







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ① 課 ・ 論	第685号	氏名	DONG XIAOMIN
審査委員会委員		主査氏名	花田 俊勝 
		副査氏名	河野 憲司 
		副査氏名	松尾 哲孝 
<p>論文題目</p> <p>A statistical evaluation of uncoupling protein 1 in the limited area of brown adipose tissue by immunoelectron microscopy                  (限局した領域の褐色脂肪組織 UCP1 発現量の免疫電子顕微鏡的解析)</p> <p>論文掲載雑誌名                  Computational Chemistry</p> <p>論文要旨</p> <p>褐色脂肪組織(BAT)はミトコンドリア内膜に脱共役タンパク質1 (UCP1) を有し、余剰活性酸素を体温として消費し生体恒常性維持機能に寄与している。近年、小型実験動物の動脈周囲および心周囲の限られた領域において、BATのUCP1発現量評価がエネルギー消費における恒常性維持機能の把握に貢献することが報告された。しかしながら小型実験動物のBAT組織量が非常に少量であり、またウェスタンブロッティング法などタンパク質発現量の定量的評価においては、その高い脂質含有割合によりタンパク質発現量の信頼性が損なわれる。この問題に対処するため、我々は免疫電子顕微鏡的検索法を用い、マウスBATのミトコンドリアにおけるUCP1発現の程度を定量的に評価した。方法として、雄性10週例マウス(C57BL/6)を用い、A群(ウサギ抗UCP1 IgG/金粒子標識ヤギ抗ウサギ IgG)、B群(ウサギ IgG/金粒子標識ヤギ抗ウサギ IgG)、C群(ウサギ抗UCP1 IgG/金粒子標識ヤギ抗ウサギ IgG)とD群(ウサギ IgG/ヤギ抗ウサギ IgG)の4群において免疫電顕結果を比較検討した。その結果、A群は他の群に比較してミトコンドリア領域で金粒子の免疫陽性の反応が顕著に観察された。この特徴的な金粒子免疫反応は、平均直径5nm以上の電気的高密度粒子から構成されていた。しかしながら、B群の電気的高密度粒子はミトコンドリア外側にまで非特異的に散在し、かつ平均直径4nm未満であった。C群とD群はほとんど電気的高密度粒子による免疫反応を観察できなかった。A群とB群の間のロジスティック回帰分析は、直径5nm以上の電気的高密度粒子の有為な閾値直径がミトコンドリア領域で抗UCP1抗体特異的な値であることを示唆した。抗UCP1抗体のpolyclonalおよびmonoclonalの両者において免疫電顕的反応の有為な差は認められなかった。これらの結果より、免疫電子顕微鏡は、非常に限られた領域における極少量のタンパク質発現の定量的評価に有用だと考えられた。</p> <p>本研究は、褐色脂肪組織におけるUCP1の発現を免疫電子顕微鏡の手法を用いて評価し、本方法がUCP1の定量化に有効であり、分子発現が限局した領域での定量的評価にも有用であることを示した。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
学力の確認

審査区分 ①・論	第 <b>685</b> 号	氏名	DONG XIAOMIN
審査委員会委員	主査氏名	花田 俊勝 	
	副査氏名	河野 憲司 	
	副査氏名	松尾 哲孝 	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. periarterial and pericardial BAT と普通の BAT との機能的違いと発生学的違いを説明しなさい。</li> <li>2. Animals で C57BL/6 と記載しているが、その亜系統は J か N か。</li> <li>3. この研究で用いたポリクローナルとモノクローナルの一次抗体について、これらを選んだ理由は何か。両者のエピトープは同一のものか。</li> <li>4. 一般的に、金コロイド免疫電顕は、どれくらい感度が高いのか。</li> <li>5. 金コロイド法では、粒子の大きさがどれくらいポジティブシグナルに関わっているのか。</li> <li>6. ロジスティクス回帰分析法は、どのような原理で、何がわかるのか。</li> <li>7. 白色脂肪組織とはどの部位の白色脂肪組織か。</li> <li>8. 1次抗体として抗 UCP1 抗体を用いた染色の dot をすべて”陽性反応”、nonimmunized IgG を用いた染色の dot を”陰性反応”としてカウントしたということによいか。</li> <li>9. dot の直径以外の因子は検討しなかったのか。</li> <li>10. 1次抗体に抗 UCP1 抗体の用いた染色の dot はすべて特異的反応ではなく、非特異的反応が混在しているはずである。”陽性反応”とした dot に非特異的反応が含まれていることになるが、この点はどうか。</li> <li>11. どうして dot (金コロイド粒子) の大きさに差がでるのか。</li> <li>12. Fig. 4 において、シグナルの数は、ポジティブ染色とネガティブ染色で、どれくらい違うのか。シグナルの数が多いことは、ポジティブの判断にも反映するのか。</li> <li>13. 連続切片を用いて、ポジティブ染色とネガティブ染色を比較することは可能なのか。</li> <li>14. 文献 13～17 はどのような定量的検索がおこなわれたのか。本研究の手法はこれらの過去の報告とは異なる新規のものか。</li> <li>15. この研究は今後どのようなことに貢献することが期待されるか。また将来どのようなことに発展できるか。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 DONG XIAOMIN

## 論 文 題 目

**A statistical evaluation of uncoupling protein 1 in the limited area of brown adipose tissue by immunoelectron microscopy**

(限局した領域の褐色脂肪組織 UCP1 発現量の免疫電子顕微鏡的解析)

## 要 旨

**背景:** 褐色脂肪組織(BAT)はミトコンドリア内膜に脱共役タンパク質 1 (UCP1) を有し、余剰活性酸素を体温として消費し生体恒常性維持機能に寄与している。近年、小型実験動物の動脈周囲および心周囲の限られた領域において、BAT の UCP1 発現量評価がエネルギー消費における恒常性維持機能の把握に貢献することが報告された。しかしながら小型実験動物の BAT 組織量が非常に少量であるため、ウェスタンブロッティング法などタンパク質発現量の定量的評価において、その高い脂質含有割合がタンパク質発現量の信頼性が損なわれうる。この問題に対処するため、我々は免疫電子顕微鏡的検索法を用い、マウス BAT のミトコンドリアにおける UCP1 発現の程度を定量的に評価した。**方法:** 雄性 10 週例マウス(C57BL/6)を用い、A 群 (ウサギ抗 UCP1 IgG/金粒子標識ヤギ抗ウサギ IgG)、B 群 (ウサギ IgG/金粒子標識ヤギ抗ウサギ IgG)、C 群 (ウサギ抗 UCP1 IgG/金粒子標識ヤギ抗ウサギ IgG) と D 群 (ウサギ IgG/ヤギ抗ウサギ IgG) の 4 群において免疫電顕結果を比較検討した。

結果：UCP1 発現は一次および二次抗体の組合せを用いた免疫組織化学検査と免疫電子顕微鏡法を通してマウス肩甲骨間 BAT 検体で確認された(Supplementary Results)。A 群は他の群に比較してミトコンドリア領域で金粒子の免疫陽性の反応が顕著に観察された。この特徴的な金粒子免疫反応は、平均直径 5nm 以上の電気的高密度粒子から構成されていた。しかしながら、B 群の電気的高密度粒子はミトコンドリア外側にまで非特異的に散在し、かつ平均直径 4nm 未満であった。C 群と D 群はほとんど電気的高密度粒子による免疫反応を観察できなかった。A 群と B 群の間のロジスティック回帰分析は、直径 5nm 以上の電気的高密度粒子の有為な閾値直径がミトコンドリア領域で抗 UCP1 抗体特異的な値であることが確認できた。抗 UCP1 抗体の polyclonal および monoclonal の両者において免疫電顕的反応の有為な差は認められなかった。考察：免疫電子顕微鏡は、非常に限られた領域（例えば小さい実験動物の BAT の UCP1 発現など）における極少量のタンパク質発現の定量的評価に有用だと考えられた。