

[特集：タンパク質分析のための最新質量分析装置]

## 質量分析装置による次世代プロテオミクス解析のための新しいメソッド

工藤寿治・肥後大輔

### SUMMARY

Based on MALDI-TOF mass spectrometry technique, Bruker Daltonics is developing the CLINPROT™ system solution for the clinical proteomics including biomarker search and Imaging MS. For the biomarker search from body fluid like blood serum or plasma, simple sample purification using CLINPROT™ magnetic beads kit is effective. After MS measurements, ClinProTools™ software is useful to search the biomarker from many complicated spectra. On the other hands, direct monitoring of protein distribution in a tissue using Imaging MS technique is attractive. Bruker Daltonics MALDI Molecular Imager™ is a total solution of Imaging MS using MALDI-TOF-MS. It includes flexImaging™ software, which has wizard-like interface simplifying the operations and settings from automatic measurements to data processing/evaluation. MALDI Molecular Imager™ is also a part of CLINPROT™ system.

Proteomics analysis based on mass spectrometry also is expected for post translation modification analysis. Electron transfer dissociation (ETD) in a non-linear Paul trap has been introduced as a new fragmentation technique, which avoids internal parent ion heating. Induced by the electron transfer the intermediate peptide radical cation fragments randomly at each amino acid position of the peptide backbone, which is particularly suitable for PTM identification and analysis of large multiply charged peptides. HCTultra PTM discovery system™ has CID- and ETD-MS/MS both, which takes easy CID-MS/MS data as proteomics analysis and ETD-MS/MS data as PTM analysis. Top-down proteomics by FT-ICR-MS is very powerful technique for identification of protein and PTM analysis. Bruker Daltonics is developing Top-down analysis system solution.

Key words: clinical proteomics, imaging MS, ETD, post translation modification, top-down proteomics.

#### 1. MALDI-TOF-MS を用いた最新プロテオーム解析

##### 1) CLINPROT™ システムによるバイオマーカー探索

近年、ポストゲノム時代におけるプロテオミクスとして、臨床プロテオーム解析が注目を集めている。正常な臓器と疾患を持った臓器とで発現差のあるタンパク質(バイオマーカー)を探索し、病気の診断や病気のメカニズムの解明、さらには治療薬の開発などに役立てることを目的としている。これには多数の検体から得られた大量のデータを統計的に解析することが必須であるが、測定に必要な時間と手間を考慮すると、実用的にバイオマーカー探索を行うためには、血清・血漿等の体液中に含まれるタンパク質をなる

べく少ないステップの前処理のみで直接的に観測できる手法を用いる必要がある。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI)は、サンプルにマトリックスとなる化合物を大過剰に混合して作成したサンプル・マトリックス結晶にレーザーを照射させることでサンプルのイオンを生成する手法であり、他のソフトイオン化法と比較すると夾雑物の存在に強い、生成されるイオンは主に一価イオンであるためにスペクトルがシンプルになるといった特徴がある。また、飛行時間型質量分析装置(Time-of-flight mass spectrometer)は電場を用いてイオンを加速し、イオン源から検出器までの一定距離を飛行させるのに

New generation of proteomics analysis based on mass spectrometry.

Toshiji Kudo, Daisuke Higo; ブルカー・ダルトニクス株式会社

Correspondence address: Daisuke Higo; Bruker Daltonics K.K., 9-A-6F, Moriya-cho, 3-chome, Kanagawa-ku, Yokohama-city, Kanagawa 221-0022, Japan.

(受付 2006 年 10 月 30 日, 受理 2007 年 1 月 25 日, 刊行 2007 年 3 月 15 日)

要した飛行時間から質量数を求める手法であるが、パルスレーザーでイオンを生成するMALDIと非常に相性がよく、また理論上は測定できる質量数に上限が存在しない、測定スループットが高いといった特徴を持つ。したがって、簡易的に精製されたタンパク質サンプルをハイスループットで直接的に観察するのに非常に適した手法であるといえる。

とはいえ、血清・血漿にはタンパク質のイオン化を阻害する夾雑物が多く含まれており、それによる分解能・S/N比低下のために良好な測定が妨げられる場合が多い。また、メジャーなタンパク質が多く含まれており、バイオマーカーになりえるマイナーなタンパク質の検出を妨げてしまう場合もある。そこで粗精製を行う必要が生じるが、Bruker Daltonicsではそれを行うための磁性ビーズキット (ClinProt Magnetic Beads Kits) を開発している<sup>1)</sup>。

- ・疎水性相互作用クロマトグラフィーに基づく HIC1/HIC3/HIC8/HIC18,
- ・弱カチオン・アニオン交換クロマトグラフィーに基づく WCX/WAX,
- ・固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーに基づく IMAC Cu/IMAC Fe
- ・レクチンアフィニティークロマトグラフィーに基づく LAC Con A (Glyco beads)
- ・イムノアフィニティークロマトグラフィーに基づく IAC Prot G (Antibody capture beads)

といった種類があり、目的に合わせて使い分けることも可能である。Fig. 1に同じサンプルからHIC8, WCX, IMAC Cuを用いて得られたスペクトルを示す。使用するビーズによって異なるプロファイルが得られていることが分かる。さらに、これらは磁性ビーズであるため、複数種類を組み合わせた使用や、スケールアップも可能である。

また、測定後に大量かつ複雑なスペクトルの中からバイオマーカーとなるシグナルを探索しなくてはならない。これは難易度の高い「間違い探し」にも例えられる作業であるが、これをクラスタ解析によって行うためのソフトウェア (ClinProTools 2.0) も開発されている (Fig. 2)。マルチクラスで解析を行うことも可能であるため、単純に正常サンプルと疾患サンプルを比較することによるバイオマーカー探索のみならず、例えば疾患の時系列を追った解析にも使用することが可能である。

このような解析を行うためのキットやソフトウェアは、Bruker Daltonicsの臨床プロテオミクス解析ソリューションパッケージ「CLINPROT<sup>TM</sup>」に含まれているものである。

## 2) MALDI Molecular Imager<sup>TM</sup>による Imaging MS

MALDIにおいてサンプルは必ずしも何らかの溶媒に溶かす必要は無く、ある程度の薄さでサンプルターゲット (サ

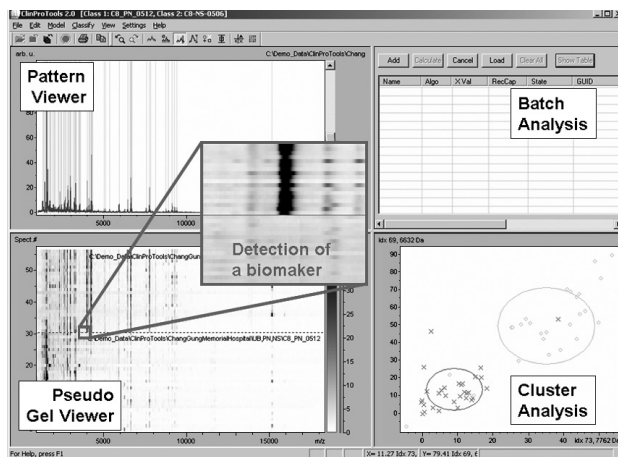


Fig. 2. Graphical user interface of ClinProTools 2.0.

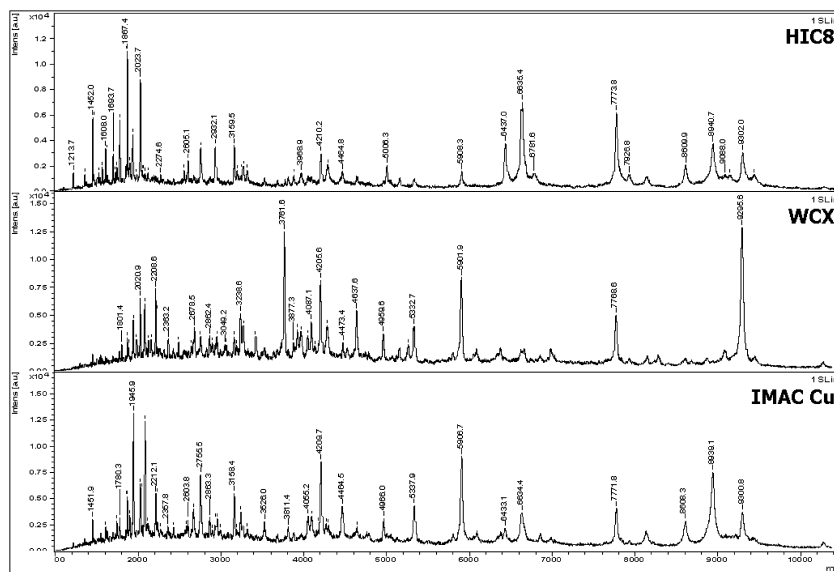


Fig. 1. Human serum profiling using HIC8, WCX, and IMAC Cu magnetic beads.

ンプルホルダ)に固定できるものであれば固体サンプルであっても質量分析装置内に導入して測定対象とすることが可能である。したがって、例えばライオミクロームを用いて作成された生体組織切片をターゲットプレート(実際には表面に電気伝導性を持たせたスライドガラス)に貼り付け、さらに Dried droplet 法やスプレー法などによってマトリックスを添加すると MALDI でイオン化、測定を行うことが可能な状態のサンプルとすることができる。サンプル調製方法やマトリックスの選択によるが、その場合に観測されるのは主にタンパク質・ペプチド、脂質等である。

また、MALDI において使用されるレーザーの照射スポットのサイズは、装置依存ではあるものの、おおよそ 10 から 100 マイクロメートル程度である。つまり、サンプル内の微小領域の質量分析を行うことが可能な手法であると言える。そこで、生体組織切片サンプルを走査するようにレーザーを照射しながら測定を行うと、各微小領域から独立してスペクトルを得ることができるようになる。得られるスペクトルは時には数千に上るが、スペクトル内のある任意の質量数ピークに着目して、そのピークが観測された領域に色を付けて元々の生体組織切片サンプル写真上に重ね合わせて表示を行う。それによって、どのような質量数の分子がサンプルのどこにどれだけ存在していたのかを文字通りイメージとして直感的に捉えられるデータを作成することができる<sup>2)</sup>。これが Imaging MS である。Fig. 3 にゼブラフィッシュの矢状方向(正中面)切片のイメージング結果を示す。200 μm ステップで測定されたスペクトルから 2500 ~ 25000 Da の様々な質量ピークを利用して作成されたイメージであるが、解剖学的構造に直接対応していることが分かる。装置・原理的に、サンプルは生体組織切片に限定されるものではないが、特に医学分野ではバイオマーカー

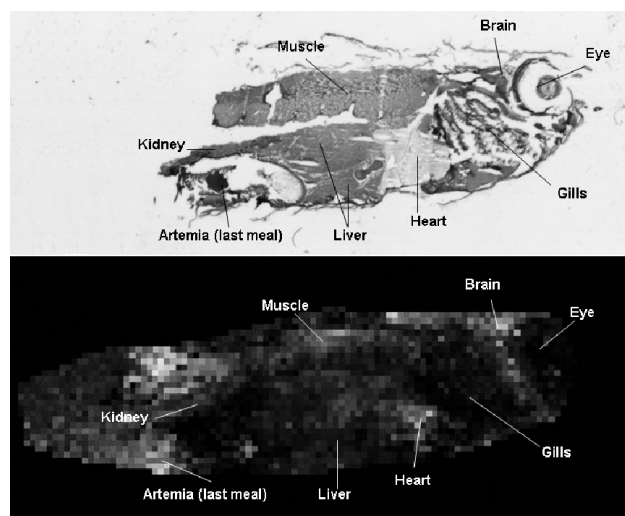


Fig. 3. Analysis of a zebrafish sagittal section. (top) Histological stained reference section used to assign the organs and (bottom) MALDI image.

探索を目的とした病理組織のイメージングが行われている。

これを行うために、Bruker Daltonics では Imaging MS の自動測定から結果の評価までをウィザード形式で便利に設定・実行することができるソフトウェア・flexImaging™を開発している。また、新技術である smartbeam™ レーザーテクノロジーを使用した場合、10 μm の空間分解能を達成することが可能である。Fig. 4 に弊社の高感度測定用ターゲットプレート Prespotted AnchorChip (PAC) 上に描かれた「E」の文字のイメージング結果を示す。わずか 63 μm の文字であるが、明瞭に E の文字がイメージングされていることが分かる。

さらに、イメージングで得られた数多くのスペクトルを ROI (Region Of Interest) ごとに前述のクラスタ解析することでバイオマーカー探索に結びつけることも可能であり、これを Class imaging と呼んでいる。「組織内の部位を良好に判別できるが、人間の目では発見しづらい」ピークを統計学的に探索できるため、より効果的なイメージングが可能になる。

MALDI Molecular Imager™ (flexImaging ソフトウェア、スライドガラス等のサンプル調製ツールの総称)も弊社の臨床プロテオミクス解析ソリューションパッケージ「CLINPROT™」の一部である。

## 2. ESI-MS 型質量分析装置を用いた Proteomics の最前線

### 1) イオントラップ型質量分析装置「HCTultra—PTM discovery system—」 ETD-MS/MS 測定による新しい Proteomics 解析の可能性

Proteomics 解析のアプローチとして質量分析装置は、そのイオン化法で区別をすると MALDI と ESI (LC-MS) が挙げられる。いずれの装置による測定においても MS/MS 法を用いた Proteomics 解析では、PSD や CID によって得られるペプチド結合の解裂したイオン (b-/y- シリーズ) を使用してタンパク質の同定に至る。PSD/CID-MS/MS 測定を行った場合、ペプチドにおいては結合エネルギーの弱いペ

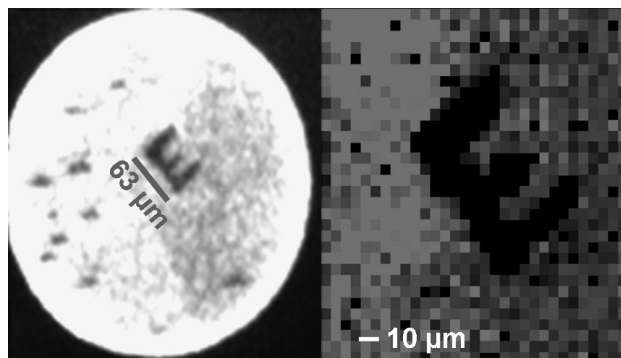


Fig. 4. (left) Photo image of PAC burned the letter "E" and (right) MALDI image.

ペプチド結合 -NH-CO- が切断される結果を得ることができ、この情報を使用してデータベース検索を実行する。

一方、ペプチド結合よりも弱い結合エネルギーを持つ結合部位が存在した場合、MS/MS 測定の結果からはペプチド結合を切断するよりも優先的に、さらに弱い結合エネルギーを持った箇所を切断することになる。例えばリン酸化修飾や糖質修飾を受けたペプチドなどを対象に PSD-/CID-MS/MS 測定した場合、ペプチドからリン酸や糖質を外してしまう結果となる。逆の言い方をすれば、PSD-/CID-MS/MS では選択的にリン酸や糖質を切断し、その情報を得ることができるが、ペプチド配列の情報やそれらの修飾部位までを解析するのが困難となる。そこで、リン酸や糖質などの構造をペプチドから外すことなく、ペプチド主鎖の結合のみを選択的に切断できる新しい MS/MS 手法が Electron transfer dissociation (ETD) -MS/MS である<sup>3,4)</sup>。

ETD-MS/MS 測定は、ペプチドの多価イオン (カチオン) とアニオン (本装置「HCTultra PTM discovery system」ではアニオンとして Fluoranthene を CI イオン源にてイオン化して使用) を同時に Iontrap で捕獲、Trap 内部で反応させることにより、選択的にペプチド主鎖の N-C $\alpha$  結合を切断する。ETD 反応の時間は、1 ~ 100 msec 程度と非常に高速に解裂を起こすことができるため、LC-MS/MS として使用することができ、またソフトウェア上のコントロールによって LC-CID/ETD-MS/MS の自動交互切替測定にも対応しているため、従来の Proteomics 解析と同時に翻訳後修飾の解析に必要なデータの獲得も自動化が可能となる。特に本装置「HCTultra」では、2D-Trap と同等以上のイオン捕獲容量を高密度で可能とした大容量タイプ 3D-Trap (High capacity trap) を採用しているため、非常に高い効率で ETD 反応を実行することができる。リン酸化ペプチドに対して ETD-MS/MS 測定を行った結果を Fig. 5 に示す。リン酸化ペプチドはその配列中に二つのセリン残基を持ち、うち一つのセリン残基にリン酸化修飾を受けた「KGS<sub>PO4</sub>EQESVK」配列を持つ。Fig. 5 では、ETD-MS/MS 測定の解析結果から上段に c-シリーズの配列、下段に z-シリーズの配列解析を行っており、c-シリーズの配列からはリン酸化修飾を受

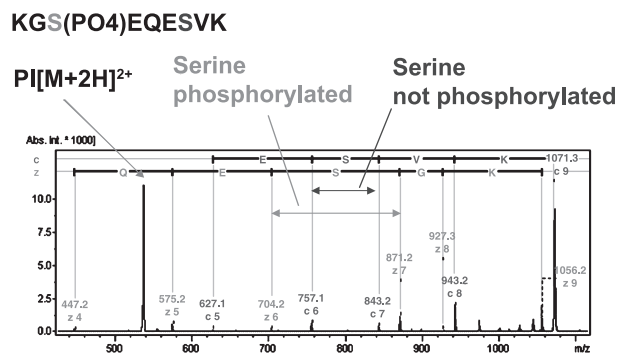


Fig. 5. ETD-MS/MS spectrum of phosphorylated peptide.

けていないセリンが検出されている。一方、z-シリーズの配列からはリン酸化修飾を受けたセリンが、リン酸基を保持したままの質量として同定されていることが分かる。前述の通り、ETD 反応は非常に高速で行うことができるため、HPLC とオンラインで測定することはもちろんのこと、CID/ETD-MS/MS の自動交互切替測定が可能となる。その一つの応用例を Fig. 6 に示す。リン酸化ペプチドを対象とした場合、リン酸化ペプチドに対する CID-MS/MS 測定結果からはリン酸基が外れることによって生じるニュートラルロスを検出することができる (Fig. 6 では三価のため 32.67 m/z のニュートラルロスを検出、スペクトル #283)。リン酸基に由来するニュートラルロスを検出した場合のみ、ソフトウェアが自動でこれを認識し、次のスキャンでは、その親イオンを対象として ETD-MS/MS を実行する (スペクトル #284)。結果、得られた ETD-MS/MS スペクトルからリン酸基を含んだままでペプチドの配列解析を行うことが可能となる。

以上のように、従来法である PSD や CID-MS/MS に加えて、さらに ETD-MS/MS を併用することにより、さらに詳細な蛋白質の構造情報を解析することが可能となる。

## 2) フーリエ変換型質量分析装置「APEX-Qe」

### FT-ICR-MS を用いた Top-down proteomics 解析の新たなツール

Proteomics 解析のアプローチとして使用されているのは、そのほとんどが酵素消化を用いた「Bottom-up」による手法が主流である。Bottom-up proteomics によるアプローチでは必ず酵素消化を行うため、タンパク質としての質量は検索結果から得られたデータベースの情報や SDS-PAGE などの質量分析以外からの情報を頼らざるを得ない。また、質量分析で検出されるペプチド断片がタンパク質全ての配列をカバーすることは難しいため、例えば翻訳後修飾を受けたペプチド断片が必ず質量分析で検出される保障はない。

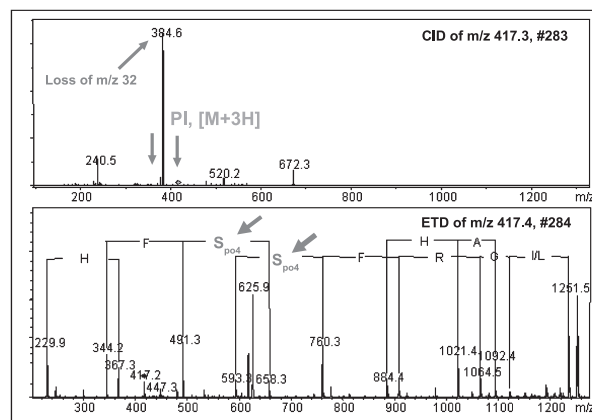


Fig. 6. LC-CID/ETD-Alternating-MS/MS of phosphorylated peptide.

一方、近年注目を集めているアプローチが、酵素消化を用いないでタンパク質を直接 MS/MS 測定し、得られたフラグメントイオンから同定を行う「Top-down」である<sup>5,6</sup>。Top-down proteomics のメリットとしては、① MS 測定結果からタンパク質の分子量を測定しているため、精度の高いタンパク質の質量情報を得ることができる、②タンパク質から直接 MS/MS 測定を行うため、配列のカバー率が 100% となる点にある。

Top-down proteomics を行う上で必要になる解析ツールは多価イオンとして検出されるシグナルの Monoisotopic peak の算出と、タンパク質同定のための検索エンジンとなる。タンパク質を ESI で測定を行なった場合、多価イオンとし

て検出されるが、これまでのアルゴリズムでは多価イオンの Monoisotopic peak を算出することが困難であった。そこで、Bruker Daltonics では新しいアルゴリズム「SNAP2」を適用することで、多価イオンから正確に Monoisotopic peak の算出を行った。Fig. 7 では Troponin-I を ESI で測定した MS スペクトル (上段) である。シグナルは  $[M+23H]$  として検出され、さらに 80 Da 質量が大きいシグナル  $[M_{pO4}+23H]$  も観測されている。得られた MS スペクトルから SNAP2 で処理をした結果が Fig. 7 下段となる。SNAP2 でデータを処理することによって多価イオンから正確に Monoisotopic peak を算出することが可能となる。Fig. 7 で検出された  $[M_{pO4}+23H]$  では 80 Da の質量差からリン酸化

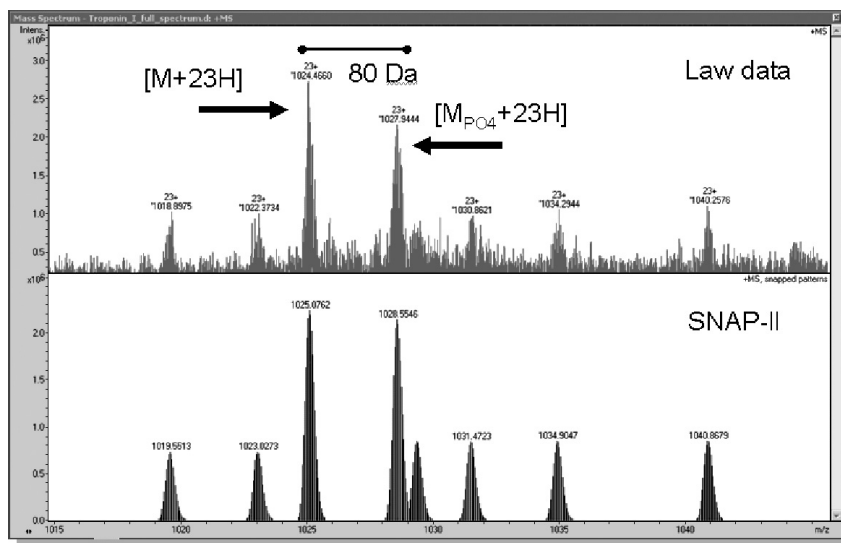


Fig. 7. MS spectrum of Troponin-I measured by ESI-FT-ICR-MS(Top) and SNAP2 spectrum(Bottom).

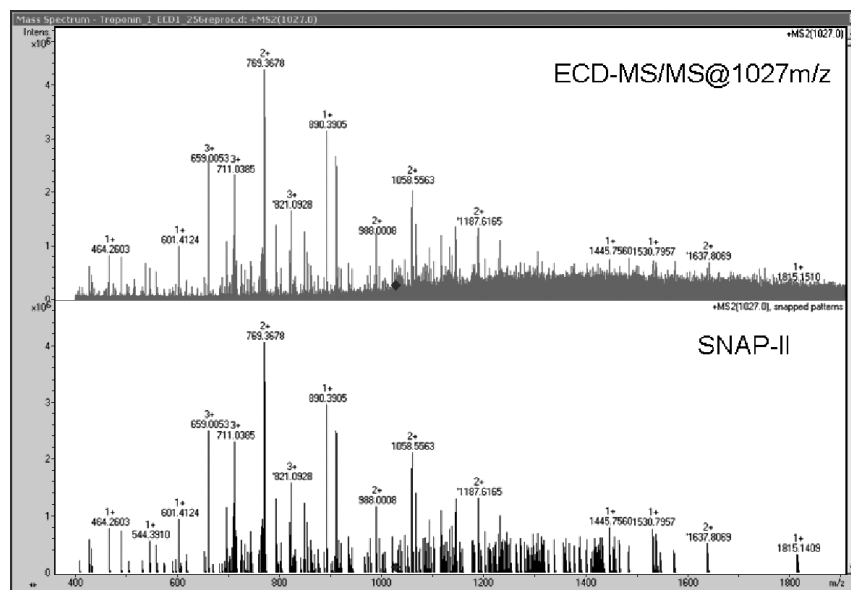


Fig. 8. ECD-MS/MS spectrum of Troponin-I,  $[M_{pO4}+23H]=1027$  m/z(Top) and SANP2 spectrum(Bottom).

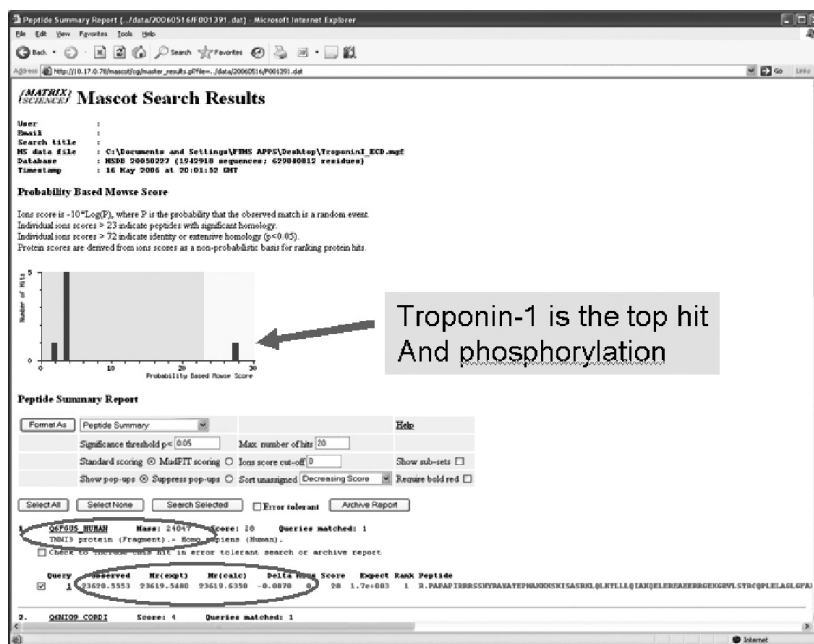


Fig. 9. BIG-MASCOT search result.

Troponin-I with phosphorylation is identified as top score.

修飾を受けている事が予想される. そこで  $[M_{po4}+23H] = 1027 m/z$  をイオンガイドの四重極ステージで Isolation して, FT セルでこれを捕獲・積算し, Electron Capture Dissociation (ECD)-MS/MS 測定を行った. 測定結果が Fig. 8 であり, 上段には Law data の MS/MS スペクトルを示す. ECD-MS/MS は, 前述した ETD と同様にリン酸基をペプチド (タンパク質) から外さないで, ペプチド鎖のみを選択的に解裂することが可能となるため, 得られた MS/MS スペクトルからリン酸基修飾部位を同定することができる. 測定結果は SNAP2 で処理をして Monoisotpic peak を算出した (Fig. 8 下段).

SNAP2 で処理された ETD-MS/MS 測定の結果を Top-down proteomics データベース検索システム「BIG-MASCOT」で同定を行なった. 従来の「MASCOT」のアルゴリズムを Top-down proteomics に対応させたデータベース検索エンジンで, BIG-MASCOT を使用することによって Top-Down のデータから直接, タンパク質の同定と翻訳後修飾の解析が可能となる. 同定の結果, トップスコアで Troponin-I がヒットしており, また検索の条件として「リン酸化」を考慮しておいた結果, 一つのリン酸化とその部位が同定できた (Fig. 9).

以上のように Proteomics 解析において翻訳後修飾を同定するための新しい技術と, その解析のための支援ソフトの

開発・リリースがすでに実用段階で進んでいる. 今後, 翻訳後修飾の解析はルーチンとなるだろう.

### 文献

- 1) Villanueva J, Philip J, Entenberg D, Chaparro CA, Tanwar MK, Holland EC, Tempst P. Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 2004; 76:1560-1570.
- 2) Meistermann H, Norris JL, Aerni HR, Cornett DS, Friedlein A, Erskine AR, Augustin A, De Vera Mudry MC, Ruepp S, Suter L, Langen H, Caprioli RM, Ducret A. Biomarker discovery by imaging mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2006;5.10:1876-1886.
- 3) Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9528-9533.
- 4) Coon JJ, Syka JE, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Tandem mass spectrometry for peptide and protein analysis. *Biotechniques* 2005;38:519-523.
- 5) Ge Y, Lawhorn BG, ElNaggar M, Strauss E, Park JH, Begley TP, McLafferty FW. Top down characterization of larger proteins (45 kDa) by electron capture dissociation mass spectrometry. *J Am Chem Soc* 2002;124:672-678.
- 6) Kelleher NL. Top-down proteomics. *Anal Chem* 2004; 76:197a-203a.