

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590050

研究課題名(和文) 広域分子量タンパク質群のリン酸化動態を追跡できるリン酸基親和性電気泳動ゲルの開発

研究課題名(英文) Development of phosphate affinity electrophoresis system for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses.

研究代表者

木下 恵美子 (Kinoshita, Emiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40379912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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基親和性電気泳動法(フォスタグSDS-PAGE)の原理を基盤として、高分子から低分子にわたる広い分子量範囲のタンパク質のリン酸化状態を解析できる技術の開発を行なった。

200kDa以下のタンパク質解析に適切なゲル緩衝液はBis-Tris-HCl (pH6.8)，それ以上の分子量ではTris-acetate (pH7.0)が適切であると決定した。広範囲の分子量領域の様々な細胞内タンパク質のリン酸化解析を行ったデータを蓄積し、それをWebで公開できるように準備している。

研究成果の概要(英文)：On the basis of the principal of our original phosphate affinity electrophoresis technology (Phos-tag SDS-PAGE)，we have developed a system that permits to separate various cellular proteins with a wide range of molecular masses. A Bis-Tris-buffered gel was optimum for the analysis of phosphoproteins with molecular masses of less than 200kDa. For analyzing high-molecular-mass proteins with more than 200 kDa, on the other hand, a Tris-AcOH-buffered gel was optimum. We are now investigating phosphorylation states of a wide variety of cellular proteins using this system and are in the process of accumulating data to be open to the public on our Web site.

研究分野：物理系薬学

キーワード：リン酸基親和性電気泳動 Phos-tag

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、リン酸モノエステルを特異的に捕捉する機能性分子、フォスタグを用いたリン酸基親和性電気泳動法、「フォスタグ SDS-PAGE」を開発している。これはタンパク質電気泳動用のゲルにアクリルアミド結合型フォスタグを共重合させ、リン酸化タンパク質を可逆的に捕捉しながら泳動するものである。リン酸化数や部位に違いがあればそれぞれを分離したバンドとして検出できる。

本電気泳動法は、2007年にウェスタン解析法との併用による細胞内シグナル伝達分子のリン酸解析法として発表して以来、国内外の研究者に広く利用されてきた。一方この間、申請者はより高い分析能を持つゲルを作成するべく、ゲル泳動バッファー共に組成の改善を行った。そして、ごく最近、フォスタグのリン酸基捕捉能力が最大となる中性 pH で泳動ができる Bis-Tris-HCl (pH 6.8) をゲルバッファーとした「中性フォスタグ SDS-PAGE」を開発した。これにより、泳動中のゲルの pH が 9.5 以上となる Laemmli 法のバッファー系を適用していた従来法よりも、多くのタンパク質の詳細なリン酸化状態の解析が可能となった。

2. 研究の目的

フォスタグ SDS-PAGE を用いて目的のタンパク質のリン酸化状態を分離・検出する重要なコツは、分子量に適合した濃度のポリアクリルアミドゲルを使用することである。分子量が大きいものには、網目構造が大きい低濃度ゲルを適用する。しかし、Bis-Tris ゲルには問題点があり、4% w/v 以下のゲルは十分な分子篩効果を示さない。それは、アクリルアミドのラジカル重合反応において、3級アミンである Bis-Tris が過硫酸アンモニウムの存在下でラジカルとなり、アクリルアミドポリマーの伸長反応を終止させるためである。特に、低濃度ゲルの重合ではその影響が顕著になる。

そこで、低濃度ポリアクリルアミドの重合を阻害しない中性 pH のゲルバッファーを選定することが急務となった。Bis-Tris をゲルバッファーとしたフォスタグ SDS-PAGE では解析が不可能であった 200 kDa を超える巨大タンパク質から、数 kDa の低分子量にいたる広域分子量タンパク質群について、リン酸化状態を解析できるゲルの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 巨大タンパク質のリン酸解析もできる改良型中性フォスタグ SDS-PAGE ゲルの開発

既存の中性フォスタグ SDS-PAGE における Bis-Tris ゲルバッファーに替わるゲルバッファーと泳動用バッファーを選定する上で、これまでに確立された中性 SDS-PAGE を参

考にした。

種々の電気泳動法において、ゲルバッファーは、弱塩基であるアミン化合物と酸の溶液からなる。前述のように、3級アミンである Bis-Tris は高分子量タンパク質を解析するための低濃度ポリアクリルアミドゲルの作成に不向きであった。本研究では、1級、2級アミン(トリズマベース、エタノールアミン類など)で、バッファーとして使用するのに見合うコストで入手できるものを選定して検討した。また、酸はゲルバッファーの pH を中性にすると同時に、酸から生じる陰イオンが電気泳動の先行イオンとなり、その種類の違いはタンパク質の分画分子量範囲に影響をもたらす。塩酸、硝酸、硫酸、酢酸などを検討した。

また、対応する泳動用バッファーは、ゲルバッファーとするアミン化合物と同等かそれ以上の pKa をもつ弱酸と、トリズマベースなどの弱塩基の混合溶液からなる。ゲルバッファーが同じでも泳動用バッファーの違いはタンパク質の分画分子量範囲に影響するため、組み合わせが重要である。Good's バッファー(アミノエタンスルホン酸誘導体)やアミノ酸から選定して検討した。

(2) 分析能の評価

分析能の評価では、1次スクリーニングとして、市販の精製リン酸化タンパク質であるカゼイン(24 kDa)と卵白アルブミン(45 kDa)のリン酸化/非リン酸化型の分解能と分離度を簡便なゲル染色法を用いて調べた。既存の中性フォスタグ SDS-PAGE と同等以上の能力があることを評価の基準とする。次の2次スクリーニングとして 200 kDa 超の巨大細胞内タンパク質におけるリン酸化フォーム検出の可否を調べた。また、数 kDa から 200 kDa までの範囲の細胞内タンパク質で1次スクリーニングと同様の評価を行った。細胞内タンパク質の検出には、ウェスタン解析法を用いた。

4. 研究成果

(1) 最適なゲル緩衝液の決定

高分子量解析のための低濃度ゲルを作成するため、既存の中性フォスタグ SDS-PAGE における Bis-Tris ゲルバッファーに替わるバッファーを検討した。その結果、Tris-HCl (pH 7.0)あるいは Tris-acetate (pH 7.0)をゲルバッファーとして適用することによって、Bis-Tris ゲルと同等の分離能を持ちながら、低濃度ゲルを用いた高分子量タンパク質のリン酸解析を実現した。泳動用緩衝液はまた、同じ中性条件でも、各バッファー使用時のタンパク質リン酸化状態の分離パターンが異なる例があることを明らかにした。一例として細胞内シグナル伝達分子である Erk1/2がある(学会発表1, 5, 7)。

(2) プレキャストゲルを用いた低い分子量領域の詳細解析法の開発

和光純薬工業株式会社から2012年12月に発売されたプレキャスト中性フォスタグ SDS-PAGEゲル「SuperSep Phos-tag」において、比較的分子量のタンパク質であるヒストン H3 (15 kDa)や10 kDa以下のペプチドのリン酸化状態の解析に有効であることを発表した。(雑誌論文2, 学会発表4, 20)

(3) Bis-tris-HClゲル、Tris-HClゲル、Tris-acetateゲルの分離能の比較

Bis-tris-HClゲルと、Tris-HClあるいはTris-acetateゲルのリン酸化タンパク質分離能に本当に差異がないのかどうかを検討した。市販されている標品タンパク質のリン酸化型、脱リン酸化型の移動度だけを比較するのではなく、様々な細胞内タンパク質の抗体を用いて、広い分子量範囲において、調べた結果、10~200 kDaの多くのタンパク質において、Bis-Tris-HClゲルのほうが分離能が優れていることがわかった。このことから、Tris-HClあるいはTris-acetateゲルは、Bis-Tris-HClゲルでは不可能な高分子領域の解析に有効ではあるが、200kDa以下では、Bis-Tris-HClゲルの使用を推奨するという指針を示した。

(4) 中性フォスタグSDS-PAGEで解析できないタンパク質の事例の発見

中性で行うフォスタグSDS-PAGEは、多くのタンパク質のリン酸化解析において、アルカリ性で行うSDS-PAGEよりも有効であるとしていたが、アルカリ性条件でしか分離が不可能なタンパク質が存在することを発見した。それは、バクテリアのヒスチジンキナーゼのEvgS, ArcB, BarAなど、ハイブリッドヒスチジンキナーゼと呼ばれるタンパク質のヒスチジンがリン酸化したものに特異的な現象であった。(雑誌論文 8, 学会発表 2, 9, 10, 12, 13, 15)

(5) 様々な分子量のタンパク質のリン酸化解析とそのデータ蓄積

現在、これまでに得た知見を利用して、広域分子量に渡るできるだけ多くのタンパク質についてのフォスタグ電気泳動パターンを収集、データベース化するための準備をおこない、データの蓄積に努めている。多くの研究者にフォスタグSDS-PAGEを利用したリン酸化解析を認知し、さらに使用していただけるよう、それらのデータをWebで公開できるよう準備している。

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16件)

(1) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. (2015) The cutting edge of affinity electrophoresis technology Proteomes. 3, 42-55. (査読有)

(2) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. (2015) Neutral phosphate affinity SDS-PAGE system for profiling of protein

phosphorylation Methods Mol. Biol. 1295, 323-354. (査読有)

(3) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Shiba, A., Edahiro, K., Inoue, Y., Yamamoto, K., Yoshida, M., and Koike, T. (2014) Profiling of protein thiophosphorylation by Phos-tag affinity electrophoresis: evaluation of adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) as a phosphoryl donor in protein kinase reactions. Proteomics, 14, 668-679. (査読有)

(4) Fujioka, H., Tsunehiro, M., Kawaguchi, M., Kuramoto, Y., Kurosaki, H., Hieda, Y., Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Koike, T. (2014) Simple enrichment of thiol-containing biomolecules by using zinc(II)-cyclen-functionalized magnetic beads. J. Sep. Sci. 37, 1601-1609. (査読有)

(5) Kinoshita-Kikuta, E., Kurosaki, H., Kunisada, N., Eiji Kinoshita, Koike, T. (2014) A Phos-tag-based fluorescence quenching system for activity assay and inhibitor screening for alkaline phosphatase. Am. J. Anal. Chem. 5, 796-804. (査読有)

(6) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Matsuda, A., Koike, T. (2014) Tips on improving the efficiency of electrotransfer of target proteins from Phos-tag SDS-PAGE gel. Proteomics, 14, 2437-2442. (査読有)

(7) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Koike, T. (2014) Identification of two phosphorylated species of β -catenin involved in the ubiquitin-proteasome pathway by using two-dimensional Phos-tag affinity electrophoresis. J. Electrophoresis, 58, 1-4. (査読有)

(8) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. (2014) Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome Biochim. Biophys. Acta. 1854, 601-608. (査読有)

(9) 木下英司, 木下恵美子, 小池透 (2014) アフィニティー電気泳動技術の最前線. ぶんせき, 7, 365-371. (査読有)

(10) Tsunehiro, M., Meki, Y., Matsuoka, K., Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Koike, T. (2013) Phos-tag-based magnetic-bead method for rapid and selective separation of phosphorylated biomolecules. J. Chromatogr. B, 925, 86-94. (査読有)

(11) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T. (2013) Sandwich assay for phosphorylation of protein multiplexes by using antibodies. Anal. Biochem. 438, 104-106. (査読有)

(12) Tsunehiro, M., Meki, Y., Matsuoka, K., Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Koike, T. (2013) A Phos-tag-based magnetic-bead method for rapid and selective separation of phosphorylated biomolecules. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. 925, 86-94. (査読有)

- (13) Fujioka, H., Hieda, Y., Kuramoto, Y., Konishi, K., Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike T. (2013) Increase in lipophilicity of enalaprilat by complexation with copper(II) or zinc(II) Ions. *Yakugaku Zasshi*, 33, 1135-1141. (査読有)
- (14) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T. (2013) Phos-tag-based microarray techniques advance phosphoproteomics. *J. Proteomics Bioinform.* S6, 8. (査読有)
- (15) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, (2013) タンパク質リン酸化修飾の高感度検出法と新しいオミクス技術としての展開. *生化学* 85, 447-552. (査読有)
- (15) Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, E. Koike, T. (2012) Highly sensitive detection of protein phosphorylation by using improved Phos-tag Biotin. *Proteomics*, 12, 932-937. (査読有)
- (16) Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, E. Koike, T. (2012) A laborsaving, timesaving, and more reliable strategy for separation of low-molecular-mass phosphoproteins in Phos-tag affinity electrophoresis. *International Journal of Chemistry*, 4, 1-8. (査読有)

〔学会発表〕(計21件)

- (1) 木下英司, 木下恵美子, 小池透. Phos-tag SDS-PAGEゲルからの標的タンパク質の転写効率を改善させる秘訣. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, 横浜市
- (2) 脇本理恵子, 木下恵美子, 木下英司, 小池透. SuperSep Phos-tag を用いた低分子量リン酸化タンパク質の解析. 第65回日本電気泳動学会総会, 2014年10月25日, 横浜市
- (3) 小西華那世, 木下恵美子, 木下英司, 小池透. 銅および亜鉛キレート形成によるACE阻害剤エナラプリラトの脂溶性増加. 第65回日本電気泳動学会総会, 2014年10月25日, 横浜市
- (4) 河口真歩, Yuan Tianfei Elena, 藤岡晴人, 木下恵美子, 木下英司, 小池透. チオール含有生体分子を分離・濃縮するための亜鉛サイクレン磁気ビーズの開発. 日本プロテオーム学会2014年会, 2014年07月18日, つくば市
- (5) 藤岡晴人, 稗田雄三, 常弘昌弥, 木下恵美子, 木下英司, 小池透. 亜鉛サイクレン磁気ビーズを用いたチオール化合物の精製. 日本薬学会第134年会, 2014年03月29日, 熊本市総合体育館, 熊本市
- (6) 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磁気ビーズの創製. 修飾シグナル病 第3回 公開シンポジウム, 2014年01月25日, 東京大学医科学研究所, 東京
- (7) 枝廣圭祐, 芝 晃生, 井上裕希, 木下恵美子, 木下英司, 小池透. ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼにおけるリン酸基転移反応の制御機構解析. 修飾シグナル病 第3回

- 公開シンポジウム, 2014年01月25日, 東京大学医科学研究所, 東京
- (8) 目木 勇馬, 木下 恵美子, 木下 英司, 小池 透. 近接Phos-tagゲルを用いたリン酸化タンパク質の電気泳動法. 第64回日本電気泳動学会総会, 2013年11月16日, 東北福祉大学ステーションキャンパス, 仙台市
- (9) 枝廣 圭祐, 芝 晃生, 井上 裕希, 木下 恵美子, 木下 英司, 小池 透. ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼにおけるリン酸基転移反応の制御機構解析. 第64回日本電気泳動学会総会, 2013年11月16日, 東北福祉大学ステーションキャンパス, 仙台市
- (10) 芝 晃生, 枝廣 圭祐, 井上 裕希, 木下 恵美子, 木下 英司, 小池 透. ヒスチジン, アスパラギン酸のタンパク質リン酸化解析におけるチオリン酸基供与体(ATP-gammaS)利用の有用性の検討. 第64回日本電気泳動学会総会, 2013年11月16日, 東北福祉大学ステーションキャンパス, 仙台市
- (11) 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総会, 2013年11月16日, 東北福祉大学ステーションキャンパス, 仙台市
- (12) Keisuke Edahiro, Akio Shiba, Emiko Kinoshita-Kikuta, Yuki Inoue, Eiji Kinoshita, Tohru Koike. Quantitative analysis of the phosphorylation state of a hybrid histidine kinase in bacterial two-component system by using phosphate-affinity SDS-PAGE. HUPO 12th Annual World Congress (HUPO2013), 2013年09月16日, パシフィコ横浜, 横浜市
- (13) Akio Shiba, Keisuke Edahiro, Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, Tohru Koike. Quantitative analysis of effects of pH on the stability of His- and Asp-phosphoproteins in bacterial two-component system by using phosphate-affinity SDS-PAGE. HUPO 12th Annual World Congress (HUPO2013), 2013年09月16日, パシフィコ横浜, 横浜市
- (14) Masaya Tsunehiro, Yuma Meki, Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, Tohru Koike. Rapid and selective separation of phosphorylated biomolecules by using a Phos-tag-based magnetic bead method. HUPO 12th Annual World Congress (HUPO2013), 2013年09月16日, パシフィコ横浜, 横浜市
- (15) Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, and Tohru Koike. Phosphorylation profiling of MAPK signaling cascade proteins by using neutral Phos-tag SDS-PAGE. HUPO 12th Annual World Congress (HUPO2013), 2013年09月16日, パシフィコ横浜, 横浜市
- (16) Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Tohru Koike. Phos-tag Biotin as an on-demand tool for study on protein phosphorylation. HUPO 12th Annual World Congress (HUPO2013), 2013年09月16日, パシフィコ横浜, 横浜市

(17) 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生成するためのPhos-tag磁気ビーズの創製. 第85回日本生化学会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡

(18) 芝 晃生, 枝廣 圭祐, 木下恵美子, 木下英司, 小池 透. 中性Phos-tag SDS-PAGE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解析. 第85回日本生化学会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡

(19) 木下恵美子, 木下英司, 小池 透. 中性Phos-tag SDS-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, 2012年12月15日, 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡

(20) 木下恵美子, 木下英司, 小池 透. 中性亜鉛 Phos-tag プレキャストゲル (SuperSep Phos-tag) を用いたリン酸化タンパク質の解析. 第63回日本電気泳動学会, 2012年08月21日, 沖縄コンベンションセンター

(21) 木下恵美子, 木下英司, 小池 透. 中性Phos-tag SDS-PAGEを用いたタンパク質リン酸化反応の解析. 第10回日本プロテオーム学会大会, 2012年07月25日, 東京科学未来館

〔図書〕(計3件)

(1) Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, E. Koike, T. (2012) Phos-tag affinity electrophoresis for protein kinase profiling. in *Protein Kinase Technology, Neuromethods*, 68, (ed. by Mukai, H); Springer, New York, 13-34.

(2) 木下英司, 木下恵美子, 小池透 (2012) Phos-tag ゲルによるリン酸化タンパク質の分離・同定法. 臨床プロテオミクス~バイオマーカー探索から個別化医療へ 金原出版, 271-274.

(3) Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, E. Koike, T. (2012) Gel-based methods using DNA-binding zinc(II) complexes for the detection of DNA mutations. in *DNA Replication and Mutation* (ed. by Leitner, RP); Nova Science Publishers, New York, 91-111.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:

権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
広島大学大学院医歯薬保健学研究院医薬分子機能科学研究室
<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・医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号: 40379912

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: