

21PO-am399S

バイオマーカー探索のための尿中タンパク質のプロテオーム解析

○藤本 貴大¹, 吉野 健一², 松尾 雅文³, 竹内 敦子¹ (¹神戸薬大, ²神戸大, ³神戸学院大)

【目的】近年、プロテオミクス技術の進歩により新しい疾患バイオマーカーが発見され、疾患の診断や治療への貢献が期待される。一方、分析試料としての尿は、血液に比べると病態の特定に関する信頼性は低いとの指摘があるものの、非侵襲的に多量に採取できるという点でメリットがある。疾患と関係する尿中タンパク質成分については不明な点が多いが、LC-MS/MS の手法を用いて疾患バイオマーカー探索のための尿中タンパク質のプロテオーム解析を行って応用性を検討した。

【方法】冷凍保存尿を遠心後、上清を遠心式限外ろ過フィルター (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit) により、10 倍に濃縮した。40μg タンパク質相当量の濃縮尿を採取し、RapiGest 処理に続き、還元アルキル化反応を行った。次に、リシルエンドペプチダーゼとトリプシン消化反応を行ったのち、固相抽出カラム (Hypersep C18 Cartridge) を用いて脱塩処理をしたペプチド断片溶液を作製した。その後、ESI スプレーチップを用いた LC-MS/MS (LTQ Orbitrap Discovery) 分析を行った。得られたスペクトルを Proteome Discoverer に適用し、タンパク質の同定を行った。

【結果・考察】尿由来ペプチド断片溶液の MS/MS スペクトルから得られたアミノ酸配列をデータベース検索したところ、serum albumin、uromodulin のほかに、osteopontin、mucin、myosin、titin など同定された。本研究結果より、試料に合わせた測定条件の最適化は必要となるが、LC-MS/MS の手法を用いた尿中タンパク質の同定は可能であった。また、健常尿と疾患尿で差が認められるタンパク質もあったことから、それらが種々の疾患の原因となり、生体機能に重要な機能をもつバイオマーカーとなる可能性も考えられた。今後は、バイオマーカー候補の定量法を確立するとともに、疾患との関係を検討する必要があると考えられた。