

プロテオミクス実験法及び 実習に参加して

助 國 晟 也

Seiya SUKEKUNI

数理情報学専攻修士課程 1年

1. はじめに

私は、2015年9月1日から3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、広島大学から9名、龍谷大学から9名の計18人の大学院生が参加した。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. 実験の目的

質量分析法の原理を理解し、ペプチドマスフィンガープリント法によって分子量マーカーのタンパク質を同定する。また、MS/MSによって未知のペプチド配列の決定を行う。

3. プロテオミクス実験内容

3.1 ペプチドマスフィンガープリント

A4の紙を敷いた上にOHPシートをのせて蒸留水をたらし、分子量マーカーを流したゲルを置いた。分子量の大きい方からバンド①とし、アルコールスプレーで洗ったカッターとピンセットを用い、バンド①～⑥をそれぞれ切り出した。バンドをゲル幅程度で細かく刻み、マイクロチューブに移した。

50%アセトニトリル100 μ Lをチューブに加え、5分間よく攪拌し、溶媒を取り除いた。ゲルの脱色が終わるまで、これを2回程度繰り返した。

100%アセトニトリル100 μ Lを加え、5分間よく攪拌した。ゲルが収縮して(白くなって)固まったのを確認し、溶媒を取り除いた。チューブの上にパラフィルムを被せて穴を空け、デジケーターに入れ

て真空ポンプで減圧乾燥した。

10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 (還元剤) 100 μ Lを加え、ゲルが膨潤したのを確認し、ヒートブロックを用いて56 $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。室温に戻し溶媒を取り除いた後、55 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 25 mM NH_4HCO_3 (アルキル化剤) 100 μ Lを加え攪拌し、45分間室温でインキュベートした。

溶媒を取り除き、25 mM NH_4HCO_3 100 μ Lを加えて5分間よく攪拌し、溶媒を取り除いた。さらにこれを2回繰り返した。

100%アセトニトリル100 μ Lを加え、よく攪拌し、10分間静置し、溶媒を取り除いた。チューブの上にパラフィルムを被せて穴を空け、デジケーターに入れて真空ポンプで減圧乾燥した。

クーラーボックスを用いて氷上で冷却し、酵素溶液(25 mM NH_4HCO_3 , 12.5 ng/ μ L トリプシン)を5~10 μ L加え(バンドの濃さからタンパク質量を予想して加えた)、さらにゲルが膨潤するまで蒸留水を加えた。10分間氷上に置き、一晚インキュベートした。

0.1% TFA, 80%アセトニトリル(膨潤が足りなさそうなので75%から80%に変更)20 μ Lを加え、10分間攪拌して10分間静置した。

ここから0.5 μ Lをとり、サンプルプレートにのせ、上からマトリクス0.5 μ Lをのせた。マトリクスにはCHCAを用いた。(やり直しの2回目はマトリクスに3H4NBAを用いた。)

MALDI-TOF MS測定を行い(リフレクターモードを選択)、ペプチドのモノアイソトピックのピークの質量を得た。

3.2 MS/MS

サンプルプレートにペプチド溶液を0.5 μ Lのせ、その上からマトリクス0.5 μ Lをのせた。MS/MS測定を行い、1アミノ酸または2アミノ酸ごとに切れたペプチド断片のピークを得た。

4. 実験の結果と考察

サンプル①から⑥のうち、③ではペプチドのピークが得られたが、他のサンプルではよい状態のピークは得られなかった。3サンプルのやり直しのできたので、サンプル①、⑤、⑥をやり直し、これらでもピークを得ることができた。MS/MS のピークは1回で得ることができた。今回同定した5つのタンパク質は以下の通りである。

バンド①：Phosphoglycerate kinase

バンド②：不明

バンド③：Ovalbumin

バンド④：不明

バンド⑤：Glycosyltransferase like domain containing protein 1

バンド⑥：Lysozyme

①、③、⑤はトップスコアのタンパク質を選択した。⑥のトップスコアは DNA-directed RNA polymerase subunit omega だったが、マッチしていないピークが多かった。そこで、2284 付近のピークを外して再検索したところ、2284 付近のピークは全サンプルで出ており、③以外ではマッチしていなかった（③でも同様にこのピークを外して再検索したが、カバー率や分子量であまりにも不自然な候補を除くと Ovalbumin が候補に残った）ことから、トリプシンの自己消化の可能性があるのである。

しかし、いずれのサンプルでもプロテインスコアが 70 以下であり、今回の結果からタンパク質を同定することは難しい。原因としては、トリプシンの自己消化が起っていたこと、他のタンパク質が混入していたことなどが考えられる。トリプシンを自己消化させたコントロールを用意したり、タンパク質の由来となる種を絞ったり、特定のアミノ酸や末端を修飾したりすることが必要だと考えられる。

また、1 回目の測定（マトリクス CHCA、学生が操作）よりも 2 回目の測定（マトリクス 3H4NBA、先生が操作）で得られたピークの方が解析に適していたことから、ペプチドサンプルのマトリクスには 3H4NBA を用いた方がよかったこと、精度の高い操作が求められることがわかった。

5. 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だった。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。