

# 技術習得報告書

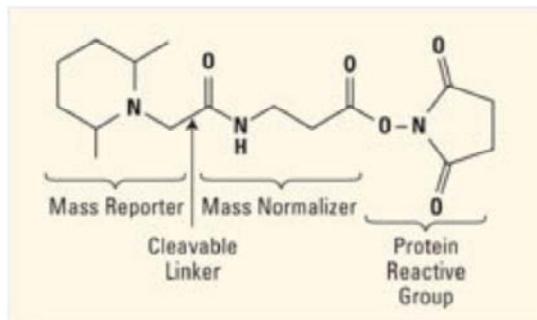
提出日 22年11月26日



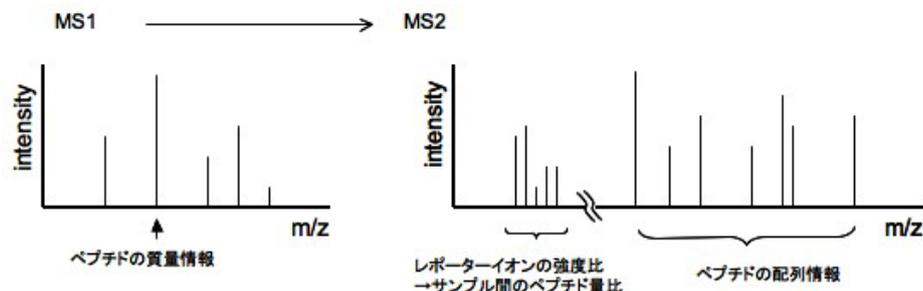
申請者	氏名	島 弘季
	所属・職	医学系研究科生物化学分野・技術員
出張期間	平成22年 11月 18日 ~ 11月 19日	
出張先	サーモフィッシャーサイエンティフィック横浜本社 (横浜市神奈川区守屋町 3-9 )	
出張目的	技術習得	
研究課題名	「定量プロテオミクス最前線・実演」セミナー参加報告	

技術解説・プロトコル・得られた成果など

質量分析によるタンパク質・ペプチドの相対定量の手法の一つとして、アイソバリックラベリング法が一般的に用いられている。サーモサイエンティフィック社が提供している TMT 試薬の場合、最大6種類の異なるサンプル由来のペプチドのアミノ基を、異なるタグで標識する。それぞれのタグは下図のような同じ構造を持ち、全体の質量はどのタグでも同じであるが、炭素 13 と窒素 15 が適宜配置されたレポーター部（およびノーマライザー部）の質量が異なっている。標識されたペプチドを混合して MS/MS 分析を行ったとき、同じ配列の標識ペプチドの質量はサンプルによらず等しいため MS1 では一つのスペクトルとして現れるが、MS2 における開裂でそれぞれのタグのレポーター部が異なる質量のイオンとして検出され、その強度比によってサンプル間でのペプチドの量比を知ることができる。MS1 から得られるペプチドの質量情報と、MS2 から得られるペプチドの配列情報およびレポーターイオンの強度比から、特定のペプチド、さらにはタンパク質のサンプル間の量比を求めることができる。



<http://www.thermoscientific.jp/bid/pierce/ms-interaction/sample-prep/tandem-mass-tag.html> より引用



<p>技術解説・プロトコル・得られた成果など</p>	<p>同様の試薬として iTRAQ が先行して販売されているが、iTRAQ では炭素 13、窒素 15 の数がタグによって異なり、したがってタグの質量にわずかではあるが違いがあるのに比べ、TMT ではどのタグも完全にアイソバリックであるのが特徴であるということである。</p> <p>サーモサイエンティフィック社のラボで行われた実演は、8 種類のタンパク質のミックスをトリプシンで消化したサンプルが準備され、それを参加者が TMT-126 または TMT-127 で別々に標識したのち任意の比率に混合し、LTQ-Orbitrap を用いた MS/MS 測定と Proteome Discoverer による解析でタンパク質の同定および相対定量を行い、その結果とサンプルの実際の混合比との整合性を確認するという内容であった。</p> <p>幾つかのグループに分かれて実験を行ったが、実験の成否はグループによってまちまちであり、どちらのサンプルが多かったかという程度の範囲ではどのグループも正しい結果を出していたものの、定量という点では正確な測定結果を出したグループもあれば何割かの誤差の出たグループもあった。この標識方法は試験管内で標識反応を行うのであるが、それ自体は標識試薬とサンプルを混合して一時間程インキュベートするだけの簡易なものではあるものの、やはり実験者の手技や試薬の状態によって標識効率に差が出る可能性があり、その点では同位体標識アミノ酸を含んだ培地を用いて培養細胞自身にタンパク質を標識させる SILAC 法がより安定しているということである。今回は内容の分かっているタンパク質標品の混合物を用いていたが、実際には細胞からの抽出物など内容のはっきりしないサンプルを扱うことも多く、その場合には標識の効率がさらに問題になるであろうから、標識方法の検討や予備実験などを十分に行う必要があると思われる。また、この方法で定量性が担保されるのは 10 対 1 程度の量比までで、それ以上に大きな差を比較するにはラベルフリーな定量法によるべきであるということであり、その点でも実際に実験を予定して結果を解釈する過程では考慮を要すると考えられる。</p>
----------------------------	---

- ※ 出張後 10 日以内に報告書を提出してください。HP に掲載することがあります。
- ※ 技術解説・プロトコルに焦点をあてたものを記載してください。
- ※ 可能であれば写真も添付してください。
- ※ 用紙が不足する場合は、適宜加えてください。