

北里大学大学院理学研究科

2020 年度博士論文

微量組織の個体間分析を実現する高感度ペプチドミクス

中川 譲 (D S - 18905)

指導教授 生物物理学 米田 茂隆

目 次

論文要旨	．．． 1
1 章 序論	．．． 2
2 章 微量組織への Differential Solubilization 法 (DS 法) の応用	．．． 4
2-1 試料と方法	．．． 4
2-2 結果と考察	．．． 7
2-2-1 DS 法の最適化	．．． 7
2-2-2 DS 法の微量組織への応用	．．． 9
(a) マウスの線条体への応用	．．． 9
(b) コントロールマウスとストレスマウスの比較 解析への応用	．．． 9
2-3 まとめ	．．． 10
2 章 表、図	．．． 11
3 章 微量組織を対象にした改良 DS 法の開発と評価	．．． 30
3-1 試料と方法	．．． 30
3-2 結果と考察	．．． 33
3-2-1 改良 DS 法の開発	．．． 33
(a) 粉末の除去法の開発	．．． 33
(b) 従来のペプチド抽出法との評価	．．． 35
3-2-2 改良 DS 法の微量組織への応用	．．． 38
(a) 同定ペプチドの特徴	．．． 38
3-2-3 改良 DS 法の小腸・大腸への応用	．．． 39
(a) 同定ペプチドの特徴	．．． 39
3-3 まとめ	．．． 41
3 章 表、図	．．． 42
4 章 総括	．．． 73
謝辞	．．． 74

微量組織の個体間分析を実現する高感度ペプチドミクス

生物科学専攻 生物物理学

DS-18905 中川 譲

生体内の内因性ペプチドには、シグナル伝達を始めとした生体機能の恒常性維持に重要な調節因子として機能するものが多く存在する。この中には、近年の次世代シーケンサー技術により発見された G タンパク質共役型受容体に対するリガンドとなるシグナル伝達ペプチドも同定されている。しかし、未だ多くのオーファン受容体が存在していることから、発見できていないリガンドとなる新規生理活性ペプチドも多数存在していることが示唆されている。

近年目覚ましい発展を遂げている液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) を用いたプロテオミクスは、タンパク質を網羅的に同定・定量できるため、疾患特異的なバイオマーカーの同定を含む幅広い生物学的研究に応用されている。これに伴い、少数例ではあるがラットやマウス 10~30 匹分の組織を対象としたペプチドーム解析が行われ、多くの論文では 1000~2000 ペプチドが、最も多い論文では約 16,000 ペプチドの同定が報告されている。しかし、現在のペプチド研究は 1 個体中の内因性ペプチドが低濃度であることに加え、ペプチド抽出効率の低さから数十匹のマウスやラットを対象として行われており、ペプチドの個体差や組織特異性の解析は未だ達成できていなかった。

そこで、本研究では、微量試料での個体差や組織特異性の分析を可能にするために高効率なペプチド抽出法の開発に挑戦した。その結果、135 μg の凍結視床下部から **Neuropeptide Y** や **Orexin-B** などの 35 種類の既知の生理活性ペプチドを含む 1535 種類の同定に成功した。そして、この中の約半分を占めるプロホルモン前駆体タンパク質に由来するペプチドが、生理活性ペプチドの持つ特徴的な切断パターンを持っていることも確認できた。このことは、従来のペプチド抽出において必要とされてきた熱処理を行わなくても、試料調製時のペプチド分解の影響を従来法と同程度に軽減できていることを示しており、凍結試料をもとにしたペプチド分析の可能性を広げる非常に重要な結果である。さらに、この確立した方法を用いて 3 回独立に抽出した試料を分析した結果、非常に高い再現性を有することも確認できた。本研究で開発した方法は、微量組織から高効率にペプチドを抽出し、高い再現性を示す比較解析が可能な方法である。この方法は、今まで困難だった個体差や組織特異性の解析を可能にただけでなく、新規生理活性ペプチド探索など様々なペプチド研究を拓く強力な戦略となる。

1 章 序論

自然界には多種多様な内因性ペプチドが存在しており、これらが様々な生合成機構から生成される。これらのペプチドは、シグナル伝達などの生物学的プロセスにおいて重要な調節因子として機能しており[1]、1900年代の初めに初めて生理活性を持つペプチドとしてセクレチンが発見されてから、生体内で働く生理活性ペプチドの探索は多くの研究者によって行われてきた。1990年代には G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に多くの生理活性ペプチドの受容体があることが知られ、実際にオーファン GPCR のリガンド探索でグレリンが発見されている[2]。近年では次世代シーケンサー技術の進歩により、オーファン GPCR や分泌タンパク質の存在が明らかになってきた[3,4]。また、オーファンレセプターのリガンドとしていくつかのシグナル伝達分子が同定されているが [5,6]、これらの事実は、多くのリガントとなる生理活性ペプチドと受容体のペアがまだ発見されていないことを示唆している。

現在発見されている既知の生理活性ペプチドでスイスバイオインフォマティクス研究所と欧州バイオインフォマティクス研究所が運営するタンパク質のアミノ酸配列の代表的なデータベースである UniProt に登録されているペプチドの多くは、アミノ酸残基数 60 以下、分子量約 6 kDa 以下の成分である。また、生体内の内因性ペプチドには、生理活性を持つペプチドだけでなく、癌細胞内の酵素により特異的な切断を受けた断片ペプチドなどの疾患関連ペプチドや酵素の活性マーカーとなりえるペプチドが多く存在する。そのため近年では、上記のような新規生理活性ペプチドや疾患関連ペプチドの探索をするために網羅的な分析であるペプチドーム解析が行われるようになった。この解析は、酵素により特異的な切断を受けた断片ペプチドを直接観測することが可能なため、疾患関連ペプチドの研究[7,8]やペプチドの生成過程の研究[9]、酵素の活性化についての研究[10,11]など幅広い生物学的研究に応用できると期待されている。しかし、内因性ペプチドを直接観測することは、試料の採取時におこるタンパク質の分解や内因性ペプチドの存在量の低さから同定が難しく、研究例も少ないのが現状である。

近年は、加熱処理を用いた消化酵素の不活性化と大量の動物からのペプチド抽出を用いて、プロホルモン由来のペプチドの低濃度による同定の難しさを克服した大規模ペプチドミクス研究が行われている。これらの研究により、ラット 32 匹の視床下部から 16,000 以上、マウス 12 匹の視床下部から 2,000 以上のペプチドが同定された[12,13]。これらの大規模ペプチドミクスはプロホルモン由来のペプチドを同定することが可能となったが、ペプチド抽出の効率が悪いことや、1 匹の動物でのペプチドの濃度が低いことなどから、ペプチドの個体差や組織特異性を測定できていない。しかし、個体差や組織特異性を分析することは、バイオマーカーの探索や疾患のメカニズム解明はもちろんのこと、生理活性ペプチドの機能の解明においても重要な情報である。

本研究で確立した改良 DS 法は、微量組織の個体間分析の実現に必要な高い再現性と安定した連続分析が可能な手法である。

2 章 微量組織への Differential Solubilization 法 (DS 法) の応用

2-1 試料と方法

(1) 試料の前処理

電気泳動

(1-1)の試料を(2-1)の DS 法でペプチドを抽出した試料を SDS-PAGE サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl, pH6.8, 50 mM DTT, 0.5% SDS, 10%グリセロール) で再溶解した。その後、自作の 16.4% Tricine SDS PAGE や市販のゲル (Perfect NT Gel W ポリペプチド分析用、15-20%、20 wells、DRC、東京都、日本) を用いて電気泳動した。泳動したゲルは銀染色 (2D-Silver Stain Reagent II、コスモバイオ、東京都、日本) または Oriole 蛍光染色 (Bio-Rad、カリフォルニア州、アメリカ) を行い、タンパク質・ペプチドのバンドを観測した。

(4) LC-MS/MS 分析

(3),(4)の凍結乾燥後の試料に 1 mL の ACN を加えボルテックスした。その後、室温、19,000×g で 15 分間遠心し、上清を除去した。沈殿物を 10 分間凍結乾燥した後、20 μL の 3% ACN-0.1% FA を加えて室温で 10 分間攪拌し、超音波破砕を 10 分間 (30 秒 ON/30 秒 OFF、high 設定) 行って溶解した。溶解した試料は、4°C、19,000×g で 15 分間遠心を行い、上清を全量バイアルに回収した。分析には、ナノフローHPLC の EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) と Q Exactive ハイブリッド四重極-オービトラップ質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を組み合わせた LC-MS システムを使用した。カラムには、Nano HPLC Capillary Column (C18 0.075 mm I.D.×125 mm analytical column、日京テクノス、京都府、日本) を使用した。流速は 300 nL/min で LC-MS/MS 分析を行った。移動相の組成は、以下に示すように溶媒 A (0.1% FA) と溶媒 B (90% ACN-0.1% FA) の混合比 ($r=[B]/([A]+[B]) \times 100$) を変えることで行った。

(5) ペプチドの同定

タンパク質・ペプチドを対象とした LC-MS/MS 分析は窒素ガスとぶつけることにより、図 2-2A に示すペプチドの点線部分で開裂が起きたイオンを測定する。本研究で用いた *de novo* シーケンス解析を基盤としたペプチドの同定では、図 2-2B に示すように開裂イオンとその隣の開裂イオンの差からアミノ酸を直接計算し同定を行う。本章ではこの *de novo* シーケンス解析を基盤とした PEAKS Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc.、オンタリオ州、カナダ) を用いてタンパク質・ペプチドを同定した。同定には UniProt のマウスのデータベース (reviewed, canonical データベース;16,968 件、

2018年4月リリース)を用いた。同定解析に必要なパラメーター設定は表 2-1,2 の条件で行い、偽陽性率(FDR)が1%のペプチドを同定ペプチドとして分析した。

(6) Skyline を用いた比較解析

MS1 定量データをもとに Skyline (ver. 3.7)[22,23]を用いて、ペプチド存在量の比較解析を行った。Skyline の解析に必要なペプチド設定とトランジション設定は表 2-3,4 の条件で行った。PEAKS 7.0 から出力した解析のデータを Skyline のスペクトルライブラリーとして使用した。定量したデータは、理論上の同位体比との一致率を示す isotope dot product のパラメーターが 0.9 以上、mass error が 6 ppm 以内のペプチドを解析した。

(9) プロホルモン前駆体タンパク質データのスクリーニング

UniProt 上の『十分に定義された生物学的活性を有する前駆体タンパク質から処理された活性ペプチド』を意味する'Peptide'という注釈キーワードを持つペプチド配列とそのタンパク質を UniProt データベースから抽出し、144 種類のプロホルモン前駆体タンパク質とそれに由来する 286 種類のペプチド配列をプロホルモン前駆体群のデータセットとして用いた。このデータセットは、Neuropeptide データベース (<http://www.neuropeptides.nl/>) と統合し、合計 167 種類のプロホルモン前駆体タンパク質に由来するペプチドの同定に使用した。

2-2 結果と考察

2-2-1 DS 法の最適化

2-2-2 DS 法の微量組織への応用

以上の結果から、DS 法とジメチル化標識法を組み合わせることにより 6 mg 以下の組織からペプチドを抽出し、比較解析を行うことに成功した。

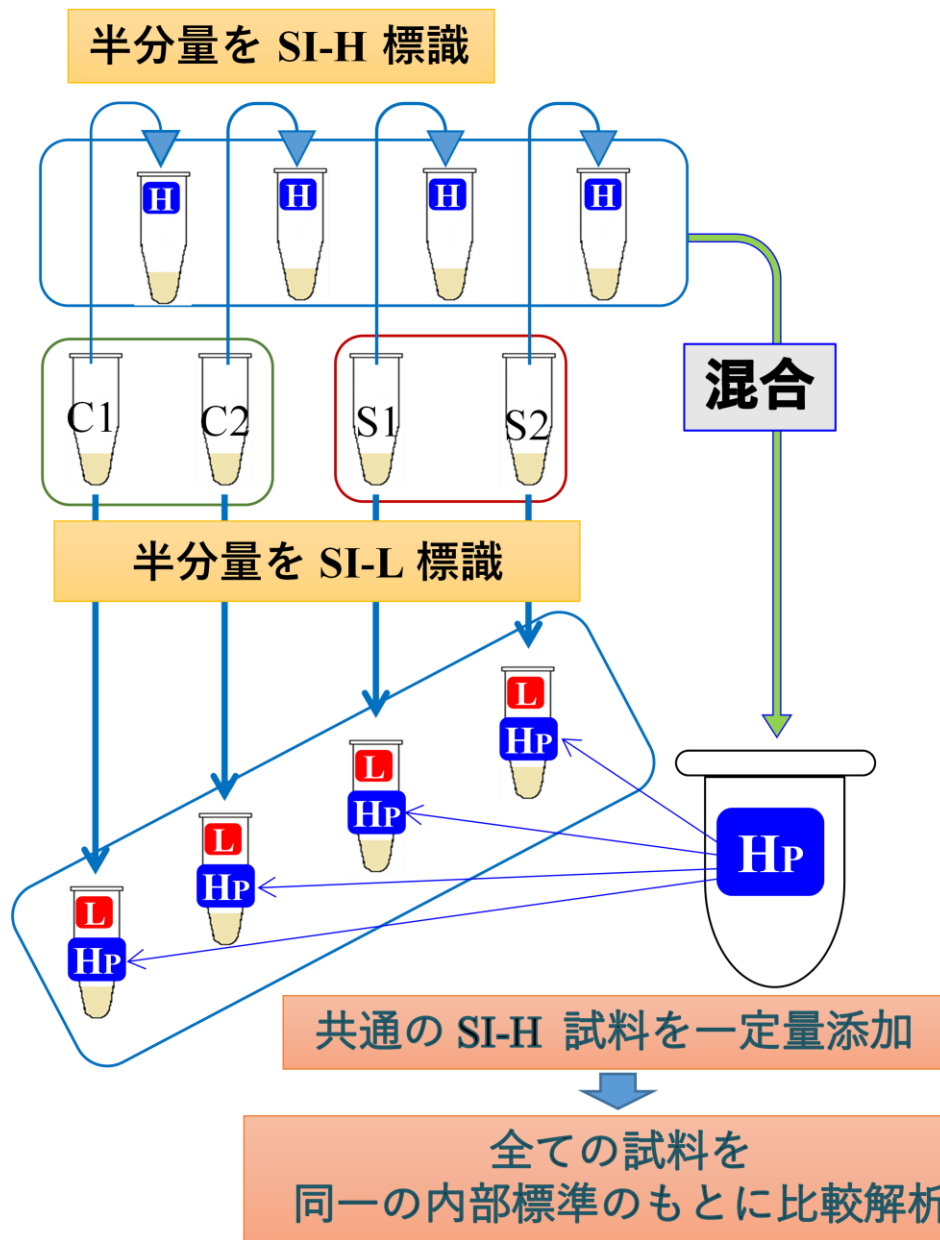
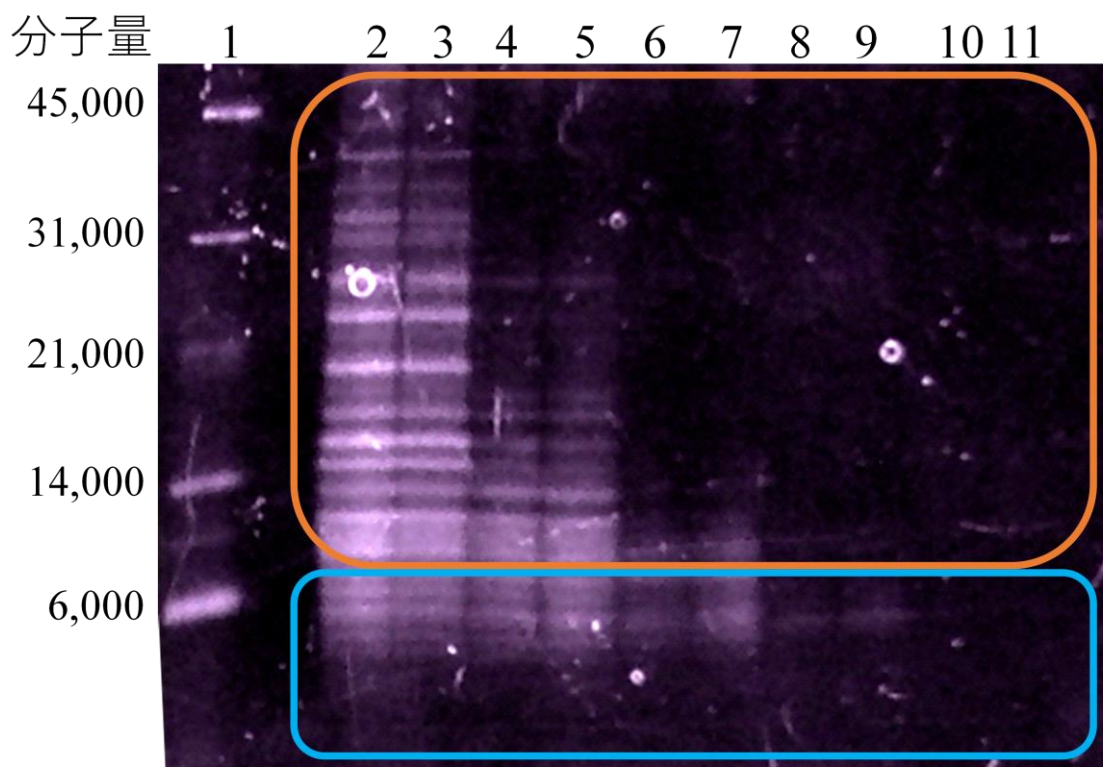


図 2-1 ジメチル化標識の概略図

C : コントロールマウス試料、S : 拘束冷水ストレスマウス、H : SI-H 標識、L : SI-L 標識、HP : SI-H の混合試料を示す。

表 2-4 比較解析に用いた Skyline のトランジション設定

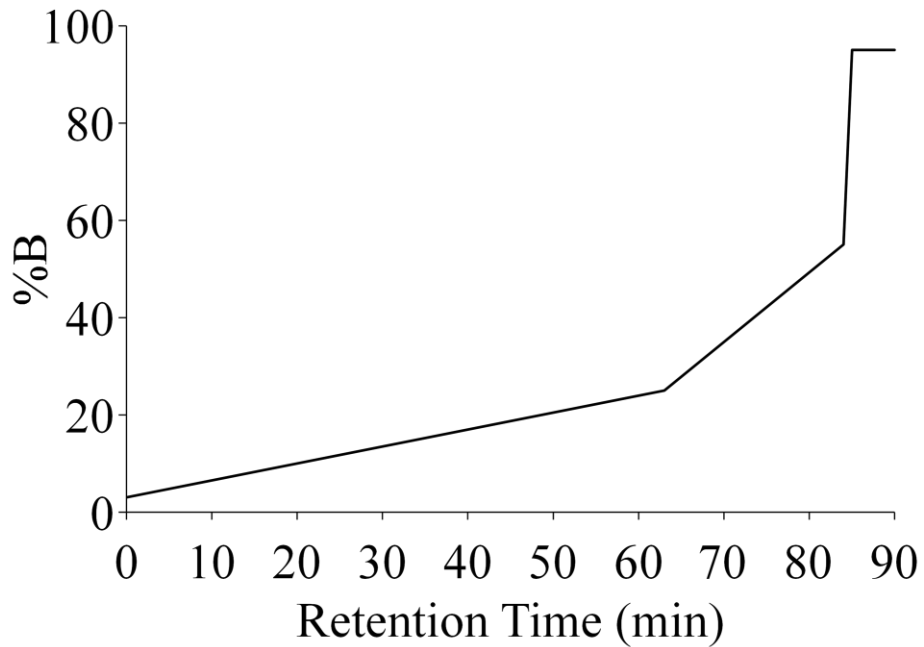
パラメーター名	パラメーターの意味	設定した値
precursor charges	ターゲットとする プリカーサーイオンの電荷 数	2-8
ion type	解析を行うイオンタイプ	p (precursor)
mass range	解析を行う質量範囲	350-900 m/z
tolerance	許容誤差	0.055 m/z
isotope peaks included	解析する同位体ピーク数	count 3
Precursor mass analyzer	分析を行った機器の種類	orbitrap
resolution	分解能	100,000 at 200 m/z
use only scans within 10 minutes of MS/MS IDs	ペプチドの同定時間の情報 から解析を行う時間範囲	ON



	80%	82.5%	85%	87.5%	90%
高分子の除去	×	×	○	○	○
ペプチドの保持	○	○	○	△	×

図 2-5 抽出液の有機溶媒濃度の電気泳動評価

Oriole 蛍光染色後、LED トランス・イルミネーター (LED505-DF36W、美館イメージング、埼玉県、日本) を用い、505 nm の波長で蛍光検出を行った。レーン 1: マーカー、レーン 2,3: 有機溶媒濃度 80%抽出液を用いた組織の DS 法結果、レーン 4,5: 有機溶媒濃度 82.5%抽出液を用いた組織の DS 法結果、レーン 6,7: 有機溶媒濃度 85%抽出液を用いた組織の DS 法結果、レーン 8,9: 有機溶媒濃度 87.5%抽出液を用いた組織の DS 法結果、レーン 10,11: 有機溶媒濃度 90%抽出液を用いた組織の DS 法結果を示す。



分析条件

nanoLC Easy-nLC1000

MS Q-Exactive

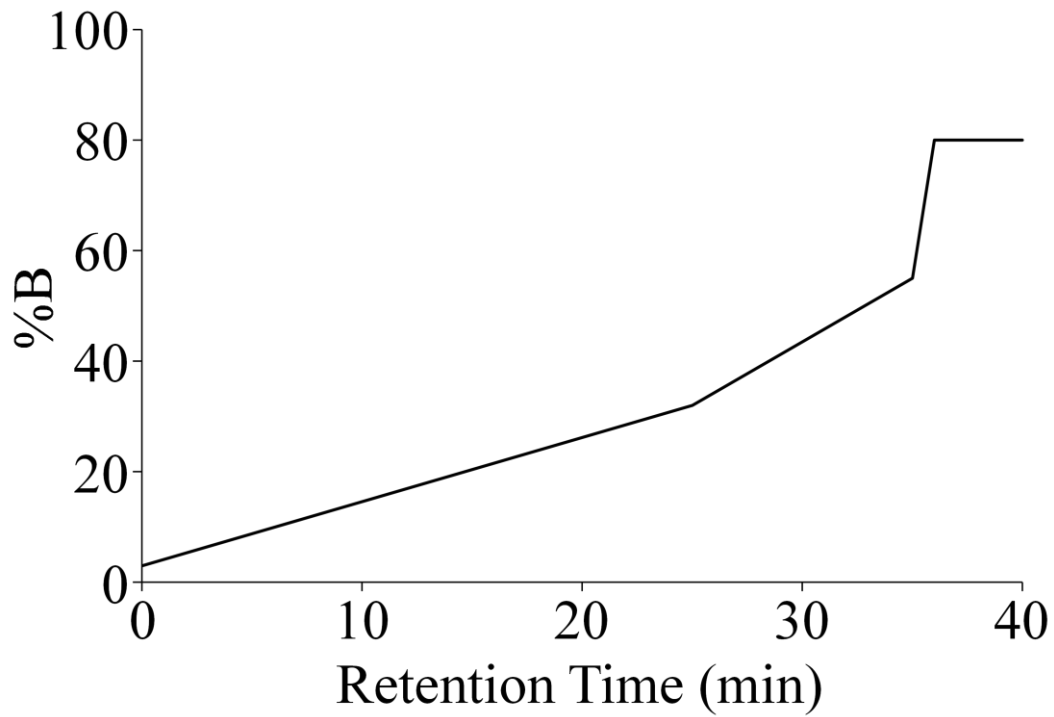
カラム Nano HPLC Capillary Column, C18 0.075 mm I.D. × 125 mm analytical column

A 溶媒 0.1% FA

B 溶媒 90% ACN-0.1% FA

流速 300nL/min

図 2-8 線条体抽出ペプチドの LC-MS/MS 分析の分離条件



分析条件

nanoLC Easy-nLC1000

MS Q-Exactive

カラム Nano HPLC Capillary Column, C18 0.075×125 mm analytical column

A 溶媒 0.1% FA

B 溶媒 90% ACN-0.1% FA

流速 300nL/min

図 2-10 比較解析に用いた LC-MS/MS 分析の分離条件

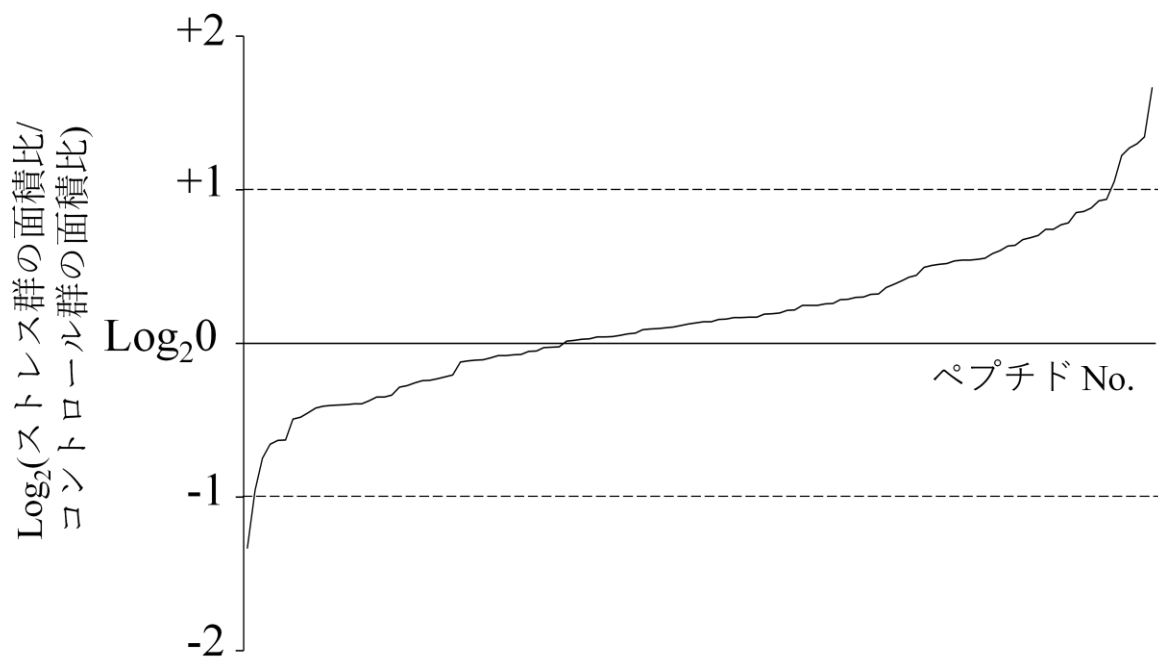


図 2-11 コントロール群とストレス群のペプチドの変動

縦軸に $\text{Log}_2((\text{ストレス群の SI-L/SI-H の平均})/(\text{コントロール群の SI-L/SI-H の平均}))$ 、横軸に $\text{Log}_2((\text{ストレス群の SI-L/SI-H の平均})/(\text{コントロール群の SI-L/SI-H の平均}))$ の値が低いペプチドから順に 120 種類のペプチドをプロットした折れ線グラフを示す。

3 章 微量組織を対象にした改良 DS 法の開発と評価

2 章に記載の通り DS 法の最適化を行うことで、1 mg 未満の組織からペプチドを抽出することが可能で、かつ、ジメチル化標識法を用いることで、比較解析も可能になった。しかし、この方法は、STAGE Tip が詰まるなどの試料調製の不安定さがあることに加え、血液試料と比べて 280 nm の吸光スペクトルの値が高いことから残留物を含んでいることが考えられた。そのため、この方法では、試料調製の不安定さや残留物の LC-MS への送液が LC-MS/MS 分析による試料間のペプチド定量分析の妨げになると考え、本章では、析出した粉末の除去法の開発を行い、DS 法と組み合わせることで、個体間分析が実現可能なペプチドのみを高効率でかつ高い再現性で抽出できる改良 DS 法の開発を目指した。

本章では、開発した粉末の除去法と 2 章で最適化した DS 法を組み合わせた改良 DS 法の開発と 2 種類の組織に応用した結果について報告する。

3-1 試料と方法

(1) 試料の前処理

(1-1) DS 法の最適化に用いたマウスの全脳の前処理

2 章と同様

(1-2) 数 mg の凍結組織の前処理

2 章と同様

(1-4) 小腸・大腸・糞便の採取

200 mL ビーカーを 2 つ準備し、それぞれに蒸留水を入れ沸騰するまで加熱した。沸騰後、マウスを安楽死させ、すぐに解剖し、小腸と大腸を別に採取した。解剖後、すぐに各臓器をそれぞれ異なるビーカーに入れ、5 分間煮た。煮た後、小腸は十二指腸後の膵臓が周りについている小腸の入口部分、腸管膜リンパ節がついている空腸（小腸の中央）部分、盲腸の直前の回腸（小腸の出口）部分の三か所を、大腸は中央部を長さ 1 cm ずつ採取し、腸が浸るほどのプロテアーゼインヒビター入りのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）の中で腸を開き、腸内の内容物を洗った。この時、大腸内の便を回収した。これらの試料は、PBS で洗浄後すぐに液体窒素で凍結し、実験に使用するまで -80°C で保存した。

(1-5) 小腸・大腸・糞便の前処理

重量を測定した 2 mL チューブに凍結組織を入れ、凍結乾燥を行った。その後、凍結破砕機を用いて粉砕した。粉砕後、クラッシュャーを取り出し、氷で冷却した 1 mL の ACN

をチューブに加えた。その後、超音波破碎機を用いて 30 分間 (30 秒 ON / 30 秒 OFF、high 設定)、組織試料を破碎した。凍結乾燥することで破碎組織から ACN を除去した。除去後、破碎した組織の乾燥重量を測定し、乾燥重量に対して 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 濃度となるように変性剤を加えた。この変性剤で懸濁した試料は超音波破碎機を用いて 30 分間 (30 秒 ON / 30 秒 OFF、high 設定) 破碎し、タンパク質・ペプチドを抽出した。その後、4°C、19,000 $\times g$ で 30 分間遠心を行い、上清を 9 割回収した。回収後、ペプチドを抽出するまで -80°C で保存した。

(2) ペプチド抽出法

(2-1) 最適化した DS 法

2 章と同様

(3) 電気泳動

2 章と同様

(4) MonoSpin C18 を用いた脱塩処理

2 mL チューブに MonoSpin C18 (GL Sciences、東京都、日本) をセットし、0.1% TFA を含む ACN を 500 μL 加え、室温、5,000 $\times g$ で 2 分間遠心した。遠心後、0.1% TFA を 500 μL 加え、室温、5,000 $\times g$ で 2 分間遠心した。MonoSpin を試料チューブにセットし、(2-1),(2-2), (2-3), (2-4) (3)の各ペプチド抽出物は 90 μL の Invitrosol で溶解し、それぞれ別のカラムに各試料を全量加え、室温、3,000 $\times g$ で 2 分間遠心した。フロースルーを再度加え、室温、3,000 $\times g$ で 2 分間遠心した。その後、新しい 2 mL チューブに MonoSpin をセットし、0.1% TFA を 500 μL 加え、室温、5,000 $\times g$ で 2 分間遠心の操作を 2 回行い、MonoSpin を洗った。回収用チューブに MonoSpin をセットし、50% ACN-0.1% TFA を 200 μL 加え、室温、3,000 $\times g$ で 2 分間遠心した。回収した試料は凍結乾燥後、LC-MS/MS 分析まで -80°C に保存した。

(5) STAGE Tip を用いた脱塩処理

2 章と同様

(6) LC-MS/MS 分析

2 章と同様

本章では 50 分の測定で、図 3-1 に示す LC の濃度勾配と条件ですべての測定を行った。

(7) ペプチドの同定

LC-MS/MS 分析結果を *de novo* シーケンス解析を基盤とした PEAKS Studio X を用いてタンパク質・ペプチドの同定を行った。同定には UniProt のマウスのデータベース

(reviewed, canonical データベース;17,053 件、2020 年 3 月リリース)を用いた。同定解析に必要なパラメーター設定は表 3-1,2 の条件で行い、偽陽性率(FDR)が 1%で分析した。

(8) Skyline を用いた比較解析

MS1 定量は Skyline (ver. 20.1)を用いて行った。Skyline の解析に必要なペプチド設定とトランジション設定は表 3-3,4 の条件で行った。PEAKS X から出力した解析のデータを Skyline のスペクトルライブラリーとして使用した。定量したデータは、理論上の同位体比との一致率を示す isotope dot product のパラメーターが 0.9 以上、mass error が 6 ppm 以内のペプチドを解析した。解析には、各測定における全てのペプチドの XIC の面積値の平均で補正後、各ペプチドで最も面積値の高いピークの電荷数の定量データを用いた。

(10) プロホルモン前駆体タンパク質データのスクリーニング 2 章と同様

3-2 結果と考察

3-2-1 改良 DS 法の開発

(a) 粉末の除去法の開発

2-2-1 では、DS 法を組織応用した場合に起こる 3 つの問題の内の 2 つ、(1)ACE 沈殿時に沈殿物が形成されず、(2)高分子量タンパク質が抽出液に再溶解されることを、それぞれ希釈を行わないこと、抽出液に含まれる ACN 濃度を上げることで解決した。しかし、(3)抽出液を凍結乾燥後に析出する多くの粉末については、STAGE Tip で強引に除去することで、LC-MS/MS 分析をすることが可能になったが、この方法は析出した粉末の影響により試料調製の不安定さがあり、実際、抽出後に析出する粉末は、STAGE Tip を詰まらせるだけでなく、図 3-2 のレーン 2 の結果から電気泳動での分析を阻害することが確認できた。これらの粉末を除去するために、従来の組織からのペプチド抽出で用いられる ACE、ACN、メタノールを用い、除去法の開発を目指した。その結果、メタノールと ACE を組み合わせることで、凍結乾燥後に析出した粉末を除去した。電気泳動 (図 3-2 のレーン 3) を確認した結果、泳動像が乱れることなく正常に泳動、分析できることが分かった。この試料は STAGE Tip での脱塩処理も可能であり、析出物を効率よく除去する方法の開発に成功した。また、この方法は従来の研究で用いられる一般的な溶媒を使用するため、本方法によって新たな人工的な切断や翻訳後修飾は発生しないと考えられる。また、この方法以外にも、GL Sciences が販売する均一な連続孔

を持つシリカモノリスを用いた MonoSpin C18 を用いれば、繊維状のポリテトラフルオロエチレンに粒径、約 10 μm の吸着剤を固定した STAGE Tip と異なり、粒子を固定するためのフィルターがなく、フィルターの前で成分が濃縮されて、カラムを詰まらせることはないと考えた (図 3-3)。実施した結果、MonoSpin では詰まることなく脱塩処理を行うことが可能でかつ多くの粉末が除去できることが確認できた。

DS 法では、高濃度の尿素・チオ尿素を用いるため、この析出した粉末には多分にそれらが含まれていることが考えられた。チオ尿素は、C₁₈ のカラムに吸着することが知られている [28]。そのため、MonoSpin のみを用いた粉末の除去は、不完全であることが考えられた。実際に、1 匹のマウスの視床下部から DS 法でペプチドを抽出し、開発した方法で粉末の除去をした後に MonoSpin で脱塩処理をした試料 (図 3-4A) と同じ試料から DS 法でペプチドを抽出し、MonoSpin で粉末の除去と脱塩を同時に行った試料 (図 3-4B) の 220 nm~350 nm の吸光度を測定した (図 3-4C)。図 3-4C の吸光度の結果から MonoSpin で粉末の除去と脱塩処理を同時に行った試料は、本研究で開発した方法に比べて 260 nm 以下の吸収スペクトルの強度が高く、核酸やアミノ酸以外の成分が粉末中に混入していることが示唆された。この混入成分が LC-MS/MS 分析にどのように影響をおよぼすか、MonoSpin のみで処理をした試料を連続で 3 回 LC-MS/MS 測定して評価した。LC-MS/MS 測定は 50 分で行い、図 3-1 に示す LC の濃度勾配と条件で測定した。3 回の測定で、216 種類のタンパク質に由来する 774 種類のペプチドが同定された。Skyline を用いて 744 種類の同定ペプチドのうち定量可能な 534 種類のペプチドの面積値を用いて測定の再現性を評価した。測定間の面積値の散布図は、同一試料の連続分析しているにもかかわらず、2 回目、3 回目では全体的に強度が高くなる傾向があった (図 3-5A~5C)。さらに、強度に対して補正を掛けても点線で示す $y=x$ よりも少しずれて散布図は分布しており、また、ピアソンの積率相関係数の平均が 0.97 だった (図 3-6A~6C)。また、測定間の対数面積比の最も高い頻度は、0.3 に収束し、0 での値は平均で約 26.7% のペプチドがこの範囲に入っていた。ペプチドの変動係数 (CV) の中央値は、12.32% であった。これらの全ペプチドの 80% 以上が 20% 以下の CV 値を示していた (図 3-6D)。

次に本研究で開発した改良 DS 法を用いて、500 μg 相当の視床下部からペプチド抽出を独立して 3 回行い、その後 LC-MS/MS 測定をした。その結果、297 種類のタンパク質に由来する 1535 種類のペプチドを同定した。1,535 個の同定ペプチドのうち 1,179 個のペプチドを Skyline で定量し、その後、MonoSpin と同様の補正を行い、再現性を評価した。試料間の面積値の散布図は、点線で示す $y=x$ 付近に分布しており、ピアソンの積率相関係数も 3 試料の測定全ての比較 0.99 以上で直線上に分布していた (図 3-7A~7C)。試料間の対数面積比の最も高い頻度は、0 に収束し、0 での値は約 42.5% の

ペプチドがこの範囲に入っていた。1,179 個のペプチドの変動係数 (CV) の中央値は、3 回の独立実験で 8.27%であった。さらに、全ペプチドの 80%以上が 20%以下の CV 値を示していた (図 3-7D)。

以上の結果から、MonoSpin での処理は、同一試料を連続分析しているにもかかわらず CV の中央値が 12.32%と半分以上のペプチドで 10%以上の誤差があることが確認できた。この変化は、除去しきれなかった残留物のカラムへの負担が大きく、測定ごとにカラムの状態が大きく変化したためと考えられる。そのため、この方法を用いて、独立で処理を行った試料を比較した場合、より大きく結果がばらつくことに加え、カラムの劣化を速め、安定した比較解析が行えないことが考えられる。MonoSpin での残留物の除去は簡単に行うことのできる除去法だが、本研究の目的である、微量組織の個体間分析の実現のためには、独立で処理を行い、高い再現性が維持可能な本方法でなければならぬため、不適切であった。それに対し、本研究で開発した改良 DS 法は、3 回の独立実験でペプチドを抽出し、分析したにもかかわらず、CV の中央値が 8.27%と高い再現性があることが示唆された。

以上のことから、MonoSpin を用いた粉末の除去は難しく、本章で新たに開発した除去法を用いた結果と比較して、開発した除去法を採用した。本研究では、この除去方法と 1 章で最適化を行った DS 法を組み合わせた改良 DS 法を用いて分析を行った。また、除去法の開発により、1 章では吸光度が高く LC-MS/MS 分析に用いられなかった ACN 濃度 85%の使用も可能になった。これにより、高分子量タンパク質の除去が可能でかつペプチドの損失が少ない ACN 濃度 85%を用いるか、ペプチド成分の損失はあるがよりペプチドのみを回収できる ACN 濃度 87%を試料や目的により選択することが可能になった。本研究では、280 nm の吸光スペクトルの値から脳組織の分析には ACN 濃度 85%を採用し、小腸・大腸の分析には ACN 濃度 87%を採用した。改良 DS 法のプロトコルを図 3-8 に示す。

(b) 従来のペプチド抽出法との評価

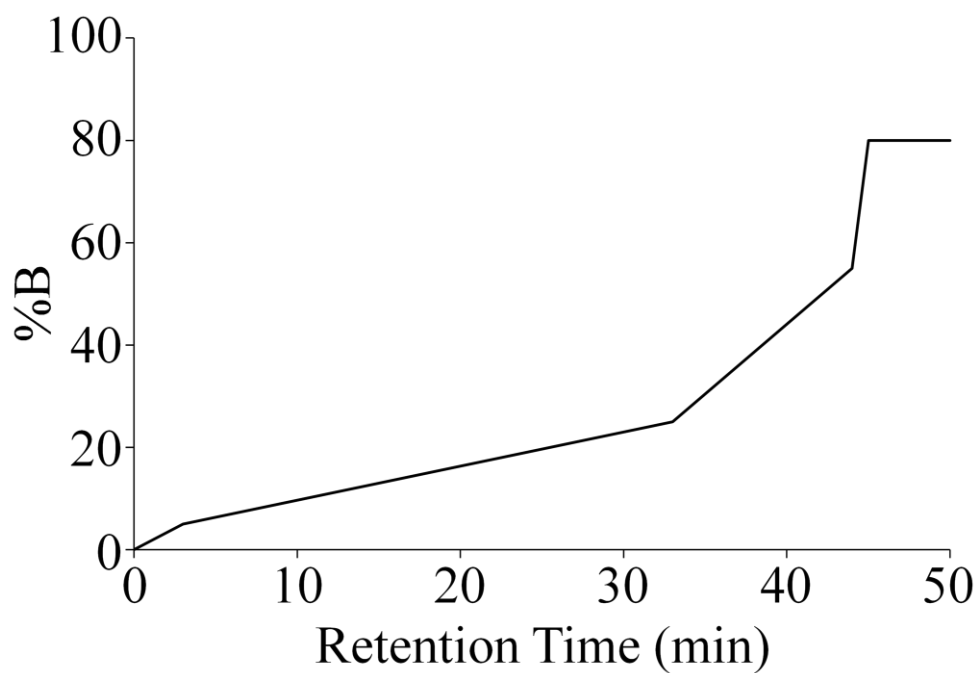
3-2-2 改良 DS 法の微量組織への応用

(a) 同定ペプチドの特徴

本研究で同定されたプロホルモン前駆体配列のペプチドアラインメントの 5 つ例を図 3-17~21 に示した。この結果から、既知のペプチドから徐々に配列が短くなっていく一連の断片が存在し、ほぼ全ての既知のペプチドの peptide spectrum matches (PSMs) は、短縮した断片の PSMs よりも高かった。また、既知のペプチドは、様々な PTM を受けていた。その結果、ペプチドの C 末端の末尾に Gly(Lys/Arg)(Lys/Arg)

配列が続く切断ペプチドのほとんどは、C末端でアミド化されていた。この方法により、数 mg の凍結組織からでも従来の研究と同様に、既知のペプチド、その PTM 産物、およびフラグメントの大まかな存在量が確認できた。

以上の結果から、改良 DS 法は 35 種類の既知の生理活性ペプチドを含めたプロホルモン前駆体タンパク質由来のペプチドを多く観測することに成功した。さらに、本研究で観測されたプロホルモン前駆体由来のペプチドの多くが先行研究でのプロホルモン前駆体由来のペプチドがもつ生成時の開裂パターンの特徴と一致しており、改良 DS 法はプロホルモン前駆体由来のペプチドを正しく抽出・同定できていることが確認できた。このことから、本方法を用いた解析は、従来の加熱処理を用いた方法と同程度に試料調製時のペプチド分解を阻害できていることが確認できた。また、3-2-1 (a) の改良 DS 法の再現性を評価した結果から、本研究で開発した方法は、マウス 1 匹分の微量組織から再現性良くペプチドを抽出することが可能である。このことから、改良 DS 法は、従来の大規模ペプチドミクス研究と比較して、生理活性ペプチドやプロホルモン由来ペプチドの高効率な観察と、多様なペプチド長のペプチドの検出を実現し、高い再現性を有しているため、従来の方法よりも微量組織の分析に適していることが示唆された。



分析条件

nanoLC Easy-nLC1000

MS Q-Exactive

カラム Nano HPLC Capillary Column, C18 0.075×125 mm analytical column

A 溶媒 0.1% FA

B 溶媒 90% ACN-0.1% FA

流速 300nL/min

図 3-1 本章で用いた LC-MS/MS 分析の分離条件

表 3-1 脳組織の同定解析に用いた PEAKS X の同定設定

パラメーター名	パラメーターの意味	設定した値
Enzyme	使用した消化酵素	None
Precursor mass	MS スペクトルの <i>m/z</i> の許容誤差	6 ppm
Fragment ion	MS/MS スペクトルの <i>m/z</i> の許容誤差	0.02 Da
PTM	翻訳後修飾	Oxidation (M), Acetylation (K), Acetylation (N-term), Amidation (C-term), Deamidation (NQ), Methylation (KR), Dehydration (DSTY, C-term), Sodium (DE, C-term), Phosphorylation (STY), Pyroglutamic acid from Q (N-term)
Maximum allowed variable PTM per peptide	1 つのペプチドに対して PTM を受ける上限	5

表 3-2 小腸・大腸・糞便の同定解析に用いた PEAKS X の同定設定

パラメーター名	パラメーターの意味	設定した値
Enzyme	使用した消化酵素	None
Precursor mass	MS スペクトルの m/z の許容誤差	6 ppm
Fragment ion	MS/MS スペクトルの m/z の許容誤差	0.02 Da
PTM	翻訳後修飾	Oxidation (M), Acetylation (K), Acetylation (N-term), Amidation (C-term)
Maximum allowed variable PTM per peptide	1 つのペプチドに対して PTM を受ける上限	5

表 3-3 比較解析に用いた Skyline のペプチド設定

パラメーター名	パラメーターの意味	設定した値
Enzyme	使用した消化酵素	trypsin KR/P
max missed cleavages	最大未消化数	9
minimal length	最小アミノ酸残基長	5
maximal length	最大アミノ酸残基長	100
variable modifications	翻訳後修飾	Oxidation (M), Acetylation (K), Acetylation (N-term), Amidation (C-term), Deamidation (NQ), Methylation (KR), Dehydration (DSTY, C-term), Sodium (DE, C-term), Phosphorylation (STY), Pyroglutamic acid from Q (N-term)
max variable mods	1つのペプチドに対して PTM を受ける上限	7

表 3-4 比較解析に用いた Skyline のトランジション設定

パラメーター名	パラメーターの意味	設定した値
precursor charges	ターゲットとする プリカーサーイオンの電荷数	2-8
ion type	解析を行うイオンタイプ	p (precursor)
mass range	解析を行う質量範囲	350-900 m/z
tolerance	許容誤差	0.055 m/z
isotope peaks included	解析する同位体ピーク数	count 3
Precursor mass analyzer	分析を行った機器の種類	orbitrap
resolution	分解能	100,000 at 200 m/z
use only scans within 10 minutes of MS/MS IDs	ペプチドの同定時間の情報か ら 解析を行う時間範囲	ON

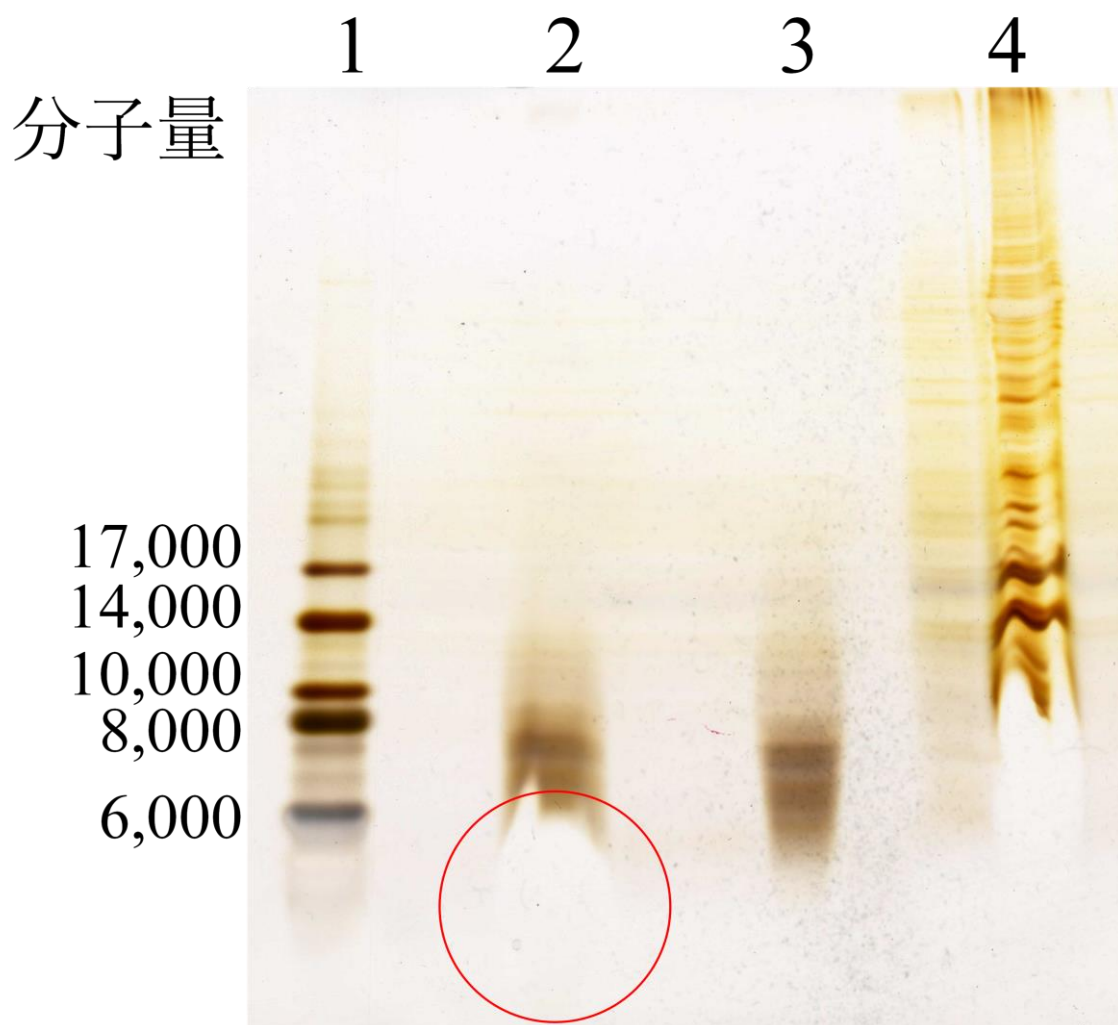


図 3-2 粉末の除去法の電気泳動での評価

電気泳動結果；レーン 1：マーカー、レーン 2：最適化した DS 法を用いたペプチド抽出物（組織相当量：0.45 mg）、レーン 3：最適化した DS 法を用いたペプチド抽出物+粉末の除去法（改良 DS 法）（組織相当量：0.45 mg）、レーン 4：ペプチド抽出前のホモジナイズ試料（組織相当量：0.45 mg）を示す。赤丸で示すように、析出した粉末がある状態で電気泳動を行うと泳動を阻害する成分により、タンパク質・ペプチドが最後まで泳動されず、バンド自体も阻害成分に押され、正確に分子量や存在量を分析すること難しい。

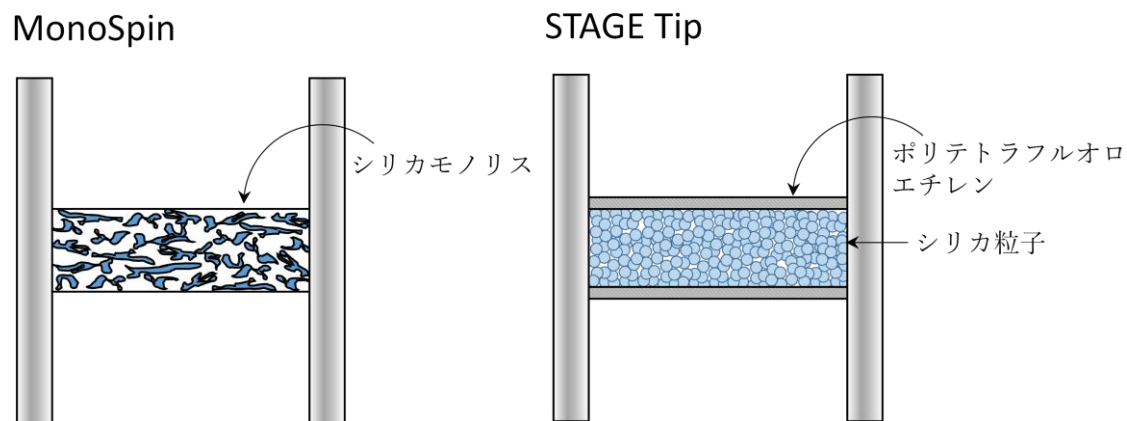


図 3-3 MonoSpin と STAGE Tip の構造の違い

MonoSpin は、ディスク状のシリカモノリスを用いており、均一な連続孔を有するため高い通液性と大きな表面積を有する。STAGE Tip で用いられるディスクは、繊維状のポリテトラフルオロエチレンに粒径、約 $10\ \mu\text{m}$ の吸着剤を固定しているため、流路が狭くなり、目的成分の拡散距離が短くなるため高い抽出効率を有する。本研究では、大量の析出した粉末を溶解した試料を通過させるため、STAGE Tip では、フィルターの前で溶液が濃縮されることで、粉末が析出したと考えられる。

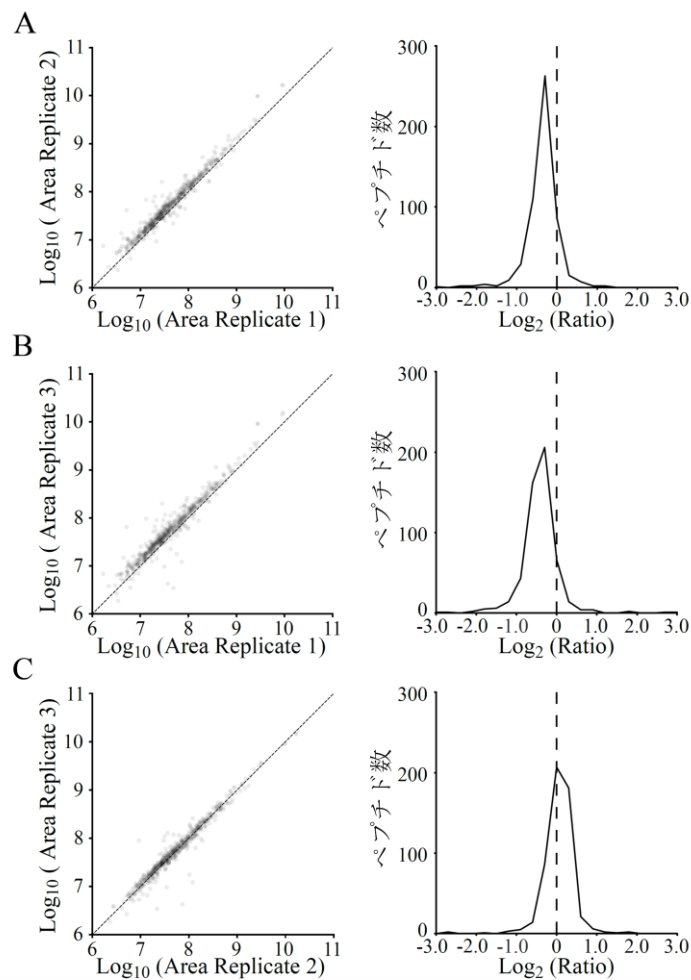


図 3-5 Skyline を用いた MonoSpin での粉末の除去の同一試料の再現性の評価

各ペプチド断片の XIC 面積から、測定の 1 回目と 2 回目(A)、1 回目と 3 回目(B)、2 回目と 3 回目(C)間の散布図と対数面積比をプロットした。散布図上の点線は $y = x$ の直線を示し、対数面積比上の点線は $\text{Log}_2 0$ を示した。

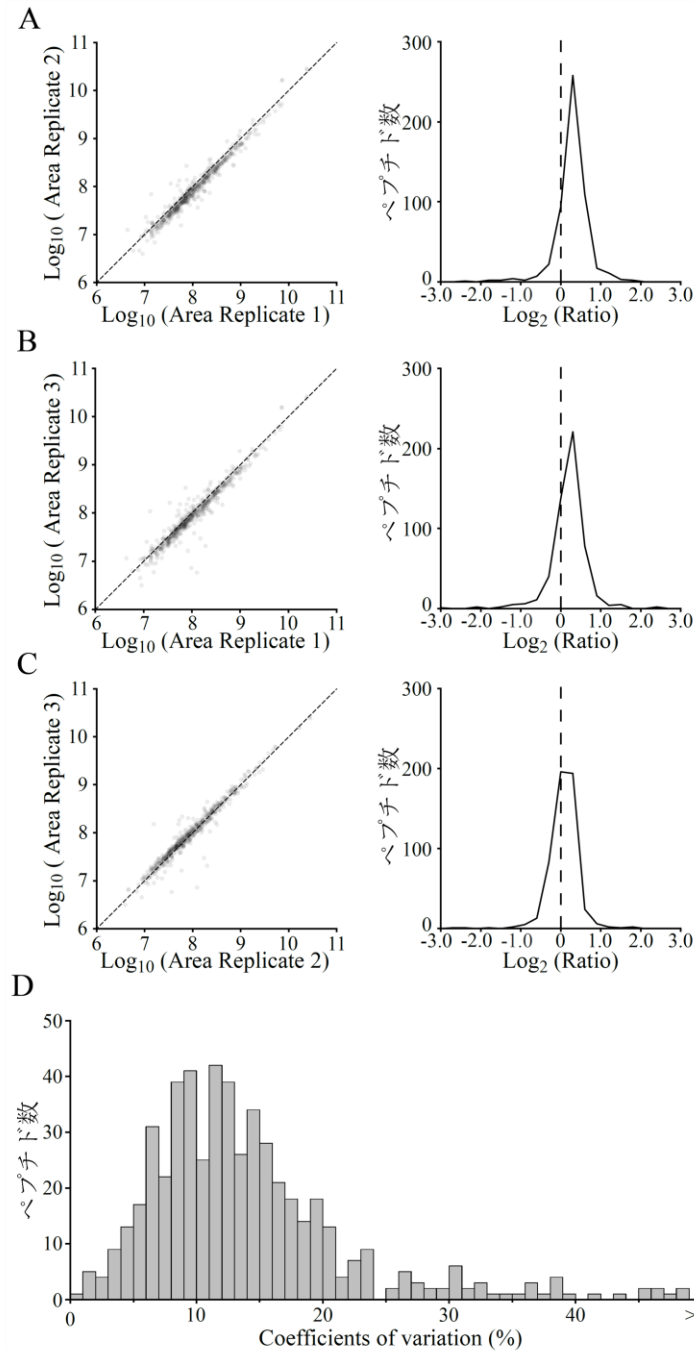


図 3-6 Skyline を用いた MonoSpin での粉末の除去の同一試料の補正を行った再現性の評価

各ペプチド断片の XIC 面積から、測定の 1 回目と 2 回目(A)、1 回目と 3 回目(B)、2 回目と 3 回目(C)間の散布図と対数面積比をプロットした。(D)3 回の測定における XIC 面積における変動係数 (CV) 値の分布。散布図上の点線は $y=x$ の直線を示し、対数面積比上の点線は $\text{Log}_2 0$ を示した。CV 値は標準偏差/平均値で求められ、平均値に対するデータとのばらつきを相対的に評価する値である。

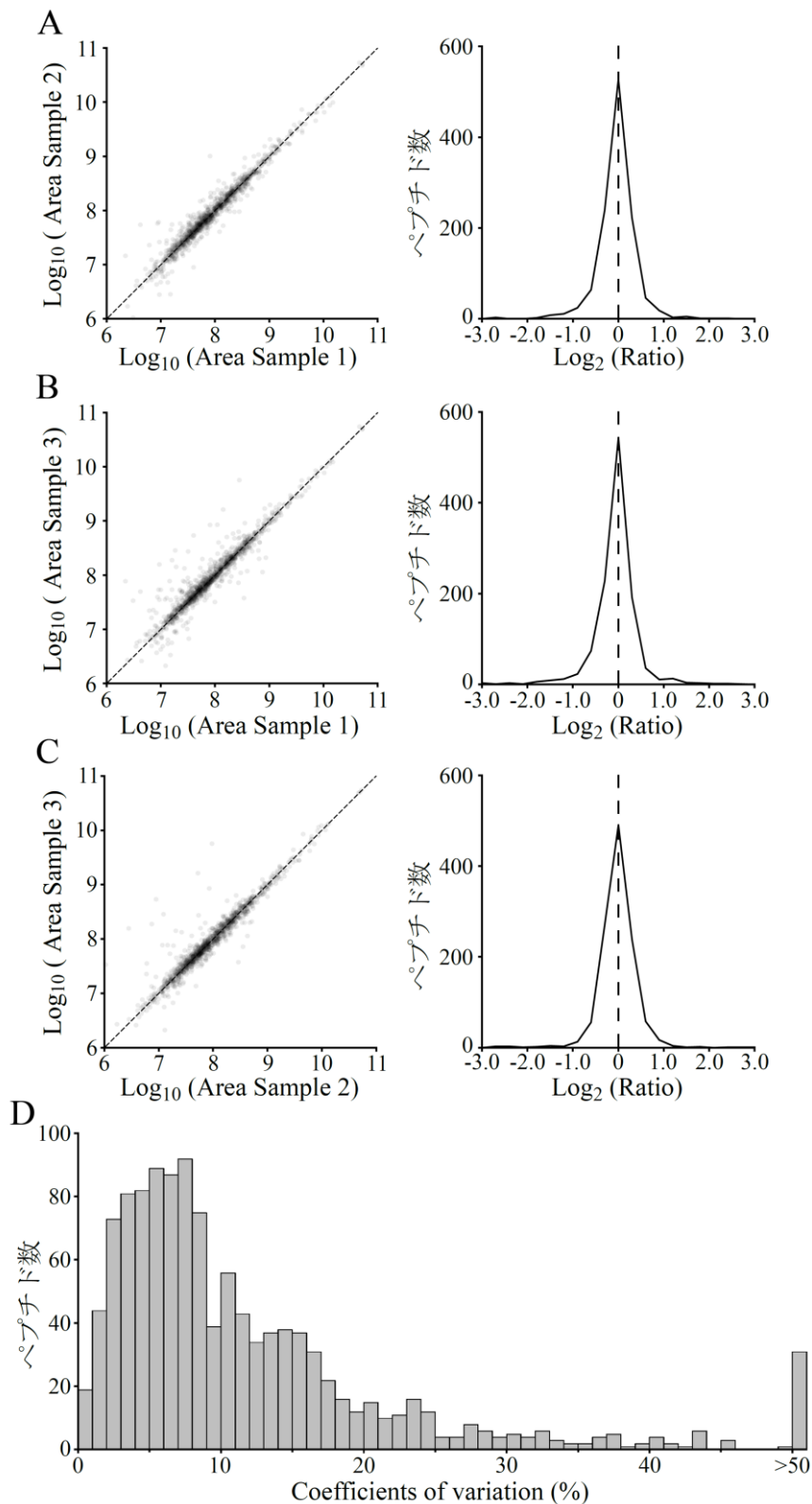


図 3-7 Skyline を用いた改良 DS 法の再現性の評価

各ペプチド断片の XIC 面積から、試料 1 と 2 (A)、1 と 3 (B)、2 と 3 (C)間の散布図と対数面積比の分布をプロットした。(D) 3 回の測定での XIC 面積の CV 値の分布。散布図上の点線は $y = x$ の直線を示し、対数面積比上の点線は $\text{Log}_2 0$ を示した。

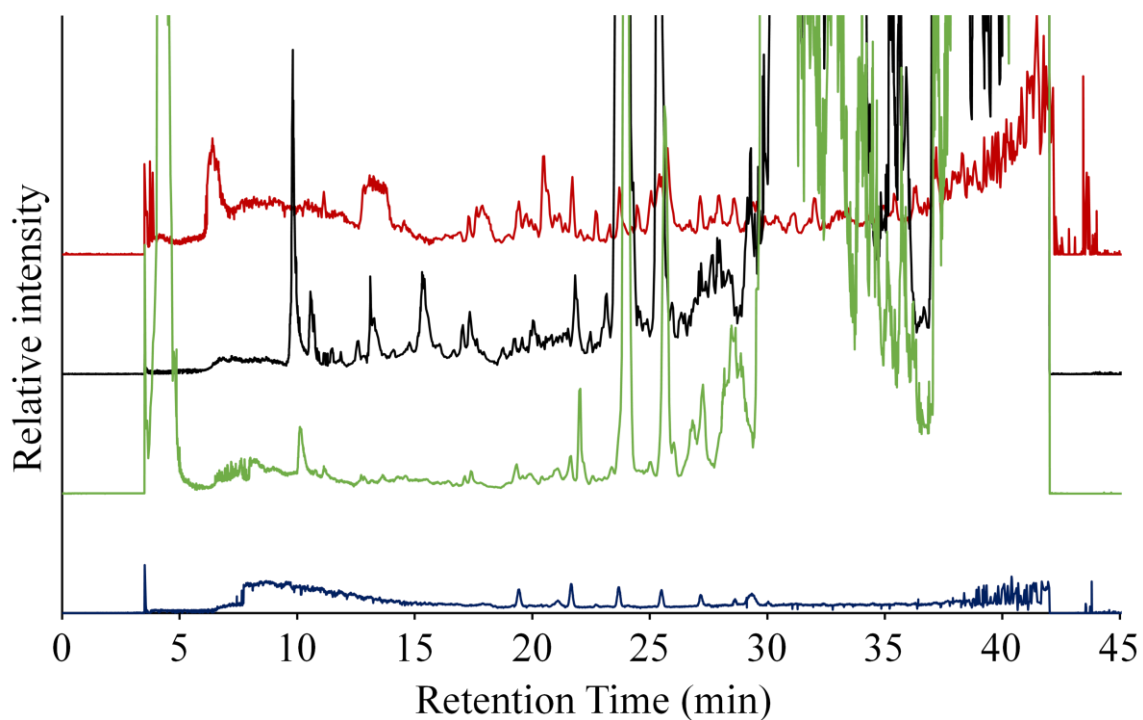


図 3-9 各抽出法の Total Ion Chromatogram

赤のクロマト：改良 DS 法でペプチドを抽出した試料の LC-MS 分析結果、黒のクロマト：ACE 抽出法でペプチドを抽出した試料の LC-MS 分析結果、緑のクロマト：ACN 抽出法でペプチドを抽出した試料の LC-MS 分析結果、青のクロマト：限外濾過法でペプチドを抽出した試料の LC-MS 分析結果。縦方向は強度を示し、同じ縮尺で強度を 5×10^9 ずつずらして表記した。

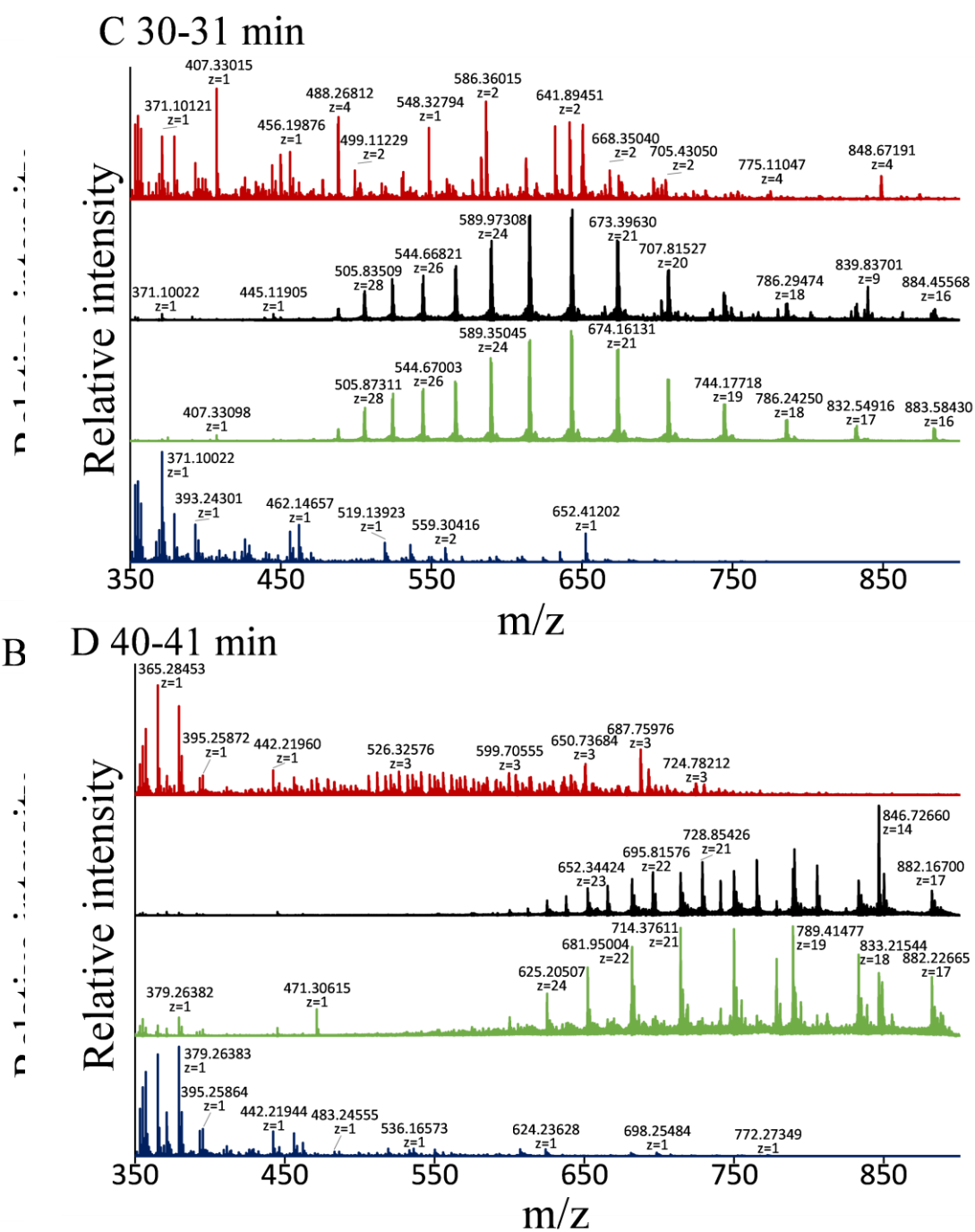


図 3-11 各抽出法の 10 分ごとでの MS1 スペクトル (30-31 分と 40-41 分)

各時間での MS1 スペクトル、(C)30-31 分、(D)40-41 分、赤のクロマト：改良 DS 法でペプチドを抽出した試料の結果、黒のクロマト：ACE 抽出法でペプチドを抽出した試料の結果、緑のクロマト：ACN 抽出法でペプチドを抽出した試料の結果、青のクロマト：限外濾過法でペプチドを抽出した試料の結果。縦方向は強度を示し、各方法で最も高い強度を 100 とした相対強度を 110 ずつずらして表記した。

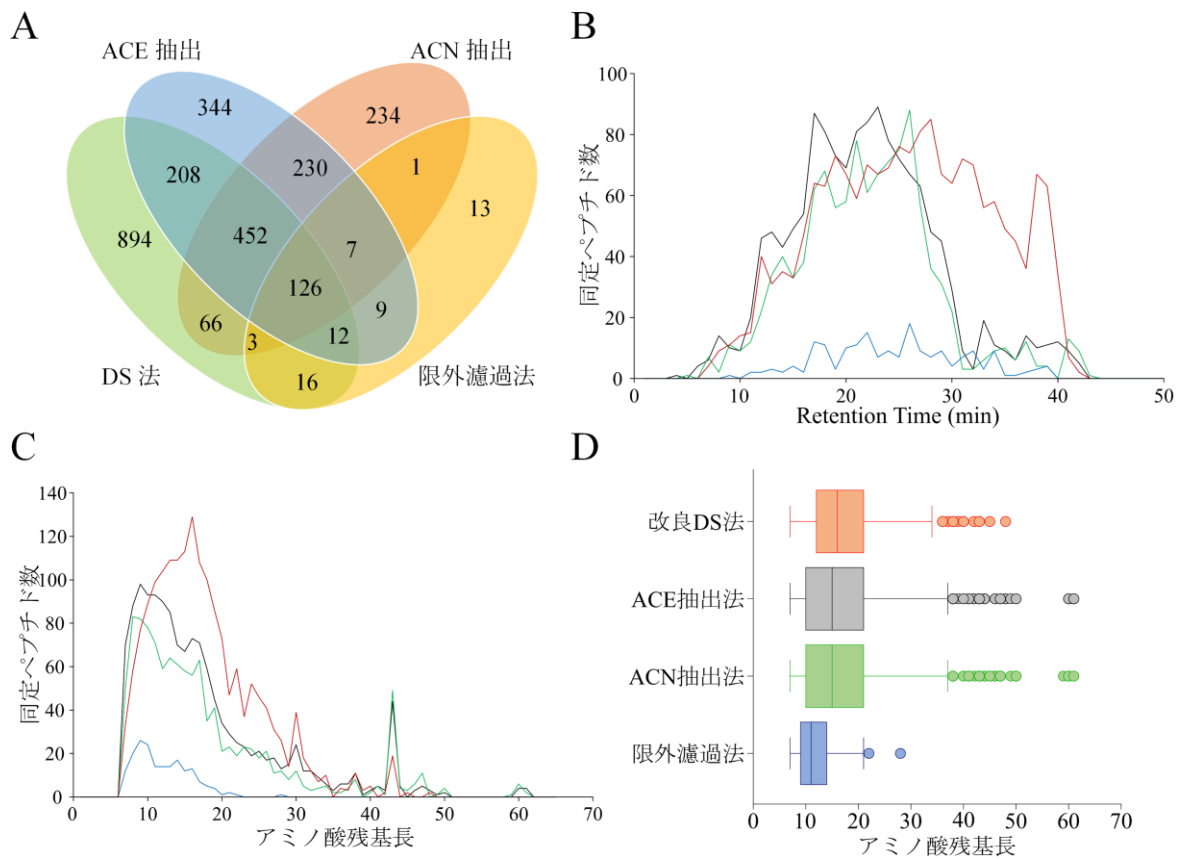


図 3-12 各抽出法の同定ベースでの評価

A: 改良 DS 法、ACE 抽出法、ACN 抽出法、限外濾過法で同定されたペプチドのベン図、B: Retention Time ごとでの同定ペプチド数の分布、C: アミノ酸残基長ごとの同定ペプチド数の分布、赤線: 改良 DS 法での結果、黒線: ACE 抽出法での結果、緑線: ACN 抽出法での結果、青線: 限外濾過法での結果、D: 改良 DS 法、ACE 抽出法、ACN 抽出法、限外濾過法で同定されたペプチドのアミノ酸残基長の箱ひげ図、丸は第三四分位数+1.5×四分位範囲を超えた外れ値を示す。

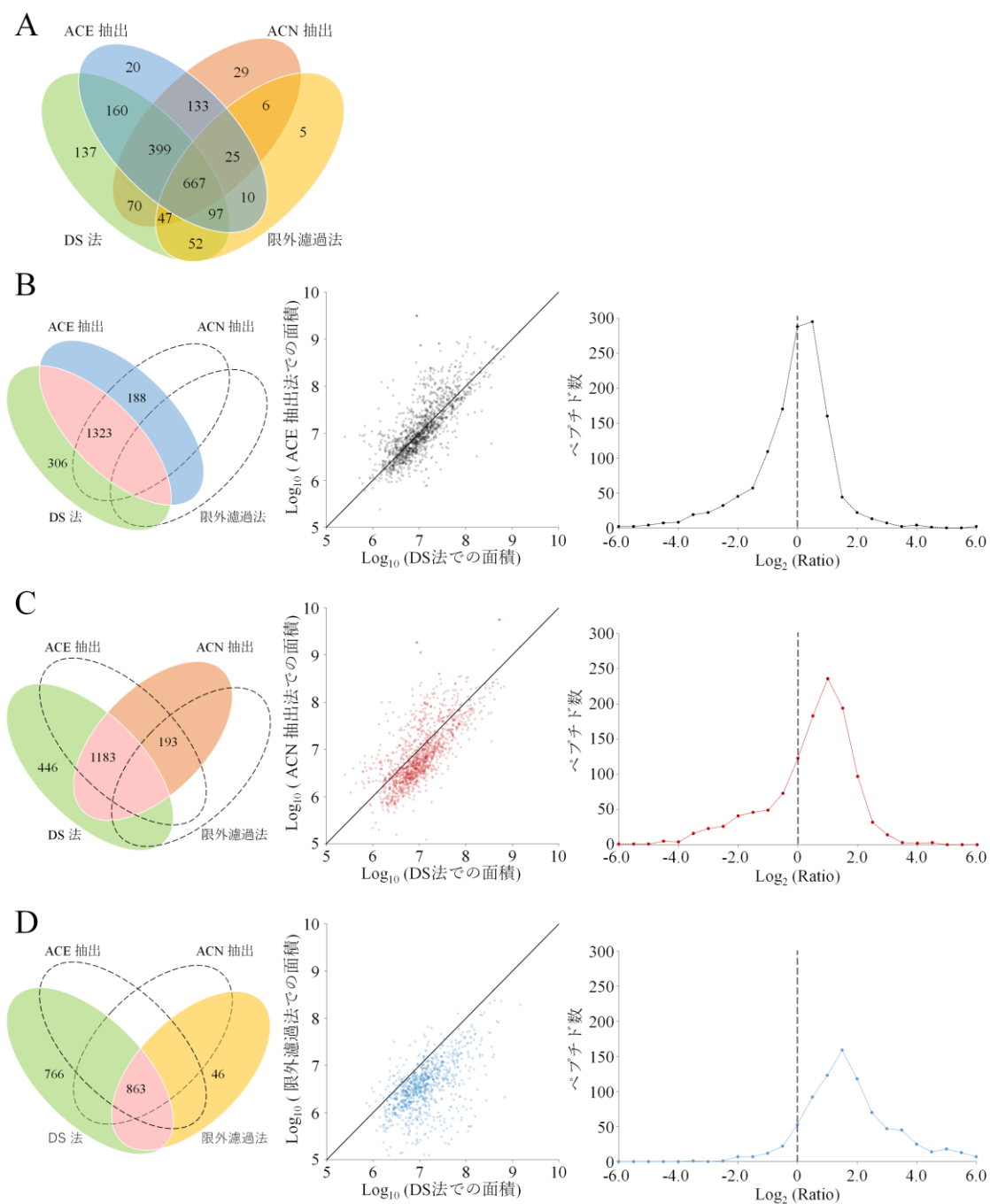


図 3-13 各抽出法の XIC 面積の比較

A : 定量可能なペプチドのベン図、各ペプチド断片の XIC 面積から、DS 法と ACE 抽出法(B)、DS 法と ACN 抽出法(C)、DS 法と限外濾過法(D)間の散布図と対数面積比をプロットした。各 B,C,D のベン図中のピンク部分のペプチドを比較した。散布図上の実線は $y = x$ の直線を示し、対数面積比上の点線は $\text{Log}_2 0$ を示した。

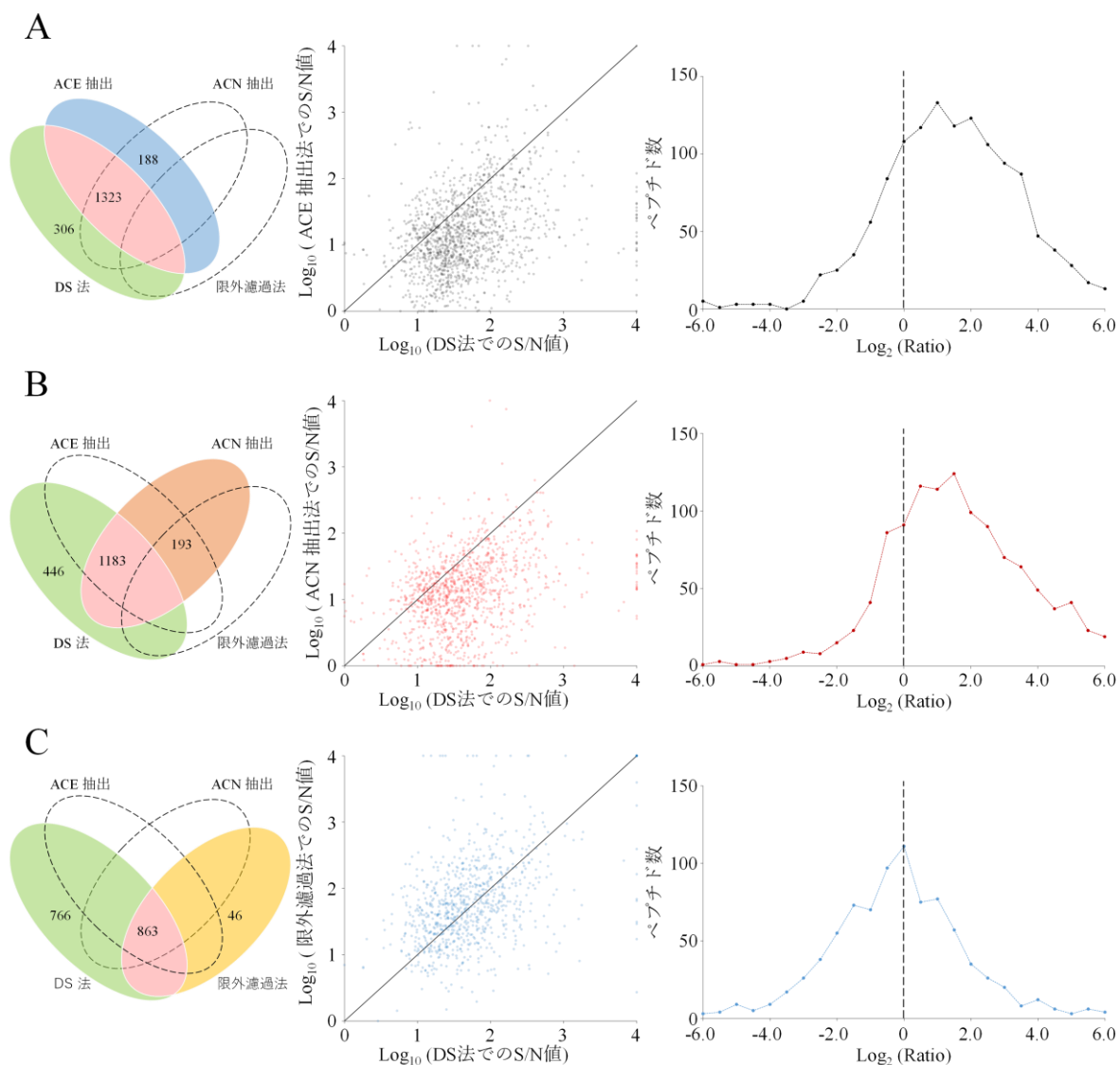


図 3-14 各抽出法の Signal/Noise 値の比較

各ペプチド断片の Signal/Noise (S/N) 値から、DS 法と ACE 抽出法(A)、DS 法と ACN 抽出法(B)、DS 法と 限外濾過法(C)間の散布図と対数比をプロットした。各 A,B,C のベン図中の赤部分のペプチドを比較した。ノイズが 0 のペプチドは、S/N 値 10^4 で表示した。散布図上の実線は $y=x$ の直線を示し、対数面積比上の点線は $\text{Log}_2 0$ を示した。

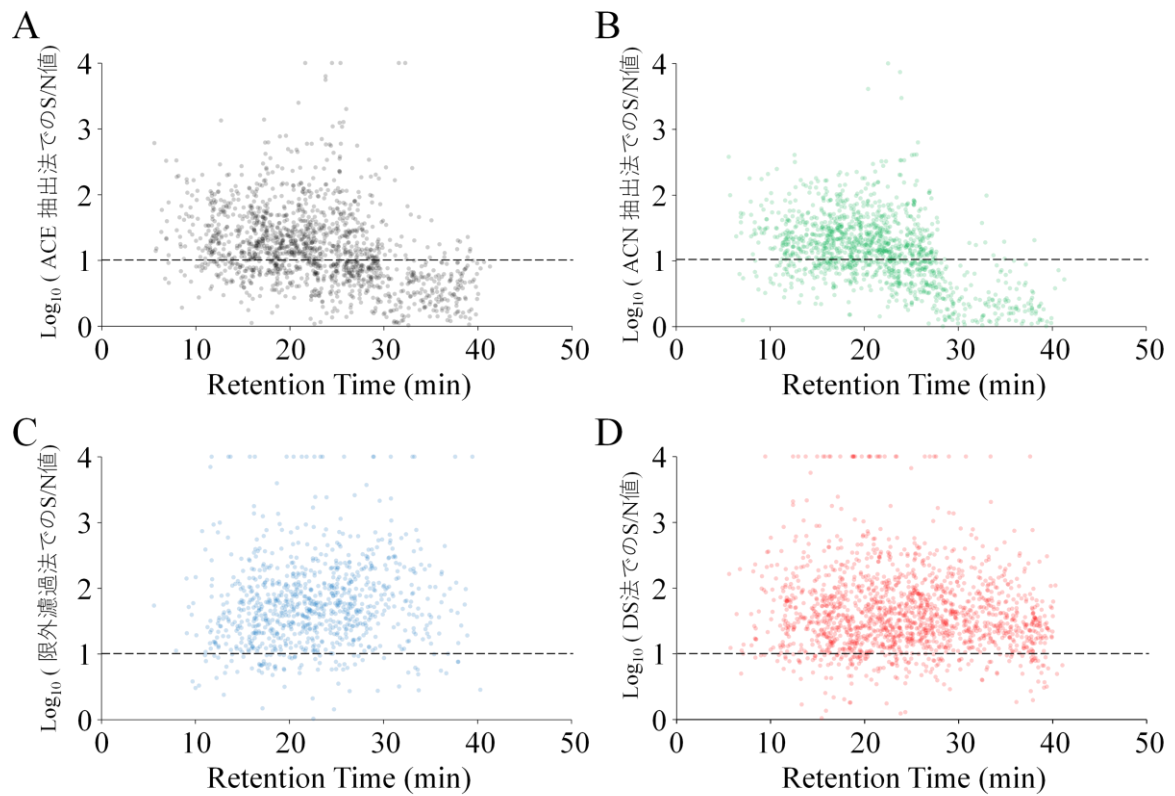


図 3-15 Retention Time と Signal/Noise 値の散布図

方法ごとの各ペプチドの Retention Time と Signal/Noise (S/N) 値の散布図。A : ACE 抽出法、B : ACN 抽出法、C : 限外濾過法、D : 改良 DS 法。ノイズが 0 のペプチドは、S/N 値 10^4 で表示した。点線は $\text{Log}_{10}1$ を示した。

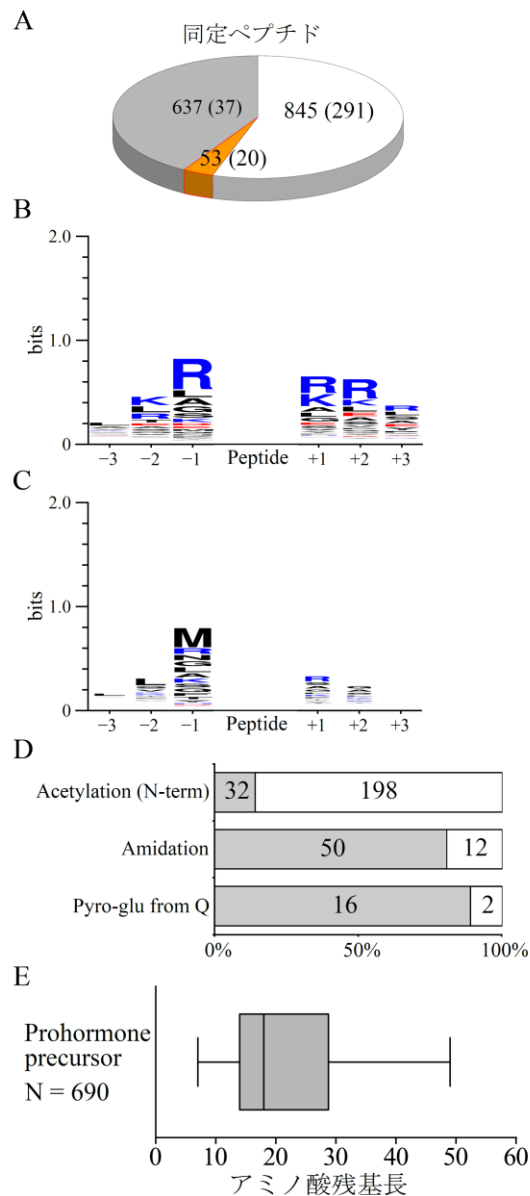


図 3-16 マウス視床下部のペプチド分析

(A) LC-MS/MS で同定されたペプチドの円グラフ；プロホルモン前駆体タンパク質由来のペプチド、非プロホルモンタンパク質由来のペプチド、表 3-5 にまとめたペプチドをそれぞれ白、灰色、橙色で示す。(B, C) プロホルモン前駆体タンパク質由来のペプチド (B) とその他のペプチド(C) の Logo Plot。正に荷電したアミノ酸を青、負に荷電したアミノ酸を赤で示す。(D) PTM の棒グラフ。色は(A)の色に対応している。(E)プロホルモン前駆体タンパク質由来のペプチドのアミノ酸残基数のボックスプロット解析を示す。

Protachykinin-1

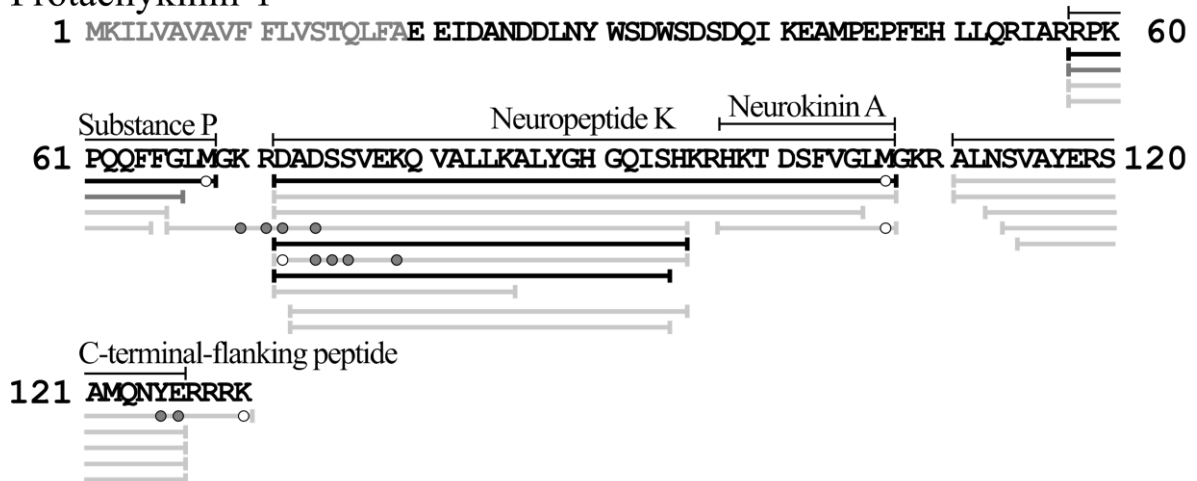


図 3-17 TKN1_MOUSE のペプチドアラインメントマップ

TKN1_MOUSE (Uniprot ID, P41539; Gene Name, Tac1)のペプチドのマッピングを表示した。バーの色の設定は以下の通りです。1-9 PSMs、薄い灰色、10-14 PSMs、濃い灰色、>14 PSMs、黒。PTM (acetylation [N-term], amidation, pyroglu from Q)、その他の PTM をそれぞれ白丸、黒丸で表示しています。

Proenkephalin-B

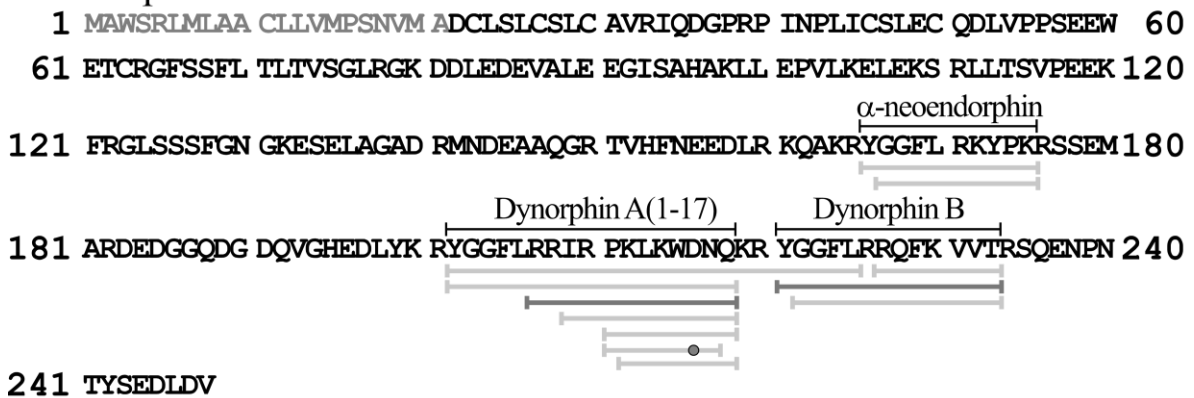


図 3-18 PDYN_MOUSE のペプチドアラインメントマップ

PDYN_MOUSE (Uniprot ID, O35417; Gene Name, Pdyn)のペプチドのマッピングを表示した。バーの色の設定は以下の通りです。1-9 PSMs、薄い灰色、10-14 PSMs、濃い灰色、>14 PSMs、黒。PTM (acetylation [N-term], amidation, pyro-glu from Q)、その他の PTM をそれぞれ白丸、黒丸で表示しています。

Orexin

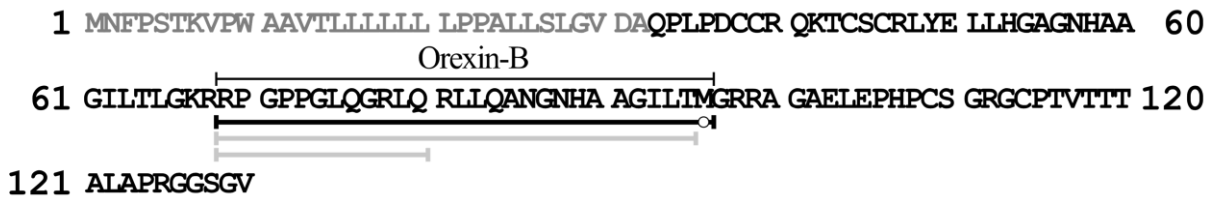


図 3-19 OREX_MOUSE のペプチドアラインメントマップ

OREX_MOUSE (Uniprot ID, O55241; Gene Name, Hcrt)のペプチドのマッピングを表示した。バーの色の設定は以下の通りです。1-9 PSMs、薄い灰色、10-14 PSMs、濃い灰色、>14 PSMs、黒。PTM (acetylation [N-term], amidation, pyroglu from Q)、その他の PTM をそれぞれ白丸、黒丸で表示しています。

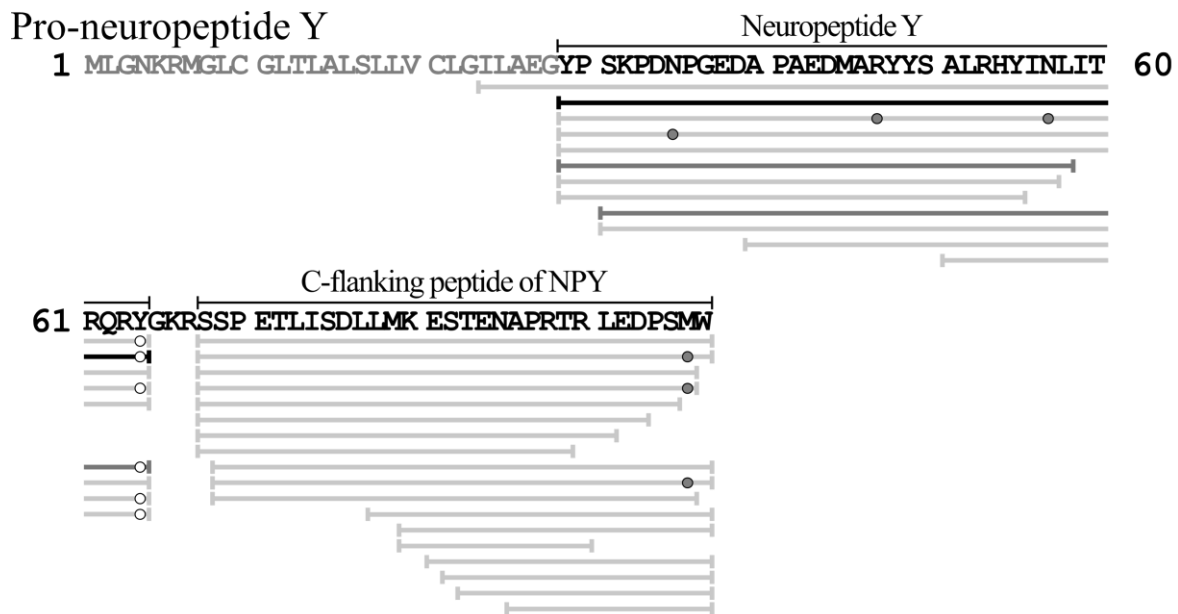


図 3-20 NPY_MOUSE のペプチドアラインメントマップ

NPY_MOUSE (Uniprot ID, P57774; Gene Name, Npy)のペプチドのマッピングを表示した。バーの色の設定は以下の通りです。1-9 PSMs、薄い灰色、10-14 PSMs、濃い灰色、>14 PSMs、黒。PTM (acetylation [N-term], amidation, pyroglu from Q)、その他の PTM をそれぞれ白丸、黒丸で表示しています。

Pro-opiomelanocortin

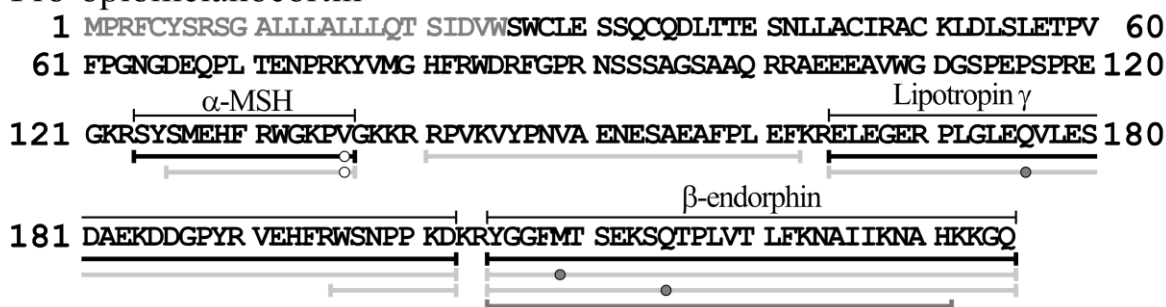


図 3-21 COLI_MOUSE のペプチドアラインメントマップ

COLI_MOUSE (Uniprot ID, P01193; Gene Name, Pomc)のペプチドのマッピングを表示した。バーの色の設定は以下の通りです。1-9 PSMs、薄い灰色、10-14 PSMs、濃い灰色、>14 PSMs、黒。PTM (acetylation [N-term], amidation, pyroglu from Q)、その他の PTM をそれぞれ白丸、黒丸で表示しています。

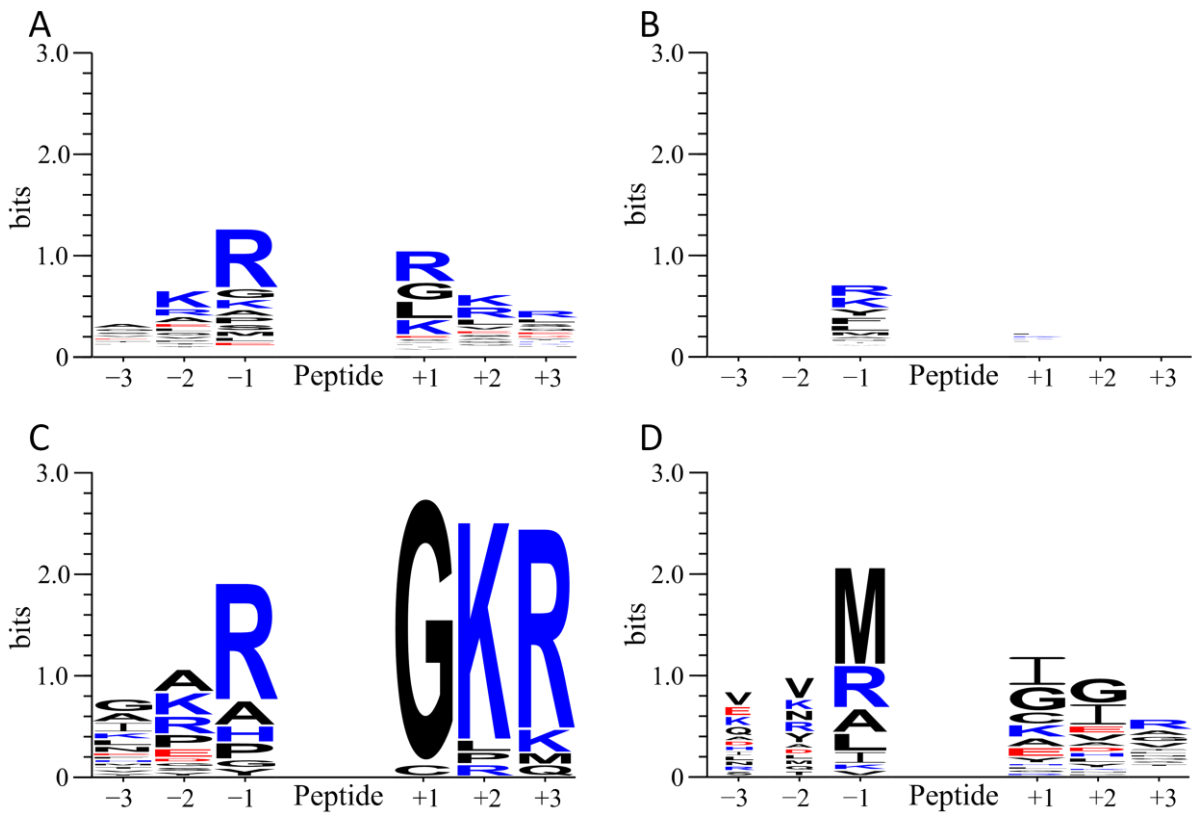


図 3-22 小腸・大腸の同定ペプチドの Logo Plot

(A) 小腸・大腸で同定されたプロホルモン前駆体タンパク質由来のペプチドの前後 3 つのアミノ酸残基の Logo Plot、(B) プロホルモン前駆体以外のタンパク質由来のペプチドの Logo Plot、(C) (A)のうちアミド化されたペプチドのみでの Logo Plot、(D) (B)のうちアミド化されたペプチドのみでの Logo Plot。正に荷電したアミノ酸を青、負に荷電したアミノ酸を赤で示す。

4 章 総括

微量組織の個体間分析の実現を目指して

本研究では第 2 章において DS 法を組織応用することで起こる 3 つの問題を解決するための最適化を実施した。それにより 1 mg 未満の組織からペプチドを抽出し、既知の生理活性ペプチドを観測することに成功した。また、この方法とジメチル化標識法を組み合わせることにより、マウス 1 匹分の微量組織から比較解析を行うことに成功した。しかし、この方法では STAGE Tip が詰まるなどの試料調製の不安定さがあることに加え、280 nm の吸光スペクトルの高さからも残留物を含んでいることが予想できた。そのため、この方法では、試料調製の不安定さや残留物の LC-MS への送液が LC-MS/MS 分析による試料間のペプチド定量分析の妨げになると考え、第 3 章では残留物の原因となる粉末の除去方法の開発に取り組んだ。この開発した除去法と組織用に最適化した DS 法を組み合わせた改良 DS 法をマウス 1 匹分の視床下部の分析に応用した結果、再現性良く抽出することが可能であり、従来のペプチドミクス手法と比較して、生理活性ペプチドやプロホルモン由来ペプチドの高効率な観測と、多様なペプチド長のペプチドの検出を可能にした。さらに、本研究で同定されたプロホルモン由来ペプチドの開裂パターンの特徴は、先行研究で観測された特徴と一致しており、改良 DS 法がプロホルモン前駆体由来のペプチドを正しく抽出・同定できていることが確認できた。このことは、従来のペプチド抽出において必要とされてきた熱処理を行わなくても、試料調製時のペプチド分解の影響を従来法と同程度に軽減できていることを示しており、凍結試料をもとにしたペプチド分析の可能性を広げる非常に重要な結果である。また本方法と従来のペプチド抽出法を同一のマウスの右脳を用いて解析した結果、従来法よりも高効率にペプチドのみを抽出でき、30 分以降の成分も定量可能だった。これらに加え、本方法は、多くの消化酵素が存在する腸などの脳組織以外の組織の分析にも応用することができ、本研究で視床下部から観測できなかった既知の生理活性ペプチドを観測することができた。以上のことから、本方法は、本研究の目的である、微量組織の個体間分析の実現はもちろんのこと、より詳しい生体内の分析にも十二分に役立つと考えられる。

しかし、本研究で開発した方法は、大規模ペプチドミクスと比べ同定されるペプチドの数は未だ少ない。今後は、還元アルキル化の最適化、LC-MS/MS 分析前の分画やリン酸化などの選択的な濃縮により同定ペプチド数を増加させることに加え、プロテオミクス研究で注目されている一度の測定で多くのペプチドを定量可能な Data independent acquisition 法[35]を用いた比較解析法と組み合わせることでより詳しく個体ごとの内因性ペプチドの機能やペプチド同士の関係性を評価していきたいと考えている。

謝辞

本研究にあたり、有益な情報、貴重なご助言を数多く頂きました生物物理学講座の米田茂隆先生に手厚くお礼申し上げます。

全ての実験過程において、直接ご指導及び、数多くの議論をして頂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。

本研究にあたり貴重なご助言及び、数多くの議論をして頂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。

マウスの組織の提供、並びに生化学の立場からタンパク質やペプチドの機能について多くの助言をいただきました北里大学医学部生化学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及び、議論をしていただいたかずさ DNA 研究所の川島祐介博士、北里大学医学部実験動物学の佐藤俊哉先生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講座の大石正道先生に深く感謝いたします。

研究の進め方についてのご助言をいただきました生物物理学講座の渡辺豪先生に深く感謝いたします。

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、本論文作成のための多くの分析にあたり惜しみない協力をしてくれた北里大学大学院博士課程の紺野亮氏に深く感謝いたします。

研究について多くの議論を交わし、実験に惜しみない協力してくれた北里大学大学院修士課程を修了した山田拓也氏に感謝いたします。

研究の生活において、多くの協力をして頂いた物性物理学講座の皆様に深く感謝いたします。

研究を続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。

参考文献

- [1] C. Martelli, F. Iavarone, F. Vincenzoni, T. Cabras, B. Manconi, C. Desiderio, I. Messina, M. Castagnola, Top-down peptidomics of bodily fluids, *Peptidomics*. 1 (2014) 47–64. <https://doi.org/10.2478/ped-2014-0005>.
- [2] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, K. Kangawa, Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature*. 402 (1999) 656–660. <https://doi.org/10.1038/45230>.
- [3] E.M. Jones, R. Jajoo, D. Cancilla, N.B. Lubock, J. Wang, M. Satyadi, R. Cheung, C. De March, J.S. Bloom, H. Matsunami, S. Kosuri, A Scalable, Multiplexed Assay for Decoding GPCR-Ligand Interactions with RNA Sequencing, *Cell Syst*. 8 (2019) 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.02.009>.
- [4] M.Y. Ang, T.Y. Low, P.Y. Lee, W.F. Wan Mohamad Nazarie, V. Guryev, R. Jamal, Proteogenomics: From next-generation sequencing (NGS) and mass spectrometry-based proteomics to precision medicine, *Clin. Chim. Acta*. 498 (2019) 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.08.010>.
- [5] C. Laschet, N. Dupuis, J. Hanson, The G protein-coupled receptors deorphanization landscape, *Biochem. Pharmacol*. 153 (2018) 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.016>.
- [6] L.D. Fricker, L.A. Devi, Orphan neuropeptides and receptors: Novel therapeutic targets, *Pharmacol. Ther*. 185 (2018) 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.11.006>.
- [7] Z. Miao, K. Ding, S. Jin, L. Dai, C. Dai, X. Li, Using serum peptidomics to discovery the diagnostic marker for different stage of ulcerative colitis, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 193 (2021) 113725. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113725>.
- [8] L. Lin, J. Zheng, F. Zheng, Z. Cai, Q. Yu, Advancing serum peptidomic profiling by data-independent acquisition for clear-cell renal cell carcinoma detection and biomarker discovery, *J. Proteomics*. 215 (2020) 103671. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103671>.
- [9] T. Tsuchiya, H. Iwakura, N. Minamino, K. Kangawa, K. Sasaki, Endogenous peptide profile for elucidating biosynthetic processing of the ghrelin precursor, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 490 (2017) 1142–1146. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.155>.
- [10] T.M. de Oliveira, J.T.J.G. de Lacerda, G.G.F. Leite, M. Dias, M.A. Mendes, P. Kassab, C.G.S. e Silva, M.A. Juliano, N.M. Forones, Label-free peptide quantification coupled with in silico mapping of proteases for identification of potential serum biomarkers in gastric adenocarcinoma patients, *Clin. Biochem*. 79 (2020) 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.02.010>.
- [11] X. Li, J. Li, B. Zhang, Y. Gu, Q. Li, G. Gu, J. Xiong, Y. Li, X. Yang, Z. Qian, Comparative peptidome profiling reveals critical roles for peptides in the pathology of pancreatic cancer, *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 120 (2020) 105687.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105687>.

- [12] A. Secher, C.D. Kelstrup, K.W. Conde-Frieboes, C. Pyke, K. Raun, B.S. Wulff, J. V. Olsen, Analytic framework for peptidomics applied to large-scale neuropeptide identification, *Nat. Commun.* 7 (2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms11436>.
- [13] P. Zhang, X. Wu, S. Liang, X. Shao, Q. Wang, R. Chen, W. Zhu, C. Shao, F. Jin, C. Jia, A dynamic mouse peptidome landscape reveals probiotic modulation of the gut-brain axis, *Sci. Signal.* 13 (2020). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.ABB0443>.
- [14] Y. Kawashima, T. Fukutomi, T. Tomonaga, H. Takahashi, F. Nomura, T. Maeda, Y. Kodera, High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 1694–1705. <https://doi.org/10.1021/pr9008018>.
- [15] T. Saito, Y. Kawashima, S. Minamida, K. Matsumoto, K. Araki, T. Matsui, M. Satoh, F. Nomura, M. Iwamura, T. Maeda, S. Baba, Y. Kodera, Establishment and application of a high-quality comparative analysis strategy for the discovery and small-scale validation of low-abundance biomarker peptides in serum based on an optimized novel peptide extraction method, *J. Electrophor.* 57 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.2198/jelectroph.57.1>.
- [16] M. Shichiri, S. Ishimaru, T. Ota, T. Nishikawa, T. Isogai, Y. Hirata, Salusins: Newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities, *Nat. Med.* 9 (2003) 1166–1172. <https://doi.org/10.1038/nm913>.
- [17] K. Fujimoto, A. Hayashi, Y. Kodera, T. Saito, T. Toki, A. Ogawa, Y. Kamata, K. Takano, H. Katakami, M. Shichiri, Identification and quantification of plasma free salusin- β , an endogenous parasympathomimetic peptide, *Sci. Rep.* 7 (2017) 8275. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08288-0>.
- [18] T. Taguchi, Y. Kodera, K. Oba, T. Saito, Y. Nakagawa, Y. Kawashima, M. Shichiri, Suprabasin-derived bioactive peptides identified by plasma peptidomics, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1047. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79353-4>.
- [19] Y. Ishihama, J. Rappsilber, M. Mann, Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional peptide fractionation in proteomics, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 988–994. <https://doi.org/10.1021/pr050385q>.
- [20] 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>.
- [21] Y. Kodera, Y. Hido, R. Kato, T. Saito, Y. Kawashima, S. Minamida, K. Matsumoto, M. Iwamura, Establishment of a Strategy for the Discovery and Verification of Low-Abundance Biomarker Peptides in Plasma Using Two Types of Stable-Isotope Tags, *Mass Spectrom.* 3 (2014) S0044–S0044. <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.s0044>.
- [22] 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>.
- [23] 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>.
- [24] J. Hanrieder, A. Ljungdahl, M. Fälth, S.E. Mammo, J. Bergquist, M. Andersson, L-DOPA-induced dyskinesia is associated with regional increase of striatal dynorphin peptides as elucidated by imaging mass Spectrometry, *Mol. Cell. Proteomics*. 10 (2011) M111.009308. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009308>.
- [25] E.J. Kim, B. Pellman, J.J. Kim, Stress effects on the hippocampus: A critical review, *Learn. Mem.* 22 (2015) 411–416. <https://doi.org/10.1101/lm.037291.114>.
- [26] G.P. Roberts, P. Larraufie, P. Richards, R.G. Kay, S.G. Galvin, E.L. Miedzybrodzka, A. Leiter, H.J. Li, L.L. Glass, M.K.L. Ma, B. Lam, G.S.H. Yeo, R. Scharfmann, D. Chiarugi, R.H. Hardwick, F. Reimann, F.M. Gribble, Comparison of human and murine enteroendocrine cells by transcriptomic and peptidomic profiling, *Diabetes*. 68 (2019) 1062–1072. <https://doi.org/10.2337/db18-0883>.
- [27] M.A. Kim, K. Markkandan, N.-Y. Han, J.-M. Park, J.S. Lee, H. Lee, Young Chang Sohn, Neural Ganglia Transcriptome and Peptidome Associated with Sexual Maturation in Female Pacific Abalone (*Haliotis discus hannai*), *Genes (Basel)*. 10 (2019) 268. <https://doi.org/10.3390/genes10040268>.
- [28] F. Gritti, G. Guiochon, Influence of the pressure on the properties of chromatographic columns: III. Retention volume of thiourea, hold-up volume, and compressibility of the C18-bonded layer, *J. Chromatogr. A*. 1075 (2005) 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.095>.
- [29] G.E. Crooks, G. Hon, J.M. Chandonia, S.E. Brenner, WebLogo: A sequence logo generator, *Genome Res.* 14 (2004) 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>.
- [30] V.Y.H. Hook, A. V. Azaryan, S. Hwang, N. Tezapsidis, Proteases and the emerging role of protease inhibitors in prohormone processing, *FASEB J.* 8 (1994) 1269–1278. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.15.8001739>.
- [31] V. Hook, N. Bandeira, Neuropeptidomics Mass Spectrometry Reveals Signaling Networks Generated By Distinct Protease Pathways in Human Systems: Commentary Review, *J Am Soc Mass Spectrom.* 26 (2015) 1970–1980. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1251-6>.
- [32] Paul Wingfield, N-Terminal Methionine Processing, *Curr. Protoc. Protein Sci.* 88 (2017). <https://doi.org/10.1002/cpps.29>.
- [33] H. Ye, J. Wang, Z. Tian, F. Ma, J. Dowell, Q. Bremer, G. Lu, B. Baldo, L. Li, Quantitative mass spectrometry reveals food intake-induced neuropeptide level changes

- in rat brain: Functional assessment of selected neuropeptides as feeding regulators, *Mol. Cell. Proteomics*. 16 (2017) 1922–1937. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000057>.
- [34] J.A. Foster, K.A. McVey Neufeld, Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression, *Trends Neurosci*. 36 (2013) 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.005>.
- [35] Y. Kawashima, E. Watanabe, T. Umeyama, D. Nakajima, M. Hattori, K. Honda, O. Ohara, Optimization of data-independent acquisition mass spectrometry for deep and highly sensitive proteomic analysis, *Int. J. Mol. Sci*. 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20235932>.