# Phos-tag 電気泳動を用いた高分子量リン酸化タンパク質の 質的・量的変動モニタリング法

木下 英司, 木下 恵美子, 小池 透

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科医薬分子機能科学研究室)

#### はじめに

現在、生体内のタンパク質リン酸化解析法の主流は、抗リン酸化抗体を用いて標的タンパク質のリン酸化の有無を検出する種々の手法である. 抗体は生体試料中に存在する微量なタンパク質を特異的に検出できる優れたツールである. しかし、抗リン酸化抗体に関しては市販品がない、製造工程が複雑で入手までに時間とコストが掛かる、入手できたとしても特異性や感度が劣るなどといった問題に少なからず遭遇する. また特定の部位に特異性を示す1種類の部位特異的抗リン酸化抗体を用いても、標的タンパク質が複数部位にわたってリン酸化されている場合、分子全体のリン酸化状態を同時に知ることはできない. 近年の質量分析装置を用いたリン酸化プロテオーム解析法の発展もめざましいが、同じタンパク質分子の様々なリン酸化状態を同時に識別、同定するとなると、依然として障壁は高い.

これまでに筆者らは、リン酸基を捕捉する機能性分子を用いた Phos-tag 電気泳動法を開発している<sup>1~4</sup>.これは SDS-PAGE の分離ゲルにアクリルアミド結合型 Phos-tag のマンガン錯体を共重合させ、混在する様々なリン酸化状態の標的タンパク質を泳動距離の差として検出する方法である。現在、この手法は幅広い生物種の多くのタンパク質リン酸化解析において使用されている<sup>50</sup>.一方でこの手法には、ポリアクリルアミドゲルの分子篩効果を基本原理とするため高分子量リン酸化タンパク質の分離が不鮮明になる、といった欠点がある。巨大タンパク質を SDS-PAGE で分離解析する際、編目構造の粗い低濃度のポリアクリルアミドゲルを使用する。しかし、ポリアクリルアミドゲルを使用する。しかし、ポリアクリルアミドゲルを使用する。

は 4% (w/v) 以下では強度が低く,従来法では 200 キロダルトン (kDa) 以上のリン酸化タンパク質の解析は,電気泳動後に染色やブロッティング操作を行う必要があるため極めて困難であった.そこで筆者らは,総アクリルアミド濃度 4% (w/v) 未満の Phos-tag SDS-PAGE ゲルに核酸解析で汎用されるアガロースゲル (0.5% [w/v]) を混合してゲル強度を高め,巨大タンパク質をリン酸化状態により鮮明に分離できる新しい分析法を樹立した6.7. 本稿では,この新規改良法を用いることで 200 kDa 以上のリン酸化タンパク質を分離,検出した応用例を示しながら,その詳細な方法論を解説する.

### 1. リン酸親和性 Phos-tag 電気泳動法

電気泳動を用いてリン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離することは、生体内タンパク質のリン酸化状態を知ることができる簡便な方法である。タンパク質の分離に広く使われる SDS-PAGE では、リン酸化されることによって泳動シフトをおこすタンパク質があり、そのことがリン酸化の指標になる場合がある。また、等電点電気泳動法では、理論上、リン酸化によるタンパク質の等電点の変化によってリン酸化量に応じたタンパク質の分離が可能となる。しかし、これらの方法ではリン酸化によって泳動に変化がおこるかどうかはタンパク質構造など固有の特性に依存しており、実際には解析できるタンパク質は限られる。そこで筆者らは、ゲル担体とリン酸基の直接相互作用に基づくリン酸化タンパク質分離法を考案し、リン酸化されたタンパク質をゲルシフトバンドとして視覚化できる技術を開発した。

一級アミノ基をもつ Phos-tag 誘導体にアクリル酸をアミド結合させて合成したアクリルアミド結合型 Phos-tag は、SDS-PAGE の分離ゲルに適量を共重合させることで、電気泳動中のリン酸化タンパク質を特異的に捕捉する媒体となる(図 1). 通常の SDS-PAGE では、一つのタンパク質のリン酸化型と非リン酸化型の泳動度は同じであることがほとんどである. 一方、アクリルアミド結合型 Phos-tag を共

Monitoring method for the alteration of phosphorylation status in a high-molecular-mass protein using Phos-tag electrophoresis technology

Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, and Tohru Koike (Department of Functional Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Kasumi 1–2–3, Minami-ku, Hiroshima 734–8553, Japan)

〔生化学 第82巻 第9号

# テクニカルノート

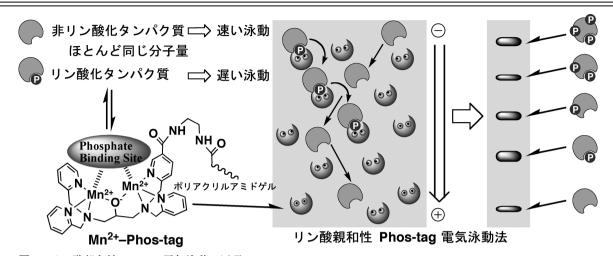


図1 リン酸親和性 Phos-tag 電気泳動の原理 リン酸化の部位やその数に違いのあるリン酸化タンパク質が泳動度の異なるバンドとして検出される.

重合させたゲルでは、Phos-tag にリン酸化型のものがトラップされながら泳動が進行するため、リン酸化型を非リン酸化型から分離できる。つまり、リン酸化型はゲルシフトしたバンドとして検出される。また、一つのタンパク質分子内に複数のリン酸化部位が存在して、様々なリン酸化状態が混在するタンパク質については、その状態の違いを泳動度の異なるバンドとして検出できる。この Phos-tag 電気泳動法は、一般的な SDS-PAGE とその後に続くゲル染色やウェスタンブロッティングによるタンパク質検出法と全く同じ試薬や操作法を用い、分離ゲルにモノマーであるアクリルアミド結合型 Phos-tag を共重合させるだけの簡便な方法である。

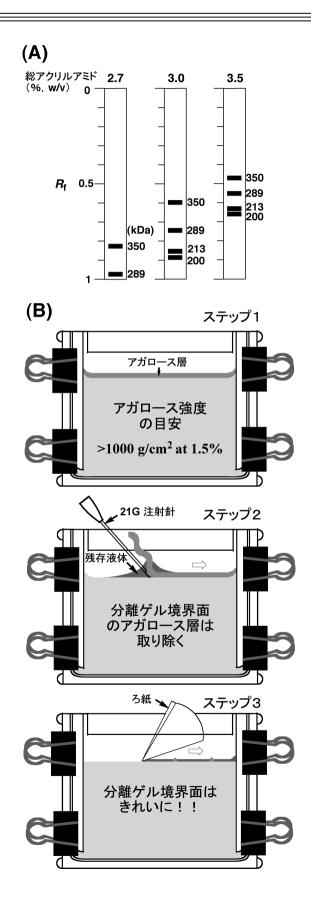
# 2. 高分子量リン酸化タンパク質の分離・検出のための 新しい電気泳動法

従来の Phos-tag 電気泳動法は、リン酸化修飾前後のタンパク質を同時定量できる画期的な手法であるが、高分子量タンパク質の分離検出という点で課題を残していた®.これまでのプロトコールでは、せいぜい 200 kDa のリン酸化タンパク質の分離解析が限界で、それ以上の巨大分子となるとさらに低濃度のポリアクリルアミドゲルの使用が必須となる。総アクリルアミド濃度 4% (w/v) 以下のゲルは、その分子篩能は保持されるが、ゲル自体が極めて軟質であるため、事実上、電気泳動後の取り扱いは不可能である。これを克服するために、他の親水性ポリマーとの共存によりゲル強度を高めるポリマーブレンドの方法論を採用し、ウェスタンブロッティングへの適合検証も行いながら、目的を達成した。具体的には、総アクリルアミド濃度 4% (w/v) 未満の Phos-tag SDS-PAGE ゲルに最終濃度が 0.5%

(w/v) となるように SeaKem Gold アガロース (Lonza 社製) を混合してゲル強度を高めた. アガロースゲルは, 1,000 g/cm²以上 (1.5% [w/v]) の強度のものが適していた. 融解したアガロースをゲル化温度以上で未重合のアクリルアミド溶液と混合し, 重合開始剤を添加して直ちにスラブゲルを作成した. 電気泳動条件は, アガロースゲルの融解温度以上に発熱しないような電流値に設定した. 電気泳動後のゲル染色法やウェスタンブロッティング膜への転写法は, 通常の SDS-PAGE ゲルと同じである. この新規法を用いることで 200 kDa 以上のリン酸化タンパク質を分離検出した実際の手順と解析例を以下に記す.

#### 3. 新しい Phos-tag 電気泳動法のプロトコール

電気泳動は、アトー社製の電気泳動装置、AE-6500型を 用いた. 分離ゲル (7 mL) の組成は, 3% (w/v) アクリ ルアミド(アクリルアミドとビスアクリルアミドの比は 29:1), 0.5% (w/v) SeaKem Gold  $\mathcal{T} \mathcal{J} \Box - \mathcal{A}$ , 375 mMトリス-塩酸 (pH 8.8), 0.1% (w/v) SDS, 20 μM アク リルアミド結合型 Phos-tag(AAL-107,フォスタグコン ソーシアム製,2010年5月より和光純薬工業社から販売 開始), 40 μM 塩化マンガン, 濃縮ゲル (2 mL) の組成は, 3% (w/v) アクリルアミド (アクリルアミドとビスアク リルアミドの比は 29:1), 0.5% (w/v) SeaKem Gold ア ガロース, 125 mM トリス-塩酸 (pH 6.8), 0.1% (w/v) SDS であり、いずれも TEMED と過硫酸アンモニウムを用 いて重合させた. 泳動槽用緩衝液は,25 mM トリス, 192 mM グリシン、0.1% (w/v) SDS を使用した. タン パク質試料の調製は、サンプル調製液(65 mM トリス-塩 酸 [pH 6.8], 1% [w/v] SDS, 5% [v/v] 2-メルカプト



エタノール,10% [v/v] グリセロール,0.03% [w/v] ブロモフェノールブルー)を使用し,95%,3分の熱処理を行った.通電はゲル 1 枚あたり 15 mA で,ブロモフェノールブルーがゲル下端に到達するまで行った.ウェスタンブロッティングは,泳動後のゲルを 1 mM EDTA(マンガンイオン除去剤)を含む転写緩衝液(25 mM トリス,192 mM グリシン,10% [v/v] メタノール)に浸して 10 分間振とうし,さらに,EDTA を含まない転写緩衝液で10 分間振とうした後,日本エイドー社製の NA-1511C型タンク式転写装置を用い,3.5 V/cm で 16 時間(オーバーナイト)転写した.キーとなるゲル作成から電気泳動までの手順を列記する.

- ① ゲル作成用のガラスプレートを組み立てる.
- ② 上記した分離ゲル組成のうち、SeaKem Gold アガロースを除いた未重合の分離ゲル溶液を準備する。Phos-tag SDS-PAGE ではすべてのタンパク質が、通常の SDS-PAGE よりも泳動が遅れる傾向がある。その程度はタンパク質によって異なり、試料溶解液の成分にも影響される。標的タンパク質に最適の分離条件を決定するため、20~100 μM アクリルアミド結合型 Phos-tag の範囲で検討する必要がある。総アクリルアミドの至適濃度は、標的タンパク質の分子量に依存する。2.7~3.5% (w/v)のポリアクリルアミドゲルを用いて 200~350 kDa のタンパク質を泳動した場合の泳動度と分子量の関係を図 2A に示す、最終濃度を決定する際の参考にされたい。
- ③ 100 mL 三角フラスコに 0.75 g の SeaKem Gold ア ガロースと蒸留水 50 mL を加え、電子レンジでアガロースを完全に融解させた 1.5% (w/v) アガロース溶液を準備する. SeaKem Gold ア ガロース (1.5% [w/v] で 3,500 g/cm²以上のゲル強度) の代替品として、ア ガロース LO3 (タカラ社製, 1.5% [w/v] で 2,200 g/cm²以上)、アガロース KANTO (関東化学社製, 1.5% [w/v]で 900~1,400 g/cm²以上)、アガロース KANTO ME (関東化学社製, 1.5% [w/v] アガロース KANTO LE (関東化学社製, 1.5% [w/v]

#### 図2 プロトコールの実際

- (A)2.7~3.5% (w/v) のポリアクリルアミドゲルを用いて 200~350 kDa のタンパク質を泳動した場合の泳動度と分子量の関係 (文献7より転載)
- (B) 分離ゲル上端にできるアガロース層の除去の仕方 ステップ1:分離ゲルが重合すると、その上端部に2~ 3 mm のアガロース層が形成される。 ステップ2:21G の注射針を用いてアガロース層をすべて 取り除く。 ステップ3:ろ紙などで残存する液体と一緒にさらに取り

ステップ3:ろ紙などで残存する液体と一緒にさらに取り 除き、分離ゲル境界面をきれいにする.

#### テクニカルノート

で1,400~1,700 g/cm²以上) の適合を確認している. Lonza 社製の NuSieve GTG (4% [w/v] で500 g/cm²以上) と NuSieve 3:1 (4% [w/v] で1,400 g/cm²以上) は代替品として不適合であった.

- ④ 完全に融解した熱い1.5% (w/v) アガロース溶液 (2.33 mL, 90℃以上) を未重合の分離ゲル溶液と混合 する.
- ⑤  $7 \mu L$  の TEMED と  $100 \mu L$  の 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム水溶液を混合し,直ちにガラスプレートに流し込み重合させる(室温で約 20 分放置).ゲル重合前のアガロースの凝固を防ぐため,蒸留水などの液体の重層は行わない.必要であれば,ガラスプレートを  $40\sim45$   $\mathbb{C}$  にセットした恒温器で予め温めておく.
- ⑥ 重合した分離ゲルの上端には未重合のアクリルアミドを含むアガロース層 (2~3 mm) が形成されるので、21G の注射針ですべて取り除き、ろ紙などで残存する液体と一緒にさらに除く(図 2B).この操作が不十分だと、分離ゲルと濃縮ゲルの接着が不十分となる.
- ⑦ 上記した濃縮ゲル組成のうち、SeaKem Gold アガロースを除いた未重合の濃縮ゲル溶液を準備する.
- ⑧ 完全に融解した熱い1.5%(w/v)アガロース溶液 (0.67 mL,90℃以上)を未重合の濃縮ゲル溶液と混合 する。
- ⑨  $2 \mu L$  の TEMED と  $50 \mu L$  の 10% (w/v) 過 硫酸 アンモニウム水溶液を混合し、直ちに分離ゲル上層に流し込む。

- ⑩ 直ちにサンプルコウムを挿入し,重合させる(室温で約20分放置).
- ① 泳動槽用緩衝液を泳動槽下部に入れ、サンプルコウムを抜いたゲルを泳動槽にセットする.
- ② 泳動槽上部に泳動槽用緩衝液を入れる.
- (3) 各サンプルウェルにタンパク質試料をアプライした 後、電源をセットする。
- ④ アガロースゲルの融解温度以上に発熱しないような電流値に設定して(定電流法,15 mA/ゲル,約2時間),通電を開始する.

#### 4. 解析の実際

新しい Phos-tag 電気泳動法を用いて、DNA 損傷刺激に伴う HeLa 細胞内の毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子産物である ataxia telangiectasia-mutated kinase (ATM, 350 kDa) と p53 結合タンパク質 1 (53BP1, 213 kDa) のリン酸化状態の変化を解析した。これらのタンパク質は分子サイズが大きいため、従来法でのゲルシフトによるリン酸化解析は不可能であった。ATM は DNA 損傷刺激における細胞内シグナル伝達の上流に位置するタンパク質キナーゼであり、刺激を受けると即座に自己の 1981 番目のセリン残基をリン酸化する。自己リン酸化により活性化したATM は、その基質となる 53BP1 の 25、29、1778 番目のセリン残基をリン酸化する。今回は、DNA 損傷刺激剤として DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ阻害剤であるアクチノマイシン D (2 μM, 5 時間処理)を用いた。

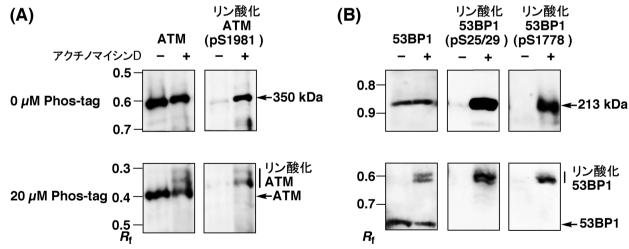


図3 DNA 損傷刺激に伴う HeLa 細胞内の高分子量タンパク質リン酸化状態の変化を新しい Phos-tag 電気泳動を用いて解析した例(文献 6,7 より転載)

Phos-tag 電気泳動には、SeaKem Gold アガロース(0.5% [w/v])共存下で架橋重合させた Phos-tag( $20~\mu$ M)固定化均一ポリアクリルアミドゲル(3%[w/v])を使用した. Phos-tag を含ませていない電気泳動ゲルを用いた結果との比較を示す.(A)アクチノマイシン D 処理後のリン酸化 ATM の検出

(B) アクチノマイシン D 処理後のリン酸化 53BP1 の検出

2010年 9月] 861

まずは、Phos-tag を含まない電気泳動ゲルにアクチノマ イシンD処理および無処理の細胞溶解試料を20 ug タン パク質/レーンでアプライし、抗 ATM 抗体によるウェス タン解析で、各試料の ATM 量がほぼ同じであることを確 認した (図3A, 左上). 今回の条件では、僅かにリン酸化 体のシフトが観察された. 同じブロット膜を抗リン酸化 ATM (pS1981) 抗体で解析し、ATM の自己リン酸化を確 認した (図 3A, 右上). 次に, 20 μM の Phos-tag を用いた 新しい電気泳動法によって同様の解析を行った。抗 ATM 抗体による解析において、アクチノマイシンD処理後の 試料では $R_{\rm f}$ 値 $0.3\sim0.4$ の範囲で三つのバンドが確認でき た (図 3A, 左下). 同じブロット膜を抗リン酸化 ATM (pS1981) 抗体で解析すると R<sub>f</sub> 値の小さい 0.35 と 0.31 の 二つのバンドが ATM のリン酸化体であることがわかった (図 3A, 右下). すなわち, 新しい Phos-tag 電気泳動法を 用いることで、リン酸化 ATM が著しくシフトアップした 2本のゲルシフトバンドとして検出されたのである.

同様に 53BP1 のリン酸化状態を解析した. Phos-tag を含 まない電気泳動ゲルに試料をアプライし、抗53BP1 抗体 を用いてウェスタン解析を行ったところ, 各試料において ほぼ等量の53BP1を確認した(図3B, 左上). 53BP1に ついては、リン酸化に伴うゲルシフトは観察されなかった が、2種類の抗リン酸化53BP1 抗体 (pS25/29 と pS1778) を用いて解析するとそのリン酸化は確認された(図3B, 上中央と右上). 次に, 20 μM の Phos-tag を含むゲルにて 抗53BP1 抗体による解析を行ったところ, 処理後の試料 において R<sub>f</sub>値 0.62 と 0.60 の二つの著しくシフトアップ したバンドが確認できた (図 3B, 左下). 引き続いて抗リ ン酸化 53BP1 抗体を用いて解析すると、R<sub>f</sub> 値 0.62 と 0.60 の二つのバンドは、25、29番目のセリン残基がリン酸化 された 53BP1 であることがわかり、また、 $R_{\rm f}$  値 0.62 のバ ンドは、1778番目のセリン残基もリン酸化されているこ とが判明した (図 3B, 下中央と右下).

# 5. 長所,短所,そして,今後の展望

リン酸親和性 Phos-tag 電気泳動法は、i) リン酸化状態を泳動距離の差で検出する(放射性同位体リンを使用しない)、ii) セリン/スレオニン/チロシン/ヒスチジン/アスパラギン酸といったアミノ酸の種類を問わず、すべてのリン酸化体を検出できる、iii) リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を同時に定量できる、iv) 様々なリン酸化状態にある同一タンパク質分子を複数の異なる泳動バンドとして検出できる、v) 同じリン酸化量のリン酸化タンパク質でもリン酸化部位の違いで分離検出できる、vi)電気泳動後にウェスタン解析が適用できるので、極微量な

リン酸化タンパク質でも感度よく検出できる、などの大き な利点をもつ. これらの利点は、今回の高分子量リン酸化 タンパク質を標的とした新しい分離検出法にも継承され, さらに、標的巨大タンパク質をプロテアーゼ処理せず、本 来の分子量サイズのネイティブ体として鮮明に検出でき る、といった有用性が付加される、しかしながら、アガ ロースを混合したゲル担体を用いるため、アガロースゲル の融解温度以上に発熱しないように電気泳動を行う必要が あるといった実験条件の制限がある. このことはウェスタ ンブロッティングを行う際も同様で,よって、タンク式に よる比較的長時間 (オーバーナイト) の転写操作が必要と なる. 転写効率は、網目の緩い低濃度のポリアクリルアミ ドゲルを使用していることから従来法よりも改善されてい るが、マンガンイオン除去のための1 mM EDTA を含む転 写緩衝液によるゲルの洗浄作業はこの新規法においても必 須である.

元来, 低濃度のポリアクリルアミドゲルの軟質性をア ガロースゲルで補強する工夫は, 生体内タンパク質にお いて最大級の構造タンパク質であるタイチン(3,000~ 4,000 kDa) やネブリン (600~900 kDa) のアイソフォー ムを分離するために考案されたものである。 タイチンは、 骨格筋形成時に、 自らもつキナーゼドメインにより自己リ ン酸化されることが知られ100, また, そのリン酸化の程度 と筋ジストロフィー疾患との関連性が示唆されている. よって、本法によりこれらメガダルトン級の巨大リン酸化 タンパク質の詳細な動態分析が可能となり、今後、病態発 症との関連性も追跡しやすくなるであろう. このように、 これまで不可能であった解析が本法により実現し、これに よって得られる新しい知見が、生命科学の基礎研究に大き く貢献するだけではなく、未知のリン酸化反応を分子標的 とした診断法や治療薬の開発のための起爆剤になることを 期待する.

# おわりに

本稿で紹介した新しい Phos-tag 電気泳動は、200 kDa 以上の高分子量リン酸化タンパク質の質的・量的変化をモニタリングできる技術である。標的タンパク質によってPhos-tag や総アクリルアミドの至適濃度は異なるが、細胞溶解液のような様々なタンパク質が混在する試料の場合、通常、20~100 μM の Phos-tag、2~4% の総アクリルアミドで条件設定ができる。細胞内シグナル伝達の解析にこの技術を用いれば、抗リン酸化抗体からだけでは得られなかった過剰リン酸化反応の可視化やその経時的リン酸化ステップなど、巨大タンパク質リン酸化状態における新たな情報を得られる可能性が高い。また、リン酸化部位の未同

862 〔生化学 第82巻 第9号

# テクニカルノート

定、あるいは抗リン酸化抗体が未開発な巨大タンパク質のリン酸化を解析する際にも非常に有効となる。さらには、リン酸化修飾前後のタンパク質を泳動度により差別化できるので、開発した抗リン酸化抗体の特異性を検証するのにも最適である。今後本法が、巨大タンパク質のリン酸化と関連した各種病態の診断や治療、創薬を目的としたキナーゼ/ホスファターゼ制御分子のスクリーニングなどを含むタンパク質リン酸化反応研究で汎用されることを期待してやまない。

- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K., & Koike, T. (2006) Mol. Cell. Proteomics, 5, 749–757.
- Kinoshita-Kikuta, E., Aoki, Y., Kinoshita, E., & Koike, T. (2007) Mol. Cell. Proteomics, 6, 356–366.
- 3) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Matsubara, M., Yamada, S., Nakamura, H., Shiro, Y., Aoki, Y., Okita, K., & Koike, T.

- (2008) Proteomics, 8, 2994-3003.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Matsubara, M., Aoki, Y., Ohie, S., Mouri, Y., & Koike, T. (2009) *Electrophoresis*, 30, 550–559.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., & Koike, T. (2009) Curr. Proteomics, 6, 104–121.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Ujihara, H., & Koike, T. (2009) Proteomics, 9, 4098–4011.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., & Koike, T. (2009) Nat. Protoc., 4, 1513–1521.
- Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Kinoshita, E., Kinoshita, Kikuta, E., Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S.J., & Takata, M. (2008) Nat. Struct. Mol. Biol., 15, 1138–1146.
- 9) Tatsumi, R. & Hattori, A. (1995) Anal. Biochem., 224, 28-31.
- Mayans, O., van der Ven, P.F., Wilm, M., Mues, A., Young, P., Fürst, D.O., Wilmanns, M., & Gautel, M. (1998) *Nature*, 395, 863–869.