

特集：プロテオミクス

尿のペプチドミクス

奥村 宣明*¹ 須藤 浩三*² 高尾 敏文*²

はじめに

尿には分子量 1 万以下のペプチドが多数存在し、その排泄量は健常者で 1 日数十 mg 程度である¹⁾。これらは主として組織中、血液中あるいは尿路中で生じたタンパク質の分解産物であり、何らかの理由で効率良く分解あるいは吸収されなかったペプチドが尿細管を通過して尿中に排泄されたものと考えられる。尿はサンプルの採取が容易で、血液よりプロテアーゼの活性が低く、血液、腎臓、膀胱などに由来する物質を含んでいることから、プロテオミクスの分野では、疾患マーカーの発見を目的として尿を対象にした種々の試みが行われている。プロテオミクスのなかでペプチドの解析に焦点を絞ったものを特にペプチドミクスと呼ぶが、本稿では、ペプチドミクスによって明らかになった尿ペプチドの構成成分の特徴、ならびにペプチドミクスによる疾患マーカー探索の現状について概説する。

尿中のヒドロキシプロリンとコラーゲン

ヒドロキシプロリン (Hyp) はゼラチンの加水分解物から発見されたアミノ酸で、タンパク質のプロリン残基の 3 位または 4 位のヒドロキシル化によって生じる。生体内の Hyp の大部分はコラーゲンの構成アミノ酸として存在する 4-Hyp であるため、Hyp の存在はコラーゲンに関連する物質が存在する可能性を示唆する。尿では遊離の Hyp は少ないが、尿を酸加水分解すると検出される Hyp の量が増加することから、尿中にコラーゲン由来のペプチドが存在することは古くから予想されていた²⁾。

コラーゲンは骨、軟骨、および多くの組織の基底膜、あ

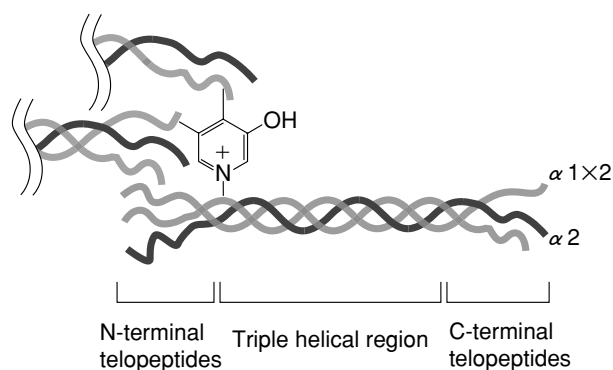


図 1 コラーゲン Type I の構造

コラーゲン Type I は、中央部分が 2 本の $\alpha 1$ 鎖と 1 本の $\alpha 2$ 鎖から成るトリプルヘリックスであり、両端にはトリプルヘリックスをとらない N 末端テロペプチド、C 末端テロペプチドと呼ばれる領域がある。テロペプチドの部分には、コラーゲン分子間の架橋構造が存在する。コラーゲンには 20 種類以上のタイプがあるが、他のコラーゲンもトリプルヘリックス領域を持った類似の構造をしている。

るいは細胞間基質の構成成分として存在するが、特に破骨細胞による骨吸収の過程ではコラーゲンの分解が活発に起こっており、尿中の Hyp の一部は骨の分解に由来すると考えられる。しかし、骨以外の組織のコラーゲンも Hyp を含むこと、食物中のコラーゲンに含まれる Hyp の一部も尿中に排泄されることなどから、尿中の Hyp が必ずしも骨吸収を反映するとは言えない。1990 年代になって、骨のコラーゲンの主成分であるコラーゲン Type I の N 末端および C 末端テロペプチド(図 1)の架橋部分を含むペプチド (NTX-I, CTX-I) が血中および尿中に存在することがわかり、これらを抗体によって特異的に定量する方法が開発され³⁾、骨代謝マーカーとして骨粗鬆症、骨転移などの診断に利用されるようになった⁴⁾。

Urinary peptidomics

*¹ 大阪大学タンパク質研究所 体内環境統合蛋白質研究グループ

*² 同 機能・発現プロテオミクス研究系

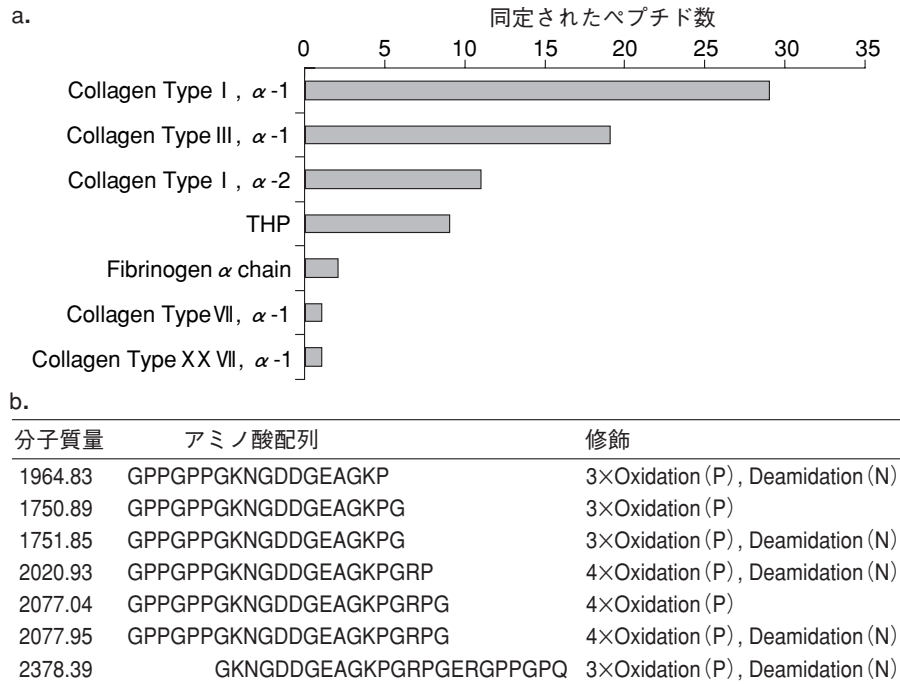


図 2

- a. 主要な尿ペプチドの同定。健康者の尿から調製したペプチド画分を逆相 NanoLC で分離し、MALDI MS/MS にて 70 種のペプチドを同定した。この解析から、メジャーなペプチドの多くはコラーゲン由来のフラグメントであることがわかる。ほかに THP、フィブリノーゲン由来のペプチドが含まれる。
- b. Collagen Type I, α -1 の同定結果の一部。同定された 29 種のペプチドのうち、7 種は同じ領域を含むもので、長さあるいは修飾の違うものであった。

尿ペプチドの構成成分

上記のように、尿にコラーゲンの分解物が存在することは古くから知られており、診断にも応用されていたが、最近まで尿ペプチドの構成成分の全体像はよくわからなかった。しかし近年、プロテオミクスの解析技術の発展に伴い、タンデムマススペクトロメトリー (MS/MS) を用いた尿ペプチドの詳細な解析が可能となった。

われわれは、尿ペプチドの成分を解析するため、逆相 HPLC で尿ペプチドを分画し、MS/MS によりペプチドの同定を行った。図 2 に示したのは尿中に存在する比較的量の多い 70 種のペプチドであるが、同定されたペプチドの約 75% はコラーゲン由来のフラグメントであった。コラーゲンには I 型(主として骨)、II 型(軟骨)、III 型(種々の結合組織)、IV 型(基底膜)をはじめ多くのタイプがあるが、尿中に特に多いのは I 型、III 型で、ほかに VII 型、IV 型なども検出された。

尿中にコラーゲン由来のペプチドが多い理由としては、コラーゲンの生体内の存在量が多いこと、骨などでターン

オーバーが活発に起こっていること、また、Gly, Pro の多い特殊なアミノ酸配列をしているため、ペプチダーゼによる分解を受けにくいことなどが考えられる。さらに、コラーゲンには 20 種類以上のタイプが存在すること、また図 2b に示すように、1 つの領域から長さの違う複数のペプチドが生じること、同じ配列のペプチドでもプロリンのヒドロキシル化など修飾の異なるものが複数存在することなどから、ペプチドの種類が多くなり、尿ペプチドの解析を非常に複雑にしている。

尿にはこのようにコラーゲンに由来するペプチドが大量に存在するため、これら以外の成分を解析するためにはより高感度な解析が必要となる。そこでわれわれは、尿ペプチドをイオン交換 HPLC で分画した後、逆相 NanoLC で分離することにより (2D-LC)、より詳細な成分の同定を試みた。その結果、1 例として 1 人の健康者の尿から、コラーゲン Type I, Type III 由来ペプチド 235 種とともに、それら以外のタンパク質に由来するペプチド 415 種を同定することができた。コラーゲン以外の成分としては、尿管上皮細胞の Tamm-Horsfall protein (THP) やオステオポンチン

由来のペプチドが比較的多く検出された。また、血液タンパク質由来と思われるペプチドとして、フィブリノーゲン、MASP2 などのフラグメントが検出された。

このように、2D-LC を用いると、尿に含まれるペプチドの種類に関する多くの情報を得ることができるが、多数の検体をハイスループットで解析することはできない。また、分画を多段階にすると定量性を確保することが難しくなる。そこでわれわれは、尿からコラーゲンペプチドを選択的に除去する方法を検討している。コラーゲンのトリプルヘリックス領域は Gly-Xaa-Xaa の繰り返し構造から成るため、一般的なプロテアーゼでは消化されにくい。細菌の分泌するコラーゲナーゼ (Col G など) は一本鎖ならびに三本鎖のコラーゲンを特異的に分解する。そこで、ペプチドをコラーゲナーゼで処理することにより、一次元の逆相 HPLC のみで非コラーゲンタンパク質 12 種類に由来するペプチドを検出することができた。この方法をさらに発展させることができれば、尿ペプチドのハイスループットな網羅的同定と定量解析が可能になるのではないかと考えている。

尿ペプチドを対象にした疾患マーカー探索

尿はサンプルの採取が容易なこと、プロテアーゼが少なくペプチドが安定していることなどの理由から、疾患マーカー探索の種々の試みが行われている。ペプチドを対象としたマーカー探索の初期段階においては、LC-MS/MS のほか、SELDI-TOF-MS (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) がしばしば用いられる。

SELDI-TOF-MS による方法は、表面にイオン交換基などを結合させたチップ上にサンプルを塗布し、そこに結合した物質の分子質量を測定し、検出された分子イオンの強度をサンプル間で比較するものである⁵⁾。この方法は、前処理に煩雑な操作を必要とせず、ハイスループットでピークの変化を解析できるため、尿からの疾患マーカー探索にしばしば利用され⁶⁻⁹⁾、また診断への応用も期待されている。一方で、SELDI-TOF-MS では個々のピークの同定が一般的には困難なため、マーカー候補が見つかってそれがどのようなペプチドかを知るのには難しく、これをいかにして解決するかが課題である。

SELDI-TOF-MS の活用例として尿中ヘプシジンの定量法がある。ヘプシジンは 20~25 残基から成るペプチドで¹⁰⁾、赤血球やマクロファージのフェロポーチンと結合し

て鉄の輸送を抑制する作用があり¹¹⁾、血色素症や貧血などの鉄代謝異常と関連がある¹²⁾。ヘプシジンは肝臓で合成され、血液中を循環するが、少量が尿に排泄される。血中および尿中のヘプシジンは SELDI-TOF-MS で検出できることが報告されており^{7,9)}、抗体や LC-MS/MS を用いた定量法との比較検討がなされている¹³⁾。

CE-MS は、キャピラリー電気泳動でペプチドを分画し、オンラインで接続した質量分析計により分子質量を測定する方法で^{14,15)}、ペプチドの発現パターンの違いをハイスループットで比較できることから、IgA 腎症¹⁶⁾、微量アルブミン尿症¹⁷⁾、尿路上皮癌¹⁸⁾、冠動脈疾患¹⁹⁾などで尿の解析を行った結果が最近報告されている。例えば IgA 腎症の解析では、尿で増加するペプチドが CE-MS によって見出され、MS/MS によりコラーゲンのフラグメントなどが同定された¹⁶⁾。ただし、キャピラリーにアプライできるサンプル量が限られていることなどから、ペプチドの同定には非常に高感度な MS/MS 解析が必要となる。

SELDI-TOF-MS や CE-MS で検出されたマーカー候補ペプチドのなかで、ペプチドの配列が明らかにされたものは多くないが、その多くはコラーゲン、THP など限られたタンパク質のフラグメントである。例えば、コラーゲンのトリプルヘリックス領域のペプチドは、冠状動脈粥状硬化症¹⁹⁾、老化²⁰⁾、I 型糖尿病²¹⁾などにおいて変化がみられるという。現時点では、これらのペプチドがどの組織に由来するのか、また、コラーゲン分子のなかの特定のフラグメントだけ変化するのか、それとも全体が変化するのか、コラーゲン自身が変化しているのか、それともそれを切るプロテアーゼが変化しているのか、など、詳しいことは明らかになっておらず、それらが実際に特定の疾患と特異的に関連した変化であるか否かは今後の検討課題となるであろう。一方、コラーゲンや THP 以外のタンパク質のフラグメントを解析するためにはより微量成分の解析が必要であることから、更なる解析の高感度化が必要となると考えられる。これらと関連して、最近では、LC-MS/MS による定量的解析の試みが行われており、健常者と慢性腎移植障害患者の尿ペプチドの比較解析などへの適用例が報告されている²²⁾。今後、解析の高感度化と比較定量的技術の進歩とともに、さらにこの分野の研究が進むことが予想される。

文 献

1. Norden AG, Sharratt P, Cutillas PR, Cramer R, Gardner SC, Unwin RJ. Quantitative amino acid and proteomic analysis: very low excretion of polypeptides >750 Da in normal urine.

- Kidney Int 2004 ; 66 : 1994-2003.
2. Ziff M, Kibrick A, Dresner E, Gribetz HJ. Excretion of hydroxyproline in patients with rheumatic and non-rheumatic diseases. *J Clin Invest* 1956 ; 35 : 579-587.
 3. Hanson DA, Weis MA, Bollen AM, Maslan SL, Singer FR, Eyre DR. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption : quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 1992 ; 7 : 1251-1258.
 4. Herrmann M, Seibel MJ. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I , NTX-I and CTX-I : a comparative review. *Clin Chim Acta* 2008 ; 393 : 57-75.
 5. Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000 ; 21 : 1164-1177.
 6. Schaub S, Wilkins J, Weiler T, Sangster K, Rush D, Nickerson P. Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Kidney Int* 2004 ; 65 : 323-332.
 7. Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 2005 ; 106 : 3268-3270.
 8. Zhang X, Jin M, Wu H, Nadasdy T, Nadasdy G, Harris N, Green-Church K, Nagaraja H, Birmingham DJ, Yu CY, Hebert LA, Rovin BH. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int* 2008 ; 74 : 799-807.
 9. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, Ishikawa I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood* 2006 ; 108 : 1381-1387.
 10. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 7806-7810.
 11. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004 ; 306 : 2090-2093.
 12. Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Hepcidin : from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 2008 ; 93 : 90-97.
 13. Swinkels DW, Girelli D, Laarakkers C, Kroot J, Camprostrini N, Kemna EH, Tjalsma H. Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2008 ; 3 : e2706.
 14. Fang X, Balgley BM, Lee CS. Recent advances in capillary electrophoresis-based proteomic techniques for biomarker discovery. *Electrophoresis* 2009 ; 30 : 3998-4007.
 15. Ahmed FE. The role of capillary electrophoresis-mass spectrometry to proteome analysis and biomarker discovery. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009 ; 877 : 1963-1981.
 16. Julian BA, Wittke S, Novak J, Good DM, Coon JJ, Kellmann M, Zurbig P, Schiffer E, Haubitz M, Moldoveanu Z, Calcaterra SM, Wyatt RJ, Sykora J, Sladkova E, Hes O, Mischak H, McGuire BM. Electrophoretic methods for analysis of urinary polypeptides in IgA-associated renal diseases. *Electrophoresis* 2007 ; 28 : 4469-4483.
 17. Rossing K, Mischak H, Parving HH, Christensen PK, Walden M, Hillmann M, Kaiser T. Impact of diabetic nephropathy and angiotensin II receptor blockade on urinary polypeptide patterns. *Kidney Int* 2005 ; 68 : 193-205.
 18. Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I, Mischak H, Frierson HF. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer : a prospective analysis. *Lancet Oncol* 2006 ; 7 : 230-240.
 19. von Zur Muhlen C, Schiffer E, Zurbig P, Kellmann M, Brasse M, Meert N, Vanholder RC, Dominiczak AF, Chen YC, Mischak H, Bode C, Peter K. Evaluation of urine proteome pattern analysis for its potential to reflect coronary artery atherosclerosis in symptomatic patients. *J Proteome Res* 2009 ; 8 : 335-345.
 20. Zurbig P, Decramer S, Dakna M, Jantos J, Good DM, Coon JJ, Bandin F, Mischak H, Bascands JL, Schanstra JP. The human urinary proteome reveals high similarity between kidney aging and chronic kidney disease. *Proteomics* 2009 ; 9 : 2108-2117.
 21. Merchant ML, Perkins BA, Boratyn GM, Ficociello LH, Wilkey DW, Barati MT, Bertram CC, Page GP, Rovin BH, Warram JH, Krolewski AS, Klein JB. Urinary peptidome may predict renal function decline in type 1 diabetes and microalbuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2009 ; 20 : 2065-2074.
 22. Quintana LF, Campistol JM, Alcolea MP, Banon-Maneus E, Sol-Gonzalez A, Cutillas PR. Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. *Mol Cell Proteomics* 2009 ; 8 : 1658-1673.