

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 崔 珍玉
学位 位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 562 号
学位授与の日付 平成 25 年 9 月 20 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 **Profiling and annotation of human kidney glomerulus proteome**
(ヒト腎糸球体プロテオームの網羅的解析とその特徴について)
論文審査委員 主査 河内 裕
副査 山本 格
副査 成田 一衛

博士論文の要旨

【背景と目的】

申請者らは正常ヒト糸球体を対象として、質量分析計を用いた網羅的解析を行い、その結果を既に報告している。この解析では、2,966 遺伝子に由来する 6,686 種のタンパク質の同定に成功したが、同一のペプチド・セットあるいはそのサブセットがマッチするタンパク質を同定タンパク質として報告したことにより、同定されたタンパク質リストには、スプライシング・バリエント、あるいは相同性が高いアミノ酸配列をもつタンパク質が含まれることになる (冗長性)。本研究では、新たに Mascot を検索エンジンに用い、さらに、同定基準を見直すことにより、冗長性を排除し、高い信頼性で同定されたタンパク質データセットを構築し、正常ヒト糸球体プロテオームの特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】

腎臓癌で摘出された腎臓の組織学的に正常な皮質からシービング法で精製した糸球体を対象とし、2 mg の抽出タンパク質を液相等電点電気泳動 (5 分画) と SDS-PAGE の 2 段階で分離し、さらに SDS-PAGE で分離したそれぞれ液相等電点の分画を 15 等分に切断して、それぞれのゲル切片をトリプシンでゲル内消化した (75 分画)。また、これとは別に直接 SDS-PAGE で分離し、15 等分したゲル切片も同様に処理した (15 分画)。これらの分画 (全 90 分画) それぞれを、2 回にわたってナノフロー逆相クロマトグラフィータンデム質量分析計で解析した。タンパク質の同定は、Mascot (version 2.2.1) を検索エンジン、IPI_human protein sequence database (version 3.70) をタンパク質配列データベースとして用いた。ペプチドの MS/MS スペクトルのスコアが "identity threshold" を超え、タンパク質の配列に帰属するすべてのペプチドの false discovery rate が 1% 以下 (0.25 % ± 0.24 %) となる条件に合致するタンパク質から、同一のペプチド・セットあるいはそのサブセットが帰属するタンパク質を除去したものを、同定タンパク質として解析の対象とした (high confidence, non-redundant dataset)。

【結果】

1. 厳しい同定基準下で Mascot を検索エンジンとして用いることにより、高信頼性、非冗長性の同定タンパク質のデータセットを構築できた (同定タンパク質 1,817、遺伝子 1,478)。
2. 我々が用いたタンパク質の分離法は、同定されたタンパク質の分子量と等電点という情報が取得できる。液相等電点電気泳動と SDS-PAGE で分離した 75 分画のそれぞれで同定されたタンパク質は、実際に測定された分子量と等電点が、データベース上の値と大きく異なるものが存在することが明らかになった。
3. 糸球体で同定されたタンパク質の特徴を知るため、GO annotation 解析 (細胞内局在、分子機能、

生理的機能) やパスウェイ解析などの Bioinformatics tool を用いて解析した結果、糸球体プロテオームには、特にアクチン細胞骨格系、中間径フィラメント細胞骨格系、細胞外マトリックス系に属するタンパク質が多く存在することが明らかになった。

4. 同定されたタンパク質のスペクトラルカウンティング法を用いた定量から、同定されたタンパク質の濃度範囲 (dynamic range) は 4.4×10^4 に及び、これまで報告されている最大の網羅的解析であるマウス糸球体を対象とした報告 (1.2×10^4) に匹敵することから、低濃度のタンパク質まで同定されていることが確認された。

5. 本研究で得られた糸球体プロテオームの解析結果と、ヒト血漿および尿の網羅的解析結果を比較することにより、糸球体に混入する血漿タンパク質、あるいは糸球体から尿中に出る糸球体タンパク質の種類と量の推定が可能となった。また、尿中出现する糸球体タンパク質のうち、糸球体に局在するタンパク質のいくつかを、抗体を用いた免疫組織・細胞化学のデータベースである Human Protein Atlas を参照することにより特定できた。

6. ヒト糸球体プロテオームとマウス糸球体プロテオームで同定された ortholog protein を比較することにより、種間に質的相違があることが示唆された。

【結論】

ヒト糸球体で高い信頼性で同定され、冗長性を排除したタンパク質データセットの bioinformatics tool による解析、血漿プロテオームあるいは尿プロテオームとの比較により、糸球体プロテオームの特徴を明確にすることができた。このデータセットは、バイオマーカーや疾患関連タンパク質の発見を目的とした臨床研究においても有用なリソースとなると考えられる。

審査結果の要旨

申請者らは腎臓癌で摘出された腎臓から、組織学的に正常な皮質を得て、糸球体を精製し、質量分析計を用いてタンパク質の網羅的解析 (プロテオーム解析) を行い、その結果を既に報告している。しかし、その解析で同定されたタンパク質には、スプライシング・バリエーションや相同性が高いアミノ酸配列をもつタンパク質が含まれ、冗長性のある解析結果であった。本研究は、タンパク質の同定基準を見直し、冗長性を排除し、信頼性の高い正常ヒト糸球体プロテオームデータセットを構築し、糸球体の特徴を明らかにすることを目的とした。検索エンジンを新たに Mascot (ver 2.2.1)、タンパク質配列データベースは IPI human (ver 3.70) を用い、同定基準はペプチドのスペクトルスコアが identity threshold を超え、false discovery rate が 1% 以下となるようにし、冗長性を排除した。その結果、1) 高信頼性、非冗長性の網羅性の高いヒト糸球体タンパク質のデータセットの構築、2) 実測された分子量と等電点が、データベース上の値と大きく異なるタンパク質の存在、3) 細胞骨格や細胞外マトリックス系タンパク質の高い集積、4) ヒト尿プロテオームとの比較による尿中糸球体タンパク質の特定、5) マウス糸球体プロテオームとの比較による種間の相違などが示された。

以上、本研究により、冗長性を排除した信頼性の高いヒト糸球体プロテオームデータセットが構築され、糸球体プロテオームの特徴が示され、尿バイオマーカーや糸球体疾患関連タンパク質研究に有用なリソースが提供されたと考えられたので、博士論文としての価値を認めた。