

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22590037
 研究課題名（和文） リン酸親和性水晶発振子マイクロバランス法を用いた
 リン酸化生体分子の解析
 研究課題名（英文） Analysis of phosphorylated biomolecules
 using a phosphate-affinity quartz-crystal microbalance method
 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

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モノエステルジアニオンを特異的に捕捉する機能性分子（以下、フォスタグ）を水晶発振子マイクロバランス（QCM）法に適用させた。まずは、フォスタグを QCM チップ上に固定化したリン酸親和性バイオセンサーチップを新たに開発した。そして、この新規センサーチップを用いることで、リン酸化蛋白質や DNA のようなリン酸化生体分子の高感度検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the researcher has applied a novel phosphate capture molecule, biotinylated Phos-tag (Phos-tag Biotin BTL-111), which was originally synthesized, to a quartz-crystal microbalance procedure (QCM). By using the BTL-111, a phosphate-affinity QCM sensor chip has been newly developed. This novel biosensor chip permitted highly sensitive detections of phosphorylated biomolecules, such as phosphoproteins or DNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：リン酸化，水晶発振子マイクロバランス，QCM，バイオセンサー，フォスタグ，分子認識，蛋白質，分析化学

1. 研究開始当初の背景

今日、蛋白質リン酸化反応の検出は細胞機能解析のみならず、癌や神経変性疾患などの早期発見や予後改良に向けた診断法及びそれらの病態発症に深く関わるキナーゼやフォスファターゼの阻害剤のスクリーニング法としても注目を集めている。そうした観点からも、生体内の僅かなリン酸化反応を網羅

的にプロファイルできる、より特異的で、かつ、簡便・迅速で安定的な定量分析用デバイスの開発が急務である。

研究代表者が所属する研究室の成果の1つに「亜鉛二核錯体構造が、アルカリフォスファターゼの基質であるリン酸モノエステル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。この酵素モデル研究の成果

を基盤に、近年、研究代表者らは、生理条件下でナノモル濃度のリン酸モノエステルを認識する機能性分子（フォスタグ、図1参照）の開発に成功した（Kinoshita, E., et al., *Dalton Trans.* (2004) 1189）。フォスタグとリン酸モノエステルの親和性（フェニルリン酸アニオンの場合、 $K_d = 25$ nM）は、カルボン酸イオンとの親和性よりも1万倍以上大きい。このリン酸基捕捉分子をQCM法に適用できれば、生体分子のリン酸化反応を重さで測る新しいリアルタイム定量分析法が開発できると考え、本研究の着想に至った。

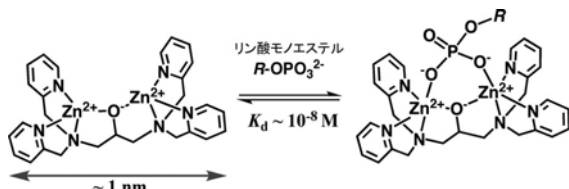


図1 二つの亜鉛イオンが協力してリン酸モノエステルを捕捉する機能性分子
フォスタグ = 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olateの二核亜鉛錯体

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが独自に開発したリン酸モノエステルジアニオンを特異的に捕捉するフォスタグをQCM法に適用する。水晶発振子とは、水晶の結晶を極薄い板状に切り出した切片の両側に金属薄膜を取り付けた構造をしたもので、それぞれの金属薄膜に交流電場を印加するとある一定の周波数で振動する性質を示す。この水晶発振子の表面に物質が付着すると物質の質量に比例して振動数が減少するため微量天秤として利用することができる。そこで本研究においては、フォスタグをQCM法におけるホスト分子、あるいはゲスト分子として適用させることで、振動数の経時変化から、微量な生体分子のリン酸化反応を定量分析できるリン酸親和性QCM法を開発する。まずは、フォスタグをQCMチップ上に固定化したリン酸親和性バイオセンサーチップを作成し、そして、そのセンサーチップを応用することで、リン酸化生体分子解析のための新しいアプリケーションに展開する。

3. 研究の方法

研究目的を達成するために、まずは、フォスタグを利用したリン酸親和性センサーチップの作成を実施し、その機能性の検証試験も行う。次に、フォスタグをゲスト分子であるアナライトとしての評価を行い、QCM法における最適化したリン酸基認識プローブとして開発する。これらの検証試験を踏まえ、蛋白質キナーゼ/フォスファターゼの酵素活性プロファイリング法やゲノム遺伝子多型の検出法を軸としたリン酸親和性QCM技術としての新しいアプリケーションを検討する。以下に、具体的事項を列記する。

(1) リン酸親和性センサーチップの作成

最適な作成法の検討や固定化させるフォスタグ量の最適化検討を行う。また、ゲスト分子として、リン酸化ペプチド、リン酸化蛋白質、DNAといったリン酸化生体分子を用いて検討を行う。

(2) フォスタグをQCM分析のリン酸基認識素子として樹立

QCM分析に対応した計測用分子プローブの開発を行い、様々なホストサンプルに応じたリン酸基認識素子としての機能性の検証を行う。

(3) リン酸親和性QCM技術を利用した新しいアプリケーション法の開発

リン酸親和性QCM技術を用いて創薬、遺伝子診断、ゲノム医療などの幅広い生命科学分野で利用できる新しいアプリケーションを開発する。リン酸親和性センサーチップを用いることで、キナーゼ/フォスファターゼ酵素活性測定法や遺伝子診断法の開発を行う。

4. 研究成果

(1) リン酸親和性センサーチップの作成

QCMセンサーチップにアビジンを固定化することで、研究代表者がこれまでに開発に成功しているビオチン化フォスタグ (BTL-104) を結合させることができ、そのセンサーチップにリン酸親和性の特性を付加させることができる。この想定のもと、ニュートラアビジンが固定化されたQCMセンサーにBTL-104を適用させることでリン酸親和性バイオセンサーチップを創出した。QCMの測定には、Affinix QNu (イニシウム社製) が使用された。さらに、本研究においては、ビオチン分子と Phos-tag 間のスペーサー分子として、エチレングリコールが12分子繋がったPEG12を導入したBTL-111を合成し、従来のBTL-104と同様にQCMセンサーチップに固定化することでリン酸親和性のセンサーチップを作成した。BTL-111,あるいはBTL-104を固定化したこれら2種類のチップとリン酸化タンパク質であるβ-カゼインを試料として用いて比較検討した結果、QCMセンサーチップにおいて、長いスペーサー分子を導入したBTL-111の方が、既存のBTL-104よりも高感度にリン酸化ターゲットを検出できることが証明された。この手法においては、検出感度を7倍以上向上させることに成功した (図2参照)。新規誘導体のBTL-111の検出感度が向上する理由として、長いスペーサーの導入により既製のBTL-104よりもPhos-tagそのものの自由度が増大し、標的へのアクセスが向上したと考察できる。

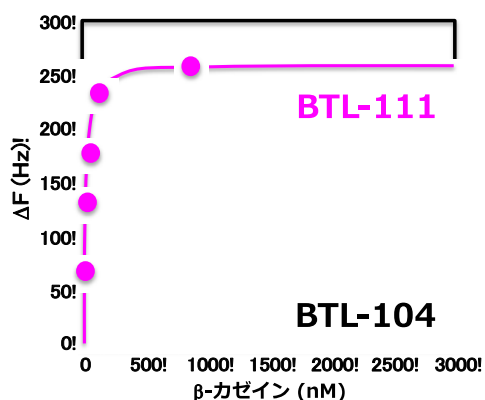


図2 QCM法による2種類のセンサーの親和性の比較

(2) フォスタグをQCM分析のリン酸基認識素子として樹立

リン酸親和性センサーチップを作成した時と同様に、まずは、QCMセンサーにニュートラアビジンを固定化した。次に、ニュートラアビジンが固定化されたQCMセンサーにビオチンが標識された各種リン酸化ペプチドを固定化させることでリン酸化ペプチド固定化QCMセンサーを作成した。このチップを利用して、従来のビオチン化フォスタグ BTL-104と新規誘導体 BTL-111（ビオチンとフォスタグ分子間に12分子のエチレンジグルコースを導入した誘導体）をリン酸基認識プローブとしてQCM法に適用させた。それぞれのビオチン化フォスタグのみの結合ではQCMシグナルを計測することはできなかった。BTL-111とストレプトアビジン複合体をゲストサンプルとしてアプライしたところ、QCMシグナルのリアルタイムな計測が可能となった。非リン酸化ペプチドを固定化したQCMセンサーチップや亜鉛と錯形成させていないBTL-111の使用では、ストレプトアビジンと複合体形成を行った後でも、QCMシグナルを計測することはできなかった。これにより、BTL-111とストレプトアビジン複合体が、QCM分析のリン酸基認識素子として機能することが明らかとなった。さらに、本研究においては、2分子、並びに4分子のビオチンが導入されたフォスタグ誘導体（それぞれBTL-108, BTL-109と名付ける）を合成し、同様にストレプトアビジンと複合体を形成させてゲスト分子としての応用を試みた。その結果、長いスペーサーを導入したBTL-111とは対照的に、これら2つの誘導体においては、QCMシグナルを得ることができなかった。この結果についてはいくつかの考察ができるが、恐らくは複数のストレプトアビジンが立体構造的な干渉となり、標的である2価の

リン酸基部位へのアクセスが阻害されたのかもしれない。

(3) リン酸親和性QCM技術を利用した新しいアプリケーション法の開発

BTL-111（ビオチンとフォスタグ分子間に12分子のエチレンジグルコースを導入した誘導体）を固定化したリン酸親和性QCMセンサーチップを用い、さらに、リン酸化タンパク質であるβカゼインを結合させ、アルカリフォスファターゼを用いた脱リン酸化アッセイ法の開発を試みた結果、リアルタイムな脱リン酸化反応を追跡することが可能となった。時間経過とともに酵素反応が進み、βカゼインが脱リン酸化されることでQCMシグナルが減少した。さらに、5'末端にリン酸基が付加されたDNAおよび付加されていないDNAを用いた結合実験を試みた結果、リン酸基が付加されたDNAのみにQCMシグナルが検出された。アレル特異的PCR法と組み合わせることで、ホモ変異の検出が可能となった。このことから、ホモ変異の遺伝子診断が可能であることがわかった。

以上より、ビオチン化フォスタグ誘導体BTL-111を固定化させたQCMセンサーチップを用いることで、より幅広いリン酸化生体分子の解析に応用できるものと期待する。

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19件）

- (1) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Sandwich assay for phosphorylation of protein multiplexes by using antibodies and Phos-tag. *Anal. Biochem.* 印刷中. 査読有 doi: 10.1016/j.ab.2013.03.029.
- (2) Tsunehiro, M., Meki, Y., Matsuoka, K., Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. A Phos-tag-based magnetic-bead method for rapid and selective separation of phosphorylated biomolecules. *J. Chromatogr. B* 86-94 (2013). 査読有 doi: 10.1016/j.jchromb.2013.02.039.
- (3) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. A laborsaving, timesaving, and more reliable strategy for separation of low-molecular-mass phosphoproteins in Phos-tag affinity electrophoresis. *Int. J. Chem.* **4**, 1-8 (2012). 査読有 doi: 10.5539/ijc.v4n5p1.
- (4) Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T.,

- Eiji Kinoshita, and Matsuoka, T. EF-1 α and mitochondrial ATP synthase \cdot chain: Alteration of their expression in encystment-induced *Colpoda cucullus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59**, 401-406 (2012). 査読有 doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00628.x.
- (5) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, リン酸化プロテオミクスのための Phos-tag テクノロジー. *分析化学*, **61**, 特集号「オミクスと分析化学」(日本分析化学会), 469-487 (2012). 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/article/bunsekikagaku/61/6/61_469/_article/-char/ja/
<http://ir.lib.hiroshima-u.ac.jp/00033871> (広島大学学術情報リポジトリ)
- (6) Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Fujiwara, S., Miyata, S., Eiji Kinoshita, and Matsuoka, T. Protein phosphorylation in encystment-induced *Colpoda cucullus*: Localization and identification of phosphoproteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **331**, 128-135 (2012). 査読有 doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02560.x.
- (7) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Sugiyama, Y., Fukada, Y., Ozeki, T., and Koike, T. Highly sensitive detection of protein phosphorylation by using improved Phos-tag Biotin. *Proteomics* **12**, 932-937 (2012). 査読有 doi: 10.1002/pmic.201100639.
- (8) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Separation and identification of four distinct serine-phosphorylation states of ovalbumin by Phos-tag affinity electrophoresis. *Electrophoresis* **33**, 849-855 (2012). 査読有 doi: 10.1002/elps.201100518.
- (9) 木下恵美子, 木下英司, 小池透, プロトコール集 フォスタグテクノロジーを用いたリン酸化タンパク質解析法. *生物物理化学*, **56**, 特集号「リン酸化生体分子解析のためのフォスタグテクノロジー」(日本電気泳動学会), s51-s75 (2012). 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/browse/sbk/56/Suppl_2/_contents/-char/ja/
- (10) 木下英司, 木下恵美子, 多幾山敬, 宗村雅男, 小池透, 今後の展望2 蛍光性 Phos-tag を用いたタンパク質リン酸化反応の解析法. *生物物理化学*, **56**, 特集号「リン酸化生体分子解析のためのフォスタグテクノロジー」(日本電気泳動学会), s45-s49 (2012). 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/browse/sbk/56/Suppl_2/_contents/-char/ja/
- (11) 木下恵美子, 木下英司, 小池透, 今後の展望1 中性条件で泳動を行う改良型 Phos-tag SDS-PAGE を用いたリン酸化タンパク質解析. *生物物理化学*, **56**, 特集号「リン酸化生体分子解析のためのフォスタグテクノロジー」(日本電気泳動学会), s41-s44 (2012). 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/browse/sbk/56/Suppl_2/_contents/-char/ja/
- (12) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, フォスタグケミストリー. *生物物理化学*, **56**, 特集号「リン酸化生体分子解析のためのフォスタグテクノロジー」(日本電気泳動学会), s3-s7 (2012). 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/browse/sbk/56/Suppl_2/_contents/-char/ja/
- (13) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions. *Proteomics* **12**, 192-202 (2012). 査読有 doi: 10.1002/pmic.201100524
- (14) Sogame, Y., Asami, H., Eiji Kinoshita, and Matsuoka, T. Possible involvement of cAMP and protein phosphorylation in the cell signaling pathway for resting cyst formation of ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Acta Protozool.* **50**, 71-79 (2011). 査読有 http://www.eko.uj.edu.pl/ap/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=42&Itemid=27
- (15) Sogame, Y., Eiji Kinoshita, and Matsuoka, T. Ca^{2+} -dependent *in vivo* protein phosphorylation and encystment induction in the ciliated protozoan *Colpoda cucullus*. *Eur. J. Protistol.* **47**, 208-213 (2011). 査読有 doi: 10.1016/j.ejop.2011.02.003
- (16) Somura, M., Takiyama, K., Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. A Phos-tag-based fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of the kinase reaction of a substrate peptide. *Anal. Methods* **3**, 1303-1309 (2011). 査読有 doi: 10.1039/C1AY05016H
- (17) Kinoshita-Kikuta, E., Yamada, A., Inoue, C., Eiji Kinoshita, and Koike, T. A novel phosphate-affinity bead

with immobilized Phos-tag for separation and enrichment of phosphopeptides and phosphoproteins. *J. Integrated OMICS* **1**, 157-169 (2011). 査読有

doi: 10.5584/jiomics.v1i1.46.

- (18) Eiji Kinoshita and Kinoshita-Kikuta, E. Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* **11**, 319-323 (2011). 査読有 doi: 10.1002/pmic.201000472.
- (19) Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Harada, N., and Koike, T. Zinc(II)-cyclen polyacrylamide gel electrophoresis for detection of mutations in short Ade/Thy-rich DNA fragments. *Anal. Biochem.* **408**, 348-350 (2011). 査読有 doi: 10.1016/j.ab.2010.09.003.
<http://ir.lib.hiroshima-u.ac.jp/00030873> (広島大学学術情報リポジトリ)

[学会発表] (計 22 件)

- (1) Eiji Kinoshita, Highly sensitive imaging of protein phosphorylation by Phos-tag technology, 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, 2013 年 2 月 1 日, 東大医科研講堂, 東京
- (2) 木下英司, Phos-tag 技術が拓くタンパク質リン酸化研究の新たな潮流, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, マリンメッセ福岡, 福岡市
- (3) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, SuperSep Phos-tag プレキャストゲル: 迅速, 高効率, かつ, 高精度なリン酸化シグナル伝達分子の分離検出法, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日, マリンメッセ福岡, 福岡市
- (4) 木下英司, Phos-tag 技術によって新たにできるようになったこと, 新薬理学セミナー 2012, 2012 年 11 月 24 日, 熊本大学薬学部宮本記念館, 熊本市 (招待講演)
- (5) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Phos-tag SDS-PAGE systems for protein phosphorylation profiling under neutral pH conditions, HUP0 2012 11th Annual World Congress, 2012 年 9 月 12 日, Hynes Convention

Center, Boston, MI, USA

- (6) 木下英司, リン酸化タンパク質解析のためのフォスタグテクノロジー, 第 63 回日本電気泳動学会総会, 2012 年 8 月 20 日, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾市
- (7) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, 改良型 Phos-tag Biotin の開発とリン酸化プロテオミクスへの応用, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 2012 年 7 月 26 日, 日本科学未来館, 東京
- (8) 木下英司, Phos-tag アフィニティ電気泳動の開発と改良〜リン酸化タンパク質の分析, 第 62 回日本電気泳動学会シンポジウム, 2012 年 5 月 11 日, 慶応義塾大学薬学部, 東京
- (9) 木下英司, リン酸化生体分子解析のための Phos-tag テクノロジー, 第 610 回九州大学生医研セミナー, 2012 年 2 月 23 日, 九州大学生医研, 福岡市 (招待講演)
- (10) 木下英司, Phos-tag がもたらす蛋白質リン酸化解析のブレイクスルー, 第 34 回日本分子生物学会バイオインダストリーセミナー, 2011 年 12 月 13 日, パシフィコ横浜, 横浜市 (招待講演)
- (11) 木下英司, 改良型 Phos-tag Biotin の開発とその応用, 第 62 回日本電気泳動学会, 2011 年 11 月 13 日, 横浜市開港記念会館, 横浜市
- (12) 木下英司, Phos-tag 親和電気泳動法の開発, 第 62 回日本電気泳動学会, 2011 年 11 月 12 日, 横浜市開港記念会館, 横浜市 (第 50 回児玉賞受賞講演)
- (13) 木下英司, Phos-tag によるタンパク質リン酸化修飾の高感度検出, 第 5 回 QCM 研究会, 2011 年 10 月 14 日, 東京會館, 東京都千代田区 (招待講演)
- (14) 木下英司, リン酸化プロテオミクスに向けた Phos-tag テクノロジーの奥義, 第 63 回日本生物工学会大会, 2011 年 9 月 28 日, 東京農工大学, 東京都小金井市 (招待講演)
- (15) 木下英司, Phos-tag を用いた分子イメージングとリン酸化シグナル研究, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 24 日, 国立京都国際会館, 京都市
- (16) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, 改良型 Phos-tag Biotin を用いたペプチドマイ

クロアレイ解析による蛋白質リン酸化反応プロファイリング, 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 2011 年 7 月 29 日, 朱鷺メッセ, 新潟市

- (17) 木下英司, Phos-tag を用いたリン酸化タンパク質解析の新展開, 日本農芸化学会 2011 年大会ランチョンセミナー, 2011 年 3 月 26 日, 京都女子大学, 京都市 (招待講演)
- (18) 木下英司, Phos-tag がもたらすリン酸化シグナル研究のブレークスルー, 酵母細胞プロジェクト研究センター春期シンポジウム, 2011 年 3 月 11 日, 広島大学大学院先端物質科学研究科, 東広島市 (招待講演)
- (19) 木下英司, Phos-tag テクノロジーが拓く生命科学研究の新展開, 第 354 回生命科学セミナー, 2011 年 2 月 23 日, 広島大学総合科学部, 東広島市 (招待講演)
- (20) 木下英司, リン酸基認識素子としての二核亜鉛錯体とオミクス解析技術への応用, 第 4 回日本化学会東海支部 若手研究者フォーラム, 2011 年 1 月 22 日, 名古屋市立大学薬学部, 名古屋市 (招待講演)
- (21) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, Improved Phos-tag Biotin for advanced profiling of protein phosphorylation, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 9 日, 神戸国際展示場, 神戸市
- (22) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, Improved Phos-tag Biotin for highly sensitive detection of protein, 日本プロテオーム学会 2010 年大会, 2010 年 7 月 27 日, 東京ベイホテル東急, 東京

[図書] (計 4 件)

- (1) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Phos-tag affinity electrophoresis for protein kinase profiling. *in Protein Kinase Technology, Neuromethods*, **68** (ed. by Mukai, H); Springer, New York, 13-34 (2012).
- (2) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, 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 (2012).
- (3) Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E.,

and Koike, T. 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 (2012).

- (4) 木下英司, 木下恵美子, 小池透, リン酸基アフィニティ電気泳動法 (Phos-tag SDS-PAGE) を用いたタンパク質リン酸化修飾の高感度検出. *実験医学*, **30**, 増刊号「シグナル伝達研究最前線 2012」(羊土社), 686-692 (2012).

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/tkoike/index.html>

<http://shushoku-signal.com/soshiki/kobo/18kinoshita.html>

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