

プロテオミクス実験法・同演習に参加して

町 釋 光

Akira MACHISHAKU

数理情報学専攻修士課程 1年

1. はじめに

平成29年9月9日から11日の三日間、広島大学で行われた「プロテオミクス実験法・同演習」の講義に参加した。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あり、今年は広島大学、龍谷大学の学生、併せて9名が受講した。

2. 参加目的と講義概要

2.1 参加目的

私がこの講義に参加した目的は、普段とは異なる分野の講義を聞き、実験をするといった大学の課程では体験することができない経験をすることで、今後の研究に対する視野を広めたいと思ったからである。また、いろいろな人と交流をとることで新しい意見やモノの見方を得たいと思い、本講義に参加した。

2.2 講義概要

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を言う。今回の講義では、プロテオミクス研究において主要な解析手法である質量分析法といわれる手法について学び、機器を用いて実験を行い、試料の分析を行った。

3. 講義内容

3.1 実験の目的

Peptide Mass Fingerprinting 法（以下では、PMF 法とする）によってプロテインマーカーの蛋白質の種類を同定する。また、MS/MS によって、ペプチド配列を決定する。

3.2 実験の準備（PMF 法）

蛋白質を特定するために、まずゲル（図1）を5つに分ける。それぞれのゲルを細かく切り、別々のマイクロチューブに移し、50% アセトニトリルを用いてゲルの色が消えるまで洗浄を行う。

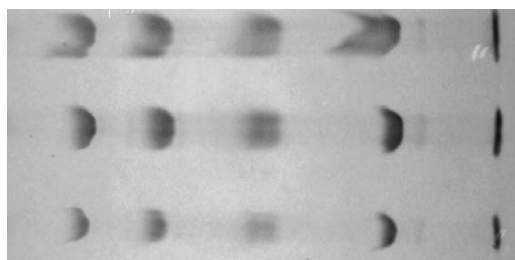


図1 ゲル

その後、100% アセトニトリルを用いて攪拌し、真空ポンプで減圧乾燥を行い、脱水によるゲルの収縮を行う。この処理の後、酸化還元剤である DTT と $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ を用いて、還元・アルキル化を行い、酸化還元剤を NH_4HCO_3 という溶媒を使用して、除去する。その後、もう一度、脱水によるゲルの収縮を行う。収縮を行った後、冷却しながら酵素溶液をゲルが膨潤する程度に加え、10分間放置する。もし膨潤が足りなければ蒸留水を加える。

最後に75% アセトニトリルを加え、10分間攪拌して10分間静置した後、0.5 μL をとり、サンプルプレートにのせ、上からマトリクス CHCA をのせた。また、1回目で十分な結果が得られなかったので別のマトリクス 3H4NBA を変更し、同様の作業を行う。

3.3 実験の準備（MS/MS）

ペプチド配列を決定するために、どのマトリックスを選択することで効果があるのか、受講生で相談して決め、サンプルプレートに試料を三ヶ所のせ、その上に、異なるマトリックス（本講義では、3H4N, CHCA, DHBA の3種類）をのせる。

3.4 質量分析

質量分析は、実験の準備で行ったサンプルプレー



図2 質量分析装置

トを質量分析装置（図2）に入れ、各試料のデータを採取していく。稼働中の質量分析装置の内部では、装置の中が真空に近い状態になっており、高電圧をかけ、試料をイオン化させ、装置内で試料のイオンを静電力によって飛行させている。試料のイオンを電氣的・磁氣的な作用等により質量電荷比に応じて分離し、それぞれの検出を行っており、これによって出たマススペクトルを参考に資料の分析を行う。

4. 実験結果と考察

PMF 法による実験で得たデータ（図3左）を用いて、Mascot（図3右）で蛋白質を特定すると以下ようになった。

バンド1：Oryctolagus cuniculus の Glycogen phosphorylase

バンド2：Bos taurus の Serum albumin

バンド3：同定できなかった

バンド4：Bos taurus の Carbonic anhydrase 2

バンド5：Glycine max の Trypsin inhibitor B

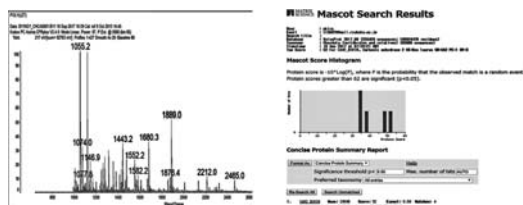


図3 PMF 法で得たスペクトル（左）と Mascot（右）

バンド3について、スペクトルを見るとほかのバンドで共通してみることができるピークが多く出ていたため、特定することができなかった。その理由として、準備のときに皮膚の一部や唾などが資料に混入してしまったためだと考えている。

また、MS/MS の結果、与えられた試料のアミノ酸の配列をいろいろなマトリックスを用いて調べたが、アミノ酸の配列を特定することができたマトリックスは、3 N 4 H であったと考えられる。

なぜなら、他のマトリックスと比べ、フラグメントを出すのに最適なマトリックスであったと考えたからである。

5. おわりに

プロテオミクス実験法・同実習では、普段の学修で行うことのないような実験ができ、貴重な体験を経験することができた。この実習では、普段使用することがない器具や聞きなれない言葉ばかりで最初は不安しかなかった。しかし、泉先生をはじめ、広島大学の学生の方々に丁寧に教えていただき、無事実習を終えることができた。私自身、この講義を通して得た経験は、今後の研究を進めていくうえで視野を広げることができた良い機会であったと思う。

最後になりましたが、今回の講義に参加するにあたり、ご指導していただいた泉先生をはじめ、広島大学、龍谷大学の方々には深く感謝いたします。