

## Human Proteome Organization (HUPO) のヒト腎臓・ 尿プロテオームプロジェクト

山 本 格

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
附属腎研究施設構造病理学分野

### Human Kidney and Urine Proteome Project of Human Proteome Organization

Tadashi YAMAMOTO

*Department of Structural Pathology, Institute of Nephrology  
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University*

#### 要 旨

ヒトの腎組織や尿のプロテオームを解析する国際共同研究プロジェクト（ヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクト）を組織し、ヒトプロテオーム機構（Human Proteome Organization, HUPO）の他のプロジェクトとも連携するプロテオミクス研究を推進している。多くの慢性腎臓病が糸球体傷害に端を発し、その病因や病態を腎生検の糸球体プロテオミクスを解析することで解明しようとしている。疾患糸球体プロテオミクスを解析する前に、正常ヒト腎糸球体のプロテオームを解析し、そのデータベースを構築し、ウェブ上でも公開した (<http://www.hkupp.org/>) (<http://www.ebi.ac.uk/pride/>)。ヒト腎組織と尿のプロテオーム解析を国際連携で行っている研究の一端を紹介する。

**Key words:** chronic kidney disease (CKD), glomerulus, human proteome organization, mass spectrometer, proteome, proteomics

#### はじめに

ヒトゲノムの解読が終わり、ヒト遺伝子の総数は

約 2.2 万と推定され<sup>1)</sup>、ヒトの生命現象の理解が深まり、病気の解明、治療法の開発へ期待が大きく膨らんだ。ヒト遺伝子の塩基配列の解読、遺伝

**Reprint requests to:** Tadashi YAMAMOTO  
Department of Structural Pathology  
Institute of Nephrology  
Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Niigata University  
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,  
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科総合研究科附属腎  
研究施設構造病理学分野 山 本 格

表1 ヒトプロテオーム機構とそのイニシアチブ

|    | ヒトプロテオーム機構         | Human Proteome Organisation, HUPO                 | <a href="http://www.hupo.org">http://www.hupo.org</a>   |
|----|--------------------|---|---|
| 1  | ヒト肝臓プロテオームプロジェクト   | Human Liver Proteome Project, HLPP                | <a href="http://www.hlpp.org/Index/index.php">http://www.hlpp.org/Index/index.php</a>                           |
| 2  | ヒト脳プロテオームプロジェクト    | Human Brain Proteome Project, HBPP                | <a href="http://www.hbpp.org/">http://www.hbpp.org/</a>   |
| 3  | プロテオーム標準化プロジェクト    | Proteomic Standard Initiative, PSI                | <a href="http://psidev.sourceforge.net/">http://psidev.sourceforge.net/</a>                                     |
| 4  | ヒト抗体イニシアチブ         | Human Antibody Initiative, HAI                    | <a href="http://www.proteinatlas.org/">http://www.proteinatlas.org/</a>   |
| 5  | 血漿プロテオームプロジェクト     | Plasma Proteome Project, PPP                      | <a href="http://www.bioinformatics.med.umich.edu/hupo/ppp">http://www.bioinformatics.med.umich.edu/hupo/ppp</a> |
| 6  | ヒト疾患糖プロテオームイニシアチブ  | Human Disease Glycomics/Proteome Initiative, HGPI | <a href="http://www.hgpi.jp/menu0.html">http://www.hgpi.jp/menu0.html</a>                                       |
| 7  | ヒト疾患マウスモデルプロジェクト   | Mouse Models of Human Disease, MMHD               | <a href="http://www.hupo.org/research/mmhd/">http://www.hupo.org/research/mmhd/</a>                             |
| 8  | 疾患バイオマーカーイニシアチブ    | Disease Biomarkers Initiative, DBI                | <a href="http://www.hupo.org/research/dbi/">http://www.hupo.org/research/dbi/</a>                               |
| 9  | ヒト心血管プロテオームイニシアチブ  | HUPO Cardiovascular Initiative, HCVI              | <a href="http://www.hupocvi.org/">http://www.hupocvi.org/</a>   |
| 10 | 幹細胞プロテオーム生物学イニシアチブ | Proteome Biology of Stem Cells Initiative, PBSCI  | <a href="http://www.hupo.org/research/stemcells/">http://www.hupo.org/research/stemcells/</a>                   |
| 11 | ヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクト | Human Kidney and Urine Proteome Project, HKUPP    | <a href="http://www.hkupp.org">http://www.hkupp.org</a>   |

子の発現解析, SNP 解析により, 単一遺伝子の異常による遺伝子病, さらにには遺伝病ではない多くの疾患の発症, 進展に遺伝子発現や個人個人の SNP の違いと疾患のなり易さなどが関与していることなどが明らかになり, 疾患の理解が急速に進んだ。しかし, 一方では多くの疾患の発症, 進展は遺伝子の関与のほか, 外因や生活習慣などが関与すると考えられ, その病気の発症, 進展は必ずしも遺伝子異常や遺伝子発現を介するのではなく, タンパク質などの機能分子の相互作用が重要と推定されている。

そこでヒト遺伝子の解読終了後の巨大サイエンスとして, 近年注目されているのが個体, 組織, 細胞などの全タンパク質 (プロテオーム) を網羅的に解析し, それらの関連を総合的に理解しようとするプロテオミクスである。網羅的にタンパク質を解析すると言っても, 推定されている約 2.2 万のヒト遺伝子から作りだされるタンパク質, ペプチドの種類はアイソフォーム, タンパク質の翻訳後修飾などで, その多様性が増し, その総数は遺伝子の数十倍～百倍にも及ぶとも言われている。このように遺伝子よりさらに多くの数の分子を解読, 研究してゆくためには国際的共同研究が必要となる。それを推進するために, ヒトプロテオーム機構 (Human Proteome Organization, HUPO) が 2001 年に組織され, その下にいくつかの国際プロジェクト (イニシアチブ) が進行している (表 1)。私どもは, ヒト腎臓・尿のプロテオームを国際共同研究として行うためのチーム, ヒト腎臓・尿のプロテオームプロジェクト (Human Kidney and Urine Proteome Project, HKUPP) を組織し, HUPO の一つのイニシアチブとして認知

された研究を行っているので, その現状を紹介する。

### ヒト腎臓病とその研究の現状

末期慢性腎不全へと進行する慢性腎臓病はヒト腎臓病の中で, 最もその治療法の開発が望まれている病気で, そのほとんどは糸球体疾患, 障害で始まり, 腎臓全体の障害へと進行する。現在, 末期慢性腎不全になると, その治療は透析療法が腎移植しなく, 腎臓の再生はまだ遠い将来の夢である。そのため, 末期慢性腎不全へと進行する慢性腎臓病の原因を解明し, その原因を除くことが最も明解な治療法開発の目標である。しかし, 溶血性連鎖球菌感染後急性糸球体腎炎などごく一部の腎臓病以外は, その病因が明らかになっておらず, 多くの腎臓病の原因の解明は遅れている。一方, 末期慢性腎不全へと進行する過程, 病態の研究はこれまでも精力的に進められてきた。腎臓病, 糸球体疾患の病態進行機序を把握するために, さまざまな動物疾患モデルや培養腎臓細胞系による解析が行われ, その結果, その病態形成にさまざまな分子が関与することが明らかになった。さらに, それらの分子がヒトの腎臓病, 糸球体疾患の病態形成にも関与していることが示された。

しかし, これらの研究成果にもかかわらず, ヒト末期慢性腎不全の発症, 進行を阻止する根治的治療法の開発は進んでいないのが現状である。現在, もっとも有効性が示されている治療薬は, 降圧剤として開発された ACE 阻害剤や AII 受容体ブロッカーが腎保護作用あるとして使われているが, この治療法もまだ, 完全にその進行を阻止で

きるわけではない。

そのため、ヒト末期慢性腎不全への進行阻止をめざすには、これまでの腎臓病研究からの戦略的転換が必要と考えられる。炎症なり、傷害なり、例え、原因が同じであってもその表現形はそれぞれの組織や細胞ごとに異なり、一般的な炎症機序や障害機序を腎臓病や糸球体の炎症、傷害の理解に当てはめても不十分であり、動物の疾患、病態モデルの解析や試験管内の研究もヒトの腎臓病、糸球体疾患の解明には不十分であったと考えるべきなのではないだろうか。また、従来の研究は特定の分子の機能を重箱のすみをつつくように研究し、全体を見る視点を見失っていたようなものではなかっただろうか。

このような観点から、ヒトの疾患糸球体に存在する分子の全容を解析し、その中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が必要と考えられる。それには、可能な限り全分子を対象に検討し、そこからどの分子群がどのような軽重で関与しているのか、それらの分子が関与する反応系は何かを明らかにする必要があり、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の強力な手法となる。

## 1. プロテオミクスとは

個体や組織や細胞の全タンパク質を示すプロテオーム (proteome) を解析する科学、プロテオミクス (proteomics) は主に次の4つの最新技術の進歩で可能になった；1) 遺伝子データベースの構築、2) 蛋白分離技術の進歩、3) 質量分析装置の進歩、4) バイオインフォマティクスの発達。網羅的に数多くのタンパク質を解析しようとするプロテオミクスでは短時間でタンパク質を同定する必要がある。現在行われているその方法の一例を簡単に述べると、はじめに、組織や細胞にある全タンパク質を抽出し、大まかに分離し、それをトリプシンのような分解酵素で消化し、いくつかのペプチドにして、それらのペプチドの分子量を質量分析装置で正確に計測し、その分子量データをもとに遺伝子データベースを基に作られたタンパク質データベースを検索し、その中からトリプシ

ンで分解したときに実際測定されたものと同じ分子量のペプチドができるものを選び出し、そのタンパク質を推定するのである。

### 1) 遺伝子データベースの構築

質量分析により、タンパク質の同定が可能になったのは遺伝子データベースが構築されたことによるところが大きい。ヒトを初めとして、代表的な生物のゲノムが解析され、そのデータが蓄積されている。遺伝子の塩基配列が明らかになると、遺伝子産物であるタンパク質のアミノ酸配列も推定され、それをトリプシン (リジン、アルギニンのC末端を加水分解する) などの蛋白分解酵素で分解するとどのような質量のペプチドに分解されるかも推定できることになる。分離されたタンパク質を同定するには、そのタンパク質をトリプシンなどの蛋白分解酵素で分解し、生じたいくつかのペプチドの分子量を正解に測定 (ペプチドマスフィンガープリント) でできれば、トリプシン分解でその分子量のペプチドが生ずるのはどのタンパク質かを検索することで、そのタンパク質が同定できるのである。ペプチドの分子量からタンパク質を推定するにはサーチエンジン (Mascotなどが主に使われている) と呼ばれるソフトウェアで、遺伝子データベースから推定されるタンパク質のデータベース (SwissProt, RefSeq, IPI など) を探索し、質量分析の結果に合うタンパク質を探し出すのである (図1)。

さらに、質量分析装置の中でペプチドをランダムに断片化して、その断片の質量を正確に測定することにより、そのペプチドのアミノ酸配列が推定され、それによりタンパク質の同定はより確実なものとなる。

### 2) 蛋白分離技術の進歩

無数のタンパク質が混在しているサンプルからタンパク質を分離する代表的な方法には二次元ゲル電気泳動法 (2-DE) や液体クロマトグラフィなどのカラム分離法がある。2-DE法は一次元目で等電点電気泳動を行い、タンパク質をその電荷により分離し、それを二次元目で分子サイズによ

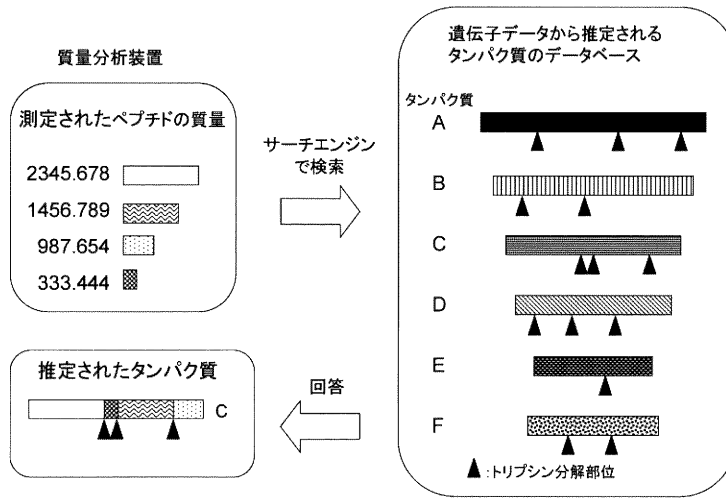


図1 質量分析装置によるタンパク質の同定の概略

りさらに分離するもので、それにより組織由来のタンパク質は数千個のスポットに分離できる。ゲルを銀染色や蛍光色素染色をし、その染色の強さからそれぞれのタンパク質の量を推定することができる。

一方、液体クロマトグラフィー (LC) も改良され、複数の特質の異なるカラムを連結する (二次元, 多次元) ことでタンパク質やペプチドの分離を良くする方法も開発されている。さらに、近年では、ごく細かいカラムを用いて分離を良くしたキャピラリーカラム、プロテインチップを用いた SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) 法もペプチドやタンパク質の分離に使われている。

### 3) 質量分析装置 (mass spectrometer, MS) の進歩

ペプチドの質量を正確に測定するのが質量分析装置で、それによりフェムトモル ( $10^{-13} \sim 10^{-15}$  モル) レベルのペプチドの質量を正確、迅速に測定できる。最も進んだ機器の検出感度はゼプトモル (フェムトモルの  $1/10^6$ ) レベルに達していると言われている。質量分析装置はイオン源とイオン分離器-イオン検出器から成り、イオン源としてはマトリックス支援レーザー脱離イオン化

(MALDI) 法とエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法が主に用いられている。イオン分離法としてはイオン化との相性により、MALDI 法では飛行時間型 (TOF) 質量分析計 (MALDI-TOF MS) が、ESI 法では四重極型 (Q) (ESI-Q MS) やイオントラップ型 (IT) (ESI-IT MS) が用いられてきた。さらに、最近では四重極型に TOF MS を備えた ESI-Q-TOF や TOF を 2 台つないだ MALDI-TOF-TOF も製品化されている。それぞれ特徴があり、多数のサンプルの簡便な同定には MALDI-TOF MS が、アミノ酸配列の決定などには ESI-IT MS や ESI-Q-TOF が用いられている。これらの MS は大きなタンパク質は分析できず、タンパク質をトリプシンなどでペプチドに分解して、その質量を測るものである。

一方、フーリエ変換質量分析装置 (FT) はイオン化したタンパク質を質量分析装置の中で断片化したり、アミノ酸配列を解析したり、翻訳後修飾を解析できる。

### 4) バイオインフォマティクスの発達

バイオインフォマティクスは遺伝子、タンパク質などのさまざまな生物情報の総称で、個々の遺伝子、タンパク質のさまざまな情報やタンパク質

の相互作用などの情報を含んでいる。プロテオミクスを疾患解析に利用するにはさらに、それらの情報と臨床情報を連結させ、その間の関係を明らかにする必要がある。それには統計的手法、特に多変量解析や機械学習法が有用とされている。プロテオミクスによるデータは膨大で、それらの情報と病態を関連させるにはコンピューターを用い、クラスター解析、主成分分析、判別分析などの多変量解析を行う。また、データ内の法則を仮定して、ノイズに埋もれた法則を見出そうとする機械的学習法も有用とされている<sup>2)</sup>。

一方、同定された個々の分子の間をつなぐ糸を既知の情報から作られたデータベースから明らかにしようとするパスイェ解析ソフトウェアやそのデータベースも開発されつつあり、これらの解析から腎臓病の病因分子だけではなく、病態の分子機構が解明され、そこから病態の制御の研究が進み、病気の治療法開発に結びつくと期待している。

## 2. 腎臓と尿のプロテオミクス

これまで腎臓組織のプロテオームを解析した研究は少ないが、尿プロテオーム解析の報告は1995年にWitzmannらが2-DEを用いて、腎毒性物質障害におけるシャペロンや glucose-regulated protein などのストレス反応性タンパク質を示した初期の報告<sup>3)</sup>後、2-DEを用いた尿タンパク質の解析がいくつか発表されてきた。しかし、当時はタンパク質の同定には分離したタンパク質のアミノ酸配列を決定することが必要であったため、網羅的な同定は困難であった。2000年頃から質量分析装置を用いた網羅的なタンパク質の同定が可能になり、ヒトの全タンパク質の解析で現在主導的役割をはたしている国際組織、ヒトプロテオーム機構 (Human Proteome Organization, HUPO, 後述) も組織され、ヒトプロテオーム研究は急速に拡大してきた。

### 1) 正常ヒト腎臓組織, 正常ヒト尿のプロテオーム研究

多くのタンパク質をもれなく、精度よく同定するプロテオーム解析には試料の調整が大切であ

る。腎臓組織は組織構築が複雑であるため腎臓組織全体のプロテオーム解析したのでは、同定されたタンパク質の局在が不明で、タンパク質同士の反応も推定できない。そのため、少なくとも腎臓組織を皮質、髄質に分けたり、さらには、ネフロンセグメントに分画して解析することが必要になる。

これまで報告されている腎臓組織のプロテオーム研究はほとんどが動物の腎臓で行なわれたものである。正常ラット腎の皮質と髄質のタンパク質のプロファイルを比較し、それらの部位で異なる機能分担が行われていることがプロテオーム解析で示されている<sup>4)</sup>。さらに、ラットの髄質からマイクロダイセクション法で集合管分画を分離し、集合管に多い50種類のタンパク質も報告されている<sup>5)</sup>。一方、尿は正常ではタンパク質の量が少なく、濃縮しないとプロテオームは解析できない。また、尿の濃さも生活条件などにより異なっているため、均一ではない。正常(蛋白尿のない)ヒト尿のタンパク質をアセトンなどで沈殿させ、濃縮、分画し、2-DEとMALDI-TOF MSを組み合わせ、プロテオーム解析し、67個のタンパク質が同定した報告がある<sup>6)</sup>。この中にはトランスポーター、接着因子、シャペロン、受容体、酵素、シグナル伝達タンパク質など興味深いタンパク質が含まれ、尿タンパク質には血漿由来と腎泌尿器系の組織由来のものが含まれていることが示された。微量のタンパク質からより多くのタンパク質を同定するには血漿プロテオーム解析<sup>7)</sup>の際に提唱されたように、尿に高濃度に含まれているタンパク質を除くことが一つの解決策である。血漿由来のアルブミンや免疫グロブリンなどの他に、腎臓から多く分泌される Tamm-Horsfall protein などを取り除くことが、より詳細な解析に必要とされている<sup>8)</sup>。特に、蛋白尿のある尿では血漿タンパク質が大量に含まれるので、腎臓由来のタンパク質を同定する際にはそれが障害になる。

### 2) 腎臓病の検出, 病態解析を目指したプロテオミクス (病態プロテオミクス)

プロテオミクスで動物の腎臓病モデルの組織を解析に応用した例で、I型糖尿病のモデルマウス

の腎臓のタンパク質を2-DEとMALDI-TOF MSで調べ、41個のタンパク質スポットが変化し、30種類のタンパク質が同定されている<sup>9)</sup>。その中には、elastase III Bの減少とelastase inhibitor E1Aの増加が含まれて、糖尿病性腎症の発症にはelastin-elastase系の異常が関与している可能性が示唆された。

ヒト腎臓病のプロテオミクス研究では慢性腎臓病の主な疾患で、糸球体にIgA1が沈着しているIgA腎症のIgA1を解析して、IgA1に糖鎖不全が見つかった<sup>10)</sup>。しかし、IgA腎症の糸球体組織の病態プロテオミクス解析に関して特に取り上げるべき報告はまだ見当たらない。腎細胞癌をプロテオミクスで研究しようとする試みは多く<sup>11)12)</sup>、一部の成果はSwiss-Prot内のデータベースで公開されている (<http://www.expasy.ch/ch2d/ch2d-top.html>)。腎毒性をもつ薬物や化学物質の腎臓に対する作用をプロテオミクスの手法で解析した報告も多いが、優れた総説が発表されているので参照していただきたい<sup>13)</sup>。

尿は入手しやすい試料であるため、尿検査により、腎臓、さらには個体全体の疾患病態を検出、把握できるのではないかと期待されている。尿のプロテオーム解析により、腎臓病の診断や治療効果の把握に利用できることを示す報告が近年数多く報告されている<sup>14-16)</sup>。また、先天性尿路閉塞性疾患の新生児の尿タンパク質のプロテオーム解析を行って、疾患予想の有用なバイオマーカーが最近見いだされ、注目されている<sup>17)</sup>。尿プロテオミクスの腎疾患への応用は他の総説も参考にしていただきたい<sup>18)-20)</sup>。

### 3. 糸球体プロテオミクス

私どもは2001年ころから正常ヒト糸球体のプロテオームデータベース作成に取り掛かった。異常の糸球体プロテオームを知るにはまず正常を良く把握する必要がある。また、ヒトと動物では病因、病態が異なる可能性もあるので、ヒトを解析しようというのである。なぜ、糸球体かというと、前述のように、多くの慢性腎臓病は糸球体疾患、糸球体障害が徐々に進行することから起こるから

である。また、残念ながら、それらの糸球体疾患の原因、糸球体障害の進行機序、病態形成機序が解明されていないため、末期慢性腎不全への進行を阻止する根治的治療法は開発されていないからでもある。

#### 1) 個々の分子に注目する研究から全分子を網羅的に解析する研究へ

従来の糸球体疾患の研究は既知の単独分子や反応系に注目し、病態への関与を検討し、それから考えられる疾患機序を仮定する研究(hypothesis-driven study)がその中心であった。それとは異なり、プロテオーム解析は未知の分子も含めて全体の実像を捕らえ(discovery-driven study)、その中から本質を推定し、疾患の分子機構を検証し、新たな治療法や薬物の開発に結びつく研究に発展させようというものである。

そのために、私たちははじめに、正常ヒト糸球体のプロテオームを解析し、疾患糸球体のプロテオームと比較するための基盤的データベースを作るとともに、正常糸球体の生理学的分子パスウェイを明らかにすることを目指している。次に、疾患糸球体のプロテオーム解析を行い糸球体疾患の病因や病態形成に関与している分子を網羅的に解明し、病因から病態形成への過程の分子パスウェイを解明し、疾患や病態変化を定量的に把握するための指標、いわゆるバイオマーカーの同定、さらには、治療標的分子の同定と治療法の開発へと展開しようと考えている。

方法としては、腎臓などのため摘出されたヒト腎臓の正常皮質部位より、糸球体を篩法で分離し、平行して組織を病理学的に検索し、異常のないことを確認して、正常ヒト糸球体試料を用意する。

最初に、NECのプロテオーム研究所の次田皓先生らとの共同研究で5例の腎臓より分離した糸球体タンパク質、100~500 $\mu$ gを2-DEゲルで分離した。2-DEゲルで分離し、銀染色されたタンパク質のスポットを切り出し、タンパク質をトリプシン消化し、MALDI-TOF MS, LC-M/MS解析することで、約450のスポットのタンパク質を同定した。タンパク質にアノテーションをつけ、

ヒト糸球体プロテオームデータベースを構築した (<http://www.hkupp.org>)<sup>21)</sup>.

このようなゲル内で等電点電気泳動を行う 2-DE では、膜タンパク質などの大きなタンパク質や等電点が極端に酸性、塩基性側に偏ったタンパク質は分離できない欠点があり、網羅性にやや問題があった。その欠点を補うため、液相で等電点電気泳動を行った後、2次元目の電気泳動を行い、短冊状ゲルを 15 分割し、それぞれをゲル内トリプシン消化し、LC-IT MS/MS 解析することも行った。この方法では 2mg オーダーのタンパク質を用いて約 6000 種類のタンパク質の同定ができ<sup>22)</sup>、このデータベースも公開している (<http://www.hkupp.org>)。

一方、腎生検組織からプロテオーム解析に必要な糸球体タンパク質を得ることは簡単ではない。腎生検組織切片からレーザーマイクロディセクションで数十個の糸球体を切り出し、タンパク質を抽出することを進めている。10  $\mu\text{m}$  程度の厚さの腎生検組織切片に平均 10 個程度の糸球体が含まれ、その平均直径が 150  $\mu\text{m}$  程度と仮定すると、約 5 切片、50 糸球体切片から約 1  $\mu\text{g}$  のタンパク質が得られる。個々の腎生検試料の疾患糸球体プロテオームを正常糸球体プロテオームと比較して、疾患に特徴的な分子や分子反応系を検出するには、この約 1  $\mu\text{g}$  のタンパク質で数百種類のタンパク質を同定する技術が必要と予想される。このような高感度のプロテオミクス技術の開発として、蛍光色素を用いた高感度の検出法と質量分析装置の精度と感度の向上の進歩は目覚ましい。現在、研究室では 1  $\mu\text{g}$  のタンパク質で数十から数百のタンパク質の同定が可能などところまでできおり、腎生検試料のプロテオーム解析が現実のものになりつつある。

#### 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

ヒトプロテオーム機構 (Human Proteome Organization, HUPO, URL:<http://www.hupo.org>) は膨大なヒトプロテオームを解析するには国際的

連携が必要であり、それを統一性をもって推進することを目的に 2001 年に設立された国際組織である (<http://www.hupo.org>)。HUPO では最初に 7 研究プロジェクトを HUPO Initiative としてスタートさせた (表 1)。毎年国際会議 (HUPO World Congress) が開催され、各国の研究者が集い、プロテオーム研究の成果の発表と国際連携に貢献している。各国にその支部が置かれ、わが国にも日本ヒトプロテオーム機構 (<http://www.jhupo.org>) があり、日本のプロテオーム研究の推進に中心的役割を果たしている。以下に HUPO イニシアチブの中のいくつかのものを簡単に紹介する。

研究プロジェクトでは肝臓、脳、血漿が主な臓器のプロテオームプロジェクトとして解析が行われてきた (図 2)。その中で、ヒト血漿プロテオームプロジェクトはアメリカのミシガン大学の Prof. Gil Omenn が代表となり 18 施設が参加して国際共同研究が開始され、2007 年にその解析結果が発表されている<sup>23)</sup>。そこでは、血漿濃度 pg/ml オーダー以上の血漿タンパク質約 3000 のタンパク質が高い信頼性をもって同定されている。一方では、血漿タンパク質の濃度の高低が幅広く (倍率で  $10^{13}$  のオーダーの差)、少ないものが多いタンパク質の影に隠れて、検出されにくいことが問題として指摘されている。

スウェーデンの Royal Institute of Technology の Prof. Mathias Uhlen が代表のヒト抗体イニシアチブではヒトのタンパク質全てに対する抗体を作製し、それを用いたデータベースを作っている。そのウェブサイトではタンパク質が遺伝子ごとに染色体上に分類され、それらに対する抗体でヒト組織アレーを免疫組織化学染色した結果の画像が示されている (<http://www.proteinatlas.org>)。多くの研究分野で抗体は重要なツールであり、このプロジェクトが提供しているデータベースは大変注目されている<sup>24)</sup>。

ヒト疾患糖プロテオームイニシアチブは大阪大学の谷口直之先生が代表で開始されたプロジェクトで、糖鎖に関連するプロテオーム解析で、糖鎖、糖タンパク質のプロテオミクスの標準化や疾患に

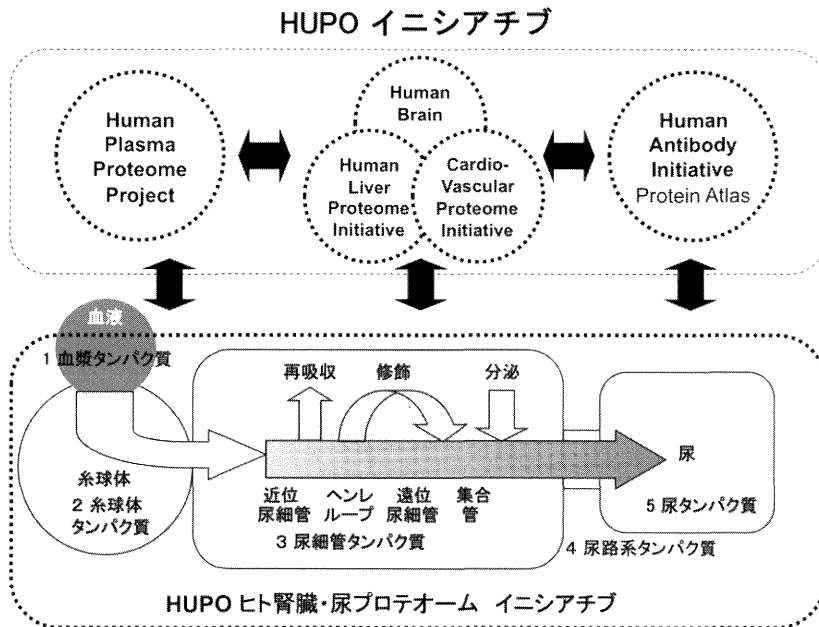


図2 HKUPPの研究とHUPO イニシアチブ間の国際連携

関連した糖タンパク質の解析が目指されている<sup>25)</sup>。この分野は日本に多くの研究者がいる分野で、日本が主導しているプロジェクトである。

私たちも糸球体のプロテオーム解析を開始した当初より HUPO World Congress に参加しながら、ヒト腎臓病の病因・病態解析のプロテオミクスには国際連携でヒト腎臓や尿のプロテオーム解析を行う必要があると考え、国際的共同研究に参加する研究者を募り、2005年にヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクト (Human Kidney and Urine Proteome Project, HKUPP) チームを結成した。そして、HUPO のプロジェクトとの連携やデータの国際標準化を計るため、その活動を HUPO のプロジェクトとして認めてもらうことを HUPO に申請した。2005年に、HUPO に新しい疾患バイオマーカーイニシアチブ (Disease Biomarker Initiative, DBI) が設けられ、その傘下に Kidney Disease が入り、私がおの代表となった。2007年には、DBI から離れ、HUPO の独立したイニシアチブ、腎臓・尿プロテオームイニシアチブとして

活動している<sup>26)</sup>。現在、腎臓・尿プロテオーム解析法の標準化、解析結果のデータベース作成などの行い、毎年のワークショップ、シンポジウムなどで検討を行っている。ヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクトのホームページ (<http://www.hkupp.org>) も設けているので関心のある方は是非ご覧いただき、このプロジェクトへの参加をお願いしたい。このプロジェクトでは正常のヒト腎組織及び尿のプロテオームデータベースを国際連携で構築し、ウェブ上に公開したり、尿プロテオミクスの標準化のガイドラインを提供することで、多くの腎臓病研究者の腎臓病の病因、病態解析研究や尿バイオマーカー探索研究を推進しようと考えている<sup>26)27)</sup>。

#### おわりに

これまで原因が不明で、十分な病態形成機序の解明もなされていなかったため、根本的治療法がなかった末期慢性腎不全へと進行する慢性腎臓病



を腎臓組織や尿プロテオームを網羅的に解析することでブレイクスルーを見出そうとするプロテオミクスを紹介した。年々増加する透析患者数の抑制のための治療法の開発にはヒトの腎臓組織や尿を対象とした膨大であるが地道で基礎的なプロテオーム解析が重要と考え、その現状と国際連携などを紹介した。このプロジェクトを推進することは、新潟大学が腎臓病研究の研究教育の国際拠点と認知されることになると思われる。

### 参考文献

- 1) International human genome sequencing consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931 - 945, 2004.
- 2) 近藤 格：疾患プロテオミクスのためのバイオインフォマティクス。In：戸田年総, 荒木令江, (編). 疾患プロテオミクスの最前線. 大阪. メディカル ドウ. p134 - 139, 2005.
- 3) Witzmann F, Clark J, Fultz C and Jarnot B: Two-dimensional electrophoretic mapping of hepatic and renal stress proteins. *Electrophoresis* 16:451 - 459, 1995.
- 4) Arthur JM, Thongboonkerd V, Scherzer JA, Cai J, Pierce WM and Klein JB: Differential expression of proteins in renal cortex and medulla: a proteomic approach. *Kidney Int*, 62: 1314 - 1321, 2002.
- 5) Hoffert JD, van Balcom BWM, Chou C-L and Knepper MA: Application of difference gel electrophoresis to the identification of inner medullary collecting duct proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F170 - F179, 2004.
- 6) Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM and Klein JB: Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* 62: 1461 - 1469, 2002.
- 7) Omen GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik YK, Yoo JS, Ping P, Pounds J, Akins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW and Hanash SM: Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 5: 3226 - 3245, 2005.
- 8) Spahr CS, Davis MT, McGinley MD, Robinson JH, Bures EJ, Bejerle J, Mort J, Courchesne PL, Chen K, Whahl RC, Yu W, Luethy R and Patterson SD: Towards defining the urinary proteome using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Profiling and unfractionated tryptid digest. *Proteomics* 1: 93 - 107, 2001.
- 9) Thongboonkerd V, Barati MT, McLeish KR, Pierce WM, Pestein PN and Klein JB: Proteomics and diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol* 141: 142 - 154, 2004.
- 10) Hiki Y, Odani H, Takahashi M, Yasuda Y, Nishimoto A, Iwase H, Shinzato T, Kobayashi Y and Maeda K: Mass spectrometry proves under-o-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int* 59: 1077 - 1085, 2001.
- 11) Sarto C, Marocchi A, Sanchez JC, Giannone D, Frutiger S, Golaz O, Wilkins MR, Doro G, Cappellano F, Hughes G, Hochstrasser DF and Mocarelli P: Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis*, 18: 599 - 604, 1997.
- 12) Celis JE and Ostergaard M: Bladder squamous cell carcinoma biomarkers derived from proteomics. *Electrophoresis* 21: 2115 - 2121, 2000.
- 13) Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, Eardley I, Selby PJ and Banks RE: Proteomic changes in renal cancer, and coordinate demonstration of both glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* 3: 1620 - 1632, 2003.
- 14) Cutillas PR, Chalkley RJ, Hansen KC, Cramer R, Norden AG, Waterfield MD, Burlingame AL and Unwin RJ: The urinary proteome in Fanconi syndrome implies specificity in the reabsorption of

- proteins by renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F353 - 364, 2004.
- 15) Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, Walden M, Rupperecht HD, Floege J, Haller H and Mischak H: Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 67: 2313 - 2320, 2005.
- 16) Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM, Walden M, Rupperecht HD, Floege J, Haller H and Mischak H: Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int* 67: 2313 - 2320, 2005.
- 17) Decramer S, Wittke S, Mischak H, Zurbig P, Walden M, Bouissou F, Bascands JL and Schanstra JP: Predicting the clinical outcome of congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis. *Nat Med* 12: 398 - 400, 2006.
- 18) Thongboonkerd V, Klein JB, Jevans AW and McLeish KR: Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases. *Contrib Nephrol* 141: 292 - 307, 2004.
- 19) Mischak H, Apweiler R, Banks RE, Conaway M, Coon J, Dominiczak A, Ehrlich JH, Fliser D, Girolami M, Hermjakob H, Hochstrasser D, Jankowski J, Julian BA, Kolch W, Massy ZA, Neusuess C, Novak J, Peter K, Rossing K, Schanstra J, Semmes OJ, Theodorescu D, Thongboonkerd V, Weissinger EM, Van Eyk JE and Yamamoto T: Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin Appl* 1: 148 - 156, 2007.
- 20) Yoshida Y, Miyamoto M, Bo X, Yaoita E and Yamamoto T: Overview of kidney and urine proteome databases. *Contrib Nephrol* 160: 186 - 197, 2008.
- 21) Yoshida Y, Miyazaki K, Kamiie J, Sato M, Okuizumi S, Kenmochi A, Kamiyo K, Nabetani T, Tsugita A, Xu B, Zhang Y, Yaoita E, Osawa T and Yamamoto T: Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language (XML) - based database. *Proteomics* 5: 1083 - 1096, 2005.
- 22) Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, Nagasaka Y, Tasaki M, Zhang Y, Xu B, Nameta M, Sezaki H, Cuellar L, Osawa T, Morishita H, Sekiyama S, Yaoita E, Kimura K and 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 Proteomics Res* 6: 3680 - 3690, 2007.
- 23) States DJ, Omenn GS, Blackwell TW, Fermin D, Eng J, Speicher DW and Hanash SM: Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. *Nat Biotechnol* 24: 333 - 338, 2006.
- 24) Uhlen M and Ponten F: Antibody - based proteomics for human tissue profiling. *Mol Cell Proteomics* 4: 384 - 393, 2005.
- 25) Wada Y, Azadi P, Costello CE, Dell A, Dwek RA, Geyer H, Geyer R, Kakehi K, Karlsson NG, Kato K, Kawasaki N, Khoo KH, Kim S, Kondo A, Lattova E, Mechref Y, Miyoshi E, Nakamura K, Narimatsu H, Novotny MV, Packer NH, Perreault H, Peter - Katalinic J, Pohlentz G, Reinhold VN, Rudd PM, Suzuki A and Taniguchi N: Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans - HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi - institutional study. *Glycobiology* 17: 411 - 422, 2007.
- 26) Cottingham K: Proteomics Projects: HKUPP becomes a full - fledged initiative of its own. *J Proteome Res* 7: 484, 2008.
- 27) Yamamoto T, Langham RG, Ronco P, Knepper MA and Thongboonkerd V: Towards Standard Protocols and Guidelines for Urine Proteomics: A Report on the Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP) Symposium and Workshop. *Proteomics* 8: 2156 - 2159, 2008.