

逆相モノリス型シリカキャピラリーカラムを用いた
ショットガンプロテオーム計測法の
高性能化に関する研究

2 0 2 5

富 岡 郁 那

目次

略語表	1
緒言	5
第 1 章	長時間グラジエント分離とイオン移動度分離を組み合わせたペプチド分離空間の 拡張 7
第 1 節	序 7
第 2 節	LC グラジエント時間とイオン移動度がペプチド分離に及ぼす影響 10
第 3 節	ペプチド分離効率とペプチドおよびタンパク質同定数の関係 14
第 4 節	検出されたイオンの確からしさの検証 19
第 5 節	DIA 法の適用によるペプチド同定数の最大化 21
第 6 節	結語 22
実験の部	 23
第 2 章	キャピラリー流速 LC/MS/MS によるハイスループットショットガンプロテオーム計測技術の開発 29
第 1 節	序 29
第 2 節	流速と ESI 効率の関係 32
第 3 節	キャピラリー流速 LC/MS/MS に適したカラムの選択 35
第 4 節	キャピラリー流速条件における流速の最適化 37
第 5 節	流路体積の最小化によるハイスループット LC/MS/MS のためのセットアップ設計 39
第 6 節	サンプル精製条件による LC 洗浄時間の短縮 41
第 7 節	1,000 SPD 実現に向けた LC/MS/MS 条件の調整 43
第 8 節	リン酸化チロシン合成ペプチドを用いた定量直線性評価 45
第 9 節	HeLa 細胞を用いた同定性能および定量再現性評価 51
第 10 節	5,000 回連続測定によるシステム頑健性評価 53
第 11 節	マウス脳空間プロテオミクスへの応用 57
第 12 節	内因性血清ペプチドの同定・定量への応用 59
第 13 節	カラム体積の微小化によるさらなるハイスループット化 62
第 14 節	カラム体積の微小化による高感度分析におけるハイスループット化 64
第 15 節	結語 68
実験の部	 69
結論	 77
参考文献	 78
謝辞	 86

略語表

ACN: Acetonitrile

アセトニトリル

BSA: Bovine serum albumin

ウシ血清アルブミン

BPC: Base peak ion current chromatogram

ベースピーククロマトグラム

COVID-19: Coronavirus disease 2019

新型コロナウイルス 感染症

CV: Coefficient of variation

変動係数

DDA: Data-dependent acquisition

データ依存的取得法

DDM: n-Dodecyl- β -D-maltoside

n-ドデシル- β -D-マルトシド

DIA: Data-independent acquisition

データ非依存的取得法

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ダルベッコ改変イーグル最小必須培地

DTT: Dithiothreitol

ジチオトレイトール

ESI: Electrospray ionization

エレクトロスプレーイオン化法

FBS: Fetal bovine serum

ウシ胎児血清

FDR: False discovery rate

偽陽性率

HILIC: Hydrophilic interaction chromatography

親水性相互作用クロマトグラフィー

IAA: Iodoacetamide

ヨードアセトアミド

IMS: Ion mobility spectrometry / ion mobility spectrometer

イオン移動度スペクトロメトリー / イオン移動度分析計

LC/MS/MS: Reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析

LMD: Laser microdissection

レーザーマイクロダイセクション

MS: Mass spectrometry / mass spectrometer

質量分析 / 質量分析計

PASEF: Parallel accumulation and serial fragmentation

並列蓄積-連続フラグメンテーション

PBS: Phosphate-buffered saline

リン酸塩緩衝生理食塩水

Pc: Peak capacity

ピークキャパシティ

PIF: Precursor ion fraction

プリカーサーイオン比率

PSM: Peptide-spectrum match

ペプチドスペクトルマッチ

PTM: Post-translational modification

翻訳後修飾

PTS: Phase transfer surfactant

相間移動溶解剤

QC: Quality control

品質管理

RPLC: Reversed-phase liquid chromatography

逆相液体クロマトグラフィー

RSD: Relative standard deviation

相対標準偏差

SCX: Strong cation exchange

強カチオン交換

SDB: Styrene divinylbenzene

スチレンジビニルベンゼン

SDC: Sodium deoxycholate

デオキシコール酸ナトリウム

SILAC: Stable isotope labeling using amino acids in cell culture

安定同位体アミノ酸培養標識法

SLS: Sodium *N*-lauroylsarcosinate

N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム

SPD: Samples per day

1日当たりのサンプル分析数

StageTip: Stop-and-go extraction tip

ステージ・チップ

TIMS: Trapped ion mobility spectrometry

トラップ型イオン移動度分析

TFA: Trifluoroacetic acid

トリフルオロ酢酸

TOF: Time-of-flight

時間飛行型

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン

緒言

1990 年頃発足したヒトゲノム計画は、2003 年にその完了が宣言され、ヒト全ゲノム配列の大部分が解読された^{1,2}。その後、シーケンシング技術の飛躍的進歩、とりわけ Nanopore シーケンシング法³や HiFi シーケンシング法⁴に代表される DNA ロングリード技術の登場により、2023 年には The Telomere-to-Telomere (T2T) consortium によってヒトゲノムの完全解読が報告された⁵。現在、ゲノム解析は疾患メカニズムの解明やバイオマーカー探索に広く用いられており、ゲノム情報に基づく個別化医療が進展している。例えば非小細胞肺癌では、EGFR や KRAS、BRAF などの遺伝子変異の有無に基づいて治療薬が選択されている⁶。また、遺伝子導入やゲノム編集技術の進歩により、CAR-T 細胞療法^{7,8}に代表されるような遺伝子を直接改変する治療戦略も実用化している。

一方、細胞機能を担う生命素子は遺伝子ではなくタンパク質である。タンパク質は遺伝子よりもはるかに多様で、アミノ酸 1 次配列情報だけでなく、その構造や翻訳後修飾 (Post-translational modification, PTM) 状態、スプライシングやプロテオリシス、といった様々な情報を含む⁹。また、疾病との相関も高く、薬剤の標的分子となる。しかし、ゲノム情報のみからタンパク質の状態を推定することは容易ではない。そのため、タンパク質発現量や修飾状態を直接網羅的に解析するプロテオミクスは、疾患理解や創薬において不可欠な情報基盤となっている¹⁰⁻¹³。2024 年にはタンパク質設計および立体構造予測の研究者にノーベル化学賞が授与されたことは、生命科学におけるタンパク質研究の重要性を改めて示すものである。

こういった背景より、タンパク質分析の基盤技術開発に関する研究は熱心に取り組まれてきた。古典的なタンパク質の 1 次アミノ酸配列の解析法として、1950 年に報告された Edman 分解法¹⁴がある。Edman 分解法はタンパク質ないしはペプチドの N 末端から 1 アミノ酸残基ずつ切り出す方法であり、この切り出されたアミノ酸を蛍光標識し HPLC で分離することでタンパク質のアミノ酸配列を同定する。この手法は高い確度にてアミノ酸配列を同定可能であり、また同じ質量を持つロイシンとイソロイシンを区別可能という利点を持つ。一方で、プロテオームのような複雑なサンプルには適していない。また、翻訳後修飾の種類によってはこの分解反応に干渉することも、この手法がプロテオーム規模の解析に広く普及していない一因である。他のプロテオーム計測法として、1975 年頃から使用されている 2 次元電気泳動法が挙げられる^{15,16}。この手法では、タンパク質の等電点と分子量に基づき分離を

行い、それぞれのスポットについて質量分析またはエドマン分解法によりタンパク質の同定を行う。大腸菌サンプルに対してこの手法を適用することで、1,000以上のスポットが得られたことが報告されている¹⁵。しかし、1枚のゲルに対して1サンプルまでしか測定できず、また2回の電気泳動を行うため分析時間が長いという課題がある。他に、新たなプロテオーム解析手法として、Nanopore シーケンシング技術^{3,17-23}を用いた方法が近年脚光を浴びている。この手法はアミノ酸1次配列^{17,19-21}や翻訳後修飾の有無^{22,23}を見分けることが示されており、今後さらなる技術の発展が期待される。しかし、現在は黎明期であり、いまだアミノ酸配列をプロテオーム規模で読み取ることは達成できていない。

タンパク質を包括的に解析する技術として最も有望な手法として、逆相液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いたショットガンプロテオミクスが広く挙げられる。ショットガンプロテオミクスでは、生体サンプルからタンパク質を抽出し、トリプシン等の消化酵素によりペプチドに断片化し、それをサンプルとして LC/MS/MS 分析し、得られたマススペクトル情報からペプチドおよびタンパク質の同定を行う¹³。しかし、ショットガンプロテオミクスにはいくつかの課題が存在する。第一に、生体内に発現するタンパク質のすべてを解析することは困難である点が挙げられる。タンパク質は、選択的スプライシングや翻訳後修飾などにより、遺伝子と比較して極めて高い複雑性を有することが知られている⁹。例えば、ヒストン H4 では、この単一のタンパク質だけでも、98,304 ものプロテオフォームが存在すると推定されている²⁴。このような背景から、現在解析可能なプロテオームは氷山の一角に過ぎないと考えられる。第二の課題として、分析スループットの不足が挙げられる。例えば、イギリスのバイオバンク (UK Biobank) では、50万以上の参加者がおり、アメリカのバイオバンク (All of Us) では約80万人の参加者がいる。一方で、現在の一般的なショットガンプロテオミクスでの LC/MS/MS の分析スループットは約1日に10サンプル程度であり、サンプル数に対してスループットが著しく不足している。これらの膨大なサンプル数に対してプロテオーム解析を実施するには、さらなるハイスループット化が求められる。

そこで本研究では、第1章では、ボトムアッププロテオミクスにおいて、液体クロマトグラフィー、質量分析、ならびにイオン移動度スペクトロメトリーを組み合わせた3次元分離を導入し、ペプチド分離効率の限界拡張を試みた。また、第2章では、高感度かつ高深度な分析性能を維持しつつ、LC/MS/MS 測定の高速化を実現する手法の開発を行った。

第1章 長時間グラジエント分離とイオン移動度分離を組み合わせたペプチド分離空間の拡張

第1節 序

緒言にて述べた通り、タンパク質は多様性に富んでおり、ショットガンプロテオミクスにて解析可能なタンパク質は限定的であると考えられる。ショットガンプロテオミクスにおける解析深度を向上させる取り組みは、2000年代から始まり、代表的な手法として、2次元LCによって分離を行う Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) が提案された^{25,26}。この手法では、1本のフューズドシリカキャピラリー内に逆相LC用C18粒子と、強カチオン交換(SCX)クロマトグラフィー用の粒子を順に詰めたものをカラムとして用いることで、1本のカラム上で2次元分離を実現した。この手法と約1 scan/secのMS/MSスキャンスピードを持つ質量分析計を組み合わせることにより、酵母抽出物から1,484種のタンパク質が同定された^{25,26}。その後、2008年には、SDS-PAGEや等電点電気泳動などの前分画法、各LC/MS/MS測定にて狭い m/z 範囲に限定して繰り返し測定を行う gas-phase fractionation を組み合わせ、4,399種のタンパク質を同定し、酵母の完全なプロテオームマップを完成させることに成功した²⁷。さらに、質量分析計の改良により、MS/MSのスキャンスピードが約4 scan/secに達する装置が登場し、2011年には前分画を用いないシングルショット分析においても3,923種のタンパク質が同定可能となった²⁸。近年では質量分析計の高性能化はさらに進展し²⁹、最新の質量分析計では200 scan/secのスピードでMS/MSスキャンが可能となり、5分間のLCグラジエント時間にて約4,500種のタンパク質が同定可能であることが報告されている³⁰。

一方、ヒトプロテオームは酵母よりも遥かに複雑であり、同様の最先端の手法を用いたとしても、全プロテオームを解析することはより困難となる。ヒトプロテオームを高深度に解析した代表的な先行研究として、Bekker-Jensenらは、高pH逆相LCによる46分画と、約30分の比較的急峻なグラジエント分離を組み合わせることで、ペプチド分離効率と質量分析計の利用効率を最大化する利点を活かし、約23時間の測定より10,000種以上のタンパク質を同定した³¹。また、前分画法を用いるもう一つの利点として、分画数分の測定分のサンプルのローディングキャパシティを得ることが可能な点にある。Bekker-Jensenらの報告では、前分画時には1~2 mgのタンパク質を用い、LC/MS/MS分析時には各測定あたり1 μ gのタンパク質を用い

て46分画の測定を行っており、合計で約46 µg 相当のサンプルを解析している。これによって、発現量の少ないタンパク質をも同定することを可能とした。しかし、前分画法は、分画操作に伴う回収率の低下や分画精度・再現性のばらつき、分析時間の増加などの課題も残されている。

こういった課題のため、定常的な分析においては、前分画なしのシングルショット分析が適用されることが多い。シングルショット測定において同定数を向上させるためには、LCの高性能化が必要である。ショットガンプロテオミクスにおいて一般的に使用される100 µm 内径、15 cm 長、3 µm の粒子充填剤型シリカキャピラリーカラムでは約20 MPaのカラム圧である。しかし、通常のLC装置で送液可能な上限圧力は35 MPa、最新の超高耐圧のLC装置でも150 MPa³²であり、粒子充填剤型カラムの伸長、粒子径の縮小による大幅な分離向上には圧力の観点から限界がある。

モノリス型シリカカラムは、従来の粒子充填型カラムと異なり、細い骨格径と大きな骨格間空隙を持ち、粒子充填型カラムより大きな透過率を持つ³³。そのため、送液に必要な圧力を小さく抑えつつ、分離能の高い長いカラムを使用できる。この特長を活かし、これまでにモノリス型シリカカラムを活用した高分離プロテオーム測定がなされてきた。例えば、岩崎らはヒト培養細胞に対し、4 m 長の逆相モノリス型シリカカラムを用いて8時間グラジエントのRPLC/MS/MS分析を行うことにより、5,970 タンパク質を同定することに成功した³⁴。また、LC分離の向上により質量分析におけるイオンサプレッションの軽減、ペプチドの検出感度を5倍に向上させることが可能であると報告した³⁴。他に、堀江らはウレイドプロピル修飾モノリス型シリカカラムを作製し、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)に適用し、HILIC用カラムとして世界で初めて数10万段の理論段数を達成した³⁵。このように、モノリス型シリカカラムは、シングルショット分析でも高いペプチド分離を実現可能なプロテオーム計測技術として広く用いられてきた³⁴⁻³⁹。

さらに近年では、質量分析計についても高分離化に向けた工夫が図られており、質量分析計にイオン移動度スペクトロメトリー(IMS)を組み合わせた質量分析計が実用化されている⁴⁰⁻⁴²。IMSでは、イオンの衝突断面積、すなわち分子の形状や嵩高さの違いに基づいた分離が行われ、 m/z とは独立した分離次元を提供する。中でも、トラップ型イオン移動度スペクトロメトリー(TIMs)では、一定方向のガス気流によるイオン輸送力と電場による反発力を釣り合わせることで、イオンをその移動度に応じて分離する^{42,43}。これまでに、TIMsを組み合わせることで、MS/MSスペクトルの複雑性を低下でき、またプロテオミクスにおける分離場が拡大されることが報告されてきた^{44,45}。一方で、IMS/MSの前段に従来よりも高い分離能を有するLCを組み合わせた場合、プロテオーム解析の網羅性がどの程度まで向上しうるのか、

また LC 分離の増強が IMS による分離とどのように相補的に作用するのかについては、体系的な検討がなされていない。

そこで本章では、メートル長 C18 モノリス型シリカキャピラリーカラムと緩勾配溶出を組み合わせた高分離 LC を、TIMS/Q/TOF 型質量分析計に接続することで、LC、IMS、MS からなる 3 次元ペプチド分離場の拡張を試みた。さらに、分離場の拡大に伴うペプチド様イオン数の増加が、実際のペプチドおよびタンパク質同定数にどのような影響を及ぼすのかを評価した。

第2節 LC グラジエント時間とイオン移動度が

ペプチド分離に及ぼす影響

LC グラジエント時間とイオン移動度それぞれがペプチド分離に及ぼす影響を調べるために、HeLa細胞由来タンパク質のトリプシン消化物をサンプルとし、グラジエント時間を1, 2, 4, 8, 12時間、TIMS 分離ありの計5条件にてRPLC/IMS/MS/MS分析を行った。

まず、ペプチド分離性能の指標として、ピークキャパシティに基づく評価を行った。ピークキャパシティは、グラジエント分析における分離の指標として広く用いられており、一分析で完全分離可能な最大のピーク数を表す^{46,47}。測定内のピーク幅が非常に類似している場合、ピークキャパシティは以下の式 (1), (2) であらわされる。

$$Pc (LC) = \frac{t_G}{w (LC)} + 1 \quad (1)$$

$$Pc (TIMS) = \frac{\Delta (1/K_0)}{w (TIMS)} + 1 \quad (2)$$

Pc : ピークキャパシティ、 t_G : グラジエント時間、 w : ピーク幅、
 $1/K_0$: 還元イオン移動度の逆数、 $\Delta (1/K_0)$: TIMS のスキャン範囲

ピークキャパシティの算出にあたって、グラジエント時間はタイムプログラム時間にて設定した値を用いた。LC におけるピーク幅は、MaxQuant によりペプチド配列が同定された各プリカーサーイオンのクロマトグラフィックピークに対して算出されたピーク幅の平均値を用いた。TIMS におけるスキャン範囲は、設定した範囲 ($1/K_0$: $0.6\text{--}1.5 \text{ V}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$) より算出した ($0.9 \text{ V}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$)。TIMS におけるピーク幅は、同一の検出されたプリカーサーイオンに対応するイオン移動度次元上のピークに対して算出されたピーク幅の平均値を用いた。

LC のみの場合、グラジエント時間の延長に伴いピークキャパシティは増加し、12 時間グラジエントでは 771 に達した (表 1-1)。さらに、LC と TIMS を組み合わせた場合のピークキャパシティを算出するために、LC および TIMS の分離直交性を評価した。具体的には、LC と TIMS の 2 次元空間におけるシグナル分布密度を

Perseus によるカーネル密度推定によって算出し、得られた 2 次元密度分布から有効分離空間の割合 (有効率) を求め、これを直交性指標とした。

$$Pc (LC \times TIMS) = Pc (LC) \times Pc (TIMS) \times \text{Utility rate} \quad (3)$$

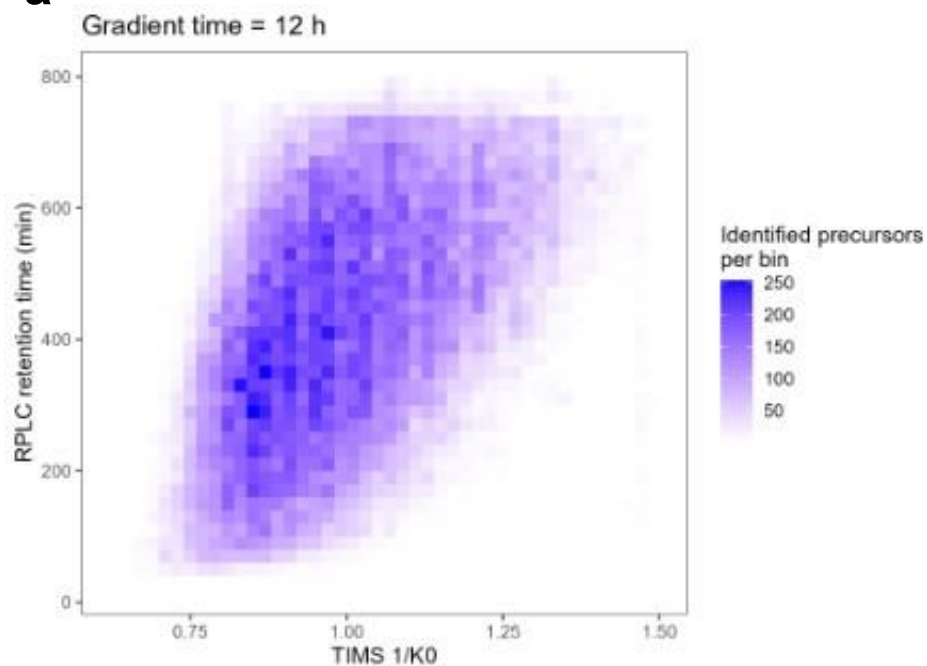
有効率は、1 であれば完全に直交、0 であれば完全に非直交であることを表し、LC と TIMS の分離が独立していることを示す。有効率は $62.9 \pm 1.2 \%$ であった (表 1-1、図 1-1)。また、TIMS のピークキャパシティは、 27.2 ± 2.4 となった。本測定では、TIMS の設定値を固定したため、グラジエント条件の違いによる TIMS のピークキャパシティの差が出なかったと考えられる。これらの結果と LC のピークキャパシティを式 (3) によって組み合わせたところ、すべてのグラジエント時間条件において、TIMS を組み合わせることでピークキャパシティがさらに向上し、最大で 14,835 に達した。これは LC のみの値の約 19 倍となった。

続いて、Bekker-Jensen らの測定データに対して同様の手順にて解析を行い、本結果との比較を行った。まず、2 次元目のみのピークキャパシティは 122 となった。2 次元 LC によるピークキャパシティの効果を調べるため、1 次元目 LC での分画数と 2 次元目 LC での保持時間の 2 次元空間における、同定されたプリカーサーイオンのシグナル分布密度を、上記と同様に Perseus にてカーネル密度推定によって算出したところ、有効率は 62.3 と計算された (表 1-1、図 1-1)。これらの結果から、この報告でのピークキャパシティは 3,498 となった。この値は、本実験での TIMS あり、2 時間グラジエント分離と同等であった。また、12 時間グラジエントの条件では、Bekker-Jensen らの結果と比較し、約 4 倍のピークキャパシティが得られた。以上より、ペプチド分離空間の拡張には LC 分離と TIMS 分離の双方が寄与しており、これらを組み合わせることで、前分画を行わず、また分析時間を長くすることなく分離性能を最大化できることが示された。

表 1-1 各分析条件におけるピーク幅ならびにピークキャパシティ

	本実験					Bekker-Jensen et al ³¹
Gradient time (hour)	1	2	4	8	12	0.5
Average of LC peak width (min)	0.50	0.63	0.78	0.93	0.93	0.25
Peak capacity (LC)	122	192	309	519	771	122
TIMS scan range (Vs cm ⁻²)	0.9					-
Average of 1/K ₀ peak width (Vs cm ⁻²)	0.037	0.038	0.036	0.033	0.030	-
Peak capacity (TIMS)	25.5	25.0	25.9	28.5	31.3	-
Utility rate (%)	61.5	64.2	63.5	63.8	61.5	62.3
Pc (LC x TIMS)	1,907	3,078	5,081	9,436	14,857	-
Pc (LC x LC)	-	-	-	-	-	3,498

a



b

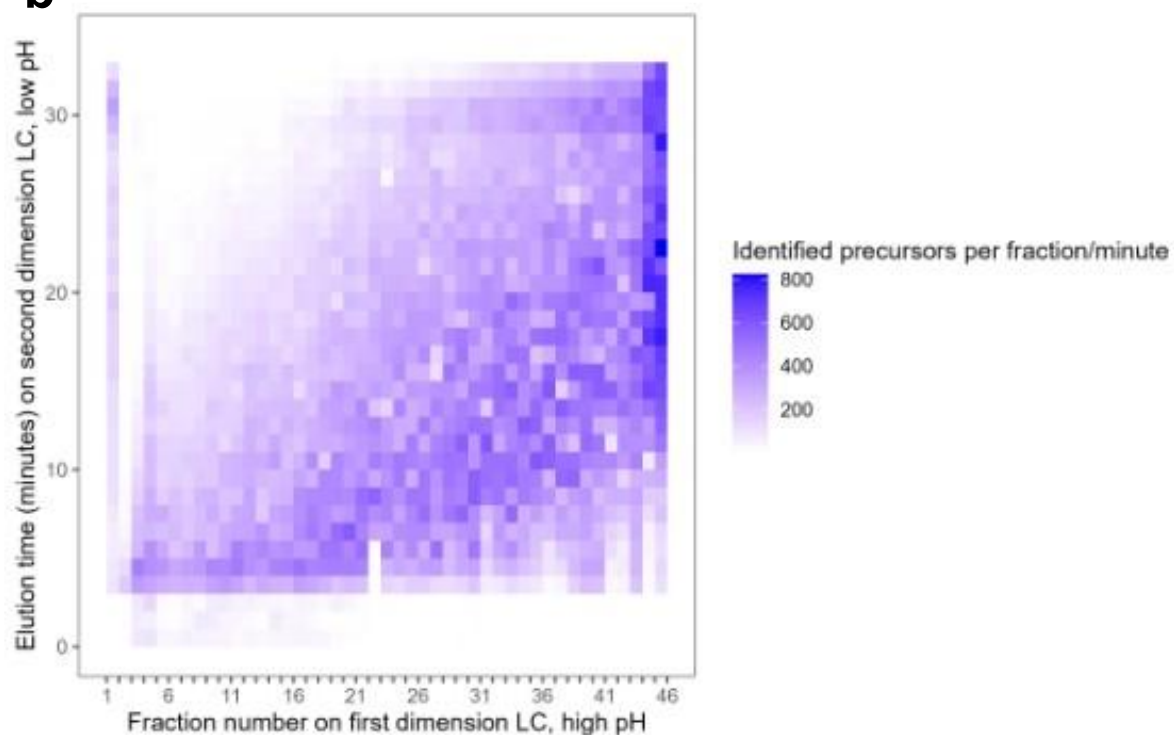


図 1-1 2次元目 RPLC と TIMS または 1次元目 RPLC との直交性

(a) 12 時間グラジエント、TIMS ありの結果。(b) Bekker-Jensen らの結果。

第3節 ペプチド分離効率とペプチドおよびタンパク質同定数の関係

次に、ペプチド分離条件がペプチドおよびタンパク質同定数に与える影響を評価した。あわせて、TIMSの有無が同定性能に与える影響を検討するために、TIMSをOFFにし、グラジエント時間を1時間とした条件についても測定を行った。さらに、前章と同様にLCによる前分画とTIMSの分離の効果を比較するため、ヒトプロテオームの高深度解析を報告しているBekker-Jensenらの公開測定データ³¹を入手し、本測定データと同一の解析手順により再解析を行った。

DDA法を用いたLC/MS/MS測定においては、まずサーベイスキャンにおいてプリカーサーイオンを検出し、その一部が選択され、フラグメンテーションによりプロダクトイオンを取得し、得られたMS/MSスペクトルを用いて配列同定を行う。したがって、同定効率は

- (1) サーベイスキャンにおいて検出されるプリカーサーイオン数
- (2) 検出されたプリカーサーイオンの内、MS/MSスペクトルが取得される割合
- (3) 取得されたMS/MSスペクトルの質がペプチド同定に十分な品質を有する割合

の3段階に依存する。分離効率の大幅な向上に対して同定数の増加が限定的であった要因を精査するために、プリカーサーイオンを次の3つのカテゴリーに分類して解析を行った。すなわち、MS1スペクトル上で一定の保持時間幅および m/z 幅、イオン移動度幅をもって観測されたイオンを「Detected」、それらのうちMS/MSスペクトルが取得されたものを「Sequenced」、そして得られたMS/MSスペクトルに基づいて偽陽性率1%のもと、ペプチド同定に至ったプリカーサーイオンを「Identified」と定義した。なお、これらの判定にはMaxQuantソフトウェアを用いた。

TIMS分離ありの条件におけるDetectedのプリカーサーイオン数を比較した結果、最大で265万種以上が検出された(図1-2)。前節の結果では、TIMSあり、12時間グラジエントの条件ではピークキャパシティが4倍となったのに対し、Detectedのプリカーサーイオン数はわずかに減少し、Bekker-Jensenらの結果の87%であった。Bekker-Jensenらの結果については、46分画由来の46回の測定を行っており、分画間に同一ペプチドが重複して検出されるため、Identifiedのプリカーサーイオンの冗長率を算出し、それを用いて補正したところ、Detectedのプリカーサーイオン数は2,749,979となると推定された。この場合、TIMSあり、12時間グラジエント条件と同等となった。TIMSあり、12時間グラジエント条件の方がBekker-Jensenらの手法よりもピークキャパシティが高かったにもかかわらず、Detectedのプリカーサー

イオンの総数に違いが見られなかった原因として、測定に使用したサンプル量の差が考えられた。具体的には、本測定にて使用したサンプル量は 2 μg であったのに対し、Bekker-Jensen らは計 46 μg のサンプルを使用しており、サンプル量に約 23 倍の差があった。一方で、本手法は 12 時間グラジエント分離（総測定時間 14 時間）であるのに対し、Bekker-Jensen らの手法では総測定時間 34.5 時間であったため、本手法はより効率良く、同等のプリカーサーイオンを検出できたことが分かった。

Sequenced のプリカーサーイオンの総数について、TIMS なし、1 時間グラジエントの条件では 62,863、TIMS ありでは 93,246 であった。前章にて述べた通り、TIMS 分離によるピークキャパシティの増大が、この結果に寄与していると考えられた。また、TIMS はその仕組みから、新たな分離場を提供するだけでなく、トラップすることによるイオンの濃縮効果も Sequenced の数が増大した要因と考えられた。TIMS あり、1 時間グラジエントの条件では 93,246 であったのに対し、12 時間グラジエントでは 484,549 まで増加した。グラジエント時間延長によるピークキャパシティの増大は Sequenced の総数増加に有効であった。また、LC による前分画を行った Bekker-Jensen らの結果と比較すると、TIMS あり、12 時間グラジエント条件での総数は 61 % となった。上述と同様に、Sequenced の総数についても冗長性を考慮したところ、Bekker-Jensen らの結果における Sequenced の総数は 712,659 となると推定され、本手法よりも多い結果となった。MS/MS スキャンは、ある一定のシグナル強度の閾値を超えるプリカーサーイオンに対してのみ実行されるため、その閾値を超えることが必要である。上述の通り、Bekker-Jensen らの報告では使用したサンプル量が多く、シグナル強度の閾値を超えるプリカーサーイオンも多かったため、Detected と同様に Sequenced の総数が増加したと考えられた。

Identified の総数は、グラジエント時間の延長とともに増加し、1 時間グラジエント条件では 26,582 であったのに対して、12 時間グラジエント条件では 101,582 となった。一方で、12 時間グラジエントの Identified の総数は、LC による前分画を行った Bekker-Jensen らの報告と比べて 30 % であった。これは、先述した使用サンプル量が少なかったことに加えて、質量分離部が TOF と Orbitrap で異なるため、分解能が低かった点も要因と考察された。

さらに、ペプチドおよびタンパク質同定数についてもグラジエント時間延長による同定数向上効果が見られ、12 時間グラジエント条件において、それぞれ 56,522 種のペプチドおよび 6,254 種のタンパク質が同定された。一方で、LC による前分画を行った Bekker-Jensen らの報告がペプチド及びタンパク質の同定数が多かった。本要因は、Detected、Sequenced、Identified に関して先述したとおり、分析に使用したサンプル量が異なることが主な要因と考察された。

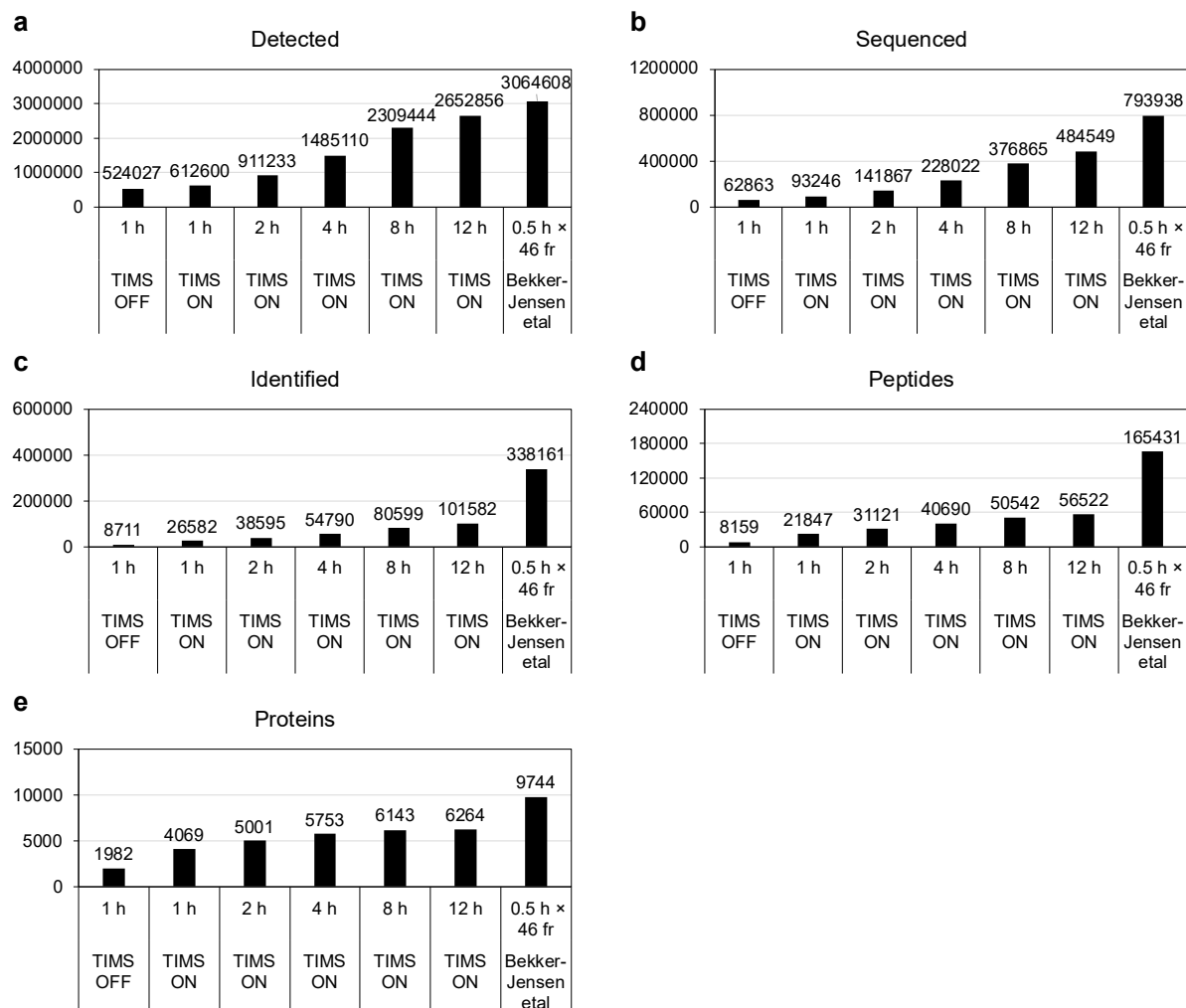


図 1-2 各分析条件における検出および同定結果

各条件における、(a) Detected、(b) Sequenced、(c) Identified、(d) 同定ペプチド数、および (e) 同定タンパク質数。なお、(a)-(c)での Bekker-Jensen らの結果については、測定間の冗長性を考慮し、補正を行った。具体的には、Identified のプリカーサーイオンの冗長性の割合 (89.7 %) を得られた Detected および Sequenced のプリカーサーイオンの総数に乗じて求めた。

続いて、MS/MS スペクトルの質について解析を行った。MS/MS スペクトルの質は、プリカーサーイオン単離時のイオン純度 (precursor ion fraction: PIF) に大きく依存する。PIF とは、プリカーサーイオン選択時のプリカーサーイオンそのものの純度であり、以下の式 (4) のようにあらわされる。

$$\text{PIF} = \frac{\text{Precursor ion intensity}}{\text{Total ion intensity in isolation window}} \quad (4)$$

そこで、各分離条件において MS/MS が取得された各イオンの PIF を算出した。その結果、グラジエント時間の延長に伴い PIF の中央値は低下する傾向が認められた (図 1-3)。これは、グラジエント時間が長くなることで分離自体は向上する一方、ピークが希釈されてイオン強度が低下し、結果として PIF が相対的に小さくなった可能性が示唆された。続いて、全条件において共通に同定されたペプチドイオンに着目し、同様に PIF を算出した。その結果、分離が向上するにつれて PIF も高くなる傾向が認められた (図 1-4)。すなわち、分離改善により、もともと検出されていたペプチドについてはプリカーサーの純度が向上し、同定に有利な条件となっていたと考えられる。一方で、分離改善によって新たに検出されるようになったペプチドでは PIF が低いものが多く、これらは同定に至りにくい可能性が示唆された。

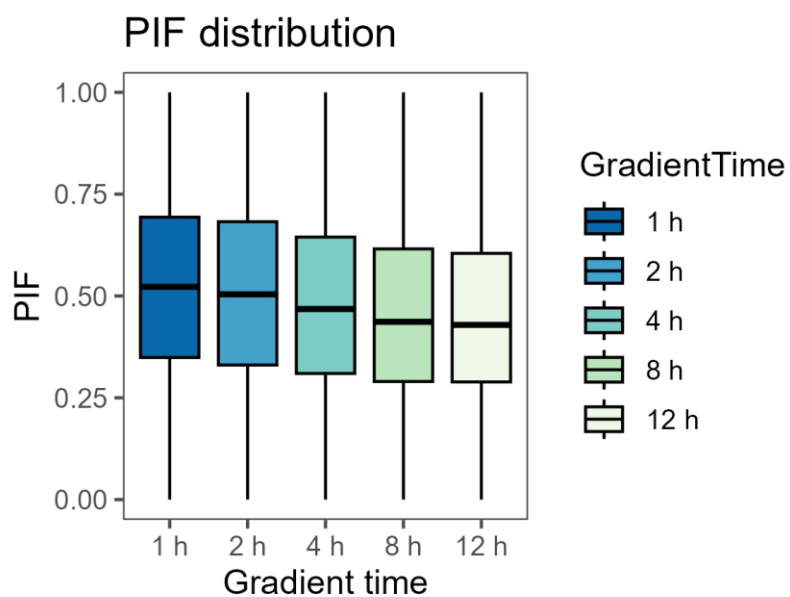


図 1-3 分析条件毎の Sequenced のプリカーサーイオンの PIF の分布

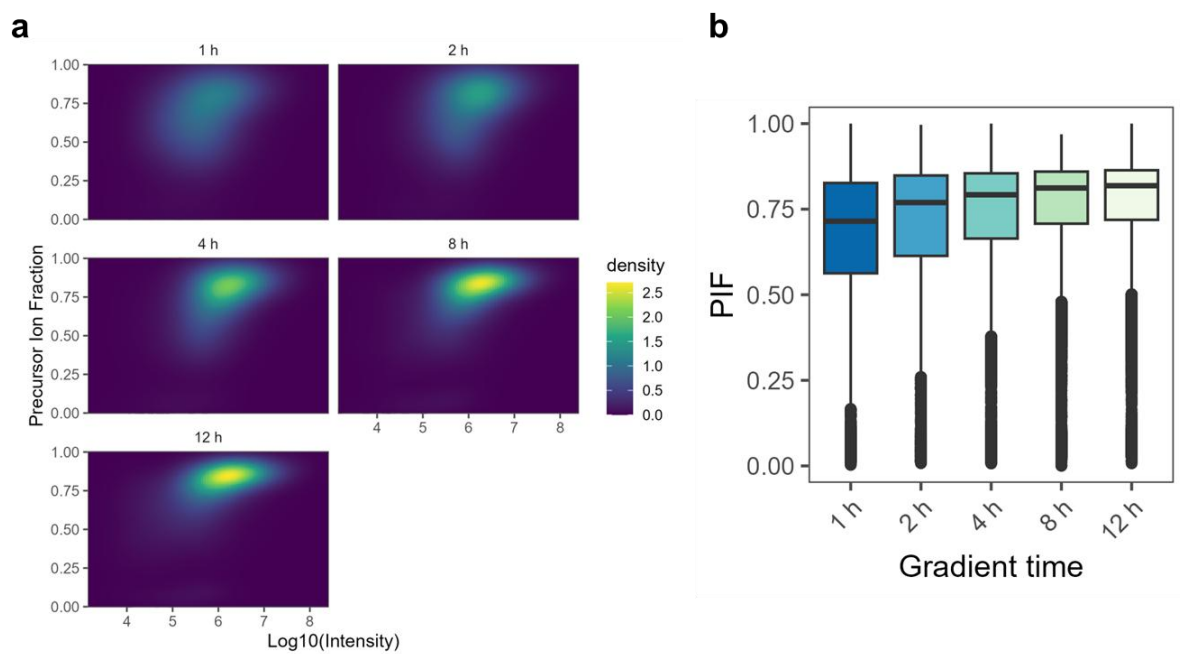


図 1-4 すべての分離条件にて同定されたプリカーサーイオンの PIF の分布
(a) PIF とピークの Intensity の密度分布。(b) 各グラジエント時間における PIF。

第4節 検出されたイオンの確からしさの検証

検出されたイオンは MaxQuant で機械的に計算されており偽陽性率などの明確な閾値がない。そこで、検出されたイオンの内、ペプチドあるいはノイズであるかを確かめるためにそれらの分離情報について検討した。用いたデータは、12 時間グラジエント、TIMS ありのものである。本実験で用いたサンプルはトリプシン消化物である。トリプシンはリシンおよびアルギニンの C 末端側で切断するため、生成されるペプチドは N 末端のアミノ基と C 末端のリシンおよびアルギニン由来の塩基が存在するため、両端に正電荷を帯びやすい。そのため 1 価の電荷をもつ場合はペプチド以外の夾雑物由来である可能性が高い。そこで、検出されたイオンについて 1 価のものについて除外した。すると、全体の内、約 80 % である 2,122,770 イオンが残った。

次に、安定同位体標識法を用いたペプチド数の推定を試みた (図 1-5)。SILAC 培地に同位体標識したリシンおよびアルギニンを添加して細胞を培養し、得られた標識サンプルと非標識サンプルを等量混合して測定を行った。検出されたイオンがペプチド由来であれば、Light 標識と Heavy 標識のペアが観測されると考えられる。この SILAC ペアを MaxQuant により同定した。ただし、本手法ではリシンあるいはアルギニンを含まないペプチドは対象外となる点に留意が必要である。

HeLa 細胞を用いた SILAC 標識サンプルを、TIMS あり・12 時間グラジエント分離条件にて測定したところ、合計 643,409 の SILAC ペアが検出された。一つのペプチドについて複数の電荷状態のイオンが検出され得ることを考慮すると、少なくとも約 300,000 程度のペプチドが検出されていると推測された。参考として、HEK293 細胞を 46 分画して測定した報告では約 246,000 ペプチドが同定されており、本研究で得られた値はこれに近い水準であった。すなわち、リシンあるいはアルギニンを含むペプチドに関しては、シングルショット測定でありながら、46 分画測定に匹敵するレベルの検出感度を実現していることが示唆された。

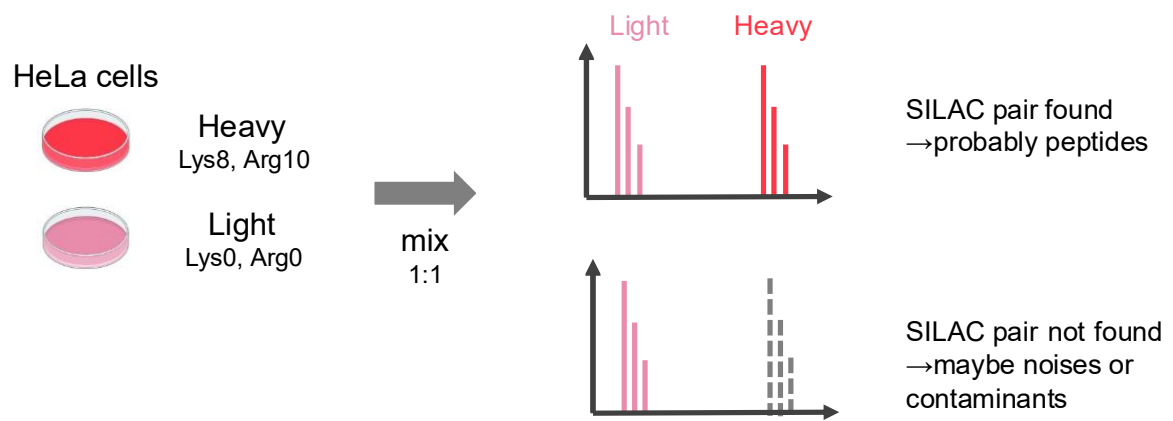


図 1-5 SILAC 実験の概要とワークフロー。

第5節 DIA法の適用によるペプチド同定数の最大化

以上の結果より、本測定条件では非常に多くのペプチド様イオンが検出されているにもかかわらず、そのすべてが同定に至っているわけではないことが明らかとなった。これは、DDA法では全てのプリカーサーイオンに対してMS/MSが取得されるわけではなく、MS/MSの取得効率が同定数の上限を規定している可能性を示している。そこで、最大化した分離効率をより有効に活用することを目的として、全プリカーサーイオンに対して原理的にMS/MSを取得可能なデータ非依存取得法(Data independent acquisition, DIA)を適用した。DIA法は、DDA法とは異なり、所定の m/z 範囲を幅広いウィンドウに分割し、各ウィンドウ内の全プリカーサーイオンを同時にフラグメンテーションする手法である。そのため、従来のDDA測定ではMS/MSスペクトルを取得できていなかったペプチド様イオンについても、解析対象とできることが期待される。

DIA法を用いてTIMSあり、12時間グラジエント分析を行った結果、165,853種のプリカーサーイオンが同定された。先ほどのSILAC実験の結果より、12時間グラジエント、TIMSありの分析条件で検出されたペプチド種数が約30万種であると仮定すると、同定に至った割合は約55%と推定された。

すべてが同定に至らなかった原因として、DIA測定時のIsolation windowの設定が考えられる。本実験で用いた質量分析計では、Isolation windowを m/z および $1/K_0$ の二つの値を用いて決定する。そのため、範囲外となってしまうイオンも一定数存在していることが考えられる。実際に、すべての検出されたイオンのシグナル強度の内、本実験で用いたIsolation window内に入ったプリカーサーイオンのシグナル強度は、84.1%であった。

他に、DDA測定の時と同様に、MS/MSが取得されてもイオン強度が低い場合やフラグメンテーションにてうまくフラグメントイオンが生成されなかった場合などが考えられる。

第6節 結語

本研究では、ペプチド同定の最大化を目的として、イオン移動度分離を備えた質量分析計と、世界最高水準の分離能を有するメートル長モノリスシリカキャピラリーカラムを組み合わせた高分離 RPLC/IMS/MS/MS システムを構築した。その結果、ヒトプロテオームサンプルにおいて、従来は数 10 万程度にとどまっていたペプチド由来イオンが 250 万種以上検出され、高分離 LC と IMS の相乗効果によりペプチド分離空間が大幅に拡張されることが示された。

また、電荷情報および SILAC 法による検証から、検出されたイオンのうち少なくとも 30 万種は実際にペプチド由来であることが確認されたが、それらのすべてが同定に至っているわけではないことも明らかとなった。実際、イオン検出数の劇的な増加にもかかわらず、タンパク質同定数はそれに比例して増加するわけではなく、同定効率には新たな律速が存在することが分かった。原因を精査した結果、① DDA 法では MS/MS 取得が全イオンに追従できていないこと、② グラジエント時間の延長に伴うピーク希釈により PIF が低下し、新規に検出されたイオンの一部では MS/MS の質が十分でないこと、の 2 点が主要因として示唆された。さらに、DIA 法を適用して理論的に網羅的なフラグメンテーションを行った結果、16 万を超えるプリカーサーイオンを同定出来ることが示された。これらの結果は、本システムが極めて多様なペプチドを網羅的に捉える能力を有している一方で、取得された情報をどのように効率的に同定へと結び付けるかが、今後のタンパク質同定数最大化の鍵となることを示している。

実験の部

実験材料

細胞株

HeLa (S3) 細胞は、JCRB Cell Bank (大阪) より入手した。

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、リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C)、酢酸、トリフルオロ酢酸 (TFA)、アセトニトリル (ACN)、メタノールは、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。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。MonoCap C18 High Resolution 2000 (100 μ m i.d., 2000 mm L)、Empore SDB-XC はジューエルサイエンスから購入した。水は、Millipore Milli-Q system (Bedford, MA, USA) で精製した。

細胞培養

HeLa 細胞は、直径 10 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。

タンパク質抽出

Hela 細胞ペレットから、相間移動可溶化法 (PTS 法) による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緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 9.0 中の 12 mM SDC、12 mM SLS) 中に懸濁し、95 ° 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。その後、サンプルを 50 mM 重炭酸アンモニウムで 5 倍に希釈し、トリプシン [酵素：基質=1：100 (w/w)] を添加し 37°C で一晩インキュベートした。消化後、等量の酢酸エチルを加え、TFA で溶液を酸性にした。2 分間振とうした後、 $15,800\times g$ で 2 分間遠心分離し、水相と有機相を完全に分離し、有機相を除いた。水相を減圧遠心濃縮機により乾固させ、0.5% TFA に再溶解後、SDB-XC StageTip を使用して脱塩した。

RPLC/MS/MS および RPLC/TIMS/MS/MS

ナノ流速 RPLC/IMS/MS/MS 測定は、液体クロマトグラフに Ultimate3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific)、オートサンプラーに HTC-PAL xt (CTC Analytics)、質量分析計に timsTOF Pro または timsTOF Pro 2 (Bruker) を用いて行った。分析カラムには MonoCap® C18 High Resolution 2000 (100 μm i.d., 2000 mm L) (GL Sciences) を用いた。移動相には、(A) 0.1 %ギ酸、(B) 0.1%ギ酸、80 % ACN を使用した。サンプルを 0.5 % TFA、4 % ACN で再溶解し、5 μL 注入した。B 5%から B 40%の 1、2、4、8、12 時間のリニアグラジエント溶出を行った。

TIMS なしの DDA 測定では、1 サイクルは、1 回の MS スキャン (スキャンスピード 2 Hz) と MS/MS スキャン (スキャンスピード 8–32 Hz) で構成し、MS のサイクルタイムは 3 秒に設定した。MS/MS Rate Control は Dynamic、Target intensity は 2,500 counts と設定し、MS および MS/MS のスペクトルでは、 m/z 150 から 2200 までを記録した。四重極の分離幅は 2 または 3 m/z に設定した。

TIMS ありの DDA 測定では、TIMS 部は、ランプタイム 100 ms、スキャンレンジ 0.6–1.5 Vs 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 スキャンで構成し、MS のサイクルタイムは 1.17 秒と計算された。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 2 または 3 m/z に設定した。CID のための衝突エネルギーは、 $1/K_0$ 0.8 Vs cm^{-2} では衝突エネルギーを 31.92 eV、 $1/K_0$ 1.56 Vs cm^{-2} では 51.24 eV とし、その間では線形に変化させた。

TIMS ありの DIA 測定では、TIMS 部は、ランプタイム 100 ms、スキャンレンジ 0.6–1.5 Vs cm^{-2} で動作させた。1 サイクルは、1 回の MS スキャンと 16 回の diaPASEF MS/MS スキャンで構成し、MS のサイクルタイムは 1.80 秒と計算された。詳細な分離ウィンドウについては、表 1-2 にて示した。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。CID のための衝突エネルギーは、 $1/K_0$ 0.8 Vs cm⁻² では衝突エネルギーを 31.92 eV、 $1/K_0$ 1.56 Vs cm⁻² では 51.24 eV とし、その間では線形に変化させた。

データ解析

MaxQuant (ver.1.6.6.0) を用いて、RPLC/IMS/MS/MS 測定データから、検出されたすべてのプリカーサーイオンピークについて、 m/z 、保持時間、イオン移動度の 3 つの分離情報を検出した (allPeptides.txt)。有効率の計算では、allPeptides.txt 内に含まれるデータを参照し、Perseus (ver.2.1.6.0) によって算出した。Perseus 内の Density estimation コマンドを用い、x = “Retention length”列、y = “Ion mobility index length”列、Number of points = 300 と設定しカーネル密度推定を実行した。PIF の計算では、公開されているコード⁴⁵を基に計算を行った。SILAC ペア数は、MaxQuant^{48,49}にて出力される summary.txt 内の”Multiplets”列内に記載された数を参照した。

次に、RPLC/IMS/MS/MS 測定で取得された MS/MS スペクトルから、MaxQuant による、UniProtKB/Swiss-Prot (2017/04) のヒトタンパク質アミノ酸配列データベースに対する自動データベース検索によりペプチドを同定した。それぞれ Lys と Arg の C 末端側における切断を設定し、2 回の切断ミスまで許容した。システインのカルバミドメチル化を固定修飾として、メチオニンの酸化とタンパク質 N 末端アセチル化を可変修飾として設定した。FDR は、PSM およびタンパク質レベルの両方で 0.01 に設定した。

46 分画マルチショットのデータについては、ProteomXchange より生データをダウンロードした (PXD004452)。サーチ条件は上述と同様とした。ただし、ピーク半値幅を計算するために、Advanced タブ内の “Calculate peak properties” オプションにチェックを入れサーチを行った。

DIA データについては、Spectronaut (ver. 19.0.240606, Biognosys, Switzerland) を使用した。検索対象のタンパク質データベースには、UniProtKB/Swiss-Prot (2024/01) から取得したヒトタンパク質アミノ酸配列データベースを用いて directDIA+モードにより検索を行った。酵素切断条件ならびに修飾条件は DDA データと同様に設定した。プリカーサーイオンおよびタンパク質の Q 値のカットオフ値はともに 1 % に制御した。

表 1-2 DIA データ取得時の分離ウィンドウの設定

#MS Type	Cycle Id	Start [1/K ₀]	IM	End [1/K ₀]	IM	Start [<i>m/z</i>]	Mass	End [<i>m/z</i>]	Mass
MS1	0	-		-		-		-	
PASEF	1	1.22		1.4		1000		1025	
PASEF	1	1.04		1.22		800		825	
PASEF	1	0.87		1.04		600		625	
PASEF	1	0.69		0.87		400		425	
PASEF	2	1.24		1.41		1025		1050	
PASEF	2	1.06		1.24		825		850	
PASEF	2	0.89		1.06		625		650	
PASEF	2	0.71		0.89		425		450	
PASEF	3	1.25		1.42		1050		1075	
PASEF	3	1.07		1.25		850		875	
PASEF	3	0.9		1.07		650		675	
PASEF	3	0.73		0.9		450		475	
PASEF	4	1.26		1.43		1075		1100	
PASEF	4	1.09		1.26		875		900	
PASEF	4	0.92		1.09		675		700	
PASEF	4	0.75		0.92		475		500	
PASEF	5	1.27		1.44		1100		1125	
PASEF	5	1.1		1.27		900		925	
PASEF	5	0.94		1.1		700		725	
PASEF	5	0.77		0.94		500		525	
PASEF	6	1.29		1.45		1125		1150	
PASEF	6	1.12		1.29		925		950	
PASEF	6	0.96		1.12		725		750	
PASEF	6	0.79		0.96		525		550	
PASEF	7	1.3		1.46		1150		1175	
PASEF	7	1.14		1.3		950		975	
PASEF	7	0.97		1.14		750		775	
PASEF	7	0.81		0.97		550		575	
PASEF	8	1.31		1.47		1175		1200	
PASEF	8	1.15		1.31		975		1000	
PASEF	8	0.99		1.15		775		800	

PASEF	8	0.83	0.99	575	600
PASEF	9	1.1	1.28	1000	1025
PASEF	9	0.92	1.1	800	825
PASEF	9	0.75	0.92	600	625
PASEF	9	0.6	0.75	400	425
PASEF	10	1.12	1.29	1025	1050
PASEF	10	0.94	1.12	825	850
PASEF	10	0.77	0.94	625	650
PASEF	10	0.6	0.77	425	450
PASEF	11	1.13	1.3	1050	1075
PASEF	11	0.95	1.13	850	875
PASEF	11	0.78	0.95	650	675
PASEF	11	0.61	0.78	450	475
PASEF	12	1.14	1.31	1075	1100
PASEF	12	0.97	1.14	875	900
PASEF	12	0.8	0.97	675	700
PASEF	12	0.63	0.8	475	500
PASEF	13	1.15	1.32	1100	1125
PASEF	13	0.98	1.15	900	925
PASEF	13	0.82	0.98	700	725
PASEF	13	0.65	0.82	500	525
PASEF	14	1.17	1.33	1125	1150
PASEF	14	1	1.17	925	950
PASEF	14	0.84	1	725	750
PASEF	14	0.67	0.84	525	550
PASEF	15	1.18	1.34	1150	1175
PASEF	15	1.02	1.18	950	975
PASEF	15	0.85	1.02	750	775
PASEF	15	0.69	0.85	550	575
PASEF	16	1.19	1.35	1175	1200
PASEF	16	1.03	1.19	975	1000
PASEF	16	0.87	1.03	775	800
PASEF	16	0.71	0.87	575	600

第2章 キャピラリー流速 LC/MS/MS によるハイスループットショットガンプロテオーム計測技術の開発

第1節 序

ショットガンプロテオミクスでは、さまざまな応用分野において、よりスループットの高い LC/MS/MS 分析法が求められている。例えば、臨床検体を用いたバイオマーカー探索では、現在主流であるナノ流速 ($< 1 \mu\text{L}/\text{min}$) LC/MS/MS のスループットの低さが制約となっており、1 日に解析可能なサンプル数は数十に限られている。また、数百の微小切片から数千種のタンパク質の空間情報を同時に取得することを目的とした空間プロテオミクスでは、数百以上の組織切片の LC/MS/MS 分析に数週間から 1 か月を要し、広範な空間情報を得るには時間がかかってしまう^{50,51}。

元来、サンプル量に制限のあるショットガンプロテオミクスでは、高感度化が最重要課題とされてきた。その理由は、LC にて分離したペプチドを MS に導入する際、イオン化のステップが必要であり、そのイオン化効率が測定感度を大きく左右するためである。LC/MS/MS では、一般的にエレクトロスプレーイオン化法 (Electrospray ionization, ESI)^{52,53} が広く用いられている¹³。ESI では、液体に高電圧を印加することでサンプルのイオン化を行う。この時、流速が高くなるほどスプレー先端で形成される液滴が大きくなり、イオン化効率が低下することが知られている⁵⁴⁻⁵⁷。そのため、ショットガンプロテオミクスでは、高感度化のためナノ流速条件での測定が一般的に採用されてきた。しかし、ナノ流速下での測定は、サンプルローディングやカラムの洗浄・平衡化に多大な時間を要してしまう。そのため、現行のナノ流速 LC/MS/MS システムを用いる限り、高感度を維持したままスループットをさらに向上させることは容易ではない。

これまでに、流速 50 ~ 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、内径 2.1 mm のカラムを用いたマイクロ流速 LC/MS/MS システムの高い堅牢性が複数の研究により示されている。これらのシステムの一例では、数千のタンパク質群の同定に成功し、SARS-CoV-2 感染の分類⁵⁸や連続測定への応用⁵⁹が報告されている。Bian らは、流速 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、30 分グラジエント分析によって、1 μg の HeLa 消化物から 3,210 タンパク質群が同定されたことを報告している⁶⁰。また、Messner らは、流速 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ のシステムでは、0.5 分グラジエントで 1,937 タンパク質群、5 分グラジエントで 5,004 タンパク質群を、いずれも 5 μg の K562 消化物から同定することに成功した⁶¹。さらに、流速 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、3 分または 5 分グラジエントにより、3 μg の K562 消化物からそれぞれ

5,286 または 5,844 種のタンパク質が同定された⁶¹。これらのマイクロ流速 LC/MS/MS システムは、最大 1 日 400 サンプル (samples per day, SPD) という高速測定を可能にする点で極めて優れている。しかし、高流速化に伴う ESI 効率の低下により感度が低下し、1 ~ 10 µg 程度のサンプル量を必要とする。このサンプル量は、1 細胞当たりのタンパク質量が 0.25 ng 程度であることから、約 4,000 ~ 10,000 細胞に相当し、サンプル量が限られている場合には、これらの手法は適用が困難となる。

近年では、1 ~ 14 µL/min の流速であるキャピラリー流速 LC が、ナノ流速 LC と同等の感度を維持しつつ、LC/MS/MS の高速化を実現する手法として注目されている。キャピラリー流速 LC は、ナノ流速 LC と比較して、サンプルローディング、カラム洗浄・平衡化に要する時間を短縮できるという利点を有する。LC/MS/MS のさらなる高速化を目的として、サンプルロードやカラム洗浄・平衡化時のみ流速を増加させる手法⁶²⁻⁶⁴ や、デュアルトラップカラムを用いた手法⁶⁵ が提案されている。これらの手法により、5 ng という微量サンプルからの高感度分析が可能となり、200 SPD で 1,074 タンパク質群の同定が報告されている。しかしながら、感度の向上が示された一方で、スループットはマイクロ流速 LC/MS/MS システムには及んでいない。

他に、LC 分離を用いないダイレクトインフュージョンによるハイスループット測定法も提案されており⁶⁶、4.4 時間以内に 132 サンプルの測定に成功している。この手法は極めて高いスループットを有するものの、ペプチド混合物の複雑性により解析深度が制限され、2.5 分間の MS 測定で同定されたタンパク質数は 525 にとどまっている。

このように、プロテオーム測定におけるスループットの向上を目的とした多様な手法が試みられてきたが、感度および解析深度を同時に達成することは困難である。しかし、高速プロテオーム解析の実際の対象となるサンプルは、極微量の臨床検体や微小組織片などサンプル量が限られている場合が多く、ハイスループットと高感度の両立は不可欠である。

そこで、本研究ではモノリス型シリカカラムに着目した。上述の通り、モノリス型カラムは高い透過率を持つため、粒子充填型カラムと比較して低圧での運用が可能である³³。すなわち、粒子充填型カラムと同じサイズのカラムを用いた場合でも、より高い流速での分離が可能であることが期待される。この特性を活かすことで、キャピラリー流速下にてナノ流速と同等の感度を保ちつつ、サンプルローディングやカラムの洗浄・平衡化時間を大幅に短縮できるのではないかと考えた。さらに、モノリス型シリカカラムは高線流速条件でも分離低下が抑えられるという報告があ

り^{67,68}、この性質がハイスループット分析に適していると予想された。

本章では、感度およびプロテオーム解析深度を損なうことなく、1,000 SPD (= 86 sec/run) を超える解析を可能とする、ハイスループット分析法の開発について述べる。

第2節 流速と ESI 効率の関係

1 日 1,000 サンプルの測定を達成するためには、1 サンプルあたりの総測定時間を約 90 秒以下に抑える必要がある。LC/MS/MS 測定における総測定時間は、以下のよう構成される。

$$\text{LC total time} = t_0 + t_D + t_G + t_{eq} \quad (5)$$

ここで、 t_0 はカラムのホールドアップタイム (カラムデッドタイム)、 t_D はグラジエントミキサー容量、送液チューブ容量およびサンプルループ容量から構成されるデュエルタイム (ミキサー入口からカラム入口までに要する時間)、 t_G はグラジエント時間、 t_{eq} はカラム洗浄および平衡化時間である。グラジエント時間以外について、流路体積と流速に依存するため、ハイスループット化には高流速化と流路体積の最小化を同時に実現する LC セットアップの設計が不可欠である。一方で、高流速化は感度低下を招いてしまう。そのため、LC/MS/MS のハイスループット化を図るには、十分な感度を維持できる流速の正確な上限を明らかにする必要がある。そこで、まず高流速化に伴う感度低下の懸念について検討した。流速をナノ流速 (< 1 $\mu\text{L}/\text{min}$) からキャピラリー流速 (1~14 $\mu\text{L}/\text{min}$)、さらにマイクロ流速 (> 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) へと増加させた際に、イオン化効率がどの程度低下するのかを評価した。なお、本研究における各流速領域の定義は、一般的に用いられるカラム内径における最適流速に基づいており、ナノ流速は内径 150 μm 未満、キャピラリー流速は内径 0.53 mm 未満、マイクロ流速は内径 1 mm 超のカラムを想定している。

LC カラムによる濃縮効果を排除し、流速とイオン化効率の関係のみを評価するため、測定にはダイレクトインフュージョン質量分析を用いた。モデルペプチドとして、ウシ血清アルブミンをトリプシン消化して得られるペプチド配列を参考とした 3 種類の合成ペプチドを用い、単位時間あたりに導入されるペプチド量が等しくなるようにペプチド溶液を調製した (表 2-1)。内径 75 μm カラムを用いたナノ流速 LC/MS/MS における典型的な流速である 250 nL/min での強度を 100 %とした場合、感度は 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ では 27%、200 $\mu\text{L}/\text{min}$ では 2.3%まで低下した (図 2-1 および表 2-1)。すなわち、ナノ流速 LC/MS/MS と同等の感度を得るためには、流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ では約 4 倍、200 $\mu\text{L}/\text{min}$ では約 50 倍のサンプル量が必要となることを示している。これらの結果から、キャピラリー流速域では、程よく感度とスループットの両立が実現できるのではないかと考えた。

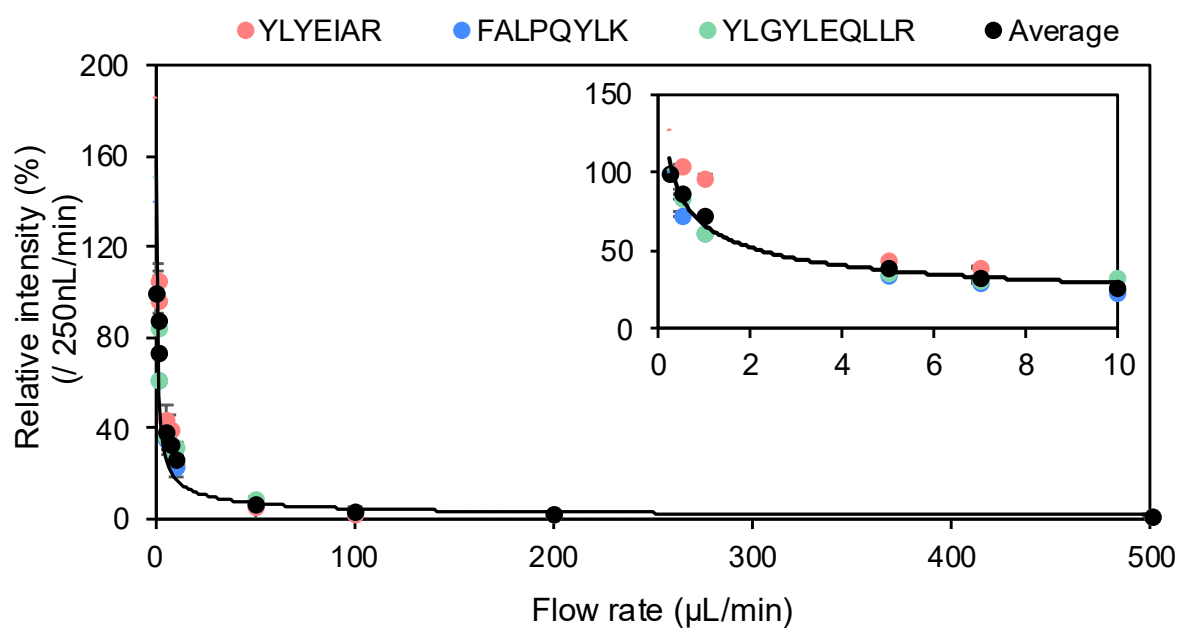


図 2-1 流速と ESI 効率の関係

250 nL/min の時のシグナル強度を 100 %として、相対的なシグナル強度を求めた。

表 2-1 ESI 効率と流速の関係を調べた実験条件と結果

Flow rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)		0.25	0.5	1	5	7	10	50	100	200	500
Peptide injection amounts /time (fmol/min)		200									
Peptide concentration (fmol/ μL)		800	400	200	40	28.6	20	4	2	1	0.5
Relative intensity (%) (/ 250nL/min)	YLYEIAR	100	105	97.3	44.5	40.0	24.6	5.8	2.6	2.2	1.7
	FALPQYLK	100	73.5	61.5	35.0	29.8	24.0	7.0	3.6	2.1	1.6
	YLGYLEQLLR	100	84.6	61.3	36.9	31.3	32.7	9.1	4.3	2.5	1.5
	Average	100	87.7	73.3	38.8	33.7	27.1	7.3	3.5	2.3	1.6

第3節 キャピラリー流速 LC/MS/MS に適したカラムの選択

次に、キャピラリー流速条件下にて分析を行うためのカラムの選択について検討を行った。カラムを選択する際には、分離性能とカラム圧のバランスを考慮する必要がある。ショットガンプロテオミクスでは、一般的に 100 μm 内径、15 cm 長のカラムに対して 500 nL/min の流速条件で分析が行われる。また、この時のカラム圧は約 20 MPa である。カラムサイズと圧力の関係は以下の式にて表される^{69,70}。

$$\Delta P = \frac{F \times \eta \times L}{K \times \pi \times r^2} \quad (6)$$

ΔP : カラム圧力, η : 移動相の粘度, F : 流速, L : カラム長, K : 透過率, r : カラム半径

上記式より、同じサイズのカラムに対してキャピラリー流速 (1~10 $\mu\text{L}/\text{min}$) を適用した場合、カラム圧力は流速に比例するため、40 ~ 400 MPa となることが推測される。一般的な LC システムの圧力上限は 40 MPa 程度、最も高耐圧のものでも 150 MPa³² であるため、この圧力範囲は分析を行うには非現実な値であることが予想される。カラム圧力を抑えるためには、①カラムサイズの変更、あるいは②空隙率の高いカラムの使用の 2 つの方法が考えられる。それぞれについて可能性を検討した。

まず、カラムサイズの変更について、式(5)より、カラム内径を太くする、またカラム長を短くするという 2 点が考えられる。しかしながら、カラムサイズの変更による圧力低減には本質的な限界がある。まず、カラム内径を大きくした場合、式(5)より圧力は r^2 に反比例して低下するものの、同時にカラム断面積が増大するため、カラム体積が大きくなる。その結果、流路体積が大きくなるため、本来の目的であるローディング時間や洗浄・平衡化時間の短縮が実現できない。

一方、カラム長を短くすることによっても圧力は低減可能であるが、理論段数はカラム長に比例するため、分離性能の低下は避けられない。複雑なペプチド混合物を対象とするショットガンプロテオミクスにおいては、十分な分離能が同定数および定量精度に直結するため、カラム長の短縮は実用的な選択肢とはなりにくい。

以上より、キャピラリー流速条件下においては、カラム内径の拡大あるいはカラム長の短縮といった単純なカラムサイズ変更のみでは、圧力低減と分離性能の両立は困難であることが考えられた。

次に、カラム圧力を低減するための第二の方策として、空隙率の高いカラムの適用について検討を行った。代表的な空隙率の高いカラムとして、マイクロピラーア

レイカラム (Micro-pillar array column, μ PAC) およびモノリス型シリカカラムが挙げられる。 μ PAC は、規則的に配列されたシリカピラー構造を持つことを特徴とし、軸方向拡散が減少することによる高い分離性能および再現性を示すことが報告されている⁷¹。また、近年では市販品としての販売が開始されており、 μ PACの作製技術が無くとも使用しやすい環境となっている。一方で、その構造的特徴に起因する制約も指摘されている。 μ PAC は、粒子充填カラムやモノリス型カラムと比較して比表面積が小さく、ローディングキャパシティが限定的であることが知られている⁷²。そのため、シングルセル解析のような低負荷条件下での分離には有効である^{73,74}ものの、サンプルに対しては、十分なローディングキャパシティを確保することが困難である⁷²。他に、クロマトグラフィーの観点からは良い分離性能が得られる一方で、LC/MS/MS 分析を行う際にスプレーエミッターを接続する際にカラム一体型スプレーの作製が構造上困難である。そのため、ポストカラム体積が大きくなってしまい、拡散によって分離性能低下や余分な流路体積が必要となると考えられる。

一方、モノリス型シリカカラムは、前述の通り、連続した 3 次元多孔質構造を有し、マクロ孔とメソ孔が共存する二重細孔構造を特徴とし、移動相の流路抵抗を低減することができる。また、高い比表面積を維持でき、小さなカラム体積でも十分なローディングキャパシティを維持することができる。さらに、既報研究では、モノリス型シリカカラムは高流速領域においても安定した分離性能を示し、粒子充填カラムと比較して低圧条件下で同等あるいはそれ以上の分離能が得られることが示されている。加えて、モノリス型シリカカラムの場合、スプレー一体型カラムの作製が可能であるため、スプレー部の流路体積削減も可能となる。これらの文献的知見を踏まえると、モノリス型シリカカラムは、キャピラリー流速条件下においてカラム圧力と高分離、そして流路体積の最小化の 3 点の両立が求められるショットガンプロテオミクス分析に対して、有望な選択肢であると考えられる。

以上より、本研究ではモノリス型シリカカラムを選択し、以降の実験を行った。

第4節 キャピラリー流速条件における流速の最適化

前節の結果に基づき、キャピラリー流速領域におけるハイスループットプロテオミクスに最適な流速の検討を行った。キャピラリー流速条件下での流速最適化は、500 ng の HeLa 消化物を用い、グラジエント時間を 1 分と定めて実施した。その結果、各流速条件において共通して同定された 336 種類のペプチドピークにおける半値幅は、流速の増加に伴って小さくなる傾向を示した (図 2-2a)。一方、同定されたペプチドピークの中央値強度および同定された PSM の数は、流速 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ で最大となり、次いで 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で高い値を示した (図 2-2b,c)。以降の最適化には、7 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、グラジエント時間 1 分と定め、LC/MS/MS 測定のさらなる高速化に向けた検討を行った。

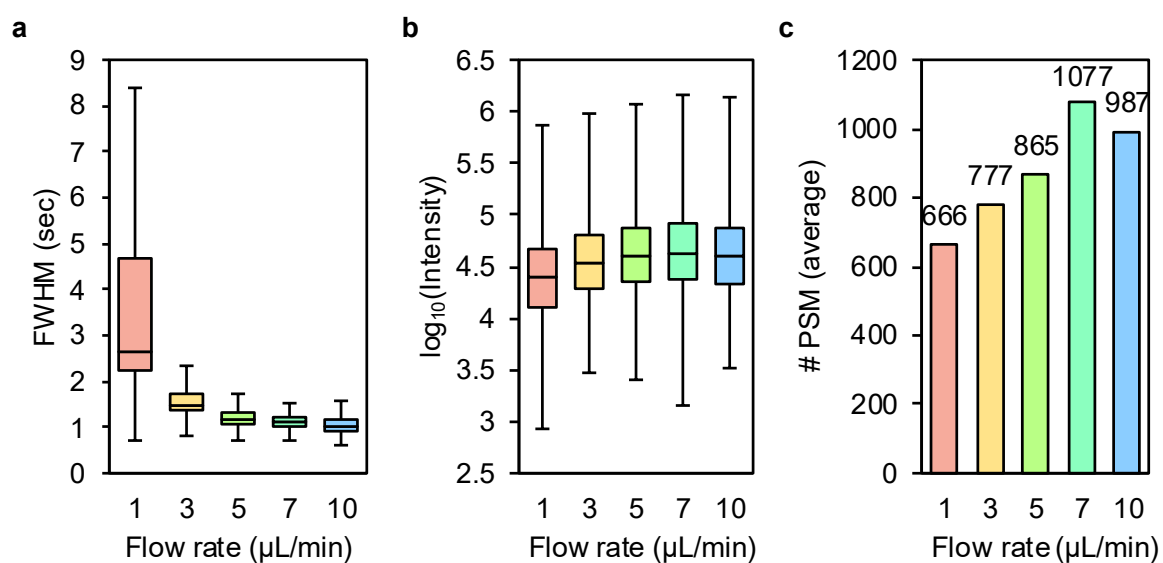


図 2-2 ハイスループット LC/MS/MS に向けた流速の最適化

グラジエント時間を 1 分に設定し、流速を 1、3、5、7、10 $\mu\text{L}/\text{min}$ に変化させた場合のペプチド半値幅の箱ひげ図 (a)、強度対数値の箱ひげ図 (b)、および PSM 数の棒グラフ (c)。 (b) の箱ひげ図では、中央値 (50 パーセンタイル) を黒線で示し、箱は四分位範囲 (IQR) Q1 および Q3 (25 パーセンタイルおよび 75 パーセンタイル) を表す。ひげは最大値と最小値を示す。IQR の 1.5 倍を超える値は外れ値として除去した。各サンプルについて 3 回の繰り返し測定を実施した。

第5節 流路体積の最小化による

ハイスループット LC/MS/MS のためのセットアップ設計

さらなる LC/MS/MS 測定的高速化に向けて、LC システムにおけるデッドボリュームの最小化を試みた。2 本のトラップカラムを並列に用い、一方のトラップカラムでグラジエント測定を行う間に、もう一方のトラップカラムへ次サンプルを導入することで LC サイクルタイムを短縮することは可能である^{62,65}。しかし、この方式はシステム構成が複雑となり、また、トラップカラムでのサンプルロスを引き起こす可能性がある。そこで本研究では、できる限り継手数を減らした、簡便かつ堅牢なシステム構成を採用した (図 2-3)。具体的には、6 ポートインジェクションバルブに接続したサンプルループを、グラジエントポンプおよびグラジエントミキサーの下流に配置し、シリンジを用いてサンプル溶液を直接サンプルループにロードした。バルブ切り替え後は、グラジエント溶離液がサンプルループを通過してカラムへ送液される構成とした。この方式では、LC 測定中にサンプルループが常時フラッシングされるため、キャリーオーバーの低減が期待できる。デッドボリュームを低減するためには、過度な内径縮小によるシステム圧力上昇を考慮しつつ、可能な限り内径の小さい LC チュービングを使用する必要がある。本研究では、内径 50 μm のフューズドシリカキャピラリーを流路として選択した。また、このキャピラリーの長さを最短化するため、外部グラジエントミキサーを備えた LC ポンプを採用し、グラジエントミキサーをインジェクションバルブの近傍に配置した。その結果、グラジエントミキサーからインジェクションバルブまでの流路体積は 0.29 μL に低減された。さらに、サンプル注入精度と最小体積の両立を考慮して、1 μL のサンプルループを選択した。加えて、インジェクションバルブから MS 装置までの距離を可能な限り短縮することで、注入点からカラム入口までの流路体積を 0.29 μL に抑えた。これらの工夫により、グラジエントミキサーからカラムまで含む LC システム全体のデッドボリュームは合計 2.8 μL まで低減された。

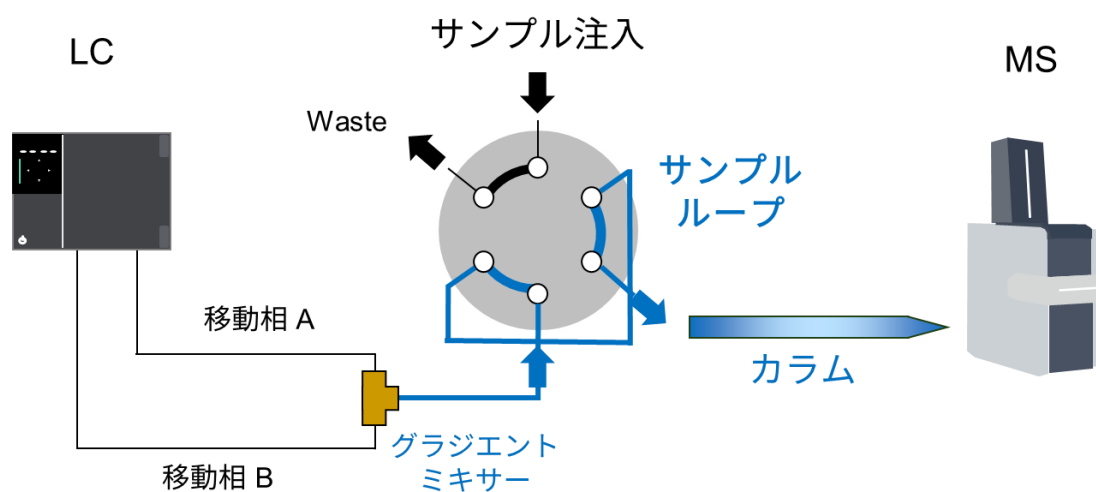


図 2-3 本研究にて用いた LC/MS のセットアップの模式図

第 6 節 サンプル精製条件による LC 洗浄時間の短縮

次に、キャリーオーバーおよび LC サイクルタイムの低減を目的として、サンプル精製工程の検討を行った。LC 分析カラムの洗浄時間短縮を目的として、StageTip^{75,76} による脱塩工程におけるペプチド溶出条件を詳細に評価した (図 2-4)。ブランク測定と HeLa サンプル測定を交互に実施し、分析カラムは 99% B (80 %ACN および 0.5 %AA) で 0 分または 2 分間洗浄した。キャリーオーバーは、ブランク測定におけるピーク面積を HeLa 測定時のピーク面積で除した比として算出した (図 2-4)。StageTip 溶出液中の ACN 濃度を 80%とした場合、キャリーオーバーは 4.2~5.2 %であり、洗浄時間を 0 分とした条件ではキャリーオーバーの増加が認められた。一方、StageTip 溶出時の ACN 濃度を 32 %まで低下させたところ、キャリーオーバーは 1.6~1.7 %まで有意に低減された。この条件下では、同定されるペプチド数の減少は約 2%にとどまり、解析深度への影響は最小限であった。さらに、洗浄時間を 0 分とした場合においても、キャリーオーバーの増加は観察されなかった。前述のとおり、本研究で採用した LC システムは、サンプルループ体積に起因して、グラジエント溶離液がサンプルループを通過する際に不可避のグラジエントディレイが生じるという欠点を有する一方で、キャリーオーバーを低減できるという利点を併せ持つ。本検討により、StageTip の溶出条件の最適化、グラジエント溶離液によるサンプルループの洗浄、ならびに流路体積 2.8 μ L への低減を組み合わせることで、LC サイクルタイムへの影響を最小限に抑えつつ、キャリーオーバーの大幅な低減を達成した。

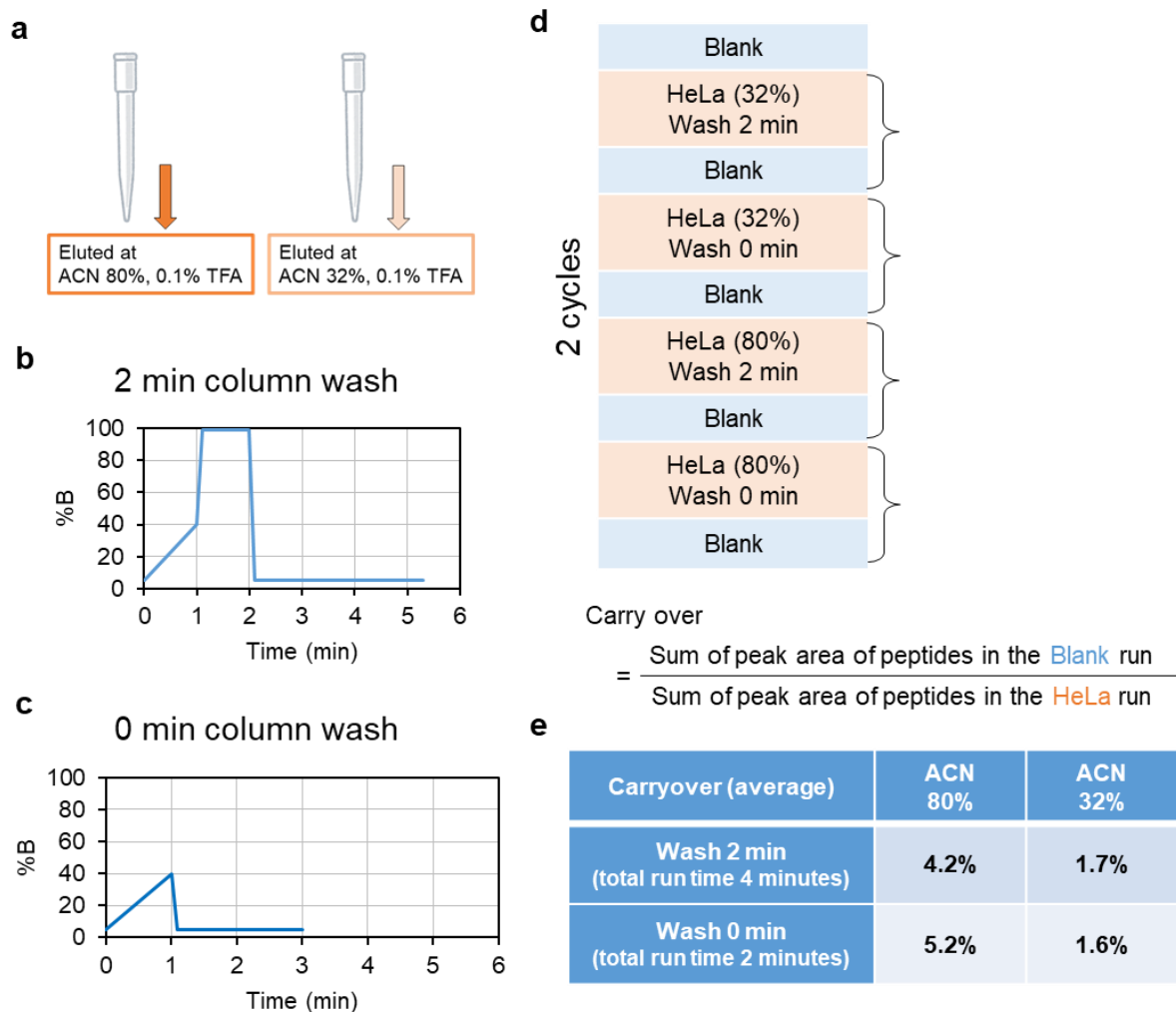


図 2-4 サンプル精製時の溶出条件とカラム洗浄時間の検討

(a) サンプル精製時に用いる溶出 ACN 濃度条件について、80 %および 32 %の 2 条件を検討した。(b), (c) (a) にて精製したそれぞれのサンプルについて、カラム洗浄時間 2 分または 0 分の 2 条件にて LC/MS/MS 分析を行った。(d) キャリーオーバーを定量するために、HeLa 消化ペプチドの後、ブランクの測定を行った。また、得られたデータを基にペプチド定量を行い、その比を取ることでキャリーオーバーの割合を算出した。(e) 各条件における平均キャリーオーバー値。

第7節 1,000 SPD 実現に向けた LC/MS/MS 条件の調整

次に、カラム平衡化時間の検討を行った。カラム平衡化時間を 1.4 分、LC サイクルタイムを 2.4 分に設定した場合、ペプチドは最大で 1.6 分まで溶出することが確認された (図 2-5a)。そこで、LC グラジエントプログラムにおける平衡化時間を 1 分まで短縮しても、保持時間の再現性が維持されるかどうかを検証した。まず、ブランク測定として、カラムを 5% B 条件で十分に平衡化した後、グラジエント時間 1 分、平衡化時間 1 分の条件で 3 回の連続測定を行った (図 2-5b)。その結果、1 回目および 2 回目の測定では、保持時間の早いペプチドにおいてわずかな再現性の低下が認められたが、2 回目と 3 回目の測定間では保持時間の変動は観察されなかった (図 2-5c-e)。以上の結果から、初期状態が完全には回復していない可能性はあるものの、平衡化時間として 1 分を設定しても実用上十分な保持時間再現性が得られると判断した。これらの最適化に基づき、LC サイクルタイム 2 分、すなわち 1 日あたり 720 サンプル (720 SPD) の解析が可能なシステムを確立した。

一方で、本研究の当初の目標値である 1,000 SPD (= 86 sec) には及んでおらず、さらなる高速化が必要であると考えた。そこで、第 4 節の検討結果より、流速を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定することで、ローディング時間および平衡化時間を短縮し、1,000 SPD を達成できる可能性があると考えた。流速を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定した条件下で、LC サイクルタイムのさらなる短縮が可能かどうかを検討した。現在の流路体積が 2.8 μL であることから、グラジエントディレイは $2.8 \mu\text{L} / 10 \mu\text{L}/\text{min} = 0.28 \text{ min} = 17 \text{ sec}$ となると計算された。また、平衡化時間は、カラム体積の 3 倍分と仮定して、 $1.1 \mu\text{L} / 10 \mu\text{L}/\text{min} \times 3 = 0.33 \text{ min} = 20 \text{ sec}$ 必要と考えた。残りの時間をグラジエント時間に充てるとした場合、 $86 \text{ sec} - 17 \text{ sec} - 20 \text{ sec} = 48 \text{ sec}$ となった。これらの計算結果により、10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 0.8 min グラジエントによって 1,000 SPD が実現できるのではないかと考えた。実際に、このプログラムに基づき、保持時間の再現性について確認したところ、良好な再現性が確認され、1,000 SPD の解析を実現できることが示された (図 2-6)。

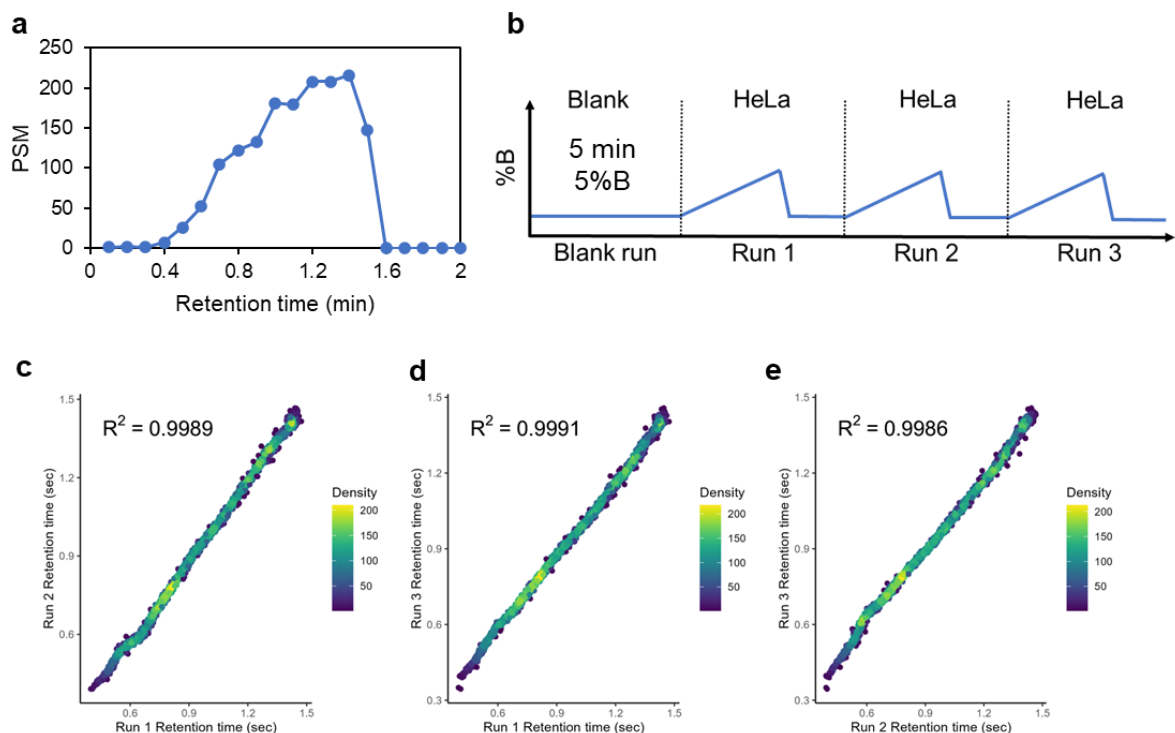


図 2-5 1 分グラジエント LC/MS/MS における LC カラムの平衡化時間の検討

(a) PSM の保持時間分布 (7 μ L/min、1 分間グラジエント LC/MS/MS)

(b) カラム平衡化時間の評価のための LC/MS/MS 測定順序

(c) - (e) 測定 1 と測定 2 間、測定 1 と測定 3 間、および測定 2 と測定 3 間の保持時間の再現性。1 分グラジエント、1 分間の平衡時間、総測定時間 2 分の結果を示す。

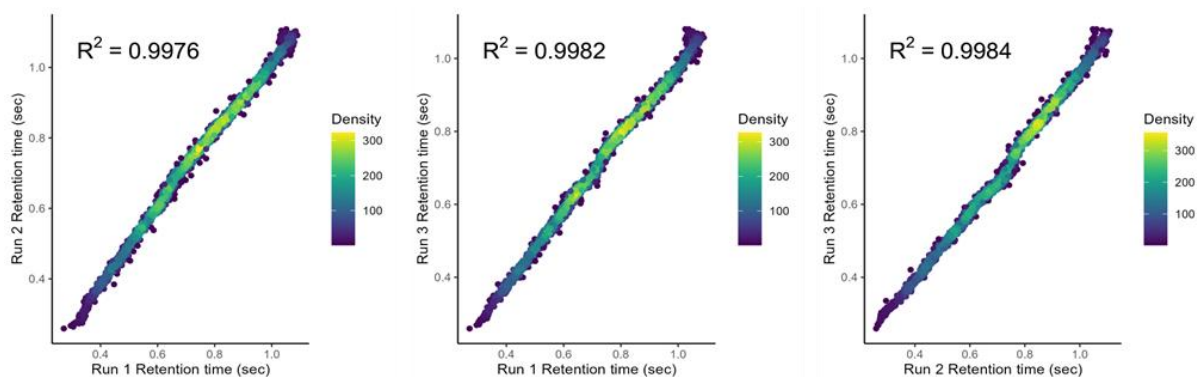


図 2-6 0.8 分グラジエント LC/MS/MS における LC カラムの平衡化時間の検討

(a) - (c) 0.8 分グラジエント、0.6 分間の平衡化時間、総測定時間 1.4 分の測定における、測定 1 と測定 2 (a)、測定 1 と測定 3 (b)、および測定 2 と測定 3 (c) の保持時間の再現性。

第 8 節 リン酸化チロシン合成ペプチドを用いた定量直線性評価

720 SPD システムの定量性能を評価するため、36 種類のリン酸化チロシン含有合成ペプチド (phosphotyrosine-containing peptides ; pY ペプチド) を用いた検証を行った (図 2-7、表 2-2)。これら 36 種類の合成 pY ペプチドは、ヒトチロシンキナーゼをトリプシン消化して得られた配列に基づくものであり、それぞれを 10、25、50、75、100、および 150 fmol/μL の濃度で混合サンプルとして調製し、各条件につき 3 回の繰り返し測定を行った。

さらに、より複雑なサンプル条件下においても定量が可能であることを検証するため、50 μg の HeLa 消化物から調製したリン酸化ペプチド濃縮サンプル (約 250 ng 相当) を、各混合サンプルにバックグラウンドマトリクスとして添加した。合成 pY ペプチドは還元的ジメチル化⁷⁷によって軽同位体標識 (dimethyl light) を施し、一方でマトリクス由来のリン酸化ペプチドは重同位体標識 (dimethyl heavy) とした。定量は MS1 レベルにて用い、MS デューティサイクルタイムを 100 ms に設定した 120-sec LC/MS/MS 法により測定を実施した。

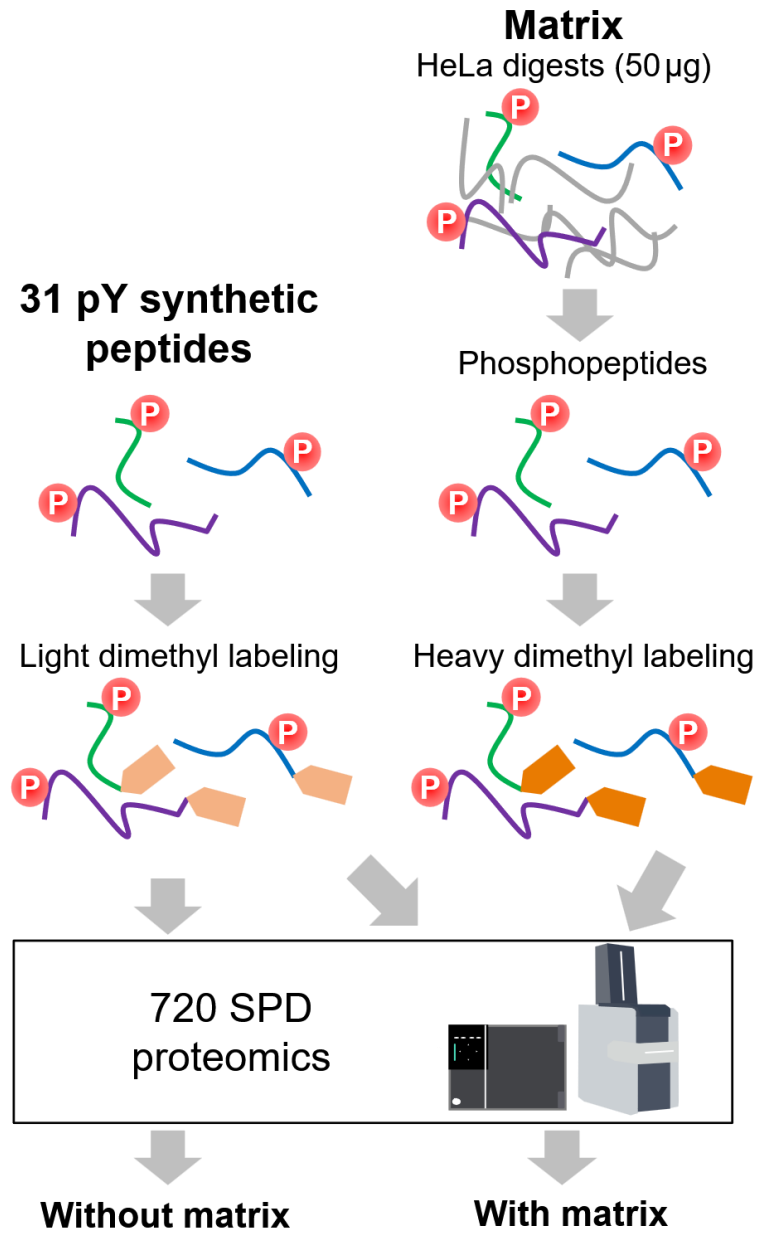


図 2-7 120-sec LC/MS/MS 法における pY 直線性定量解析のための実験ワークフロー。

表 2-2 36 個のリン酸化チロシン含有合成ペプチドのリスト

“phospho”はリン酸化修飾を、“ox”は酸化修飾を示す。

Peptide sequences	Gene name
NLY(phospho)AGDY(phospho)YR	DDR1
RSDSASSEPVGIY(phospho)QGFEK	PRKCD
NLY(phospho)SGDY(phospho)YR	DDR2
MQQYTEHFM(ox)AAGY(phospho)TAIEK	EPHA2
RPAQAFPVSY(phospho)SSSGAR	RET
DIY(phospho)RASY(phospho)YRK	ALK
SVLEDDFTATEGQY(phospho)QPQP	LCK
SLEATDSAFDNPDY(phospho)WHSR	ERBB3
AVPEGHEY(phospho)YR	TYK2
AVPEGHEYY(phospho)R	FGFR1
MQQY(phospho)TEHFMAAGYTAIEK	EPHA2
DIHHIDY(phospho)YKK	FGFR1
DIY(phospho)ETDYY(phospho)RK	IGF1R
YVLDDQY(phospho)TSSSGAK	TEC
EY(phospho)HAEGGKVPIK	EGFR
EY(phospho)YSVHNK	MET
DIKNDSNY(phospho)VVK	KIT
GVHHIDY(phospho)Y(phospho)KK	FGFR4
QEDHAEAAALY(phospho)KNLLHSK4	KIT
YLANM(ox)NY(phospho)VHR	EPHA2
GVHHIDY(phospho)YK	FGFR4
VIEDDPEAVY(phospho)TTTGGK	EPHA7
YMEDSTYY(phospho)KASK	PTK2
LM(ox)TGDTY(phospho)TAHAGAK	ABL1
LMTGDTY(phospho)TAHAGAK	ABL1
YLANMNY(phospho)VHR	EPHA2
SLY(phospho)DRPASY(phospho)K	PDGFRA
SLY(phospho)DRPASYK	PDGFRA
EPPPY(phospho)QEPRPR	DDR1
IGEGT(phospho)Y(phospho)GVVYK	CDK1
DIY(phospho)KDPDY(phospho)VR	VGFR2
MQQYTEHFMAAGY(phospho)TAIEK	EPHA2
IYSGDY(phospho)YR	MERTK
IYSGDYY(phospho)R	MERTK
DINNIDY(phospho)YKK	FGFR2
DIMHDSNY(phospho)VSK	PDGFRA

36 種類の pY ペプチドについて、サンプル濃度とピーク面積との関係における直線性を評価した (図 2-8)。マトリックスを含まないサンプルでは、ほとんどの pY ペプチドにおいて高い直線性が確認され、相関係数の中央値は $R = 0.990$ であった。また、マトリックスを添加した場合においても直線性はほとんど低下せず、相関係数の中央値は $R = 0.988$ であった。この結果は、本研究で開発した超高速プロテオミクス手法が、複雑なサンプル条件下においてもペプチドを高精度に定量可能であることが示唆された。

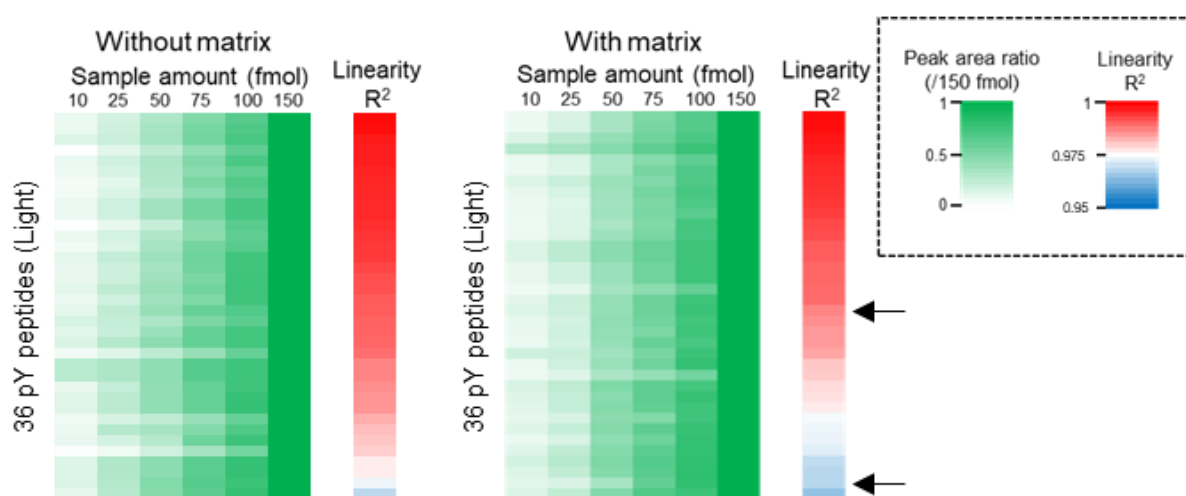


図 2-8 pY 合成ペプチドを用いた定量直線性の結果。

緑から白のカラースケールにて示したヒートマップは、150 fmol の pY 合成ペプチドをスパイクした結果に対する相対的なピーク面積比を示す。赤-白-青のカラースケールは定量直線性の R^2 値を示す。

次に、本実験にて用いたリン酸化部位異性体について着目した。これら 2 種類のペプチドは同一のアミノ酸配列を有するが、リン酸化部位が異なる異性体であり、ephrin type-A receptor 2 (EphA2) 由来の 918–935 残基配列における 921 位チロシンリン酸化体 (921pY) および 930 位チロシンリン酸化体 (930pY) である。Eph 受容体を介したシグナル伝達は、細胞移動、軸索誘導、血管新生などの重要な細胞機能を制御することが知られており、がんを含む生理的および病理的条件下で重要な役割を果たす。中でも、EphA2 の 921Y および 930Y のリン酸化は、アダプタータンパク質 Grb7 の Src homology 2 (SH2) ドメインへの結合様式を変化させ、それぞれ異なる機能的結果をもたらすことが報告されている⁷⁸。また、受容体型チロシンプロテインホスファターゼ F (PTPRF) は、EphA2 の 930pY を特異的に脱リン酸化することで、Nck1 との相互作用を制御し、結果として細胞移動を調節することが示されている⁷⁹。このように、921Y および 930Y のリン酸化は機能的に区別されるため、両者を個別に定量する必要がある。しかし、これら 2 種類のペプチドはリン酸化部位のみが異なるため、 m/z 値は同一であり、イオン移動度分離を用いない場合には、保持時間のみでは十分な分離が得られず、ピーク境界は不明瞭であった (図 2-9)。一方、イオン移動度分離を付加することで、両ペプチドを明確に分離されたピークとして抽出することが可能となった (図 2-9)。さらに、イオン移動度情報を加えることにより、定量直線性も改善された (図 2-9)。すなわち、本手法においては、イオン移動度分離が、短時間グラジエントに起因する LC 分離能の低下を補完する役割を果たしていることが示された。

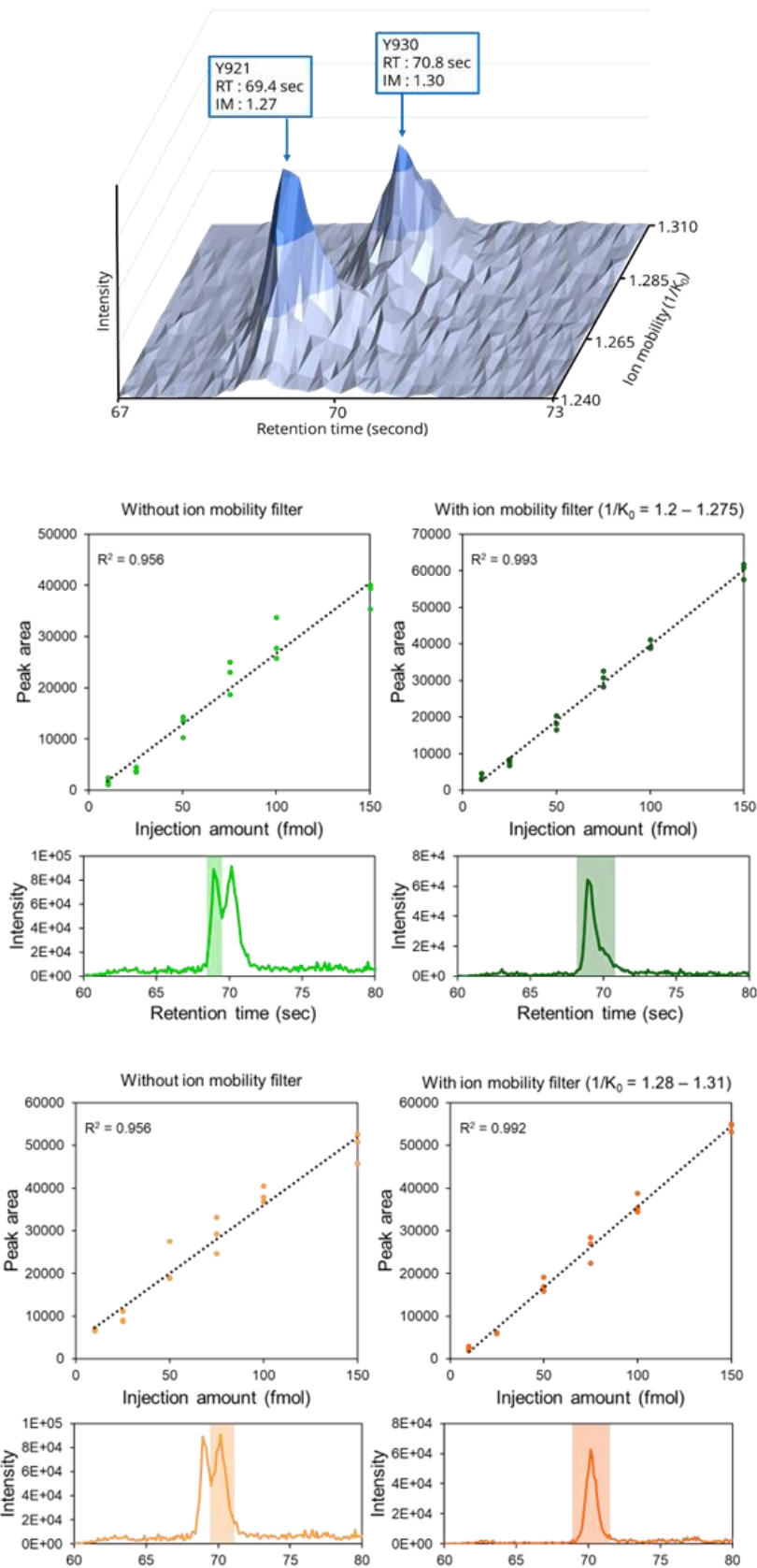


図 2-9 EPHA2 921pY および 930pY ペプチドの分離。

第9節 HeLa細胞を用いた同定性能および定量再現性評価

本手法の基本的な性能を評価するために、HeLa 細胞消化物を用いた性能評価を行った。その結果、最大で 20,000 種類以上のプリカーサーイオンおよび 3,500 種類以上のタンパク質群を同定することができた (図 2-10a)。さらに、サンプル量が 10 ng と極微量であっても、約 2,000 種類のタンパク質群が同定された (図 2-10a)。これらの結果から、本手法がハイスループット、高感度、ならびに十分な解析深度を同時に達成可能であることが確認された。120 秒の LC/MS/MS システムでは、サンプル量が 1000 ng の条件、84 秒の LC/MS/MS システムでは、250 ng 以上の条件において同定数の減少が観察された。これは、グラジエント時間の短縮により、多数のペプチドが同時に溶出し、検出器の飽和により分離能低下が生じたためと考えられる。定量再現性については、相対標準偏差 (RSD) は 13~23%であった (図 2-10b)。

次に、本手法を既報^{30,60,61,63-65,80,81}のハイスループットプロテオミクス研究と比較した (図 2-10c)。図 4a の同定数を用いて比較した結果、本研究のスループットは、これまでに報告された最速の手法と比較して、同等のタンパク質同定数を維持しつつ 2 倍以上を達成した。また、必要サンプル量も少なく (Messner ら: 5000 ng、本研究: 100 または 750 ng)、高感度であることが示された。以上より、本手法は LC/MS/MS におけるスループット、感度、解析深度のいずれも犠牲にすることなく両立可能であることが示された。

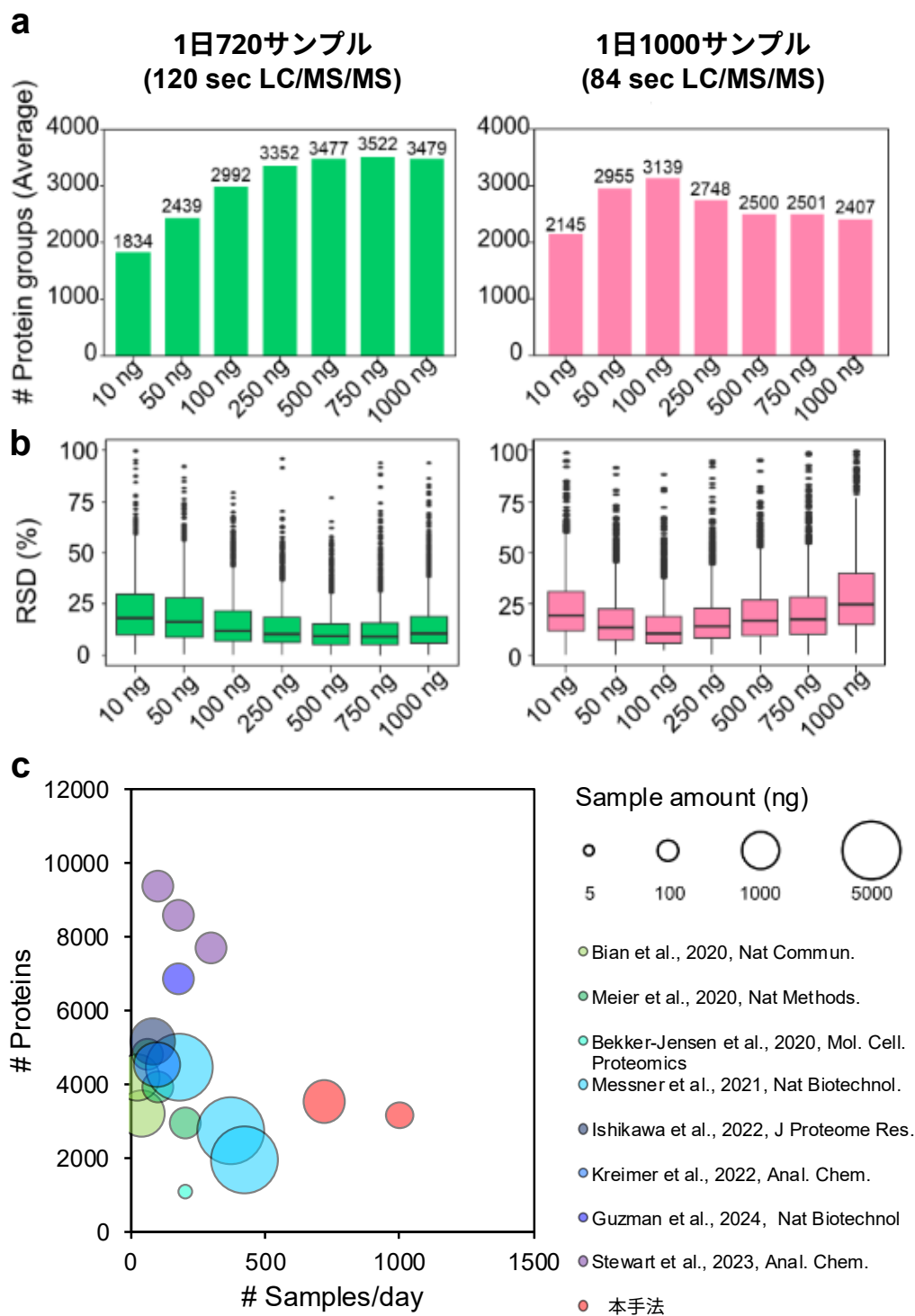


図 2-10 本手法の HeLa 細胞を用いたベンチマーク結果

各サンプル量における (a) タンパク質同定数、(b) 定量再現性。(c) 既報と本手法の比較結果。凡例のサイズは測定に使用したサンプル量を示す。

第 10 節 5,000 回連続測定によるシステム頑健性評価

超高速プロテオミクスシステムの堅牢性および再現性を検証するため、合計 4,940 回の連続測定を実施した。サンプルとして、培養 HeLa 細胞および大腸菌、ヒト血漿、ヒト血清、マウス脳を用いた (図 2-11a)。また、QC サンプルとして BSA 消化物を用い、プレート測定ごとに注入した。これらのサンプルは 3 枚の 96 ウェルプレートを用いて調製し、1,000 SPD DIA、1,000 SPD DDA、720 SPD DIA、720 SPD DDA の 4 条件について、それぞれ 5 サイクル、合計 20 サイクルの測定を行った (図 2-11a)。プレート 1 および 2 の測定は、StageTip 脱塩工程における回収率のばらつきを評価する目的で実施した。プレート 1 では、5 μ g の消化サンプルを 96 本の StageTip で個別に脱塩した。プレート 2 では、同様に 96 本の StageTip で脱塩後、一度 5 mL チューブに回収し、再度 96 ウェルに分注することで、StageTip 間のばらつきを評価した。プレート 3 では、HeLa および大腸菌の混合サンプル、SILAC 標識 HeLa 細胞、ヒト血漿、ヒト血清、マウス脳を用いて、システムの堅牢性を検証した。その結果、すべての測定は 1 週間以内に完了した (図 2-11a)。測定期間中、5 サイクルごとに定期メンテナンスを実施し、MS 感度、TOF および TIMS のキャリブレーション、カラム交換を行った。4,833 回目の測定時にカラム詰まりが発生し測定が中断されたため、720 SPD・DDA 条件のプレート 2 測定を最初からやり直す必要が生じ、総測定回数は 5,011 回となった。メンテナンス時間を除外した LC/MS/MS 測定時間は、データ生成日時に基づいて算出し、1,000 SPD 法では平均 82 秒、720 SPD 法では 118 秒であり、それぞれ 732 SPD および 1,054 SPD の測定性能が得られた。

次に、QC サンプルとして用いた BSA 由来ペプチド LGEYGFQNALIVR に着目し、1 週間にわたる保持時間の再現性を評価した。その結果、保持時間の CV は 1,000 SPD 法で 1.4%、720 SPD 法で 2.5%であり、5 サイクルごとにカラム交換を行ったにもかかわらず、有意な保持時間変動は認められなかった (図 2-11b)。これらの結果から、本システムは 720 または 1,000 SPD のスループットを安定して達成可能であり、長期連続測定においても高い再現性および頑健性を有することが示された。キャリーオーバーについては、ベースピークロマトグラム (BPC) を用いて評価したところ、HeLa 測定と比較してブランクの強度は著しく低く、キャリーオーバーが極めて低いことが確認された (図 2-11c)。

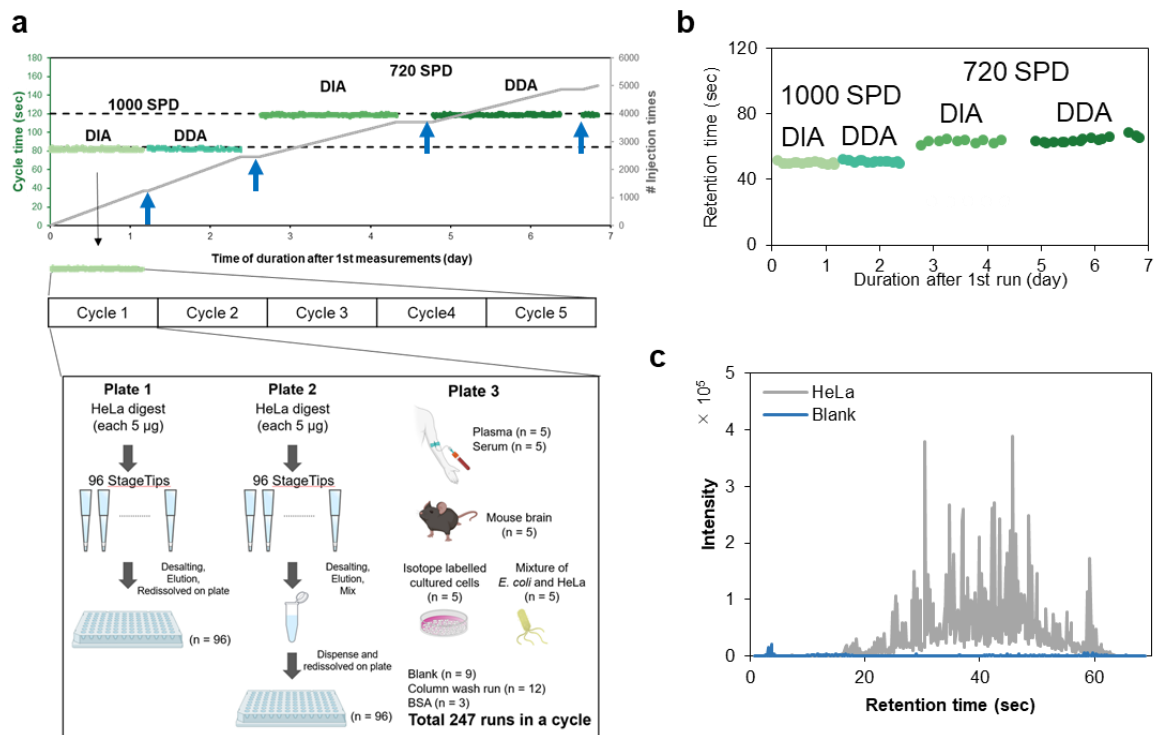


図 2-11 1 週間連続測定による本システムの頑健性評価 (1)

a 1 週間連続 LC/MS/MS における使用サンプルの内容と測定順序。 **b** 1 週間の連続測定における実際のサイクルタイムとサンプル注入回数を示した組み合わせグラフ。横軸は初回測定後の経過時間を、左縦軸はサイクルタイムを、右縦軸は注入回数をそれぞれ示す。 (c) HeLa 測定と Blank 測定の重ね合わせ BPC。

続いて、プレート 1 および 2 の 1,000 SPD・DDA 条件の結果を比較したところ、プレート 2 における同定ペプチド数およびタンパク質数はそれぞれ $1,540 \pm 85$ および 410 ± 24 であった (図 2-12a, b)。これに対し、プレート 1 ではそれぞれ $1,616 \pm 83$ および 429 ± 23 であり、両者間に有意な差は認められなかった (図 2-12a, b)。プレート 2 では均一サンプルが 96 ウェルに分注されているため、注入および測定に起因するばらつきが主な要因であるのに対し、プレート 1 では StageTip 脱塩工程に由来するばらつきが加わると考えられる。しかし、実際には両者のばらつきに差はなく、StageTip 脱塩工程に起因する変動は非常に小さいことが示唆された。さらに、日内再現性を評価するため、1,000 SPD・DDA 条件の第 2 サイクル (192 測定) に着目して解析を行った。保持時間の変動は概ね小さかったが、一部に異常値が認められ、Grubbs 検定により外れ値と判定された (図 2-12c)。これらの結果から、本システムは 1 週間の連続測定を可能とし、測定間の再現性も高いことが確認された。次に、DIA と DDA におけるペプチドおよびタンパク質定量の再現性を比較した。プレート 1 および 2 の HeLa サンプルにおける第 2 サイクルのデータ ($n = 192$) を用い、192 測定中 135 回以上 (70 %以上) 同定されたペプチドまたはタンパク質群を対象として RSD を算出した。DIA 定量は MS2 レベルで実施した。その結果、DDA および DIA の RSD の中央値はいずれも約 20% であり、取得方式による有意な差は認められなかった (図 2-12d, e)。一方で、同定数は DIA が DDA を大きく上回っていたため、超高速プロテオミクスには DIA がより適していると結論付けた。

以上より、本研究では 1 週間で 5,000 回以上の測定を完遂し、プロテオーム解析に十分な再現性を有することを示すとともに、720 SPD および 1,000 SPD システムが長期連続測定において実用可能であることを実証した。

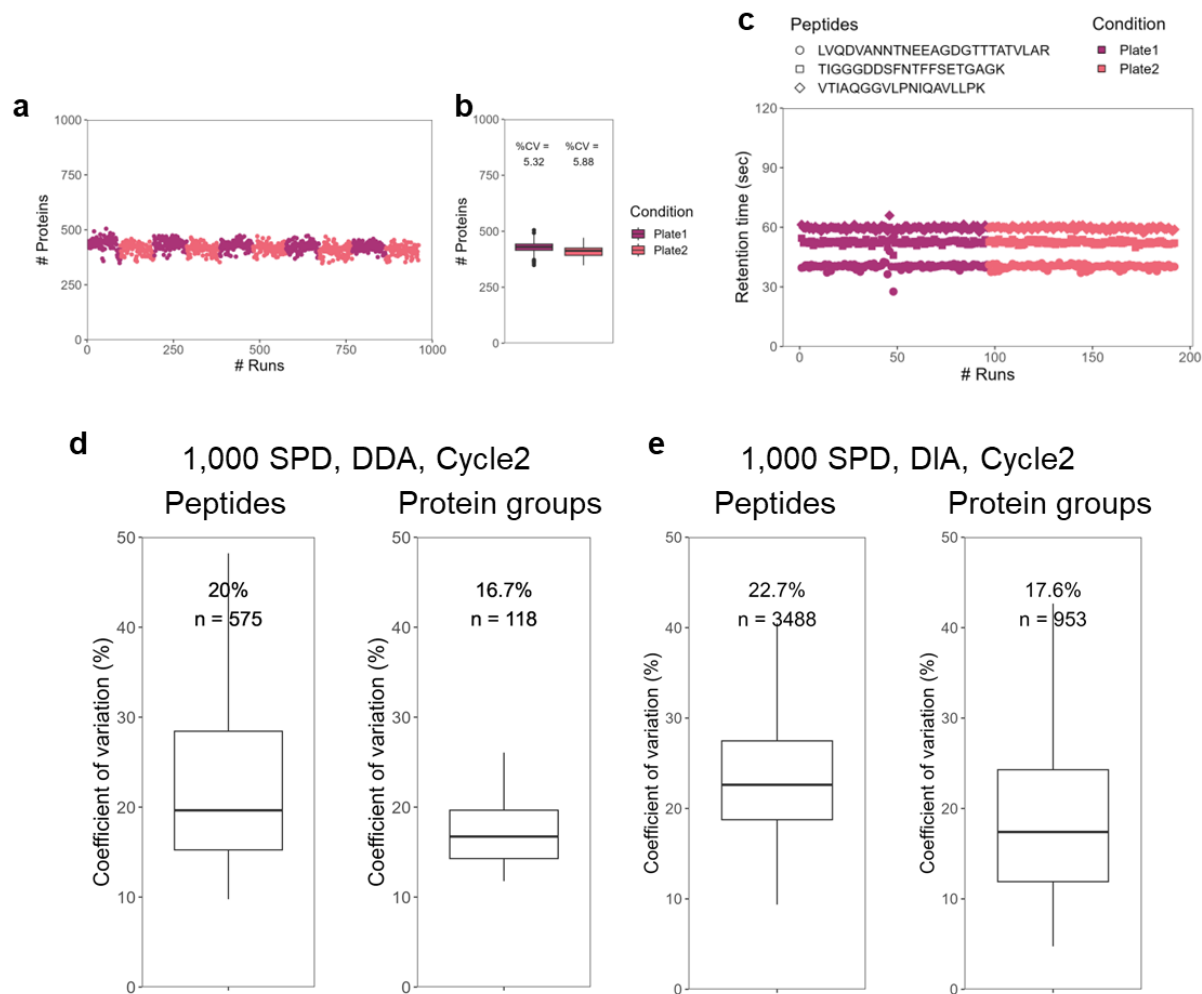


図 2-12 1 週間連続測定による本システムの頑健性評価 (2)

(a), (b) プレート 1 および 2 のサンプルを 1,000 SPD 法で測定した際の、各ランにおける同定タンパク質数 (DIA により 5 サイクル取得)。(b) 各プレートにおけるタンパク質同定数の再現性。変動係数は同定されたタンパク質数を基に算出した。(c) ペプチドの保持時間の再現性。1,000 SPD, DDA の 2 サイクル目のデータを用いた。(d), (e) ペプチドまたはタンパク質の定量値の再現性。DDA (a), DIA (b) のデータを基に算出した。

第 1 1 節 マウス脳空間プロテオミクスへの応用

高感度およびハイスループットの両立が要求される応用例として、マウス脳の空間プロテオミクスにより本手法の有効性を検証した。1 枚のマウス脳切片から、レーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いて、1 辺約 440 μm の正方形領域を合計 96 区画切り出し、それぞれを 96 ウェルプレートの個別ウェルに回収した。各区画について、タンパク質抽出および消化を行い、0.8 分グラジエント条件の LC/MS/MS 法により測定を実施した (図 2-13a)。その結果、LMD 切片から切り出した 96 区画において、最大で 500 種以上のタンパク質が同定された (図 2-13b)。タンパク質同定数は HeLa 細胞を用いたベンチマーク結果と比較して少なかったが、これはサンプル前処理過程における損失に加え、マウス脳において発現しているタンパク質数が限られていることに起因すると考えられる。

次に、同定されたタンパク質由来ペプチドの空間分布を解析したところ、オリゴデンドロサイトのマーカータンパク質⁸²として知られる Mag、Cnp、Mog、Plp1、および Mbp 由来ペプチドは、マウス脳切片全体にわたって共通した特徴的な分布パターンを示した (図 2-13d,e)。これに対し、皮質マーカー⁸²である Actn1 および Stx1a 由来ペプチドは、皮質が存在する左上領域において他の領域より高い発現が確認され、オリゴデンドロサイトマーカーとは異なる空間的発現分布を示した (図 2-13i)。

以上の結果から、本手法は空間的なタンパク質発現パターンを高精度に定量可能であり、空間プロテオミクスへの応用が可能であることが示唆された。

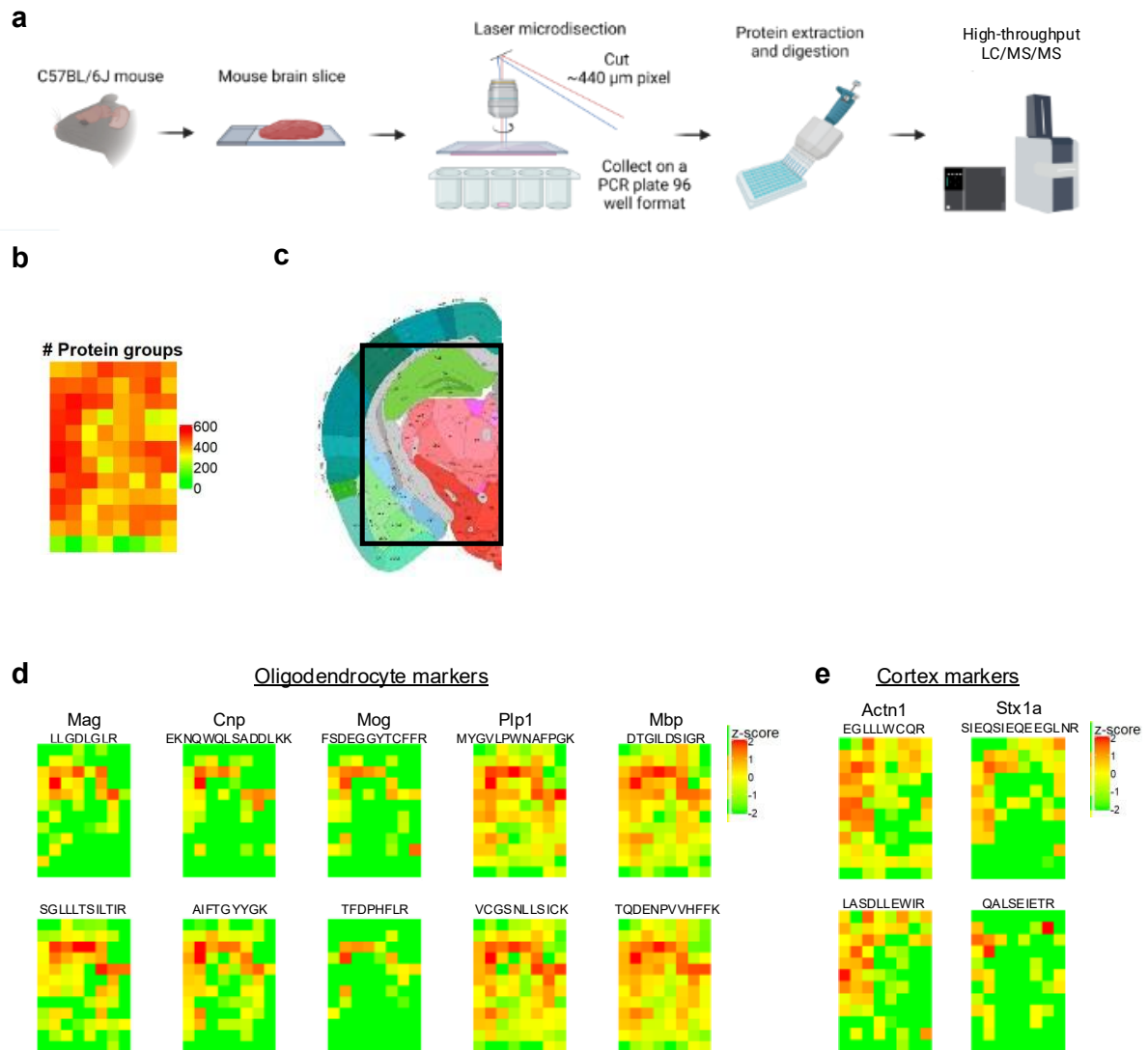


図 2-13 マウス脳の空間プロテオミクス

(a) 本実験のワークフロー。(b) 各断片におけるタンパク質同定数。(c) 本実験にて用いたマウス脳部位。なお、本データは <https://mouse.brain-map.org/static/atlas> のものを一部改変した。(d) オリゴデンドロサイトマーカー、(e) Cortex マーカーとされるタンパク質由来のペプチド定量値の空間分布。

第12節 内因性血清ペプチドの同定・定量への応用

続いて、本手法の臨床応用例として、COVID-19 患者のヒト血清を用いた内因性ペプチドの同定・定量を試みた。ヒト血清中には、炎症や組織障害に伴うプロテアーゼ活性を反映した多様な内因性ペプチドが存在しており、これらは疾患バイオマーカーとしての応用が期待されている。そのため、生体サンプル内に存在するペプチドを直接網羅的に解析するペプチドミクスは、他のオミクス解析と同様にバイオマーカー探索に有用である⁸³。本実験では、健常人と COVID-19 患者間のペプチドームの変化、ならびに α 1-antitrypsin (A1AT) 由来ペプチドに着目した。A1AT は炎症応答やプロテアーゼ制御に関与する血清タンパク質であり、COVID-19 を含む感染症において感染予防をする働きを持つことが報告されており⁸⁴、この感染症において A1AT の発現を定量することは重要であると考えられる。A1AT の C 末端由来ペプチドは敗血症によって発現が増加する⁸⁵ ほか、これらのペプチドそれぞれが感染において重要な役割を果たす⁸⁵ ことが報告されている一方で、COVID-19 との関連については明らかとなっていない。そこで本研究では、A1AT の C 末端由来ペプチドである C-36、CAAP48、SPAAT の 3 配列と COVID-19 の関連性に着目した。

実験では、ACN によるタンパク質沈殿を行い、その上清を用いてペプチドーム解析を行った。その結果、サンプル毎の同定数のばらつきは見られたものの、合計で 382 ペプチドが同定された。また、健常人と COVID-19 患者間の同定数のオーバーラップより、COVID-19 患者サンプルについてより多くのペプチドが同定されることが分かった (図 2-14)。一因として、炎症応答によりプロテアーゼ活性が変化し、プロテオリシスが活性化し、それを反映したものと考えられる。

また、A1AT の C 末端ペプチドの定量結果より、いずれの配列においても、COVID-19 患者血清中では健常者と比較してペプチド濃度が高い傾向が認められた (図 2-15)。C-36 ペプチドについては発現量の明確な上昇は認められなかった一方で、CAAP48 および SPAAT ペプチドでは発現量の上昇が認められた。既報の敗血症患者と健常人との比較では、C-36 および CAAP48 において有意な発現上昇が報告されている一方、SPAAT では有意差が認められていない⁸⁵。これらの結果から、A1AT を基質とするプロテアーゼ活性は、感染症の種類や病態に応じて異なる応答を示す可能性が示唆された。

これらの結果より、本手法がヒト血清中のプロテオリシス由来ペプチドを安定的に定量可能であることが示されたとともに、COVID-19 における病態関連ペプチドの解析への応用可能性が示唆された。

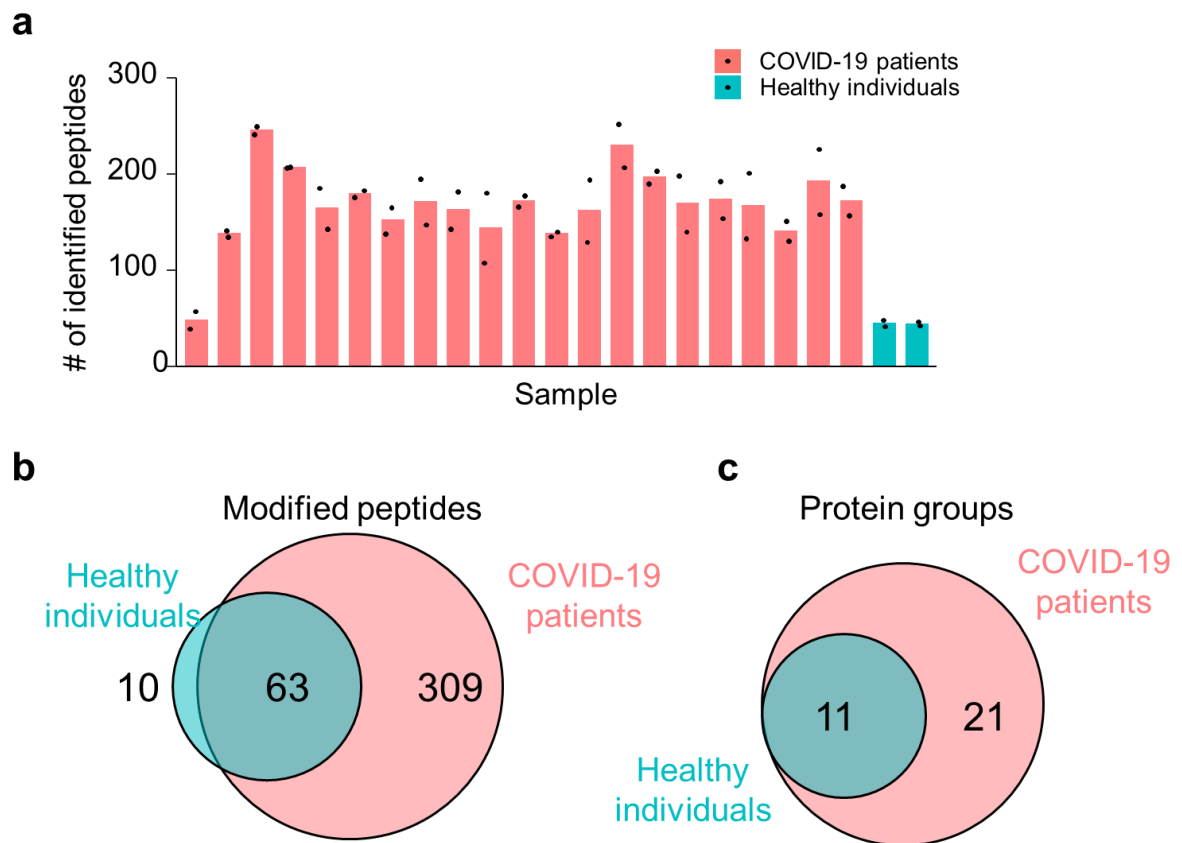


図 2-14 ヒト血清サンプルを用いたペプチドミクスへの応用

(a) 各サンプルのペプチド同定数。(b) (c) 健常人と COVID-19 患者サンプル間でのペプチド (b) またはタンパク質 (c) の同定オーバーラップ

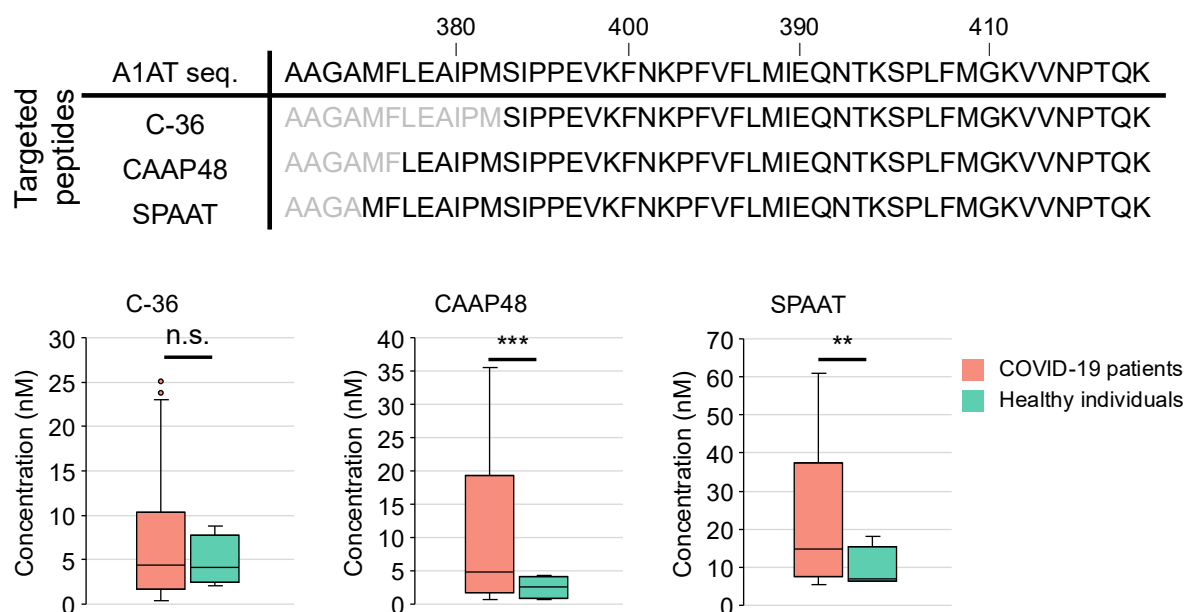


図 2-15 ヒト血清サンプルを用いた内因性ペプチド定量への応用

α 1-antitrypsin の C 末端由来ペプチド 3 配列について定量解析を実施し、COVID-19 患者血清 (赤, $n = 21$) と健常人血清 (緑, $n = 2$) を比較した。また、各サンプルについて 2 回の繰り返し LC/MS/MS 測定を行った。各ボックスプロットは血中ペプチド濃度の分布を示しており、中央線は中央値、箱は四分位範囲、ひげは最小値および最大値を示す。P 値は Welch の t 検定によって算出した。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, n.s. 有意差なし。

第13節 カラム体積の微小化によるさらなるハイスループット化

これまでに、100 μm 内径、15 cm 長のモノリス型シリカカラムを使用してメソッドの最適化を行ってきたが、内径を 75 μm へ小さくすることで、カラム体積を小さくし、さらなるハイスループット化が可能ではないかと考えた。

そこで、これまでに開発した 720 SPD のシステム (7 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、1 min グラジエント) に対して、75 または 100 μm 内径、15 cm 長のモノリス型シリカカラムに適用した。その結果、ペプチドおよびタンパク質同定数について 75 μm 内径のカラムを用いた場合にやや増加する傾向が見られた (図 2-16a, b)。また、2 条件にて共通で同定されたペプチドピークの半値幅を算出したところ、75 μm 内径の条件はより半値幅が短い傾向にあり (図 2-16c)、ピークキャパシティは 100 μm 内径カラムの条件では 31.9、75 μm 内径カラムの条件では 32.4 であり、75 μm 内径の条件ではより分離が良い傾向にあった。プロテオームサンプルのように複雑なサンプルに対して、限られたピークキャパシティの条件にて分析を行う場合には、このピークキャパシティの差の寄与が大きくなり、同定数の差に表れたと考えられる。

続いて、得られたクロマトグラムを元に、1,000 SPD のシステム (10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、0.8 min グラジエント) に 75 μm 内径のモノリス型シリカカラムを適用した場合に、総測定時間がどの程度短縮可能であるか概算した。カラム内径を 100 μm から 75 μm へと変更した場合、カラム体積は 1.1 μL から 0.60 μL となると計算された。そのため、全体の流路体積は 2.2 μL となり、10 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で送液する場合、カラムローディング時間が 0.22 分 = 13 秒、平衡化時間が 0.18 分 = 11 秒となり、グラジエント時間を 0.8 分 = 48 秒とすると、総測定時間 1.2 分 = 72 秒 = 1,200 SPD のシステムを開発できるのではないかと考えた。実際に、この LC プログラムを 75 μm 内径のカラムに適用したところ、保持時間の再現性が $R^2 = 0.9953$ と良好な結果が得られた (図 2-16d, e)。また、1,000SPD システム (100 μm 内径のモノリス型シリカカラム) を用いた場合と比較した場合、タンパク質同定数は同等であった (図 2-16f)。以上より、カラム体積を小さくすることで、さらなるハイスループット化が実現できることが示された。

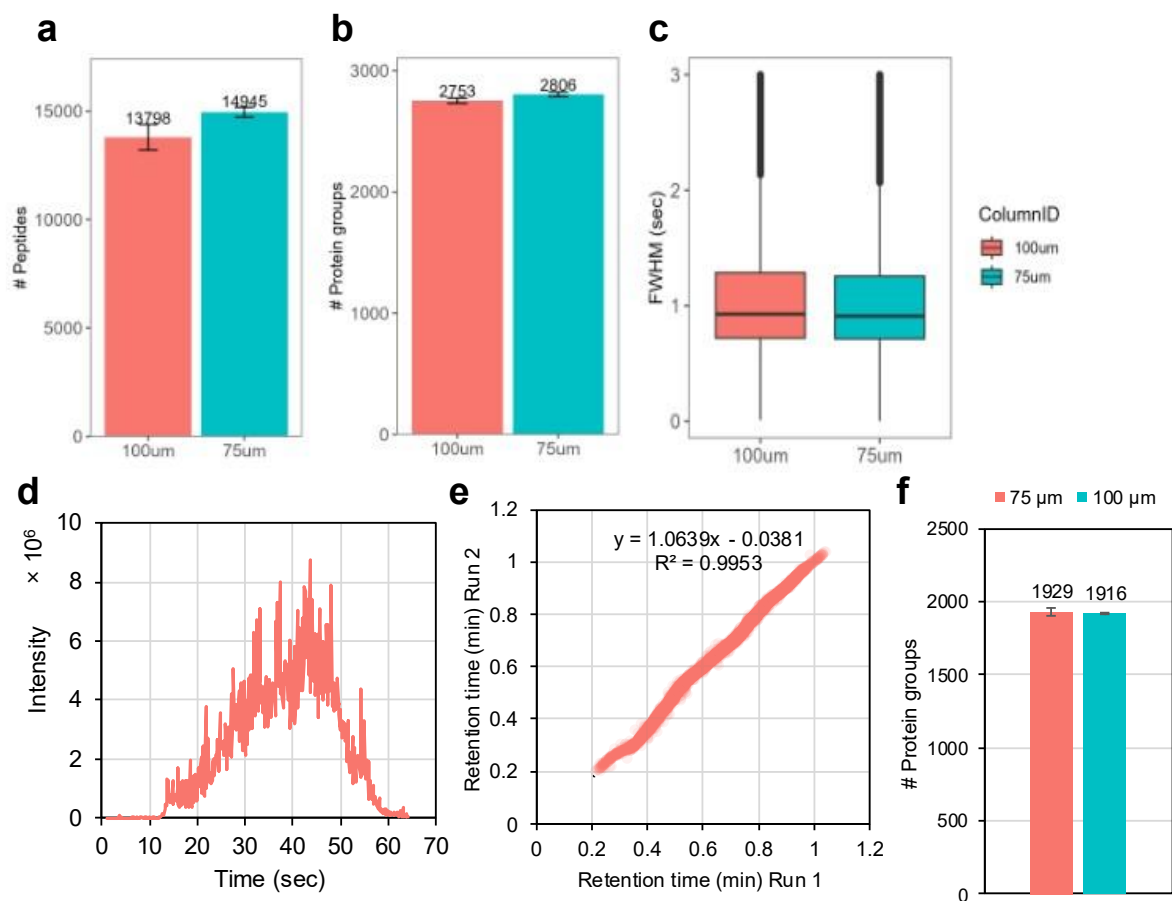


図 2-16 75 μm 内径カラムを用いたさらなるハイスループット化の検討

(a) 同定されたペプチド数、(b) 同定タンパク質数、(c) 2 条件において共通で同定されたペプチドピークの半値全幅 (FWHM) の分布。(d) 10 μL/min, 0.8 min グラジエントの条件を 75 μm 内径、15 cm 長のモノリス型シリカカラムに適用した場合の代表的な MS2 の TIC 例。(e) 連続測定時における保持時間の再現性。(f) 10 μL/min, 0.8 min グラジエントの条件下にて 75 μm 内径または 100 μm 内径のモノリス型シリカカラムを比較した際のタンパク質同定数。すべての測定において、注入サンプル量は 100 ng とした。

第 1 4 節 カラム体積の微小化による高感度分析における

ハイスループット化

ここまでの検討結果を基にし、シングルセルレベルの高感度な分析のハイスループット化も可能ではないかと考えた。シングルセル解析において、細胞間の異質性を検出するには、サンプル数を増加させる必要があり、分析のハイスループット化が強く求められている。一方で、極微量サンプルを対象とするシングルセル解析では超高感度な分析が不可欠であり、その実現にはナノ流速条件での分離・検出が前提となる。現在広く用いられている手法では、内径 75 μm 、15 cm 長の粒子充填型カラムを用い、流速はおおよそ 200 nL/min 程度で運用されている⁸⁶が、この条件ではローディング時間や平衡化時間に要する時間がボトルネックとなり、スループット向上に限界がある。そこで、従来の充填型カラムを内径のより細いモノリスカラムに置き換えることで、カラム体積の低減に伴う平衡化時間およびローディング時間の短縮が可能となり、結果としてシングルセル解析におけるハイスループット化が実現できるのではないかと考えた。そこで、従来法のカラムとして 75 μm 内径の粒子充填型カラムに加え、50 μm 内径の粒子充填型カラム、30 μm および 50 μm 内径のモノリス型シリカ型カラムを用意した。加えて、流速を高くすることでスループット高められ、反対に、流速を低くすることで高感度化が実現できることから、流速を従来法の 200 nL/min に加えて 125, 280 nL/min の 3 条件にて検討を行った(図 2-17)。また、サンプル注入量は 5 ng (= 20~40 細胞相当) とした。なお、カラム内径が異なる条件間では、同一の流速であってもカラム内の線流速は大きく異なる(表 2-3)。一般に、LC における分離効率には流速ではなく線流速によって支配されることが知られている。したがって、本検討では、線流速の観点からも分離挙動について評価を行った。

まず、75 μm 内径の粒子充填型カラムについて、流速を高くすることで、同定数が増加する傾向が見られた(図 2-17a-c)。また、LC ピークの半値幅についても、流速を高くすることで細くなる傾向が見られた(図 2-17d)。プリカーサーイオンのピークエリアについては、流速が高くなるにつれて小さくなる傾向が見られ、ESI 効率の低下による影響があったと考えられた(図 2-17e)。また、ペプチドの溶出が完了する時間は、ペプチドの溶出プロファイルより、125 nL/min では 27 分、200 nL/min では 22 分、280 nL/min では 19 分であり、流速を高くすることでスループットを高くすることができる可能性が示された。さらに、本測定結果およびこれまでの知見に基づき、75 μm 内径の粒子充填型カラム(200 nL/min 条件)について、理論的に必要な総測定時間を算出した。カラム平衡化には、カラム体積の 3 倍量の

溶媒が必要であると仮定し、 t_0 に対して3倍の時間を平衡化時間とすると、9分と算出された。したがって、実測されたペプチド溶出完了時間（22分）に平衡化時間を加えると、理論的に必要な総測定時間は31分（= 46 SPD）となった。

続いて、50 μm 内径 のモノリス型シリカカラムでは、検討した流速範囲において同定数およびピーク半値幅について明確な流速依存性が見られなかった。この結果は、本検討で設定した線流速の範囲が、当該モノリスカラムにおける分離効率の最適領域付近に位置していた可能性を示唆している。また、同定数については75 μm 内径 の粒子充填型カラムよりも多いという結果になった。この理由として、75 μm 内径 の粒子充填型カラムを用いた場合のペプチドの溶出プロファイルを確認したところ、カラム洗浄のため%Bを上昇した際にペプチドが一度に多く溶出している傾向が見られ、このことによって同定数の減少が起きたと考えられる。また、ペプチドの溶出が完了する時間は、280 nL/min では18分であり、カラム内径の微小化に伴いペプチド溶出が完了する時間が、75 μm 内径 の粒子充填型カラムよりも短くなることが確認された。また、50 μm 内径 のモノリス型シリカカラム（280 nL/min 条件）についても同様に平衡化時間を算出したところ、カラム平衡化にはカラム体積の約3倍量の溶媒が必要であると仮定すると、 t_0 の3倍に相当する3分を要すると見積もられた。したがって、実測されたペプチド溶出完了時間（18分）に平衡化時間を加えると、理論的に必要な総測定時間は21分（= 69 SPD）にまで短縮可能であることが示唆された。

次に、50 μm 内径 の粒子充填型カラムでは、同定数が上記2つのカラムよりも少ない結果となった(図 2-17a-c)。一因として、50 μm 内径 の粒子充填型カラムでは、サンプルローディング時にMSでのIntensityが高くなる傾向があったため、カラムのローディングキャパシティが不足しており、一部のペプチドが保持されなかった可能性が考えられた。

最後に、30 μm 内径 のモノリス型シリカカラムでは、半値幅が太く、また同定数も少ない傾向が見られた(図 2-17a-d)。この理由として、線流速がアイソクラティック分離条件で最適と言われる1 mm/secの条件よりも高く、分離効率の低下が起きてしまったと考えられる。また、カラム作製技術の限界などが考えられた。

以上より、50 μm 内径 のモノリス型シリカカラムで280 nL/minで分析した場合、広く用いられる75 μm 内径 の粒子充填型カラムで200 nL/minで分析したコントロール条件と比較して同等の同定数ならびに感度を維持しつつ、ペプチド溶出の完了まで22分から18分へ短縮することができ、また総測定時間の試算結果から1日に測定可能なサンプル数を1.5倍に増加させることが可能であることが示唆された。

表 2-3 本実験で使用した各カラム内径および流速における線流速 (mm/s)

カラム内径 (μm)		30	50	75
流速 (nL/min)	125	2.95	1.06	0.47
	200	4.72	1.70	0.75
	280	6.60	2.38	1.06

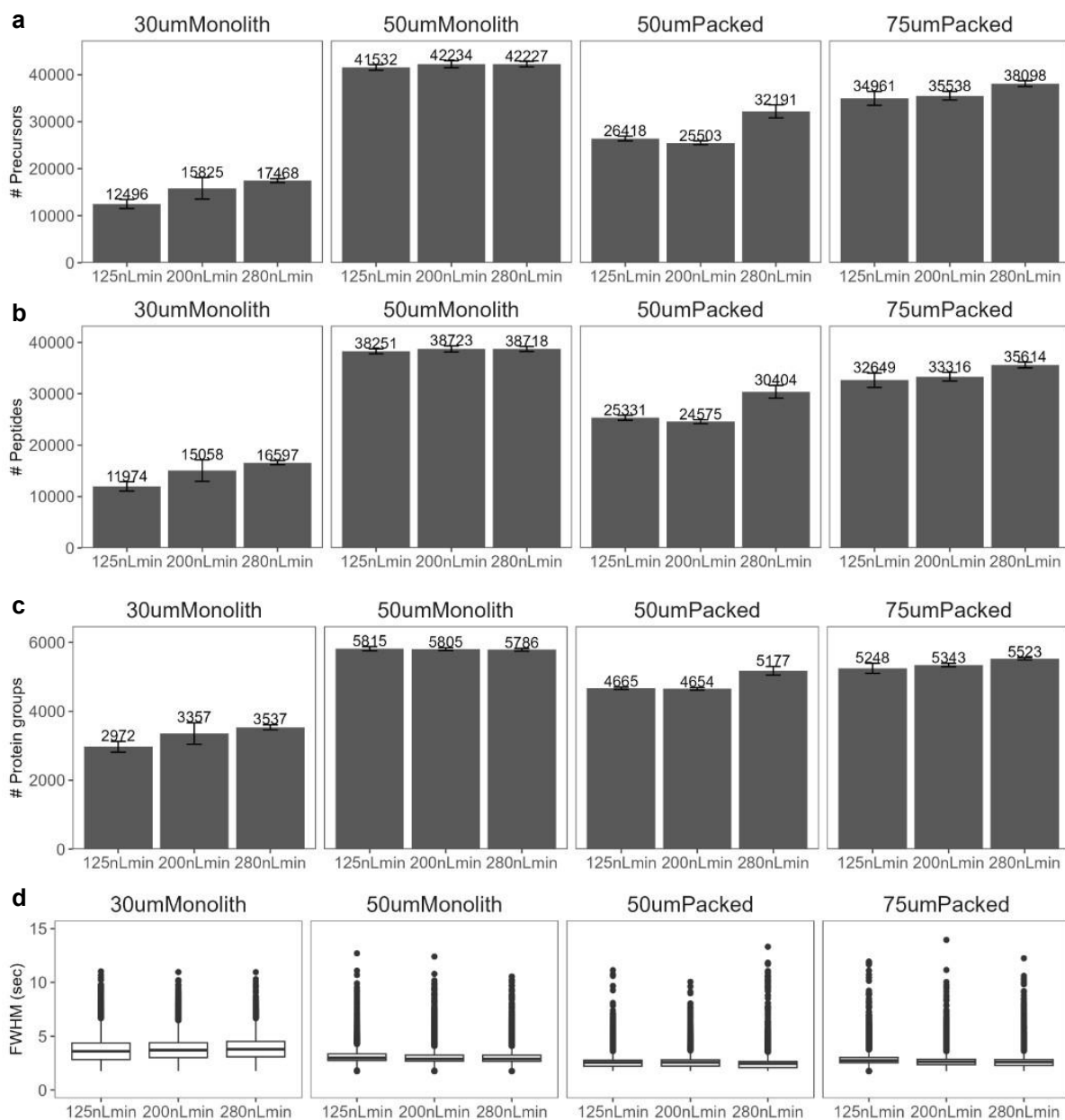


図 2-17 高感度分析のためのハイスループット化に関する検討

内径 30 μm および 50 μm のモノリスカラム、ならびに内径 50 μm および 75 μm の充填型カラムを用い、流速 125、200、280 nL/min における分析性能を比較した。(a) 同定されたプリカーサー数、(b) ペプチド数、(c) タンパク質数。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を表す。(d) 各条件における LC ピークの半値幅の分布。30umMonolith: 30 μm 内径のモノリス型シリカカラム、50umMonolith: 50 μm 内径のモノリス型シリカカラム、50umPacked: 50 μm 内径の粒子充填型カラム、75umPacked: 75 μm 内径の粒子充填型カラム。カラム長はすべて 15 cm とした。

第 15 節 結語

本研究では、感度および解析深度を犠牲にすることなく、これまでに報告された中で最速のプロテオーム測定を実現する超高速プロテオーム計測技術を確立した。

本研究では、広い流速範囲にわたって ESI 効率を系統的に評価し、流速とイオン化効率の関係を定量的に明らかにした。さらに、流速増加に伴う感度低下は、グラジエント時間の短縮によって補償可能であることを示した。これらの知見を基盤として、マイクロ流速 LC/MS/MS を超えるスループットと、ナノ流速 LC/MS/MS に匹敵する感度を同時に達成することに成功した。本手法は、市販装置を用いて構築されており、他研究室においても再現性高く導入可能である。特に、分析カラム、インジェクションバルブ、グラジエントミキサーを極力近接配置することで、オーバーヘッドタイムを最小化した点が重要である。また、本研究で用いたモノリス型シリカカラムは高い透過率と大きな空隙を有し、大容量かつ夾雑物の多い臨床サンプルに対しても高い頑健性が期待される。実際に、5,000 回の連続測定による頑健性評価の結果より、1つのカラムにつき約 1,000 回程度は詰まることなく測定できることが示された。さらに、保守時間を含めても、1週間で 5,000 サンプル以上の測定が現実的に可能であったことは、血液プロテオミクスを用いたバイオマーカー探索など、スループットの制約により解析サンプル数が限定されてきた分野において、重要な課題解決につながると期待される。

空間プロテオミクスへの応用として、マウス脳切片解析を行った結果、96 区画の測定を合計 2 時間 15 分で完了した。これは、Piehowski らによる 100 μm 角切片 1 区画あたり 3 時間以上を要する手法と比較して、測定時間を 100 分の 1 以下に短縮したことに相当する⁵¹。なお、本研究における空間分解能は約 400 μm と限定的であるが、サンプル調製法は一般的なバルクサンプル調製と同一であり、近年発展が著しい高感度サンプル調製技術、とりわけシングルセル解析技術⁸⁶⁻⁸⁹を導入することで、さらなる高分解能化が十分に期待される。

以上より、本研究で開発したハイスループットプロテオーム計測技術は、高速かつ高感度な包括的 LC/MS/MS 解析において大きな前進であると結論づけられる。流速最適化とイオン移動度分離を組み合わせることで、従来は両立困難であったスループット、感度、解析深度を同時に達成した本手法は、バイオマーカー探索や空間プロテオミクスをはじめとする多様なプロテオミクス研究分野において、複雑な生命現象の理解を加速する基盤技術となることが期待される。

実験の部

実験材料

細胞株

HeLa (S3) 細胞は、JCRB Cell Bank (大阪) より入手した。

ヒト血清

第 1 2 節での研究について、臨床サンプルの受入および解析に当たり、京都大学大学院医学研究科・医学部および医学部附属病院 医の倫理委員会より審査を受け（第 R3418 号）、承認を得た上で行われた。

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、リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C)、酢酸、トリフルオロ酢酸 (TFA)、アセトニトリル (ACN)、酢酸 (AA)、メタノール、1 級ウシ血清アルブミン (BSA)、水酸化アンモニウム、トリエチルアミン (TEA) 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。N-ドデシル β -D-マルトシド (DDM) は、同仁化学研究所 (熊本) 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。ヒト血清および血漿は Merck (Madison, WI, 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。MonoCap C18 High Resolution 2000 (100 μ m i.d., 2000 mm L)、Empore SDB-XC、Empore C8 ディスク、多孔性酸化チタン (TiO₂) 粒子 (TitansphereTiO、10 μ m) はジーエルサイエンスから購入した。水は、Millipore Milli-Q system (Bedford, MA, USA) で精製した。

マウス脳の調製

動物実験手順は理化学研究所横浜動物実験審査委員会により承認を得、その指針を遵守して行った。C57BL/6J 系統雄マウスは日本クレア (東京、日本) より購入した。

動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し、飼料と水は自由に与えた。生後 8 週齢の C57BL/6J 系統雄マウスから脳を新鮮に摘出し、液体窒素で急速凍結した。その後、ライカ CM3050 S クライオスタットを用いて 10 μm 厚の冠状断面切片を作製し、DIRECTOR™スライド (AMR、東京、日本) に静置した。

レーザーマイクロダイセクション

レーザーマイクロダイセクションおよびサンプル採取は、ライカ LMD7 システム (ライカマイクロシステムズ社) を用いて実施した。マウス脳凍結切片 (冠状断面) を、自動検出モードソフトウェアモジュールにより 2.5 倍対物レンズ下で 96 ピクセル (1 ピクセルあたり 191,014 μm の領域) に分割した。組織切片は UV レーザーで切断され、サンプルは重力により、PTS バッファー (10 mM SDC、10 mM SLS、100 mM Tris-HCl (pH 9)) を含む 96 ウェルプレートに滴下収集された。

ペプチド抽出

第 1 2 節について、ヒト血清サンプル 10 μL に対し、ACN 20 μL を氷冷下にて添加した後、4 ° C にて 30 分間インキュベーションした。その後、4 ° C 下にて 3,000 g $\times$ 10 分間の遠心処理を行い、タンパク質を沈殿させた。その後、上清を抽出し、SpeedVac にて減圧乾固した後、4% ACN, 0.5 % TFA, 0.02 % DDM に再溶解し、LC/MS/MS 分析を行った。

タンパク質抽出

各サンプルから、相間移動可溶化法 (PTS 法) による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緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 9.0 中の 12 mM SDC、12 mM SLS) 中に懸濁し、95 ° 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。その後、サンプルを 50 mM 重炭酸アンモニウムで 5 倍に希釈し、トリプシン [酵素 : 基質 = 1 : 100 (w/w)] を添加し 37 ° C で一晩インキュベートした。消化後、等量の酢酸エチルを加え、TFA で溶液を酸性にした。2 分間振とうした後、15,800 $\times$ g で 2 分間遠心分離し、水相と有機相を完全に分離し、有機相を除いた。水相を減圧遠心濃縮機により乾固させ、0.5% TFA に再溶解後、SDB-XC StageTips^{75,76} を使用して脱塩した。

リン酸化ペプチドの濃縮とジメチル標識による pY ペプチドを用いた定量的直線性の評価

HeLa 細胞タンパク質抽出物から、TiO₂ 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を濃縮し、0.5 % ピペリジンで溶出した⁹⁰。濃縮サンプルは SDB-XC StageTips^{75,76} を用いて脱塩し、キャピラリー流速 LC/MS/MS により分析した。

安定同位体ジメチル標識は、以前報告された方法に従って実施した⁷⁷。HeLa 細胞リン酸化ペプチドまたは合成リン酸化ペプチドを 1000 µL の 100 mM TEAB に溶解した。次に、40 µL の 4 % CD₂O (Isotec) (HeLa 細胞リン酸化ペプチド) または CH₂O (Sigma) (合成ペプチド) を混合し、40 µL の 0.6 M シアン化ホウ素ナトリウムを添加した。混合物を室温で 60 分間インキュベーションした。その後、1 % 水酸化アンモニウム 160 µL を添加して反応を停止し、10 % TFA 620 µL と混合した。標識されたペプチドは、SDB-XC StageTip を用いて脱塩した。標識後、HeLa 細胞由来のリン酸化ペプチドに合成ペプチドを添加した (HeLa 細胞消化物 50 µg あたり 10、25、50、75、100、150 fmol)。

A1AT C 末端ペプチドの定量

C-36、CAAP48、SPAAT の合成ペプチドについて、それぞれ 10、20、50、100、200 nM の濃度にて 1,000 SPD LC/MS/MS 分析を行い、検量線を作成した。得られた検量線をもとに、血中の A1AT ペプチドを定量した。定量には Skyline⁹¹ を用い、フラグメントイオンレベルでの定量を行った。

オフライン高 pH-RPLC ペプチド分画

720 SPD メソッド用のスペクトルライブラリー作成のために、LC-30AD システム (島津製作所) を使用し、L-column3 C18 (化学物質評価研究機構, 150 mm × 2.1 mm, 3 µm) と 200 µL/min の流速でペプチドを分画した。移動相 A は 0.1% トリエチルアミン (TEA)、移動相 B は 0.1% TEA、80% ACN とした。HeLa 消化物 (200 µg) を、65 分間で 2-35% B の線形グラジエントにより分離した。分画は 96 ウェルディーププレートに 1.33 分間隔で回収した。1,000 SPD 用のスペクトルライブラリー作成のため、島津 Nexera Mikros ポンプと nanoEase™ M/Z Peptide (300 µm × 100 mm, BEH C18, 130 Å 1.7 µm, Waters) カラムを用い、3 µL/min の流速でペプチドを分画した。移動相 A は 0.1% TEA、移動相 B は 0.1% TEA、80% ACN とした。各サン

プル (HeLa 細胞、大腸菌、SILAC 標識 HeLa 細胞、マウス脳) のトリプシン消化物 50 µg を、65 分の 2~35 % B のリニアグラジエントで分離した。分画は 1.33 分ごとに 96 ウェルプレートに回収した。

回収した 48 分画は、分画 13 を分画 1 に、分画 14 を分画 2 となるように順次加えることで 12 分画に連結した。得られた分画は SpeedVac で乾燥後、4% ACN、0.5% TFA に再溶解し、キャピラリー流速 RPLC/MS/MS で測定した。

ダイレクトインフュージョン質量分析

ダイレクトインフュージョン分析は、エレクトロスプレーイオン源 (Bruker) を備えた timsTOF Pro 2 質量分析計 (Bruker) にシリジポンプ 11 Elite (Harvard Apparatus) を接続し実施した。ESI 源のパラメーターは以下の通りに設定した：キャピラリー電圧 4000 V、ネブライザーガス 2.0 bar、ドライガス 3.0 L/min、温度 240 ° C。3 つの合成ペプチドは、10% ACN、0.5% AA に溶解した。

ナノ流速 RPLC/MS/MS

ナノ流速 RPLC/IMS/MS/MS 測定は、液体クロマトグラフに Ultimate3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific)、オートサンプラーに HTC-PAL xt (CTC Analytics)、質量分析計に timsTOF Pro または timsTOF Pro 2 (Bruker) を用いて行った。分析カラムには、C18 修飾シリカ粒子 (1.9 µm ReproSil-Pur 120 C18-AQ (Dr. Mainsch)) をフューズドシリカキャピラリー (100 µm i.d., 150 mm L, (GL Sciences)) に充填した自家製カラムを用いた。移動相には、(A) 0.5 % 酢酸 (AA)、(B) 0.5 % AA、80 % ACN を使用した。サンプルを 0.5 % TFA、4 % ACN で再溶解し、5 µL 注入した。流速は 0.5 µL/min とし、5 分間かけて 5 – 10 % B の線形グラジエントを適用した後、60 分の 10 – 40 % B の線形グラジエントを適用した。その後、カラムを 99 % B で 10 分間洗浄し、5% B で 30 分間平衡化した。

TIMS 部は、ランプタイム 100 ms、スキャンレンジ 0.7-1.4 Vs 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 2 または 3 *m/z* に設定した。

キャピラリー流速 RPLC/MS/MS

キャピラリー流速 RPLC/IMS/MS/MS 測定では、液体クロマトグラフに Nexera

Mikros (島津製作所)、オートサンプラーに HTC-PAL xt (CTC Analytics)、質量分析計に timsTOF Pro、timsTOF Pro 2、または timsTOF HT にナノ ESI イオン源 (CaptiveSpray) (Bruker) を接続して行った。

すべての接続について、フューズドシリカキャピラリー (GL Sciences) あるいは nanoViper (ThermoFisher Scientific) を用いた。ポンプのアウトレットには内径 50 μm のフューズドシリカキャピラリーを用いて、P-875 T 字コネクタ、または M-540 ミキサー (IDEX Health & Science) に接続し、移動相の混合を行った。ミキサーから注入バルブには、内径 50 μm 、150 mm 長のフューズドシリカキャピラリーを用いて接続した。サンプルループには、自家製サンプルループ (100 μm ID $\times$ 127 mm capillary, 1 μL)、または nanoViper (ThermoFisher Scientific, 1 μL) を用いた。注入バルブからカラム間の接続には、内径 50 μm 、150 mm 長のフューズドシリカキャピラリーを用いた。ペプチドの分離は、MonoCap C18 High Resolution 2000 (100 μm 内径, 150 mm 長)を用いた。移動相には、(A) 0.5 %酢酸 (AA)、(B) 0.5 % AA、80 % ACN を使用した。720 SPD メソッドでは、B 5 %から B 40 %の 1 分グラジエント分析を行った後、5 %B で 1 分間平衡化した。1,000 SPD メソッドでは、B 5 %から B 40 %の 0.8 分グラジエント分析を行った後、5 %B で 0.6 分間平衡化した。65 分グラジエント、10 $\mu\text{L}/\text{min}$ の測定では、5 分間かけて 5 – 10 % B の線形グラジエントを適用した後、60 分の 10 – 40 % B の線形グラジエントを適用した。その後、カラムを 99 % B で 10 分間洗浄し、5 % B で 30 分間平衡化した。第 1 3 節の実験では、75 μm 内径, 150 mm 長のモノリス型シリカカラムを用いた。移動相条件は同上であり、B 5 %から B 40 %の 0.8 分グラジエント分析を行った後、5 %B で 0.35 分間平衡化した。第 1 4 節では、30 or 50 μm 内径, 150 mm 長のモノリス型シリカカラムまたは、自家製のスプレー一体型カラム (50 or 75 μm 内径, 150 mm 長, 1.9 μm ReproSil-Pur 120 C18-AQ (Dr. Mainsch)) を使用した。グラジエントプログラムは次の通りに設定した : 5-40 % B in 10 min, 40-99 % B in 2 min, 99 % B in 10 min, 5 % B in 13 min。流速は、125, 200, 280 nL/min の 3 条件でそれぞれ分析を行った。

リン酸化ペプチドの直線性実験では MS1 モードで質量スペクトルを取得した。第 4 節では DDA モードを、第 7 節、第 9 節、第 1 1 節、第 1 2 節、第 1 3 節、および、第 1 4 節では DIA モードを採用した。

MS1 モードでは、TIMS 部は、ランプタイム 100 ms、スキャンレンジ 0.7–1.4 Vs cm^{-2} で動作させた。1 サイクルは、1 回の 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。

DDA モードでは、TIMS 部は、ランプタイム 100 ms、スキャンレンジ 0.7–1.4 Vs cm⁻²で動作させた。1 サイクルは、1 回の MS スキャンと 3 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 2 または 3 m/z に設定した。

DIA モードでは、TIMS 部は、ランプタイム 100 ms、スキャンレンジ 0.7–1.4 Vs cm⁻²で動作させた。1 サイクルは、1 回の MS スキャンと 4 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。各分離幅は 36 m/z , 0.11 Vs cm⁻² に設定し、 m/z 400 – 1120, 1/ K_0 0.7–1.4 Vs cm⁻² の間にてスキニングした。

第 1 4 節での DIA 解析では、TIMS 部は、ランプタイム 100 ms、スキャンレンジ 0.6–1.5 Vs 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。各分離幅は 23.5 m/z , 0.15 Vs cm⁻² に設定し、 m/z 261.5 – 1366, 1/ K_0 0.6–1.5 Vs cm⁻² の間にてスキニングした。

スペクトルライブラリー作成

1 週間連続実験の diaPASEF 解析では、Spectranaut Pulsar (Biognosys, ver.17, Switerland) を用いてスペクトルライブラリーを生成した。すべての diaPASEF データは、まずデフォルト設定で検索され、システインのカルバミドメチル化を固定修飾として、メチオニンの酸化とタンパク質 N 末端アセチル化を可変修飾として設定した。PSM、ペプチド、タンパク質レベルで 1% FDR カットオフを設定した。フラグメントイオンは最小 m/z 300、最大 m/z 1800、前駆体あたり強度上位 6 フラグメントイオンを含み、3 アミノ酸残基未満のものは除外した。SILAC 解析では、標識設定を次のように 2 チャンネルに設定した：チャンネル 1 は無標識、チャンネル 2 は Arg10 と Lys8 に設定した。

データ解析

ダイレクトインフュージョン MS 分析では、合成ペプチドの MS シグナル強度を Bruker Compass DataAnalysis (ver. 6.0) を用いて定量した。流速とグラジエント時間の関係評価およびリン酸化ペプチド定量分析の基準直線性評価のため、ペプチド

は Skyline (バージョン 22.2.0.351) または DataAnalysis (バージョン 6.0) を用いて MS1 レベルで定量した。

第4節での ddaPASEF 分析について、LC/IMS/MS/MS 測定で取得された MS/MS スペクトルから、MaxQuant (ver. 1.6.10.43) による、UniProtKB/Swiss-Prot (2017/04) のヒトタンパク質アミノ酸配列データベースに対する自動データベース検索によりペプチドを同定した。それぞれ Lys と Arg の C 末端側における切断を設定し、2 回の切断ミスまで許容した。システインのカルバミドメチル化を固定修飾として、メチオニンの酸化とタンパク質 N 末端アセチル化を可変修飾として設定した。FDR は、PSM およびタンパク質レベルの両方で 0.01 に設定した。

次に、LC/IMS/MS/MS 測定で取得された MS/MS スペクトルから、MaxQuant による、UniProtKB/Swiss-Prot (2017/04) のヒトタンパク質アミノ酸配列データベースに対する自動データベース検索によりペプチドを同定した。それぞれ Lys と Arg の C 末端側における切断を設定し、2 回の切断ミスまで許容した。システインのカルバミドメチル化を固定修飾として、メチオニンの酸化とタンパク質 N 末端アセチル化を可変修飾として設定した。FDR は、PSM およびタンパク質レベルの両方で 0.01 に設定した。

DIA データについては、Spectronaut (ver. 17, Biognosys, Switzerland) を使用した。検索対象のタンパク質データベースには、UniProtKB/Swiss-Prot から取得したヒト (2017/04) またはマウス (2023/03) タンパク質アミノ酸配列データベースを用いて directDIA+モードにより検索を行った。酵素切断条件ならびに修飾条件は DDA データと同様に設定した。プリカーサーイオンおよびタンパク質 (run level)、タンパク質 (experiment level) の Q 値のカットオフ値はそれぞれ 0.01, 0.05, 0.01 に制御した。

第7節、第9節、第11節、第12節、および第13節での DIA データについては、Spectronaut (ver. 17 or 19, Biognosys, Switzerland) を使用した。検索対象のタンパク質データベースには、UniProtKB/Swiss-Prot から取得したヒト (2017/04) またはマウス (2023/03) タンパク質アミノ酸配列データベースを用いて directDIA+モードにより検索を行った。ヒト血清サンプルについては、UniProtKB/Swiss-Prot から取得する際に、“Serum”という用語フィルターを設けたデータベースを取得した。酵素切断条件ならびに修飾条件は DDA データと同様に設定した。プリカーサーイオンおよびタンパク質 (run level)、タンパク質 (experiment level) の Q 値のカットオフ値はそれぞれ 0.01, 0.05, 0.01 に制御した。第10節では、DDA および DIA 分析の両方を行い、詳細は以下の条件にて解析を進めた。

まず、DIA 解析については、上述の通りに作成したスペクトルライブラリーを用いてペプチドおよびタンパク質の同定・定量を Spectronaut (ver.17, Biognosys, Switzerland) の libraryDIA モードによって行った。検索パラメーターは記載が無い限りデフォルト設定を用いた。XIC RT 抽出および MS1・MS2 質量許容誤差はそれぞれ full、20ppm、20ppm に設定した。酵素切断条件ならびに修飾条件は DDA データと同様に設定した。プリカーサーイオンおよびタンパク質 (run level)、タンパク質 (experiment level) の Q 値のカットオフ値はそれぞれ 0.01、0.01、1 に設定した。

DDA 解析では、ProLuCID、DTASelect2、Census を用いて PaSER (2023, ver. 3.0, Bruker) によるペプチドおよびタンパク質の同定を行った。マスマスペクトルは、PaSER プラグインを介して、専用 LAN 接続により timsTOF の取得制御ソフトウェア (timsControl) から PaSER ワークステーションに直接ストリーミングされ、UniprotKB/Swiss-Prot タンパク質データベースに対して検索された。FASTA ファイルのダウンロード日時は以下の通りであった：ヒト：2020/07、大腸菌：2020/03、マウス：2022/08。プリカーサーイオンの質量許容誤差 20ppm、フラグメントイオン質量許容誤差 30ppm と設定した。酵素切断条件ならびに修飾条件は他の上記条件と同様に設定した。FDR はペプチドおよびタンパク質レベルで 1 %未満に設定した。第 14 節での DIA 解析では、DIA-NN⁹² (ver.2.1.0)を用いた。検索対象のタンパク質データベースには、UniProtKB/Swiss-Prot から取得したヒト (2024/01) タンパク質アミノ酸配列データベースを用いて library-free モードにより検索を行った。酵素切断条件ならびに修飾条件は DDA データと同様に設定した。ペプチド長の設定は 7-30 アミノ酸残基、プリカーサーイオンならびにフラグメントイオンの m/z の範囲は 100-1700 とした。プリカーサーイオンレベルの FDR は 1 % に設定した。

結論

本研究では、ショットガンプロテオミクスのためのモノリス型シリカカラムを用いた LC/MS/MS 計測技術の高性能化に取り組み、以下の知見を得た。

第 1 章では、長時間グラジエント液体クロマトグラフィーとイオン移動度分離を組み合わせることにより、ペプチド分離空間を多次元的に拡張し、それが及ぼす効果について検証した。ペプチド分離を最大化することにより、従来の LC/MS/MS 測定では共溶出により十分に検出できなかったペプチド群を分離できることを示し、最大で 265 万を越えるペプチド様ピークを検出することができた。一方で、ペプチドの分離場を最大化しても同定に至らないピークは数多く存在することが分かった。この原因として、MS/MS 取得時のフラグメンテーションの質や、検出されたピークのシグナル強度の低さ等が影響している可能性が考えられた。近年では、質量分析計におけるイオントランスミッションの改善^{93,94} やスキャンスピードの高速化^{29,81,93,95}、新たなマスアナライザー^{96,97} やフラグメンテーション法⁹⁸ の開発など、装置性能の高度化が進んでいる。これらの最先端質量分析計と本研究で用いた分離手法を組み合わせることで、未同定ピークの同定率向上が今後期待される。

第 2 章では、キャピラリー流速 LC/MS/MS を用いたハイスループットショットガンプロテオーム計測技術の開発を行った。本手法は、分析時間を大幅に短縮しつつも十分な感度および同定性能を維持できる点に特長があり、多検体解析を基軸とするコホート研究において有用であることを示した。さらに、多検体測定において重要となる測定の頑健性についても、5,000 回にわたる連続測定を通じて実証した。

これらの成果は、分離次元の拡張による網羅性の向上（第 1 章）と、測定効率の最適化によるスループットの向上（第 2 章）という、プロテオーム解析における二つの重要課題に対して相補的な解決策を提示するものである。本研究で提案した手法群は、目的に応じて使い分けることで、従来法では達成困難であった柔軟かつ高性能なプロテオーム解析を可能にすると考えられる。

今後は、これらの手法を生体サンプルや臨床サンプルへ応用することで、より複雑な生物学的現象の解明や、バイオマーカー探索などへの展開が期待される。また、本研究で示した分離および測定の高度化に関する概念は、プロテオミクスにとどまらず、メタボロミクス、薬物血中濃度測定、食品・環境分析など、LC/MS/MS を基盤とする他分野での分析性能向上へも拡張されることが可能である。

参考文献

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–945 (2004).
2. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
3. Deamer, D., Akeson, M. & Branton, D. Three decades of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.* **34**, 518–524 (2016).
4. Wenger, A. M. *et al.* Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat. Biotechnol.* **37**, 1155–1162 (2019).
5. Rhie, A. *et al.* The complete sequence of a human Y chromosome. *Nature* (2023) doi:10.1038/s41586-023-06457-y.
6. 日本肺癌学会. ドライバー遺伝子変異/転座陽性. in *肺癌診療ガイドライン 2024年版* (ed. 日本肺癌学会) (2024).
7. June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S. & Milone, M. C. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361–1365 (2018).
8. Patel, K. K., Tariveranmoshabad, M., Kadu, S., Shobaki, N. & June, C. From concept to cure: The evolution of CAR-T cell therapy. *Mol. Ther.* **33**, 2123–2140 (2025).
9. Smith, L. M., Kelleher, N. L. & Consortium for Top Down Proteomics. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat. Methods* **10**, 186–187 (2013).
10. Geyer, P. E., Holdt, L. M., Teupser, D. & Mann, M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol. Syst. Biol.* **13**, 942 (2017).
11. Bader, J. M., Albrecht, V. & Mann, M. MS-based proteomics of body fluids: The end of the beginning. *Mol. Cell. Proteomics* 100577 (2023).
12. Aebersold, R. & Mann, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* **537**, 347–355 (2016).
13. Sinha, A. & Mann, M. A beginner's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Biochem.* (2020) doi:10.1042/BIO20200057.
14. Edman, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* **22**, 475 (1949).

15. O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021 (1975).
16. Scheele, G. A. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 5375–5385 (1975).
17. Motone, K. *et al.* Multi-pass, single-molecule nanopore reading of long protein strands. *Nature* **633**, 662–669 (2024).
18. Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y. & Au, K. F. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat. Biotechnol.* **39**, 1348–1365 (2021).
19. Wang, K. *et al.* Unambiguous discrimination of all 20 proteinogenic amino acids and their modifications by nanopore. *Nat. Methods* **21**, 92–101 (2024).
20. Brinkerhoff, H., Kang, A. S. W., Liu, J., Aksimentiev, A. & Dekker, C. Multiple rereads of single proteins at single-amino acid resolution using nanopores. *Science* eabl4381 (2021).
21. Zhang, M. *et al.* Real-time detection of 20 amino acids and discrimination of pathologically relevant peptides with functionalized nanopore. *Nat. Methods* **21**, 609–618 (2024).
22. Chen, X. *et al.* Resolving sulfation posttranslational modifications on a peptide hormone using nanopores. *ACS Nano* (2024) doi:10.1021/acsnano.4c09872.
23. Ensslen, T., Sarthak, K., Aksimentiev, A. & Behrends, J. C. Resolving Isomeric Posttranslational Modifications Using a Biological Nanopore as a Sensor of Molecular Shape. *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 16060–16068 (2022).
24. Aebersold, R. *et al.* How many human proteoforms are there? *Nat. Chem. Biol.* **14**, 206–214 (2018).
25. Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates, J. R., 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242–247 (2001).
26. Link, A. J. *et al.* Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **17**, 676–682 (1999).
27. de Godoy, L. M. F. *et al.* Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature* **455**, 1251–1254 (2008).

28. Nagaraj, N. *et al.* System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top Orbitrap. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, M111.013722 (2012).
29. Shishkova, E., Hebert, A. S. & Coon, J. J. Now, More Than Ever, Proteomics Needs Better Chromatography. *cells* **3**, 321–324 (2016).
30. Guzman, U. H. *et al.* Ultra-fast label-free quantification and comprehensive proteome coverage with narrow-window data-independent acquisition. *Nat. Biotechnol.* (2024) doi:10.1038/s41587-023-02099-7.
31. Bekker-Jensen, D. B. *et al.* An Optimized Shotgun Strategy for the Rapid Generation of Comprehensive Human Proteomes. *Cell Syst* **4**, 587-599.e4 (2017).
32. Zheng, R., Stejskal, K., Pynn, C., Mechtler, K. & Boychenko, A. Deep Single-Shot NanoLC-MS Proteome Profiling with a 1500 Bar UHPLC System, Long Fully Porous Columns, and HRAM MS. *J. Proteome Res.* (2022) doi:10.1021/acs.jproteome.2c00270.
33. Tanak, N. *et al.* Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. *J. Chromatogr. A* **965**, 35–49 (2002).
34. 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).
35. Horie, K. *et al.* Hydrophilic interaction chromatography using a meter-scale monolithic silica capillary column for proteomics LC-MS. *Anal. Chem.* **86**, 3817–3824 (2014).
36. Wang, C. *et al.* Surface-Charged Hybrid Monolithic Column for MS-Compatible Peptide Separation with High Peak Capacity and Its Application in Proteomic Analysis. *Anal. Chem.* (2022) doi:10.1021/acs.analchem.2c02084.
37. Yamana, R. *et al.* Rapid and deep profiling of human induced pluripotent stem cell proteome by one-shot NanoLC-MS/MS analysis with meter-scale monolithic silica columns. *J. Proteome Res.* **12**, 214–221 (2013).
38. Urisman, A. *et al.* An Optimized Chromatographic Strategy for Multiplexing In Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry: Insights from Quantitation of Activated Kinases. *Mol. Cell. Proteomics* **16**, 265–277 (2017).

39. Iwasaki, M. *et al.* One-dimensional capillary liquid chromatographic separation coupled with tandem mass spectrometry unveils the Escherichia coli proteome on a microarray scale. *Anal. Chem.* **82**, 2616–2620 (2010).
40. 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).
41. Hebert, A. S. *et al.* Comprehensive Single-Shot Proteomics with FAIMS on a Hybrid Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **90**, 9529–9537 (2018).
42. 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).
43. 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).
44. 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).
45. Charkow, J. & Röst, H. L. Trapped Ion Mobility Spectrometry Reduces Spectral Complexity in Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Anal. Chem.* (2021) doi:10.1021/acs.analchem.1c01399.
46. Neue, U. D. Peak capacity in unidimensional chromatography. *J. Chromatogr. A* **1184**, 107–130 (2008).
47. Neue, U. D. Theory of peak capacity in gradient elution. *J. Chromatogr. A* **1079**, 153–161 (2005).
48. 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).
49. Prianichnikov, N. *et al.* MaxQuant Software for Ion Mobility Enhanced Shotgun Proteomics *. *Mol. Cell. Proteomics* **19**, 1058–1069 (2020).
50. Nwosu, A. J. *et al.* In-Depth Mass Spectrometry-Based Proteomics of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues with a Spatial Resolution of 50-200 μ m. *J. Proteome Res.* (2022) doi:10.1021/acs.jproteome.2c00409.

51. Piehowski, P. D. *et al.* Automated mass spectrometry imaging of over 2000 proteins from tissue sections at 100- μ m spatial resolution. *Nat. Commun.* **11**, 8 (2020).
52. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64–71 (1989).
53. Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451–4459 (1984).
54. Schmidt, A., Karas, M. & Dülcks, T. Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 492–500 (2003).
55. Reschke, B. R. & Timperman, A. T. A study of electrospray ionization emitters with differing geometries with respect to flow rate and electrospray voltage. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 2115–2124 (2011).
56. El-Faramawy, A., Siu, K. W. M. & Thomson, B. A. Efficiency of nano-electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1702–1707 (2005).
57. Page, J. S., Kelly, R. T., Tang, K. & Smith, R. D. Ionization and transmission efficiency in an electrospray ionization-mass spectrometry interface. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1582–1590 (2007).
58. Messner, C. B. *et al.* Ultra-High-Throughput Clinical Proteomics Reveals Classifiers of COVID-19 Infection. *Cell Syst* **11**, 11-24.e4 (2020).
59. Bian, Y. *et al.* Robust Microflow LC-MS/MS for Proteome Analysis: 38 000 Runs and Counting. *Anal. Chem.* **93**, 3686–3690 (2021).
60. Bian, Y. *et al.* Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by micro-flow LC-MS/MS. *Nat. Commun.* **11**, 157 (2020).
61. Messner, C. B. *et al.* Ultra-fast proteomics with Scanning SWATH. *Nat. Biotechnol.* 1–9 (2021).
62. 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).
63. Ishikawa, M. *et al.* Optimization of Ultrafast Proteomics Using an LC-Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with Data-Independent Acquisition. *J. Proteome Res.* (2022) doi:10.1021/acs.jproteome.2c00121.
64. 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).

65. Kreimer, S. *et al.* Parallelization with Dual-Trap Single-Column Configuration Maximizes Throughput of Proteomic Analysis. *Anal. Chem.* 2022.06.02.494601 (2022) doi:10.1021/acs.analchem.2c02609.
66. Meyer, J. G., Niemi, N. M., Pagliarini, D. J. & Coon, J. J. Quantitative shotgun proteome analysis by direct infusion. *Nat. Methods* **17**, 1222–1228 (2020).
67. Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N. & Tanaka, N. Effect of skeleton size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **762**, 135–146 (1997).
68. Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N. & Tanaka, N. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **68**, 3498–3501 (1996).
69. Gritti, F. & Guiochon, G. Ultra high pressure liquid chromatography. Column permeability and changes of the eluent properties. *J. Chromatogr. A* **1187**, 165–179 (2008).
70. Broeckhoven, K. & Desmet, G. Advances and challenges in extremely high-pressure liquid chromatography in current and future analytical scale column formats. *Anal. Chem.* **92**, 554–560 (2020).
71. Gzil, P., Vervoort, N., Baron, G. V. & Desmet, G. Advantages of perfectly ordered 2-D porous pillar arrays over packed bed columns for LC separations: a theoretical analysis. *Anal. Chem.* **75**, 6244–6250 (2003).
72. Della Posta G. D’Orazio and Salvatore Fanali, M. A. R. C. F. S. Nano-liquid chromatography. in *Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation* (ed. Salvatore Fanali, Bezhan Chankvetadze, Paul R. Haddad, Colin F. Poole, Marja-Liisa Riekkola) 197 (Elsevier Science, Oxford, England, May 4 2023).
73. Stadlmann, J. *et al.* Improved sensitivity in low-input proteomics using micropillar array-based chromatography. *Anal. Chem.* **91**, 14203–14207 (2019).
74. Stejskal, K., Op de Beeck, J., Dürnberger, G., Jacobs, P. & Mechtler, K. Ultrasensitive NanoLC-MS of subnanogram protein samples using second generation micropillar array LC technology with Orbitrap exploris 480 and FAIMS PRO. *Anal. Chem.* **93**, 8704–8710 (2021).
75. 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).

76. 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).
77. Boersema, P. J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S. & Heck, A. J. R. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* **4**, 484–494 (2009).
78. Borthakur, S., Lee, H., Kim, S., Wang, B.-C. & Buck, M. Binding and function of phosphotyrosines of the Ephrin A2 (EphA2) receptor using synthetic sterile α motif (SAM) domains. *J. Biol. Chem.* **289**, 19694–19703 (2014).
79. Lee, H. & Bennett, A. M. Receptor protein tyrosine phosphatase-receptor tyrosine kinase substrate screen identifies EphA2 as a target for LAR in cell migration. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 1430–1441 (2013).
80. Meier, F. *et al.* diaPASEF: parallel accumulation–serial fragmentation combined with data-independent acquisition. *Nat. Methods* **17**, 1229–1236 (2020).
81. Stewart, H. I. *et al.* Parallelized acquisition of Orbitrap and Astral analyzers enables high-throughput quantitative analysis. *Anal. Chem.* **95**, 15656–15664 (2023).
82. Sharma, K. *et al.* Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nat. Neurosci.* **18**, 1819–1831 (2015).
83. Foreman, R. E., George, A. L., Reimann, F., Gribble, F. M. & Kay, R. G. Peptidomics: A Review of Clinical Applications and Methodologies. *J. Proteome Res.* **20**, 3782–3797 (2021).
84. Wettstein, L. *et al.* Alpha-1 antitrypsin inhibits TMPRSS2 protease activity and SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* **12**, 1726 (2021).
85. Bigalke, A., Sponholz, C., Schnabel, C., Bauer, M. & Kiehntopf, M. Multiplex quantification of C-terminal alpha-1-antitrypsin peptides provides a novel approach for characterizing systemic inflammation. *Sci. Rep.* **12**, 3844 (2022).
86. Ye, Z. *et al.* One-Tip enables comprehensive proteome coverage in minimal cells and single zygotes. *Nat. Commun.* **15**, 2474 (2024).
87. Leduc, A., Khoury, L., Cantlon, J., Khan, S. & Slavov, N. Massively parallel sample preparation for multiplexed single-cell proteomics using nPOP. *Nat. Protoc.* **19**, 3750–3776 (2024).

88. Xu, Z., Zou, R., Horn, N. C., Kitata, R. B. & Shi, T. Robust surfactant-assisted one-pot sample preparation for label-free single-cell and nanoscale proteomics. *Methods Mol. Biol.* **2817**, 85–96 (2024).
89. Masuda, T. *et al.* Water Droplet-in-Oil Digestion Method for Single-Cell Proteomics. *Anal. Chem.* **94**, 10329–10336 (2022).
90. Sugiyama, N. *et al.* Phosphopeptide Enrichment by Aliphatic Hydroxy Acid-modified Metal Oxide Chromatography for Nano-LC-MS/MS in Proteomics Applications**S. Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1103–1109 (2007).
91. MacLean, B. *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966–968 (2010).
92. Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S. & Ralser, M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat. Methods* **17**, 41–44 (2020).
93. Hsu, C. *et al.* Evaluation of a prototype Orbitrap Astral Zoom mass spectrometer for quantitative Proteomics—Beyond identification lists. *J. Proteome Res.* **24**, 5742–5754 (2025).
94. Stewart, H. *et al.* Parallelized Acquisition of Orbitrap and Astral Analyzers Enables High-Throughput Quantitative Analysis. *bioRxiv* 2023.06.02.543408 (2023) doi:10.1101/2023.06.02.543408.
95. Vitko, D. *et al.* TimsTOF HT improves protein identification and quantitative reproducibility for deep unbiased plasma protein biomarker discovery. *J. Proteome Res.* **23**, 929–938 (2024).
96. Papanastasiou, D. *et al.* The Omnitrap platform: A versatile segmented linear ion trap for multidimensional multiple-stage tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **33**, 1990–2007 (2022).
97. Smyrnakis, A. *et al.* Characterization of an Omnitrap-orbitrap platform equipped with infrared multiphoton dissociation, ultraviolet photodissociation, and electron capture dissociation for the analysis of peptides and proteins. *Anal. Chem.* **95**, 12039–12046 (2023).
98. Baba, T. *et al.* Electron impact excitation of ions from organics on singly protonated peptides with and without post-translational modifications. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **33**, 1723–1732 (2022).

謝辞

本論文を作製するにあたり、数多くの方々より多大なるご支援とご指導を賜りました。ここに深く御礼申し上げます。

学部生時代より終始ご指導を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 生体分子計測学分野 石濱泰 教授に心より感謝申し上げます。

本研究の副査をお引き受けくださり、真摯にご査読いただきました、病態機能解析学分野 小野正博 教授ならびに構造生物薬学分野 加藤博章 教授に深く感謝申し上げます。また、小野正博 教授には、学部生時代に研究室選択について親身にご相談に乗っていただきました。この場を借りて、重ねて御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、基礎から丁寧にご指導いただきました、国立循環器病研究センター 創薬オミックス解析センター プロテオーム系解析室長 杉山直幸 博士、国立研究開発法人理化学研究所 生命医科学研究センター ユニットリーダー 今見考志 博士、新潟大学大学院医歯学総合研究科 吉沢明康 特任准教授、京都大学大学院薬学研究科 生体分子計測学分野 小形公亮 助教ならびに金尾英佑 助教に、深く感謝申し上げます。

日々の研究活動において活発な議論を重ねていただきました、株式会社島津製作所 新苗智也 博士、京都大学大学院薬学研究科 生体分子計測学分野 西田紘士 特定助教、田畑剛 氏、ならびに同分野の先輩、同期、後輩の皆様に、心より感謝いたします。

学会等の場において、研究者としての在り方をご教示くださいました、京都大学 iPS 細胞研究所 岩崎未央 講師、国立研究開発法人理化学研究所 生命医科学研究センター 津曲和哉 博士、大阪大学大学院工学研究科 生物工学専攻 山口祐希 助教、新潟大学 医学部研究推進センター 中谷航太 助教に感謝申し上げます。

マウス脳サンプルにつきましては、慶應義塾大学薬学部 代謝生理化学講座 森一晟 氏、磯部洋輔 准教授、有田誠 教授よりご提供いただきました。ここに深く感謝申し上げます。

本研究の一部は、科学技術革新創出に向けた大学フェローシップ制度（JST、助成番号 JPMJFS2123）および日本学術振興会（JSPS）若手研究者研究助成（DC2、助成番号 24KJ1440）の支援を受けて実施されました。ここに感謝申し上げます。

最後に、これまでの研究生活を温かく見守り、支え、応援してくれた家族・友人に心より感謝いたします。