

プロテオミクス実験法・同実習 に参加して

神山 蒼太

Sota KOYAMA

数理情報学専攻修士課程 1年

1. はじめに

平成28年9月1日から3日まで広島大学で行われた「プロテオミクス実験法・同実習」の講義に参加しました。この講義は広島大学、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単位互換プログラムで、今回は約20名の学生が参加しました。

プロテオミクスとはたんぱく質の構造を中心に、その機能や相互作用を解析する研究分野です。この授業ではプロテオミクスでよく使われる質量分析法といわれる分析手法について講義を受け実験を行いました。

2. 実験内容

実験は、与えられたゲルシートに含まれる4つのタンパク質サンプルが何かを質量分析法によって同定するというものです。

タンパク質を酵素により分解、結晶化させたのち、MALDI-TOF mass という装置にかけ、測定データをプロテインデータベースと照らし合わせることでタンパク質の同定を行いました。

3. 実験方法

3.1 ゲルの切り出し

A4の紙、OHPシートと順にのせ、そこに蒸留水を垂らします。その上にゲル（青色に染色されたタンパク質を含む）をのせ、アルコールで洗ったカッターの刃でゲルを切り出します。この際、切り出したゲルを細かく刻んでおくと、後の作業で溶媒との接触面積が増加し反応の速度を上げられます。

3.2 ゲルの洗浄

切り出したゲルをマイクロチューブ（ μl から ml 程度の試料を扱う小型試験管）に移します。次に、マイクロチューブのなかに50%アセトニトリル100 μl を加え5分間攪拌、その後、溶媒を取り除く、という作業をゲルの色が消えるまで行います。

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分間攪拌、その後、溶媒を取り除きます。マイクロチューブをパラフィン製のフィルム（パラフィルムという）で蓋をし、そこに小さな穴をあけます。次に、真空ポンプを使ってゲルを減圧乾燥します。

3.4 還元・アルキル化

分解酵素により効率的にペプチド鎖を切断するために、タンパク質を事前に還元・アルキル化しておく必要があります。

還元剤10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 100 μl を加え、1時間56°Cでインキュベート（温度を一定に保つこと）、その後、室温に戻し溶媒を取り除きます。アルキル化剤55 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 25 mM NH_4HCO_3 100 μl を加え、45分間室温で攪拌します。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

25 mM NH_4HCO_3 を100 μl を加え、攪拌後、溶媒を取り除く、という作業を2回繰り返し、ゲルを洗浄します。

3.6 脱水によるゲルの収縮

100%アセトニトリル100 μl を加え、攪拌し、10分間静置後、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、穴をあけます。その後、真空ポンプを使ってゲルを減圧乾燥します。

3.7 消化

ゲルをクーラーボックス上の水で冷却、酵素溶液

(25 mM NH₄ HCO₃, 12,5 ng/μl トリプシン) をゲルが膨潤する程度加えます。10 分間冷やしながらか置した後、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 分間の攪拌、10 分間の静置のち、この中の 0.5 μl を質量分析で測定します。

4. 結果と考察

試料の分析には、maldi tof mass という装置を使います。この装置による測定では、試料にレーザー光を当てて分子をイオン化する必要があります。このイオン化の効率を上げるために、試料に混ぜる物質をマトリックスといいます。今回は、吸光度が高いこと、ペプチド測定に標準的なマトリックスであることなどの理由からマトリックスとして CHCA を選ぶことにしました。

装置にはライナーモードとリフレクトロンモードという 2 つのモードがあります。リフレクトロンモードはライナーモードより感度が落ち、また、計測可能な質量範囲も狭くなりますが、計測する分子の質量は狭い範囲に収まっており、精度も高くなるのでリフレクトロンモードを選びました。

この装置で計測したデータをもとに同定を行った結果、タンパク質は以下であるとわかりました。

- サンプル 1 Ovalbumin
- サンプル 2 CAH2_BOVIN
- サンプル 3 同定できなかった
- サンプル 4 Lysozyme C

サンプル 3 の同定ができなかったのは、酵素の自己消化などで測定データにノイズが増え、データの正確な読み取りが困難であったことが原因と考えられます。

5. おわりに

予備知識のほとんどない状態だったので、少し不安だったのですが、班の仲間と協力することで、どうにか乗り切ることができました。

プロテオミクスという分野の研究が、どのような考え方で行われているか知れたこと、数理情報学専攻の私では普段行わない化学の実験を経験できたこと、広島大学という自然溢れる場所で授業を受けることが出来たことは私にとって大変価値のある体験でした。今後の研究や生活において、この体験を何らかの形でフィードバックしていけたらと思っています。

最後になりますが、講義を担当してくださった泉俊輔先生をはじめ、講義に参加するにあたって協力していただいた広島大学、龍谷大学の皆様、一緒に実験してくださった班の皆様に感謝いたします。