

特集：プロテオミクス

尿プロテオーム解析とその公開データベース

足立 淳

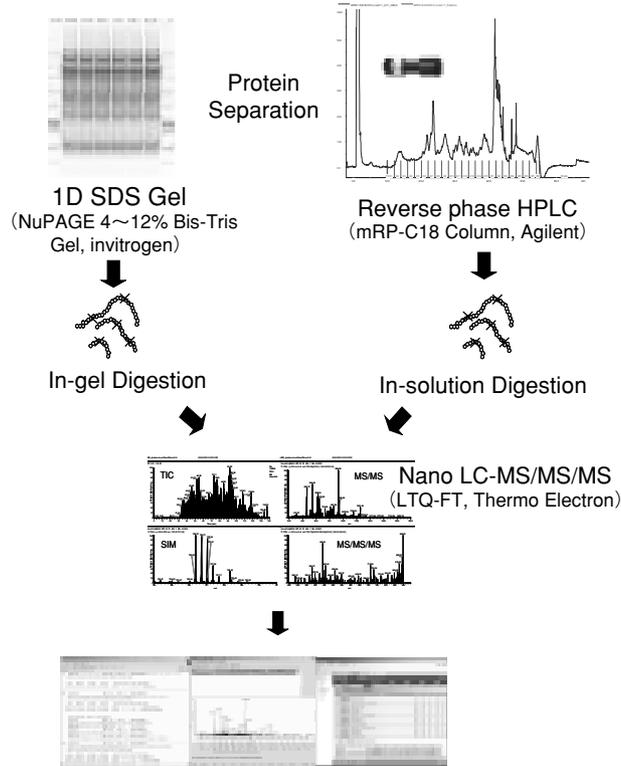
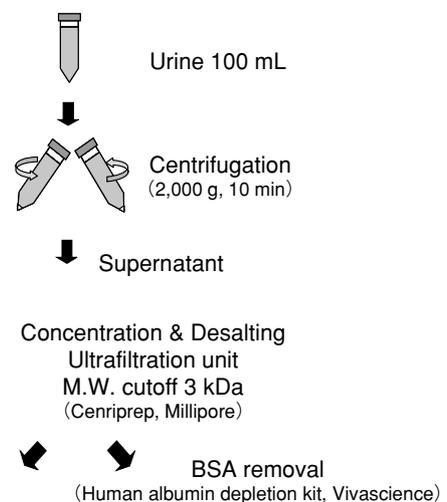
はじめに

尿は、血液など他の体液と比較して採取が容易な一方で、含まれるタンパク質は微量である。微量なタンパク質を同定するためには測定系の高感度化が必要であるため、最新の質量分析技術を用いた高感度と正確さを両立させた尿プロテオーム解析手法を構築してきた¹⁾。以下にその詳細と解析結果を紹介する。

「高感度」と「正確さ」を両立させたプロテオーム解析技術

通常、尿中のタンパク質は微量であるため、尿プロテオーム解析を行うためには、まず尿中タンパク質の濃縮が必要である。これまでは限外濾過、遠心、逆相分離、透析、凍結乾燥、アフィニティ精製など、さまざまな手法が用いられてきた。われわれは濃縮時におけるタンパク質のロスを少なくし、また、濃縮と脱塩を同時に行うことができ手法の標準化が容易な手法として、限外濾過フィルタ (centri-con 3 kDa cut off, amicon) を採用した。解析フロー図(図 1) に示すように、尿 100 mL を遠心後、限外濾過フィルタで約 50 倍に濃縮、脱塩を行った。

濃縮したタンパク質は、そのまま解析するには複雑すぎるため、分画してサンプルの複雑度を下げる必要がある。われわれは SDS-PAGE と逆送カラムによる 2 種類の分画方法を並列で行った。SDS-PAGE の場合、150 μg のタンパク質をゲルで分離し、10~14 個のブロックに分割して、定法に従いゲル内消化を行い、タンパク質を断片化した。一方、逆送カラムの場合、250 μg のタンパク質からアルブミ



Data Analysis (Mascot, MSQUANT, EPICenter)

図 1 尿プロテオーム解析の流れ

Human urinary proteome analysis and the open access database of the urinary proteome

マックスプランク生化学研究所 プロテオーム・シグナル伝達部門
(現所属) 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト

表 尿プロテオーム解析の実験条件, 同定ペプチド数, および同定タンパク質数

Experimental conditions and statistics on database searches of 4 individual experiments using single urine sample

	in-gel 1	in-gel 2	in-solution 1	in-solution 2
Urinary protein	150 μ g	150 μ g	125 μ g	125 μ g
Albumin removal	–	–	+	+
Protein separation	invitrogen NuPAGE 4~12 % Bis-Tris Gel		Agilent mRP-C18 Column	
Number of fraction	14	10	22	22
Digestion	in-gel	in-gel	in-solution	in-solution
Denaturant			50 % Trifluoroethanol	6 M Urea & 2 M Thiourea
LC gradient time	100 min	140 min	100 min	100 min
Identified IT-MS2 spectra by mascot*	16,219	10,535	13,367	10,175
Number of unique peptides*	4,504	3,853	3,164	2,637
Number of identified proteins*	759	815	656	580
Total number of unique peptides*	8,041			
Total number of identified proteins*	1,281			

Experimental conditions and statistics on database searches of 10 slices of pooled urine sample

	Pooled 1	Pooled 2	Pooled 3	Pooled 4	Pooled 5	Pooled 6	Pooled 7	Pooled 8	Pooled 9	Pooled 10
Protein separation	invitrogen NuPAGE 4~12 % Bis-Tris Gel									
Digestion	in-gel									
LC gradient time	140 min									
Identified IT-MS2 spectra by mascot	42,578	36,288	46,328	42,664	48,938	46,529	48,101	50,654	26,607	26,817
Number of unique peptides*	777	1,133	1,841	1,114	1,591	2,493	2,179	878	1,671	2,006
Number of identified proteins*	125	186	290	186	229	302	239	96	206	153
Total number of unique peptides*	9,737									
Total number of identified proteins*	1,055									

*Applied criteria was described in materials and methods.

(文献 1 より引用)

ン除去カラム (Vivascience) を用いて, アルブミンを除去した後に, 多孔性逆相 C18 カラム (mRP-C18 column, Agilent technologies) を用いてタンパク質を 22 分画した。得られた分画をトリフルオロエタノールもしくは尿素とチオ尿素を変性剤として用いて, 溶液内消化を行いタンパク質をペプチドに断片化した。得られたペプチドは Stagetip を用いて脱塩・濃縮し, ナノ LC-MS/MS で解析した。

質量分析はフーリエ変換型質量分析計 (LTQ-FT, LTQ-Orbitrap) を用いて解析を行い, Mascot と MSQUANT を用いて同定を行った。LTQ-FT を用いた場合には MS³測定も

を行い, ペプチド同定の正確性を向上させた。その結果同定したペプチド, タンパク質数を表に示す。1 個人の尿を LTQ-FT で解析した場合, 8,041 ペプチド, 1,281 タンパク質を同定し, 10 人の尿をプールしたサンプルを LTQ-Orbitrap で解析した場合, 9,737 ペプチド, 1,055 タンパク質を同定した。すなわち, 両データを合わせて 1,536 個のタンパク質を同定した。タンパク質同定の際には, 偽陽性の同定が混入することを防ぐために, LTQ-FT データの場合 $p=0.001$, LTQ-Orbitrap データの場合 $p=0.0025$ に相当するスコア以上のタンパク質のみを同定したと認める, ぎわ

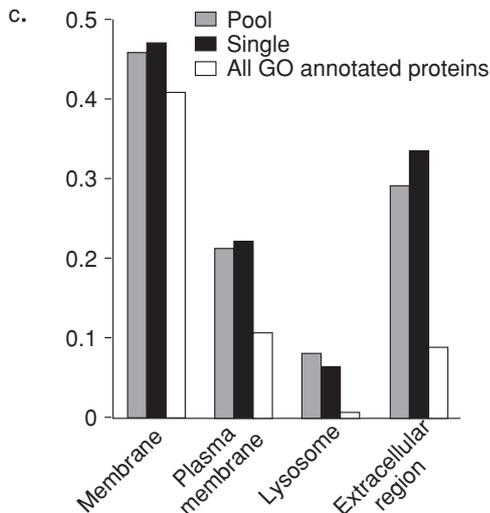
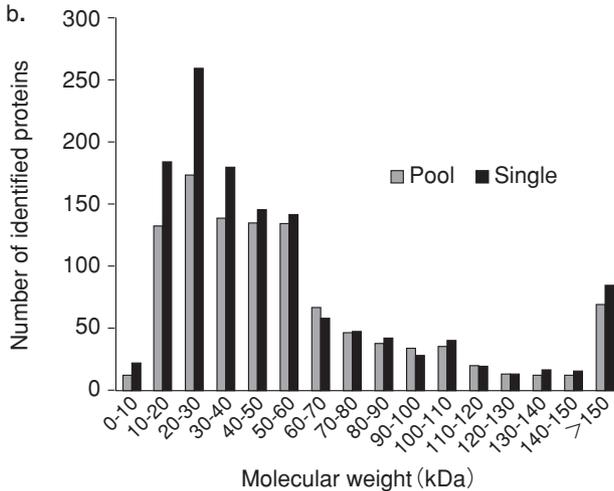
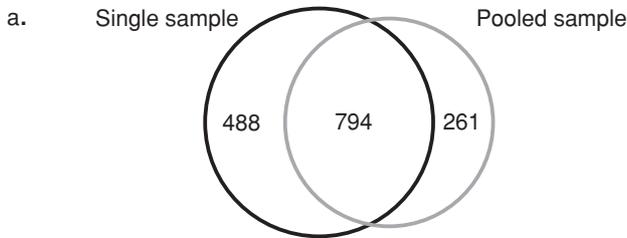


図 2 個人尿サンプルとプール尿サンプルのプロテオームデータ比較

a. 同定されたタンパク質の重複, b. タンパク質の分子量分布, c. 細胞内の局在 (文献 1 より引用)

めて厳しい同定基準を用いた。実際にデコイデータベースを用いた偽陽性ヒット検索の結果、偽陽性の同定は検出されなかった。以上の結果から、われわれの同定した尿プロテオームリストはほぼ偽陽性ヒットを取り除き、正確さを担保したうえで、1,500 個以上のタンパク質を同定する感度(深さ)も得ることができた。プロテオーム解析では、ペプチドやタンパク質の同定基準を緩めれば同定数は増加す

る一方、同定の正確性を失うため、感度と正確さは一般的にはトレードオフの関係にある。この関係を乗り越えて感度と正確さを両立させるためには、ロスの少ない前処理方法、複雑度を下げる画分方法、質量精度、感度が良い質量分析計で測定することが有効であると思われる。

尿プロテオームの特徴

尿中のタンパク質量は個人差や時間変動が大きいといわれているが、プロテオームレベルではどうであろうか。われわれは、個人から採取したサンプルと 9 人から採取しプールしたサンプルのプロテオームデータを比較した。図 2a に示すように、同定されたタンパク質の 51%が両サンプルで同定され、49%はどちらか一方のサンプルで同定された。次に分子量分布を比較すると、両者は似かよった分布パターンを示した(図 2b)。これらの結果は、個人用とプール尿に含まれるタンパク質が大きく異なるというよりも、LC-MS/MS のスキャンスピードがサンプルの複雑性に完全には追いついていないため、MS 上でピークは存在するが、同定されなかったタンパク質が存在することを示唆している。

さらに、細胞内の局在をジーンオントロジー(GO)解析ソフト BiNGO を用いて調べた。図 2c に示すように、GO に登録されているタンパク質と比較して、個人尿、プール尿中には膜タンパク質(特に細胞膜タンパク質)やリソソームタンパク質、分泌タンパク質が有意に濃縮されていた。その一方で、核タンパク質、リソソームタンパク質などの細胞内タンパク質は有意に希釈されていた。この結果は、膜タンパク質や、リソソームタンパク質が、尿中に含まれる細胞から由来した可能性よりも、むしろ膜タンパク質やリソソームタンパク質が尿に特異的に排出される経路が存在していることを示唆している。

さらに molecular function について GO 解析を行った結果、主にシグナル伝達、ペプチダーゼ活性、酵素阻害にかかわるタンパク質が濃縮されていた。シグナル伝達(275 タンパク質が該当)については予期していない結果であり、また血清プロテオームでは濃縮されていないので、尿プロテオームの特徴の一つであると言える。Biological process について GO 解析を行うと、免疫反応にかかわるタンパク質が濃縮されていた。これは、尿がケモカインや接着分子、炎症系サイトカインを含むことを考えると妥当な結果と言える。特に、接着分子はカドヘリンなどを含む 144 個のタンパク質がこのカテゴリーに属し、統計的にきわめて有意

Accession (PE)	Accession (Uniprot)	Accession (Uniprot)	Accession (NCBI)	Gene Symbol	M.W.	Protein Name	# of Identified Peptides	# of Unique Peptides	Tissue
F180008935	Q5U0L1	n/a	4525461	NRAS	21561	GTPase HRas precursor	7	3	Urine
F180008934	Q08174	n/a	24212877	PCDH1	113488	Splice isoform 1 of Protocadherin 1 precursor	6	5	Urine
F180008945	F18510	n/a	17894313	IL13RA	30384	Splice isoform 1 of Interleukin-1 receptor antagonist protein precursor	12	6	Urine
F180008970	P01130	n/a	4584075	LDR	86506	Low density lipoprotein receptor precursor	5	2	Urine
F180008973	Q5L235	n/a	4823461	DGF	137565	Pro-epidermal growth factor precursor	254	26	Urine
F180008990	Q5U0M	n/a	4797944	CD81	26476	CD81 antigen	5	1	Urine
F180008930	n/a	n/a	17900832	LOC384432	15012	PREDICTED: similar to NSP123	5	2	Urine
F180008960	O19863	n/a	7724394	DNMT2	29511	DNMT2 demethylase demethyltransferase 2	53	6	Urine
F180008932	Q08257	n/a	13230465	QSOX2	35256	Quarone oxidoreductase	11	3	Urine
F180008916	Q13473	n/a	882323	PRAME	29326	24-23 protein spakin	19	5	Urine
F180008974	Q06838	n/a	1245236	PCOL1	12234	Perlecanin-1	12	11	Urine
F180008949	Q9V977	n/a	4823065	COYH	28819	Ha crystallin homolog	10	1	Urine
F180008977	Q38131	n/a	8387450	DOR1	10203	Splice isoform 1 of Epithelial discoid domain-containing receptor 1 precursor	26	3	Urine
F180008932	Q14936-2	n/a	4581465	OPN6	63345	Splice isoform 2 of Transmembrane glycoprotein NP6 precursor	3	1	Urine
F180008933	F42762	n/a	4626940	PR3P	56277	1-protonal Pro-3 carbonopeptidase precursor	21	5	Urine
F180008911	P01394	n/a	489469	IGF2	30983	Splice isoform 1 of Insulin-like growth factor II precursor	4	2	Urine
F180008933	Q40155	n/a	7019361	FUR2	74817	Laudin-rich repeat transmembrane protein FUR2 precursor	16	2	Urine
F180008962	Q14962	n/a	4821565	OPN4	38496	Class I folding protein-cell adhesion molecule precursor	29	2	Urine
F180008954	Q9Y24	n/a	11464113	F13B	12962	Functional adhesion molecule A precursor	23	5	Urine
F180008959	Q29928	n/a	4821561	CD81	21453	Classical low-density lipoprotein receptor 1	16	5	Urine

図 3 尿プロテオームデータベースの検索結果表示ページ

に濃縮されていた ($p < 4.60 \times 10^{-23}$)。

細胞膜タンパク質の由来について

尿プロテオームに細胞膜タンパク質が濃縮されていたが、細胞膜タンパク質でも頂側膜タンパク質に偏って同定された。例えば、腎臓で頂側膜側に存在するアクアポリン 1, 2, 7 は同定されたが、基底膜側に存在するアクアポリンは同定されなかった。細胞膜タンパク質の尿への排出経路については、エキソソームを介した尿への排出仮説が提唱されてきたが^{2,3)}、われわれの実験結果はこれを支持するものであった。さらに、リソソームタンパク質については、われわれはリソソーム内の酵素だけでなく、Lamp1, Lamp2, Lamp3 などのリソソーム膜タンパク質も同定した。リソソーム膜が細胞膜に融合することによって Lamp1 は細胞膜に存在することも報告されており⁴⁾、リソソームタンパク質が細胞膜、エキソソームを介して尿へ排出されている可能性が考えられる。

尿プロテオームデータベース

本研究で同定された尿プロテオームデータは、他の体液や細胞のプロテオームデータと合わせて Max-Planck Unified Database (MAPU 1.0)⁵⁾にて公開されている (<http://141.61.102.16/urine/>)。MAPU の特徴として、その品質の高

さがあげられる。1つの研究室で、実験精度をコントロールした条件下で取得したデータのみ蓄積しているため、データの精度にばらつきが少なく信頼性が高いため、現在までに 360 万件以上アクセスされている。図 3 に示すように、タンパク質のアクセス番号、タンパク質名を用いて検索すると、同定タンパク質情報が表示される。またペプチドの欄をクリックすると、同定ペプチド配列や MS/MS スペクトル中で最もイオン強度の強いピーク情報も「MS3 precursor」として表示されるので、興味のあるタンパク質を Multi Reaction Monitoring 解析で定量するための基礎データとして有用であると考えている。

おわりに

尿は腎臓に関する疾患の診断に最適であるが、尿に含まれるタンパク質は予想以上に種類が多く、本研究で同定したタンパク質もまだ氷山の一角であると思われる。実際、本研究においてはきわめて厳しい同定基準を用いたため、同定に至らなかったタンパク質が多数存在した。このように、尿プロテオームを構成するタンパク質の多様性は、尿の診断材料としてのポテンシャルが高いことを示唆している。さらに血清と比較して、アルブミンなどの主要タンパク質の寡占率が低く、プロテオーム解析においても、これらのタンパク質を除去しなくても、1,000 個以上のタンパク質を同定することが可能である。今後は定量的かつハイ

スルーポットなアプローチを取り入れることにより、疾患の診断マーカーの開発が進むことを期待している。

文 献

1. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol* 2006 ; 7 : R80.
2. Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, Ishikawa S, Fushimi K, Nakanishi S, Bichet DG, Marumo F. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *N Engl J Med* 1995 ; 332 : 1540-1545.
3. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 13368-13373.
4. Klein D, Bussow H, Fewou SN, Gieselmann V. Exocytosis of storage material in a lysosomal disorder. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 327 : 663-667.
5. Zhang Y, Adachi J, Olsen JV, Shi R, de Souza G, Pasini E, Foster LJ, Macek B, Zougman A, Kumar C, Wisniewski JR, Jun W, Mann M. MAPU : Max-Planck Unified database of organellar, cellular, tissue and body fluid proteomes. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : D771-779.