

金属イオンの特性を利用したリン酸化タンパク質の特異的認識と検出

木下英司,* 木下恵美子, 小池 透

Specific Recognition and Detection of Phosphorylated Proteins
Using Characteristics of Metal Ion

Eiji KINOSHITA*, Emiko KINOSHITA-KIKUTA, and Tohru KOIKE

Department of Functional Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University,
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

(Received July 20, 2007)

Protein phosphorylation is one of the most important post-translational modifications. Organisms utilize this reversible reaction of proteins to control many cellular activities, including signal transduction, apoptosis, gene expression, cell cycle progression, cytoskeletal regulation, and energy metabolism. Abnormal protein phosphorylation is deeply related to carcinogenesis and neuropathogenesis. Methods for monitoring the phosphorylation status of proteins are, thus, very important with respect to the evaluation of diverse biological and pathological processes. Recently, we reported that a dinuclear metal complex of 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)-amino]propan-2-olato acts as a novel phosphate-binding tag molecule, Phos-tag, in an aqueous solution under physiological conditions. The Phos-tag has a vacancy on two metal ions that is suitable for the access of a phosphomonoester dianion ($R-OPO_3^{2-}$) as a bridging ligand. The resulting 1:1 phosphate-binding complex, $R-OPO_3^{2-}$ -(Phos-tag) $^{3+}$, has a total charge of +1. A dinuclear zinc(II) complex (Zn^{2+} -Phos-tag) strongly binds to phenyl phosphate dianion ($K_d=2.5\times 10^{-8}$ M) at a neutral pH. The anion selectivity indexes against SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , and bisphenyl phosphate monoanion at 25°C are 5.2×10^3 , 1.6×10^4 , 8.0×10^5 , and $>2\times 10^6$, respectively. A manganese(II) homologue (Mn^{2+} -Phos-tag) can also capture the $R-OPO_3^{2-}$ anion, such as phosphoserine, phosphotyrosine, and phosphohistidine, at an alkaline pH. By utilizing the Phos-tag molecule and its derivatives, we developed convenient and reliable methods for the detection of phosphorylated proteins. We believe that our Phos-tag technology will result in great progress in phosphoproteomics.

Key words—phosphate-binding tag; phosphorylation; phosphorylated protein; phosphoproteomics; proteome

1. はじめに

2003年4月、ヒトゲノム解析の完了が宣言され、生命科学はゲノム情報を基にヒトの遺伝子機能を網羅的に解明していこうという時代(ポストゲノム時代)を迎えた。ヒトには2万数千個程度の遺伝子が存在することが明らかにされ、そこから生み出されるタンパク質はスプライシングや翻訳後修飾を受け、何十万種にもなる。それらの機能を明らかにし、複雑な生命現象を制御するタンパク質ネットワークの全体像を解き明かす研究(プロテオミクス)は、ポストゲノム研究の重要な課題である。プロテ

オミクスにより得られた情報は、がんや糖尿病などの多遺伝子疾患の原因究明や創薬、並びに、個別化診断・治療を行うテーラーメイド医療の基礎となることが期待される。それゆえに、多くの製薬企業や研究機関がその情報の蓄積にしのぎを削っている。

プロテオミクスの中でも、リン酸化タンパク質の解析(リン酸化プロテオミクス)は医薬品開発の観点からも興味を集めている。タンパク質の可逆的なリン酸化反応は重要な翻訳後修飾の1つである。タンパク質リン酸基転移酵素(キナーゼ)はヒトでは500種類以上もの遺伝子があり、それらの複雑なネットワークの基で作られ出されるリン酸化タンパク質は実に緻密な生体制御を行っている。したがって、キナーゼの活性に異常を来し生体制御のバランスが崩れることは疾病をもたらす大きな要因となる。事実、いくつかのがんでは特定のキナーゼの異常な活

広島大学大学院医歯薬学総合研究科医薬分子機能科学研究室(〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3)

*e-mail: kinoeiji@hiroshima-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムS11で発表したものを中心に記述したものである。

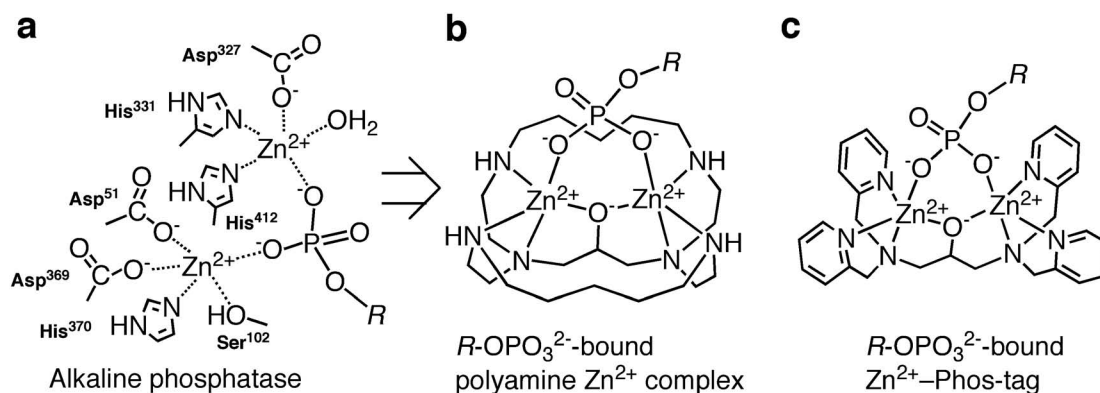


Fig. 1. Development of the Phosphate-binding Tag Molecule through Zinc Enzyme Model Studies

Active center of alkaline phosphatase with a phosphomonoester dianion ($R\text{-OPO}_3^{2-}$) (a). Structures for $R\text{-OPO}_3^{2-}$ -bound dinuclear zinc(II) complexes (b and c), which were synthesized as a model for the active center of alkaline phosphatase.

性亢進が原因であることが明らかになり、治療薬としてのキナーゼ阻害剤が開発されている。

生体内のリン酸化反応は、時間的及び空間的に変化する極めて動的な現象である。それゆえに、発現しているすべてのタンパク質のリン酸化を解析して初めてその全体像が明らかになるのであり、複数の研究法から得た多くの知見から総合的に理解することが大切である。今後のリン酸化プロテオミクス研究には、現在汎用されている放射性同位体の ³²P や抗リン酸化抗体などのツールに加え、それらとは異なる視点で簡便に信頼性の高い情報が得られる新しい技術が求められている。

筆者らの研究グループは、リン酸基を特異的に捕捉することができる機能性分子のフォスタグ (Phos-tag) を用いて、リン酸化プロテオミクスに有用な種々の技術を開発している。Phos-tag の Phos は「リン酸イオン (phosphate)」を、tag は「標識」を意味する。Phos-tag は 2 つの金属イオンを持つ錯体化合物で、水溶液中でリン酸基を選択的に捕捉できる。リン酸化タンパク質に対しては、リン酸化アミノ酸残基の種類に係らず捕捉することができる。本稿では、リン酸化タンパク質やリン酸化ペプチドを分離・濃縮できるクロマトグラフィー担体の Phos-tag アガロース、ウエスタンブロッティング膜上のリン酸化タンパク質を検出できる Phos-tag ビオチン、タンパク質のリン酸化状態の違いを電気泳動法で分離できる Phos-tag アクリルアミドについて概説し、それらを用いたリン酸化タンパク質の研究法の実例を紹介したい。

2. 二核金属錯体 Phos-tag によるリン酸イオンの特異的捕捉機能

生体内には活性中心に金属イオンを持つ、金属酵素と呼ばれるタンパク質群がある。それらに含まれる金属イオンは亜鉛や鉄など十数種類であるが、金属酵素が行う反応は莫大な数であり、われわれの生命活動を支えている。金属イオンが様々な酵素反応を行うことができるのは、配位する小分子の電子状態を大きく変化させてその反応性を制御するからだと考えられる。筆者らの研究グループでは、亜鉛酵素であるアルカリフォスファターゼの活性中心 (Fig. 1 (a)) における 2 つの亜鉛イオンが、リン酸基を特異的に捕捉する機能¹⁾に注目し、モデル錯体を合成してその反応中間体の特性を探求してきた。²⁻⁸⁾ その研究の中で筆者らは、ポリアミンの亜鉛錯体 (Fig. 1 (b)) が、水溶液中においてもリン酸モノエステルジアニオン ($R\text{-OPO}_3^{2-}$) を選択的に捕捉する能力を持っていることを発見した。⁸⁾ このポリアミン-亜鉛錯体を用いた亜鉛酵素のモデル研究により、 $R\text{-OPO}_3^{2-}$ の選択的な捕捉には 3 から 4 Å の距離に配置した二核亜鉛錯体構造が適していることが明らかとなった。この発見を基盤として、



木下英司

広島大学大学院医歯薬学総合研究科准教授。1997年広島大学大学院医学系研究科博士(薬学)取得後、La Jolla アレルギー免疫学研究所(米国)博士研究員を経て、1998年広島大学医学部助手、2003年より現職。Phos-tag技術を利用することで、生命現象を司る未知のリン酸化ネットワーク機構を解明したい。

酵素が機能する環境, すなわち生理的 pH 下の水溶液中で $R-OPO_3^{2-}$ を特異的に捕捉する亜鉛錯体, Phos-tag (Fig. 1 (c)) の開発に至った.⁹⁾

Phos-tag 亜鉛錯体 (Zn^{2+} -Phos-tag) と様々なアニオン性基質との複合体形成反応を pH 滴定法により検討した.⁹⁾ アニオン性基質との 1:1 複合体の解離定数は, フェニルリン酸イオン $K_d=25$ nM, 酢酸イオン $K_d=0.40$ mM, 水酸化物イオン $K_d=63$ nM, 硫酸イオン $K_d=0.13$ mM, 塩化物イオン $K_d=20$ mM (25°C, $I=0.10$ NaNO₃) である. このことから, この Zn^{2+} -Phos-tag は, フェニルリン酸イオンを酢酸イオンよりも約 16000 倍も強く捕捉することが明らかとなった. Zn^{2+} -Phos-tag とフェニルリン酸イオン (それぞれ 10 μM) の混合物の pH 依存的な水溶液内化学種の組成を Fig. 2 に示す. その結果, pH 5 から 8 の条件 (生理 pH) で 80% 以上の Zn^{2+} -Phos-tag が, フェニルリン酸イオンと複合体を形成することが明らかとなった.

Zn^{2+} -Phos-tag が二価のリン酸イオンを捕捉することは, マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS) から確認できる.¹⁰⁾ リン酸バッファー (pH 6.9) に溶解した Zn^{2+} -Phos-tag のポジティブイオンモードにおける MALDI-TOF/MS スペクトルは, $[(Zn^{2+}\text{-Phos-tag})^{3+}\text{-HPO}_4^{2-}]^+$ の 1:1 の複合体に帰属される複数のピークを示した (Fig. 3 (a), 最大ピーク m/z 679.1). この複数のピークは, 二核亜鉛イオンの同位体 (天然存在比, ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn , $^{70}Zn=$

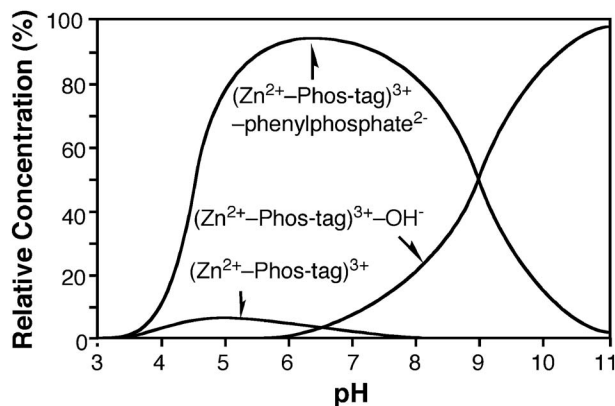


Fig. 2. Distribution Diagram for Phos-tag (10 μM) in the Presence of Zinc(II) Ion (20 μM) and Phenyl Phosphate Dianion (10 μM) as a Function of pH in an Aqueous Solution at 25°C with $I=0.10$ (NaNO₃)

48.6, 27.9, 4.1, 18.8, 0.6%) に起因する. そこで, この複雑な同位体ピークを回避するために, 単一の亜鉛同位体の $^{64}Zn^{2+}$ -Phos-tag を用いて測定したと

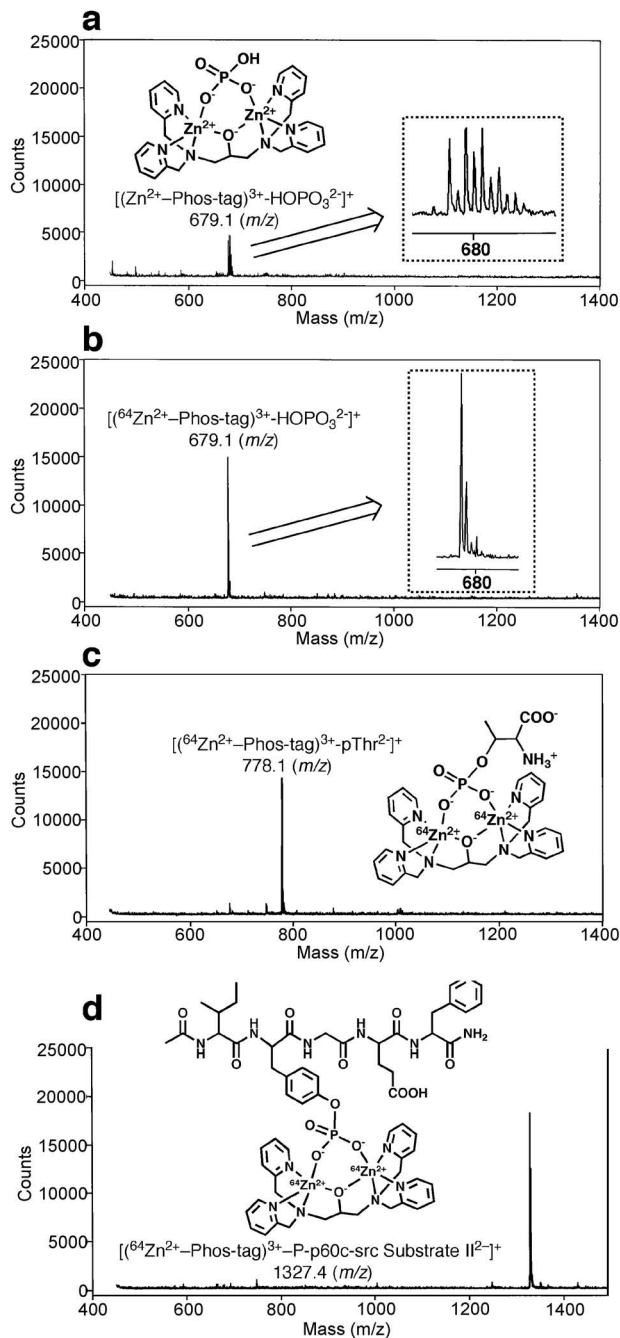


Fig. 3. MALDI-TOF Mass Analysis (positive mode) of Phosphate Compounds Using Phos-tag

Spectra for natural abundance Zn^{2+} -Phos-tag (a) and $^{64}Zn^{2+}$ -Phos-tag (b) (0.50 μM) dissolved in a 10 mM phosphate buffer (pH 6.9) containing a neutral matrix, 2,4,6-trihydroxyacetophenone. Spectra for phosphorylated threonine (50 μM) (c) and p60c-src substrate II (Ac-Ile-phosphoTyr-Gly-Glu-Phe-NH₂) (25 nM) (d) dissolved in a 10 mM Tris-borate buffer (pH 8.0) containing acetate-bound $^{64}Zn^{2+}$ -Phos-tag (100 μM and 50 μM in c and d, respectively), 2,4,6-trihydroxyacetophenone, or 50% (v/v) acetonitrile. Reprinted with permission from Ref. 10) © (2003), John Wiley & Sons, Ltd.

ころ、天然同位体のピークよりも単純で大きなピークが得られた (Fig. 3(b), m/z 679.1). この $^{64}\text{Zn}^{2+}$ -Phos-tag は、様々なリン酸化合物の MALDI-TOF/MS 分析に応用することができる。例えば、リン酸化アミノ酸であるリン酸化スレオニンの分析では、 $[(^{64}\text{Zn}^{2+}\text{-Phos-tag})^{3+}\text{-(pThr)}^{2-}]^{+}$ に帰属される大きなピークを検出することができた (Fig. 3(c), m/z 778.1). これはリン酸化アミノ酸ジアニオンが $^{64}\text{Zn}^{2+}$ -Phos-tag との複合体形成により、特有のマスシフト (+581.1 Da) を示すことと、総電荷が -2 から +1 に変化することに基づく。さらに、 $^{64}\text{Zn}^{2+}$ -Phos-tag はリン酸化ペプチド分析にも適用できる。チロシンキナーゼの p60c-src の基質ペプチドである p60c-src substrate II のチロシンリン酸化体 (Ac-Ile-pTyr-Gly-Glu-Phe-NH₂) を $^{64}\text{Zn}^{2+}$ -Phos-tag の存在下で MALDI-TOF/MS 分析した結果、 $[(^{64}\text{Zn}^{2+}\text{-Phos-tag})^{3+}\text{-(phosphopeptide)}^{2-}]^{+}$ に帰属される明瞭なピークを検出することができた (Fig. 3(d), m/z 1327.4).

3. リン酸基親和性クロマトグラフィー担体としての Phos-tag アガロース

生体内に存在するすべてのタンパク質のうち、約 1/3 がリン酸化され得るタンパク質である。しかし、リン酸化タンパク質は、ダイナミックに変化するキナーゼ/フォスファターゼ反応によって刻一刻とリン酸化と脱リン酸化を繰り返しており、実際に

リン酸化状態にあるのは極微量といえる。そのようなリン酸化タンパク質を研究する上で、リン酸化タンパク質を生体内の環境に近い条件で分離、濃縮することは非常に有効な手法となろう。そうした観点から、筆者らは生理的 pH でリン酸基を捕捉するという Phos-tag の特性を利用したリン酸化タンパク質の分離濃縮法の開発を行った。低分子の Phos-tag は、他の機能性分子を容易に化学的に導入できるという利点を持つ。そこで、リン酸基親和性クロマトグラフィー担体を作成するべく、一級アミノ基を持つ Phos-tag 誘導体と末端カルボキシル基が *N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) により活性化したビーズ状アガロース (NHS-activated Sepharose 4FF, GE ヘルスケアバイオサイエンス社) を反応させ、「Phos-tag アガロース」を合成した (Fig. 4).¹¹⁾

3-1. リン酸化ペプチド及びリン酸化タンパク質の分離 まず、この Phos-tag アガロースを用いて、リン酸化ペプチド (527 番のチロシンがリン酸化されている p60c-src 521-533 ペプチド) 及びリン酸化タンパク質の標品を分離した例を示す (Fig. 5).¹¹⁾ アガロースゲル担体を用いたクロマトグラフィーでは、サンプルの量や実験目的によって、使用するカラムサイズを自在に変えることができる。ここで示す結果は、リン酸化ペプチドに対してゲル容量が 50 μL のスピンカラム法を、リン酸化タンパク

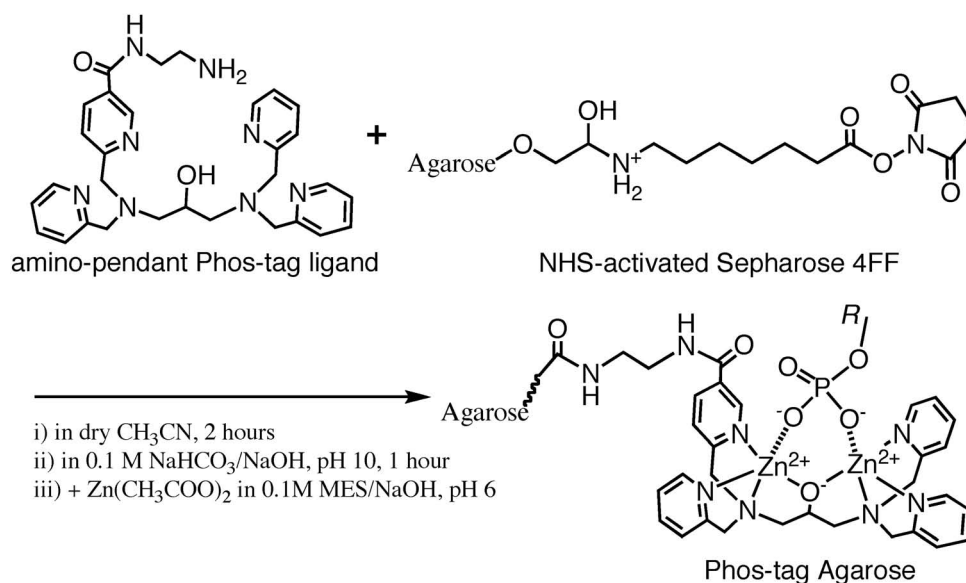


Fig. 4. Synthesis of Phos-tag Agarose

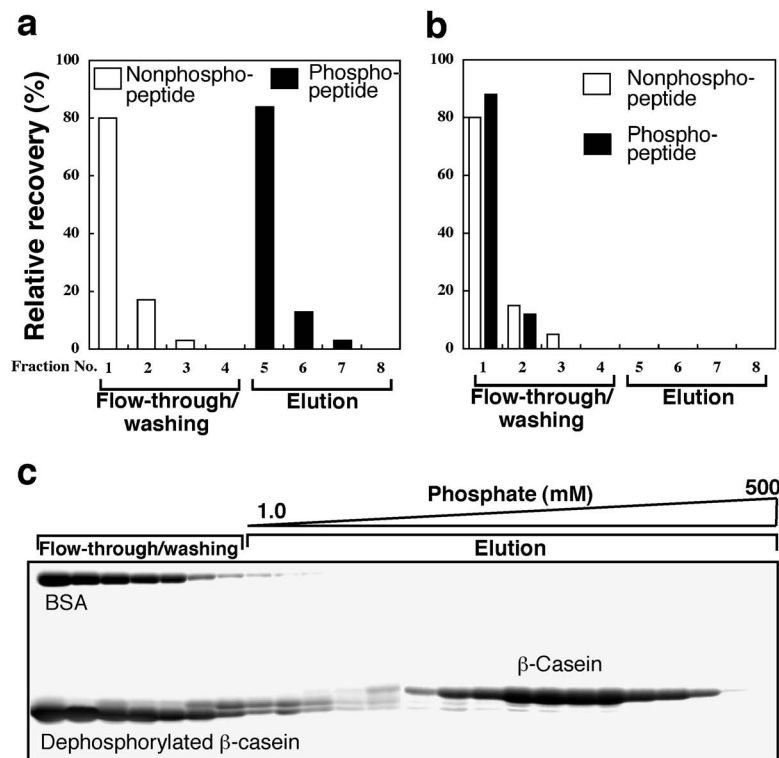


Fig. 5. Separation of Phosphopeptide and Phosphoprotein by Column Chromatography Using Phos-tag Agarose

Relative recoveries of the p60c-*src* phosphopeptide (45 μ g) and nonphosphopeptide (45 μ g) by the spin column method using zinc (II)-bound Phos-tag agarose (a) and EDTA-treated Phos-tag agarose (b). SDS-PAGE analysis of each fraction after open column chromatography of a protein mixture of BSA (30 μ g), β -casein (0.30 mg), and dephosphorylated β -casein (0.30 mg) (c). Reprinted with permission from Ref. 11) © (2005), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

質標品に対してゲル容量が 1.0 ml のオープンカラム法を適用したものである。試料の結合、非結合試料の洗浄除去の各段階では、0.10 M Tris-acetate (pH 7.4), 0.50 M NaNO₃ を、結合試料の溶出にはペプチドの場合は 10 mM, タンパク質の場合は 1.0 から 500 mM (濃度勾配) のリン酸バッファー (pH 7.4) を用いた。ペプチド混合物の分離 (Fig. 5(a)) において、素通り・洗浄画分 (Fraction No. 1-4) に非リン酸化ペプチドを排除し、溶出画分 (Fraction No. 5-8) にリン酸化ペプチドを得た。ペプチドの回収率は 100% であった。また、カラムを EDTA 前処理によって亜鉛除去を行った場合には、すべての試料が素通り・洗浄画分に得られたことから、Zn²⁺-Phos-tag の亜鉛イオンを介したリン酸化ペプチドの特異的結合であることが証明された (Fig. 5(b))。リン酸化タンパク質標品の β -カゼイン、脱リン酸化処理後の β -カゼイン、及び非リン酸化タンパク質のウシ血清アルブミン (BSA) の 3 種のタンパク質混合物の分離 (Fig. 5(c)) においても、素通り・洗浄画分に脱リン酸化 β -カゼイン

と BSA が排除され、 β -カゼインを溶出画分に得ることができた。

3-2. 細胞抽出液中のリン酸化タンパク質の分離・濃縮 次に、複雑な生体試料である細胞抽出液からリン酸化タンパク質を分離した例を示す。様々なタンパク質が混在する複雑な試料の分離においては、ペプチドや精製された標品タンパク質の分離に用いた前述の条件を大きく改善する必要があった。細胞抽出液を試料とする際の問題点は、目的としないタンパク質がカラムに非特異的に吸着してしまうことと、結合したタンパク質が溶出困難なことだった。非特異的結合の原因として、Zn²⁺-Phos-tag と酸性タンパク質のカルボン酸基との親和性や、アガロース本体とタンパク質の静電的結合が考えられた。しかし、結合バッファーの 0.10 M Tris-acetate (pH 7.4) に 1.0 M の酢酸ナトリウムを添加することによって、酢酸イオンによるカルボン酸基との結合障害、及びイオン強度増大による静電的結合の緩和の両方の効果を得ることができた。また、細胞溶解液には、Zn²⁺-Phos-tag とリン酸基

の結合を阻害する可能性のある試薬 (EDTA, 界面活性剤, バナジン酸など) が含まれる場合が多いが, 細胞抽出液に対して 4 倍量以上の結合バッファを混合したものをカラム容積の 1.25 倍を超えないように添加することにした. 溶出においては, Zn^{2+} -Phos-tag とリン酸基の結合を無機リン酸の添加によって競合的に解離させるが, 細胞内タンパク質サンプルの場合, タンパク質とカラム担体との静電的な結合を解除するような適切な塩を添加する必要があった. 塩化ナトリウムで高い溶出効果を得られたため, 溶出バッファは 0.10 M Tris-acetate (pH 7.4) に 10 mM のリン酸バッファ (pH 7.4)

と 1.0 M の塩化ナトリウムを添加することにした.¹²⁾

ここでは, 細胞内タンパク質リン酸化反応がよく研究されている上皮増殖因子 (EGF) 刺激後の A431 細胞 (ヒト扁平上皮がん細胞株) の抽出液をサンプルとし, 細胞内リン酸化タンパク質を良好に分離, 濃縮した例を示す (Fig. 6). EGF 刺激した A431 細胞 (10^7 個) を, Tris-buffered saline (TBS) で洗浄後, 0.50 ml の細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M 塩化ナトリウム, 0.25% デオキシコール酸ナトリウム, 1.0% NP-40, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM PMSE, 各 1.0 μ g/ml アプロチニン, ロイペ

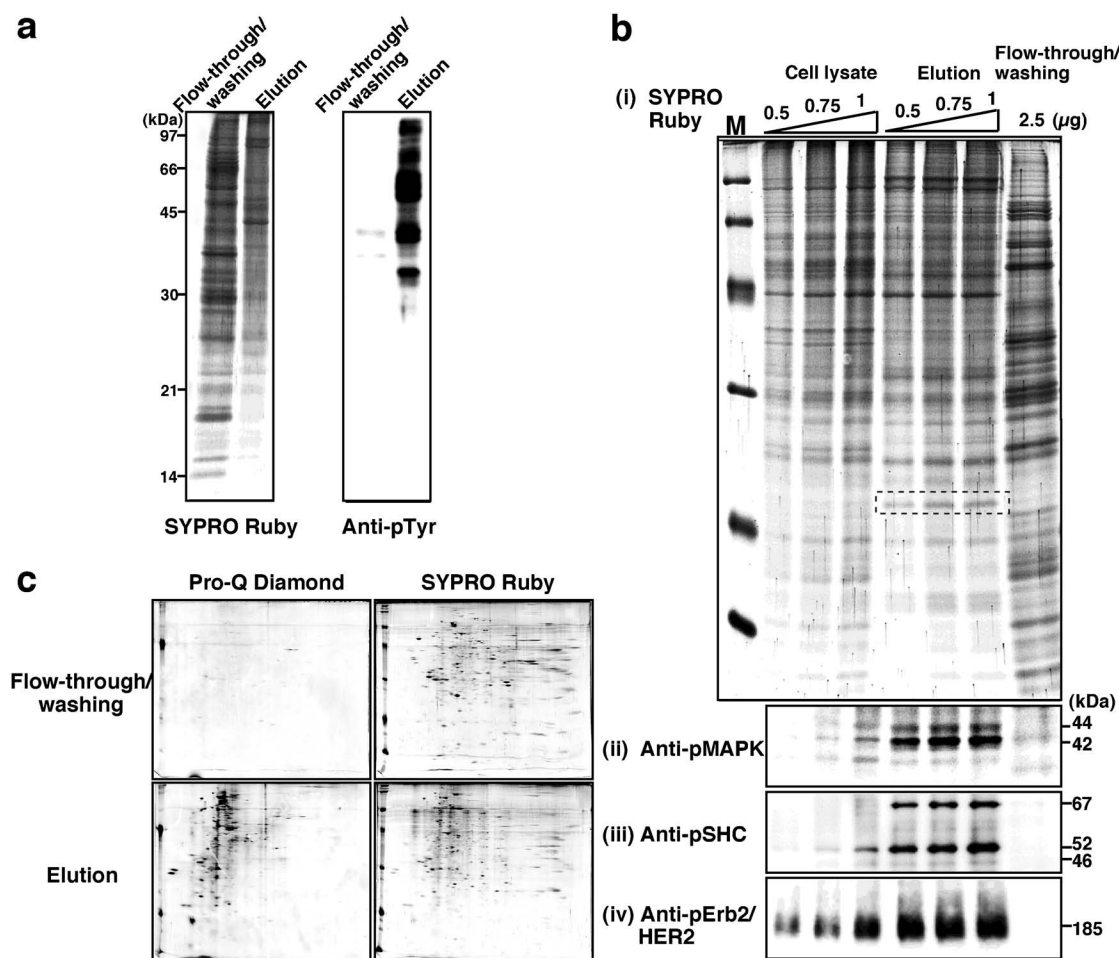


Fig. 6. Separation and Enrichment of Phosphoproteins from an EGF-stimulated A431 Cell Lysate Using Phos-tag Agarose

Separation of cellular proteins (20 μ g) by a spin column method using Phos-tag agarose (a). The obtained flow-through/washing and elution fractions were desalted and condensed by using a Microcon YM-10 centrifugal filter unit (Millipore) and then resolved in 20 μ L of distilled water. After the resulting solutions were divided into halves (10 μ L), one was analyzed by SDS-PAGE with SYPRO Ruby gel staining, and the other, by SDS-PAGE and Western blotting. Enrichment of cellular phosphoproteins by an open column method using Phos-tag agarose (b). Gel staining analysis of the cell lysate before chromatography (0.50, 0.75, and 1.0 μ g proteins) and the elution fraction (0.50, 0.75, and 1.0 μ g proteins) and the flow-through/washing fraction (2.5 μ g proteins) after chromatography (i). The enriched bands in the elution fraction surrounded by a hashed fill were analyzed by peptide mass fingerprinting. The molecular weight standards for 97, 66, 45, 29, 20, and 14 kDa are shown in lane M. Immunoblotting analyses with anti-phosphorylated MAPK (ii), anti-phosphorylated SHC (iii), and anti-Phospho-ErbB-2/HER-2 antibodies (iv). 2-DE analyses followed by Pro-Q Diamond phosphoprotein gel staining and SYPRO Ruby gel staining of the flow-through/washing fraction and the elution fraction (each 20 μ g proteins) (c). Reprinted with permission from Ref. 12) \copyright (2006), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, and Ref. 13) \copyright (2007), YODOSYA Co., Ltd.

プチン, ペプスタチン, 1.0 mM バナジン酸ナトリウム, 1.0 mM フッ化ナトリウム) で溶解し, 2.0 mg/ml のタンパク質濃度の抽出液を調製した. 20 μ g のタンパク質を含む細胞抽出液をスピンカラム法で分離し, 素通り・洗浄画分と溶出画分を分析した結果を Fig. 6(a) に示す. 各画分を限外ろ過ユニットで濃縮し, それぞれ半量を SDS-PAGE 及び抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタン解析に供した. 溶出画分のタンパク質量は, 素通り・洗浄画分のそれよりも少なかった. 一方, チロシンリン酸化タンパク質はほぼすべて溶出画分に得られた. これは, Phos-tag アガロースがリン酸化タンパク質を特異的に捕捉したことを示している. 0.50 mg のタンパク質を含む細胞抽出液をオープンカラム法で分離した結果を Fig. 6(b) に示す. 分離前の細胞抽出液と溶出画分を 1 レーン当たりのタンパク質量が 0.50 から 1.0 μ g, 素通り・洗浄画分は 2.5 μ g になるように SDS-PAGE に供した. SYPRO Ruby 全タンパク質ゲル染色像 (i) から, 分離前及び各画分の 3 者のバンドパターンが異なることが確認できた. 溶出画分の 22 kDa 付近の明瞭なバンド (破線で囲む) を切り出し, ペプチド・マス・フィンガープリンティング解析を行ったところ, リン酸化タンパク質として報告されているトランスジェリン 2 (SM22 α と呼ばれる) であることが分かった.¹³⁾ さらに, MAPK, SHC, Erb2/HER2 の抗リン酸化抗体を用いたウエスタン解析 (ii-iv) から, 分離前の細胞抽出液ではシグナルが弱い, あるいは非特異的シグナルとの区別がつかない結果だったものが, 溶出画分では明瞭なシグナルとして検出でき, これらのリン酸化タンパク質を効果的に濃縮できたことが示された. オープンカラム法で得た各画分のタンパク質 (20 μ g) を二次元電気泳動解析した結果を Fig. 6(c) に示す. Pro-Q Diamond リン酸化タンパク質ゲル染色と SYPRO Ruby 全タンパク質ゲル染色の比較からも, Phos-tag アガロースカラムによってリン酸化タンパク質が特異的に分離されたことが証明された.¹³⁾ 二次元電気泳動ゲルにおいてリン酸化タンパク質が明瞭なスポットとして確認できることは, その後の MS 解析に有効である. この実験ではオープンカラム法で 0.50 mg の細胞内タンパク質を分離したが, 0.25 mg (50%) を非リン酸化タンパク質として排除し, 0.11 mg (22%) のタン

パク質を溶出画分に得た. 0.14 mg (28%) のロスがあったが, その原因はアガロースビーズに吸着するタンパク質があることや, 限外ろ過ユニットで各画分を濃縮する操作によって失われることが考えられる.

4. ウエスタン解析用プローブとしての Phos-tag ビオチン

リン酸化タンパク質の研究において抗リン酸化抗体は欠かせないツールと言えるだろう. 網羅的なリン酸化タンパク質の解析に当たっては, 抗リン酸化チロシン抗体の pY20 や 4G10 などの優れたモノクローナル抗体が販売されている. しかし, セリンやスレオニン残基がリン酸化されたタンパク質を一網打尽に解析するための抗体に関しては, 特異性や感度について満足できない場合が多い. 一方, Phos-tag はチロシン/セリン/スレオニンのいずれのリン酸基にも類似した親和性を持ち, 小分子であるため抗体よりもリン酸化部位の周囲の構造に影響され難い利点を持つ. そこで筆者らは, ウエスタン解析用のプローブとして, 抗体に替わる網羅的なリン酸化タンパク質検出のための「Phos-tag ビオチン」を開発した.¹⁴⁾

Phos-tag ビオチンは, PVDF 膜上のリン酸化タンパク質を特異的に検出できる分子である. この検出法の原理を Fig. 7 に示す. Phos-tag ビオチンを, あらかじめ市販品の HRP (西洋わさびペルオキシダーゼ) 結合ストレプトアビジンと 4:1 の複合体を形成させておき, プロット膜とプロービングする. 膜上のリン酸化タンパク質と特異的に結合した Phos-tag ビオチンは, 市販の化学発光基質 (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製の ECL キットなど) と HRP の反応によって検出される. これは, 一般的なウエスタン解析法に準じたものであり, 使用するバッファー, 試薬などは特別なものではなく, 抗体を Phos-tag ビオチンに替えただけの簡便な方法である. また, 通常のウエスタン解析では, PVDF 膜と抗体の非特異的な結合を防止する目的でブロッキング操作を行うが, この方法はそれを必要としない. さらに, 二次抗体によるプロービングの段階が不要であるので, 時間と手間が大幅に節約できる.

4-1. PVDF 膜上のリン酸化タンパク質の特異的検出 この方法で, リン酸化タンパク質としてよ

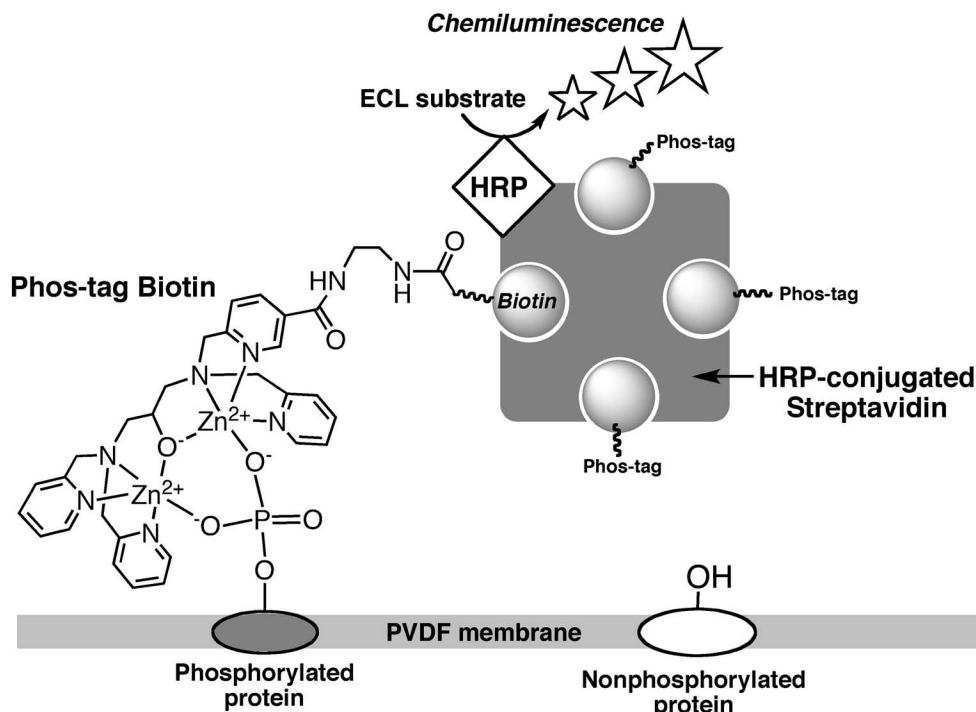


Fig. 7. Chemiluminescence Detection of Phosphoproteins on PVDF Membrane Using Biotin-pendant Zn^{2+} -Phos-tag and HRP-conjugated Streptavidin

く知られているカゼイン、卵白アルブミン、ペプシンを検出した例を Fig. 8 に示す。各タンパク質は 250 から数 ng をそれぞれ PVDF 膜にドットブロットした。比較のためのコントロールとして、非リン酸化タンパク質の BSA、ヒト血清アルブミン、炭酸脱水素酵素、 β -ガラクトシダーゼ、また、上記のリン酸化タンパク質をアルカリフォスファターゼ (AP) 処理によって脱リン酸化したものもブロットした。化学発光シグナルとして検出されたのは、リン酸化タンパク質のみであり、脱リン酸化処理したものはシグナルが完全に消失した。リン酸化タンパク質によってシグナルの強さは異なるが、いずれも数 ng の量を検出することができた。より高感度な ECL 基質を用いることで、さらに少ないリン酸化タンパク質を検出することが可能である。

4-2. *In vitro* キナーゼ・フォスファターゼ反応の解析 次に、タンパク質のリン酸化及び脱リン酸化反応を検出するためのウェスタン解析に Phos-tag ビオチンを応用した例を Fig. 9 に示す。サンプルは、チロシンキナーゼ Abl の基質となるペプチドとグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) の融合タンパク質 (Abltide-GST, H_2N -GST-Glu-Ala-Ile-Tyr-Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-Lys-Lys-Lys-COOH)

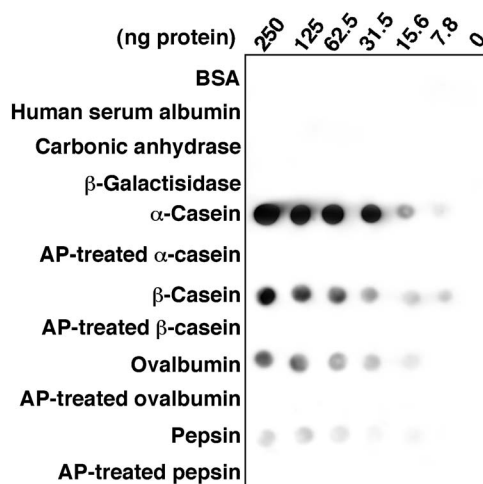


Fig. 8. Dot Blotting Analysis of Four Nonphosphoproteins (BSA, human serum albumin, carbonic anhydrase, and β -galactosidase), Four Phosphoproteins (α -casein, β -casein, ovalbumin, and pepsin), and the Corresponding Dephosphorylated Proteins after Treatment with Alkaline Phosphatase (AP) Using Biotin-pendant Zn^{2+} -Phos-tag
Reprinted with permission from Ref. 14) © (2006), The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

で、このペプチドのチロシンがリン酸化・脱リン酸化される様子を Phos-tag によって視覚化した。キナーゼには Abl を、フォスファターゼにはチロシン脱リン酸化酵素である TC-PTP を用いた。上段

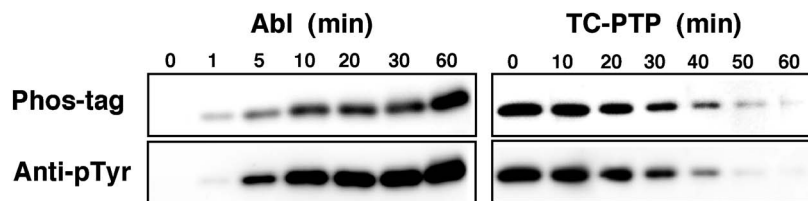


Fig. 9. Electroblotting Analysis of the Kinase and Phosphatase Assay

Abltide-GST (0.13 μ g protein/lane) was incubated with a tyrosine kinase, Abl (left panels), and phosphorylated Abltide-GST (50 ng proteins/lane) was incubated with a tyrosine phosphatase, TC-PTP (right panels). The incubation time is shown above each lane. The membranes were probed with Zn^{2+} -Phos-tag (upper panels), and the same membranes were then reprobbed with the anti-pTyr antibody (bottom panels). Reprinted with permission from Ref. 14) \copyright (2006), The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

のブロットが Phos-tag で検出したもので、基質が時間経過に伴って、リン酸化・脱リン酸化されている様子が見える。これらの反応は、既存の方法である抗リン酸化チロシン抗体 (Anti-pTyr) を用いたイムノブロットングによっても、確認することができた。

4-3. 細胞内タンパク質のリン酸化状態の解析
次に、A431 細胞抽出液のリン酸化タンパク質の解析を Fig. 10 に示す。Figure 10(a) の SDS-PAGE の各レーンには、分子量マーカー (M)、EGF 刺激前後の細胞抽出液、EGF 刺激後の細胞抽出液をアルカリフォスファターゼで処理したものを左のレーンから順にアプライした。SYPRO Ruby による総タンパク質のゲル染色から各レーンのタンパク質量が等しいことが分かり、Pro-Q Diamond によるリン酸化タンパク質のゲル染色で、細胞のリン酸化状態が変化していることが各レーンの染色度合いから推測できる。中央の Phos-tag による検出では、分子量マーカーの卵白アルブミンが特異的に染色されており、また、リン酸化状態の変化が Pro-Q Diamond よりもはっきりと観察できる。このように EGF 刺激によって化学発光シグナルが増加し、アルカリフォスファターゼ処理によって著しく減少することから、Phos-tag によって検出されたタンパク質はリン酸化タンパク質であるといえる。抗リン酸化チロシン抗体 (Anti-pTyr) と抗リン酸化セリン抗体 (Anti-pSer) による解析結果と比較しても、Phos-tag によるリン酸化状態の変化の解析結果は信頼度の高いものであることが証明された。

さらに、EGF 刺激後の A431 細胞抽出液を二次元電気泳動 (等電点電気泳動/SDS-PAGE) したのちに、エレクトロブロットングしてリン酸化タンパク質の解析を行った結果を Fig. 10(b) に示す。左

図が Phos-tag でプロービングしたもので、図中の破線の部分を拡大し、抗リン酸化チロシン抗体、及び抗リン酸化セリン抗体でリプロービングした像と重ね合わせた像がそれぞれ中央と右の 2 つの図である。Phos-tag によって検出されたスポットは緑、それぞれの抗体によって検出されたスポットはマゼンタ、両者が重なったスポットは白く見え、重なるスポットが多く観察された。一致しないスポットもあることについては、その原因として各タンパク質に対する抗体と Phos-tag の親和性の違いや、抗体の非特異的結合及び認識部位周辺のアミノ酸配列に起因する各タンパク質への親和性の違いなどが考えられる。PVDF 膜はリプロービングできるのが大きな利点である。1 つの生体試料のブロット膜を Phos-tag ビオチンと様々な抗体を併用して解析することで、より多くのリン酸化タンパク質の情報が得られるであろう。

5. リン酸基親和性電気泳動担体としての Phos-tag アクリルアミド

ゲル電気泳動法を用いてリン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離することは、生体内のタンパク質リン酸化の状態を知ることができる簡単な方法である。タンパク質の分離に広く使われる SDS-PAGE では、リン酸化されることによって移動度のシフトを起こすタンパク質があり、その現象がリン酸化の指標になる場合がある。また、等電点電気泳動法を用いれば、リン酸化によるタンパク質の等電点の変化によってリン酸化タンパク質を分離することが可能である。しかし、これらの方法ではリン酸化によって泳動度に変化が起こるかどうかはタンパク質構造など固有の特性に依存しており、実際には解析できるタンパク質の数は限られている。そこで筆者らは、ゲル担体とリン酸基の直接相互作用

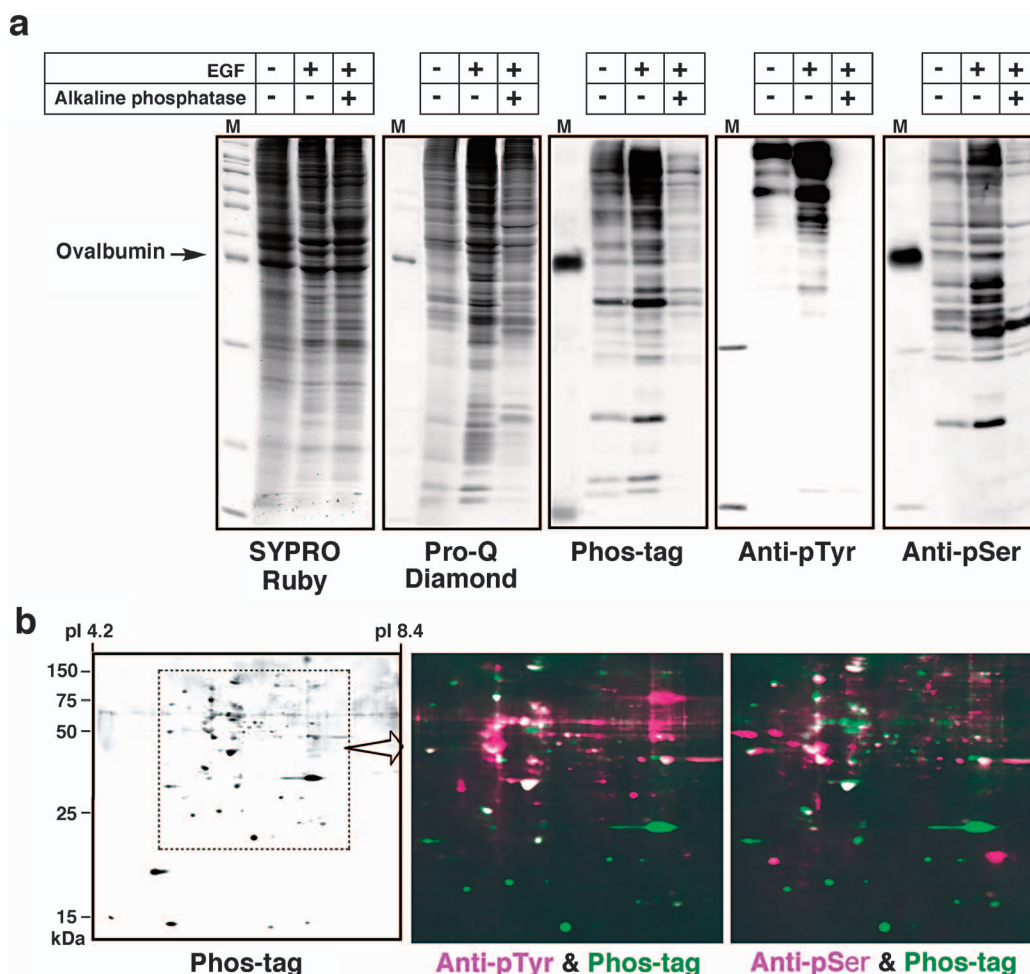


Fig. 10. Analysis of Protein Phosphorylation of the A431 Cell before or after EGF Stimulation

Gel staining and electroblotting analyses after SDS-PAGE (a). Each lane contains 7.5 μ g protein of the A431 cell lysate before or after EGF stimulation and the AP-treated lysate of EGF-stimulated A431 cells. The molecular-weight standards (MW: 205, 116, 97, 80, 66, 55, 45 (ovalbumin), 30, 21, and 14 kDa from the top) are applied in lane M. Electroblotting analysis of the 2-DE of the EGF-stimulated A431 cell lysate (50 μ g proteins) (b). The blot was probed with biotin-pendant Zn^{2+} -Phos-tag (left). The same blot was sequentially reprobated with the anti-pTyr antibody and the anti-pSer antibody, and each image of immunoblottings was superimposed on the left panel. The superimposed images of the area surrounded with a dotted square in the left panel are shown in the center (anti-pTyr) and right (anti-pSer) panels. The green and magenta spots are proteins detected by biotin-pendant Zn^{2+} -Phos-tag and antibodies, respectively. Proteins detected by both methods appear as white spots. Reprinted with permission from Ref. 14)[©] (2006), The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

用に基づくリン酸化タンパク質分離法を考案し、リン酸化されたタンパク質をゲルシフトバンドとして視覚化できる技術を開発した。¹⁴⁻¹⁷⁾

一級アミノ基を持つ Phos-tag 誘導体にアクリル酸をアミド結合した「Phos-tag アクリルアミド」は、SDS-PAGE の分離ゲルに適量を共重合させることで、電気泳動中のリン酸化タンパク質を特異的に捕捉する媒体となる。Phos-tag アクリルアミドについては、上述した 2 つの Phos-tag 技術とは異なり、マンガン錯体として機能する。この Phos-tag アクリルアミドを用いる電気泳動法を Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE と名付け、その原理を Fig. 11 に示した。通常の SDS-PAGE では、1 つのタンパ

ク質のリン酸化型と非リン酸化型の移動度は同じであることがほとんどである。一方、Phos-tag アクリルアミドを共重合させたゲルでは、Phos-tag にリン酸化型のものがトラップされながら泳動が進行するため、リン酸化型を非リン酸化型から分離できる。つまり、リン酸化型はゲルシフトしたバンドとして検出される。また、1 つのタンパク質分子内に複数のリン酸化部位が存在して、様々なリン酸化状態が混在するタンパク質については、その状態の違いを移動度の異なるバンドとして分離できる。この電気泳動法は、一般的な SDS-PAGE とそのあとに続くゲル染色によるタンパク質の検出法と全く同じ試薬や操作法を用い、分離ゲルにモノマーである

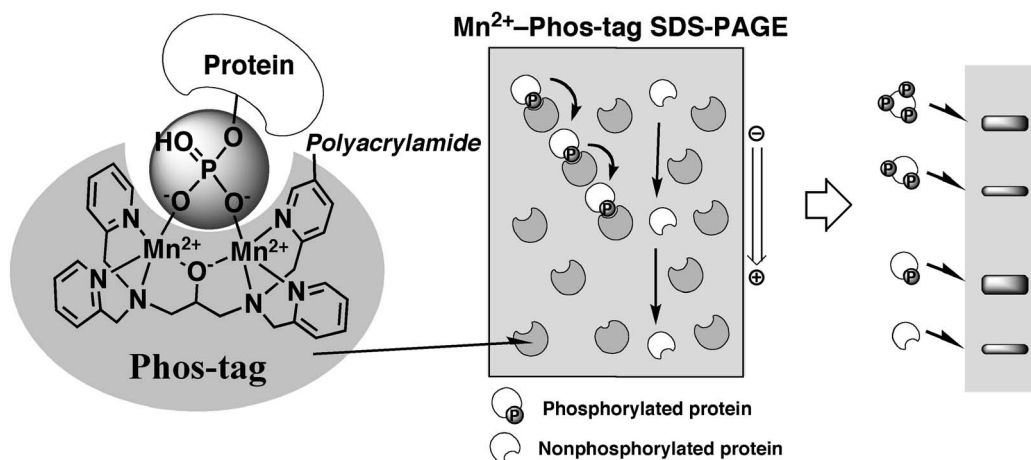


Fig. 11. Principle of Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE

Phos-tag アクリルアミドを共重合させるだけの簡便な方法である。この電気泳動法のリン酸化プロテオミクスへの応用として、プロテインキナーゼの特性を解明する研究（キナーゼプロファイリング）を行った例を以下に述べる。

5-1. リン酸化型及び非リン酸化型タンパク質の同時定量解析 初めに、リン酸化タンパク質である β -カゼインとその脱リン酸化体（アルカリフォスファターゼ処理したもの）を分離した例を示す。まず、電気泳動のための最適な Phos-tag 濃度を検討した (Fig. 12(a))。10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルに対して、Phos-tag を 50, 100, 150 μM 混合したところ、 β -カゼインは脱リン酸化 β -カゼインよりも移動度の小さい複数のバンドに分離し、100 μM のとき最も多い 8 本のバンドが確認できた。 β -カゼインは 5 つのセリンリン酸化部位があり、使用した標品のロットに含まれるリン酸の数と部位の違いに起因するリン酸化アイソフォームが分離したと考えられる。濃度依存的に両者ともに移動度が小さくなるが、これはリン酸基に係わらず正電荷を帯びた Phos-tag と負電荷を帯びたタンパク質との電気的親和性があるためと考えられる。アルカリフォスファターゼ反応液を時間経過毎に分取し、通常の SDS-PAGE (10% (w/v) ポリアクリルアミドゲル) と 100 μM Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE で比較した (Fig. 12(b))。 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では時間経過に伴って移動度の大きい 1 本のバンドに収束したが、これは移動度の小さいバンドがリン酸化タンパク質であることを裏付けている。脱リン酸

化反応の時間変化は、通常の SDS-PAGE よりも明瞭である。

次に、Phos-tag ビオチンの項でも述べた Abl キナーゼ反応を解析した (Fig. 12(c))。通常の SDS-PAGE (12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル) では、キナーゼ反応の経過に係わらず 1 本のバンドだったが、100 μM Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では、反応後のサンプルにおいて 2 本のバンドを検出した。反応経過に伴って、移動度の小さいバンドの濃度が増え、それとは対照的に移動度の大きいバンドは減少している様子が分かる。抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタン解析により、移動度の小さいバンドがリン酸化体であることを証明した。抗体での解析では、特に化学発光シグナルで検出されたバンドの強度はかならずしもそこに存在するタンパク質量を反映せず定量性に欠けるが、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE のゲル染色では、反応液中にあるリン酸化体と非リン酸化体のバンドの濃度が同時に検出できるのでキナーゼ反応の進行を定量的に解析できる。なお、泳動後のゲルをウエスタン解析に使用する場合は、Phos-tag にトラップされたタンパク質を効率よく PVDF 膜に転写するために 1.0 mM の EDTA を加えた転写バッファーにゲルを 10 分間浸とうさしてから通常のブロットング操作を行った。¹⁴⁾

5-2. *In vitro* キナーゼ活性プロファイリング

次に、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE を用いた *in vitro* におけるキナーゼ活性の解析法について述べる。ここでキナーゼの基質タンパク質として用いた

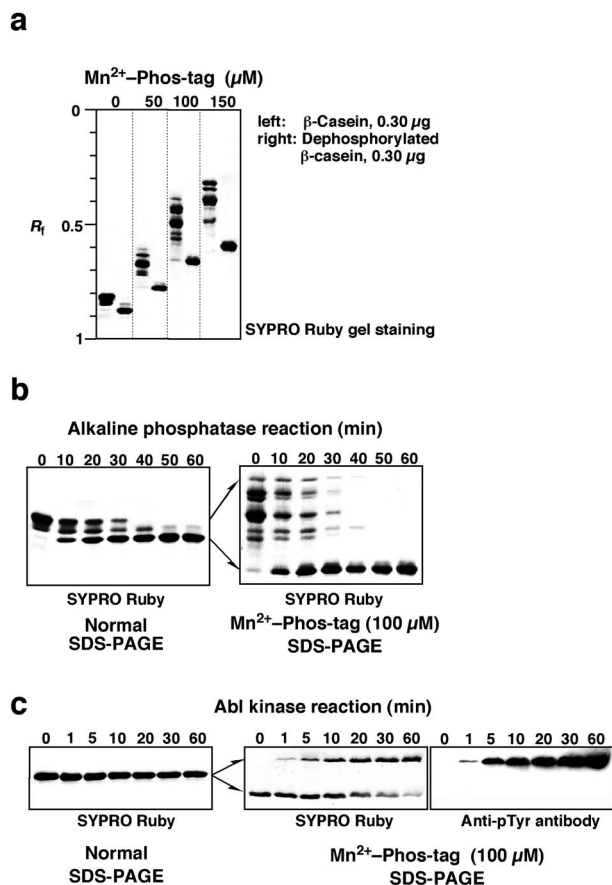


Fig. 12. Visualization of Protein Phosphorylation/Dephosphorylation Using Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE

SDS-PAGE (10% (w/v) polyacrylamide) of β -casein (left) and dephosphorylated β -casein after treatment with alkaline phosphatase (right) in the absence and presence of Mn^{2+} -Phos-tag (0–150 μM) (a). Each lane contains 0.30 μg proteins. Electrophoresis migration bands were detected by SYPRO Ruby gel staining. Time-course dephosphorylation of β -casein by alkaline phosphatase using normal SDS-PAGE (10% (w/v) polyacrylamide) and Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE (100 μM polyacrylamide-bound Mn^{2+} -Phos-tag and 10% (w/v) polyacrylamide) (b). Each lane contains 0.30 μg proteins. Electrophoresis bands were detected by SYPRO Ruby gel staining. Time-course phosphorylation of Abltide-GST by Abl kinase using normal SDS-PAGE (12.5% (w/v) polyacrylamide) and Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE (100 μM polyacrylamide-bound Mn^{2+} -Phos-tag and 12.5% (w/v) polyacrylamide) (c). Each lane contains 0.10 μg proteins. Electrophoresis bands were detected by SYPRO Ruby gel staining and immunoblotting with anti-pTyr antibody. Reprinted with permission from Ref. 14) (2006), The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, and Ref. 17) (2007), The Japanese Electrophoresis Society.

のは、アルツハイマー病のバイオマーカーとして注目されている Tau である。Tau は、主に脳の神経細胞に発現する細胞骨格系のタンパク質であるが、アルツハイマー病患者の Tau は過剰リン酸化状態にあり、そのような過剰リン酸化 Tau の増大が病変の一因となる。筆者らはヒト由来の組換え Tau タンパク質を基質とし、GSK-3 β , cdk5, PKA, MAPK, CKII, CaMKII (いずれも組換えタンパク質) の 6 種類のアルツハイマー関連キナーゼの活性

をプロファイリングした。^{16,17)} それぞれのキナーゼ反応産物とコントロールとしての非リン酸化 Tau を通常の SDS-PAGE (7.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル) 及び 80 μM Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE にアプライし、銀染色 (Fig. 13 (a), 左) とオートラジオグラフィー (Fig. 13 (a), 右) を行った。通常の SDS-PAGE においては、CKII 以外の 5 つのキナーゼ反応で、リン酸化に伴う移動度のわずかな変化が観察された。オートラジオグラフィーの結果より、すべてのキナーゼ反応が成功し、基質に ^{32}P が取り込まれていることが分かる。一方、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では、著しくゲルシフトした複数のバンドが観察され、これらのシフトパターンは各キナーゼ反応で特徴的であった。オートラジオグラフィーよりシフトアップしたバンドがリン酸体であることが確認できた (矢印で示したバンドはキナーゼ由来)。

Tau1 分子当たりに取り込まれたリン酸の量とリン酸化 Tau バンドの移動度 (R_f 値) の関係を調べるため、Fig. 13 (a) における ^{32}P シグナル強度と銀染色濃度の比 (^{32}P -SI/DSS) をキナーゼ反応毎に求め、Fig. 13 (b) のようにグラフに示した。その結果、GSK-3 β を除く 5 つの反応において、取り込まれたリン酸量が多いアイソフォームほど (^{32}P -SI/DSS が増えるほど)、 R_f 値の小さいバンドとして検出される傾向があった。しかし、同じ R_f 値でもキナーゼ反応によっては異なる ^{32}P -SI/DSS 値を示していることから、移動度を決定するのはリン酸化量だけではなく、キナーゼに特異的なリン酸化部位が大きく関与していることが示唆された。

次に、各キナーゼ反応の時間変化 (0 から 300 分) を Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE で解析した。ここでは 3 種類のキナーゼ反応 (GSK-3 β , cdk5, PKA) の検出結果を示す (Fig. 13 (c))。銀染色像から 3 種のキナーゼとも反応経過に伴ってシフトアップの程度が増加しながら複数のバンドに分離していくことが観察でき、それぞれ異なる固有の泳動パターンを示した (矢印のバンドはキナーゼ由来)。オートラジオグラフィーからシフトアップしたバンドが ^{32}P を取り込んだリン酸化アイソフォームであることが分かる。さらに、バンドのシフトとリン酸化アミノ酸部位の関係を調べるため、6 種類の部位特異的な抗リン酸化 Tau 抗体 (pS¹⁹⁹, pT²¹², pS²¹⁴, pT²³¹,

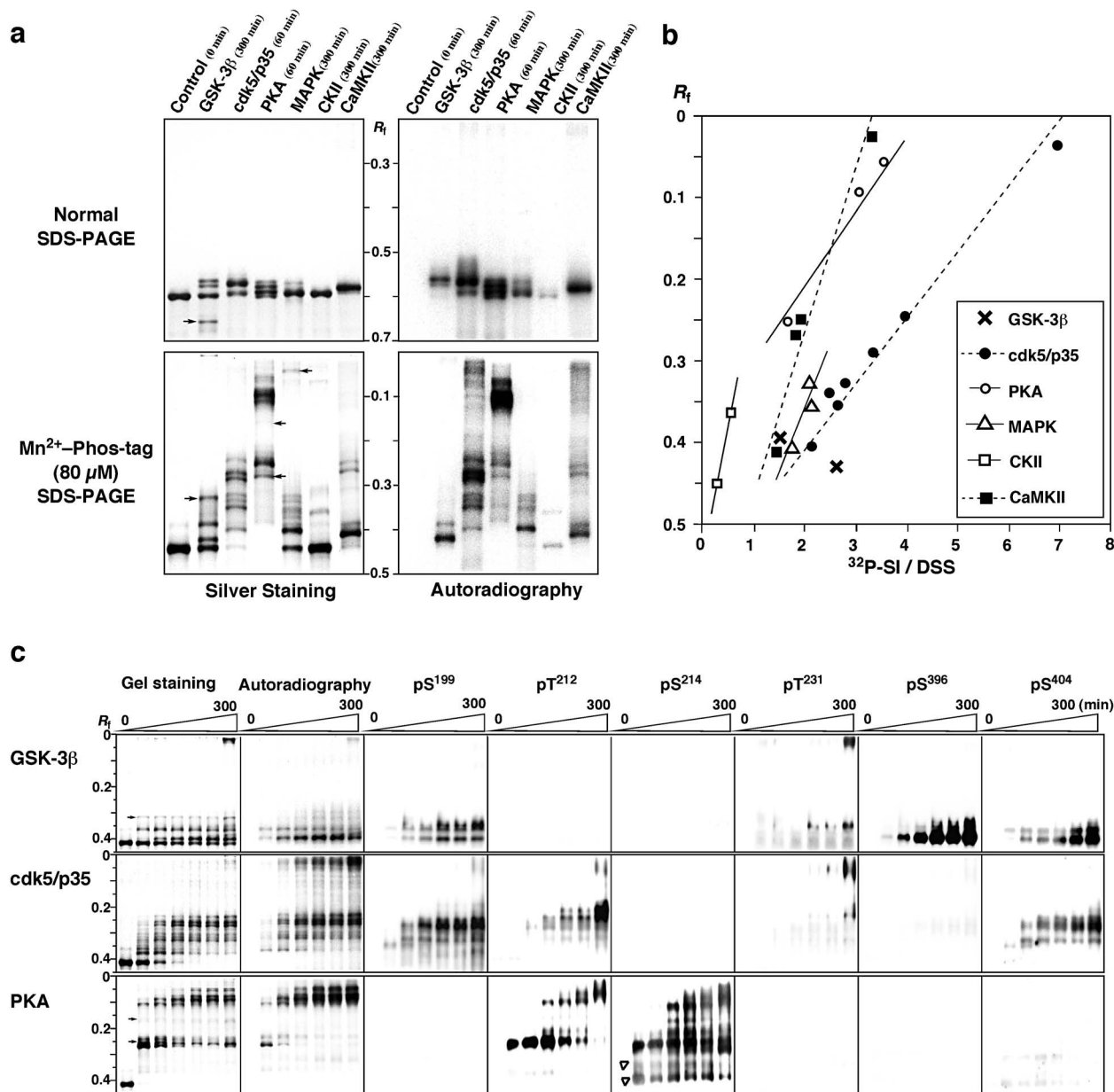


Fig. 13. Determination of *In Vitro* Kinase Activity Profiling toward Tau Protein

Normal SDS-PAGE (7.5% (w/v) polyacrylamide) and Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE (80 μ M polyacrylamide-bound Mn²⁺-Phos-tag and 7.5% (w/v) polyacrylamide) of six kinds of kinase products of the Tau protein (a). Each lane contains 0.17 μ g of Tau protein. Electrophoresis migration bands were detected by silver gel staining (left panels) and autoradiography (right panels). Kinase and the reaction time are described above each lane. Relationship between the phosphate incorporation ratio and mobility shift degree in Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE (b). Plots of the phosphate incorporation ratios (³²P-SI/DSS values) against the R_f values. Time-course phosphorylation (0, 10, 30, 60, 120, 180, and 300 min) of the Tau using three kinds of kinases by Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE (80 μ M polyacrylamide-bound Mn²⁺-Phos-tag and 7.5% (w/v) polyacrylamide) followed by silver gel staining, autoradiography, and immunoblotting using the site-specific anti-phosphorylated Tau antibodies (c). Each lane contains 0.17 μ g (for silver gel staining and autoradiography) or 0.25 μ g (for immunoblotting) of Tau protein. Reprinted with permission from Ref. 16) (2007), The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, and Ref. 17) (2007), The Japanese Electrophoresis Society.

pS³⁹⁶, pS⁴⁰⁴) によるウエスタン解析を行った。まず GSK-3 β では、S¹⁹⁹, T²³¹, S³⁹⁶, S⁴⁰⁴ の4種類の抗体でリン酸化 Tau が検出された。R_f 値が0.4付近のバンドは S¹⁹⁹, S³⁹⁶, S⁴⁰⁴ のいずれの部位でもリン酸化されており、これらの箇所のリン酸化アイソフォームは互いの分離度が小さく、さらには、それらのリ

ン酸化の順番もランダムに起こっているといえる。また、T²³¹ のリン酸化 Tau において反応時間の遅い段階で移動度のかなり小さいバンドが検出され、このバンドは他の抗体では検出されていない。このことは、GSK-3 β による T²³¹ のリン酸化がここで示した以外の箇所の priming phosphorylation を必要

とすることを示している。次に、*cdk5* では、S¹⁹⁹, T²¹², T²³¹, S⁴⁰⁴ の抗体でリン酸化 Tau が検出された。S¹⁹⁹, T²³¹, S⁴⁰⁴ のリン酸化は GSK-3 β 反応と類似するが、バンドの数やシフトアップの程度はそれよりも大きいことから、その他の部位もリン酸化されている可能性があり、*cdk5* は GSK-3 β よりも多くの箇所をリン酸化し得るキナーゼであることを示している。PKA 反応に関しては、GSK-3 β 反応と対照的である。泳動バンドは GSK-3 β 反応よりも大きくシフトアップしているが、それらは T²¹², S²¹⁴ がリン酸化されたものであり、GSK-3 β がリン酸化する S¹⁹⁹, T²³¹, S³⁹⁶, S⁴⁰⁴ はリン酸化されていない (三角で示したバンドは基質に混在していた小さい分子量のタンパク質断片がリン酸化を受けたものである)。この対照的な結果は、Fig. 13 (b) でも示したように、リン酸化アミノ酸部位の違いが Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE におけるリン酸化アイソフォームの分離に大きく関与することを裏付けている。

5-3. *In vivo* キナーゼ活性プロファイリング

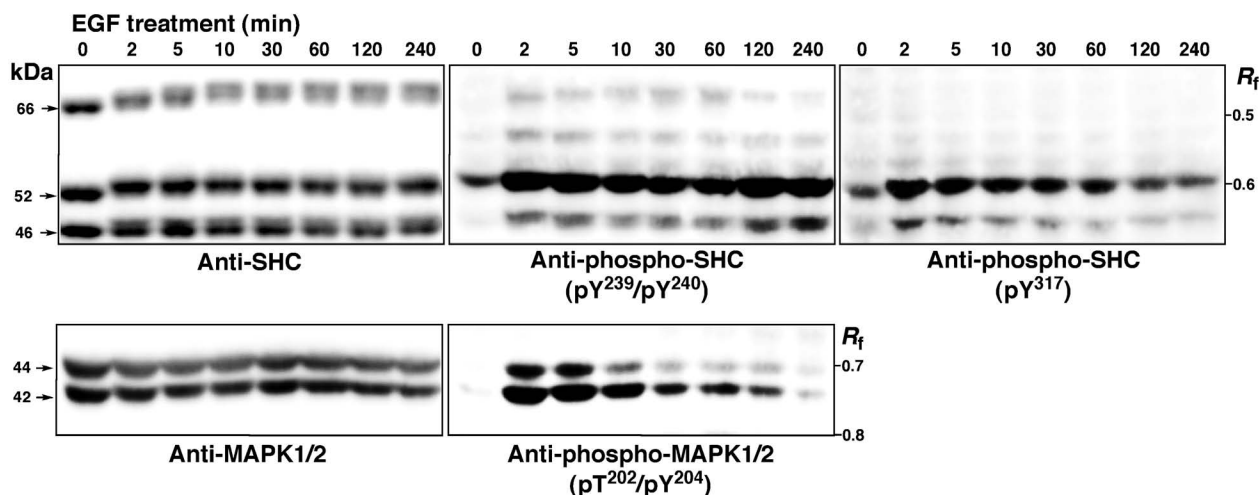
さらに、様々なタンパク質を含む生体試料を Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE で分離し、*in vivo* リン酸化反応の解析へ適用した例を示す。EGF 刺激に伴う A431 細胞の細胞内シグナル伝達に係わるリン酸化シグナル分子はいくつか同定されている。そこで今回は、EGF (250 ng/ml) 処理後の細胞抽出液を用いて、その代表的なシグナル分子である SHC 及び MAPK のリン酸化状態の経時変化を解析した例を示した。まず、通常の SDS-PAGE (7.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル) に 1 レーン当たり 15 μ g のタンパク質をアプライして泳動したのち、抗 SHC 抗体 (66, 52, 46 kDa) 及び抗 MAPK1/2 抗体 (44/42 kDa) を用いたウエスタン解析により、各刺激時間に調製した抽出液に含まれる SHC 及び MAPK 量がほぼ同じであることを確認した (Fig. 14 (a), 左)。SHC はリン酸化に起因するわずかなバンドシフトがみられたが、MAPK では検出できなかった。さらに、部位特異的な抗リン酸化 SHC 抗体 (pY^{239/240}, pY³¹⁷) 及び抗リン酸化 MAPK1/2 (pThr²⁰²/pTyr²⁰⁴) 抗体で解析し、EGF 刺激後 240 分までのリン酸化状態の変化を確認した (Fig. 14 (a), 中央と右)。このように通常の SDS-PAGE では抗リン酸化抗体を使用しない限り、明瞭なリン酸化レベルの経時変化を追うことはできない。次に、

25 μ M Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE を用いた場合、抗 SHC 抗体及び抗 MAPK1/2 抗体による解析において、通常の SDS-PAGE よりも明らかに多い複数のバンドが確認でき、時間経過に伴ってその泳動パターンが変化した (Fig. 14 (b), 左)。今回ターゲットとした SHC 並びに MAPK においては、25 μ M より低濃度の Phos-tag では複数バンドを検出し難く、高濃度では R_f 値が小さいためにバンドの分離が不明瞭になる傾向があった。さらにそれぞれの抗リン酸化抗体で解析すると、著しくシフトアップした複数のバンドがリン酸化体であることが確認できた (Fig. 14 (b), 中央と右)。Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE を用いれば、抗リン酸化抗体からだけでは得られなかった、生体内での過剰リン酸化や段階的なリン酸化反応の新しい情報を得られるであろう。^{16,17)}

5-4. *In vitro* キナーゼ阻害プロファイリング

多くの疾病の原因としてタンパク質キナーゼ活性亢進が知られており、キナーゼ特異的阻害剤の開発には多くの製薬企業が力を注いでいる。阻害剤のスクリーニングでは化合物の阻害活性とキナーゼ特異性の関係をプロファイリングする技術が必要不可欠である。ここでは、慢性骨髄性白血病患者において異常に活性亢進しているチロシンキナーゼの Abl とその特異的阻害剤として開発されたグリベックを用いて、100 μ M Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE (12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル) によるキナーゼ阻害剤活性プロファイリングの例を示す。上述した Abl のキナーゼ反応 (Fig. 12 (c)) のうち、リン酸化型と非リン酸化型の基質量が 1:1 となるような反応条件下にグリベック (0.10 から 100 μ M) を共存させると、グリベック濃度依存的にリン酸化型の基質が減少していく様子が観察された (Fig. 15 (a))。ゲル染色後の画像解析において、各レーンの上下 2 つのバンドの濃さの和は常に一定であるため、各バンドに存在する基質の量が正確に測定できる。その測定値を用いて Abl キナーゼ反応の見掛けの 1 次反応速度定数 (k_{obs}) を求め、グリベックの濃度との関係をグラフにし、50% 阻害濃度 (IC₅₀) 1.6 μ M を求めた (Fig. 15 (b))。阻害剤の評価の指標とされる IC₅₀ 値を測定できる Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE は、ハイスループットな阻害剤プロファイリングにも応用可能となろう。^{16,17)}

a Normal SDS-PAGE



b Mn²⁺-Phos-tag (25 μM) SDS-PAGE

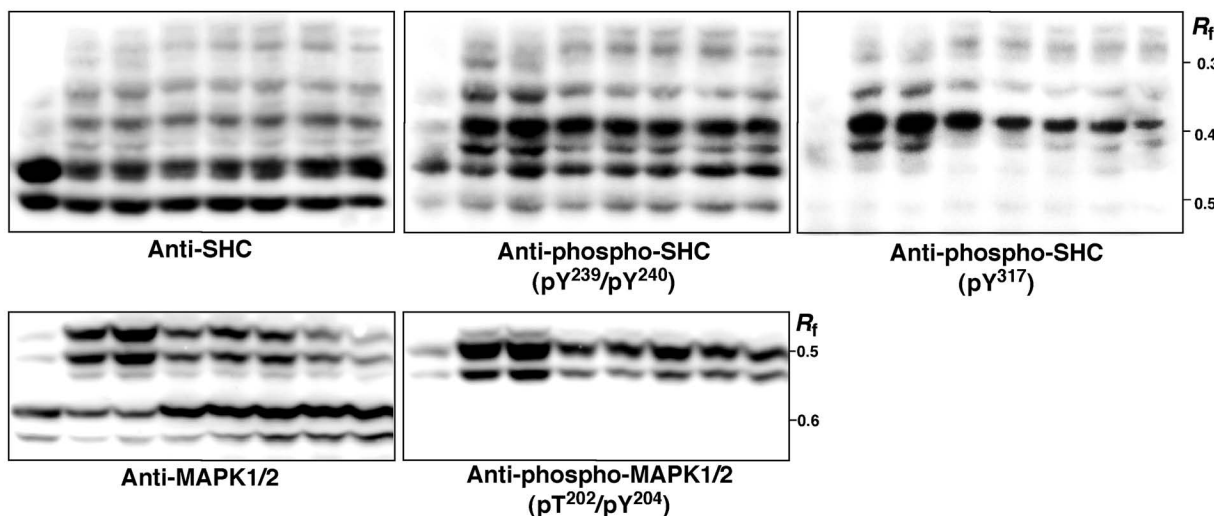


Fig. 14. Analyses of Phosphorylation of SHC and MAPK in A431 Cells Stimulated with EGF

Normal SDS-PAGE (7.5% (w/v) polyacrylamide) followed by Western blotting using the anti-SHC antibody, anti-phosphorylated SHC for pY²³⁹/pY²⁴⁰, and anti-phosphorylated SHC for pY³¹⁷ antibodies (upper panels) as well as the anti-MAPK1/2 antibody and anti-phosphorylated MAPK for the pT²⁰²/pY²⁰⁴ antibody (lower panels) (a). Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE (25 μM polyacrylamide-bound Mn²⁺-Phos-tag and 7.5% (w/v) polyacrylamide) followed by Western blotting using the anti-SHC antibody, anti-phosphorylated SHC for pY²³⁹/pY²⁴⁰, and anti-phosphorylated SHC for pY³¹⁷ antibodies (upper panels) as well as the anti-MAPK1/2 antibody and anti-phosphorylated MAPK for the pT²⁰²/pY²⁰⁴ antibody (lower panels) (b). The incubation times with EGF (250 ng/ml) were 0 (without EGF), 2, 5, 10, 30, 60, 120, and 240 min. Each lane contains 15 μg of cellular proteins. Reprinted with permission from Ref. 16)^o (2007), The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, and Ref. 17)^o (2007), The Japanese Electrophoresis Society.

6. おわりに

本研究は、二核金属錯体である Phos-tag とリン酸基の溶液内相互作用を化学的に追求し、その成果を実用的な技術へ応用展開させたものである。その例として、ここでは、3種類の Phos-tag 誘導体を用いたリン酸化タンパク質の研究法を紹介した。

Phos-tag アガロースを用いたリン酸基親和性クロマトグラフィーは、Phos-tag のリン酸基捕捉条件（生理的 pH での迅速な吸脱着）を生かし、試料

の調製からカラムとの結合・溶出までを中性 pH で行うこと、各操作に長時間のインキュベーションを要しないこと、さらに、溶出バッファーに界面活性剤や還元剤を用いないことが特徴である。このようにタンパク質を変性させない条件で分離・濃縮した試料は、そののちに続く多様な解析法に適用させることができる。市販されているカラムなど、既存のリン酸基親和性クロマトグラフィーではタンパク質を変性させる条件を用いるためにそののちに適用で

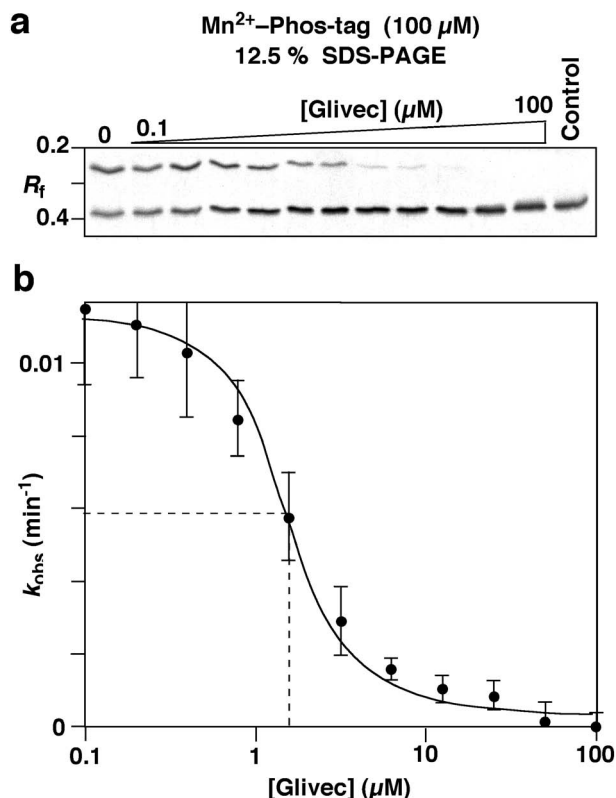


Fig. 15. Kinase Inhibition Assay of a Tyrosine Kinase, Abl, Using the Substrate Abltide-GST and the Specific Inhibitor Glivec

Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE ($100 \mu M$ polyacrylamide-bound Mn^{2+} -Phos-tag and 12.5% (w/v) polyacrylamide) of reaction mixtures of phosphorylated (higher band) and nonphosphorylated Abltide-GST (lower band) by Abl in the absence and presence of Glivec (0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.6, 3.2, 6.4, 13, 25, 50, and $100 \mu M$) (a). Each lane contains the kinase reaction product of Abltide-GST ($0.10 \mu g$). Nonphosphorylated Abltide-GST ($0.10 \mu g$) was applied as a control in the rightmost lane. Inhibition curve of the Abl kinase reaction in the presence of Glivec (b). The observed rate constants k_{obs} (min^{-1}) were plotted against the concentrations of Glivec (μM), where a logarithmic scale was used for the x-axis. Reprinted with permission from Ref. 16) (2007), The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, and Ref. 17) (2007), The Japanese Electrophoresis Society.

きる解析法が限られたが、本法はその問題点を補完する技術である。

Phos-tag ビオチンを応用した PVDF 膜上でのリン酸化タンパク質の検出法は、一般的なウエスタン解析法とほとんど同じ操作で行える利便性がある。リン酸化アミノ酸残基の種類に係らず網羅的にリン酸化タンパク質を検出できるので、従来の方法では得られなかった新しいリン酸化タンパク質の情報をもたらす可能性を秘めている。また、PVDF 膜は抗体でのリプロービングが可能なので、イムノブロットング解析との併用は非常に貴重な情報を与えてくれることであろう。

リン酸基親和性電気泳動法, Mn^{2+} -Phos-tag

SDS-PAGE は、1つのタンパク質のリン酸化状態の異なるアイソフォームを泳動度の異なるバンドとして分離する全く新しい原理に基づく電気泳動法である。本法は SDS-PAGE の分離ゲル作成時に Phos-tag アクリルアミドを共重合するだけで、その他の操作、試薬、染色法、ウエスタン解析への適用法は一般的な SDS-PAGE とほぼ同じである。個々のリン酸化タンパク質の電気泳動度を決定する要因は、タンパク質 1 分子に取り込まれたリン酸の数とその部位である。したがって、同じリン酸化量でもその部位が異なれば分離検出できるなど興味深い結果を与える。また、抗リン酸化抗体の未開発なタンパク質やリン酸化部位の未同定なタンパク質のリン酸化を解析する際にも非常に有効であろう。泳動バンドの in-gel 消化後の質量分析は弊害なく行えることを確認している。¹⁶⁾ 本稿では Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE を用いたキナーゼ解析法を 3 例示したが、キナーゼの異常に基づく病気の診断や、特異的キナーゼ阻害剤のスクリーニング、様々な生命現象を解明するための生化学分野などで広く応用できると考えている。

筆者らの開発した Phos-tag 技術が、リン酸化プロテオーム研究を行う世界中の研究者にとって、使い易く、そして、確かな情報を与えるものとして貢献することを期待してやまない。

謝辞 本研究は、平成 15-18 年度科学研究費補助金基盤研究 (B) (課題番号: No. 15390013)、平成 17-18 年度科学研究費補助金若手研究 (B) (課題番号: No. 17790034)、平成 18 年度独立行政法人科学技術振興機構研究成果活用プラザ広島実用化可能性試験、平成 18 年度財団法人池谷科学技術振興財団研究奨励助成、並びに平成 17 年広島大学藤井研究助成基金の助成により実施した。また、榊ナード研究所、並びに、マナック㈱の多大なご協力に感謝する。

REFERENCES

- 1) Vallee B. L., "Zinc Enzymes," Chap. 1, eds. by Bertini I., Luchinat C., Maret W., Zeppezauer M., Brikhäuser, Boston, 1986, pp. 1-15.
- 2) Koike T., Kimura E., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**,

- 8935–8941 (1991).
- 3) Koike T., Kajitani S., Nakamura I., Kimura E., Shiro M., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1210–1219 (1995).
 - 4) Kimura E., Aoki S., Koike T., Shiro M., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3068–3076 (1997).
 - 5) Kimura E., Koike T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1495–1500 (1998).
 - 6) Fujioka H., Koike T., Yamada N., Kimura E., *Heterocycles*, **42**, 775–787 (1996).
 - 7) Koike T., Inoue M., Kimura E., Shiro M., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3091–3099 (1996).
 - 8) Kinoshita E., Ishikawa K., Kinoshita-Kikuta E., Ohtani K., Shiro M., Koike T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 125–131 (2005).
 - 9) Kinoshita E., Takahashi M., Takeda H., Shiro M., Koike T., *Dalton Trans.*, 1189–1193 (2004).
 - 10) Takeda H., Kawasaki A., Takahashi M., Yamada A., Koike T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2075–2081 (2003).
 - 11) Kinoshita E., Yamada A., Takeda H., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., *J. Sep. Sci.*, **28**, 155–162 (2005).
 - 12) Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., Yamada A., Endo M., Koike T., *Proteomics*, **6**, 5088–5095 (2006).
 - 13) Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., *Biotechnol. J. (Tokyo)*, **7**, 217–220 (2007).
 - 14) Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Takiyama K., Koike T., *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 749–757 (2006).
 - 15) Yamada S., Nakamura H., Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., Shiro Y., *Anal. Biochem.*, **360**, 160–162 (2007).
 - 16) Kinoshita-Kikuta E., Aoki Y., Kinoshita E., Koike T., *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 356–366 (2007).
 - 17) Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Aoki Y., Koike T., *Seibutsu-butsuri-kagaku*, **51**, 199–206 (2007).