

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790036
 研究課題名 (和文) リン酸基アフィニティー蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動法の開発
 研究課題名 (英文) Development of phosphate-affinity two-dimensional fluorescence difference gel 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)：

フォスタグを用いた技術の1つにリン酸アフィニティー電気泳動法がある。通常の電気泳動ではリン酸基の有無による移動度の差がほとんどない。しかし、フォスタグを加えることで、リン酸基1つの違いでも分離することができる。更に、フォスタグは生体試料や低濃度の蛋白質にも適用できる。本研究では、この方法を用いたリン酸化蛋白質解析のための新しい2次元電気泳動法を開発した。

研究成果の概要 (英文)：

The researcher developed a novel type of two-dimensional electrophoresis using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for the analysis of phosphoproteins. By this procedure, the separations of phosphoprotein isotypes should be improved relative to those by current PAGE methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ナノ材料，分子認識，蛋白質，バイオテクノロジー，分析化学，リン酸化，フォスタグ，電気泳動

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) の開発に成功している。このフォスタグ分子のリン酸イオンへの親和性は、カルボン酸イオンに対して1万倍以

上も高い。すなわち、その分子のリン酸イオンに対する捕捉選択性は非常に優れていると言える。このリン酸基捕捉分子を、ポリアクリルアミドに固定化することに成功すれば、リン酸化された蛋白質を効率良く非リン酸化蛋白質から分離する新しい電気泳動法

が確立できると考え、研究代表者らは、モノマーであるアクリルアミドをフォスタグに導入した新規誘導体を合成した。そして、これを利用することで「リン酸化修飾前後の蛋白質を同時定量できるリン酸アフィニティー電気泳動法」の開発に成功した。この方法は、上述したアクリルアミド結合型誘導体をスラブ型の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) に応用し、リン酸化蛋白質と非リン酸化蛋白質の間で電気泳動度に有意差を生じさせるといった原理に基づいたものである。通常の電気泳動法では、リン酸基の有無による移動度の差はほとんどない。一方、この新しい方法は、分離ゲル中に適量のフォスタグを加え、共重合するだけで、リン酸基1つの違いでも分離することができる。

そこで、本研究においては、この全く新しいオリジナルな分離技術原理に基づいたリン酸アフィニティー電気泳動法をさらに応用することで、細胞、あるいは、生体組織中の全リン酸化蛋白質を1枚の電気泳動ゲル上において単独スポットとして分離検出する方法に発展できると考え、着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者らがこれまでに独自に開発したリン酸アフィニティー電気泳動法をさらに展開させることで、細胞、あるいは、生体組織中の全リン酸化蛋白質を一網打尽とする分離検出法を開発することである。生体試料には、様々な非リン酸化蛋白質が多量に含まれるのに対し、リン酸化蛋白質は極微量にしか存在しないといった難点がある。これを打開するために、以下の二つの手段を採用し、上記の目的を研究期間内に実現化する。

(1) 既存の電気泳動法とフォスタグ分子を利用したリン酸アフィニティー電気泳動法を組み合わせ、新しいリン酸アフィニティー2次元電気泳動法を樹立する。

(2) 生理学的状態の異なる二種類の生体試料に含まれる蛋白質群を二種類の異なる蛍光色素でそれぞれ標識し、(1)で樹立したリン酸アフィニティー2次元電気泳動法を用いることで、リン酸化修飾の差異を感度良くビジュアル化する解析法 (リン酸アフィニティー蛍光ディファレンスゲル2次元電気泳動法) を確立する。

3. 研究の方法

フォスタグアクリルアミド誘導体 (図1) は、一級アミノ基を1つ持つフォスタグにアクリルアミド分子 (モノマー) を導入することで合成した。リン酸化蛋白質の分離のために、マンガン錯体としてのフォスタグアクリルアミド誘導体を分離ゲルに加え、アクリル

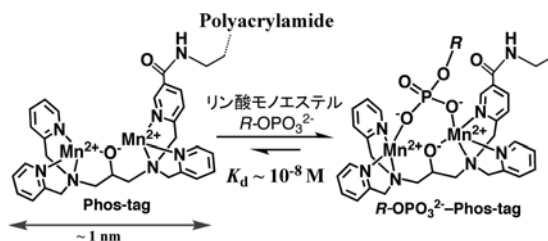


図1 リン酸モノエステルを捕捉する Phos-tag (アクリルアミド誘導体)

アミド及びビスアクリルアミドと共重合させた。フォスタグ固定化ゲルを用いたリン酸アフィニティー電気泳動を2次元目展開として利用した。1次元目展開としては、urea-PAGE, IEF/NEpHGE, SDS-PAGE の3種類の既存のゲル電気泳動法を採用した。それぞれについて以下に述べる。

(1) urea-PAGEとの組み合わせによる2次元電気泳動法

1次元目として urea-PAGE, 2次元目としてフォスタグを用いたリン酸アフィニティー電気泳動を行った。試料として、5つのセリンリン酸化部位をもつβ-カゼイン (精製標品) を用いた。

(2) IEF/NEpHGEとの組み合わせによる2次元電気泳動法

1次元目として IEF/NEpHGE, 2次元目としてフォスタグを用いたリン酸アフィニティー電気泳動を行った。試料として、IEFとの組み合わせの際は酸性蛋白質のカゼイン (精製標品) を、NEpHGEとの組み合わせの際は塩基性蛋白質のタウ (精製標品) を用いた。

(3) SDS-PAGEとの組み合わせによる2次元電気泳動法

1次元目として SDS-PAGE, 2次元目としてフォスタグを用いたリン酸アフィニティー電気泳動を行った。期待される電気泳動像は図2の通りである。非リン酸化蛋白質は本来の分子篩にしたがってゲルのほぼ対角線上に泳動される。一方、リン酸化蛋白質は2次元目の分離ゲル内で泳動がトラップされるため、対角線上より上部へシフトする。試料として、ヒト扁平上皮癌 A431 細胞株を用い、上皮細胞成長因子刺激後の Erk と Shc のリン酸化

蛋白質異性をそれぞれの特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検出した。さらに、蛍光ディファレンシャル2次元電気泳動法の

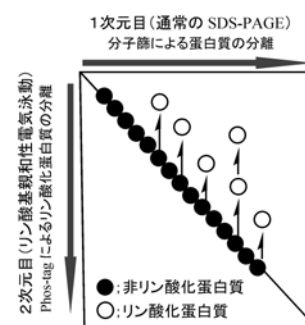


図2 リン酸基親和性2次元電気泳動によるリン酸化蛋白質の分離像

ため、10% (v/v) 牛胎児血清 (FBS) を含む DMEM 培地で培養した A431 細胞から可溶性蛋白質を抽出した溶液、およびそれをアルカリフォスファターゼ処理した溶液を作成し、いずれも蛋白質濃度は 2.0 mg/mL に調整した。各サンプルは、CyDye Fluor minimal dyes (GE ヘルスケアバイオサイエンス社) を用い、そのプロトコルに従って前者を Cy3、後者を Cy5 でそれぞれ標識した。標識後のサンプルは、上記(3)の電気泳動法により解析された。

4. 研究成果

urea-PAGE および IEF/NEpHGE との組み合わせによる新しい 2 次元電気泳動法により、これまでは不可能であった同じリン酸化量のリン酸化異性体の分離検出が可能となり、また、その後のリン酸化部位同定のための質量分析に適したサンプル提供が可能となった。また、SDS-PAGE との組み合わせによる新しい 2 次元電気泳動法により、スプライシング様式の違いによって生じる分子量の異なるアイソフォームごとのリン酸化異性体を明瞭に分離検出でき、どのアイソフォーム由来のリン酸化異性体であるかを特定することも可能となった。さらには、リン酸アフィニティー電気泳動を組み込んだ蛍光ディフレンシャル電気泳動法による蛋白質のリン酸化状態の比較解析法を用いて、血清存在下で培養した A431 細胞では少なくとも 5 つの蛋白質が過剰にリン酸化されていることがわかった (図 3)。質量分析の結果、スポット 1 および 2 の蛋白質がそれぞれ Heat shock 70kDa protein 8 および 1 と同定された。

本法を用いることによって、より詳細な蛋白質リン酸化状態の情報を得ることができ、今後の蛋白質リン酸化解析における新しい分離検出技術として大きく貢献することを期待している。また、リン酸アフィニティー電気泳動を組み込んだ蛍光ディフレンシャル電気泳動法は、1 枚のゲル内で 2 つのサンプル間のリン酸化状態の差異を比較できるのでリン酸化状態の僅かな違いを検出す

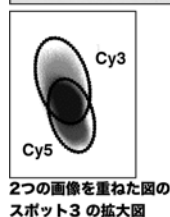
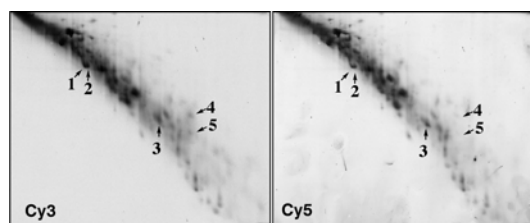


図 3 リン酸基親和性 2 次元電気泳動によるリン酸化蛋白質の分離像

ることができることがわかった。一方で、Cy 色素の検出感度では微量発現蛋白質などは検出できないことや、分子量の近接する蛋白質が混在するサンプルでは解析が困難であるという問題点も抽出できた。

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 11 件) すべて査読あり

1. Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta, Nakashima, H., and Koike, T. (2010) Genotyping and mapping assay of single-nucleotide polymorphisms in CYP3A5 using DNA-binding zinc(II) complexes. Clin. Biochem. 43: 302-306. 査読有
2. Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta, and Koike, T. (2009) Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. Nat. Protoc. 4: 1513-1521. 査読有
3. Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta, Ujihara, H., and Koike, T. (2009) Mobility shift detection of phosphorylation on large proteins using a Phos-tag SDS-PAGE gel strengthened with agarose. Proteomics 9: 4098-4101. 査読有
4. Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta, and Koike, T. (2009) Phosphate-affinity gel electrophoresis using a Phos-tag molecule for phosphoproteome study. Curr. Proteomics 6: 104-121. 査読有
5. Emiko Kinoshita-Kikuta, Kinoshita, E., and Koike, T. (2009) Phos-tag beads as an immunoblotting enhancer for selective detection of phosphoproteins in cell lysates. Anal. Biochem. 389: 83-85. 査読有
6. Takiyama, K., Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta, Fujioka, Y., Kubo, Y., and Koike, T. (2009) A Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the dephosphorylation of phosphopeptides. Anal. Biochem. 388: 235-241. 査読有
7. Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta,

- Matsubara, M., Aoki, Y., Ohie, S., Mouri, Y., and Koike, T. (2009) Two-dimensional phosphate-affinity gel electrophoresis for the analysis of phosphoprotein isotypes. *Electrophoresis* 30: 550-559. 査読有
8. Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta, Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S.J., and Takata, M. (2008) FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 1138-1146. 査読有
 9. Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta, Yoshimoto, M., and Koike, T. (2008) Detection of the Gua/Cyt-to-Cyt/Gua mutation in a Gua/Cyt-lined sequence using Zn²⁺-cyclen polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 380: 122-127. 査読有
 10. Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta, Matsubara, M., Yamada, S., Nakamura, H., Shiro, Y., Aoki, Y., Okita, K., and Koike, T. (2008) Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE. *Proteomics* 8: 2994-3003. 査読有
 11. Emiko Kinoshita-Kikuta, Kinoshita, E., and Koike, T. (2008) A mobility shift detection method for DNA methylation analysis using phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 378: 102-104. 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
1. 木下恵美子, 木下英司, 山田篤志, 氏原弘洋, 小池 透 細胞内リン酸化シグナル解析におけるPhos-tag固定化ポリマーの新しい応用法. 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山県桃太郎アリーナ.
 2. 木下英司, 木下恵美子, 中島弘美, 小池透 DNA結合性亜鉛錯体を用いたCYP3A5 遺伝子における一塩基多型の高精度検出法. 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山県桃太郎アリーナ.
 3. 宗村雅男, 木下英司, 木下恵美子, 山田篤志, 小池 透 新規リン酸親和性カラムを用いたヌクレオチド類の精製法. 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山県桃太郎アリーナ.
 4. 木下恵美子, 木下英司, 山田篤志, 氏原弘洋, 小池 透 改良型リン酸基親和性電気泳動法による 200 kDa以上の高分子量タンパク質のリン酸化異性体解析. 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸国際展示場.
 5. 柳原志穂, 木下恵美子, 木下英司, 中神明, 小池 透 リン酸基親和性電気泳動法を用いたヒスチジン・アスパラギンリン酸化タンパク質の定量解析法. 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸国際展示場.
 6. 山田篤志, 木下恵美子, 木下英司, 小池透 細胞内リン酸化タンパク質を高精度に検出するためのPhos-tag ビーズによるサンプル前処理法. 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸国際展示場.
 7. 木下英司, 木下恵美子, 小池 透 蛋白質リン酸化解析のためのリン酸基親和性 2 次元電気泳動法. 第 60 回日本電気泳動学会総会, 2009 年 9 月 19 日, 松本市Mウィング文化センター.
 8. 木下英司, 木下恵美子, 小池 透 Phos-tag固定化ポリマーを利用したシグナル伝達解析における選択的な蛋白質リン酸化検出のための新技術. 日本ヒトプロテオーム機構 第7回大会, 2009 年 7 月 28 日, 北里大学薬学部.
 9. 木下英司, 木下恵美子, 中村寛夫, 城 宜嗣, 小池 透 フォスタグ電気泳動法を用いた細菌 2 成分情報伝達系におけるリン酸化ヒスチジンおよびリン酸化アスパラギン酸蛋白質異性体の同時定量解析. 第 9 回蛋白質科学会, 2009 年 5 月 20 日, 熊本全日空ホテルニュースカイ.
 10. 山田篤志, 木下英司, 木下恵美子, 小池透 リン酸基アフィニティービーズ “Phos-tag Toyopearl” を用いたリン酸化プロテオーム解析における前処理技術の開発. 第 9 回蛋白質科学会, 2009 年 5 月 20 日, 熊本全日空ホテルニュー

- スカイ。
11. 木下英司, 木下恵美子, 小池 透
Phos-tagを利用したメチル化DNA検出法の開発. 第 50 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2009 年 5 月 16 日, 鳥取市とりぎん文化会館.
 12. 木下英司, 木下恵美子, 中島弘美, 氏原弘洋, 小池 透 リン酸基結合ナノ分子を利用した高感度・高効率なエピジェネティクス変異検出技法の創成. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 26 日, 国立京都国際会館.
 13. 原田奈生子, 木下英司, 木下恵美子, 小池 透 改変亜鉛サイクレン電気泳動法を用いたAT含有率が高い短PCR断片のSNP解析. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 26 日, 国立京都国際会館.
 14. 石村憲和, 木下英司, 木下恵美子, 小池透 ペプチドのリン酸化状態を検出する蛍光共鳴エネルギー移動システムの開発. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 26 日, 国立京都国際会館.
 15. 木下英司, 木下恵美子, 松原 守, 山田斉爾, 中村寛夫, 城 宜嗣, 青木悠里, 沖田鋼季, 小池 透 リン酸基親和性電気泳動法を利用した同じリン酸化量を有するリン酸化蛋白質異性体の分離検出. BMB2008, 2008 年 12 月 12 日, 神戸国際展示場.
 16. 山田篤志, 木下英司, 木下恵美子, 小池透 リン酸基アフィニティービーズ“Phos-tag™ Toyopearl”を用いたリン酸化ペプチド&タンパク質の分離濃縮. BMB2008, 2008 年 12 月 12 日, 神戸国際展示場.
 17. 多幾山敬, 木下英司, 木下恵美子, 小池透 ペプチドのリン酸化状態を検出する蛍光共鳴エネルギー移動システムの開発. BMB2008, 2008 年 12 月 12 日, 神戸国際展示場.
 18. 木下英司, 木下恵美子, 小池 透 リン酸基親和性電気泳動法を利用した新しい遺伝子診断技術. 第 59 回日本電気泳動学会総会, 2008 年 11 月 16 日, 麻布大学百周年記念ホール.
 19. 木下英司, 木下恵美子, 山田篤志, 井上知香, 小池 透 フォスタグ結合型新規リン酸基アフィニティービーズを利用した細胞抽出液からのリン酸化蛋白質

の分離と濃縮. 日本ヒトプロテオーム機構 第 6 回大会, 2008 年 7 月 29 日, ホテル阪急エキスポパーク.

20. 多幾山敬, 木下英司, 木下恵美子, 小池透 ペプチドのリン酸化/脱リン酸化反応を検出する F R E T 型蛍光センサーの開発. 第 49 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2008 年 5 月 16 日, 香川県県民ホール.

〔図書〕(計 3 件)

1. 木下英司, 木下恵美子, 小池透 (2009) 細胞内リン酸化タンパク質を高精度に検出するためのPhos-tagビーズによるサンプル前処理法. 秀潤社, 細胞工学, 28: 934-938.
2. Emiko Kinoshita-Kikuta, Kinoshita, E., and Koike, T. (2009) Zn(II)-cyclen polyacrylamide gel electrophoresis for SNP detection. in Single Nucleotide Polymorphisms, Methods in Molecular Biology, 578 (ed. by Komar AA); Humana Press, Chapter 10, p169-182.
3. Kinoshita, E., Emiko Kinoshita-Kikuta, and Koike, T. (2009) Phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis for SNP genotyping. in Single Nucleotide Polymorphisms, Methods in Molecular Biology, 578 (ed. by Komar AA); Humana Press, Chapter 11, p183-192.

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: 40379912

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし