

分析報告書

分析情報

分析課題名 乳がん幹細胞のリン酸化プロテオミクス
弊社分析コード
分析の目的 乳がん幹細胞のリン酸化プロテオームを遺伝子ノックダウンの有無の間で定量的に比較する。
報告書提出日 2014年8月5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
電話

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棟 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 乳がん幹細胞から調製したタンパク質混合物 計2試料

分析の概要

各試料からトリプシン加水分解を経てペプチド混合物を得た。チタニア法を用いて、ペプチド混合物からリン酸化ペプチドを選択的に回収した。回収したリン酸化ペプチド混合物を LC-MS/MS に供した。得られた MS/MS データを配列データベースと照合し、1537 種類のリン酸化ペプチドを同定した。これらについて、試料間の検出強度の比較情報を出力した。

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 先端医科学研究棟 産学連携ラボ P201

電話 045(374)3361 ファックス 045(374)3364
Eメール contact_form@medicalproteoscope.com



URL <http://www.medicalproteoscope.com>

1. 材料と方法

1.1. 分析試料

2回に分けて受領した（表 1-a, b）。いずれの試料も細胞溶解液^{注1}に溶解してある。受領後ただちに -80°C にて保存した。

表 1. 受領試料

(a) 2014年3月27日受領分：計2試料

試料名	総蛋白質濃度 (mg/ml) ^{注2}	液量 (μl) ^{注2}
NC	24.4	50-60
W	24.3	50-60

(b) 2014年7月24日受領分：計2試料

試料名	総蛋白質濃度 (mg/ml) ^{注2}	液量 (μl) ^{注2}
NC	1.74	287
W	1.81	187

注 1：組成は次の通り。20 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 9 M urea, phosphatase inhibitor cocktail 2, phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma)

注 2：分析委託者より提供された情報。

1.2. トリプシンによる試料蛋白質の加水分解

各試料からそれぞれ 150 μg 総タンパク質に相当する細胞溶解液を分取し、これを出発材料とした。試料溶液に細胞溶解液を加えて液量を合わせた後、ジチオトレイトールを加え 37°C で 30 分間保温し、続いてヨードアセトアミドによる還元アルキル化処理に供した。還元アルキル化処理後に 100 mM 重炭酸アンモニウムを加え、溶液の尿素濃度を 2 M まで希釈した。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。反応後のペプチド溶液に、 C_{18} StageTip による脱塩処理を施した (Rappsilber J, et al., Anal Chem. 2003, 75: 663-70)。

1.3. リン酸化ペプチドの回収

脱塩処理後のペプチド試料からリン酸化ペプチドを分画回収した。リン酸化ペプチドの特異的吸着には TiO_2 樹脂を用いた。処理手順は GL サイエンス社の「Titansphere Phos-TiO Kit」に準じた。すなわち、マイクロチップに充填した TiO_2 樹脂にリン酸化ペプチドを吸着させたあと、強アルカリ溶液で溶出した (Sugiyama N, et al., Mol Cell Proteomics. 2007, 6: 1103-9)。溶出試料は減圧下で乾燥した。

1.4. LC-MS/MS

リン酸化ペプチド試料を、水、アセトニトリルおよびギ酸からなる溶媒（体積比 98:2:0.1）に溶解し、LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS システムの仕様と設定条件は次の通り。

LC： Ultimate3000 液体クロマトグラフ（ダイオネクス社）

- ・分析用 C₁₈ カラム： Acclaim PepMap100（粒径 3 μm、孔径 100 Å、内径 75 μm、長さ 15 cm、ダイオネクス社）
- ・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, %アセトニトリル）： (0, 2, 3.86) → (5, 2, 3.86) → (120, 33, 32, 69) → (120.01, 95, 90, 35) → (130, 95, 90.35) → (130.01, 2, 3.86) → (145, 2, 3.86)
- ・流速： 毎分 300 nl

MS/MS： LTQ Orbitrap Velos 質量分析計（サーモフィッシャー社）

- ・イオンモード： 陽イオンモード
- ・スプレーエミッター： New Objective 社製 PicoTip Emitter（ヒューズドシリカ製、コーティング処理無し、長さ 5 cm、胴部の内径 20 μm、先端の内径 10 μm）。
- ・カラムオープンの設定温度： 35°C
- ・イオントランスファーキャピラリーの設定温度： 250°C
- ・FullScan の m/z 走査範囲 (Scan range)： 350–1200
- ・質量分解能 (Resolution)： 30000
- ・Lock Mass： On (Reference m/z = 536.165)
- ・Scan Event： 計 16 個設定した。Scan Event 1 では FullScan MS (m/z 350–1200) の測定変数を、Scan Event 2 以降は MS/MS の測定変数をそれぞれ設定した。

1.5. ペプチド及びタンパク質の同定

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 Daemon ver. 2.4.0 (<http://www.matrixscience.com/>) を用いた。検索用の配列データベースには SwissProt2014_01 (<http://www.uniprot.org/>) を使用した。設定した検索条件は次の通り： Taxonomy, Homo Sapiens (Human) (20,273 sequences) ; Enzyme, semiTrypsin; Maximum missed cleavage, 2; Peptide tolerance, ± 5 ppm; MS/MS tolerance, ± 0.5 Da; Mass, monoisotopic mass; Fixed Modification, Carbamidomethyl (C) ; Variable Modifications, Oxidation (M) , Phospho (ST) , Phospho (Y) 。

1.6. ペプチドの同定情報と検出強度値の連結

各試料から得られた LC-MS/MS のデータを Nonlinear Dynamics 社の Progenesis ver. 4.0 (<http://www.nonlinear.com>) で解析し、各検出ピークの強度値を算出した。1.5. で得られたペプチドの同定結果を各検出ピークと連結し、連結された検出ピークの強度を当該ペプチドの検出強度とした。

2. 結果

2.1. LC-MS/MS

2 回目に受領した各試料から取得された LC-MS/MS の TIC クロマトグラムを図 1 に示す。NC および W の 2 つの TIC クロマトグラムは類似のイオン強度パターンを示した。この結果から、両試料間で試料調製と LC-MS/MS がともに一様に行われ、比較可能なペプチドデータが得られたと判断した。

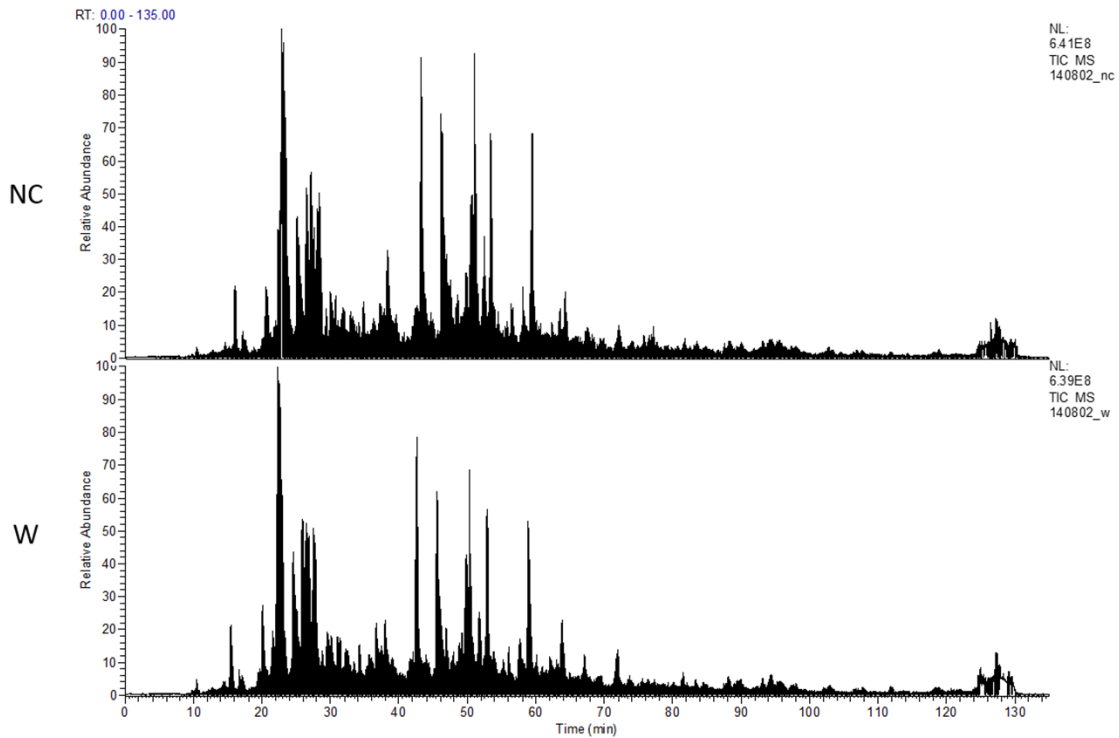


図 1. TIC クロマトグラム (0-135 分)

2.2. 同定ペプチド及びタンパク質の数

NC および W の 2 種類の試料から得られた LC-MS/MS のデータから、比較解析ソフトである Progenesis を用いて MS/MS データを抽出し、1.5.の手順に従って配列データベースと照合した。その結果、ペプチドの同定情報と連結された 1648 個のピークが検出された (添付ファイル 1)。このうちの 1537 種類、すなわち 93.3% がリン酸化ペプチドであった。これらのリン酸化ペプチドは、計 713 種類のリン酸化タンパク質に由来する。

なお、1 回目に受領した試料では、NC の試料からは 26 種類、W の試料からは 21 種類のペプチドが同定された。そのうち、リン酸化ペプチドの数はそれぞれ 16 種類、10 種類だった。試料調製と測定の対照としておいた OVISe の試料からは通常通り 6360 種類のペプチドが検出され、このうちの 5827 種類、すなわち 91.6% がリン酸化ペプチドだった。この結果から試料調製の工程に改善が必要だと考え、1 回目に受領した試料の分析はこの時点で中断した。

2.3. 検出強度の比較

同定された1537種類のリン酸化ペプチドの比較定量データを表計算ファイルにまとめた（添付ファイル2）。ただし、3種類のリン酸化ペプチドについては、NCあるいはWにおいて、検出強度値が得られなかったので、倍数値（Fold change）を算出することができなかった。

3. 添付データ

以下に列挙したデータファイルは、本分析報告書とともに電子メールで分析委託者に送付する。

添付ファイル1：ファイル名[添付ファイル1_ペプチドの同定情報と検出強度.xls]

添付ファイル2：ファイル名[添付ファイル2_プロテオーム比較解析結果まとめ.xls]

*倍数値を求めることができなかった3種類のリン酸化ペプチドの情報は、表の一番下に載せた。

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ヵ月を経た時点で破棄いたします。

以上