

第7号：プロテオミクス特集②

～DIA法による網羅的なタンパク質解析～

はじめに

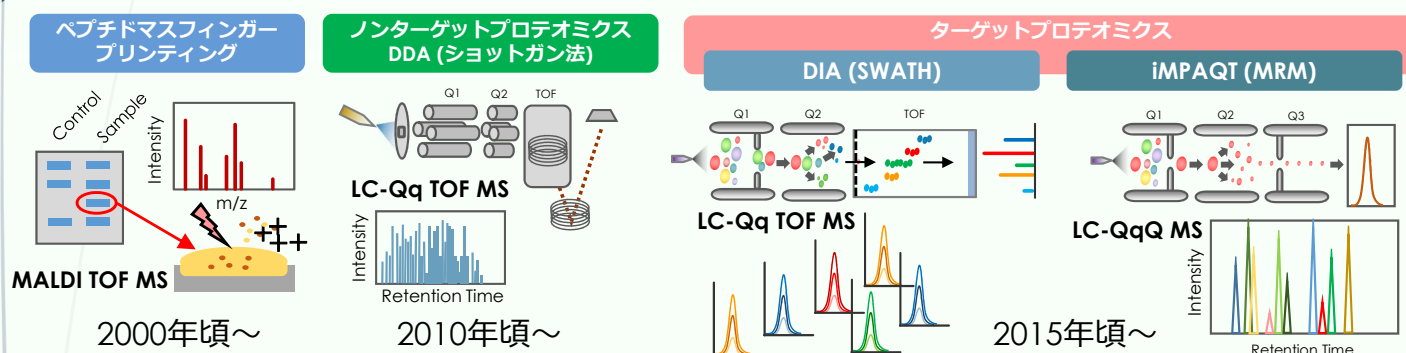
いつもKPSLニュースをご覧いただきありがとうございます。

今回の第7号は、プロテオミクス特集の第2弾として「DIA (Data independent acquisition) 法による網羅的なタンパク質解析」について紹介いたします。前回紹介した「iMPAQT法」は感度や定量再現性に優れた手法でしたが、DIA法は網羅性に重点を置いた分析技術となります。多成分（数千タンパク質）の中から目的とするバイオマーカーを探索したい方にお勧めです。

プロテオミクス技術の進歩

プロテオミクス技術は質量分析装置の発展とともに大きく成長してきました。特に最近10年間の発展は目覚ましく、タンパク質の検出感度や同定率、定量再現性も飛躍的に向上しています。

20年ほど前は、SDS-PAGEにて泳動・分離したタンパク質を含むゲル片を切り出し、各タンパク質を同定するペプチドマスフィンガープリンティングという手法が主流でした。この技術は現在では感染症検査分野で日常的に利用されています。

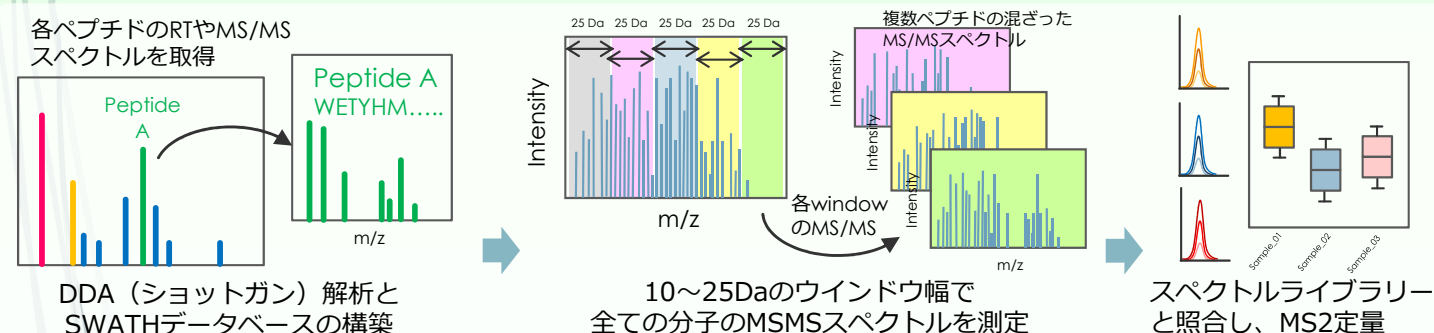


その後、2010年頃から「ショットガン法 (DDA : Data dependent acquisition) 」に代表される、ノンターゲットプロテオミクスが普及してきました。本法では酵母などの比較的複雑性の低いサンプルにおいては、全タンパク質の同定にも成功しています。しかしながらヒトのように遺伝子数も多く、かつ発現ダイナミックレンジも非常に広い生物を対象とした場合、低発現タンパク質の検出や定量再現性に課題がありました。近年この課題へのアプローチとして、MRM技術を応用したiMPAQT法や、SWATH技術を用いたDIA (Data independent acquisition) 法による大規模なターゲットプロテオミクスが普及しつつあります。本誌ではこのDIAの概要について紹介いたします。

MRM : Multiple Reaction Monitoring
iMPAQT : in vitro proteome-assisted Multiple reaction monitoring for Protein Absolute Quantification
SWATH : Sequential window acquisition of all Theoretical fragment ion spectra

DIAプロテオミクスの登場

従来のDDA(ショットガン)分析では存在量の多いタンパク質から順に検出・同定していましたが、DIA分析では存在量に関係なく、全てのMS/MSスペクトルを取得し、事前に構築したスペクトルライブラリーと照合する事で従来技術よりも高感度で正確なプロテオーム解析を可能とします。現在の技術ではヒト細胞などを用いた場合、一回の分析で5000タンパク質以上の比較定量が可能です。

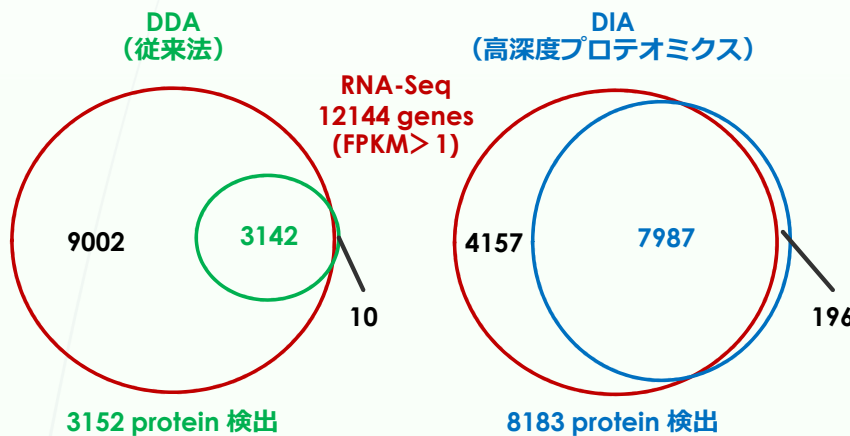


各プロテオミクス技術の比較

従来のプロテオミクスであるDDA法や、iMPAQT法に代表されるMRMベースのターゲットプロテオミクス技術、およびDIA法の特徴を比較すると以下のようになります。

分析技術	DDA	DIA (SWATH)	MRM (iMPAQT)
定量タイプ	MS1定量	MS2定量	MS2定量
定量可能なタンパク質数/Run	1,000~2,000	5,000~10,000	~400(最大)
おおよその定量感度	> 10 fmol/μg Protein	> 1.0 fmol/μg Protein	> 0.1 fmol/μg Protein
定量精度・再現性	△	○	◎

MS1、MS2定量とは、それぞれprecursor ion およびproduct ionsのピークを用いた定量を意味する。
 おおよその定量感度は試料中の総タンパク 1 μg proteinあたり何fmol存在すれば定量可能かを表す。
 (> 1 fmol/μg proteinとはトランスポーターや受容体などの微量な膜タンパク質を定量できる感度) [薬剤学, 78\(5\), 228-234\(2018\)](#)



RNA-Seqとプロテオーム解析で観測された遺伝子とタンパク質の重複

HEK293F細胞を用いたRNA-seq およびプロテオミクス相互解析の結果、RNA-seqの結果検出された約12000遺伝子のうち、従来DDA技術では約3000タンパク質しか検出されなかったのに対して、高深度DIAプロテオミクスでは約8000種、70%ものカバー率を得ることが可能となりました。

[KAWARABAN, Promega, 6-7, \(2018 Autumn\)](#)

2020年1月時点での分析参考価格
 (依頼条件により価格は変動します。その都度お問い合わせください。なお、本分析はかすかゲノムテクノロジーズ社(販売元:プロメガ株式会社)にて実施します)

解析メニュー	取得データ目安(培養細胞)	カタログ価格 (10サンプル依頼時)
簡易DIAプロテオーム解析	2000~4000タンパク質	134,000円 / サンプル
標準DIAプロテオーム解析	4000~6000タンパク質	229,000円 / サンプル
高深度DIAプロテオーム解析	6000~8000タンパク質	329,000円 / サンプル

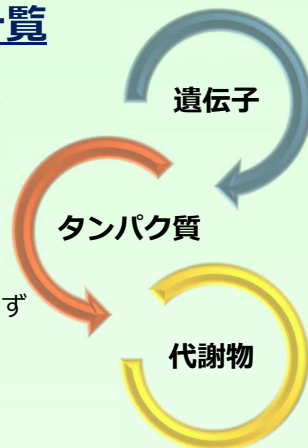
オミクス解析サービス一覧

①解析したい経路・ターゲット分子がある程度予測or決まっている。微量の増減も正確に捉えたい。抗体による検出が難しい。

→ **iMPAQT**

②ターゲットが明確に決まっておらずある程度全体を網羅的に調べたい

→ **DIAプロテオミクス**



①遺伝子発現量(mRNA)を網羅的に解析

→ **RNA-seq**

②エクソン領域の変異を網羅的に解析

→ **exome-seq**

③がん患者血液中のcell free DNAを解析

→ **cf DNA解析**

血液・組織・尿・糞便などあらゆる生体試料中の低分子代謝物を分析したい

→ **メタボロミクス/リポドミクス**

KPSLは各種バイオマーカー測定・網羅解析を提供します。

医学・生命科学研究でお困りの際はお気軽にご相談ください。

KPSL News バックナンバー

- Vol.1 プロテオミクス特集
~次世代定量プロテオミクス『iMPAQT』分析始めました~
- Vol.2 メタボロミクス特集
~網羅分析からターゲット分析へ~
- Vol.3 高感度マルチタイムノアッセイ特集
- Vol.4 遺伝子解析特集
~次世代シーケンサーの基本原理と新たな技術の紹介~
- Vol.5 リキッドバイオプシ特集
~細胞外小胞(Extracellular Vesicles)の新たな展開~
- Vol.6 リキッドバイオプシ特集②
~ctDNA解析について~

【お問い合わせ先】

九州プロサーチ有責任事業組合
 〒819-0388 福岡県福岡市西区九大新町4-1
 TEL:092-805-3239 FAX:092-805-3239
 MAIL: info@kpsl.jp
 ←URL: <https://kpsl.jp/>

