

アプリケーションデータ編

注意

本アプリケーションデータにおいて、hpHA(-)/MfTag(-)、hpHA(-)/MfTag(+)、hpHA(+)/MfTag(+))をそれぞれ-/-、-/+、+/+ と表記しています。

＜蛍光アッセイの例＞

各試料について-/-、-/+、+/+の3つの処理をおこない、蛍光分光光度計にて325 nm 励起における525 nm の蛍光強度を測定した。下記2通りの補正グラフを作成した。

A 試料毎のS-パルミトイル化修飾特異性の判定

B 複数試料間のS-パルミトイル化総量の比較解析

※各解析方法の詳細はプロトコール編(反応キットの部)3-2. 蛍光アッセイ をご参照ください。

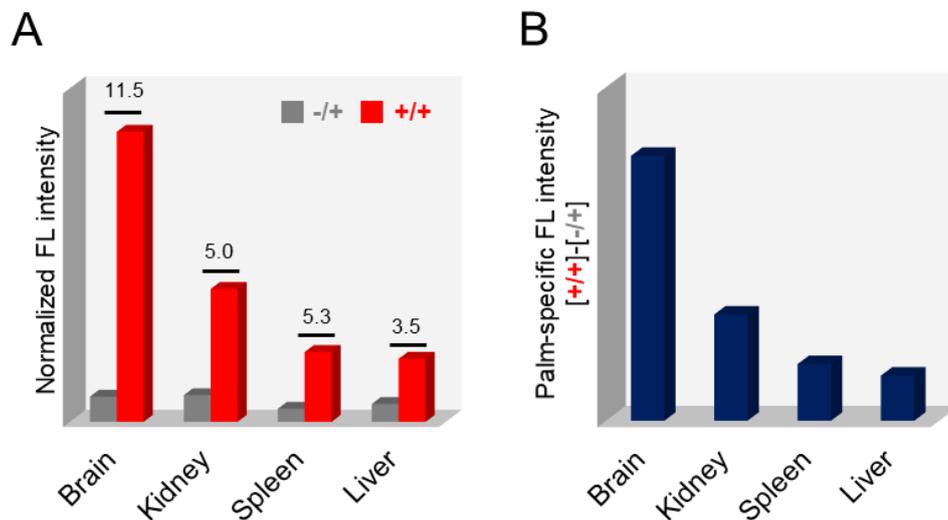
実施例1 マウス由来組織のS-パルミトイル化修飾総量の相対比較と特異性判定

試料: 成体マウスより摘出した脳、腎臓、脾臓、肝臓

ライセート調製方法: トータル組織ライセート

スタート試料量: 200 μ g/1 処理 総タンパク質量

使用したキット: 反応キット



(A) 各試料におけるS-パルミトイル化修飾特異性の評価

いずれの組織試料についても、-/+と+/+で高いSN比が確認され、S-パルミトイル化修飾特異的なシグナルが優位に観察されていることがわかる。

(B) 4つの組織試料間におけるS-パルミトイル化修飾総量の相対比較

今回比較した4つの組織においては脳組織のS-パルミトイル化修飾量が最も多いことが分かった。

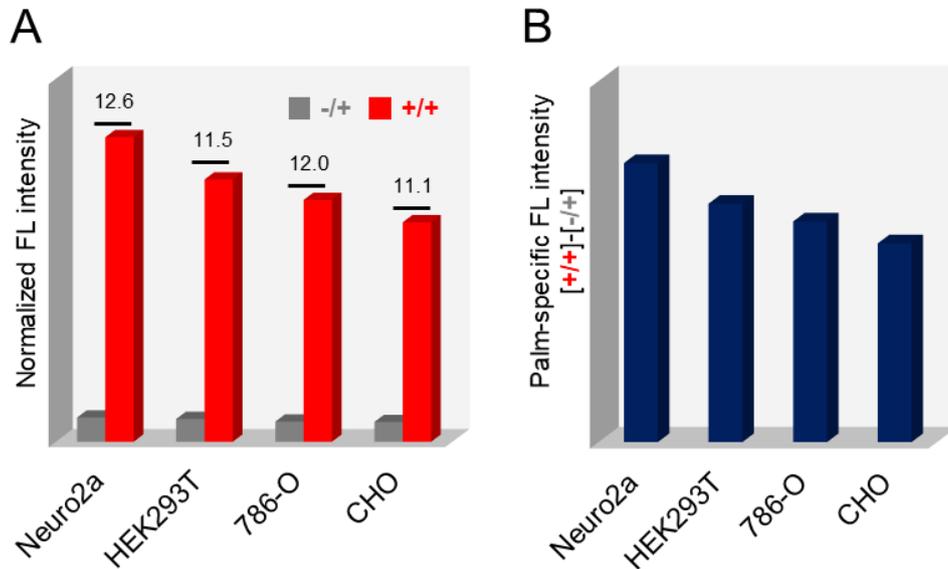
実施例 2 培養細胞株の S-パルミトイル化修飾総量の相対比較と特異性判定

試料: 培養細胞株 Neuro2a、HEK293T、786-O、Chinese hamster ovary(CHO)

ライセート調製方法: トータル細胞ライセート

スタート試料量: 200 μ g/1 処理 総タンパク質量

使用したキット: 反応キット



(A) 各試料における S-パルミトイル化修飾特異性の評価

いずれの組織試料についても、-/+と+/+で高い SN 比 (hpHA(+)/(-) >10) が確認され、S-パルミトイル化修飾特異的なシグナルが優位に観察されていることがわかる。

(B) 4 種類の培養細胞試料間における S-パルミトイル化修飾総量の相対比較

今回比較した 4 種類の細胞株においては Neuro2a の S-パルミトイル化修飾量が最も多いことが分かった。

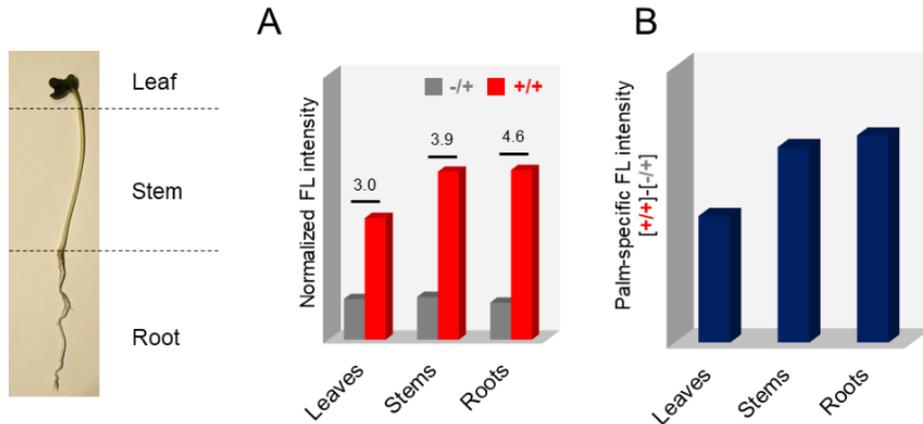
実施例 3 ブロッコリースプラウトの各部における S-パルミトイル化修飾総量の相対比較と特異性判定

試料:ブロッコリースプラウトの葉、茎、根

ライセート調製方法:トータル組織ライセートより不溶性残渣を取り除いたもの

スタート試料量:200 µg/1 処理 総タンパク質量

使用したキット:反応キット



(A) 各試料における S-パルミトイル化修飾特異性の評価

いずれの組織試料についても、hpHA(+)(-)>3 が確認され、S-パルミトイル化修飾特異的なシグナルが優位に観察されていることがわかる。

(B) 3 部位試料間における S-パルミトイル化修飾総量の相対比較

今回比較した 3 つの部位では幹と根が同程度であることが分かった。

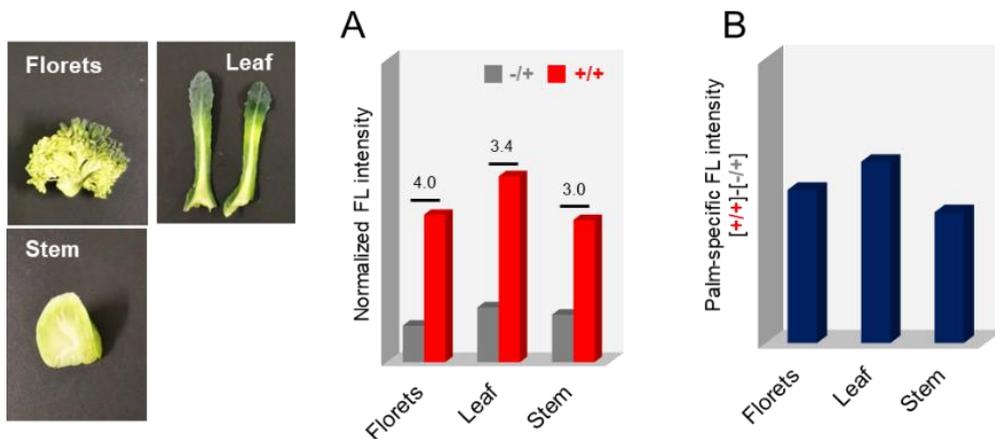
実施例 4 ブロッコリー組織の各部における S-パルミトイル化修飾総量の相対比較と特異性判定

試料:ブロッコリーのつぼみ、葉、茎

ライセート調製方法:トータル組織ライセートより不溶性残渣を取り除いたもの

スタート試料量:200 µg/1 処理 総タンパク質量

使用したキット:反応キット



(A) 各試料における S-パルミトイル化修飾特異性の評価

いずれの組織試料についても、hpHA(+)(-)>3 が確認され、S-パルミトイル化修飾特異的なシグナルが優位に観察されていることがわかる。

(B) 3 部位試料間における S-パルミトイル化修飾総量の相対比較

今回比較した 3 つの部位では葉、つぼみ、幹の順で S-パルミトイル化修飾総量が多いと見積もられた。

<蛍光イメージャーによる SDS-PAGE ゲル内の S-パルミトイル化タンパク質バンドの検出>

実施例 マウス脳試料における S-パルミトイル化タンパク質の SDS-PAGE ゲル内検出

試料: 成体マウスから抽出した脳組織

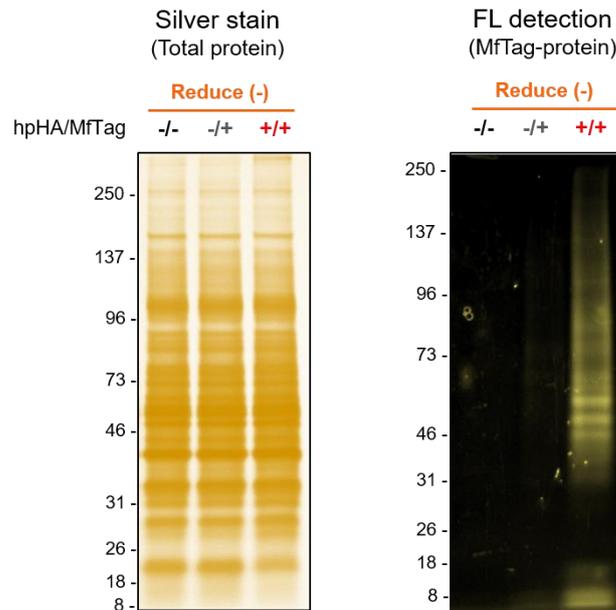
ライセート調製方法: トータル組織ライセート

使用したキット: 反応キット

スタート試料量: 200 μ g / 処理 総タンパク質量

電気泳動条件: **非還元条件** (MfTag 標識を維持)

検出方法: 銀染色および蛍光イメージャー検出 (Ex 312 nm / Em >560 nm)



マウス脳組織ライセートに対し反応キットを用いて **-/-**、**-/+**、**+/+** の 3 種類の処理をおこなった。反応後、各処理試料を MfTag が維持されるよう**非還元条件下**にて 2 枚のゲルで SDS-PAGE を実施し、1 枚は銀染色で総タンパク質を検出、もう 1 枚を 312 nm UV 光源を用いた蛍光イメージャーで検出した。**-/-**、**-/+**、**+/+** のいずれも総タンパク質量に差はみられないが、**+/+** 特異的に蛍光が検出された。

<ゲルシフトアッセイによる目的タンパク質の S-パルミチル化修飾個数の判定>

実施例 マウス脳試料における代表的な S-パルミチル化タンパク質の修飾個数判定

試料: 成体マウスから抽出した脳組織

ライセート調製方法: トータル組織ライセート

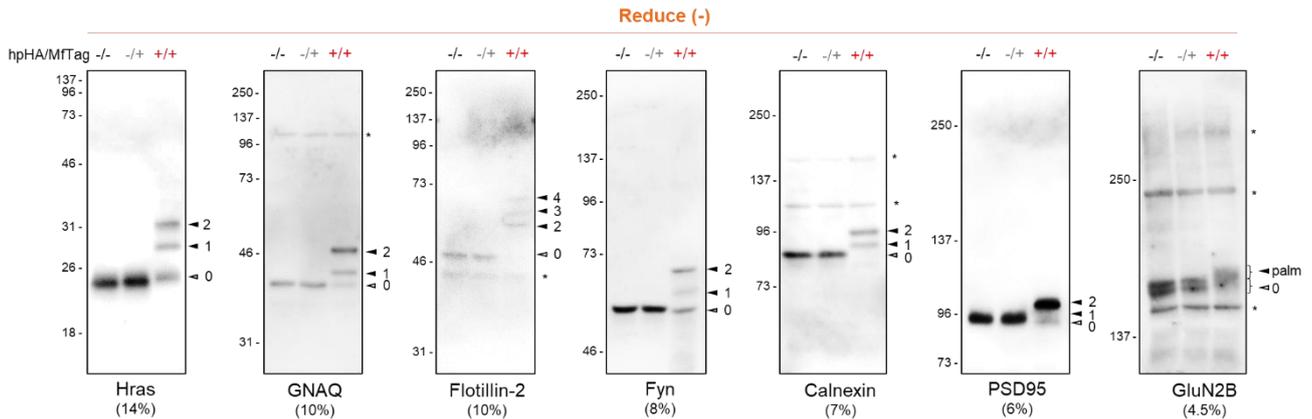
使用したキット: 反応キット

スタート試料量: 200 µg/処理 総タンパク質量

電気泳動条件: **非還元条件** (MfTag 標識を維持)

(ゲル濃度は因子名の下のカッコ内参照)

検出方法: PVDF メンブレンに転写後、各種特異的抗体を用いて WB を実施



マウス脳組織ライセートに対して反応キットを用いて **-/-**、**-/+**、**+/+** の 3 種類の処理をおこなった。反応後、各処理試料を MfTag が維持されるよう**非還元条件下**にて各因子の分子量にあったゲル濃度で電気泳動を実施し、PVDF メンブレンに転写したのち代表的な S-パルミチル化タンパク質に対する特異的抗体を用いた WB で検出した。いずれの因子においても **+/+** のみでバンドシフトが観察され、**-/+** ではバンドシフトが見られていないため、S-パルミチル化特異的な変換反応が確認できた。マウス脳組織において Hras は 2 つ、GNAQ は 2 つ、Flotillin-2 は 4 つ、Fyn は 2 つ、Calnexin は 2 つ、PSD95 は 2 つの MfTag、すなわち S-パルミチル基を有すると推定された。なお、GluN2B は分子量約 150 kDa で、**+/+** 特異的にスメア状のバンドシフトが観察されたが、MfTag の標識個数の判定はできなかった。

<精製キットによる S-パルミトイル化タンパク質の網羅的精製と検出>

実施例 1 マウス由来組織における S-パルミトイル化タンパク質の精製と特異性判定

試料: 成体マウスより摘出した脳、腎臓、脾臓、肝臓

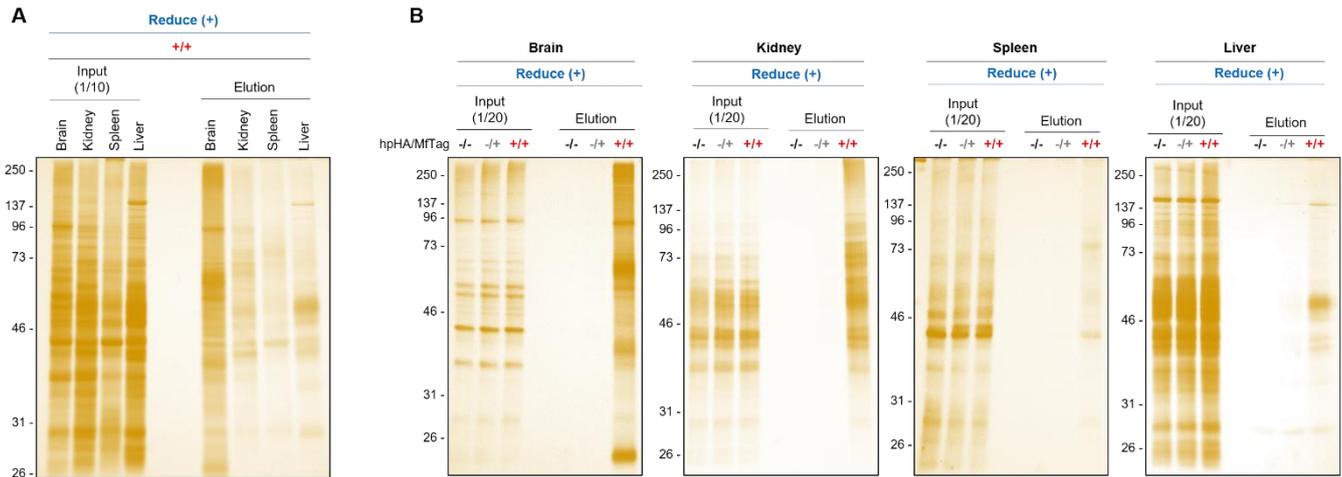
ライセート調製方法: トータル組織ライセート

使用したキット: 反応キット+精製キット

スタート試料量: 200 μ g/1 処理 総タンパク質量

精製カラムアプライタンパク質量: 100 μ g/1 処理 総タンパク質量

電気泳動条件: **還元条件下** (MfTag 標識を除去)



A: 精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製作業後、4 種類の組織の **+/+** 処理のカラム精製前試料 (Input、10 倍希釈) およびカラム溶出画分 (Elution、原液) を同液量ずつ **還元条件下** で電気泳動し精製量を比較した。4 種類の組織では脳組織で最も多く精製されていることがわかる。

B: 精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製作業後、4 種類の組織それぞれの 3 処理 (**-/-**、**-/+**、**+/+**) のカラム精製前試料 (Input、20 倍希釈) およびカラム溶出画分 (Elution、原液) を同液量ずつ **還元条件下** で電気泳動し、銀染色で検出。いずれの組織においても **+/+** 特異的な精製タンパク質が多数観察された。

注 肝臓では、30kDa 付近の一部のタンパク質が **-/-** でもカラム精製されているのが確認できる。このようなタンパク質はカラム吸着性のある非特異成分である。

実施例 2 培養細胞株における S-パルミトイル化タンパク質の精製と特異性判定

試料: 培養細胞株 Neuro2a、HEK293T、786-O、Chinese hamster ovary(CHO)

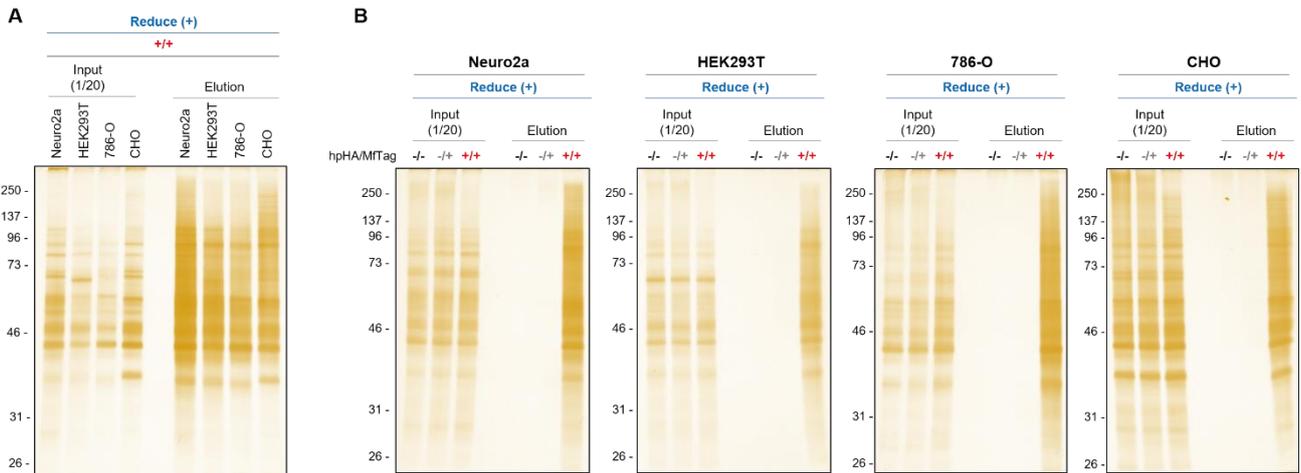
ライセート調製方法: トータル細胞ライセート

使用したキット: 反応キット+精製キット

スタート試料量: 200 μg/1 処理 総タンパク質量

精製カラムアプライ量: 100 μg/1 処理 総タンパク質量

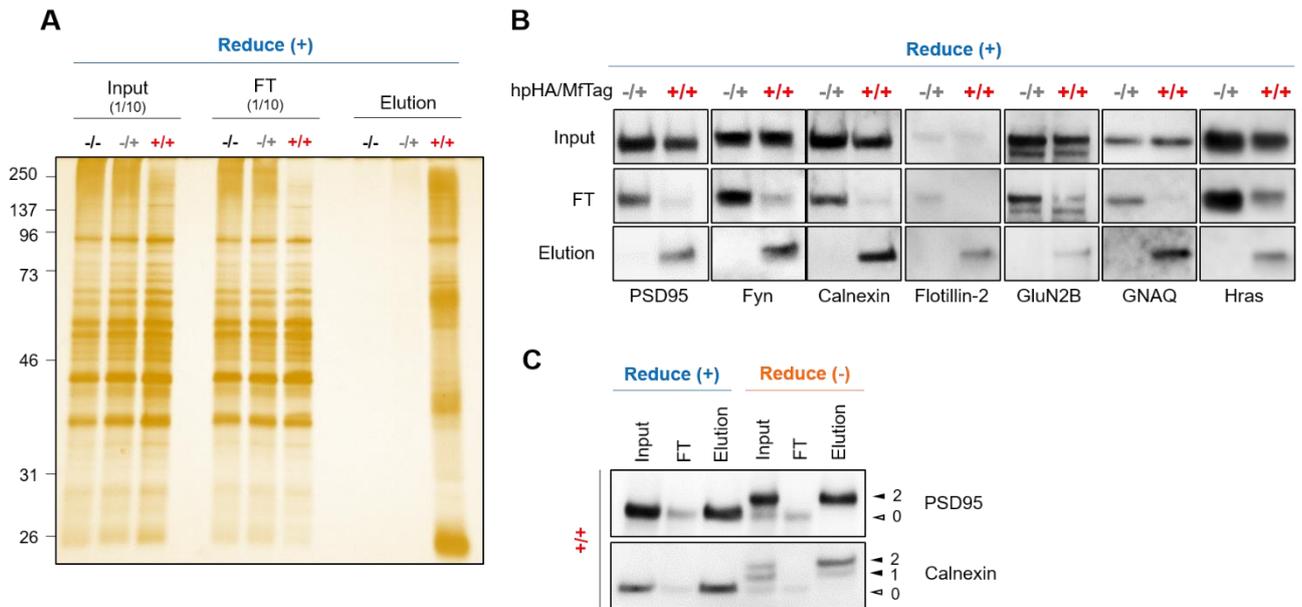
電気泳動条件: **還元条件下** (MfTag 標識を除去)



- A: 精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製作業後、4 種類の細胞株の **+/+** 処理のカラム精製前試料 (Input、20 倍希釈) およびカラム溶出画分 (Elution、原液) を同液量ずつ **還元条件下** で電気泳動し精製量を比較した。4 種類の細胞株では Neuro2a で比較的多く精製されていることがわかる。
- B: 精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製作業後、4 種類の細胞株それぞれの 3 処理 (-/-、-/+、**+/+**) のカラム精製前試料 (Input、20 倍希釈) およびカラム溶出画分 (Elution、原液) を同液量ずつ **還元条件下** で電気泳動し、銀染色で検出した。いずれの細胞株においても **+/+** 特異的な精製タンパク質が多数観察された。また、いずれ細胞株においても -/-、-/+ の Elution 画分からはほとんどバックグラウンドシグナルが観察されなかった。

＜精製キットによる目的タンパク質の S-パルミトイル化修飾判定と修飾割合推定＞
 実施例 マウス脳試料の代表的な S-パルミトイル化タンパク質の検出と修飾割合推定

試料: 成体マウスより摘出した脳
 ライセート調製方法: トータル組織ライセート
 使用したキット: 反応キット+精製キット
 スタート試料量: 200 μg/1 処理
 精製カラムアプライ量: 100 μg/1 処理
 電気泳動条件: **還元条件**(図 A、B、C-左)および**非還元条件**(図 C-右)



- A: 精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製操作後、カラム精製前試料 (Input、10 倍希釈)、カラム素通画分 (Flow through (FT)、10 倍希釈)、カラム溶出画分 (Elution、原液) を同液量ずつ **還元条件下** で電気泳動し、銀染色で検出した。総タンパク質量に差がみられない中、**+/+** に特異的な精製タンパク質が多数検出された。
- B: 精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製操作後、Input、FT、Elution (いずれも原液) を同液量ずつ **還元条件下** で電気泳動し、PVDF メンブレンへ転写したのち 7 種類の代表的な S-パルミトイル化タンパク質の各特異的抗体を用いてウェスタンブロットで検出をおこなった。各タンパク質の Input、FT、Elution は同一メンブレン上で、データを取得した。いずれのタンパク質についても **+/+** 特異的に Elution で検出された。
- C: 精製キットによる MfTag 標識タンパク質の精製操作後、Input、FT、Elution (いずれも原液) を同液量ずつ **還元条件下** (左)、および **非還元条件下** (右) で電気泳動し、PVDF メンブレンへ転写したのち代表的な S-パルミトイル化タンパク質である PSD95 と Calnexin の特異的抗体を用いてウェスタンブロットで検出をおこなった。まず、**非還元条件** (右) を見ると、PSD95、Calnexin とともに MfTag 標識済みのバンドは FT には見られず、Elution のみ観察されたため、カラム精製が良好に完了していることがわかる。このようなケースにおいて、**還元条件** (左) で FT と Elution の存在量を比較することで、S-パルミトイル化修飾存在量を推察することができ、PSD95、Calnexin とともに大部分が S-パルミトイル化体であることが推定された。

<総合的なアプリケーション例>

実施例 1 マウス脳組織の組織分画による S-パルミトイル化タンパク質の濃縮

事前の試料調製:

図 A に沿ってマウス脳組織から P2 膜画分および P2-TritonX100 不溶性画分 (P2-TXinsol) を取得した。

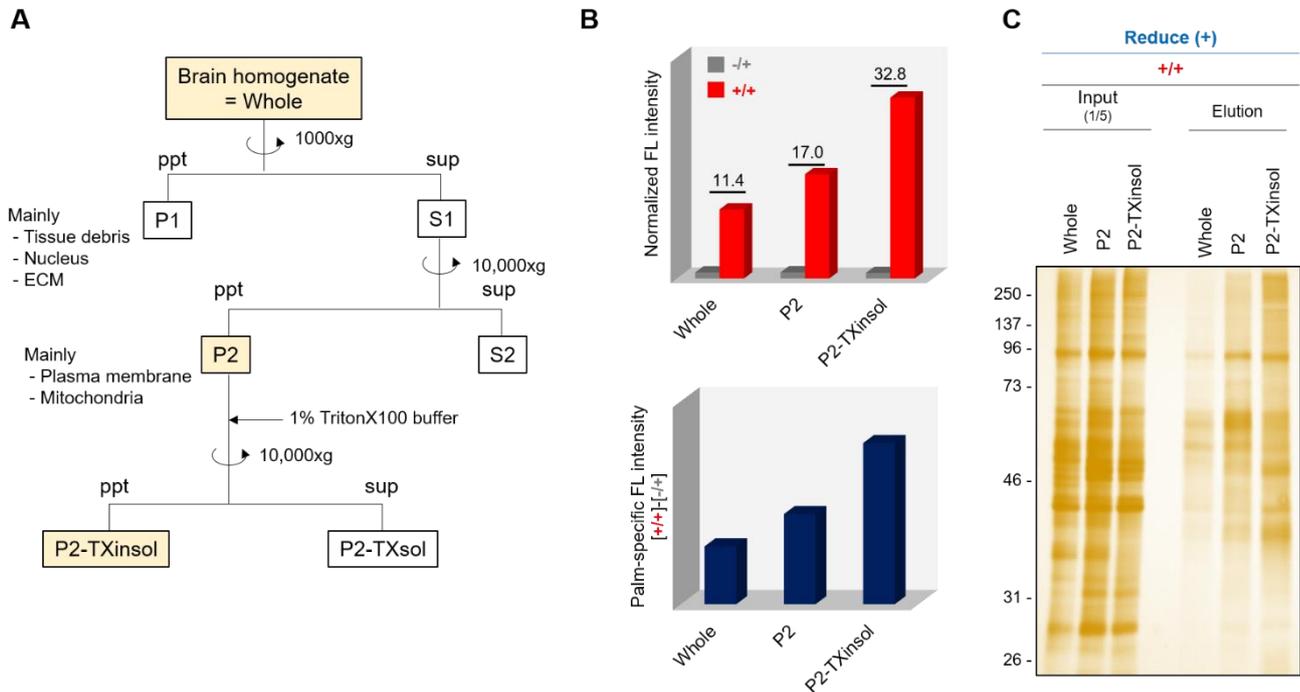
使用したキット: 反応キット+精製キット

分析方法: 蛍光アッセイ、カラム精製溶出物の銀染色

スタート試料量: 100 μ g/1 処理

精製カラムアプライ量: 50 μ g/1 処理

電気泳動条件: **還元条件下**



- A: P2 および P2-TXinsol 画分の取得方法。マウス全脳を界面活性剤不含破碎バッファー (50 mM phosphate (pH 7.4), 150mM NaCl, 320 mM sucrose) 中にてダウンス型ホモジナイザーで破碎後、低速遠心分離にて P1 画分を沈殿として除去したのち、上清 S1 を中速遠心分離にかけた。沈殿を P2 画分として回収し、さらに P2 画分の半分に 1% TritonX100 バッファーを添加して可溶化後、中速遠心分離で TritonX100 可溶性画分 (P2-TXsol) と不溶性画分 (P2-TXinsol) に分画した。回収した P2 および P2-TXinsol 画分に 1x Basal Buffer を添加し可溶化して反応キットに使用した。
- B: 蛍光アッセイによる各試料の hpHA 特異性の評価(上)および各試料間の S-パルミトイル化量の相対比較(下)。全脳組織に比べ P2 画分、P2-TXinsol 画分で S-パルミトイル化タンパク質が濃縮しているのが確認できる。
- C: 精製キットによる精製作業後、各 +/+ のカラム精製前試料 (Input、5 倍希釈) およびカラム溶出画分 (Elution、原液) を同液量ずつ還元条件下で電気泳動し、銀染色で検出した。精製されたタンパク質が全脳組織に比べ P2 画分、P2-TXinsol 画分で S-パルミトイル化タンパク質が濃縮しているのが確認できる。

実施例 2 培養細胞における細胞内 S-パルミトイル化タンパク質分布の解析

事前の試料調製:

図 A に沿って Neuro2a 細胞から全細胞ライセート、P_{10k} 画分(主に細胞膜)、S_{10k} 画分(主に小胞体膜および細胞質)を取得した。

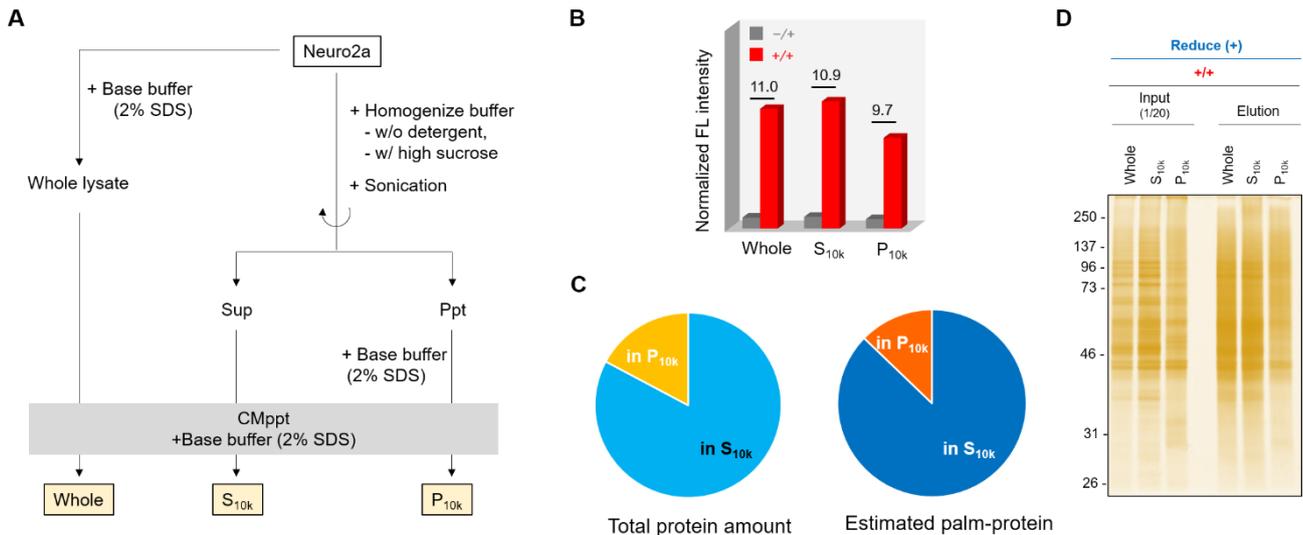
使用したキット: 反応キット+精製キット

分析方法: 蛍光アッセイ、カラム精製溶出物の銀染色

スタート試料量: 100 μg/1 処理

精製カラムアプライ量: 50 μg/1 処理

電気泳動条件: **還元条件下**



A: Neuro2a 由来各ライセートの調製方法。“Whole”は Neuro2a に直接 1x Basal Buffer を添加してライセートを調製した。一方、分画用として界面活性剤不含の破碎バッファー(50 mM phosphate (pH7.4), 150 mM NaCl, 320 mM sucrose)により細胞を懸濁後、超音波破碎をおこない、中速遠心分離(10,000xg、20 分間、4°C)により沈殿画分(P_{10k})および上清画分(S_{10k})を取得した。各試料のバッファーを統一するため、それぞれ CMppt を一度実施し、いずれも 1x Basal Buffer に置換したのち、反応キットに使用した。

B: 蛍光アッセイによる各試料の hpHA 処理特異性の評価。

C: 総タンパク質量の割合(左)と蛍光アッセイをもとにした各試料の S-パルミトイル化量の割合(右)。本分画実験では S_{10k} に S-パルミトイル化タンパク質が相対的に多く含まれていた。

D: 精製キットによる精製作業後、各 **+/+** のカラム精製前試料(Input、20 倍希釈)およびカラム溶出画分(Elution、原液)を同液量ずつ **還元条件下** で電気泳動し、銀染色で検出した。精製されたタンパク質が全細胞ライセートに比べ S_{10k} に S-パルミトイル化タンパク質が濃縮しているのが確認できる。

実施例 3 培養細胞における刺激応答性の評価

事前の試料調製:

図 A に沿って Neuro2a 細胞に 4 種類の薬剤(パルミトイル転移酵素 (PAT) 阻害剤 (10 μ M 2-Bromopalmitate + 10 μ M Cerulenin)、一酸化窒素 (NO) ストレス (1 mM SNAP)、小胞体 (ER) ストレス (1 μ g/ml Tunicamycine) および細胞膜脱分極 (50 mM KCl)) を 24 時間処理し、細胞を回収後、細胞膜粗精製画分 (P_{10k}) を粗精製した (P_{10k} 調製方法は実施例 2 をご参照ください。)

使用したキット: 反応キット + 精製キット

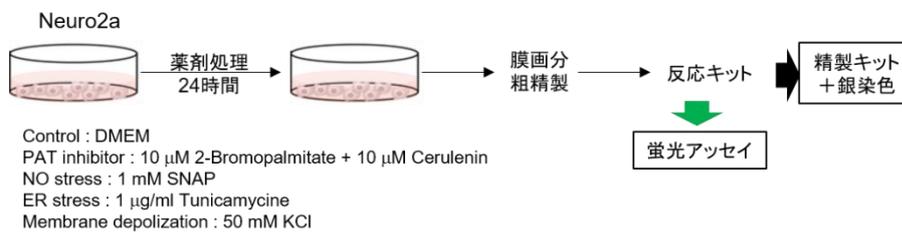
分析方法: 蛍光アッセイ、カラム精製溶出物の銀染色

スタート試料量: 100 μ g / 1 処理 総タンパク質量

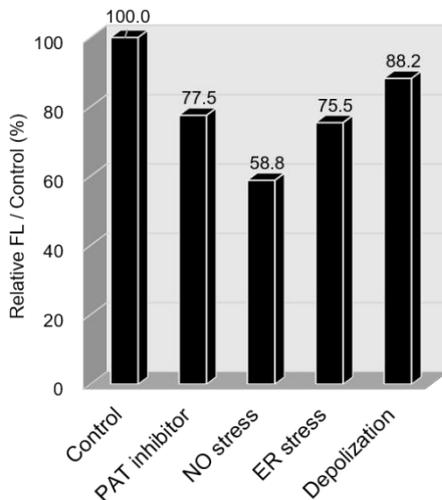
精製カラムアプライ量: 50 μ g / 1 処理 総タンパク質量

電気泳動条件: **還元条件下** および **非還元条件下**

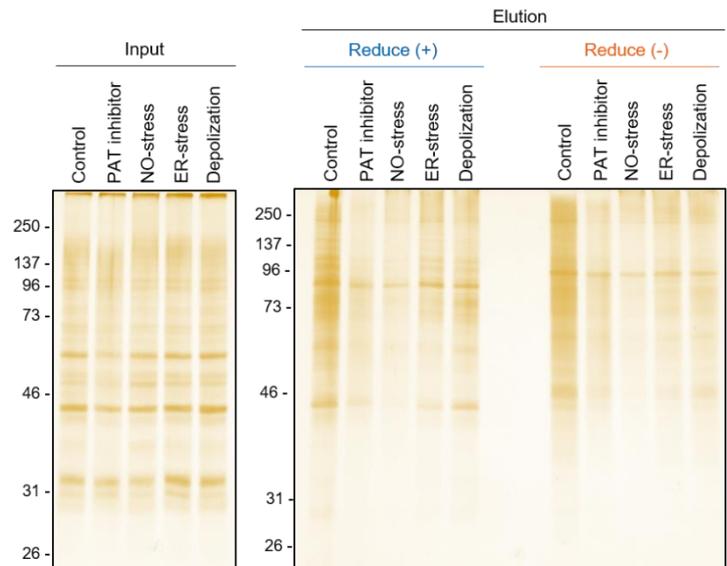
A



B



C



A: 実験プロトコルの概要

B: 蛍光アッセイによる各+/+試料の蛍光値を測定後、コントロール処理の蛍光値に対する各刺激処理の蛍光値を比較した。いずれも蛍光量 (= S-パルミトイル化総量) の変動が確認でき、特に NO ストレスにおいて顕著な減少が確認された。

C: 精製キットによる精製作業後、各+/+試料のカラム精製前試料 (Input) とカラム溶出画分 (Elution) を **還元条件下** および **非還元条件下** で電気泳動し、銀染色で検出した。いずれの条件下においても NO ストレス処理により精製タンパク質の大きな変動が観察された。