

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	瀧本 裕基
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 816 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	腎糸球体スリット膜に関連した膜タンパク質の網羅的解析の試み: ラットポドサイトにおける PECAM-1 の発現
論文審査委員	主査 教授 成田 一衛 副査 准教授 福住 好恭 副査 教授 河内 裕

博士論文の要旨

(背景と目的)

腎糸球体の基底膜を覆っているポドサイト (糸球体上皮細胞) は、スリット膜と呼ばれる特徴的な細胞間接着を形成している。この構造は、血漿タンパク質を保持するための最終的かつ本質的な障壁として機能し、ポドサイトの機能を調節するシグナル伝達の間としての役割も果たす。したがって、スリット膜に発現しているタンパク質の網羅的な解析はポドサイトの特性を理解するうえで重要であると考えられる。

質量分析装置を用いて糸球体またはポドサイトのプロテオーム解析を行った結果がいくつか報告されている。しかし、これらの報告ではスリット膜に関連して発現している、細胞全体として発現量の低いタンパク質に関しては検出できていない可能性がある。このような分子も含めて同定するためには、スリット膜近傍のタンパク質を選択的に抽出して解析する方法が理想的である。さらに、すでに報告されているポドサイトのプロテオーム研究のなかにはスリット膜のマーカーともいえる **nephrin** が同定されていない、あるいはごくわずかな量しか検出されていないものがあり、実験手法がポドサイトの細胞間接着を解離させるなど、生理的状态を反映していない可能性があることにも留意しなければならない。

本研究では、抗原を中心に 200-300 nm 以内のタンパク質のチロシン残基を **fluorescein** で標識し解析する **Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS)**法を用いて、スリット膜近傍の膜タンパク質の網羅的な解析を行う手法の確立を目指した。

(方法)

実験動物は 8~10 週齢のオスの **Wistar** ラットを用いた。ラットの糸球体を単離した後に **nephrin** の細胞外領域を認識する **5-1-6** 抗体を用いて **Horseshoe peroxidase (HRP)** で **nephrin** を標識し **EMARS** 反応によりスリット膜近傍のタンパク質を網羅的に **fluorescein** で標識した。これらのタンパク質を抗 **fluorescein** 抗体による免疫沈降で回収して質量分析装置で同定した。また、抗 **Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)** 抗体を用いて同様の手順で回収されたタンパク質のサンプルや糸球体膜分画サンプルの質量分析装置での同定結果との比較を行った。

(結果)

5-1-6 抗体を用いて **EMARS** 反応によって **fluorescein** 標識を行ったサンプル (“**5-1-6** 抗体群”))

と抗 KLH 抗体を用いて得られたサンプル(“KLH 抗体群”)あるいは糸球体膜分画との比較により、スリット膜近傍のタンパク質が“5-1-6 抗体群”に選択的に濃縮されて回収できていることがわかった。また、このなかには Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1)が濃縮されていたため、ラットのポドサイトにおける発現の検証を行った。抗体の特異性を検証したうえで免疫蛍光抗体法による組織染色を行ったところ、PECAM-1 の発現は糸球体基底膜の外側の細胞で認められ、ポドサイトのマーカーである nephrin と局在が一致しておりポドサイトに特異的であった。同じ抗体を用いてヒトやマウスの腎組織でも組織染色を行ったが、これらの生物種に関しては糸球体の内皮細胞で PECAM-1 の発現を認めるもののポドサイトにおいては認められなかった。

(考察と結論)

本研究では EMARS という方法に注目し、ポドサイトのスリット膜近傍の膜タンパク質を選択的に回収する方法の確立をめざした。nephrin, Kin of IRRE-like protein 1 および podocin などのスリット膜関連タンパク質は EMARS 反応産物として同定されているが、スリット膜の細胞内の構成分子として知られる ZO-1 および CD2AP は同定されていなかった。これは、本研究の方法によって目的のタンパク質がより選択的に回収された結果と考えられる。さらに、これまでのポドサイトに関連するプロテオーム解析と比較して我々の方法の優れた点としては、生体内のポドサイトのスリット膜を中心としてより選択的にタンパク質を抽出できたことである。しかし、方法論としての問題点や限界も増えてきたように思われる。最も重要なのは抽出できるタンパク質が極端に限られていることであり、Fat1 や TRPC6 などのよく知られたスリット膜関連分子が同定されていない。また、内因性ペルオキシダーゼによる非特異的標識の問題や細胞外領域のアミノ酸配列(チロシン残基の数)によって標識の効率が変化する可能性もあることにも注意を要する。

現在のところ特異抗体が入手できないため、スリット膜関連タンパク質かどうか検証困難であるが、PECAM-1 以外にも“5-1-6 抗体群”のみに同定された膜タンパク質、または“KLH 抗体群”にも同定されたが“5-1-6 抗体群”で濃縮されている膜タンパク質が同定された。今回得られたプロテオーム解析結果について、より詳細な検討を加えてこの方法の評価を行う必要があるが、今後のポドサイト研究における重要なリソースになると期待される。

審査結果の要旨

腎臓糸球体ポドサイトのスリット膜は、糸球体濾過において重要な役割を担っているが、スリット膜構成成分の全体像については未解決の問題が多い。そのため、申請者は、スリット膜近傍の膜タンパク質を網羅的に解析する手法の確立を目指した。ラットを使い、スリット膜構成分子であるネフリンに対する抗体で Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS)法を試みた。この方法によりネフリン分子を中心に 200-300nm 以内のタンパク質が fluorescein 標識され、免疫沈降後、質量分析装置によるタンパク質の網羅的な解析が可能となった。従来スリット膜構成分子として報告されているもののほとんどが、有意に検出された。また、他の種では内皮細胞での発現が報告されている PECAM-1 が多く検出され、免疫沈降、免疫染色の結果、ラットのポドサイトに PECAM-1 が存在することがはじめて明らかとなった。

本研究によって、EMARS 法がスリット膜構成タンパク質の網羅的解析に有用であること、まだ

検証中である膜タンパク質を含め今後のポドサイト研究における重要なリソースになることが期待され、学位論文としての価値が有るものと判断された。