

選択的ショットガンプロテオミクス

Targeted Shotgun Proteomics

— 肝ミクロソーム中P-450の網羅的解析 —

— Exhaustive analysis of P-450 in liver microsomes —

財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

山中 秀徳
HIDENORI YAMANAKA

美濃部 安史
YASUSHI MINOBE

武吉 正博
MASAHIRO TAKEYOSHI

矢可部 芳州
YOSHIKUNI YAKABE

高月 峰夫
MINEO TAKATSUKI

Chemicals Assessment Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

1. はじめに

ヒトを含めた多くの種において、「生命の設計図」であるゲノム構造解析が次々と完了し、その成果が公表されている。ゲノム情報は動物の生物学の研究に大きな変革をもたらしつつあり、ゲノミクスをはじめトランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボノミクスと呼ばれる生体分子の網羅的解析研究の流れが生まれてきた。これらオミクス研究の中で個々の疾患発症メカニズム・治療ターゲット・疾患マーカーなどを明らかにすることを主眼とした疾患プロテオミクスが注目されており、疾病の予防や早期診断・治療への応用が期待されている。スクリプス研究所のYatesⅢらが提案した多次元クロマトとタンデム型質量分析装置とを組み合わせた多次元タンパク質同定技術 (Multidimensional Protein Identification Technology: MudPIT) を利用したショットガンプロテオミクスは現在最も強力なプロテオーム解析手法だが、定量的な解析には不向きといわれている¹⁾。MudPIT法に安定同位体ラベル法などを組み合わせた様々な改良が試みられているが、マーカー探索のために正確な定量比較を多くの検体間で行うことは依然として困難な状況にある。我々は、ショットガンプロテオミクスの長所である網羅性を維持したまま、バイオマーカーやマーカーパネル探索に必須の多検体間での正確な定量比較を効率的に実施するシステムとして“選択的ショットガンプロテオミクス”を提案している。システムの応用例としてラットおよびヒト肝ミクロソームのP450 (CYP) アイソフォームの解析を行った例を紹介する。

2. 選択的ショットガンプロテオミクスの特徴

プロテオミクス解析に必要とされる主要な要素として、網羅性、再現性と定量性が挙げられる。現在、網羅性の点で最も強力なプロテオーム解析システムは、前述したMudPIT法を用いたショットガンプロテオミクスである。ショットガンプロテオミクスでは、図-1に示したような強カチオン交換樹脂および逆相系樹脂を充填したマイクロキャピラリーカラム(100 μ m i.d.)をHPLCに装着し、カラムから直接LC-MSにスプレーする。YatesⅢらの検討では、ラット脳ホモジネートに対してMudPIT法を適用した場合に1,610種のタンパク質が同定されたと報告している²⁾。このうち454のタンパク質(28.2%)が膜貫通領域を有する膜タンパク質であり、これまで二次元電気泳動法などで解析するのが困難であった膜タンパク質の同定に対してMudPIT法が有効であることが証明された。しかし、同定された殆どのタンパク質で、ペプチド配列の照合に用いた範囲のシークエンスカバー率は20%以下と低かった。MudPIT法は、網羅性においては優れているが、再現性に難があり定量的な解析には不向きである。また、スループット化に関しても、質量分析装置を複数台導入可能な大規模施設以外では多検体の解析は不可能であるなど、バイオマーカー探索のためのシステムとしてのその使用は限定されたものであった。

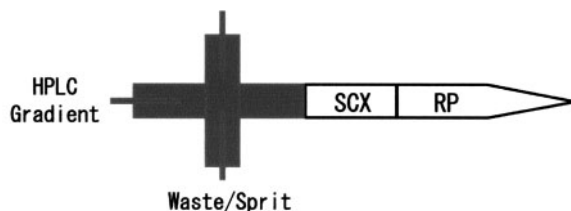


図1 多次元クロマトシステム

ショットガンプロテオミクス (MudPIT法) の解析フロー

ステップ1 : マイクロキャピラリーカラムに、全細胞溶解液フラクションである複雑なペプチド混合物をオフラインでロード。

ステップ2 : ペプチド混合物をロードした後に装置に装着し、ソフトウェアによりHPLCとMSを同時にコントロール。ロードしたペプチドは、最初に強カチオン交換樹脂から塩濃度勾配により逆相へ溶離させ、逆相樹脂から直接MSにスプレー。より高い塩濃度での溶離と逆相による分離を繰り返す。

ステップ3 : MS/MSデータをアルゴリズムによりタンパク質またはDNAデータベースと照合して同定する。

我々は、強カチオン交換樹脂からの塩濃度勾配による溶離が、MudPIT法において再現性を低下させている原因のひとつと考え、この強カチオン交換樹脂による分画の部分より信頼性の高い分画手法にすることでMudPIT法の網羅性を損なわずに、バイオマーカー探索に必要な定量比較が可能なシステムを構築可能と考え、下記に示したようなタンパク質同定システムを考案した。ステップ2の逆相分離以降の処理を同一とし、同一性能の質量分析装置を使用し、強カチオン交換樹脂と同程度の分画を実施すればMudPIT法と同レベルの網羅性が得られる。さらに、本システムの利点は、液相等電点分画のような再現性の高い前分画を実施することにより再現性を向上させただけでなく、フラクションに対して等電点に関する情報を付加できることである。本手法は、MudPIT法と同程度の網羅性を維持したまま、高い再現性が期待できるシステムでありバイオマーカー探索などには最適な手法と考える。

CERI*の選択的ショットガンプロテオミクス

* 財団法人化学物質評価研究機構

ステップ1 : 全細胞溶解液を液相等電点や溶解性に基づく分画などの手法を用いて前分画する。前分画後のタンパク質を混合物のまま、もしくはSDS-PAGEで分画したものを酵素消化する。

ステップ2 : ペプチド混合物を逆相樹脂で分離し直接MSにスプレー。

ステップ3 : MS/MSデータをアルゴリズムによりタンパク質またはDNAデータベースと照合して同定する。

3. 選択的ショットガンプロテオミクスによるP450アイソフォームの解析

薬物性肝障害の発症機序のひとつとして、P450(CYP)の分子種の遺伝的多型に起因する薬物代謝異常による肝障害や薬物相互作用による副作用が注目されている。たとえば、CYP3A4で代謝される経口避妊薬(エストロゲン製剤)は、CYP3A4を誘導するフェノバルビタールまたはフェニトインとの併用で、効果が減弱する可能性が指摘されている。CYPアイソフォームの解析は、今後、新薬の臨床試験における薬物相互作用の検討、個々の患者に対するオーダーメイド医療における診断等の目的に必須の技術となることが予想されている。CYPの質量分析装置による同定についても近年のプロテオーム解析技術の進展により、研究が急激に盛んになってきている。

現在、700種類以上のP450アイソフォームが細菌から哺乳動物までさまざまな生物で見つけられ、P450は遺伝子スーパーファミリーを形成している。ラットおよびヒトについては、Unigeneデータベース中に約50種類のP450アイソフォームが登録されている(<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>)。P450の各アイソフォームは非常に近い配列を有しており、この類似した構造を有することがP450の網羅的な解析をこれまで困難にせしめてきたことも事実である。

これに対して、近年質量分析装置の飛躍的な性能向上に伴い前述したショットガンプロテオミクスの手法を用いて、P450アイソフォームを直接質量分析装置で解析同定することが可能になってきている。最も多種類のP450アイソフォームを解析した例として、SDS-PAGEで分離したラット肝ミクロソームの分子量48-62kDaの画分のみをLC-MS/MS解析に供することにより24種類のアイソフォームを同定したことが報告されている³⁾。しかしながら、この分子量に基づく分画では網羅的な解析には不十分であった。

我々は、このP450が類似した一次構造をもつためにその物理化学的な性状も似てくることを逆に利用してP450の網羅的な解析を試みた。具体的には、肝ミクロソームを溶解性に基づいて5つのフラクションに分画し、各々の分画に対してLC-MS/MSを用いた一斉同定を試みた。この場合ほとんどのP450が、難溶解性の分画においてのみ検出されることが確認された。(表-1参照)難溶解性の画分に

P450が濃縮されることによって、これまで報告されている中で最も多い計36種類のCYPアイソフォームを同定することに成功した。また同定されたアイソフォームの中で分画の有無によるシーケンスカバー率の比較を図-2に示した。

表1 各フラクションで同定されたCYPアイソフォームの数

Solubility				
Low				High
Fraction1	Fraction2	Fraction3	Fraction4	Fraction5
29	17	4	0	0

本同定手法によりこれまでに報告されている中で最も多い36種類のCYPアイソフォームを含めて500種類以上の肝ミクロソーム中のタンパク質が同定された。本同定手法と安定同位体ラベル法とを組み合わせることで定量比較解析を行うことも可能である。

我々は、正確な定量比較手法として蛍光ディフレーション解析(2D-DIGE; GEヘルスケア社)を用いた詳細なプロテオーム解析も実施している⁴⁾。いくつかのCYPアイソフォームに関して、二次元電気泳動上の相当する領域で実際にCYPを同定している。CYPのように、目的に応じて解析したいタンパク質種が決まっている場合には、選択的ショットガン法を利用して全領域のタンパク質を同定し、実際に解析する二次元電気泳動上の領域を絞り込むのが効率的で有効な手法になると考えられる。

4. 今後の展望

まだ基礎的検討の段階であるが、プロテオーム解析の応用例としてCYPアイソフォームの解析を紹介した。紹介したプロテオーム解析手法は、網羅性を犠牲にせずに、マーカー探索に必須の定量比較の正確さも追及可能なシステムに拡張可能である。様々な前分画手法とショットガンプロテオミクス手法の融合(選択的ショットガンプロテオミクス法)を実施することにより、既存の方法と比較してより正確に且つ多くの有意義な情報を得ることが出来るようになると期待される。

参考文献

- 1) Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* **2001**, 19, 242-247.
- 2) Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE, Yates JR 3rd. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat Biotechnol.* **2003**, 21, 532-538.
- 3) Nisar S, Lane CS, Wilderspin AF, Welham KJ, Griffiths WJ, Patterson LH. A proteomic approach to the identification of cytochrome P450 isoforms in male and female rat liver by nanoscale liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* **2004**, 32, 382-386.
- 4) Yamanaka, H., Yakabe, Y., Saito, K., Sekijima, M., Shirai, T. Quantitative proteomic analysis of rat liver for carcinogenicity prediction in a 28-day repeated dose study. *Proteomics* **2007**, 7, 781-795.

(A)

Match to: CP2B1_RAT Score: 912
(P00176) Cytochrome P450 2B1 (EC 1.14.14.1)
Sequence Coverage: 44%

```

1 MEPTILLLLA LLVGFLLLLV RGHPKSRGNF PPGPRPLPLL GNLLQLDRGG
51 LLNSFMQLRE KYGDVFTVHL GPRPVVMLCG TDTIKEALVG QAEDFSGRGT
101 IAVIEPIFKE YGVIFANGER WKALRRFSLA TMRDFGMGKR SVEERIQEEA
151 QCLVEELRKS QGAPLDPTFL FQCITANIIC SIVFGERFDY TDRQFLRLLLE
201 LFYRTFSLLS SFSSQVFEFF SGFLKYFPGA HRQISKNLQE ILDYIGHIVE
251 KHRATLDPSA PRDFIDTYLL RMEKEKSNHH TEFHHENLMI SLLSLFFAGT
301 ETSSTTLRYG FLLMLKYPHV AEKVQKEIDQ VIGSHRLPTL DDRSKMPYTD
351 AVIHEIQRFES DLVPIGVPHR VTKDITMFRGY LLLPKNTEVYP ILSALHDPQ
401 YFDHPDSFNP EHFLDANGAL KKSEAFMPFS TGKRICLGEG IARNELFLFF
451 TTILQNFVSVS SHLAPKDIDL TPKESGIGK PPTYQICFSA R

```

(B)

Match to: CP2B1_RAT Score: 418
(P00176) Cytochrome P450 2B1 (EC 1.14.14.1)
Sequence Coverage: 27%

```

1 MEPTILLLLA LLVGFLLLLV RGHPKSRGNF PPGPRPLPLL GNLLQLDRGG
51 LLNSFMQLRE KYGDVFTVHL GPRPVVMLCG TDTIKEALVG QAEDFSGRGT
101 IAVIEPIFKE YGVIFANGER WKALRRFSLA TMRDFGMGKR SVEERIQEEA
151 QCLVEELRKS QGAPLDPTFL FQCITANIIC SIVFGERFDY TDRQFLRLLLE
201 LFYRTFSLLS SFSSQVFEFF SGFLKYFPGA HRQISKNLQE ILDYIGHIVE
251 KHRATLDPSA PRDFIDTYLL RMEKEKSNHH TEFHHENLMI SLLSLFFAGT
301 ETSSTTLRYG FLLMLKYPHV AEKVQKEIDQ VIGSHRLPTL DDRSKMPYTD
351 AVIHEIQRFES DLVPIGVPHR VTKDITMFRGY LLLPKNTEVYP ILSALHDPQ
401 YFDHPDSFNP EHFLDANGAL KKSEAFMPFS TGKRICLGEG IARNELFLFF
451 TTILQNFVSVS SHLAPKDIDL TPKESGIGK PPTYQICFSA R

```

図2 CYP2B1の分画前後のMS/MSデータの検索結果の比較

(A) 溶解性に基づく分画後の2B1アミノ酸シーケンスの中で同定されたペプチド(大文字で表記)
(B) 分画しない場合の2B1アミノ酸シーケンスの中で同定されたペプチド(大文字で表記)