

2017年奨励賞受賞者論文 テクニカルレポート

無細胞合成ペプチドを利用したタンパク質絶対定量

鳴海良平^{*1,2}, 清水義宏^{3,4}, 上田泰己^{2,5}

*E-mail: narumi@nibiohn.go.jp

¹ 医薬基盤・健康・栄養研究所 プロテオームリサーチプロジェクト : 567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8

² 理化学研究所 生命システム研究センター 合成生物学研究グループ : 565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3

³ 理化学研究所 生命システム研究センター 無細胞タンパク質合成研究ユニット : 565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3

⁴ 理化学研究所 生命システム研究センター 細胞質量分析研究チーム : 565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3

⁵ 東京大学大学院 医学系研究科 機能生物学専攻 システムズ薬理学教室 : 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

(受付 2017 年 11 月 21 日, 改訂 2017 年 12 月 11 日, 受理 2017 年 12 月 15 日)

近年, 高い感度と定量精度でタンパク質を絶対定量する方法として, 質量分析によるターゲットプロテオミクスが発展してきた。しかしこの方法は, 内部標準となる濃度決定した安定同位体標識ペプチドを必要とし, それを得難いことが一つのボトルネックとなっていた。筆者らは無細胞タンパク質合成系の PURE system を用い, 安定同位体標識ペプチドを, 簡便かつ多種少量で合成し, 絶対定量に利用する方法 (MS-based Quantification By isotope-labeled Cell-free products, MS-QBiC) を開発した。MS-QBiC により多数の内部標準を得られることで, 多数のタンパク質の解析が可能になることはもちろん, 1 タンパク質あたり複数のターゲット配列候補から高感度な配列を選択できる。さらに超高感度分析のための 2 次元 SRM 解析における解析ペプチド数の増大に対応が可能である。

1 序論

タンパク質の絶対定量は, 質量分析を用いたターゲットプロテオミクスにより行うことができ, その解析には同位体標識された合成ペプチドである内部標準 (内標) が重要な役割を果たす。

内標を得る最も一般的な方法は化学合成である。この方法は, ペプチドにリン酸化などの翻訳後修飾を導入できるのが利点である¹⁾。しかし, 通常, ペプチドの合成・精製・定量までの全工程を通しスケールダウンすることは難しく, 高額な安定同位体標識アミノ酸を大量に必要とするためコストが高くなる。

近年, 翻訳後修飾のないペプチドに限定されるが, 生合成も用いられている。大腸菌などの細胞中で発現させる方法では, 安定同位体標識アミノ酸を含む培地で培養することによって, タンパク質に代謝標識する²⁾。この方法は, 多種類の同位体標識ペプチドを, 大量に得ることに向いている。

一方, 無細胞タンパク質合成系による方法は, 比較的少量ながら多数の同位体標識ペプチドを得る点でさらに有用である^{3)~5)}。細胞培養するより反応スケールを非常に小さくできる為, 安定同位体標識アミノ酸のコストを減らすことができる。さらに細胞の培養, 回収, 破砕などの必要

がないため, ハイスループットな合成および精製が可能となる。

最近, 著者らは, 無細胞タンパク質合成系の PURE system⁶⁾ を利用し, ターゲットプロテオミクスによる絶対定量法に最適化したワークフローを開発した⁴⁾。それを MS-based Quantification by isotope-labeled Cell-free products (MS-QBiC) と名付けた (Fig. 1)。MS-QBiC では, ペプチドをマイクロリットルスケールで合成から精製まででき, 内標を簡便かつハイスループットに準備して絶対定量を行うことができ (2-1, 3-1), またコスト面においては, 1 ペプチドあたり約 ¥2,000 と, 通常, 濃度既知の安定同位体標識ペプチドを購入するのに比べ大幅に下げることができた。この MS-QBiC を用い, 非常に微量なマウス時計タンパク質 (20 個)⁷⁾ の絶対量の日内変動を測定する為, ターゲットプロテオミクスで高感度分析が可能な選択的反応モニタリング (Selected Reaction Monitoring, SRM) により 120 本のターゲットペプチドに対し, 絶対定量を行った⁴⁾。その結果 16 個の時計タンパク質 (47 ペプチド) の日内変動を測定することができ, MS-QBiC の絶対定量における有用性が示された。

本テクニカルノートでは, MS-QBiC の原理と方法の紹介と, 時計タンパク質のような低発現量のタンパク質を定量する為の SRM 解析の高感度化について述べる。

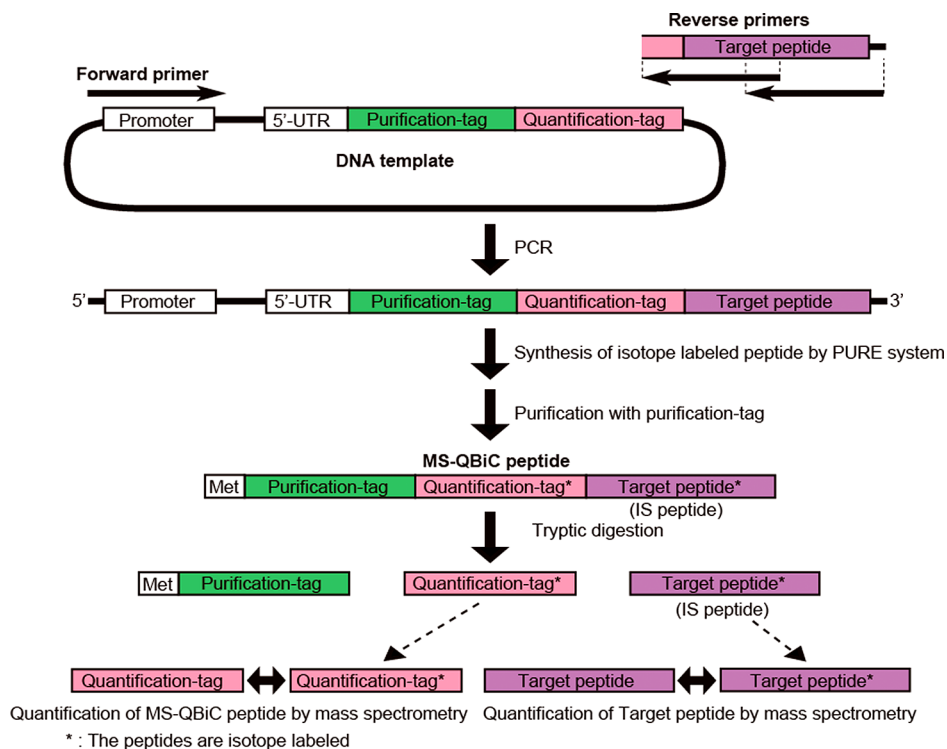


Fig. 1 Schematic description of the MS-QBiC workflow

A purification-tag, a quantification-tag, and a tryptic peptide of the target protein (target peptide) are sequentially arrayed as a single peptide sequence (MS-QBiC peptide). The target peptide sequence is attached by one- or two-step PCR. The MS-QBiC peptide is synthesized in the PURE system in the presence of stable isotope-labeled Arg and Lys for isotopic labeling of both the quantification-tag and the target peptide. Trypsin digestion of purified MS-QBiC peptide produces equal amounts of isotopically labeled quantification-tag and target peptide. The quantification-tag is used to measure purified MS-QBiC peptide and the target peptide is used as an internal standard for the target protein quantification.

2 方法

2-1 MS-QBiC ペプチドの合成

開始アミノ酸であるメチオニンの下流に FLAG タグ (DYKDDDDK), スパーサーペプチド (LLLLK), 定量タグ (LVTDLTK) を順番に連結させたペプチド (MDYKDDDDKLLLLKLVTDLTK) をコードする DNA 配列 (5'-ATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGCTGCTGCTGCTGAAGCTGGTTACTGACCTGACTAAG-3') を, T7 プロモーター配列と大腸菌の翻訳システム用の 5'-UTR 配列を含む pURE1 ベクター (BioComber) へ導入した. 得られたプラスミドをテンプレートとして, T7 プロモータープライマー (5'-GGGCCTAATACGACTCACTATAG-3') をフォワードプライマー, 各ターゲットペプチドをコードする配列をリバースプライマーとして PCR を行なった. 得られた PCR 反応液 (1.25 μ L) を, $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_4$ Arg と $^{13}\text{C}_6$ Lys を含む 25 μ L PURE system reaction mixture に添加してインキュベート (37°C, 30 分) し, ペプチドを合成した. ペプチドは抗 FLAG M2 抗体磁気ビーズにより定法に従い精製し, 溶出は 20 μ L の 0.2% TFA により行った. 得られたペプチドは, Phase Transfer Surfactant (PTS) 溶液 (12 mM

sodium deoxycholate, 12 mM sodium N-lauroylsarcosinate, and 50 mM NH_4HCO_3)¹⁾ で 6 倍に希釈した状態で -80°C で保存した.

2-2 サンプル処理

MS-QBiC ペプチドまたはマウス肝臓タンパクのトリプシン消化は, Phase Transfer Surfactant (PTS) 法⁸⁾ に基づき行った. MS-QBiC ペプチドのみ消化する際は, 吸着防止のため使用する試験管を PTS 溶液中の酵母エノラーゼ消化物 (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) で一晩以上ブロッキングした後, 同消化物 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 存在下で処理を行った. またマウス肝臓タンパクの絶対定量を行う際は, 肝臓組織を溶解バッファ (PTS 溶液, プロテアーゼ阻害剤およびフォスファターゼ阻害剤) に溶解後, 得られたライセートに各 2 μL の MS-QBiC ペプチドを添加した. それ以降は PTS 法の常法に従い, 還元アルキル化, トリプシン消化, ペプチド抽出を行い, Stagetip⁹⁾ (MS-QBiC ペプチド) または SPE カートリッジ (マウス肝臓タンパク) を用いて脱塩した.

2-3 マウス肝臓消化物のオフライン分画

マウス肝臓タンパクのトリプシン消化物の前分画を

SCX クロマトグラフィによって行った。分離溶媒は、A 液に 25% アセトニトリル, 10 mM H_3PO_4 , pH 2.7 (SCX-A) および B 液に 1 M KCl, 25% アセトニトリル, 10 mM H_3PO_4 , pH 2.7 (SCX-B) を使用した。200 μ g の肝臓消化物 (200 μ L の SCX-A に溶解) を, SCX カラム (100 mm \times 2.1 mm, 5- μ m, PolySULFOETHYL A; PolyLC) の付いた HPLC (Elite LaChrom HPLC system; Hitach) にロードし, 流速 200 μ L/min で SCX-A, B の 60 分間のグラジエント (0% B 3 分, 0–7% B 25 分, 7–22% B 12 分, 22–40% B 7 分, 40–100% B 4 分, 100% B 5 分) を用いて分離した。溶出液は 1 分毎に集め, SpeedVac によって乾燥後, 2% アセトニトリル, 0.1% TFA に溶解し, Fig. 5 の SCX クロマトグラムで示されているように 18 分画にまとめ, Stagetype による脱塩および乾燥後, 測定まで -80° C で保存した。

2-4 SRM メソッド作成

標識ターゲットペプチドに対し, 理論的な SRM トランジションを構築し, 初期 SRM メソッドとした¹⁰⁾: プリカーサーイオンの m/z は 2 価と 3 価を選択し, 2 価のプリカーサーの場合, プロダクトイオンの m/z は 1 価の y_3 から y_{n-1} を選択し, 3 価のプリカーサーの場合, 1 価と 2 価の y_3 から y_{n-1} を選択した (n はペプチド長)。またペプチド長が 10 以下の時は, b 系列も使用し, トランジションの選択は y 系列と同様にした。初期の開裂エネルギー (CE) は $0.034 \times m/z_{\text{precursor}} - 0.848$ (2 価), $0.022 \times m/z_{\text{precursor}} + 5.953$ (3 価) を用いた¹¹⁾。

初期 SRM メソッドを用いて, MS-QBiC ペプチドのトリプシン消化物の LC-SRM/MS 測定を行った後, 最大 10 個の SRM トランジションを強度に基づいて選択した。その上トランジション毎に 7 段階の CE (初期 CE, 初期 CE \pm 2 eV, 初期 CE \pm 4 eV, 初期 CE \pm 6 eV) を設定した SRM メソッドを作成し, もう一度測定して, 各トランジションの最適な CE を選択した。最終的に 1 ペプチドあたり 5 個までの SRM トランジションまで絞り込んだメソッドを作成した。

2-5 LC-MS

Oribitrap 解析および SRM 解析にはそれぞれイオントラップ -Oribitrap ハイブリッド質量分析計 (LTQ Orbitrap Velos Pro; Thermo Scientific, ポジティブモード, scan range; 350–1,500 m/z , 30,000 FWHM resolution at 400 m/z) およびトリプル四重極質量分析計 (TSQ Vantage EMR; Thermo Scientific, ポジティブモード, scan width; 0.002 m/z , Q1 and Q3 resolutions; 0.7 FWHM, cycle time; 1 s, ガス圧; 1.8 mTorr) を使用した。各質量分析装置は, Nano HPLC システム (nanoLC インタフェース; AMR, nano-Advance UHPLC system; Bruker Daltonics, HTC-PAL オートサンブ

ラー; CTC Analysis) と接続されており, サンプルロードにはトラップカラム (0.3 \times 5 mm, L-column, C18; 化学物質評価機構) を使用した。分析カラムには自作 ESI カラム (200 mm \times 100 μ m, 2 μ m L-column 2 C18 レジン; 化学物質評価機構), 分離溶液には A 液に 0.5% 酢酸 (RP-A) および B 液に 0.5% 酢酸, 80% アセトニトリル (RP-B) を用い, RP-A, B のグラジエント (流速 300 nL/min) をかけ溶出したペプチドを, エレクトロスプレーイオン化法によりイオン化し (スプレー電圧; 2.4 kV), 質量分析装置へ導入した。

2-6 データ解析

Oribitrap 解析および SRM 解析のデータ解析には Xcaliber 2.2 (Thermo Scientific) の Qual Browser を使用した。Oribitrap 解析の MS1 定量では, 各ペプチドのモノアイソトピックイオンの精密質量 (Mass tolerance; 5 ppm) における抽出イオンクロマトグラム (XIC) を作成し, マニュアルで該当するピークを選択し, その面積を定量値とした。SRM 解析では, シグナル強度の配列依存性の分析においては, 各合成ペプチドに該当するトランジションのクロマトグラムを抽出し, マニュアルで該当するピークを選択し, その面積を定量値とした。時計タンパク質の解析においては, 内標と比べ, 保持時間との一致, SCX 分画のパターンの一致, トランジション比の相関を基準に選択した。その上で, トランジション中で, ノイズとオーバーラップが無く, 最もシグナルノイズ比が高いトランジションを選択し, マニュアルで該当するピークを選択し, その面積を定量値とした。

3 結果と考察

3-1 PURE system によるペプチド合成を利用したタンパク絶対定量法

ターゲットプロテオミクスによるタンパク質の絶対定量を, 簡便かつ, 多数のタンパク質に対して行うため, 我々は Fig. 1 のような MS-QBiC のワークフローを考案した。この手法は, 再構成系の無細胞タンパク質合成システムである PURE system⁶⁾ を利用した。このシステムは, 細胞抽出液の無細胞タンパク質合成システムでは頻繁に起こるプロテアーゼ分解がほとんど起こらず, また同位体のスクランプリング (目的的位置以外に同位体が導入すること) や希釈による標識率の低下を, システムの構成要素を調整せずに避けることができる¹²⁾。特筆すべきなのは, 直鎖 DNA からのタンパク質やペプチドの合成が可能で, PCR で増幅させた直鎖 DNA を, 直接 PURE system の反応液中に添加するだけでペプチドが合成できることである。したがって直鎖 DNA の準備からペプチドの合成と精製までを, 単純かつハイスループットに行うこと可能で

ある。1 プチドあたり 1 本か 2 本の DNA プライマーから、数時間で全工程を行うことができる。

我々は、ターゲットプロテオミクスのワークフローに合うよう、Fig. 2 のようなペプチド (MS-QBiC ペプチド) を設計した。精製タグには FLAG タグを選択し、その下流に完全消化を促すスペーサー配列を、直後に BSA (ウシ血清アルブミン) のトリプシン消化物の 1 つの配列を定量タグとして導入した。これらをコードする DNA 配列は、T7 プロモーターと大腸菌の翻訳システム用の 5'-UTR 配列を含むプラスミドベクターに導入した。さらに、そのプラスミドを鋳型として PCR を行うことで、定量タグの C 末側に直後に内標を置くように設計した。この MS-QBiC ペプチドのトリプシン切断により、等量の標識定量タグペプチドとターゲットペプチド (内標) が産生されるので、濃度既知の非標識定量タグペプチドと共に MS 解析することによって標識定量タグペプチドと内標の濃度を計算することができ、その濃度をもとに内在性のターゲットペプチド

を絶対定量することができる。

3-2 SRM 解析の感度の配列依存性

ターゲットプロテオミクスの際、定量に使用するペプチド (ターゲットペプチド) を選択するとき、ショットガンプロテオミクスの先行実験がある場合は同定されたペプチドから選択し、無い場合はタンパク質の配列からいくつかの基準を用いた選択を行う。また、SRMAtlas などのデータベースから選択することもできる。しかし、一般的に内標が得難い為、しばしば、候補配列が多数あっても、十分な根拠無く少数の配列に絞り込む必要があった。

1 タンパク質から多数のターゲットペプチドを選択できる場合、感度にどの程度の影響を与えるか調査する為、MS-QBiC を利用し、PER2 タンパク質由来の 19 種類のペプチドの SRM シグナル強度を比較した (Fig. 3A)。その結果、その強度は最大 100 倍近く異なり、SRM 解析の感度は配列により大きく依存することが示された。このこと

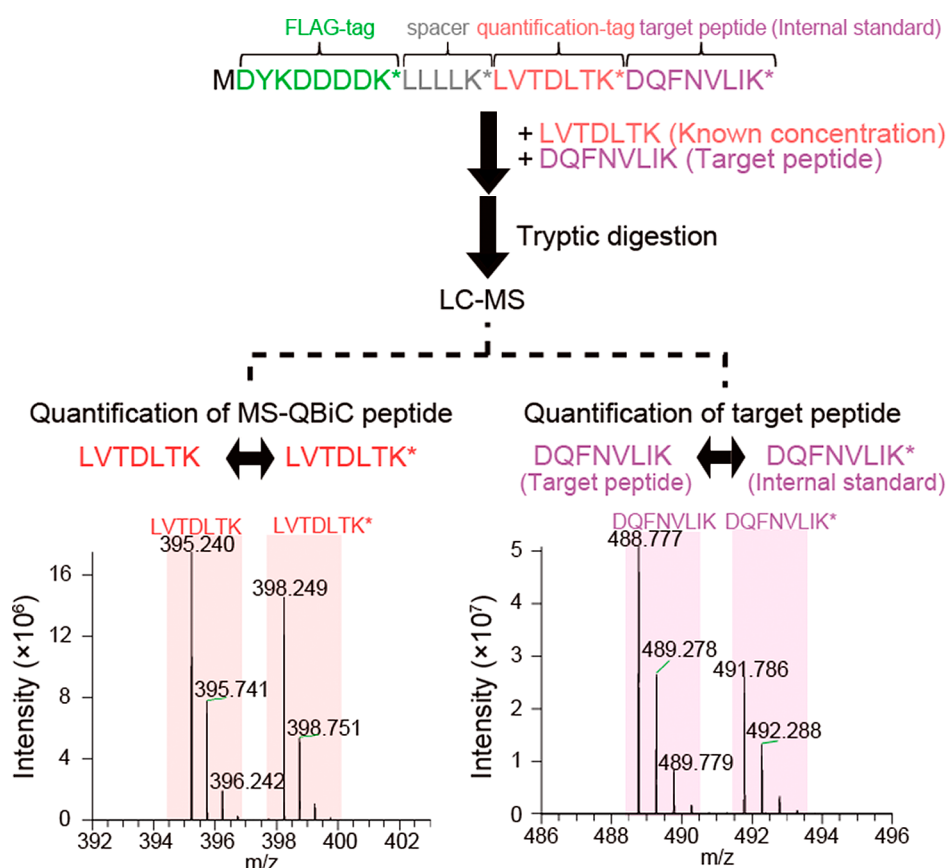


Fig. 2 Quantification of the target peptide using MS-QBiC

The MS-QBiC peptide (top) is composed of the 4 parts; FLAG-tag (used for its purification), spacer (for accelerating of its tryptic digestion), stable isotope-labeled quantification-tag (a sequence of BSA digest) and a target peptide (used as internal standard). Its tryptic digestion can generate equimolar amounts of the stable isotope labeled quantification-tag and target peptide. The stable isotope-labeled quantification-tag was quantified by comparing its ion peak intensities with those of the chemically synthesized quantification-tag of known concentration (bottom left). The target peptide was quantified by comparing the stable isotope-labeled target peptide with the non-labeled target peptide (bottom right). Here the stable isotope-labeled target peptide from the MS-QBiC peptide was analyzed by an orbitrap mass spectrometer in the presence of the non-labeled target peptide chemically synthesized in order to show that this system worked properly.

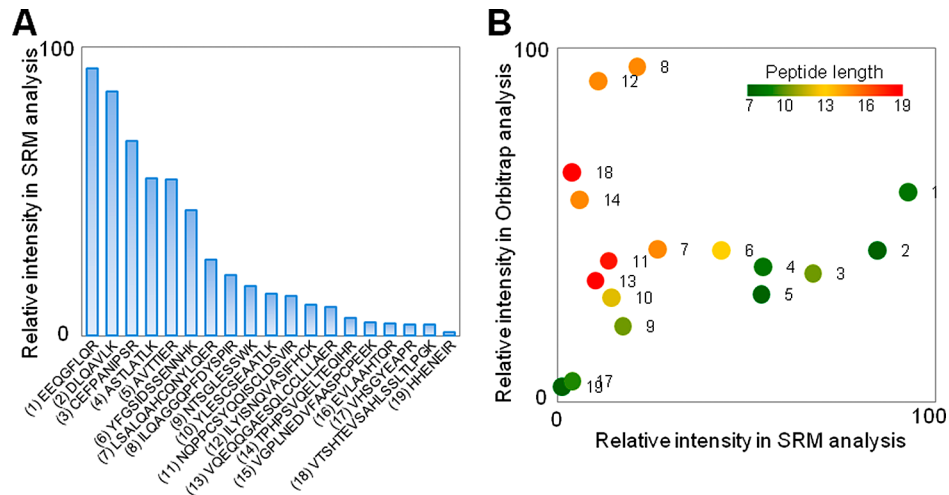


Fig. 3 Different signal intensities dependent on peptide sequence and principle of MS analysis

The bar graph showed the SRM intensities of the peptides of PER2, a circadian protein (A). In the right panel, their intensities in the SRM analyses (X-axis) and in the orbitrap analyses (Y-axis) were plotted (B). The colors represent the peptide length. The color code is represented in upper right in the panel (7–13 A.A. from green to yellow and 13–19 A.A. from yellow to red).

から、多数の配列をSRM解析に使用し、感度の高い配列を選択する重要性が示された。

また、ショットガン解析およびSRM解析における感度に与える配列依存性の相関を調べる為、LTQ Orbitrap Velosで同じペプチドを解析してMS1シグナルの強度を取得し、SRM解析の強度と比較した (Fig. 3B)。その結果、意外なことに、Orbitrap解析とSRM解析におけるシグナル強度の配列依存性はあまり相関していなかった (ピアソン相関係数 = 0.07)。このことは、ショットガン解析に基づき選択したペプチドが、必ずしもSRM解析でベストでないことを意味する。

では、どうして相関性があまり高くないのだろうか。

Fig. 3B中におけるペプチドの特徴を見てみると、相関しないペプチド群が2つあり、ショットガン解析で高感度でもSRM解析で低感度 (ペプチド 8, 12, 14, 18) のグループ (A群)、ショットガン解析で中程度の感度でSRM解析で高感度 (ペプチド 1–5) のグループ (B群) があり、A群は、ペプチド長が比較的長い傾向 (15–19 アミノ酸) にあり、B群は比較的短い傾向にあった (7–10 アミノ酸)。また、ショットガン解析で、非常に感度の低かったもの (ペプチド 9, 17, 19) は両解析で共通していた (C群)。

これらのことから考察すると、感度の配列依存性が一致するC群は、イオン化が低い為であり、一方、A、B群において、それが一致しない原因は、ショットガン解析がMS1定量であるのに対し、SRM解析が、限られた数 (例えば5個) のトランジションを使用する定量法だからではないかと推察される。すなわち、長いペプチドは、開裂で発生するプロダクトイオンの種類が多く、発生するプロダクトイオンに対し、定量に用いるプロダクトイオンの割合が低い為、Q2まで到達したプリカーサーイオンのうち

一部しかSRMシグナルとして利用されない。一方、短いペプチドはプロダクトの種類が少なく、その割合が高くなる為、感度が得られやすいのかもしれない。

しかしながら、短いペプチド (7–10個) を選択することは、必ずしも高感度な解析に繋がると限らないと思われる。短いペプチドの場合、トランジションの m/z が低いレンジであること、さらに選択できる種類も限られることなどの理由から、目的としないペプチドのSRMシグナルによって解析を阻害されやすい傾向がある為、短いペプチドはサンプルのバックグラウンドの違いによっても感度が左右されやすいと考えられるからである。

以上より、高感度なSRM解析の為には、ターゲットペプチドは事前に絞り込み過ぎず、候補をできるだけ多数合成してSRM解析を行うことが重要であると考えられる。

3-3 SRM解析のバックグラウンドシグナル

SRM解析の感度を低下させる一因となる、SRM解析のバックグラウンドシグナルは、しばしば、装置の電気ノイズより、非特異的なペプチド由来のSRMシグナルの寄与が大きい。Fig. 4で示されるように、細胞消化物がある場合とない場合で、バックグラウンドシグナルが大きく異なる。このペプチドは10アトモルで検出できるが、細胞消化物の存在下、バックグラウンドシグナルがペプチドの100アトモルの強度に匹敵し、シグナルが埋もれて検出できなくなる。

非特異的なペプチド由来のバックグラウンドシグナルの問題を解決する為には、2次元分画が有効と考えられる。それによって、ターゲットペプチドを濃縮できるだけでなく、非特異的なペプチドを分散できる為、バックグラウンドシグナルに対する特異的シグナルの比を高めることができる。

実際に、Fig. 5 では微量な時計タンパクの PER1 を絶対定量する為、MS-QBiC ペプチドを加えたマウスの肝臓タンパク消化物を強陽イオン交換 (SCX) クロマトグラフィで分画後、LC-SRM/MS 測定を行い、その結果、定量することに成功した。

この2次元分画とSRM解析の組み合わせは、非常に強

力なものと考えられる。筆者らは、2次元SRM解析によって、マウス肝臓における16個の時計タンパク質の定量に成功したが⁷⁾、同様に、分画無しSRM解析による定量も試みたところ、検出できたのはCKIδの1個のみであった。このタンパク質は時計タンパク質の中で最も多く14万copies/cell (アボガドロ数; 6×10^{23} , 1細胞当たりのタ

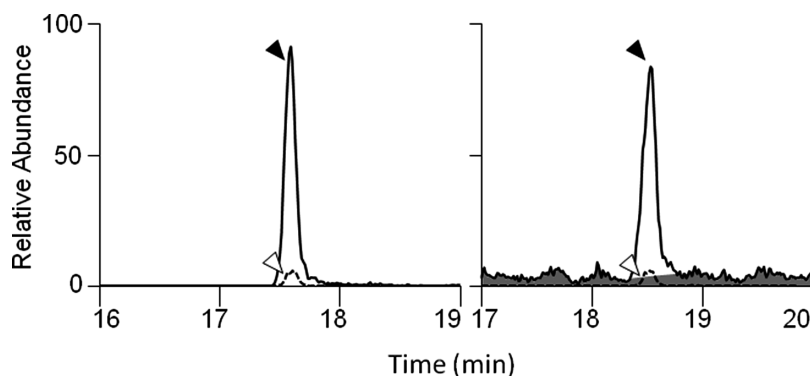


Fig. 4 Background signals derived from a whole cell digest

The chromatograms showed the results of LC-SRM/MS analysis of 2 fmol of synthetic peptide (EEQGFLQR, filled arrowheads) with (right) or without (left) 2 μg of HEK293T digest. The part in grey represents the background derived from the cell digest. The dotted traces, which were the result of SRM analysis of 100 amol of the synthetic peptide (open arrowheads), were overlaid to the chromatograms to compare the background.

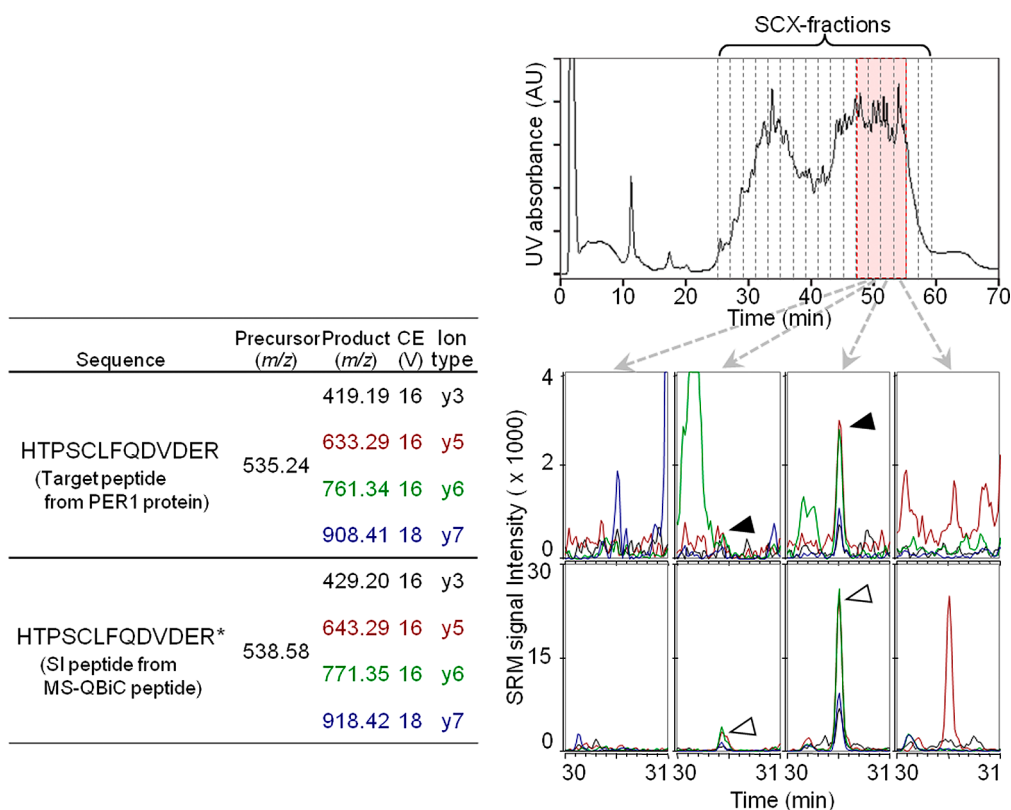


Fig. 5 Quantification of low abundance protein using 2D LC-SRM/MS analysis

Digest of Mouse liver proteins containing SI peptides derived from MS-QBiC peptides was firstly separated by super cation exchange (SCX) chromatography in off-line (Upper chromatogram), followed by LC-SRM/MS analysis of the SCX fractions. The SRM transitions for a target peptide to quantify the PER1 protein (left) were developed by using purified MS-QBiC peptide. The target peptide was quantified by comparing ion peak intensities of the SI peptide (open arrowheads in lower bottom) with the target peptide in mice livers (filled arrowheads in upper bottom). CE; collision energies.

ンパク質量 ; 0.5 ng/cell¹³) より計算) であったのに対し, 2次元分画によって定量できた時計タンパク質は0.1~2.5万 copies/cellであった. したがってこの研究においては1オーダーから2オーダー近い高感度化が2次元分画でなされたと考えられる.

また, リン酸化SRM解析においても, 2次元分画は感度を向上させると考えられる. 著者らがマウス肝臓においてCKIδのリン酸化を調査した際⁴⁾, リン酸化SRM解析と足立らが開発したC18-SCXチップによる分画法¹⁴⁾を組み合わせることによって, いくつかのリン酸化ははじめて検出され, 高感度なリン酸化解析を行うことができた.

2次元SRM解析は, 1サンプルの解析時間が長くなり, スループットが悪くなる反面, 2次元分画でスケジュールSRMを行うことができれば, 1サンプルあたりの解析可能なターゲットペプチドの数は飛躍的に増やすことができ, 高感度かつ大規模なSRM解析には有効な戦略になり得ると考えられる.

4 結 論

ターゲットプロテオミクスによるタンパク質の絶対定量を, 簡便かつ, 多数のタンパク質に対して行うため, 我々は, 無細胞タンパク質合成系のPURE systemを利用したMS-QBiCを開発した. この方法では, 内標を単純かつハイスループットに準備して絶対定量を行うこと可能である. 多数の内標を得られることは, 多数のタンパク質を解析できることはもちろん, 感度が配列に大きく依存するSRM解析では, 1タンパク質に選択できる配列数を増やすことができ, 感度向上につながる. また, 超高感度分析が可能となる2次元SRM解析では分析可能なペプチドが増大する為, 高感度かつ大規模なSRM解析への応用が期待される.

謝 辞

本研究で用いたプロテオミクスの技術・知識を教えていただいた医薬基盤・健康・栄養研究所の朝長毅先生に感謝申し上げます.

著者らに開示すべき利益相反状態は無い.

文 献

- 1) Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:6940-6945.
- 2) Hanke S, Besir H, Oesterhelt D, Mann M. Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level. *J Proteome Res*. 2008;7:1118-1130.
- 3) Simicevic J, Schmid AW, Gilardoni PA, *et al*. Absolute quantification of transcription factors during cellular differentiation using multiplexed targeted proteomics. *Nat Methods*. 2013;10:570-576.
- 4) Narumi R, Shmizu Y, Ukai-Tadenuma M, *et al*. Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:E3461-E3467.
- 5) Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K, *et al*. A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. *Nat Methods*. 2017;14:251-258.
- 6) Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, *et al*. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol*. 2001;19:751-755.
- 7) Ueda HR, Chen W, Adachi A, *et al*. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*. 2002;418:534-539
- 8) Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res*. 2008;7:731-740.
- 9) 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.
- 10) Stergachis AB, MacLean B, Lee K, Stamatoyannopoulos JA, MacCoss MJ. Rapid empirical discovery of optimal peptides for targeted proteomics. *Nat Methods*. 2011;8:1041-1043.
- 11) Ebhardt HA, Sabidó E, Hüttenhain R, Collins B, Aebersold R. Range of protein detection by selected/multiple reaction monitoring mass spectrometry in an unfractionated human cell culture lysate. *Proteomics*. 2012;12:1185-1193.
- 12) Yokoyama J, Matsuda T, Koshihara S, Tochio N, Kigawa T. A practical method for cell-free protein synthesis to avoid stable isotope scrambling and dilution. *Anal Biochem*. 2011;411:223-229.
- 13) Brown TA. *Genomes*. 2nd ed. Oxford (UK): Wiley-Liss; c2002. Chapter 3, Transcriptomes and proteomes; p.70-91.
- 14) Adachi J, Hashiguchi K, Nagano M, *et al*. Improved proteome and phosphoproteome analysis on a cation exchanger by a combined acid and salt gradient. *Anal Chem*. 2016;88:7899-7903.

Protein Absolute Quantification Using Cell-Free-Synthesized Peptide

Ryohei Narumi^{*1,2}, Yoshihiro Shimizu^{3,4}, Hiroki R. Ueda^{2,5}

*E-mail: narumi@nibiohn.go.jp

¹Laboratory of Proteome Research, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition,
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki City, Osaka 567-0085, Japan

²Laboratory for Synthetic Biology, RIKEN Quantitative Biology Center, 6-2-3, Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan

³Laboratory for Cell-Free Protein Synthesis, RIKEN Quantitative Biology Center, 6-2-3, Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan

⁴Laboratory for Single Cell Mass Spectrometry, RIKEN Quantitative Biology Center,
6-2-3, Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan

⁵Department of Systems Pharmacology Graduate School of Medicine, The University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

(Received: November 21, 2017; Revised: December 11, 2017; Accepted: December 15, 2017)

Accurate measurements of absolute protein abundance can be achieved by emerging targeted proteomics approaches, in which target peptides of enzymatic digests of proteins are analyzed by selected reaction monitoring (SRM) using the stable isotope labeled peptides as internal standard. Thus, development of a simple and easy way for the preparation of internal standards is advantageous for the analyses of multiple target proteins. We developed a method, termed MS-based Quantification By isotope labeled Cell-free products (MS-QBiC), which provided the simple and high-throughput preparation of internal standards by using a reconstituted cell-free protein synthesis system called PURE system. This method facilitates both multiplexed and sensitive quantification of absolute amounts of target proteins, and then can enhance the capability of the targeted proteomics.

Keywords: absolute quantification; cell-free protein synthesis system; mass spectrometry; selected reaction monitoring; targeted proteomics.