

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：35407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07147

研究課題名(和文) 創薬を指向したハイスループットヒスチジinkinナーゼアッセイ法の創出

研究課題名(英文) Development of high-throughput histidine kinase assay for drug discovery

研究代表者

木下 英司 (Eiji, Kinoshita)

広島文教大学・人間科学部・教授

研究者番号：80304418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はフォスタグに蛍光分子を標識した蛍光フォスタグを合成し、この蛍光フォスタグをゲル染色剤として用いることで、細菌由来のヒスチジンリン酸化タンパク質のリン酸化プロファイリングに成功した。さらに、フォスタグ蛍光ゲル染色剤の1つであるPhos-tag Aquaを用いてブロット膜上のリン酸化タンパク質の検出を試みた結果、ブロット膜上にドットブロットされた細菌由来のヒスチジンキナーゼを選択的に視覚化する方法を開発することに成功した。Phos-tag Aquaを用いたドットブロット染色法は、細菌由来のヒスチジンキナーゼアッセイや細菌のキナーゼ阻害剤の評価に有用であることが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症治療薬について、病原菌特有のヒスチジンキナーゼ阻害薬が、次世代の抗生物質として注目されつつある。しかし、病原菌のヒスチジンキナーゼは化学的に不安定で短寿命なリン酸化タンパク質を生成する性質があり、阻害薬としての候補化合物を検証する方法が限られていた。本研究では、そのような不安定なリン酸化タンパク質を高感度に定量分析するための蛍光標識型分子デバイスを創出し、それを応用することで、病原菌特有のヒスチジンキナーゼ阻害薬を探索すべく多検体処理能力に秀でた高速スクリーニングシステム開発の可能性を証明できたことはとても意義深い。本手法が今後のこの分野におけるブレイクスルーになることを期待する。

研究成果の概要(英文)：The principal investigator newly synthesized several fluorophore-labeled Phos-tag derivatives and succeeded in phosphorylation profiling of histidine-phosphorylated proteins (histidine kinases) derived from bacteria by using the fluorophore-labeled Phos-tag derivatives as gel stains after SDS-PAGE analysis. This novel Phos-tag dye technology is suitable for the quantitative monitoring of histidine- and aspartate-phosphorylated proteins in bacterial signaling systems, and it can be applied directly on SDS-PAGE gels. Furthermore, as a result of attempting to detect phosphorylated proteins on the blot membrane using Phos-tag Aqua, which is one of the Phos-tag fluorescent gel stains, bacterial histidine kinases dot-blotted on the membrane were selectively visualized. This simple dot-blotting method using Phos-tag Aqua developed in this study has been demonstrated to be useful for high-throughput histidine kinase assays and high-throughput screening of bacterial histidine kinase inhibitors.

研究分野：人間栄養学

キーワード：フォスタグ リン酸化タンパク質 ヒスチジンキナーゼ ヒスチジンキナーゼ阻害剤 waldiomycin Phos-tag Aqua ドットブロット法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、細菌に特有の2成分情報伝達分子であるヒスチジンキナーゼを標的とした抗菌薬の探索が国内外で進められている。ヒスチジンのリン酸化を介して生理活性を担うこの分子は、ヒスチジンのリン酸結合の脆弱性のために分析法が限られていた (^{32}P 標識法のみ)。研究代表者らは、独自に開発したリン酸基捕捉分子、フォスタグを用いたヒスチジンキナーゼのリン酸化定量電気泳動法 (Non-RI 法) を考案しており、本法はキナーゼ阻害剤のプロファイリングにも有用である。また、ヒスチジンキナーゼ阻害剤として有能な低分子化合物 (walkmycin, signermycin, waldiomycin 等) も幾つか見出ししている。そこで本研究では、それらを基盤とすることで、薬理面や安全面でさらに優れた抗菌薬をいち早く創成できるような、ハイスループット性を加味した新たなヒスチジンキナーゼアッセイ法を創出する。

2. 研究の目的

(1) コントロールとなる阻害プロファイルの作成

既知のヒスチジンキナーゼ阻害剤の阻害プロファイルを、フォスタグ電気泳動法によって作成する。まず標的とするのは、大腸菌のヒスチジンキナーゼ EnvZ である。EnvZ は多くのヒスチジンキナーゼに共通するドメインのみからなる単純で理想的なサンプルであり、フォスタグ電気泳動法で自己リン酸化の動態を解析した実績もある。既知の阻害剤 (waldiomycin 等) と遺伝子組換え EnvZ を用いて、*in vitro* キナーゼアッセイを行うことで、阻害プロファイルを作成し、以降の実験系の検証のコントロールとする。

(2) 抗リン酸化ヒスチジン抗体を使った化学発光によるリン酸化ヒスチジンキナーゼの検出

電気泳動法よりもスループット性を著しく向上させるため、当初は、ビオチン化フォスタグを使った PVDF 膜上のリン酸化タンパク質検出を試みる予定であった。本法は、チロシン・セリン・スレオニンリン酸化タンパク質の検出については十分な実績があったが、ヒスチジンリン酸化タンパク質の検出には不向きであることがわかった。そこで、その代替として、市販の抗リン酸化ヒスチジン抗体を用いた。電気泳動では1枚のゲルで20検体ほどしか検査できないが、PVDF 膜にキナーゼアッセイ反応液をブロットする方法であれば、ドットブロッターを用いて 96~384 検体を一度に検査できる。化学発光法は一般的に高感度で、検査に使用する EnvZ と、阻害剤ライブラリーにラインナップされた貴重な低分子化合物群の使用量を抑えることが期待できる。一方、 IC_{50} 値算出のために必要な定量性を確保できるかどうかは課題となる。これについては、(1) において作成したコントロールの阻害プロファイルと比較しながら、定量的な阻害プロファイルを作成できる条件を設定する。

(3) 蛍光フォスタグを使った PVDF 膜上のリン酸化ヒスチジンキナーゼの検出

(2) で述べた検出法では、抗リン酸化ヒスチジン抗体のプロービングや複数回の洗浄、化学発光基質との反応等で、時間がかかり、やや面倒である。それを解決するため、定量性に優れた高感度な蛍光分子を標識したフォスタグ誘導体を用いた検出法を試みる。この場合、プロービング直後にイメージアナライザーによる検出を行うだけであり、大幅な時間短縮が図れる。ただ、蛍光フォスタグはゲル染色剤として当時開発中の段階であり、PVDF 膜上で検出できるようにするには、改めて蛍光分子の選定を行う、プロービング条件を検討する等の課題に挑む必要がある。蛍光フォスタグを使った PVDF 膜上のリン酸化ヒスチジンキナーゼの検出が可能となれば、ハイスループット系の確立も十分に期待できる。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

Phos-tag Aqua と PVDF 膜は富士フイルム和光純薬工業株式会社より、BSA、カルボニックアンヒドラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -カゼイン、 β -カゼイン、卵白アルブミン、ペプシン、アルカリフォスファターゼ、ATP、アセチルリン酸は SIGMA より、ABL キナーゼは Merck Millipore より購入した。GST-Abltide, EnvZ, ArcA のタンパク質は以前の論文に従って調整した^{1,2)}。

(2) ドットブロット

PVDF 膜をメタノールに浸した後 TBS に浸し、親水化処理をした。タンパク質溶液、またはキナーゼ反応溶液 2 μL を、ピペットマンを用いて PVDF 膜にドットブロットした。PVDF 膜を完全に乾燥させてからメタノールに浸し、メタノールを 50%含む TBS-T に浸し1時間振とうした。そしてプラスチックバッグの中で PVDF 膜を Phos-tag Aqua 溶液に浸し1時間染色した。その後、PVDF 膜を、メタノールを 50%含む TBS-T で1分洗浄し、蛍光イメージスキャナ FLA-7000 (Cytiva) を用いて蛍光 ($\lambda_{\text{Ex}} = 551 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 564 \text{ nm}$) を検出した。

(3) キナーゼ反応

ABL キナーゼ反応は、20 mM MOPS (pH 7.2), 25 mM β -glycerol phosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM

DTT, 15 mM MgCl₂, 0 あるいは 1 mM ATP, 0.2 μg ABL, 2 μg GST-Abltide を含む 10 μL の溶液中で 30 °C で 30 分行った。EnvZ の自己リン酸化反応は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM KCl, 5.0 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0 あるいは 10 mM ATP, 2 μg EnvZ を含む 10 μL の溶液中 25 °C で 30 分行った。ArcA の自己リン酸化反応は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM KCl, 5.0 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0 あるいは 100 mM アセチルリン酸, 2 μg ArcA を含む 10 μL の溶液中 25 °C で 30 分行った。

4. 研究成果

(1) リン酸化タンパク質ゲル染色法を利用したヒスチジinkinナーゼ阻害剤のスクリーニング³⁾

フォスタグに蛍光分子を標識した蛍光フォスタグは、特に SDS-PAGE のゲル内のリン酸化タンパク質の染色試薬として開発してきた。励起/蛍光波長の違いにより、4 種類の蛍光フォスタグ誘導体を開発した (図 1 A)。一般的な CBB 染色や蛍光ゲル染色法では、酢酸とメタノールを含む酸性溶液中でタンパク質をゲルに固定する。一方、フォスタグ蛍光ゲル染色では、中性溶液を全ての染色ステップで使用する。フォスタグ試薬を用いた蛍光染色では、リン酸化にかかわらず非特異的に検出されるタンパク質もあるが、ゲル染色操作の簡便さから、タンパク質によっては非常に利用価値のある方法である。研究代表者らは、本試薬が大腸菌のヒスチジinkinナーゼである EnvZ, ArcB, EvgS のヒスチジンリン酸化型を選択的に染色することを確認した。そして、これらのヒスチジinkinナーゼとヒスチジinkinナーゼ阻害活性が見出されている抗生物質の waldiomycin を使用して、本蛍光染色試薬がヒスチジinkinナーゼ阻害剤のスクリーニングに適用できるかどうかを検討した。waldiomycin は、薬剤耐性菌にも有効な新規で特異的作用点を持つ抗菌薬のリード化合物として注目されている。その作用機序は、ヒスチジinkinナーゼの 2 量体化に必要な高度に保存された H Box という領域に特異的に結合してヒスチジinkinナーゼを阻害するというものである。

EnvZ, ArcB, EvgS の *in vitro* 自己リン酸化反応に対し 0~1000 μM の waldiomycin を添加し、その反応液を SDS-PAGE で分離後、Phos-tag Cyan 蛍光染色を行った (図 1 B)。リン酸化されたヒスチジinkinナーゼのバンドの蛍光量は waldiomycin の濃度依存的に少なくなった。デンストメトリー解析の結果、IC₅₀ は 20~30 μM と決定された (図 1 C)。本法は電気泳動法を基盤としているため、ハイスループットスクリーニングには適さないが、非常に簡便なスクリーニング法として利用できることが示された。

(2) 抗リン酸化ヒスチジン抗体を利用したヒスチジinkinナーゼ阻害剤のスクリーニング⁴⁾

前述の電気泳動に続くゲル染色法よりもスループット性の高いドットプロット法と抗 N3 リン酸化ヒスチジン抗体を組み合わせたヒスチジinkinナーゼ阻害剤スクリーニング法について述べる。まず、2015 年に初めて発売された抗 N3 リン酸化ヒスチジン抗体について、ヒスチジinkinナーゼのリン酸化が特異的に検出できることを確認した。4 種類のヒスチジinkinナーゼ (EnvZ, WalK, ArcB, EvgS) の自己リン酸化反応液 [ATP (+), ATP (-)] を Phos-tag SDS-PAGE で分離し、抗 N3 リン酸化ヒスチジン抗体によるウェスタン解析を行ったところ、ATP (+) のレーンに見られるシフトアップしたリン酸化型のバンドが特異的に検出された (図 2 A)。これらの反応液を電気泳動で分離せずに、PVDF 膜にドットプロットし、抗 N3 リン酸化ヒスチジン抗体で検出した場合、WalK, ArcB, EvgS については ATP (-) サンプルでも弱いシグナルが検出されたが、EnvZ については ATP (+) のサンプルのシグナルのみが検出された (図 2 B)。次に、

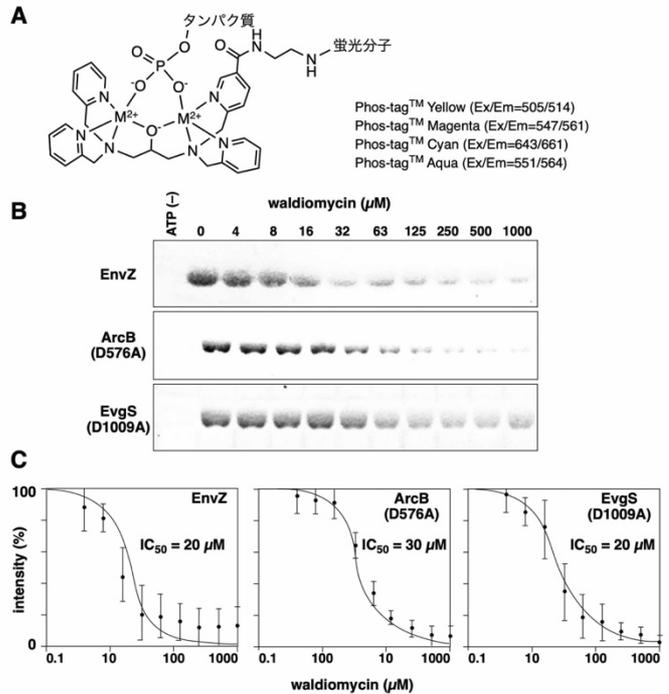


図1 ヒスチジinkinナーゼ阻害剤によるヒスチジinkinナーゼ自己リン酸化反応の阻害プロファイリング

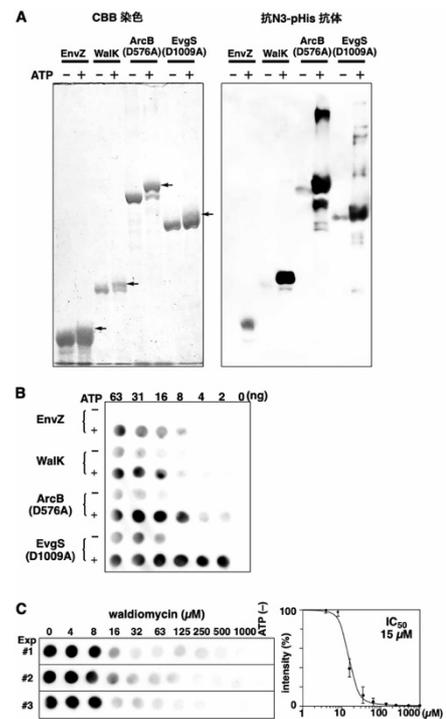


図2 抗体リン酸化ヒスチジン抗体を利用したヒスチジinkinナーゼ阻害剤のスクリーニング

EnvZ をサンプルとして、自己リン酸化反応に対する waldiomycin の阻害効果を、ドットブロットと抗 N3 リン酸化ヒスチジン抗体を用いて調べた (図 2C)。バンドの蛍光強度は waldiomycin の濃度依存的に弱くなり、デンストメトリー解析により IC₅₀ が 15 μM と決定された。大量サンプルを扱えるドットブロッターや自動分注機などを利用することにより、ドットブロット法は、96 や 384 フォーマットに拡大できるため、ハイスループットスクリーニングへの応用も可能であると考えられた。

(3) 蛍光 Phos-tag 誘導体によるブロット膜上のリン酸化タンパク質の定量解析法の開発⁵⁾

① リン酸化タンパク質の特異的染色

非リン酸化タンパク質として BSA, カルボニックアンヒドラーゼ, β-ガラクトシダーゼ, リン酸化タンパク質として α-カゼイン, β-カゼイン, 卵白アルブミン, ペプシンとそれぞれをアルカリフォスファターゼ処理したものを 2000~1ng の範囲でブロットし, Phos-tag Aqua で染色した (図 3 左)。その後, 同じ膜を CBB-R250 で染色した (図 3 右)。リン酸化タンパク質の α-カゼイン, β-カゼイン, 卵白アルブミン, ペプシンが特異的に検出され, 検出限界は, カゼインは 63ng, 卵白アルブミンは 32ng, ペプシンは 16ng だった。同じ膜を CBB-R250 で染色し, 全てのサンプルが正確にブロットされていることを確認した (図 3 右)。この結果より PVDF 膜にドットブロットされたリン酸化タンパク質が Phos-tag Aqua によって特異的に染色されることが示された。

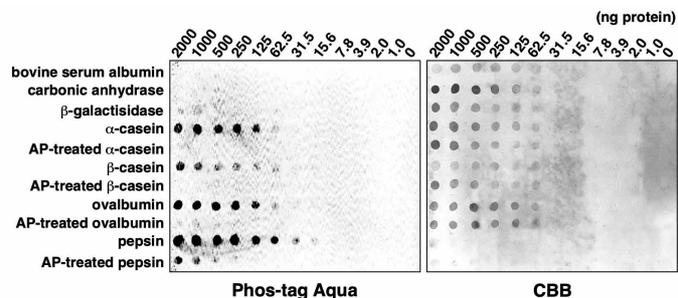


図 3 Phos-tag Aqua を用いたドットブロット方によるリン酸化タンパク質の特異的染色

② ABL キナーゼ反応における基質のチロシンリン酸化検出

チロシンキナーゼ ABL による基質タンパク質 GST-Abltide の *in vitro* リン酸化反応を行い, 反応液をドットブロットし, Phos-tag Aqua で染色した (図 4A)。反応液に ATP を加えたサンプルのシグナルが強く検出され, ATP を加えなかったものはシグナルが検出されなかった。その後, 同じ膜を CBB-R250 で染色し, 両サンプルにタンパク質量の差がないことを確認した。この結果から Phos-tag Aqua 染色によって基質のチロシンリン酸化を特異的に検出できることが示された。

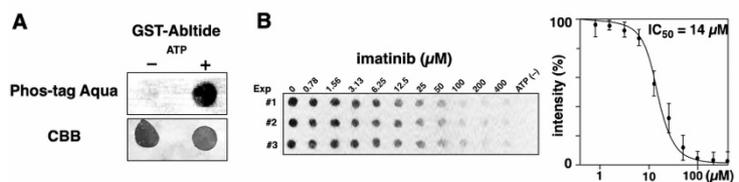


図 4 キナーゼアッセイにおけるチロシンキナーゼの基質リン酸化検出

さらに, 本法の応用として, ABL キナーゼに対するイマチニブの阻害プロファイリングを行った。リン酸化基質のシグナルはイマチニブの濃度依存的に減少し, IC₅₀ は 14 μM と決定された (図 4B)

③ ヒスチジンとアスパラギン酸タンパク質のリン酸化検出

ATP 存在下でヒスチジン残基が自己リン酸化される大腸菌タンパク質 EnvZ, アセチルリン酸存在下でアスパラギン酸が自己リン酸化される大腸菌タンパク質 ArcA について, *in vitro* リン酸化反応を行い, 反応液をドットブロットし, Phos-tag Aqua で染色した (図 5)。反応液にアセチルリン酸を加えたサンプルのシグナルが強く検出され, アセチルリン酸を加えなかったものはシグナルが検出されなかった。その後, 同じ膜を CBB-R250 で染色し, 両サンプルにタンパク質量の差がないことを確認した。この結果から Phos-tag Aqua 染色によってヒスチジンやアスパラギン酸がリン酸化されたタンパク質を特異的に検出できることが示された。

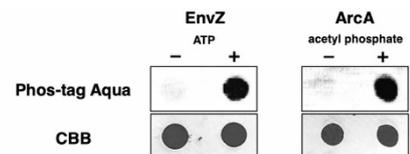


図 5 キナーゼアッセイにおけるヒスチジン及びアスパラギン酸リン酸化タンパク質の検出

本研究では, 蛍光ゲル染色剤として実用化された Phos-tag Aqua を用いて, PVDF 膜にドットブロットされたセリン, スレオニン, チロシン, ヒスチジン, アスパラギン酸残基などがリン酸化されたタンパク質を検出する染色法を開発した。イマチニブの ABL 阻害プロファイリングではリン酸化タンパク質検出における定量性が示された。また, 中性条件下でリン酸化タンパク質を染色できる本手法では, 酸性やアルカリ性で加水分解されやすいヒスチジンやアスパラギン酸残基のリン酸化タンパク質の検出が可能であることを示した。このことは, 近年, 新しい抗生物質のターゲットとして注目されている細菌のヒスチジンキナーゼを阻害する薬剤のスクリーニングに適用できる可能性があることを示唆している。また, 本法は実験操作が簡便で, ブロットされた膜の染色操作は 2 時間半程度で完了する。ドットブロッターや自動分注機器を用いると, 容易に 96 あるいは 384 フォーマットの多検体スクリーニングに適用することも可能である。したがって, Phos-tag Aqua を用いたドットブロット染色法は, キナーゼアッセイやキナーゼ阻害剤の評価に有用である。

【引用文献】

- 1) E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, Y. Eguchi, T. Koike, 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.
- 2) H. Kusamoto, E. Kinoshita-Kikuta, T. Nishimura, T. Nagai, E. Kinoshita, T. Koike, Gel-based analysis of protein phosphorylation status by rapid fluorometric staining using TAMRA-labeled Phos-tag, J. Electrophoresis 63 (2019) 25–32.
- 3) E. Kinoshita-Kikuta, H. Kusamoto, S. Ono, K. Akayama, Y. Eguchi, M. Igarashi, T. Okajima, R. Utsumi, E. Kinoshita, T. Koike, Quantitative monitoring of His and Asp phosphorylation in a bacterial signaling system by using Phos-tag Magenta/Cyan fluorescent dyes, Electrophoresis 40 (2019) 3005–3013.
- 4) E. Kinoshita-Kikuta, S. Maruta, Y. Eguchi, M. Igarashi, T. Okajima, R. Utsumi, E. Kinoshita, T. Koike. An immunodot blot assay for screening histidine kinase inhibitors, Anal. Biol. 600 (2020)113765.
- 5) E. Kinoshita-Kikuta, K. Akayama, E. Kinoshita, T. Koike. A dot-blot-staining method for detecting phosphoproteins with a Phos-tag Aqua fluorescent dye, J. Electrophoresis 64 (2020) 7–10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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, 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 有
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 Tsunehiro Masaya, Sasaki Kenji, Kinoshita-Kikuta Emiko, Kinoshita Eiji, Koike Tohru	4. 巻 1151
2. 論文標題 Phos-tag-based micropipette-tip method for analysis of phosphomonoester-type impurities in synthetic oligonucleotides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography B	6. 最初と最後の頁 122198 ~ 122198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchromb.2020.122198	査読の有無 有
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
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 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 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 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 Kinoshita-Kikuta Emiko, Kinoshita Eiji, Koike Tohru	4. 巻 64
2. 論文標題 Quantitative analysis of phosphoproteins in a bacterial two-component system using Phos-tag techniques	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electrophoresis Letters	6. 最初と最後の頁 35 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/electroph.64.35	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 Sogame Yoichiro, Kojima Katsuhiko, Takeshita Toshikazu, Kikuchi Shiho, Shimada Yuto, Nakamura Rikiya, Arikawa Mikihiro, Miyata Seiji, Kinoshita Eiji, Suizu Futoshi, Matsuoka Tatsuomi	4. 巻 59
2. 論文標題 Analysis of Water-Soluble Proteins by Two-Dimensional Electrophoresis in the Encystment Process of Colpoda cucullus Nag-1 and Cytoskeletal Dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Protozoologica	6. 最初と最後の頁 107 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4467/16890027AP.20.009.13264	査読の有無 有
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 Kusamoto, H., Kinoshita-Kikuta, E., Nishimura, T., Nagai, T., Eiji Kinoshita, Koike, T.	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 Journal of 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 Kinoshita-Kikuta, E., Kusamoto, H., One, S., Akayama, K., Eguchi, Y., Igarashi, M., Okajima, T., Utsumi, R., Eiji Kinoshita, Koike, T.	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, E., Tanikawa, A., Hosokawa, T., Kiwado, A., Moriya, K., Eiji Kinoshita, Koike, T., Utsumi, T.	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 -

〔学会発表〕 計15件(うち招待講演 7件/うち国際学会 0件)

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 木下英司
2. 発表標題 Phos-tag 技術に関する最近のトピックス
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020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（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大川原佑季, 木下英司, 佐藤夏美, 川上隆雄, 大竹則久, 木村鮎子, 長田誠, 林由利子, 藤田清貴, 平野久
2. 発表標題 Phos-tag 対角線電気泳動によるヒト 26S プロテアソームのリン酸化状態の解析
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田実里, 上里裕樹, 森澤啓子, 坂本修士, 木下英司, 木下恵美, 小池透, 亀下勇, 杉山康憲
2. 発表標題 STYK1を介した腫瘍形成に伴うがん悪性化機構の解析
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 木下英司
2. 発表標題 Phos-tag PAGE + ゲル内消化 = 精確なリン酸化部位の同定
3. 学会等名 日本電気泳動学会 タンパク質分析トレーニングコース（招待講演）
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 錯体医療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ーシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下英司
2. 発表標題 Development and Application of Phos-tag Technology for Phosphoproteomics
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会合同大会（招待講演）
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2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下英司
2. 発表標題 リン酸化プロテオミスのためのPhos-tag技術：サンプル前処理技術としての貢献
3. 学会等名 JASISコンファレンス2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下英司
2. 発表標題 Phos-tag電気泳動法の開発と応用
3. 学会等名 第39回キャピラリー電気泳動シンポジウム（SCE2019）－研究を加速させる電気泳動－（招待講演）
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 平野 久，木村鮎子，佐野夏美，長田 誠，木下英司，藤田清貴
2. 発表標題 Phos-tag対角線電気泳動により明らかになったプロテアソームサブユニットのリン酸化状態
3. 学会等名 日本育種学会大137回講演会
4. 発表年 2020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 http://phostag.hiroshima-u.ac.jp/
--

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
研究分担者	江口 陽子 (Eguchi Yoko) (30757422)	近畿大学・生物理工学部・准教授 (34419)	

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
---------	---------