

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460036

研究課題名(和文) 消光性リン酸基結合タグ分子を用いたリン酸化シグナルの定量解析法

研究課題名(英文) Analysis of phosphorylation signal using a Phos-tag quencher

研究代表者

小池 透 (Koike, Tohru)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：90186586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：オリジナルなリン酸化解析法(フォスタグ技術)を次世代の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、蛍光エネルギー移動や消光性分子間相互作用を利用した可逆的リン酸化シグナルの解析システムを開発した。 μmol 濃度の試料の分析試料容量は μL から mL レベルであり、現行の汎用蛍光機器を通常の実験環境でリン酸化状態のリアルタイム測定が可能である。本研究で開発したリン酸化化合物解析法は、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 an original analytical method using Phos-tag derivatives, we have developed convenient and reliable protocols for real-time analysis of phosphorylation status of kinase or phosphatase substrates. Since the analytical volume of μM -level sample is between μL and mL , the general fluorometric apparatus can be used in a standard chemical laboratory. We believe that our Phos-tag technology will result in great progress in phosphoproteomics.

研究分野：医薬分子機能科学

キーワード：プロテオミクス 蛍光分析 キナーゼ フォスファターゼ Phos-tag リン酸化分子

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、従来技術である放射性同位体法(同位体リンの放射線を使う方法)、抗体法(リン酸化蛋白質を抗体で捕まえる方法)、単核金属錯体法(リン酸化蛋白質を金属配位結合により捕まえる方法)など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。申請者は、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「脱リン酸化酵素の亜鉛二核錯体構造が、基質であるリン酸化化合物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。その化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イオンを捕捉するタグ分子(フォスタグ)を開発した。フォスタグとリン酸アニオンとの親和性は、カルボン酸イオンなど他のアニオンの 10000 倍以上である。国内外において、リン酸化化合物と亜鉛イオンの溶液内相互作用を化学的に追求し、その成果を実用的なリン酸化プロテオーム解析技術へ応用する研究は、申請者のグループ以外ではほとんど行なわれていない。これまでに申請者は、5 種類の実用的なフォスタグ誘導体: リン酸化分子の質量分析増感剤、リン酸親和性アガロースゲル、リン酸化分子の化学発光検出剤、リン酸親和性電気泳動用アクリルアミド、リン酸親和性磁気ビーズを開発している。それらはリン酸化物質を分解することなく濃縮・分離したり、検出したりできるオリジナルなリン酸化プロテオーム解析用試薬である。

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するオリジナルな消光性リン酸基結合タグ分子(消光性フォスタグ)を用いたリン酸化シグナルの定量解析法を開発を目的と

する。その研究手法は、従来のリン酸化分子の分析法(放射性リン同位体法、抗リン酸化抗体法、リン酸基親和性単核金属錯体法)と比較して、より網羅的なリン酸化シグナルの高精度な定量解析を可能にし、簡便な操作性や安全性などの利点をもち、癌やアルツハイマーなどの治療薬や診断法の開発に役立つ新しい分析技術である。それらは、消光性官能基(無蛍光性のダーククエンチャー)を有するモノ置換フォスタグとリン酸化反応基質ペプチドを用いた均一液相系の蛍光クエンチング法、および、固相に吸着または共有結合により固定化したリン酸化基質分子(蛋白質、ペプチド、糖質、脂質)のリン酸化量を消光性フォスタグを用いて解析する分析手法である。現在、複雑な生体試料中のリン酸化蛋白質の選択的な検出には、抗リン酸化抗体が汎用されているが、それらはリン酸化分子を網羅的に捕捉することはできない。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 の水溶液中でリン酸化分子を分解することなく、可逆的かつ網羅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る(結合定数は 10^8 ℓ/mol 以上: ナノモル濃度の希薄な条件でもリン酸化分子を捕捉する)。また、アデノシン-3-リン酸(ATP)は、ミリモル濃度のマグネシウムイオンが存在すると安定な 1:1 錯体を形成するため、生成したリン酸化基質とフォスタグの結合を阻害しない。さらに、本研究で使用する消光性官能基は無蛍光性であり、蛍光測定のパックグラウンドがないことから大きなシグナル・ノイズ比(高い感度と優れた定量性)が期待できる。また、フォスタグは化学的に安定な化合物であるため、その合成、保管、取扱いは、抗体や放射性同位体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消光性フォスタグを使った新しいリン酸化シグナルの定量解析法は、リン酸化蛋白質の機能解析を行っている創薬や病態診断分野の発展に大きく貢献できるものである。

3. 研究の方法

本研究以前に申請者らは消光性フォスタグのプロトタイプ合成に成功している(亜鉛結合型フォスタグのダブル誘導体)。可視領域に蛍光を発するリン酸リボフラビンと、このプロトタイプは、20%エタノール水溶液中、それぞれ $5 \mu\text{mol}$ 濃度で定量的に 1:1 の複合体を形成し、リボフラビンの蛍光を約 95%も消失させた。しかし、このプロトタイプは、純水への溶解性が小さいこと(エタノ

ールなどの有機溶媒が必要：酵素反応に適さない条件)や可視領域の吸収帯の幅が狭いこと(すべての蛍光プローブに対応できない)などの欠点がある。本研究では、ダブルシル基や他のダーククエンチャー(BHQ など)や消光機能を有する蛍光色素(TAMRA など)を水溶性の高いスペーサー(ジアミノトリエチレングリコールなど)とアミド結合でつないだ新規消光性フォスタグを複数合成し、それらとリン酸化蛍光基質との溶液内相互作用を詳細に調べるとともに、リン酸化シグナルの定量解析法としての利用を以下の手順で検討した。(1)水溶液中で蛍光分析が可能な新規消光性フォスタグ(ダブルシル系, BHQ 系, TAMRA 系など)を合成した。原料である一級アミノ基やカルボキシル基を有するフォスタグ誘導体を合成法し、新規分子の構造確認を各種機器分析法で行った。(2)蛍光性を有するリン酸化モデル分子(アミノ酸やペプチドなど)を合成した。それらに対応する非リン酸化体も用意した。(3)新規フォスタグ誘導体とリン酸化モデル分子の化学的性質(純度, 溶解性, 蛍光量子収率, 蛍光特性の溶媒効果, 可視吸収特性, 酸解離定数, 錯体生成定数など)を検討した。(4)蛍光性リン酸化モデル分子と新規フォスタグを組み合わせた蛍光分析により, 複合体形成に伴う消光効率, リン酸基特異性, 検出濃度範囲などについて調べた。(5)非リン酸化モデル分子やピロリン酸イオンの添加による消光率の変化量を検討した。(6)キナーゼやフォスファターゼを用いたリン酸化状態のリアルタイム蛍光検出の分析条件を最適化し, 蛍光性官能基と消光性プローブの最適な組み合わせを決定した。同様の研究方法でスペーサーなどを改良した消光性フォスタグを合成した。さらに, 創薬や病態診断分野で注目されているキナーゼやフォスファターゼ基質の蛍光標識体を用いた様々なリン酸化シグナル解析の検討を行った。慢性骨髄性白血病と関連のあるキナーゼ Abl のリン酸化反応の解析では, 基質として知られているペプチド Abltide を蛍光標識したものを用意し, リン酸化量の経時変化を消光率を指標として解析した。この方法により, キナーゼ阻害剤のシーズ探索が可能になると考えている。また, マイクロプレートやマイクロビーズなどの固相に蛍光性リン酸化ペプチド基質を固定化した分析試料を調製することにより, ハイスループットかつ大規模な阻害剤のスクリーニングや臨床検査システムへの適用を検討した。まず, マイクロプレート法に適したサンプル量を用いてリン酸化量の簡便な定量分析法を開発した。マイクロビーズ法を用いたリン酸化基質の選択的検出法(蛍光性基質と消光性フォスタグの異なる組み合わせを使用する)を検討した。さらに, 疎水性面メンブレン, マレイミド結合型プレート, アビジン-ビオチン系固定化ビーズなどを用いて, 複数の蛍光性基質ペプチドや蛍光性蛋白質を固定化し

た分析試料のリン酸化量の蛍光定量分析についても検討した。

4. 研究成果

(1)新規水溶性アミノフォスタグ誘導体の合成法を確立し, それらのリン酸基結合能と水溶液内の化学平衡論的に検討した。蛍光性または消光性官能基としては, Dabcyl, TAMRA, NBD, FITC, Dansyl, Dabsyl, DNP などである。有機構造解析(NMR, IR, MS, UV)と水溶液中の分光蛍光分析を行い, それら新規誘導体の化学的特性(蛍光波長, 量子収率, 消光率, 共存イオン効果, 溶媒効果など)を明らかにした。(2)新規蛍光性または消光性フォスタグを用いたリアルタイムリン酸化シグナルの定量解析法を検討した, その結果, 水溶性ダブルシル誘導体を用いた実用的なフォスファターゼの活性測定と酵素阻害剤の極めて簡便なプロファイリング方を開発した。(3)キナーゼの解析法への応用を検討し, マイクロプレート容量のサンプルでリン酸化量を定量分析できるプロトコルを作成した。(4)フォスタグ誘導体を結合したマイクロビーズ(トヨパールまたは架橋型アガロース)やマイクロプレート(マレイミド誘導体, 疎水性誘導体)に蛍光生リン酸化分子(リン酸化エタノールアミン誘導体またはリボフラビンリン酸)を結合したものをフォスファターゼ基質として利用した新しい蛍光分析法を開発した。(5)光安定性が極めて高く, 安価な汎用蛍光分析機器の利用が可能で, マイクロモル濃度でも十分な定量蛍光分析が可能な TAMRA 誘導体を用いた新しいリン酸化シグナルの解析法を見出した。TAMRA 誘導体は, ピロリン酸やビスリン酸化糖などを架橋配位子として生理 pH の水溶液中で安定な二量体を形成する。二量体は TAMRA の蛍光を自己消光する。したがって, 脱リン酸が進行すると, 消光率が減少する。フォスファターゼ反応その消光率の変化から脱リン酸化反応をリアルタイムで解析できた。今後, この蛍光分析法を様々な天然型リン酸化基質を用いた新しいキナーゼ・フォスファターゼのプロファイリング法として利用することを検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

1. E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, Phos-tag SDS-PAGE methodology that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1, *Journal of Electrophoresis*, 61, 2017, 1-7, 査読有, doi:10.2198/electroph.61.1

2. E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, K. Karata, T. Kawano, A. Nishiyama, M. Yamato, and T. Koike, Specific glutamic acid residues in targeted proteins induce exaggerated retardations in Phos-tag

SDS-PAGE migration, *Electrophoresis*, 38, 2017, 1136-1149, 査読有, doi:10.1002/elps.201600520

3. E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, Y. Kubota, M. Takekawa, and T. Koike, A Phos-tag SDS-PAGE method that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1, *Proteomics*, 16, 2016, 1825-1836, 査読有, doi:10.1002/pmic.201500494

4. E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, Y. Eguchi, and 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*, e0148294, 2016, pp16, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0132598

5. Y. Sugiyama, S. Katayama, I. Kameshita, K. Morisawa, T. Higuchi, H. Todaka, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, T. Taniguchi, and S. Sakamoto, Expression and phosphorylation state analysis of intracellular protein kinases using Multi-PK antibody and Phos-tag SDS-PAGE, *MethodsX*, 2, 2015, 469-474, 査読有, doi:10.1016/j.mex.2015.11.007

6. E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, Y. Eguchi, S. Yanagihara, K. Edahiro, Y. Inoue, M. Taniguchi, M. Yoshida, K. Yamamoto, H. Takahashi, T. Sawasaki, R. Utsumi, and T. Koike, Functional Characterization of the Receiver Domain for Phosphorelay Control in Hybrid Sensor Kinases, *PLoS ONE*, e0132598, 2015, pp20, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0132598

7. E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1854, 2015, 601-608, 査読有, doi:10.1016/j.bbapap.2014.10.004

8. E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, A. Matsuda, and T. Koike, Tips on improving the efficiency of electrotransfer of target proteins from Phos-tag SDS-PAGE gel, *Proteomics*, 14, 2014, 2437-2442, 査読有, doi:10.1002/pmic.201400380

9. E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike, Identification of two phosphorylated species of β -catenin involved in the ubiquitin-proteasome pathway by using two-dimensional Phos-tag affinity electrophoresis, *Journal of Electrophoresis*, 58, 2014, 1-4, 査読有, doi:10.2198/jelectroph.58.1

10. E. Kinoshita-Kikuta, H. Kurosaki, N. Kunisada, E. Kinoshita, and T. Koike, A Phos-tag-based fluorescence quenching system for activity assay and inhibitor screening for alkaline phosphatase,

American Journal of Analytical Chemistry, 5, 2014, 796-804, 査読有, doi:10.4236/ajac.2014.512088

11. A. Shiba, K. Edahiro, Y. Inoue, K. Yamamoto, and T. Koike, Profiling of Protein Thiophosphorylation Using Phos-tag Affinity Electrophoresis: Evaluation of Adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) as a Phosphoryl Donor in Protein Kinase Reactions, *Proteomics*, 14, 2014, 668-679, 査読有, doi:10.1002/pmic.201300533

〔学会発表〕(計16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, 日本薬学会第 137 年会, 2017.3.24-27, 宮城県・仙台市

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, 2016.11.30-12.2, 神奈川県・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, 日本生化学会第 89 回大会, 2016.9.25-27, 宮城県・仙台市

4. Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, and Tohru Koike, Phos-tag SDS-PAGE methodology that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1, HUP02016 台湾大会, 2016.9.18-22, 台湾・台北市

5. Maho Kawaguchi, Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, and Tohru Koike, Phosphate-affinity chromatographic micro-tip technology for enrichment of phosphopeptides towards phosphoproteomic study, HUP02016 台湾大会, 2016.9.18-22, 台湾・台北市

6. 木下英司, 木下恵美子, 小池 透, 質的・量的なリン酸化ダイナミクスを捉える Phos-tag SDS-PAGE, 日本電気泳動学会第67回総会, 2016.8.26-27, 北海道・釧路市

7. 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, 2016.7.28-29, 東京都

8. 曽根雄太郎, 山野 喜, 志賀もえみ, 杉本幸子, 木下英司, 木下恵美子, 小池 透, 大塚英昭, 松波勝義, Phos-tag SDS PAGE を用いたリン酸化阻害物質の探索, 日本薬学会第 136 年会, 2016.3.27, 神奈川県・横浜市

9. 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, 2016.3.27, 神奈川県・横浜市

10. Maho Kawaguchi, Norinao Koretake,

Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, and Tohru Koike, Development of Thio-tag magnetic bead for rapid and selective separation of thiol-containing molecules, 環太平洋国際化学会議 PACIFICHEM 2015, 2015.12.15, 米国・ホノルル市

11. 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リース情報伝達機構におけるレシーバードメインの制御機能, BMB2015, 第38回日本分子生物学会年会, 2015.12.2, 兵庫県・神戸市

12. 河口真歩, 井野洋子, 木村弥生, 平野 久, 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 Tip の開発, 第66回日本電気泳動学会総会, 2015.9.4, 東京都

13. 國貞夏実, 木下恵美子, 木下英司, 小池 透, リン酸基捕捉能を持つダーククエンチャーを用いた蛍光分析法, 第66回日本電気泳動学会総会, 2015.9.4, 東京都

14. Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Yoko Ino, Yayoi Kimura, Hisashi Hirano, Tohru Koike, Phos-tag tip, a novel tool for phosphoproteome study, 日本プロテオーム学会 2015 年会, 2015.7.23, 奈川県・横浜市

15. 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, 2014.11.25, 神奈川県・横浜市

16. 脇本理恵子, 木下恵美子, 木下英司, 小池 透, 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, 2014.10.24, 神奈川県・横浜市

〔図書〕(計5件)

1. E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike, Phosphopeptide Detection with Biotin-Labeled Phos-tag, Phosphoproteomics - Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, Edited by Louise von Stechow, Humana Press, Springer Science, New York, 2016, pp17-29

2. E. Kimura, T. Koike, and S. Aoki, Evolution of Zinc(II)-Macrocyclic Polyamines to Biological Probes and Supramolecular Assembly, Macrocyclic and Supramolecular Chemistry: How Izatt-Christensen Award Winners Shaped the Field, Edited by Reed M. Izatt. Wiley, 2016, pp415-443

3. E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, Neutral Phosphate-Affinity SDS-PAGE System for Profiling of Protein Phosphorylation, Proteomic Profiling: Methods in Molecular Biology, Edited by Anton Posch, Chapter 24, Humana Press, Springer Science, New York, 2015,

pp323-354

4. E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike, Phos-tag Technology for Kinomics, Kinomics: Approaches and Applications, Edited by H. Kraatz and S. Martic, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015, pp195-210

5. E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, and T. Koike, Phos-tag-Based Affinity Chromatography Techniques for Enrichment of the Phosphoproteome, Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, Edited by J. Inoue and M. Takekawa, Springer Japan, 2015, pp17-30

〔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