

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K21247

研究課題名（和文）タンパク質のリン酸化状態に着目した生活習慣病の病態把握及び治療への応用

研究課題名（英文）Identification of functional protein phosphorylation state using Phos-tag diagonal electrophoresis and its application to understand metabolic disorders

研究代表者

佐藤 葵 (Satoh, Aoi)

新潟大学・医学部・技術職員

研究者番号：10808752

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質のリン酸化は細胞内の様々なシグナル伝達に重要なタンパク質の翻訳後修飾であるが、各タンパク質の機能的なリン酸化状態を特定することは困難であった。しかし、2020年に開発されたPhos-tag対角線電気泳動法では、タンパク質の機能的なリン酸化状態を検出及び同定することを可能とした。本研究では、同技術を発展させ、細胞や組織といった生体資料より抗体を用いて任意のタンパク質のリン酸化状態を検出できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のPhos-tag電気泳動では特異度の高い抗体や任意タンパク質の精製・単一化を必要としていたが、本研究により、Phos-tag対角線電気泳動法を用いて通常のWestern blotと同様にPVDF膜にタンパク質を転写し、任意のタンパク質のリン酸化状態を検出することができることが明らかとなった。このことより、細胞や組織由来の多種多様なタンパク質の中から任意のタンパク質の機能的なリン酸化状態を検出及び同定することが可能となった。この技術を利用し現在、タンパク質のリン酸化状態という新しい視点に着目して肥満や糖尿病といった生活習慣病の病態解明につなげようとしている。

研究成果の概要（英文）：Phos-tag electrophoresis requires highly specific antibodies or purification of target proteins to detect specific protein phosphorylation. This study revealed that by using Phos-tag diagonal electrophoresis, proteins can be transferred to a PVDF membrane similar to a regular Western blot, allowing to detect the phosphorylation state of any target protein. This enables the identification of functionally phosphorylated states of specific proteins from a diverse range of cellular and tissue-derived proteins. By focusing on protein phosphorylation states as a new perspective, this technique can be applied to elucidate the pathogenesis of various diseases.

研究分野：生活習慣病学

キーワード：Phos-tag対角線電気泳動 生活習慣病 リン酸化タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病は増加の一途を辿っており、盛んに研究がなされている。しかし、それら多くの研究はマウスなどの実験動物や培養細胞を用いて、遺伝子工学により、特定のタンパク質の欠損あるいは過剰発現により評価されている。一方で、タンパク質のリン酸化は、タンパク質の機能制御において重要な翻訳後修飾であり、リン酸化状態の変化が多くの病態に関与していることも明らかになっている。また、インスリンシグナルカスケードを代表としたタンパク質のリン酸化状態は代謝調節における重要な指標となる。しかしながら、病態に関わるタンパク質の機能的なリン酸化状態の把握はこれまで困難であった。従来タンパク質のリン酸化を評価する方法としては、①リン酸化タンパク質に対する抗体を用いた Western Blot による検出、②質量分析による同定の2つが行われてきたが、リン酸化部位特異的抗体の必要性や断片化されたペプチドでの評価に留まるといった欠点があり、複数個所にリン酸化部位がある場合、リン酸化状態が異なるタンパク質の定量的な評価が困難であった。

### 2. 研究の目的

本研究では群馬パース大学の平野久教授が開発した、Phos-tag 対角線電気泳動法 (図1) (Okawara Y, Hirano H. et al. *J Proteomics*. 2020) を用いて、機能的なリン酸化部位を定量的に解析する。Phos-tag 対角線電気泳動法では一次元目 SDS-PAGE、二次元目 Phos-tag SDS-PAGE で二次元に電気泳動することで、未リン酸化状態を含めたリン酸化状態の異なる同一タンパク質を検出及び同定することができる。しかしながら、Phos-tag 対角線電気泳動法によるタンパク質のリン酸化検出及び同定は、既知のタンパク質を泳動後に CBB 染色や銀染色といったタンパク質全て

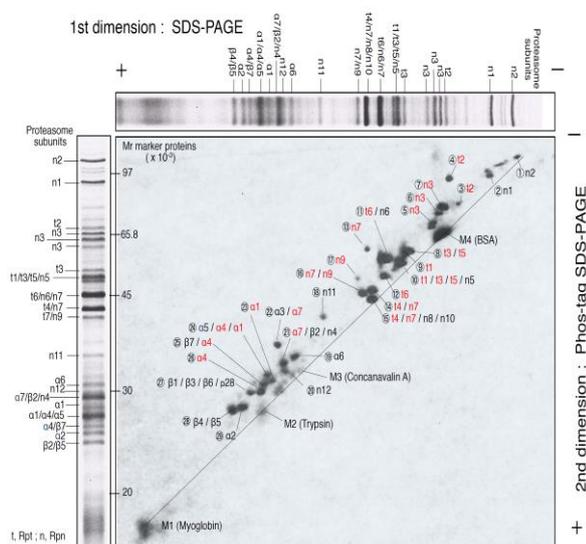


図1 : Phos-tag 対角線電気泳動法 ヒト 26S プロテアソームサブユニットを、Phos-tag 対角線電気泳動で解析したもの

を検出し、スポットを質量分析により同定している。そこで本研究では、Phos-tag 対角線電気泳動法を発展させ、細胞や組織由来の多種多様なタンパク質の中から任意のタンパク質に対する抗体を用いて、タンパク質の機能的なリン酸化状態の検出及び同定を行い、この新技術を利用して糖尿病や肥満症といった生活習慣病に係るタンパク質のリン酸化状態に着目した病態解明を目的とする。特に、膵β細胞の増殖に中心的な役割を果たし複数のリン酸化部位を有する転写因子である FoxM1 に着目し、リン酸化状態による核移行や転写活性化などの制御機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、生活習慣病に係る変動可能で機能的なリン酸化部位を明らかにし、新たな治療標的へと発展させるために、(1)Phos-tag 対角線電気泳動法を用いたタンパク質のリン酸化状態の評価系確立と、(2)タンパク質のリン酸化状態に着目した生活習慣病の新たな治療標的を創出する。具体的な方法は以下に示す。

- (1) Phos-tag 対角線電気泳動法を用いたタンパク質のリン酸化状態の評価系確立

転写因子 FoxM1 は膵β細胞の増殖に中心的な役割を果たすことが明らかになっている (Shirakawa J. et al. *Cell Metab.* 2017)。



図2: FoxM1の構造とリン酸化部位  
FoxM1は少なくとも6か所のリン酸化部位が報告されている。

FoxM1は、MAPKやChk2、Cdkファミリーにより、複数箇所リン酸化されることが報告されているが(図2)、各リン酸化部位がどのような細胞外刺激により変化するのか、また、どのリン酸化部位がFoxM1の核内移行や転写機能の活性化に関与するのかが不明な点が多く残っている。そこで、膵β細胞株であるMin6細胞からのタンパク質抽出液より、FoxM1抗体を用いてPhos-tag対角線電気泳動法後に通常のWestern-blotと同様にPVDF膜へ転写しFoxM1を検出及び、リン酸化状態の異なるプロテオフォームを検出できるのか検討する。

#### (2) FoxM1の転写機能の活性化や核内移行に係る機能的なリン酸化状態の同定

タンパク質のリン酸化状態に着目した生活習慣病の新たな治療標的を創出するために、本研究ではモデルケースとしてFoxM1に着目する。マウス膵β細胞株であるMin6細胞やマウス肝細胞株であるHep1-6細胞、ヒト及びマウスの単離膵島にグルコースやインスリンによる刺激を行い、核と細胞質分画に分けタンパク質抽出し、Phos-tag対角線電気泳動によりリン酸化状態を評価する。また、検出効率を高めるために、FoxM1の免疫沈降やFoxM1をアデノウイルスにより過剰発現させ検討をおこなう。その後、FoxM1の活性化状態の異なるサンプル間や、細胞の核・細胞質の間で異なるスポットを質量分析計で測定する。

### 4. 研究成果

#### (1) Phos-tag対角線電気泳動法を用いたタンパク質のリン酸化状態の評価系確立

従来のPhos-tag対角線電気泳動法ではタンパク質の検出はCBB染色や銀染色で行っており、泳動したサンプルに含まれるすべてのタンパク質のリン酸化状態を捕捉している。しかし、本研究においては特定のタンパク質(FoxM1)のリン酸化状態を評価するため、Phos-tag対角線電気泳動後にPVDF膜へと転写しFoxM1に対する抗体を用いて検出する必要がある。Phos-tag対角線電気泳動では泳動ゲル中にマンガンが含まれるため、PVDF膜への転写効率が低下する。この問題はマンガンをキレートするEDTA処理するなどを行うことで改善し、安定的に抗体による検出を可能とした。

#### (2) FoxM1の転写機能の活性化や核内移行に係る機能的なリン酸化状態の同定

様々な条件でタンパク質を抽出し、Phos-tag対角線電気泳動後にFoxM1抗体で検出した結果を以下に列記する。

- ① マウス膵β細胞株であるMin6細胞及びマウス肝細胞株のHep1-6細胞の核と細胞質分画に分けたところ、細胞ごとにリン酸化状態の異なるFoxM1が検出され、既報にあるように核分画ではリン酸FoxM1が優位であることが確認された。
- ② FoxM1のリン酸化修飾に係る上流因子の阻害剤であるU0126を細胞に添加すると、FoxM1のリン酸化抑制が確認された。
- ③ アデノウイルスを用いてFoxM1を過剰発現させ、FoxM1のリン酸化阻害剤U0126を細胞に添加すると、リン酸化状態の違いは観察されなかった。

今後はFoxM1のリン酸化状態が顕著に異なった核と細胞質分画の条件において、FoxM1の免疫沈降により濃縮・質量分析を行い各リン酸化状態の異なるプロテオフォームの解析を進めていく。

上記結果より、細胞や組織由来の多種多様なタンパク質の中から任意のタンパク質の機能的なリン酸化状態を検出及び同定することが可能となった。この技術を利用し、タンパク質のリン酸化状態という新しい視点に着目して様々な疾患の病態解明に応用可能となる事が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Ryota, Tsuno Takahiro, Togashi Yu, Okuyama Tomoko, Sato Aoi, Nishiyama Kuniyuki, Kyohara Mayu, Li Jinghe, Fukushima Setsuko, Kin Tatsuya, Miyashita Daisuke, Shiba Yusuke, Atobe Yoshitoshi, Kiyonari Hiroshi, Bando Kana, Shapiro A.M. James, Funakoshi Kengo, Kulkarni Rohit N., Terauchi Yasuo, Shirakawa Jun	4. 巻 25
2. 論文標題 Uncoupling protein 2 and aldolase B impact insulin release by modulating mitochondrial function and Ca <sup>2+</sup> release from the ER	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104603 ~ 104603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Li Jinghe, Inoue Ryota, Togashi Yu, Okuyama Tomoko, Satoh Aoi, Kyohara Mayu, Nishiyama Kuniyuki, Tsuno Takahiro, Miyashita Daisuke, Kin Tatsuya, Shapiro A.M. James, Chew Resilind Su Ern, Teo Adrian Kee Keong, Oyadomari Seiichi, Terauchi Yasuo, Shirakawa Jun	4. 巻 71
2. 論文標題 Imeglimin Ameliorates $\beta$ -Cell Apoptosis by Modulating the Endoplasmic Reticulum Homeostasis Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 424 ~ 439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db21-0123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学 生体調節研究所 代謝疾患医科学分野 白川研究室ホームページ <a href="https://diabetes.imcr.gunma-u.ac.jp/">https://diabetes.imcr.gunma-u.ac.jp/</a> 群馬大学 生体調節研究所ホームページ <a href="https://www.imcr.gunma-u.ac.jp/">https://www.imcr.gunma-u.ac.jp/</a> 群馬大学ホームページ <a href="https://www.gunma-u.ac.jp/">https://www.gunma-u.ac.jp/</a>
---

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------