組織切片試料を用いたLC/MS^{E}法のタンパク質同定及び発現差異解析能力の検証

Verification of Capability for Identification and Label-free Differential Expression Analysis of Proteins using LC/MSE Methodology with Tissue Sample

（日本ウォーターズ[1]・昭和大学歯学部口腔病理学教室[2]）
○佐藤太[1]・山本剛[2]、立川哲彦[2]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

[Introduction]

The false positive identification of proteins has been a major concern in many proteomic projects. As such, it is becoming unacceptable to report single peptide protein identification in reviewed publication. LC/MSE is a parallel unbiased approach to data acquisition that increases both the number of peptides and also the reproducibility of the peptides sampled during an LC/MS experiment. In this study we applied LC/MSE methodology to the laser microdissected tissue samples and compared identification and relative quantification results to a microarray and two-dimensional gel electrophoresis analysis, another system biology approach.

[Methods]

○試料採取及び前処理

患者の同意を得て採取された扁平上皮癌5症例(No.3, 5, 10, 12及び 14)、及びそこに含まれる正常粘膜上皮4症例(No.1, 4, 8 及び 11) 、異型上皮1症例(No.2)を用いて測定を行った。凍結切片を、10μm に薄切し、70%エタノールで30秒間PETメンブレンフィルムに固定した。HE染色後、蒸留水で30秒間洗浄し、70%、85%及び100%エタノールの順で脱水操作を行った。切片を乾燥した後、レーザーマイクロダイセクション(PALM, Carl Zeiss MicroImaging社製)で、正常粘膜組織、異型上皮組織、及び平上皮癌細胞組織を回収した。

8M尿素10 ulに採取した凍結切片を溶解し、100 mM 重炭酸アンモニウム(NH_4HCO_3)及び100 mM DTTを加えて還元処理を行った。100 mM IAAを加えてアルキル化した後、trypsinによりペプチド断片に消化した。逆相の前処理チップにより、尿素を除去した後に、0.1%ギ酸含有5%アセトニトリル20 μlに溶解した。

○LC条件

装置	:nanoAcquity UPLC®(Waters社製)
サンプル温度	:10℃
注入量	:2 μL(Partial Loop)
洗浄溶媒	:0.1%ギ酸含有アセトニトリル(強溶媒) 0.1%トリフルオロ酢酸(弱溶媒)
カラム	:nanoACQUITY UPLC® BEH130 C18 1.7 μm 75 μm x 150mm
トラップカラム	:nanoACQUITY UPLC® Trap Symmetry® C18 5 μm 180 μm x 20mm ロード時間1.5分、流速 10 μL/min
移動相	:0.1%ギ酸含有アセトニトリル(B)、0.1%ギ酸(A)
カラム温度	:35℃
測定時間	:140分

グラジエント

Time (min)	Flow Rate (μL/min)	%A	%B
Initial	0.3	99	1
1	0.3	99	1
120	0.3	60	40
121	0.3	15	85
125	0.3	15	85
126	0.3	99	1

○MS条件

装置	: SYNAPT™ HDMS™, (Waters社製)
イオン化モード	:ESIポジティブ
キャピラリー電圧	:3.0 kV
脱溶媒ガス	:0.5 Bar
コーンガス	:50 L/hr
イオン源ヒーター	:80 ℃
取り込み条件	:MSEモード、m/z 50-1990、1.5秒、 コーン電圧25 V Low Energy CE / trap 6 V、 transfer 4 V Elevated Energy CE / trap 20-30 V、 transfer 10 V
リファレンス	:60秒ごと、Glu-fibrinopeptide B、2価 / 785.84265、1価 / 684.3469

○データベース検索

ソフトウェア	:Proteinlynx global SERVER (PLGS) 2.4
データベース	:Homo sapiens (Human)、uniprot
擬陽性の低減	:1試料につき3回繰り返し測定した (No.8,10,11,12及び14は2回)
タンパク質量の計算	:試料にエノラーゼ(酵母由来)を添加し、同定された各タンパク質の絶対量*を計算した

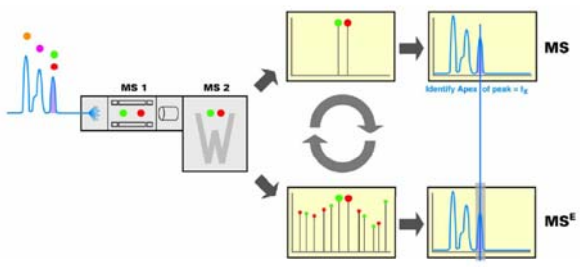

Figure 1 . MS^E 概念図
ペプチドのプレカーサーイオンは、保持時間によってすべてのフラグメントイオンと関連付けられる

[Results]

Table 1. タンパク質同定及び定量結果

condition		normal				carcinoma					dysplasia
sample name		No1	No4	No8	No11	No3	No5	No10	No12	No14	No2
Injection Volume (μL)		2	2	2	1	1	1	1	1	2	2
Number of Replicate		3	3	2	2	3	3	2	2	2	3
average	# protein	169	164	48	277	118	239	352	260	161	136
	# peptide	1406	1313	296	2122	947	1872	2429	1834	1224	
	total amount (ng)	208	210	25	112	104	228	231	124	806	185
replicate =>2	# protein	154	151	-	-	109	210	-	-	-	123

Table 2. Protein Aの定量結果

condition		normal				carcinoma					dysplasia
sample name		No1	No4	No8	No11	No3	No5	No10	No12	No14	No2
Injection Volume (μL)		2	2	2	1	1	1	1	1	2	2
amount (f mol)	replicate 1	621	607	54.4	214	6.6	0.9	0.0	18.3	13.7	150
	replicate 2	598	578	57.3	218	5.9	1.7	1.1	8.6	29.3	127
	replicate 3	570	606	-	-	4.4	0.0	-	-	-	113
	average	596	597	55.8	216	5.6	0.9	0.6	13.4	21.5	130
	(cv%)	4.3%	2.7%	-	-	20%	64%	-	-	-	14%

Table 1 に全試料の同定タンパク質数と内部標準として添加したエノラーゼとの強度比によって計算されたタンパク質量の合計を示した。タンパク質量は、ほとんどが100-250 ngの範囲内だったが、No,8 は25ng、No14 は806 ngであり、大きく異なっていた。

Figure 2 に、No. 8 と14 を除く正常粘膜上皮(No.1, 4, 11)と扁平上皮癌(No.3, 5, 10, 12)で、2回以上同定されたタンパク質について、発現差異解析を行った結果を示した。個々のタンパク質について絶対量値(f mol) を計算することにより、共通して同定されたタンパク質の差異解析だけではなく、片方にのみ検出されたものについても、評価を行うことができた。20 fmolを閾値にすると、それぞれの組織で特異的に発現しているタンパク質として、正常組織で1つ及び癌組織で4つを絞り込むことができた。

Talbe 2 に発現量に大きな差があったProtein A の繰り返し測定の定量値及び変動係数を示した。Protein A は2次元電気泳動及びマイクロアレイにおいても、同様の変動を示しており、LC/MS^{E}による測定においても、一致する結果が得られた。

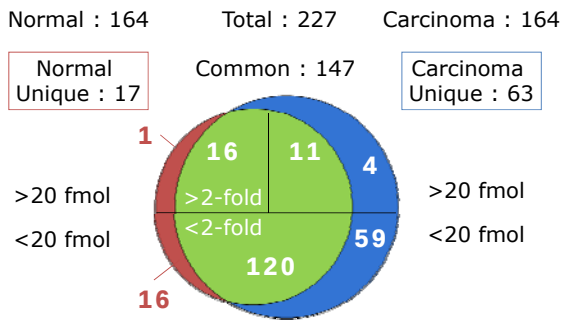

Figure 2. 正常粘膜上皮と扁平上皮癌における発現差異解析結果
Normal(No.1, 4, 11), carcinoma(No.3, 5, 10, 12)

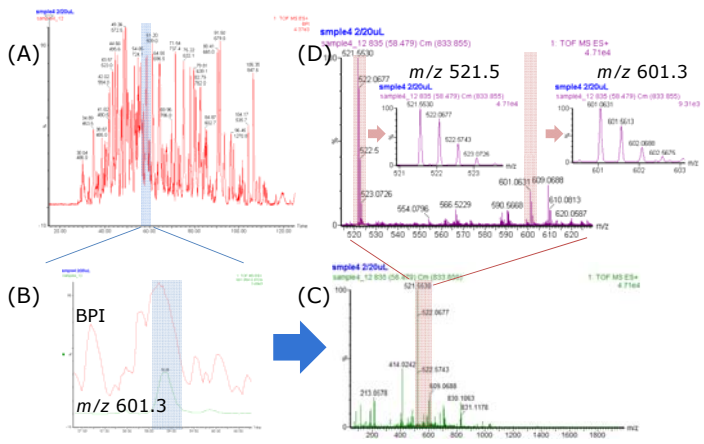

Figure 3. (A)No.4のBPI, (B)57-61minのBPI及びProtein A, QSVEADINGLR(m/z 601.3)のマスクロマトグラム, (C) QSVEADINGLRのMSスペクトル, (D) QSVEADINGLRのMSスペクトル(m/z 510-630)

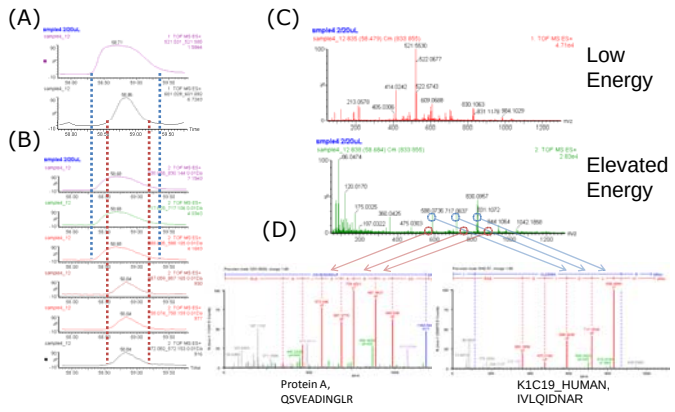

Figure 4. (A)Low energyスキャンにおけるm/z 601.3(Protein A, QSVEADINGLR)及び521.5(共溶出ペプチド)のマスクロマトグラム, (B)Elevated Energyスキャンにおけるフラグメントイオンのマスクロマトグラム, (C)Low及びElevated energyスキャンのスペクトル, (D)PLGSで同定に使われたMS^{E}スペクトル

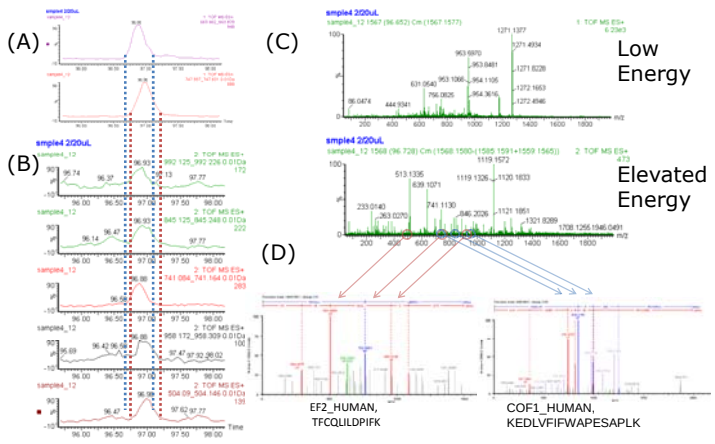

Figure 5. (A)Low energyスキャンにおけるm/z 747.9 (EF2_HUMAN, TFCQLILDPIFK)及び664.0 (共溶出ペプチド)のマスクロマトグラム, (B)Elevated Energyスキャンにおけるフラグメントイオンのマスクロマトグラム, (C)Low及びElevated energyスキャンのスペクトル, (D) PLGSで同定に使われたMS^{E}スペクトル

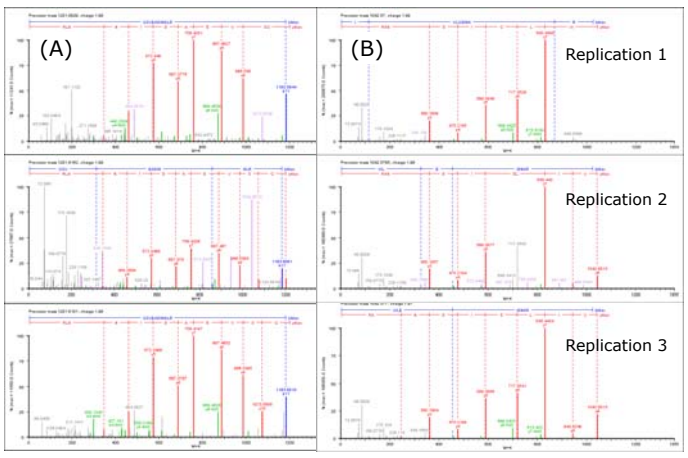

Figure 6. (A) 3回繰り返し測定において、PLGSによりProtein A, QSVEADINGLRの同定に用いられたMS^{E}スペクトル , (B)共溶出ペプチド(K1C19_HUMAN, IVLQIDNAR)のMS^{E}スペクトル

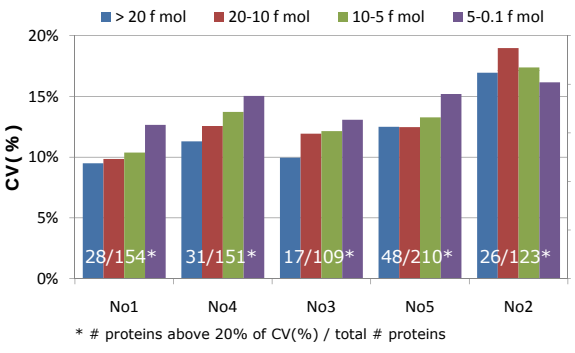

Figure 7. 3回繰り返し測定におけるタンパク質量定量の再現性
定量濃度により4つの分画に分けて平均値を示した。グラフ内部に、各試料における、cv(%)が20%以上のタンパク質数と全同定タンパク質数を示した。

Figure 3 及び 4 にProtein A に同定されたペプチドQSVEADINGLR と共溶出したペプチド(K1C19_HUMAN, IVLQIDNAR)のマスクロマトグラム、MSスペクトル及びMS^{E}スペクトルを示した。ピークの溶出プロファイルによって2つのペプチド由来のフラグメントイオンを識別し、同定を行っていることが示された。より絶対量が少なかった(10 fmol)のEF2_HUMANに同定されたペプチドTFCQLILDPIFKについても、同様に共溶出ペプチドと比較した(Figure 5)。また、Figure 6 に3回の繰り返し測定におけるMS^{E}スペクトル(QSVEADINGLR 及び IVLQIDNAR)を示した。保持時間によるフラグメントイオンの識別が、繰り返し測定においても、再現よく行われていることが示された。

Figure 7 に3回の繰り返し測定を行ったNo.1, 4, 3, 5 及び 2 について検出量ごとに4つに分類して、それぞれの検出量領域における個々のタンパク質量の定量値の変動係数の平均値を示した。検出量が低い領域では、再現性が低下する傾向がみられたが、どの領域においても変動係数の平均は20%以下だった。また、20%を超える変動を示したタンパク質は、全体の25%以下であり、タンパク質量の測定の再現性が高いことが示された。

[Conclusion]

We applied LC/MS^E methodology to the frozen human tissue that was validated using different system biology approach.

Protein A was down-regulated more than a few hundreds fold in carcinoma tissue and this result agreed rather well with previous study.

The average values of coefficient of variance for all identified proteins in each sample were less than 20%.

*Silva et al., Mol Cell. Proteomics. 5 (2006) 144-156