

生理的なタンパク質のリン酸化の原位置 (*in situ*) での検出

三浦 賢司¹, 寺石 俊也²

(¹ 防衛医科大学校再生発生物学講座)

(² 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部)

1. はじめに

化学修飾により機能が調節されているタンパク質が多数存在することは論をまたない。また、タンパク質は存在している場所においてのみ機能するわけだから、その局在は機能に直結する。つまり、タンパク質の機能の詳細を論ずるためには、修飾状態と局在との双方を同時に知る必要がある。また、生命現象は時間とともに変化しているため、最終的には、タンパク質の修飾の時間-空間分布の全貌を把握することが必要になる。本稿では、細胞内シグナル伝達分子として詳しく解析がなされている MAP キナーゼのうちの ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) に関して、生理的なリン酸化を原位置 (*in situ*) で検出する際の問題点と最適な方法に関して論ずる。以下の内容は簡単で当たり前のことだが、甘く見ると行く手を阻む予想外の落とし穴になる場合があるので油断は禁物だ。

2. 抗体を用いたリン酸化タンパク質の検出方法

免疫組織染色法では、実験動物に遺伝子操作等の人為的な操作を行わずに特定のタンパク質を検出するので、生理的な局在を正確に反映した検出が期待できる。本稿ではそれ以外の方法に関しては論じない。タンパク質のリン酸化を検出するためには、リン酸化特異抗体を使用する。リン酸化特異抗体は 1990 年代初頭に開発された^{1,2)}。これは、リン酸化部位を中心とする 10 アミノ酸程度の長さのペプチドを抗原にして作成されたもので、リン酸化した部位を特異的に認識する。このような抗体を用いて免疫組織染色を行えば、リン酸化した状態の特定のタンパク質を特異的

に検出できる。モノクローナルでもポリクローナルでもよい。使用方法は通常の免疫組織染色法と同様である。ただし、抗体と反応させるまでのサンプルの調製方法は、通常の免疫組織染色法と比してより注意深く行う必要がある。なぜなら、タンパク質のリン酸化状態は容易に変化するからである。いくら特異性の高い抗体を用いようとも、実験操作に起因するアーチファクトを検出したのでは誤った解釈をまねく。特に、ERK1/2 のようにリン酸化と脱リン酸化の変換速度が速いタンパク質に関しては細心の注意を払わなければ信頼できる結果は得られない。抗体と反応させるまでの操作に関しては、免疫組織染色法の操作とは別個の、独立した生化学および細胞生物学の実験操作だと考えるとわかりやすい。リン酸化タンパク質の *in situ* での検出の要点はこの部分にあることを以下に記す。

3. タンパク質のリン酸化に影響を与える因子

ERK1/2 のリン酸化に関しては多くの報告がなされている。それらによると、還元固定、麻酔、神経損傷、痛み刺激、ホルマリン暴露などにより、ERK1/2 のリン酸化が惹起される³⁾。そのため、生理的なリン酸化状態を正確に把握するためにはこれらの操作を避けなければならない。ところが、これらの操作は通常の動物実験において日常的に行われるものである。さらに複雑なのは、細胞の種類によってリン酸化のレスポンスが異なる点である。例えば、マウスをパラホルムアルデヒドで灌流固定した場合、肝臓では ERK1/2 がリン酸化されて細胞核内に検出されるが、腎臓においてはリン酸化 ERK1/2 は検出されない³⁾。タンパク質のリン酸化は、リン酸化酵素と脱リン酸化酵素の働きのバランスによって規定される。細胞が死ぬと、ATP の供給が停止してリン酸化反応は減衰して脱リン酸化反応が優勢になる⁴⁾。これらのことから、サンプルの処理は可能な限り迅速に行わなければならないのは明らかである。

ERK1/2 のリン酸化は動的で変化は急速である。多くの操作によって容易にリン酸化反応が進み、一方では脱リン酸化反応も進んでいる。ERK1/2 のリン酸化状態を解析す

In situ detection of physiologically phosphorylated protein
Kenji Miura¹ and Toshiya Teraishi² (Department of Developmental Anatomy and Regenerative Biology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan; ²Department of Mental Disorder Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Japan)
原稿受付：2008 年 12 月 22 日

テクニカルノート

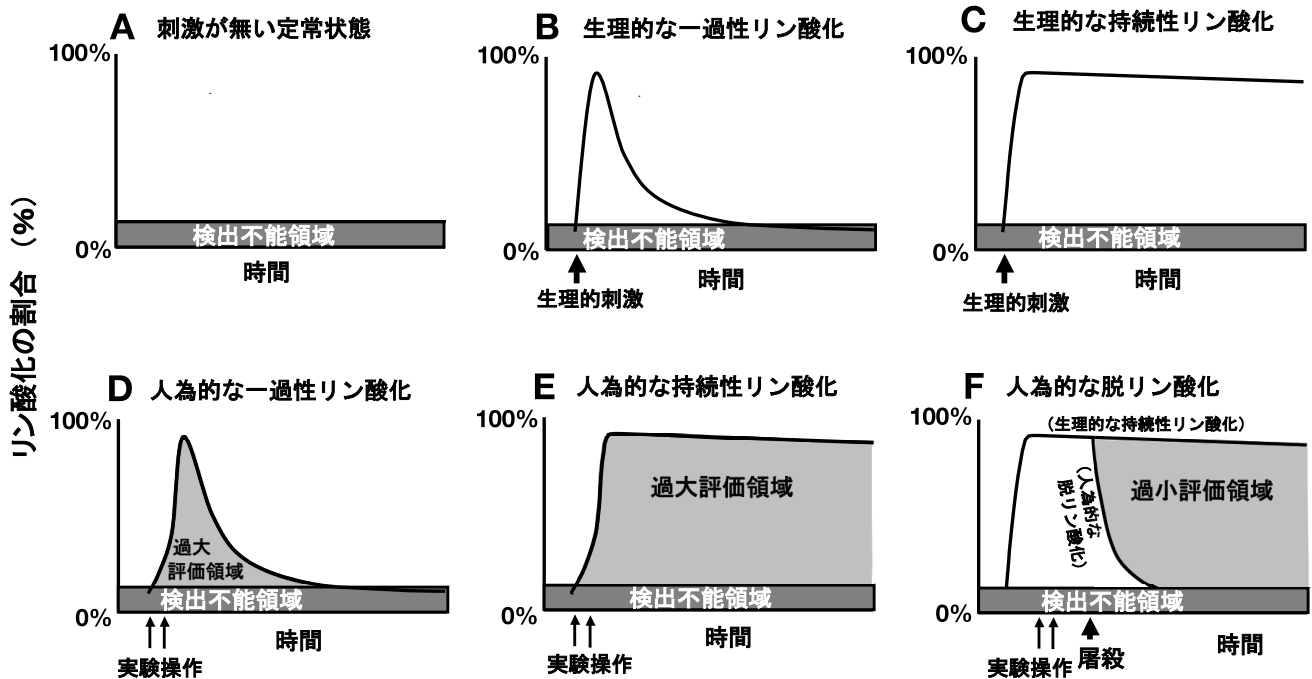


図1 ERK1/2のリン酸化の割合の時間変化

縦軸は一つの細胞内におけるERK1/2のリン酸化の割合(100×リン酸化ERK1/2の分子数/トータルERK1/2の分子数)、横軸は時間を示す。生理的の刺激、実験操作、屠殺などのERK1/2のリン酸化に影響を及ぼす事象の発生ポイントを横軸上に矢印で示した。

(A) 刺激を受けない定常状態。実験的にはリン酸化を検出できない場合でも、実際には検出限界以下のレベルでリン酸化が起きている。

(B) 生理的な一過性のリン酸化。増殖因子などによって引き起こされる生理的なリン酸化。刺激から2時間程度で刺激前のレベルに戻る。

(C) 生理的な持続性のリン酸化。増殖因子などによって引き起こされる生理的なリン酸化。リン酸化状態が4時間以上持続する。

(D) 人為的な一過性のリン酸化。実験操作に起因する一過性のリン酸化。生理的なリン酸化より高く検出されてしまう領域を「過大評価領域」として表示した。この部分はアーチファクトである。

(E) 人為的な持続性のリン酸化。実験操作に起因する持続性のリン酸化。生理的なリン酸化より高く検出されてしまう領域を「過大評価領域」として表示した。この部分はアーチファクトである。

(F) 人為的な脱リン酸化。実験操作に起因する脱リン酸化。生理的なリン酸化より低く検出されてしまう領域を「過小評価領域」として表示した。この部分はアーチファクトである。

る際は、常に実験操作と時間変化について厳密に考える必要がある。これらの概念を図1にまとめた。複雑なのは、アーチファクトによってリン酸化が過大評価される場合(図1D, E)と過小評価される場合(図1F)があるということだ。実験条件が厳密さを欠く場合には、リン酸化と脱リン酸化の双方にアーチファクトが生じ、それぞれが細胞の種類によって程度が異なる。結果として、空間的に一様ではなくきわめて複雑にアーチファクトの影響を受けることになる。それでも、同じ条件で実験を行えば、結果は再現されるはずだ。しかしながら、高い再現性の実験結果が得られても、それらが生理的なリン酸化を正確に反映しているとは限らないことになる。

4. 最適な方法

生理的なタンパク質のリン酸化を把握するためには、慎重を期して「事実上すべての実験操作がERK1/2のリン酸化状態を変化させ得る」と考えた方がよいだろう。脱リン酸化酵素阻害剤などの薬剤の使用は、それ自体が生理的状態から外れることになるし、均一に作用させることも困難なので本稿では考慮しない。それではどうすればよいのかといえば、極力ステップ数を減じたプロトコールにしたがってごく短時間に実験操作を完了するしかない。瞬時にサンプル中の分子の動きを止めることができればタンパク質のリン酸化はその瞬間の状態が維持されるが、もちろんこれは実現不可である。しかし、現実的には、液体窒素などで急速に冷却して、細胞応答や化学反応の進行速度より

- 1 マウント用のコンパウンドが注入された凍結用チャンバーを氷上に置きあらかじめ冷却しておく
- 2 実験動物を屠殺後、迅速に摘出した試料をコンパウンドに埋め込む
- 3 凍結用チャンバーを液体窒素に浸す
- 4 試料が完全に凍結したら-80°Cの冷却庫に移し保管する
- 5 -80°Cの冷却庫から試料を取り出しクリオスタットにて切片を薄切する
- 6 25°Cに保管しておいたスライドグラスをクリオスタット庫内に入れる
- 7 ただちに庫内にて薄切した切片をスライドグラスに貼付する
- 8 貼付後ただちに-20°Cの100%エタノールに30分間浸して試料を固定する
- 9 切片を取り出しドライヤーの冷風を用いて25°Cの風を当てて風乾する
- 10 免疫組織染色に用いる

図2 生理的なタンパク質リン酸化の *in situ* での検出のプロトコール (文献3より改変)
アーチファクトが生じやすいのが2から3, および7から8のステップなので特に注意して迅速に行うこと。用いる用具などの詳細に関しては文献3を参照されたい。

も速い速度で凍結すれば、事実上生理的なリン酸化を把握することができるだろう。このようにして調製した切片は、光学顕微鏡で観察するには十分な形態を保つ。

我々が用いているプロトコール³⁾を図2に示す。2から3のステップにおいては、個々の細胞がまだ生きているのでリン酸化と脱リン酸化の両方のアーチファクトが生じ得る。また、7から8のステップにおいては、細胞はすでに死んでいるものの、凍結された状態から一度融解することになるので脱リン酸化のアーチファクトが生じ易い。したがって、特にこれらのステップにおいて迅速な操作を行うことが肝要だ。

5. 限界と課題

図2の方法は、サンプルのサイズが小さい方が適用しやすい。例えば、小さいモデル実験生物を丸ごと処理する場合には向いている。逆をいうと、大きいサンプルでは温度が下がるまでに時間が長くなってしまいうので、迅速な処理という原則からはずれやすくなる。また、大きい実験動物の何らかの器官を調べたい場合には、摘出するための実験操作が多くなってしまい、場合によっては器官そのものを細切しなければならない。これらは極力ステップ数を減じたプロトコールという原則からはずれてしまう。著者らは、現在はマウスの胎児を解析の対象にしている。今後、より大きいモデル生物や器官を調べる場合には、さらに工夫したプロトコールを適用する必要があるかもしれない。

い。

別の意味での重要な課題が、動物実験の倫理に関わる問題である。現在の一般的な規定では、動物を冷凍によって死に至らしめてはならないとされている。根拠は、「冷凍すると水の結晶ができて痛みを生じる」というものである。したがって、たとえ小さな動物であっても、断頭などによって安楽死させてから凍結しなければならない。あらゆる実験操作がERK1/2のリン酸化に影響を及ぼす可能性があることは前述した通りである。

抗体に関しては、リン酸化状態に特異的な抗体が数多く市販されている。しかしながら、非リン酸化状態に特異的な抗体はほとんど開発されていない。本来ならば、リン酸化型と非リン酸化型のタンパク質を分別して局在の時間-空間変化を動的に捉えることが重要であろう。したがって、非リン酸化型タンパク質の特異的な検出が課題として残る。

6. おわりに

プロテオミクス解析の一環として、世界各地でタンパク質の局在を網羅的に把握するプロジェクトが進行している⁵⁻⁹⁾。それらの結果は、インターネット経由で閲覧可能なものが多い。これらのプロジェクトの延長として、いずれは、すべての器官においてすべてのタンパク質の局在が明らかにされる日が来るかもしれない。遺伝子産物レベルではあるが、マウスの脳においては2万を超えるほとんど

テクニカルノート

すべての mRNA の三次元分布が調べられている¹⁰⁾。この結果も、インターネット経由で公開されている。世界の情勢、そして本稿で述べてきたことを合わせて考えると、リン酸化を始めとするタンパク質の修飾状態について網羅的に把握することは今後の重要な課題であり、それを実現することは現時点でもかなりの部分で可能である¹¹⁾。タンパク質の局在を網羅的に把握することは、それだけで一つのゴールとなる。そして、そのゴールを新たなスタートとして次のステップ、例えば病態の解明、へと進むことが可能になるだろう。ゲノムあるいはエピゲノム解読のプロジェクトなどとのアナロジーからすれば明らかと思われる。

謝辞

本研究を進めるにあたりまして、有益な議論をして下さいました防衛医科大学校再生発生学講座の今城純子教授に感謝いたします。

- 1) Nishizawa, K., Yano, T., Shibata, M., Ando, S., Saga, S., Takahashi, T., & Inagaki, M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 3074–3079.
- 2) Yano, T., Taura, C., Shibata, M., Hirono, Y., Ando, S., Kusubata, M., Takahashi, T., & Inagaki, M. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 1144–1151.
- 3) Teraishi, T., Miura, K., & Imaki, J. (2008) *J. Immunol. Methods*, **330**, 34–43.
- 4) Mandell, J.W. (2003) *Am. J. Pathol.*, **163**, 1687–1698.
- 5) Agaton, C., Galli, J., Hoiden Guthenberg, I., Janzon, L., Hansson, M., Asplund, A., Brundell, E., Lindberg, S., Ruthberg, I., Wester, K., Wurtz, D., Hoog, C., Lundeberg, J., Stahl, S., Ponten, F., & Uhlen, M. (2003) *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 405–414.
- 6) Warford, A., Howat, W., & McCafferty, J. (2004) *J. Immunol. Methods*, **290**, 81–92.
- 7) Uhlen, M., Bjorling, E., Agaton, C., Szigyarto, C.A., Amini, B., Andersen, E., Andersson, A.C., Angelidou, P., Asplund, A., Asplund, C., Berglund, L., Bergstrom, K., Brumer, H., Cerjan, D., Ekstrom, M., Elobeid, A., Eriksson, C., *et al.* (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1920–1932.
- 8) Mulder, J., Wernerus, H., Shi, T.J., Ponten, F., Hober, S., Uhlen, M., & Hokfelt, T. (2007) *Neuroscience*, **146**, 1689–1703.
- 9) Berglund, L., Bjorling, E., Oksvold, P., Fagerberg, L., Asplund, A., Szigyarto, C.A., Persson, A., Ottosson, J., Wernerus, H., Nilsson, P., Lundberg, E., Sivertsson, A., Navani, S., Wester, K., Kampf, C., Hober, S., Ponten, F., *et al.* (2008) *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 2019–2027.
- 10) Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., Chen, L., Chen, L., Chen, T.M., Chin, M.C., Chong, J., Crook, B.E., Czaplinska, A., *et al.* (2007) *Nature*, **445**, 168–176.
- 11) Teraishi, T., & Miura, K. (2009) *Bioessays*, **31** (in press).