ヒト尿試料を用いたLC/MS^E 法によるタンパク質同定及び定量能力の評価

○佐藤　太[1]，井口誠士[2]，高尾敏文[2]
[1]日本ウォーターズ，[2]大阪大学蛋白質研究所

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

[Introduction]

診断や治療のためのタンパク質バイオマーカーの測定対象となる試料には、採取が容易に行えることが求められる。尿はその点において理想的な試料であるが、一方で濃度や組成の変動が大きいため、定量的な発現差異解析が困難である。さらに、尿は、その他の生体液試料と同様に、幅広い濃度範囲と複雑なタンパク質組成を持つので、その中から着目する疾患特異的な微量なタンパク質の変動を検出することは、容易ではない。

LC/MS^{E}法は、高低二段階のコリジョン電圧を交互に切り替えるだけで、特定のイオンを選択することなく、プレカーサーイオンとフラグメントイオンを記録する測定手法で、強度の高いイオンと同時溶出した強度の低いイオンも、再現よく検出できる可能性が高い。さらにこの手法では、常に一定の間隔(1秒毎)でプリカーサーイオンを記録することから、そのマスクロマトグラムのピーク面積により、ペプチド及びタンパク質に関する定量的な情報を正確に得ることが可能である。

本研究では、尿試料を用いてLC/MS^{E}法による同定及び定量測定を行い、添加した既知濃度のタンパク質トリプシン消化物(Enolase / ENO1_YEAST)の結果から、再現性などの評価を行った。

[Methods]

○試料採取及び前処理

患者の同意を得て採取された尿試料(No.2, 4 及び 6)、及び健常者の尿試料(No.1, 3 及び 5) を用いて測定を行った。尿試料10 mLをゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、10-40 kDaの分子量画分を得た。これをDTT／IAAにより、還元アルキル化した後、トリプシンによりペプチド断片に消化し、0.1%ギ酸含有5%アセトニトリル10 µlに溶解した。

○LC条件

装置　:nanoAcquity UPLC®(Waters社製)
サンプル温度　:10℃
注入量　:1.5 µL(Partial Loop)
洗浄溶媒　:0.1%ギ酸含有アセトニトリル
　0.1%トリフルオロ酢酸
カラム　:nanoACQUITY UPLC® BEH130 C18
　1.7 µm　75 µm x 150mm
トラップカラム　:nanoACQUITY UPLC® Trap Symmetry®
　C18 5 µm　180 µm x 20mm
　ロード時間1.5分、流速 10 µL/min
移動相　:0.1%ギ酸含有アセトニトリル(B)、0.1%ギ酸(A)
カラム温度　:35℃
測定時間　:140分
グラジエント

Time (min)	Flow Rate (µL/min)	%A	%B
Initial	0.3	99	1
1	0.3	99	1
120	0.3	60	40
121	0.3	15	85
125	0.3	15	85
126	0.3	99	1

○MS条件

装置　: SYNAPT™ HDMS™, (Waters社製)
イオン化モード　:ESIポジティブ
キャピラリー電圧　:3.0 kV
脱溶媒ガス　:0.5 Bar
コーンガス　:50 L/hr
イオン源ヒーター　:80 ℃
取り込み条件　:MS^E モード、m/z 50-1990、1.5秒、
　コーン電圧25 V
　Low Energy CE / trap 6 V、
　transfer 4 V
　MS^E CE / trap 20-30 V、transfer　10 V
リファレンス　:60秒ごと、Glu-fibrinopeptide B、2価 / 785.84265、1価 / 684.3469

○データベース検索

ソフトウェア　:Proteinlynx global SERVER (PLGS) 2.4
データベース　:Homo sapiens (Human)、uniprot
擬陽性の低減　:1試料につき3回繰り返し測定した
タンパク質の定量:試料にEnolase (ENO1_YEAST)のトリプシン消化物を添加し、同定された各タンパク質の絶対量*を計算した

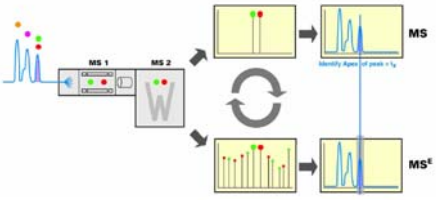

Figure 1．MS^E 法の概念図
ペプチドのプリカーサーイオンは、保持時間によってすべてのフラグメントイオンと関連付けられる

[Results]

Table 1に、6試料のタンパク質同定結果を示した。PLGSは、各タンパク質で同定されたペプチドのうち、強度が高い上位3番目(Hi3)までピーク強度の合計を、内部標準となる添加した既知濃度タンパク質のHi3のピーク強度合計と比較し、タンパク質量を算出する*1。 Table 1には、3回繰り返し測定中2回以上同定されたタンパク質数、及び上記の計算に基づく各タンパク質量(ng)を示した。その結果、試料間でのタンパク質濃度の違いが見られ、また、同定数は、47-92の範囲だった。No4はタンパク質量は平均の2倍以上で最も多かったが、同定数は平均以下だった。

Table 1. タンパク質同定及び定量結果

condition		Healthy state			Disease state		
sample name		No1	No3	No5	No2	No4	NO6
Number of replicate		3	3	3	3	3	3
replicate =>2	# protein	47	53	92	80	61	74
	average # peptide	197	288	496	434	487	387
average total amount (ng)		110	328	335	320	1177	220

Table 2. Enolaseの同定結果

sample name		No1	No3	No5	No2	No4	NO6
Number of replicate		3	3	3	3	3	3
coverage (%)		34.9	34.1	36.9	38.6	35.5	34.9
average # peptide*2		14	14	13	15	10	14
replicate =3	# peptide*3	12	12	10	11	6	10

*2：3回の繰り返し測定における平均ペプチド数
*3：3回の繰り返し測定中3回同定されたペプチド

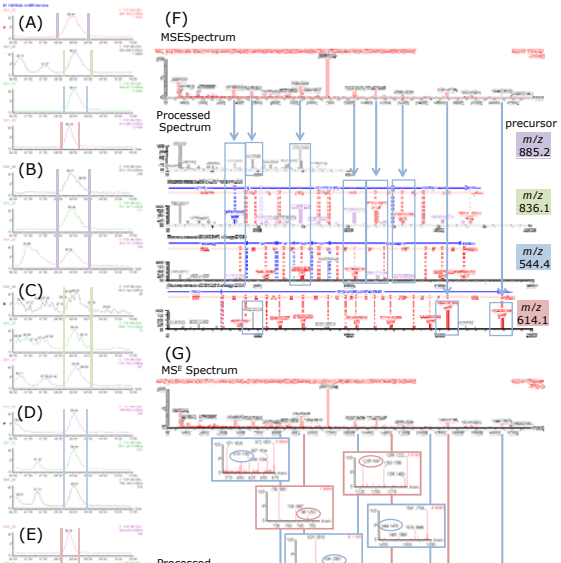

Figure 4．(A)Enolase, SIVPSGASTGVHEALEMR(*m/z* 614.1)及び共溶出しているピークのマスクロマトグラム、(B)*m/z* 885.2に帰属されたElevated Energyスキャンにおけるフラグメントイオンのマスクロマトグラム、以下、それぞれ(C) *m/z* 836.1、(D) *m/z* 544.4、(E) *m/z* 614.1に帰属されたイオンのマスクロマトグラム、(F)と(G) Elevated EnergyスキャンのスペクトルとPLGSで同定に使われたスペクトル

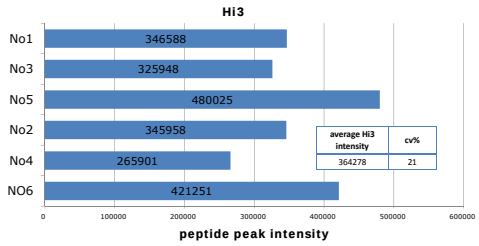

Figure 5．EnolaseのHi3ペプチドのピーク強度合計

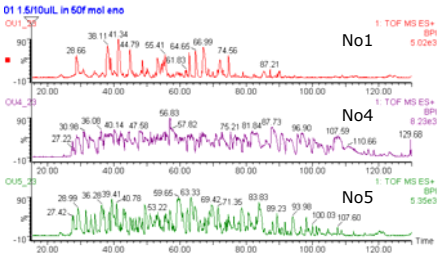

Figure 2．ベースピークイオンクロマトグラム

このようにタンパク質量や同定数に違いのある試料中で、添加したEnolaseのペプチドが、どの程度繰り返し同定されたかをTable 2に示した。No4以外では、3回の繰り返し測定における、各試料ごとの平均ペプチド数13-15に対して、3回とも同定されたペプチド数は10-12であり、繰り返し測定間で同一のペプチドが高い頻度で同定された。No4は、ペプチド数も同定の再現性も、他の試料よりも低い結果となった。 No4のベースピークイオンクロマトグラム(Figure 2)には、強度が高いイオンが多く、イオン抑制などの影響が考えられた。

Enolaseのペプチド/SIVPSGASTGVHEALEMR(*m/z* 614.1)と共溶出したピークのMSスペクトルを、Figure 3 に示した。これらのプレカーサーイオンとMS^{E}スキャンで記録されたフラグメントイオンのマスクロマトグラム、及びその情報をもとに加工され、同定に使用されたスペクトルをFigure 4 に示した。*m/z* 614.1のピークは、他のピークとピーク幅とピークトップが異なるため、その他のピークに由来するフラグメントイオンのほとんどが取り除かれたスペクトルが、構築されていた(Figure 4 F及びG)。それ以外のピークは近接しているため、フラグメントイオンの多くは重複して帰属されているが、データベース検索の過程で、それぞれのプレカーサーイオンのフラグメントとして同定された(Figure 4 F)。

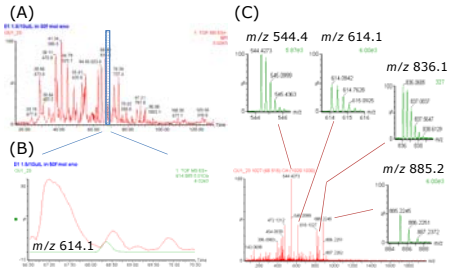

Figure 3．(A)No.1のBPI, (B)66.5-70.5minのBPI及びEnolase, SIVPSGASTGVHEALEMR(m/z 614.1)のマスクロマトグラム, (C)68.2-68.5minのMSスペクトル

Table 3. 4試料以上で繰り返し同定されたペプチド

peptide sequence / replicate 4>=	# replicate between sample
NVNDVIAPAFVK	6
SIVPSGASTGVHEALEMR	6
VNQIGTLSESIK	6
IEEELGDNAVFAGENFHHGDKL	6
IGSEVYHNLK	6
GNPTVEVELTTEK	6
AADALLLK	6
AVDDFLISLDGTANK	6
TFAEALR	5
IEEELGDNAVFAGENFHHGDK	5
IATAIEK	5
AAQDSFAAGWGVMVSHR	5
TAGIQIVADDLTVTNPK	4
YDLDFK	4

Table 3に、Enolaseの同定頻度が高かったペプチド(6試料中4試料以上)と、その同定頻度を示した。6試料のすべてで同定されたペプチド数は8で、多くのペプチドが異なる試料間で繰り返し同定されていた。

Figure 5にEnolaseの各試料のHi3ピーク強度合計を示した。Hi3は、タンパク質量の計算に使用されるが、試料間におけるcv%は21%で、濃度に大きな違いがある尿試料で、Hi3のピーク強度合計の変動幅は十分に小さかった。

[Summary]

・幅広い濃度範囲と複雑なタンパク質組成をもつ尿試料を用いて、LC/MS^{E}法の同定及び定量能力の評価を行った。

・添加したEnolaseのペプチドは、繰り返し測定間で同一のペプチドが再現よく同定された。また、濃度の異なる6試料間でも、8種のペプチドが全て観測され、LC/MS^{E}法による、保持時間を用いたフラグメントイオンの帰属の再現性が示された。

・タンパク質量の計算に使用されたEnolaseのペプチドのHi3ピーク強度合計の変動係数は、異なる試料間で21%と十分に小さい値を示した。Hi3ピーク強度合計により、試料中のタンパク質量が一定の精度で測定が可能であることが示された。

*1：Silva et al., Mol Cell. Proteomics. 5 (2006) 144-156