

ナノスケール液体クロマトグラフィー/  
イオンモビリティスペクトロメトリー/タンデム質量  
分析によるリン酸化ペプチド大規模解析に関する研究

2021

小 形 公 亮



# 目次

略語表.....	3
緒言.....	7
第一章 逆相 LC/MS におけるリン酸化ペプチドと 非リン酸化ペプチドの保持順序の逆転 .....	11
第一節 序.....	11
第二節 リン酸化ペプチドの逆相クロマトグラフィー保持挙動解析.....	13
第三節 リン酸化ペプチドの逆相クロマトグラフィー分離モデル構築.....	17
第四節 結語.....	20
第二章 CoolTip:リン酸化ペプチドを 捕捉するための低温固相抽出マイクロカラム .....	21
第一節 序.....	21
第二節 冷却 StageTip の開発.....	23
第三節 冷却 StageTip はペプチドの定量精度を改善する .....	30
第四節 結語.....	33
第三章 多重定量リン酸化プロテオミクスのための ナノスケール固相同重体化学標識 .....	35
第一節 序.....	35
第二節 TMT 標識は TiO <sub>2</sub> クロマトグラフィーによる リン酸化ペプチド濃縮を阻害する .....	37
第三節 ナノグラム規模固相 TMT 標識プロトコルの開発 .....	41
第四節 セルメチニブを投与した HeLa 細胞のリン酸化プロテオーム解析.....	49
第五節 同重体標識シグナル増幅とリン酸化モチーフを利用する チロシンリン酸化プロテオミクス .....	52
第六節 結語.....	56
第四章 捕捉型イオンモビリティスペクトロメトリーによる分離空間の拡大に 基づくプロテオミクス LC/MS/MS における同重体標識定量精度の向上..	57
第一節 序.....	57
第二節 TMT プロテオミクスにおける TIMS 分離場の特性.....	59
第三節 TIMS 分離場は非標的イオンの混入を抑制する .....	62
第四節 TIMS 分離場は TMT の定量真度を向上させる .....	64
第五節 結語.....	66

第五章	イオンモビリティスペクトロメトリーにおいて	
	リン酸化修飾がペプチドイオンの衝突断面積に及ぼす影響	.....67
第一節	序	.....67
第二節	リン酸化ペプチドと非修飾ペプチドの衝突断面積データの収集	.....69
第三節	リン酸化/非修飾ペプチドペアの衝突断面積の差	.....73
第四節	リン酸化ペプチドの特性と衝突断面積変化	.....76
第五節	結語	.....82
結論		.....83
実験の部		.....85
	実験材料	.....85
	装置および測定条件	.....86
	実験手法	.....90
発表論文		.....99
謝辞		.....101
参考文献		.....103

## 略語表

2D-LC :	二次元液体クロマトグラフィー two-dimensional liquid chromatography
AA :	酢酸 acetic acid
ACN :	アセトニトリル acetonitrile
AGC :	自動利得制御 auto gain control
BASIL :	同重体標識シグナル増幅 boosting to amplify signal with isobaric labeling
CCS :	衝突断面積 collision cross section
CID :	衝突誘起解離 collision-induced dissociation
DDA :	データ依存的取得法 data-dependent acquisition
DIA :	データ非依存的取得法 data-independent acquisition
D-MEM :	ダルベッコ改変イーグル培地 Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO :	ジメチルスルホキシド dimethyl sulfoxide
DTT :	ジチオトレイトール dithiothreitol
ESI :	エレクトロスプレーイオン化 electrospray ionization

FA :	ギ酸 formic acid
FAIMS :	電界非対称型イオンモビリティスペクトロメトリー field assymetric waveform ion mobility spectrometry
FWHM :	半値全幅 full width at half maximum
GRAVY :	疎水親水度の総平均 grand average of hydrophaticity
HCD :	高エネルギー衝突解離 higher-energy collisional dissociation
HFBA :	ヘプタフルオロ酪酸 heptafluorobutyric acid
HPLC :	高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography
IAA :	ヨードアセトアミド iodoacetamide
IMS :	イオンモビリティスペクトロメトリー ion mobility spectrometry
ISP :	固有サイズパラメーター intrinsic size parameter
IT :	イオントラップ ion trap
IQR :	四分位範囲 internal quartile range
KSEA :	キナーゼ基質エンリッチメント解析 kinase substrate enrichment analysis
LSS :	線形溶媒強度 linear solvent strength
MIT :	最大注入時間 maximum injection time

MS :	質量分析 mass spectrometry
MS/MS :	タンデム質量分析 tandem mass spectrometry
NCE :	規格化衝突エネルギー normalized collision energy
OT :	オービトラップ orbitrap
PASEF :	並行集積－直列断片化 parallel-accumulation-serial-fragmentation
PBS :	生理食塩水 phosphate buffered saline
PC :	ピークキャパシテイ peak capacity
PGC :	多孔性グラファイトカーボン porous graphitic carbon
PTS :	相間移動可溶化剤 phase-transfer surfactant
RPLC :	逆相液体クロマトグラフィー reversed phase liquid chromatography
SDB :	ポリスチレンジビニルベンゼン poly(styrene-co-divinylbenzene)
SDC :	デオキシコール酸ナトリウム sodium deoxycholate
SLS :	<i>N</i> -ラウロイルサルコシン酸ナトリウム sodium <i>N</i> -lauroylsarcosinate
SPE :	固相抽出 solid phase extraction
SPS-MS <sup>3</sup> :	同時プリカーサー選択－MS <sup>3</sup> synchronous precursor selection-MS <sup>3</sup>

StageTip :	ステージチップ stop-and-go extraction tip
TFA :	トリフルオロ酢酸 trifluoroacetic acid
TIMS :	捕捉型イオンモビリティスペクトロメトリー trapped ion mobility spectrometry
TMT :	タンデムマスタグ tandem mass tag
TWIMS :	進行波型イオンモビリティスペクトロメトリー traveling wave ion mobility spectrometry
TOF :	飛行時間型 time-of-flight
UHPLC :	超高压液体クロマトグラフィー ultra high-pressure liquid chromatography



## 緒 言

すべての生物は細胞から構成されており、それぞれの細胞には生命維持に必要な情報を持つ遺伝子の集合体であるゲノムが存在する。多細胞生物であるヒトは  $10^{13}$  個以上の細胞から構成されており<sup>1</sup>、一部の例外を除きすべての細胞が同一のゲノムを有している。しかし、実際の各細胞の形態や機能は組織によって大きく異なる。細胞の多様性をつかさどる主要な因子は、遺伝子から転写・翻訳されるタンパク質である。タンパク質は、他のタンパク質や生体分子と物理的・機能的に相互作用しながら、細胞内の特定の時間・場所でその機能を発揮し、「プロテオーム (proteome)」と呼ばれる高度に構造化された実体を形成する<sup>2</sup>。ヒトゲノムには約 2 万のタンパク質コード遺伝子が含まれているが、ヒトプロテオームははるかに複雑であり、ヒトタンパク質の総種数は数百万に及びうると推定されている<sup>3</sup>。タンパク質種の増大の主要な要因の 1 つは、その翻訳後修飾である。翻訳されたタンパク質には、そのポリペプチド鎖の特定の官能基に様々な化学修飾が施される。翻訳後修飾は、1 つの遺伝子産物に対して、異なる亜種である「プロテオフォーム (proteoform)」の数を指数関数的に増加させるため、プロテオームを著しく複雑にする<sup>3,4</sup>。このようなプロテオームとその構造、機能、動態の完全かつ定量的な記述と理解は、生物学の中心かつ基本的な課題であり、それらを扱う「プロテオミクス (proteomics)」は比較的新しい学問分野として現在も注目されている<sup>2,5</sup>。プロテオミクス研究では、生体内に存在するすべてのタンパク質を同定し、正確に定量するだけでなく、ポリペプチド鎖上の修飾アミノ酸の位置と種類を系統的に同定する方法論を扱う。近年では、タンパク質複合体のサブユニットの組成、化学量論、トポロジーの決定にも利用することができる<sup>2</sup>。

プロテオミクスにおいて最も汎用される手法は、トリプシン等のタンパク質消化酵素でペプチドへと消化したタンパク質試料を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とタンデム質量分析 (MS/MS) を組み合わせた LC/MS/MS により網羅的に測定する、ショットガンプロテオミクスである。近年の質量分析計の目覚ましい高感度化と高速化<sup>6-9</sup>に加え、 $2\ \mu\text{m}$  以下のシリカ粒子を充填した UHPLC カラム<sup>10-12</sup>、モノリス型シリカカラム<sup>13-15</sup>、ピラーアレイカラム<sup>16,17</sup>の使用などによる LC の性能向上によりペプチドの高い分離効率を得ることが可能になったため、ヒト細胞のような複雑な試料についても次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析に匹敵する深度でのタンパク質の同定と定量が可能になった<sup>18</sup>。しかし、ショットガンプロテオミクスの基本的な考え方は、20 年以上前から変わっていない<sup>19,20</sup>。つまり、試料から抽出したタ

ンパク質群をより小さく扱いやすいペプチドに消化し、LCで分離した後、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) により液相から気相に放出させ MS に導入する。プリカーサーイオン群の  $m/z$  を記録したのち、それぞれのイオンを四重極マスアナライザーで分離し、衝突誘起解離 (CID) などによる断片化で得られたプロダクトイオンを測定して MS/MS スペクトルを得る。これらの MS/MS スペクトルはゲノム情報を基に理論的に生成されたデータベースに対して検索・照合され、スコア化の後、確からしく同定されたペプチド、ひいてはタンパク質のリストを生成するために使用される (図 1)。生体内のすべてのタンパク質を計測する真の網羅的なプロテオミクスを実現するためには、上述の工程すべてに解決すべき課題が残されている。すなわち、試料抽出工程ではプロテオームが完全に抽出される保証はなく、またプロテオームのその不可分な複雑性により存在する試料成分を完全に分離することは困難である。質量分析計では全く同一の  $m/z$  をもつイオンを選別することができず、さらにその検出ダイナミックレンジがプロテオーム試料の濃度ダイナミックレンジに達しないため、試料中に存在しながらピークとして検出できない成分もある。加えて、配列データベースに登録されていない分子種を同定することはできず、予期しないタンパク質や修飾タンパク質を同定するのは困難である。

生命現象の理解のためには、プロテオーム試料の各タンパク質は同定されるのみならず、定量的に測定される必要がある。定量プロテオミクスでは、質量分析で得られたそれぞれのペプチドの MS シグナルを基に相対比較定量を行う。定量プロテオミクスには安定同位体標識を用いた定量法<sup>21, 22</sup>や非標識定量法<sup>23, 24</sup>などさまざまな手法があるが、近年では、試料の多重化、高精度、高スループットな定量を実現することが可能な同重体化学修飾試薬を用いた定量プロテオミクスが注目を集めている<sup>25</sup>。同重体標識法では、多重化された試料中の全く同一のペプチドプリカーサーイオンから、断片化により生成される質量の異なるレポーターイオンをモニターすることで同時並行の定量を可能にする<sup>26</sup>。しかし、この方法で得られる定量データの真度は、標的となるプリカーサーイオンの四重極分離窓に他の非標的イオンが混入することで低下する。そのため、MS<sup>3</sup> スキャン<sup>27, 28</sup>とリアルタイムサーチ法<sup>29</sup>の組み合わせやイオンモビリティスペクトロメトリー (IMS) の導入<sup>30, 31</sup>など、いくつかのアプローチによって夾雑ピークの混入の低減が図られてきたが、十分な結果は得られておらず、更なる技術開発が求められている。

タンパク質リン酸化に代表される翻訳後修飾の包括的解析でも、LC/MS/MS が中心的な役割を担っている。セリン・スレオニン・チロシン残基のヒドロキシ基が受けるリン酸化修飾は、細胞の成長、代謝、アポトーシスなど、さまざまな細胞機能を制御する細胞内シグナル伝達経路の重要な因子であり、刺激に応じてダイナミックに変動

シタンパク質機能を制御する<sup>32-37</sup>。ヒトのプロテオームにおけるリン酸化セリン (pS)、リン酸化スレオニン (pT)、およびリン酸化チロシン (pY) 部位の存在比は、古典的な<sup>32</sup>Pによる放射性同位体標識の方法に基づいて、90:10:0.05と推定されている<sup>38</sup>。近年のリン酸化プロテオミクスの技術進歩により、生体試料から数万のリン酸化ペプチドを同定することが可能になった<sup>39-41</sup>。これには固定化された金属イオンや金属酸化粒子を用いた金属アフィニティークロマトグラフィーにより、リン酸化ペプチドを選択的に濃縮できるようになったことが大きく貢献している<sup>42-46</sup>。しかしリン酸化プロテオミクスには前述のプロテオミクスにおける問題点に加え、リン酸化ペプチド解析に特有の問題点があり、解析はより困難となる。まず、プロテオーム試料に含まれるリン酸化ペプチド量は重量比で1%未満と存在量が少なく、検出感度の良い手法が求められる。また、リン酸化ペプチドには同一のペプチド配列の異なる部位にリン酸化修飾を持つ“位置異性体”が存在するが、これら異性体は全く同一の質量をもつためシングルステージ質量分析では区別がつかない。化学的物性が近しいため分離することも容易ではない。リン酸化ペプチドを同定する場合にはこれら異性体を分離した上、さらに修飾部位を断定するために十分なプロダクトイオンを検出する必要がある。そして、一般的にLC/MS/MS分析では同定されるリン酸化ペプチドが試料中のより豊富なものに偏るため、低濃度のpYペプチドについては、複雑なリン酸化プロテオーム中に存在する高濃度のpSおよびpTペプチドの存在によるイオン化抑制によって質量分析での検出が困難となる。金属アフィニティークロマトグラフィーとpY抗体を用いた抗体アフィニティー精製<sup>47</sup>や、最近開発されたSH2ドメイン由来のpYスーパーバインダー<sup>48,49</sup>を組み合わせることで、pYペプチドの同定率が向上することが報告されている。また、様々な経路のタンパク質に由来するリン酸化ペプチドやチロシンキナーゼに由来するpYペプチドを同定・定量するために、複数の抗体を用いた抗体アフィニティー精製法が開発されている<sup>50</sup>。しかしながら、チロシンリン酸化プロテオームを深く解析するためには、一般的に大量のタンパク質(1~10 mg)が必要となる。

以上の背景を踏まえて、本研究では定量リン酸化プロテオミクスの高感度化実現のために、リン酸化ペプチドの逆相クロマトグラフィーにおける保持挙動の解析(第一章)、プロテオーム試料の精製工程における回収率向上のための基盤技術開発(第二章)、多重安定同位体標識法の高感度化とそのリン酸化プロテオミクスへの応用(第三章)、捕捉型イオンモビリティスペクトロメトリーによる多重安定同位体標識の定量真度の向上(第四章)、およびリン酸化ペプチドイオンのイオンモビリティスペクトロメトリー分離挙動の解析(第五章)を行った。

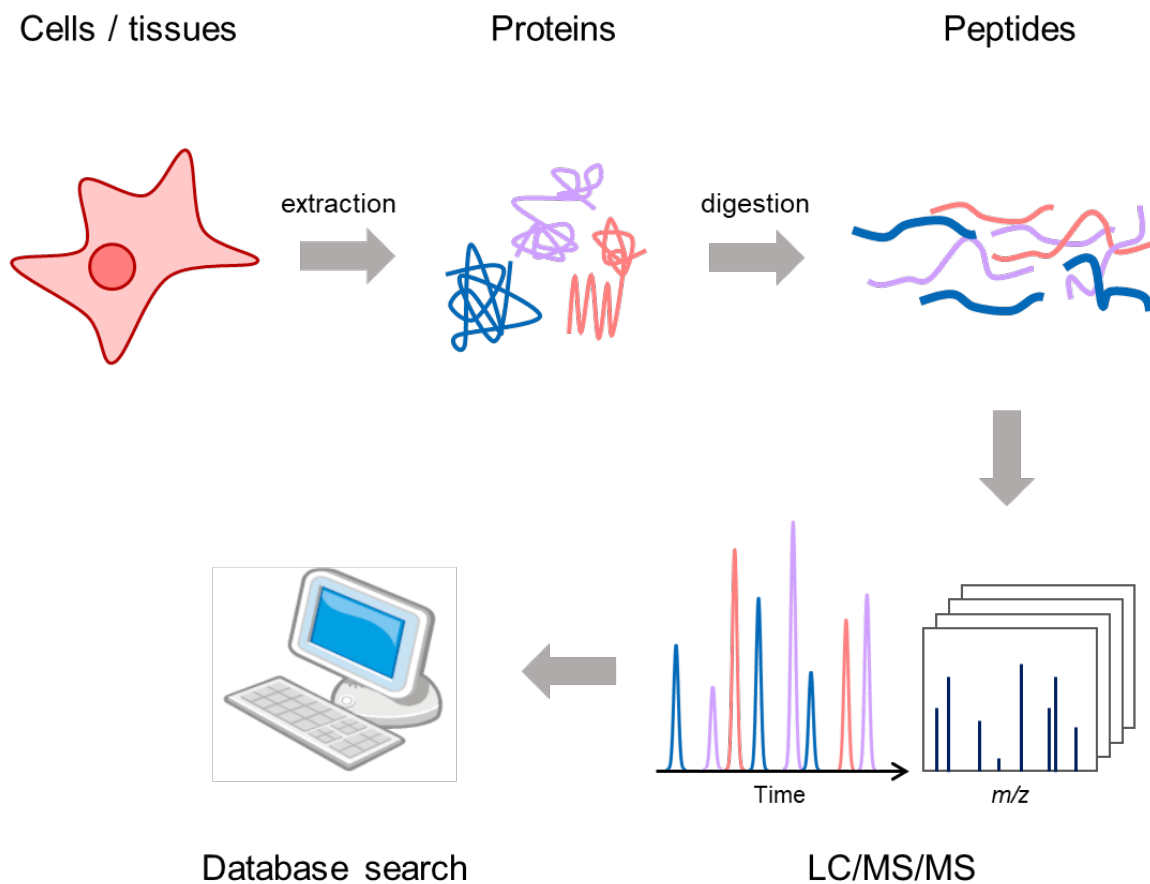


図 1. ショットガンプロテオミクスのワークフロー。細胞あるいは組織試料から抽出したタンパク質をトリプシン等の酵素によりペプチド断片に消化し、LC/MS/MS で測定する。得られた MS/MS スペクトルから、データベース検索によりペプチド・タンパク質を同定する。

## 第一章

### 逆相 LC/MS におけるリン酸化ペプチドと

#### 非リン酸化ペプチドの保持順序の逆転

##### 第一節 序

LC/MS を用いたショットガンプロテオミクスにおいて、逆相クロマトグラフィー (RPLC) でのペプチド保持時間はペプチド同定のための重要な情報であり、配列決定の信頼性を高めるのに役立っている<sup>51</sup>。しかし、その有用性を最大限に引き出すためには、ペプチドの保持時間を事前に精度よく予測する必要がある。近年、LC/MS/MS による大規模なデータセットが利用できるようになったことで、ペプチドの保持時間予測モデルの精度は飛躍的に向上している<sup>52</sup>。しかし、翻訳後修飾ペプチドの保持時間予測は、RPLC における修飾ペプチドの保持メカニズムが十分に理解されていないため、依然として大きな課題となっている。

ペプチドのセリン・スレオニン・チロシン残基上のヒドロキシ基に対しリン酸基がエステル結合したリン酸化ペプチドは、リン酸基が親水性であることから、リン酸化されていないペプチドよりも RPLC では早く溶出すると考えられてきた。実際、中性条件下<sup>53</sup>、またはイオンペア試薬としてパーフルオロアルカン酸 (トリフルオロ酢酸 (TFA) など) を用いた酸性条件下<sup>54</sup> では、リン酸化ペプチドはその非リン酸化体と比較して C18 逆相固定相への保持が弱く、早く溶出することが報告されている。しかし、RPLC/MS では移動相に不揮発性の塩が使用できず、また TFA はペプチドのイオン化を抑制することが知られているため、ギ酸 (FA) や酢酸 (AA) など、TFA よりも弱い酸がイオンペア試薬として用いられる。LC/MS でリン酸化ペプチドが分析されるようになるにしたがい、このような酢酸やギ酸条件下では、リン酸化ペプチドは対応する非リン酸化体よりもむしろ強く保持されることが明らかとなってきた<sup>55-57</sup>。最近の 10 万種以上の合成ペプチドを用いた大規模な解析でも、ギ酸移動相条件下でこの観察結果が支持されている<sup>58</sup>。これまでのところ、この保持挙動を定量的に説明する保持モデルは提案されておらず<sup>59</sup>、このような変化の原因となる根本的なメカニズムを解明する必要がある。

そこで、RPLC におけるリン酸化ペプチドの保持挙動を解明するために、固定相の細孔径や疎水性の異なるシリカカラムを AA や TFA などのイオンペア試薬と組み合わせ、リン酸化ペプチドと対応する非リン酸化ペプチドの保持挙動を解析した。リン酸化ペプチドの保持時間を、オフラインの RPLC 分画法と nanoLC/MS/MS を用いて、対

応する非リン酸化体と合わせて系統的に解析した。また、上記 2D-LC/MS/MS で得られた結果を確認するために、C4 または C18 キャピラリーカラムを MS に直接接続して、リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの保持挙動を測定した。

## 第二節 リン酸化ペプチドの逆相クロマトグラフィー保持挙動解析

まず、HeLa 細胞抽出物由来のタンパク質から得られたトリプシン消化リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドを、C18 シリカカラムにてそれぞれ分画し、その溶出挙動を解析した。イオンペア試薬には AA または TFA を用いた。充填剤の細孔径がペプチドの保持挙動に影響することを避けるため、無孔性シリカゲル (Eprogen NPS-ODS-I) を選択した。2 分ごとに画分を回収し、各画分からリン酸化ペプチドを濃縮した場合としない場合のそれぞれについて nanoLC/MS/MS で分析した結果、AA と TFA の条件でそれぞれ 166 組と 111 組のリン酸化/非リン酸化ペプチドペアが同定された。各画分の平均保持時間差を溶出 ACN 濃度に換算し表すと (リン酸化ペプチドの溶出 ACN 濃度 - 非リン酸化ペプチドの溶出 ACN 濃度)、AA では +0.87% ACN、TFA では -0.48% ACN となった (図 2A)。つまり、AA の代わりに TFA を用いると、無孔性 C18-シリカカラムにおけるリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの保持順序が逆転した。これは、孔径 11 nm と 20 nm の C18 シリカゲルを用いた既報と一致しており<sup>59</sup>、リン酸化ペプチドとその非リン酸化ペプチドの保持順序を制御する主要な因子が充填剤の細孔径ではないことを示している。

さらにこの現象のメカニズムを調べるために、2 種類の C4 シリカカラムと AA、TFA の 2 種類のイオンペア試薬を用いて上述の試料を分画し、nanoLC/MS/MS を行った。その結果、AA と TFA の分画実験から、それぞれ 213 組と 293 組 (GL Sciences Inertsil WP300 C4、GLS-C4)、89 組と 124 組 (YMC Protein-RP、YMC-C4) のリン酸化/非リン酸化ペプチドがそれぞれ同定された。AA の場合、C4 におけるリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの保持率の差はゼロに近い (GLS-C4)、あるいはマイナス (YMC-C4) であり、C18 に比べて非リン酸化ペプチドの保持率が相対的に強くなっていることがわかった (図 2B,C)。この現象は TFA の場合も同様で、リン酸化ペプチドの相対的な保持の弱さがさらに強調されていた。これらの結果から、AA と TFA の両方において、C4 カラムでは C18 カラムに比べてリン酸化ペプチドの保持が弱い傾向にあることが見出された。また、二種の C4 カラムの両方で、AA の代わりに TFA を使用すると非リン酸化ペプチドの保持が強くなるという C18 カラムと同様の傾向が認められたが、YMC-C4 カラムではこの効果はそれほど大きくなかった。なお、リン酸化セリン、リン酸化スレオニン、リン酸化チロシンを含むペプチドの保持挙動については、今回の実験結果では違いは見られなかった。特に、今回の試料ではチロシンリン酸化ペプチドの含有量が 1~2% 程度であったため、これらリン酸化修飾アミノ酸の違いによる保持挙動の違いについてはさらなるデータの取得が必要であると考えられた。

さらに、YMC-C4 および Reprisil-C18 を充填した自家製キャピラリーカラム (内径 0.1 mm) を用いたオンライン nanoLC/MS/MS により、C4 および C18 カラムの AA に

よる保持順序の逆転を再確認した。キャピラリーC4 カラムの分離効率はそれほど高くなかったため、表 1 に示すように両実験条件で共通に同定されたのは 5 組のリン酸化ペプチドと非修飾ペプチドのみであったが、前述のオフライン分画実験と同様の保持順序の逆転が 4 組のペプチドペアで見られた。一方、KQPPVSPGTALVGSQK と KQPPVpSPGTALVGSQK の保持順序は C18 と C4 で逆転しなかったが、C4 ではリン酸化体と非リン酸化体の保持時間差がより小さくなる傾向が見られ、オフライン分画実験と矛盾しない結果が得られた。



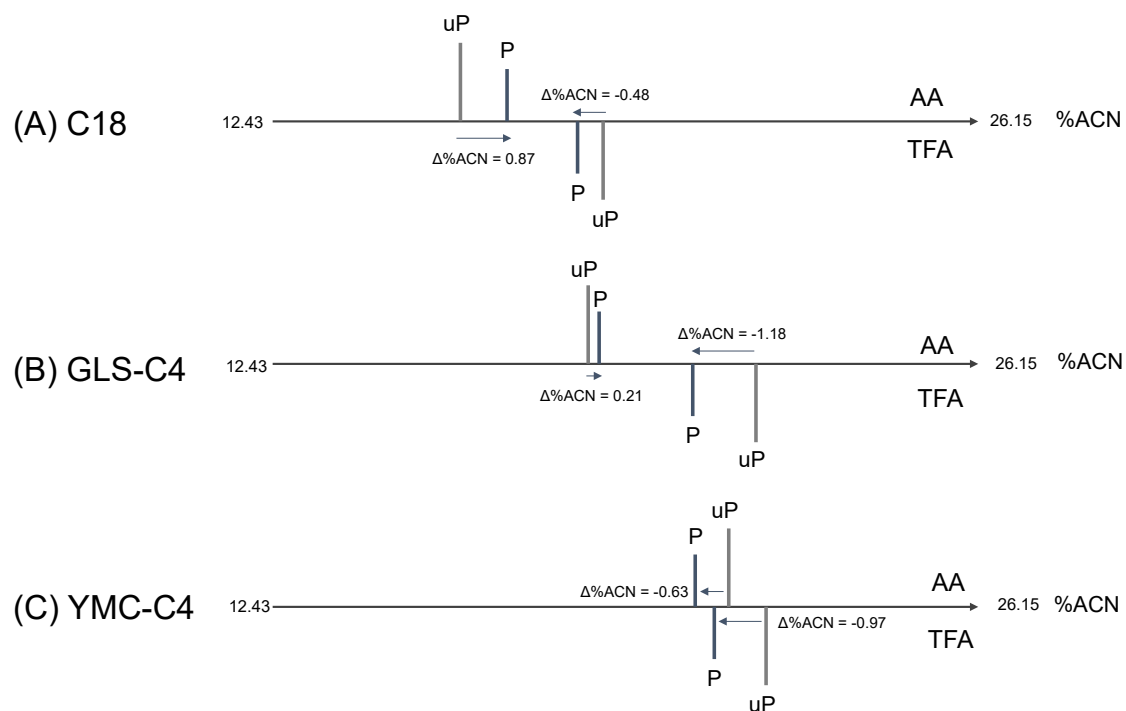


図 2. 各種カラムをイオンペア試薬の異なる条件で用いた際のリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの保持時間の平均。(A) 無孔性 C18 シリカカラムに AA (上部) と TFA (下部)、(B) GL Sciences 社の C4 シリカカラム (GLS-C4) に AA と TFA、(C) YMC 社の C4 シリカカラム (YMC-C4) に AA と TFA を使用した場合を示した。保持時間は、グラジエント時間補正後の分画溶出液中の ACN 濃度として、12.43%から 26.15%までを記載した。P：リン酸化ペプチド、uP：非リン酸化ペプチド。

表 1. YMC C4-シリカと Reprosil-Pur C18-AQ を充填したキャピラリーカラムでの nanoLC/MS/MS における 5 つのリン酸化ペプチドと対応する非リン酸化ペプチドの保持時間。AA をイオンペア試薬として使用した。

Sequence	YMC C4			Reprosil C18		
	RT_uP <sup>a)</sup>	RT_P <sup>b)</sup>	Delta RT <sup>c)</sup>	RT_uP	RT_P	Delta RT
QVPDpSAATATAYLcmCGVK	33.78	33.41	-0.37	44.57	47.53	2.96
DELHIVEAEAMNYEGpSPIK	50.04	45.02	-5.02	54.82	56.97	2.15
EGRPSGEAFVELEpSEDEVK	32.95	28.89	-4.06	40.57	42.35	1.79
SLYASpSPGGVYATR	23.78	22.16	-1.62	32.86	37.66	4.81
KQPPVpSPGTALVGSQK	20.04	20.91	0.87	26.69	30.04	3.35

a) 非リン酸化ペプチドの保持時間(分)、b) リン酸化ペプチドの保持時間(分)、  
c) リン酸化ペプチドの保持時間－非リン酸化ペプチドの保持時間 (分)

### 第三節 リン酸化ペプチドの逆相クロマトグラフィー分離モデル構築

これまで、C18 カラムにおけるトリプシン消化ペプチドの保持挙動に対する TFA の影響は、TFA とペプチド間のイオンペア形成によるペプチドの固定相への保持増強として説明されてきた。リン酸基は塩基性官能基との分子内相互作用によりこのイオンペア形成を阻害するため、リン酸化ペプチドの C18 での保持は非リン酸化ペプチドよりも弱くなると考えられてきた<sup>54,60</sup>。しかし一方で、この塩基性官能基とリン酸基の分子内イオンペア形成は、酸性条件下におけるペプチドの正味の電荷を減少させるため、疎水性固定相への保持力増強が起こる可能性も考えられる。AA や FA の場合、疎水性が TFA ほど高くないため、後者の効果がより発現し、非リン酸化ペプチドよりもリン酸化ペプチドの保持力が強くなると考えられた<sup>55-57</sup>。ただし、この傾向に当てはまらない例外的なペプチドも存在しており<sup>58,59</sup>、これはペプチドの二次構造の影響によるものと考えられてきた<sup>59</sup>。今回の実験で見出された、C4 カラムでは C18 とは逆に、TFA と AA の両方で、リン酸化ペプチドの保持が非リン酸化ペプチドよりも弱くなるという事実は新しい発見であり、そのメカニズムを解明する必要がある。

RPLC では、異なるグラジエントスロープを適用するとペプチドの保持順序が逆転することがよく知られており、これは線形溶媒強度理論 (LSS 理論) によって定量的に説明することができる<sup>61</sup>。

$$\log k = \log k_0 - S\varphi \quad (1)$$

ここで、 $\varphi$  は水-有機溶媒移動相中の極性の低い成分の体積分率、 $k_0$  は初期移動相でのグラジエント開始時の溶質の  $k$  の値 ( $\varphi = 0$ )、 $S$  は分析対象物とクロマトグラフィーシステムによって定まる定数である<sup>61</sup>。 $k_0$  が似ていても、2つのペプチドの  $S$  値が十分に異なる場合は、2つの異なるグラジエント溶出条件の間で保持順序の逆転が起こると考えられる。ここから、リン酸化ペプチドは対応する非リン酸化ペプチドよりも  $S$  値が小さいという仮説を立てた。ペプチドの  $S$  値に正に寄与する主な要因は分子量である<sup>61,62</sup>が、最近では Shinoda ら<sup>63</sup>と Spicer ら<sup>64</sup>が、疎水性アミノ酸の数が  $S$  値に負に寄与し、塩基性アミノ酸と親水性アミノ酸の数が  $S$  値に正に寄与することをそれぞれ独立に報告している。これらのデータに基づいて、 $S$  値予測のための NZHI モデル (N: ペプチド長、Z: 正味の電荷、HI: 疎水性指数) が提案された<sup>64</sup>。酸性条件下でリン酸基はトリプシン消化ペプチドの正味の電荷を減少させるため、一般にリン酸化ペプチドでは  $S$  値が小さくなると予想される。これを確認するために、SGVVGDGFGGR と pSGVVGDGFGGR の実験的な  $S$  値を、ACN 濃度を変えたアイソクラティックな条件で測定した。その結果、 $\log k_0$  と  $S$  が以下のように得られた。

$$\log k = 3.32 - 24.0 \varphi \text{ (for SGVVVGDGFGGR, } r^2 = 0.9993) \quad (2)$$

$$\log k = 3.53 - 21.4 \varphi \text{ (for pSGVVVGDGFGGR, } r^2 = 0.9984) \quad (3)$$

NZHI モデルから予想されるように、リン酸化ペプチドの  $S$  値は非リン酸化ペプチドの  $S$  値よりも小さくなっていたが、今回採用した ACN 濃度の範囲では保持順序の逆転は見られなかった。

これらを総合し、図 3 に示すような、本研究で発見された LSS に基づく保持順序反転のモデルを提案した。C4 カラムと C18 カラムのいずれの場合も、イオンペア試薬である TFA は、AA に比べてリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの両方の保持を増強する。この効果は非リン酸化体の方が正味の電荷が大きいためにより顕著となる。一方、TFA と AA のいずれの場合でも、リン酸化ペプチドの  $S$  値が小さいため、リン酸化ペプチドに対する非リン酸化ペプチドの相対的な保持力は、C18 よりも C4 の方が強くなる。つまり、C4 カラムは C18 カラムに比べて疎水性相互作用が弱いため、保持時間に対するペプチドの疎水性の寄与が小さくなり、その結果、非リン酸化ペプチドの相対的な保持が強くなる。なお、図 2 では、C4 カラムが C18 カラムと疎水性以外の特性が全く同じ（C4 カラムは、各条件で同じ  $S$  でより小さな  $\log k_0$  を与え、したがって、C4 での保持順序は、低い  $\varphi$  では C18 での保持順序と同じである）と仮定している。しかし実際には、今回採用した C4 カラムと C18 カラムでは、カラム長、カラム径、粒子径、細孔径、アルキルシリル化方法、相比が異なっている。これらの違いのため、今回無孔性の C18 カラムで観測されたペプチドの保持率（%ACN）は、図 1 に示した C4 カラムでの保持率よりも低くなっていた。提案した LSS モデルによると、リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの保持順序はグラジエント条件に依存するため、MS に適合した条件（イオンペア試薬として AA または FA）を用いた正確な予測モデルを開発するためには、種々のグラジエント条件でより多くの実験データを収集する必要がある。このモデルでは、ペプチドの RPLC システムでの挙動を決定する  $\log k_0$  と  $S$  の両方に対するリン酸化の配列固有の効果を検討する必要がある。

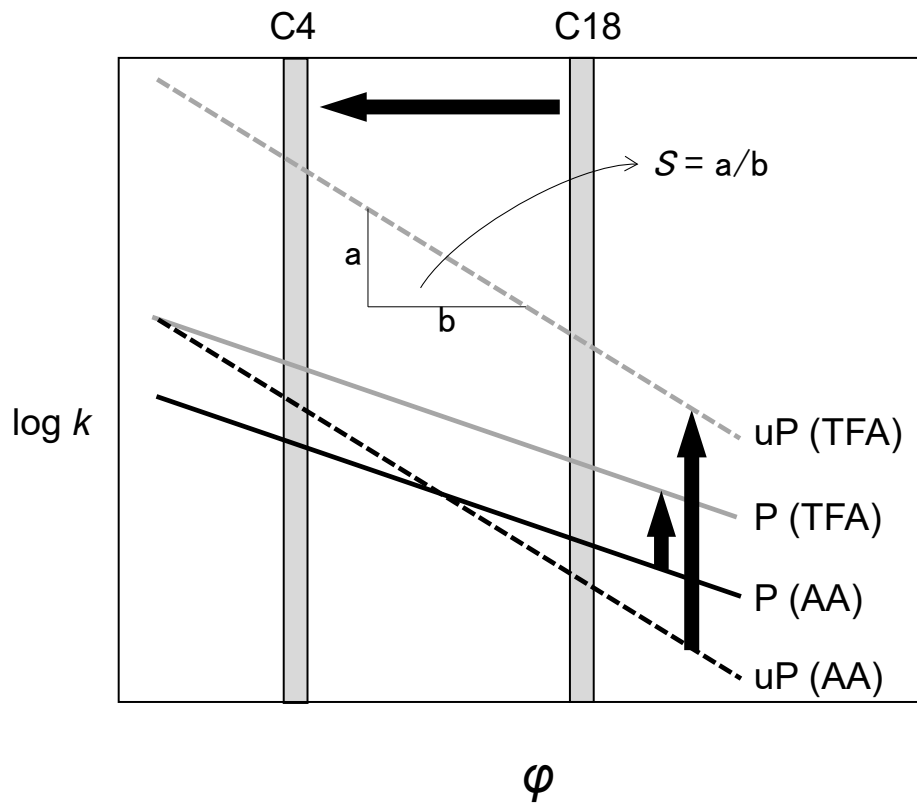


図 3. LSS に基づいた、リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの保持順序の逆転を説明するモデル。代表的なリン酸化ペプチド P (実線) とその非リン酸化ペプチド uP (点線) を、AA (黒) と TFA (灰色) を用いて様々な ACN 濃度  $\phi$  でアイソクラティックな条件で分析する場合に、ある  $\phi$  での C18 での保持係数と、対応する  $\phi$  での C4 での保持係数を、それぞれ C18、C4 とラベルした灰色の四角で示した。

#### 第四節 結語

総括すると、イオンペア試薬として AA を用いた場合、C4 カラムと C18 カラムの間でリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドのペアの保持順序が逆転することが観察された。また、C18 カラムに AA と TFA を用いた場合も同様の現象が見られた。これらのペプチドの保持挙動を理解するために、LSS 理論に基づく保持モデルを提案した。これまでに報告されているモデルによると、リン酸化ペプチドでは  $S$  値が小さくなることが予想された。この仮説は、アイソクラティック RPLC 条件下での測定により実際に確認された。今回提案したモデルは、包括的なリン酸化ペプチドの保持時間予測ツールを開発するための重要な知見を提供するものと考えられる。

## 第二章

### CoolTip: リン酸化ペプチドを

#### 捕捉するための低温固相抽出マイクロカラム

##### 第一節 序

発現したタンパク質とその翻訳後修飾を包括的に同定・定量するプロテオミクスは、生物学研究に欠かせないものとなっている<sup>65</sup>。特に、LC/MS/MSを用いたショットガンプロテオミクスは、生体試料中のタンパク質を同定するための信頼性の高い高感度なツールである<sup>2</sup>。一般的なショットガンプロテオミクスのワークフローでは、標的ペプチドのイオン化効率を高めるだけでなく、分析システムの寿命を延ばすためにも、LC/MS/MS分析の前にペプチドを精製して測定に干渉する物質を取り除く必要がある<sup>66</sup>。具体的には、ペプチドを逆相カラムに負荷し、適切な溶液で洗浄した後、有機溶媒で溶出してから、その後のLC/MS/MS分析を行う。分析システム直結型のオンライントラップカラムは、試料調製の自動化や試料量が多い場合の注入時間の短縮に有効である<sup>67</sup>。しかし、トラップカラムのサイズや特性は使用する分析カラムの性質によって制限されるため、分離効率を維持しながら十分な保持容量を確保するためには、トラップカラムのサイズを慎重に選択する必要がある<sup>68</sup>。試料に対するトラップカラムの選択が不適切な場合、特に保持の弱い親水性ペプチドが失われてしまうことが多い<sup>69</sup>。一方、オフラインの固相抽出(SPE)カラムは、分析カラムから独立しているため容易に最適な条件を得ることができる。現在、ポリスチレンジビニルベンゼン(SDB)などの逆相系固定相粒子をテフロンメッシュに埋め込んだ小さなディスクで構成されたStageTipなどの、ピペットチップを用いたSPEマイクロカラムが、保持容量が大きく、ペプチドの回収率が高く、また必要な溶出溶液量が少ないことから、ペプチドの精製に広く用いられている<sup>66,70</sup>。これらのピペットチップ型のマイクロカラムでは、試料を並行して処理することができるため、総分析時間を短縮することができる。しかし、非常に短いペプチドやリン酸化ペプチドなどの親水性ペプチドは固定相に保持されにくく、精製工程中に失われやすいため<sup>71,72</sup>、プロテオームを十分にカバーできないという問題があった。

古くから、逆相カラムでの親水性ペプチドの保持を向上させるために、フッ化炭素鎖をもつ脂肪酸がイオンペア試薬として使用されてきた<sup>73</sup>。しかし、これらの強力なイオンペア試薬はESIの効率を著しく低下させ、MS分析の感度を下げる原因となっていた<sup>68</sup>。また、長いフッ化炭素鎖を持つイオンペア試薬を試料調製時にのみ使用し

た場合でも、その後の LC/MS 分析を汚染する可能性がある<sup>74</sup>。また、これらの疎水性のイオンペア試薬を使用しても、非リン酸化ペプチドに比べてリン酸化ペプチドの保持を向上させる効果は低いことが明らかになっている<sup>60,75,76</sup>。一方で、ペプチドを非極性基で化学的に修飾することで、疎水性を高め、保持力を向上させ、試料調製時の親水性ペプチドの回収率を高めることができる<sup>72,77,78</sup>。しかし、これらの手法では一般的に、ペプチドを標識するためのより複雑なワークフローを必要とし、限られた量の試料に適用するのは困難であることが多い。これまでのところ、多孔性グラファイトカーボン (PGC) クロマトグラフィーが、短いペプチドや親水性ペプチドの分析において、RPLC に代わる最も有望な手法であると考えられている<sup>79,80</sup>。しかし、PGC クロマトグラフィーでは疎水性ペプチドの回収率が低いため、PGC カラムをペプチド分析に導入する際には、オンラインおよびオフラインの両方で逆相カラムを併用する必要があった<sup>71,81,82</sup>。

LC における溶質の保持とカラム温度の関係は、式 4 と式 5 で表される<sup>83</sup>。

$$\Delta G^\circ = -RT \ln (k/\Phi) \quad (4)$$

$$\ln k = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R + \ln \Phi \quad (5)$$

ここで、 $\Delta G^\circ$  はギブス自由エネルギー変化、 $k$  は保持係数、 $\Phi$  は相比、 $\Delta H^\circ$  はエンタルピー変化、 $\Delta S^\circ$  は移動相から固定相への分析対象物の移動に伴うエントロピー変化である。この式は van't Hoff 式と呼ばれ、 $\Delta S^\circ$ 、 $\Delta H^\circ$ 、 $\Phi$  が温度に依存しないと仮定すると、 $\ln k$  の  $1/T$  への線形依存性を表している<sup>84</sup>。RPLC/MS 分析では、一般に、カラム温度を上げると分析対象成分の保持時間が短くなり、鋭いピークが得られる<sup>85</sup>。一方、カラム温度を下げると、親水性の溶質をより効果的に保持することができ<sup>86,87</sup>、これを利用したカラム温度制御ピーク集束法によりペプチドやタンパク質のピーク形状の改善が可能である<sup>88</sup>。また、RPLC/MS に低温のペプチド試料を注入すると、ウシ血清アルブミンの配列カバー率が高くなり、また、プロテオーム試料測定においても同定ペプチド数が増加することが報告されている<sup>89,90</sup>。

本研究では、ピペットチップ型の逆相固相抽出マイクロカラムを冷却することで、オフラインでの脱塩工程において親水性 (リン酸化) ペプチドを保持する能力が向上するのではないかという仮説に基づき、冷却した RP-StageTip を用いることで、疎水性ペプチドの回収率を犠牲にすることなく、プロテオームおよびリン酸化プロテオーム解析における親水性ペプチドの回収率を向上させる簡便な方法を開発することを目的とした。



## 第二節 冷却 StageTip の開発

まず、HeLa 細胞から抽出したトリプシン消化ペプチド 20  $\mu\text{g}$  を精製するため、脱塩マイクロカラムとして、SDB-StageTip と PGC-StageTip を比較したところ、SDB-StageTip は LC/MS/MS での保持時間が小さい (< 20 分、溶出 ACN 濃度 8%未満に相当) 親水性ペプチドを回収できなかったのに対し、これらのペプチドは PGC-StageTip ではうまく回収された (図 4A)。しかし、疎水性ペプチドの回収率は PGC-StageTip の方が低く (図 4A)、SDB-StageTip、PGC-StageTip のどちらも、幅広い親水性/疎水性を持つトリプシン消化ペプチドの回収には適していないことがわかった。次に、SDB-StageTip の上にクロマトグラフィー用の逆相系固定相粒子を加えることで、固定相の体積を増やした。SDB 粒子 (InertSep PLS-2) またはより疎水性の高い C18 修飾 SDB 粒子 (InertSep RP-C18) を使用し、親水性ペプチドの回収率を調べた。また、イオンペア試薬として TFA の代わりにヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) を採用し、試料ペプチドの疎水性を高めた<sup>91</sup>。図 4B に示すように、疎水性の高い逆相系樹脂 (SDB-C18) でもイオンペア試薬 (HFBA) でも、親水性ペプチドの回収率は向上しなかった。親水性ペプチドの回収率は、追加の SDB 粒子を充填した SDB-StageTip の場合に若干の改善が見られた。しかし、依然として親水性ペプチドの回収率は PGC-StageTip で最も高かった。次に、回収率をさらに向上させるために、試料添加時の SDB-StageTip の温度の影響を調べた。StageTip を用いた脱塩工程では、溶液を通過させるために冷却遠心機を使用しているため、遠心機の温度を 4°C に設定し、脱塩工程を開始する前に遠心機の中で StageTip を 5 分間冷却した。HeLa 細胞抽出物からの 5  $\mu\text{g}$  のトリプシン消化ペプチドをこの低温 SDB-StageTip プロトコル (CoolTip) と標準 SDB-StageTip プロトコル (RT-Tip) を用いて分析し、両者の比較を行った。アセトニトリル (ACN) 濃度は逆相系固定相のペプチドの保持力に強く影響するため、試料負荷と洗浄の工程では、ACN の濃度が異なる 3 つの溶液 (0.1%TFA / 0、2、or 4%ACN) を評価した。脱塩後、500 ng のペプチドを nanoLC/MS/MS システムに注入した。図 5A-C は、RT-Tip および CoolTip の保持時間毎に集約したペプチドの同定数を示している。CoolTip では、特に保持時間が 20 分未満 (溶出 ACN 濃度 8%未満に相当) の親水性ペプチドの同定数が、調べた 3 種の溶媒全てで高くなった。つまり、StageTip の温度を下げることで、親水性ペプチドの回収率が向上した。この冷却による回収率向上効果は、ACN 濃度が高いほど大きくなった。2-4% ACN 溶媒はペプチドの脱塩における試料負荷と洗浄工程に広く使用されているが、この条件では親水性ペプチドが脱塩中に失われることが示された。しかし、これらの親水性ペプチドは、同定されたペプチドの総数のごく一部 (10%未満) でしかないため、同定数の合計は、評価したすべての条件で有意な差は認められなかった。

さらに、一連の StageTip の温度 (25 °C、16 °C、8 °C、4 °C) を評価したところ、StageTip の温度が低いほど親水性ペプチドの回収率が高まることが明らかとなった (図 6)。8 °C 以下の条件間では親水性ペプチドの回収率に有意差は認められなかった。さらに、4 °C の CoolTip 脱塩において、親水性ペプチドの回収率に対する試料溶液および洗浄液の事前冷却の効果を評価したところ、事前冷却を行った場合と行わなかった場合では有意差がなかった (図 6)。これらの結果から、4 °C で最大の回収率が得られ、また、用いる溶液自体を予冷する必要はないと結論づけた。

一般的に、生体試料由来のリン酸化ペプチドは非リン酸化ペプチドよりも親水性が高いとされる。これは、第一章でも述べたようにリン酸基自体がペプチドの親水性を高めることに加え、生体内のリン酸化修飾が、疎水性アミノ酸残基の含有率が低い天然変性領域などに集中していることに起因する<sup>92-95</sup>。そのため、CoolTip による親水性ペプチドの回収率の向上は、リン酸化プロテオーム解析に特に効果的であると考えられた。通常、リン酸化プロテオミクスの試料調製ワークフローでは、リン酸化ペプチド濃縮前とリン酸化ペプチド濃縮後の 2 回の脱塩工程が必要となる。ここでは、議論を簡単にするために、リン酸化ペプチドの濃縮に対応したタンパク質抽出液を利用することで、1 回の脱塩手順のみをリン酸化プロテオミクスのワークフローに組み込んだ<sup>96,97</sup>。つまり、消化されたペプチドのうち 30 µg を直接 TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーにかけ、約 150 ng のリン酸化ペプチドを含む溶出液を StageTip により脱塩し、LC/MS/MS で分析した。図 5D-F は、リン酸化ペプチドの同定数を保持時間ごとに集計したものである。リン酸化ペプチドの保持時間範囲は、非リン酸化ペプチドの場合に比べて早くなっており、その結果、親水性ペプチドの割合が高くなっている。非リン酸化ペプチドの場合と同様に、CoolTip では、特に早い保持時間 (< 20 分) でより多くのリン酸化ペプチドが同定された。また、温度の影響は、非リン酸化ペプチドの場合と同様に、試料負荷/洗浄工程の ACN 濃度が高いほど顕著に現れた。同定されたリン酸化ペプチドの総数は、非リン酸化ペプチドの場合よりも、温度や試料溶液の ACN 濃度に敏感であり、CoolTip がリン酸化ペプチドに対してより効果的であることを示している。以上の結果から、CoolTip は、プロテオームとリン酸化プロテオームの両方の試料について、どの ACN 濃度の試料溶媒でも、RT-Tip よりも多くのペプチドを同定することが可能であった (図 7A-C)。最後に、最適化された CoolTip を PGC-Tip と比較した<sup>79,81</sup>。ここでも、親水性と疎水性の両方の (リン酸化) ペプチドについて、CoolTip ではより多くのペプチドを同定することが可能であった (図 8)。

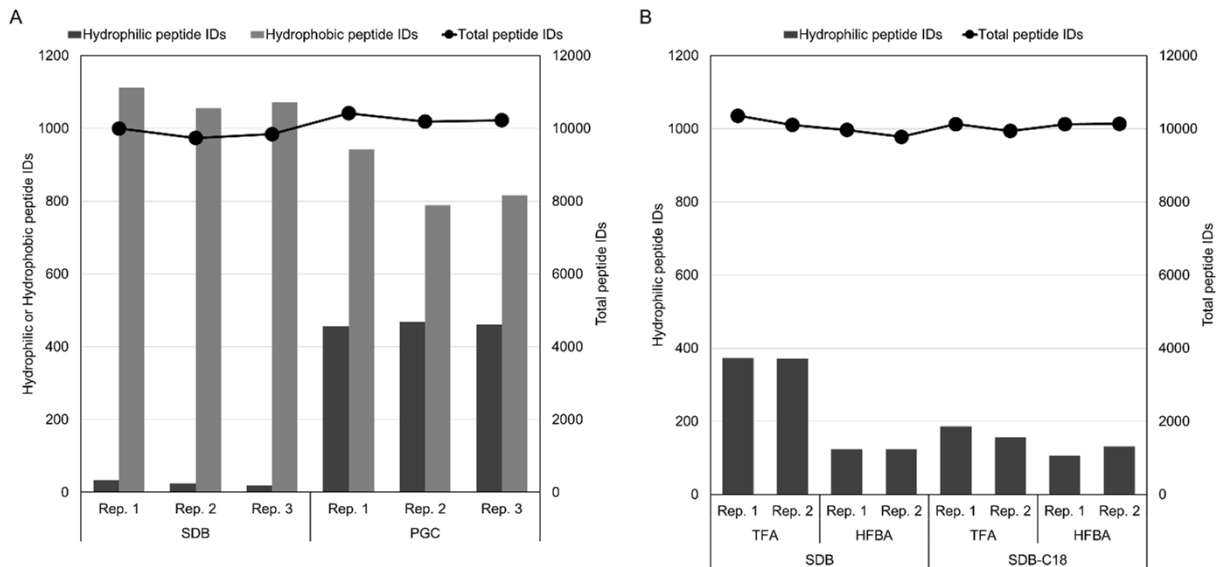


図 4. 異なる逆相系固定相とイオンペア試薬を用いた場合のペプチド同定数の概要。(A) SDB-StageTip と PGC-StageTip、(B) 逆相系樹脂 (InertSep PLS-2 (SDB) および InertSep RP-C18 (SDB-C18)) を 1 mg 詰めた SDB-XC StageTip を用いて、4% ACN / 0.5% TFA または 0.5% HFBA に溶解した 20  $\mu$ g の HeLa トリプシン消化物を脱塩した。脱塩したペプチドから、1  $\mu$ g を nanoLC/MS/MS に注入した。親水性ペプチド：より早い保持時間で溶出したペプチド (<20 分、8%未満の ACN 濃度に対応)。疎水性ペプチド：より遅い保持時間で溶出したペプチド (>70 分、28%より大きい ACN 濃度に対応)。(A) 3 回の繰り返し実験、(B) 2 回の繰り返し実験の結果を示す。

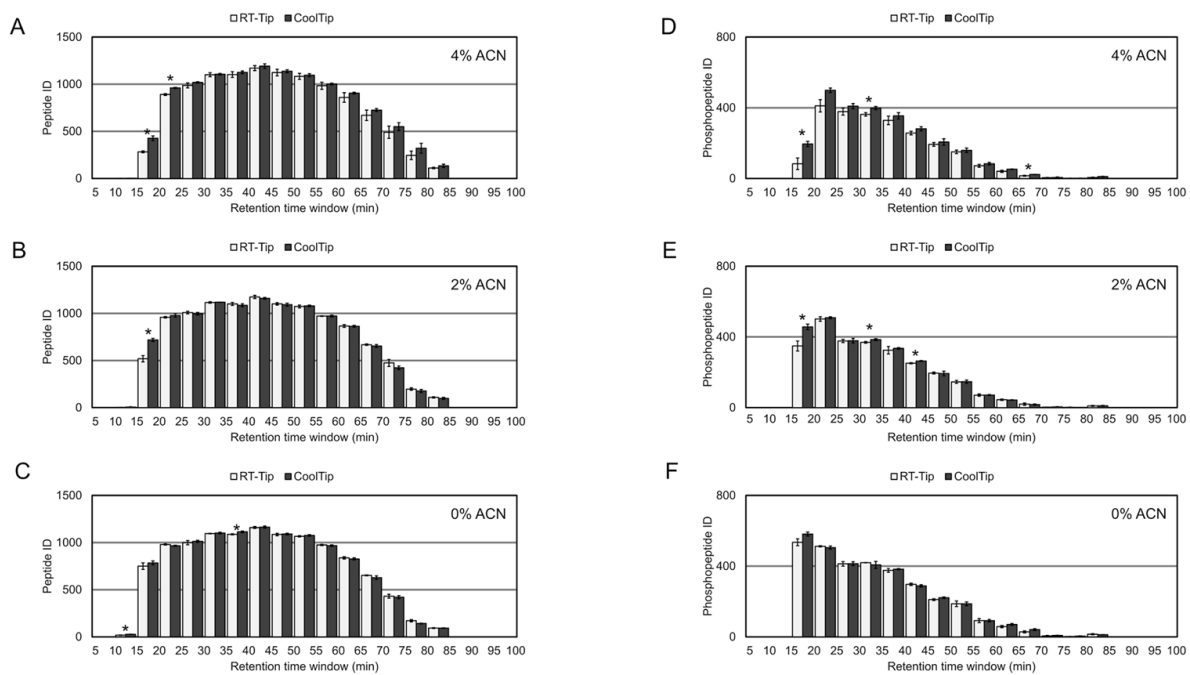


図 5. 保持時間毎のペプチド同定数の比較。棒グラフは各領域のペプチド同定数を示す。エラーバーは 3 回の繰り返し解析の標準偏差を示す。\*:  $p < 0.05$  (A-C) (A) 4% ACN、(B) 2% ACN、(C) 0% ACN の溶媒で試料負荷し、洗浄した場合のプロテオミクスの結果。(D-F) 脱塩工程での試料負荷と洗浄に (D) 4% ACN、(E) 2% ACN、(F) 0% ACN 溶媒を使用した場合のリン酸化プロテオミクスの結果。

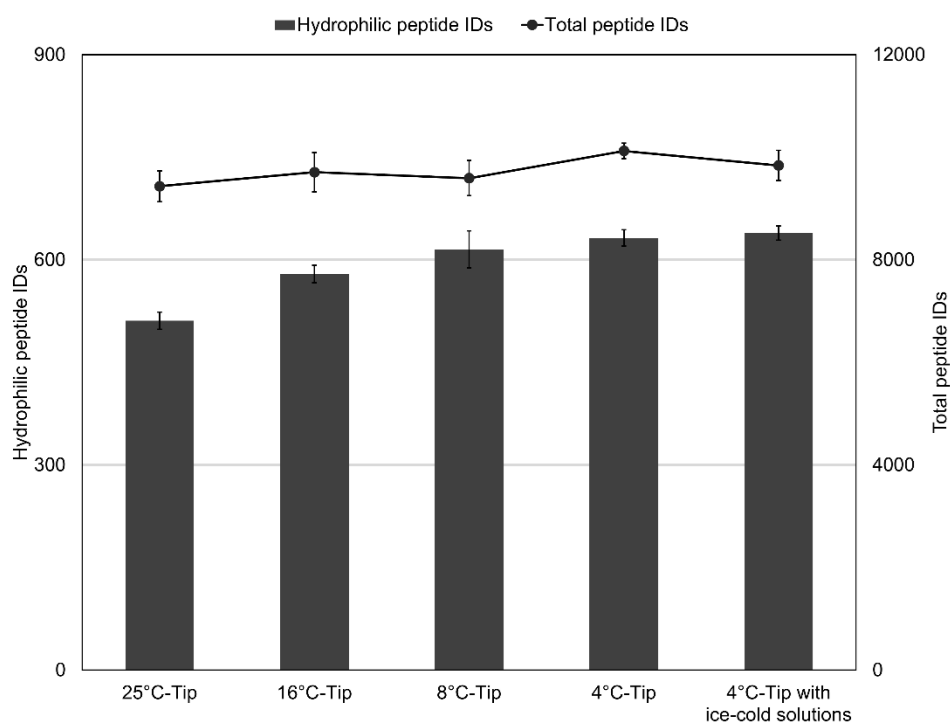


図 6. 一連の StageTip の温度によるペプチド同定のまとめ。25 °C、16 °C、8 °C、4 °C の SDB-XC StageTip は、4% ACN / 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) に溶解した 5 µg の HeLa トリプシン消化物を用いて評価した。試料負荷、洗浄、溶出のための溶媒はすべて 25 °C または氷上で調製した。脱塩したペプチドのうち 500 ng を nanoLC/MS/MS に注入した。親水性ペプチド：より早い保持時間で溶出したペプチド (< 20 分、8%未満の ACN 濃度に対応)。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

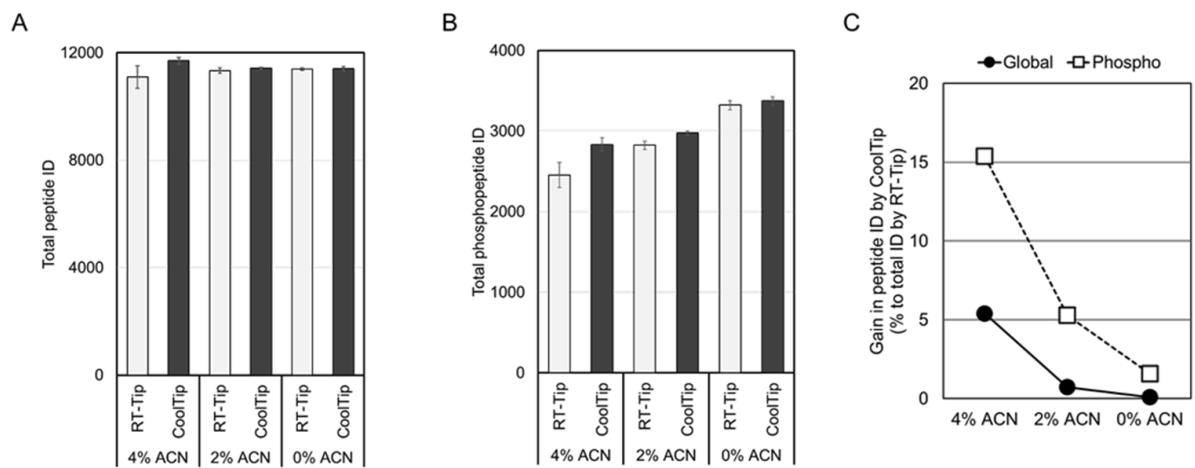


図 7. 各条件でのペプチド同定数のまとめ。(A) プロテオーム解析におけるペプチドの総同定数。(B) リン酸化プロテオミクスにおけるペプチドの総同定数。棒グラフはペプチドの同定数を示す。エラーバーは、3 回の解析による標準偏差を示す。(C) CoolTip によって得られたペプチド同定数の増加率。CoolTip での平均ペプチド同定数と RT-Tip での平均ペプチド同定数を各溶媒条件で比較した。

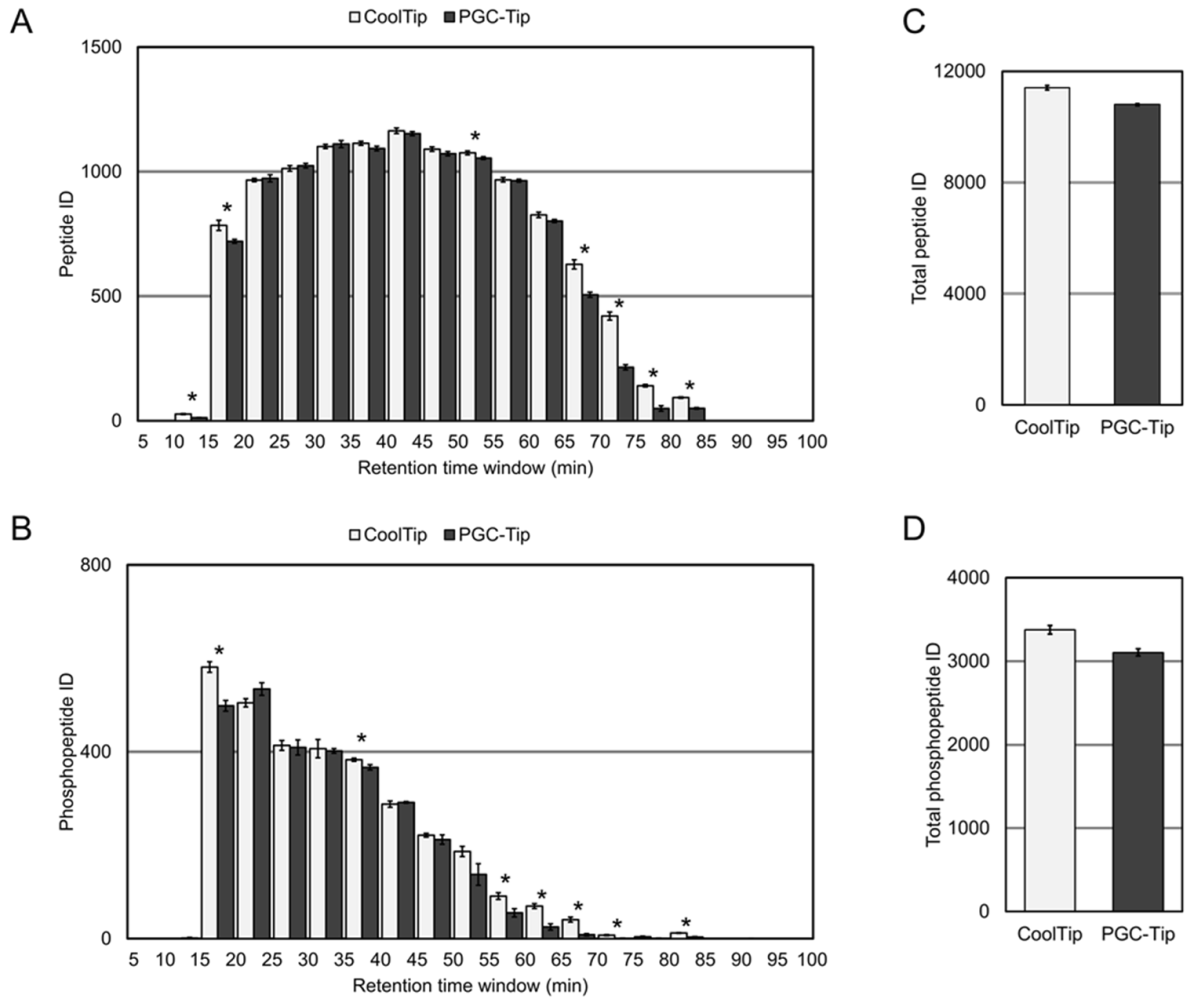


図 8. PGC-Tip と CoolTip を用いた脱塩法におけるペプチド同定数のまとめ。各 StageTip を用いて、5  $\mu$ g のペプチドまたは約 150 ng のリン酸化ペプチドを脱塩した。脱塩工程での試料負荷と洗浄には 0% ACN 溶媒を使用した。PGC-Tip を用いた脱塩は室温で行った。(A、B) ペプチドの同定数を保持時間毎に集約した。棒グラフは、各領域におけるペプチド同定数を示す。エラーバーは 3 回の繰り返し実験における標準偏差を示す。\*:  $p < 0.05$  (C、D) 棒グラフは、全ペプチド同定数の平均値を示す。エラーバーは、3 回の繰り返し実験による標準偏差を示す。

### 第三節 冷却 StageTip はペプチドの定量精度を改善する

CoolTip におけるペプチドの回収率を定量的に評価するために、プリカーサーイオンのシグナルに基づいた非標識定量を行った。ペプチドのピーク面積情報は、抽出イオンクロマトグラムターゲット抽出法<sup>98</sup>に基づき、自作のスクリプトを用いて抽出した。6回の測定（RT-Tip と CoolTip の3回繰り返し分析）すべてで定量されたペプチドに着目し、ACN 濃度条件ごとに2つの手法間で共通して同定されたペプチドのピーク面積比を算出した。その結果、図 9A-C の親水性の非リン酸化ペプチドおよび図 9D-F のリン酸化ペプチドで示されているように、保持時間が20分未満の親水性ペプチドについて CoolTip でより良好な回収率が得られた。保持時間が20分未満のペプチドとリン酸化ペプチドの回収率は、平均して CoolTip 条件でそれぞれ2.1倍と1.9倍に増加した。特筆すべきは、CoolTip を使用しても疎水性ペプチドの大幅な減少は見られず、CoolTip 法の汎用性が証明されたことである。次に、この3回繰り返し実験のデータから、それぞれの手法の定量精度を評価した。図 10A と図 10B は、それぞれ同定ペプチドと同定リン酸化ペプチドのピーク面積の相対標準偏差（RSD）を示している。低 ACN 濃度の条件でより良い精度が得られたが、これは ACN 濃度が低いと逆相固定相への保持力が強くなり、脱塩時のペプチドの損失が少なくなるためと考えられた。同様に、CoolTip は RT-Tip よりも低い RSD 値を示した。これは、CoolTip がより強い保持を可能にし、脱塩工程でのペプチドの損失を減少させることを反映している。CoolTip は特別な試薬を必要とせず、様々な種類のショットガンプロテオミクス実験に簡単に導入することができる。StageTip の冷却は、広く普及している冷却遠心機で行うことができ、LC/MS/MS システムの温度をコントロールする必要はない。したがって、CoolTip は、StageTip を直接キャピラリー LC システムへ接続する、近年開発された speLC/MS/MS システムなどとも容易に組み合わせることができ<sup>99,100</sup>、分析の堅牢性を高めることが可能である。



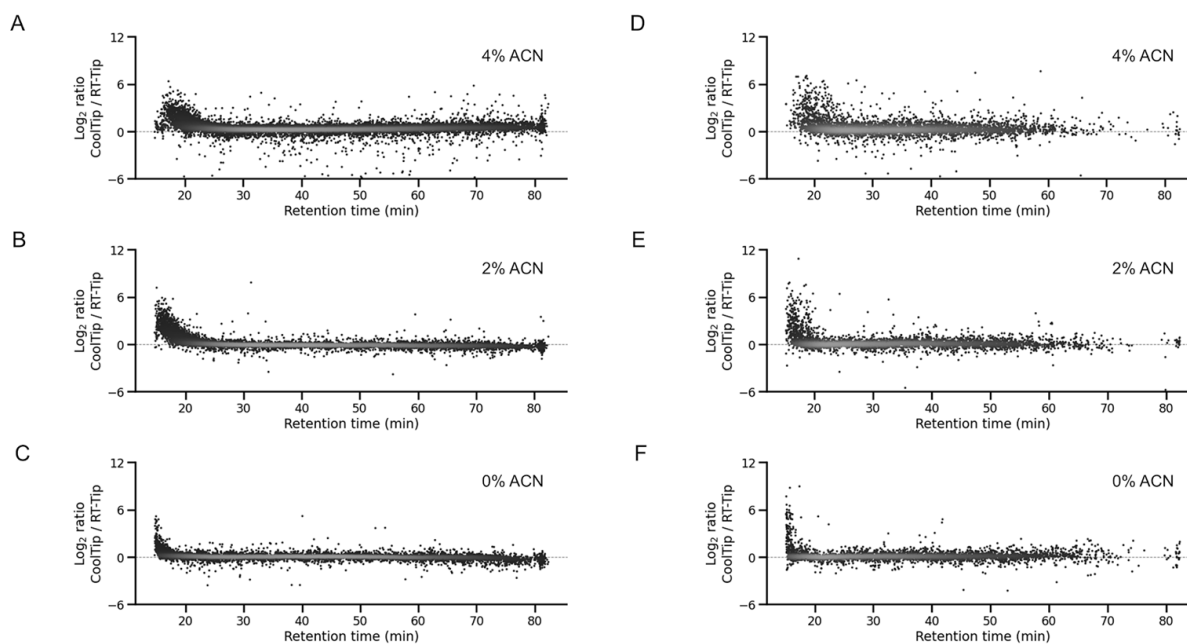
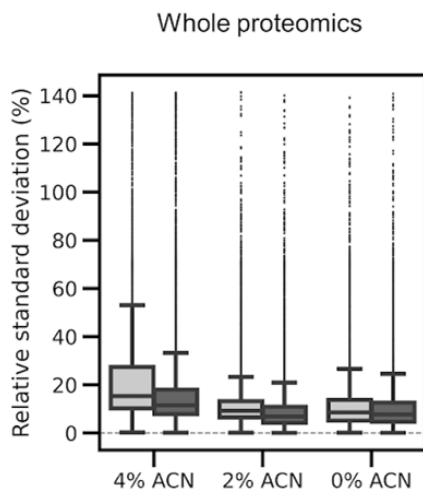


図 9. CoolTip および RT-Tip のペプチド保持時間に応じた相対定量の結果。各溶媒条件で同定されたペプチドに対して非標識定量を行った。各点はペプチドの定量比を表す。(A-C) (A) 4% ACN、(B) 2% ACN、(C) 0% ACN の溶媒で試料負荷し、洗浄した場合のプロテオミクスの結果。(D-F) 脱塩工程での試料負荷と洗浄に (D) 4% ACN、(E) 2% ACN、(F) 0% ACN 溶媒を使用した場合のリン酸化プロテオミクスの結果。

A



B

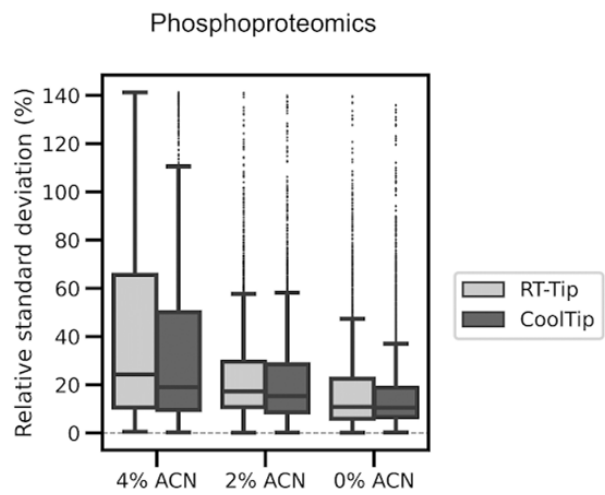


図 10. 3 回の繰り返し実験における定量されたペプチドの定量再現性の分布。箱は四分位範囲を表す。ひげは 5%と 95%の四分位を示す。各ボックス内の太い水平線は中央値を示す。(A) プロテオミクスの結果。(B) リン酸化プロテオミクスの結果。

#### 第四節 結語

本研究では、冷却 StageTip を用いたシンプルな脱塩プロトコルを新規に開発した。CoolTip は、疎水性ペプチドの回収率を犠牲にすることなく、親水性（リン酸化）ペプチドの同定範囲を拡大し、さらにペプチドの定量分析の精度を高めることを示した。様々なプロテオミクス実験のパフォーマンスを向上させるために、このプロトコルを容易に適用できると期待される。



## 第三章

### 多重定量リン酸化プロテオミクスのための

#### ナノスケール固相同重体化学標識

##### 第一節 序

Tandem mass tag (TMT) に代表される同重体化学標識を用いた定量プロテオミクスは、試料の多重化が可能で、高精度、高スループットであることが魅力である<sup>25</sup>。同重体標識法は、多重化された試料の同重体プリカーサーイオンから生成されるレポータープロダクトイオンをモニターすることで、一度の測定で複数の試料を同時に定量することができる。さらに、この TMT を用いた相対定量法では、異なる標識タグを付けたペプチドが単一のプリカーサーイオンピークとして現れ、低濃度のペプチドの検出性を高めることができることが大きな利点の 1 つである<sup>26</sup>。例えば、十分な量の標的ペプチドを含む「キャリア試料」を用いることで、少量の試料からのペプチドの検出感度を向上させることが可能である<sup>101,102</sup>。1 つまたは複数の TMT チャンネルで標識された大量の「キャリア試料」を使用する同重体標識シグナル増幅 (BASIL) は、一細胞プロテオーム解析などにおいても有用である<sup>102-104</sup>。ただし、キャリアペプチドの添加量は、装置のダイナミックレンジを考慮して決定する必要がある<sup>105</sup>、また、TMT 標識反応において、微量試料の取り扱いには注意が必要である。

TMT 試薬を用いた多重定量リン酸化プロテオミクス研究では、試料調製時の手技的なばらつきを抑えるために、リン酸化ペプチド濃縮の前に標識反応を行うことが多い<sup>106,107</sup>。しかし経験上、リン酸化ペプチド濃縮のための TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーにおいて、TMT によるペプチド修飾は化学的性質を変化させるため、選択性の変化を引き起こす。実際、2 つの論文で、TMT で標識したリン酸化ペプチドの TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーでの回収率が低いことが報告されている<sup>108,109</sup>が、その理由はまだ明らかにされていない。また、哺乳類プロテオーム試料消化物中のリン酸化ペプチドの含有量は一般的に 1%未満であり、この方法では、非リン酸化ペプチドごと標識する必要があるため、高価な TMT 試薬が大量に必要となる。一方、リン酸化ペプチドを濃縮した後に TMT 標識を行うと、TMT 試薬の使用量は少なくて済むが、リン酸化ペプチドの濃縮と TMT 標識の両方に再現性の高い手法が必要となる<sup>39,110</sup>。出発試料が少量 (100 µg 未満) の場合、濃縮されたリン酸化ペプチドの量は 1 µg 以下の規模となり、このような少量のペプチドを標準的なプロトコルで TMT 標識することは困難である。逆相 SPE カラムを用いたペプチドの固相 TMT 標識は、従来の溶液 TMT 標識よりも高

感度であることが報告されている<sup>111-114</sup>。最適化すれば、1-2  $\mu\text{g}$  のペプチドを固相上で TMT 標識することができる<sup>112, 113</sup> が、リン酸化ペプチドに対するこのようなマイクロスケールの固相標識の適用性はまだ評価されていない。

ここでは、まず  $\text{TiO}_2$  クロマトグラフィーによるリン酸化ペプチドの濃縮に及ぼす TMT の修飾の影響を系統的に評価した。次に、StageTip ベースの固相マイクロリアクターを用い、リン酸化ペプチドの濃縮工程の後に TMT 標識反応を行う、再現性と感度の高いリン酸化プロテオミクスワークフローを確立した。反応 pH、逆相固定相、イオンペア試薬が、微量リン酸化ペプチドの固相標識を成功させるために重要であることが明らかとなった。確立した手法の評価実験として、MKK1/2 阻害剤（セルメチニブ）の投与に伴う HeLa 細胞のリン酸化プロテオームの変化をプロファイリングした。約 10000 個の重複を含まないリン酸化ペプチドを、50  $\mu\text{g}$  タンパク質試料の 3 回の分析で定量することが可能であった。さらに、確立した手法を基に、*in vitro* チロシンキナーゼ反応処理試料を「キャリア試料」として用いることにより、標的とする配列モチーフを有するチロシンリン酸化ペプチドを特異的に検出するリン酸化モチーフ標的 TMT アプローチを開発し、抗体アフィニティー濃縮なしに、100  $\mu\text{g}$  以下の試料から 2000 以上のチロシンリン酸化ペプチドを定量した。

## 第二節 TMT 標識は TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーによる

### リン酸化ペプチド濃縮を阻害する

リン酸化プロテオミクスでは、実験操作のばらつきを考慮して、リン酸化ペプチドの濃縮前に TMT などによる同重体標識反応を行うことが多い。しかし、化学的標識が TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーによるリン酸化ペプチドの濃縮過程に与える影響については系統的に検討されておらず、さらに、TMTpro<sup>115</sup> のような新しい標識試薬が導入された場合には、リン酸化ペプチドの濃縮条件を再検討する必要がある。一方、リン酸化ペプチドを濃縮した後に化学標識すれば、再検討の必要はない。また、標識に供するペプチド量を大幅に減らすことができ、それに伴って標識試薬のコストも削減できる。ここでは、比較的微量の試料を分析する際に、リン酸化ペプチドの濃縮と TMT 標識のどちらを先に行うべきかを評価するために、以下の実験を行った。まず、50 µg の消化ペプチドを 100 µg の TMT を用いて溶液中で標識し、TMT で標識された消化物からリン酸化ペプチドを濃縮した (TMT-TiO<sub>2</sub>)。次に、50 µg のペプチドからリン酸化ペプチドを濃縮し、25 µg の TMT を用いて溶液中で標識した (TiO<sub>2</sub>-TMT)。リン酸化ペプチドが濃縮された各試料を異なる TMT タグで標識し、全量混合後、nanoLC/MS/MS で分析した (図 11A)。

図 11B は、定量されたリン酸化ペプチドのレポーターイオン強度の分布を示している。TiO<sub>2</sub>-TMT 戦略では TMT 標識反応の規模が小さいため、試料損失の影響がより顕著であると予想されたが、実際にはリン酸化ペプチドの回収率は TiO<sub>2</sub>-TMT の方が TMT-TiO<sub>2</sub> よりも平均で 5.4 倍高かった (図 11B)。TMT-TiO<sub>2</sub> で回収率が低い理由を調べたところ、2つのアプローチ間の強度比は、ペプチドあたりのリン酸化修飾の数と相関していることが明らかとなった (図 11C 左)。また、ペプチドあたりの酸性残基 (Glu、Asp) の数についても同様の傾向が見られ (図 11C 右)、TMT 標識リン酸化ペプチドが TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーで保持されるためには、非標識リン酸化ペプチドよりも多くの酸性残基が必要であることが示唆された。リン酸化ペプチドが TMT 標識によって TiO<sub>2</sub> との親和性を弱めているかどうかを確認するために、TMT 標識したリン酸化ペプチド試料と標識なしのリン酸化ペプチド試料を調製し、それぞれ TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーの非保持画分と溶出画分を採取し、nanoLC/MS/MS を用いて分析した。その結果、TMT で標識されたリン酸化ペプチドの約 10% がフロースルー画分に含まれていたのに対し、非標識のリン酸化ペプチドは 1% 未満であった (図 12)。このことから、TMT-TiO<sub>2</sub> ワークフローにおける回収率の低さは、TMT で標識されたリン酸化ペプチドの TiO<sub>2</sub> 粒子に対する親和性が弱いことに起因すると考えられた。これは、TMT の望ましくない電荷増強効果<sup>116</sup>により、TMT の第三級アミンがリン酸基と分子内塩橋を形成し、リン酸基と TiO<sub>2</sub> 粒子の相互作用を阻害した結果と考えられ

る。また、この2つの戦略の再現性を3回繰り返し分析で評価した。TiO<sub>2</sub>-TMT法の再現性は、TMT-TiO<sub>2</sub>法よりも優れていた。TiO<sub>2</sub>-TMT法で定量されたリン酸化ペプチドの90%以上は、相対標準偏差の値が20%未満であり、リン酸化ペプチドの濃縮手順における手技のばらつきが定量に大きな影響を与えないことを示している（図11D）。TMT-TiO<sub>2</sub>での再現性が低いのは、レポーターイオンのシグナル強度が低いためと考えられる。これらの結果から、特に微量試料の場合は、試料の損失を最小限に抑えるために、リン酸化ペプチドの濃縮後にTMT標識を行うべきであると結論づけた。



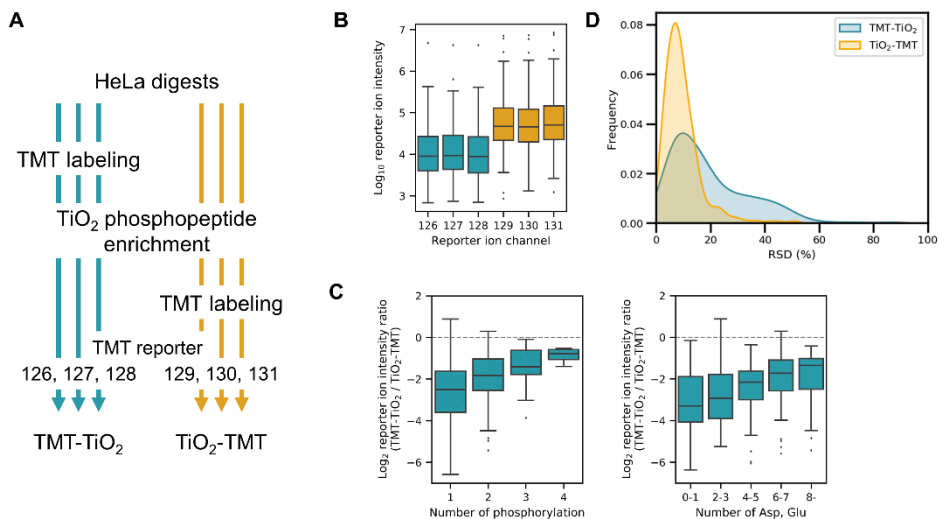


図 11. TMT 標識と  $\text{TiO}_2$  ベースのリン酸化ペプチド濃縮のワークフローの組み合わせ。(A) ワークフローの模式図。両手法で得られた TMT 標識リン酸化ペプチドを全量混合し、LC/MS/MS で分析した。(B) 同定されたリン酸化ペプチドのレポーターイオン強度の分布。TMT の定量は、6 つの TMT チャンネルすべてでシグナルが検出された場合にのみ行った。箱は四分位範囲を表す。ひげは 5% および 95% までの定量値を表す。太い水平線は中央値を示す。(C) レポーターイオン強度比と各リン酸化ペプチド上のリン酸基または酸性残基 (Glu、Asp) の数との関係。箱は四分位範囲を表す。ひげは 5% および 95% までの定量値を表す。太い水平線は中央値を示す。(D) 同定されたリン酸化ペプチドレポーターイオン強度の相対標準偏差 (RSD) の頻度分布。

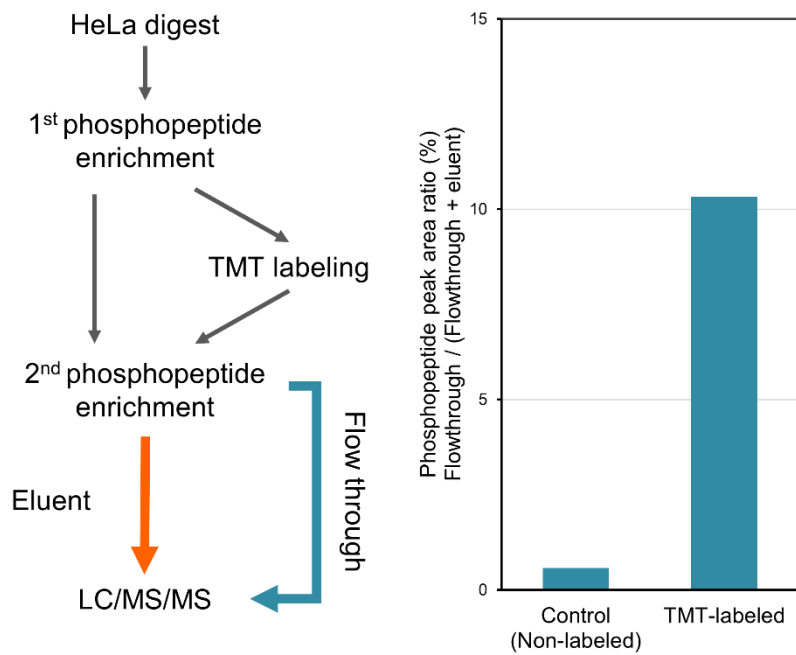


図 12.  $\text{TiO}_2$  リン酸化ペプチド濃縮における TMT 標識リン酸化ペプチドの回収率。 $\text{TiO}_2$  リン酸化ペプチド濃縮からのフロースルー画分の分析。直列で二度のリン酸化ペプチド濃縮実験を行い、フロースルー画分中のリン酸化ペプチドを分析した。同定されたリン酸化ペプチドのピーク面積を溶出画分とフロースルー画分で比較した。

### 第三節 ナノグラム規模固相 TMT 標識プロトコルの開発

TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーの溶出液は TMT 標識反応液と互換性がないため、標識反応の前に脱塩操作が必要となる。試料調製の手順が増えるとリン酸化ペプチド損失の機会が増すため、ナノグラム単位の微量リン酸化ペプチドに対して、1 本の StageTip 逆相マイクロカラムを脱塩装置および固相マイクロリアクターとして使用する固相反応方法を検討した。

まず、StageTip における反応の pH 条件を最適化した。Empore C18 を充填した StageTip をリアクターとして使用し、合成リン酸化ペプチド (YLpSFTPPEK) 20 pmol (25 ng 以下) を 10 μg の TMTzero 試薬で標識した。pH 4.5 では、ペプチドの約 30% が未標識で、60% が 2 つのアミノ基のうち 1 つだけが TMT で標識されていたが、pH 6.5 では 95% 以上が完全に標識されていた (図 13A)。図 13B は、pH 4.5 と 6.5 での反応試料の LC/MS 分析におけるクロマトグラムである。pH 4.5 の抽出イオンクロマトグラム (XIC) では、部分的に標識されたペプチドに対応する二重ピークが観測され、N 末端あるいはリジン残基のうち片方が標識された 2 種類のペプチドが存在することがわかった。一方、pH 6.5 では、同量の TMT 試薬を用いても、完全に標識されたペプチドに対応する単一のピークが優位に観測された。1 μg のペプチドに対し 40 μg の TMT で標識するような比較的大規模な反応では、いくつかの研究グループが固相 TMT 標識に pH 4.5 を採用しているが<sup>111, 112</sup>、ナノグラム単位の量のペプチドを TMT 試薬で標識するには pH 4.5 は低すぎるということがわかった。これらの結果に基づき、できるだけ少量の TMT 試薬を使用するために pH 6.5 を選択し、さらなる検討を行った。

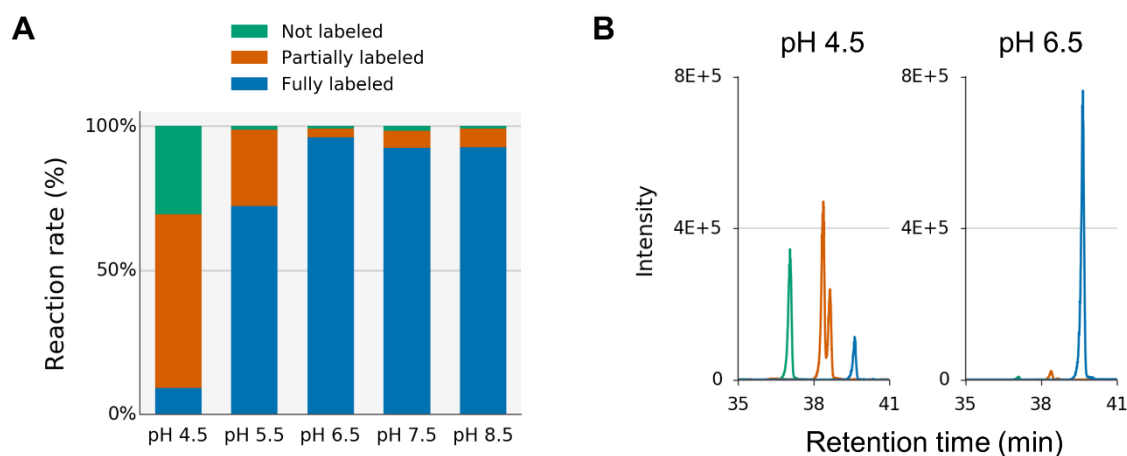


図 13. StageTip を用いた固相 TMT 標識反応の pH 最適化。(A) 合成リン酸化ペプチド YLpSFTPPEK のピーク面積比。ペプチドは TMT タグの数に応じて 3 つのクラスに分類した。Not labeled: TMT 非標識ペプチド。Partially labeled: TMT タグが付いているが、リジン側鎖またはペプチド N 末端のいずれかが標識されていないペプチド。Fully labeled: TMT で完全に標識されたペプチド。(B) 各カテゴリーの合成リン酸化ペプチドの抽出イオンクロマトグラム。

次に、固相標識用のクロマトグラフィー固定相を検討した。一般的な逆相の C18-シリカゲル (Sep-Pak tC18) およびさまざまなポリマーベースの固定相を評価した。50  $\mu\text{g}$  の HeLa 消化物から濃縮されたリン酸化ペプチドを 10  $\mu\text{g}$  の TMTzero で標識した。検討した 5 種類の材料のうち、C18-シリカおよび C18 修飾ポリスチレンジビニルベンゼン共重合体樹脂 (C18-polymer、InertSep RP-C18) は高い標識効率を示したが、C18 を含まない他のポリマー樹脂では反応効率が低かった (図 14A)。標識効率が低い理由を調べるために、未標識のリン酸化ペプチドに着目したところ、これらのリン酸化ペプチドは、ペプチドの疎水親水度の総平均の指標 (GRAVY index<sup>117</sup>) に基づくと、より親水性が高いことが明らかとなった (図 14B)。このことから、StageTip カラムの入口で、固定相の疎水性が不十分なために狭い試料バンド内に濃縮されず、これらの親水性リン酸化ペプチドが完全には捕捉されなかったと考えられた。したがって、これら 5 種類の樹脂の中では、最も疎水性が高いと予想される C18 ポリマー樹脂が、標識効率の点で最も良い結果を示した。注目すべきは、C18 ポリマー樹脂が、同定されたリン酸化ペプチドの数の点でも最も優れた結果を示したことである (図 14C)。そこで、この C18 ポリマー樹脂を選んで、さらなる検討を行うことにした。

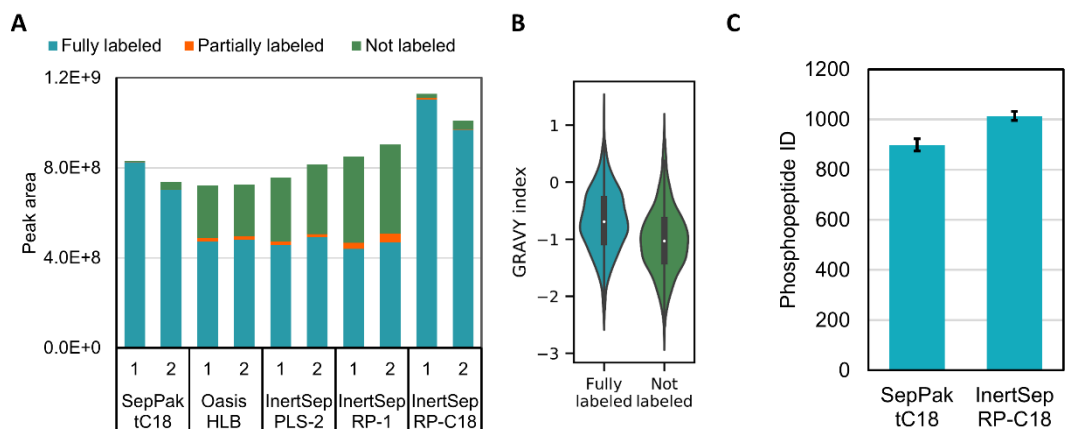


図 14. StageTip を用いた固相 TMT 標識のための逆相系樹脂の最適化。(A) 固相標識のための逆相系樹脂のスクリーニング。各固定相は 2 回の繰り返し実験で評価した。リン酸化ペプチドのピーク面積の合計を示す。Not labeled: TMT 非標識ペプチド。Partially labeled: TMT 標識されているが、リジン側鎖またはペプチド N 末端のいずれかが標識されていないペプチド。Fully labeled: TMT で完全に標識されたペプチド。(B) 5 種類の固定相を用いて TMT で標識された、または標識されていない同定リン酸化ペプチドの GRAVY index 分布。(C) 異なる固定相粒子を用いて固相標識したリン酸化ペプチドの同定結果。エラーバーは標準偏差を示す (n = 3)。

次に、StageTip を用いた固相標識プロトコルと、幅広い疎水性を持つリン酸化ペプチドを用いた従来の溶液反応プロトコルを比較し、解析可能なペプチドに偏りが生じていないかどうかを調べた。その結果、StageTip 固相標識プロトコルは溶液反応プロトコルよりも平均して 1.26 倍良い結果が得られたが (図 15A)、StageTip 固相標識プロトコルでは、図 15B に示すように、最初に溶出する親水性ペプチド画分の結果が溶液反応プロトコルよりも悪くなっていたことが明らかとなった。固相標識法において、親水性ペプチドの回収率が低下することはすでに報告されている<sup>72,111</sup>。これらの親水性リン酸化ペプチドの回収率を向上させるために、試料溶媒添加剤として TFA よりも疎水性の高いイオンペア試薬の使用を検討した<sup>60,76</sup>。そこで、その強い疎水性と LC/MS との互換性に基づいて HFBA を選択し、オリジナルの TFA-StageTip プロトコルおよび溶液反応プロトコルと比較した。その結果、HFBA を用いた StageTip 法は、溶液反応法に比べて平均で 1.71 倍のシグナルが得られた (図 15A)。最初に溶出した画分についても、HFBA プロトコルにより、溶液反応プロトコルと同等の結果を得ることができた (図 15C)。さらに、HFBA は疎水性のリン酸化ペプチドの回収率を向上させた (図 15D)。これは、HFBA が TFA よりも強い表面活性を持つことから、プラスチック製の実験器具へのリン酸化ペプチドの吸着を防ぐためと考えられた<sup>118</sup>。さらに、1-100  $\mu\text{g}$  の HeLa タンパク質から濃縮したリン酸化ペプチドを用いて、最適化した固相標識プロトコルの直線性範囲を確認した (図 16)。リン酸化ペプチドの含有量は、HeLa 細胞由来の全トリプシンペプチドの約 0.5%であることを考慮すると (nanoLC/UV 214nm による推定値)、本法は 5-500 ng のリン酸化ペプチドの分析に使用することが可能であると考えられる。以上より、StageTip を用いたナノグラム単位のリン酸化ペプチドの固相標識には、C18 修飾ポリスチレンジビニルベンゼン共重合体樹脂を固定相とし、HFBA を試料溶媒添加剤として用い、pH 6.5 で反応させることが最適条件であると結論づけた。また、このプロトコルは、新たに商品化された TMTpro 試薬との互換性があることも確認した (図 17)。

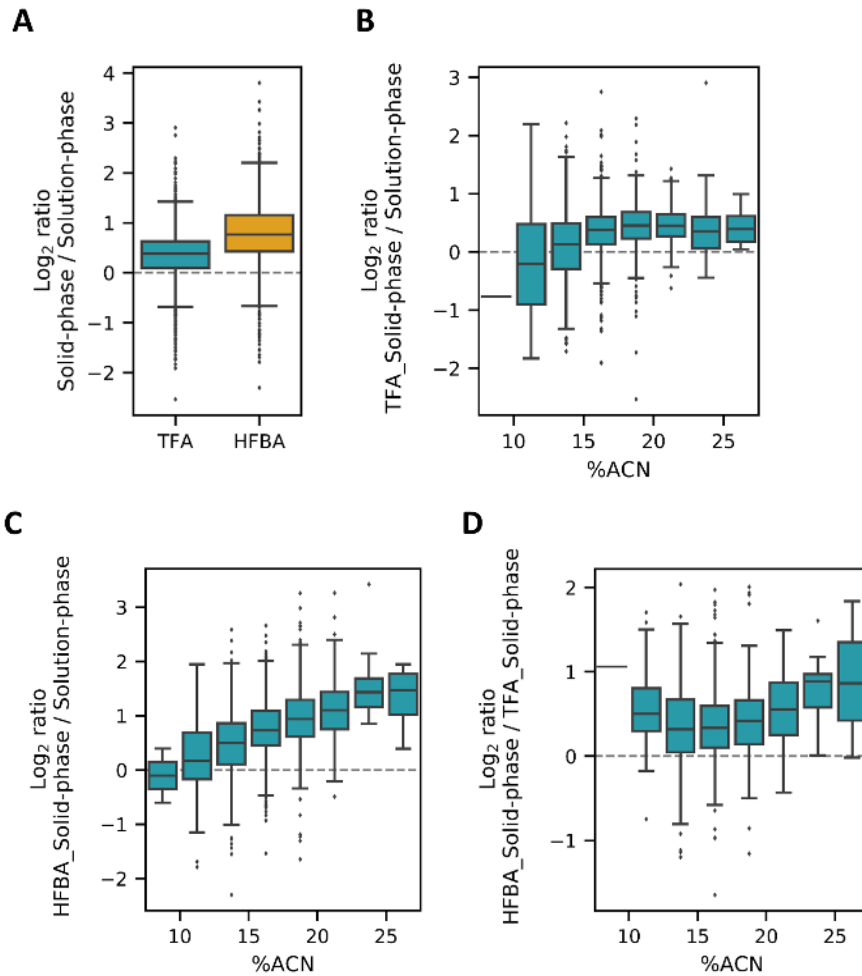


図 15. StageTip を用いた固相 TMT 標識におけるイオンペア試薬の最適化。(A) 各イオンペア試薬を用いた固相標識法と溶液標識法のレポーターイオン強度比の分布の比較 (n = 5、平均)。箱は四分位範囲を表す。ひげは 5%および 95%までの定量値を表す。太い水平線は中央値を示す。(B-D) グラジエント分析におけるリン酸化ペプチドのレポーターイオン強度比とその溶出 ACN 組成の関係。(B) TFA を用いた固相での TMT 標識と溶液相での標識の比較。(C) HFBA を用いた固相 TMT 標識と溶液相標識との比較。(D) HFBA を用いた固相 TMT 標識と TFA を用いた固相 TMT 標識の比較。箱は四分位範囲を表す。ひげは 5%および 95%までの定量値を表す。太い水平線は中央値を示す。



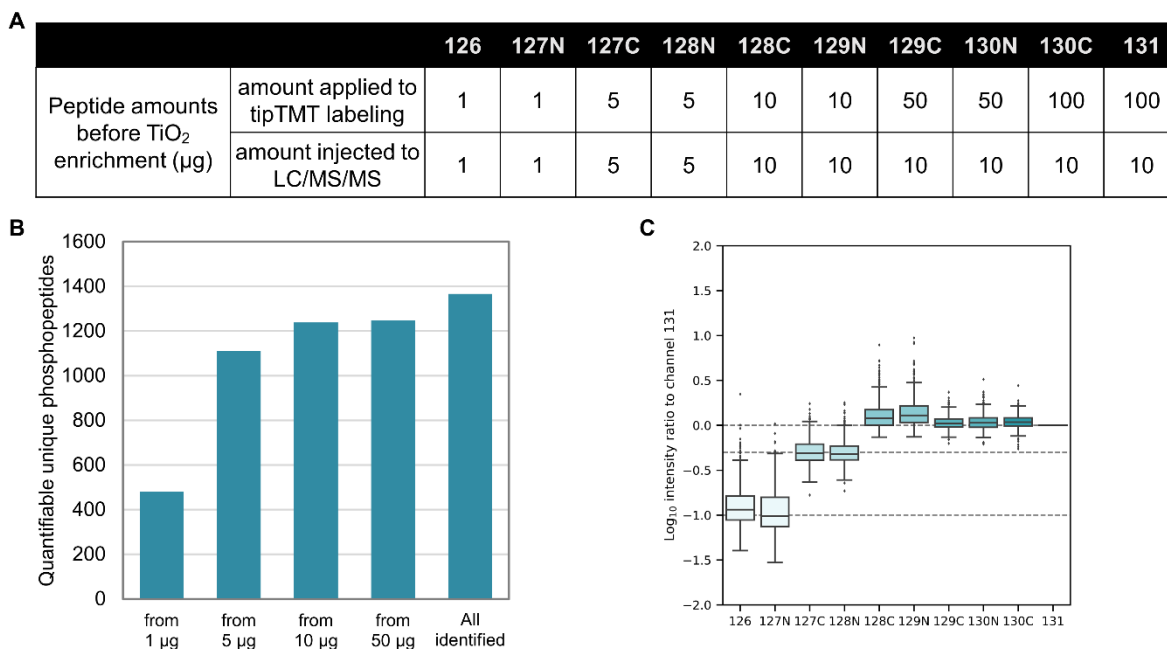


図 16. 最適化された固相 TMT 標識法におけるペプチド量の適用範囲。HeLa 消化物から TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーでリン酸化ペプチドを濃縮し、(A) に示す量に分けた。最適化された固相 TMT 標識法により TMT10plex 試薬で標識した後、示された量のペプチドを混合し、LC/MS/MS で分析した。分析には、FAIMS pro を搭載した Orbitrap Exploris 480 質量分析計と UltiMate 3000 RSLCnano ポンプ (Thermo Fisher Scientific) を使用した。(B) 棒グラフは、定量可能なリン酸化ペプチドの数を示している。10 個のレポーターイオンチャンネルすべてでピークが検出されたものを 1 μg のリン酸化ペプチドから定量可能とした。また、8 個のレポーターイオン (127C、128N、128C、129N、129C、130N、130C、131)、6 個のレポーターイオン (128C、129N、129C、130N、130C、131)、4 個のレポーターイオン (129C、130N、130C、131) が検出されたものを、それぞれ 5 μg、10 μg、50 μg のリン酸化ペプチドから定量可能とした。(C) 箱ひげ図は、チャンネル 131 に対する TMT レポーターイオン強度比の上四分位、中央値、下四分位を示している。箱ひげ図の統計を用いて外れ値を特定した (閾値: 1.5×四分位範囲 (IQR))。破線は期待される比率を表す。1 μg から定量可能なリン酸化ペプチドをプロットした。

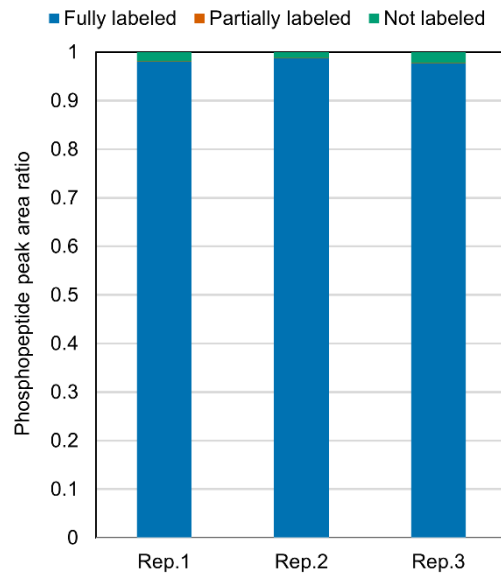


図 17. 固相 TMTpro 標識の標識効率。最適化された固相 TMT 標識プロトコルを用いた HeLa 細胞消化物からの TMTpro 標識リン酸化ペプチドのピーク面積比を示した。試料は 3 回に分けて調製した。ペプチドは、TMTpro タグの数に応じて 3 つのクラスに分類した。Not labeled: TMTpro 非標識ペプチド。Partially labeled: TMTpro 標識されているが、リジン側鎖またはペプチド N 末端のいずれかが標識されていないペプチド。Fully labeled: TMTpro で完全に標識されたペプチド。同定されたリン酸化ペプチドのピーク面積の 98%以上が完全に標識されたペプチドであった。

#### 第四節 セルメチニブを投与した HeLa 細胞のリン酸化プロテオーム解析

確立したナノグラム単位の TMT 標識法の有用性を示すために、本法をセルメチニブ処理した HeLa 細胞のリン酸化プロテオームプロファイリングに適用した。2メートル長のシリカモノリスキャピラリーカラムを用いて 8 時間グラジエントで 3 回の nanoLC/MS/MS を行ったところ、TMT チャンネルごとに 50  $\mu\text{g}$  の HeLa 細胞の全消化物から濃縮された 9822 個のリン酸化ペプチドを定量することに成功した (図 18A)。必要な TMT 試薬量は 1 チャンネルあたり 10  $\mu\text{g}$  で、10plex の TMT 試薬を使用した (セルメチニブ処理、 $n = 5$ 、DMSO 処理、 $n = 5$ )。これらのリン酸化ペプチドの中から、リン酸化サイトの局在化確率が 75%以上のペプチド ( $n = 7524$ ) を用いてさらに解析を進めた結果、7428 個のクラス I リン酸化部位<sup>35</sup>が同定された。Perseus ソフトウェア<sup>119</sup>を用いて、セルメチニブ処理によって有意に発現が低下した 305 個のリン酸化ペプチドを同定した (図 18B)。全リン酸化ペプチドの約 4%が有意な減少を示した (図 18B)。

セルメチニブは、MAP キナーゼキナーゼ 1 および 2 (MKK1/2) の活性を直接阻害することが知られており、その結果、その下流の細胞外シグナル関連キナーゼ 1 および 2 (ERK1/2) の活性を阻害する<sup>120</sup>。メラノーマ細胞を対象とした以前のリン酸化プロテオミクス研究では、MKK1/2 阻害剤の投与により、ERK1/2 阻害剤の投与とほぼ同じリン酸化プロテオームの変化が見られた<sup>121</sup>。これは、MKK1/2 のレベルでは、分岐した経路がほとんど存在しないことを示している。今回取得したデータでは、ERK1/2 の制御部位に対応するリン酸化ペプチドや、MYC、STMN1、RPS6KA1 などの ERK1/2 の既知の下流基質は、セルメチニブ投与により有意な減少を示した。さらに、以前から ERK 依存的にリン酸化されることが示されていたヌクレオポリン複合体メンバー<sup>122,123</sup>も、セルメチニブ処理によって減少した (図 19)。

次に、KSEA (Kinase-Substrate Enrichment Analysis)<sup>124</sup>を行った (図 18C)。キナーゼ-基質の関係は、公共データベース PhosphoSitePlus のキナーゼ基質データセットに基づいて割り当てられた。期待した通り、KSEA では MKK1、ERK2、RPS6KA1 の活性減少が見られた。興味深いことに、セルメチニブ処理後に MTOR や CDK4 などの一部のキナーゼが活性化された。いくつかの細胞株では、MAPK 経路の阻害後に PI3K/MTOR 経路が活性化されることが報告されており<sup>125,126</sup>、MAPK と MTOR の共同阻害は相乗効果を示した<sup>127</sup>。MEK/CDK4、6 の共阻害も一部のメラノーマで有効であることが報告されている<sup>128</sup>。本手法により、最小限の量のリン酸化ペプチドと TMT 試薬で、薬物処理による主要なキナーゼ活性の変化を解析することが可能であった。

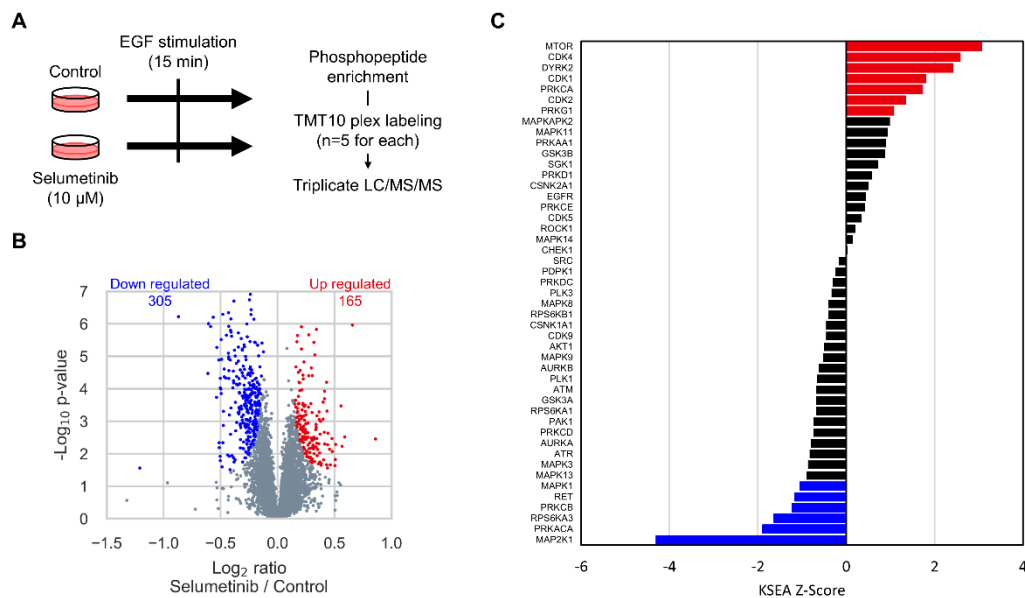


図 18. セルメチニブで処理した HeLa のリン酸化プロテオームの定量比較解析。  
 (A) ワークフローの概略。コントロールおよびセルメチニブで処理した HeLa 細胞を EGF で刺激し (15 分)、回収した。タンパク質の消化、リン酸化ペプチドの濃縮、固相 TMT 標識を行った後、LC/MS/MS を 3 回繰り返して試料を分析した。(B) リン酸化プロテオームの比較解析。プロットは、同定されたリン酸化ペプチドの強度比と p 値を示している (n = 7524)。305 個のリン酸化ペプチドと 165 個のリン酸化ペプチドが、それぞれ有意な減少と増加を示した (それぞれ青/赤でハイライト:  $S_0 = 0.05$ ,  $FDR = 0.01$ ,  $n = 5$ )。(C) Kinase-Substrate Enrichment Analysis (KSEA) の結果。同定されたすべてのリン酸化ペプチド (n = 7524) を分析に使用した。4 つ以上の基質を持つキナーゼの Z スコアを示す。負のスコアはキナーゼ活性の低下を意味する。z-score が 1 以上のキナーゼは青/赤で表示されている。

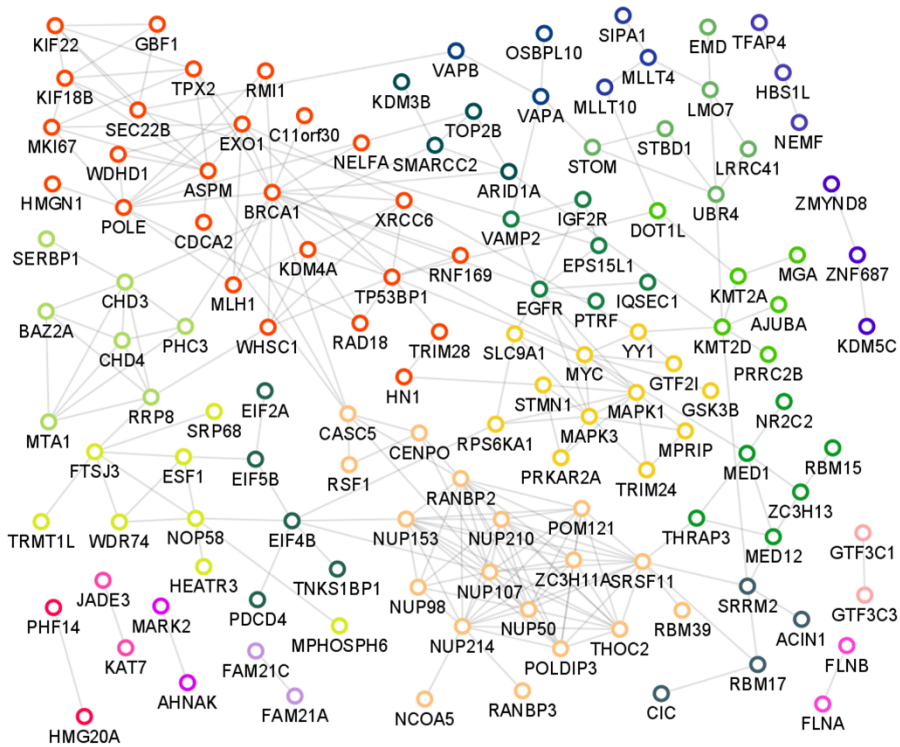


図 19. セルメチニブ処理によりリン酸化量が減少したタンパク質の STRING ネットワーク解析。セルメチニブ投与によりリン酸化部位が減少したタンパク質間相互作用（最小信頼度スコア 0.700）の STRING ネットワーク (v11.0)。ノードの色は、STRING MCL クラスタリング（インフレーションパラメータ：1.6）に基づくクラスタを示す。孤立したノードは表示していない。

## 第五節 同重体標識シグナル増幅とリン酸化モチーフを利用する

### チロシンリン酸化プロテオミクス

TMT で標識された大量の「キャリア試料」の使用はチロシンリン酸化プロテオミクスにおいても有用である。最近、Chua らは BOOST (Broad-spectrum Optimization Of Selective Triggering) 法を開発し、過バナジン酸 (チロシンホスファターゼ阻害剤) 処理した細胞をキャリア試料として使用し、pY ペプチドの検出率を高めた<sup>129</sup>。抗リン酸化チロシン抗体を用いた pY ペプチド濃縮法と組み合わせた BOOST 法では、2300 以上のユニークな pY ペプチドを定量することができた。しかし、タンパク質の必要試料量はなお mg 単位であり、抽出可能なタンパク質量が 100  $\mu$ g 以下であることが多い臨床検体のような微量試料への適用は困難であった。そこで本研究では pY ペプチドの検出能を高めるために、チロシンキナーゼを用いた *in vitro* キナーゼ反応処理試料をキャリア試料に用いることにより、pY ペプチドの検出率向上を目指した。

全体のワークフローを図 20a に示す。リン酸化モチーフ含有ペプチドは、チロシンキナーゼを用いた *in vitro* キナーゼ反応により生成する (図 20a)。これにより、同じ試料 (同じ細胞種または組織) を用いて、内在性リン酸化部位に対応する、非リン酸化画分のリン酸化 (逆リン酸化) を達成することができる<sup>130-132</sup>。pY 部位は pS や pT 部位と比較してリン酸化率 (リン酸化ストイキオメトリー) が極めて低いため検出が制限されるが<sup>132, 133</sup>、この低いストイキオメトリーにより、逆リン酸化に利用することが可能な非リン酸化体が試料中に大量に存在する。タンデム MS では、内在性リン酸化ペプチドと逆リン酸化ペプチドからの TMT 標識プリカーサーイオンが断片化されることで、ペプチド同定のためのシグナルが増幅され、特に存在量の少ない内因性リン酸化ペプチドのペプチド同定に役立つ。異なる試料間の内在性リン酸化ペプチドの相対的な定量には、同時プリカーサー選択-MS<sup>3</sup> (SPS-MS<sup>3</sup>)<sup>28</sup> を用い、MS<sup>3</sup> でレポーターイオンを定量することで、プリカーサーイオンの共分離による干渉を低減することが可能である。

チロシンリン酸化プロテオームのカバー率を拡大するために、チロシンキナーゼ EGFR を用いて、*in vitro* キナーゼ反応をトリプシン消化ペプチドに対して行い、HeLa ペプチドの逆リン酸化部位をリン酸化させ、チロシンリン酸化反応モチーフに基づく pY ペプチドを生成した。その後、存在量の少ない内在性のリン酸化ペプチドに対応するため、先に開発したナノグラム規模の固相 TMT 標識プロトコルを適用し、TMT 標識を行った。Cheung ら<sup>105</sup> は、キャリア試料に基づく定量法には、技術的な限界により、特にキャリア試料が大量に添加された場合にデータの品質に悪影響を与えると報告している。しかし、本手法では細胞内のリン酸化ストイキオメトリーが各 pY 部位に依存するため、すべての pY ペプチドに対し TMT 比を定量可能な範囲に制御するこ

とは困難である。そこで、定量可能なリン酸化部位の数に対するリン酸化モチーフ含有ペプチドのキャリア試料量の添加効果を評価した。未処理の HeLa 細胞から得た異なる量の TMT 標識ペプチド (5、10、25、60  $\mu\text{g}$ ) を、異なる量 (5、25、125  $\mu\text{g}$ ) のキャリア試料 (EGFR による pY モチーフペプチド) と混合した (図 20a)。標的試料/キャリア試料添加量比を変えた場合の定量可能な pY サイト割合の分布を図 20b に示す。ここでは、定量値に悪影響を及ぼすイオンサンプリング効果<sup>103,105</sup>を最小化するために、pY モチーフペプチドチャンネルの試料チャンネルに対する TMT シグナル比は 100 未満であるべきという基準 (図 20b) を設定した。この基準を適用した場合、リン酸化モチーフ含有ペプチドの量が一定の条件で内在性ペプチドの量を増やすと、定量可能な pY 部位の割合、数は直線的に増加した (図 20b、c)。一方、内在性ペプチドの量が限られている場合、定量可能な pY 部位の数は、リン酸化モチーフ含有ペプチドの量の増加とともに飽和するか、あるいは減少することが示された (図 20c)。この減少は、キャリア試料由来のシグナルが標的試料のシグナルに比して高くなりすぎるために、上述の基準を満たさなくなるからであると考えられた。

以上の結果から、高純度の pY ペプチドを添加することが可能な本リン酸化モチーフ標的法が、pY 抗体を用いるような pY 特異的アフィニティー精製を必要とせずに、内在性 pY 部位の検出能を高めることができることが実証された。本手法により、60  $\mu\text{g}$  の試料から 2000 以上のチロシンリン酸化ペプチドが定量可能であることを実証した。

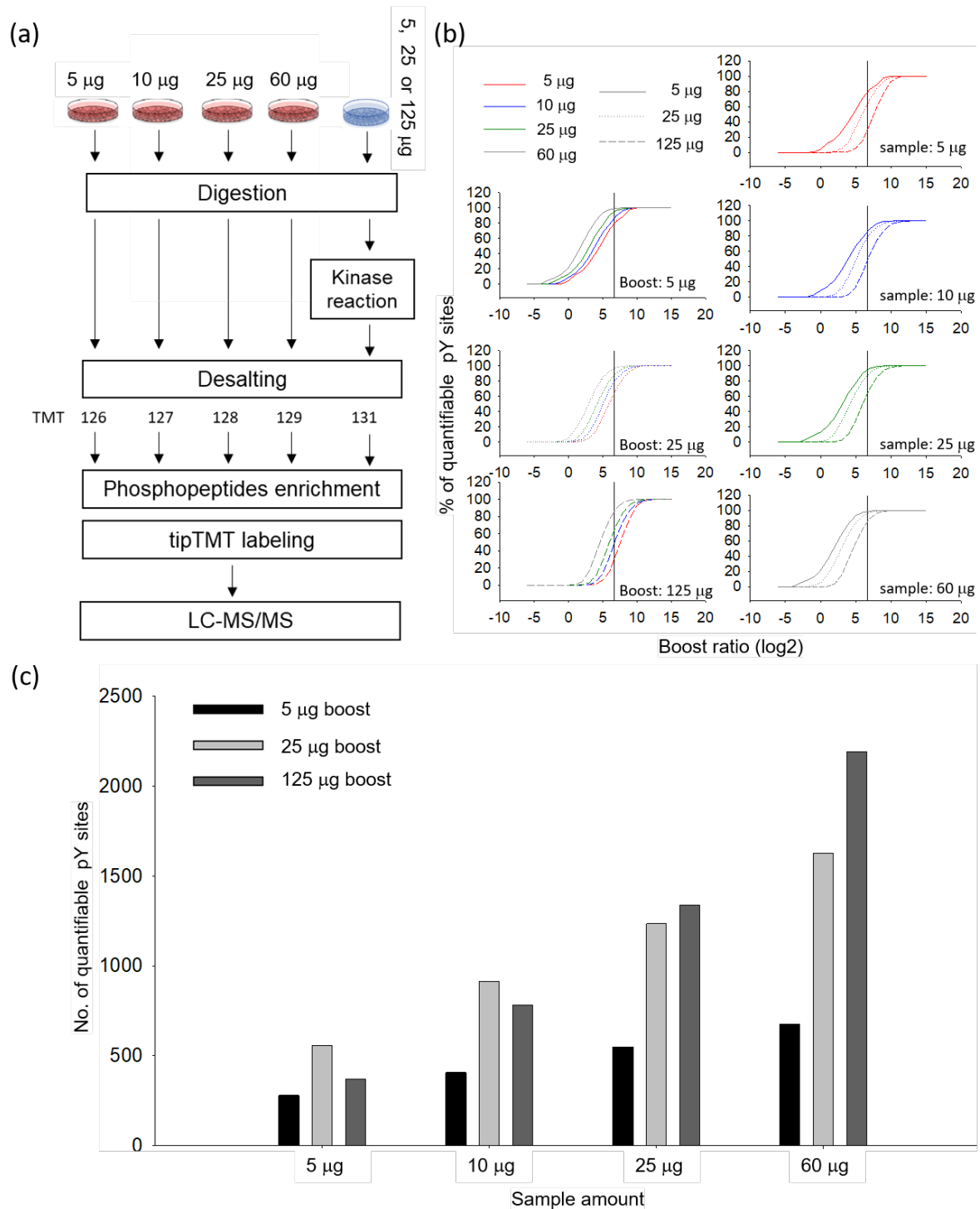


図 20. リン酸化モチーフを利用するチロシンリン酸化プロテオミクスの概要と、定量可能な pY 部位に対するキャリア試料の添加量比の影響。(a) 未処理の HeLa 細胞からの異なる量の TMT 標識ペプチド (5、10、25 および 60  $\mu\text{g}$ ) を、異なる量 (5、25 および 125  $\mu\text{g}$ ) の pY モチーフ (EGFR) 中心のペプチドと混合した。リン酸化ペプチド濃縮後に固相 TMT 標識した各試料を混合し、LC/MS/MS で分析した。(b) ブースト比と定量可



能 pY 部位の割合の分布。(c) 各試料量においてリン酸化モチーフ含有ペプチドの量を変えた場合に検出された pY サイトの数 (シグナル比 < 100 倍)。

## 第六節 結語

本章では、リン酸化ペプチドを濃縮した後、ナノグラム規模の固相 TMT 標識を用いる、高感度なリン酸化プロテオーム解析を行うための新しい手法を開発した。反応 pH、逆相固定相、イオンペア試薬を適切に選択することが、固相マイクロリアクター上でのリン酸化ペプチド標識を成功させる鍵であった。この方法では、リン酸化ペプチドを濃縮した後、高感度の StageTip を用いた同重体標識技術を用いることで、感度を損なうことなく、わずかな量の TMT 試薬でリン酸化ペプチドを標識することができる。さらに、本手法を、*in vitro* キナーゼ反応により生成したチロシンリン酸化ペプチドをキャリアペプチドとして添加するチロシンリン酸化プロテオミクスと組み合わせることで、60  $\mu\text{g}$  の試料から 2000 以上のチロシンリン酸化ペプチドが定量可能であることを実証した。今回の戦略は、ナノグラム規模の試料を用いた、大規模な定量リン酸化プロテオミクス研究に役立つものと期待している。

## 第四章

### 捕捉型イオンモビリティスペクトロメトリーによる

#### 分離空間の拡大に基づくプロテオミクス LC/MS/MS

#### における同重体標識定量精度の向上

##### 第一節 序

MS を用いたプロテオミクスは、様々な生体試料からタンパク質を同定・定量するための強力なツールである。TMT による同重体標識定量プロテオミクスでは、多重化された試料中の全く同一のプリカーサー質量をもつペプチドから生成される異なるレポーターイオンをモニターすることで、同時並行の定量を可能にする<sup>26</sup>。これにより、前章で行ったような高感度かつ高スループットな解析が実現できるが、この方法で得られる定量データの精度はターゲットとなるプリカーサーイオンの四重極分離窓に非標的プリカーサーイオンが混入することで悪影響を受ける。この定量比の歪みを低減するために、既に様々な手法が開発されてきた。プロトン移動イオン反応によりプリカーサーイオンの電荷状態を減少させることで、妨害イオンを除去し、定量測定の精度を向上させることが可能になった<sup>134</sup>。また、SPS-MS<sup>3</sup>をはじめとする MS<sup>3</sup> を用いたタンデム質量分析により、混入したプリカーサーイオンが定量に及ぼす影響を取り除くことに成功している<sup>27,28</sup>。しかし、これらのアプローチは同重体タグにおける定量比の歪みを防ぐことができるが、質量分析計内で MS<sup>2</sup> のプロダクトイオンをさらに選択する必要があるため、感度やデューティサイクルの面で切り離すことのできない限界がある。そのほか、TMT を用いた補完レポーターイオンアプローチ<sup>135,136</sup> や、EASI-tag<sup>137</sup> を用いた同重体標識試料の解析法では、プリカーサーの質量と電荷状態を利用してバックグラウンド干渉を低減し、定量の精度を向上させることができる。しかし、これらの手法では、標的ペプチドのプリカーサーイオンに同位体ピークの影響を排するために約 0.4  $m/z$  という非常に狭い四重極分離窓が必要であることから、感度が低くなってしまう問題がある。

以上の戦略はすべて、質量分析計内においてプリカーサーイオンを選択する時点での妨害イオンの除去に主に焦点を当てている。一方で、質量分析の前のペプチド分離効率を上げることも、歪んだ定量比を正すためには有効である。第三章で採用したようなメートル長のモノリスカラムと長時間の緩勾配溶出を組み合わせた高分離能 LC や、高 pH 逆相 LC (High-pH RPLC) による TMT 標識ペプチドの事前分画により、質

量分析の前に試料の複雑さを軽減し、妨害イオンにより定量比が歪む影響を低減させることができる<sup>138</sup>。しかし、このような実験では、総測定時間が長くなり、スループット面での同重体修飾法の利点を生かすことができない。一方イオンモビリティスペクトロメトリー (IMS) は、LC および MS と互換性があり、総測定時間を増加させることなく、MS における感度と選択性の向上、および全体的なピークキャパシティ (PC) の増加を可能にする<sup>139,140</sup>。これまでに、進行波型イオンモビリティスペクトロメトリー (TWIMS)<sup>141</sup> や電界非対称型イオンモビリティスペクトロメトリー (FAIMS)<sup>30,31,142</sup> を用いた LC/IMS/MS 測定により、プロテオームの定量分析において、同重体タグの定量比を改善させることが可能であることが示されている。

捕捉型イオンモビリティスペクトロメトリー/四重極-飛行時間型質量分析計 (trapped ion mobility spectrometry/quadrupole/time-of-flight mass spectrometer、TIMS/Q/TOF) のために開発された TIMS アナライザーは、2つのトラップデバイスを直列に配置し、イオンの捕捉と放出を交互に繰り返すことが可能である。Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) 取得法を名付けられた本解析法を TOF による高速 MS/MS 取得と組み合わせることで、TIMS 部と四重極部でイオンを廃棄することなく、高感度・高効率のタンデム質量分析が可能となってきた<sup>8,143</sup>。これらの特徴は、同重体標識を用いた高速かつ高感度な定量プロテオミクスに特に重要であり、大きなメリットが期待できる。そこで本研究では、RPLC と TIMS を組み合わせた場合の分離空間の特徴を明らかにし、LC/TIMS/Q/TOF システムがどの程度まで同重体標識ペプチドの標的プリカーサーイオンを正確に定量できるかを検討した。

## 第二節 TMT プロテオミクスにおける TIMS 分離場の特性

プロテオミクスにおける同重体標識定量のための LC/TIMS/Q/TOF システムの性能を評価するために、2 プロテオームモデル<sup>27</sup>に基づいて一連の試料を調製した。標準試料は、TMT 標識後の大腸菌タンパク質消化物と HeLa タンパク質消化物を混合して調製した。大腸菌ペプチドと HeLa ペプチドの理想的な TMT 6-plex レポーターイオン比は、それぞれ 10 : 4 : 1 : 1 : 4 : 10、0 : 0 : 0 : 4 : 4 : 4 とした (図 21)。

まず、RPLC の後に TIMS を挿入することで、Q/TOF MS の前にどれだけ追加の分離空間が得られるかを評価した。RPLC と TIMS の両方の分離選択性が完全に直交していれば、分離空間は最大限に活用できる。図 22 は、MaxQuant<sup>144,145</sup> (version 1.6.4.0) を用いて抽出したモノアイソトープピークの、RPLC と TIMS が提供する分離空間における分布を示したものである。2つの分離アプローチの間には相関関係がなかった ( $r^2 = 0.056$ )。RPLC-TIMS の 2次元分離空間の利用率は、Perseus ソフトウェア<sup>119</sup>で推定したモノアイソトープピークの密度分布を用いて算出した。算出された分離空間の利用率は 34.3%であり、電荷の高いイオンの密度分布がより凝縮されているために、分離空間の半分以上が利用されていないことがわかった。次に、RPLC と TIMS による分離のピークキャパシティ (PC) を評価した。20分から85分、0.6 Vs cm<sup>-2</sup>から1.5 Vs cm<sup>-2</sup>で溶出した187247個のペプチドイオンの半値全幅 (FWHM) を用いて PC を算出したところ、RPLC の PC は 197.7、TIMS の PC は 48.7 であった。つまり、RPLC と TIMS を組み合わせることで、約 3300 (197.7×48.7×0.343) の PC を容易に達成することができた。これは従来の多次元 LC 分画法では 30 画分の測定で得られる PC に相当しており、TIMS により 30 倍高スループットな解析が可能であることが示された。

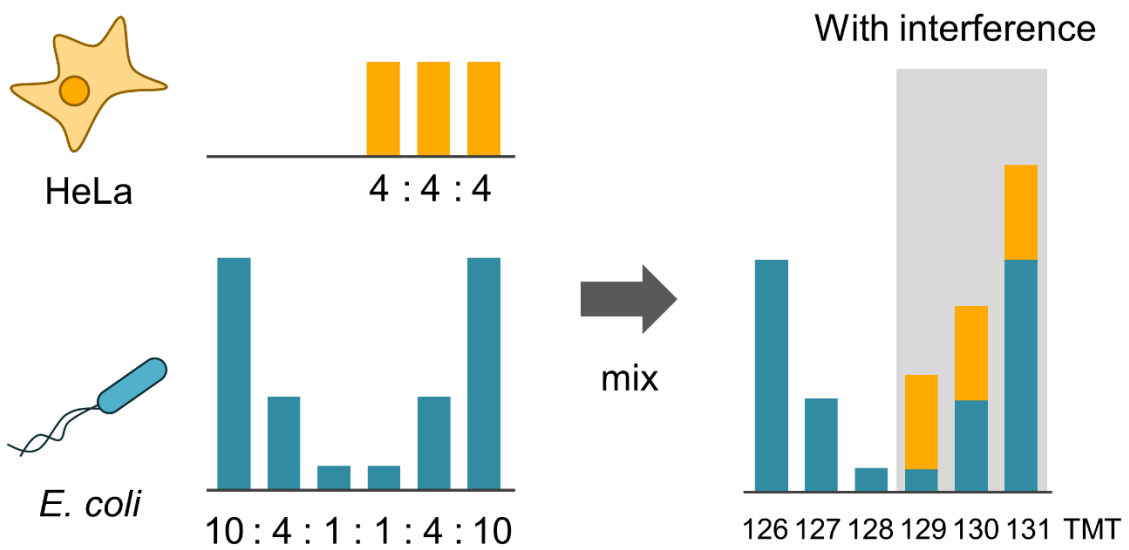


図 21. 2 つのプロテオームからなる標準試料の概略。HeLa と大腸菌のプロテオーム試料を消化し、TMT で標識し、0 : 0 : 0 : 4 : 4 : 4 (HeLa) と 10 : 4 : 1 : 1 : 4 : 10 (大腸菌) の比率で混合した。

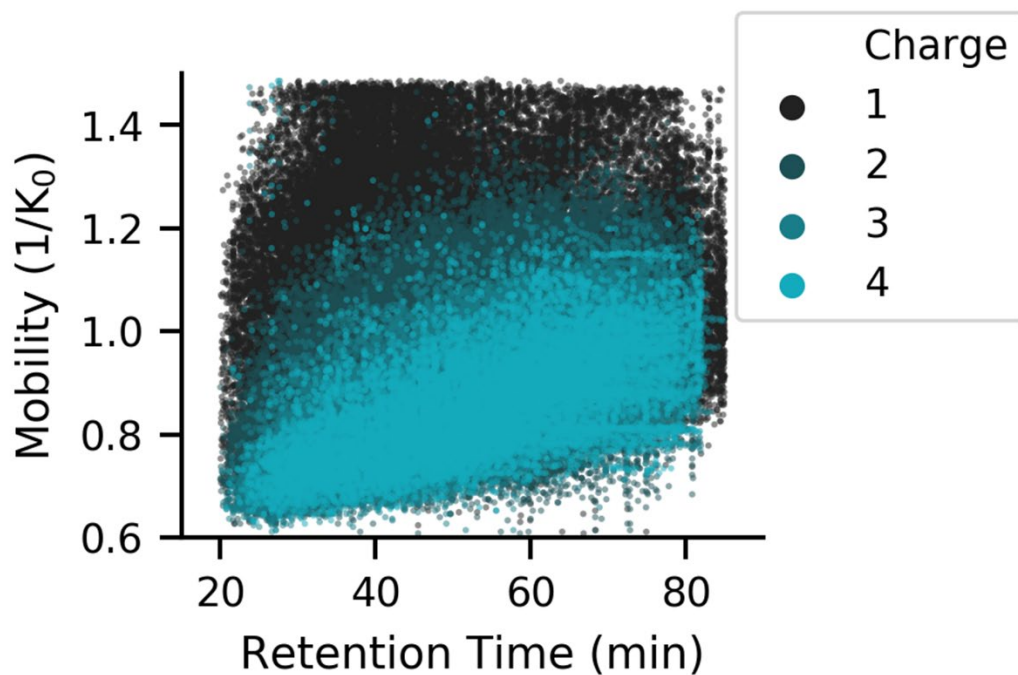


図 22. RPLC と TIMS によるペプチド分離の直交性。フルスキャン MS で検出されたモノアイソトープピークの保持時間とイオンモビリティ分布を示す。同位体ピークは MaxQuant ソフトウェアを用いてモノアイソトープピークに集約した。

### 第三節 TIMS 分離場は非標的イオンの混入を抑制する

同重体標識定量法では、非標的前駆体イオンの共分離によりレポーターイオン強度比が歪み、タンパク質の定量性に影響を与える。TMT 標識ペプチドの大規模プロテオミクス解析に関する最近の報告では、TWIMS や FAIMS を用いたイオンモビリティスペクトロメトリーにより、プリカーサーの共分離の程度が大幅に減少することが示されている<sup>30,31,141,142</sup>。本研究では、LC/TIMS/Q/TOF における共分離・共断片化の程度を評価するために、空のチャンネルのレポーターイオン強度と試料を含むチャンネルのレポーターイオン強度の比から算出される Interference-Free Index (IFI)<sup>146</sup> を利用した (図 23A)。同定された HeLa ペプチドについて、1 に近い IFI 値は、質量分析検出シグナルの大部分が HeLa ペプチドに由来し、大腸菌ペプチドの混入が少ないことを示している。本研究では、IFI が 0.95 より大きい同定ペプチドを干渉なしと定義した。共通して同定される HeLa ペプチドについて、標準的な四重極分離窓 ( $2 m/z$ ) を持つ TIMS-off、標準的な四重極分離窓 ( $2 m/z$ ) を持つ TIMS-on、狭い四重極分離窓 ( $1 m/z$ ) を持つ TIMS-on の三条件での分析において、それぞれ 19.7%、55.7%、63.4%が干渉なしと分類された (図 23B)。これらの結果から、TIMS は、TMT 標識試料のプロテオーム解析において、プリカーサーの共分離を大幅に低減できることが示された。

また、quadrupole/Orbitrap/ion trap (Q/OT/IT) 装置 (Orbitrap Fusion Lumos) を用いて、同試料を同クロマトグラフィー条件で、標準的な Orbitrap MS<sup>2</sup> 法と SPS-MS<sup>3</sup> 法で分析した。この実験では、共通して同定された HeLa ペプチドの 24.0%、43.0%、59.7%が、分離窓の狭い Orbitrap-MS<sup>2</sup>、SPS-MS<sup>3</sup>、TIMS/Q/TOF で、それぞれ干渉なしと分類された (図 23B)。今回の実験において SPS-MS<sup>3</sup> は TIMS/Q/TOF に比べて共分離イベントの低減という点では効果的ではなかったが、これは MS<sup>3</sup> スペクトルに対する、MS<sup>2</sup> におけるプロダクトイオンの選択が不適切であったためと考えられる。最近では、SPS-MS<sup>3</sup> にリアルタイムデータベース検索 (RTS) を組み合わせることで、MS<sup>3</sup> のために MS<sup>2</sup> において適切なプロダクトイオンを選択できるようになり<sup>29</sup>、定量精度が向上することが報告されている。



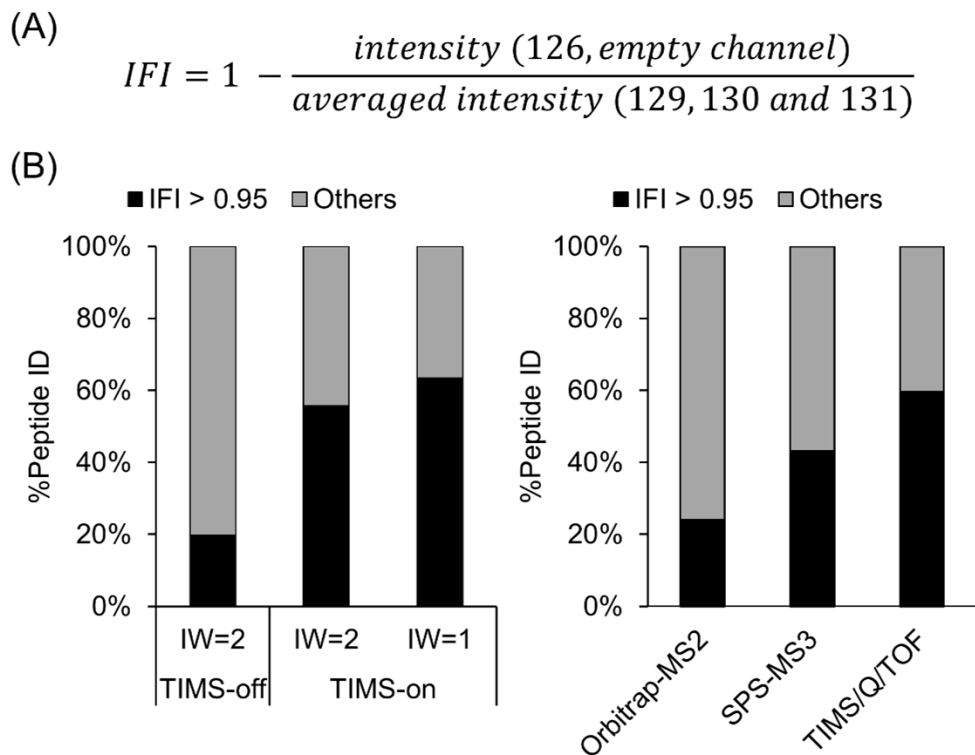


図 23. 共通同定されている HeLa のペプチドをもとに、プリカーサーイオンの共分離効果を評価した。(A) interference-free index (IFI) を算出する式。同重体のプリカーサーイオンを共分離した場合、IFI が低下する。(B) 低干渉と判定されたペプチドの比率を 100%積み上げ棒グラフで示した。IFI が 0.95 以上のペプチドを干渉なしとした。IW：四重極分離窓。

#### 第四節 TIMS 分離場は TMT の定量真度を向上させる

TMT 定量における 65 分グラジエント LC/TIMS の性能をさらに評価するために、大腸菌ペプチドの最初の 3 チャンネルと最後の 3 チャンネルを比較し、HeLa のバックグラウンドイオンが定量結果にどの程度影響するかを評価した。まず、TIMS を用いた場合と用いない場合の定量結果を比較した。図 24A は、共通して同定された大腸菌ペプチドの分析で得られた TMT 定量比を TIMS の有無で示したものである。6 つのレポーターイオンチャンネルのいずれかにおいてシグナルが検出されなかった MS/MS スペクトルはすべて破棄した。TMT 比（中央値）は、TIMS-on、TIMS-off でそれぞれ 10.0 : 4.8 : 1.3 : 1.6 : 4.6 : 11.6、10.0 : 5.0 : 1.4 : 2.3 : 6.0 : 12.8 であった。すなわち、バックグラウンドイオンを含む TMT チャンネルの定量比は、TIMS-off では最大 61.3%、TIMS-on では最大 19.2% 過大評価されており、TIMS が定量真度の向上に有効であることがわかった。さらに、TIMS と狭い四重極分離窓 (1  $m/z$ ) を組み合わせた場合、バックグラウンドイオンを含む TMT 比は最大で 13.6% 過大評価された (図 24A)。このように、TIMS を用いた場合には、TIMS を用いない場合に比べて定量真度が向上し、さらに狭い四重極分離窓を用いた場合には、定量真度は一層向上した。これらの傾向は、HeLa のペプチドの定量結果と一致した。

次に、MS<sup>2</sup> および SPS-MS<sup>3</sup> モードを用いて、TIMS/Q/TOF による大腸菌の定量結果を Q/OT/IT による定量結果と比較した。Orbitrap-MS<sup>2</sup>、SPS-MS<sup>3</sup>、TIMS/Q/TOF では、共通して同定された大腸菌ペプチドについて、バックグラウンドイオンとの定量比がそれぞれ 70.2%、19.7%、16.2% 過大評価されていた (図 24B)。これらの結果から、TIMS/Q/TOF は SPS-MS<sup>3</sup> と同等以上に定量比率の歪みの軽減効果があることが明らかとなった。SPS-MS<sup>3</sup> と比較した TIMS 分離の潜在的な利点は、PASEF 取得スキームにより TIMS 分離を追加してもデューティサイクルが増加しないことである。近年報告されたインテリジェント RTS プラットフォームであっても、SPS-MS<sup>3</sup> 法を適用するとデューティサイクルの増加は不可避である。さらに、TIMS は 1 回の LC 分析で、感度を落とすことなく、イオンモビリティに基づいてほとんどのトリプシン消化ペプチドイオンを捕捉・分離することができる。一方で、FAIMS のようなイオンモビリティスペクトロメトリーは、標的イオンの分析時にフィルターとして機能するため、他のイオンを捨てる必要があり、すべてのペプチドイオンを分析するためには複数回の試料注入が必要となる。これらの結果は、TIMS/Q/TOF システムが同重体タグを用いた高速・高感度・高精度・高スループットの多重化定量プロテオミクスにとって非常に魅力的であることを示している。

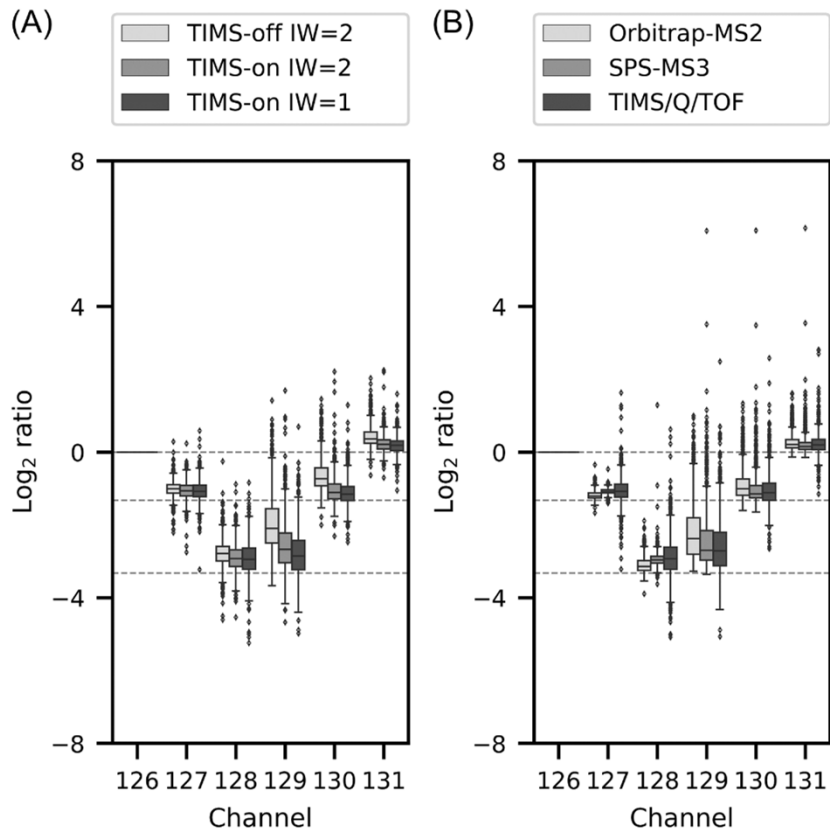


図 24. 大腸菌由来のペプチドの TMT 定量比がバックグラウンドの HeLa プロテオームの存在でどの程度歪曲するかを調べた。解析には共通に同定された大腸菌ペプチドを使用した。箱ひげ図は、TMT 定量比の上四分位、中央値、下四分位を示している。箱ひげ図の統計を用いて外れ値を特定した（閾値： $1.5 \times \text{IQR}$ ）破線は期待される比率を表す。IW：四重極分離窓。(A) TIMS-on と TIMS-off の比較。(B) 異なるシステム設定間の比較。

## 第五節 結語

本研究では、RPLC/TIMS の分離空間の直交性を明らかにし、TMT 定量プロテオミクスへの応用を検討した。その結果、RPLC/TIMS の二次元分離空間の 34.3%が、TMT 標識プロテオーム試料の分離に有効であることが示された。TIMS が、Q/TOF タンデム質量分析の前段階におけるピークキャパシティを、分析時間を増やすことなく大幅に向上させることができることを実証した。TIMS は、TMT 定量における比率歪みを軽減し、装置の感度やスキャン速度を犠牲にすることなく、SPS-MS<sup>3</sup> 法と同等の比率の歪み軽減を達成することができた。LC/TIMS/Q/TOF システムを用いた同重体標識に基づく定量法は、ハイスループット、高精度、高感度が必須である臨床試料の分析に向けて、大きな可能性を秘めていると考えられる。

## 第五章

### イオンモビリティスペクトロメトリーにおいて

#### リン酸化修飾がペプチドイオンの衝突断面積に及ぼす影響

##### 第一節 序

タンパク質のリン酸化は可逆的な翻訳後修飾であり、タンパク質のフォールディング、活性、タンパク質間の相互作用、細胞内局在に影響を及ぼす<sup>34</sup>。リン酸化は、多くの細胞機能を制御する細胞内シグナル伝達経路において重要な役割を果たしていることがよく知られている<sup>33</sup>。細胞内で変化したリン酸化イベントをモニターするために、さまざまな技術が開発されてきたが、質量分析は現在、プロテオーム規模の研究を行うための最も強力な技術の1つである<sup>65,147</sup>。LC/MS ベースのショットガンプロテオミクスでは主に MS/MS スペクトルがペプチドの同定に使用されるが、LC の保持時間などの他の情報も配列の割り当ての信頼性を高めるのに役立つ<sup>51</sup>。近年の予測モデル<sup>52,148-151</sup>の向上により、ペプチドの保持時間情報は、特にターゲットモード<sup>152,153</sup>やデータ非依存取得法 (DIA)<sup>154</sup>の分析において、ペプチドの同定や定量的ための強力な補助手段となっている。しかし、リン酸化ペプチドの保持時間を予測するモデルはまだ成熟していない。そこでこれまでに、リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドのペアを比較する解析がなされてきた<sup>54,58,59,76</sup>。また第一章では、同様のペアの解析によりリン酸化ペプチドの保持機構を説明するモデルを確立した。

近年、プロテオミクスおよびリン酸化プロテオミクス実験におけるペプチド同定効率を向上させる手段として、LC と MS の間に IMS を挿入することが注目されている<sup>8,9,155-157</sup>。前章では、IMS により得られる LC と MS を補完する分離の次元により、タンパク質の定量精度が向上することが示された。IMS では、イオンの形状や電荷状態の違いに基づいてイオンを分離するため、イオンの構造情報が得られる。しかし、リン酸化ペプチドの衝突断面積 (CCS) 値を正確に予測し、IMS の有用性を最大限に引き出すためには、リン酸基がペプチドの CCS にどのような影響を与えるのかを知る必要がある。これまでの IMS-MS 研究<sup>158-161</sup>では、少数の 1 価および 2 価のリン酸化ペプチドイオンを用いて、リン酸化ペプチドの CCS が、同等の質量を持つ非リン酸化ペプチドの CCS よりも小さいことが示されてきた。これらの知見に基づいて、リン酸化ペプチドの CCS を予測するための固有サイズパラメーター (ISP)<sup>162,163</sup>を用いたモデルが拡張されてきた。ISP は、ペプチドの CCS に対する各アミノ酸残基または修飾の平均的な寄与を示し、ペプチドのアミノ酸組成に基づいて CCS を予測することができ

る。しかし、このモデルでは現在のところ、リン酸化修飾位置情報や残基の組み合わせなど、配列特有の特徴は考慮していない。また、このモデルではリン酸化に伴う CCS の変化を CCS の増加として扱っており<sup>159,164</sup>、特定の配列に見られるリン酸化による CCS の減少を説明することができない<sup>159,165</sup>。さらに、このモデルは、分子量 1000 Da から 1400 Da の 2 価ペプチドを用いて開発されたものであるため、プロテオミクス実験で一般的に検出される 600 Da から 5000 Da の範囲の、より大きく、より高電荷のイオンに直接適用することはできない。したがって、リン酸化ペプチドの CCS 予測のための改良モデルを確立するためには、さらなるデータ収集が必要である。本研究では、TIMS を用いてリン酸化ペプチドとそれに対応する非リン酸化ペプチドの CCS 値を系統的に解析した。TIMS は、イオン源からのガス流と対向する電界の力で RF イオントンネル内にイオンを捕捉し、電位を下げることで捕捉されたイオンを CCS に応じて順次放出するものである<sup>166</sup>。HeLa 細胞抽出物由来トリプシン消化ペプチドから得られた 6544 個のリン酸化ペプチドイオンの CCS 値を調べたところ、800 Da から 4500 Da の質量範囲で、電荷状態が 2 価から 4 価のリン酸化ペプチドイオンと非リン酸化ペプチドイオンの 4433 個の CCS ペアが得られた。その結果、CCS の大きな変化は、主に複数の塩基性官能基を持つ構造的に伸長したペプチドで起こることが明らかとなった。

## 第二節 リン酸化ペプチドと非修飾ペプチドの衝突断面積データの収集

まず、リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドのペアを含む HeLa 細胞抽出トリプシン消化物試料を、C4 カラムを用いて分画し試料の複雑さを軽減した<sup>76</sup>。分画後、各フラクションを LC/TIMS/MS/MS で分析し CCS 値のペアを得た。解析を簡単にするため、複数の CCS 値を持つペプチドは最も高いピーク強度を持つ CCS に集約し、メチオニンの酸化や N 末端のアセチル化修飾を含むペプチドは除外した。最終的に、HeLa のトリプシン消化物から 6544 個のリン酸化ペプチドイオンと 22666 個の非リン酸化ペプチドイオンの CCS 値 (4000 個以上のペア CCS 値を含む) が得られた (表 2)。図 25A に、リン酸化されていないペプチドイオンについて得られた CCS- $m/z$  プロットを示す。このプロットでは、2 価、3 価、4 価に帯電した集団が明確に分かれている。各荷電状態において、質量と CCS の間には強い相関関係があり、3 価のイオンは拡張型とコンパクト型の 2 つのサブ集団に明確に分かれている。これらの観察結果はこれまでの IMS-MS の知見<sup>8, 167-169</sup>と一致している。図 25B は、リン酸化ペプチドイオンの CCS- $m/z$  プロットである。リン酸化ペプチドイオンの傾向はリン酸化されていないペプチドイオンと同様であった。さらに詳しく調べるために、リン酸化ペプチドイオンと非リン酸化ペプチドイオンを電荷状態によって分類した。図 26A-C に CCS-質量プロットを表示する。また、各分子量範囲におけるリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの平均 CCS 値の差を図 26D に示す。これらの図より、リン酸化ペプチドは同一質量の非リン酸化ペプチドよりも CCS 値が一般的に小さいことがわかり、この観察結果は過去の IMS-MS 研究<sup>158-160</sup>と一致した。これまでの研究では、主に 1 価および 2 価に帯電したペプチドイオンに焦点を当てていたが、本研究では 3 価および 4 価に帯電したペプチドについても同様の傾向を確認した。

表 2. 同定結果のまとめ

	Phosphopeptides	Unphosphorylated peptides
Unique peptide ions (Sequence + Modification + Charge) <sup>a</sup>	6544	22666
Unique peptides (Sequence + Modification) <sup>a</sup>	5965	20298
Unique peptide sequences (Sequence) <sup>a</sup>	4942	20298
Unique peptide ion pairs (P / uP) <sup>b</sup> (Sequence + Modification + Charge) <sup>a</sup>	4433	
Unique peptide pairs (P / uP) <sup>b</sup> (Sequence + Modification) <sup>a</sup>	4080	

a. ユニークキー、 b. P：リン酸化ペプチド uP：非リン酸化ペプチド



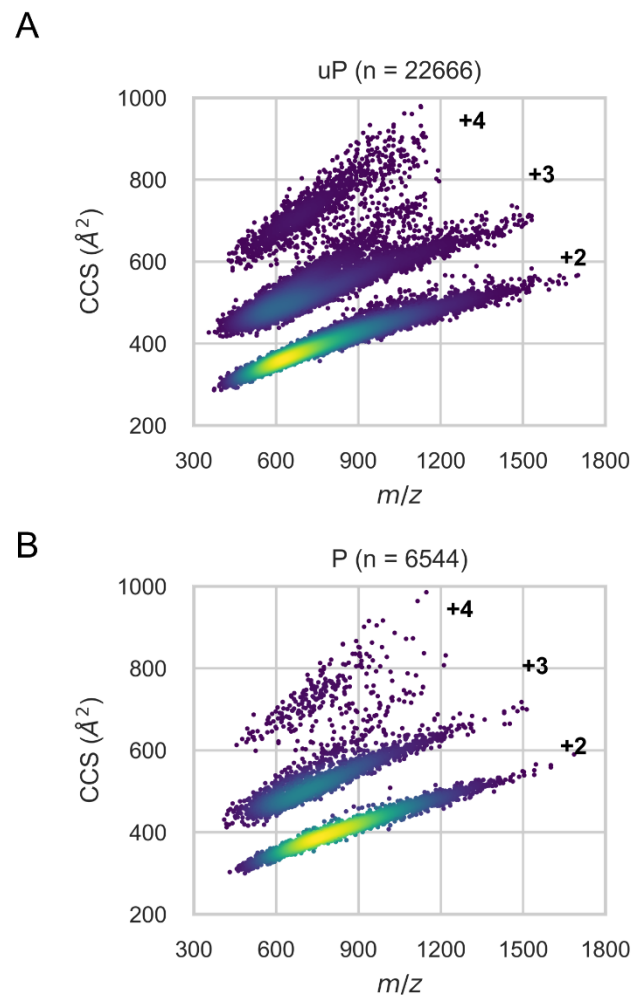


図 25. (A) 非リン酸化ペプチドイオンと (B) リン酸化ペプチドイオンの CCS を  $m/z$  の関数として表したもの。下段、中段、上段の集団は、それぞれ 2 価、3 価、4 価のイオンで構成されている。3 価のイオンは上側の拡張イオンと下側のコンパクトイオンの 2 つのサブグループにさらに分けられる。P：リン酸化ペプチド、uP：非リン酸化ペプチド。

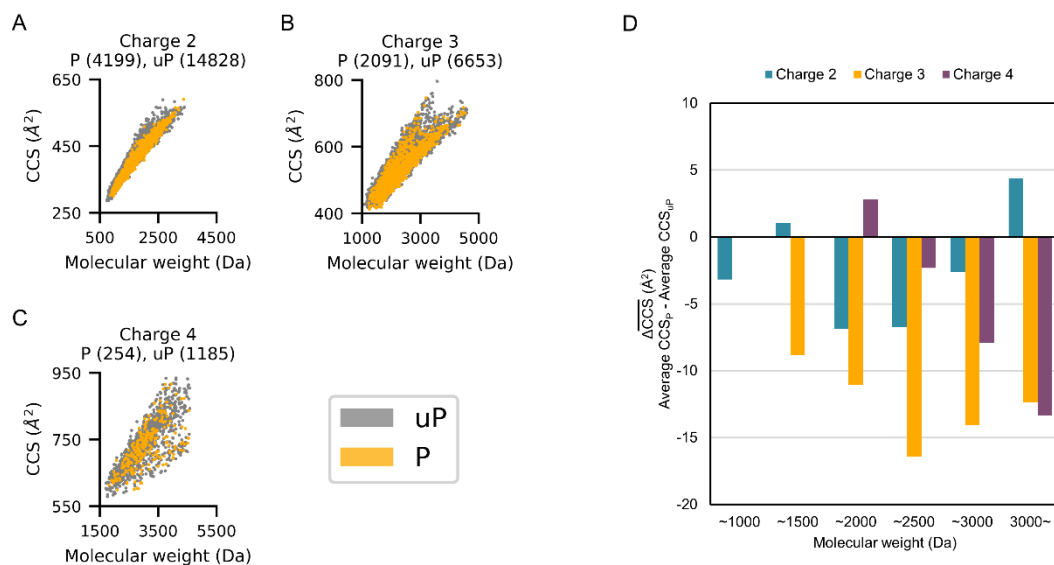


図 26. リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの分布の違いを示す質量 - CCS プロット。(A、B、C) 非リン酸化ペプチドイオンとリン酸化ペプチドイオンの CCS をペプチド質量の関数として表したもの。(D) 様々な分子量範囲におけるリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの CCS 値の差の平均。リン酸化ペプチドの CCS は、同等の質量の非リン酸化ペプチドの CCS よりも一般的に小さいことが明らかとなった。P: リン酸化ペプチド、uP: 非リン酸化ペプチド。

### 第三節 リン酸化/非修飾ペプチドペアの衝突断面積の差

ペプチドのリン酸化修飾が CCS に与える影響をさらに評価するために、同一配列のモノリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドのペアを比較した。CCS と質量の相関関係を考慮すると、リン酸化により 80 Da の質量増加が生じるため、リン酸化ペプチドは対応する非リン酸化ペプチドよりも CCS が大きくなるはずである。実際、モノリン酸化ペプチドの CCS の中央値は、非リン酸化ペプチドの CCS よりも  $4.0 \text{ \AA}^2$  大きかった (図 27A)。しかし、32.0% (1419/4433) のモノリン酸化ペプチドイオンは、対応する非リン酸化ペプチドよりも CCS 値が小さく、かなりの数のペプチドがリン酸化に伴いそのコンフォメーションが縮小したことが示唆された (図 27A)。CCS が減少したリン酸化ペプチド ( $\Delta\text{CCS} < 0$ ) の割合は、66 個の 2 価リン酸化ペプチドについて報告されている 19.7% (13/66)<sup>159</sup> よりもはるかに高かった。実際、今回取得したデータの 2 価のモノリン酸化ペプチドでは、図 27B に示すように、その含有率は 23.4% (642/2743) であった。3 価と 4 価の場合、 $\Delta\text{CCS} < 0$  のリン酸化ペプチドの含有率は、それぞれ 46.2% (688/1488)、44.1% (89/202) であった (図 27C、D)。これらの結果は、各電荷状態のペプチドの分子量分布によって一部説明できる。高電荷のペプチドほど分子量が大きく、 $\Delta\text{CCS}$  の値はペプチドの分子量と弱い負の相関があったからである (図 28)。大きなペプチドの場合、80 Da の質量シフトはペプチドの全質量に比べて小さく、したがって質量増加による CCS への影響は比較的小さいと予想された。しかし、いくつかの大きなペプチドでは、CCS に大きな変化が見られた。これは、リン酸化によってペプチドのコンフォメーションが変化したためと考えられる。一方、先の研究で調べられていたような比較的小さな 2 価ペプチドでは、そのような大きな変化は見られず、主に正の質量シフトによる CCS の正の変化が見られた。しかし、1500 Da から 2000 Da の特定の分子量範囲内でも、2 価および 3 価に荷電したモノリン酸化ペプチドイオンの 26.8% (306/1140) および 48.0% (231/481) について、リン酸化に伴い CCS が減少した。これらの結果は、電荷状態の高いイオンほど、リン酸化に伴ってより顕著な縮小方向への構造変化を示すことを示唆している。これは、これまでの報告<sup>167,169</sup>にあるように、3 価のイオンの方が 2 価のイオンよりも CCS の分布が広いことに起因していると考えられる。3 価のイオンの構造の多様性は、リン酸化に伴う構造のよりダイナミックな変化を可能にするかもしれないが、この考えを検証するにはさらなる調査が必要である。

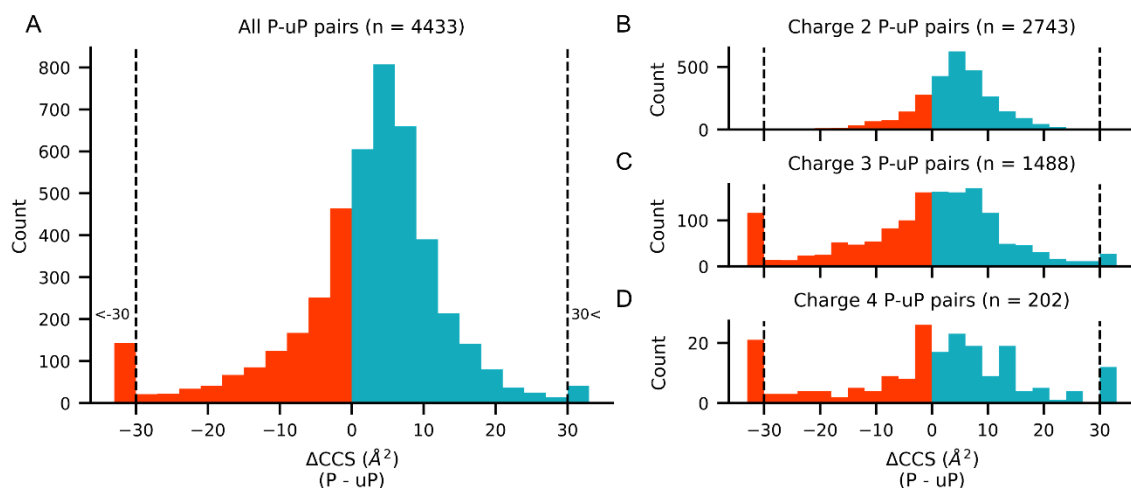


図 27. リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドのペア間の  $\text{CCS}$  差の分布。 $\Delta\text{CCS}$  は、リン酸化ペプチドの  $\text{CCS}$  から非リン酸化ペプチドの  $\text{CCS}$  を引いて算出した。30 以上または-30 未満の  $\Delta\text{CCS}$  値については集約した。(A) 同定されたすべてのペプチドペアの  $\Delta\text{CCS}$  のヒストグラム。(B-D) 各電荷状態の  $\Delta\text{CCS}$  のヒストグラム。P：リン酸化ペプチド、uP：非リン酸化ペプチド。

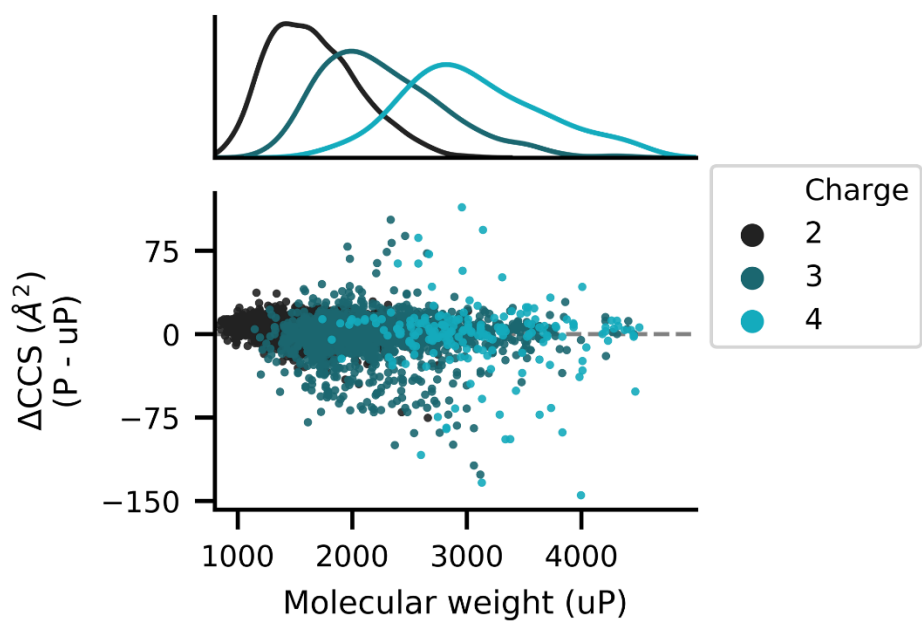


図 28. 各電荷状態のペプチドイオンの  $\Delta\text{CCS}$  値をペプチド分子量の関数として表したもの。破線は  $\Delta\text{CCS}$  値ゼロを示す。P:リン酸化ペプチド、uP:非リン酸化ペプチド。

#### 第四節 リン酸化ペプチドの特性と衝突断面積変化

どのような種類のペプチドの特徴が、リン酸化に伴う CCS の変化と関連しているかを評価するために、 $m/z$ 、CCS、 $\Delta$ CCS の値の関係を調べた (図 29)。マーカーの色は、 $\Delta$ CCS 値を示している。CCS の最も顕著な変化は、3 価のイオンのうち、伸長したものとコンパクトなものに関連しているようであった。顕著ではないが、2 価および 4 価のイオンにも同様の傾向が見られた。30 Å<sup>2</sup> までの CCS の増加については、コンパクト型から拡張型への移行というよりは、質量が増加したことで説明されると考えられたが、リン酸化による CCS の減少は、拡張型からコンパクト型への移行によるものと考えられた。さらなる検討のために、3 価イオンの拡張型のペプチドに注目した。拡張型は、その分布形状に基づいて視覚的に分類した (図 30)。さらに、CCS 変化のリン酸化位置依存性を評価するために、リン酸化部位の局在情報が確実であるリン酸化ペプチド (リン酸化部位局在化確率 > 0.75) <sup>35</sup> のみを考慮し、これらの基準を満たすリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドのペア 277 組を解析に使用した。 $\Delta$ CCS とペプチド内のリン酸化アミノ酸残基の相対的な位置との関係を調べた。その結果、その傾向は大きくはないものの、ペプチドの末端領域でリン酸化されている方が、コンフォメーションの縮小が起りやすいことがわかった (図 31)。この CCS データを正しく解釈するための分子構造情報は十分ではないが、この観察結果は、リン酸基が関与する分子内相互作用の観点から説明できるかもしれない。リン酸化された残基は、ペプチドイオンの複数の分子内相互作用に関与していると考えられており、いくつかの 2 価リン酸化ペプチドイオンに関する過去の研究 <sup>165, 170</sup> では、特定の配列のリン酸基と塩基性基の間に分子内塩橋またはイオン性水素結合 <sup>171</sup> が形成されていることが示唆されている。

これまでの研究 <sup>165, 170</sup> で示されているように、リン酸基とその遠位の塩基性基が相互作用してペプチド構造が折りたたまれる可能性がある。もう一つの可能性は、リン酸基がその近位塩基性基と相互作用して、ペプチド配列中の正電荷のバランスを崩し、ペプチド構造に変化をもたらすことである <sup>167, 172, 173</sup>。言い換えれば、末端のリン酸化がペプチド内の電荷バランスを変化させ、構造変化をもたらすのかもしれない。これらの可能性をさらに評価するために、塩基性アミノ酸が  $\Delta$ CCS に及ぼす影響を調べた。3 価のペア 277 組のデータセットでは、ペプチドの塩基性基 (Lys、His、Arg、N 末端アミン) の数が  $\Delta$ CCS と弱く負の相関関係にあることがわかった (図 32A)。これは、塩基性残基がリン酸化時のコンフォメーション縮小に関与していることを示唆している。塩橋やイオン性水素結合には、気相でのペプチドイオンの全体的な電荷状態には寄与しない追加の塩基性基が必要であることを考えると、塩基性基が多いペプチドは、このような分子内相互作用を持つ可能性が高いと考えられる。そこで、277 の 3

価のペプチドペアのうち、電荷状態よりも塩基性基が多い 127 のペプチドにさらに着目した。これらのペプチドは、電荷数の合計には寄与しない塩基性基を持つことになる。ペプチドの末端領域にあるリン酸基は、必ず N 末端のアミン基や C 末端の Lys や Arg に由来する近位の塩基性基を持っていることを考慮して、 $\Delta$ CCS とリン酸基とその近位の塩基性基との距離との関係を調べたが、特に相関は見られなかった (図 32B)。次に、他の塩基性基とリン酸化部位との距離が、リン酸化に伴うペプチドの構造変化に重要ではないかと考え、検証を行ったところ、確かに、リン酸化部位とその 2 番目に近い塩基性基との相対的な位置関係が、 $\Delta$ CCS と弱く負の相関を示すことが分かった (図 32C)。これらの結果は、上述のメカニズムのいずれかで説明できる。つまり、リン酸化により、最も近い塩基性基の正電荷が中和され、次に近い塩基性基 (または正電荷) が相対的に遠くなるため、ペプチド内の電荷のバランスが崩れ、構造が変化する。あるいは、リン酸化部位とその遠位にある塩基性基との間の分子内相互作用により、ペプチドのイオン構造が縮小される。いずれにしても、今回得られた結果は、リン酸基と塩基性基の相互作用がリン酸化ペプチドの構造縮小に大きく寄与していることを示唆している。

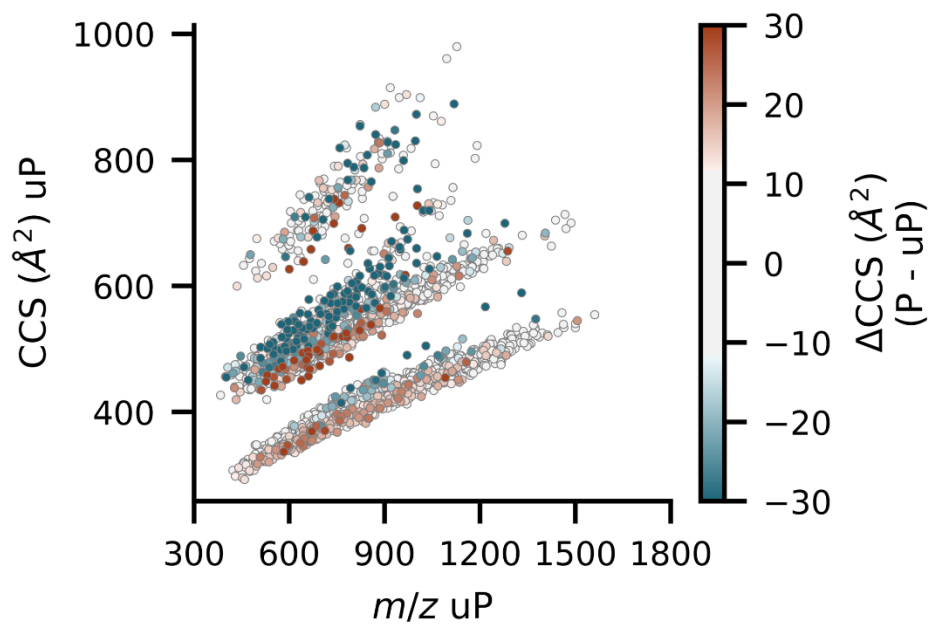


図 29. 非リン酸化ペプチドイオンの CCS を  $m/z$  の関数として表したものの。マーカーの色は  $\Delta\text{CCS}$  の値を示す。P：リン酸化ペプチド、uP：非リン酸化ペプチド。



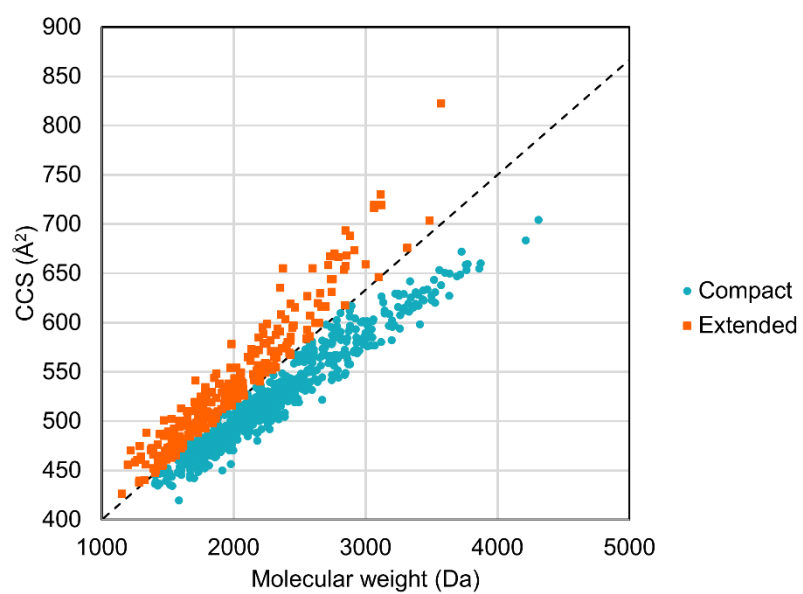


図 30. 3 価の非リン酸化ペプチドの拡張型と縮小型を視覚的に分類した。破線は分類の境界を表す。

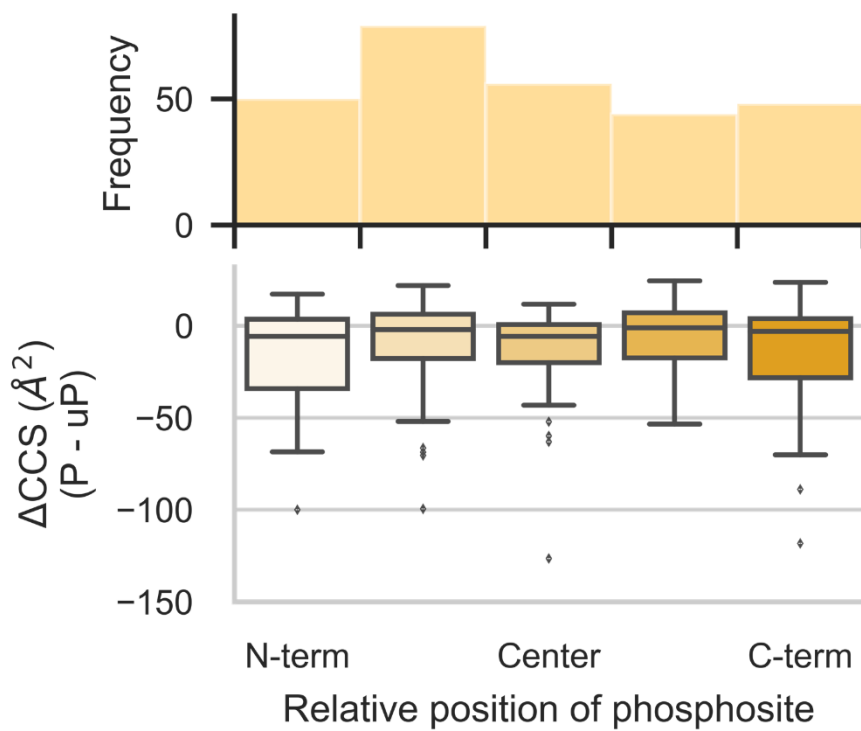


図 31. ペプチドのリン酸化位置と  $\Delta\text{CCS}$  の関係。277 組のペプチドを、相対的なリン酸化部位の位置に応じて分類した。箱ひげ図は、各サブセットの  $\Delta\text{CCS}$  値の上四分位、中央値、下四分位を示している。箱ひげ図の統計を用いて外れ値を同定した（閾値： $1.5 \times \text{IQR}$ ）

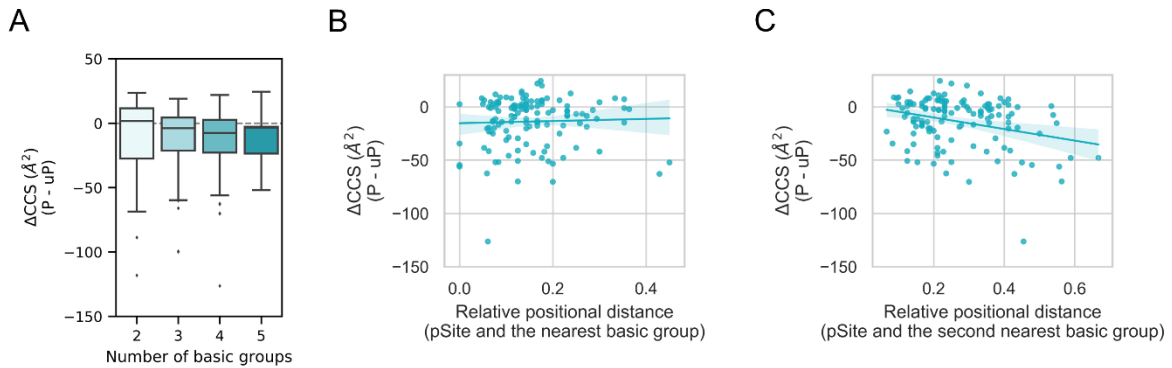


図 32. ペプチド中の塩基性基と  $\Delta\text{CCS}$  の関係。(A) 277 組のペプチドを、塩基性官能基の数に応じて分類した。各群における  $\Delta\text{CCS}$  の値の上四分位、中央値、下四分位を箱ひげ図に示した。箱ひげ図の統計を用いて外れ値を同定した (閾値:  $1.5 \times \text{IQR}$ )。破線は  $\Delta\text{CCS}$  値ゼロを示す。(B、C) 127 個の 3 価のペプチドペアの  $\Delta\text{CCS}$  値を、そのリン酸化部位 (pSite) と最も近い塩基性基との間の相対的な距離の関数としてプロットした。相対的な距離は、リン酸化部位と塩基性官能基の間の距離をペプチド配列の長さで割って算出した。直線は線形回帰を表し、濃淡は回帰式の 95% 信頼区間を示す。P: リン酸化ペプチド、uP: 非リン酸化ペプチド。

## 第五節 結語

本章では、TIMS を用いて、リン酸化ペプチドとそれに対応する非リン酸化ペプチドの CCS 値を系統的にプロファイリングした。これまでの報告と同様に、リン酸化は主にペプチドのコンフォメーションの縮小をもたらす。また、3 価および 4 価のイオンの CCS 値は、リン酸化によってより強く影響を受けることがわかった。これは、少なくとも部分的には、これらの大きなペプチドのコンフォメーションの変化によって説明できる。最も顕著な CCS の変化は、拡張型かつ塩基性基の数が多い 3 価のペプチドで見られ、リン酸基と塩基性基の間の分子内相互作用を反映していると考えられる。今回の発見は、リン酸化ペプチドの CCS 予測を向上させるものと考えられる。

## 結論

本研究では、高感度定量リン酸化プロテオミクスのための基盤技術開発を行い、以下の知見を得た。

第一章では、イオンペア試薬として酢酸 (AA) を用いた場合、C4 カラムと C18 カラムの間でリン酸化ペプチドと非修飾ペプチドのペアの保持順序が逆転することを見出した。また、C18 カラムに AA と TFA を用いた場合も同様の現象が見られた。これらのペプチドの保持挙動を理解するために、LSS 理論に基づく保持モデルを提案した。これまでの報告によると、リン酸化ペプチドでは  $S$  値が小さくなることが予想され、この仮説は、アイソクラティック RPLC 条件下での測定により実際に確認された。今回提案したモデルは、包括的なリン酸化ペプチドの保持時間予測ツールを開発するための重要な知見を提供するものと期待される。

第二章では、冷却 StageTip を用いた、シンプルな脱塩プロトコルを開発した。本 CoolTip プロトコルは、疎水性ペプチドの回収率を犠牲にすることなく、親水性 (リン酸化) ペプチドの同定範囲を拡大し、さらにペプチドの定量分析の精度を高めることを示した。このプロトコルは、様々なプロテオミクス実験のパフォーマンスを容易に向上できると期待される。

第三章では、リン酸化ペプチドを濃縮した後、ナノグラム規模の固相 TMT 標識を用いる、高感度なリン酸化プロテオーム解析を行うための新しい手法を開発した。この方法では、リン酸化ペプチドを濃縮した後、高感度の StageTip を用いた同重体標識技術を用いることで、感度を損なうことなく、わずかな量の TMT 試薬でリン酸化ペプチドを標識することができる。さらに、本手法を、*in vitro* キナーゼ反応により生成したチロシンリン酸化ペプチドを添加する、同重体標識シグナル増幅チロシンリン酸化プロテオミクスと組み合わせることで、60  $\mu\text{g}$  の試料から 2000 以上のチロシンリン酸化ペプチドが定量可能であることを実証した。本プロトコルは、ナノグラム規模の試料を用いた、大規模な定量リン酸化プロテオミクス研究に役立つものと期待している。

第四章では、RPLC/TIMS の分離空間の直交性を明らかにし、TMT 定量プロテオミクスへの応用を検討した。その結果、RPLC/TIMS の二次元分離空間の 34.3% が、TMT 標識プロテオーム試料の分離に有効であることが示された。また、TIMS が、Q/TOF タンデム質量分析の前段階におけるピークキャパシティを、分析時間を増やすことなく大幅に向上させることができることを実証した。さらに TIMS は、TMT 定量における

定量比の歪みを軽減し、装置の感度やスキャン速度を犠牲にすることなく、SPS-MS<sup>3</sup>法と同等の定量真度改善を達成することができた。LC/TIMS/Q/TOF システムを用いた同重体標識に基づく定量法は、高スループット、高精度、高感度が必須である臨床試料の分析に向けて、大きな可能性を秘めていると考えられる。

第五章では、TIMS を用いて、リン酸化ペプチドとそれに対応する非リン酸化ペプチドの CCS 値を系統的にプロファイリングした。これまでの報告と同様に、リン酸化は主にペプチドのコンフォメーションの縮小をもたらした。また、3 価および 4 価のイオンの CCS 値は、リン酸化によってより強く影響を受けることがわかった。これは、少なくとも部分的には、これらの大きなペプチドのコンフォメーションの変化によって説明できると考えられた。最も顕著な CCS の変化は、拡張型かつ塩基性基の数が多い 3 価のペプチドで見られ、リン酸基と塩基性基の間の分子内相互作用を反映していると考えられた。今回の発見は、リン酸化ペプチドの CCS 予測を向上させるものと期待される。

以上、高感度定量リン酸化プロテオミクスのための基盤技術を確立した。分析とは、ある物事を分解して、それを成立させている成分・要素・側面を明らかにすることである。分析技術の分離分解能・感度向上によって生命科学の重要な発見が達成されてきた。生体試料中のタンパク質は未だ開拓途上であり、新しいタンパク質網羅的分析技術の開発こそが、未だ見ぬ新奇な生物学的発見を可能にする唯一無二の方策である。本研究により、生体試料中に存在していながらこれまでは検出することが困難であったリン酸化修飾部位の解析が可能になった。生体内のシグナル伝達の分子メカニズムの包括的な理解に向け、大きな貢献が期待される。さらに、今まで解析対象とされてこなかった微量試料に対してリン酸化プロテオミクスが可能になった。得られる試料量が限られる臨床試料、生体組織試料や難培養性微生物種など、希少試料の解析に有用であることは無論、細胞内小器官や細胞内局所環境に焦点を当てた解析においても本研究が一助をなすと期待される。生体試料中のタンパク質成分の包括的な同定・定量を目指すところから出発したプロテオミクス研究は現在、単なるタンパク質の同定・定量にとどまらず、タンパク質の局在・機能・構造変化までを対象とした包括的な解析へとその標的を拡張させつつある。高分解能・高スループット・高感度な解析技術はあらゆるプロテオミクス研究の基盤であり、本研究がプロテオームの構造、機能、動態の完全かつ定量的な記述と理解のための一助を成すと期待される。

## 実験の部

### 実験材料

#### 細胞株

HeLa (S3) 細胞は、ヒューマンサイエンス振興財団（東京）より入手した。大腸菌 K-12 BW25113 株は、慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形）より譲渡いただいた。

#### 試薬

ダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (D-MEM)、カナマイシン、リン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジチオトレイトール (DTT)、ヨードアセトアミド (IAA)、デオキシコール酸ナトリウム (SDC)、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (SLS)、重炭酸アンモニウム、Lys-C、アデノシン三リン酸 (ATP)、酢酸、トリフルオロ酢酸、DL-乳酸、ピペリジン、25%アンモニア水、およびアセトニトリル (ACN)、メタノール、クロロホルムは富士フィルム和光純薬工業（大阪）より購入した。トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) は同仁化学研究所（熊本）から購入した。LB 培地はナカライテスク（京都）より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Life Technologies (Grand Island, NY, USA) より購入した。プロテアーゼ阻害薬カクテル、ホスファターゼ阻害剤カクテル、50%ヒドロキシルアミンは Sigma-Aldrich より購入した。トリプシン（シークエンスグレード）はプロメガ (Madison, WI, USA) より購入した。ヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) は東京化成工業（東京）から購入した。Selumetinib は Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) から購入した。リコンビナント EGFR はカルナバイオサイエンス（神戸）から購入した。

SGVVGDGFGGR ペプチドおよびそのリン酸化アナログ pSGVVGDGFGGR は JPT Peptide Technologies (Berlin, Germany) により合成された。

水は、Millipore Milli-Q system (Bedford, MA, USA) で精製した。

#### 固相抽出剤

多孔性酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) 粒子 (TitansphereTiO<sub>2</sub>, 10 μm)、Empore SDB-XC、Empore C18 および Empore C8 ディスク、InertSep RP-C18、InertSep PLS-2、InertSep RP-1 粒子、多孔性グラファイトカーボン (PGC) チップはジーエルサイエンス（東京）から入手した。Sep-Pak tC18 および Oasis HLB 粒子は Waters (Milford, MA, USA) から購入した。

## HPLC カラム

Inertsil WP300 C4 カラム (2.1 mm ID、150 mm length、5  $\mu$ m C4-silica、30 nm pore)、MonoCap C18 High Resolution 2000 (100  $\mu$ m i.d.、200 cm) はジーエルサイエンスから購入した。Protein-RP カラム (2.0 mm ID、150 mm length、5  $\mu$ m C4-silica (USP L26)、20 nm pore) は YMC (京都) から購入した。Eprogen NPS-ODS-I カラム (4.6 mm ID、33 mm length、1.5  $\mu$ m non-porous C18-silica) は東京化成工業から購入した。Luna C18(2)カラム (1.0 mm ID、100 mm length、5  $\mu$ m silica) は Phenomenex (Torrance、CA、USA) から購入した。Reprosil-Pur C18-AQ 3  $\mu$ m は Dr. Maisch (Ammerbuch、Germany) から購入した。

## 装置および測定条件

### HPLC

ACQUITY UPLC H-Class Bio システム (Waters、Milford、MA、USA)

Agilent 1100 シリーズ HPLC システム (Agilent、Santa Clara、CA、USA)

### nanoLC/MS/MS

オートサンプラー : HTC-PAL (CTC Analytics、Zwingen、Switzerland)

: WPS-3000 (Thermo Fisher Scientific)

送液ポンプ : UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific)

イオンモビリティ分析計 : FAIMS Pro (Thermo Fisher Scientific)

質量分析計 : TripleTOF 5600+ (SCIEX、Concord、ON、Canada)

: LTQ (Thermo Fisher Scientific)

: Q Exactive (Thermo Fisher Scientific)

: Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific)

: Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific)

イオンモビリティ質量分析計 : TimsTOF Pro (Bruker、Bremen、Germany)

全ての網羅的ペプチド計測は、上述のオートサンプラー、送液ポンプ、イオンモビリティ分析計と、いずれかの質量分析計、イオンモビリティ質量分析計を接続し行った。データ取得は、オンライン逆相ナノスケール液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析システムによるポジティブモードでのデータ依存的分析 (DDA) によって行われた。0.5% TFA / 4% ACN 溶液に溶解したペプチド試料から、オートサンプラーにより 5  $\mu$ L を注入した。ポンプ流速は 500 nL/min に設定した。移動相は、(A) 0.5% 酢酸 (B) 0.5% 酢酸 / 80% ACN を用いた。特に記載がない限り、Reprosil-Pur 120 C18-AQ



3  $\mu\text{m}$  (Dr. Maisch) を充填した自家製カラム (長さ 150 mm、内径 100  $\mu\text{m}$ 、先端径 6  $\mu\text{m}$ ) によりペプチドを分離した。実験ごとの詳細を以下に示す。

#### <<第一章>>

NanoLC/MS/MS 分析は、Ultimate 3000 ポンプと HTC-PAL オートサンプラーに接続した TripleTOF 5600+ または Q Exactive で実施した。YMC-C4 キャピラリーカラムを用いた nanoLC/MS/MS 分析では、YMC Protein-RP 5  $\mu\text{m}$  粒子を充填した自家製カラム (長さ 150 mm、ID 100  $\mu\text{m}$ 、先端径 6  $\mu\text{m}$ ) によりペプチドを分離した。5-40%B で 20 分、40-99%B で 1 分の 2 段階線形グラジエントを採用した。TripleTOF 5600+ ではスプレー電圧は 2300 V に設定し、MS スペクトルを  $m/z$  300-1500 の範囲にて 0.25 秒間スキャンし取得した。各 MS スペクトルについて、トップ 10 モードにてプリカーサーイオンを選択、四重極により単離し、rolling collision energy 機能により自動決定した値のエネルギーで CID により開裂させ、高感度モードで 0.1 秒間スキャンし MS/MS スペクトルを取得した。12 秒間の dynamic exclusion time を設定した。Q Exactive では、スプレー電圧は 2.4 kV、イオン導入管は 240  $^{\circ}\text{C}$  に加熱し、S-lens RF レベルは 50 に設定した。MS スペクトルは、70000 の分解能で取得した。フルスキャン自動利得制御 (AGC) ターゲット値は  $3 \times 10^6$  で、最大注入時間 (MIT) は 100 ms とした。フルスキャン質量範囲は 300-1500 に設定した。MS<sup>2</sup> スキャンの AGC ターゲット値は  $1 \times 10^5$ 、MIT は 100 ms に設定した。分解能 17500 でデータを取得した。プリカーサーイオンは規格化衝突エネルギー (NCE) 27% で高エネルギー衝突解離 (HCD) により断片化された。四重極の分離幅は 2.0  $m/z$  に設定し、フル MS スキャンの間に上位 10 プリカーサーイオンの MS<sup>2</sup> スキャンを取得した。

#### <<第二章>>

NanoLC/MS/MS 分析は、Ultimate 3000 ポンプと HTC-PAL オートサンプラーに接続した Q-Exactive で実施した。5-10% B 5 分、10-40% B 60 分、40-99% B 5 分の 3 段階線形グラジエントにより分離を行った。スプレー電圧は 2.4 kV、イオン導入管は 250  $^{\circ}\text{C}$  に加熱し、S-lens RF レベルは 50 に設定した。MS スペクトルは、70000 の分解能で取得した。フルスキャン AGC ターゲット値は  $3 \times 10^6$  で、MIT は 100 ms に設定した。フルスキャン質量範囲は 350-1500 に設定した。MS<sup>2</sup> スキャンの AGC ターゲット値は  $1 \times 10^5$ 、MIT は 100 ms に設定した。分解能 17500 でデータを取得した。プリカーサーイオンは NCE 27% で HCD により断片化された。四重極の分離幅を 2.0  $m/z$  に設定し、フル MS スキャンの間に上位 10 プリカーサーイオンの MS<sup>2</sup> スキャンを取得した。

### <<第三章>>

合成リン酸化ペプチドの NanoLC/MS/MS 分析は、Ultimate 3000 ポンプおよび HTC-PAL オートサンプラーに接続した LTQ で実施した。HeLa プロテオーム解析には、UltiMate 3000 ポンプと HTC-PAL オートサンプラーを接続した Q Exactive 質量分析計を使用した。メソッド評価には、分析カラムとして内径 100  $\mu\text{m}$  の粒子充填型 15 cm カラム (ReproSil-Pur C18-AQ) を使用し、5%から 40%B までの 20 分または 65 分の直線グラジエントを採用した。スプレー電圧は 2.4 kV、イオン導入管は 240  $^{\circ}\text{C}$  に設定した。各 MS スキャンで上位 10 個のプリカーサーイオンを選択し、その後 MS/MS スキャンを取得した。フルスキャン分解能は 70000 に設定した。質量範囲は 300-1500 に設定した。MS<sup>2</sup> スキャンの分解能と AGC ターゲット値は、それぞれ 35000 と  $1 \times 10^5$  に設定した。分離幅は 1.4  $m/z$  に設定した。NCE は 33 に設定した。MS<sup>2</sup> のターゲットは電荷状態 2-5 のみとした。

高深度のリン酸化プロテオミクスには、分析カラムとして MonoCap C18 High Resolution 2000 (100  $\mu\text{m}$  i.d., 200 cm) を使用した。基本的には上記と同じ条件を使用し、以下の変更を加えた。5%から 40% ACN の 480 分の線形グラジエントを使用し、スプレー電圧 3200 V、質量範囲 350-1500、NCE 32 を設定した。

### <<第四章>>

NanoLC/TIMS/Q/TOF 分析は、Ultimate 3000 ポンプと HTC-PAL オートサンプラーに接続した timsTOF Pro で実施した。5-10% B 5 分、10-40% B 60 分、40-99% B 5 分の 3 段階線形グラジエントにより分離を行った。TIMS 部は、ランプタイム 100 ms、スキャンレンジ 0.6-1.5 Vs  $\text{cm}^{-2}$  で動作させた。1 サイクルは、1 回の MS スキャンと 10 回の PASEF MS/MS スキャンで構成した。MS および MS/MS のスペクトルでは、 $m/z$  100 から 1700 までを記録した。ポリゴンフィルターを適用し、1 価イオンを MS/MS に選択しないようにした。四重極の分離幅は 1 または 2  $m/z$  に設定した。CID のための衝突エネルギーは、イオンモビリティの増加に応じて段階的に増加させた：ランプ時間の 0-19%では 52 eV、19-38%では 47 eV、38-57%では 42 eV、57-76%では 37 eV、そして残りは 32 eV とした。TMT レポーターイオンの検出のため、Collision RF を 500 と 1500、Collision Energy を 125%と 100%、Transfer Time を 25  $\mu\text{s}$  と 60  $\mu\text{s}$ 、Pre Pulse Storage Time を 8  $\mu\text{s}$  と 12  $\mu\text{s}$  に設定した TIMS Stepping 機能を使用した。

LC/TIMS/Q/TOF との比較のために、Ultimate 3000 ポンプと HTC-PAL オートサンプラーを接続した Orbitrap Fusion Lumos で同じ試料を分析した。MS スペクトルは 120000 の分解能に設定し、データ依存の OT MS<sup>2</sup> スキャンは、Full MS スキャン間のサイクルタイムを 3 秒に設定して Top Speed モードで収集した。四重極の分離幅は

0.7  $m/z$  に設定した。OT は分解能 50000 に設定し、プリカーサーイオンを 38% の NCE で HCD により断片化した。SPS-MS<sup>3</sup> を用いた方法では、衝突エネルギー 35% のイオントラップ CID でプリカーサーイオンを断片化し ITMS<sup>2</sup> スペクトルを取得した。OTMS<sup>3</sup> スペクトルの取得では、HCD の NCE を 55% に増加させた以外は、OTMS<sup>2</sup> と同じパラメータを利用した。10 個の MS<sup>2</sup> プロダクトイオンを選択し MS<sup>3</sup> スペクトルを取得した。

#### <<第五章>>

NanoLC/TIMS/Q/TOF 分析は、Ultimate 3000 ポンプおよび HTC-PAL オートサンプラーに接続した timsTOF Pro で実施した。5-40% B 50 分の線形グラジエントにより分離を行った。TIMS セクションは 200 ms のランプタイム、スキャン範囲は 0.6-1.5 Vs  $cm^{-2}$  に設定した。1 サイクルは、1 回の MS スキャンと 10 回の PASEF MS/MS スキャンで構成した。MS および MS/MS スペクトルでは、 $m/z$  100 から 1700 までを記録された。1 価イオンは、その  $m/z$  と  $1/K_0$  値に基づいて、プリカーサーイオンから除外された。四重極の分離幅は 2  $m/z$  に設定した。TIMS 電圧は、ESI-L Tuning Mix (Agilent) の 3 つの選択イオン ( $m/z$  622、922、1222) を用いて得たイオンモビリティの逆数 ( $1/K_0$ ) により線形較正した。

## 実験手法

### <<共通の部>>

#### HeLa 細胞の培養

HeLa 細胞は、直径 10 cm または 15 cm のディッシュで、10% FBS を含む DMEM 中で 80% コンフルエントになるまで培養された。細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄し、セルスクレーパーを用いて回収し、遠心分離によりペレット化した。セルメチニブ処理試料については、直径 15 cm のディッシュ上の細胞が 80% コンフルエントに達した後、培地を 0.1% FBS を含む DMEM に変更した。24 時間培養した後、細胞をセルメチニブ (10  $\mu$ M) または DMSO で 30 分間処理し、その後 EGF (150 ng/mL) で 15 分間刺激した。その後細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄し、セルスクレーパーを用いて回収し、遠心分離によりペレット化した。

#### タンパク質抽出・消化

Hela 細胞ペレットから、相間移動可溶化法 (PTS 法)<sup>174</sup> によるトリプシン消化プロトコルを用いてタンパク質を抽出・消化した。具体的には、細胞ペレットを、タンパク質ホスファターゼ阻害剤カクテル 1 及び 2 並びにプロテアーゼ阻害剤を含む 1 mL の緩衝液 (100 mM Tris-HCl、pH 9.0 中の 12 mM SDC、12 mM SLS) 中に懸濁し、95  $^{\circ}$ C のヒーティングブロック上で 5 分間インキュベートした後、20 分間超音波処理を行った。抽出したタンパク質を BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で定量し、10 mM DTT で 30 分間還元し、50 mM IAA で 30 分間暗所にてアルキル化した。試料は 50 mM 重炭酸アンモニウムで 5 倍に希釈し、Lys-C で室温 3 時間、トリプシンで 37  $^{\circ}$ C で一晩消化した。特に記載のない限り、消化液 1 mL に酢酸エチル 1 mL を加え、0.5% TFA (最終濃度) で溶液を酸性にした。2 分間振とうした後、15800g で 2 分間遠心分離し、水相と有機相を完全に分離し、水相を回収した。特に記載のない限り、水相を減圧遠心濃縮機により乾固させ、5% ACN、0.5% TFA に再溶解後、SDB-XC StageTip<sup>70</sup> を使用して脱塩した。

### リン酸化ペプチドの濃縮

TiO<sub>2</sub> 粒子を充填した C8-StageTip (0.5 mg 粒子/10 μL ピペットチップ) を用いてリン酸化ペプチド濃縮を行った<sup>175</sup>。TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーチップを 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) と、選択性向上剤として 300 mg/mL 乳酸を含む 80% ACN で平衡化した (A 液)。分画した試料を等量の溶液 A で希釈し、StageTip に負荷した。溶液 A と 0.1% TFA を含む 80% ACN で洗浄した。特に記載のない限り、リン酸化ペプチドを 0.5% ピペリジンで溶出した後 10% TFA で酸性化し、SDB-XC StageTip で脱塩した。

### 脱塩

特に記載のない限り、SDB-XC StageTip に対し、buffer B (0.1% TFA、80% ACN) による活性化、buffer A (0.1% TFA、4% ACN) による平衡化の後にペプチド試料を負荷し、buffer A で洗浄の後、buffer B で溶出した。

## <<第一章>>

### HPLC 分画

HeLa 細胞由来抽出消化物を 0.5% TFA を含む 4% ACN に溶解し、ACQUITY UPLC H-Class Bio システムを用いて Eprogen NPS-ODS-I カラム、YMC Protein-RP カラムまたは GL Sciences Inertsil WP300 C4 カラムに注入した。移動相には、(A) 0.5% AA または 0.1% TFA、(B) 0.5% AA または 0.1% TFA/80% ACN を用いた。ペプチドは、0.8 mL/min (NPS-ODS-I) または 0.2 mL/min (YMC Protein-RP および GL Sciences Inertsil WP300 C4) の流速で、5-60%で 30 分、60-99%で 1 分の 2 段階直線グラジエントにより分離された。フラクションは 2 分ごとに採取した。各フラクションの 10 分の 1 は減圧遠心濃縮機により乾燥させた後、nanoLC/MS/MS で直接分析した。残りの試料は、リン酸化ペプチド濃縮ステップに供した。

### アイソクラティック RPLC 測定

Agilent 1100 シリーズ HPLC システムと、UV 検出器 (214 nm)、10  $\mu$ L 注入ループ、1 x 100 mm Luna C18(2) カラム、150  $\mu$ L/min の流速を用いて分離を行った。SGVVGDGFGGR/pSGVVGDGFGGR ペアの保持係数を測定するために、ACN 濃度を 9-17% の範囲で変化させた。イオンペア試薬として 0.5% AA を用いた。~2  $\mu$ g の各ペプチドを注入した。

### LC/MS/MS データベース検索

ペプチドおよびタンパク質は、UniprotKB/Swiss-Prot リリース 2017/04 のヒトデータベースに対する、Mascot v2.6 (Matrix Science、London) を用いた自動データベース検索によって同定した。プリカーサーイオン質量誤差許容値は 20 ppm (TripleTOF 5600+) または 5 ppm (Q Exactive)、プロダクトイオン質量誤差許容値は 0.1 Da (TripleTOF 5600+) または 20 ppm (Q Exactive) を設定した。2 回のミス切断まで許容した厳格な trypsin/P の切断特異性を設定した。システインのカルバミドメチル化を固定修飾として設定した。メチオニンの酸化を可変修飾として設定した。リン酸化ペプチドの同定には、セリン、スレオニン、チロシンのリン酸化を可変修飾として設定した。各ペプチドの identity スコアを基に Mascot スコアが 95%信頼限界以上 ( $p < 0.05$ ) であれば、ペプチドが同定されたとみなした。

## <<第二章>>

### リン酸化ペプチドの濃縮

リン酸化ペプチドの濃縮は、いくつかの修正を加えて行った<sup>40,96</sup>。消化液 1 mL に ACN 4 mL、乳酸 706  $\mu$ L、TFA 28  $\mu$ L を加え、最終濃度をそれぞれ 69.8、12.8、0.5% にした。TiO<sub>2</sub> 粒子を充填した C8-StageTip (0.5 mg 粒子/10  $\mu$ L ピペットチップ) を、選択性向上剤として乳酸を 300 mg/mL の濃度で含む 0.1% TFA / 80% ACN 20  $\mu$ L (洗浄液) で平衡化させた。消化された試料 (100  $\mu$ g ペプチド) を TiO<sub>2</sub>/C8-StageTip に負荷した。StageTip を 20  $\mu$ L の洗浄液と 50  $\mu$ L の 0.1% TFA / 80% ACN で洗浄し、50  $\mu$ L 15% NH<sub>4</sub>OH / 40% ACN でリン酸化ペプチドを溶出させた。溶出画分を乾燥後、100  $\mu$ L の 0.1% TFA / 0、2 または 4% ACN 溶液に再懸濁した。

### 低温 StageTip 脱塩

SDB-StageTip は既報の通り作製した<sup>70</sup>。Empore SDB-XC membrane 3 枚を 16G 鈍端注射針 (Hamilton) で打ち抜き、200  $\mu$ L チップに充填した。平衡化、試料負荷、洗浄および溶出を含むすべての手順は、Eppendorf 5415R 冷却遠心分離機で実施した。遠心分離機の温度を 4 °C に設定し、5 分間静置し StageTip の冷却を行った。試料溶液を含むすべての溶媒は 25 °C で調製し、予冷せずに脱塩チップの SDB ディスクに負荷した。1 分間静置後、遠心分離を開始し、50  $\mu$ L の溶液を 1500 g で 3 分間 StageTip に通した。脱塩後、ペプチドを減圧遠心濃縮機で乾燥させ、4% ACN / 0.5% TFA に再溶解した。

### LC/MS/MS データベース検索

ペプチド同定のため、MaxQuant version 1.6.17.0<sup>144, 176</sup> を用いて、Mascot generic format のピークリストを作成した。ペプチドおよびタンパク質を、UniprotKB/Swiss-Prot リリース 2019/10 (20380 配列) からのヒトデータベースに対する、Mascot v2.7 を用いた自動データベース検索によって同定した。プリカーサーイオン質量誤差許容値 5 ppm、プロダクトイオン質量許容値 20 ppm を設定した。2 回のミス切断まで許容した厳格な trypsin/P の切断特異性を設定した。システインのカルバミドメチル化を固定修飾として設定した。メチオニン酸化は可変修飾とした。リン酸化プロテオーム解析では、メチオニン酸化とセリン、スレオニン、チロシンへのリン酸化を可変修飾として設定した。各ペプチドの identity スコアを基に Mascot スコアが 95% 信頼限界以上 ( $p < 0.05$ ) であれば、ペプチドが同定されたとみなした。ペプチド同定における偽陽性率が、本基準において 1% 未満であることを、逆配列偽データベースに対する検索で推定した。

## <<第三章>>

### リン酸化ペプチド濃縮

TiO<sub>2</sub> クロマトグラフィーによる濃縮後のリン酸化ペプチド溶液に 10% TFA を加えて最終濃度 0.1%とし、SDB-XC StageTip を用いて脱塩した。固相 TMT 標識では、10% TFA を 10% HFBA に置き換え、試料を StageTip ベースのマイクロリアクターに負荷した。

### 液相 TMT 標識

消化ペプチドまたは濃縮リン酸化ペプチドを乾燥させ、200 mM HEPES pH 8.5 緩衝液に再溶解し、ACN に溶解した TMTzero または TMT10plex 標識試薬と混合し、室温で 1 時間静置した。最終濃度 0.33%になるようにヒドロキシルアミンを加えて反応を停止した後、試料を 1% TFA 溶液により溶液を酸性にし、ACN 濃度が 5%未満になるように希釈し、SDB-XC StageTip を用いて脱塩した。50 µg の消化物を、緩衝液 50 µL と 100 µg の TMT 試薬を含む ACN 5 µL からなる 55 µL の反応液中で標識した。リン酸化ペプチド濃縮後の試料は、緩衝液 5 µL と TMT 試薬を含む ACN 5 µL からなる 10 µL の反応液中で標識した。

### 固相 TMT 標識

各逆相固定相粒子 (0.5 mg) を充填した SDB-XC StageTip を 0.1% TFA 含有 80% ACN で活性化し、0.1% TFA 含有 5% ACN で平衡化した。その後、リン酸化ペプチドを各 StageTip 上に負荷し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で洗浄した。TMT 試薬は、ペプチドの溶出を避けるため、ACN に溶解したのち、50 mM リン酸緩衝液で希釈して ACN 含量を 5%未満にした。この TMT 溶液 10 µL (10 µg/10 µL) を各チップ上に負荷した。試料は StageTip 上にて、室温で 1 時間放置した。その間、粒子を湿潤状態に保った。1 時間後、StageTip を 0.1% TFA を含む 5% ACN で洗浄し、ペプチドを 0.1% TFA を含む 80% ACN で溶出した。

### In vitro チロシンキナーゼ反応

脱塩後のトリプシン消化ペプチドを 40 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶解し、1 mM ATP と 4 mM MnCl<sub>2</sub> 存在下、キナーゼ (0.2 µg EGFR) を加え 37 °C で一晩静置しチロシンキナーゼ反応を行った。キナーゼ反応後、ペプチドを SDB-XC StageTip で脱塩した。

### メソッド評価のためのデータベース検索

ペプチドおよびタンパク質を、UniprotKB/Swissprot リリース 2015\_01 または 2016\_03 からのヒトデータベースに対する、Mascot v2.5 を用いた自動データベース



検索によって同定した。プリカーサーイオン質量許容値 5 ppm、プロダクトイオン質量許容値 0.02 Da を設定した。2 回のミス切断まで許容した厳格な trypsin/P の切断特異性を設定した。システインのカルバミドメチル化、リジンと N 末端の TMT あるいは TMT6plex 標識を固定修飾として設定した。メチオニンの酸化およびセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化を可変修飾として設定した。標識効率の確認には、システインのカルバミドメチル化を固定修飾とし、メチオニンの酸化、セリン、スレオニン、チロシンのリン酸化、およびリジンと N 末端の TMT 標識を可変修飾として設定した。各ペプチドの identity スコアを基に Mascot スコアが 95%信頼限界以上 ( $p < 0.05$ ) であれば、ペプチドが同定されたとみなした。

#### Selumetinib 処理 HeLa 細胞のためのデータベース検索

ペプチドおよびタンパク質は、UniprotKB/Swissprot リリース 2019\_10 (20380 配列) からのヒトデータベースに対する、Mascot v2.7 を用いた自動データベース検索によって同定した。プリカーサーイオン質量誤差許容値 5 ppm、プロダクトイオン質量誤差許容値 0.02 Da を設定した。2 回のミス切断まで許容した厳格な trypsin/P の切断特異性を設定した。システインのカルバミドメチル化、リジンと N 末端の TMT6plex 標識を固定修飾として設定した。メチオニンの酸化およびセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化を可変修飾として設定した。Proteome Discoverer (version 2.1) の Percolator<sup>177</sup> を用いて、q 値に基づいて 1%の偽陽性率でペプチドスペクトルマッチ (PSM) およびペプチドグループを同定した。PhosphoRS (ptmRS)<sup>178</sup> により、リン酸化部位の局在の信頼性を評価した。

## <<第四章>>

### 大腸菌試料の調製

大腸菌 K-12 BW25113 株を LB 培地（ナカライテスク社製）で 37 °C にて激しく振盪しながら培養した。対数増殖期に遠心分離により細胞を回収した。Lin らの手法<sup>179</sup>を基に、PTS 法により抽出した大腸菌タンパク質をメタノール・クロロホルム沈殿法により洗浄後、消化し、脱塩した。

### TMT 標識

消化されたペプチド（50 µg）を 20 µL 200 mM HEPES pH 7.6 に再溶解し、5 µL ACN に溶解した 0.1 mg の TMT6plex 標識試薬と混合し、室温で 1 時間静置した。反応は、最終濃度が 0.33% となるようにヒドロキシルアミンを添加し停止させた。15 分間静置後、試料を 1% TFA で酸性化し、ACN 濃度が 5% 未満になるように希釈し、適切な混合比になるように混合し、SDB-XC StageTip を用いて脱塩した。

### LC/MS/MS データベース検索

ペプチドおよびタンパク質は、UniprotKB/Swiss-Prot release 2018/08 のヒトおよび大腸菌連結データベースに対する、Mascot v2.6 を用いた自動データベース検索により同定した。プリカーサーイオン質量誤差許容値 30 ppm (timsTOF Pro) または 5 ppm (Orbitrap Fusion Lumos)、プロダクトイオン質量誤差許容値 0.05 Da (timsTOF Pro)、20 ppm (Orbitrap Fusion Lumos、MS<sup>2</sup>) または 0.5 Da (Orbitrap Fusion Lumos、SPS-MS<sup>3</sup>) を設定した。2 回のミス切断まで許容した厳格な trypsin/P の切断特異性を設定した。システインのカルバミドメチル化、リジンと N 末端の TMT6plex 修飾を固定修飾として設定した。メチオニンの酸化を可変修飾として設定した。各ペプチドの identity スコアを基に Mascot スコアが 95% 信頼限界以上 ( $p < 0.05$ ) であれば、ペプチドが同定されたとみなした。ペプチド同定における偽陽性率が、本基準において 1% 未満であることを、逆配列偽データベースに対する検索で推定した。レポーターイオンの強度は mgf ファイルから自作のスクリプトで抽出した。ピークキャパシティの計算のため、MaxQuant<sup>144,145</sup> (version 1.6.4.0) を用いて保持時間およびイオンモビリティ情報を抽出した。

## <<第五章>>

### リン酸化ペプチドの脱リン酸化

リン酸化ペプチド濃縮後の試料から 3 分の 1 を分注し乾燥させ、25  $\mu$ L の 100 mM Tris-HCl バッファー (pH 9.0) に溶解させた。アルカリホスファターゼ (子牛腸由来; 5 単位) を加え、37  $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした。反応後、10% TFA 10  $\mu$ L を加えて溶液を酸性にし、StageTip を用いて脱塩した。

### HPLC 分画

リン酸化ペプチドとその脱リン酸化物を混合し、0.5% TFA を含む 4% ACN に溶解し、UV 検出器 (280 nm) を備えた ACQUITY UPLC H-Class Bio システムを用いて Protein-RP カラム (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、5  $\mu$ m C4-silica (USP L26)、20 nm pore) に注入した。注入量は 10  $\mu$ L、流速は 200  $\mu$ L/min に設定した。ペプチドは、0.5% 酢酸をイオンペア試薬として、4-40% ACN 30 分、40-80% ACN 1 分の 2 段階線形グラジエントで分離した。

### LC/MS/MS データベース検索

ペプチドとタンパク質は、UniprotKB/Swiss-Prot リリース 2017/04 からのヒトデータベースに対する、TIMS-DDA モードの MaxQuant (バージョン 1.6.14.0) を用いた自動データベース検索により同定した。2 回のミス切断まで許容した厳格な trypsin/P の切断特異性を設定した。システインのカルバミドメチル化を固定修飾として設定した。メチオニンの酸化、タンパク質 N 末端のアセチル化、セリン、スレオニン、チロシンのリン酸化を可変修飾として設定した。検索結果として得られた evidence.txt ファイルを解析に使用した。衝突断面積は、MaxQuant を用いて得られたイオンモビリティの逆数 ( $1/K_0$ ) から算出した。



# 発表論文

## 第一章

1. Kosuke Ogata, Oleg V. Krokhin, Yasushi Ishihama  
Retention Order Reversal of Phosphorylated and Unphosphorylated Peptides in Reversed-Phase LC/MS  
Analytical Sciences, 34(9), 1037-1041, 2018

## 第二章

2. Kosuke Ogata and Yasushi Ishihama  
CoolTip: Low-Temperature Solid-Phase Extraction Microcolumn for Capturing Hydrophilic Peptides and Phosphopeptides  
Molecular & Cellular Proteomics, 20, 100170, 2021

## 第三章

3. Kosuke Ogata, Chia-Feng Tsai, Yasushi Ishihama  
Nanoscale Solid-Phase Isobaric Labeling for Multiplexed Quantitative Phosphoproteomics  
Journal of Proteome Research, 20(8), 4193-4202, 2021
4. Chia-Feng Tsai, Kosuke Ogata, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama  
Motif-Centric Phosphoproteomics to Target Kinase-Mediated Signaling Pathways  
Cell Reports Methods, 2, 100138, 2022

## 第四章

5. Kosuke Ogata and Yasushi Ishihama  
Extending the Separation Space with Trapped Ion Mobility Spectrometry Improves the Accuracy of Isobaric Tag-Based Quantitation in Proteomic LC/MS/MS  
Analytical Chemistry, 92(12), 8037-8040, 2020

## 第五章

6. Kosuke Ogata, Chih-Hsiang Chang, Yasushi Ishihama  
Effect of Phosphorylation on the Collision Cross Sections of Peptide Ions in Ion Mobility Spectrometry  
Mass Spectrometry, 10(1), A0093, 2021

その他

7. Chih-Hsiang Chang, Darien Yeung, Victor Spicer, Kosuke Ogata, Oleg Krokhin, Yasushi Ishihama  
Sequence-Specific Model for Predicting Peptide Collision Cross Section Values in Proteomic Ion Mobility Spectrometry  
Journal of Proteome Research, 20(7), 3600-3610, 2021
8. Akihiro Matsumoto, Yuki Takahashi, Kosuke Ogata, Shimpei Kitamura, Naoki Nakagawa, Aki Yamamoto, Yasushi Ishihama, Yoshinobu Takakura  
Phosphatidylserine-Deficient Small Extracellular Vesicle (sEV) is a Major Somatic Cell-Derived sEV Subpopulation in Blood  
iScience, 102839, 2021
9. Kotaro Akaki, Kosuke Ogata, Yuhei Yamauchi, Noriki Iwai, Ka Man Tse, Fabian Hia, Atsushi Mochizuki, Yasushi Ishihama, Takashi Mino, Osamu Takeuchi  
IRAK1-Dependent Regnase-1-14-3-3 Complex Formation Controls Regnase-1-Mediated mRNA Decay  
eLife, 10, e71966, 2021

## 謝辞

本論文作成に際し終始ご指導及びご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科薬科学専攻製剤機能解析学分野 石濱泰教授に、深謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、ご親切なるご助言とご指導をいただきました京都大学大学院薬学研究科 杉山直幸准教授、国立循環器病研究センター 若林真樹博士に深く感謝いたします。さらに、研究において筆者と活発な議論をしていただきました、京都大学大学院薬学研究科 今見考志博士、台湾国防医学院 張心儀博士、米国パシフィックノースウエスト国立研究所 蔡家烽博士、同志社女子大学薬学部 高橋知里博士、慶應義塾大学医学部 津曲和哉博士、熊本大学大学院生命科学研究部 張智翔博士、カナダマニトバ大学 Oleg Krokhin 准教授、またその他の石濱研研究室の卒業生ならびに在学生の皆様に深く感謝申し上げます。本研究の一部は上尾竹圓会研究助成の支援を受けて行われました。この場を借りて感謝申し上げます。最後に、研究生生活を支えてくださった家族に感謝いたします。

本研究は、JSPS 科研費 JP20K21478 の助成を受けたものです。





## 参考文献

1. Bianconi, E. et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol* **40**, 463-471 (2013).
2. Aebersold, R. & Mann, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* **537**, 347-355 (2016).
3. Aebersold, R. et al. How many human proteoforms are there? *Nat Chem Biol* **14**, 206-214 (2018).
4. Carbonara, K., Andonovski, M. & Coorsen, J.R. Proteomes Are of Proteoforms: Embracing the Complexity. *Proteomes* **9** (2021).
5. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207 (2003).
6. Hebert, A.S. et al. The one hour yeast proteome. *Mol Cell Proteomics* **13**, 339-347 (2014).
7. Scheltema, R.A. et al. The Q Exactive HF, a Benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field Orbitrap analyzer. *Mol Cell Proteomics* **13**, 3698-3708 (2014).
8. Meier, F. et al. Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Mol Cell Proteomics* **17**, 2534-2545 (2018).
9. Bekker-Jensen, D.B. et al. A Compact Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with FAIMS Interface Improves Proteome Coverage in Short LC Gradients. *Mol Cell Proteomics* **19**, 716-729 (2020).
10. MacNair, J.E., Patel, K.D. & Jorgenson, J.W. Ultrahigh-pressure reversed-phase capillary liquid chromatography: isocratic and gradient elution using columns packed with 1.0-micron particles. *Anal Chem* **71**, 700-708 (1999).
11. Mellors, J.S. & Jorgenson, J.W. Use of 1.5-microm porous ethyl-bridged hybrid particles as a stationary-phase support for reversed-phase ultrahigh-pressure liquid chromatography. *Anal Chem* **76**, 5441-5450 (2004).
12. Patel, K.D., Jerkovich, A.D., Link, J.C. & Jorgenson, J.W. In-depth characterization of slurry packed capillary columns with 1.0-microm nonporous particles using reversed-phase isocratic ultrahigh-pressure liquid chromatography. *Anal Chem* **76**, 5777-5786 (2004).
13. Luo, Q. et al. Preparation of 20-microm-i.d. silica-based monolithic columns and their performance for proteomics analyses. *Anal Chem* **77**, 5028-5035 (2005).
14. Kobayashi, H. et al. Properties of monolithic silica columns for HPLC. *Anal Sci* **22**, 491-501 (2006).

15. Iwasaki, M., Sugiyama, N., Tanaka, N. & Ishihama, Y. Human proteome analysis by using reversed phase monolithic silica capillary columns with enhanced sensitivity. *J Chromatogr A* **1228**, 292-297 (2012).
16. He, B., Tait, N. & Regnier, F. Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography. *Anal Chem* **70**, 3790-3797 (1998).
17. Baca, M., Desmet, G., Ottevaere, H. & De Malsche, W. Achieving a Peak Capacity of 1800 Using an 8 m Long Pillar Array Column. *Anal Chem* **91**, 10932-10936 (2019).
18. Bekker-Jensen, D.B. et al. An Optimized Shotgun Strategy for the Rapid Generation of Comprehensive Human Proteomes. *Cell Syst* **4**, 587-599 e584 (2017).
19. Pandey, A. & Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837-846 (2000).
20. Shishkova, E., Hebert, A.S. & Coon, J.J. Now, More Than Ever, Proteomics Needs Better Chromatography. *Cell Syst* **3**, 321-324 (2016).
21. Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S. & Heck, A.J. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc* **4**, 484-494 (2009).
22. Geiger, T. et al. Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture as a spike-in standard in quantitative proteomics. *Nat Protoc* **6**, 147-157 (2011).
23. Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem* **404**, 939-965 (2012).
24. Cox, J. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* **13**, 2513-2526 (2014).
25. Rauniyar, N. & Yates, J.R., 3rd Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics. *J Proteome Res* **13**, 5293-5309 (2014).
26. Thompson, A. et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem* **75**, 1895-1904 (2003).
27. Ting, L., Rad, R., Gygi, S.P. & Haas, W. MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics. *Nat Methods* **8**, 937-940 (2011).
28. McAlister, G.C. et al. MultiNotch MS3 enables accurate, sensitive, and multiplexed detection of differential expression across cancer cell line proteomes. *Anal Chem* **86**, 7150-7158 (2014).
29. Schweppe, D.K. et al. Full-Featured, Real-Time Database Searching Platform Enables Fast and Accurate Multiplexed Quantitative Proteomics. *J Proteome Res* **19**, 2026-2034 (2020).
30. Schweppe, D.K. et al. Characterization and Optimization of Multiplexed Quantitative Analyses Using High-Field Asymmetric-Waveform Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal Chem* **91**, 4010-4016 (2019).

31. Pfammatter, S., Bonneil, E. & Thibault, P. Improvement of Quantitative Measurements in Multiplex Proteomics Using High-Field Asymmetric Waveform Spectrometry. *J Proteome Res* **15**, 4653-4665 (2016).
32. Hunter, T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 140-146 (2009).
33. Pawson, T. & Scott, J.D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**, 2075-2080 (1997).
34. Hunter, T. Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127 (2000).
35. Olsen, J.V. et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648 (2006).
36. Needham, E.J., Parker, B.L., Burykin, T., James, D.E. & Humphrey, S.J. Illuminating the dark phosphoproteome. *Sci Signal* **12** (2019).
37. Cohen, P. The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* **4**, E127-130 (2002).
38. Hunter, T. & Sefton, B.M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1311-1315 (1980).
39. Högberg, A. et al. Benchmarking common quantification strategies for large-scale phosphoproteomics. *Nat Commun* **9**, 1045 (2018).
40. Humphrey, S.J., Azimifar, S.B. & Mann, M. High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics. *Nat Biotechnol* **33**, 990-995 (2015).
41. Mertins, P. et al. Reproducible workflow for multiplexed deep-scale proteome and phosphoproteome analysis of tumor tissues by liquid chromatography-mass spectrometry. *Nat Protoc* **13**, 1632-1661 (2018).
42. Ikeguchi, Y. & Nakamura, H. Determination of organic phosphates by column-switching high performance anion-exchange chromatography using on-line preconcentration on titania. *Analytical Sciences* **13**, 479-483 (1997).
43. Stensballe, A., Andersen, S. & Jensen, O.N. Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics* **1**, 207-222 (2001).
44. Ficarro, S.B. et al. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **20**, 301-305 (2002).
45. Wolschin, F., Wienkoop, S. & Weckwerth, W. Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics* **5**, 4389-4397 (2005).
46. Kweon, H.K. & Hakansson, K. Selective zirconium dioxide-based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis. *Anal Chem* **78**, 1743-1749 (2006).
47. Abe, Y., Nagano, M., Tada, A., Adachi, J. & Tomonaga, T. Deep Phosphotyrosine Proteomics by Optimization of Phosphotyrosine Enrichment and MS/MS Parameters. *J Proteome Res* **16**, 1077-1086 (2017).
48. Bian, Y. et al. Ultra-deep tyrosine phosphoproteomics enabled by a phosphotyrosine superbinder. *Nat Chem Biol* **12**, 959-966 (2016).

49. Dong, M. et al. Sensitive, Robust, and Cost-Effective Approach for Tyrosine Phosphoproteome Analysis. *Anal Chem* **89**, 9307-9314 (2017).
50. Stokes, M.P. et al. PTMScan direct: identification and quantification of peptides from critical signaling proteins by immunoaffinity enrichment coupled with LC-MS/MS. *Mol Cell Proteomics* **11**, 187-201 (2012).
51. Pasa-Tolić, L., Masselon, C., Barry, R.C., Shen, Y. & Smith, R.D. Proteomic analyses using an accurate mass and time tag strategy. *Biotechniques* **37**, 621-624, 626-633, 636 passim (2004).
52. Krokhin, O.V. et al. Use of peptide retention time prediction for protein identification by off-line reversed-phase HPLC-MALDI MS/MS. *Anal Chem* **78**, 6265-6269 (2006).
53. Lucas, J. & Henschen, A. Identification and assay of phosphoserine and tyrosine-O-sulphate in fibrinopeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **369**, 357-364 (1986).
54. Kim, J. et al. Phosphopeptide elution times in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1172**, 9-18 (2007).
55. Ishihama, Y. et al. Enhancement of the efficiency of phosphoproteomic identification by removing phosphates after phosphopeptide enrichment. *J Proteome Res* **6**, 1139-1144 (2007).
56. Kawakami, T. et al. Protein identification from product ion spectra of peptides validated by correlation between measured and predicted elution times in liquid chromatography/mass spectrometry. *Proteomics* **5**, 856-864 (2005).
57. Steen, H., Jebanathirajah, J.A., Rush, J., Morrice, N. & Kirschner, M.W. Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. *Mol Cell Proteomics* **5**, 172-181 (2006).
58. Marx, H. et al. A large synthetic peptide and phosphopeptide reference library for mass spectrometry-based proteomics. *Nat Biotechnol* **31**, 557-564 (2013).
59. Perlova, T.Y. et al. Retention time prediction using the model of liquid chromatography of biomacromolecules at critical conditions in LC-MS phosphopeptide analysis. *Proteomics* **10**, 3458-3468 (2010).
60. Dass, C., Mahalakshmi, P. & Grandberry, D. Manipulation of ion-pairing reagents for reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of phosphorylated opioid peptides from their non-phosphorylated analogues. *J Chromatogr A* **678**, 249-257 (1994).
61. Stadalius, M.A., Gold, H.S. & Snyder, L.R. Optimization Model for the Gradient Elution Separation of Peptide Mixtures by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography - Verification of Band-Width Relationships for Acetonitrile-Water Mobile Phases. *Journal of Chromatography* **327**, 27-45 (1985).
62. Sakamoto, Y., Kawakami, N. & Sasagawa, T. Prediction of peptide retention times. *J Chromatogr* **442**, 69-79 (1988).

63. Shinoda, K., Tomita, M. & Ishihama, Y. Aligning LC peaks by converting gradient retention times to retention index of peptides in proteomic experiments. *Bioinformatics* **24**, 1590-1595 (2008).
64. Spicer, V., Grigoryan, M., Gotfrid, A., Standing, K.G. & Krokhin, O.V. Predicting retention time shifts associated with variation of the gradient slope in peptide RP-HPLC. *Anal Chem* **82**, 9678-9685 (2010).
65. Ishihama, Y. Analytical Platforms for Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Chromatography* **40**, 89-97 (2019).
66. Rappsilber, J., Ishihama, Y. & Mann, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* **75**, 663-670 (2003).
67. Mitulovic, G. et al. An improved method for tracking and reducing the void volume in nano HPLC-MS with micro trapping columns. *Anal Bioanal Chem* **376**, 946-951 (2003).
68. Ishihama, Y. Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1067**, 73-83 (2005).
69. Maia, T.M. et al. Simple Peptide Quantification Approach for MS-Based Proteomics Quality Control. *ACS Omega* **5**, 6754-6762 (2020).
70. Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* **2**, 1896-1906 (2007).
71. Larsen, M.R., Graham, M.E., Robinson, P.J. & Roepstorff, P. Improved detection of hydrophilic phosphopeptides using graphite powder microcolumns and mass spectrometry: evidence for in vivo doubly phosphorylated dynamin I and dynamin III. *Mol Cell Proteomics* **3**, 456-465 (2004).
72. Tsai, C.F. et al. Tandem Mass Tag Labeling Facilitates Reversed-Phase Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Hydrophilic Phosphopeptides. *Anal Chem* **91**, 11606-11613 (2019).
73. Shibue, M., Mant, C.T. & Hodges, R.S. Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1-60 mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behaviour of peptides. *J Chromatogr A* **1080**, 58-67 (2005).
74. Ishihama, Y., Rappsilber, J. & Mann, M. Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional Peptide fractionation in proteomics. *J Proteome Res* **5**, 988-994 (2006).
75. Ohguro, H. & Palczewski, K. Separation of phospho- and non-phosphopeptides using reverse phase column chromatography. *FEBS Letters* **368**, 452-454 (1995).
76. Ogata, K., Krokhin, O.V. & Ishihama, Y. Retention Order Reversal of Phosphorylated and Unphosphorylated Peptides in Reversed-Phase LC/MS. *Anal Sci* **34**, 1037-1041 (2018).
77. Garcia, B.A. et al. Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* **2**, 933-938 (2007).

78. Sidoli, S. et al. Drawbacks in the use of unconventional hydrophobic anhydrides for histone derivatization in bottom-up proteomics PTM analysis. *Proteomics* **15**, 1459-1469 (2015).
79. Chin, E.T. & Papac, D.I. The use of a porous graphitic carbon column for desalting hydrophilic peptides prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* **273**, 179-185 (1999).
80. Piovesana, S. et al. Sensitive untargeted identification of short hydrophilic peptides by high performance liquid chromatography on porous graphitic carbon coupled to high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1590**, 73-79 (2019).
81. Alley, W.R., Jr., Mechref, Y. & Novotny, M.V. Use of activated graphitized carbon chips for liquid chromatography/mass spectrometric and tandem mass spectrometric analysis of tryptic glycopeptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**, 495-505 (2009).
82. Jennings, M.E., 2nd, Silveira, J.R., Treier, K.M., Tracy, P.B. & Matthews, D.E. Total Retention Liquid Chromatography-Mass Spectrometry to Achieve Maximum Protein Sequence Coverage. *Anal Chem* **93**, 5054-5060 (2021).
83. Greibrokk, T. Heating or cooling LC columns. *Anal Chem* **74**, 374A-378A (2002).
84. Tanase, M., Soare, A., David, V. & Moldoveanu, S.C. Sources of Nonlinear van't Hoff Temperature Dependence in High-Performance Liquid Chromatography. *ACS Omega* **4**, 19808-19817 (2019).
85. Li, B. et al. The characterization of column heating effect in nanoflow liquid chromatography mass spectrometry (nanoLC-MS)-based proteomics. *J Mass Spectrom* **55**, e4441 (2020).
86. Wilson, R.E., Groskreutz, S.R. & Weber, S.G. Improving the Sensitivity, Resolution, and Peak Capacity of Gradient Elution in Capillary Liquid Chromatography with Large-Volume Injections by Using Temperature-Assisted On-Column Solute Focusing. *Anal Chem* **88**, 5112-5121 (2016).
87. Groskreutz, S.R., Horner, A.R. & Weber, S.G. Temperature-based on-column solute focusing in capillary liquid chromatography reduces peak broadening from pre-column dispersion and volume overload when used alone or with solvent-based focusing. *J Chromatogr A* **1405**, 133-139 (2015).
88. Eghbali, H. et al. Exploring the possibilities of cryogenic cooling in liquid chromatography for biological applications: a proof of principle. *Anal Chem* **84**, 2031-2037 (2012).
89. Schöbinger, M., Klein, O.-J. & Mitulović, G. Low-Temperature Mobile Phase for Peptide Trapping at Elevated Separation Temperature Prior to Nano RP-HPLC-MS/MS. *Separations* **3**, 6 (2016).
90. Young, C., Podtelejnikov, A.V. & Nielsen, M.L. Improved Reversed Phase Chromatography of Hydrophilic Peptides from Spatial and Temporal Changes in Column Temperature. *J Proteome Res* **16**, 2307-2317 (2017).
91. Ogata, K., Tsai, C.F. & Ishihama, Y. Nanoscale Solid-Phase Isobaric Labeling for Multiplexed Quantitative Phosphoproteomics. *J Proteome Res* **20**, 4193-4202 (2021).

92. Collins, M.O., Yu, L., Campuzano, I., Grant, S.G. & Choudhary, J.S. Phosphoproteomic analysis of the mouse brain cytosol reveals a predominance of protein phosphorylation in regions of intrinsic sequence disorder. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1331-1348 (2008).
93. Landry, C.R., Levy, E.D. & Michnick, S.W. Weak functional constraints on phosphoproteomes. *Trends Genet* **25**, 193-197 (2009).
94. Dyson, H.J. Making Sense of Intrinsically Disordered Proteins. *Biophys J* **110**, 1013-1016 (2016).
95. Morris, O.M., Torpey, J.H. & Isaacson, R.L. Intrinsically disordered proteins: modes of binding with emphasis on disordered domains. *Open Biol* **11**, 210222 (2021).
96. Masuda, T., Sugiyama, N., Tomita, M. & Ishihama, Y. Microscale phosphoproteome analysis of 10,000 cells from human cancer cell lines. *Anal Chem* **83**, 7698-7703 (2011).
97. Humphrey, S.J., Karayel, O., James, D.E. & Mann, M. High-throughput and high-sensitivity phosphoproteomics with the EasyPhos platform. *Nat Protoc* **13**, 1897-1916 (2018).
98. Schilling, B. et al. Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: application to protein acetylation and phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* **11**, 202-214 (2012).
99. Falkenby, L.G. et al. Integrated solid-phase extraction-capillary liquid chromatography (speLC) interfaced to ESI-MS/MS for fast characterization and quantification of protein and proteomes. *J Proteome Res* **13**, 6169-6175 (2014).
100. Bache, N. et al. A Novel LC System Embeds Analytes in Pre-formed Gradients for Rapid, Ultra-robust Proteomics. *Mol Cell Proteomics* **17**, 2284-2296 (2018).
101. Yi, L. et al. Boosting to Amplify Signal with Isobaric Labeling (BASIL) Strategy for Comprehensive Quantitative Phosphoproteomic Characterization of Small Populations of Cells. *Anal Chem* **91**, 5794-5801 (2019).
102. Budnik, B., Levy, E., Harmange, G. & Slavov, N. SCoPE-MS: mass spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation. *Genome Biol* **19**, 161 (2018).
103. Tsai, C.F. et al. An Improved Boosting to Amplify Signal with Isobaric Labeling (iBASIL) Strategy for Precise Quantitative Single-cell Proteomics. *Mol Cell Proteomics* **19**, 828-838 (2020).
104. Dou, M. et al. High-Throughput Single Cell Proteomics Enabled by Multiplex Isobaric Labeling in a Nanodroplet Sample Preparation Platform. *Anal Chem* **91**, 13119-13127 (2019).
105. Cheung, T.K. et al. Defining the carrier proteome limit for single-cell proteomics. *Nat Methods* **18**, 76-83 (2021).
106. Huang, F.K. et al. Deep Coverage of Global Protein Expression and Phosphorylation in Breast Tumor Cell Lines Using TMT 10-plex Isobaric Labeling. *J Proteome Res* **16**, 1121-1132 (2017).

107. Navarrete-Perea, J., Yu, Q., Gygi, S.P. & Paulo, J.A. Streamlined Tandem Mass Tag (SL-TMT) Protocol: An Efficient Strategy for Quantitative (Phospho)proteome Profiling Using Tandem Mass Tag-Synchronous Precursor Selection-MS3. *J Proteome Res* **17**, 2226-2236 (2018).
108. Lombardi, B., Rendell, N., Edwards, M., Katan, M. & Zimmermann, J.G. Evaluation of phosphopeptide enrichment strategies for quantitative TMT analysis of complex network dynamics in cancer-associated cell signalling. *EuPA Open Proteom* **6**, 10-15 (2015).
109. Paulo, J.A., Navarrete-Perea, J., Erickson, A.R., Knott, J. & Gygi, S.P. An Internal Standard for Assessing Phosphopeptide Recovery from Metal Ion/Oxide Enrichment Strategies. *J Am Soc Mass Spectrom* **29**, 1505-1511 (2018).
110. Erickson, B.K. et al. Evaluating multiplexed quantitative phosphopeptide analysis on a hybrid quadrupole mass filter/linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* **87**, 1241-1249 (2015).
111. Bohm, G. et al. Low-pH Solid-Phase Amino Labeling of Complex Peptide Digests with TMTs Improves Peptide Identification Rates for Multiplexed Global Phosphopeptide Analysis. *J Proteome Res* **14**, 2500-2510 (2015).
112. de Graaf, E.L., Pellegrini, D. & McDonnell, L.A. Set of Novel Automated Quantitative Microproteomics Protocols for Small Sample Amounts and Its Application to Kidney Tissue Substructures. *J Proteome Res* **15**, 4722-4730 (2016).
113. Myers, S.A. et al. Streamlined Protocol for Deep Proteomic Profiling of FAC-sorted Cells and Its Application to Freshly Isolated Murine Immune Cells. *Mol Cell Proteomics* **18**, 995-1009 (2019).
114. Mao, Y. et al. Fully Integrated and Multiplexed Sample Preparation Technology for Sensitive Interactome Profiling. *Anal Chem* **93**, 3026-3034 (2021).
115. Thompson, A. et al. TMTpro: Design, Synthesis, and Initial Evaluation of a Proline-Based Isobaric 16-Plex Tandem Mass Tag Reagent Set. *Anal Chem* **91**, 15941-15950 (2019).
116. Thingholm, T.E., Palmisano, G., Kjeldsen, F. & Larsen, M.R. Undesirable charge-enhancement of isobaric tagged phosphopeptides leads to reduced identification efficiency. *J Proteome Res* **9**, 4045-4052 (2010).
117. Kyte, J. & Doolittle, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-132 (1982).
118. Bhatarai, B. & Gramatica, P. Prediction of aqueous solubility, vapor pressure and critical micelle concentration for aquatic partitioning of perfluorinated chemicals. *Environ Sci Technol* **45**, 8120-8128 (2011).
119. Tyanova, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* **13**, 731-740 (2016).
120. Davies, B.R. et al. AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol Cancer Ther* **6**, 2209-2219 (2007).



121. Basken, J. et al. Specificity of Phosphorylation Responses to Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase Pathway Inhibitors in Melanoma Cells. *Mol Cell Proteomics* **17**, 550-564 (2018).
122. Kosako, H. et al. Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1026-1035 (2009).
123. Stuart, S.A. et al. A Phosphoproteomic Comparison of B-RAFV600E and MKK1/2 Inhibitors in Melanoma Cells. *Mol Cell Proteomics* **14**, 1599-1615 (2015).
124. Wiredja, D.D., Koyuturk, M. & Chance, M.R. The KSEA App: a web-based tool for kinase activity inference from quantitative phosphoproteomics. *Bioinformatics* **33**, 3489-3491 (2017).
125. Hoeflich, K.P. et al. In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin Cancer Res* **15**, 4649-4664 (2009).
126. Sunayama, J. et al. Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Stem Cells* **28**, 1930-1939 (2010).
127. Holt, S.V. et al. Enhanced apoptosis and tumor growth suppression elicited by combination of MEK (selumetinib) and mTOR kinase inhibitors (AZD8055). *Cancer Res* **72**, 1804-1813 (2012).
128. Posch, C. et al. MEK/CDK4,6 co-targeting is effective in a subset of NRAS, BRAF and 'wild type' melanomas. *Oncotarget* **9**, 34990-34995 (2018).
129. Chua, X.Y. et al. Tandem Mass Tag Approach Utilizing Pervanadate BOOST Channels Delivers Deeper Quantitative Characterization of the Tyrosine Phosphoproteome. *Mol Cell Proteomics* **19**, 730-743 (2020).
130. Li, X. et al. Quantifying Kinase-Specific Phosphorylation Stoichiometry Using Stable Isotope Labeling In a Reverse In-Gel Kinase Assay. *Anal Chem* **88**, 11468-11475 (2016).
131. Mundiña-Weilenmann, C., Chang, C.F., Gutierrez, L.M. & Hosey, M.M. Demonstration of the phosphorylation of dihydropyridine-sensitive calcium channels in chick skeletal muscle and the resultant activation of the channels after reconstitution. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 4067-4073 (1991).
132. Tsai, C.F. et al. Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics. *Nat Commun* **6**, 6622 (2015).
133. Sharma, K. et al. Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep* **8**, 1583-1594 (2014).
134. Wenger, C.D. et al. Gas-phase purification enables accurate, multiplexed proteome quantification with isobaric tagging. *Nat Methods* **8**, 933-935 (2011).
135. Wuhr, M. et al. Accurate multiplexed proteomics at the MS2 level using the complement reporter ion cluster. *Anal Chem* **84**, 9214-9221 (2012).

136. Sonnett, M., Yeung, E. & Wuhr, M. Accurate, Sensitive, and Precise Multiplexed Proteomics Using the Complement Reporter Ion Cluster. *Anal Chem* **90**, 5032-5039 (2018).
137. Virreira Winter, S. et al. EASI-tag enables accurate multiplexed and interference-free MS2-based proteome quantification. *Nat Methods* **15**, 527-530 (2018).
138. Niu, M. et al. Extensive Peptide Fractionation and y1 Ion-Based Interference Detection Method for Enabling Accurate Quantification by Isobaric Labeling and Mass Spectrometry. *Anal Chem* **89**, 2956-2963 (2017).
139. Haynes, S.E. et al. Variable-Velocity Traveling-Wave Ion Mobility Separation Enhancing Peak Capacity for Data-Independent Acquisition Proteomics. *Anal Chem* **89**, 5669-5672 (2017).
140. Chouinard, C.D. et al. Improved Sensitivity and Separations for Phosphopeptides using Online Liquid Chromatography Coupled with Structures for Lossless Ion Manipulations Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Anal Chem* **90**, 10889-10896 (2018).
141. Shliaha, P.V. et al. Additional precursor purification in isobaric mass tagging experiments by traveling wave ion mobility separation (TWIMS). *J Proteome Res* **13**, 3360-3369 (2014).
142. Pfammatter, S. et al. A Novel Differential Ion Mobility Device Expands the Depth of Proteome Coverage and the Sensitivity of Multiplex Proteomic Measurements. *Mol Cell Proteomics* **17**, 2051-2067 (2018).
143. Meier, F. et al. Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF): Multiplying Sequencing Speed and Sensitivity by Synchronized Scans in a Trapped Ion Mobility Device. *J Proteome Res* **14**, 5378-5387 (2015).
144. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367-1372 (2008).
145. Prianichnikov, N. et al. MaxQuant Software for Ion Mobility Enhanced Shotgun Proteomics. *Mol Cell Proteomics* **19**, 1058-1069 (2020).
146. Paulo, J.A., O'Connell, J.D. & Gygi, S.P. A Triple Knockout (TKO) Proteomics Standard for Diagnosing Ion Interference in Isobaric Labeling Experiments. *J Am Soc Mass Spectrom* **27**, 1620-1625 (2016).
147. Mann, M. & Jensen, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**, 255-261 (2003).
148. Spicer, V. et al. Sequence-specific retention calculator. A family of peptide retention time prediction algorithms in reversed-phase HPLC: applicability to various chromatographic conditions and columns. *Anal Chem* **79**, 8762-8768 (2007).
149. Ma, C. et al. Improved Peptide Retention Time Prediction in Liquid Chromatography through Deep Learning. *Anal Chem* **90**, 10881-10888 (2018).
150. Moruz, L., Tomazela, D. & Kall, L. Training, selection, and robust calibration of retention time models for targeted proteomics. *J Proteome Res* **9**, 5209-5216 (2010).

151. Gessulat, S. et al. Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning. *Nat Methods* **16**, 509-518 (2019).
152. Takahashi, C., Yazaki, T., Sugiyama, N. & Ishihama, Y. Selected Reaction Monitoring of Kinase Activity-Targeted Phosphopeptides. *Chromatography* **40**, 39-47 (2019).
153. Schmidlin, T. et al. High-Throughput Assessment of Kinome-wide Activation States. *Cell Syst* **9**, 366-374 e365 (2019).
154. Ludwig, C. et al. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* **14**, e8126 (2018).
155. Myung, S. et al. Development of high-sensitivity ion trap ion mobility spectrometry time-of-flight techniques: a high-throughput nano-LC-IMS-TOF separation of peptides arising from a *Drosophila* protein extract. *Anal Chem* **75**, 5137-5145 (2003).
156. Bonneil, E., Pfammatter, S. & Thibault, P. Enhancement of mass spectrometry performance for proteomic analyses using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS). *J Mass Spectrom* **50**, 1181-1195 (2015).
157. Ogata, K. & Ishihama, Y. Extending the Separation Space with Trapped Ion Mobility Spectrometry Improves the Accuracy of Isobaric Tag-Based Quantitation in Proteomic LC/MS/MS. *Anal Chem* **92**, 8037-8040 (2020).
158. Thalassinou, K. et al. Characterization of phosphorylated peptides using traveling wave-based and drift cell ion mobility mass spectrometry. *Anal Chem* **81**, 248-254 (2009).
159. Glover, M.S. et al. Examining the Influence of Phosphorylation on Peptide Ion Structure by Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **27**, 786-794 (2016).
160. Ruotolo, B.T. et al. Distinguishing between phosphorylated and nonphosphorylated peptides with ion mobility-mass spectrometry. *J Proteome Res* **1**, 303-306 (2002).
161. Ruotolo, B.T. et al. Analysis of phosphorylated peptides by ion mobility-mass spectrometry. *Anal Chem* **76**, 6727-6733 (2004).
162. Valentine, S.J., Counterman, A.E., Hoaglund-Hyzer, C.S. & Clemmer, D.E. Intrinsic amino acid size parameters from a series of 113 lysine-terminated tryptic digest peptide ions. *Journal of Physical Chemistry B* **103**, 1203-1207 (1999).
163. Valentine, S.J. et al. Using ion mobility data to improve peptide identification: intrinsic amino acid size parameters. *J Proteome Res* **10**, 2318-2329 (2011).
164. Kaszycki, J.L. & Shvartsburg, A.A. A Priori Intrinsic PTM Size Parameters for Predicting the Ion Mobilities of Modified Peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* **28**, 294-302 (2017).
165. Kim, D. et al. Probing the electron capture dissociation mass spectrometry of phosphopeptides with traveling wave ion mobility spectrometry and molecular dynamics simulations. *J Am Soc Mass Spectrom* **26**, 1004-1013 (2015).
166. Fernandez-Lima, F., Kaplan, D.A., Suetering, J. & Park, M.A. Gas-phase separation using a trapped ion mobility spectrometer. *Int J Ion Mobil Spectrom* **14**, 93-98 (2011).

167. Lietz, C.B., Yu, Q. & Li, L. Large-scale collision cross-section profiling on a traveling wave ion mobility mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom* **25**, 2009-2019 (2014).
168. Shah, A.R. et al. Machine learning based prediction for peptide drift times in ion mobility spectrometry. *Bioinformatics* **26**, 1601-1607 (2010).
169. Valentine, S.J., Counterman, A.E. & Clemmer, D.E. A database of 660 peptide ion cross sections: Use of intrinsic size parameters for bona fide predictions of cross sections. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **10**, 1188-1211 (1999).
170. Simmonds, A.L. et al. Structural Analysis of 14-3-3-zeta-Derived Phosphopeptides Using Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry, Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry, and Molecular Modeling. *J Phys Chem B* **124**, 461-469 (2020).
171. Okuda, S. et al. jPOSTrepo: an international standard data repository for proteomes. *Nucleic Acids Res* **45**, D1107-D1111 (2017).
172. Hudgins, R.R., Ratner, M.A. & Jarrold, M.F. Design of helices that are stable in vacuo. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 12974-12975 (1998).
173. Xiao, C., Perez, L.M. & Russell, D.H. Effects of charge states, charge sites and side chain interactions on conformational preferences of a series of model peptide ions. *Analyst* **140**, 6933-6944 (2015).
174. Masuda, T., Tomita, M. & Ishihama, Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res* **7**, 731-740 (2008).
175. Sugiyama, N. et al. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1103-1109 (2007).
176. Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* **11**, 2301-2319 (2016).
177. Kall, L., Canterbury, J.D., Weston, J., Noble, W.S. & MacCoss, M.J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* **4**, 923-925 (2007).
178. Taus, T. et al. Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *J Proteome Res* **10**, 5354-5362 (2011).
179. Lin, M.H., Sugiyama, N. & Ishihama, Y. Systematic profiling of the bacterial phosphoproteome reveals bacterium-specific features of phosphorylation. *Sci Signal* **8**, rs10 (2015).