[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Progenesis QI for Proteomics を用いたラベル化およびラベルフリープロテオミクスデータの解析

Lee Gethings, Gushinder Atwal, Martin Palmer, Chris Hughes, Hans Vissers, and James Langridge
Waters Corporation, Wilmslow, United Kingdom

アプリケーションのメリット

このアプリケーションノートでは、ラベル化およびラベルフリー定量ワークフローにおける Progenesis QI for proteomics の定性的および定量的機能を紹介します。DDA（data-dependent acquisition）および DIA（data-independent acquisition）を用いて取得されたデータは、採用した測定法には依存せず、一貫して高い精度の定量値が得られます。

ウォーターズのソリューション

Progenesis® QI for proteomics

SYNAPT® G2-Si

nanoACQUITY®

*Rapi*Gest™

NanoEase™ カラム

MassPREP™ Digest Standards（MPDS）

キーワード

HDMS^E、プロテオミクス、ラベルフリー定量、安定同位体標識定量

はじめに

LC-MS は、日常的に生物学的プロセスの特性解析や疾患状態を理解するために、また、複雑なプロテオームの定性的および定量的分析のために利用されます。巨大で複雑なデータセットを扱うプロテオミクス分析は解析と結果の解釈に多大な時間がかかります。その結果、効率的で正確なデータ圧縮プログラム、メニューガイド付きのワークフローによる直感的なソフトウェアインタフェース、サンプル数に制限のない柔軟な実験デザイン、正確さと精度が改善した一貫したピーク検出、信頼できる統計解析のための欠損値のない完全なデータ、分画したサンプルを分析する機能を含む改善されたデータ解析システムが要求されます。今回のアプリケーションノートでは Progenesis QI for proteomics によるソリューションの中心となるこれらの要求に対応する機能を安定同位体によるラベル化およびラベルフリープロテオミクスデータセットの同定と定量の両方においてご紹介します。

実験方法

サンプル

- bovine serum albumin (BSA)、alcohol dehydrogenase（ADH）、enolase および glycogen phosphorylase B のトリプシン消化標準品を添加したEscherichia coli (E. coli) タンパク質のトリプシン消化物
- ジメチル化ラベルを行った HL60 ヒト B 細胞のトリプシン消化物 (University of Leiden) lysate of Saccharomyces cerevisiae (yeast)
- Sigma-Aldrich UPS1 標準品 (25、2.5 および 0.125 fmol) を添加した Saccharomyces cerevisiae (yeast) 抽出物

実験条件

LC条件

LC システム： nanoACQUITY UPLC®

カラム： 5 µm Symmetry® C_{18}、180 µm×20 mm 2G トラップカラム、1.8 µm HSS T3 C_{18}、75 µm×150 mm NanoEase 分析カラム

カラム温度： 35℃

流速： 300 nL/min

移動相 A： 0.1% ギ酸水溶液

移動相 B： 0.1% ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント：3% - 40% B（90 分）

注入量： 1 µL

MS条件

MS システム： SYNAPT G2-S*i*

イオン化法： ESI (+)

キャピラリー電圧：3.2 kV

コーン電圧： 30V

スキャン範囲：50 – 2000 *m/z*（DDA および HDMS^E）

スキャン時間：0.2 s (DDA)、0.5 s（HDMS^E）

コリジョンエネルギー (HDMS^E)：5 eV (low energy)、19 – 45 eV (high energy)

コリジョンエネルギー (DDA)：*m/z*-dependent ramp

データ解析

Progenesis QI for proteomics v2.0（Nonlinear Dynamics, Newcastle Upon Tyne, UK）

ProteinLynx Global SERVER™ v3.0.2（Waters Corporation, Milford, MA）

ProteoLabels v1.0（University of Liverpool, UK）
Mascot v2.5（Matrix Science, London, UK）

Spotfire v9.1（Tibco, Palo Alto, CA）

結果および考察

図 1 に示すように、最初にピーク検出が行われます [1]。ピーク検出の精度を評価するために、E. coli 消化物の 6 回繰り返し LC-IM（イオンモビリティー）-DIA-MS データを比較し、28793 ± 458 ピークが検出されました。

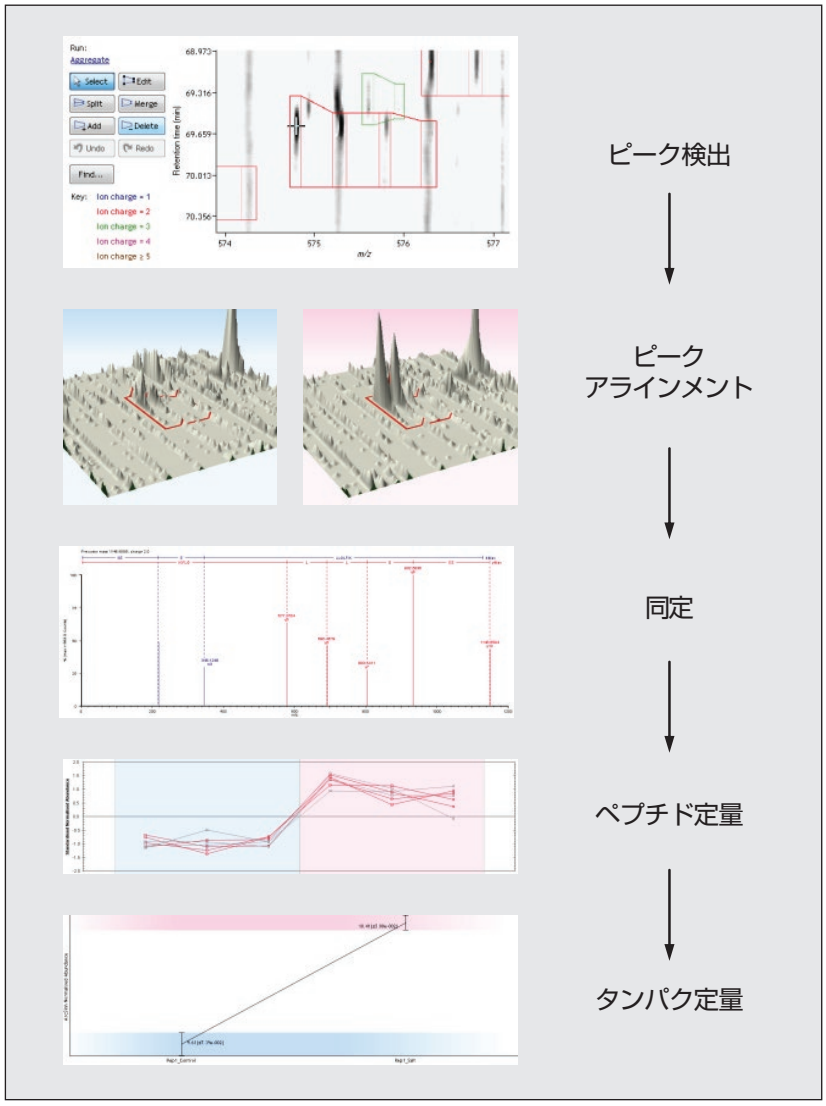

図 1. Progenesis QI for proteomics のワークフロー

図 2 の左図に示すようにデータの大部分は許容値 *m/z* ± 5 ppm、保持時間 ± 0.5 min、ドリフトタイム± 5% において、すべてのサンプルで同定されました。完全なデータセット中の存在量上位 95%を考慮しました。注入間およびサンプル間のピーク検出を改善するために、ピークアラインメントおよびピークの「一括検出（co-detection）」を行い、ひとかたまりのデータ（aggregate）を構築しました。このひとかたまりのデータ（aggregate）のピークの境界情報は個々のサンプルへと戻され、多変量解析を用いてより下流の分析を改善するための完全なデータを提供します。

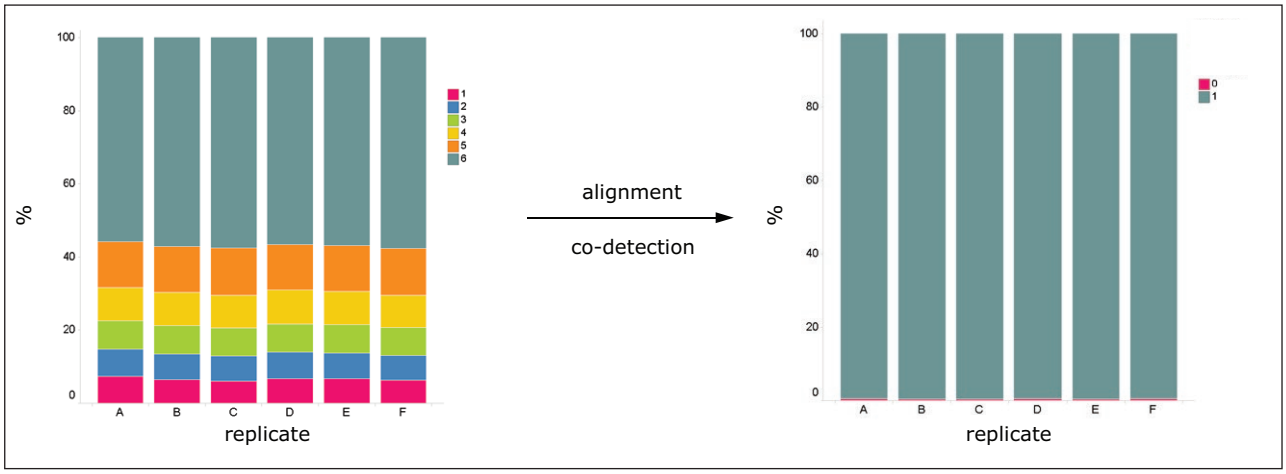

図 2 E. coli の 6 回繰り返し LC-IM-DIA-MS データにおいて他のサンプルで検出されたそれぞれのサンプルでのピークの割合（左）、ひとかたまりのデータ（aggregate）と一致したピークの割合（右）　薄い灰色は、すべての繰り返しデータで同定されたピークを表しています。

この原理と上述の 1 対 1 比較の時と同じ一致基準を適用すると、個別に検出されたピークの圧倒的多数はひとかたまりのデータ（aggregate）で同定されました（図 2 右）。個別に解析した場合では、図 2 左のグラフの薄い灰色で示されたピークのおよそ 55%をすべてのデータで検出することができました。対照的に図 2 右のグラフに示すように、ピークのほぼ 100%が、ひとかたまりのデータ（aggregate）で同定されました。「一括検出（co-detection）」されたピークの 98.3% で平均値の増加がみられました。

BSA、ADH、enolase および glycogen phosphorylase B を添加した E. coli サンプルを LC-IM-DIA-MS で 3 回繰り返し分析しました。図 3 には、内部標準として ADH を用いた定量解析結果の一部を示しています。添加されたすべてのタンパクは、サンプルに記載された比率で定量されました。

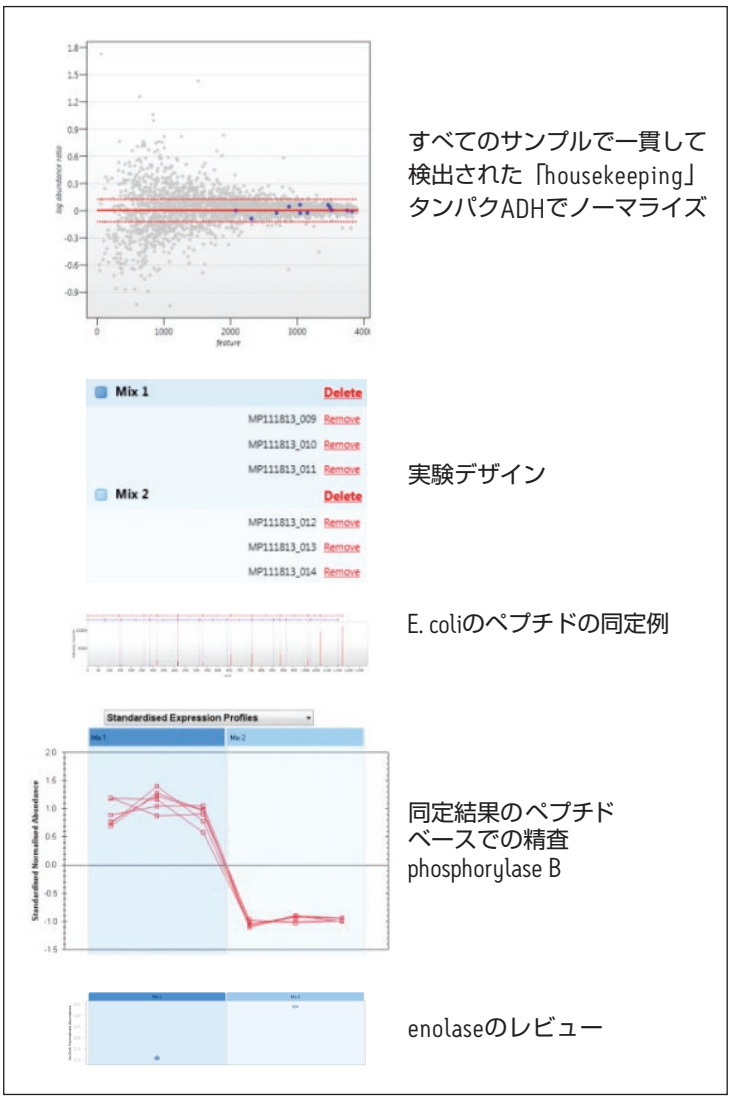

図 3. ラベルフリー LC-IM-DIA-MS のワークフローおよび定量結果

SILAC やジメチルラベル化のような安定同位体標識を用いた定量ワークフローにおいては、ペプチドのペアの保持時間やイオンモビリティーのドリフトタイムが近接することが予想されます。ヒト細胞株サンプルのジメチルラベル化されたペプチドのペアの検出の結果を図 4 に示しました。(a) はマススペクトルの詳細、(b) は部分的に分離されているペアを赤で強調表示したクロマトグラフィー分離、(c) はイオンモビリティー分離です。ジメチルラベル化ペプチドで予想されるように、クロマトグラフの頂点は分離していますが、衝突断面積とドリフトタイムは非常に近接しています。ペプチド定量とタンパク定量は ProteoLabels を用いて行いました。

図 5 は (a) ジメチルペアの同定結果を表示した *m/z* 対保持時間の等高線図、(b) 3 回繰り返しの分布プロットの重ね描き、(c) 繰り返し実験の精度を強調した存在比グラフの 3 つの ProteoLabels の図です。タンパクベースの定量結果の要約を、定量可能なペプチドの数をスポットサイズで表した p 値対量比 (log2 変換) のスチューデントの t 検定で右に示しました。

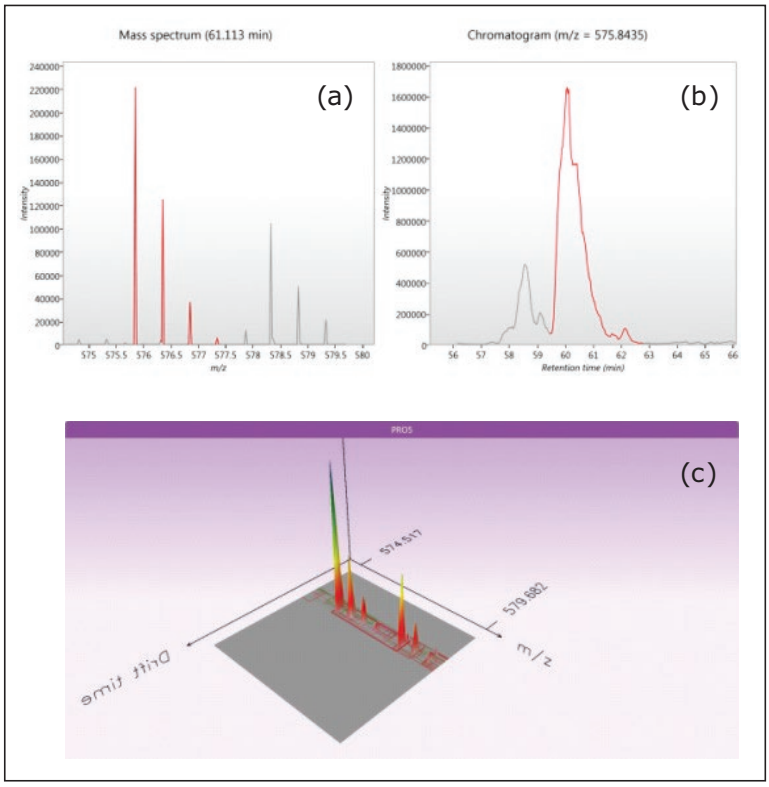

図 4. ジメチル化ペプチドペアの検出結果
(a) マススペクトルの詳細
(b) 部分的に分離されたペアを示したクロマトグラフィー分離
(c) ペプチドペアのイオンモビリティー分離

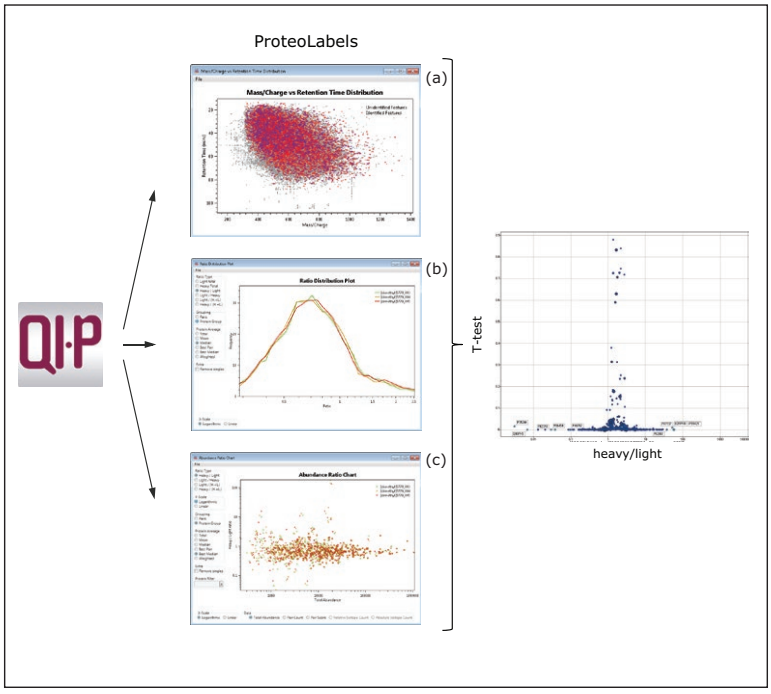

図 5. Progenesis QI for proteomics (QI.P) で「co-detection」とペプチド同定を行い、ジメチルラベル化したペプチドとタンパクの LC-IM-DIA-MS データ解析
(中図 a, b, c) Proteolabels ペア解析
(右図) 定量結果

Progenesis QI for proteomics は DDA データのラベルフリー定量も実行可能です。図 6 は yeast のトリプシン消化物にオンカラムで UPS1（SYUG_HUMAN）をそれぞれ 25 fmol, 2.5 fmol および 0.125 fmol 添加し、DDA で測定を行ったデータのピーク検出とラベルフリー定量の結果です。ペプチドおよびタンパクの分布プロファイルを有する同位体クラスタが示されました。図 6（a）は 1 つのペプチドプリカーサーのピーク検出結果を 3 回繰り返し測定したサンプル平均値で示しています。（b）は SYUG_HUMAN に同定されたすべてのペプチドの強度分布プロファイルを示し、（c）は分散を含むタンパクベースの定量結果の要約を示しています。

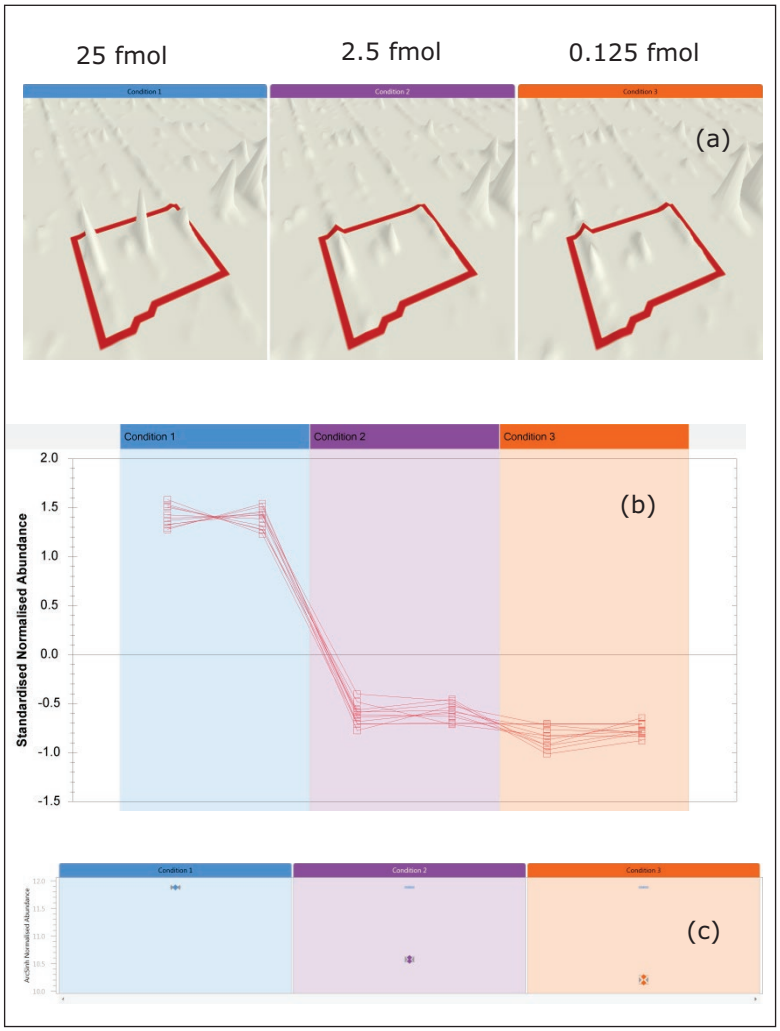

図 6. UPS1 standard Gamma-synuclein（SYUG_HUMAN）の DDA データのラベルフリー定量解析 3 サンプルにわたる（a）ピーク検出、（b）ペプチド定量、（c）タンパク定量結果

結論

Progenesis QI for proteomics は DDA あるいは DIA モードでのラベル化およびラベルフリーでのデータ取得を含む、数多くの「ボトムアップ」プロテオミクスアプリケーションに適応できます。さらに一貫性のあるピーク検出およびひとかたまりのデータ（aggregate）の形成が、改善された差異解析および統計分析を可能にしました。最終的に、DIA と DDA 定量の正確さと精度が「一括検出（co-detection）」に基づいたラベルフリー定量的アプローチを使用することで大幅に改善されました。

謝辞

Dimethyl-labeled HL60 human B cells were kindly donated by Bobby Florea, Bio-organic Synthesis, Faculty of Science, Leiden Institute of Chemistry, the Netherlands.

ProteoLabels software was provided by Andrew Collins and Andy Jones from Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, United Kingdom.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、nanoACQUITY、UPLC、SYNAPT、Symmetry、Progenesis および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
*Rapi*Gest、NanoEase、MassPREP および ProteinLynx Global SERVER は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年5月 720005239JA PDF