

## プロテオミクス実験法・同実習を終えて

近藤 匠

Takumi KONDO

数理情報学専攻修士課程 1年

### 1. はじめに

2017年9月9日から9月11日までの3日間、私は広島大学で開講された「プロテオミクス実験法・同実習」の講義に参加した。

プロテオミクスとは、蛋白質の構造・機能を総合的に研究していく分野である。今回私たちはプロテオミクスの講義で質量分析を行い、蛋白質の同定を行った。

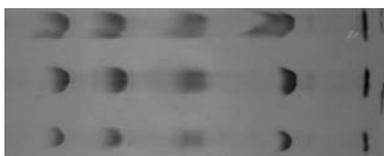
### 2. 実験内容

実験内容は、与えられたプロテインマーカーの蛋白質の種類を質量分析を用いて同定するというものである。蛋白質のゲルの切り出し、洗浄、還元・アルキル化、消化を行い、その後MALDI TOF MS測定を行い蛋白質の種類を調べた。

### 3. 実験手順

#### 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、蒸留水をたらす。その上にゲルをのせてカッターでゲルをチップで切り出す。このとき、ゲルの順番が変わらないように注意しながら切り出す。



ゲルの電気泳動図

#### 3.2 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た後、50%アセトニトリル100μl

を加え、10分間よく攪拌し、溶媒を取り除く。この工程をゲルの色が消えるまで繰り返し行う。

#### 3.3 脱水によるゲルの収縮

100%アセトニトリル100μlを加え、10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、穴をあけた。そして、ゲルをデシケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥した。

#### 3.4 還元・アルキル化

10mM DTT in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100μl (直前調製)を加え、ヒートブロックを用いて、1時間56℃でインキュベートした。その後、室温に戻し、溶媒を取り除く。

55mM  $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$  in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100μl (直前調製)を加え、45分、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  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100μlを加え、10分間よく攪拌し、溶媒を取り除く。この操作を2回繰り返す。

#### 3.6 脱水によるゲルの収縮

3.3と同じ操作を行う。

#### 3.7 消化

クーラーボックス上の氷で冷却し、酵素溶液(25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 12.5ng/μl トリプシン)をゲルが膨潤する程度(通常5~10μl)加え、10分間氷上で放置する。この工程の後、ゲルが角張っていれば膨潤が足りているので、インキュベートする。そうでなければ蒸留水を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 20μlを加え、20分間よく攪拌する。

試料を0.5μl取り出し、サンプルプレートに乗

せ、その上にマトリックスを乗せた後、質量分析装置で測定する。

#### 4. 質量分析

抽出が終わった後、質量分析装置を用いて質量分析を行った。分析方法は MALDI TOF と呼ばれる手法を用いた。測定試料とマトリックスを混合したのに対して紫外レーザー光を照射してイオン化させてそのイオンの質量を測定する手法です。マトリックスはレーザー光が照射されたときその光エネルギーを吸収しマトリックス自身がイオン化を起し、試料分子との間でプロトンや電子などを受け渡す役割を持っている。また、それ以外にも試料分子を分子レベルで均一に分散させる分散剤の役割も持つ。マトリックスは測定試料によって変更することが重要である。今回は測定試料がペプチドなのでそれに対応するマトリックスである CHCA を使用した。

#### 5. 結果と考察

質量分析を行った結果、以下のような蛋白質が同定できました。

バンド 1 : Glycogen phosphorylase (Oryctolagus cuniculus)

バンド 2 : Interferon-stimulated 20 kDa exonuclease-like 2 (Bos taurus)

バンド 3 : Fibroblast growth factor 4 (Gallus gallus)

バンド 4 : Carbonic anhydrase 2 (Bos taurus)

バンド 5 : 同定できなかった。

バンド 5 が同定できなかった理由は、バンド 5 には 2 種類の蛋白質が混ざっていたため、データが複雑になり、データの解析がうまくいかなかったと考えています。

#### 6. おわりに

これまでやってきたことのない分野の実験だったため大変でしたが、班員の皆さんのおかげで無事に実験を終えることができました。3 日間の広島大学での講義や生活は普段経験することのない大変貴重なものでした。この経験をこれからの生活や研究に活かしていきたいと思いました。

最後に、講義を担当してくださった泉先生をはじめ、広島大学、龍谷大学の皆様、実験を一緒に行った班員の皆様に感謝いたします。