

疾患プロテオミクスラボラトリー

施設長: 山本 雅 内線:75201 FAX:75401 E-mail: tyamamot@ims.u-tokyo.ac.jp

URL: <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imswww/Soshiki/ShikkanProteomics-j.htm>

支援業務: 蛋白質情報解析 (p1~p7)

微細形態解析 (p8~p10)

(原則的にかかった経費は自己負担とします。)

1. 蛋白質情報解析支援の案内

(1) 質量分析の利用案内

担当者: 尾山 大明 内線:75469 FAX: 75491 E-mail: moyama@ims.u-tokyo.ac.jp

支援内容: タンパク質の同定、翻訳後修飾解析、及び相対定量解析

申し込み先: prtmx@ims.u-tokyo.ac.jp

(支援業務は医科学研究所内に限ります。所外の利用希望者は当施設と共同研究契約を結んで頂く必要がありますので、施設長までお問い合わせ下さい)

質量分析計を用いてタンパク質の同定やリン酸化等の翻訳後修飾解析、並びに異なる試料間の相対定量解析を行いたい場合は、まず上記の申し込み先にメールでご連絡下さい。研究の目的に応じて担当者と相談の上、使用する測定機器及び測定サンプルの調製方法に関して方針を決定します。測定に必要な消耗品の費用は原則として申込者負担になります。なお本施設のスタッフが解析や技術指導を行った場合は、共同研究扱いとさせていただきます。現在稼動している質量分析計は以下の3タイプです。

① MALDI-TOF/TOF 型質量分析計 (担当: 福田 宏之、高村 千鶴子 内線:75245)

解析対象のタンパク質を酵素消化により断片化したペプチドに関して、分析計内での衝突解離により更に部分断片化した質量データセット(MS/MS データ)を取得します。内部アミノ酸配列に関する情報も得られるため、確度の高い同定が可能となります。解析サンプルが混合物で複雑性が高い場合は、MS 測定の前にLCによる分画を行います。なお分画処理を行う場合、1サンプル当たり¥5,000 かかります。分析は技術指導担当者が付き添って行います。

② nanoLC-ESI-Q-TOF 型質量分析計 (担当:尾山 大明、 秦 裕子 内線:75469)

MALDI-TOF/TOF 型と同様、MS/MS データの取得により、確度の高い同定が可能です。サンプルに含まれるペプチドを nanoLC によって分離を行いながら、直接質量分析計に導入して測定を行います。そのため、複雑性の高いサンプルに関する包括的な同定を行うことが可能です。LC と MS は直接接続しており、MS での効率的な検出を行えるよう、LC における分離条件を最適化してあります。nanoLC における分離能が検出感度に直接影響を及ぼすため、消耗品のカラム、ESI スプレイヤーは全て申込者ごとに付け替え、必要経費として1測定あたり¥70,000 かかります。なお、分析は専属の担当者が行います。

③ MALDI-TOF 型質量分析計 (セルフサービス、相談窓口:福田、高村、尾山、秦)

解析対象のタンパク質を酵素消化し、断片化したペプチド群の分子量に関するデータセット(MS データ)を基に検索によって同定します(ペプチドマスフィンガープリント法)。同定を行うためには高い精製度が必要となるため、通常一次元ないし二次元電気泳動によって十分に分離したゲルバンドないしゲルスポットから測定試料を調製します。現在は、利用者によるセルフサービスとなっています。使用予約表が備えてありますので、予約してご利用下さい。

(2) ペプチド合成サービス利用案内

担当者:大海 忍 内線:75311 FAX: 75491 E-mail: ohmi@ims.u-tokyo.ac.jp

オペレーター:市川 希

抗体作成などの目的のためにペプチドの化学合成を行います。利用者は所定用紙に配列を記入し合成を申し込んでください。次ページ「ペプチド合成サービスの利用規定」を参照ください。

(3) 蛋白質調製・機能解析支援利用案内

担当者:大海 忍 内線:75311 FAX: 75491 E-mail: ohmi@ims.u-tokyo.ac.jp

種々の蛋白質実験のためのサンプル調製、ペプチドの精製、抗体の精製などをおこないます。この中で、化学合成したペプチド(一度に4本まで)の脱保護はオペレーターがおこないますが、他は技術指導を致します。またプロテオーム解析のための二次元電気泳動から質量分析の方法、蛋白質間相互作用の解析や酵素の活性測定などは、可能な範囲でアドバイスおよびサポートします。

ペプチド合成サービスの利用規定

(2006年12月)

ペプチドの化学合成の概略

現在、2台の合成機が動いています。合成効率の良いフロー方式と一度に8本までのマルチ合成が可能な開放方式の合成機です。合成は、樹脂に結合したカルボキシル末端のアミノ酸からアミノ末端方向に1個ずつアミノ酸をつけてゆきます。すべてのアミノ酸は、反応基が保護された状態で付加されます。したがって合成後にこれらの保護基を除去し、樹脂からペプチドを切り出す操作をしなければなりません。さらに必要に応じて不純物を除くために逆相HPLCによる精製をおこないます。合成ペプチドは最終的に凍結乾燥してお渡します。合成後のすべての操作は手作業によります。

一度に依頼できるペプチドの本数

一度に依頼できるペプチドの本数は原則として4本までです。5本以上を依頼される場合は、脱保護をセルフサービスでやっていただくオプションが選べます。オペレーターの脱保護操作を一度見学していただき、4本を越えた分をご自分で脱保護すると出来上がりが早くなります。セルフサービスを希望されないときは、オペレーターが脱保護をおこないますが、合成依頼の混み具合でお渡しする日にちが遅くなることもあります。

合成可能なペプチド

ペプチドの化学合成は鎖長が増すと急激に収量が落ちます。不必要に長いペプチドの合成はお奨めしません。抗体作成ならば通常15-20残基で十分です。ただし、アミノ酸配列によっては短くても合成が困難な場合もあります。疎水性の高いものあるいは組成が偏っているペプチド、きわめて短いものなどは、HPLCによる精製が困難なため、合成しても使用できないことがあります。マルチ型合成機(10 μ mol スケール)の場合、一度に最大8本のペプチドが合成できます。ただし、キャパシティー一杯で合成することはほとんどありませんので余裕をもって依頼してください。リン酸化ペプチド(Tyr, Ser, Thr にリン酸基が入ったペプチド)、蛍光標識ペプチドなど、特殊なペプチドは、対応するアミノ酸誘導体が市販されている場合は合成可能です。

ペプチドの精製について

HPLC によるペプチドの精製は別途依頼してください。1サンプルについて一定時間まではオペレーターが処理いたしますが、溶けにくいペプチドなど精製に時間がかかる場合は、出来上がりに日数がかかることがあります。HPLC 操作を依頼者がセルフサービスでやっていただくと早くお渡しできます。こちらから連絡させていただきます。10 μ mol スケールで合成したペプチドについては、HPLCによる精製は原則としておこなっていません。合成効率次第で最終的に得られるペプチドが極端に少なくなることもあるからです。

合成量について

合成は通常 0.1mmol スケールまたは 10 μ mol スケールの Fmoc 法でおこなっています。分子量 1,000 のペプチドならば理論的にはそれぞれ 100mg, 10mg のペプチドができるはずですが、実際に最終的に得られるペプチドの量はアミノ酸配列によって大きく左右されます。

合成ペプチドが出来上がるまでの日数について

フロー方式合成機(0.1mmol スケール)の場合:合成機の運転時間は1残基あたり1時間足らずで1日1本の合成が可能ですが、合成後に脱保護操作をおこないますので、このペースよりは長くかかります。HPLCによる精製は1日1〜2本できますが、カラムに結合しにくいペプチドの場合は先に凍結乾燥をしますのですらに時間がかかります。さらに、凍結乾燥が律速になるため供給が遅れることがあります。

マルチ型合成機(10 μ mol スケール)では同時に8本までの合成が可能ですが、ひとりのオペレーターが2台の合成機を操作しているためできあがりまでに要する日数はフロー型とほぼ同じと考えてください。合成が順調に進んでいる状態でできあがりまで平均4週間程度です。

脱保護操作のセルフサービスについて

合成依頼が増えたために出来上がりが遅れがちになっています。脱保護操作をご自分でおこなうことによってペプチドを早く手にすることが可能です。一度に5本以上の依頼をされた場合は「脱保護操作のセルフサービス」をご案内しています。

凍結乾燥サービスについて

現在、合成したペプチドは 50 mL チューブに入れて凍結乾燥してお渡ししています。ペプチドは乾燥した冷暗所に保存することをお勧めします。同じ容器を何回も開閉して使用すると劣化していきます。1.5 mL チューブに分注したペプチドを凍結乾燥するサービスをおこなっています。以下の方法に従って分注したペプチドをお持ち下さい。経費は現在のところ請求いたしません。

1. ペプチド(10 mmol, 50 mL チューブ入り)を 5〜10 mL の蒸留水で溶解する。泡を立てないように注意、ボルテクスミキサーはなるべく使わない。
2. 10 本の 1.5 mL チューブに等量分注する。チューブの側面とふたにペプチドの番号をマジックインキで記入しておく。テープやシールの使用は不可。
3. 分注したペプチドをフリーズボックス(所属・名前を明記)に入れ、 -20°C で凍結する。
4. チューブのふたを開け、 -80°C で凍結する。

「凍結乾燥サービス利用申込書」(最終ページ)に記入の上、凍結ペプチドをフリーズボックスごと合同ラボ棟1階・大海までお持ち下さい。乾燥が完了次第(混んでいなければ翌日)お渡しできます。なお、チューブの本数は一度に 50 本以内にしていただくようお願いいたします。

合成費用について

合成、脱保護および精製に要した試薬・消耗品類の実費のみを負担していただきます。現在1残基あたりのコストは、0.1mmol スケールでは 2,800 円程度、10 μ mol スケールでは 560 円程度になっていますが、使用するアミノ酸誘導体によって費用が変わりますので若干の上下があります。ペプチドが出来上がった翌月の請求となります。なお費用は使用した消耗品にチャージされますので、得られたペプチドの量にかかわらずかかってきます。

合成したペプチドに関する分析データについて

0.1mmol スケールで合成したペプチドの精製時のHPLCのチャートや質量分析データは、希望されればお渡しします。10 μ mol スケールで合成したペプチドについては、HPLCによる精製は原則としておこないませんが脱保護後の標品はHPLCで確認しております。

申込み資格について

原則として医科研所内からの依頼に限ります。所外の方が合成サービスを希望される場合は医科研の研究分野・施設を経由して申し込んでください。

申込手続きについて

次ページの『[ペプチド合成申込書](#)』に必要事項を記入のうえ、疾患プロテオミクスラボラトリー（合同ラボ棟1階）・大海まで提出してください。申込書はペプチドごとに作成してください。不明な点がありましたら、大海 (ohmi@ims.u-tokyo.ac.jp)宛お問い合わせください。

ペプチド合成申込書

年 月 日

ペプチド合成担当者 殿

以下のペプチドの化学合成を申し込みますのでよろしくお願いいたします。

所属研究分野・施設: _____

申込者(使用者): _____ 印

連絡先(内線番号, 電子メールアドレス): _____

申込責任者: _____ 印

連絡先(内線番号, 電子メールアドレス): _____

アミノ酸配列(一文字表記でアミノ末端から):

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30

Ala⇨A Cys⇨C Asp⇨D Glu⇨E Phe⇨F Gly⇨G His⇨H Ile⇨I Lys⇨K Leu⇨L

Met⇨M Asn⇨N Pro⇨P Gln⇨Q Arg⇨R Ser⇨S Thr⇨T Val⇨V Trp⇨W Tyr⇨Y

アミノ酸残基数: _____ 残基

合成スケール: 0.1mmol スケール 10 μ mol スケール (どちらかをチェック)

カルボキシル末端: COOH、 CONH₂ (どちらかをチェック **参考**: 抗体作成の場合, 合成するペプチドのC末端がタンパク質のC末端と一致するときは COOH, 合成箇所が内部配列のときは CONH₂ とすることが多い) 0.1mmol スケールの場合, HPLC精製を する / しない

合成ペプチドの使用目的(例, 抗体の作成など): _____

その他希望があれば書いてください _____

凍結乾燥サービス利用申込書

疾患プロテオミクスラボラトリー 御中

凍結乾燥サービスの申込をいたします。

申込日: _____年 ____月 ____日

申込者(ふりがな): _____ (_____)

所属研究分野/施設: _____

内線電話番号: _____

電子メールアドレス: _____@ims.u-tokyo.ac.jp

ペプチド番号: _____

1本あたりの量: 1mmol _____

本数: _____本

溶媒: 蒸留水 _____

ペプチド番号: _____

1本あたりの量: 1mmol _____

本数: _____本

溶媒: 蒸留水 _____

ペプチド番号: _____

1本あたりの量: 1mmol _____

本数: _____本

溶媒: 蒸留水 _____

ペプチド番号: _____

1本あたりの量: 1mmol _____

本数: _____本

溶媒: 蒸留水 _____

2. 微細形態解析支援の案内

担当者:相良 洋 TEL/FAX: 75515 E-mail: sagara@ims.u-tokyo.ac.jp

微細形態解析グループでは以下のサービスを行います。

1. 透過型電子顕微鏡用試料作成および指導
2. 走査型電子顕微鏡用試料作成および指導
3. 免疫電子顕微鏡法用試料作成および指導
4. その他、形態学的観察のサポート

(光学顕微鏡標本(樹脂包埋)作成、ネガティブ染色、等)

1. 透過型電子顕微鏡用試料作成および指導について

超薄切片法により組織・細胞の微細形態を観察するための試料作成、電子顕微鏡観察、写真撮影を行います。また、自分で試料作成、観察を希望される方々には、適正な指導、アドバイスをします。

2. 走査型電子顕微鏡用試料作成および指導について

走査型電子顕微鏡で組織、細胞の表面構造を観察するための試料作成、観察、写真撮影を行います。自分で試料作成、観察を希望される方々には、指導、アドバイスをします。

3. 免疫電子顕微鏡法用試料作成および指導について

特定分子の細胞内局在を免疫電子顕微鏡法を用いて検索します。コロイド金法、HRP法等、用いる方法については事前に相談して決定します。

用いる抗体は一次抗体、二次抗体とも利用者側でご用意ください。

また、検索したい抗原分子によっては必ずしも明確な局在が得られない場合があります。事前に了解の上ご利用ください。

4. その他、形態学的観察のサポートについて

上記の電子顕微鏡的観察以外にも電子顕微鏡用樹脂包埋試料の厚切り切片による光学顕微鏡的観察や、ネガティブ染色による細胞分画や分子の観察等、様々な形態学的観察のサポートが可能です。

思いついたことがありましたら一度ご相談ください。

利用の手順

1. 担当者(相良)に連絡。
電話: 内線 75515
E-mail: sagara@ims.u-tokyo.ac.jp
2. 担当者と打合せ。
実験目的をおうかがいした後、目的達成のための最適な方法をご提案し話し合いの上、具体的な実験の計画を立案します。
3. 利用申込書の提出。

検体引き渡し
4. 作業の実施
5. 試料・写真の引き渡し、説明

利用料金

1. 透過型電子顕微鏡

- 一式……………10,000 円
別途、ネガ一枚につき 150 円が必要になります。
- 固定・脱水・包埋…………… 6,000 円
- 薄切・染色・観察・撮影…………… 4,000 円
別途、ネガ一枚につき 150 円が必要になります。
- 写真焼き付け…………… 印画紙一枚につき 150 円

2. 走査型電子顕微鏡

- 一式……………10,000 円
- 固定・脱水・凍結乾燥…………… 6,000 円
- 観察・撮影…………… 4,000 円

3. 免疫電子顕微鏡

透過型電子顕微鏡に準ずる

4. その他、形態学的観察のサポート

その都度相談により決定します。
最低限消耗品代の負担をお願いいたします。

