KPSLセミナー

KPSL
九州プロサーチLLP

総合支援型研究検査ラボ『九州プロサーチLLP』

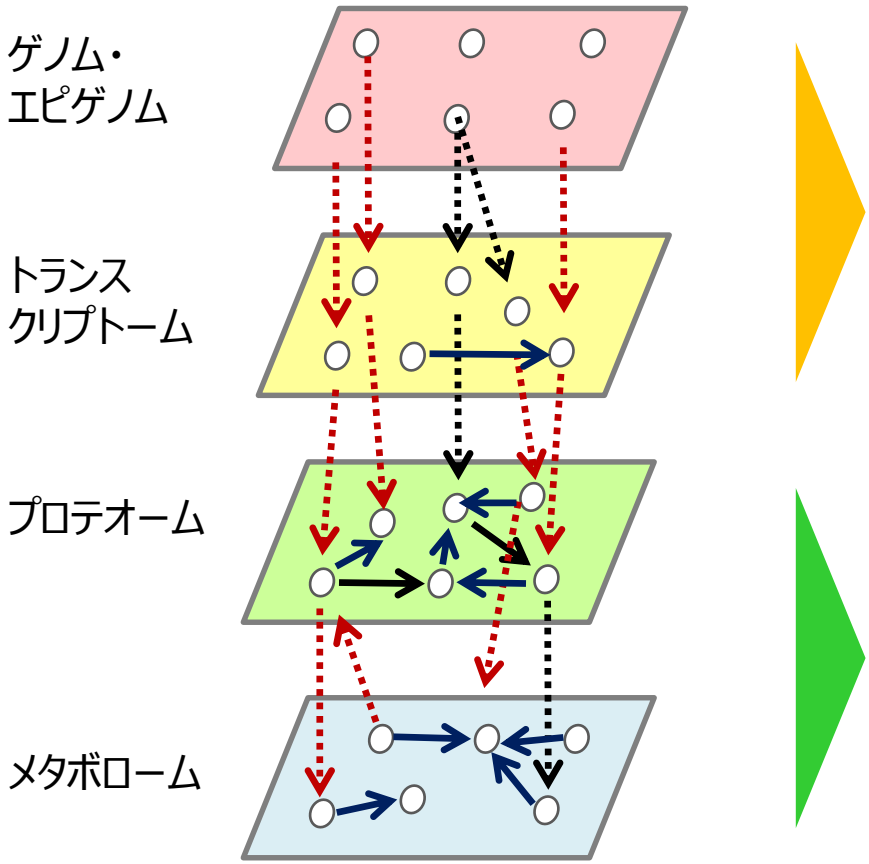
質量分析とプロテオミクス

九州プロサーチ有限責任事業組合

網羅的解析技術の発展と、トランスオミクス時代の到来

KPSL
九州プロサーチLLP

トランスオミクスネットワーク



網羅的かつ定量性の高い分析手法の発達

次世代シーケンサー(アレイ)

ゲノム・エピゲノム，トランスクリプトーム



LC,GC,CE-質量分析計

プロテオーム，メタボローム



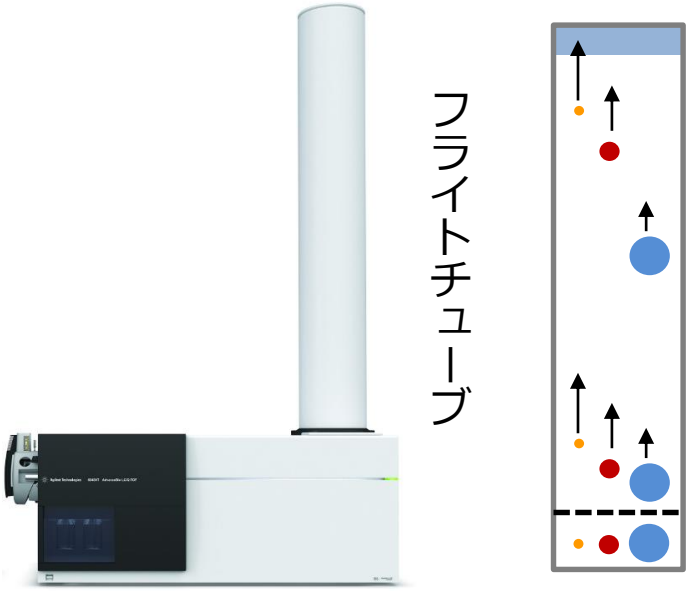
質量分析計について

KPSL 九州プロサーチLLP

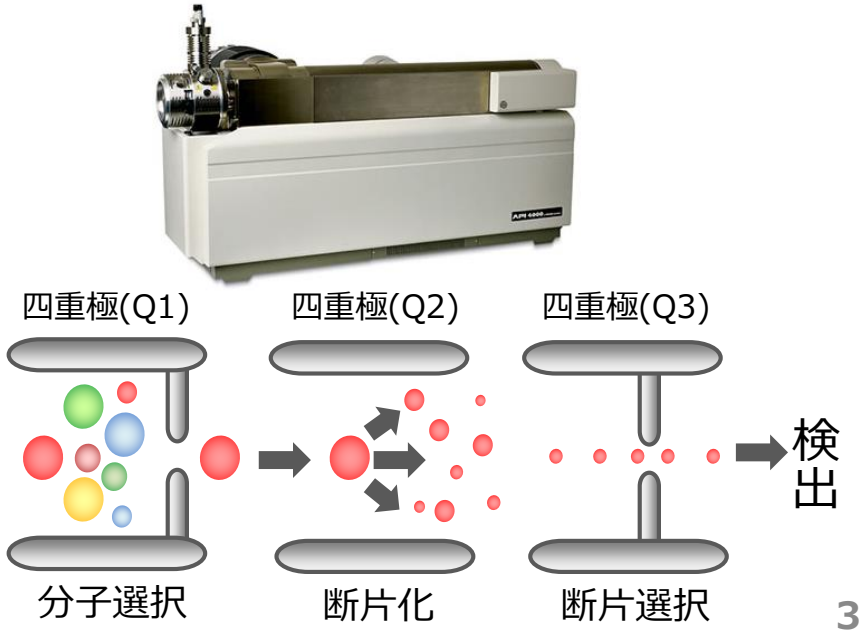
質量分析ではイオン化した分子を真空中に飛ばし、その大きさによって分子をふるい分けます

分類	主な質量分離部	特徴	主要用途
高分解能型	飛行時間型 Time of Flight (TOF)	精密質量を測定可能 (0.001Da程度)	定性分析 化合物同定・網羅解析
高感度型	三連四重極型 Triple quadrupole (QqQ)	微量成分を検出可能 (最大1pg/mL程度)	定量分析 微量バイオマーカー定量

飛行時間型 質量分析計



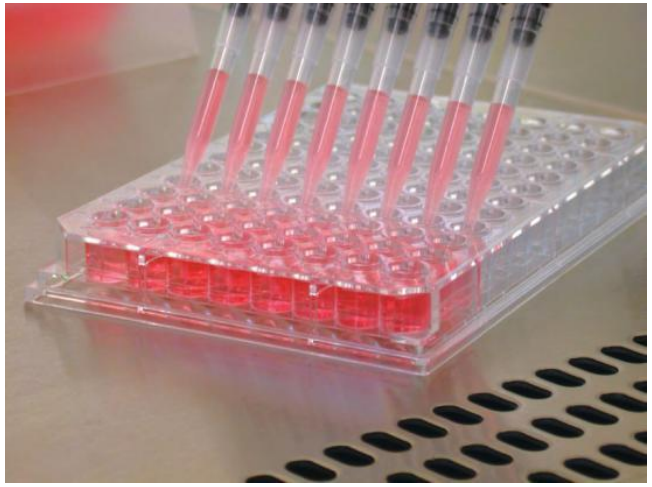
三連四重極型 質量分析計



質量分析の特徴①：多項目同時測定

KPSL
九州プロサーチLLP

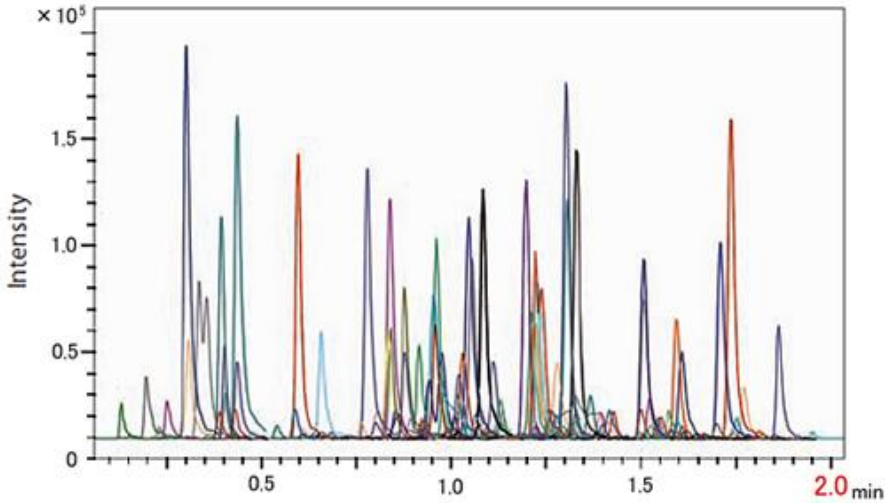
多検体同時測定



イムノアッセイは一度に**複数の検体**を測定できます。

イムノアッセイの強み

多項目同時測定



質量分析装置は一度に**複数の成分**を測定できます。

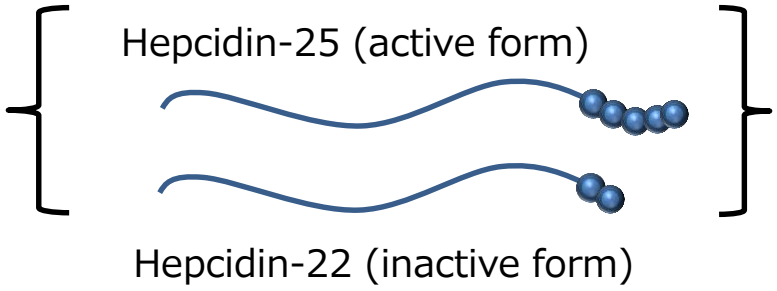
質量分析装置の強み

質量分析の特徴②：高い特異性

イムノアッセイ（抗体）では識別が難しい微細な分子構造の違いであっても、
質量分析装置では正しく区別する事ができます。

【 ELISA 】

類似分子の
区別は難しい



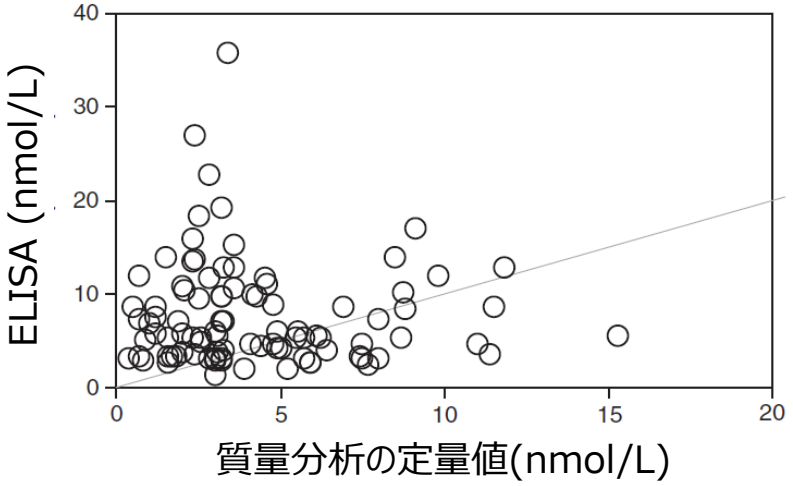
【 Mass spectrometry 】

分子量が異なるため、
明確に区別して定量可能

貧血マーカーのヘプシジンは活性型ペプチド(25 a.a.)と非活性型ペプチド(22 a.a.)が血液中に存在します。

イムノアッセイではこの２つを正しく識別することが困難ですが、質量分析装置では容易に区別ができます。

Clinica Chimica Acta 413 (2012) 696–701

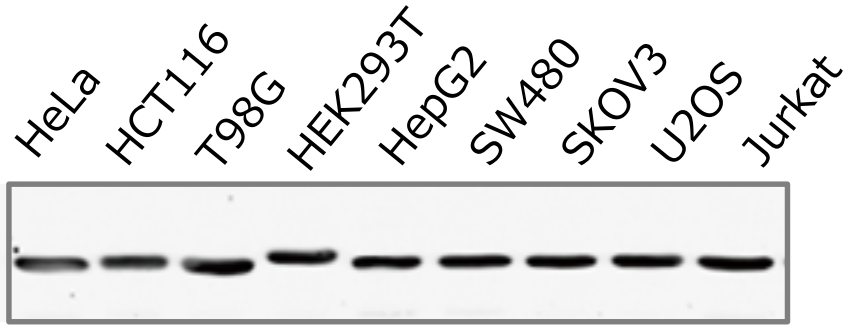


質量分析の特徴③：広い定量ダイナミックレンジ

KPSL 九州プロサーチLLP

GAPDHの
Western blot(WB)例

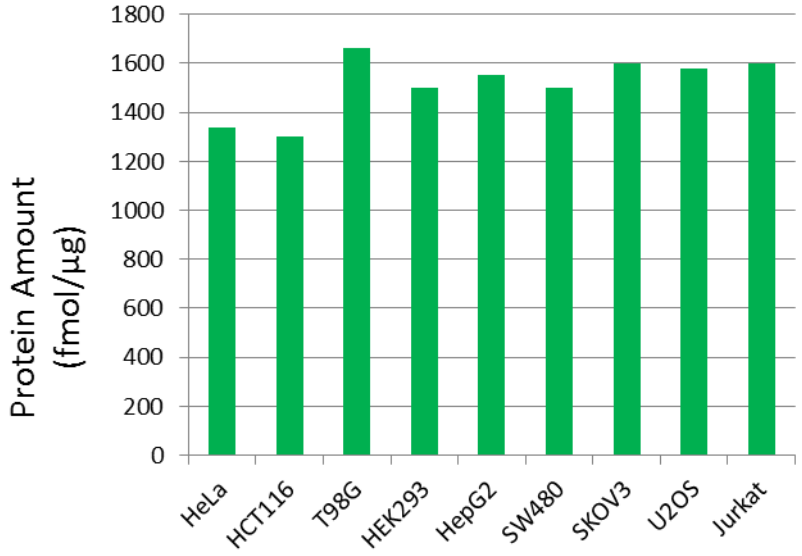
Cell lysate (5.0µg/lane)



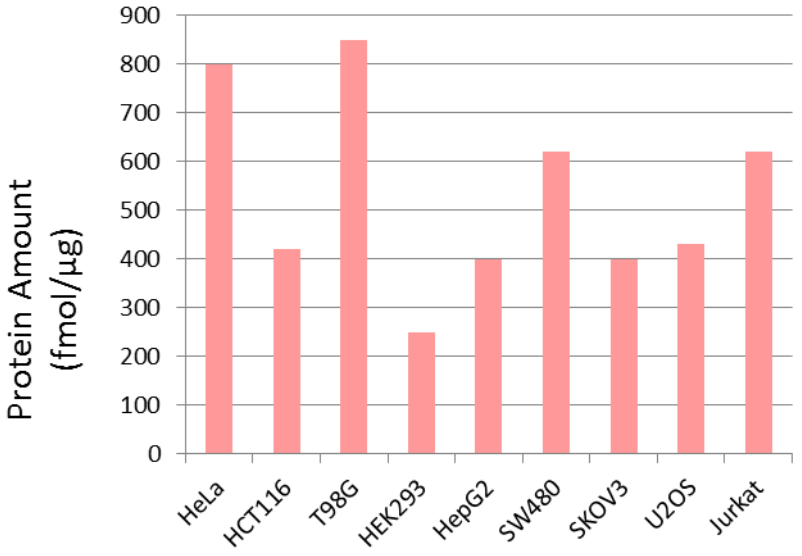
WBでは抗体の特異性や
Saturationの影響により、
十分な定量ダイナミックレンジ
を得ることは難しい



Western blotting (ABS測定)



質量分析 (MRM測定)



KPSL
九州プロサーチLLP

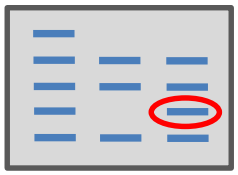
質量分析とタンパク質解析

タンパク質解析に用いられる質量分析計

KPSL 九州プロサーチLLP

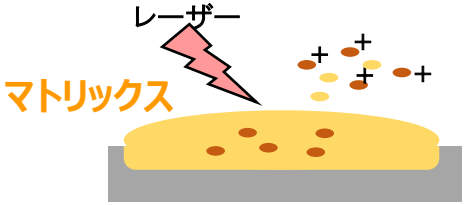
代表的な質量分析計の種類と構造

試料分離	イオン化部	質量分離(MS)部



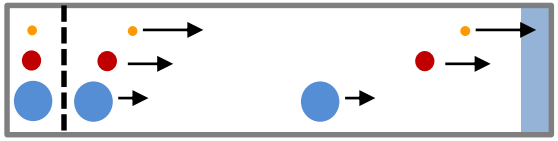
Sodium dodecyl sulfate
Poly- Acrylamide Gel Electrophoresis

SDS-PAGE



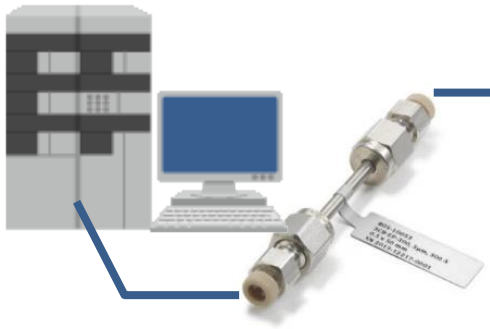
Matrix Assisted Laser
Desorption / Ionization

MALDI



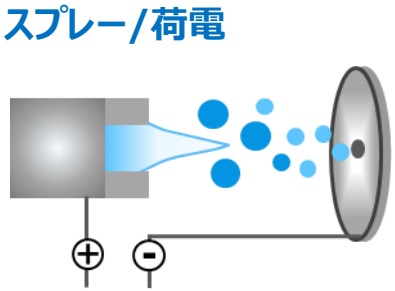
Time of Fright

TOF
（飛行時間型）



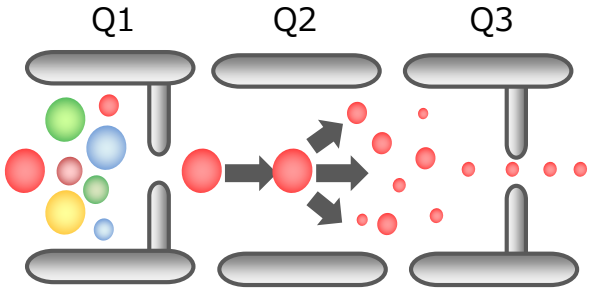
liquid chromatography

LC



Electrospray ionization

ESI



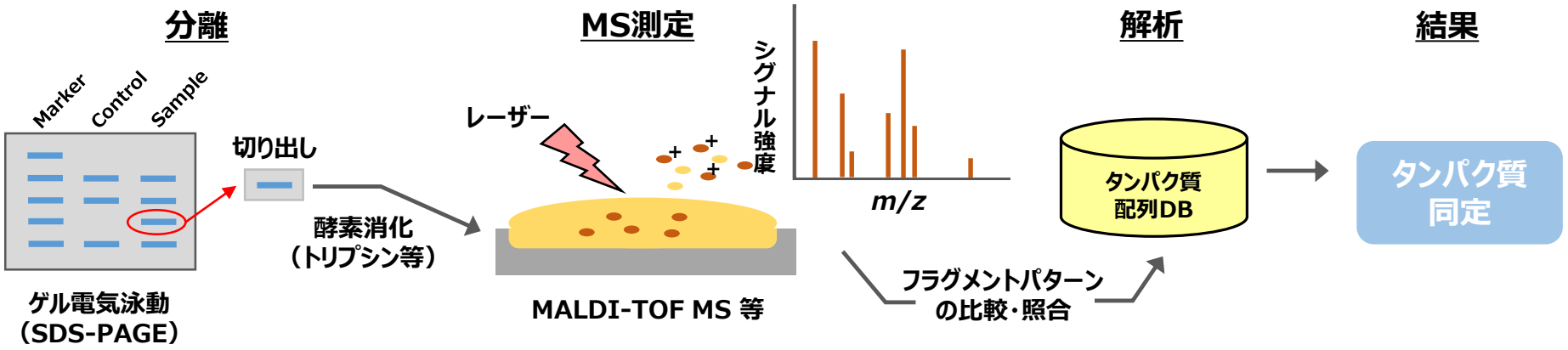
(quadrupole, ion trap)

Q（四重極）

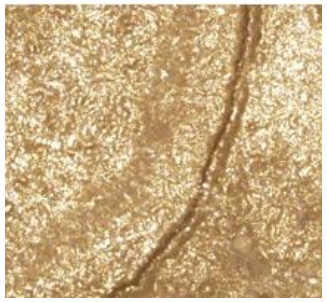
利用例①　MALDI MS 分析

KPSL 九州プロサーチLLP

1．ペプチドマスフィンガープリンティング



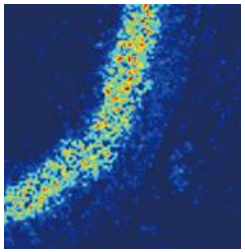
2．分子イメージング



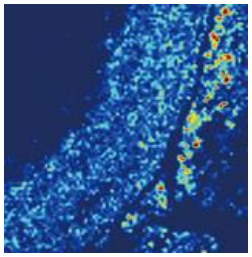
マウス網膜

マトリックス塗布
2500ポイント測定

分子A



分子B



臨床検査（感染症）

・検査時間の短縮
・検査精度の向上

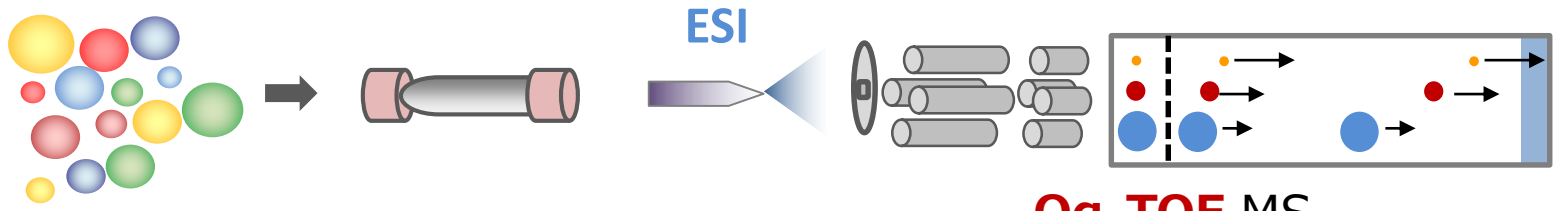
薬剤ADME試験 等

・薬剤分布情報取得
・薬剤代謝物の構造情報

利用例② LC-(ESI)MS/MS 定性分析

KPSL 九州プロサーチLLP

ショットガン法(DDA)：ターゲットを決めず、網羅的に分析



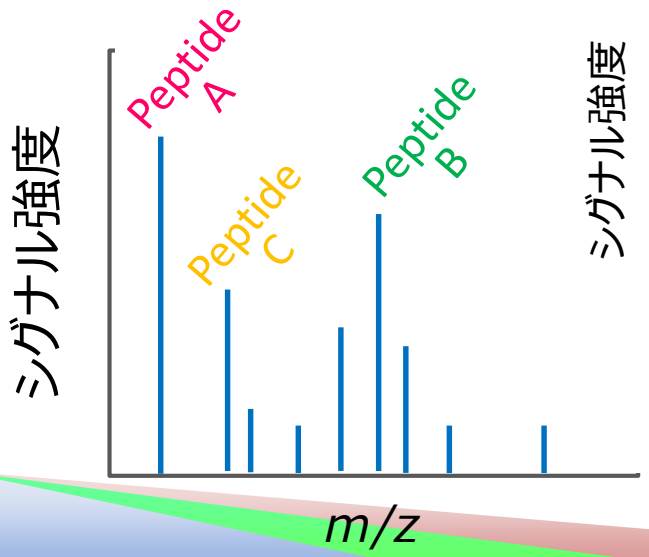
消化ペプチド

液体クロマト(**LC**)分離

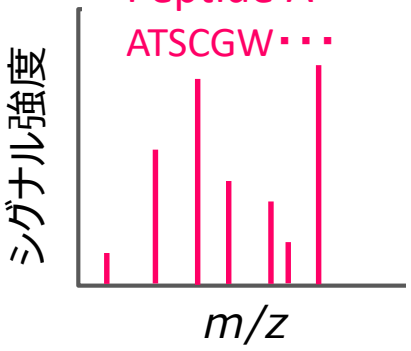
Qq-TOF MS

LCから溶出した順に分子を同定する手法
網羅的な定性分析に威力を発揮する
（ノンターゲット分析）

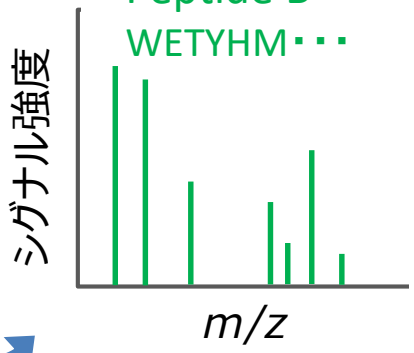
MS測定(ある瞬間のMSスペクトル)



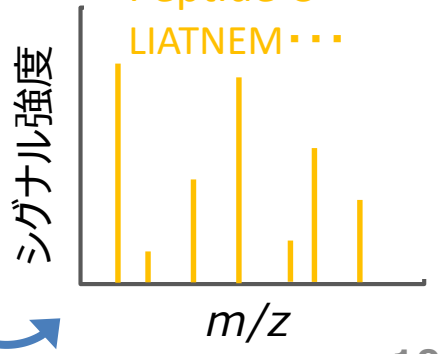
MS/MS測定①



MS/MS測定②



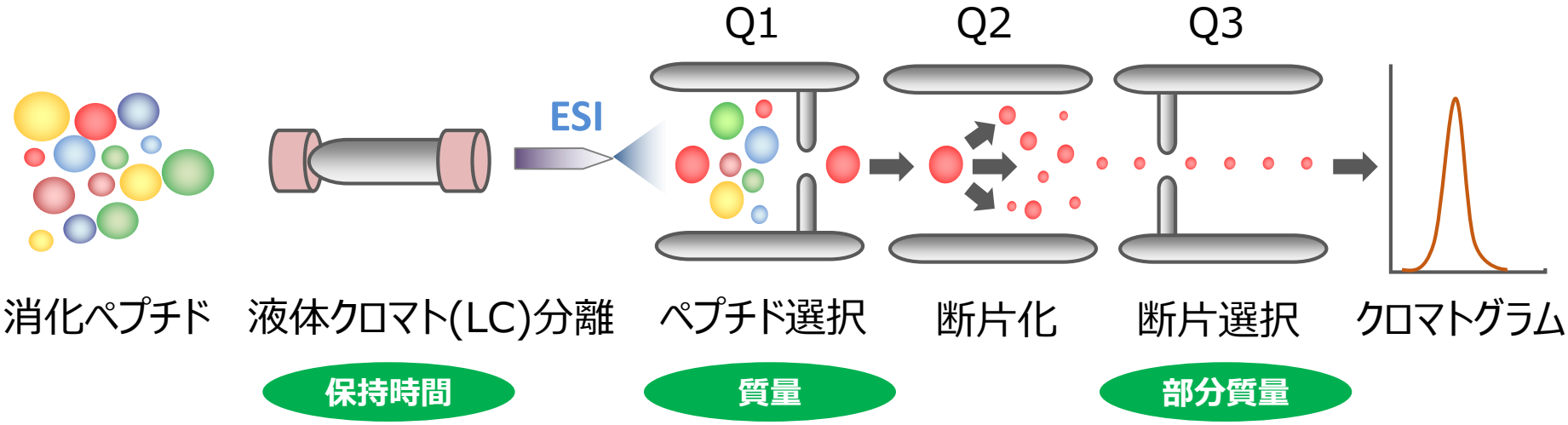
MS/MS測定③



利用例③　LC-(ESI)MS/MS 定量分析

KPSL 九州プロサーチLLP

Multiple Reaction Monitoring(MRM)法：目的分子を決めて定量分析



ＭＲＭ法の特徴

- ３フィルターによる高い**特異性**
- 高い検出感度
- 広い定量ダイナミックレンジ
- **複数**成分の**同時**分析

抗体の作製が難しい分子の定量測定
⇒アイソザイムや修飾の定量 等

複数成分同時定量分析が求められる検査
⇒新生児代謝異常のマススクリーニング

九州大学とのプロテオミクス技術開発

KPSL
九州プロサーチLLP

KPSLでは九大・生医研の中山教授と次世代定量プロテオミクス技術
『iMPAQT法』の**実用化に成功し、受託分析を開始**しました！

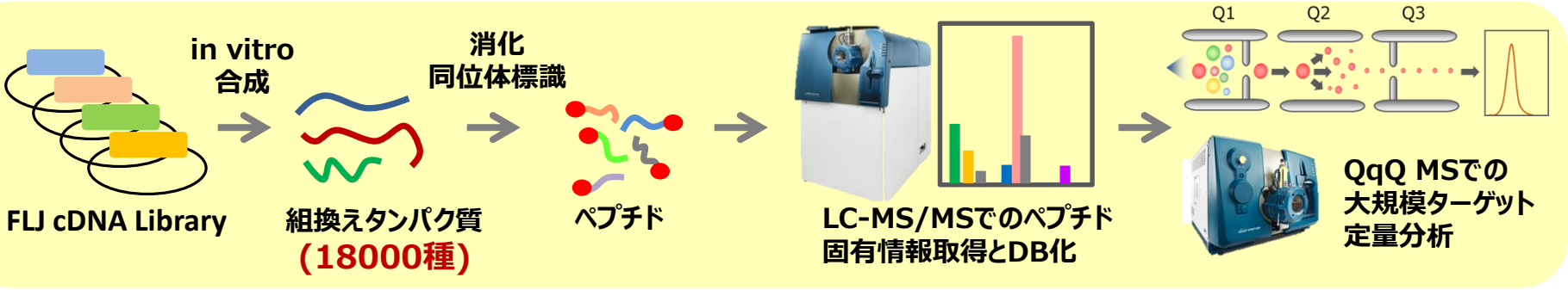


九州大学
生体防御医学研究所

中山 敬一 先生

iMPAQT (旧名称：iMRM)

in vitro proteome-assisted MRM for Protein Absolute QuanTification



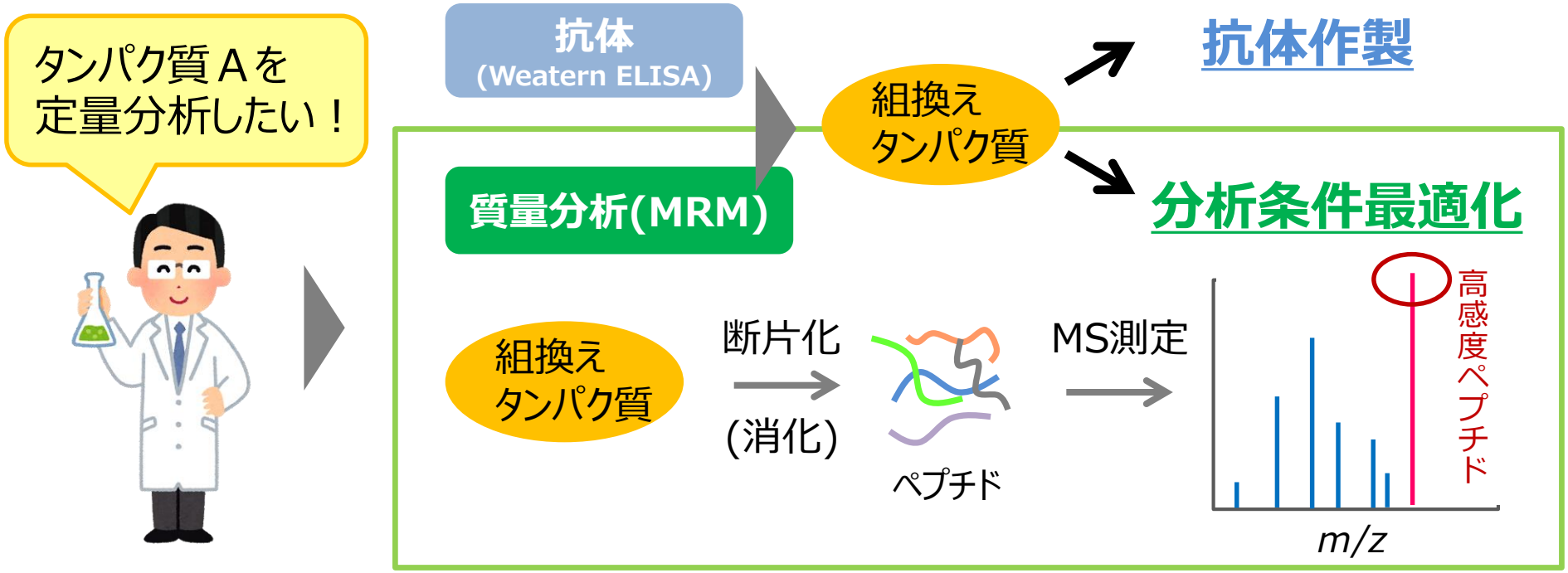
MRM技術を発展させた、タンパク質の大規模ターゲット定量分析技術

nature methods
Techniques for life scientists and chemists

A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome
(Matsumoto M. *et.al.*, *Nat Methods.*, 2017 Mar;14(3):251-258.)

iMPAQTとは？＝タンパク質大規模ターゲット定量分析

in vitro proteome-assisted MRM for Protein Absolute QuanTification

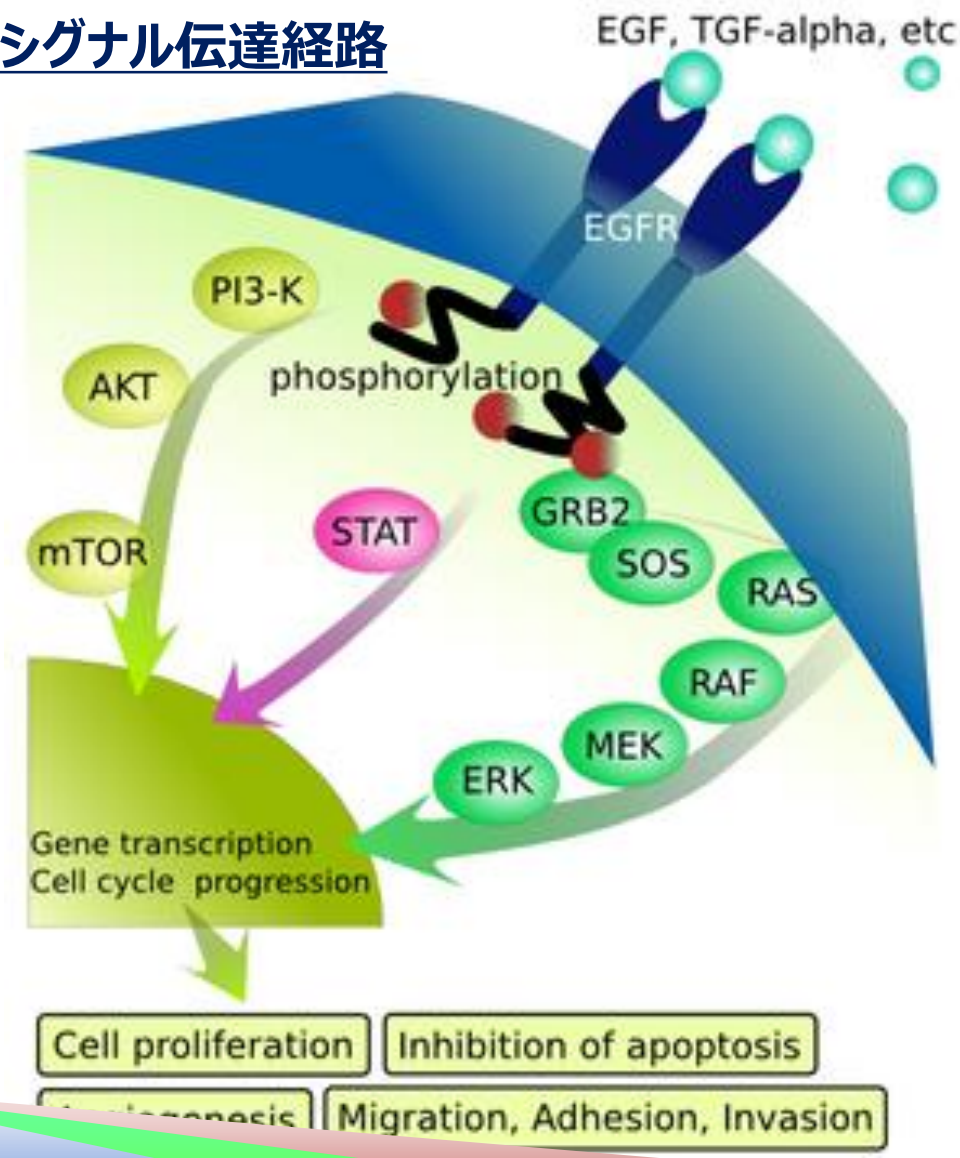


- この最適化作業を18000種のヒトタンパク質に実施しDB化した。
- 1時間に最大400種類のタンパク質(1Protein＝1Peptide)を定量可能
  ⇒抗体を使用せずに多数のタンパク質を同時定量可能

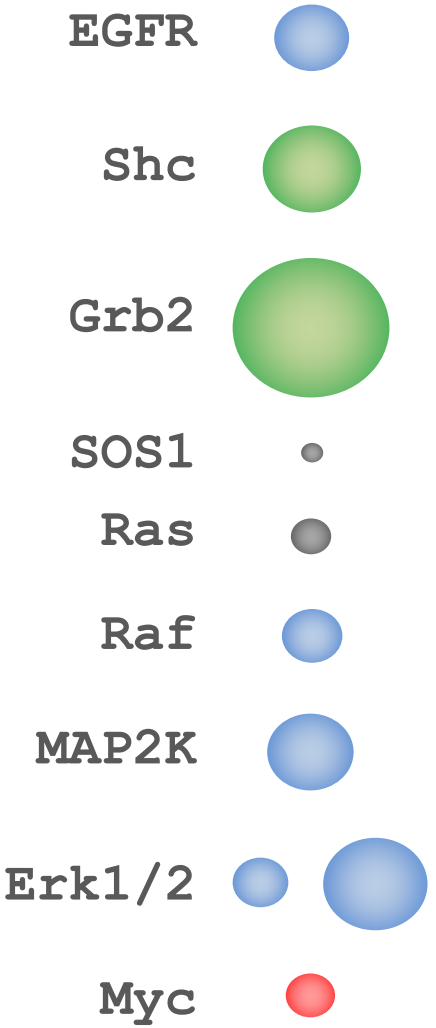
定量プロテオミクスがもたらす次世代バイオロジー

KPSL
九州プロサーチLLP

EGFシグナル伝達経路

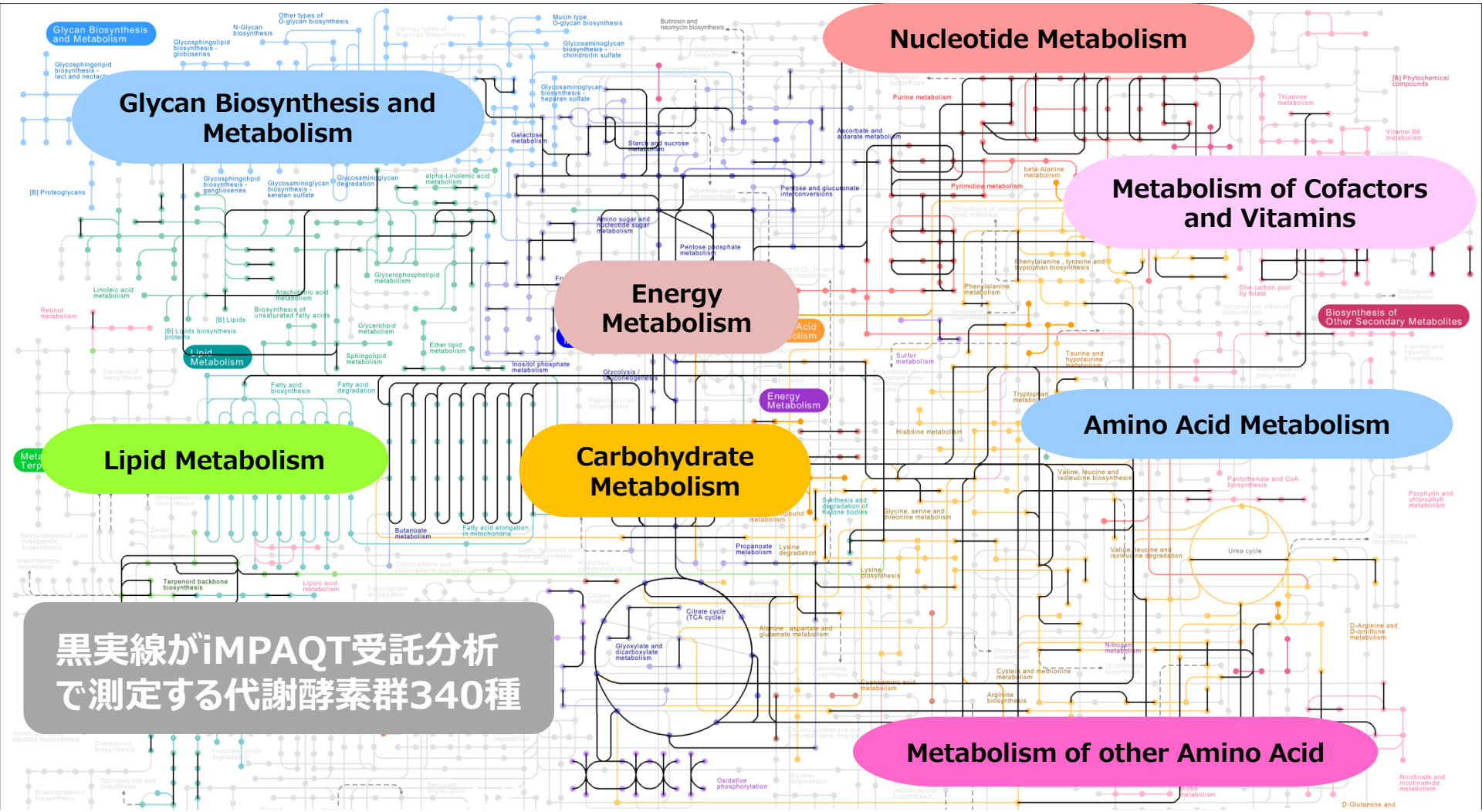


Ras/Raf/MAPK経路のタンパク質をiMPAQT技術で定量化



iMPAQT受託サービス(代謝酵素340種パネル)

KPSL
九州プロサーチLLP

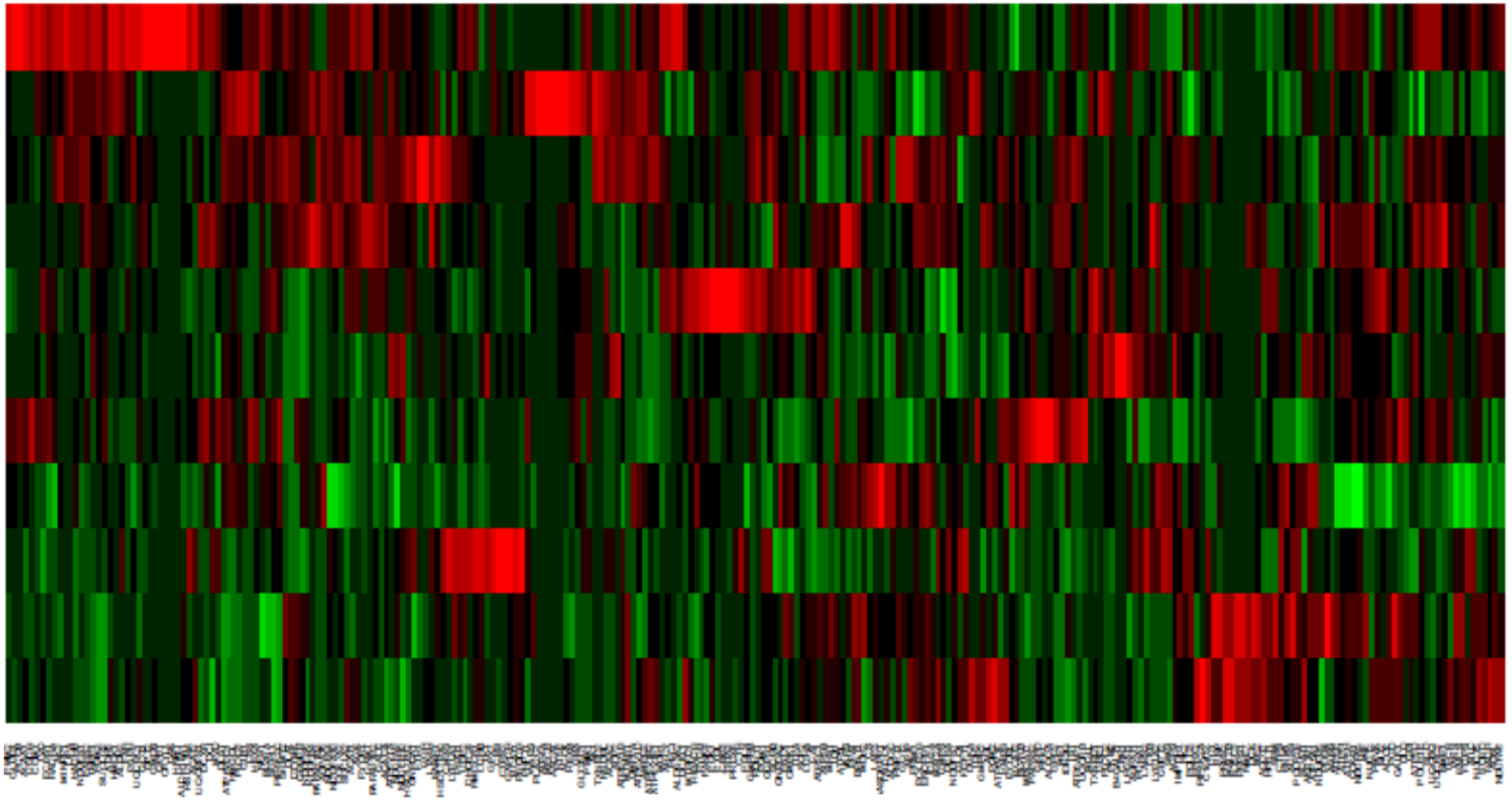


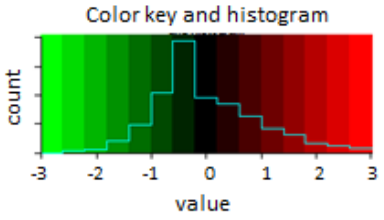
詳しい測定酵素リストや報告書例等、KPSLホームページをご覧ください
https://kpsl.jp/

iMPAQT アプリケーションデータ１

KPSL
九州プロサーチLLP

11種の培養細胞間での代謝酵素発現量比較





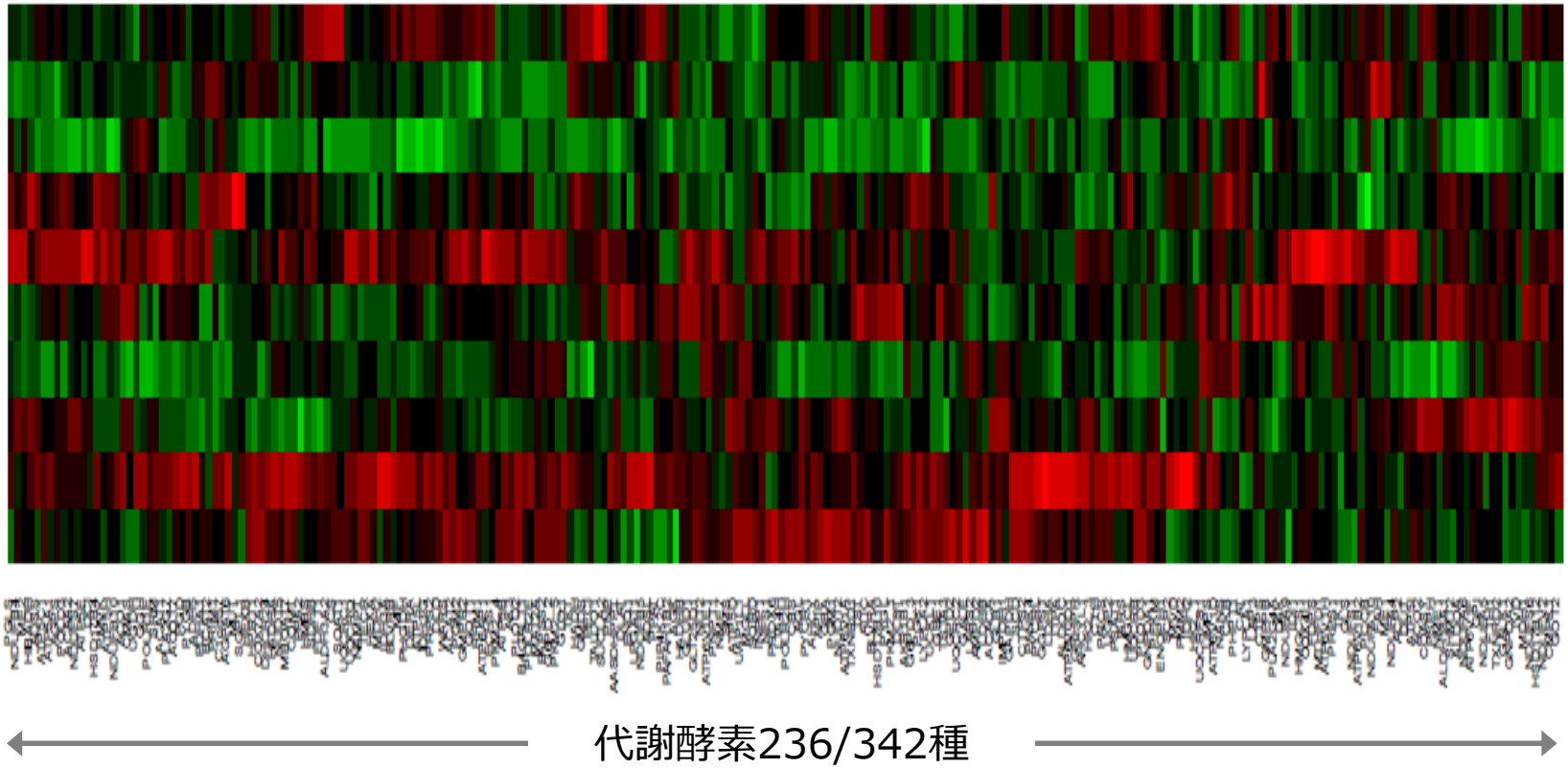
Cell Line
HepG2 (ヒト肝癌由来細胞株)
TIG3 (ヒト胎児由来線維芽細胞株)
SW480 (ヒト結腸癌由来細胞株)
HCT116 (ヒト大腸癌由来細胞株)
PC3 (ヒト前立腺癌由来細胞株)
HeLa (ヒト子宮頸癌由来細胞株)
MCF7 (ヒト乳腺癌由来細胞株)
HEK293T (ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株)
NTERA-2/D1 (ヒト精巣胎児性癌由来細胞株)
Namalwa (ヒトバーキットリンパ腫由来細胞株)
Jurkat (ヒトT細胞性白血病由来細胞株)

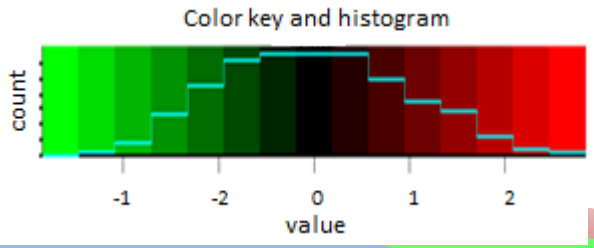
各種培養細胞からタンパク質を抽出し、
代謝酵素発現量を測定・比較した。

iMPAQT アプリケーションデータ２

KPSL
九州プロサーチLLP

HeLa細胞の各細胞分裂周期での代謝酵素発現量比較



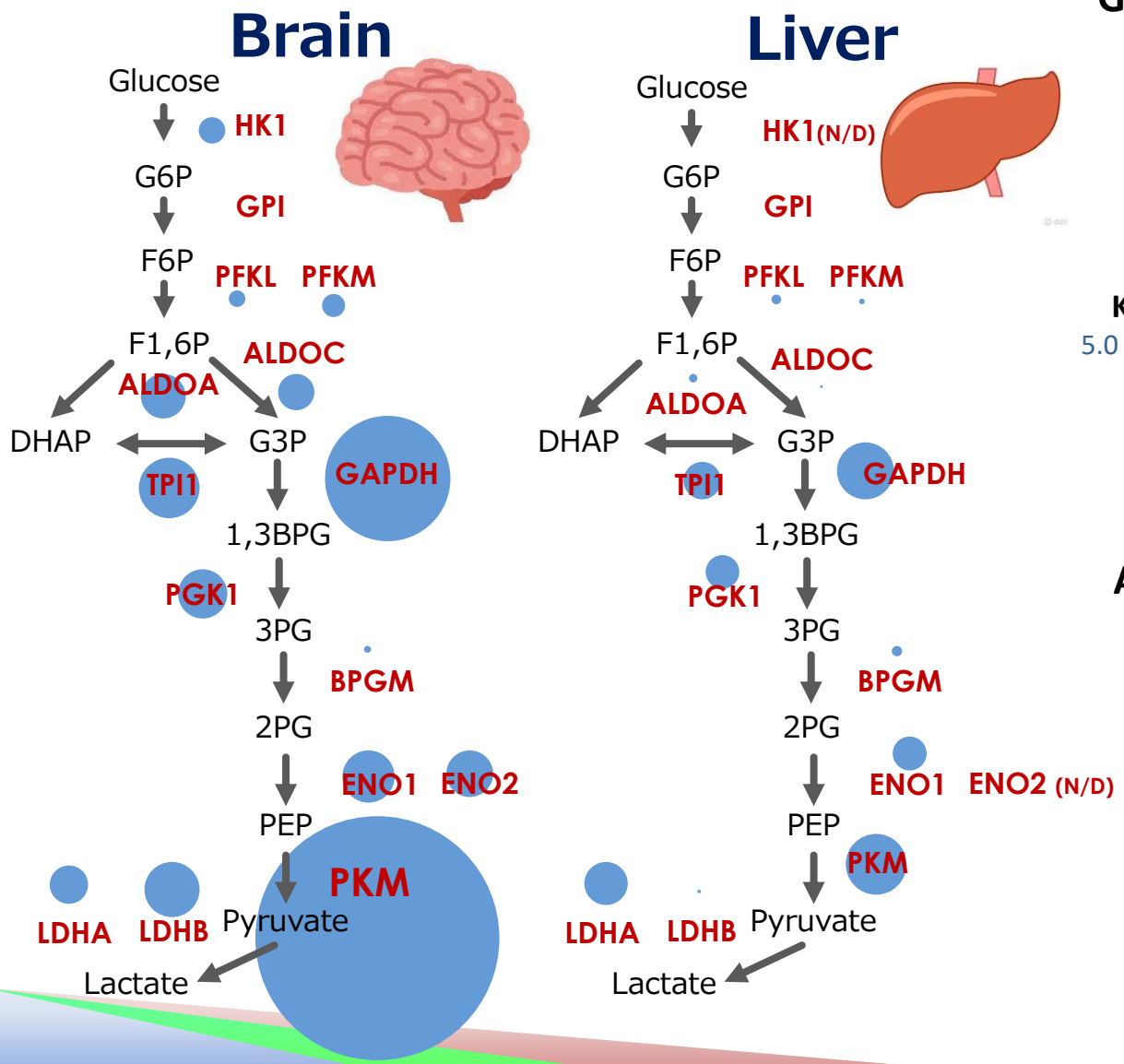


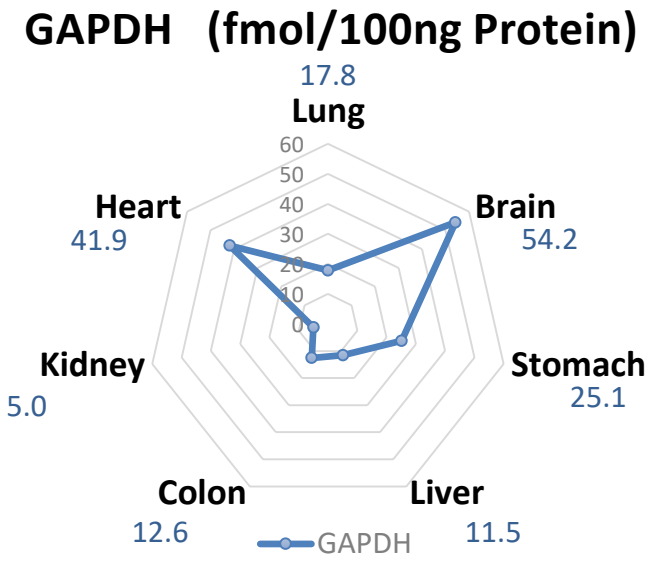
HeLa細胞を、thymidine blockにて細胞周期同調後、2時間毎に細胞回収し代謝酵素発現量を測定した。

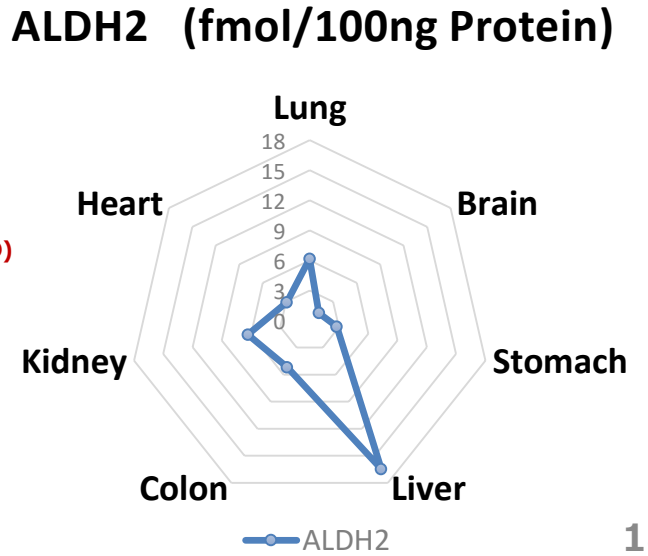
iMPAQT アプリケーションデータ3

KPSL 九州プロサーチLLP

各臓器での解糖系代謝酵素発現パターン比較





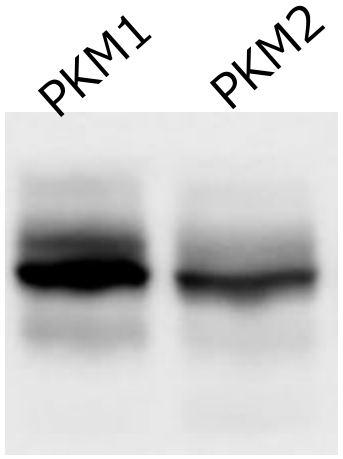


iMPAQT アプリケーションデータ４

KPSL 九州プロサーチLLP

大規模データベースを活用したアイソザイム解析





>PKM1

VDMVFASFIRKASDVHEVRKVLGEKGKNIKIISKIENHEGVRRFDEILEAS
DGIMVARGDLGIEIPAEKVFLAQKMMIGRCNRAGKPVICATQMLESMIKK
PRPTRAEGSDVANAVLDGADCIMLSGETAKGDYPLEAVRMQHLIAREAEA
AMFHRKLFEELVRASSHSTDLMEAMAMGSVEASYKCLAAALIVLTESGRSA
HQVARYRPRAPIIAVTRNPQTARQAHLYRGIFPVLCKDPVQEAWAEDVDL
RVNFAMNVGKARGFFKKGDVVIVLTGWRPGSGFTNTMRVVPVP

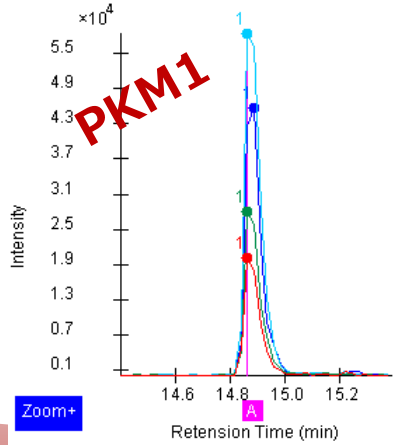
>PKM2

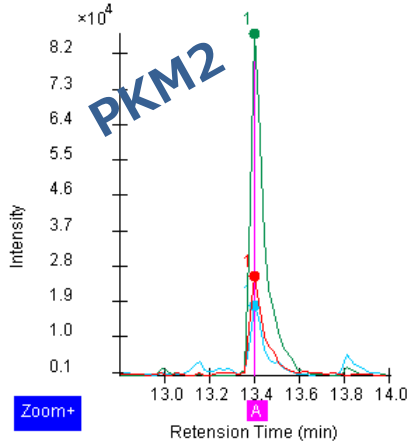
VDMVFASFIRKASDVHEVRKVLGEKGKNIKIISKIENHEGVRRFDEILEAS
DGIMVARGDLGIEIPAEKVFLAQKMMIGRCNRAGKPVICATQMLESMIKK
PRPTRAEGSDVANAVLDGADCIMLSGETAKGDYPLEAVRMQHLIAREAEA
AIYHLQLFEELRRLAPITSDPTEATAVGAVEASFKCCSGAIIVLTKSGRSAH
QVARYRPRAPIIAVTRNPQTARQAHLYRGIFPVLCKDPVQEAWAEDVDLR
VNFAMNVGKARGFFKKGDVVIVLTGWRPGSGFTNTMRVVPVP

- PKM1,2を定量的に検出したい・・・
- PKM1/PKM2の比率をモニタリングしたい・・・
- 凍結組織 50～100検体など検体数を増やして分析して欲しい・・・

目的のアイソザイムのみを特異的かつ迅速に測定可能

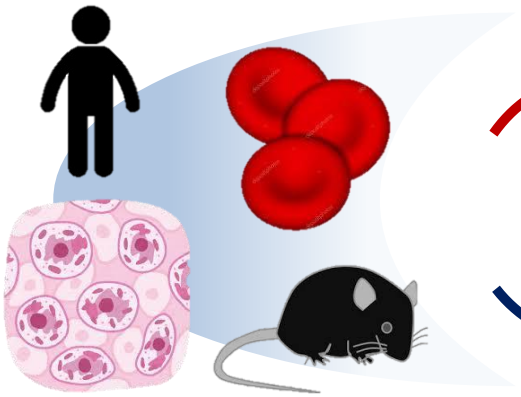
特異的配列を使ってiMPAQT分析





統合オミクス解析を目指して

KPSL
九州プロサーチLLP

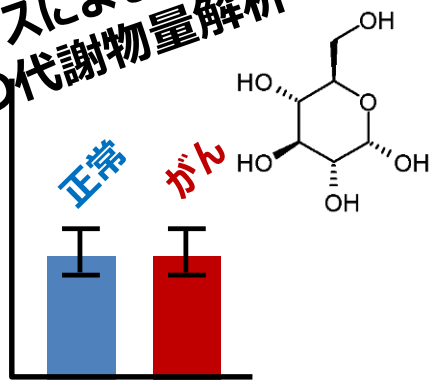


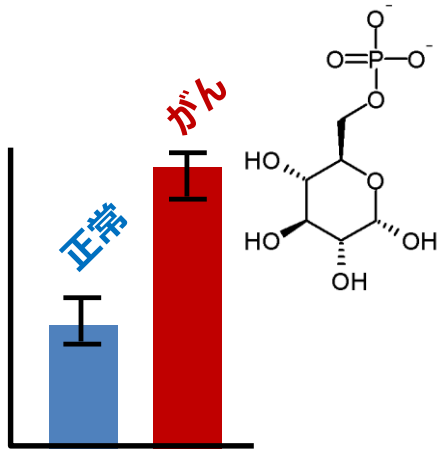
メタボロミクス

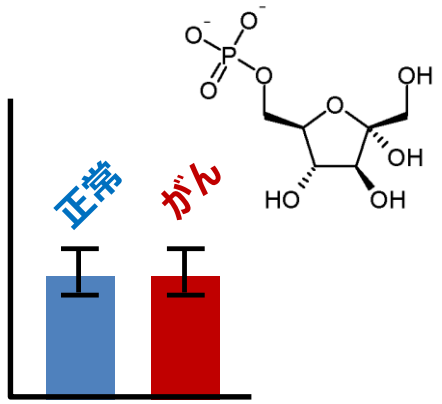
プロテオミクス

統合オミクス解析
（トランスオミクス）

メタボロミクスによる
ある瞬間の代謝物量解析







Glucose

Glucose-6-Phosphate

D-Fructose-6-Phosphate

ヘキソキナーゼ

？亢進？

G6Pイソメラーゼ

？減衰？

KPSL
九州プロサーチLLP

プロテオミクス最新研究

オミクス解析を使った癌代謝メカニズムの解明

Cancer Cell, 2018 Mar 12;33(3):355-367

オミクス解析を使った癌代謝メカニズムの解明

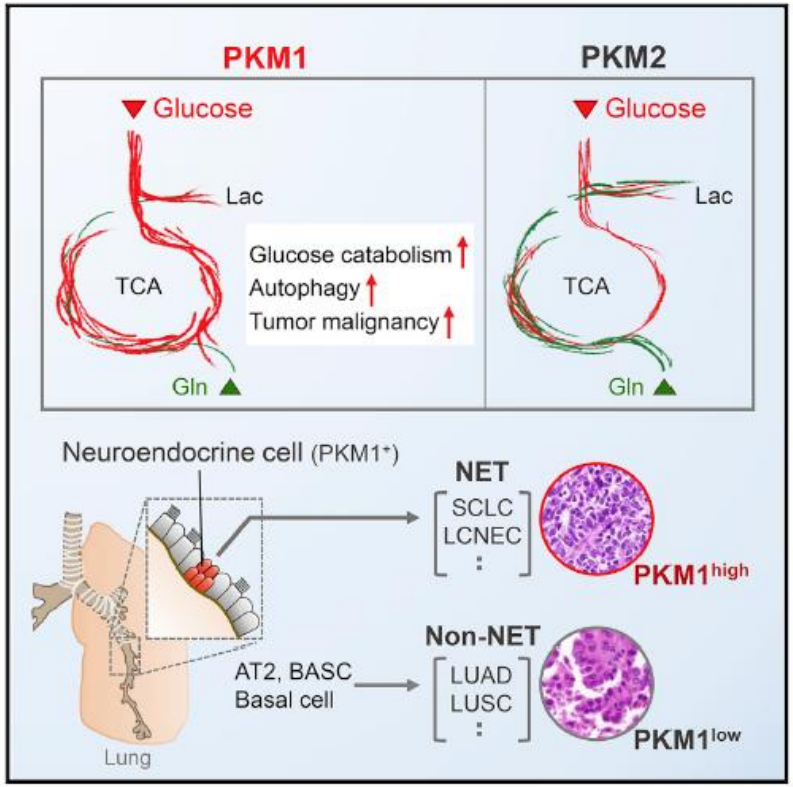
KPSL
九州プロサーチLLP

Article

Cancer Cell

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

Graphical Abstract



Cancer Cell. 2018 Mar 12;33(3):355-367

Authors

Mami Morita, Taku Sato,
Miyuki Nomura, ..., Hiroshi Shima,
Makoto Maemondo, Nobuhiro Tanuma

宮城県立がんセンター，田沼先生論文

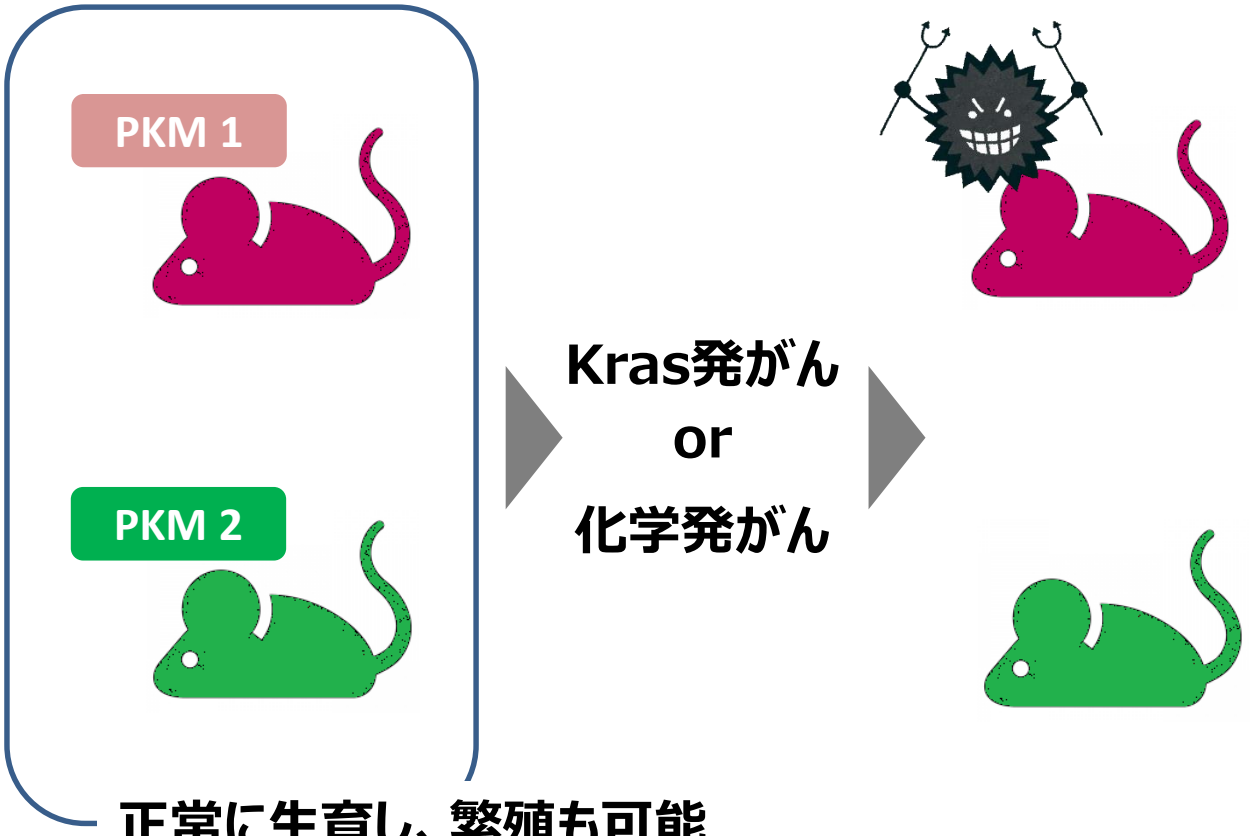
①プロテオミクス（iMPAQT）
②メタボロミクス（代謝フラックス解析）

を駆使して、解糖系酵素のPKM-1が、癌増殖を促進することを示した論文

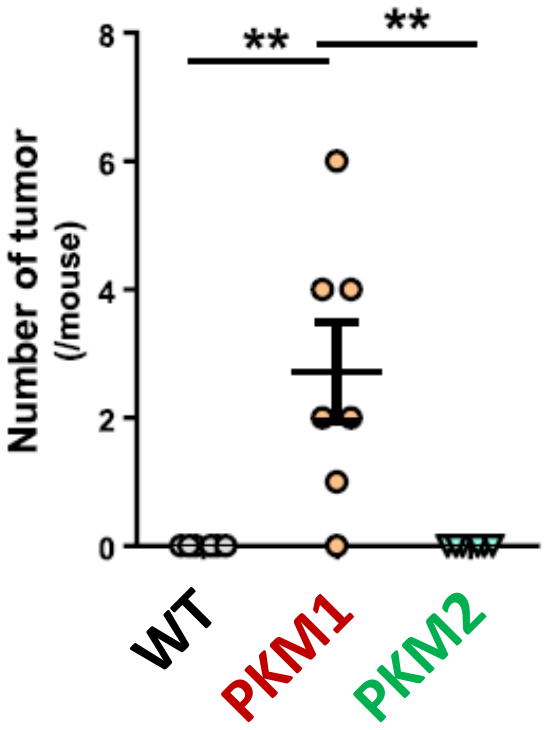
各アイソザイムとがん増殖能

KPSL 九州プロサーチLLP

PKM1 or PKM2のみ（ヒトキメラ遺伝子）を発現するノックインマウスを作製



PKM1の方が、
がん発生・増殖促進



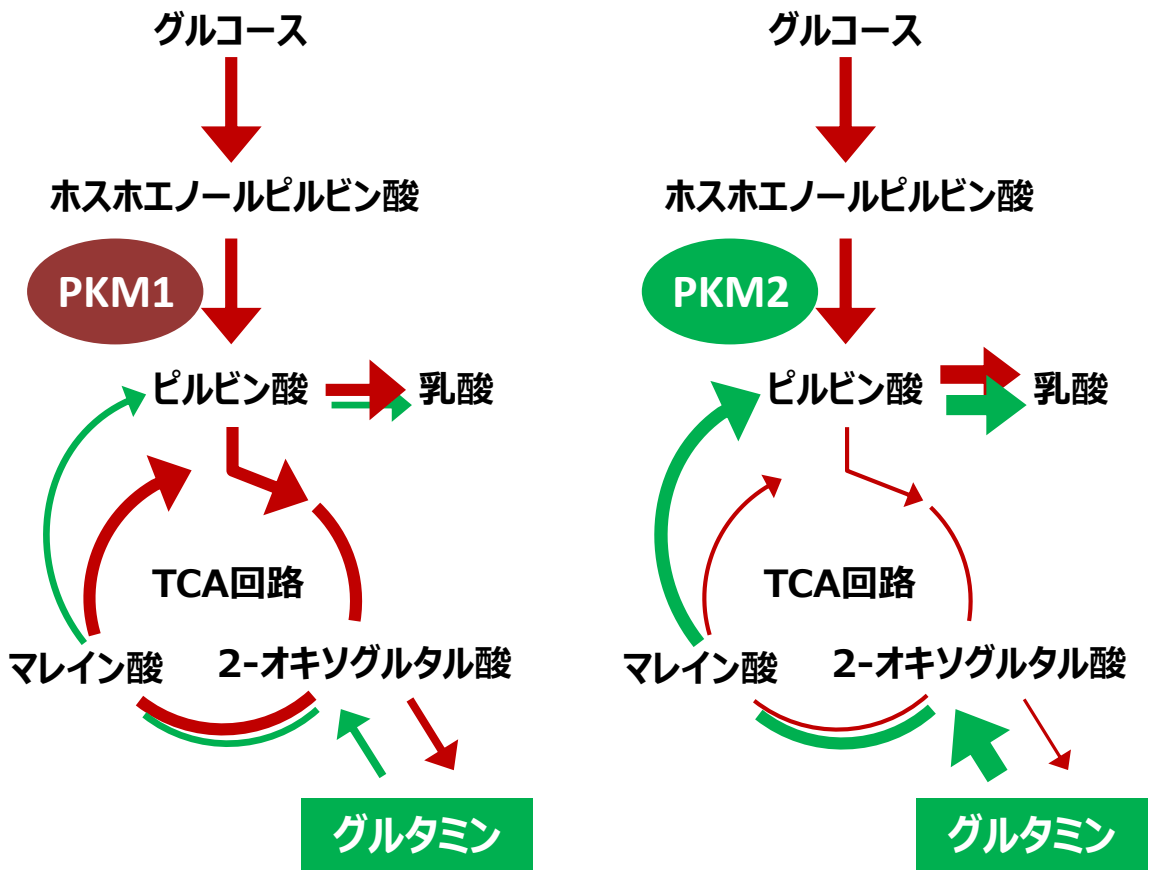
PKM1はPKM2よりも癌増殖を促進する

Pkm1とPkm2の機能差

KPSL
九州プロサーチLLP



グルコースとグルタミンのトレーサー実験
(^{13}Cによるメタボロミクス解析)

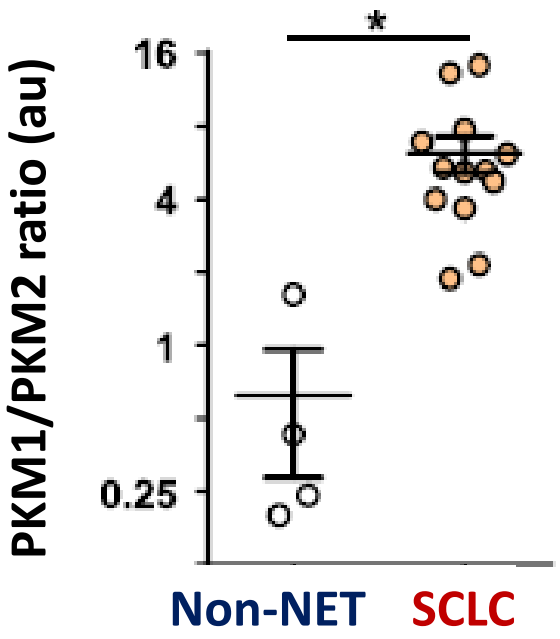


主な生合成	PKM1	PKM2
①解糖 グルコース →乳酸合成	亢進 ↑	亢進 ↑
②ピルビン酸 →TCA回路 への流入	亢進 ↑	抑制 ↓
③グルタミン →乳酸合成	抑制 ↓	亢進 ↑

PKM1は各種生体成分の生合成を阻害せずにグルコース異化を促進し、がん増殖を促進させる

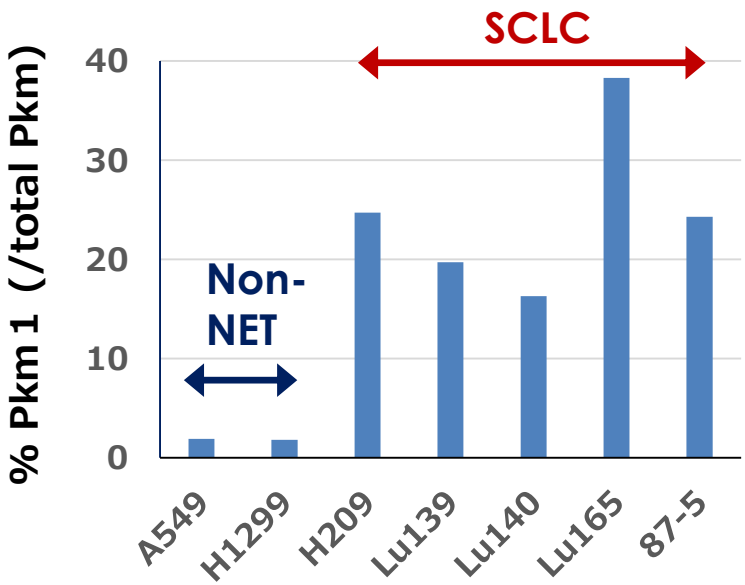
小細胞肺がんではPKM1が高発現している

小細胞肺がん(SCLC)を典型とする肺神経内分泌腫瘍(Neuroendocrine tumor：NET)のPKM1/PKM2発現を**「遺伝子」**+**「タンパク質」**で詳細に調べた。



SCLCでPKM1の**mRNA高発現**
(Cell line移植組織)

小細胞肺がんではPKM1の発現割合が10倍増加



SCLCでPKM1**タンパク質高発現**
(Cell line移植組織)

SCLCは抗がん剤や放射線治療が効きやすいが、再発率が高く予後も悪い。本結果より、PKM1やその関連因子を標的とした治療開発が期待できる。