

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790037

研究課題名（和文）リン酸親和性電気泳動に基づく蛋白質二重翻訳後修飾の同時検出法の開発とその応用

研究課題名（英文）A method for simultaneous detection of dual post-translational modifications using phosphate-affinity electrophoresis

研究代表者

木下 恵美子（KINOSHITA EMIKO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40379912

研究成果の概要（和文）：

本研究では、申請者らが開発したリン酸親和性電気泳動法(Phos-tag SDS-PAGE)を用いた2次元電気泳動法を基盤とした蛋白質翻訳後修飾の同時検出法の開発を行った。すなわち、蛋白質を1次元目としてSDS-PAGEなどの電気泳動法で分離し、次に2次元目としてPhos-tag SDS-PAGEで分離することによって、「リン酸化とユビキチン化」など、複数の翻訳後修飾に関する解析を1枚のゲルで同時に検出する方法である。

研究成果の概要（英文）：

The researcher developed a method for simultaneous detection of dual post-translational modifications using two-dimensional electrophoresis based on the original principal of phosphate-affinity electrophoresis, Phos-tag SDS-PAGE. By coupling general SDS-PAGE as the first dimension and Phos-tag SDS-PAGE as the second dimension, dual post-translational modifications of cellular proteins, such as phosphorylation and ubiquitination, were detectable simultaneously on the same gel.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：リン酸親和性2次元電気泳動法, Phos-tag SDS-PAGE, 翻訳後修飾, リン酸化, ユビキチン化, β -カテニン, 卵白アルブミン, 蛍光ディフュージョン電気泳動法

1. 研究開始当初の背景

これまでに研究代表者らは、生理条件下でリン酸モノエステルを認識するフォスタグ分子（二核金属錯体）を開発した。また、フォスタグを用いたリン酸化タンパク質解析手

法を開発し、フォスタグテクノロジーとして、国内外の研究者に利用される技術を確立して来た。その中でも、リン酸親和性電気泳動法は多くの研究者に利用される技術となった。本電気泳動法は SDS-PAGE の分離ゲルに

アクリルアミド結合型フォスタグのマンガ
ン錯体を共重合させ、混在する複数の蛋白質
リン酸化異性体を泳動距離の差として検出
する手法である。泳動後に、ウェスタン解析
法が適用できるので、生体試料に含まれる微
量なリン酸化異性体でも高感度に検出でき
る大きな利点をもつ。また、既存の種々のゲ
ル電気泳動法を1次元目の泳動とし、本電気
泳動法を2次元目の泳動として組み合わせる
ことで、より詳細な蛋白質リン酸化状態を
分析できる2次元電気泳動も可能である。本
研究においては、この2次元分離の原理に基
づくリン酸化修飾とそれ以外の翻訳後修飾
の同時検出法、さらには、複合体プロテオミ
クスに対応する3次元展開モニタリング法
に発展できると考え、着想に至った。

2. 研究の目的

ある蛋白質の1種類の翻訳後修飾が分子ス
イッチとして機能することで別の翻訳後修
飾が稼働し、さらにそれらの修飾が複数の蛋
白質群との複合体形成のために必須である
といった細胞内シグナリングが多くの研究
成果より明らかになってきている。複数の蛋
白質翻訳後修飾を同時に検出することは重要
で、これらの翻訳後修飾が誘導する複合体
プロテオームの質的・量的な変動を詳細にモ
ニタリングすることは、種々の細胞現象を分
子レベルで理解するうえで不可欠である。そ
れ故に、蛋白質複合体の個々の構成因子にお
ける複数の化学反応修飾を同時にプロファイ
ルできる、より特異的で、かつ、安定した
分析技法の開発が必要である。従来法では、
それぞれの翻訳後修飾を検出するための抗
体を用いてウェスタン解析を繰り返し行う
必要があった。しかし、この方法では、過剰
な化学反応修飾やその経時的な修飾ステッ
プなど、蛋白質の詳細な翻訳後修飾反応をモ
ニタリングすることは困難である。そこで本
研究では、フォスタグを用いたリン酸親和性
2次元電気泳動法の原理を基盤とした蛋白
質ダブル翻訳後修飾の同時検出法の開発を
行い、蛋白質のリン酸化修飾を軸とした複雑
で多様なネットワークを理解するための高
性能な分析技法を確立することを目的とし
た。

また、より高い分離能力を持つリン酸親
和性電気泳動法を開発することと、上記の二重
翻訳以外にも単独の次元の電気泳動だけ
では得られない情報を得られるような2次元
電気泳動法方法の確立とその解析例を示す
事も目的とした。

3. 研究の方法

(1) リン酸親和性電気泳動法の分離性能の改良

従来のフォスタグマンガ
ン錯体を用いたり

リン酸親和性電気泳動法に対して、ゲル緩衝液、
泳動用緩衝液を変更し、より高い分離能力を
持つリン酸親和性電気泳動法へと改良を試
みた。

(2) 通常の SDS-PAGE 法とリン酸親和性電気泳動法の組み合わせ

(2-1) Wnt シグナルの構成分子であるβ-カ
テニンのユビキチン化とリン酸化の同時検
出を実施検証した(図1)。

β-カテニンは、ポリユビキチン化に続いて
プロテアソーム系で分解される。ポリユビ
キチン化の前段階には特定部位のリン酸化が
必須であることが報告されている。本研究で
は、β-カテニン抗体によるウェスタン検出に
よって、2次元電気泳動後のβ-カテニンの分
離像を検出し、その「リン酸化とユビキチ
ン化」の同時検出を行なった。



図1 リン酸親和性2次元電気泳動法に基づくリン酸化とユビキチン化の同時検出法の具体例
(分子スイッチとしてのリン酸化→ユビキチン化→蛋白質消化システム)

(2-2) 培養細胞内のフォスファターゼを
阻害した場合のタンパク質のリン酸化状態
の変化を、通常の SDS-PAGE 法とリン酸親
和性電気泳動法を組み合わせた2次元電気
泳動における蛍光ディファレンシャル解析
により検討した。

(3) 種々の電気泳動法とリン酸親和性電気泳動法の組み合わせ

1次元目の電気泳動法として種々の既存
の電気泳動法を適用し、リン酸親和性電気
泳動法と組み合わせる事を試みた。それぞ
れの単独の次元の電気泳動のみで得られ
る情報と比較して2次元電気泳動によっ
てどれだけの情報量が増加するかを
実施検証した。

4. 研究成果

(1) リン酸親和性電気泳動法の分離性能の改良

本研究以前に開発したリン酸親和性電気
泳動法は一般的な SDS-PAGE 法である
Laemmli の方法で作成するゲルにフォ
スタグのマン

ガン錯体を共重合させる。しかしながら、このゲルでは、泳動中のゲル内 pH は 9.5 とアルカリ性であるため、フォスタグとリン酸基の親和性において至適条件ではなかった。本研究では、ゲル緩衝液に中性 pH のビストリス-HCl (pH6.8) を適用し、ゲルにはフォスタグの亜鉛錯体を共重合させ、泳動用緩衝液にトリス-モップスを適用することによって中性条件でのリン酸親和性電気泳動を実現し、それによって多くのタンパク質において詳細なリン酸化フォームの分離に成功した (雑誌論文 2)。

(2) 通常の SDS-PAGE 法とリン酸親和性電気泳動法の組み合わせ

(2-1) β -カテニンは、プロテアソーム阻害剤存在下の HEK293 細胞において、ポリユビキチン化され、それは、1次元目の SDS-PAGE で分子量の増加を検出できた。また、2次元目のリン酸親和性電気泳動では、細胞内で恒常的に 10 種類の β -カテニンのリン酸化状態が存在すること、さらにそのうち 2 つのリン酸化状態がポリユビキチン化とプロテアソームによる分解へと導かれることがわかった (図 2)。

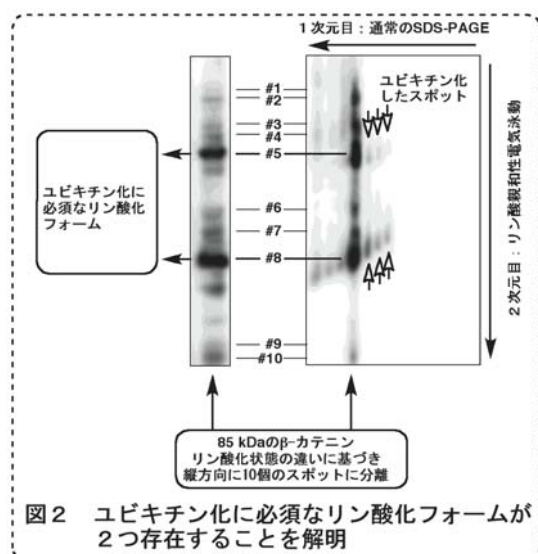


図2 ユビキチン化に必要なリン酸化フォームが2つ存在することを説明

なお、前項 (1) で述べた改良型のリン酸親和性電気泳動では 10 種類のリン酸化状態を検出することができたが、従来の方法では、6 種類しか検出することができず、改良法における分析能力の向上も示した (雑誌論文 2)。

(2-2) HeLa 細胞株において、フォスファターゼ阻害剤を処理した細胞抽出液と処理しない細胞抽出液を調製し、それぞれ異なる蛍光色素である Cy5 と Cy3 で蛍光標識し、混合後、通常の SDS-PAGE 法とリン酸親和性電

気泳動法を組み合わせた 2 次元電気泳動に供した。それぞれの色素によって検出されるスポットの差異を比較 (蛍光ディフレーション解析) したところ、フォスファターゼ阻害剤存在下で高度にリン酸化され、多数のリン酸化状態に分解される細胞内タンパク質、(ヒストン H3, ビメンチン, ケラチン 8, ケラチン 18, ラミン, EF2 など) を同定した (雑誌論文 6)。

(3) 種々の電気泳動法とリン酸親和性電気泳動法の組み合わせ

1 次元目の電気泳動法として多種の手技を適用し、等電点電気泳動法、ネイティブ電気泳動法、ブルーネイティブ電気泳動法を組み合わせる事を試みた。これらは、リン酸基によるものを含めタンパク質の電荷の違いを分離する方法であるのに対し、Phos-tag SDS-PAGE はリン酸基による状態の違いのみを分離する特徴がある。この組み合わせの 2 次元電気泳動により、ニワトリの卵白アルブミンには遺伝的なアミノ酸変異による電荷の違いがあること、またそれらのそれぞれに 4 種類のリン酸化状態が存在することがわかった (雑誌論文 7)。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件) すべて査読あり

- 1) Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E., and Koike T. (2012) Separation and identification of four distinct serine-phosphorylation states of ovalbumin by Phos-tag affinity electrophoresis. Electrophoresis, in press.
- 2) Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Sugiyama Y., Fukuda Y., Ozeki T., and Koike T. (2012) Highly sensitive detection of protein phosphorylation by using improved Phos-tag Biotin, in press.
- 3) Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., and Koike T. (2012) 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.
- 4) 木下英司, 木下恵美子, 小池透 (2012) フォスタグケミストリー, 生物物理化学, 56, s3-s7.
- 5) 木下恵美子, 木下英司, 小池透 (2012) 今後の展望 1 中性条件で泳動を行う改良型 Phos-tag SDS-PAGE を用いたリン酸化タンパク質解析, 生物物理化学, 56, s41-s44.

- 6) 木下英司, 木下恵美子, 多幾山敬, 宗村雅男, 小池透 (2012) 今後の展望 2 蛍光性 Phos-tag を用いたタンパク質リン酸化反応の解析法, 生物物理化学, 56, s45-s49.
- 7) 木下恵美子, 木下英司, 小池透 (2012) プロトコール集 フォスタグテクノロジーを用いたリン酸化タンパク質解析法, 生物物理化学, 56, s51-s75.
- 8) Kinoshita, E. and Kinoshita-Kikuta E. (2011) Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. Proteomics 11, 319-323.
- 9) Somura, M., Takiyama, K., Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita, E., Koike, T. (2011) 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.
- 10) Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Harada N., and Koike T. (2011) Zinc(II)-cyclen polyacrylamide gel electrophoresis for detection of mutations in short Ade/Thy-rich DNA fragments. Analytical Biochemistry, 408, 348-350.
- 11) Kinoshita-Kikuta, E., Yamada, A., Inoue, C., Kinoshita, E., Koike, T (2011) A novel phosphate-affinity bead with immobilized Phos-tag for separation and enrichment of phosphopeptides and phosphoproteins. Journal of Integrated Omics, 1, 157-269.
- 12) Kinoshita-Kikuta E., Kinoshita E. and Koike T. (2010) Monitoring method for the alteration of phosphorylation status in a high-molecular-mass protein using Phos-tag electrophoresis technology. Seikagaku, 82, 857-862.
- よる細胞内キナーゼ/フォスファターゼの動態解析, 第 84 回日本生化学大会, 平成 23 年 9 月 24 日, 国立京都国際会館
- 4) 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蛋白質リン酸化反応プロファイリング, 第 9 回日本プロテオーム学会大会, 平成 23 年 7 月 29 日, 朱鷺メッセ, 新潟
- 5) 木下恵美子, Phos-tag 技術の開発とリン酸化プロテオミクスへの応用. 第 9 回日本プロテオーム学会大会, 平成 23 年 7 月 29 日, 朱鷺メッセ, 新潟
- 6) 木下恵美子, 木下英司, 小池透, 中性ゲルを用いた改良型 Phos-tag SDS-PAGE によるタンパク質リン酸化フォームの詳細な分離解析法. 第 9 回日本プロテオーム学会大会, 平成 23 年 7 月 28 日, 朱鷺メッセ, 新潟
- 7) Masao Somura, Kei Takiyama, Tomomi Nagai, Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, and Tohru Koike, Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of phosphorylated molecules. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 平成 22 年 12 月 16 日, Kamehameha Halls, Honolulu, Hawaii, USA.
- 8) Shiho Yanagihara, Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, and Tohru Koike, Quantitative analysis of the phosphorylation states in a bacterial two-component system using Phos-tag SDS-PAGE. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 平成 22 年 12 月 16 日, Kamehameha Halls, Honolulu, Hawaii, USA
- 9) Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Saori Okatani, and Tohru Koike, Phos-tag SDS-PAGE for protein phosphorylation profiling. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 平成 22 年 12 月 16 日, Kamehameha Halls, Honolulu, Hawaii, USA
- 10) Masao Somura, Kei Takiyama, Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, and Tohru Koike, A Phos-tag-based
- [学会発表] (計 16 件)
- 1) Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, and Tohru Koike, Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of signaling proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions, 第 33 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 16 日, パシフィコ横浜
- 2) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, Phos-tag Biotin の開発とその応用, 第 62 回日本電気泳動学会総会, 平成 23 年 11 月 13 日, 横浜市開講記念会館改良型
- 3) 木下恵美子, 亜鉛-Phos-tag SDS-PAGE に

fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the kinase reaction of a substrate peptide. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 平成 22 年 12 月 9 日, 神戸国際展示場

- 11) Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, and Tohru Koike, Improved Phos-tag Biotin for advanced profiling of protein phosphorylation. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 平成 22 年 12 月 9 日, 神戸国際展示場
- 12) Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, and Tohru Koike, Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 平成 22 年 12 月 9 日, 神戸国際展示場
- 13) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, 高分子量リン酸化蛋白質解析のための改良型 Phos-tag 電気泳動法. 第 61 回日本電気泳動学会総会, 平成 22 年 9 月 19 日, 北海道大学
- 14) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, 蛋白質リン酸化反応を高感度検出するための改良型 Phos-tag Biotin. 第 8 回日本プロテオーム学会大会, 平成 22 年 7 月 27 日, 東京ベイホテル東急
- 15) 宗村雅男, 木下英司, 木下恵美子, 山田篤志, 小池透, 新規リン酸親和性 Phos-tag ビーズを用いたヌクレオチド類の分離精製法. 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会, 平成 22 年 5 月 14 日, 山口大学
- 16) 木下英司, 木下恵美子, 山田篤志, 小池透, 新規リン酸親和性 Phos-tag ビーズを用いたリン酸化タンパク質の分離濃縮法. 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会, 平成 22 年 5 月 14 日, 山口大学

[ホームページ]

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 恵美子 (KINOSHITA EMIKO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科
・助教
研究者番号 : 4 0 3 7 9 9 1 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし