

プロテオミクス的手法を用いた血液脳関門輸送機構の解明

Proteomics-based Analysis of Blood-Brain Barrier Transport System

寺崎 哲也 (TETSUYA TERASAKI)

東北大学・大学院薬学研究科・教授



研究の概要

本研究は、高感度定量定性質量分析装置を用い脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞に発現する輸送担体蛋白量を網羅的に定量化し、「血液脳関門輸送機構の定量的マップ」を完成させ、さらに、定量的マップから機能未知の輸送担体を同定し、輸送機能の解明によって、脳関門プロテオミクスによる「血液脳関門の新しい生理機能の解明」を実現する。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：血液脳関門、プロテオミクス、トランスポーター、質量分析

1. 研究開始当初の背景

脳への薬物分布に重要な血液脳関門輸送の研究は functional genomics が主流であり、「輸送担体の細胞膜局在性の証明とその基質の同定」がボトルネックとなり全容の解析まで至っていない。一方で、我々は、高感度質量分析装置を用いて、膜タンパク質の絶対発現量の高感度一斉定量に世界で初めて成功した。この独自技術を脳関門輸送研究に応用することで、上記のボトルネックを克服することが可能となる。血液脳関門のプロテオミクスを世界に先駆けて推進することで、世界をリードし、より多くの世界の研究者との共同研究へ発展させる基盤整備が実現することができる。

2. 研究の目的

本研究は、高感度定量定性質量分析装置を用い脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞に発現する輸送担体蛋白量を網羅的に定量化し、「血液脳関門輸送機構の定量的マップ」を完成させ、さらに、細胞膜で多く発現する機能未知の輸送担体について輸送基質を同定し、血液脳関門の未知の生理機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

輸送担体蛋白質の絶対発現量は、各輸送担に特異的なトリプシン消化ペプチド断片の絶対発現量を、同一のアミノ酸配列を有する安定同位体標識ペプチドを内部標準として液体クロマトグラフィ接続型質量分析装置によって定量を行った（論文2）。脳

毛細血管内皮細胞の高純度単離は、内皮細胞特異抗原に対する抗体と磁気細胞単離装置 (MACS)を用いて行った（論文3,5）。

4. これまでの成果

定量の材料となる脳毛細血管内皮細胞の磁気細胞分離による高純度分離法の確立を行った。破碎条件、酵素条件、表面抗原等を検討し、分離の最適化を行った。その結果、ラット、マウスからの高純度分離法を確立した。脳毛細血管内皮細胞のマーカー分子の mRNA 発現レベルは、脳と比較して分離画分に濃縮された。さらに、神経細胞やアストロ細胞などのマーカー分子の mRNA 発現レベルは従来の分離法と比較して低かった。従って、確立した手法を用いることで、より高純度の脳毛細血管内皮細胞を回収できる。分離したラット脳毛細血管内視細胞を用い、MRP1 から MRP6 のサブタイプの mRNA 発現を解析した結果、MRP1 および MRP4 の高い発現が認められた。従って、これらサブタイプが血液脳関門で重要な機能をしていると考えられる（論文5）。高純度マウス脳毛細血管内皮細胞を用いて密着結合に重要な膜蛋白質である Claudin のサブタイプ 1-24 の mRNA を解析した結果、Claudin-5 が極めて高い発現であることを明らかにした（論文3）。

さらに、Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode を用いた多検体同時の細胞膜タンパク質の絶対量法を開発した。細胞膜サンプルの可溶化条件、還元、アルキル化条件などの検討を行い、ABC トランスポーターの ABCB, ABCC, ABCG サブファミリーの定量法を確

立した。膜タンパク質のトリプシン消化に関しても、最適条件の検討を行い、タンパク質断片をほぼ 100%の調製できることが検証できた。

数種類のタンパク質について、トリプシン消化ペプチド断片を質量分析装置で検出し、ペプチド配列と検出強度との間の法則性を解析した。その結果、7-15 個のアミノ酸から構成されること、膜貫通ドメインなど疎水性ペプチドを多く含む領域を排除し、塩基性アミノ酸が繰り返される領域を排除する、などの条件を満たしたペプチド断片を選択することで、質量分析装置で高感度に定量することが明らかになった。この *in silico* 設計法は、タンパク質の配列情報にのみ基づいた定量的膜タンパク質の質量分析法を開発できたことになり、普遍的な高感度絶対定量方法の開発に成功した。当該ペプチド断片について 3 種類の娘イオンを MRM mode で定量することで定量値に配列情報の信頼性を高めることが可能となり、高い信頼性で定量を行うことができる (論文 2)。

開発した方法を用いて、マウス脳毛細血管内皮細胞に発現する輸送担体タンパク質の絶対定量し、下記のような輸送担体蛋白質の絶対発現量プロファイルを明らかにした。

| | |
|-------|---------------------|
| Glut1 | 90 fmol/μg protein |
| Mct1 | 24 fmol/μg protein |
| Asct2 | 16 fmol/μg protein |
| Mdr1a | 16 fmol/μg protein |
| Bcrp | 4.0 fmol/μg protein |
| Taut | 3.8 fmol/μg protein |
| Lat1 | 2.2 fmol/μg protein |
| Oatpf | 2.4 fmol/μg protein |
| Oatp2 | 2.1 fmol/μg protein |
| Oat3 | 2.0 fmol/μg protein |
| Mrp4 | 1.6 fmol/μg protein |

脳毛細血管の血液側、脳側の細胞膜における局在量を明らかにするためには、それぞれの膜面分の純度が問題となる。そこで、上記の定量法によって得られる絶対量を用い、各膜のマーカー蛋白質の絶対量によって純度を補正することによって、高純度に膜面分を精製しなくても局在量を求めることができる方法論を構築した。本方法論で肝臓をモデルとして解析した結果、免疫染色によって報告されている結果とよく一致する結果が得られた。

輸送担体蛋白質の基質同定にのいても、複数基質候補のカクテルを用いて、質量分析装置によって一斉定量を行うことによって、評者標識化合物を用いずに効率よく多くの化合物をスクリーニングする系を開発した。本系で脳関門に発現する MRP4 の基質の探索を行い、新規薬物基質を多く同定した (論文 4)。

5. 今後の計画

独自開発した高感度定量技術を用いて、脳関門における定量的マップを完成し、発現があるにもかかわらず脳関門において機能未知のトランスポーターを同定する。同定した分子の輸送機能を独自開発の基質同定システムによって解析し、絶対発現量を基にした *in vivo* 活性の再構築によって脳関門輸送への寄与と生体機能を解明する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

原著論文

1. S. Akanuma, S. Hori, S. Ohtsuki, M. Fujiyoshi, T. Terasaki: Expression of nuclear receptor mRNA and liver X receptor-mediated regulation of ABC transporter A1 at rat blood-brain barrier. *Neurochem. Int.*, 52: 669-674 (2008).
2. J. Kamiie, S. Ohtsuki, R. Iwase, K. Ohmine, Y. Katsukura, K. Yanai, Y. Sekine, Y. Uchida, S. Ito, T. Terasaki: Quantitative atlas of membrane transporter proteins: Development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel *in-silico* peptide selection criteria. *Pharm. Res.*, 25:1469-1483 (2008)
3. S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, Y. Katsukura, T. Asashima, T. Terasaki: mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J. Neurochem.*, 104:147-154 (2008)
4. Y. Uchida, J. Kamiie, S. Ohtsuki, T. Terasaki: Multichannel liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail method for comprehensive substrate characterization of multidrug resistance-associated protein 4 transporter. *Pharm. Res.*, 24:2281-2296 (2007)
5. S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, T. Asashima, T. Terasaki: Establishing a method to isolate rat brain capillary endothelial cells by magnetic cell sorting and dominant mRNA expression of multidrug resistance-associated protein 1 and 4 in highly purified rat brain capillary endothelial cells. *Pharm. Res.*, 24: 588-694 (2007)

総説

1. 大峰健、上家潤一、大槻純男、寺崎哲也: 質量分析法を用いたタンパク質の複数同時絶対定量法と Pharmacoproteomics への新展開、*薬事新報*, 2558: 45-50 (2009).
2. 内田康雄、大槻純男、寺崎哲也: 脳関門の ABC トランスポーターの薬物療法における役割、*Clinical Neuroscience*, 26: 1107-1110 (2008).
3. 寺崎哲也: 血液脳関門機能と薬物の分布、*薬剤学*, 68(2): 88-96 (2008).
4. 寺崎哲也: ABC タンパク質と個体維持機構: 脳関門における ABC トランスポーターの働きと疾患治療、「ABC タンパク質の基礎と臨床」、*最新医学*, 62(11): 2454-2460 (2007)
5. S. Ohtsuki, T. Terasaki: Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.*, 24:1745-1758 (2007)
6. 寺崎哲也、大槻純男、上家潤一: 薬物の薬効、毒性標的への分布: 血液脳関門の透過性の評価「最新創薬学 2007 -薬物動態学特性の解析は創薬のキーワード-」*遺伝子医学 Mook*, 8: 170-177 (2007)

受賞

1. 大槻純男: The 2008 ISSX New Investigator Award、2008 年 5 月
2. 寺崎哲也: 日本薬物動態学会賞、2007 年 10 月
3. 寺崎哲也: 日本薬剤学会賞、2007 年 5 月
4. 大槻純男: 東京テクノフォーラム 21 ゴールドメダル賞、2007 年 4 月

ホームページ等

[http:// www.pharm.tohoku.ac.jp/~soutatsu/dds](http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~soutatsu/dds)