

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名	生駒 俊和
学 位	博士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博 (医) 第 628 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 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	非標識サンプルの質量分析解析からタンパク質を定量する簡易エクセルツールの作成とその応用
論文審査委員	主査 教授 成田 一衛 副査 教授 山本 格 副査 教授 河内 裕

### 博士論文の要旨

【背景と目的】病気の発症や予後はタンパク質の機能の変化が重要視されている。そのため、タンパク質を網羅的に解析し、その構造や発現量の変化から病態を解明することを目指すプロテオミクス研究が盛んに行われている<sup>3</sup>。

質量分析装置を用いたプロテオミクス解析からのタンパク質関連情報のデータ量は大容量で、多数の標本から目的タンパク質の情報を調べるには、大容量のタンパク質関連情報のデータからタンパク質の数や発現量を整理し、容易に比較できるツールが必要となった。

質量分析プロテオミクスでタンパク質を定量するには、タンパク質やペプチドを安定同位体などで標識する標識法と標識物質を使わない非標識法があるが、前者は定量性が高いが、検査が煩雑で、解析コストが高いのが欠点である。一方、後者はその定量性が欠点と言われてきたが、近年、定量性が高い指標として Normalized Spectral Index (SIN) が提唱されている。

本研究では質量分析装置で分析し、MASCOT サーチエンジンで同定されたタンパク質同定情報を、一定のフォーマットで出力したデータを Microsoft 社 Excel に読み込み、目的とするタンパク質の定量的な情報である SIN を算出するツールの作成を目指した。

【方法】正常ヒト腎の皮質と糸球体は全腎摘出手術を受けた患者さんから、インフォームドコンセントを得て、提供された腎臓から光学顕微鏡及び抗体組織検査で正常と判断された組織部分を得た。糸球体の単離などは氷上にて、4℃の緩衝液を用い、篩法で行った。皮質と糸球体をホモジェネートし、尿素を含む緩衝液を用いて可溶化した。

ヒトフケは質量分析装置でタンパク質を同定する際に空中の浮遊物として、解析サンプルに混入する主な汚染物質で、タンパク質の同定の障害となるものである。今回のヒトフケを頭部から採取した。このフケを糸球体由来のペプチドサンプルに 2%, 20%, 100% 添加させた (フケ添加サンプル) 3 サンプルを各々 3 回測定し、実験結果再現性の検証ツールでの解析に利用した。

ペプチド精製はヒト腎組織由来タンパク質は 10% SDS-PAGE で展開し、その後ゲル内消化を行った。ペプチドの精製は StageTip® を用いて行った。精製されたペプチドは凍結遠心乾燥を行い、-30℃で保存した。

MS 測定を行う前に超純水に溶かし、濃度を測定した。

MS 測定は Agilent 社 nanoLC-MS/MS (Agilent 6300 series LC-MSD) で行い、腎皮質由来のペプチドサンプルを 6 サンプル、糸球体由来のペプチドサンプルを 3 サンプルの分析をおこなった。質量分析計の測定条件の違いによる影響を検証するために上記のサンプルを MS target parameter を 732 m/z と 1032 m/z に変更して測定した。

その分析結果を MASCOT サーチエンジンで同定した。そのタンパク質同定情報から SIN を算出するツールをエクセルの関数、と VBA (Visual Basic for Application) を用いて作成した。算出された定量的情報から 2 群間のデータ比較ツール、実験結果再現性の検証ツールを作成した。

【結果】タンパク質の定量的な情報 (SIN) 算出ツールの結果は腎皮質由来のペプチド標本と、腎糸球体由来のペプチド標本を測定し、その同定結果からタンパク質の SIN の算出を行った。pep\_score が 20 以上のときに検出されたタンパク質の数は 527 種類。腎皮質由来のタンパク質は 392 種類、糸球体由来のタンパク質は 205 種類で、腎皮質と糸球体ともにみられたパク質は 70 種類であった。pep\_score が 0 以上のときに検出されたタンパク質の数は 573 種類でそのうち腎皮質由来のタンパク質は 425 種類、糸球体由来のタンパク質は 218 種類で、腎皮質と糸球体ともにみられたパク質は 70 種類であった。検出されたタンパク質の中から糸球体に特異的、あるいは比較的多く存在していることが示されているポドカリキシン (podxl)、ビメンチン (VIM)、ポドシン (NPHS2)、 $\alpha$ -アクチニン 4 (ACTN4) の 4 タンパク質の SIN の算出結果を検証したところ pep\_score の条件を 0 以上と 20 以上に変更しても SIN の結果はほとんど変化はなく、発現の信頼性が高いことを示した。

2 群間のプロテオームデータ比較では、腎皮質と糸球体ともに検出されたタンパク質は 51 種類、腎皮質のみ検出されたタンパク質は 243 種類、糸球体のみ検出されたタンパク質は 87 種類であった。さらにタンパク質の SIN の平均と標準偏差をもとめ t 検定を行った。腎皮質と糸球体ともに検出されたタンパク質の中で優位差のあるものが 21 種類、腎皮質のみ検出されたタンパク質の中で優位差のあるものが 47 種類、糸球体のみ検出されたタンパク質の中で優位差のあるものが 10 種類あった。

実験結果の再現性の検証では、変動係数率 0.2 以下が腎皮質と糸球体の数値とフケ添加サンプルの数値には大きな差があり、フケ添加サンプルの再現性が悪いことを示していた。

【考察と結論】本研究は各種腎疾患のプロテオーム解析のために用いられている MASCOT サーチエンジンで同定したタンパク質情報をエクセルで読み込み、検索したタンパク質の量的情報である SIN を容易に算出できるツールを作成し、有効性について検証したことである。約 600 種類のタンパク質の分析データであったが容易に比較検討、データ処理を行うことができた。このツールは通常よく使用されている表計算ソフトエクセルで作成してあるので、個人のパソコンでも質量分析計からのタンパク質同定情報結果からの定量的情報の発現レベルの比較検証を容易にできることを示した。

#### 審査結果の要旨

質量分析計の進歩により、タンパク質を網羅的に同定、定量するプロテオミクスでは得られる情報が膨大となり、研究者が手作業で注目するタンパク質の定量情報を抽出するのがほとんど不可能になった。そのために高価な市販の解析ソフトを利用することも出来るが、本研究は質量分析プロテオミクスでタンパク質の定量的指標として使われている Normalized Spectral Index (SIN) をエクセルで算出する簡易ツールを作成することを目指した。

液体クロマトグラフィー・質量分析装置でヒト腎臓の皮質と糸球体などのプロテオームを解析し、その

情報をタンパク質検索エンジン（Mascot）でタンパク質を同定し、その結果を CSV ファイルとした。このファイルから個々のタンパク質の定量に必要な情報を自動的に抽出し、SIN を計算する簡易ツールをエクセルで作成し、その有用性を検証した。

その結果、正常腎皮質と腎糸球体のプロテオームを定量的に比較し、糸球体に特異的、あるいは優位に多く存在しているタンパク質の抽出ができた。また、同一サンプルを複数回質量分析した場合、結果の再現性の指標となる変動係数率を SIN から求めることで、再現性の検証を行うことが出来た。

以上、本研究は通常よく使用されている表計算ソフトエクセルで質量分析計によるタンパク質の同定情報から個人のパソコンでもタンパク質の定量情報を簡単に計算、抽出できるツールを作成し、その有用性を示した点に学位論文としての価値を認める。