

選択反応モニタリングを用いるタンパク質定量法

武森 信曉

1. はじめに

選択反応モニタリング (selected reaction monitoring: SRM) とは、標的の分子に関する情報を、分析試料から選択的に検出するための質量分析法である。現状における SRM のモニタリング対象は、アミノ酸、ペプチド、脂質といった比較的分子量の物質に限定されるものの、生体高分子であるタンパク質も分析前に断片化処理を施せば、その解析対象となりうる。近年では、本稿で紹介するさまざまな解析支援技術の急速な発展に伴って、任意のタンパク質を計測するための SRM アッセイを、個々の研究者レベルで自由自在に構築することが可能になりつつある。大規模な SRM アッセイを活用して関心のある生体内タンパク質集団の網羅的解析を行う新しいオミクス手法 (ターゲットプロテオミクス) も開発され、*Nature Methods* 誌の Method of the Year 2012 に選出されている。抗体を用いることなく、数十種類のタンパク質に関する定量情報や翻訳後修飾情報を迅速に取得できる本手法は、各種イムノアッセイの代替的手法として注目度は高く、これからの生化学研究に必須の技術である。なお、SRM は多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring: MRM) と呼ばれることも多いが、日本質量分析学会のマススペクトロメトリー関係用語集 (第3版) では、この呼称は推奨されていない。

2. SRM の原理

図1に、トリプル四重極型の質量分析計を用いる SRM の原理を示す。溶液状態の分析用試料は、イオン化された直後に質量分析計内へと導入される。その後、最初の四重極内 (Q1) において質量電荷比に基づき目的のイオンを

取り出す作業が行われるが、その際に標的と類似した質量電荷比を有する他のイオンが混入する可能性がある。そのため SRM では、取り出したイオンを次の四重極内において断片化した後、標的に固有の断片化イオンを、最後尾の四重極内 (Q3) で選択する。以上の操作を質量分析計内で高速に行うことにより、標的を高選択的に検出することができる。加えて、異なる四重極を用いたフィルタリングによるノイズレベルの低減は、標的高感度な検出を可能にする。Q1 と Q3 の組み合わせを SRM トランジションと呼び、標的分子に関する最適なトランジションの決定が、信頼度の高い SRM 解析を実現する上で重要となる。また、複数のトランジションを同時にモニタリングすれば、異なる種類の標的分子を一斉に分析することも可能となる (図2)。

標的分子のイオン化は試料内の他成分に影響を受けやすく、SRM を用いて定量解析を行う際には夾雑物によるイオン化の抑制もしくは促進といった問題点を考慮する必要がある。たとえば、同じモル数の標的分子を SRM で分析しても、分析試料に含まれる他の成分が異なる場合は、得られるシグナルの強度は変動してしまう。そのため、SRM を用いて精度の高い定量情報を取得したい場合には、同位体希釈質量分析法の導入が欠かせない。同位体希釈質量分析法とは、同位体で標識された内部標準物質を用いることで、質量分析による高精度な定量解析を可能にする実験手法である。タンパク質の場合は、 ^{13}C や ^{15}N などの安定同位体で標識した合成ペプチド (AQUA ペプチドと呼ばれる) が内部標準物質として用いられることが多い¹⁾。

3. タンパク質の SRM アッセイ

SRM でタンパク質を分析するためには、あらかじめタンパク質試料を分析に適したサイズへ断片化するための前処理工程を必要とする (図1)。プロテアーゼによる断片化処理が主流であり、具体的には基質特異性の高いトリプシン (アルギニンもしくはリシン残基の C 末端側を切断) や Lys-C (リシン残基の C 末端側を切断) が用いられることが多い。前処理後に得られた消化ペプチド断片が、SRM アッセイにおける実際のモニタリング対象となる。我々の研究室では、低流量 (300 nL/分) の液体クロマトグ

愛媛大学プロテオサイエンスセンタープロテオミクス研究部門
(〒791-0295 愛媛県東温市志津川)

Targeted protein quantitation using Selected Reaction Monitoring
Nobuaki Takemori (Division of Proteomics Research, Proteo-
Science Center, Ehime University, Shitsukawa, Toon, Ehime 791-
0295, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870636

© 2015 公益社団法人日本生化学会

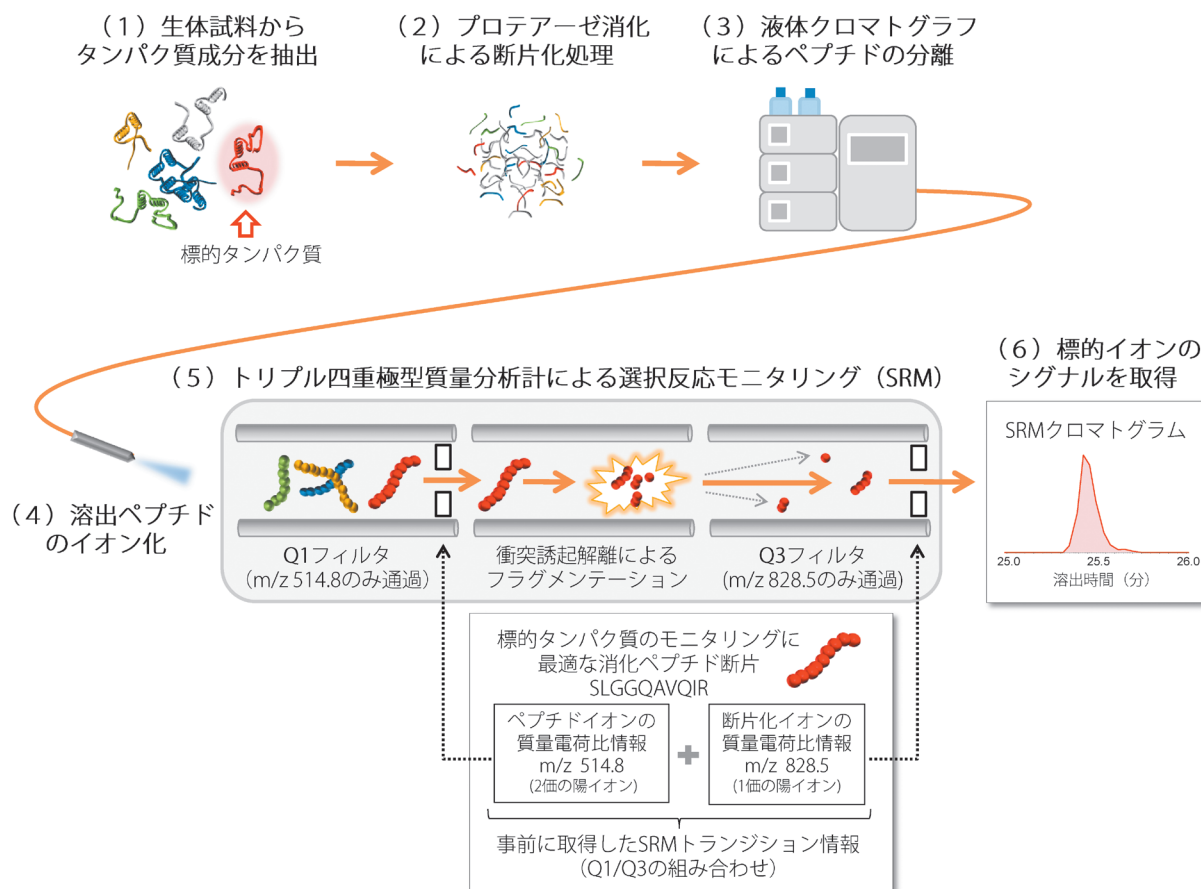


図1 選択反応モニタリング (SRM) を用いる標的タンパク質解析の流れ

ラフ (LC) で消化ペプチドを分離した後、標的のペプチドを選択的に検出するLC-SRMアッセイの手法を用いて、これまでにさまざまな生体試料に含まれるタンパク質²⁻⁵⁾や生理活性ペプチド⁶⁾のターゲット分析を行っている。

モニタリングに適した消化ペプチド断片のことを、proteotypic peptide (PTP) と呼ぶ。PTPには、標的タンパク質に固有のアミノ酸配列を有し、再現性よく検出できるペプチドが選択される。使用する質量分析計の検出レンジにもよるが、一般的には10~30アミノ酸のペプチド長が分析に適している。疎水性が極端に高いペプチドは、試料保存時やLC分離工程において損失する可能性が高く、取り扱いが困難である。翻訳後タンパク質修飾によるペプチド質量数の変化は、定量解析時にバイアスを生じることから注意を必要とする。たとえば配列内にメチオニン残基を有するペプチドは、メチオニン側鎖が酸化修飾を受けやすく、PTP候補から除くことが望ましい。

生物種によっては、すでにプロテオームワイドにPTPが明らかにされ、その配列情報が公的に利用できる場合もある。たとえばモデル生物ショウジョウバエの場合は、すでに2007年の段階で9124種類のタンパク質に関するPTPが同定され、詳細な質量分析情報とともにその配列情報が

公開されている⁷⁾。ヒトプロテオームのPTPに関しても、情報整備が急速に進められている。たとえば、2014年に*Nature*誌に報告された質量分析によるヒトプロテオームの大規模解析において、膨大なペプチド情報が明らかにされており⁸⁾、PTPを選択する上で貴重な情報源となっている。その詳細はProteomics DB (<https://www.proteomicsdb.org>) からWebで閲覧できる。その他にもPASSEL⁹⁾のようなSRMのデータリポジトリも構築されている。関心のあるタンパク質のPTP情報が利用できるか、まずは一度Webで検索してみることをお勧めする。

4. アッセイ構築に必要な標準試料の入手方法

データベースなどから公的に得られるPTP情報は、アッセイ構築を行う上で大変有益である。しかし、その有効性は報告者の実験環境において保障されたものであり、自身の実験環境において必ずしも再現できる保証はない。またタンパク質によっては、公的なPTP情報が入手できないケースも想定される。目的タンパク質の実試料が入手可能であれば、やはりPTP配列を自分で決定することが望ましい。高感度な質量分析計が利用できる実験環境であれば、

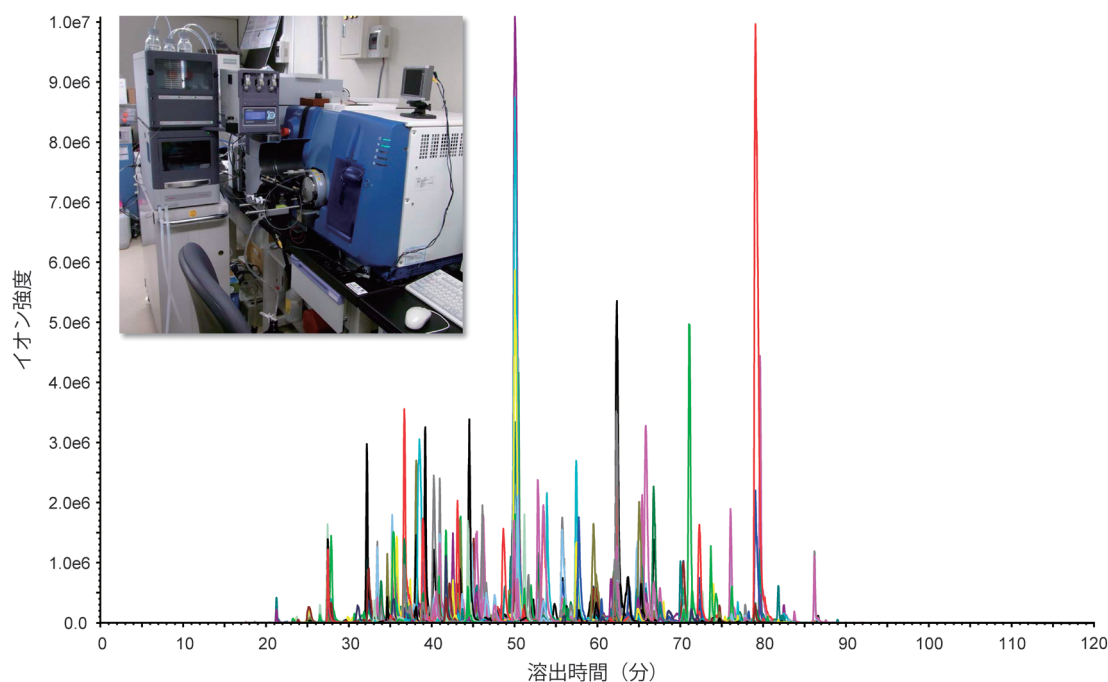


図2 SRM アッセイによるマルチターゲットの一斉分析例
液体クロマトグラフ (LC) で分離した194種類のペプチドを, SRMを用いて検出した。写真は実際の分析に用いた LC-質量分析システム。

準備する試料は微量でも問題ない。たとえば, 二次元ゲル電気泳動で分離したタンパク質スポット (ナノグラムレベル) は, PTP探索の重要なリソースとなる³⁾。乾燥したゲル内環境ではタンパク質は比較的安定な状態で保存されており¹⁰⁾, 過去に泳動したゲルであっても質量分析に使用できる可能性は高い。筆者らは実際に, 20年前に泳動した二次元ゲルから切り出したタンパク質スポットを用いて, 目的タンパク質のトリプシン消化ペプチドを検出することに成功している¹¹⁾。なお, 質量分析は質量電荷比に基づいて標的分子を特異的に検出することができるため, 試料の純度が多少悪くても分析を行う上で大きな問題にはならない。数ミリグラムレベルの粗精製ペプチドを迅速に提供する受託合成サービスも各社から提供されており, アッセイ構築用のペプチドライブラリも比較的短期間かつ低コストで構築できる¹²⁾。そのため, 目的タンパク質試料が入手困難である場合には, 任意に選択した数種類のPTP候補ペプチドを実際に合成して, 実測定により最適なペプチドを選択するのも一案である。定量解析の内部標準としても使用できる安定同位体標識ペプチドの粗精製品を提供するサービスも出現しており, ターゲットプロテオミクス用の大規模なSRMアッセイ構築に活用されている。今後は, 特定のシグナル伝達経路や代謝経路に関わるタンパク質の検証済みPTPから構成されたりファレンスペプチドライブラリの整備が, ターゲットプロテオミクスを普及する上で重要となるだろう。

5. アッセイ構築を支援するソフトウェア

標準試料を入手した後は, 質量分析計を用いて事前分析を行い, アッセイ構築に必要な情報を取得する。具体的には, 標的ペプチドのLC溶出時間や, トランジション設定に必要となる断片化イオン情報などである。本稿では詳細に関する説明は割愛するが, 現在市販されている標準的な質量分析システムであれば, 分析作業はほぼ自動化されており, 1時間程度あれば分析は終了する。分析終了後は, 米国ワシントン大学のMacCossらのグループが開発したオープンソフトウェア「Skyline」¹³⁾を用いれば, 取得したデータからアッセイ用パラメータを作成する作業を, 自分のPC上で気軽に行うことができる。Skylineは, 多くの質量分析メーカーの入出力フォーマットに対応しており, 分析データの読み込みから, データの解析, 作成した分析メソッドの出力までスムーズに行うことができる。

現在, SkylineはMacCoss研究室のウェブサイトから無料でダウンロードできる (<https://skyline.gs.washington.edu>)。各種操作のビデオチュートリアルもきわめて充実している。取り扱い説明書は日本語にも翻訳されており, 初心者でも扱いやすい。さらに近年では, Skyline上で構築したアッセイ情報の共有化を目的として, 「PanoramaWeb」¹⁴⁾と呼ばれるデータリポジトリ用ソフトウェア (<https://panoramaweb.org>) も開発された。最近論文の投稿時に, 公的データベースへSRMデータとアッセイ情報

の提出を求められることが多いが、PanoramaWebを用いてデータを共有化することにより即対応できる。もちろんデータへのアクセス制限も可能であり、パスワード付き限定公開用アカウントも別途発行できるので、投稿論文の査読時にデータを提供するには大変便利である。

6. コムギ無細胞タンパク質合成法を用いたアッセイ構築

上述のように、さまざまな手法で標準試料の入手は可能であるが、目的タンパク質の遺伝子が手元にある場合は、コムギ無細胞タンパク質合成法の利用を是非お勧めする。本手法は、遠藤弥重太（愛媛大学特別荣誉教授）のグループにより開発された日本発の画期的なタンパク質合成法^{15, 16)}であり、翻訳阻害因子を取り除いたコムギ胚芽抽出液を用いることで、従来の無細胞合成法に比べて高効率な翻訳反応を実現している点に特徴がある。簡易合成用キットも市販されており、小スケールの合成（数百マイクロリットルレベル）であれば、タンパク質によっては最短2日間で質量分析に十分な量を、比較的低コストに合成することができる。

無細胞合成は試験管内で翻訳反応を行うため、添加するアミノ酸成分の変更も容易であり、同位体標識タンパク質の合成に使用されることも多い。筆者らが、コムギ無細胞合成系と¹³C/¹⁵N標識アミノ酸（リシンおよびアルギニン）を用いて完全長の安定同位体標識タンパク質を合成したところ、合成タンパク質の同位体標識効率は97%以上であり、翻訳時に添加する¹³C/¹⁵N標識アミノ酸の量を増加することにより、最大99.6%の標識も可能であった⁵⁾。無細胞合成により得られた安定同位体標識タンパク質は、定量解析における内部標準としても用いることができる。しかしながら、微量に存在する非標識体が、生体試料中における低含有量タンパク質の解析時には定量の妨げとなる可能性がある。そのため、高精度な定量解析を行う際は、高効率（99%以上）に標識された合成タンパク質を内部標準として用いることが望ましい。上述のAQUAペプチドを用いる定量解析は、不十分なプロテアーゼ消化が原因で生じる定量バイアスが問題とされてきたが、生体試料中の標的タンパク質ときわめて類似した物性を有する完全長の同位体標識タンパク質を内部標準に用いることで、こうした問題を回避することができる¹⁷⁾。

なお、SRMにより標的タンパク質の絶対量を算出する際は、内部標準タンパク質の絶対量をあらかじめ正確に算出する必要がある。アミノ酸分析は信頼度の高いタンパク質定量法であるが、煩雑かつ多量の分析試料を必要とする。Steenらのグループは、合成タンパク質のN末端に定量解析用のペプチドタグを付加することで、質量分析を

用いて内部標準タンパク質の絶対量を簡易に算出することができる定量解析法（FLEXIQuant法）を開発している¹⁸⁾。FLEXIQuant法とコムギ無細胞合成法とを組み合わせれば、同位体希釈質量分析による大規模なタンパク質の絶対定量解析も実現可能であろう。内部標準を使用しないラベルフリー絶対定量法^{19, 20)}も開発が進められており、高いスループット性と精度を併せ持つ定量解析技術の開発が今後さらに期待される。

7. ターゲット“トランスメンブレン”プロテオミクス

さまざまなタンパク質に関するSRMアッセイ情報の整備が進み、ターゲットプロテオミクスの解析対象も急速に拡大している。しかしながら、膜貫通型タンパク質成分（トランスメンブレンプロテオーム）のターゲット解析は、適切な標準試料の入手が困難であるため難航している。上述のコムギ無細胞合成法は、翻訳反応時にリボソームを添加することで、従来の細胞ベースの合成法では困難であった膜貫通型タンパク質を効率よく合成できる^{21, 22)}。これまでに筆者らは、Gタンパク質共役型受容体、ABCトランスポーター、TRPチャネルなどの膜貫通型タンパク質263種類の安定同位体標識体をリボソーム存在下で合成し、SRMアッセイの構築や定量解析時の内部標準として活用している⁵⁾。なお、無細胞合成により得られた膜貫通型タンパク質は、リボソームとの複合体（プロテオリボソーム）を形成している。そのため、プロテオリボソームをそのまま生体試料へ添加すれば、膜ペレットの遠心処理やタンパク質抽出といった試料調製時に、内在性の標的膜タンパク質とリボソーム内の同位体標識膜タンパク質は類似した挙動を示すことが期待できる（図3A）。膜貫通型タンパク質の理想的な同位体希釈質量分析の実現に向けて、筆者らはマウス脳組織に発現する神経伝達物質受容体の定量SRM解析を、内部標準用プロテオリボソームを用いて行った（図3B～D）。GABRA1とGRIA3の各種PTPに関するSRMクロマトグラム（図3B）は、内在性（¹²C/¹⁴N）と内部標準（¹³C/¹⁵N）の間できわめて類似しており、そのため異なるPTPを使用しても定量解析の結果はほぼ同様であった（図3C）。さらにGABA受容体 α サブユニット6種類の絶対量をSRMで一斉に解析することにより、各マウス脳組織におけるサブユニットの組成比を算出することにも成功している（図3D）。これらの解析結果は、プロテオリボソームとして合成した完全長の同位体標識膜貫通型タンパク質を内部標準に用いる我々のアプローチが、トランスメンブレンプロテオームの高精度なターゲット定量解析を行う上で有効であることを示している。ただし、内部標準として添加するプロテオリボソームには、完全長の翻訳産物に加えて、きわめて微量ではあるものの合成途中の翻

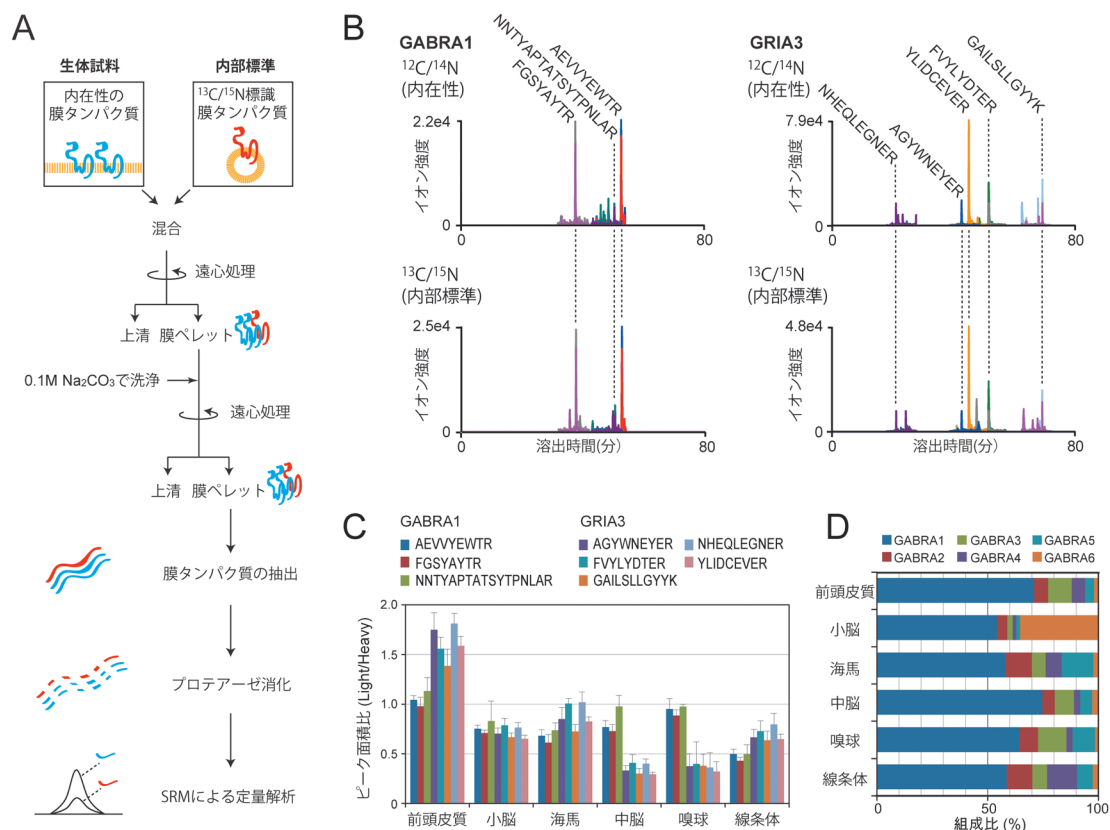


図3 複数回膜貫通型タンパク質のターゲット定量解析例

(A) プロテオリポソームを用いた膜貫通型タンパク質の同位体希釈質量分析法。(B) GABRA1 と GRIA3 の LC-SRM アッセイ。マウス大脳皮質から抽出したタンパク質試料を使用。トリプシン消化後に、LC-SRM アッセイを用いて分析を行った。(C) 異なる組織間の比較定量解析例。GABRA1 と GRIA3 の各種トリプシン消化ペプチドを用いて、各マウス脳組織における比較発現プロファイルを求めた。(D) 絶対定量解析により得られた GABA 受容体 α サブユニットの組成比。文献5より許可を得て転載。

誤産物が混入するリスクがある。よりコンタミの少ない高品質なプロテオリポソーム合成系の開発は、正確な絶対量解析に向けた今後の課題である。

8. おわりに

本稿では、タンパク質を分析対象とした SRM アッセイを構築するために必要な基礎知識と、筆者らが日ごろ活用している実験技法について簡単に説明した。公的に利用可能な PTP 情報は急速に増加しており、Skyline のように操作性の高い無料ソフトウェアが開発され、さらには標準試料の受託合成サービスや簡易合成キットも登場したことにより、今や SRM を誰でも気軽に扱える環境が整備されていることをおわかりいただけたと思う。質量分析計の操作は難解であるという誤解をよく耳にするが、実際には多くの工程は自動化されており、あくまで個人的な印象であるが、容易に質量分析計を利用できる環境であれば、SRM を用いる本手法はウェスタンブロットより実験の難易度は低いのではないだろうか。SRM に用いるトリプル四重

極型の質量分析計は堅牢性も高く、医療デバイスとして米国 FDA に認可された機種も登場するなど、今後はさらに普及することが予想される。なお、アッセイに必要な消耗品費 (試薬、分析カラム等) は比較的安価である一方、質量分析計の導入費用や保守点検費用は依然として高額であるため、当面は共通機器としての利用が望ましいかもしれない。近年では、質量分析メーカーが主催する講習会も多数あり、もちろん我々の研究室でも事前に連絡をいただければ見学や実習も可能である。「機械を壊してしまうのでは?」、「なにやら難解そうだな……」、といった先入観を捨てて、まずは自身の手で一度操作してみることが理解を深める上で重要な一歩となるに違いない。

文 献

- Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W., & Gygi, S.P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6940–6945.
- Ohnuki, H., Inoue, H., Takemori, N., Nakayama, H., Sakaue, T., Fukuda, S., Miwa, D., Nishiwaki, E., Hatano, M., Tokuhisa, T., Endo, Y., Nose, M., & Higashiyama, S. (2012) *Blood*, **119**, 2688–

- 2698.
- 3) Miura, N., Takemori, N., Kikugawa, T., Tanji, N., Higashiyama, S., & Yokoyama, M. (2012) *Mol. Oncol.*, **6**, 311–322.
 - 4) Takemori, N., Takemori, A., Ishizaki, J., & Hasegawa, H. (2014) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **967**, 36–40.
 - 5) Takemori, N., Takemori, A., Matsuoka, K., Morishita, R., Matsushita, N., Aoshima, M., Takeda, H., Sawasaki, T., Endo, Y., & Higashiyama, S. (2015) *Mol. Biosyst.*, **11**, 361–365.
 - 6) Yokoi, S., Okuyama, T., Kamei, Y., Naruse, K., Taniguchi, Y., Ansai, S., Kinoshita, M., Young, L.J., Takemori, N., Kubo, T., & Takeuchi, H. (2015) *PLoS Genet.*, **11**, e1005009.
 - 7) Brunner, E., Ahrens, C.H., Mohanty, S., Baetschmann, H., Loevenich, S., Potthast, F., Deutsch, E.W., Panse, C., de Lichtenberg, U., Rinner, O., Lee, H., Pedrioli, P.G., Malmstrom, J., Koehler, K., Schrimpf, S., Krijgsvelde, J., Kregenow, F., Heck, A.J., Hafen, E., Schlapbach, R., & Aebersold, R. (2007) *Nat. Biotechnol.*, **25**, 576–583.
 - 8) Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Moghaddas Gholami, A., Lieberenz, M., Savitski, M.M., Ziegler, E., Butzmann, L., Gessulat, S., Marx, H., Mathieson, T., Lemeer, S., Schnatbaum, K., Reimer, U., Wenschuh, H., Mollenhauer, M., Slotta-Huspenina, J., Boese, J.H., Bantscheff, M., Gerstmair, A., Faerber, F., & Kuster, B. (2014) *Nature*, **509**, 582–587.
 - 9) Farrah, T., Deutsch, E.W., Kreisberg, R., Sun, Z., Campbell, D.S., Mendoza, L., Kusebauch, U., Brusniak, M.Y., Hüttenhain, R., Schiess, R., Selevsek, N., Aebersold, R., & Moritz, R.L. (2012) *Proteomics*, **12**, 1170–1175.
 - 10) Matsumoto, H. & Komori, N. (1999) *Anal. Biochem.*, **270**, 176–179.
 - 11) Mecklenburg, K.L., Takemori, N., Komori, N., Chu, B., Hardie, R.C., Matsumoto, H., & O'Tousa, J.E. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 1238–1249.
 - 12) Picotti, P., Rinner, O., Stallmach, R., Dautel, F., Farrah, T., Domon, B., Wenschuh, H., & Aebersold, R. (2010) *Nat. Methods*, **7**, 43–46.
 - 13) MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., & MacCoss, M.J. (2010) *Bioinformatics*, **26**, 966–968.
 - 14) Sharma, V., Eckels, J., Taylor, G.K., Shulman, N.J., Stergachis, A.B., Joyner, S.A., Yan, P., Whiteaker, J.R., Halusa, G.N., Schilling, B., Gibson, B.W., Colangelo, C.M., Paulovich, A.G., Carr, S.A., Jaffe, J.D., MacCoss, M.J., & MacLean, B. (2014) *J. Proteome Res.*, **13**, 4205–4210.
 - 15) Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., & Endo, Y. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 559–564.
 - 16) Takai, K., Sawasaki, T., & Endo, Y. (2010) *Nat. Protoc.*, **5**, 227–238.
 - 17) Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Court, M., Vandenesch, F., & Garin, J. (2007) *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 2139–2149.
 - 18) Singh, S., Springer, M., Steen, J., Kirschner, M.W., & Steen, H. (2009) *J. Proteome Res.*, **8**, 2201–2210.
 - 19) Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., & Mann, M. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1265–1272.
 - 20) Ludwig, C., Claassen, M., Schmidt, A., & Aebersold, R. (2012) *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, M111.013987.
 - 21) Goren, M.A. & Fox, B.G. (2008) *Protein Expr. Purif.*, **62**, 171–178.
 - 22) Nozawa, A., Ogasawara, T., Matsunaga, S., Iwasaki, T., Sawasaki, T., & Endo, Y. (2011) *BMC Biotechnol.*, **11**, 35.

著者寸描

●武森 信曉 (たけもり のぶあき)



愛媛大学プロテオサイエンスセンター
プロテオミクス研究部門講師。博士（材料科学）。

■略歴 1973年石川県に生る。97年名古屋工業大学卒業。2002年北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科博士課程修了。同年オクラホマ大学医学部博士研究員。07年ショウジョウバエ遺伝資源センター博士研究員。10年愛媛大学プロテオ

医学研究センター特任助教。13年より現職。

■研究テーマと抱負 コムギ無細胞合成法とソフトイオン化質量分析の融合から生まれる新しいタンパク質解析技術を駆使して、まだ誰も見たことのないプロテオームの深淵に迫りたい。

■ウェブサイト <http://www.proteomicslaboratory.com/>

■趣味 桜文鳥の飼育。