

知識天地

多組化膜蛋白體定量策略：探索自體顯性遺傳之多囊性腎疾病的藥物標的蛋白質

陳玉如副研究員（化學研究所）

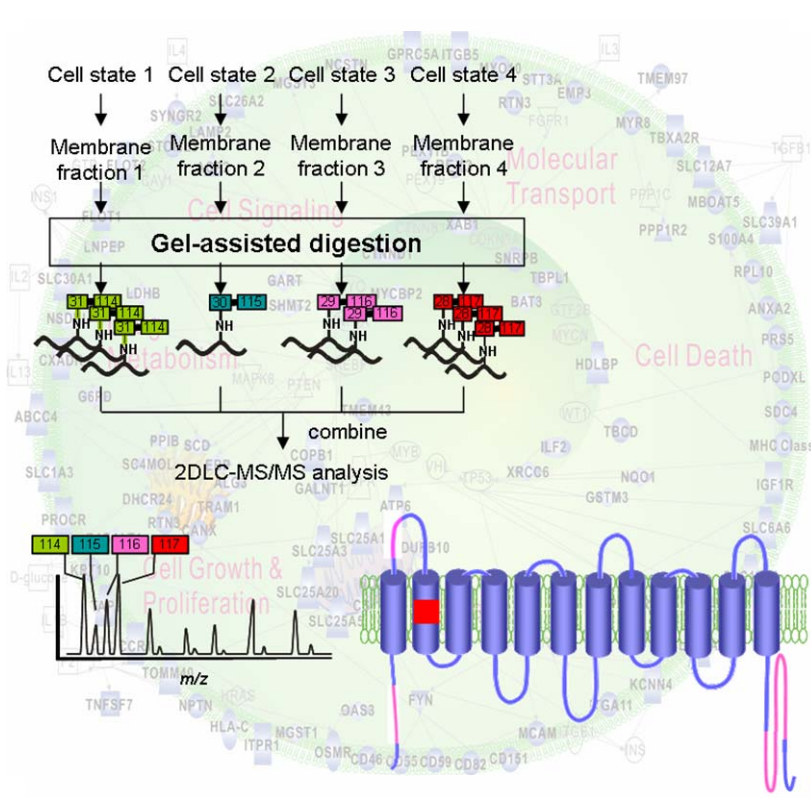
摘要

許多膜蛋白質的異常表現被報導和疾病相關，因此，全面性地定量膜蛋白體可增進我們對膜蛋白質調控疾病的機制及其訊息傳遞的了解。我們實驗室針對膜蛋白體提出新穎多組化膜蛋白體定量策略，並應用於具有自體顯性多囊性腎臟病的小鼠，找出104個異常變化的蛋白質，其中有部分蛋白質已被使用為治療此疾病的藥物標的分子。藉由此定量平台的研究不僅闡釋了疾病之可能致病機制，也發現其他可能被使用於治療或診斷疾病之標的蛋白質。

細胞膜是細胞的基本組成物質之一，膜蛋白質介於細胞與外界溝通的介面，掌控了很多重要的細胞功能，例如：訊息傳遞、細胞間交互作用、吸收和分泌物質等；此外膜蛋白質與新藥開發及製造有密切的關係，也是許多疾病在臨床診斷與治療的標的分子，目前市面上的藥物有三分之二即是針對膜蛋白質所研發而來，儘管膜蛋白質在細胞中扮演重要的角色，但不論在生化特性、結構及拓撲學（topology）上的研究卻嚴重缺乏，造成此現象之原因在於膜蛋白質具有高疏水性及低含量的特性，使得膜蛋白質在樣品製備、處理、分離及分析上有許多的限制，造成膜蛋白質研究的困難。

近10年來，由於幾種重要的生物基因體定序陸續完成，蛋白體學成為後基因時代生命科學領域最重要的課題之一，以質譜為主的技術平台已成為研究蛋白體學的主力工具之一。質譜技術能對大量蛋白質進行快速、靈敏的鑑定及定量分析，對蛋白體學的研究造成革命性的衝擊，但是在進行質譜儀分析前所需要的膜蛋白純化、溶解及分離仍然是一大瓶頸，要得到全面的膜蛋白體分析更是困難。現今常用的膜蛋白體定量分析方法可分為：以凝膠技術為主及以液相層析技術為主的兩大方向，搭配質譜儀的分析便可解析出一生物體的膜蛋白質，這兩類方法各有不同的優劣，可依不同實驗需求來選擇適當方法。

在凝膠技術上最常見的是二維膠體電泳法(two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)或是二維螢光差異膠體電泳法 (2-D fluorescence difference gel electrophoresis)。分析物以2DE分離，利用影像分析找出表現量變異的點，經由in-gel digestion後得到的肽以質譜儀分析，再與蛋白質資料庫比對即可鑑定其中的蛋白質，此方法是目前蛋白體研究上最被廣泛應用的技術。在膜蛋白體的研究上，早在1979年時Charron等人成功地以2DE分離了人類B細胞的膜蛋白質¹；Jang等人也在2003年也以2DE分離血癌病人的B細胞群的膜蛋白體了解病人的膜蛋白體變化²，以便藉此研究藥物治療的標的蛋白質。雖然2DE可以提供完整的蛋白質地圖，幫助我們瞭解蛋白質表現、異構物組成及轉譯後修飾程度的變化，但2DE的許多缺點限制了其在膜蛋白體的應用，包括對於高酸性或鹼性的蛋白質及分子量極小或極大的蛋白質無法有效的分離、實驗流程耗時、實驗重複性差；此外，因為受



限於染色技術的靈敏度或是樣品中含有大量高含量蛋白質，低含量蛋白質將難以偵測；而疏水性的膜蛋白質因為溶解度差，不容易在膠體上出現，即使如此，2DE仍然是分析膜蛋白質的主要工具之一，但相較於其應用在細胞質蛋白質體上的研究，2DE在膜蛋白質的成果仍是遠遠落後。

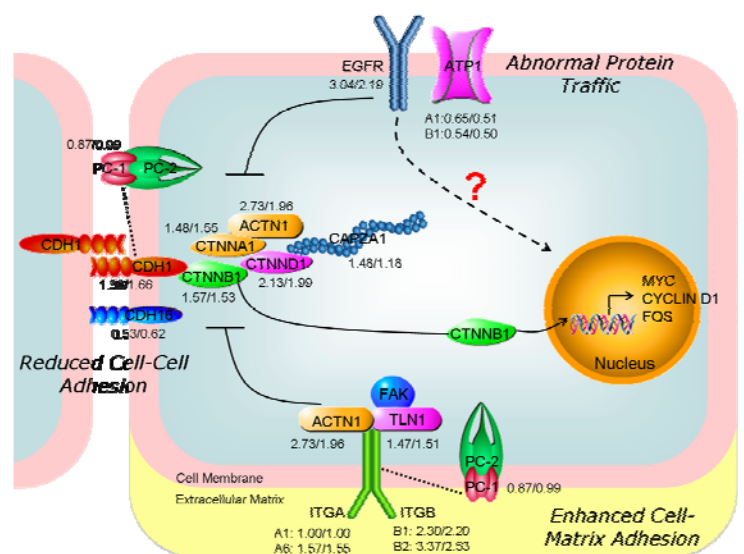
液相層析法配合串聯式質譜儀(LC-MS/MS)可以解決許多2DE分析的限制，尤其是奈流毛細管液相層析質譜(nanoflow LC-MS/MS)的應用顯著地增加蛋白質體分析的速度與靈敏度，並可達到自動化及高通量(high-throughput)的目的。實驗流程為：蛋白質樣品溶於適當的溶劑後，直接在液相中進行酵素水解，得到的混合物利用離子交換層析管柱和逆式液相層析管柱分離，接著進入質譜儀分析，並與蛋白質資料庫比對後可鑑定蛋白質。由於膜蛋白質具有高疏水性的特點，我們常利用介面活性劑（如：SDS）來使膜蛋白質達到有效的溶解，但高濃度的介面活性劑易使水解酵素（如：Trypsin）的活性降低造成蛋白質水解反應不完全，也會干擾逆式液相層析管柱的分離效率和蛋白質鑑定的可信度，所以，許多科學家們針對膜蛋白質開發出不同的蛋白質水解技術，例如Tube-Gel水解法³及甲醇輔助液相水解法⁴等。在蛋白質定量方面，搭配同位素標定法，例如：ICAT⁵ (Isotope-coded affinity tags)、SILAC⁶ (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture) 和iTRAQ⁷ (Isobaric tag for relative and absolute quantitation)；或者直接利用質譜訊號即可進行蛋白質的相對定量。

我們實驗室專注於針對膜蛋白質開發新穎定量技術，並於2008年提出多組化膜蛋白質體定量策略平台（圖一），此平台結合本實驗室發展之膠體輔助蛋白質水解法及iTRAQ定量試劑，目標為達到(1)提高可鑑定及定量的膜蛋白質數量、(2)增進具有穿透雙層膜之高疏水蛋白的定量效率以及(3)可相容於不同的溶解試劑並適用於各式各樣的生物樣品。

由於iTRAQ定量試劑是在肽片段上進行同位素試劑之標定，所以，有效地使膜蛋白質溶解、變性及水解對iTRAQ定量具有關鍵性之影響。為了找出最適合膜蛋白質的水解方法，我們實驗室新開發一膠體輔助蛋白質水解法，並將此方法與過去已發表可有效水解膜蛋白質的其他方法互相比較，在嚴謹的蛋白質鑑定條件下，有75、34、26及19個膜蛋白質分別在膠體輔助蛋白質水解法、Tube-Gel水解法、SDS輔助液相水解法及甲醇輔助液相水解法中被鑑定，此結果證實本實驗室新開發之膠體輔助蛋白質水解法為針對膜蛋白質之最佳水解方法。我們接著利用四次等量且獨立製備的細胞樣品測試此平台的再現性，實驗中鑑定的所有蛋白質表現 (Mean=1.08) 皆與理論值十分接近，且平均標準偏差為0.12代表著此定量平台的高再現性及高準確性。依據統計理論，我們定義1.5倍以上的表現量變化具有統計意義。

為了能夠大量地定量膜蛋白質體，此平台使用多維化肽分離技術來降低樣品的複雜度。我們藉由獨立純化之膜蛋白樣品及此平台來深入探討本實驗室所開發之膠體輔助蛋白質水解法與最常被使用的 SDS 輔助液相水解法對於膜蛋白質的水解效率，同時，我們也檢視此多組化定量平台的定量效能。在實驗結果中，我們定量了 696 個蛋白質（錯誤率=0%），利用 TMHMM 預測軟體以及 Ingenuity Pathway Analysis 分析所有蛋白質後，得知此次實驗總共定量了高達 520 個膜蛋白質（91%，扣除未知蛋白質），據我們所知，此結果為現今分析膜蛋白質數量及涵蓋率最高的記錄，在定量的精確度及精準度也超越現今其他定量方法！

經過蛋白質結構預測分析所定量的膜蛋白質後，顯示膠體輔助蛋白質水解法可以更有效地溶解具有多個 TMH 的高疏水性膜蛋白質，增加了穿透膜肽片段的偵測率。經由蛋白質位置的分類後，我們發現產率增加 1.5 倍以上的蛋白質主要皆為膜蛋白質（86.1%，扣除未知蛋白質）。整體而言，結果顯示膠體輔助蛋白質水解法的確能夠有效的水解膜蛋白



質，增加其勝 的偵測率，並且提高了 iTRAQ 定量的成功率。

最後，我們與本院分生所的李鴻研究員合作，進一步將此技術平台應用在自體顯性多囊性腎臟病（Autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD）的小鼠模式。雖然此疾病是腎臟疾病中最常見且最容易致命的遺傳疾病，然而其疾病的蛋白質表現與病理機制之關係仍有待釐清，我們希望能藉由多組化膜蛋白體定量平台找出和老鼠腎臟病變有關的膜蛋白質。經過分析正常鼠及病鼠的腎臟細胞膜蛋白體後，我們成功定量了 791 個蛋白質，其中 67 個及 37 個蛋白質為大於兩倍增加及減少的變異蛋白質，有部分的變異蛋白質在過去曾被報導與 ADPKD 相關，這些蛋白質參與了包括細胞增生及死亡、細胞與細胞之間或者細胞與介質間的溝通、溶質運輸和膜蛋白質極化等功能（圖二），在這些變異蛋白質中，有部分蛋白質已被證實為藥物標的運輸及受體蛋白質，例如 EGFR、COX 及 Na^+/K^+ ATPase 已被證實可有效治療 ADPKD；另外有部份蛋白質則被使用於其他疾病的治療上。此一新的定量平台不僅可幫助我們了解 ADPKD 的致病機制，也找到數個可能作為藥物標的之膜蛋白質。我們相信此技術平台能有效且全面性地分析及定量膜蛋白質體，可應用於各種不同刺激狀態或病理的生物系統及細胞、組織及體液等各種樣品，幫助我們瞭解疾病的致病原因、找出有效診斷及治療的生物標的蛋白質！

論文發表於 *Molecular & Cellular Proteomics* 7: 1983-1997, 2008

References

1. Charron, D.J., McDevitt, H. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 6567-6571.
2. Jang, J. H., Hannash, S., *Proteomics* 2003, 3, 1947-1954.
3. Lu, X. N., Zhu, H. N., *Mol. Cel. Proteomics* 2005, 4, 1948-1958.
4. Zhang, N., Chen, R., Young, N., Wishart, C., Winter, P., Weiner, J. H., Li, L., *Proteomics* 2007, 7, 484-493.
5. Ramus, C., de Peredo, A. G., Gallagher, M., Garin, J., *Mol. Cel. Proteomics* 2006, 5, 68-78.
6. Beynon, R. J., Pratt, J. M., *Mol. Cel. Proteomics* 2005, 4, 857-872.
7. Ross, P. L., Huang, Y. L. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D. J., *Mol. Cel. Proteomics* 2004, 3, 1154-1169.