

---



---

 原 著
 

---



---

正常ヒト糸球体タンパク質の質量分析計と  
免疫組織化学染色の比較：  
質量分析計だけで同定されたタンパク質の解析

多 賀 昌 樹

新潟大学大学院医歯学総合研究科

構造病理学分野

(主任：山本 格教授)

Comparison of the Normal Human Glomerulus Protein of Mass Spectrometer and  
Immunohistochemistry. : Only Identified Protein on the Mass Spectrometer

Masaki TAGA

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science*

*(Director: Prof. Tadashi YAMAMOTO)*

要 旨

プロテオームとは、生体中において存在しているタンパク質の総体であり、プロテオームを網羅的に解析することをプロテオミクスという。プロテオーム解析には、主に質量分析装置による質量分析プロテオミクスにより生体内で発現するタンパク質の網羅的な解析と、抗体を用いた免疫化学組織染色による局在的な情報取得を可能とする抗体プロテオミクス解析がある。本研究室では、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を組織し、ヒト腎糸球体を構築するタンパク質を質量分析計による網羅的解析を行い、次に抗体によるプロテオーム解析でタンパク質の局在を解明することで、慢性腎臓病の病因、病態を解明することを目指している。しかし、質量分析プロテオミクスで同定された糸球体タンパク質の中には、抗体プロテオミクスにおいて同定されない糸球体タンパク質が存在した。本研究では、質量分析プロテオミクスでは同定されたが、抗体プロテオミクスでは同定できなかったタンパク質についてその原因を解析することを目的とした。ヒト正常糸球体の同定には、冗長的プロテオームを検出するため Spectrum Mill をサーチエンジンとして用いた。プロテオームを抗体プロテオームと比較した結果、質量分析プロテオミクスでは同定されるが、抗体プロテオミクス

Reprint requests to: Masaki TAGA  
Department of Structural Pathology,  
Institute of Nephrology, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
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  
腎研究施設 構造病理学分野 多賀昌樹

では同定されないタンパク質が801個分類された。これらのうち19個(2.4%)のタンパク質は、糸球体に染色が確認された。801個のうち、628個(78.4%)のタンパク質は、糸球体以外の腎組織に、それぞれの抗体による染色が確認された。これは糸球体を腎皮質からシービング法にて採取する際の糸球体外組織の混入である可能性であることが示唆された。抗体プロテオミクスで腎臓の組織がすべて染色されていないタンパク質は154個(19.2%)あった。154個を血漿プロテオームとの比較したところ、80%以上が血漿中にも存在するタンパク質であった。抗体プロテオミクスにより腎組織が染色されなかった理由について、血漿プロテオーム、尿プロテオーム、マウス糸球体プロテオームとの比較を比較することで、血漿タンパクの混入、抗体の特異度に問題があるタンパク質、質量分析計による分解産物の同定が存在することが示唆された。質量分析計を用いる方法では糸球体サンプルの採取における精度と純度を高め、抗体プロテオミクスでは対応するタンパク質の高品質な抗体作成と複数抗体の作成および、染色技術の向上が必要であると考えられた。

キーワード：糸球体、質量分析プロテオミクス、抗体プロテオミクス

## 緒 言

近年、ヒトのすべてのゲノムが解析され、タンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスが可能となった。プロテオミクスとは、個体、組織、細胞、細胞小器官、タンパク質複合体など、ある生物系のプロテオームを網羅的に解析し、タンパク質の機能解析や疾患の原因となり得るタンパク質をカタログ化し、カタログ中のタンパク質がどのような現象にかかわっているのか、どのような機能を持っているのかを解析することである。現在、プロテオームの解析は主に質量分析装置による質量分析プロテオミクスと抗体を用いた免疫化学組織染色を行う抗体プロテオミクスの2種類の方法を用いて行われている。前者はペプチドまたはタンパク質分子の飛行時間を元に試料の質量数を計算し、この結果を元に、データベースからタンパク質を網羅的に同定、定量することができる。後者は、抗体を用いた免疫化学組織染色を行う抗体プロテオミクスにより、特定のタンパク質群に焦点を当てた解析によりタンパク質の局在性の情報の取得が可能である。それらを総合的に解析するバイオインフォマティクスは細胞や組織のタンパク質プロファイル解析を組み合わせて、組織や細胞におけるヒトタンパク質のプロファイリングを行うことが可能となり、病因・病態解析や、バイオ

マーカーの探究研究に役立ち、病態の全貌が俯瞰できると考えられている<sup>1)2)</sup>。細胞組織内において、健康状態と疾患状態との間でタンパク質の発現量が異なるタンパク質は、疾患の発症・悪化のメカニズムと関連する可能性が高く、疾患の発症・悪化のメカニズムと関連する可能性が高いため、それらのタンパク質は疾患バイオマーカーとなりうる可能性がある<sup>3)</sup>。

ヒト腎臓組織や尿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)が組織され、ヒトプロテオーム機構(Human Proteome Organization: HUPO)の組織と連携したプロテオミクス研究が推進され、糸球体プロテオームの網羅的解析を行い、データベース化を行っている<sup>4)</sup>。一方、Human Protein Atlas (HPA: <http://www.proteinatlas.org/>)は抗体プロテオミクスのデータベースであり、ヒトのタンパク質全てに対する抗体を作成し、それを用いたデータベースを作成し、そのウェブサイトでは、タンパク質が遺伝子ごとに分類され、それらに対する抗体で組織マイクロアレイおよび免疫組織化学染色技術を用いて、包括的ヒト組織アレイを免疫組織化学染色した結果の画像が提供されている<sup>5)</sup>。

HUPOのヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクトでは、ヒトの腎臓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を組織し、ヒト腎糸球体を構築するタンパク質を質量分析計による網羅的解析を行い、次に抗体によるプロテオーム解析でタンパク質の局在を解明し、慢性腎臓病の病因、病態の解明を目指している。そのため、最初に正常ヒト糸球体プロテオームとして、ヒトの腎臓より糸球体を分離し、そのタンパク質を、質量分析計で網羅的に同定した結果、6,686種類のタンパク質を同定し、そのデータベースをWEBで公開している (<http://www.hkupp.org>)<sup>6)</sup>。

しかし、質量分析による糸球体プロテオーム解析より同定された糸球体タンパク質の中には、HPAが提供する免疫組織化学染色の画像では糸球体に同定されないタンパク質が確認された。高い信頼性を得るためのプロテオームデータベースを作成するに当たり、正確なタンパク質の発現の信頼性は最も重要である。質量分析プロテオミクスと抗体プロテオミクスを組み合わせることで、より精度の高い糸球体タンパク質データベースを構築できるが、どちらか一方のみの同定では信頼性は得られない。本研究では、質量分析によるプロテオーム解析で同定されたタンパク質が抗体プロテオミクスでは同定されない原因について解析することで、今後の精度の高い糸球体プロテオームのデータベース化に役立て、多くの腎臓病研究の病因、病態解析や、尿バイオマーカーの研究に役立てることを目的とした。

## 材料と方法

### 1. 正常ヒト糸球体タンパク質の調整

正常ヒト糸球体の質量分析プロテオミクスに用いた糸球体は、腎臓がんのため腎臓摘出を余儀なくされた68歳の男性患者さんからインフォームドコンセントを得て提供を受け、正常と認められた腎臓皮質から正常であると確認できた糸球体を、シービング法により単離した<sup>6)</sup>。

### 2. 質量分析プロテオミクス

糸球体組織からのタンパク質抽出物は、二つの電気泳動法により分画した。一つは、1-D SDS-

PAGE、二つ目は、等電点 (IEF) を使用した2-D SDS-PAGEを用いた。すべてのSDS-PAGEのレーンは15のスライスに切断し、ゲル内トリプシン消化によって処理し、90スライス画分を作成した。各ゲル切片から回収したペプチドをLC-MS/MSによって分析した。冗長性プロテオームの解析には、Spectrum Mill (version A.03.12.060, Agilent Technologies) を用い、解析精度を高く設定した非冗長性プロテオーム解析には、Mascot (version 2.3.01, Matrix Science) を用いた。タンパク質データベースは、IPI human protein sequence database (<http://ebi.ac.uk/IPI>) を用いた<sup>7)</sup>。

### 3. 抗体プロテオミクス

抗体プロテオミクスの免疫組織化学画像は、Human Protein Atlas (Version 11) (HPA: <http://www.proteinatlas.org/>) のウェブサイトに掲載されている免疫組織化学染色が行われた腎臓の画像のうち、糸球体の染色強度がNegativeと判定されているタンパク質を分類した。複数の抗体の染色において、1つ以上の染色が見られたタンパク質は、Negativeから除外した。これらのタンパク質について、免疫組織化学染色の画像について再評価を行い、腎臓の染色を7部位 (糸球体、近位尿細管、遠位尿細管、集合管、間質、毛細血管、核) を4強度 (Negative, Weak, Moderate, Strong) に分類しデータベース化を行った。

## 結 果

**結果 1. 糸球体の Spectrum Mill による質量分析プロテオミクスにより同定されたタンパク質と HPA の提供する抗体プロテオミクスにおいて同定されたタンパク質の比較**

HPAによる腎臓組織の抗体プロテオミクスと、Spectrum Millによる質量分析プロテオミクスにより同定された糸球体プロテオームの分類を図1に示す。質量分析プロテオミクスにより糸球体に同定されるが、HPAの提供する抗体プロテオミクスにおいて糸球体に同定されない領域 (Dに分類される領域) に801個のタンパク質が分類された。

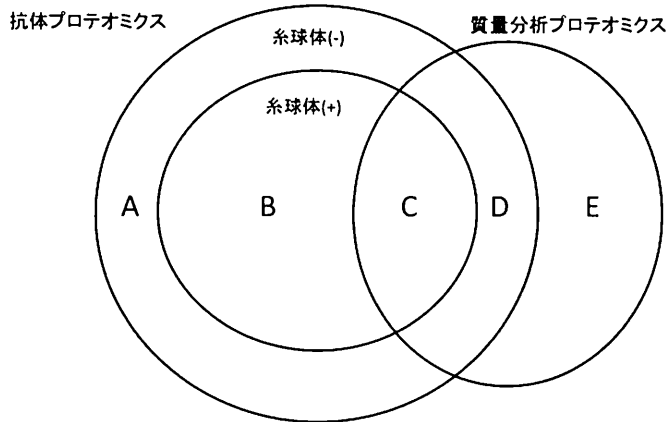


図1 糸球体の冗長的プロテオームにより同定されたタンパク質と Human Protein Atlas の提供する抗体プロテオミクスにおいて同定されたタンパク質の比較

HPAによる抗体プロテオミクスによるタンパク質数は14,777個であり、そのうち糸球体に同定されたタンパク質は7,062個、糸球体に同定されなかったものは7,715個である。一方、Spectrum Millにより冗長性に同定したタンパク質は6,197個あった。これらを分類すると、質量分析プロテオミクスで検出されるが、抗体プロテオミクスにおいて糸球体同定されないタンパク質(Dの領域)には801個のタンパク質が分類された。

表1 Spectrum Millでは同定されるが抗体プロテオミクスでは同定されないプロテオームの腎組織の染色分類

HPAの腎臓における免疫組織画像について、腎組織を7部位(糸球体, 近位尿細管, 遠位尿細管, 集合管, 毛細血管, 間質, 核)に分類し、各部位の染色強度を4段階(Negative, Week, Moderate, Strong)で判定した結果。

GL: 糸球体, PT: 近位尿細管, DT: 遠位尿細管, CD: 集合管, CA: 毛細血管, IN: 間質, NU: 核

	GL	PT	DT	CD	CA	IN	NU
Negative	781	228	395	449	783	789	772
Week	13	271	230	222	11	6	21
Moderate	4	225	126	104	6	4	8
Strong	2	77	50	26	1	2	0

結果 2. 質量分析プロテオミクスでは同定されるが抗体プロテオミクスでは同定されないプロテオームの腎組織の染色分類

Spectrum Millによる質量分析プロテオミクス

により同定されるが、HPAの提供する抗体プロテオミクスにおいて糸球体に同定されないタンパク質の腎臓組織の染色分布を表1に示した。我々の再判定によって、19個(2.4%)のタンパク質に

表2 糸球体の染色が確認されたタンパク質の一覧

表1の腎組織の染色分類により糸球体に染色が確認された、19個のタンパク質の一覧を示す。

gene	protein
COL4A2	collagen, type IV, alpha 2
RPL12	ribosomal protein L12
HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)
AK1	adenylate kinase 1
MXRA7	matrix-remodelling associated 7
PSMD11	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11
NFASC	neurofascin
SDPR	serum deprivation response
CHCHD4	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4
SIRPB1	signal-regulatory protein beta 1
MAN2B2	mannosidase, alpha, class 2B, member 2
ISOC1	isochorismatase domain containing 1
LRRRC49	leucine rich repeat containing 49
B4GALNT2	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2
CACNA2D2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2
HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
PLXDC1	plexin domain containing 1
SEH1L	SEH1-like ( <i>S. cerevisiae</i> )

において糸球体の染色を確認した (図2)。801個のうち、628個 (78.4%) のタンパク質は、糸球体以外の近位尿細管、遠位尿細管、集合管、間質、毛細血管、核のいずれかに、それぞれのタンパク質の抗体による染色を確認した。その結果、腎組織すべての部位に抗体による染色が確認できなかったタンパク質として154個 (19.2%) が分類された。

**結果3. Spectrum Millによる質量分析プロテオミクスにより同定されるが、抗体プロテオミクスで同定されないタンパク質と Mascotによる質量分析プロテオミクスとの比較**

Cuiら<sup>7)</sup>は、Spectrum Millによる質量分析プロテオミクスにより、糸球体全体に6,686個のタンパクを同定し、Mascotによる質量分析プロテオミクスでは1,817個のタンパクを同定した。抗体プロテオミクスで検出されなければ糸球体タンパク質の存在の可能性が低いと推測されることか

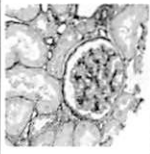
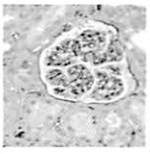
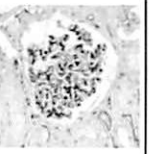
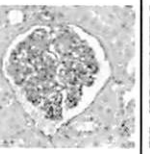
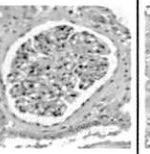
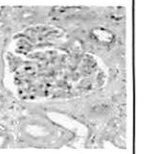
gene	COL4A2	SDPR	HLA-DRB1	PSMD11	LRRC49	PLXDC1
protein	collagen, type IV, alpha 2	serum deprivation response	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 11	leucine rich repeat containing 49	plexin domain containing 1
Spectrum Mill Spectra	133	8	99	10	2	1
Immunohistochemistry						

図2 糸球体の染色が確認されたタンパク質のHPA画像

表3 Spectrum Mill と Mascot との糸球体プロテオームの比較  
糸球体プロテオームの Spectrum Mill による質量分析プロテオミクスと Mascot による質量分析プロテオミクスによるタンパク質数と両者に一致したタンパク質の割合を示す。

分類	Spectrum Mill	Mascot
糸球体全体のタンパク質 <sup>(7)</sup>	6686	1817
糸球体の染色が見られないタンパク質	801 (11.99%)	329 (18.1%)
腎組織すべてが染色されないタンパク質	154 (2.3%)	56 (3.1%)

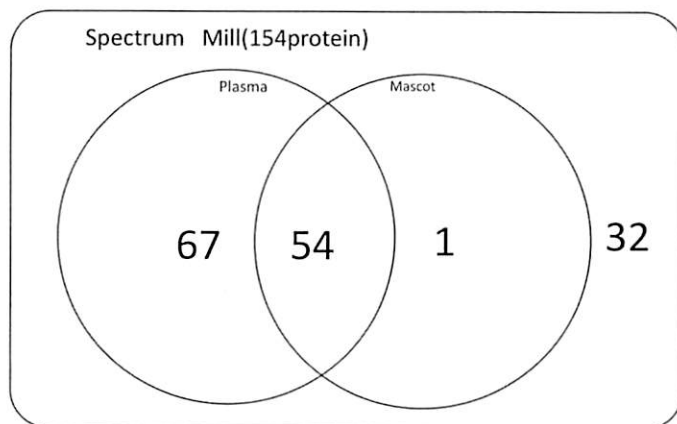


図3 糸球体プロテオームと血漿プロテオームの比較  
抗体プロテオミクスでは同定されないが, Spectrum Mill による質量分析プロテオミクスで同定された 154 個のタンパク質と, 血漿プロテオームを比較した。

表4 血漿プロテオームと Mascot による質量分析プロテオミクスに共通して同定されたタンパク質  
Mascot による質量分析プロテオミクスおよび血漿プロテオームともに  
存在するタンパク質の一覧を示す。

gene	protein
COL6A3	collagen, type VI, alpha 3
HBB	hemoglobin, beta
CLU	clusterin
DES	desmin
ATP1A2	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 2 polypeptide
CAPZA2	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2
DBN1	drebrin 1
CA1	carbonic anhydrase I
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
TAGLN2	transgelin 2
MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein
HYOU1	hypoxia up-regulated 1
PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme
RPLP0	ribosomal protein, large, P0
CACNA2D1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1
EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma
RHOB	ras homolog family member B
GNAI3	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3
CNN2	calponin 2
PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
GNA11	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)
MFAP4	microfibrillar-associated protein 4
S100A8	S100 calcium binding protein A8
PNMA1	paraneoplastic Ma antigen 1
CORO1A	coronin, actin binding protein, 1A
CRKL	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like
LMAN2	lectin, mannose-binding 2
IGJ	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides
PIP	prolactin-induced protein
ICAM2	intercellular adhesion molecule 2
PITPNA	phosphatidylinositol transfer protein, alpha
RCN1	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain
SSR4	signal sequence receptor, delta
EVL	Enah/Vasp-like
SEC13	SEC13 homolog (S. cerevisiae)
FCN1	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
SERPINB1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1
COPS8	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 8 (Arabidopsis)
CPM	carboxypeptidase M
EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A
PRNP	prion protein
SNTB2	syntrophin, beta 2 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 2)
RPL11	ribosomal protein L11
CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle
LCN2	lipocalin 2
TYMP	thymidine phosphorylase
FAM169A	family with sequence similarity 169, member A
GMPS	guanine monophosphate synthetase
S100A9	S100 calcium binding protein A9
SUMF1	sulfatase modifying factor 1
TGFB1	transforming growth factor, beta 1
MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> dependent) 2, methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase
S100A7	S100 calcium binding protein A7

ら、冗長性に解析した Spectrum Mill による質量分析プロテオミクスと解析精度を高めた Mascot による質量分析プロテオミクスでのタンパク質の検出割合を比較した (表 3)。Spectrum Mill では、糸球体外が染色されたタンパク質の検出割合が 11.8%であったが、Mascot では 18.1%であり、腎組織が染色されなかったタンパク質の検出割合は、Spectrum Mill では 2.3%、Mascot では 3.1%であった。

#### 結果 4. ヒト血漿プロテオーム解析との比較

糸球体タンパク質を腎臓から単離・精製する際に、腎臓組織から血液を完全に取り除くことは困難なことから、血液由来のタンパク質が糸球体プロテオームに含まれている可能性がある<sup>6)7)</sup>。すべての腎組織に染色が確認できなかったタンパク質 154 個について、ヒト血漿プロテオームデータベース<sup>8)</sup> (<http://www.plasmaproteomedatabase.org/>) との比較を行い、血漿中に存在するタンパク質との比較を行った (図 3)。抗体プロテオミクスで腎組織すべてに染色が見られない 154 個のタンパク質のうち Spectrum Mill による質量分析プロテオミクスで同定され、血漿プロテオームデー

タベースと一致したタンパク質は 121 個 (78.5%) であった。そのうち、血漿プロテオームデータベースおよび Mascot による質量分析プロテオミクスで同定されたタンパク質の両方に確認されたタンパク質は 54 個 (98.2%) であり、ほぼすべてのタンパク質が血漿にも存在するタンパク質であることが示唆された (表 4)。

#### 結果 5. ヒト正常尿プロテオーム解析との比較

正常なヒト尿中には微量のタンパク質が含まれ、そのプロテオーム中には血漿由来のタンパク質や、腎臓、尿路系に由来するタンパク質が存在する<sup>9)</sup>。そこで、ヒト正常尿プロテオーム<sup>10)</sup> との比較を行った (図 4)。Spectrum Mill による質量分析プロテオミクス解析で同定されたタンパク質のうち 35 個 (22.7%) はヒト正常尿タンパク質と一致した。そのうち、Mascot による質量分析プロテオミクス解析と一致したものは 23 個 (15%) であった (表 5)。これら 23 個はすべて、血漿中にも存在するタンパク質であった。

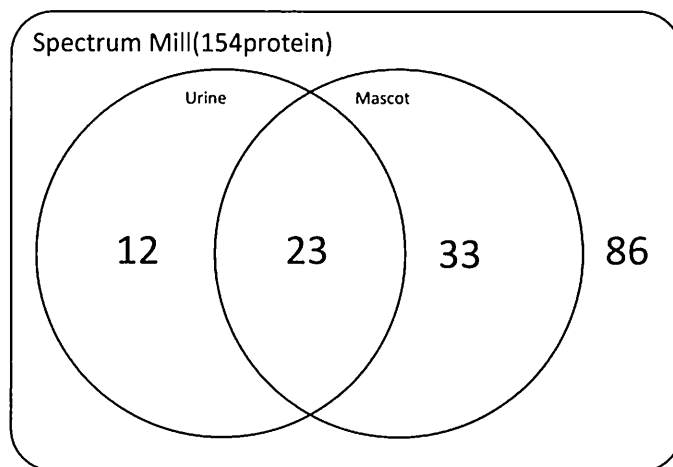


図 4 糸球体プロテオームとヒト尿プロテオームの比較

抗体プロテオミクスでは同定されないが、Spectrum Mill による質量分析プロテオミクスで同定された 154 個のタンパク質と、尿プロテオームの比較。



表5 尿プロテオームと Mascot による質量分析プロテオミクスに  
共通して同定されたタンパク質  
Mascot による質量分析プロテオミクスおよび尿プロテオームともに  
存在するタンパク質の一覧を示す。

gene	protein
COL6A3	collagen, type VI, alpha 3
HBB	hemoglobin, beta
CLU	clusterin
CAPZA2	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2
CA1	carbonic anhydrase I
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
TAGLN2	transgelin 2
CACNA2D1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1
RHOB	ras homolog family member B
GNAI3	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3
GNA11	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)
MFAP4	microfibrillar-associated protein 4
S100A8	S100 calcium binding protein A8
LMAN2	lectin, mannose-binding 2
IGJ	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides
PIP	prolactin-induced protein
ICAM2	intercellular adhesion molecule 2
SERPINB1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1
CPM	carboxypeptidase M
PRNP	prion protein
LCN2	lipocalin 2
S100A9	S100 calcium binding protein A9
S100A7	S100 calcium binding protein A7

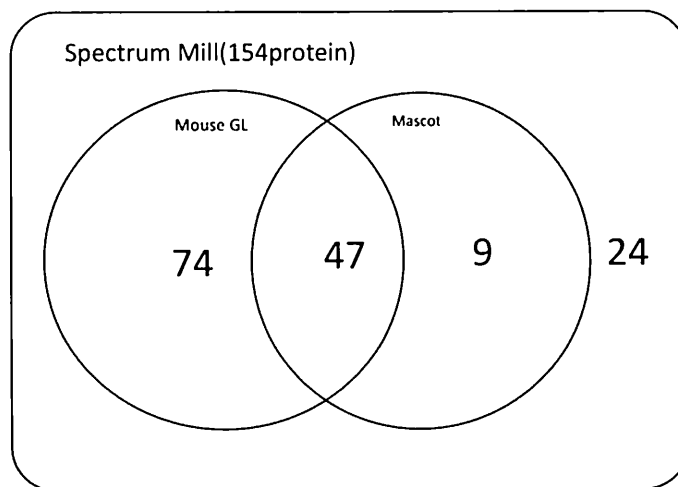


図5 糸球体プロテオームとマウス糸球体プロテオームの比較

抗体プロテオミクスでは同定されないが、Spectrum Mill による質量分析プロテオミクスで同定された 154 個のタンパク質と、マウス糸球体プロテオームを比較した。

表6 マウス糸球体プロテオームと Mascot による質量分析プロテオミクスに  
共通して同定されたタンパク質  
Mascot による質量分析プロテオミクスおよびマウス糸球体プロテオームともに  
存在するタンパク質の一覧を示す。

gene	protein
CLU	clusterin
DES	desmin
ATP1A2	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 2 polypeptide
CAPZA2	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2
DBN1	drebrin 1
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
TAGLN2	transgelin 2
MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein
HYOU1	hypoxia up-regulated 1
PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme
RPLP0	ribosomal protein, large, P0
CACNA2D1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1
EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma
RHOB	ras homolog family member B
GNAI3	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3
CNN2	calponin 2
PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
GNA11	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)
MFAP4	microfibrillar-associated protein 4
S100A8	S100 calcium binding protein A8
PNMA1	paraneoplastic Ma antigen 1
CORO1A	coronin, actin binding protein, 1A
CRKL	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like
LMAN2	lectin, mannose-binding 2
IGJ	immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides
PIP	prolactin-induced protein
MYOZ1	myozenin 1
PITPNA	phosphatidylinositol transfer protein, alpha
RCN1	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain
SSR4	signal sequence receptor, delta
SEC13	SEC13 homolog (S. cerevisiae)
LOH12CR1	loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1
COPS8	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 8 (Arabidopsis)
CPM	carboxypeptidase M
EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A
PRNP	prion protein
SNTB2	syntrophin, beta 2 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 2)
RPL11	ribosomal protein L11
CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle
LCN2	lipocalin 2
TYMP	thymidine phosphorylase
FAM169A	family with sequence similarity 169, member A
GMPS	guanine monophosphate synthetase
S100A9	S100 calcium binding protein A9
SUMF1	sulfatase modifying factor 1
TGFB1	transforming growth factor, beta 1
MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> dependent) 2, methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase

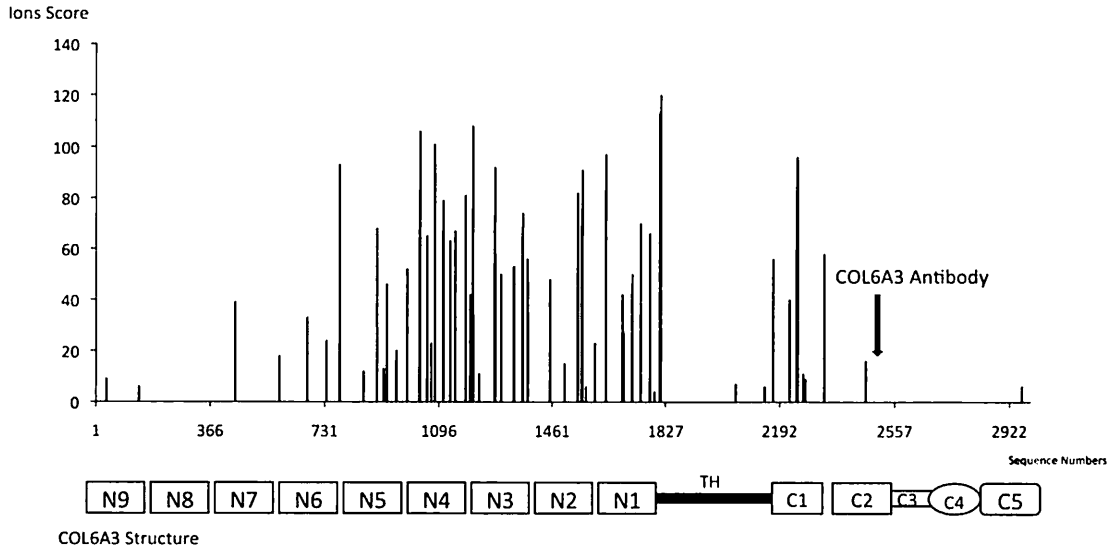


図6 COL6A3のMascotによるIons Score

MascotによるCOL6A3の同定ペプチドのIons Scoreを示す。矢印は、COL6A3抗体の特異的反応部位を示す。N9 to N1: N-末端ドメイン, TH: トリプルヘリカルセグメント C5 to C1: C-末端ドメイン。

### 結果6. マウス糸球体プロテオーム解析データベースとの比較

Cuiら<sup>7)</sup>は、ヒトマウス糸球体プロテオームとマウス糸球体プロテオーム<sup>11)</sup>とを比較し、1,320遺伝子のうち977遺伝子がマウス糸球体と共通して同定されることを示している。マウス糸球体に存在するタンパク質はヒト糸球体にも存在する可能性が考えられることから、抗体プロテオミクスで、腎組織に染色が見られなかった154個のタンパク質についてマウス糸球体タンパク質データベースとの比較を行った(図5)。マウス糸球体プロテオームとの比較では、Spectrum Millによる質量分析プロテオミクス解析で同定され、免疫組織化学で同定されなかったタンパク質154個のうち47タンパク質がマウス糸球体とMascotによる質量分析プロテオミクス解析データと一致した(表6)。

### 結果7. COL6A3のMascotによる分析結果

Collagen type IV alpha3 (遺伝子名COL6A3)は、Spectrum MillおよびMascotによる質量分析プロテオミクス解析において上位に同定された。

COL6A3は分子量が34万程度のタンパク質であるが、SDS電気泳動ゲルでの分離の際には、10万~15万の分子量のスライド画分から検出されていた。そこで、MascotによるペプチドのIons Scoreを解析した(図6)。Mascotによるペプチドの同定部位は、アミノ酸配列の750~2,250付近であることが示された。また、HPAが用いたCOL6A3抗体の特異的配列のペプチドは同定されていなかった。

### 考 察

慢性腎臓病の多くは糸球体に初期病変がみられることから、ヒト慢性腎臓病の糸球体に存在するプロテオーム、さらには糸球体を構成する個々の細胞ごとのプロテオームを網羅的に解析し、正常な糸球体や糸球体細胞を比較し、バイオインフォマティクスで解析することで、慢性腎臓病の原因や病態形成に関わるタンパク質やその分子機構が推定できる可能性がある。

近年、飛躍的に進歩したLC-MS/MSシステム

を用いることによって、非常に短時間で、数千個のタンパク質を網羅的に同定することが可能となった。プロテオームの網羅的解析によって、膨大なタンパク質の解析データが得られ、それらのデータベースの構築は、新たな疾患バイオマーカーや疾患解明の手掛かりとなることが期待される。Human Proteome Organization (HUPO) のヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクトでは、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を組織し、多くの慢性腎臓病が糸球体損傷に端を発し、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しようとしている<sup>4)</sup>。そのために、正常ヒト腎臓糸球体のプロテオームを解析し、冗長性質量分析プロテオーム解析により2,725 遺伝子由来の6,686 タンパク質を同定し<sup>6)</sup>、質量分析計で同定した正常ヒト糸球体のタンパク質を Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) との共同研究により、タンパク質の存在部位を示す免疫組織化学画像を統合したデータベースを構築し、情報を Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP) のウェブ上に公開している。

本研究では、質量分析プロテオミクスで同定された糸球体タンパク質を HPA が提供する抗体プロテオミクスの画像と比較し、質量分析プロテオミクス解析では同定されるが、抗体プロテオミクスでは同定されない 801 個のタンパク質についてその原因を解析した。免疫組織画像を再判定し、タンパク質の染色について、染色強度を7部位(糸球体、近位尿細管、遠位尿細管、集合管、間質、毛細血管、核)を4強度に分類した。その結果、801 個のタンパク質のうち19 個のタンパク質については、糸球体が染色されていると判断した。これらは、HPA による免疫組織化学画像の誤判定が考えられる。抗体を用いたプロテオーム解析は、網羅的に解析することは困難であるが、組織内でのタンパク質の局在性を確認するには有効であり、様々な遺伝子レベルでの解析が進む現在においても発現されるタンパク質レベルの解析・証明には重要な解析手法の一つといえる。しかし、結果の解釈には二面性があり、染色されている部分

が本当に陽性であるかは多くの何らかの原因で生じる異常所見により、偽陽性や偽陰性が生じうる可能性がある。Spectrum Mill による質量分析プロテオミクスにより同定されるが、HPA の提供する抗体プロテオミクスにおいて糸球体に同定されないタンパク質(801 個)のうち、628 個(78.4%)のタンパク質は、糸球体以外の近位尿細管、遠位尿細管、集合管、間質、毛細血管、核のいずれかに、それぞれのタンパク質の抗体による染色を確認した。糸球体タンパク質の Spectrum Mill による質量分析プロテオミクスでは同定されるが、抗体プロテオミクスでは同定されない理由は、糸球体を腎皮質からシービング法にて採取する際の糸球体外組織の混入である可能性が示唆された。ヒトの正常糸球体タンパク質の解析には腎生検検体から糸球体を単離する必要がある。生体からの腎生検検体には、糸球体の他にも尿細管や結合組織などの様々な構成成分を含んでいる。今回の用いたサンプルは糸球体の単離にシービング法を用いたことから、糸球体外組織(尿細管、間質など)の混入が多くみられた可能性がある。これらを解決するには、腎生検検体をスライスした組織切片から糸球体を回収する最近の技術であるレーザーマイクロダイセクション(laser micro dissection, LMD)法がある。LMD 法を行うにはレーザー照射装置など高価な器具が必要であるが、レーザー照射によるタンパク質の変性が問題となる。また、1本の腎生検から得られる組織切片は30 スライス程度であるが、糸球体タンパク質の生化学的分析を行うには100 スライス以上の組織切片が必要である。さらに、凍結による糸球体タンパク質の変性の可能性も無視できない問題である。また、1本の腎生検から得られる組織切片は30 スライス程度であるが、糸球体タンパク質の解析を行うには100 スライス以上の組織切片が必要である。さらに、凍結による糸球体タンパク質の変性の可能性も無視できないなど、糸球体サンプルの単離には多くの課題が存在する<sup>4)</sup>。

Cui ら<sup>7)</sup>は、ヒトの糸球体プロテオームデータを Spectrum Mill による質量分析プロテオミクス解析で6,197 個のタンパクを同定し、同じサン

ルについて、Mascotによる質量分析プロテオミクスとして再解析した結果、1,817個(27.1%)のプロテオームを同定した。Spectrum Millでは、糸球体外が染色されたタンパク質の検出割合が11.8%であったが、Mascotでは18.1%であり、腎組織が染色されなかったタンパク質では、Spectrum Millでは2.3%、Mascotでは3.1%であった。質量分析プロテオミクスで同定されるタンパク質の同定数を、同定ソフトウェアをSpectrum MillとMascotで比較すると、同定結果に大きな差があり、同定は各ソフトウェアのアーキテクチャやアルゴリズムに依存していることが示されている<sup>7)</sup>。質量分析計の同定条件を厳しくした解析において同定されたタンパク質でも、抗体による染色が確認できないタンパク質が存在することが確認され、Mascot解析において解析精度の高い設定で同定タンパク質数を少なく絞っても、必ずしも質量分析プロテオミクスで同定されるが、抗体プロテオミクスで同定されないタンパク質の比率は高くないことが示された。

さらに、血漿プロテオーム、尿プロテオームとの比較において、血漿タンパク質混入や尿タンパク質の混入が示唆された。ヒトの正常糸球体組織の採取は、通常腎生検の際に分離されることが多く、その際に灌流等の処置ができなため血液成分を分離することが困難である。本研究においても、質量分析プロテオミクスで同定されたタンパク質のうち抗体プロテオミクスで陰性のタンパク質154個のうち、血漿プロテオームと共通していたタンパク質が121個(78.5%)存在しており、さらにMascotによる質量分析プロテオミクスでも54個(96.4%)が共通しており、腎組織全体が染色されなかった154個のタンパク質のほとんどが血漿中にも存在するタンパク質であることが示唆された。糸球体サンプルには、血液成分が残存している可能性は否定できないことから、糸球体サンプルを調整する際の、血液成分の除去も重要なポイントとなる。さらに、糸球体内に存在するかを明らかにするためには、特異度の高い抗体や複数の抗体を用いた同定が必要であると思われる。

糸球体には、尿中の微量のタンパク質も含まれ、そのプロテオーム中には血漿由来のたんぱく質や、腎臓、尿路系に由来するタンパク質が存在する<sup>9)</sup>。尿プロテオームとの比較において、23個のタンパク質(表5)が分類されたが、これらはすべて、血漿にも存在するタンパク質であった。尿中には糸球体タンパク質が存在しており、そのタンパク質の由来が血液由来かを区別する必要がある。

マウス糸球体に存在するタンパク質はヒト糸球体にも存在する可能性が考えられ、抗体プロテオミクスで、染色が見られなかった154個のタンパク質についてマウス糸球体タンパク質データベースとの比較を行った結果から、Mascotによる質量分析プロテオミクスで同定されたタンパク質のデータとマウス糸球体プロテオームにも共通して同定されたタンパク質は47個存在した(表6)。これらのタンパク質の中には、Clusterin(遺伝子名CLU)、Desmin(遺伝子名DES)など、既にヒト糸球体で同定されているタンパク質が存在していることから、ヒト糸球体に存在する可能性も高いと推測される<sup>12)13)</sup>。これらは、抗体プロテオミクスの抗体の特異性が悪く、染色が見られなかった可能性が高いと推測された。

Collagen, type IV, alpha3(遺伝子名COL6A3)は、Spectrum MillおよびMascotによる質量分析プロテオミクス解析において上位に同定された。COL6A3<sup>14)</sup>は分子量が34万程度のタンパク質であるが、SDS電気泳動ゲルでの分離の際には、10万~15万の分子量のスライド画分から検出されていた。また、Mascotデータの解析では、COL6A3の同定領域が、COL6A3抗体の特異的領域とは異なった部分を同定していた(図7)。COL6A3が質量分析計で検出されたのは、COL6A3の分解産物の一部を質量分析プロテオミクスにて同定しており、抗体プロテオミクスでは、抗体の特異的部分のペプチドを同定することができなかった可能性が示唆された。

高い信頼性の糸球体プロテオームのデータベース作成における課題として、質量分析計を用いる方法では糸球体サンプルの採取における精度と純

度を高め、抗体におけるプロテオームは対応するタンパク質の高品質な抗体作成と複数抗体の作成および、染色技術の向上が必要であると考えられた。高い信頼性のプロテオームデータベースを作成するためには、精度の高い質量分析プロテオミクスと抗体プロテオミクスの抗体プロテオミクスを組み合わせたことが必要であり、その結果、病態の全貌が俯瞰でき腎臓病研究の病因、病態解析や尿バイオマーカーの研究に役立つものと考えられる。

### 結 語

ヒト糸球体プロテオームの質量分析プロテオミクスでは検出できたが、抗体プロテオミクスでは検出できなかったタンパク質についてその原因を解析した。ヒト正常糸球体の冗長的解析としてサーチエンジンを Spectrum Mill を用いて同定されたプロテオームを抗体プロテオームと比較した結果、質量分析プロテオミクスでは同定されるが、抗体プロテオミクスでは同定されないタンパク質を 801 個分類した。これらのうち 19 個 (2.4%) のタンパク質は、糸球体に染色が確認された。801 個のうち、628 個 (78.4%) のタンパク質は、糸球体以外の腎組織に、それぞれの抗体による染色が確認された。これは糸球体を腎皮質からシービング法にて採取する際の糸球体外組織の混入である可能性であることが示唆された。抗体プロテオミクスで腎臓の組織がすべて染色されていないタンパク質は 154 個 (19.2%) あった。154 個のタンパク質のうち、血漿プロテオームとの比較において、80%以上が血漿中にも存在するタンパク質であった。ヒト尿プロテオーム、マウス糸球体プロテオームのそれぞれのプロテオームとの比較において、尿中にも存在するタンパク質の存在、抗体の特異度が低いタンパク質が存在することが示唆された。また、質量分析計による分解産物の同定が存在することが示唆された。質量分析計を用いる方法では糸球体サンプルの採取における精度と純度を高め、抗体プロテオミクスでは対応するタンパク質の高品質な抗体作成と複数抗体の作成

および、染色技術の向上が必要であると考えられた。

### 謝 辞

稿を終えるに際し、ご指導賜りました指導教官の山本格教授ならびに腎研究施設構造病理学分野の研究室の皆様にご感謝申し上げます。

### 参 考 論 文

- 1) Su - Chien Chiang, Chia - Li Han, Kun - Hsing Yu, Yu - Ju Chen and Kun - Pin Wu mail: Prioritization of Cancer Marker Candidates Based on the Immunohistochemistry Staining Images Deposited in the Human Protein Atlas. PLoS One Vol.8, No.11, P1 - 11, 2013.
- 2) Pontén F, Schwenk JM, Asplund A and Edqvist PH: The Human Protein Atlas as a proteomic resource for biomarker discovery, J Intern Med. 270: 428 - 446, 2011.
- 3) Melton L: Protein arrays: proteomics in multiplex. Nature 429: 101 - 107, 2004.
- 4) 山本 格: Human Protein Organization (HUPO) のヒト腎臓・尿プロテオームプロジェクト. 新潟医学会雑誌 124: 55 - 64, 2010.
- 5) Farrah T, Deutsch EW, Omenn GS, Sun Z, Watts JD, Yamamoto T, Shteynberg D, Harris MM and Moritz RL: State of the human proteome in 2013 as viewed through Peptide Atlas: comparing the kidney, urine, and plasma proteomes for the biology - and disease - driven Human Proteome Project. J Proteome Res 13: 60 - 75, 2014.
- 6) 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 and Yamamoto T: In - depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two - dimensional protein pre - fractionation in combination with liquid chromatography - tandem mass spectrometry. J Proteome Res. 6: 3680 - 3690, 2007.
- 7) Cui Z, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Nameta M, Magdeldin S, Makiguchi T, Ikoma T, Fujinaka H,

- Yaoita E and Yamamoto T: Profiling and annotation of human kidney glomerulus proteome. *Proteome Sci.* 11: 13, 2013.
- 8) Nanjappa V, Thomas JK, Marimuthu A, Muthusamy B, Radhakrishnan A, Sharma R, Ahmad Khan A, Balakrishnan L, Sahasrabudhe NA, Kumar S, Jhaveri BN, Sheth KV, Kumar Khatana R, Shaw PG, Srikanth SM, Mathur PP, Shankar S, Nagaraja D, Christopher R, Mathivanan S, Raju R, Sirdeshmukh R, Chatterjee A, Simpson RJ, Harsha HC, Pandey A and Prasad TS: Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research: 2014 update. *Nucleic Acids Res* 42 (Database issue): 959 - 965, 2014.
- 9) Lennon R, Byron A, Humphries JD, Randles MJ, Carisey A, Murphy S, Knight D, Brenchley PE, Zent R and Humphries MJ: Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* 25: 939 - 951, 2014.
- 10) Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV and Mann M: The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol* 7: R80, 2006.
- 11) Waanders LF, Chwalek K, Monetti M, Kumar C, Lammert E and Mann M: Quantitative proteomic analysis of single pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18902 - 19807, 2009.
- 12) Rastaldi MP, Candiano G, Musante L, Bruschi M, Armelloni S, Rimoldi L, Tardanico R, Sanna-Cherchi S, Ferrario F, Montinaro V, Haupt R, Parodi S, Carnevali ML, Allegri L, Camussi G, Gesualdo L, Scolari F and Ghiggeri GM: Glomerular clusterin is associated with PKC-alpha/beta regulation and good outcome of membranous glomerulonephritis in humans. *Kidney Int* 70: 477 - 485, 2006.
- 13) Stamenkovic I, Skalli O and Gabbiani G: Distribution of intermediate filament proteins in normal and diseased human glomerulum. *J Pathol* 125: 465 - 475, 1986.
- 14) Chu ML, Zhang RZ, Pan TC, Stokes D, Conway D, Kuo HJ, Glanville R, Mayer U, Mann K, Deutzmann R and Timpl R: Mosaic structure of globular domains in the human type VI collagen alpha 3 chain: similarity to von Willebrand factor, fibronectin, actin, salivary proteins and aprotinin type protease inhibitors. *EMBO J.* 9: 385 - 393, 1990.

(平成 27 年 1 月 15 日受付)