

高感度プロテオミクス分析を簡便に達成できる試料前処理方法の開発

市村徹 土屋雅大

令和2年9月

高感度プロテオミクス分析を簡便に達成できる試料前処理方法の開発

市村 徹* 土屋 雅大*

(令和2年3月23日受付：令和2年7月15日受理)

Development of sample pretreatment method to easily achieve sensitive proteomic analysis

By Tohru ICHIMURA, Masahiro TSUCHIYA

While mass spectrometry (MS)-based proteomics has become an indispensable technology for molecular and cellular biology, the analysis of low and limited protein samples is often challenged by several factors that cause protein loss. We recently reported a robust and sensitive proteomic sample preparation platform termed microbead-based and organic-media-assisted proteolysis strategy (BOPs). Here, we develop a disposable reaction cartridge with embedded microbeads for achieving BOPs in it only by pipetting. The cartridge-used BOPs method (cBOPs) enables successful and reproducible MS analysis regardless of whether workers are experienced or inexperienced in proteomics. Moreover this technology is applicable to the analysis of minute amounts of samples in dilute and/or denaturing solutions such as 70 % formic acid, 8 M urea, 7 M guanidine hydrochloride and 0.1% sodium dodecyl sulfate without significant protein loss. The simplicity and availability of the present cBOPs approach make it especially attractive not only for biological research but also for future automation in operation.

Keywords: Mass spectrometry, Proteomics, BOPs

1. 緒言

生体を構成する基本材料である生体高分子(核酸、タンパク質、多糖)や、これらの構成要素であるヌクレオチド、アミノ酸、各種糖などの構造・機能研究の一つに、質量分析計(mass spectrometry: MS)を基礎とするプロテオミクスの技術・戦略が幅広く利用されている。プロテオミクスは、生命科学の様々な領域で必要不可欠なテクノロジーであり、最も一般的なタンパク質の同定手順は、被験物質であるタンパク質が含有された溶液内でタンパク質を直接的に酵素(トリプシン)消化し、その消化物をショットガンMS分析するという流れである。しかしながら、溶液内トリプシン消化法はタ

ンパク質の濃度や混入物によって大きく影響を受けることが知られている。例えば、濃度 1 μ M 以下の希薄タンパク質溶液では、トリプシン消化の効率は著しく減じられる。またこのような希薄溶液では管壁効果(反応容器の内部表面にタンパク質やペプチドが非特異的に吸着する現象)により試料の損失が起こる⁽¹⁾⁻⁽³⁾。さらに、様々な生体高分子の変性剤「例えば、高濃度のギ酸や、尿素、塩酸グアニジン(Gud·HCl)などのカオトロピック試薬、またはラウリル硫酸ナトリウム(SDS)などの界面活性剤」の混入もトリプシン消化を妨害する。そのためトリプシン消化の前にこれらの変性剤を凍結乾燥や透析、または特殊なフィルターや有機溶媒などを用いて除去する必要があるが^{(4),(5)}、いずれの操作も多量のタンパク質の損失につながるため、微量量のタンパク質を高感度にショットガンMS分析すること

*防衛大学校 応用科学群 応用化学科 教授

は難しい状況にある。

これらの問題の解決を目的として、疎水性マイクロビーズ担体の表面に目的タンパク質をあらかじめ結合させ、その後ビーズ表面に結合したタンパク質に対してトリプシン消化を行うという方法（オンビーズ消化法）が考案されている⁽¹⁾。この方法は、タンパク質を濃縮できる上に、共存する様々な変性剤も洗浄操作で簡単に除去できるという利点を持つ。しかし、この方法はトリプシン消化の前に、目的タンパク質であらかじめビーズ表面を十分にコーティングする必要がある、サンプル量が限定されている場合や貴重な微量試料の場合、分析には適さない⁽⁶⁾。さらに、トリプシン消化においても不完全に断片化されたペプチドしか回収できないという大きな欠点をもっている⁽⁷⁾。

一方、疎水性マイクロビーズに変えて親水性マイクロビーズを吸着担体として利用し、タンパク質をオンビーズ消化する方法も考案されている⁽⁸⁾⁻⁽¹⁰⁾。しかし、この方法は、試料をビーズに吸着させる過程で試料溶液の酸性化（pH2~3）や疎水性化をはかる必要があり⁽⁸⁾⁻⁽¹⁰⁾、タンパク質の変性に伴う凝集化（アグリーゲーション）が引き起こされる可能性がある。タンパク質の凝集はトリプシン消化に対して抵抗性をもつことから、少量の被験物質では消化ペプチドの回収が困難になる。さらに、親水性ビーズを用いる方法の中には、特殊な界面活性剤で可溶化したサンプルにしか適用できないものがあり、方法としての一般性に欠けるものも含まれている⁽⁹⁾。

最近我々は、有機-水混合溶媒を使用することで、疎水性マイクロビーズ担体に結合したタンパク質を効率よくトリプシン消化できることを発見した（Microbead-Based Organic Media-Assisted Proteolysis Strategy: BOPs 法）⁽¹¹⁾。BOPs 法は、ビーズ表面を目的タンパク質でコーティングしなくても定量的にトリプシン消化を行える利点を持っている。さらにこの方法は希薄サンプル溶液または変性剤混入サンプルからでも試料の損失なく MS サンプルを調製することができる。しかしながら、BOPs 法の操作手順には繊細なハンドリング操作（遠心・溶媒抽出）が多数含まれており⁽¹¹⁾、人為的負担に加えて習熟度の違いに起因する作業の煩雑さによって、結果の MS データにバラツキが生じることが明らかになってきた。さらに、多くのハンドリング操作は、細菌や寄生虫などを標的とする分析においては、感染リスクを増大させる可能性も含んでいた。

本研究では、ピペットチップの先端に疎水性マイク

ロビーズ担体を内包した小型のディスポーザブル反応カートリッジを考案した。またこのカートリッジを使用することで、ピペティング操作のみで作業の習熟度に拘わらずだれもが容易かつ高感度に BOPs 法を実現できる方法（cartridge-used BOPs 法：以下 cBOPs 法）を開発したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 材料と試薬

ピペットチップはサーモフィッシャーサイエンティフィック社の QSP イエローチップ 1-200 μ L (Cat# 110) を、メンブレンフィルターはミリポア社の OmniporeTM (Cat# JCWPO1300, 孔径 10 μ m) を使用した。マイクロビーズは PerSeptive Biosystems 社の Poros R2 (粒子径 50 μ m) を使用した。トリプシン (Cat# V5280) はプロメガ社から、ウシ血清アルブミン (BSA, Cat# 017-17841) は和光純薬からそれぞれ購入した。アセトニトリル (Cat# 10955529 24)、メタノール (Cat# 1831335 619)、ギ酸 (Cat# K4364024 246) はメルク社から、尿素 (Cat# 217-00171) Gud-HCl (Cat# 070-01825) は和光純薬から、SDS (Cat# L3771-500G) は SIGMA 社から、アセトン (Cat# 01026-2B) は関東化学から、トリフルオロ酢酸 (TFA, Cat# 34826-21) はナカライテスク社からそれぞれ購入した。

2.2 反応カートリッジ (図 1)

反応カートリッジのケースはピペットチップを加工して作成した。ケース本体とメンブレンフィルター固

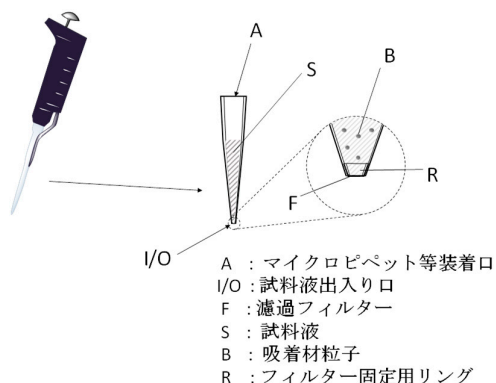


図 1 反応カートリッジ

Fig. 1 Diagram of the reaction cartridge

定用リングをピペットチップから治具を用いて切り出した。固定用リングの内径は 0.8 mm になるよう調整した。一边がおおよそ 5 mm の正三角形になるように成形したメンブレンフィルター（孔径 10 μ m）を固定用リングにかぶせ、治具を用いて加工したケース内に固定した。ピペットチップの加工および固定用リングの装着に用いた治具は自作した。加工および装着作業は手作業で行った。作成したカートリッジケースに POROS R2 ビーズ（粒子径 50 μ m）を 1 μ L 分(250 mg)内包し、反応カートリッジとして使用した。反応カートリッジは、100 μ L の 75% アセトニトリル/0.1% TFA 溶液を吸引して洗浄後、100 μ L の 100 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8）に平衡化してから使用した。

2.3 処理方法（図2）

cBOPs 法は、①濃縮処理、②洗浄処理、③トリプシン消化の 3 工程から構成される（図2）。①マイクロチューブ内に収容された 1 μ g の BSA 溶液をピペティングにより吸引・排出した。ピペティング回数は 20 μ L の溶液では 15 回、100 μ L では 40 回行った。この操作により、2.2 項で平衡化したカートリッジ内に BSA 溶液の流入・流出が繰り返し行われ、カートリッジ内の R2 ビーズに BSA が吸着して濃縮される。②マイクロチューブ内に収容された 100 μ L の洗浄溶液（100 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 8）を吸引し、3~4 回ピペティングすることでカートリッジ内を洗浄した。この操作を更に 2 回洗浄溶液を取り換えて行った。③0.5 μ g のトリプシンを含む 20 μ L の 60% アセトニトリル/40% 100 mM Tris-HCl, pH8（最終濃度）の混合溶媒を吸引し、カートリッジの上下を蓋で密閉してから 37°C でオーバーナイトでトリプシン消化を行った。変性剤（ギ酸、尿素、Gud-HCl）が混入した BSA 溶液に対しても

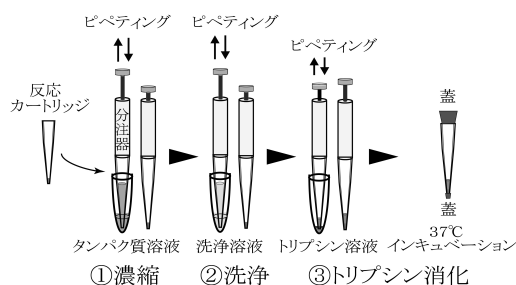


図2 cBOPs 法のワークフロー

Fig. 2 Schematic workflow of cartridge-used BOPs (cBOPs)

同様の操作でサンプル処理した。ただし、0.1% SDS が混入するサンプルでは、BSA を R2 ビーズに吸着させた後で 100 μ L のアセトンでカートリッジ洗浄を 3 回繰り返してから、上述した②の洗浄処理、③のトリプシン消化を行った。溶液内消化は、1 μ g の BSA 溶液（100 μ L, 100 mM Tris-HCl, pH8）に 0.5 μ g のトリプシンを直接加えて行った。

2.4 LC-MS 分析

トリプシン消化を行った後で、反応カートリッジから消化液を排出し 0.1% TFA 溶液で 20 倍に希釈した。希釈した消化液の内、2 μ L (5 ng タンパク質) を極微量流量液体クロマトグラフィー/質量分析システム（Waters 社製 LC-MSnanoACQUITY UPLC-Xevo G2-S QToF システム）で LC-MS 分析した⁽¹¹⁾。消化ペプチドの回収量は、対応する MS クロマトグラム内のすべてのペプチドピークの高さを合計して計算した⁽¹¹⁾。

2.5 その他

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）は既報の手順に従い、10%ゲルを用いて行った。ゲルはクマシーブリリアントブルー（CBB R250）で染色した。

3. 結果

3.1 cBOPs 法による希薄タンパク質溶液の分析

1 μ M 以下の希薄タンパク質溶液では、トリプシンの消化効率が著しく減じられることが知られている⁽¹⁾⁻⁽³⁾。

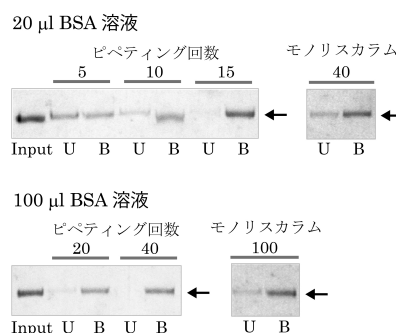


図3 希薄溶液からのタンパク質回収におけるピペティング回数の検討

Fig. 3 Effect of pipetting frequency on protein recovery from dilute solution

図示したピペティング回数後、R2 ビーズに結合 (B)、非結合 (U) した BSA を SDS-PAGE で分析した。

そこで cBOPs 法が希薄サンプル溶液のトリプシン消化に適用できるかを検討した。1 μg の BSA を 20 μL または 100 μL の 100 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解し (それぞれ 0.75 M と 0.15 M BSA 溶液)、ピペティングを繰り返すことで BSA を反応カートリッジ内の R2 ビーズに吸着させた (2.3 項参照)。SDS-PAGE で、この実験における BSA の吸着量とピペティング回数を査定した結果を図 3 に示す。20 μL の BSA 溶液では 15 回 (図 3 左)、100 μL の BSA 溶液では 30~40 回のピペティングで (図 3 右)、それぞれの溶液内の BSA をほぼ 100% ビーズ表面に吸着・回収できることが分かった。一方、市販の固定化 (モノリス) R2 カラムを用いて同実験を行ったところ、20 μL の BSA 溶液では 40 回、100 μL の BSA 溶液では 100 回のピペティングの後でも試料を完全に回収することはできなかった (図 3)。このことから本法に市販固定化カラムを適用しただけでは迅速な濃縮は困難であり、考案した反応カートリッジを用いることでより実用的な濃縮が可能であることが分かった。

次に、上述した 100 μL の BSA 溶液 (0.15 M) から調製した BSA-R2 ビーズを含む反応カートリッジに、トリプシン溶液をピペティングで吸引しオーバーナイト消化した (cBOPs 法)。また、コントロール実験として 100 μL の 0.15 M BSA 溶液にトリプシンを直接加えてオーバーナイト消化した (溶液内消化)。それぞれの消化物を LC-MS で分析した結果を図 4 に示す。以前の報告⁽¹⁾⁻⁽³⁾と一致して、希薄 (0.15 M) 溶液中での溶液内消化は、低いイオンシグナルをもつ極少数本のペプチドフラグメントしか検出できなかった (図 4 上)。しかしながら、cBOPs 法はこのデメリットを改善し高いイオンシグナルをもつ多数本のペプチドフラグメントを産生できることが明らかとなった (図 4 下)。本方法の MS クロマトグラムの形状やペプチド回収量は、以前に同 BSA 溶液を BOPs 法で処理した場合の形状や回収量とほぼ同じであった⁽¹¹⁾。また、これと類似の分析結果は 100 μL の 0.15 M チトクローム C 溶液を用いた実験でも観察された (未発表データ)。従って、cBOPs 法はピペティング操作のみで、希薄タンパク質溶液から MS サンプルを高感度に調製できると結論した。

3.2 習熟度の異なる作業員間の実験データ比較

前述した通り BOPs 法のプロトコールには繊細なハンドリング操作が多数含まれており、作業員の習熟度の違いによって結果の MS データにバラツキが生じ

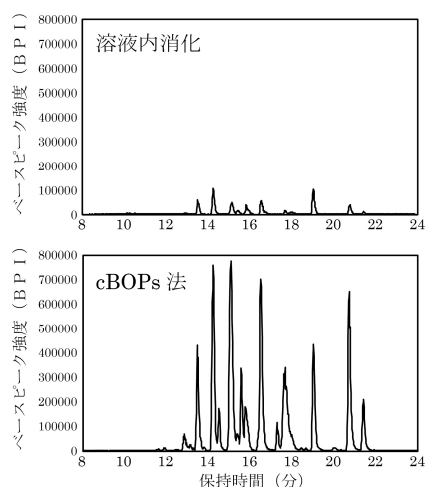


図 4 溶液内消化と cBOPs 法で調製した BSA フラグメントの LC-MS クロマトグラム
Fig. 4 LC-MS chromatograms of BSA fragments obtained from digestion with in-solution and cBOPs

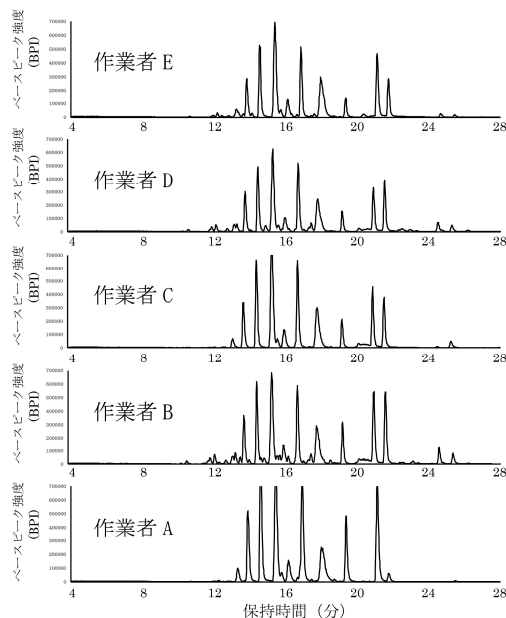
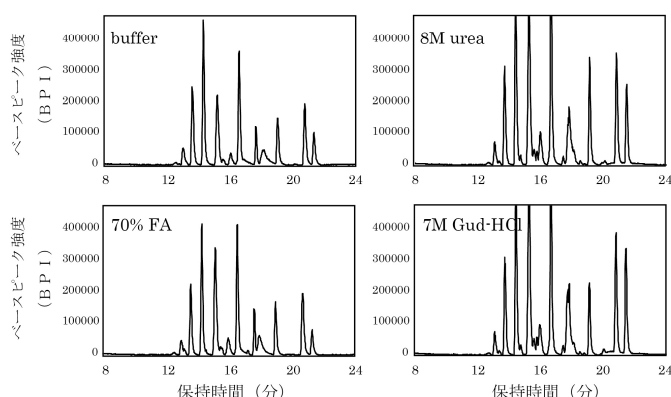


図 5 習熟度の異なる 5 人の作業員が行った cBOPs 法のデータ比較
Fig. 5 Comparison of cBOPs data performed by five workers with different proficiency

A



B

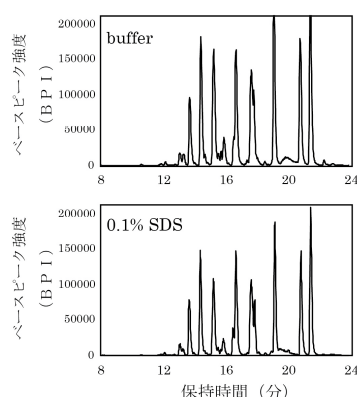


図6 変性剤が混入したBSAサンプルのcBOPs法による分析

Fig. 6 Analysis of BSA samples contaminated with denaturing reagents by cBOPs

A, 緩衝液 (buffer)、70%ギ酸 (FA)、8M 尿素 (urea)、または7M 塩酸グアニジン (Gud-HCl)を含む溶液中のBSAにcBOPs法を適用した。B, 緩衝液 (buffer)または0.1% SDSを含む溶液中のBSAにcBOPs法を適用した。

る。そこで、cBOPs法の利便性と再現性を査定するため、習熟度が異なる5人の作業員（作業員A～E）が行った実験結果を比較した。作業員には、トリプシン消化をまったく行ったことのない3人の作業員を含めた。図5に希薄BSA溶液（20 μ L, 0.75 M）からcBOPs処理した後のMSクロマトグラムの結果を示す。すべての消化物からシャープなイオンシグナルが多数本検出された。また各作業員のMSクロマトグラムはほぼ同様の形状とペプチド回収量を示すことが明らかとなった。従って、cBOPs法はプロテオミクスの経験者、未経験者に拘わらず同一の操作手順で再現的かつ高精度にMSサンプルを調製できる実験プラットフォームであることが確認された。

3.3 変性剤混入サンプルへの適用

タンパク質の可溶化には様々な変性剤が用いられている。cBOPs法の利便性をさらに評価するために、今日最も広汎に使用されている変性剤である70%ギ酸 (FA)、8M尿素、7M Gud-HClを含むBSAサンプル(20 μ L, 0.75 M)にcBOPs法を適用した（2.3項参照、図6A）。また、0.1% SDSが混入するBSAサンプルに対しては、アセトン洗浄を加えたのちに同法を適用した（2.3項参照、図6B）。コントロール実験として、変性剤を含まないBSAサンプル(buffer)に対してもcBOPs法を適用した。LC-MS分析の結果、上述した

変性剤が混入してもcBOPs法の消化パターンに大きな違いは認められないことが明らかになった（図6A,B）。このことは、本法の洗浄操作によって変性剤が反応カートリッジから効率よく除去されたことを示唆している。従ってcBOPs法は様々な変性剤が混入する微量サンプルに対してもダイレクトに適用できることが明らかになった。

4. 考察

本研究で考案した反応カートリッジを用いることでピペティングによる溶液の吸引吐出のみでMSサンプルを調製できる方法（cBOPs法）を開発した。cBOPs法は、希薄溶液中の微量タンパク質を高感度にMS分析することを可能にした（図4）。またcBOPs法は、習熟度の程度に関わらず高精度なMSサンプルを再現的に調製できた（図5）。さらにcBOPs法は、様々な変性剤を含む微量サンプルに対しても直接的に適用できた（図6）。従って、cBOPs法は、ピペティング操作のみでBOPs法実現できる実験プラットフォームになると提案する。

本研究では自作した反応カートリッジを使用した。この反応カートリッジを利用することで、ピペットマンを用いるピペティング操作により、容器内に試料溶液の流入・流出が繰り返し行われ、また容器内に配置

されたビーズ担体を効率よく溶液内に懸濁・分散できるようにした。この分散反応により、市販の固定化ビーズ担体に比べて、ビーズとタンパク質またはビーズと溶媒との衝突回数が増し、試料の吸着や溶媒洗浄が格段に向上することが期待された。また自作したカートリッジケースでは、フィルターをピペットチップの先端に配置した。このことにより反応に関与しない装置内部の死容積を極限にまで減少できた。さらに、チップ先端部の目詰まりを防止するため、孔径の大きなフィルターを採用した。本研究で示した通り、同カートリッジを用いた LC-MS の分析結果は極めて良好であった (図 4～図 6)。これは作成したカートリッジケースを使用することで、ビーズ担体の懸濁・分散および管壁効果の抑制が、実際効果的に実現できたことを示している。

一方、反応カートリッジを使用したことで、cBOPs 法は実現できても、作成したカートリッジの品質にバラツキがあればデータの再現性は得られない。材料は市販のピペットチップを利用しているので、再現性に影響する因子として加工による形状やフィルターの固定具合の精度が挙げられる。それゆえ本研究では、固定用リングとメンブレンフィルターのサイズや形状を可能な限り均一化し、反応チップに安定に装着・固定できるようにした (2.2 項参照)。正三角形にメンブレンフィルターを成形したのも、固定リング装着時のよれを防止し、固定位置や死容積のばらつきおよび漏れを防ぐためである。実際、円形のフィルターではよれが発生し、液漏れが生じるものが散見された。図 5 に示した通り、作成したカートリッジケースを用いた cBOPs 法は、作業者の習熟度に拘わらず再現性の高い分析結果を示した。それゆえ、同カートリッジは cBOPs 法を実行するにあたり、十分な品質を確保していると考えられる。本研究ではカートリッジケースの作成を手作業で行っているが、工業的により簡便かつ高品質のものを作成することは可能である。こうした試みは cBOPs 法の適用範囲を広げるものと考えられる。

5. 結論

本研究で開発した cBOPs 法の操作は非常に簡単であり、すべての工程 (試料の濃縮、洗浄、トリプシン消化) を、同一カートリッジケース内の連続ピペティングで実現できる。また本法は、作業者の習熟度に拘わらず希薄溶液や変性剤が混入する微量試料に直接適用することができ、さらに高感度な MS サンプルを再現

的に調製することができる。それゆえ、cBOPs 法は、生命科学の基礎および応用研究 (感染症対策を含む) に今後幅広く利用できるものと期待される⁽¹²⁾。さらに cBOPs 法は、作業者の実験負担を低減させ今後の操作自動化を図るための基盤技術としても極めて有用になると考えられる。

謝辞

実験を補佐していただいたキャリエ・レゾ社の鹿嶋彰子氏に感謝いたします。

参考文献

- (1) A. Doucette, D. Craft and L. Li, “Protein Concentration and Enzyme Digestion on Microbeads for MALDI-TOF Peptides Mass Mapping of Proteins from Dilute Solutions”, *Anal. Chem.* **72**[14](2000), pp. 3355-3362.
- (2) M. B. Strader, D. L. Tabb, W. J. Hervey, C. Pan and G. B. Hurst, “Efficient and Specific Trypsin Digestion of Microgram to Nanogram Quantities of Proteins in Organic-Aqueous Solvent Systems”, *Anal. Chem.* **78**[1](2006), pp. 125-134.
- (3) W. J. Hervey 4th, M. B. Strader and G. B. Hurst, C “Comparison of Digestion Protocols for Microgram Quantities of Enriched Protein Samples”, *J. Proteome Res.* **6**[8](2007), pp. 3054-3061.
- (4) J. R. Wiśniewski, A. Zougman, N. Nagaraj and M. Mann, “Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis”, *Nat. Methods* **6**[5](2009), pp. 359-362.
- (5) J. R. Wiśniewski, A. Zougman and M. Mann, “Combination of FASP and StageTip-Based Fractionation Allows In-Depth Analysis of the Hippocampal Membrane Proteome”, *J. Proteome Res.* **8**[12](2009), pp. 5674-5678.
- (6) M. I. Aguilar, D. J. Clayton, P. Holt, V. Kronina, R. I. Boysen, A. W. Purcell and M. T. Hearn, “RP-HPLC Binding Domains of Proteins”, *Anal. Chem.* **70**[23](1998), pp. 5010-50168.
- (7) A. Doucette, D. Craft and L. Li, “Mass Spectrometric Study of the Effects of Hydrophobic Surface Chemistry and Morphology on the Digestion of Surface-Bound Proteins”, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*

- 14**[3](2003), pp. 203-214.
- (8) C. S. Hughes, S. Foehr, D. A. Garfield, E. E. Furlong, L. M. Steinmetz and J. Krijgsveld, "Ultrasensitive Proteome Analysis Using Paramagnetic Bead Technology", *J. Mol. Syst. Biol.* **10**(2014), p. 757.
 - (9) W. Chen, S. Wang, S. Adhikari, Z. Deng, L. Wang, L. Chen, M. Ke, P. Yang and R. Tian, "Simple and Integrated Spintip-Based Technology Applied for Deep Proteome Profiling", *Anal. Chem.* **88**[9](2016), pp. 4864-4871.
 - (10) W. H. Chen, S. C. Lee, S. Sabu, H. C. Fang, S. C. Chung, C. C. Han and H. C. Chang, "Solid-Phase Extraction and Elution on Diamond (SPEED): a Fast and General Platform for Proteome Analysis with Mass Spectrometry", *Anal. Chem.* **78**[12](2006), pp. 4228-4234.
 - (11) M. Taoka, M. Fujii, M. Tsuchiya, T. Uekita and T. Ichimura, "A Sensitive Microbead-Based Organic Media-Assisted Method for Proteomics Sample Preparation from Dilute and Denaturing Solutions" *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**[49](2017), pp. 42661-42667.
 - (12) M. Taoka, K. Horita, T. Takekiyo, T. Uekita, Y. Yoshimura and T. Ichimura, "An Ionic Liquid-Based Sample Preparation Method for Next-Stage Aggregate Proteomic Analysis", *Anal. Chem.* **91**[21](2019), pp. 13494-13500.