

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390006

研究課題名(和文) 蛍光性リン酸基結合タグ分子を用いたプロテインキナーゼ反応の解析法

研究課題名(英文) Analytical methods for protein kinase profiling by using fluorescent Phos-tag molecules

研究代表者

小池 透 (Koike, Tohru)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：90186586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円、(間接経費) 3,810,000円

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キナーゼ反応の高感度蛍光分析システム、(2) リン酸化タンパク質の蛍光検出・定量システム、(3) リン酸化数やリン酸化部位の異なるリン酸化生体分子(ペプチドや糖類)のリン酸化状態解析法を開発した。本研究で開発した新しいリン酸化化合物の研究手法は、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 fluorescent derivatives, we have developed convenient and reliable methods for the analysis of phosphorylated biomolecules such as peptides and proteins. In this program, we applied the Phos-tag technology to (1) FRET system for kinase/phosphatase profiling using Phos-tag, (2) fluorometric analysis of phosphorylated proteins, (3) analysis of phosphorylation status of multi-phosphorylated biomolecules. We believe that our Phos-tag technology will result in great progress in phosphoproteomics.

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：プロテオミクス キナーゼ フォスファターゼ 蛍光分析 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

ヒトの遺伝子から生み出される蛋白質は何十万種にもなる。それらの機能を明らかにし、複雑な生命現象を制御する蛋白質群の全体像の解明は、次世代の重要な研究課題である。なかでも、リン酸化された蛋白質の機能解析は、癌やアルツハイマー病などの原因究明、治療薬の開発、個別化診断・治療にとって極めて重要である。民間市場調査報告書(2008年)によると、世界の新薬開発プログラムの約30%が蛋白質のリン酸化異常に関わるものである。プロテインキナーゼ(蛋白質リン酸化酵素:ヒトでは500種類以上)が触媒となる蛋白質のリン酸化反応は、時間的および空間的に変化する動的な生体機能調節機構である。それゆえに、発現している全ての蛋白質のリン酸化状態を解析して初めてその全体像が明らかになるのであり、複数の研究方法から得た多くの知見から総合的に理解することが重要である。今後のリン酸化蛋白質の研究には、放射性同位体法(同位体リンの放射線を使う方法)や抗体法(リン酸化蛋白質を抗体で捕まえる方法)などの既存の研究ツールに加え、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研究技術が求められている。

本研究者は、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きた。その研究成果の1つに「脱リン酸化酵素(アルカリフォスファターゼ)の亜鉛二核錯体構造が、基質であるリン酸化分子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)で選択的かつ迅速にリン酸化分子を捕捉する機能性タグ分子(フォスタグ)を開発した。フォスタグ(二核亜鉛錯体)とリン酸アニオンとの親和性($K_d \sim 10^{-8}$ mol/l)はカルボン酸イオンの10000倍以上であり、フォスタグは極めてリン酸基に特異性の高いオリジナルな機能性分子である。

2. 研究の目的

ナノモル濃度のリン酸化分子を選択的に捕捉できる蛍光発色団を有するオリジナルな分子(蛍光性フォスタグ)を用いた新しいリン酸化プロテオーム解析法を開発を目的とする。生体の複雑な試料の中からリン酸化蛋白質を選択的に分離する既存の方法は、リン酸化蛋白質を特異的に捕捉する抗リン酸化抗体を使う免疫沈降法しかない。また、リン酸化ペプチドなどの低分子を捕捉・濃縮するリン酸親和性担体はいくつか市販されているが、いずれもリン酸化分子に対する選択性は低く、また担体からの分離には酸性やアルカリ性の条件と有機溶媒が必要である。一方、フォスタグは、生理 pH の水溶液でリン酸化された高分子や低分子を分解することなく、可逆的かつ選択的に捕捉する機能を持っている。フォスタグのリン酸化分子捕捉能は、抗体に匹敵するものであり、通常の陰イオン交換樹脂と比べて10000倍以上も優れたリン酸基捕捉認識機能を有している。また、リン酸化分子を捕捉したフォスタグに、リン酸イオンを添加すると、速やかな交換反応が起こり、リン酸化分子を簡単にフォスタグから解離させることができる。このようなリン酸化分子に対するフォスタグの迅速かつ可逆的な捕捉能は、リン酸化分子のリアルタイム蛍光検出などに応用できる。また、フォスタグ試薬は化学的に安定な低分子化合物であるため、その合成、保管、取り扱いは、抗体や放射性同位体リン試薬に比べて格段に簡便である。フォスタグ技術は、従来のリン酸化解析技術と比べて、上記のような卓越した新規性・独創性・優位性がある。したがって、本研究が目的とする蛍光性フォスタグを使った新しいリン酸化プロテオーム解析法は、生体内リン酸化蛋白質の機能解析を行っている創薬や診断分野の発展に大きく貢献する研究手法である。

3. 研究の方法

(1) 蛍光共鳴エネルギー移動を起こす蛍光発色団(例:アミノクマリンとフルオレセイン)をフォスタグとキナーゼ基質ペプチドにそれぞれ結合した化合物を合成した後、キナ

ーゼ反応条件やリアルタイム蛍光測定条件を最適化し、キナーゼ反応の解析法を確立する。合成済みのアミノクマリン誘導体は脂溶性が大きいため、反応液に 20%エタノール水溶液を使用しなければならないという欠点がある。そこで、本研究ではフォスタグとアミノクマリンを水溶性のスペーサーで繋いだ新しい蛍光性フォスタグを合成する。さらに、水溶性の他の蛍光発色基の組み合わせ(NBD系、インドシアニン系、ローダミン系)についても検討を行う。合成した蛍光性分子の化学的性質(純度、溶解度、蛍光量子収率、温度や pH の効果、溶媒効果、溶液内安定性、リン酸イオンの添加効果など)を検討する。

(2) リン酸化分子が結合する前後で大きく蛍光量子収率が変化する新規蛍光性フォスタグを開発する。このフォスタグ誘導体を用いて、簡便な操作でリン酸化化合物を検出する蛍光検出法を開発する。蛍光強度変化の大きい蛍光性フォスタグを発色試薬として用いて、電気泳動法や TLC により分離したリン酸化分子(蛋白質、ペプチド、脂質、核酸など)の検出効率を検討する。

(3) 上記で開発した新規蛍光性フォスタグを用いて固相に結合したキナーゼ基質の蛍光分析システムを構築する。マイクロビーズ(活性化末端を有する磁気ビーズ担体など)に基質ペプチドを共有結合した後、キナーゼ反応により生成するリン酸化体をビーズ単位で分析する方法を開発する。

(4) 本研究で開発する蛍光性フォスタグを組み合わせ、脂質や糖類のポリリン酸化反応の分析法への利用を検討する。

4. 研究成果

(1) 蛍光性フォスタグのリン酸化化合物捕捉能と蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理を組み合わせたペプチド基質のリン酸化反応の検出法を開発した。水溶性スペーサーで蛍光色素を結合した新規蛍光性フォスタグの合成とそ

の物性の検討を行った後、FRET法のドナーとしてアミノクマリンおよびフルオレセイン蛍光色素を結合させたフォスタグを、アクセプターとしてカルボキシフルオレセインまたはローダミンでラベルしたペプチド基質を用いて、キナーゼ反応解析法の検討を行った。ペプチド基質のリン酸化の進行に伴い、ドナーとアクセプターの接近に由来する効率的な FRET (50~80%)を確認した。その実験結果を基礎として、リン酸化基質ペプチドの新しいリン酸化定量解析システムを確立した。さらに、リン酸化ペプチド基質のリアルタイム検出によるキナーゼ阻害剤の活性測定法も確立した。

(2) 可視光領域に蛍光を発生するフォスタグとリン酸化基質ペプチド組み合わせたキナーゼ反応の検出法を開発した。さらに、磁気ビーズにフォスタグ分子結合させた新しい機能性分子を作成し、蛍光発色基をもつキナーゼ基質ペプチドを効率よく分離して定量する新しい手法を検討した。本磁気ビーズ法の開発では、水溶性スペーサーを結合した新規フォスタグの合成とその物性の検討を行った後、フルオレセイン蛍光色素を結合させたリン酸化基質とフォスタグとの結合および解離反応速度論を時間分解蛍光分析法で解析した。その結果、 μmol 濃度の稀薄な条件下においても、フォスタグ分子(磁気ビーズ結合型フォスタグや蛍光性フォスタグ)は数秒以内にリン酸化ペプチド基質を捕捉すること、さらに、リン酸緩衝液を用いた生理条件下で、数分以内にほぼ 100%の基質を解離することも明らかとなった。このフォスタグ分子の速度論的な特徴は、リン酸化ペプチド基質のリアルタイム検出に十分応用可能なものである。

(3) 2種類の蛍光性フォスタグを新たに合成し、既存のものと合わせてそれらの機能性(蛍光染色剤やキナーゼ解析試薬としての利用)について検討した。それらの内、ローダミン系のフォスタグ誘導体が最も簡単な操作手順で、効率よくリン酸化タンパ

ク質を選択的に染色することが明らかとなった。さらに、磁気ビーズに固定化したフォスタグと蛍光性基質分子（リン酸化ペプチドやヌクレオチドなど）を用いて、フォスタグに対する様々なリン酸化分子の相対的な親和性順位を初めて測定することに成功した。それらの実験データは、フォスタグを用いたリン酸化分子解析における最適な分析条件を最適化する上で極めて重要なものである。新規蛍光性フォスタグを用いた複数のリン酸基を有する生体分子（リン酸化糖やリン酸化ペプチド）の蛍光エネルギー移動分析法を開発した。この方法では近接するマルチリン酸化分子のみを選択的に定量解析することが可能である。

(4) 上記の蛍光性フォスタグとリン酸化分子の可逆的な結合反応における速度論に関する性質を詳細に検討した結果、フォスタグの亜鉛イオンの配位子（リン酸イオン）の交換速度は、亜鉛キレート剤であるEDTAによる亜鉛イオンの除去速度にくらべて極めて大きい（ミリ秒以内）であることが明らかとなった。さらに、蛍光性フォスタグと消光性置換基を有する新規フォスタグを組合せたビスリン酸化生体分子の解析法に必要な基礎データを得ることもできた。

本研究により開発した蛍光性フォスタグ分子群を用いた上記分析手法は、次世代のリン酸化プロテオームに関する研究現場で即戦力として役立つものである。今後も国内外の学会発表や総説論文によるフォスタグ技術の理解増進、科学試薬企業の協力を通してフォスタグ分析システムの実用化を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Sandwich assay for phosphorylation of protein multiplexes by using antibodies and Phos-tag, *Analytical Biochemistry*, 438, 104-106 (2013), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, 査読あり
doi:10.1016/j.ab.2013.03.029

A Phos-tag-based magnetic-bead method for rapid and selective separation of phosphorylated biomolecules, *Journal of*

Chromatography B, 925, 86-94 (2013), M. Tsunehiro, Y. Meki, K. Matsuoka, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita and T. Koike, 査読あり,

doi:10.1016/j.jchromb.2013.02.039
A Laborsaving, Timesaving, and More Reliable Strategy for Separation of Low-Molecular-Mass Phosphoproteins in Phos-tag Affinity Electrophoresis, *International Journal of Chemistry*, 4, e1-e8 (2012), E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike, 査読あり, doi:10.5539/ijc.v4n5p1

Highly sensitive detection of protein phosphorylation by using improved Phos-tag Biotin, *Proteomics*, 12, 932-937 (2012), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, Y. Sugiyama, Y. Fukada, T. Ozeki, and T. Koike, 査読あり, doi:10.1002/pmic.201100639
Separation and identification of four distinct serine-phosphorylation states of ovalbumin by Phos-tag affinity electrophoresis, *Electrophoresis*, 33, 849-855 (2012), E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike, 査読あり, doi:10.1002/elps.201100518

Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions, *Proteomics*, 12, 192-202 (2012), E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, 査読あり, doi:10.1002/pmic.201100524

A Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the kinase reaction of a substrate peptide, *Analytical Methods*, 3, 1303-1309 (2011), M. Somura, K. Takiyama, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike, 査読あり, doi:10.1039/c1ay05016h

The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated phosphorylation with casein kinase 1 β , *Biochemical Journal*, 472, 489-497 (2010), Y. Sugiyama, N. Hatano, N. Sueyoshi, I. Suetake, S. Tajima, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, and I. Kameshita, 査読あり, doi:10.1042/BJ20091856

A clean-up technology for the simultaneous determination of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a phosphate-capture molecule,

Phos-tag, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 1075-1084 (2010), J. Morishige, M. Urikura, H. Takagi, K. Hirano, T. Koike, T. Tanaka, and K. Satouchi, 査読あり, doi:10.1002/rcm.4484

〔学会発表〕(計8件)

常弘昌弥, 目木勇馬, 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 磁気ビーズの開発, 第 64 回日本電気泳動学会, 2013 年 11 月 15 日, 仙台

E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, Phos-tag Biotin as an on-demand tool for study on protein phosphorylome, 12th HUPO Annual World Congress, 14-18 Sep 2013, Yokohama
木下恵美子, 木下英司, 小池 透, 中性 phos-tag PAGE を用いたタンパク質リン酸化反応の解析, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, 福岡

E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, Phos-tag SDS-PAGE systems for protein phosphorylation profiling under neutral pH, 11th HUPO Annual World Congress, 9-13 Sep 2012, Boston, USA

木下英司, 木下恵美子, 小池 透, Phos-tag Biotin の開発とリン酸化プロテオミクスへの応用, 10th JHUP0, 2012 年 7 月 27 日, 東京

木下英司, 木下恵美子, 小池 透, 改良型 Phos-tag Biotin を用いたペプチドマイクロアレイ解析によるリン酸化反応プロファイリング, 9th JHUP0, 2011 年 7 月 28 日, 新潟

小池 透, リン酸基結合タグ分子 (Phos-tag) を用いたリン酸化生体分子の解析法, 生体機能関連化学部会 若手の会 第 23 回サマースクール, 2011 年 7 月 23 日, 廿日市市

M. Somura, K. Takiyama, T. Nagai, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, Phos-tag fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of phosphorylated molecules, International Chemical Congress of Pacific Basin, 15-20 Dec 2010, Honolulu, USA

〔図書〕(計3件)

Phos-tag Affinity Electrophoresis for Protein Kinase Profiling, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, "Protein Kinase Technologies, Neuromethods" Humana Press, Springer, 68, 13-34 (2012), ISBN: 978-1-61779-823-8

Phos-tag ゲルによるリン酸化タンパク質の分離・同定法, 木下英司, 木下恵美子, 小池 透, 臨床プロテオーム (日本プロテオーム研究会編), 金原出版, 271-274(2012),

ISBN: 978-4-307-00470-1

蛍光性 Phos-tag を用いたタンパク質リン酸化反応の解析法, 木下英司, 木下恵美子, 多幾山敬, 宗村雅男, 小池 透, 生物物理化学, 日本電気泳動学会編, 56, s45-s49 (2012),

doi:10.2198/sbk.56.s45

〔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・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 90186586