

## 学位論文内容の要旨

| 論文提出者氏名  | 論文審査担当者     |
|--|-------------|
| 向井規子   | 主査 教授 池田 恒彦 |
|  | 主査 教授 田窪 孝行 |
|  | 副査 教授 林 秀行  |
|  | 副査 教授 古谷 榮助 |
|  | 副査 教授 花房 俊昭 |
| <p>主論文題名</p> <p>Identification of phosphotyrosyl proteins in vitreous humours of patients with vitreoretinal diseases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting/matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry<br/>(SDS-PAGE/ウエスタンブロット/マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による網膜硝子体疾患患者硝子体中チロシンリン酸化タンパク質の同定)</p>   |             |
| <p style="text-align: center;">学位論文内容の要旨</p>   |             |
| <p>《緒言》</p> <p>網膜硝子体疾患の病態・発症機序を解明するためには、それら疾患群の指標となる特異的診断マーカーを見出すことが重要である。我々は、これまでに網膜硝子体疾患患者の硝子体を試料とし、プロテオーム手法を用いて解析した結果、7種類の血管新生制御因子を含む121種類の発現タンパク質を同定した。我々グループ以外に、硝子体中発現タンパク質を網羅的に解析した報告例はあるが、リン酸化をはじめとする翻訳後修飾タンパク質についての報告例は数少ない。また、これまでの報告例では、解析試料として実験動物由来の硝子体・網膜細胞あるいはヒト由来培養細胞株などが用いられて来た。しかし、ヒト硝子体中のリン酸化などの修飾タンパク質をプロテオーム手法で同定した例は殆どない。</p> <p>今回我々は、網膜硝子体疾患患者群から術中採取した硝子体を用いて、ドデシル硫酸 Na-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)/ウエスタンブロット(WB)-高感度化学発光検出(ECL)/質量分析(MS)法によるリン酸化タンパク質プロテオーム解析を施行し、網膜硝子体疾患の病態・発症機序の解明のための指標となり得るリン酸化タンパク質プロファイルを明らかにし、目的タンパク質を同定した。</p> <p>《試料と方法》</p> <p>糖尿病網膜症 23例、黄斑円孔 16例、網膜剥離 5例の計23症例の手術時に採取した硝子体を試料とした。</p> <p>1) SDS-PAGE/リン酸化タンパク特異染色</p> <p>ブルージェル、ProteinA/G アガロースにて処理し、アルブミンと免疫グロブリン G&amp;A を除去した硝子体を試料(10<math>\mu</math>g タンパク量/レーン当り)として、市販ミニゲル 10/20(第一化学薬品社製)を用い還元・変性下、電気泳動(30mA 定電流/1時間)を行った。泳動ゲルを固定後、リン酸化タンパク特異染色試薬(Phos-tools™: Phospho-protein Gel Stain)にて可視化し、励起波長 554nm、蛍光波長 581nm にてリン酸化タンパク質由来バンドを検出した。</p> <p>2) SDS-PAGE/WB/ECL 検出</p> <p>①上記1)と同様に処理した硝子体を用い、SDS-PAGE にて分離したタンパク質を PVDF(ポリビニリデンフルオライド:9x9cm)膜に転写(20V 定電圧/1時間)した後、3%ブロッキング試薬/10mMTris 塩酸-100mMNaCl-0.1%Tween 液(TBS-T)にてブロッキングした。(1 昼夜)</p> <p>②PVDF 膜を TBS-T にて 4 回(15 分間、水平式攪拌装置)洗浄後、一次抗体として抗チロシンリン酸</p> |             |

化抗体(PY-20)を2000倍希釈(3%専用ブロッキング試薬/TBS-T)した溶液1.5mLを用いて室温2時間反応させた。

- ③PVDF膜をTBS-Tにて洗浄後、ECL試薬2mL/PVDF膜(9x9cm)を注ぎ5分間反応させた。
  - ④反応後、余分な試薬を除去しPVDF膜をサララップなどで覆い化学発光検出器(LAS-3000)にて陽性バンドの有無を検出した
  - ⑤対照として健常者硝子体に代えてウサギ硝子体を採取し、同様にPY-20を用いてWB/ECL検出した。
- 3)マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-TOFMS)による質量分析/データベース検索によるタンパク質同定

PVDF膜上のECL陽性バンドに対応する可視化ゲル上の陽性バンドを切り抜き、ゲル内トリプシン消化し、溶媒抽出/濃縮後、トリプシン消化ペプチド混合物をブルカー・ダルトニクス社製UltraFlex(MALDI-TOF/TOFMS)を用いてリン酸化タンパク質の同定を行った。データベース検索ソフトはSwiss-Prot/NCBIを用いた。

#### 《結果》

- 1)リン酸化タンパク質染色キットを用いて可視化したSDS-PAGE施行後のゲルでは網膜硝子体疾患患者硝子体、血清、共に40~120kDaの範囲で複数の陽性バンドが見出された。
- 2)PY-20抗体を用いたWB法による検出では、網膜硝子体疾患のうち網膜剥離、黄斑円孔患者硝子体中から、20,30,35,55kDa付近に陽性バンドが見出された。このうち55kDaのバンドは黄斑円孔患者硝子体の8例中7例と網膜剥離患者硝子体の5例中3例で認められ、増殖糖尿病網膜症患者硝子体では認められなかった。一方、対照とした正常ウサギ硝子体からは対応するバンドは見出されなかった。
- 3)MALDI-TOFMSによる質量分析では、WB法での陽性バンドに対応するゲル片から、5つのチロシンリン酸化タンパクを同定した。そのうち、55kDaの部位からは、 $\alpha$ -1アンチトリプシン( $\alpha$ -1AT)を同定した。その他はコラーゲンIV型 $\alpha$ -2、カテニン $\beta$ 1、カルシウム結合タンパク質等であった。

#### 《考按》

今回、リン酸化 $\alpha$ -1ATが、黄斑円孔と網膜剥離患者硝子体のみから検出され、増殖糖尿病網膜症患者硝子体と血清からは検出されなかった。このことから、本リン酸化タンパク質は非増殖性、非炎症性疾患である黄斑円孔や網膜剥離のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

$\alpha$ -1ATは、血清中に存在する急性期応答性タンパク質の一つであり、細胞外液にも存在し自己免疫反応において重要な役割を果たす。網膜硝子体疾患においては、これまでに、増殖糖尿病網膜症患者硝子体中で発現量が増加したという報告があり、 $\alpha$ -1ATの発現量は、網膜の虚血状態や炎症期に増えると考えられる。しかし、リン酸化などの翻訳後修飾 $\alpha$ -1ATについての報告例は少なく、網膜硝子体疾患からリン酸化 $\alpha$ -1ATを同定したのは我々が最初である。このリン酸化 $\alpha$ -1ATが、黄斑円孔と網膜剥離の様な非炎症性・非増殖性疾患でのみ検出された結果については、増殖糖尿病網膜症に代表される炎症性・増殖性疾患に比べてこれらの疾患では、脱リン酸化反応が抑制されているからではないかと推測している。

#### 《結語》

- 1)今回、初めてヒト硝子体よりリン酸化 $\alpha$ -ATを同定した。
- 2)リン酸化 $\alpha$ -1ATは、非増殖性、非炎症性疾患である黄斑円孔や網膜剥離のバイオマーカーとなる可能性がある。
- 3)非炎症性・非増殖性網膜硝子体疾患では、リン酸化反応の亢進というより、脱リン酸化反応が抑制されている可能性が示唆された。
- 4)炎症性・増殖性網膜硝子体疾患では、リン酸化反応も脱リン酸化反応も共に亢進し、結果としてリン酸化 $\alpha$ -1AT量が低下するものと推察された。

## 審査結果の要旨および担当者

| 報告番号   | 甲 第 号 | 氏 名             | 向 井 規 子 |
|--|-------|-----------------|---------|
| 論文審査担当者  |       | 主 査 教 授 池 田 恒 彦 |         |
|  |       | 主 査 教 授 田 窪 孝 行 |         |
|  |       | 副 査 教 授 林 秀 行   |         |
|  |       | 副 査 教 授 古 谷 榮 助 |         |
|  |       | 副 査 教 授 花 房 俊 昭 |         |
| 主論文題名  |       |                 |         |
| <p>Identification of phosphotyrosyl proteins in vitreous humours of patients with vitreoretinal diseases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting/matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry<br/>(SDS-PAGE/ウエスタンブロット/マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による網膜硝子体疾患患者硝子体中チロシンリン酸化タンパク質の同定)</p>  |       |                 |         |
| 論文審査結果の要旨  |       |                 |         |
| <p>本研究は、ドデシル硫酸 Na-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)/ウエスタンブロット(WB)/質量分析(MS)法によるリン酸化タンパク質プロテオーム手法を用いて網膜硝子体疾患の病態・発症機序解明のための指標となり得るリン酸化タンパク質プロファイルを明らかにし、目的タンパク質候補の一つを同定したものである。これまでに、硝子体中発現タンパク質プロファイルを網羅的に解析した例はあるが、リン酸化をはじめとする翻訳後修飾タンパク質についての報告は数が少ない。また、解析試料としては実験動物由来細胞あるいはヒト網膜上皮細胞やミュラー細胞の培養細胞株などが用いられて来たが、術中に採取した硝子体を用い、リン酸化などの修飾タンパク質をプロテオーム手法で同定した例は殆どなかった。</p> <p>申請者は増殖糖尿病網膜症、黄斑円孔、網膜剥離患者計 23 症例の手術時に採取した硝子体を分析試料として、SDS-PAGE/WB/マトリックス支援レーザー脱離イオン化 MS(MALDI-TOFMS)法による硝子体リン酸化プロテオーム解析を施行した。WB/ECL 検出法では網膜硝子体疾患のうち網膜剥離、黄斑円孔患者硝子体中から、複数の陽性バンドが見出された。このうち 55kDa のバンドは、黄斑円孔患者の 8 例中 7 例、網膜剥離患者の 5 例中 3 例で認められ、増殖糖尿病網膜症患者硝子体では認められなかった。MALDI-TOFMS 法では、WB/ECL 検出法での陽性バンドに対応するゲル片から、5 つのチロシンリン酸化タンパクを同定した。そのうち、55kDa の部位からは、<math>\alpha</math>-1 アンチトリプシン(<math>\alpha</math>-1AT)を同定した。</p> <p>本研究結果において、リン酸化 <math>\alpha</math>-1AT が、黄斑円孔と網膜剥離患者硝子体から検出され、増殖糖尿病網膜症患者硝子体と血清からは検出されなかったことから、リン酸化 <math>\alpha</math>-1AT は非増殖性、非炎症性疾患である黄斑円孔や網膜剥離のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に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> |       |                 |         |
| (主論文公表誌)   |       |                 |         |
| Annals of Clinical Biochemistry 45(): - , 2008 In press  |       |                 |         |