

## プロテオミクス実験法・同実習に参加して

増田 祐

Yu MASUDA

数理情報学専攻修士課程 1年

### 1. はじめに

私は、2017年9月9日から9月11日まで広島大学でおこなわれた、広島大学明治大学単位互換プログラム「プロテオミクス実験法・同実習」に参加しました。この講義には、広島大学から4名、龍谷大学から5名の計9人の大学院生が参加し、プロテオミクス研究において主要な解析方法になりつつあるタンパク質の質量分析について機器を用いた実験法の講義を受け、実習を行いました。

### 2. 実験の目的

質量分析法の原理を理解し、ペプチドマスフィンガープリントによってプロテインマーカーのタンパク質を同定する。また、ACTHのms/msスペクトルをとり、そのスペクトルをアサインする。

### 3. プロテオミクス実験内容

#### 3.1 ペプチドマスフィンガープリント

A4の紙を敷いた上にOHPシートをのせて蒸留水をたらし、プロテインマーカーを流したゲルを置いて、アルコールスプレーで洗ったカッターとピン

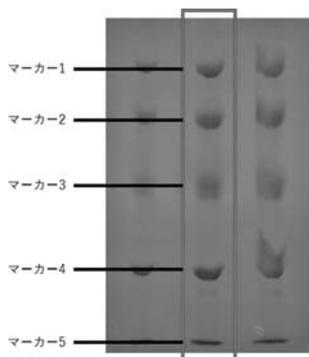


図1 プロテインマーカー

セットを用いて、マーカー①～⑤をそれぞれ切り出します。

マーカーはゲル幅程度で細かく刻むことで、表面積を多くし作業の効率が上がります。

50% アセトニトリル 100  $\mu\text{L}$  をチューブに加え、5分間よく攪拌し、溶媒を取り除いてゲルの脱色が終わるまで、これを繰り返します。

100% アセトニトリル 100  $\mu\text{L}$  を加え、5分間よく攪拌し、ゲルが収縮して（白くなって）固まったのを確認し、溶媒を取り除きます。その後チューブの上にパラフィルムを被せて穴を空け、デジケータに入れて真空ポンプで減圧乾燥します。

10 mM DTT in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ （還元剤）100  $\mu\text{L}$  を加え、ゲルが膨潤したのを確認したら、ヒートブロックを用いて56 $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートします。その後、室温に戻し溶媒を取り除いた後55 mM  $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$  in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ （アルキル化剤）100  $\mu\text{L}$  を加え攪拌し、45分間室温でインキュベートします。

溶媒を取り除き、25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100  $\mu\text{L}$  を加えて5分間よく攪拌し、溶媒を取り除くという作業を2回繰り返します。

100% アセトニトリル 100  $\mu\text{L}$  を加え、よく攪拌し、10分間静置し、溶媒を取り除きます。チューブの上にパラフィルムを被せて穴を空け、デジケータに入れて真空ポンプで減圧乾燥します。

クーラーボックスを用いて氷上で冷却し、酵素溶液（25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 12.5 ng/ $\mu\text{L}$  トリプシン）を5～10  $\mu\text{L}$  加え（マーカーの濃さからタンパク質量を予想して加えます）、さらにゲルが膨潤するまで蒸留水を加えます。10分間氷上に置き一晚インキュベートします。

0.1% TFA, 75% アセトニトリル 20  $\mu\text{L}$  を加え、10分間攪拌します。

ここから0.5  $\mu\text{L}$  をとり、サンプルプレートにのせ、上からマトリクス0.5  $\mu\text{L}$  をのせた。マトリクスにはCHCAを用います。（2回目はマトリクスに3H4NとDHBAを用います。）

MALDI-TOF MS 測定を行い、ペプチドのピククの質量を得ます。

### 3.2 MS/MS

サンプルプレートにペプチド溶液を 0.5  $\mu$ L のせ、その上からマトリクス 0.5  $\mu$ L をのせます。MS/MS 測定を行い、ペプチド断片のピークを得ます。

## 4. 実験の結果と考察

マーカー①から⑤のうち、①、②、④ではペプチドのピークが得られましたが、他のマーカーではよい状態のピークは得られませんでした。サンプルのやり直しのできたので、サンプルをやり直しましたが、ピークを得ることができませんでした。MS/MS のピークは 1 回で得ることができましたが、一応やり直しました。今回同定した 5 つのタンパク質は

マーカー①：Oryctolagus cuniculus (アナウサギ)

マーカー②：Bos Taurus (ウシ)

マーカー③：不明

マーカー④：Bos Taurus (ウシ)

マーカー⑤：Glycine max (ダイズ)

マーカー①、②、④はトップスコアのタンパク質を選択しました。③のマッチしていないピークが多くやり直したサンプルと比較してもマッチしていないピークが多くノイズによって同定は困難でした。

今回、いずれのサンプルでもプロテインスコアが 70 以下であり、今回の結果からタンパク質を同定することは難しいことが分かりました。原因としては、トリプシンの自己消化が起こっていたこと、作業中に他のタンパク質が混入していたことなどが考

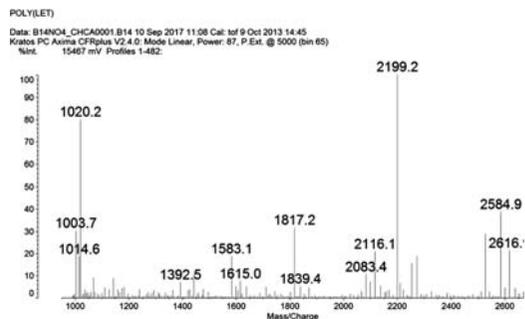


図 2 マーカー 4 のピーク

えられます。トリプシンを自己消化させたコントロールを用意したり、タンパク質の由来となる種を絞ったり、特定のアミノ酸や末端を修飾したり、作業を丁寧にすることが必要であると考えられます。

## 5. おわりに

私はプロテオミクス実験法のような化学の講義を受ける機会がなく、予備知識のない状態だったので出来るか不安でしたが、班で協力して一応形にはなったのでよかったです。今回の実習では、実習に用いた器具はすべて初めて目にするものばかりで、広島大学の院生方に使いかたを教えてもらいながらの実習でしたが無事終わることができました。私が専攻している数理情報学以外の分野に触れたこと、実際実験しても正確なデータを得るためには多大な時間が掛かるということ、龍谷もですが自然あふれる場所で授業を受けれたことは良い経験になりました。また、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、一緒に実験した班の方々に深く感謝いたします。