

せるてQuiz

presented by

大海 忍

東京大学医科学研究所

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/ohmiken/index.htm>

問題

以下の文は、質量分析を用いてタンパク質の解析をしようとする実験の途中経過です。Aさん、Bさん、C君、D君の4人の中で、実験の進め方として明らかに問題がある人をすべて挙げてください。

Aさんは、市販の牛血清タンパク質標品に培養細胞の増殖を促進する活性を見いだした。いくつかのロットを調べてみると約半数のロットには増殖促進活性があった。活性のあるロットとないものをSDS-PAGEにかけてみると、活性のあるロットに特有のタンパク質バンドが見つかった。そこで、Aさんは質量分析計を用いてこのタンパク質を同定しようとした。ゲルからバンドを切り出してトリプシンで消化、ペプチドを抽出してペプチドマスフィンガープリント法でデータベース検索を行った。しかし、ゲノムデータベースを検索しても該当するタンパク質は見つからなかった。Aさんは、このバンドが細胞増殖促進活性を持つ新しいタンパク質であると結論づけた。

Bさんは、あるオリゴマー酵素のサブユニット構成について興味を持っている。しかし、この酵素は精製が難しく純度が20%くらいの標品までしか得られないため、このサンプルをトリプシン消化して質量分析計にかけ、各サブユニットに由来するペプチド断片を調べた。いくつかのフラグメントが3つのサブユニットから同定でき、そのピークの高さが1:1:2であったことから、Bさんはこの酵素のサブユニットは1:1:2の構成であると結論づけた。

C君は、ある病態と関連があるモノクローナル抗体を用いて、この抗体が結合する抗原を同定しようと考えた。いくつかの培養細胞から全タンパク質を抽出してイムノプロットを行うと、一部の細胞株では分子量7万付近にバンドが染まるのが観察できた。そこでC君は、最もシグナルが強く出た細胞を大量に培養してタンパク質を抽出し、これをSDS-PAGEで分離、分子量7万のバンドを切り出してトリプシン消化し、微流速逆相カラムでペプチドを分画して質量分析計でMS/MS解析を行った。

D君は、ある酵素Xと相互作用する細胞質タンパク質を探そうとしている。まず、酵素XをグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)と連結した融合タンパク質を作り、精製した融合タンパク質を樹脂に固定化してアフィニティーカラムを準備した。対照実験に使うために、GSTに別の酵素Yをつなげたものも用意した。次に、培養細胞から細胞質画分を調製し、一定量のサンプルを2つのカラムと混ぜて生理的条件下で洗浄した。カラムに結合したタンパク質をSDS-PAGEにかけてゲルを銀染色すると、酵素Xのカラムに特異的なバンドが見つかった。そこでD君は、これを切り出してトリプシン消化し質量分析にかけようと考えている。

● 答え ●

アクセスはコチラまで!

<http://gakken-mesh.jp/journal/saibo/>

※『細胞工学』各月号ページの「関連リンク」欄から解答のPDFをご覧ください。

せてQuiz^{クイズ} 第11回

• 答え •

Aさん, Bさん, C君の3人.

解説

Aさん: ペプチドマスフィンガープリント法は, 対象となるサンプルをトリプシンなどで限定分解して生じるペプチド断片の質量を, データベース上の配列に基づいて *in silico* で計算した質量と照らし合わせてタンパク質同定を進める方法なので, サンプルの純度が高いことが前提になります. したがって, 複数の遺伝子産物が混ざっている場合は結果が出てこなくても当然です. サンプルを精製して均一にするか, タンデム型質量分析計 (MS/MS) で解析して実験的に配列データを得る必要があります.

Bさん: 質量分析計で検出されるペプチドのピーク高は実際の量を反映していません. 効率よくイオン化されれば高くなります. 安定同位体で標識して質量分析計で相対的に量を比較することは可能ですが, ここにあるようなサブユニット構成を求める実験には向いていません. 別の手段で定量する必要があります.

C君: イムノブロットで染まった分子量7万のバンドが, 大量にサンプル調製してゲルから切り出した分子量7万のバンドと同一であるという保証はありません. もう少し正確に言うと, ゲルから切り出した分子量7万のバンドを消化してナノLCにかけ, MS/MS解析によってヒットしてきたいくつかのタンパク質の中に抗体で染まった遺伝子産物があるかもしれないという程度なのです. 抗体による検出感度は一般に, 質量分析よりもずっと高いので, 染まりすぎて困るくらいの量が必要です.

D君: この選択肢の内容については, 細胞工学 1999年3月号の連載「ラボラトリーひとくちメモ」(GST融合タンパク質の怪)でも紹介しました. そのときは, 対照実験でGSTそのもののアフィニティークラムを用いたため, 内在性のGSTを一所懸命調べることになりました. 今回, 酵素Xと酵素YをそれぞれGSTに融合して比べるため, もし内在性GSTが結合するならば双方につくのではないかと, ちょっと期待してます.