COMMENTARY

プロテオームの定量・同定解析のためにナノ液体クロマト
グラフィー/ナノエレクトロスプレーイオン化/
イオントラップ質量分析装置を使う†Use of Nano Liquid Chromatography/Nanoelectrospray Ionization/
Ion Trap Mass Spectrometer for Proteome
Quantitation and Identification川上隆雄^{*a)}・安養寺久栄^{a)}・西村俊秀^{a)}

Takao KAWAKAMI, Hisae ANYOJI, and Toshihide NISHIMURA

(Received November 13, 2002; Accepted December 2, 2002)

We describe the potential and applicability of ion trap mass spectrometer to high-throughput expression proteome analysis. In an ion trap, the masses of the peptide ions are analyzed, and/or a particular ion can be selected to undergo collisions resulting in its fragmentation by which sequence information can be directly obtained. Equipped with nanoflow capillary liquid chromatography directly interfaced with nanoelectrospray ionization, ion trap mass spectrometer has been one of the standard systems to identify and quantify large numbers of proteins in complex protein mixtures. The characteristics including the stability, reliability and capability of MSⁿ essentially lead the mass spectrometer to the center of proteome-wide analysis.

1. 広く普及しているイオントラップ質量分析計

本稿では、現在のプロテオミクスにおける有力な分析手段の一つであるイオントラップ質量分析計 (Ion trap mass spectrometer, ITMS) の基本的な特長を抽出して概説するとともに、LC/MS としてプロテオミクスに適用した際に重要なその高い安定性と定量性について言及する。

ITMS は、分子イオンを「イオントラップ」セルの内部に捕獲しながら質量分離を行う装置である。IT 質量分析部はセクター型や TOF 型などに比べてずっと小型でありそれほど高い真空度を必要としないため、大気圧下で行う ESI や APCI などのイオン化法との相性がよく、長期にわ

たる定常分析に適している。特に ESI をインターフェースとして LC と接続した LC/ESI/ITMS は、生体などから抽出した混合試料の分析に有利である。また、解析対象となる特定のイオンを選択的にセル内に捕獲しておくことができるため、本方式の最大の特徴である多段階の MS/MS 測定 (MSⁿ) が可能である¹⁾。

これまでに LC/ESI/ITMS を基軸とした系に対してキャピラリーナノ LC (nanoLC) やナノ ESI (nanoESI) 法の導入による分析の微量化がなされ、1 フェムト (10⁻¹⁵) モル程度の蛋白質分解物の連続分析が実現している。さらに試料導入ロボットや解析データの検索プログラムまで組み込まれた全自動システムは、現在では高処理能プロテオーム解析の標準装備の一つになるまでに至った^{2), 3)}。

2. 質量精度の安定性

質量分析では一般に、質量数が既知の標準品混合物を前もって測定して質量分析部の校正を行った後に試料の測定を行うか、あるいは既知標準品を試料に混ぜて測定する。これは、各質量分析計に固有の原因により質量精度に狂いが生じるためである。イオントラップや四重極型などの分

^{*a)} グラクソ・スミスクライン株式会社 化学研究部 プロテオミクス課 (☎300-4247 つくば市和台 43)

^{a)} Proteomics Unit, Chemistry Department, GlaxoSmithKline K.K. (43 Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-4247, Japan)

現住所: 東京医科大学臨床プロテオームセンター (☎163-(全員) 0203 新宿区西新宿 2-6-1)

Clinical Proteome Center, Tokyo Medical University (2-6-1 Nishi-shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-0203, Japan)

† Congratulations on winning the 2002 Nobel Prize.

Dear Professor Fenn,

We everyday receive the blessings of your great discovery and innovation!

Respectfully yours,

Takao Kawakami,

GlaxoSmithKline K.K., Japan

析部での質量精度の‘ずれ’は、おもに制御回路系の温度ドリフトと電極の形状変化などが原因として挙げられている。特に後者では、電極が温度変化で変形（膨張など）したり、電極が汚れたりすることによる影響が考えられる⁴⁾。しかしながら、現実にはこれらの影響はほとんど無視してよい程度であり、通常は6カ月以上質量校正をせずに連続測定を行ってもほとんど問題ない。TOF-MSなど他の質量分析部と比較する際にこの性質は見落とされがちだが、高処理能が要求される分析の現場では研究の生産性を上げるために特に重要である。筆者らのグループでは、合計600の臨床試料のプロテオーム解析に当たって上記の全自動 nanoLC/nanoESI/ITMS を最適化し、1試料当たり60分間の分析時間にて逆相 nanoLC による1カ月間の連続測定を行った。この間、標準物質による質量校正は行わず、キャピラリー-カラムとスプレーチップの交換各1回以外はほぼ完全にメンテナンスフリーで測定を完了することができた（未発表データ）。

3. イオン強度の定量性

ITMS は四重極型や TOF 型などのイオン透過型の MS と異なり、トラップされたイオンをすべて検出するため高感度の検出が可能である。一方でトラップセルのイオン蓄

積量には限りがあるため、セルに到達した分子イオンをすべてトラップできるわけではない。また、低質量域のイオンはトラップされず（Low mass cut-off 現象）、2,000 Da 以上のイオンではトラップ効率が悪い。このように原理的に定量分析には不利な性質が多いが、nanoESI を介して nanoLC と連結した定常システムでは、特に微量域での広いダイナミックレンジが得られる。図1は、あるチロシンリン酸化ペプチドをおなじアミノ酸配列をもつ非リン酸化ペプチドとさまざまな割合で混合したのちに定量分析した結果である。質量クロマトグラム上での両者の強度比（図2a）および実験値と理論値との相関（図2b）から、検出限界付近の1 fmol から50 fmol まで高い定量性を示していることがわかる。

4. データ依存的スキャン

一度システムを構築すると同定解析は容易に行うことができる。分析試料はほとんどの場合単一あるいは複数の蛋白質のプロテアーゼ消化によって生じたペプチドの混合物である。nanoLC から連続的に分離溶出されてきたペプチド分子は nanoESI によって多価に荷電する。IT 質量分析部では、ペプチド分子イオンの m/z 値の測定 (MS^1) および選択された分子イオンをヘリウムガスと衝突誘起解離 (Collision-induced dissociation, CID) して得られる分解イオンの測定 (MS^2) が交互に行われる。通常のデータ依存的スキャン (Data-dependent scan) と呼ばれる測定では、 MS^1 で相対強度が最大のイオンが親イオンとして MS^2 で選択されるようにスキャンの条件を設定する。このとき、同一保持時間に共溶出する2番目以降の強度のペプチドイオンについても CID スペクトルを得るために、同一親イオンに対して最高 n 回のスキャンまで CID を取るように MS^2 の条件を設定する。この動的排除モード (Dynamic exclusion mode) では、溶出するペプチドの‘込み具合’と実験の性格によって最適の n の値が決まる。二次元ゲルによって分離された蛋白質スポットなどは試料中の蛋白質の純度が高く、かつペプチドが共溶出することが少ない。このため、確実に同定したいときには n 値を高くすることでデータ依存的スキャンによって最大強度のピークを積算すれば、十分な強度の CID スペクトルが得られる可能性が高い。しかし一方でペプチドカバー率は低くなるので、リン酸化などの翻訳後修飾の情報を逃す率は高くなる。また、SDS-PAGE によって分画された生体組織蛋白質群⁵⁾ やリボソームなどの機能複合体を全消化して得られるペプチド混合物の分析^{6), 7)} では、ほとんどの MS^1 で複数のピークが検出される。このような場合にはできるだけ多くのペプチドイオンに対して CID スペクトルを得るために $n=1$ に設定する。 n 値が小さいと、当該ペプチドの一番高い強度が得られるスキャン時間のところすでにそのペプチドが‘排除’されていて十分な強度の CID スペクトルが得られない確率が高くなることにも注意すべきである。理想的には、各スキャン時間において共溶出するペプチドの数に応じて n 値が変化するようなプログラムが望ましい。

図1 nanoLC/nanoESI/ITMS の定量性。あるペプチド 50 fmol を同じアミノ酸配列をもつチロシンリン酸化ペプチドと混合し、文献3に記述した方法に従って測定した。a) 質量クロマトグラム。混合したリン酸化ペプチドの量 1, 2.5, 5, および 50 fmol における非リン酸化ペプチドに対する量比は、それぞれ 0.02, 0.05, 0.1, 1 である。b) 理論値と実測値との相関。混合比（横軸）に対して、a で示したピークの面積から計算した比率（縦軸）をプロットした。

5. nanoLC/nanoESI/ITMS による定量と同定

前述のデータ依存的スキャンによる溶出ペプチドの効率的な MS² 測定の結果を用いて、ペプチドの定量とそのペプチドが帰属される蛋白質の同定を同時に行うことは

すでに多くのグループで実施されている。同位体コード化アフィニティタグ (Isotope-coded affinity tags, ICAT)^{8), 9)} などの安定同位体化合物による化学修飾を利用した相対定量法はその代表例である。このような相対定量においても、あるいは質量クロマトグラムに現れる溶出ペプチドの

図2 LC/MS プロファイルの一例。ある蛋白質のゲル内トリプシン消化物を文献3に記述した方法に従って測定した。a) 3次元 LC/MS プロファイル。縦軸はペプチドイオンの相対強度、横軸はLC保持時間、そして奥行きの軸は m/z 値を示す。同一保持時間に複数のペプチドが溶出している様子がわかる。b) m/z 値 935.5 から 936.5 までの部分を抽出した質量クロマトグラム (a のプロファイル中の矢印で示したピークの付近)。c) m/z 値 936.14 (b の質量クロマトグラム中の矢印で示したピーク) の CID スペクトル。

強度の絶対値を測定する場合でも定量された値の解釈には注意が必要である。通常はあらかじめ設定された時間間隔（スキャン時間）でペプチド m/z 値の測定 (MS1) と選択されたペプチドに対する CID (MS2) が交互に行われる。このときに質量クロマトグラムに現れる各ペプチド分子イオンの強度のプロファイルは図 2 のように不連続になる。ピーク面積の計算はこのようにもっぱら MS¹ における信号強度に基づいており、そのデータ取得間隔はスキャンの制約上ペプチドの LC 溶出プロファイルを描くには不十分なため、単純にこの不連続のピーク面積を合計した値は再現性に乏しいものとなる。例えばピーク強度が一番高い LC 溶出時間に MS¹ のスキャンが重なる場合とそうでない場合とでは全体のピーク面積の積算値に大きな違いが生じる。この問題を改善するためには、検出感度はある程度犠牲になるが、スキャンの切り替わる間隔を短くしてデータポイント数を増やすことにより積算の誤差を小さくするか、あるいは不連続のクロマトグラムのプロファイルパターンからペプチド溶出の連続近似曲線を引かせるプログラムを使用するなどの方策が必要である。

6. プロテオーム解析における全自動システムの役割

これまでの全自動システムの開発経緯および現在の稼働状態を見ると、ITMS は LC, ESI, データ検索プログラムそしてインフォマティクスなどの各要素技術とうまく適応しており、このことは複合科学であるプロテオーム解析をそのまま具現化していると言って良いだろう。

プロテオミクスにおける発現レベルの定量解析は生体システムの動的な状態を探索する上で必須の情報であり、分析の微量化、定量性と再現性、およびダイナミックレンジについては今後も追求されなければならない。現在のところこの分野の解析技術は改良の途上にあり、いまだにポジティブとネガティブの検出結果のみで論じられる例が多いが、これはその解析法の検出限界の問題を含んでいること

に注意したい。したがって、例えばある病態組織の発現プロテオームに対して病態の進行状況に従った時系列の変化を追う場合には、プロテオームレベルでの蛋白質分子の存在量の増減や翻訳後修飾の割合の変化などの定量情報が疾患のメカニズムに関して新たな知見を与えてくれるだろう。またこれらの情報は疾患のマーカー分子を探索する上でも有用である。

上記の全自動システムから得られる膨大な定量・同定のデータからいかに意味のある情報を引き出すかが今後の課題であり、このためにはおもに統計学を駆使したバイオインフォマティクスと連携した解析が重要であることを付記しておく。

文 献

- 1) 原田健一, 田口 良, 橋本 豊編, “生命科学のための最新マスマスベクトロメトリー”, 講談社サイエンティフィック (2002).
- 2) T. Kawakami, F. Usui, and T. Nishimura, *Jpn. J. Electrophoresis*, **44**, 185 (2000).
- 3) 川上隆雄, 安養寺久栄, 西村俊秀, “生命科学のための最新マスマスベクトロメトリー”, 原田 健一, 田口 良, 橋本 豊編, 講談社サイエンティフィック (2002), p. 79.
- 4) <http://www.mssj.jp/index-jp.html> (Q & A コーナー)
- 5) T. Kawakami, H. Anyoji, and T. Nishimura, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **50**, 135 (2002).
- 6) T. Nishimura, Y. Sakaguchi, F. Usui, M. Kubota, Y. Bando, and Y. Fujita, *Med. Sci. Digest*, **28**, 205 (2002).
- 7) 坂口裕理子, 安養寺久栄, 川上隆雄, 碓井史彦, 板東泰彦, 鈴木 勉, 西村俊秀, *生化学*, **74**, 740 (2002).
- 8) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, and R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 994 (1999).
- 9) D. K. Han, J. Eng, H. Zhou, and R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 946 (2001).

Keywords: Data-dependent scan, Dynamic exclusion mode, Expression proteome, Ion trap mass spectrometer, Nanoelectrospray ionization, Protein identification, Proteome quantitation