質量分析を用いたリン酸化プロテオミクスにおける リン酸化ペプチド濃縮用チタニア担体の開発

Development of Titania Particles Used for Phosphopeptide Enrichment in Mass Spectrometry-Based Phosphoproteomics

京野 完¹・杉山直幸¹・今見考志¹・宮崎将太²

大平真義²・富田 勝¹・石濱 泰^{1,3*}

Yutaka KYONO,¹ Naoyuki SUGIYAMA,¹ Koshi IMAMI,¹ Shota MIYAZAKI,²
Masayoshi OHIRA,² Masaru TOMITA,¹ and Yasushi ISHIHAMA^{1,3*}

¹ 慶應義塾大学先端生命科学研究所 *Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, YAMAGATA, JAPAN*

² GLサイエンス株式会社 *GL Sciences Inc., Iruma, SAITAMA, JAPAN*

³ JST さきがけ *PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Chiyoda-ku, TOKYO, JAPAN*

Titanium dioxide, titania, is used as an affinity support for enriching phosphopeptides in mass spectrometry-based phosphoproteomics. In this study, a variety of titania particles were prepared by calcination at different temperatures or were obtained from different manufacturers, and relationships between their physico-chemical properties and the selectivity in phosphopeptide enrichment was examined. Tryptic peptides from three phosphoproteins were employed for phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxyl acid-modified metal oxide chromatography (HAMMOC) using titania in the presence of lactic acid. The recovery of phosphopeptides increased with increasing calcination temperature, up to 500°C, while the number of identified non-phosphopeptides decreased. For titania calcined at 800°C, the retention of phosphopeptides as well as non-phosphopeptides was significantly reduced in the presence of lactic acid. Various physico-chemical parameters, such as crystalline form, pore size and surface area were examined for these calcined titania beads, as well as commercial titania beads. The findings indicate that the weight-loss from 130°C to 800°C, as determined by thermal analysis, was well correlated with the selectivity of phosphopeptides by HAMMOC. Based on these results, optimized titania beads were prepared and applied to 100 µg of a HeLa cell extract. More than 1,000 phosphorylation sites were successfully identified with a false positive rate of 1.4%, whereas 455 phosphorylation sites were identified with a false positive rate of 4.1% when commercially available titania beads were used for HAMMOC.

(Received March 26, 2010; Accepted April 16, 2010)

1. 序 論

タンパク質の代表的な翻訳後修飾の一つである可逆的リン酸化修飾は、生体内の機能調節や細胞内シグナル伝達において重要な役割を担っており、さまざまな機能を有するタンパク質に対してユビキタスに出現し、多様性に富んだ時空間動態を示す¹⁾。したがって、細胞内の機能を解明するうえでタンパク質のリン酸化修飾解析は極めて重要であ

り、その解析法にはリン酸化タンパク質の同定、リン酸化部位の特定ならびにその量的変動の定量などの機能が求められる。

近年のゲノム情報の充実に加え、質量分析 (mass spectrometry, MS) およびその周辺技術の急速な発達に伴い、MSを基盤とするプロテオーム解析技術も目覚ましく発展してきた。リン酸化タンパク質の大規模解析 (リン酸化プロテオーム解析) も、選択性の高いリン酸化ペプチド濃縮法が開発されたことにより、ここ数年で大きな発展を遂げ、実用的な大規模解析例も報告されるようになった^{2), 3)}。リン酸化プロテオーム解析が今まで困難を極めた主要原因の一つは、生体内におけるリン酸化タンパク質の発現量が極めて低いことである。現在のMSの感度・分解能および二次元電気泳動法や高速液体クロマトグラフィー

* Correspondence to: Yasushi ISHIHAMA, *Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 403-1 Nipponkoku, Daihoji, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, JAPAN*, e-mail: y-ishi@ttck.keio.ac.jp
石濱 泰, 慶應義塾大学先端生命科学研究所, 〒997-0017 山形県鶴岡市大宝寺日本国 403-1

(high performance liquid chromatography, HPLC) の分離能をもってしても、リン酸化タンパク質はその他の高発現タンパク質の山に埋もれ、直接分離・検出することは非常に困難である。特に HPLC を基盤としたショットガンプロテオミクスにおいては、トリプシンなどのプロテアーゼでタンパク質を断片化するため、試料中にはリン酸化ペプチドよりも圧倒的に大量の非リン酸化ペプチドが常に存在することになる。そのため、リン酸化ペプチドを網羅的に解析するためには、LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) 分析に供する前に非リン酸化ペプチドをできるだけ除去し、リン酸化ペプチドを十分に精製・濃縮しておくことが鍵となる。チロシンリン酸化タンパク質に関しては、抗チロシンリン酸化抗体を用いることで特異的に精製・濃縮することが可能であり、たとえば Rush らは抗チロシンリン酸化抗体により精製したリン酸化ペプチドの LC-MS/MS 解析によってがん細胞におけるシグナル伝達分子のリン酸化プロファイリングを行った⁴⁾。しかし抗リン酸化抗体を用いる方法は、選択性の高い抗セリン/スレオニンリン酸化抗体がないため、網羅的なリン酸化プロテオーム解析に適用することは現状では困難である。一方、セリンおよびスレオニンも含めたリン酸化ペプチドの濃縮手段として、鉄 (Fe^{3+}) やガリウム (Ga^{3+}) などの三価の金属イオンを固定化した担体を用いた固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)⁵⁾ やアルミナ (酸化アルミニウム, Al_2O_3)⁶⁾、チタニア (酸化チタン, TiO_2)⁷⁾、ジルコニア (酸化ジルコニウム, ZrO_2)⁸⁾ などの酸化金属を担体とした酸化金属クロマトグラフィー (metal oxide chromatography, MOC) などが報告されている。しかし、これらの担体はいずれもリン酸基だけではなく、カルボキシル基に対しても親和性を有するため、酸性アミノ酸残基を多数有する非リン酸化ペプチドの吸着も非常に多く、その精製効率は一般的に高いものではない。リン酸化ペプチドに対する選択性を向上させるため、これまでに多くのグループがこれらのアフィニティークロマトグラフィーの改良を行ってきた。IMAC 法の場合、カルボキシル基のメチルエステル化^{9), 10)} や pH の最適化¹¹⁾、他の分離技術による前分画¹²⁾ などを行うことにより、酸性ペプチドの吸着が抑えられることが報告されている。MOC の場合、試料溶液または移動相中に 2,5-ジヒドロキシ安息香酸やフタル酸などの芳香族カルボン酸¹³⁾ やオクタンスルホン酸¹⁴⁾、酸性アミノ酸⁶⁾ などを添加することで、リン酸化ペプチドの選択性が向上することが報告されている。杉山らは親水性ヒドロキシ酸を試料溶液中に添加することで、MOC におけるリン酸化ペプチド濃縮の選択性を飛躍的に向上させ、その後の LC-MS 測定を妨害しないことを見だし、HAMMOC (hydroxy acid-modified metal oxide chromatography) 法と命名した¹⁵⁾。チタニア HAMMOC に対しては乳酸を、ジルコニア HAMMOC に対しては、3-ヒドロキシプロピオン酸を用いることで、リン酸化ペプチドに対する選択性が大幅に向上し、細胞などの複雑な試料

から直接前分画なしで、一度に 1,000 個以上のリン酸化ペプチドを同定することが可能となった。また、HAMMOC 法で濃縮されたリン酸化ペプチドを溶出する際に、用いるアミンの種類によりリン酸化ペプチドの溶出選択性が異なることを利用して、アンモニア水や環状アミンを用いた段階的な溶出により分画することで、100 μg の細胞抽出物から 3,000 個以上のリン酸化ペプチドの同定が可能となった¹⁶⁾。

このように HAMMOC 法は他手法に比べ非常に高いリン酸化ペプチド濃縮効率を有しているが、プロテオーム規模でみた場合、その網羅性は十分であるとは言いがたい。また、Bodenmiller らは、各種リン酸化ペプチド濃縮法で同定されるリン酸化ペプチドの性質には偏りがあり、いくつかの方法を相補的に使用することでより多くのリン酸化ペプチドが同定されると報告している¹⁷⁾。タンパク質リン酸化大規模解析を行うにあたっては、試料の前分画などに多くの労力、時間が費やされることは否めず、より効率的かつ包括的なリン酸化ペプチド濃縮法の開発が望まれている。

チタニアは、シリカゲルと比較して化学的な安定性が高いことから、クロマトグラフィー担体として順相、逆相、イオン交換および配位子交換などの各種分離モードでその特性が検討されてきた^{18)~22)}。しかし、HAMMOC 法におけるチタニア、ヒドロキシ酸およびリン酸化ペプチド間の詳細な相互作用機序に関しては十分に解明されていない。したがって、これらの溶質および固定相間の相互作用を明らかにし、その知見を基に HAMMOC 法における洗浄方法・溶出条件などを最適化することで、より効率的かつ包括的なリン酸化ペプチド法の確立が期待できる。本研究では、HAMMOC 法によるリン酸化ペプチド濃縮に適したチタニア担体の開発を目的に、物理化学的特性の異なるチタニア担体を作製し、それら担体のリン酸化ペプチド濃縮効率を評価した。また、市販のチタニア担体についても同様の評価を行い、それらの評価結果および物理化学的特性からチタニア、ヒドロキシ酸、リン酸化ペプチド間に働く相互作用機序の解明を試みた。

2. 実験

2.1 試薬

市販のクロマトグラフィー用チタニアとして、Titansphere (粒子径 10 μm) を GL サイエンス社 (東京, 日本) より、Sachtopore NP-300A (アナターゼ型, 粒子径 5 μm , 細孔径 300 Å) および Sachtopore NP-2000A (ルチル型, 粒子径 10 μm , 細孔径 2,000 Å) を ZirChrom Separation 社 (アノーカ, 米国) より入手した。また、ゾルゲル法にて合成されたアナターゼ型チタニアを谷 和江博士 (山梨大) から供与いただいた。未焼成チタニアは、GL サイエンス社にて合成されたものを用いた。酸化チタン (IV) アモルファス (~0.05 μm)、酸化チタン (IV) アナターゼ型 (~5 μm)、酸化チタン (IV) ルチル型 (~5 μm)、Lys-C (lysyl endopeptidase, MS グレード)、酢酸 (LC/

MS グレード) およびアセトニトリル (LC/MS グレード) は和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した。トリプシン (sequencing grade-modified trypsin) は Promega 社 (マディソン, 米国) より購入した。Empore C8 および C18 ディスクは 3M 社 (セントポール, 米国) より購入した。Bovine α -casein, bovine fetuin および chicken phosphovitin は Sigma-Aldrich 社 (セントルイス, 米国) から購入した。水は Milli-Q システム (ミリポア社, ベッドフォード, 米国) により精製した超純水を使用した。その他の試薬は和光純薬工業より購入したものを使用した。

2.2 試料調製

8 M 尿素/50 mM トリス緩衝液 (pH 9.0) を用いて, 3 種類の標準リン酸化タンパク質, bovine α -casein, bovine fetuin および chicken phosphovitin の 2.5 mg/mL ストック溶液を調製した。各ストック溶液 200 μ L に, 50 mM 重炭酸アンモニウム (ABC) 水溶液で溶解した 10 mM ジチオトレイトール (DTT) 溶液を 10 μ L 加え, 室温下, 30 分間還元処理を行った。50 mM ABC 水溶液で調製した 50 mM ヨードアセトアミド (IAA) 溶液を 10 μ L 加え, 室温・暗所下, 30 分間のアルキル化反応を行った。反応溶液に Lys-C 10 μ g を加えて 37°C, 3 時間酵素消化を行い, 50 mM ABC で 5 倍希釈後, さらにトリプシン 10 μ g を加えて, 37°C, 16 時間酵素消化を行った。酵素消化後の反応液は 2% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液で酸性にした後, C18 Empore ディスクを固定化した StageTip による脱塩・濃縮処理を行った²³⁾。濃縮された酵素消化物は 0.1% TFA/80% ACN 1 mL で溶出し, 最終濃度を 0.5 mg/mL に調製した。

HeLa 細胞は 100 mM トリス緩衝液 (pH 8.0) に溶解し, protein phosphatase inhibitor 1 および 2 (Sigma-Aldrich) を各 10 μ L 加えた後, protease inhibitors (Sigma-Aldrich) を 10 μ L 加えた。ホモジナイズ後, 遠心分離 (1,500 g, 10 分間) し, 得られた上清を上記と同様に酵素消化および脱塩操作を行い, 0.1% TFA/80% ACN で最終濃度を 1.0 mg/mL に調製した。調製した各試料は測定に供するまで -20°C で冷凍保存した。

2.3 チタニア担体の作製

未焼成チタニアゲルは小型プログラム電気炉 MMF-1 (アズワン, 大阪, 日本) で熱処理を施し, 結晶構造の異なるチタニアゲルを作製した。焼成温度は 200, 300, 400, 500, 600, 700 および 800°C とし, 焼成時間は 2 時間とした。得られたチタニア担体は走査電子顕微鏡 (SEM) JSM-6060S (日本電子, 東京, 日本) による構造観察, 粉末 X 線回折 (XRD) 装置 RINT-Ultima III (リガク, 東京, 日本) による測定, 非表面積・細孔分布測定装置 TriStar (Micromeritics, ノークロス, 米国) による多孔性チタニア粒子の細孔径測定および示差熱-熱重量分析 (TG-DTA) 装置 WS002 (マック・サイエンス, 横浜, 日本) による測定を行った。TG-DTA 測定は窒素雰囲気下, 約 2 mg の試料に対して, 室温から毎分 20°C の昇温速度で 130°C まで昇温し, 30 分間そのまま温度を保った後, 毎分 40°C 以下

の昇温速度で 800°C まで昇温し, そのまま 10 分間保温するという昇温プログラムを適用した。130°C から 800°C までの昇温過程における最大重量減少量を測定し, 単位秤取量当たりの重量減少量を算出した。

2.4 リン酸化ペプチドの精製および濃縮

HAMMOC チップの作製およびリン酸化ペプチドの精製・濃縮は既報¹⁵⁾ に従った。C8 Empore ディスクを詰めた 200 μ L ピペットチップに, チタニア担体 3 mg を充填した HAMMOC チップは 300 mg/mL 乳酸 (LA) を含む 0.1% TFA/80% ACN 溶液 (A 液) 20 μ L で平衡化した後, α -casein, fetuin および phosphovitin の各トリプシン消化試料の等量混合溶液 15 μ L と A 液 100 μ L を負荷した。A 液 20 μ L および 0.1% TFA/80% ACN 溶液 (B 液) 20 μ L で洗浄した後, 0.5% アンモニア水 50 μ L でリン酸化ペプチドを溶出した。溶出液は 2% TFA 水溶液で酸性にした後, C18 Empore ディスク StageTip による脱塩・濃縮処理を行った。濃縮されたペプチドは B 液 20 μ L で溶出した後, 遠心エバポレーター CC-105 (トミー精工, 東京, 日本) で減圧下, 溶媒除去し, 0.1% TFA/5% ACN 溶液 10 μ L で再溶解した溶液を LC-MS/MS 測定に供した。また上記の HeLa 細胞抽出液のトリプシン消化物 100 μ L に対しても同様の処理を施し, LC-MS/MS 測定に供した。

2.5 装置および分析条件

LC-MS/MS 装置は HTC PAL オートサンプラー (CTC analytics, ツヴィンゲン, スイス) および Agilent 1100 nanoflow ポンプ (Agilent Technologies, ヴァルトブロン, ドイツ) を装備したハイブリッド四重極-飛行時間型質量分析計 QSTAR XL (AB/MDS Sciex, トロント, カナダ) または HTC PAL オートサンプラーおよび Dionex Ultimate3000 ポンプ (Dionex, ゲルメリング, ドイツ) を装備した LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, ブレーメン, ドイツ) を使用した。ペプチドの分離には, 既報²⁴⁾ に従い粒子径 3 μ m の ReproSil Pur 120 C18-AQ (Dr. Maisch, ドイツ) を自家充填した nanoESI スプレーチップ-体型 nanoLC カラム (長さ 150 mm, 内径 100 μ m, 先端径 6 μ m) を使用した。試料注入量を 5 μ L に, 移動相流速を 500 nL/min に設定した。移動相には 0.5% 酢酸水溶液 (移動相 A) および 0.5% 酢酸/80% ACN 溶液 (移動相 B) を使用し, 標準リン酸化タンパク質酵素消化物に対しては 5% B $\rightarrow$ 30% B (20 min) $\rightarrow$ 100% B (5 min) $\rightarrow$ 100% B (10 min) のグラジエント条件を, 細胞抽出試料に対しては 5% B $\rightarrow$ 10% B (5 min) $\rightarrow$ 40% B (60 min) $\rightarrow$ 100% B (5 min) $\rightarrow$ 100% B (10 min) のグラジエント条件を適用した。スプレー電圧は +2.4 kV (ポジティブイオンモード) としスキャン範囲を QSTAR では m/z 350 $\sim$ 1,400 に, LTQ-Orbitrap では m/z 300 $\sim$ 1,500 に設定した。QSTAR では MS スペクトル中最も強度の強い三つのプリカーサーイオンに対して, LTQ-Orbitrap では MS スペクトル中最も強度の強い 10 個のプリカーサーイオンに対して, データ依存的に MS² スペクトルを取得した。

2.6 データベース検索

ピークリストの作成には Mass Navigator ver.1.2 (三井情報, 東京, 日本) を使用した. データベース検索には Mascot ver.2.1 (Matrix Science, ロンドン, 英国) を使用し, データベースには UniProt/Swiss-Prot 57.1 (24-Jan-2008) を使用した. 検索条件として, 制限酵素にはトリプシンを選択し, fixed modification にはシステイン残基のカルバミドメチル化を, variable modification にはメチオニン残基の酸化およびセリン, スレオニン, チロシン残基のリン酸化をそれぞれ選択した. 計算質量との許容範囲を ± 0.25 Da (QSTAR) または ± 3.0 ppm (LTQ-Orbitrap), プロダクトイオンの計算値との許容誤差範囲を ± 0.25 Da (QSTAR) または ± 0.8 Da (LTQ-Orbitrap) に設定し, ペプチドの未切断は 2 まで許容した²⁵⁾. 質量値はモノアイソトピックを, 装置タイプは ESI-Quad-TOF (QSTAR) または ESI-TRAP (LTQ-Orbitrap) を選択した.

ペプチドの同定は, イオンスコアが identity ($p < 0.05$) スコア以上で, MS/MS スペクトル中に三つ以上の連続した y -もしくは b -イオンを含み, かつ計五つ以上の y -, b -イオンまたはブリカーサーイオン由来のリン酸基のニュートラルロスピークが検出されたペプチドを採用した²⁶⁾. Mascot Perl スクリプトから作成した無作為データベースを用いて, 上記の基準を満たす同定ペプチドに対して偽陽性率を求めた.

リン酸化ペプチドおよび非リン酸化ペプチドのピーク面積は, Mass Navigator のラベルフリー定量機能を用いて計測した. なお, ピーク面積算出にあたって, リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドのイオン化効率の違いは特に考慮しなかった.

3. 結果および考察

3.1 焼成温度の異なるチタニアによるリン酸化ペプチド濃縮効率の比較

チタニアは製造工程において焼成温度をコントロールすることにより, 異なる 2 種類の結晶形 (アナターゼ型およびルチル型) を作り分けることが可能である²⁷⁾. この 2 種類のチタニア結晶は表面積や細孔径など物理的性質が異なるだけではなく, 配位水や表面水酸基の違いによるものと考えられる配位子交換能やイオン交換能などの化学的性質も異なることが報告されている²⁰⁾. 本研究では, これらのチタニア結晶とリン酸化ペプチド濃縮における選択性との関係を調べるため, 未焼成のチタニアを電気炉で加熱処理し, さまざまなチタニア担体を作製した. 未焼成および 200~800°C で焼成したチタニアの XRD 測定の結果を Fig. 1 に示す. 未焼成チタニアは非晶質であったが, 焼成温度 200°C 付近から結晶を形成し始め, 谷らの報告と同様に, 500~600°C 付近でアナターゼ型結晶構造に, 700~800°C 付近でルチル型結晶構造に転移した.

次にこれらのチタニアを用いて, α -casein, fetuin および phosvitin 消化物由来のリン酸化ペプチドを濃縮し, LC-MS 測定後, マスコットデータベース検索にてペプチドの同定を行った. 同定されたリン酸化ペプチドおよび非リン酸化ペプチドの抽出イオンクロマトグラム上でのピーク面積を用いて, 下記の式よりリン酸化ペプチド選択性を算出した.

リン酸化ペプチド選択性 (%)

$$= \frac{\text{同定リン酸化ペプチドの総ピーク面積}}{\text{同定ペプチドの総ピーク面積}} \times 100$$

(1)

結果を Fig. 2 に示す. チタニアを用いた HAMMOC 法で

Fig. 1. Powder X-ray diffraction patterns of calcined titania beads. Symbols ○ and ● represent diffraction peaks corresponding to rutile and anatase, respectively.

Fig. 2. Phosphopeptide enrichment of tryptic peptides from standard phosphoproteins using titania beads calcined at different temperatures.

(A) HAMMOC with lactic acid, (B) Without lactic acid.

Sample: tryptic digests of α -casein, fetuin, and phosvitin ($2.5\mu\text{g}$ each). Triplicate analyses were carried out and the average values are shown. Phosphopeptide selectivity was calculated using Eq. (1).

は、リン酸化ペプチド濃縮時の競合剤として乳酸を使用することにより、非リン酸化ペプチドの結合を妨害し、リン酸化ペプチド選択性を飛躍的に向上させることが可能である¹⁵⁾。本研究では、乳酸を使用した場合 (Fig. 2A) と使用しなかった場合 (Fig. 2B) を検討した。リン酸化ペプチド濃縮を行わなかった場合のリン酸化ペプチド選択性は8.0%であった。乳酸が共存する系では、未焼成チタニアはリン酸化ペプチドに対してほとんど親和性をもたず、回収されたペプチドの95%以上が非リン酸化ペプチドであった。焼成温度の上昇に伴い、リン酸化ペプチドの回収量が増加する一方、非リン酸化ペプチドの回収量は減少し、300°C以上でリン酸化ペプチドの回収量が非リン酸化ペプチドの回収量を上回った。500°Cでリン酸化ペプチドの回収量は最大となり、リン酸化ペプチド選択性は95%以上となった。それ以降の温度では、リン酸化ペプチドの回収量は減少し、800°C焼成チタニアでは、リン酸化ペプチド、非リン酸化ペプチドいずれもほとんど回収されなくなった。一方、乳酸が共存しない系では、焼成温度にかかわらず、チタニアからのリン酸化ペプチドの回収量はほぼ一定であった。それに対して、非リン酸化ペプチドの回収量には焼成温度依存性が認められ、400°Cまではわずかに増加傾向を示したが、600°C以上では大幅に減少し、リン酸化ペプチドの回収よりも下回り、結果としてリン酸化ペプチドに対する選択性が向上した。

谷らは、200~800°Cで焼成したチタニアに対し、乳酸を含むヒドロキシ酸の保持挙動を報告している²⁰⁾。それによると乳酸を含むヒドロキシ酸の保持は200~600°C焼成チタニアではほぼ一定であるが、600°C以上の焼成チタニアで大きく減少し始め、700°C以上のルチル型チタニアでは

全く保持しなくなった。一方、本研究で得られたルチル型チタニアは乳酸の共存の有無によりリン酸化ペプチドや非リン酸化ペプチドの保持が変化し、乳酸に対して親和性を保持していると考えられ、谷らによって得られたルチル型結晶とは異なっていた。実際、谷らのルチル型結晶の細孔径(約5 nm)は焼成に伴いアナターゼ型(約12 nm)に比べて50%以上減少しているのに対し、今回得られたルチル型結晶(細孔径56.6 nm)では、アナターゼ型(8.6 nm)に比べて大きく増加していた。本研究で得られたルチル型チタニアは、乳酸などの競合剤を使わずにリン酸化ペプチド濃縮を行うことが可能であり、すでに細胞抽出タンパク質試料への応用も報告されている²⁸⁾。乳酸とアナターゼ型チタニアを用いた従来法(HAMMOC法)と比較すると、リン酸化ペプチド同定数は1/3程度であるが、多重リン酸化ペプチドの同定率が高いなど、ユニークな特性をもっている。

アナターゼおよびルチル結晶はいずれも正方晶であり、

Fig. 3. Proposed binding schemes for (A) phosphoric acid, (B) hydroxy acid, and (C) carboxylic acid on a titania surface.

Fig. 4. Powder X-ray diffraction patterns of 6 commercially available titania beads obtained from different manufacturers. Symbols ○ and ● represent diffraction peaks assigned to rutile and anatase, respectively.

結晶格子定数はそれぞれ、 $a=b=3.78\text{ \AA}$, $c=9.49\text{ \AA}$, および $a=b=4.58\text{ \AA}$, $c=2.95\text{ \AA}$ と原子間密度はルチル型が高い²⁷⁾. Connor らは赤外分光測定をもとにリン酸基とチタニア間の結合様式を、1リン酸基に対してチタニウム原子の2座配位であることを推定している (Fig. 3(A))²⁹⁾. したがって、結晶形の変化に応じてリン酸基との親和性が変化することが予測されたが、Fig. 2(B) に示すように乳酸非共存下でリン酸化ペプチドの回収量は結晶形にかかわらずほぼ一定であった。一方、乳酸とチタニアの間の相互作用に関しては、谷らにより5員環形成モデルが提唱されており (Fig. 3(B))²¹⁾, これは非リン酸化ペプチド-チタニア間の推定される静電的な相互作用 (Fig. 3(C)) よりもエネルギー的に安定であることが予想されるため、乳酸共存系においてリン酸化ペプチド選択性が向上したと考えられる。

3.2 市販チタニア担体によるリン酸化ペプチド濃縮効率の比較

さまざまな結晶形を有する市販のチタニア担体6種につき、焼成チタニアと同様にXRD測定およびリン酸化ペプチド濃縮を行った。XRD測定の結果をFig. 4に示す。また、リン酸化ペプチド濃縮選択性をFig. 5に示す。TitansphereはXRDパターンやリン酸化ペプチド濃縮選択性において、500℃焼成チタニアと似ていた。一方、Sachtopore NP-300AはTitansphereと同様のアナターゼ型結晶形を有していたが、リン酸化ペプチド濃縮において競合剤である乳酸の添加効果がほぼ認められず、ルチル型のSachtopore NP-2000Aとほぼ同等のリン酸化ペプチド濃縮選択性が得られた。Sachtopore NP-2000Aでは、ルチル型の800℃焼成チタニアとは異なり、乳酸共存下でもリン酸化ペプチドが回収された。和光純薬製の酸化チタニアモルファス、酸化チタニアアナターゼ型、酸化チタニルチル型のXRDパターンは、それぞれ表示どおりの結晶形

を示した。リン酸化ペプチド選択性は、乳酸が共存しない系では、18.4% (アモルファス), 7.1% (アナターゼ) および12.3% (ルチル), 乳酸が共存する系では、0.6% (アモルファス), 14.7% (アナターゼ) および22.5% (ルチル) であった。和光純薬工業製チタニアではSachtopore担体とは異なり、いずれの結晶系においても乳酸共存下で、リン酸化ペプチドおよび非リン酸化ペプチドの回収はいずれも大きく減少した。

以上の結果より、市販チタニア担体の結晶形とリン酸化ペプチド選択性の間には焼成チタニアで見られたような関係は認められず、チタニアの結晶構造が類似する場合でも、酸性官能基に対する親和性は大きく異なることから、結晶構造が必ずしもリン酸化ペプチド選択性を決める主因子ではないことが明らかとなった。

3.3 配位水分子の定量とリン酸化ペプチド選択性との関係

市販チタニア担体および焼成チタニア担体の中で最も高いリン酸化ペプチド選択性を示すものは、乳酸共存下の500℃焼成チタニアであり、焼成チタニアにおいては、乳酸のチタニアへの親和力の調節が選択性向上の最も重要な因子であった。乳酸やカルボン酸のチタニア担体への保持にはチタニアの配位子交換能が重要であり、それには担体表面のチタン原子に配位している水分子 (配位水) や表面水酸基が関与していると考えられる^{19)~21)}。配位水とリン酸化ペプチド選択性との関係を検討するため、TG-DTA測定によるアナターゼ型結晶チタニアの配位水の定量を試みた。付着水と配位水を区別するため、昇温プログラムにおいて、130℃で昇温を止め、30分間で付着水を除去することとした。測定の一例として、Fig. 6(A) に和光チタニア (アナターゼ型) のTG-DTA曲線を示す。配位水の放出によると考えられる重量減少は200℃付近から始まり、

Fig. 5. Phosphopeptide enrichment of tryptic peptides from standard phosphoproteins using commercial titania beads in the absence and presence of lactic acid.

(A) Titansphere, Sachtopore NP-300A and Sachtopore NP-2000A, (B) Titansphere and Wako titania (amorphous, anatase, and rutile).

Sample: tryptic digests of α -casein, fetuin, and phosvitin ($2.5 \mu\text{g}$ each). Triplicate analyses were carried out and the average values are shown. Values above each bar indicate the number of phosphopeptides identified, the number of non-phosphopeptides and phosphopeptide selectivity using Eq. (1), in that order.

600°C付近で終了した。これはすべてのアナターゼ型担体に共通しており、200~500°C焼成チタニアについては、その焼成温度が高いほど重量減少は少なくなった。各アナターゼ型チタニア担体の単位重量当たりの重量減少に対して乳酸共存下でのリン酸化ペプチド選択性をプロットした相関図をFig. 6(B)に示す。高選択性を与える重量減少値には最適範囲が存在しており、重量減少が10 mg/g前後のチタニア担体が乳酸共存下、最も効率良くリン酸化ペプチドを濃縮できることが判明した (Table 1)。

HAMMOC法では、チタニアに対するリン酸化ペプチ

Fig. 6. Weight loss from 130°C to 800°C measured by TG-DTA analysis.

(A) Typical TG-DTA curves obtained for Wako titania (anatase), (B) Relationship between selectivity (%) in phosphopeptide enrichment and weight-loss per sample from 130 to 800°C determined by TG-DTA. Open circle: Wako titania anatase containing both anatase and rutile forms.

ド、非リン酸化ペプチドおよび乳酸の三者の相対的な親和性のバランスが鍵である。それぞれの溶質と固定相（チタニア）間の親和性は、静電的相互作用、疎水性相互作用や配位子交換など複合的な因子で成り立っていると考えられ、特に表面の化学構造が重要であることは容易に予想できる。しかしながら、赤外分光法やイオン交換クロマトグラフィーでは異なるリン酸化ペプチド選択性を有するチタニアの差異を検出することはできなかった。Fig. 7にTitansphereとSachtopore NP-300Aの電子顕微鏡写真を示す。両者は同じアナターゼ型結晶構造を有し、粒子径もほぼ同等であるが、細孔径や表面積は全く異なっている。しかし、このような物性値についても、リン酸化ペプチド濃縮率との間の相関を見いだすことはできず、今回熱分析で検出された重量変化が唯一リン酸化ペプチド濃縮率と関連が認められた因子であった。

Table 1. Relationship between Weight-loss per Sample and Selectivity (%) in Phosphopeptide Enrichment Using Different Titania Beads

Material	Weight-loss per sample (mg/g)	Selectivity (%) in phosphopeptide enrichment
Titansphere (Lot. A)	8.4	96.6
Titansphere (Lot. B)	4.6	93.9
Titania monolith calcined at 500°C	4.2	41.4
Titania without calcination	77.0	5.3
Titania calcined at 200°C	75.6	16.6
Titania calcined at 300°C	29.8	59.6
Titania calcined at 400°C	9.3	90.3
Titania calcined at 500°C	10.1	95.7
Sachtopore NP-300A	3.1	50.3
Titania Anatase (Wako) ^a	6.8	14.7
Titania YU-200 (Lot. A) ^b	16.1	79.5
Titania YU-200 (Lot. B) ^b	27.7	24.0
Titania YU-500 ^b	4.8	74.1

^a This material was a mixture of the anatase and rutile forms of titania.

^b Titania YU-XXX was synthesized and calcined at XXX °C by Dr. Tani (Yamanashi Univ.).^{20), 21)}

Fig. 7. Scanning electron microscope images of Titansphere and Sachtopore NP-300A.

(A) Titansphere, scale factor; $\times 15,000$, (B) Titansphere, scale factor; $\times 100,000$, (C) Sachtopore NP-300A, scale factor; $\times 18,000$, (D) Sachtopore NP-300A, scale factor; $\times 100,000$.

なお、今回熱分析で検出された重量変化は焼成チタニアに対して得られていることから、可逆的なものである (TG-DTA 曲線から考えると製造時の焼成ステップで配位水は消失しているはずなので、室温まで冷却することで再び水分子が配位したことになる)。ちなみに 500°C 焼成チタニアは、湿度制御なしの環境下で数カ月間放置しておくと回収率が約 30% 低下するが (選択性は変わらない)、このチタニアを 500°C で 2 時間以上焼成すると性能が戻る。

一方、デシケーター保存や真空パック保存では、1 年以上保存していても回収率や選択性に顕著な変化は見られない。これらの事実は可逆的な水分子の配位が HAMMOC 法におけるリン酸化ペプチド選択性に重要な役割を果たしていることを支持している。この因子をさらに精密に制御することで HAMMOC における濃縮機構の詳細な解明が可能となり、よりよい担体の開発や、注入、洗浄、溶出段階における最適化によりさらなる高性能化が期待できる。

Fig. 8. HAMMOC phosphopeptide enrichment of HeLa cell extracts using 500°C calcined titania and Sachtopore NP-300A. (A) Number of identified peptides, (B) total peak area.

Tryptic peptides from 100 μ g of HeLa cell proteins were examined by HAMMOC with lactic acid. Triplicate analyses were carried out and the merged results were used for the peptide number, whereas average values were employed for the peak area. Values above each bar indicate phosphopeptide selectivity, calculated using Eq. (1).

3.4 最適化チタニア担体を用いた細胞抽出試料のリン酸化プロテオーム解析

最後に 500°C 焼成チタニアおよび Sachtopore NP-300A による HeLa 細胞抽出試料（総タンパク質量 100 μ g）からのリン酸化ペプチド濃縮効果を検討した (Fig. 8)。いずれの担体も濃縮の際に乳酸を競合剤として用い、それぞれ同様の処理を施した。500°C 焼成チタニアでは 1,200 個のリン酸化ペプチド（同定リン酸化サイト数; 1,115, リン酸化ペプチド同定における偽陽性率 1.4%）が同定されたのに対して、Sachtopore NP-300A では 439 個（同定リン酸化サイト数; 455, リン酸化ペプチド同定における偽陽性率 4.1%）と 500°C 焼成チタニアに比べ 1/3 程度のリン酸化ペプチドしか同定されなかった。リン酸化ペプチド濃縮効率も 500°C 焼成チタニアでは 87.0% と高い選択性を示したのに対して、Sachtopore NP-300A ではわずか 27.3% であった。このように細胞抽出試料のような複雑な試料からリン酸化ペプチドを濃縮する場合、同様の濃縮操作を行ったにもかかわらず、使用するチタニア担体によって得られる結果は大きく異なった。また、選択性の低いチタニア担体で処理された試料は、大量に存在する非リン酸化ペプチドの影響により、リン酸化ペプチド同定における偽陽性率が上昇した。限られた試料から精度の高いリン酸化ペプチド同定結果を得るためには、より選択性の高いチタニア担体を使用することが重要である。

4. 結 語

近年のリン酸化プロテオーム解析法の発展により、多くのリン酸化タンパク質、リン酸化サイトが明らかになってきたが、ヒトリン酸化プロテオームの全貌はいまだに不明である。全貌を解明するうえで前分画なしに濃縮可能な不

偏的かつ効率的なリン酸化ペプチド濃縮法の開発が望まれている。そのためにはリン酸化ペプチド濃縮法の詳細な作用機構の解明が必須であり、今回チタニアに関して得られた知見はその詳細な濃縮機構解明の第一歩となることが期待される。

謝 辞 焼成チタニアを供与いただいた谷 和江博士（山梨大学）、粉末 X 線回折装置および走査型電子顕微鏡装置を貸していただいた中西和樹博士（京都大学）および各種測定機器の操作にご協力いただいた GL サイエンス開発部の皆様に感謝いたします。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (No. 21310129)、(独) 科学技術振興機構重点地域研究開発推進プログラム (育成研究)、山形県および鶴岡市の援助を受けて実施しました。ここに感謝いたします。

文 献

- 1) T. Hunter, *Cell*, **100**, 113 (2000).
- 2) J. V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnäd, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann, *Cell*, **127**, 635 (2006).
- 3) N. Dephoure, C. Zhou, J. Villen, S. A. Beausoleil, C. E. Bakalarski, S. J. Elledge, and S. P. Gygi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 10762 (2008).
- 4) J. Rush, A. Moritz, K. A. Lee, A. Guo, V. L. Goss, E. J. Spek, H. Zhang, X. M. Zha, R. D. Polakiewicz, and M. J. Comb, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 94 (2005).
- 5) A. Stensballe, S. Andersen, and O. N. Jensen, *Proteomics*, **1**, 207 (2001).
- 6) F. Wolschin, S. Wienkoop, and W. Weckwerth, *Proteomics*, **5**, 4389 (2005).
- 7) Y. Ikeguchi and H. Nakamura, *Anal. Sci.*, **13**, 479 (1997).
- 8) H. K. Kweon and K. Hakansson, *Anal. Chem.*, **78**, 1743 (2006).
- 9) S. B. Ficarro, M. L. McClelland, P. T. Stukenberg, D. J.

- Burke, M. M. Ross, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and F. M. White, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 301 (2002).
- 10) Y. M. Ndassa, C. Orsi, J. A. Marto, S. Chen, and M. M. Ross, *J. Proteome Res.*, **5**, 2789 (2006).
 - 11) M. Kokubu, Y. Ishihama, T. Sato, T. Nagasu, and Y. Oda, *Anal. Chem.*, **77**, 5144 (2005).
 - 12) D. E. McNulty and R. S. Annan, *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 971 (2008).
 - 13) M. R. Larsen, T. E. Thingholm, O. N. Jensen, P. Roepstorff, and T. J. Jorgensen, *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 873 (2005).
 - 14) M. Mazanek, G. Mituloviae, F. Herzog, C. Stingl, J. R. Hutchins, J. M. Peters, and K. Mechtler, *Nature Protocols*, **2**, 1059 (2007).
 - 15) N. Sugiyama, T. Masuda, K. Shinoda, A. Nakamura, M. Tomita, and Y. Ishihama, *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 1103 (2007).
 - 16) Y. Kyono, N. Sugiyama, K. Imami, M. Tomita, and Y. Ishihama, *J. Proteome Res.*, **7**, 4585 (2008).
 - 17) B. Bodenmiller, L. N. Mueller, M. Mueller, B. Domon, and R. Aebersold, *Nat. Methods*, **4**, 231 (2007).
 - 18) J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, and P. W. Carr, *J. Chromatogr. A*, **1028**, 1 (2004).
 - 19) J. Winkler and S. Marme, *J. Chromatogr. A*, **888**, 51 (2000).
 - 20) K. Tani and E. Miyamoto, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **22**, 857 (1999).
 - 21) K. Tani and M. Ozawa, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **22**, 843 (1999).
 - 22) A. Sano and H. Nakamura, *Anal. Sci.*, **20**, 861 (2004).
 - 23) J. Rappsilber, Y. Ishihama, and M. Mann, *Anal. Chem.*, **75**, 663 (2003).
 - 24) Y. Ishihama, *J. Chromatogr. A*, **1067**, 73 (2005).
 - 25) J. V. Olsen, S. E. Ong, and M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 608 (2004).
 - 26) M. Mann and M. Wilm, *Anal. Chem.*, **66**, 4390 (1994).
 - 27) T. Nakamura, *TECHNO-COSMOS*, **14**, 34 (2001).
 - 28) K. Imami, N. Sugiyama, Y. Kyono, M. Tomita, and Y. Ishihama, *Anal. Sci.*, **24**, 161 (2008).
 - 29) P. A. Connor and A. J. McQuillan, *Langmuir*, **15**, 2916 (1999).

Keywords: Phosphoproteome, Phosphopeptide identification, HAMMOC, Titania, Calcination