

〔特集：タンパク質分析のための最新質量分析装置〕

MUDPIT を用いた血漿タンパク質のプロテオーム解析

瀬崎浩史・福永清信

SUMMARY

The mass spectrometry (MS) has been a mainstay of proteomics and metabolomics research in these days. In a field such as biomarker research, more stringent accuracy and sensitivity on MS are demanded to identify very low abundant proteins in human plasma. It is essentially needed to deplete high abundant proteins from complex human plasma but with the least no specific binding to the target proteins which is a kind of contradictory difficulty. Two dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS PAGE) has its limitation in pH range and molecular weight to some extent and is not able to yield high through put in sample preparation. Further more conventional nano electrospray ionization (ESI) technology which is the most appropriate to analyze such low abundant proteins needs frequent adjustment for ionization.

The multi dimensional protein identification technology using two dimensional high performance liquid chromatography (HPLC) technology followed by HPLC chip MS analysis can substitute 2D SDS PAGE and conventional nano ESI ionization to realize more sensitive, more accurate, ease of use and high through put analysis for proteomics and metabolomics research. And also multi affinity removal system followed by OFFGEL Fractionator make it possible to deplete high abundant proteins from complex human plasma with the least no specific binding to very low abundant target proteins and separate the mixture of such target proteins in prior to applying them to mass spectrometry. Agilent Technologies Inc developed such total analysis system from sample preparation down to biomarker search software.

Key words: Proteome, MUDPIT (multidimensional protein identification technology), MARS (multiple affinity removal system), OFFGEL Fractionator, HPLC-Chip.

はじめに

プロテオミクス・メタボロミクスにおける解析技術の中心には質量分析法 (MS) が存在し, その中でも Nanoflow LC/MS を使用することによって, 高感度で網羅的にタンパク質を同定することが可能になった。

ライフサイエンスの分野で Nanoflow LC/MS を使用する必要がある理由として, 第 1 に Nanoflow LC/MS では超低流速 (nL/min) を使用することによりイオン化効率が向上し, その結果 S/N 値が向上する。第 2 に内径の細かいカラムを使用することができるため, 感度が向上し試料の微量化が可能になる。一般的なカラム (内径: 4.6 mm) に対して

ナノカラム (内径: 0.075 mm) では 3700 倍の相対的な感度上昇が見られた^{1~2)}。

また, 疾患研究や臨床診断において個々の患者の病気の進行によって発現するタンパク質の発見や, 疾患に関係したタンパク質を制御する薬剤開発のための治療ターゲット分子の探索など, プロテオミクス・メタボロミクスによるバイオマーカーの探索を通じて, 将来的に医療につながる応用例が開発されている。

本稿では, 効率的な前処理技術と高感度 Nanoflow LC/MS を用いて血漿中タンパク質の網羅的な解析例を紹介する。

Proteomics of plasma protein by MUDPIT.

Hiroshi Sezaki, Kiyonobu Fukunaga; アジレント・テクノロジー株式会社

Correspondence address: Hiroshi Sezaki; 9-1 Takakura-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192-8510, Japan.

(受付 2006 年 11 月 8 日, 受理 2007 年 1 月 25 日, 刊行 2007 年 3 月 15 日)

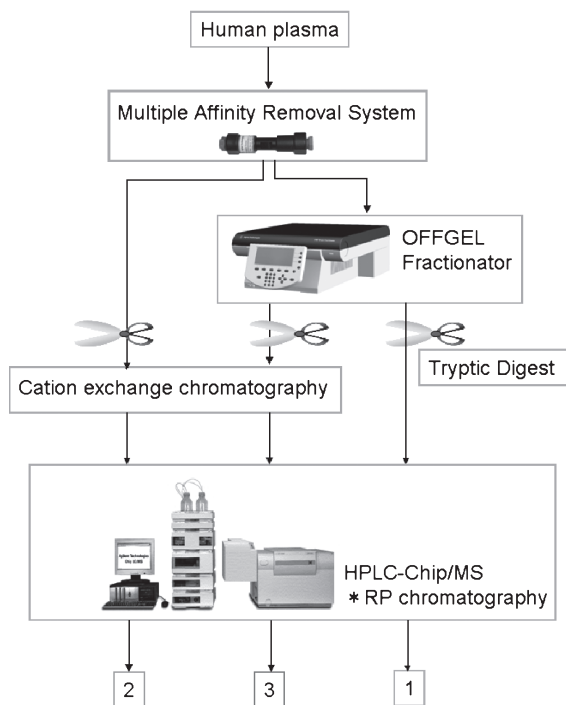


Fig. 1. An online of MDPIT.

多次元タンパク質同定法

(Multidimensional protein identification technology)

2001年に Washburn ら³⁾は、複雑な生体試料の酵素消化物をイオン交換カラムと逆相カラムを使用して分離しペプチドおよびタンパク質の同定率を向上させる手法を開発し、Multidimensional protein identification technology (MUDPIT: 多次元タンパク質同定法)と名づけた。Agilent Technologies は Fig. 1 に示すタンパク質の前処理を含めた分離法、多次元タンパク質同定法で血清中タンパク質のプロテオーム解析を行った。

1. Multiple Affinity Removal System (MARS)

血漿中のバイオマーカー探索を行う上で問題となるのが Albumin や IgG のような血漿中に大量に含まれているタンパク質である。これらの既知の高含量タンパク質は血漿中の約 90% を占めている⁴⁾。これらのタンパク質により血漿中に含まれる微量タンパク質の同定が困難となっている。そこで Agilent Technologies では高含量タンパク質のうち 7 種類のタンパク質 (Albumin, IgG, IgA, Transferrin, Haptoglobin, Antitrypsin, Fibrinogen) を除去する MARS (multiple affinity removal system) カラムを用いて前処理を行った (Fig. 1)。MARS カラムを用いた LC の条件は Table 1 に示す。この条件により分離したクロマトグラムは Fig. 2-A に示し、そこで得られたピークを SDS-PAGE にて確認した (Fig. 2-B)。ピーク 2 からは 7 種類の高含量タンパク質のバンドパターンが得られ、ピーク 1 のバンドパターンからはそれらのバ

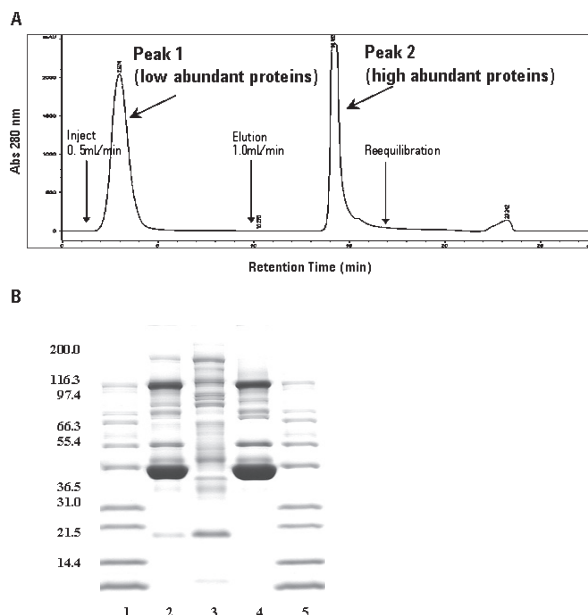


Fig. 2. Multiple affinity removal system.

A: Representative chromatogram of 4.6×100 mm column.
 B: SDS-PAGE of human serum. Lane 1, 5: marker protein, Lane 2: human serum, Lane 3: peak 1 (low abundant Protein), Lane 4: peak 2 (high abundant Protein).

Table 1. LC method for 4.6×100 mm column

| | | | | |
|--|------------|--------------------------|-----------|--------------|
| Solvent A: Buffer A | | Pressure limits: 120 bar | | |
| Solvent B: Buffer B | | | | |
| LC timetable | | | | |
| | Time (min) | %B | Flow rate | Max pressure |
| 1 | 0.00 | 0.00 | 0.500 | 120 |
| 2 | 10.00 | 0.00 | 0.500 | 120 |
| 3 | 10.01 | 100.00 | 1.000 | 120 |
| 4 | 17.00 | 100.00 | 1.000 | 120 |
| 5 | 17.01 | 0.00 | 1.000 | 120 |
| 6 | 28.00 | 0.00 | 1.000 | 120 |
| Run Time: 30 min | | | | |
| Sample: Dilute human serum 5 times | | | | |
| (for example: 30 uL human serum with 120 uL of Buffer A) | | | | |

ンドが確認されないことから効率よく 7 種類のタンパク質が除去されたことが示された。さらに、非特異的吸着を抑えた手法をとっているため血漿中の微量タンパク質の損失を防いでいる。この結果、血漿中の約 85% のタンパク質が除去された。

2. Agilent 3100 OFFGEL Fractionator

MARS カラムで 7 種類のタンパク質を除去した試料を用い Agilent 3100 OFFGEL Fractionator を用いてタンパク質の分画を行った。Agilent 3100 OFFGEL Fractionator は^{5~8)}、高い分離能で実績がある IPG (Immobilized pH-gradient gel) ゲルを分離ベースにして、分離された試料は液層の画分として回収される (Fig. 3-A)。IPG ゲルは pH 4-7 と pH 3-10

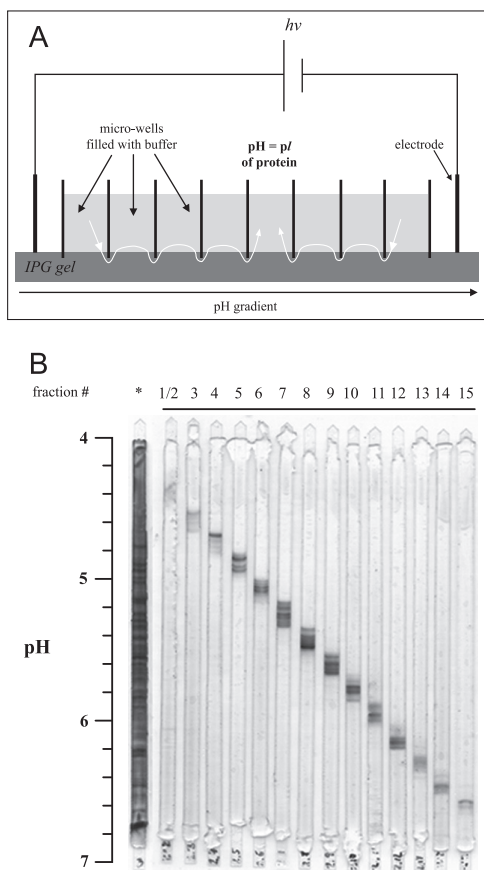


Fig. 3. Agilent 3100 OFFGEL Fractionator.

A: Principle of off-gel isoelectric focussing.
 B: Off-gel electrophoresis. *E. coli* lysate was fractionated by OGE and protein fractions were loaded on IPG strips. Strips were coomassie stained after IEF.

でそれぞれ low resolution と high resolution (0.1/0.5 pH) の計 4 種類のタイプがある。また分画は 12 または 24 画分に分画できる。その時の例を Fig. 3-B に示す。今回の測定には pH 4-7 の IPG ゲルを使用した。

3. Multidimensional Protein Identification Technology (MUDPIT)

MUDPIT は、イオン交換カラムと逆相カラムを使用した二次元 HPLC を基本としている。MUDPIT には Offline Mode と Online Mode がある。Offline Mode はイオン交換カラムクロマトグラフィーの溶出方法としてグラジエント溶出を行い、フラクションコレクターを使って一旦分取した各フラクションを逆相カラムで分離し、MS で解析する手法である。Online Mode はイオン交換カラムクロマトグラフィーの溶出方法としてステップワイズ溶出を行い、直接逆相カラムで分離し、MS で解析する手法である。

4. SCX カラムクロマトグラフィー

分画したタンパク質は、トリプシン消化を行った。そこ

Table 2. LC method (SCX chromatography)

Solvent A: 0.1% Formic acid/5% Acetonitrile
 Solvent B: 0.1% Formic acid/5% Acetonitrile/500 mM KCl

| LC Timetable | | |
|--------------|------------|--------|
| | Time (min) | %B |
| 1 | 0.00 | 0.00 |
| 2 | 5.00 | 0.00 |
| 3 | 8.00 | 10.00 |
| 4 | 18.00 | 15.00 |
| 5 | 29.00 | 70.00 |
| 6 | 32.00 | 100.00 |
| 7 | 38.00 | 100.00 |
| 8 | 38.01 | 0.00 |

Flow rate: 20 uL/min
 Run time: 45 min

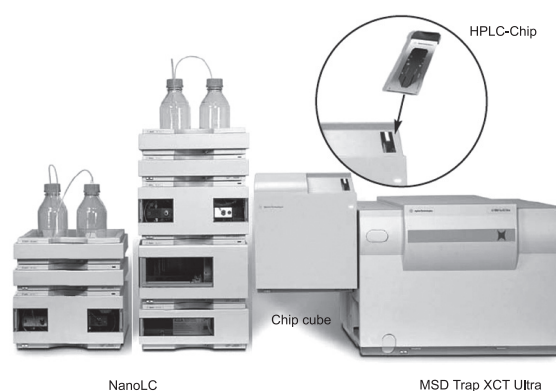


Fig. 4. Agilent HPLC-Chip/MS Protein ID solution system.

で得られたペプチド群は Agilent BioSCX series2 を使って Offline Mode の陽イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。その時の LC の条件は Table 2 に示す。

5. Nanoflow HPLC/MS システム

Agilent Nanoflow LC/MS システムは、HPLC-Chip を使用した Agilent HPLC-Chip/MS プロテイン ID ソリューションシステムで、その構成は、Fig. 4 に示す。ナノフロー HPLC システム、HPLC-Chip、HPLC-Chip キューブインターフェイス (NanoESI ソース)、MSD Trap XCT Ultra とそれらを制御する ChemStation Software (PC) からなる。

HPLC-Chip

HPLC-Chip は濃縮カラム、分析カラム、ナノスプレーチップを一体化したデバイスである (Fig. 5)。

デバイス化したことにより 4 つの利点が得られた。第 1 にこれまでは Fig. 5 に示すような濃縮カラム、分析カラム、ナノスプレーチップとそれらを結ぶチューブ類を自分で接続・調整する必要があったが、その面倒な接続・調整が不要になった。第 2 に接続部分からの液漏れの心配がなくなった。第 3 にこれが一番大きなメリットであるが流路の短縮によってデッドボリュームが減少することにより分離能が

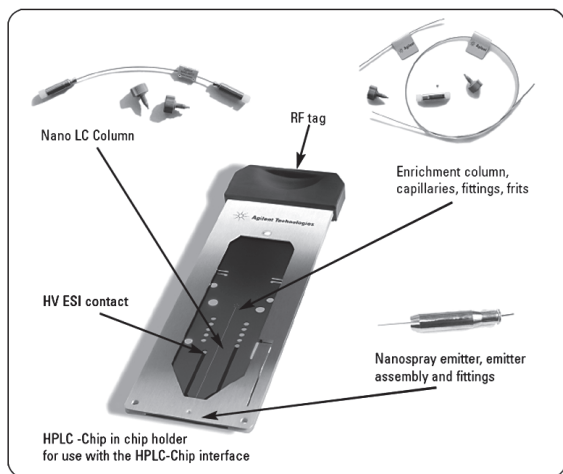


Fig. 5. HPLC-Chip.

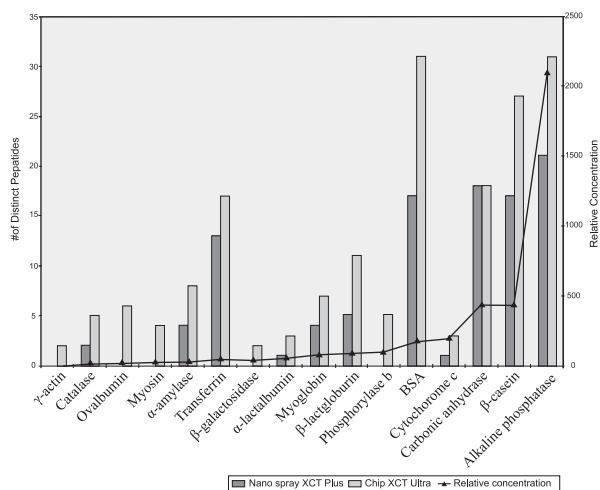


Fig. 6. Comparison of HPLC-Chip XCT Ultra and Nano-XCT Plus.

The numbers of identification were compared by using 16 kinds of proteins. HPLC-Chip/MS XCT Ultra system found all proteins. Nano-XCT Plus system found 11 of the 16 proteins.

改善され、測定時間も短縮された。第4に HPLCchip を挿入するだけで測定ができ、スプレーの位置調整が不要になった。このように HPLC-Chip は手軽に Nanoflow LC/MS を使えるようにするツールである。

Agilent LC/MSD Trap XCT Ultra

Agilent LC/MSD Trap XCT Ultra は従来の Agilent LC/MSD Trap XCT と比較して Cycle time が 4 倍に向上した。Cycle time は 1MS-1MS/MS を 1 Cycle としたときの 1 秒間の回数であり、これが早くなったことから 1 回の測定で得られる MS/MS スペクトルの数が増加し、この HPLC-Chip と Agilent LC/MSD Trap XCT Ultra を用いることによりタンパク質・ペプチドの同定数が増加した (Fig. 6)^{9~19)}。今回の分析では複数の条件を用いて測定を行った。その一例を Table 3 に示す。

Table 3. Method of HPLC Chip/MS

| | | |
|--|-------|-------|
| LC method | | |
| Solvent A: 0.1% Formic acid/H ₂ O | | |
| Solvent B: 0.1% Formic acid/Acetonitrile | | |
| Pressure Limits: 150 bar | | |
| LC Timetable | | |
| Time (min) | %B | |
| 1 | 0.00 | 3.00 |
| 2 | 30.00 | 60.00 |
| 3 | 30.01 | 80.00 |
| 4 | 40.00 | 80.00 |
| 5 | 40.01 | 3.00 |
| Flow rate: 0.3 uL/min | | |
| Run time: 45 min | | |
| MS condition | | |
| Drying gas: 3 L/min, 325 °C | | |
| V cap: 2300 V | | |
| Skim 1: 30 V | | |
| Capillary exit: 75 V | | |
| Trap drive: 85 | | |
| Averages: 2 | | |
| ICC: On | | |
| Max. accumulation time: 150 ms | | |
| Smart target: 500,000 | | |
| MS scan range: 300-1800 | | |

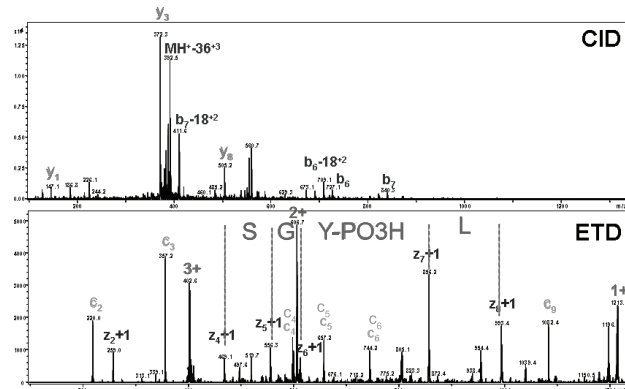


Fig. 7. Identification of phosphorylated peptide.

MS/MS spectrum of phosphorylated peptide (TThyGSLPQK) was compared with CID and ETD.

更に翻訳後修飾の研究において有効な ETD (Electron Transfer Dissociation) を搭載している。ETD は、電子をペプチドに与え C, Z 系列でフラグメンテーションを起こす方法で、CID と比較して MS/MS スペクトルが改善される共に 1/3 cut off がない。ETD を用い MS/MS 解析を行うことにより翻訳後修飾の中でもリン酸化を解析するのに有効な方法である。CID と ETD のスペクトルを Fig. 7 に示す。

6. MS データ解析ソフト

Agilent Spectrum Mill work bench

HPLC-Chip/MS で得られた分析データを、Agilent Spectrum Mill work bench を用いてタンパク質の同定を行った。Agilent Spectrum Mill work bench は、複数の分析データ群

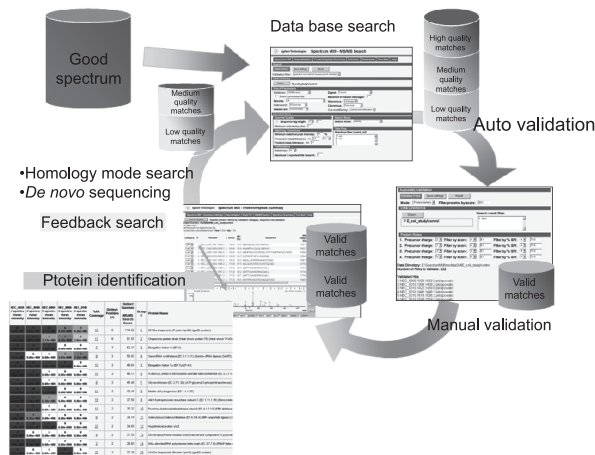


Fig. 8. Spectrum Mill workflow.

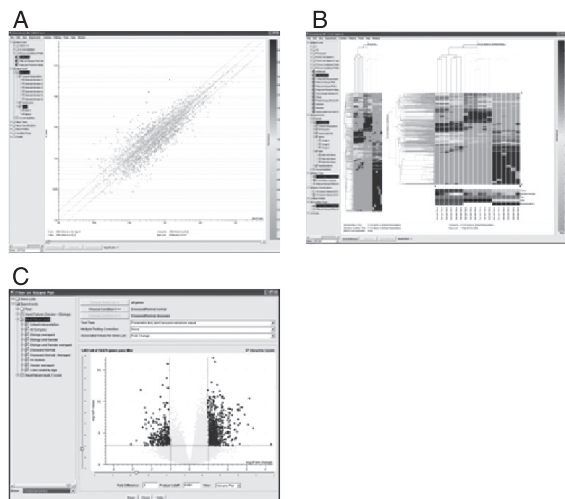


Fig. 9. GeneSpring MS.

A: Differential analysis, B: Tree clustering analysis, C: Volcano plots analysis.

を同時に解析できる。その MS/MS スペクトルの中から良質の MS/MS スペクトルだけを抽出し、解析することにより解析時間が短縮される。また、オートバリデーション機能や Fwd-Rev Score, Rank 1-2 Score といった同定結果の検証機能を使うことにより正確な同定結果が得られる。さらに複数の分析データ群を同時に解析した結果を使ってペプチドの感度を比較し相対定量することができる (Fig. 8)。今回の解析には、データベースとして Swiss Prot を使用した。

GeneSpring MS

プロテオミクス・メタボロミクスにおいて、バイオマーカー探索をする上で 2D-GE を使用したデファレンシャル解析が行われている。GeneSpring MS は DNA の発現データの解析ソフトとして定評のある GeneSpring GX をベースに設計されていて、MS データを用いてデファレンシャル解析を行い、データの視覚化と統計解析ツール (ANOVA や t-test, 主成分分析 (PCA), 階層クラスタリング, 自己組織

Table 4. Number of proteins and peptides identified with MUDPIT

| | OGE Fract. | SCX Fract. | RP Runs | RP Time (min) | Protein ID | Peptide ID |
|-------|------------|------------|---------|---------------|------------|------------|
| 1a | 13 | — | 13 | 45 | 55 | 365 |
| 1e | 13 | — | 13 | 165 | 89 | 684 |
| 2a | — | 12 | 12 | 45 | 46 | 252 |
| 2b | — | 24 | 24 | 45 | 67 | 400 |
| 2c | — | 67 | 67 | 45 | 118 | 632 |
| 2d | — | 67 | 67 | 180 | 223 | 985 |
| 3a | 12 | 24 | 288 | 45 | 504 | 2706 |
| 3b | 12 | 24 | 288 | 90 | 818 | 3228 |
| Total | | | 772 | | 1836 | 7257 |

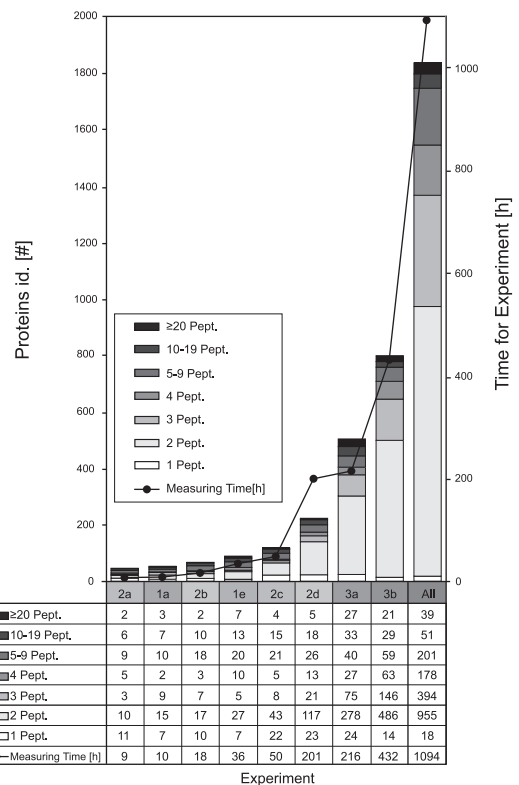


Fig. 10. Number of identified peptides for individual experiments and analysis time.

化マップ (SOM), QT クラスタリング, SVM などのクラスプレディクション機能と 3 群以上の主成分解析) を用いて生物学的機能に関係のあるタンパク質や低分子化合物をプロファイリングし、疾患や毒性と関連のあるバイオマーカー探索が効率的にできる解析ソフトである (Fig. 9)。

アプリケーション

Fig. 1 で示された 3 種類の分画方法を用いてタンパク質の同定を行い、それぞれのタンパク質同定数を比較した (Table 4)。

分析 1 は MARS 処理後、OFFGEL Fractionator でタンパク質を 13 画分に分画した。各画分をそれぞれトリプシン

消化し HPLC-Chip/MS で測定した. データは Agilent Spectrum Mill work bench でタンパク質の同定を行った. HPLC-Chip/MS の測定時間を 1a: 45 分と 1e: 165 分とした. 分析 2 は MARS 処理後, トリプシン消化した. そのトリプシン消化物を SCX カラムクロマトグラフィーにより 2a: 12, 2b: 24, 2c と 2d: 67 にそれぞれ分画した. 各画分は HPLC-Chip/MS で測定し, Agilent Spectrum Mill work bench でタンパク質の同定を行った. HPLC-Chip/MS の測定時間を 45 分 (2a-2c) と 180 分 (2d) とした. 分析 3 は MARS 処理後, OFFGEL Fractionator でタンパク質を 12 画分に分画した. 各画分をそれぞれトリプシン消化し, そのトリプシン消化物を SCX カラムクロマトグラフィーにより 24 画分に分画した. 各画分は HPLC-Chip/MS で測定し, Agilent Spectrum Mill work bench でタンパク質の同定を行った. HPLC-Chip/MS の測

定時間を 45 分 (3a) と 90 分 (3b) とした.

各測定結果から, 同定できたタンパク質とペプチドの数は Table 4 に示す. また, それぞれの測定において同定できたタンパク質がいくつのペプチドによって同定されたかを比較したものを Fig. 10 に示す.

各測定結果のうち 2d (SCX+HPLC-Chip/MS) と 3a (OGE+SCX+HPLC-Chip/MS) を比較すると 2d からは 985 種類のペプチドと 223 種類のタンパク質が同定された. 一方 3a からは 2706 種類のペプチドと 504 種類のタンパク質が同定された. この結果より 3a において新たに 1721 種類のペプチドが同定され, それに伴いタンパク質も新たに 281 種類同定された. その上昇率はペプチドが 175%, タンパク質は 126% であった.

さらに, Fig. 10 より 2d と 3a で同定できたタンパク質は

Table 5. Top 50 proteins identified with the combined experiment.

hit table read Spec Features read Files:78141 Hits: 13449
protein groups ready for display 1671 Proteins listed

| Group (#) | Spectra (#) | Distinct Summed | %AA Coverage | Mean Peptide | Protein MW (Da) | Database Accession # | Species | Entry_name | |
|-----------|-------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------|---------|---|--|
| | | MS/MS search | Spectral | | | | | | |
| | | Score | Intensity | | | | | | |
| 1 | 4145 | 2321.32 | 83 | 6.63e+007 | 187165.1 | P01024 | HUMAN | Complement C3 precursor [Contains: C3a anaphylatox | |
| 2 | 4707 | 1830.73 | 72 | 7.78e+007 | 163278.8 | P01023 | HUMAN | Alpha-2-macroglobulin precursor (Alpha-2-M). | |
| 3 | 1890 | 1198.49 | 69 | 1.56e+008 | 122205.8 | P00450 | HUMAN | Ceruloplasmin precursor (EC 1.16.3.1) (Ferroxidass | |
| 4 | 300 | 1189.98 | 25 | 1.76e+007 | 515565.2 | P04114 | HUMAN | Apolipoprotein B.100 precursor (Apo B.100) [Contai | |
| 5 | 958 | 1178.45 | 49 | 7.30e+007 | 192772.5 | P01028 | HUMAN | Complement C4 precursor [Contains: C4A anaphylatox | |
| 6 | 739 | 991.78 | 59 | 9.64e+007 | 139126.3 | P08603 | HUMAN | Complement factor H precursor (H factor 1). | |
| 7 | 5653 | 898.08 | 92 | 4.35e+008 | 30778.0 | P02647 | HUMAN | Apolipoprotein A-I precursor (Apo-AI). | |
| 8 | 539 | 837.56 | 78 | 1.60e+008 | 45371.3 | P06727 | HUMAN | Apolipoprotein A-IV precursor (Apo-AIV). | |
| 9 | 632 | 763.49 | 59 | 5.68e+007 | 103358.9 | Q14624 | HUMAN | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 precu | |
| 10 | 1115 | 759.06 | 85 | 2.60e+008 | 52964.0 | P02774 | HUMAN | Vitamin D-binding protein precursor (DBP) (Group-e) | |
| 11 | 706 | 742.37 | 65 | 6.71e+007 | 70037.3 | P00734 | HUMAN | Prothrombin precursor (EC 3.4.21.5) (Coagulation f | |
| 12 | 264 | 726.42 | 32 | 3.06e+007 | 262607.9 | P02751 | HUMAN | Fibronectin precursor (FN) (Cold-insoluble globuli | |
| 13 | 304 | 606.71 | 55 | 5.68e+007 | 85533.4 | P00751 | HUMAN | Complement factor B precursor (EC 3.4.21.47) (C3/C | |
| 14 | 1310 | 602.56 | 81 | 2.25e+008 | 51511.9 | P02679 | HUMAN | Fibrinogen gamma chain precursor (PRO2061). | |
| 15 | 579 | 594.62 | 66 | 8.99e+007 | 55928.5 | P02675 | HUMAN | Fibrinogen beta chain precursor [Contains: Fibrino | |
| 16 | 1563 | 589.67 | 75 | 2.45e+008 | 51676.7 | P02790 | HUMAN | Hemopexin precursor (Beta-1B-glycoprotein). | |
| 17 | 320 | 579.40 | 61 | 8.14e+007 | 69069.6 | P43652 | HUMAN | Afamin precursor (Alpha-albumin) (Alpha-Alb). | |
| 18 | 160 | 558.51 | 28 | 4.18e+007 | 188332.4 | P01031 | HUMAN | Complement C5 precursor [Contains: C5a anaphylatox | |
| 19 | 733 | 555.35 | 39 | 6.34e+007 | 106437.0 | P19823 | HUMAN | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 precu | |

Table 5. continued

hit table read Spec Features read Files:78141 Hits: 13449

protein groups ready for display 1671 Proteins listed

| Group | Spectra | Distinct | %AA | Mean | Protein MW | Database | | |
|-------|---------|--------------|----------|-----------|------------|-------------|--------------|---|
| (#) | (#) | Summed | Coverage | Peptide | (Da) | Accession # | Species | Entry_name |
| | | MS/MS search | | Spectral | | | | |
| | | Score | | Intensity | | | | |
| 20 | 583 | 548.71 | 46 | 8.19e+007 | 94973.5 | P02671 | HUMAN | Fibrinogen alpha/alpha-E chain precursor [Contains |
| 21 | 975 | 541.30 | 64 | 6.62e+007 | 52602.7 | P01008 | HUMAN | Antithrombin-III precursor (ATIII) (PRO0309). |
| 22 | 756 | 519.26 | 39 | 1.09e+008 | 71945.7 | P01042 | HUMAN | Kininogen precursor (Alpha-2-thiol proteinase inhi |
| 23 | 379 | 499.90 | 66 | 3.68e+008 | 51941.0 | 69990 | human | alpha-1-B-glycoprotein |
| 24 | 464 | 461.34 | 43 | 4.46e+007 | 101389.7 | P19827 | HUMAN | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 precu |
| 25 | 168 | 458.23 | 49 | 3.03e+007 | 85697.9 | P06396 | HUMAN | Goloolin precursor. plasma (Actin- depolymerizing f |
| 26 | 489 | 437.05 | 56 | 4.66e+007 | 47651.1 | P01011 | HUMAN | Alpha-1-antichymotrypsin precursor (ACT). |
| 27 | 171 | 432.96 | 55 | 6.38e+007 | 76684.9 | P09871 | HUMAN | Complement C1s component precursor (EC 3.4.21.42) |
| 28 | 164 | 398.90 | 47 | 6.83e+007 | 63173.8 | P02748 | HUMAN | Complement component C9 precursor. |
| 29 | 190 | 391.28 | 54 | 4.36e+007 | 80174.1 | P00736 | HUMAN | Complement C1r component precursor (EC 3.4.21.41). |
| 30 | 492 | 378.74 | 47 | 1.61e+008 | 54305.9 | P04004 | HUMAN | Vitronectin precursor (Serum spreading factor (S. |
| 31 | 244 | 365.20 | 54 | 6.28e+007 | 57070.9 | P05546 | HUMAN | Heparin cofactor II precursor (HC-II) (Protease in |
| 32 | 426 | 351.01 | 42 | 8.33e+007 | 52494.9 | P10909 | HUMAN | Clusterin precursor (Complement-associated protein |
| 33 | 142 | 347.82 | 55 | 7.62e+007 | 62217.3 | 15705411 | Homo sapiens | peptidoglycan recognition protein L precursor |
| 34 | 280 | 343.70 | 78 | 6.30e+007 | 39618.3 | P27169 | HUMAN | Serum paraoxonase/ arylesterase 1 (EC 3.1.1.2) (EC |
| 35 | 73 | 343.44 | 38 | 2.01e+007 | 92375.1 | P80108 | HUMAN | Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase |
| 36 | 105 | 337.77 | 41 | 6.60e+007 | 67033.6 | P04003 | HUMAN | C4b-binding protein alpha chain precursor (C4bp) (|
| 37 | 311 | 331.21 | 56 | 6.61e+007 | 38999.7 | P02760 | HUMAN | AMBP protein precursor [Contains: Alpha-1-microglo |
| 38 | 87 | 326.61 | 42 | 1.84e+007 | 90569.6 | P00747 | HUMAN | Plasminogen precursor (EC 3.4.21.7) [Contains: Ang |
| 39 | 253 | 325.36 | 52 | 4.67e+007 | 46342.5 | P36955 | HUMAN | Pigment epithelium-derived factor precursor (PEDF) |
| 40 | 259 | 320.88 | 38 | 6.43e+007 | 55154.5 | P05155 | HUMAN | Plasma protease C1 inhibitor precursor (C1 Inh) (C |
| 41 | 87 | 306.93 | 42 | 3.68e+007 | 65163.6 | P07357 | HUMAN | Complement component C8 alpha chain precursor. |
| 42 | 133 | 304.15 | 39 | 6.76e+007 | 66035.3 | P35858 | HUMAN | Insulin-like growth factor binding protein complex |
| 43 | 327 | 301.91 | 67 | 8.86e+007 | 38298.4 | P02749 | HUMAN | Beta-2-glycoprotein I precursor (Apolipoprotein H) |
| 44 | 466 | 301.43 | 37 | 6.69e+007 | 53154.5 | P01019 | HUMAN | Angiotensinogen precursor [Contains: Angiotensin I |
| 45 | 265 | 298.40 | 61 | 4.24e+007 | 54566.1 | P08697 | HUMAN | Alpha-2-antiplasmin precursor (Alpha-2-plasmin inh |
| 46 | 64 | 289.71 | 32 | 1.83e+007 | 104844.8 | P13671 | HUMAN | Complement component C6 precursor. |
| 47 | 415 | 279.93 | 61 | 1.00e+008 | 39324.9 | P02765 | HUMAN | Alpha-2-HS-glycoprotein precursor (Fetuin-A) (Alph |
| 48 | 116 | 275.84 | 59 | 6.10e+007 | 36154.3 | P02649 | HUMAN | Apolipoprotein E precursor (Apo-E). |
| 49 | 910 | 275.44 | 80 | 6.09e+007 | 23044.2 | P02753 | HUMAN | Plasma retinol-binding protein precursor (PRBP) (R |
| 50 | 1082 | 274.67 | 77 | 1.42e+008 | 11175.1 | P02652 | HUMAN | Apolipoprotein A-II Precursor (Apo-AII) (ApoA-II). |

そのほとんどが2種類以上のペプチドを使って同定されている (2d: 200 タンパク質, 3a: 480 タンパク質) ことから, タンパク質の確からしさに問題はないといえる。そして, 今回のすべての測定で同定されたタンパク質は 1836 種類, ペプチドは 7257 種類であった。1836 種類のタンパク質のうち同定率の高かった 50 種類を Table 5 に示した。

おわりに

Agilent の MUDPIT を用いることにより従来の方法と比較してタンパク質の同定数が向上した。本システムを使うことによりプロテオミクス・メタボロミクスで要求される微量な物質 (タンパク質や代謝物) から多量に存在する物質群の網羅的な解析や, マトリクスの多い実試料中の微量な目的物質の解析が可能になった。

プロテオミクスはタンパク質同定だけが目的ではなく, 同定できたタンパク質から新しい研究への進展が望まれている。今後, さまざまなアプリケーションに適合した試料調整技術や LC/MS の技術の発展が進み, よりアグレッシブな研究とそれに伴う研究成果が得られることが期待される。

文 献

- 1) Valaskovic GA, Kelleher NL. Miniaturized formats for efficient mass spectrometry-based proteomics and therapeutic development. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2002;2:1-12.
- 2) Kenneth BT, Arthur M, Leesa JD, Carol EP. Capillary liquid chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 1994;13:431-457.
- 3) Washburn MP, Wolters D, Yates JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001;19:242-247.
- 4) Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:1096-1103.
- 5) Michel PE, Reymond F, Arnaud IL, Josserand J, Girault HH, Rossier JS. Protein fractionation in a multicompartiment device using Off-Gel™ isoelectric focusing. *Electrophoresis* 2003;24:3-11.
- 6) Heller M, Michel PE, Crettaz D, Wenz C, Tissot JD, Reymond F, Rossier JS. Two-stage off-gel isoelectric focusing: Protein followed by peptide fractionation and application to proteome analysis of human plasma. *Electrophoresis* 2005;26:1174-1188.
- 7) Manfred H, Mingliang Y, Philippe EM, Patrick M, Daniel S, Martin AJ, Ruedi A, Frederic R, Joel SR. Added value for tandem mass spectrometry shotgun proteomics data validation through isoelectric focusing of peptides. *J Proteome Research* 2005;4:2273-2282.
- 8) Philippe EM, David C, Patrick M, Manfred H, Denis G, Jean-Daniel T, Frederic R, Joel SR. Proteome analysis of human plasma and amniotic fluid by off-gel isoelectric focusing followed by nano-LC-MS/MS. *Electrophoresis* 2006;27:1169-1181.
- 9) Nägele E, Vollmer M, Hörth P. Two-dimensional nano-liquid chromatography—mass spectrometry system for applications in proteomics. *J Chromatogr A* 2003;1009:197-205.
- 10) Hörth P, Nägele E, Vollmer M. Multidimensional LC-MS for proteomics- present and future. *J. LC/GC Europe* 2003;16:641-647.
- 11) Vollmer M, Hörth P, Nägele E. Differential proteome analysis: Two-dimensional nano-LC/MS of *E. coli* proteome grown on different carbon sources. *J Biomol Tech* 2003;14:128-135.
- 12) Gauthier G-L, Grimm R, Miniaturisation: Chip-based liquid chromatography and proteomics. *DDTEC* 2006;3:59-66.
- 13) Fortier M-H, Bonneil E, Goodly P, Thibault P. Integrated Microfluidic device for mass spectrometry-based proteomics and its application to biomarker discovery programs. *Anal Chem* 2005;77:1631-1640.
- 14) Vollmer M, Horth P, Rozing G, Coute Y, Grimm R, Hochstrasser D, Sanchez J-C. Multi-dimensional HPLC/MS of the nucleolar proteome using HPLC-chip/MS. *J Sep Sci* 2006;29:499-509.
- 15) Ghitun M., Bonneil E., Fortier M-H., Yin H., Killeen K. and Thibault P., Integrated microfluidic device with enhanced separation performances; Application to phosphoproteome analyses of differentiated cell model systems. *J Sep Sci* 2006;29:1539-1549.
- 16) Ninonuevo M, An H, Yin H, Killeen K, Grimm R, Ward R, German B, Lebrilla C. Nanoliquid chromatography-mass spectrometry of oligosaccharides employing graphitized carbon chromatography on microchip with a high-accuracy mass analyzer. *Electrophoresis* 2005;26:3641-3649.
- 17) Yin H, Killeen K, Brennen R, Sobek D, Werlich M. Van de Goor T. Microfluidic chip for peptide analysis with an integrated HPLC column, sample enrichment column and nano-electrospray Tip. *Anal Chem* 2005;77:527-533.
- 18) Hardoin J, Duchateau R, Joubert-Caron R, Caron M. Usefulness of an integrated microfluidic device (HPLC-Chip-MS) to enhance confidence in protein identification by proteomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2006;20:3236-3244.
- 19) Ninonuevo MR, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward RE, Clowers BH, German JB, Freeman S.L, Killeen K, Grimm R, Lebrilla CB. A Strategy for annotating the human milk glycome. *J Agric Food Chem* 2006;54:7471-7480.