

## 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

八 木 美和枝

Minae YAGI

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日の期間に広島大学にて実施された「プロテオミクス実験法・同実習」の講義に参加しました。

龍谷大学は、明治大学と広島大学と大学間交流に関する包括協定を結んでおり、理工学研究科の学生は明治大学大学院及び広島大学大学院の科目を受講することができます。この講義には広島大学10名、明治大学1名そして龍谷大学6名の学生が参加しました。

### 2. 講義概要

蛋白質の大量発現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つけ、生体高分子の構造・機能相関解析や薬物の分子設計をおこなうための基礎を養うことを目的とした、講義になっています。

### 3. 実験の内容

ポストゲノムの時代に対応するためには、タンパク質のアミノ酸配列や立体構造を有効に活用することが必要となります。しかし、それらの情報がどのような実験で得られたかを体験して理解しておけば、より有効かつ実用的な活用が期待できます。この講義はそのような立場から、プロテオミクスの中心をなしている質量分析法とX線構造解析をとり上げてその実験法の講義と実験を行いました。

#### 【タンパク質の質量分析法による微量解析】

試料の調製、質量分析装置の原理、質量分析装置による測定、データ処理の方法と活用法

#### 【タンパク質のX線回折法による立体構造解析】

タンパク質試料の結晶化、X線回折装置の原理、X線回折装置によるデータ収集、データ処理と構造解析の基礎

#### 3.1 実験の手順

##### 【ゲルの切り出し】

A4の紙を敷いた上にOHPシートを乗せ、その上に蒸留水をたらしめます。ゲルを乗せ、ゲルをカッターで切り出す。

##### 【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、50%アセトニトル100 $\mu$ lを加え5分間よく攪拌して溶媒を取り除きます。この操作をゲルの色が消えるまで繰り返します。

##### 【脱水によるゲル収縮】

100%のアセトニトル100 $\mu$ lを加え5分間よく攪拌し、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、穴をあけてゲルをデシータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥させます。

##### 【還元・アルキル化】

10 mM DTT in 25 mM  $NH_4 HCO_3$  100 $\mu$ lを加えます。ヒートブックを用いて、1時間56 $^{\circ}C$ でインキュベートし室温に戻し溶媒を取り除きます。

5 mM  $I CH_2 CONH_2$  in 25 mM  $NH_4 HCO_3$  100 $\mu$ l (直前調製)を加え、45分間室温で攪拌し溶媒を取り除きます。

##### 【DTTと $I CH_2 CONH_2$ の除去】

25 mM  $NH_4 HCO_3$  100 $\mu$ lを加え、5分間よく攪拌し溶媒を取り除きます。この操作を2回繰り返します。

##### 【脱水によるゲルの収縮】

100%のアセトニトル100 $\mu$ lを加え、攪拌の後10分間静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、穴をあける。ゲルをデシータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥させます。

### 【消化】

クーラーボックス上の水で冷却し、酵素溶液（25 mM  $NH_4 HCO_3$ , 12.5 ng/ $\mu$ l トリプシン）をゲルが膨潤する程度（通常5~10  $\mu$ l）加え、氷上でさらに10分放置します。もし膨潤がたかなければ蒸留水を加え、インキュベートします。

### 【抽出】

0.1% TFA, 75% アセトニトリル 120  $\mu$ l を加えた後に 0.5  $\mu$ l を質量分析で測定します。

## 3.2 結果と考察

CHCA は、ペプチドを測定する標準的なマトリックスであり、再現性の高い測定が期待できると考え、良い感度でピークが観測でき、タンパク質の同定に対して良い結果が得られると判断しマトリックスを選択しました。

maildi tof mass にはリニアモードとリフレクターモードがあります。この実験では単に質量の測定を行うのではなく、タンパク質の同定をおこなうような精度の高い測定が必要となる場合、分解能や感度

の高い測定が行えるリフレクターモードの方が適切であると考えました。

その結果、1 レーン分（5つのタンパク質）は以下であることが分かりました。

バンド1：Glycogen phosphorylase

バンド2：Serum albumin

バンド3：Ovalbumin

バンド4：Calbionic anhydrase

バンド5：同定できなかった

## 4. おわりに

この講義を担当してくださった泉俊輔先生ならびに広島大学の学生の方々には、丁寧に説明をして頂きました。理工学部数理情報学専攻では、普段経験できない実験を行い実際に行うことができとてもよい刺激を受けることができました。

最後になりましたが今回の講義に参加するにあたって、ご協力して下さった広島大学、龍谷大学の先生方に深く感謝いたします。