

次世代プロテオミクスが拓く生命科学 research の新地平： ウエスタンブロッティングはもう要らない?!

中津海 洋一^{1,3)}, 松本 雅記^{2,3)}, 中山 敬一^{1,3)}

¹⁾九州大学生体防御医学研究所分子医科学分野,

²⁾九州大学生体防御医学研究所プロテオミクス分野,

³⁾JST CREST)

はじめに

遺伝子発現情報の網羅的解析など、近年では大規模データの取得が比較的手軽に行えるようになったが、その一方でタンパク質の解析のスループットは一般に低く、また解析に多大な労力が要求される。たとえばウエスタンブロッティング法での単純な定量解析をひとつ取っても感度の高い抗体が無ければ不可能であり、もし高感度の抗体を自作するとすれば大きな労力を費やすことになる。もしタンパク質についての網羅的データを取得しようとしても、要求される労力の大きさが足かせとなり、これまでは事実上不可能であった。しかし近年このソリューションとして質量分析計を用いたプロテオミクス解析が注目されている。たとえばあるタンパク質の結合タンパク質を同定する解析では、これまで大量に精製した免疫沈降物を SDS-PAGE で分離し、各共沈物ごとに精製してそれぞれを同定する必要があった。しかし近年の質量分析計の発達によって SDS-PAGE による分離のステップを省く方法が既に一般化している。免疫沈降物は多くの共沈物を含む混合物であるが、免疫沈降物を直接酵素消化してそのまま LC-MS/MS で測定する。免疫沈降物が数百程度のタンパク質の混合物であれば、1回の解析で同定が可能である。近年の質量分析計の発達は特に目覚ましく、スループットや同定の精度は格段に向上し、一度の解析で数千のタンパク質のデータを得ることも可能である。そのため大規模なデータからタンパク質ワールドを鳥瞰するという、これまででは難しかった

アプローチも可能となった。本稿では、質量分析計を用いた解析の技術開発のうち、特にタンパク質の絶対定量を大規模に行う方法論について、その測定原理と併せてご紹介する。

ディスカバリー・プロテオミクスと ターゲット・プロテオミクス

ひと口に質量分析計での解析と言っても、実際には様々な方法論が存在する。たとえば多数のタンパク質の混合物を酵素消化しサンプル中に含まれるペプチドを網羅的に同定する手法はショットガン・プロテオミクスと呼ばれている。細胞内のタンパク質をそのまま消化したサンプルを調製してショットガン・プロテオミクス解析を行えば、一度の解析で数百～数千種類のタンパク質を同定・定量することも可能となった。この規模は以前までのタンパク質の解析からみれば大規模といえる。しかし一方でヒトゲノムから推定されるタンパク質の複雑性を考えるとその網羅性は十分とは言えない。実際にマウスの組織から2～3千のタンパク質を同定したとしても、その中にシグナル伝達分子や転写因子が含まれることは稀であり、ほとんどが分子シャペロンやリボソーム構成タンパク質などの高発現タンパク質で占められる。すなわち低発現量のタンパク質は高発現量のタンパク質によって隠されてしまい、同定と定量が困難となる。タンパク質の発現量のダイナミックレンジの広さという壁はショットガン・プロテオミクス解析のみならず、タンパク質の同定を目的としたディスカバリー・プロテオミクス解析全体が抱える問題であり、この問題点を克服するためには何らかの技術的革新が必要である。近年、この問題を解決するための有力な技術として多重反応モニタリング (MRM: Multiple Reaction Monitoring) 【選択反応モニタリング (SRM: Selected Reaction Monitoring) とも呼ぶ】をペプチド定量に利用したターゲット・プロテオミクスが注目を集めている¹⁻⁵⁾。

New horizons in biological research developed by next-generation proteomics: Say good-bye to Western blotting Hirokazu Nakatsumi^{1,3)}, Masaki Matsumoto^{2,3)} and Keiichi Nakayama^{1,3)} (¹⁾Division of Cell Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University (3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan), ²⁾Division of Proteomics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, ³⁾JST CREST)

テクニカルノート

MRM法とは三連四重極型質量分析計(QqQ型MS)を用いた定量分析法である。QqQ型MSとは四重極(quadrupole: Q-pole)を三つタンデムに連ねた質量分析計であり、イオン導入部に近い方からQ1, Q2, Q3と呼ぶ。これら三つのQ-poleはそれぞれで役割が異なっており、Q1は特定質量を持ったイオンを通過させるフィルターとして、Q2はQ1を通過したイオンを不活性ガスとの衝突によって開裂させるためのガス室として用いる。Q3はQ2で開裂された断片イオンから特定質量のイオンを通過させるフィルターとして用いる。MRM法は定量性の高さやS/N比の高さから、これまで代謝産物の定量や薬物動態研究で低分子化合物の定量解析において盛んに用いられてきた手法であったが、近年ではプロテオミクスへの応用が注目されている。MRM法によるターゲット・プロテオミクスは現在も発展途上段階ではあるが、MRM法によるプロテオミクス解析の現状とその将来性を紹介したい。

MRM法によるペプチドの定量

前述したディスカバリー・プロテオミクスではペプチドを同定する過程が必ず含まれるが、MRM法ではペプチドの同定を行わず、検出のみに目的を絞り「狙い撃ち」の測定を行う。まずHPLCから溶出したペプチドイオンをQqQ型MSに取り込み、一つ目の質量フィルターQ1によって測定したいペプチドイオンの質量のみを通過させる。Q1を通過したイオンは単一なペプチドであるとは限らず、多くの場合は複数のペプチドの混合物となっている。Q1を通過したイオン混合物は次にQ2で開裂して断片イオン化し、続いて二つ目の質量フィルターであるQ3によって断片イオンの中から特定の質量のみが通過し、これを検出する。MRM法で用いるQ1とQ3の質量の組み合わせをMRMトランジションと呼ぶ(図1)。Q2での開裂でどのような断片イオンが生じるかは開裂するペプチド

のアミノ酸配列に依存するため、Q1の段階で混入したノイズペプチドに由来する断片イオンについてはQ3を通過する確率が低い。よってたとえ様々なペプチドが混合したサンプル中でも二つの質量フィルターによってノイズシグナルを排除し、目的ペプチドを特異的に検出することが可能となる。また通常QqQ型MSはHPLCとオンライン連結して使用するが、分離・溶出されたペプチドは二つの質量フィルターを通過し、そのシグナル強度は持続的に測定される。よってクロマトグラムが得られペプチドの定量的な検出ができる。また経時的な測定を行うことで再現性の良い検出も可能となり、ダイナミックレンジ・定量性・再現性というこれまでのプロテオミクス解析が抱えていた原理的な問題を解決しうる手法といえる。

そもそもMRM法では一度に計測できるペプチド数に限界があり、スループットという面で弱点があったのだが、現在では技術の進歩によりその弱点も克服されつつある。現行の装置ではMRMトランジションを超高速度で切り替えることで測定のスループットを向上させている。たとえば5ミリ秒の間に一つのMRMトランジションのデータ取得を行い、次の5ミリ秒では別のMRMトランジションのデータを取得できる。仮にこの設定で400のMRMトランジションについてデータを取得しても、2秒の間に全てのMRMトランジションについてデータの取得が可能である。(ただし実際は各MRMトランジションの切り替えに1~2ミリ秒を要するので単純計算はできないが。)つまり約2秒に1回の割合で全てのMRMトランジションのプロットデータを取得でき、各MRMトランジションについて2秒毎のプロットを繋げれば十分な質のクロマトグラムを描くことができる。またスループットをさらに上げるために、MRM解析をHPLCから標的ペプチドが溶出する時間に限定して行うことが可能であり、この方法を用いれば一度の測定でさらに多数のペプチドについて定量が可能と

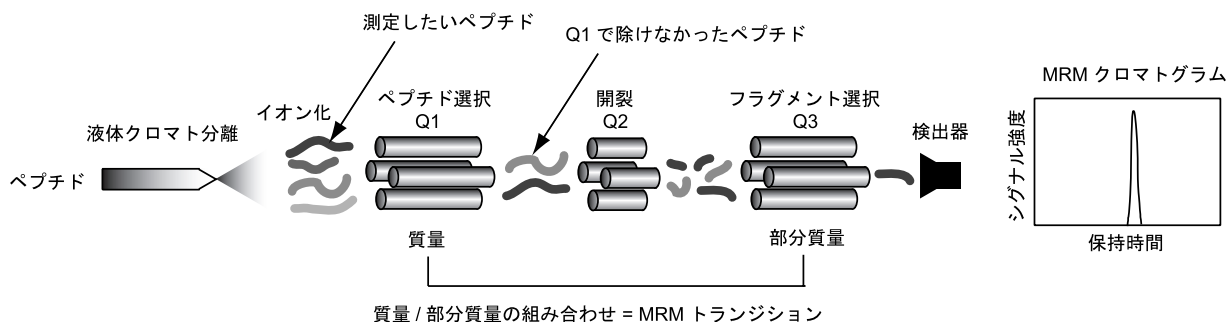


図1 MRM/SRM法の原理

特定のペプチド固有の質量と部分質量の組み合わせ(MRMトランジション)を設定し、選択的にペプチドを定量する。二つの質量を組み合わせることで、高いS/N比を得ることができる。また持続的にシグナル強度取得を行うことでクロマトグラムを描くことができる。

なる。

iMRM法の原理：事前情報取得とタンパク質の絶対定量

近年の質量分析計の高性能化に伴い、MRM法による同時多成分の検出が現実味を帯びてきた。しかしまだ現状ではMRM法によるタンパク質の網羅的な定量は実用化に至っていない。その原因は、測定に必要なペプチド固有の事前情報が不足しているためである。まず一つ目の事前情報とは、ペプチドのMRMトランジションの中でどれが最も高感度に機能するかという情報である。たとえば検出したい一つのタンパク質についてMRMトランジションを組もうとすると、その選択肢はざっと考えても数百以上に及ぶ。これらのMRMトランジションはそれぞれで検出感度が大きく異なり、その中から最も感度が高いMRMトランジションを選定する方法は現時点では予備実験による実測以外にない。このステップはMRM解析を成功させるために必須の過程といえる(図2)。二つ目の事前情報とは、ペプチドがHPLCから溶出する時間の情報である。上述したように、現行の装置では一度に400程度のMRMトランジションを設定することが可能であるが、より多くのMRMトランジションを設定する場合には、HPLCから目的のペプチドが溶出する時間に限定したデータ取得を行う必要がある。そのためには、正確なペプチドの溶出時間を知る必要があり、これも実測する以外手立てがない。すなわちタンパク質をMRM法で定量するためには「どのMRMトランジションを選択するのが最適か」という情報と、「ペプチドがどの時間にHPLCから溶出されるか」という情報について事前に実測して取得するステップが必須である。われわれはこれらの情報の事前取得から内在性タンパク質の絶対定量までの過程を効率よく行うために新た

なスキームを開発しており、事前情報取得型MRM(iMRM: information-based MRM)法と命名している。iMRM法は、1)日本が世界に誇るFLJ(full-length long Japan)のクローンを元にヒトの組み換えタンパク質を試験管内で全て合成⁶⁾、2)実際に質量分析計でMS/MSスペクトルなどのペプチド固有座標情報を取得し、これらの情報をデータベース化、3)組み換えタンパク質を内部標準としてサンプルタンパク質のMRM解析による絶対定量、の三つのプロセスより構成される。この方法論を用いることでヒトの全タンパク質の絶対定量情報を取得することが可能となる。

1) 組み換えタンパク質からの事前情報取得とデータベース化

MRM解析に必要な事前情報とは、高感度のMRMトランジションとそのペプチドがHPLCから溶出される時間の情報である。組み換えタンパク質をペプチド化したサンプルを用いて事前情報取得を行うことで、目的のタンパク質に由来する全ペプチドについてMRMの感度を実測することができ、また内在性にはほとんど発現しないようなタンパク質でも、組み換えタンパク質ならば十分な感度で事前情報を得ることができる。iMRM法ではFLJクローンからヒトの全ての遺伝子について組み換えタンパク質を合成して実測し、MRM解析のための事前情報を取得してデータベース化する。実際にMRM法によるタンパク質の絶対定量を行う際には、データベースの情報を利用して測定することが可能となる。

2) 組み換えタンパク質を内部標準とした内在性タンパク質の絶対定量

MRM法によってペプチドの絶対量を測定する際には、同じアミノ酸配列のペプチドを内部標準としてサンプルに混ぜ込んでMRM解析を行う。内部標準ペプチドと目的ペ

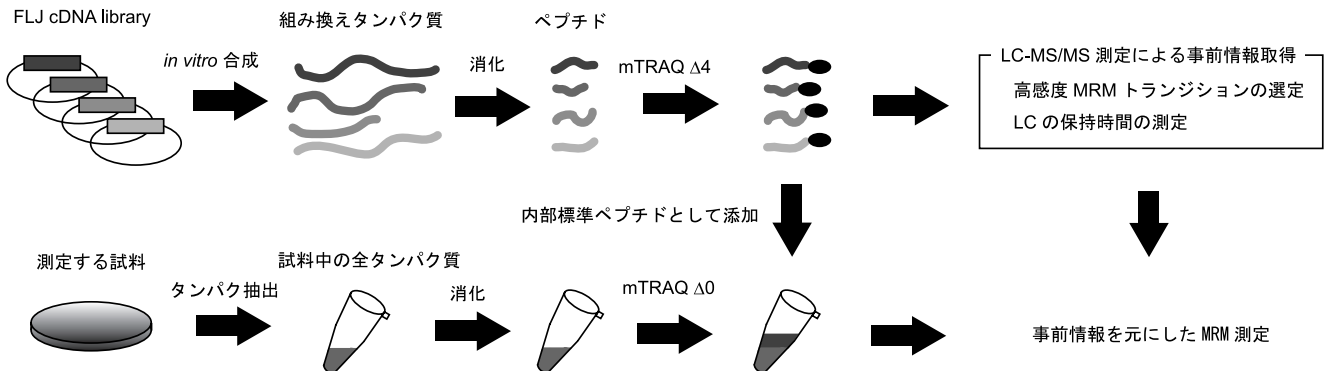


図2 iMRMの原理

ヒトの全遺伝子のFLJクローンから合成した組み換えタンパク質を質量分析計で測定し、MRMの測定に必要な事前情報を取得してデータベース化する。また組み換えタンパク質の消化物をmTRAQ Δ4で標識し内部標準として用いることで、内在性タンパク質の絶対量を知ることができる。

テクニカルノート

ペプチドの各々についてクロマトグラムを取得しこれらの面積比を求めれば、内部標準ペプチドの絶対量から目的ペプチドの絶対量を求めることができる。同じ配列の二つのペプチドを区別してクロマトグラムを描くには、各ペプチドに質量差を持たせ別のMRM トランジションで測定する必要がある。iMRM 法では事前情報取得に使用したペプチドを、絶対定量を行う際の内部標準ペプチドとしても使用する。組み換えタンパク質由来の内部標準ペプチドと目的ペプチドに質量差を持たせるため、安定同位体元素を用いた標識試薬 (mTRAQ 試薬) を用いる。mTRAQ 試薬はペプチドのアミノ基を標識する試薬で、安定同位体によって質量が4異なる mTRAQ $\Delta 0$ と mTRAQ $\Delta 4$ が用意されている。組み換えタンパク質のトリプシン消化物は mTRAQ $\Delta 4$ を用いて標識し、一方で内在性タンパク質のトリプシン消化物は mTRAQ $\Delta 0$ を用いて標識し、これらを混合してサンプルとする。標識試薬の化学的性質は等しいため、同じペプチドであれば HPLC から同時に溶出するが、由来の異なるペプチドは質量が異なるため質量分析計で区別して検出できる。すなわち同時に2種類のクロマトグラムを描いて重ね合わせることができ、目的ペプチドの絶対量を算

出できる。

以上が iMRM 法による内在性タンパク質の絶対定量法である。一例として、iMRM 法によって内在性 p27^{Kip1} を定量したデータを示す (図3)。MRM 法を用いる第一の利点は、検出に抗体が不要かつ一度に複数のタンパク質の定量ができる点である。これまでウエスタンブロッティング法で比較定量解析を行う際には、抗体の良し悪しで結果が大きく左右されてきた。一方でMRM 解析では抗体の良し悪しに左右されず、また数多くタンパク質についての情報を一度に得ることができる。第二の利点は絶対定量情報が得られる点である。すなわちタンパク質Aが1細胞中に何分子存在するかという情報を大規模に得ることができる。通常ウエスタンブロッティング法で得られるのは相対定量情報であり、これでは異なるタンパク質同士での量の比較はできなかった。しかしMRM 法によって「あるタンパク質Aとあるタンパク質Bの発現量はどれだけ違うのか」という問いに答えを出すことができ、これまでにない新しい視点から生物学を眺めることができる。

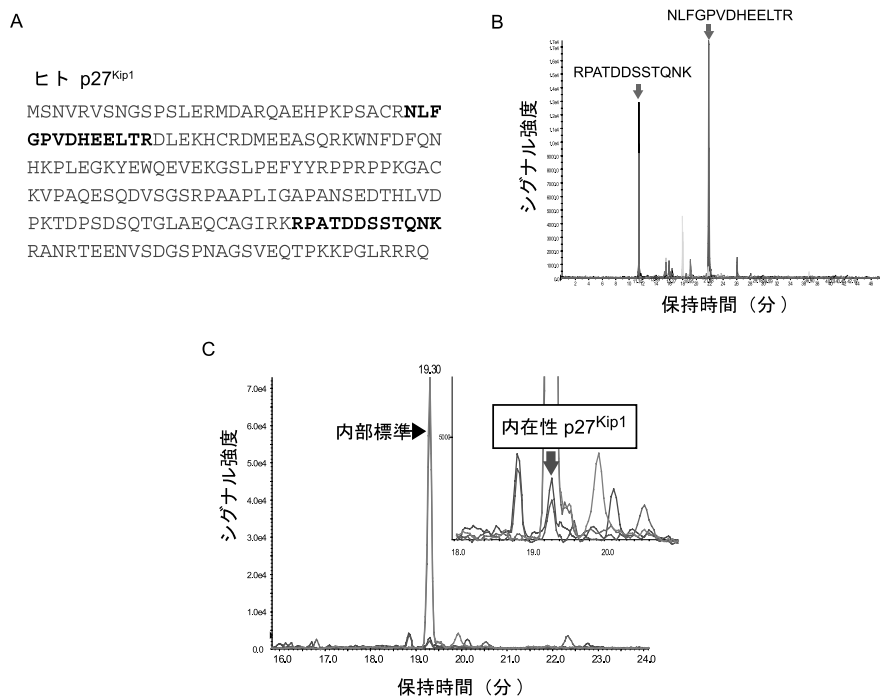


図3 p27^{Kip1} のMRM 法による定量

A ヒト p27^{Kip1} のアミノ酸配列

B ヒト p27^{Kip1} の組み換えタンパク質を作成し、酵素消化してペプチド断片化したのちMRM 測定を行った。全てのペプチドは等モル存在するにもかかわらず、検出感度に大きな差があることがわかる。

C HeLa 細胞の内在性 p27^{Kip1} の絶対定量。内部標準ペプチドのクロマトグラムと面積を比べることで、内在性タンパク質の絶対量が分かる。

iMRM法の将来性

タンパク質の絶対量情報から、今後どのような生物学が拓かれていくだろうか。たとえば細胞周期に依存して量的制御を受けるタンパク質群について模式図を描くとする。現状では異なるタンパク質の発現量の変動幅について等しく描くほかないが、もしこれに各タンパク質の絶対量情報が付加されればどうなるだろうか。たとえば各細胞周期において各タンパク質の絶対量を比較することも可能となり、新しい視点から今までにない考察が生まれるかもしれない。またRNAについては次世代シーケンサーや定量RT-PCRによって既に絶対定量情報の取得が可能である。タンパク質とRNAの二つの絶対量情報を関連付けることで、DNA、RNA、タンパク質へと繋がるセントラルドグマに量的な概念を付加することができる。またRNAとタンパク質の絶対量情報を大規模に取得することで、新規の量的制御のメカニズムを見出せるかもしれない。他にも生命現象を数理モデル化する際にタンパク質の絶対量情報を

含めれば、より精度と信頼性の高いモデルの構築も可能だろう。絶対量情報はこのように生物学をあらゆるベクトルへ広げる可能性を持っている。また基礎生物学的な発展のみならず、医療応用への可能性も期待できる。iMRM法によるターゲット・プロテオミクスの今後の発展に期待したい。

- 1) 松本雅記, 中山敬一 (2009) 明日を拓く新次元プロテオミクス (中山敬一, 松本雅記/監), pp. 33-40, 秀潤社.
- 2) Kamiie, J., Ohtsuki, S., Iwase, R., Ohmine, K., Katsukura, Y., Yanai, K., Sekine, Y., Uchida, Y., Ito, S., & Terasaki, T. (2008) *Pharm. Res.*, 25, 1469-1483.
- 3) Lange, V., Picotti, P., Domon, B., & Aebersold, R. (2008) *Mol. Syst. Biol.*, 4, 222.
- 4) Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Domon, B., & Aebersold, R. (2009) *Cell*, 138, 795-806.
- 5) Picotti, P., Rinner, O., Stallmach, R., Dautel, F., Farrah, T., Domon, B., Wenschuh, H., & Aebersold, R. (2010) *Nat. Methods*, 7, 43-46.
- 6) Goshima, N. et al. (2008) *Nat. Methods*, 5, 1011-1017.