

【分析報告書の例】

分析課題名： LC-MS/MS を用いたタンパク質バンドの同定

弊社分析コード： P****

(株) メディカル・プロテオスコープ

分析報告書

分析情報

分析課題名 LC-MS/MS を用いたタンパク質バンドの同定
弊社分析コード P****
分析の目的 SDS ゲルから切り出した染色バンドに含まれるタンパク質を同定する。
報告書提出日 20**年*月**日
分析担当者 -

分析委託者

機関名 -
ご担当者名 -
ご所属 -
ご所属先住所 -
-

分析施設

〒236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9
横浜市立大学先端医科学研究センター 産学連携ラボ内
(株) メディカル・プロテオスコープ

分析試料

内容と受領数 銀染色済みの SDS ゲル 1 枚： 分析対象の領域 2 ケ所を含む
受領日 20**年*月**日

分析の概要

銀染色済みの SDS ゲルから指定の染色領域およびその対照領域を切り出した。切り出した各ゲル片からトリプシン加水分解を経てペプチド混合物を得た。ペプチド混合物を LC-MS/MS に供し、取得した MS/MS データを配列データベースと照合した。両領域から得られた同定一覧の比較によって、有意なタンパク質同定情報を絞り込んだ。

株式会社メディカル・プロテオスコープ

〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦3-9
横浜市立大学 先端医科学研究センター内
電話 045 (374) 3361 ファックス 045(374)3364
Eメール contact_form@medicalproteoscope.com

 **Medical
ProteoScope**
www.medicalproteoscope.com

【分析報告書の例】

分析課題名： LC-MS/MS を用いたタンパク質バンドの同定

弊社分析コード： P****

(株) メディカル・プロテオスコープ

1. 分析方法

1.1. 分析試料

20**年*月**日に銀染色済の SDS ゲル 1 枚を受領した。受領後ただちに 4°C の条件下で保存した。このうち、*月*日に調製されたゲルを分析に供した (図 1)。SDS 電気泳動に供した試料は、分析委託者のもとで調製されたアフィニティー精製物である。

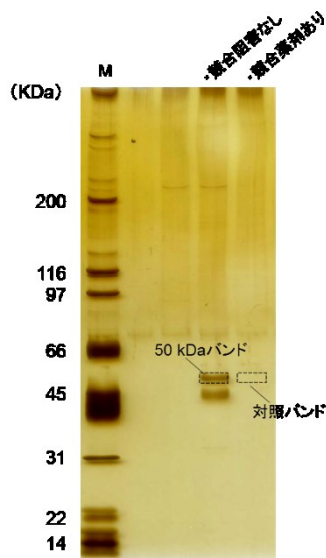


図 1. SDS ゲルの染色像 (分析委託者より提供)。

分析委託者が指定した「50 kDa バンド」および「対照バンド」を点線にそって切り出した。バンド名は分子量メーカーの移動度から見積もった分子量より名付けた。

1.2 ゲル中タンパク質のトリプシン加水分解

ゲル中のトリプシン加水分解は Shevchenko らの方法^{注1}にしたがっておこなった。

SDS ゲルから分析対象のタンパク質バンドを切り出した (図 1)。切り出したゲル片を約 1 mm 角のサイコロ状の細片にした。細片をまとめて水及びアセトニトリルで洗浄した後、DTT 及びヨードアセトアミドによるアルキル化処理に供した。最後にトリプシンを加え、37°C で 16 時間保温して加水分解反応を行った。反応後、25 mM 重炭酸アンモニウム、5%ギ酸、及びアセトニトリルを用いてゲル片からペプチドを抽出した。最後に抽出溶液を減圧下で乾燥した。

注 1： Shevchenko, A. et al., Anal. Chem. 1996, 68(5): 850–8.

1.3 LC-MS/MS

乾燥済みのペプチド試料を、水、アセトニトリルおよびトリフルオロ酢酸からなる溶媒 (体積比 98:2:0.1) に溶解した。このうちの 2 分の 1 量を LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS システムの仕様と測定条件は次のとおり。

LC： Paradigm MS4 (Michrom Bioresources 社)

【分析報告書の例】

分析課題名： LC-MS/MS を用いたタンパク質バンドの同定

弊社分析コード： P****

(株) メディカル・プロテオスコープ

- ・分析用 C₁₈ カラム： L-Column Micro (内径 100 μm、長さ 15 cm、化学物質評価研究機構)
- ・移動相 A の組成： [水]：[アセトニトリル]：[ギ酸] = 98:2:0.1 (体積比)
- ・移動相 B の組成： [水]：[アセトニトリル]：[ギ酸] = 5:95:0.1 (体積比)
- ・アセトニトリル送液勾配 (分, %B)： (0, 5) → (20, 35) → (25, 90) → (30, 90) → (30.01, 5) → (40, 5)
- ・流速： 毎分 500 nL

MS/MS： LTQ OrbiTrap XL 質量分析計 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

- ・イオンモード： 陽イオンモード
- ・スプレーエミッター： PicoTip emitter (出口内径 30 μm、コーティング無し； New Objective 社製)
- ・イオントランスファーキャピラリーの設定温度： 200°C
- ・FullScan の *m/z* 走査範囲 (Scan range)： 300–1500
- ・質量分解能 (Resolution)： 30 000
- ・データ取得方法：「Top 10 method」を用いた。すなわち、各 FullScan MS (*m/z* 300–1500) で検出したピークの高いものから 10 個選択し、高い順に MS/MS データを取得するように測定変数を設定した。

1.4 配列データベース検索によるペプチドの同定

LC-MS/MS で取得した MS/MS データを配列データベース検索に供した。検索ソフトウェアとして Matrix Science 社の Mascot (ver. 2.5) (<http://www.matrixscience.com/>) を用いた。検索用配列データセットは、SwissProt (<http://www.uniprot.org/>) 20**_01 版から出力したヒト (*Homo sapiens*) 由来のタンパク質エントリー (計 20,192 件) にブタ (*Sus scrofa*) トリプシンのアミノ酸配列を加えて構築した。

データベース検索の条件は次の通り：

Enzyme, Semi trypsin

Maximum missed cleavage, 2

Peptide tolerance, ± 5 ppm

MS/MS tolerance, ± 0.5 Da

Mass, monoisotopic mass

Fixed Modification, Carbamidomethyl (C, +57.021 Da)

Variable Modifications, Oxidation (M, +15.099 Da)

検索結果を閲覧ソフトウェア Scaffold (Proteome Software 社) に入力した。Identity threshold 以上の Mascot イオンスコアを示すユニークペプチド^{注2}がタンパク質あたり 2 個以上認められた場合を有意な同定とみなした。

注 2： 当該タンパク質エントリーにのみ帰属するペプチド

【分析報告書の例】

分析課題名： LC-MS/MS を用いたタンパク質バンドの同定

弊社分析コード： P****

(株) メディカル・プロテオスコープ

2. 分析結果

2.1 ペプチド及びタンパク質の同定

切り出したゲル片をそれぞれトリプシン加水分解に供し、ペプチド断片の MS/MS データを配列データベースと照合した (表 1 および添付ファイル 1)。表 1 では、「50 kDa バンド (競合薬剤なし)」及び「対照バンド (競合薬剤あり)」からそれぞれ同定されたユニークペプチドの数を、タンパク質エントリー毎に比較した。

リガンド化合物に特異的に結合するタンパク質は、50 kDa バンドと比べて競合剤を添加した対照ではその結合量が少ないことが予想される。そこで今回の分析では、次に挙げる①と②の条件を満たす同定タンパク質を、対象化合物に特異的に結合するタンパク質の候補として挙げた (10 種類； 表 1 に背景灰色で示した)。

- ① Identity threshold 以上の Mascot イオンスコアを示すユニークペプチドの数が 2 個以上帰属している (1.4)。
- ② ①の条件を満たすペプチドが、50 kDa バンドと比べて対照で 2 つ以上少ない。

なお、ケラチン及びトリプシンの同定情報は絞り込みの対象から外した (表 1 に灰色字で示した)。

以下に示す 10 種類のタンパク質同定が上記の条件を満たした。

ProteinX1
ProteinX2
ProteinX3
ProteinX4
ProteinX5
ProteinX6
ProteinX7
ProteinX8
ProteinX9
ProteinX10

このうちの ProteinX1 に帰属したユニークペプチドは 70 種類であり (図 2)、同定ペプチド全体 (116 種類) の半数以上を占めた。したがって、このタンパク質を染色バンドに含まれる主要なタンパク質とみなした。

【分析報告書の例】

分析課題名： LC-MS/MS を用いたタンパク質バンドの同定

弊社分析コード： P****

(株) メディカル・プロテオスコープ

表 1. 同定タンパク質及びユニークペプチドの数^{注3}

No.	Protein name	Gene Name	Uniprot Accession Number	Molecular Weight (×10 ⁻³)	ユニークペプチドの数	
					50 kDa バンド	対照 バンド
1	ProteinX1	X1	XXX001	53	70	12
2	keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	P04264	66	30	49
3	keratin, type II cytoskeletal 5	KRT5	P13647	62	15	17
4	ProteinY1	Y1	YYY001	56	7	10
5	keratin, type I cytoskeletal 14	KRT14	P02533	52	10	13
6	ProteinX2	X2	XXX002	60	6	2
7	ProteinX3	X3	XXX003	91	6	0
8	ProteinY2	Y2	YYY002	92	5	8
9	ProteinY3	Y3	YYY003	332	5	11
10	ProteinX4	X4	XXX004	52	4	0
11	ProteinX5	X5	XXX003	55	3	0
12	Trypsin (9-231)	KRT9	P0076	23	25	40
13	ProteinX6	X6	XXX006	39	2	0
14	keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	P35908	62	15	17
15	ProteinX7	X7	XXX007	54	2	0
16	ProteinX8	X8	XXX008	55	2	0
17	ProteinY4	Y4	YYY004	11	2	4
18	ProteinY5	Y5	YYY005	51	2	0
19	ProteinX9	X9	XXX009	120	53	0
20	ProteinX10	X10	XXX010	54	2	0
21	ProteinY6	Y6	YYY006	105	2	5
22	ProteinY7	Y7	YYY007	114	2	5
23	ProteinY8	Y8	YYY008	282	2	11
24	ProteinY9	Y9	YYY009	50	0	2
25	ProteinY10	Y10	YYY010	124	0	2
26	ProteinY11	Y11	YYY011	42	0	2

(注3) 背景灰色： 競合薬剤の添加により結合量が減少したタンパク質同定。灰色字： ケラチン及びトリプシンの同定。

14 exclusive unique peptides, 15 exclusive unique spectra, 18 total spectra, 173/420 amino acids (41% coverage)

```

MSGRRP TTSF AESCKPVQQP SAFGSMKVSR DKDGSKVTTV VATPGGGPDR
PQEVSYTDTK VIGNGSFGVV YQAKLCDSGE LVAIKKVLQD KRFKNRELQI
MRKLDHCNIV RLRVFFYSYG EKKDEVYLN VLDYVPETVY RVARHYSRAK
QTLPIYVKL YMYQLFRSLA YIHSFGICHR DIKPQNLLLD PDTAVLKLCD
FGSAKQLVRG EPNVSYICSR YYRAPELIFG ATDYTSSIDV WSAGCVLAEI
LLGQPIFPD SGVDQLVEII KVLGTPTRER IREMNPNYTE FKFPQIKAHP
WTKVFRPRT PEAIALCSRL LEYTPARLT PLEACAHSEF DEL RDPNVKL
PNGRDTPALF NFTTQELSSN PPLATILIPP HAR IQA AAST PTNATAASDA
NTGDRGQTNN AASASASNST

```

図 2. ProteinX1 のアミノ酸配列
同定されたペプチドを黄色で示した。

【分析報告書の例】

分析課題名： LC-MS/MS を用いたタンパク質バンドの同定

弊社分析コード： P****

(株) メディカル・プロテオスコープ

3. 添付データ

以下に挙げた電子ファイルを本分析報告書とともに納品する。

添付ファイル_タンパク質の同定結果一覧.xlsx

その他

残余試料の取りあつかい

本分析の終了後に残った試料は、お申し出のない限り、分析報告書の提出から 6 ヶ月を経た時点で破棄いたします。

分析の結果から得られた研究成果

今回の分析結果を用いて得られた研究成果を学会や論文などに発表される際はご一報ください。

以上