

〔特集：タンパク質分析のための最新質量分析装置〕

プロテオームおよびメタボローム解析に向けた 液体クロマトグラフ質量分析装置

神 田 勝 弘

SUMMARY

Mass spectrometer is one of the most promising instruments for proteomics and metabolomics. It is not only applied for the protein and small molecule identification, but also for the complicated post-translational modification analysis, biomarker discovery from the quantitative analysis between the multiple samples, and so forth. Hitachi High-Technologies produced a novel liquid chromatograph mass spectrometer (NanoFrontier LD), which may identify and quantitate the proteins and peptides of interest. The improvements in the detection system brought the dynamic range and resolution over 5,000 and 10,000, respectively, enabling the high-resolution determination. Alternative collision-induced dissociation technique enhances the information abundance, and functional addition to the software advances the analysis efficiency. Furthermore, we also developed the pretreatment methodology, for enzymatic digestion and affinity purification, by applying the unique protein immobilization technique presently used in protein microarrays. These technical approaches and details were described and discussed.

Key words: proteomics, metabolomics, quantitative analysis, liquid chromatograph mass spectrometer, information based acquisition (IBA), protein microarray.

1. はじめに

ポストゲノムの時代を迎え、遺伝情報に基づく生体内機能分子であるタンパク質を解析するプロテオミクス、代謝物を網羅的に解析するメタボロミクスが脚光を浴びている。タンパク質のような生体高分子、もしくは低分子代謝物の解析にとって質量分析装置は不可欠であり、様々な機能、特色を持たせた装置が開発されている。

日立ハイテクノロジーズは、液体クロマトグラフ (LC) と質量分析装置 (MS) をシステム化し、同定および定量性能を同時に備えた新型の液体クロマトグラフ質量分析装置 (LCMS) (NanoFrontier LD) を開発した (Fig. 1)。同装置の LC 部は、独自の送液方式、Dual Exchange Gradient System (DEGS)^{1,2)} により、50–250 nl/min のナノ流量域で再現性の高いダイレクトフローによるグラジエント送液を可能にしたナノ流量液体クロマトグラフ (NanoLC) である (RSD 値 0.5%)。一方、MS 部はリニアイオントラップ型 (LIT) と

飛行時間型 (TOF) の 2 種類の MS をハイブリッド化した構成となっており³⁾、多段階の MS/MS 分析 (MSⁿ 解析) を高い質量数精度で実施することが可能である。

2. NanoFrontier LD の新機能

以下に、従来機種にはなかった NanoFrontier LD の特徴と測定事例を示す。

2.1. 高速 ADC 搭載による定量性能の付加

定量性能を付加するため、NanoFrontier LD の検出系を従来の Time to Digital Converter (TDC) から新規に開発した 2 GHz での高速サンプリングが可能な Analog to Digital Converter (ADC) に変更した。

TDC は質量分解能が高いことから定性解析 (同定) に優れている反面、到達したイオンの定量検出には不適であったが、ADC によりイオン量をアナログ検出することで幅広いダイナミックレンジを確保した。Fig. 2 (A) は、

Liquid chromatograph mass spectrometer for proteomics and metabolomics.

Katsuhiro Kanda; 株式会社日立ハイテクノロジーズ 研究開発本部バイオメディカルセンター

Correspondence address: Katsuhiro Kanda; Bio-Medical Center, R&D Division, Hitachi High-Technologies Corporation, 882 Ichige, Hitachinaka, Ibaraki 312-8504, Japan.

(受付 2006 年 11 月 30 日, 受理 2007 年 1 月 25 日, 刊行 2007 年 3 月 15 日)

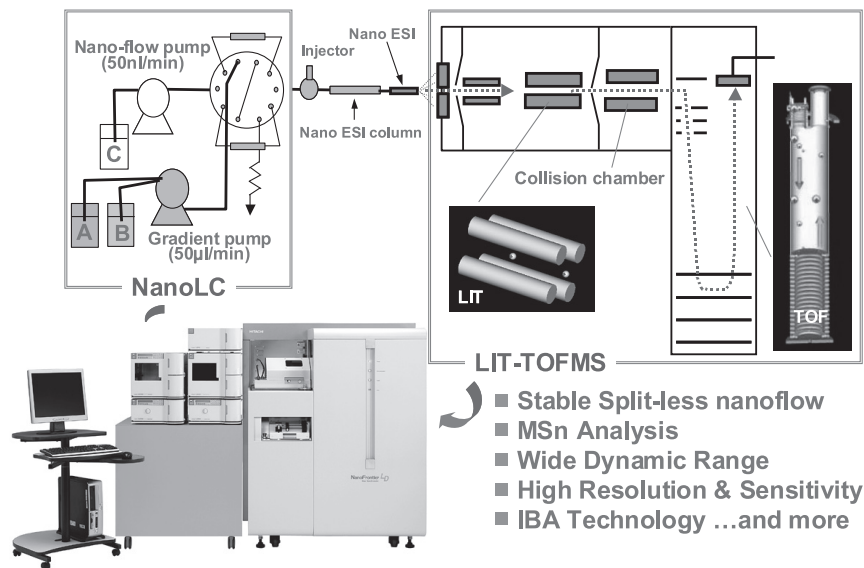


Fig. 1. Schematic diagram of NanoFrontier LD.

NanoFrontier LD is a liquid chromatograph mass spectrometer composed of a reproducible nLC and a hybrid MS of LIT and TOF.

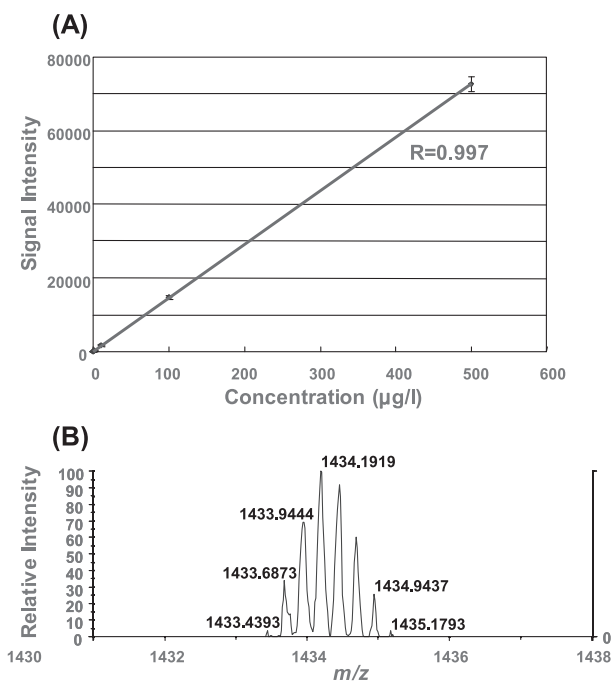


Fig. 2. Evaluation of dynamic range and resolution.

- (A) Calibration curve of reserpine. The linearity showed in the concentration range from 0.1 to 500 µg/l.
- (B) Mass spectrum of insulin. The resolution was 14,660.

NanoFrontier LD でレセルピンを測定した際の検量線を示す。試料濃度 0.1 から 500 µg/l の範囲において高い直線性が認められ (相関係数 R=0.997), ダイナミックレンジで 5,000 を実現した。

一方, ADC への変更にもなる質量分解能の低下は, TOF を改良することで分解能 10,000 以上を達成した。Fig. 2 (B) は, NanoFrontier LD によるインシュリンの測定結果であ

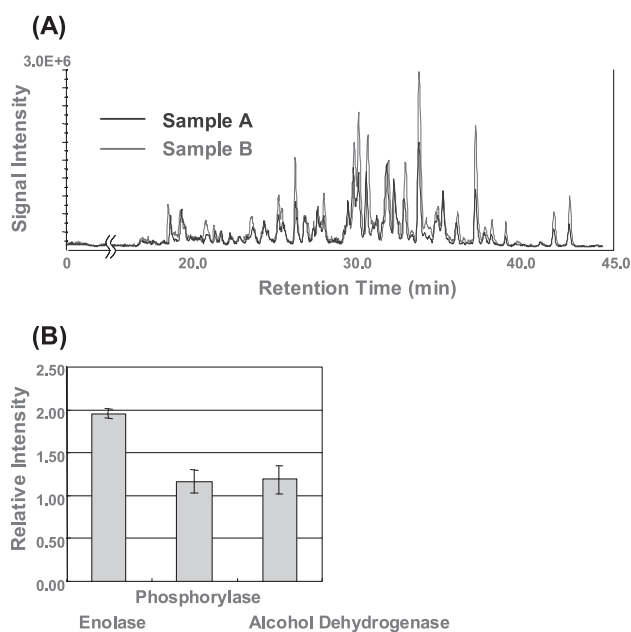


Fig. 3. Evaluation of quantitative performance.

(A) MS spectra of the tryptic digested protein mixture. Separated peaks and spectrum similarity between samples A and B suggest the high resolution and retention time reproducibility of the instrument. Signal intensity of the several peaks in sample B showed two times higher than sample A seems to represent the enolase fragment.

(B) Quantitative analysis of the proteins in the samples A and B. Phosphorylase and alcohol dehydrogenase showed even quantity, in contrast to enolase doubled in sample B.

り, 4 価イオンにおいて分解能 14,660 を達成した。

Fig. 3 に NanoFrontier LD によるタンパク質消化物の非標識による比較定量の結果を示す。4 種類のタンパク質 (エノラーゼ, ホスホリラーゼ, アルコールデヒドロゲナーゼ,

ヘモグロビン) のトリプシン消化物からなる試料 A および B を調製した. 各試料のタンパク質濃度は, ホスホリラーゼ, アルコールデヒドロゲナーゼ, ヘモグロビンについては試料 A および B とともに各々 100 nmol/l としたのに対して, エノラーゼは試料 A が 100 nmol/l, 試料 B が 200 nmol/l とした. 各試料 1 μ l を同装置に供試し, 得られた結果をタンパク質検索エンジン MASCOT (Matrix Science, Ltd.) で検索して各タンパク質の同定を行った. また, ヘモグロビンを内部標準としてそれ以外の 3 種類のタンパク質について試料 A および B 間の比較定量を行った.

試料 A および B のトータルイオンクロマトグラムを Fig. 3 (A) に示す. クロマトグラム上に消化ペプチド断片に相当するピークが多数検出されるとともに, 試料 A および B 間のクロマトグラムのパターンが一致していることが認められる. このことは, NanoFrontier LD の分解能および保持時間再現性が優れていることを示唆している. また, クロマトグラム上のいくつかのピークについては, 試料 B の信号強度が試料 A の 2 倍程度高くなることから, これらはエノラーゼ由来のイオンと推測され, クロマトグラムからも同装置が定量性能を有していることが示唆される.

MS/MS 測定後に MASCOT で検索したところ, 試料中の 4 種類のタンパク質全てが同定されたため, 各タンパク質間の比較定量を行った. ヘモグロビン由来の任意のペプチドを内部標準とし, その信号強度に基づいて試料 A および B 間の規格化を行った. そして, ヘモグロビン以外の各タンパク質に由来する任意の複数のペプチドについて試料 A および B 間の信号強度比を求め, それらの平均値をタンパク質ごとに算出した (Fig. 3 (B)). その結果, ホスホリラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼについては試料 A および B 間の信号強度比の平均値と標準偏差は各々 1.16 ± 0.13 および 1.19 ± 0.16 であるのに対して, エノラーゼの場合は 1.95 ± 0.05 を示し, 調製時のタンパク質量比と比較して各信号強度比の平均値は相対誤差 20% 以内で一致した.

以上のように, 高分解能を維持しながらダイナミックレンジを拡大することにより, NanoFrontier LD はより正確に試料イオンの量的変動が測定可能となった.

2.2. 衝突室を応用した構造解析

NanoFrontier LD では, LIT 部における MSⁿ 解析という特長に加え, LIT と TOF 間に位置する衝突減衰器 (衝突室, コリジョンチャンパー) 内でイオンを解離させることによる MS/MS 測定も可能であり, 測定試料や目的に応じて選択できる. 衝突室における解離は, イオントラップによる解離特有の低質量イオンのカットオフがないため, 低質量イオン由来の構造情報を得やすい特徴がある. 一方, LIT 部における MSⁿ 解析は, 翻訳後修飾や低分子などの高次構造の解析に有利である.

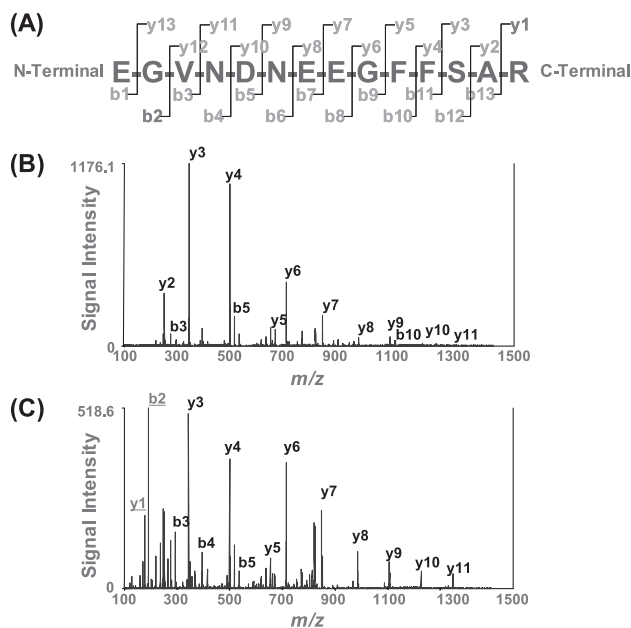


Fig. 4. MS spectrum comparison of different collision-induced dissociation techniques.

- (A) An amino acid sequence of [Glu]¹-Fibrinopeptide B.
 (B) MS spectrum of collision-induced dissociation by LIT.
 (C) MS spectrum of collision-induced dissociation by collision chamber. In contrast to (B), y1 and b2 ions were detected.

Fig. 4 は, [Glu]¹-Fibrinopeptide B (配列は Fig. 4 (A) 参照) を, LIT (Fig. 4 (B)) あるいは衝突室 (Fig. 4 (C)) で MS/MS 測定したときのマススペクトルを示す. 衝突室による MS/MS 測定では, LIT では検出できなかった b2 イオン (N 末端から 2 番目のペプチド結合が開裂) および y1 イオン (C 末端のペプチド結合が開裂) が認められることから, 低質量数のフラグメントイオンが得やすいとともに, より多くの配列情報を提供し得ることを示唆している.

このように, LIT 部および衝突室における特徴的な 2 種類の解離モードを駆使することは, タンパク質および低分子の構造解析に極めて有効である.

2.3. IBA の機能拡張

Information Based Acquisition (IBA: NEDO 助成事業の成果の一部) は, 同一試料を繰り返し測定する際に, MS/MS 測定したターゲット成分の情報 (質量数, 価数, 保持時間) をリアルタイムに内部データベースへ自動登録することで同一成分の重複測定を防ぐ機能である⁴⁾. これにより, 親イオンの信号強度順に重複なく MS/MS 測定するため, 繰り返し回数に比例して同定数を増加させることが可能となり, より微量な成分の同定に効果的である.

NanoFrontier LD では, この内部データベースに編集機能を付加した. これにより, 例えば予め測定試料中に混在し得る夾雑成分等を登録しておくことにより, それらを仮

想的に除去した測定が可能となる。また、得られた結果を内部データベースに登録することにより、その試料と比較したい試料の測定は、後者に特異的な成分を選択的に測定することになるため、解析の効率化が図れる。

以下に IBA の基本性能である MS/MS 測定したターゲット成分の情報をリアルタイムに内部データベースへ登録することによる重複測定回避効果について事例を示す。

血清中に存在する各種タンパク質の濃度レンジは 12 桁の幅があると考えられている⁵⁾。このことは、例えば微量な疾患マーカー等を探索する場合にはアルブミン等の主要なタンパク質を除去する必要があることを示しており、そのためのキットが各社から市販されている。しかしながら、目的成分が微量であるほど、市販キットでは除去対象になっていない成分や除去し切れずに残存した成分が解析を阻害することになり、血清中のバイオマーカー探索における最大のボトルネックとなっている。

そこで、この問題に対する IBA の効果を検証するために、バイオマーカー探索のモデル試料として、市販血清中に炎症関連のマーカーの一種である C 反応性タンパク質(CRP) を患者濃度レベル (100 µg/ml) 添加したものを調製した⁶⁾。

同試料は、市販の主要タンパク質除去キットを用いて血清中のアルブミン等を除去した後、トリプシン消化を行った。消化産物は NanoFrontier LD に供試し、MASCOT 検索により網羅的にタンパク質を同定した。

IBA を機能させないで解析した場合、同定された 50 種類程度のタンパク質 (ペプチドスコア値 30 以上のペプチドを 2 断片以上含むことで保証) のほとんどは、引用文献 5 に示されている classical plasma proteins に相当する血清中に多量に存在するタンパク質であり、CRP の同定には至らなかった。一方、IBA を機能させて解析したところ (保持時間は 10%, m/z は ± 0.1 Da を許容範囲に設定)、IBA の 1 サイクル目の MS/MS 測定において同定されたこれら主要成分情報の内部データベースへの自動登録により、2 サイクル目以降の MS/MS 測定では重複測定が回避され、より微量な成分の測定が促進された結果として、CRP の同定に至った。

本実験では、アミノ酸配列が RQDNEILIFWSK および ESDTSYVSLK の 2 種類のペプチドが、各々 40 および 49 のスコア値で同定された。Fig. 5 は前者のペプチド (RQDNEILIFWSK) を同定したときのマスクロマトグラム

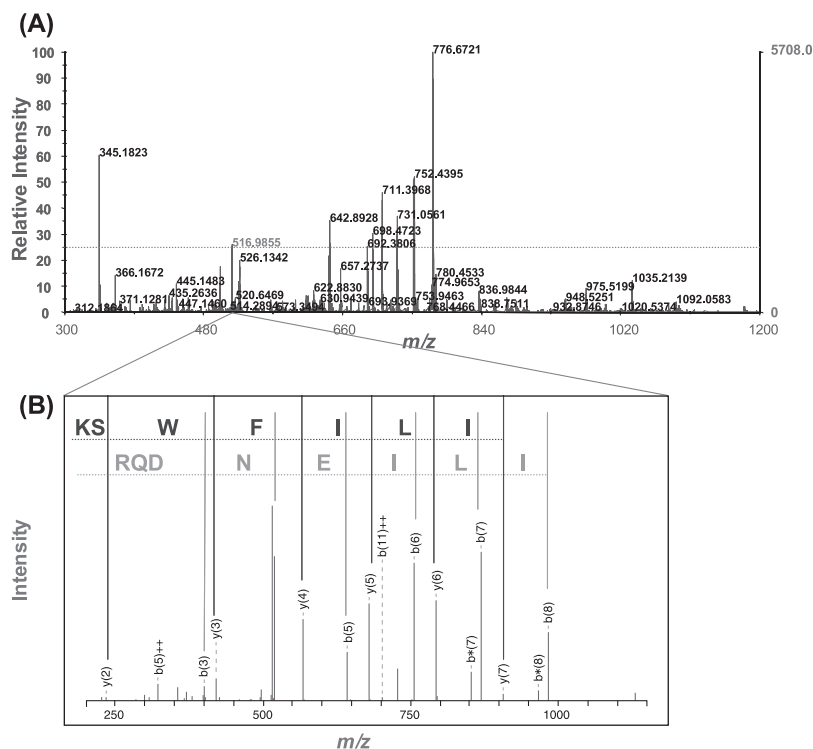


Fig. 5. Identification of CRP from the artificial patient serum using IBA.

(A) Representative MS spectrum of the artificial patient serum. A peak of m/z 516.9855 indicates the peptide ion derived from CRP. The ions having higher intensities than m/z 516.9855 (the peaks higher than the dotted line) are efficiently excluded from the following MS/MS measurements by IBA. (B) MS/MS spectrum of the peptide ion derived from CRP identified on the second run of IBA. The sequence and score was RQDNEILIFWSK and 40, respectively. Another peptide (ESDTSYVSLK) was also identified at the score of 49 (data not shown).

である。CRP 由来のプリカーサーイオンは m/z 516.9855 のピークとして示されている (Fig. 5 (A)). また、点線は同ピークの信号強度を示す。MS/MS 測定はプリカーサーイオンの信号強度順に行われるため、IBA を用いない場合は、点線よりも信号強度の高いピークに由来するタンパク質を予め試料から除去等しない限り、CRP 由来プリカーサーイオンの MS/MS 測定には至らないことを示唆しており、結果的に CRP は同定できないことになる。一方、IBA を用いることで 1 サイクル目の登録情報に由来するピークを測定対象から除外することが可能となり、2 サイクル目で CRP 由来プリカーサーイオンの MS/MS 測定に至ったと考えられる (Fig. 5 (B)).

3. MS 前処理のための反応ユニット

生体由来の複雑な試料に含まれているタンパク質を MS で解析する場合、目的や試料等に応じて前処理を行う必要がある。例えば、酵素消化やアフィニティー精製による目的成分の濃縮回収等が挙げられる。このことは、MS 測定プロセス全体の効率化や安定化を図るためには、高性能な MS の開発だけでなく、導入する試料の調製技術の向上も必要となることを示唆している。そこで、NanoFrontier LD の開発と並行して、試料調製を簡便に効率化するための小型の反応ユニットを開発した (Fig. 6).

同ユニットは、ユニークなタンパク質固定化技術 (ProLinker™) をスライドガラス表面にコートしたプロテインアレイ基板 (ProteoChip™)⁷⁾、基板上に反応槽を形成させるための polydimethylsiloxane (PDMS) チップ、両者を固定するためのホルダー、反応溶液攪拌のための振動モーター

を取り付けた振動ユニットで構成される。そして、ProteoChip™ 表面にトリプシン等の消化酵素を固定化することで固定化酵素処理ユニット、抗体等を固定化することでアフィニティー精製ユニットとして使用することが可能である。同ユニットは単体で取り扱えるため、様々な用途に応用可能である。

ProLinker™ を介したタンパク質固定の利点は、目的タンパク質を高密度かつ配向性良く簡便に固定化できるとともに、固定化したタンパク質が容易に剥離しないことにある。したがって、酵素消化やアフィニティー精製後の産物に固定化したタンパク質の混入が抑えられ、測定結果に支障を来たすことがない。

3.1. 酵素消化

ProteoChip™ 表面にプロテアーゼを固定化し、反応ユニットを用いてウシ血清アルブミン (BSA) を消化した (Fig. 7 (A)). 消化産物は逆相カラムクロマトグラフィーに供試し、クロマトグラム上の未消化ピーク面積の経時変化から消化の割合を求めた。その結果、BSA 未消化ピーク的面積がコントロールと比較して 90% 以上減少するのに要する時間は、トリプシンで 20 min 以内、キモトリプシンで 10 min 以内、エンドプロテイナーゼ Arg-C (ArgC) で 60 min 以内であり (Fig. 7 (B)), 一般的な終夜にかけての液相バッチ処理における消化に比べて大幅に時間短縮が可能となった。また、反応ユニットおよび液相バッチ処理で各々 1 hr かけて BSA をトリプシン消化し、得られた消化物を MS に供試して同定結果を比較したところ、常法に対して反応ユニットを用いた場合はカバー率、スコア値、ペプチド数と

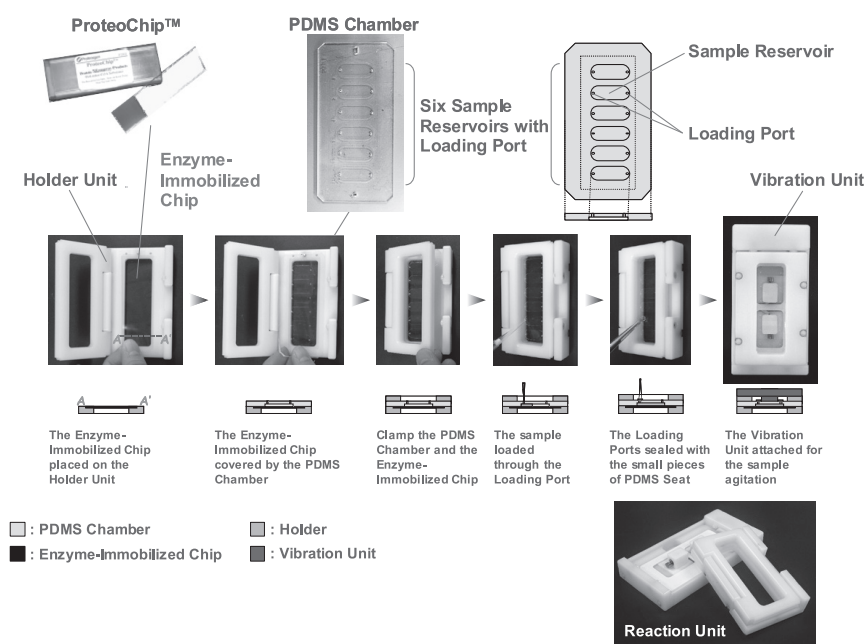


Fig. 6. Schematic diagram of the reaction unit.

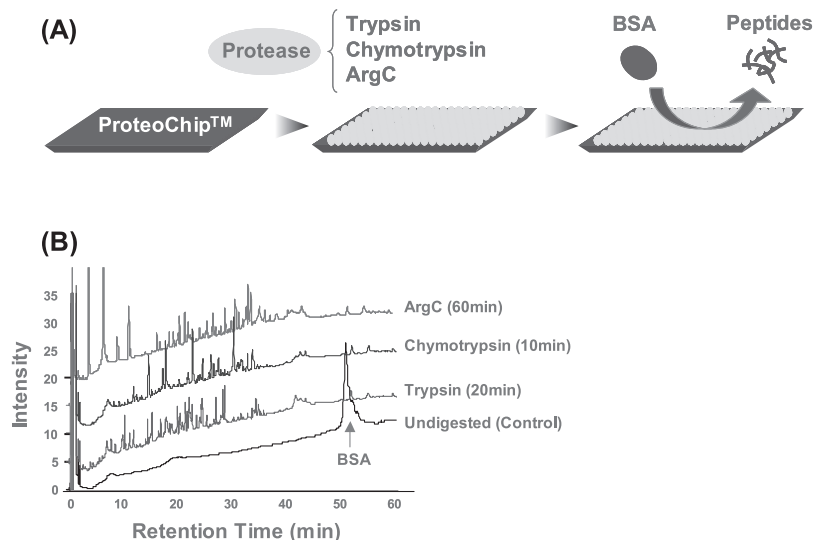


Fig. 7. Immobilized protease digestion.

(A) Schematic diagram of the process.
 (B) Chromatogram of the digested product. BSA was digested completely by the immobilized ArgC, chymotrypsin, and trypsin, within 60 min, 10 min, and 20 min, respectively.

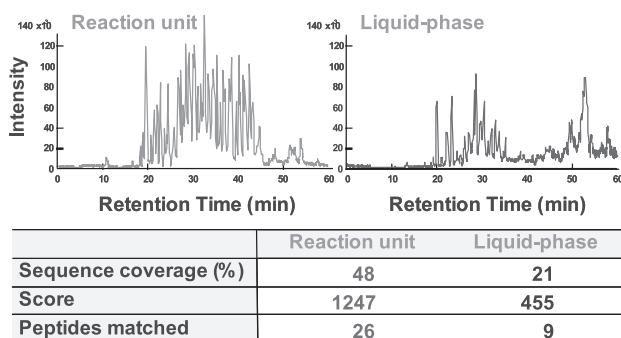


Fig. 8. Comparison of the tryptic digestion performance.

Tryptic digestion performance between the reaction unit and the conventional liquid-phase method was compared. Both digestion was done for 1hr. Each of the reaction product was analyzed, respectively, and sequence coverage, score, matched peptide numbers were determined.

もに優位であった (Fig. 8).

タンパク質の翻訳後修飾の一つに糖鎖が挙げられる。糖鎖の構造解析を行うためには、糖タンパク質をペプチドにした後に糖鎖を遊離する必要がある。通常、タンパク質消化と糖鎖遊離は個別に行われるため、酵素処理だけで2日以上の時間と労力がかかる。そこで、このプロセスに必要なトリプシンとグリコペプチダーゼFを同時に ProteoChip™ 表面に固定化し、反応ユニットを用いて、糖タンパク質試料として市販のヒト由来 IgG 標品のタンパク質消化と糖鎖遊離を一括して行った (Fig. 9 (A))。消化産物を LC に供試した結果、ペプチドおよび遊離糖鎖を示すクロマトグラムが各々得られるとともに (Fig. 9 (B) および (D))、MS に供試した後に MASCOT 検索したところ、各種ヒト由来

IgG が同定された (Fig. 9 (C))。このことは、反応ユニットを用いた複数酵素の一括処理が有効であることを示している。

以上の実験は、いずれも試料調製から MS 測定までを1日のうちに完了させることが可能であり、反応ユニットにより安定高速消化を実現できる可能性が示された。また、消化効率の向上により、消化し難い試料や変性条件下における消化等への応用が期待される。

3.2. 相互作用解析

ProteoChip™ 上で目的タンパク質に相互作用するタンパク質を捕捉するためには、目的タンパク質をその構造および機能を保持した状態で固定化する必要がある。そこで、目的タンパク質として大腸菌由来 Direct Oxygen Sensor タンパク質 (*EcDOS*) を適用し、そのヒスチジンタグ (His-Tag) 融合体を ProteoChip™ 上に予め固定化した抗 His-Tag 抗体を介して固定することで、*EcDOS* が有する諸性質を維持した状態で固定できる手法を確立した^{8,9)}。同手法で固定化した *EcDOS* に大腸菌ライセートを供試し、特異的に相互作用したタンパク質を回収後、Far Western Blotting 法で検出した *EcDOS* に直接相互作用するタンパク質を MS 測定した (Fig. 10)。その結果、新規の相互作用分子であるグルコン酸オペロン転写抑制因子 (*GntR*) を同定し、その作用機序を推定した (Fig. 11 (A) (B))¹⁰⁾。

このことは、特に解析対象を絞ったプロテオミクスを行うためには MS の性能向上だけでなく、解析目的に合わせた前処理手法の確立が重要であることを示唆している。

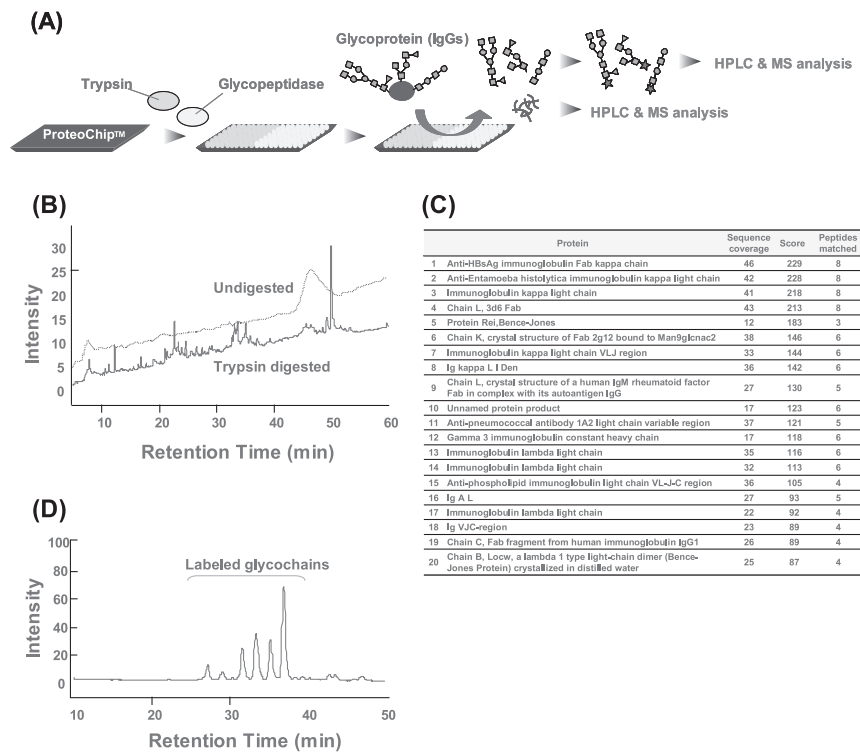


Fig. 9. Multiplexed digestion by immobilized trypsin and glycopeptidase.

(A) A schematic diagram of the multiplexed digestion. Trypsin and glycopeptidase F were immobilized on the ProteoChip simultaneously, and IgG was applied as a substrate glycoprotein.

(B) The portion of the reaction product was applied to the reverse-phase liquid chromatography. The chromatogram represents the incidence of the peptides.

(C) List of the high scored 20 proteins identified by MS analysis. Series of the human IgGs were identified.

(D) Another portion of the reaction product was labeled with 4-aminobenzoic octyl ester (ABOE), and the ABOE-labeled glycochains were applied to the reverse-phase liquid chromatography. The chromatogram represents the incidence of the labeled glycochains.

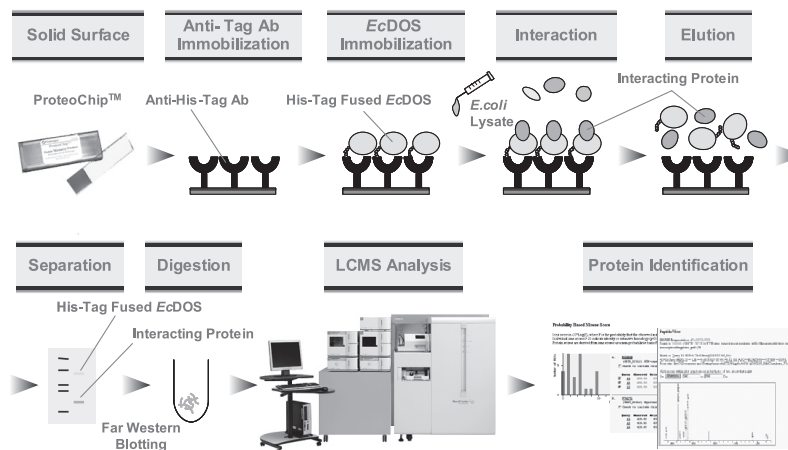
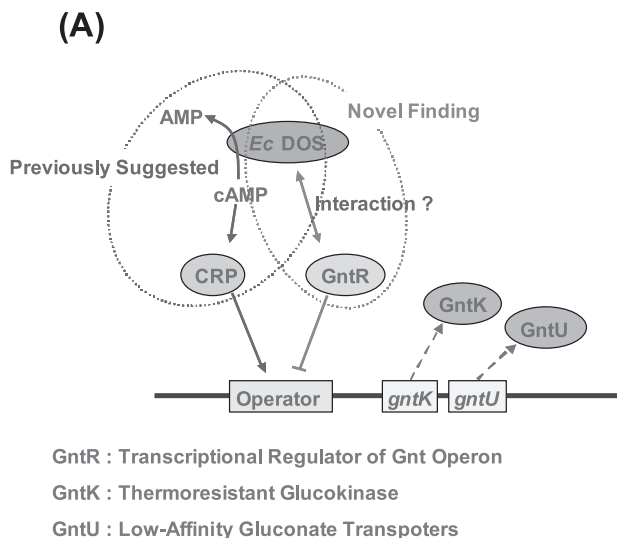


Fig. 10. Preparation of the interacting protein(s) of *EcDOS*.

A schematic diagram was presented. *EcDOS* was prepared as a His-tag fusion protein, and immobilized as an intact form on the ProteoChip™ via pre-immobilized anti-His-tag antibody. The interacting protein(s) in the *E. coli* lysate was captured on the substrate specifically, and eluted. The eluate was applied to SDS-PAGE to separate the recovered proteins, and the directly interacting protein was determined by far western blotting. The SDS-PAGE band corresponding to the directly interacting protein was in-gel digested and analyzed. As a result, the protein was GntR.



(B)

	GntK Activity (nM/min/mg)*
Wild Type	54 ± 3
<i>EcDOS</i> Knock-out	146 ± 35

*: NADPH production per min per mg of total cellular protein

Fig. 11. Biochemical estimation of the interaction of *EcDOS* and GntR.

(A) The biochemical relationship between *EcDOS* and GntR was estimated.

(B) To confirm the estimation, the GntR activity was determined by measuring the GntK activity. The GntK activity between the *EcDOS* knock-out strain and wild-type strain indicates the existence of the *EcDOS* suppresses the GntK activity, suggesting the interaction of *EcDOS* and GntR.

4. おわりに

プロテオミクスの解析対象は多種多様となっている。これからは、タンパク質を消化処理なしにそのまま解析するトップダウンプロテオミクスに向け、Electron Capture Dissociation (ECD: 電子捕獲解離) のような新規イオン解離法や、フォーカストプロテオミクスのための解析対象に適した前処理手法の充実が望まれる。

なお、本稿は株式会社日立ハイテクノロジーズ技師である緒方いずみ、師子鹿司、大和田章、吉岡信二、笹倉由貴江らの協力のもと執筆に至った。

- 1) Deguchi K, Ito S, Yoshioka S, Ogata I, Takeda A. Nano-flow gradient generator for capillary high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* 2004;76(5):1524–1528.
- 2) 出口喜三郎, 伊藤伸也, 吉岡信二, 緒方いずみ. ナノ高速液体クロマトグラフィー・質量分析法のナノ流量グラジエント装置の開発. *日立評論* 2004;86(10):59–62.
- 3) Hashimoto Y, Waki I, Yoshinari K, Shishika T, Terui Y. Orthogonal trap time-of-flight mass spectrometer using a collisional damping chamber. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19(2):221–226.
- 4) Yokosuka T, Yoshinari K, Kobayashi K, Ohtake A, Hirabayashi A, Hashimoto Y, Waki I, Takao T. Information Based Acquisition (IBA) Technique with an IonTrap/Time-of-Flight mass spectrometer for high-throughput and reliable protein profiling. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20(17):2589–2595.
- 5) Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(11):845–867.
- 6) Vlahou A, Fountoulakis M. Proteomic approaches in the search for disease biomarkers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;814(1):11–19.
- 7) Lee Y, Lee EK, Cho YW, Matsui T, Kang IC, Kim TS, Han MH. ProteoChip: A highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies. *Proteomics* 2003;3(12):2289–2304.
- 8) Sasakura Y, Kanda K, Yoshimura-Suzuki T, Matsui T, Fukuzono S, Han MH, Shimizu T. Protein microarray system for detecting protein-protein interactions using an anti-his-tag antibody and fluorescence scanning: effects of the heme redox state on protein-protein interactions of heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli*. *Anal Chem* 2004;76(22):6521–6527.
- 9) Sasakura Y, Kanda K, Yoshimura-Suzuki T, Matsui T, Fukuzono S, Shimizu T. Investigation of the relationship between protein-protein interaction and catalytic activity of a heme-regulated phosphodiesterase from *Escherichia coli* (*EcDOS*) by protein microarray. *Biochemistry* 2005;44(28):9598–9605.
- 10) Tong S, Porco A, Isturiz T, Conway T. Cloning and molecular genetic characterization of the *Escherichia coli* gntR, gntK, and gntU genes of GntI, the main system for gluconate metabolism. *J Bacteriol* 1996;178(11):3260–3269.