

自動化された高選択性リン酸化 ペプチド濃縮によるリン酸化ペプチドの 同定とリン酸化部位の決定

著者

Valery G. Voinov and
Joseph S. Beckman
e-MSion Inc.
Corvallis, OR, USA

Shuai Wu, Kenneth
Newton, Linfeng Wu, and
Jordy J. Hsiao
Agilent Technologies Inc.,
Santa Clara, CA, USA

はじめに

リン酸化ペプチド濃縮は、LC/MS 分析における最も困難なサンプル前処理手順の 1 つです。その理由は、手作業でのサンプル前処理による再現性と選択性のばらつきが大きいからです。リン酸化ペプチドサンプルの LC/MS 分析が困難であるのは、次のようなさまざまな要因によるものです。

- HPLC システムの表面または溶媒内の金属イオンによってリン酸化ペプチドと金属イオンの複合物が形成され、リン酸化ペプチドのピーク強度が著しく抑制される場合があります。このため、特に多リン酸化ペプチドの場合、リン酸化ペプチドの同定が非常に難しくなる可能性があります。
- リン酸化ペプチドのイオン化効率もよく問題になります。非リン酸化ペプチドとの複雑な混合物では、リン酸化ペプチドのイオン化効率が大幅に低下します。
- ホスホリル基は不安定な翻訳後修飾（PTM）であり、通常は CID により断片化されるとリン酸として除去されます。通常、このようなリン酸のニュートラルロスが顕著な断片化であるため、ペプチド骨格の断片化で部位固有の情報が失われます。このためリン酸化ペプチド中のリン酸化部位の決定が困難になります。

Human Proteome Project (HPP) の Phosphopeptide Challenge では、各参加ラボに 2 種類のサンプルバイアルが提供されました。「リン酸化ペプチド」のラベルの付いたバイアルには、さまざまな濃度のヒト由来の配列を有する一連の合成リン酸化ペプチドが、非リン酸化同等物と混合されて含まれています。一部のペプチドには、複数のリン酸化形態があります。「リン酸化ペプチド酵母」のラベルの付いた 2 つ目のバイアルでは、6 μg のトリプシン消化された酵母ライセートに、同じペプチドが含まれています。各バイアルは乾燥状態で提供されました。この調査では HUPO メンバーに対し、各種メソッドを用いたペプチドシーケンス分析の実施を依頼しました。各ラボはサンプル中のペプチドを同定し、各ペプチドのリン酸化部位の数と位置を決定する必要があります。各ラボは、各修飾部位でのリン酸化の相対アブundanceを、非リン酸化同等物との比較によって測定する必要があります。3 番目のリクエストには、酵母マトリックスを含むサンプルからのリン酸化ペプチドの濃縮と MS による分析が含まれます (図 1)。HUPO はこの調査の実行にあたり、89 種類のヒトペプチドシーケンスのリストと、ペプチドの同定、リン酸化部位の決定、相対定量、濃縮の結果を記録するためのワークシートを提供しました。

Agilent AssayMAP Bravo プラットフォームでは、大容量 Fe(III)-NTA カートリッジによって、選択性の高いリン酸化ペプチドの濃縮ワークフローを完全に自動化できました。この自動化プラットフォームでは、マイクロクロマトグラフィーカートリッジを用いて、サンプル量が少なくてもルーチンワークフローでリン酸化ペプチドを簡単に濃縮できます。サンプル分析は、Agilent 1290 Infinity II LC と静電磁 (EMS) ECD セル付の Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS を組み合わせて実施しました。リン酸化ペプチドのピーク形状と回収率を上げるため、Agilent InfinityLab の不活性化添加

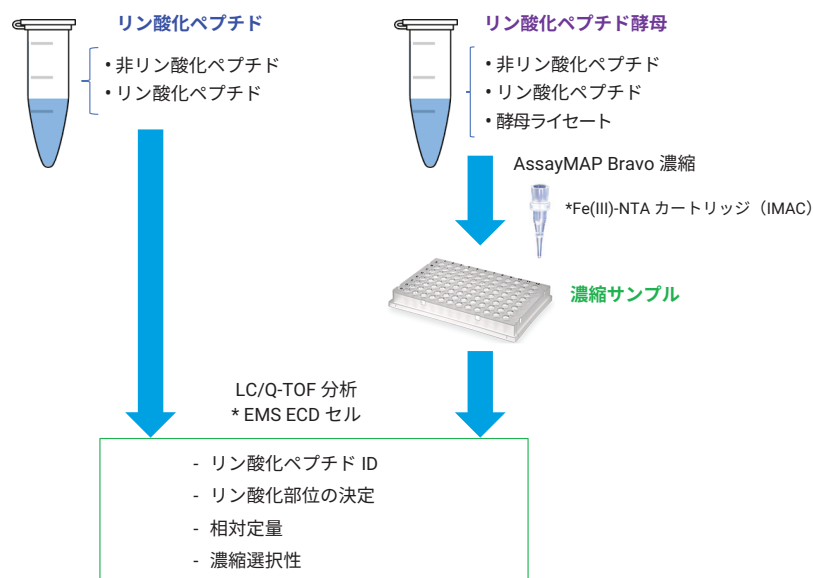


図 1. HUPO Phosphopeptide Challenge 実験

剤を HPLC 移動相に添加しました。ペプチド同定にはデータ依存型測定 (DDA)、データ分析には Agilent Spectrum Mill B.06 ソフトウェアを使用しました。DDA によるペプチド同定の後にターゲット MS/MS と ECD を用いてリン酸化部位を決定し、Byonic ソフトウェア (Protein Metrics、クパチーノ、カリフォルニア州、米国) を用いて HUPO シーケンスリストに基づくデータ処理を実行しました。リン酸化ペプチドの相対定量の実行には、1 回の MS1 スキャン、DDA によって生成されたスペクトルライブラリ、および Skyline ソフトウェア (MacCoss グループ、ワシントン大学、シアトル、ワシントン州、米国) を使用しました。濃縮選択性は、全体の特徴的なリン酸化ペプチドの数と HUPO シーケンスリストに含まれるリン酸化ペプチドの数の両方に基づいて評価しました。

実験方法

材料

HUPO から 2 種類のサンプルバイアルが提供されました。

- 「リン酸化ペプチド」には、さまざまな濃度のヒトシーケンス由来の合成リン酸化 (Ser, Thr, または Tyr) ペプチドと非リン酸化同等物の混合物が含まれていました。一部のペプチドには、複数のリン酸化形態があります。HUPO から 89 種類のペプチドシーケンスが提供されました。
- 「リン酸化ペプチド酵母」には、6 μg のトリプシン消化された酵母ライセートで構成されるバックグラウンドマトリックス中に、同じペプチドが含まれていました。

AssayMAP Fe(III)-NTA カートリッジはアジレント・テクノロジー株式会社 (サンタクララ、カリフォルニア州、米国) の製品を使用しました。他のすべての化学物質は Sigma-Aldrich 社 (セントルイス、ミズーリ州、米国) の製品を使用しました。

AssayMAP Bravo による
リン酸化ペプチドの濃縮と精製

「リン酸化ペプチド酵母」サンプルバイアルを、100 µL の 80 % ACN、0.1 % TFA で再懸濁しました。サンプルを 2 分間超音波処理し、A1 の位置の 96 ウェル PCR プレートに移しました。

Agilent AssayMAP Phosphopeptide Enrichment v2.0 アプリを使用して、Fe(III)-NTA カートリッジを用いてリン酸化ペプチドを自動濃縮しました。図 2 はユーザーインタフェースとアプリケーションの設定を示しています。1 個の Fe(III)-NTA カートリッジを事前に A1 のデッキ位置 2 に配置しました。ラボウェアはラボウェア表の記載にあるように配置しました。デッキ位置 4 と 9 では LoBind 96 Eppendorf プレートを使用了しました。300 µL/min の高流量で、100 µL、50 % ACN、0.1 % TFA でカートリッジをプライミングしました。その後、0.1 % TFA を含む 80 % ACN（結合バッファと同じ溶媒）を用いてカートリッジを平衡化しました（表 1）。カートリッジへのサンプルのロードは重要な手順でした。以前の試験に従って流量を 3.0 µL/min に設定し、リン酸化ペプチドを効率的に結合できる時間を確保しました。ロード後に、0.1 % TFA を含む 80 % ACN で内部カートリッジを洗浄しました。濃縮したリン酸化ペプチドは、20 µL の 1 % 水酸化アンモニウム（約 pH 11）で、80 µL の 2.5 % ギ酸を含む LoBind PCR プレートに直接溶出しました（表 1 と図 2）。¹

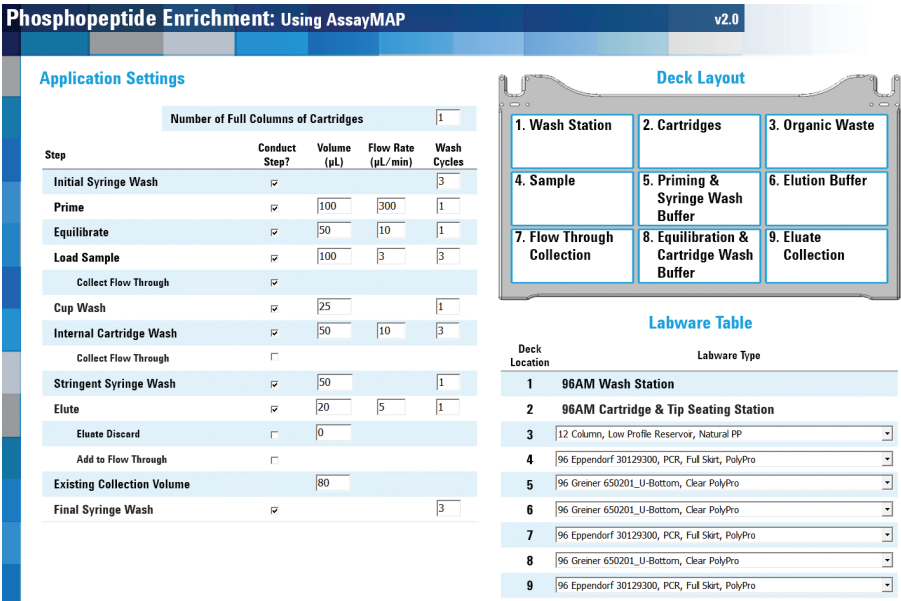


図 2. AssayMAP Bravo Phosphopeptide Enrichment v2.0 アプリ

表 1. AssayMAP Bravo によるリン酸化ペプチドの濃縮および精製プロトコル

	リン酸化ペプチド濃縮	ペプチド精製
アフィニティ媒体	IMAC	逆相
樹脂量	5 µL	5 µL
サポート	Fe(III)-NTA、100 nmol Fe(III)	C18
プライムバッファ	50 % ACN、0.1 % TFA 水溶液	50 % ACN、0.1 % TFA 水溶液
平衡化バッファ	80 % ACN、0.1 % TFA 水溶液	0.1 % TFA 水溶液
ローディングバッファ	80 % ACN、0.1 % TFA 水溶液	ギ酸アンモニウム水溶液
ロード量	100 µL	100 µL
ロード流量	3 µL/min	3 µL/min
洗浄バッファ 1	80 % ACN、0.1 % TFA 水溶液	0.1 % TFA 水溶液
洗浄量 1	50 µL	50 µL
洗浄回数 1	1	1
溶出バッファ 1	1 % 水酸化アンモニウム	70 % ACN、0.1 % TFA 水溶液
溶出量 1	20 µL	20 µL
既存の測定量	80 µL	0 µL

Agilent AssayMAP Peptide Cleanup v2.0 アプリを用いて、濃縮したリン酸化ペプチドを C18 カートリッジで脱塩しました (図 3)。1 個の C18 カートリッジを事前に A1 のデッキ位置 2 に配置しました。ラボウェアはラボウェア表の記載にあるように配置選択しました。デッキ位置 9 では LoBind 96 Eppendorf プレートを使用しました。濃縮したリン酸化ペプチドプレートをデッキ位置 4 に設置しました。C18 カートリッジを 100 μ L の 50 % ACN、0.1 % TFA 水溶液でプライミングし、50 μ L の 0.1 % TFA で平衡化し、3 μ L/min の流量で濃縮したリン酸化ペプチドサンプルをロードし、50 μ L の 0.1 % TFA で洗浄し、20 μ L の 70 % ACN、0.1 % TFA で 5 μ L/min の流量で溶出しました。

SpeedVac 真空濃縮器 (Thermo Fisher Scientific, Inc.、ウォルサム、マサチューセッツ州、米国) でサンプルを室温で乾燥させ、25 μ L の 10 % ACN、0.1 % FA で再懸濁し、2 分間超音波処理しました。さらに、サンプルを 25 μ L の 0.1 % FA 水溶液で希釈して、最終サンプルを 50 μ L の 5 % ACN、0.1 % FA 溶液としました。

データ依存型測定によるペプチドの同定

「リン酸化ペプチド」サンプルを、25 μ L の 10 % ACN、0.1 % FA で再懸濁しました。サンプルバイアルは、2 分間ボルテックスおよび超音波処理しました。さらに、サンプルを 25 μ L の 0.1 % FA で希釈し、最終サンプルを 50 μ L の 5 % ACN、0.1 % FA 溶液としました。

1290 Infinity II LC システムを Agilent Infinity UHPLC ナノアダプタと組み合わせ、ナノフロー LC に変換しました。ペプチド同定のため、このナノフロー LC を Agilent ナノスプレー ESI ソースに接続し、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS と組み合わせました (図 4)。

Peptide Cleanup: Using AssayMAP v2.0

Application Settings

Step	Conduct Step?	Volume (μ L)	Flow Rate (μ L/min)	Wash Cycles
Initial Syringe Wash	☒			3
Prime	☒	100	300	1
Equilibrate	☒	50	10	1
Load Sample	☒	100	3	3
Collect Flow Through	☒			
Cup Wash	☒	25		1
Internal Cartridge Wash	☒	50	10	3
Collect Flow Through	☐			
Stringent Syringe Wash	☒	50		1
Elute	☒	20	5	1
Elute Discard	☐	0		
Add to Flow Through	☐			
Existing Collection Volume		0		
Final Syringe Wash	☒			3

Number of Full Columns of Cartridges: 1

Deck Layout

1. Wash Station	2. Cartridges	3. Organic Waste
4. Sample	5. Priming & Syringe Wash Buffer	6. Elution Buffer
7. Flow Through Collection	8. Equilibration & Cartridge Wash Buffer	9. Eluate Collection

Labware Table

Deck Location	Labware Type
1	96AM Wash Station
2	96AM Cartridge & Tip Seating Station
3	12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
4	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro
5	96 Greiner 650201_U-Bottom, Clear PolyPro
6	96 Greiner 650201_U-Bottom, Clear PolyPro
7	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro
8	96 Greiner 650201_U-Bottom, Clear PolyPro
9	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro

図 3. Agilent AssayMAP Bravo Peptide Cleanup v2.0 アプリ



図 4. Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS とナノアダプタの組み合わせによる標準フロー LC からナノフロー LC への変換

表 2 は LC パラメータを示しています。ナノアダプタは直接注入モードで構成しました。75 μm $\times$ 25 cm の C18 カラムを 60°C に維持し、90 分間のグラジエントによるペプチド分離に使用しました (LC 分析の合計時間は 120 分)。² イオン抑制を最小限にしてリン酸化ペプチドのクロマトグラフィー性能を上げるため、0.1 % の InfinityLab 不活性化添加剤を溶媒 A に添加しました。³ ペプチド同定のため、2 μL の「リン酸化ペプチド」と濃縮した「リン酸化ペプチド酵母」サンプルを、サンプルごとに 3 回注入しました。上位 15 種類のプリカーサイオンの選択には、データ依存型測定を使用しました。表 3 に、CID による DDA 用の 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS の詳細設定を示します。

表 2. ナノ LC パラメータ

LC 条件													
ナノアダプタ構成	直接注入モード												
ガードカラム	PepMap C18、75 μm $\times$ 2 cm												
分析カラム	PepMap C18、75 μm $\times$ 25 cm												
カラム温度	60 °C												
溶媒 A	0.1 % 酢酸、0.1 % 不活性剤水溶液												
溶媒 B	0.1 % 酢酸 + 90 % アセトニトリル												
流量	0.085 mL/min 一次流量 300 nL/min オンカラム流量												
Q-TOF グラジエント	<table> <tr> <th>時間 (分)</th><th>B (%)</th></tr> <tr> <td>0</td><td>3</td></tr> <tr> <td>90</td><td>37</td></tr> <tr> <td>95</td><td>70</td></tr> <tr> <td>97</td><td>70</td></tr> <tr> <td>100</td><td>3</td></tr> </table>	時間 (分)	B (%)	0	3	90	37	95	70	97	70	100	3
時間 (分)	B (%)												
0	3												
90	37												
95	70												
97	70												
100	3												
ストップタイム	115												
ポストタイム	5												
注入量	2 μL (CID)、4 μL (ECD)、1 μL (MS1)												

表 3. Agilent 6550 iFunnel Q-TOF のパラメータ

パラメータ	設定値													
スプレーニードル	New Objective 製のノンコーティングニードル、内径 25 μm 、チップ内径 10 μm 、長さ 5 cm、直交方向配置													
ガス温度	200 °C													
ドライガス	11 L/min													
測定モード	拡張ダイナミックレンジ (2 GHz) m/z 100 ~ 1700 高分析感度													
	MS	MS/MS												
質量範囲	m/z 300 ~ 1700	m/z 50 ~ 1700												
測定レート	3 スペクトル/秒	>3 スペクトル/秒												
選択幅	中程度 (~4 m/z)													
コリジョンエネルギー	(傾き) * (m/z) / 100 + オフセット <table> <tr> <th>Charge</th><th>Slope</th><th>Offset</th></tr> <tr> <td>2</td><td>3.1</td><td>1</td></tr> <tr> <td>3</td><td>3.6</td><td>-4.8</td></tr> <tr> <td>>3</td><td>3.6</td><td>-4.8</td></tr> </table>		Charge	Slope	Offset	2	3.1	1	3	3.6	-4.8	>3	3.6	-4.8
Charge	Slope	Offset												
2	3.1	1												
3	3.6	-4.8												
>3	3.6	-4.8												
最多プリカーサ/サイクル	15													
プリカーサの閾値	1,000 カウントと 0.01 %													
アクティブな排除	1 スペクトル後に排除 0.2 分後に開放													
同位体モード	ペプチド													
プリカーサの順位	強度のみ; +2、+3、>+3													
プリカーサの強度に基づくスキャン速度の変更	あり													
ターゲット	25,000 カウント/スペクトル													
MS/MS 累積時間制限の使用	あり													
純度の厳密性	100 %													
純度のカットオフ	30 %													

Swiss-Prot ヒトタンパク質データベースの検索には、Spectrum Mill (偽発見率 1.5 %) を使用しました。トリプシンを消化酵素として使用し、切断ミスの許容数を 2 に設定しました。固定修飾としてカルバミドメチル化、可逆修飾として N 末端アセチル、脱アミド (N)、およびセリン (S)、トレオニン (T)、チロシン (Y) のリン酸化を設定しました。表 4 は詳細な検索パラメータを示しています。

ECD によるリン酸化部位の決定

ECD セルは、短いヘキサポールコリジオンセルと組み合わせて Agilent Q-TOF システムの元のヘキサポールコリジオンセルと置き換えられるように設計されています。ECD セルと短いコリジオンセルを組み合わせた長さは、元のコリジオンセルと同じです (図 5)。ペプチド標準物質 P を使用して ECD 信号を調整し、+2 電荷状態での変換効率が約 1 % になるようにしました。測定はコリジオンエネルギーを印加せずに実行しましたが、ECD 測定には、適用するコリジオンエネルギー (約 5 eV) と同等の設定を使用しました。

m/z、電荷状態、リテンションタイム、デルタリテンションタイム、選択幅、測定時間を含むプリカーサイオンのターゲットリストは、DDA 測定で同定されたリン酸化ペプチドのリストを用いて生成しました。コリジオンエネルギーを 0 eV に設定し、1 回の分析で同じプリカーサイオンを 4 ~ 5 回断片化しました。データは Byonic で分析しました。最初の分析で特定したリン酸化ペプチドをターゲット MS/MS リストから除外し、さらに注入を繰り返して未同定のリン酸化ペプチドに関する実験を継続しました。

表 4. Spectrum Mill の検索パラメータ

Spectrum Mill の検索パラメータ		
データベース	Swiss-Prot ヒトタンパク質	
酵素	トリプシン	
切断ミスの最大値	2	
修飾	固定 カルバミドメチル化	可逆 アセチル (N 末端) 脱アミド型 (N) リン酸化 (S) リン酸化 (T) リン酸化 (Y)
質量許容範囲	MS1 15 ppm	MS2 30 ppm
不確定プリカーサ電荷の最大値	5	
リバースデータベーススコアの計算	あり	
ダイナミックピーク閾値	あり	
ペプチド FDR	1.50 %	
プリカーサの電荷範囲	2 ~ 7	

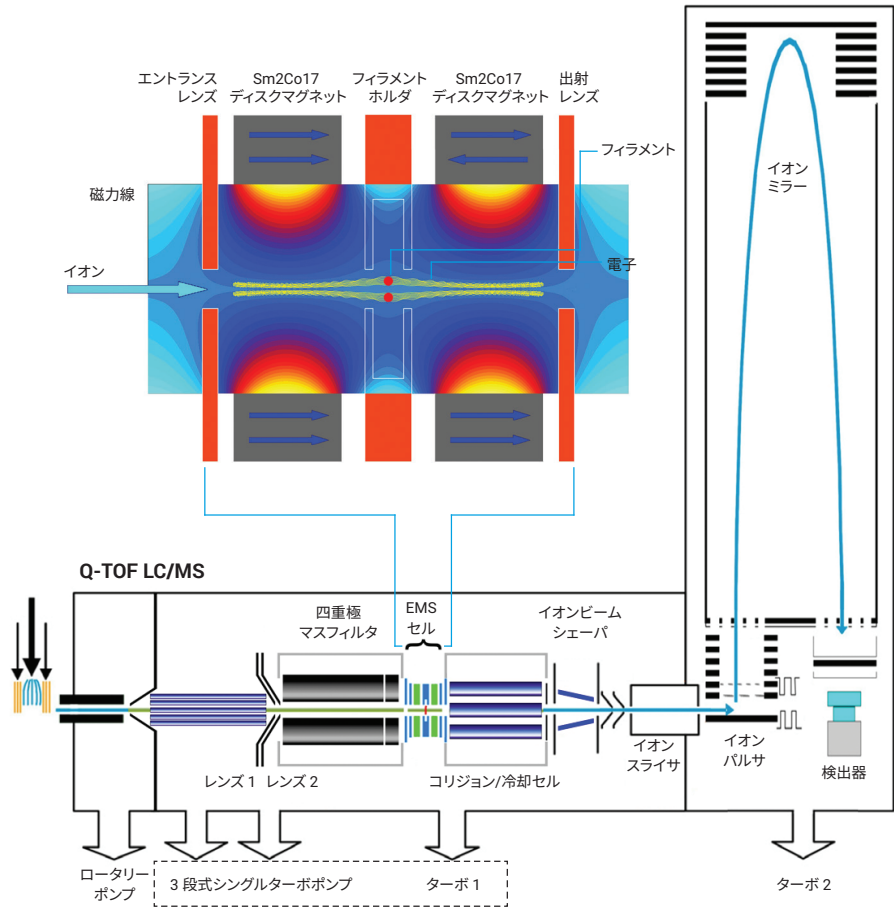


図 5. Agilent Q-TOF LC/MS における静電磁場 (EMS) ECD セルとその位置の概略図

Byonic ソフトウェアで ECD スペクトルを分析しました。同じ Swiss-Prot ヒトタンパク質データベースを使用（酵素はトリプシン、切断ミスは 2 回まで）しました。固定修飾としてカルバミドメチル化、可逆修飾として脱アミド（N、Q）、およびセリン（S）、トレオニン（T）、チロシン（Y）のリン酸化を設定しました。

各修飾部位でのリン酸化の相対定量

さらに、同じ LC グラジエントを用いて「リン酸化ペプチド」サンプルを 1 μ L 注入し、MS1 測定を 3 回実施しました。まず DDA データを Skyline にインポートしてから、ペプチド CID スペクトルライブラリを作成しました。その後、MS1 データをすべて Skyline にインポートして、同定したペプチドピークを MS1 スキャンに基づいて統合しました。ピーク領域（または +2 と +3 のプリカーサイオンからのイオン強度）を Excel にエクスポートして、非リン酸

化ペプチドとリン酸化ペプチド（脱アミド型を含む）の両方に追加しました。各リン酸化部位でのリン酸化ペプチド/非リン酸化ペプチドの比率を、イオン強度の比率に基づいて計算しました。

結果と考察

DDA データの Spectrum Mill 分析

図 6A に、90 分間のグラジエントによる「リン酸化ペプチド」サンプルのトータルイオンクロマトグラム（TIC）を示します。DDA を用いてサンプルを 3 回注入した結果、Spectrum Mill では 437 種類の特徴的なペプチドと 294 種類の特徴的なリン酸化ペプチドが同定されました（表 5）。分析結果を評価するため、HUPO から 89 種類のペプチドシーケンスのリストが提供されました。「リン酸化ペプチド」サンプルから、89 種類の非リン酸化ペプ

チドがすべて同定されました。リン酸化された同等物も同定されましたが、ほとんどのリン酸化部位は CID では確認されませんでした。また、同じメソッドを用いて、濃縮した「リン酸化ペプチド酵母」サンプルも分析しました。図 6B に、90 分間のグラジエントによる濃縮した「リン酸化ペプチド酵母」サンプルの TIC を示します。表 5 に、「リン酸化ペプチド」サンプルと濃縮した「リン酸化ペプチド酵母」サンプルの詳しい検索結果を示します。各測定と検索結果の組み合わせも含まれています。濃縮後には、全部で 287 種類の特徴的なペプチドと 264 種類の特徴的なリン酸化ペプチドが同定されました。ペプチド ID の全体数からの濃縮（リン酸化ペプチド/ペプチド）の選択性は約 92 % です。

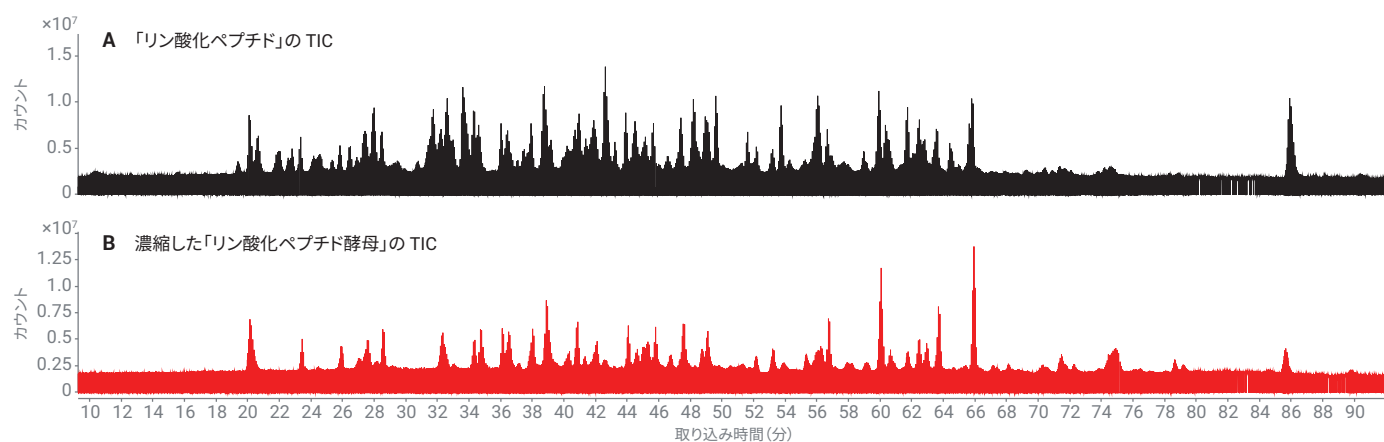


図 6. A) 90 分間のグラジエントによる「リン酸化ペプチド」サンプルの TIC B) 90 分間のグラジエントによる濃縮した「リン酸化ペプチド酵母」サンプルの TIC

表 5. Spectrum Mill の検索結果

	「リン酸化ペプチド」				濃縮した「リン酸化ペプチド酵母」			
	測定 1	測定 2	測定 3	全体	測定 1	測定 2	測定 3	全体
特徴的なペプチドの合計	316	297	308	437	193	203	203	287
特徴的なリン酸化ペプチドの合計	195	182	193	294	179	192	189	264
一リン酸化ペプチド	123	125	127		117	127	123	
二リン酸化ペプチド	63	50	58		52	56	53	
三リン酸化ペプチド	8	6	7		8	8	12	
四リン酸化ペプチド	1	1	1		2	1	1	
リン酸化ペプチド/ペプチドの合計数 (%)	61.7	61.3	62.7	67.3	92.7	94.6	93.1	92.0
リン酸化部位の合計数	277	247	268		253	267	269	
割り当て済み部位 (%)	63	61.9	63.7	62.9	62.4	63.4	62.4	62.7
未割り当て部位	102	94	97		95	98	101	

Byonic による ECD スペクトルの分析

ペプチド VVEAVNSDSDSEFGIPK の分析結果を例として使用して、リン酸化部位の決定の方法を説明します。図 7A に非リン酸化ペプチド VVEAVNSDSDSEFGIPK の CID スペクトルを示します。Spectrum Mill ではプリカーサイオン m/z 896.93 ($z = +2$ 、質量誤差 = 1.1 ppm) が同定されました。このペプチドでリン酸化部位は同定されませんでした。シーケンスマッチングの結果、このペプチドは、b、y タイプのイオンで完全なシーケンスカバー率を示しました。

図 7B、7C、7D に、シーケンスが同じですが、一リン酸化、二リン酸化、三リン酸化したペプチドの ECD スペクトルを示します。図 7B のとおり、Byonic ではこのペプチドでプリカーサイオン m/z 936.92 ($z = +2$ 、質量誤差 = -0.07 ppm) と 1 つのリン酸化部位が同定されました。診断イオン c6 ($m/z = 629.36$) および c7 ($m/z = 796.37$) では、このペプチドのセリン 7 でリン酸化部位が確認されました。図 7C のとおり、このペプチドでは Byonic によってプリカーサイオン m/z 651.60 ($z = +3$ 、質量誤差 = -3.69 ppm) と 2 つのリン酸化部位が同定されました。診断イオン c7 ($m/z = 796.35$) および z11 ($m/z = 1325.45$)、c9 ($m/z = 1078.37$) および z9 ($m/z = 1043.40$) では、このペプチドのセ

リン 7 および 9 で 2 つのリン酸化部位が確認されました。図 7D のとおり、このペプチドでは Byonic によってプリカーサイオン $m/z = 678.25$ ($z = +3$ 、質量誤差 = -11.54 ppm) と 3 つのリン酸化部位が同定されました。診断イオン c7 ($m/z = 796.37$)、c9 ($m/z = 918.42$)、および z9 ($m/z = 1123.40$) では、セリン 7、9、11 で 3 つのリン酸化部位が確認されました。リン酸化の程度が異なるペプチド VVEAVNSDSDSEFGIPK の CID スペクトル (ここには表示されていません) では、リン酸化部位の数だけを同定でき、位置は確認できません。

図 7B と図 7C を比較すると、リン酸化ペプチドのサイズが大きくなると、+3 電荷状態のプリカーサイオンのアバンダンスが高くなり、ECD スペクトルはシーケンスカバー率が向上して改善されます (図 7C)。+2 電荷状態でアバンダンスの低いプリカーサイオンでは生成されるフラグメントイオンが少ないですが、まだリン酸化部位の位置は確認できます (図 7B)。図 7C と図 7D を比較すると、複数 (3 つ以上) のリン酸化部位があるペプチドは、一般的にポジティブイオンモードでのイオン化効率が低いことがわかります。同じ電荷状態 (+3) でアバンダンスが高いプリカーサイオンでは、ECD スペクトルが改善されます (図 7C)。図 7B と図 7D を比較すると、2 つのペ

リカーサイオンのアバンダンスはほぼ同じです。電荷状態が +3 の場合は、+2 の場合より多くのフラグメントイオンが生成されます。

この調査では、HUPO から 89 種類のペプチドシーケンスのリストが提供されました。このシーケンスリストに基づいて ECD によって確認された「リン酸化ペプチド」サンプル中の特徴的なリン酸化ペプチドの総数は 96 です。また、酵母ライセートにスパイクした 96 種類のリン酸化ペプチドのうち 95 種類は、濃縮した「リン酸化ペプチド酵母」サンプルからも同定されました。この結果から、多くのリン酸化ペプチドが濃縮から回収されたことがわかります。逆に、89 種類の非リン酸化ペプチドのうち 9 種類が、「リン酸化ペプチド酵母」サンプルの濃縮後でも検出されました。ペプチドシーケンスリストに基づく濃縮 (リン酸化ペプチド/ペプチド) の選択性は約 91.3 % です。

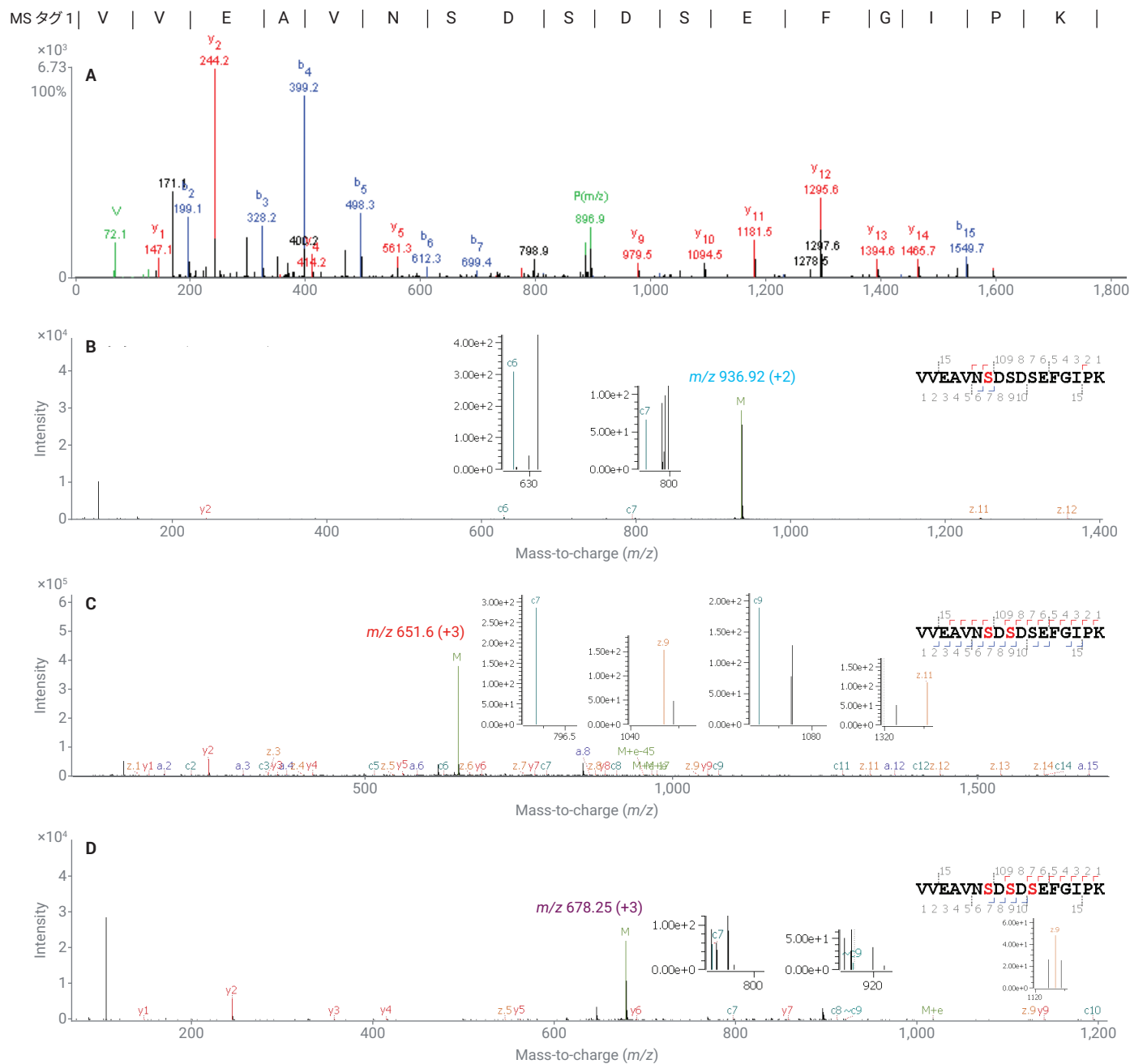


図 7. A) b、y タイプのイオンにより完全なシーケンスカバー率を示すペプチド VVEAVNSDSDSEFGIPK の CID スペクトル。
B)、C)、D) c、z タイプイオンで決定した一リン酸化、二リン酸化、三リン酸化ペプチド VVEAVNSDSDSEFGIPK の ECD スペクトル。
低電荷状態により低感度が予測される場合でも ECD スペクトルにほとんどのシーケンスイオンが存在する。

ペプチドリノ化の相対定量

図 8 に、リン酸化の程度が異なるペプチド VVEAVNSDSDSEFGIPK の抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示します。すべてのペプチドは、C18 カラムを用いて 90 分間のグラジエントで良好に分離しました。二リン酸化ペプチドと三リン酸化ペプチドでは、脱アミド型リン酸化ペプチドのイオン強度を元のリン酸化ペプチドに追加しました。リン酸化ペプチド/非リン酸化ペプチドの相対アバンダンスは、イオン強度に基づいて計算しています。ペプチド VVEAVNSDSDSEFGIPK の場合、非リン酸化ペプチドのアバンダンスを 1.00 とすると、一リン酸化ペプチド、二リン酸化ペプチド、三リン酸化ペプチドの比率はそれぞれ 0.03、4.71、0.02 です (図 8)。「リン酸化ペプチド」サンプル中の全 96 種類のリン酸化ペプチドについて、各修飾部位でのリン酸化の相対アバンダンスを、リン酸化ペプチド/非リン酸化ペプチドの比率に基づいて計算しました。この相対定量では、ペプチド種によってイオン化効率が異なることは考慮されていません。単に各種ペプチドのイオン強度から比較したものです。

結論

HUPO Phosphopeptide Challenge では、Agilent AssayMAP Bravo プラットフォームと LC/Q-TOF システムを用いて、リン酸化ペプチドの自動濃縮と定性/定量分析を実施しました。

ペプチド同定のための CID 測定を実施した結果、「リン酸化ペプチド」サンプルで 437 種類の特徴的なペプチドと 294 種類のリン酸化ペプチドが同定されました。HUPO シーケンスリストに含まれる 89 種類の非リン酸化ペプチドはすべて同定されました。ECD 測定では、89 種類の非リン酸化ペプチドのシーケンスに基づいて、96 種類のリン酸化ペプチドのリン酸化部位の位置を特定しました。シーケンスリストに含まれていない、その他のペプチドについても HUPO に報告されました。

濃縮した「リン酸化ペプチド酵母」サンプルでは、287 種類の特徴的なペプチドが同定され、そのうち 264 種類は特徴的なリン酸化ペプチドでした。濃縮の全体的な選択性は約 92.0 % でした。

また、酵母にスパイクした 96 種類のリン酸化ペプチドのうち 95 種類は、濃縮した「リン酸化ペプチド酵母」サンプルからも同定されました。アジレントはこの研究において、他のどのラボよりも多くのリン酸化ペプチドを濃縮から回収できることを実証しました。

参考文献

1. Russell, J. D.; Murphy, S. Agilent AssayMAP Bravo Technology Enables Reproducible Automated Phosphopeptide Enrichment from Complex Mixtures Using High-Capacity Fe (III)-NTA Cartridges, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6073EN, **2016**.
2. Wu, S.; Wu, L. Human Breast Cancer Cell Line Phosphoproteome Revealed by an Automated and Highly Selective Enrichment Workflow, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0315EN, **2018**.
3. Hsiao, J. J. *et al.*, Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Anal. Chem.* **2018**, 90(15), 9457-9464.

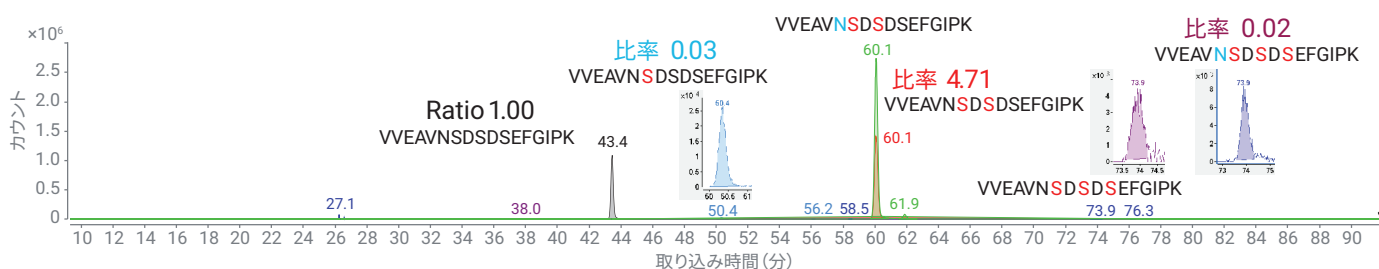


図 8. すべての VVEAVNSDSDSEFGIPK ペプチドの EIC とアノテーション付きのリン酸化ペプチド/非リン酸化ペプチドの比率

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, August 26, 2019

5994-1235JAJP