

特集：次世代シグナル伝達研究—先駆的基礎解析と臨床・創薬への展開—

タンパク質リン酸化修飾の高感度検出法と 新しいオミクス技術としての展開

木下英司, 木下恵美子, 小池透

本稿では、リン酸基捕捉分子、Phos-tag を用いたリン酸化タンパク質の解析技術について述べる。Phos-tag のビオチン化誘導体は、リン酸化タンパク質の網羅的検出のためのウェスタンブロットニング、ペプチドアレイを用いた試料中のキナーゼ活性の高感度検出などに応用できる分子デバイスである。また、アクリルアミド化 Phos-tag を共重合させたゲルを用いてタンパク質のリン酸化状態の違いを分離検出するリン酸親和性電気泳動法についても概説する。この手法は細胞内タンパク質の多様なリン酸化状態とその経時変動を定量解析することができる。リン酸化プロテオミクスの主流であるショットガン分析法においては、タンパク質のリン酸化修飾はペプチドとしての情報となるが、本法は全長タンパク質のリン酸化状態を解析しようとするものであり、オミクス技術に新しい視点をもたらす技術となる。

1. はじめに

生体におけるタンパク質のリン酸化反応は、その機能を制御するための重要な翻訳後修飾である。負電荷 (-2) を持つリン酸基がタンパク質に共有結合することにより、そのタンパク質の構造や性質は大きく変化し、酵素活性や局在性、他のタンパク質との複合体形成などをダイナミックに制御する。タンパク質のリン酸化反応を可逆的に司るのは、500 種類以上のプロテインキナーゼ¹⁾と、約 150 種類のプロテインホスファターゼ²⁾(いずれもヒトにおいて)である。これらのキナーゼ/ホスファターゼの複雑で多様なネットワークは、速やかで正確なタンパク質リン酸化状態の調節を行い、細胞の生命活動の根幹をなす多くの働きを

支えている。このことは同時に、キナーゼ/ホスファターゼの協調の破綻が多くの疾病の原因となり得ることを意味する³⁾。それゆえに、生体内のタンパク質リン酸化反応の全体像を解明しようとするリン酸化プロテオミクスは、様々な生命現象や病気発症メカニズムの解明、さらには病気の治療法の開発につながる研究として注目を集めているのである。

近年、リン酸化プロテオミクスの主流となっている質量分析を基盤とした種々の技術は、タンパク質リン酸化に関する膨大なデータを生み出している。しかし、極めて動的で複雑なタンパク質リン酸化/脱リン酸化反応を理解するためには、複数の研究法から得た多くの知見をもとに全体像を理解する必要がある。実際、最新の質量分析装置を用いても、生体内タンパク質の種々のリン酸化状態の存在比や時間的変化を追跡することは難しいのである。したがって、既存の技術に加え、さらにそれらとは異なる視点でタンパク質リン酸化に関する情報が得られる画期的な技術も必要である。

筆者らは、リン酸基を特異的に捕捉する機能性分子、フォスタグ (Phos-tag) を用いて、リン酸化プロテオミクスに有用な新しい技術を開発している。Phos-tag は二つの

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 (〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3)

Highly sensitive detection method for protein phosphorylation and its development as a new technique toward phosphoproteomics

Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta and Tohru Koike (Department of Functional Molecular Science, Institute of Biomedical & Health Science, Hiroshima University, Kasumi 1-2-3, Hiroshima 734-8553, Japan)

金属イオンを持つ二核錯体化合物で、水溶液中でリン酸モノエステル基を選択的に捕捉する⁴⁾。また、生体高分子であるリン酸化タンパク質も、リン酸化アミノ酸残基の種類に関わらず捕捉できる。本稿では、リン酸化タンパク質の網羅的検出のためのウェスタンブロットリングやペプチドアレイを用いた試料中のキナーゼ活性の高感度検出などに応用できるビオチン化 Phos-tag、また、アクリルアミド化 Phos-tag を共重合させたゲルを用いることで、タンパク質のリン酸化状態の違いを分離検出するリン酸親和性電気泳動法 (Phos-tag SDS-PAGE) を概説し、次世代シグナル伝達研究を担う新しいオミクス技術としての展望についても言及したい。

2. ビオチン化 Phos-tag を用いたリン酸化タンパク質の高感度検出

1) 概要

近年、タンパク質リン酸化反応の検出技術は、がんなどの分子標的薬のスクリーニング法として注目されている。よって、生体内のごくわずかなタンパク質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、高感度な分析技法の開発が急務である。筆者らはリン酸基を特異的に捕捉する Phos-tag にビオチンを導入したリン酸基認識プローブ、ビオチン化 Phos-tag を既に開発し、実用化している。ビオチン化 Phos-tag はストレプトアビジンと複合体を形成させることで表面プラズモン分析用⁵⁾やウェスタンブロットリング解析用⁶⁾のイメージング試薬となる。この節では、ごくわずかなタンパク質リン酸化反応をより高感度に検出できる次世代型の Phos-tag 誘導体を用いたリン酸化プロテオーム研究のための新しい分析技法を紹介する。

2) 新規誘導体ビオチン化 Phos-tag の開発⁷⁾

従来のビオチン化 Phos-tag (BTL-104, 和光純薬工業) を改変させることで、既存の機器や発光試薬を改良することなく検出感度を飛躍的に高めることを目指し、新規誘導体の開発を試みた。幾つかの誘導体を合成し、標品リン酸化タンパク質を試料としたウェスタン解析による比較検討を行った結果、図 1A で示すような、ビオチンと Phos-tag 間のスパーサー分子として、エチレングリコールが 12 分子つながった PEG12 を導入した誘導体 (BTL-111) で、検出感度が有意に向上することが認められた⁷⁾。さらに、別のアプローチにおいても同様な結果が得られるかを検証するため、水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法による検討を行った (図 1B)。QCM 用のセンサーチップにニュートラアビジンをコートし、BTL-111, あるいは BTL-104 をさらに固定化させることで、リン酸親和性の QCM センサーチップを作製した。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 法においても、長いスパ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 1B 中の表参照)。新規誘導体の BTL-111 の検出感度が向上する理由として、長いスパ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 1A 参照)。

次に、プロテオーム試料である細胞溶解液を用いてウェスタン解析法における BTL-111 の特異性の検証を行った (図 1C)。左が CBB 染色像、右が BTL-111 でのプロービング像を示す。試料は左右同じもので、両端のレーン (レーン M1 と M2) はそれぞれ卵白アルブミンを含む分子量マーカーである。両者の分子量マーカーともに、リン酸化タンパク質である卵白アルブミンのみが特異的に検出された。また、細胞溶解液では、チロシンホスファターゼ阻害剤である過バナジン酸 (レーン 5)、タンパク質キナーゼ C 活性化剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, レーン 9) を処理した細胞において強い化学発光シグナルを認め、アルカリホスファターゼによる脱リン酸化処理 (偶数番号のレーン) によってシグナルが有意に減少することがわかった。これらの結果より、新規に合成した BTL-111 がプロテオーム試料中のリン酸化タンパク質群を特異的に検出していることを証明することができた。

3) Lab-on-a-Chip 技術への応用⁷⁾

新規誘導体の BTL-111 をハイスループットなプロテインキナーゼプロファイリングを目的としたペプチドマイクロアレイチップ技術に応用した。今回使用した Intavis 社製の CelluSpots キナーゼ基質ペプチドアレイは、384 のスポットがデュプリケートフォーマットで配置され、また、コントロールとして予めリン酸化されたアミノ酸残基 (チロシンとセリン/トレオニン) を含むペプチドが 2 か所に固定化されている。まずは、Phos-tag を使用せずに西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) が結合したストレプトアビジンのみで検出したところ、多くの疑陽性を呈したスポットが観察されたので (図 2A 左)、この手法にはブロッキング操作が必須であることがわかった⁷⁾。ブロッキング操作 (ウシ血清アルブミン処理) 後に BTL-111 でプロービングしたところ、上記したコントロールのリン酸化ペプチドのみが特異的に検出された (図 2A 中央, O2 と M22 の 2 か所のスポット)。一方、既製の BTL-104 では、ブロッキング操作後には特異的な検出はできなかった (図 2A 右)。この BTL-104 の結果は、ブロッキング操作により標的へのアクセスが抑制されたためと考察できる。

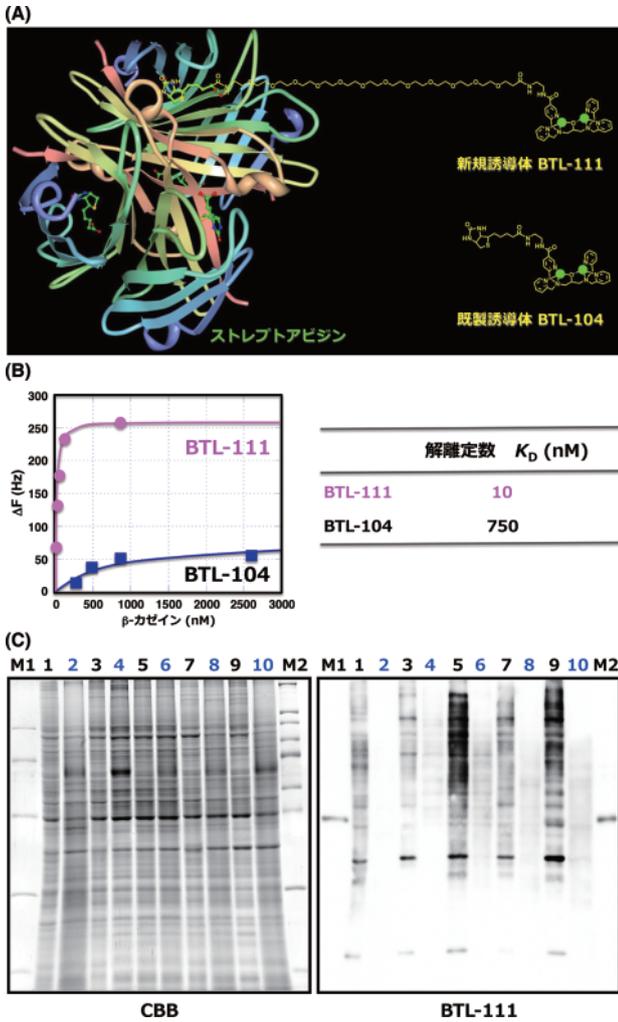


図1 新規誘導体ビオチン化 Phos-tag の開発 (文献7より転載)
 (A) ストレプトアビジン (4量体)-ビオチン複合体の X線解析構造に新規誘導体 BTL-111 の構造を重ねたイメージ。比較のため既製誘導体 BTL-104 の構造も示した。
 (B) QCM法による BTL-111 と BTL-104 の親和性の比較。
 (C) ウェスタン解析法による BTL-111 の特異性の検証。レーン1&2: A431細胞溶解液, レーン3&4: EGF (上皮細胞増殖因子) 刺激後の A431細胞溶解液, レーン5&6: 過バナジン酸処理後の A431細胞溶解液, レーン7&8: HeLa細胞溶解液, レーン9&10: PMA処理後の HeLa細胞溶解液。偶数番号のレーンは、脱リン酸化処理を施している。

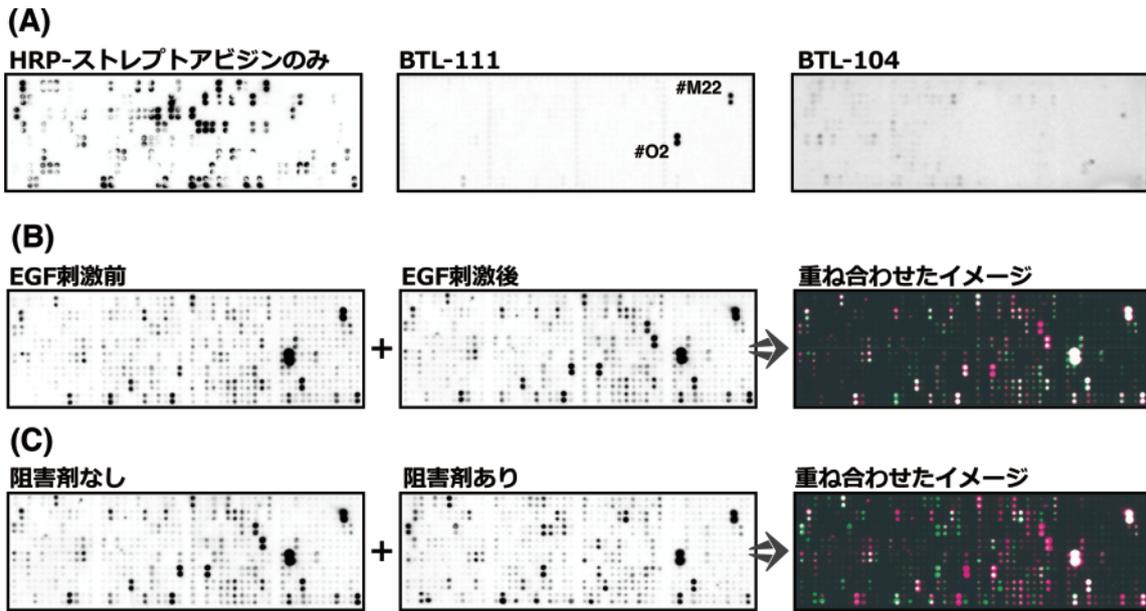


図2 ペプチドマイクロアレイチップ技術に応用したキナーゼプロファイリング (文献7より転載)
 (A) HRP-ストレプトアビジンのみ (左), BTL-111 (中央), BTL-104 (右) を用いた比較データ。両者の誘導体とも HRP-ストレプトアビジンと複合体を形成させた後に使用している。
 (B) A431細胞における EGF 刺激前後のキナーゼ活性プロファイリング。
 (C) 創薬を指向したキナーゼ阻害プロファイリング。

様々な細胞溶解液を用いることで、シグナル伝達系におけるハイスループットなキナーゼ活性プロファイリングが可能となる。上皮細胞増殖因子 (EGF) 刺激前後のプロテオーム試料 (A431 細胞溶解液) を別々のアレイに処理し、得られたイメージをコントロールである 2 か所のスポットを指標にして標準化しながら重ね合わせることで、刺激前後の多くのキナーゼ活性の強弱を短時間で検出することができるようになった (図 2B)。刺激前と後でリン酸化が増大しているスポットはそれぞれ緑色とマゼンタ色で、前後で変化しないスポットは白色で表されている。さらには、創薬を指向したハイスループットなキナーゼ阻害プロファイリングも可能である。Src キナーゼ阻害剤である Src kinase inhibitor I を用い、EGF 刺激後の阻害剤の影響を調べた (図 2C)。阻害剤によってキナーゼ活性が抑制されたスポットをマゼンタ色で、逆に、阻害剤によって亢進されたスポットを緑色で表した。このように、本法が、複雑なリン酸化シグナルを短時間で一網打尽とするキナーゼ/ホスファターゼの活性プロファイリング法として、あるいはハイスループットなキナーゼ/ホスファターゼの阻害剤スクリーニング法として、今後大きく貢献することを期待している。

3. Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化タンパク質の分離検出法

1) 概要

Phos-tag SDS-PAGE は、タンパク質の分子量に基づく分離に広く利用されている SDS-PAGE 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電気泳動法である。リン酸基捕捉分子であるアクリルアミド化 Phos-tag を分離ゲルに共重合させたゲルを用い、タンパク質試料の調製法や電気泳動の操作・試薬は、すでに確立されている SDS-PAGE 法とほぼ同様である。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移動度は同じであることがほとんどである。一方、アクリルアミド化 Phos-tag を共重合させた分離ゲルでは、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、その状態の違いを移動度の異なるバンドとして分離できる。さらには、同一タンパク質において、リン酸化アミノ酸残基数が同じでも、部位が異なる場合には、移動度の異なるバンドとして検出される特徴があるので、リン酸化状態の違いを高精度かつ高感度に分離検出できる方法であると言える。

筆者らは、本電気泳動法を最も汎用されている Laemmli

の SDS-PAGE システムに適用させ、2006 年に Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE として発表した⁶⁾。これは一般的な SDS-PAGE 用の機器と試薬があれば実行できるという簡便さゆえ、数年間で多くの研究者に利用され、タンパク質リン酸化修飾に関する貴重な成果が数多く報告された。さらに 2011 年に、その改良法として中性ゲル緩衝液システムを適用させた Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE を発表した⁸⁾。これにより分離能力が顕著に向上し、多くのタンパク質のリン酸化状態を詳細に解析できるようになった。この節では、改良法である Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE を用いて細胞内で進行するシグナル関連タンパク質のキナーゼ/ホスファターゼ反応を同時に解析した例⁹⁾について述べると共に、 Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE の原理に基づいて開発された SuperSep Phos-tag プレキャストゲル (和光純薬工業) によるリン酸化タンパク質の分離検出の実施例¹⁰⁾についても紹介する。

2) 細胞内シグナル伝達分子、ERK の活性化・不活性化過程の同時定量解析⁹⁾

細胞内シグナル伝達分子、ERK は MAP キナーゼファミリーの一つであり、細胞外からの刺激に応答して核へと情報を伝達する。ERK の活性化は、上流のキナーゼである MEK (MAP キナーゼキナーゼ) によってトレオニンとチロシン (ERK1 では Thr-202 と Tyr-204, ERK2 では Thr-183 と Tyr-185) が同時にリン酸化されることによって行われる。 Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE とそれに続くウェスタン解析により、EGF 刺激後の A431 細胞の ERK1/2 (44/42 kDa) を検出したところ、3 本のシフトアップバンドが観察された (図 3A)。1 次元目を通常の SDS-PAGE、2 次元目を Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE とした 2 次元電気泳動で、各バンドは ERK1 と ERK2 のそれぞれから派生したものが二つ重なったものであることがわかった。次に、EGF 刺激後の経時的なリン酸化状態の変化を追跡した (図 3B)。活性化型 ERK を特異的に検出する抗リン酸化 ERK1/2 抗体 (pT_{202}/pY_{204}) によって、一番上のバンドが活性化型であることがわかった。活性化型 ERK は 2~10 分で最大に達する。活性化型以外の 2 本のバンドは、Thr-202 と Tyr-204 のそれぞれのリン酸化を認識する部位特異的な抗リン酸化抗体によって、上から 2 番目のバンドがリン酸化 Tyr-204、一番下のバンドがリン酸化 Thr-202 を含むモノリン酸化型であることが判明した (図 3C)。MEK は、ERK の Thr-202 と Tyr-204 を同時にリン酸化するという「Processive model」が提唱されていることから¹¹⁾、これらのモノリン酸化型 ERK は、活性化過程ではなく不活性化過程で生じるものであると考えられた。リン酸化 ERK に対するホスファターゼは 10 種以上が報告されているが¹²⁾、チロシンホスファターゼ阻害剤である過バナジン酸、あるいはセリン/トレオニンホスファターゼ阻害剤である Calyculin A の存

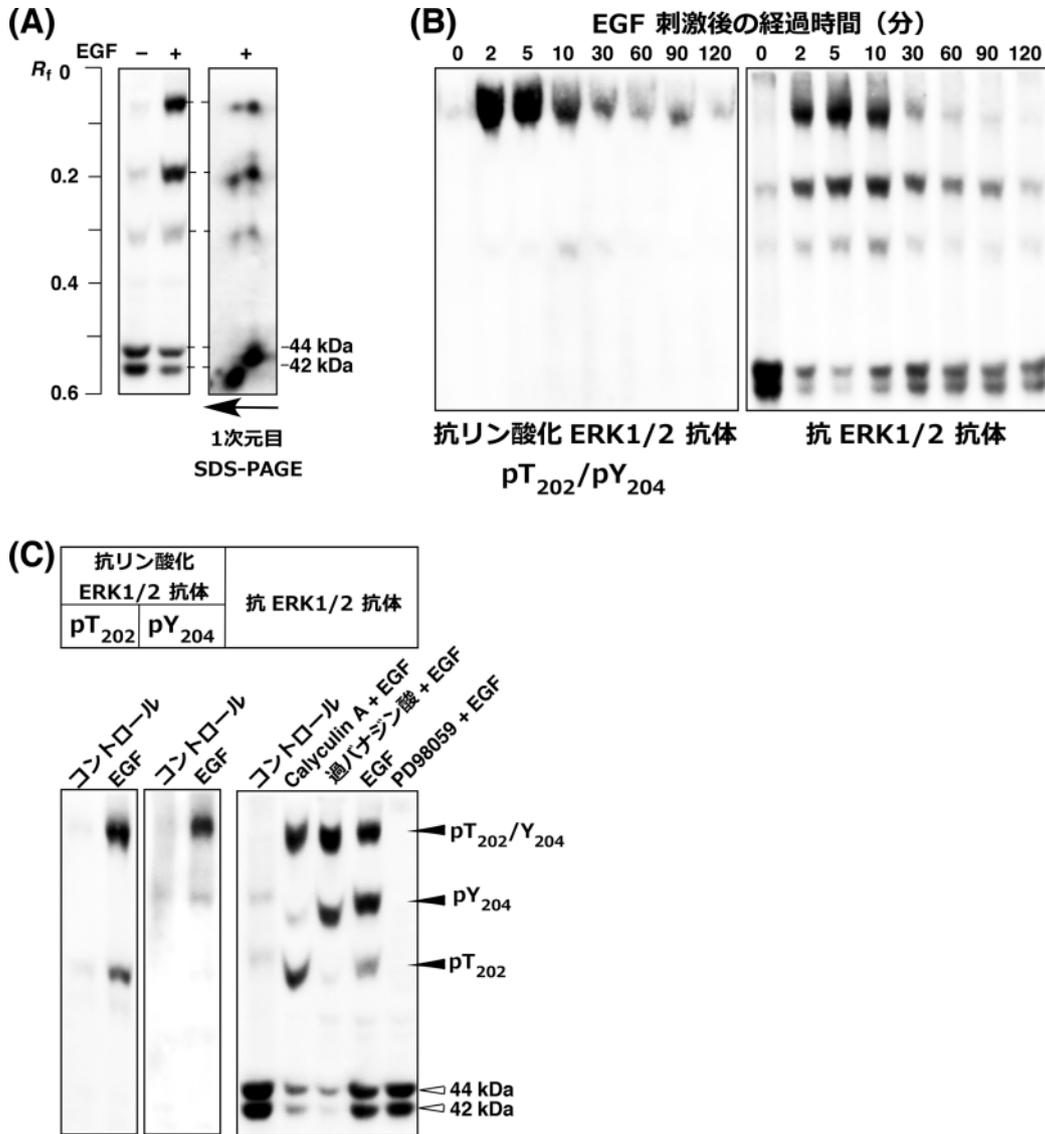


図3 ERKの活性化・不活性化過程の同時定量解析 (文献9より転載)
 (A) EGF刺激前後のリン酸化ERKの検出。
 (B) EGF刺激後のリン酸化ERKの経時的定量解析。
 (C) 三つのERKリン酸化型の同定。

在下でEGFを与えたところ、それぞれリン酸化Thr-202、リン酸化Tyr-204を含むバンドが特異的に消失した(図3C)。このことから、モノリン酸化型ERKは、ホスファターゼによる不活性化の過程において生じていることが裏付けられた。なお、MEKの阻害剤であるPD98059の存在下では、いずれのリン酸化ERKのバンドも検出されないことから、これらはMEK依存的なリン酸化型であることも証明された。本解析において明らかとなった興味深いことの一つは、不活性化過程で生じる2種類のモノリン酸化型のERKにおいて、経時変化に伴う存在比に違いがあることである(図3B参照)。リン酸化Thr-202を含むモノリン酸化型は、活性化型とほぼ同様な存在比パターンを示

す。一方、リン酸化Tyr-204を含むモノリン酸化型は、EGF刺激後の120分においても顕著に残存する。この生理的意義については今後さらなる詳細な解析が必要であるが、このような同一タンパク質のリン酸化状態の違いを時間分解的に定量分析できるのは、Phos-tag SDS-PAGEの大きな利点であると言えよう。

3) SuperSep Phos-tag プレキャストゲルを用いたリン酸化タンパク質・リン酸化ペプチドの分離¹⁰⁾

Laemmli法を基盤としていたMn²⁺-Phos-tag SDS-PAGEでは、分離ゲル用の緩衝液がアルカリ性であるために、ゲルを保存するとポリアクリルアミドが加水分解され、プレ

キャストゲルの作製が困難であった⁸⁾。それに対して中性ゲルを用いる Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE のシステムでは耐久性が向上し、長期間の品質を保証するプレキャストゲルの開発が可能となった。ごく最近、この Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE の原理に基づいて開発されたプレキャストゲル、SuperSep Phos-tag が和光純薬工業より市販化された。現段階 (2013年4月現在) ではゲル濃度 12.5% と 15% (w/v)、Phos-tag 濃度が 50 μ M という2種類のみが販売されており、解析できるタンパク質の分子量範囲が比較的分子量に限定されている。このゲルを用いて細胞内タンパク質として 15 kDa のヒストン H3 を標的としたリン酸化状態の分離検出の実施例¹⁰⁾を示す。

筆者らが開発した Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE の中性ゲル緩衝液は Bis-Tris-HCl (pH 6.8)⁸⁾であるが、このプレキャストゲルのゲル緩衝液の組成は公表されておらず、泳動用のランニング緩衝液としては Laemmli 法と同じ Tris-グリシンが推奨されている。メーカー推奨プロトコルを用いて、セリン/トレオニンホスファターゼ阻害剤の Calyculin A で処理した HeLa 細胞溶解液を分離し、抗ヒストン H3 抗体で検出すると、特徴的にシフトアップした3本のリン酸化型のバンドが検出された (図 4A)。Thr-3, Ser-10, Thr-11, Ser-28 に対する抗リン酸化抗体で検出したところ、少なくとも Thr-3, Ser-10, Ser-28 の三つのアミノ酸残基がリン酸化されており、そのリン酸化状態の違いを移動度の異なるバンドとして分離検出できた (図 4B)。

また、推奨ランニング緩衝液である Tris-グリシンを Tris-Tricine に替えることで、10 kDa 以下のリン酸化ペプチドにも適用できる。リン酸化タンパク質である卵白アルブミンと β -カゼインを臭化シアンで消化してできたリン

酸化アミノ酸残基を含むペプチドと、それらのタンパク質を完全に脱リン酸化後に消化して得られた相応のペプチドについて移動度の違いを検討した (図 5)。Phos-tag を含まないプレキャストゲル SuperSep Ace [12.5% (w/v)] と Tris-グリシンランニング緩衝液を併用した場合、14.7, 8.8, 11.9 kDa のペプチドは泳動フロントに収束してゲル内での分離検出ができなかった (図 5 矢印参照)。一方、同じゲルでも Tris-Tricine 緩衝液を併用した場合は、全てのペプチドが分離検出された。SuperSep Phos-tag [12.5% (w/v)] では、Tris-グリシンの場合、14.7, 11.9 kDa の非リン酸化型のバンドを検出することができなかったが、Tris-Tricine に変更することで、全ペプチドがゲル内で分離検出され、リン酸化ペプチドの顕著なゲルシフトも観察された。

中性ゲルを用いた改良法は、迅速性、簡便性、かつ、結果の再現性などに利点を持つプレキャストシステムの開発の突破口となった。今回示した SuperSep Phos-tag プレキャストゲルでは解析可能分子量範囲が低分子量域に限られたが、高い分離性能を持つことが証明されたので、今後、ゲル濃度や Phos-tag 濃度の一層の多様化、充実化が望まれる。

4. Phos-tag 技術の展望

1) ビオチン化 Phos-tag

ビオチン化 Phos-tag を応用したプロット膜上でのリン酸化タンパク質の検出法は、一般的なウェスタン解析法とほとんど同じ操作で行える利便性がある。リン酸化アミノ酸残基の種類に関わらず網羅的にリン酸化タンパク質を検出できるので、従来の方法では得られなかった新しいリン酸

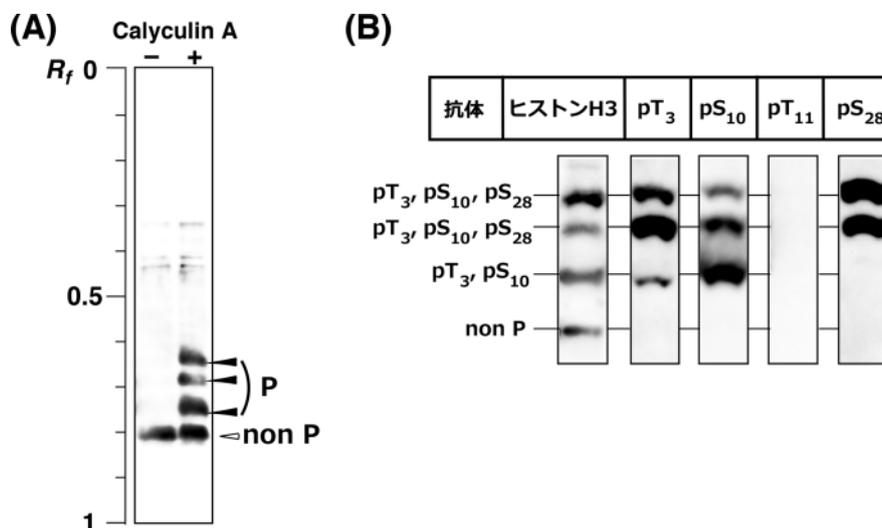


図 4 SuperSep Phos-tag によるヒストン H3 の解析 (文献 10 より転載)

(A) Calyculin A 処理後のリン酸化ヒストン H3 の検出。ゲル濃度 12.5% (w/v) のものを使用。

(B) 部位特異的な抗リン酸化抗体を用いたリン酸化部位のマッピング。

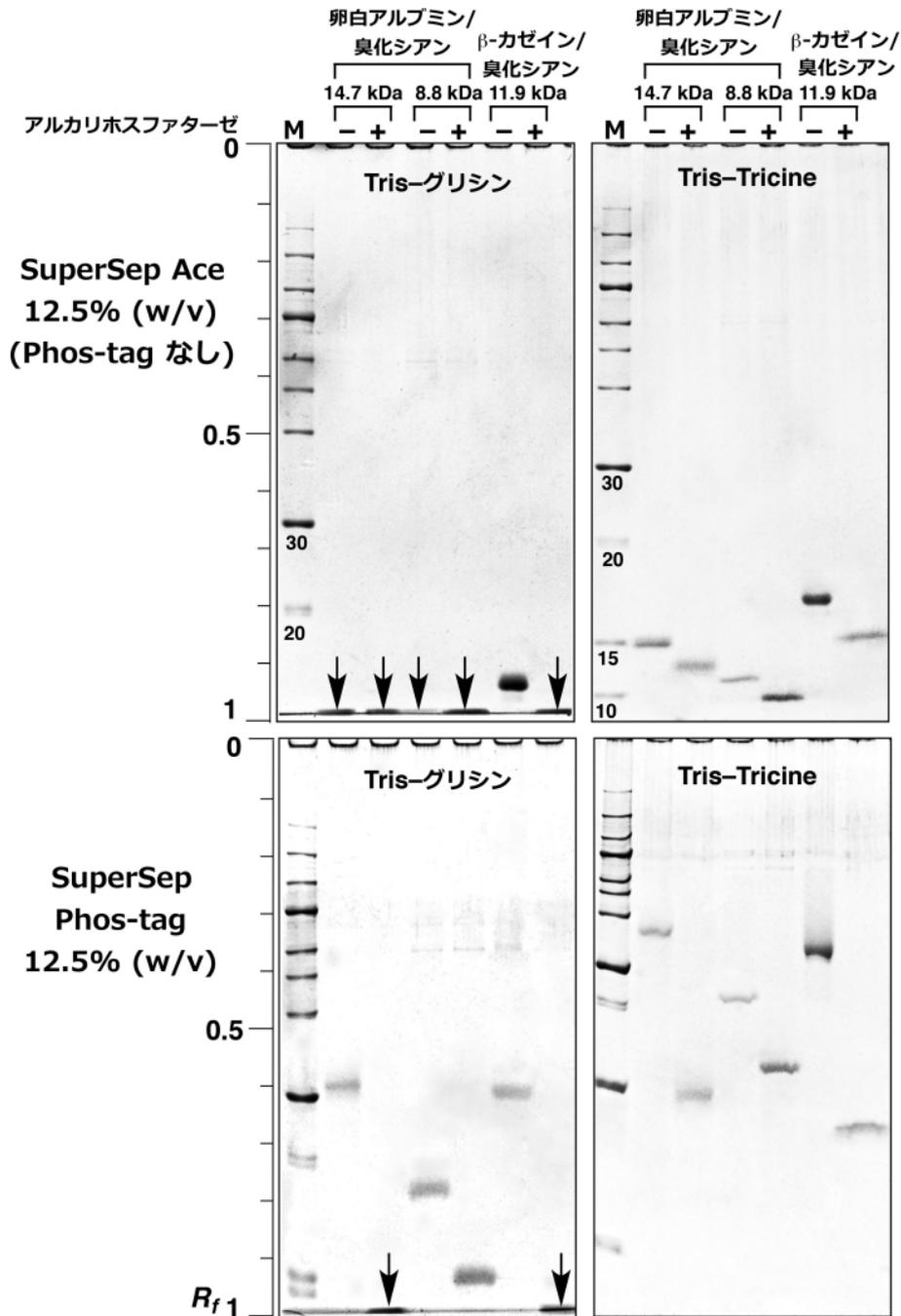


図5 SuperSep Phos-tag によるリン酸化ペプチドの解析と電気泳動用ランニング緩衝液の違いによる泳動パターンの比較検討 (文献 10 より転載)

化タンパク質の情報をもたらす可能性を秘めている。また、プロット膜は抗体でのリプロービングが可能なので、イムノブロット解析との併用は非常に貴重な情報を与えてくれることであろう。さらに、長いスパーサー分子 (PEG12) を導入した新規のビオチン化 Phos-tag 誘導體 (BTL-111) の開発により、ウェスタン解析だけではなく、Lab-on-a-Chip 技術として創薬研究に大きく貢献することが期待されるペプチドマイクロアレイを用いた分析が可能

となった。この BTL-111 の特徴としては、親水性で非常に取り扱いやすいこと、従来の BTL-104 よりも検出感度の向上が認められること、ビオチン-アビジンの結合能を利用しているため様々なアプリケーションに対応できること、などが挙げられる。このように BTL-111 は、ユーザーそれぞれのオンデマンドツールとして利用できると考えている。本稿を読んでいただいた研究者の方々にとって、新しいタンパク質リン酸化研究の誘因となれば幸いです。

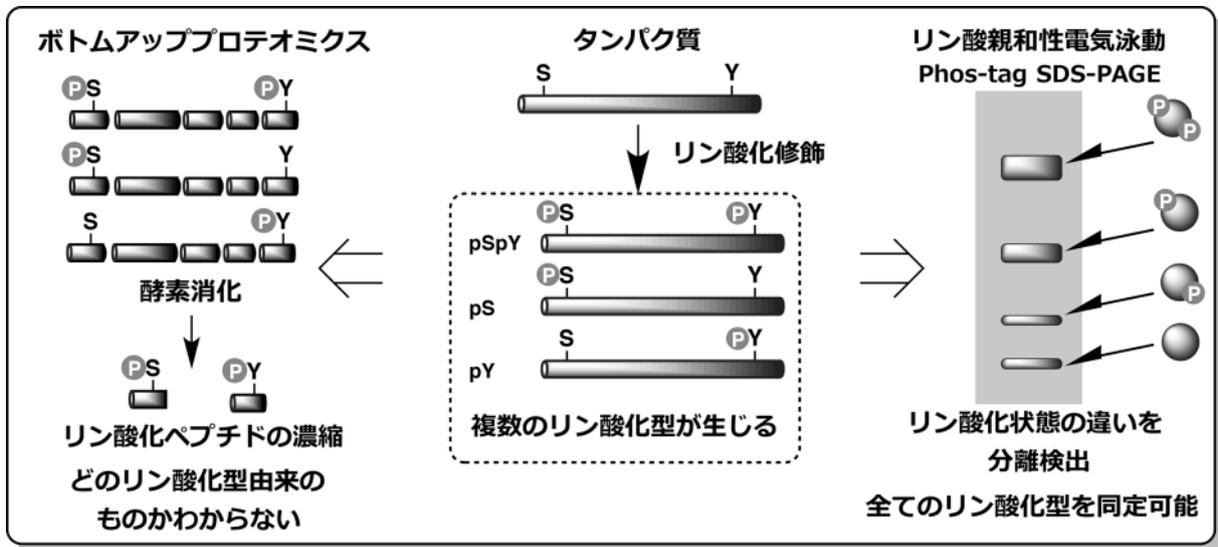


図6 質量分析によるリン酸化ペプチド解析とリン酸親和性電気泳動法によるリン酸化タンパク質解析

ある。

2) Phos-tag SDS-PAGE

Phos-tag SDS-PAGE は、同一タンパク質内のリン酸化状態の異なる複数のタンパク質種を泳動度の異なるバンドとして分離する全く新しい原理に基づく電気泳動法である。従来の Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE に改良を加え、亜鉛錯体としての Phos-tag を中性条件下で行う SDS-PAGE システムに適用することで、これまでに分離検出が不可能であったタンパク質のリン酸化について解析することが可能になった。また、中性の Zn^{2+} -Phos-tag ゲルは、長期間の品質を保持するといった長所もあり、このことが高分解能を有した Phos-tag プレキャストゲルの実用化につながった。この Phos-tag SDS-PAGE では、タンパク質のリン酸化状態（複数のリン酸化型）を優れた分離能力によって一つ一つゲル上で分析することができるので、それぞれのリン酸化型がもつ特異的な（固有の）機能を追跡することができる。これにより、細胞の生理機能やその機能破綻、それに伴う病態発現に関連するリン酸化標的分子のさらなる詳細で高精度な絞り込みが可能となろう。最近では、生体内タンパク質の酵素消化後のペプチド混合試料からリン酸化ペプチドのみを特異的に濃縮する手法の改良が進み、それと同時に質量分析装置のさらなる高度化が進んだ結果、タンパク質リン酸化部位の同定数は飛躍的に増大している。また、濃縮したリン酸化ペプチドの量的な変化を追跡することで、タンパク質のリン酸化状態の変動を推定する研究も行われている。しかし、上述したように、タンパク質のリン酸化状態は同じタンパク質であっても一定であるとは限らず、同じ生理条件下でも複数のリン酸化型が生じていることがほとんどである。そのため、タンパク質そのもので

はなく、ペプチドの分析を行う質量分析装置を用いた解析法、いわゆる「ボトムアッププロテオミクス法」では、タンパク質のリン酸化状態を正確に理解することは難しい（図6参照）。それに対して Phos-tag SDS-PAGE の最もユニークな利点は、リン酸化タンパク質をペプチド断片化せず、すなわち、タンパク質の貴重な分子量情報を失うことなく、リン酸化型ごとの時間的・空間的な変動を捉えることができることである。このような他に類のない特徴を持つ Phos-tag SDS-PAGE を用いて、今後、多くの生体内のタンパク質のキナーゼ/ホスファターゼ依存的なダイナミクスが詳細に解析されるであろう。

5. おわりに

Phos-tag を使ったリン酸化タンパク質の解析技術は Phos-tag とリン酸基の溶液内相互作用を化学的に追究し、その成果を実用的な技術へと応用展開させたものである。その例として、本稿では、ビオチン化 Phos-tag を用いたリン酸化タンパク質の高感度発光検出法、そして、リン酸親和性電気泳動法である Phos-tag SDS-PAGE を用いたリン酸化タンパク質の高精度かつ高感度な分離検出法について述べた。今後、リン酸化プロテオミクスの新しい視点としてこれらの手法が取り入れられ、生体内のシグナル伝達に関連する多くのリン酸化タンパク質のダイナミクスがより詳細に解析されること、さらには、創薬を目的としたリン酸化調節因子のスクリーニング法やタンパク質のリン酸化に関連した各種病態の診断法として寄与することを期待している。

文 献

- 1) Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002) *Science*, **298**, 1912–1934.
 - 2) Kerk, D., Templeton, G., & Moorhead, G.B. (2008) *Plant Physiol.*, **146**, 351–367.
 - 3) Brognard, J. & Hunter, T. (2011) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 4–11.
 - 4) Kinoshita, E., Takahashi, M., Takeda, H., Shiro, M., & Koike, T. (2004) *Dalton Trans.*, 1189–1193.
 - 5) Inamori, K., Kyo, M., Nishiya, Y., Inoue, Y., Sonoda, T., Kinoshita, E., Koike, T., & Katayama, Y. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 3979–3985.
 - 6) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K., & Koike, T. (2006) *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 749–757.
 - 7) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Sugiyama, Y., Fukada, Y., Ozeki, T., & Koike, T. (2012) *Proteomics*, **12**, 932–937.
 - 8) Kinoshita, E. & Kinoshita-Kikuta, E. (2011) *Proteomics*, **11**, 319–323.
 - 9) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., & Koike, T. (2012) *Proteomics*, **12**, 192–202.
 - 10) Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., & Koike, T. (2012) *Int. J. Chem.*, **4**, 1–8.
 - 11) Aoki, K., Yamada, M., Kunida, K., Yasuda, S., & Matsuda M. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 12675–12680.
 - 12) Stephen, M.K. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 186–192.
-