

	キョ	ハ
氏 名	許	波
学 位	博 士 (医学)	
学 位 記 番 号	新大博(医)第1670号	
学位授与の日付	平成17年 3月23日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
博 士 論 文 名	Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney: differential protein expression in glomerulus, cortex and medulla (2次元電気泳動による正常ヒト腎臓のプロファイリング: 糸球体、皮質、髄質のタンパク質差異発現の解析)	
論文審査委員	主査 教授 追 手 巍	
	副査 教授 山 本 格	
	副査 教授 清 水 不二雄	

#### 博士論文の要旨

腎臓の多彩な生理的機能は腎臓を構成する基本的構造単位であるネフロンによって担われている。ネフロンは、機能的、構造的に異なる分節からなり、腎臓の実質を構成する皮質と髄質の両者にまたがって走行している。ネフロンが機能的に異なる分節からなり、それぞれの分節が腎臓の特定の部位に存在するので、腎臓の異なるコンパートメントではそのタンパク質組成と発現量(プロテオーム)が異なる。本研究は、2次元電気泳動(2-DE)を用いて、ヒト正常腎臓の皮質と髄質、さらに皮質から高度に精製した糸球体を対象として、それぞれのコンパートメントのタンパク質組成と発現量の違いを明らかにすることを目的とした。

ヒト正常腎臓の皮質と髄質は、腎腫瘍により腎全摘術を受けた患者より同意を得て入手した。電気泳動に用いる試料は腫瘍部位からできるだけ離れた部位から切除し、また、同時に同組織から組織学的検査のための標本作製した。本研究では、光学顕微鏡による病理学的検査で異常所見がみられず、蛍光抗体法によりIgG、IgA、IgM、C3の沈着のないものを正常とし、解析の対象とした。糸球体は皮質より通常のシービング法により精製し、尿細管の混入がみられる場合は、再度シービングを繰り返すことにより高純度の糸球体標本とした。これらの試料は一般的に用いられる Urea/NP-40/DTT 試料溶解液で可溶化し2-DEの試料とした。2-DEは、1次元目に18cmのpH3-10の固定化pH勾配ゲルを用い、2次元目に20×20cmの12.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、タンパク質スポットの検出は銀染色で行なった。

4例の正常ヒト腎臓組織から得られた糸球体、皮質、髄質(外層)の2-DEパターンは、それぞれのコンパートメントの2-DEゲルごとに2-DE解析ソフト(PDQuest)により、スポット検出、ゲル間のスポットのマッチングを行い、明確なすべてのスポットを含む合成2-DE画像を作製し、さらに各コンパートメントの合成2-DE画像のスポットのマッ

ングを行い、すべてのコンパートメントの 2-DE ゲルで検出された明確なスポットを含む高次合成 2-DE 画像を作成した。この高次合成 2-DE 画像には、すべての 2-DE ゲルで検出されたスポットの定量値が含まれ、それぞれのコンパートメントに統計学的に有意に多く発現しているスポットあるいは特異的に発現しているスポットを、一元配置分散分析と Turkey の Post-hoc テストにより特定した。

その結果、糸球体には 1,810 個、皮質には 1,758 個、髄質には 1,275 個の明確なスポットが検出され、糸球体に有意に多く発現しているスポットとして 616 個、皮質に有意に多く発現しているスポットとして 582 個、髄質に有意に多く発現しているスポットとして 469 個のスポットを見出した。これらのスポットのうち、それぞれのコンパートメントに特に多く発現しているスポット（糸球体 204 個、皮質 112 個、髄質 80 個）について、MALDI-TOF 型質量分析計を用いてペプチド・マス・フィンガープリント法による同定を試み、これまでに、糸球体に特異的に発現する 19 個のスポット、皮質に特異的に発現する 35 個のスポット、髄質に特異的に発現する 21 個のスポットを同定した。

我々は、既にヒト正常糸球体の 2-DE 解析により 421 個のスポットを同定し、データベース化して、Web 上に公開しているが、本研究で得られた腎臓のコンパートメントによるタンパク質差異発現の解析結果も同データベースと統合し、基礎的ならびに臨床的研究に有用なヒト腎臓プロテオームデータベースとして、研究者の利用に供する予定である。

## 審査結果の要旨

ヒトゲノムの解読が完了し、プロテオミクスの時代に入っている。本研究ではヒトの正常腎臓（皮質、特に糸球体、髄質）に発現する蛋白を二次元電気泳動法(2-DE)で網羅的に検出し、各部位に特異的に発現する蛋白を同定した。腎腫瘍で摘出された腎の正常部位を使用し、尿素・NP-40・DTT で溶解・可溶化して 2-DE の試料とした。一次元目は pH3-10 の勾配ゲルを用いた等電点電気泳動、2 次元目は 12.5%ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動を行い、蛋白質スポットを銀染色した。4 例の腎組織から得られた糸球体、皮質、髄質（外層）の 2-DE パターンを解析ソフト(PDQuest)でスポットのマッチングを行ない、高次合成 2-DE 画像を作成した。既知蛋白を指標として一元配置分散分析と Turkey の Post-hoc テストにより各染色スポットを特定した。その結果、糸球体、皮質、髄質にそれぞれ 1,810, 1,758, 1,275 個のスポットを検出した。各部位に優位に発現しているスポットについて MALDI-TOF 型質量分析計により糸球体、19 個、皮質 35 個、髄質 21 個の特異的蛋白を同定した。この結果は、すでに公表しているデータに追加し、基礎的並びに臨床的研究に有用なヒト腎臓プロテオームデータベースとして利用可能となることから、本研究に学位論文としての価値を認める。