

かった。低発現血清タンパク質解析には、ベックマン抗体カラムの非特異的吸着を防止する改良が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。創薬プロテオームファクトリー施設では万全なバイオハザード対策を施工している。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

I. 参考文献：

- 1) 金子 勲：疾患関連タンパク質解析研究 平成 16 年度 総括・分担研究報告書(長尾 拓編) p254-286.
- 2) 金子 勲：疾患関連タンパク質解析研究 平成 17 年度 総括・分担研究報告書 (山西弘一編) p.104-144.
- 3) Kirk, C. et al. Molecular & Cellular Proteomics. **2**. 299-314(2003)

表 1. フランス人血清Aの解析結果

Protein Reference ID	Score	Description	Ratio	Deviaton	LCAT Label	RF	Ref	Publ	Pop	LCys	Cont
1 QI4557871	1167.38	transferrin; PRO2086 protein	0.539	0.103	LIGHT	28	107			24	
2 QI4557872	1163.63	H factor 1 (complement); H factor-1 (complement); complement factor 1; factor 1	0.539	0.103	LIGHT	28	107			24	
4 QI4502027	873.99	albumin precursor; PRO2083 protein	0.726	0.171	LIGHT	22	79			26	
4 QI4557385	823.75	complement component 3 precursor; acylation-stimulating protein	0.544	0.156	LIGHT	23	83			19	
5 QI4503635	644.99	coagulation factor II precursor; prothrombin	0.724	0.156	LIGHT	16	32			13	
6 QI4505881	609.46	plasminogen	0.655	0.131	LIGHT	20	41			23	
7 QI4557225	548.48	alpha-2-macroglobulin precursor	0.817	0.23	LIGHT	14	48			13	
8 QI4557327	537.37	beta-2-glycoprotein I precursor	1.096	0.247	HEAVY	14	62			14	
9 QI32483410	485.67	vitamin D-binding protein precursor; vitamin D-binding alpha-globulin	0.71	0.226	LIGHT	14	43			20	
10 QI4502397	439.1	complement factor B precursor; C3 proactivator; C3 proactivator; C3 proactivator; C3 proactivator	0.55	0.175	LIGHT	23/25	29			28	
11 QI45580688	437.95	complement component 7 precursor	0.70	0.186	LIGHT	15	24			18	
12 QI45049372	417.02	I factor (complement)	0.999	0.175	LIGHT	16	28			17	
13 QI4504893	403.77	kininogen 1; alpha-2-thiol proteinase inhibitor; bradykinin	1.129	0.163	LIGHT	9	40			7	
14 QI4557485	402.68	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	1.32	0.215	HEAVY	11	33			8	
15 QI4504877	399.48	plasma kallikrein B1 precursor; Kallikrein, plasma; kallikrein 3, plasma	0.685	0.168	LIGHT	11	33			8	
16 QI4501987	387.52	afamin precursor; alpha-albumin	0.99	0.158	HEAVY	12	17			13	
17 QI4558406	389.75	Complement component 6 precursor	0.937	0.204	LIGHT	12	22			13	
18 QI11321561	378.98	hemexipin	1.091	0.147	LIGHT	8	152			9	
19 QI4502067	377.36	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor; Alpha-1-microglobulin/bikunin	0.61	0.23	LIGHT	9	40			7	
20 QI14577919	369.9	complement component 4A precursor; acidic C4; Rodgers form 1; C4A	0.952	0.163	LIGHT	12	44			12	
21 QI4502503	362.76	complement component 4 binding protein, alpha; Complement component 4 binding protein, alpha	0.646	0.126	LIGHT	8	45			8	
22 QI4826762	329.81	haptoglobin	0.646	0.126	LIGHT	8	45			8	
23 QI38016947	327.31	complement component 5	0.958	0.202	LIGHT	8	15			7	
24 QI4502005	309.96	alpha-2-HS-glycoprotein; Alpha-2-HS-glycoprotein	0.675	0.101	LIGHT	9	55			6	
25 QI4503625	307.51	coagulation factor XII precursor; Hageman factor	0.714	0.191	LIGHT	9	16			8	
26 QI16932542	303.5	fibrinectin; isoform 3 precursor; cold-insoluble globulin; migration-inhibiting factor 2	0.67	0.188	HEAVY	11	16			16	
27 QI4502153	305.61	apolipoprotein B precursor, apoB-100; apoB-48	0.765	0.183	LIGHT	6	9			6	
28 QI4502493	277.55	complement component 1, r subcomponent	0.818	0.087	LIGHT	8	13			8	
29 QI21071039	267.06	alpha 1B-glycoprotein	1.109	0.121	LIGHT	6	18			5	
30 QI4557389	260.6	complement component 8, alpha polypeptide precursor	0.935	0.168	LIGHT	7	11			7	
31 QI15174411	250.57	CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine rich family); SPALPO	0.67	0.197	LIGHT	9	10			10	
32 QI4505737	225.87	properdin P factor, complement	1.398	0.276	HEAVY	8	11			11	
33 QI4502495	224.23	complement component 1, s subcomponent	0.815	0.208	LIGHT	8	11			10	
34 QI40317626	221.37	thrombospondin 1 precursor	0.666	0.083	LIGHT	8	11			10	
35 QI4502544	209.86	complement component 9	1.285	0.19	LIGHT	5	9			6	
36 QI4505757	196.4	tetranectin (plasminogen binding protein); tetranectin (plasminogen binding protein)	0.658	0.077	LIGHT	4	6			4	
37 QI5574122	179.41	retinol-binding protein 4, plasma precursor	1.129	0.338	HEAVY	3	13			2	
38 QI4504781	169	inter-alpha (globulin) inhibitor H1; inter-alpha (globulin) inhibitor, H1	0.628	0.135	HEAVY	3	7			3	
39 QI21361542	154.49	peptidoglycan recognition protein L precursor	0.845	0.14	LIGHT	4	7			4	
40 QI4504165	148.1	gelsolin isoform 1	0.646	0.105	LIGHT	3	9			2	
41 QI4505733	140.1	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)	2.532	0.64	HEAVY	3	6			2	
42 QI4502261	138.91	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1; alpha-2-macroglobulin	0.677	0.135	LIGHT	4	23			4	
43 QI45080723	137.52	haptoglobin-related protein; Haptoglobin-related locus	0.624	0.064	LIGHT	5	19			5	
44 QI4505987	131.67	pro-platelet basic protein precursor; connective tissue activating peptidase III; inter-alpha-2-macroglobulin; neutrophil-activating protein	0.555	0.149	HEAVY	4	5			3	
45 QI31643212	126.15	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	0.955	0.192	LIGHT	5	5			6	
46 QI4502337	125.67	alpha-2-glycoprotein 1, zinc; Alpha-2-glycoprotein, zinc	0.781	0.053	LIGHT	3	5			2	
47 QI4504488	124.89	histidine-rich glycoprotein precursor; histidine-proline rich glycoprotein	0.62	0.061	LIGHT	4	8			3	
48 QI21489959	122.04	immunoglobulin J chain	0.628	0.13	LIGHT	4	8			3	
49 QI4503636	113.93	coagulation factor X precursor; prothrombinase; factor Xa	0.729	0.353	LIGHT	3	5			3	
50 QI9961357	109.52	coagulation factor XIII B subunit precursor; TGate	0.877	0.092	LIGHT	3	3			3	
51 QI9257232	108.7	orosomucoid 1 precursor; Orosomucoid-1 (alpha-1-acid glycoprotein)	0.74	0.05	LIGHT	3	8			2	
52 QI11450407	105.34	complement component 2 precursor; C3/C5 convertase	0.781	0.107	HEAVY	2	3			3	
53 QI21450883	103.45	atriacin isoform 2; attractin-2; mahogany protein	0.856	0.103	HEAVY	4	5			4	
54 QI4506189	100.47	complement component 8, beta polypeptide	0.577	0.135	LIGHT	3	5			5	
55 QI4503745	96.43	filamin 1 (actin-binding protein-280); filamin 1; filamin A, alpha	0.68	0.109	LIGHT	3	4			3	
56 QI11321587	86.59	H factor (complement)-like 1	0.709	0.443	HEAVY	3	4			3	
57 QI54792787	84.31	complement factor H-related 3	1.095	0.083	HEAVY	3	5			3	
58 QI4502871	72.89	mannan-binding lectin serine protease 1 isoform 1, precursor; pro-heparan sulfate binding protein-associated; HSP	0.855	0.199	LIGHT	3	4			3	
59 QI4504383	72.51	HCF activator precursor; HCF	0.640	0.084	LIGHT	3	4			3	
60 QI4504783	72.18	inter-alpha (globulin) inhibitor H2; inter-alpha (globulin) inhibitor, H2	0.64	0.085	HEAVY	2	16			4	
61 QI51464088	71.15	PREDICTED: similar to Carboxypeptidase N 83 kDa chain (Carboxypeptidase N; inter-alpha-2-macroglobulin subunit)	0.628	0.184	LIGHT	3	6			5	
62 QI50363217	71.11	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, alpha-1-macroglobulin, alpha-2-macroglobulin, alpha-1-antitrypsin)	0.64	0.01	LIGHT	2	5			5	
63 QI4557331	67.93	complement component 8, beta polypeptide	0.815	0.208	LIGHT	8	11			10	
64 QI4504617	65.8	insulin-like growth factor binding protein 3	0.628	0.184	LIGHT	4	4			6	
65 QI50599080	65.47	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3 precursor; alpha-2-macroglobulin	0.64	0.08	LIGHT	4	4			6	
66 QI4557373	64.4	biotinidase precursor	1.038	0.287	HEAVY	4	4			1	
67 QI4504985	61.59	L-plastin; Lymphocyte cytosolic protein-1 (plasmin); plaslin 2	1.136	N/A	LIGHT	4	4			1	
68 QI4502871	61.59	plasmin 1 isoform; Plasmin-1	1.106	N/A	LIGHT	1	1			1	
69 QI118021911	60.11	vitronectin precursor; serum spreading factor; somatomedin B; complement component 5	1.106	N/A	LIGHT	2	3			1	
70 QI4506547	58.05	pancreatic ribonuclease precursor; RNase up1-1	2.133	0.196	LIGHT	2	3			2	
71 QI5031925	57.89	proteoglycan 4; megakaryocyte stimulating factor; articular superoxide dismutase	0.628	0.184	LIGHT	2	3			2	
72 QI45030078	57.89	pancreatic ribonuclease precursor; RNase up1-1	2.133	0.196	LIGHT	2	3			2	
73 QI27363488	54.72	complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide; complement component 1, q subcomponent, gamma polypeptide	0.628	0.184	LIGHT	2	1			1	
74 QI4507171	54.72	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin); Osteonectin (secreted protein, acidic, cysteine-rich)	0.628	0.184	LIGHT	2	1			1	
75 QI11386143	51.35	alpha-2-plasmin inhibitor; alpha-2-antiplasmin	0.639	0.016	LIGHT	1	1			1	
76 QI4507725	47.85	transferrin; transferrin	0.571	0.026	LIGHT	2	4			1	
77 QI4557373	46.95	complement component 1 inhibitor precursor	1.017	0.165	HEAVY	1	5			1	
78 QI5031695	46.67	H factor (complement)-like 3; factor H-related gene 2	0.624	0.519	LIGHT	2	2			2	
79 QI40354192	45.73	keratin 10; cytokeratin 10	N/A	N/A	LIGHT	1	1			1	
80 QI7705753	45.54	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide precursor; complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	0.628	0.184	LIGHT	1	1			1	
81 QI42716174	44.14	clusterin isoform 2; clusterin	0.855	0.028	HEAVY	1	1			1	
82 QI51472914	42.64	PREDICTED: similar to KIAA1501 protein	0.786	0.04	HEAVY	1	3			1	
83 QI4626898	40.03	profilin 1; profilin-1	1.413	0.141	HEAVY	2	2			2	
84 QI13994151	39.21	PDZ and LIM domain 1 (effin); carboxy terminal LIM domain protein 1	0.54	N/A	LIGHT	1	1			1	
85 QI4507907	39.04	von Willebrand factor precursor; Coagulation factor VIII VWF (von Willebrand factor); HEAVY	0.628	0.184	LIGHT	1	1			1	
86 QI20149670	37.9	RNA-binding protein regulatory subunit; oncoferrin D1	1.402	N/A	HEAVY	1	1			1	
87 QI4502505	36.3	complement component 4 binding protein, beta; complement component 4-binding protein, beta polypeptide; complement	0.628	0.184	LIGHT	1	1			1	
88 QI5031863	35.64	galectin 3 binding protein; L3 antigen; Mac-2-binding protein; serum glycoprotein 130	0.628	0.184	LIGHT	1	2			1	
89 QI28372497	35.09	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 1; ubiquitin ligase E3 component n-recogin 1	0.628	0.184	HEAVY	1	2			1	
90 QI18418142	33.42	insulin-like growth factor 2-like 1; 2310031E04Rik; 1300008B03Rik	0.628	0.184	LIGHT	2	3			2	
91 QI30148317	32.81	similar to Iq kappa chain	0.527	0.061	LIGHT	1	3			1	
92 QI4507357	32.55	transgolin 2; SM22-alpha homolog	1.325	N/A	HEAVY	1	1			1	
93 QI18426906	32.14	dopamine beta-hydroxylase precursor; dopamine beta-monooxygenase	0.628	0.002	LIGHT	2	2			2	
94 QI4501865	29.94	beta actin; beta cytoskeletal actin	0.785	N/A	HEAVY	1	1			1	
95 QI5174875	29.84	cysteine-rich secretory protein 3; specific granule protein (28 kDa); calcium and diacylglycerol-inducible secretory protein-3	0.628	0.184	LIGHT	2	2			2	
96 QI4758236	29.33	extracellular matrix protein 1 isoform 1 precursor; secretory component	0.628	0.184	LIGHT	2	2			2	
97 QI7657242	29.3	fetuin B; fetuin-like protein	0.668	N/A	LIGHT	2	2			3	
98 QI40217643	27.81	cartilage oligomeric matrix protein precursor; epiphyseal dysplasia, type 1	0.628	0.184	LIGHT	2	2			2	
99 QI5803219	27.81	serine protease inhibitor, Kazal type 5; lymphocytic choriomeningitis virus serine protease inhibitor	0.628	0.18							

表 2. フランス人血清 (A,B,C,D) の cICAT 法による解析結果のまとめ。

Sample	Ratio (H/L)	同定タンパク質数		
		Score > 50	Score > 30	Score > 20
フランス人 (A)	0.882	75	93	133
フランス人 (B)	1.146	77	98	131
フランス人 (C)	0.868	81	101	135
フランス人 (D)	0.777	88	115	155
米国人血清(CT02S)	1.000	57	76	91

注：フランス人プール血清を L 鎖試薬、各血清を H 鎖試薬で標識し、Score 20, 30 or 50 以上の判定基準で同定されたタンパク質数を示す。また、比較定量値 (Ratio : H/L) は Score 20 以上で同定した全タンパク質の平均値を示す。なお、A と D とは同一検体である。

表 3. フランス人血清 B, C, D 及び米国人血清の解析結果

表 3-1 ; フランス人血清 B :

gi 4503635	671.47	coagulation factor II precursor; prothrombin	16	29	14	26	1.435
gi 4557225	648.67	alpha-2-macroglobulin precursor	14	50	13	25	0.425
gi 4557327	516.05	beta-2-glycoprotein I precursor	13	75	12	23	1.615
gi 4504579	506.13	I factor (complement)	14	23	17	42	1.424
gi 4502397	478.88	complement factor B preproprotein; C3 proactivator; C3 proaccelerator; glycin-rich beta-2-glycoprotein C3/C5 convertase	12	39	9	19	1.311
gi 4504893	451.68	kininogen 1; alpha-2-thiol proteinase inhibitor; bradykinin	12	39	9	19	1.311
gi 32483410	445.53	vitamin D-binding protein precursor; vitamin D-binding alpha-globulin	13	47	22	28	1.535
gi 4559406	433.04	Complement component 6 precursor	11	22	12	64	1.121
gi 4557485	428.84	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	10	27	8	15	1.196
gi 4504877	413.85	plasma kallikrein B1 precursor; Kallikrein, plasma; kallikrein 3, plasma; kallikrein B plasma; Fletcher factor	12	20	13	34	1.042
gi 4501987	408.64	afamin precursor; alpha-albumin	12	20	13	34	1.042
gi 14577919	400.15	complement component 4A preproprotein; acidic C4; Rodgers form of C4; C4A anaphylatoxin	12	20	13	28	1.186
gi 4826762	386.47	hepcidin	9	46	8	12	0.322
gi 11321561	381.71	hemopexin	8	81	9	13	1.355
gi 16933542	367.93	fibronectin 1 isoform 3 preproprotein; cold-insoluble globulin; migration-stimulating factor 7	8	39	6	14	1.082
gi 4502503	365.37	complement component 4 binding protein, alpha; Complement component 4-binding protein, alpha	8	39	6	14	1.082
gi 4502005	355.92	alpha-2-HS-glycoprotein; Alpha-2HS-glycoprotein	8	39	6	14	1.082
gi 38016947	336.22	complement component 5	10	11	12	30	1.209
gi 4502153	333.43	apolipoprotein B precursor; apoB-100; apoB-48	9	15	8	25	1.146

表3-2 ; フランス人血清C :

gij45580688	729.12	complement component 7 precursor	19	31	25	56	1.230
gij4503635	715.14	coagulation factor II precursor; prothrombin	15	47	13	26	0.975
gij4557225	621.84	alpha-2-macroglobulin precursor	16	62	14	25	0.579
gij32483410	517.87	vitamin D-binding protein precursor; vitamin D-binding alpha-globulin	15	63	20	28	0.985
gij4504893	493.44	kininogen 1; alpha-2-thiol proteinase inhibitor; bradykinin	12	45	9	19	1.064
gij4557327	482.74	beta-2-glycoprotein I precursor	12	94	12	23	0.993
gij4502397	450.53	complement factor B preproprotein; C3 proactivator; C3 proaccelerator; glycine-rich beta-2-glycoprotein; C3/C5 convertase	9	166	10	13	1.057
gij11321561	438.53	hemopexin	9	166	10	13	1.057
gij4826762	411.92	hepatoglobin	9	58	8	12	0.245
gij14577919	409.29	complement component 4A preproprotein; acidic C4; Rodgers form of C4; C4b anaphylatoxin	14	46	15	28	0.990
gij4504877	403.27	plasma kallikrein B1 precursor; Kallikrein, plasma; kallikrein 3, plasma; kallikrein B plasma; Fletcher factor	14	29	37	0.900	
gij4501987	402.17	afamin precursor; alpha-albumin	13	24	12	34	0.875
gij4557485	398.4	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	10	43	8	15	1.319
gij4559406	393.62	Complement component 6 precursor	11	17	12	64	0.934
gij4502067	387.03	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor; Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (inter-alpha-trypsin inhibitor, type 1); alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	9	16	10	16	0.939
gij38016947	384.6	complement component 5	9	18	7	30	0.902
gij4504579	373.4	I factor (complement)	12	20	11	42	0.964
gij4502005	372.7	alpha-2-HS-glycoprotein; Alpha-2HS-glycoprotein	8	65	6	14	0.782
gij4503629	333.13	coagulation factor XII precursor; Hageman factor	11	19	10	40	0.857
gij4502503	320.98	complement component 4 binding protein, alpha; Complement component 4 binding protein, alpha-1 polypeptide chain	5	11	5	13	1.073

表3-3 ; フランス人血清D :

gij4503635	806.26	coagulation factor II precursor; prothrombin	18	43	15	26	0.795
gij45580688	704.88	complement component 7 precursor	19	38	23	56	0.763
gij4557225	633.57	alpha-2-macroglobulin precursor	15	61	14	25	0.650
gij4557327	549.16	beta-2-glycoprotein I precursor	13	96	12	23	1.005
gij32483410	514.13	vitamin D-binding protein precursor; vitamin D-binding alpha-globulin	13	57	15	28	0.942
gij4504579	498.52	I factor (complement)	16	30	20	42	0.887
gij14577919	496.82	complement component 4A preproprotein; acidic C4; Rodgers form of C4; C4b anaphylatoxin	14	46	20	28	0.672
gij4504893	491.6	kininogen 1; alpha-2-thiol proteinase inhibitor; bradykinin	12	36	10	19	1.010
gij11321561	482.96	hemopexin	9	120	10	13	0.926
gij4501987	472.63	afamin precursor; alpha-albumin	13	27	14	34	1.015
gij4557485	471.18	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	11	37	9	15	1.229
gij4502397	458.69	complement factor B preproprotein; C3 proactivator; C3 proaccelerator; glycine-rich beta-2-glycoprotein; C3/C5 convertase	9	166	10	13	1.057
gij4826762	452.05	hepatoglobin	9	66	8	12	0.379
gij4559406	445.97	Complement component 6 precursor	13	19	14	64	0.940
gij4504877	436.57	plasma kallikrein B1 precursor; Kallikrein, plasma; kallikrein 3, plasma; kallikrein B plasma; Fletcher factor	14	29	37	0.895	
gij4502153	433.05	apolipoprotein B precursor; apoB-100; apoB-48	12	16	10	25	0.714
gij4502067	432.14	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor; Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (inter-alpha-trypsin inhibitor, type 1); alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	9	16	10	16	0.939
gij16933542	416.13	fibrinectin 1 isoform 3 preproprotein; cold-insoluble globulin; migration-stimulating factor	14	21	19	63	0.434
gij4503629	343.14	coagulation factor XII precursor; Hageman factor	9	15	9	40	0.626
gij38016947	333.26	complement component 5	10	21	13	30	0.823

表3-4 ; 米国人血清(CT02S) :

gij4504877	455.42	plasma kallikrein B1 precursor; Kallikrein, plasma; kallikrein 3, plasma; kallikrein B plasma; Fletcher factor	14	29	37	0.966	
gij45580688	431.62	complement component 7 precursor	13	23	16	56	0.919
gij4504579	410.35	I factor (complement)	14	26	18	42	0.968
gij32483410	405.83	vitamin D-binding protein precursor; vitamin D-binding alpha-globulin	13	30	20	28	1.039
gij4502397	397.71	complement factor B preproprotein; C3 proactivator; C3 proaccelerator; glycine-rich beta-2-glycoprotein; C3/C5 convertase	9	166	10	13	1.057
gij4559406	393.16	Complement component 6 precursor	11	15	14	64	0.973
gij14577919	366.27	complement component 4A preproprotein; acidic C4; Rodgers form of C4; C4b anaphylatoxin	14	46	20	28	0.958
gij4557327	361.77	beta-2-glycoprotein I precursor	10	32	12	23	0.934
gij4501987	355.89	afamin precursor; alpha-albumin	10	14	10	34	1.061
gij4557485	352.19	ceruloplasmin (ferroxidase); Ceruloplasmin	9	31	8	15	1.023
gij38016947	341.92	complement component 5	11	19	13	30	0.975
gij4502005	320.76	alpha-2-HS-glycoprotein; Alpha-2HS-glycoprotein	7	24	5	14	1.024
gij11321561	294.99	hemopexin	7	39	7	13	0.985
gij4502067	274.59	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor; Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (inter-alpha-trypsin inhibitor, type 1); alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	9	16	10	16	0.939
gij4503629	271.84	coagulation factor XII precursor; Hageman factor	11	16	13	40	0.947
gij4502153	265.48	apolipoprotein B precursor; apoB-100; apoB-48	9	14	8	25	0.965
gij4502503	260.07	complement component 4 binding protein, alpha; Complement component 4 binding protein, alpha-1 polypeptide chain	5	11	5	13	1.073
gij21361845	242.17	peptidoglycan recognition protein L precursor	5	11	5	13	1.073
gij4502511	235.98	complement component 9	8	17	18	26	0.946
gij4502493	216.75	complement component 1, r subcomponent	6	7	7	27	0.946

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別事業）
「疾患関連タンパク質解析手法の比較検討と追加手法の検討」
分担研究報告

分担研究者 山田哲司
国立がんセンター研究所化学療法部・部長
腫瘍プロテオミクスプロジェクト・リーダー
「SELDI 法によるタンパク質定量解析」

研究要旨

創薬プロテオームファクトリーにて行う疾患関連タンパク質解析手法として Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI)法が適するかを明らかにする目的で研究を行った。研究用に市販されている健常人4人の血清を用いて、改良型の SELDI-QqTOF-MS 法にて定量的なタンパク質発現解析を行い、定量再現性を評価した。全ピークの強度を総強度補正した数値データを用いて教師なしの階層的クラスタリングすることで個人の識別が可能であった。本法は操作性に優れ、創薬プロテオームファクトリーへの導入によって早期に大規模な定量プロテオーム解析が可能になると考えられた。

A. 研究目的

近年、質量分析とその周辺技術が急速な進歩をとげ、血液中に含まれる微量なタンパク質やペプチドが網羅的に解析できるようになってきた。

我々は平成17年度までの第3次対がん総合戦略研究事業でプロテインチップの測定に高分解能質量分析装置を用いる Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization hybrid Quadrupole Time of Flight Mass spectrometry (SELDI-QqTOF-MS)法を独自に開発し、新規ソフトウェア（NCC-ProteJudge）でデータ解析することで、早期膵がんを含めて膵がん患者を100%検出できるタンパク質や (Honda *et al.*, Cancer Res. 2005 Nov 15;65(22):10613-22.)、進行食

道癌の化学放射線療法感受性を予測できるタンパク質(Hayashida *et al.*, Clin Cancer Res. 2005 Nov 15;11(22):8042-7.)を見出してきた。

本研究の目的は、この SELDI-QqTOF-MS 法が多数の症例を扱う疾患関連タンパク質解析手法として創薬プロテオームファクトリーに導入するのに適するかどうかを明らかにすることであった。

B. 研究方法

九州大学中山敬一教授から分注送付された市販健常人血清4検体（A-D）をバイオラッド社のプロトコールに従い変性させ、3種類4条件のプロテインチップ H50、CM10 pH4、CM10 pH7、IMAC、（バイオラッド社製）に乱数計算にてランダムに各

8スポットずつ（合計128スポット）バイオメック 2000（ベックマンコールター社製）を用いてスポットティングした。

プロテインチップは、国立がんセンターとパーキンエルマー社と共同で開発したプロテインチップ計測用アダプターを用い、四重極搭載高分解能質量分析計 proTOF 2000（パーキンエルマー社製）で計測した。

各検体は8回の重複計測し、国立がんセンター研究所で開発した高速計算システム NCC-ProteoJudge を使用し、ピーク検出、総ピーク数算定、相関係数、変動係数を算出した。さらに全ピークの強度を総強度補正し、教師なしの階層的クラスタリングで個人が識別できるか検討した。

（倫理面への配慮）

提供者の同意を得て採取され、匿名化されて研究目的に市販されているヒト血清検体を用いて全ての研究を行ったため、倫理的な問題はないと考えられる。

C. 研究結果

国立がんセンター研究所とパーキンエルマー社との共同で、四重極搭載直行型高分解能質量分析計にプロテインチップが計6本搭載できるアダプターを開発し、全自動で48スポットの計測を可能とした。

proTOF2000 の質量誤差はさらに低く、0.015%程度であった。本計測によって 1000~30000 m/z の範囲で S/N 比 5 以上、存在比率 15% 以上のピークが各プロテインチップあたり 495-823 本、4 種のプロテインチップで合計が 2366 本検出された。

8回の測定の間関係数（Log10 平均）は 0.9664-0.9868 で、再現性良好であった。変動係数は 0.1718-0.2663 であった。2366 全ての peak の値を用い階層的クラスタリングを行ったところ、検体 A と D が近似し、B と C とは大きく異なるという結果が得られた。実際に検体 A と D は同一個人から得られたものであった。症例間で異なるピークは肉眼でも多数認められるため、解析はこの段階で終了した。

D. 考察

従来使用していた質量分析計 Q-star XL（アプライドバイオシステムズ社製）では 90 秒ごとに 1 スポット毎でレーザー照射を手動で行わなければならない、また 1 本のプロテインチップしか搭載できなかった。そのため、プロテインチップ 6 本を計測するためには 1 時間半の時間が必要であり、その間研究者が機械の前に拘束されていたが、本システムを採用することにより、著しい作業の軽減がなされる。

Q-star XL を用いた検討では、研究室レベルの検討では再現性等に問題なかったが、長期間にわたり質量分析計を安定的に維持することや機械の操作等が煩雑であることを考えると、創薬プロテオームファクトリーへの導入は困難であると考えられた。

proTOF2000 は orthogonal 法の採用により質量精度と分解能が Q-star XL より優れ、プロテインチップの計測を 6 本まで自動計測でき、計測の煩雑さが減少したのみならず、長期間安定して稼動できるため、創薬プロテオームファクトリーにて行

う疾患関連タンパク質解析手法の一つとして適切であると考える。

E. 結論

proTOF2000 を用いた改良型 SELDI-QqTOF-MS 法は質量精度、分解能再現性のよい定量プロテオーム解析が可能なることに加え、自動化により多数検体の処理が可能である。十分な解析速度があり、操作性が良く、機械の長期間安定な稼動が可能なることより質量分析機の使用経験の少ない研究者でも安定して使える。また新規に proTOF2000 を購入しなければならないが、四重極搭載高分解能質量分析計と比較して経済的にも優れており、創薬プロテオームファクトリーにて行う疾患関連タンパク質解析手法の一つとして適切であると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(平成18年11月10日以降)

1. 論文発表

Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T.

Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: Possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling.

Cancer Res.

2007 Feb 1;67(3):911-8.

Hara T, Honda K, Shitashige M,

Ono M, Matsuyama H, Naito K, Hirohashi S, Yamada T.

Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells.

Mol Cell Proteomics.

2007 Mar;6(3):479-491.

Shitashige M, Naishiro Y, Idogawa M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.

Involvement of splicing factor-1 in β -catenin/T cell factor-4-mediated gene transactivation and pre-mRNA splicing.

Gastroenterology.

2007 Mar;132(3):1039-54.

Kakisaka T, Kondo T, Okano T, Fujii K, Honda K, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Yamada T, Kato H, Nishimura T, Todo S, Hirohashi S.

Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in pancreatic cancer.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life. (in press)

Kikuchi S, Honda K, Handa Y, Kato H, Yamashita K, Umaki T, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Hirhashi S, Yamada T.

Serum albumin-associated peptides of in patients with uterine endometrial cancer.

Cancer Sci. (in press).

山田哲司、本田一文

プロテオミクス解析による膵臓がんの血漿マーカーの開発
ファルマシア
2007 Jan;43(1):32-36.

山田哲司

プロテオミクスによるバイオマーカー探索
社会保障
2007 Jan;61(2417):61.

下重美紀、本田一文、尾野雅哉、山田哲司

プロテオミクスの臨床応用への期待
Annual Review 呼吸器、中外医学社
2007 Jan 20;208-213.

尾野雅哉、本田一文、山田哲司

バイオテクノロジーのがん検診への応用とその将来性
公衆衛生
2007 Feb 15;71(2):100-102.

尾野雅哉、本田一文、山田哲司

腫瘍マーカー
クリニカル プラクティス
2007 March;26(3):235, 2007.

本田一文、尾野雅哉、山田哲司

血漿・血清がん診断法、新たな検診方法はあるのか。－血漿ペプチドプロファイルによる難治がん患者検出の可能性－
呼吸器コモンディジーズ
肺がんのすべて (印刷中)

本田一文、尾野雅哉、下重美紀、山田哲司

質量分析をもちいた血清・血漿プロテオ

ーム解析によるがん診断マーカー開発法
細胞工学 (印刷中)

本田一文、山田哲司

がん転移・浸潤に対するアクチン結合たんぱく質アクチニン-4 の生物学的機能
生化学 (印刷中)

佐藤礼子、山田哲司

エクソンアレイを用いた癌特異的スプライシングバリエーションの探索
バイオテクノロジージャーナル (印刷中)

2、学会発表

The 28th Congress of the Society of International Urology
(Nov, 2007)

Hara T, Honda K, Umaki T, Ono M, Hayashida Y, Naito K, Hirohashi S, Yamada T.

Two serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry

The 2nd International Cancer Biomarker Consortium Conference
(Dec, 2006)

Yamada T., Honda K, Ono M, Hirohashi S.

Biomarker discovery strategy of Japanese ICBC team

Ono M, Honda K, Hirohashi S, Yamada T.

Plasma biomarker discovery by a new proteome platform 2DICAL

Honda K, Ono M, Hirohashi S,

Yamada T.

Development of a biomarker discovery software platform NCC-ProteoJudge for large-scale clinical proteomics

International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2007

(Jan, 2007)

Yamada T

Proteomic analysis of β -catenin-mediated colorectal carcinogenesis

The 96th United States and Canadian Academy of Pathology

(March, 2007)

Seki K, Honda K, Yamada T, Hirohashi S.

Actinin-4 Expression in 187 Cases of Gastrointestinal Stromal Tumor (GISTs) of the Stomach and Intestine: An Immunohistochemical (IHC) Study.

第9回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ

(Nov, 2007)

山田哲司

プロテオミクスによる新規バイオマーカー探索

第3回千葉疾患プロテオミクス研究会
(Nov, 2007)

山田哲司

プロテオーム解析による発がん機構の解明と新しい診断法の開発

第9回癌治療増感研究シンポジウム
(Feb, 2007)

山田哲司

臨床応用を目指したプロテオーム研究の

現況と展望

第16回泌尿器科分子・細胞研究会
(Feb, 2007)

山田哲司

臨床応用を目指した疾病プロテオミクスの現状と展望

原智彦、本田一文、下重美紀、松山豪泰、内藤克輔、山田哲司

Actinin-4による前立腺がん細胞増殖抑制効果およびエンドサイトーシスに関するプロテオーム解析

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

(平成18年11月10日以降)

1. 特許取得

「糖ペプチドタンデムマスタデータの解析方法」

平成18年3月16日

特許出願(特願2007-68651)

「大腸癌の治療に用いられる薬物のスクリーニング法」

出願準備中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者 氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Hirano, H.</u>	4-kDa peptide.	Kastin, A. J.	Handbook of Biological Active Peptides	Academic Press	London	2006	1-4
岩船裕 子, 平野 久	プロテインチップ と医療応用	山本重夫	バイオ解析・ 診断技術のテ ーラーメイド 医療への応用	シーエム シー出版	東京	2006	63-72

雑誌 (注: ○, 別刷を添付)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shirane, M., <u>Nakayama, K.I.</u>	○Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking.	<i>Science</i>	314	818-821	2006
Matsumoto, A., Onoyama, I., <u>Nakayama, K.I.</u>	○Expression of mouse Fbxw7 isoforms is regulated in a cell cycle- or p53- dependent manner.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	350	114-119	2006
Hara, K., <u>Nakayama, K.I.</u> , Nakayama, K.	Geminin is essential for the development of preimplantation mouse embryos.	<i>Genes Cells</i>	11	1281- 1293	2006
Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., <u>Nakayama, K.I.</u> , Ide, T., Saya, H., Hara,	○Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence.	<i>Nature Cell Biol</i>	8	1291- 1297	2006

E.					
Gao, Y., Kitagawa, K., Hiramatsu, Y., Kikuchi, H., Isobe, T., Shimada, M., Uchida, C., Hattori, T., Oda, T., Nakayama, K., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> , Tanaka, T., Konno, H., Kitagawa, M.	○Up-regulation of GPR48 induced by down-regulation of p27 ^{Kip1} enhances carcinoma cell invasiveness and metastasis.	<i>Cancer Res</i>	66	11623- 11631	2006
Pula, G., Schuh, K., Nakayama, K., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> , Walter, U., Poole, A.W.	PKC δ regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation.	<i>Blood</i>	108	4035- 4044	2006
Shukla, A., Lounsbury, K.M., Barrett, T.F., Gell, J., Rincon, M., Butnor, K.J., Taatjes, D.J., Davis, G.S., Vacek, P., <u>Nakayama,</u>	○Asbestos-induced peribronchiolar cell proliferation and cytokine production are attenuated in lungs of protein kinase C δ knockout mice.	<i>Am J Pathol</i>	170	140-151	2007

<u>K.I.</u> , Nakayama, K., Steele, C., Mossman, B.T.					
Tu, X., Joeng, K.S., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> , Nakayama, K., Rajagopal, J., Carroll, T.J., McMahon, A.P., Long, F.	Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKC δ activation promotes bone formation.	Dev Cell	12	113-127	2007
Yanagawa, M., Tsukuba, T., Nishioku, T., Okamoto, Y., Okamoto, K., Takii, R., Terada, Y., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> , Kadowaki, T., Yamamoto, K.	Cathepsin E deficiency induces a novel form of lysosomal storage disorder showing the accumulation of lysosomal membrane sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal pH in macrophages.	<i>J Biol Chem</i>	282	1851-1862	2007
Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> , Gotoh, Y.	The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex.	<i>J Biol Chem</i>	282	390-396	2007
Sakai, T., Sakaue, H.,	Skp2 controls adipocyte proliferation during the	<i>J Biol Chem</i>	282	2038-2046	2007

Nakamura, T., Okada, M., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Nakayama, K., <u>Nakayama, K.I.</u> , Kasuga, M.	development of obesity.				
Uchida, T., Iwashita, N., Ohara- Imaizumi, M., Ogihara, T., Nagai, S., Choi J.B., Tamura, Y., Tada, N., Kawamori, R., <u>Nakayama, K.I.</u> , Nagamatsu, S., Watada, H.	Protein kinase C δ plays a non-redundant role in insulin secretion in pancreatic β cells.	<i>J Biol Chem</i>	282	2707- 2716	2007
Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., <u>Nakayama, K.I.</u> , Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., Moss, S.J., Yamamoto, T., Nabekura, J.,	Phospholipase C- related inactive protein is involved in trafficking of γ 2 subunit-containing GABA _A receptors to the cell surface.	<i>J Neurosci</i>	27	1692- 1701	2007

Hirata, M.					
Matsuda, T., Matsumoto, A., Uchida, M., Kanaly, R., Misaki, K., Shibutani, S., Kawamoto, T., Kitagawa, K., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> , Tomokuni, K., Ichiba, M.	Increased formation of hepatic N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice treated with ethanol.	<i>Carcinogenesis</i> ,			2007
Liu, Z., Liu, X., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> , Nakayama, K., Ye, K.	Protein kinase C- δ phosphorylates Ebp1 and prevents its proteolytic degradation, enhancing cell survival.	<i>J Neurochem</i>	100	1278- 1288	2007
Moller, C., Karlberg, M., Abrink, M., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> , Motoyama, N., Nilsson, G.	Bcl-2 and Bcl-X _L are indispensable for the late phase of mast cell development from mouse embryonic stem cells.	<i>Exp Hematol</i>	35	385-393	2007
Nakagawa, T., Shirane, M., Iemura, S., Natsume, T., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> ; in press.	Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38.	Genes Cells in press			

Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., <u>Nakayama,</u> <u>K.I.</u> , Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., Hirao, A.	○Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool.	<i>Cell Stem Cell</i>	1	1-12	2007
---	--	-----------------------	---	------	------

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sassa, H., Kakui, H., Miyamoto, M., Suzuki, Y., Hanada, T., Ushijima, K., Kusaba, M., <u>Hirano,</u> <u>H.</u> , Koba, T.	S locus F-box brothers: Multiple and pollen- specific F-box genes with S haplotype- specific polymorphisms in apple and Japanese pear.	Genetics in press			
Asakawa, H., Sasabe, M., Miyazaki, R., Matsuda, H., Fukai, F., Hanada, K., <u>Hirano, H.</u>	The analysis of N- glycolilneuraminic acid (NeuGc) of hepatoma tissue and K562 cell ferritins using HPLC and mass spectrometry.	Proc Japan Acad Ser B	82	181-187	2006

Takasaki, S.					
Ino, Y., Okayama, A., Iwafune, Y., Arakawa, N., Kikuchi, J., Kamita, M., Kawasaki, H., Okada, T., <u>Hirano, H.</u>	○Efficient electroblotting of gel-resolved proteins onto diamond-like carbon-coated plate for protein-chip.	J Electrophoresis	53	33-37	2006
Morita, A., Miyagi, E., Yasumitsu, E., Kawasaki, H., <u>Hirano, H.</u> Hirahara, F.	○Proteomic search for potential diagnostic markers and therapeutic targets for ovarian clear cell adenocarcinoma.	Proteomics	6	5880-5890	2006
Sassa, H., <u>Hirano, H.</u>	○Identification of a new class of pistil-specific proteins of <i>Petunia inflata</i> that is structurally similar to, but functionally distinct from, the self-incompatibility factor HT.	Mol Genet Genomics	275	97-104	2006
Tanaka, Y., Akiyama, H., Kuroda, T., Jung, G., Tanahashi, K., Sugaya, H., Utsumi, J., Kawasaki, H., <u>Hirano, H.</u>	○A novel approach and protocol for discovering extremely low-abundance proteins in serum.	Proteomics	6	4845-4855	2006
Yokoyama, R., Kawasaki, H.	○Identification of yeast aspartyl	FEBS J	2173	192-198	2006

<u>Hirano, H.</u>	aminopeptidase gene by purifying and characterizing its product from yeast cells.				
荒川憲昭, 岩船裕子, <u>平野久</u>	プロテインチップを用いた蛋白質間相互作用分析	臨床検査	50	1467-1476	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, <u>Yamada T.</u>	○Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: Possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling.	Cancer Res	67(3)	911-8	2007
Hara T, Honda K, Shitashige M, Ono M, Matsuyama H, Naito K, Hirohashi S, <u>Yamada T.</u>	Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actin-4 in prostate cancer cells.	Mol Cell Proteomics	6(3)	479-491	2007
Shitashige M, Naishiro Y, Idogawa M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, <u>Yamada T.</u>	○Involvement of Splicing Factor-1 in β -Catenin/T Cell Factor-4-mediated Gene Transactivation and Pre-mRNA Splicing.	Gastroenterology	132(3)	1039-54	2007
Kakisaka T, Kondo T,	○Plasma proteomics of pancreatic cancer	J Chromatogr B Analyt Technol			

Okano T, Fujii K, Honda K, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, <u>Yamada T</u> , Kato H, Nishimura T, Todo S, Hirohashi S.	patients by multi- dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D- DIGE): Up-regulation of leucine-rich alpha-2- glycoprotein in pancreatic cancer.	Biomed Life (in press)			
Kikuchi S, Honda K, Handa Y, Kato H, Yamashita K, Umaki T, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Hirhashi S, <u>Yamada T</u> .	Serum Albumin- Associated Peptides of Patients with Uterine Endometrial Cancer.	Cancer Sci in press			
<u>山田哲司</u> 、本 田一文	プロテオミクス解析によ る膵臓がんの血漿マーカ ーの開発	ファルマシア	43(1)	32-36	2007
<u>山田哲司</u>	プロテオミクスによるバ イオマーカー探索	社会保障	61(2 417)	61	2007
下重美紀、本 田一文、尾野 雅哉、 <u>山田哲 司</u>	プロテオミクスの臨床応 用への期待	Annual Review 呼 吸器	20		2007
尾野雅哉、本 田一文、 <u>山田 哲司</u>	バイオテクノロジーのが ん検診への応用とその将 来性	公衆衛生	71(2)	100-102	2007

尾野雅哉、本田一文、 <u>山田哲司</u>	腫瘍マーカー	クリニカル プラクティス	26(3)	235	2007
本田一文、尾野雅哉、 <u>山田哲司</u>	血漿・血清がん診断法、新たな検診方法はあるのか。－血漿ペプチドプロファイルによる難治がん患者検出の可能性－	肺がんのすべて (印刷中)			
本田一文、尾野雅哉、下重美紀、 <u>山田哲司</u>	質量分析をもちいた血清・血漿プロテオーム解析によるがん診断マーカー開発法	細胞工学 (印刷中)			
本田一文、 <u>山田哲司</u>	がん転移・浸潤に対するアクチン結合たんぱく質アクチニン-4の生物学的機能	生化学 (印刷中)			
佐藤礼子、 <u>山田哲司</u>	エクソンアレイを用いた癌特異的スプライシングバリエントの探索	バイオテクノロジージャーナル			

Protrudin Induces Neurite Formation by Directional Membrane Trafficking

Michiko Shirane and Keiichi I. Nakayama*

Guanosine triphosphatases of the Rab family are key regulators of membrane trafficking, with Rab11 playing a specific role in membrane recycling. We identified a mammalian protein, protrudin, that promoted neurite formation through interaction with the guanosine diphosphate (GDP)-bound form of Rab11. Phosphorylation of protrudin by extracellular signal-regulated kinase (ERK) in response to nerve growth factor promoted protrudin association with Rab11-GDP. Down-regulation of protrudin by RNA interference induced membrane extension in all directions and inhibited neurite formation. Thus, protrudin regulates Rab11-dependent membrane recycling to promote the directional membrane trafficking required for neurite formation.

The molecular mechanisms that underlie neurite formation include both cytoskeletal remodeling and membrane trafficking (1, 2). During this process, membrane components are transported in a directional manner within the cell by a membrane recycling system, resulting in expansion of the cell surface area in the region of neurite formation (3, 4). Rab11 regulates membrane recycling back to the plasma membrane and constitutive exocytosis (5–14).

We isolated protrudin as a protein that interacts with FKBP38, a multifunctional membranous chaperone (15). Protrudin contains a Rab11 binding domain (RBD11), a guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor (GDI) consensus sequence (16), two hydrophobic domains (HP-1 and HP-2), an FFAT motif (an endoplasmic reticulum-targeting signal) (17), a coiled-coil domain, and a FYVE domain (a phosphoinositide binding domain) (fig. S1A) (18). These characteristics suggested that protrudin might function in membrane trafficking, especially in membrane recycling.

Expression of FLAG-protrudin in HeLa cells resulted in the generation of long processes (Fig. 1A). Processes were observed in 5 to 30% of transfected cells. We also monitored process formation by time-lapse video microscopy in living HeLa cells expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP)-protrudin (Fig. 1B and movie S1). The processes appeared to grow in a manner similar to that of neurites with ruffling lamellipodia. In rat hippocampal neurons, expression of the exogenous protrudin promoted neurite extension in the neurons (Fig. 1C and fig. S2). We next analyzed the effects of depletion of endogenous protrudin by RNA interference (RNAi) in the rat pheochromocytoma PC12 cell line, which extends

neurites in response to nerve growth factor (NGF) (Fig. 1D). Depletion of protrudin resulted in inhibition of NGF-induced neurite outgrowth and triggered spreading of the plasma membrane in all directions (Fig. 1, E and F). Thus, protrudin is necessary for neurite formation and may function by regulating the direction of membrane sorting.

In mouse, protrudin was most abundant in the cerebrum and the cerebellum (Fig. 2A). In mouse primary neurons in the early stage of differentiation, protrudin was localized to the

pericentrosomal region and neurites (Fig. 2B). At later stages, it was detected in both dendrites and axons and was concentrated at the growth cones (Fig. 2C). We next examined the effect of NGF on the subcellular distribution of protrudin in PC12 cells (Fig. 2D). In the absence of NGF, protrudin was distributed diffusely throughout the cell body. In cells exposed to NGF for 6 hours, protrudin was markedly concentrated in the pericentrosomal region, where it colocalized with the recycling endosome marker Rab11 (fig. S3, A to C). After culture with NGF for 24 hours, protrudin was distributed from the pericentrosomal region to the tips of neurites (Fig. 2D). The overall abundance of protrudin was not affected by NGF (fig. S3D). Immuno-electron microscopic analysis revealed that protrudin appears to be associated with vesicle membranes (fig. S3E). Thus, protrudin undergoes a dynamic redistribution during neurogenesis.

Although protrudin contains a consensus sequence for an RBD11, the amino acids required for interaction with the GTP-bound form of Rab11 are not conserved in this domain of protrudin (19) (Fig. 3A). The amino acid sequence of the RBD11 of protrudin is similar to the corresponding sequences of GDI- α and GDI- β , both of which interact with the GDP-

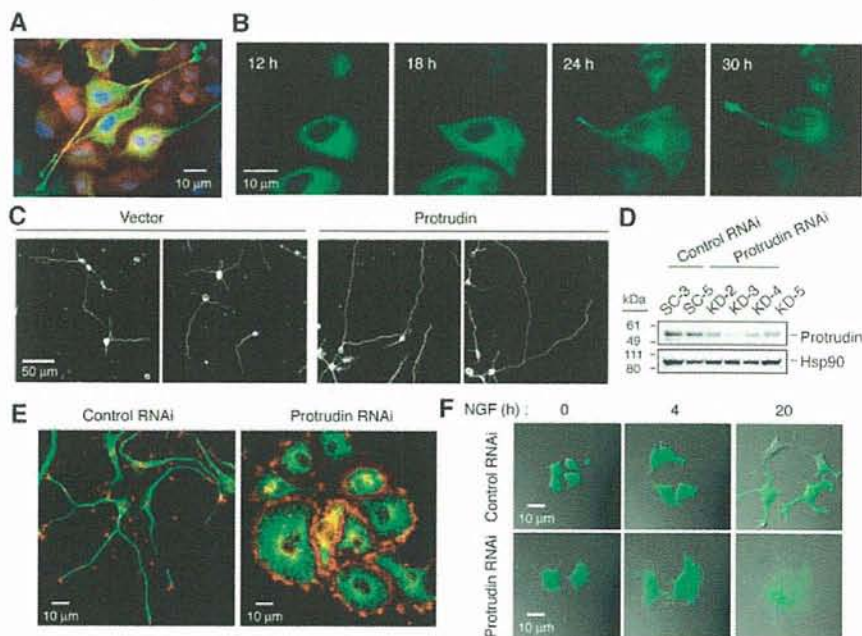


Fig. 1. Protrudin induces outgrowth of cellular projections. (A) HeLa cells were transfected with a FLAG-protrudin vector and stained with anti-FLAG (green), phalloidin (red), and Hoechst 33258 (WAKO, Osaka, Japan) (blue). (B) HeLa cells were transfected with EGFP-protrudin, and the fluorescence was monitored by video (movie S1). (C) Rat hippocampal neurons were transfected with FLAG-protrudin or the empty vector and stained with anti- β III-tubulin. (D) PC12 cells were transfected with short hairpin RNA (shRNA) vectors specific for protrudin mRNA (KD-2, -3, -4, and -5) or control (SC-3 and -5) and subjected to immunoblotting with anti-protrudin and anti-heat shock protein 90 (anti-Hsp90). (E) PC12 cells were transfected with control (SC-3) or protrudin (KD-3) shRNA vectors, stimulated with NGF, and stained with anti- α -tubulin (green) and phalloidin (red). (F) PC12 cells were transfected with a vector encoding Venus and either control (SC-3) or protrudin (KD-3) shRNA, stimulated with NGF, and examined for Venus fluorescence.

Department of Molecular and Cellular Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan. Precursory Research for Embryonic Science and Technology and Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency (JST), Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: nakayak1@bioreg.kyushu-u.ac.jp