

## 教育セミナー：プロテオミクス熊の巻 2015 総合論文

# 定量プロテオミクス：Selected Reaction Monitoring (SRM) の基礎と実践

上家潤一\*, 相原尚之, 代田欣二

\*E-mail: kamiie@azabu-u.ac.jp

麻布大学獣医学部獣医学科：252-5201 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

(受付 2016 年 6 月 19 日, 改訂 2016 年 8 月 6 日, 受理 2016 年 8 月 8 日)

質量分析計を用いたタンパク質定量法として、安定同位体標識ペプチドを内部標準とし、Selected Reaction Monitoring (SRM) で検出する内部標準法が広く普及している。SRM によるタンパク質定量は、①測定対象ペプチドの選択と標識ペプチドの作成、② SRM transition の作成、③試料の酵素消化、④質量分析とデータ解析から構成される。近年リリースされた Skyline Software はペプチドについて、各社の質量分析計に適した transition を作成することができる。本ソフトウェアを用いることで、①測定ペプチドの選択および② transition の作成をスムーズに行うことが可能である。③試料の酵素消化はプロテオミクス研究の基礎であるが、現状における定量プロテオミクスの最大の問題点でもある。すなわち、内部標準を試料処理後に添加するため、処理過程における試料損失が補正されておらず、本法で求める定量値は過小評価されている可能性がある。本論文では、我々がやっている前処理過程における試料損失を評価するための取り組みを紹介する。

## 1 はじめに

近年、三連四重極型質量分析計の Selected Reaction Monitoring (SRM) を用いたタンパク質定量の報告が増加している。対象ペプチドの特異的質量を検出する SRM は、複雑な生体試料における微量分子の解析に有用であり、ショットガン法では検出が困難であった微量タンパク質の定量解析に用いられる。本論文では SRM を用いたタンパク質の検出および定量の原理を解説し、安定同位体標識したペプチドを内部標準とする定量法のプロトコルを紹介する。

## 2 SRM を用いたタンパク質定量の基礎

### 2-1 SRM の原理

SRM は三連四重極型質量分析計を用いて限定した質量範囲のみを検出する。特定の質量のみを検出する方法であり、不特定多数の MS/MS spectrum を取得する定性分

析とは、測定対象を限定する点で異なる。SRM はプレカーサーイオンとプロダクトイオンの質量を組み合わせた transition をモニターしている (Fig. 1)。Q1 で測定対象とするペプチドのプレカーサーイオンをその質量 ( $m/z$ ) によって分離する。選択された  $m/z$  によって分離されたペプチドは Q2 で断片化され、プロダクトイオンが生成される。特定のプロダクトイオンの  $m/z$  を Q3 で選択することにより、質量特異的に目的のペプチドのみを検出することができる。設定した質量以外のシグナルを大幅に低減することができ、結果としてノイズに埋もれて、ショットガン法などでは検出が困難であった微量成分についても検出が可能となる。また、多分子同時分析が SRM モードの利点の一つであり、測定中に transition を切り替えることで、複数のペプチドを同時に分析することが可能である。

### 2-2 対象ペプチドの選択

SRM モードを利用した定量では、測定対象が選択した

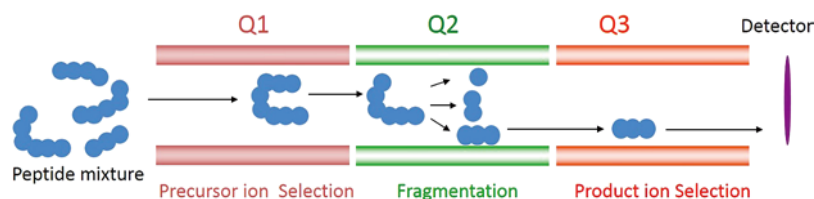


Fig. 1 Schematic diagram of SRM. In SRM, precursor ion of target peptide and specific product ions derived from the precursor ion are selected in Q1 and Q3, respectively.

ペプチドに限定されるため、対象となるペプチドの選択が重要である。通常は対象タンパク質をトリプシン消化して得られるペプチド群から測定対象ペプチドを選択するが、配列によって質量分析におけるペプチドの検出感度は大きく異なるため、測定ペプチドの選択は定量法を構築する上で重要である。安定した定量解析を実施するために、対象ペプチドには高い特異性と質量分析における感度が求められる。ショットガン法などで検出された実績のあるペプチドは、SRM 測定においても良好な感度で検出されることが多い。しかし、質量分析での検出実績のないタンパク質を標的とする場合には、配列情報から高感度に検出できるペプチドを選択する必要がある。SRM 分析に適しているペプチドの条件は、1) ターゲットタンパク質に特異的な配列である、2) 翻訳後修飾を含まない、3) 測定  $m/z$  (通常は 2 価イオン) が使用する質量分析計の測定範囲を超えないこと、4) 酵素消化率の低いと考えられる膜貫通部位やリジンやアルギニンの連続部位を含む配列を含まない等である<sup>1)</sup>。これらの条件を考慮することで、安定した定量解析が行えるペプチドを選択することができる。

対象ペプチドを検出する transition の最適化は SRM を用いた定量における重要な過程であり、様々な手法が提案されている。ワシントン大学の MacCosh Lab で開発された Skyline Software は、対象タンパク質の配列情報から transition を自動作成できる<sup>2)</sup>。各社 (AB sciex, Thermo, Agilent, Waters, Shimadzu) の三連四重極型質量分析計に最適化された Collision energy, Decluttering potential の値が設定可能であり、利便性が高い。無償で使用することができ、下記からダウンロードすることができる (<https://skyline.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view>)。同様に各質量分析計メーカーからペプチドに対する transition を設計するためのソフトウェアが提供されている。これらを用いることで、実測データがない状況でも対象タンパク質由来のペプチドに対する適切な transition が作成可能である。

### 2-3 SRM 測定

特定の質量のみを検出する SRM は、安定同位体標識ペプチドを内部標準として用いる定量分析に適している。安定同位体標識ペプチドは対象ペプチドと溶出時間が同一であるため、測定ペプチドにつき試料と内部標準それぞれ複数設定し (3~4 transition)、計 6~8 transition に共通して同一溶出時間に重なるピークを対象シグナルとすることで、精度の高いピーク同定が可能になる。また transition ごとに定量値を算出することで、各 transition のバックグラウンドの影響を評価することができる。

多分子同時分析は SRM の利点であるが、transition 数の増加は、定量解析に重要なピーク形状に影響する。総

transition 時間 (Cycle time) は Data point 数との関係により、1 分析に数百 transition で測定されることが多い。再現性の良い定量解析を行うためには、ペプチドのクロマトグラム形状が重要であり、Data point 数は 10 point 以上が望ましいとされている<sup>3)</sup>。このため、Cycle time は可能な限り短くする必要があり、ペプチドのクロマトグラムの幅 (Peak width) が 30 秒の場合は、Cycle time は 3 秒以下が推奨される。また、transition あたりのモニター時間 (Dwell time, Scan time) は感度に影響し、高い S/N 比を確保するために 10 m 秒以上が推奨されている<sup>4)</sup>。Cycle time は設定した transition 全てのシグナルを検出するのに要する時間であるから、Cycle time を 3 秒、Dwell time を 10 m 秒とした設定した場合、1 分析に使用できる transition 数は 300 となる。

Cycle time と Dwell time を確保して transition 数を増やすために、測定時間ごとに異なる transition を設定する機能が利用できる (Scheduled MRM, Time-scheduled SRM)。通常の SRM 測定では、全ての transition を測定時間中モニターし続けるが、この機能では transition ごとにモニターする測定時間を設定する。ペプチドは液体クロマトグラフィーで分離され質量分析計に導入されるため、ペプチドごとに溶出時間が異なる。対象とするペプチドの溶出時間に合わせて、対応する transition を設定することで、transition 数を 300 以上に増やしても、定量精度が保たれ安定した定量解析を行うことができる。各 transition の測定時間を設定するためには、あらかじめ各ペプチドの溶出時間情報を取得する必要があり、液体クロマトグラフィーの溶出時間の再現性が重要になる。また、溶出時間をモニターするためのマーカーペプチド (MRMplus Standard Peptides) を用いることで、測定の再現性を高めることができる。

## 3 安定同位体標識ペプチドを内部標準とする定量法の実践

### 3-1 測定対象ペプチドの選択

ショットガン法などにより既に検出された実績のあるペプチドがあれば、それを定量対象候補とすればよいが、そのようなケースは実際には稀である。対象タンパク質の存在は想定されるが、定性分析では検出されないものを対象とする場合、検出自体を SRM で実施することで、測定対象ペプチドの決定と transition の設定を行うことが出来る。以下、Skyline Software を用いた対象ペプチドの選択を紹介する。

#### 3-1-1 Skyline Software による transition の設定

対象タンパク質の Fasta ファイルを読み込み、ペプチドに対する transition を設定する。通常は Peptide setting と Transition setting を設定する。

Peptide setting では、Digestion タブで使用する消化酵素、Filter タブで対象とするペプチドの残基数、除外するアミノ酸残基種、Modifications タブで修飾情報を設定する。

Transition setting では、Prediction タブで Collision energy から使用する質量分析計を選択し、Filter タブでプレカーサーイオン (Precursor mass) とプロダクトイオン (Product ion mass) の価数、プロダクトイオンのタイプ (Ion types: 通常は y シリーズ)、プロダクトイオン数を設定する。

Export から Transition List を選択して作成した transition を Excel ファイルに書き出し、各質量分析計の transition 表に入力する。Dwell time は 20 m 秒以上、cycle time は 3 秒以内とする。Cycle time が 3 秒を超える場合は transition を分割し、複数回測定する必要がある。

### 3-1-2 実測による対象ペプチドの決定

実試料による検討が可能であれば、上記で設定した transition で測定を行う。Skyline Software を用いると、全ての断片ペプチドに対して transition を作成でき、SRM の実測による対象ペプチドの選択が可能である。実測された transition を選出し、感度およびピーク形状の良好な transition を多く含むペプチドを測定候補とする。1 つのペプチドあたり 4 つ以上の transition を選択することが望ましい。また、特異性が低いことから、y1 および y2 イオンを含む transition は選択しない。測定候補配列について、既存のデータベース上で配列特異性、修飾の有無を確認し、修飾される可能性の少ない特異的な配列を測定対象とする。

### 3-1-3 内部標準ペプチドの合成

決定したペプチドの安定同位体標識体を合成する。定量標準に用いる標識ペプチドの正確な定量は重要であるが、合成ペプチドは各社からアミノ酸分析により濃度が規定されているものを購入することができる。コストの問題から、通常は一残基のみ安定同位体標識する。ペプチドを対象としたほとんどの transition はプロダクトイオンを y シリーズイオンから選択するため、C 末端側のアミノ酸残基を標識することで対象ペプチドと標識ペプチドにそれぞれ特異的な Q1, Q3 の値を組み合わせることができる。消化酵素がトリプシンの場合、多くは C 末端のリジンもしくはアルギニンを標識する。

### 3-1-4 試料調整

市販キットもしくは定法に従い試料を酵素消化する。消化後に安定同位体標識ペプチドを一定量添加し、質量分析を実施する。

### 3-1-5 データ解析

ピーク認識からピーク面積の算出は、各メーカー提供の解析ソフトウェアが利用できる。また、前述の Skyline Software を用いてデータ解析することも可能である。

SRM は選択性の高い分析法であるが、実際の解析では複数のピークが検出され、ピークの同定が必要とされるこ

とがある。我々の測定では、対象ペプチドと内部標準ペプチドそれぞれで 4 transition 以上のピークが同一溶出時間に得られた場合に、各 transition から得られる測定値の平均値を定量値として算出している。

## 4 SRM を用いたタンパク質定量の課題

上記プロトコルに従って、内部標準との比率で対象ペプチドの定量値を求めることは容易であるが、タンパク質定量法としていくつかの課題がある。

### 4-1 定量単位

得られた定量値を生物試料中のタンパク質の発現量に換算するためには、その単位が重要となる。通常は試料中の総タンパク質量を測定し、定量値は単位タンパク質量あたりの量 (mol/g protein) として表される。しかし、臓器や組織、血液などをそのまま試料として質量分析することは困難であり、多くの場合は分画された試料を測定することとなる。試料の総タンパク質量は必ずしも適切な分母とは考えられない。それぞれの研究において生物学的に意義のある定量値を示すことが重要であり、最終的に得られる定量値の単位 (分母) を考慮して定量法をデザインする必要がある。

我々が実施している腎糸球体の足細胞 (podocyte) を対象とした研究においては、足細胞あたりのタンパク質発現量として算出する工夫を考案している<sup>5)</sup>。測定対象である Nephricin は足細胞に特異的に発現し、足細胞障害時に減少が報告されているスリット膜構成タンパク質である。足細胞あたりの Nephricin 発現量を求めるには、測定試料中の正確な足細胞数を知る必要がある。そこで、単離した糸球体を試料とし、実態顕微鏡下で試料中の単離糸球体数 (glomerulus/assay) をカウントした (Fig. 2)。また、足細胞マーカーである WT1 の免疫染色を行い、糸球体あたりの足細胞数を蛍光顕微鏡下で実測した。得られた足細胞数

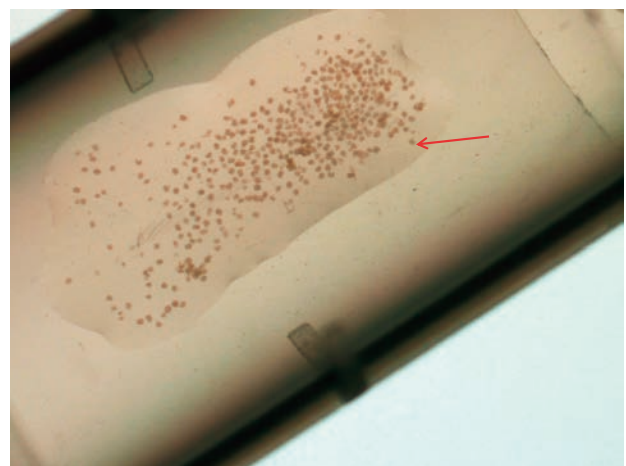


Fig. 2 Isolated glomerulus in a tube.

とチューブ内糸球体数から、測定試料中の足細胞数を算出することができる。測定は糸球体 200 個を用いて行い、最終的に Nephrin の定量値は mol/podocyte で示される。足細胞障害モデルである Puromycin Aminonucleosid (PAN) 腎症ラットでは、糸球体あたりの足細胞数の減少がみられることから、Nephrin 定量値は分母が糸球体あたり (mol/glomerulus) と足細胞あたり (mol/podocyte) では大きく異なる (Fig. 3)。糸球体あたりでは接種後 10 日で定量値は低値を示すが、足細胞あたりでは接種前レベルまで回復している。10 日目では足細胞数は減少するが、存在する足細胞では Nephrin 発現量が回復していることを示唆する。

#### 4-2 定量精度

現状のプロトコルでは、質量分析によるタンパク質量の精度は低いと言わざるを得ない。最も深刻な問題は、試料前処理後に内部標準ペプチドを添加するため、試料前処

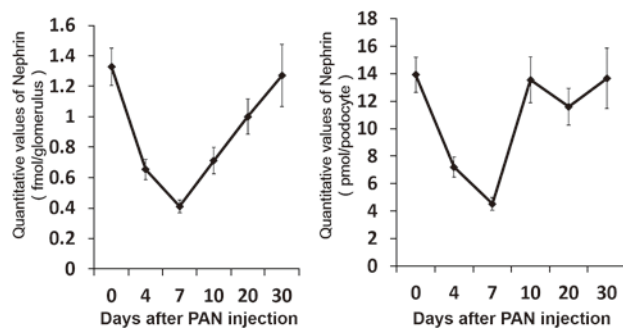


Fig. 3 Quantitative values of Nephrin in a glomeruli (A) and a podocyte (B). mean±S.D. n=5

理過程における試料の吸着や酵素消化効率が定量的に評価できていないことである。トリプシンによる酵素処理のプロトコルはほぼ確立されているものの、吸着による損失や未消化物の存在が考慮されておらず、対象ペプチドの定量値は過小評価されている可能性が高い。

この問題は、全長タンパク質を内部標準とし、試料前処理過程の最初に添加することで解決することができる。安定同位体標識したタンパク質を内部標準として試料に添加し、前処理を行うことで前処理過程の損失と酵素消化率を補正することができる。得られるペプチド試料中には、ターゲットタンパク質に由来する全ての断片ペプチドの内部標準ペプチドが存在するため、複数のペプチドについて定量が可能である (Fig. 4)。

前述の Nephrin について、安定同位体標識した全長タンパク質を作製し、糸球体試料に一定量を添加して前処理を行い、定量したところ、測定直前に内部標準ペプチドを加える従来法に比べて約 20% 定量値が上昇した (Fig. 5)。すなわち、ペプチドを内部標準とする従来法で得られる定量値は、少なくとも 20% 程度は過小評価された値と考えられる。安定同位体標識されたタンパク質を、安価かつ安定して供給する市販サービスは今のところ見当たらないが、定量内部標準としての安定同位体標識タンパク質の重要性は今後高まることが予想される。Peptide Atlas 社の SILu™ PrEST は部分配列ではあるが安価にヒトの安定同位体標識タンパク質 (リジンとアルギニンを標識) を供給しており、内部標準としての有用性が期待される。

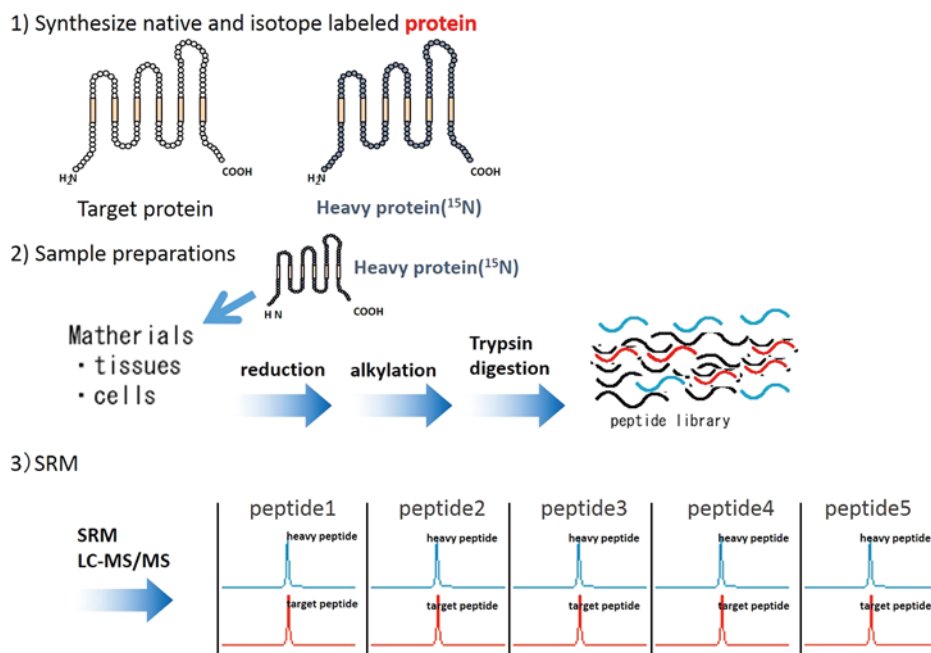


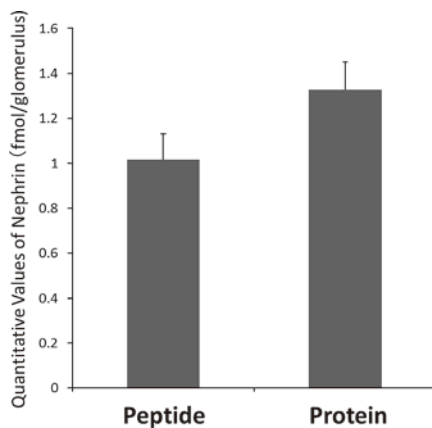
Fig. 4 An overall outline flowchart of SRM assay with protein reference.

#### 4-3 翻訳後修飾の定量

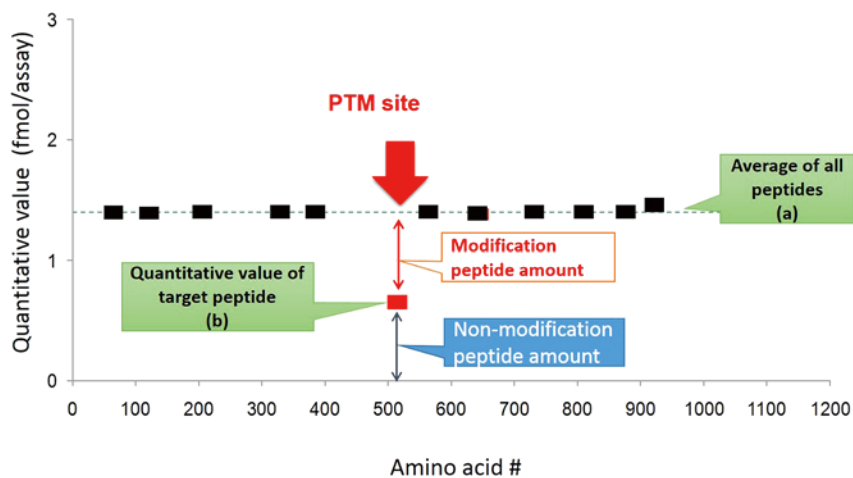
翻訳後修飾された安定同位体標識ペプチドを用いることで、翻訳後修飾量を測定することは原理的に可能であるが、実測例は非常に少ない。前述の全長タンパク質を内部標準とすることで、翻訳後修飾部位の同定と修飾率の算出が可能である。この手法では、大腸菌で発現した標識タンパク質を内部標準として用いる。大腸菌で発現させたタンパク質は哺乳類の翻訳後修飾を含まないことから、定量対象は翻訳後修飾を含まないペプチドに限定される。従って、本法では修飾量のみで当該ペプチドの定量値は低値を示す。複数の断片ペプチドの平均値との比較から翻訳後修飾部位を同定することが可能である (Fig. 6)。

#### 5 終わりに

SRMによるタンパク質定量は、抗体などの特異的結合プローブ法に変わる定量法として期待される半面、定量精度の問題や最適 transition の構築の煩雑さなどから一般に



**Fig. 5** Quantitative values of Nephrin by SRM assays with peptide reference and protein reference. mean±S.D. n=5



**Fig. 6** Schematic presentation of analysis of post translational protein modifications (PTM) by SRM assay with protein references. PTM sites are identified by low quantitative values of the peptides (b) rather than average of quantitative values of all peptides (a).

普及していない。対象ペプチドの選択や適切な transition の構築など従来は経験と知識が必要とされていた作業も、現在では使い勝手の良いソフトウェアが多数開発されたおかげで、誰でもある程度できるようになっている。Proteome Letter の読者の皆様には、SRM がタンパク質定量法のスタンダードとなるよう、ぜひ本定量法にチャレンジしていただきたい。

#### 謝 辞

本研究を実施するに当たり、分析機器をご提供いただいた AB sciex, Thermo fisher scientific, エーエムアールの各社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) Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, *et al.* Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res.* 2008;25:1469–1483.
- 2) Broudy D, Killeen T, Choi M, *et al.* A framework for installable external tools in Skyline. *Bioinformatics.* 2014;30:2521–2523.
- 3) Gallien S, Duriez E, Domon B. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J Mass Spectrom.* 2011;46:298–312.
- 4) Lange V, Picotti P, Domon B, *et al.* Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2008;4:222.
- 5) Kawakami H, Kamiie J, Yasuno K, *et al.* Dynamics of absolute amount of nephrin in a single podocyte in puromycin aminonucleoside nephrosis rats calculated by quantitative glomerular proteomics approach with selected reaction monitoring mode. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:1324–1330.

## Basics and Practices of Quantitative Proteomics Using Selected Reaction Monitoring (SRM)

Junichi Kamiie\*, Naoyuki Aihara, Kinji Shirota

\*E-mail: kamiie@azabu-u.ac.jp

Azabu University, Fuchinobe 1-17-71, Chuo-ku, Sagamihara city, Kanagawa 252-5201, Japan

(Received: June 19, 2016; Revised: August 6, 2016; Accepted: August 8, 2016)

Selected reaction monitoring mode (SRM)-based strategies have recently been developed for quantitation of proteins. Using sequence information from the proteins, these strategies can be used to develop simultaneous quantitative methods for several proteins of interest. In this article, we discussed the problems and potential roles of SRM-based strategies in protein quantitation. "Absolute" quantitation of proteins is one of the strengths of SRM strategies. For mass spectrometry, protein samples should be digested with enzymes to their component peptides. But we cannot correct for the sample loss or efficiency of enzyme digestion in this preparatory step. Therefore, quantitative values from SRM strategies may underestimate protein abundance. In this article, we introduced our solution to this problem with isotope-labeled protein as quantitative reference. Also, we have developed a PTM profiling method with isotope-labeled full-length proteins as references. This method makes it possible to obtain the modification sites and rates of proteins using differential analysis for the quantitative values of each peptide.

**Keywords:** nephrin; post-translational modification; quantitation; selected reaction monitoring.