

〔特集：タンパク質分析のための最新質量分析装置〕

生命科学分野における質量分析装置の応用：サンプル調製の工夫とデータ解析におけるディファレンシャル解析のプラットフォーム

牛山正人・石塚雄一・平野 穰

SUMMARY

Application of mass spectrometry for the life sciences, especially for the proteome analysis, has attracted considerable attention as it shows high potential for the complete of comprehensive analysis of protein expressions. Although the technology progress of the mass spectrometry is outstandingly fast, there are a few difficulties to solve in the peripheral areas. In this report, we focus on the sample preparation in the up-stream of mass spectrometry and the data analysis method at the down-stream of mass spectrometry, and introduce/discuss the current and new technologies.

Key words: sample preparation, differential analysis, phosphorylation, blood sample, data analysis software.

はじめに

近年、生命科学における質量分析装置の応用には目を見張るものがあり、特にプロテオーム解析においては、質量分析装置の進展がプロテオーム解析の展開を支えていると言っても過言ではなく、また今後の質量分析装置の技術革新がこの分野の研究に大きな影響を与えると思われる。質量分析装置の利用が一般になる以前のタンパク質研究においては、未知のタンパク質の同定のため目的タンパク質の分離、精製に多くの時間と労力を要し、ある生物学的なサンプルに含まれるタンパク質を網羅的に解析する事は事実上不可能であった。質量分析装置のタンパク質同定への応用が進むにつれ、質量分析装置の持つ分析感度ならびに精度の高さにより、数多くのタンパク質の短期間による同定が可能となってきた。

しかしもともとは低分子化合物の分析目的から始まった質量分析装置が生命科学研究へ応用されるには幾つかの超えなければいけないハードルが存在している。本稿では特に生命科学研究において特徴的な；

1. 多種多様でかつ幅広いダイナミックレンジをもち、また様々な夾雑物ともに存在するタンパク質混合物であ

る生物試料をどのように質量分析装置に適するようサンプル調製を行うか。

2. 質量分析装置によって得られる膨大なタンパク質分析データをどのように生命現象の解明に役立てることができるのか。

の2点に注目し、1. においては血液サンプルの解析ならびにリン酸化タンパク質の解析、2. においてはソフトウェアパッケージを利用したタンパク質発現ディファレンシャル解析を紹介する。

1. 質量分析を用いたタンパク質分析におけるサンプル調製の必要性

質量分析法を利用した網羅的なタンパク質分析では、使用する質量分析装置とサンプルに含まれるタンパク質の多様性と広いダイナミックレンジが対応していなくてはならない。質量分析技術が目覚ましい発展を遂げているとはいえ、1回の質量分析計のタンパク質分析で生物試料に含まれる全てのタンパク質の網羅的解析が行えるほどには残念ながら達していない。よって、質量分析においても例外でなく、タンパク質分析にはサンプル調製が重要で且つ必要である。この工程における最も重要なポイントは質量分析装置に供

MS Spectrometer application in life sciences: —Developments of sample preparation and differential analysis as a data analysis platform—.

Masato Ushiyama, Yuichi Ishizuka, Joe Hirano; GE ヘルスケアバイオサイエンス (株)

Correspondence address: Joe Hirano; GE Healthcare Biosciences K.K., Sanken BLDG., 3-25-1, Hyakunin, Shinjuku, Tokyo 169-0073, Japan.

(受付 2006 年 11 月 9 日, 受理 2007 年 1 月 25 日, 刊行 2007 年 3 月 15 日)

Some types of proteins in plasma

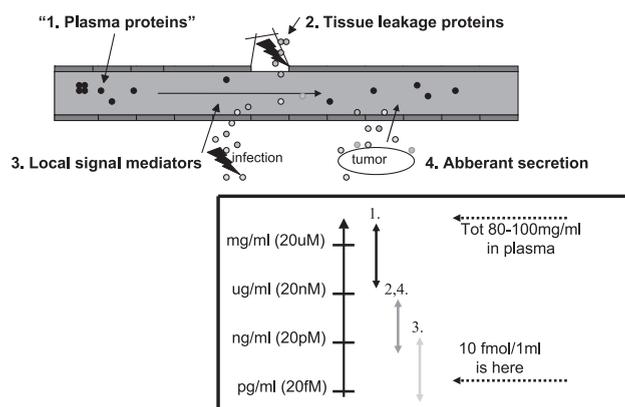


Fig. 1. Upper: Possible plasma proteins are classified into four categories:

1. "Plasma proteins"
2. Tissue leakage proteins.
3. Local signal mediators
4. Aberrant secretor protein from tumor

Bottom: The protein concentrations of the categories 1 to 4 above in plasma are summarized. 1: mg/ml (μM), 2, and 4: $\mu\text{g/ml}$ (n-pM) and 3: n-pg/ml (p-fM)

するサンプルに含まれるタンパク質の分離（除去、濃縮工程を含む）である。現在この工程には、二次元電気泳動やクロマトグラフィーなどが利用されている。しかしこれら手法のタンパク質分離能も通常の生物学的サンプルを取り扱うには十分ではなく、生物学的なレベルでの分析対象のしぼり込み（特定の細胞の分取、細胞内小器官の分画）、抗体やある種のタンパク質に対する親和性を持つ物質を用いた分離・精製の手法との組み合わせを用いることが一般的である。

(1) 血液サンプルの場合

血液サンプル中のタンパク質分析は疾患プロテオームで注目され、疾患マーカーになり得るタンパク質を血液の中から探し出そうと研究が続けられている。血液には、体の様々な生命反応の痕跡が反映されていると考えられ (Fig. 1), 臨床現場から入手しやすく、またそのサンプル形態も広く統一された生物学的サンプルである。血液中から疾患の前後に特異的に発現されるタンパク質を見つけることで、疾患の診断や予後観察の指標になることが期待されている。しかし、血液は多様で且つ広いダイナミックレンジを持つタンパク質の混合体であり、その様相は氷山に例えることができる。つまり、マーカー候補になり得るタンパク質は氷山の底の方にあると言われており、我々が見ることができているのは海上に出ている所謂“氷山の一角”に過ぎない。血液中には氷山の大部分を示す Albumin や IgG などが約 60% を占め、Albumin や IgG を取り除いたサンプルにマーカーとなり得るタンパク質群が含まれる。しかし、これま

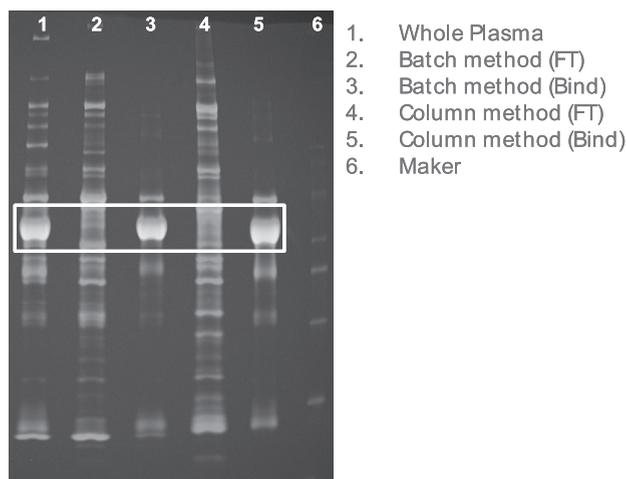


Fig. 2. Comparison between batch method using antibody conjugated resin (Albumin & IgG Removal Kit, GE Healthcare Bioscience) and standard column method with abundant plasma protein specific antibodies conjugated media for plasma protein pretreatment.

- Lane 1: Whole plasma
- Lane 2: Flow through fraction in batch method
- Lane 3: Binding fractionation of batch method
- Lane 4: Flow through fraction of column method
- Lane 5: Binding fractionation of column method
- Lane 6: Molecular weight markers

The strong band of albumin is not observed in the Lane 2 and 4, processed by the batch and the column methods. On the other hands the strong band of albumin is observed in the Lane 1, 3, and 5. The area of albumin band is shown by square.

での分析法では“氷山の底”にたどり着くのは容易でなく、何らかの新しい手法が必要となる。ここでは、抗体レジンを使った LC-MS によるバイオマーカー探索のためのサンプル前処理を紹介する。抗体レジン、Albumin & IgG Removal Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用い、ヒト血漿中のバイオマーカー探索の前処理に用いた。この Kit はヒト用ポリクロナル抗体を施しており、操作が簡単なスピニカラムを使ったバッチ法を採用している。またバッチ法は、カラム法で懸念されるクロスコンタミネーションが発生せず、臨床サンプルを解析する事情にも配慮でき且つ、サンプル処理量の増加によるスケールアップも容易である。処理法は、レジンを均一にしてから一定量取り (処理する血漿量によって異なり、2 mL のレジンで約 50 μL の血漿を処理できる)、PBS で 4~5 回溶媒置換したのちレジンに血漿を加え、ロータリーシェーカー上でレジンが沈殿しないように 30 分攪拌する。攪拌後のレジンはスピニカラムに移し遠心分離によって上清と分ける。回収された溶出画分は、限外ろ過ユニットを使い濃縮・溶媒置換後、変性処理を行いプロテアーゼ等でタンパク質を消化して質量分析へのサンプルとして供する。一般的なカラム法と Albumin 等の除去傾向を調べた結果、ほぼ同等の処理が行えることがわかった (Fig. 2)。このときの Albumin の除去率は 95% (SDS-PAGE/ 蛍光染色, デー

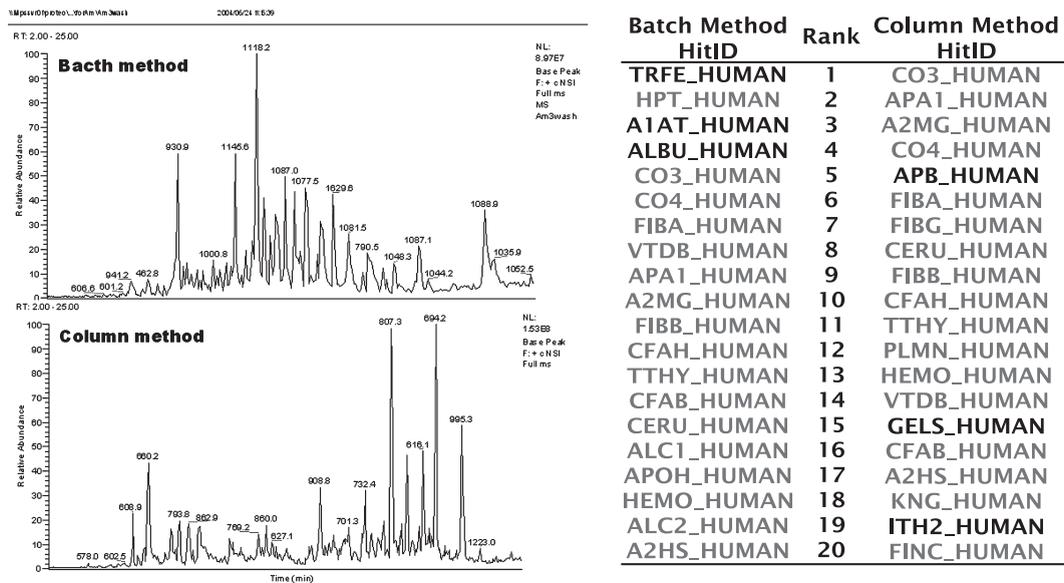


Fig. 3. (A) Mass chromatogram obtained by batch and column method. (B) Protein identification result by LC-MS from sample pretreatment by batch and column method.

Top twenty-ranked proteins are listed. The protein names shown in italic fonts and masked with shading were identified only by the batch method or by the column method within the top fifty-ranked proteins.

タ未公開)で, LC-MSによる溶出画分に含まれるタンパク質の同定を試みたところ, ほぼ同じ結果が得られていた (Fig. 3). なお, この方法を最適化したプロトコルを用いて東京医科大学臨床プロテオームセンターでは, 延べ 1000 検体を越える研究用血漿臨床サンプルの処理を行っており, LC-MSによる各疾患マーカーの探索を行っている. また, 血液のほかには髄液や尿など体液とよばれるサンプルには, 体内の現象において様々な情報をもたらすという意味では重要で, いずれの体液にも Albumin 等の高含有タンパク質が含まれており, 疾患マーカーの探索にはそれらの高含有タンパク質を除去する必要がある. 本稿で血液サンプル調製の手法はこれらの他の臨床サンプルの解析においても参考になると考えられる.

(2) リン酸化プロテオーム解析

リン酸化プロテオーム解析におけるリン酸化タンパク質の MS 解析については, 大きく分けて, 1) リン酸化タンパク質のタンパク質としての同定を行う場合と, 2) リン酸化タンパク質のリン酸化部位を同定する場合がある. いずれの場合においても, リン酸化タンパク質の細胞内での存在量が少ないことが解析上の大きな問題であり, リン酸化タンパク質に対する何らかの濃縮過程は必須といえる.

1 番目のリン酸化タンパク質をタンパク質として同定する場合では, リン酸化タンパク質をタンパク質レベルで濃縮した後に MS 解析し同定を行うことになる. チロシンがリン酸化されたタンパク質については, リン酸化チロシンに対する特異的抗体を用いた免疫沈降により網羅的な解析が行われている^{1,2)}. リン酸化セリン, リン酸化スレオニ

ンについては特異的抗体が限られているため, これらのリン酸化タンパク質の解析ではタンパク質レベルよりも, むしろ次に記すようなペプチドレベルでの濃縮操作が一般的である.

2 番目のリン酸化部位の同定においては, タンパク質を酵素消化して得られたペプチドを MS 解析し同定することになる. この場合はリン酸化を受けたペプチド (リン酸化ペプチド) に対する濃縮操作が必要となる. この同定方法は, 特異的抗体が限られるセリン, スレオニンがリン酸化したタンパク質の同定においても有効である. リン酸化ペプチドに対する濃縮操作については, これまでに様々な方法が多数報告されている^{1~7)}. ここでは IMAC (Immobilized metal-ion affinity chromatography; 金属イオン固定化アフィニティークロマトグラフィー) による方法^{1,3)} と, イオン交換クロマトグラフィーによる方法⁶⁾ について, 我々が行った検討結果とあわせて紹介させていただきたい.

IMAC による方法はリン酸基の金属イオンに対するアフィニティを利用した濃縮操作である. IMAC には, 鉄 (3+) イオン, ガリウム (3+) イオンといった 3 価の金属イオンを, イミノジ酢酸 (-N(CH₂COOH)₂) などの官能基を固定したキレート担体に配位結合させた金属イオン固定化担体を用いる. IMAC での濃縮操作はリン酸化ペプチドを含むサンプル溶液に対してバッチ法により, リン酸化ペプチドの IMAC 担体への結合, 非リン酸化ペプチドの洗浄除去, IMAC 担体に結合したリン酸化ペプチドの溶出, という 3 つのステップで行われる (Fig. 4). 我々が試みた限りでは, 用いる IMAC 担体と金属イオンの種類, また結合, 洗浄, 溶出の各バッファーの組成などで結果が大きく変わる傾向が

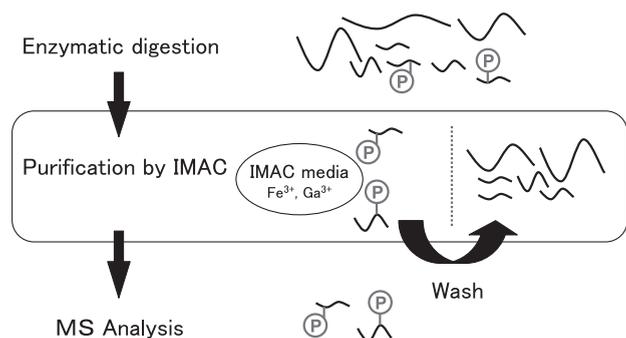


Fig. 4. Enrichment of phosphopeptide by IMAC.

Peptides obtained from enzymatic digestion of proteins are treated with IMAC. First, phosphopeptides are bound to IMAC media by the interaction between phosphoric group (shown as P) and metal ion. Second, non-phosphopeptides are washed out from the media. Finally, bound phosphopeptides are eluted and subjected to MS analysis.

みられたが、様々な条件の中で、Kokubuらによって報告された濃縮操作方法を基本とした方法で良好な結果が得られている³⁾。

評価実験例として、オブアルブミンのトリプシン消化物をIMACにて処理し、得られたサンプルをMALDI-ToF MSで測定したMSスペクトルをFig. 5に示す。IMAC処理を行っていないサンプルのスペクトルと比べて、非リン酸化ペプチド由来のピークが大幅に抑えられ、リン酸化ペプチド由来のピークが効率的に検出されたMSスペクトルが得られていることがわかる。ここではMALDI-ToF MSでの測定結果を示したが、IMACの利用において必要となる条件検討では、サンプル中のペプチドについて一度にMSスペクトルが得られるMALDI-ToF MSの利用が有効である。

一方、イオン交換クロマトグラフィーによる方法は、リン酸基のpKaがペプチドの他の官能基のpKaと異なることを利用した濃縮操作である⁶⁾。溶液のpHが2.7のとき、理論的にはペプチドの主鎖および側鎖のアミノ基はプロトン(H⁺)を受け取り正の電荷を持つが、カルボン酸はプロトンの解離が起きないため電的に中性である。タンパク質の酵素消化の際にトリプシンを用いると、リジンまたはアルギニンのC端側で切断されたペプチドが生じるため、このpHでのペプチドは原理的にN末端アミノ酸主鎖とC末端アミノ酸側鎖のアミノ基により+2の電荷をもつことになる(Fig. 6)。リン酸基はこのpHでプロトン了解離するため負の電荷を持つ。このためリン酸化ペプチドはペプチド自体の+2の電荷とは別に、リン酸基1つあたり-1の電荷を持つことになり、たとえばリン酸基を1つ含むリン酸化ペプチドは全体で+1の電荷となる。イオン交換クロマトグラフィーによる濃縮方法では、リン酸基の有無による電荷の違いを利用し、強陽イオン交換クロマトグラフィーを用いてリン酸化ペプチドを分離濃縮する。

我々はこれらIMACおよびイオン交換クロマトグラ

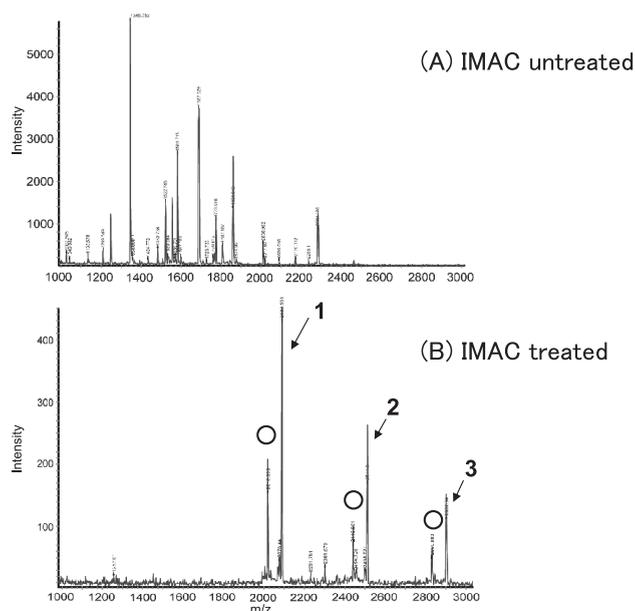


Fig. 5. MALDI-ToF MS spectra of tryptic peptides from ovalbumin (chicken egg).

Spectrum of sample without (A) and with (B) IMAC treatment. The peaks of phosphopeptides are 1: OVA(340-359) + 80Da, 2: OVA(62-84) + 80Da, and 3: OVA(59-84) + 80Da. Open circles show the peaks corresponding to the component produced by de-phosphorylation of phosphopeptide on the measurement of MALDI-ToF MS.

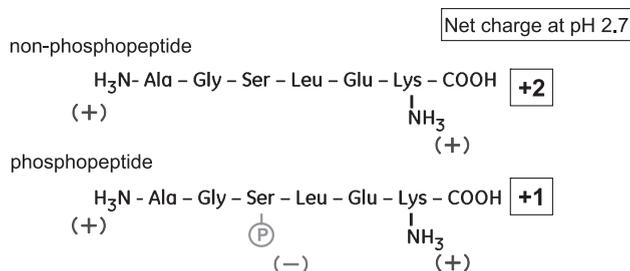


Fig. 6. Enrichment of phosphopeptides by an ion-exchange chromatography.

Tryptic peptides without phosphoric group have +2 of net charge; on the other, tryptic peptides with one phosphoric group have +1 of net charge. The difference of net charge enables the separation of phosphopeptides and non-phosphopeptides on a strong cation-exchange chromatography.

フィーによるリン酸化ペプチドの濃縮方法を用いて、網羅的なリン酸化プロテオーム解析を試みた。サンプルとしてはPDGF処理したマウス培養細胞(NIH3T3)を用い、抽出タンパク質をトリプシン消化した後に2種類の方法でそれぞれリン酸化ペプチドを濃縮処理した。得られたサンプルはEttan MDLC (GEヘルスケアバイサイエンス)およびFinnigan LTQ (サーモフィッシャーサイエンティフィック)からなるnanoLC-MSシステムにて測定した。測定に際してはセリン、スレオニンがリン酸化したリン酸化ペプチドの検出に効果的とされているリン酸基に対するニュートラ

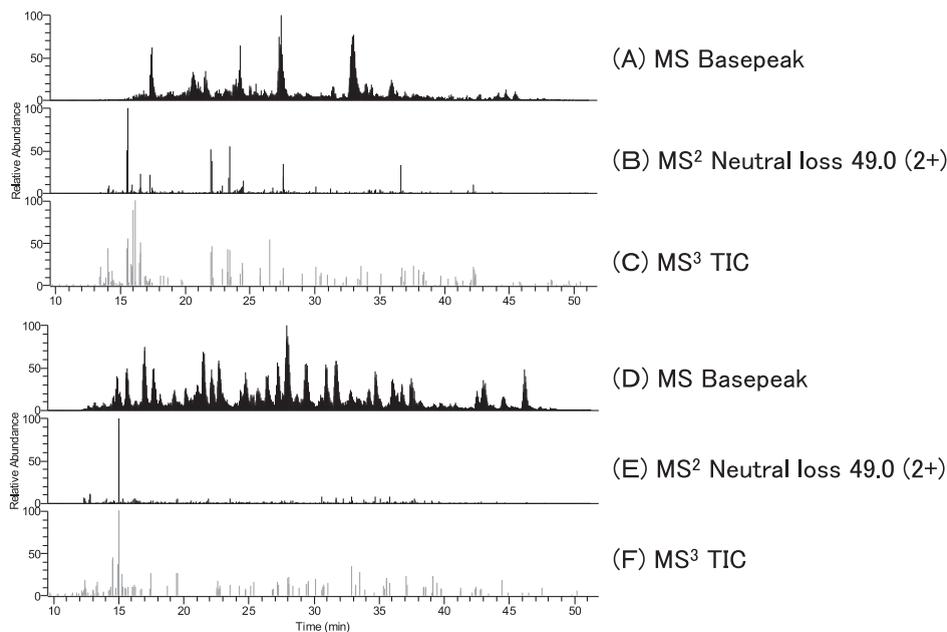


Fig. 7. MS chromatogram of phosphopeptides obtained by a neutral scan method.

MS chromatogram of sample with (A-C) and without (D-F) treatment of ion-exchange chromatography. MS chromatograms of MS2 correspond to the neutral loss of phosphoric acid (B, E) and MS chromatograms of MS3 show TIC on the MS3 scan of neutral loss peaks detected on MS2 scan (C, F).

Table 1. Number of proteins of which phosphorylation-sites were identified

IMAC	SCX	Untreated
312	108	4

ルロススキャン法 [MS² スキャンでニュートラルロスが見られたピークに対して MS³ スキャンを行う方法⁶⁾] を用いた。イオン交換クロマトグラフィーによって濃縮したサンプルに対する MS クロマトグラムを Fig. 7 に示す。MS² と MS³ のクロマトグラムから、多くのピークがニュートラルロススキャンとそれに続く MS³ スキャンで検出されていることがわかる。一方、濃縮操作を行わないサンプルでは、わずかのピークのみしかニュートラルロススキャン、MS³ スキャンともに検出されていない (Fig. 7)。次に、得られたスペクトルについて Turbo Sequest を用いて解析し、リン酸化部位の同定およびタンパク質の同定を行った (Table 1)。リン酸化部位が同定されたタンパク質の数は、濃縮処理を施していないサンプルについてはわずか 4 であったが、IMAC 処理サンプルでは 312、イオン交換クロマトグラフィー処理サンプルに対しては 108 であり、濃縮操作によってリン酸化タンパク質の MS 解析結果が大幅に向上することが示された。2 種類の濃縮方法でそれぞれ処理したサンプルについて同定されたタンパク質を比較したところ、両方法に共通で同定されたタンパク質はわずか 28 で、その他の大部分のタンパク質は IMAC もしくはイオン交換クロマトグラフィーによる濃縮方法に依存的という結

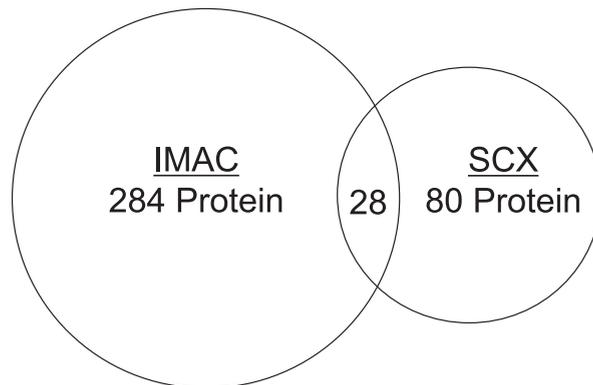


Fig. 8. Number of proteins of which phosphorylation-sites were identified according to the enrichment method.

IMAC enrichment gave 312 and ion-exchange chromatography enrichment gave 108 identified proteins, respectively. Proteins identified by both methods were 28.

果であった (Fig. 8)。今回の結果のみで詳細について議論することは難しいが、この結果はより網羅的な解析を行うためには、2 種類の濃縮方法を組み合わせた解析が重要であることを示しているといえる。

ここでは IMAC とイオン交換クロマトグラフィーによる濃縮方法について触れたが、これら以外の方法として、例えばリン酸基に対する化学修飾を使う方法も報告されている^{1,2)}。濃縮効率とともに濃縮されるリン酸化ペプチドの種類が異なる可能性があるため、今後注目していきたい方法の 1 つと考えられる。

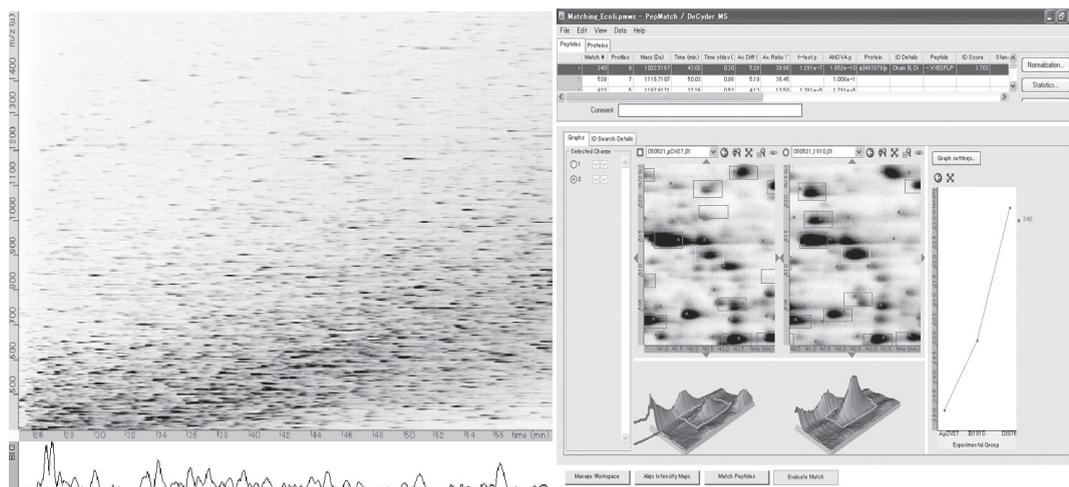


Fig. 9. (A) Intensity Map made with DeCyderMS software. Intensity Map of X, Y and Z axes is shown by retention time, mass and peak ion intensity, respectively.

(B) Matching module screen where comparison quantitative analysis is done. The spot enclosed with a square frame shows the peak matched between data, and they can be 2D・3D displayed. A calculation of the change ratio of peaks, and a statistical analysis can be carried out and the results are shown in the right window.

2. 最新の質量分析データ解析

先述のサンプルの前処理でも同様だが、いかにして雑多なタンパク質サンプルから目的とするタンパク質群へたどりつくかは、立てた解析方法に大きく依存する。この項では前処理の必要性と同じくらい重要で、解析方法を大きく変える方法論として、ディファレンシャル解析を取り上げる。現在、質量分析におけるディファレンシャル解析はタンパク質に化合物をラベルする“ラベル法”が普及してきた。しかしながら、ラベル法には限界がありラベルに依存しない方法が模索されてきた。DeCyder™ MS (GEヘルスケアバイオサイエンス)は、膨大なLC-MSデータを可視化することで、これまで困難だったラベルをしないLC-MSデータによるディファレンシャル解析を可能にした。このソフトウェアは、①データの交換および可視化、②ピークの検出、③バッチ処理、④ディファレンシャル解析の4つのステップで構成されている。データはサーモフィッシャーサイエンティフィック社、マイクロマス社製質量分析装置のデータに対応しており、そのほかにもmzXMLフォーマットでデータが出力できる質量分析装置(アプライドバイオシステムズ社製)などにも対応している。また、適応可能な質量分析計は、イオントラップ型、飛行時間型、フーリエ変換型に対応しており、最近発売された電場型(オービトラップ)にも対応している。解析は、

- ① プロファイルモード(サーモフィッシャーサイエンティフィック社の場合)で取得されたLC-MSデータをDeCyder™ MSのフォーマットに変換、データの可視化を行う。
- ② 横軸を保持時間、縦軸を質量、ピークの強度を色の

濃さに変換されたデータはIntensity Map (Fig. 9)と呼ばれる図に変換され可視化される。可視化されたマップの上にはスポット状のピークが見られ、パラメータを用いてこれらのスポットを検出する。

- ③ 検出条件が決まったら、バッチ処理にて検出を行う。
- ④ ディファレンシャル解析をおこなうモジュールでは、比較定量解析 (Fig. 9)、データの標準化、発現差異の解析を行う。

また、データの測定時に得られたMS/MSからタンパク質同定結果を得ておくと、DeCyder™ MS上に取り込むことができ、差異があったスポットはどんなタンパク質由来かがわかるようになっている。このソフトは、タンパク質解析のみならず、ペプチドミクスにおいても有効に活用され、Andren¹²⁾らは、このソフトを使ってアルツハイマー病に起因する脳内ペプチドのディファレンシャル解析を行っている。

おわりに

質量分析装置の進展は、生命科学、特に近年のプロテオーム解析の発展には大きな寄与をもたらしている。これまでには不可能であった、ある生命現象における発現タンパク質の網羅的解析、さらには網羅的なディファレンシャル解析も可能になりつつある。しかし本稿でも議論されているように、高感度で高精度、ある意味「繊細」な、質量分析装置を、雑多で多様性に富む生命科学が抱えている多くの疑問の解明に役立てるには、今後解決しなければいけない問題が多く存在している。このためには質量分析装置そのものの発展も重要であるが、その上流におけるサンプル調製方法をより質量分析装置の特性にあったものに改良するこ

と、またその下流におけるデータ解析の分野においては、生命科学の疑問によりダイレクトに答えられ、且つ多量のデータも容易に扱えるようなデータ解析プラットフォームの開発も、今後、質量分析装置がより生命科学に貢献するには重要な要因であると考えられる。

謝 辞

本稿で紹介した研究に関してご指導ご助言頂いた、東京医科大学臨床プロテオームセンター川村猛先生、西村俊秀先生、ならびに東京大学医科学研究所細胞ゲノム動態解析小迫英尊先生、服部成介先生に深謝致します。

文 献

- 1) Blagoev B, Ong SE, Kratchmarova I, Mann M. Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nature Biotechnol* 2004;22:1139–1145.
- 2) Maguire PB, Wynne KJ, Harney DF, O'Donoghue NM, Stephens G, Fitzgerald DJ. Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets. *Proteomics* 2002;2:642–648.
- 3) Posewitz MC, Tempst P. Immobilized gallium (III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal Chem* 1999; 71:2883–2892.
- 4) Brill LM, Salomon AR, Ficarro SB, Mukherji M, Stettler-Gill M, Peters E. Robust phosphoproteomic profiling of tyrosine phosphorylation sites from human T cells using immobilized metal affinity chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2004;76:2763–2772.
- 5) Kokubu M, Ishihama Y, Sato T, Nagasu T, Oda Y. Specificity of immobilized metal affinity-based IMAC/C18 tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis. *Anal Chem* 2005;77:5144–5154.
- 6) Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJD. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:873–886.
- 7) Schlosser A, Vanselow JT, Kramer A. Mapping of phosphorylation sites by a multi-protease approach with specific phosphopeptide enrichment and nanoLC-MS/MS analysis. *Anal Chem* 2005;77:5243–5250.
- 8) Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villén J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:12130–12135.
- 9) Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha XM, Polakiewicz RD, Comb MJ. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nature Biotechnol* 2005;23:94–101.
- 10) Knight ZA, Schilling B, Row RH, Kenski DM, Gibson BW, Shokat KM. Phosphospecific proteolysis for mapping sites of protein phosphorylation. *Nature Biotechnol* 2003;21:1047–1054.
- 11) Oda Y, Nagasu T, Chait BT. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nature Biotechnol* 2001;19:379–382.
- 12) Skold K, Svensson M, Kaplan A, Bjorkesten L, Astrom J, Andren PE. A neuroproteomic approach to targeting neuropeptides in the brain. *Proteomics* 2002;2(4):447–454.