

## 最終報告書

## iMPAQQT 法による代謝酵素一斉分析

(PRD\_〇〇〇〇\_iMPAQQT\_0001)

九州プロサーチ有限責任事業組合

〇〇〇〇年〇月〇日

## 委受託内容

試験表題	iMPAQQT 法による代謝酵素一斉分析	
試験番号	PRD_〇〇〇〇_iMPAQQT_0001	
試験目的	本試験は提供された培養細胞に含まれる約300種類の主要代謝酵素を、質量分析計を用いて定量分析することを目的とする。	
試験委託者	名称	〇〇〇〇
	所在地	〇〇〇〇
	担当者	〇〇〇〇   〇〇〇〇
試験受託者	名称	九州プロサーチ有限責任事業組合
	所在地	福岡県福岡市西区九大新町4番地1
	試験責任者	〇〇 〇〇   〇〇〇〇 開発部
	試験担当者	〇〇 〇〇   iMPAQQT 分析 G
	連絡先	福岡県福岡市西区九大新町4番地1 TEL: 092-805-3239   FAX: e-mail:〇〇〇〇
日程	分析サンプル受領日	〇〇〇〇年〇月〇日
	最終報告書作成日	〇〇〇〇年〇月〇日

## 試験委託者へ提出する資料

最終報告書(日本語)	写し 1 部
質量分析測定 Raw データ	
質量分析 method ファイル	
各酵素定量値を入力した Excel ファイル	CD-R 1 枚
ヒートマップ・クラスタリング解析 PDF ファイル	

## 資料保存

保存対象	・最終報告書(日本語)(原本) ・質量分析methodファイル ・質量分析Rawデータ ・各酵素定量値を入力したExcelファイル ・ヒートマップ・クラスタリング解析PDFファイル
保存予定期間	試験終了日(測定報告書提出日)から 1 年間
保存場所	九州プロサーチ有限責任事業組合

## 試験責任者の署名

試験番号	PRD_〇〇〇〇_iMPAQT_0001
試験担当者	(日付) 年 月 日
	(署名)
	九州プロサーチ有限責任事業組合 研究開発部 ○○ ○○
試験責任者	(日付) 年 月 日
	(署名)
	九州プロサーチ有限責任事業組合 研究開発部 ○○ ○○

## 目次

1. 材料及び分析方法 .....	4
1-1. 測定サンプルおよび測定対象項目 .....	4
1-2. 内部標準物質 .....	4
1-3. 試薬類 .....	4
1-3-1. 購入試薬 .....	4
1-3-2. 調製試薬 .....	5
1-4. 主な使用機器 .....	6
1-5. 前処理 .....	6
1-6. 装置性能確認 .....	7
1-6-1. 質量分析装置感度および液体クロマトグラフ性能の確認 .....	7
1-7. 分析条件 .....	7
1-7-1. LC 条件 .....	7
1-7-2. 質量分析計条件 .....	7
1-8. サンプル測定 .....	8
1-8-1. サンプル名について .....	8
1-8-2. サンプル測定順序 .....	8
1-9. データ解析 .....	9
1-10. CD-Rへのデータ保存 .....	9
2. 試験結果 .....	10
2-1. 細胞ライセート溶液中粗タンパク質濃度 .....	10
2-2. 検出タンパク質と各代謝酵素定量結果 .....	10
2-3. ヒートマップとクラスター解析 .....	10
2-4. 主な変動酵素 .....	10
3. 結論 .....	13
4. 参考資料 .....	13
別紙1 測定代謝酵素一覧(342種) .....	14
別紙2 各代謝酵素定量測定結果 .....	20
別紙3 ヒートマップとクラスター解析結果 .....	25

## 1. 材料及び分析方法

### 1-1. 測定サンプルおよび測定対象項目

測定サンプル: 培養細胞の凍結ペレット6サンプル

測定対象項目: 別紙1に示す代謝酵素群342種

### 1-2. 内部標準物質

合成ペプチドに還元アルキル化処理および mTRAQ ラベル(△4)を施したもの  
(合成ペプチドは○○社より購入)

### 1-3. 試薬類

#### 1-3-1. 購入試薬

名称	グレード	製造元	保存条件
アセトン	LC/MS	SIGMA-ALDRICH	室温
○○○	○○○	○○○	○○○
○○○	○○○	○○○	○○○
○○○	○○○	○○○	○○○
○○○	○○○	○○○	○○○

### 1-3-2. 調製試薬

名称	調製方法	保存条件	使用期限
Tris-HCl (1.5M, pH 8.8)	Tris aminomethane 181.7g を 800mL の水で溶解後、6N HCl および 1N HCl にて pH8.8 に合わせ、1000mL にメスアップ	室温	調製後 3箇月
○○○	○○○	○○○	○○○
○○○	○○○	○○○	○○○
○○○	○○○	○○○	○○○
○○○	○○○	○○○	○○○





## 2. 試験結果

### 2-1. 細胞ライセート溶液中粗タンパク質濃度

細胞ライセート溶液中の粗タンパク質濃度を BCA アッセイにて定量した結果を以下に示す。

細胞ライセート溶液中粗タンパク質濃度

No.	Sample 名称	細胞ライセート溶液量(μL)	粗タンパク質濃度(μg/μL)
1	Sample01	600	2.4
2	Sample02	600	2.6
3	Sample03	600	2.9
4	Sample04	600	1.2
5	Sample05	600	1.6
6	Sample06	600	1.2

上記濃度表を元に粗タンパク質 200 μg 分を分注し、以降の前処理に使用した。

### 2-2. 検出タンパク質と各代謝酵素定量結果

iMPAQT 法による代謝酵素定量結果を別紙2に示した。

(各酵素の参考配列や機能情報などについては CD-R に記録した Excel ファイルを参照。)

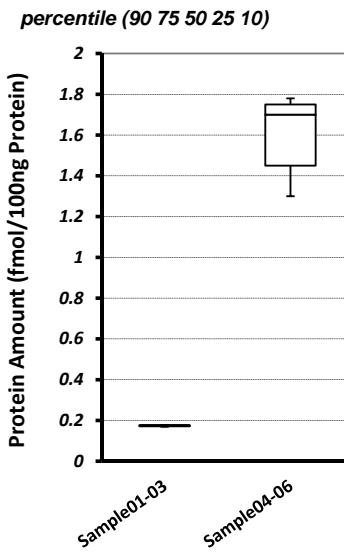
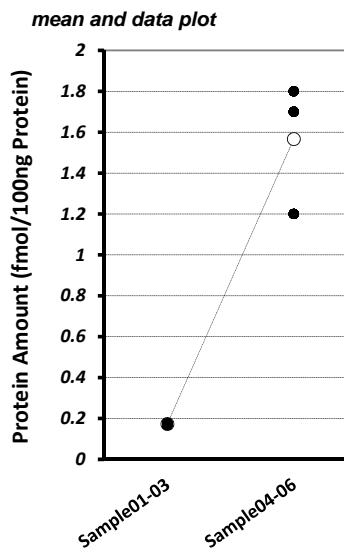
### 2-3. ヒートマップとクラスター解析

2-2での定量値を元にクラスタリング解析およびヒートマップ作成を実施した結果を別紙3に示した。

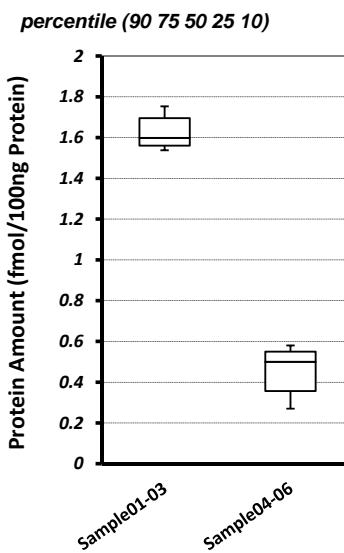
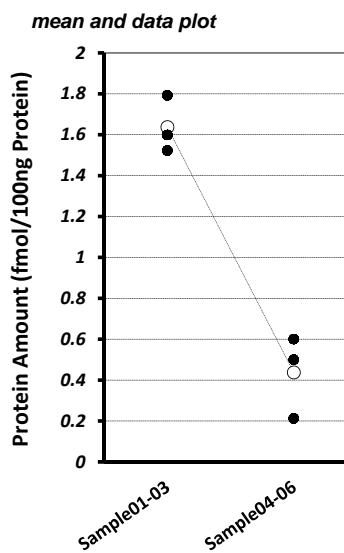
### 2-4. 主な変動酵素

2-2の定量結果から二群間で5倍以上の変化があった酵素についてその変動情報を以下にまとめた。

### 【代謝酵素1】



### 【代謝酵素2】









No.	RefSeq	Genelid	Description	Symbol
241	NP_006431	10587	thioredoxin reductase 2	TXNRD2
242	NP_002480	4697	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa	NDUFA4
243	NP_001013454;NP_0011239	4357	mercaptopyruvate sulfurtransferase	MPST
244	NP_004028;NP_631895;NP_	271	adenosine monophosphate deaminase 2	AMPD2
245	NP_005902	4144	methionine adenosyltransferase II, alpha	MAT2A
246	NP_056511	2882	glutathione peroxidase 7	GPX7
247	NP_001164409;NP_0011644	51477	inositol-3-phosphate synthase 1	ISYNA1
248	NP_001087240;NP_003321;	7296	thioredoxin reductase 1	TXNRD1
249	NP_002517	4907	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	NTSE
250	NP_001003785;NP_006347	10476	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial Fo complex, subunit d	ATPSH
251	NP_001896	1503	CTP synthase	CTPS
252	NP_004083	1892	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	ECHS1
253	NP_060760	55276	phosphoglucomutase 2	PGM2
254	NP_005882	39	acetyl-CoA acetyltransferase 2	ACAT2
255	NP_00129612;NP_057392	51727	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1, cytosolic	CMPK1
256	NP_06286	7407	valyl-tRNA synthetase	VARS
257	NP_002694	5471	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	PPAT
258	NP_056155	23395	leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	LARS2
259	NP_000282	5230	phosphoglycerate kinase 1	PGK1
260	NP_000293	5351	procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1
261	NP_001159631;NP_004541	4720	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme	NDUFS2
262	NP_002667	5372	phosphomannomutase 1	PMM1
263	NP_000226;NP_001121077	3988	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase	LIPA
264	NP_000007;NP_00120800	34	acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	ACADM
265	NP_056348	26007	dihydroxyacetone kinase 2 homolog (S. cerevisiae)	DAK
266	NP_000782	1719	dihydrofolate reductase	DHFR
267	NP_001924	1743	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate	DLST
268	NP_001152980;NP_002216	3712	isovaleryl-CoA dehydrogenase	IVD
269	NP_001157412;NP_002854	5836	phosphorylase, glycogen, liver	PYGL
270	NP_055577	1718	24-dehydrocholesterol reductase	DHCR24
271	NP_006076	10380	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1	BPNT1
272	NP_000246	4594	methylmalonyl CoA mutase	MUT
273	NP_004991	4698	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa	NDUFA5
274	NP_001852	1327	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	COX4I1
275	NP_002070	2805	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase	GOT1
276	NP_689953	11112	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	HIBADH
277	NP_000511	3073	hexosaminidase A (alpha polypeptide)	HEXA
278	NP_002618	5214	phosphofructokinase, platelet	PFKP
279	NP_003092	6646	sterol O-acyltransferase 1	SOAT1
280	NP_000128	2184	fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetate)	FAH
281	NP_004676	9107	myotubularin related protein 6	MTMR6
282	NP_056238	60496	aminoacidate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl	AASDHPP
283	NP_001093251;NP_0010932	2687	gamma-glutamyltransferase 5	GGT5
284	NP_037467;NP_995319	29926	GDP-mannose pyrophosphorylase A	GMPPA
285	NP_848934	137964	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 (lysophosphatidic acid	AGPAT6
286	NP_000471;NP_001020560;NP_001020561;NP_0011659	272	adenosine monophosphate deaminase 3	AMPD3
287	NP_006102	10449	acetyl-CoA acyltransferase 2	ACAA2
288	NP_001171070;NP_003839	8801	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit	SUCLG2
289	NP_004533	4696	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3, 9kDa	NDUFA3
290	NP_001034455;NP_0010344	529	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1	ATP6V1E1
291	NP_000467	203	adenylate kinase 1	AK1
292	NP_001171546;NP_0011715	440	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	ASNS
293	NP_006402;NP_116130	10554	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid	AGPAT1
294	NP_001164554;NP_060221:	55627	sphingomyelin phosphodiesterase 4, neutral membrane (neutral	SMPD4
295	NP_057038	51071	deoxyribose-phosphate aldolase (putative)	DERA
296	NP_001159482;NP_006108:	10455	peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase	PECI
297	NP_000373;NP_001026976	224	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	ALDH3A2
298	NP_079106	79888	lysophatidylcholine acyltransferase 1	LPCAT1
299	NP_612510	9524	trans-2,3-enoyl-CoA reductase	TECR
300	NP_004586	6611	spermine synthase	SMS

No.	RefSeq	Genelid	Description	Symbol
301	NP_004544	4726	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa (NADH-coenzyme	NDUFS6
302	NP_001616;NP_037543	204	adenylate kinase 2	AK2
303	NP_003249	7083	thymidine kinase 1, soluble	TK1
304	NP_004499	3422	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	IDI1
305	NP_000611	4842	nitric oxide synthase 1 (neuronal)	NOS1
306	NP_000149	2632	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	GBE1
307	NP_689540	122481	adenylate kinase 7	AK7
308	NP_001491	2762	GDP-mannose 4,6-dehydratase	GMDS
309	NP_001686	528	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C1	ATP6V1C1
310	NP_000145	2584	galactokinase 1	GALK1
311	NP_000886	4048	leukotriene A4 hydrolase	LTA4H
312	NP_00364	7372	uridine monophosphate synthetase	UMPS
313	NP_001171846;NP_002852	5833	phosphate cytidylyltransferase 2, ethanolamine	PCYT2
314	NP_004539	4716	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10, 22kDa	NDUFB10
315	NP_037462;NP_932076	29922	non-metastatic cells 7, protein expressed in (nucleoside-diphosphate	NME7
316	NP_000062;NP_001171479:	875	cystathione-beta-synthase	CBS
317	NP_000173	3030	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	HADHA
318	NP_000265;NP_001165285	4942	ornithine aminotransferase	OAT
319	NP_872270;NP_872271	5315	pyruvate kinase, muscle 1	PKM1
320	NP_000393;NP_001035810	2539	glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD
321	NP_000180	3099	hexokinase 2	HK2
322	NP_002645	5315	pyruvate kinase, muscle 2	PKM2
323	NP_064587	56954	nitrilase family, member 2	NIT2
324	NP_002071	2806	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate	GOT2
325	NP_006321	10434	lysophospholipase 1	LYPLA1
326	NP_003106	6675	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	UAP1
327	NP_000695	495	ATPase, H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> exchanging, alpha polypeptide	ATP4A
328	NP_004879	9550	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1	ATP6V1G1
329	NP_066951	5441	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6kDa	POLR2L
330	NP_066952	5464	pyrophosphatase (inorganic) 1	PPA1
331	NP_000389;NP_001123291;NP_001165131;NP_0011651	1727	cytochrome b5 reductase 3	CYB5R3
332	NP_059139	54107	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	POLE3
333	NP_003357	7385	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	UQCR2
334	NP_000938	5558	primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)	PRIM2
335	NP_001007100;NP_0010071	6342	sterol carrier protein 2	SCP2
336	NP_066977;NP_478059	29968	phosphoserine aminotransferase 1	PSAT1
337	NP_001177809;NP_112484	81888	hydroxypyruvate isomerase (putative)	HYI
338	NP_004535	4705	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa	NDUFA10
339	NP_002188	48	aconitase 1, soluble	ACO1
340	NP_073624	64802	nicotinamide nucleotide adenyllyltransferase 1	NMNAT1
341	NP_068809	5435	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	POLR2F
342	NP_000311	5860	quinoid dihydropyridine reductase	QDPR





No.	Description	Symbol	Protein Amount (fmol/100ng total Protein)					
			Sample01	Sample02	Sample03	Sample04	Sample05	Sample06
321 hexokinase 2		HK2	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
322 pyruvate kinase, muscle 2		PKM2	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
323 nitrilase family, member 2		NIT2	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
324 glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase) GOT2		GOT2	0.200	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
325 lysophospholipase I		LYPLA1	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
326 UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1		UAP1	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
327 ATPase, H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> exchanging, alpha polypeptide		ATP4A	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
328 ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1		ATP6V1G1	0.200	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
329 polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L, 7.6kDa		POLR2L	0.300	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
330 pyrophosphatase (inorganic) 1		PPA1	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
331 cytochrome b5 reductase 3		CYB5R3	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
332 polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)		POLR3	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
333 ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II		UCRC2	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
334 primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)		PRIM2	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
335 sterol carrier protein 2		SCP2	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
336 phosphoserine aminotransferase 1		PSAT1	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
337 hydroxypyruvate isomerase (putative)		HYI	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
338 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa		NDUFA10	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
339 aconitase 1, soluble		ACO1	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
340 nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1		NMNAT1	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
341 polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F		POLR2F	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
342 quinoid dihydropyridine reductase		QDR	0.100	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050

## 別紙3 ヒートマップとクラスター解析結果

(ヒートマップ例です。サンプル数や検出タンパク質などにより内容は異なります。参考としてお考え下さい。)

