

MALDI-MSによるリン酸化ペプチドの網羅的解析 Comprehensive analysis of phosphorylated peptides using MALDI-MS

○山田賢志¹・船越なつ美¹・村瀬雅樹¹・梶原茂樹¹・木村剛之²・青島健²・小田吉哉²・田中耕一¹ 1 島津製作所 田中最先端研究所 2 エーザイ株式会社

○ Y.Yamada¹, M.Murase¹, N.Funakoshi¹, S.Kajihara¹, T.Kimura², K.Aoshima², Y.Oda², K.Tanaka¹ 1 Koichi Tanaka Laboratory of Advanced Science and Technology, Shimadzu Corp. 2 Eisai Co., Ltd



1. 概要

Since phosphorylation is related to intracellular signal transduction, disorder of phosphorylation causes many diseases such as cancer. Therefore, comprehensive analysis of phosphorylation in biological samples will bring crucial key for developing drug or diagnosis. MALDI-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) gives complementary identification results compared to ESI (Electrospray Ionization)-MS due to the difference of ionization mechanisms. In this presentation, we will show novel MSⁿ analysis procedure and precursor selection algorithm (LDIA: Logical-Data Influenced Acquisition) which allows to increase the number of identified peptides. This procedure utilizes the feature of MALDI-MS that allows to analysis same samples repeatedly.

2. 目的

- MALDI-MSの特徴
- 構造解析に広く活用
 - 同じサンプルを繰り返し使用して、詳細解析が可能

LC分離したサンプルを解析際の課題

- × 網羅的解析には多大な時間が必要
 - × サンプル枯渇の問題があり、MS² precursor選択が難しい
- ⇒ より多くのリン酸化ペプチドを同定するためのMSⁿ測定手順・precursor選択アルゴリズム (LDIA: Logical-Data Influenced Acquisition) が必要

3. 解析手順

3-1. 全体の流れ

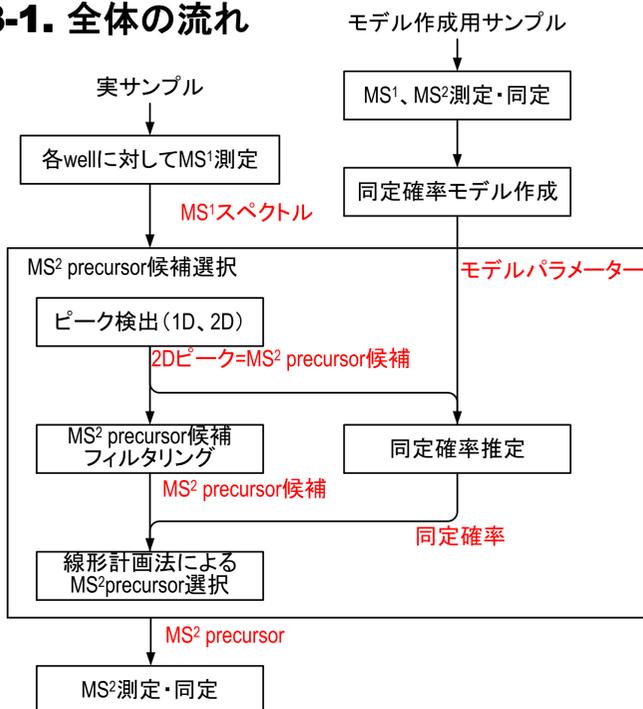


Fig. 1. 解析全体の流れ

以下、
 $P_{w,j}$: well w のMS¹スペクトルから検出された j 番目のMS¹ピーク
 $P_k^{(2D)}$: 全MS¹スペクトルをheatmap表示して検出される2Dピーク

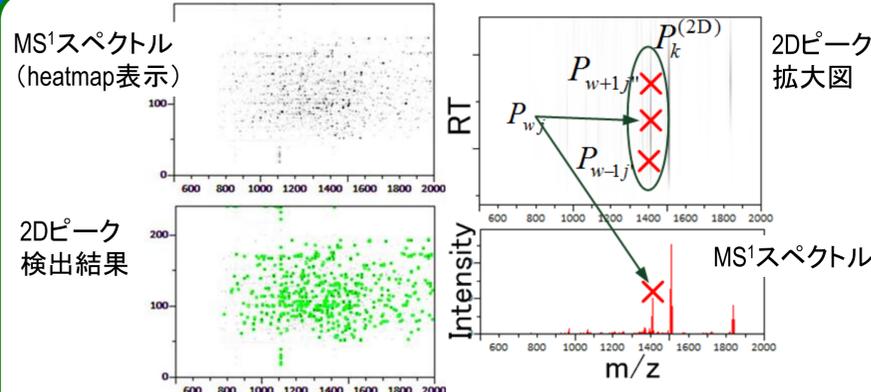


Fig. 2. 左上: MS¹スペクトル (heatmap表示)、左下: 2Dピーク検出結果、右: MS¹ピークと2Dピークの関係

3-2. 同定確率モデル

同定確率: あるMS¹ピークをprecursorとするMS²測定が同定に繋がる確率
 ←モデル作成用サンプルのS/N比・同定数の関係を近似式でフィッティングしてモデリング

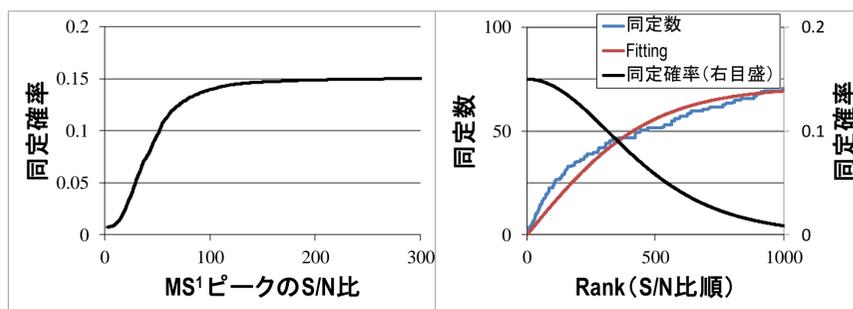


Fig. 3. 同定確率推定モデル

3-3. MS² precursor候補フィルタリング

- Precursor候補から除外するMS¹ピーク
- コンタミピーク
 - 脱水・脱塩のニュートラルロスピーク
 - 98Daあるいは80Daのペアピークのうち一方 (原則high mass側を除外)
 - ✓ high mass側 (リン酸基付き) \geq low mass側 $\times 10$ の時 low mass側ピーク除外
 - ✓ 逆の時はhigh mass側ピークを除外

3-4. 線形計画法を用いたMS² precursor選択

最適化のための目的関数
 より多くのペプチド同定できるprecursor選択
 ⇒ 全wellを通じた同定確率の総和 $f = \sum_{w,j} p_{w,j}$ の最大化

$p_{w,j}$: MS¹ピーク $P_{w,j}$ にて、MS²測定した場合の同定確率
 ←実サンプルのMS¹ピークのS/N比を基に同定確率推定モデルから推定

さらに、 n 回積算でS/N比が \sqrt{n} 倍になると仮定
 ⇒ n 回積算でMS²測定を行った場合の同定確率 $p_{w,j}^{(n)}$

0-1線形計画法の適用

0-1変数 $x_{w,j}^{(n)} = \begin{cases} 1 & \text{MS}^1\text{ピーク } P_{w,j} \text{ に対して } n \text{ 回積算のMS}^2\text{測定を実施} \\ 0 & \text{それ以外 (MS}^2\text{測定を実施 or 積算回数が } n \text{ 以外)} \end{cases}$

目的関数 $f(x_{w,j}^{(n)}) = \sum_{w,j,n} p_{w,j}^{(n)} x_{w,j}^{(n)} \left(= \sum_{w,j} p_{w,j} \right)$ と変形される。

制約条件

MS¹ピーク $P_{w,j}$ をprecursorとするMS²測定は積算回数に応じて

- 測定しない $x_{w,j}^{(1)} = x_{w,j}^{(2)} = x_{w,j}^{(3)} = \dots = 0$
- 1回積算 $x_{w,j}^{(1)} = 1, x_{w,j}^{(2)} = x_{w,j}^{(3)} = \dots = 0 \Rightarrow$ “ $P_{w,j}$ での積算回数” = $\sum_n n x_{w,j}^{(n)}$
- 2回積算 $x_{w,j}^{(1)} = 0, x_{w,j}^{(2)} = 1, x_{w,j}^{(3)} = \dots = 0$
- ...

“全wellを通じた積算回数” = $\sum_{w,j,n} n x_{w,j}^{(n)} \leq U^{(\text{Total})}$ 式 (2)



2Dピーク $P_k^{(2D)}$ でのMS²測定は高々1回
 $\sum_{P_{w,j} \in P_k^{(2D)}} \sum_n x_{w,j}^{(n)} \leq 1$ 式 (4)

Fig. 4. 制約条件

式(1)を制約条件式(2)~(4)の下で最適化⇒0-1線形計画法

4. 基礎評価実験結果とまとめ

リン酸化ペプチドサンプル

- HeLa細胞 lysate
- μ Focus MALDI Plate™ 700 μ m (384 circles) (Hudson Surface Technology, Inc. USA)
- Matrix: DHB (LaserBio Labs, M103)、添加剤: MDPNA (Aldrich, M9508)

Precursor選択の最適化条件

- 各wellでの積算回数上限 $U_w = 10$ 、全wellを通じた総積算回数上限 $U^{(\text{Total})} = 1000$
- ⇒最適化により、591個のMS² precursorが選択され延べ983回積算

単純選択

- ピーク強度が閾値以上のピークを機械的にMS²測定⇒1593回のMS²測定

装置

- Axima Resonance (島津/Kratos, UK)

Mascot検索条件(概略)

- Enzyme: Trypsin/P
- Variable modifications: Acetyl (N-term), Dehydrated (STY), Gln→pyro-Glu (N-term Q), Glu→pyro-Glu (N-term E), Oxidation (M), Deamidated (NQ)及びDehydratedに代えてPhospho
- Missed Cleavages: 2

ペプチド同定結果

PTMが異なれば別配列とカウント ペプチド配列が異なるもののみ別配列とカウント



Fig. 5. MALDI (LDIA) によるペプチド同定数

今後の課題

- MS²測定の活用: 特定のMS² fragmentが強く表れて同定に失敗、PTMサイトの確度が不十分
- CID電圧等、測定条件の検討
- 検証用データ数の追加

Acknowledgement

本研究は、日本学術振興会の最先端研究開発支援プログラムにより、助成を受けたものである。