

血漿プロテオミクスの自動サンプル前処理

PreOmics iST 技術と Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform

著者

Phillipp E. Geyer^{2,3},
Garwin Pichler¹, Peter V.
Treit², Sophia Doll², and Nils A.
Kulak¹

¹ PreOmics GmbH,
Matrinsried, Germany

² Department of Proteomics
and Signal Transduction,
Max Plank Institute of
Biochemistry,
Matinstried, Germany

³ NNF Center for Protein
Research Faculty of Health
Sciences,
University of Copenhagen,
Denmark

概要

臨床研究では、血漿や血清などの血液ベースサンプル中のタンパク質を頻繁に分析します。血液試料に含まれる血漿プロテオームの研究は、さまざまな問題のために極めて困難なものでした¹。最大の問題は、サンプル前処理ワークフローにおけるマニュアル操作が複雑で時間がかかることです。このようなマニュアル操作を行うことで、サンプルの平行処理でミスが非常に起こりやすくなり、比較分析に必要な再現性を犠牲にせざるを得ません。サンプル数が増えるほどこれらのマニュアル操作による前処理はより困難になり、信頼性が低い結果を導きます。一方で、仮定のない 1 回の MS 分析で測定される何千もの変数（この場合はタンパク質やペプチド）でバランスを取るには、統計学的に大量のサンプル数が不可欠です。

これらの問題を解消するために、Geyer 等は高速（2 時間）かつ堅牢な「血漿プロテオームプロファイリング」パイプラインを開発しました²。このプロトコルには、PreOmics の iST Kit と Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform の高スループット自動化ソリューションとの組み合わせで実現するシンプルなサンプル前処理の相乗作用を活用しています。他のサンプル前処理メソッドとは異なり、このプロトコルはサンプル前処理のすべてのステージ（変性、還元、アルキル化、酵素消化、ペプチド精製、脱塩）が、単一の反応バイアルで完結します。Bravo ロボティクスプラットフォームの使用によって、汚染を最小に抑え、ユーザーに起因するシステム誤差を低減することができます。この単一分析 LC/MS/MS プロテオミクスワークフローでは、以上のような利点を活用して、数百もの血漿プロテオームの再現性のある自動定量分析が 1 µL のサンプルから可能になります^{2,3}。

はじめに

循環器系のタンパク質は個々人の生理機能を映し出します。現在、タンパク質の測定には、一般的に単一タンパク質の免疫測定法が使用されていますが、これは複数の欠点が生じやすい手法です⁴。MS ベースのプロテオミクスを使用する、高スループットで仮定のない定量データは、きわめて望ましい代替手段ですが、それには特有の課題があります。最も多く言及される問題は、プロテオーム内のタンパク質アバUNDANCEの広いダイナミックレンジで、これは質量分析システムとスキャンモードの仕様の絶え間ない向上によってバランスがとられています^{1, 2}。しかし、大規模コホート中の潜在的バイオマーカーの同定と確認に必要な、堅牢で高スループットのプロテオミクスワークフローが存在しなかったため、プロテオミクスワークフローの分析前段階に大きな制約がありました。

この制限を克服するために、Geyer 等 (2016)² は高速かつ堅牢な「血漿プロテオームプロファイリング」パイプラインを発表しました。先ごろ記述された in-StageTip (iST) × ソッド³ をベースとし、血漿サンプルに特化して手法をさらに合理化しました。指を針で突いてわずか 1 µL の血漿を得ることから初め、すべての前処理段階 (変性、還元、アルキル化、酵素消化、ペプチド精製、脱塩) を 1 つの反応バイアル iST カートリッジで実行しました。iST Kit の手順に従って実行すると、サンプル前処理全体が 2 時間未満で完了し、Bravo 液体処理プラットフォームにおいて 96 ウェルフォーマットで簡単に実行できました。他のサンプル前処理メソッドとは異なり、この

ワークフローではタンパク質除去が不要で、指を針で突いて得た 1 µL の血液中の数百種類の血漿プロテオームの定量分析が、20 分のグラジエントを用いた LC/MS/MS で可能になります。

このアプリケーションノートでは、女性 1 名と男性 1 名の被験者から得た血漿サンプルに適用した、血漿プロテオミクスプロファイリングのサンプル前処理ワークフローのための 2 ステップ Agilent Bravo プロトコルを解説します。PreOmics 社の iST Kit を使用して、血漿タンパク質の変性、還元、アルキル化、消化を実行しました。サンプル前処理後に、サンプルに対して混合相ペプチドクレンジングを実施し、次いで LC/MS/MS 分析を行いました。1 回の分析で平均 300 のユニークなタンパク質が定量され、全体で 3,486 のユニークなペプチド配列と 373 のタンパク質が同定されました。大部分は 96 ウェルのすべてのサンプル中に存在し、わずか 2 % が複数の単一 LC 分析で一意的に存在しました。繰り返し測定により、血漿プロテオーム特性解析のための LC/MS ワークフローの再現精度が明らかになりました。全体のワークフローの繰り返し分析間で、0.98 のピアソン相関係数が得られました。

実験方法

材料

血漿サンプル: 静脈穿刺によって 10 mL の血液を採取しました。2,000 × g で 20 分間遠心分離した後、血漿を採取しました。血液は、マックスプランク研究所の生命倫理委員会の事前の承認を得て、書面でのインフォームドコンセントを提出した健康なドナーから採取しました。

ワークフロー

iST サンプル前処理: 溶解、タンパク質の変性、還元、アルキル化、消化: iST サンプル前処理プロトコルにより、96 ウェルプレートで 1 ~ 96 プレートと同時に処理する選択肢が提供されます。この実験では、2 人の血漿サンプルをそれぞれ 48 × 1 µL 量、つまり合計で 96 の血漿サンプルを処理しました。プロトコルに従って、Bravo は順に適切なソースプレートから試薬を吸引し、試薬をサンプルに添加した後、ソフトウェアに入力した条件に従って、サンプルプレート内で溶液を混合します。

試薬の準備

1. 血漿サンプルを、水と 1:10 (v:v) の比に溶解して ~ 5 µg/µL の濃度にする
2. 10 µL のサンプルを MTP → SAMPLE の 1 ~ 12 列に加える
3. 120 µL の溶解液を MTP → LYSE の列 1 ~ 6 に加える
4. 210 µL の再懸濁液を消化用の各チューブに加えて振る (RT、500 rpm、10 分)
5. 120 µL の消化液を MTP → DIGEST の列 1 ~ 6 に加える
6. 120 µL の停止液を MTP → STOP の 1 ~ 12 列に加える

図 1 は、Agilent Bravo Platform での試薬の適切な配置を示しています。

サンプル	新しいチップ	加熱、37 °C
廃液	iST カートリッジ	加熱、80 °C
溶解液	停止	消化液

図 1. プロトコル 1 のプレート構成: 溶解、タンパク質の変性、還元、アルキル化、消化

Agilent Bravo システムのワークフロー

- ロボットとインキュベータを始動させる
- 80 °C、ポジション 6
- 37 °C、ポジション 3
- 図 1 に示すようにプレート配置する
- プロトコルを開始する
 - 溶解液を iST カートリッジにピペットで移す
 - サンプルを iST カートリッジにピペットで移す
 - iST カートリッジを閉める
 - iST カートリッジをポジション 6 に移動させる
 - サンプルを iST カートリッジ内で 10 分間 80 °C で加熱する
- 5 分間冷却する
- iST カートリッジを最大 400 g で遠心分離する
- iST カートリッジをポジション 5 に配置する
- ふたを取り外す
- プロトコルを再開する
 - 消化液を iST カートリッジにピペットで移す
 - iST カートリッジをポジション 3 に移動する
 - iST カートリッジを閉める
 - トリプシン消化 iST カートリッジを 60 分間 37 °C で加熱する
- iST カートリッジを最大 400 g で遠心分離する
- iST カートリッジをポジション 5 に配置する
- プロトコルを再開する
 - 停止液を iST カートリッジにピペットで移す
- アダプタ内の iST カートリッジを廃液に配置する
- iST カートリッジを 3,800 rcf で 3 分間遠心分離機にかける

ペプチドを含むチューブまたはカートリッジを閉めます (底の場合はキャップを使用)。ペプチドは -20 °C で冷凍できます。ペプチドを -20 °C で 2 週間を超えて保管しないでください。保管期間を延長する場合は、プロトコルを完了して -80 °C で保管してください。

表 1. デッキ上のサンプルと試薬

iST サンプル前処理: タンパク質の変性、還元、アルキル化、消化	
デッキの位置と試薬	ラボウェアタイプ
1: 血漿サンプル、5 µg/µL 水溶液	twin.tec PCR プレート 96 LoBind (Eppendorf 社、p/n 0030129504)
2: 新しいチップ	384ST 70 µL チップ、滅菌 (p/n 19133-112)
3: 加熱シェーカー	Teleshake 加熱振とうステーション (G5498B#009)
4: 廃液	
5: iST カートリッジ	アダプタプレート (PreOmics 社、P.O.00027)
6: 加熱	ベルチェ式サーマルステーション (G5498B#035)
7: 溶解液	twin.tec PCR プレート 96 LoBind (Eppendorf 社、p/n 0030129504)
8: 停止液	twin.tec PCR プレート 96 LoBind (Eppendorf 社、p/n 0030129504)
9: 消化液	twin.tec PCR プレート 96 LoBind (Eppendorf 社、p/n 0030129504)

表 2. 分析機器

iST Kit 96x (P.O.000027)、ボトムアップ式プロテオミクスサンプル前処理用	
iST カートリッジ	1 ~ 100 µg タンパク質原材料用カートリッジ
アダプタプレート	カートリッジを 96 ウェル MTP プレートに配置
廃液プレート	洗浄後に廃液を収集するためのディープウェルプレート
MTP プレート	溶出後にペプチドを収集するための LoBind プレート
自動化	
コア自動化プラットフォーム	スタンドアロン仕様の Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform (G5523A)
アジレントのピペットヘッド	96ST ディスポーザブルチップピペットヘッド (G5498B#041)
アジレントの Bravo アクセサリ	Bravo、グリップ付き、スタンドアロン (G5523A#003)
その他のアクセサリ	分注機用アクセサリ (G5498B)
その他のアクセサリ	アライメントステーション (G5498B#028)
その他のアクセサリ	Inheco 社の MTC コントローラ (G5498B#015)
その他のアクセサリ	Teleshake 加熱振とうステーション (G5498B#009)
その他のアクセサリ	スロット/シェーカーカード (G5498B#019)
その他のアクセサリ	CPAC、Ultraflat、コントローラなし (G5498B#021)
その他のアクセサリ	カスタムネスト、CPAC 用 (G5498B#017)
その他のアクセサリ	ベルチェ式サーマルステーション (G5498B#035)
その他のアクセサリ	Bravo risers、146mm (G5498B#055)
その他のアクセサリ	アダプタプレート、INHECO CPAC NUNC 用 (G5498B#012)
その他のアクセサリ	V_P PCR プレートインサート VP741I6A (G5498B#013)
LC/MS/MS	
LC システム	EASY- nLC 1000 超高压システム (Thermo Fisher Scientific 社)
ナノエレクトロスプレーイオン源	ナノエレクトロスプレーイオン源 (Thermo Fisher Scientific 社)
MS セットアップ	Q Exactive HF Orbitrap (Thermo Fisher Scientific 社)
LC カラム	40 cm HPLC カラム

iST サンプル前処理: ペプチドのクリーンアップ

トリプシンペプチドを有機性および水溶性の洗浄溶液で洗浄して、脂質や塩などの疎水性および親水性汚染を除去しました。

試薬の準備

- 1. 120 µL の洗浄液 1 を 1 ～ 12 列に加える (twin.tec PCR Plate 96 LoBind、Eppendorf 社)
- 2. 120 µL の洗浄液 2 を 1 ～ 12 列に加える (twin.tec PCR Plate 96 LoBind、Eppendorf 社)
- 3. 120 µL の溶出液を 1 ～ 12 列に加える (twin.tec PCR Plate 96 LoBind、Eppendorf 社)
- 4. 120 µL の LC ロードを 1 ～ 6 列に加える (twin.tec PCR Plate 96 LoBind、Eppendorf 社)

図 2 は、Bravo Platform での試薬の適切な配置を示しています。



図 2. ステップ 2 のペプチドクリーンアップ用プレート構成 (表 1 にも掲載)

Bravo システムでのワークフロー

- ロボットを始動する
- iST カートリッジをポジション 5 に配置する
- プロトコルを開始する
 - 洗浄液 1 を iST カートリッジにピペットで移す
- iST カートリッジを3,800 rcf で 3 分間遠心分離機にかける
- iST カートリッジをポジション 5 に配置する
- プロトコルを再開する
 - 洗浄液 2 を iST カートリッジにピペットで移す
- iST カートリッジを3,800 rcf で 3 分間遠心分離機にかける
- iST カートリッジを MTP プレートに配置する
- iST カートリッジをポジション 5 に配置する
- プロトコルを再開する
 - 溶出液を iST カートリッジにピペットで移す
- iST カートリッジを3,800 rcf で 3 分間遠心分離機にかける
- MTP プレート内の溶出液を Speed-Vac にかけて 45 °C で完全に乾燥させる
- MTP プレートをポジション 5 に配置する
 - LC Load を MTP プレートにピペットで移す
 - MTP プレートを超音波洗浄器または振とう器にかけてペプチドを完全に再懸濁する

LC/MS/MS 分析

EASY-nLC 1000 超高压システム (Thermo Fisher Scientific 社) とナノエレクトロスプレーイオン源 (Thermo Fisher Scientific 社) と Q Exactive HF Orbitrap (Thermo Fisher Scientific 社) で構成した LC/MS 機器を使用して、サンプルを測定しました。精製したペプチドを 40 cm HPLC カラム (内径 75 µm、インハウスで ReproSil-Pur C18-AQ 1.9 µm 樹脂をチップに充填、Dr. Maisch 社) で分離しました。

10 ～ 50 % の緩衝液 B (0.1 % 酢酸、60 % アセトニトリル v/v) の 15 分間の直線グラジエントでペプチドを溶出した後、98 % 洗浄液を 5 分間、流量 450 nL/min で流しました。カラム温度は 60 °C に保持しました。

データ解析

MS の生データファイルを MaxQuant ソフトウェアバージョン 1.5.2.10⁵ で解析し、システムインカルバミドメチル化を固定修飾として、N-端子アセチル化とメチオニン酸化を可変修飾として、ヒト Uniprot FASTA データベース (2014 年 6 月版) および Andromeda サーチエンジン⁶ による共通汚染物質データベースでペプチドリストを検索しました。

表 3. デッキ上のサンプルと試薬

iST サンプル前処理: タンパク質の変性、還元、アルキル化、消化	
デッキの位置と試薬	ラボウェアタイプ
1: 洗浄液 1	twin.tec PCR プレート 96 LoBind (Eppendorf 社、p/n 0030129504)
2: 新しいチップ	384ST 70 µL チップ、滅菌 (p/n 19133-112)
3: 加熱シェーカー	Teleshake 加熱振とうステーション (G5498B#009)
4: 廃液	
5: iST カートリッジ	アダプタプレート (PreOmics 社、P.O.00027)
6: 加熱	ペルチェ式サーマルステーション (G5498B#035)
7: 洗浄液 2	twin.tec PCR プレート 96 LoBind (Eppendorf 社、p/n 0030129504)
8: 溶出液	twin.tec PCR プレート 96 LoBind (Eppendorf 社、p/n 0030129504)
9: LC ロード	twin.tec PCR プレート 96 LoBind (Eppendorf 社、p/n 0030129504)

False discovery rate は、最小で 7 アミノ酸の長さのタンパク質およびペプチドの両方について 0.01 に設定し、リバースデータベースを検索することによって求めました。データベース検索では、酵素特異性をアルギニンとリジンの C-末端として設定し、トリプシンをプロテアーゼとして使用し、最大 2 個の切断ミスを許容しました。初期プリカーサ質量偏差は最大 7 ppm 許容し、フラグメント質量偏差は 20 ppm 許容して、ペプチドを同定しました。ラベルフリー定量法 (LFQ) は最小レシオカウント 1 で実行しました⁷。

結果と考察

このアプリケーションノートで解説する容易に適応可能な血漿プロテオミクスワークフローにより、PreOmics 社が開発した iST サンプル前処理メソッドと、Bravo システムが可能にした高スループット自動化の相乗効果を得られます。このメソッドを使用すると、血漿プロテオミクスサンプルの大規模コホートを高速かつ堅牢で再現性の高い方法で分析することができます。

先ごろ記述された in-StageTip (iST) メソッド³ (PreOmics GmbH、ドイツ) を基に、Bravo システムでの平行自動化プロトコルを確立することができました。1 μ L の血漿から始め、すべての前処理ステップを単一の反応バイアルである iST カートリッジで実行しました。iST Kit の手順に従って、1 時間後には十分なタンパク質

消化がすでに起こっていました。脂肪や塩などの汚染物質を除去するための有機性および水性の洗浄ステップで、ペプチドを精製しました。サンプル前処理の手順全体が 2 時間未満で完了し、Bravo の 96 ウェルフォーマットで簡単に実行して、MS 分析用にペプチドを精製できました。

自動化プロトコルを評価するために、96 個の血漿サンプル (女性と男性 1 人ずつから得たそれぞれ 48 個のサンプル) を処理して分析しました。LC/MS/MS データの定量ラベルフリー解析用に MaxQuant を使用しました⁷。各個人のワークフローでの繰り返し分析全体でピアソン相関係数を計算しました。定量化されたタンパク質信号の相関値の平均は 0.98 です (図 3)。

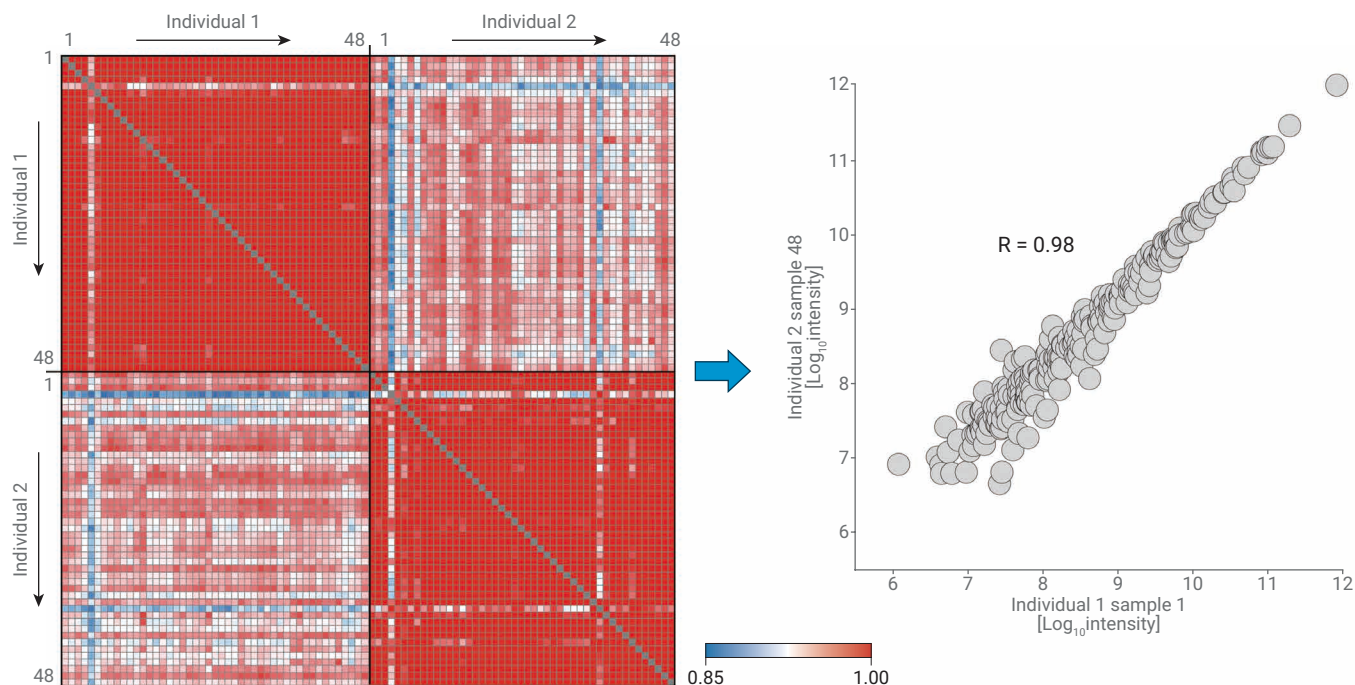


図 3. 色分けされたピアソン相関係数、96 テクニカルワークフローレプリケートの対比較用。0.98 のピアソン相関係数は高い再現性を示しています。

テクニカルレプリケートの優れた再現性を強調するために、1 個のサンプルからの 3 つの繰り返し分析で生成されたトータルイオンクロマトグラム (TIC) を重ね表示しました (図 4)。重要なことは、溶液内消化とペプチド精製を含む包括的な血漿プロテオミクスサンプル前処理ワークフロー全体の実行後に、この優れた再現性レベルが達成されたことです。

血漿プロテオーム中のタンパク質の量の範囲はおよそ 6 桁にわたり (図 5)、1 回の平均的な分析につき 300 個の定量化されたタンパク質で構成されました。これらの約 300 種類のタンパク質の中で、さまざまな典型的血漿タンパク質機能が示されました。例えば、アポリポタンパク質 A1 および B などの脂質恒常性システムからのタンパク質、補体因子 C5 などの炎症を起こす反応に参与するタンパク質、レチノール結合タンパク質やインシュリン感受性パラメータアディポネクチン (ADIPOQ) などの輸送タンパク質などです。

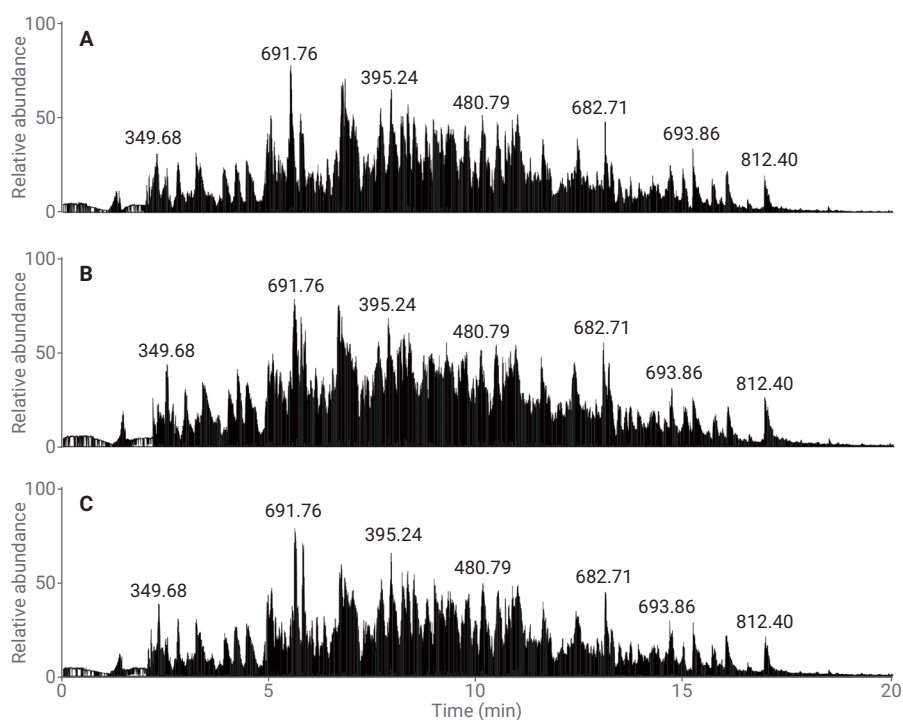


図 4. 個々人のサンプルの異なるテクニカルレプリケートから 3 つの TIC を直接比較。ピークの上の数値は m/z を示しています。

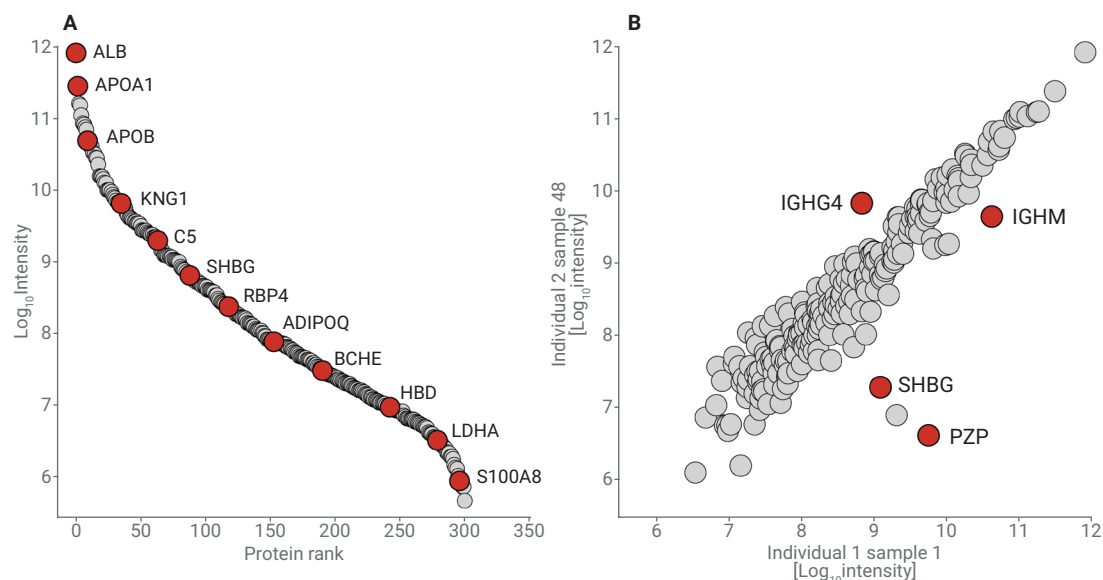


図 5. A) 20 分間のグラジエントで定量化された 96 ワークフロー繰り返し分析によるタンパク質の分布。B) 他の定量化された血漿タンパク質をバックグラウンドとして IGHG4、IGHM、SHBG、PZP の量を視覚化するための直接比較

このラベルフリーワークフローは、個人間のタンパク質の自然および病理学的変化の捕捉に最適です²。例えば、2つのサンプル(女性1人と男性1人)間のタンパク質の定量レベルの直接比較では、妊娠性血漿タンパク質(PZP)と性ホルモン結合グロブリン(SHBG)は女性サンプル中の血漿タンパク質に絶対的に多く存在します(図5)。SHBGの主要な機能的役割はエストロゲンとの結合です。一方、PZPはプロテアーゼをトラップします。免疫グロブリンは膜結合性があり、また、Bリンパ球によって生成される分泌糖タンパク質です。免疫グロブリンIGHG4およびIGHMは2つのサンプル間で存在量が異なり、タンパク質発現レベルに個人間で大きな差異があることを示しています。

結論

PreOmics iST Kitは、プロトコルを変えずに、Bravo システムでシームレスに使用できます。このメソッドの組み合わせを使用すると、血漿タンパク質の同定のための堅牢かつ高感度で高速なテクニックを用いて、わずか2時間の合計サンプル処理時間でLC/MS/MSグレードのペプチドを得ることができます。Bravo Liquid Handling Platform が実現する自動化により、ワークフローでの繰り返し分析全体から得られる結果も再現性が非常に高まります。ワークフローの再現性は、2つの血漿サンプル間での有意差を明らかにするのに十分なものでした。この再現性は、特に長期的な研究において、血漿プロテオーム中の新規の生物学的変化を発見する上で十分であると結論付けました。このことは、Geyer 等による別の研究で示されています(2017)¹。このアプリケーションノートでは、女性と男性それぞれ1

人から得た1 µLの血漿の48回の繰り返し分析でサンプルを前処理する、つまり合計96サンプルを前処理することによって、このワークフローの特長を実証しました。

1回の分析で、血漿プロテオーム中のタンパク質を平均300個定量しました。生物学的に関連したパラメータを基にした患者の層別化に使用できる血漿プロテオームの典型的な機能も含まれています。2つのテクノロジーを1つのワークフローに統合することで実現される高スループットと堅牢性のコンビネーションを活用することによって、数百種類さらには数千種類の血漿サンプルの前処理が実現可能なものとなります。この相乗効果は大規模な臨床研究アプリケーションにおいて不可欠になると考えられます。

参考文献

1. Geyer, P. E.; et al. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology* **2017**, 13(9), 942.
2. Geyer, P. E.; et al. Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Systems* **2016**, 2(3), 185–195. <http://doi.org/10.1016/j.cels.2016.02.015>
3. Kulak, N. A.; et al. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature Methods* **2014**. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2834>
4. Anderson, L. Six decades searching for meaning in the proteome. *Journal of Proteomics* **2014**, 107, 24–30. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.005>.
5. Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology* **2008**, 26(12), 1367–1372. <http://doi.org/10.1038/nbt.1511>
6. Cox, J.; et al. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* **2011**, 10(4), 1794–1805. <http://doi.org/10.1021/pr101065j>
7. Cox, J.; et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics* **2014**, 13(9), 2513–26.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, October 17, 2018

5994-0306JAJP