

# Elucidation of the mechanism of action of a proprietary compound on a liver cell line using 2D DIGE.

蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D DIGE)技術を利用した新薬候補物質の肝細胞への作用機序解明

Hiroyuki Yokota<sup>1</sup>, Masashi Hiramoto<sup>1</sup>, Shigeru Yoshida<sup>1</sup>, Sadao Kuromitsu<sup>1</sup> & Paul Orange<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., 21, Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585, Japan.

<sup>2</sup> GE Healthcare UK Ltd., White Lion Road, GE Healthcare, Buckinghamshire, HP7 9LL, UK.

本報では、新薬候補物質(試験物質)の毒性機序の解明にEttan DIGEシステムを用いた研究例をご紹介します。まず、試験物質を添加した肝細胞(処理細胞)および未処理の肝細胞(コントロール細胞)からそれぞれタンパク質サンプルを抽出し2種類の蛍光色素で標識し混合しました。これら2種のサンプルを二次元電気泳動により同一ゲル上で分離し、DeCyder 2D Softwareを用いて自動解析を行いました。今回、試験物質の添加により一貫性ある増加を示すタンパク質スポットが1つ検出されました。このタンパク質スポットをゲルから切り出してゲル内消化し、質量分析計による解析を行った結果、ガン遺伝子産物であることが確認できました。このガン遺伝子産物が試験物質の毒性過程に関与している可能性が示唆されました。

## はじめに

新薬候補物質が引き起こす副作用のメカニズム解明は、現代の新薬開発過程において極めて重要な要素です。こうしたメカニズムを解明することで、候補物質をより安全性の高い物質に設計しなおすことも可能になります。プロテオーム解析はこの種の解析に非常に適しています。個々のタンパク質について薬物処理/非処理サンプル間の差異を検出できるため、副作用のメカニズムを解明するうえで重大な手がかりを得ることができます。蛍光標識2Dディファレンスゲル電気泳動(2D DIGE)(1, 4)では、3種類のタンパク質サンプルをおのおの異なる蛍光色素CyDye DIGE Fluors(本試験ではCy3およびCy5)で標識したうえで、これらのサンプルを混合して標準的な二次元電気泳動法により同一ゲル上で分離します。その後それぞれの蛍光物質を検出することで、単一ゲルに展開した2種の異なるサンプルイメージは、完全に重なった状態で得られます。DeCyder 2D Softwareによる自動画像解析後、発

現量に差異を示したスポットを選択してEttan Spot Pickerで切り出し、ゲル内酵素消化および質量分析を行いました。

## サンプルの調製と標識

試験物質の毒性試験に使用する同型の肝細胞株を別々のフラスコ内で培養し、それぞれ試験物質(処理サンプル)もしくは溶媒(コントロールサンプル)を添加しました。この後、細胞をPBSバッファーで洗浄し、DIGE用細胞溶解バッファー(8 M urea, 4 % CHAPS, 10 mM Tris pH 8.0)で溶解しました。

処理サンプルおよびコントロールサンプルを添付のマニュアルに従って専用の蛍光色素CyDye DIGE Fluor minimal dyesで標識しました。同一ゲルで異なるサンプルを泳動できるようにサンプルをCy3またはCy5で標識し、それぞれ50 μg(ゲル1枚あたりの添加量は計100 μgとなります)を混合し、等量の2×サンプルバッファー(4 % CHAPS, 8 M

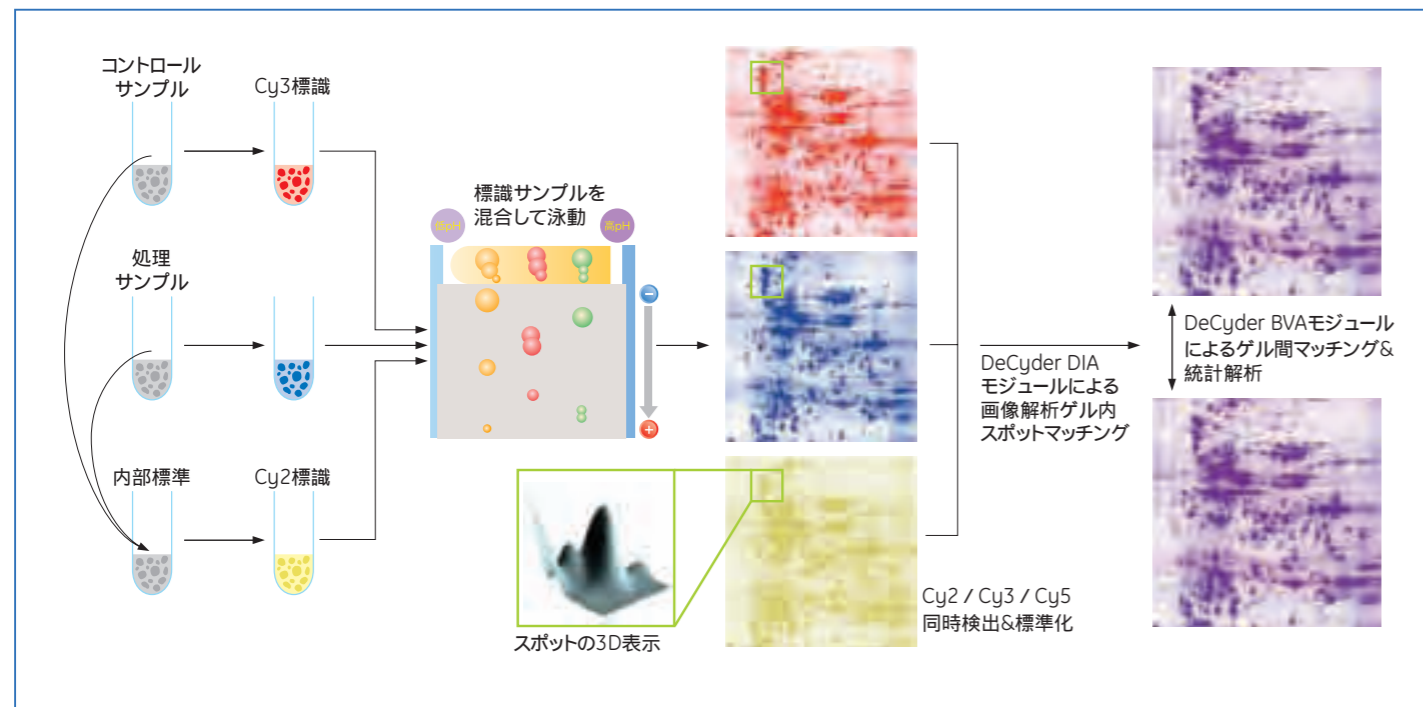


図1. 蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D DIGE)技術の概要

複数種類のタンパク質サンプルを異なる蛍光色素で標識後混合し、二次元電気泳動で同時に分離します。ゲル中のスポットをTyphoonで視覚化し、二次元解析ソフトウェアDeCyder 2D Softwareを用いて定量解析します。その後、スポットボリュームに著しい差異を示すスポットを切り出し、酵素処理し、質量分析計で解析します。

Urea, 2 % Pharmalyte, pH 3.0-10.0, 20 mg/ml DTT)を添加しました。この混合サンプルを表1のように6枚のゲルに添加しました。

表1. 標識サンプルおよび使用したIPGストリップの種類

ゲル番号	Cy3標識サンプル	Cy5標識サンプル	使用したIPGストリップ
1	コントロール	処理	18 cm, pH 4-7
2	処理	コントロール	18 cm, pH 4-7
3	コントロール	処理	18 cm, pH 4-7
4	処理	コントロール	18 cm, pH 4-7
5	コントロール	処理	18 cm, pH 3-10 NL
6	処理	コントロール	18 cm, pH 3-10 NL

## 二次元電気泳動

混合サンプルをImmobiline DryStrip膨潤バッファー(4 % CHAPS, 8M urea, 1 % Pharmalyte, pH 3.0-10.0, 2 mg / ml DTT)で希釈後、Immobiline DryStripに添加し、IPGphor IEF Systemで等電点電気泳動を行いました。二次元目の電気泳動の前に、Immobiline DryStripを8 M urea, 100 mM Tris-HCl (pH 6.8) (Sigma) 30 %グリセロール(Sigma) 1 % SDS, 0.5 % DTTで10分間、8 M urea, 100 mM Tris-HCl (pH 6.8) 30 %グリセロール, 1 % SDS, 4.5 % iodoacetamide (Sigma)でさらに10分間平衡化しました。平衡化済みのIPGストリップの端を切り、泳動バッファーに溶解した0.5 % 低融点アガロース溶液(微量のプロモフェノールブルーを含む)でSDS-PAGEゲルの上部に封入しました。

二次元目の展開には1 mm厚の12.5 %T ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmli泳動バッファーを満したSE 600 Standard Vertical Unitにより二次元目の泳動を行いました。リファレンスマーカーを接着したBind-Silane処理済みのガラス板にゲルを設置し、一定電流下、温度20 の設定でプロモフェノールブルーがゲル下端に移動するまで泳動を行いました。

## スキニングから画像解析

SDS-PAGE後、ゲルを低蛍光ガラス板に挟んだままの状態ですべて2920 Master Imagerを用いてスキャンしました。Cy3/Cy5標識サンプルを同一ゲル上に泳動しているため、1回のスキャンで2種類のサンプルのイメージを得ることができます。

DeCyder 2D SoftwareのDIAモジュール(Differential In-gel Analysis; ゲル内変動解析)を用いて、ソフトウェア内に取り込んだCy3およびCy5イメージ16-bit TIFFファイルを自動解析しました。2種のサンプルに共通するタンパク質のスポット位置が完全に重なるため、自動解析が可能です。全ての測定パラメーター中検出スポット数の予測値のみをマニュアルで設定しました。スポット検出後(自動バックグラウンド補正、スポットボリュームの標準化、スポットボリューム比の計算を含む)ゲルに適したダストフィルターを指定しました。この操作により、ゲルからタンパク質以外のスポットを自動的に除去し検出スポット数を再計算することができます。

## スポットピッキングおよびゲル内トリプシン消化処理

2種のサンプル間で発現差のあるタンパク質スポットはソフトウェアの機能により認識され、かつ視覚的にも確認できました。その後、当該スポットはゲル内切り出しのためにソフトウェアで選別され、ピッキングリストが作成されました。ピッキングリストをEttan Spot Picker(2)に転送し、このリスト

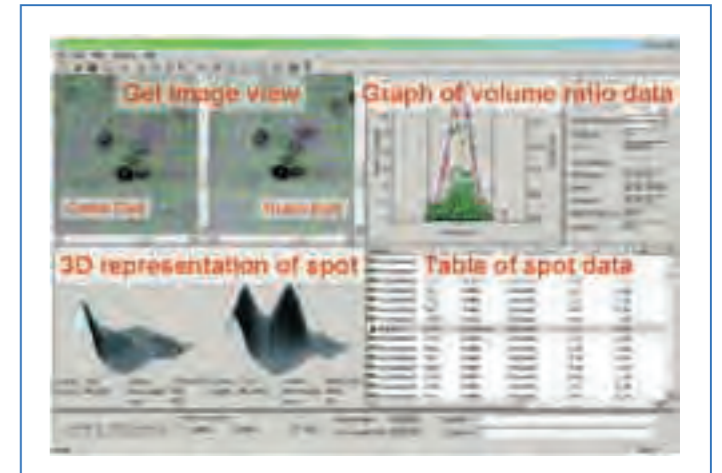


図2. ゲル番号3のDeCyder DIA解析スクリーンビュー  
スクリーンは連動性のある4つのサブビューに分かれています。左上がゲルイメージで、スポットボリュームが大きく変化したスポット(選択スポット)については強調表示されています。左下は選択スポットの三次元ビューが表示されています。右上がゲル全体のスポットボリューム比を示すヒストグラム、右下がスポット情報の表です。今回解析した全6枚のゲルで同様の解析結果が得られました。両方のイメージの選択スポットの三次元ビューは左下に示されています。(図中の赤字テキストは特定の機能を強調するために加筆したもので、通常スクリーン上でみられるものではありません。)

をもとにゲルからスポットを切り出して96ウェルマイクロプレートへ移しました。その後切り出したタンパク質スポットをShevchenkoらの方法でゲル内トリプシン消化処理しました(3)。

## LC / MS解析

選択した各スポット由来の消化処理済みのペプチド溶液は、Nanospace SI-1 LC system (Shiseido) に Accurate micro-flow splitter (LC-Packings) を接続した送液系に Pepmap C18 capillary LC column (0.075 x 150 mm; LC-Packings) を装着したシステムを用いて、流速200 nl / minで4 ~ 50 %アセトニトリル(0.2 %のギ酸を含む)の30分間のリニアグラジエントにて分離しました。LC溶出液はPicoChip capillary needle (New Objective) を用いてLCQ四重極型イオントラップ質量分析装置(ThermoQuest)にエレクトロスプレーしました。スプレー電圧を1.5 kV、加熱キャピラリーを200 °C、CID(衝突誘起解離)を35 %に設定したData-dependent scanモードで断片ペプチドのMS / MSスペクトルが得られました(データ未掲載)。

## 結果と考察

2種のサンプル間のスポットボリュームにみられる差異のうち、どの程度の違いを有意なものとするのかを決定するための検討も行いました(データ未掲載)。スポットボリュームの比を検討するため、同一のサンプルを専用蛍光色素CyDye DIGE FluorsのCy3とCy5で標識しました。複数のゲルを解析した結果、検出されたスポットのうち95 %は2種のサンプル間の差異(増加または減少)が1.2倍以内にとどまることが示されました(データ未掲載)。このデータをもとに、スポットボリュームの比が1.5倍以上となるものに関しては、細胞の薬剤処理による発現差異とみなしました。2D DIGE技術を用いている他のグループも同様の結果を得ています(5)。今回解析した6枚のどのゲルについても、図2で強調表示されているスポットで試験物質の処理後にシグナル強度の大幅な増加がみられました。平均すると、処理サンプルのスポットボリュームはコントロールサンプルの2.17 (±0.62) 倍増加しました。

このようにしてスポットの選択を行い、Ettan Spot Picker で切り出してゲル内トリプシン消化を行いました。質量分析の結果、試験物質の処理によりシグナル強度が大きく変化したタンパク質を同定することができました。

今回の比較試験ではDeCyder 2D SoftwareのDIAモジュールのみを用いていますが、DIAのほかにBVA (biological variation analysis ; 生物学的変動)モジュールもあります。BVAモジュールを用いれば、複数の2D DIGEゲル間マッチング、スポットボリュームの比の平均値決定、スポットごとの統計学的解析までを完全に自動化することができます。BVAモジュールを使用することで、実験結果の自動統計解析およびグラフ化をとまなう、より複雑な実験デザインが可能になります。

## おわりに

本報では革新的な二次元電気泳動技術である2D DIGEのアプリケーションおよび特定の毒性試験への応用例をご紹介します。こうした毒性試験は疾病に有効かつ副作用の少ない効果的な新薬の開発に不可欠です。2D DIGE技術を用いることで、今回ご紹介したような薬剤処理サンプルとコントロールの単純比較のみならず、時間経過や連続投薬処理などを加味した、より複雑な検討も可能です。さらに、2D DIGE技術は、新薬候補物質の発見および有効性の確認、あるいはリード物質の有効性試験など新薬開発のさまざまな段階へ応用することができる次世代プロテオーム解析技術であるといえます。

## 参考文献

1. Beaumont, M. *et al.* Integrated technology platform for fluorescence 2-D difference gel electrophoresis. *Life Science News* 7, 3-5 (2001).
2. Bergling, H. Automated 2-D gel electrophoresis spot excision using Ettan Spot Picker in proteomics research. *Life Science News* 7, 6 (2001).
3. Schevchenko, A. *et al.* Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry* 68, 850-858 (1996).
4. Ünlu, M. *et al.* Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 11, 2071-2077 (1997).
5. Tonge, R. *et al.* Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 3, 377-396 (2001).

本報は山之内製薬株式会社より弊社ニュースレターLife Science News(英語版)にご投稿いただいた原稿の邦訳です。

新薬開発に関わる機密を含むため、本報では、同定されたタンパク質名、試験物質の正確な構造、あるいはその物質が示唆する毒性等を明記することはできません。