化学修飾トリプシン由来自己消化断片ペプチドの スペクトルライブラリーを利用したタンパク質の同定

A Strategy for Protein Identification by Using Spectral Libraries of Chemically Modified Trypsin Autolysis Peptide Fragments

吉野健一^{1,2,*}・宇佐見 至³・竹内敦子⁴

Ken-ichi YOSHINO^{1,2}, Itaru USAMI³, and Atsuko TAKEUCHI⁴

¹ 神戸大学バイオシグナル総合研究センター *Biosignal Research Center, Kobe University*

² 神戸大学大学院医学研究科質量分析総合センター *The Integrated Center for Mass Spectrometry, Graduate School of Medicine, Kobe University*

³ マトリックスサイエンス株式会社 *Matrix Science K. K.*

⁴ 神戸薬科大学中央分析室 *Instrumental Analysis Center, Kobe Pharmaceutical University*

Chemically modified trypsin by reductive methylation is a standard reagent for identifying proteins by mass spectrometry. The reductive methylation of trypsin is assumed to protect the enzyme against autolysis. However, it has been reported that peptides with mono- or di-methylated Lys, or Asn residues at their C-termini have been observed in autolysis products of chemically modified trypsin. In most cases, the chemical modification of trypsin is not taken into consideration in database searches for protein identification. Spectral data derived from autolysis peptides of chemically modified trypsin might be incorrectly assigned to peptides derived from other proteins, thus creating false-positive identifications. In this paper, we propose a simple strategy for searching databases by using spectral libraries to identify autolysis peptides from heavily chemically modified trypsin, which cannot be identified by a normal search strategy.

(Received November 25, 2020; Accepted December 14, 2020)

1. 序 論

ペプチド鎖中のLys残基およびArg残基のカルボキシル基側ペプチド結合 (Lys-X, Arg-X) の加水分解を触媒するトリプシン (Trypsin, EC 3.4.21.4) は、トップダウンプロテオミクスにおいて、試料タンパク質断片化のための残基特異的エンドペプチダーゼとして最も高頻度で使用されている^{1)~3)}。トリプシン分子自身もタンパク質であり、そのポリペプチド鎖中にはLys-X, Arg-Xのペプチド結合が複数存在している。そのため試料タンパク質断片化の過程において、トリプシン分子ポリペプチド鎖の断片化、いわゆる自己消化を避けることはできない^{4)~8)}。特にゲル内消化では、試料タンパク質に比べて大過剰量のトリプシンが用いられることから、分析試料中にトリプシン自己消化由来の断片ペプチドが豊富に存在している。

自己消化を軽減させるためにトリプシンのLys残基にメチル化^{注1)}等の化学修飾を施した商品が開発され、市販されている^{注2)}。しかし、Arg残基に修飾は施されておらず、ペプチド鎖中のすべてのLys残基がメチル化されているわけではない。したがって化学修飾トリプシンを用いたとしても自己消化を完全に防ぐことはできない^{5)~8)}。

トリプシンの基質特異性も完全ではない^{9)~12)}。最もよ

く知られている非特異的な切断はAsn-Xの加水分解である。Asn-X以外にも、臍臓から調製品であれば精製の過程で完全に除去しきれていないキモトリプシンの影響が残されている。残存キモトリプシンを不活性化させるためにTPCK (L-1-tosylamido-2-phenylethylchloromethyl ketone) 処理が施されているが³⁾、Lys-XやArg-Xと比較すると反応速度は遅いながらもキモトリプシン様の非特異的な加水分解が起こることが知られている。驚くべきことは、自己消化を防ぐために施されたモノメチル化Lys残基やジメチル化Lys残基のC末端側のペプチド結合が加水分解されることによって生じた自己消化断片ペプチドも存在している^{6)~8)}。化学修飾トリプシンの自己消化断片ペプチドは、非特異的な加水分解によって生じた断片ペプチドに加え、モノメチル化やジメチル化の化学修飾を含む断片ペプチドなど多様な修飾基を有した自己消化断片ペプチドが存在している。本論文では、一般的なデータベース検索条件では

注1) アミノ基の水素原子にメチル基が置換する化学修飾としてモノメチル化、ジメチル化、トリメチル化があるが、本稿ではこれらの総称として「メチル化」の用語を使用し、具体的な修飾を示す場合はモノメチル化、ジメチル化と明記する。ただしMASCOTのmodificationの選択肢では“methyl”はmonomethylを指す用語として使用されていることから、MASCOTのmodificationの選択肢を表記する場合に限って“methyl”はモノメチル (monomethyl) を示す。

注2) 市販されている化学修飾トリプシンは必ずしもメチル化による修飾とは限らない。

*連絡先: kyoshino@kobe-u.ac.jp

同定できない Lys-X, Arg-X 以外の非特異的な加水分解によって生じた断片ペプチドやデータベース検索時に考慮されることが少ない化学修飾を含む断片ペプチドを以下「想定外自己消化断片ペプチド」と表記する。

想定外自己消化断片ペプチドは、特異的な加水分解によって生じた自己消化断片ペプチドに比べれば量的には少量である。試料タンパク質量に比べ、消化酵素であるトリプシンの量が少ない場合は想定外自己消化断片ペプチドの存在は大きな問題にはならない。しかし、プロテオミクス用の試料、特にゲル内消化によって調製される試料では、試料タンパク質に比べてトリプシンは過剰量存在しており、想定外自己消化断片ペプチドは、タンパク質を同定するための試料由来のペプチドの分子数と同程度もしくはそれ以上の量が質量分析計に導入されることもある。その結果、想定外自己消化断片ペプチドに由来するプロダクトイオンスペクトルデータが大量に取得されることになる。

トップダウンプロテオミクスにおいて、タンパク質を同定するために行われるデータベース検索では、存在しているすべてのタンパク質の配列データに対して、すべての修飾基の存在を想定して検索が行われるわけではない。分析担当者が設定した検索条件に合致したアミノ酸配列と修飾基の情報を満たす母集団の中から、スペクトルデータと合致する最も可能性の高い候補を示しているに過ぎない。したがって、当該スペクトルデータを与えたペプチドのアミノ酸配列と修飾基の情報が検索対象となる母集団に含まれない検索条件が設定された場合、母集団の中から相対的に最も合致している候補が示されることになり、結果として擬陽性のアミノ酸配列が提示されることになる。擬陽性のアミノ酸配列であったとしても、有意な期待値やスコアを伴って提示された場合、擬陽性であることに気付くことは困難である。

化学修飾トリプシンに由来する想定外自己消化断片ペプチドを同定できない検索条件を用いた場合、取得された想定外自己消化断片ペプチド由来のスペクトルデータが異なるタンパク質由来のペプチドとして誤同定されることは否定できない。質量確度の高い質量分析計を用いた場合、プリカーサーイオンの測定質量データによって検索対象となるアミノ酸配列の候補はかなり限定されるため、誤同定される確率はそれほど高くはないが、ゼロではない。例えば、ジメチル Lys 残基を C 末端にもち、C¹¹⁷ と C¹²⁴ が S-カルバミドメチル化されたブタトリプシンの自己消化断片ペプチド SCAAAGTECLISGWGNTK (116-133) は、human Ras-related protein Rab-32 (RAB32_HUMAN) の N 末端ペプチドに誤同定されることが知られている^{7), 注3)}。

誤同定を防ぐために想定外自己消化断片ペプチドをもれなく同定させるためには、検索時に設定する消化酵素の特異性を考慮せず、すべてのペプチド結合を切断することを

想定する設定 (MASCOT では “none”) にする必要があり、修飾基として少なくとも Lys 残基のモノメチル化とジメチル化を考慮する (MASCOT では “Variable modification” として [methyl(K)] と [dimethyl(K)] を選択) 必要がある。しかし、このような網羅的な検索条件は、検索対象となるアミノ酸配列候補の母集団 (search space) を拡張させてしまうことから、検索時間が長くなることに加え、誤ったアミノ酸配列が偶然にマッチする確率を上昇させてしまうため、有意となる期待値の閾値 (significant threshold) をより厳しくする必要が生じる。その結果、通常の条件で同定可能なタンパク質が同定されなくなるおそれもあるため、この方法は通常のプロテオミクスで利用できる現実的な解決法ではない。

われわれは、一般的に用いられる最適な検索条件をほとんど変えることなく、ほぼ同程度の検索時間で、簡便に化学修飾トリプシンに由来する想定外自己消化断片ペプチドを同定し、想定外自己消化断片ペプチドが誤同定されることを防止するための方法として、想定外自己消化断片ペプチドのスペクトルライブラリーを利用したライブラリーサーチを併用する方法を提案する。

2. 実 験

2.1 試薬

試料調製の際に使用する蒸留水は富士フィルム和光純薬 (大阪市)・高速液体クロマトグラフ用を、アセトニトリルおよびトリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid: TFA) はナカライテスク (京都市)・高速液体クロマトグラフ用を用いた。ジチオスレイトールはナカライテスク・SH 基タンパク質研究用を、炭酸水素アンモニウムおよびヨードアセトアミドは富士フィルム和光純薬・プロテオミクス用を使用した。

液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry: LC/MS/MS) の移動相に用いるアセトニトリルおよび超純水は富士フィルム和光純薬・LC/MS 用を、ギ酸はナカライテスク・カラムクロマトグラフ用を使用した。

化学修飾トリプシンはメチル化処理が施されている Sequence Grade Modified Trypsin (V511A, Promega Corporation, Madison, WI, USA) を用いた。

2.2 化学修飾トリプシン自己消化断片ペプチド試料の調製

トリプシン凍結乾燥品 20 µg が入ったバイアルに 25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液 1 mL を加え溶解し、37°C で 2 時間インキュベートした。0.2% TFA 溶液 1 mL を加えることによって反応を停止させた。減圧濃縮用遠心機を用いて溶液を除いた後、2% アセトニトリル 0.1% TFA 溶液 1 mL に溶解し、その 2 µL (トリプシン 40 ng 相当) を LC/MS/MS に供しデータを取得した。

2.3 ゲル内消化

脱色後のゲル片が入った 1.5 mL のマイクロチューブに蒸留水 1 mL を加え、ThermoMixer® (Eppendorf AG, Ham-

注3) 本稿で表記するブタトリプシンのアミノ酸残基番号は、プロペプチドを含んだ前駆体のアミノ酸配列で、SwissProt 等の配列データベースに収録されている UniProtKB P00761 (TRYP_PIG) の配列データに準拠している。

burg, Germany) を用いて10分間室温で振とう (900 rpm) することによってゲル片の洗浄を行った。蒸留水を交換し、この操作をさらに2度行った。蒸留水を除去し、アセトニトリル0.5 mLを加え、10分間室温で振とう (900 rpm) した。ゲル片が白く縮んだことを確認した後、チューブ内のアセトニトリルを除去した。

白く縮んだゲル片が入ったチューブに10 mM ジチオスレイトール/25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液200 μ Lを加え、ThermoMixer[®]を用いて50°Cで1時間振とうすることによってゲル内還元処理を行った。溶液を除去した後、100 mM ヨードアセトアミド/50 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を200 μ Lを加え、室温にて45分間遮光状態で静置し、ゲル内アルキル化 (S-カルバミドメチル化) 処理を行った。その後、ゲル片が入った1.5 mLのマイクロチューブに蒸留水1 mLを加え、ThermoMixer[®]を用いて3分間室温で振とう (900 rpm) することによってゲル片の洗浄を行った。蒸留水を交換し、この操作をさらに2度行った。蒸留水を除去し、アセトニトリル0.5 mLを加え、10分間室温で振とう (900 rpm) した。ゲル片が白く縮んだことを確認した後、チューブ内のアセトニトリルを除去した。

次に化学修飾トリプシンが20 μ g入ったバイアルに1 mLの25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を加えることによって調製した酵素溶液を各チューブに10 μ L加えた。ゲルが膨潤したことを確認した後、恒温培養器に入れて37°Cで15時間静置し、ゲル内消化を行った。

2.4 ペプチドの抽出

ギ酸溶液 (0.2%, v/v) 25 μ Lをチューブに添加することによって酵素反応を停止させた。10 min 室温で静置した後、50%アセトニトリル/0.1% ギ酸溶液25 μ Lをチューブに加えた。10 min 室温で静置した後、チューブ内の溶液を低吸着仕様の1.5 mLチューブに回収した。次にアセトニトリル50 μ Lをチューブに添加し、ゲル片が白く縮んだことを確認した後、チューブ内のアセトニトリルを回収し、先に回収した同じ低吸着仕様の1.5 mLチューブに加えた。減圧濃縮用遠心機を用いて溶液を除いた後、2%アセトニトリル0.1% TFA 溶液25 μ Lに溶解し、LC/MS/MSに供した。

2.5 液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC/MS/MS)

液体クロマトグラフィーはDionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用い、以下の条件で行った。

カラム：化学物質評価研究機構 (埼玉県北葛飾郡) L-column Micro C-18, 0.1 mm i.d. $\times$ 150 mm, 粒径3 μ m

カラム温度：室温

移動相：アセトニトリル0.1%ギ酸系移動相によるリニアグラジエント

移動相A：0.1% (v/v) ギ酸水溶液 (ギ酸：超純水=1:1000)

移動相B：0.1% (v/v) ギ酸アセトニトリル (ギ酸：アセトニトリル=1:1000)

グラジエント条件：移動相B濃度3–33% (1%/min)

流速：UltiMate 3000から0.14 mL/minで送液された移動相をスプリットし、カラムでの流速は約500 nL/minで行った。

質量分析は、リニアイオントラップ電場型フーリエ変換 (オービトラップ) 質量分析計LTQ Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) を用い、以下の条件で分析を行った。

イオン化法：カラムの出口にFortisTip[™] (オムニセパロ適塾, 尼崎市) を装着し、ポジティブモードのナノフローエレクトロスプレーイオン化法によってイオン化を行った。

キャピラリー電圧：1.8 kV

測定範囲： m/z 300~1,500

MS/MS (プロダクトイオン分析) は各スペクトルにおいて上位7番目までの信号強度を示すイオンをブリカーサイオンとして自動的に選択するデータ依存取得を行った。

質量較正はPolytyrosine (1, 3, 6) を用いた外部標準法で実施した後、ロックマス機能によってスペクトル毎に補正を行った。

2.6 データベース検索

データベース検索とスペクトルライブラリーの作成はMASCOT (<http://www.matrixscience.com>) Ver. 2.7.0を利用して行った。

Raw dataからmgfファイルへの変換はProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net>) Ver. 3.0.20266を利用した¹³⁾。

SwissProtは2020_05版, common Repository of Adventitious Proteins (cRAP; <https://www.thegpm.org/crap>) は20190305版, PRIDE_Contaminants¹⁴⁾は20160906版を利用した。

3. 結 果

3.1 化学修飾トリプシン修飾基の解析

Fig. 1に本研究において提案するスペクトルライブラリーを併用したデータベース検索法のスキームを示す。

「2. 実験」に記載した方法を用いて化学修飾トリプシンから自己消化断片ペプチドの試料を調製し、そのLC/MS/MSデータを取得した (Fig. 1, ①, ②)。取得したデータを用い、“enzyme”として“Trypsin”を選択し、SwissProtデータベースに対してMASCOT検索を行い、試料中に含まれるタンパク質の同定を行った。“Taxonomy”は“all entries”を選択した。その結果TRYP_PIGが1,113のトップスコアで同定され、計65個のクエリーがTRYP_PIG由来の5種類の断片ペプチドにマッチした (Table 1)。TRYP_PIG以外に2種類以上のペプチドが有意にマッチしたタンパク質は、同一の組み合わせの4個のクエリーがマッチしたKeratin, type II cytoskeletal 1 (K2C1_HUMAN, K2C1_CANLF, K2C1_PANTR) およびKeratin, type II cytoskeletal 1b (K2C1B_MOUSE, K2C1B_RAT) であり、スコアは146であった。この結果から、取得されたLC/MS/MS

Fig. 1. A flowchart of the proposed database search strategy using spectral libraries to identify autolysis peptide fragments from chemically modified trypsin.

のデータは、ほぼ化学修飾トリプシンの自己消化断片ペプチドに由来したスペクトルデータで構成されているとみなした。

次に化学修飾トリプシンに存在する修飾基を明らかにするために、同じLC/MS/MSデータを用いて“error tolerant search”をオンにしたMASCOT MS/MS ion searchを行った。その結果Table 2に示した8種類の修飾が存在することが示唆された。

3.2 化学修飾トリプシン由来スペクトルライブラリーの作成

次に、化学修飾トリプシン由来スペクトルライブラリーを作成するにあたり (Fig. 1, ③), 存在が示唆された修飾基を有する断片ペプチドや、Lys-X, Arg-X以外のトリプシンの非特異的な加水分解によって生成された断片ペプチドなど、この試料中に含まれている、通常の検索条件では同定できない化学修飾トリプシン由来の自己消化断片ペプチドのアミノ酸配列と修飾基の情報を得るために、“Variable

Table 1. Data for Peptide Sequences Matched to TRYP_PIG in a Result of a MASCOT Search of an Autolyzed Digest of Chemically Modified Trypsin, Using Normal Search Parameters

N	C	-1	Amino acid sequence	Observed m/z	Charge number	Observed monoisotopic mass/Da	Calculated monoisotopic mass/Da	Error (ppm)
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	1106.0557	2	2210.0968	2210.0967	0.0
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	737.7055	3	2210.0947	2210.0967	-0.9
78	97	K	IITHPNFNGNTLDNDIMLIK	761.7311	3	2282.1714	2282.1729	-0.7
78	97	K	IITHPNFNGNTLDNDIMLIK	571.5508	4	2282.1740	2282.1729	0.5
78	107	K	IITHPNFNGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR	828.4368	4	3309.7182	3309.7216*	-1.0
98	107	K	LSSPATLNSR	523.2852	2	1044.5558	1044.5564	-0.6
108	115	R	VATVSLPR	421.7586	2	841.5026	841.5022	0.5

N: Residue number of the N-terminal amino acid residue of the matched sequence.

C: Residue number of the C-terminal amino acid residue of the matched sequence.

-1: Amino acid residue one residue before the N-terminal of the matched sequence.

*: Based on composition containing one atom of ^{13}C .

Used Search Parameters

Type of search:	MS/MS ion search
Database:	SwissProt_2020_05
Taxonomy:	All entries
Enzyme:	Trypsin
Max missed cleavages:	2
Fixed modifications:	None
Variable modifications:	None
Peptide mass tolerance:	4 ppm (#13C = 1)
Fragment mass tolerance:	0.8 Da
Instrument type:	ESI-TRAP

Table 2. Modifications Detected in an “Error Tolerant Search” of MASCOT MS/MS Ions Search Based on the LC/MS/MS Data of Chemically Modified Trypsin Autolysis Peptides

Notation in MASCOT	Modification	Monoisotopic mass difference/Da
Methyl (K)	Monomethylation of ϵ -amino group of Lys	+14.0157
Dimethyl (K)	Dimethylation of ϵ -amino group of Lys	+28.0313
Methyl (N-term)	Monomethylation of α -amino group of N-terminal	+14.0157
Dimethyl (N-term)	Dimethylation of α -amino group of N-terminal	+28.0313
Deamidated (N)	Deamidation of Asn (Conversion of Asn to Asp)	+0.9840
Deamidated (Q)	Deamidation of Gln (Conversion of Gln to Glu)	+0.9840
Oxidation (M)	Oxidation of Met	+15.9949
Kynurenine (W)	Conversion of Trp to Kynurenine residue	+3.9949

Table 3. Comparison of the Search Parameters Used among Six Search Strategies for the Identification of Autolysis Fragment Peptides of Chemically Modified Trypsin in an In-Gel Digest, in This Study

	Search strategy					
	A	B	C	D	E	F
Enzyme	Trypsin	None	Trypsin	Trypsin	Trypsin	Trypsin
Variable modification	Carbamidomethyl (C)	Carbamidomethyl (C) Methyl (K, N-term) Dimethyl (K, N-term) Deamidated (N, Q) Kynurenin (W)	Carbamidomethyl (C)	Carbamidomethyl (C)	Carbamidomethyl (C)	Carbamidomethyl (C)
Database	SwissProt cRAP	cRAP	SwissProt cRAP Promega_Trypsin_SG1	SwissProt cRAP Promega_Trypsin_SG2	SwissProt cRAP Promega_Trypsin_SG1 Promega_Trypsin_SG2	SwissProt cRAP PRIDE_Contaminants
Taxonomy	<i>Homo sapiens</i> (Human)	All entries	<i>Homo sapiens</i> (Human)	<i>Homo sapiens</i> (Human)	<i>Homo sapiens</i> (Human)	<i>Homo sapiens</i> (Human)

modification”としてTable 2にリストアップされた修飾を選択し，“enzyme”を“none”に設定しMASCOT MS/MS ion searchを行った。

TRIP_PIGにマッチしたスペクトルデータの中からスペクトルライブラリーに収録するデータを選択するにあたり，スペクトルライブラリーを用いた検索での擬陽性を防ぐために，本検索結果において誤同定のおそれがあるデータを収録させない必要がある．そのため，decoyデータベースを対象とした検索においてスペクトルデータが偶然にマッチするペプチドの数と期待値 (p) との相関を調べた．Significant thresholdをデフォルト値の $p < 0.05$ に設定した場合，decoyデータベースを対象とした検索においてスペクトルデータが偶然にマッチしたペプチド数は17, $p < 0.01$ に設定した場合は1であったが， $p < 0.005$ に設定した場合は0となった．したがって，スペクトルライブラリーを作成する条件として，今回のデータの場合はSignificant thresholdを $p < 0.005$ に設定した場合，擬陽性を生じさせる確率を大幅に軽減できると判断した。

Significant thresholdを $p < 0.005$ に設定した際，計396のクエリーがTRYP_PIGのアミノ酸配列にマッチした．Table 1の結果との単純な比較はできないが，Significant thresholdの条件を $p < 0.005$ と10倍厳しくしたにもかかわらず，約6倍の数のクエリーがTRYP_PIGにマッチした。

スペクトルライブラリーを作成する際は，アミノ酸配列と修飾基の種類と位置の情報が同じスペクトルデータであっても，プリカーサーイオンの価数が異なる場合は，異なるエントリーとして収録される．一方，アミノ酸配列と修飾基の種類と位置，イオンの価数が同じ場合は，最もスコアの高いスペクトルデータ1種類がエントリーされる．本研究で取得した化学修飾トリプシン自己消化断片ペプチドのLC/MS/MSデータからは，アミノ酸配列，修飾基の種類と位置，イオンの価数が異なるTRYP_PIGにマッチした166種類のスペクトルデータが抽出され，このスペクトルライブラリーを化学修飾トリプシンスペクトルライブラリー“Trypsin_Promega_SG1”とした^{注4)}．収録されたスペクトルデータのアミノ酸配列や修飾等の情報をSupport-

ing Information 1に示した^{注5)}．

3.3 化学修飾トリプシンスペクトルライブラリーを用いたゲル内消化物中の想定外自己消化断片ペプチドの同定

化学修飾トリプシンスペクトルライブラリー“Trypsin_Promega_SG1”を使用した検索と使用しない通常の検索における，ゲル内消化物に含まれる化学修飾トリプシン自己消化断片ペプチドの同定結果の比較を行った。

ヒト由来培養細胞から調製した試料のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られたあるタンパク質バンドの化学修飾トリプシンゲル内消化物を分析したLC/MS/MSデータを利用した。

最初に，プロテオミクスで利用される一般的な検索条件（本稿ではSearch Strategy Aとする）を用いた検索を行い，同定されるペプチドを確認した．ゲル内消化時にヨードアセドアミドを用いたゲル内還元アルキル化を行っていることから，“Variable modification”として“Carbamidomethyl (C)”を選択した（Table 3, Search Strategy A）．その結果，Table 4のSearch Strategy Aの列で○によって示した10種の断片ペプチドが同定された．Arg-Xが加水分解されることによって生じるVATVSLPR (108-115)の断片ペプチドが検出されるのは当然であるが，Lys残基にメチル化処理が施されている化学修飾トリプシンを用いたにもかかわらず未修飾のLys残基を含む断片ペプチドが数多く検出されている．“Variable modification”として“Methyl (K)”と“Dimethyl (K)”を選択していないため，存在しているはずのモノメチル化Lys残基やジメチル化Lys残基を含んだ断片ペプチドは同定されていない。

Supporting Information 1で示された結果は，化学修飾トリプシンの自己消化断片ペプチドには一般的に利用される検索条件では同定することができない多種多様な断片ペプチドが存在していることを示している．ゲル内消化物由来

注4) Spectral libraries Trypsin_Promega_SG1 and Trypsin_Promega_SG2: <http://www.matrixscience.com.jp/SLdata/SLmsp.zip>

注5) Supporting Information 1: http://www.matrixscience.com.jp/SLdata/Yoshino_Usami_Takeuchi_Supporting_Information_1.pdf

Table 4. Comparison of Identified Peptides Matching TRYP_PIG in the MASCOT Search, Using Six Different Search Strategies, with the Same LC/MS/MS Data Set Obtained from an In-Gel Digest

N	C	— 1	Amino acid sequence	Modification	Charge number	Search strategy					
						A	B	C	D	E	F
9	18	K	IVGGYTCAAN	Carbamidomethyl (C ¹⁵)	2	×	○	△	△	△	
9	22	K	IVGGYTCAANSIPY	Carbamidomethyl (C ¹⁵)	2	×	○	△	△	△	
9	27	K	IVGGYTCAANSIPYQVSLN	Carbamidomethyl (C ¹⁵)	2	×	○	△	△	△	
9	28	K	IVGGYTCAANSIPYQVSLNS	Carbamidomethyl (C ¹⁵)	2	×	○	△	△	△	
9	29	K	IVGGYTCAANSIPYQVSLNSG	Carbamidomethyl (C ¹⁵)	2	×	○	△	△	△	
19	27	N	SIPYQVSLN		2	×	○	○	△	○	
28	39	N	SGSHFCGGSLIN	Carbamidomethyl (C ³³)	2	×	○	△	△	△	
40	48	N	SQWVVSAAH		2	×	○	○	○	○	
58	71	R	LGEHNIDVLEGNEQ		2	×	○	△	○	○	
58	74	R	LGEHNIDVLEGNEQFIN		2	×	○	○	○	○	
58	75	R	LGEHNIDVLEGNEQFINA		2	×	○	○	○	○	
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK		2	○	○	○	○	○	○
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK		3	○	○	○	○	○	○
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	Monomethyl (K ⁷⁷)	2	×	○	○	○	○	
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	Monomethyl (K ⁷⁷)	3	×	○	○	○	○	
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	Dimethyl (K ⁷⁷)	3	×	○	○	○	○	
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	Deamidated (N ⁶²)	3	×	○	×	△	×	
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	Deamidated (N ⁷⁴)	3	×	○	×	○	○	
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	Deamidated (N ⁷⁴), Monomethyl (K ⁷⁷)	3	×	○	△	○	○	
58	77	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	Deamidated (Q ⁷¹)	3	×	○	△	△	△	
58	83	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAKIITHPN	Dimethyl (K ⁷⁷)	4	×	○	○	○	○	
58	107	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAKIITHPNF- NGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR	Dimethyl (K ⁷⁷ , K ⁹⁷)	5	×	○	○	○	○	
58	107	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAKIITHPNF- NGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR	Dimethyl (K ⁷⁷ , K ⁹⁷), Deamidated (N ⁸⁵)	5	×	×	○	△	○	
58	107	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAKIITHPNF- NGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR	Dimethyl (K ⁷⁷ , K ⁹⁷), Deamidated (N ⁹¹)	5	×	×	△	○	×	
58	107	R	LGEHNIDVLEGNEQFINAAKIITHPNF- NGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR	Dimethyl (K ⁷⁷ , K ⁹⁷), Deamidated (N ¹⁰⁵)	5	×	×	△	○	×	
62	74	H	NIDVLEGNEQFIN		2	×	○	○	○	○	
75	87	N	AAKIITHPNFNNGN	Monomethyl (N-term), Monomethyl (K ⁷⁷)	2	×	○	△	△	△	
75	87	N	AAKIITHPNFNNGN	Dimethyl (K ⁷⁷)	2	×	○	○	○	○	
78	87	K	IITHPNFNNGN		2	×	○	○	○	○	○
78	97	K	IITHPNFNNGNTLDNDIMLIK		3	○	○	○	○	○	○
78	97	K	IITHPNFNNGNTLDNDIMLIK	Oxidation (M ⁹⁴)	3	×	○	○	○	○	○
78	97	K	IITHPNFNNGNTLDNDIMLIK	Monomethyl (K ⁹⁷)	3	×	○	○	○	○	
78	107	K	IITHPNFNNGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR	Monomethyl (K ⁹⁷)	4	×	○	△	○	○	
78	107	K	IITHPNFNNGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR	Dimethyl (K ⁹⁷)	4	×	○	○	○	○	
84	107	N	FNGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR	Dimethyl (K ⁹⁷)	3	×	○	○	○	○	
84	107	N	FNGNTLDNDIMLIKLSPPATLNSR	Dimethyl (K ⁹⁷), Oxidation (M ⁹⁴)	3	×	×	○	×	○	
88	97	N	TLDNDIMLIK	Monomethyl (K ⁹⁷)	2	×	○	○	○	○	
88	98	N	TLDNDIMLIKL	Dimethyl (K ⁹⁷)	2	×	○	△	○	○	
88	98	N	TLDNDIMLIKL	Dimethyl (K ⁹⁷), Oxidation (M ⁹⁴)	2	×	○	△	○	○	
88	102	N	TLDNDIMLIKLSPPA	Dimethyl (K ⁹⁷)	2	×	○	△	○	×	
88	105	N	TLDNDIMLIKLSPPATLN	Dimethyl (K ⁹⁷)	2	×	○	△	○	○	
88	107	N	TLDNDIMLIKLSPPATLNSR	Dimethyl (K ⁹⁷)	3	×	○	○	○	○	
95	105	M	LIKLSPPATLN	Dimethyl (K ⁹⁷)	2	×	○	○	○	○	
96	105	L	IKLSPPATLN	Dimethyl (K ⁹⁷)	2	×	○	△	○	○	
96	107	L	IKLSPPATLNSR	Dimethyl (K ⁹⁷)	2	×	○	○	○	○	
98	107	K	LSSPATLNSR		2	○	○	○	○	○	○
99	107	L	SSPATLNSR		2	×	○	×	×	×	
100	107	S	SPATLNSR		2	×	○	○	△	○	○
101	107	S	PATLNSR		2	×	×	○	△	○	○
108	115	R	VATVSLPR		2	○	○	○	○	○	○
108	115	R	VATVSLPR	Monomethyl (N-term)	2	×	○	○	△	○	
108	115	R	VATVSLPR	Dimethyl (N-term)	2	×	○	×	○	○	
116	131	R	SCAAAGTECLISGWGN	Carbamidomethyl (C ¹¹⁷ , C ¹²⁴)	2	×	○	△	△	△	

Table 4. Continued

N	C	-1	Amino acid sequence	Modification	Charge number	Search strategy					
						A	B	C	D	E	F
116	133	R	SCAAAGTECLISGWGNTK	Carbamidomethyl (C ¹¹⁷ , C ¹²⁴), Dimethyl (K ¹³³)	2	×	○	△	△	△	
126	133	L	ISGWGNTK	Dimethyl (K ¹³³)	2	×	×	○	×	○	
134	147	K	SSGSSYPSLLQCLK	Carbamidomethyl (C ¹⁴⁵)	2	○	○	○	○	○	○
148	157	K	APVLSDSCK	Carbamidomethyl (C ¹⁵⁶)	2	○	○	○	○	○	○
148	167	L	APVLSDSCKSSYPGQITGN	Carbamidomethyl (C ¹⁵⁶), Dimethyl (K ¹⁵⁷)	2	×	○	△	△	△	
158	167	K	SSYPGQITGN		2	×	○	○	○	○	○
209	216	K	NKPGVYTK		2	○	×	△	○	○	
209	216	K	NKPGVYTK		3	○	×	△	○	○	
209	216	K	NKPGVYTK	Dimethyl (K ²¹⁰)	2	×	○	○	△	○	
215	231	Y	TKVCNRYVNWQQTIAAN	Monomethyl (N-term, K ²¹⁶), Carbamidomethyl (C ²¹⁸)	2	×	○	△	△	△	
217	231	V	VCNRYVNWQQTIAAN	Carbamidomethyl (C ²¹⁸)	2	○	○	○	○	○	○
215	231	Y	TKVCNRYVNWQQTIAAN	Dimethyl (N-term), Carbamidomethyl (C ²¹⁸)	2	×	○	△	△	△	
220	227	N	YVNWQQT		2	×	○	○	○	○	
220	231	N	YVNWQQTIAAN		2	×	○	○	○	○	○
220	231	N	YVNWQQTIAAN	Deamidated (N ²²²)	2	×	×	△	○	○	
220	231	N	YVNWQQTIAAN	Deamidated (Q ²²⁵)	2	×	○	△	△	△	
220	231	N	YVNWQQTIAAN	Deamidated (Q ²²⁶)	2	×	○	○	○	○	
223	231	N	WQQTIAAN		2	×	×	○	○	○	

N: Residue number of the N-terminal amino acid residue of the matched sequence.

C: Residue number of the C-terminal amino acid residue of the matched sequence.

-1: Amino acid residue one residue before the N-terminal of the matched sequence.

○: Identified with significant expect value.

×: Not identified with significant expect value.

△: Spectral data are not stored in the spectral library.

のLC/MS/MSスペクトルデータ中にも、Table 2でリストアップされている修飾基を有する断片ペプチドや、Lys-XやArg-X以外の非特異的な加水分解によって生成された断片ペプチドなど、多種多様な想定外の化学修飾トリプシン由来断片ペプチドに由来するスペクトルデータが数多く含まれている可能性が高い。このゲル内消化物由来のLC/MS/MSデータに含まれている化学修飾トリプシン自己消化断片ペプチド由来のデータの情報を得るために、“Variable modification”としてTable 2にリストアップされた8種類の修飾と“Carbamidomethyl (C)”を、“enzyme”として“none”を選択して検索を行った (Table 3, Search Strategy B)。アミノ酸配列や修飾基、価数の異なる61種類の断片ペプチドが同定された (Table 4, Search Strategy Bの列で○と表示された断片ペプチド)。TRYP_PIGにマッチしたクエリー数は157であった。通常の検索条件 (Table 3, Search Strategy A) で得られた同定結果においてTRYP_PIGにマッチしたクエリー数は68であったことから、化学修飾トリプシン自己消化断片ペプチド由来の89のクエリーが、特定のタンパク質の配列にマッチしなかったか、可能性としては高くはないが別のペプチドとして同定されていたおそれもある。

通常の検索で用いられる Search Strategy A の検索条件に加えて、本研究で作成した化学修飾トリプシンスペクトルライブラリー “Trypsin_Promega_SG1” を検索対象データベースに加えた検索 (Table 3, Search Strategy C) を行った

ところ (Fig. 1, ④)、アミノ酸配列や修飾基、価数の異なる40種類の断片ペプチドが同定された (Table 4, Search Strategy Cの列で○と表記された断片ペプチド)。Search Strategy Aでは価数の違いを含めて10種類の断片ペプチドのみが同定されたが、化学修飾トリプシンスペクトルライブラリー “Trypsin_Promega_SG1” を検索対象データベースに加えるだけで、さらに30種類の断片ペプチドを同定することが可能となった。

負荷がかかる Search Strategy B の検索で同定された61種類の断片ペプチドのうち、S-カルバミドメチル化Cys残基を含む断片ペプチドは14種類であった。“Trypsin_Promega_SG1” は、S-カルバミドメチル化処理を施していない化学修飾トリプシンを試料とした分析によって得られたデータから作成されていることから、S-カルバミドメチル化Cys残基を含んだ断片ペプチドのスペクトルデータはスペクトルライブラリーに収録されていない。したがって “Trypsin_Promega_SG1” を使用してもS-カルバミドメチル化Cys残基を含む14種類を同定することはできない。それゆえ、Table 4においては、スペクトルライブラリーにスペクトルデータが収録されていないために同定できなかったことを意味する△と表記した。ただし、トリプシンの特異的な加水分解によって生じ、ジメチル化されていない3種の断片ペプチドはスペクトルライブラリーを利用せずとも同定できるため○と表示されている。

3.4 スペクトルデータがライブラリーに収録されているにもかかわらず同定できないクエリーの存在

Search Strategy Bの検索で同定された61種類の断片ペプチドのうち、S-カルバミドメチル化Cys残基を含んだ断片ペプチド以外はSearch Strategy Cの検索ですべて同定されることを期待したが、15種類の断片ペプチドは同定されなかった。その一方で、Search Strategy Bでは同定されていなかった6種類の断片ペプチドが同定されていた。

同定されなかった15種の断片ペプチドのうち11種類は“Trypsin_Promega_SG1”に収録されていなかった。残りの4種類はスペクトルデータが収録されていたにもかかわらず同定されなかった。

Search Strategy Cによる検索では、トリプシンの特異的な加水分解によって生じた断片ペプチドに由来するデータは、通常の配列データを利用する検索も並行して行われ、スペクトルライブラリーのデータとの合致度よりも信頼性が高い場合には配列データから同定された結果として示される。Fig. 2にSearch Strategy Cによる同定結果の一部を示した。19のクエリーがLGEHNIDVLEGNEQFINAAK (58-77) とマッチしていると判断された。Sourceの列にSLと記されているクエリーはスペクトルライブラリーによって同定されたスペクトルデータ、AAと記されたクエリーはスペクトルライブラリーによって同定されず、配列データを利用した通常の検索によって同定されたスペクトルデータである。同じアミノ酸配列のペプチドに由来する同じLC/MS/MSのデータに含まれるスペクトルデータであっても、12のクエリーがスペクトルライブラリーによって同定されないデータであった。

スペクトルデータが収録されていた断片ペプチドから取

得されたデータにもかかわらず、スペクトルライブラリーによって同定されなかったデータは、試料由来のプロダクトイオンスペクトルとスペクトルライブラリーに収録されたスペクトルデータのプロダクトイオンの種類や強度のパターンの合致度が低かったことが考えられる。プロトン付加分子の衝突誘起解離 (collision-induced dissociation: CID) によって得られたプロダクトイオンスペクトルのパターンは、電子イオン化によって得られる分子イオンとそのフラグメントイオンが観測されるマスマスペクトルと比較すると再現性が低いことが知られている。このことは、残念ながら、電子イオン化マスマスペクトルのスペクトルライブラリーを利用したライブラリーサーチとは異なり、MASCOTのペプチドライブラリーサーチでは、同じアミノ酸配列に由来するすべてのクエリーを必ずしも同定できるわけではないことを示している。

3.5 異なる化学修飾トリプシンスペクトルライブラリーを利用したゲル内消化物中の想定外自己消化断片ペプチドの同定

同定されなかった15種の断片ペプチドのうち11種類は“Trypsin_Promega_SG1”に収録されておらず、残りの4種類はスペクトルデータが収録されていたにもかかわらず同定されなかった。

それゆえ、同じアミノ酸配列のペプチドのデータであっても“Trypsin_Promega_SG1”に収録されたデータとは異なるスペクトルパターンのデータが収録されることや、“Trypsin_Promega_SG1”に収録されなかったペプチドのデータが収録されることを期待して、試料の調製方法や分析条件を変えずに、別途調製した試料を分析することによって化学修飾トリプシン自己消化断片ペプチドのLC/

Query	Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Score	Source	Expect	Rank	U	Peptide
4458	19 - 27	510.7707	1019.5269	1019.5276	-0.65	0	731	SL	1.7e-05	1	U	N.SIFPQVSLN.S
4459	19 - 27	510.7707	1019.5269	1019.5276	-0.65	0	532	SL	0.049	1	U	N.SIFPQVSLN.S
4280	40 - 48	492.7469	983.4792	983.4814	-2.23	0	688	SL	9.5e-05	1	U	N.SQWVSAAH.C
4262	58 - 74	970.9706	1939.9266	1939.9265	0.034	0	785	SL	1.9e-06	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFIN.A
4263	58 - 74	970.9706	1939.9266	1939.9265	0.034	0	762	SL	4.9e-06	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFIN.A
4264	58 - 74	970.9706	1939.9266	1939.9265	0.034	0	761	SL	5.1e-06	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFIN.A
4265	58 - 74	970.9706	1939.9266	1939.9265	0.034	0	673	SL	0.00017	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFIN.A
4344	58 - 75	1006.4901	2010.9656	2010.9635	1.00	0	742	SL	1.1e-05	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFIN.A
4588	58 - 77	737.7045	2210.0918	2210.0951	-1.52	0	581	SL	0.0069	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4592	58 - 77	737.7050	2210.0930	2210.0951	-0.94	0	727	SL	2e-05	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4593	58 - 77	737.7050	2210.0930	2210.0951	-0.94	0	824	SL	4.1e-07	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4597	58 - 77	737.7062	2210.0967	2210.0951	0.71	0	685	SL	0.00011	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4601	58 - 77	737.7088	2210.1046	2210.0951	4.28	0	818	SL	5.2e-07	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4590	58 - 77	1106.0532	2210.0919	2210.0956	-1.65	0	858	SL	1e-07	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4594	58 - 77	1106.0543	2210.0941	2210.0956	-0.66	0	851	SL	1.4e-07	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4585	58 - 77	737.7033	2210.0881	2210.0967	-3.90	0	74	AA	1.6e-07	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4586	58 - 77	737.7034	2210.0885	2210.0967	-3.74	0	30	AA	0.0044	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4587	58 - 77	737.7045	2210.0918	2210.0967	-2.25	0	27	AA	0.0096	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4589	58 - 77	1106.0532	2210.0919	2210.0967	-2.19	0	122	AA	2.6e-12	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4591	58 - 77	1106.0536	2210.0926	2210.0967	-1.85	0	92	AA	2.6e-09	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4595	58 - 77	737.7056	2210.0951	2210.0967	-0.76	0	49	AA	5.4e-05	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4596	58 - 77	737.7061	2210.0965	2210.0967	-0.093	0	71	AA	3.7e-07	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4598	58 - 77	737.7072	2210.0996	2210.0967	1.31	0	31	AA	0.0039	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4599	58 - 77	737.7072	2210.0996	2210.0967	1.31	0	31	AA	0.0039	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4600	58 - 77	737.7072	2210.0998	2210.0967	1.40	0	46	AA	0.00012	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4608	58 - 77	738.0390	2211.0952	2210.0967	452	0	37	AA	0.00085	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4609	58 - 77	738.0426	2211.1060	2210.0967	457	0	50	AA	4.8e-05	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I
4604	58 - 77	738.0325	2211.0756	2211.0791	-1.60	0	769	SL	3.7e-06	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I + Deamidated
4605	58 - 77	738.0330	2211.0770	2211.0791	-0.94	0	737	SL	1.3e-05	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I + Deamidated
4630	58 - 77	742.3768	2224.1087	2224.1108	-0.97	0	879	SL	4.5e-08	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I + Methyl
4631	58 - 77	742.3777	2224.1114	2224.1108	0.26	0	802	SL	9.8e-07	1	U	R.LGEHNIDVLEGNEQFINAAK.I + Methyl

Fig. 2. A part of identified peptide data matching TRYP_PIG in the MASCOT search of the LC/MS/MS data obtained from an in-gel digest, using Search Strategy C.

MS/MSデータを取得し、“Trypsin_Promega_SG1”と同じ方法でスペクトルライブラリー“Trypsin_Promega_SG2”を作成した。スペクトルライブラリー“Trypsin_Promega_SG2”を得るためのLC/MS/MSデータは、試料の調製日、LC/MS/MSの分析を実施した日が異なるだけで、同じPromega CorporationのSequence Grade Modified Trypsinの製品を調製し、分析したデータである。

Search Strategy Cの“Trypsin_Promega_SG1”に換えて“Trypsin_Promega_SG2”を用いた検索（Table 3, Search Strategy D）を行ったところ、Search Strategy Cと同様、Search Strategy Bで同定されたすべての断片ペプチドを同定することはできなかった（Table 4, Search Strategy Dの列）。同定された断片ペプチドの中にはSearch Strategy Cの検索で同定されなかった断片ペプチドがある一方、Search Strategy Cの検索で同定されたにもかかわらず、Search Strategy Dの検索では同定されない断片ペプチドもあった。

3.6 複数の化学修飾トリプシンスペクトルライブラリーを併用したゲル内消化物中の想定外自己消化断片ペプチドの同定

次に、“Trypsin_Promega_SG1”と“Trypsin_Promega_SG2”を併用した検索（Table 3, Search Strategy E）を行ったところ、Search Strategy Cでは同定できなかった8種類の断片ペプチドを追加で同定することが可能となった（Table 4, Search Strategy Eの列）。この結果は、スペクトルライブラリーを利用して、化学修飾トリプシンの自己消化断片ペプチドをできる限り多く同定するためには、異なる調製、異なる分析によって作成した複数のスペクトルライブラリーを併用した検索を行うことが望ましいことを示している。

3.7 スペクトルライブラリー“PRIDE_contaminants”を利用したゲル内消化物中の想定外自己消化断片ペプチドの同定

MASCOTではデフォルトのスペクトルライブラリーとして“PRIDE_contaminants”¹⁴⁾を利用できる。本研究で作成した“Trypsin_Promega_SG1”や“Trypsin_Promega_SG2”に換えて“PRIDE_contaminants”を利用した検索（Table 3, Search Strategy F）を行ったところ14種類のトリプシン自己消化断片ペプチドを同定することができた（Table 4, Search Strategy Fの列）。そのうち、“PRIDE_contaminants”を使用せずとも同定可能な特異的な加水分解によって生じた断片ペプチドは8種類であり、“PRIDE_contaminants”を使用したことによって同定できた断片ペプチドは6種類のみであった。同じLC/MS/MSデータを用いた検索であったが、“Trypsin_Promega_SG1”と“Trypsin_Promega_SG2”を併用した検索（Search Strategy E）と比較すると、同定された断片ペプチドは35種類少なく、化学修飾トリプシン由来の想定外自己消化断片ペプチドを検出するためのスペクトルライブラリーとしては不十分である。“PRIDE_contaminants”はトリプシンの消化断片ペプチドのみが含まれているトリプシンに特化したスペクトルライブラリーではなく、またメチル化などの修飾基を考慮した同定結果から作成されたものではない。

配列データに対する検索も並行して行われる断片ペプチドLGEHNIDVLEGNQFINAAK（58-77）については18のクエリーがマッチしていると判断されたが、スペクトルライブラリーによって同定されたクエリーはNo. 4592のみであった。

4. 考 察

4.1 想定外の断片ペプチドが存在する理由

Supporting Information 1とTable 4にリストアップされたほとんどの断片ペプチドは、Search Strategy Aのような通常の検索条件では検索対象外となる下記の特徴を有するペプチドである。

- 1) モノメチル化もしくはジメチル化Lys残基を含んだ断片ペプチド
- 2) Asn残基もしくはGln残基の脱アミド化、Met残基の酸化、Trp残基からキヌレニン残基への変換によって生じた断片ペプチド（Met残基の酸化については検索対象に加えられることも多い）
- 3) Lys-X, Arg-X以外のペプチド結合が加水分解される非特異的な酵素反応によって生成した断片ペプチド
- 4) α -アミノ基がメチル化された断片ペプチド

ブタトリプシン分子は1本のポリペプチド鎖によって構成されているモノマーである。1本のポリペプチド鎖の状態であれば、成熟型トリプシンのN末端であるI⁹以外のすべての α -アミノ基は、試料タンパク質の断片化の工程が開始されるまではポリペプチド鎖中でペプチド結合を形成している。それにもかかわらずI⁹以外の、トリプシンのペプチド主鎖を構成していたはずの α -アミノ基がメチル化されている断片ペプチドが同定されたことは、メチル化処理前に当該 α -アミノ基がフリーになっていた形跡であり、この位置のペプチド結合がメチル化処理以前に自己消化によってすでに加水分解されていたことを示している。Supporting Information 1とTable 4に示されているV¹⁰⁸の α -アミノ基がメチル化された断片ペプチドが検出されることは知られているが^{6), 8)}、Supporting Information 1にはL⁵⁸の α -アミノ基がメチル化された断片ペプチドがリストアップされている。L⁵⁸、V¹⁰⁸はともにメチル化されないArg残基が寄与するペプチド結合が加水分解されて生じる断片ペプチドのN末端である。

Supporting Information 1のリストにはA⁷⁵、A⁷⁶、K⁷⁷、D⁹⁰、L⁹⁵の α -アミノ基がメチル化された断片ペプチドが存在している。しかし、著者らはこれらのメチル化はソフトウェアの誤同定であると判断した。A⁷⁵、A⁷⁶、K⁷⁷の α -アミノ基（N-term）がメチル化されていると判断されたすべてのスペクトルデータのブリカーサーイオンの観測質量は、同じアミノ酸配列でK⁷⁷の ϵ -アミノ基がジメチル化された断片ペプチドの計算質量の設定誤差範囲内であった。同じアミ

ノ酸配列でK⁷⁷がジメチル化された断片ペプチド由来のイオンから取得されたプロダクトイオンスペクトルパターンの微細な差異によって、ソフトウェアが判断する修飾基の位置が変化したと考えられる。D⁹⁰, L⁹⁵の α -アミノ基のメチル化についても同様にK⁹⁷がジメチル化された断片ペプチドから取得されたスペクトルデータを誤同定した結果だと思われる。

「化学修飾トリプシンスペクトルライブラリー」作成の目的は、修飾基の解析を正確に行うことではなく、化学修飾トリプシン断片ペプチドに由来するスペクトルデータが別のタンパク質由来の断片ペプチドとして誤同定されることを防ぐことである。修飾基の同定に関しては適切ではないが、化学修飾トリプシン由来の断片ペプチドを同定していることは誤りではないことから、作成の目的を満たしており、ライブラリーに収録されていること自体は問題ないと判断した。

4.2 S-カルバミドメチル化システイン残基を含む断片ペプチド

通常の検索方法 (Search Strategy A) による検索結果においても、ゲル内消化物からは3種類のS-カルバミドメチル化Cys残基を含んだトリプシン自己消化断片ペプチドが検出されている (Table 4)。ゲル内還元S-カルバミドメチル化の工程は、トリプシンを添加して消化を開始する前に行われ、トリプシンのCys残基をS-カルバミドメチル化する目的で行われてはいない。しかしながら、筆者のこれまでの経験でも、S-カルバミドメチル化Cys残基を含むトリプシンの断片ペプチドが検出される分析例が多い。ゲル内還元S-カルバミドメチル化とトリプシンによる断片化は同じチューブ内で行われることから、チューブの器壁やゲル中に残存していたモノヨードアセトアミドによってトリプシンのCys残基がS-カルバミドメチル化されたことが推定される。今回、スペクトルライブラリーを作成するために分析に供した試料は還元S-カルバミドメチル化処理を施さない試料から調製されており、S-カルバミドメチル化Cys残基を含んだ断片ペプチドは含まれていない。Search Strategy Bでは、S-カルバミドメチルCys残基を含み、かつ非特異的な切断によって生成した断片ペプチドが数多く同定されている。その中にはジメチル化された断片ペプチドも存在している。これらの断片ペプチドは今回作成したスペクトルライブラリーを用いても同定することはできない。S-カルバミドメチル化Cys残基を含んだ想定外自己消化断片ペプチドを同定するためには、還元S-カルバミドメチル化処理後の化学修飾トリプシン自己消化断片ペプチドのスペクトルライブラリーを作成し、未処理の試料のスペクトルライブラリーと併用した検索を行う必要がある。

ブタトリプシンは12のCys残基を有しており、C¹⁵-C¹⁴⁵, C³³-C⁴⁹, C¹¹⁷-C²¹⁸, C¹²⁴-C¹⁹¹, C¹⁵⁶-C¹⁷⁰, C¹⁸¹-C²⁰⁵の6つのジスルフィド結合を形成している。ゲル内消化物の試料中には、S-カルバミドメチル化Cys残基を含んだトリプシンの断片ペプチドは存在しているが、あくまでも副産物であり、トリプシンのすべてのCys残基をS-カルバミドメチル

化するような処置が施されているわけではない。したがってジスルフィド結合で架橋されたままの断片ペプチドも試料中に存在している⁸⁾。ジスルフィド結合を有する断片ペプチドの中にも、メチル化されたLys残基等を含む断片ペプチドが存在することが予想される。複雑になるため「3. 結果」にデータを示してはいないが、筆者らはスペクトルライブラリー“Trypsin_Promega_SG1”を作成したデータ中に、C¹⁵⁶とC¹⁷⁰で架橋された断片ペプチドAPVLSDDSS-CK (148-157), SSYPGQITGNMICVGFLEGGK (158-186), ジスルフィド結合のスクランブリングによって生じたと推定されるC¹¹⁷とC¹²⁴が分子内架橋された断片ペプチドSCAAAGTECLISGWGNTK (116-133), およびそのK¹¹³がジメチル化された断片ペプチドにマッチするデータが含まれている結果を得ている。ジスルフィド結合を考慮した化学修飾トリプシン断片ペプチドのスペクトルライブラリーを作成し、併用して検索を行った結果、本研究で用いたゲル内消化物の試料中にC¹¹⁷とC¹²⁴が分子内架橋されたSCAAAGTECLISGWGNTK (116-133) とそのK¹¹³がジメチル化された2種類の断片ペプチドを同定することが可能となった。

4.3 脱アミド化されたAsn残基, Gln残基を含む断片ペプチド

トリプシン自己消化断片ペプチドにはAsn残基, Gln残基の脱アミド化によって生成したペプチドが多数同定されている。脱アミド化は塩基性条件下で起こりやすい非酵素的な修飾であり¹⁵⁾, タンパク質変性の一環である。化学修飾トリプシンの製品化の工程や、弱塩基性条件下で行われる消化の過程で脱アミド化が起きていると予想される。脱アミド化によってペプチドの質量は約1 Da増加することから、ペプチド中の脱アミド化の有無はプリカーサーイオンの観測質量で識別することは容易である。しかしながら、当該断片ペプチド中にAsn残基やGln残基が複数存在している場合は、観測されたプロダクトイオンスペクトルから脱アミド化が起きたアミノ酸残基を正確に特定することが困難なことも多い。Search Strategy Bでは、C末端ペプチドYVNWIQQQTIAAN (220-231) のQ²²⁵が脱アミド化されたペプチドが同定されているが、Search Strategy Dでは同じスペクトルデータ (クエリー) が、N²²²が脱アミド化されたペプチドとして同定されている。スペクトルライブラリー“Trypsin_Promega_SG1”と“Trypsin_Promega_SG2”にはQ²²⁵が脱アミド化されたと判断された断片ペプチドYVNWIQQQTIAANのデータが収録されていないためである。Search Strategy Bによる検索においても、“Trypsin_Promega_SG1”や“Trypsin_Promega_SG2”を作成するために行った検索においても、脱アミド化された断片ペプチドとしての同定に誤りはないと考えられるが、表示された脱アミド化アミノ酸残基の位置が正確ではない可能性もある。しかし、脱アミド化が起きている化学修飾トリプシン由来断片ペプチドを同定できることが重要であり、具体的な修飾部位の正確性を求める必要はないと考える。

4.4 プロダクトイオンスペクトルの再現性

エレクトロスプレーイオン化法等によって生成されるプロトン付加分子をブリーカーイオンとするCIDプロダクトイオンスペクトルのパターンは、ガスクロマトグラフィー質量分析法において得られる電子イオン化マスペクトルに比べて再現性が低いことが知られている。本研究においても、同じ配列をもった断片ペプチドに由来するスペクトルデータがスペクトルライブラリーに存在しているにもかかわらず、同定することができなかった例もあった。別の測定結果から作成したスペクトルライブラリーを併用することで、完全ではないが補完することが可能であることを示すことができた。LC/MS/MSで取得されたスペクトルデータのライブラリーサーチを行う場合は、化学修飾トリプシンの自己消化物に限らず、同じ試料であっても複数のライブラリーを作成し、併用することが望ましいと考える。本研究では同じ調製方法、同じ測定方法で取得した異なるスペクトルデータを利用したが、導入する試料量やLCの溶出条件など、条件を変化させて取得した複数のスペクトルデータから作成することが望ましいと考える。

筆者らは検証した5社の化学修飾トリプシン市販品のすべてが、製品の段階ですでに部分的に自己消化されていることを示すデータをドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得ている。しかも自己消化の程度はメーカーによって異なっていた。自己消化の進行具合が異なれば、生じる断片ペプチドの種類や量に違いが生じることが考えられる。化学修飾トリプシン自己消化断片ペプチドのスペクトルライブラリーを利用する場合は、CIDプロダクトイオンスペクトルの再現性の問題もあることから、利用している商品のデータを、利用しているLC/MS/MS装置で取得、作成した複数のライブラリーを利用することが望ましい。本研究で作成した2種類のスペクトルライブラリーのスペクトルデータ数は172 (SG1) と133 (SG2) であり、この程度のスペクトルライブラリーを複数併用しても検索時の負荷はほとんど変わらない。

4.5 化学修飾トリプシンはプロテオミクスのための最適なエンドペプチダーゼなのか？

トリプシンのメチル化処理によって自己消化の反応速度は抑制されたかもしれないが完全に阻害されたわけではない。メチル化処理自体も完全ではなく、未修飾、モノメチル化、ジメチル化の3種類のLys残基が存在している。加えてLys残基でのmiss cleavageが起こる確率を上げていることから、メチル化処理を行うことによって、自己消化断片ペプチドの種類を何倍にも増加させている。化学修飾が施されていないトリプシンの自己消化断片ペプチドを分析したとしても、Supporting Information 1のような多種多様な断片ペプチドは得られない。自己消化を抑制させることは、タンパク質量当たりの反応速度である比活性を上げる利点はあるかもしれない。しかし化学修飾トリプシンを用いることは、非修飾トリプシンを用いることと比較して、分析試料中の試料以外のペプチドの種類を増やす状態を招いている。LC/MS/MSを用いたショットガンプロテオミク

スでは、試料中に存在するすべてのペプチドのスペクトルデータが取得されているわけではない。そのため、トリプシン自己消化断片ペプチドの種類が多ければ多いほど、本来の目的である試料ペプチドのイオン化やプロダクトイオンスペクトルデータの取得の機会を抑制することになる。化学修飾が施されていないトリプシン製品を使用して消化を行った場合、特定の自己消化断片ペプチドの量は確実に増加することが予想されるが、断片ペプチドの種数は減少する。プロテオミクスにおけるトリプシンの有用性は疑う余地はないと思われるが、化学修飾の有無に関しては再検討する意義はあるのではないだろうか。

4.6 擬陽性を防ぐために

質量確度の高い質量分析計を用いた場合、自己消化断片ペプチド由来のデータが他のタンパク質由来の断片ペプチドに誤同定される確率はそれほど高くはないと思われる。しかし、FDR (false positive rate) を求める際、decoy データベースを対象とした検索が行われるが、存在しないはずのdecoy配列に一定の割合でマッチするデータが存在している。同様に、通常の検索条件で同定されないトリプシン自己消化断片ペプチド由来のデータが他のタンパク質由来の断片ペプチドに誤同定されることも起こりえる。

質量分析法とデータベース検索を利用するタンパク質同定において、何種類ものペプチドが同定されることによってタンパク質が同定される場合、根拠とされるペプチドの中に1種類だけ誤同定されたペプチドが含まれていたとしても大きな問題にはならない。しかし2,3種類の少数の断片ペプチドのマッチによってタンパク質の存在を示す場合や、翻訳後修飾の解析を目的とする場合は、一つのスペクトルデータの誤同定は、誤った結論を導き出す危険性を秘めている。加えて、誤った結果が示されたとしてもそれに気付くことはかなり困難である。誤同定の憂いをできる限り軽減させるために、化学修飾トリプシン由来想定外断片スペクトルライブラリーを併用した検索を行うことを勧める。

プロテオミクスやバイオ医薬品分析におけるLC/MS/MSでは、膨大なマスペクトルデータが取得されているが、実際にタンパク質の同定や品質管理に用いられているデータはその一部であり、大部分は帰属されないまま無視されている¹⁶⁾。しかし、イオンが発生している以上、無視されたマスペクトルデータを与えた化合物は必ず存在している。抗体医薬品に代表されるバイオ医薬品の分析においては、帰属されないデータは不純物や医薬品本体の変化を反映したペプチドに由来する可能性もあり、多くのスペクトルデータを未帰属のまま放置することは品質管理上、好ましい状態ではない。帰属されないデータの中には試料由来、溶媒由来、環境由来、分析機器由来等、さまざまな原因があると思われるが、可能な限り取得されたマスペクトルデータを帰属することを目指すべきである。それによって、プロテオミクスでは擬陽性や誤同定を減少させ、バイオ医薬品の分析においては、想定外の不純物の存在や医薬品の変性を迅速に検知できる品質管理法が可能になると考える。

文 献

- 1) J. V. Olsen, S. E. Ong, and M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 608 (2004).
- 2) J. V. Olsen and M. Mann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 13417 (2004).
- 3) J. M. Burkhardt, C. Schumbrutzki, S. Wortelkamp, A. Sickman, and R. P. Zahedi, *J. Proteomics*, **75**, 1454 (2011).
- 4) M. M. Vestling, C. M. Murphy, and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **62**, 2391 (1990).
- 5) W. A. Harris, D. J. Janecki, and J. P. Reilly, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1714 (2002).
- 6) K. F. Medziharadzky, *Meth. Enzymol.*, **405**, 50 (2005).
- 7) M. Schittmayer, K. Fritz, L. Liesinger, J. Griss, and R. Birner-Gruenberger, *J. Proteome Res.*, **15**, 1222 (2016).
- 8) UCSF Mass Spectrometry Facility, "Trypsin Autolysis Products" in ProteinProspector, <<http://prospector.ucsf.edu/prospector/html/misc/trypsin.htm>>.
- 9) P. Picotti, R. Aebersold, and B. Domon, *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 1589 (2007).
- 10) J. Rodriguez, N. Gupta, R. D. Smith, and P. A. Pevzner, *J. Proteome Res.*, **7**, 300 (2008).
- 11) J. Bunkenborg, G. Espadas, and H. Molina, *J. Proteome Res.*, **12**, 3631 (2013).
- 12) P. D. Gershon, *J. Proteome Res.*, **13**, 702 (2014).
- 13) M. C. Chambers, B. Maclean, and P. Mallick, *Nat. Biotech.*, **30**, 918 (2012).
- 14) J. Griss, Y. J. M. Foster, H. Hermjakob, and J. A. Vizcaino, *Nat. Methods*, **10**, 95 (2014).
- 15) P. Hao, Y. Ren, A. Datta, J. P. Tam, and S. K. Sze, *J. Proteome Res.*, **14**, 1308 (2015).
- 16) J. Griss, Y. Perez-Riverol, S. Lewis, D. L. Tabb, J. A. Dianes, N. Del-Toro, M. Rurik, M. W. Walzer, O. Kohlbacher, H. Hermjakob, R. Wang, and J. A. Vizcaino, *Nat. Methods*, **13**, 651 (2016).

Key words: Trypsin, Methylation, Autolysis, Database search, Spectral library, Protein identification