

## 2015 年奨励賞受賞者論文 テクニカルレポート

### ペプチド分画用陽イオン交換カラムの性能比較

足立 淳\*, 佐藤彩子, 朝長 毅

\*E-mail: jun\_adachi@nibiohn.go.jp

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 プロテオームリサーチプロジェクト：  
567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8

(受付 2016 年 4 月 23 日, 改訂 2016 年 6 月 13 日, 受理 2016 年 6 月 14 日)

Stop and go extraction tips (StageTips) はプロテオーム解析サンプルの脱塩・濃縮に広く用いられている。また StageTips を用いた分画は、簡易かつサンプルロスを最小限に抑えられ、また同時に多数のサンプルを処理できる長所を有する。しかし、分画の切れがそれほど良くないため、大規模な同定、定量を目指したプロテオーム解析、特にリン酸化プロテオーム解析にはほとんど用いられていない。そこで、StageTip を用いた簡易・迅速かつ大規模な定量法の構築を目指して、陽イオン交換 (SCX) StageTips からトリフルオロ酢酸 (TFA) でペプチドを溶出する新たな分画法を開発した。本研究では、StageTips に用いるディスクの種類、及び類似製品との比較検討を行った結果、C18-SCX StageTips とスチレンジビニルベンゼン (SDB) -SCX StageTips ではほぼ同等のペプチド同定結果が得られた。また異なる陽イオン交換レジンをういたマイクロカラムでも TFA によってペプチドが溶出されることが確認されたが、SDB-SCX StageTip の方がより多くのペプチドが同定された。我々の開発した分画法は、簡易で拡張性に優れ、コストが安く、特別な機器や技術を必要としないため、プロテオミクスやその他の分野において幅広く普及することが期待される。

#### 1 序 論

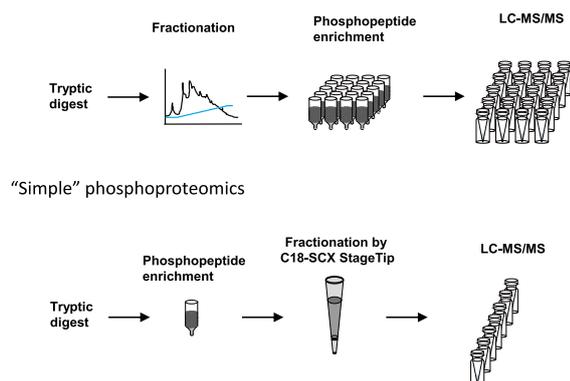
ボトムアッププロテオミクスでは、ペプチドの分離によってサンプルの複雑性が大きく変化し、測定感度が大きく左右するため、ペプチドの分離は極めて重要である。原理の異なる分離方法を組み合わせる 2 次元もしくは 3 次元分離を行うことで、よりサンプル量を増やすことが可能になり、その結果より存在量が少ないタンパク質を同定することが可能になる。このようなペプチドの分離は、ヒトプロテオーム概要版をはじめ様々なプロテオーム解析において採用されている<sup>1),2)</sup>。しかし、このような多次元分離は、解析の迅速性を大きく損なうため、多サンプル解析には不向きである。このため解析深度と迅速性を両立できるような手法の開発は重要である。

StageTips は、プロテオーム解析サンプルの脱塩、濃縮に加えて、分画の用途にも開発された<sup>3)</sup>。マイクロリッタースケールで簡易に操作を行え、かつ回収率が高いことが特徴で、プロテオーム解析の前処理の標準的な手法となっている。また C18 をはじめ、SDB、陽イオン交換、陰イオン交換などのディスクを自由に組み合わせて使用することができる。分画に関しては、プロテオーム解析においては 9500 個以上のタンパク質を同定した大規模解析例が報告されている<sup>4)</sup>が、リン酸化プロテオームに関しては、大

規模な同定例は報告されていなかった。我々は、C18-SCX StageTip を用いて、従来用いられていた塩による分画法 (Table 2, Elution A) とは異なった酸による分画法 (Table 2, Elution B) を開発した。具体的には TFA 濃度に応じてペプチドが段階的に溶出されること、さらにリン酸化ペプチドを 2 万ペプチド以上同定できることを見出した (現在投稿中)。C18-SCX StageTip でこれまで用いられてきた、酢酸アンモニウムによる塩溶出と比較して、酸溶出では分画毎のペプチドの電荷依存性が大きいこと、つまり陽電荷をもつリジン、アルギニン、ヒスチジンのペプチド内での合計数が後の分画になるにつれ多くなっていく傾向が強く見られた。また同定数に関しても、塩溶出と比較して、酸溶出ではプロテオーム解析で 7%、リン酸化プロテオーム解析で 34% 増加した (現在投稿中)。大規模リン酸化プロテオーム解析では、従来 HPLC によるペプチドの分離後にリン酸化ペプチドの濃縮が行われることが多かったが、新開発した手法ではリン酸化ペプチドの濃縮後に StageTip による分離を行う「シンプル」な手法を構築することにより、実験負荷が大幅に改善された (Fig. 1)。

本研究では、C18-SCX StageTip の C18 の代わりにスチレンジビニルベンゼンポリマー (SDB) を用いた SDB-SCX StageTip や、SDB にスルホ基 (-SO<sub>3</sub>H) を結合させ、1 枚のディスクで疎水性結合性と陽イオン結合性を持たせた

## Typical large-scale phosphoproteomics



**Fig. 1** Typical large-scale phosphoproteomics workflow and the "simple" phosphoproteomics workflow

SDB-RPS ディスクを用いた SDB-RPS StageTip のペプチド分画に関する検討を行った。また上記ディスクはすべて 3M 社の Empore ディスクを用いているが、Glygen 社から発売されている SCX レジンをチップに充填したマイクロカラムを用いて、ペプチドが酸溶出されるかの検証を行い、さらに SDB-SCX StageTip との性能比較も行った。

## 2 方法

### 2-1 サンプル調製

Hela-S3 細胞および SNU-16 細胞は 10% 牛胎児血清, 100 IU/ml ペニシリン/ストレプトマイシンを含んだ IMEM 培地で 37°C, 10% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。細胞を溶解液 (50 mM ammonium bicarbonate, 12 mM sodium deoxycolate, 12 mM sodium lauroyl-sarcosinate, complete protease inhibitor cocktail and PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche Applied Science)) で溶解後, 95°C で 5 分間加熱, 10 分間超音波処理 (Bioruptor, Cosmo Bio) を行い, DC Protein Assay (Biorad) でタンパク定量を行った。続いて還元アルキル化, トリプシン消化, 界面活性剤の除去は定法<sup>5)</sup>に従って行った。また SNU-16 細胞由来のペプチド消化物を用いて Fe<sup>3+</sup> immobilized metal affinity chromatography (IMAC) 法でリン酸化ペプチドを濃縮した<sup>6)</sup>。

### 2-2 StageTip でのペプチド分画

C18-SCX StageTips は定法<sup>7)</sup>に従い作製した。SDB-SCX StageTips, SCX StageTips および SDB-RPS StageTips は GL science 社で作製された Tip を使用した。また TopTip POROS strong cation exchanger Micro-spin column (Glygen) も性能比較対象として使用した。

各チップの前処理, サンプルロード, 洗浄工程を Table 1 に示す。また各溶出法は Table 2 に示す。

**Table 1** Buffers used for pretreatment of StageTips

	Buffer	Volume (μl)
Activation	MeOH	30
Equilibration	Buffer SB	30
	Buffer SA	30
	Buffer S500-N	30
	Buffer SA	30
	Buffer SA	30
Loading	Sample dissolved in Buffer U	50
Washing	Buffer U	50
	Buffer SA	50
	Buffer SB	50
	Buffer SA	50
	Buffer SB	50

Buffer SA: 0.1% TFA, 5% Acetonitrile

Buffer SB: 0.1% TFA, 80% Acetonitrile

Buffer S500-N: 500 mM Ammonium Acetate, 30% Acetonitrile

Buffer U: 2M urea, 1% TFA

### 2-3 LC-MS/MS 測定

HTC-PAL autosampler (CTC Analytics), UltiMate 3000 Nano LC system (Thermo Scientific), 電場型フォーリエ変換質量分析計 Q Exactive (Thermo Scientific) もしくは HTC-PAL autosampler (CTC Analytics), Paradigm Nano LC system (Michrom Biosciences), イオントラップ-Orbitrap ハイブリッド質量分析計 Orbitrap XL (Thermo Scientific) から構成される LC-MS/MS を使用した。トラップカラムは Acclaim PepMap RSLC Nano-Trap Column (0.075×20 mm, Thermo Scientific) もしくは L-column2 ODS (Chemicals Evaluation and Research Institute) を使用し, 分析カラムは ReproSil-Pur C18-AQ, 1.9 μm resin (Dr. Maisch) をパッキングした内径 75 μm, カラム長 30 cm もしくは 10 cm のカラムを使用した。グラジエントは B 液を 5% (0 分) → 30% (45 分) まで変化させた (A 液 0.1% FA, 2% acetonitrile; B 液, 0.1% FA, 90% acetonitrile)。Q Exactive は以下のようにパラメータ設定した。Survey full scan MS spectra range, *m/z* 350–1800; resolution, 70000; accumulation of target ions (MS), 3×10<sup>6</sup>; dynamic exclusion, 10 sec; TopN, 12; target ions, *z*≥2; accumulation of target ions (MS/MS), 1×10<sup>5</sup>; maximum injection time, 120 msec; resolution (MS/MS), 35000; spray voltage, 2 kV; heated capillary temperature, 250°C; normalized HCD collision energy, 25%; MS/MS ion selection threshold, 2.5×10<sup>4</sup> counts; isolation width, 3.0 Da。Orbitrap XL は以下のようにパラメータ設定した。Survey full scan MS spectra range, *m/z* 350–1800; resolution, 30000; accumulation of target ions (MS), 2×10<sup>6</sup>; maximum injection time, 300 msec; dynamic exclusion, 30 sec; TopN, 8; target ions, *z*=2 or 3; accumulation of target ions (MS/MS), 1×10<sup>5</sup>; maximum injection

**Table 2** Elution buffers used for peptide fractionation

Elution A			
Fraction	Ammonium Acetate (mM)	NH <sub>4</sub> OH (%)	Acetonitrile (%)
1	20	0	30
2	50	0	30
3	75	0	30
4	125	0	30
5	200	0	30
6	500	0	30
7	0	0.1	30

Elution B			
Fraction	TFA (%)	Ammonium Acetate (mM)	Acetonitrile (%)
1	0.5	0	30
2	1	0	30
3	2	0	30
4	3	0	30
5	3	100	30
6	4	500	30
7	0	500	30

Elution C			
Fraction	TFA (%)	Ammonium Acetate (mM)	Acetonitrile (%)
1	0.5	0	75
2	1	0	75
3	2	0	75
4	3	0	75
5	3	100	75
6	4	500	75
7	0	500	75

Elution D			
Fraction	HCl (%)	NH <sub>4</sub> OH (%)	Acetonitrile (%)
1	0.72	0	75
2	1.08	0	75
3	1.44	0	75
4	2.16	0	75
5	3.6	0	75
6	5.4	0	75
7	0	5	75

Elution E			
Fraction	HCl (%)	NH <sub>4</sub> OH (%)	Acetonitrile (%)
1	0.18	0	75
2	0.36	0	75
3	0.72	0	75
4	1.08	0	75
5	1.44	0	75
6	2.16	0	75
7	3.6	0	75
8	0	5	75

time, 100 msec; spray voltage, 2 kV; heated capillary temperature, 250°C; normalized collision energy, 35%; MS/MS ion selection threshold,  $5 \times 10^3$  counts; isolation width, 2.0 Da. プロテオーム解析にはタンパク質 20 µg 分を分画したサンプルを LC-MS/MS 測定に供した. リン酸化プロテオーム解析にはタンパク質 2 mg 分から濃縮したリン酸化ペプチドを分画したサンプルを LC-MS/MS 測定に供した.

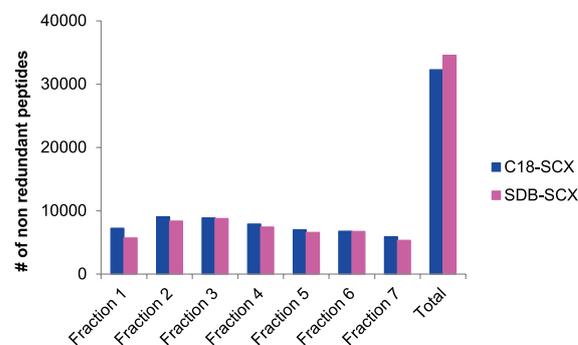
#### 2-4 ペプチドおよびタンパク質の同定

ペプチドおよびタンパク質の同定には MaxQuant (version 1.3.0.5) を使用した. 検索条件を以下に示す. UniProt human database (2011\_11 release); fixed modification, carbamidomethylation of cysteine; variable modification, N-terminal protein acetylation, methionine oxidation, phosphorylation of serine, threonine and tyrosine (リン酸化プロテオームの場合のみ); mass tolerance, 6 p.p.m.; Fragment ion mass tolerance, 20 p.p.m.; digestion parameters for enzyme, Trypsin/P; maximum false discovery rate (FDR) on protein, peptide and PTM-site level, 0.01; localization probability, 0.75.

### 3 結果と考察

#### 3-1 C18-SCX StageTips と SDB-SCX StageTips の性能比較

C18-SCX StageTips は上部に C18 ディスク, 下部に SCX ディスクが連続してイエローチップ内に装填されている. 上部の C18 ディスクの役割は, サンプル中のペプチドをトラップして, 脱塩する役割である. 脱塩後にペプチドは 80% Acetonitrile, 0.1% TFA 溶液で C18 ディスクから溶出され, 下部の SCX ディスクにトラップされる. 本研究ではまず, 上部の C18 ディスクについて, より親水性の高いペプチドも捕集できるスチレンジビニルベンゼンポリマー (SDB) ディスクの比較検討を行った. Fig. 2 に示すように, HeLa-S3 細胞由来トリプシン消化ペプチドを分



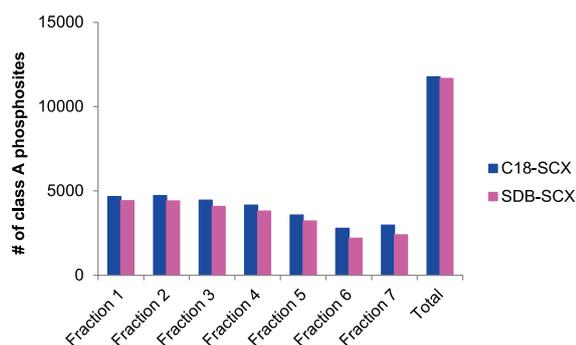
**Fig. 2** Step-wise peptide elution by TFA and ammonium acetate from C18-SCX StageTip and SDB-SCX StageTip

20 µg of tryptic peptides from HeLa-S3 cells were fractionated by Elution B buffer (Table 2).

画し、各分画のペプチド同定数を比較した結果、両者ともに非常に似通った同定プロファイルを示した。同定重複率（各フラクションの同定数の和/全体の重複のない同定数）は、C18-SCX と SDB-SCX でそれぞれ 1.63, 1.41 となり、SDB-SCX のほうが同定重複率が低かった。

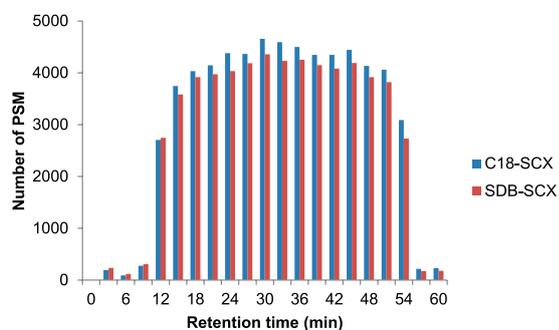
SNU-16 細胞由来リン酸化ペプチドを用いて分画した結果、Fig. 3 に示すように、リン酸化ペプチドにおいても非常に似通った同定プロファイルを示した。同定重複率は、C18-SCX と SDB-SCX でそれぞれ 2.32, 2.09 となり、リン酸化ペプチド解析においても SDB-SCX のほうが同定重複率が低かった。

SDB は C18 と比較してより親水性のペプチドも捕集できるため、プロテオーム解析において各溶出時間における MS/MS スペクトル同定数を調べたところ、両者の間で大きな差異はみられなかった (Fig. 4)。以上の結果より、C18-SCX StageTips と SDB-SCX StageTips を用いた TFA と酢酸アンモニウムを併用した分画によるプロテオーム、リン酸化プロテオーム解析において、Stagetip の上段のディ



**Fig. 3** Step-wise phosphopeptide elution by TFA and ammonium acetate from C18-SCX StageTip and SDB-SCX StageTip

Phosphopeptides enriched from two mg of tryptic peptides from SNU-16 cells were fractionated by Elution B buffer (Table 2).



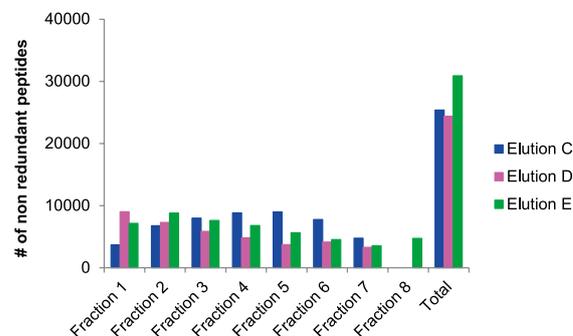
**Fig. 4** Identified number of peptide spectrum matches (PSM) in the retention time segments

20  $\mu$ g of tryptic peptides from HeLa-S3 cells were fractionated by Elution B buffer (Table 2) and sequenced by Q Exactive mass spectrometer. Identified number of PSM of seven fractions was merged.

スクの相違が、同定数に影響を及ぼさないことが示唆された。また同定重複率は、SDB-SCX StageTips のほうが低い傾向が見られた。分画に関しては、SCX ディスクで行われるため、上段のディスクの相違で同定重複率に差が見られることは、意外な結果であり、今後さらにデータを積み重ねることで検証する必要がある。

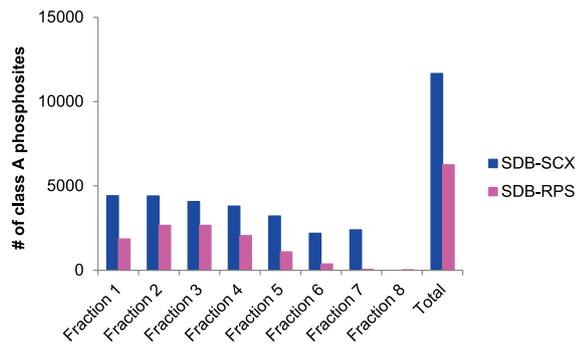
### 3-2 SDB-RPS StageTips と SDB-SCX StageTips の性能比較

SDB-RPS ディスクは 1 枚のディスクに疎水性結合性と陽イオン結合性を併せ持つ。この特性を生かして、これまで C18 と SCX, もしくは SDB と SCX の 2 種類のディスクを組み合わせていた代わりに SDB-RPS 単独でペプチド分離することができるのではないかと考えた。SDB-RPS ディスクは、疎水性結合性と陽イオン結合性を併せ持つことから、ペプチド溶出にはこれまで用いてきた塩や TFA 分画バッファー (Table 2, Elution A, B) ではアセトニトリル濃度が低いために適さないと考えられた。そこでまず溶出液の検討を行った。具体的にはアセトニトリル濃度を 75% に高めた TFA による溶出法 (Table 2, Elution C), HCl 濃度を 0.72% から 5.4% まで高めた溶出法 (Table 2, Elution D), HCl 濃度を 0.18% から 3.6% まで高めた溶出法 (Table 2, Elution E) を比較した。その結果 Fig. 5 に示すように TFA (Elution C) での溶出の場合、4 番目、5 番目の分画で最も同定数が多くなったが、HCl での溶出 (Elution D) は 1 番目の分画で最も同定数が多かった。そこで、HCl 濃度をより低濃度にして溶出を行うと分画による同定数の偏りが緩和され、合計で 3 万個を超えるペプチドを同定することができた (Elution E)。そこで、最も同定数が多かった Elution E を用いた SDB-RPS StageTips による分画 (Fig. 5) と従来の SDB-SCX StageTips による分画 (Fig. 2) を比較すると、プロテオーム解析では、SDB-



**Fig. 5** Comparison of identified number of non-redundant peptides fractionated by different elution buffers from SDB-RPS StageTips

20  $\mu$ g of tryptic peptides from HeLa-S3 cells were fractionated by Elution C, D or E buffer (Table 2) and sequenced by Q Exactive mass spectrometer.



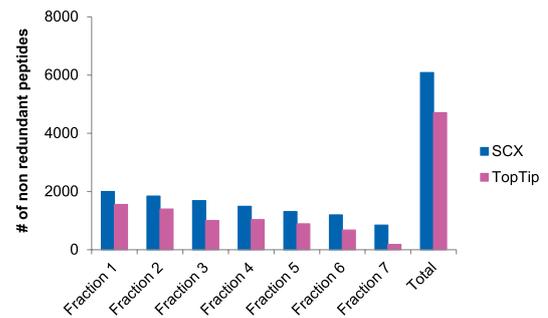
**Fig. 6** Comparison of phosphorylated sites identified in the fractions separated by step-wise elution from SDB-SCX StageTip and SDB-RPS StageTip

Phosphopeptides enriched from two mg of tryptic peptides from SNU-16 cells were fractionated by Elution B buffer (SDB-SCX) or Elution E buffer (SDB-RPS) and sequenced by Q Exactive mass spectrometer.

SCX StageTips による分画のほうが同定数が8%上回った。SDB-SCX StageTips による分画数が7であり、SDB-RPS StageTips による分画数は8であることを勘案すると、プロテオーム解析にはSDB-SCX StageTips による分離が優れているといえる。続いてSNU-16細胞由来リン酸化ペプチドを用いて分析した結果、Fig. 6に示すように、SDB-SCX StageTips のほうが2倍程度同定リン酸化サイト数が多い結果が得られた。同定重複率については、SDB-SCX, SDB-RPS StageTips それぞれ2.10, 1.72となった。SDB-RPS StageTips の場合、SDBにスルホ基(-SO<sub>3</sub>H)を結合させ、1枚のディスクで疎水性結合性と陽イオン結合性を持たせているという特性から、1枚のSDB-RPSディスクでSDBディスクとSCXディスクを代替できると期待されたが、本研究で行った条件下ではプロテオーム解析、リン酸化プロテオーム解析において、SDB-RPS StageTips よりもSDB-SCX StageTips による分離がより多くのペプチドを同定するために適していると考えられる。

### 3-3 TopTip POROS strong cation exchanger Micro-spin column と SCX StageTips の比較検討

SCXディスクからペプチドが酸によって溶出されることを示してきたが、これまで使用してきた3M社のEmporeディスク以外のSCX担体にも適用できるか調べるために、SCX担体がイエローチップに充填されているTopTip POROS strong cation exchanger Micro-spin column (Glygen)を試行した。Fig. 7に示すように、TopTipカラムを用いた場合でもTFAを用いたステップグラジエントでペプチドが溶出されることが確認された。しかしSCX stagetipと比較すると各分画においてペプチド同定数が22~79%少なく、全体では23%少なかった。



**Fig. 7** TFA-based peptide elution from different SCX micro columns

20 μg of tryptic peptides from HeLa-S3 cells were fractionated by Elution B buffer (Table 2) and sequenced by Orbitrap XL mass spectrometer.

## 4 結論

SCX Stagetip の上段部分についてC18ディスク、SDBディスクともにペプチド、リン酸化ペプチドの同定数がほぼ同じであり、溶出時間毎の同定数も類似していることから、Stagetipの分画における差異はほとんど無いものと考えられる。ただし、同定重複率については、SDBディスクを用いた場合のほうが低い傾向が観察された。

SDBにスルホ基(-SO<sub>3</sub>H)を結合させたSDB-RPSディスクを用いたSDB-RPS Stagetipは、本研究で用いた溶出液の組成ではSDB-SCX Stagetipよりもペプチド、リン酸化ペプチドの同定数が少なかった。同定数の向上には、今後さらなる溶出液の組成の検討が必要である。

酸(TFA)を用いたSCX担体からのペプチドの溶出については、3M社のEmporeディスクに加えて、Glygen社のマイクロスピナカラムでも適用可能であることが示された。ペプチド同定数では、3M社のEmporeディスクを用いたSD-SCX StageTipsのほうが優れていた。SCXはプロテオーム解析だけでなく、例えば食品試料・環境試料分析等でも多用されており、酸を用いた溶出法は様々な分野での応用が期待される。

## 謝辞

本研究においてStagetipを提供していただいたGLサイエンスの宮崎将太氏、鈴木健一氏に感謝申し上げます。

著者らに開示すべき利益相反状態は無い。

## 文献

- 1) Kim MS, Pinto SM, Getnet D, *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature*. 2014;509:575–581.
- 2) Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*. 2014;509:582–587.
- 3) Ishihama Y, Rappsilber J, Mann M. Modular stop and go ex-

- traction tips with stacked disks for parallel and multidimensional Peptide fractionation in proteomics. *J Proteome Res.* 2006;5:988–994.
- 4) Kulak NA, Pichler G, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods.* 2014;11(3):319–324.
  - 5) Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res.* 2008;7:731–740.
  - 6) Narumi R, Murakami T, Kuga T, *et al.* A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J Proteome Res.* 2012;11:5311–5322.
  - 7) Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc.* 2007;4:1896–1906.

## Comparison of Peptide Fractionation on Different SCX Micro Columns for Proteome and Phosphoproteome Analysis

Jun Adachi\*, Ayako Sato, Takeshi Tomonaga\*

\* E-mail: jun\_adachi@nibiohn.go.jp, tomonaga@nibiohn.go.jp

Laboratory of Proteome Research, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition,  
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

(Received: April 23, 2016; Revised: June 13, 2016; Accepted: June 14, 2016)

StageTips are widely used for desalting and purification of peptides for various proteomic analysis. However, StageTips are not commonly used for peptide fractionation especially for phosphopeptides fractionation. In the previous study, we found that a degree of peptide separation on C18-SCX StageTip was greatly improved by a novel peptide fractionation method using acid gradient. Our method is simple, reproducible, MS-friendly and applicable for both peptide and phosphopeptide fractionation for in-depth proteome and phosphoproteome analysis. In this study, we further evaluated the disks or resins used for StageTips or similar micro column system from the point of the view of the identified number of peptides or phosphopeptides. We found that C18-SCX StageTip and SDB-SCX StageTip showed nearly same performance, whereas SDB-RPS StageTip showed poor performance compared with SDB-SCX StageTip. Furthermore, we confirmed that peptides are eluted from not only SCX disks but also SCX resins by TFA-based elution method. Our fractionation method is very simple, flexible in scale, low-cost (less than \$0.1/sample) and does not need any special equipment and techniques. Furthermore our method has a potential to be applied to other fields using SCX chromatography.

**Keywords:** fractionation; mass spectrometry; phosphoproteomics; StageTips.