

## 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

野田 康 矢

Koya NODA

数理情報学専攻修士課程 1年

### 1. はじめに

私は、2016年9月1日から3日の期間に広島大学で行われた「プロテオミクス実験法・同実習」という集中講義に参加しました。

龍谷大学は、教育・研究活動の交流と連携の推進を目的とした大学間交流に関する包括協定を、明治大学および広島大学との間に構築しており、龍谷大学大学院理工学研究科の学生は明治大学大学院・広島大学大学院の科目を受講することができます。

今回のこの講義には広島大学から9名、龍谷大学から9名の学生が参加し、お互いに協力し合いながら活動を行いました。

### 2. 講義概要

タンパク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に必要となる基本的な技術を身につけ、生体高分子の構造・機能相関解析や薬物の分子設計を行うための基礎を養う。また、他大学の学生と協動的に学ぶことも目標としている。

### 3. 実験の内容

#### 3.1 実験概要

プロテオミクスとは、タンパク質が生体内の細胞や組織においてどのような働きをしているのか、タンパク質の構造や機能についての研究のことを言う。

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で、それらの情報がどのような手順で得られるのかを理解しておくことはとても大切である。本講義はそのような立場から、プロテオミクスの研

究手法のひとつである、質量分析法とX線構造解析を取り上げ、その実験法の講義と実験を行う。

#### 3.2 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、そこにゲルを乗せ、アルコールでよく洗ったカッターを用いてゲルを切り出す(図1)。

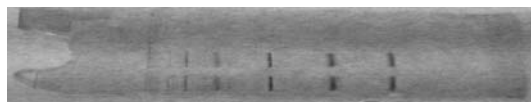


図1 ゲル

##### 【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%アセトニトリル100 $\mu$ lを加え5分間よく攪拌した後、溶媒を取り除く。この操作をゲルの色が消えるまで繰り返し行う。

##### 【脱水によるゲルの収縮】

100%アセトニトリル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、穴をあける。ゲルをデシケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥させる。

##### 【還元・アルキル化】

10 mM DTT in 25 mM  $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$  100 $\mu$ l (直前調整)を加える。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後、室温に戻し溶媒を取り除く。

55 mM  $\text{ICH}_2 \text{CONH}_2$  in 25 mM  $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$  100 $\mu$ l (直前調整)を加え、45分間室温で攪拌し溶媒を取り除く。

##### 【DTT と $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ の除去】

25 mM  $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$  100 $\mu$ lを加え、5分間よく攪拌し溶媒を取り除くという操作を2回繰り返し行う。

##### 【脱水によるゲルの収縮】

100%のアセトニトリル100 $\mu$ lを加え攪拌する。十分に攪拌した後、10分間静置し溶媒を取り除く。

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。ゲルをデシケータに入れ、真空ポンプ

で減圧乾燥させる。

### 【消化】

ゲルをクーラーボックス上の氷で冷却し、酵素溶液 (25 mM NH<sub>4</sub> HCO<sub>3</sub>, 12.5 ng/μl トリプシン) をゲルが膨潤する程度 (通常 5~10 μl) 加え、氷上でさらに 10 分間放置する。ゲルが最初の大きさぐらいに膨潤しているか確認し、もし足りないようであれば蒸留水を加え、インキュベートする。

### 【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 分間静置させる。この 0.5 μl を、質量分析で測定します。

### 【質量分析】

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

リニアモードとは、イオンの生成点から検出器まで生成したイオンが、直線的に飛行しするものを検出して測定するモードのことである。

サンプルスライド上で発生した正イオンが電位差 ( $V_0$ ) により引き出され

$$qV_0 = \frac{1}{2}Mv^2$$

より、速度  $v$  について解くと

$$v = \left( \frac{2qV_0}{M} \right)^{\frac{1}{2}}$$

を得る。 $V_0$  はどのイオンに対しても一定であるので、 $M/q$  値が小さいイオンほど高速でドリフト空間を飛行し検出器に到達する。このように  $M/q$  値の違いにより、イオンの飛行時間が異なることを利用して質量分析を行う方法を「飛行時間型質量分析法 (TOF MS)」という。このような原理をリニアモードと呼び、生成したイオンが直線的に飛行し、そのイオンがリフレクター内で電場により反射されて折り返したものを、検出し測定するモードのことリフレクターモードと呼ぶ。リフレクターモードの利点としては、リフレクターにより運動エネルギーの広がりによる飛行時間の広がりを収束できるので、分解能が改善されるという点があげられる。

上記のような特徴により、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が適切である。

### 3.3 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。

MALDI/TOFMS には、リニアモードとリフレクターモードの 2 つがある。本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った。

表 1 同定結果

タンパク質の種類	由来	M.W. (Da)
Phosphorylase B	Rabbit muscle	97,200
Serum Albumin	Bovine	66,409
Ovalbumin	Hen egg white	44,287
Carbonic anhydrase	Bovine	29,000
Trypsin Inhibitor	Soybean	20,100
Lysozyme	Hen egg white	14,300

## 4. おわりに

数理情報学専攻では、普段経験することのできない分野に触れることができ、とても貴重な経験をすることができました。実験では初めて聞く言葉や、初めて目にする器具ばかりで不安もありましたが、広島大学の方々に丁寧に教えて頂いたことで、無事に実習を終えることができました。今回の集中講義に参加したことで、他大学の学生と交流を深めることができ、また、自分自身の知識を深めることもできました。ご指導いただいた泉俊輔先生、協力してくださった広島大学の方々に深く感謝いたします。