

〈特集：尿路結石〉

尿路結石の分析：X線回折装置およびLC-MSを用いて

金子 希代子

Analysis of urinary stones with the use of micro area X-ray diffractometry and liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS)

Kiyoko Kaneko

Summary Urinary stones are recognized as a frequent complication in patients with gout, hyperuricemia and hypouricemia. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) following the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique was applied for the analysis of proteins in two urinary stones found in a hypouricemic patient. We describe in detail the method using these very sensitive analyses. Analysis with a micro area X-ray diffractometer showed that one of the stones was composed of calcium oxalate monohydrate and hydroxyapatite. The other stone was formed from calcium oxalate dihydrate. After determination by LC-MS, they were both found to contain uromodulin, albumin, osteopontin, protein Z, and defensins. Lysozyme and calgranulin A were also identified in these calculi. The role of these proteins in the process of urolithiasis is of particular interest. This technique used was sensitive enough to detect small quantities of proteins even in renal stones.

Key words: Urinary stones, LC-MS, Micro area X-ray diffractometer, Calcium oxalate

I. はじめに

1995年の調査による尿路結石症の罹患率は、1965年と比べて、男性が4.3%から9.0%に、女性が1.8%から3.8%に上がっていることが知られている¹⁾。その原因として、生活習慣の変化、特に食生活の欧米化があげられる。

生活習慣の変化により、近年、増加している疾患として、痛風・高尿酸血症があげられる。痛風・高尿酸血症や腎性低尿酸血症では尿路結石の合併が多いことが知られている²⁾。これらの疾患では、尿中に排泄される尿酸の量が増加しているため、尿酸結石のみならず、シュウ酸カルシウム結石の生成も早められるためだと考え

帝京大学 薬学部 薬品分析学教室
〒229-0195 神奈川県相模原市相模湖町寸沢嵐1091-1

Department of Analytical Chemistry, School of
Pharmaceutical Sciences, Teikyo University,
Sagamiko-cho, Sagamihara, Kanagawa 229-0195, Japan

られている³⁾。

また、尿路結石の90~95%は結晶性の低分子成分であるが、高分子成分、特にたんぱく質を数%含んでいることが報告されている⁴⁾。

筆者らは、痛風・高尿酸血症に合併する尿路結石を、まず、微小領域X線回折装置および赤外分光分析装置を用いて部位別に分析した後、液体クロマトグラフ質量分析装置（以下、LC-MSと略）を用いて、タンパク質成分を分析している。本稿では、腎性低尿酸血症患者に合併した尿路結石の分析を例にとり、その測定方法について紹介したい⁵⁾。

II. 試料および方法⁵⁾

尿路結石を繰り返す、分泌前再吸収障害型の特発性腎性低尿酸血症患者（男性）から自然排泄により得られた尿路結石を試料とした。結石1は、直径が約2mmの暗褐色の球状の結石で表面は滑らかであった。この結石を、カッターで2つに割り、直径100 μ m径のX線ビームを照射して微小部分を調べることのできる微小領域X線回折装置を用いて、外辺部と断面部を測定した。断面部には、中央に白色部分があり、そ

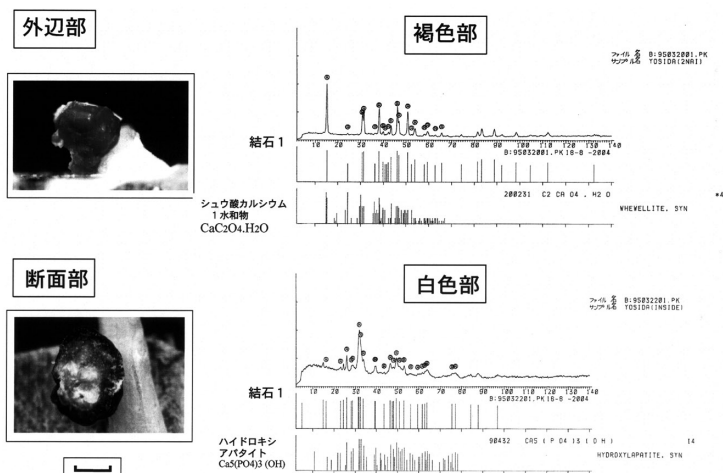


図1 結石1のX線回折図形

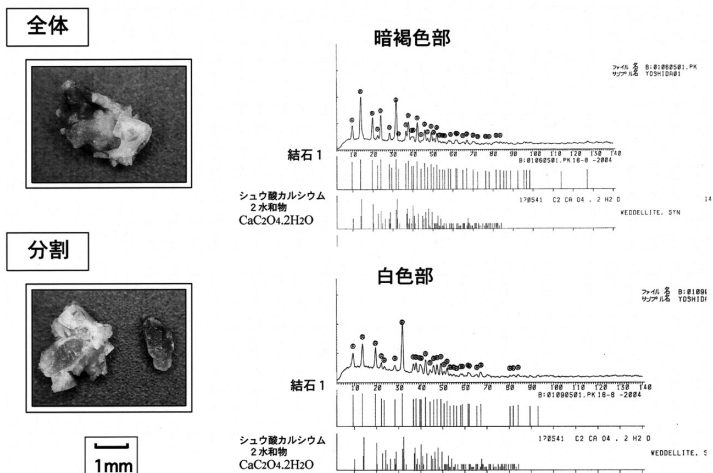


図2 結石2のX線回折図形

れらを数ヶ所、分析する。結石2は、褐色部と白色部および透明な部分を持つ不定形の結石であり、これもカッターで分割して、外辺部と断面部を分析した。分析後は、データベースとの比較により物質を同定した。

次に尿路結石を粉碎して臭化カリウム (KBr) と混合して赤外分光分析を行った。赤外分光分析は、尿路結石の成分を調べるために、一般的に使用されている方法である。標準品と比較することにより、結石に含まれる成分を同定することができる。

赤外分光分析の後、0.6 mol/L塩化カリウム、10% ギ酸、4 mol/Lグアニジン塩酸、0.5 mol/Lエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を用いて、別々の溶媒で順次タンパク質を抽出した。抽出液は、脱塩して濃縮後、試料をSDS含有緩衝液で溶解して、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (ATTO PAGEL NPG-D520、5-20% gradientゲル) で分離した。ゲルはクーマシーブリリアントブルー (CBB) で染色後、バンドを切り出して、洗浄し、還元・アルキル化の後、ゲル内でトリプシン消化を37℃で16時間行った。ペプチド混合液は濃縮後、液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS) に導入した。

Ⅲ. 微小領域X線回折分析⁹⁾

図1に尿路結石1のX線回折図形、図2に尿路結石2のX線回折図形を示した。測定条件は、装置：JEOL JDX-8030T, DX-MAP2、条件：ター

ゲットCu；フィルターNi；電圧40 kV；電流40 mA、コリメーター径：100 μmである。

図1の上段に示す褐色の外辺部は、バックグラウンドの少ないスペクトルを与えた。回折角度70°以下で認められたピークのほとんどは、下部に示す標準品としてデータベースに収録されているシュウ酸カルシウム1水和物と一致した。一方、下段に示した断面の白色部は、弱いスペクトルではあるが、HYDROXYLAPATITEとよく一致した。また、断面の透明な部分は、外辺部と同じシュウ酸カルシウム1水和物とほぼ一致した。

尿路結石2は、不定形の暗褐色と白色の結石であるが、外側の暗褐色部、内側の白色部など数箇所の測定した結果、いずれの場所もシュウ酸カルシウム2水和物とほぼ一致していた。

両結石とも、赤外分光分析で3000-3500 cm⁻¹に水酸基の吸収が、1620 cm⁻¹にカルボニル基の吸収が認められたことから、シュウ酸カルシウムが主成分であると考えられる。

Ⅳ. 液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)⁹⁾

尿路結石から抽出したタンパク質は、電気泳動 (SDS-PAGE) 後、CBB染色してバンドをゲルから切り出し、トリプシン処理してペプチド断片にする。電気泳動で1つのバンドに見えても1種類のタンパク質とは限らないので、トリプシン消化液の中には、さまざまな種類のペプチドが混合物として存在することになる。このよ

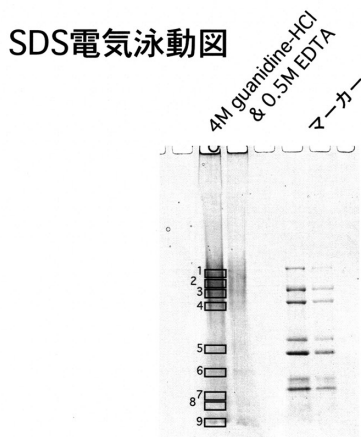


図3 尿路結石1から検出されたタンパク質

検出されたタンパク質

- Uromodulin----- band 1,3,4,6
- Osteopontin---- band 1,2,3
- Protein Z ----- band 1,2,3,4
- Albumin ----- band 2,4
- Lysozyme ----- band 8
- Defensins ----- band 9

うな多くのペプチドを、液体クロマトグラフで分離しながら、質量分析を行う。LC-MS条件は、装置：LC部；AMR MAGIC 2002、MS部；Thermo Fisher Scientific LCQDACA、LC：カラム；Magic C18 0.2×50 mm、移動相；0.1mol/Lギ酸/CH₃CN gradient (5-50% in 20分)、流速；2 μL/分、MS：イオン化；ESI (electrospray ionization)、検出；イオントラップ型 (MSn)、ソフトウェア；X calibur 1.2およびBioworks 2.0 (SEQUEST Search) で行った。

検出された最大イオン強度のフラグメントを、さらに、開裂させて得られるMS/MS分析の結果から、Bioworks 2.0を用いてタンパク質検索を行った。本測定法ではナノフローLCを用いることにより、一つの尿路結石の一部から、タンパク

質を高感度に測定することが可能である。

V. LC-MSによる測定例⁹⁾

尿路結石 1 のSDS電気泳動図とゲルから検出されたタンパク質を図3に示した。尿路結石からグアニジン塩酸とEDTAで抽出した液は、SDS-PAGEにおいて、スメア状で分離の悪いバンドを示したが、バンド1、3、4、6からウロモジュリン、バンド1、2、3からオステオポンチン、バンド1、2、3、4からプロテインZ、バンド2、4からアルブミン、バンド8からリゾチーム、バンド9からディフェンシンの6種類のタンパク質が検出された。

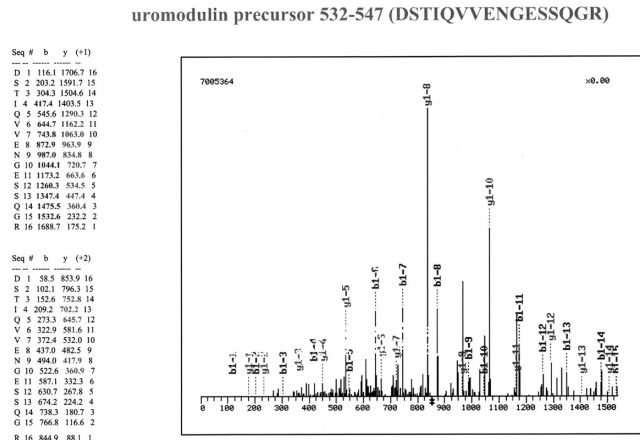
図4はband 1から検出されたウロモジュリン

```

database=C:\Xcalibur\database\human.fasta, accession=gil137116[sp]P07911[UROM_HUMAN
peptide(s)=DGPCGTVLTR DSTIQVVENGESSQGR STEYGEYACDTDLR YFHQDR
Analyzing ...
>gil137116[sp]P07911[UROM_HUMAN UROMODULIN PRECURSOR (TAMM-HORSFALL URINARY
GLYCOPROTEIN) (THP) [gi|88978|pir|A30452 uromodulin precursor - human:gil|340164 (M15881) uromodulin precursor
[ Homo sapiens] [ MASS=69761]
MGQPSLTWML MVVVASWEIT TAATDTSEAR WCSECHSNAT CTEDEAVTTC TCGEGFTGDD LTCVDLDECA
YRGAHNSCAN SCSVNTPGSF SCVCEPGRFL SPGLGCTDVD ECAEPLSHC HALATCVNVV GSYLVCVCPAG
IPGDGWHCEC SPGSCGPGLD CVPEGDALVC ADPCQAHRTL DEYWRSTEYGEYACDTDLR GYVRFVGGGG
ARMAETCVPV LRCNTAAPMW LNGTHPSSDE GIVSRKACAH WSGHCLLWDA SVQVKACAGG YVYVNLTAAP
ECHLAYCTDP SSVGECEEC SIDEDCKSN GRWHQCKQD FNITDISLE HRLCEGANDM KVSLGKCOLK
SLFGDKVFMV LSDSRCSGFN DRDNDRVWSV VTPARDGPGC TVLTRNETHA TYSNTLYLAD EHIRLDNIK
INFACSYPLD MKVSLKTAQ PMVSNLRV GGTGMFTVRM ALFQTPSYTQ PYQSSVTL S TEAFLYVGTM
LDGGDLRFA LLMTNCAATP SSNATDPLKY FHIQDRCPHT RDTSTIQVVEN GESSQGRFVS QMFRFAGNYD
LVYLHCEVYL CDTMNEKCKP TCSGTRFRSG SVIDQSRVLN LGPITRKGVQ ATVSRAFSSL GLLKVLVPLL
LSATLTLTFQ
>average mass = 69742
position sequence (NCBI BLAST link)
-----
386-395 DGPCGTVLTR
532-547 DSTIQVVENGESSQGR
186-200 STEYGEYACDTDLR
520-526 YFHQDR
Protein Coverage: 48/640 = 7.5% by amino acid count, 5285/69742 = 7.6% by mass
Search SWISS-PROT with gil137116[sp]P07911[UROM_HUMAN via accession, descr./ID, or full text field.
Done.
    
```

Uromodulin precursor

図4 尿路結石 1 から検出されたウロモジュリン (バンド1)



生物試料分析

で、640個のアミノ酸のうちの48個にあたる4つのペプチドが検出されている。LC-MSによって検出されたペプチドは配列の中で赤く示されて

いる。図5は、検出されたペプチドの一つである532~547残基目のアミノ酸16個から成るペプチド (DSTIQVVENGESSQGR) のMS/MSスペク

```

database=C:\Xcalibur\database\human.fasta, accession=g|2144493|pir|KXHUZ
peptide(s)=ENFVLTAK GLLSGWAR YSLWFK APDLQDLPWQVK
Analyzing ...
>g|2144493|pir|KXHUZ plasma protein Z precursor - human [gi|90466 (M55671) protein Z [Homo sapiens]
[MASS=47053]
MAGCVPLAQ LVLVLAHRV EPSATSLKER HGLHSDSACT GVQESLFLPA SKANDVLRW KRAGSYLLEE
LFEGNLEKEC YEIICVYEEA REVFENEVTV DEFWRRYKGG SPICISQPCFLH NGSCQDSIWG YTCTSPGYE
GNSCELAKNE CHPERTDGCQ HFCLPGQESY TCSCAQGYRL GEDHKQCVPH DQACAGVLTG EKRAPDLQDL
PWQVKLTNSE GKDFCGGVII RENFVLTAK CSLLHRNITV KTYFNRTSQD PLMIKITHVH VHMRYDADAG
ENDLLELE WPIQCPGAGL PVCPEKDFE EHLIPRTRG LLSGWARNGT DLGNSLTTRP VTLVEGEECG
QVLNVTVTR TYCERSVAA MHWMDGSVVT REHRGSWLT GVLGSPVGG QAHMVLTVK SRYSLWFKQI
MN
>average mass = 47035
position sequence (NCBI BLAST link)
-----
232- 240 ENFVLTAK
320- 327 GLLSGWAR
413- 418 YSLWFK
204- 215 APDLQDLPWQVK
Protein Coverage: 35/422 = 8.3% by amino acid count, 4061/47035 = 8.6% by mass
Search SWISS-PROT with gi|2144493|pir|KXHUZ via accession, deser./ID, or full text field.
Done.
    
```

Protein Z precursor

図6 尿路結石1から検出されたプロテインZ (バンド2)

ProteinZ precursor 204-215 (APDLQDLPWQVK)

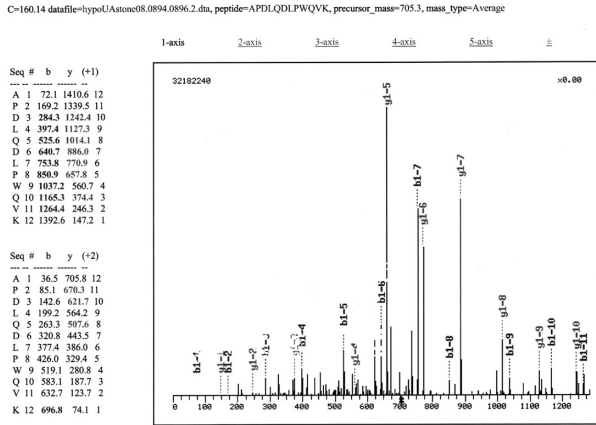


図7 プロテインZに由来するペプチドのMS/MSスペクトル

```

database=C:\Xcalibur\database\human.fasta, accession=g|2119708|pir|I76601
peptide(s)=GDSVVYGLR QNLLAPETLPSK AIPVAQDLNAPSDDWSR YPDAVATWLNPDPSQK
Analyzing ...
>g|2119708|pir|I76601 OPN-b - human (fragment) [gi|992949|gn|PID|1006501 (D28760) OPN-b [Homo sapiens]
[MASS=33836]
MRIAIVICFL LGITCAIPVK QADSGSSEK QLYNKYPDAV ATWLNPDPSQ KQNLLAPETL PSKSNESHDD
MDDMDDDDDD DHVDSQDSID SNDSDDVDDT DDSHQSDSH HSDESDLVLT DFFPTDL PATE VFTPVPTVD
TYDGRGDSVV YGLRSKSKKF RRPDIQYPA DDEHITSHME SEELNGAYKA IPVAQDLNAP SDWDSRSGKDS
YETSQDQSQ AEASHKQSR LYKRKANDES NEHSDVIDSQ ELSKVSRFHF SHEFHSHEMD LVVDPKSKEE
DKHLKFRISH ELDSASSEVN
>average mass = 33818
position sequence (NCBI BLAST link)
-----
146- 154 GDSVVYGLR
52- 63 QNLLAPETLPSK
190- 206 AIPVAQDLNAPSDDWSR
36- 51 YPDAVATWLNPDPSQK
Protein Coverage: 54/300 = 18.0% by amino acid count, 5860/33818 = 17.3% by mass
Search SWISS-PROT with gi|2119708|pir|I76601 via accession, deser./ID, or full text field.
Done.
    
```

OPN-b fragment

図8 尿路結石1から検出されたおすてオステオポンチン (バンド2)

トルである。左側に理論値が示されており、測定値が理論値と合致したm/zが、bイオンは赤、yイオンは青で表示されている。右側の測定されたMS/MSスペクトルでは、理論値と合致するピークに赤と青で合致する開裂イオンの記号が書かれている。このように検出されたイオンのほとんどがDSTIQVVENGESSQGRのペプチドに由来するピークであることからペプチドを同定し、それらの複数のペプチドを含むタンパク質が候補として検索される。

同様にband 2から検出されたプロテインZを図6に示した。4つのペプチドフラグメントが同定され、422個のアミノ酸うちの35個、8.3%の合致率を示した。図7には、プロテインZの204~215番目にあたるアミノ酸12個のペプ

チドのMS/MSスペクトルを示した。ウロモジュリン同様、理論値とよく一致したスペクトルが得られている。

図8にはband 2から検出されたオステオポンチンbフラグメントを示した。300アミノ酸残基の18%にあたる4つのペプチド、54個のアミノ酸、が検出されている。同様に図9、図10にリゾチームCを示したが、分子量が小さいタンパク質であるため、47%の合致率、148個のアミノ酸中の69個にあたる6つのペプチドが検出された。このように小さいタンパク質であると、検出されるペプチドの比率が大きくなり、合致率が上がる。

図11に、尿路結石2のSDS-PAGEとそこから検出されたタンパク質を示した。尿路結石2

```

database=C:\Xcalibur\database\human.fasta, accession=gil126615|sp|P00695|LYC_HUMAN
peptide(s)=YWCNDGK WESGYNTR QYVQCGV AWWAWR STDYGIFQINSR
TPGAVNACHLSCSALLQDNIADAVACAK

Analyzing ...

>gil126615|sp|P00695|LYC_HUMAN LYSOZYME C PRECURSOR (1,4-BETA-N-ACETYLMURAMIDASE
C) [gil2144473|pir|LZHU lysozyme (EC 3.2.1.17) c precursor - human [gil307140 (I03801) lysozyme precursor (EC
3.2.1.17) [Homo sapiens] [gil307142 (M19045) lysozyme precursor (EC 3.2.1.17) [Homo sapiens] [gil1790941
(U76912) lysozyme c precursor [Pan troglodytes] [gil1790961 (U76933) lysozyme c precursor [Pan paniscus]
[MASS=16537]
MKALIVLGLV LLSVTVQGV FERCELARTL KRLGMDGYRG ISLANWCLA KWESGYNTRA
TNYNAGDRST DYGIFQINSR YWCNDGKTPG AVNACHLSCS ALLQDNIADA VACAKRVVRD
PQGIRAWAW RNRCQNRDVR QYVQCGV
>average mass = 16519

position sequence (NCBI BLAST link)
-----
81- 87 YWCNDGK
52- 59 WESGYNTR
141- 148 QYVQCGV
126- 131 AWWAWR
69- 80 STDYGIFQINSR
88- 115 TPGAVNACHLSCSALLQDNIADAVACAK

Protein Coverage: 69/148 = 46.6% by amino acid count, 7587/16519 = 45.9% by mass
Search SWISS-PROT with gil126615|sp|P00695|LYC_HUMAN via accession, descr./ID, or full text field.
Done.
    
```

Lysozyme C precursor

図9 尿路結石1から検出されたおすてリゾチームC (バンド8)

Lysozyme C precursor 69-80 (STDYGIFQINSR)

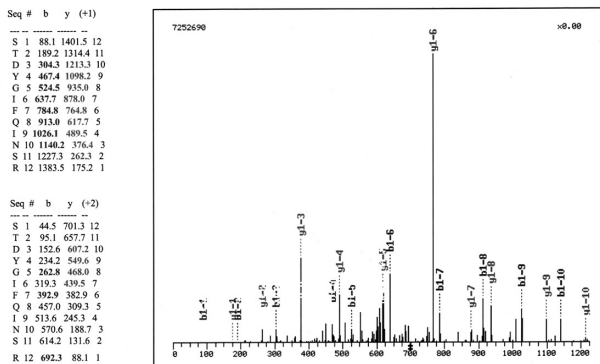
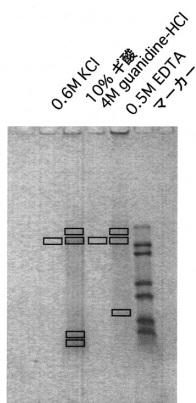


図10 Lysozyme Cに由来するペプチドのMS/MSスペクトル

SDS電気泳動図



検出されたタンパク質

0.6M KCl 画分

not detected

10% ギ酸 画分

Calgranulin A
Uromodulin
Albumin
Defensins

4M guanidine-HCl 画分

not detected

0.5M EDTA 画分

Osteopontin
Protein Z

図11 尿路結石2から検出されたタンパク質

は、タンパク抽出を0.6 mol/L KCl, 10%ギ酸、4 mol/L グアニジン塩酸、0.5 mol/L EDTAで別々の画分に分けて分析した。その結果、ギ酸画分にcalgranulin A、uromodulin、albumin、defensinsが検出され、EDTA画分にカルシウム結合性のosteopontin、protein Zが検出された。

VI. 測定結果のまとめ⁵⁾

尿路結石1は、シュウ酸カルシウム1水和物が主成分で内部に hidroksiapatite が含有されており、タンパク質としてはalbumin、uromodulin、osteopontin、protein Z、lysozyme、defensinsが検出された。尿路結石2はシュウ酸カルシウム2水和物が主成分であり、10%ギ酸画分からalbumin、uromodulin、calgranulin A、defensinsが、EDTA画分からosteopontin、protein Zが検出された。2つの尿路結石は結晶性成分に違いがあるものの、含有されるタンパク質は類似していた。一部、異なるタンパク質もあり、それらの役割について現在検討中である。

VII. おわりに

腎性低尿酸血症患者から得られた尿路結石の分析例を通して、高感度な機器分析法を紹介した。尿路結石を繰り返している症例においては、個々の結石から得られる情報がその原因物質の解析に役立つ可能性がある。

引用文献

- 1) 尿路結石症の疫学. p17-21 in尿路結石症診療ガイドライン, 日本泌尿器科学会, 日本Endourology・ESWL学会, 日本尿路結石症学会編. 金原出版, (2002)
- 2) 清水 徹: 痛風に合併する尿路結石症・腎障害. 特集「高尿酸血症・痛風Update」, 日本臨床, 66(4): 717-722, 2008
- 3) Felix Grases, Pilar Sanchis, Bernat Isern, Joan Perello and Antonia Costa-Bauza: Uric acid as inducer of calcium oxalate crystal development. Scand. J. Urol. Nephrol., 41: 26-31, 2007
- 4) 永田仁夫, 高山達也, 麦谷荘一, 大園誠一郎: 尿路結石の高分子物質. p169-170 in尿路結石症のすべて. 日本尿路結石症学会, 郡 健二郎編: 医学書院, (2008)
- 5) Kaneko K, Yamanobe T and Fujimori S: Analysis of urinary calculi complicated in a hypouricemic patient with the use of a micro area X-ray diffractometer and LC-MS. Urol. Res., 33(6): 415-421, 2005