知識天地

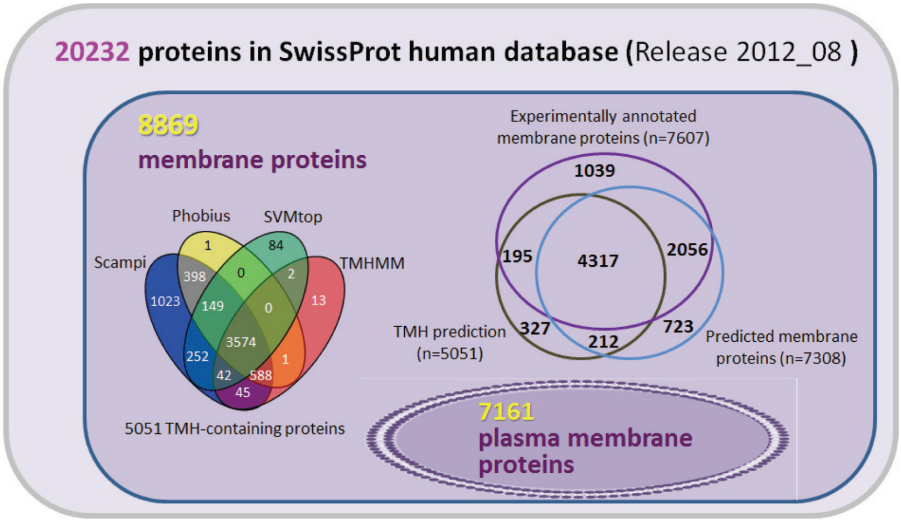
膜蛋白質體學於轉譯醫學上的技術開發與應用

陳玉如研究員、韓嘉莉博士後研究員（化學研究所）

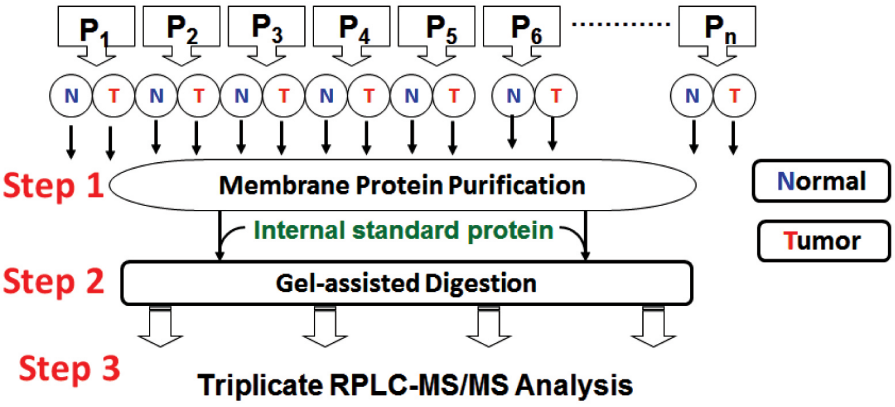
根據世界衛生組織（WHO）於今年二月發佈最新報導，2008年癌症已是全球首要的死亡主因，每年約有760萬人死於癌症，占總死亡人數的13%，在臺灣，惡性腫瘤更是多年蟬聯國人十大死因之首；雖然現今治療技術已有大幅進步，但病人多在癌症後期才被診斷發現，接受治療後較容易產生癌細胞轉移及復發機率高，使得癌症的致死率仍居高不下，癌症的早期診斷及有效個人化治療為人類健康永續的積極策略，開發早期癌症診斷的生物標記物（biomarker）是刻不容緩的任務。生物標記物意指能反映生理狀態或疾病發生及進展的生物分子，以癌症為例，生物標記物可以用於診斷或預後、預測藥物治療的生理反應，及評估用藥之有效劑量或治療效果。

細胞膜是細胞與外界的屏障，不僅為細胞內外物質運輸的通道和橋樑，調控細胞內的物質平衡，同時也是接受外界信號進而啟動細胞內下游傳遞訊息的重要胞器，掌控廣泛的生理功能。在分子的微觀層面，細胞膜上的膜蛋白質能啟動各種生物學途徑，調控重要的細胞功能，例如細胞間交互作用、物質運輸、能量轉換、訊息接收、識別和傳遞的作用，因此許多膜蛋白質的異常表現被報導和疾病相關或為藥物治療的標靶蛋白質。以癌症為例，現今在臨床上使用的癌症標記分子大多數為膜蛋白質，例如用於診斷卵巢癌的CA 125、大腸直腸癌的預後標記分子-CEA、以及用於診斷乳癌或監測癌細胞是否轉移的HER2/Neu與CA 15-3/CA 27.29。此外，膜蛋白質與新藥開發有密切的關係，大多數藥物通過與膜蛋白質結合或活化而起作用，是許多疾病在臨床治療的標的分子，根據Yildirim等人發表的報導(1)，美國食品藥物管理局（FDA）在1996-2006年所核准的藥物中，約有三分之二臨床使用的藥物標靶為膜蛋白質。

雖然人類基因體已定序完成（約25,000基因），我們目前仍不清楚人類蛋白質體中的蛋白質總數，以現今註記較完整也是較多學者使用的人類蛋白質資料庫（UniProtKB/Swiss-Prot）為例，此資料庫內存有20232筆蛋白質資料，我們分析每個蛋白質細胞內位置分析，並利用蛋白質序列進行訊號胜肽（Signal peptide）以及穿膜螺旋（Transmembrane helix，TMH）之結構分析，此結果顯示有5051個蛋白質屬於跨膜蛋白質；再交叉比對各式資料庫（包括Gene Ontology、Human Protein Atlas及Human Protein Reference Database）或結構預測所有蛋白質的細胞內位置可得知，人體內至少有將近9000個膜蛋白質，其中高達7161個是細胞膜蛋白質，約佔整個蛋白體資料庫的35%（圖一），顯示這是一個蘊藏潛力的機會，有待我們從這些多數未知的膜蛋白中開發新穎的疾病檢測或藥物標靶蛋白質，增進對膜蛋白質調控疾病的機制及其訊息傳遞的了解。雖然膜蛋白質具有重要的生理功能，基於其高疏水性及低含量的特性，膜蛋白質在純化、樣品處理、分離及分析上有諸多限制，



圖一、現有蛋白質資料庫中可能存在的膜蛋白質。



圖二、適用於臨床樣品分析之資訊輔助免標定定量策略。

使其生化特性及結構的研究嚴重缺乏。上述統計中，只有約77%膜蛋白質具有實驗證據，高達23%的膜蛋白質只有基因資料並無實際表現之證據，開發有效工具分析膜蛋白質為一個高挑戰性課題。

在人類基因體計畫完成後，這大量的基因序列訊息提供疾病研究一個全新的基礎，可了解基因和各種生理階段或病程狀態的關聯性。相較於基因，蛋白質往往才是執行功能的關鍵分子，因此當Mark Wilkins於1995年提出「蛋白質體學」（proteomics）的概念後，此新的工具被廣泛應用於臨床醫學課題，可針對組織、體液、細胞中的所有蛋白質作快速、靈敏定性與定量分析，幫助我們了解蛋白質表現、作用網絡及轉譯後修飾程度在正常和疾病狀態下的差異，希冀發展成早期診斷檢測或新穎藥物標靶蛋白質。質譜技術為研究蛋白體學的主力工具之一，但是在進行質譜儀分析前所需要的膜蛋白純化、萃取及水解仍然是一大瓶頸，要得到完整的膜蛋白體定量分析更是困難。為了克服這些挑戰，許多科學家便針對膜蛋白質開發各種不同純化及水解方法，常見的純化方法有蔗糖密度梯度搭配超高速離心、液相萃取法，以及利用抗體與抗原、生物素（biotin）與抗生物素蛋白（avidin）、凝集素（lectin）與特定細胞表面醣分子的親和吸引力來純化細胞膜蛋白質。膜蛋白體定量分析方面，現今常用的方法可分為凝膠技術及液相層析技術為主的兩大方向。二維膠體電泳法（two-dimensional gel electrophoresis, 2DE）為早期膜蛋白體研究上最被廣泛應用的技術(2)，但2DE具許多缺點，包括對於高酸性或鹼性及分子量極小或極大的蛋白質無法有效分離、實驗流程耗時及重複性差；此外，疏水性的膜蛋白質因為溶解度差，限制2DE在膜蛋白體的分析效率。以液相層析為主之蛋白質體分析技術又稱為多維化蛋白質鑑定技術，先將膜蛋白質進行水解後得到胜肽混和物，再利用不同功能的液相層析串聯質譜儀，搭配使用同位素標定或者免標定之定量技術，可以同時偵測數千個蛋白質的變化量。

在過去的文獻中，已有研究團隊透過膜蛋白體定量分析策略尋找癌症標記分子，Liu等人(3)使用細胞培養下穩定同位素標記技術（Stable isotope labeling using amino acids in cell culture，SILAC）分析低轉移性及高轉移性的皮膚惡性黑色素瘤細胞株的細胞膜蛋白體，從中發現CDCP1在高轉移性的細胞株中大量表現，並且透過活化Src激酶使癌細胞轉移，顯示CDCP1可能作為癌細胞轉移的細胞表面標記分子。Muraoka等人(4)結合另一型同位素標記定量法（isobaric tags for relative and absolute quantitation，iTRAQ）與Selected Reaction Monitoring（SRM）質譜法，進行癌症標記分子的開發與驗證，在高風險與低風險的乳癌病人組織中成功鑑定5122個蛋白質，包括2480個膜蛋白質，並且找出61個在高風險及低風險病人中具有差異表現量的細胞膜蛋白質，再使用SRM質譜法進行更多病人樣品的驗證，除了確認10個已報導過與乳癌相關的高度表現膜蛋白質，也驗證另外5個有可能成為乳癌預後標記分子的細胞膜蛋白質。

我們的研究團隊長期致力於開發以質譜為主力之蛋白質異常表現及轉譯後修飾的高效能蛋白體學分析平台，尤其專注於針對膜蛋白體開發新穎定量技術，為了尋找癌症標記蛋白質，我們開發一套簡單的資訊輔助免標定定量策略(5)，結合由我們實驗室開發的膠體輔助蛋白質水解法、高效能液相層析串聯質譜法以及生物資訊等技術。在大腸直腸癌的個案研究裡，我們分析及比較28個來自不同期別大腸直腸癌病人的癌症與配對正常組織，此策略有效測定856個蛋白質的濃度變化，和先前多數研究均以混合多個病人檢體之分析相比，此平台的特色在於可以個別比較同一個病人的正常和癌症組織之膜蛋白質表現，降低因為個體差異所造成之誤差。在多數病人（71%）之癌症組織都有過量表現的蛋白質中，包括現今臨床檢測使用中的臨床標記CEA，顯示此技術的高靈敏度。本工作中最重要的發現在於找出STOML2蛋白質的過量表現在大腸直腸癌症組織有高發生率（86%），為具有診斷大腸直腸癌或預後潛力的新癌症標記蛋白質。經由205對組織及70個病患血液檢體的進一步驗證，STOML2的高量表現與大腸直腸癌的低存活率成正相關，具有STOML2高表現量的病人的平均存活時間為34.77±2.03個月；而具有STOML2較低表現量的病人則提高為53.67±3.46個月，顯示STOML2作為預後標記蛋白質之潛力。經由酵素免疫法分析血液檢體之結果，相較於正常人，STOML2在早期大腸直腸癌病患的血液中亦具有高量表現（$p<0.001$），利用STOML2用於診斷大腸直腸癌的整體靈敏度為71%，與CEA合併測量可將整體靈敏度提高為87%，並可提高早期大腸直腸癌病患之檢測靈敏度（69%），此數據顯示STOML2可能作為早期診斷大腸直腸癌的非侵入性生物標記，有助於改善目前CEA無法有效診斷早期大腸直腸癌之困境。

在微觀層面，許多疾病的發生往往反映出或源自許多蛋白質的變化，從單一蛋白質的研究跨越至臨床蛋白質體學，發展多重癌症標記蛋白質檢測為新的趨勢；因此，我們預期膜蛋白質體學技術可提供一高靈敏分析平台，搭配以臨床應用為導向之轉譯醫學課題，有助於從組織、體液或細胞中鑑定癌症相關之蛋白質結構或表現差異，進而在更大規模的病人樣品中進行驗證，找出有效診斷及治療的生物標記蛋白質！

參考資料

1. Overington, JP; Al-Lazikani B; Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5, 993-996.
2. Jang, JH; Hanash S. Profiling of the cell surface proteome. *Proteomics*, 2003, 3, 1947-1954.
3. Liu, H; Ong SE; Badu-Nkansah K; Schindler J; White FM; Hynes RO. CUB-domain-containing protein 1 (CDCP1) activates Src to promote melanoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA,* 2011, 108, 1379-1384.
4. Muraoka, S; Kume H; Watanabe S; Adachi J; Kuwano M; Sato M; Kawasaki N; Kodera Y; Ishitobi M; Inaji H; Miyamoto Y; Kato K; Tomonaga T. Strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. *J Proteome Res,* 2012, 11, 4201-4210.
5. Han, CL; Chen JS; Chan EC; Wu CP; Yu KH; Chen KT; Tsou CC; Tsai CF; Chien CW; Kuo YB; Lin PY; Yu JS; Hsueh C; Chen MC; Chan CC; Chang YS; Chen YJ. An informatics-assisted label-free approach for personalized tissue membrane proteomics: case study on colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10, 003087.