

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19390011  
研究課題名(和文) リン酸基結合タグ分子を利用したリン酸化プロテオーム解析技術の開発  
研究課題名(英文) Development of novel analytical methods for phosphoproteomics by using a phosphate-binding tag molecule.  
研究代表者  
小池 透 (KOIKE TOHRU)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：90186586

研究成果の概要(和文)：フォスタグ技術を世界標準のリン酸化プロテオーム解析技術にすることを目的として、(1)蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用したリン酸化ペプチドのフォスファターゼ反応の解析システム、(2)リン酸化タンパク質のフォスタグ電気泳動システム、(3)リン酸化生体分子の分離カラムシステムなどを開発した。本研究で開発した新しいリン酸化合物解析法は、今後のリン酸化プロテオーム研究を劇的に促進するものであると確信している。

研究成果の概要(英文)：By utilizing the Phos-tag molecule and its derivatives, we have developed convenient and reliable methods for the detection and separation of phosphorylated peptides and proteins. In this program, we applied the Phos-tag technology to (1) FRET system for kinase profiling using Phos-tag, (2) phosphate affinity electrophoresis, (3) phosphate affinity column system. We believe that our Phos-tag technology will result in great progress in phosphoproteomics.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：リン酸化プロテオミクス，ケミカルバイオロジー，リン酸化蛋白質，キナーゼ，フォスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化は、シグナル伝達、細胞周期の進行、遺伝子発現の制御などの多様な生命活動に関与している。タンパク質の

リン酸化の異常は、癌、神経疾患、代謝性疾患など様々な疾患の原因となっていることが明らかとなり、リン酸化タンパク質の研究(リン酸化プロテオミクス)は、それらの疾

患の予防や治療にとってますます重要になっている。これまでにタンパク質のリン酸化について調べる様々な手法が開発されており、その中で現在最も汎用されている方法は、電気泳動法と質量分析法である。電気泳動法では、放射性リンや抗リン酸化タンパク質抗体を用いてリン酸化タンパク質を検出する。放射性リンを使用する場合、「放射性物質を取扱う特別な設備」が必要である。また、抗体には、「高価、複雑な製造工程、化学的安定性が低い、基質特異性の不安定性」などの欠点がある。一方、ハイスループットなリン酸化分子の分析には質量分析が優れているが、測定感度や定量性などのさらなる向上が求められている。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、亜鉛イオンを必須とする酵素（亜鉛酵素）がアニオン性の基質を選択的に捕捉する機能を持っていることに注目して、低分子亜鉛化合物の機能に関する研究を行っている。その研究成果の1つに「亜鉛二核錯体構造が、アルカリフォスファターゼ（亜鉛酵素）の基質であるリン酸モノエステルアニオンを特異的に捕捉するために必須である」という発見がある。その科学的事実を基礎として、生理条件下（pH 7, 室温）でリン酸イオンに結合するタグ分子（フォスタグ）の開発に成功した。フォスタグ（二核金属錯体）とリン酸アニオンとの親和性は、カルボン酸イオンの10000倍以上である。国内外において、リン酸化合物と金属イオン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リン酸化プロテオーム解析技術へ応用する研究は、研究代表者らの研究グループ以外ではほとんど行なわれていない。本研究以前に、研究代表者は、リン酸化分子を中性pHで選択的に捕捉する金属錯体化合物群を開発し、リン酸化分子の質量分析増感剤、リン酸アフィニティーアガロースゲル、ビオチン化リン酸化分子捕捉剤、リン酸アフィニティー電気泳動ポリアクリルアミドゲルを開発した実績がある。それらはリン酸化物質を分解することなく濃縮したり、検出したりできるオリジナルなリン酸化プロテオーム解析用試薬である。本研究では、フォスタグ技術を世界標準のリン酸化プロテオーム解析技術にすることを目的として、(1)フォ

スタグのリン酸基結合能と生体分子（酵素や抗体）の特異的機能を組み合わせた分析法、(2)フォスタグ技術を組み込んだハイスループットなリン酸化生体分子の検出法（リアルタイムリン酸化プロファイリング）、(3)リン酸化タンパク質の新しい二次元電気泳動法、(4)質量分析前処理用の耐圧性リン酸アフィニティーカラム法、(5)フォスタグとリン酸基の結合により誘導される蛍光共鳴エネルギー移動を利用したリン酸化反応の分析法の開発を行う。

フォスタグは、セリン、チロシン、スレオニンの水酸基に結合したリン酸基に配位結合する。リン酸化合物とフォスタグの結合は、生理 pH で平衡論的に極めて安定である。一方、その複合体に無機リン酸イオンや金属キレート剤（EDTA など）を添加すると、数分以内にリン酸化合物を解離する。このようなフォスタグの可逆的かつ迅速なリン酸化合物の脱着は、リン酸基がついている物質すべてに適用できる。リン酸化合物であればすべての分子に結合できるという性質は、網羅的なリン酸化タンパク質の分析には大きな長所になる。すなわち、フォスタグには、抗リン酸化タンパク質抗体のようなアミノ酸配列特異性がない。現在、リン酸基に親和性があるフォスタグ以外の金属錯体（チタン、鉄、またはガドリニウム錯体）が知られているが、リン酸化合物に対する選択的な親和性を得るためには強い酸性やアルカリ性条件が必要なため、それらのターゲット分子や使用条件は限定されている。一方、フォスタグ分子は、生理条件下で使用できる。

## 3. 研究の方法

(1)フォスタグの基本骨格にアミノ基やカルボン酸基を一つ結合させた誘導体に生体高分子や人工高分子ポリマーをアミド結合により結合させた高分子を合成した。結合する生体高分子は、西洋わさびペルオキシダーゼ（化学発光触媒）、フルオレッセインなどの蛍光色素で標識した牛血清アルブミン、低分子結合性タンパク質（ストレプトアビジン、グルタチオン結合タンパク質）である。以前に、ビオチン化したフォスタグとストレプトアビジン-結合型西洋わさびペルオキシダーゼを用いた、リン酸化タンパク質の化学発光検出法を開発しているが、フォスタグと西洋わさびペルオキシダーゼを直結することで、

より簡単な操作で高感度の化学発光検出が可能になると考えた。それぞれの誘導体に適したカルボン酸活性化剤 (EDC など) を用いて、アミド結合形成反応の条件検討を行った。生体高分子へのフォスタグの結合量は、紫外線吸光度分析、液体クロマトグラフィー、電気泳動法で検討した。

(2) 高分子担体は、液体クロマトグラフィー用の耐圧性有機ポリマービーズ、カルボン酸やアミノ基を有する磁気ビーズ、マレイミドなどの活性基を有する96穴プレートである。カルボン酸活性化剤を用いて、それぞれの誘導体に適したアミド結合形成反応の条件検討を行った。ポリアクリルアミド電気泳動ゲル用に開発したアクリルアミド基を有するフォスタグは、マイクロゲルやキャピラリー電気泳動ゲルとして使用可能な直鎖状ポリマーの合成に用いた。

(3) 合成したフォスタグ誘導体の物理化学的性質 (溶液中平衡反応、金属錯体の安定性、溶解度) について、分光分析、pH 滴定法、電気泳動法、表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析などにより検討した。さらに、同様の原理を利用して、リン酸化反応の水晶発振子マイクロバランス法の検出試薬や電気泳動のシフト試薬の開発も行った。

(4) 通常の等電点電気泳動あるいは尿素変性電気泳動と、フォスタグ-PAGE法 (アクリルアミド-フォスタグを使用) を組み合わせた二次元電気泳動法に最適な分析条件 (フォスタグ濃度、pH緩衝系、泳動条件) を検討した。この方法により、複数のリン酸化タンパク質と対応する非リン酸化タンパク質を同時に分析することが可能となった。さらに、ゲル泳動後にPVDF膜にタンパク質を転写し、西洋わさびペルオキシダーゼ結合型フォスタグを用いた化学発光分析により、網羅的なリン酸化タンパク質の検出を行った。

(5) 耐圧性リン酸アフィニティー担体は、カルボン酸基をもつ高分子ビーズ (シリカゲルやトヨパールなど) とアミノ基をもつフォスタグの縮合反応により合成した。スピンカラムやステンレスカラムに耐圧性リン酸アフィニティー担体を充填した。液体クロマトグラフ装置を用いて、そのカラムのリン酸化分子の分離能やリン酸化分子に対する選択率を検討した。

(6) フルオレッセインを持つリン酸化ペプチドと蛍光性クマリン基をもつフォスタグ誘導体の合成を行った。それらを組み合わせると、蛍光共鳴エネルギー移動を利用したリアルタイムフォスファターゼプロファイリングが可能になる。

#### 4. 研究成果

(1) フォスタグのリン酸基結合能と抗体やリン酸化酵素など生体分子の特異的な分子認識機能を組み合わせた分析法を開発した。

(2) リン酸化タンパク質のプロファイリングを目的とした新しい二次元電気泳動法を開発した。一次元目の電気泳動には、従来の電気泳動法 (等電点電気泳動、尿素変性電気泳動、SDS 変性電気泳動など) を二次元目にはフォスタグ電気泳動を組み合わせている。この手法によりより詳細なリン酸化蛋白質解析が可能になった。(3) 質量分析や電気泳動の前処理用の耐圧性リン酸アフィニティーゲル担体を開発した。リン酸化蛋白質を網羅的に濃縮精製するこの手法は、従来のリン酸化プロテオミクスの精度を格段によくするものである。(4) フォスタグとリン酸基の結合により誘導される蛍光共鳴エネルギー移動を利用したリン酸化反応の分析法を開発した。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用したリン酸化ペプチドのフォスファターゼ反応を解析するシステムを構築した。蛍光分子の組み合わせを検討した結果、基質となるリン酸化ペプチドにフルオレッセインを結合した分子と、アミノクマリンを結合したフォスタグの組み合わせるとキナーゼ反応に不可欠な ATP 存在下でも有効な FRET 現象が起きることが明らかになった。それらの蛍光分子の組み合わせに、キナーゼを作用させると、FRET 効率の増加を観察することができた。今後、この蛍光分析システムを、様々なキナーゼ反応の解析に利用することを検討していく予定である。

#### 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 10 件)

① Phos-tag beads as an immunoblotting enhancer for selective detection of phosphoproteins in cell lysates, *Analytical Biochemistry*, 389, 83-85

- (2009), E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike, 査読あり
- ②A Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the dephosphorylation of phosphopeptides, *Analytical Biochemistry*, 388, 235-241 (2009), K. Takiyama, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, Y. Fujioka, Y. Kubo, and T. Koike, 査読あり
- ③Two-dimensional phosphate affinity gel electrophoresis for the analysis of phosphoprotein isotypes, *Electrophoresis*, 30, 550-559 (2009), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, M. Matsubara, Y. Aoki, S. Ohie, Y. Mouri, and T. Koike, 査読あり
- ④Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE, *Nature Protocols*, 4, 1513-1521 (2009), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, 査読あり
- ⑤A mobility-shift detection method for DNA methylation analysis using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 378, 102-104 (2008), E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike, 査読あり
- ⑥Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE, *Proteomics*, 8, 2994-3003 (2008), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, M. Matsubara, S. Yamada, H. Nakamura, Y. Shiro, Y. Aoki, K. Okita, and T. Koike, 査読あり
- ⑦FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway, *Nature Structural & Molecular Biology*, 15, 1138-1146 (2008), M. Ishiai, H. Kitao, A. Smogorzewska, J. Tomida, A. Kinomura, E. Uchida, A. Saberi, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, S. Tashiro, S. J. Elledge, and M. Takata, 査読あり
- ⑧Separation of a phosphorylated-His protein using phosphate-affinity polyacrylamide gel, *Analytical Biochemistry*, 360, 160-162 (2007), S. Yamada, H. Nalkamura, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, and Y. Shiro, 査読あり
- ⑨A single nucleotide polymorphism genotyping method using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis *Analytical Biochemistry*, 361, 294-298 (2007), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, 査読あり
- ⑩Label-free kinase profiling using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis, *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 356-366 (2007), E. Kinoshita-Kikuta, Y. Aoki, E. Kinoshita, and T. Koike, 査読あり
- [学会発表] (計 10 件)
- ①リン酸基親和性電気泳動法を用いたヒスチジン・アスパラギン酸リン酸化タンパク質の定量解析法, 柳原志穂, 木下恵美子, 木下英司, 中神 明, 小池 透, 第 82 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2009. 10. 21
- ②蛋白質リン酸化解析のためのリン酸基親和性 2 次元電気泳動法, 木下英司, 木下恵美子, 小池 透, 第 60 回日本電気泳動学会総会, 長野, 2009. 9. 18
- ③Phos-tag 固定化ポリマーを利用したシグナル伝達解析における選択的蛋白質リン酸化検出のための新技術, 木下英司, 木下恵美子, 小池 透, 日本ヒトプロテオーム機構第 7 回大会, 東京, 2009. 7. 27
- ④フォスタグ結合型新規リン酸基アフィニティービーズを利用した細胞抽出液からのリン酸化蛋白質の分離と精製, 木下英司, 木下恵美子, 山田篤志, 井上知香, 小池 透, 日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会, 大阪, 2008. 7. 29
- ⑤ウエスタンブロッティング膜に転写されたリン酸化蛋白質の検出とダイレクト膜上質量分析, 木下英司, 木下恵美子, 中西 豪, 安藤英治, 古田 大, 網澤 進, 西村 紀, 小池 透, 日本薬学会第 128 年会, 横浜, 2008. 3. 26
- ⑥Phosphate affinity 2-D gel electrophoresis for the analysis of phosphoproteins, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, Y. Aoki, S. Ohie, Y. Mouri, Mamoru Matsubara, and T. Koike, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 2007. 12. 12

⑦遺伝子変異を認識する機能性分子を用いた遺伝子診断技術の開発, 木下英司, 木下恵美子, 由元実希, 小池 透, 第58回日本電気泳動学会総会, 宇部, 2007. 11. 7

⑧リン酸化プロテオーム研究の新戦略, 木下英司, 木下恵美子, 小池 透, 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007. 7. 30

⑨リン酸基結合ナノ分子を利用した新しい二次元電気泳動法の開発, 木下英司, 木下恵美子, 大家志織, 松原 守, 小池 透, 第49回生化学会中四国支部例会, 高知, 2007. 5. 19, 優秀研究発表賞

⑩消化プロセスで生じる創傷治癒ホルモン・リゾホスファチジン酸による消化管組織修復, 田中 保, 堀内 剛, 平野 薫, 徳村 彰, 盛重純一, 小池 透, Mandi Murph, Gordon Mills, 里内清, 第49回生化学会中四国支部例会, 高知, 2007. 5. 19

[図書] (計5件)

①細胞内リン酸化タンパク質を高精度に検出するためのPhos-tagビーズによるサンプル前処理法, 細胞工学, 秀潤社, 28, 938 (2009), 木下英司, 木下恵美子, 小池 透

②Phosphate-affinity Gel Electrophoresis Using a Phos-tag Molecule for Phosphoproteome Study, Current Proteomics, 6, 104 (2009), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike

③リン酸基アフィニティー電気泳動法を利用した遺伝子診断法, 実験医学, 羊土社, 25, 3033 (2007), 木下英司, 木下恵美子, 小池 透

④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, 薬学雑誌, 127, 1897 (2007), 木下英司, 木下恵美子, 小池 透

⑤リン酸基親和性クロマトグラフィーを用いた細胞内のリン酸化タンパク質の網羅的精製, バイオテクノロジージャーナル, 羊土社, 7, 217 (2007), 木下英司, 木下恵美子, 小池 透

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/tkoike/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小池 透 (KOIKE TOHRU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科  
・教授

研究者番号: 90186586

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: