

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07887

研究課題名(和文) 迅速に進行するリン酸基転移反応の中間体ダイナミクスを可視化する分析技術の創出

研究課題名(英文) Creation of the analysis technique to visualize the dynamics of labile intermediates in phosphotransfer reactions

研究代表者

木下 恵美子 (Kinoshita, Emiko)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・助教

研究者番号：40379912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内にはヒスチジンやアスパラギン酸のリン酸化を介した情報伝達機構がある。それらのアミノ酸のリン酸化型は化学的に不安定で加水分解されやすくリン酸基転移反応のダイナミクスを捉えることが困難だった。ATPアナログのATP γ Sを用いた*in vitro*反応では、チオリン酸化ヒスチジンやチオリン酸化型アスパラギン酸が生成し、それらは加水分解を受けにくい。リン酸基親和性電気泳動法のPhos-tag SDS-PAGEを用いて、チオリン酸化型タンパク質を分離し、これまで解析できなかった不安定化学種を持つリン酸基転移反応のダイナミクスを解析した。

研究成果の概要(英文)：Signal-transduction regulatory systems for certain cellular responses which rely on phosphorylation of histidine or aspartic acid have known in eukaryotic cells. Identification of site-specific phosphorylation dynamics of His or Asp is technically difficult because of the labile nature of the phosphorylated amino acid residues. ATP γ S, which used as a phosphoryl donor to trace protein kinase activities, has the advantage of permitting study of His- or Asp phosphorylation, because the resulting thiophosphorylated substrates are resistant to chemical hydrolysis or the action of phosphatases. Using the phosphate affinity electrophoresis, Phos-tag SDS-PAGE, we separated thiophosphorylated substrate generated as a intermediate of kinase reaction, and studied the dynamics of the histidine kinase reactions.

研究分野：物理系薬学

キーワード：phos-tag チオリン酸化タンパク質 ATP γ S

1. 研究開始当初の背景

生体内タンパク質では、セリン、トレオニン、チロシン残基以外にもヒスチジン、リジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、及びシステインがリン酸化修飾を受ける。しかし、これらのリン酸エステルは化学的に不安定であるため、研究手法は限られ、速度論的な分析についての報告はこれまでにほとんどない。これらのアミノ酸残基におけるリン酸エステル結合は、化学的に不安定であるがゆえに、生物学的に重要な機能を担っている。たとえば、細菌や植物の細胞では、ヒスチジン (His) からアスパラギン酸 (Asp) へのリン酸基転移反応を介した情報伝達系が存在し、外部環境変化への迅速な応答を担っている。同様に、ヒトを含む高等生物の細胞においても、これらのアミノ酸がリン酸化修飾を受けたリン酸基転移反応中間体の存在が知られているが、多くは詳細が不明のままである。その大きな理由として、これまでのリン酸化分析法では、不安定なリン酸化タンパク質(極めて迅速に進行するリン酸基転移反応)の検出が困難であったことが挙げられる。

申請者は、生理条件下でリン酸イオンを捕捉する機能性分子、フォスタグ (Phos-tag) を用いることで、リン酸化分子を特異的に検出するための様々な分析技術を開発している。その中でも、Phos-tag SDS-PAGE 法は、リン酸化タンパク質をゲルシフトした電気泳動のバンドとして定量解析する世界で唯一のリン酸親和電気泳動法である。さらに、ATP のアナログである ATP γ S をリン酸化反応に用いて、His や Asp 残基がチオリン酸化修飾を受けたタンパク質も Phos-tag に捕捉されることがわかった。

2. 研究の目的

(1) チオリン酸基は加水分解を受けにくく、リン酸基よりも立体的に大きいので、リン酸基転移反応の基質ともなりにくいので、普通は短寿命であるタンパク質リン酸基転移反応の中間体を Phos-tag SDS-PAGE で捕捉、分離できると考えた。ATP γ S によるチオリン酸化反応と Phos-tag SDS-PAGE を組み合わせ、これまでに不明であった反応中間体の存在をゲル上で可視化し、リン酸基転移反応のダイナミクス(反応速度論的性質)を解析することを目的とした。

(2) Phos-tag 技術の一つである Phos-tag リン酸基親和性クロマトグラフィーを利用して、生体サンプルからチオリン酸基を捕捉、分離、濃縮する方法を確立して、今まで存在

が明らかになっていなかったリン酸基転移反応の中間体をチオリン酸化タンパク質として捕捉、探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Phos-tag SDS-PAGE を用いた生体内チオリン酸基転移反応中間体の可視化
細菌や植物の細胞では、ヒスチジンやアスパラギン酸のリン酸基転移反応が知られている。このうち、大腸菌の情報伝達系タンパク質として知られているヒスチジンキナーゼ (HK) (ヒスチジンがリン酸化) と、それによってアスパラギン酸がリン酸化されるレスポンスレギュレータ (RR) の間のリン酸基転移反応をサンプルに用い、ATP と ATP γ S のそれぞれを供与体とした時のリン酸基転移反応のダイナミクスを解析する。

(2) Phos-tag 親和性クロマトグラフィー法を用いた生体内チオリン酸化タンパク質群の分離

生体試料においてごく微量にしか存在しないリン酸化タンパク質を生体内の環境に近い条件で濃縮することは非常に有用な手法となる。そうした観点から、申請者はこれまでに生理的(中性) 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親和性クロマトグラフィー法を開発している。チオリン酸基も Phos-tag 親和性クロマトグラフィーによって捕捉され、分離、濃縮できるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) Phos-tag SDS-PAGE を用いたチオリン酸基転移反応中間体の可視化

大腸菌のヒスチジンキナーゼ (HK) とレスポンスレギュレータ (RR) の組み換えタンパク質を精製し、ATP と ATP γ S のそれぞれを供与体とした時のリン酸基転移反応を解析した。PhoB (HK) / PhoR (RR) において、ATP を供与体とした場合には、迅速に PhoR にリン酸基が転移されるため、PhoB のリン酸化型は Phos-tag SDS-PAGE において可視化することができなかったのに対し、ATP γ S を供与体とした場合には、PhoB がチオリン酸化したものが蓄積し、PhoR に転移される量が相対的に少なく、PhoB と PhoR のチオリン酸化型が約 1 : 1 になって反応が平衡状態になることを確認した。また、分子内でヒスチジン、アスパラギン酸、ヒスチジンと多段階のリン酸基転移反応を行うヒスチジンキナーゼ ArcB (図 1) においては、ATP を供与体とした場合には、迅速に 2 段階のリン酸基転移反応が行われ、2 種類のリン酸化型が観察されるのに対し、ATP γ S を供与体とした場合に

は、1段階目の転移反応が終わったところでアスパラギン酸のチオリン酸化型が生じ、その次の段階の転移反応が起こりにくいことを明らかにした(図2)。

(2) Phos-tag 親和性クロマトグラフィ法を用いた生体内チオリン酸化タンパク質群の分離

哺乳類の細胞においてはチロシン、セリン、スレオニンのリン酸化反応が主であるが、リン酸基転移反応の中間体として、ヒスチジン、リジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、及びシステインがリン酸化される可能性がある。そこで、ヒト培養細胞株 HEK293 のライセートを作成し、ATP あるいは ATP γ S を加え、チオリン酸化反応を行った。生成するチオリン酸化タンパク質の中には、通常であれば短寿命であるリン酸化反応の中間体が含まれている可能性がある。チオリン酸化したライセートタンパク質を抗チオリン酸化タンパク質抗体で検出したところ、

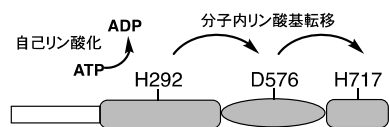


図1 ArcBにおけるリン酸基転移反応の模式図

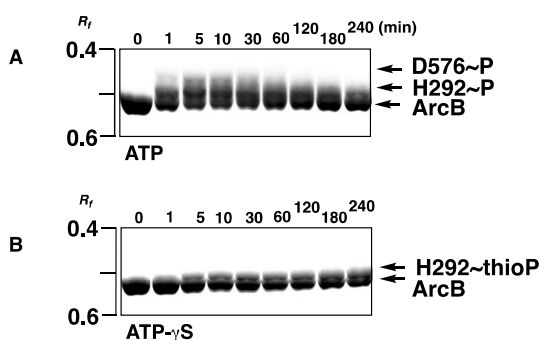


図2 ArcBにおけるATPとATP γ Sリン酸基転移反応のPhos-tag SDS-PAGE解析

多くのタンパク質がチオリン酸化することが明らかになった(図3左)。しかしながら、Phos-tag クロマトグラフィでチオリン酸化タンパク質の捕捉を試みたところ、一部のチオリン酸化タンパク質しか捕捉できないことが明らかになった(図3右)。圧倒的に多く含まれていると考えられるリン酸化タンパク質との区別が困難である可能性や、チオリン酸基への親和性がリン酸基よりも低い可能性がある。今後、チオリン酸基を網羅的に捕捉するためにクロマトグラフィ担体の改良が必要である。

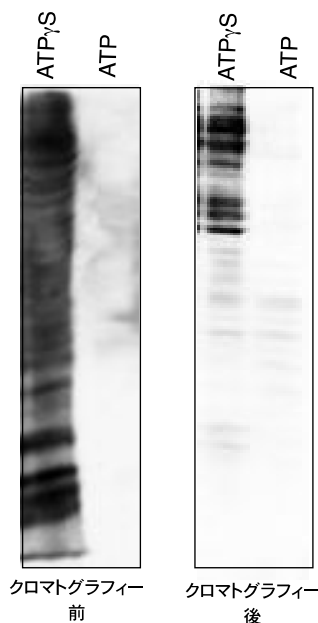


図3 Phos-tag クロマトグラフィによるライセート中のチオリン酸化タンパク質の捕捉実験

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Shiba A., Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., Koike T. TAMRA/TAMRA fluorescence quenching systems for the activity assay of alkaline phosphatase. *Sensors* 2017, 17, 1877-1888. (査読有り)
2. Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Karata K., Kawano T., Nishiyama A., Yamato M., Koike T. Specific glutamic acid residues in targeted proteins induce exaggerated retardations in Phos-tag SDS-PAGE migration. *Electrophoresis*, 38, 2017, 1139-1146. (査読有り)
3. Kusamoto H., Shiba A., Koretake N., Fujioka H., Hieda Y., Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., koike T. A novel thiol-affinity micropipette tip method using zinc(II)-cyclen-attached agarose beads for enrichment of cysteine-containing molecules. *Journal of chromatography B*, 1031, 2016, 195-201. (査読有り)
4. Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Kubota Y., Takekawa M, Koike T. A Phos-tag SDS-PAGE method that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1.

- Proteomics. 13, 2016, 1825-36. (査読有り)
5. Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., Eguchi Y., Koike T. Validation of *cis* and *trans* modes in multistep phosphotransfer signaling of bacterial tripartite sensor kinases by using Phos-tag SDS-PAGE. PLoS One, 11, 2016, e0148294. (査読有り)
 6. Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., Eguchi Y., Yanagihara S., Edahiro K., Inoue Y., Taniguchi M., Yoshida M., Yamamoto K., Takahashi H., Sawasaki T., Utsumi R., Koike T. Functional characterization of the receiver domain for phosphorelay control in hybrid sensor kinases. PLoS One, 10, 2015, e0132598. (査読有り)
 7. Sugiyama Y., Katayama S., Kameshita I., Morisawa K., Higuchi T., Todaka H., Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., Taniguchi T., Sakamoto S. Expression and phosphorylation state analysis of intracellular protein kinases using Multi-PK antibody and Phos-tag SDS-PAGE. MethodsX, 2, 2015, 469-474. (査読有り)

〔学会発表〕(計 32 件)

- 1) 芝 晃生, 木下 恵美子, 木下 英司, 小池 透, 蛍光クエンチングを用いるアルカリホスファターゼ分析の新規蛍光分析法の開発, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 金沢市
- 2) 草本 寛, 芝 晃生, 常弘 昌弥, 藤岡 晴人, 木下 恵美子, 木下 英司, 小池 透, 亜鉛酵素モデルに対するリガンドの親和性を解析する新規分光分析法の開発, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月, 金沢市
- 3) 谷川 綾音, 木下 恵美子, 黄波戸 亜哉, 守屋 康子, 木下 英司, 小池 透, 内海 俊彦, Phos-tag SDS-PAGE を用いた N-ミリスチル化依存的なタンパク質リン酸化反応の解, 日本農芸化学会大会 2018 年 3 月, 名古屋市
- 4) 木下英司, 木下恵美子, 小池 透, Phos-tag を基盤とした *in vitro* キナーゼアッセイ法: 宿主細胞に由来する偽陽性のキナーゼ活性を見極める有効手段, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年 12 月, 神戸市
- 5) 上里裕樹, 木下英司, 木下恵美子, 小池透, 亀下勇, 杉山康憲, プロテインキナーゼのリン酸化動態のプロファイリング法の開発, 2017 年度生命科学系学会合同年会 (ComBio2017), 2017 年 12 月, 神戸市
- 6) 上里裕樹, 木下英司, 木下恵美子, 小池透, 亀下勇, 杉山康憲, マルチ PK 抗体と Phos-tag 2D-PAGE を組み合わせたプロテインキナーゼのプロファイル法, 第 68 回日本電気泳動学会 2017 年 11 月, 広島市
- 7) 木下恵美子, 山戸護久, 西山敦洋, 河野敏己, 木下英司, 小池透, Phos-tag SDS-PAGE の移動度に影響を及ぼすリン酸基以外の要因, 第 68 回日本電気泳動学会 2017 年 11 月, 広島市
- 8) 谷口翼, 上田爽夏, 石山美帆, 木下恵美子, 木下英司, 小池透, 細胞内情報伝達における MEK1 リン酸化種の動態解析, 第 68 回日本電気泳動学会 2017 年 11 月, 広島市
- 9) 池上まどか, 木下恵美子, 木下英司, 小池透, ハイブリッドヒスチジンキナーゼにおけるリン酸基転移反応様式の検証, 第 68 回日本電気泳動学会 2017 年 11 月, 広島市
- 10) 藤田萌々子, 木下恵美子, 木下英司, 小池透, Phos-tag SDS-PAGE を基盤とした *in vitro* キナーゼアッセイ法: 宿主細胞に由来する偽陽性のキナーゼ活性を見極める, 第 68 回日本電気泳動学会 2017 年 11 月, 広島市
- 11) 木下恵美子, タンパク質のリン酸化分子種全体を見える化する Phos-tag SDS-PAGE, 日本プロテオーム学会 2017 年大会, 2017 年 7 月, 大阪市
- 12) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, フォスタグ技術とプロテオミクス情報を活用した細胞内 MEK1 リン酸化ダイナミクスのプロファイリング, 第 137 回日本薬学会年会, 2017 年 3 月, 仙台市
- 13) 木下英司, 木下恵美子, 久保田裕二, 武川睦寛, 小池透, フォスタグ技術とプロテオミクス情報を活用した細胞内 MEK1 リン酸化ダイナミクスのプロファイリング, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月, 横浜市
- 14) 木下恵美子, フォスタグ技術によるセンサーキナーゼの自己リン酸化制御機構の解析, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月, 仙台市

- 15) 木下英司, 木下恵美子, 江口陽子, 小池透, 大腸菌ハイブリッドセンサーキナーゼにおけるリン酸基転移反応様式の検証, 第 89 回日本生化学大会, 2016 年 9 月, 仙台市
- 16) Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, and Tohru Koike, Phos-tag SDS-PAGE methodology that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1, 15th Human Proteome Organization World Congress, 2016 年 9 月, 台北市
- 17) Maho Kawaguchi, Elena Tianfei Yuan, Yoko Ino, Yayoi Kimura, Hisashi Hirano, Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, Tohru Koike, Phosphate-affinity chromatographic micro-tip technology for enrichment of phosphopeptides towards phosphoproteomic study, 15th Human Proteome Organization World Congress, 2016 年 9 月, 台北市
- 18) Hiroshi Kusamoto, Akio Shiba, Norinao Koretake, Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, Tohru Koike, Thio-tag tip method by using zinc(II)-cyclen-attached agarose beads for enrichment of cysteine-containing biomolecules, 15th Human Proteome Organization World Congress, 2016 年 9 月, 台北市
- 19) 河口真歩, 藤岡晴人, 木下恵美子, 木下英司, 小池透, チオール含有生体分子を分離・濃縮するための Thio-tag 磁気ビーズの開発, 第 67 回日本電気泳動学会総会, 2016 年 8 月, 釧路市
- 20) 草本寛, 藤岡晴人, 芝晃生, 是竹紀尚, 木下恵美子, 木下英司, 小池透, Thio-tag Tip を用いたチオール基含有化合物の選択的分離精製法, 第 67 回日本電気泳動学会総会, 2016 年 8 月, 釧路市
- 21) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, フォスタグ技術を用いたヒスチジンキナーゼにおける自己リン酸化ダイナミクスのプロファイリング, 日本プロテオーム学会 2016 年大会, 2016 年 7 月, 東京
- 22) 草本 寛, 芝 晃生, 是竹 紀尚, 木下恵美子, 木下英司, 小池透, Thio-tag Tip を用いたチオール基含有化合物の選択的分離精製法, 日本プロテオーム学会 2016 年大会, 2016 年 7 月, 東京
- 23) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, ハイブリッドセンサーキナーゼにおけるリン酸基転移反応の制御機構 ~ レシーバードメインによるリン酸化レベルの負の制御機能 ~, 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月, 横浜市
- 24) 曾根雄太郎, 山野喜, 志賀もえみ, 杉本幸子, 木下英司, 木下恵美子, 小池透, 大塚英昭, 松浪勝義, Phos-tag SDS-PAGE を用いたリン酸化阻害物質の探索, 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月, 横浜市
- 25) 草本寛, 藤岡晴人, 是竹紀尚, 木下恵美子, 木下英司, 小池透, Thio-tag Tip を用いたチオール基含有化合物の選択的分離精製法, 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月, 横浜市
- 26) Maho Kawaguchi, Norinao Koretake, Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, Tohru Koike, Development of Thio-tag magnetic bead for rapid and selective separation of thiol-containing biomolecules. Pacificchem2015, 2015 年 12 月, ホノルル市
- 27) 木下恵美子, 木下英司, 江口陽, 吉多美祐, 山本兼由, 内海龍太郎, 小池透, ハイブリッドセンサーキナーゼのリン酸機リレー情報伝達機構におけるレシーバードメインの制御機構, BMB2015, 2015 年 12 月, 神戸市
- 28) 木下英司, 草本寛, 木下恵美子, 小池透, Phos-tag SDS-PAGE ゲルからの標的リン酸化タンパク質の転写効率の改善, 日本電気泳動学会第 66 回総会, 2015 年 09 月, 東京
- 29) 國貞夏実, 木下恵美子, 木下英司, 小池透, リン酸基捕捉能を持つダーククエンチャーを用いた蛍光分析法, 日本電気泳動学会第 66 回総会, 2015 年 09 月, 東京
- 30) 河口真歩, 井野洋子, 木村弥生, 平野久, 木下恵美子, 木下英司, 小池透, 迅速かつ簡便にリン酸化生体分子を分離精製するための Phos-tag Tip の開発, 日本電気泳動学会第 66 回総会, 2015 年 09 月, 東京
- 31) 井野洋子, 木下英司, 木下恵美子, 小池透, 戸田年総, 平野久, 木村弥生, Phos-tag ビーズを用いたゲル内消化産物からのリン酸化ペプチド濃縮, 日本電気泳動学会第 66 回総会, 2015 年 09 月, 東京
- 32) Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Yoko Ino, Yayoi Kimura, Hisashi Hirano, Tohru Koike, Phos-tag tip, a novel tool for phosphoproteome study, 日本プロテ

オーム学会 2015 年大会 , 2015 年 7 月,
熊本市

〔 図書 〕 (計 6 件)

- 1) Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., Zn(II)-Phos-tag SDS-PAGE for Separation and Detection of a DNA Damage-Related Signaling Large Phosphoprotein, Sergei V. Kozlov (ed.), ATM Kinase: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 1599, 2017, 113-126. Springer Science+Business Media LLC 2017
- 2) Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., Koike T., Phosphopeptide detection with biotin-labeled Phos-tag, in Phospho-proteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 1355 (ed. by Stechow, L), 2016, 17-29, Springer, New York
- 3) Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., Koike T., Neutral phosphate affinity SDS-PAGE system for profiling of protein phosphorylation. in Proteomic Profiling: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 1295 (ed. by Posch A), 2015, 323-354, Springer, New York,
- 4) Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T., Phos-tag-based affinity chromatography techniques for enrichment of the phosphoproteome. in Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. (eds. by Inoue, J and Takekawa, M), 2015, 17-30, Springer, New York
- 5) Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita E., Koike T., Phos-tag technology for kinomics. in Kinomics: Approaches and Applications. (eds. by Kraatz, H.-B. and Martic, S), 2015, 195-210, Wiley-VCH, Weinheim
- 6) Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike T., Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. Biochim. Biophys. Acta, 1854, 2015, 601-618.

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔 その他 〕
ホームページ等
<http://www.phostag.hiroshima-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
木下 恵美子 (KINOSHITA, Emiko)
広島大学医歯薬保健学研究科 (薬) ・ 助教
研究者番号 : 40379912

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :

(4) 研究協力者
()