

[特集: タンパク質分析のための最新質量分析装置]

タンデム四重極リニアイオントラップを用いた微量タンパク質の 検出及び翻訳後修飾研究への戦略 4000 Q TRAP[®] システム

土屋文彦

SUMMARY

Mass spectrometry has become the main technique in proteomics study. And the strategy has been recently changed to focus more on research of target proteins from comprehensive proteins, because characterization of target proteins and quantitative study of protein biomarkers could provide important knowledge for drug discovery and development. Protein biomarkers and PTM (post-translational modification) are the main targets in target protein research called focused proteomics. However, biomarker discovery and PTM research are challenging due to difficulty in detection. A phosphate group of a compound could decrease ionization efficiency, which makes the detection of phosphorylated proteins more difficult. Most biomarkers are low abundant proteins, so detection of such compounds from highly complex samples like serum and cell lysate is not easy without sample fractionation using multi dimensional LC. The difficulty of proteomics technology using mass spectrometry results from lack of a tool to detect target proteins directly in complex samples. Here we introduce a strategy to detect a target protein directly even in a low concentration sample (e.g., PTM sample and low abundant biomarker) without additional fractionation. In this strategy unique scan modes of 4000 Q TRAP[®] system, precursor ion scan and MRM are key features to remove contaminant signal in chromatogram. We also show successful examples of the detection of phosphorylated peptides from digested protein kinase, the verification of low abundant protein using a new tool, "MIDASTM workflow", and the monitoring for variation of phosphorylation sites using iTRAQTM reagent.

Key words: QTRAP, PTM, MRM, phosphorylation, quantification.

I. はじめに

大量の夾雑成分に含まれる微量タンパク質の存在を検証する為には、ターゲットに特化した分析条件下で直接的に検出する手段が必要である。すなわち大量の夾雑成分を無視し、ターゲットのみを確実に検出できる分析ツールが、微量な疾患バイオマーカーの探索や翻訳後修飾の解析に必要とされている。ここでは、リニアイオントラップを配置したタンデム四重極型質量分析装置である 4000 Q TRAP[®] システムの構造的特徴と、最近注目されているバイオマーカーバリデーションや翻訳後修飾解析における測定例を挙げ、微量成分の選択的な高感度分析への有効性について述

べたい。

近年の質量分析装置によるプロテオミクス技術の発展はめざましく、同定感度はピコモルから僅か数年のうちにアットモルの領域にまで到達した。確実に質量分析装置のパフォーマンスは向上していると言っていい。同時に新しいソフトウェアやラベル試薬の開発も進み、従来のデータベースサーチでは困難であった変動解析や統計的な評価が可能になりつつあることはプロテオミクス研究に非常に良い材料であると言える。一方、サンプル処理技術、特にタンパク質の分離・分画については、クロマトグラフィー、電気泳動をはじめ、UF 膜、固相抽出なども含めると、その手段に関して選択の幅が広いといえる。しかし一方、現在で

Novel strategy for PTM study and detection of low abundant protein using tandem quadrupole linear ion trap mass spectrometer.

Fumihiko Tsuchiya; アプライドバイオシステムズジャパン株式会社

Correspondence address: Fumihiko Tsuchiya; Applied Biosystems Japan, PSM application support, 4-5-4, Hatchobori, Chuo-ku, Tokyo 104-0032, Japan.

(受付 2006 年 12 月 4 日, 受理 2007 年 1 月 25 日, 刊行 2007 年 3 月 15 日)

も条件検討に多大な労力を要していること、例えば不溶化や吸着などによる予期しないサンプル消失の危険性が伴うなど、未だ課題が多い。したがって、これらの分画技術の確立が今後のプロテオミクスの発展に大きな鍵となるといっても過言ではないだろう。

我々は LC/MS/MS 測定で得られる膨大なペプチドの MS/MS 情報を、データベース検索を通じてタンパク質同定結果という理解しやすい答えとして得ることができる。このプロセスで使用されるデータは、Mass scan 及び MS/MS 測定で得られた、親イオン、価数、フラグメントイオンである。そしてこれらの分析結果の全てが Mass List という数値情報へと変換され用いられる (BLAST サーチは除く)。我々はまず、この合理的なプロセスが完璧な結果を生むわけではないことを再認識する必要がある。その理由のひとつとして Mass Tolerance の扱い方があげられる。一般に、質量精度の低い分析結果であっても結果の誤差を許容する範囲を広げることで、質量精度の高い分析結果と同様にデータベース上の理論値と一致させることができる。しかし、データベース検索条件の基準に寛容性を求めることは同時に不確かさを生むため、その結果に擬陽性をも巻き込んでしまう危険性がある。事実、質量精度の高い質量分析装置より質量精度の低い質量分析装置の分析結果の方が、一見、より多くのタンパク質名を検索してくる。この差が擬陽性であることは言うまでもない。この時のデータの信憑性に疑問を持つ研究者であれば、このようなデータのサーチ結果の検証に十分時間をかけているはずである。しかしながら、一般には各メーカーの解析ソフトウェアの開発は、ユーザーに対し操作面で負担をかけない配慮から測定及び解析の自動化を理想としてきた。この一見便利な機能のおかげで、同定結果に対する十分な検証が疎かとなり、信頼性の不十分なデータが一人歩きする危険性が高くなった。このような状況において、結果の信憑性の数値化やトレーサビリティを求める動きがでてきた。例えば Molecular & Cellular Proteomics では、論文投稿におけるタンパク質同定結果やデータの取り扱いに関するガイドライン (MCP ガイドライン¹⁾) が提唱されている。このように、今まで以上に正確なデータの評価が求められているのが最近の流れと言える。

分析結果の信頼性については 0 (decoy) データベース (ペプチドのアミノ酸配列を反転させるなどで意図的に作製した擬陽性タンパク質データベース) と真のデータベースを対比させて評価する方法が用いられ、このようなテストでは、質量精度や MS/MS の情報量の劣る測定データが多く 0 を捕らえることが確認されている。いずれにしても、最初から検索結果を鵜呑みにしないことは重要であり、それぞれの研究者がデータの内容を注意深く検証することが必要であることは間違いない。そしてデータ数が膨大になればなるほど、厄介な作業となるため、この検証のための

ツールの開発もプロテオミクス解析における必須事項となっている。例えば、データの検証に必要な機能としては検索結果のグルーピングや編集機能があげられる。

以上のように、質量分析装置による網羅的なプロテオミクス解析を進める上でデータの取り扱いには細心の注意が必要である。そして質量分析装置による測定及び解析への負担を軽減するためには、分画によるサンプル組成の単純化が有効であることから、現在多くの研究者がサンプル処理方法の検討に取り組んでいる。そして数日を要す大変な作業の末、網羅的なタンパク質同定のための貴重なサンプルが調製される。ただし、実サンプルに含まれる微量なターゲットタンパク質に関しては、依然としてこれらを夾雑物の中から検出することが非常に難しいため、同定率に再現性を求めるのは容易ではない。また、精製過程において予期しないサンプル消失が起こることも否定できない。したがって、微量のタンパク質を検出するには、できるだけサンプルに手を加えずに、ターゲットの検出を行うことが望ましい。これは一見矛盾しているが、ターゲットイオンの特異的な検出ができれば問題は解決する。タンデム四重極型質量分析装置の存在価値はまさに、こうした微量タンパクの直接的な検出であり、翻訳後修飾をはじめ、微量な疾患バイオマーカー探索の検証を行う最も近道となることが期待されている。ここで一つの例を挙げたい。Fig. 1 の上下のクロマトグラムは全く同じサンプルを測定したものである。多数のタンパク質トリプシン消化物の中から微量のペプチドのみを検出するために 4000 Q TRAP[®] システムによる選択的な検出を行った結果、夾雑物である他のペプチドは質量分析装置により選別され、ターゲットペプチドのみが検出されている。

この他、さまざまな検出モードを駆使することで、精製の進んでいないサンプル中の微量タンパク質の分析が可能となる。このように 4000 Q TRAP[®] システムでは質量分析装置でイオンの選択が可能のため、最低限のサンプル調製で分析が可能である。これは、分画による予期しないサンプルの消失の危険性、労力を軽減することにつながる。

II. タンデム四重極型質量分析装置の構造 (4000 Q TRAP[®] システムの仕組み)

四重極 (Q: Quadrupole) は現在の質量分析装置においてイオンの制御、選択、開裂などを行うポピュラーな機構の一つと言える。タンデム四重極型質量分析装置では、異なる役割をもつ四重極を組み合わせることで、Precursor ion scan や MRM といった選択的な検出手段を獲得している。4000 Q TRAP[®] システムはこのタンデム四重極型質量分析装置のメリットを最大限に利用したリニアイオントラップである。4000 Q TRAP[®] システムの各四重極はそれぞれ、Q0, Q1, Q2 及び Q3 と呼ばれ、直列に配置される。各四重極の

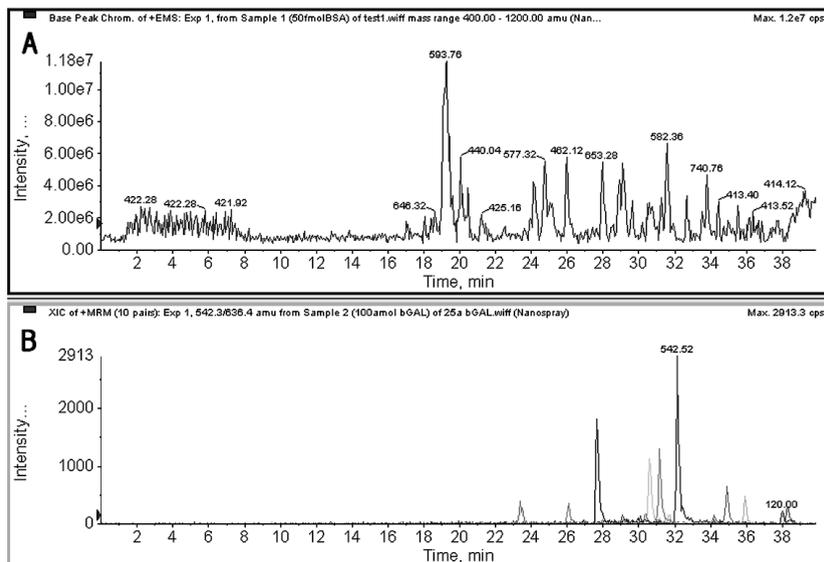


Fig. 1. Comparison of Chromatogram with Mass Scan and MRM.

Chromatograms A and B are results of mass scan and MRM, respectively, using a mixture of 100 amol beta-Gal and 50 fmol BSA as a sample. Many peaks from beta-Gal could be detected due to more selectivity of MRM as well as those from BSA (Fig. B). However peaks from beta-Gal could not be found in the chromatogram obtained with mass scan although all the peaks from BSA were detected (Fig. A).

役割は異なり、それぞれの特性を組み合わせることで通常の Mass scan ばかりでなくイオンの選択的検出が可能となる。Q0 はイオンが質量分析装置内に進入した際通る最初の部屋であり、測定に重要な Q1 以降の四重極に非イオン性の汚れを通さないためのダミー四重極であるばかりでなく、簡易のイオントラップ機能を有し MS/MS 測定では検出感度の向上をもたらす。Q1 は、通常の Mass scan ではイオンの通過を制御するのみであるが、MS/MS 測定時には、単一のイオンのみを選択して通過させることが可能である。また、選択的な検出モードでは、イオンのスキャンを行う。Q2 では N₂ ガスが噴射されており、ガス圧を調節することで、CID によるイオンの開裂状態を制御している。Q3 は最も多機能であり、リニアイオントラップとしてイオンの濃縮及びスキャンを行う他、単一のフラグメントイオンのみを選択的に通過させることも可能である。また、トラップ内でイオンの分離を行い、開裂させることも可能 (MSⁿ 測定) である。

<用語の説明>

開裂 : Fragmentation のこと。イオンにエネルギーなどを加え、断片化する MS/MS 測定に必要な物理現象
 Q : 四重極 (Quadropole) と呼ぶ。4 本の金属ロッドを四角柱様に等間隔かつ平行に配置し、これに対角に同じ極性、両隣に逆の極性となるように交流電圧を与え、交流電圧の周波数をコントロールしてイオンを保持する機構
 CID : Collision Induced Dissociation の略。イオンをガスに

衝突させることで発生する衝撃が分子全体へ広がり内部運動に変換された後に誘発される開裂を司るシステム

以下に、プロテオミクス解析に用いられる代表的な測定モードについて解説する。

1. リニアイオントラップモード (LIT: Linier Ion Trap) の Mass scan 及び MS/MS scan

1.1. EMS (Enhanced Mass Scan: LIT モードでの Mass Scan)

EMS では、Q0 から Q2 までをイオンの通過のために使用し、開裂させない状態で、LIT にイオンを蓄積する。イオンが十分な濃度まで濃縮された後、電圧を増大させイオンの放出を行う (スキャン)。このとき、質量電荷比 (m/z) の低いイオンから電圧上昇の勾配にしたがって順に検出器へと移動する。

1.2. EPI (Enhanced Product Ion Scan: LIT モードの MS/MS scan)

EPI では、Q1 によるイオンの選択の後、Q0-Q2 間の電位差により加速したイオンを Q2 内に誘導し、N₂ ガスと衝突させる。この衝撃エネルギーがイオン内部の運動エネルギーに変換されると、激しい分子内運動 (揺らぎ) が発生し、イオンは分子内の弱い結合部位からドメイン単位で断片化される。この開裂によって得られたフラグメントイオンは LIT に蓄積され、スキャンされる。つまり、イオンの開裂とイオンのトラップ及びスキャンは別の四重極で行われる。

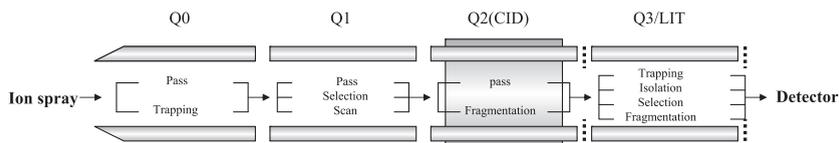


Fig. 2. Quadrupole function in 4000 Q TRAP® system.

Each quadrupole has different functions (e.g. selection of m/z of ion, fragmentation and ion trap), however works closely with each other.

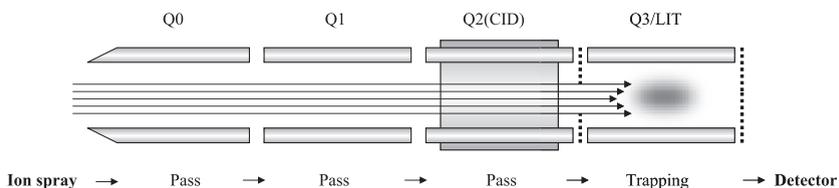


Fig. 2A. Enhanced mass scan (EMS).

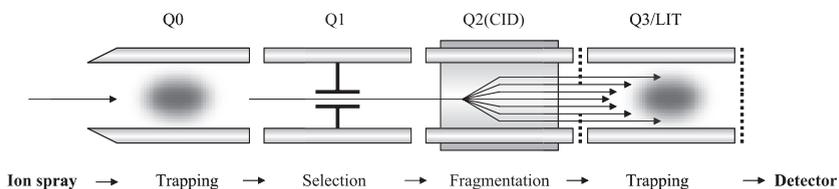


Fig. 2B. Enhanced product ion scan (EPI).

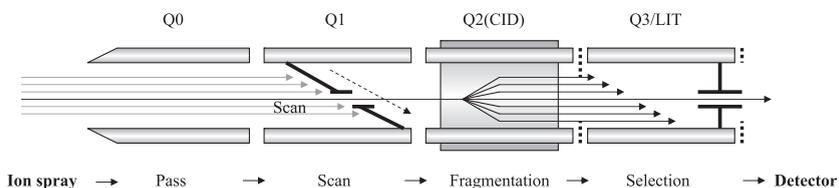


Fig. 2C. Precursor ion scan

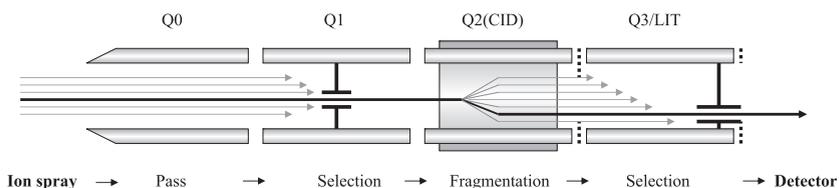


Fig. 2D. MRM (Multiple reaction monitoring).

加えて、Q0のトラッピングを有効にすると、イオンのトラップ及びスキャンの時間、次のスキャンのためのイオンがQ0内に濃縮され、一桁以上の感度向上が得られる。このように各四重極が個々の役割をもち独立していることで、3Dイオントラップに見られた、MS/MSでの1/3カットオフは生じない。またリン酸化ペプチドのように質量分析装置内でβ脱離しやすいイオンにおいても、修飾したままのフラグメントイオンを検出することができる。これらの特性によって、この四重極のレイアウトでは広範囲かつ情報

量の豊富なプロダクトイオンを検出することが可能である。

2. Quadrupoleを使用した選択的イオン検出法 (LITは使用しない)

2.1. Precursor Ion Scan (用途：リン酸化ペプチド、糖ペプチドなど翻訳後修飾の検出)

Precursor Ion Scanでは、Q1でのイオンスキャンを行いQ2により開裂したイオンの中から、ターゲットイオンに特徴的なフラグメントイオンのみをQ3で通過させ検出する。

例えば、翻訳後修飾の測定では Q3 で選択するイオンとして、 m/z 79 (リン酸化ペプチドの測定: セリンまたはスレオニンのリン酸化ペプチドに見られる PO_3^-)、 m/z 204 及び 366 (糖ペプチドの測定: GlcNAc 及び Hex - GlcNAc) などが使われる。これらを用いると、予想される翻訳後修飾を有するペプチドのみが検出され、翻訳後修飾に選択的な検出が可能となる。このとき情報は、共通の修飾をもつ親イオンのスペクトルとして得られる。

2.2. MRM—Multiple Reaction Monitoring— (微量ペプチドの存在の検証, 定量など)

MRM は、質量分析装置による定量の分野ではあまりにも有名である。このモードでは、スキャンは行わず、固定化した Q1 (親イオン) 及び Q3 (フラグメントイオン) の二段階選別を行う。これによって飛躍的にターゲットイオン選択性が高まり、夾雑イオン及びケミカルノイズが消失し、結果として検出感度を高めることができる。このような Q1 及び Q3 選択の組み合わせ (ターゲットイオンのチャンネル) において一定時間 (dwell time) の測定 (単位は一秒あたりの平均カウント cps で表示) した後、連鎖して次に設定されたチャンネルの測定へ移行していく。複数のチャンネル (ペプチドでは 100 程度) を数秒間で取得することが可能であり、一斉分析の手段として用いられている。このような利点から近年、微量なバイオマーカーの検証に最も注目されている手法の一つである。これについては、MIDAS™ workflow の章で述べる。

3. IDA (Information Dependent Acquisition) によるイオンの自動分析

3.1. 通常の IDA 測定

IDA は、Mass scan によるイオン (ペプチドなど) の検出からペプチドのシーケンシングに必要な MS/MS 測定までを自動化した測定モードで、通常 LC 分離と併用して用いる。Fig. 3A は最も一般的な IDA 測定の流れを表している。ここでは、ペプチドの消化物について、最初の EMS (Mass scan) 測定で得られたイオンのうち、最も強いものからイオンの選択を行う。次に ER (高分解モード) 測定で得られたアイソトープの分布からイオンの価数を確認して IDA Criteria で必要なイオンであるかを評価し、このフィルターを通過したものが EPI (MS/MS) 測定される。そして、再び次の Mass scan が始まる。このサイクルを連続的に繰り返す中で、小さなイオンの取りこぼしを無くすために、強いイオンを次回の選別で排除するためにリストへ書き足す。これにより、存在量の多いものから少ないものまで幅広くイオンを検出し同定が可能となる。

ここで、サンプル中に存在するペプチドに対するリカバリー率はスキャン速度と、LC 分離、ピーク幅に依存する。したがって、できる限り多くのペプチドを回収する手段と

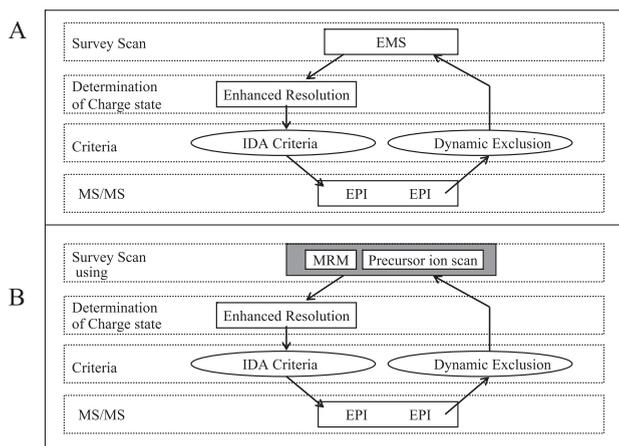


Fig. 3. Normal IDA workflow (Fig. A) and IDA with selective scan mode (Fig. B).

A target compound can be detected in a low concentration sample using the more selective workflow shown in Fig. B.

して以下が考えられる。

- ① スキャンのサイクルを早くする。
- ② 長いグラジエントで LC の分離を行う。
- ③ 流速を落としてピークの溶出時間を広げる。
- ④ 多次元 LC で分離する。
- ⑤ 高分離カラムを使用する。

例に挙げた手段のうち、①については、最も直接的な手段であるが、サイクル時間の短縮を迫及しすぎると、質量精度の低下や、得られた MS/MS スペクトルの情報が乏しくなるなど、擬陽性をヒットさせる要因となるので注意が必要である。②～④では分析時間が長くなる欠点がある。また、⑤についてはモノリスカラムなどの普及で一般化している。

3.2. 選択的検出モードを使用した IDA 測定

前項で紹介した IDA に選択的な測定モード (Precursor ion scan または MRM) を組み合わせることで、翻訳後修飾や、微量タンパク質に特化した測定が可能となる (Fig. 3B 参照)。特に、イオン化率の低いリン酸化ペプチドや、微量なペプチドを大量の夾雑成分から検出する際に有効である。つまり、選択的なモードを使用することで、検出されるイオンが間引かれる結果、単純なクロマトグラムとしてデータを得ることができる。その結果、無駄な MS/MS スキャンが無くなることで時間的に余裕が生まれ、十分に MS/MS 測定に時間をかけることができる。リン酸化部位の決定などに有利である。

4. 4000 Q TRAP® システムを用いたリン酸化ペプチド測定例 —IDA 測定—

4.1. 翻訳後修飾の検出 (リン酸化ペプチドの検出)

実験 1. BTK のリン酸化部位の検出

[測定サンプル]

BTK (Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase) トリプシン消化物: サンプルは Carna Biosciences Inc. の松原守博士 (現在, 京都学園大学バイオ環境学部助教授) よりご提供いただいた。

[測定モード]

IDA 測定及び Precursor ion scan [m/z79] (以下「Prec79-IDA」とする。) -IDA 測定

[装置, カラム]

質量分析装置: 4000 Q TRAP[®] システム
NanoLC: Ultimate (Dionex)
Column: Vydac C18, 75 μ m, 15 cm

[解析]

ProteinPilot[™] ソフトウェア及び BioAnalyst[™] ソフトウェア

[分析結果]

IDA 及び Prec79-IDA 測定により Table 1 のリン酸化ペプチド及びリン酸化部位が明らかとなった。Prec79-IDA 測定及びリン酸化ペプチドのペプチドのフラグメントイオンを Fig. 4 及び 5 に示した。

III. バイオマーカー探索のためのツール
—MIDAS[™] workflow—

1. バイオマーカーの臨床研究利用

疾患バイオマーカーの発見から臨床研究応用までにはいくつかの段階を踏む必要がある。第一に Profiling から Verification までのステップが必要である。この段階では網羅的なプロファイリングを行い、その候補バイオマーカーの存在を立証していく。検証にはターゲットイオンの高感度分析が要求される。次に Validation から Assay までのステップが必要である。ここでは、Assay を行うための高い

Table 1. Phosphorylation sites of peptides identified with precursor ion scan triggered IDA experiment

LKpYPVSSQQNK
LpKYPVSSQQNK
KPLPPpTPEEDQILK
pSQAEQLLK
YNpSDLVQK
GQpYDVAIK
HYVVCSpTPQSQYYLAEK
KTpSPLNFK
HYVVCSTPQpSQYYLAEK
LSYpYEYDFER
PYERFTNSEpTAEHIAQGLR
WSPPEVLMYpSK

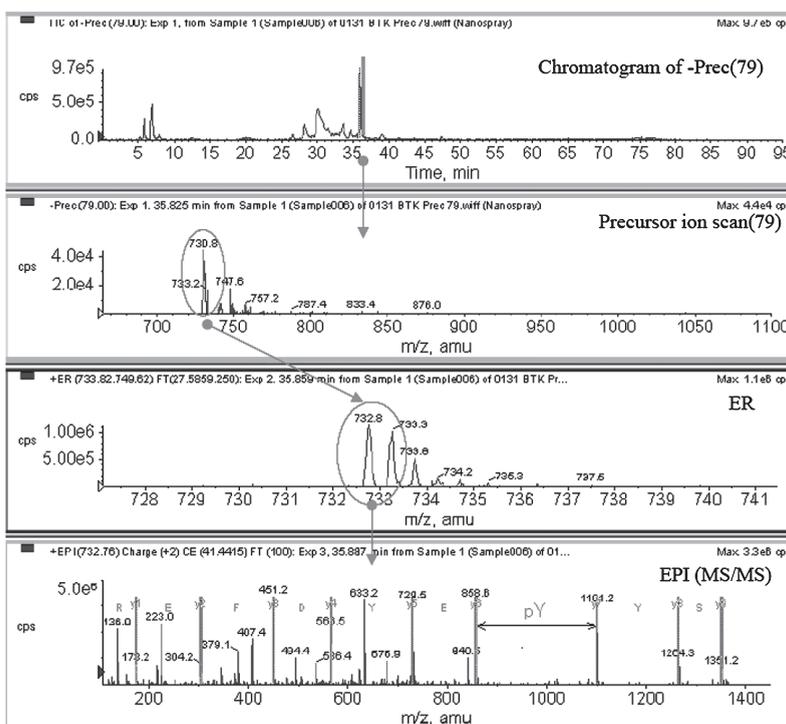


Fig. 4. Information dependent acquisition (IDA) using precursor ion scan.

再現性の確保のための繰り返し実験が必要であり、実験方法のハイスループット化が求められる。このようにバイオマーカーの発見から利用までに多くの時間と労力が必要となる。さらに、血清におけるバイオマーカーの存在は非常に微量であり、血清全タンパク質の多く見積もっても1%以下の枠内に存在していると予想される (Fig. 6)。そして、ヒト血漿中に存在するタンパク質濃度のダイナミックレンジが大きく、最も多いタンパク質と最も少ないタンパク質の濃度差は10桁以上に達する (Anderson NL et al., 2003)²⁾とされる。したがって、一般に行われるMS/MSスキャン (非選択的検出による) によるプロテオミクス解析の手法では、ターゲットが非常に微量であるために、これらを確認することが困難であり、多次元LCのようなサンプル分画が必須となる。このため多大な労力を要している。だからこそ、高感度かつハイスループットの分析手段が求められる。このために構築されたものがMIDASTM workflow (MRM Initiated Detection and Sequencing) である。

2. MIDASTM workflow とは

MRM 測定の利点は、親イオン、フラグメントイオンの二段階選別によって高いイオンの選択性を得たことで、ノイズレベルを極限まで低いレベルに押し下げ、さらに多成分の同時測定が可能でなことである。これらの特徴により高感度の一斉分析が可能となっている。一方、欠点は、測定のための準備が必要であることが挙げられる。すなわち選択性の高い分析用チャンネルを構築する上で、標品によるパラメーターのチューニングが必要な点である。したがって、一般的に既知の物質にしか適用されない方法といえる。

MIDASTM workflow はタンパク質のアミノ酸配列から、消化酵素による断片、価数、翻訳後修飾などを *in silico* で予想し、確認したい候補バイオマーカーや翻訳後修飾についての仮定のチャンネルを作製し、狙い撃ち分析を行う新し

い分析方法である^{3~6)}。そして実際のメソッドはMRMによるターゲットペプチドの検出を行った後、MS/MS測定を行い、作製されたチャンネルのみのイオンの確認及びキャラクタライゼーションを行う。MIDASTM workflow designer ソフトウェアは、仮定のチャンネルを作製する専用のソフトウェアであり、QTRAP[®] システムの解析ソフトウェアであるAnalyst[®] ソフトウェアに後から組み込むことができる。

MIDASTM workflow の実験の流れを以下に示す。

- ① 存在を確認したいターゲットのアミノ酸配列を入手 (候補バイオマーカー, 翻訳後修飾)
- ② MIDASTM workflow designer でチャンネルを作製する。
 - 1) MIDASTM workflow designer にアミノ酸配列を入力する。(copy → paste 行う)
 - 2) フラグメントイオンの選択を行う。
 - 3) 予想の修飾条件, 価数を設定する。
 - 4) 上記の設定条件を考慮した MRM チャンネルを既存のIDA メソッドに書き加える。
- ③ 作製したメソッドを用いてMRM-IDA測定を行う。
- ④ 結果の確認を行う。

3. MIDASTM workflow designer の設定

ここではMIDASTM workflow designer の設定画面について紹介する。

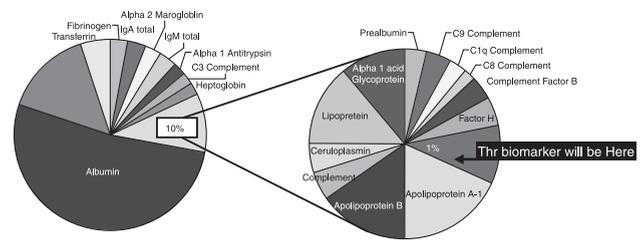


Fig. 6. Protein distribution in serum.

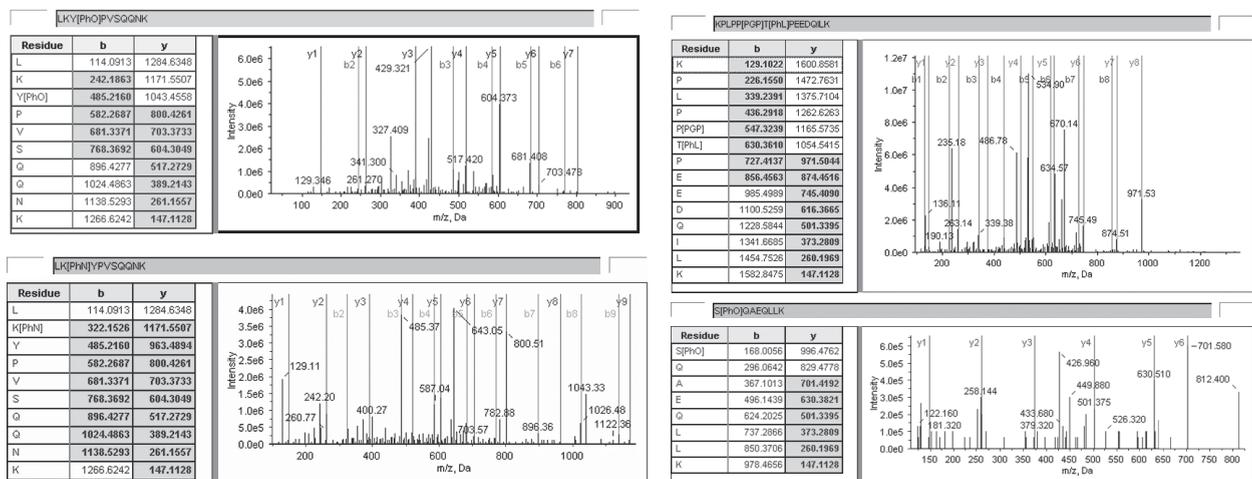


Fig. 5. Result of phosphopeptides identification with ProteinPilotTM software.

配列の場合 3) の 1y/2y>precursor のルールが適用される。

- ④ 消化酵素, Miss cleavage, Modification, 価数などを選択し, 新しく作製するメソッド名を記入する。
- ⑤ プレビューで作製するメソッドの確認を行う。

必要に応じてフィルターをかけ, MRM チャンネルを適度な量に調整する。

4. MRM の検量線の直線性

微量のタンパク質やペプチドを血漿, 血清サンプルのような複雑な組成のサンプルから検出するために, 高い選択性かつ高感度なペプチド分析が要求されるが, さらに再現性や変動解析もバイオマーカー研究に求められている。このためペプチド濃度を評価できる定量的なデータが得られることが望ましい。Fig. 8 は血漿サンプル中のアンジオテンシン II の濃度と MRM のピーク面積をプロットしたものである。血漿サンプル中には量, 種類共に非常に多くの夾雑タンパク質が存在するが, MRM 測定では高い選択性によって濃度とピーク面積の間に直線的 ($R=0.9988$) な相関がある。この時の定量下限は約 100 amol であった。以上より MIDAS™ workflow では多量の夾雑タンパク質の中からも, 微量のターゲットにたいして定量性の高いデータを得ることが期待できる。

5. MIDAS™ workflow による同定感度

通常のタンパク質同定で血漿中の微量タンパク質を確認するためには, タンパク質の状態で多次元に分画が必要であるが, MRM を用いた MIDAS™ workflow では, そこまでの労力を必要としないことは既に述べた。しかしながら血漿タンパク質の濃度差が 10 桁以上となると, やはりある程度の分画は必要になる。Anderson NL と Hunter CL らは, MIDAS™ workflow での検出限界について検討している

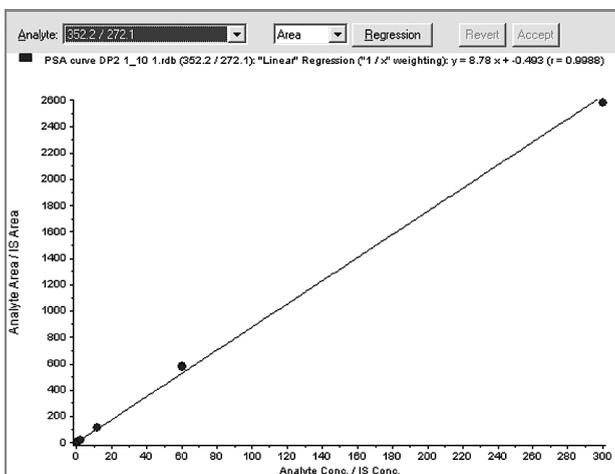


Fig. 8. Relationship between peak area and concentration of angiotensin in plasma.

(Anderson L and Hunter C, 2006) ^{4,6}. 彼らは, 最小限のサンプル調製として, MARS (Agilent Technologies) カラムを使用して 6 種類のタンパク質 (Albumin, IgG, IgA, Transferrin, Haptoglobin, Antitrypsin) の除去を行った後, トリプシン消化を行い, 53 種類のタンパク質 (137 MRM チャンネル) を確認している (Fig. 9). この中で, 血漿中濃度 0.67 $\mu\text{g/ml}$ の L-selectin を確認している。さらに MARS カラムにより濃度の高いタンパク質が除かれた後であっても, 分析の再現性は高く, 同定感度が向上している。一方, このような除タンパクのためのアフィニティーカラムによる精製のステップでは, 除去されるタンパク質に相互作用を持つタンパク質が同時にトラップされるため, Shen らは, 吸着後のアフィニティーカラムからもタンパク質を回収し, 同定を行った結果, 通常得られないタンパク質を同定している⁷⁾。この結果は今後のタンパク質分画の新しい可能性を示唆する。一般的に, 測定するペプチドに対するマトリックスが低いほど分離カラムへの負担が軽減され測定限界が高くなるため, 血漿タンパク質の更なる分画は, 今までの検出手段でも確認が難しかった超微量のタンパク質の検出を可能にすることが期待できる。

6. MIDAS™ workflow の実験例

[実験]

スプライセオソーム (snRNP 複合体) 関連タンパク質の MIDAS™ workflow を用いた検証

[背景]

ヒトスプライセオソームをアフィニティー精製し, グリセロール濃度勾配遠心分離で粗分画したサンプルについて通常のタンパク質同定を行ったところ, 多数のタンパク質がヒットした。関連のタンパク質として着目されるものの中には, ペプチドのシングルヒットで同定されたタンパク

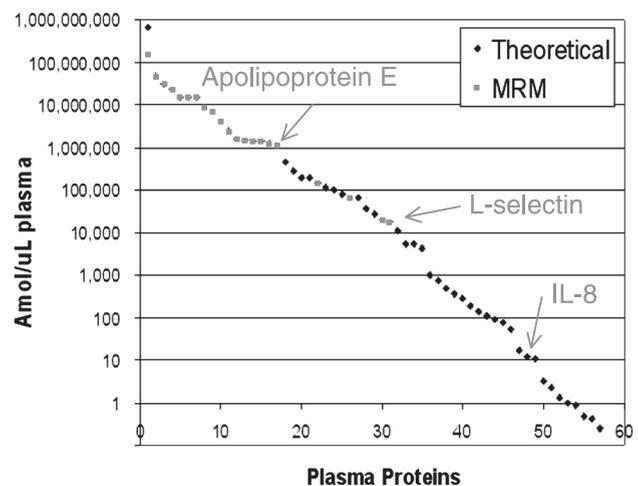


Fig. 9. Theoretical concentration of plasma protein (Blue) and the proteins detected by MRM (Red).

質が含まれた。繰り返し分析の結果スコアの向上が得られなかったため、スコアの低い4タンパクについて MIDAS™ workflow による検証を実施した。

[測定モード]

MRM-IDA 測定

[装置, カラム]

質量分析装置: 4000 Q TRAP® システム

NanoLC: Ultimate (Dionex)

Column: PepMap C18 (Dionex)

[解析]

MASCOT® ソフトウェア

[分析結果]

MIDAS™ workflow での検証の結果, 4種のタンパク質全てのペプチド同定数及びスコアが向上した (Table 1 及び Fig. 10 参照)。

IV. iTRAQ™ 試薬を用いたリン酸化部位のモニタリング

1. iTRAQ™ 試薬について

1.1. iTRAQ の基本構造

iTRAQ™ 試薬は Reporter ion と Balance group (Fig. 11 参照) によって構成される^{8,9)}。この試薬はペプチドの N 末端及びリジン残基側鎖のアミノ基をラベルし, バイオマーカー探索, ペプチドの定量など定量プロテオミクス的一端

を担う新しいワークフローを提唱する試薬である。この iTRAQ™ 試薬には 4 種類のラベル剤があり, 最大で 4 種類のサンプルに含まれるペプチドの存在量を比較定量することが可能である。

例えば, タンパク質の組成を比較したい 4 種類のサンプルがあったとする。これらのサンプルに存在するそれぞれのペプチドは, 4 種類 iTRAQ™ 試薬によってそれぞれラベリングがされる。ラベル後サンプルは混合され, 同じペプチドであれば, 異なる標識を持っていたとしても同じ分子量, 同じ構造であるため挙動を共にする。最終的には MS/MS 測定によって, Reporter ion (114-117) がペプチドから切り離され, その際, それぞれのサンプルの由来と量は MS/MS スペクトルの低分子領域 (m/z 114 ~ 117) に示される。この方法はディファレンシャルディスプレイの有効な手段の一つであり, 今日バイオマーカー探索のツールとしても注目されている。

2. 実験の背景

近年疾患バイオマーカーのプロファイリングに用いられてきた iTRAQ™ 試薬はタンパク質の発現量の違いを確認する用途で最も一般化した。しかしながら, この試薬の用途は幅広く, 例えば翻訳後修飾の経時変化を見ることも可能である。近年における創薬研究の流れの中でリン酸化と疾病特に癌との関係が指摘されるようになると, キナーゼを制御するためのインヒビターのスクリーニング方法に注目が集まっている。しかしながら, 従来の ELISA や IR を用いた手段では各リン酸化部位を個別に評価することは難

Table 1. Result of identification on traditional experiment workflow with MS/MS scan.

#	Name	MW [kDa]	Score 1	PC 1	Score 2	PC 2
1	Splicing factor 3b, subunit 1, 155 kDa	145.7	665	23	630	22
2	RNA helicase A	142.0	568	18	606	21
3	splicing factor 3b, subunit 2	116.8	324	19	224	11
4	splicing factor 3b, subunit 3, 130 kDa	135.5	296	13	280	12
5	arsenate resistance protein ARS2B	100.2	278	12	242	8
6	heterogeneous ribonuclear particle U	88.9	226	8	238	11
7	cell-cycle and apoptosis regulatory protein 1	132.6	218	11	134	7
8	growth regulated nuclear 68 protein	66.9	211	10	201	7
9	DEAD box polypeptide 5	69.1	211	11		
10	SF3B1 protein	87.4	195	7	280	10
11	splicing factor 3a, subunit 1, 120 kDa	88.8	180	7	163	7
12	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C isoform b	31.9	155	4	225	8
13	putative pre-mRNA splicing factor RNA helicase	90.9	150	7		
14	DEAH box polypeptide 15	92.8	138	7	177	9
15	U2-associated SR140 protein	125.0	131	7	134	10
16	RNA-binding protein 10	103.4	129	5	80	10
17	nuclear cap binding protein subunit 1, 80 kDa	91.8	124	5	63	4
18	U1 snRNP 70 kDa protein	70.0	95	5	92	3
19	DEAD box polypeptide 46 (RNA helicase)	117.2	91	3	60	5
20	SR-related CTD associated factor 6	103.5	83	5		
21	apoptosis-regulated protein 2	50.4	74	7	172	10
22	pre-mRNA splicing factor SRp77	56.8	58	8	40	1
23	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide D3	13.9	47	5	27	1
24	RNA binding motif 17; splicing factor (45kDa)	45.2	42	4		
25	HNRP A2/B1 isoform A2	35.9	38	2	125	3
26	U5 snRNP 100 kDa protein	95.6	38	6		
27	Tubulin beta-1 chain	49.7	37	3	74	4
28	elongation factor 1-alpha	47.4	31	1		
29	tubulin alpha	50.5	21	1		
30	glutamyl-tRNA synthetase	90.3			62	2
31	Splicing factor 3a, subunit 3, 60 kDa	59.2			61	3
32	HNRP A1	38.8			39	1
33	RNA binding region containing protein 2 isoform c	58.9			28	1

Four proteins with poor confidence (grey) was applied to verification using MIDAS™ workflow.

しなかった。したがって新しい創薬研究のためのタンパク質リン酸化変動モニタリングツールの開発が求められている。質量分析装置では前に述べたとおり各リン酸化部位を同定が可能であり、この情報に動的な要素を加えることでリン酸化変動の個別モニタリングが可能となる。本実験では、この動的な情報を iTRAQ™ 試薬を用いて取得する新しいリン酸化部位の評価法を検討した。

3. 実験方法

リン酸化変動のモニタリングを検討するため、モデル系としては既知の MAP キナーゼカスケードから JNK 1 と MBP のリン酸化反応を選択し、リン酸化過程の 4 ポイントの経時変化を iTRAQ™ 試薬で次のように追跡した (Fig. 12 参照)。JNK1 による MBP のリン酸化処理を行い処理前、処理後 5 分、30 分及び 60 分後の合計 4 ポイントでサンプリングを行い、TCA による反応停止の後、常法により TCEP による還元処理の後、MMTS によるシステインのアルキル化を施し、トリプシン消化を 37°C、16 時間行った。それぞれのトリプシン消化サンプル (0, 5, 30, 60 min) に対して iTRAQ™ 試薬 (114, 115, 116, 117) 加え室温 (20°C) にて 1 時間インキュベーションを行った。その後不要な試薬を除くために SCX カラムにより精製したものを LC/MS/MS 測定試料とした。なお使用したタンパク質 (MBP 及び JNK1) はカルナバイオサイエンス社内で発現、精製されたものを用いた。検出された iTRAQ™ 試薬ラベルリン酸化ペプチドの MS/MS 測定結果に期待される Reporter ion のパターンは Fig. 13 に示した通りであり、本モデル実験において下記のパターンが確認されればリン酸化変動をモニタリング可能と評価することができる。

装置及び測定条件

質量分析装置: 4000QTRAP®LCMSMS System (APPLIED BIOSYSTEMS/MDS SCIEX)

nanoLC: DiNa (KYA Technologies Corporation)

Mobil Phase: A:2% Acetonitril (0.1% FA) B: 70% Acetonitril (0.1% FA)

Flow rate: 200 nl/min

Gradient: 0 min (0%B) –10 min (0%B) –45 min (40%B) – 50 min (100%B)

Protein Identification:Protein Pilot™ Software (APPLIED

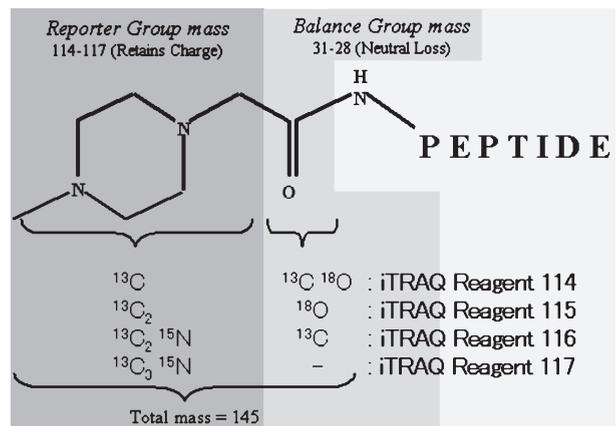


Fig. 11. Structure of iTRAQ™ reagent.

Each iTRAQ™ reagent consists of a reporter group and a balance group. The mass of the reporter group and the balance group are drawn up for four types of molecular weight using stable isotope. However, the total mass of each iTRAQ™ reagent is the same (145 Da) by combining the reporter group and the balance group. In MS/MS spectrum, the reporter groups are shown as fragment ions which were dissociated under the same collision energy by CID. Therefore iTRAQ™ reagent could be a useful tool for differential display of kinetic changes of PTM and biomarker discovery.

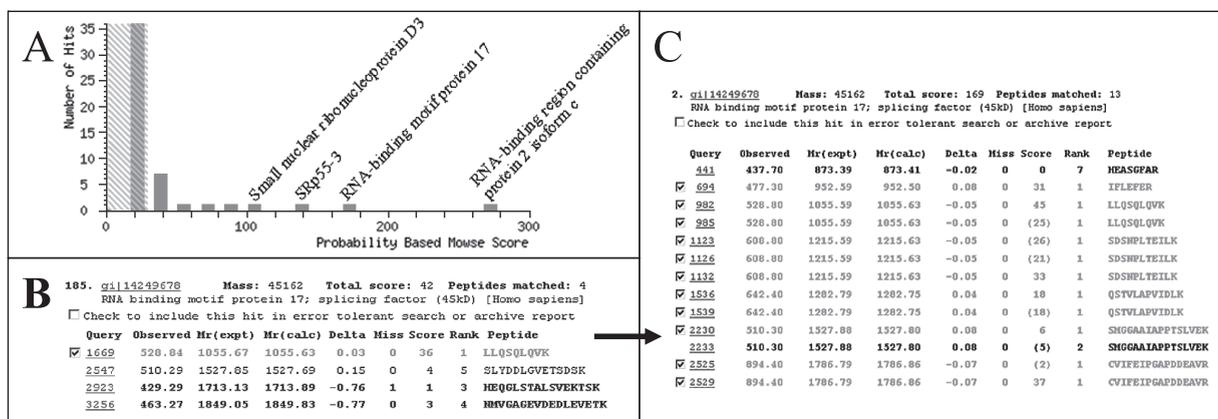


Fig. 10. Verification result with MIDAS™ workflow.

Fig. A shows the MIDAS™ experiment result with MASCOT. Some low abundant proteins were detected with enough confidence in a single LC-MS experiment of MIDAS™ workflow. Figs. B and C show the result using conventional MS/MS scan and MIDAS™ workflow respectively. The better scores and the better sequence coverage for RNA binding motif protein 17 were obtained by MIDAS™ workflow.

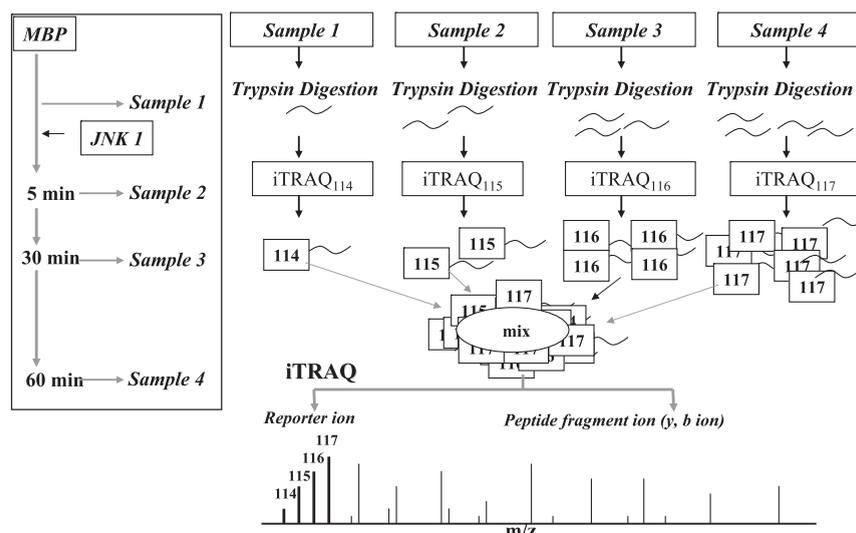


Fig. 12. iTRAQ experiment workflow.

The time course of phosphorylation at individual phosphorylation sites could be observed by the intensity of iTRAQ reporter ion peak (114, 115, 116 and 117) in MS/MS spectra.

BIOSYSTEMS/MDS SCIEX), MASCOT® Software (Matrix Science)

4. 実験結果

iTRAQ™ 試薬でされた MBP のトリプシン消化物の nanoLC-MS/MS 測定結果では 70% 以上の Sequence coverage が得られ, Protein Pilot™ Software, MASCOT® Software の両検索結果から, リン酸化ペプチドが複数検出された. その中の JNK1 のモチーフであるプロリン前の Ser/Thr (.. [ST] P..) については Reporter ion のフラグメントパターンに I 型のパターンが認められた. 同時に, リン酸化サイトを持つ非リン酸化ペプチドからはリン酸化状態に移行するため, 減少傾向を示す D 型パターンが得られた. リン酸化サイトを持たない非リン酸化ペプチドは C 型が認められ, iTRAQ™ 試薬によって Reporter ion の情報からリン酸化変動をモニタリングすることが可能であることが明らかとなった (Fig. 14).

5. まとめ

質量分析装置測定に iTRAQ™ 試薬を用いることで, 各リン酸化部位について個別にリン酸化変動を確認することが可能であった. この方法はキナーゼインヒビターのスクリーニングへの応用に有効と考えられた.

V. おわりに

タンデム四重極型質量分析装置である 4000 Q TRAP® システムの最大の特徴は, 通常の MS/MS 測定で検出されない微量のターゲットイオンを Precursor ion scan や MRM などといった選択性の高いモードで選択的に検出可能なこと, さらに得られたイオンがそのまま MS/MS スキャンと連動

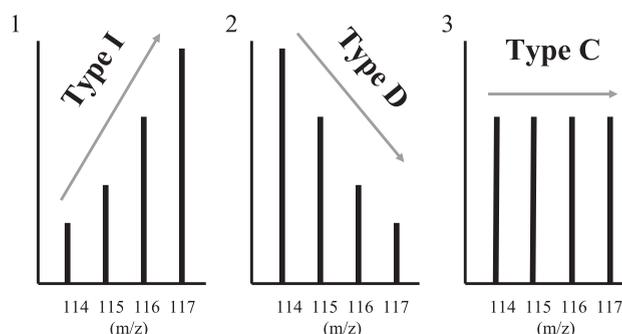


Fig. 13. Expected fragment pattern of iTRAQ reporter ions.

MS/MS fragment pattern for peptides phosphorylated by JNK1 was expected to be Type I (Increase). Peptides dephosphorylated during this experiment would show Type D(decrease) fragment pattern. And peptides which had no site to be phosphorylated would be Type C (Constant) since JNK1 didn't affect them.

し同定が可能である点にあること, つまり選択的なターゲット検出と MS/MS 測定が一回の実験で行うことができる点にある. この直接的な確認手段により, 調製にかかる時間と, 実験回数は飛躍的に減少する. 同じタンデム四重極型質量分析装置という名称であっても, メーカーによってこれらの選択的検出と MS/MS を組み合わせるモードを有していない場合があり, MIDAS™ workflow や, Precursor ion scan のようなツールを有効に使用して, 応用的な実験を行うことを目指す研究者の方は, 装置の選択を慎重に行うことをお勧めする. スタンダードサンプルで, 質量分析装置の同定感度やペプチドの回収率のみで装置の性能を評価すればよかった数年前と違い, 複雑なサンプルから微量タンパク質に関するより正確なデータの取得が求められる現在では, 目的にあった実践的な測定方法が必要とされる. 4000 Q TRAP® システムが採用したレイアウトが

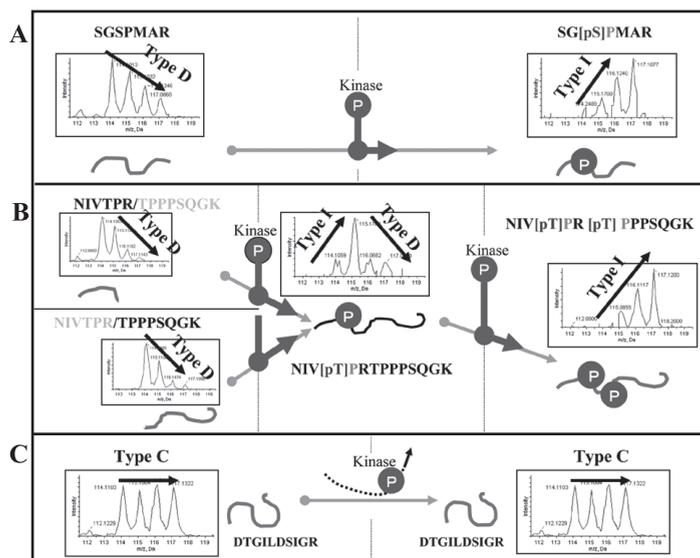


Fig. 14. iTRAQ pattern of trypsin digested peptides.

All of the phosphorylation sites of MBP corresponded with the phosphorylation motif of MAP kinase was identified as type D, I or C. Then reporter ions of iTRAQ™ reagent which were labeled to MBP clearly showed the time course of phosphorylation interaction by JNK1 (i.e., the phosphopeptide on the phosphorylation or non-phosphorylation state). These results indicated that iTRAQ reagent could provide enough information for monitoring of variation of phosphorylation interaction between proteins and kinases.

TOF ではなく、四重極をベースとしたリニアイオントラップを選んだことによって獲得したMRMやPrecursor ion scanをトリガーにして行うMS/MS測定が、まさに現代に求められているニーズに適合しており、今後のプロテオミクス研究において担う役割は非常に大きい。

謝 辞

本実験において、カルナバイオサイエンス株式会社並びに京都学園大学バイオ環境学部バイオサイエンス学科の松原守助教より、貴重なキナーゼサンプルをご提供頂きました。また松原先生には実験全般にわたり貴重なご助言を頂戴致しました。心より感謝申し上げます。

リン酸化ペプチドのnano LC分析では、ケーワイエテクトロジー株式会社の工藤憲一博士より多大なる援助を受けましたので、心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Carr S, Aebersold R, Baldwin M, Al Burlingame, Clauser K, Nesvizhskii A. The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working group on publication guidelines for peptide and protein identification data. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:531-533.
- 2) Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2003;1:845-866.
- 3) Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai

RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A. The human plasma proteome: A non-redundant list developed by combination of for separate sources. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:311-326.

- 4) Anderson L, Hunter C. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:573-588.
- 5) Cox DM, Zhong F, Du M, Duchoslav E, Sakuma T, McDermoff JC. Multiple reaction monitoring as a method for identifying protein posttranslational modification. *Journal of Bimolecular Techniques* 2005;16:83-90.
- 6) Unwin RD, Griffiths JR, Leverentz MK, Grallert A, Hagan IM, Whetton AD. Multiple reaction monitoring to identify sites of protein phosphorylation with high sensitivity. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:1134-1144.
- 7) Shen Y, Kim J, Strittmatter EF, Jacobs JM, Camp DG, Fang R, Tolic N, Moore RJ, Smith RD. Characterization of the human blood plasma proteome. *Proteomics* 2005;5:4034-4045.
- 8) Zhang Y, Wolf-Yadlin A, Ross PL, Pappin DJ, Rush J, Lauffenburger DA, White FM. Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:1240-1250.
- 9) Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Daniels S, Pukkayastha S, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:573-588.