

氏名	伊藤辰将
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第1196号
学位授与の日付	平成31年3月10日
学位論文題名	Detection and Identification of Potential Transglutaminase 2 Substrates in the Mouse Renal Glomeruli 「マウス腎糸球体におけるトランスグルタミナーゼ2の基質候補タンパク質の同定と探索」 Archives of Biochemistry and Biophysics 660:11-19,2018.12
指導教授	湯澤由紀夫
論文審査委員	主査 教授 今泉和良 副査 教授 下野洋平 教授 松山晃文

論文内容の要旨

【緒言】

IgA腎症は腎糸球体メサンギウム領域へのIgA沈着を特徴とするメサンギウム増殖性腎炎の1つであり、末期腎不全へと進行するリスクを持つ。これまでにヒトIgA腎症においてメサンギウム領域でのTransglutaminase 2 (TG2) の発現が有意に上昇することが報告されている。

TG2はCa²⁺存在下において特定のタンパク質のグルタミン残基とリジン残基の間にイソペプチド結合を形成するタンパク質架橋化酵素である。TG2は全身に発現が認められており、アポトーシスや細胞接着に関与する。腎においては、間質領域で細胞外基質の架橋による安定化を介して線維化進行に寄与することが知られており、線維化に関わる基質候補タンパク質も同定されつつある。一方で、糸球体疾患に対するTG2の役割については未だ明らかになっていない。そこで糸球体におけるTG2の役割を解明するため、まずは正常マウス腎から糸球体を単離し、TG2の基質候補タンパク質の同定を試みた。

【方法】

雄性、6-7週齢C57BL/6Jマウスを用いた。未固定腎凍結組織切片上にFITC標識したグルタミン残基側TG2特異的基質ペプチド (pepT26) を添加し、切片上のリジン残基側基質候補タンパク質との架橋反応を誘導し、TG2の架橋活性および分布を検出した。

次に、全身麻酔下において腹部大動脈左右総腸骨動脈分岐部から磁気ビーズを左右腎に灌流し、両腎を摘出後、磁石を用いて糸球体 (糸球体画分) を単離し、糸球体以外 (非糸球体画分) と分画した。それぞれの画分の組織抽出液にbiotin標識したpepT26を加えることにより、内在性TG2による架橋反応を誘導し、組織抽出液中のリジン残基側基質候補タンパク質をbiotin標識した。続いてbiotin標識されたタンパク質をアフィニティー精製し、LC-Q-OT-qIT hybrid 質量分析計を用いてタンパク質同定および非標識定量を行った。同

様にTG2-遺伝子欠損 (TG2 KO) マウスを用いた検討も併せて行った。同定されたタンパク質の定量値をz-scoreにより標準化し、野生型 (WT) マウスとTG2 KOマウスの2群間でt検定を用いて比較した。各サンプル間で $p < 0.05$ かつ、TG2 KOと比較してWTサンプルでの検出量が多いタンパク質を、TG2の基質候補タンパク質とした。

【結果】

正常マウス腎において糸球体、ボーマン嚢、尿細管周囲毛細血管および尿細管間質の一部でTG2活性を認めた。

TG2の基質候補として、糸球体画分では40個、非糸球体画分では33個のタンパク質が同定された。それぞれの画分には、他組織においてTG2の基質として既報告のタンパク質が含まれていた。また、同定されたタンパク質の中にはTG2を除いて、糸球体および非糸球体画分で共通するものは全く存在しなかった。

【考察】

マウス腎において、TG2活性が糸球体で認められたため、本研究では糸球体と糸球体以外に組織分画を行い、糸球体におけるTG2基質候補タンパク質同定を行った。本研究は初めて腎臓全体ではなく腎を分画してTG2の基質候補タンパク質を同定した。同定されたタンパク質にはTG2の基質として既に報告があるものが含まれており、これ以外の他のタンパク質はTG2の新規の基質である可能性がある。

また、糸球体と非糸球体画分でそれぞれ同定されたタンパク質にはオーバーラップがなく、全く異なるタンパク質が同定されたことから、TG2は糸球体と間質で異なる役割を持つことが示唆された。糸球体画分ではメサンギウム細胞増殖やメサンギウム基質の増加に関連があるタンパク質が複数同定されており、IgA腎症との関連を支持する結果となった。

【結語】

腎糸球体におけるTG2基質候補タンパク質の同定方法を確立した。本研究の結果は糸球体の恒常性およびIgA腎症に対してTG2が関与するメカニズムを明らかにし、新規の診断方法や創薬ターゲットを想起する上で重要な礎となる。

論文審査結果の要旨

タンパク質架橋化酵素の一つであるTransglutaminase 2 (TG2) は腎間質線維化進展に関与している。糸球体疾患であるIgA腎症においてTG2の発現が腎炎進展に必須であると報告されているが、その役割は未だ明らかでない。本研究では糸球体におけるTG2の架橋活性に注目し、正常マウス腎からのTG2の基質候補タンパク質の同定を行っている。腎臓を磁気ビーズで還流して糸球体と糸球体以外に分画し、それぞれの組織抽出液において内在性のTG2によりpepT26との架橋反応を誘導し、pepT26と結合したタンパク質の同定を行っている。同定されたタンパク質には既知のTG2の基質タンパク質に加えて新規の基質タンパク質候補が同定された。また、各々の画分では全く異なるタンパク質が同定され、糸球体画分にはIgA腎症進展に関わりがあるタンパク質が含まれていた。以上の結果からTG2は糸球体において、間質線維化とは異なる役割を担っている可能性を導き出している。同定された基質候補タンパク質が実際に生体内で基質となり、疾患に関与しているかどうかの検討は今後の課題である。本研究はTG2の糸球体特異的基質を見出し、IgA腎症の病態解明や新規治療ターゲットの同定に繋がり得る研究成果であり学位論文に十分に値するものと判断された。