SHIMADZU
Excellence in Science

Application Note

No. 88

ライフサイエンス

ナノLC-トリプル四重極質量分析計を用いた中心代謝酵素のターゲットプロテオミクス

松田 史生[1,2,3]、岩倉 崇文[1]、清家 泰介[1]、馬越 泰[4]

Life Science

■要旨

ターゲットプロテオミクスとは、事前に決めたターゲットタンパク質の発現量を測定する分析技術です。微量なペプチドの高感度分析には、ナノLCによる低流量化が用いられます。また、多数のターゲットタンパク質の一斉分析には、Ultra-Fast Mass Spectrometry (UFMS™)のような高速動作が可能な質量分析計が求められます。そこで本研究では、ナノLCおよびUltra-Fast Mass Spectrometryを用いたターゲットプロテオミクスの酵母およびヒト培養細胞中心代謝酵素への適用例を紹介します。

1. はじめに

中心代謝は生物が広く共有する基本機能の一つです。たとえば、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae* は中心代謝経路を通じてグルコース（ブドウ糖）をエタノールと二酸化炭素へと変換する発酵を行います。出芽酵母の高い発酵能力は、日本酒やワインの醸造、製パンといった食品生産に古くから利用され、近年はバイオエタノール生産にも活用されています。また、遺伝子組換え技術やゲノム編集技術を用いて、出芽酵母内の中心代謝経路を改変し、多様な有用化合物を生産させる代謝工学研究も活発化しています。ほかにも、油糧酵母*Lipomyces starkeyi* が油脂を菌体内に大量に蓄積する能力にも中心代謝経路が関与しています。さらに、がん研究分野では、がん細胞がグルコースから乳酸を生産する経路を特異的に活性化することが知られており、中心代謝と疾患メカニズムの関連に注目が集まっています。

中心代謝は100種程度の酵素タンパク質が中心代謝経路の各反応を触媒することで機能しています。中心代謝の制御による有用物質生産能の強化や、疾患と中心代謝機能の関連を理解するには、中心代謝経路を構成する酵素タンパク質の発現量を測定することが近道となります。

ターゲットプロテオミクスは質量分析法を用いたタンパク質発現量測定法の一つで、生体サンプルから抽出した粗酵素液をトリプシン消化し、生成したトリプシン消化ペプチド混合物を液体クロマトグラフートリプル四重極質量分析計で分析します[1,2)]。本法では、測定対象（ターゲット）タンパク質毎に、定量用トリプシン消化ペプチドを事前に選抜し、これを多重反応モニタリング（MRM）系列を用いて選択的に検出、定量する点に特徴があります。微量なペプチドの高感度分析には、ナノLCによる低流量化が用いられます。また、多数のターゲットタンパク質の一斉分析には、Ultra-Fast Mass Spectrometry (UFMS)のような高速動作が可能な質量分析計が求められます。そこで本研究では、ナノLCおよびUltra-Fast Mass Spectrometryを用いたターゲットプロテオミクスの酵母およびヒト培養細胞中心代謝酵素への適用を行いました。

1 大阪大学大学院情報科学研究科
2 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所
3 大阪大学先導的学際研究機構産業バイオイニシアチブ研究部門
4 株式会社島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

2. 実験

2-1.試薬および培養条件

LC/MS用の溶媒はすべてLC/MSグレードのものを用いました（富士フイルム和光純薬）。出芽酵母は200 mLのバッフル付きフラスコ中の50 mL SD培地 (Yeast Nitrogen Base w/o amino acid 6.7 g/L, Glucose 20 g/L)を用いて、30 ℃, 120 rpmで回分培養を行いました。菌体は対数増殖期に回収しました。*L. starkeyi* は50 mLの合成培地[3]を用い出芽酵母と同様の条件で培養しました。MCF-7は1.0×10^6個を10 cmプレートに播種し、DMEM培地中で培養しました。

2-2. 分析サンプルの調製方法

分析サンプルの調製は、大きく分けて生体組織からのタンパク質抽出、タンパク質の還元アルキル化とトリプシン消化、脱塩の３段階があります。酵母細胞からのタンパク質抽出は下記のプロトコルで行いました。培養液50 mLを遠心分離 (5000×g, 4 ℃, 5 min)して上清を捨て、沈殿と同重量の溶菌緩衝液（50 mM HEPES, 5 % Glycerol, 15 mM DTT, 100 mM KCl, 5 mM EDTA, cOmplete protease inhibitors cocktail 1粒（Roche））に再懸濁しました。ジルコニアビーズ（0.6 mmビーズPCRチューブ1杯, 6 mmビーズ1粒）を入れたエッペンチューブに懸濁液を移し、Beads Crusher µT-12（TAITEC）で破砕（3000 r/min、6 min）しました。これを遠心分離（15000 rpm, 4 ℃, 5 min）し、上清をプロテオミクス用エッペンチューブ（タンパク質低吸着性チューブ）に移してサンプルを得ました。また、タンパク質の還元アルキル化とトリプシン消化は文献[4]に従って実施しました。ヒト乳がん細胞MCF-7からのタンパク質抽出とタンパク質の還元アルキル化とトリプシン消化は、Proteomics Sample Preparation Kit for Cultured Cell, (#FMR-001、フナコシ)を用いました。脱塩工程では、市販のMonoSpin C18 (ジーエルサイエンス)、あるいはプロテオミクス用チップにEmpore Octadecyl C18 47 mm Extraction Disks 2215を3枚重ねて作成した自作のStageTipを用いました[5,6]。

2-3. ナノLC-トリプル四重極質量分析計の分析条件

本研究ではナノLCとしてLC-20ADnano、トリプル四重極質量分析計としてLCMS™-8040およびLCMS-8060を用いました。分析条件を表1に示します。すべてのデータ解析にSkylineを用いました[7]。MRM条件として、出芽酵母中心代謝酵素用には、LC/MS/MS MRMライブラリ 代謝酵素（酵母）を用いました[8]。*L. starkeyi* 中心代謝酵素用には自作のものを用いました（未公表データ）。MCF-7用のMRM系列は、文献[9]の133ペプチド 398トランジションのテキストデータをSkylineに読み込んだ後、LC/MS用のメソッドとして出力しました。また、コリジョン電圧はQ1の*m/z*値から、CE = 0.03 × [Q1 *m/z*] + 4.0の式で求めました。

表1　ナノLC-トリプル四重極質量分析計の構成及び分析条件例

LC	：LC-20ADnano
溶離液A	：0.1%ギ酸＋5%アセトニトリル水溶液
溶離液B	：0.1%ギ酸＋95%アセトニトリル水溶液
溶離液C（トラップ用）	：0.1%ギ酸水溶液
オンラインデガッサ	：溶離液Ａと溶離液Ｂ用を2台用意（混合防止のため）
配管	：nanoViper fingertight fitting（Thermo Scientific）
流量	：400 nL/min
グラジエント	：B. conc 0%(0-7 min)–65%(45 min)–100%(50-65 min)–75%(67 min)-0%(75-90 min) インジェクションバルブは5分にサンプル導入側に切り替え
トラップ流量	：40 µL/min
カラム温度	：調節なし
カラム	：L-column Micro L-C18 0.1×150 mm, 3 µm (CERI)
トラップカラム	：L-column Micro L-C18 0.3×5 mm, 5 µm (CERI)
チップ	：Fortis tip 150-20 (AMR)
インターフェイス	：nano-spray interface (AMR)
MS	：LCMS-8040 or LCMS-8060
ネブライザーガス流量	：なし
DL温度	：150℃
ヒートブロック温度	：200℃
ドライイングガス流量	：なし
Q1分解能	：Low
Q3分解能	：Low
CIDガス	：310 kPa (LCMS-8040) 270 kPa (LCMS-8060)
インターフェイス電圧	：1.4-1.7 kV
検出法	：MRMモード

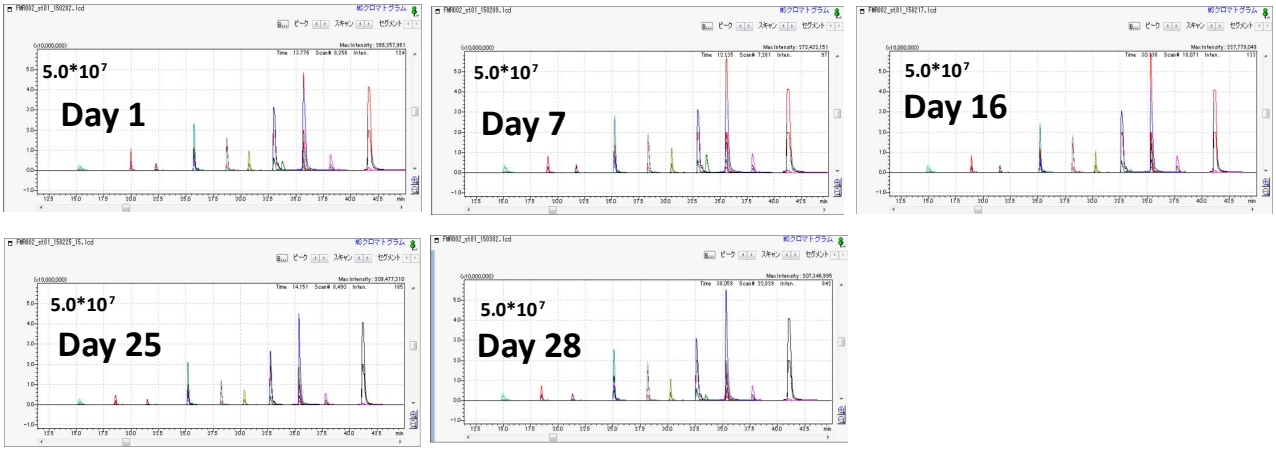

図1　ナノLCの保持時間安定性の確認
1ヶ月の連続分析の実施時に、1回／週頻度でイオン源の清掃とMRMplus Retention Time Marker (FMR-002、フナコシ)の分析を行いました。

3. 結果

3-1.ナノLCの保持時間安定性の確認

ターゲットプロテオミクス用の試験分析用ペプチドサンプルとしてMRMplus Retention Time Marker (FMR-002、 フナコシ)を用いました。これは12種のペプチド混合物であり、それぞれを検出するSRMトランジションも公表されています。そこで、1ヶ月の連続分析の実施時に、1回／週頻度でイオン源の清掃とFMR-002の分析を行いました（図1）。その結果保持時間ずれは0.2分以内、検出感度の変動もわずかだったことから、ナノLCの保持時間およびイオン源に定量分析に必要な安定性があることが確認できました（図1）。

3-2. トリプル四重極質量分析計の高速動作性能の確認

近年、トリプル四重極質量分析計の高速化が進み、MRM系列1チャネル分のデータ取得時間（Dwell time）の最低値が、LCMS-8060では0.8 msecまで高速化しています。これに加えてPause time が1.0 msec必要となるため、500-555チャネルから並行してデータ取得が可能となります。一方、Dwell timeの低下は、クロマトグラムのS/N比の低下、すなわち定量精度の悪化につながることが懸念されます。そこで、同じサンプルからDwell timeのみが異なるMRMメソッドでデータ取得を行い、定量値の比較を行いました。今回はフル^{13}Cグルコース培地で培養した出芽酵母S288C株と非標識グルコースで培養した*ZWF1*遺伝子欠損株(zwf1Δ)からそれぞれトリプシン消化ペプチドを作成し、1:1で混合したサンプルを用いて、中心代謝酵素解析用のMRMメソッドを用いて非標識ペプチドと、^{13}C標識ペプチドの相対含量測定値（[zwf1Δ]／[S288C]）を測定しました。また、Dwell timeが異なってもデータ取得サイクル（1200 msec/cycle）は同一に設定しました。LCMS-8040を用いて取得した結果を見るとDwell timeが10 msecから3 msecに減少しても相対含量測定値に大きな変動は見られませんでした（図2a）。また、1 msecに減少しても変動は2倍以内と低レベルに抑えられていました（図2b）[10]。

また、同様の比較をLCMS-8060を用い、油脂酵母*L. starkeyi* の中心代謝酵素用MRMメソッドを用いて実施したところ、Dwell timeが10 msecから3 msec、1 msecまで減少しても、相対含量測定値に2倍以上の変動は見られませんでした（図2c, d）（未公表データ）。これらの結果から、LCMS-8040、LCMS-8060では定量値の精度を維持しながら高速にデータ取得が可能であると確認できました。

3-3. MRMアッセイメソッドの移植性の確認

ヒト、マウスといった生物種では、全タンパク質をゲノムワイドに測定するMRMアッセイ法の構築が進められています。MRMアッセイ法がいったん確立すると、異なる質量分析装置メーカー間で移植が可能です。例えば、過去にヒト中心代謝酵素78タンパク質のMRMアッセイ法が構築されています[9]。本論文ではThermo Scientific社のトリプル四重極質量分析計用に作成された133ペプチド 398トランジションのテキストデータが報告されています。そこで、テキストデータをSkylineに読み込ませた後、島津製作所製LC/MS用のMRM分析メソッドとして出力しました。また、コリジョン電圧はQ1の*m/z*から算出しました（**2-3**参照）。LCMS-8040に移植したMRMアッセイ法を用いてヒト培養細胞株（乳がん由来）MCF-7株の定量プロテオーム分析を行ったところ、複数のペプチドを検出できました。また、各ペプチドの保持時間は文献記載のものと線形関係があり、保持時間情報の移植も可能でした（図3、未公表データ）。

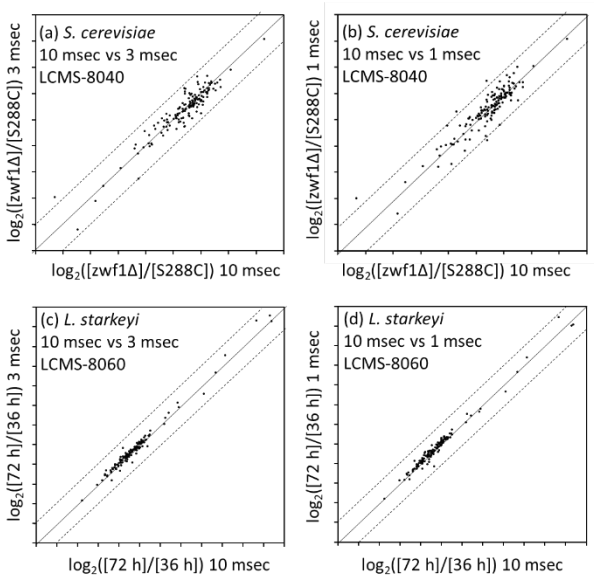

図2　Dwell timeがペプチドの相対含量測定に与える影響
基準サンプルに対する装置定量値の対数値をプロットしました[10]。
点線は2倍と0.5倍の変動を示しています。

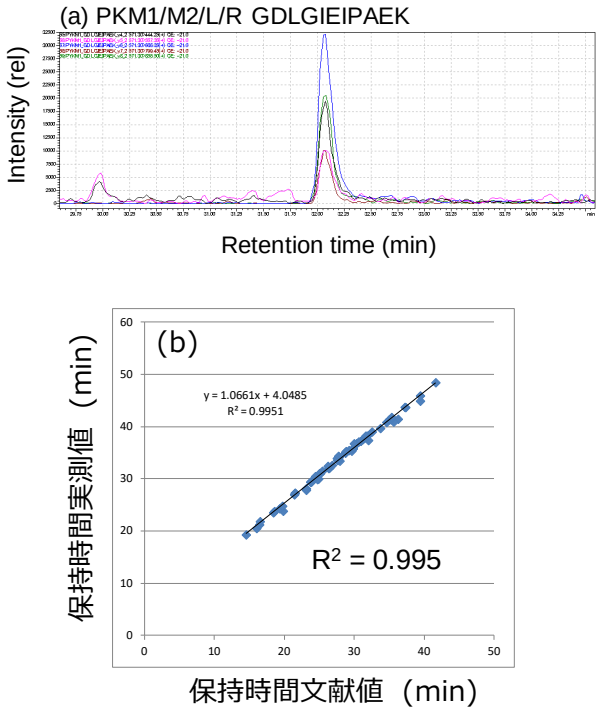

図3　MRMアッセイメソッドの移植性の確認
文献掲載のMRMアッセイメソッドを移植したものを用いて、乳がん細胞MCF-7中心代謝酵素のターゲットプロテオーム解析を行いました。(a) PKM由来の測定ペプチドGDLGIEIPAEKの検出例 (b) 定量ペプチドの保持時間の文献値と移植後の実測値との比較

3-4.出芽酵母１遺伝子欠損変異株中心代謝酵素のターゲットプロテオーム解析

出芽酵母はもともと高いエタノール生産能力を持ちます。そこで、解糖系の生産物であるピルビン酸(PYR)をエタノール(ETOH)に変換する経路のカギ酵素であるピルビン酸脱炭酸酵素である*PDC1*遺伝子を欠損させ、PYRを他の化合物の生合成に切り替える試みが行われていますが、若干エタノール変換が低下する程度で、目論見通りに切り替わらないことが知られています。そこで、*PDC1*遺伝子が欠損した1遺伝子破壊株pdc1Δと野生株BY4741の定量プロテオーム解析を行い、中心代謝酵素発現プロファイルを比較しました[11]。その結果、pdc1Δ株では、Pdc1タンパク質の発現量がゼロまで減少していました(図４a)。しかし、*PDC1*遺伝子と同じ機能を持ち、通常はほとんど発現していないPdc5タンパク質の発現が著しく向上し、バックアップとして機能していました。また、解糖系の入り口や中間部分の鍵酵素であるHxk1やTdh1の発現も同時に向上しており、*PDC1*遺伝子が解糖系の他の部分に影響を及ぼすことが明らかとなりました。

さらに、解糖系のグローバルレギュレーターである*GCR2*遺伝子の欠損株gcr2Δで同様の解析を行ったところ、解糖系の多くの酵素発現量が低下する傾向がありました(図４b)。また、アミノ酸生合成経路の酵素の発現量低下や、トレハロース経路の酵素発現量の向上など、中心代謝以外にもさまざまな影響を及ぼすことが明らかとなりました。代謝工学研究では追加反応を触媒する酵素タンパク質を発現させたり、不要な反応を触媒する酵素タンパク質を取り除くことで、目的物の生産効率向上を目指します。1か所に対する操作が中心代謝経路全体に影響を及ぼすことが示唆されました[11]。

4. まとめ

本研究では、ナノLCとUltra-Fast Mass Spectrometryを用いたターゲットプロテオミクス法を酵母およびヒト培養細胞中心代謝酵素の発現量解析へ適用しました。ナノLCの保持時間およびイオン源に定量分析に必要な安定性があることが確認できました（図１）。またUltra-Fast Mass Spectrometryを用いることで定量値の精度を維持しながら高速にデータ取得が可能であると確認できました（図2）。さらに、文献情報からMRMアッセイメソッドを移植できることも確認しました（図3）。また、出芽酵母1遺伝子破壊株の解析から、1か所に対する操作が中心代謝経路全体に影響を及ぼすことが示されました（図4）。ナノLCとUltra-Fast Mass Spectrometryを用いたターゲットプロテオミクス法を用いた中心代謝酵素の一斉定量分析からは、有用物質生産能向上のための中心代謝の制御方法や、疾患と中心代謝機能の関連に関する知見が得られると期待されます。

謝辞

本研究の実施に当たり*Lipomyces starkeyi* 培養に協力いただきました新潟薬科大学 応用生命科学部高久洋暁教授、佐藤里佳子特任助教、プロテオーム解析に技術面でご協力いただきました大阪大学大学院情報科学研究科、脇坂恵都子様、北野博司様、富田淳美様（当時）に御礼申し上げます。

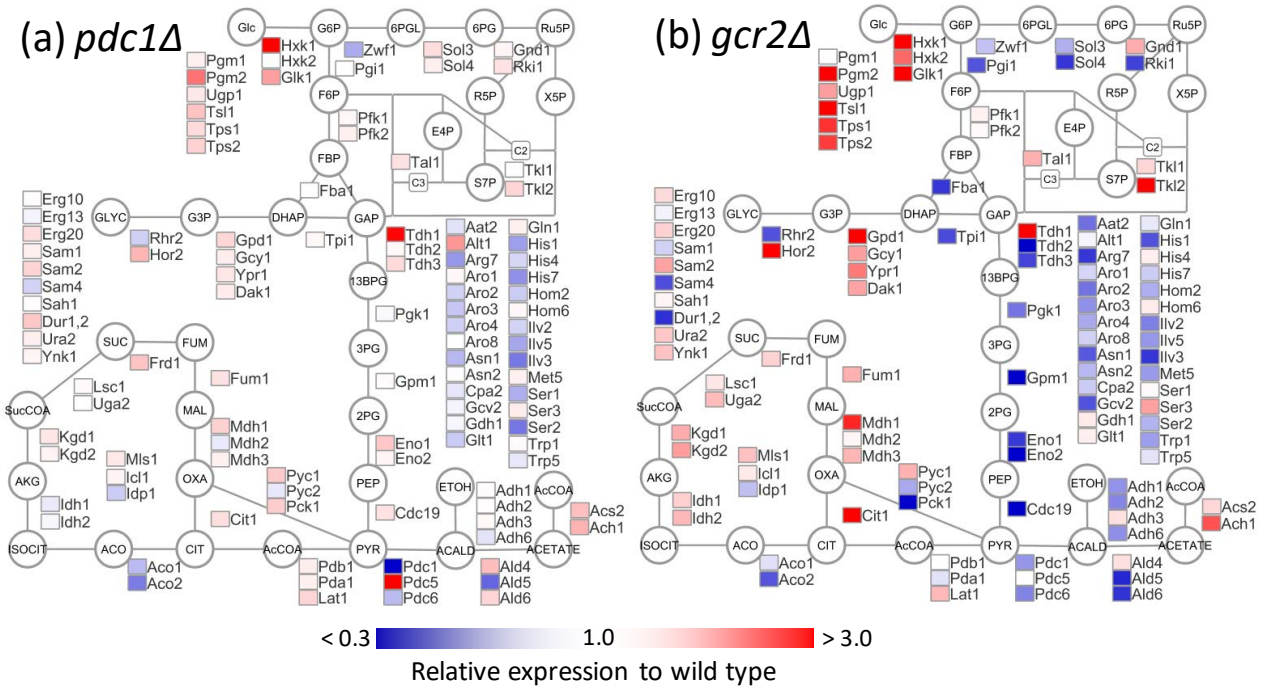

図4 出芽酵母１遺伝子欠損変異株中心代謝酵素のターゲットプロテオーム解析[11]
野生株に対するpdc1Δ株(a), gcr2Δ株 (b)の各酵素の相対発現量をヒートマップで示しました。

<参考文献>
1) 大槻純男. 定量的標的プロテオミクスによる生化学の新展開：抗体を用いない汎用的タンパク質定量技術. 生化学, 2012;84:911-919.

2) Marx T. Targeted proteomics. Nature Methods, 2013;10:19-22.

3) Takaku, H., Ebina, S., Kasuga, K., Sato, R., Ara, S., Kazama, H., Matsuzawa, T., Yaoi, K., Araki, H., Shida, Y., Ogasawara, W., Ishiya, K., Aburatani, S., & Yamazaki, H. (2021). Isolation and characterization of *Lipomyces starkeyi* mutants with greatly increased lipid productivity following UV irradiation. J Biosci Bioeng, 131(6), 613-621.

4) Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, *et al.* A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. Fluids Barriers CNS, 2013; 10:21.

5) 石濱 泰. プロテオーム解析用固相抽出ミニカラムStage Tipの開発. 分析化学, 2008;57:1011-1018

6) Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Nat Protoc. 2007;2: 1896-1906.

7) MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. Bioinformatics, 2010; 26:966-968.

8) Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN, *et al.* Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. Cell, 2009;138:795-806.

9) Drabovich AP, Pavlou MP, Dimitromanolakis A, Diamandis EP. Quantitative analysis of energy metabolic pathways in MCF-7 breast cancer cells by selected reaction monitoring assay. Mol Cell Proteomics, 2012; 11:422-434.

10) Matsuda F, Ogura t, Tomita A, *et al.* Nano-scale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using the multiple reaction monitoring mode based quantitative platform for analyzing multiple enzymes associated with central metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* using ultra fast mass spectrometry, J Biosci Bioeng.2015;119:117-120.

11) Matsuda, F., Kinoshita, S., Nishino, S., Tomita, A., & Shimizu, H. (2017). Targeted proteome analysis of single-gene deletion strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking enzymes in the central carbon metabolism. PLoS ONE, 12(2), e0172742.

UFMSおよびLCMSは、株式会社 島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
https://www.an.shimadzu.co.jp/

初版発行：2023 年 10 月

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証等を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。
掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。

© Shimadzu Corporation, 2023