

## 消化管出血モデルを用いたグルタミン保護効果のプロテオーム解析

玉井 幸恵・赤木 玲子・井上 幸江

Proteomic Analysis in Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma Cells after Hemin Treatment in the Presence or Absence of Glutamine

Sachie ODA-TAMAI, Reiko AKAGI and Sachiye INOUE

### Abstract

In this study, we analyzed the proteomic changes after hemin treatment on human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2) in the presence or the absence of glutamine. Up to now, proteome analysis has been focused on cellular protein profiling. Although proteome analysis is thought to be unable to detect the changes in minor proteins, we succeeded in identify the small changes in receptor proteins. First, we investigated proteomic analysis in cell fraction. Two-dimensional electrophoresis showed the increase in protein spots in nuclei of Caco-2 after hemin treatment in the absence of glutamine, and the decrease in those in the presence of glutamine, suggesting that nuclear signal transduction was changed.

As the second step, we investigated phosphorylation of proteins, which was known to be a key mode of signal transduction. Among several analytical techniques, we choose phosphoproteomic analysis using phosphospecific antibodies for identifying low-abundance tyrosin phosphorylated protein such as receptor tyrosine kinase phosphorylation. We purified phosphoproteins by the column chromatography, followed by mass spectrometry-based approaches, for several receptors showed altered phosphorylation status. Our results suggest that phosphorylation of proteins might be induced by hemin, and glutamine might counteract those changes in Caco-2.

**keywords** : proteomics, phosphoproteomics, Caco-2 cell, 2-dimentional electrophoresis

### 序 論

プロテオームという学術用語は、1995年オーストラリアのM. Willkins 博士によって提唱されたタンパク質 (protein) と集団を意味する接尾語 (ome) を結びつけた造語である。それから20年、プロテオーム解析は、2次元電気泳動と質量分析法 (マス・スペクトロメトリー) を主とした古典的プロテオーム解析 (細胞での発現プロファイリング) から、相互作用リンケージ解析 (細胞内で形成される機能性タンパク質複合体の同定) へと発展してきている。さらに、タンパク質の翻訳後修飾の変化が注目されて久しいが、現在までにプロテオーム解析法を用いて同定・

報告されたタンパク質は比較的量の多いタンパク質<sup>1)</sup>ばかりであり、微量タンパク質の変化を捉えるには至っていない。

一方、タンパク質のリン酸化は、プロテオーム解析の重要な研究対象となってきた。リン酸化は、既存のタンパク質を可逆的に活性化/不活性化することから、速やかな細胞応答に適しており、シグナル伝達系の主要な伝達様式である<sup>2,3)</sup>。現在、ヒト細胞内では、約30%のタンパク質にリン酸化が認められている<sup>4)</sup>。しかし、網羅的なプロテオーム解析の手法では、微量なリン酸化タンパク質の変化を検出するのは、困難なのが現状である<sup>5)</sup>。

ヒト消化管培養細胞Caco-2は、ヘムの存在下で、タイトジャンクションが損傷し基底膜側と管腔側のバリアー機能が崩壊するが、グルタミンは、それを保護する機能をもつと考えられた<sup>6)</sup>。この消化管出血モデルを用いて、グルタミンによる保護作用におけるタンパク質レベルの変化を明らかにするため、プロテオーム解析を試みた。今回、1. 細胞分画後のプロテオーム解析 2. チロシンリン酸化抗体による受容体タンパク質の網羅的解析 3. リン酸化タンパク質精製法によるリン酸化プロテオーム解析 の3法を用いて検討した結果について、報告する。

## MATERIALS AND METHODS

*Cell culture and Treatments.* Human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells were kindly provided by Tooru Taniguchi, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences. Caco-2 cells were seeded onto 6-well plates with a pore size of 0.4  $\mu\text{m}$  (BD Falcon<sup>TM</sup>) at a density of 25000cells/cm<sup>2</sup> and maintained at 37°C in a culture medium composed of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 4 mM glutamine with 50 U/ml penicillin, 50 U/ml streptomycin, and supplemented with heat-inactivated 10% FBS<sup>7)</sup>. Heme arginate (HA), a water-soluble and stable reaction product of hemin and L-arginate, was used for heme treatment at a final concentration of 50  $\mu\text{M}$  in DMEM without or with 4mM glutamine for 3 h after rinsing cells with phosphate-buffered saline (PBS).

*Protome Profiler Antibody Arrays.* Cells were extracted with Proteome Profiler kit (R&D Systems, bio-technie). Profiling Changes in Receptor Tyrosin Kinase (RTK) phosphorylation using Antibody Arrays (R&D Systems, bio-technie). After binding the extracellular domain of both phosphorylated and unphosphorylated RTKs, anti-phospho-tyrosines antibody was used to detected phosphorylated tyrosines on activated receptors. The positive signals was detected by LAS-4000 IR multi color (Fujifilm/GE Healthcare) and analyzed by image analysis software.

*Isolation of Phosphoproteins.* Cells were washed 2 times with 50 mM HEPES buffer (pH 7.0) and HEPES buffer was removed. Phosphoproteins were isolated from cells using Phosphoprotein Enrichment Kit (Thermo scientific com/pierce, IL) according to the manufacturer's instructions.

*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).* Electrophoresis was performed by the method of Laemmli<sup>8)</sup>. Each sample was added equal volume of Laemmli sample buffer (Bio-Rad) and boiled at 100 °C for 10 min. Samples were run on an 5-20% polyacrylamide gel (Atto, Japan) at 200 V for 60 min with Tris-glycine-SDS buffer (TaKaRa).

*Two-Dimensional electrophoresis (2-DE)*. For 2-DE, Caco-2 cells sample was added Rehydration Buffer (Ready Prep<sup>TM</sup>, Bio-Rad) and performed in a horizontal 2-DE strips (7cm ZOOM IPG Runner system, Invitrogen) for 16 h, at room temperature. Running conditions were at 200 V for 20 min, 450 V for 15 min, 750 V for 15 min, and then 2000V for 30 min. After isoelectrofocusing, strips were sequentially equilibrated using Ready Prep<sup>TM</sup> system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. The second dimension (SDS-PAGE) was performed on 10 cm x 10 cm (10-20 % polyacrylamide gel, Cosmo Bio, Japan). Proteins were stained with Coomassie brilliant blue or MS Silver stain (Wako, Japan). The spot was analyzed by Delta2D (Fujifilm/GE Healthcare).

*Peptide Mass Finger Printing*. The protein spots were excised from the gel manually with spot-picker and digested with trypsin (MS grade, pierce). The peptides obtained after tryptic digestion were prepared for MALDI-TOF/MS (ultraflex, Bruker Daltonics) after cleaning by Millipore ZipTip<sup>TM</sup>. The MASCOT search engine software (Matrix Science) was used to search the NCBI database.

## 結果および考察

### 1. 細胞分画後のプロテオーム解析

Caco-2を可溶化した後、800gで10分遠心し、上清 (supernatant) と核画分 (nuclear fraction) を得た。対照 (a), ヘム処理 (b), グルタミン添加 (c), グルタミン存在下のヘム処理 (d) Caco-2から各画分を得た。各画分とも電気泳動は、細胞当りの等量で比較した。各レーン等量 (約5  $\mu$ g) を用いてSDS-PAGEを行い、クマシー染色を行った結果をFig. 1に示した。上清 (A) と核画分 (B) では、存在するタンパク質群は、大きく異なっていた。タンパク質量も測定したが、ヘム処理、グルタミン添加で核画分は、ほとんど変化しなかった。上清は、グルタミン添加によって、1.2倍程度に増加した。

画像解析ソフトを用いてタンパク質バンドのヘム処理とグルタミン添加による変化を解析した。上清 (Fig.1A) の泳動像からは、比率の変化を特定することはできなかった。核画分 (Fig.1B) の泳動像からは、分子サイズ50 ~ 100 kDのバンドに微細な変化があることが示された (data not shown)。そこで、核画分を用いて2次元電気泳動を行った。

Fig. 2に、対照 (A), ヘム処理 (B), グルタミン添加 (C), グルタミン存在下のヘム処理 (D) Caco-2より得た核画分 (nuclear fraction) を用いた2次元電気泳動後の銀染色像を示した。核には、ヒストン等の塩基性タンパク質が多く存在しているが、2次元電気泳動の結果からも塩基性タンパク質の存在が確認された。画像解析からは、ヘム処理により、スポット数が増加していることが示された。一方、グルタミン存在下のヘム処理では、ヘム処理に比べスポット数は激減していた。グルタミン添加のみのスポット数の変化は、あまり大きくは無かった。これは、あくまでも2次元電気泳動後銀染色の結果であり、タンパク質量では、大きな変化は認められていないことから、実際に変化しているタンパク質は量的には少ないものと考えられた。これらのスポットを質量分析装置で解析を試みたが、やはり量的に少ないためタンパク質同定までには至らなかった。

細胞分画後の2次元電気泳動によるプロテオーム解析の結果、ヘム処理で核内タンパク質数が

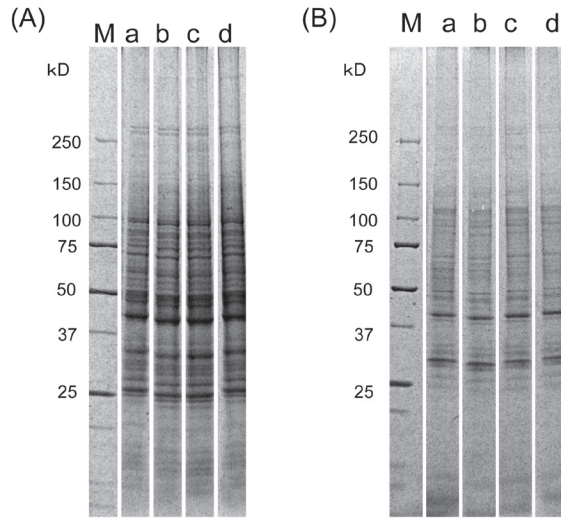


Fig.1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of supernatant (A) and nuclear fraction (B). Each fraction was obtained from Caco-2 cells untreated (a), treated with 50  $\mu$ M HA (b), treated with 4 mM glutamine (c), and treated with HA in the presence of glutamine (d). Samples were electrophoresis on 5-20 % polyacrylamide gel for 40 min at 120 V. After electrophoresis, the protein bands were stained with Coomassie brilliant blue.

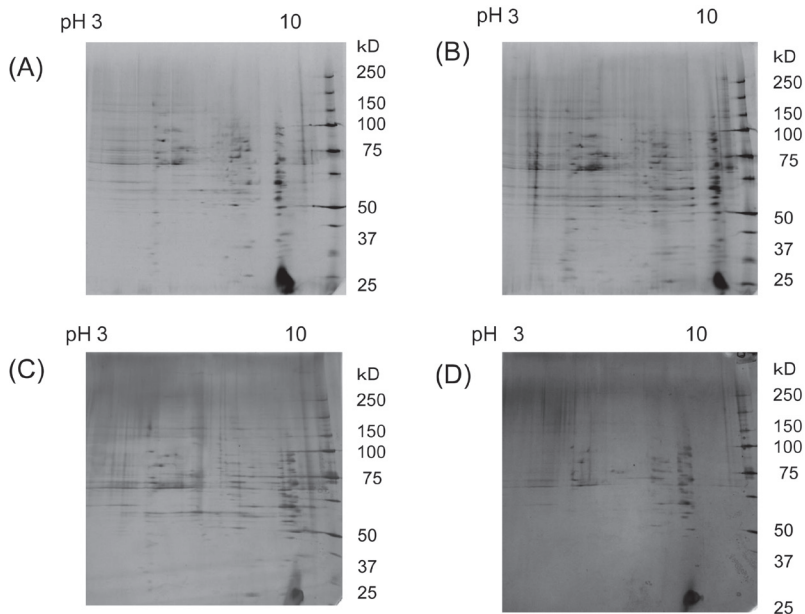


Fig.2 Two-dimensional electrophoresis of nuclei. Nuclear fraction of Caco-2 cells untreated (A), treated with 50  $\mu$ M HA (B), treated with 4 mM glutamine (C), and treated with HA in the presence of glutamine (D) was isoelectrophoresis with pH3-10 strips. Each strips were SDS treatment and electrophoresis on 10-20 % polyacrylamide gel at 200 V. After 60 min, silver staining was performed.

増加し、グルタミン存在下のヘム処理では減少したことから、ヘムによる遺伝子発現レベルでの調節があり、グルタミンはその変化を打ち消す作用がある可能性が考えられた。

## 2. チロシンリン酸化受容体のプロテオーム解析

細胞分画後のプロテオーム解析結果より、遺伝子発現レベルでの変化の可能性が示唆された。そこで、シグナル伝達系の変化について調べるため、リン酸化プロテオーム解析を行うことにした。リン酸化プロテオーム解析の手法には、いくつかあるが、チロシンリン酸化抗体を用いた細胞受容体におけるリン酸化に焦点をあてた網羅的プロテオーム解析を、Proteome Profiler Human Phospho-Receptor tyrosin kinase Array (bio-technie, USA) を用いて行った。このシステムは、ニトロセルロース膜上に48種類の受容体抗体を結合させたものである。これらにCaco-2 cell lysate中の各受容体を結合させ、チロシンリン酸化抗体を用いたサンドイッチ法で、リン酸化された受容体を検出することが可能となる。検出後は、各受容体Arrayについて、ソフトを用いた画像解析を行った。

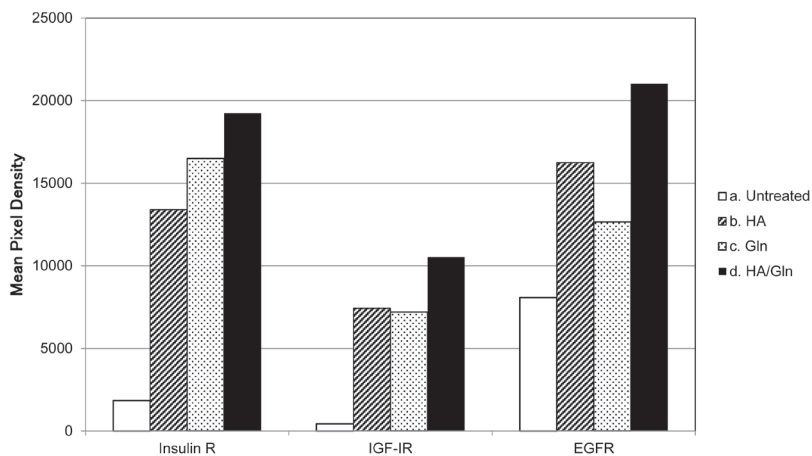


Fig.3 The human phospho-Receptor tyrosin kinase (RTK) Array. Caco-2 cells untreated (a), treated with  $50\mu\text{M}$  HA (b), treated with  $4\text{mM}$  glutamine (c), and treated with HA in the presence of glutamine (d) was analyzed using the Human Phospho-RTK Array. The indicated quantity of lysate was run on array of Insulin Receptor, IGF-I Receptor and EGF Receptor. Data shown are from 10 minute exposure.

いくつかの受容体のリン酸化に変化がみられた。Fig. 3に、リン酸化の変化が最も顕著にみられたインスリン受容体群とEGF受容体の解析結果を図示した。インスリン受容体群は、対照ではリン酸化されたものはほとんど検出されず、ヘム処理、グルタミン添加、グルタミン存在下のヘム処理によって、リン酸化が亢進していた。EGF受容体は、対照においてもリン酸化がみられたが、ヘム処理、グルタミン添加、グルタミン存在下のヘム処理でリン酸化が増加していた。これらの結果から、チロシンキナーゼ受容体を經由したシグナル伝達が活性化している可能性が示唆された。



### 3. リン酸化タンパク質精製後のプロテオーム解析

一方で、リン酸化タンパク質をカラム精製した後のプロテオーム解析法を検討した。リン酸化タンパク質精製カラム (Cosmo bio) を用いた結果は、ヘムの存在によってリン酸基とカラムの結合が阻害された。ヘムを除去し、精製する事を試みたが、完全にヘムの影響をとり除く事ができなかった。(data not shown)。リン酸化タンパク質精製カラム ((Thermo scientific com/pierce) では、ヘムの存在下でもリン酸化タンパク質を結合でき、精製する事ができた。得られたリン酸化タンパク質量を測定したが、グルタミン添加によって増加していた。ヘム処理によるタンパク質量の変化は、ほとんど認められなかった。このサンプルを用いてプロテオーム解析を行った。

Fig.4AにSDS-PAGE後に銀染色を行った結果を示した。細胞質 (Fig. 1A)、核 (Fig. 1B) とも異なるパターンが得られた。画像解析を行ったところ、グルタミン添加 (Fig. 4 lane c and d) において、分子サイズ40 ~ 100 kDのバンドに変化が認められた。そこで、グルタミン添加の試料を用いて2次元電気泳動を行った。2次元電気泳動において、特に、SDS-PAGEから変化が予想された分子サイズの場所を拡大した結果をFig. 4 (B) (C) に示した。核内タンパク質と同様に、ヘム処理により、スポット数の減少が認められた。

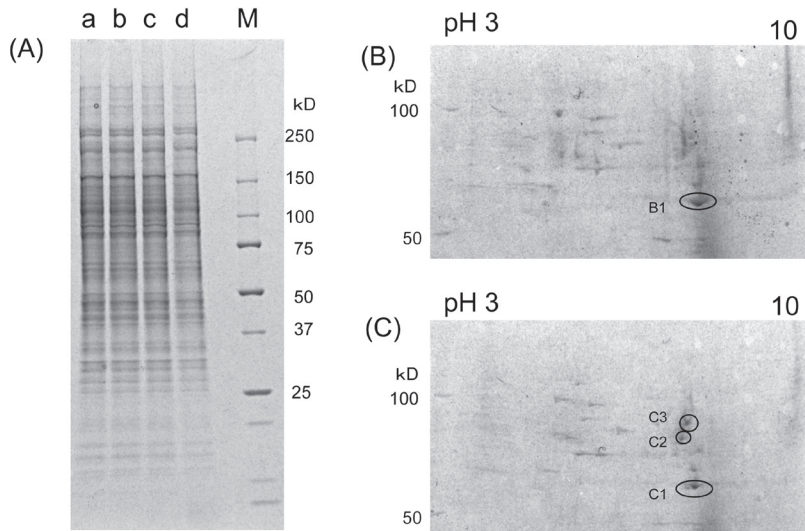


Fig.4 SDS-PAGE (A) and 2-DE (B,C) of phosphoprotein. Phosphoprotein was obtained by the column from Caco-2 cells untreated (a), treated with  $50 \mu\text{M}$  HA (b), treated with 4 mM glutamine (c), and treated with HA in the presence of glutamine (d). Phosphoprotein sample ( $2 \mu\text{g}$ ) was electrophoresis on 5-20% polyacryl amide gel at 120V in the presence of SDS. After for 40 min, silver staining was performed (A). Phosphoprotein (about  $600 \mu\text{g}$ ) in Caco-2 cells treated with glutamine (B), treated with heme & glutamine (C) was isoelectrophoresis with pH3-10 strips. Each strips were SDS treatment and electrophoresis on 10-20 % polyacrylamide gel at 200V. After 60 min, protein spots were stained with Coomassie blue.

### 4. Peptide Mass Finger Printig (PMF) 法による解析

グルタミン存在下でのヘム処理, 未処理の2次元電気泳動ゲルから切り出したスポットについて

て、PMF法でMALDI-TOF/MSを用いたタンパク質同定を行った。現在までに、解析ができた4つのスポットを○で示した (Fig.4B, 4C)。B1, C1は、同じタンパク質であり、Neugrinである可能性が示唆された。一方、C2はtublin, C3はNF-KappaBに関連するタンパク質である可能性が示唆され、ヘム処理時にはっきりとしたスポットとして検出された。これらシグナル伝達に関与するタンパク質のリン酸化に変化が起きている可能性が考えられた。さらに、その他のスポットや、グルタミン非添加のリン酸化タンパク質について、2次元電気泳動の条件を変えて、解析中である。今後、これらのタンパク質同定を進め、リン酸化部位などの特定をしたいと考えている。

### ま と め

今回、消化管出血モデルを用いたグルタミン保護効果のプロテオーム解析において、量的に少ないタンパク質の変化を捉えるための試みを検討した。細胞分画によって、核画分の2次元電気泳動のスポット数の変化を捉える事が出来た。さらに、チロシンリン酸化抗体を用いた受容体の網羅的解析から、インスリン受容体群、EGF受容体の活性化が示された。また、リン酸化タンパク質を精製して、分析することによって、いくつかの情報伝達系タンパク質のリン酸化が関与している可能性を知る事が出来た。プロテオーム解析によるリン酸化タンパク質の同定は、いくつかの方法を組み合わせれば、ある程度の知見が得られることが明らかになった。これらの結果を元に、さらに詳しい解析を行う事が可能となった。

### 謝 辞

実験にあたり、ご協力を頂いた薬学部学生世羅綾香氏、質量分析装置の使用にご協力を頂いた久保貴紀講師に深く感謝いたします。本研究の一部は、安田女子大学 平成27年度 学術研究助成「ストレス性疾患の治療薬としてのグルタミンの作用機序」(研究代表 井上, 研究協力者 玉井, 赤木) によるものである。

### References

1. McFarland MA, Ellis CE, Markey SP, Nussbaum RL. (2008) Proteomics analysis identifies phosphorylation-dependent alpha-synuclein protein interactions. *Mol Cell Proteomics*. 7: 2123-37
2. Hunter T. (2000) Signaling-2000 and Beyond. *Cell*; 100: 113-27.
3. Pawson T, Scott JD. (2005) Protein phosphorylation in signaling-50 years and counting. *Trends Biochem Sci*. 30: 286-90.
4. Mann M, Ong SE, Gronborg M, Steen H, Jensen ON, Pandey A. (2002) Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends in biotechnology*. 20: 261-68.
5. Solari F A, Dell'Aica M, Sickmannabc A, Zahedi RP. (2015) Why phosphoproteomics is still a challenge. *Mol. BioSyst*. 11: 1487-93.
6. Akagi R, Akagi M, Hatori Y, Inouye S. (2016) Prevention of Barrier Disruption by Heme Oxygenase-1 in Intestinal Bleeding Model. *Biol Pharm Bull*. 39: 1007-12.
7. Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line

- (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96 (3): 736-49.
8. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259): 680-5.

[2016. 9. 29 受理]

コントリビュータ：新井 茂昭 教授（薬学科）