

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	多賀 昌樹
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 630 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	正常ヒト糸球体タンパク質の質量分析計と免疫組織化学染色の比較:質量分析計だけで同定されたタンパク質の解析
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 味岡 洋一

博士論文の要旨

【背景と目的】 プロテオームとは、生体中において存在しているタンパク質の総体であり、プロテオームを網羅的に解析することをプロテオミクスという。プロテオーム解析には、主に質量分析装置による質量分析プロテオミクスにより生体内で発現するタンパク質の網羅的な解析と、抗体を用いた免疫化学組織染色による局所的な情報取得を可能とする抗体プロテオミクス解析がある。申請者らの研究室では、ヒトの腎組織や尿のプロテオームを解析する国際共同研究プロジェクトを組織し、ヒト腎糸球体を構築するタンパク質を質量分析計による網羅的解析を行い、次に抗体によるプロテオーム解析でタンパク質の局在を解明することで、慢性腎臓病の病因、病態を解明することを目指している。しかし、質量分析プロテオミクスで同定された糸球体タンパク質の中には、抗体プロテオミクスにおいて同定されない糸球体タンパク質が存在した。本研究では、質量分析プロテオミクスでは同定されたが、抗体プロテオミクスでは同定できなかったタンパク質についてその原因を解析することを目的とした。

【方法】 1. 正常ヒト糸球体タンパク質の調整

正常ヒト糸球体の質量分析プロテオミクスに用いた糸球体は、腎臓がんのため腎臓摘出を余儀なくされた 68 歳の男性患者さんからインフォームドコンセントを得て提供を受け、正常と認められた腎臓皮質から正常であると確認できた糸球体を、シービング法により単離した。

2. 質量分析プロテオミクス

冗長性プロテオームの解析には、Spectrum Mill (version A. 03. 12. 060, Agilent Technologies) を用い、解析精度を高く設定した非冗長性プロテオーム解析には、Mascot (version 2. 3. 01, Matrix Science) を用いた。タンパク質データベースは、IPI human protein sequence database (<http://ebi.ac.uk/IPI>) を用いた。

3. 抗体プロテオミクス

抗体プロテオミクスの免疫組織化学画像は、Human Protein Atlas (Version 11) (HPA: <http://www.proteinatlas.org/>) のウェブサイトに掲載されている免疫組織化学染色が行われた腎臓の画像のうち、糸球体の染色強度が Negative と判定されているタンパク質を分類した。これらのタンパク質に

ついて、免疫組織化学染色の画像について再評価を行い、腎臓の染色を7部位(糸球体, 近位尿細管, 遠位尿細管, 集合管, 間質, 毛細血管, 核)を4強度に分類しデータベース化を行った。

【結果】質量分析プロテオームと抗体プロテオームを比較した結果、質量分析プロテオミクスでは同定されるが、抗体プロテオミクスでは同定されないタンパク質が801個分類された。これらのうち19個(2.4%)のタンパク質は、糸球体に染色が確認された。801個のうち、628個(78.4%)のタンパク質は、糸球体以外の腎組織に、それぞれの抗体による染色が確認された。抗体プロテオミクスで腎臓の組織がすべて染色されていないタンパク質は154個(19.2%)あった。154個を血漿プロテオームとの比較したところ、80%以上が血漿中にも存在するタンパク質であった。Collagen, typeIV, alpha3(遺伝子名COL6A3)は、Spectrum MillおよびMascotによる質量分析プロテオミクス解析において上位に同定されたが、抗体プロテオミクスでは同定されなかった。COL6A3は分子量が34万程度のタンパク質であるが、SDS電気泳動ゲルでの分離の際には、10万~15万の分子量のスライド画分から検出されていた。また、Mascotデータの解析では、COL6A3の同定領域が、COL6A3抗体の特異的領域とは異なった部分を同定していた。COL6A3が質量分析計で検出されたのは、COL6A3の分解産物の一部を質量分析プロテオミクスにて同定しており、抗体プロテオミクスでは、抗体の特異的部分のペプチドを同定することができなかつた可能性が示唆された。

【考察と結論】抗体プロテオミクスにより腎組織が染色されなかつた原因について、糸球体を腎皮質からシービング法にて採取する際の糸球体外組織の混入の可能性が80%であることが示唆された。腎組織全体が染色されなかつた154個のタンパク質(19.2%)のほとんどが血漿中にも存在するタンパク質であることから血漿タンパクの混入が示唆された。さらに、すでに糸球体に同定されているタンパク質が染色されていなかつたことで抗体の特異度に問題があるタンパク質の存在、COL6A3の様に質量分析計による分解産物の同定により、質量分析計では同定されるが、抗体プロテオミクスでは同定されないことが示唆された。高い信頼性の糸球体プロテオームのデータベース作成における課題として、質量分析計を用いる方法では糸球体サンプルの採取における精度と純度を高め、抗体におけるプロテオームは対応するタンパク質の高品質な抗体作成と複数抗体の作成および、染色技術の向上が必要であると考えられた。高い信頼性のプロテオームデータベースを作成するためには、精度の高い質量分析プロテオミクスと抗体プロテオミクスを組み合わせることが必要であり、その結果、病態の全貌が俯瞰でき腎臓病研究の病因、病態解析や尿バイオマーカーの研究に役立つものと考えられる。

審査結果の要旨

プロテオーム解析には、質量分析計で生物系のタンパク質を網羅的に同定する質量分析プロテオミクスと、抗体を用いた免疫組織染色などでタンパク質の局在情報を網羅的に取得する抗体プロテオミクスがある。しかし、両解析結果は必ずしも一致しない。本研究室は、ヒト腎糸球体を質量分析プロテオミクスと抗体プロテオミクスで解析し、質量分析プロテオミクスでは同定されたが、抗体プロテオミクスでは同定できなかったタンパク質が同定された原因を解明することを目的とした。

ヒト正常糸球体の質量分析プロテオミクスは、冗長的プロテオームを検出する(Spectrum Mill)サーチエンジンを利用した。抗体プロテオミクスはHuman Protein Atlasが提供する免疫組織化学法画像の判定結果を利用した。

その結果、質量分析プロテオミクスで同定(6,686種)されたが、抗体プロテオミクスでは同定されなかつたタンパク質が801種あった。このうち、628種(78.4%)は免疫組織化学法画像を再評価した結果、糸球体周囲の組織に染色が確認され、質量分析プロテオミクスの糸球体試料に周囲の組織が混入した可能

性が示唆された。また、19種(2.4%)は再評価で糸球体局在が確認された。抗体プロテオミクスで腎臓に全く検出できないタンパク質が154種(19.2%)あり、それらを血漿プロテオームデータベースと比較したところ、80%以上が血漿タンパク質であった。

以上の結果から、質量分析プロテオミクスと抗体プロテオミクスで解析結果が乖離する原因として、試料の精製度、抗体の品質、血漿タンパクの混入などが考えられた。

以上ことを明らかにした点に学位論文としての価値を認める。