

プロテオミクス実験法・同演習 について

高 下 直 登

Naoto KOGE

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日まで広島大学で行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・同実習」という講義に参加しました。この講義では、プロテオミクス研究においてタンパク質の質量分析とX線結晶構造分析について、最新機器を用いて実験を行いました。

2. 実験内容

2.1 実験概要

たんぱく質の大量発言と高度な分析装置によるデータの収集や解析のための基本技術を身に付け、生体高分子の構造・機能相関解析薬物の分子設計を行うための基礎を行う。また、本講義は他大学からの受講者も多いため協動的に学ぶことを目的としている。

2.2 ゲルの切り出し・洗浄

A4の用紙の上にOHPシートをのせ、OHPシートの上に蒸留水をたらし、その上にゲルを置く。そしてアルコールスプレーでカッターを洗い、ゲルを切り出す。切り出したゲルをマイクロチューブに移し、50%アセトニトリルを100 μ l加えて5分間よく攪拌し溶液を取り出す。これを、ゲルの色が消えるまで続ける。

2.3 脱水によるゲルの収縮

100%アセトニトリルを100 μ l加え、5分間よく攪拌し溶液を取り出す。マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ、パラフィルムに穴を開ける。(小さな穴で良い。)そして、マイクロチューブをデ

ジケータに入れ、真空ポンプで減圧圧縮乾燥する。

2.4 還元・アルキン化

10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 を100 μ l加え、ヒートブロックを用いて1時間56 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートし、そのあと常温に戻し溶液を取り出す。55 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 25 mM NH_4HCO_3 を加え、45分間よく攪拌し溶液を取り出す。

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

25 mM NH_4HCO_3 を100 μ l加え5分間よく攪拌し、溶液を取り除く。これを2回繰り返す。

2.6 脱水によるゲルの収縮

100%アセトニトリルを100 μ l加え、5分間よく攪拌する。そして、10分間静置した後溶液を取り出す。マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ、パラフィルムに穴を開ける。そして、マイクロチューブをデジケータに入れ、真空ポンプで減圧圧縮乾燥する。

2.7 消化

ゲルを入れたマイクロチューブを氷を入れたクーラーボックスで冷却する。冷却したら取り出し酵素溶液をゲルが膨潤する程度(通常5~10 μ l)加え、10分間放置する。もし、膨潤が足りなければ蒸留水を加える。

2.8 抽出

0.1% TFA, 75%アセトニトリルを20 μ l加え、10分間よく攪拌し10分間静置する。この0.5 μ lを質量分析で測定する。

2.9 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。この装置には、リニアモードとリフレクトロンモードがあり、

リニアモードは、イオン源から検出器まで直線的に飛行させる方法である。感度がよく、測定範囲が広く、分解能が低いという特徴を持つため、高分子の測定に適している。また、リフレクトロンモードは、直線的に飛行させた後、静電界ミラーを用いては反転させる方法である。分解能がよく、感度が低く、測定範囲が狭い（10 kDa 以下）という特徴があり、低分子の測定に適している。

今回の実験では、リフレクトロンモードを用いて質量分析した。理由としては、今回質量分析を行うたんぱく質は CHCA であり、CHCA は分解能が良く、感度が低いためリフレクトロンモードを用いてもたんぱく質が分解することなく質量分析を行うことができるためリフレクトロンモードを用いた。

3. 実験結果

Sequence Name

1. Glycogen phosphorylase, muscle from
OS = Bos tauros GN = PYGM PE = 1 SV = 3
PYGM_BOVIN
2. Uncharacterized protein YAE1
OS = Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508/S 288 c) GN = YAE 1 PE = 1 SV = 1
YAE 1_YEAST
3. Putative helicase MOV-10 OS = Homo sapiens
GN = MOV10 PE = 1 SV = 2 MOV10_HUMAN
4. Carbonic anhydrase 2 OS = Bos taurus
GN = CA2 PE = 1 SV = 3 CAH2_BOVIN
5. 同定不可

4. 実験考察

今回の測定で5つ中4番目の1つしかピークがうまく出て特定することができたが、それ以外の物はピークがうまく出ず特定することができなかった。

これは、50%のアセトニトリルを攪拌させるのがうまくいっていなかったのではないかと考える。また、収縮・消化する際にゲルの中心が少し白かったためその前の工程がうまくいってなかったと考える。5つめのゲルは測定の際にピーク値がうまくとれずうまく測定することができなかった。これは、測定の際にピーク値が高いところをうまく選ぶことができていないことが挙げられる。

5. おわりに

今回の単位互換で分析機械などなかなか見ることもし出来ない実験を経験することができました。精密機械を操作することもできとても良い経験になりました。

実験の際に、実験方法が書いてある用紙を見てもよく分からず困っていたら、同じ班の広島大学の方が分かりやすく説明してくれて実験を円滑に行うことができました。

質量分析をする際に、無数にある点からいくつか選んでデータとするのがとても難しく、慣れている人は一つの点を選んで数値を見るたびに、どの点のデータを取ったら良いのかを検討をつけて選ぶことができていました。

実験の結果は、5つ中1つしか上手く同定することができなくあまり良い結果を出すことができませんでした。班の中には、5つ中4つ良い結果を出すことができた班がありました。結果の違いはどこで生まれたのかを考えた際に、やはり機械を使って同定を行う前の工程でどれだけ同定するたんぱく質を抽出出来ているかが重要であるため、ここに差があったのかなと感じます。

今回の単位互換講義で、他大学の人と交流ができ、楽しく3日間を送ることができました。