

質量分析に基づくP-450タンパク質の多型解析



○山中秀徳¹⁾・堀内雅史¹⁾・武吉正博¹⁾・美濃部安史¹⁾

1) 化学物質評価研究機構

概要

CYPアイソフォームの解析は、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であり、CYPアイソフォームの質量分析装置を用いたプロテオーム解析研究が注目されている。CYPアイソフォームの網羅的解析では、CYPスーパーファミリーの1次構造が非常に類似していることが解析を困難にする要因の1つとして考えられるが、我々はこれまでの研究から、タンパク質の一次構造の類似性由来する物理化学的特徴を解析に利用することが可能であることを明らかにしている。具体的には、ヒトおよびラット肝ミクロソームを溶解性に基づいて分画した後に、各画分に含まれるタンパク質をMS/MSにより一斉同定することによって膜タンパク質であるCYPは難溶性画分に濃縮され、分画しない場合に比較して同定されるCYPアイソフォームの種類が飛躍的に増大するとともに、タンパク質同定の精度を示すスコア値、シーケンスカバー率も向上した¹⁾。今回、我々は質量分析に基づくアミノ酸配列のシーケンシングによってCYPアイソフォームの同定に加えて、タンパク質レベルで一塩基多型解析 (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) に対応する一アミノ酸置換 (SAPs: single amino acid polymorphisms) が検出可能であることを確認した。

実験

・LC条件
 カラム: L column Micro (75μmID×15cm, 3μm, 100Å)
 カラム温度: 室温
 移動相: A液 95/5 水/アセトニトリル 0.1%蟻酸
 B液 5/95 水/アセトニトリル 0.1%蟻酸
 流速: 2.5μL/min

・MSの条件
 MS測定はMasslynxソフトウェア(マイクロマス社)のサーベイモードで行った。
 キャピラリー電圧 3300 V
 コーン電圧 45 V
 Collision-induced dissociation (CID) ガス アルゴン
 コリジョンエネルギー 25-35 eV

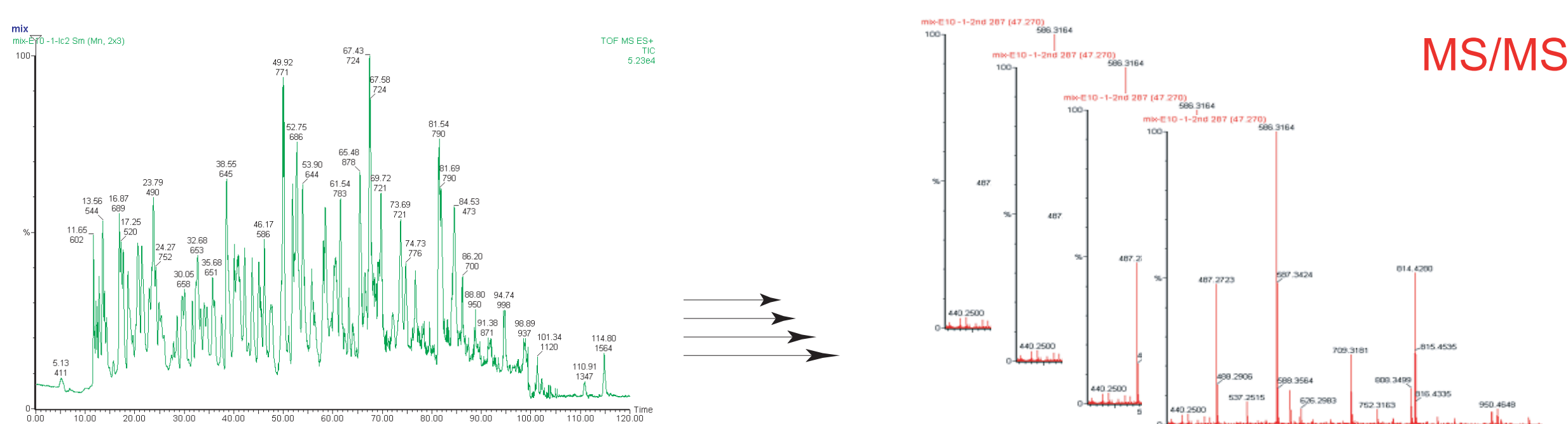
MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology)¹⁾

- Step1. サンプル中のタンパク質を混合物のまま酵素消化
- ↓
- Step2. SCX (Strong Cation eXchange)
- ↓
- Step3. RP (Reverse Phase) + ESI-MS/MS

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.

CERIの選択的ショットガンプロテオミクス

- Step1. タンパク質を液相等電点、溶解性などに基づく分画
- ↓
- Step2. ~~SCX (Strong Cation eXchange)~~
 SCXをスキップし直接LCで分析するか若しくは、再現性の高い分画手法(溶解性に基づく分画、液相等電点など)を使用する。
- ↓
- Step3. RP (Reverse Phase) + ESI-MS/MS



溶解性に基づく前分画

ラット肝ミクロソームの分画

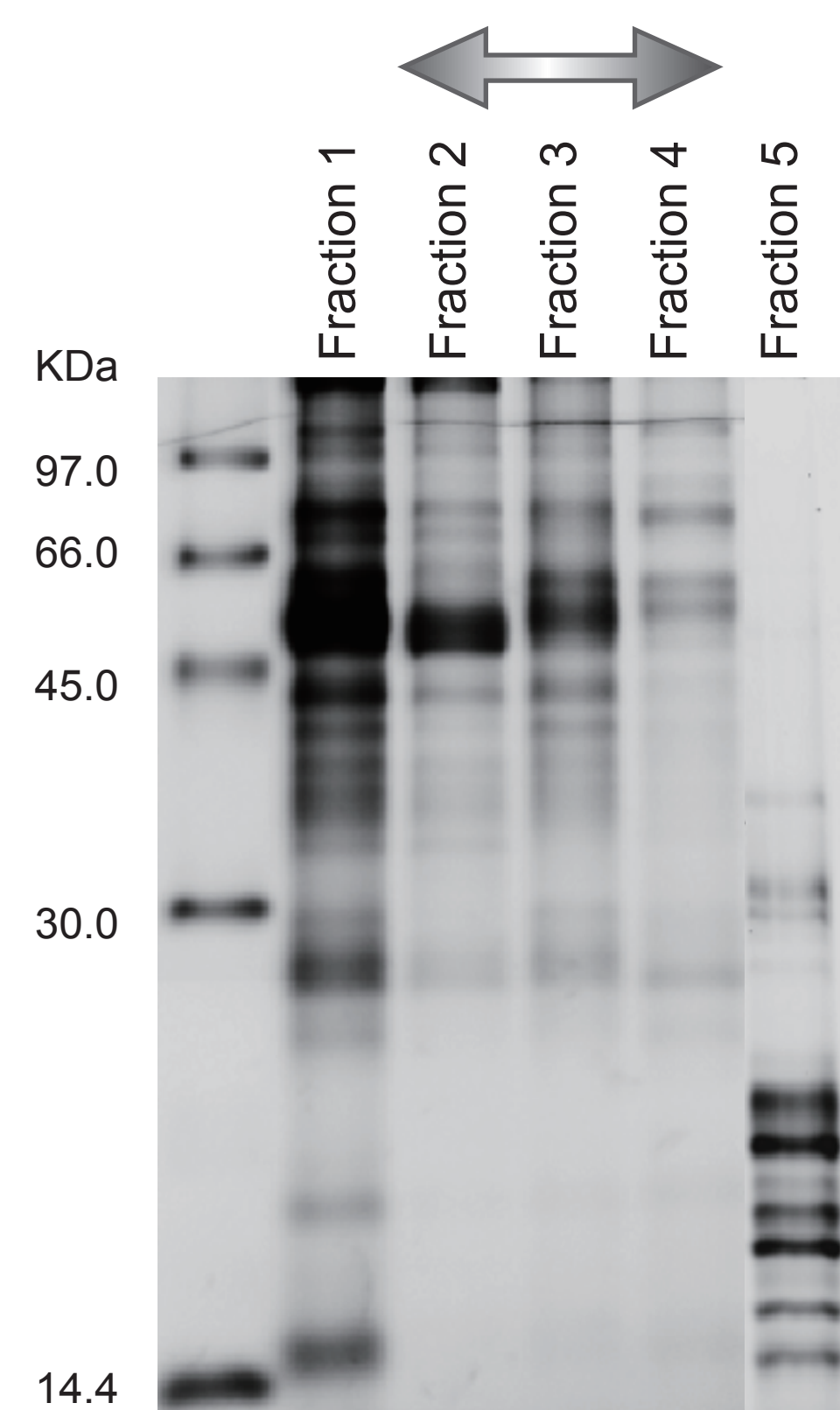


図-1. 溶解性に基づく分画後の各フラクションのSDS-PAGEゲルイメージ

多型情報DBの検索

UniProt - Swiss-Prot Protein Knowledgebase
 以下のデータベースを使用してMS/MSデータから多型を解析。
 Description:
 Human polymorphisms and disease mutations: index
 Name: humsavar.txt
 Statistics for single amino acid variants:
 Disease variants: 18949
 Polymorphisms: 21193
 Unclassified variants: 2062
 Total: 42204

結果

表-1. 各分画で同定されたP450アイソフォームの数

Low Solubility		High Solubility		
Fractoin1	Fractoin2	Fractoin3	Fractoin4	Fractoin5
29	17	4	0	0

(A) Match to: CYP2B1 RAT Score: 912 (P90178) Cytochrome P450 2B1 (EC 1.14.14.1) Sequence Coverage: 44%

(B) Match to: CYP2B1 RAT Score: 418 (P90178) Cytochrome P450 2B1 (EC 1.14.14.1) Sequence Coverage: 27%

図-2. 溶解性に基づく分画前後のCYP2B1のシーケンスカバー率の比較 (赤字がMS/MSで検出されたペプチド)

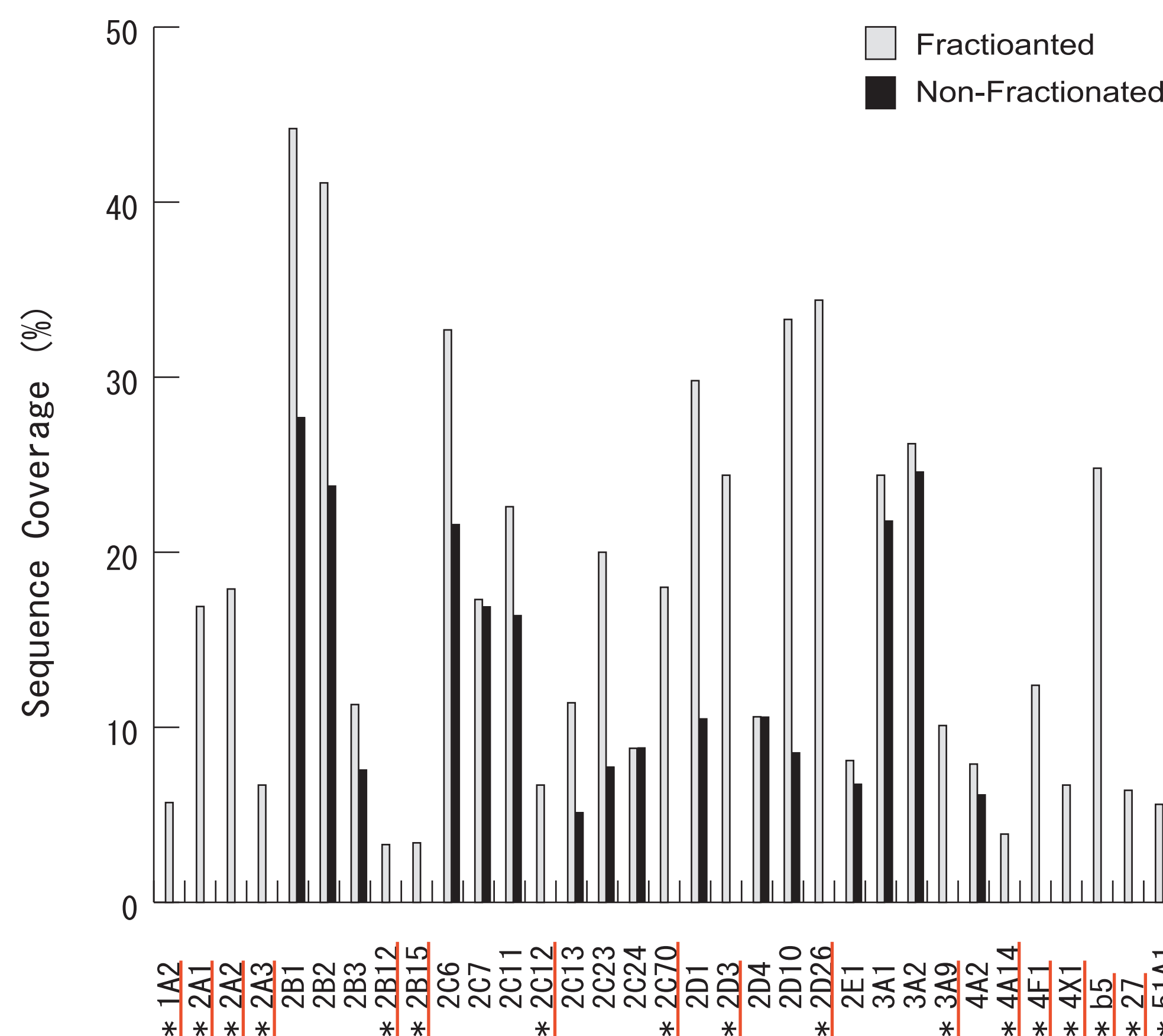


図-3. 溶解性に基づく分画前後のシーケンスカバー率の比較 (*分画後にもみ検出されたアイソフォーム)

表-2. 同定されたラットP450の一覧

- 1A1, 1A2
- 2A1, 2A2, 2A3
- 2B1, 2B2, 2B3, 2B12, 2B15
- 2C6, 2C7, 2C1 1, 2C12, 2C13
- 2C23, 2C24, 2C70
- 2D1, 2D3, 2D4, 2D10, 2D26
- 2E1
- 2J3
- 3A1, 3A2, 3A9, 3A18
- 4A1, 4A2, 4A10, 4A14
- 4F1
- 4X1
- 27
- 51A1

表-3. 同定されたヒトP450の一覧

- 1A2
- 2A6, 2A13
- 2C8, 2C9, 2C19
- 2D6
- 2E1
- 3A3, 3A4
- 4A1 1
- 4F2, 4F1 1
- 51A1
- 8B1

ヒトの薬物代謝において主要な4つのアイソフォーム (1A2, 2D6, 2E1, 3A4) を含む15種類を同定。

これまで報告されている中で最も多い35種類のラット P450 アイソフォームを同定

MS/MSデータに基づく多型解析

CYP2C19の以下の2つのSAPが、MS/MSデータ解析から直接検出された。

表-4. タンパク質多型の解析結果

prot_acc	prot_desc	prot_score
P33261-00-18-00	Isoform Displayed; Variant allele CYP2C19*11; Conflict Displayed; of P33261 - Homo sapiens	102
P33261-00-04-00	Isoform Displayed; Variant allele CYP2C19*18; Conflict Displayed; of P33261 - Homo sapiens	81

CYP2C19*11	Structural information on the variant	130 TLNFMGMRKRSIEDRVQEEA R CLVEELRKTAKSPDCDPTFIL 170
	Location on the sequence	↓ H
CYP2C19*18	Structural information on the variant	309 ALLLLLKHPEVIKRVQEEIE R VVGRNRSFPCMDRGRHMPYTD 349
	Location on the sequence	↓ H

まとめ

今回、我々は肝ミクロソームタンパク質の溶解性に基づく分画を実施した後、難溶性フラクションのLC-MS/MS解析による一斉同定を実施し、CYP2C19の2種類のSNPsを直接的に同定した。

肝臓中に発現しているP-450は、多くの医薬品の代謝に重要な役割を果たしているが、その発現量および活性には大きな個人差が存在する。定量プロテオーム解析が、SNPs、マイクロサテライトの解析に加えてオーダーメイド医療の実現へのキーテクノロジーに発展すると期待される。

参考文献:

1) Yamanaka, H., Takeyoshi, M., Minobe, Y., Yakabe, Y., Takatsuki, M., Sato, H., *Drug Metabolism Letters*, 1, 281-286 (2007)