

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293005

研究課題名(和文) 網羅的リン酸化タンパク質解析のための3次元電気泳動イメージング技術の構築

研究課題名(英文) Technique of 3-DE imaging for the analysis of protein phosphorylation

研究代表者

木下 英司 (Kinoshita, Eiji)

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：80304418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らが独自に開発したリン酸化タンパク質分離解析のためのリン酸親和性電気泳動法、フォスタグSDS-PAGEを3次元電気泳動法に適用させた。3次元目の電気泳動としてフォスタグ電気泳動を行うことによって、タンパク質翻訳後修飾の詳細な分離分析が可能となった。さらには、蛍光ディファレンシャル電気泳動に応用することにより、複数の細胞内タンパク質のリン酸化種を高感度に検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the researcher has applied a method of phosphate affinity gel electrophoresis, Phos-tag SDS-PAGE that was originally developed for the separation analysis of phosphoprotein species, to a three-dimensional electrophoresis (3-DE) procedure. The use of the procedure of Phos-tag SDS-PAGE as three-dimensional electrophoresis permitted us to analyze the post-translational modification of proteins including protein phosphorylation and ubiquitination. By coupling with fluorescence difference gel electrophoresis, furthermore, the novel 3-DE procedure permitted highly sensitive detections of phosphorylated species of multiple intracellular proteins.

研究分野：物理系薬学

キーワード：フォスタグ リン酸化 翻訳後修飾 電気泳動 生物物理化学

1. 研究開始当初の背景

筆者はこれまでに、リン酸モノエステルを特異的に捕捉する機能性分子、フォスタグを利用したリン酸親和性電気泳動法を開発している。これはアクリルアミド結合型フォスタグを共重合させたゲルを用いて、タンパク質のリン酸化状態の違いを移動度の差で検出する電気泳動法である。この手法においては、リン酸化タンパク質はゲルに固定されたフォスタグと可逆的な結合を繰り返しながら泳動するためその移動が遅れ、泳動像としては相当する非リン酸化タンパク質よりもシフトアップする。同一タンパク質において、リン酸化アミノ酸残基数が同じでも部位が異なる場合には、移動度の異なるバンドして検出できる。このフォスタグ SDS-PAGE は、2006年の公表以来、数年間で国内外の多くの研究者に利用され多数の重要な研究成果に寄与した。筆者らも「細胞内において、ある1つのタンパク質は複数のリン酸化状態で存在し、その存在比は必ずしも一定ではなく、細胞のおかれる環境に応じて刻一刻と変化し、そのようにして生じたリン酸化状態の異なるタンパク質種にはそれぞれ固有の機能が備わっている」ことをこの手法によって明らかにしてきた。

あるタンパク質のリン酸化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タンパク質群との複合体形成のために必須であるといった複数の翻訳後修飾によるシグナルネットワーク制御が多くの研究成果より明らかになってきている。通常の2次元電気泳動法では、等電点や分子量の変化が伴う様々な翻訳後修飾とリン酸化修飾とを区別して検出することは困難である。本研究において、フォスタグ SDS-PAGE をリン酸化に特化した3次元目の分離軸として確立できれば、リン酸化とそれに関わる他の修飾やその反応プロセスなど、分子全体の翻訳後修飾の動態の同時解析が可能になる。また、多数のタンパク質分子を同一ゲル内で解析する手法であるので、リン酸化に関わる複合体形成など、システム化された細胞内の「リン酸化ワールドとシグナルネットワーク」を一度に分析でき、リン酸化タンパク質の機能に関する知見を従来の各論から網羅的な理解へと発展できると考え、着想に至った。

2. 研究の目的

筆者は、2次元電気泳動法をさらに発展させ、独自に開発したフォスタグ SDS-PAGE の原理を組み合わせ、「タンパク質のリン酸化状態」という3つ目の独立した要素による分離を加えた新しい3次元軸の構築を提案する。究極的な目標は、フォスタグ SDS-PAGE を3次元軸として取り入れた立体ゲルとその電気泳動法の顕在化である。生体内で様々なリン酸化状態の混在するタンパク質が立体ゲル空間へと展開されれば、従来までの平面分離のみと比較してその情報量は飛躍的に増大する

ことが見込まれる。本研究では、新技術の顕在化までのプロセスとして、以下の5つの項目を遂行し、立体ゲルと3次元電気泳動法の有用性を立証する。

① リン酸化修飾と他の翻訳後修飾の同時検出を視野に入れた3次元解析データを蓄積する。タンパク質のリン酸化とそれに関わる他の修飾、またその反応プロセスなど、分子全体の翻訳後修飾の動態の同時解析が可能になることを証明することで、本技術の有用性を立証する。

② 高次複合体プロテオームの質的・量的ダイナミクスの解明を視野に入れた3次元モニタリング法を確立する。リン酸化に関わる複合体形成など、複数のタンパク質分子のダイナミクスを同一ゲル内で解析が可能になることを証明することで、本技術の有用性を立証する。

③ 分離・分解能向上のためのアクリルアミド結合型誘導体の新規合成を行い、改善されれば新たな分子デバイスとして顕在化させる。

④ 3次元蛍光ディファレンシャル解析法の確立を視野に入れたリン酸化ディファレンシャルデータを蓄積する。3次元展開ゲルにおいて、生理的・病理的状態の異なるサンプル間のリン酸化ディファレンシャル解析を行い、その検出の感度や頻度に関するデータを蓄積し、3次元蛍光ディファレンシャルイメージングの有用性を立証する。

⑤ フォスタグ立体ゲルのプロトタイプとそれを利用した電気泳動法の開発を行う。

3. 研究の方法

① リン酸化修飾と他の翻訳後修飾の同時検出を行うための3次元電気泳動解析

フォスタグ SDS-PAGE を3次元軸とした泳動像は、従来の2次元平面ゲルを分子量方向・等電点方向・分子量/等電点方向に平行な短冊状に切り取り、フォスタグ SDS-PAGE のゲルの上部に接着して泳動することによって得られる。

② 高次複合体プロテオームの質的・量的ダイナミクスの解明を行うための3次元電気泳動解析

①項において分子量方向、あるいは等電点方向で解析され得るタンパク質の多重翻訳後修飾は、多くの場合、複合体形成に深く関わっている。2次元電気泳動ゲル上には、その複合体の構成因子が展開されているはずであるので、フォスタグ SDS-PAGE による網羅的な3次元展開ができれば、複合体構成因子全てのリン酸化と翻訳後修飾の状態が一度に解明できることになる。さらに①項では、2次元展開の要素は分子量と等電点であったが、高次複合体プロテオーム解析を視野に入れた場合、ブルーネイティブ電気泳動(生体内の複合体を未変性で分離)と SDS-PAGE (分子量)を2次元展開の要素とし、3次元目にフォスタグ SDS-PAGE を導入することも有用である。このように起点となる2次元平面ゲル

を適宜応用することで、3次元電気泳動を高次複合体プロテオームのダイナミクス解析法として確立し、その有用性を立証する。

③ 3次元蛍光ディファレンシャル解析法の確立

①と②項に共通して、2次元展開よりも詳細で微量なタンパク質スポットの分離が実現することが予想されるため、可視化の手段として高感度なタンパク質蛍光標識法を採用する。これは、立体ゲル空間において染色等の作業を経ずにタンパク質をスキャニングするためにも最善の手法である。蛍光標識試薬にはバラエティがあるので、生理的な状態の異なる（例えば、正常細胞と癌細胞など）サンプルを異なる蛍光色素で標識し、リン酸化状態に関する質的・量的差異を同一ゲルで解析するための3次元蛍光ディファレンシャル解析法にも発展させる。3次元での網羅的なリン酸化ディファレンシャルイメージングが可能になれば、疾病に特異的なリン酸化亢進タンパク質（リン酸化バイオマーカー）の発見などが期待できる。本研究では、3次元展開ゲルにおいて、生理的・病理的な状態の異なるサンプル間のリン酸化ディファレンシャル解析を行い、その検出の感度や頻度に関するデータを蓄積し、3次元蛍光ディファレンシャルイメージングの有用性をシミュレーションする。具体的な実験手順は、既に申請者が開発しているリン酸親和性蛍光ディファレンシャル2次元電気泳動法の原理を応用し、蛍光はシアニン色素（CyTMDye, GEヘルスケア社製）を用い、標識法は色素のマレイミド基を介したサチュレーションラベル法を採用して検討する。

④ フォスタグ立体ゲルのプロトタイプとそれを利用した電気泳動法の開発

リン酸親和性トラップゲル電気泳動転写法は既存のウェスタン解析用の転写装置を用い、原理としては3次元電気泳動法と類似ではあるが、フォスタグゲルが薄い平面（厚さ2mm以内）であるため、現時点の技術ではリン酸化状態の異なるリン酸化タンパク質フォームをそれぞれ分離するのではなく、まとめてトラップすることを目的としている。リン酸化タンパク質は拡散することなく上方から下方に垂直に電気泳動的に転写され、フォスタグゲル内にトラップされる。一方、非リン酸化タンパク質はフォスタグゲルを通過する。トラップされたリン酸化タンパク質は質量分析法によって高感度に同定等の解析が可能となる。このフォスタグゲルの厚みを既存の装置で分析できる限界までに拡大させた立体ゲルを作成し、その立体ゲル空間において蛍光標識されたタンパク質フォームの分離分析が可能な条件を見出すことで、3次元電気泳動用ゲルのプロトタイプとその手法を開発する。

4. 研究成果

リン酸化修飾と他の翻訳後修飾の同時検出を行うための3次元電気泳動解析を指向した結

果を示す（Fig. 1）。ブルーネイティブ電気泳動したタンパク質群を含むゲルより切断し、それをSDS-PAGE、さらにはフォスタグ SDS-PAGEへと3次元展開させた。フォスタグ SDS-PAGEによりリン酸化分子種が縦軸方向に分離され、そのリン酸化分子種より横軸方向にリン酸化分子種が分離検出されている。これはリン酸化修飾後に起こるユビキチン就職に由来するタンパク質と考えられた。

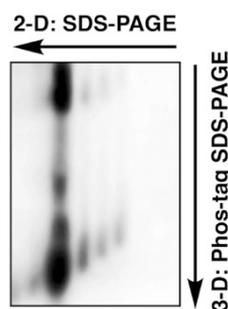


Fig. 1

さらには、3次元蛍光ディファレンシャルイメージングへの応用を試みた。方法にも記したようにGEヘルスケア社製のシアニン色素を用い細胞内タンパク質群をラベル化した。Fig. 1の結果と同様に、最終的にフォスタグ SDS-PAGEによる3次元イメージングをFig. 2に示した。

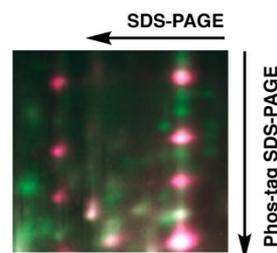


Fig. 2

最後にリン酸親和性トラップゲル電気泳動転写法としてのアッセイ法の検証を行った。問題点は標的となるリン酸化タンパク質の転写効率・タンパク質試料の解析量となる。Fig. 3で示したスキームのアッセイ系を確立した。3次元蛍光ディファレンシャルにおけるこのアッセイ系については、今後のさらなる展開に期待したい。

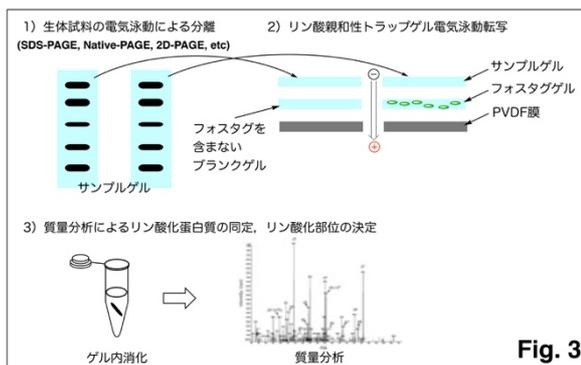


Fig. 3

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12件）

- (1) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Karata, K., Kawano, T., Nishiyama, A., Yamato, M., and Koike, T. Specific glutamic acid residues in targeted proteins induce exaggerated retardations in Phos-tag SDS-PAGE migration. *Electrophoresis*. **38**, 1139–1146 (2017). 査読有

- (2) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Kubota, Y., Takekawa, M., Koike, T. A Phos-tag SDS-PAGE method that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1. *Proteomics* **16**, 1825–1836 (2016). 査読有
- (3) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Eguchi, Y., Koike, T. Validation of *cis* and *trans* modes in multistep phosphotransfer signaling of bacterial tripartite sensor kinases by using Phos-tag SDS-PAGE. *PLoS One* **11**, e0148294 (2016). 査読有
- (4) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochim. Biophys. Acta* **1854**, 601–618 (2015). 査読有
- (5) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. The cutting edge of affinity electrophoresis technology. *Proteomes* **3**, 42–55 (2015). 査読有
- (6) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Eguchi, Y., Yanagihara, S., Edahiro, K., Inoue, Y., Taniguchi, M., Yoshida, M., Yamamoto, K., Takahashi, H., Sawasaki, T., Utsumi, R., Koike, T. Functional characterization of the receiver domain for phosphorelay control in hybrid sensor kinases. *PLoS One* **10**, e0132598 (2015). 査読有
- (7) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Matsuda, A., and Koike, T. Tips on improving the efficiency of electrotransfer of target proteins from Phos-tag SDS-PAGE gel. *Proteomics* **14**, 2437–2442 (2014). 査読有
- (8) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. 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 (2014). 査読有
- (9) Kinoshita-Kikuta, E., Kurosaki, H., Kunisada, N., Eiji Kinoshita, and Koike, T. A Phos-tag-based fluorescence quenching system for activity assay and inhibitor screening for alkaline phosphatase. *Am. J. Anal. Chem.* **5**, 796–804 (2014). 査読有
- (10) Fujioka, H., Tsunehiro, M., Kawaguchi, M., Kuramoto, Y., Kurosaki, H., Hieda, Y., Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Simple enrichment of thiol-containing biomolecules by using zinc(II)-cyclen-functionalized magnetic beads. *J. Sep. Sci.* **37**, 1601–1609 (2014). 査読有
- (11) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Shiba, A., Edahiro, K., Inoue, Y., Yamamoto, K., Yoshida, M., and Koike, T. 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 (2014). 査読有
- (12) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Sandwich assay for phosphorylation of protein multiplexes by using antibodies and Phos-tag. *Anal. Biochem. Anal. Biochem.* **438**, 104–106 (2013). 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
- (1) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, フォスタグ技術とプロテオミクス情報を活用した細胞内 MEK1 リン酸化ダイナミクスのプロファイリング, 第 137 回日本薬学会年会, 2017 年 3 月 25 日, 仙台国際センター, 仙台
- (2) 木下英司, 木下恵美子, 久保田裕二, 武川睦寛, 小池透, フォスタグ技術とプロテオミクス情報を活用した細胞内 MEK1 リン酸化ダイナミクスのプロファイリング, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜, 横浜市
- (3) 木下英司, 木下恵美子, 江口陽子, 小池透, 大腸菌ハイブリッドセンサーキナーゼにおけるリン酸基転移反応様式の検証, 第 89 回日本生化学大会, 2016 年 9 月 25 日, 仙台国際センター, 仙台
- (4) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T., Phos-tag SDS-PAGE methodology that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1, Human Proteome Organization 15th Annual World Congress (HUPO 2013), 2016 年 9 月 19 日, International Congress Center, Taipei
- (5) 木下英司, 質的・量的なリン酸化ダイナミクスを捉える Phos-tag SDS-PAGE, 第 67 回日本電気泳動学会総会, 2016 年 8 月 25 日, 釧路市観光国際交流センター, 釧路市 (特別招待講演)
- (6) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, フォスタグ技術を用いたヒスチジンキナーゼにおける自己リン酸化ダイナミクスのプロファイリング, 日本プロテオーム学会 2016 年大会, 2016 年 7 月 27 日, 北里大学, 東京
- (7) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, ハイブリッドセンサーキナーゼにおけるリン酸基転移反応の制御機構, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜, 横浜
- (8) 木下恵美子, 木下英司, 江口陽子, 吉多美祐, 山本兼由, 内海龍太郎, 小池透, ハイブリッドセンサーキナーゼのリン酸基リレー情報伝達機構におけるレシーバドメインの制御機能, BMB2015, 2015 年 12 月 4 日, 神戸国際展示場, 神戸市
- (9) Eiji Kinoshita, Phos-tag technology for

- profiling of protein phosphorylation: principle and application, BMB2015 ワークショップ, 2015年12月2日, 神戸国際展示場, 神戸市
- (10) 木下英司, 草本寛, 木下恵美子, 小池透, Phos-tag SDS-PAGE ゲルからの標的リン酸化タンパク質の転写効率の改善, 第66回日本電気泳動学会総会, 2015年9月4日, 東京工科大学, 東京
- (11) 木下英司, フォスタグ (Phos-tag) 技術のノート & チップ. アステラス製薬株式会社バイオサイエンス研究所研修セミナー, 2015年7月10日, アステラス製薬株式会社バイオサイエンス研究所, つくば市 (国内招待講演)
- (12) 木下英司, リン酸化プロテオーム研究のための Phos-tag テクノロジー: サンプル前処理技術としての貢献, 宮崎大学プロテオミクス教育セミナー, 2015年6月19日, 宮崎大学, 宮崎市 (国内招待講演)
- (13) 木下英司, 亜鉛の特性を利用したタンパク質翻訳後修飾の解析, 第12回北里疾患プロテオーム研究会, 2015年3月18日, 北里大学, 相模原市 (国内招待講演)
- (14) 木下英司, Phos-tag 電気泳動, 第65回日本電気泳動学会総会, 2014年10月24日, 横浜情報文化センター, 横浜市 (国内招待講演)
- (15) 木下英司, 亜鉛の特性を利用したライフイノベーション. 第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会&第3回 JHUPPO サテライトジョイントシンポジウム「先端プロテオーム解析技術とライフイノベーションへの展開」, 2014年8月22日, フェニックス・シーガイアリゾート, 宮崎市 (国内招待講演)
- (16) 木下英司, リン酸化プロテオームのための Phos-tag テクノロジー: サンプル前処理技術としての貢献. 第41回 BMS コンファレンス (プロテオミクス), 2014年7月8日, 能登ロイヤルホテル, 石川 (国内招待講演)
- (17) 木下英司, Phos-tag を用いた解析技術. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「キナーゼ・シグナリング研究の進展」, 2014年3月14日, 大阪大学蛋白質研究所, 吹田市 (国内招待講演)
- (18) Eiji Kinoshita, Phos-tag-based technological advances for studies on signal transductions in the coming generation, Human Proteome Organization 12th Annual World Congress (HUPO 2013), 2013年9月18日, Pacific Yokohama, Yokohama, Japan (国際招待講演)
- (19) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T., Phos-tag Biotin as an on-demand tool for study on protein phosphorylation, Human Proteome Organization 12th Annual World Congress (HUPO 2013), 2013年9月14日, Pacific Yokohama, Yokohama, Japan
- (20) 木下英司, 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. 愛媛大学プロテオサイエンスセンター&第2回 JHUPPO サテライトジョイントシンポジウム「先端融合領域におけるプロテオサイエンスの萌芽」, 2013年6月7日 (国内招待講演)
- 〔図書〕 (計5件)
- (1) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Zn(II)-Phos-tag SDS-PAGE for separation and detection of a DNA damage-related signaling large phosphoprotein. *in ATM kinase: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, **1599** (ed. by Kozlov, SV); Springer, New York, 113-126 (2017).
- (2) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Phosphopeptide detection with biotin-labeled Phos-tag. *in Phosphoproteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, **1355** (ed. by Stechow, L); Springer, New York, 17-29 (2016).
- (3) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Phos-tag technology for kinomics. *in Kinomics: Approaches and Applications.* (eds. by Kraatz, H.-B. and Martic, S); Wiley-VCH, Weinheim, 195-210 (2015).
- (4) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Phos-tag-based affinity chromatography techniques for enrichment of the phosphoproteome. *in Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling.* (eds. by Inoue, J and Takekawa, M); Springer, New York, 17-30 (2015).
- (5) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Neutral phosphate affinity SDS-PAGE system for profiling of protein phosphorylation. *in Proteomic Profiling: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, **1295** (ed. by Posch A); Springer, New York, 323-354 (2015).
6. 研究組織
- (1)研究代表者
木下 英司 (KINOSHITA EIJI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授
研究者番号: 80304418
- (2)研究分担者
- (3)連携研究者