

プロテオーム解析技術論： 微量同定から定量解析まで

松本 雅記

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

Masaki Matsumoto
Division of Proteomics
Medical Institute of Bioregulation
Kyushu University



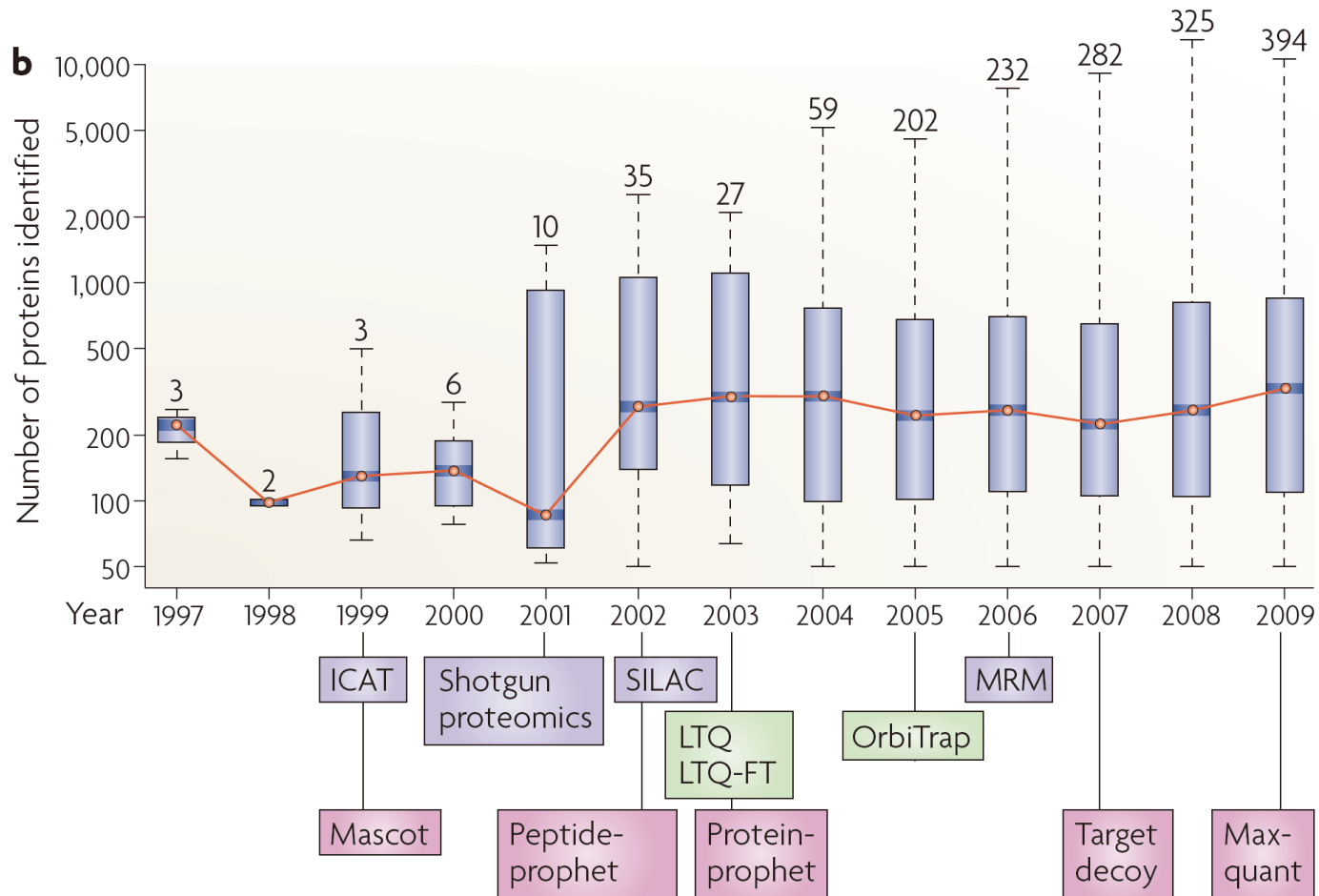
なぜプロテオームが重要か？

- 生命現象の実行因子はタンパク質である
- mRNA量＝タンパク質量ではない
- タンパク質の機能は翻訳後修飾や局在で変わる

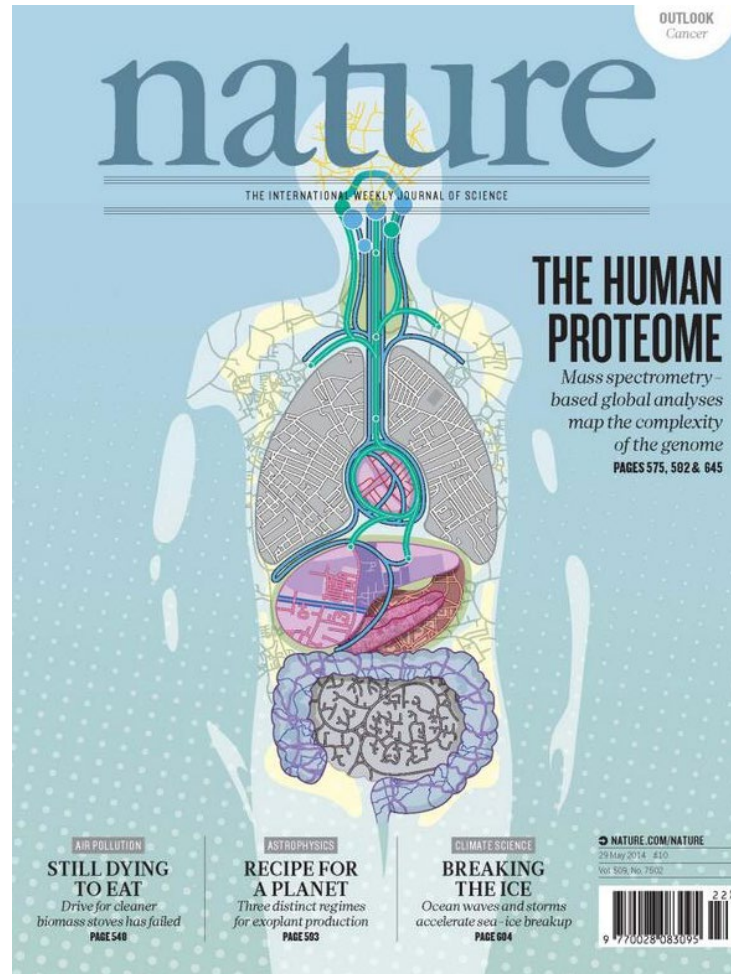
なぜプロテオーム研究が難しいのか？

- プロテオームの持つ情報量が膨大すぎる
- 技術の原理や特徴が理解されず使われている
- データ解析の困難さや未熟さ

プロテオーム解析技術の変遷



2014: Human proteome draft



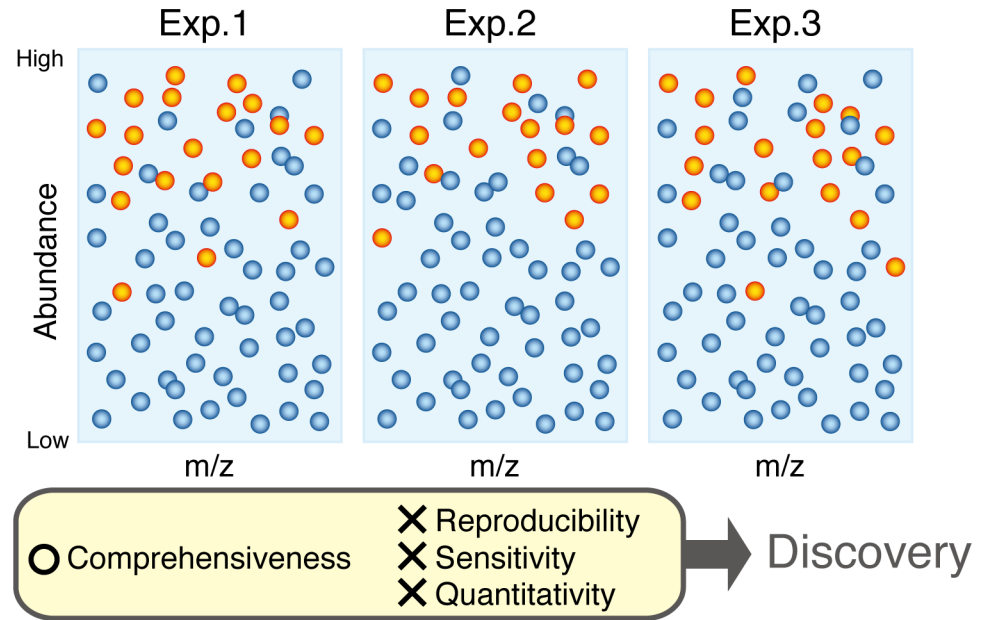
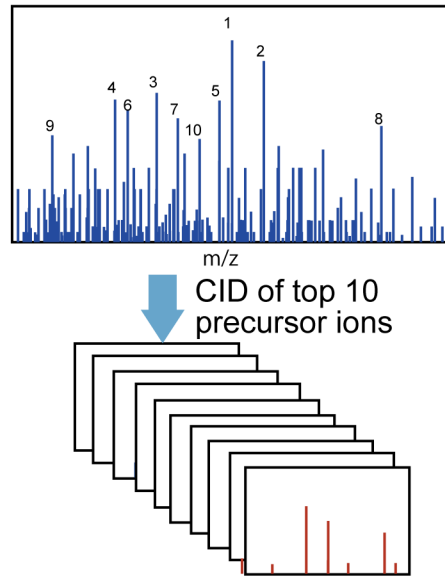
- 10年来集められた世界中のDDAデータを集約してヒトプロテオームのカタログ化

現在のディープ・プロテオーム解析の問題点

超ロースループット・偽陽性・静的・定性的

Discovery proteomics

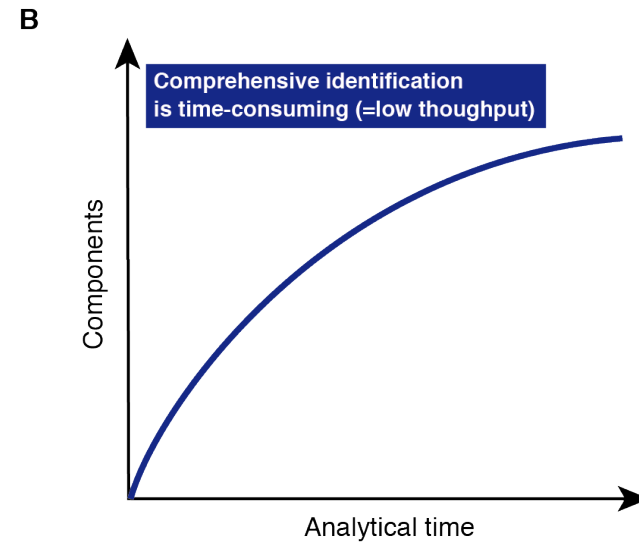
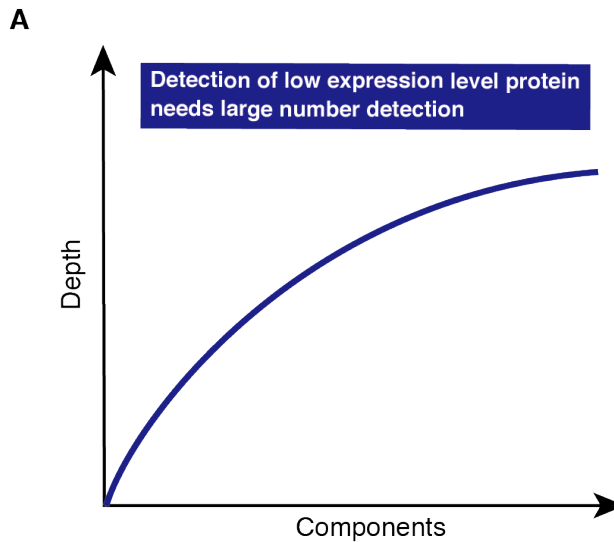
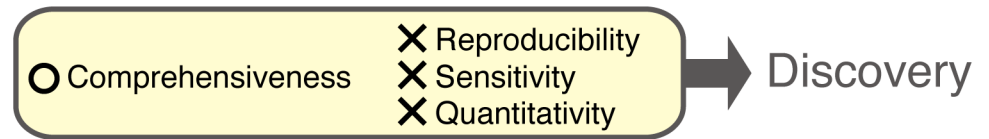
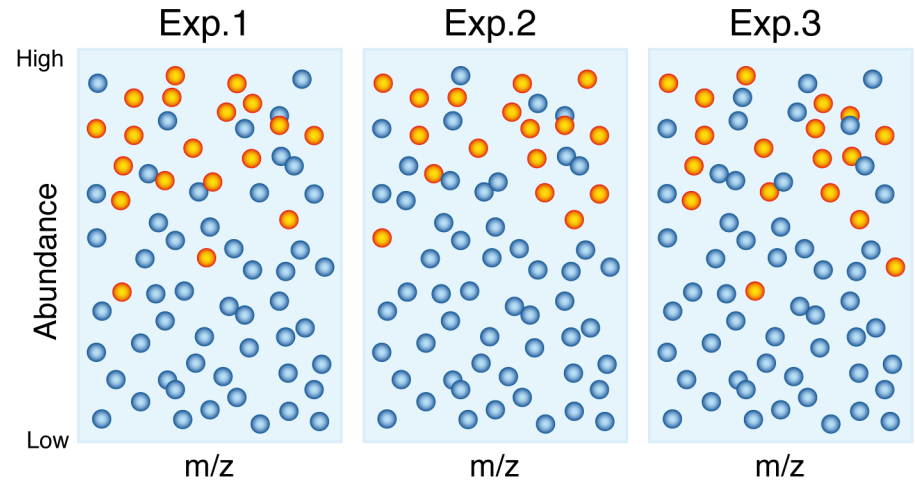
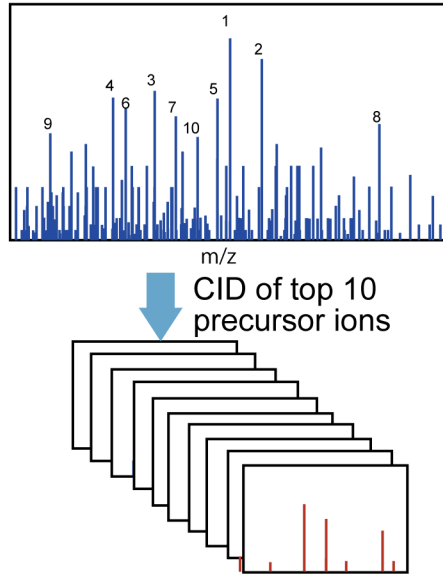
**“Non-targeted”
(DDA)**



- Start without any prior knowledge
- Simple enumeration: grasp entire structure of proteome
- Relative comparison among small number of samples
- Easy to perform experiments
- Availability of various tools for data analysis

Discovery proteomics

**“Non-targeted”
(DDA)**



プロテオミクスにおける技術選択

◆ 結合タンパク質解析

- Overexpression or endogenous ?
- Single purify or tandem purify?
- In-solution digestion or in-gel digestion?

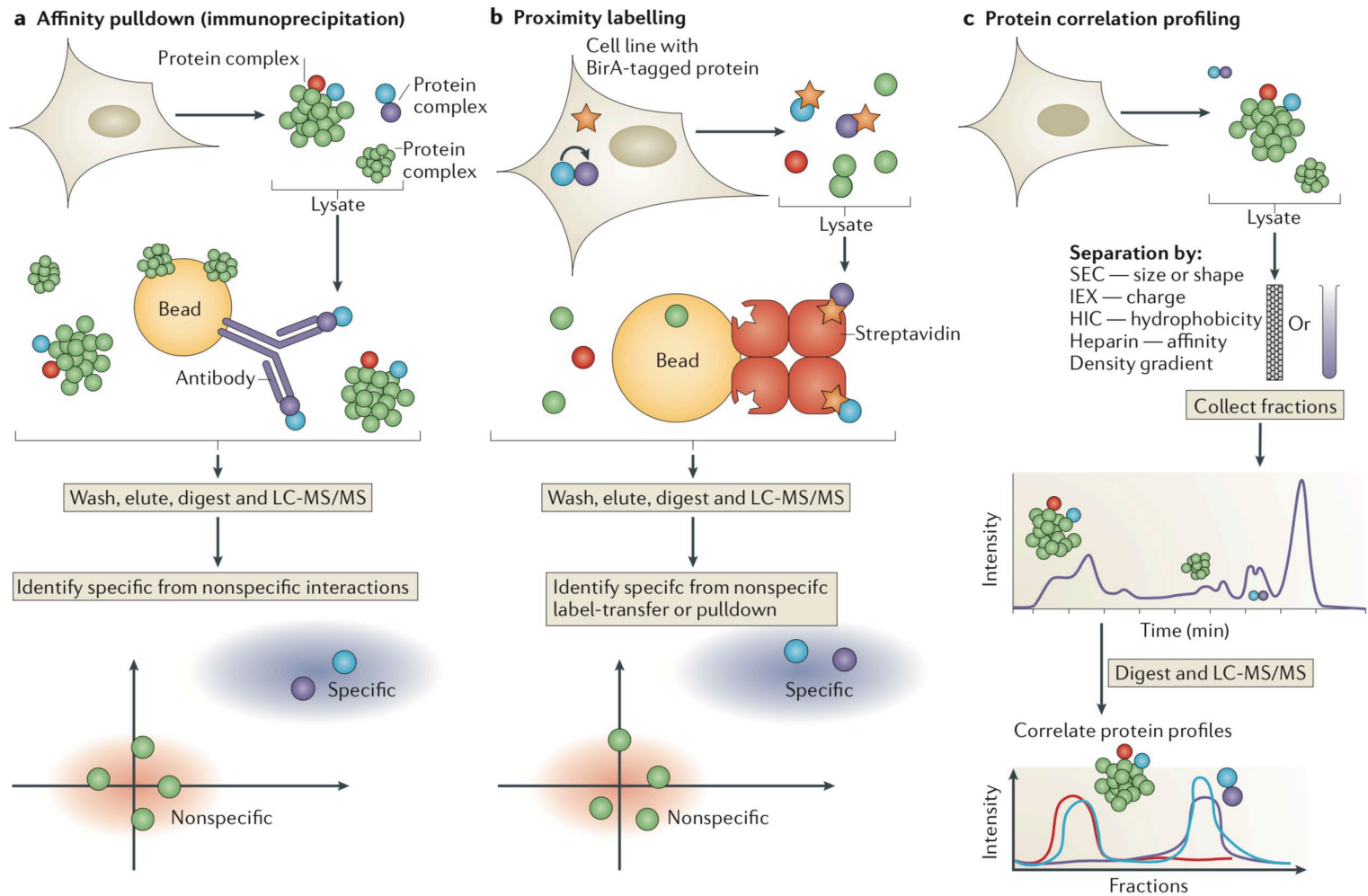
◆ 発現量解析(定量解析)

- Sample number or protein number?
- Non-targeted or targeted ?
- Label or label-free quantification?
- Isotopic or isobaric labeling?

◆ 翻訳後修飾

- Comprehensive or specific protein?
- Phosphorylation: IMAC or TiO_2 ?

タンパク質間相互作用解析法



Q：相互作用解析のゴールドスタンダードは？

FLAG-tagをつけたタンパク質を発現
(タグの位置は要検討)

色々試したけど
これが一番

時間は短く。ラ
イゼート濃度も2
mg/ml以下に

↓
Anti-FLAG抗体で精製

↓
FLAGペプチドで競合溶出

面倒だけど効果的

SDSで溶出する
のは禁忌

↙
電気泳動で展開

↘
In-solution digestion

↓
In-gel digestion

ハイスループット

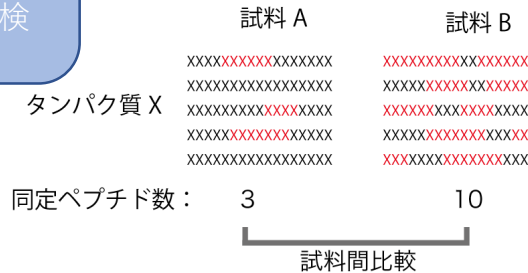
直接MSに入れ
るので量や化学
ノイズに注意

Baitを除去できる
LC-MSの設定にあまり依存しない

LC-MSによる定量プロテオーム解析法

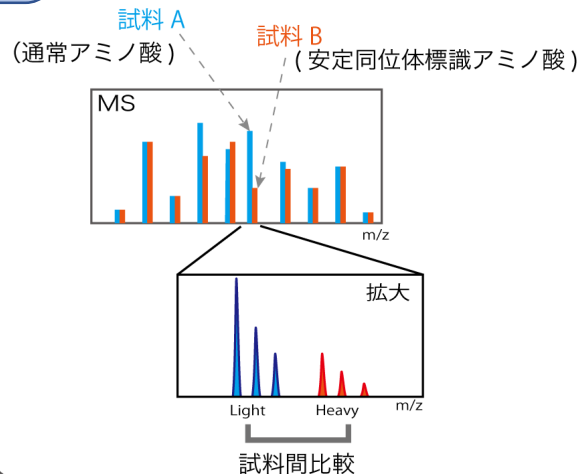
- 簡単
- 装置を選ばない
- 差が大きい時に検出可能
- 微細な変化は検出不能

スペクトルカウント法

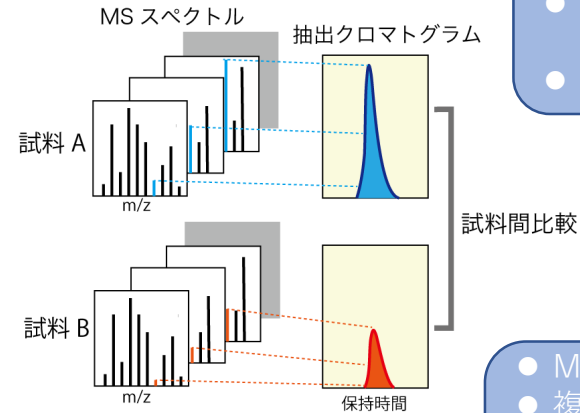


- 高質量精度・高分解能が必要
- 培養が必要。細胞を選ぶ

in vivo 標識法



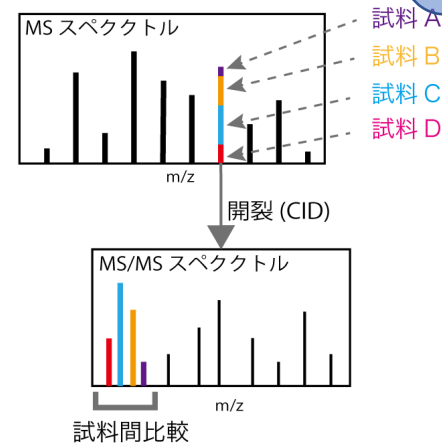
ラベルフリー定量法



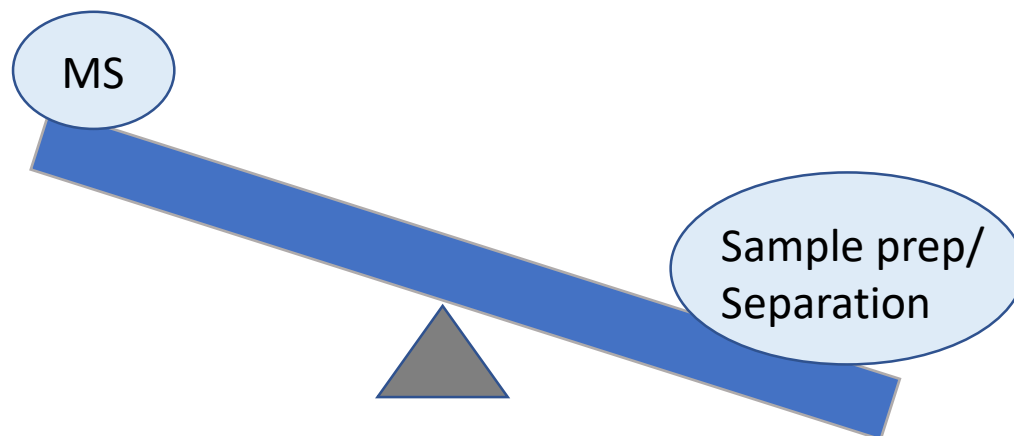
- 質量精度・分解能が必要
- 高いLCの再現性が必要
- 試料調製が簡単

- Multiplex解析
- 複雑性が定量性に影響
- ラベル効率の評価必要
- 同定数が低減

in vitro 標識法 (Isobaric-tag 標識)



Q: いかにしてタンパク質同定数を増やすか？



- 質量分析のパラメーターは多くの場合、同定数に大きな影響はない。
- メンテナンスとQCが重要。
- 最新装置での同定数向上は見込める。

- 事前分画やLCの分離能は同定数に直結。
- 微量同定の場合ではshort gradient
- 消化効率。

有効な事前分画法

サンプル内の複雑性が下がれば質量分析計の性能は引き出せる！！

◆Subcellular fractionation

機能的な意義が大きい。定量的に分画するのが難しい。クロスコンタミが多い。

◆SDS-PAGE

特別な装置は不要。作業が面倒。時間がかかる。
酸化修飾など入りやすい

◆Basic reverse phase

設備が必要。再現性が完全ではない。

DDAショットガンプロテオミクスの 定量技術の利点・欠点

	Nonlabel	SILAC	Isobaric-tag
同定数：	+++ (+++)	++ (+++)	+
定量の信頼性：	+ (++)	+++ (+++)	++
スループット：	+	++	+++

() はSWATH/DIAの場合

今の所、完璧な方法はない。目的に応じて使い分けが必要。

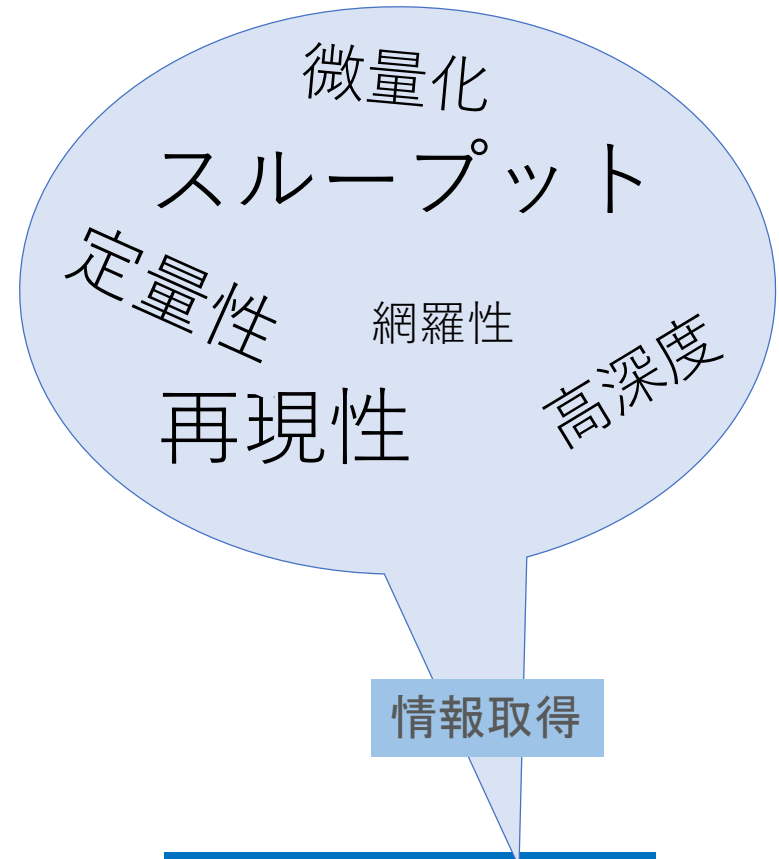
そろそろ、真剣にプロテオーム解析のあり方を考える時期では？

- タンパク質でしか得られない情報とは？
- 網羅性？スループット？再現性？
- データドリブン？仮説ドリブン？

プロテオミクスに何を求めるのか？

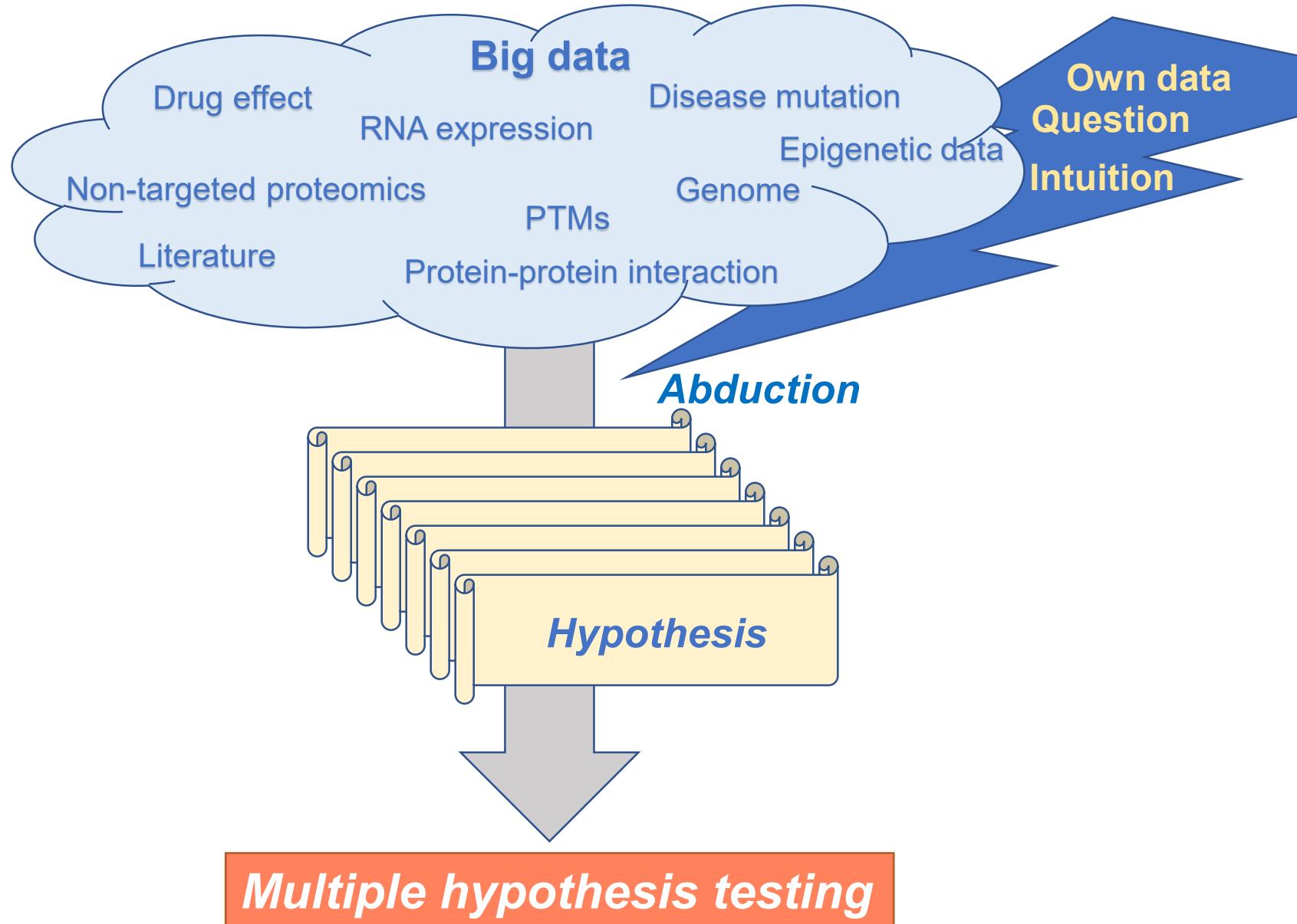


発見の生物学



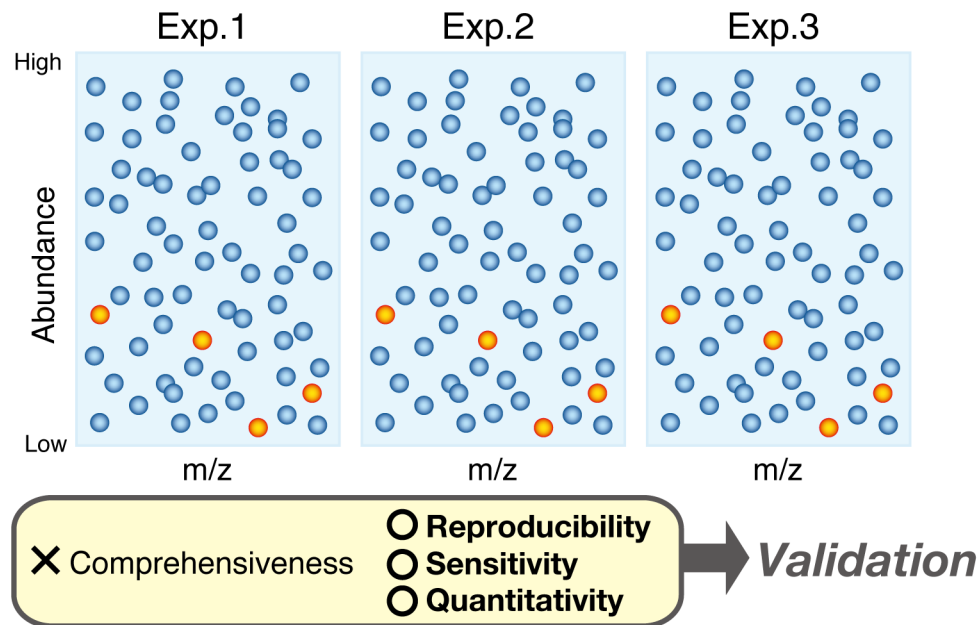
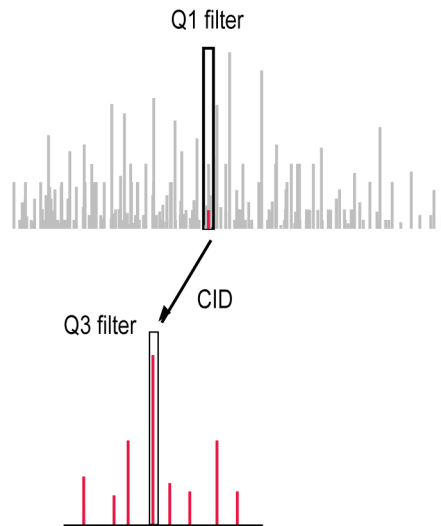
理解の生物学

Multiple-hypothesis arose from big data



Targeted proteomics

***“Targeted”
(MRM)***



- Start with specific question
- Quantification across various samples
- Absolute quantification
- High data consistency
- ◆ Difficulty in method development
- ◆ Need for manual inspection of chromatogram

Q. MRMでのペプチド定量のコツは？

- 内部標準が絶対的に必要

定量目的だけでなくピーク検出のためにも必須

- 高感度ペプチドの選定が必須

同じタンパク質由来でもペプチドによって100倍以上感度が違うことがある
さらに感度が必要なら個別に最適化 (CE, CXPなど)

- 酵素消化をケアする

Freshなtrypsinを使う。消化条件の再検討。MCや過切断はないか？

- ピーク形状が悪い

親水性が高いペプチドは2回ピークが現れたりする：カラムの不具合やデッドボリュームの存在
疎水性が高いペプチドはピークがブロードになりがち。充填剤径を小さく(2 umなど) にすると改善
することがある

Comprehensive targeted proteomics

Selection of sensitive and specific peptide for MRM

Quantity known internal standard for each peptide



**Genome wide recombinant protein library,
“in vitro proteome”**

I. Factory of “In vitro proteome”

Human full length cDNA library



↓ In vitro synthesis

Recombinant proteins
> 25,000 proteins



↓ Digestion

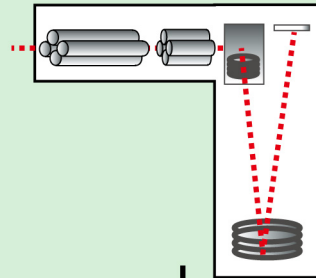
Peptide library



Peptides

II. Discovery (identification) step

QqTOF
(TTOF5600)



Peptide ID

Proteotypic peptides database

> 100,000 peptides

MS (Q1), MS/MS (Q3),
retention time, and pI

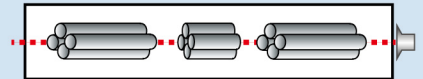
Info

III. Target (quantification) step

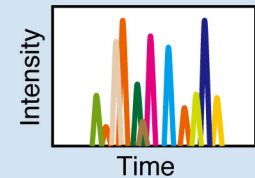
Target sample + Recombinant

↓ mTRAQ labelling
Digestion

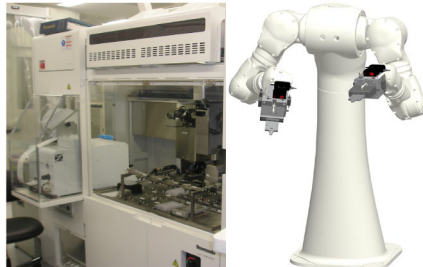
Triple stage quadrupole
(QTRAP5500)



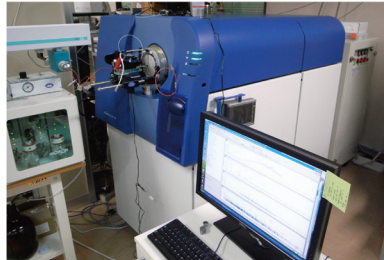
MRM chromatogram



Absolute protein quantification



Protein Synthesizing Robot

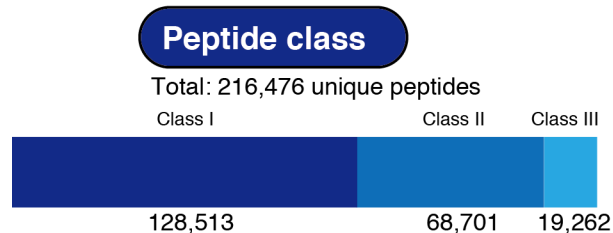
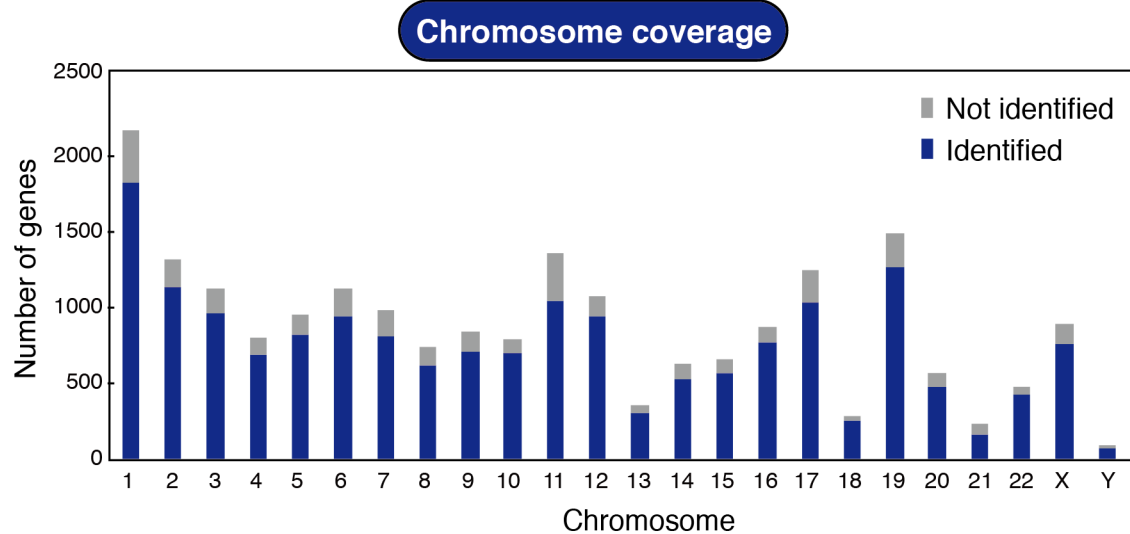


TTOF5600

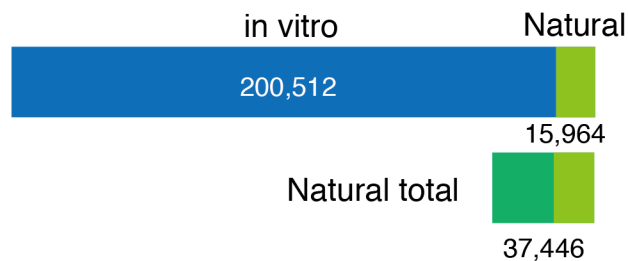


QTRAP5500

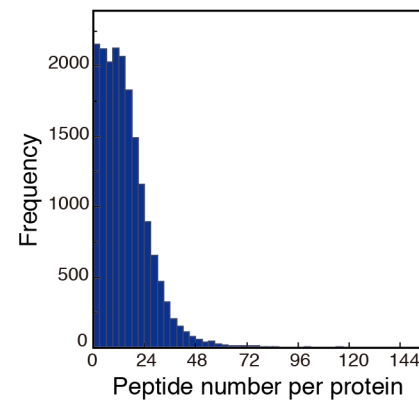
Statistics of iMPAQT database



Class I: protein-specific peptide
Class II: gene-specific peptide
Class III: razor peptide



Peptide number per protein





iMPAQT

in vitro proteome-assisted MRM for Protein Absolute QuanTification

[Top]

Search



iMPAQT-mTRAQ



iMPAQT-NL
Partial version

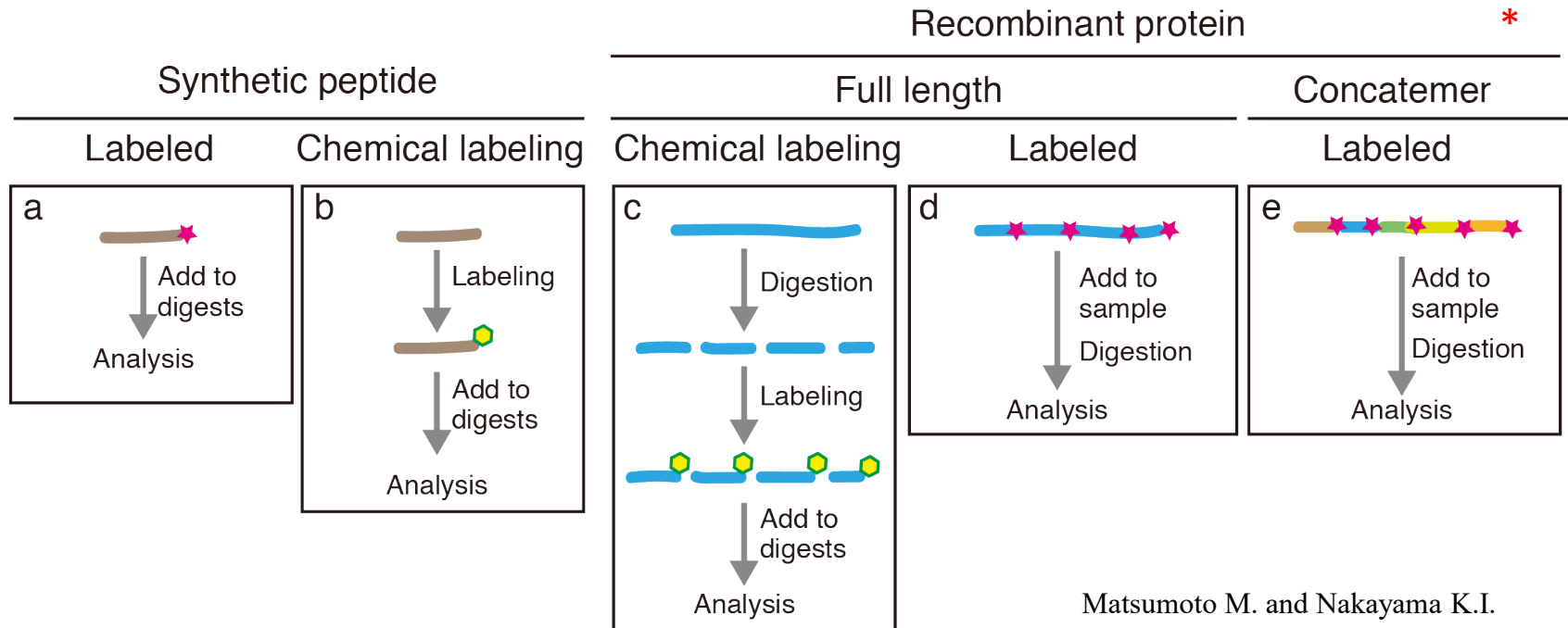
News

Date	Comment
2017-02-28	<p>News and Views about iMPAQT</p> <hr/> <p><i>Synthetic human proteomes for accelerating protein research.</i> <i>Nature Methods</i>, 14: 240-2, 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4191</p>
2016-12-26	<p>iMPAQT's first paper published in Nature Methods</p> <hr/> <p><i>A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome.</i> <i>Nature Methods</i>, 14: 251-8, 2017. DOI: 10.1038/nmeth.4116</p> <p><i>"Targeted proteomics approaches are of value for deep and accurate quantification of protein abundance. Extending such methods to quantify large numbers of proteins requires the construction of predefined targeted assays. We developed a targeted proteomics platform-in vitro proteome-assisted multiple reaction monitoring (MRM) for protein absolute quantification (iMPAQT)-by using >18,000 human recombinant proteins, thus enabling protein absolute quantification on a genome-wide scale. Our platform comprises experimentally confirmed MRM assays of mass tag (mTRAQ)-labeled peptides to allow for rapid and straightforward measurement of the absolute abundance of predefined sets of proteins by mass spectrometry. We applied iMPAQT to delineate the quantitative metabolic landscape of normal and transformed human fibroblasts. Oncogenic transformation gave rise to relatively small but global changes in metabolic pathways resulting in aerobic glycolysis (Warburg effect) and increased rates of macromolecule synthesis. iMPAQT should facilitate quantitative biology studies based on protein abundance measurements."</i></p>
2016-12-25	<p>iMPAQT-quant ver.0.9.0.0 released</p>

Human synthetic proteome

	Material	Label	Internal std.	Final information
SRM Atlas (Kusebauch et al, Cell , 2016)	Synthetic peptide (~170 k peptides)	No	No	<ul style="list-style-type: none">• MS/MS spectra• MRM assays
iMPAQT (Matsumoto et al, Nature Methods , 2017)	Recombinant protein (~18000 proteins/ ~210 k peptides)	Chemical	Yes	<ul style="list-style-type: none">• MS/MS spectra• MRM assays
ProteomeTools (Zolg et al, Nature Methods , 2017)	Synthetic peptide (~330 k peptides)	No	No	<ul style="list-style-type: none">• MS/MS spectra• Various modes

多様な内部標準ペプチド取得法



Matsumoto M. and Nakayama K.I.
Curr. Opin. Biotech. 2018

コスト

¥80000/peptide

手間

¥1200/peptide

*Concatemer approach was originally developed by two independent groups.
Beynon, R.J., et al. *Nat. Methods*, 2005, 2: 587-589.
Kito, K., et al. *J. Proteome Res*, 2007, 6: 792-800.

結語

- I. 網羅性とスループットの兼ね合いを意識することが重要
- II. 定量法の選択は重要。それぞれ一長一短あり。
- III. 質量分析計自体の最適化より周辺技術の改良が良い結果をもたらすことが多い。
- IV. 内部標準ペプチドの利用が定量解析では極めて有効。