# 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>5)</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

Monitoring method for the alteration of phosphorylation status in a high-molecular-mass protein using Phos-tag electrophoresis technology 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<sup>6.7</sup>.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。

ー級アミノ基をもつ 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

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)



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.

# 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<sup>8</sup>.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/cm<sup>2</sup>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 アガロース, 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°C,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0.75g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/cm<sup>2</sup>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/cm<sup>2</sup>以上),アガロース KANTO (関東化学社製,1.5% [w/v] で900~1,400 g/cm<sup>2</sup>以上),アガロース KANTO ME (関東化学社製,1.5% [w/v] で1,200~1,500 g/cm<sup>2</sup>以上),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 除き,分離ゲル境界面をきれいにする.

で1,400~1,700 g/cm<sup>2</sup>以上)の適合を確認している. Lonza 社製の NuSieve GTG(4% [w/v] で500 g/cm<sup>2</sup>以上)と NuSieve 3:1(4% [w/v] で1,400 g/cm<sup>2</sup>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 µLのTEMEDと100 µL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40~45℃ 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 µL の TEMED と 50 µL 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).
- 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.
- 12 泳動槽上部に泳動槽用緩衝液を入れる.
- (13) 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 μM) 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

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<sub>f</sub>値 0.3~0.4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>i</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<sup>9</sup>. 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<sup>10</sup>, 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

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.
- 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.
- 5) 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.
- 8) 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.
- 10) 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.

\_\_\_\_