

timsTOF *Pro 2*

- 高速高感度 4D- マルチオミクスの新基準

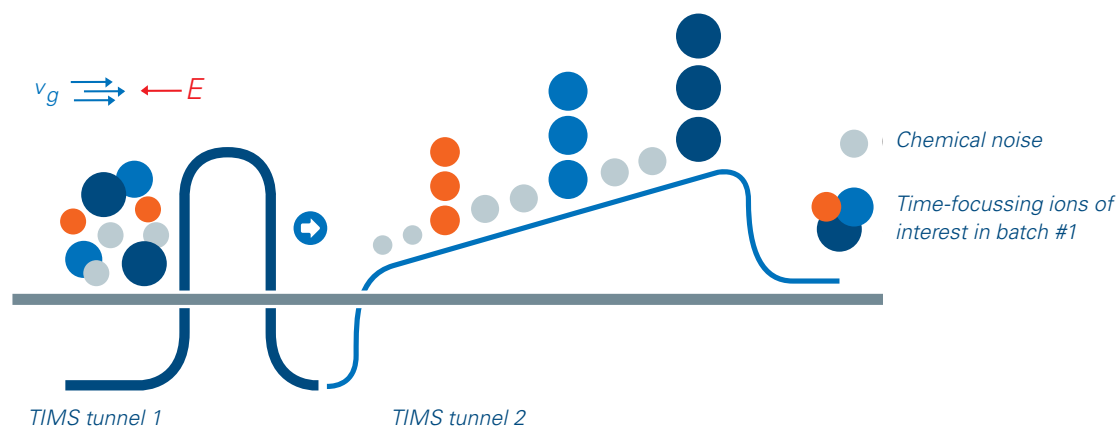
timsTOF *Pro 2*

高速、高感度、4D-マルチオミクスの基準



最新世代のデュアルTIMSアナライザーを搭載したtimsTOF Pro 2質量分析計は、3倍のイオンキャパシティを実現しました。簡素化されたイオン光学系は、イオントランスファーと感度を最大化し、4D-マルチオミクスの新たな基準となります。短いグラジエントでも妥協のないカバレッジの深さとCCSに対応した精度により、timsTOF Pro 2はトランスレーショナル・マルチオミクスのアプリケーションに欠かせないものとなっています。

デュアルTIMSとCCSに対応した分析



Trapped ion mobility spectrometry (TIMS) は、LC-MS に気相での分離という新たな次元を加えることで、サンプルの複雑性を解消します。TIMS は、所定の質量電荷比 (m/z) と断面積に基づく移動度のイオンを蓄積・濃縮します(時間集束効果)。これにより、シグナルからのノイズの分離をより忠実に行うことができ、速度に応じて感度を向上させることができます (100 Hz 以上の TIMS デューティサイクル)。

デュアルTIMS は、TIMSトンネル1にイオンを蓄積することでほぼ100%のデューティサイクルを実現し、TIMSトンネル2のイオンが順次放出されます (100 Hz 以上)。このParallel Accumulation Serial Fragmentation (PASEF®) により、衝突断面積 (CCS) 解析を高速で行うことができます。

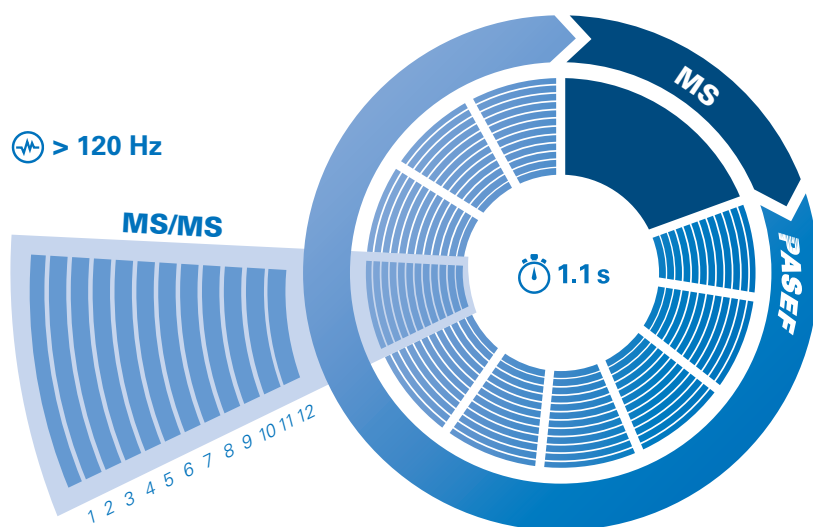
複雑なサンプルを PASEF がより深く掘り下げる

ブルカーでは、Matthias Mann 教授と共同で、プロテオミクス質量分析の欠点を解消するために、デュアル TIMS 技術を用いた PASEF (Parallel Accumulations Serial Fragmentation) スキャン機能を開発しました。ペプチドイオンは、トラップドイオンモビリティスペクトロメトリーで分離・溶出され (~ 100ms)、四重極飛行時間アナライザー (QTOF) で検出され、TIMS MS ヒートマップが生成されます。

PASEF® は、同じ TIMS 分離を利用して、MS/MS でイオンを連続的に断片化します。四重極は、溶出中

に特定のイオン種を分離し、すぐに次のプレカカーサーにシフトします。親イオンとフラグメントのスペクトルは、移動度の値によって整列されます。

PASEF® テクノロジーは、120Hz 以上の速度でシーケンシングを実現し、MS/MS スペクトルの品質が低いペプチドを何度か選択することで、より信頼性の高いペプチドスペクトルマッチング (PSM) を実現することができます。



PASEF® はショットガンプロテオミクスに最適なソリューションです。PASEF® を搭載した timsTOF Pro は、感度や分解能を損なうことなく、120Hz 以上のシーケンス速度を実現しています。これは、四重極の分離質量窓を TIMS ファンネルからの特定のペプチドパッケージの溶出時間と同期させることによって達成されます。



Prof. Dr. Matthias Mann, Director, Department of Proteomics and Signal Transduction, Max-Planck-Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany

「ペプチドの混合物を 2 次元 (保持時間と m/z) で分析すると、非常に複雑であることがわかりました。もう一つの次元を追加することで、原理的にはその先に進むことができます。新たな分離次元に加えて、timsTOF Pro 2 は非常に速いスピードと高い感度を備えているので、プロテオームをより深く理解することができ、サンプル量も少なく済みます。」

これまでにないプロテオミクスの深さ

ペプチドやタンパク質の配列を最大限にカバー

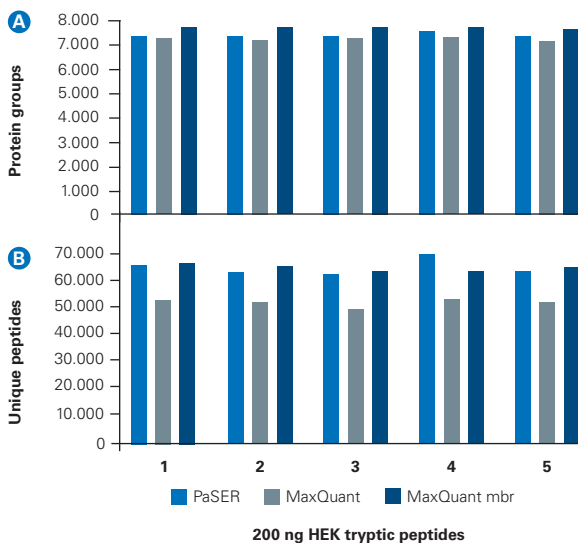
timsTOF Pro 2 では、ステンレス製のスタックリングイオンガイド (SRIG) と、最適化された標準的な dda-PASEF メソッドを採用することで、シングルショットプロテオミクスにおいて前例のないプロテオームカバレッジの深さを実現しています。200 ng の HEK トリプシン消化物から、Aurora-25 cm カラムを用いた 60 分のグラジエントで、7000 以上のタンパク質グループと 60,000 以上のペプチドが同定されました。

timsTOF Pro 2 は、スペクトルライブラリを必要とせず、分析間でのデータベース検索とマッチングにより、日常的な細胞株のプロテオーム定量実験を直接行うための詳細なプロテオームカバレッジを提供します。異なるデータベース検索戦略においても同等の結果が得られました。タンパク質をリアルタイムで同定できる PaSER、そして MaxQuant では、タンパク質とペプチドの両方のレベルで同様の ID 数が得られました。

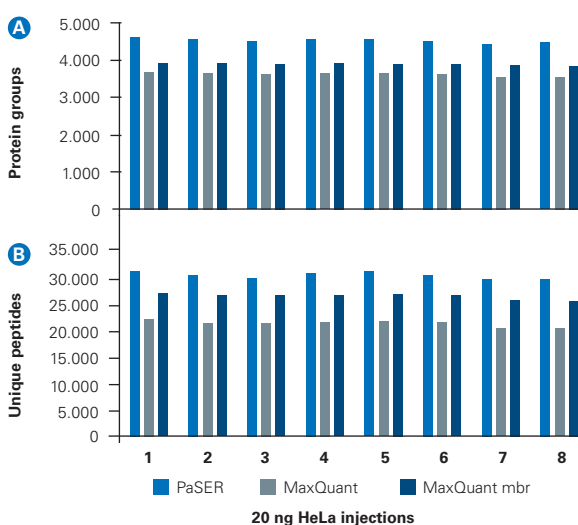
プロテオミクスと PTM の難易度の高い分析課題を解決する高感度

特殊な細胞、希少な細胞集団、微細針吸引腫瘍生検など、ますます多くの生物学的アプリケーションにおいて、少量のサンプルを用いたプロテオームの定量化が重要になっています。このような少量のサンプルでも、高感度の質量分析計を用いてプロテオームを定量することは非常に重要です。20 ng の HeLa (Pierce) のペプチドを Aurora-25 cm カラムで 30 分のグラジエントで測定すると、リアルタイム検索エンジンである PaSER は 4200 以上のタンパク質グループと 30,000 近くのペプチドを同定します。

60 分のグラジエント時間で前例のないプロテオームカバレッジを実現



200 ng の HEK 消化物から、60 分で 6000 以上のタンパク質群 (A) と約 60,000 のペプチド (B) を再現性よく同定。PaSER と MaxQuant は同等の結果をもたらします。



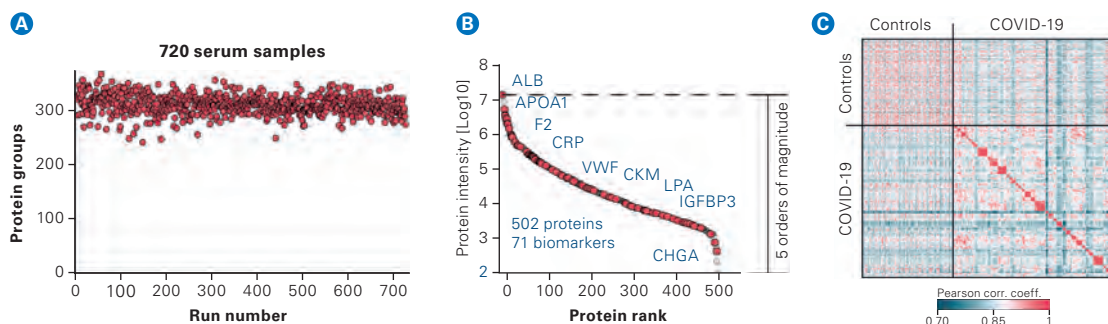
(A) 20 ng の HeLa タンパク質消化物からの 30 分間グラジエントでのタンパク質グループの同定 (~4000)。PaSER、MaxQuant、MaxQuant + MBR をそれぞれ実施。

(B) 20 ng の HeLa タンパク質消化物からの 30 分間グラジエントでのペプチド同定 (~25,000)。PaSER、MaxQuant、MaxQuant + MBR をそれぞれ実施。

ハイスループットなプラズマプロテオミクスの COVID-19 研究への応用

ごく最近、timsTOF Pro 2 と Evosep One の強力な組み合わせを用いて、COVID-19 感染者を対象とした最大規模の血清プロテオーム研究におけるプロテオームの変化を調査しました。これは、プレプリントとして公開されています。最大 54 日の入院期間中に 31 名の患者から得られた血清サンプルを分析した結果、458 個のサンプルが得られました。COVID-19 と類似した症状を持つ 262 名の患者から得られた PCR 陰性のサンプルがコントロールとなりました。データは PASEF を用いた Evosep 60 samples per day (SPD) 法で取得され、MaxQuant¹ のマッチングライブラリで処理されました。この 720 の患者サンプルから、70 以上の潜在的なバイオマーカーを含む 310 ± 18 のタンパク質が定量されました（下図）。驚くべきことに、今回の研究ではメンテナンスやクリーニングの必要がありませんでした。これは、非常に低い CV をもたらす均一で高精度なタンパク質量の値を得るために重要であり、タンパク質レベルのわずかな変化でさえも明らかにすることができます。

この研究により、制御されている血清タンパク質の非常に詳細な縦断的軌跡と、新規のバイオマーカーの可能性が明らかになりました。このパイプラインを使って同様のデータセットや大規模なデータセットを測定することができれば、問題に対する貴重な洞察を得ることができるでしょう。



COVID-19 患者と対照群の血漿プロテオーム解析。① 定量化されたタンパク質の数、② 少数の既知のバイオマーカーとともに定量化されたタンパク質のダイナミックレンジ、③ 全サンプル間の相関を示すクラスタリングヒートマップ。

¹ www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.02.22.21252236v1



Roman Fischer, Ph.D., Associate Professor in Clinical Proteomics, Target Discovery Institute, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

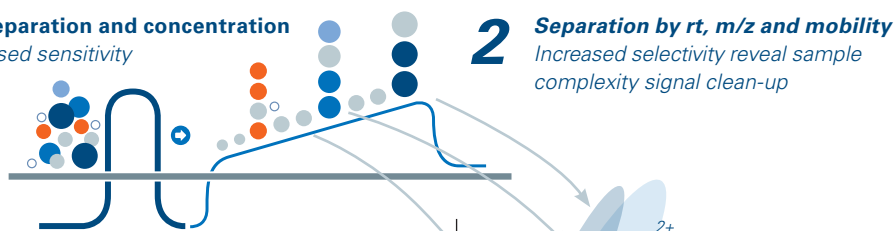
「2019年2月に timsTOF Pro を使い始めてから、25000 以上の LCMS サンプルを実行してきましたが、そのうち約 5000 は非枯渇性の血漿ダイジェストでした。これまでダウンタイムはほぼゼロでした。」

識別の信頼性を高める dia-PASEF

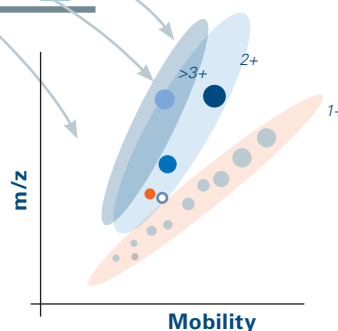
PASEF のスピードと TIMS 由来の衝突断面積 (CCS) の圧倒的な特異性により、データインディペンデント解析を実現します。



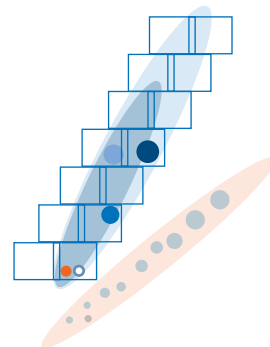
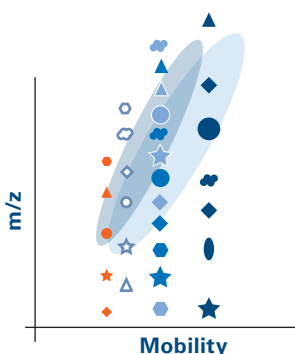
1 TIMS separation and concentration - Increased sensitivity



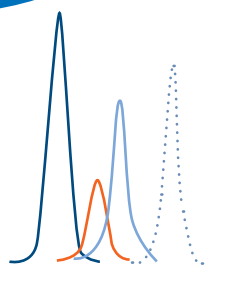
2 Separation by m/z and mobility Increased selectivity reveal sample complexity signal clean-up



3 CCS-coded analytes increased - ID Confidence - Increased Quant accuracy - MOMA ID & Quant



6 Accuracy - Selectivity - Sensitivity Robustness - Confidence - Speed



5 MS:MS based, CCS-aware - Quantitation accuracy - Ultimate selectivity - Results confidence

4 Bi-dimensional dia-PASEF windows - Improved ion usage: sensitivity - Shortened cycle time: throughput - $1+$ removal: spectral quality

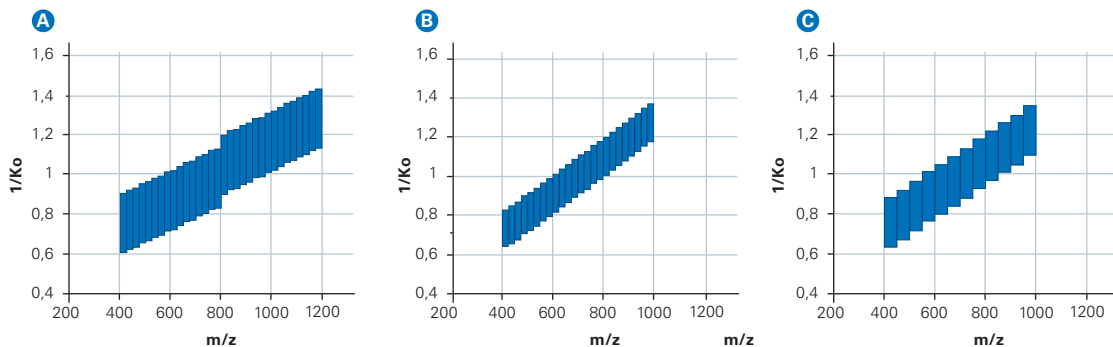
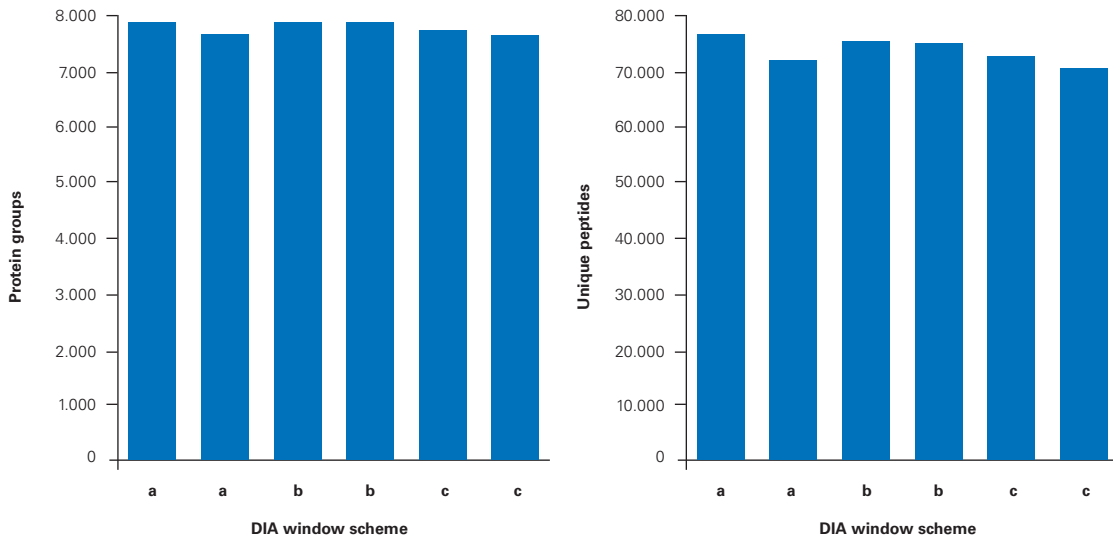
- Chemical noise
- Ion 1 (high CCS)
- Ion 2 (intermediate CCS)
- Ion 3 (intermediate CCS)
- Isobaric Ion 4 (MOMA)
- Isobaric Ion 5 (MOMA)

Data-independent acquisition (dia) - PASEF は、DIA の利点と PASEF のイオン利用効率を組み合わせで適用することで、従来の DIA のアプローチよりも高い感度と選択性を実現します。LC-MS/MS dia-PASEF の実行全体にわたって、 m/z 、イオンモビリティ (CCS)、保持時間、強度を含む完璧な 4 次元データが作成されます。TIMS 分離は、選択性を高め、1 価の前駆体をフラグメンテーションから除外し、ノイズからシグナルを濃縮することでサンプルをクリーンにします。また、デュアル TIMS ファンネルから得られる分子量と CCS 情報の相関を利用して、dia-PASEF は確信度の高いペプチド同定を可能にします。

dia-PASEF

ハイスループットの定量的プロテオミクスのための 比類のないデータ完全性と分析の深さ

標準的な dia-PASEF メソッドを用いたデータインディペンデント解析により、複数回のランで再現性のある同定が可能。3種類の異なる dia-PASEF ウィンドウスキームにより、Aurora-25cm カラムを用いた 60 分グラジェントで、8000 近いタンパク質グループと 7 万以上のペプチド配列の定量が可能であり、定量的な正確さを示します。



3種類の dia-PASEF ウィンドウ設定を用いた重複注入でのタンパク質群およびペプチド同定率 (A) (B) (C)。

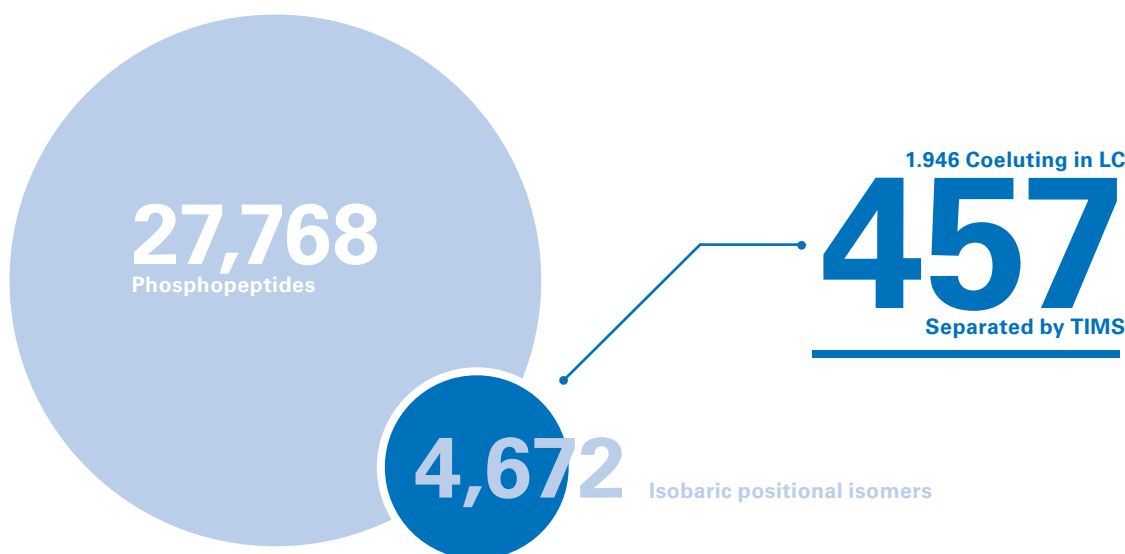
高感度リン酸化プロテオミクスと異性体分離

CCS による近位リン酸化部位の定量化

timsTOF Pro 2 における dia-PASEF の高感度、シーケンス速度、再現性は、限られたサンプル量でも定量的なホスホプロテオーム解析を可能にします。マウスの脳サンプルから得られたわずか 25 µg の総タンパク質から、ラベルフリーでホスホプロテオームの定量が可能です。30 SPD (samples per day) の Evosep メソッドを用いて濃縮されたホスホペプチドを dia-PASEF で分析した結果、3 回の濃縮複製で最大 4473 個のユニークなホスホペプチドを同定することができました。これらの結果は、針生検への応用を期待させるものであり、がんのプロテオゲノミクスデータをシグナル伝達に関する情報で補完することができます。結果は Stefan Tenzer 教授のご好意により提供されました。

サンプル量が限られている細胞シグナリングの解析

CCS 情報がない従来のプロテオミクスでは、クロマトグラフィーで共溶出した時点で、質量数とシグナルオーバーレイのため、リン酸化ペプチドの異性体は定量できませんでした。標準的な 150 µg の TiO₂ 濃縮ワークフローによる PASEF 分析では、以下のように 27,768 個のリン酸化ペプチドが同定され、MOMA (Mobility Offset Mass Aligned) によるイオンモビリティ分離の利点が明らかになりました。1946 個の共溶出アイソマーのうち、20% が TIMS で完全に分離され、タンパク質の近位リン酸化部位の理解を深めることができます。



TIMS と PASEF によるリン酸化ペプチドの同定とリン酸化部位異性体の分離。
結果は Stefan Tenzer 教授のご好意により提供されました。



Prof. Dr. Stefan Tenzer, Institute for Immunology, University Medical Center of the Johannes-Gutenberg University, Mainz, Germany

「高感度であることに加えて、timsTOF Pro のユニークな点は、気相中で位置的なリン酸化アイソマーを分解できることです。そのため、シグナル伝達経路をより詳細に知ることができます。」

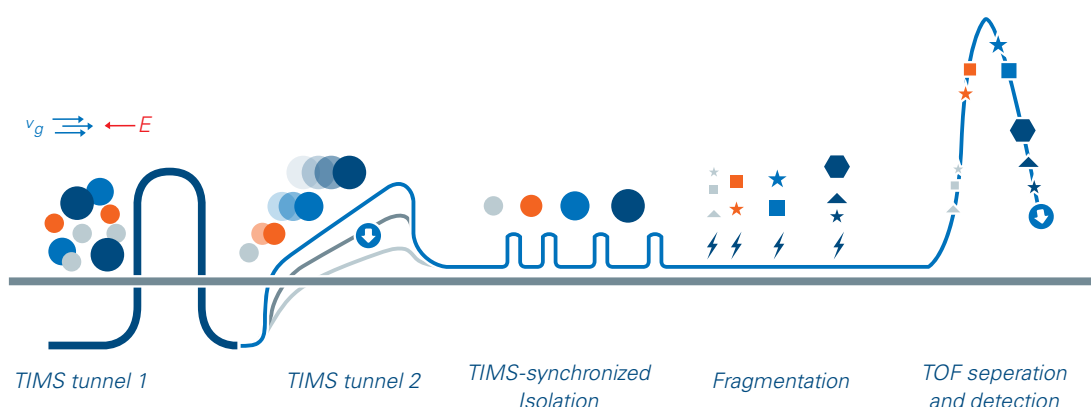
前例のない感度でのハイスループットなターゲットプロテオミクス

prm-PASEF は、標準的な選択反応モニタリングやパラレルリアクションモニタリング (SRM や PRM) と比較して、選択性や感度を損なうことなく、1回の取り込みで対象となるペプチドの数を増やすことができます。

ターゲット質量分析 (MS) は、プロテオミクス実験において、大規模なサンプルコホートにおけるバイオマーカー候補の検証などに使用される強力な手法です。この技術は、データ依存性解析法 (DDA) やデータ非依存性解析法 (DIA) に比べて感度が向上します。この技術は、1回の分析で測定できるター

ゲットの数、液体クロマトグラフィーの分離ステージの時間、全体的な感度などによって制限されます。多数のターゲットペプチドの完全なデータを得るためには、クロマトグラフィーの分離時間を長くするか、MS の感度と選択性を調節するかのどちらかしかありません。

prm-PASEF は、ブルカーの timsTOF Pro による 4 次元分離の恩恵を受けて選択性と感度を向上させ、PASEF のスピードを加えてプリカーサーターゲットの数を増やすことで、1回の取り込みでターゲットにできるペプチドの数を増やします。



Prof. Dr. Gunnar Dittmar, Group Leader Proteomics of Cellular Signalling, Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

「約 1 年前、私の研究室は tims-TOF Pro 上で prm-PASEF 法を開発するためにブルカーとの共同研究を開始しました。prm-PASEF 法の開発では、デュアルトラップ型イオンモビリティ装置がイオンを蓄積し、高分解能 TOF と相まって非常にシャープで強いピークを放出することで、信号を増やし、強度を高める素晴らしい方法であることがわかりました。さらに、装置の信頼性にも感銘を受けました。素晴らしいですね！」



Jarrod A. Marto, Ph. D. Associate Professor, Dept. of Pathology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA

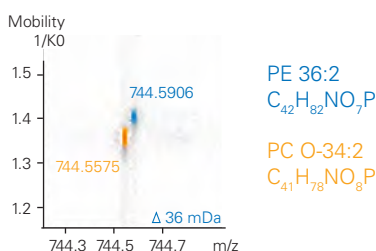
「私たちはブルカーと緊密に協力して、prm-PASEF を一から作り上げてきました。prm-PASEF が提供するスピード、感度、堅牢性のハイレベルな組み合わせには、これまでのコラボレーションを通じて感銘を受けました。この性能を timsTOF Pro 2 で次のレベルに引き上げることに興奮しています。」

4D-Lipidomics でより速いスループットを実現

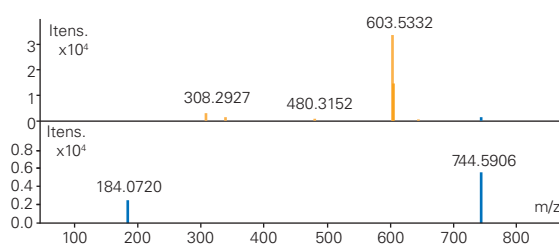
プロテオミクスサンプルと同様に、脂質の抽出物は、その構造的な多様性のために、サンプルの複雑性が高いです。高品質の MS/MS スペクトルは、信頼できる脂質のアノテーションを得るために不可欠です。PASEF は、CCS に対応したワークフローを提供し、脂質のアノテーションの信頼性をさらに高めることができます。

アイソバリック脂質の MOMA (Mobility Offset Mass Aligned) データ

PASEF は、モビリティ分離を利用して、わずか 100 ms の時間内に 10 種類以上のプレカーサーを選択することで、10 倍以上のプレカーサーを断片化することができます。これにより、重複する夾雑物が除去され、同重体や異性体の脂質も分離されます。結果として得られる MS/MS スペクトルは、各脂質クラスに固有のフラグメントを示し、信頼性の高いアノテーションが得られます。



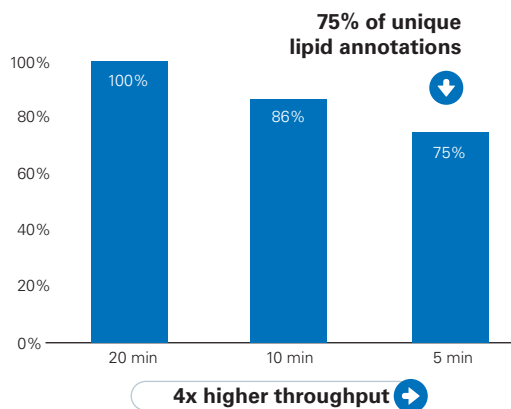
逆相から共溶出した 2 つのアイソバリック脂質のモビリティ分離を示すヒートマップ



モビリティ分離後のクリーンな PASEF MS/MS スペクトル

確信を持ったアノテーションによるハイスループット

1 回の注入で平均 65% のプレカーサーの MS/MS スペクトルを取得できるため、貴重なサンプルを複数回に分けて注入する必要がありません。これにより、スループットが 4 倍以上向上し、高速 LC グラジエントとの組み合わせにより、ハイスループットな脂質プロファイリングが可能になります。正確で精密な TIMS CCS 値は、ライブラリフリーのルールベースアプローチによるアノテーションの自動 CCS 予測において、信頼性を高めるための追加の判定基準として使用されます。



NIST SRM 1950 (ESI(+)) モード) から得られた、異なるグラジエントランタイムでのユニークな脂質のアノテーション



Zheng-Jiang Zhu, Ph.D. Principal Investigator, Director of Metabolomics Research Center, Interdisciplinary Research Center on Biology and Chemistry (IRCBC), Shanghai Institute of Organic Chemistry (SIOC), Chinese Academy of Sciences (CAS)

「timsTOF Pro は非常に汎用性の高いプラットフォームで、1 つのプラットフォームですべてのアプリケーションを行うことができます。装置のデザインは、市場に出回っているどの装置よりも優れています。」

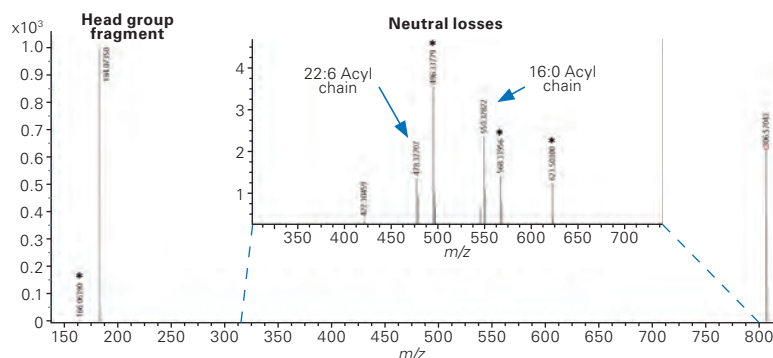
リポミクスの初心者から上級者までを対象とした統合アノテーションツール

結果を適切に報告するためにアノテーションを検証することは、脂質プロファイリングの重要なステップです。この作業を簡単にするために、MetaboScape® ではいくつかのツールが用意されています。

ルールに基づくアノテーション

MetaboScape®には、典型的なデータベースやスペクトルライブラリに基づいたアノテーションの他に、公開されているフラグメントルールを利用したライブラリフリーのアノテーションツールがあります。

フラグメントとニュートラルロスに応じて、MetaboScape®は種または分子種レベルのアノテーションを行うことができます。



PC 22:6_16:0の極性頭部とアシル鎖のフラグメントに基づくルールベースのアノテーション

発展を続けるリポミクスコミュニティと一体化するために、MetaboScape®では、略語や階層に関する最新の推奨事項を採用し、プロファイリングのワークフローを簡素化するための新しいリポミクスツールを定期的に更新しています。

Kendrick Mass Defect 分析

複数の脂質クラスで異なるKendrick Mass Defectsを計算し、多次元プロットで表示することで、外れ値のスクリーニング、非アノテーション種の識別、偽陽性の除去を行うことができます。

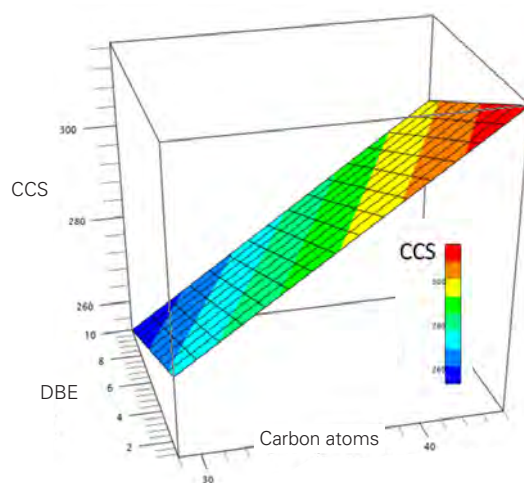
外れ値を自動的に検出することで、相同性のある一連の脂質の深い分析を簡素化します。

自信を持って脂質のアノテーションを行うためのCCS対応ツール

MetaboScape®はCCSに完全対応したソリューションで、CCS値を利用してアノテーションの質を向上させる複数のツールを備えています。CCS値が統合されたMS/MSスペクトルライブラリ(例:50万の脂質に対応したLipidBlastライブラリ)に加えて、CCS超平面に基づいてCCS値を自動的に予測する新しいツールがMetaboScape®に実装されています。



相同性を示す魚油抽出物のトリアシルグリセライドのKendrick Mass Defect プロット



CCS 値の自動予測に使用される CCS 超平面

timsTOF *Pro 2*



*Prof. Janne Lehtiö, Science for Life Laboratory, Department of
Oncology-Pathology, Karolinska Institute, Sweden*

「我々は timsTOF Pro の性能に感銘を受けました。特に、この装置のスピードと感度は、限られた量の出発物質からより多くの免疫ペプチドを確認することを可能にします。これは、ネオアンチゲンの発見や、がん治療のための個別化医療の開発において、特に価値があると期待しています。」



timsTOF Pro 2 と PaSER (Parallel Search Engine in Real-time) は、ハードウェアとソフトウェアを組み合わせたソリューションで、完全に統合された GPU ベースのリアルタイムデータベース検索と結果ベースのサンプルキュー管理を可能にします。PaSER は、PTM 検索を含め、妥協のないスピードで結果を提供します。PaSER の妥協のない検索速度により、データ取得が終了した数秒後には結果が手元に届き、Run & Done! を実現します。

本製品は研究用です。臨床での診断には使用できません。

● **ブルカージャパン株式会社**

横浜営業所
〒221-0022
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9
TEL: 045-440-0471
FAX: 045-453-1827

www.bruker.com

● **ダルトニクス事業部**

大阪営業所
〒532-0004
大阪府大阪市淀川区西宮原1-8-29
テラサキ第2ビル2F
TEL: 06-6396-8211
FAX: 06-6396-1118