

¹⁵N スピルリナを用いた哺乳類への安定同位体標識

Daniel B. McClatchy, Jeffrey Savas, and John R. Yates

定量質量分析は、生物学研究のための強力な道具になりました。定量質量分析には、一般的に、重い安定同位体（例えば ¹⁵N、¹⁸O または ¹³C）で標識したタンパク質を利用します。標識された「重い」ペプチドは、標識されていない「軽い」ペプチドと同じ化学的特性を持っているので液体クロマトカラムから質量分析計に同時に溶出します。質量分析計によって、それらは質量の違いによって簡単に識別できます。

それからアルゴリズムは、軽いペプチドと重いペプチドのイオンクロマトグラを抽出するために使用される。そして、それはペプチドの量を表します。

軽/重の比率は、相対的なタンパク質の量を推測するのに用いられます。

種々の非標識タンパク質サンプルと同じ標識タンパク質スタンダードを混ぜることにより相対的な量の変化を生物学的条件下で決定できます。

安定同位体は、試験管内か、生体内で、ペプチドに取り込まれます。

試験管内で特定のアミノ酸側鎖と反応する ITRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)のような多数の共有結合タグがあります。これらの試験管内での標識技術の潜在的な落とし穴はサンプル調製後に混ぜられる軽いサンプルと重いサンプルにあります。そして、重いサンプルはサンプル調製後、混ぜられて、定量分析において系統誤差を導入することになります。代わりに、代謝標識は、重い同位体を全てのプロテオームに取り込むために、細胞自身の翻訳機を使います。代謝標識は、軽いサンプルと重いサンプルをサンプル調製の前に混ぜることができます。代謝標識は生体系、例えば速く生長し栄養源を容易に操作できるバクテリア、酵母、哺乳類細胞培養でルーチンに実行できます。

病気の動物モデルを研究するために、Stable Isotope Labeling in Mammals (SILAM) は、包括的に ¹⁵N を全ての齧歯動物に導入するために開発されました。以下に、齧歯動物の標識プロセス、実験設計、データ解析と SILAM のアプリケーションについて議論します。

哺乳類組織の ¹⁵N 標識

CIL は ¹⁵N が 98%濃縮されたスピルリナ（藍藻植物）を含んでいる常用飼料でネズミとマウスの標識に成功しました。手短かに言うと、乾燥 ¹⁵N スピルリナは、澱粉、砂糖、重要なビタミンとその他の栄養分からなる非タンパク粉末と混ぜ合わせられます。この混合物は、生地を成型するために、水でこねられます。生地は、それから手で通常の齧歯目の飼料と同じサイズのペレットに成型されて、食品脱水機で乾燥します。SILAM による唯一の挑戦は、若干の組織が標識するのが難しく（<90%の ¹⁵N 濃縮度）、質量分析データの効率と正確な定量ができない結果に終わっています。窒素源はすべての組織のために同じであるが、アミノ酸前駆物質プールが違います。より遅いタンパク質転換率の組織（例えば脳と

筋肉) は、通常のアミノ酸前駆物質プールで釣り合うために ^{15}N 標識アミノ酸で長くかかります。まず最初に、実験は ^{15}N スピルリナと非タンパク質粉末を 1:3(wt/wt) を使って実行されました。この研究において、離乳したネズミは、6 週間この飼料を与えられました。多くの組織は、高い濃縮率 (> 95%) であったが、遅いタンパク質転換率の組織は、低い濃縮率に終わりました。これらの組織について高い濃縮率を得るために、飼料は交尾、妊娠の間と子供の保育の間、離乳雌のネズミに与えられます。離乳後、子ネズミは出産後 45 日 (p45) まで、 ^{15}N 飼料を与えられます。この時点で、すべての組織は、 ^{15}N が高濃度になります。マウスはネズミより自分の子供を食べる傾向があるので、世代の標識化は避けなければなりません。 ^{15}N スピルリナを増やして 1:2 の比率にした飼料で、離乳後 10 週 (未発表のデータ) の間 ^{15}N 飼料を与えることによって、高い ^{15}N 濃縮度を実現できました。テストしていないが、10-週の標識時間による 1:2 の比率はラットに標識するのに十分である。ラットの世代標識実験のために、850g の ^{15}N Spirulina (CIL Cat # NLM-8401) が典型的な敷き藁のために必要です、そして、10 週マウス標識実験のために、100g の ^{15}N Spirulina (CIL Cat # NLM-8401) が 1 匹のマウスのために必要です。

これらの ^{15}N 標識プロトコルは、テストされたすべての組織で少なくとも 95% の平均 ^{15}N 濃縮度になりました。 ^{15}N 組織の濃縮度は、アルゴリズム Census を使って消化されたペプチドの同位体分布から予測できます。

実験設計

SILAM 実験を設計するとき、 ^{15}N 組織が内部標準としてだけに使われることを思い出すことが重要です。2 つのサンプルを比較するために、 ^{15}N 組織は別々に 2 つのサンプルを混ぜ合わせます、それから、2 つの $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 混合物が分析されます。 ^{15}N 組織が内部標準としてだけ使われるので、この分析は ^{15}N (少しの有害な生物学的影響も観察されなかったが) のどんな潜在的な同位体効果による問題も除去し、実験で起こるかもしれない系統誤差を修正します。さらに、この実験設計で、 ^{15}N 内部標準は、非標識サンプルと同一である必要はありません。たとえば、内部標準として ^{15}N 標識肝臓を用いて肝臓と脳組織の核 phosphoproteome の違いを調べました (図 1)。

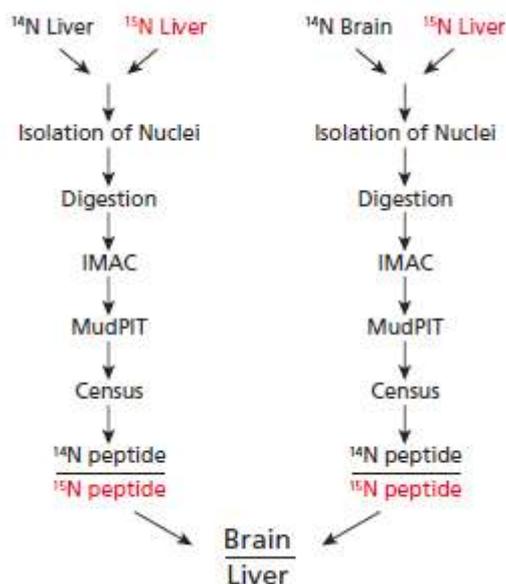


図 1

この研究において、 ^{15}N 標識肝臓ホモジネートは、別々に 1:1 に ^{14}N 肝臓と ^{14}N 脳ホモジネートを混ぜ合わせられました。細胞核は $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 混合物から分離され、そして、ペプチドまで消化されました。リンペプチドは鉄の金属アフィニティクロマトグラフィ (IMAC) を使用して濃縮されました、それから、結果として濃縮されたサンプルは Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) によって分析されました。標識されたペプチドと非標識ペプチドは SEQUEST (タンデム質量分析タンパク質の同一証明に使用するデータ解析プログラム) によって同定されました、そして、定量データは Census ソフトウェアを用いて計算されました。

データ解析

$^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 質量分析データは、アルゴリズム Census を使って定量することができます。前記の肝臓/脳研究からのリン酸化されたペプチド (NLAKPGVTSTpSDSEEDDDQEGEK) のための Census 出力の例は、図 2 に示されます。最初に、非標識ペプチドと標識ペプチドの両方の元素組成と対応する同位体分布が計算されます、そして、この情報はそれから、イオンクロマトグラムで抽出する ^{14}N と ^{15}N 前駆ペプチドの両方のために適当な m/z 範囲を決定するのに用いられます。このように、 ^{14}N または ^{15}N ペプチドの同定だけは、 $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 比率を出すのに必要です。Census はそれから、線形最小二乗相関関係を使用することによって抽出された $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ イオンクロマトグラムの各ペアのためにペプチドイオン強度比率を計算します。そして、それは ^{14}N と ^{15}N イオンクロマトグラムのデータ点の間のフィット (すなわち、相関係数 [r]) の近似と比率 (すなわち、線の傾斜) を計算するのに用いられる。

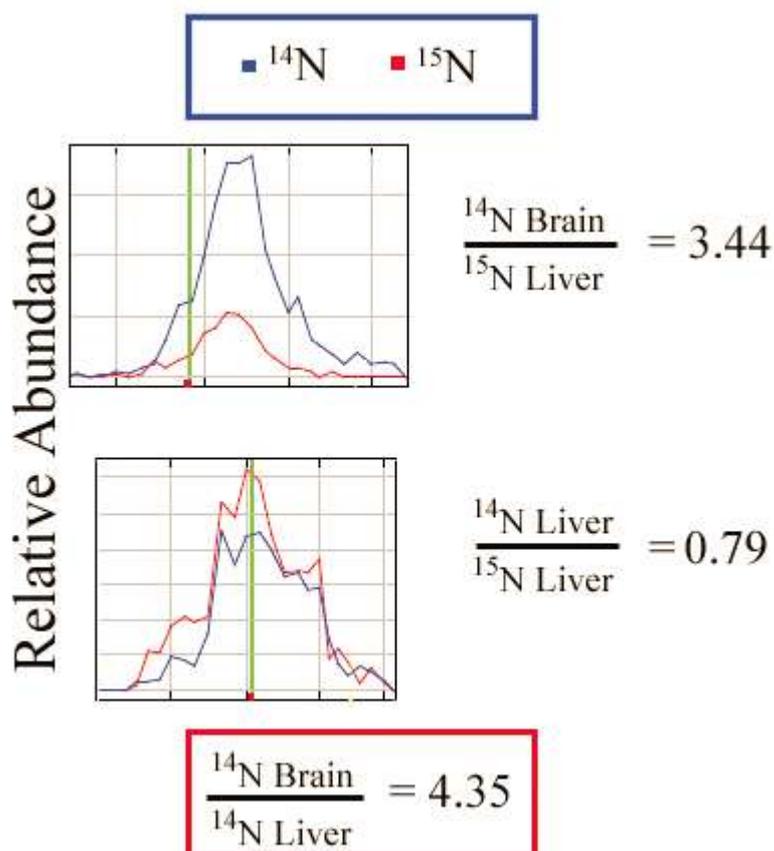


図 2

Census は、ユーザーが相関係数（0 と 1 の間の値）に基づくペプチド比率測定をフィルターに通すことができます。

それは、正確な定量のために相関係数値 0.5 を超えるペプチド比率だけを受け入れることが推奨されます。そのうえ、Census はオートメーション化した方法を Grubbs test を使って統計的な異常値を検出して除外するため自動的な方法を提供します。

生物学条件の間で $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 比率を比較する前に、データは標準化されなければなりません。 ^{14}N と ^{15}N 組織サンプルが 1:1 の比率に混ぜられるので、分析の範囲内のすべての $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ペプチド比率の中央値は 1 でなければなりません、そして、それが 1 にならないようであれば、偏差は人為ミス（例えばピペットで取るとき）によります。Census はデータを正常化するために中央値 $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 比率をシフトし修正することができます。

^{14}N と対応する ^{15}N ペプチドの違いが質量分析計のダイナミックレンジより大きいかもしれない、そして、この状況は singleton peptide と呼ばれます。

結果として、singleton peptide は低い r 値で減点されて、データセットから除外されます。

この制限を処理するために、Census は singleton peptide を検出するために、特定の線形判別分析を使います。

Census は、Institutional Software Transfer Agreement（詳細は、<http://fields.scripps.edu/census> を見てください）を通して、個々の使用と評価のために著者から入手可能です。

文献中での SILAM

1つの報告の中で、分離されたシナプスは4つの発達時点で定量された。この分析のために、¹⁴Nと¹⁵N脳組織ホモジネートは、シナプスの分離の前に混ぜられました。p45ネズミからの標識された脳組織は、p1,p10,p20,p45でネズミの標識されていない脳組織を定量するのに使用されました、標識されたサンプルと標識されていないサンプルが同一でないときでも、正確で効率的な定量をすることができる。この研究において、4つの発育時点での1138のタンパク質のタンパク質発現レベルが定量され、196のタンパク質変化が統計学的に有意であることが測定された。

観察された発達上の変化の50%以上が他のタンパク質定量技術を使用して以前に報告されました、そして、神経発生の潜在的新しい調節装置が同定された。

第2のレポートでは、phosphoproteomeは脳の発達の間、分離された神経核から定量された。再度、¹⁴N組織と¹⁵N組織が、細胞小器官の分離前に混ぜられました。リン酸化がリバーシブルで変化しやすい変形であるが、標識されたp45脳は異なる発育時点でのphosphoproteomeの定量に成功した。¹⁴N/¹⁵N混合物から、リンペプチドを濃縮するためにIMACを使って、それぞれ、705と1477のリンペプチドが、p1とp45脳から定量された。同じタンパク質の異なるリン酸化サイトが異なって調節できることが広く観察された。この研究において、メチル-CpG-結合タンパク質2 (MeCP2)のリン酸化サイトの異なった調節が発育中に観察された。MeCP2の機能突然変異の喪失はRett症候群（神経発生の障害）の原因になります、しかし、突然変異を表現型に繋いでいる細胞メカニズムは十分にわかっていません。その後の研究において、SILAMによって同定されたMeCP2のリン酸化サイトの異なる調節は、MeCP2による転写の調節に必須であることが証明されました。

関連する製品

NLM-8401	スピルリナ (U- ¹⁵ N, 98%)
MLK-LYS-C	マウス飼料標識キット (1kgのL-リジン ¹³ C 飼料/1kgの非標識飼料)
CLM-2247-H	L-リジン : 2HCL (U- ¹³ C ₆ , 99%)
CNLM-291-H	L-リジン : 2HCL (U- ¹³ C ₆ , 99%; ¹⁵ N ₂ , 99%)
CM-2265-H	L-アルギニン : HCL (U- ¹³ C ₆ , 99%)
CNLM-539-H	L-アルギニン : HCL (U- ¹³ C ₆ , 99%; ¹⁵ N ₄ , 99%)
CLM-2262-H	L-ロイシン (U- ¹³ C ₆ , 99%)
CNLM-281-H	L-ロイシン (U- ¹³ C ₆ ,99%; ¹⁵ N, 99%)
CLM-2248-H	L-イソロイシン (U- ¹³ C ₆ , 99%)

CNLM-561-H L-イソロイシン (U-¹³C₆, 99%;¹⁵N, 99%)

参考

1. Shadforth, I.P., et al., i-Tracker: for quantitative proteomics using iTRAQ. BMC Genomics, **2005**. 6: p. 145.
2. Wu, C.C., et al., Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis. Anal Chem, **2004**. 76(17): p. 4951-9.
3. McClatchy, D.B. and J.R.I. Yates, Stable Isotope Labeling of Mammals (SILAM). CSH Protocols, **2008**.
4. McNurlan, M.A., V.M. Pain, and P.J. Garlick, Conditions that alter rates of tissue protein synthesis *in vivo*. Biochem Soc Trans, **1980**. 8(3): p. 283-5.
5. McClatchy, D.B., et al., ¹⁵N metabolic labeling of mammalian tissue with slow protein turnover. J Proteome Res, **2007**. 6(5): p. 2005-10.
6. MacCoss, M.J., et al., Measurement of the isotope enrichment of stable isotope-labeled proteins using high-resolution mass spectra of peptides. Anal Chem, **2005**. 77(23): p. 7646-53.
7. Park, S.K., et al., A quantitative analysis software tool for mass spectrometry-based proteomics. Nat Methods, **2008**.
8. Ficarro, S.B., et al., Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. Nat Biotechnol, **2002**. 20(3): p. 301-5.
9. Washburn, M.P., D. Wolters, and J.R. Yates, 3rd, Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nat Biotechnol, **2001**. 19(3): p. 242-7.
10. Eng, J., A.L. McCormack, and J.R. Yates, 3rd, An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. J. Am. Soc. Mass Spectrom., **1994**. 5: p. 976-989.
11. Ting, L., et al., Normalization and statistical analysis of quantitative proteomics data generated by metabolic labeling. Mol Cell Proteomics, **2009**. 8(10): p. 2227-42.
12. McClatchy, D.B., et al., Quantification of the synaptosomal proteome of the rat cerebellum during post-natal development. Genome Res, **2007**. 17(9): p. 1378-88.
13. Liao, L., et al., Quantitative analysis of brain nuclear phosphoproteins identifies developmentally regulated phosphorylation events. J Proteome

Res, **2008**. 7(11): p. 4743-55.

14. Amir, R.E., et al., Rett syndrome is caused by mutations in X-linked **MECP2**, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet, **1999**. 23(2): p. 185-8.

15. Tao, J., et al., Phosphorylation of **MeCP2** at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function. Proc Natl Acad Sci USA, **2009**. 106(12): p. 4882-7.

Cambridge Isotope