

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

松原 久

Hisashi MATSUBARA

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日までの3日間、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。この講義は、教育・研究活動の交流と連携、そして一層の進展に資することを目的として、龍谷大学は、明治大学及び広島大学と大学交流間に関する包括協定を結んでおり、その協定に基づく単位互換プログラムです。

プロテオミクスとは、タンパク質（プロテイン）と遺伝子（ゲノム）を組み合わせたプロテオームが語源であり、生体内の細胞や組織における、タンパク質の構造・機能を総合的に研究する学問です。

2. 実験内容

プロテインマーカーのタンパク質を In Gel 消化によってペプチド質量を抽出し、データベースのタンパク質の情報と照らし合わせてタンパク質の種類

を同定する。Figure 1 にプロテインマーカーの電気泳動の様子を示す。

2.1 ゲルの切り出し

A4の紙を敷いた上に OHP シートをのせ、そ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とピンセットを消毒し、ゲルを切り出す。

2.2 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 μl を加え、5分間よく攪拌する。溶媒を取り除き、ゲルの色が消えるまでこの操作を繰り返す。

2.3 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（ゲルが白くなるまで）よく攪拌する。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。ゲルをデシケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。

2.4 還元・アルキル化

10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 100 μl （直前調製）を加える。ヒートブロックを用いて、1時間 56 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートする。室温に戻し、溶媒を取り除き、55 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 25 mM NH_4HCO_3 100 μl （直前調製）を加える。45分間、室温で攪拌し、溶媒を取り除く。

2.5 DTT と $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ の除去

25 mM NH_4HCO_3 100 μl を加え、5分間よく攪拌する。溶媒を取り除き、この操作を繰り返す。

2.6 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。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。ゲルをデシケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。

2.7 消化

クーラーボックス上の氷で冷却し、酵素溶液（25 mM NH_4HCO_3 , 12.5 ng/ μl トリプシン）（直前調製）をゲルが膨潤する程度（通常 5~10 μl ）加える。10



Figure 1 プロテインマーカーの電気泳動

分間放置し、もし膨潤が足らなければ蒸留水を加え、インキュベートする。

2.8 抽出

0.1% TFA, 75% アセトニトリル 20 μ l を加え、10 分間攪拌し、その後 10 分間静置する。このサンプル 0.5 μ l プレートに滴下する。マトリックス (CHCA) をサンプルと同じ場所に 0.5 μ l 滴下し、質量分析で測定する。

3. 結果と考察

CHCA というマトリックスを使用して測定した結果、サンプル 3 は同定することができた。サンプル 1, 5, 6 においてマトリックスを 3H4NBA に変更して測定した結果、同定することができた (Figure 2)。

サンプル 1 : Phosphoglycerate kinase

サンプル 2 : 同定不可

サンプル 3 : Ovalbumin

サンプル 4 : 同定不可

サンプル 5 : L-lactate dehydrogenase C chain

サンプル 6 : Lysozyme C

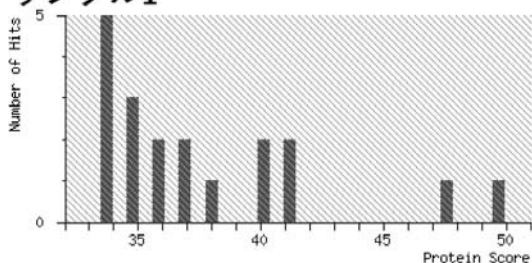
サンプル 2, 4 が同定できなかった理由として、質量分析のピークをうまく拾うことができなかったことや、トリプシン消化が十分でなかったこと、ノイズを多く拾ってしまったことが原因であると考えられる。

また、同定できているサンプルにおいて、いずれもスコアが 70 を超えていないので、有意なデータではないと考えられる。

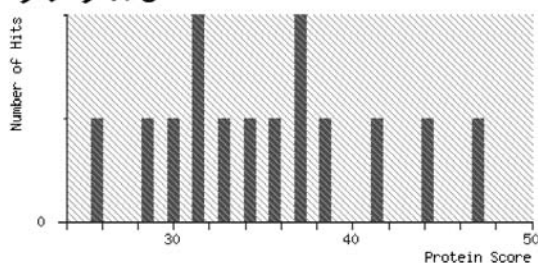
4. おわりに

広島大学での集中講義に参加して、実験に慣れていないため、実験方法や実験器具の使い方など分からないことばかりでしたが、普段やらない実験をやるのはとても新鮮でした。実験はグループで行うため、実験内容で分からないところは広島大学の方が教えてくれました。そのため、広島大学の方々と協力して実験を楽しく行うことができました。また、

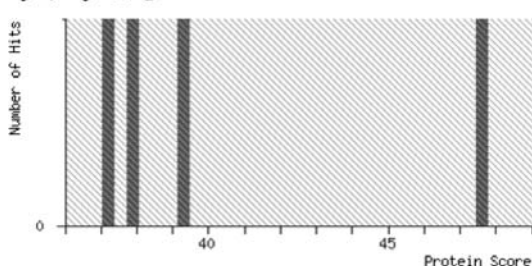
サンプル1



サンプル3



サンプル5



サンプル6

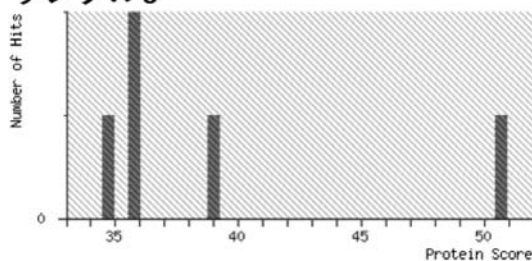


Figure 2 タンパク質同定

違う分野のことを学ぶことやなかなか見ることができない分析機器を使うことは、とても貴重な経験になったと思います。

この講義は、広島大学の方々と交流するよい機会であり、研究のことや大学生活のことを話すことで、他大学の様子を知ることができ、自分にとってとても良い刺激になりました。