

北里大学大学院理学研究科

2020 年度博士論文

生体中におけるタンパク質機能状態の高精度比較解析

紺野 亮（ DS-18902 ）

指導教授 生物物理学 米田 茂隆

目次

目次

論文要旨	．．．．1
1 章 背景	．．．．2
1 章 図・表	．．．．4
2 章 材料と方法	．．．．8
2-1 材料	．．．．8
2-2 マウスの組織試料の採取	．．．．8
2-3 組織からのタンパク質抽出	．．．．8
2-4 Recombinant Human Serum Albumin (HSA) のキモトリプシン による限定分解	．．．．9
2-5 β カゼインの脱リン酸化	．．．．9
2-6 タンパク質のジメチル化	．．．．9
2-6-a タンパク質のジメチル化効率の評価	．．．．9
2-6-b 従来法と SI-GeLC-MS/MS におけるジメチル化の比較精度の比較	．．．．10
2-6-c 2-4 および 2-5 で作製した試料 (HSA、および β カゼイン)	．．．．10
2-7 ジメチル化試料の電気泳動	．．．．11
2-7-a 2-6-b で調製した試料	．．．．11
2-7-b 2-5 および 2-6 で調製した試料 (HSA、および β カゼイン)	．．．．11
2-8 ジメチル化試料の溶液中の酵素消化	．．．．11
2-9 ゲル内酵素消化	．．．．11
2-9-a ゲルの切り出し	．．．．11
2-9-a1 2-7-b で調製した試料	．．．．12
2-9-a2 2-7-b で作製した試料 (HSA)	．．．．12
2-9-a3 2-7-b で作製した試料 (β カゼイン)	．．．．12
2-9-b ゲル内酵素消化	．．．．12
2-9-b1 2-9-a1 および 2-9-a2 で作製した試料 (HSA)	．．．．12
2-9-b2 2-9-a3 で作製した試料 (β カゼイン)	．．．．13
2-10 脱塩処理 (Stop and go extraction Tip : STAGE Tip)	．．．．13
2-11 MS 試料の調製	．．．．13

2-12 LC-MS 分析	・ ・ ・ ・ 14
2-12-a 溶液中での酵素消化試料の LC-MS/MS 分析	・ ・ ・ ・ 14
2-12-b ゲル内消化試料の LC-MS/MS 分析	・ ・ ・ ・ 14
2-13 タンパク質・ペプチドの同定解析	・ ・ ・ ・ 15
2-13-a -12a の同定解析	・ ・ ・ ・ 15
2-13-b 2-7-b で調製した試料の同定解析	・ ・ ・ ・ 15
2-13-c 2-4 で調製した試料 (HSA)	・ ・ ・ ・ 16
2-13-d 2-5 で調製した試料 (β カゼイン)	・ ・ ・ ・ 16
2-14 Skyline による XIC の解析	・ ・ ・ ・ 16
2-14-a 2-7-b で調製した試料	・ ・ ・ ・ 16
2-14-b 2-7-b および 2-5 で調製した試料 (HSA)	・ ・ ・ ・ 17
2-14-c 2-5 で調製した試料 (β カゼイン)	・ ・ ・ ・ 17
2-15 Peptograph の作成	・ ・ ・ ・ 17
2 章 図・表	・ ・ ・ ・ 18
3 章 結果	・ ・ ・ ・ 33
3-1 SI-GeLC-MS/MS 法の評価	・ ・ ・ ・ 33
3-1-a タンパク質におけるジメチル化効率の評価	・ ・ ・ ・ 33
3-1-b 従来法と SI-GeLC-MS/MS におけるジメチル化の精度の比較	・ ・ ・ ・ 33
3-1-c 高精度な定量分析におけるペプチドの網羅性	・ ・ ・ ・ 34
3-1-d SI-GeLC-MS/MS のジメチル化比較分析の再現性	・ ・ ・ ・ 35
3-2 モデル試料を用いたタンパク質分解および翻訳後修飾の高精度比較分析	・ ・ ・ ・ 35
3-2-a 限定分解した HSA を用いたタンパク質分解の検出	・ ・ ・ ・ 35
3-2-b 脱リン酸化 β カゼインを用いたタンパク質翻訳後修飾の検出	・ ・ ・ ・ 35
3 章 図・表	・ ・ ・ ・ 38
4 章 考察	・ ・ ・ ・ 46
4 章 図	・ ・ ・ ・ 48
参考文献	・ ・ ・ ・ 49
謝辞	・ ・ ・ ・ 53

生体中におけるタンパク質機能状態の高精度比較解析

生物科学専攻 生物物理学

DS-18902 紺野 亮

タンパク質の酵素消化ペプチドを網羅的に分析する、いわゆるショットガンプロテオミクス技術の急速な発展に伴い、生命ならびに疾患に関連したタンパク質の高感度な検出が可能となってきた。しかし、この方法は最初の段階でタンパク質を酵素消化するため、疾患や生理機能にとって重要なタンパク質の切断状態を解析することは不可能である。一方、試料中のタンパク質を電気泳動で分離し、ゲルを短冊状に切り出してゲル内消化後に質量分析する one-dimensional SDS-PAGE followed by LC-MS/MS (GeLC-MS/MS) 法はタンパク質の切断情報を解析することができる。しかし、2 試料間での比較を行う場合、レーン間でのゲルの切り出し精度の低さや高感度質量分析計の分析における不安定性により、タンパク質切断状態の高精度な比較解析は困難である。そこで、本研究では安定同位体ジメチル標識と GeLC-MS/MS 法を組み合わせた Stable isotope labeled GeLC-MS/MS (SI-GeLC-MS/MS) 法を開発した。SI-GeLC-MS/MS 法では、従来法に比べて約 2 倍にあたる全体の約 80% のペプチドについて高い精度（比率 0.8~1.25 以内）での比較分析が実現できた。これらのことから本方法によって比較対象試料中のペプチドの高精度な比較分析を実現できることが示された。さらに、確立した方法を限定分解したヒト血清アルブミン（HSA）と β カゼインに応用し、タンパク質の切断ならびに翻訳後修飾の解析を行った。その結果、HSA では消化酵素量の増加に伴って、切断断片が増加したことを確認した。また、 β カゼインではリン酸化による電気泳動の移動度の変化およびリン酸化部位の特定に成功した。

以上の結果より、本研究で開発した SI-GeLC-MS/MS 法は 2 試料間のタンパク質切断状態ならびに翻訳後修飾の違いを高い精度で比較分析可能であり、今後、疾患や生理機能に直結するタンパク質の切断情報の検出に役立つものと考えている。

1 章 背景

タンパク質の活性、局在、ターンオーバーなどのライフサイクルはリン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾および、タンパク質分解、タンパク質間の相互作用などのタンパク質機能状態の変化によって調節されている[1,2]。例えば、タンパク質分解は免疫応答やシグナル伝達などに関与している。また、タンパク質分解機能不全は、感染症や癌などの病理学的現象にも関係している[3]。

過去 20 年以上にわたり、溶液中で酵素消化を行うショットガンプロテオミクスは、マウス脳から一度に 10000 タンパク質が同定可能になり[5]、また、リン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾の解析にも利用され[2,6,7]、生命現象に関与するタンパク質の検出も可能になってきた。しかし、図 1 で示すようにこの方法はトリプシンやキモトリプシンなどの酵素を用いて人為的に消化したペプチド混合物を LC-MS/MS 分析するため、生理条件下でのタンパク質分解に関する情報が損失する。

一方、SDS-PAGE と液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析を組み合わせた方法 (one-dimensional SDS-PAGE followed by LC-MS/MS (GeLC-MS/MS) 法) [7,9] は、SDS-PAGE でタンパク質分解断片を分離し、その後、LC-MS/MS によってタンパク質断片の配列を同定する (図 2)。したがって、GeLC-MS/MS 法は、ショットガンプロテオミクスの解析では困難であったタンパク質分解断片の検出を可能にし、複雑な試料からそれぞれのタンパク質分解断片を分離、検出する優れた方法である。GeLC-MS/MS 法を使用した解析法である Protein Topography and Migration Analysis Platform (PROTOMAP 法) [3,10] は、サンプル間における各タンパク質のタンパク質分解状態と存在量の違いを可視化する方法である。しかし、ゲルからタンパク質を抽出するステップと LC-MS/MS 測定の再現性が低いため、正確な定量結果が得られない可能性がある[7,11,12]。

これらの問題を解決するために、安定同位体標識されたアミノ酸を用いて細胞培養を行う Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC 法) と組み合わせた GeLC-MS/MS 法が開発された[13,14]。SILAC 法では、通常のアミノ酸で培養した細胞と安定同位体を含むアミノ酸で培養した細胞を混合したのち、試料調製と LC-MS/MS 分析を行う[15]。その後、各同位体で標識された同じペプチド断片に対応する extracted ion chromatogram(XIC) の面積値を定量的に解析することで高精度な比較分析を可能にする。したがって、SILAC 法と GeLC-MS/MS 法を組み合わせた方法は PROTOMAP 法に応用することで、タンパク質分解断片は高精度に比較解析できる。しかし、SILAC はタンパク質のアミノ酸を安定同位体アミノ酸に置換する必要があるため、培養試料に対してのみ標識可能であり、組織や体液などの多種多様な試料に対しては標識できない。そのため、多種多様な試料に応用できる汎用的かつ正確な比較定量が可能な方法が必要とされてきた。

そこで、本研究では多種多様な試料に応用できる安定同位体ジメチル標識[16]と

GeLC-MS/MS を組み合わせた新たな方法 (Stable isotope labeled GeLC-MS/MS (SI-GeLC-MS/MS)) を確立し (図 3)、タンパク質分解断片の高精度な比較分析を行うことを目指した。図 4 に安定同位体ジメチル標識の概要を示す。安定同位体ジメチル標識は簡易なステップかつ細胞や組織、体液を含む幅広い試料に利用可能であるため、タンパク質科学研究で幅広く使用されている方法である。タンパク質の安定同位体ジメチル標識は、ホルムアルデヒド (CH_2O) とシアノ水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_3CN) により、タンパク質の N 端とリジン残基の各アミノ基の 2 つの水素を 2 つのメチル基に置換する。また CH_2O の化学的性質は、安定同位体 $^{13}\text{CD}_2\text{O}$ の化学的性質と非常に類似しているため、同位体試薬の質量差 $\Delta\text{mass} = 6$ に相対するピークがほぼ同じ保持時間 (RT) で溶出され、ダブルットイオンピークとして検出される。このダブルットイオンピークの各ピークの XIC 面積の比より、比較対象試料中の対応するペプチドの量比を高精度に比較できる。

本研究ではタンパク質分解断片の正確な比較分析を行うために、まずタンパク質のジメチル化標識効率を検討し、この条件を用いて、SI-GeLC-MS/MS 法と従来法である GeLC-MS/MS 法を用いて電気泳動のレーン間を比較する方法との比較分析の精度を評価した。また、SI-GeLC-MS/MS 法の定量比較できるペプチド数および、高精度に定量比較できるペプチド数について従来法と比較した。さらに多検体分析を想定して、この確立した方法の比較精度の再現性を検討し、最後に、本方法の目的であるタンパク質分解ならびにタンパク質の翻訳後修飾において、モデル試料を用いて具現性を示した。

1章 図

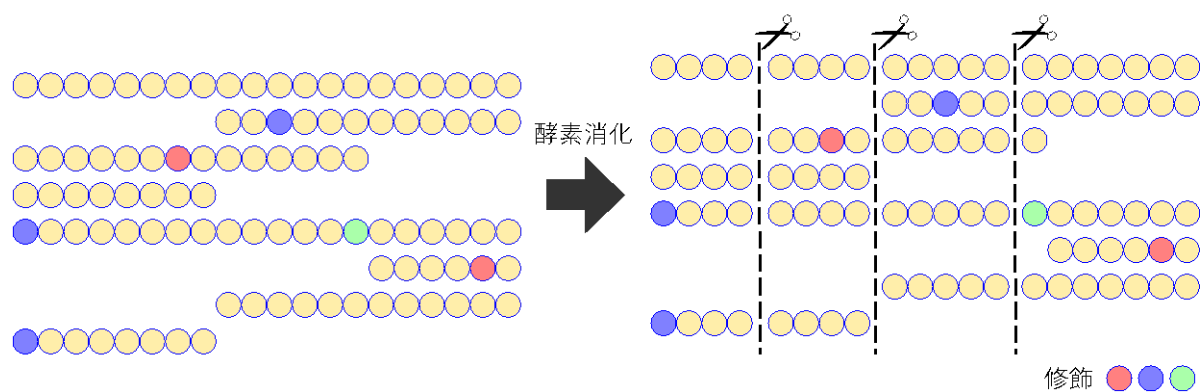


図1 タンパク質と消化ペプチドの多様性

タンパク質は生理的に修飾や切断を受けて存在している。このタンパク質は人為的に切断することで修飾や切断の違いにより多くの酵素消化ペプチドを生成する。

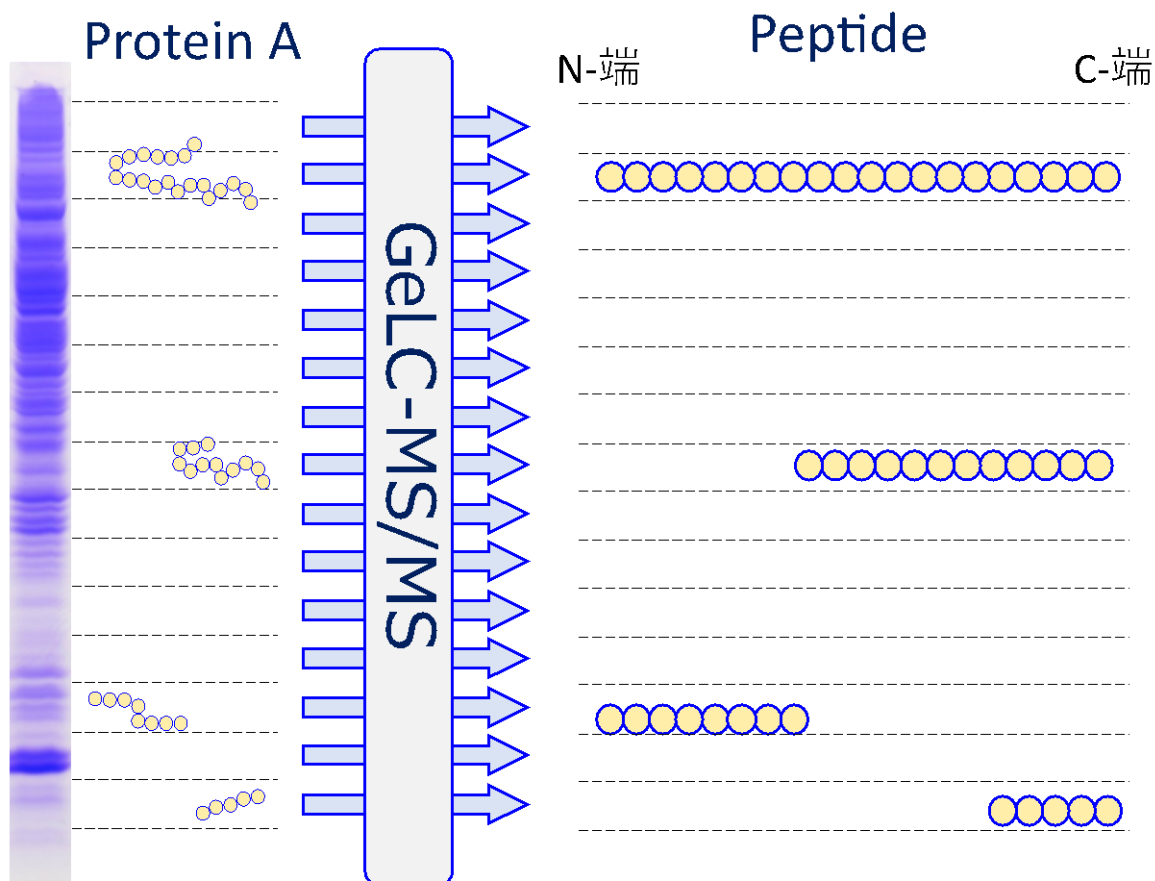


図2 GeLC-MS/MS 法の解析例

生理的に切断され生成されたタンパク質分解断片は SDS-PAGE によって、分子量ごとに分離される。その後、各ゲル断片を GeLC-MS/MS することでタンパク質分解断片を同定することができる。

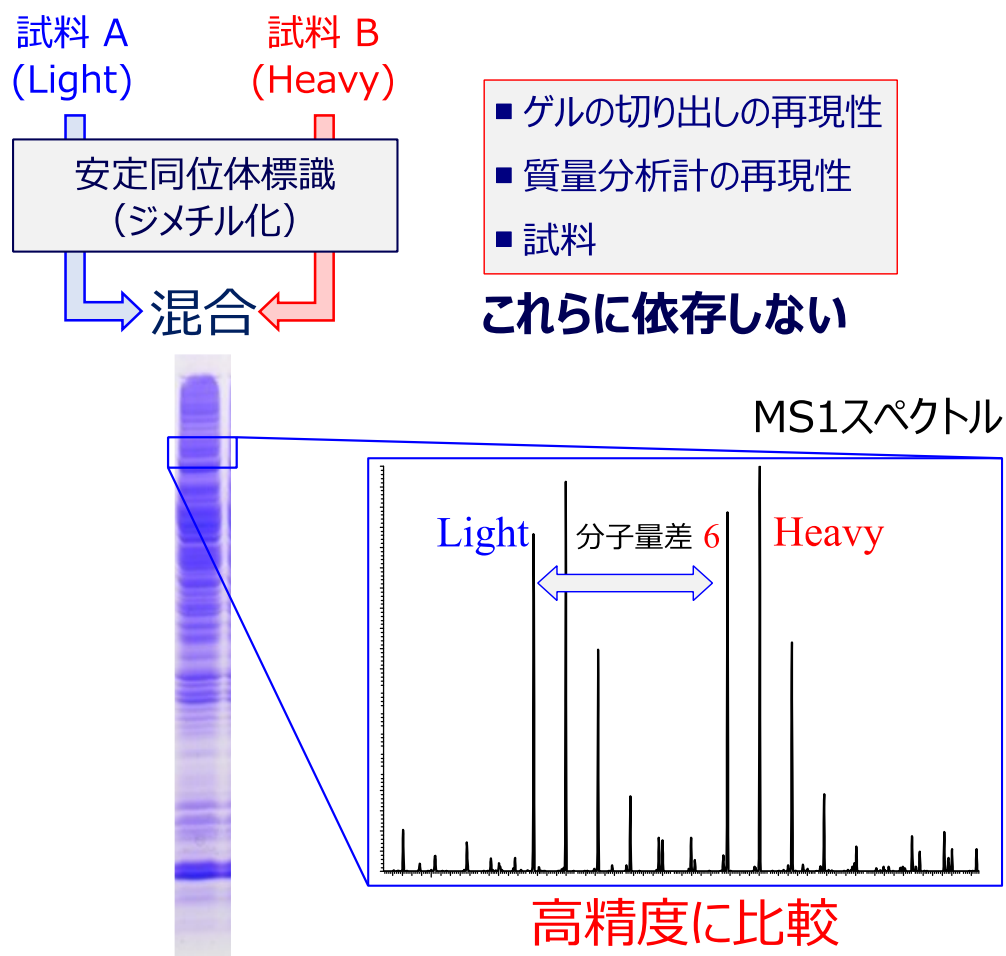
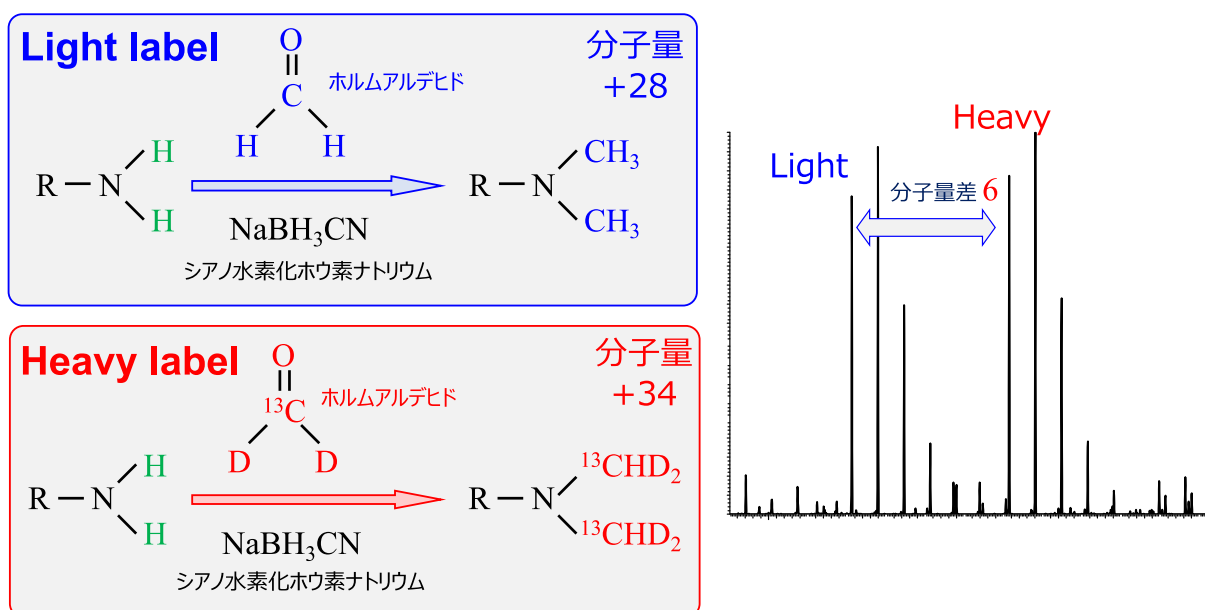


図3 確立した方法の概要

比較試料を2種類の同位体元素の違うホルムアルデヒドを用いて、それぞれ安定同位体ジメチル標識して、ジメチル化試料を混合したのちに一つのレーンで電気泳動する。その後、GeLC-MS/MSを行うことで、2種類の安定同位体ジメチル標識されたタンパク質を一度にLC-MS/MS分析することができる。これによってゲルの切り出しや質量分析計の再現性に依存せずに高精度に比較解析を実現する。



2 章 試料と方法

2-2 マウスの組織試料の採取

C57BL/6 マウスは、クレアジャパン株式会社（東京都）から購入した。動物に関する実験手順は、北里大学医学部の動物実験倫理委員会の承認を得た上で、マウスの全脳を採取した。

2-5 β カゼインの脱リン酸化

β カゼインの脱リン酸化は New England Biolabs (MA, USA) が提供しているプロトコールに従った (図 8)。蒸留水(DW) 40 μ L に β カゼイン 20 μ g を溶解し、10 \times NE バッファーを 5 μ L、10 mM $MnCl_2$ 5 μ L を加えた。その後、ラムダプロテインホスファターゼを 1 μ L 加え、30°Cで 30 分間インキュベートして脱リン酸化した。脱リン酸化していない試料はジメチル化 Light 標識、脱リン酸化した試料はジメチル化 Heavy 標識を行った。

2-8 ジメチル化試料の溶液中での酵素消化

2-9-a1 2-7-a で調製した試料のゲルの切り出し

マウス脳から抽出したタンパク質と LMWM のジメチル化された混合試料を電気泳動した後、LMWM のバンドに従って 250 と 97、45、30、14 kDa の 5 か所の分子量の位置を 0.2 cm の幅で切り出し、各ゲル中のタンパク質をゲル内で酵素消化した。

2-9-a2 2-7-b で作製した試料 (HSA) のゲルの切り出し

キモトリプシンにより限定分解されたジメチル化HSAは電気泳動した後、0.3 cm の幅で短冊状に16断片切り出し、各ゲル中のタンパク質をゲル内で酵素消化した。

2-9-a3 2-7-b で作製した試料 (β -カゼイン) のゲルの切り出し

脱リン酸化した β -カゼインと β -カゼインはジメチル化後に混合し電気泳動した。それぞれのバンドを 0.1 cm 幅ずつ切り出し、各ゲル中のタンパク質をゲル内で酵素消化した。

2-9-b ゲル内酵素消化

2-9-b1 2-9-a1, a2, で切り出したゲルのゲル内酵素消化

ゲル内酵素消化のプロトコールを図 12 に示す。各試料を電気泳動後、切り出したゲルに 800 μ L の脱染色液 (50 mM 炭酸水素アンモニウム (ABC)、50%ACN) を加えて 2 時間脱染色した後、200 μ L の蒸留水でゲルバンドを洗浄した。溶液を捨てた後、400 μ L の 100% ACN でゲルを脱水した。ACN 溶液を除去した後、ゲル中のタンパク質を 100 μ L の 10mM Dithiothreitol と 25 mM ABC で 56°C、30 分間反応させ、還元した。還元試薬を除去し、100 μ L の 25 mM ABC を添加してゲル断片を洗浄した。還元したタンパク質は 100 μ L の 55 mM IAA と 25 mM ABC を 30 分間、室温、遮光してシステイン残基をアルキル化修飾した。アルキル化試薬を除去し、100 μ L の 25mM ABC を添加して、ゲルを洗浄した。そして、ゲルに 100% ACN を加えて 15 分間静置してゲルを脱水した。脱水したゲルに 0.025 μ g の Trypsin を加えた 50 mM Tris-HCl(pH 9.0) 25 μ L を用いて氷上で 45 分間膨潤させた。残留液を除去し、30 μ L の 50 mM Tris-HCl(pH 9.0)を添加して、18 時間 37°C でゲル内消化を行った。消化後、ゲルを吸わないように上清①を回収した。膨潤したゲルに 5% FA/50% ACN 30 μ L を加え、20 分間室温でボルテックスした。そして、ゲルを吸わないように上清②を回収し、上清①と混合し、混合物を凍結乾燥した。凍結乾燥後、沈殿物に 0.1% TFA 40 μ L を添加した。そして 10 分間攪拌し、Bioruptor sonicator (30 秒 on/30 秒 off) で 10 分間、沈殿物を溶解した。その後、

19000×g、4℃、15 分間で遠心を行った。上清を回収し、脱塩処理を行った。

2-9-b2 2-9-a3 で切り出したゲルのゲル内酵素消化

ゲルを切り出した後、各ゲル断片を脱染色した。その後、各ゲル断片は DTT を用いてシステイン残基のジスルフィド結合の切断を行い、IAA を用いて切断したシステイン残基の再結合を防ぐためにシステイン残基にカルバミドメチル化を修飾した。還元アルキル化したゲル断片を脱水した後、ゲルに 20 ng のキモトリプシンを加えた 10 mM CaCl₂/50 mM Tris-HCl (pH 9.0) 20 μL を用いて氷上で 45 分間膨潤させた。残留液を除去し、25 μL の 10 mM CaCl₂/50 mM Tris-HCl (pH 9.0) を添加して、18 時間 25℃でゲル内消化を行った。消化酵素を添加する前後の実験手順は上記の 2-9-b1 と同様に行った。

2-10 脱塩処理 (Stop and go extraction Tip : STAGE Tip) [17]

STAGE-Tip のプロトコルを図 13 に示す。低流速 HPLC の流路を詰まらせる原因や LC-MS 測定時のノイズの原因になる塩などの不純物を除去するために、Stage Tip (200 μL チップの先にクロマトグラフィー用樹脂を高密度に詰めたテフロン樹脂 (エンポアディスク solid phase extraction (3M、ミネソタ州、USA)) (C₁₈担体) で脱塩処理した。Stage Tip の構造と実験手順を図 13 に示す。まずメタノールをチップ内に添加し、1500 × g で溶媒が C₁₈担体を完全に通過するまで遠心した。70% ACN/0.1% TFA (溶出液) を Tip 内に注入し、1500 × g で溶媒が完全に通過するまで遠心した。0.1% TFA (洗浄液) を Tip 内に注入し、1500 × g で溶媒が完全に C₁₈担体を通過するまで遠心し C₁₈担体を平衡化した。試料を Tip 内に注入し、1000 × g で試料が C₁₈担体を完全に通過するまで遠心した。ここで完全に試料を C₁₈担体に吸着させるために C₁₈担体を通過した試料を再度同カラムに注入し、1000 × g で試料が C₁₈担体を完全に通過するまで遠心した。ペプチド成分以外を洗浄するために洗浄液を注入し、1500 × g で溶媒が C₁₈担体を完全に通過するまで遠心した。再度洗浄液を注入し同様に遠心した。その後、ペプチド成分を溶出するために溶出液 80 μL をチップに注入し、1000 × g で全量が C₁₈担体を通過するまで遠心し、ペプチド成分を回収した。得られた試料を凍結乾燥により濃縮し、LC-MS 測定するまで -80℃で保存した。

2-11 MS 試料の調製

MS 試料の調製のプロトコルを図 14 に示す。乾固した試料に 3% ACN/0.1% FA を 20 μL 添加し、MICRO TUBE MIXER (ミキサー、MRX 152、TOMY、日本、東京) で 10 分間攪拌した。そして攪拌した試料を Bioruptor sonicator (30 秒 on/30 秒 off) でさらに溶解した。その後、19000 × g、4℃、15 分間で遠心を行った。上清を回収し NanoDrop

(Thermo Fisher Scientific, CA, USA) でタンパク質定量を行い 50 ng/ μ L になるように調製を行った。この試料を質量分析計で分析した。

2-12 LC-MS/MS 分析

2-12a 溶液中での酵素消化試料の LC-MS/MS 分析

LC のグラジエントを図 15 に、MS の分析条件を表 2 に示す。ジメチル化試料は、超低流速用 HPLC (EASY-nLC 1000、Thermo Fisher Scientific) で分離し、溶出した試料液を四重極オービトラップハイブリット質量分析計 (Q-Exactive、Thermo Fisher Scientific) に直接導入して LC-MS/MS 分析を行った。ジメチル化標識タンパク質の酵素消化ペプチドは、分析カラム (C18、粒径 3 μ m、0.075 mm \times 125 mm ; 日京テクノス、日本) にインジェクションした。その後、EASY-nLC 1000 を用いて、300 nL/min の流速で、緩衝液 A (0.1% FA) および B (0.1% FA および 90% ACN) のグラジエント (0-1 分; 5-10%B、1-41 分; 10-25%B; 41-54 分、25-50%B; 54-56 分、50-80%B、56-60 分; 80%B) でペプチドを分離し、Q-Exactive にインジェクションした。イオン化部のスプレー電圧は 2 kV、イオン導入管温度は 250°C に設定した。質量分析計では Automatic gain control (AGC) target は 1×10^6 、MS1 スペクトルのスキャン範囲を 350~900 m/z、分解能を 140000 に設定した。MS2 スペクトルは AGC target 1×10^5 、intensity threshold 2×10^4 に設定した。ペプチドイオンの取得は Data dependent mode で行った。最も強度の高い 10 個のペプチドイオンを、Isolation window 幅 2.4 m/z で選択し、27%の相対的衝突エネルギーで衝突誘起解離させた。MS2 スペクトルは分解能 17,500 (200 m/z) で分析した。最大許容イオン蓄積時間では、MS1 スキャンは 100 ms、MS2 スキャンは 50 ms に設定した。Dynamic exclusion は 30 秒に設定した。LC-MS/MS 分析で得られた生データファイルは、ProteomeXchange コンソーシアム (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) [18] の jPOST パートナーリポジトリ (<http://jpostdb.org>) [19] を用いて、ProteomeXchange のデータセット識別子 PXD022591、jPOST のデータセット識別子を JPST001046 として登録した。

2-12b ゲル内消化試料試料の LC-MS/MS 分析

LC のグラジエントを図 15 に、MS の分析条件を表 2 に示す。ジメチル化試料は、超低流速用 HPLC (EASY-nLC 1000、Thermo Fisher Scientific) と四重極オービトラップベンチトップ型質量分析計 (Q-Exactive、Thermo Fisher Scientific) を組み合わせて分析した。ジメチル化試料中の酵素消化ペプチドは、分析カラム (C18、粒径 3 μ m、0.075 mm \times 125 mm ; 日京テクノス) に直接注入した。酵素消化ペプチドは EASY-nLC 1000 を用いて、300 nL/min の流速で、緩衝液 A (0.1% FA) および B (0.1% FA および 90% ACN) のグラジエント (0~29 分; 5~30%B、29~37 分; 30~55%B、

2-15 Peptograph[10]の作成

Peptograph は SDS-PAGE からのタンパク質分子量情報と検出した消化ペプチドで示したある特定のタンパク質の同定状況を示す 2 次元マップである。本研究ではこの 2 次元マップ上に比較対象ペプチド間の XIC 面積比を描いた。この 2 次元マップの横軸は一つのタンパク質に由来する検出した消化ペプチドをタンパク質配列の N 端から C 端の順に、縦軸は SDS-PAGE ゲルから切り出したゲルを高分子量から低分子量の順に並べた。また、Light 標識および Heavy 標識されたペプチドの XIC 面積比は検出できたゲルにプロットし、1 タンパク質の Peptograph を作成した。

抽出



マウス全脳に
PTS(200 mM TEAB, 12 mM SDC, 12 mM SLS) 1mLを添加
氷上でホモジナイズ
超音波破碎機で 30 分間破碎 (30 秒 on, 30 秒 off,氷水上)
遠心 (19,000×g, 15 分間, 4℃)

回収



上清を回収
NanoDropで1mg/mLになるようにプロテアーゼインヒビター入りのPTSで調製
使用まで-80℃で保存

図 6. 組織からのタンパク質抽出

還元



HSA 20 μg に PTS 20 μL を添加
200 mM TCEP/200 mM TEAB 4 μL を添加
vortex (Flash) → 加熱 (30 分間、50 $^{\circ}\text{C}$)

アルキル化



試料 24 μL に 375 mM IAA/200 mM TEAB 4 μL を添加
vortex (Flash) → 遮光にて静置 (30 分間、室温)
試料 28 μL に 400 mM L-Cys 4 μL を添加
vortex (Flash) → 遮光にて静置 (10 分間、室温)

消化



試料 32 μL に 2 ng/ μL Chymotrypsin 4 μL 、または 0.4 ng/ μL Chymotrypsin 4 μL を添加
試料 36 μL に 100mM CaCl_2 4 μL を添加
静置 (30 分間、25 $^{\circ}\text{C}$)
ジメチル化へ

図 7 キモトリプシンを用いた HSA の限定分解

脱リン酸化



B-カゼイン 20 μg に DW 40 μL を添加

試料 20 μL に 10 \times NEバッファー 5 μL を添加

試料 25 μL に 10 mM MnCl_2 5 μL を添加

試料 30 μL に ラムダプロテインホスホターゼ 1 μL を添加

加熱（30分間、30 $^{\circ}\text{C}$ ）

ジメチル化へ

図 8 β カゼインの脱リン酸化

New England Biolabs (MA, USA) が提供しているプロトコールに従って脱リン酸化した。



図 11 キモトリプシンを用いた 酵素消化

表 1 マウス脳タンパク質と LMW マーカートンパク質の混合比

	Dimethylation	試料 1	試料 2
Mouse brain	Light	30	30
(μg)	Heavy	30	30
LMWM	Light	3	3
(μg)	Heavy	3	6

ゲルの切り出し



スポットを切り出す
50% ACN / 50 mM NH_4HCO_3 (ABC)を 800 μL 加える
CBB を除去できるまでRotate (2 または 3 h以上)
上清を除く
DWを 500 μL を添加⇒上清を除く
100% ACN を 200 μL 添加
静置 (15 分間、室温)
上清を除く
Speed Vac (15 分間)

還元



10 mM DTT/25 mM ABC を 100 μL を添加
vortex (Flash) →加熱 (1時間、56℃)
上清を除く
25 mM ABCを 100 μL を添加⇒上清を除く

アルキル化



55 mM IAA/25 mM ABC を 100 μL を添加
遮光にて静置 (30 分間、室温)
上清を除く
25 mM ABCを 100 μL を添加⇒上清を除く
100% ACN を 200 μL 添加
静置 (15 分間、室温)
上清を除く
Speed Vac (15 分間)

消化



1 ng/ μL Trypsin/50 mM Tris-HCl(pH 9.0) 25 μL を添加
氷上で膨潤 (45 分間)
上清を除く
50 mM Tris-HCl(pH 9.0) 25 μL を添加
加熱 (18 時間、37℃)

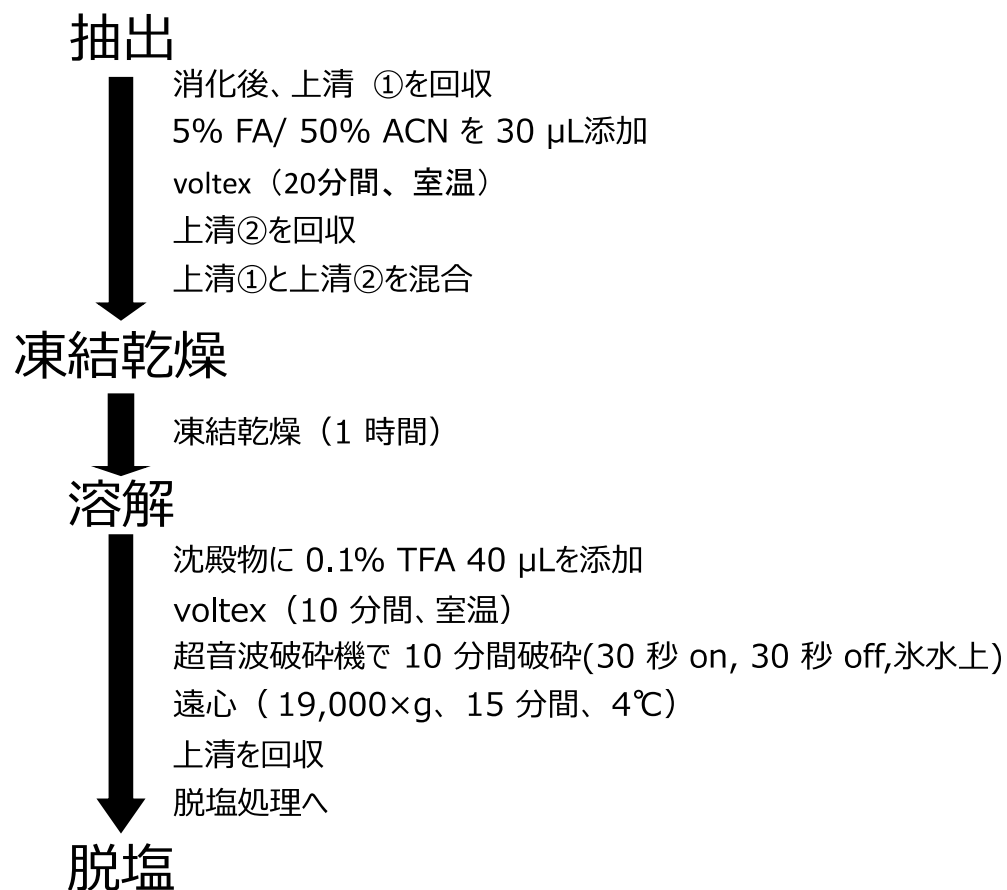


図 12 ゲル内酵素消化

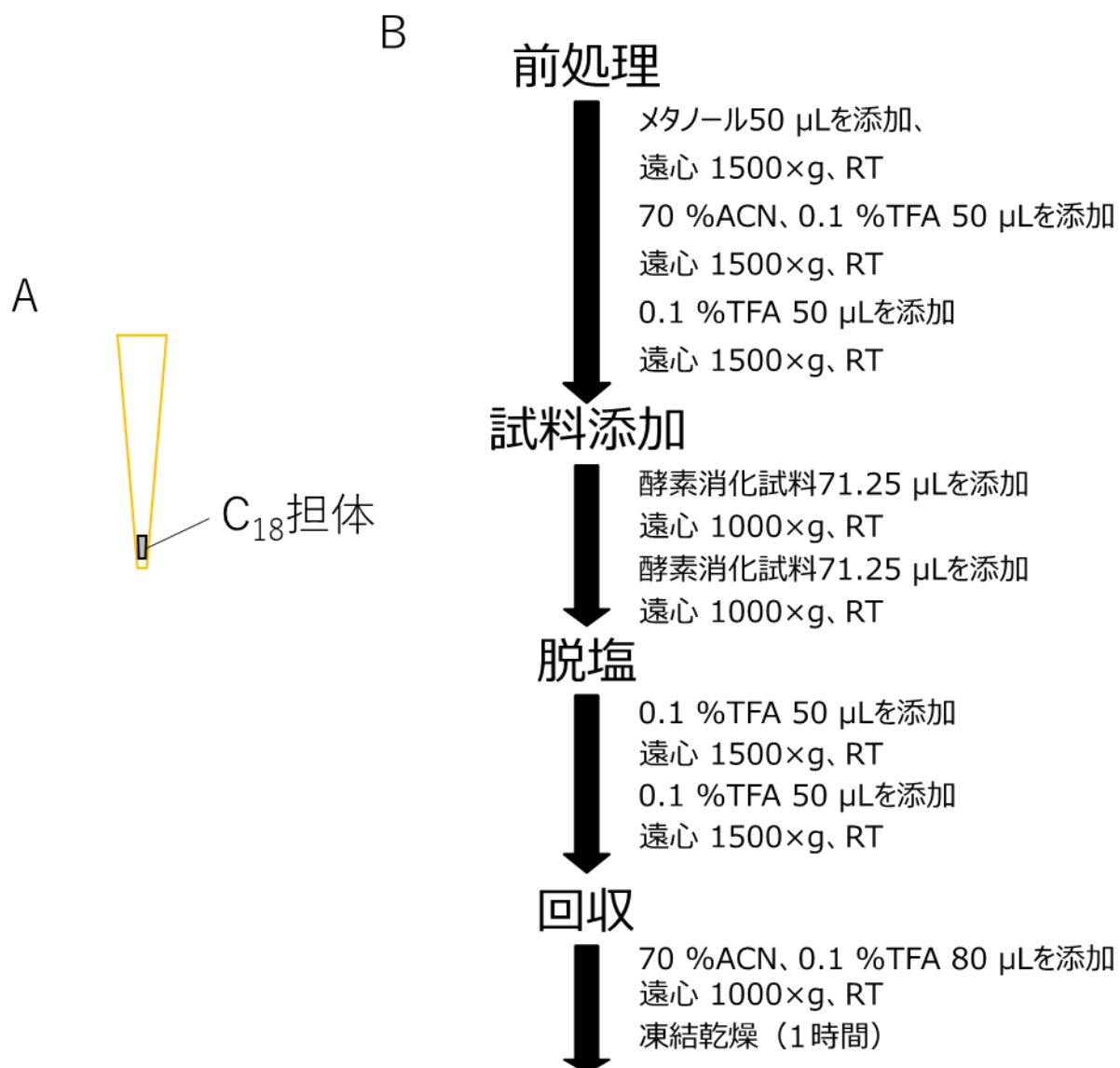


図 13 脱塩処理（Stage Tip）の構造と実験手順

A：Stage Tip の構造, B：Stage Tip の実験手順

溶解



沈殿物に 3% ACN/0.1% FA 20 μ Lを添加

vortex (10 分間、室温)

超音波破碎機で 10 分間破碎(30 秒 on, 30 秒 off, 氷水上)

遠心 (19,000 \times g、15 分間、4 $^{\circ}$ C)

回収



上清を回収

NanoDropでタンパク質定量

図 14 質量分析の溶媒調製

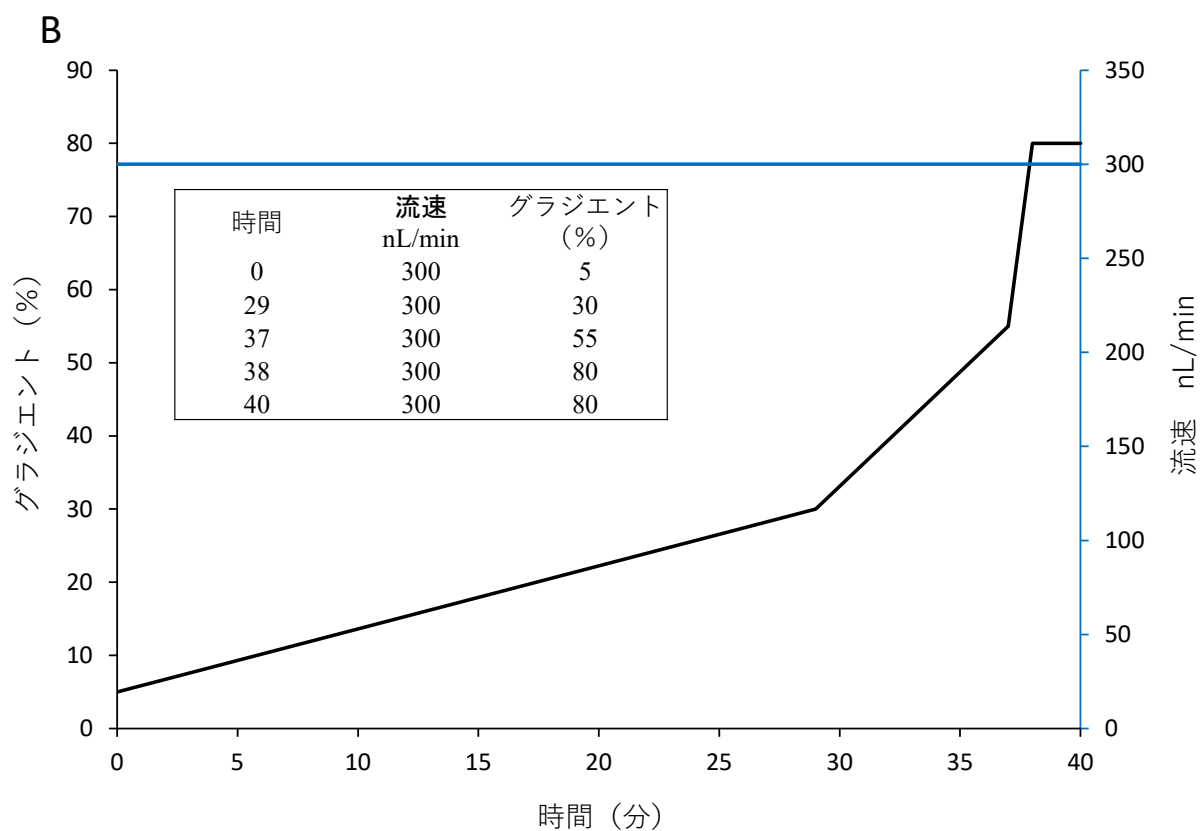
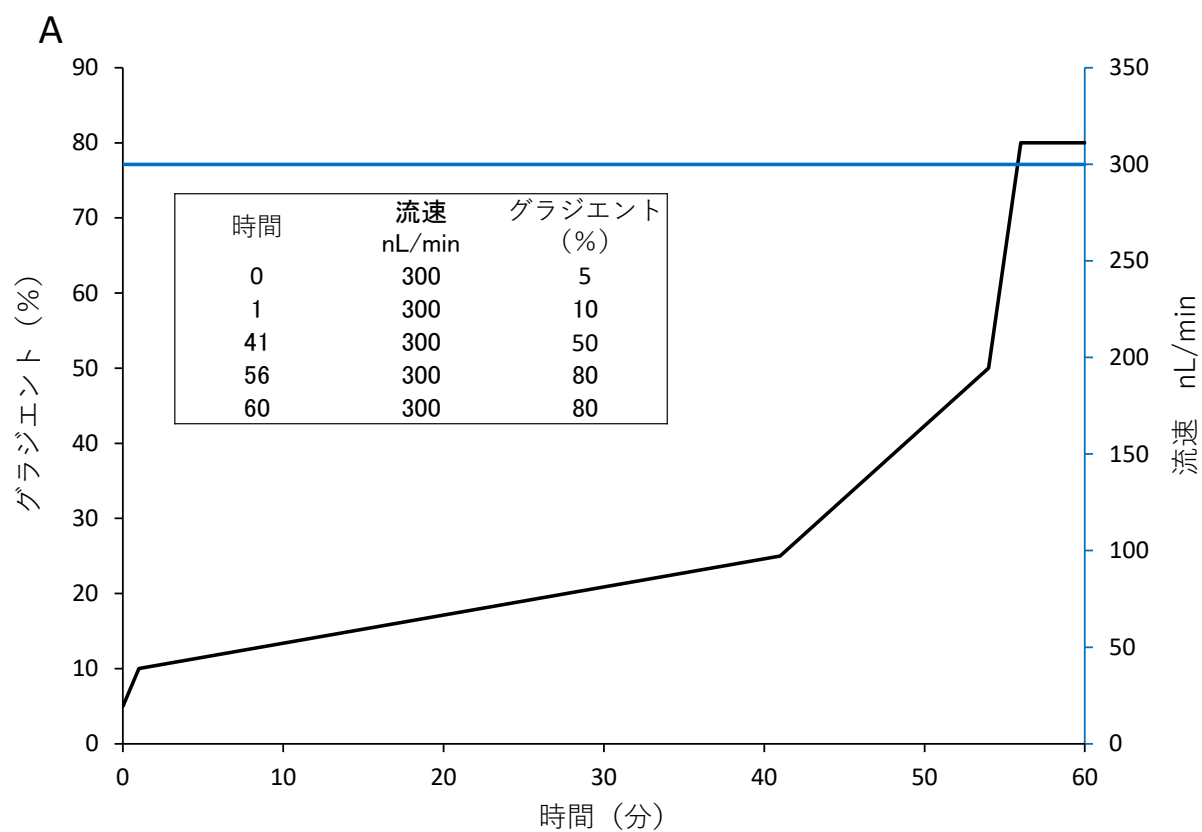


図 15 nanoLC のグラジエント

A; ジメチル化効率の評価のための LC グラジエント、B; ゲル内酵素消化した試料のための LC グラジエント。黒線は LC のグラジエント、青線は LC の流速。

表 2 質量分析計のパラメータ

	ジメチル化効率の評価	ゲル内酵素消化
Time	60 min	40 min
FullMS		
Resolution	140000	140000
AGC Target	1.00×10^6	3.00×10^6
Maximum IT	100 ms	100 ms
Scan range	350 - 900 m/z	350 - 1400 m/z
dd-MS2		
Resolution	17500	17500
AGC Target	1.00×10^5	3.00×10^5
Maximum IT	50 ms	50 ms
Loop count	10	10
Isolation window	2.4 m/z	2.4 m/z
NCE	27	27
Charge exclusion	unassigned, 1, 6, 7, 8, > 8	unassigned, 1, 6, 7, 8, > 8
Dynamic exclusion	30 s	30 s

3 章 結果

3-2 モデル試料を用いたタンパク質分解および翻訳後修飾の高精度比較分析

3-2-a 限定分解した HSA を用いたタンパク質分解の検出

本方法で用いている GeLC-MS/MS は peptograph を用いることでタンパク質分解を視覚的に検出することができるはずである。そこで、本方法でもタンパク質分解を視覚的に検出し、タンパク質分解断片の定量比較について調べるために、タンパク質分解例として限定分解した HSA を用いた。HSA をキモトリプシンの酵素濃度に応じて限定的に消化し、2-6- c で調製したジメチル化試料を電気泳動した。その後、図 22 のゲル画像で示した赤線に従って 16 断片に切り出して GeLC-MS/MS を行い、比較対象試料のタンパク質分解断片の XIC 面積を比較した。本解析では HSA 由来の 101 ペプチドが同定され、そのうちジメチル化標識されたペプチド数は 66 ペプチドであった。図 22 に示すように縦軸に切り出したゲルを、横軸にジメチル化された 66 ペプチドを N 端から C 端の順に並べ peptograph を作成した。その結果、キモトリプシン濃度の増加に伴い、ほぼ全てのペプチド断片の存在量が増加し、全長の HSA が存在する分子量域では HSA の存在量が減少した。この傾向は SDS-PAGE で観察された傾向と一致していた (図 22)。対照的に、HSA の C 末端領域では、正確な比較分析後、少ない酵

素量で切断した HSA 由来の断片は多い酵素量で切断した HSA の断片よりも多く存在していることがわかり、切断のされ方に他の断片とは異なる酵素濃度依存性を示した。

3種類の脱リン酸化ペプチドが検出された。さらに、消化ペプチド（176-206 残基）では peptograph 上での p β カゼインのゲルから検出した存在量と β カゼインのゲルから検出した存在量は脱リン酸化による電気泳動の移動度と一致していた。以上の結果から、リン酸化修飾残基に対応するペプチド（19-67 残基）の存在量比は消化ペプチド（176-206 残基）の存在量比と異なる挙動を示した。これは N 端のリン酸化部位の消化ペプチドの検出が可能であることを示している。

電気泳動ではタンパク質の分子量に比例して SDS はタンパク質に一定の割合で結合する。しかし、負に帯電したリン酸化修飾はタンパク質の電荷密度を低下させるため、非リン酸化タンパク質に比べてリン酸化タンパク質への SDS の結合を阻害する。このとき、リン酸化タンパク質は電気泳動の移動度が遅れ、非リン酸化タンパク質と分離して検出することができる。しかし、リン酸化に伴う電気泳動の移動度はタンパク質の構造特性に依存するため、検出できるリン酸化タンパク質の数は多くはない[23]。そこで同一ゲル上でも翻訳後修飾が検出することができるかどうかを確認するために、p β カゼインおよび β カゼインが分離する前に電気泳動を止めた（図 24 のレーン 7）。図 24 のレーン 7 で示した赤線に従って 1 断片切り出して GeLC-MS/MS を行った。その結果、23 ペプチドが同定され、ジメチル化標識ペプチドは 7 ペプチドであり、そのうちリン酸化ペプチドに関与するペプチドは 4 ペプチドであった。 β カゼインと p β カゼインに由来するジメチル化標識された 7 ペプチドに対して XIC の面積対数比を計算した後、タンパク質の N 端から C 端に並べた（図 24）。N 端側のペプチド（19-67 残基）では β カゼイン由来の脱リン酸化ペプチドのみが検出された。また、C 端側のペプチド（176-206 残基）の XIC 面積対数比が 0.31（面積比 1.24）であった。p β カゼインおよび β カゼインの混合比は 1 であるため、C 端側のペプチドは正確な存在量比を表している。このように、p β カゼインおよび β カゼインのバンドが分離されていない場合でも、リン酸化修飾の有無によって N 端と C 端のペプチドの XIC 面積比が異なることを示した。

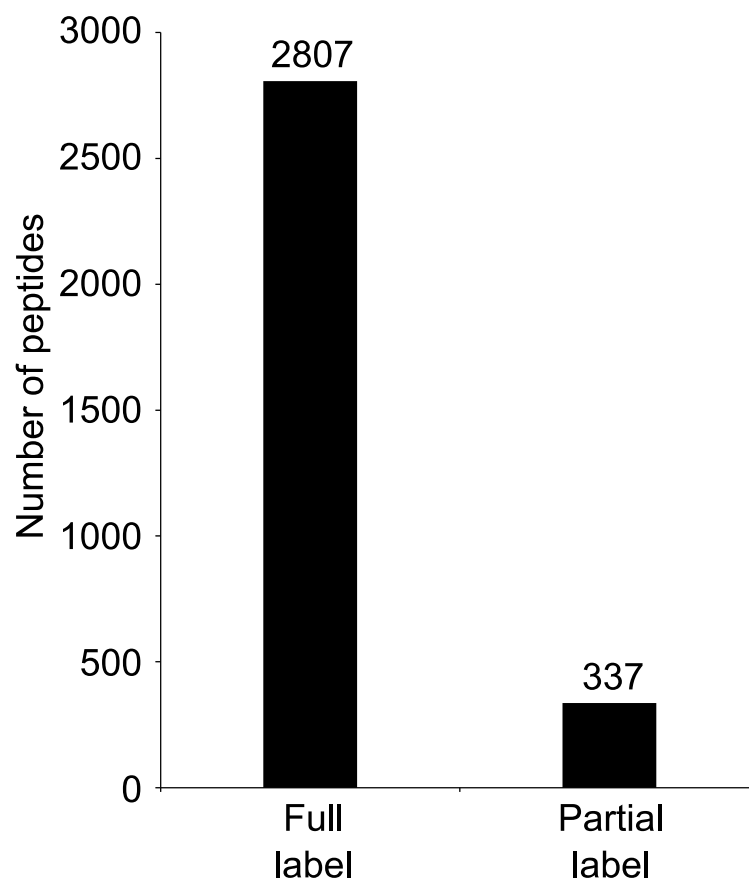


図 17 タンパク質におけるジメチル化効率の評価

Lys 残基を含むキモトリプトペプチドで 3144 ペプチドがジメチル化およびモノメチル化、非修飾として同定された。モノメチル化または非標識 Lys が検出されず、Lys 残基にジメチル化修飾のみのペプチドは、完全標識ペプチドとして分類した (Full label)。モノメチル化された Lys 残基または非標識 Lys 残基を含むペプチドは部分標識ペプチドに分類した (Partial label)。

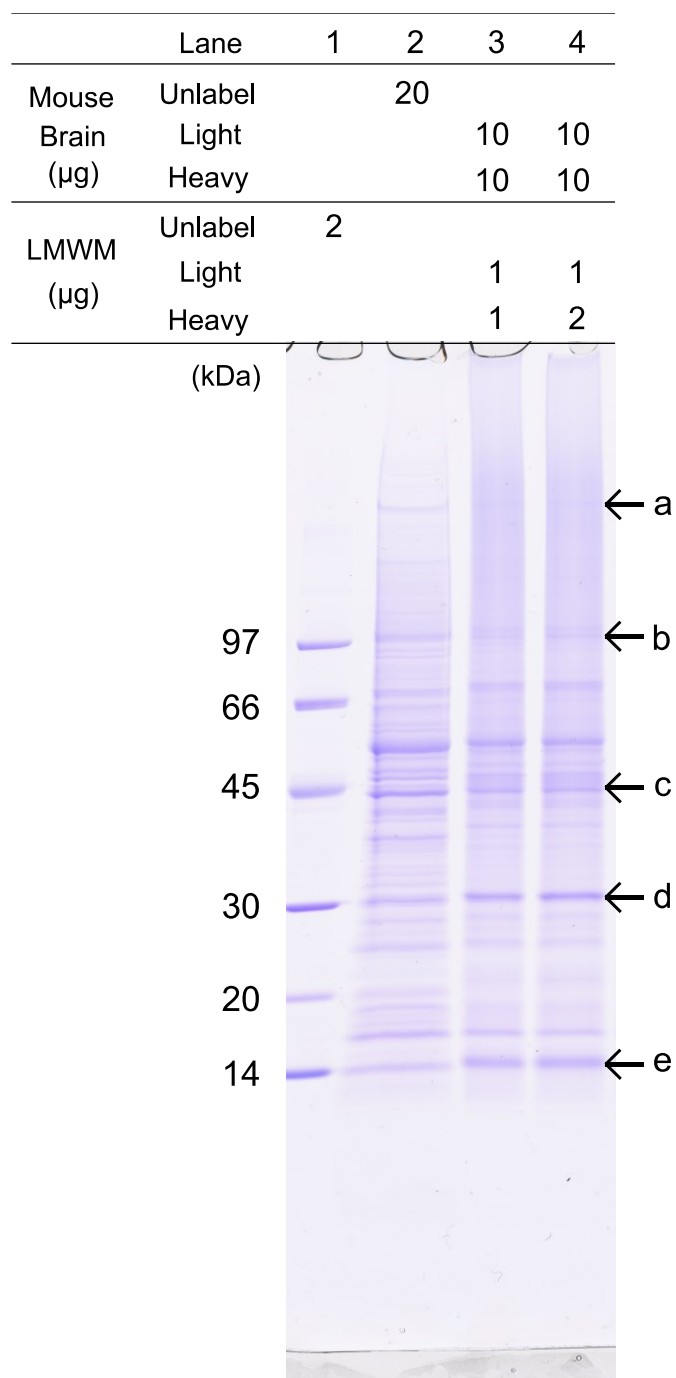


図 18 ジメチル化タンパク質の SDS-PAGE プロファイル

マウスの脳試料と LMWM を表で示す割合で混合し、電気泳動した。レーン 1；LMWM、レーン 2；マウス全脳から抽出したタンパク質、レーン 3 および 4；ジメチル化したサンプル混合物を泳動した。レーン 3 および 4 では、矢印で描かれたゲルバンドを切り出した。矢印 b、c、d、および e は、それぞれ LMWM 中のホスホリラーゼ B、オブアルブミン、カーボニックアンハイドラーゼ、および α -ラクトアルブミンに対応している。

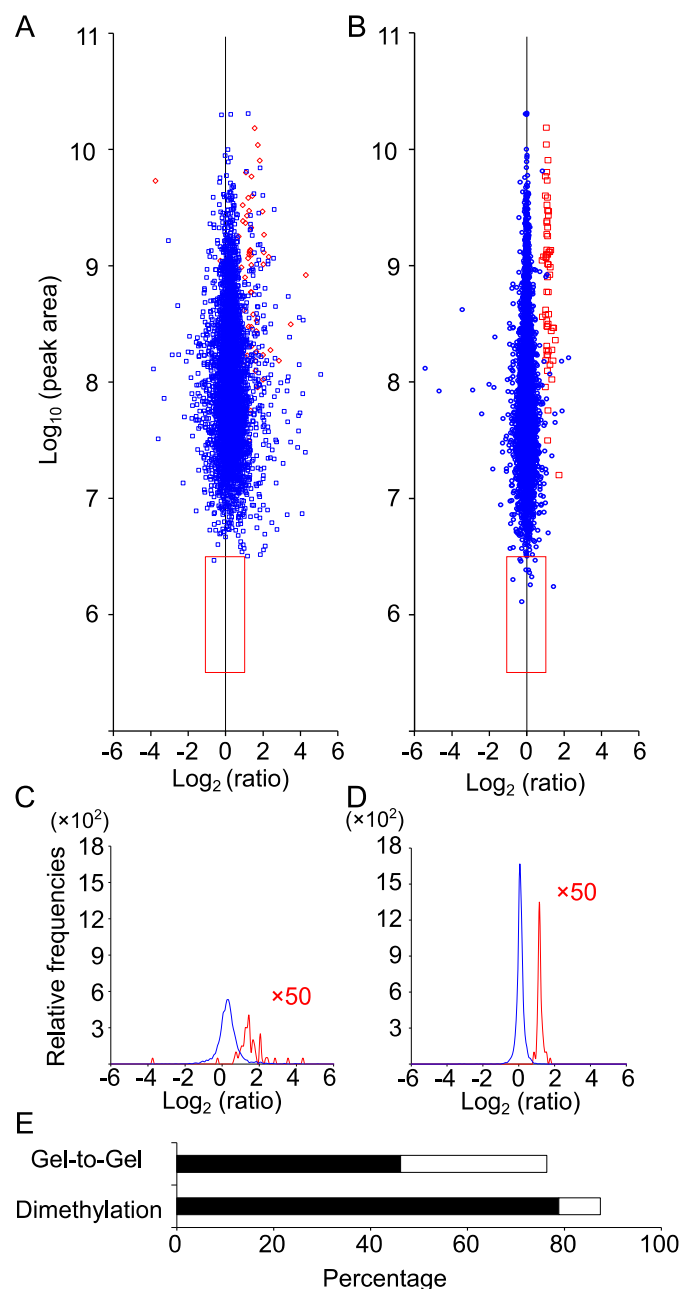


図 19 Gel-to-gel および Dimethylation のジメチル化精度における評価

図 18 で示したバンド a-e をゲル内酵素消化し、信頼性の高い 4,509 個のジメチル化ペプチドを選択した。4,509 ペプチドにおける Gel to gel (A) および Dimethylation (B) の XIC 面積を縦軸に、対数比を横軸に示し MA プロットを作成した。また、(C) Gel to gel および(D) Dimethylation の XIC 面積比の分布を解析した。マウス脳由来のペプチドは青、LMWM 由来のペプチドは赤で表示した。赤の四角は 6.5×10^6 以下の領域である。(E) は gel to gel および Dimethylation の定量したペプチドの割合を調べた。白は定量されたペプチドを、黒は対数面積比 0 ± 0.322 以内 (面積比 0.8~1.25) で高精度に定量されたペプチドを表した。

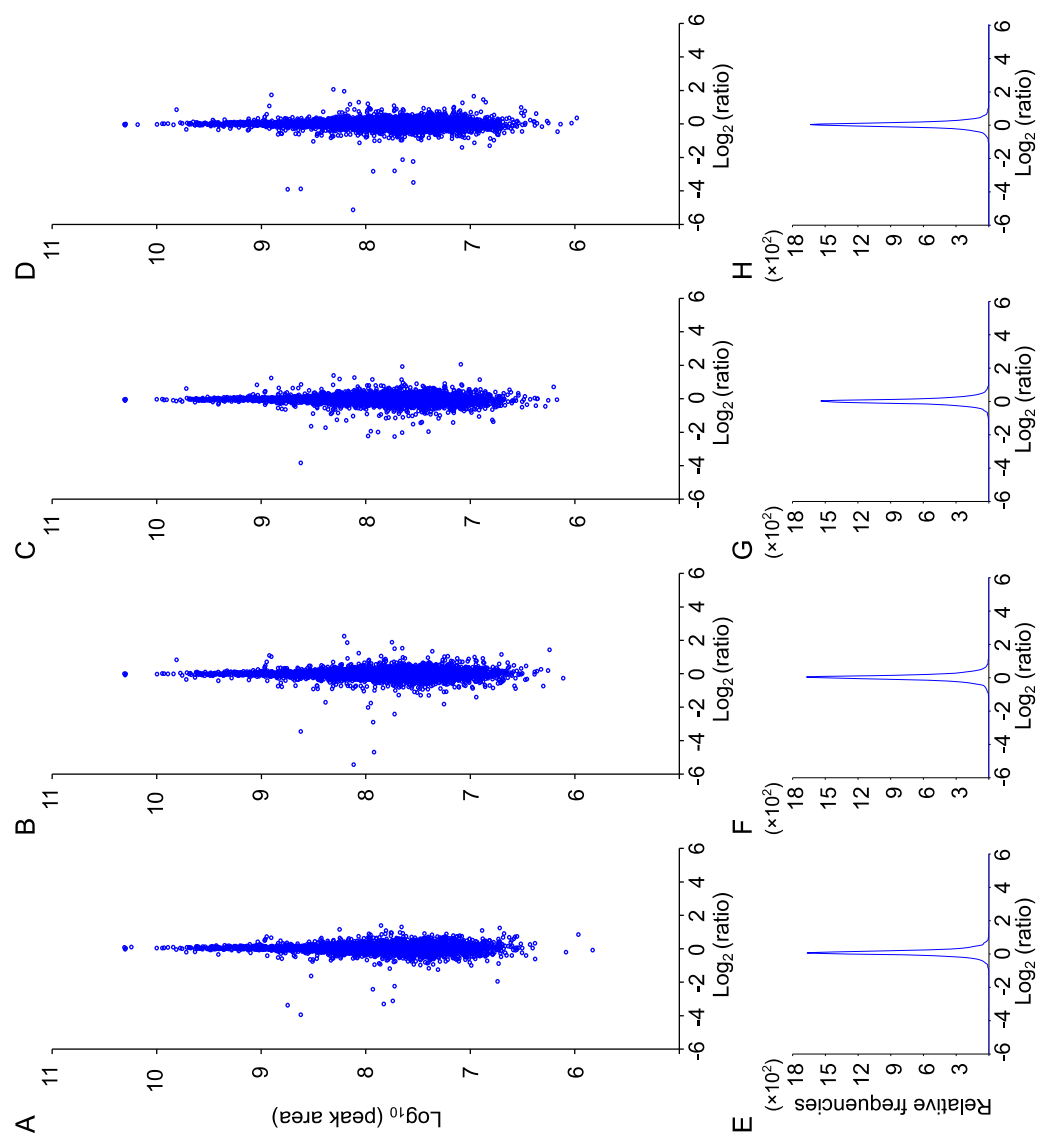


図 21 確立した方法の再現性
 4つの独立した実験においてジメチル化を用いた定量分析の再現性を示す。MAプロット (A-D) および分布 (E-H) は、図18の矢印a-dに対応するバンドに由来するペプチド断片のXIC面積から算出した。

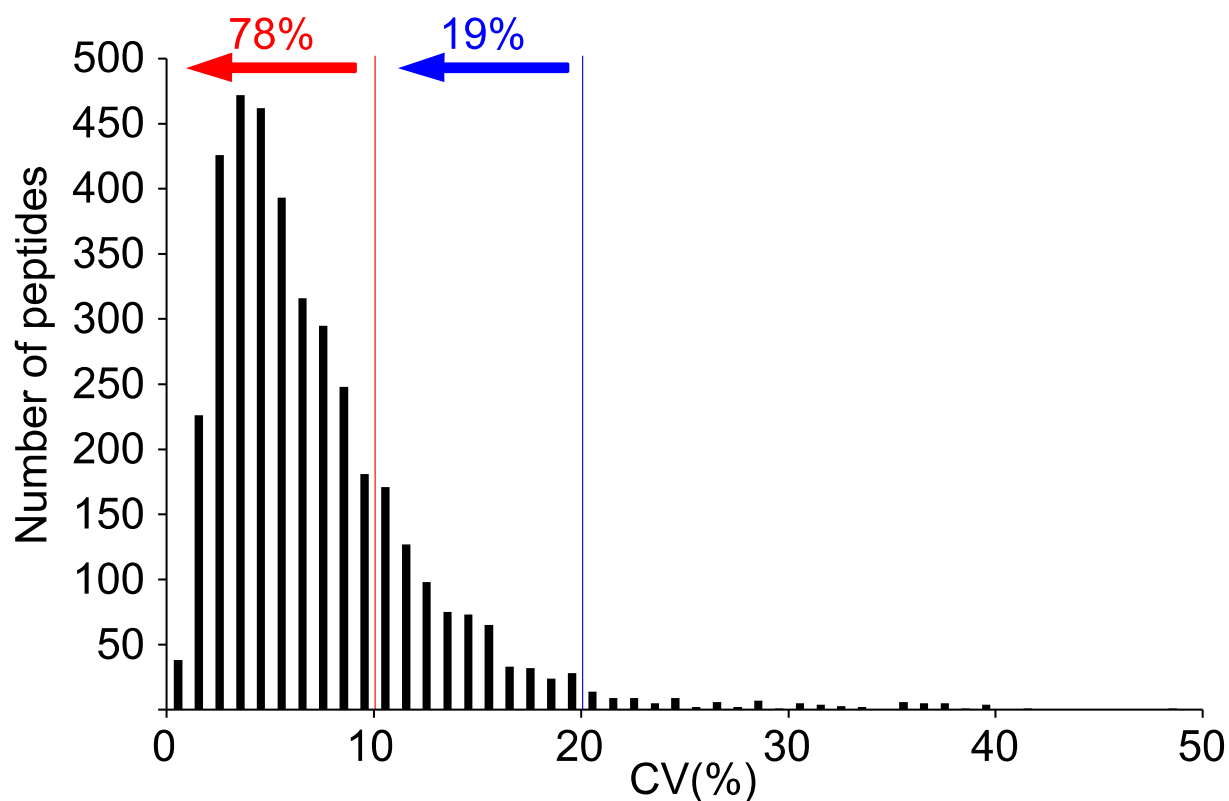


図 21 比較分析精度の再現性

安定同位体ジメチル標識法のペプチド対の面積比における変動係数 (CV) 値の分布を示す。CV とは標準偏差を平均値で割り、100 をかけた値で相対的な分散度合いを示す指標である。図 20 で使用した全てのペプチドの CV 値の分布を表示している。全てのペプチドのうち、4 回の独立した実験において、78% 及び 97% がそれぞれ 10% 未満及び 20% 未満の CV 値を示した

レーン 1；分子量マーカー、レーン 2；HSA、レーン 3； 8 ng または 1.6 ng のキモトリプシンで消化した Light 標識または Heavy 標識した HSA の混合物、レーン 4；8 ng のキモトリプシンで消化後、Light 標識した HSA、レーン 5；1.6 ng のキモトリプシンで消化後、Heavy 標識した HSA。レーン 3 のゲルバンドを 3mm 間隔（図上の赤で示した線）で 16 個のバンドに切断したものを GeLC-MS/MS 分析した。この切り出した 16 個のバンドに由来する HSA のペプチドを Peptograph で表示した。横軸は、N 末端から C 末端までのペプチドの配列（左から右）を示しており、縦軸は切り出されたバンドの位置を示す（高分子量から低分子量、上から下）。各消化ペプチドの面積比は、カラーバー（青→赤、低→高）に反映されている。

Light 標識および Heavy 標識したタンパク質混合物を酵素消化した後、各標識ペプチドの XIC 面積を求め、面積比を算出して、それぞれの同一ペプチドの存在量比を比較する。消化ペプチド b のように一方の試料にのみ翻訳後修飾が存在すると対応するもう一方の試料には当該ペプチドが存在しない、または存在量が減少するため、ペプチド b の面積比が当該タンパク質の別のペプチド a, c, d とは異なる比を示す。

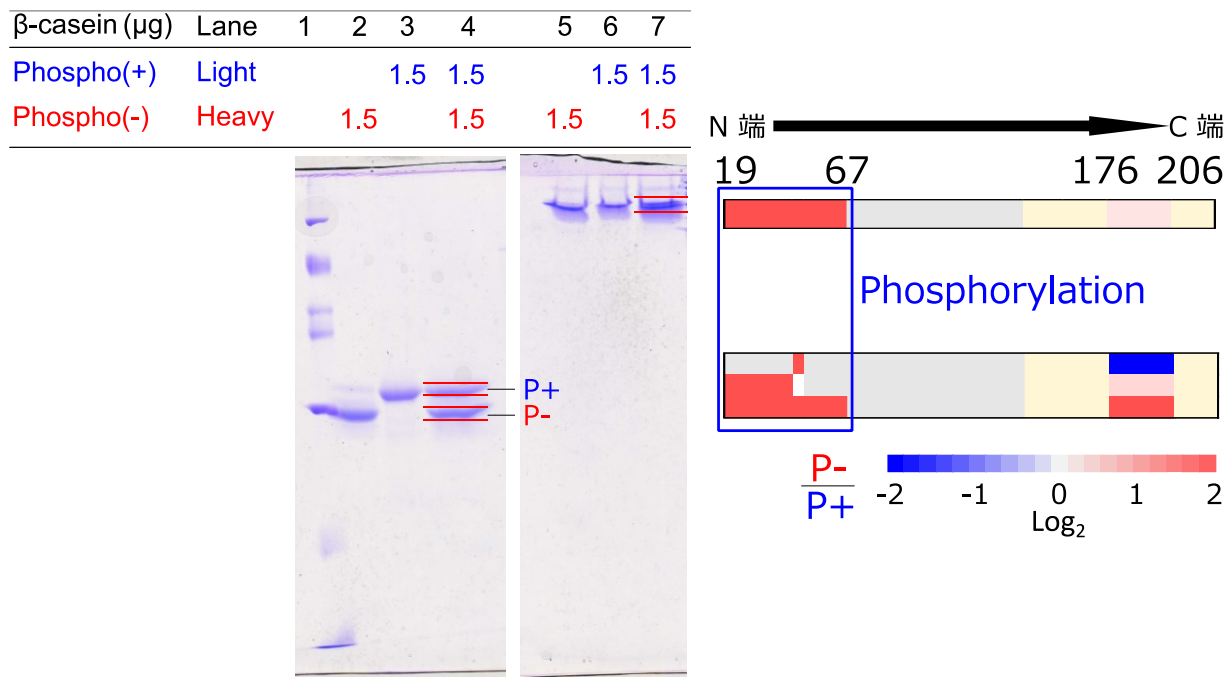


図 24 β カゼインを用いた修飾解析評価

レーン 1；分子量マーカー、レーン 2 と 5；脱リン酸化後に Light 標識した β カゼイン、レーン 3 と 6；Heavy 標識した β カゼイン、レーン 4 と 7；レーン 3 とレーン 4 の試料をそれぞれ等量混合した試料。レーン 5, 6, 7 はレーン 7 の脱リン酸化 β カゼインが分離する前に電気泳動を止めた。レーン 4 を 1mm 間隔（図上の赤で示した線）で 3 個のバンドに切断し、また、レーン 7 のゲルバンドを 1mm 間隔で 1 断片に切り出した後に GeLC-MS/MS 分析した。この切り出した 4 個のバンドに由来する β カゼインのペプチドを Peptograph で表示した。横軸は、N 末端から C 末端までのペプチドの配列（左から右）を示しており、縦軸は切り出されたバンドの位置を示す（高分子量から低分子量、上から下）。各消化ペプチドの面積比は、カラーバー（青→赤、低→高）に反映されている。また、黄色に染めている領域は同定できているがリジン残基を含まないペプチド、灰色に染めている領域は同定できなかったペプチドの配列を示している。

4 章 考察

SDS-PAGE はタンパク質を高分解能で分離する一般的な方法であり、タンパク質を可視化することによって、タンパク質の存在量や分子量変化を迅速に確認することができる。しかし、SDS-PAGE では 1 バンドに数十から数百タンパク質が存在しており、それらを網羅的に同定することは困難である。そこで、SDS-PAGE と LC-MS/MS 分析を組み合わせた GeLC-MS/MS 法は、一次元 SDS-PAGE でタンパク質を分子量で分画し、ゲル中に含まれるタンパク質を LC-MS/MS 分析することで複雑なサンプル混合物中から網羅的にタンパク質を同定することが可能である。一方で、SDS-PAGE の異なるレーン間の比較解析では、バンドの切り出しやゲルからタンパク質を抽出する再現性が低く、定量結果が不正確になる可能性があった。本研究では、これらの問題を解決した SI-GeLC-MS/MS を開発した。Light 標識と Heavy 標識の混合試料を SDS-PAGE ゲルで電気泳動を行い、切り出した 1 バンドに含まれる異なる同位体標識を持つタンパク質を LC-MS 分析で同時に測定することで試料間のペプチド存在量を定量分析できる。本方法の利点は、従来の GeLC-MS/MS と比較してゲルからのタンパク質抽出効率の再現性やイオン化条件の違いに影響されることがなく、比較分析することである。また、本研究で採用した安定同位体ジメチル標識法は、培養試料、組織、体液など、幅広い種類のサンプルにも適応可能な標識方法である。さらに、この比較定量は MS1 ベースの分析であり、MS2 スペクトルに依存しない。一方で標識試薬中のレポーターイオンの強度がサンプル中のペプチド相対量として定量する iTRAQ [24] や TMT [25,26] のような同位体タグ法は、一度に多くの比較試料を分析することができるため、多くのプロテオミクス研究に使用されてきた。この同位体タグは Mass tag 領域（レポーター）、Mass Normalizer 領域（スパーサーアーム）及び amino reactive group から構成され、全タグの分子量は均一であり、MS2 の衝突誘起解離によって同位体 ^{13}C , ^{15}N の異なる置換数を含むレポーターが生成される。このため、比較分析のためのレポーターイオンの観測には、MS2 測定が必要である。また、図 25 に示すように MS1 スペクトルで選択されたペプチドに対して 2.4m/z の選択幅で MS2 を取得する。このとき、この選択幅に他のペプチドが混在する場合、レポーターイオンは同定されたペプチドだけでなく、混在した他のペプチドからも断片化される。したがって、レポーターイオンは正確な比較を示すことができず、高精度に比較分析できない可能性がある [27,28]。本研究で用いた安定同位体ジメチル標識法は、同位体タグ法とは対照的に、MS2 スペクトルに依存せずに高分解能な MS1 スペクトルから高精度な定量比較を実現する。

次に SI-GeLC-MS/MS 法を用いて peptograph を作成し、タンパク質分解状態の検出を試みた。タンパク質分解のモデル試料として濃度の異なるキモトリプシンを

HSA に作用されることで HSA の分解状態を作製した。予想通りにキモトリプシンの濃度に応じてタンパク質分解によるペプチド断片の量が増加した。一方、驚くべきことに HSA の C 末端領域は他の領域とは異なる挙動を示した。これは HSA の C 端側から切断されている可能性があると考えられる。このようにタンパク質分解による微妙な変化までも捕えるためには正確な比較分析が必要である。

最後に SI-GeLC-MS/MS 法はタンパク質の消化ペプチドをそれぞれ正確に比較解析することができるため、タンパク質の翻訳後修飾の検出も可能であると考えた。タンパク質の翻訳後修飾のモデル試料として $p\beta$ カゼインと β カゼインを用いて各消化ペプチドの面積対数比を他の消化ペプチドの面積対数比と比較した。これにより、リン酸化修飾部位の脱リン酸化ペプチドの面積対数比と C 端側の消化ペプチドの面積対数比の挙動が違ふことを示し、リン酸化に伴って電気泳動の移動度も変化した。各ペプチドの正確な XIC 面積比を求めることでリン酸化修飾の部位を検出することが可能であることを確認した。この解析は翻訳後修飾によってペプチドの分子量が非翻訳後修飾のペプチドの分子量からずれることを利用している。そのため、リン酸化修飾だけでなく他の翻訳後修飾においても、同様の解析を行うことでタンパク質の翻訳後修飾の部位を検出することができると考えられる。しかし、この解析では消化ペプチドのどのアミノ酸がどのような翻訳後修飾を受けているかまではわからない。そこで、タンパク質の翻訳後修飾を解析するために、PEAKS studio version X[19]や Proteome software 社の scaffold PTM などのソフトウェアによる網羅的な翻訳後修飾解析が必要と考えられる。また、翻訳後修飾の中で負に帯電しているリン酸化ペプチドは LC-MS/MS 分析時のイオン化効率が低いため、非リン酸化修飾ペプチドと混在している試料中ではほとんどのリン酸化ペプチドのイオン化は困難になる。さらに、リン酸化修飾ペプチドの存在量は非リン酸化修飾ペプチドの存在量に比べて微量であるため、リン酸化修飾ペプチドの場合、別途リン酸化濃縮する必要がある。このように SI-GeLC-MS/MS によるタンパク質の翻訳後修飾部位の検出と合わせてタンパク質の翻訳後修飾の解析を行い、両者を解釈することでより深い知見を解析することができると考えられる。

本研究で開発した SI-GeLC-MS/MS 法は 2 試料間におけるタンパク質の存在量を高精度に比較解析し、定量ペプチドの高い網羅性と実験的な再現性を示した。さらに、正確な比較によりタンパク質分解およびタンパク質の翻訳後修飾部位の検出も可能であることを示した。したがって、SI-GeLC-MS/MS を使用することで、生理学的メカニズム、特にタンパク質分解の知見を明確にし、疾患診断および治療のための新規バイオマーカーの探索に役立つと考えられる。

4 章 図

MS1スペクトル

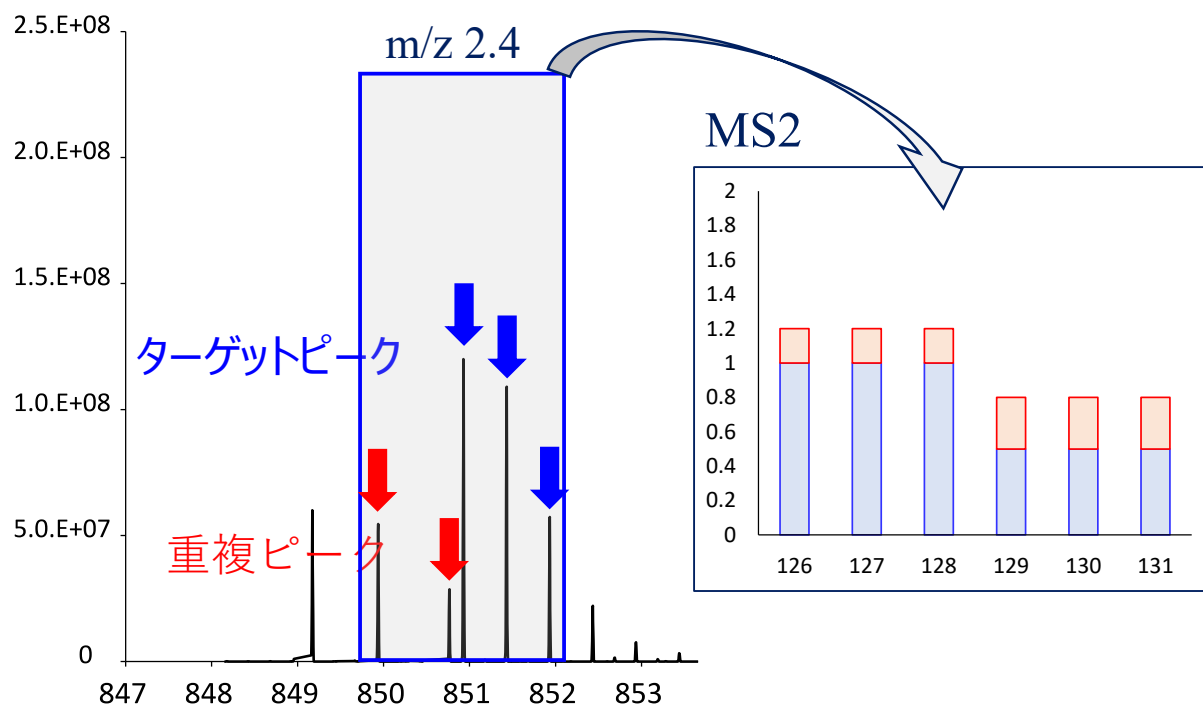


図 25 TMT による問題点

TMT 標識における MS/MS 測定の問題点を示す。TMT 標識では MS/MS 測定で生成されたレポーターイオン強度をもとに定量分析を行う。MS1 スペクトルでの青色がターゲットピーク、赤色が非ターゲットピークとして表示した。2.4m/z の幅で MS/MS 測定を行うと非ターゲットピークが混在し不正確な定量になる可能性がある。

参考文献

- [1] M.M. Rinschen, K. Limbutara, M.A. Knepper, D.M. Payne, T. Pisitkun, From Molecules to Mechanisms: Functional Proteomics and Its Application to Renal Tubule Physiology, *Physiol. Rev.* 98 (2018) 2571– 2606.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2017>.
- [2] R. Aebersold, M. Mann, Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function, *Nature*. 537 (2016) 347– 355.
<https://doi.org/10.1038/nature19949>.
- [3] M. Taoka, N. Morofuji, Y. Yamauchi, H. Ojima, D. Kubota, G. Terukina, Y. Nobe, H. Nakayama, N. Takahashi, T. Kosuge, T. Isobe, T. Kondo, Global PROTOMAP Profiling to Search for Biomarkers of Early-Recurrent Hepatocellular Carcinoma, *J. Proteome Res.* 13 (2014) 4847– 4858. <https://doi.org/10.1021/pr500262p>.
- [4] M. Uhlen, L. Fagerberg, B.M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A.-K. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, F. Ponten, Tissue-based map of the human proteome, *Science* (80-.). 347 (2015) 1260419– 1260419.
<https://doi.org/10.1126/science.1260419>.
- [5] F. Meier, P.E. Geyer, S. Virreira Winter, J. Cox, M. Mann, BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes, *Nat. Methods*. 15 (2018) 440– 448.
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0003-5>.
- [6] T. Masuda, M. Tomita, Y. Ishihama, Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 731– 740.
<https://doi.org/10.1021/pr700658q>.
- [7] E. Gokce, C.M. Shuford, W.L. Franck, R.A. Dean, D.C. Muddiman, Evaluation of normalization methods on GeLC-MS/MS label-free spectral counting data to correct for variation during proteomic workflows, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 2199– 2208. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0237-2>.
- [8] R. Aebersold, M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*. 422 (2003) 198– 207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>.
- [9] M. Schirle, M.-A. Heurtier, B. Kuster, Profiling Core Proteomes of Human Cell

- Lines by One-dimensional PAGE and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Mol. Cell. Proteomics*. 2 (2003) 1297– 1305.
<https://doi.org/10.1074/mcp.m300087-mcp200>.
- [10] M.M. Dix, G.M. Simon, B.F. Cravatt, Global Mapping of the Topography and Magnitude of Proteolytic Events in Apoptosis, *Cell*. 134 (2008) 679– 691.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.038>.
- [11] Y. Lyutvinskiy, H. Yang, D. Rutishauser, R.A. Zubarev, In silico instrumental response correction improves precision of label-free proteomics and accuracy of proteomics-based predictive models, *Mol. Cell. Proteomics*. 12 (2013) 2324– 2331. <https://doi.org/10.1074/mcp.O112.023804>.
- [12] X. Wang, S. Shen, S.S. Rasam, J. Qu, MS1 ion current-based quantitative proteomics: A promising solution for reliable analysis of large biological cohorts, *Mass Spectrom. Rev.* 38 (2019) 461– 482. <https://doi.org/10.1002/mas.21595>.
- [13] J. Graumann, N.C. Hubner, J.B. Kim, K. Ko, M. Moser, C. Kumar, J. Cox, H. Schöler, M. Mann, Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) and proteome quantitation of mouse embryonic stem cells to a depth of 5,111 proteins, *Mol. Cell. Proteomics*. 7 (2008) 672– 683.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M700460-MCP200>.
- [14] S.E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics., *Mol. Cell. Proteomics*. 1 (2002) 376– 386. <https://doi.org/10.1074/mcp.M200025-MCP200>.
- [15] N.J. Carruthers, G.C. Parker, T. Gratsch, J.A. Caruso, P.M. Stemmer, Protein mobility shifts contribute to gel electrophoresis liquid chromatography analysis, *J. Biomol. Tech.* 26 (2015) 103– 112. <https://doi.org/10.7171/jbt.15-2603-003>.
- [16] J.L. Hsu, S.Y. Huang, N.H. Chow, S.H. Chen, Stable-Isotope Dimethyl Labeling for Quantitative Proteomics, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6843– 6852.
<https://doi.org/10.1021/ac0348625>.
- [17] J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama, Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1896– 1906. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.261>.
- [18] E.W. Deutsch, A. Csordas, Z. Sun, A. Jarnuczak, Y. Perez-Riverol, T. Ternent, D.S. Campbell, M. Bernal-Llinares, S. Okuda, S. Kawano, R.L. Moritz, J.J. Carver, M. Wang, Y. Ishihama, N. Bandeira, H. Hermjakob, J.A. Vizcaíno, The ProteomeXchange consortium in 2017: Supporting the cultural change in

- proteomics public data deposition, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) D1100– D1106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw936>.
- [19] S. Okuda, Y. Watanabe, Y. Moriya, S. Kawano, T. Yamamoto, M. Matsumoto, T. Takami, D. Kobayashi, N. Araki, A.C. Yoshizawa, T. Tabata, N. Sugiyama, S. Goto, Y. Ishihama, JPOSTrepo: An international standard data repository for proteomes, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) D1107– D1111. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1080>.
- [20] B. Ma, K. Zhang, C. Hendrie, C. Liang, M. Li, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2337– 2342. <https://doi.org/10.1002/rcm.1196>.
- [21] B. MacLean, D.M. Tomazela, N. Shulman, M. Chambers, G.L. Finney, B. Frewen, R. Kern, D.L. Tabb, D.C. Liebler, M.J. MacCoss, Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments, *Bioinformatics.* 26 (2010) 966– 968. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>.
- [22] B. Schilling, M.J. Rardin, B.X. MacLean, A.M. Zawadzka, B.E. Frewen, M.P. Cusack, D.J. Sorensen, M.S. Bereman, E. Jing, C.C. Wu, E. Verdin, C.R. Kahn, M.J. MacCoss, B.W. Gibson, Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: Application to protein acetylation and phosphorylation, *Mol. Cell. Proteomics.* 11 (2012) 202– 214. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.017707>.
- [23] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, Separation and detection of large phosphoproteins using phos-tag sds-page, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1513– 1521. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.154>.
- [24] M. Hardt, H.E. Witkowska, S. Webb, L.R. Thomas, S.E. Dixon, S.C. Hall, S.J. Fisher, Assessing the Effects of Diurnal Variation on the Composition of Human Parotid Saliva: Quantitative Analysis of Native Peptides Using iTRAQ Reagents, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4947– 4954. <https://doi.org/10.1021/ac050161r>.
- [25] A. Thompson, J. Schäfer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, C. Hamon, Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1895– 1904. <https://doi.org/10.1021/ac0262560>.
- [26] O. Engmann, J. Campbell, M. Ward, K.P. Giese, A.J. Thompson, Comparison of a protein-level and peptide-level labeling strategy for quantitative proteomics of

- synaptosomes using isobaric tags, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 2725– 2733.
<https://doi.org/10.1021/pr900627e>.
- [27] M. Sonnett, E. Yeung, M. Wühr, Accurate, Sensitive, and Precise Multiplexed Proteomics Using the Complement Reporter Ion Cluster, *Anal. Chem.* 90 (2018) 5032– 5039. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04713>.
- [28] T.I. Roumeliotis, H. Weisser, J.S. Choudhary, Evaluation of a Dual Isolation Width Acquisition Method for Isobaric Labeling Ratio Decompression, *J. Proteome Res.* 18 (2019) 1433– 1440.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00870>.

謝辞

本研究にあたり、貴重なご助言を多くいただきました生物物理学研究室の米田茂隆先生に深く感謝いたします。

本研究において厳しくも優しく、全ての実験過程、本論文の執筆に終始直接ご指導いただきました物性物理学講座の小寺義男先生に深く感謝いたします。

本論文を執筆にあたり数多くの貴重なご助言、ご指導いただきました生物物理学講座の松井崇先生に深く感謝いたします。

マウス試料の採取および生物学的な知見にあたり、様々なご指導、ご助言をいただきました北里大学医学部生化学研究室の板倉誠先生に深く感謝いたします。

研究についてご指導いただき、数多くの議論の機会をしていただきました、かずさDNA研究所の川島裕介博士に深く感謝いたします。

生物学的なご助言をいただきました生物物理学研究室の大石正道先生に深く感謝いたします。

データ解析についてご助言をいただきました生物物理学研究室の渡辺豪先生に深く感謝いたします。

本論文をご精読いただきました、細胞生物学講座の太田安隆先生と医療衛生学部臨床検査学研究室の長塩亮先生に心より感謝いたします。

ともに博士課程を歩み、研究について多くの議論を交わし、実験や研究室での生活において協力してくれた北里大学大学院博士課程の中川譲氏に深く感謝いたします。

本論文を作成に当たり実験や研究室での生活において協力してくれた北里大学大学院修士課程の伊藤大晃氏に深く感謝いたします。

研究室で日々切磋琢磨し、苦楽をともにしてきた研究室の皆様、研究を手伝ってくれた後輩に心より感謝しております。

研究をつづけることを全面的に協力、支援してくれた家族に心より深く感謝いたします。