

## 膜蛋白體定量策略之開發及應用

中央研究院化學所 韓嘉莉 陳玉如

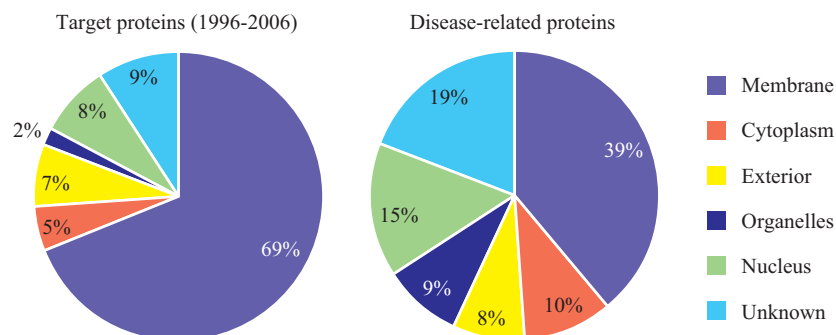
細胞膜是細胞與外界屏障，不僅作為細胞內外物質運輸的通道和橋樑，有選擇性的達到調控細胞內的物質平衡，同時也是接受外界信號進而啟動細胞內下游傳遞訊息的重要胞器，掌控廣泛的生理功能。在分子的微觀層面，細胞膜上含有大量的膜蛋白質，這些膜蛋白質能刺激或啟動各種生物學途徑，調控了很多重要的細胞功能，例如細胞間交互作用、物質運輸、能量轉換、訊息接收、識別和傳遞的作用，全面性定量膜蛋白體可增進我們對膜蛋白質調控疾病的機制及其訊息傳遞的了解。許多膜蛋白質的異常表現被報導和疾病相關或為藥物治療的標靶蛋白質，以癌症為例，現今在臨床上使用的癌症標識分子(biomarker)大多數為膜蛋白質。此外，膜蛋白質與新藥開發及製造有密切的關係，是許多疾病在臨床診斷與治療的標的分子，大多數藥物通過與膜蛋白結合或活化而起作用，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（圖一）。此外，從蛋白質結構預測結果顯示，人體內至少有超過 8000 種膜蛋白，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有相當大的潛力。雖然膜蛋白質具有重要的生理功能，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，使得膜蛋白質的研究不論在純化、樣品處理、分離及分析上有諸多限制。

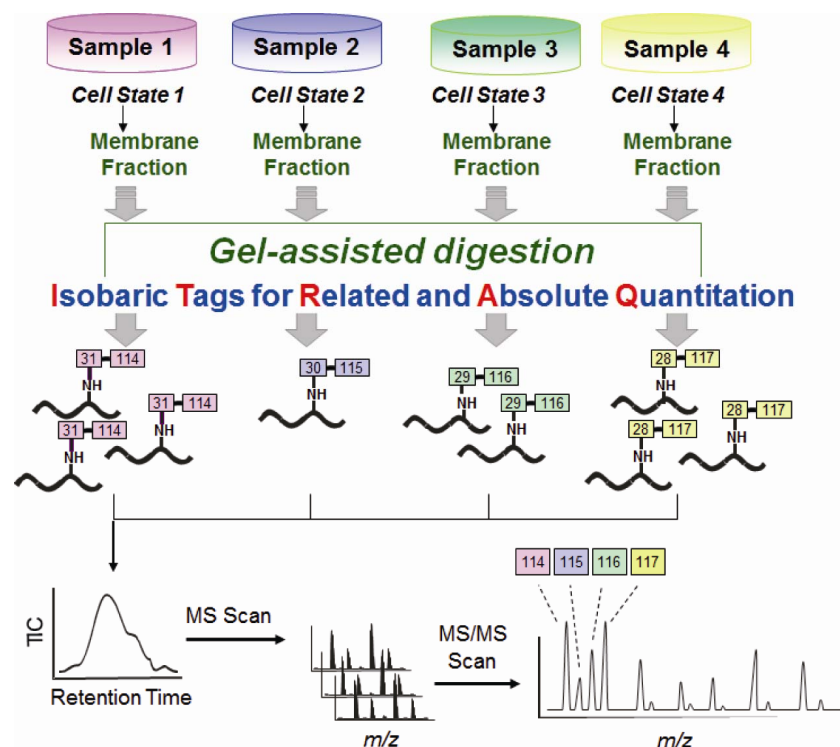
近 10 年來，在多種重要的生物基因體定序陸續完成後，蛋白體學成為後基因時代生命科學領域最重要的課題之一，可以提供完整的蛋白質地圖，幫助我們瞭解蛋白質表現、作用網路及轉譯後修飾程度的變化。質譜技術為研究蛋白體學的主力工具之一，能對大量蛋白質進行快速、靈敏的鑑定及定量分析，但是在進行質譜儀分析前所需要的膜蛋白純化、萃取及分離仍然是一大瓶頸，要得到完整的膜蛋白體分析更是困難。現今常用的膜蛋白體定量分析方法可分為：以凝膠技術為主及以液相層析技術為主的兩大方向，二維膠體電泳法(two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)或二維螢光差異膠體電泳法(2-D fluorescence difference gel electrophoresis)為早期膜蛋白體研究上最被廣泛應用的技術[2]，但 2DE 的許多缺點限制了其在膜蛋白體的分析，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，疏水性的膜蛋白質因為溶解度差，不容易進入膠體被偵測到。

### 一、多組化膜蛋白體定量策略

我們的研究團隊長期致力於開發以質譜為



圖一 美國食品藥物管理局(FDA)在 1996-2006 年所核准的藥物中，其作用的標靶蛋白質位於細胞不同胞器之分佈



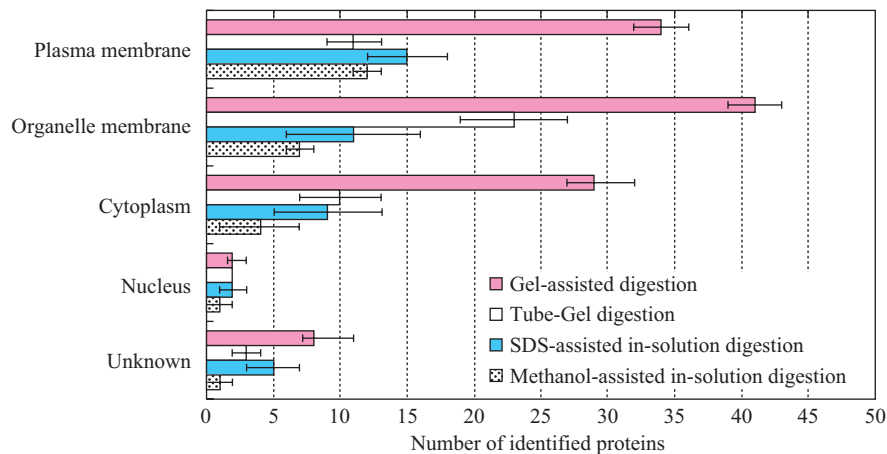
圖二 多組化膜蛋白體定量策略平台之實驗流程，包括細胞膜蛋白純化、膠體輔助蛋白水解法，iTRAQ 反應，強陽離子交換層析分離以及二維液相層析串聯質譜儀分析

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，並於 2008 年提出多組化膜蛋白體定量策略平台（圖二），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。在此工作中，我們針對膜蛋白體開發一新穎多組化定量策略平台[3]，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，可達到(1)提高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之定量效率以及(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。

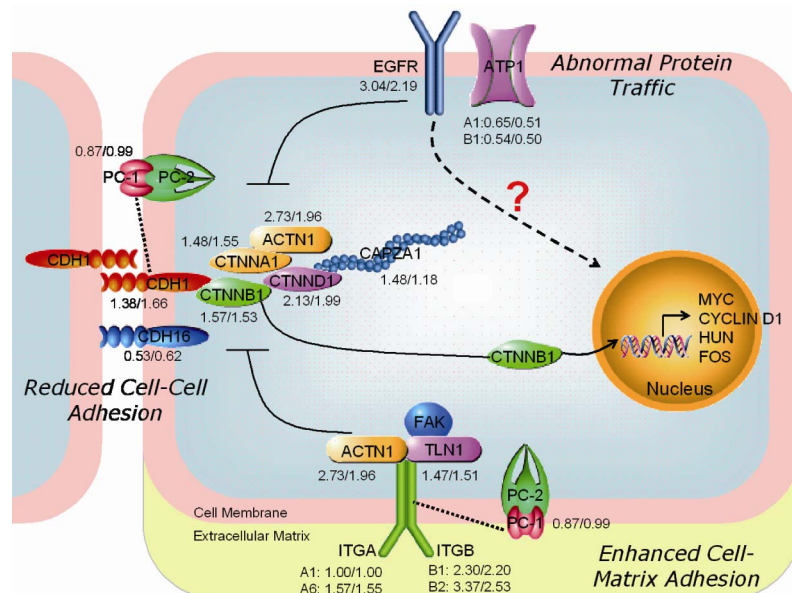
由於 iTRAQ 定量試劑是在肽段上進行同位素試劑之標定，所以，有效地使膜蛋白質溶解、變性及水解具有關鍵性之影響。為了找出最適合膜蛋白質的水解方法，我們開發一膠體輔助蛋白質水解法，並將此方法與過去已發表可有效水解膜蛋白質的其他方法互比較效率，在嚴謹

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（圖三），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。

為了能夠大量地定量膜蛋白體，此平台使用多維化肽段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此多組化定量策略平台的定量效能。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體涵蓋率最高的記錄，在定量的精確度及精準度也超越了現今其他定量方法！經由蛋白質細胞內位置的分類後，我們發現水解產率增加 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），此外，也增進了具有多個 TMH 的高疏水性蛋白質被偵測的機會。整體而言，結



圖三 比較經由膠體輔助蛋白質水解法、Tubel-Gel 水解法、SDS 輔助液相水解法及甲醇輔助液相水解法等不同方法所得到的蛋白質之位置分類



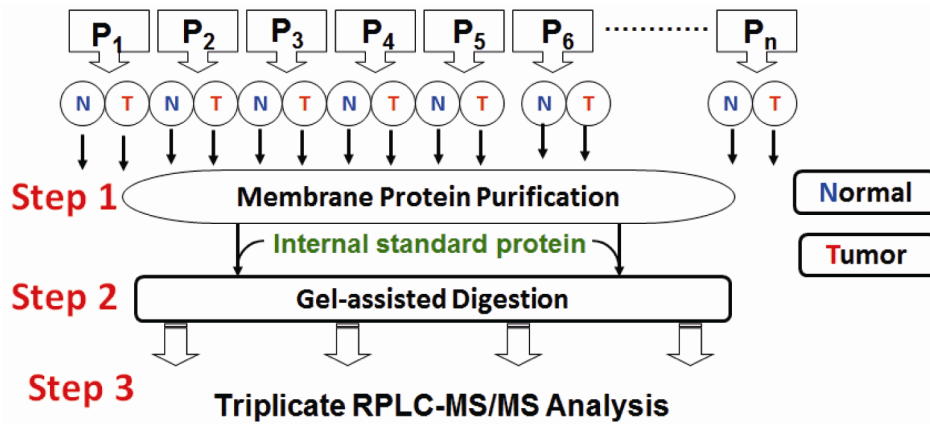
圖四 已知與多發性腎囊腫疾病相關之蛋白質及其所參與之功能，包括細胞增生及死亡、細胞與細胞之間或者細胞與介質間的溝通、溶質運輸和膜蛋白質極化等。圖中數字代表 *pkd1* 基因剔除老鼠與正常鼠之 iTRAQ 比值（摘錄自參考文獻[2]）

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，增加其胜肽的偵測率，並且提高了 iTRAQ 定量的成功率。

## 二、多囊性腎臟病的小鼠模式之應用

最後，我們將此一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，我們希望能藉由發展之新方法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（圖四），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



圖五 適用於臨床樣品分析之資訊輔助免標定定量策略

蛋白質，例如 EGFR、COX 及 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 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。

### 三、個人化組織膜蛋白體分析策略及大腸直腸癌之應用

上述的成果顯示膜蛋白體定量分析可以提供機會有效地找到和疾病相關的蛋白質，也啟發我們進一步將膜蛋白體定量技術應用於臨床病人檢體，然而，以同位素試劑進行定量分析需進行複雜化學反應，可比較之樣品數量有限，並不適用於大量臨床檢體之多組比較。為了尋找癌症標識蛋白質，我們開發一套簡單的資訊輔助免標定定量策略[4]，結合新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，並應用於大腸直腸癌之個人化癌症與正常組織的膜蛋白體分析。在此免標定定量法中（圖五），我們利用胜肽在液相層析儀中的胜肽層析峰面積進行定量分析，藉由先前所發展的四維校正的演算法[5]，利用胜肽序列、沖提時間、質荷比及內嵌標準品作比對，可提高可定量的蛋白質數目。此外，利用在蛋白質水解前加入的內嵌標準品，可以校正實驗流程中因為酵素水解的效率和進行質譜儀分析時時間和空間不同所造成胜肽層析峰面積的誤差。利用人類大腸直腸組織進行三重複實驗顯示，此策略可提供高準確性（6%錯誤率）與高再現性（34%相對標準偏差）的定量分析。

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，在不經由額外分群(fractionation)的情況及嚴謹的蛋白質鑑定標準下，此策略可有效測定 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 20 個多數病人(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識蛋白質。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 作為預後標識蛋白質之潛力。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。

我們預期這些膜蛋白質體學技術平台可以有效地分析及定量膜蛋白質體，更可應用於各種不同刺激或病理的生物系統及細胞、組織及體液等各種樣品，幫助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！

#### 參考資料

- [1] J. P. Overington, B. Al-Lazikani and A. L. Hopkins, *Nature reviews. Drug discovery*, **5**, 993 (2006).
- [2] J. H. Jang and S. Hanash, *Proteomics*, **3**, 1947 (2003).
- [3] C. L. Han, C. W. Chien, W. C. Chen, Y. R. Chen, C. P. Wu, H. Li and Y. J. Chen, *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 1983 (2008).
- [4] C. L. Han, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, 1 (2011).
- [5] C. C. Tsou, C. F. Tsai, Y. H. Tsui, P. R. Sudhir, Y. T. Wang, Y. J. Chen, J. Y. Chen, T. Y. Sung and W. L. Hsu, *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 131 (2010).