

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	瀧澤 勇介
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 815 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	グルタルアルデヒド固定パラフィン包埋組織のプロテオーム解析は不可能か？
論文審査委員	主査 教授 成田 一衛 副査 教授 小松 雅明 副査 教授 河内 裕

博士論文の要旨

背景と目的

組織・病理学的研究において、組織の保存や生体分子の不活性化のために、ホルマリンをはじめとする様々な固定剤が使われている。中でも、グルタルアルデヒドは強力に分子間、分子内を架橋する固定剤で、微細構造が保持されるので、電子顕微鏡用試料の固定に広く使用されている。一方、組織のタンパク質を質量分析装置で網羅的に解析するプロテオミクス研究が盛んに行われており、それには未固定組織が主に使われていたが、近年、長期に保存されているホルマリン固定パラフィン包埋組織への応用が始まっている。しかし、プロテオミクスではタンパク質をトリプシンなどで分解したペプチドが解析対象となるため、ホルマリンで架橋されたタンパク質から良質のペプチドを得ることが容易でない。さらに、架橋作用がより強力なグルタルアルデヒド固定組織はプロテオミクスには供せないとされ、これまで、ほとんどその解析結果の報告はされていない。しかし、この強力な架橋作用は裏を返せば、生体内で近接するタンパク質同士をプロテオミクスで網羅的に同定できる可能性を秘めている。

本研究は、申請者が所属する研究室によって開発された **On-Site Direct Digestion (OSDD)** 法を用いて、グルタルアルデヒド固定組織と架橋しない固定剤 (メチルカルノア固定剤) で固定した組織を質量分析装置で解析し、その結果を比較したものである。

方法

本研究においては、2.5%グルタルアルデヒド固定組織標本を液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) によって解析することによって、タンパク質の同定と共に、非標識的タンパク質の定量を試みた。ラットから摘出した腎臓組織を 2.5%グルタルアルデヒド (試験群) およびメチルカルノア (コントロール群) で 16 時間固定し、パラフィン包埋した後に薄切した。薄切切片から腎皮質をレーザーマイクロダイセクション (LMD) 装置を用いて選択的に回収し、**On-Site Direct Digestion (OSDD)** 法で組織中のタンパク質をトリプシン消化した後、生成したペプチドを精製した。精製したペプチドは LC-MS/MS 解析に供し、得られたスペクトルをデータベース検索にかけ、タンパク質を同定した。同定されたタンパク質については、**Normalized Spectral Index (SI_N)** を算出し、定量評価を実施した。両群で同定できたタンパク質、メチルカルノア固定群のみで同定できたタンパク質、グルタルアルデヒド固定群のみで同定できたタンパク質にカテゴリズし、各々のタンパク質について包含関係を評価した。

結果

メチルカルノア固定群で 1063 ± 98.8 種類 ($N=6$) のタンパク質を同定できたのに対し、グルタルアルデヒド固定群では 847.5 ± 30.8 種類 ($N=6$) のタンパク質を同定できた。また、グルタルアルデヒド固定群およびメチルカルノア固定群の SI_N 値を対数変換後に Q-Q Plot を作成した結果、主たる部分で直線的な配置が見られた。加えて、両群の SI_N 値を冪関数に単回帰分析した結果、両者に相関が見られた (決定係数=0.58)。さらに、グルタルアルデヒド固定群およびメチルカルノア固定群の双方で同定できたタンパク質数は 600 で全体の 53.5% を、メチルカルノア固定群でのみ同定できたタンパク質数は 400 で全体の 35.7% を、グルタルアルデヒド固定群のみで同定できたタンパク質数は 121 で全体の 10.8% を占めた。

考察

グルタルアルデヒド固定群およびメチルカルノア固定群の SI_N 値を対数変換後に Q-Q Plot を作成した結果、主たる部分で直線的な配置が見られたことから、 SI_N 値は両群ともに対数正規分布に従っていると考えられる。加えて、両群の SI_N 値を冪関数に単回帰分析した結果、決定係数が 0.58 であったことから、両群の SI_N 値は正の相関を示していると考えられる。さらに、両群で共通して同定できたタンパク質が 600 種で、全体の 53.5% を占めていたということから、グルタルアルデヒド固定によっても十分にタンパク質を同定できるものと考えられる。すなわち、LC-MS/MS 解析によって非標識的にタンパク質量を実施する際、従来利用されてきたメチルカルノア固定組織標本同様、グルタルアルデヒド固定組織標本も利用できる可能性が示唆された。一方で、メチルカルノア固定群でのみ同定できたタンパク質、グルタルアルデヒド固定群でのみ同定できたタンパク質もある程度は存在しており、タンパク質の物理・化学的性質や細胞内の局在の相違等によって同定に差が出たものと考えられる。

将来的には、この手法を応用することで、タンパク質相互作用を LC-MS/MS を用いて解析できる可能性がある。今後の課題として、より信頼性の高いデータ収集およびタンパク質相互作用の評価のため、固定条件と同定できるタンパク質との関係を、量的にも質的にも評価することが必要であると考えられる。

結論

固定組織のプロテオーム解析に OSDD 法を用いて試料調整を行うことで、グルタルアルデヒド固定組織標本でも、満足できる解析が可能であることが示された。将来、この手法を応用し、タンパク質相互作用を LC-MS/MS を用いて解析できる可能性に道が開かれた。

審査結果の要旨

組織内に含まれるタンパク質の同定・定量は、組織の成り立ち・病因を研究するために重要である。これまで、凍結切片、メチルカルノア (非架橋) 固定組織切片、ホルマリン固定の組織切片を用いて、質量分析装置を使ったタンパク質解析の報告はあるが、さらに強い固定剤、グルタルアルデヒドで固定した標本を用いてタンパク質同定を行った試みは報告されていない。そこで申請者は、ラット腎臓を用いグルタルアルデヒド固定組織とメチルカルノア固定組織を質量分析計 (LC-MS/MS) で解析し、同定されたタンパク質を比較した。その結果は、グルタルアルデヒド固定標本のタンパク質同定はメチルカルノア固定標本のそれに匹敵するものであった。具体的には同定数は、メチルカルノア固定群

で 1063 種類、グルタルアルデヒド固定群では 848 種類であり、また、同定タンパク質の **Normalized Spectral Index** による定量評価では、冪関数単回帰分析した結果、両者に良好な相関が観察された。本研究によって、従来困難と考えられていたグルタルアルデヒド固定標本でも、十分にタンパク質解析が可能であることが示され、学位論文としての価値が有るものと判断する。