

プロテオミクス実験法・同演習 について

廣瀬翔太

Shota HIROSE

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日にかけて、広島大学にて実施された「プロテオミクス実験法・同演習」の講義に参加しました。

この講義は、広島大学と明治大学との協定による単位互換科目です。今回は、広島大学、龍谷大学の学生が20名受講しました。

2. 実験の内容

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、今回は、プロテオミクス研究においてますます主要な解析手法になりつつあるタンパク質の質量分析法について、最新機器を用いた実験を行い4つのタンパク質の同定を行いました。

3. 実験の手順

3.1 ゲルの切り出し

A4の紙を敷いた上にOHPシートをのせる。OHPシートの上に蒸留水をたらし、ゲルをのせる。アルコールスプレーでカッターの刃をよく洗い、ゲルをカッターで切り出す。

3.2 ゲルの洗浄

切り出したゲルを細かく刻み、ピンセットでマイクロチューブに移す。その後、50%アセトニトリル100 μl を加え5分間よく攪拌し、溶媒を取り除く。この作業をゲルの色が消えるまで繰り返す。

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、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て穴をあけた後に、デシケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。

3.4 還元・アルキル化

10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 100 μl を加え、ヒートブロックを用いて、1時間56°Cでインキュベートする。その後室温に戻し、溶媒を取り除く。次に55 mM I CH_2CONH_2 in 25 mM NH_4HCO_3 100 μl を加え、45分間室温で攪拌した後に、溶媒を取り除く。

3.5 DTT と ICH₂CONH₂ の除去

25 mM NH_4HCO_3 100 μl を加え5分間よく攪拌した後に、溶媒を取り除く。この作業を2回繰り返す。

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、攪拌の後10分間静置する。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、穴をあける。そして、デシケータに入れ真空ポンプで減圧乾燥する。

3.7 消化

クーラーボックス上の氷で冷却する。そして、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(今回は7.5 μl)を加え、氷上で10分放置する。ここで、膨潤が足りない場合は蒸留水(今回は5.5 μl)加えてからインキュベートする。

3.8 抽出

0.1% TFA, 75%アセトニトリル20 μl を加え、10分間攪拌した後に、10分間静置する。この0.5 μl を質量分析で測定する。

3.9 質量分析

質量分析は MALDI (マトリクス支援レーザー脱離イオン化法) という極めて広範囲の化合物をソフトにイオン化する手法を用いました。この方法では、レーザー光を吸収し、試料のイオン化を促進させる化合物「マトリックス」が必要になります。今回は3種類のマトリックスの中から CHCA を選択しました。CHCA はペプチド測定 of the 標準マトリックスであり、精度の高い測定が行えると考えたからです。選択したマトリックスを資料の上に乗せ測定器にかけます。測定器にはリニアモードとリフレクターモードの2種類があります。リニアモードには感度が高い測定が行えるという利点があり、リフレクターモードには、分解能が高く精度の高い測定が行えるという利点があり、それぞれに違った利点があります。実験では、まずリフレクターモードで測定し、もし感度が悪かった場合にはリニアモードで測定することにしました。

4. 実験の結果と考察

実験の結果、渡された4つのタンパク質は以下の

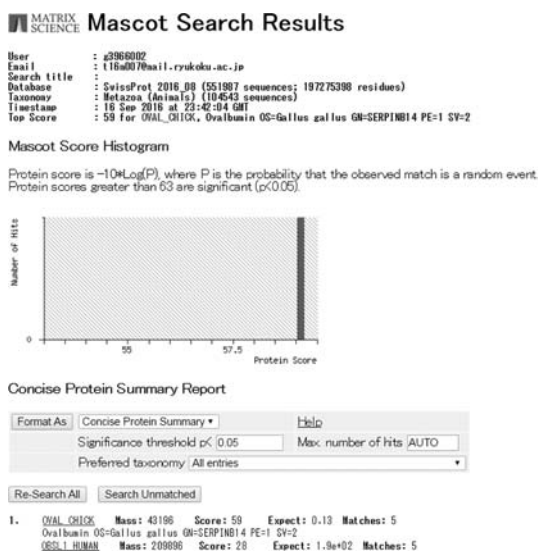


図1 Mascot の検索結果

ようになりました。

- バンド1: Ovalbumin
- バンド2: Carbonic anhydrase 2
- バンド3: 同定できなかった
- バンド4: Lysozyme C

バンド3を Mascot で検索した結果、他の3つに比べてスコアの高いものが見つからず、同定することができませんでした(図1)。その理由としては、Mascot の扱いが未熟であったことと、消化のときにゲルの膨潤が足りていなかったのではないかと考えられます。

5. おわりに

プロテオミクス実験法・同実習では、数理情報学専攻で行うことのないような実験ができ、貴重な体験になりました。マイクロピペッターなど扱ったことのない器具ばかりで、不安に思うこともありました。しかし、泉先生をはじめ広島大学の学生の厚いサポートのおかげで、無事終えることができました。

私は修士課程で数理生物学の分野を学んでいます。この分野では、生物学者が繰り返し実験を行い、その実験によって得た結果を数理モデル化して解析を行っています。普段私が行っているのは解析の部分であり、生物学者の方々がどのように実験を行っているのかは知りませんでした。今回、広島大学での実習に参加することで、その一端を知ることができて良かったと思います。今回の実習で得た経験を、今後の研究に活かすことができるように励んでいきたいと思っています。

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