

特集：プロテオミクス

腎臓病学におけるプロテオミクス

山本 格

はじめに

日本の透析患者数はこれまで年間約 1 万人ずつ増え続け、その総数は 2008 年 12 月末現在で約 28 万人にのぼっている。増加の主な原因は慢性腎臓病 (CKD) 患者、特に糖尿病性腎症患者が増加し、それが進行して透析療法を余儀なくされているためである¹⁾。糖尿病性腎症のほかには慢性 (糸球体) 腎炎や腎硬化症が透析療法を必要とする病態に進展する主な CKD である。これらの CKD のうち糖尿病性腎症と腎硬化症はそれぞれ糖尿病と高血圧症による腎臓病で、生活習慣病と密接に関連している。そのため、腎臓障害を早期に発見し、生活習慣を改善することでその発症や進行を阻止することが世界的に目指されている。また、降圧薬として開発された ACEI (angiotensin converting enzyme inhibitor) や ARB (angiotensin II receptor blocker) が糸球体内圧を低下させることで糸球体の負荷を軽減し、糸球体障害を抑制し、さらにはその降圧作用とは別に、それらの“腎臓保護作用”による治療効果が期待され、CKD の治療薬として第一選択の薬剤となっている。

このように、糖尿病性腎症や腎硬化症は生活習慣の改善や降圧薬によりその進行を抑制できると期待される。一方、慢性 (糸球体) 腎炎はその病因が不明のため有力な根治的療法はなく、生活習慣の改善や高血圧の抑制だけではその進行を十分には抑制できていない。また、糖尿病性腎症や腎硬化症でも、糖尿病や高血圧がどのような分子機構で糸球体を傷害するのかは明らかではない。そのため、CKD の病因や病態の分子機構の解明はその治療法の開発に非常に重要である。本稿ではそれらの解明に期待されているプロテオミクスについて概説する²⁾。

慢性腎臓病の病因と進行機序の研究

CKD の根治的あるいは有力な治療薬がまだ開発されていないのは、主に次の 3 点が問題であったためと思われる。

第一に、これまで腎臓病の研究は先人の偉大な研究にとらわれすぎていたのかもしれないという点である。すなわち、多くのヒトの病気の研究がそうであったように、動物に疾患モデルを求め、それを解析し、ヒトに当てはめようとする研究が多くなされてきた。しかし近年、病因や病態が明らかになったヒトの病気の多くは、ヒトを対象に研究し、それらが解明されたものが多い。

第二に、糸球体という部位で起きている病変は、糸球体の構造や機能から離れて理解するのは危険と考えられる点である。例えば、同じ分子が糸球体とそれ以外の組織に作用しても、異なった応答が起こる可能性がある。すなわち、糸球体以外の部位で発見された分子や傷害機序を糸球体に当てはめ検討しても、それらは必ずしも糸球体と他の部位とが同じとは限らない。また、糸球体構造の複雑さを単純化するために培養糸球体細胞を用いた研究もなされてきたが、培養細胞は生体内と全く異なった環境で生存し分裂を続けているので、それらを用いた研究成果も直ちに生体内の現象を反映しているとは言えない。

第三は、近年、末期慢性腎不全に進行する可能性のある疾患を CKD として総括してしまったために、全く異なった病因や病態で発症した病気の病因や初期の傷害機構の研究ではなく、末期の腎不全に進行する共通の機序の研究に注目が集まってしまった可能性がある点である。

このようなことから、ヒトの疾患糸球体の初期の組織に存在する分子の全容を解析し、そのなかから原因や中心的な病態形成の分子機構を解明することや、さらにはタンパク尿より早期に CKD を発見できる尿中バイオマーカーの発見などが必要と考えられる。近年急速に発展しているタンパク質を網羅的に把握、解析するプロテオミクスは、そ

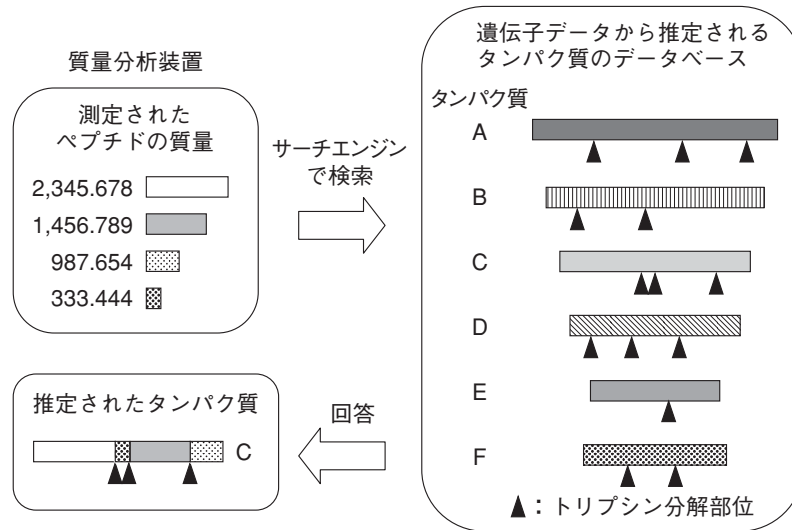


図 1 フィンガープリント法

あるタンパク質をトリプシンで分解して得られるペプチドの質量を測定することで、そのようなペプチドを生ずるタンパク質を推定する。

の解明と発見のための強力な手法となると考えられる。

プロテオミクスとは

プロテオミクス (proteomics) とは、ある生物学的な系において存在しているタンパク質の総体 (プロテオーム, proteome) を総合的に研究する科学である。生物学的な系とは、生物全体、臓器、組織、細胞、細胞内器官、タンパク質の機能的複合体などを指し、プロテオミクスは、生物学的な系全体のタンパク質を把握し、タンパク質同士の相互作用などを推定することで、その系を総合的に理解することを目指している。また、生物学的な系のプロテオームを生理的状態と病的状態で比較することにより、病的状態の分子機構を理解することが可能になると期待されている。

現在、プロテオミクスのほかに、遺伝子全体を対象とするゲノミクス、発現遺伝子全体を対象とするトランスクリプトミクス、代謝産物全体を対象とするメタボロミクスなどがオミックスと総称され、その研究が盛んに行われている。いずれも個々の分子から出発して、その分子と相互作用をする分子を探索していく従来の研究手法と異なり、対象分子を含む生物学的系全体の分子を捉え、それらの分子の相互作用などからその系を理解しようとするものである。その利点は、ある生物学的な系全体を実態 (分子) として把握できる点であり、従来の研究のように研究者の“センス”に頼った仮説を実証する研究とは異なる新しい研究手法でもある。

プロテオミクスは広範な科学分野を含んでおり、さまざま

な手法が用いられている。はじめに、臓器、組織、細胞、あるいは細胞内器官など対象となる生物学的系を分離、精製し、そこにあるタンパク質を網羅的 (プロテオーム) に同定することから始める。それには、生物学的系からタンパク質を精製するが、その後の解析はさまざまである。ここでは、通常行われている主な 2 種類の解析法を簡単に紹介する。

一つはある生物学的系のタンパク質群を二次元ゲル電気泳動法などで分離し、分離したタンパク質を染色し、タンパク質を含むゲル (スポット) を切り出し、その中のタンパク質をリジンあるいはアルギニンの C 末端を加水分解するトリプシンなどで消化し、複数のペプチドに分解する。それらのペプチド質量を MALDI-TOF (Matrix-Assist Laser Dissociation Ionization-Time of Flight) 型などの質量分析計で正確に測定する。次に、その生物の遺伝子データベースから推定される全タンパク質をトリプシンで分解したとき、質量分析計で実測された複数のペプチドと同じ質量のペプチドを生じるタンパク質をコンピュータで検索し、そのタンパク質を推定するのである (フィンガープリント法、図 1)。

もう一方は、ショットガン法とも呼ばれ、生物学的系の全タンパク質を分離せずにトリプシンでペプチドに分解し、そのペプチドを液体クロマトグラフィなどで分離し、分離されたペプチドの質量を ESI-MS/MS (Electron-Spray Ionization Mass Spectrometer) などの質量分析装置で測定する (MS)。さらに、質量分析計のなかで個々のペプチドのアミノ酸の結合をランダムに分解し、その分解産物の質量を正確に測定すること (MS/MS) により、そのペプチドのアミノ酸配列が推定できる (図 2)。その結果、ペプチドの質量やその

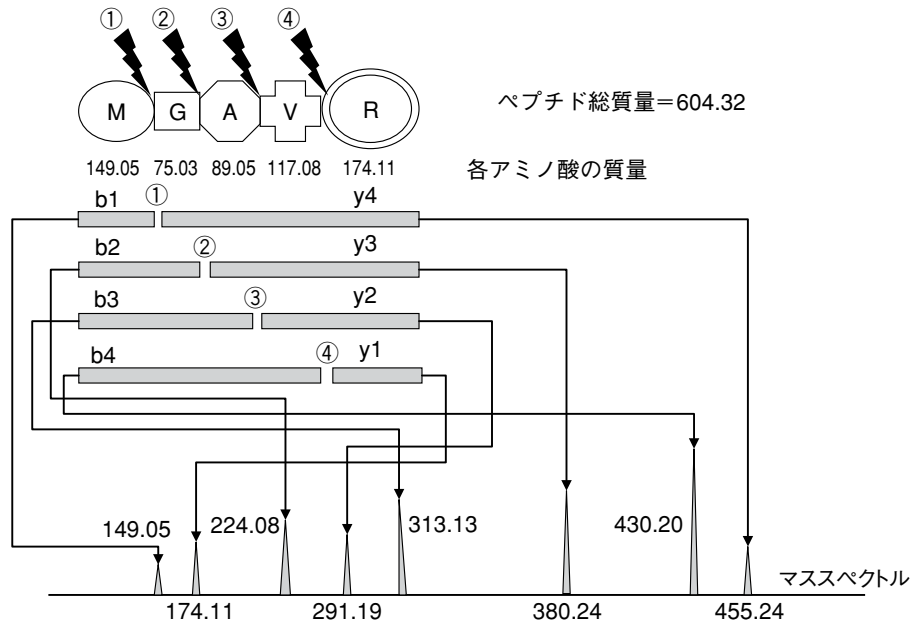


図 2 ショットガン法

トリプシンで分解されたペプチド(質量=604.32)が質量分析計の中でアミノ酸の結合がランダムに壊され(①~④), 分解されたペプチド(b1~b4, y1~y4)を測定することでアミノ酸配列(MGAVR)が決定される。

アミノ酸配列情報からタンパク質が特定されるのである。

このような方法でプロテオミクスでは数日で数百~数千のタンパク質を同定することも可能で, 1つのタンパク質を精製して, そのアミノ酸配列を決定して1つのタンパク質を同定する従来の方法に比べて格段にスループットが高い。

1つのタンパク質由来のペプチドの数をカウントするなどして, そのタンパク質の凡その量を推定することも可能である。そのため, 複数の生物学的な系の間でプロテオームを比較することにより, ある系で増減するタンパク質を探索できる。増減するタンパク質はその系で特徴的な生物反応に関係するタンパク質と推定することができる。また, 疾患患者と健常者の尿のプロテオームを比較することで, 疾患の早期診断や予後判定の新しいバイオマーカーが見つかるのではないかと期待されている。

バイオインフォマティクス

このようにタンパク質が同定され, ある系のタンパク質のカタログができるが, それだけでその系の生物学的意味を理解するのは容易ではない。そのため, タンパク質の立体構造や翻訳後修飾の解析, これまでの研究成果から推定される他のタンパク質との相互作用(パスウェイ), ある生物学的系に特徴的なタンパク質群を選択するソフトウェアなどコンピューターを用いた解析手法が発展している。

このような分野をバイオインフォマティクスと言い, その発展によって, 初めてある系のタンパク質のカタログから意味のある情報を取り出せる。パスウェイの代表的データベースに KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.kegg.jp/ja/>)³⁾がある。

プロテオミクスの重要性と困難性

一般にゲノムは同一生物種内では変化しないが, そこから作られるトランスクリプトーム(転写産物), プロテオーム(翻訳産物)は細胞の種類や状態によって大きく変化する。特にタンパク質は機能を担っている分子であり, 複雑なタンパク質の集合であるプロテオームを知りその系の全容を推定することは, その系を理解するために重要である。

これまで, タンパク質が存在するかどうかは主に抗体により検出されてきた。しかし, 現在推定されるヒト遺伝子約2万個のうち, その翻訳産物であるタンパク質が捉えられている遺伝子は約1万個で, 残りの約1万個の遺伝子についてはそれに由来するタンパク質の実態はいまだに検出されていないと言われている。その原因の一つは, そのタンパク質に対する抗体が用意されていないことによる。しかし, 質量分析計による同定では抗体がなくてもタンパク質を同定できるため, 同定の網羅性はより高くなる。

一方, タンパク質を網羅的に解析することは, 遺伝子よ

りもはるかに困難である。その理由の一つは、遺伝子は実験室で増幅して解析することができるが、タンパク質はそれができない。また、遺伝子は4種類の塩基配列の決定で同定できるが、タンパク質を構成するアミノ酸は20種類あるため、核酸の配列決定よりも難しい。さらに、1つの遺伝子から数種類のバリエーションができて、そこから翻訳されるタンパク質は、分解、結合、翻訳後修飾(リン酸化、糖鎖修飾、アセチル化など)を受け、そのバリエーションは数十倍に増え、対象が多く複雑である。

そのほか、質量分析計によるタンパク質の同定はあくまで推定であるので、抗体などによる検証が必要とされていたが、近年の質量分析計の精度の向上により、同定のための抗体が不必要な時代が来るかもしれない⁴⁾。

ヒトプロテオーム機構とヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクト

ヒトプロテオームの解析を標準化、規格化して行うために2001年にヒトプロテオーム機構(Human Proteome Organization: HUPO, <http://www.hupo.org/>)が組織され、その傘下にいくつかのプロジェクト(イニシアチブ)が行われている(表)。われわれも2001年頃からCKDの組織や尿をプロテオーム解析し、その病因、病態、バイオマーカーの発見、検証を目指して国際連携研究を行うヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクト(Human Kidney and Urine Proteome Project: HKUPP)を開始した。

このプロジェクトは2008年にはHUPOイニシアチブとして認知され⁵⁾、現在はHUPOイニシアチブのHuman Antibody Initiative(Protein Atlas, <http://www.proteinatlas.org/>)やHuman Plasma Proteomeと連携して、ヒト腎臓・尿プロテオームのデータベースの構築やプロテオーム間の比較解析の共同研究が行われている⁶⁾。

腎臓病のバイオマーカーの探索を目指した尿のプロテオミクスも盛んに行われている。HKUPPでは尿プロテオーム解析のための尿の採取、保存に関する検討を行い、その標準方法をガイドラインとして提唱している。日本でも尿中バイオマーカーを探索する研究が盛んとなり、2008年に日本腎臓学会に尿中バイオマーカーパネル化に関する小委員会が設けられ、2009年から全国多施設で同じ規格で尿を採取、保存し、さらに研究者に提供する尿バンクがスタートした(<http://www.urinebank.org/>)。これまで尿中バイオマーカーの探索、検証研究はほとんど研究室単位で行ってきたものが多く、大規模検証研究による臨床的有用性の実

表 HUPO イニシアチブ

1. Human Liver Proteome Project (HLPP), <http://www.hlpp.org/Index/index.php/>
2. Human Brain Proteome Project (HBPP), <http://www.hbpp.org/>
3. Proteomic Standard Initiative (PSI), <http://www.psidev.info/>
4. Human Antibody Initiative (HAI), <http://www.proteinatlas.org/>
5. Plasma Proteome Project (PPP), <http://www.bioinformatics.med.umich.edu/hupo/ppp/>
6. Human Disease Glycomics/Proteome Initiative (HGPI), <http://www.hgpi.jp/menuD.html/>
7. Mouse Models of Human Disease (MMHD)
8. Disease Biomarkers Initiative (DBI)
9. HUPO Cardiovascular Initiative (HCVI), <http://www.hupocvi.org/>
10. Proteome Biology of Stem Cells Initiative
11. Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP), <http://www.hkupp.org/>

証研究は十分には行われていなかった。尿バンクは多検体の尿を提供することで、それを可能にするため、日本からの腎臓病患者の早期診断や予後予測に有用なバイオマーカーの提唱が期待される。また、同一の尿検体でいくつかのバイオマーカー候補を測定することにより、それぞれの特性を解析し、その結果からいくつかのバイオマーカーを組み合わせ(パネル化)て測定することで、早期発見や予後予測に有用な新しいシステムの構築を産学連携で目指すことも目標にしている。この尿バンクには多くの施設の協力が必要で、多くの先生方のご協力をお願いしたい。

文 献

1. Imai E, Horio M, Iseki K, et al. Prevalence of chronic kidney disease (CKD) in Japanese population predicted by MDRD equation modified by a Japanese coefficient. *Clin Exp Nephrol* 2007; 11: 156-163.
2. 高橋信弘, 磯辺俊明. 細胞機能解析に向けたプロテオミクス基盤技術. *細胞工学* 2006; 25: 590-595.
3. Kanehisa MI, Goto S. KEGG. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Res* 2000; 28: 27-30.
4. Mann M. Can proteomics retire the western blot? *J Proteome Res* 2008; 7: 3065.
5. Cottingham K. HKUPP becomes a full-fledged initiative of its own. *J Proteome Res* 2008; 7: 484.
6. Yamamoto T, Langham RG, Ronco P, et al. Towards standard protocols and guidelines for urine proteomics. *Proteomics* 2008; 8: 2156-2159.