

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
小山 玲子	主査 教授 池田 恒彦 主査 教授 清水 章 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 鏡山 博行 副査 教授 窪田 隆裕
主論文題名 Catalogue of soluble proteins in human vitreous humor by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry including seven angiogenesis-regulating factors (一次元 SDS ポリアクリルアミド電気泳動法とエレクトロスプレーイオン化質量分析法による硝子体可溶蛋白質のカatalog、7種の血管新生制御因子の検出)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》 種々の網膜疾患、特に血管新生を伴うものでは、眼内における血管新生促進因子あるいは抑制因子をはじめ、種々の蛋白質が変動している可能性がある。この研究は、硝子体に含まれる可溶蛋白質の種類を明らかにし、眼内血管新生の病態解明に役立つ基礎データを得ることを目的とする。申請者はこれまでに、二次元ドデシル硫酸ナトリウムゲル電気泳動法(2D-SDS-PAGE)とエレクトロスプレーイオン化イオントラップ質量分析法(ESI-IT-MS)を用いて、硝子体を分析し、51種類の蛋白質の中に2種類の血管新生制御因子を見出した。2D-PAGEは蛋白質の分布の分析に最も汎用される技術であるが、泳動中の拡散などにより、蛋白質の検出率が低下するとの報告がある。申請者は、より多種類の蛋白質を同定するために、一次元(1D)SDS-PAGEを用い、染色を行わずに全ゲルを分割して分析し、ペプチドの検出率を向上させることを試みた。</p> <p>《試料と方法》 1) 試料調製、1D-SDS-PAGE、ゲル内消化 硝子体は糖尿病網膜症の1患者から得た。硝子体から塩を除くために、分子量1000u以下の分子を除く透析膜を使用し、蒸留水を用いて透析した。約500μlの硝子体を4℃で一晩、3lの蒸留水を2回交換し、透析した。これを凍結乾燥したのち、蛋白質約100μg(Lowry法で定量)を、pH8.3、50mM Tris-HCl、8M 尿素、2% NP-40、30mM DTT(dithiothreitol)に溶解し、1D-SDS-PAGEにより分析した。1D-SDS-PAGEはゲル1枚あたり40mAの定電流で泳動した。泳動終了後、ゲルを10%酢酸-50%メタノール混合液で30分間固定し、ゲルは染色を行わず、全ゲルを、1.5mm間隔に短冊状に50個に切り出し、ゲル片を、50%メタノールを300μl用いて30分間洗浄(SDSを除く)し、減圧乾固した。このゲル片を50mM DTT/50mM 炭酸アンモニウム溶解液50μlで、56℃で1時間還元した後、100mM モノヨードアセトアミド/50mM 炭酸アンモニウム溶解液50μlを加え45分間室温でアルキル化を行った。これを減圧乾固した後、トリプシン溶液(250ng TPCK 処理トリプシンを溶解した50mM 重炭酸アンモニウム)50μlを加え、ゲルを膨潤させ、その後50mM 炭酸アンモニウム100μlを加え、37℃で16時間ゲル内トリプシン消化を行った。5% 蟻酸、続いて5%蟻酸-50%アセトニトリルそれぞれ100μlを用いてゲルからペプチドを含む溶液を抽出し、減圧濃縮し0.1%蟻酸に溶解し質量分析を行った。</p> 2) 質量分析による同定 ゲルから抽出されたペプチド溶液からアミノ酸配列を同定するために、液体クロマトグラフィー(LC)を連結したタンデム型ESI/MS/MS、LCQ(サーモコエスト社製、イオントラップ型)を用いた。続いてLCにはマイクロキャピラリー逆相カラム monitor C ₁₈ (0.2×50mm)を用い、溶媒は、0.1%蟻酸でスタートしアセトニトリル濃度を60%にまで上昇させた。流量は1-2 μl/minとした。衝突誘導解離、CID(collision-induced dissociation)のためのコリジョンエネルギーを28-35eV(プロダクトイオンの価数に応じて変動)とした。コリジョンセルのガス圧は6.0×10 ⁻⁵ mbarに調整し、得られたCIDスペクトルの	

データベース検索 (SwissProt)を行い、目的蛋白質を同定した。

《結果》

1) 糖尿病網膜症の1患者から得た硝子体の1D-SDS-PAGEと質量分析の結果

1.5mm幅の50分画のゲルを分析した結果、84種類の蛋白質を同定した。この中に、血管新生抑制因子3種(色素上皮由来因子<pigment epithelium-derived factor, PEDF>、エンドスタチン、トロンボスポンジン)、ならびに、血管新生促進因子4種(インスリン様成長因子1a、血管内皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、胎盤内皮細胞増殖因子)が検出された。申請者は既に2次元電気泳動(2D-PAGE)で51種類の蛋白質を検出し、かつイオン交換カラムでpIの高い蛋白質5種類を検出している。これら蛋白質のうち32種類は今回の1D-SDS-PAGEでは見出されなかった。最終的に合計116種類の蛋白質を同定している。

2) 血漿蛋白質との比較

2D-PAGEおよび質量分析で同定した血漿蛋白質のカatalogがデータベースに公表されており、申請者らも一部確認している。これと比べると、116種類の同定蛋白質のうち、75種類は血漿中には見出されていない。硝子体の非血漿蛋白質は2D-PAGEでpI 5.0~9.0の間、分子量20k~65kの間に、また1D-PAGEでは分子量20k~100kの間に認めた。

3) 血管新生促進及び血管新生抑制因子

見出された7種類の因子のうち5種類は2D-PAGEでは見出されず、1D-SDS-PAGEでのみ認められた。1D-SDS-PAGEでは蛋白質の量比を正確に推定することは出来ないが、ペプチドのシグナル強度からの大まかな判断では、血漿タンパク質を除く他の蛋白質とほぼ同等の濃度と判断されている。申請者は1D-SDS-PAGEおよびウエスタンブロット法を用いて、血管新生のある糖尿病患者群、血管新生の無い黄斑円孔患者群間で硝子体のPEDFを定量的に示した。その結果、PEDFは両群間に差は認められなかった。

4) 硝子体中の仮説蛋白質

遺伝子レベルでのみ認められている5種類のペプチド配列を同定し、それぞれの推定機能を記載している。

《考察》

1) 検出感度

1D-SDS-PAGEでは高濃度の蛋白に隠れて検出できない微量成分があったが、操作中の損失が少なく、また、全ゲルを分析していることから、より多くの蛋白質を同定した。今後は、血漿蛋白質を取り除く吸着カラム、およびより高感度の質量分析を用いることによって、さらに多種類の蛋白質が同定できると考えられる。

2) 定量性

プロテオミクスと呼ばれている手法において、蛋白質の濃度を比較する種々の試みがなされており、2D-PAGEでは染色スポットの強度を利用するのが一般的である。申請者らの2D-PAGEを用いた既報の論文によると、 α_1 -アンチトリプシン、 α_2 -HS糖蛋白、トランスフェリン、ハプトグロビン α_1 、 α_2 鎖、補体C4、Gcグロブリン、アポリポプロテインA-I、免疫グロブリンH,L鎖、トランスサイレチンは血漿中に比べ硝子体中でアルブミンに対する相対濃度が高かった。例えば、硝子体アルブミン:トランスサイレチンは1:10、血漿では1:100であった。

抗炎症蛋白質である α_1 -アンチトリプシン、 α_2 -HS糖蛋白、補体C4、免疫グロブリンH,L鎖の2D-PAGE-銀染色ゲルスポットは黄斑円孔(血管新生がない)よりも糖尿病網膜症(血管新生がある)硝子体において明瞭に認められた。これは、糖尿病網膜症における組織障害を反映していると考えられる。

血管新生制御因子のうち特異抗体の得られるものについてはウエスタンブロット法により濃度を比較することができた。例数は十分ではないが、糖尿病患者群、黄斑円孔患者群でウエスタンブロット法を用いPEDFの発現を比較したが、両群間に差は認められなかった。糖尿病では新生血管が増殖しており、新生血管抑制因子であるPEDFは減少していると予想していたが、結果は対照とした黄斑円孔と差がなかった。

《総括》

硝子体の種々の蛋白質を検出した。この結果は、今後の血管新生性疾患の病態解明に有用である。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第680号	氏名	小山玲子
論文審査担当者		主査 教授 池田 恒彦 主査 教授 清水 章 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 鏡山 博行 副査 教授 窪田 隆裕	
主論文題名 Catalogue of soluble proteins in human vitreous humor by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry including seven angiogenesis-regulating factors (一次元 SDS ポリアクリルアミド電気泳動法とエレクトロスプレーイオン化質量分析法によるヒト硝子体可溶蛋白質のカatalog、7種の血管新生制御因子の検出)			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究は硝子体に含まれる可溶蛋白質の種類を明らかにし、血管増殖疾患の病態解明に役立つ基礎データを得ることを目的としている。</p> <p>申請者らはこれまでに、二次元ポリアクリルアミド電気泳動法(2D-PAGE)とエレクトロスプレーイオン化イオントラップ質量分析法(ESI-IT-MS)を用い、硝子体を分析し、2種類の血管新生制御因子を含む51種類の蛋白質を見出している。本論文では、1次元電気泳動ゲルを、1.5mm幅の50分画に分けて、染色をせずに全ゲルを分析し、ペプチドの検出率を上げ、84種類の蛋白質を同定している。この中に、血管新生抑制因子3種、(色素上皮由来因子<PEDF>、エンドスタチン、トロンボスポンジン)、ならびに、血管新生促進因子4種、(インスリン様成長因子1a、血管内皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、胎盤内皮細胞増殖因子)が含まれていた。また、2D-PAGE、1D-PAGE およびイオン交換カラムクロマトグラフィーで同定した蛋白質は合計116種類であった。そのうち75種類は血漿中に見出されなかった。さらに5種類は遺伝子のみでしか認められなかった。</p> <p>同定された蛋白質について、非血管新生性疾患である黄斑円孔と血管新生性である糖尿病網膜症を比較し、炎症反応蛋白質が糖尿病で高いこと、血管新生抑制因子であるPEDFには差が見出されないことを示している。</p> <p>本研究結果は多くの硝子体蛋白質を同定しており、今後の眼内血管新生機構解明の基礎データとして評価できる。</p> <p>本論文は本学大学院学則第9条の定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Journal of Chromatography B 792 (1):5-21, 2003</p>			