マウスおよびラットの器官におけるタンパク量の測定

이川瀬泰司 '、寺崎真樹 '、佐藤太 '、腹巻ゆかり '、Stapels Martha D.²、Langridge James I.ª、Piper Chelsea*、Zhou An* 日本ウォーターズ株式会社 '、Waters Corporation, Milford, MA²、Waters Corporation, Manchester, United Kingdom³、Legacy Research, Portland, OR³

rs

POSSIBLE." THE SCIENCE OF

OVERVIEW

目的: ラットおよびマウスの各器官におけるタンパク量の測定

方法: ラベルフリー LC/MS^E 測定による絶対定量

結果:各器官に特異的および共通するタンパクを同定し定量した

INTRODUCTION

異なる疾患状態におけるプロテオーム解析を行う前に、ベースとなる正常状態 におけるタンパク量の測定が必要である。これらの測定では、サンプルの前処理 によって生じる変動もあるが、異なる個体から生じる変動を知ることができる。 そこで我々は4匹のラットおよび3匹のマウスの5種類の器官(脳、心臓、 腎臓、肝臓、脾臓)におけるタンパク量を、強度の高い上位3個のペプチド におけるピーク面積値を内標と比較することにより算出した。I



Figure 1. ラットの肝臓から抽出した試料を測定した結果のクロマトグラム Four biological replicates are depicted.

METHODS

LC/MS Systems: 1D and 2D nanoACQUITY UPLC $^{\otimes}/$ SYNAPT $^{^{\bowtie}}$ HDMS

1D LC System:

Column: 75 μm x 15 cm BEH C₁₈ (1.7 μm) Gradient: 5-40% B for 90 min at 300 nL/min Eluent A: 0.1% formic acid in water Eluent B: 0.1% formic acid in acetonitrile

2D LC System: First Dimension:

Column: 300 µm x 5 cm XBridge[™] C₁₈ (5 µm) Gradient: discontinuous step gradient at 2 µL/min Eluent A: 20 mM ammonium formate pH 10.0 Eluent B: acetonitrile Online dilution flow rate: 20 µL/min aqueous

Second Dimension:

Column: 75 µm x 15 cm BEH C₁₈ (1.7 µm) Gradient: 5-40% B for 90 min at 300 nL/min Eluent A: 0.1% formic acid in water Eluent B: 0.1% formic acid in acetonitrile

Sample Preparation: Proteins extracted from rat organs using RapiGest surfactant. Bradford assay was used to measure protein concentration prior to reduction with dithiothreitol, alkylation with iodoacetamide, and in-solution digestion with trypsin. Yeast ADH (P00330) was added as an internal standard for absolute quantitation.

Online Dilution with RP/RP: To maximize sample recovery on the second dimension trap column from the organic-containing fractions, an aqueous flow was delivered with the 2^{nd} dimension pump, and mixed with the eluted fraction prior to trapping.

MS Data processing: All data was processed with ProteinLynx Global Server (PLGS 2.4) with Identity^E informatics², MS^E data from the individual 2D chromatograms were processed separately and then merged into one file prior to database searching. A rat or mouse database with an equal number of random sequences concatenated onto it was used for the searches to limit the false positive rate to 4%. Hierarchical clustering was performed in Spotfire.

RESULTS



Figure 2. ラット試料において同定された 1223 個のタンパク量を log fmol/µg で示したヒートマップ The colors corresponding to decreasing abundance are in the order of red, black, and green. Four biological replicates of each organ and four technical replicates of each digest were performed. Proteins had to be identified in at least three of four technical replicates of one organ type. Two random proteins replicated, for a false positive rate of 0.16% at the protein level.



Figure 3. マウス試料の予備分析において同定された 383 個のタンパク量を log fmol/ug で示したヒートマップ Three biological replicates of each organ were analyzed once.



Figure 6. ラット試料測定結果の階層的クラスタリング



Figure 7. ラット脳から抽出した試料を一次元目で5 フラクションに 分けて分析した二次元目のクロマトグラム



Figure 8. 1D および 2D クロマトグラフィによって同定されたタンパクの重なり Figure 6. 10 みな20 クロイドシンスによりに同定されたシンパウ重化 を示したペンダイアグラム 89% of the proteins identified by 1D were also found in the 2D analysis.



Figure 4. 肝臓におけるシトクロム P450 を示した ートマップの拡大図

Hemoglobin subunit alpha	Aspartate aminotransferase
Hemoglobin subunit beta	Phosphoglycerate kinase 1
Actin cytoplasmic	Zero beta globin
Glyceraldehyde 3 phosphate dh	Heat shock cognate 71 kDa protein
Serum albumin	Elongation factor 1 alpha 1
Hemoglobin subunit beta 2	Cofilin 1
Malate dehydrogenase	Tubulin alpha 3 chain
Actin cytoplasmic 2	Tubulin beta 2A chain
Malate dehydrogenase cytoplasmic	Peroxiredoxin 1
Alpha globin	Glutamate dehydrogenase 1
ATP synthase subunit beta	Electron transfer flavoprotein subunit alpha
Tubulin alpha 4A chain	Phosphatidylethanolamine binding protein 1
Actin alpha skeletal muscle	L lactate dehydrogenase A chain
Peptidyl prolyl cis trans isomerase A	Hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase
ATP synthase subunit alpha	Nucleoside diphosphate kinase B
Alpha enolase	Pyruvate kinase isozymes M1 M2
Calmodulin	Gamma enolase
L lactate dehydrogenase B chain	Tubulin beta 4
Tubulin alpha 1C chain	14 3 3 protein zeta delta
Isocitrate dehydrogenase NADP	Aldehyde dehydrogenase
Profilin 1	Peroxiredoxin 2
Fructose bisphosphate aldolase A	Cytochrome b c1 complex subunit 6
Superoxide dismutase Cu Zn	ADP ATP translocase 2
Beta glo	Phosphoglycerate mutase 1
and the second sec	Flasters transfer flavoretain solumit hats

Table 1. 全 5 器官で同定されたタンパクのトップ 50 を fmol/µg の降順で

示したリスト A total of 130 proteins were identified in all of the rat or-gans. Many of these common proteins are the house-keeping enzymes that are present in all tissues.



Figure 5. マウス器官の測定結果における階層的クラスタリング Despite the fact that only one technical replicate was performed, the data from the same organs clustered correctly.



CONCLUSIONS

ラットの器官から1220以上のタンパクが高い再現性で同定、定量された

・シトクロム P450 のような器官特異的なタンパクが多く同定され定量された

- ・ 全 5 器官において 130 個の共通するタンパクが検出された
- ・ 生物学的変動も含めたなンパク量を正確に測定することにより生物学的変化を提 えることが可能
- ・ 2D クロマトグラフィを用いることでより微量なタンパクを同定することが可能である

References

Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, G proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS a Li GZ, Vissers JP, Silva JC, Golick D, Gorens accounting of multiplexed precursor and pro analysis of simple and complex peptide mixt ers JP, Gi llel MS ac os SJ. Abso n. Mol Cell

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Keith Fadgen and Dr. Scott Geromanos for their assistance with this work.