

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15107

研究課題名(和文)トリプシン超越型新世代ショットガンプロテオミクス

研究課題名(英文)Shotgun proteomics beyond trypsin

研究代表者

石濱 泰 (Ishihama, Yasushi)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30439244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規プロテアーゼの開拓に取り組み、LysArgaseに属するTrypNを検討した。消化条件を最適化するとともに、生成するペプチドの分離条件およびMS条件を調べた。特にイオン交換クロマトグラフィーを積極的に利用する分離条件を検討し、トリプシン消化ペプチドとの比較において、陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて正電荷の位置による分離が可能であることを見出した。TrypN消化後に陽イオン交換クロマトグラフィー分離を行うことにより、タンパク質N末端ペプチドを選択的に濃縮可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the usefulness of various proteases for shotgun proteomics, and found that TrypN, belonging to LysArginase family, has quite unique features. We optimized the digestion conditions as well as the separation conditions for tryp-N digested peptides. As a result, we found that tryp-N peptides can be separated based on the positive charged positions on peptides by strong cation exchange chromatography. Using the separation selectivity, we successfully enrich the protein N-terminal peptides, applying to N-terminomics.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：ショットガンプロテオミクス トリプシン トリプエヌ タンパク質末端解析

1. 研究開始当初の背景

近年のタンデム質量分析(MS/MS)の急速な進歩と、nanoLCをはじめとする周辺技術の飛躍的發展により、タンパク質の網羅的解析法(プロテオミクス)の高性能化は目覚ましく、4,000-5,000種のタンパク質を数時間で同定・定量することが可能となった。その中心的手法は「ショットガンプロテオミクス」で、トリプシン消化したタンパク質混合試料を nanoLC-MS/MS で測定するものである。これまでトリプシンがショットガン法で独占的に用いられてきた理由には(1)切断における配列特異性(K, R の C 端側で切断)が高いこと(2)安価であること(3)MS/MS における衝突誘起解離反応の効率が高いことが挙げられる[1]。しかしヒトプロテオームのトリプシン消化ペプチドの 56%は 6 残基以下となり、タンパクに対する配列特異性が不十分なためプロテオミクスでは解析対象外となる。また、そもそもトリプシン消化ペプチドの分子量が MS 測定範囲内にはない場合には、測定不可となる等の問題もある。最近、トリプシン以外の消化酵素を用いる方法も報告され始めたが、上記(1)(2)を満たしていても(3)の問題が解決されておらず、あくまでもトリプシン補完法として用いられ、根本的な解決には至っていない[2,3]。

申請者らは、15 年以上にわたり発表論文ごとに数千の MSMS スペクトルを目視で確認してきた。その中で、Q-TOF 型および Q-orbitrap 型 MS の衝突誘起解離では、K, R が C 末端にないタンパク C 末端ペプチドの同定率が極端に低いことや、末端化学修飾により MSMS スペクトルが大きく変化することなどを経験してきた。一方、ペプチドの MS 感度向上を目的として塩基性官能基を導入しても、感度が向上することはほとんどなく、多くの場合は逆に感度低下につながることも報告してきた[4]。これらを踏まえ、衝突誘起解離効率および MS 感度を指標にしてペプチドの末端化学構造を最適化し、あらゆるペプチドに対し普遍的かつ不偏的に適用可能なペプチドシークエンス解析法を開発し、従来のトリプシン消化ペプチドに基づくショットガンプロテオミクスの限界を超える新世代技術 shotgun proteomics beyond trypsin を着想するにいたった。

文献

- [1] Tsiathiani L, Heck AJR, FEBS Lett (2015) 282, 2612-26.
- [2] Swaney DL, Wenger CD, Coon JJ, J Proteome Res (2010) 9, 1323-1329.
- [3] Nagaraj N et al., Mol Syst. Biol. (2011) 7, 548.
- [4] Wakabayashi, M.; Sugiyama, N.; Ishihama, Y. 61st ASMS Conference, Minnesota, (2013) MP475.

2. 研究の目的

従来の「トリプシン消化ペプチドの

LC-MS/MS 解析に基づくショットガンプロテオミクス」の限界を突破する新世代ショットガンプロテオミクスプラットフォーム' Shotgun Proteomics Beyond Trypsin' の開発を提案する。タンデム質量分析における衝突誘起解離効率を指標にして、試料ペプチドの末端化学構造を修飾することにより、あらゆるペプチドに対して高い決定率でアミノ酸配列情報を取得可能な新規ペプチドシークエンス解析法を開発する。本法を様々なタンパク質消化酵素法や化学的断片化法と組み合わせることにより、従来法では達成不可能であった配列カバー率 100%のタンパク質シークエンス解析が可能となり、本法は、ゲノム配列にコードされていない翻訳後修飾、架橋情報および翻訳後切断サイト等の解析のためのコアテクノロジーとなる。

3. 研究の方法

本研究では、(i) アミノ酸配列に関わらず高効率かつ高感度で測定可能なペプチドシークエンス解析法のための化学修飾法の検討、および (ii) 上記ペプチドシークエンス解析法に基づくタンパク質シークエンス解析の配列カバー率を最大化するための断片化法の検討、を行う。これらの手法を翻訳後修飾プロテオーム解析、化学的架橋に基づく相互作用プロテオーム解析および膜プロテオーム解析に適用し、従来法(トリプシン法)に対する有用性を検証する。さらに、ヒトプロテオーム発現解析において、従来法では達成できていない 10000 タンパク質/24 時間の高深度・多検体 LC-MS/MS 解析システムの確立を実現する。

(1) ペプチドシークエンス解析法およびタンパク質シークエンス解析法の検討
ペプチドシークエンス解析法 (i) については、ペプチドのアミノ酸配列に関わらず MSMS スペクトルにおいて配列決定に十分なプロダクトイオンが生成すること、およびプリカーサーイオンの感度が修飾前に比べて同等以上であることを指標にして、N 末端および C 末端の化学修飾について検討を行う。用いるタンデム MS 装置には Q-TOF 型および Q-orbitrap 型を用い、必要に応じて ion trap 型 MS も使用する。CID 反応には低エネルギー型 CID を用い、モニターするプロダクトイオンは y-, および b-シリーズとする。ランダム配列を持ったペプチド試料には、10 種程度の標準タンパク質を ProK によりランダムに切断したもの、および Trypsin, Lys-C, Lys-N, Chymotrypsin, V8 および Asp-N を用いて消化したペプチドの混合物を用いる。化学修飾には、N 末端の α -アミノ基および C 末端のカルボキシ基を対象にして行う。必要に応じて、Lys の ϵ -アミノ基や Asp, Glu のカルボキシ基を保護する。定量プロテオミクス用試薬として市販されている各種の試薬 (iTRAQ, TMT, ICAT, Py-Tag, 還元的ジメチル化剤など)に加え、アミノ酸蛍光誘導体用に

市販されている試薬に対してもスクリーニングを行う。すでにこれらのもののいくつかについてはアセチル化ペプチド濃縮用に検討しており、反応自体は問題がないことは確かめている。これらの結果に基づいてさらに標識試薬をデザインし、10 種程度自家合成する。導入したタグが衝突誘起解離によりフラグメント化するものについては検討の対象外とする。N 末端および C 末端それぞれに対する修飾を最適化するだけでなく、最適な組み合わせについても合わせて検討する。判断指標については、配列決定に十分なプロダクトイオンの生成を優先し、プリカーサーイオンの感度低下が見られる場合でも、iTRAQ や TMT 試薬と同等程度(10-20%減)であれば許容する。タンパク質シーケンス解析法の検討 (ii) については、入手可能な Trypsin, Lys-C, Lys-N, Chymotrypsin, V8 および Asp-N に加え、ProK, Elastase, Pepsin, LysargiNase, OmpT 等についても検討する。さらにシアノ化 Cys や CNBr を用いる化学的切断法についても検討する。これらについてはその切断選択性に基づき、すでに in silico でどのような断片ができるかが予測可能である。単一の切断法を複数並行して行い、結果を組み合わせる手法がよいのか、複数の切断法を連続して行った方がよいのかについても、in silico 予測および実験の両方で検証する。

(2) プロテオーム試料への適用
試料として、本分野で最もよく用いられている HeLa 細胞タンパク質に対して、翻訳後修飾プロテオーム解析、化学的架橋に基づく相互作用プロテオーム解析および膜プロテオーム解析を行う。翻訳後修飾については Ser/Thr/Tyr 残基に対するリン酸化修飾および Lys 残基に対するアセチル化修飾について検討する。化学的架橋剤としては市販の Lys に対する架橋剤処理をしたものを適用する。ペプチドシーケンス解析用に修飾されたペプチドに対する LC 条件についても最適化検討を行う。さらに、従来法では実現できていない高深度解析と多検体処理能の両立の目安として「10000 タンパク質/24 時間測定」[5] を設定し、ヒトプロテオーム発現解析システムの確立を行う。

4. 研究成果

様々なプロテアーゼをスクリーニングし、その切断選択性の厳格さ、および MSMS におけるフラグメントイオンの生成効率を検討した。その結果、LysArgase に属する Try 特にトリプシンが切断できない R-P, K-P 結合 (P-R, P-K 結合) を切断することが可能であった。ただし、推奨されている消化条件では、切断ミス部位を含むペプチドが多数同定されたので、消化条件を改めて検討することにした。デオキシコール酸ナトリウムおよびラウロイルサルコシン酸ナトリウムを用いる相関移動溶剤法を用いたところ、ミス切断数

を激減させることに成功した。Tryp-N ペプチドは N 末端に正電荷が 2 つ位置していることから、その分離精製法として強カチオン交換クロマトグラフィー (SCX) を検討した。トリプシン消化ペプチドを混合して、同時にその保持挙動を比較したところ、トータル正電荷が同じでも、正電荷のポジションによってその保持挙動が変わることが観測された(図 1)。

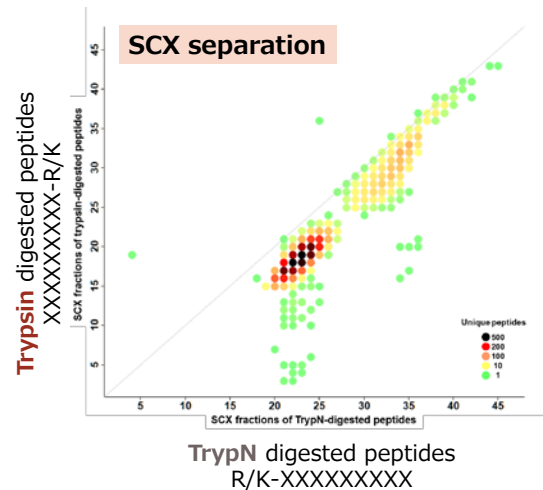


図 1 トリプシン消化ペプチドと Tryp-N 消化ペプチドの SCX における保持比較

本知見を基にして、タンパク質 N 末ペプチドを濃縮することを検討した。哺乳類由来タンパク質の N 末端のほとんどはアセチル化されていることが知られている。Tryp-N で消化すると、内部ペプチドおよびタンパク質 C 末端ペプチドは N 末端に 2 つの正電荷を持つものに対して、タンパク質 N 末端ペプチドはその N 末端の正電荷はゼロもしくは 1 となり、SCX 分離により、タンパク質 N 末端ペプチドが濃縮可能となる。ヒト培養細胞株 HEK293T を試料とし、Tryp-N 消化ペプチドを SCX で分画し、タンパク質 N 末端ペプチドの溶出位置を検討した(図 2)。

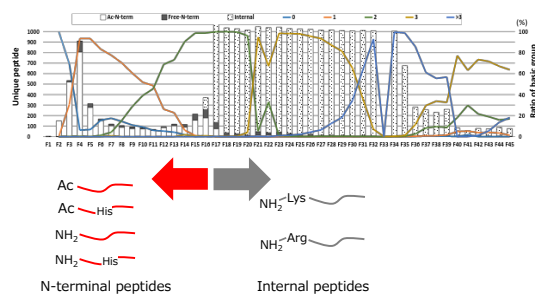


図 2 Tryp-N 消化ペプチドの SCX 分画におけるタンパク質 N 末端ペプチドの濃縮率

その結果、タンパク質 N 末端ペプチドは、内部ペプチドが溶出する前にはほぼすべて溶出していることが分かった。His を一つ含むタンパク質 N 末端ペプチドについて、ヒトプロテオームデータを用いて in silico 消化すると、その含有量は 15%であり、今回得られた

結果を解析すると、14%であったことから、もっとも分離が困難と予測されていたHis含有タンパク質N末端ペプチドについても内部ペプチドと十分に分離されていると考えられる。画分1-16を混合したものを試料とし、LC/MS/MS解析した結果を表1に示す。SCX分画を3回繰り返し行い、それぞれの試料を3回LC/MS/MS解析した結果、アセチル化N末端ペプチドが重複なしで2971種、アセチル化なしのものが400種同定された。内部ペプチドの混入はごくわずかで、タンパク質N末端ペプチド純度はピーク面積換算で97-98%であった。

表1 HEK293T細胞タンパク質のN末端プロテオーム解析(n=9)

	Replicated 1	Replicated 2	Replicated 3	Combine
Unmodified protein N-termini	228(±3)	209(±5)	195(±0)	400
Acetylated protein N-termini	2,103(±27)	1,427(±12)	1,638(±28)	2971
Internal peptide	207(±3)	193(±5)	209(±13)	400
N-term ratio (% Unique Peptide)	91.8(±0.0)	89.5(±0.3)	87.4(±0.5)	
N-term ratio (% Area)	97.8(±0.1)	96.6(±3.3)	96.6(±0.2)	
Unmodified protein groups	129(±3)	111(±2)	132(±1)	194
Partially acetylated protein groups	47(±2)	69(±2)	56(±2)	120
Acetylated protein groups	1,358(±14)	1,029(±5)	1,280(±20)	1794

これらの同定ペプチドの結果からタンパク質N末端についてまとめてみると、アセチル化修飾体と非修飾体の両方が同定されたタンパク質は120種、アセチル化体のみが同定されたタンパク質は1794種、被修飾体のみが同定されたのは194種で、N末端が同定できたタンパク質総数は2108種であった。

一方、トリプシン消化ペプチドをSCX分画した場合でも、タンパク質末端(N端、C端の両方)を含むペプチドが濃縮可能であった。

また、トリプシン消化後にアミノ基を化学修飾し、イオン交換クロマトグラフィーで分離することにより、タンパク質C末端ペプチドについても濃縮が可能であった(図3)。

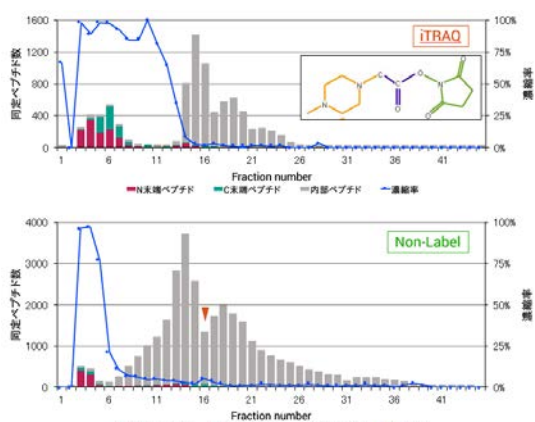


図3 トリプシン消化ペプチドのSCX分画におけるタンパク質末端ペプチドの濃縮率

但し、この場合には、N末端ペプチドはアセチル化されたもののみが濃縮可能であり、そうでないものは内部ペプチドとの分離は不可能であった。トリプシン消化ペプチドにおけるタンパク質末端ペプチドの濃縮効率を向上させるために種々の検討を行った結果、定量タグとして用いられるiTRAQによる標識が効果的で、特にタンパク質C末端ペプチドに対して効果が大きかった。

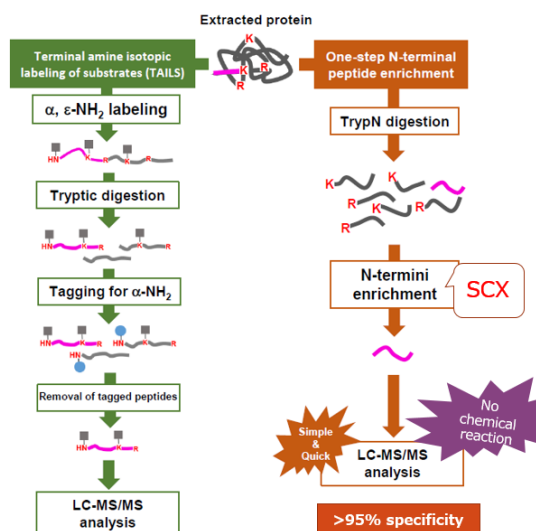


図4 従来のタンパク質N末端ペプチド濃縮法と今回の手法のワークフロー比較

図4に、従来法と今回開発したタンパク質N末端ペプチド濃縮法のワークフローを比較した結果を示す。本手法は従来法のような化学修飾反応を必要とせず、またステップ数も最小限に抑えることに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Giese SH, Ishihama Y, Rappsilber J, Peptide Retention in Hydrophilic Strong Anion Exchange Chromatography Is Driven by Charged and Aromatic Residues. *Anal Chem.* 2018, 90(7):4635-4640. doi:10.1021/acs.analchem.7b05157.

〔学会発表〕(計15件)

○Kosuke Ogata, Chia-Feng Tsai, Masaki Wakabayashi, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, High sensitivity and high throughput phosphoproteomics with micro-scale TMT labeling, 21st International Mass Spectrometry Conference, 2016.

○石濱泰, プロテオーム間引き解析とSWATH, 第64回質量分析総合討論会, 2016.

○伊藤麻里子、若林真樹、杉山直幸、園村和弘、松田文彦、石濱泰、腸内細菌叢メタプロテオーム解析プラットフォームの開発、第 89 回日本生化学会大会、2016.

○阿知波弘憲、若林真樹、杉山直幸、石濱泰、DIA スライスモードを用いた LC/MS/MS による大規模定量プロテオミクス、日本プロテオーム学会 2016 年大会、2016.

○Kazuya Tsumagari, Takayuki Hashimoto, Masaki Wakabayashi, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, Acetyl proteomics using a novel enrichment strategy for lysine acetylated peptides. HUPO2016, 2016.

○阿知波弘憲、鎌倉健雄、市原駿、若林真樹、杉山直幸、石濱泰、メートル長 HILIC モノリス型シリカカラムを用いた高分離能 nanoLC/MS/MS プロテオミクス、第 27 回クロマトグラフィー科学会議、2016.

○石濱泰、ヒトプロテオーム解明に向けたプロテオーム解析法の開発、第 36 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2016.

○ Chih-Hsiang Chang, Eito Yamamoto, Hsin-Yi Chang, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, One-step Enrichment Method for Protein N-Terminome, AOMSC 2017, 2017.

○ Chih-Hsiang Chang, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, N-terminal Arg/Lys Proteases for Shotgun Proteomics, 日本プロテオーム学会 2017 年大会、2017.

○山本 英人、張 智翔、木村 迪子、杉山 直幸、石濱 泰、タンパク質末端大規模解析に向けた新規タンパク質末端ペプチド濃縮法の開発、ConBio2017, 2017.

○舟橋充央、阿知波弘憲、Hsin-Yi Chang、杉山直幸、石濱泰、ポリマー被覆モノリス型シリカを用いた逆相系キャピラリーカラムの開発、第 24 回クロマトグラフィーシンポジウム、2017.

○舟橋充央、阿知波弘憲、山本有希子、Hsin-Yi Chang、杉山直幸、石濱泰、メートル長 C18 モノリス型シリカキャピラリーカラムと緩勾配溶出を組み合わせた nanoLC/MS/MS によるタンパク質同定システムの最適化、第 28 回クロマトグラフィー科学会議、2017.

○西田紘士、若林真樹、杉山直幸、石濱泰、プロテオミクス試料調製用タンパク質固定化 StageTip の開発、日本薬学会第 138 年会、2018.

○石濱 泰、ショットガンプロテオミクスにおける計測と情報の新展開、第 15 回北里疾患プロテオーム研究会、2018.

○ Yasushi Ishihama, Peptide Chromatographic Approaches for Illuminating Human Proteome, 18th KHUPO Annual International Proteomics Conference, 2018.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石濱 泰 (ISHIHAMA Yasushi)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30439244

(3) 連携研究者

杉山 直幸 (SUGIYAMA Naoyuki)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：50545704

若林 真樹 (WAKABAYASHI Masaki)
京都大学・大学院薬学研究科・連携准教授
研究者番号：70552024