

広島大学単位互換制度 「プロテオミクス実験法・同実習」 に参加して

丸山亮祐

Ryosuke MARUYAMA

数理工学専攻修士課程 1年

1. はじめに

私は2016年9月1日から3日にかけて単位互換制度の一環である広島大学での講義「プロテオミクス実験法・同実習」に参加した。

この講義は、広島大学・明治大学・龍谷大学の大学間での研究・教育に関する協力体制のもとで行われている。今回の講義には広島大学10名、龍谷大学9名の学生が参加した。

2. 実験概要

プロテオミクスとは、タンパク質の構造と機能についての研究のことである。この研究ではタンパク質間相互作用を明らかにすることが目的である。研究手法は様々あるが、本講義では「質量分析法」と「X線構造解析」によるタンパク質の解析を行った。

本講義は、上記のような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の基本技術を身につけ、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ことを目標としている。

3. 実験内容

3.1 ゲルの切り出し

A4用紙を敷いた上に、OHPシートをのせ、その上に蒸留水をたらす。その上にゲルをのせ、アルコールスプレーで洗浄されたカッターの刃とピンセットを使い、ゲルを切り出す。切り出したゲルをさらに細かく切り、ピンセットでマイクロチューブに移す。

3.2 ゲルの洗浄

マイクロチューブに50%アセトニトリル100 μ lを加え、5分間よく攪拌する。その後、マイクロチューブ内の溶媒を取り除く。この攪拌と溶媒を取り除く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

マイクロチューブに100%アセトニトリル100 μ lを加え、5分間よく攪拌し、溶媒を取り除く。その後、マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ、穴を開ける。その状態でデシケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。

3.4 還元・アルキル化

マイクロチューブに10mM DTT in 25mM NH_4HCO_3 100 μ lを加え、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。室温に戻ったところで溶媒を取り除く。その後、マイクロチューブに55mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 25mM NH_4HCO_3 100 μ lを加え、45分間室温で攪拌し、溶媒を取り除く。

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

25mM NH_4HCO_3 100 μ lを加え、5分間よく攪拌する。その後、溶媒を取り除きます。この作業を2回繰り返す。

3.6 脱水によるゲルの収縮

マイクロチューブに100%アセトニトリル100 μ lを加えよく攪拌し、10分間静置した後、溶媒を取り除く。その後、マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ、穴を開ける。その状態でデシケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。

3.7 消化

ゲルと溶媒の入ったマイクロチューブを氷で冷却し、酵素溶液(25mM NH_4HCO_3 , 12.5ng/ μ l トリプシン)をゲルが膨潤する程度(通常5~10 μ l)を加え、さらに10分間、氷上で冷却する。ゲルが十

分に膨潤しているか確認し、膨潤が足りていない場合、蒸留水を加える。十分な膨潤が確認でき次第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、10 分間静置する。その後、その溶媒のうちの 0.5 μl を抽出し、サンプルプレートに乗せる。

3.9 質量分析

MLADI-TOFMS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計) という装置を用いて質量分析を行う。MLADI-TOFMS にはリニアモードとリフレクターモードが存在し、どちらかのモードを選択し測定を行う。また、ペプチドのイオン化を促進させるためのマトリックスを選択する。

サンプルプレートに乗せた試料にマトリックスを合わせ、レーザーを当てることでイオン化させる。それを分子の飛行時間から測る TOF (Time-Of-Flight) 法を用いて、試料を同定した。

4. 結果・考察

今回の実験ではペプチドをイオン化させるマトリックスとして CHCA を選択した。理由としてトリプシン消化によりタンパク質はペプチド化しているため、そのペプチドの分子量は大きくてもおよそ 3000 Da くらいであると考えられる。本講義で使用可能なマトリックスの中で最もペプチド測定に適しているのは CHCA であったためである。

測定の結果、対象のタンパク質は以下の 6 つであ

ることがわかった。

バンド 1 : Ferredoxin-nitrite reductase

バンド 2 : Serum Albumin

バンド 3 : Ovalbumin

バンド 4 : Carbonic anhydrase

バンド 5 : Trypsin Inhibitor

バンド 6 : Lysozyme

今回はこのような結果が出たものの、それぞれのタンパク質を検索したときには、そのタンパク質と特定するためのスコアがあまり高くなかった。その原因として考えられるのは 3 点ある。ひとつは、アセトニトリルによるゲルの洗浄である。色が完全に消えきっていないものもありスコアの低かった原因であると考えられる。二つ目は、ゲルの膨潤不足である。教授にはそのことを指摘されたが、その状態のまま測定したのがよくなかった考えられる。三つ目は、測定時のピーク値のとり方である。測定データで出てきたピーク値に対して高い部分を上手く選ぶことができなかったと考えられる。

5. おわりに

今回の講義を受けて、非常に貴重な経験ができたと感じている。私は今までにこのような実験をする機会がなかったこともあり、実験の内容を聞いても理解できず、器具を見てもどのように扱っていいのかもわからなかった。しかし、その講義を受講していた広島大学の学生や先生の助けもあり、なんとか実験を理解し、やり遂げることができた。

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。