

第2回 質量分析ハッカソン・シンポジウム  
2018. 7. 15 in 徳島



# 質量分析によるプロテオーム解析

小林 大樹

熊本大学大学院生命科学研究部腫瘍医学分野

## 『プロテオーム』とは...

**組織や培養細胞などの、ある生体系に存在している  
タンパク質の総体**

例. 肝臓組織に含まれるすべてのタンパク質

HEK293培養細胞の細胞膜に存在するすべてのタンパク質

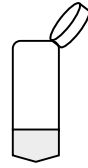
## 『質量分析 (Mass Spectrometry/MS) で プロテオームを測定する』とは...

**『質量分析を用いて、ある生体系に存在している  
すべてのタンパク質を測定する。』ということ**

# 質量分析によるプロテオーム解析

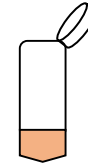
サンプル調製

対照群



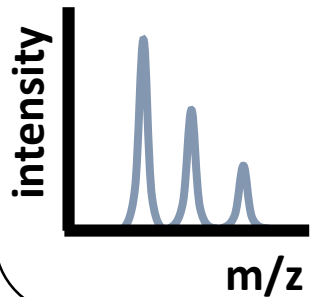
VS

実験群



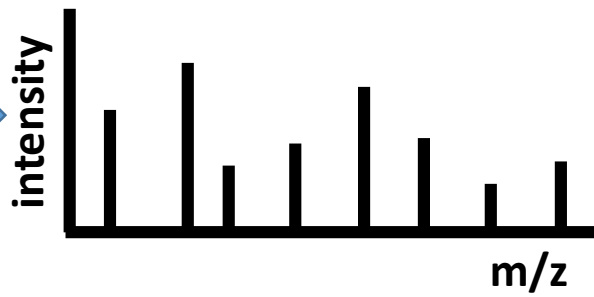
MS測定

ペプチド検出



MS/MS測定

断片化ペプチドスペクトル取得



## 定性プロテオーム解析

○ペプチド(タンパク質)配列の同定

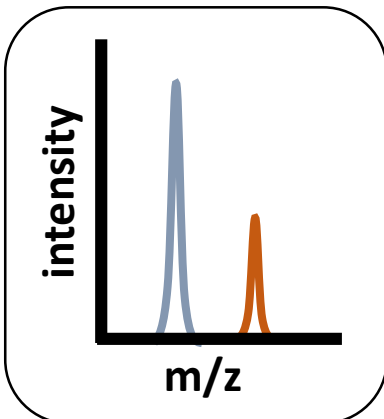
## 定量プロテオーム解析

○ラベルフリー定量

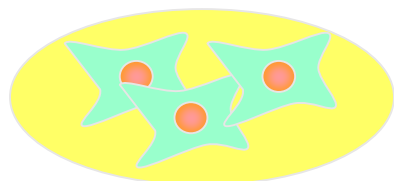
- ・スペクトルカウント
- ・プレカーサーイオン定量
- ・SWATH

○安定同位体ラベル定量

- ・SILAC
- ・iTRAQ
- ・TMT



# プロテオミクスにおけるタンパク質同定のワークフロー1 酵素 (Trypsin) による消化

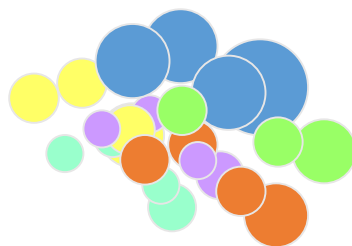


生体試料 (培養細胞、組織、菌など)

Trypsin: LysineまたはArginineのC末端側のペプチド結合を加水分解する酵素



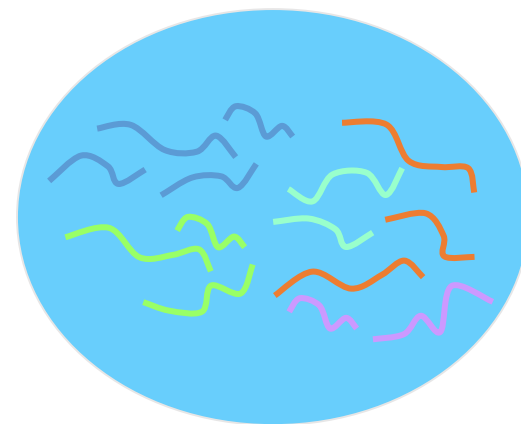
抽出



Protein

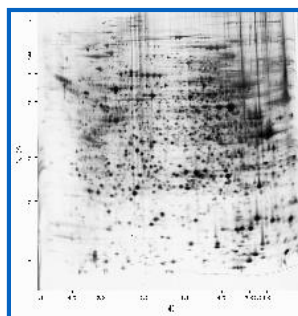


消化



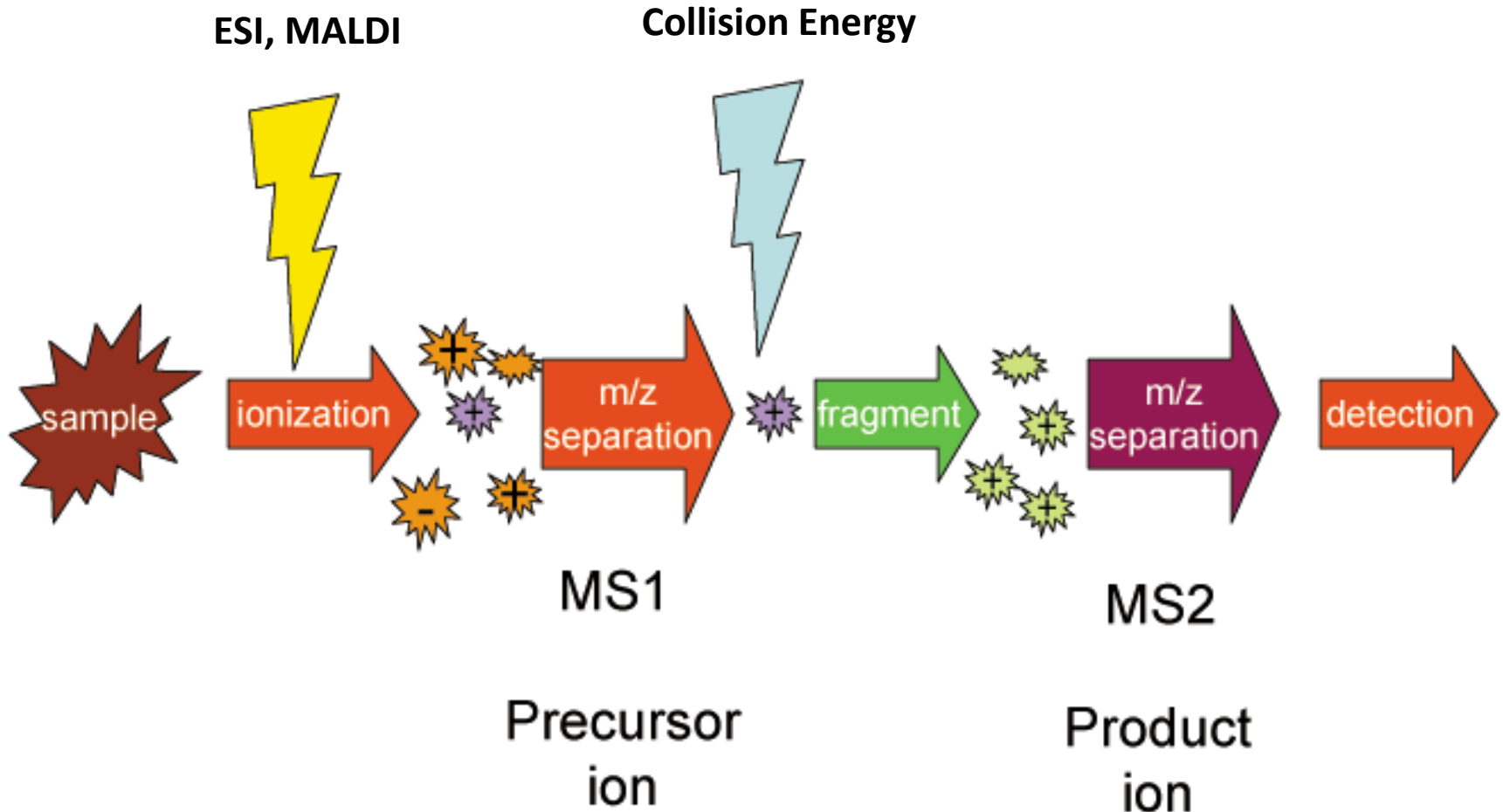
Peptide mixture

2次元電気泳動



# ペプチドの配列を同定するための 質量分析で計測されるMS/MSスペクトル

質量分析装置でサンプル(ペプチド)がどのようにして検出されているのか??

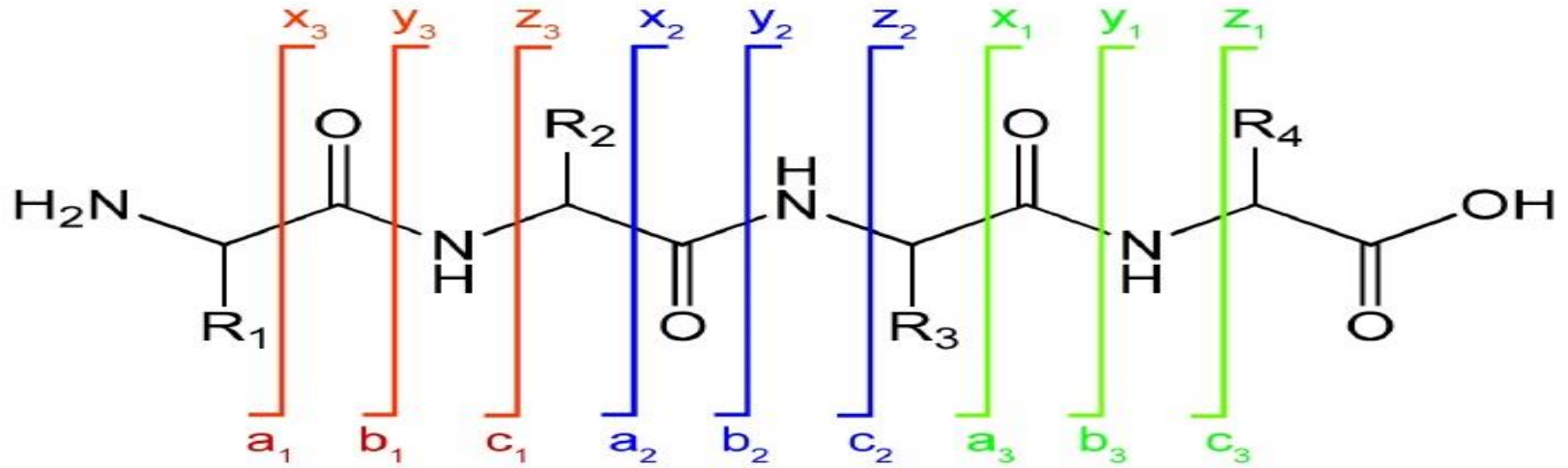


ESI: Electron spray ionization

MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization

# ペプチドの配列を同定するための質量分析で計測される MS/MS スペクトル

## ペプチドのフラグメント化パターン



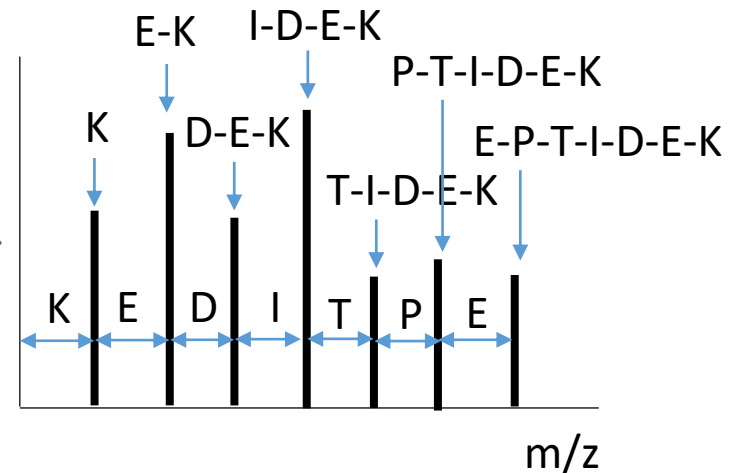
### Collision

### MS/MS スペクトル

#### ペプチド

-P--E--P--T--I--D--E--K-

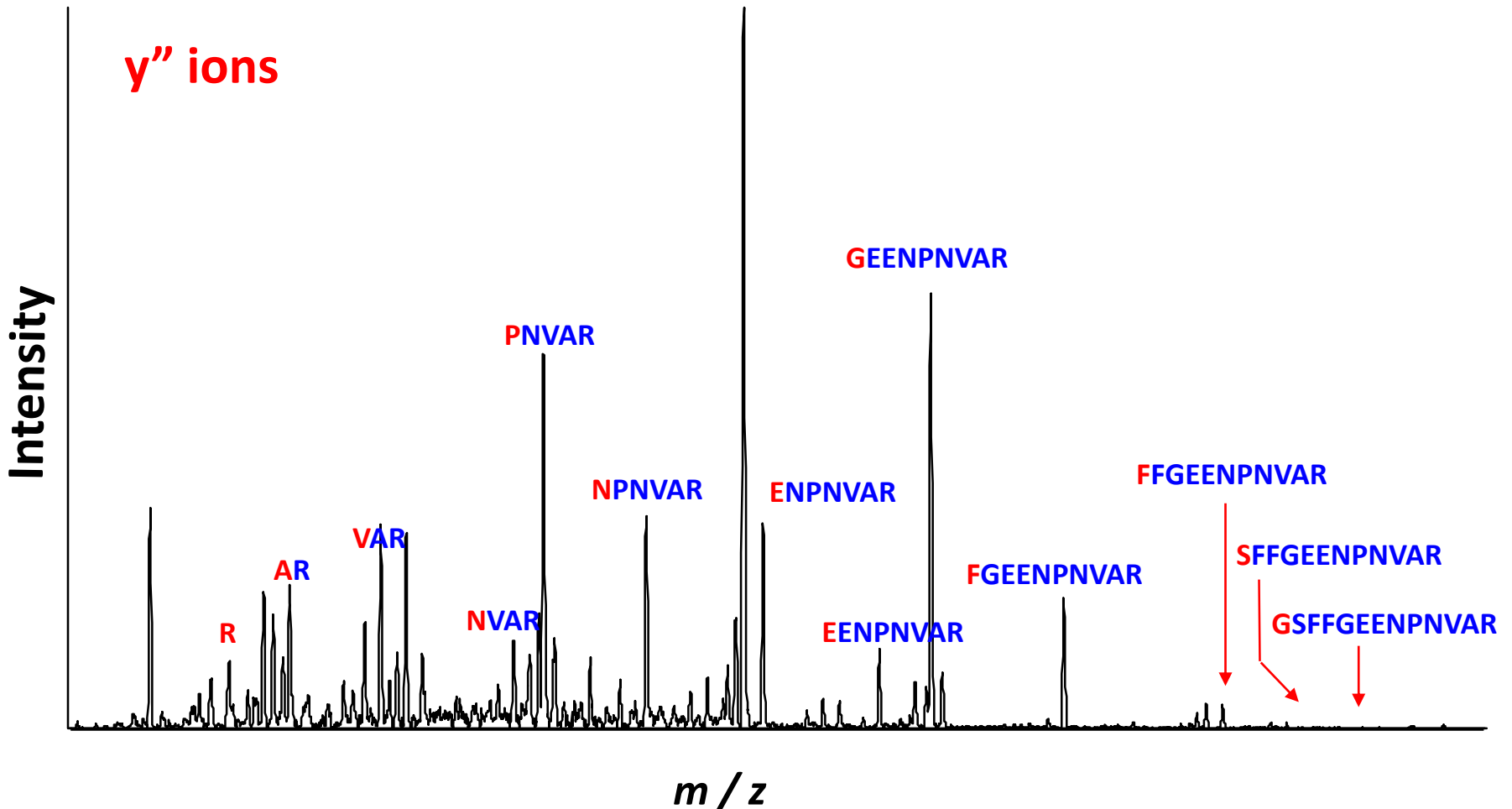
-P-    -E--P--T--I--D--E--K-  
 -P--E-    -P--T--I--D--E--K-  
 -P--E--P-    -T--I--D--E--K-  
 -P--E--P--T-    -I--D--E--K-  
 -P--E--P--T--I-    -D--E--K-  
 -P--E--P--T--I--D-    -E--K-  
 -P--E--P--T--I--D--E-    -K-



m/z

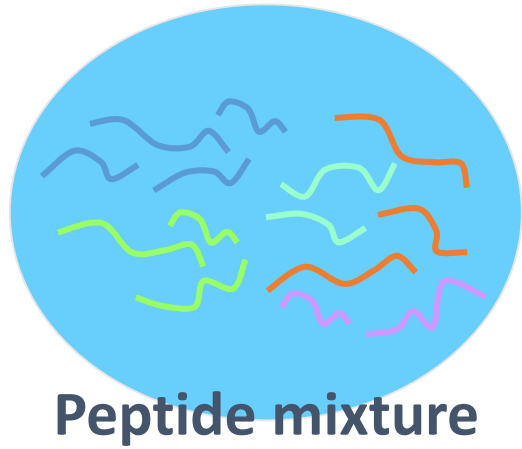
# ペプチドの配列を同定するための 質量分析で計測されるMS/MSスペクトル

## EGSFFGEENPNVARという配列を持つペプチドのMS/MS



MS/MSによってペプチド断片のスペクトル情報(質量情報)が得られる

# プロテオミクスにおけるタンパク質同定のワークフロー2 (質量分析装置による測定)



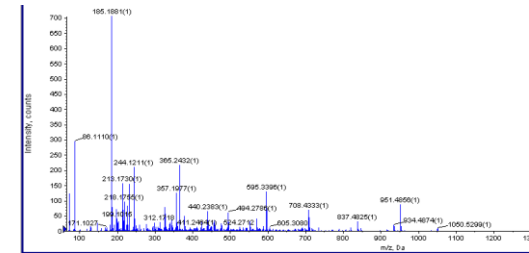
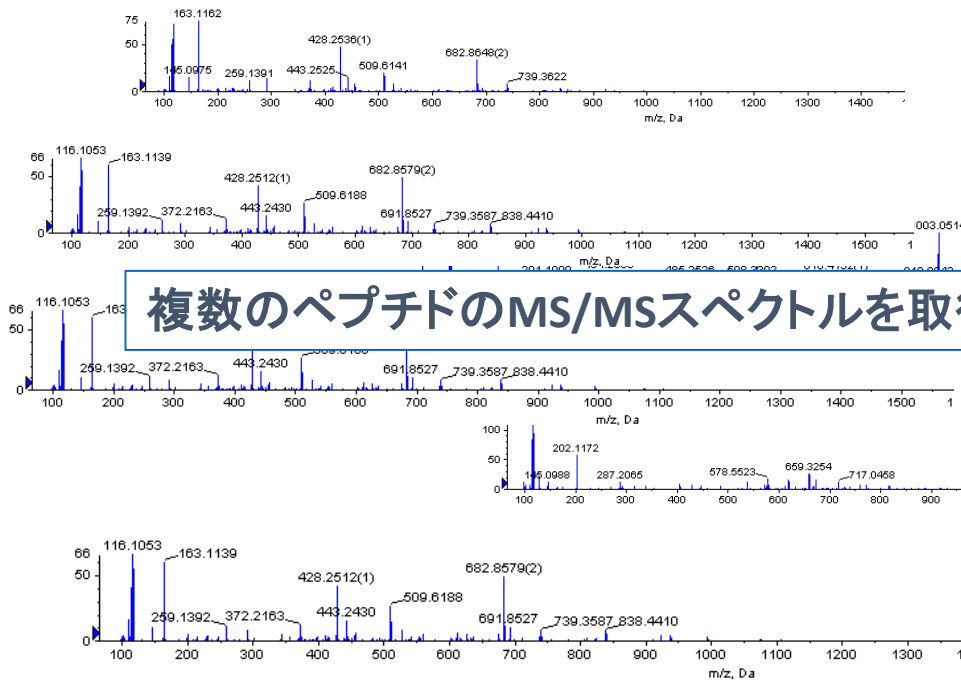
Nano LC  
(ペプチド分離)



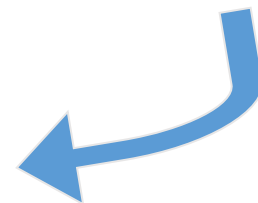
質量分析装置



MS測定

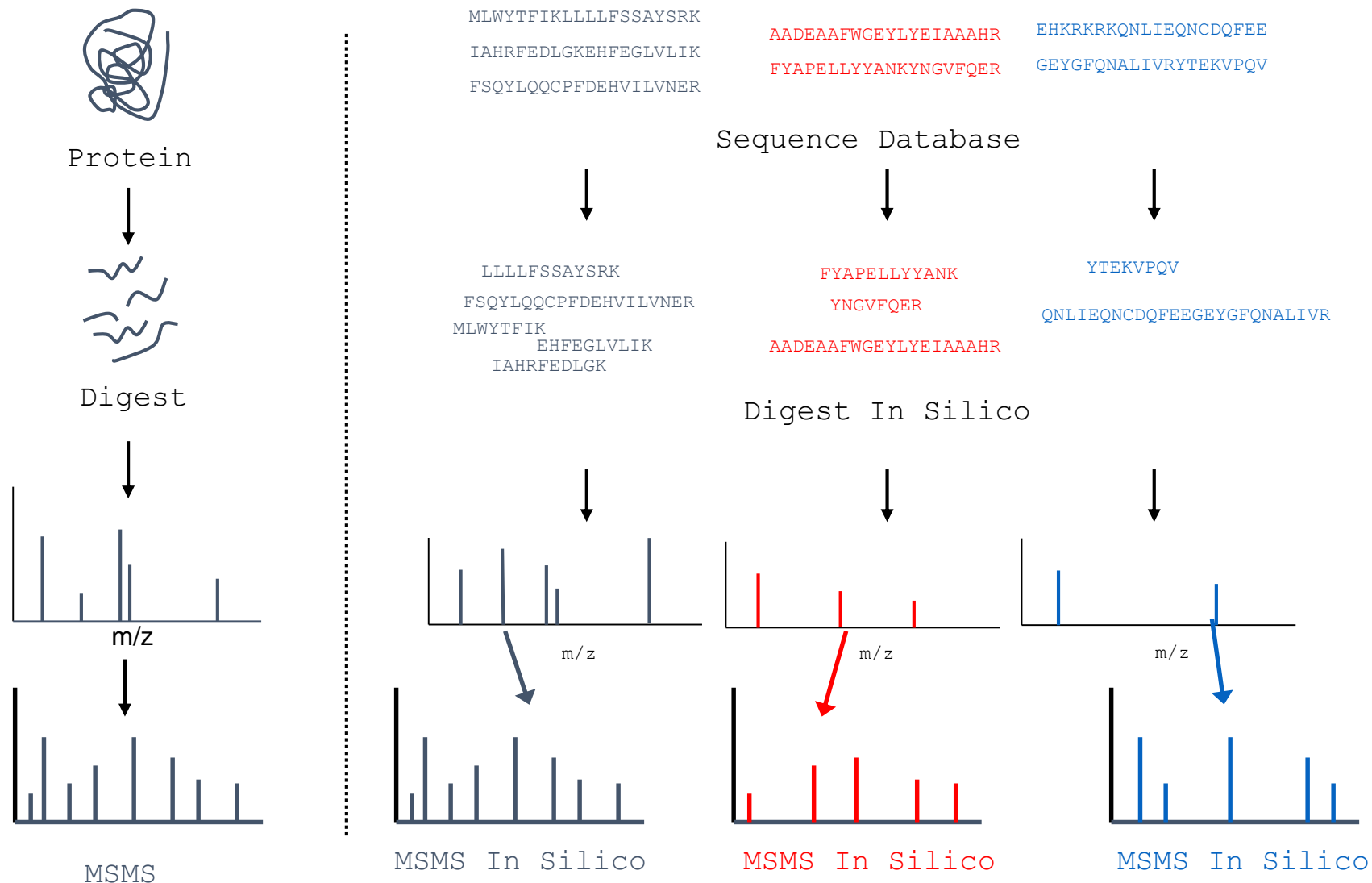


MS/MS測定





# MS/MSスペクトルからタンパク質を同定する ~データベース検索~



Observed Peak List



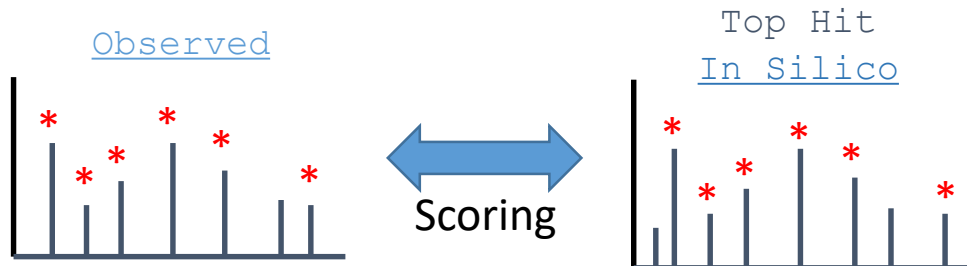
Database Search

Calculated Peak List

# プロテオーム解析でのデータベース検索結果の評価

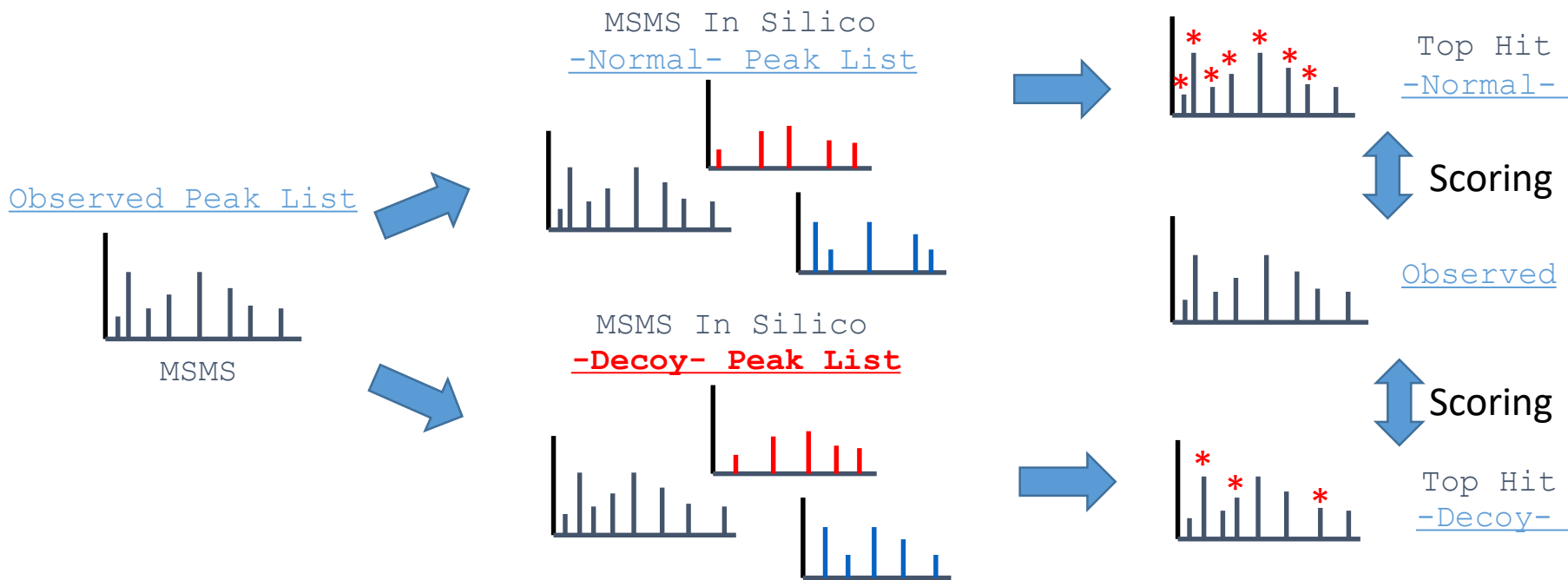
## スコアによる評価

MS/MSスペクトルが、in silicoで作成されたスペクトルにどのくらいマッチしているか。



## False Discovery Rate(FDR)による評価

MS/MSスペクトルが、in silicoで作成された正規とデコイのスペクトルのどちらによりマッチしているか。



# 質量分析による様々なプロテオーム解析

- ・定性プロテオーム解析(タンパク質の網羅的同定)
- ・定量プロテオーム解析(タンパク質の網羅的発現差異解析)
- ・翻訳後修飾ペプチド・タンパク質の網羅的同定・定量解析
- ・特定の分子(低分子化合物・生体分子)に結合するタンパク質の網羅的同定

などなど



様々なプロテオーム解析結果に応じた  
ソフトウェアの開発が必要となる。

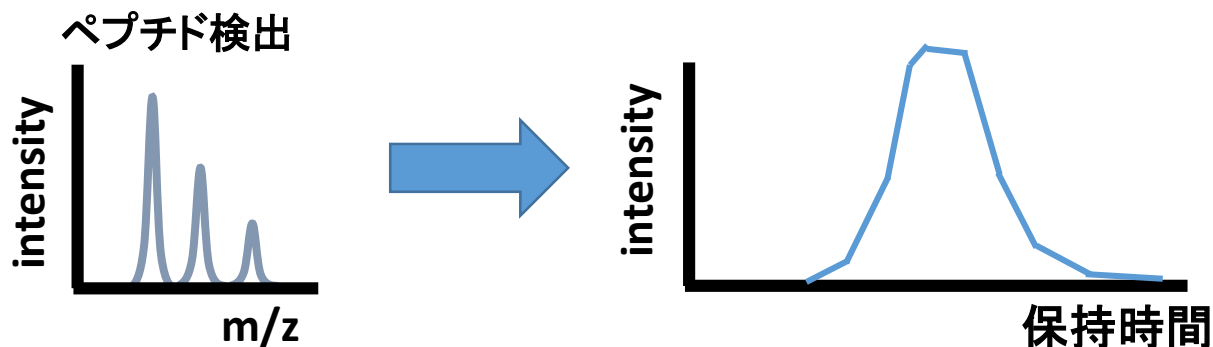
# 質量分析による定量プロテオーム解析技術

## 1. スペクトルカウントによる非標識相対定量

同定されたタンパク質に帰属したスペクトルの数により相対的に定量する。

## 2. ラベルフリーのプレカーサーイオン定量

ペプチドのイオン強度を保持時間ごとにクロマトグラム化して定量する。



# 質量分析による定量プロテオーム解析手法

## 3. 安定同位体ラベルによるプレカーサーイオン定量

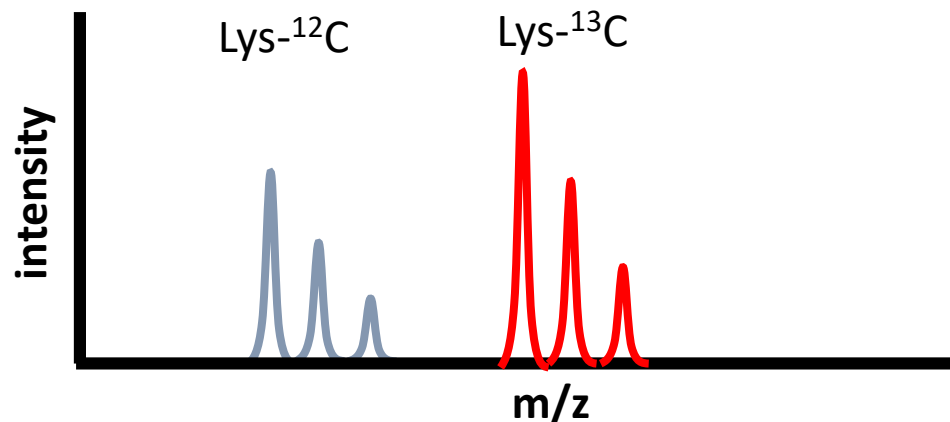
### Dimethylラベル法

ペプチドにまでサンプルを調製した後に、安定同位体重水素化ホルムアルデヒドを用いて、第一級アミンを重水素化メチル基で標識して、イオンの強度、あるいはクロマトグラムにより定量する。

### SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) 法

安定同位体Lys、Argなどを培養液中にて代謝的にタンパク質をラベルし、それぞれの共溶出した安定同位体修飾プレカーサーイオンの強度、あるいはクロマトグラムにより定量する。

### SILAC\_ペプチド検出

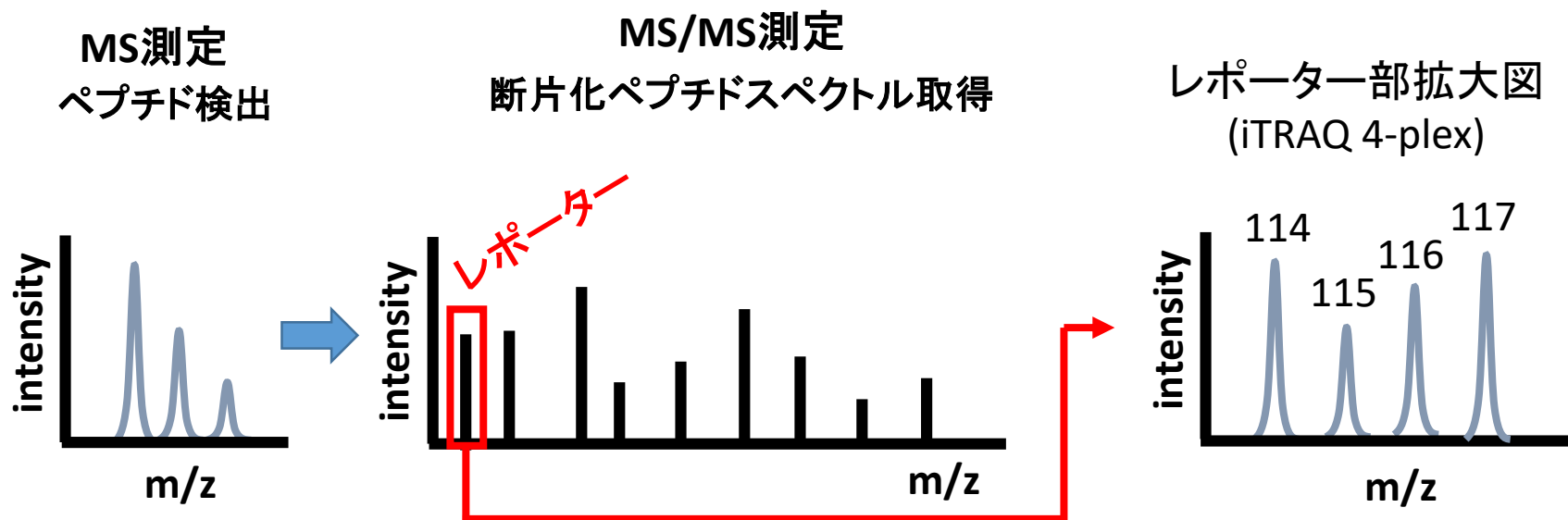


# 質量分析による定量プロテオーム解析手法

## 4. 安定同位体ラベルによるレポーターイオン定量

### *i*TRAQ/TMTラベル法

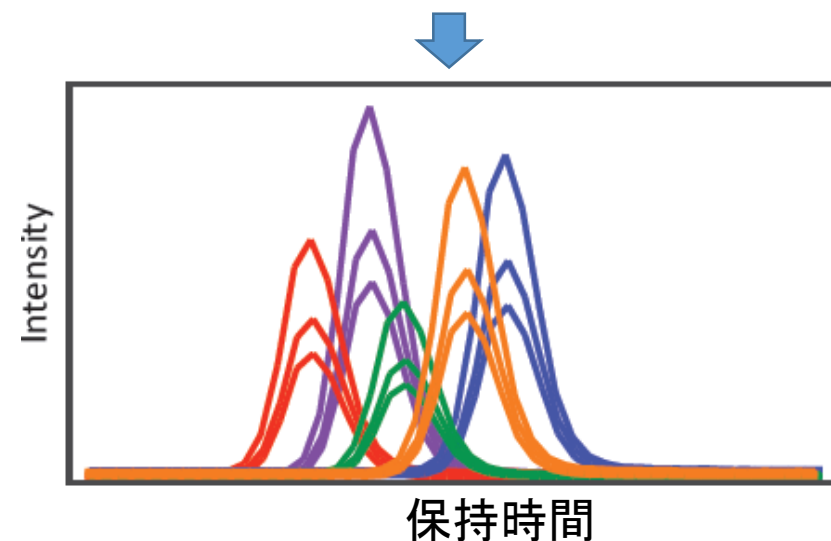
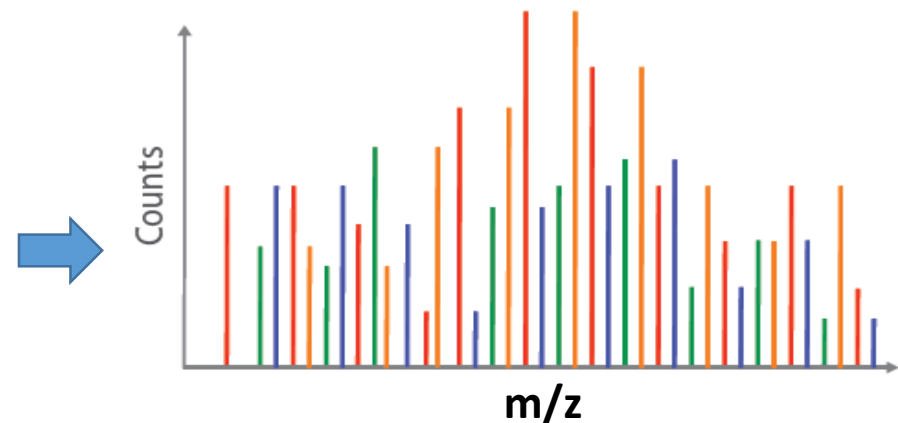
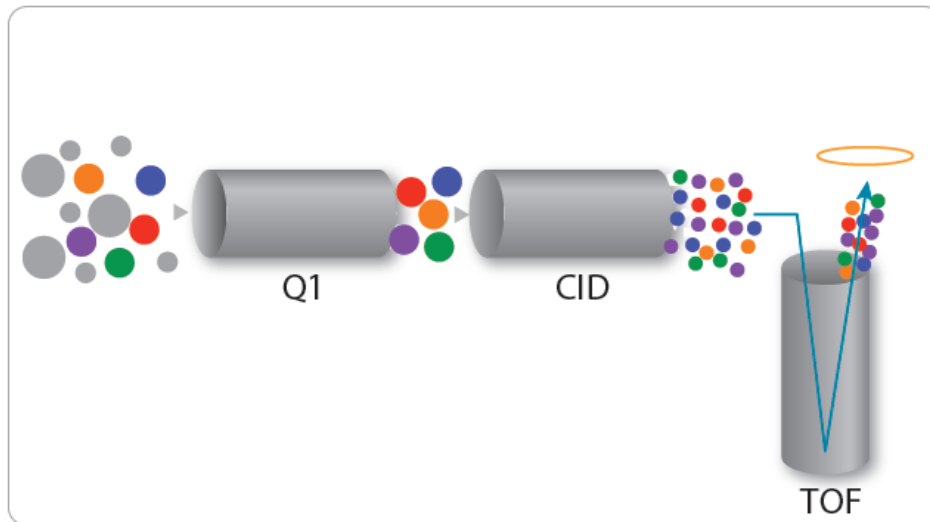
ペプチドの一級アミンに結合し、レポーター一部と balanサー一部の質量の総計が同じになるように設計された試薬で、MS/MSスペクトルでのレポーター一部のイオン強度により定量する。



# 質量分析による定量プロテオーム解析手法

## 5. Data independent acquisition (DIA)/ SWATH法

特定のプレカーサーイオンに対してではなく、ある決まった質量範囲に対して、MS/MSスペクトルを取得し、プレカーサーイオンの溶出時間とMS/MSスペクトルの情報と照合させ、帰属したプレカーサーイオン由来のMS/MSスペクトルでの、イオン強度のクロマトグラムによって定量する。



## 質量分析を用いたプロテオーム解析とバイオインフォマティクス技術

○質量分析を用いた様々なプロテオーム解析手法が確立され、プロテオームデータに応じたソフトウェアが開発されている。

○質量分析装置の高感度化・高精度化・迅速化によって、膨大なプロテオームデータが次々と生み出される。



『質量分析でプロテオームを測定する』ためには、  
バイオインフォマティクス分野が欠かせない存在となっている。