

ひらめき☆ときめき サイエンス

～名市大の研究室に
ようこそ～



KAKENHI
高校生のための
プログラム

※本プログラムは、独立行政法人日本学術振興会
と共同で行います。

遺伝子が働く仕組み

～ゲノム情報から機能タンパク質を見つけ出す～

生物はどのようにゲノム情報を読み出し、生体システムとして機能させるか？
細胞内で働いているタンパク質がどんな遺伝子に由来するのかを
質量分析、情報データベースを使って自分で調べてみよう。

開催日時 平成20年8月1日(金) 9:00 受付開始 16:30 解散予定
開催場所 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科 (山の畑キャンパス)
所在地: 名古屋市瑞穂区瑞穂町字山の畑1
募集対象 高校生 約30名(参加費無料 昼食付)
申込締切 平成20年7月22日(火)必着(申込多数の場合は抽選)
プログラムの詳細はホームページをご覧ください。
<http://www.jsp.go.jp/hirameki/>

名古屋市立 ひらめき

検索



公立大学法人 名古屋市立大学
<http://www.nagoya-cu.ac.jp/>

事務局学術推進室
ひらめき☆ときめきサイエンス担当
TEL:052-853-8041 FAX:052-841-0261
E-mail:kikaku7@adm.nagoya-cu.ac.jp

1. はじめに

皆さん、名古屋市大の研究室にようこそ！

研究室とは一体どんなところでしょう？

K. Barkerさんの「At the Bench」CSHL Pressでは以下のように書いてあります。ちょっと褒めすぎの感がありますが、日本語にすると違和感がありますので原文のまま味わってください。

「Welcome to one of the most exciting and enjoyable workplaces ever evolved, the biomedical research laboratory. There is an amazing concept in operation here: You get paid or credit for doing experiments, surely an almost scandalously delightful way to make a living. The work is worth while. The dress code, if any, is casual. The work hours are often self-determined and based on the needs of the experiment. The lab or department is filled with bright and interesting people, with whom you can discuss the salt concentration needed for a kinase assay or the implications of the latest congressional bill. It can come to have all the psychological comforts of home.」

DNA の情報を RNA に転写する RNA ポリメラーゼの構造を解いて 2006 年にノーベル化学賞を受賞されたロジャー・コーンバーグ博士は、父親であるアーサー・コーンバーク博士（DNA 合成のメカニズム解明により 1959 年にノーベル医学生理学賞受賞）に「クリスマスプレゼントは何がいい？」と聞かれて「研究室での一週間」と答えたくらい、子供のころから実験するのが大好きだったそうです。

私自身は大学 4 年生時に初めて研究室に参加して、実験の面白さにのめり込みました。今日、「ひらめきときめきサイエンス」に参加された皆さんに少しでも研究室の雰囲気を体感していただければ嬉しいです。今日のメニューはまさに最先端で大学院レベルです。きっと君たちの知的好奇心を刺激できると思います。

大学ってどんなところなのかな？ / 研究者ってどんな人たちなんだろう？

なんて生命システムは複雑なのだろう？ / どうやって謎を解くのかな？

もちろん答えは一つではありません。

テストのための勉強を今日は忘れて、一緒にサイエンスを楽しみましょう！

参加した皆さんの中から将来、生命科学者を目指す人が出てくれることを心より願っています。

平成 20 年 8 月 1 日
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

田上英明

2. 実施スケジュール

9:00 受付開始@5号館2階生物実習室 テキスト、ネームプレート配布、白衣貸与

9:15 主催者挨拶 (森山教授)

9:30 オリエンテーション (1日の説明; 田上)

10:00 研究者による講演「DNAが分かれば生物が分かるの？」(田上)

10:30 実験I:

1. DNAのエタノール沈殿 (DNAを見てみよう) 終了後プレゼント
2. タンパク質の電気泳動 (タンパク質を分けてみよう) 染色後パックしてプレゼント
3. 先端研究機器の案内 (研究室内を探検しているんな機械を触ろう):

キャピラリー型自動DNAシーケンサー、PCRシステム、タンパク質精製システム、蛍光顕微鏡システム、電子顕微鏡システム、低温室、遺伝子組換え実験室など自由行動。

12:00 ランチョンセミナー、フリートーク@生協「タンパク質を見つけろ」(森山教授)

13:00 実験 II:

1. 質量分析とデータベース検索 (5号館1階 MALDI-TOF、4号館4階 計算機演習室)
 - 1) 前処理した未知の酵母タンパク質のトリプシン分解サンプルを1人ずつ選び、プレート上でマトリックスと混合
 - 2) 小グループ (3~4人) ずつ分析室へ行き、質量分析
 - 3) スペクトラムをCDに焼き、4号館4階の演習室でデータベース検索 (自分の選んだタンパク質がどの遺伝子に由来していたかを見つけ出そう) CDとデータをプレゼント
2. 細胞観察
 - 1) 染色体の観察 (生物実習室) それ以外にも出芽酵母、分裂酵母、自分の口腔内細胞、ヨーグルト、納豆、ビール酵母、チーズなど身の回りの細胞など興味のあるものを各自観察してビデオプリントしてプレゼント
 - 2) 暗室の蛍光顕微鏡で酵母や自分の細胞のDNAをライブ観察 (2階254号室)
 - 3) 走査型電子顕微鏡で昆虫などを観察 (2階271号室)
3. 先端研究機器の案内

15:00 クッキータイム@4号館1階大会議室、フリートーク後に参加者による実験結果発表

16:00 修了式、「未来博士号」授与 (田島研究科長)

16:30 解散

3. 用語説明

DNA: deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)の略称。塩基、糖、及びリン酸基からなるデオキシリボヌクレオチドの重合体で、遺伝子の化学的実体である。下図に示すような二重らせん構造が、J.ワトソンとF.クリックにより明らかにされた。

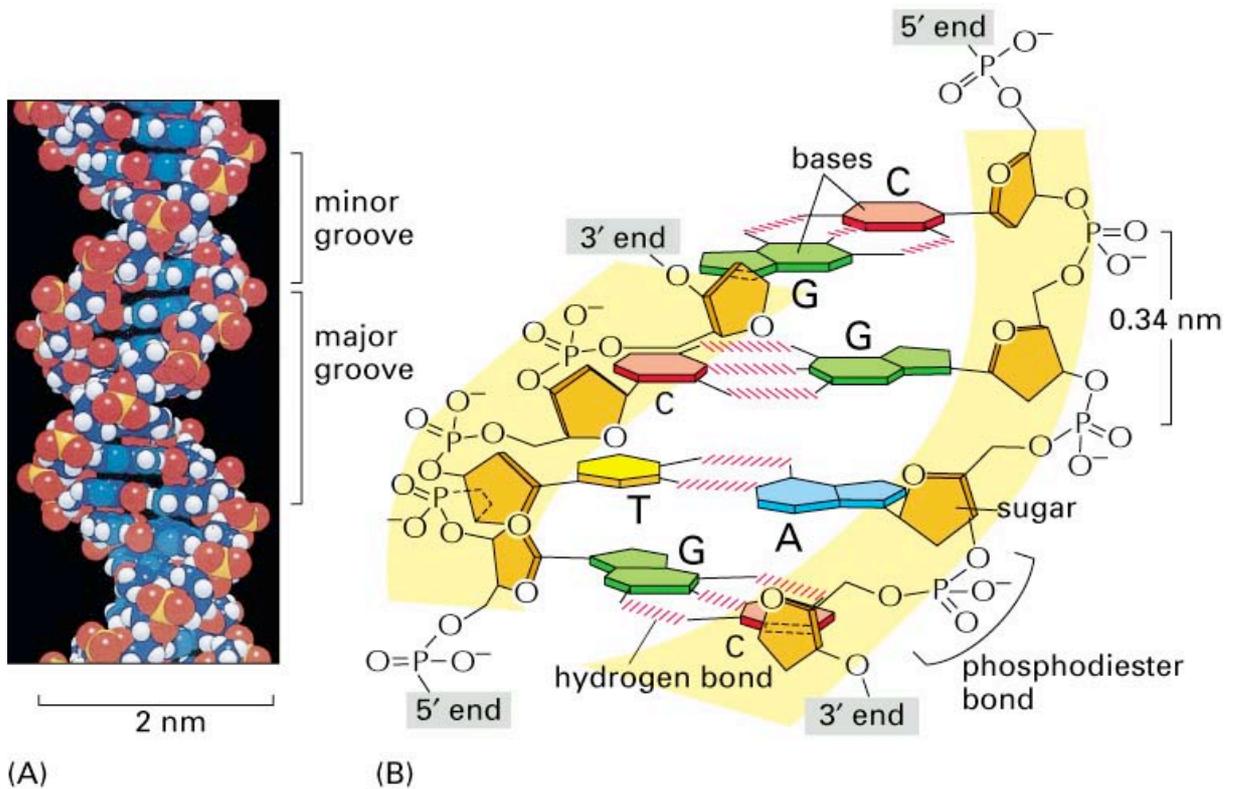
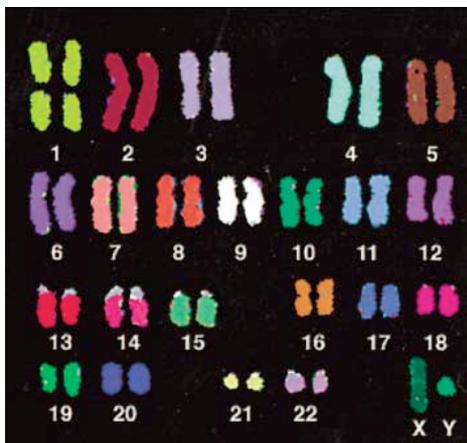
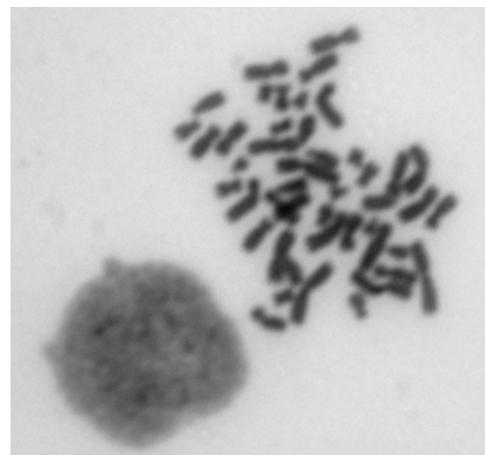


Figure 4-5. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

染色体(Chromosome): その名の通り、動植物細胞で有糸分裂の際に観察される塩基性色素で濃く染まる糸状の構造物のことであるが、現在では全ての生物においてゲノムDNA とそれに結合したタンパク質、RNA などからなる構造体を指す。



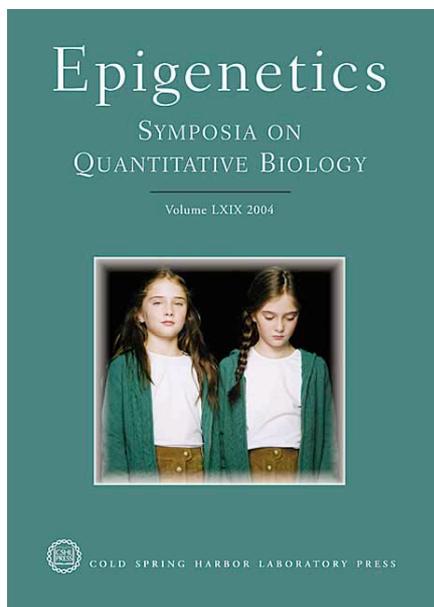
人の染色体



森山先生のリンパ球

ゲノム(genome): 元々は半数体細胞が持つ全ての遺伝子(gene)と染色体(Chromosome)をゲノムと定義したが、今日的にはその生物固有の全ての遺伝情報と言って良く、一倍体染色体DNAの塩基配列情報である。ミトコンドリアや葉緑体などDNAを持つ細胞内小器官の遺伝情報配列はミトコンドリアゲノム、葉緑体ゲノムと呼ぶ。

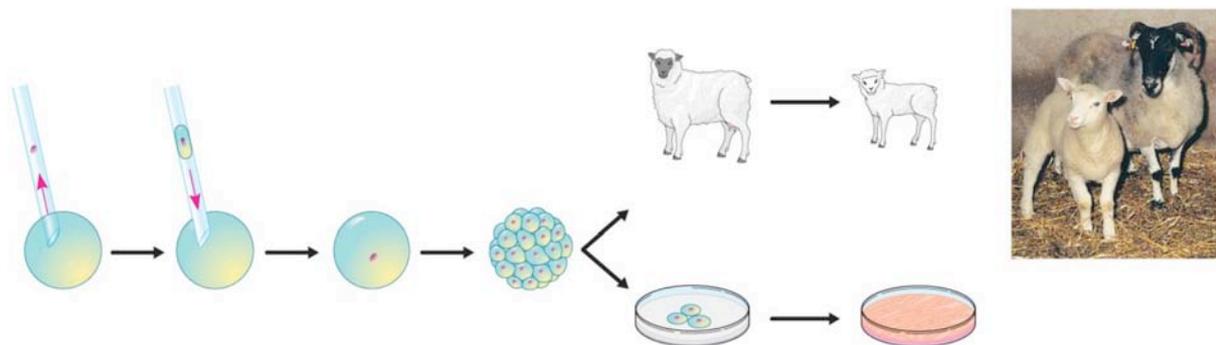
エピジェネティクス(epigenetics): DNA上の遺伝暗号(genetic code)の上にある情報(Epiは「上」、「さらに」という意味の接頭語である)で、もともとは発生学で用いられた造語だったが、現在ではDNA配列の変化を伴わずに細胞分裂以降も継承される情報を指す。DNAメチル化やクロマチン制御を介すると考えられる。実際に、DNA情報は全く同じである一卵性の双子でも、年齢とともに性格や既病歴が異なる一因となることが明らかになってきた。



双子でも違う



三毛猫は雌がほとんど



Copyright © 2007 Pearson Education Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

クローン動物 (ドリー)

4. 実験説明

マイクロピペッターの扱い方

マイクロピペッターは、マイクロリットルオーダーの溶液を分取するために使用する道具であり、微量サンプルを扱う分子生物学では必須アイテムである。精密な実験には、正確な液体の分取が欠かせず、ピペッターの扱い方を熟知しておく必要がある。

1. 容量を合わせる

モーションナットを回して、デジタル容量目盛を目的の量に合わせる。

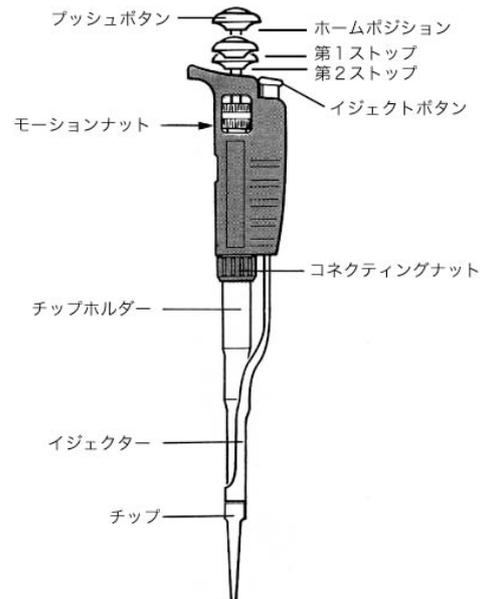
いったん目的の量を超えて余分に回し、そこから目的の量までゆっくり戻すのがよい。

2. チップを装着する

ピペッターを片手で持ち、垂直に保ったまま少しひねるようにしてチップスタンドのチップにチップホルダー(シャフト)先端を差し込み、しっかり装着する。

3. ピペッティング操作 (フォワードモード)

- ① ピペッターを垂直に持ち、プッシュボタンを**第1ストップ**の位置まで押す。
- ② チップの先端のみを液体に浸し、ホームポジションにまでプッシュボタンをゆっくり戻す。勢いよく戻すと本体に試料が入り汚染する。
- ③ 目的の容器にチップ入れ、**第1ストップ**位置までゆっくりプッシュボタンを押し、液をはき出させる。通常先端に少し液が残る。
- ④ **第2ストップ**位置までさらにプッシュボタンを押し、残っている液を完全に排出する。
※これら一連の操作は**必ず一度できめる。**
- ⑤ チップイジェクターを押して、チップを捨てる。



4. 揮発性の液体 (エタノール、エーテルなど) を扱うとき

揮発性の液体を分取するときは、あらかじめピペッター内の空気が揮発溶媒で飽和されるまでピペッティングを繰り返してから分取操作を行う。

5. 粘性の高い液体 (グリセロール、酵素溶液など) を扱うとき

粘性の高い液体を分取する場合は、チップの先端を少し切り、時間をかけて液体をピペッターに吸い込む。一度、その液体を排出し、あらかじめチップ内に液体の膜を形成しておく。その後、分取の操作を極めてゆっくり行う。

6. その他注意すべき点

- ① チップの先は絶対に触らない。
- ② チップイジェクター先端部分は汚染し易いため清潔に保つ。
- ③ 液をチップに吸い込んでいるときは、大きくピペッターを傾けない。もちろん逆さまにもしない。
- ④ 容量の大きなピペッターを使用するときは、シャフト内にまで液を吸い込んでしまうので、気をつけて、ゆっくり吸い込む。
- ⑤ 触るなどして誤ってチップの先を汚染したときは、速やかにそのチップを取り外し廃棄する。
- ⑥ 塩酸などの強酸は、ピペッター内部のステンレスピストンを腐蝕させるので使用できない。
- ⑦ チップ内に液を残さないようにテクニックを磨く。
- ⑧ 定期的に分解掃除をする。
- ⑨ 内部のシール部材は摩耗品であるため、むやみに空ピペッティングして遊ばない。
- ⑩ 水溶液の場合に先に水を使ってからバッファーを入れるなど順番を考えると、同じチップも使えるので無駄が省ける。ただし、酵素などに触れたチップは直ちに替え、クロスコンタミネーション (汚染) を極力避けること。

タンパク質の電気泳動

SDS-PAGE はタンパク質を変性させて分子量に依存して分離する方法である。SDS によりタンパク質に負電荷を付加して、熱や還元剤等で三次構造や S-S 結合を破壊した後にポリアクリルアミドゲル内に入れて電圧をかける。すると、プラスの方向にタンパク質は流れていくが、網目状のゲルの中は、ちょうど障害物競走の網のようで小さいタンパク質分子は早く移動し、大きい分子はなかなか進めない。そのため、分子量に依存して分離することができるのである。下の図は英語ですが、実際に自分たちでタンパク質を泳動して実感してみましょう。

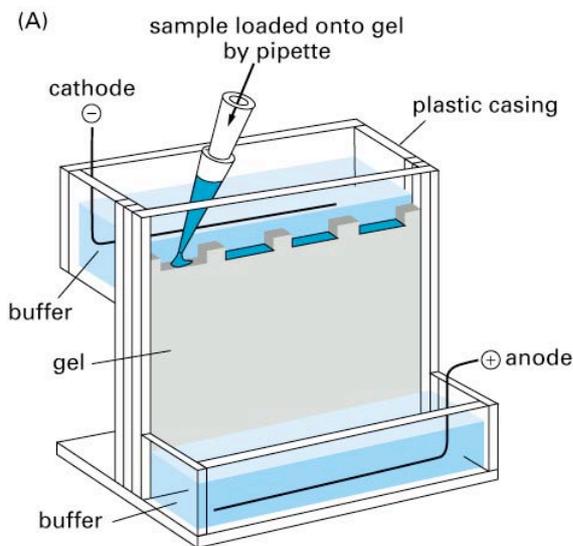


Figure 8-14 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

電気泳動の様子

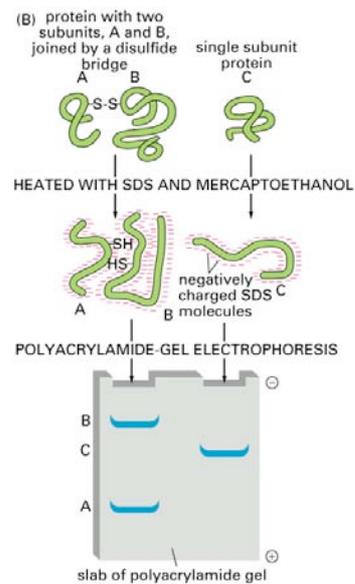


Figure 8-14 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

タンパク質分離の様子

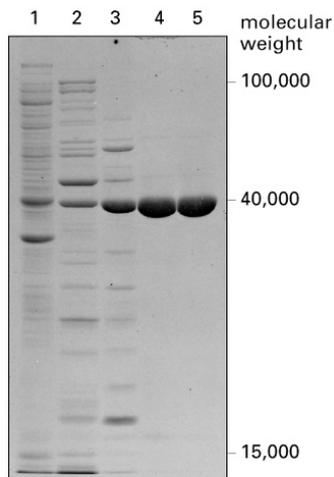


Figure 8-15. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

SDS-PAGE の実際例

質量分析 (Mass spectrometry)

正確な質量を測る装置が質量分析装置ですが、ノーベル賞を受賞された田中耕一さんは MALDI-TOF という手法によって、高分子の質量も測定できることを明らかにしました。今回は、各人のタンパク質サンプルをトリプシンというタンパク質分解酵素で処理します。トリプシンは決まったアミノ酸でタンパク質を切るなので、切断されたペプチドパターンはタンパク質ごとに変わります。ちょうど人の指紋がみんな違うように、タンパク質も違う切断パターンになるのです。その一つ一つのペプチドの質量を正確に測定するのです。現在までに様々な生物で遺伝情報が解読されていますので、理論上のペプチドパターンと付き合わせることで、自分のサンプルがどの遺伝子に由来するタンパク質か分かるのです。下の図は、その様子を示しています。英語ばかりでごめんなさい。

MALDI-TOF 質量分析の実際

質量分析によるタンパク質同定の原理

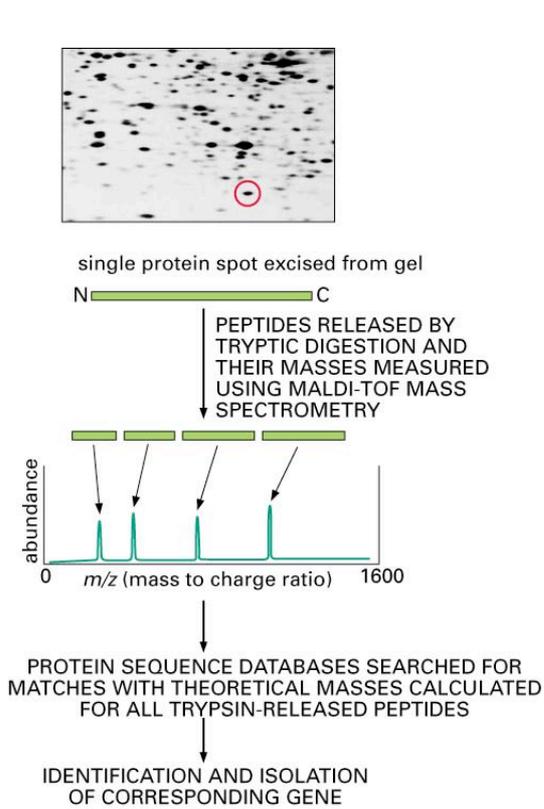
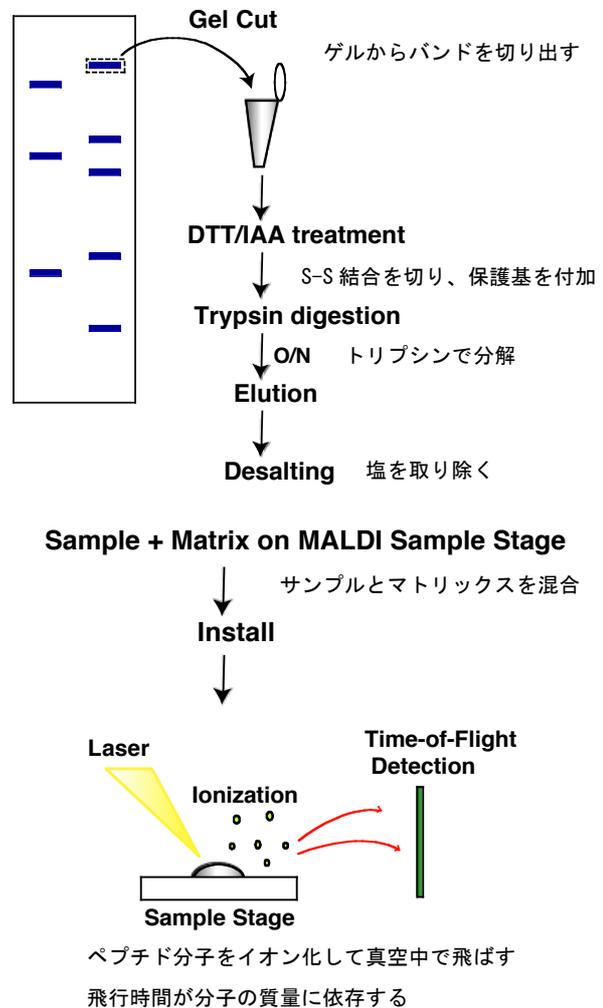


Figure 8-20 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



5. 実験操作

実験 I

1) DNA のエタノール沈殿

DNA 分子は極性を持つ高分子で水に溶けるが、酸性条件でアルコールを添加すると析出する。本実験では、サケ精子の DNA 溶液にエタノールを加えて DNA 分子を実際に観察してみよう。

1. 各自、DNA 溶液の入った 1.5mL チューブを 1 本受け取る。この中には 400 μ L の DNA 溶液 (~ 1 mg/ml DNA, 0.3 M NaOAc.(酢酸ナトリウム) pH5.2) が入っている。透明な液体であることを確認する。
2. 蓋の内側を触らないように注意深くチューブの蓋を開け、チューブ台に置く。
3. P1000 のマイクロピペッターの目盛りを 1000 に合わせる。
4. P1000 のマイクロピペッターにブルーのチップを装着して、エタノール溶液を 1mL 測り取る。
5. 注意深く DNA 溶液に加えて、チューブの蓋をきちんと閉める。ブルーチップは廃棄用のビーカーに捨てる。
6. エタノールを加えた DNA 溶液のチューブを手で激しく振ってみる。
7. 析出してきた DNA を観察し、糸状の高分子が絡まり合っていることを確認する。この分子内に遺伝情報が詰め込まれていることを実感してほしい。
8. チューブの蓋にパラフィルムを巻き、溶液が漏れないようシールする。
9. サンプルは記念品として持ち帰って良い。

2) タンパク質の電気泳動

生物の体を構成し、実際に酵素活性など生体機能を担う主役がタンパク質である。タンパク質のアミノ酸情報は DNA にコードされているが、遺伝情報を読み取ったり、保存したりするのもタンパク質である。2 番目の実験として、酵母の全タンパク質を電気泳動という方法で大きさ順に分離してみよう。

1. 各自、4 連の 0.2 mL チューブを受け取る。チューブ内には、SDS で負に帯電させた以下のタンパク質溶液が 10 μ L 入っている。
 - #1: タンパク質サイズマーカー1 (既に分子量の分かっているタンパク質の混合液: 染色済み)
 - #2: タンパク質サイズマーカー2 (既に分子量の分かっているタンパク質の混合液: 無染色)
 - #3: 出芽酵母の細胞抽出液 1 (元気いっぱい育っている状態の菌体由来)
 - #4: 出芽酵母の細胞抽出液 2 (増殖を止めた状態の菌体由来)
2. 95 度のサーマルサイクラーにセットして 5 分間加熱する。
3. P20 のマイクロピペッターの目盛りを 10.0 に合わせ、イエローチップを付ける。
4. 注意深くチューブの蓋を開け、#1 のタンパク質サンプルを全量取る。
5. 各実験台の上にセットしてある電気泳動装置のゲルのウェル内に注意深くサンプルを乗せる。二人でゲル 1 枚を使うため、一人ずつ慌てずに順番に乗せること。
6. 4 本とも全てゲルに乗せ終わったら、泳動槽をセット (各泳動槽ごとに異なるので TA に確認し

- てもら)して電流を流す。200V で 35 分 (4-12% NuPAGE) か、25mA で 60 分 (12% Laemli Gel)。
- 泳動を開始したら、染色済みのタンパク質が流れていく様子を観察する。
 - 染色していないサンプルではタンパク質はまだ見えない。泳動終了後に TA が CBB 染色するので、午後に染色済みのゲルを観察して、タンパク質の分離を観察する。#3 と 4 は同じ酵母であるが、異なるバンドがあることに注目しよう。
 - パッキング後にゲルを記念品として持ち帰って良い。

3) 先端研究機器の案内

タンパク質の電気泳動を観察したら自由に興味のある先端機器のところに行き、TA に説明やデモをお願いし、実際に自分で動かしてみよう。どれも大変高額 (100 万円から 1 千万円以上) の機器なので、壊さないように注意しながらも積極的に触ってみよう。

1. PCR サーマルサイクラー (生物実習室) :

PCR (Polymerase Chain Reaction) とは試験管内で特定の DNA 配列を酵素反応によって増幅する方法である。DNA 二重らせんは水素結合で互いに相補的であり、DNA 複製方向が決まっている。そのため、特定領域を挟むような 2 種類のプライマー DNA (DNA 複製を開始させる特定領域に相補的な配列を持つ合成 DNA) と基質となる dNTPs、及び DNA 合成を行う DNA ポリメラーゼによって増幅することが可能である。映画ジュラシックパークで有名になったが、現在では分子生物学研究だけでなく医療現場での各種診断や犯罪捜査にも広く利用されている。

試験管内での DNA 合成技術自身は古くから知られていたが、改良することで現在の我々生命科学者にとって欠かせない革新的な技術となったのである。1987 年に実験書として発表されたこの手法は、当時シータス社というベンチャー企業に勤務していた K. マリス博士によるもので、1993 年にノーベル化学賞を受賞している。因みに、この斬新なアイデアは彼女とのドライブ中にひらめいたという話である。

サーマルサイクラーは高速かつ正確に温度制御できる装置で、この装置と耐熱性 DNA ポリメラーゼにより PCR の自動化が一挙に進んだ。下図は、その原理を示したものであるが、理論的には 30 回反応することで 1 個の DNA 領域を 1 億以上に増幅することが可能である。

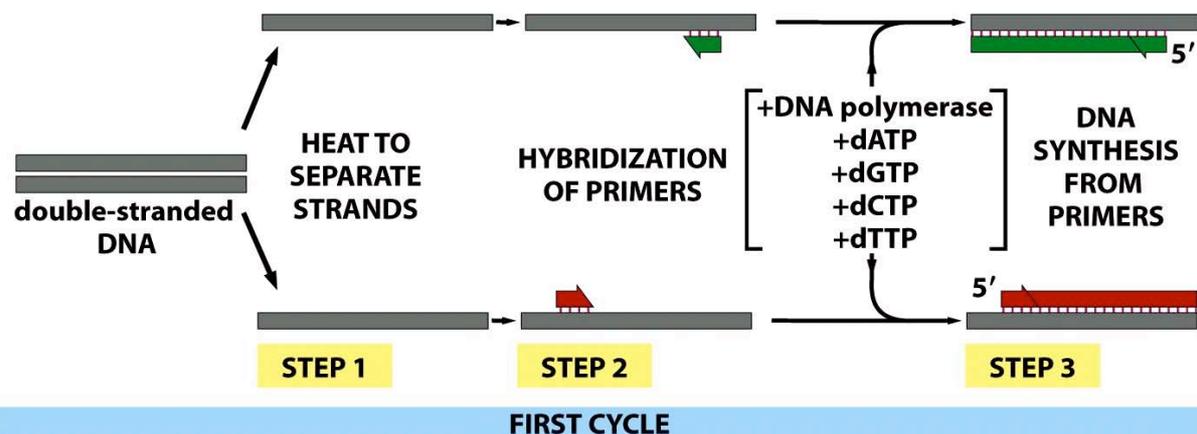


Figure 8-45a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

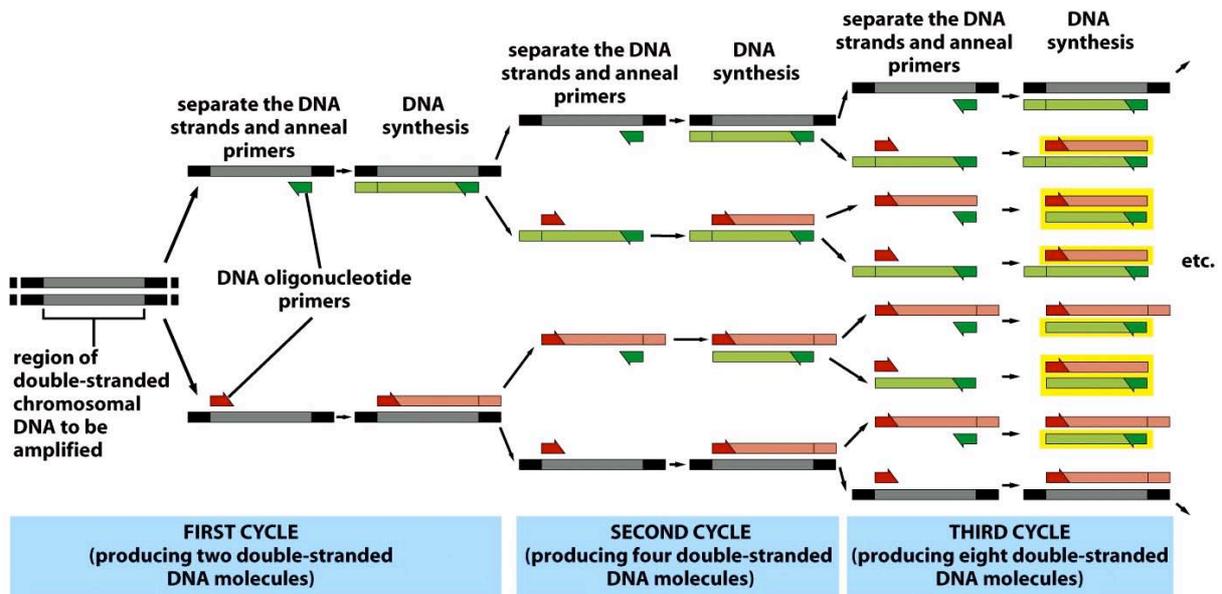
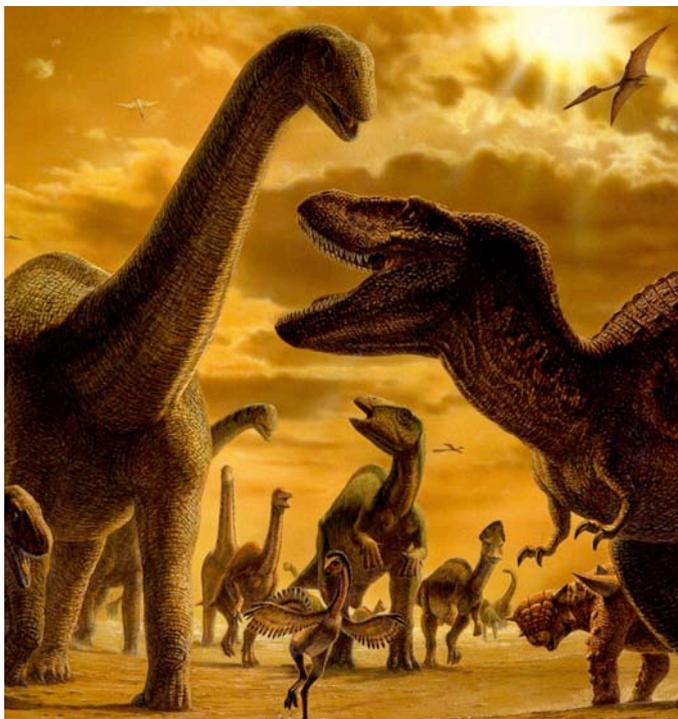


Figure 8-45b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

【考えてみよう！】

映画ジュラシックパークでは、琥珀の中の蚊が吸っていた恐竜の血液から PCR によって DNA を増幅させ、恐竜を蘇らせたとされている。現在において、本当に恐竜を蘇らせることは技術的に可能でしょうか？問題点などをみんなで話し合ってみよう。



「恐竜大陸」パンフレットより

PCR を使った犯罪捜査は我々の DNA のもつどのような性質を利用しているのでしょうか？

2. キャピラリー型自動 DNA シークエンサー (5 号館 3F) :

DNA 合成がプライマーという決まったところから始まります。特定の塩基だけ反応が止まってしまう基質 (ジデオキシヌクレオチド) を少量だけ加えて DNA 合成を行うと、その塩基のところだけで反応の停止した産物ができます。標識した同じプライマーを使えば開始点は同じですから、4 種類の塩基について同じ反応を行うと、長さの異なる反応産物が塩基の種類ごとにできることになります。これをゲル電気泳動により分離すると下図のようなはしご上のパターンができます。これを短い順に 1 塩基ずつ読むことで DNA 配列が決定できるのです。このような DNA 塩基配列決定法を開発した F. サンガー博士は別の手法を開発した W. ギルバート博士とともに 1980 年にノーベル化学賞を受賞している。因みに、サンガー博士はアミノ酸配列決定法で 1958 年にノーベル化学賞を受賞している。

20 年ほど前までは放射性同位元素を用いて X 線フィルムに焼き付けていたが、蛍光標識を用いた自動シーケンサーが登場し、飛躍的に簡便となった。さらにワイヤーのように細いキャピラリー内に充填したゲルを用いたシステムによりさらに高速化、簡便化され、20 年前は研究者一人で、1 日あたり数百塩基を解読するのが精一杯だったのが、数時間で数千塩基を簡単に読むことができるようになってきている。現在は、全く違う原理を利用したさらに次世代シーケンサーが登場して加速度的に DNA 解析のスピードが上がっている。

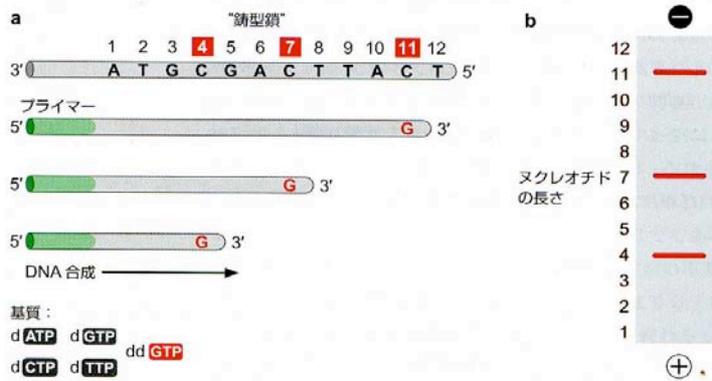
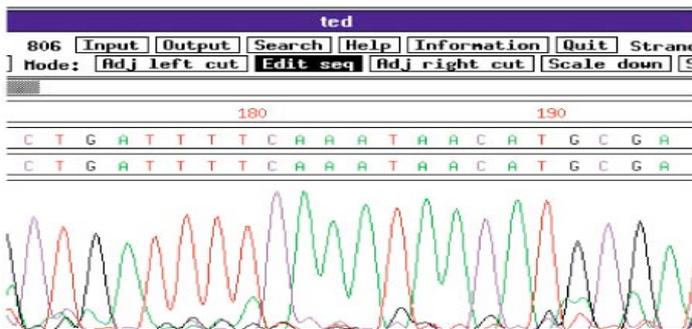


図 20.14 鎖終結法による DNA 塩基配列決定。本文中に述べたように、反応液にジデオキシヌクレオチドを加えておくと、長さの異なる鎖が合成される。できあがる鎖の長さは、鋳型 DNA の塩基配列に依存する。(a) 図の最上段に鋳型の塩基配列を示す。この反応液中の塩基は、A, C, T はデオキシヌクレオチドだが、G はデオキシとジデオキシヌクレオチドの両方が存在する。したがってポリメラーゼが鋳型の C に出会うたびに伸長中の鎖の一部には dGTP でなく ddGTP が付加され、その鎖はそこで終結する。(b) ポリアクリルアミドゲル上で分離した断片。ゲル上に見られる断片の長さは、この反応で配列決定される鋳型 DNA 中のシトシンの位置を示すことになる。



シーケンシングゲル

蛍光標識と自動シーケンサー

- ddATP-● (green)
- ddTTP-● (red)
- ddGTP-● (black)
- ddCTP-● (blue)

【考えてみよう！】

蛍光標識するとどんな利点があるのだろうか？

昨年、DNA 二重らせんモデルを提唱した一人の J. ワトソン博士の個人 DNA 全配列が決定され、究極の個人情報である DNA 配列が手に入れられるかもしれません。あなたは自分の DNA 情報を知りたいですか？どんなことが分かり、どんなことが分からないかみんなで話し合ってみましょう。

3. タンパク質精製システム (5号館 2F 低温室) :

20種類のアミノ酸が複雑に立体構造を取ったタンパク質は DNA と違ってかなり多様な高分子です。タンパク質を大きさで分離する方法の一つが実験 I 2) の電気泳動ですが、活性を持ったまま生化学的に分離する一般的な方法がカラムクロマトグラフィー (下図) です。高圧ポンプやフラクションコレクター、分光光度計など全てコンピューター制御できるシステムが AKTA システムです。タンパク質は当然「生もの」ですので精製する場合は低温中で操作しなくてはなりません。実際に涼しい (寒い?) 低温室に入ってみましょう。夏は涼しくて良いと思う人もいるかもしれませんが、温度差がある分長時間作業していると膝に来ます。生化学の研究はまさに体力勝負なのです。

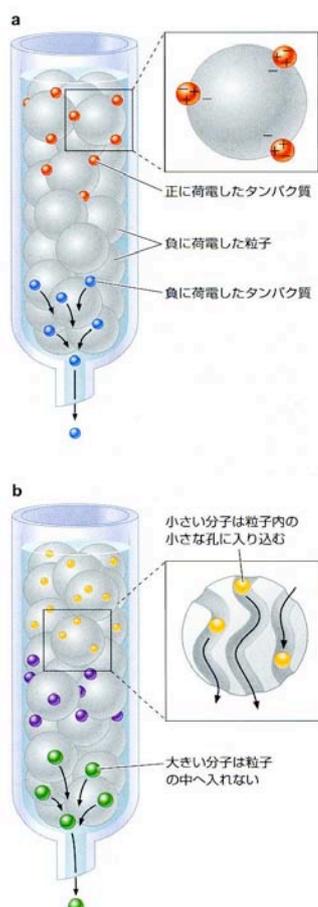


図 20.22 イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィー。よく使われるこれら2つのクロマトグラフィーは、それぞれタンパク質を電荷と大きさの違いによって分画する。どちらの場合もガラス管に小さな粒子を詰め、タンパク質の混合物をこれらの充填材を通して流す。粒子の性質がタンパク分画の方法を決定する。(a)粒子は負に荷電している。したがって、正に荷電したタンパク質は粒子に結合してカラムにとどまるが、負に荷電したタンパク質はカラムを通り抜ける。(b)粒子には小さな孔があり、小さいタンパク質はここに入り込んで寄り道をするので、カラムを流れる速度が遅くなる。大きいタンパク質は粒子の中へ入れないのでさっさとカラムを通り抜ける。

【考えてみよう！】

網目状のゲルを利用した電気泳動では小さいものが先に流れるのに、ゲル濾過カラムではなぜ逆になるのでしょうか？

4. その他の機器 (5号館 2F 田上研究室その他) :

折角の機会なので、超遠心機や画像解析システム、超音波破碎機など研究室の気になる機器について TA や教員に気兼ねなく聞いて探検してみよう。

実験 II : 全体の参加者を大きく 2 グループに分け、1) と 2) を交互に行う。

1) 質量分析とデータベース検索

電気泳動で分離した未知のタンパク質試料について、自分でペプチドの質量分析を行い、データベースを検索してどの遺伝子に由来するものかあててみよう。2~3人で1枚のプレートを用いる。

1. トリプシンで分解したペプチドサンプルを一人1本取る。次ページの図に示す番号がゲル上でのタンパク質のバンドに相当する。
2. サンプルプレートのサークルの一つ（できるだけ中心に近く、コントロールのサンプルの周辺が良い）に $1\mu\text{L}$ のマトリックス溶液 ($\alpha\text{-CHCA}$) をマイクロピペッターで乗せる自分のサンプルを乗せた番号をメモしておく。
3. マトリックスが乾かないうちに自分のペプチドサンプルを $1\mu\text{L}$ 混合してよくサークル内で混ぜる。この時チップの先がプレートに付かないようにすると良い。
4. 風乾したら、1F の質量分析室にプレートと CD を持って移動する。
5. Control Panel 上で質量分析装置のプレートホルダーを真空チャンバーより出す。(約 1 分。この状態で放置すると真空コンプレッサーが壊れるので、必ずホルダーは閉まった状態にしておく)
6. サンプルプレート正しい向きにセットし、プレートタイプ (ゴールド/ステンレス) を選択して装置内に挿入する。
7. 予め最適条件に設定してあるので、自分のサンプルの番号を選択し、レーザーを照射する。きめの細かい結晶をねらうと良く分子がイオン化するのでジョイスティックで狙いを定めよう。ゲームのような感覚です。
8. ピークスペクトルがうまく出ているのを確認したら保存する。
9. Data Explorer software 上で、ベースライン補正、スムージング、トリプシンの自己分解産物を指標とした内部補正を行い、正確なスペクトラムピークを出す。
10. スペクトラムデータをプリントアウトする。
11. Excel ファイルとして保存したデータを CD に焼き付け、4 号館 4 階の計算機演習室に行く。
12. 演習室ではスリッパに履き替え、空いている計算機に CD をセットする。
13. Web ブラウザで Profound (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>) を立ち上げる。図 1 のように設定してピークマスをコピーペーストしたら、[Identify Protein] をクリックする。
14. 検索できると図 2 のような結果が出る。この時の Est'd Z の値が 1 以上であればかなり信頼性が高いと思って良い。分子量 (kDa) がゲル上の見かけのものと矛盾しないことなどを確認する。出ない場合は、TA に相談する。
15. % (理論値とあっているペプチドの存在比) をクリックすると、データの詳細画面 (図 3) になる。どれくらいのペプチドがあっていたか、それは目的タンパク質のどの部分か、エラーはどれくらいあるかなどを確認してみよう。
16. タンパク名をクリックするとそのタンパク質のさらなる情報が得られる。必要な情報をプリントアウト、CD に保存して実習室に戻る。

質量分析サンプルの電気泳動写真：

左 3 レーンが出芽酵母の細胞抽出液を泳動したもので、実験 I 2) で用いる #3, #4 が YPD veg., YPD sta. と同一のものである。レーン左の数字がサンプル No. である。XL マーカーは実験 1 で用いる #2 無染色サイズマーカーと同じもので、右の数字は各タンパク質の分子量(kDa)を示す。

YPD sta. : 増殖停止期 栄養培地

YPD veg. : 増殖期 栄養培地

SD veg. : 増殖期 最小培地

4-12% NuPAGE ゲル

200 V x 35 min 泳動 MES バッファー

C.B.B. 染色

同一の酵母でも生育条件により発現するタンパク質パターンが異なることに注意する。

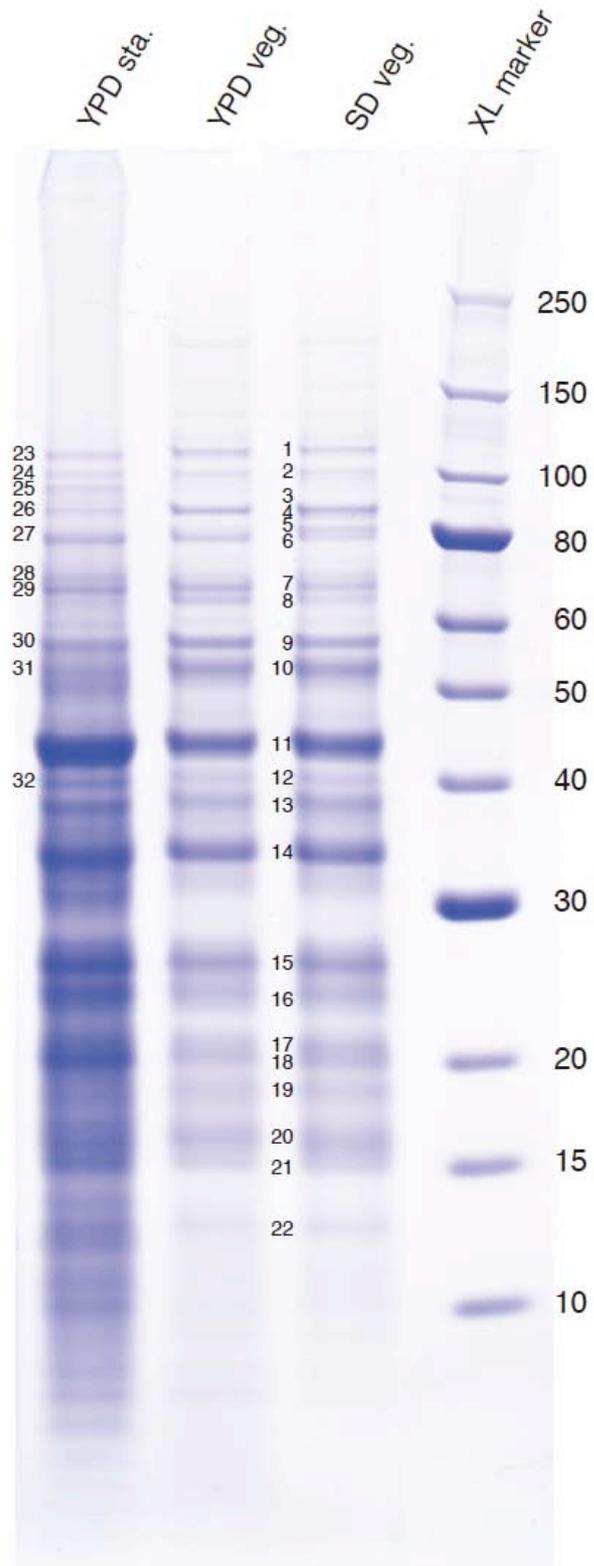


図 1 : Profound の設定画面

PROFOUND

General

Sample ID

Database

Taxonomy

Protein Mass - kDa

Protein pI -

Expect

Z show candidates

Digestion

Allow missed maximum cleavages

Enzyme

For user-defined cleavage, click here.

Modifications

Complete Modification(s)

Partial Methionine Modification oxidation

For more partial modifications, click here.

Masses

Average Masses:

Mass tolerance (average): +/-

Tolerance unit: Da % ppm

Monoisotopic Masses:

Mass tolerance (monoisotopic): +/-

Charge state: M MH+

図 2 : 検索結果画面

Est'd Z が 1 以上、分子量が大体あっていることなどを確認する。%をクリックすると詳細画面になる。

PROFOUND

Protein Candidates

Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	R
1	1.0e+000	1.54	gi 6320779 ref NP_010858.1 Subunit of the Hat1p-Hat2p histone acetyltransferase complex; required for high affinity binding of the complex to free histone H4, thereby enhancing Hat1p activity; similar to human RbAp46 and 48; has a role in telomeric silencing; Hat2p [Saccharomyces cerevisiae]	34	4.7	45.16	<input checked="" type="radio"/>
2	4.5e-008	0.67	gi 6323006 ref NP_013078.1 Non-essential component of the HAT-B histone acetyltransferase complex (Hat1p-Hat2p-Hif1p), localized to the nucleus; has a role in telomeric silencing; Hif1p [Saccharomyces cerevisiae]	31	4.6	43.52	<input checked="" type="radio"/>
3	1.7e-013	0.02	gi 6319672 ref NP_009754.1 Subunit of chromatin assembly factor I (CAF-1), negative regulator of the RAS/cAMP pathway via sequestration of Npr1p kinase; localizes to the nucleus and cytoplasm; homologous to human retinoblastoma binding proteins RbAp48 and RbAp46; Msi1p [Saccharomyces cerevisiae]	27	5.3	47.75	<input checked="" type="radio"/>

図 3 : 結果の詳細 どれくらいのペプチドがあっていたか、それは目的タンパク質のどの部分か、エラーはどれくらいあるかなどを確認する。

ProFound - Search Result Details

The Rockefeller University Edition

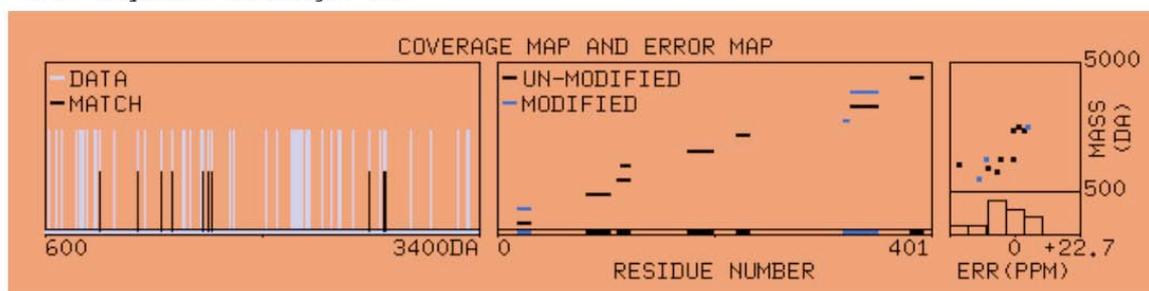
Details for rank 1 candidate in search B5053522-026C-33703C12

1. [gil6320779|ref|NP_010858.1](#) Subunit of the Hat1p-Hat2p histone acetyltransferase complex; required for high affinity binding of the complex to free histone H4, thereby enhancing Hat1p activity; similar to human RbAp46 and 48; has a role in telomeric silencing; Hat2p [*Saccharomyces cerevisiae*]

2. [gil731418|spl|P39984](#) HAT2_YEAST Histone acetyltransferase type B subunit 2

3. [gil603262|qbl|AAB65031.1](#) Hat2p: subunit of a cytoplasmic histone acetyltransferase [*Saccharomyces cerevisiae*]

Sample ID : sample [Pass:0]
 Measured peptides : 67
 Matched peptides : 11
 Min. sequence coverage: 34%



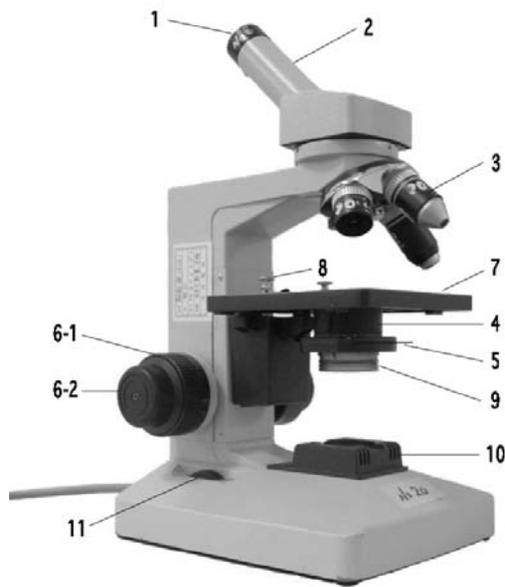
Note: click on the symbol to change column format.

Measured Mass (M)	Avg/ Mono	Computed Mass	Error (ppm)	<input checked="" type="checkbox"/> Residues	Missed	Peptide sequence	
				Start	To	Cut	
951.444	M	951.455	-12	320	326	0	LMMWDLK (1)+OEM;
1204.528	M	1204.535	-6	115	123	0	YEHEEEI TR
1347.684	M	1347.696	-9	382	394	0	CSHSLPIVGGPPK
1422.697	M	1422.724	-19	222	234	0	DLFGTVSEDSLLK
1617.799	M	1617.799	0	111	123	1	ITAKYEHEEEI TR
1656.773	M	1656.781	-5	19	32	0	SNVPLMYDFVSE TR
1672.760	M	1672.776	-9	19	32	0	SNVPT.MYDFVSE TR

2) 細胞観察

タンパク質や遺伝子が機能しているのは生体内であり、複雑な細胞の様子を細胞生物学的手法で観察してみよう。

1. 光学顕微鏡 (生物実習室) を用いて、ヒトの染色体を初め、興味のあるサンプルを観察してみよう。次ページに、簡単な顕微鏡の使用法を記すが、加藤先生や TA に遠慮なく聞くと良い。



1. 接眼レンズ 10倍に固定
2. 鏡筒 基部ねじを緩める事により回転可能
3. 対物レンズ 4倍、10倍、40倍に変換
観察は低倍から始める。倍率を変換する時には対物レンズの基部（レボルバー）を回転させる。
レンズの先端に無理な力を加えると光軸のズレる原因となる。
4. コンデンサー 標本を照明するための集光レンズ
コンデンサーが一番上に上げた状態が最も明るく標本を照明できるように設計されている。コンデンサー上下ねじのついていない顕微鏡もあるが、人工光源を用いる場合は一番上に上げた状態で使用する。
5. 対物絞り
対物絞りは、観察像の焦点深度を決めるためのものである。目的に応じて絞りの開閉をおこなう。
絞りを絞りすぎると、輪郭ははっきりするが像が暗くなり色も不鮮明となるので注意。

6. 焦点操作ねじ

6-1. 粗動ねじ（外側） 対物レンズの4倍でだまかに焦点を合わせる時に使用。

標本を覗きながら焦点を合わせてかまわないが、けっして無理な力を加えないように注意。高倍率で覗きながら粗動ねじを動かさない。

6-2. 微動ねじ（内側） 微細な焦点合わせ、および、倍率を上げた時に用いる。

無理な力を加えないように注意するのは粗動ねじの場合と同様である。

7. ステージ

標本を載せる台で、焦点合わせの時にはこの台が上下する。

8. 標本押さえクリップ

プレパラートを押さえる為のクリップ。

9. 青色フィルター

赤外線をカットし赤色光を減衰させるためのフィルターで、常に装着しておく。

10. 光源

タングステンランプ内蔵で、赤色光が強い。

11. 光源輝度調節ボリューム

光源の明るさを調節するためのボリュームであるが、ランプの寿命を縮めることになるので上限一杯までまわさないように注意。

2. 倒立型蛍光顕微鏡システム（5号館2F暗室）では、DNAを染色した酵母や、GFPというクラゲの蛍光タンパク質と融合させた染色体タンパク質の細胞内局在を観察してみよう。

3. 電子顕微鏡室では昆虫などを走査型で、さらに微細な細胞内構造については透過型を用いて、複雑な生体構造を観察してみよう。

協力教員、スタッフ リスト

名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科	研究科長	田島讓二
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科	教授	森山昭彦
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科	教授	加藤宏一
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科	教授	谷本英一
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科	准教授	湯川泰
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科	准教授	田上英明
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科	学内講師	片山詔久
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科	学内講師	宮原一弘
名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科	技術職員	河野良典
名古屋市立大学 山の畑事務室	事務長	尾田功
名古屋市立大学 山の畑事務室	係長	岩田美知子
名古屋市立大学 山の畑事務室		中川真理
名古屋市立大学 事務局学術推進室		福満和美

TA、ボランティア リスト

博士研究員	道家康平	(田上研究室)
博士後期課程3年	鈴木美恵子	(森山研究室)
博士前期課程2年	加藤麻希	(田上研究室)
博士前期課程2年	保坂いづみ	(田上研究室)
博士前期課程2年	西田満帆	(湯川研究室)
博士前期課程2年	伊藤雄史	(森山研究室)
博士前期課程2年	加藤智子	(森山研究室)
博士前期課程2年	北出かおる	(桑江研究室)
博士前期課程1年	蒔田裕史	(森山研究室)
博士前期課程1年	小林達矢	(田島研究室)
博士前期課程1年	出原由季	(熊澤研究室)

