KPSL news vol.01 2018年8月号

KPSL 九州プロサーチLLP

創刊号：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～

はじめに

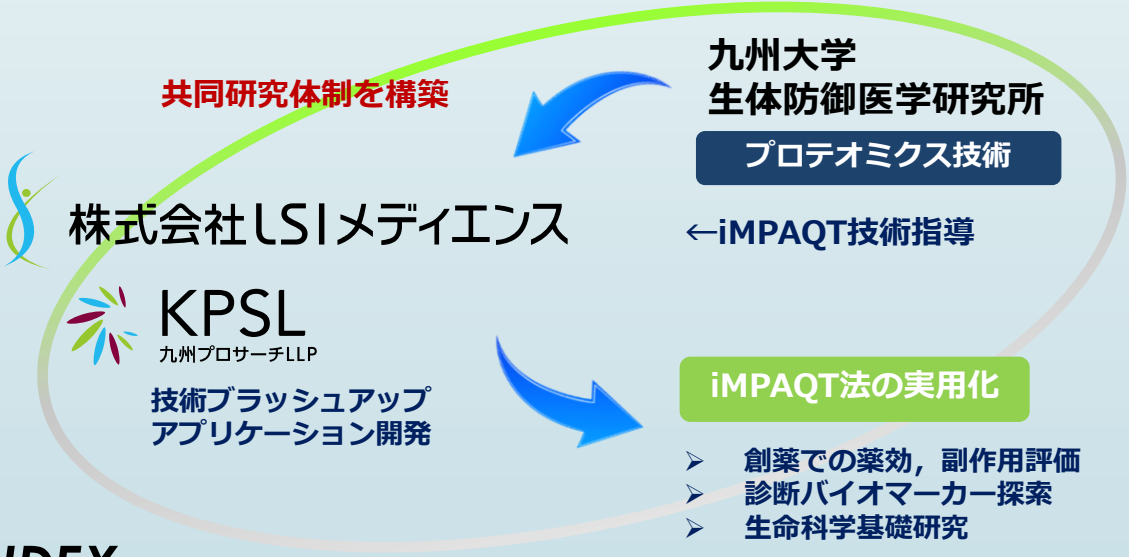
九州プロサーチLLP（KPSL）は、九大TLOである株式会社産学連携機構九州と、株式会社LSIメディエンスが医学研究成果の早期実用化と研究支援を目的に設立した有限責任事業組合です。

この度KPSLでは、九州大学生体防御医学研究所の中山敬一主幹教授の研究グループが開発した次世代定量プロテオミクス「**iMPAQT**：*in vitro proteome-assisted MRM for Protein Absolute QuanTification*」法を使ったプロテオミクス受託サービスを開始しました。

本技術はNature methods誌[1]に掲載された革新的な大規模タンパク質解析技術で、KPSLでは本技術実用化に向け中山教授らと共同で技術ブラッシュアップを進めてまいりました。この度当組合では、九州大学から正式に本技術のライセンス許諾を受け、受託サービスとして皆様へ提供できる運びとなりました。

1) Matsumoto M. et.al., Nat Methods., 2017 Mar;14(3):251-258.

本創刊号では、iMPAQT法を中心に質量分析を使ったタンパク質解析について紹介いたします。プロテオミクスについて普段馴染みのない研究者様におかれましても、当該技術活用のきっかけとしていただけますと幸いです。



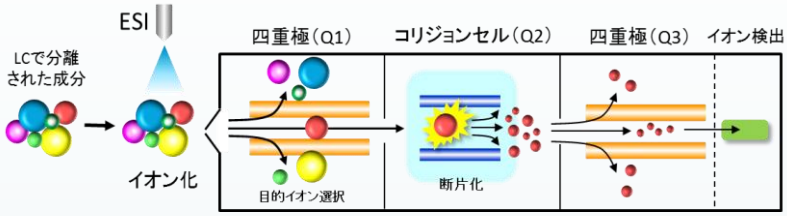
INDEX

- はじめに
- 質量分析とタンパク質解析
- 次世代定量プロテオミクス『iMPAQT』
- 最新研究レポート
- iMPAQT受託サービス概要

質量分析とタンパク質解析

多くの生命現象にかかわる複数のタンパク質を、同時にかつ正確に測定することができれば、病気のメカニズム解明や新しい診断法の開発につながる事が期待されます。現在普及している網羅的なタンパク質解析では高分解能型質量分析計を使ったノンターゲット分析「ショットガン法（DDA法：data-dependent acquisition）」が使われており、最新の分析装置では大腸菌や酵母などの比較的遺伝子数の少ない生物種においては、ほぼすべての発現タンパク質を検出することが可能となっています[2),3)]。しかしながらヒトやマウスを対象とした場合、試料の複雑性（タンパク質の数や発現ダイナミックレンジの広さ）から、十分な感度や定量再現性が得られていないのが現状です。

一方で定量再現性に重点をおいたタンパク質解析として、三連四重極型質量分析計を使用したMRM(Multiple Reaction Monitoring)法があり、定量プロテオミクスに用いられています(右図)。本法は感度や定量再現性に優れますが、分析には高感度ペプチドの選定や、分析条件の最適化が必要となります。



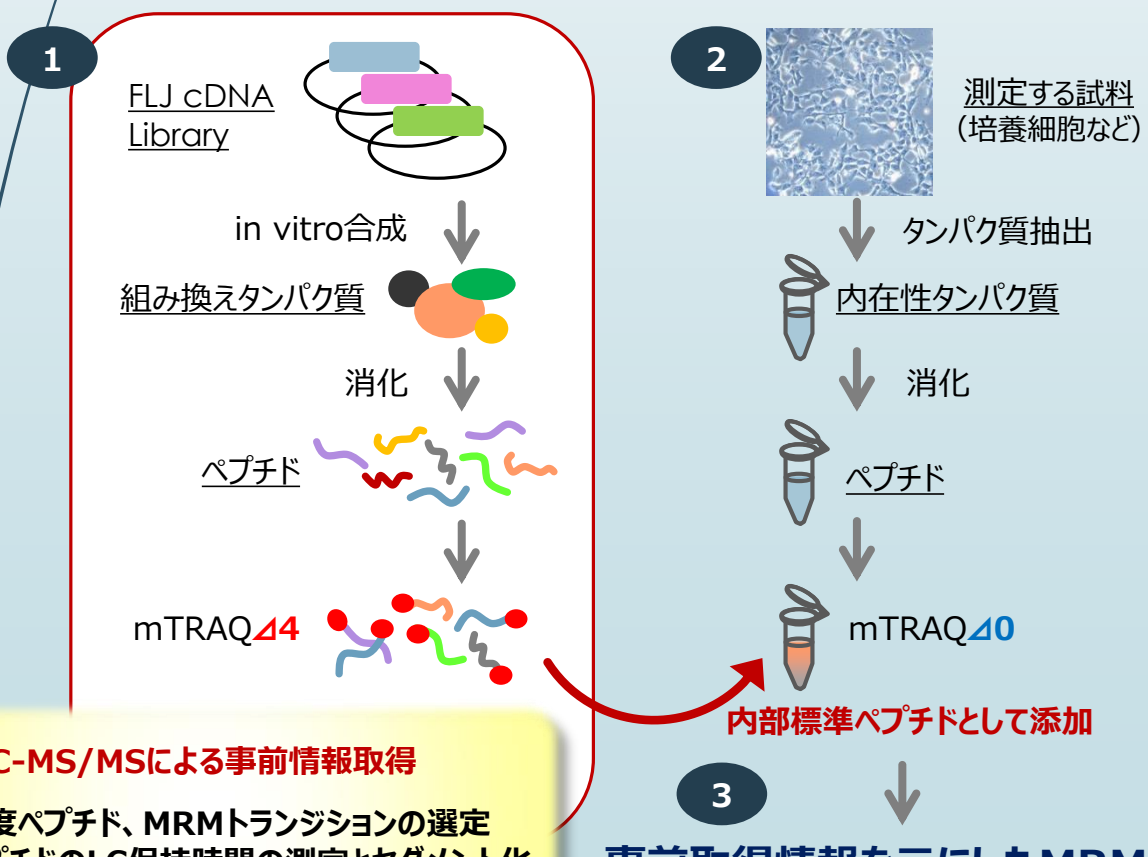
MRM法原理：Q1で目的のプレカーサイオンを選択し、続くコリジョンセルで不活性化ガスと衝突させ断片化します。さらにQ3でプロダクトイオンを選択することにより、高選択性・高感度の定量分析が可能になります。

2) Masuda, T. et al. : Mol. Cell Proteomics, 8 : 2770-2777, 2009.
3) Nagaraj, N. et al. : Mol. Cell Proteomics, 11 : M111.013722, 2012.

次世代定量プロテオミクス『iMPAQT』

iMPAQT法はMRM法をベースとした大規模タンパク質定量分析技術です。ヒト組換えタンパク質ライブラリー約18000種から各タンパク質を測定するための高感度ペプチド選定と分析条件の最適化を行い、MRMメソッドデータベースを構築することで迅速かつ簡便な大規模タンパク質定量分析を可能としました。現行の分析装置性能（AB Sciex社, QTRAP6500）では1時間に約400種(1タンパク質＝1ペプチド)のタンパク質を分析する事が可能となっています。
この度KPSLでは代謝酵素約340種の測定パネルを開発し、受託サービスを開始しました。

iMPAQT法 の基本プロセス

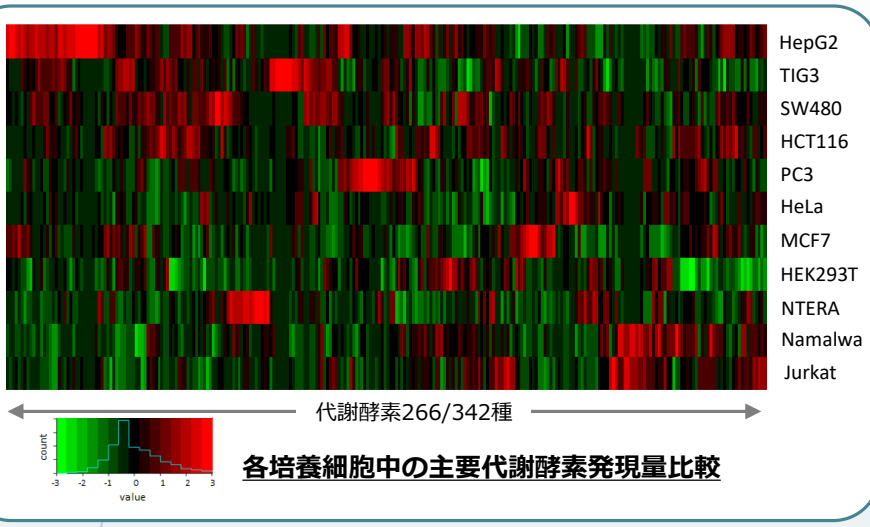


LC-MS/MSによる事前情報取得

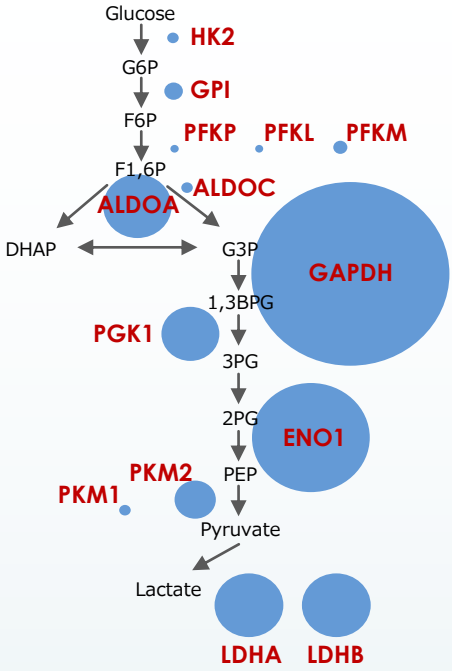
- **高感度ペプチド、MRMトランジションの選定**
- **各ペプチドのLC保持時間の測定とセグメント化**

iMPAQT分析例① 代謝酵素群一斉分析

KPSLで提供している代謝酵素約340種の分析パネルにて、ヒト培養細胞11種を分析しヒートマップを作成しました。各細胞の由来によって代謝酵素の特徴的な発現パターンを示しており、各細胞が増殖するにあたりどの経路が活性化しているのかを可視化することが出来ました。またiMPAQT法では、従来のショットガン法に代表されえる相対定量分析とは異なり、各酵素の発現量を定量値として算出できるため、各パスウェイの中での重要な因子を把握する事が可能となります。



各培養細胞中の主要代謝酵素発現量比較



HeLa細胞中の解糖系酵素の発現量

各酵素の発現量を算出し、青円の面積で量的関係を表現している

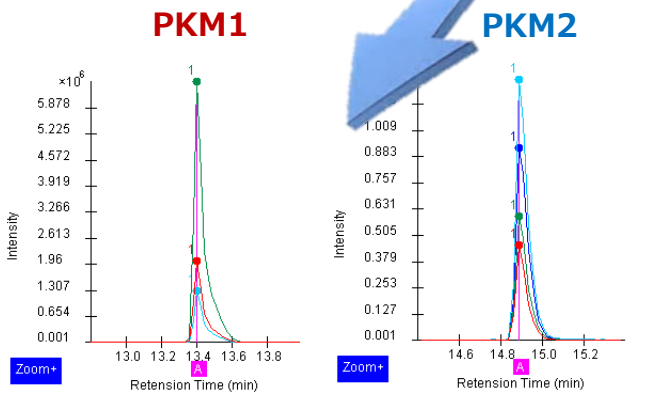
iMPAQT分析例② アイソザイム分析

iMPAQTデータベースを活用すれば、アイソザイムなど抗体では非特異反応により定量的な評価が難しい分子も分析することが可能です。抗体性能でお困りの際は是非ともご相談ください。

注）iMPAQTデータベースはヒト組換えタンパク質をベースに構築されているため、リン酸化など修飾タンパク質の分析はできません。あらかじめご了承ください。

- ✓ 特定のアイソザイムのみ検出したい・・・
- ✓ 各アイソザイムの量比を正確に算出したい・・・
- ✓ 抗体の特異性が低い・・・

など、お困りではありませんか？



iMPAQT法による解糖系酵素PKM1とPKM2の分析クロマトグラム

分析例）解糖系酵素：ピルビン酸キナーゼ
pyruvate kinase(PKM)

> PKM1

VDMVFASFIRKASDVHEVRKVLGEKGKNIKIISKIENHE
GVRRFDEILEASDGIMVARGDLGIEIPAEKVFLAQKMMI
GRCNRAGKPVICATQMLESMIKKPRPTRAEGSDVANAV
LDGADCIMLSGETAKGDYPLEAVRMQHLIAREAEAAMF
HRKLFEELVRASSHSTDLMEAMAMGSVEASYKCLAAALI
VLTESGRSAHQVARYRPRAPIIAVTRNPQTARQAHLYRG
IFPVLCKDPVQEAWAEDVDLRVNFAMNVGKARGFFKKG
DVVIVLTGWRPGSGFTNTMRVVPVP

> PKM2

VDMVFASFIRKASDVHEVRKVLGEKGKNIKIISKIENHE
GVRRFDEILEASDGIMVARGDLGIEIPAEKVFLAQKMMI
GRCNRAGKPVICATQMLESMIKKPRPTRAEGSDVANAV
LDGADCIMLSGETAKGDYPLEAVRMQHLIAREAEAAIYH
LQLFEELRRLAPITSDPTEATAVGAVEASFKCCSGAIIVLT
KSGRSAHQVARYRPRAPIIAVTRNPQTARQAHLYRGIFP
VLCKDPVQEAWAEDVDLRVNFAMNVGKARGFFKKGDV
VIVLTGWRPGSGFTNTMRVVPVP

iMPAQT法を用いれば、上記スプライシングバリアントのように、類似配列により抗体では評価が難しいタンパク質でも、特異的かつ定量的に検出する事が可能です。

最新研究レポート

*iMPAQT*法をはじめ、オミクス解析技術を使った最新研究事例を紹介します。

右論文では、解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ１*(PKM1)*が小細胞肺がんを典型とする肺神経内分泌腫瘍の増殖に必須である事を明らかにしています。

従来までは*PKM2*の選択的な発現が*Warburg*効果の成立には必須とされており，ほとんどのがん細胞は*PKM1*ではなく*PKM2*を圧倒的に高く発現するものでした。ところが本論文では、マウスにおける発がん実験や移植モデルにおける解析において、*PKM2*よりも*PKM1*の方が癌の増殖を促進することを示しており、これまでの癌代謝研究の定説に反証を唱えています。

本論文では、

① **PKM1・PKM2を選択的に発現するマウスモデルを構築し、*vivo*での癌増殖現象確認**

② **メタボロミクス・トレーサー実験により各モデルの代謝メカニズム解明**

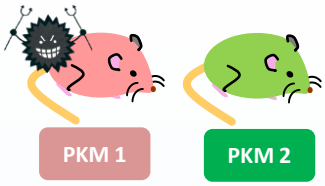
③ **癌細胞移植モデルでの、遺伝子*(mRNA)*発現とタンパク質発現*(*ターゲットプロテオミクス：*iMPAQT*法*)*解析による検証**

を行っており、各種オミクス解析を駆使した研究事例となっています。プロテオミクスをはじめ、オミクス解析にご興味がございましたら、是非とも弊社までお問い合わせください。

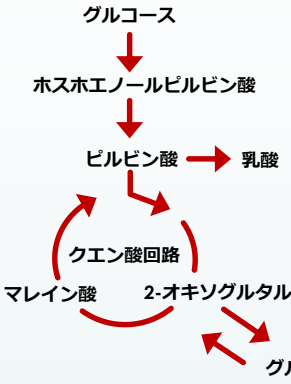
Cancer Cell Article

PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth

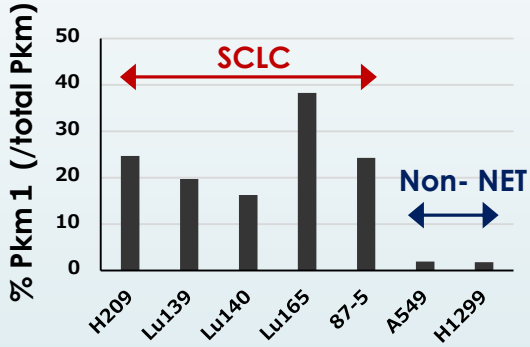
Morita M., *et al.*, *Cancer Cell*. 2018 Mar 12;33(3):355-367



モデルマウスにてPKM1の癌増殖を促進を確認



メタボロミクスにてPKM1の癌増殖促進メカニズムを解明



ターゲットプロテオミクスでのPKM1発現検証

*iMPAQT*受託サービス概要

- **測定対象タンパク質**
  酵素群約３４０種類の一斉定量　(KPSLホームページよりリストをダウンロード可能です)

- **測定可能試料および出検数**
  ヒト培養細胞の凍結ペレット（２×１０^6 cells 以上）、ヒト凍結組織（５０ mg以上）
  （サンプル調製手順については別途お問い合わせください）

- **定量値算出**
  内部標準として添加した安定同位体標識合成ペプチドの濃度を元に定量値を算出します。
  （内部標準とのクロマトグラム強度比からの概算値となります。検量線は引きません）

- **分析装置**
  Sciex社, QTRAP6500

- **報告期間**
  サンプル受領から約二か月でご報告
  （依頼サンプル数により変動する場合があります）

- **分析費用**
  別途お問い合わせください

- **その他、アイソザイム分析などカスタム分析を**
  ご希望の場合もお問い合わせください

【お問い合わせ先】
九州プロサーチ有限責任事業組合
〒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://www.kpsl.jp
KPSL 九州プロサーチLLP