

プロテオミクス実験法及び実習に参加して

加藤 玲 大

Reo KATO

数理情報学専攻修士課程 1年

1. はじめに

私は、2015年9月4日から9月6日まで広島大学でおこなわれた、広島大学明治大学単位互換プログラム「プロテオミクス実験法・実習」に参加した。

この講義には、広島大学、明治大学、龍谷大学の大学院生から16名の学生が参加し、プロテオミクス研究において主要な解析方法になりつつあるタンパク質の質量分析とX線結晶構造解析について、最新機器を用いた実験法の講義を受け、実習を行った。

2. プロテオミクス実験内容

2.1 ゲルの切り出しと洗浄

OHPシートの上に蒸留水をたらし、その上に青色に着色されたタンパク質を含んだゲルをのせ、アルコールで消毒したカッターで切り出す。その際、後々ゲルを洗浄するときうまく洗浄できるように細かく切る必要がある。切り出したゲルをピンセットでマイクロチューブに移し、その中に50%アセトニトリル100 μl を加え、5分間よく攪拌した後、溶媒を取り除く。攪拌と溶媒を取り除く作業を、ゲルの色が消えるまで繰り返す。

2.2 脱水によるゲルの縮小

ゲルの入ったマイクロチューブ内に100%アセトニトリル100 μl を加え、5分間よく攪拌する。その後溶媒を取り除く。マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ、穴をあける。その後、ゲルをデジケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。脱水することによってゲルが収縮される。タンパク質は織

維状になっているので、減圧乾燥をさせることによって糸のようになっているタンパク質の先端を見つけ出すことができる。

2.3 還元・アルキル化

マイクロチューブに10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 を加え、ヒートブロックを用いて1時間56°Cでインキュベートする。その後、室温に戻し、溶媒を取り除く。そして、55 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 25 mM NH_4HCO_3 を加え、45分間室温で攪拌し、溶媒を取り除く。

2.4 DTT と $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ の除去

先ほど加えた DTT と $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ を取り除くために、25 mM NH_4HCO_3 100 μl 加え、5分間攪拌し溶媒を取り除くという作業を2回繰り返す。

2.5 脱水によるゲルの収縮

ここでも、脱水によるゲルの収縮をおこなっていく。2.2同様、100%アセトニトリル100 μl を加え、攪拌したあと10分間ほど静置し、溶媒を取り除く。そして、マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ、穴をあける。そのあと、デジケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。

2.6 消化

クーラーボックスの中に細かく砕いた氷を入れ、その中にマイクロチューブを突き刺して試料を冷却する。酸素溶液(25 mM NH_4HCO_3 12.5 ng/ μl トリプシン)をゲルが膨張する程度(通常5~10 μl)加える。10分間、氷上で放置する。ゲルが最小の大きさくらいに膨張しているか確認し、もし膨張が足りないのであれば、蒸留水を加える。最後にインキュベートを行う。

2.7 抽出

マイクロチューブに0.1% TFA、75%アセトニトリル20 μl を加える。(10分間攪拌、10分間静置)

この 0.5 μl を質量分析で測定する。

2.8 質量分析

今回の実験では MLADI-TOFMS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計) という装置を用いて質量分析を行った。MLADI-TOFMS にはリニアモードとリフレクターモードが存在し、どちらかのモードを選択し測定を行う。さらに、ペプチドを測定する際に用いるマトリックスを 4 種類の中から選ぶ。

これまでの作業で用意しておいた試料の上にマトリックスを載せ、レーザーを当てることでイオン化させる。それを分子の飛行時間から測る TOF (Time-Of-Flight) 法を用いて、試料を同定した。

3. 実験の結果と考察

私は MLADI-TOFMS でリフレクターモードを選択し、マトリックスは SA を用いて測定を行った。しかし、私の測定結果は望ましいものではなかった。その原因のひとつに選んだマトリックスが SA であったことである。ペプチドを測定する標準的なマトリックスである CHCA ではなく SA を用いたことにより、良い感度でピークが観測できず、タンパク質の同定に対して良い結果が得られなかった。

タンパク質の同定で良い結果が得られなかったため、CHCA を用いて観測した班の方々に 1 レーン分 (5 つのタンパク質) が何であったか教えていただいた。

今回同定した 5 つのタンパク質は

バンド 1 : Glycogen phosphorylase

バンド 2 : Serum albumin

バンド 3 : Ovalbumin

バンド 4 : Carbonic anhydrase

バンド 5 : 同定できなかった

であった。バンド 5 に対しては他の班も同定できていなかった。

バンド 1 の Glycogen phosphorylase (グリコーゲンホスホリラーゼ) はグリコーゲンを加リン酸分解してグルコース 1-リン酸にする反応を触媒する酵素である。

バンド 2 の Serum albumin (血清アルブミン) は血漿総タンパク質の約 6 割を占め、栄養、代謝物質の運搬、浸透圧の維持などの働きをする。

バンド 3 の Ovalbumin (オвалブミン) とは、卵アルブミンの大部分を占め、分子量 4 万 5000 のタンパク質である。

バンド 4 の Carbonic anhydrase (炭素脱水酵素) とは金属プロテイン酵素に属する酵素で二酸化炭素と水と炭酸水素イオンと水素イオンとに迅速に変換する酵素である。

4. おわりに

私はプロテオミクス実験法のような化学の講義を受ける機会がなく、今回の実習はとても有意義であった。実習に用いた器具はすべて、初めて目にするものばかりであったが、広島大学の院生方に使いかたを教えていただき、実習を無事終えることができた。私が専攻している数理情報学以外の分野に触れる良い経験になった。

今回の講義に参加するにあたって、ご協力して下さった龍谷大学、広島大学の先生方皆さまの深く感謝いたします。