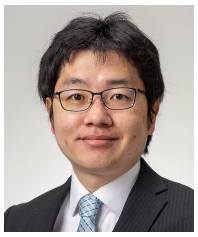
薬 剤 学, **81** (4), 290–295 (2021)

≪若手研究者紹介≫



質量分析を基盤にしたトランスポーターの生体内基質探索

増 尾 友 佑* Yusuke Masuo
金沢大学薬学系 分子薬物治療学研究室

1. は じ め に

2013 年に博士後期課程を修了して 8 年が経過した．筆者は，学生時代から現在に至るまで薬剤学と薬物動態学に基づいて薬物治療の最適化を目指して研究を展開しており，これらは液体クロマトグラフィー-質量分析計（LC-MS）での分析に基づいている．LC-MS は，化合物の定量解析に汎用されるが，定性解析も含めた活用を筆者の体験に基づいて本稿で紹介していきたい．

2. MS との関わり～学生時代～

学部 4 年の時，鈴木洋史教授が主宰する臨床薬物動態学研究室（東京大学医学部附属病院薬剤部）に配属された．最初はあるトランスポーターとホモロジーが高い機能未知の膜タンパク質のクローニングに取り組み，幸いにしてクローニングは順調に進み，細胞での一過性発現も確認できた．初めての研究室セミナーの発表において，当該タンパク質の輸送基質の探索手法を尋ねられた際に，安易に LC-MS/MS で同定します，と答えた．基質の候補化合物を一つずつ検証するか，スクリーニングを実施するか，全く考慮しておらず恥ずかしい限りであるが，これが私の MS との関わりの最初であった．

その後，抗てんかん薬バルプロ酸とカルバペネム系抗生物質の薬物相互作用メカニズムを解明すべく，バルプロ酸とその代謝物のバルプロ酸グルクロナイドの LC-MS/MS での測定系をまず立ち上げた．ここでバルプロ酸グルクロナイドを LC-MS/MS にインジェクションした際に，バルプロ酸が検出された．イオン源での熱や電圧で，抱合代謝物が開裂し，親化合物として検出される「インソースフラグメンテーション」が生じていた．質量分析の経験者が頻繁に遭遇する現象だが，当時の筆者はそのような知識もなく，コンタミネーションではないかと右往左往していた．この「開裂しやすい特徴的な構造」に直面した経験は，後の筆者の構造選択的な検出，解析に活きてきたと思う．なお，バルプロ酸グルクロナイドの脱抱合を特徴づけしつつ[1]，当該酵素の分子実体の解明のためにタンパク質精製に取り組んでいた矢先，当該酵素を同定した論文が公開され，研究における競争の激しさを痛感した．博士後期課程 1 年の夏であったが，あと 1～2 年ずれていたらと思うと背筋が凍る思いである．

3. トランスポーター OCTN1 の生体内基質の同定

3.1 トランスポーターの生体内基質同定へのメタボロミクスの活用

博士課程修了後，金沢大学薬学系分子薬物治療学研究室の助教に着任し，加藤将夫教授のもとトランスポーターの機能解析に取り組んでいる．トランスポーターは，薬物のみならず，生体内基質を輸送し，生体のホメオスタシス維持にも働く．実際，トランスポーターの遺伝子変異は種々の疾患と関連し，トランスポーターの生体内基質を同定することは当該トランスポーターの生理的機能や病態原因の解明に

*2008 年 3 月東京大学薬学部卒，2013 年 3 月東京大学大学院薬学系研究科博士後期課程修了，同年 4 月より金沢大学薬学系分子薬物治療学研究室助教，2021 年 7 月准教授，現在に至る．2015 年 1 月～12 月米国 NIH 訪問研究員．研究テーマ：薬物治療学，メタボロミクス．
連絡先：〒920–1192 石川県金沢市角間町
E-mail: masuo@p.kanazawa-u.ac.jp

つながる．トランスポーターOCTN1/SLC22A4（Organic Cation/Carnitine Transporter 1）は，クローン病の関連遺伝子の一つで，OCTN1の一遺伝子多型のL503Fを有するヒトはクローン病の罹患リスクが高い．そこで，OCTN1はクローン病の関連化合物を基質とするのではないかとの仮説を立て，OCTN1の生体内基質の同定を試みた．

メタボロミクスは化合物の濃度変化を網羅的に検出できるため，トランスポーターの輸送機能が異なるサンプル間を比較することで，生体内基質の同定に有用である．トランスポーターの機能変化で生じた血漿や組織，細胞内の化合物濃度変化は，イオンのシグナル強度変化として網羅的に検出される．本手法は，トランスポーターの輸送機能を直接捉えられるため，オミクス解析から見出した差異が機能に直結する．メタボロミクスは，バイオマーカー探索を目指して差異のあるイオンに着目する方法と，測定結果を代謝マップに投影してパスウェイ解析を行う方法に大きく二分される．筆者は主に前者を対象として，測定対象化合物を限定しないアンターゲットメタボロミクスによる基質探索を，高分解能で測定可能な，液体クロマトグラフィー–飛行時間型質量分析計（LC-TOFMS）を併用して取り組んでいる．

3.2 トランスポーターの機能が異なる実験系の構築

トランスポーターの機能が異なる群として，野生型と遺伝子欠損マウス，vehicleと阻害剤投与群，mockとトランスポーター発現系細胞といった比較群がある．このうち，野生型とノックアウトマウスの血漿や組織をメタボロミクスで比較するアプローチは，*in vivo*での機能変化を的確に捉えられるものの，炎症とは無関係の基質化合物や，炎症で副次的に変動した基質以外の化合物も含む可能性がある．そこで*in vivo*よりも，*in vitro*のトランスポーター発現系のほうが，トランスポーターの機能変化による副次的な影響が少ないのではないかと考えた．一方で，*in vitro*実験系の培地中に目的の基質が存在するかは不明であったことから，デキストラン硫酸ナトリウムで誘発した炎症性腸疾患マウスから消化管ホモジネートを抽出し，基質源に供した．OCTN1発現細胞またはコントロール細胞を，基質源を含有するバッファーと一定時間インキュベーションし，OCTN1基質候補化合物を細胞内に濃縮した．

3.3 誘導体化反応を用いた構造選択的メタボロミクス

選択性をさらに高めるべく，サンプル調製とLC-MS/MSによる検出に誘導体化反応を組み込んだ．OCTN1は，生理的なpHで正電荷を帯びた化合物を基質として認識しやすく，基質の多くはアミノ基を有している．この特徴を利用して，アミノ基を有する化合物のみを選択的に検出する誘導体化メタボロミクスを構築して，偽陽性の軽減を目指した．アミノ酸の質量分析用の誘導体化試薬3-aminopyridyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamate（APDS）は，アミノ基と水中で反応し，誘導体化反応物はAPDS由来のfragmentイオンを共通に有する．そこで，細胞抽出液をAPDSと反応後，APDSのfragmentイオンを対象にしたprecursorイオンスキャンをLC-MS/MSで行うことで，APDSと反応した化合物，すなわちアミノ基を有した化合物を選択的かつ網羅的に検出できる（図1A）．また，水溶性が高く，汎用の逆相カラムに保持しづらい化合物は，APDSによる誘導体化後は，脂溶性が増してカラムに保持されやすくなる．つまり，APDSによる誘導体化と，APDS由来のfragmentイオンを対象にしたprecursorイオンスキャンを融合することで，測定対象の化合物を拡大しつつも，選択的な検出ができる．筆者は，他にも誘導体反応を活用することで，腎機能の異なる患者血漿中の6-hydroxyindoleを，位置異性体を分離した上でLC-MS/MSで定量し，腎機能の低下に伴って6-hydroxyindoleの血漿中濃度が増加することを示した[2]．

アンターゲットメタボロミクスの取得データは，*m/z*（イオンの精密質量を電荷で除した値），リテンションタイム（カラムからの溶出時間），イオン強度の3次元データで構成され，最初にピークの抽出工程（ピークピッキング）が必要となる．ピークピッキングは，ソフトウェアのパラメーターや抽出アルゴリズムに強く依存し，厳しいパラメーター設定では検出される総ピーク数が少なく，緩い設定ではノイズ由来のシグナルが多数を占め，最適化に苦労した．ソフトウェアよりも，ヒトの目で画像を比較した方が精度よく抽出できるのではないかと考え，それぞれの検出イオンを，横軸をリテンションタイム，縦軸を*m/z*でプロットし，イオンのシグナル強度を

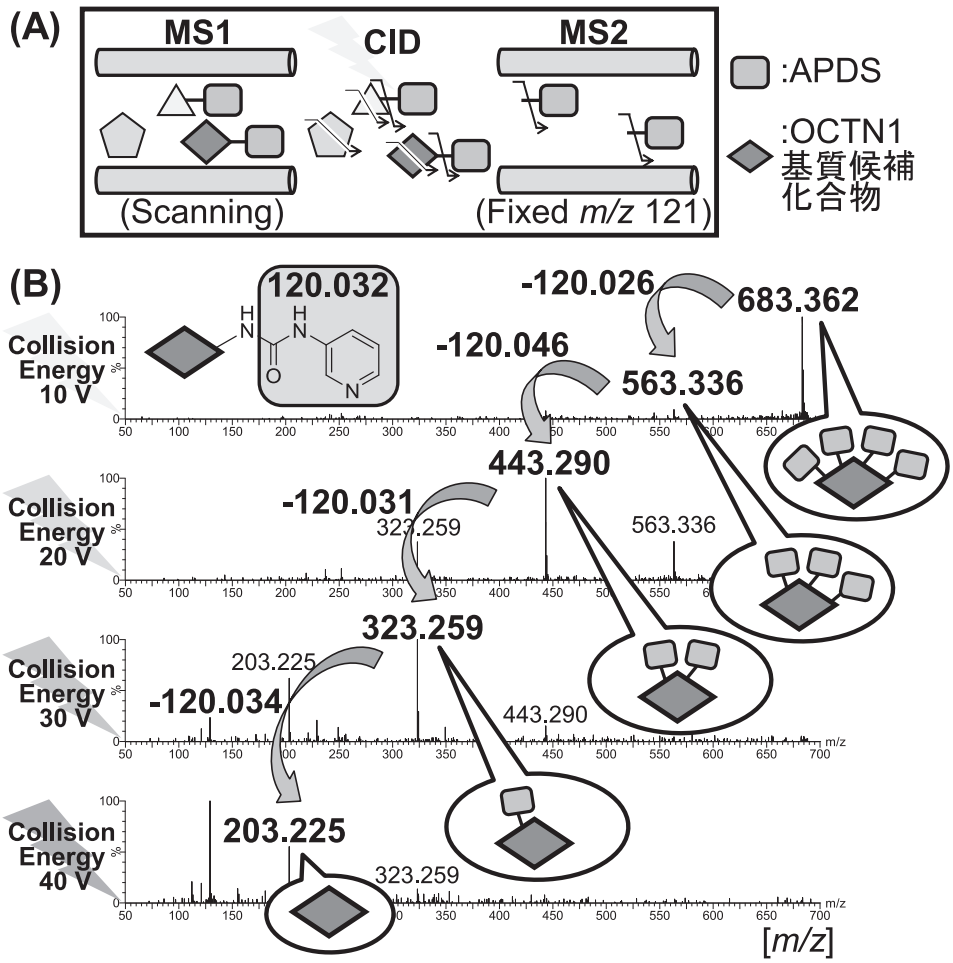


図 1 （A）LC-MS/MS による APDS 誘導体化反応物の Precursor イオンスキャン．
（B）*m/z* 683.4 の MS/MS スペクトル．

色の濃淡で示したヒートマップを，タンパク質の二次元電気泳動のように描画した．OHP フィルムに印刷して重ねて見比べるという，アナログな荒業も挑戦したが，全く役立たなかった．そんな中，アメリカ国立衛生研究所の Dr. Frank Gonzalez の研究室に留学する機会を頂き，アンターゲットメタボロミクスの技術基盤を習得した．助教に着任して 2 年も経っていない中，快く送り出してくださった加藤教授，研究室員の方々には感謝しつくせない．

帰国後，測定と解析に取り組み，OCTN1 発現系細胞で mock よりもイオン強度が明確に高いピークが抽出されたが，化合物に帰属できないでいた．アンターゲットメタボロミクスでは，*m/z* とリテンションタイムの情報で構成されるイオンを，化合物に帰属するのが困難なことが多い．リテンションタイムは LC システムやカラムに依存し，化合物の帰属には活用しづらい．一般的には，*m/z* を化合物データベースで検索し，候補化合物の妥当性を検証する．しかし，データベースは全化合物を網羅していない上に，同一の *m/z* でも異なる組成式や異性体の候補化合物が存在する．他のオミクス解析として次世代シークエンスやプロテオミクスは，構成される要素が核酸塩基またはアミノ酸に限定され，さらにゲノム情報に基づいて塩基またはアミノ酸配列情報と照合できることから，帰属が比較的容易である．筆者もプロテオミクスでタンパク質の一斉定量に携わったが，タンパク質に自動で帰属できることに感銘を受けた[3]．一方，メタボロミクスで検出対象とする化合物は，ヒトが一生のうちに暴露されるだけでも数万種類存在し，その代謝物までも考慮すると，全てを網羅したデータベースの構築は困難である．OCTN1 生体内基質候補として抽出された *m/z* 342.1 を APDS の誘導体化による増加分を引いた上で，データベースで検索しても妥当な化合物がヒットしなかった．化合物がデータベースに存在しない場合を考慮し，*m/z* を満たす炭素，水素，窒素，硫黄の原

子数を計算し，2 週間ほど構造推定をする日々が続いていた．

ある日，候補イオン *m/z* 342.1 の MS スペクトルの同位体イオンとの差が 0.5 であり，候補イオンは 2 価であったことにようやく気付いた．炭素原子の ^{12}C と ^{13}C の安定同位体比はおよそ 100：1 であり，炭素を含む化合物の MS スペクトルは ^{13}C を含む同位体ピークが観測され，その間隔の逆数が価数になる．1 価では *m/z* は 683.4 であり，既知の OCTN1 基質よりも分子量が大きいことが懸念されたが，MS/MS 解析でこの杞憂は解消された．コリジョン電圧を高めていくと，*m/z* 683.4 の fragment イオンは，120 ずつ 4 回減り，この差分は開裂しやすいアミド結合でつながった APDS に由来する（図 1B）．つまり，化合物には APDS が 4 分子反応し，アミノ基を 4 つ有することが推測された．データベース検索の結果，spermine が候補としてヒットした．実際に，spermine は分子内にアミノ基を 4 個有していたことから，未知分子の構造推定において MS/MS fragment 情報の有用性を実感した．その後，spermine は OCTN1 内因性基質として同定された．L503F 変異を有するヒトは，腸管マクロファージ等に spermine が多く取り込まれ，spermine の活性代謝物が炎症を増悪させる因子の一部になることを示唆できた[4]．

4. トランスポーター BCRP の生体内基質の同定

4.1 トランスポーターの生体内基質の機能バイオマーカーへの活用

トランスポーターの輸送機能は，遺伝子変異，発現量，阻害作用等の複数の要因で変化し，その機能変化は基質薬の薬効や副作用に影響する．トランスポーターの生体内基質は，トランスポーターの機能変化に応じて血漿や尿中濃度が変化しうるため，その血漿または尿中濃度が，*in vivo* でのトランスポーター機能を反映したバイオマーカーに活用できる．

トランスポーター BCRP（Breast Cancer Resistant Protein/ABCG2）は，小腸管腔側，肝臓胆管膜，血液脳関門の基底膜側の細胞膜に発現し，基質化合物を細胞外へ排出する．BCRP は，抗がん薬を含む多くの薬物を排出輸送し，これらの薬物の体内動態の規定因子の一つである．BCRP の生体内基質は複数同定されていたが，併用薬による BCRP の阻害でこれらの血漿中濃度が変動するかは不明であった．そこで，薬物相互作用のポテンシャル予測に適用可能な BCRP の生体内基質探索を目的とし，野生型マウスに BCRP 阻害剤を投与後，血漿中濃度が上昇する化合物をメタボロミクスで網羅的に探索した．

4.2 マウスの食餌成分の基質源としての重要性

バイオマーカーへの活用を目指した化合物を実験動物で探索するにあたり，実験動物とヒト間での食餌成分の違いに着目した．マウスが通常摂取する chow diet は，穀物と添加された必須栄養素で構成され，ヒトの食餌のような化合物のバリエーションが少ない．そこで，マウスの餌をヒトの食事に模倣することで，基質源中の化合物の多様性が高まり，バイオマーカーを発見しやすくなると考えた．しかし，混餌できる食材はマウスへの感染対策から限定され，少なくとも乾燥食品が望ましい．最初の候補はペットフードであり，成分表を確認して，なるべく多様な原料で構成された製品をマウスに摂餌させたものの，有望な候補イオンは発見できなかった．その後，BCRP は isoflavone 類とその代謝物を基質とし，ヒトは大豆由来食品を日常的に摂取することに着目し，粉末で混餌投与が容易な「きな粉」を摂餌したマウスでバイオマーカー探索を開始した．

4.3 All Ion Fragmentation による構造情報の絞り込み

アンターゲットメタボロミクス解析において「*m/z* と溶出時間から化合物に帰属する」プロセスは，前述のように困難が多く，バイオマーカーの候補イオンでも化合物が同定できないことにも遭遇した．打開策を模索していたところ，precursor イオンに付随して，fragment イオンを一度の測定で網羅的に取得できる All Ion Fragmentation（AIF）という測定解析技術の導入に至った（図 2）．コリジョン電圧のオフ，オンを切替えながら測定すると，precursor イオンと fragment イオンを交互に取得できるが，fragment イオンがどの precursor イオンに由来するかは不明であった．そこで，precursor とその fragment イオン間のリテンションタイムが等しい，precursor とその fragment のイオン強度比は全てのサンプルで等しい，という両方の条件を満たす precursor と fragment イオン間で対応づけることがインフォマティクス解析で可能になった[5]．AIF は fragment イオンを一度の測定で取得するため，

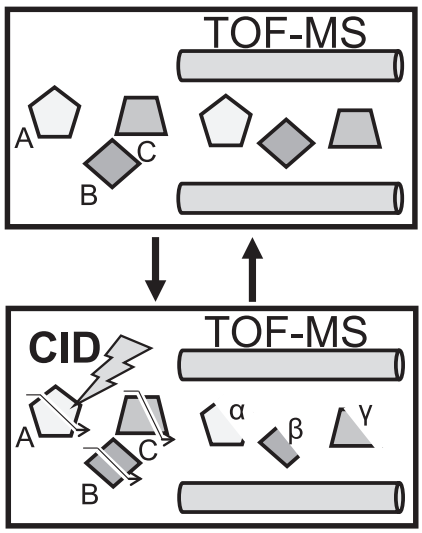


図 2　All Ion Fragmentation によるデータ取得．Precursor イオン（A, B, C）と Fragment イオン（α, β, γ）は，インフォマティクス処理で対応づける．

conventional な MS/MS のように precursor イオンごとに fragment イオンを取得する必要がなくなり，解析が効率化できる．さらに，未知イオンの化合物への帰属において，対象とするイオンと類似した fragment パターンを有するイオンをグループ化することで，グループ内の既知イオンの化合物情報から，未知イオンの構造推定が可能である．AIF がイオンから化合物の帰属を飛躍的に発展することが期待されるため，筆者は LC-TOFMS での全測定に AIF を導入している．

AIF を活用して，BCRP の阻害剤を投与したマウスで血漿中濃度が変動する BCRP の生体内基質を効率的に同定した例を紹介する．マウスに阻害剤を投与した群と非投与群の血漿サンプルをメタボロミクスで比較すると，阻害剤投与群の血漿では，目的の BCRP 生体内基質に加えて，阻害剤に由来する化合物も濃度が増加する．阻害剤は代謝で複数化合物を生じ，さらに各化合物のインソースフラグメンテーションや多価イオンが存在して，阻害剤に由来するイオンが複数存在することが示唆された．用いた阻害剤は，分子内に塩素原子を含み，塩素原子は ^{35}Cl と ^{37}Cl の同位体比が約 3：1 と高く，阻害剤に由来するイオンは特徴的な MS スペクトルを示す．しかし，塩素原子を失う代謝物や fragment イオンも存在することから，precursor イオンの MS スペクトル情報のみでは，阻害剤に由来する全イオンは抽出できない．そこで，構造選択的なメタボロミクスで BCRP の生体内基質を効率的に選択した．硫酸抱合体は，BCRP の基質となりやすく，その fragment イオンは開裂しやすい硫酸基が外れて検出される．AIF で生成させた precursor と fragment イオンの対応づけ情報から，precursor と fragment の *m/z* の差分が硫酸基に対応している precursor のみを選択することで，硫酸抱合体を抽出できる．複数の硫酸抱合体が同定され，BCRP の生体内基質を効率的に同定することに成功した．同様な手法は neutral loss scan でも特定の構造を有した代謝物の網羅解析で利用されるが，AIF では取得済みの MS データの再解析から可能な面で，汎用性が高く今後の活用が期待される．

5. お　わ　り　に

多くのトランスポーターは複数臓器に発現しており，生体内基質の血漿中濃度がいずれの臓器での機能を反映するか，生体内基質の合成，消失を考慮した薬物動態の観点に基づいた探索がバイオマーカーの有用性を示す上で今後必要である．一方で，MS の感度や分解が進展しつつも，MS での取得データを十分に活かしきれていないことがある．Fragment パターンやイオン強度のクラスター解析は，対象化合物の前駆体や代謝物同定につながる可能性があり，データ駆動型サイエンスでの活用が期待される．筆者は，これまで培った薬剤学の研究基盤に基づき，本分野で貢献していきたいと考えている．最後に，本研究を遂行するに当たり，ご指導・ご協力を頂きました先生方に深謝するとともに，研究に一緒に携わってくれました学生の方々にも感謝いたします．

引　用　文　献

1) Y. Masuo, K. Ito, T. Yamamoto, A. Hisaka, M. Honma, H. Suzuki, Characterization of inhibitory effect of carbapenem antibiotics on the deconjugation of valproic acid glucuronide, *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1828–1835 (2010).
2) Y. Masuo, K. Fujita, K. Mishiro, N. Seba, T. Kogi, H. Okumura, N. Matsumoto, M. Kunishima, Y. Kato, 6-Hydroxyindole is an endogenous long-lasting OATP1B1 inhibitor elevated in renal failure patients, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **35**, 555–562 (2020).
3) Y. Masuo, S. Nagamori, A. Hasegawa, K. Hayashi, N. Isozumi, N. Nakamichi, Y. Kanai, Y. Kato, Utilization of liver microsomes to estimate hepatic intrinsic clearance of monoamine oxidase substrate drugs in humans, *Pharm. Res.*, **34**, 1233–1243

(2017).
4) Y. Masuo, Y. Ohba, K. Yamada, A. H. Al-Shammari, N. Seba, N. Nakamichi, T. Ogihara, M. Kunishima, Y. Kato, Combination metabolomics approach for identifying endogenous substrates of carnitine/organic cation transporter OCTN1, *Pharm. Res.*, **35**, 224 (2018).
5) H. Tsugawa, R. Nakabayashi, T. Mori, Y. Yamada, M. Takahashi, A. Rai, R. Sugiyama, H. Yamamoto, T. Nakaya, M. Yamazaki, R. Kooke, JA. Bac-Molenaar, N. Oztolan-Erol, JJB. Keurentjes JJB, M. Arita, K. Saito K, A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms, *Nat. Methods*, **16**, 295–298 (2019).