

令和 3 年 4 月 29 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2018～2020  
 課題番号：18K06596  
 研究課題名(和文) タンパク質のリン酸化状態から疾患の病態をプロファイリングするシステムの開発

研究課題名(英文) Development of a system for profiling the pathophysiology of diseases from the phosphorylated states of proteins

研究代表者  
 木下 恵美子 (Kinoshita, Emiko)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：40379912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、疾患に関わるキナーゼ変異とリン酸化状態の関連をPhos-tag電気泳動を用いて解析した。MEK1キナーゼの点変異は、ある種の孤発性ガンの悪性度と関係し、抗がん剤耐性に関わる点変異も報告されている。本研究では15種の点変異について、細胞内リン酸化状態をPhos-tag解析した。この結果、Phos-tag解析は、ガンとリン酸化状態の相関、キナーゼ活性の変化や薬剤の有効性の予測などに有効であることが示された。また、これまでの研究において蓄積したタンパク質のPhos-tag電気泳動解析データを(<http://phostag.hiroshima-u.ac.jp>)公開するサイトを開設した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
 ガンに関わるキナーゼの点変異が細胞内でのリン酸化状態にどのような変化をもたらすかをPhos-tag電気泳動方ももちいて調べた。この電気泳動パターンは、ガンの悪性度とリン酸化状態の相関、キナーゼ活性の変化や薬剤の有効性の予測などに役立つデータである。これまでも、このようなPhos-tag電気泳動パターンを多く蓄積してきたので、本研究期間中にそれらのデータを公開するためのWebサイトを開設し、研究者に閲覧していただけるように整備している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the relationship between disease-related kinase mutations and phosphorylation status using Phos-tag electrophoresis. Point mutations in MEK1 kinase are associated with the malignancy of certain sporadic cancer. Moreover, point mutations associated with anticancer drug resistance have also been reported. In this study, Phos-tag analysis was performed on the intracellular phosphorylation status of 15 types of MEK1 point mutations. As a result, it was shown that Phos-tag analysis is effective for the estimation of correlation between cancer and phosphorylation status, prediction of changes in kinase activity, and prediction of drug efficacy.

In addition, we have set up a site to publish Phos-tag electrophoresis analysis data of proteins accumulated in previous studies (<http://phostag.hiroshima-u.ac.jp>).

研究分野：タンパク質のリン酸化解析技術の開発

キーワード：Phos-tag キナーゼ リン酸化 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化反応は、重要な翻訳後修飾の一つで、これによりタンパク質の活性は厳密に制御される。したがって、タンパク質のリン酸化と細胞機能や疾病との相関を理解することは、疾病の原因究明、診断・治療につながる重要な研究である。近年、質量分析技術とプロテオミクスの進展により、多数のタンパク質の翻訳後修飾に関する情報が蓄積されてきている。特にリン酸化については、様々なデータベースでリン酸化されるアミノ酸残基の膨大な情報(リン酸化プロテオミクス情報)が登録・公開されている。しかし、その情報をどのように利用すれば個々のタンパク質の機能解析に役立つかという方法論は遅れをとっており、情報の膨大化のみが先に進んでいるのが現状である。

申請者は、リン酸基を特異的に捕捉する分子、「Phos-tag」を利用したリン酸基親和性電気泳動法(Phos-tag 電気泳動法)を開発し、それをを用いて、細胞シグナル伝達分子をはじめとした疾患関連タンパク質のリン酸化状態を解析してきた。そのなかで、シグナル伝達分子は応答時に活性型として生じるリン酸化状態以外に、恒常的に複数のリン酸化バンド(状態)が存在することも明らかにした。膨大なリン酸化プロテオミクス情報と Phos-tag 技術を組み合わせることにより、それら複数のバンドのリン酸化部位を同定し、それぞれのリン酸化状態がシグナルに応じて存在割合などが経時的に変動することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

増殖因子などに応答する細胞内シグナル伝達経路に属するキナーゼなどは、様々なガンにおいて遺伝子変異が多く報告されており、それらのキナーゼを標的とした創薬も進展しつつある。また、MAPK, NF- $\kappa$ B, AKT 経路など重要な細胞シグナル伝達経路に属する分子には、その機能異常が疾病の原因となっているものがある。そのようなタンパク質は研究事例が多く、シグナル伝達に関わるリン酸化部位や関与するキナーゼが特定されているものも多い。一方、あらためて Phos-tag 電気泳動による解析を行うと、ほとんどのタンパク質が複雑な泳動像を示し、シグナルに関わらず複数のリン酸化状態を有することが明らかになる。既存の技術ではタンパク質の特定部位のリン酸化の解析に限定されることが多かったのに対し、Phos-tag 電気泳動はリン酸化タンパク質の全体像を解析できる。

そのバーコードのように複雑な Phos-tag 電気泳動パターンは、まさに細胞の状態を示すコード(暗号)を含んでいると言える。したがって、リン酸化状態を同定することは細胞状態のコードを解読することであり、極めて重要な情報を創出することになる。本研究では種々のタンパク質において、Phos-tag 電気泳動解析結果をデータベース化し、公開することを目標とした。それを利用すれば、疾患におけるタンパク質の Phos-tag 電気泳動パターンを登録データに照合してパターンマッチングなどの画像解析から、疾病の原因となるタンパク質の特定や、遺伝子変異のタイプを類推できるなど、医療分野への波及効果が見込まれる。さらに広い生命科学分野への波及効果も視野に入れ、現在までに蓄積した疾患関連タンパク質以外のタンパク質の Phos-tag 電気泳動パターンも公開し、それらのデータの利用を目指して Web の整備をすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内シグナル伝達経路のキナーゼをはじめとする様々な細胞内タンパク質の Phos-tag 泳動パターンの収集

重要なシグナル伝達経路を構成する主要なタンパク質、あるいは遺伝子変異と疾病の関連が報告されているタンパク質のリン酸化状態について Phos-tag 電気泳動パターンを収集する。

### (2) データベースの作成

以前の研究で蓄積した種々のタンパク質のデータも含めて、申請者らの研究グループのホームページ Phos-tag.com (<http://www.phos-tag.com>) に画像を公開する。広い分野の研究者が閲覧することを前提とし、検索機能、詳細データへのリンクなど、データベースとしての機能を付加させる。

#### 4. 研究成果

##### (1) ガンで遺伝子変異が多く報告されている MEK1 のリン酸化解析

MEK1 はメラノーマ、肺癌、卵巣癌などの孤発性のガンにおいて、点変異とガンの悪性度との相関が示唆されている。また、MEK1 阻害剤耐性細胞においても点変異が報告されている。本研究では、15 種類の点変異体 (メラノーマ (Q56P, I111S, C121S, P124S, P124L, E203K, and N382H) 胃癌 (Q56P and D67N) 肺癌 (K57N and D67N) 卵巣癌 (D67N) MEK1 阻害剤耐性細胞 (Q56P, I103N, L115P, P124S, F129L, and V211D) を作成し、それらの細胞内におけるリン酸化状態を Phos-tag 電気泳動で解析した (図 1)。15 種類全ての変異体において、野生型の MEK1 では見られないリン酸化状態の存在を示す複数のバンドが観察された (図 1a)。活性化型 MEK1 であるリン酸化 MEK1 (pS218/pS222) に対する抗体で解析した画像 (図 1b) を重ねると、増加したバンドには活性化型 MEK1 が含まれることがわかった (図 1c)。

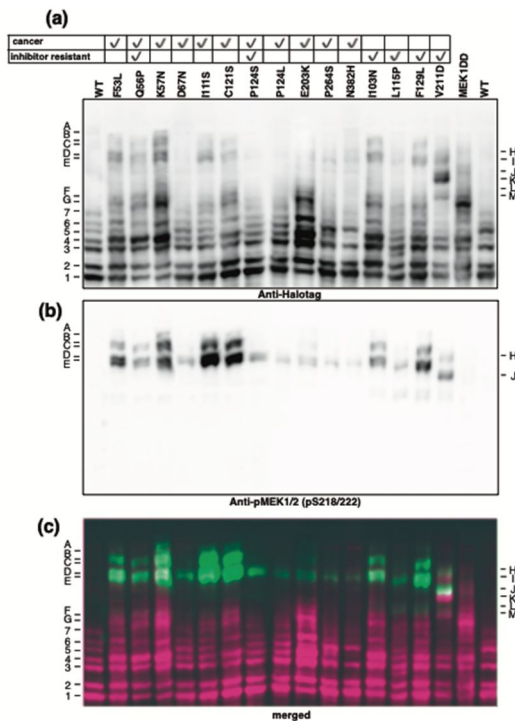


図 1. 孤発性ガン、MEK1 阻害剤耐性細胞にみられる点変異 MEK1 の Phos-tag 電気泳動パターン

(Kinoshita-Kikuta E. *et al*, BBA - Proteins and Proteomics (2018) 1867 62-70 より転載)

(a) FLAG-MEK1 を HEK293 に一過性発現させ、細胞全タンパク質を Phos-tag 電気し、抗 FLAG 抗体で検出した。

(b) (a) と同じプロットを抗リン酸化 MEK1 (pS218/pS222) で検出した

(c) (a) と (b) の画像を重ね合わせた。

孤発性ガンと MEK1 阻害剤耐性細胞の MEK1 変異では、キナーゼ活性が増加していることが in vitro キナーゼアッセイによって明らかになった (図 2)。

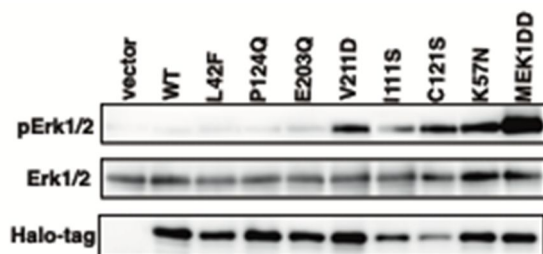


図 2 点変異 MEK1 in vitro キナーゼアッセイ

(Kinoshita-Kikuta E. *et al*, BBA - Proteins and Proteomics (2018) 1867 62-70 より転載)

孤発性ガン、MEK1 阻害剤耐性細胞にみられる点変異 MEK1 では基質の Erk1/2 をリン酸化する活性が上昇している。

さらに、HEK293 細胞において、10 種の Raf/MEK 阻害剤存在下での MEK1 のリン酸化状態を調べた。細胞自身の内因 MEK1 は、10 種の阻害剤が増殖因子による活性化を抑えたのに対して、一過性発現させた孤発性ガンの MEK1 変異体に対しては、抑えられないものがあった。MEK1 阻害剤耐性 MEK1(V211D)に対しては PLX4720 以外の阻害剤は MEK1 活性化を抑えられなかった (図 3)

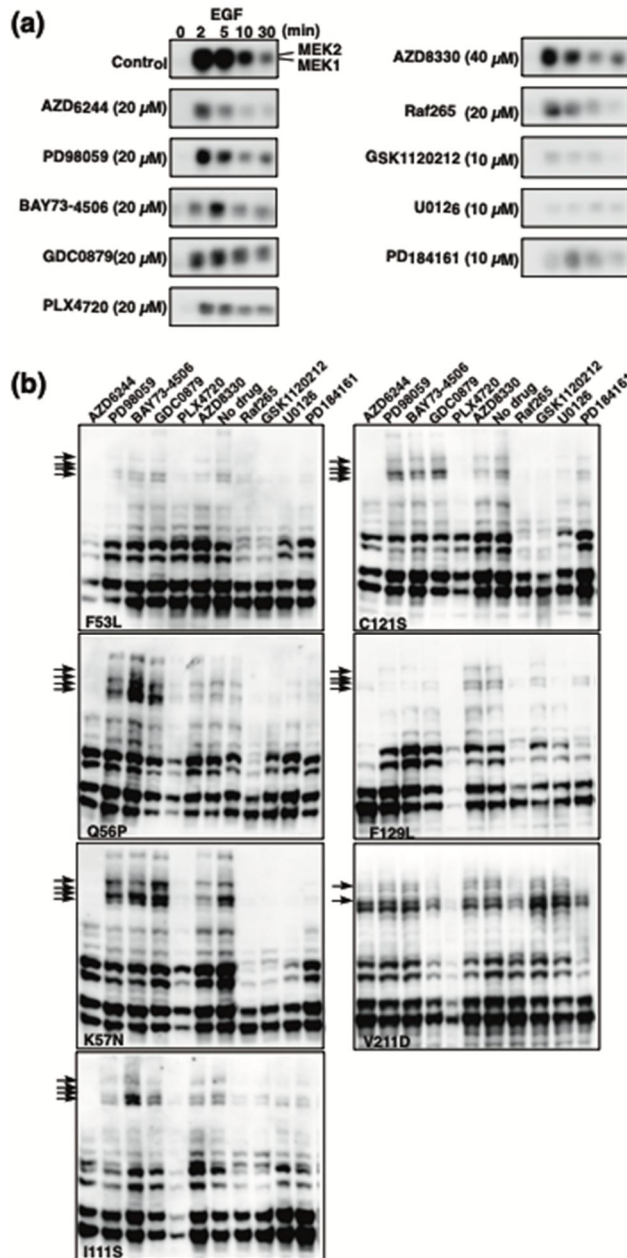


図 3 Raf/MEK 阻害剤存在下での MEK1 リン酸化プロファイリング (Kinoshita-Kikuta E. *et al*, BBA - Proteins and Proteomics (2018) 1867 62-70 より転載)

(a) HEK293 細胞内因性の MEK1/2 は細胞増殖因子 EGF によってリン酸化するが、10 種類の Raf/MEK 阻害剤存在下では、リン酸化が抑えられることを抗リン酸化 MEK1(pS218/pS222)抗体をもちいて確かめた。

(b) HEK293 細胞に一過性発現させた孤発性ガン, MEK1 阻害剤耐性細胞にみられる変異 FLAG-MEK1 の 10 種類の Raf/MEK 阻害剤存在下でのリン酸化状態の解析。いくつかの阻害剤は、活性型の MEK1 のリン酸化種の生成を抑えた。MEK1 阻害剤耐性細胞にみられる V211D では、PLX4720 のみが活性型の MEK1 のリン酸化種の生成を抑えた。

MEK1 の解析を通じて、様々なタンパク質の遺伝子変異に対して、Phos-tag 電気泳動パターンを調べることで、ガンとの相関, キナーゼ活性の予測, 薬剤の有効性の予測などが可能になることが示された

## (2) Phos-tag 電気泳動データの Web 公開

さまざまなタンパク質のリン酸化解析データを掲載する Web サイト Phos-tag 電気泳動パターン「Phos-tag SDS-PAGE データ集」(<http://phostag.hiroshima-u.ac.jp>)を 2018 年に開設した。MEK1 をはじめとする 110 のデータを掲載した。今後もデータの掲載を継続していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kinoshita-Kikuta Emiko, Yoshimoto Momoka, Yano Marina, Kinoshita Eiji, Koike Tohru	4. 巻 70
2. 論文標題 An assay of human tyrosine protein kinase ABL activity using an Escherichia coli protein expression system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 209 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2144/btn-2020-0154	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita-Kikuta Emiko, Akayama Keisuke, Kinoshita Eiji, Koike Tohru	4. 巻 64
2. 論文標題 A dot-blot-staining method for detecting phosphoproteins with a Phos-tag Aqua fluorescent dye	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 7 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/jelectroph.64.7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita-Kikuta Emiko, Utsumi Toshihiko, Miyazaki Aya, Tokumoto Chiharu, Doi Kyosuke, Harada Haruna, Kinoshita Eiji, Koike Tohru	4. 巻 10
2. 論文標題 Protein-N-myristoylation-dependent phosphorylation of serine 13 of tyrosine kinase Lyn by casein kinase 1 at the Golgi during intracellular protein traffic	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16273-16273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73248-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita-Kikuta Emiko, Maruta Shino, Eguchi Yoko, Igarashi Masayuki, Okajima Toshihide, Utsumi Ryutaro, Kinoshita Eiji, Koike Tohru	4. 巻 600
2. 論文標題 An immuno-dot blot assay for screening histidine kinase inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113765 ~ 113765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113765	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Emiko Kinoshita-Kikuta, Ayane Tanikawa, Takuro Hosokawa, Aya Kiwado, Koko Moriya, Eiji Kinoshita, Tohru Koike, Toshihiko Utsumi	4. 巻 14
2. 論文標題 A strategy to identify protein-N-myristoylation-dependent phosphorylation reactions of cellular proteins by using Phos-tag SDS-PAGE.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0225510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Emiko Kinoshita-Kikuta, Hiroshi Kusamoto, Syogo Ono, Keisuke Akayama, Yoko Eguchi, Masayuki Igarashi, Toshihide Okajima, Ryutaro Utsumi, Eiji Kinoshita, Tohru Koike	4. 巻 40
2. 論文標題 Quantitative monitoring of His and Asp phosphorylation in a bacterial signaling system by using Phos-tag Magenta/Cyan fluorescent dyes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 3005-3013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elps.201900261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Kusamoto, Emiko Kinoshita-Kikuta, Tomoyo Nishimura, Tomomi Nagai, Eiji Kinoshita, and Tohru Koike,	4. 巻 63
2. 論文標題 Gel-based analysis of protein phosphorylation status by rapid fluorometric staining using TAMRA-labeled Phos-tag	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 25-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/jelectroph. 63.25	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuuki Uezato, Isamu Kameshita, Keiko Morisawa, Shuji Sakamoto, Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Tohru Koike, Yasunori Sugiyama,	4. 巻 1867
2. 論文標題 A method for profiling the phosphorylation state of tyrosine protein kinases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 71-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2018.05.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, Sayaka Ueda, Yoko Ino, Yayoi Kimura, Hisashi Hirano, Tohru Koike	4. 巻 1867
2. 論文標題 Increase in constitutively active MEK1 species by introduction of MEK1 mutations identified in cancers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 62-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2018.05.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kusamoto Hiroshi, Shiba Akio, Tsunehiro Masaya, Fujioka Haruto, Kinoshita-Kikuta Emiko, Kinoshita Eiji, Koike Tohru	4. 巻 47
2. 論文標題 A simple method for determining the ligand affinity toward a zinc-enzyme model by using a TAMRA/TAMRA interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 1841 ~ 1848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7dt04364c	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木下恵美子
2. 発表標題 Phos-tag を用いた リン酸化タンパク質の解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下恵美子, 木下英司, 内海俊彦, 小池透
2. 発表標題 細胞内のタンパク質のN-ミリスチル化に依存したリン酸化反応
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤山圭佑, 木下恵美子, 木下英司, 小池透
2. 発表標題 蛍光Phos-tag誘導体によるプロット膜上のリン酸化タンパク質の定量解析法の開発
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斧尚吾, 木下恵美子, 木下英司, 小池透
2. 発表標題 Phos-tag 蛍光ゲル染色剤を用いた細菌の2成分伝達系のHis/Asp定量的リン酸化解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下恵美子, 内海俊彦, 木下英司, 小池透
2. 発表標題 チロシンキナーゼ Lyn は細胞膜への輸送の過程でゴルジ体においてcasein kinase 1 によってセリン13をリン酸化される
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下恵美子
2. 発表標題 Phos-tag を用いたリン酸化タンパク質の解析法
3. 学会等名 日本プロテオーム学会JPrOS2019, 日本電気泳動学会JES2019合同年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 草本寛, 木下恵美子, 木下英司, 小池透
2. 発表標題 リン酸化タンパク質選択的な電気泳動ゲル蛍光染色法
3. 学会等名 日本プロテオーム学会JPrOS2019, 日本電気泳動学会JES2019合同年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 草本寛, 木下恵美子, 木下英司, 小池透
2. 発表標題 錯体医薬における亜鉛酵素阻害剤の親和性解析
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019/第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下英司, 木下恵美子, 江口陽子, 五十嵐雅之, 岡島俊英, 内海龍太郎, 小池透
2. 発表標題 Phos-tag蛍光ゲル染色剤を用いた2成分系シグナリングの定量モニタリング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 N-ミリスチル化依存的なタンパク質リン酸化反応のPhos-tag SDS-PAGEを用いた解析法の確立
3. 学会等名 第59回日本生化学会 中国四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 草本寛, 西村朋世, 木下恵美子, 木下英司, 小池透
2. 発表標題 TAMRA-Phostagを用いたリン酸化タンパク質のゲル染色法
3. 学会等名 第69回日本電気泳動学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 草本寛, 西村朋世, 木下恵美子, 木下英司, 小池透
2. 発表標題 TAMRA-Phostagを用いたリン酸化タンパク質のゲル染色法
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 218
3. 書名 Neuroproteomics: Neuromethods, 146 (ed. by Li, KW)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Phos-tag SDS-PAGE データ集 <a href="http://phostag.hiroshima-u.ac.jp">http://phostag.hiroshima-u.ac.jp</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------