

「プロテオミクス実験法・同実習」 に参加して

牧 田 渉

Wataru MAKITA

数理情報学専攻修士課程 1年

1. はじめに

平成30年8月31日から9月2日の3日間、広島大学東広島キャンパスで「プロテオミクス実験法・同実習」の講義に参加した。この講義は、龍谷大学理工学研究科数理情報学専攻と明治大学大学院先端数理科学研究科と広島大学理学研究科数理分子生命理学専攻との間で、研究／教育に関する大学間協力体制を構築することを目的とした包括的協力単位互換に基づいた講義で、10名が参加した。

2. 講義

2.1 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現しているタンパク質すべての動態を要素とする集合。PROTEin と genOME を組み合わせた造語。

2.2 講義の目的

従来のように一つのタンパク質に着目して解析するのではなく、タンパク質群が生物活性を発現する様子を系統的、網羅的に解析をする。

3. 実験

実験は以下のような手順で行った。

3.1 ゲルの切り出し

1. A4の紙を敷いた上にOHPシートをのせる。
2. OHPシートの上に蒸留水を加える。
3. ゲルをのせる。
4. カッターでゲルをチップで切り出す。
5. ゲルをチップで切り出す。

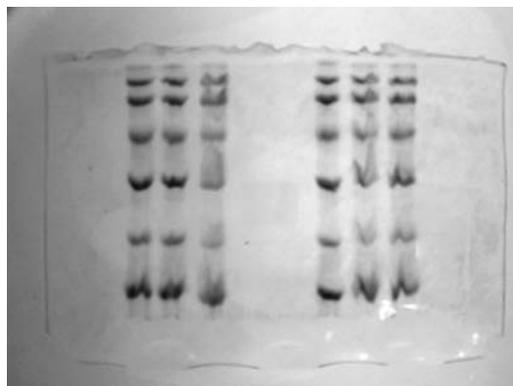


図1 プロテインマーカーの電気泳動像

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す。

50% アセトニトリル 100 μ l を加える。

溶媒を取り除く。

7~8 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

10. 100% アセトニトリル 100 μ l を加える。

11. 溶媒を取り除く。

12. マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせる。

13. ゲルをデシケーターに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。

3.4 還元・アルキル化

14. 10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 100 μ l を加える。

15. 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。

16. 室温に戻す。

17. 溶媒を取り除く。

18. 55 mM ICH_2CONH_2 \in 25mM NH_4HCO_3 100 μ l を加える。

19. 45分、室温で攪拌する。

20. 溶媒を取り除く。

3.5 DTT と ICH 2 CONH 2 の除去

21. 25 mM NH_4HCO_3 100 μ l を加える.
22. 溶媒を取り除く.
23. 操作 21-22 を 2 回繰り返す.

3.6 脱水によるゲルの収縮

24. 100% アセトニトリル 100 μ l を加える.
25. 溶媒を取り除く.
26. マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ、穴をあける.
27. ゲルをデシケーターに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する.

3.7 消化

28. クーラーボックスの上で冷却する.
29. 酵素溶液をゲルが膨張する程度加える.
30. 10 分放置する.
31. もし膨張が足りなければ蒸留水を加える.
32. インキュベートする.

3.8 抽出

33. 0.1% TFA, 75% アセトニトリル 20 μ l を加える.
34. この 0.5 μ l を質量分析で測定する.

4. 結果と考察

今回は、PMF (Peptide Mass Fingerprinting) では、MALDI TOF MS 測定を行った。MALDI TOF MS 測定でのレーザーは、マトリックスでは、500 回程度、Fr 1~Fr 6 では、100~200 回程度行い、うまくスペクトルが出なかった場合は、レーザーの回数を増やしていった。レーザーは、AXIMA-CFR を使用した。

PMF より得たデータに Kompact と Mascot を用いた解析を行い、以下のような結果となった。

Kompact より得たスペクトル (図 2) からピックアップするピークは感度が大きく、きれいな山型になっているものを選択した。また、ピックアップする範

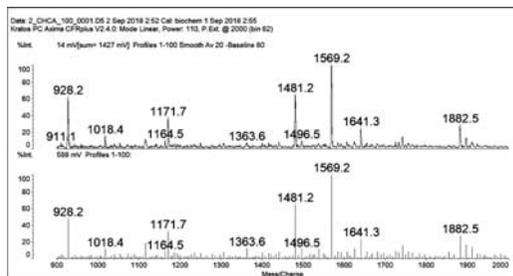


図 2 Kompact から得たスペクトル

表 1 解析結果

サンプルの番号	Top Score
Fr 1	Beta-galactosidase-Escherichia coli.
Fr 2	(Bos taurus) Bovine serum albumin precursor
Fr 3	Ovalbumin-Gallus gallus (Chicken).
Fr 4	Alpha-S 2-casein [Contains: Casocidin -1-Bos taurus (Bovine)].
Fr 5	Chymotrypsinogen A-Bos taurus (Bovine).
Fr 6	Lysozyme C-Gallus gallus (Chicken).

囲は、1000~3000 前後で行った。選択するピークを誤ると、ケラチンが Top Score になってしまうことが多くあったが、皮膚片が混入していたことが原因と考えられる。

5. おわりに

今回の実習で扱った実験器具や行った実験方法は初めてのものばかりで資料を見ても理解できない部分もあったが、同じ班の方々に助けていただき無事に終えることができました。

物理実験以来の実験を含む講義ということで、プロテオミクス実験法・同実習はいつも行っている講義と異なり、貴重な体験をすることができました。

また、この講義を通じて、広島大学・明治大学の方々との交流ができ、研究のことや大学のことなどを話すことができ、とても良い経験になりました。

最後に、この講義を担当してくださった泉俊輔先生と広島大学の大学院生の方々には、深く感謝いたします。