

広島大学単位互換プログラム 「プロテオミクス実験法・同実習」 に参加して

仁 科 智 貴

Tomoki NISHINA

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6日まで広島大学で行われた単位互換プログラムである「プロテオミクス実験法・同実習」の講義に参加しました。

この講義は教育・研究活動の交流と連携の推進を目的として、広島大学、龍谷大学、明治大学の間で締結された大学交流に関する包括的協定に基づいた単位互換プログラムです。今回この講義には広島大学、龍谷大学、明治大学合わせて約20名の学生が参加しました。

2. 実験の概要

プロテオミクスとは、タンパク質の構造と機能を調べる研究のことです。タンパク質は生物にとってなくてはならないもので、タンパク質を調べることによって、新薬の開発などに役立ちます。また、タンパク質の多くは相互作用があり、新しくタンパク質が発見された際、そのタンパク質の機能の推測に役立つことがあります。

今回はプロテオミクスの研究手法のひとつである、「質量分析法」を使ってタンパク質の同定を行いました。質量分析法は分子の質量を測定することによって、その分子がどの分子であるかを同定することができる手法です。この手法を使って今回は5つのタンパク質の同定を行いました。

この講義では、生命科学の基盤である分子生物学の基礎を理解すること、生体高分子の持つ情報を引き出すために必要な知識や手段を習得すること、生命体を構成する生体高分子の構造が、その機能や情報とどのように関連するかを理解することを目標に

しています。

3. 実験の内容

3.1 ゲルの切り出し

A4の紙を敷いた上に、OHPシートをのせ、その上に蒸留水をたらしめます。そのたらした蒸留水の上にゲルをのせ、アルコールスプレーで洗ったカッターの刃でゲルを切り出します。

3.2 ゲルの洗浄

切り出したゲルスポットをピンセットでマイクロチューブに移します。そして、その中に50%アセトニトリル100 μl を加え、5分間よく攪拌します。そしてその後、溶媒を取り除き、また50%アセトニトリル100 μl 加え攪拌します。この動作をゲルの色が消えるまで繰り返します。

3.3 脱水によるゲルの収縮

100%アセトニトリル100 μl を加え、5分間よく攪拌します。その後、溶媒を取り除き、マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ、そこに穴を数か所あけます。そして、ゲルをデシケータに入れて、真空ポンプで減圧乾燥します。

3.4 還元・アルキル化

マイクロチューブに10mM DTT in 25mM NH_4HCO_3 を加え、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ます。その後、室温に戻し、溶媒を取り除きます。次に55mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 25mM NH_4HCO_3 を加え、45分間室温で攪拌し、その後、溶媒を取り除きます。

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

25mM NH_4HCO_3 を加え、5分間よく攪拌し、その後、溶媒を取り除きます。この動作を2回ほど繰り返します。

3.6 脱水によるゲルの収縮

100% アセトニトリルを 100 μl 加え攪拌し、その後 10 分間放置し、溶媒を取り除きます。マイクロチューブの上に、パラフィルムをかぶせ、数か所穴をあけます。そして、ゲルをデシケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥します。

3.7 消化

ゲルをクーラーボックス上の水で冷却をします。その後、酵素溶液 (25 mM NH_4HCO_3 , 12.5 ng/ μl トリプシン) をゲルが膨潤する程度 (通常は 5~10 μl) を加え、10 分間水の上で放置します。ここでもし膨潤が足りない場合は蒸留水を追加します。そしてインキュベートします。

3.8 抽出

0.1% TFA, 75% アセトニトリル 20 μl を加え、10 分間攪拌し、その後、10 分間静置します。そして、この 0.5 μl を質量分析で測定します。

今回は測定にあたり、CHCA をマトリックスとして使用しました。CHCA はペプチドを測定するのに標準的なマトリックスであり、よい感度でピークを見つけることができるのではないかと考えたからです。

板上に採取したものをのせ、分析装置に読み込ませ測定をします。ピークをいくつか見つけその数値を保存し、その後そのデータからタンパク質を同定します。

4. 実験結果

実験の結果、私は 5 つ中 4 つのタンパク質を同定

することができました。1 つ目のタンパク質は、Glycogen phosphorylase というタンパク質で、アロステリックな酵素として最初に発見されたことで有名です。

2 つ目のタンパク質は bovine serum albumin でした。このたんぱく質は血清中に約 60% 存在し、栄養や代謝物の運搬、浸透圧の維持などの働きをする人間にはなくてはならないタンパク質です。

3 つ目のタンパク質は ovalbumin でした。このタンパク質は卵白を構成する主要なタンパク質であり、タンパク質の 60~65% を占めているタンパク質です。

4 つ目のタンパク質は Carbonic anhydrase でした。これは二酸化炭素と水を迅速に炭酸水素イオンと水素イオンに変換することのできる酵素です。

5 つめのタンパク質は先に書いた通り同定できませんでした。質量分析をする際にピークをうまく見つけることができなかつたのが原因だと考えられます。

5. おわりに

今回の実験を終えて、普段の自分の研究とは違った分野の化学実験を行うことができたのはとても貴重な体験でした。初めて触る実験器具などもありましたが、同じ班の人たちが丁寧に使い方を教えてくださったりしたおかげで、無事に実験を終えることができました。今回の実験の指導をしていただいた泉俊輔先生、また、講義に参加するにあたって協力してくださった広島大学、龍谷大学の先生方皆さま、そして一緒に実験してくださった同じ班の皆様にも深く感謝いたします。