

特集：プロテオミクス

尿のプロテオーム解析法開発から診断マーカー獲得に向けて

小寺義男*¹ 大草 洋*²

はじめに

プロテオーム解析は、組織や細胞内のタンパク質を網羅的に解析する方法で、ポストゲノム研究の一研究領域として定着しつつある。そのなかでも血清、尿を中心とした体液のプロテオーム解析は診断マーカーの確立において重要な位置を占めている。しかしながら、これらの体液を対象とした解析は、含まれるタンパク質の多様性に加え、存在量のダイナミックレンジが非常に広いため、組織・細胞を対象としたプロテオーム解析に比べて困難である。なかでも尿は、3種類の高存在量タンパク質(アルブミン, IgG, Tamm-Horsfall タンパク)の存在に加えて、含まれる総タンパク量の検体差が非常に大きいため、診断マーカーの探索は血清に比べて遅れている。こうしたなか、2006年より Human Kidney and Urine Proteome Project 主導の下、プロテオーム解析のための健常者尿の取り扱い基準(採取法, 保存法, 前処理法)が作成された。さらに、質量分析計を用いた尿中タンパク質の詳細な定性分析が行われ、約1,500種類から成る尿中タンパク質のデータベースが作成され、公開されている¹⁾。しかし、マーカー探索に必要な多検体による比較分析はなかなか進んでいないのが現状である。こうした状況のなか、われわれの開発した尿の前処理方法は、さまざまなタンパク量の患者尿に対しても適応でき、不安定なタンパク質の回収も可能である。また、市販のゲル濾過カラムと限外濾過膜を利用し、比較的簡便で高い回収効率と再現性を実現している。

本稿で紹介する尿プロテオームの基礎データと、マ

ーカー獲得に向けたアプローチが、今後の尿研究の一助となることと期待している。

方法

1. 尿の採取と保存

早朝第2尿を採取し、速やかに尿定性試験紙法(N-Multisticks SG-L : Bayer, Berlin, Germany)により尿タンパク量、潜血を確認した。尿は遠心処理を行うまでは室温で放置し、タンパク質分解を防ぐため採取後できるだけ早くタンパク質分解酵素阻害剤(Complete mini : Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を尿50 mLに対し1 tabletを加え良く溶解させた。次に1,000×g, 10°Cで10分間遠心処理を行い、尿中の細胞成分と不溶成分を取り除き、その上清を12 mL ずつポリプロピレンチューブ(Corning : Corning, NY, USA)に分注し、-80°Cに保存した。

2. 尿の脱塩・濃縮法

-80°Cに保存されていた尿は、室温で混濁がなくなるまでゆっくりと解凍した。尿の脱塩処理には、PD-10カラム(GE Healthcare : Little Chalfont, UK)を使用した。このカラムを使用して1本当たり2.5 mLの尿を脱塩し、脱塩されたタンパク質をHEPESバッファー(pH 6.5)3.5 mLで回収した。10 mLの尿を脱塩するのにカラムは4本必要であり、脱塩後の液量は14 mLに増加した。脱塩後、回収された尿は分画分子量1万の限外濾過フィルタ(Vivaspin 2 : Vivascience, Hanover, Germany)を用いて濃縮を行った。1回の操作で2 mLの溶液を濃縮することが可能である。この過程でのタンパク質の損失を少なくするために2本の限外濾過フィルタを使用した。それぞれ2 mLの尿を入れ、10,000×g, 4°Cで遠心処理を行い、14 mLすべてが濃縮されるまで繰り返し同じ2つのフィルタを使用した。限外濾

Development of a strategy for urine proteomics, toward urinary biomarkers

*¹ 北里大学理学部物理学科生体分子動力学研究室, 同 理学部付属疾患プロテオミクスセンター

*² 同 医学部泌尿器科

過膜へタンパク質が付着し濾過効率が低下するため、2 回目以降の尿サンプルを加えた後、遠心処理前に 5 分間ボルテックスによってよく攪拌した。完全に濃縮処理が終了した後、タンパク抽出液(7 M 尿素, 2 M チオ尿素, 0.1 M DTT, 2.5 % w/v Pharmalyte(pH 3-10), 2 % w/v CHAPS, Complete Mini EDTA-free(タンパク分解酵素阻害剤; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)1 錠/10 mL)を 10 倍希釈した溶液を 600 μ L ずつ限外濾過フィルタに加え、5 分間ボルテックスで攪拌することで限外濾過膜に付着したタンパク質を溶解させた。その後、30 分間程度遠心処理を行い、限外濾過フィルタ 1 本当たり 20~50 μ L まで濃縮した。次にタンパク質抽出液を限外濾過フィルタ 1 本当たり 100 μ L になるように加え、再度ボルテックスにてよく攪拌した。その後、100 μ L を損失なく回収するために、1,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 2 分間、リバーススピンを行ってすべての溶液を回収した。最終的には尿 12 mL を脱塩・濃縮し、合計 200 μ L のタンパク質溶液を得た。この脱塩、濃縮作業に要する時間は約 2.5 時間であった。

3. アガロース 2-DE

アガロース 2-DE は大石らの方法に従って行った^{2~4)}。一次元目の電気泳動用ゲル(アガロースを担体とした等電点電気泳動ゲル)は長さ 180 mm, 直径 3.4 mm のガラス管を用いて作製し、二次元目の SDS-PAGE ゲルは 195 \times 120 \times 1.5 mm の大きさのものを作製した。アガロース 2-DE の特性を活かすために、われわれは 2 種類の濃度の SDS-PAGE ゲルを目的に応じて作製した。すなわち、分子量 8 万以下のタンパク質の分離を目的としたアクリルアミド濃度 12 % の均一ゲルと、高分子量(high molecular mass : HMM)タンパク質の分離を目的とした 6~10 %濃度勾配ゲルである。二次元目の SDS-PAGE は Laemmli の方法によって行った⁵⁾。ゲルの染色はすべて Coomassie Brilliant Blue(CBB)にて行った。

4. タンパク質同定

2-DE ゲルから切り出したタンパックスポットは 50 % v/v アセトニトリルで脱色した後に 100 %アセトニトリルで脱水、乾燥させた。0.5 ng/ μ L トリプシン(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 50 mM NH_4HCO_3 バッファー(pH 8.0)で 37 $^{\circ}$ C 24 時間タンパク質のゲル内消化を行った。この消化ペプチドを 50 %アセトニトリル/50 % H_2O (5 %蟻酸)溶液で溶出させた。ゲル内消化後のペプチド混合物を液体クロマトグラフィ質量分析計[液体クロマトグラフィ : Nanospace SI-2, (Shiseido Fine Chemicals, Tokyo, Japan)質量分析計 : LCQ-DECA (Thermo Fisher Scientific,

San Jose, CA, USA)]により分析した。

上記した質量分析計によって得られた各トリプシン消化ペプチドの MS スペクトルとタンデム MS スペクトル(MS/MS スペクトル)を質量分析計に装備されているタンパク質同定用プログラム(SEQUEST Search Ver 2.0, <http://fields.scripps.edu/sequest/index.html>)を用いてデータベース検索を行った⁶⁾。本研究では、同定スコアが 70 以上のものを同定されたタンパク質とした。また、スコアが 70 未満の場合は、信憑性の高い MS/MS スペクトルが 2 つ以上観測されていることを確認し、同定されていると判断した。

結果と考察

アガロース二次元電気泳動による分析

アガロース 2-DE は、10~500 kDa に及ぶ非常に広い分子量範囲でのタンパク質の分離が可能であり、またダイナミックレンジが広く、尿中の高濃度タンパク質と微量タンパク質を 1 枚のゲル上に展開することができる⁴⁾。今回開発した前処理法を用いて、健常者尿 10 mL を処理し、アガロース 2-DE 法で分離し、CBB 染色した結果を図 1 a に示す。腎機能が正常にもかかわらず 80 kDa を超える高分子量タンパク質が数多く観測されている。また、健常者の尿においてはタンパク量は血液などと比較し非常に少なく、そのほとんどをアルブミンと IgG が占めている。そこで、脱塩前に血清用のアルブミン/IgG 除去カラム(ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit : Calbiochem, Darmstadt, Germany)を用いてアルブミン/IgG を除去し、分析する尿の量を 10 mL から 30 mL へと増やした(図 1b)。これにより、微量なタンパク成分が明確に観測されていることに加えて、アルブミン、IgG に重なって観測されていなかったタンパク質が数多く観測された。次に図 1a で観測されたスポットすべてと、図 1b で新たに確認されたスポット、さらに、高分子量タンパク質を分離検出するための高分子用 2-DE(data not shown)で観測された高分子スポットを切り出し、酵素消化後に LC-MS/MS 分析にて同定を行った。その結果、合計で 318 スポットを切り出して 268 スポットのタンパク質名を決定し、重複しているものを除いて約 150 種類のタンパク質の同定に成功した。このなかで一般的な 2-DE 法では分析の困難な高分子量領域のタンパク質同定結果を表に示す。健常者尿においても 80 kDa 以上の高分子量タンパク質が多く存在し、18 スポット、13 種類の高分子量タンパク質が同定された(表)。このうち 3 種類のタンパク質は、尿タンパク質のデータベース¹⁾にも

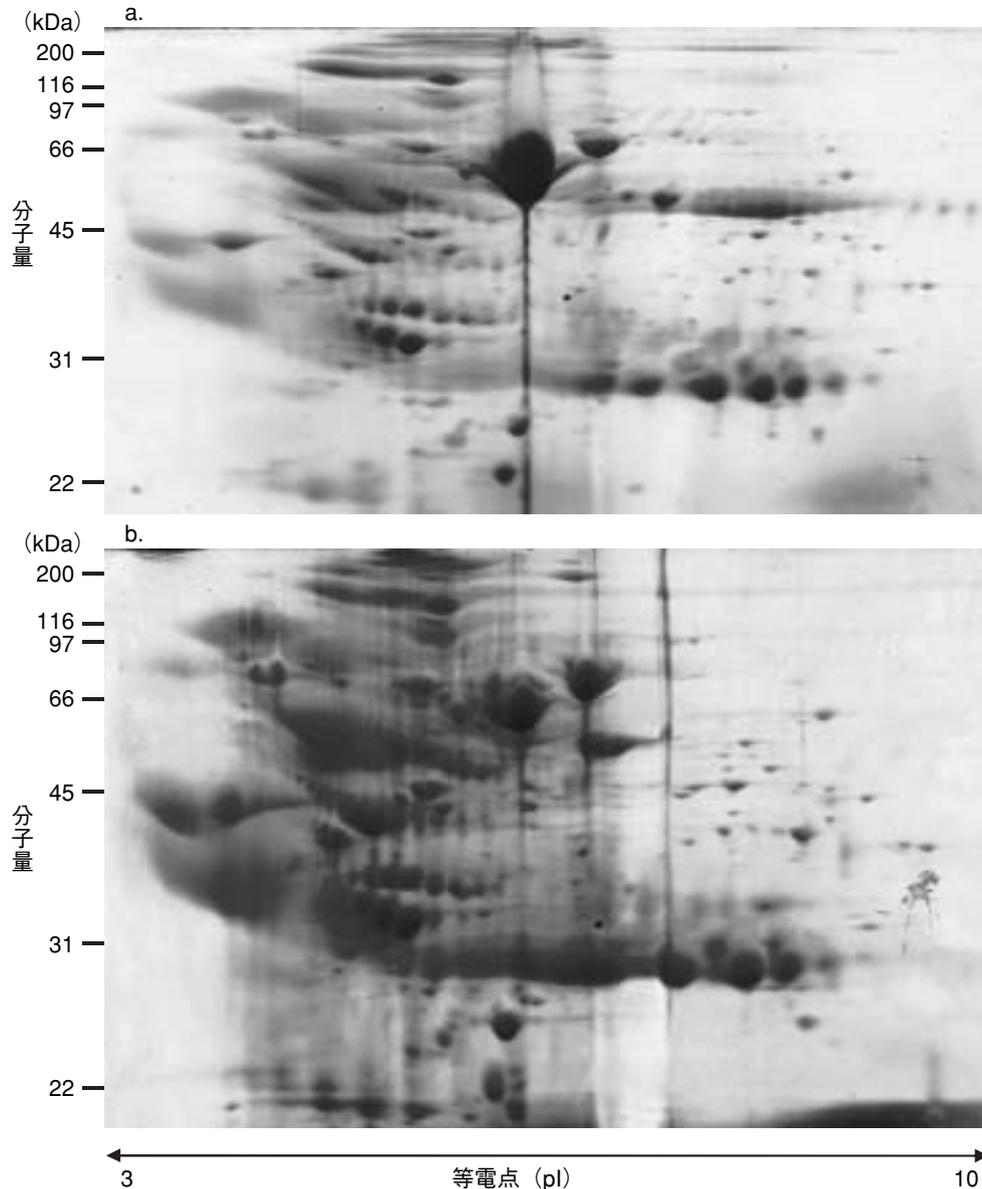


図 1 健常者尿のアガロース二次元電気泳動分析結果

- a. 尿 10 mL を脱塩・濃縮後に分析
 b. 尿 30 mL をアルブミン/IgG 除去後に脱塩・濃縮して分析

載っておらず、尿中で初めて同定されたタンパク質と考えられる。今までに観測されていない理由としては、試料調製時に沈殿して分析不可能となった可能性がある。その点では、今回確立した前処理法では途中で可溶性の高いタンパク抽出液を使っていること、高分子量タンパク質も分析可能なアガロース 2-DE 法を使用したことが理由であると考えられる。健常者尿中には 70 kDa 以上のタンパク質は存在しないと考えられているが、今回、検出・同定されたタンパク質は exocytosed vesicles から分泌されるタンパク質であり⁷⁾、腎糸球体のタンパク漏出防止機構(size and/

or charge selectivity)の影響を受けないものであった。

今回われわれは、高効率な尿の前処理法を確立し、低分子量から高分子量まで広い範囲のタンパク質を検出することに成功した。このことは、新たな腫瘍マーカーや疾患関連タンパク質探索の出発点として有用であると考えられる。

尿中のマーカータンパク質探索に向けて

今回確立した尿の前処理法の応用例として、さまざまな

表 健康者尿中の高分子量タンパク質の同定結果

タンパク名	分子量*	文献 1**
Ceruloplasmin	115,472	1
Collagen alpha 1 (VI) chain precursor	108,640	1
Pro-epidermal growth factor [Precursor]	127,958	1
Lysosomal alpha-glucosidase [Precursor]	105,338	1
Alpha-N-acetylglucosaminidase	82,167	1
Iron-responsive element-binding protein 1	98,399	0
Programmed cell death 6-interacting protein	96,818	1
Complement C3 [Precursor]	187,148	1
10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	98,700	0
Amiloride-sensitive amine oxidase [Precursor]	85,342	1
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 [Precursor]	521,931	1
Maltase-glucoamylase, intestinal	209,853	1
Cubilin [Precursor]	384,285	0

*分子量はデータベース上の分子量を示す。**文献 1 で検出されているものには「1」を、観測されていないものには「0」を記載した。

	健康者尿			膀胱癌患者尿 (腎機能正常)													
尿タンパク	-	-	±	-	-	-	-	±	±	+	+	+	2+	2+	3+	4+	4+
潜血	-	-	-	±	2+	-	-	3+	-	3+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	2+

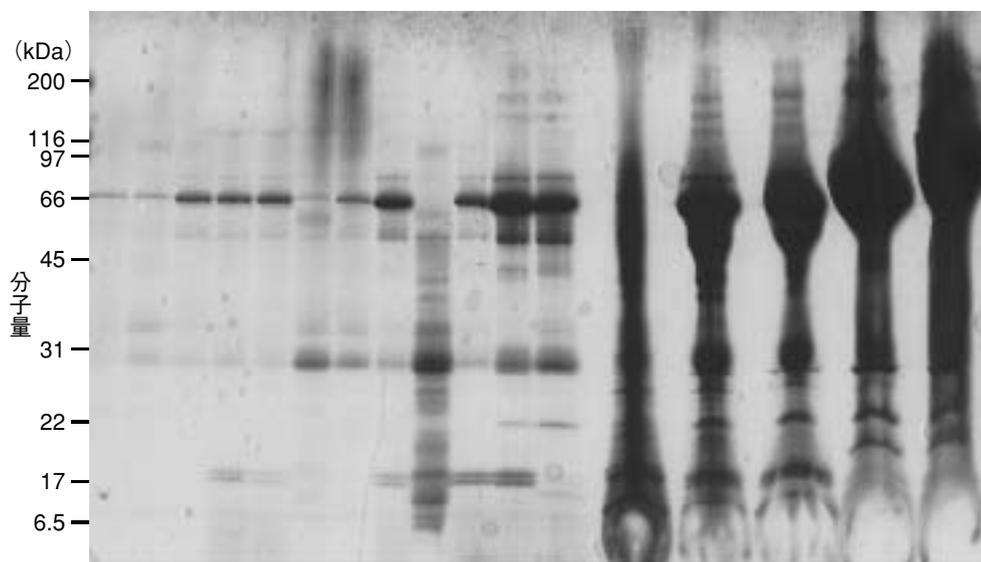


図 2 健康者尿ならびに膀胱癌患者尿の電気泳動分析結果

尿 30 μL を脱塩・濃縮後に SDS-PAGE で分離して CBB 染色。電気泳動ゲル上の表に各レーンで分析した尿タンパク量 (尿タンパク) ならびに潜血の度合いを示す。

膀胱癌患者尿の分析を試みた。その結果, 尿タンパク (3+), (4+) の尿においては, 限外濾過膜の詰まりを緩和するための対策として, 処理前の尿の希釈と濾過途中 (遠心途中) の濾過膜の攪拌が必要であったが, この処理によりすべての尿タンパクレベルにおいて, 開発した前処理法の適用が可

能であることがわかった。図 2 は健康者尿 3 検体とさまざまなタンパク量の膀胱癌患者尿 14 例をそれぞれ前処理し電気泳動分析した結果である。すべて尿 30 μL に含まれているタンパク質を分析している。尿タンパク (1+) 以下ではきれいな泳動パターンが展開されているのに対し, 尿タン

パク(2+)以上ではタンパク量が多すぎるため構成成分が一塊となり、各タンパクのバンドが描出されなかった。尿を対象としたプロテオーム解析においては、さまざまなタンパク量の尿を電気泳動法ならびに質量分析計で同じ方法で比較分析し、疾患関連タンパク質を探し出すことは困難な場合が多い。そこでわれわれは、さまざまな方法で尿中のマーカー探索を試みている。そのなかの2つの例を以下に示す。

一つは、膀胱癌を対象とし、膀胱癌組織中で探索したマーカー候補タンパク質の尿中での変動分析、もう一つは、腎移植後の患者尿を経時的に分析し、拒絶反応の早期診断ならびに予後予測を行うためのマーカーの探索である。前者では、手術で摘出した膀胱癌組織と正常組織のタンパク成分を比較して、膀胱癌組織特異的に増加していたタンパク質に対して、ウエスタンブロッティング法にて尿中での存在と膀胱癌特異的な増減を検討した。確立した前処理法で濃縮した患者尿と健常者尿試料に対して、膀胱癌組織で増加している7種類のタンパク質を分析した結果、Structural maintenance of chromosomes protein 3(SMC3)が、膀胱癌特異的に尿中で増加していることを確認した⁸⁾。このタンパク質は今までに膀胱癌との関連ならびに尿中での検出例はなく、膀胱癌の新たな尿中マーカーの候補であると考えている。後者に関しては、現在数名の患者尿の分析を進めている。移植後1週間を経過すると尿中のタンパク濃度は比較的落ち着いてくる。したがって、移植前と移植1週間後から数カ月後までの同一患者尿を定期的に採尿し、前処理後にアガロース2-DEで分析することにより、経時的に増減する複数のタンパク質の検出・同定に成功している。

プロテオーム解析の各分野への普及に伴い、質量分析技術の多様な発達が進められている。こうしたなか、三連四重極型質量分析計を用いたタンパク質・ペプチドの選択的定量分析(MRM法: Multiple Reaction Monitoring法、またはSRM法: Selected Reaction Monitoring法)が可能となってきた。この方法では、理想的には診断マーカー候補タンパク質・ペプチド100種類以上を同時に一度のLC-MS測定(20~120分)により、定量分析することが可能である。目的としたタンパク質の酵素消化断片を選択的に高感度検出できるため、原理的には 10^4 ~ 10^5 の濃度差のあるタンパク質の同時分析も可能である。すでに組織ならびに血清中のタンパク質・ペプチドの定量分析に応用されている^{9,10)}。今後、組織・細胞・タンパク濃度のほぼ等しい限定された

尿で探索されたマーカー候補タンパク質が、この方法によって多検体評価され、尿中の診断マーカーが確立されることが期待される。

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究ならびに北里大学共同研究振興資金(AKPS)の支援のもとに行った研究である。

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 Biology* 2006 ; 7 : R80 : 1-16.
2. Oh-Ishi M, Satoh M, Maeda T. Preparative two-dimensional gel electrophoresis with agarose gels in the first dimension for high molecular mass proteins. *Electrophoresis* 2000 ; 21 : 1653-1669.
3. Oh-Ishi M, Maeda T. Separation techniques for high-molecular-mass proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002 ; 771 : 49-66. Review.
4. Oh-Ishi M, Maeda T. Disease proteomics of high-molecular-mass proteins by two-dimensional gel electrophoresis with agarose gels in the first dimension (Agarose 2-DE). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007 ; 849 : 211-222. Review.
5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 ; 227 : 680-685.
6. Yates JR 3rd, Eng JK, McCormack AL, Schieltz D. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal Chem* 1995 ; 67 : 1426-1436.
7. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 13368-13373.
8. Okusa H, Kodera Y, Oh-ishi M, Minamida M, Tsuchida M, Kavoussi N, Matsumoto K, Sato T, Iwamura M, Maeda T, Baba S. Searching for new biomarkers of bladder cancer based on proteomic analysis. *J Electrophoresis* 2008 ; 52 : 19-24.
9. Kuzyk MA, Smith D, Yang J, Cross TJ, Jackson AM, Hardie DB, Anderson NL, Borchers CH. Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma. *Mol Cell Proteomics* 2009 ; 8 : 1860-1877.
10. Kuhn E, Wu J, Karl J, Liao H, Zolg W, Guild B. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics* 2004 ; 4 : 1175-1186.