

ニワトリ腹腔内脂肪組織を構成するタンパク質の同定

品川真吾¹⁾・仁木隆博¹⁾・河邊弘太郎²⁾・山下秀次¹⁾・荒木朋洋¹⁾・信國喜八郎¹⁾・芝田 猛¹⁾

¹⁾九州東海大学農学部, 熊本県阿蘇郡南阿蘇村 869-1404

²⁾鹿児島大学生命科学資源開発研究センター, 鹿児島県鹿児島市郡元 890-0065

本実験では、鳥類の脂肪組織におけるタンパク質の存在とその種類を明らかにするため、ニワトリの脂肪組織をもちいて SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、クマシーブリリアントブルー (CBB) R 250 で検出した後、アミノ酸配列を決定しタンパク質の同定を試みた。供試鶏としてプロイラー (Ross 308 系統) を用い、43 日齢に放血と殺後、腹腔内脂肪を摘出した。腹腔内脂肪は界面活性剤と尿素を含む溶媒でホモジナイズして遠心分離し、得られた上清について SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。その結果、腹腔内脂肪組織から約 40 種類のバンドが検出された。このうち CBB R250 による染色の度合いから量的に多いと推定された 12 種類のタンパク質バンドについて、リシルエンドペプチダーゼによりゲル内消化後、逆相 HPLC によりペプチドを分離した。このうち 8 種類のタンパク質バンドについてペプチドマップが得られた。これらのタンパク質について、1 つのタンパク質当たり 2~3 のペプチドについてアミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列から、BLAST により相同性のあるタンパク質を推定した。相同性検索の結果と推定分子量から、血漿アルブミン、2 種類のビメンチン、アネキシン II および脂肪組織由来脂肪酸結合タンパク質 (AFABP) が同定された。これらのタンパク質は、二次元電気泳動法によりそのスポット位置が推定された。ペプチドのアミノ酸配列が決定されたタンパク質のうち 3 種類のタンパク質バンドは、BLAST による相同性検索で一致するものが無く、このうち幾つかのタンパク質バンドは、新規のタンパク質である可能性が示唆された。このことから、更に解析を進めることでニワトリの脂肪組織に新規なタンパク質を検出できる可能性が示唆された。

キーワード: 腹腔内脂肪組織, タンパク質, SDS-PAGE, BLAST, ニワトリ

緒 言

脂肪組織の役割が余剰なエネルギーの貯蔵であることは、従来から知られている。しかし、最近の研究では、この組織はエネルギーの貯蔵のみならず、生理的活性物質の合成・分泌に関与することが示されている。すなわち、肥満遺伝子の産物であるレプチンが脂肪細胞から血液中に分泌されていること (Freedman *et al.* 1998)、脂肪細胞内にアディポネクチンと称される新規タンパク質が存在し (Maeda *et al.*, 1998)、このタンパク質は抗動脈硬化作用 (Yokota *et al.*, 2000, Ouchi *et al.*, 2001) やインシュリン感受性亢進作用 (Hotta *et al.*, 2001) を持

つことなどが報告されている。これらのことから脂肪細胞の生理的意義が注目されている。

脂肪組織について畜産学分野では肉用牛の脂肪交雑との関連で脂肪細胞分化の要因となる C/EBP フェミリーや PPAR γ についての遺伝子解析 (Sundvold *et al.*, 1997)、またゲノム解析データを利用した QTL 解析 (山田ら, 2003) が盛んに試みられている。ニワトリでは、肉用鶏の肥育に伴う腹腔内への多量の脂肪沈着が認められることから、これに関連する遺伝子についての QTL 解析が進められている (Burt, 2001)。しかし、ニワトリがヒトと同様な、または特異的なタンパク質やペプチドを脂肪細胞で合成、分泌しているか否かについての報告はみあたらない。

一方、ゲノム解析の結果がデータベース化され利用できるようになってきている。しかしながら、遺伝子の機能については、実際に細胞内で翻訳後修飾を受け、機能調節を受けて様々な働きをしているタンパク質について DNA 解析からのみでは全てを明らかにすることは困難

2004 年 11 月 8 日受付, 2004 年 12 月 6 日受理

連絡者: 芝田 猛

〒869-1404 熊本県阿蘇郡南阿蘇村河陽

Tel: 0967-67-3931

Fax: 0967-67-3960

e-mail: tshibata@ktmail.ktokai-u.ac.jp

である。近年、ゲノム情報を利用しながら遺伝子の産物であるタンパク質について、直接その機能を解明する必要のあることが認識されるようになった。この種の研究は、プロテオームまたはプロテオミクス解析と呼ばれ、細胞で発現しているタンパク質を網羅的に研究しようとするものである (Kahn, 1995; Pandey and Mann, 2000)。

本研究は、ニワトリの脂肪組織について、電気泳動法によりタンパク質を分離し、それぞれのタンパク質について部分アミノ酸配列を明らかにし、ゲノムデータベースを利用して未だ解明されていないニワトリの脂肪組織を構成する主要なタンパク質を明らかにすること、および新規なタンパク質を検出し、プロテオーム解析を行うための基礎とすることを目的として行った。

材料および方法

供試鶏としてブロイラー (Ross 308 系統) の雄 8 羽を用いた。これらのニワトリは、初生から 20 日齢までは常法に従って育雛器 (全慶園製作所) で飼育した。その後、43 日齢までは温度 20~24℃, 照明時間 14 時間 (午前 5 時~午後 7 時) に調整された部屋に移し、中雛用ケージにて飼育した。飼料は、20 日齢までは育雛用、以後は中雛用 (いずれも伊藤忠飼料) を用い、水とともに自由摂取させた。43 日齢で放血屠殺し腹腔内脂肪組織を摘出した。脂肪組織は分析に供試するまで -20℃ で凍結保存した。

Lowry 法により脂肪組織のタンパク質量を測定したところ、組織 1g あたり約 1.5mg と他の組織に比較すると 10~15% 程度とかなり低いものであった。このため、電気泳動に供する試料は、1g の脂肪組織に 3ml の試料溶解液 (8M 尿素, 2% ノニデット P40, 5% 2-メルカプトエタノール) でホモジナイズし、20,000×g で 20 分間遠心分離を 2 回行い、上清を -20℃ で凍結保存したものをを用いた。

タンパク質の分離は SDS-PAGE によって行い、Laemmli (1970) の方法を一部変更して行った。分離用ゲル (180×140×1mm) は 10-20% の濃度勾配を作成したものをを用いた。各個体の抽出液を 1 レーン当たりタンパク質量 30μg に調整し添加した。電気泳動後のゲルは 0.25% クマシーブリリアントブルー (CBB) R250 により染色後、脱色液 (5% メタノール, 7% 酢酸) で脱色し、真空パックで保存した。

SDS-PAGE により検出されたバンドが単一のタンパク質か否かを検討するために、二次元電気泳動を行った。まず、一次元目の電気泳動は、固定化 pH 勾配ゲル (IPG) を用いて行った。IPG ディスクゲルは、イモビラ

イン溶液 (アマシヤムフェルマシアバイオテック) を Hirano *et al.* (2000) の報告に従い調合し、8M 尿素および 2% 2-メルカプトエタノールを含む 3.8% のポリアクリルアミドゲルを作製した。この IPG ディスクゲルでタンパク質を分離し、これを SDS-PAGE により二次元展開し、SDS-PAGE の場合と同様に CBB R250 染色後、脱色した。

解析に先立ち、調整した脂肪組織試料と血漿試料を同一ゲル上で電気泳動を行い、血液タンパク質が脂肪組織試料の電気泳動像に影響を与えていないことを確認した。また、供試鶏毎に腹腔内脂肪タンパク質を分離したが、タンパク質バンドに個体変異が確認されなかった。そこで各タンパク質バンドについての抽出および解析は、2~3 羽の試料をプールして用いた。

次に、タンパク質のアミノ酸配列解析は、ペプチドマップを作製し任意の単一ピークを示したペプチドについてアミノ酸配列を決定することで行った。SDS-PAGE により分離した目的とするタンパク質部分のゲルを切り出して粉碎し、100% アセトニトリルで脱色および脱水を行った。これに 1g のグアニジジン塩酸塩、600μl のトリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) を加え、さらに、5μl の 4-ピニルピリジンおよび 10μl のトリ-n-ブチルフォスフィンを加え、室温で暗所に還元ピリジリルエチル化を行った。その後、反応液を除去し、0.2M NH₄OH で 5 回ゲルを洗浄し、吸引して乾燥させた。切り出したバンドに含まれるタンパク質の酵素消化は、ゲルに含まれたままの状態で行った。タンパク質のゲル内での消化は、ゲル片にトリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) を 266μl 加え、これにプロテアーゼ I (0.5μg のリシルエンドペプチダーゼ) を添加し、37℃ で 12 時間の反応後、同量のプロテアーゼ I を加え 12 時間行った。消化物は、15,000 rpm, 20 分間遠心分離し、得られた上清に 0.114% トリフルオロ酢酸 (TFA) を加え、酵素消化液とした。

回収したペプチドをシリカ系逆相高速液体クロマトグラフィーカラム (Chromolith Performance RP-18e, 4.6×100 mm, Merck KgaA Darmstadt Germany) により分離した。ペプチドの溶出には、0.1% TFA (溶液 A) と溶液 A に濃度 60% でアセトニトリルを溶解したもの (溶液 B) を用い、アセトニトリルの 0~60% の直線濃度勾配によりペプチドを溶出した。ペプチドの検出は、インテリジェントインテグレーター 807-IT (日本分光) により 220 nm で行った。溶出された任意の単一ピークをエドマン法による自動アミノ酸シーケンサ (Model 492 precise cLC, PE バイオシステムおよび PPSQ-21, 島津製作所) により N 末端部分アミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列を BLAST (<http://www.ncbi>

nlm.nih.gov/BLAST/; Karlin and Altschul, 1990) により相同性を検索しタンパク質の同定を行った。

結 果

1. SDS-PAGE および二次元電気泳動像

図 1 a に示すように腹腔内脂肪組織において、SDS-PAGE により分離され CBB R250 染色で肉眼的に検出されるタンパク質バンドは、およそ 40 種類であった。しかし、そのほとんどは CBB R250 染色の度合いから微量であると考えられた。本実験では、図 1 a に示すとおり CBB R250 で濃く染色され、分析に十分なタンパク質量があると考えられる 12 種類のバンドについてアミノ酸配列解析を試みた。その結果、8 種類のタンパク質バンドのペプチドについて部分アミノ酸配列を得ることができた。アミノ酸配列が得られたタンパク質について解析を進めるうえで、これらのタンパク質バンドに分子量の大きい方から番号 (AP-1~8) をつけた。これらのタンパク質バンドは、タンパク質マーカーの分子量と移動度から分子量がおおよそ 66-kDa (AP-1)、55-kDa (AP-2)、50-kDa (AP-3)、44-kDa (AP-4)、40-kDa (AP-5)、29-kDa (AP-6)、15-kDa (AP-7) および 14-kDa (AP-8) と推定された。

(AP-6)、15-kDa (AP-7) および 14-kDa (AP-8) と推定された。

二次元電気泳動により脂肪組織のタンパク質を展開した像を図 1 b に示した。ニワトリ腹腔内の脂肪組織タンパク質は、その多くのが等電点 5~7 にあり、量的に多いタンパク質のほとんどがこの位置に検出された。しかし、等電点 8 前後にもタンパク質が検出された。

また、二次元電気泳動 (図 1 b) から SDS-PAGE で検出されるバンドに複数のタンパク質が含まれるか否かが確認された。すなわち AP-1~3, 5 および AP-8 のバンドはほぼ単一のタンパク質で構成されていると考えられた。しかしながら、AP-4 のバンドは等電点 5.5 付近に濃いスポットと 7 に近い付近に薄いスポットが認められた。AP-6 のバンドは、等電点 5.5 付近に含有量の多いタンパク質スポットが検出されるが、同様に等電点 7 付近にも幾つかの薄いスポットが検出された。AP-7 は同一の分子量の位置に等電点が類似した染色度合いが濃いものと薄いものの 2 つのスポットが検出された。AP-7 についてはこの 2 つのスポットが共存する状態でアミノ酸配列解析を行った。

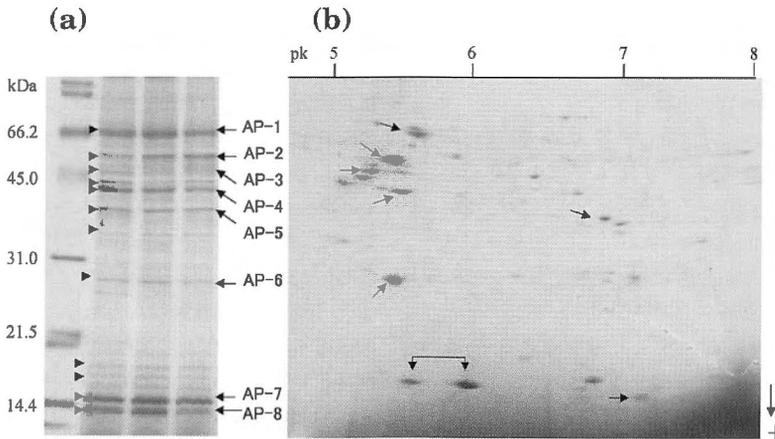


図 1. SDS-PAGE および二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (2-D PAGE) により分離されたニワトリ腹腔内脂肪組織のタンパク質像。

(a) SDS-PAGE によるタンパク質像。ゲルの最も左のレーンには、分子量マーカーを示す。▶印のついたタンパク質は、実験に供せられたタンパク質を示す。AP-1~8 は、本研究において同定のためのペプチド断片が得られたタンパク質を示している。(b) 2-D PAGE によるタンパク質像。矢印で示されたタンパク質スポットは、SDS-PAGE により分離され、同定に用いられたタンパク質 (AP-1~8) の 2-D PAGE ゲル上での推定位置を示している。

Fig. 1. SDS-PAGE and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) separation of proteins in chicken abdominal adipose tissue.

(a): shows separation by mean of SDS-PAGE. The left lane is protein molecular marker. ▶ marks show proteins that were used for this experiment. AP-1~8 show proteins that were obtained peptide segments for identification of protein. (b): shows separation by mean of 2-D PAGE. Protein spots with arrows show estimated positions for AP-1~8 on 2-D PAGE gel.

表 1. ニワトリ腹腔内脂肪組織において同定が試みられたタンパク質の部分アミノ酸配列と推定されたニワトリのタンパク質

Table 1. Partial amino acid sequence and estimated protein identified in chicken abdominal adipose tissue

タンパク質の記号 Symbol for protein band	推定 分子量 MW (kDa)	ペプチドのアミノ酸配列 Amino acid sequence of a peptide	推定されたニワトリのタンパク質 Estimated chicken protein	分子量 MW (Da)	アクセス番号* Accession number
AP-1	66	G K P Q M T E E Q I... G V I D L A Q K...	Serum Albumin (precursor)	69918	P19121
AP-2	55	L Q E A E E...	Vimentin	53011	P09654
AP-3	50	L Q E A E E...	Vimentin	53011	P09654
AP-4	44	Y P X E R... C D V D L R K...	unknown		
AP-5	40	V F E R Y K... D I I S D T S G D F...	Annexin II	38509	P17785
AP-6	29	G E L M S A K... G N I E M F L...	unknown		
AP-7	15	R V Y E R A... L G E E F D E T T A...	Adipocyte Fatty acid binding protein (AFABP)	14894	Q90X55
AP-8	14	V L S A A D L G G G... D L D L E A H K... G I F T K...	unknown		

*ExpPASy Proteomics Server におけるアクセス番号。
Accession number in the ExpPASy Proteomics Server.

2. タンパク質のペプチドマップ

SDS-PAGE ゲルから切り出した各タンパク質バンドについて、HPLC により酵素消化したペプチドを検出した。解析したタンパク質のペプチドは、溶出 20 分後からピークが認められ 80 分間でほとんどのペプチドが溶出された。各ペプチドを溶出順にマイクロチューブに回収した。この中から、ゲルブランクを参考にペプチドと判定された立ち上がりの鋭い単一と考えられる 2~3 のピークを選びアミノ酸配列解析を行った。

3. アミノ酸配列解析とタンパク質の同定

各タンパク質のペプチドについて、N-末端部分アミノ酸配列を解析した結果を表 1 に示した。ペプチドピークの中には複数のペプチドを含むものがあり解析のできないものもあったが、AP-1, 4, 5, 6 および 7 では、2 つの部分アミノ酸配列が得られた。同様に AP-2 と 3 では 1 つの、AP-8 では 3 つのアミノ酸配列が得られた。

これらのアミノ酸配列について BLAST によりアミノ酸類似配列検索を行った。その結果、AP-1 における 2 つのペプチドのアミノ酸配列は、ともに肝臓で認められたニワトリ血清アルブミン前駆体 (Accession No. P19121) と相同性が認められた。また、解析された 11 個のアミノ酸配列中に 1 個所および 8 個のアミノ酸配列中

に 2 個所のアミノ酸置換が認められた。AP-2 および 3 の部分アミノ酸配列は、ニワトリの筋肉に発現するビメンチン (Accession No. P09654) の cDNA 配列 (Zehner and Paterson, 1983) から推定されるアミノ酸配列と部分アミノ酸配列について全ての配列が一致し、その分子量も約 53-kDa とほぼ一致した。AP-5 における 2 つのペプチドのアミノ酸配列は、ともにニワトリ胚繊維芽細胞から得られた cDNA の塩基配列より推定されたアネキシン II (Accession No. P17785) のアミノ酸配列 (Gerke and Koch, 1990) と一致し、その分子量も約 38.5-kDa であることからほぼ一致していた。AP-7 における 2 つのペプチドのアミノ酸配列は、いずれもニワトリの脂肪組織について得られた mRNA の塩基配列から推定された脂肪組織由来脂肪酸結合タンパク質 (AFABP) (Accession No. Q90X55) のアミノ酸配列と一致し、その分子量も約 14-kDa であることから良く一致していた。

一方、AP-4 については解析した 2 つのペプチドのうち、一方のペプチド (配列; CDVDLRK) とニワトリの β アクチンが一致したが、もう一方のペプチドについては一致するものが見あたらなかった。AP-6 および AP-8 については、BLAST に登録された高等動物のタンパク質と相同性を示すタンパク質は認められなかった。

考 察

ニワトリの腹腔内脂肪組織について SDS-PAGE および二次元電気泳動法によりタンパク質の分離を試みた。しかし、脂肪組織はその大部分が脂肪滴で占められるためタンパク質含量は、他の組織や臓器に比較すると 10%程度と低く、電気泳動的に CBB R250 染色により検出されたタンパク質バンドも約 40 種類と少なかった。染色度合いから見てタンパク質量が十分あると考えられる 12 種類のバンドについてアミノ酸配列を解析したが、それらのうちで配列を明らかにすることができたものは 8 種類であった。ペプチドのアミノ酸配列が明かとなった 8 種類のバンドで BLAST により同定されたものは 5 種類のバンドについてであり、そのうち 2 種類は同一のタンパク質であった。

細胞は基本的に細胞膜、細胞小器官および細胞質から構成される。そこで本実験で同定されたタンパク質を見てみると細胞膜に存在すると考えられるものとしてアネキシン II が検出された。アネキシンはレクチン活性を示すカルシウムおよびリン脂質に結合するタンパク質ファミリーで菌類を除くすべての真核細胞から 20 種類以上のものが検出されている。これらは種類の違いにより様々な物質との接着機能あるいは接着阻止機能が異なることから注目されているタンパク質の 1 つである。特にアネキシン II は細胞外マトリクス糖蛋白質であるティネシンや組織プラスミノゲンアクティベーターと結合することが明らかにされている (Mollenhauer 1997)。ニワトリでは Gerke and Koch (1990) が胚繊維芽細胞について cDNA クローニングによりアネキシン II を同定している。本実験において、脂肪組織でもアネキシン II が合成されていることが明かとなった。

さらに細胞小器官を構成するタンパク質として、ビメンチンが同定された。ビメンチンは細胞骨格タンパク質であり、核や細胞小器官の位置決定などに関与しているタンパク質であると考えられている。しかし、一方では脂肪細胞の分化に関係しているという報告もある (Takenouchi *et al.*, 2004)。また、ガン細胞のみを攻撃するヒトモノクローナル抗体では、ビメンチンを抗原として攻撃するとの報告もある (Hagiwara *et al.*, 2001)。Zehner and Paterson (1983) は、ニワトリ胚の筋肉のビメンチンについてその性質などを明らかにしているが、その分子量は約 53-kDa とされており、本実験においてもほぼ同様の分子量を持つ 2 種類のビメンチンが脂肪組織に検出された。

細胞質に存在すると考えられるタンパク質としては、脂肪組織由来脂肪酸結合タンパク質 (AFABP) が同定

された。FABP は脂肪酸結合タンパク質ファミリーとして各組織に存在する。ニワトリでは今までに肝臓 (Accession No. P80226)、心臓 (Accession No. Q6DRR5)、胚の網膜 (Accession No. Q05423) などの FABP についての報告がある。脂肪組織については、Wang *et al.* (2004) がニワトリの脂肪組織について得られた mRNA より塩基配列を決定し、脂肪組織に分布する AFABP のアミノ酸配列を推定している。FABP は主に脂肪酸の結合、細胞内への疎水性物質の輸送の仲介に関与している。このタンパク質をノックアウトしたマウスでは、食事性肥満からのインシュリン抵抗性や糖尿病が生じないことが報告されている (Shaughnessy *et al.*, 2000)。しかがって、FABP は肥満の過程で生ずる幾つかの病態の発症と関連があるものと考えられる。本実験においてもタンパク質レベルで AFABP を同定することができた。しかし、二次元電気泳動において、同一分子量の位置にやや等電点の異なる 2 つのスポットとして検出されていることから、AFABP がそのいずれか、もしくはリン酸化などを受けて等電点に変化しているものかを検討する必要がある。

また、血清アルブミンが検出されたが、同様にマウス脂肪細胞の二次元電気泳動のデータベースにも血清アルブミンが検出されている (<http://Kr.expasy.org/cgi-bin/ch2d-compute-map?WAT-MOUSE,P07724>)。血清アルブミンは 1 分子に 7~8 分子の遊離脂肪酸を結合し、これを脂肪組織に運搬する働きがある。したがって、遊離脂肪酸輸送のため脂肪細胞膜に結合していたアルブミンが検出されたものと考えられた。

一方、その他 4 種類のタンパク質は、決定された部分アミノ酸配列から BLAST によりタンパク質を同定することができなかった。これらのタンパク質では、例えば AP-4 においては、2 つのペプチドのアミノ酸配列が解読されたが、その一方はアクチンと相同性を示し、一方は全く一致するタンパク質が無いというものであった。アクチンはビメンチンとともに脂肪細胞分化に関与しているとの報告 (Takenouchi *et al.*, 2004) もある。したがって、AP-4 のバンドは二次元電気泳動の結果から複数のタンパク質を含んでいる可能性があるため、その一部がアクチンである可能性は否定できない。また、AP-6 および AP-8 については高等動物のタンパク質と一致するものは認められず、新規のタンパク質である可能性が高いと考えられた。

本実験では、ニワトリ腹腔内脂肪組織について 4 種類のタンパク質を同定するとともに、新規のタンパク質が存在する可能性を示唆した。さらに今回の実験では、存在が認められるにもかかわらず微量であるために同定が

できていないタンパク質があり、これらのタンパク質の中にも新規のタンパク質が存在する可能性が残されている。

謝 辞

アミノ酸配列解析の一部を担当していただいた東海大学伊勢原研究推進部教育・研究支援センター分子科学部門の塚本秀雄氏に感謝の意を表します。また本研究の一部は、伊藤記念財団による平成 13 年度食肉に関する助成研究調査事業および 2002 年度九州東海大学特色ある教育研究プロジェクト研究の助成を受けて行われた。

引用文献

- Burt DW. Chicken genomics: Progress and Prospects. *Journal of Animal Genetics*, 28 : 35-39. 2001.
- Freedman JM and Halaas J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395 : 763-770. 1998.
- Gerke V and Koch W. The cDNA sequence of chicken annexin II. *Nucleic Acids Research*, 18 : 4246. 1990.
- Hagiwara H, Aotsuka Y, Yamamoto Y, Miyahara J and Mitoh Y. Determination of the antigen/epitope that is recognized by human monoclonal antibody CLN-IgG. *Human Antibodies*, 10 : 77-82. 2001.
- Hirano H, Kawasaki H and Sassa H. Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient tube gels. *Electrophoresis*. 21 : 440-445. 2000.
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC and Matsuzawa Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*. 50 : 1126-1133. 2001.
- Kahn P. From genome to proteome: Looking at a cell's proteins. *Science*, 270 : 369-370. 1995.
- Karlin S and Altschul SF. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 : 2264-2268. 1990.
- Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685. 1970.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y and Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221 : 286-289. 1998.
- Mollenhauer J. Annexins: what are they good for? *Cellular and Molecular Life Science*, 53, 506-507. 1997.
- Ouchi N, Kimura S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T and Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*, 102 : 1296-1301. 2000.
- Pandey A and Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405 : 837-846. 2000.
- Shaughnessy S, Smith ER, Kodukula S, Storch J and Fried SK. Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (ap2^{-/-}) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte [correction of keratinocyte] fatty acid binding protein. *Diabetes*. 49 : 904-911. 2000.
- Sundvold H, Brzozowska A. and Lien S. Characterization of bovine peroxisome proliferator-activated receptors gamma 1 and gamma 2: genetic mapping and differential expression of the two isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239 : 857-861. 1997.
- Takenouchi T, Miyashita N, Ozutsumi K, Rose MT and Aso H. Role of caveolin-1 and cytoskeletal proteins, actin and vimentin, in adipogenesis of bovine intramuscular preadipocyte cells. *Cell Biology International*, 28 : 615-623. 2004.
- Wang Q, Li H and Li N. Cloning and characterization of chicken adipocyte fatty acid binding protein gene. *Animal Biotechnology*, (in press).
- 山田宣永・谷口幸雄・三宅 武・佐々木義之. 脂肪交雑原因遺伝子の QTL 解析の現状と展望. *動物遺伝育種研究*, 30 : 21-28. 2003.
- Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y and Matsuzawa Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*, 96 : 1723-1732. 2000.
- Zehner ZE and Paterson BM. Characterization of the Chicken Vimentin Gene: Single Copy Gene Producing Multiple mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 80 : 911-915. 1983.

Identification of Proteins in Abdominal Adipose Tissue in Chicken

Shingo Shinagawa¹⁾, Takahiro Nikki¹⁾, Kotaro Kawabe²⁾, Hideji Yamashita¹⁾, Tomohiro Araki¹⁾, Kihachiro Nobukuni¹⁾ and Takeshi Shibata¹⁾

¹⁾ School of Agriculture, Kyushu Tokai University, Aso-gun 869-1404, Japan

²⁾ Research Center for Life Science Resource, Kagoshima University, Kagoshima-shi 890-0065, Japan

In order to clarify the existence and the kind of proteins in adipose tissue of chickens, we attempted to identify proteins by means of SDS-PAGE separation with coomassie brilliant blue (CBB) R250 staining, and amino acid sequencing in adipose tissue of broiler chicken (Ross 308 strain). Abdominal adipose tissues were obtained from eight birds at 43 days of age. These tissues were homogenized with lysis buffer containing detergent and urea, and centrifuged. Proteins in supernatants were separated by SDS-PAGE. Consequently, about forty protein bands were recognized in the lysate of abdominal fat pad. Twelve kinds of main protein bands were digested with lysylendopeptidase in gel, and separated on a reversed-phase HPLC. Peptide segments were obtained from eight proteins in those. Two or three peptide segments for one protein were selected and used for the determination of amino acid sequence. Four kinds of proteins ; serum albumin, two kinds of vimentine, annexin II and adipocyte fatty acid binding protein (AFABP) ; were identified by the homology search with BLAST and the molecular mass. Furthermore, other three proteins were remained as unknown which had not been identified in this research work. Therefore, it is suggested from the results that some novel proteins might exist in chicken adipose tissue.

(The Japanese Journal of Poultry Science, 42 : J87-J93, 2005)

Key words : chicken, abdominal adipose tissue, protein, SDS-PAGE, BLAST, chicken