

2015 年功労賞受賞者論文 総説

腎糸球体プロテオーム解析からみえてきたもの： あるプロテオミクス研究者の挑戦と挫折

吉 田 豊 *^{1,2}

*E-mail: yyoshi@med.niigata-u.ac.jp

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科：951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757

²新潟大学研究推進機構：950-2181 新潟市西区五十嵐 2 の町 8050

(受付 2016 年 12 月 15 日, 改訂 2017 年 3 月 10 日, 受理 2017 年 3 月 15 日)

腎疾患のバイオマーカーと治療ターゲット分子の発見を目的として、質量分析計を用いたタンパク質解析が熱く語られ始めた頃からおよそ 15 年にわたり主に腎糸球体のプロテオーム解析に関わってきた。この間研究することの喜びとともに多くの挫折も味わってきた。本論では、我々のこれまでの研究成果について概説するが、その前にこれまで糸球体プロテオーム解析に携わってきた経験から、プロテオミクスについていくつか意見あるいは感想を述べる。最初にプロテオーム解析の限界と課題について私見を紹介する。プロテオーム解析の課題として依然として解決されていない同定のあいまいさと、対象としてのプロテオームの絶望的な複雑さが中心的話題になる。つづいてプロテオーム解析の目的について述べ、これに関連することとして、これまでプロテオーム研究が歩んできた道と現在の状況について整理することを試みる。次に我々の糸球体プロテオームの研究の歴史と、最新の結果も交えて、これまで得られたささやかな成果について概説する。研究の当初抱いていた夢とは少しばかりずれてしまったが、質量分析を楽しんだことは間違いのない。最後に、プロテオーム研究の今後の展望について私見を述べる。

1 はじめに

15 年ほど前になるが、2 次元電気泳動で分離したタンパク質を MALDI-TOF 質量分析計を用いて同定する実験を経験した。O'Farrell の 2 次元電気泳動法¹⁾は大学院時代に経験しており²⁾、質量分析計に出会ったのはこの時が初めてである。そして、これが私のプロテオミクス研究の最初の機会となった。それまでは薬理学教室に在籍し、血管平滑筋弛緩に至る cyclic GMP のシグナル伝達系の研究をしていた私は、cyclic GMP-dependent protein kinase の基質を同定することに熱心だった。240-kDa と 138-kDa の 2 つのリン酸化タンパク質のうち、240-kDa タンパク質は type 1 IP₃ 受容体であることを同定したが³⁾、138-kDa タンパク質の同定は困難で手をこまねいていた。ところがドイツの J. Schlossmann らのグループが同定に成功し、Nature 誌上に発表しているのを知り愕然とした⁴⁾。彼らが用いた方法が質量分析計だった。その当時はまだ質量分析計の性能も悪く研究環境も整っていない時代で、彼らもエドマン分解などを併用して苦労した様子がうかがえるが、質量分析計を用いたアミノ酸配列決定が決め手となった。とても悔しかった。だが、同時に質量分析計の可能性に目を見開かされた時であった。そしてかなり年齢を重ねていたが、それからの研究生活は質量分析計を用いたプロテオミクス研究

にささげる意志が芽生え、幸い多くの方々のサポートも得て私のプロテオミクス研究が始まった。

本総説では、質量分析計を用いたプロテオーム解析の限界と問題点、これまで取り組んできた腎糸球体プロテオーム解析の経過と現状、そしてプロテオーム解析の展望について、挫折の連続ともいえる私のプロテオミクス研究の経験から私見を述べさせていただく。

2 プロテオーム解析の限界と課題

2-1 タンパク質同定のあいまいさ

質量分析計を用いてタンパク質を同定することは、我々にとってルーチン・ワークである。私が経験した検索エンジンはせいぜい 4 種ほどにすぎないが、共通する問題としてタンパク質同定のあいまいさがある。Fig. 1 はタンパク質同定の根拠となる配列がマッチしているとみなされるペプチドの分類である。この例では Protein B が Protein A と同じペプチドセット (Same set of protein A) でマッチしているため、どちらが同定されているかわからない。Protein B は false positive であり、タンパク質データベース上にある Protein B の配列にマッチした結果かもしれない (Bioinformatics redundancy)、実際に Protein B が試料中に存在した結果かもしれない (Biological redundancy)。Protein C-E は Protein A にマッチしたペプチドセットのう

Protein	Matched peptide	Peptide set
Protein A	P1 P2 P3	Same set of protein A Subset of protein A
Protein B	P1 P2 P3	
Protein C	P1 P2	
Protein D	P2 P3	
Protein E	P1	
Protein F	P3 P4 P5	Subset of protein A + unique peptide
Protein G	P2 P4	Subset of protein A + unique peptide

Fig. 1 Ambiguity in protein identification as judged by peptide matches in shotgun analysis with LC-tandem mass spectrometry

P1 to P5 represent peptides matched to protein amino acid sequences. In this case, only protein A and protein F are included in a non-redundant list of identified proteins.

ち Protein A より少ないペプチド (Subset of protein A) がマッチしている。この場合も Protein C-E のヒットは試料中には存在しないが、データベース上の splicing variant あるいは domain 構造の配列が同じか相同性の高いタンパク質にマッチしている可能性があり、これらのタンパク質が同定されているかどうかはあいまいである。Protein F と Protein G は、Protein A の Subset のマッチに加えて、新たなペプチドがマッチしている。通常はこれらのペプチドは unique peptide と呼ばれ、タンパク質が正しく同定されている根拠とみなされる。しかし P2 も P4 もより上位のタンパク質にすでにマッチしており、試料中には存在しないがデータベース上の Protein G にマッチした結果ではないかという疑問が残る。一般的に使用されている検索エンジンである Mascot (version 2.3 以降) では、これらのタンパク質を Protein Family としてグループ化して表示する機能があるが、最終的な同定タンパク質のリストを作成する場合には、Protein A と Protein F のみを残し、それ以外のタンパク質は省いてしまうことが多い。質量分析の経験がなく、第三者に同定を委託した研究者は、提出された同定タンパク質のリストはこのような大幅な省略を含むリストであることが多いことに留意すべきである。

ここで述べた同定のあいまいさは、タンパク質同定の基準が既知配列で切断するタンパク質分解酵素を用いて作製したペプチド断片の MS/MS スペクトルに含まれるアミノ酸配列情報に基づいていることに起因する。すなわち、ショットガン解析の持つ問題点・課題である。ショットガン解析がもたらした技術革新の多大なる恩恵を考えると、これらのあいまいさを包含したタンパク質同定リストの標準的な表記法、革新的なアルゴリズムを有する検索エンジンの登場が待たれる。

また、ショットガン解析に伴う同定のあいまいさは現在のところ解決が難しいが、同定タンパク質を最も高いスコアで同定されたタンパク質に所属したペプチドセットと同一のペプチドセット (Same set) が所属したタンパク質、あるいはその一部のペプチドセット (Subset) がマッ

チしたタンパク質を同じグループ (Protein group) として示すことは、存在する可能性のあるタンパク質の情報をすべて含むことになるので、有用な方法になるかも知れない。最近の報告ではタンパク質の同定数をこのような Protein group の数として発表している例がある。また、Mascot では、最も高いスコアで同定されたタンパク質 A に所属するペプチドを選択し、そのペプチドが所属した他のタンパク質を選択してタンパク質 A の「Protein family」とし、さらに、それらのタンパク質に所属する新規ペプチドを抽出して、これらのペプチドが所属しているタンパク質を選び、同じ Protein family に加える。この操作により、Protein family には、同じペプチドセット (Same set) のみが所属するタンパク質、一部のペプチド (Subset) のみが所属するタンパク質、さらに Same set あるいは Subset が所属する以外に、非共通ペプチド (Intersection) が所属するタンパク質、非共通ペプチドのみが所属するタンパク質が含まれることになる。さらに非共通ペプチドのスコアから、同じ Protein family に含まれるタンパク質間の類似性を算出し (非共通ペプチドの数が多いほど、非共通ペプチドのスコアの低いほど、Protein family メンバー間の距離が遠くなる、つまり、類似性が低くなる)、系統樹として表現している。この方法は通常であれば同定タンパク質として報告することになる、共通ペプチドと非共通ペプチドが所属する複数のタンパク質間の類似性を視覚的に把握できる利点があり、同定タンパク質のデータベースに起因する冗長性の排除、同定タンパク質の基準の設定に利用できる可能性がある。詳細は Matrix 社が提供しているマニュアル (jap_2.5_mserver.manual.pdf) を参照されたい。

2-2 プロテオームの複雑さ

ヒトのタンパク質をコードする遺伝子の数はおよそ 2 万種類だが (neXtProt の 2017-01-23 release では 20,159)、タンパク質になるとその種類は膨大になる (ロシアの A.I. Archackov らのグループの推定⁵⁾ によると、0.62 ~ 6.13 × 10⁶⁾。これは alternative splicing, 翻訳後修飾、タンパク質分解酵素による切断などが原因だが、この複雑さが質量分析により同定されるタンパク質の数を制限することになる。splicing variant の同定、リン酸化される部位の同定、糖鎖修飾部位の決定と糖鎖構造の解析手法は確実に進歩しているが、高度に専門的な知識と豊富な経験が要求される。またタンパク質同定の網羅性は、質量分析計の目を見張る改良、LC 技術の発展、同定検索エンジンの改良などによりこの 10 年間で確実に広がったが、次世代シーケンサーほどのパフォーマンスを出すまでには至っていない。

一方、質量分析計によるタンパク質同定を妨げているものに、タンパク質の濃度範囲の膨大な広さ (Dynamic range) がある。最も複雑なプロテオームといわれる血漿

は 10^{12} のダイナミックレンジをもつことが試算されている⁶⁾。それに対して質量分析計を用いたタンパク質同定は、タンパク質粗抽出液を細分画して解析してもせいぜい 10^4 程度であり、低濃度のタンパク質を同定するためには濃縮しなければならない。これらの操作は煩雑で、時間と労力がかかり、プロテオームの時間的変化をスナップショットとしてとらえることは難しい。

2-3 質量分析計の価格とメンテナンス

最近、概算要求の資料として、質量分析計の代表的メーカー2社にメタボローム解析までを視野に入れた最新の質量分析計一式の見積もりを依頼したところ、およそ8千万円～1億円であった。昨今の研究費削減と効率的使用のための設備・機器の共同利用構想の下では、これだけの高額の研究用機器を購入する手段は、共同利用を前提とした概算要求、大型プロジェクトへの応募による外部資金獲得以外には困難である。しかし共同利用設備と運営体制が充実している大学は少なく、大型プロジェクト予算の枠は限られている。タンパク質研究、さらにはメタボロームや薬物などの低分子化学物質の解析には質量分析計は非常に強力な手段であり、一般的な研究機器に位置づけられてもいいのではないかと考えられる。したがって、各大学ならびに研究機関に設置する機器としては最も高い優先順位をつけてもよいと思われるが、現実には資金に恵まれた一部の大学、研究所に機器が集中し、多くの研究者が質量分析を用いた解析を遂行することは困難な状況にあるといってもよい。

長い間主に nanoflow-LC-tandem MS spectrometer を用いて、いわゆるショットガン解析を行ってきた私の経験から、このシステムを常に稼働状態に保つことがいかに難しいかを実感している。特に nanoflow-LC は、安定した性能を保ち、再現性のある結果を得ることが難しく、深夜までギ酸とアセトニトルを含む溶液で指先を痛めながら悪戦苦闘したことが幾度となくある。また、質量分析計は高真空の質量分析器にイオンを導入してその質量を測定するという構造から、内部の汚染は避けられず、年に1～2回のサービス技術者による内部洗浄が必須である。また消耗品の部品も高価なものが多く、スプレーチップの交換だけで数千円がとび、カラムも安いもので1万円、一般汎用品になると数万円から10万円を超えるものまである。またLCの10方バルブ、6方バルブも高価で最新の注意を払って取扱うが、交換しなければならない時は必ず来る。さらに高いのが質量分析計の部品であるイオン検出器、ターボポンプ、基盤などであり、科研費などによる支払は不可能である。年間保守契約を結ぶことが最も望ましいが、フルバージョンの保守契約で300万円を超える。消耗品の水、アセトニトリルは高純度のものが必要であり、ガラス器具、プラスチック器具などの洗浄に洗剤は用いられない。とにかく質量分

析計というのは手間と時間、技術と知識、高額の維持費用を要求するものなのである。さらに、最近は落ち着いてきたが、質量分析計の開発と新製品の導入は、高価な機器であるにもかかわらず、少し前のPCと同じでサイクルが短い。新しい機器の精度、感度、速度の違いは旧機種に比べると桁違いで、新しい機器の販売が始まりしばらくたつと、古い機器での解析結果で投稿した論文にクレームがつくことさえある。

2-4 後継者の育成

質量分析計を用いたタンパク質の解析は数年前から徐々に浸透しており、共同研究あるいは依頼分析で試料が届けられることが多くなってきた。背景には科学論文や学会発表で質量分析計を用いた解析が増えてきたことがあると思われるが、質量分析計による解析結果には興味を示しても、質量分析計によるタンパク質の解析という技術はハードルが高いように見えるらしく、質量分析計の操作そのものに興味をもち、測定も自分でやる研究者というのは少ない。講義でプロテオミクスを担当する機会も多くなってきたが、興味を示して、実際に研究室を訪ねてくる学生は少ない。日本プロテオーム学会の会員数は年々増加しており、徐々にプロテオミクス研究者の数が増えていることは間違いないのだが、実感として感じることはない。日本のプロテオミクス研究者は、質量分析学会に所属するような、技術系の開発に興味を持つ人と、日本プロテオーム学会に所属して、主に生物学系の課題に質量分析を用いることに興味をもつ人に分かれるように思う。私は後者に分類される人間だと思っているが、生物学を目指しつつも、質量分析という機器分析にも強い興味を持たないと、プロテオミクスの研究者としては育ってこないような気がする。生物学と質量分析の両方に強い関心のある後継者を育てることは、現在では難しい課題ではあるが、私はあまり悲観的には見えない。質量分析は、生物学に限らず、化学、物理学にも一般的に用いられている技術であり、益々その重要性は増している。質量分析を用いる解析が普及するにつれて、研究基盤として質量分析計が配備される大学、研究機関は増加すると考えられるし、近年の文部科学省が主導している研究設備の共用化の推進も機器の導入と技術の発展、そして技術者の拡充に寄与するのではないだろうか。

最近、臨床検査に質量分析計を応用する研究が注目を集めている。この傾向は喜ばしいことである。質量分析を用いる臨床検査がより一般的になれば、質量分析を扱える人が増え、質量分析計のメーカーがうるおうとともに、メーカー間に競争が生まれ、質量分析計が安くなる可能性があるからである。

3 プロテオーム解析の目的：基礎科学的立場から

実際の観点からすると、プロテオーム解析の目的は、1) 生理的あるいは病態生理的過程のタンパク質に視点をのせた分子的理解、2) 疾患バイオマーカーあるいは治療ターゲット分子の発見、の二つにあるように思う。さらにこれらの目的を達成するのに、hypothesis-driven のアプローチと、discovery-driven のアプローチがある。プロテオームという用語は、若い生化学者であった Marc Wilkins が 1994 年にイタリアのシエナで開催されたシンポジウム「2D-electrophoresis: from protein maps to genomes」で行った講演のなかで初めて使われた。その時の定義は、“The complete set of proteins encoded by the genome of a given organism”であり、ゲノムに対応する総括的な概念としてプロテオームの概念が定義されたことがわかる。この定義は 1990 年にアメリカ合衆国の主導で開始された Human Genome Project の目的である “Determining the sequence of nucleotide base pairs that make up human DNA, and identifying and mapping all genes of the human genome from both a physical and a functional standpoint” を強く意識したものであることは間違いないだろう。このような出発をしたプロテオーム解析は、当然のことながら網羅的な解析が基本的な手法となった。網羅的解析を通じて、仮説に基づくのではなく発見を目指す方向に進路が定まったのも理解できる。その結果、体液（血漿、尿）、組織・器官（脳、心臓、肝臓、腎臓など）、糖タンパク質、抗体プロテオミクス、バイオインフォマティクスのプロジェクトが Human Proteome Organization (HUPO) の Initiative として開始された。これらのプロジェクトの目指すものは、国際的な共同研究を通じて、方法論の検討、標準的解析法の開発、データマイニング（バイオインフォマティクス）の手法を開発し、discovery-driven のアプローチによる疾患バイオマーカー、治療ターゲット分子の発見、疾患の分子的理解であった。

最初はプロテオミクスによる疾患バイオマーカーの発見、治療ターゲット分子の発見は大きな期待がもたれ、研究者も熱心にプロテオーム解析に取り組んだ。しかし、その後の研究から当初の期待に沿うようなアウトプットはなかなか出てこなかった。すべてを否定するわけではもちろんないが、砂丘がプロテオームであり、その砂のなかから砂金を拾うようなアプローチに技術と戦略が追いつかなかったことが主な原因ではなかったかと思う。質量分析計による解析は一度に数千のタンパク質の同定、定量を可能にする。人々はそれに感嘆の声をあげるが、それだけでは砂金を見つけることは難しかったのではないだろうか。

最近の質量分析計の著しい性能の向上は、かつての限界を打ち破る可能性を示した。また次世代シーケ

ンサーによる mRNA の定量的な解析の技術的成熟は、proteogenomics という新しいアプローチを生み出した。その一里塚となった研究が 2014 年に発表された Human Proteome の draft map である^{7),8)}。プロテオームのマッピングとは、ヒトの約 20,000 の遺伝子がコードする少なくとも 20,000 種類の基本タンパク質がいつ、どこで、どれくらい発現しているかを示すこと、すなわち、ヒトタンパク質の発現量の時間・空間的地図（アトラス）作りである。プロテオームはきわめて動的で、年齢、環境、生理的条件、薬物に対する反応、疾患過程などで大きく変化するものであり、完全なプロテオームのマッピングは困難なものであることが予想されるが、実用可能なレベルになれば、ヒトの生理的過程と病態生理的過程の分子的理解に格段の深化をもたらすものになることは間違いない。2014 年に発表された 2 つのヒトプロテオームの draft map は、現在利用可能な技術を用いて、これまで確認されていなかったタンパク質を含む、20,000 に迫る数のタンパク質を同定し、そのおおよそのマッピングに成功したという点で画期的であり、今後の研究の指針になるものとして高く評価されていると考える。

ヒトプロテオームのマッピングの波は HUPO にも押し寄せ、あらたに Human Proteome Project が 2010 年頃から動きだした。つまりプロテオミクスは当初の目的に向かって新たな挑戦を開始したわけである。詳細はここでは触れないが、最新の発表によればヒトのタンパク質をコードするおおよそ 20,000 の遺伝子のうち、85% の遺伝子がコードするタンパク質の同定が完了し、2,949 個の遺伝子がコードするタンパク質 (missing protein) の同定が残されているそうである (<https://www.hupo.org>)。

Missing protein とは遺伝子解析からヒトに存在することが予測されるおおよそ 20,000 のタンパク質のうち、発現が確認されていないタンパク質である。つまり、タンパク質の検出に用いられる質量分析や免疫学的方法により検出できないタンパク質である。これらのタンパク質には、きわめて微量のため検出できないもの、分解速度が速く抽出過程で濃度が低下するもの、ショットガン解析のために一般的に用いられるタンパク質分解酵素により分解されないもの、などが含まれる。また、発生の特定期にしか発現しないタンパク質、ある特定の環境下でしか発現しないタンパク質である可能性がある。しかし、技術的な進歩は著しく、特定の配列をもつペプチドのみを標的にできる選択的反応モニタリング (SRM) や、トップダウン分析などにより、多くの未確認タンパク質の発現が確認されており、タンパク質をコードしているすべて遺伝子の産物が確認される日もそう遠くはないと思われる。

4 糸球体プロテオーム解析

4-1 糸球体プロテオームデータベースの構築

糸球体は多くの腎疾患の主要な病変部であり、糸球体プロテオームの生理学あるいは病態生理学的変化を知ることが、これまでの研究とは異なるパラダイムで新たな知見を提供でき、腎疾患の理解をさらに深め、画期的な診断法、治療法の開発に貢献するという理念は最初からあった。しかし、プロテオーム解析ができる体制が整うにつれて、ヒト腎糸球体のプロテオームの解析法そのものを至適化することが必要と考えて、正常糸球体のプロテオーム解析が我々の研究の出発点になった。

正常糸球体のプロテオーム解析を通じて最初の目的としたのが、糸球体プロテオームのデータベースの構築と公開である。当時はヒトの組織、体液（尿や血漿あるいは血清）のプロテオームデータベースは利用できるものがほとんどない状況であった。データベースの構築となるとできるだけ網羅的な解析が必要になるが、最初に取り組んだのが大型のゲルを用いる2次元電気泳動（2-DE）による分離と検出されたスポットの質量分析計（MALDI-TOF mass spectrometer と nanoflow LC-ion trap mass spectrometer）による同定だった（Fig. 2）。対象とした4例の精製糸球体標品を用いてそれぞれ2回の2-DEを行い、すべてのイメージから正常糸球体の2-DE画像を合成した。その画像で明確に分離されている1,713個のスポットのうち、すべてのゲルに共通して存在する1,559スポットを対象としてタンパク質の同定を行い、347スポット（タンパク質として212種類）を同定した⁹⁾。同定されたスポットの数は当

正常糸球体2-DEゲルイメージの合成

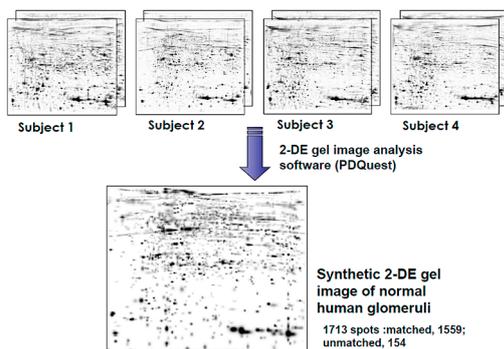


Fig. 2 Two-dimensional gel electrophoresis images of normal human glomerulus

Histologically normal portions of cortices of kidneys from patients who underwent surgical nephrectomy due to renal cell carcinoma were used to purify glomeruli. The purified glomeruli were separated on two-dimensional gel electrophoresis gel using 24 cm immobilized DryStrip of pH 3–10 in the first dimension, and stained with silver nitrate.

然ながら十分ではないが、当時としては、タンパク同定数は多かったと認識している。この結果はすぐにデータベース化して、共同研究を行っていた NEC 基礎研究所の協力により公開された（現在は後述の HKUPP データベースの統合されている）。

タンパク質の同定数が少ないことを解消するため、次に行ったのが、正常糸球体タンパク質を2次元（液相等電点電気泳動と SDS-PAGE）で細分画し、それぞれの分画を nanoflow LC-ion trap mass spectrometer で同定することだった¹⁰⁾。この方法により6,686種類のタンパク質（遺伝子数で2,966）が同定され、網羅的といってもよい糸球体プロテオームのデータベースの構築が可能になり、一般に公開されることになった（Fig. 3）（www.hkupp.org）。このデータベースから冗長性を排除し、高い信頼性で同定されたタンパク質を対象にして、マウス糸球体プロテオームとの比較、ヒト血漿プロテオームとの比較、さらにヒト尿プロテオームとの比較など、さらに詳細な解析が行われ¹¹⁾、また Human Protein Atlas の免疫組織化学データベースとの関連付けが加えられることにより、より充実したデータベースとなっている。

4-2 臨床試料を用いた糸球体プロテオーム解析

手術標本、また腎疾患とくに慢性腎不全の病理組織診断に用いられる腎生検試料から糸球体を取りだしプロテオーム解析を可能にするため、Laser micro-dissection (LMD) を用いて組織切片から糸球体を切り出し、プロテオーム解析を行う方法を検討してきた。病理組織診断は凍結試料を用いる場合と固定試料を用いる場合があるが、特に後者の試料は長期間保存が可能であり、プロテオーム解析が可能になれば理想的なリソースとなり得る。我々は凍結試料あるいはホルマリン固定試料から作製した10 μm の切片を用いて、LMDにより糸球体を切り出し、その50個におよそ1–2 μg のタンパク質が含まれることを見出した。さらに、糸球体切片から効率よくトリプシン消化ペプチドを調製する方法（On site direct digestion, OSDD）を開発した。OSDD法は、微量遠心管型のcollecting tubeのキャップ裏側の粘着性のある表面に50個の糸球体切片を付着させた状態で、上下を逆にし、トリプシンを含む溶液を切片上におよせて、水平状態を保ったままキャップをしめ、そのまま37°Cのエアーインキュベーター中で終夜静置することによりタンパク質を消化する方法である¹²⁾。

これらの技術を用いて調製したペプチド試料を高精度、高速、高感度質量分析計で解析することにより、凍結試料、ホルマリン固定試料から切り出した50個の糸球体切片からおよそ1800のタンパク質が同定できる。実際にこの技術を用いて糸球体硬化症の糸球体では硬化に抗原抗体反応非依存性の補体活性化経路のうち alternative pathway が関

Glomerulus proteome database

The figure shows a screenshot of the HKUPP (Human Kidney and Urine Proteome Project) website. It is divided into several sections:

- Search Interface:** At the top, there are search boxes for 'Query' and 'Query in parameter'. A yellow callout box labeled '1. Search start' points to the search input field.
- Search Results:** Below the search interface, a table lists search results. The first result is 'Tight junction protein ZO-1' with IPI Accession 'IP00216219'. A red arrow labeled 'Click' points to the accession number, and another red arrow labeled 'Click' points to a 'Detail' link.
- General Information:** A box on the left provides details for the selected protein:
 - Entry name: IP00216219.3
 - Accession number: IP00216219, IP00014987, IP00074129
 - Created: IPI Human rel. 2.18, 09-APR-2003
 - Description: ISOFORM LONG OF TIGHT JUNCTION PROTEIN ZO-1
 - Organism source: Homo sapiens (Human)
 - NCBI TaxID: 9606
- Detailed Information:** A box on the right shows a heatmap of protein spots, a localization image, and other data:
 - Protein Name: Isoform Long of Tight junction protein ZO-1
 - Gene Symbol: TJP1
 - Species: MIM: 102450
 - Spots: 246
 - Peptides: 49
 - Score: 743.11
 - Localization: (Image showing protein spots)

Fig. 3 Overview of human glomerulus proteome database of Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP)

与していることを証明できた¹²⁾。また、糸球体には血液が大量に存在し、質量分析に干渉することが問題になるが、凍結試料から調製した糸球体切片をPBSなどで洗浄することにより、血液由来のタンパク質のほとんどを除去できることが示されている¹³⁾。

4-3 糸球体のサブプロテオーム解析と腎泌尿器系プロテオーム解析

糸球体上皮細胞は足突起と呼ばれる突起を細胞体から伸ばし、糸球体基底膜を覆っている。足突起は一定の間隔で隣接しているが隣接している足突起はそれぞれ異なる細胞からでており、さらに足突起間にはスリット膜と呼ばれる隔膜があり、タンパク質の漏出を防ぐ最終的な構造として機能していると考えられている。このような糸球体上皮細胞の特徴的な構造の維持には、細胞間、基底膜との間のシグナル伝達が重要な役割を果たしていると考えられている。我々は、2次元電気泳動、抗チロシン抗体を用いたイムノブロットング、免疫沈降法を組み合わせ、糸球体のチロシンリン酸化タンパク質の網羅的解析を行い、いくつかの興味あるチロシンリン酸化タンパク質を見出している¹⁴⁾。

上述のスリット膜を構成するタンパク質としてネフリン、NEPH-1、ポドシンなどが同定され、これらの欠損や機能異常が蛋白尿を引き起こすことがわかっている。我々は強い張力がかかるスリット膜を維持する細胞間接着因子が見

出されていないことから、新規スリット膜構成因子を同定することを目的として、高知大学の自家、小谷らによって開発されたEMARS法¹⁵⁾を用いて、ネフリン近傍の微小環境に存在するタンパク質をin situで蛍光色素により標識し、蛍光色素に対する抗体で標識タンパク質を免疫沈降により濃縮することにより、既知のスリット膜構成タンパク質に加えて多くのタンパク質が同定されることを見出している (Fig. 4) (投稿準備中)。

腎臓の血管内皮細胞の表面にあるABO血液型糖鎖をもつタンパク質はABO血液型不適合腎移植の際に抗体の標的となるタンパク質であり、拒絶反応の原因となり得るが、これまで網羅的な同定はなされていなかった。本学の泌尿器科との共同研究で、ABO血液型不適合腎移植の際に観察される、“Accommodation”と呼ばれる拒絶反応の抑制現象を説明するための基礎研究として、A型糖鎖抗原に特異的なレクチン・アフィニティー・クロマトグラフィー、抗A、B型糖鎖抗体を用いたイムノブロットング、免疫沈降を組み合わせ、ヒト腎臓でABO血液型糖鎖抗原をもつタンパク質の網羅的解析を行い、いくつかのタンパク質の同定に成功している¹⁶⁾。さらにこの研究に関連して、内皮細胞の細胞膜タンパク質の網羅的解析を目的として、陽性荷電をもつコロイド・シリカ・ナノパーティクル (CCSN) を臓器還流法によりラット腎臓血管内に導入し、陰性荷電をもつ内皮細胞膜タンパク質と相互作用させ、細胞膜を選択的に標識後、CCSN標識された細胞膜を密度勾

腎糸球体: スリット膜 Slit diaphragm構成タンパク質の同定(EMARS法)

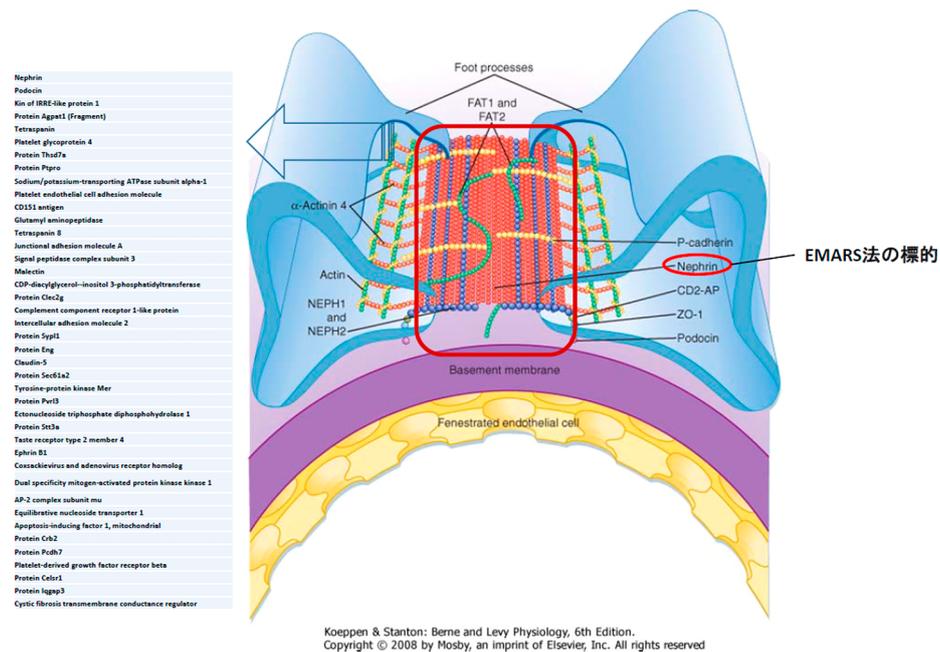


Fig. 4 Identification of novel protein components of the slit diaphragm bridging podocyte foot processes by EMARS method

配遠心法により精製する方法で濃縮することにより多くの内皮細胞の細胞膜タンパク質の同定を行った¹⁷⁾。

5 プロテオーム研究あるいは質量分析計を用いたオミックス研究の展望

Human Proteome Project のドラフト研究が発表されたことからわかるように、すべてのタンパク質をコードする遺伝子のタンパク質を質量分析計で同定することはすでに射程内に入っていると考えられる。しかし、タンパク質の機能は多彩であり、その時間的・空間的発現、既知のあるいは未知の翻訳後修飾の同定、生理活性ペプチドの同定、依然として残る同定のあいまいさ、効率的な疾患バイオマーカー、治療ターゲット分子の発見法など、多くの解決すべき課題が残っている。RNAseq のデータから発現しているタンパク質を標的にして、SRM/MRM でタンパク質の同定・定量を行うアプローチは、これまで質量分析計では同定できなかったタンパク質の同定を可能にすると考えられる。また、近年著しい発展を見せている SRM/MRM を用いる定量法は、すべてのタンパク質をターゲットにする環境が整ってきている。さらに SRM/MRM を用いたアミノ酸変異タンパク質の定量的解析や、特定の部位がリン酸化されたタンパク質の定量など、新しい応用が目につくようになってきた。

一方で、メタボロミクスなど、低分子化合物の同定・定量法の普及は目覚ましく、臨床検査への応用の道筋がみえてきたことは明るい話題である。とくに臨床検査への応用が一般的になると、臨床検査に特化した質量分析計の開発

が行われると予想されるが、すでに、感染菌の同定専用の質量分析計やキットの開発、ソフトウェアの充実などが実現している。また、質量分析計の普及はメーカーの競争を刺激し、より安価な機器の開発や、より高度な機能をもつ機器の開発につながるとも考えられる。

質量分析の技術は高度に専門的である状況はしばらく変わらないと思われる。すでに医用マスメクトル学会で実施しているが、学会や国、地方自治体が質量分析の専門職を認定する制度を設けることは、質量分析を目指す後継者のための教育環境の整備や質量分析を専門とする技術者の増員に有用な施策になるかも知れない。

謝辞

私のプロテオミクス研究は挫折にみちていたが、HUPO で Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP) の project leader として活躍し、新潟大学におけるプロテオミクスの推進に尽力してこられた山本 格教授をはじめとする腎研究施設構造病理学分野の同僚、技術職員、大学院生、基礎配属で訪れてくれた学部学生諸君、そして日本プロテオーム学会でいつも暖かく接してくれた会員の方々に支えられてきた。ここに改めて感謝する。

著者に開示すべき利益相反状態は無い。

文献

- 1) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol Chem. 1975;250:4007-4021.

- 2) Yoshida Y, Takahashi Y. Compositional changes in soluble proteins of cerebral mantle, cerebellum, and brain stem of rat brain during development: a two-dimensional gel electrophoresis. *Neurochem Res.* 1980;5:81–96.
- 3) Yoshida Y, Sun H-T, Cai J-Q, Imai S. Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca²⁺ pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein. *J Biol Chem.* 1991;266:19819–19825.
- 4) Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, *et al.* Regulation of intracellular calcium by a signaling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase Iβ. *Nature.* 2000;404:197–201.
- 5) Ponomarenko EA, Poverennaya V, Iglsonls EV, *et al.* The size of the human proteome: the width and depth. *Int J Anal Chem.* 2016, Article ID 7436849.
- 6) Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1:845–867.
- 7) Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature.* 2014;509:582–587.
- 8) Kim MS, Pinto SM, Getnet D, *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature.* 2014;509:575–581.
- 9) Yoshida Y, Miyazaki K, Kamiie J, *et al.* Two-dimensional profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language (XML)-based database. *Proteomics.* 2005;5:1083–1096.
- 10) Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, *et al.* 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.* 2007;6:3680–3690.
- 11) Cui Z, Yoshida Y, Xu B, *et al.* Profiling and annotation of human kidney glomerulus proteome. *Proteome Sci.* 2013;11:13.
- 12) Zhang Y, Xu B, Kinoshita N, *et al.* Label-free quantitative proteomic analysis reveals strong involvement of complement alternative and terminal pathways in human glomerular sclerotic lesions. *J Proteomics.* 2015;123:89–100.
- 13) Yoshida Y, Nameta M, Kuwano M, *et al.* Proteomic approach to human kidney glomerulus prepared by laser microdissection from frozen biopsy specimens: Exploration of proteome after removal of blood-derived proteins. *Proteomics Clin Appl.* 2012;6:412–417.
- 14) Zhang Y, Yoshida Y, Nameta M, *et al.* Glomerular proteins to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:1785–1795.
- 15) Jiang S, Kotani N, Ohnishi T, *et al.* A proteomics approach to the cell-surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction. *Proteomics.* 2012;12:54–72.
- 16) Tasaki M, Yoshida Y, Miyamoto M, *et al.* Identification and characterization of major proteins carrying ABO blood group antigens in the human kidney. *Transplantation.* 2009;87:1125–1133.
- 17) Liu Z, Nameta M, Zhang Y, *et al.* Profiling of kidney vascular endothelial cell plasma membrane proteins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Exp Nephrol.* 2013;17:327–337.

Overview and Perspective of Proteomics in the Sight of a Researcher Committed to Proteomics of the Glomerulus of Kidney

Yutaka Yoshida*^{1,2}

*E-mail: yyoshi@med.niigata-u.ac.jp

¹Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Asahimachi-dori 1-757, Chuo-ku, Niigata 951-8510, Japan

²Institute for Research Promotion, Niigata University, Ikarashi 2-no-cho, 8050, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan

(Received: December 15, 2016; Revised: March 10, 2017; Accepted: March 15, 2017)

I started my research on proteomics of the glomerulus of kidney almost 15 years ago when proteomics was at its initial stage and in a frenzy of anticipation. Through the research I have experienced a lot of frustration as well as pleasures in working with mass spectrometers. In this short review, I would like to summarize history and achievements of our research. This review, however, starts with overview and perspective of proteomics field in the sight of a researcher deeply committed to proteomics for long years. It includes ambiguity of protein identification, tremendous heterogeneity of proteome, brief history of proteomics and current challenge confronting proteomics. I then briefly summarize our research including recent works. Finally I would like to depict my personal view on prospects of proteomics.

Keywords: kidney glomerulus; overview; perspective; proteomics.