

細胞膜トランスポーター定量技術に基づく薬物輸送研究の新展開

上 家 潤 一

Progress of Drug Transport Study Based on Absolute Quantitative Method
for Membrane Transporter Proteins

Junichi KAMIIE

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, SORST · JST,
6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan*

(Received November 15, 2007)

Knowing the amount of membrane transporter expression in human tissue is one of the key issues in the rational and reliable prediction of pharmacokinetic profiles in humans. Recently, we have developed a simultaneous and highly sensitive method for the absolute quantification of multiple membrane transporter proteins in mammalian tissues. To develop quantitative analysis of high molecular-weight membrane proteins, we have solved problems using proteomics technology as follows: 1) The target proteins are detected *via* tryptic peptides that can be dissolved and analyzed with LC-MS/MS, while membrane protein is difficult to dissolve. 2) LC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode produce a highly sensitive and selective response for transporter proteins with low expression by separation from highly abundant molecules. 3) Analyte specificity for each peptide was demonstrated in amino acid sequences using multiple MRM detection. Selection of the peptide probe was very important for highly sensitive analysis with LC-MS/MS. We set criteria for peptide selection using an informatics approach. Peptides without unstable residue, double basic residues, and integral membrane domain were selected as useful probes. The developed method will provide an inclusive assay platform for all transporter proteins expressed in both animal/human tissues and will contribute to progress in drug discovery and development.

Key words—membrane transporter; quantification; LC-MS/MS; Pharmaco proteomics; multiple reaction monitoring

1. プロテオミクス概説

1-1. プロテオーム研究 ヒトをはじめとする各種生物の遺伝子情報の整備と、質量分析計の技術革新はタンパク質の大規模解析を実現させた。生命現象をタンパク質全体（プロテオーム）のダイナミクスとして解明することを目的とし、質量分析計を利用した大規模なタンパク質同定法の開発が行われている。¹⁾ 特にタンパク質の酵素消化ペプチドを対象としたショットガン法と呼ばれる質量分析法は、従来困難とされてきた細胞膜タンパク質の解析に有用な技術である。タンパク質をプロテアーゼで消化し、消化ペプチド断片を測定対象とすることで、難溶性細胞膜タンパク質の性質に係わらず解析が可能

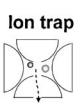

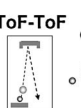
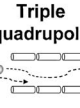
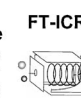
となる。効率よく消化するために、試料を7M グアニジン塩酸で変性させ、還元アルキル化したのちにプロテアーゼ処理を行う。²⁾ この操作により、システイン残基のチオール基を保護し、酸化などの副反応も阻害される。このショットガン方式は高感度で迅速なタンパク質解析法であり、適用できるタンパク質の等電点や分子量、可溶化条件などの制約が少ないため、細胞膜タンパク質を含めたほとんどのタンパク質に適用できる利点がある。ショットガン法を用いることで数千タンパク質の迅速な同定が可能である。²⁾ タンパク質セット全体を対象とするプロテオミクスアプローチは遺伝子機能を総合的に理解する上で重要であり、また、疾患マーカーのスクリーニング法として有効であると考えられる。しかし、現状では真に網羅的解析を行うには技術的限界があり、解析対象を限定したアプローチが取られている。プロテオミクス解析の技術的基盤である質量分析計には様々な種類があり、解析目的に応じて機種

東北大学大学院薬学研究科、日本科学技術振興機構
(〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

e-mail: kamiie@azabu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウム S30 で
発表したものを中心に記述したものである。

Table 1. Characteristics of Commonly Used Types of Spectrometers

					
特性					
質量精度	×	○	○	△	◎
感度	○	○	○	◎	△
ダイナミックレンジ	×	△	△	◎	△
イオン源	ESI	ESI, MALDI	MALDI	ESI	ESI
タンパク質解析における有用性					
同定	△	○	○	△	◎
定量	×	◎	○	◎	△

選定がなされる (Table 1). 今後も質量分析計のさらなる高感度化, 多機能化とそのタンパク質解析への利用法について技術開発が進むと考えられる.

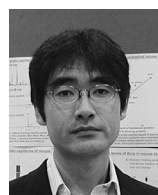
1-2. フォーカスドプロテオミクス 本来プロテオミクスはタンパク質の網羅的解析を目的としているが, 現段階では生体試料を構成するすべてのタンパク質を解析できる方法はない. 網羅的なタンパク質同定を主目的として発展してきた従来のショットガン法では, ハウスキーピングタンパク質等の多量成分に由来する強いノイズシグナルが優先的に分析され, 微量成分検出の障害となる. 微量発現タンパク質の検出は, 大規模解析において重要な課題である. そこで微量な構成タンパク質の解析法として, 特定のタンパク質群に焦点を当てた「フォーカスドプロテオミクス」と呼ばれるアプローチがとられている. 細胞膜やミトコンドリア等の特定の細胞小器官, 腎糸球体等の特定の構造体に焦点を当て, 前処理によって高純度に分画した目的構造物を構成するタンパク質の網羅的解析が行われている. また, リン酸化や糖鎖付加等の特定の翻訳後修飾タンパク質を選択的に濃縮し, 網羅的に解析するアプローチも行われている.

構造体を分画して解析するアプローチでは, 純度の高い試料を調整することが最も重要である. 腎糸球体を解析した例では, 従来法であるステンレスメッシュを用いたシーピング法で調整した糸球体を, さらにガラスキャピラリーを用いて顕微鏡下で単離して高純度糸球体試料を調整し解析している.³⁾ こ

れにより, 微細構造物であるスリット膜構成タンパク質を含む 6000 種類以上の糸球体構成タンパク質の同定に成功している. また, 細胞膜を対象とした解析では, 細胞膜表面をビオチンで標識したのちアビジンを用いたアフィニティー精製を行い, 細胞膜に局在するタンパク質を選択的に濃縮してプロテオーム解析を行っている. この方法では, 標識部位を同定することで, 細胞膜タンパク質の同定に加えて, 細胞膜への配向情報を得ることができる.⁴⁾

翻訳後修飾タンパク質群の解析では, アフィニティー精製と修飾部の安定同位体標識を組み合わせた方法が行われている. 糖鎖修飾タンパク質の解析では, レクチンアフィニティー精製と糖鎖修飾部位の安定同位体標識, 質量分析を用いたペプチド配列と修飾部位の同定が行われている.^{5,6)} レクチンは糖鎖配列特異的な結合を示すので, 複数のレクチンを用いて解析を行うことで, 糖タンパク質の糖鎖付加位置及び糖鎖配列情報を得ることができる. 線虫を試料とした大規模糖タンパク質解析例では, 3 種類のレクチンを用いて 829 タンパク質の 1465 ヶ所の糖鎖結合部位が決定されている.⁶⁾ これまでの個別解析で, 実験的に糖鎖付加部位が明らかにされているヒト糖タンパク質はわずか 154 種類であり, この糖鎖修飾タンパク質の大規模解析結果は生命科学におけるプロテオミクス技術がもたらしたブレイクスルーの 1 例であると言える. 翻訳後修飾解析において質量分析法は, 特異性, 網羅性に優れた有用な手法である. 今後はメチル化やアセチル化など他の翻訳後修飾についても特異的な解析法が開発され, 修飾部位の同定及び定量解析が進められていくと考えられる.

1-3. 相対定量的プロテオミクス タンパク質の網羅的同定だけではなく, 大規模なタンパク質の動態変化を定量的に解析する定量プロテオミクスが確立されている. 相対的定量プロテオミクスでは, 異なる 2 種類の試料を質量数の異なる安定同位体で



上家潤一

麻布大学獣医学部病理学研究室講師. 1999 年麻布大学獣医学部卒業. 新潟大学医学研究科博士課程修了, 東京都立大学理学研究科学術研究員, 東北大学薬学研究科助教を経て, 2007 年 11 月から現職. 獣医師, 医学博士. 現在のテーマ: 質量分析を用いたタンパク質解析技術の薬剤耐性癌研究への応用.

標識し、質量分析において質量差で区別されるシグナルの強度比を比較する。タンパク質試料の安定同位体標識法として、代謝標識法と化学標識法がある。

代謝標識法は安定同位体標識アミノ酸を含む培地で細胞を培養し、同位体標識する方法である。通常及び同位体標識アミノ酸の各培地で培養することで、構成タンパク質すべてに質量差を与える。比較対象の細胞を各培地で培養し、混合して酵素消化を行いペプチド混合物を質量分析する。

化学標識法は ICAT に代表される安定同位体標識試薬を用いて、抽出タンパク質試料を *in vitro* で標識する方法である。分子量の異なる Heavy 若しくは Light 同位体試薬で比較対象を別個に標識し、混合物を酵素消化し質量分析する。

代謝標識法、化学標識法いずれも 1 回の質量分析で 2 種の試料間のタンパク質発現差異が大規模に同定及び定量解析可能であり、タンパク質の differential display 法として有用である。

1-4. 絶対定量的フォーカスドプロテオミクス

相対定量的プロテオミクスは異なる試料に含まれるタンパク質の相対的な存在比を明らかにすることができるが、特定の対象タンパク質の絶対的な発現量を測定することはできない。また、検出原理はショットガン法であるため、微量分子解析には限界があった。この問題を解決するために、内部標準ペプチドを用いて特定のタンパク質を対象とし、特異的に解析する絶対定量的フォーカスドプロテオミクスが試みられている。

薬学領域では従来から低分子化合物の分析に、安定同位体標識体を内部標準として質量分析装置の selected reaction monitoring (SRM) モードで測定する質量分析法が用いられてきた。この定量原理は生体中の微量発現タンパク質の解析にも有用である。生体試料中の微量発現タンパク質を高感度に検出するためには、トリプシン消化で生成される膨大なノイズペプチドの中から、微量な対象ペプチドを特異的に検出する方法が必要であり、従来のショットガン法では限界があった。低分子化合物の定量分析に使用されている三連四重極型質量分析装置の SRM モードは、特定質量の親イオンを選択的にコリジョンセル中で破壊し、生成した娘イオンのうちさらに特定イオンのみを検出する。このモードでは、親イオン、娘イオンの両方をモニターするので

二重の質量フィルターをかけることになり非常に選択性が高く、夾雑物中の微量成分の検出に有効な測定法である。これを生体試料中のペプチド測定に応用することで、膨大なノイズ情報の中から特異的に対象ペプチドを検出することが可能となる。⁷⁾ さらに、同じ原理で複数の対象を同時測定する multiple reaction monitoring (MRM) モードでは、最大 300 分子の同時測定が可能である (4000QTRAP; Applied Biosystems)。

質量分析法ではペプチドの種類によってイオン化効率が異なるために、スペクトルのシグナル強度から直接定量することは困難である。そのため、安定同位体標識体を用いる内部標準法が用いられる。^{7,8)} 測定ペプチドと同配列の安定同位体標識ペプチドを内部標準物質として用いることで、タンパク質の同定と定量を同時に行うことができる (Fig. 1)。両者は化学的挙動が同一であり LC-MS/MS 分析において LC 溶出時間が一致し、質量差から質量分析装置によって分離検出される理想の内部標準物質である。既知量の安定同位体ペプチドを試料に添加し、LC 保持時間と質量値から対象ペプチドのシグナルを同定し、シグナル強度の比から試料中の対象ペプチドの絶対量を求める。MRM モードと安定同位体標識ペプチドを用いた定量法を組み合わせることで、多数の微量膜タンパク質の同時定量を行うことが可能である。われわれはこの技術を用いて、マウスの薬物トランスポータータンパク質 22 種類の同時定量法を開発し、マウス組織におけるトランスポーター定量プロファイルを初めて明らかにした。開発した方法は、10 fmol から 1000 fmol で直線性を示す高感度広範囲な実用的定量法である。この定量的フォーカスドプロテオミクスアプローチは特異的かつ高感度な汎用的タンパク質解析法であり、従来の ELISA に変わるタンパク質定量のスタンダードになることが予想される。

2. ファーマコプロテオミクス

2-1. トランスポーター研究における技術的課題

ヒトの薬物動態を考える上で、生体膜を介した輸送過程の理解は重要である。トランスポーターを介した担体介在輸送が薬物動態に大きく係わることが示され、薬物輸送に係わるトランスポーター研究の重要性が認識されている。理想的な体内動態を示す薬物の開発のために、ヒトの各組織におけるトラン

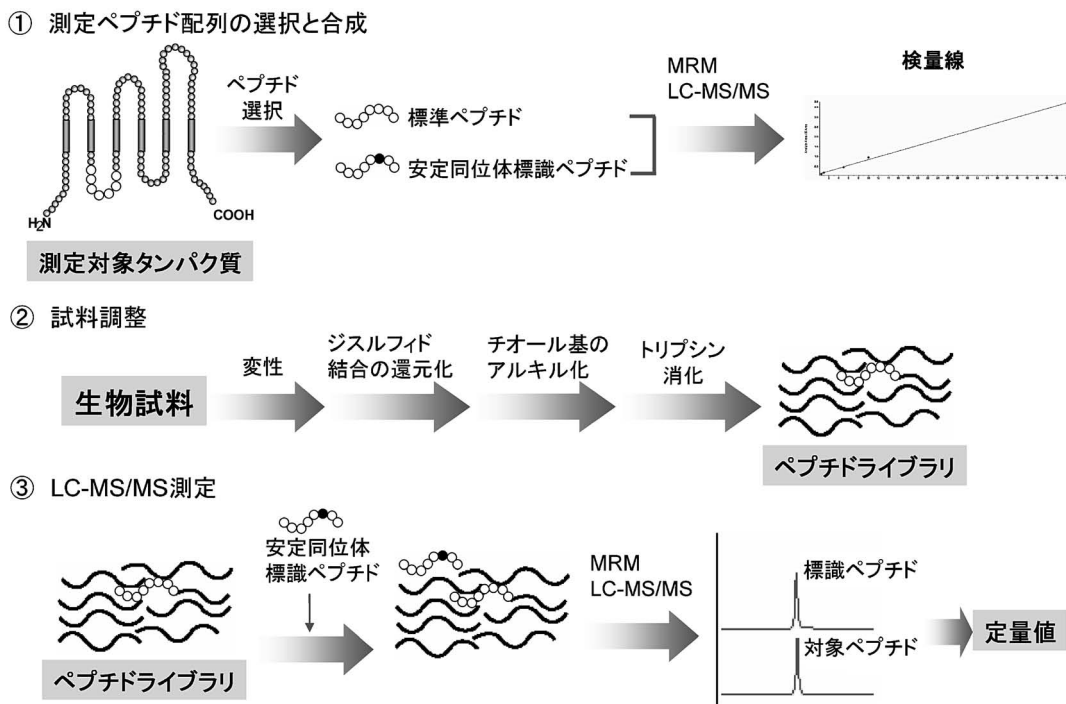


Fig. 1. Quantitative Strategy of Protein with LC-MS/MS

The peptides of target proteins for quantitative probes were selected by *in silico* selection criteria. The set of unlabeled and stable isotope labeled peptides were synthesized. The biological sample is digested with trypsin and known amounts of stable isotope-labeled peptides were spiked as internal references. The mixture is analyzed by LC-MS/MS in MRM mode. To yield a measure of target protein amounts, the peptides are quantified against isotope-labeled peptides by calculate peak area ratio.

スポンター活性の解明は重要な課題である。近年、膜透過性の *in vitro* モデルとして、種々のモデル細胞株及びトランスポーター遺伝子導入細胞が開発され、医薬品探索・開発のためのスクリーニングに利用されている。これらの *in vitro* モデルの最大の問題は、当該トランスポータータンパク質の発現量が不明である点である。さらにヒト組織のトランスポーターの発現量も不明である以上、これらの評価系を用いて、トランスポーターの基質となるかどうかを定性的に示すことができても、測定した値を *in vivo* に外挿することは不可能である。つまり、単分子輸送活性のパラメーターの算出が課題である。この課題を解決するには、トランスポーターのタンパク質レベルの発現量を測定する必要がある。個々のトランスポーター発現系と対象臓器のトランスポーターの発現量の情報を用いることが *in vivo* 輸送活性の外挿への最良の方法であると考えられる。

疎水性の高分子膜タンパク質であるトランスポーターは、可溶化を前提とする従来のタンパク質解析技術では発現解析は困難であり、これまで網羅的・定量的なタンパク質発現解析はほとんど取り組まれ

ることはなかった。前述の定量的フォーカスドプロテオミクスの手法はトランスポータータンパク質の定量に非常に有効である。本項では、質量分析装置を用いたトランスポータータンパク質定量技術を中心に、われわれの提唱する Pharmaco Proteomics を紹介する。

2-2. ヒトトランスポーターフォーカスド定量プロテオミクス 定量的フォーカスドプロテオミクスの手法は特異的抗体を必要とせずに難溶性細胞膜タンパク質を解析可能であり、トランスポータータンパク質の大規模定量解析に非常に有用である。ヒトゲノムにおいて ATP binding cassette transporter family 51 種, Solute carrier superfamily 280 種, 計 331 分子がトランスポーターに分類されている。⁹⁾ 原理的に、これらすべての分子について、酵素消化ペプチド配列を予測して定量プローブを作成し、質量分析法を用いたタンパク質定量系を確立することが可能である。しかし実際には、1タンパク質から数十-数百のペプチド断片が生成され、各ペプチドの LC 分離条件及びイオン化効率著しく異なるため、LC-MS/MS 測定に適したペプチド断片を選出

する必要がある。イオン化効率のよいプローブペプチドの選択が定量系の確立において最も重要である。通常、イオン化効率のよい最適プローブペプチドの選択のためにショットガン法等の大規模解析による予備検討が行われる。しかし予備検討には目的タンパク質を発現した生体試料若しくは強制発現系が必要であり、このアプローチ法を用いた大規模なヒトトランスポータータンパク質の最適プローブペプチド選択は現実的ではない。つまり、トランスポータータンパク質の大規模定量系構築において、ボトルネックになっているのは質量分析装置などのハードウェアではなく、最適プローブペプチドを効率よく選択するソフト面であった。そこでわれわれは、予備検討によらない *in silico* プローブペプチド選択法の開発に取り組んだ。過去に作成した定量プローブペプチドの質量分析におけるシグナル強度とアミノ酸配列に相関を見出し、質量分析に適したアミノ酸配列条件を抽出し、最適プローブペプチド選択クライテリアを構築した。このプローブ選定クライテリアは、質量分析装置の検出 m/z レンジ、ペプチドの化学的安定性、翻訳後修飾、トリプシン消化効率を考慮したものである(国際特許出願中)。本クライテリアを用いて選択したペプチドは human serum albumin の総ペプチドに比較して、質量分析において高感度であり、定量プローブとして有用であることが示された。さらに、選択クライテリアを組み込んだソフトウェアを開発し、最適プローブペプチド選択を自動化することでタンパク質量系確立のハイスループット化に成功した。実試料を用いずに *in silico* で最適プローブペプチド選択することで、ヒトトランスポーター 331 分子の定量系確立が可能となった。われわれはヒトトランスポータータンパク質 331 種すべての最適プローブペプチドを決定し、既に薬物トランスポーター 72 分子のプローブペプチドを作成し定量法を確立している(国際特許出願中)。本定量解析で得られるタンパク質量情報は、*in vitro* データと *in vivo* を連結可能とするものであり、将来の薬物動態研究と製薬産業を支える中心的な基盤になると考えている。

2-3. 創薬支援技術としての定量プロテオミクス

本来のプロテオーム研究は細胞若しくは組織に発現するタンパク質を網羅的に解析するものであり、生命現象の分子基盤を解明することを目標とする。

近年、病態に係わるタンパク質をハイスループットで網羅的に解析する疾患プロテオーム研究が盛んに行われている。特に、がんの早期診断を目標とする新規腫瘍マーカーの探索は、直接的に臨床と結びつく重要なテーマとして、多次元 LC や質量分析計を駆使した多様なアプローチが試みられている。しかし依然として、多量発現タンパク質に隠れた「有用な」微量タンパク質の検出は困難であるのが現状である。本シンポジウムで紹介したトランスポータータンパク質量法は、絶対定量法としてだけでなく、高感度タンパク質解析法としても優れている。すなわち、この定量法を用いることで、生命科学に有用な微量タンパク質の高感度定量解析が可能であり、トランスポーターに限らず、薬学領域において重要である代謝酵素、チャネル、レセプター、細胞間接着分子のタンパク質大規模プロファイル解析が実現可能である。われわれは、これらタンパク質群の質量分析法を用いた大規模定量解析を「Pharmaco Proteomics」と呼ぶことを提唱している。今後の創薬及び薬物動態研究の展開において、「Pharmaco Proteomics」を推進することが重要になると思われる。

これらの技術が医療、薬学分野において実践的に活用されるためには、DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイル技術のような簡便さが必要である。特に LC-MS/MS を用いた先端的なプロテオーム技術は、高度な技術と知識を必要とし、誰もが簡単に利用できるとは言いがたい。われわれの構築した定量法は、1) 開発したソフトウェアを用いた最適プローブペプチドの決定、2) プローブペプチド合成及び質量分析装置検出条件の最適化、3) タンパク質試料の前処理、4) 質量分析、5) データ解析の一連の過程からなる。従来の定量プロテオミクスで問題であったプローブペプチドの選択は配列選択クライテリアの構築、ソフトウェアの開発により解決された。5) データ解析が解析の律速段階となっている。本定量法では 1 分析当たり数千のクロマトグラムデータが得られ、このピーク波形解析を実験者が行っており、膨大な量のデータ処理を強いられる。この問題を解決するために、ピーク波形解析から定量値算出までを行うデータ解析ソフトウェアを開発中であり、データ解析が自動化されることで本定量技術が一般に普及する利用環境が整うと考えている。

3. おわりに

特異的抗体を用いた ELISA 法は従来のタンパク質定量のスタンダードであるが、特異的抗体の作成、可溶化条件等の検討に莫大な労力と時間を要し、特に細胞膜タンパク質への汎用的な応用は困難であった。われわれの開発した LC-MS/MS を用いたタンパク質定量技術は、抗体等の特異的結合プローブを必要としない汎用的方法であり、ELISA 法に代わる次世代のタンパク質定量のスタンダードになると考えている。本技術を用いて構築したヒトトランスポータータンパク質の大規模定量系はトランスポーター研究をこれまでの個別定性的研究から大規模定量的研究へとシフトさせるものである。トランスポータータンパク質絶対定量値は、*in vitro* データと *in vivo* を連結するパラメーターであり、ヒトの細胞膜透過性を高精度に予測する方法を開発する突破口になると期待される。また、トランスポーターの大規模定量データセットからこれまでの個別研究では得られなかった視点を見出し、さらなる新しい研究手法を開拓していくことがトランスポーター研究の発展に必要であると考えている。

謝辞 発表の機会を与えて頂きました大槻純男准教授（東北大学薬学研究科）、崔吉道准教授（共立薬科大学）に深く御礼申し上げます。本シンポジウムで紹介した研究成果は、東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野において得られたものであり、ご指導とご助言を賜りました寺崎哲也教授に感謝いたします。また、ヒトトランスポータータンパク質定量法の確立に御尽力頂いた勝倉由樹研究員、岩瀬 怜君、大峰 健君に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Aebersold R., Mann M., *Nature*, **422**, 198–207 (2003).
- 2) Taoka M., Yamauchi Y., Shinkawa T., Kaji H., Motohashi W., Nakayama H., Takahashi H., Isobe T., *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 780–787 (2004).
- 3) Miyamoto M., Yoshida Y., Taguchi I., Nagasaka Y., Tasaki M., Zhang Y., Xu b., Nameta M., Sezaki H., Cuellar L. M., Osawa T., Morishita H., Sekiyama S., Yaoita E., Kimura K., Yamamoto T., *J. Proteome Res.*, **6**, 3680–3690 (2007).
- 4) Nunomura K., Nagano K., Itagaki C., Taoka M., Okamura N., Yamauchi Y., Sugano S., Takahashi N., Izumi T., Isobe T., *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1968–1976 (2005).
- 5) Kaji H., Saito H., Yamauchi Y., Shinkawa T., Taoka M., Hirabayashi J., Kasai K., Takahashi N., Isobe T., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 667–672 (2003).
- 6) Kaji H., Kamiie J., Kawakami H., Kido K., Yamauchi Y., Shinkawa T., Taoka M., Takahashi N., Isobe T., *Mol. Cell. Proteomics*, Aug **30** (2007).
- 7) Barnidge D., Dratz E., Martin T., Bonilla L., Moran L., Lindall A., *Anal. Chem.*, **75**, 445–451, (2003).
- 8) Anderson L., Hunter C., *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 573–588 (2006).
- 9) Tsuji A., *J. Infect. Chemother.*, **12**, 241–250 (2006).