

定量的標的プロテオミクスによる生化学の新展開： 抗体を用いない汎用的タンパク質定量技術

大槻 純 男

タンパク質は生命現象を司る重要な分子である。しかし、その解析は抗体に大きく依存してきた。我々は、質量分析を用いることによって抗体を用いずに標的分子の量を特異的かつ高感度に定量する技術を開発した。本技術は配列情報のみから短時間で定量系を構築することができる。また、質量に基づいた極めて高い特異性を有し、37分子の絶対発現量を同時に定量することが可能である。本技術は、オミクスによって同定したバイオマーカー候補分子の定量系を短期間で構築し、同時評価を可能にするだけでなく、タンパク質の絶対発現量とそのプロファイルに基づくタンパク質創薬科学であるファーマコプロテオミクスを拓くことができる。本稿では、質量分析を用いた新しいタンパク質定量技術である multiplexed-multiple reaction monitoring の技術概要を述べると共に、ファーマコプロテオミクスを目指した我々の最新成果について紹介する。

1. はじめに

この総説を読む研究者は、多かれ少なかれこれまでに抗体で苦勞したことがあるのではないだろうか。抗体による高感度かつ特異的なタンパク質検出は生命科学の進歩に大きく貢献してきた。しかし、研究者は抗体の有無によって研究の方向性を大きく変更しなければならない経験や、購入した抗体の特異性の問題によって検出したバンドや定量値が標的のタンパク質のものであるかどうか悩んだ経験があるはずである^{1,2)}。また、様々な抗体の調製法が開発されてきているが、依然、特異的な抗体の調製は困難である。従って、抗体に代わる汎用的なタンパク質検出、定量技術の必要性を多くの研究者が感じている。特にゲノミクスやプロテオミクスによる網羅的解析が可能となると、同定したバイオマーカー候補分子に対する抗体の有無や抗体

調製の困難さが解析全体のボトルネックとなってくる。つまり、オミクスに対応できるタンパク質定量システムというデマンドも大きい。以上のような抗体に対する問題を経験した、もしくは現在有している研究者にとって、本稿で技術の概略を紹介する定量的標的プロテオミクスは、抗体に代わるタンパク質定量の選択肢となるはずである(表1)。さらに、本稿では独自のタンパク質定量技術から得られる新しいタンパク質情報によって拓かれる新領域における我々の最新の成果を紹介する。

2. 質量情報によるタンパク質の定量

アミノ酸配列はタンパク質を特徴付ける情報である。さらにアミノ酸配列が決まると、その配列情報とアミノ酸の質量からタンパク質の質量が決まる。従って質量情報からタンパク質を同定することが可能である。この原理を利用した手法が質量分析計を用いたタンパク質同定である通常のプロテオミクスである。この原理を別の視点からみると、試料中の特定質量を持つタンパク質の数を数えることによって標的タンパク質の量を計測することが可能である。このような定量方法は、薬物などの低分子化合物で実施されており、我々も質量分析計を用いた薬物定量を行っていた。低分子化合物をタンパク質に置き換えることで抗体を用いずにタンパク質を特異的に検出することができる。

熊本大学大学院生命科学研究部 (〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1)

Novel approach for biochemistry by quantitative targeted proteomics: New protein quantification method without using antibodies

Sumio Ohtsuki (Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Chuou-ku, Kumamoto 862-0973, Japan)

表1 タンパク質定量法としての multiplexed-MRM 法と ELISA 法の比較

ELISA 法に対する利点

- ・配列情報のみから定量に最適なペプチドを選択し定量系を構築することが可能。
- ・約1ヶ月で定量法を確立可能。
- ・抗体作製時に必要な抗原タンパク質や実験操作等は不要。
- ・タンパク質あたり4フラグメントを定量する場合、300MRM トランジションを使用して、37分子の絶対発現量を同時定量可能。
- ・質量に基づく定量であるため1アミノ酸の相違や翻訳後修飾の相違を区別して検出する特異性の高い定量が可能。
- ・実験的な特異性の確認は不要。データベース検索のみで特異性を確認可能。

ELISA 法に対する欠点

- ・親和性の高い抗体による検出と比較すると感度が低い (0.1~1 fmol/アッセイ)。
- ・装置が高額である (数千万円~1億円)。
- ・多検体を短時間で測定することが困難 (約2時間/検体)。

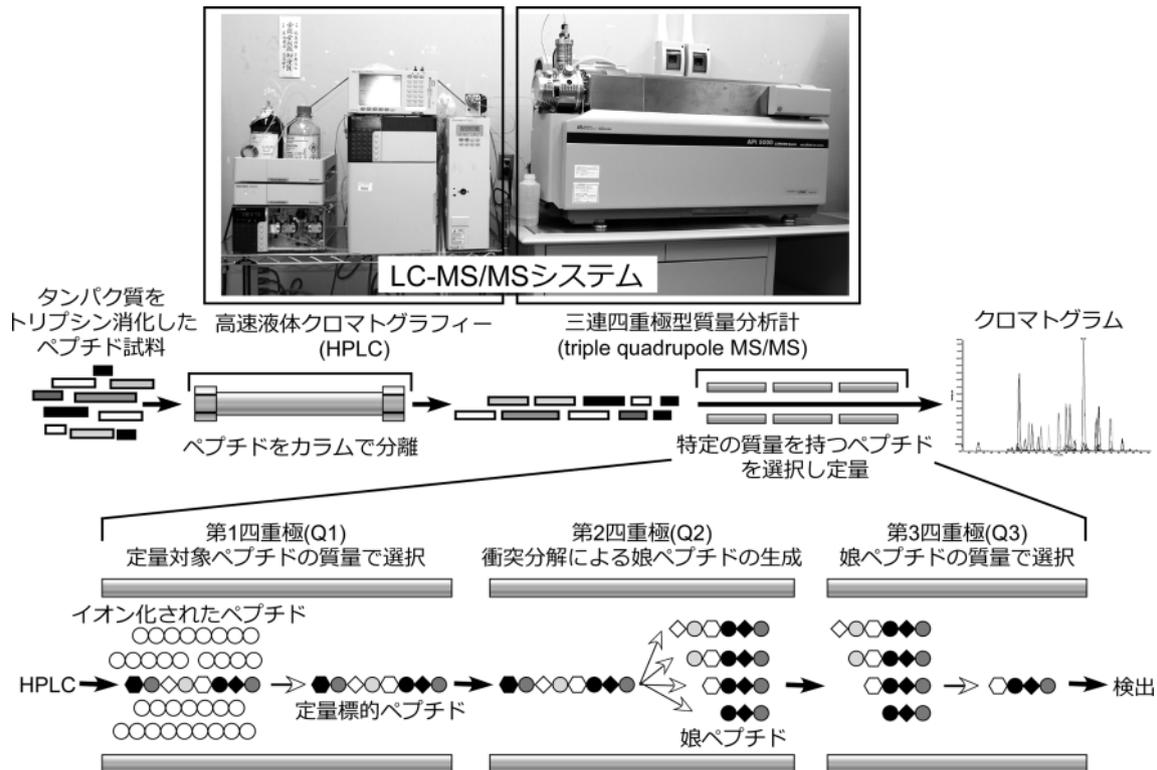


図1 LC-MS/MS システムを用いたタンパク質の定量

試料をトリプシン消化し生成されたペプチド試料を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分離する。分離されたペプチドはオンラインでタンデム質量分析計 (MS/MS) である三連四重極型質量分析計に導入される。イオン化されたペプチドが三つの四重極を通過することで、特定の質量を持つペプチドのみが検出器に到達する。検出器では到達したペプチドをカウントすることによって、最終的に横軸が時間、縦軸がカウントのクロマトグラムが得られる。通過させるペプチドの質量を短時間 (10~50 ms) に切り替えることにより複数の異なる質量のペプチドを同時に計測できる。

従来の同定を目的としたプロテオミクスでは質量数の精度が同定の精度を決めるため、高精度で質量のスペクトルを得ることができる質量分析装置として飛行時間型やフーリエ変換型が使用されている。一方で、定量の場合は特定の質量を持つ物質 (イオン) を選択することができる三連四重極型の質量分析装置を用いる。三連四重極型質量分析計は三つの四重極 (Q1, Q2, Q3) を有している。図1に示すように高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離

された化合物はイオン化され質量分析計に入ってくる。最初の四重極である Q1 は特定の質量を持つイオン (親イオン) のみを通過させる質量フィルターである。Q1 を通過した親イオンは Q2 で限定的に破壊させて娘イオンを作る。さらに、Q3 では特定の質量を持つ娘イオンを通過させる。親イオンと娘イオンがともに質量フィルターを通過したイオンの数を最終的に検出器で計測し、定量を行う。この質量分析による定量法は multiple reaction monitoring

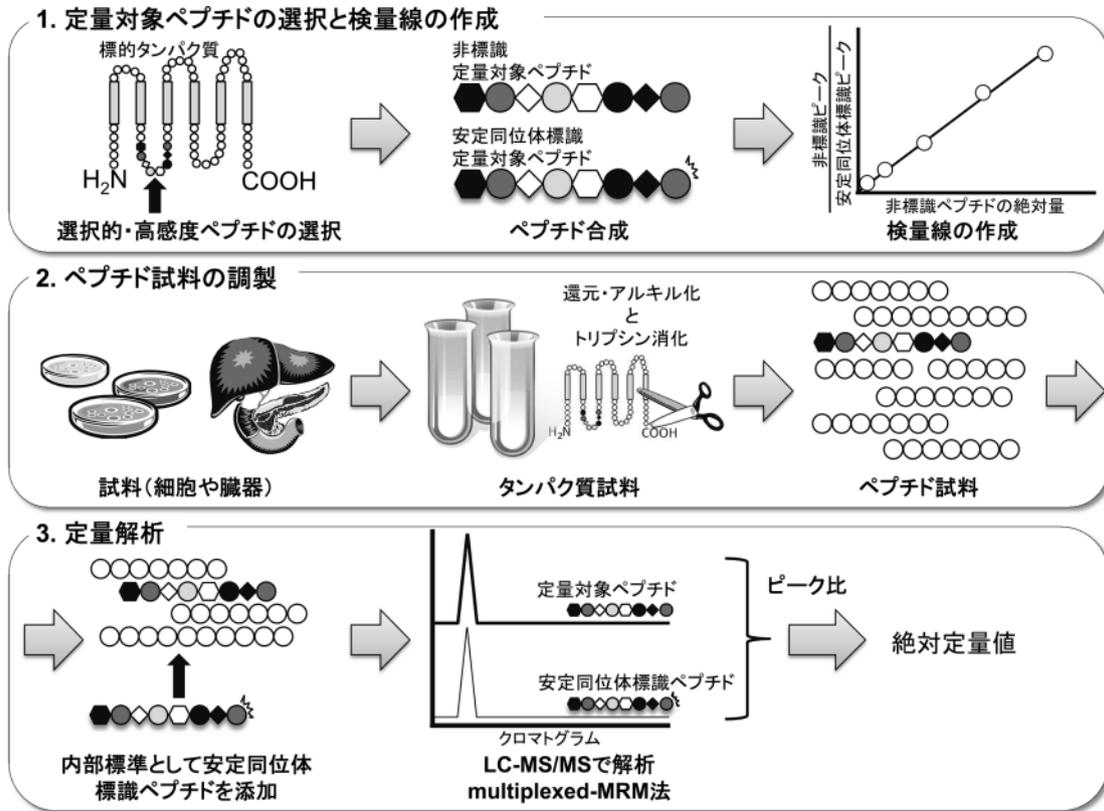


図2 LC-MS/MSを用いた multiplexed-MRM 法によるタンパク質定量手順の概略

(MRM) と呼ばれ、Q1 と Q3 の 2 回の質量フィルターによって標的質量をもつ化合物を選択することによって高感度かつ特異的な測定が可能である³⁾。

実際の解析においては、Q1 や Q3 の質量フィルターの上限がタンパク質質量よりも小さいためタンパク質自身を直接選択できない。そこで、タンパク質をトリプシン消化し生成されるペプチド中で標的タンパク質に特異的なペプチドを MRM 法によって定量する。膜タンパク質のような難溶性タンパク質であってもこのトリプシン消化によって生じる一部の親水ペプチドを定量対象とすることによって、定量が可能となる利点がある。MRM 法を用いたタンパク質定量法の手順概要を図 2 に示した^{4,5)}。標的タンパク質をトリプシンで分解し、そのペプチド断片の中から標的タンパク質に特異的であり、かつ強いシグナルを与えるペプチドを定量対象ペプチドとする。非標識ペプチド及び内部標準としての安定同位体標識ペプチドを化学合成によって作製し、検出条件を最適化した後に定量のための検量線を作成する。生体試料から調製したタンパク質試料を可溶化後、還元、アルキル化を行いトリプシンによって完全に消化を行い、ペプチド試料を調製する。ペプチド試料に既知量の安定同位体標識ペプチドを添加し、HPLC に接続した三連四重極型質量分析計 (LC-MS/MS) によって解析を行う。試料中の消化ペプチドは HPLC の C₁₈ カラムで分離

され、順次オンラインで質量分析計に投入され MRM モードで解析される (図 1)。その結果、各 MRM に対応するクロマトグラムが生成され、定量対象ペプチドと内部標準である安定同位体標識ペプチドとのピークエリア比と検量線からペプチド試料中の定量対象ペプチドの絶対量を測定する。

図 1 に示すように Q2 において複数種類の娘ペプチドが生成される。一つの Q1/Q3 セット (MRM トランジション) では 1 種類の娘ペプチドのみを検出し定量を行うが、この Q1/Q3 セットは 10 ms ごとに変更可能である。従って、同一の親ペプチドに由来する複数の娘ペプチドを 1 回の測定で同時に検出し定量することができる。このようにして得られた同一親ペプチド由来の複数の定量値から最終的に標的タンパク質の定量値を計算する。複数の Q1/Q3 セットから定量値を計算することによって、ノイズによる影響を最小限にし、さらに定量値の特異性と信頼性を格段に上げることができる⁵⁾。このように複数の Q1/Q3 セットから定量値を得ることを multiplexed-MRM と呼んでいる。

我々の技術の最大の特徴は、定量対象とするペプチドを配列情報のみから *in silico* で選択することである。MRM 法では、トリプシン消化によって生成されるペプチドを定量する。従って、どのペプチドを定量対象とするかが定量の感度と信頼性に大きく影響する。特に、微量タンパク質

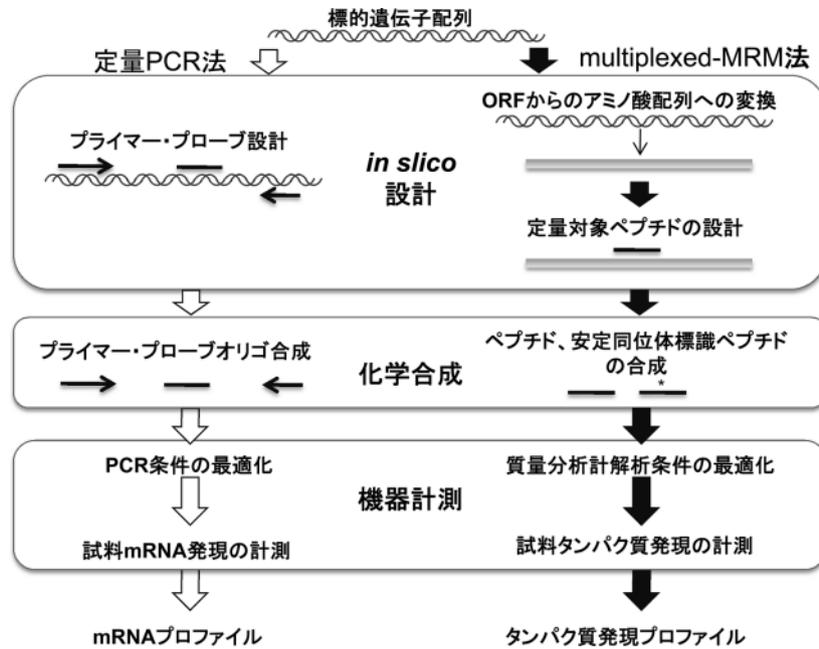


図3 定量PCRによる遺伝子発現解析(左)とmultiplexed-MRM法によるタンパク質定量(右)の定量法構築手順の比較

の定量には、ペプチドが標的タンパク質に特異的であるだけでなく、LC-MS/MSで高効率に分離、イオン化、断片化、検出される必要がある。我々は過去に作成したプローブと蓄積された検出感度の情報をもとに、データベース上のタンパク質配列のみから定量に最適なペプチドを選択する *in silico* 選択基準を開発した⁵⁾。この *in silico* での定量標的ペプチド選択の実現によって定量PCRと同様に配列情報のみからタンパク質定量法を構築することが実現された(図3)。この選択法を用いることによって約1ヶ月の短期間でタンパク質を用いずに定量系を構築することが可能である。また、どのような生物種においても、ゲノム解析等で同定された遺伝子から生成されるタンパク質に対する定量系を構築することが可能であり、最新オミクス解析に対応できるタンパク質定量技術である。この *in silico* ペプチド選択法を用いて、我々はこれまでにトランスポーターやCYP等の代謝酵素、受容体を含め400を超えるタンパク質の定量系を構築している。さらに、脳毛細血管、肝臓、腎臓、血小板での定量を報告している⁴⁻¹²⁾。

3. 既存技術との比較

multiplexed-MRM法によるタンパク質定量法は、同様に質量分析を用いる従来の網羅的同定を目的としたグローバルプロテオミクスと区別し、定量的標的プロテオミクス(Quantitative Targeted Absolute Proteomics: QTAP)と呼ばれる。しかし、標的のタンパク質のみを特異的に定量するという視点からは、抗体を用いたELISAやイムノブロットに置き換わる技術であるといえる。グローバルプロテオ

ミクスと比較したmultiplexed-MRM法の利点は感度の高さや定量性である(図4)^{3,13,14)}。グローバルプロテオミクスはすべてのタンパク質を同定することを目指しているため、低発現タンパク質を同定するためには、同定数を増加しなければならない。一方でmultiplexed-MRM法の場合は、標的以外のシグナルを検出しないためにノイズとなる成分を除去することができ、結果として、高感度化を達成できる。一方で、multiplexed-MRMは標的とするタンパク質以外は検出することができず、また、同時定量数も37分子と限られる。以上のことからグローバルプロテオミクスとmultiplexed-MRM法による定量的標的プロテオミクスは相補的な関係にあり、グローバルプロテオミクスで同定した候補分子をmultiplexed-MRM法によって定量し評価することで、システム全体を効率化できると考えられる。

ELISAとの比較を表1にまとめた。multiplexed-MRM法には、定量系の構築の容易さや高い特異性などこれまでの抗体による定量の問題点を克服するいくつかの優位点が存在する。一方で、多検体解析が困難であり、優れた抗体と比較して感度が低い等の問題点がある。しかし、LC-MS/MSの機能向上スピードはめざましく、数年後には抗体に対する問題点はかなり解消されていることが期待される。近年、従来は定量に用いられていなかった飛行時間型質量分析計の定量性とダイナミックレンジが改良され(ABSCIEX社Triple TOF 5600等)、その高い質量精度を活用し非常にノイズの低い優れた定量(high-resolution MRM)が可能となっており、高感度化の一つの方向性として有望である。

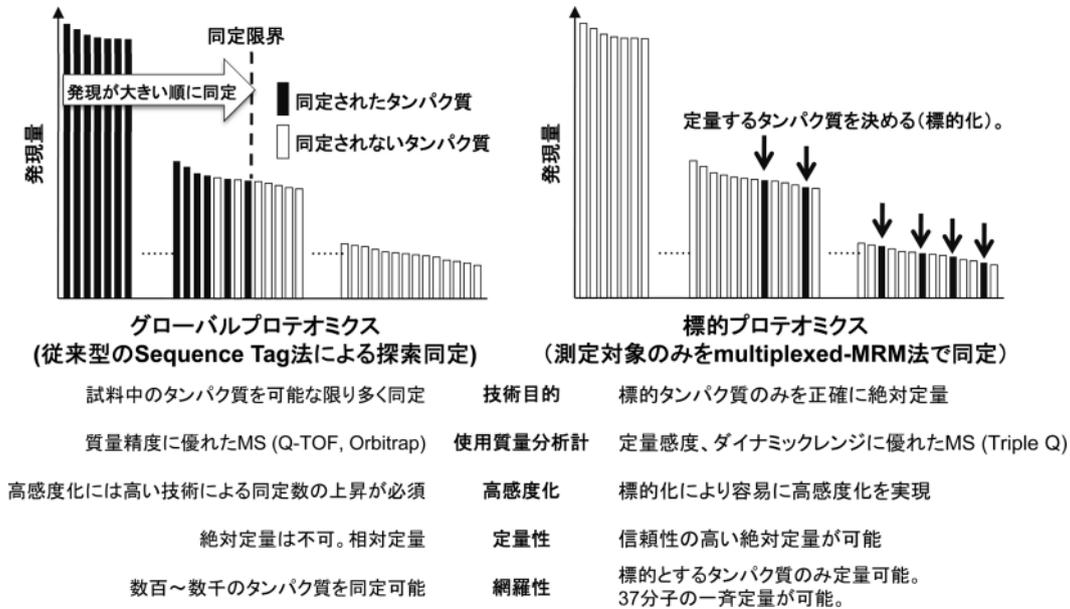


図4 従来プロテオミクス (左) と multiplexed-MRM 法 (右) の比較

4. タンパク質発現と遺伝子発現

遺伝子発現解析ではごく少量の試料から高感度かつ容易に定量解析を実施することが可能である。一方で、一般的に遺伝子発現とタンパク質発現は必ずしも一致しないと言われている¹⁵⁾。図5は、ヒト肝臓17検体における膜タンパク質であるトランスポーターのタンパク質発現量とmRNA発現量の比較である⁷⁾。膜タンパク質は細胞膜における発現量が機能に重要なため、multiplexed-MRM法を用いて細胞膜画分における発現量を計測している。図5に示すとおり、膜タンパク質のmRNA発現とタンパク質発現にはほとんど相関がない。例えば、NTCPに関して、mRNA発現は1000倍の個人差があるがタンパク質発現量では2.8倍の個人差しかない。このことは、分子機能の個人差を理解するためにはタンパク質発現量を計測する必要性を示している。

一方で、タンパク質の機能は発現量だけで規定される訳ではない。リン酸化等の翻訳後修飾によって活性が制御され、また、SNPs等の変異によっても活性が変動する。このような修飾や変異を特異的に検出する抗体の調製は不可能ではないが非常に困難であった。一方、multiplexed-MRM法は質量が異なると別のペプチドとして区別するため、非常に高い特異性をもって修飾や変異を検出することが可能である^{16,17)}。今後、このような修飾や変異を定量的に解析することによって、修飾タンパク質や変異タンパク質の生体における役割が明らかになると考えられる。

5. 絶対発現量情報を利用した定量的なタンパク質研究

LC-MS/MSを用いた定量によってタンパク質の絶対発

現量 (モル数) を得ることができる。絶対発現量が得られることにより、1) 異なる分子間の発現量の比較、2) 異なる実験間の発現量の比較が可能となる。特に後者に関しては、一度に試料が手に入らない臨床検体を計測する際に有用である。さらに、絶対発現量を用いることによってより定量的なタンパク質研究が可能となる。例えば図6Bは細胞内の酵素活性を示しており、PK9細胞可溶性画分には酵素活性が存在するが、RPK9細胞では測定限界値以下であることを示している¹⁸⁾。この酵素活性には他の実験でdCKと呼ばれる酵素が関与している可能性が示されている。これまでのタンパク質研究では、dCKの遺伝子の導入やリコンビナントタンパク質の添加によって活性が回復することによって「関与」していることが示唆できる定量的な実験が可能であった。一方でLC-MS/MSを用いた定量によってPK9におけるdCKタンパク質の絶対発現量(0.477 fmol/μgタンパク質)が計測されており、RPK9では検出限界以下(<0.01 fmol/μgタンパク質)であることを明らかにしている(図6A)。そこで、RPK9細胞可溶性画分にPK9の発現量と同等量のリコンビナントdCKタンパク質を添加し、活性の回復を測定することによって、定量的に「どの程度関与」しているかを評価することができる。図6では同量添加によって81.6%回復しているため、酵素活性の大部分を説明できることを示唆している。

また、LC-MS/MSを用いた定量はばらつきが小さく(%CV<20%)、かつ線形性を保つダイナミックレンジが広い(3桁以上)、イムプロットでは明確でない差を数値として明確に提示することが可能である¹⁹⁾。さらに、広いダイナミックレンジを活かして、タンパク質発現量のプロファイルの比較を行うことも可能である^{3,5,8,10)}。この

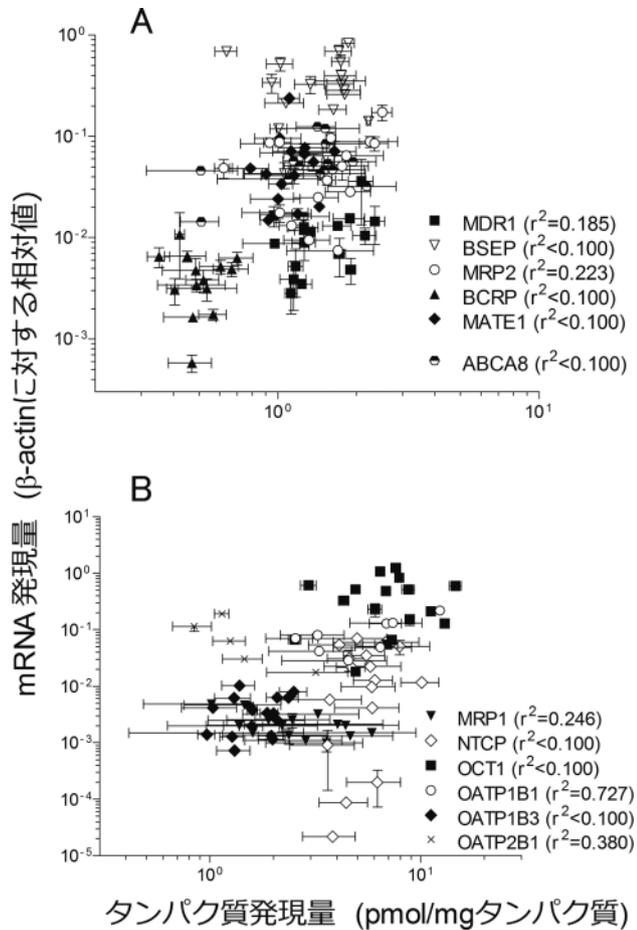


図5 ヒト肝臓におけるトランスポーターのタンパク質発現量と mRNA 発現量の比較

膜タンパク質であるトランスポーターのタンパク質発現量は細胞膜画分を multiplexed-MRM 法によって定量した。mRNA 発現量は同一検体を定量 PCR により定量した。各シンボルは各検体における該当トランスポーターの発現量を示している。(A) 胆管側膜に局在、もしくは局在不明のトランスポーター、(B) 類洞側膜に局在しているトランスポーター。また、分子名の右には相関係数 (r^2) を示した。(文献7を改変)

ような比較によって、タンパク質レベルでの種差の解析や *in vitro* 系の評価が可能である。タンパク質発現量による脳関門輸送系の種差に関しては文献3を参照されたい。

6. タンパク質発現量と分子活性に基づく *in vivo* 機能の再構築

生体内におけるタンパク質の活性は、その活性を発現している「場」における「タンパク質発現量」と「分子あたりの活性」で決まると考えられる。これを複数の分子の相互作用と時間経過を取り入れモデル化することがシステムズバイオロジーである。これまでタンパク質発現量は計測が困難であったためシステムズバイオロジーにはほとんど組み入れられてこなかった。LC-MS/MS を用いた定量で分画した試料を計測することで活性を発現している場にお

A	PK9	RPK9
dCK発現量 (fmol/ μ g タンパク質)	0.477 ± 0.047	< 0.01

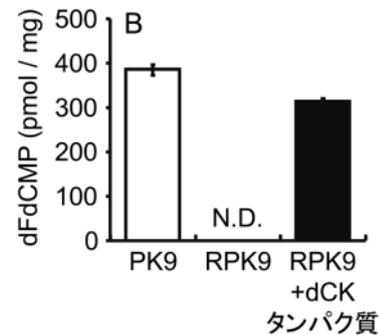


図6 タンパク質発現量情報を用いた定量的な活性回復実験

(A) ゲムシタビン感受性膵がん細胞 (PK9) 及び耐性膵がん細胞 (RPK9) の細胞可溶性画分のゲムシタビンをリン酸化する酵素 (deoxycytidine kinase : dCK) の絶対量。RPK9 では定量限界以下であったため、定量限界値を示している。(B) 細胞可溶性画分中のゲムシタビンを一リン酸化する活性 (ゲムシタビン一リン酸化体生成量) を示している。活性が検出限界以下の RPK9 細胞可溶性画分に PK9 と同等量 ($0.477 \text{ fmol}/\mu\text{g}$ タンパク質 $\times 20 \mu\text{g}$ タンパク質) のリコンビナント dCK を添加することによって活性が 81.6% まで回復した。(文献18を改変)

けるタンパク質の絶対発現量を計測することが可能になった。また、発現細胞における標的タンパク質の絶対発現量を定量することによって *in vitro* 系からモルあたりの活性を計測することが可能である。発現量と活性の情報を図7のように統合することによって、*in vitro* の分子活性を再構築し、定量的に評価することが可能である。

我々は脳関門の重要な機能分子である P-糖タンパク質 (mdr1a) の機能の再構築をマウスを用いて行った²⁰⁾。P-糖タンパク質は血液脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞の血液側の細胞膜に発現し、細胞内から血液方向に薬物を排出することで、薬物の脳への分布を抑制している。野生型と mdr1a/1b ノックアウトマウスの brain-to-plasma concentration ratio ($K_{p \text{ brain}}$) の比である $K_{p \text{ brain}}$ ratio を P-糖タンパク質の *in vivo* 機能の指標とした。11 種類の P-糖タンパク質の基質を用いて $K_{p \text{ brain}}$ ratio を再構築した結果、すべての化合物について予測値と実測値は 1.6 倍以内で一致した (図8)。

この再構築法は *in vivo* における分子の活性評価において三つの大きな意味を持つと考えている。一つは、ノックアウト動物を用いずに *in vivo* の活性の評価が可能となることである。二つめは、原理的にヒトも含めたどのような種にも適応可能であり、分子解析が困難であるヒト、特に疾患時のヒト、における分子の活性評価が可能になることである。最後は、定量的な仮説の評価が可能になることである。モデル化による再構築により得られた値と実測値が

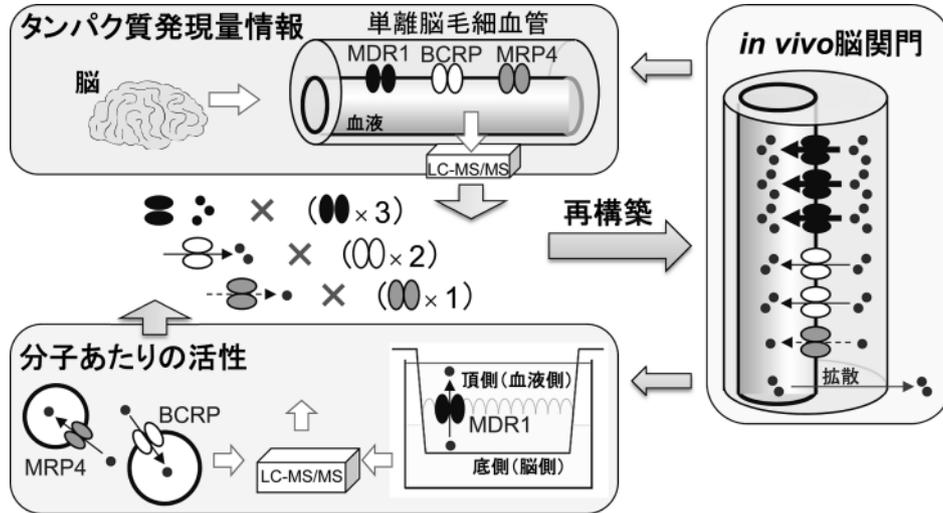


図7 タンパク質発現量と分子活性に基づく *in vivo* 機能の再構築の概要

脳関門(脳毛細血管内皮細胞)における排出輸送系を例に示している。*in vivo* 脳関門の輸送系をタンパク質発現量(上)と分子あたりの活性(下)に分解する。タンパク質発現量は multiplexed-MRM 法から得られる。分子あたりの活性は *in vitro* の輸送活性測定と、multiplexed-MRM 法によるタンパク質量から計算できる。発現量と活性情報を統合することによって、*in vivo* における輸送活性を再構築する。詳細については文献 20 を参考されたい。

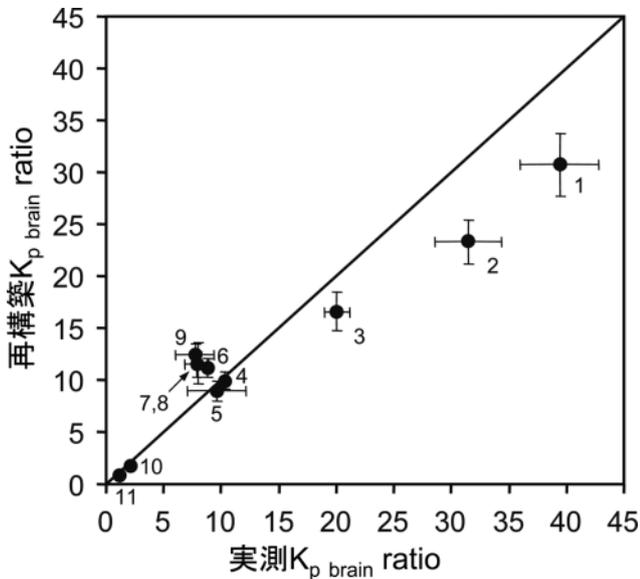


図8 脳関門 P-糖タンパク質活性指標値 ($K_{p, \text{brain}}$ ratio) の再構築値と実測値の一致

1 : quinidine, 2 : loperamide, 3 : digoxin, 4 : risperidone, 5 : indinavir, 6 : dexamethasone, 7 : vinblastine, 8 : paclitaxel, 9 : verapamil, 10 : loratadine, 11 : diazepam. (文献 20 から引用)

異なった場合、それはモデルという仮説のいずれかの部分が正しくないということを意味している。例えば、*in vitro* と *in vivo* の分子あたりの活性が異なる場合もあり得る。再構築値と実測値の違いがモデルのどこに起因しているかということ解析することによって、新しい知見が得られる。今後このような定量的なモデル化による評価は次の生化学としての重要な方向性である「定量的システム生化学」

に必須である。

7. 分子標的薬の個別化治療への展開

がんバイオマーカー研究の目的は主に早期発見と個別化治療のバイオマーカーの同定である。従来のプロテオミクスは網羅的な計測からバイオマーカーの候補を提示する。一方、multiplexed-MRM 法によるタンパク質定量から考えた場合、全く異なる戦略が見えてくる。分子標的薬は作用する分子が従来薬と比較して明確である。従って、分子標的薬が有効な作用を発揮するためには標的分子が発現していなければならない。つまり、標的分子の発現量が分子標的薬の個別化治療の優れたバイオマーカーとなる可能性がある。非常に単純な発想であるが、前に述べたとおり遺伝子発現では細胞膜上のタンパク質発現量を反映することはできない。multiplexed-MRM 法を用いることによって細胞膜上の標的受容体を一齐に定量することができ、初めてタンパク質発現量による分子標的薬の個別化治療が可能になると考えた。

そこで、金沢大学医学系研究科脳・脊髄機能制御学分野の濱田潤一郎教授、中田光俊講師との共同研究のもと、短期間で再発を繰り返す退行性髄膜腫における標的受容体群として PDGFR, EGFR, HER2, VEGFR, c-Met, IGF1R, CD33, CD37, c-kit の発現量を定量した(図 9)²¹⁾。その結果、PDGFR β が高い発現を示していることが明らかになった。そこで、医学倫理審査委員会の承認を得て PDGFR β を阻害する分子標的薬スニチニブ(sunitinib)を投与したところ、開始 2 週間後の MRI にて原発巣および播種巣の

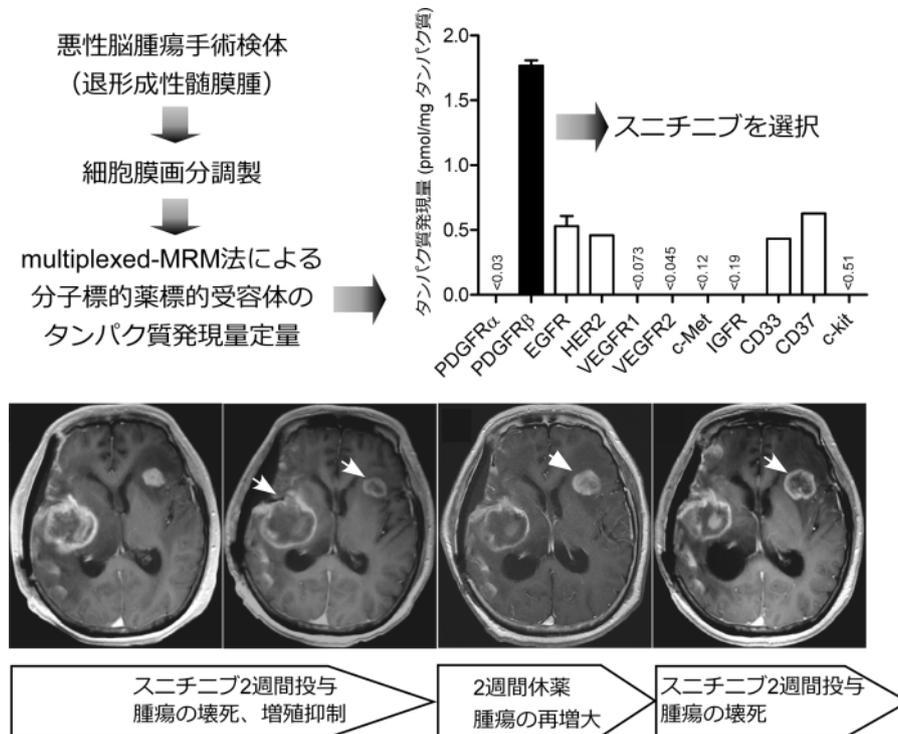


図9 標的受容体のタンパク質発現量に基づく脳腫瘍に対する分子標的薬個別化治療
悪性脳腫瘍患者から摘出した検体から細胞膜画分を調製し multiplexed-MRM 法で定量を行い、グラフに示す分子標的薬の標的受容体タンパク質発現量を得た。グラフ中でバーを示していない分子は定量限界以下であり、定量限界値を示している。患者の腫瘍増殖速度は極めて速く1ヶ月程度で再発を繰り返していた。スニチニブ投与2週間後のMRIにより白く観察される腫瘍の増殖抑制及び内部が黒くなる内部壊死所見が認められた。休薬期間中に腫瘍の再増大が認められたが2回目のスニチニブ投与により再び内部壊死所見が観察された。(文献21を改変)

内部壊死所見を得た。この結果は、標的分子のタンパク質発現量が分子標的薬の選択に有用な指標であることを示唆している。分子標的薬が一部の患者でのみ劇的な効果を発揮している現状から考えると、分子標的薬の適用はがん組織ごとではなく、がんが発現している分子の発現プロファイルに基づいて行うべきだと考えられる。さらに、標的分子の発現プロファイルによる分子標的薬の選択が可能であれば、様々ながんへの適用の拡大が今よりも素早く効果的にいえるようになるであろう。

8. おわりに

LC-MS/MSを用いたMRM法は抗体に代わるタンパク質定量技術として認知されつつある。しかし、液体クロマトグラフィーと質量分析に関してかなりの技術的難度が予想されるため、技術を知っていても実際に利用するには至らないケースもあることが予想される。現在、複数の会社でMRM法によるタンパク質定量の受託解析が開始されている。また、解析のための試料前処理に関してもタンパク質を扱うための基本的知識と技術を備えていれば難しい処理方法ではない。受託解析を利用すれば質量分析とプロテ

オミクスの専門家ではない生化学研究者にとっても充分利用することができる技術になりつつある。また、multiplexed-MRMは単にイムノプロットやELISAに代わる技術ではない。そこから得られるタンパク質発現量情報はこれまでの技術とは異なる精度と質を含んでいる。タンパク質定量は生命科学研究の根幹技術であるため、得られる情報の応用性は極めて広く、今後、多くの研究者に利用していただくことによって様々な方面への新しい展開が開けるのではないだろうか。特に、本稿で紹介したように新たに得られるタンパク質の発現量を基盤とした創薬研究やバイオマーカー研究はファーマコプロテオミクスとして新たな領域を展開すると期待される。

謝辞

本研究の一部は新エネルギー・産業技術開発機構産業技術研究助成事業、内閣府最先端最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われたものであり、ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Michaud, G.A., Salcius, M., Zhou, F., Bangham, R., Bonin, J., Guo, H., Snyder, M., Predki, P.F., & Schweitzer, B.I. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1509–1512.
- 2) Baron, A.T., Lafky, J.M., Suman, V.J., Hillman, D.W., Buenafe, M.C., Boardman, C.H., Podratz, K.C., Perez, E.A., & Maihle, N.J. (2001) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **10**, 1175–1185.
- 3) Ohtsuki, S., Uchida, Y., Kubo, Y., & Terasaki, T. (2011) *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3547–3559.
- 4) Kawakami, H., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Suzuki, T., Abe, T., & Terasaki, T. (2011) *J. Pharm. Sci.*, **100**, 341–352.
- 5) Kamiie, J., Ohtsuki, S., Iwase, R., Ohmine, K., Katsukura, Y., Yanai, K., Sekine, Y., Uchida, Y., Ito, S., & Terasaki, T. (2008) *Pharm. Res.*, **25**, 1469–1483.
- 6) Schaefer, O., Ohtsuki, S., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., Sakamoto, A., Ishiguro, N., Matsumaru, T., Terasaki, T., & Ebner, T. (2012) *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 93–103.
- 7) Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., Ishiguro, N., Kishimoto, W., Ludwig-Schwelling, E., Ebner, T., & Terasaki, T. (2012) *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 83–92.
- 8) Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J., & Terasaki, T. (2011) *J. Neurochem.*, **117**, 333–345.
- 9) Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Dumas-Duport, C., Couraud, P.O., Terasaki, T., & Scherrmann, J.M. (2011) *Mol. Pharm.*, **8**, 1332–1341.
- 10) Ito, K., Uchida, Y., Ohtsuki, S., Aizawa, S., Kawakami, H., Katsukura, Y., Kamiie, J., & Terasaki, T. (2011) *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3939–3950.
- 11) Niessen, J., Jedlitschky, G., Grube, M., Kawakami, H., Kamiie, J., Ohtsuki, S., Schwertz, H., Bien, S., Starke, K., Ritter, C., Strobel, U., Greinacher, A., Terasaki, T., & Kroemer, H.K. (2010) *Pharmacogenet. Genomics*, **20**, 396–400.
- 12) Niessen, J., Jedlitschky, G., Grube, M., Bien, S., Schwertz, H., Ohtsuki, S., Kawakami, H., Kamiie, J., Oswald, S., Starke, K., Strobel, U., Siegmund, W., Roskopf, D., Greinacher, A., Terasaki, T., & Kroemer, H.K. (2009) *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 1129–1137.
- 13) Wang, M.Z., Wu, J.Q., Dennison, J.B., Bridges, A.S., Hall, S. D., Kornbluth, S., Tidwell, R.R., Smith, P.C., Voyksner, R.D., Paine, M.F., & Hall, J.E. (2008) *Proteomics*, **8**, 4186–4196.
- 14) Stahl-Zeng, J., Lange, V., Ossola, R., Eckhardt, K., Krek, W., Aebersold, R., & Domon, B. (2007) *Mol. Cell Proteomics*, **6**, 1809–1817.
- 15) Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Domon, B., & Aebersold, R. (2009) *Cell*, **138**, 795–806.
- 16) Domanski, D., Murphy, L.C. & Borchers, C.H. (2010) *Anal. Chem.*, **82**, 5610–5620.
- 17) Ciccimaro, E., Hanks, S.K., Yu, K.H., & Blair, I.A. (2009) *Anal. Chem.*, **81**, 3304–3313.
- 18) Ohmine, K., Kawaguchi, K., Ohtsuki, S., Motoi, F., Egawa, S., Unno, M., & Terasaki, T. (2012) *Pharm. Res.*, **29**, 2006–2016.
- 19) Ito, S., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Funaki, M., Koitabashi, Y., Sugino, A., Murata, S., & Terasaki, T. (2011) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**, 457–466.
- 20) Uchida, Y., Ohtsuki, S., Kamiie, J., & Terasaki, T. (2011) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **339**, 579–588.
- 21) Yoshikawa, A., Nakada, M., Ohtsuki, S., Hayashi, Y., Obuchi, W., Sato, Y., Ikeda, C., Watanabe, T., Kawahara, Y., Hasegawa, T., Sabit, H., Kita, D., Hayashi, Y., Nakanuma, Y., Terasaki, T., & Hamada, J.I. (2012) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **38**, 105–110.