

## シンポジウム：プロテオミクス技術の最前線 総説

### ターゲット・プロテオミクスの最新動向と試料調製の重要性

松本 雅 記\*

\*E-mail: masakim@bioreg.kyushu-u.ac.jp

九州大学生体防御医学研究所トランスオミクス医学研究センター：812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

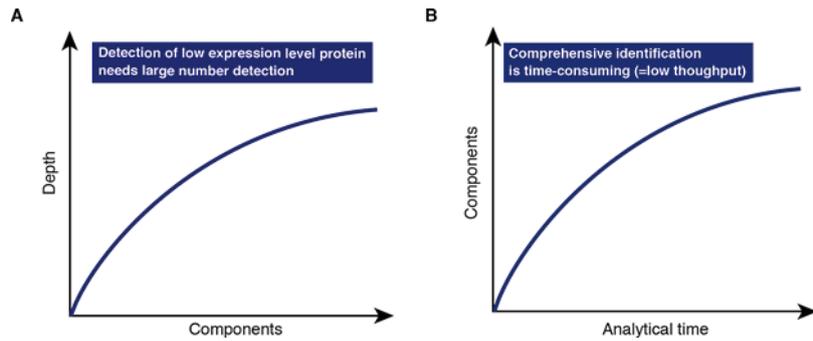
(受付 2016 年 5 月 4 日, 改訂 2016 年 6 月 2 日, 受理 2016 年 6 月 3 日)

質量分析計の感度や速度, さらには分解能の向上によって網羅的なタンパク質同定・定量が可能となっている。しかしながら, 現在の主流である data-dependent acquisition (DDA) による手法は技術的な制約から高深度の分析を多検体に対して行うことは困難である。近年 MRM などのターゲット・プロテオミクスの手法が確立され, ハイスループットに任意のタンパク質の正確な定量が可能になり, 新たなプロテオーム解析基盤を提供しつつある。本総説ではターゲット・プロテオミクスを中心とした定量プロテオミクス技術の最新動向を紹介するとともに, その利点を生かすために最も必要な試料調製について解説する。

#### 1 序 論

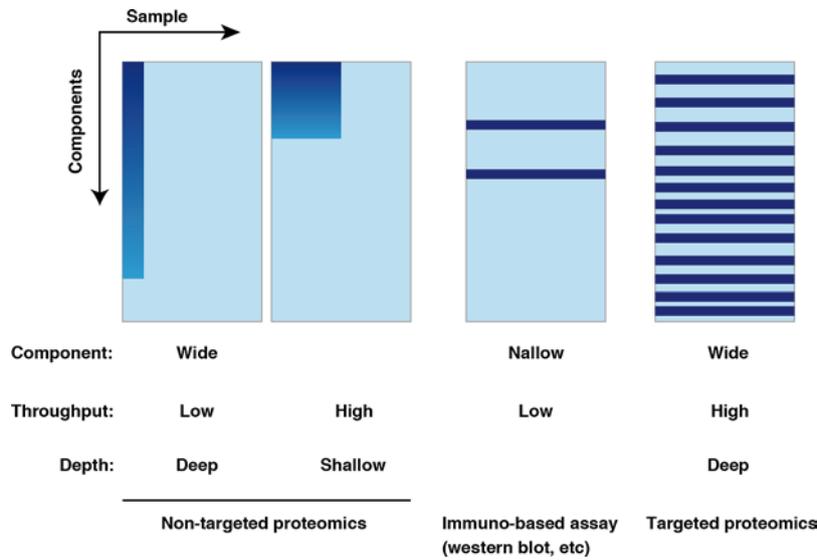
液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析計を連結した装置がプロテオミクスの標準的な手法となって久しい。特に, 近年の高速化は目覚ましく, 大腸菌などの比較的複雑性の低い生体試料のプロテオーム解析はトランスクリプトームと同等の網羅性を得ることが可能になっている<sup>1)~3)</sup>。また, 質量精度および分解能の向上は同定されたペプチドの親イオンのイオンクロマトグラフィーを低ノイズで容易に得ることを可能にし, 安定同位体標識法による定量やラベルフリー定量が容易に実施できる<sup>4),5)</sup>。ヒトやマウスのように複雑なプロテオームの場合でも, 数千から1万程度のタンパク質の同定が可能になっている<sup>4)~8)</sup>。ヒトの培養細胞では RNA レベルで発現している遺伝子は 10000~12000 程度であるので, ほぼフルカバーできるレベルに到達していると思える。一方, 定量性やスループットという観点から見ると, 未だ不十分であり, 多数の検体に対して高深度かつ高い定量精度をもって検出することは未だに容易ではない<sup>9),10)</sup>。これは, これまでプロテオーム解析における主流の質量分析計の測定が, MS スペクトルから強度順に親イオン選択後 MS/MS スペクトルを取得する data-dependent acquisition (DDA) 法に依存していることによる。この手法ではタンパク質の同定数は取得した MS/MS スペクトルの数に依存する。また, DDA では MS/MS スペクトルの取得は基本的に存在量の多い順に実施される。したがって, 発現量が低いタンパク質を検

出するためには必然的に網羅性の高い分析を実施する必要がある (Fig. 1A)。哺乳類などの複雑なプロテオームはその発現量ダイナミックレンジが7桁以上に及ぶことが知られており, 十分な網羅性を得るためには試料の前分画等を実施することで分析時間を稼ぐ (MS/MS スペクトル取得数を増やす) ことになる (Fig. 1B)。すなわち, DDA では測定のスループットを保ったまま, 高深度 (低発現タンパク質にアクセス可能) な解析を実施することは困難である (Fig. 2)。このような問題を解消するためには, MRM/SRM のようなターゲット・プロテオミクスが有効である<sup>11)~14)</sup>。ターゲット・プロテオミクスでは一度に計測できるペプチドの数に制限があるが, 広いダイナミックレンジで再現性よくペプチドの定量が可能である。また, 事前に選定したペプチドの狙い撃ち計測であることから, 比較的発現量が低いタンパク質でも確実にとらえることが可能となる。また, 最近では検出されるイオンの MS/MS スペクトルを取得する data-independent acquisition (DIA) 法と呼ばれる方法が開発され普及しつつある<sup>15)</sup>。DIA 法では取得した raw data の中には理論的にはすべてのプロダクトイオンの MS/MS スペクトルがクロマトグラムの溶出に従って格納されており, 興味あるペプチドに関するプロダクトイオンのイオンクロマトグラムをこれら任意に抽出することができる。すなわち, 事前に特定ペプチドに特化した測定メソッドを組むことなく, 高分解 MRM 様の定量をデータ取得後に表示可能である。しかしながら, DIA の手法は MRM による解析に比べて感度面で若干劣る状況であり<sup>15)</sup>, 低発現タンパク質の定量にはより高感度な装置の



**Fig. 1** Limitations of data-dependent acquisition

A, Relationship between component and depth. B, Relationship between component number and analytical time in proteome analysis.



**Fig. 2** Comparison of the strategies in proteomics

Features of proteome analysis were compared by the throughput, components, and depth. Blue area indicates matrix of obtained data in each strategy. The depth of blue indicates the consistency and reproducibility of the identification of proteins.

開発が望まれる。

このように、単一の方法では未だに不十分であるものの、プロテオーム解析の手法はその長所・短所を十分に理解して利用すれば、様々な生物学あるいは医学的課題に対して極めて有効な手段を提供できる。本総説では主にターゲット・プロテオミクスの手法に関して、最新の動向について解説するとともに、高度な定量技術を有効に使うために必要な試料調製法について紹介する。

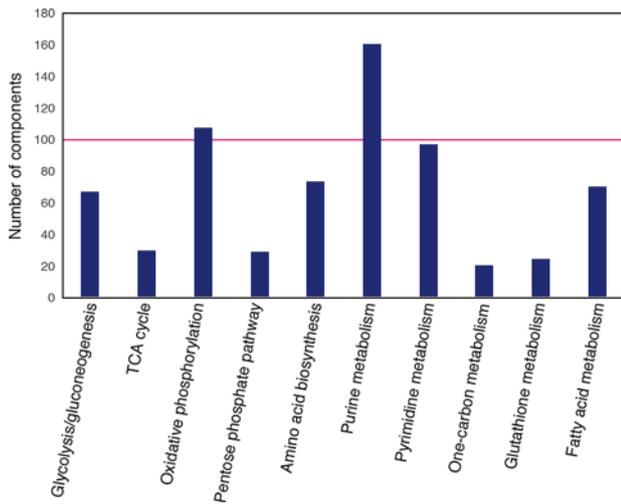
## 2 ターゲット・プロテオミクスの最新動向

### 2-1 ターゲット・プロテオミクスの利用価値

これまでプロテオーム研究は如何に多数のタンパク質を同定するかに重きを置いて進められてきた。これはプロテオーム解析を重要なタンパク質の探索目的に利用してきたためであり、そのためにはまずは発現しているタンパク質を網羅している必要があった (Fig. 2)。このような文脈に

おいて、MRMのようなターゲット・プロテオミクスは探索の結果を確認する手法として認識されてきた。しかしながら、質量分析計の高速化やスケジュール化（液体クロマトグラフィー上での保持時間指定）の発達により、一度に数百のペプチドの定量が可能になっている。複数のタンパク質セットを一斉かつ確実に（欠損値なく）定量することは、オミクス計測としての網羅性・多次元性を有しながら多検体でデータ取得が可能な新たな方法論としての地位を確立しつつある。これまで、生物学の研究において、免疫ブロット法などを用いて様々な条件下での発現挙動を計測することで、「タンパク質“X”が生命現象“Y”に関わる」という仮説検証が行われてきたが、これを多成分で実施できる意義は極めて大きい (Fig. 2)。

多くのタンパク質は生体内では物理的あるいは機能的に繋がり、様々なパスウェイを構成している。代謝経路を全体で見ると1000種類を超える代謝酵素が存在するが、解



**Fig. 3** The number of proteins involved in metabolic pathway

The number of components was calculated from the KEGG database.

糖系 (67 酵素) やクエン酸回路 (30 酵素) などモジュール単位で切り分けるとほとんどが 100 種類以下のタンパク質で構成されている (Fig. 3). 主要なシグナル伝達経路も同様に概ね 100 タンパク質以下で構成されている。また、分子機能で見ても、数十から数百の単位で構成されている。例えばタンパク質のリン酸化に関わる酵素を gene ontology で見てみると, serine/threonine protein kinase (339 種類), tyrosine kinase (95 種類), serine/threonine phosphatase (36 種類), tyrosine phosphatase (88 種類) である。従って、数十から数百のタンパク質を確実に一斉定量できればパスウェイや機能単位の情報取得が可能となる。

## 2-2 ターゲット・プロテオミクスのためのリソース

ターゲット・プロテオミクスでは事前にタンパク質特異的で高感度な分析が可能なお対象ペプチド (Proteotypic peptides: PTPs) を選定する必要がある<sup>16)</sup>。これは、各研究者が自身で同定したタンパク質のペプチドを選ぶことも可能であるが、現在では世界中で取得された DDA データが各種リポジトリサイトを介して集約され、高頻度に同定されるペプチドが PTP 候補として利用されている<sup>17)</sup>。しかしながら、これらの情報はあくまで PTP 候補であり、実際にはこれらの中からより感度が高いペプチドの選定や測定に必要な情報 (どのフラグメントイオンを使うかや液体クロマトグラフィー上の保持時間情報など) を合成ペプチドや組換えタンパク質などの標品を用いて取得し、MRM メソッドの有効性を評価する必要がある<sup>18)~19)</sup>。このステップは比較的煩雑であり、初めて MRM を行う研究者には敷居が高いものかもしれない。近年、ハイスループットなペプチド合成を利用して得たペプチドライブラリーを用いて、大規模に MRM メソッドの評価を実施することがなされて

おり、評価済みの MRM メソッドが蓄積・公開されている。MRM の最も重要な利点は一旦構築した MRM メソッドは多くの場合は測定者や施設が異なっても共有できる点である。また、品質保証が行き届いた内部標準と試料調製法の標準化が進めば、定量値を極めて再現性の高い絶対量として取得することができるため、複数の研究室で別個に取られたデータの完全な統合が可能となる。

## 2-3 ターゲット・プロテオミクスの技術進化

現在、ターゲット・プロテオミクスの手法では 3 連 4 重極型質量分析計による MRM モードを用いることが主流である。また、Orbitrap に代表される高分解能質量分析計の登場によって比較的複雑な試料でも SIM 分析による定量が可能であり、MRM のように入念な事前設定をすることなく簡単にペプチドの定量が可能となっている。残念なことに、SIM を用いた分析ではそのペプチドの選択を親イオンの質量のみで行っているため、哺乳類細胞の全抽出液消化物のように極めて複雑性の高い試料中に存在する微量ペプチドを高い信頼性で検出・定量することは未だ困難である。同様に、現行の 3 連 4 重極型質量分析計の分解能では MRM での選択性は十分ではなく、多くの低発現タンパク質の検出がノイズによって妨げられる。この問題を解決する手段として、高分解能ハイブリッド型質量分析計を用いたフラグメントイオンモニターに基づく手法が注目されている。例えば、Qq-Orbitrap 型である Q-Exactive に実装されている PRM 法や QqTOF 型である TripleTOF5600 等に実装されている MRM<sup>HR</sup> などはその高い分解能と質量精度で MRM の高ノイズ問題を解消できる手法として期待されている<sup>20)</sup>。残念なことに、現行の装置では感度や速度の面で MRM に及ばない。例えば、PRM に関しては少数のペプチドを解析する場合は最新の 3 連 4 重極型質量分析計に匹敵する感度を示すが、多数のペプチドを選択するための multiplex mode (複数の親イオンを選択・蓄積後、まとめて開裂させて MS/MS スペクトルを取得する手法) で使用すると、急激に感度が低下する傾向にある。今後、これらの問題点が改善されれば、より特異性の高いターゲット・プロテオミクスの実施が可能になると期待される。

## 3 定量プロテオームにおける試料調製

### 3-1 タンパク質の抽出と浄化

タンパク質はそれぞれ固有の局在や物性を有しており、それらを生体試料から抽出・処理する過程で何かしらのバイアスがかかる可能性が高い。特に試料調製過程が複雑になればなるほど、個々のプロセスで生じる実験誤差が積み重なることになり、得られる結果に大きな影響を与える。例えば、細胞内でのタンパク質の絶対量を知ることが目的であれば、出来るだけシンプルな方法でタンパク質を

抽出することが肝心である。われわれは2% SDS/7 M 尿素溶液で細胞を溶解後、メタノール・クロロホルム沈殿法あるいはアセトン沈殿法で不純物（脂質や SDS 等）を除去し、沈殿を塩酸グアニジンで再溶解してから酵素消化を実施している。この際、タンパク質濃度が低すぎると各種沈殿法においてバイアスが生じる可能性があるため、概ね 1-2 mg/ml 程度の濃度で沈殿操作を実施している。また、タンパク質量が多すぎると沈殿後の再溶解が上手くいかないこともあるため 1つのチューブで実施する沈殿操作で使用するタンパク質量は 300  $\mu$ g 程度を上限としている。また、再溶解をより完全に行うために、超音波処理や加熱処理を施し、その後 BCA (Bicinchonic Acid) アッセイなどの直線性の高いタンパク質定量法を用いて回収されたタンパク質量を見積もっている。

### 3-2 酵素消化

現在のプロテオーム解析の主流はタンパク質を酵素等で消化して得られるペプチドを解析する、いわゆるショットガン分析が主流である。従って、タンパク質の定量を行う場合は酵素消化の効率や再現性が定量結果に直結する。タンパク質を構成するアミノ酸はそれぞれが固有の物性を有することから、タンパク質内では局所的な構造等の影響で酵素消化効率が高い配列、低い配列が存在する。このようなタンパク質の消化効率を高くするためには、可能な限りタンパク質を変性させることが重要である。しかしながら、消化に用いる酵素自体もタンパク質であることから、タンパク質を十分に変性させる条件では酵素自体の失活も不可避である。したがって、高濃度の変性剤（7 M 程度の尿素やグアニジン塩酸塩など）を用いて変性させ、その後希釈によって変性剤濃度を落としてから酵素を加えるのが一般的である。変性の作用はグアニジン塩酸塩の方が尿素より強力であり、タンパク質沈殿法を行った場合の再溶解に適している。

グアニジン塩酸はトリプシンでは 1 M 以下、リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C) では 2 M 以下まで希釈する必要があるが、変性させたタンパク質溶液を 1 M 以下まで希釈するとタンパク質不溶化による沈殿が生じてしまう。このため、われわれは 7 M グアニジン塩酸で変性後は 4 倍希釈 (1.75 M) 後、Lys-C 処理を行い、その後さらに倍希釈 (0.875 M) した後トリプシンを添加している。

尿素やグアニジン塩酸とともにタンパク質の変性剤と使用されているのが SDS などの界面活性剤である。SDS は膜タンパク質などの疎水性の高いタンパク質可溶化も効率良くできるため重宝されているが、質量分析計での測定前に除去する必要がある。上述したようにタンパク質抽出液を沈殿法で浄化することで SDS の除去は可能であるが、半透膜を用いた SDS 除去法も開発されて広く普及してい

る<sup>21)</sup>。疎水性領域が多い膜タンパク質では界面活性剤存在下での酵素消化が有効であるが、SDS は消化物からの除去が困難である。増田ら<sup>22)</sup>はデオキシコール酸などの胆汁酸塩はトリプシンの酵素活性を活性化する作用がある極めて有用な界面活性剤であることを見出し、酵素消化後に酢酸エチルによる液相分配によって容易に除去する手法を報告している。実際、われわれもデオキシコール酸を用いた酵素消化法を MRM による定量実験に利用したところ、多くの膜タンパク質やオルガネラ局在タンパク質由来のペプチドのシグナル強度が顕著に向上した。

### 3-3 分画

ターゲット・プロテオミクスでは、従来の DDA による手法に比べて発現量によるバイアスが弱く、比較的低発現タンパク質でも再現性よく検出可能であるが、極端に発現量が低いタンパク質に関しては、その検出感度が足りないことがある。DDA の場合と同様に、LC-MS の前に分画を実施することで試料の複雑性を低減させることは有効であるが、分画法の適用は分析時間の増加に直結し、ターゲット・プロテオミクスの利点が失われてしまう。このような問題を解決するには、目的タンパク質の物性を利用して特定分画だけを狙い撃ちする方法である。例えば、等電点ゲル電気泳動を液相で実施する OFFGEL 法<sup>11),23)</sup>や分子量で分画する SDS-PAGE、さらに SDS-PAGE から直接タンパク質を液相に回収できる Gelfree 法<sup>24)</sup>などが挙げられる。しかしながら、いずれの方法も、再現性、必要タンパク質量の多さ、回収率の低さ、さらには多検体処理の困難さなどの問題点が残っている。一方、タンパク質の細胞内局在が予測される場合などは細胞分画法の適用は極めて重要な手段である。例えば、転写因子は発現量が一般に少なく、ターゲット・プロテオミクスでも検出が困難なタンパク質が多い。転写因子が機能する場所は当然核内であり、核内における存在量の計測は機能的にも意義深い。近年、細胞をホルマリン固定後、クロマチン画分を精製する方法が開発され、実際に DNA 上で機能しているタンパク質を効率良く回収することが可能になっている<sup>25),26)</sup>。また、転写因子の標的配列を人工的につないだ DNA を転写因子に対するアフィニティリガンドとして利用することで活性化した転写因子を回収する手法が開発されている<sup>27)</sup>。

このように、単なる物性による分画法は感度面では有利なものその代償としてスループットを犠牲にするが、細胞分画法は感度面の向上に加え、タンパク質の細胞内局在に基づく機能的な情報を与えるため、その利用価値は高い。その反面、細胞分画法は様々な要因によって結果が変わりやすいため、試料調製条件の厳密なコントロールが重要である。

## 4 試料調製の標準化・自動化

### 4-1 データ統合の重要性

質量分析計を用いたプロテオーム・データは実験自体の目的や手技の多様性に加え、装置の種類や測定条件によってシグナル強度が大きく変化することから、異なる研究機関はもとより、同じ研究室でも定量的な比較や統合はほとんどなされていない (PRIDE などリポジトリサイトへの質量分析データや同定結果の集約<sup>28)</sup> や再解析<sup>9),10)</sup> は進んでいるが)。しかしながら、濃度既知の安定同位体標識を施した組換えタンパク質や合成ペプチドを内部標準として加えたターゲット・プロテオミクスでは絶対値としてデータの取得が可能となるため、装置や測定条件が異なるデータであっても理論的には統合して比較することが可能である。生物学領域のデータは一般にサンプル数が少なく、要素の数が多い状態にあるため、一つの研究で得られたデータのみから生物学的に意味のある規則性の抽出などの解釈は困難である。一方、様々なデータを集約・統合することができれば、サンプルサイズが飛躍的に向上しビッグデータとしての利用価値が出てくる。今後、ターゲット・プロテオミクスの手法が普及していけば、ゲノムやトランスクリプトームと同様、集約されたデータ利用の動きが加速すると思われる。

### 4-2 ロボットを用いた試料調製

上述したように、プロテオーム・データの統合化自体はターゲット・プロテオミクスを用いた絶対量計測によって原理的には可能である。しかしながら、現実的には、使用する内部標準や試料の品質保証や実験操作性など、解決すべき課題が山積している。特に、実験操作に関しては、使用する試薬の量や操作条件 (インキュベーション温度や時間など) を文章化して共有するが、実験者毎の微妙な解釈の違いや操作の癖などが実験結果に少なからず影響を与える可能性がある。このような背景からわれわれは汎用ヒト型ロボット (多目的ロボット) を用いた試料調製プロトコルの標準化に注目している。これまでもリキッドハンドリングロボットを用いた多検体酵素処理などは一般化しているが、可能な操作は限られており、細胞からタンパク質の抽出から酵素消化までの全工程のロボット化は報告されていない。われわれは、ヒト培養細胞からタンパク質抽出、沈殿法による浄化作業、タンパク質量、還元・アルキル化、さらには酵素消化までのほぼ全工程を1台のヒト型ロボットによって実施できており、現在、その精度や再現性の検証を行っている。また、上述したように細胞分画法など操作工程が多い実験もロボット化を計画中であり、より再現性の高い試料調製が期待される。

## 5 結論

本総説ではターゲット・プロテオミクスの現状を解説すると共に、その高い定量精度や再現性を生かすための試料調製について議論した。ターゲット・プロテオミクスの利点は、「多検体」を対象に「興味ある複数のタンパク質」を「正確」に定量できることであり、これを十分に理解して使用すると、これまでの探索的アプローチとは異なる方向性を有するツールとして、医学・生物学領域に大いに貢献するであろう。また、本総説で紹介したロボットを用いた試料調製の標準化が普及すると、多数の研究室が統合を前提としたデータ取得を実施するようになり、プロテオーム・ビッグデータに基づく新たな研究領域の創出が期待される。

### 利益相反

著者に開示すべき利益相反状態は無い。

### 文献

- 1) de Godoy LMF, Olsen JV, Cox J, *et al.* Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature*. 2008;455:1251–1254.
- 2) Iwasaki M, Miwa S, Ikegami T, *et al.* One-dimensional capillary liquid chromatographic separation coupled with tandem mass spectrometry unveils the *Escherichia coli* proteome on a microarray scale. *Anal Chem*. 2010;82:2616–2620.
- 3) Nagaraj N, Kulak NA, Cox J, *et al.* System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top Orbitrap. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11:M111.013722.
- 4) Schwanhäusser B, Busse D, Li N, *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2012;473:337–342.
- 5) Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, *et al.* Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*. 2011;7:548.
- 6) Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, *et al.* The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol*. 2011;7:549.
- 7) Thakur SS, Geiger T, Chatterjee B, *et al.* Deep and highly sensitive proteome coverage by LC-MS/MS without pre-fractionation. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10:M110.003699.
- 8) Geiger T, Wehner A, Schaab C, *et al.* Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11:M111.014050.
- 9) Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*. 2015;509:582–587.
- 10) Kim MS, Pinto SM, Getnet D, *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature*. 2015;509:575–581.
- 11) Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN, *et al.* Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell*. 2009;138:795–806.
- 12) Jovanovic M, Reiter L, Picotti P, *et al.* A quantitative targeted proteomics approach to validate predicted microRNA targets in *C. elegans*. *Nat Methods*. 2010;7:837–842.

- 13) Karlsson C, Malmström L, Aebersold R, *et al.* Proteome-wide selected reaction monitoring assays for the human pathogen *Streptococcus pyogenes*. *Nat Commun.* 2012;3:1301.
- 14) Marx V. Targeted proteomics. *Nat Methods.* 2013;10:19–22.
- 15) Gillet LC, Navarro P, Tate S, *et al.* Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11:O111.016717.
- 16) Maiolica A, Jünger MA, Ezkurdia I, *et al.* Targeted proteome investigation via selected reaction monitoring mass spectrometry. *J Proteomics.* 2012;75:3495–3513.
- 17) Deutsch EW, Lam H, Aebersold R. PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. *EMBO Rep.* 2008;9:429–434.
- 18) Picotti P, Rinner O, Stallmach R, *et al.* High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. *Nat Methods.* 2009;7:43–46.
- 19) Stergachis AB, MacLean B, Lee K, *et al.* Rapid empirical discovery of optimal peptides for targeted proteomics. *Nat Methods.* 2011;8:1041–1043.
- 20) Gallien S, Duriez E, Crone C, *et al.* Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11:1709–1723.
- 21) Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;6:359–362.
- 22) Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res.* 2008;7:731–740.
- 23) Hubner NC, Ren S, Mann M. Peptide separation with immobilized pI strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis. *Proteomics.* 2008;8:4862–4872.
- 24) Tran J, Zamdborg L, Ahlf DR, *et al.* Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature.* 2011;480:254–258.
- 25) Kustatscher G, Hégarat N, Wills KL, *et al.* Proteomics of a fuzzy organelle: interphase chromatin. *EMBO J.* 2014;33:648–664.
- 26) Kustatscher G, Wills KL, Furlan C, *et al.* Chromatin enrichment for proteomics. *Nat Protoc.* 2014;9:2090–2099.
- 27) Ding C, Chan DW, Liu W, *et al.* Proteome-wide profiling of activated transcription factors with a concatenated tandem array of transcription factor response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:6771–6776.
- 28) Martens L, Hermjakob H, Jones P, *et al.* PRIDE: the proteomics identifications database. *Proteomics.* 2005;5:3537–3545.

## Targeted Proteomics: Current Technical Advance and Sample Preparation

Masaki Matsumoto\*

\*E-mail: masakim@bioreg.kyushu-u.ac.jp

Medical Institute of Bioregulation, Division of Proteomics, Kyushu University,  
812-8582 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Japan

(Received: May 4, 2016; Revised: June 2, 2016; Accepted: June 3, 2016)

Advances in sensitivity, scanning speed, and resolution of mass spectrometry extensively facilitated comprehensive identification and quantification of proteome. However, one of the major techniques used in the current proteomics, data-dependent acquisition (DDA), has technical limitations that prevent in-depth proteome analysis across large number of samples. Recently, targeted proteomics, such as multiple-reaction monitoring (MRM) has been developed to promote high-throughput, accurate and consistent quantification of given protein sets, that serves the extended application of proteomics for biology. In this review, I describe the current topics in targeted proteomics and the sample processing procedure required for targeted proteomics.

**Keywords:** absolute quantification; mass spectrometry; robot; targeted proteomics.