

既知のパルミチル化蛋白である SNAP 25 及び、そのパルミチル化 site を欠損した Mutant SNAP 25 の発現ベクターを作製し、アフリカ緑サル腎細胞由来 COS-1 細胞株に高発現させた。その細胞抽出液を ABE 法に従い処理して、パルミチル化 site を有する Wild type SNAP25 のみが精製されるか否かを Western blotting にて検証した。

次にパルミチル化蛋白の網羅的同定の予備検討として、HEK 293 細胞の抽出液を ABE 法にて精製した。この精製の際に、蛋白の非特異的吸着がきわめて少ないナノ磁性粒子ビーズ（多摩川精機）に streptavidin を固定化して使用した。精製した蛋白を SDS-PAGE して、ゲルからトリプシン消化後にペプチドを抽出し、LC-MS/MS 解析にて蛋白を同定した。

### C. 研究結果

#### a) SNAP25 発現細胞を用いたパル

#### ミチル化蛋白の検証

まず、パルミチル化蛋白の精製が行われていることを確認するために、既知のパルミチル化蛋白である SNAP 25 及びそのパルミチル化 site を欠損した Mutant SNAP25 の発現ベクターを作製し、アフリカ緑サル腎細胞由来 COS-1 細胞株に高発現させた。その細胞抽出液を ABE 法に従い処理して、パルミチル化 site を有する Wild type SNAP25 のみが精製されることを Western blotting にて検証した。

ABE 法での精製の際には、Step 2 の HA 処理を行わないコントロールをおくことにより、free の SH 基がビオチンラベルされていないか確認した。その結果、HA 処理した Wild type SNAP25 のみが Western blotting で検出され、Mutant SNAP25 は精製されなかった(図 2)。これにより、ABE 法にてパルミチル化蛋白のみが精製されていることを確認することができた。

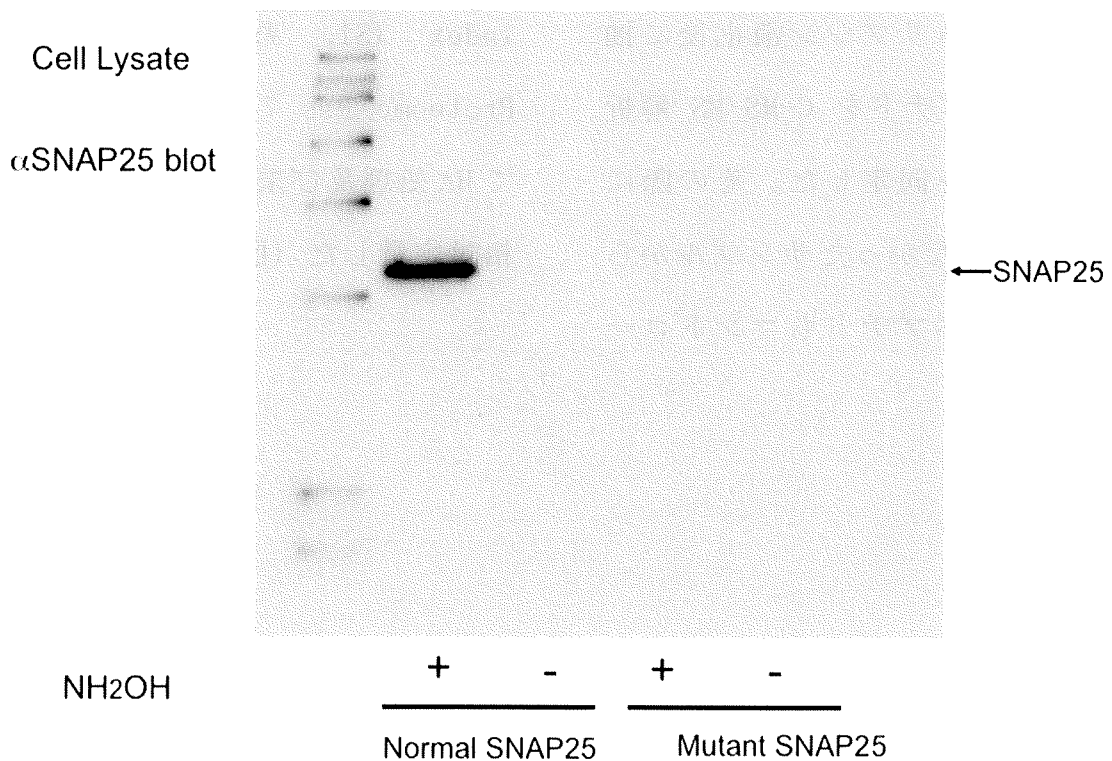


図 2. Cos-1 細胞に高発現したパルミチル化 SNAP-25 の精製

b) HEK 293 細胞を用いたパルミチル化蛋白の検証

次に、HEK 293 細胞を試料としてパルミチル化蛋白の網羅的同定を試みた。パルミチル化蛋白の精製の際に、ナノ磁性粒子ビーズ (多摩川精機) を使用した。これは東京工業大学の半田宏教

授と多摩川精機が共同開発したビーズであり、粒子径が 200nm と小さいために表面積が大きく、効率的な結合が可能であり、粒子の表面は蛋白の非特異的な吸着が少ないことが特徴である。このビーズに streptavidin を固定化して、パルミチル化蛋白精

製に使用した。

精製した蛋白を SDS-PAGE して、ゲルからトリプシン消化後に抽出したペプチドを C-MS/MS 解析にて蛋白を同定した。その際に HA 処理しなかったサンプルから抽出したペプチドもコントロー

ルとして解析して、ノンラベルの定量法の一つである Spectral index (SI, Wan et al. J Proteome Res 7:4313, 2008) にて HA 処理及び未処理サンプルを相対定量した (図 3)。

$$SI = \left( \frac{S_i}{S_i + S} \times \frac{N_i^D}{N_i^T} \right) \div \left( \frac{S}{S_i + S} \times \frac{N^D}{N^T} \right)$$

$S_i$  Spectral count for a given protein among HA<sup>+</sup> sample

$S$  Spectral count for a given protein in HA<sup>-</sup> controls

$N_i^D$  Numbers of HA<sup>+</sup> samples in which the protein of interest is detected

$N^D$  Numbers of HA<sup>-</sup> samples in which the protein of interest is detected

$N_i^T$  Total number of HA<sup>+</sup> subjects

$N^T$  Total number of HA<sup>-</sup> subjects

図 3. Spectral index によるパルミチル化候補蛋白の相対定量

その結果から、SI>0.65 の蛋白を パルミチル化候補蛋白と考えた

(図 4)。

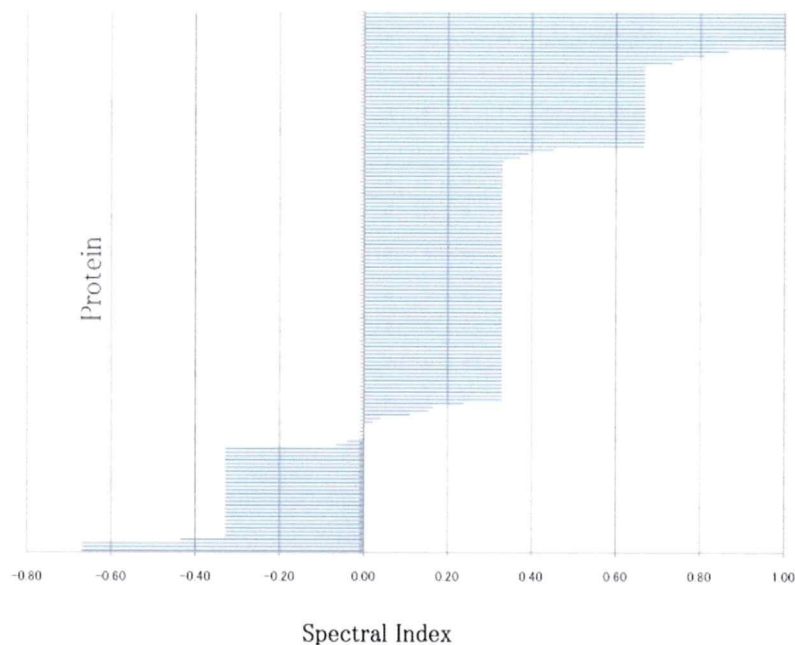


図 4. ABE 法での精製蛋白の SI の分布

同定された蛋白は 143 個であったが、SI が 0.65 以上の蛋白は 36 個であった。この中で Ubiquitin や Acetoacetyl, Phosphopantetheine といったパルミチル化以外のチオエステル結合を有する修飾を受ける蛋白

を除外した結果、8 個の蛋白が除外された。残りの 26 個の蛋白の中では 8 個が既知のパルミチル化蛋白であり、18 個が未報告のパルミチル化候補蛋白と考えられた (表 1、表 2)。

Uniprot Entry NAME	prot_acc	prot_desc	S+	S-	N+	N-	SpI	Biological process	Cellular component	PTM	Molecular function
LDHB	gi4557032	L-lactate dehydrogenase B	6	0	3	0	1	Glycolysis	Cytoplasm	Acetylation, Phosphoprotein	Oxidoreductase
SCRB2	gi5031631	scavenger receptor class B, member 2	4	0	3	0	1	cell adhesion	lysosome, membrane		Receptor, protein binding
	gi16924319	Unknown (protein for IMAGE 3538275)	30	0	3	0	1				
SODC	gi2234806	dismutase, Cu/Zn superoxide	11	0	3	0	1	Antioxidant DNA fragmentation involved in apoptosis	Cytoplasm	Acetylation, Disulfide bond, Phosphoprotein, Ubiquitination	Antioxidant, Oxidoreductase
	gi348239	{Human mRNA, complete cds} gene product	3	0	2	0	0.67				
HSP90B	gi306891	90kDa heat shock protein	11	0	2	0	0.67	Stress response	Cytoplasm	Acetylation, Phosphoprotein	Chaperone
CD63	gi4502679	CD63 antigen isoform A	3	0	2	0	0.67		Cell membrane, Endosome, Lysosome, Membrane	Glycoprotein	
FLNA	gi57284166	filiin A, alpha (actin binding protein 280)	31	0	2	0	0.67				actin binding
Q53GZ6	gi5729877	heat shock 70kDa protein B isoform 1	18	0	2	0	0.67	response to stress			ATP binding
MLEC	gi7661948	malectin precursor	3	0	2	0	0.67	Carbohydrate metabolism	Endoplasmic reticulum, Membran	Glycoprotein	carbohydrate binding
QBUDJ2	gi255317	nuclear autoantigen RA33 A2 hnRNP homolog	2	0	2	0	0.67				
SAHH	gi118277	S-adenosylhomocysteine hydrolase	2	0	2	0	0.67	one carbon metabolic proces	Cytoplasm, melanosome	Acetylation	adenosylhomocysteinase, protein binding
TBB2C	gi5174735	tubulin, beta, 2	15	0	2	0	0.67	cell motion	cytosol, microtubule	Acetylation, Phosphoprotein	structural molecule activity
	gi28590	unnamed protein product	6	0	2	0	0.67				
	gi35844	unnamed protein product	2	0	2	0	0.67				
	gi36102	unnamed protein product	5	0	2	0	0.67				
	gi37433	unnamed protein product	6	0	2	0	0.67				
PFN1	gi4826898	profilin 1	3	1	3	1	0.67				

表 1. ABE 法にて精製された新規パルミチル化候補蛋白

Uniprot Entry NAME	prot_acc	prot_desc	S+	S-	N+	N-	SpI	Biological process	Cellular component	PTM	Molecular function
SCAM3	gi2232243	secretory carrier membrane protein	5	0	3	0	1	Protein transport	Endosome, Golgi apparatus, Membrane		protein binding
FLOT1	gi124504560combine	FLOT1 protein	19	0	3	0	1	cell adhesion	Cell membrane, Membrane	Phosphoprotein	protein binding
FLOT2	gi13277550combine	FLOT2 protein	8	0	3	0	1	cell adhesion	Cell membrane, Membrane	Phosphoprotein	protein binding
CALX	gi10718563combine	calnexin precursor	8	0	3	0	1	protein folding	Endoplasmic reticulum, Membrane	Acetylation, Phosphoprotein	Chaperone
MPRD	gi4505061	cation-dependent mannose-6-phosphate receptor precursor	4	0	2	0	0.67	Transport	Lysosome, Membrane	Glycoprotein, Phosphoprotein	Receptor
CD44	gi29801	CD44E (epithelial form)	3	0	2	0	0.67	cell adhesion	plasma membrane		hyaluronic acid binding
GNAI3	gi5729850	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	2	0	2	0	0.67	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	Golgi apparatus		Transducer
RRAS2	gi20147741	Ras family small GTP binding protein TC2	2	0	2	0	0.67		endoplasmic reticulum, plasma membrane	Acetylation, Lipoprotein, Methylation, Phosphoprotein, Prenylation	GTP binding, GTPase activity, protein binding

表 2. ABE 法にて精製された既知のパルミチル化蛋白

#### D. 考察

ABE 法が発表されるまではトリチウムラベルしたパルミチン酸での *in vivo* labeling を行った細胞のサンプルにて電気泳動を行い、パルミチル化蛋白を確認することは可能であったが、パルミチル化蛋白精製は不可能であったため、Yamada らの報告でも見られるように蛋白の同定は非常に困難であった (Yamada S et al. *Endocrinology* 143:4203-4209, 2002)。今回の結果で示されたように、ABE 法を用いた解析は、既知及び未知のパルミチル化蛋白の精製及び同定が可能であった。但し、ABE 法ではパルミチル化以外のチオエステル結合を有する修飾を持つ蛋白も精製されてしまうため (Wan et al. *Nature Protocols* 2:1573, 2007)、同定された蛋白が実際に本研究で解析にパルミチル化されたかを検証するために、最終的にはトリチウムラベルしたパルミチン酸あるいは官

能基を有するパルミチン酸誘導体での *in vivo* labeling を用いた解析 (*Resh. Methods* 40:191, 2006) が必須であり、今後個々のパルミチル化候補蛋白の効率的な検証を行うための検討が必要である。

#### E. 結論

ABE 法はパルミチル化蛋白に特異的な精製法ではないが、少なくともパルミチル化蛋白を含む一群の蛋白を精製することは可能であり、*in vivo* labeling を用いた検証を行うことによって、未知のパルミチル化蛋白を網羅的に解析することは技術的に可能となってきた。今後の膵島  $\beta$  細胞での解析によって、インスリン分泌を制御する新たな蛋白の同定が期待され、これによって糖尿病における  $\beta$  細胞障害の原因解明、さらに、スルホニルウレア薬 (KATP 閉鎖薬) やインクレチン作動薬 (cAMP アゴニスト) と作用機序の異なる、2 型糖

尿病に対する画期的な新しい治療薬の開発につながる可能性が高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：

Yasushi Kaburagi, Keiko Hamada, Eri Takahashi, Ayaka Honma and Kazuki Yasuda. Proteomic analysis of palmitoylated proteins in HEK 293 cells using acyl-biotinyl exchange technology. 第32回日本分子生物学会、ポスター発表, 横浜, 12月, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得：なし

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レイアウト (参考)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Y Okamoto K, Iwasaki N, Nishimura C, Doi K, Noiri E, <u>Kasuga M</u> , et al.	Identification of KCNJ15 as a susceptibility gene in Asian patients with type 2 diabetes mellitus	Am J Hum Genet.	86	54-64	2010
Miyake K, Yang W, Hara K, Yasuda K, Horikawa Y, Osawa H, Furuta H, <u>Kasuga M</u> , et al.	Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence	J Hum Genet.	54	236-241	2009
<u>Kaburagi Y</u> , Yamashita R, Takahashi E, Yasuda K, <u>Noda M</u> .	Proteomic Studies on Investigations of Diabetes.	J Mass Spectrom Soc Jpn.	57	201-206	2009



