

「プロテオミクス実験法・同実習」 に参加して

箕尾 暁日

Asahi MINOH

数理情報学専攻修士課程 1年

1. はじめに

私は、平成 29 年 9 月 9 日から 11 日までの三日間に、広島大学での「プロテオミクス実験法・同実習」の講義に参加しました。

この講義は、広島大学との単位互換プログラムです。単位互換プログラムとは、龍谷大学が広島大学・明治大学と大学間における交流に関する包括協定を結んでおり、理系研究者の交流と能力の発展を図るものです。

今回の参加人数は 9 人で、二つのグループに分けて講義を受け、実験に取り組みました。

2. 講義の内容

今回のタイトルにもなっている「プロテオミクス」とは、ある生物のゲノムの産物の総和、すなわち個体あるいは一つの細胞で発見しているタンパク質すべての動態を要素とする集合であり、タンパク質の意味をもつ英語「プロテイン」と遺伝子の研究「ゲノミクス」を組み合わせた造語となっている。

今回の講義の目的は、一つのタンパク質に注目するのではなく、タンパク質群が生物活性を発見する様子を解析する。実験では、質量分析を用いて、タンパク質の種類を同定した。

3. 実験手順

3.1 ゲルの切り出し

A4 の紙の上に OHP シートをのせ、蒸留水をたらず。そこに、ゲルを乗せてカッターで切り出し、ゲルを取り出す。

3.2 ゲルの洗浄

切り出したゲルをマイクロチューブに移し、50% アセトニトリル 100 μ l を加え、10 分間攪拌する。その後、溶媒である 50% アセトニトリルを取り除く。この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

100% 50% アセトニトリル 100 μ l を加え、10 分間攪拌する。その後、溶媒である 100% アセトニトリルを取り除く。マイクロチューブの上にパラフィルムを被せ、穴を開ける。そして、ゲルをデシケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。

3.4 還元・アルキル化

10 mM DTT in 25 nM NH_4HCO_3 100 μ l (直前調整) を加え、ヒートブロックを用いて、1 時間 56°C でインキュベートする。室温に戻し、溶媒を取り除く。55 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 25 nM NH_4HCO_3 100 μ l (直前調整) を加え、攪拌する。その後、取り除く。

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

25 nM NH_4HCO_3 100 μ l を加え、10 分間攪拌し、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

100% アセトニトリル 100 μ l を加え、10 分間攪拌し、溶媒を取り除く。マイクロチューブの上にパラフィルムを被せ、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。

3.7 消化

クーラーボックスの上の氷で冷却し、酵素溶液 (25 nM NH_4HCO_3 12.5 ng/ μ l トリプシン) (直前調整) をゲルが膨張する程度 (通常 5~10 μ l) 加え、10 分間氷上で放置する。もし、膨張が足りない場合蒸留水を加える。その後、インキュベートする。

3.8 抽出

0.1% TEA, 75% アセトニトリル 20 μ l を加え, 20 分間攪拌する. この 0.5 μ l を質量分析で測定する.

4. 質量分析の内容

実験で得られたデータから解析ソフトを用いて, ピークの高い値を選ぶ. この際に, 実験中に入り込んでしまった人のケラチンと消化に用いたトリプシンの値を参考にして, 排除する必要もある. 得られたピークの高い値を Mascot というソフトを用いて, 解析を行う. このソフトは, 先ほど得られた値を入力することでそれらの値を併せ持つタンパク質とどんな生物に含まれているかがわかる. そして, 入力する値を変えることでタンパク質の同定を行う.

5. 結果と考察

バンド①から⑤まで解析を行い, ⑤のみ二つのタンパク質を見つけることができた.

バンド①: Glycogen phosphorylase

バンド②: Serum albumin

バンド③: Ovalbumin-related protein Y

バンド④: Carbonic anhydrase 2

バンド⑤: Trypsin inhibitor B,
Domain-containing protein

④や⑤に関しては, 少ない値でタンパク質を同定できた. これは実験が正確に行われたと考える. しかし, ②においては多くの値を入力する必要があった. 理由は, 解析ソフトで算出した値のピークと本来その物質が持つ値のピークに対してずれがあったと考える. さらに, ①において人のケラチンが多く検出された. この値だけ大きかったので, ケラチンだということはわかった. ①は実験において最後に OHP シートで切り分けたため, OHP シートにケラチンが付着して, 検出されたのではないかと考える. このように, 実験の正確性の大事さ, 値の取り方による同定の難しさを感じた.

6. おわりに

今回のプロテオミクス実験法で, 本格的な実験に参加しました. 器具の名前や初めて行う実験方法にとっても戸惑いましたが, 泉先生や広島大学の学生のサポートによって最後まで達成することができました. その中で, 広島大学の学生との交流を深めることもできました. そして, この講義や実験では, 龍谷大学において体験できないことがたくさんあり良い経験になりました.

最後に, 今回の講義に参加するにあたってご協力してくださった, 広島大学, 龍谷大学の先生方には深く感謝いたします.