテオーム解析であった。生体由来の粗タンパク質抽出物をトリプシン消化したペプチドサンプルを調製し、液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析 (LC-MS/MS) で網羅的に取得したプロダクトイオンスペクトルからペプチド同定を行う。少量のペプチドサンプルからより高品質のデータを多量に取得するためにナノ LC や高分解能質量分析が利用されてきた。

一方、発見型プロテオーム解析で見つかったバイオマーカー候補タンパク質の検証や、生体機能に関わるタンパク質の発現量変化、中心代謝システムの酵素発現量を解析するには、事前に決めた複数のタンパク質の発現量を正確に定量することが求められる。そこで、発見型プロテオーム解析に、定量性に優れた三連四重極質量分析を持ち込んだものがターゲットあるいは定量プロテオーム解析と呼ばれる分析アプローチである^{1)~3)}。高感度なペプチド検出のために選択的反応モニタリング (SRM) モードを用いることから SRM アッセイ法とも呼ばれている。

ターゲットプロテオーム解析が近年注目されている背景には、上記の幅広い活用範囲に加え、トリプシン消化物に含まれるペプチドの定量分析として、低分子化合物の LC-MS 分析の延長線上に捉えることができる点、さらに

後述する Skyline の登場により SRM アッセイ法の構築およびデータ処理環境が一気に整ったことが挙げられる。そこで本稿では、筆者がターゲットプロテオーム解析システムを立ち上げたときの経験をもとに、低分子化合物の LC-MS 分析の経験者がサンプル調製、ナノ LC、SRM アッセイ法の作成およびデータ解析などターゲットプロテオーム解析に特有の要素技術を導入する際の留意点を解説する。

2 Skyline

Skyline とは米国 University of Washington で開発されている Windows 用ソフトウェアであり、無償で公開されている^{4),5)}。タンパク質アミノ酸配列から SRM アッセイ法を自動生成する機能に始まり、クロマトグラムデータのピーク面積計算に至るターゲットプロテオーム解析のワークフロー全般を支援する強力な機能をもつ。また、主要なメーカーの質量分析装置への SRM トランジションの書き出しと、クロマトグラムデータの読み込みが可能であり、ターゲットプロテオーム解析を試みるにあたって使わない選択肢はないと言えるだろう。また、充実したチュートリアルを参照しながら Skyline の主要機能を把握することは、ターゲットプロテオーム解析の考え方の理解にもつながる。本稿では Skyline の利用を前提として解説を進める。

3 サンプル調製

サンプル調製は、大きく分けて①生体サンプルからのタンパク質抽出、②タンパク質の還元アルキル化とトリプシ

Table 1 酵母タンパク抽出法⁷⁾

1	液体培地に培養した微生物細胞の吸光度を測定し必要量あることを確認する (濃度 300 µg/ml のタンパク質溶液が調製できる細胞量を事前に検討しておく)。
2	液体培地全量を 15 mL のファルコンチューブにうつし、遠心分離 (3000 rpm, 5 min)
3	上清を捨てて、氷上で冷やした溶菌バッファー (50 mM HEPES バッファー (pH 7.5), 5%グリセロール, 15 mM Dithiothreitol (DDT), 100 mM KCl, 5 mM EDTA, Complete protease inhibitors cocktail 1 粒) を 1 mL 添加する。
4	よくボルテックスした懸濁液を 1.5 mL チューブにうつし、ジルコニアビーズを入れる (6 mm×1, 0.6 mm×PCR チューブで 1 杯分)
5	2.5 min 破碎後、一度氷上で冷やしてからさらに 2.5 min 懸濁液が白濁するまで破碎する。
6	遠心分離 (15000 rpm, 5 min)
7	上清をプロテオーム解析用の 1.5 mL チューブ (低タンパク吸着性チューブ) にうつす
8	Bio-RAD RC DC protein assay (Bio-Rad, Reinach, Switzerland) を用いてタンパク質の量を測定する

ン消化, ③脱塩の3つに分けられる。①, ②について動物培養細胞の分析であればフナコシ製キット Proteomics Sample Preparation Kit for Cultured Cell, (#FMR-001)⁶⁾ を用いればよい。また、筆者のグループでは酵母のタンパク質抽出法⁷⁾ を全ての微生物種に適応して良好な結果を得ている (Table 1)。②は優れた実験プロトコルが公表されており⁸⁾, このプロトコル通りに作業を実施することで速やかに実験を立ち上げることができた。③脱塩工程では種々の検討を経て StageTip 法を愛用している。これは固相カラムの自作を可能にした画期的技術であり、文献を参考に自作したカラム^{9),10)} と市販のアタッチメントをルーティーンの分析に用いている。

4 ナノ LC- 三連四重極質量分析計の立ち上げ

筆者が活用しているナノ LC- 三連四重極質量分析計 (島津製作所製) の構成及び分析条件を Table 2 に示す。立ち上げ時には、試験分析用のペプチドサンプルとして MRMplus Retention Time Marker (FMR-002, フナコシ) を利用した。これは 12 種のペプチド混合物であり、それぞれを検出する SRM トランジションも公表されている¹¹⁾。筆者の研究室ではその後も LC-MS 全体の状態を把握するための標準ペプチドとして使用している。装置の立ち上げ時に起きたトラブルとして、ナノ LC では配管にスリーブを用いるため、液漏れが発生しやすくさらにその発見が困難だった点がある。この問題は組み立て済みナノ配管用チューブであるサーモ社製 nanoViper fingertight fitting¹²⁾ を用いることで完全に解決できた。次に連続分析時に保持時間が前方にシフトする現象に見舞われた。これは島津製作所製ナノ LC がスプリットした溶媒を繰り返しリサイク

Table 2 ナノ LC- 三連四重極質量分析計の構成及び分析条件例

LC-20ADnano	
溶離液 A	0.1% 酢酸 + 5% アセトニトリル水溶液
溶離液 B	0.1% 酢酸 + 95% アセトニトリル水溶液
溶離液 C (トラップ用)	0.1% 酢酸水溶液
流量	400 nl/min
グラジエント	min [B%] 0 [0%]-7 [0%]-45 [35%]-50 [100%]-65 [100%]-67 [75%]-75 [0%] インジェクションバルブは 5 分後にサンプル導入側に切り替え
トラップ流量	40 microl/min
カラム温度	調節なし
カラム	L-column ODS 2 3 microm, 0.1*150 mm, CERI Japan
トラップカラム	L-column
チップ	Fortis tip 150-20 (AMR)
インターフェイス	nano-spray interface (AMR, Japan)
LCMS-8040	
ネブライザーガス流量	0 L/min
DL 温度	150° C
ヒートブロック温度	200° C
ドライイングガス流量	なし
Q1 分解能	Low
Q3 分解能	Low
CID ガス	310 kPa
インターフェイス電圧	1.4-1.7 kV

ルする際に、オンラインデガッサ内で水にアセトニトリルが混合してしまうことが原因だった。そこでオンラインデガッサを 2 つに分けることで解決できた。ナノ ESI プローブ (AMR 社製) のスプレー位置とイオン量との関連を調べたが特にスイートスポットは見つからず、あまりスプレー位置に神経質になる必要はないようだった。一方、スプレーチップ (Fortis tip AMR 社製) はプローブ電圧が低いと液滴が生じやすく、電圧を上げすぎると即時に先端が破損してイオン化が不安定になる現象がみられた。これらの初期トラブルを解決すると安定した分析が可能となった。週に 1 回イオン源の清掃を行ないながら 1 ヶ月の連続分析をおこなっても保持時間ずれ、検出感度の変動もわずかだったことから、定量分析に必要な安定性があることが確認できた (Fig. 1)。

また、ターゲットプロテオーム解析の実施には、ナノ LC- 三連四重極質量分析計が必須というわけではない。検出器に Q-ToF 型質量分析計のデータ非依存型分析モード (いわゆる SWATH モード) を用いると非ターゲット型の定量プロテオーム解析が可能になる¹³⁾。また感度に余裕

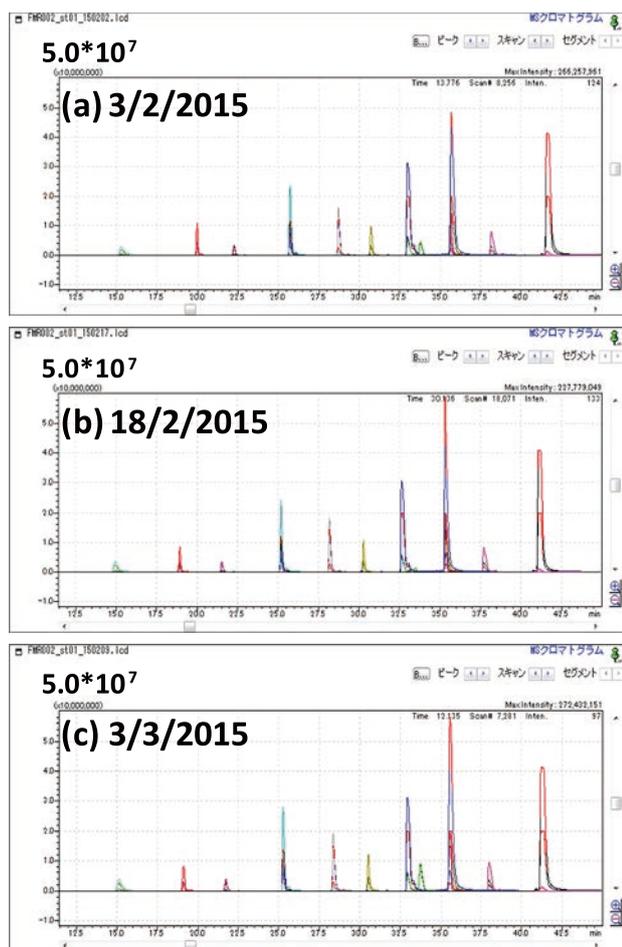


Fig. 1 Long term stability of nanoLC-MS/MS analyses

SRM chromatograms of standard peptides (FMR-002, Funakoshi, Japan) were obtained at (a) 3/2/2015, (b) 18/2/2015, and (c) 3/3/2015 during a large scale targeted proteome analyses.

がある場合はナノ LC に代わりセミマイクロ LC を用いることで、1 測定あたりの分析時間を短縮することが可能であり、前述のプロトコルにも方法が記載されている⁸⁾。つまり、低分子化合物分析用のセミマイクロ LC-三連四重極質量分析計でそのままターゲットプロテオーム解析を始めることが可能である。

5 SRM アッセイ法の作成

ターゲットプロテオーム解析では1タンパク質毎に2-4ペプチドを定量用に選定し、各ペプチドを3-4つのSRMトランジションで冗長に測定するのが標準とされている^{3),8)}。このため、測定するタンパク質毎にトリプシン消化で生成しうる多数のペプチドから定量に最適なものを選抜し、その選択的検出のためのSRMトランジションを決定して、SRMアッセイ法を作成する必要がある。一方、コリジョンセル関連の設定はプリカーサーイオンの質量電荷比から計算で求めることが一般的である。Uchidaらは

定量ターゲットに適したペプチドの選抜指針を示している (Table 3)⁸⁾。これを酵母中心代謝酵素メソッド¹⁴⁾で検証してみると、まず、1タンパク質あたり平均ペプチド数が1.88、1ペプチドあたりのSRMトランジション数が3.55であったことから、ペプチド、SRMトランジションともに選択肢に余裕がないことが見て取れる。このため、イオン化効率が低いといわれるメチオニン、システイン、ヒスチジンを含むペプチドも全体の1割程度採用されている。ペプチドは最低7残基、最長のもので24残基であり、8-20残基のものが全体の96%だった。SRMトランジションを調べるとプリカーサーイオンが $[M+2H]^{2+}$ でプロダクトイオンがy系列のものが全体の81.9%、プリカーサーイオンが $[M+2H]^{3+}$ でプロダクトイオンがy系列なものが全体の17.2%と99%以上をカバーしていた。したがって新規に測定対象タンパク質のSRMアッセイ法を構築する場合は(1)測定対象のタンパク質アミノ酸配列から上記を参考に分析に適したトリプシン消化ペプチド候補をすべてリストアップする。(2)すべての候補ペプチドについて、2価あるいは3価のプリカーサーイオンのm/zと、そこから生成しうるすべてy系列の1価のフラグメントイオンのm/zの組み合わせを網羅したSRMトランジションを作成する。例えば大腸菌のGndタンパクの場合、候補ペプチドは20種、総計457SRMトランジションが探索対象になる。ここまでの作業はGndのアミノ酸配列データ (FASTAフォーマット) をSkylineに取り込むことで自動的に行なうことができる。(3)作成したSRMトランジションを各装置用のメソッドとして出力し、対象タンパク質を含有するサンプル由来のトリプシン消化ペプチドのLC-MS分析を行う。対象タンパク質を含有するサンプルとしては、大腸菌などで対象タンパク質を発現させたものが望ましいが、生体試料由来のタンパク抽出物をそのまま用いることも可能である。また、今回用いた島津製作所製LCMS-8040では各チャンネルデータ取得時間を2ミリ秒まで減少させることが可能なためGndタンパクのメソッド作成に必要な457SRMトランジションのデータを一齐に取得することができた。(4)高強度に検出されるペプチドのシグナルを選抜し、その選択的検出に有効なSRMトランジションの選抜と保持時間情報を記録する。(5)必要に応じてペプチド標準物質でピーク同定を行う。

このように、SRMアッセイ法の構築には労力が必要とされるが、いったん確立すれば、異なるメーカーの三連四重極質量分析計間でSRMトランジションにおよそ互換性があることを利用した移植が可能である。例えば、ヒト中心代謝酵素78タンパクを定量するための133ペプチド398トランジションからなるSRMアッセイ法がTSQ Vantage用に作成され論文として公表されている¹⁵⁾。そのテキストデータを前述のSkylineに読み込ま

せた後、LCMS-8040用のメソッドとして出力できた。また、コリジョン電圧はQ1の質量電荷比から次式で求めた ($CE=0.03 \times [Q1\ m/z]+4.0$)。移植したSRMアッセイ法を用いてヒト培養細胞株(乳がん由来)MCF-7株のターゲットプロテオーム解析を行ったところ、複数のペプチドを検出することができた (Fig. 2, 未公表データ)。また、文献

記載の保持時間と実測値には明確な線形の関係があり、保持時間情報の移植も可能だった。ヒトでは全タンパク質をゲノムワイドに測定するSRMアッセイ法の構築が進められており、その公表後はユーザーがSRMアッセイ法を独自に作成する必要がなくなると考えられる。

一方、ターゲットプロテオーム解析は万能とは言えず、

Table 3 ペプチド選抜ルール

ペプチド選抜ルール ⁸⁾		酵母中心代謝酵素メソッドによる検証 ¹³⁾
1	目的タンパク質由来の4ペプチドをそれぞれ4SRMで計測する	1タンパク質あたり平均1.88ペプチド 1ペプチドあたり平均3.55SRMトランジション
2	長さは8-20残基である。	7-24残基, 96%が8-20残基
3	ペプチドの配列は目的タンパクにユニークである。	すべてユニーク
4	配列のN末端がプロリンではない。	N末端プロリンなし
5	LCでの保持時間が適当である(ペプチドの疎水性から予測できるSSRCalc)。	検証していない
6	メチオニン, システインを含まない。	45 (10.4%) ペプチドが含む
7	ヒスチジンを含まない(イオン化が低下する)。	40 (9.3%) ペプチドが含む
8	前後のトリプシン消化サイトのK, Rが重複(KK, RR, KR, RK)していない。	KP, RPは16ペプチド(4%)
9	過去に検出されたことがある(Peptide Atlasにデータがある)。	検証していない
10	プロリン, グリシンを含む(イオン化が向上する)。	360 (83.9%) ペプチドが該当
11	4割以上のアミノ酸が親水性である。	検証していない
12	翻訳後修飾や配列に多型がない。	検証していない
13	膜通過領域ではない(疎水性が高すぎる)。	検証していない
14	プリカーサーイオンは[M+2H] ²⁺ , [M+3H] ³⁺ , プロダクトイオンはyかb系列	[M+2H] ²⁺ y系列 1251 (81.9%) [M+2H] ²⁺ b系列 6 (0.4%) [M+3H] ³⁺ y系列 264 (17.2%) [M+3H] ³⁺ b系列 6 (0.4%) ただし[M+2H] ²⁺ y系列を含まないペプチドはなし

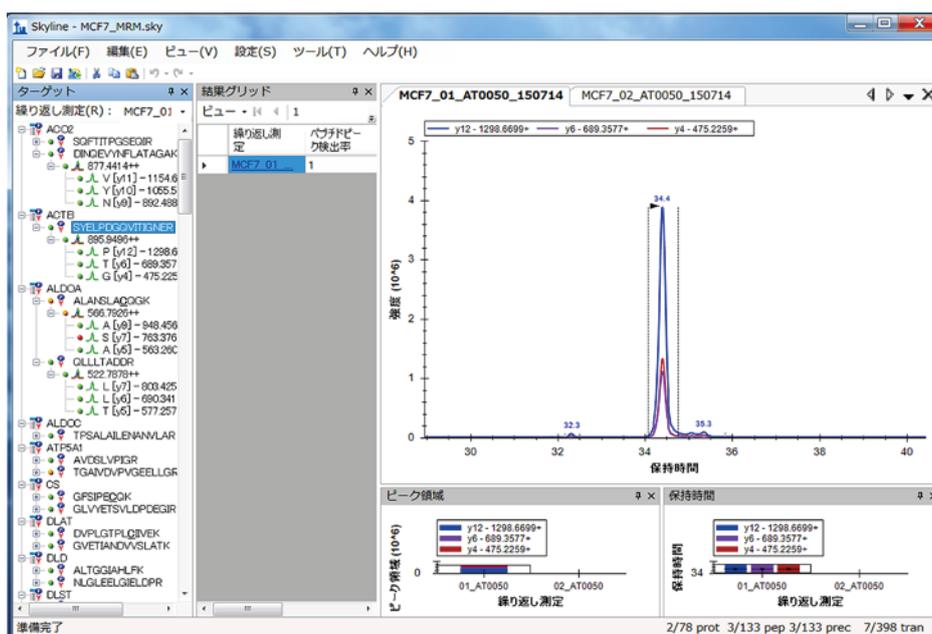


Fig. 2 Targeted proteome analysis using a converted SRM assay method

Targeted proteome data of the central metabolism related enzymes were successfully acquired from MCF-7 cells using a SRM assay method for LCMS8040 (Shimadzu Co.) converted from that of TSQ Vantage (Thermo Scientific).

苦手とするタンパク質も存在する。例えばリボソームの小サブユニットなどアミノ酸残基数が少ないタンパク質は、トリプシン消化により定量に適したペプチドが生成しない場合は分析が困難になる。またアミノ酸配列の類似性が非常に高い2種のアイソフォームを区別するにはアミノ酸配列が異なる部分から定量用ペプチドを選抜する必要がある。さらに、計測するタンパク質の大きさを知ることができないため、成熟タンパクとその前駆タンパクの発現量比較などには困難が多い。

6 定量の実際

ターゲットプロテオーム解析で正確な定量値を得る様々な手法が考案されている。合成安定同位体標識ペプチドあるいは安定同位体標識タンパク質を内部標準としてサンプルに添加するという正攻法に加え、別々の試料から調製したペプチドに、それぞれ異なるラベル化合物で標識する化学標識法がある。ペプチドは化学合成技術が確立しており、標準物質の入手がボトルネックになることはない。さらに安定同位体標識タンパク質も大腸菌や無細胞発現系を用いて自由に調製できる。さらにこれらを工夫したさまざまな手法が発表されている。また相対定量法として SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino acids in Cell culture) が利用されている。¹³C 標識アルギニン、リジンを含む培地由来の培養細胞と、非標識培地由来の培養細胞からそれぞれ調製したサンプルを混合したものを LC-MS 分析する。筆者らは出芽酵母中心代謝制御機構の解明を目指し¹⁶⁾、158種の酵素タンパク質を対象としたターゲットプロテオーム解析を1遺伝子欠損変異株と野生株総計29株について実施した。その際には SILAC の変法として比較的安価な [U-¹³C] グルコースを用いた。この分析プロジェクトでは1株当たり3連でサンプルを調製し、3つに分けた SRM アッセイ法でデータ取得する必要があるため、29 × 3 = 87 個のサンプルについて、総計 261 回の測定を実施する必要が生じた。そこで合成培地で生育できる出芽酵母の特性を生かし、[U-¹³C] グルコースを単独炭素源とした合成培地中で培養した野生型酵母 (S288C 株) から調製した ¹³C 標識ペプチドサンプルを内部標準ペプチド混合物として、全てのサンプルに等量添加した。また Skyline の機能を用いて ¹³C 標識ペプチド用の SRM トランジションも SRM アッセイ法に追加した。LC-MS 分析の結果得られたクロマトグラムデータを Skyline に読み込み、ピークピッキング作業を行なった結果、110種の酵素タンパク質の発現を定量することに成功した (未公表データ)。発現量は内部標準サンプルの ¹³C 標識ペプチドとの相対値として Skyline から出力した。酵素発現量の相関係数を2種の酵素タンパク質間で網羅的に計算したところ、発現量が増減する酵素タンパク質の共発現モジュールが存在すること

が明らかとなった (未公表データ)。

このように多サンプルの分析データからはさまざまな知見を得ることが可能となる。一方、分析プロジェクトの成功には優れたデータ処理技術に加えて、保持時間や感度の変動が少ないデータの取得法を確立することが重要である。それには装置の持つ性能の 80–90% を安定して出すためのメンテナンススケジュール、トラブル時のバックアップなどの様々なノウハウと創意工夫が必要とされている点は、ターゲットプロテオーム解析と低分子化合物の LC-MS 分析も何ら変わらない。ターゲットプロテオーム解析を取り巻く環境が整備されてきた現在、研究に取り入れる絶好のチャンスにあると言える。

謝 辞

紹介したターゲットプロテオーム解析システムの構築は NEDO 若手グラントの支援のもと (株) 島津製作所との共同研究として実施したものである。平野一郎氏、小倉泰郎博士 (島津製作所)、富田淳美氏、清水浩教授 (大阪大学情報科学研究科) に厚く御礼申し上げる。また、オンラインデガッサ内での溶媒混合の可能性をご教示いただいた故森坂裕信助教 (京都大学農学研究科) にこの場を借りて心より御礼とご冥福をお祈りしたい。

著者に開示すべき利益相反状態は無い。

文 献

- 1) 大槻純男. 定量的標的プロテオミクスによる生化学の新展開: 抗体を用いない汎用的タンパク質定量技術. 生化学. 2012;84:911–919.
- 2) Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncology*. 2009;3:33–44.
- 3) Marx T. Targeted proteomics. *Nature Methods*. 2013;10:19–22.
- 4) MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, *et al*. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 2010;26:966–968.
- 5) Skylineホームページ: <https://brendanx-uw1.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view>
- 6) <http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/FMR/FMR-001.pdf>
- 7) Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN, *et al*. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell*. 2009;138:795–806.
- 8) Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, *et al*. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS*. 2013;10:21.
- 9) 石濱 泰. プロテオーム解析用固相抽出ミニカラム Stage Tip の開発. 分析化学. 2008;57:1011–1018, 2008-12-05

- 10) 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.
- 11) <http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/FMR/FMR-002.pdf>
- 12) <http://www.dionex.com/en-us/products/accessories/reagents-accessories/nano-viper-fingertight/lp-81337.html>
- 13) Gillet LC, Navarro P, Tate S, *et al.* Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11:O111.016717.
- 14) Costenoble R, Picotti P, Reiter L, *et al.* Comprehensive quantitative analysis of central carbon and amino-acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* under multiple conditions by targeted proteomics. *Mol Syst Biol.* 2011;7:464.
- 15) Drabovich AP, Pavlou MP, Dimitromanolakis A, Diamandis EP. Quantitative analysis of energy metabolic pathways in MCF-7 breast cancer cells by selected reaction monitoring assay. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11:422–434.
- 16) Matsuda F, Ogura T, Tomita A, *et al.* Nano-scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using the multiple reaction monitoring mode based quantitative platform for analyzing multiple enzymes associated with central metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* using ultra fast mass spectrometry. *J Biosci Bioeng.* 2015;119:117–120.

A Practical Introduction to Targeted Proteomics

Fumio Matsuda*

*E-mail: fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

Osaka University, Yamadaoka 1-5, Suita, Osaka 565-8102, Japan

(Received: April 20, 2016; Revised: May 26, 2016; Accepted: May 27, 2016)

Targeted proteome analysis is an approach for quantitative analysis of multiple target peptides using liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. Although it is essentially similar to that of quantitative analysis of small molecules, several specific techniques are required for targeted proteome analysis including sample preparation methods, handling of nano-LC, and construction of SRM assay methods. Recent progresses in the sample preparation protocols, improved stability of modern nanoLC machines, and development of softwares enable a wide application of the targeted proteome analysis in biological studies.

Keywords: nano LC-MS; sample preparation; SRM assay; targeted proteome analysis.