

特集：プロテオミクス

腎組織プロテオームとそのデータベース

吉田 豊

はじめに

腎臓のプロテオーム解析に質量分析計(MS)を応用した研究は、1998年のWitzmannら¹⁾の報告が最初になるだろう。その後のヒトゲノムのほぼ完全な解読に代表される遺伝子とタンパク質データベースの充実と質量分析計の驚くべき技術的進歩は、固体、臓器、組織、細胞、細胞内小器官、また、血液や尿などの体液に含まれるタンパク質の総体(プロテオーム)の網羅的解析がもはや夢物語ではないという認識を生み、腎臓に限ってみても、網羅的解析の報告が増えてきた²⁾。腎臓疾患のプロテオーム解析というと、急性腎障害ならびに慢性腎臓病の早期発見、鑑別診断、病態把握、予後判定が可能な尿バイオマーカーの発見を目的とした研究が、現在、精力的に行われていることはよく知られており、本特集でもいくつかの総説が掲載されている。一方、ヒト腎組織を解析の対象とする場合は、試料入手の困難さ、試料の複雑さと個体差などが障害になり、現在のプロテオーム解析技術では困難な課題であることは否めない。しかし、本来のプロテオーム解析(プロテオミクス)の目的は、ゲノムデータベースに相当するような、対象とするプロテオームの詳細なプロファイリングと研究リソースとしてのデータベース構築にある。そして、最近のプロテオーム解析技術の発展は、次第にその目的の実現に具体性を与え始めている。本総説では、最も解析の進んでいる糸球体プロテオームを中心として、現在までに公表されている腎組織プロテオミクスと公開されているデータベースについて解説する。

質量分析による網羅的プロテオーム解析の問題点

プロテオーム・データベースで得ることのできる情報は、解析に用いた技術に大きく依存する。利用しようとするデータベースの限界と問題点を知るために、最初に、現在の質量分析による網羅的プロテオーム解析の問題点を整理しておく。

1. 網羅性

質量分析計を用いた網羅的プロテオーム解析は、タンパク質あるいはペプチドの分離法に基づき、2次元電気泳動(2-DE)を用いた方法(gel-based)と液体クロマトグラフィー(LC)を用いた方法(LC-based)に分類できる。前者は従来から用いられてきた方法であり、分子量と等電点という物理化学的性質を保持したまま、解析対象のプロテオームに含まれるタンパク質を定量的に解析できる点、タンパク質のisoformや翻訳後修飾されたタンパク質、タンパク質分解酵素の分解を受けたタンパク質を視覚化して解析できる点が最大の特徴であるが、分子量の大きなタンパク質や疎水性の強いタンパク質、また、等電点が極端に酸性あるいはアルカリ性のもは通常解析できない。さらに、検出・同定されるタンパク質は比較的濃度の高いものに限られるのが一般的であり、低濃度のタンパク質の同定は通常困難である。

一方、LCを用いた方法(LC-tandem MSあるいはLC-MS/MS)は、タンパク質をトリプシンのような配列特異的なタンパク質分解酵素で消化し、得られたペプチドを逆相LCもしくは陽イオン交換と逆相を組み合わせた2次元LCで分離し、LCに直結した質量分析計で分離されてきたペプチドのMSスペクトル(質量数の測定)とMS/MSスペクトル(アミノ酸配列情報の取得)を同定のために利用する。注意しなければならないことは、非常に複雑な試料の場合、特に低濃度のペプチドのMS/MSスペクトルの取得に任意性が生じることである。つまり、同じ試料を同じ方

表 腎臓プロテオーム・データベース

組織	方法	同定数	URL アドレス	文献
ヒト正常糸球体	2-DE	スポット：347 タンパク質：212	http://hkupp.kir.jp/index.htm	3
ヒト正常糸球体	LC-MS/MS	タンパク質：6,686 遺伝子：2,966	http://hkupp.kir.jp/index.htm	5
ラット集合管	LC-MS/MS	タンパク質：656	http://cddb.nhlbi.nih.gov/cddb/	11

法で測定しても、同じタンパク質が同定される再現性は低い。また、ペプチドの MS/MS スペクトルに基づいて同定するため、タンパク質固有の物理化学的性質は失われる。

2. 同定の曖昧さ、あるいは冗長性

質量分析計によるタンパク質の同定には、その同定の原理に由来する曖昧さが常に存在する。例えば、同じ複数のペプチドの MS/MS スペクトルが、複数のタンパク質に高い信頼性でヒットすることはしばしば経験することである。これは、共通するアミノ酸配列をもつ相同性の高いタンパク質が複数同定される場合と、同定の検索に用いたタンパク質データベースが整理されておらず、冗長性が除去されていないことに起因する場合がある。通常は全く同じペプチドがヒットした場合、最も高いスコアを与えるものを選択して冗長性を排除するが、問題なのは、同じペプチドがヒットした、より低いスコアのタンパク質が存在する可能性を完全には否定できないことにある。

もう一つの問題は偽陽性である。データベースのタンパク質アミノ酸配列をアミノ酸組成を変えずにランダム化したものや、N 末からの配列を逆にしたものを作成して検索した結果で、有意にヒットした数から偽陽性率を計算する方法があるが、完全には偽陽性を排除することができないことは銘記しておかなければならない。また、1つだけのペプチドがヒットした場合は偽陽性率が高いので、2つ以上のペプチドがヒットしたものを同定されたタンパク質としている例が多い。

3. ダイナミックレンジ

ヒト血漿に存在するタンパク質の濃度範囲は 1 pg/mL ~ 120 mg/mL に達する(ダイナミックレンジ $\sim 10^{12}$)。また、細胞に存在するタンパク質のダイナミックレンジはおおよそ 10^{10} と推定されている。一方、タンパク質同定に現在用いられている多くの質量分析計で同定されるタンパク質のダイナミックレンジはおおよそ 10^4 である。つまり、分画しない複雑なタンパク質試料に含まれるタンパク質のすべてを LC-MS/MS で測定することは、理論的に不可能ということになる。この問題は、前述した「網羅性」にも関連する

が、低濃度のタンパク質を効率よく同定するために、比較的少量のタンパク質試料(あるいはペプチド試料)を細分画して、それぞれの分画に含まれるタンパク質の複雑性をできるだけ単純化して解析することが一般的な解決法になる。

糸球体プロテオーム

1. 2 次元電気泳動(2-DE)による解析

Yoshida ら³⁾は、4 例の腎腫瘍により摘出された腎臓の組織学的に正常な皮質から糸球体を高度に精製し、2-DE で分離後、全例で共通に存在する 1,559 個のタンパク質スポットを対象にして MALDI-TOF MS と LC-MS/MS を用いて解析し、347 個のスポットを同定した(同一のタンパク質が複数のスポットとして分離されるため、タンパク質数は 212)。本報告はヒト糸球体プロテオームを網羅的に解析した最初の例であり、同定タンパク質の機能分類の結果は、後述の LC-MS/MS でさらに詳細な網羅的解析を行った結果と基本的には類似しており、現在の技術からみると少ない同定数であるが、正常ヒト糸球体のプロテオームの特徴を明らかにしている。データベースは 2005 年から公開されており(表)、タンパク質名、等電点と分子量の範囲、遺伝子名、機能などから目的のスポットを検索できるほか、ゲルイメージを任意の倍率で拡大することにより、利用者の 2-DE 画像との比較も可能である。

Sitek ら⁴⁾は、マグネットビーズを灌流したマウス腎臓から単離した糸球体とレーザーマイクロダイセクション(LMD)で切り出したヒト腎生検試料の糸球体を用いて、微量タンパク質(3 μ g と 0.5 μ g)を Saturation dye とよばれる高感度蛍光色素でタンパク質を標識後 2-DE で分離し、それぞれ、2,900 個と 900 個のスポットが検出できたことを示し、微量試料を用いた網羅的解析の可能性を示した。この方法は 2D-DIGE 法とよばれ、複数の微量試料を定量的に解析する優れた方法であるが、高価な標識試薬と専用のスキャナー、解析ソフトウェアが必要であることが普及の

妨げになっている。

2. 液体クロマトグラフィ・タンデム質量分析計(LC-MS/MS)による解析

Miyamoto ら⁵⁾は、腎腫瘍により摘出された腎臓の組織学的に正常な皮質から糸球体を高純度に精製し、タンパク質を液相等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた方法で 90 分画に分け、それぞれの分画を 2 回の LC-MS/MS で解析した結果を報告している。同定タンパク質数は 6,686 (遺伝子数 2,966) であり、これまでのところ最も網羅的な解析になっている。すでにデータベース化して公表されているが(表)、現在、冗長性の除去などのデータの見直し、Human Proteome Organization (HUPO) の Human Antibody Initiative (HAI) で構築しているデータベースである Human Protein Atlas で公開されている免疫組織化学画像との統合が進行中であり、近いうちに改訂版の公表を予定している。

3. 糸球体の phosphoproteome 解析

糸球体の構造と機能の制御に、チロシンリン酸化タンパク質が大きな役割を果たしていることが明らかになりつつある。詳細は本特集の張田氏らによる総説を参照していただくことにして、われわれの独自の取り組みとして、正常ラット糸球体のチロシンリン酸化タンパク質の網羅的解析を紹介しておく。抗リン酸化チロシン抗体をプローブにして、2-DE と Western ブロットニング、さらに免疫沈降法を用いて、チロシンリン酸化タンパク質のほとんどが糸球体に高濃度に存在することが明らかになり、網羅的プロテオーム解析の結果、主要なチロシンリン酸化タンパク質のほとんどを同定した (nephrin, SHPS1, FAK1, paxillin, Neph1, talin, vinculin)⁶⁾。その多くが糸球体上皮細胞足突起のスリット膜の基部と糸球体基底膜との接着部に局在していたという知見は興味深い。

4. 足細胞とメサングウム細胞の解析

In vivo で足細胞を直接の対象とした網羅的プロテオーム解析に関しては現在のところ報告はないようである。足細胞の分離の困難さと材料として微量なことが解析を困難にしていると考えられる。しかし、樹立された細胞株を用いて高血糖の影響を解析した報告⁷⁾と、WT1 に突然変異を持つ Denys-Drash 症候群の足細胞のプロテオーム解析を行った報告がある⁸⁾。

メサングウム細胞についても足細胞と同様な状況にあり、解析対象として樹立した細胞株を用いた報告が中心で、高血糖によるプロテオームの変化を前述の 2D-DIGE 法を用いて定量的解析を行った研究⁹⁾、S-nitrosylation されたタンパク質を解析した研究¹⁰⁾などが報告されている。

その他の腎組織プロテオーム解析

腎臓全体、腎皮質などを対象としたプロテオーム解析の報告は散見されるが、アルドステロン、ADH などによる集合管のプロテオームの変化を明らかにすることを目的とした Knepper のグループによる集合管の網羅的プロテオーム解析が注目されている¹¹⁾。ラットの内層集合管を精製し、LC-MS/MS による網羅的解析と合わせて、核、リン酸化タンパク質などを標的とした解析を加え、集合管の Na トランスポーター・チャンネル、アクアポリン 2 の制御の分子機序に新しい知見を提供している。かれらの解析の結果はデータベースとして公開されている(表)。

今後の展望

現在のところ、腎臓の網羅的プロテオーム解析は少数の報告にとどまっていると言わざるを得ず、ここで報告したように、公開されているデータベースの数も限られている。しかし、最近の Mann のグループの報告¹²⁾では、ナノフロー LC の工夫と、きわめて高い分解能と精度をもつ質量分析計を用いて、マウスの腎臓から LMD で切り出した 50 個の糸球体切片から、2,406 のタンパク質が同定されている。この数は、われわれが試みているヒト腎皮質の凍結切片から LMD で切り出した糸球体で同定されたタンパク質の数がおよそ 300 にとどまることを考えると驚異的な数字である。このような網羅的解析は一部の研究室でしかできないのが現状であるが、近い将来には一般的になると考えられ、質量分析による疾患プロテオミクスに明るい展望を与える結果である。また最近、Sethi ら¹³⁾は、腎生検試料のホルマリン固定パラフィン包埋標本から LMD で切り出した少数の糸球体切片のプロテオーム解析をすることにより、II 型の膜性増殖性糸球体腎炎では抗体非依存性の補体活性化の副経路が活性化していることを示した。この報告も腎疾患のプロテオミクス解析に新しい展開をもたらすものであろう。

文 献

1. Witzmann FA, Fultz CD, Grant RA, Wright LS, Korneguth SE, Siegel FL. Differential expression of cytosolic proteins in the rat kidney cortex and medulla: preliminary proteomics. Electrophoresis 1998; 19: 2491-2497.
2. Yoshida Y, Miyamoto M, Xu B, Yaoita E, Yamamoto T. Overview of kidney and urine proteome databases. Contrib Nephrol 2008; 160: 186-197.

3. Yoshida Y, Miyazaki K, Kamiie J, Sato M, Okuizumi S, Kenmochi A, Kamijo K, Nabetani T, Tsugita A, Xu B, Zhang Y, Yaoita E, Osawa T, Yamamoto T. Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language (XML)-based database. *Proteomics* 2005 ; 5 : 1083-1096.
4. Sitek B, Potthoff S, Schulenburg T, Stegbauer J, Vinke T, Rump LC, Meyer HE, Vonend O, Stühler K. Novel approaches to analyse glomerular proteins from smallest scale murine and human samples using DIGE saturation labelling. *Proteomics* 2006 ; 6 : 4337-4345.
5. Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, Nagasaka Y, Tasaki M, Zhang Y, Xu B, Nameta M, Sezaki H, Cuellar LM, Osawa T, Morishita H, Sekiyama S, Yaoita E, Kimura K, Yamamoto T. In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein prefractionation in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2007 ; 6 : 3680-3690.
6. Zhang Y, Yoshida Y, Nameta M, Xu B, Taguchi I, Ikeda T, Fujinaka H, Mohamed SM, Tsukaguchi H, Harita Y, Yaoita E, Yamamoto T. Glomerular proteins related to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2010 : in press (doi : 10.1093/ndt/gfp697).
7. Schordan S, Schordan E, Endlich N, Lindermeier MT, Meyer-Schwesinger CM, Giebel J, Cohen CD, Endlich K, Maurer MH. Alterations of the podocyte proteome in response to high glucose concentrations. *Proteomics* 2009 ; 9 : 4519-4528.
8. Viney RL, Morrison AA, van den Heuvel LP, Ni L, Mathieson PW, Saleem MA, Ladomery MR. A proteomic investigation of glomerular podocytes from a Denys-Drash syndrome patient with a mutation in the Wilms tumour suppressor gene WT1. *Proteomics* 2007 ; 7 : 804-815.
9. Ramachandra Rao SP, Wassell R, Shaw MA, Sharma K. Profiling of human mesangial cell subproteomes reveals a role of calmodulin in glucose uptake. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 ; 292 : F1182-F1189.
10. Kumcewicz T, Sheta EA, Goldknop IL, Kone BC. Proteomic analysis reveals novel protein targets of S-nitrosylation in mesangial cells. *Contrib Nephrol* 2004 ; 141 : 221-230.
11. Sachs AN, Pisitkun T, Hoffert JD, Yu MJ, Knepper MA. LC-MS/MS analysis of differential centrifugation fractions from native inner medullary collecting duct of rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 ; 295 : F1799-1806.
12. Waanders LF, Chwalek K, Monetti M, Kumar C, Kannert E, Mann M. Quantitative proteomic analysis of single pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 18902-18907.
13. Sethi S, Gamez JD, Vrana JA, Theis JD, Bergen HR 3rd, Zipfel PF, Dogan A, Smith RJ. Glomeruli of Dense Deposit Disease contain components of the alternative and terminal complement pathway. *Kidney Int* 2009 ; 75 : 952-960.