

**A Phos-tag-based
fluorescence resonance energy transfer system for
the analysis of the dephosphorylation of phosphopeptides**

by

Kei Takiyama

2009

Table of contents

1. Summary	1
2. Introduction	4
3. Materials and methods	6
4. Results and discussions	13
5. Conclusions	23
6. References	24
7. Supplemental material	28
8. Appendixes	32
9. Acknowledgement	70

1. Summary

タンパク質の可逆的なリン酸化反応は、多くの生体制御機構に関わる重要な化学修飾の一つである。したがって、タンパク質のリン酸化のバランスが崩れることは、疾病をもたらす大きな要因である。私が所属する研究室では、リン酸基を特異的に捕捉する分子（フォスタグ）を用いたリン酸化タンパク質の解析技術の開発を行なっている。フォスタグは、2つの金属イオンが協力することで、リン酸アニオン ($R-OPO_3^{2-}$) を捕捉する低分子である。本研究では、蛍光色素を付加したフォスタグを使って、ペプチドのリン酸化状態をリアルタイムで検出する蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 型システムの開発を行った。FRET 現象は、ドナーとなる蛍光分子とアクセプターとなる蛍光分子が近接する時、励起されたドナー分子のエネルギーがアクセプター分子に移動する現象である。エネルギー移動が起こると、励起したアクセプター分子は固有の蛍光を発する。

本研究で開発した FRET システムには、ドナーとしてクマリンを結合させたフォスタグ分子を、アクセプターとしてフルオレセインで標識した様々なペプチド誘導体を用いた。クマリン系蛍光色素 6-((7-amino-4-methylcoumarin-3-acetyl)amino)hexanoic acid (以下、AMCA) をドナー基として、フルオレセイン系蛍光色素 5-carboxyfluorescein (以下、FAM) をアクセプター基として選択した。これら2つの蛍光色素の組み合わせは、FRET 現象を起こす一般的なものである。まず始めに、*N*-hydroxysuccinimide 基で活性化してある AMCA と一級のアミノ基を側鎖に持つフォスタグ配位子、*N*-(5-(2-aminoethylcarbamoyl)-pyridin-2-ylmethyl)-*N,N',N'*-tris(pyridin-2-ylmethyl)-1,3-diaminopropan-2-ol を室温下、アセトニトリル中で反応させた。得られたフォスタグ配位子に2つの亜鉛イオンを配位させることで AMCA 標識フォスタグ (以下、AMCA-フォスタグ) とした。pH 7.4 の HEPES 緩衝液 (10 mM HEPES-NaOH, 0.50 M NaCl, 20%(v/v) EtOH) 中での AMCA-フォスタグは 350 nm に吸収極大を、445 nm に蛍光極大を持つ。アクセプター分子には、AnaSpec 社の FAM 標識されたリン酸化ペプチドおよび非リン酸化ペプチド (以下、FAM-ペプチド) を使用した。市販されていないリン酸化体 (または非リン酸化体) は、対応する非リン酸化体 (またはリン酸化体) のキナーゼ反応 (またはフォスファターゼ反応) により調製した。

続いて、AMCA-フォスタグ (ドナー) と FAM-リン酸化ペプチド (アクセプター) を共存させると、FRET 現象が起こることを確認した。ドナー溶液 (0.80 μ M) にアク

セプターである FAM-リン酸化ペプチドを 0~2.0 μM 共存させると, AMCA 由来の蛍光強度 (445 nm) が濃度依存的に減少し, 逆に FAM 由来の蛍光強度 (520 nm) が増加した。すなわち, AMCA の励起エネルギーが FAM の励起エネルギーとして使われる FRET 現象が起こっている。一方, FAM-非リン酸化ペプチドを共存させた場合, AMCA 由来の蛍光強度は全く変化しなかった。同様の結果は, セリン, スレオニンのリン酸化されるペプチドでも観察された。これらの事実は, 本システムが μ モル濃度のリン酸化ペプチドを選択的に定量できることを示している。次に, リン酸化ペプチド添加による AMCA の濃度依存的な蛍光強度変化から, リン酸化ペプチドが結合した AMCA-フォスタグ複合体の解離定数 K_d [μM] と FRET 効率を算出した。この解析から, チロシンのリン酸化されたペプチドの親和性は, セリンやスレオニンのリン酸化体の親和性より約 10 倍大きいことがわかった。セリンやスレオニンよりも, チロシンに結合したリン酸基の方がペプチド鎖から離れているので, リン酸基周辺の立体障害が少ないことがその原因の一つと考えられる。

本システムを応用して, 酵素による脱リン酸化反応を蛍光スペクトル変化として検出した。AMCA-フォスタグ共存下, アルカリフォスファターゼによる FAM-リン酸化ペプチド (FAM-DADE-pY-LIPQQG-OH) の脱リン酸化反応を行い, 一定時間ごとに蛍光測定を行った。AMCA-フォスタグと FAM-リン酸化ペプチドの濃度はそれぞれ 0.80 μM , 1.0 μM とした。結果, 時間経過とともに AMCA 由来の蛍光強度 (445 nm) が増加し, FAM 由来の蛍光強度 (520 nm) が減少した。それらの変化は, 半減期約 5 分の擬一次反応に帰属できた。AMCA 由来の蛍光強度変化は, フリーの AMCA-フォスタグの濃度変化に対応し, FAM 由来の蛍光強度変化は FAM-リン酸化ペプチドと AMCA-フォスタグとの複合体の濃度変化に対応する。以上の結果から, アルカリフォスファターゼ添加により FAM-リン酸化ペプチドのリン酸基が時間経過とともに取り除かれ, FAM-ペプチドと AMCA-フォスタグが複合体を形成しなくなることが明らかとなった。

本研究では, 蛍光標識したフォスタグを用いた「ペプチドのリン酸化状態を検出する FRET 型システム」を開発した。その特徴は, i) リン酸化ペプチドを選択的に検出する, ii) リン酸化されているアミノ酸の種類に関わらず検出可能である, iii) 脱リン酸化の様子をリアルタイムに検出可能である, iv) ペプチドは固相化する必要はなく, 操作が簡便なことである。この蛍光標識フォスタグを用いたリン酸化ペプチドの検出法が, 今後のキナーゼ/フォスファターゼ研究に貢献すると期待している。開発した

FRET システムを簡単に表した図を下に示す。

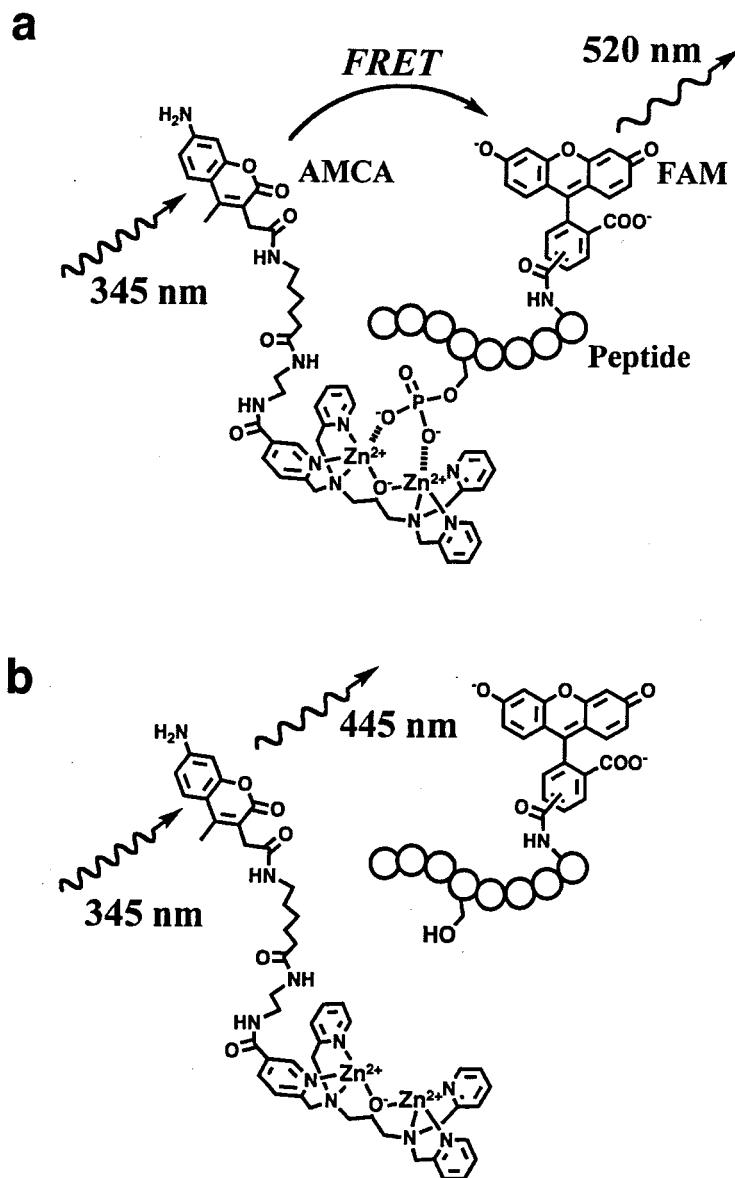


図. リン酸化ペプチドを検出する FRET 型システムの原理
 a) 標的ペプチド (アクセプター分子) がリン酸化体の場合
 b) 標的ペプチドが非リン酸化体の場合

2. Introduction

Protein kinases and phosphatases are implicated in a variety of cellular processes, such as proliferation, differentiation, and apoptosis. An estimated 20% of all proteins in humans are phosphorylated, and the families of protein kinases and phosphatases represent up to 5% of the human genome [1,2]. These enzymes increase (or suppress) the activity of other enzymes, mark proteins for destruction, allow proteins to move from one subcellular compartment to another, or enhance (or impede) protein-protein interactions. Any change in the expression level, activity, or localization of these enzymes greatly influences the regulation of key processes. Because of the critical roles of protein kinases and phosphatases in cellular functions, they represent important drug targets [3,4]. The existing methods to detect phosphorylation and dephosphorylation include the radiometric assay [5], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)¹ [6], ATP consumption assay [7], and several fluorescence-based assays, such as the time-resolved fluorescence [8], fluorescence polarization [9,10], fluorescence resonance energy transfer (FRET) [11], and fluorescence quench assays [12]. Although the radiometric method can be applied to almost all kinase and phosphatase targets with high sensitivity, radioisotopes are inconvenient to handle regarding certain safety and disposal. The ELISA method requires specific antibody-based detection reagents. Unfortunately, the specificity of antibodies is problematic in some cases. Fluorescence-based methods do not necessarily require a radioactive or immunoactive label and are thus attractive as convenient and high-quality approaches for the analysis of the phosphorylation status of targeted substrates.

Recently, we reported original methods for detecting phosphorylated compounds, such as phosphopeptides, phosphoproteins, and phospholipids, using a phosphate-binding tag molecule (Phos-tag), which is a dinuclear metal(II) complex of 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olate [13]. The procedures for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the

enhanced analysis of the phosphorylated compounds [14–16], phosphate affinity chromatography for the separation of phosphopeptides and phosphoproteins [17,18], surface plasmon resonance analysis for reversible peptide phosphorylation [19,20], Western blot analysis for the detection of phosphoproteins on a blotting membrane [21,22], and phosphate affinity electrophoresis for the mobility shift detection of phosphoproteins on an SDS-PAGE gel [23–28] have been established and put to practical use.

Herein, we describe a novel FRET system using Zn^{2+} -Phos-tag for the real-time analysis of peptide phosphorylation status. FRET is a distance-dependent interaction between the electronic excited states of two dye molecules in which excitation is transferred from a donor molecule to an acceptor one without emission of a photon. For this FRET system, a Phos-tag derivative as a fluorescent donor attached with a 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid (AMCA) and carboxyfluorescein (FAM)-labeled peptides as fluorescent acceptors were prepared. As the first practical example using the AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag, we demonstrated the detection of the time-dependent dephosphorylation of the FAM-labeled protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) substrate.

3. Materials and methods

Materials

Bovine intestinal mucosa alkaline phosphatase, L-serine, *O*-phospho-L-serine (phosphoserine), *O*-phospho-L-tyrosine (phosphotyrosine), ATP, glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate, and boric acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Thin-layer and silica gel column chromatographies were performed using a Merck silica gel TLC plate, numbers 5554 and 5567 (Darmstadt, Germany), and Fuji Silysia Chemical NH-DM 1020 silica gel (Kasugai, Japan), respectively. DIAION HP-20 was purchased from Mitsubishi Kagaku (Tokyo, Japan). 2,4,6-Trihydroxyacetophenone was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). A recombinant mouse protein kinase A (PKA) catalytic subunit and sodium orthovanadate were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Recombinant mouse mitogen-activated protein kinase 2 (MAPK2), and recombinant Abl were purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) succinimidyl ester and 6-([7-amino-4-methylcoumarin-3-acetyl]amino)hexanoic acid succinimidyl ester were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). 5-FAM-labeled Kemptide, 5-FAM-labeled EGF receptor 661–681, 5-FAM-labeled Abltide, a 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate, and a 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide were purchased from Anaspec (San Jose, CA, USA). Microcon YM10 filter units were purchased from Millipore (Bedford, MA, USA). NANOSEP MF GHP (45 μ m) centrifugal devices were purchased from Pall (Ann Arbor, MI, USA). All reagents and solvents used were of the highest commercial quality. All aqueous solutions were prepared using deionized and distilled water.

Apparatus

UV and visible spectra were recorded on a Jasco spectrophotometer V-630 (Tokyo, Japan) at 25.0 ± 0.1 °C. Fluorescence spectra were obtained with a Hitachi F-2500 fluorescence spectrophotometer (Tokyo, Japan) at 25.0 ± 0.1 °C. The IR spectrum was recorded on a Horiba FT-710 infrared spectrometer (Kyoto, Japan) with a KCl pellet (Real Crystal IR Card) at 20 ± 2 °C. ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectra at 25.0 ± 0.1 °C were recorded on a JEOL LA500 spectrometer (Tokyo, Japan). Tetramethylsilane (in CDCl_3) (Merck) was used as an internal reference for the NMR measurements. MALDI-TOF MS spectra (positive reflector mode) were obtained on a Voyager RP-3 BioSpectrometry Workstation (PerSeptive Biosystems, Path Framingham, MA, USA) equipped with a nitrogen laser (337 nm, 3-ns pulse). Time-to-mass conversion was achieved by external calibrations using the peaks for angiotensin I (m/z 1296.7 for $\text{M} + \text{H}^+$) and a peptide, ACTH (clip 18-39) (m/z 2465.2 for $\text{M} + \text{H}^+$). The pH measurement was conducted with a Horiba F-12 pH meter and a combination pH electrode (Horiba-6378), which was calibrated using pH standard buffers (pH 4.01 and 6.86) at 25 °C. High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed using an HPLC system Jasco LCSS-905 with a column oven CO-2060 (at 40 °C), a UV-detector UV-2070 (at 480 nm), and a reversed phase column (Shiseido CAPCELL PAK C18 UG80, 4.6×150 mm, Yokohama, Japan). All samples were separated under the proper gradient conditions (eluent: 0.1% [v/v] TFA/ H_2O and 0.1% [v/v] TFA/ CH_3CN) for 20 min at a flow speed of 1.0 mL/min.

Synthesis of the AMCA-labeled Phos-tag ligand

An amino-pendant Phos-tag ligand (*N*-[5-(2-aminoethylcarbamoyl)pyridine-2-ylmethyl]-*N,N',N'*-tris[pyridin-2-ylmethyl]-1,3-diaminopropan-2-ol) was synthesized as described previously [17]. A solution of 6-([7-amino-4-methylcoumarin-3-acetyl]amino)hexanoic acid succinimidyl ester (9.7 mg, 21.9 μmol) in 1 mL of *N,N*-dimethylformamide was added

dropwise to a solution of the amino-pendant Phos-tag ligand (10.5 mg, 19.4 μmol) in 5 mL CH_3CN at room temperature. After the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature, the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 50:0$ to $50:1$, silica gel: NH-DM1020) to obtain the AMCA-labeled Phos-tag ligand, *N*-(5-[2-(*N*-6-[(7-amino-4-methylcoumarin-3-acetyl)amino]hexyl)aminoethylcarbamoyl]pyridine-2-ylmethyl)-*N,N',N'*-tris[pyridin-2-ylmethyl]-1,3-diaminopropan-2-ol) as a pale-yellow oil (16.2 mg, 18.6 μmol , 96% yield). TLC (Merck 5567, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/28\%$ (v/v) aqueous $\text{NH}_3 = 10:2:0.5$) $R_f = 0.6$. IR: 3339, 3226, 3063, 2930, 2854, 1648, 1598, 1553, 1475, 1436, 1390, 1367, 1249, 1172, 1150, 1035, 846, 765, 472, 408 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.20–1.28 (2H, m, CCH_2CCC), 1.42 (2H, quin, $J = 7.0$ Hz, CCCH_2CC), 1.58 (2H, quin, $J = 7.3$ Hz, CCCCH_2C), 2.15 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, CH_2CCCC), 2.43 (3H, s, CH_3), 2.54–2.68 (4H, m, NCCCH_2N), 3.15 (2H, dd, CCCCCH_2 , $J = 12.6, 6.4$ Hz), 3.49 (2H, s, NCOCH_2), 3.51–3.65 (4H, m, NCCH_2N), 3.80–3.96 (9H, m, NCCHCN and PyCH_2N), 4.40 (2H, bs, NH_2), 6.49 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, COOCCHC), 6.54–6.58 (2H, m, COOCCCCHC , and CONH), 6.66 (1H, CONH), 7.10–7.12 (3H, m, PyH), 7.33 (3H, d, $J = 7.8$ Hz, PyH), 7.37 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, COOCCCCCHC), 7.42 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, PyH), 7.56–7.60 (3H, m, PyH), 7.87 (1H, CONH), 8.02 (1H, dd, PyH , $J = 8.1$ and 2.2 Hz), 8.49 (3H, m, PyH), 8.95 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, PyH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 11.6, 15.5, 24.9, 26.1, 28.8, 35.7, 36.4, 39.1, 39.4, 41.6, 59.2, 60.8, 61.0, 67.3, 100.6, 111.9, 112.3, 115.1, 122.1, 122.7, 123.2, 126.4, 127.1, 128.0, 128.3, 135.4, 136.6, 145.0, 149.0, 150.8, 154.2, 158.2, 159.3, 159.4, 163.1, 163.5, 163.8, 164.1, 165.7, 166.3, 166.6, 170.3, 175.0, 176.8. MALDI-TOF MS: AMCA-labeled Phos-tag ligand in a 50% (v/v) CH_3CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (5 mg/mL), m/z 869.4. 1:1 phosphate-bound dizinc(II) complex (AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag- HOPO_3^{2-}) in a 25% (v/v) CH_3CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL), 20 μM ZnCl_2 , 10 μM AMCA-labeled Phos-tag ligand, and 20 μM $\text{NaHPO}_4\text{-NaOH}$ (pH 7.4), m/z 1090.7.

Preparation of 6-FAM-labeled serine, phosphoserine, and phosphotyrosine

A solution of 6-FAM succinimidyl ester (5.5 mg, 12.4 μmol) in 230 μL of dimethyl sulfoxide was added to a solution of the amino acid (serine, phosphoserine, or phosphotyrosine) in 2.3 mL of 0.20 M $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$ (pH 8.4) at room temperature. After stirring overnight at room temperature, the reaction mixtures were diluted to 7.3 mL with distilled water and acidified by the addition of aqueous 6.0 M HCl to pH 3. A lipophilic resin, DIAION HP-20 (6.0 g) was added to the reaction mixtures. The resin was washed with 20 mL of aqueous 1.0 mM HCl and the adsorbed compound was eluted with methanol. After the solvent was evaporated, the residue was lyophilized to obtain 6-FAM-labeled serine, phosphoserine, and phosphotyrosine as orange-colored powders. The purity of each powder was determined by HPLC. As for 6-FAM-labeled serine, TLC (Merck 5554, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.10 \text{ M CH}_3\text{COOH}_{\text{aq}} = 5:6:2$): $R_f = 0.7$. HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/ H_2O from 90% to 40% (v/v) and 0.1% [v/v] TFA/ CH_3CN from 10% to 60% [v/v], 20 min): Retention time = 11.5 min, purity 90%. MALDI-TOF MS: 6-FAM-labeled serine (100 μM) dissolved in 50% CH_3CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (5.0 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, m/z 464.0. As for 6-FAM-labeled phosphoserine, TLC (Merck 5554, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.1 \text{ M CH}_3\text{COOH}_{\text{aq}} = 5:6:2$): $R_f = 0.3$. HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/ H_2O from 90% to 40% (v/v) and 0.1% [v/v] TFA/ CH_3CN from 10% to 60% [v/v], 20 min): Retention time = 9.0 min, purity 77%. MALDI-TOF MS: 6-FAM-labeled phosphoserine (100 μM) dissolved in a 50% CH_3CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (5.0 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, m/z 544.1. As for 6-FAM-labeled phosphotyrosine, TLC (Merck 5554, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/0.1 \text{ M CH}_3\text{COOH}_{\text{aq}} = 5:6:2$): $R_f = 0.4$. HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/ H_2O from 90% to 40% (v/v) and 0.1% [v/v] TFA/ CH_3CN from 10% to 60% [v/v], 20 min): Retention time = 10.9 min, purity 82%. MALDI-TOF MS: 6-FAM-labeled serine (100 μM) dissolved in a 50% (v/v) CH_3CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (5.0 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, m/z 620.1.

Preparation of 5-FAM-labeled peptides and phosphopeptides, and 6-FAM-labeled tyrosine

Kinase reactions were conducted at 30 °C. For phosphorylation of 40 nmol of 5-FAM-labeled Kemptide (5-FAM-LRRA-S-LG-OH), EGF receptor 661–681 (5-FAM-KRELVEPL-T-PSGEAPNQALLR-NH₂), and Abltide (5-FAM-KKGEAI-Y-AAPFA-NH₂) by PKA, MAPK2, and Abl, respectively, a reaction buffer (200 µL) containing 0.10 M MOPS-NaOH (pH 7.2), 25 mM dithiothreitol, 50 mM EGTA, 50 mM glycerol 2-phosphate, 50 mM sodium orthovanadate, 20 mM MgCl₂, and 300 µM ATP was used. The amino acids between two hyphens are phosphorylated by each kinase. The amount of each kinase in the buffer was 2,500 units of PKA, 0.4 µg of MAPK2, and 0.16 µg of Abl. For the dephosphorylation of the 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate (5-FAM-DADE-*p*Y-LIPQQG-OH), the 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide (5-FAM-GGGPA-*p*T-PKKAKKL-OH), and 6-FAM-labeled phosphotyrosine by alkaline phosphatase (4.3 units, 86 units, and 4.3 units, respectively), a reaction buffer (200 µL) containing 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) and 1.0 mM MgCl₂ was used. These phosphatase reactions were conducted overnight at 37 °C. To remove the enzymes, the reaction mixture was put into a Microcon YM10 filter unit and centrifuged at 14,000 × *g* for 10 min. One micro-liter of aqueous 6.0 M HCl and 0.2 g of DIAION HP-20 were added to the filtrates containing FAM-labeled compounds. After the solutions were stirred, the resins were applied in sample reservoirs (Centrifugal Devices, NANOSEP MF GHP) and centrifuged at 2,000 × *g* for 20 s, and the filtered buffers were discarded. To wash the resin, a 1.0 mM HCl solution (300 µL) was added to the sample reservoir. The filter units were centrifuged at 2,000 × *g* for 20 s, and the filtered buffers were discarded. The washing operation was repeated 5 times. To elute the adsorbed FAM-labeled compounds, 300 µL of methanol was added to the sample reservoir. The filter units were centrifuged at 2,000 × *g* for 20 s, and the filtrates were collected. The eluting operation was repeated 3 times. The eluting fractions were combined,

evaporated, and lyophilized. The residues were dissolved in 100 μL of a 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8). The washing and eluting operation was also carried out for 5-FAM-labeled Kemptide, EGF receptor 661–681, Abltide, the phosphorylated PTP1B substrate, and the phosphorylated histone H1-derived peptide, which were not treated by kinase or phosphatase. The purities of all prepared compounds were determined by HPLC. As for 6-FAM-labeled tyrosine, HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/ H_2O from 90% to 40% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/ CH_3CN from 10% to 60% [v/v], 20 min): Retention time = 14.2 min, purity 83%. MALDI-TOF MS: 6-FAM-labeled tyrosine (100 μM) dissolved in a 50% (v/v) CH_3CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (5.0 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, m/z 540.1. As for all prepared peptides, the data of purity and MALDI-TOF MS were shown in Supplementary material.

MALDI-TOF MS analysis of a complex of the FAM-labeled phosphorylated compound and AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag

Six aqueous solutions (pH 8, 1 mM Tris-HCl) containing AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (10 μM), a FAM-labeled phosphorylated (20 μM) compound, and its nonphosphorylated counterpart (30 μM) were prepared. The FAM-labeled substituent groups were serine, tyrosine, Kemptide, the PTP1B substrate, the histone H1-derived peptide, and EGF receptor 661–681. An aqueous solution containing AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (10 μM), 5-FAM-labeled phosphorylated Abltide (27 μM), and its nonphosphorylated counterpart (33 μM) was prepared. Each solution (0.50 μL) was mixed with 0.50 μL of a CH_3CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (10 mg/mL). The predicted Phos-tag complexes with phosphorylated compounds in the mixed solutions were determined by MALDI-TOF MS analyses (positive mode).

Fluorescence analysis

All fluorescence measurements were performed in duplicate at 25.0 ± 0.1 °C with 5-nm slit width. The quantum yield of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag was determined by comparison of the integrated corrected emission spectrum of a chemical standard (quinine). Excitation at 345 nm was used for quinine in 0.10 M H_2SO_4 , and its quantum yield was assumed to be 0.54. In all fluorescence analyses, a HEPES buffer (a 10 mM HEPES-NaOH buffer [pH 7.4] containing 0.50 M NaCl, 2.0 μM ZnCl_2 , and 20% [v/v] ethanol) was used. For the excitation and emission spectra measurements of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag, the emission and excitation wavelengths were 445 nm and 345 nm, respectively. The fluorescence spectra of the solutions containing the FAM-labeled compound (0–2 μM) and AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (0.80 μM) excited at 345 nm were measured.

4. Results and discussion

Preparation of AMCA-labeled Zn²⁺-Phos-tag

The fluorescent Phos-tag ligand was synthesized by a coupling reaction of an active ester of AMCA (a coumarin derivative) and an amino-pendant Phos-tag derivative in 96% yield (see Materials and methods). The AMCA group emits visible light of wavelength 440–460 nm on irradiation of UV light (*ca.* 350 nm). The Stokes shift of 100 nm allows easy filter discrimination of exciting and emitting radiation. The coumarin derivative is frequently used as a fluorescent donor of a coumarin-fluorescein-based FRET pair [29–31]. The structure of a dinuclear zinc(II) complex of the AMCA-labeled Phos-tag ligand (AMCA-labeled Zn²⁺-Phos-tag) is illustrated in Fig. 1a. The UV absorption and fluorescence spectra of AMCA-labeled Zn²⁺-Phos-tag in a buffer solution (pH 7.4) containing 10 mM HEPES-NaOH, 0.50 M NaCl, and 20% (v/v) ethanol at 25 °C are shown in Figs. 1b and c, respectively. The absorption maximum (λ_{max}) is 350 nm and the fluorescence peak appears at 445 nm. The quantum yield of AMCA-labeled Zn²⁺-Phos-tag in the HEPES buffer was 0.38. We confirmed that the fluorescence intensity of AMCA-labeled Phos-tag is proportional to its concentration up to 5 μM .

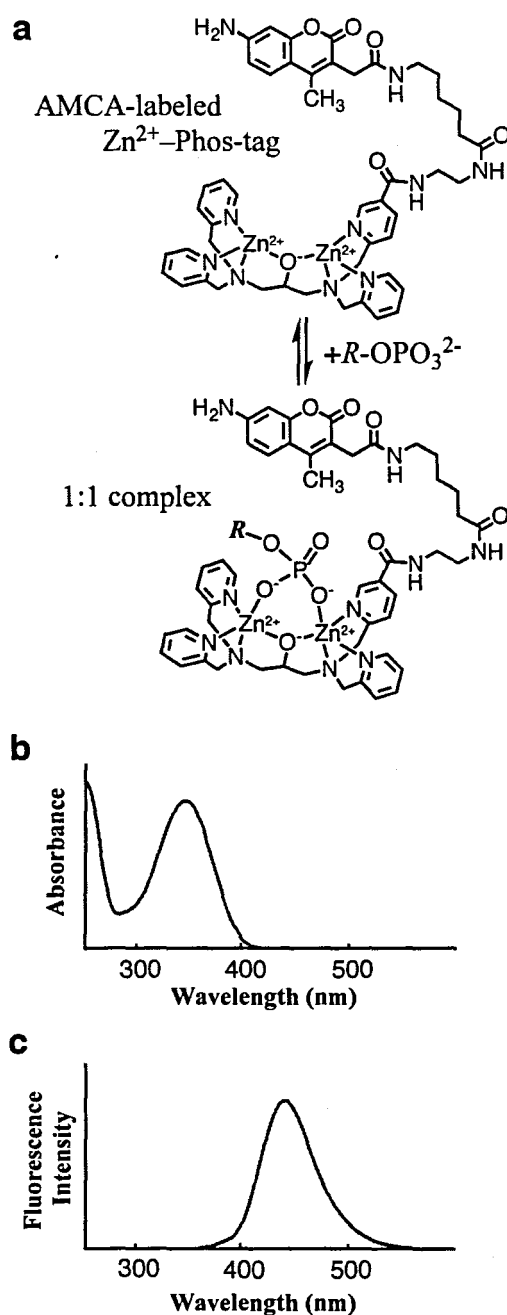


Figure 1.

(a) Structures of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag and its 1:1 complex with phosphomonoester dianion ($R\text{-OPO}_3^{2-}$). (b) Absorption spectrum of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag [$50\ \mu\text{M}$] at $25\ ^\circ\text{C}$ and pH 7.4 (10 mM HEPES-NaOH, 0.50 M NaCl, and 20% [v/v] ethanol): $\lambda_{\text{max}} = 350\ \text{nm}$ and $\epsilon = 1.32 \times 10^4\ \text{L/mol}\cdot\text{cm}$. (c) Emission spectrum of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag ($1.0\ \mu\text{M}$) by 345-nm excitation at $25\ ^\circ\text{C}$ and pH 7.4 (10 mM HEPES-NaOH, 0.50 M NaCl, and 20% [v/v] ethanol): $\lambda_{\text{max}} = 445\ \text{nm}$.

Determination of the 1:1 complex formation by MALDI-TOF MS

The Phos-tag ligand forms a stable dinuclear zinc(II) complex in the presence of two equivalents of zinc(II) ions at physiological pH [13,14]. In the presence of a phosphate dianion such as HOPO_3^{2-} and phosphorylated peptides, the Zn^{2+} -Phos-tag molecule captures an equimolar phosphate to give a phosphate-bound complex (see Fig. 1a). The phosphate-bound AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag complex was confirmed by MALDI-TOF MS (e.g., m/z 1090.7 for the AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag complex with HOPO_3^{2-}). Similarly, we performed MALDI-TOF MS analyses using all pairs of the prepared FAM-labeled phosphopeptides and their nonphosphorylated counterparts. Figures 2a, b, and c show typical mass spectra for the 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide (m/z 1690.2), the nonphosphorylated counterpart (m/z 1610.1), and the phosphopeptide-bound Zn^{2+} -Phos-tag complex, respectively. The sample for Fig. 2c was prepared by mixing of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (50 pmol), 5-FAM-labeled phosphopeptide (100 pmol), and 5-FAM-labeled nonphosphopeptide (150 pmol) at pH 8. The MS signal of the phosphopeptide-bound Zn^{2+} -Phos-tag complex appeared at m/z 2682.6. While the signals for the phosphopeptide and nonphosphopeptide were also detected in the same spectrum (Fig. 2c), there was no signal for the nonphosphopeptide-bound Zn^{2+} -Phos-tag complex. These results demonstrate that the AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag preferentially captures FAM-labeled phosphorylated peptides to form the 1:1 complexes.

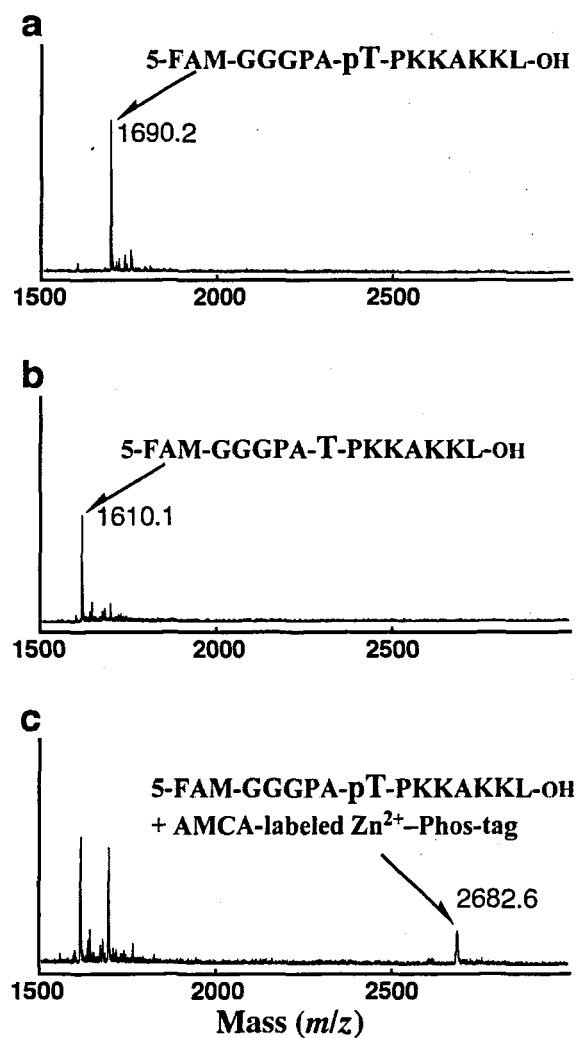


Figure 2.

MALDI-TOF MS spectra: (a) the 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptides, 5-FAM-GGGPA-pT-PKKAKKL-OH (100 pmol), (b) the nonphosphorylated counterpart, 5-FAM-GGGPA-T-PKKAKKL-OH (150 pmol), (c) a mixture of 5-FAM-GGGPA-pT-PKKAKKL-OH (100 pmol), 5-FAM-GGGPA-T-PKKAKKL-OH(150 pmol), and AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (50 pmol).

Determination of the Phos-tag-based FRET system

We conducted the FRET analysis using AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (a fluorescent donor: λ_{ex} 345 nm, λ_{em} 445 nm) and FAM-labeled phosphorylated compounds (a fluorescent acceptor: λ_{ex} 490 nm, λ_{em} 520 nm) in an aqueous solution (pH 7.4) at 25 °C. The test solution contains AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (0.80 μM) and a FAM-labeled phosphorylated compound (0–2.0 μM). The reference experiments were performed using the nonphosphorylated counterparts (0–2.0 μM) under the same conditions. The spectra of 6-FAM-labeled phosphoserine, 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide, the 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate, and 5-FAM-labeled phosphorylated EGF receptor 661–681 are shown in Figs. 3a–d, respectively. The left panels are the spectra using the phosphorylated compounds, and the right panels are those using the nonphosphorylated counterparts. As shown in the left panels, the fluorescence intensity at 445 nm, which is derived from the AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag, decreased with an increase in the concentration of the FAM-labeled phosphorylated compounds. Among the phosphorylated compounds tested, the efficiency of FRET varied widely, which is possibly due to the differences in the length (5–9 amino acid sequences) between the AMCA and FAM groups and the dissociation constants K_d for the Zn^{2+} -Phos-tag complexes with the phosphorylated compound (see below). On the other hand (see right panels), the fluorescence spectra using the nonphosphorylated compounds showed almost no change in intensity at 445 nm. Furthermore, the increases of the emission intensity at 520 nm, which is derived from the FAM group, using the nonphosphorylated compounds were smaller than those using the phosphorylated counterparts. Similar changes in the fluorescence spectra were observed using 6-FAM-labeled phosphotyrosine, the 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide, and 5-FAM-labeled phosphorylated Abltide (see supplemental Fig. S1 in supplementary material). Thus, the combination of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag and a FAM-labeled phosphorylated compound provides a novel FRET system for quantitative analysis.

From the changes in the fluorescence intensity at 445 nm as shown in Fig. 3 and supplemental Fig. S1 (see supplementary material), the dissociation constants K_d (μM) of the 1:1 complexes of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag and FAM-labeled phosphorylated compounds ($K_d = \frac{[\text{AMCA-labeled Zn}^{2+}\text{-Phos-tag}][\text{FAM-labeled phosphorylated compound}]}{[1:1 \text{ complex}]}$) were estimated [32]: 0.04 μM for 6-FAM-labeled phosphotyrosine, 0.07 μM for 6-FAM-labeled phosphoserine, 0.06 μM for the 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate, 0.07 μM for 5-FAM-labeled phosphorylated Abltide, 0.6 μM for 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide, 0.6 μM for phosphorylated EGF receptor 661–681, and 0.7 μM for the 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide. Although there is a small difference in the K_d values of phosphotyrosine and phosphoserine, the values of the phosphoserine- and phosphothreonine-containing peptides are over 10 times larger than those of the phosphotyrosine-containing peptides. Similarly, the FRET efficiencies determined from the changes in intensity at 445 nm varied as follows: 84% for 6-FAM-labeled phosphotyrosine, 84% for 6-FAM-labeled phosphoserine, 86% for the 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate, 84% for 5-FAM-labeled phosphorylated Abltide, 59% for 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide, 55% for phosphorylated EGF receptor 661–681, and 47% for the 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide. These facts suggest that the steric hindrance around the phosphate groups of the phosphoserine- and phosphothreonine-containing peptides would be larger than that of the phosphotyrosine-containing peptides. The other factors responsible for the difference in the phosphopeptides might be the charge and hydrophobicity of the amino acid sequence context. The donor-to-acceptor distance for an efficient FRET system should be in a range of 1–10 nm [33]. The distances between the FAM and AMCA groups in the phosphate-bound Phos-tag complexes used are all in the range, which is shown by the general molecular models.

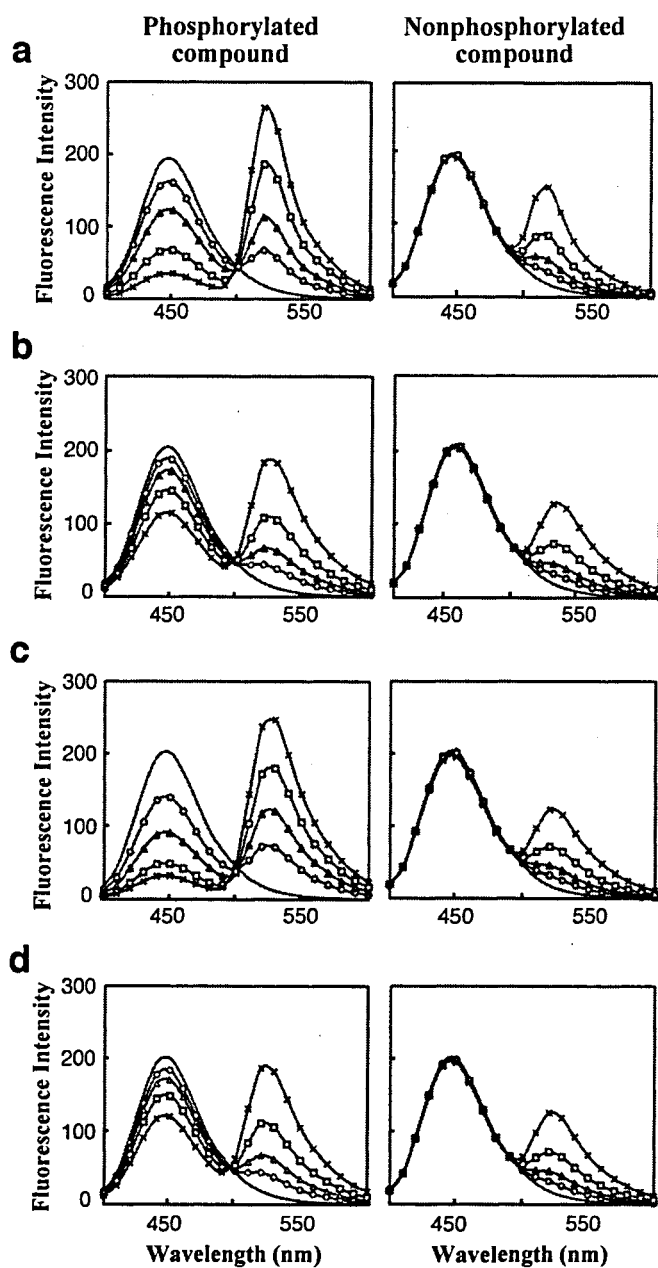


Figure 3.

Overlaid emission spectra (λ_{ex} 345 nm, 25 °C, pH 7.4) of the mixtures of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (0.80 μM) with FAM-labeled phosphorylated (left panels) and nonphosphorylated compounds (right panels): (a) 0 (solid line), 0.2 (circle), 0.4 (triangle), 0.8 (square), and 1.6 μM (cross) of 6-FAM-labeled serine, (b) 0 (solid line), 0.2 (circle), 0.5 (triangle), 0.9 (square), and 1.8 μM (cross) of Kemptide (5-FAM-LRRA-[*p*]S-LG-OH), (c) 0 (solid line), 0.3 (circle), 0.5 (triangle), 1.0 (square), and 2.0 μM (cross) of the PTP1B substrate (5-FAM-DADE-[*p*]Y-LIPQQG-OH), (d) 0 (solid line), 0.2 (circle), 0.5 (triangle), 0.9 (square), and 1.8 μM (cross) of EGF receptor 661–681 (5-FAM-KRELVEPL-[*p*]T-PSGEAPNQALLR-NH₂).

Kinetic study of the dephosphorylation of a phosphopeptide

For the kinetic study of the dephosphorylation of a phosphopeptide using alkaline phosphatase, we applied this FRET system. Real-time analyses of the dephosphorylation of 5-FAM-labeled phosphoserine, phosphorylated PTP1B substrate, and phosphorylated histone H1-derived peptide were performed using a 10-mm quartz cell under stirring at 25 °C. The reaction mixture (3 mL) contains AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (0.80 μM), a FAM-labeled phosphorylated compound (0.80 or 1.0 μM), 1.0 mM MgCl_2 , and 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4). The dephosphorylation reaction was initiated by addition of an appropriate amount of alkaline phosphatase. Immediately, the fluorescence intensity at 445 nm increased time-dependently. The rate of the dephosphorylation increased with an increase in the concentration of alkaline phosphatase. Typical fluorescence changes using 6-FAM-labeled phosphoserine in the presence of five concentrations of alkaline phosphatase (0.05, 0.10, 0.20, 0.40, and 0.81 $\mu\text{g/mL}$) are shown in Fig. 4a. The fluorescence spectrum change for the 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate (1.0 μM) in the presence of alkaline phosphatase (0.60 μg) is displayed in Fig. 4b, which shows the fluorescence increase at 445 nm and the decrease at 520 nm. The plots of the intensities at 445 and 520 nm against the reaction times (0–60 min) are shown in Fig. 4c. At 60 min, the fluorescence spectrum was the same as that for a solution (pH 7.4) containing AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (0.80 μM) and the 5-FAM-labeled nonphosphorylated PTP1B substrate (1.0 μM). The dephosphorylation reaction progressed according to a pseudo-first-order rate kinetics until 20 min. Thus, the fluorescence change is consistent with the time-dependent dephosphorylation of the phosphopeptide to produce the dephosphorylated PTP1B substrate and the phosphopeptide-unbound the AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag. On the other hand, there was no change in the fluorescence spectrum using another substrate, the 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide (data not shown). This result indicates the substrate specificity of alkaline phosphatase under the experimental conditions. Consequently,

this FRET system would be useful to determine the profile of various phosphatases at physiological pH.

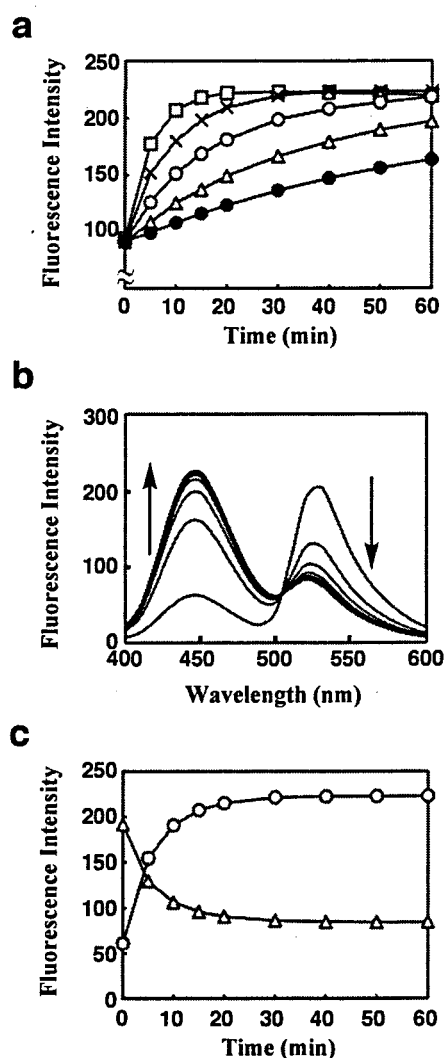


Figure 4.

(a) Time-course changes of the fluorescence intensity at 445 nm of the solutions containing AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag ($0.80 \mu\text{M}$) and of 6-FAM-labeled phosphoserine ($0.80 \mu\text{M}$) in the presence of alkaline phosphatase (0.05 [black circle], 0.10 [triangle], 0.20 [open circle], 0.40 [cross], and $0.81 \mu\text{g/mL}$ [square]). (b) Overlaid emission spectra of a mixture of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag ($0.80 \mu\text{M}$) and the 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate ($1.0 \mu\text{M}$) at 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min after the addition of alkaline phosphatase ($0.60 \mu\text{g}$). (c) Time-course changes of the fluorescence intensity taken from the spectra of Fig. 4b at 445 nm (open circle) and 520 nm (triangle).

5. Conclusions

In this report, we introduced a novel FRET system to analyze the dephosphorylation status of phosphorylated compounds. For this system, a novel fluorescent phosphate-binding molecule, AMCA-labeled Zn²⁺-Phos-tag was synthesized. The Zn²⁺-Phos-tag derivative selectively captures a FAM-labeled phosphorylated compound, resulting in efficient FRET. Using this FRET system, the real-time analysis of the dephosphorylation reaction of the FAM-labeled phosphopeptide using alkaline phosphatase was demonstrated. The Phos-tag-based FRET system has the following major advantages: i) The real-time analysis of the dephosphorylation reaction is possible without multiple samplings, ii) the analysis requires a simple procedure just using two solutions of AMCA-labeled Phos-tag and a FAM-labeled phosphorylated compound, and iii) the system would be useful for the reliable and comprehensive dephosphorylation assays for various phosphopeptides containing phosphoserine, phosphothreonine, or phosphotyrosine, *in vitro*. Thus, the principle of this system would be useful to a high-throughput phosphatase profiling, such as an array-format screening involved in the investigation of substrate specificity, the measurement of enzyme activity, and the determination of an activator (or an inhibitor).

6. References

- [1] P. Cohen, The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5001–5010.
- [2] G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome, *Science* 298 (2002) 1912–1934.
- [3] P. Cohen, Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 309–315.
- [4] N.K. Tonks, Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 833–846.
- [5] N. D. Cook, Scintillation proximity assay: A versatile high-throughput screening technology, *Drug Discov. Today* 1 (1996) 287–294.
- [6] H. H. Versteeg, E. Nijhuis, G. R. van den Brink, M. Evertzen, G.N. Pynaert, S. J. H. van Deventer, P. J. Coffey, M. P. Peppelenbosch, A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein, *Biochem. J.* 350 (2000) 717–722.
- [7] M. Koresawa, T. Okabe, High-throughput screening with quantitation of ATP consumption: A universal non-radioisotope, homogeneous assay for protein kinase, *Assay Drug Dev. Technol.* 2 (2004) 153–160.
- [8] A. F. Braunwalder, D. R. Yarwood, M. A. Sills, K. E. Lipson, Measurement of the protein tyrosine kinase activity of c-src using time-resolved fluorometry of europium chelates, *Anal. Biochem.* 238 (1996) 159–164.
- [9] R. Seethala, R. Menzel, A fluorescence polarization competition immunoassay for tyrosine kinases, *Anal. Biochem.* 255 (1998) 257–262.
- [10] J. R. Sportsman, E. A. Gaudet, A. Boge, Immobilized metal ion affinity-based fluorescence polarization (IMAP): Advances in kinase screening, *Assay Drug Dev. Technol.* 2 (2004) 205–214.

- [11] S. M. Rodems, B. D. Hamman, C. Lin, J. Zhao, S. Shah, D. Heidary, L. Makings, J.H. Stack, B. A. Pollok, A FRET-based assay platform for ultra-high density drug screening of protein kinases and phosphatases, *Assay Drug Dev. Technol.* 1 (2002) 9–19.
- [12] A. G. Morgan, T. J. McCauley, M. L. Stanaitis, M. Mathrubutham, S. Z. Millis, Development and validation of a fluorescence technology for both primary and secondary screening of kinases that facilitates compound selectivity and site-specific inhibitor determination, *Assay Drug Dev. Technol.* 2 (2004) 171–181.
- [13] E. Kinoshita, M. Takahashi, H. Takeda, M. Shiro, T. Koike, Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Trans.* (2004) 1189–1193.
- [14] H. Takeda, A. Kawasaki, M. Takahashi, A. Yamada, T. Koike, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of phosphorylated compounds using a novel phosphate capture molecule, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2075–2081.
- [15] T. Tanaka, H. Tsutsui, K. Hirano, T. Koike, A. Tokumura, K. Satouchi, Quantitative analysis of lysophosphatidic acid by time-of-flight mass spectrometry using a phosphate-capture molecule, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 2145–2150.
- [16] K. Hirano, H. Matsui, T. Tanaka, F. Matsuura, K. Satouchi, T. Koike, Production of 1,2-didocosahexaenoyl phosphatidylcholine by bonito muscle lysophosphatidylcholine/transacylase, *J. Biochem.* 136 (2004) 477–483.
- [17] E. Kinoshita, A. Yamada, H. Takeda, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 155–162.
- [18] E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, A. Yamada, M. Endo, T. Koike, Enrichment of phosphorylated proteins from cell lysate using a novel phosphate-affinity chromatography at physiological pH, *Proteomics* 6 (2006) 5088–5095.
- [19] K. Inamori, M. Kyo, Y. Nishiya, Y. Inoue, T. Sonoda, E. Kinoshita, T. Koike, Y.

- Katayama, Detection and quantification of on-chip phosphorylated peptides by surface plasmon resonance imaging techniques using a phosphate capture molecule, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3979–3985.
- [20] T. Mori, K. Inamori, Y. Inoue, X. Han, G. Yamanouchi, T. Niidome, Y. Katayama, Evaluation of protein kinase activities of cell lysates using peptide microarrays based on surface plasmon resonance imaging, *Anal. Biochem.* 375 (2008) 223–231.
- [21] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, T. Koike, Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins, *Mol. Cell. Proteomics* 5 (2006) 749–757.
- [22] T. Nakanishi, E. Ando, M. Furuta, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, S. Tsunasawa, O. Nishimura, Identification on membrane and characterization of phosphoproteins using an alkoxide-bridged dinuclear metal complex as a phosphate-binding tag molecule, *J. Biomol. Tech.* 18 (2007) 278–286.
- [23] E. Kinoshita-Kikuta, Y. Aoki, E. Kinoshita, T. Koike, Label-free kinase profiling using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis, *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 356–366.
- [24] S. Yamada, H. Nakamura, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Kioke, Y. Shiro, Separation of a phosphorylated histidine protein using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* 360 (2007) 160–162.
- [25] C. M. Barbieri, A. M. Stock, Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents, *Anal. Biochem.* 376 (2008) 73–82.
- [26] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, M. Matsubara, S. Yamada, H. Nakamura, Y. Shiro, Y. Aoki, K. Okita, T. Koike, Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE, *Proteomics* 8 (2008) 2994–3003.
- [27] M. Ishiai, H. Kitao, A. Smogorzewska, J. Tomida, A. Kinomura, E. Uchida, A. Saberi, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, S. Tashiro, S.J. Elledge, M. Takata, FANCI

- phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (2008) 1138–1146.
- [28] E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, M. Matsubara, Y. Aoki, S. Ohie, Y. Mouri, T. Koike, Two-dimensional phosphate-affinity gel electrophoresis for the analysis of phosphoprotein isotypes, *Electrophoresis* 30 (2009) in press.
- [29] S. A. Grant, J. Xu, E. J. Bergeron, J. Mroz, Development of dual receptor biosensors: An analysis of FRET pairs, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 231–237.
- [30] E. Nakata, Y. Koshi, E. Koga, Y. Katayama, I. Hamachi, Double-modification of lectin using two distinct chemistries for fluorescent ratiometric sensing and imaging saccharides in test tube or in cell, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 13253–13261.
- [31] G. Zlokarnik, P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burres, L. Feng, M. Whitney, K. Roemer, R. Y. Tsien, Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter, *Science* 279 (1998) 84–88.
- [32] A. C. Kenneth, *Binding constants*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- [33] P. Wu, L. Brand, *Resonance energy transfer: methods and applications*, *Anal. Biochem.* 218 (1994) 1–13.

7. Supplementary material

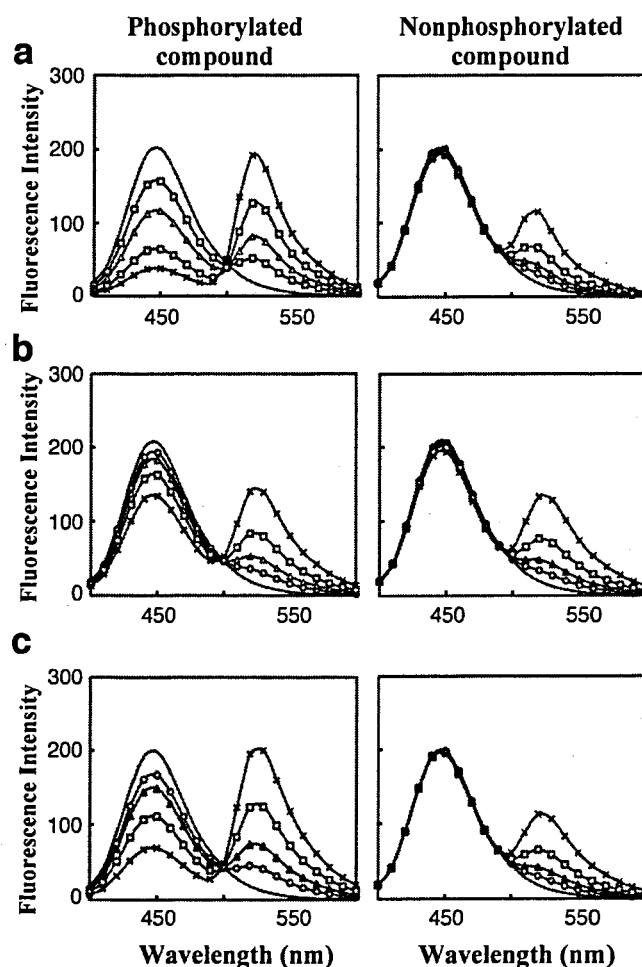
The purity and MALDI-TOF MS data of all peptides used

As for 5-FAM-labeled Kemptide (5-FAM-LRRA-S-LG-OH), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 90% to 20% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 10% to 80% [v/v], 20 min): Retention time = 11.7 min, purity 98%. MALDI-TOF MS: 5-FAM-labeled Kemptide (100 μM) dissolved in a 25% (v/v) CH₃CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, *m/z* 1130.2. As for 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide (5-FAM-LRRA-*p*S-LG-OH), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 90% to 20% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 10% to 80% [v/v], 20 min): Retention time = 11.5 min, purity 91%. MALDI-TOF MS: 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide (100 μM) dissolved in a 25% (v/v) CH₃CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, *m/z* 1210.1. As for the 5-FAM-labeled nonphosphorylated PTP1B substrate (5-FAM-DADE-Y-LIPQQG-OH), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 90% to 20% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 10% to 80% [v/v], 20 min): Retention time = 11.8 min, purity 95%. MALDI-TOF MS: the 5-FAM-labeled nonphosphorylated PTP1B substrate (40 μM) dissolved in a 50% (v/v) CH₃CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, *m/z* 1605.6. As for the 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate (5-FAM-DADE-*p*Y-LIPQQG-OH), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 90% to 20% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 10% to 80% [v/v], 20 min): Retention time = 11.0 min, purity 97.2%. MALDI-TOF MS: the 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate (40 μM) dissolved in a 50% (v/v) CH₃CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, *m/z* 1685.3. As for the 5-FAM-labeled histone H1-derived peptide (5-FAM-GGGPA-T-PKKAKKL-OH), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 100% to 50% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 0% to 50% [v/v], 20 min): Retention time = 12.3 min, purity 96%.

MALDI-TOF MS: the 5-FAM-labeled histone H1-derived peptide (100 μ M) dissolved in a 50% (v/v) CH₃CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, *m/z* 1610.1. As for the 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide (5-FAM-GGGPA-*p*T-PKKAKKL-OH), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 100% to 50% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 0% to 50% [v/v], 20 min): Retention time = 12.1 min, purity 99%. MALDI-TOF MS: the 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide (100 μ M) dissolved in a 50% (v/v) CH₃CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1%(v/v) TFA, *m/z* 1690.2. As for 5-FAM-labeled Abltide (5-FAM-KKGEAI-Y-AAPFA-NH₂), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 90% to 20% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 10% to 80% [v/v], 20 min): Retention time = 11.5 min, purity 94%. MALDI-TOF MS: 5-FAM-labeled Abltide (100 μ M) dissolved in a 50% (v/v) CH₃CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1%(v/v) TFA, *m/z* 1622.1. As for 5-FAM-labeled phosphorylated Abltide (5-FAM-KKGEAI-*p*Y-AAPFA-NH₂), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 90% to 20% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 10% to 80% [v/v], 20 min): Retention time = 10.8 min, purity 44.2%. MALDI-TOF MS: 5-FAM-labeled phosphorylated Abltide (100 μ M) dissolved in a 50% (v/v) CH₃CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, *m/z* 1702.1. As for 5-FAM-labeled EGF receptor 661–681 (5-FAM-KRELVEPL-T-PSGEAPNQALLR-NH₂), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 100% to 50% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 0% to 50% [v/v], 20 min): Retention time = 15.1 min, purity 97%. MALDI-TOF MS: 5-FAM-labeled EGF receptor 661–681 (100 μ M) dissolved in a 50% (v/v) CH₃CN solution containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, *m/z* 2674.9. As for 5-FAM-labeled phosphorylated EGF receptor 661–681 (5-FAM-KRELVEPL-*p*T-PSGEAPNQALLR-NH₂), HPLC (eluent: 0.1% [v/v] TFA/H₂O from 100% to 50% [v/v] and 0.1% [v/v] TFA/CH₃CN from 0% to 50% [v/v], 20 min): Retention time = 14.9 min, purity 92%. MALDI-TOF MS: 5-FAM-labeled phosphorylated EGF receptor 661–681 (100 μ M) dissolved in a 50% (v/v) CH₃CN solution

containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone (2.5 mg/mL) and 0.1% (v/v) TFA, m/z 2754.3.

Supplemental Figure S1.



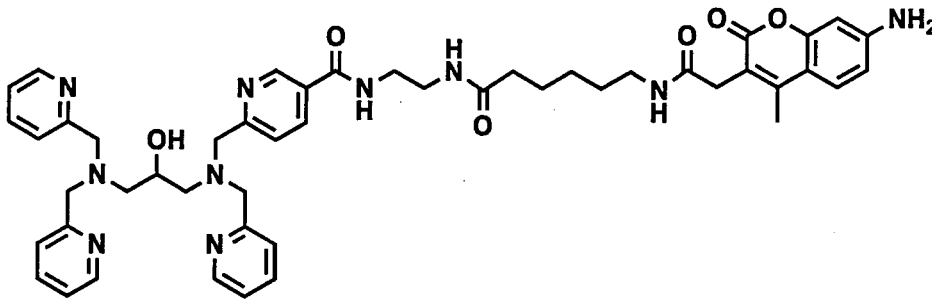
Overlaid emission spectra (λ_{ex} 345 nm, 25 °C, pH 7.4) of the mixtures of AMCA-labeled Zn^{2+} -Phos-tag (0.80 μM) with FAM-labeled phosphorylated (left panels) and nonphosphorylated compounds (right panels): (a) 0 (solid line), 0.2 (circle), 0.4 (triangle), 0.8 (square), and 1.6 μM (cross) of 6-FAM-labeled tyrosine, (b) 0 (solid line), 0.3 (circle), 0.5 (triangle), 1.0 (square), and 2.0 μM (cross) of the histone H1-derived peptide (5-FAM-GGGPA-[*p*]T-PKKAKKL-OH), (c) left panel: 0 (solid line), 0.1 (circle), 0.2 (triangle), 0.4 (square), and 0.8 μM (cross) of phosphorylated Abltide (5-FAM-KKGEAI-*p*Y-AAPFA-NH₂), which contain 1.3 eq of nonphosphorylated counterpart; right panel: 0 (solid line), 0.2 (circle), 0.5 (triangle), 1.0 (square), or 1.9 μM (cross) of nonphosphorylated Abltide (5-FAM-KKGEAI-Y-AAPFA-NH₂).

8. Appendixes

8-1. AMCA-フォスタグ配位子の ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, AMCA-フォスタグ MALDI-TOF MS スペクトル . . .	33
8-2. FAM-アミノ酸またはペプチドの精製法 (DIAION HP-20 処理) . . .	36
8-3. FAM-アミノ酸またはペプチドの MALDI-TOF MS, HPLC 分析 . . .	38
8-4. AMCA-フォスタグの量子収率の測定	57
8-5. AMCA-フォスタグと FAM が相互作用しないことの確認	59
8-6. 亜鉛二核錯体形成からリン酸化分子捕捉過程の 蛍光スペクトル変化 . . .	60
8-7. AMCA-フォスタグによる脱リン酸化反応の検出	62
8-8. フォスタグとの親和性に影響を与えるリン酸基周辺の構造 . . .	65

8-1. AMCA-フォスタグ配位子の ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR,
AMCA-フォスタグ MALDI-TOF MS スペクトル

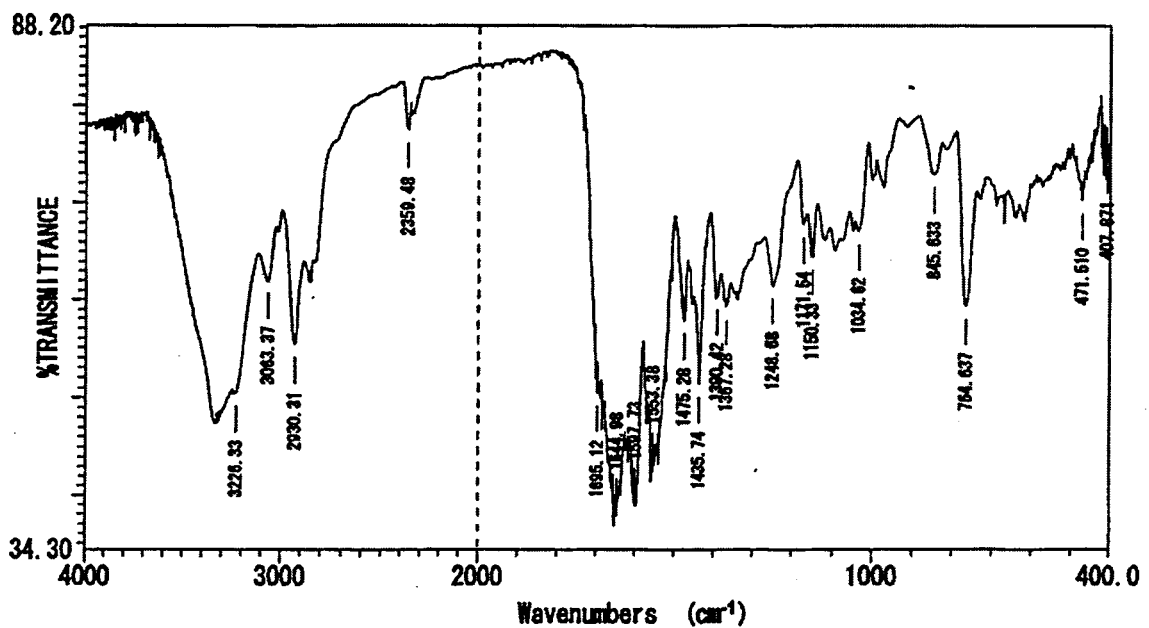
8-1-1. AMCA-フォスタグ配位子の構造



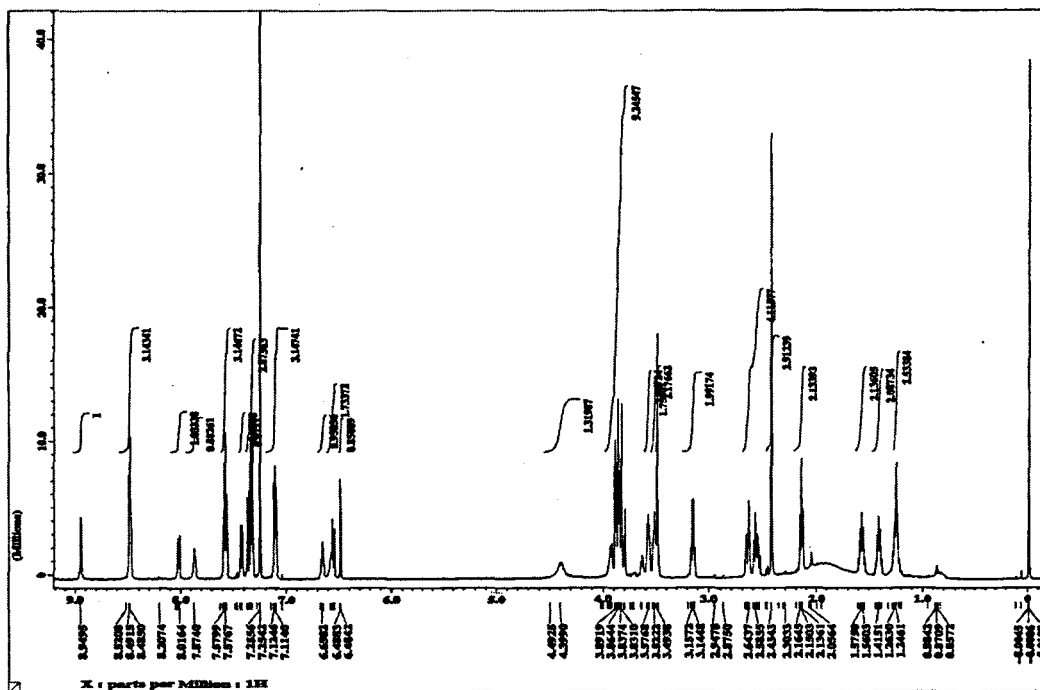
Molecular Weight: 869.02

Exact Mass: 868.4

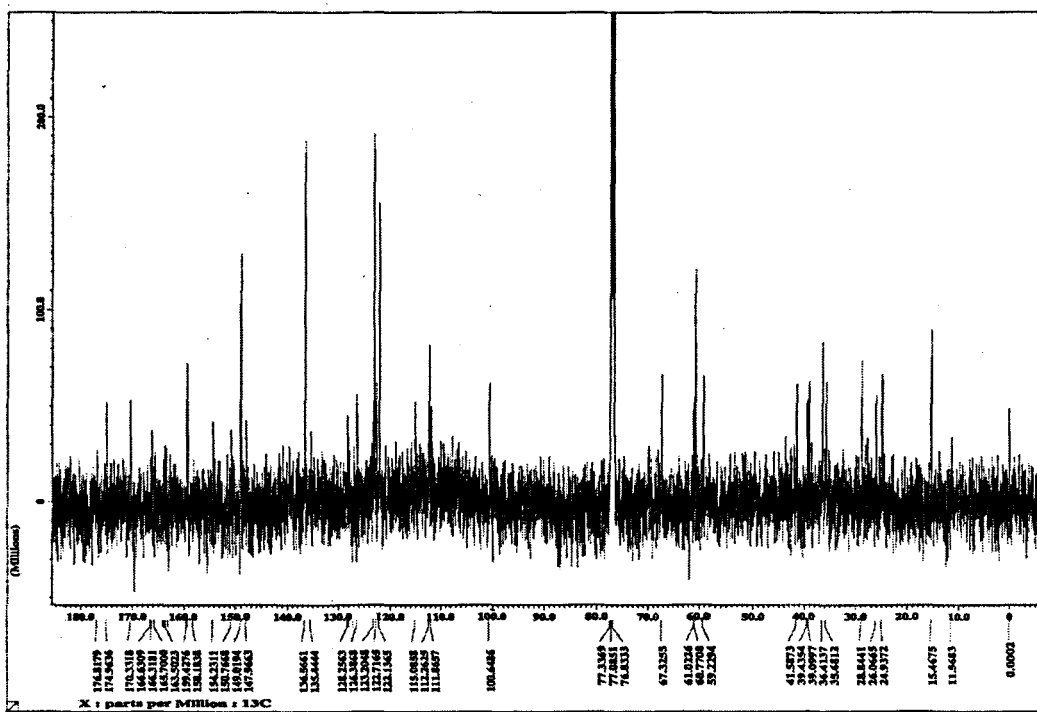
8-1-2. AMCA-フォスタグ配位子の赤外線吸収スペクトル (with a KCl pellet)



8-1-3. AMCA-フォスタグ配位子の ¹H NMR スペクトル (in CDCl₃)



8-1-4. AMCA-フォスタグ配位子の ¹³C NMR スペクトル (in CDCl₃)



8-1-5. AMCA-フォスタグ-リン酸複合体の MALDI-TOF MS スペクトル

まず、以下に示す3つの溶液を調製した。

- 2.0 mg/mL (2.3 mM) の AMCA-フォスタグ配位子の MeOH 溶液
- 100 μ M の ZnCl_2 水溶液
- 10 mM $\text{NaHPO}_4\text{-NaOH}$ (pH 7.4)

これら3つの溶液と Milli-Q 水を混合し、AMCA-フォスタグ配位子 (27 μ M), ZnCl_2 (53 μ M), $\text{NaHPO}_4\text{-NaOH}$ (27 μ M, pH 7.4) を含む溶液を調製した。この溶液 0.75 μ L と 10 mg/mL の THAP のアセトニトリル溶液 0.25 μ L を MALDI-TOF MS 用サンプルプレート上で混和した。サンプルプレート上にスポットした溶媒は自然乾燥させた。以上の操作で調製した試料の質量分析を行った。

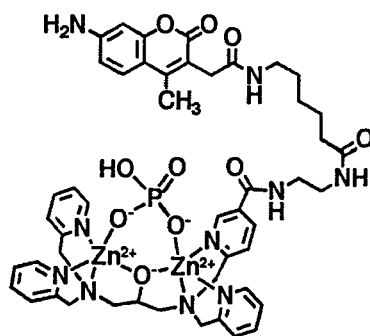
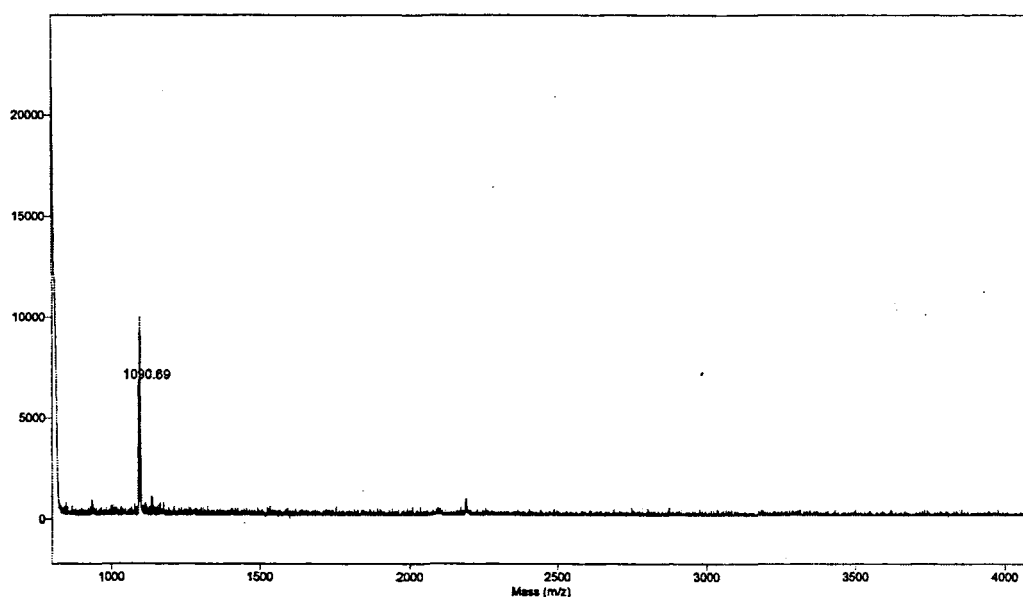


図. AMCA-フォスタグ-リン酸の
1 : 1 複合体
Exact mass 1091.3



8-2. FAM-アミノ酸またはペプチドの精製法 (DIAION HP-20 処理)

8-2-1. DIAION HP-20 樹脂の親水化

DIAION HP-20 樹脂 (18 g) を 100 mL ナスフラスコに量り取り, 50 mL 程度の MeOH を加え, 1 時間以上攪拌した。その後 3 回ほど MeOH で洗浄し, 100 mL のサンプル瓶に移し MeOH を除去した。続いて蒸留水を 50 mL 程度加え, DIAION HP-20 のストック溶液とした。

8-2-2. 6-FAM-セリン, リン酸化セリン, リン酸化チロシンの精製法 (図 a)

合成反応終了後 (9 ページ参照) の反応溶液を 50 mL ナスフラスコへ移した。この溶液をスターラーで攪拌しつつ, 6 N HCl を滴下し溶液の pH を 2~3 とした。ここへ親水化済みの DIAION HP-20 樹脂を 6 g 加え, 10 分程度攪拌した。以上の操作により, 6-FAM-アミノ酸は樹脂に吸着する。続いてこの樹脂をガラス製のオープンカラムへ充填した。充填した樹脂を, カラムの上部から 1 mM HCl 溶液を 20 mL 程度流し, 洗浄した (未反応のアミノ酸の除去)。最後にカラム上部から MeOH を流し, 樹脂に吸着していた 6-FAM-アミノ酸を溶出させた。得られた溶液中の MeOH はエバポレーターによって, 残った水は凍結乾燥によって除去し, FAM 標識体の粉末を得た。これらの粉末は DMSO に再溶解し, スtock溶液とした。

8-2-3. 6-FAM-チロシン, 5-FAM-ペプチドの精製法 (図 b)

200 μ L の酵素反応後の反応溶液 (遠心ろ過ユニット YM-10 により酵素除去済み, 10 ページ参照) に 1~2 μ L の 6 N HCl を加え, 溶液を酸性とする。この溶液へ親水化済みの DIAION HP-20 樹脂を 0.2 g を加えボルテックス等により攪拌した。以上の操作により, FAM 標識体は樹脂に吸着する。続いてこの樹脂を遠心ろ過ユニット (NANOSEP MF GHP) のサンプルリザーバーへ移した。遠心操作 (2,000 \times g) によって不純物として存在する親水性低分子 (ADP, ATP, Mg^{2+} など) を除去した。さらに, 樹脂の洗浄操作として 1 mM HCl 溶液を 300 μ L 加え攪拌し, 遠心操作によって除去した (5 回繰り返す)。最後に MeOH を 300 μ L 加え攪拌し, 遠心操作によって得られた画分を回収した (3 回繰り返す)。得られた溶液中の MeOH と水は, 凍結乾燥操作によって除去し, FAM 標識体の粉末を得た。これらの粉末は 10 mM Tris-HCl (pH 8.8)

に再溶解し、ストック溶液とした。

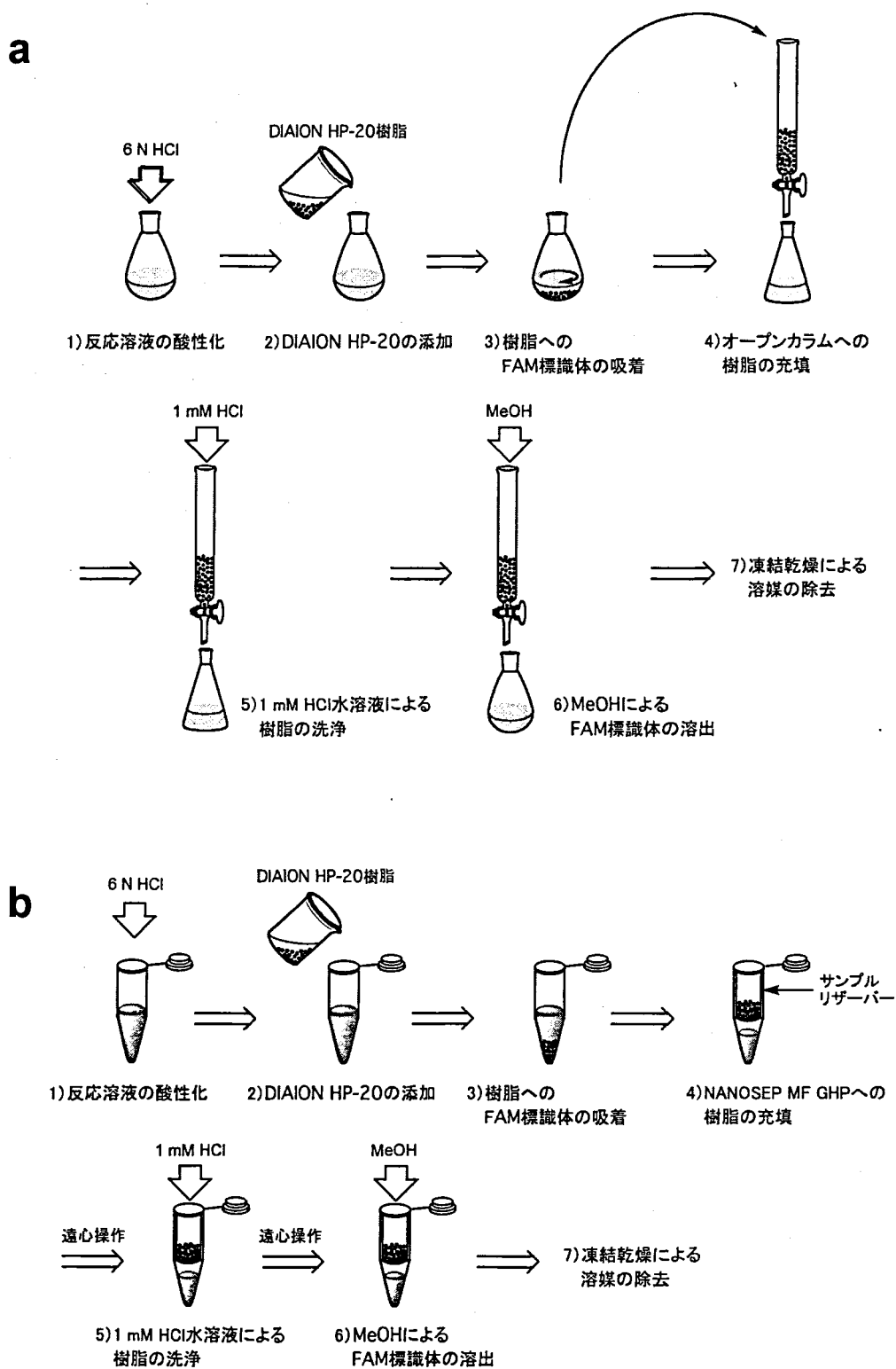


図 a. 6-FAM-セリン，リン酸化セリン，リン酸化チロシンの精製法

図 b. 6-FAM-チロシン，5-FAM-ペプチドの精製法

8-3. FAM-アミノ酸またはペプチドの MALDI-TOF MS, HPLC 分析

精製した各 FAM-アミノ酸, ペプチドストック溶液 (10~11, 36~37 ページ参照) 中の FAM 標識体の濃度は, 吸光度測定により決定した。続いてこれらの溶液を用いて, 各 FAM-ペプチドの MALDI-TOF MS 分析を行った。また, それらの純度は HPLC 分析によって決定した。

8-3-1. FAM-アミノ酸またはペプチド濃度の測定

まず, 6-Carboxyfluorescein (1.0 mM, 構造は 59 ページ参照) の DMSO 溶液を調製した。続いて 6-Carboxyfluorescein の DMSO 溶液を 0.1 M NaOH 溶液によって希釈し 8 μ M 溶液とした。この溶液を FAM-アミノ酸またはペプチドの濃度決定のための標準溶液とする。石英ガラス製のマイクロセル (光路長 \times 光路幅 \times 高さ = 10 mm \times 2 mm \times 45 mm) を用いて標準溶液の吸光度測定を行うと, 495 nm の吸光度は 0.7 を示した。

精製した各 FAM-アミノ酸またはペプチドのストック溶液は, 0.1 M NaOH 溶液によって適度に希釈し, 上記のセルを用いて吸光度を測定した。得られた吸光度の値を 8 μ M の 6-Carboxyfluorescein の値と比較し, 各ストック溶液中の FAM 標識体の濃度を算出した。

8-3-2. 質量分析

各 FAM-ペプチドの質量分析手順を以下に示す。まず, 8-3-1 で濃度決定した FAM-ペプチド溶液を 0.2%(v/v) TFA 水溶液によって 200 μ M に希釈した。この溶液 0.5 μ L と 5 mg/mL の THAP のアセトニトリル溶液 0.5 μ L を MALDI-TOF MS 用サンプルプレート上で混和した。サンプルプレート上にスポットした溶媒は自然乾燥させた。以上の操作で調製した試料の質量分析を行った。

FAM-ペプチドと AMCA-フォスタグの 1:1 複合体の質量分析は 11 ページに示した条件で行った。手順を以下に示す。まず, 2.3 mM の AMCA-フォスタグ配位子の MeOH 溶液を調製した。また, 100 μ M の ZnCl₂ 水溶液を調製した。続いて, FAM-ペプチドのリン酸化体と非リン酸化体のストック溶液と, 調製した 2 つの溶液を混合し, FAM-ペプチドのリン酸化体を 40 μ M, 非リン酸化体を 60 μ M, AMCA-フォスタグ配位子を 20 μ M, ZnCl₂ を 40 μ M 含む溶液を調製した。この溶液 0.5 μ L と 10 mg/mL の THAP

のアセトニトリル溶液 0.5 μL を MALDI-TOF MS 用サンプルプレート上で混和した。サンプルプレート上にスポットした溶媒は自然乾燥させた。以上の操作で調製した試料の質量分析を行った。

FAM-Abltide は、リン酸化した際にリン酸化が十分に進まず、リン酸化体と非リン酸化体の混合物となった (29, 51 ページ参照)。そこで、このペプチドは、リン酸化後に得られたリン酸化体と非リン酸化体の混合物に AMCA-フォスタグを混合し、質量分析を行った。

8-3-2. HPLC 分析

各 FAM 標識分子の HPLC 手順を以下に示す。分析用カラムには逆相系カラムである Shiseido CAPCELLPAK C18 を使用した。以下に示す 2 つの移動相をドラフト中で調製し、超音波処理によって脱気した。

水系移動相 : 0.1% TFA(v/v)水溶液

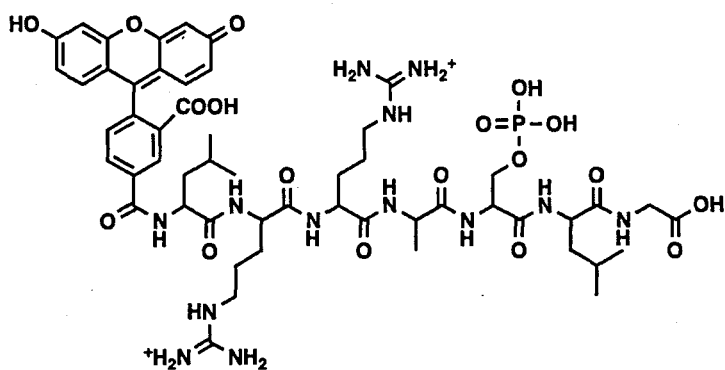
有機溶媒系移動相 : 0.1% TFA(v/v)を含むアセトニトリル溶液

溶離は、これら 2 つの溶媒の比を連続的に変えるグラジエント溶離法で行った。用いたグラジエントプログラムは以下に示す。試料は水系移動相で希釈し、濃度を 100 μM , 50 μM とした。調製した各試料を HPLC 装置に注入し、分離を行った。検出は吸光度計で行った (検出波長 480 nm)。測定後、濃度 50 μM と 100 μM の試料を分析して得た目的化合物のピーク面積比が 1 : 2 になっていることを確認した (定量性の確認)。さらに、目的化合物のピーク面積を検出された全てのピーク面積で割り算し、純度を計算した。

プログラム	水系移動相 : 有機系移動相	測定時間	試料
1	9:1 to 4:6	20 min	6-FAM-[p]serine 6-FAM-[p]tyrosine
2	9:1 to 2:8	20 min	5-FAM-[p]Kemptide 5-FAM-[p]PTP1B substrate 5-FAM-[p]Abltide
3	10:0 to 5:5	20 min	5-FAM-[p]histone H1-derived peptide 5-FAM-[p]EGF receptor 661-681

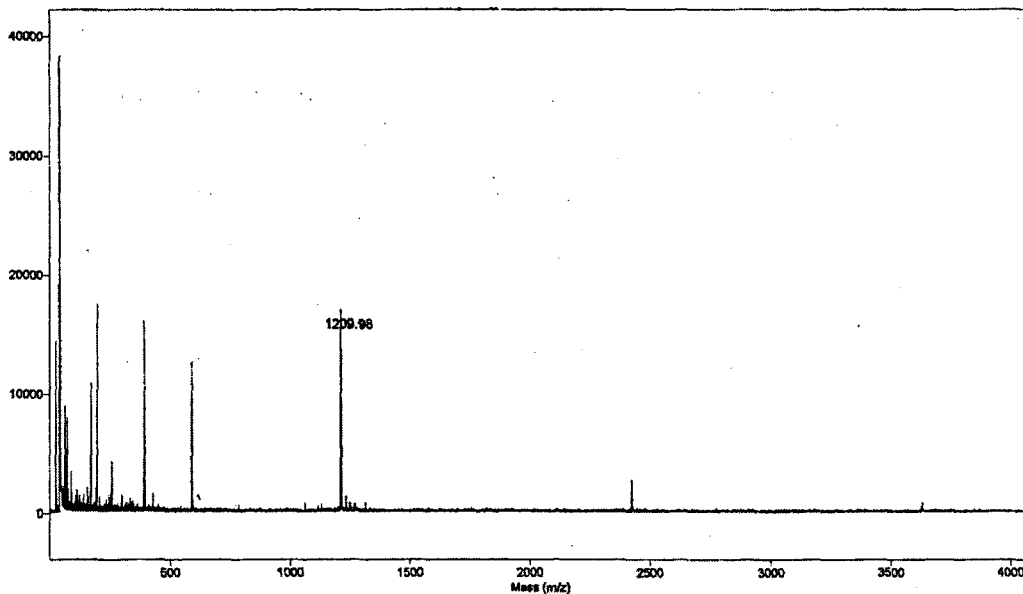
Data 1. 5-FAM-labeled Kemptide

Data 1-1. 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide の構造

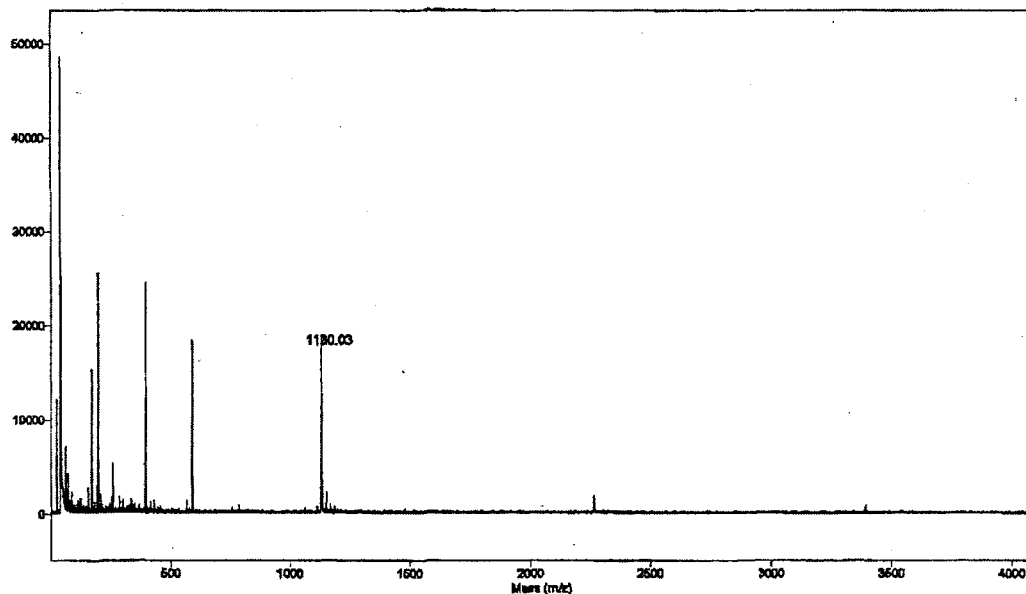


5-FAM-LRRA-S-LG-OH (非リン酸化型) の
Theoretical mass ($M + H^+$): 1131.2

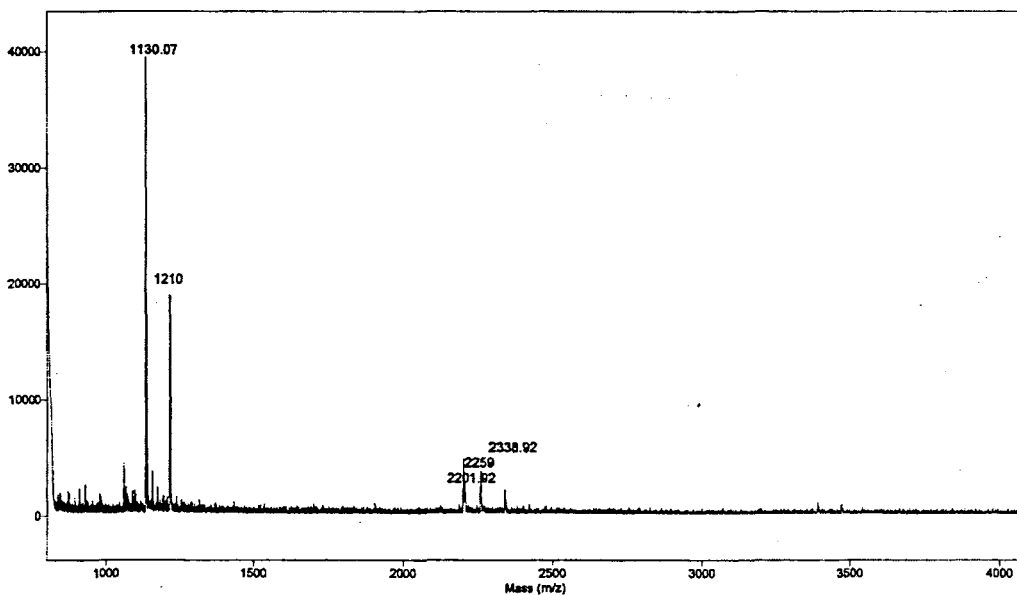
**Data 1-2. 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide の
MALDI-TOF MS スペクトル**



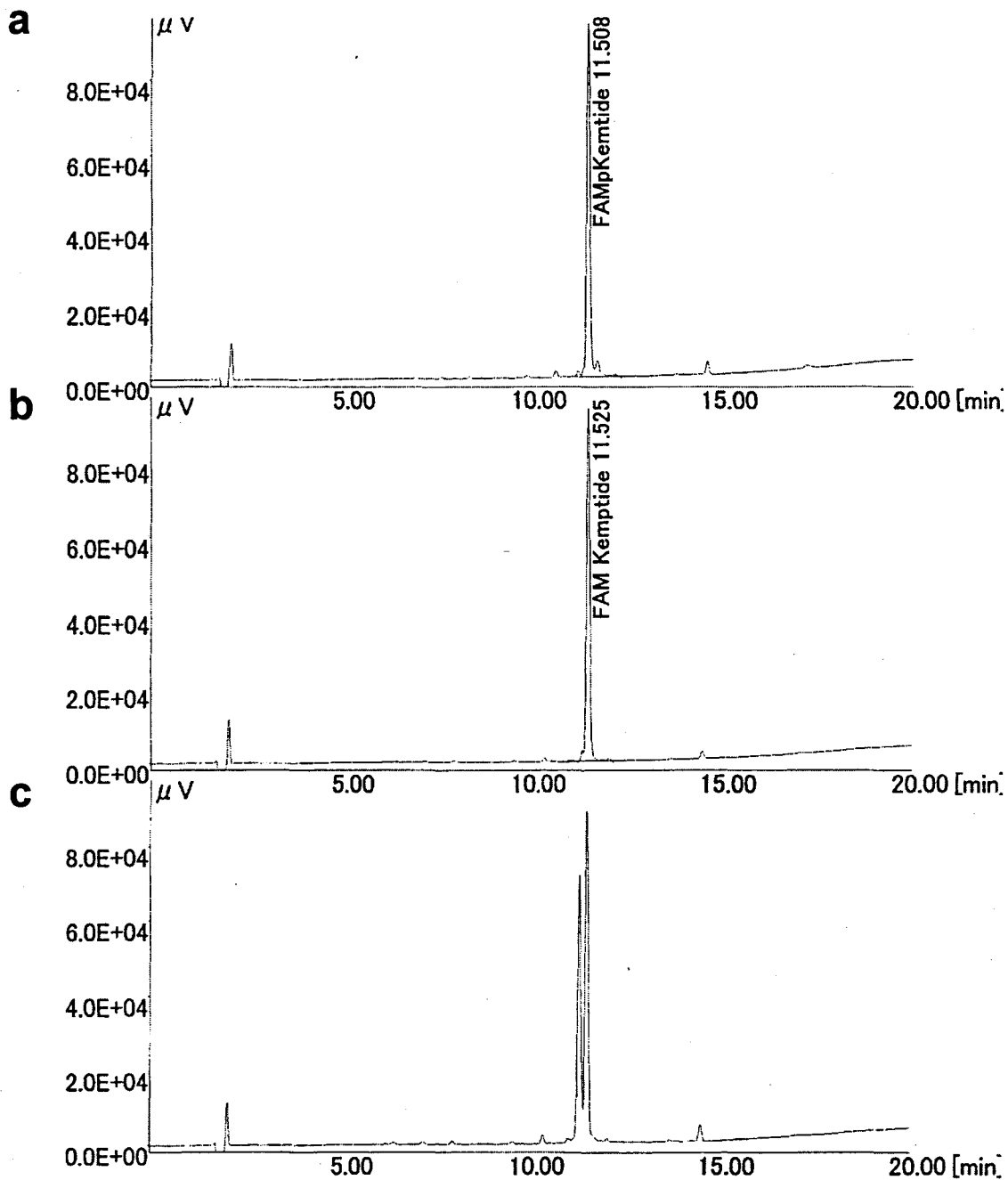
Data 1-3. 5-FAM-labeled nonphosphorylated Kemptide の MALDI-TOF MS スペクトル



**Data 1-4. 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide,
5-FAM-labeled nonphosphorylated Kemptide,
AMCA-Phos-tag 混合試料の MALDI-TOF MS スペクトル**



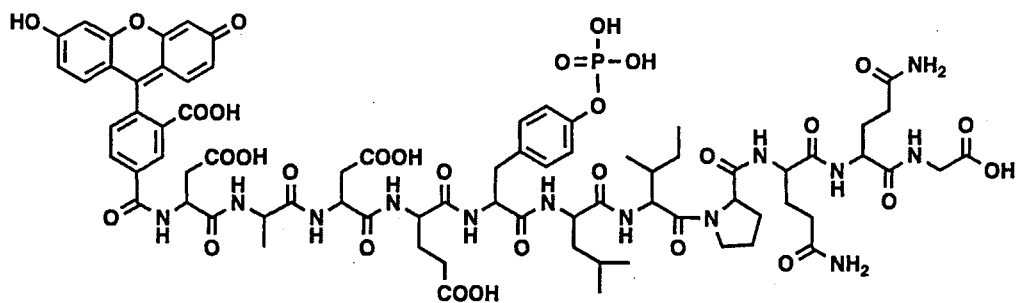
Data 1-5. 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide,
5-FAM-labeled nonphosphorylated Kemptide の HPLC 分析結果



- 分析結果 a. 50 μM 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide のクロマトグラム
分析結果 b. 50 μM 5-FAM-labeled Kemptide のクロマトグラム
分析結果 c. 50 μM 5-FAM-labeled phosphorylated Kemptide と
50 μM 5-FAM-labeled Kemptide 混合試料のクロマトグラム

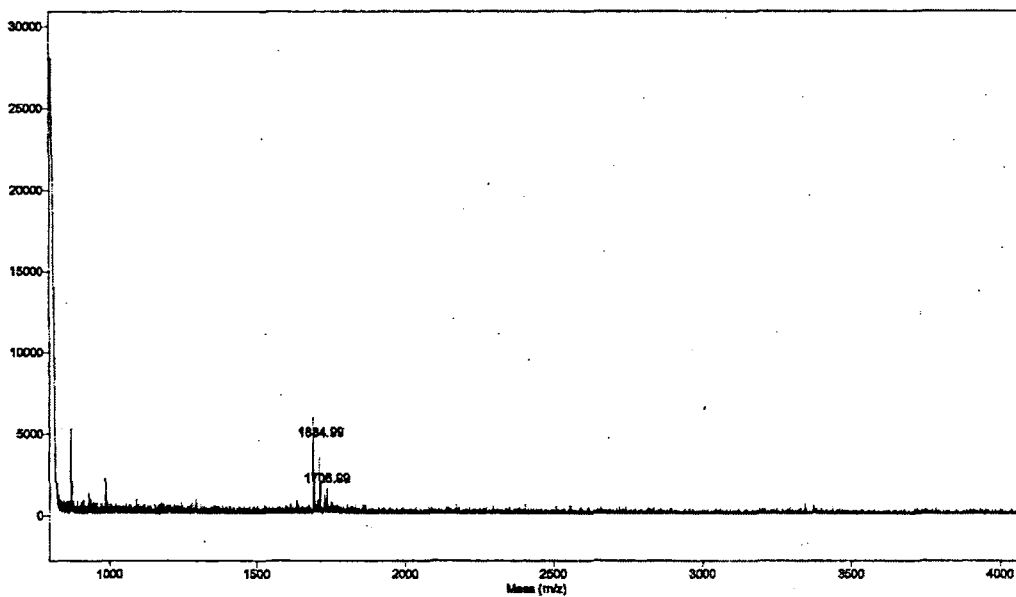
Data 2. 5-FAM-labeled PTP1B substrate

Data 2-1. 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate の構造

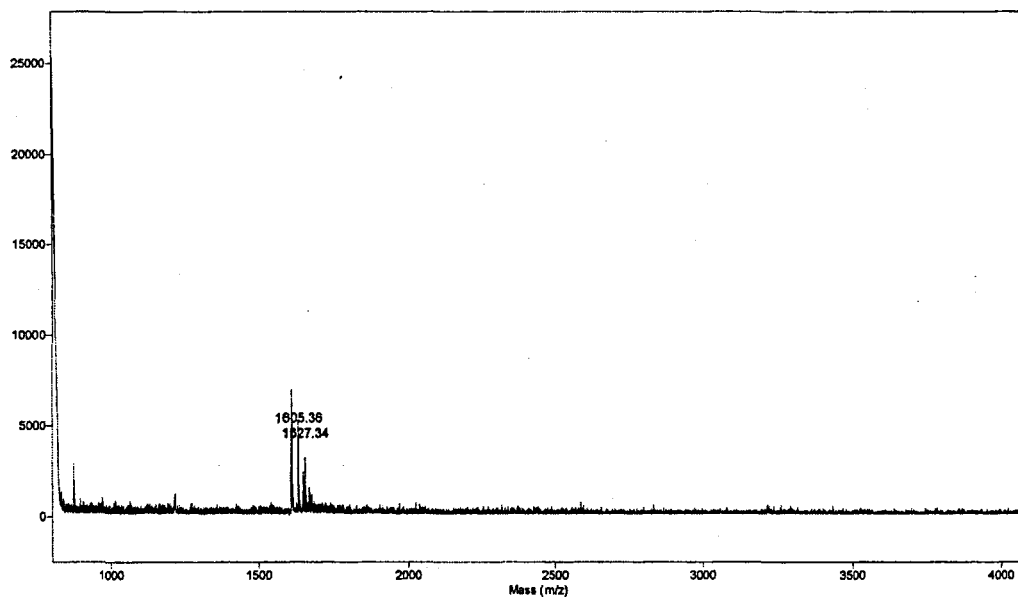


5-FAM-DADE-pY-LIPQQG-OH (リン酸化型) の
Theoretical mass ($M + H^+$): 1685.6

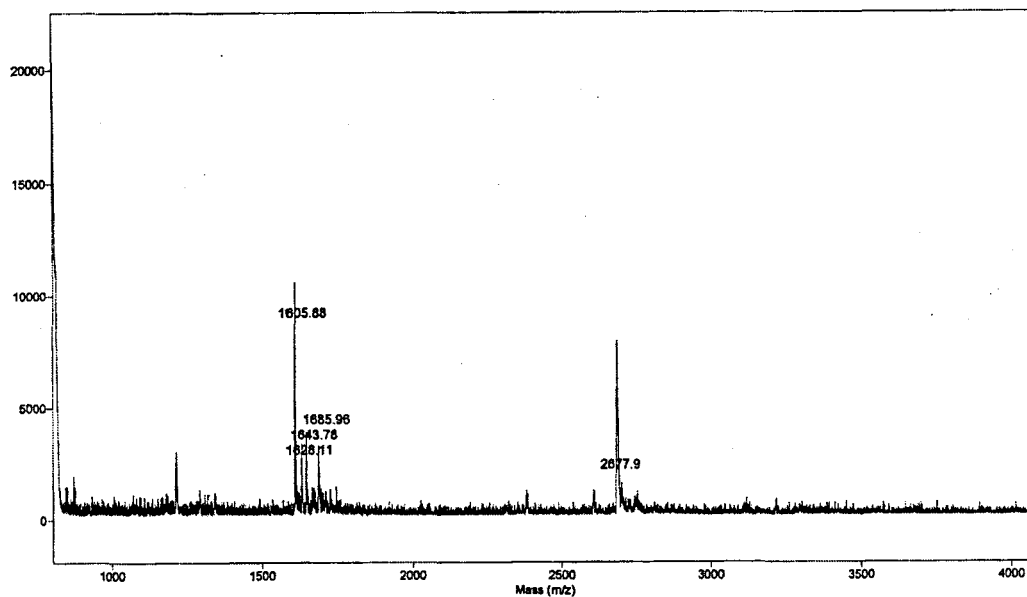
Data 2-2. 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate の MALDI-TOF MS スペクトル



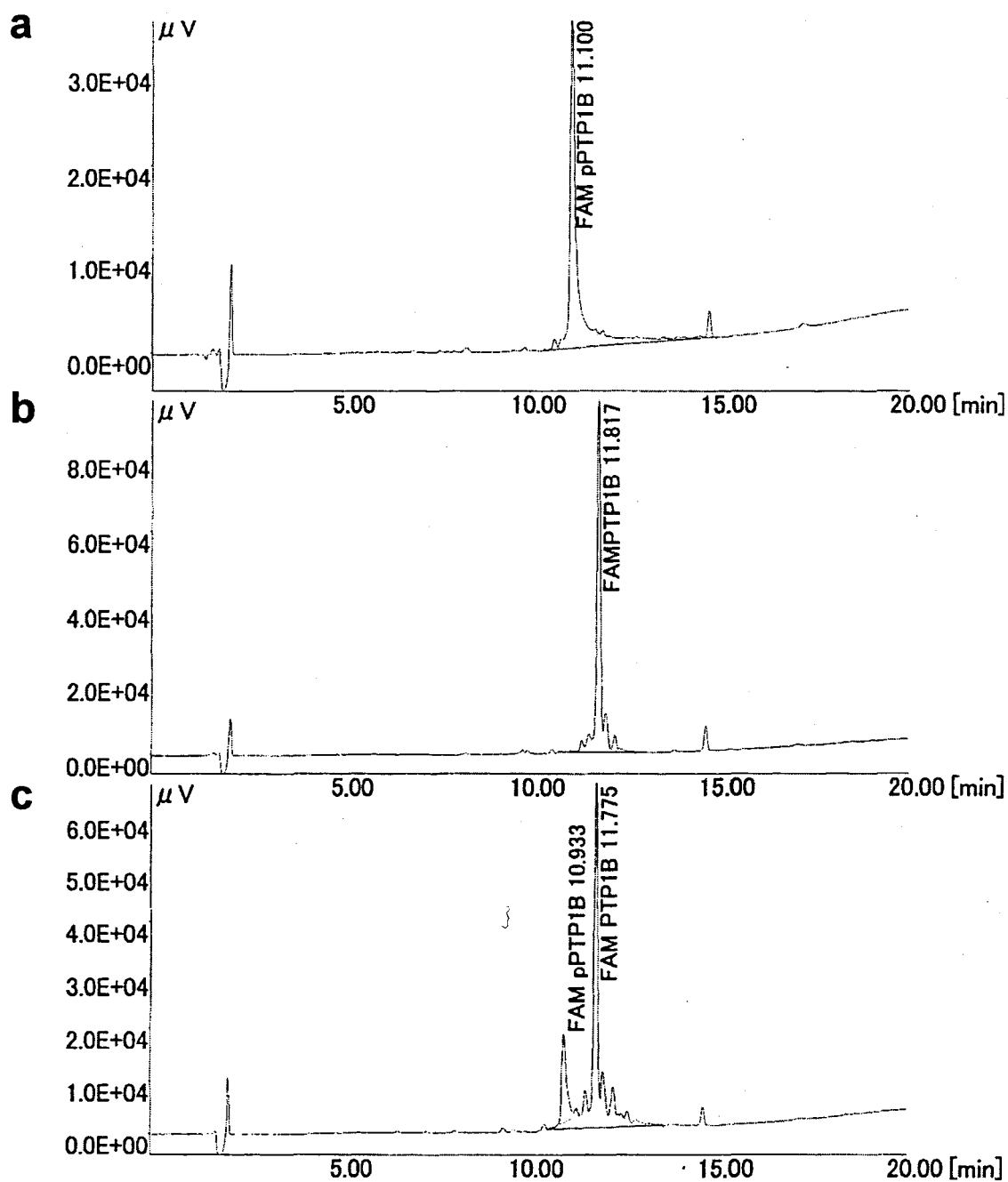
Data 2-3. 5-FAM-labeled nonphosphorylated PTP1B substrate の MALDI-TOF MS スペクトル



Data 2-4. 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate, 5-FAM-labeled nonphosphorylated PTP1B substrate, AMCA-Phos-tag 混合試料の MALDI-TOF MS スペクトル



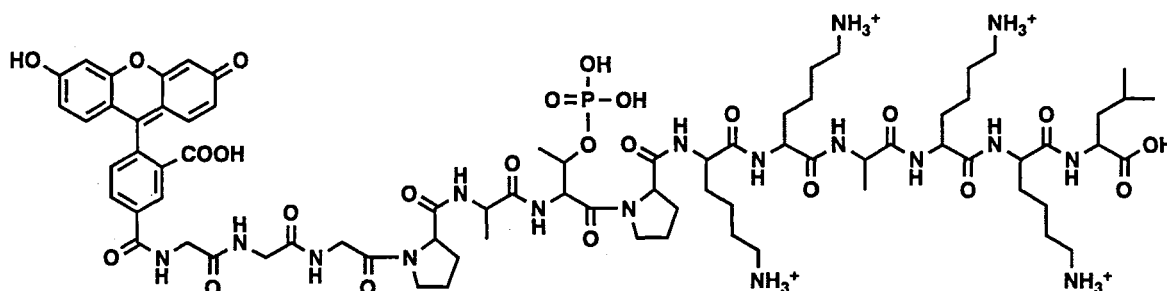
**Data 2-5. 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate と
5-FAM-labeled nonphosphorylated PTP1B substrate の
HPLC 分析結果**



- 分析結果 a. 50 μ M 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate のクロマトグラム
 分析結果 b. 50 μ M 5-FAM-labeled PTP1B substrate のクロマトグラム
 分析結果 c. 50 μ M 5-FAM-labeled phosphorylated PTP1B substrate と
 50 μ M 5-FAM-labeled PTP1B substrate 混合試料のクロマトグラム

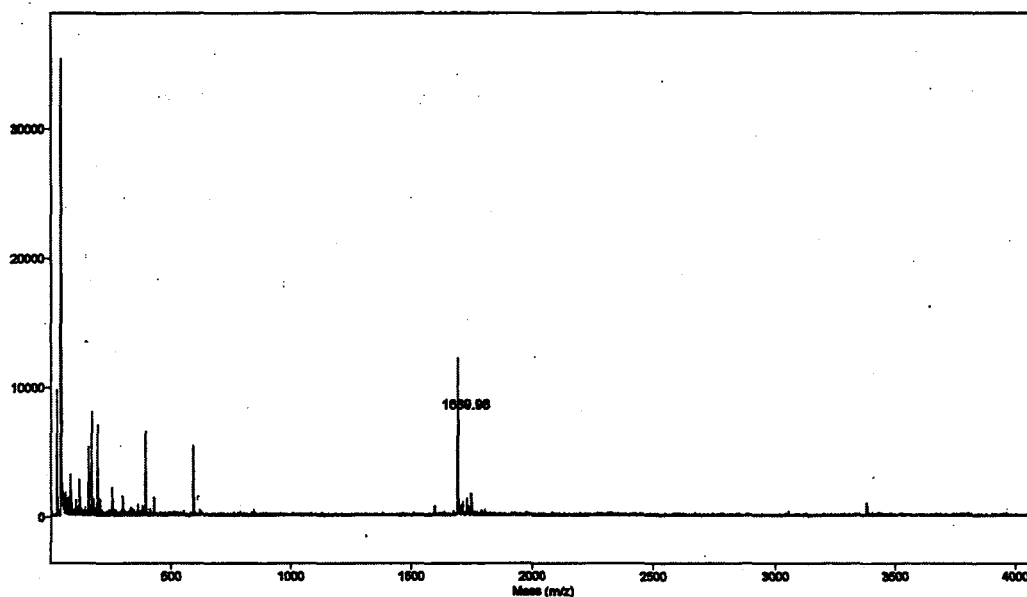
Data 3. 5-FAM-labeled histone H1-derived peptide

Data 3-1. 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide の構造

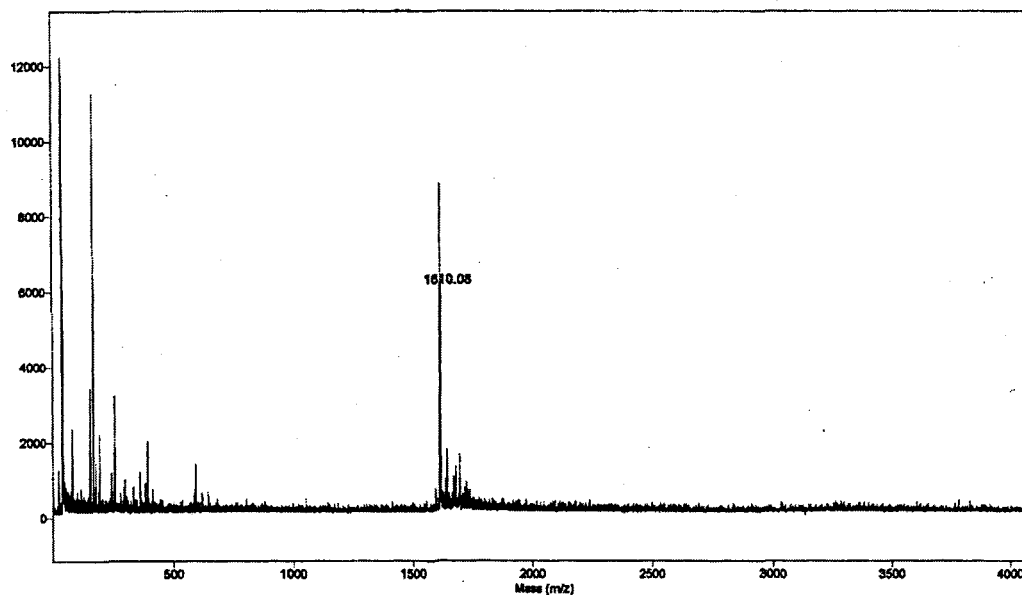


5-FAM-GGGPA-pT-PKKAKKL-OH (リン酸化型) の
Theoretical mass ($M + H^+$): 1691.8

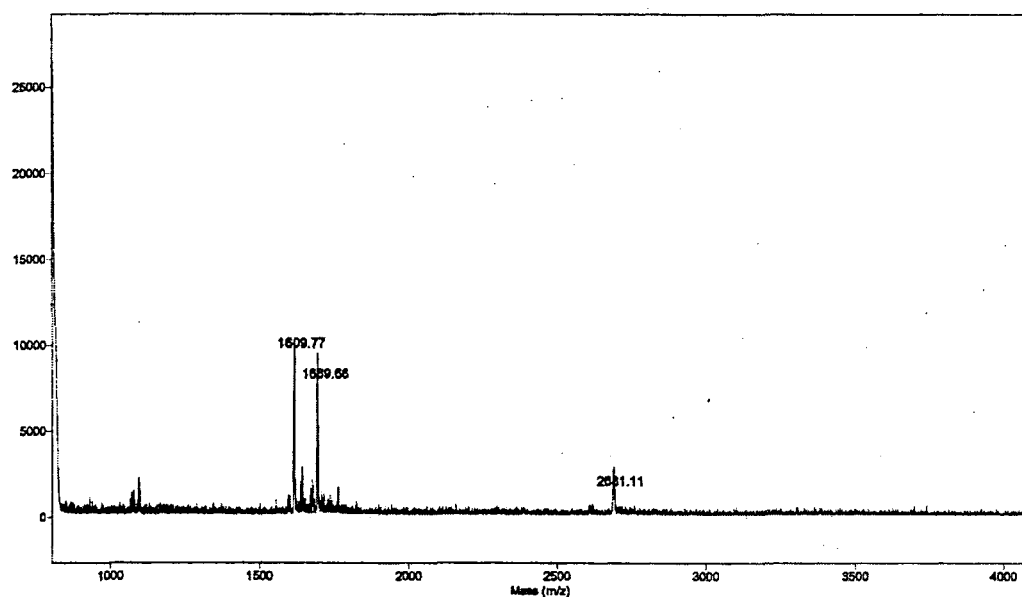
Data 3-2. 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide の MALDI-TOF MS スペクトル



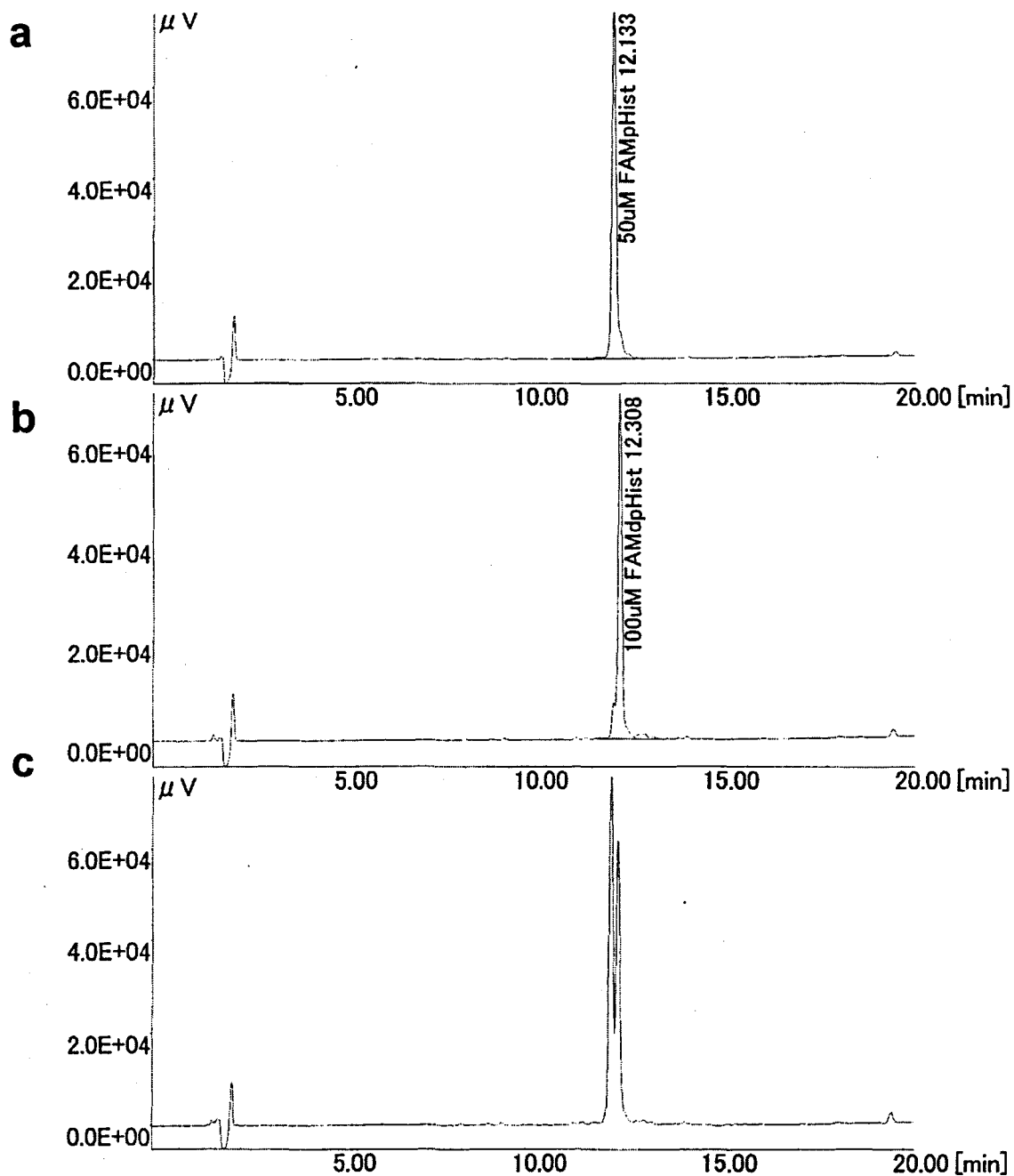
Data 3-3. 5-FAM-labeled nonphosphorylated histone H1-derived peptide の MALDI-TOF MS スペクトル



Data 3-4. 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide, 5-FAM-labeled nonphosphorylated histone H1-derived peptide, AMCA-Phos-tag 混合試料の MALDI-TOF MS スペクトル



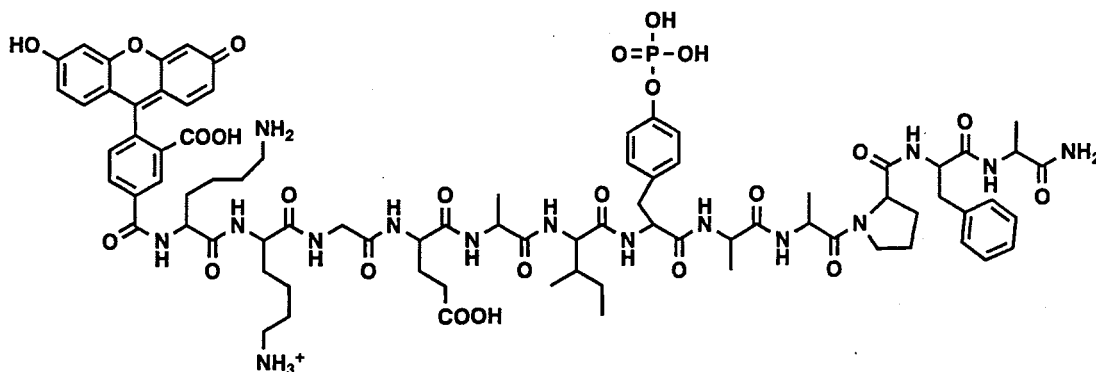
**Data 3-5. 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1-derived peptide と
5-FAM-labeled nonphosphorylated histone H1-derived peptide の
HPLC 分析結果**



- 分析結果 a. 50 μ M 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1 derived peptide の
クロマトグラム
分析結果 b. 50 μ M 5-FAM-labeled histone H1 derived peptide のクロマトグラム
分析結果 c. 50 μ M 5-FAM-labeled phosphorylated histone H1 derived peptide と
50 μ M 5-FAM-labeled histone H1 derived peptide 混合試料のクロマトグラム

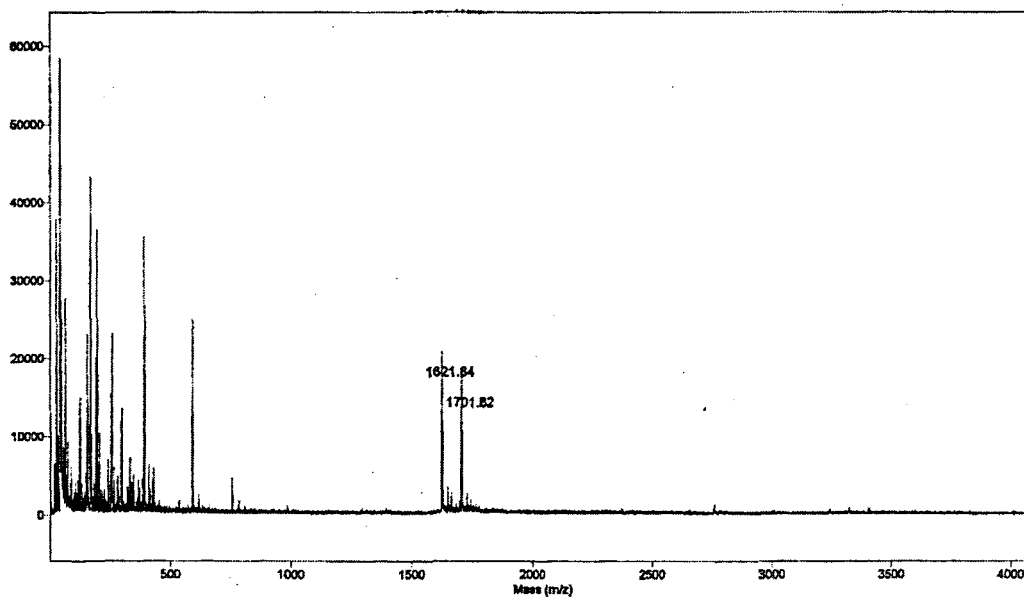
Data 4. 5-FAM-labeled Abltide

Data 4-1. 5-FAM-labeled phosphorylated Abltide の構造

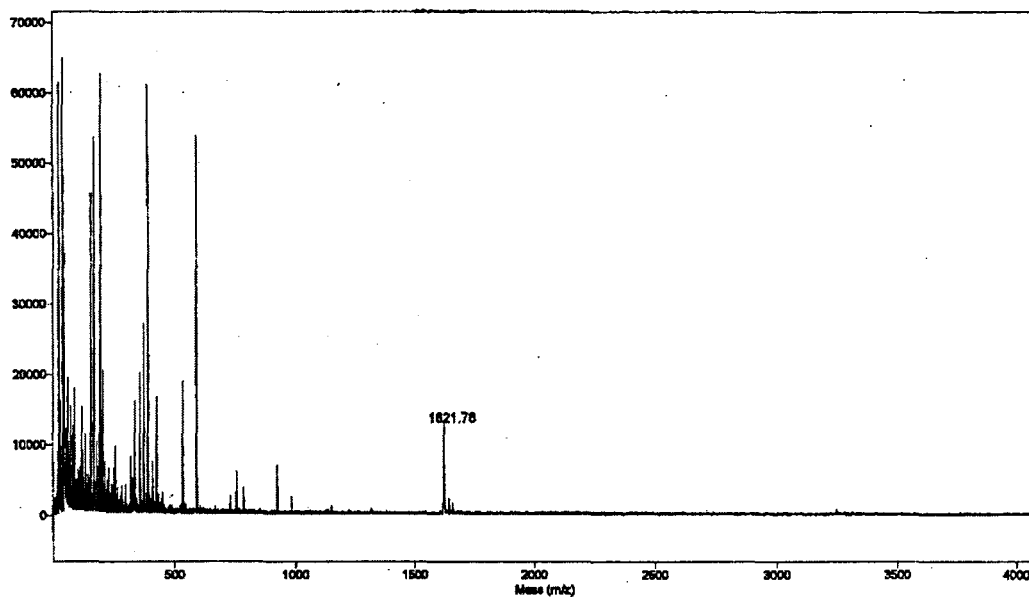


5-FAM-KKGEAI-Y-AAPFA-NH₂ (非リン酸化型) の
Theoretical mass (M + H⁺): 1623.8

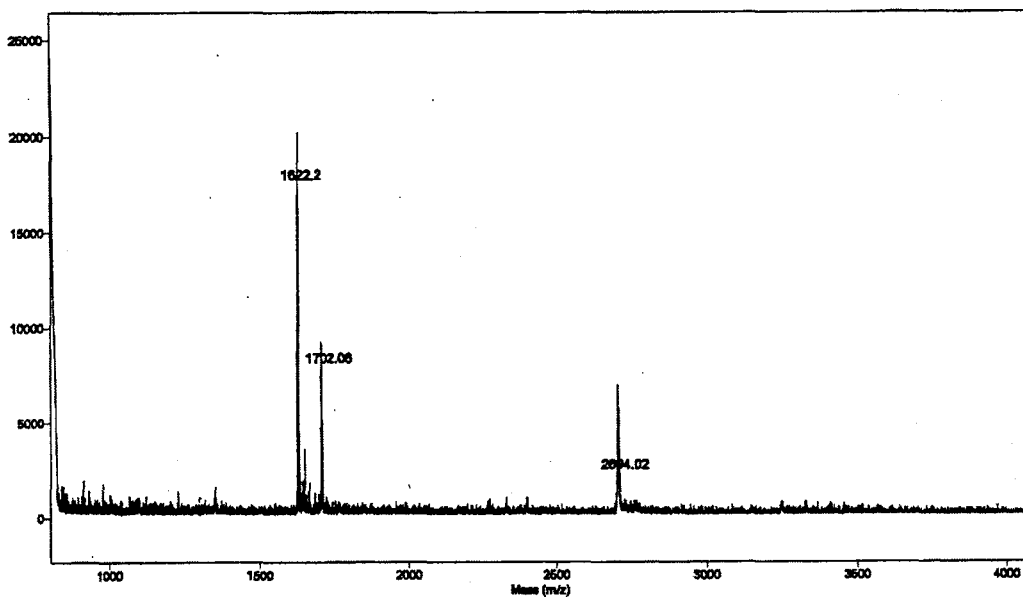
Data 4-2. 5-FAM-labeled phosphorylated Abltide の MALDI-TOF MS スペクトル



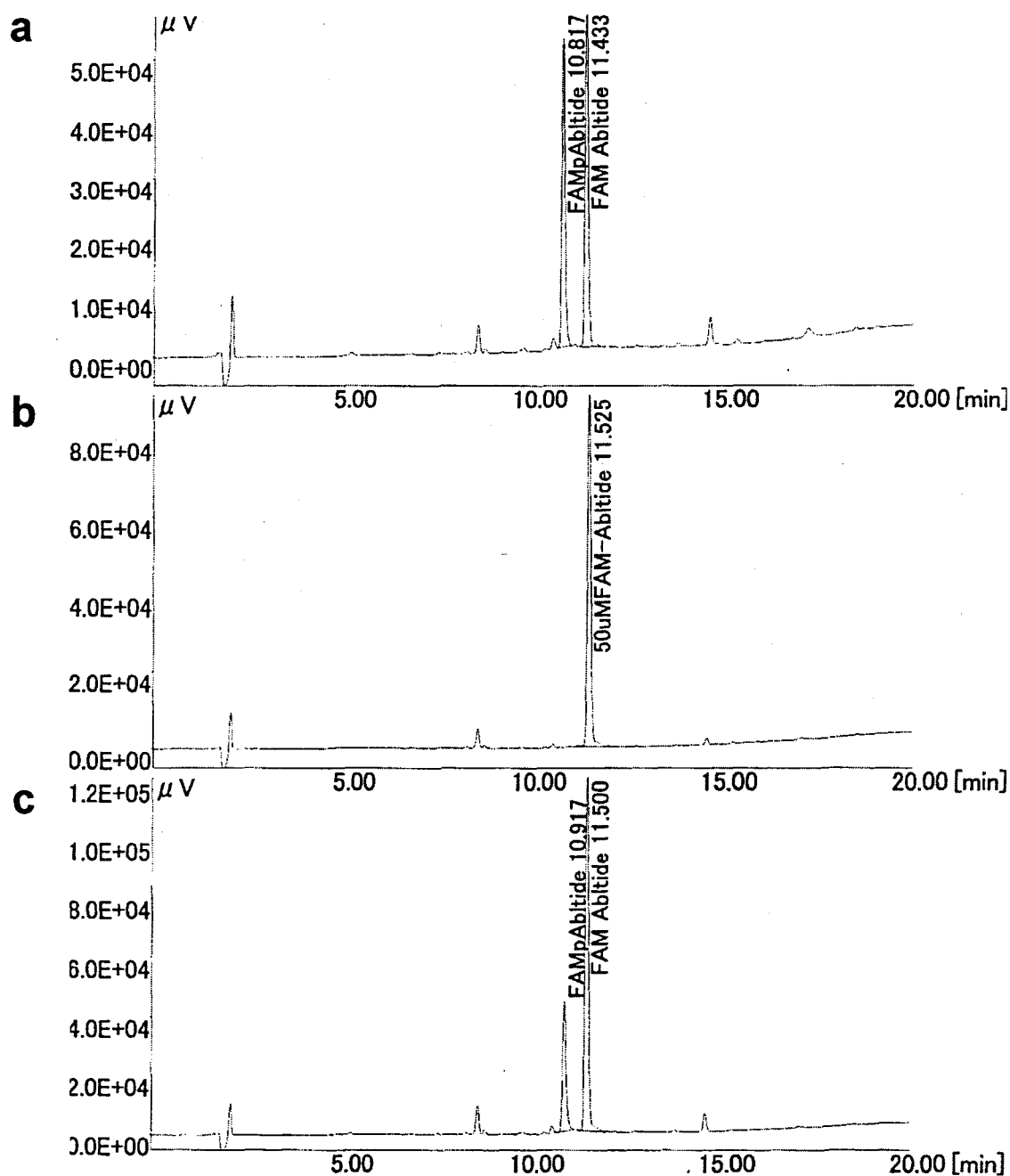
**Data 4-3. 5-FAM-labeled nonphosphorylated Abltide の
MALDI-TOF MS スペクトル**



**Data 4-4. 5-FAM-labeled phosphorylated Abltide,
5-FAM-labeled nonphosphorylated Abltide,
AMCA-Phos-tag 混合試料の MALDI-TOF MS スペクトル**



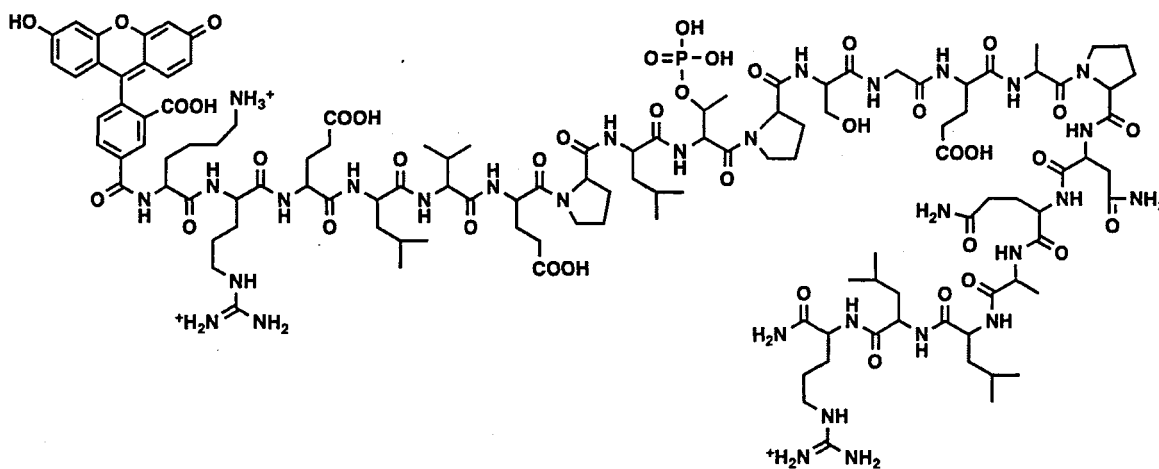
**Data 4-5. 5-FAM-labeled phosphorylated Abtide と
5-FAM-labeled nonphosphorylated Abtide の HPLC 分析結果**



- 分析結果 a. 50 μ M 5-FAM-labeled phosphorylated Abtide のクロマトグラム
 分析結果 b. 50 μ M 5-FAM-labeled Abtide のクロマトグラム
 分析結果 c. 50 μ M 5-FAM-labeled phosphorylated Abtide と
 50 μ M 5-FAM-labeled Abtide 混合試料のクロマトグラム

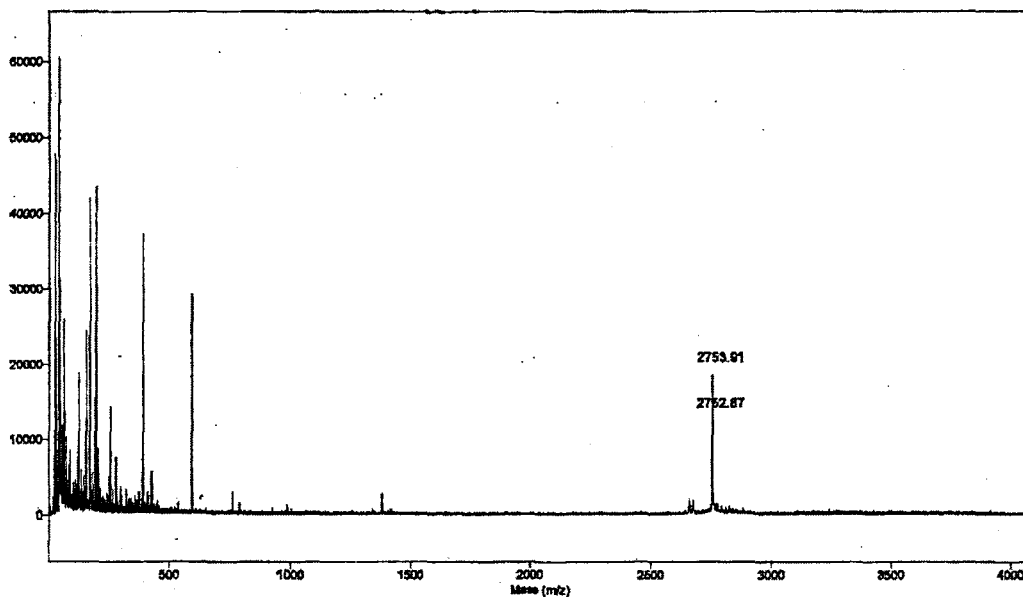
Data 5. 5-FAM-labeled EGF receptor 661-681

Data 5-1. 5-FAM-labeled phosphorylated EGF receptor 661-681 の構造

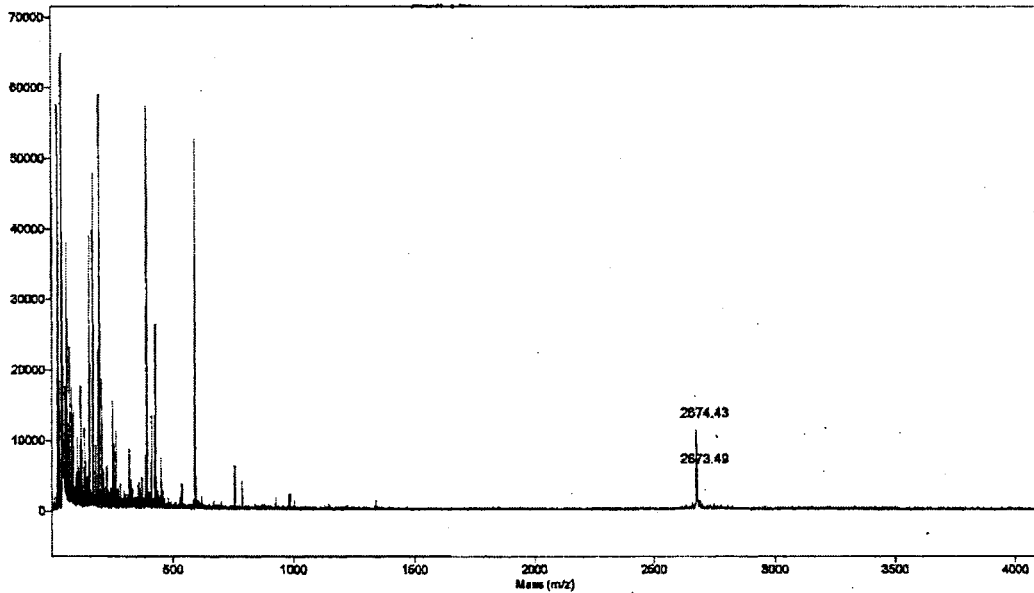


5-FAM-KRELVEPL-T-PSGEAPNQALLR-NH₂ (非リン酸化型) の
Theoretical mass (M + H⁺): 1131.2

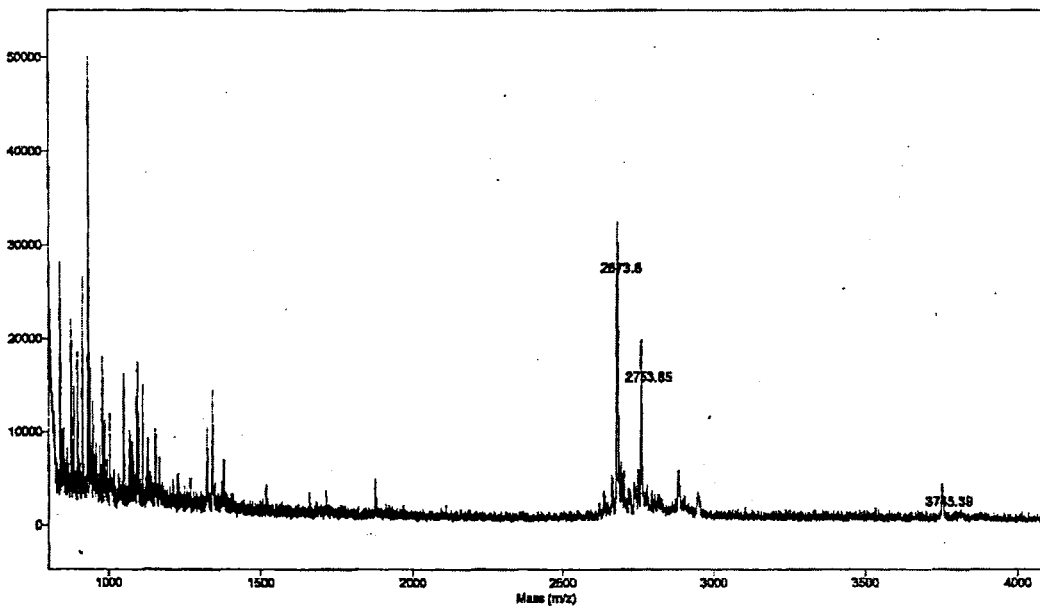
Data 5-2. 5-FAM-labeled phosphorylated EGF receptor 661-681 の
MALDI-TOF MS スペクトル



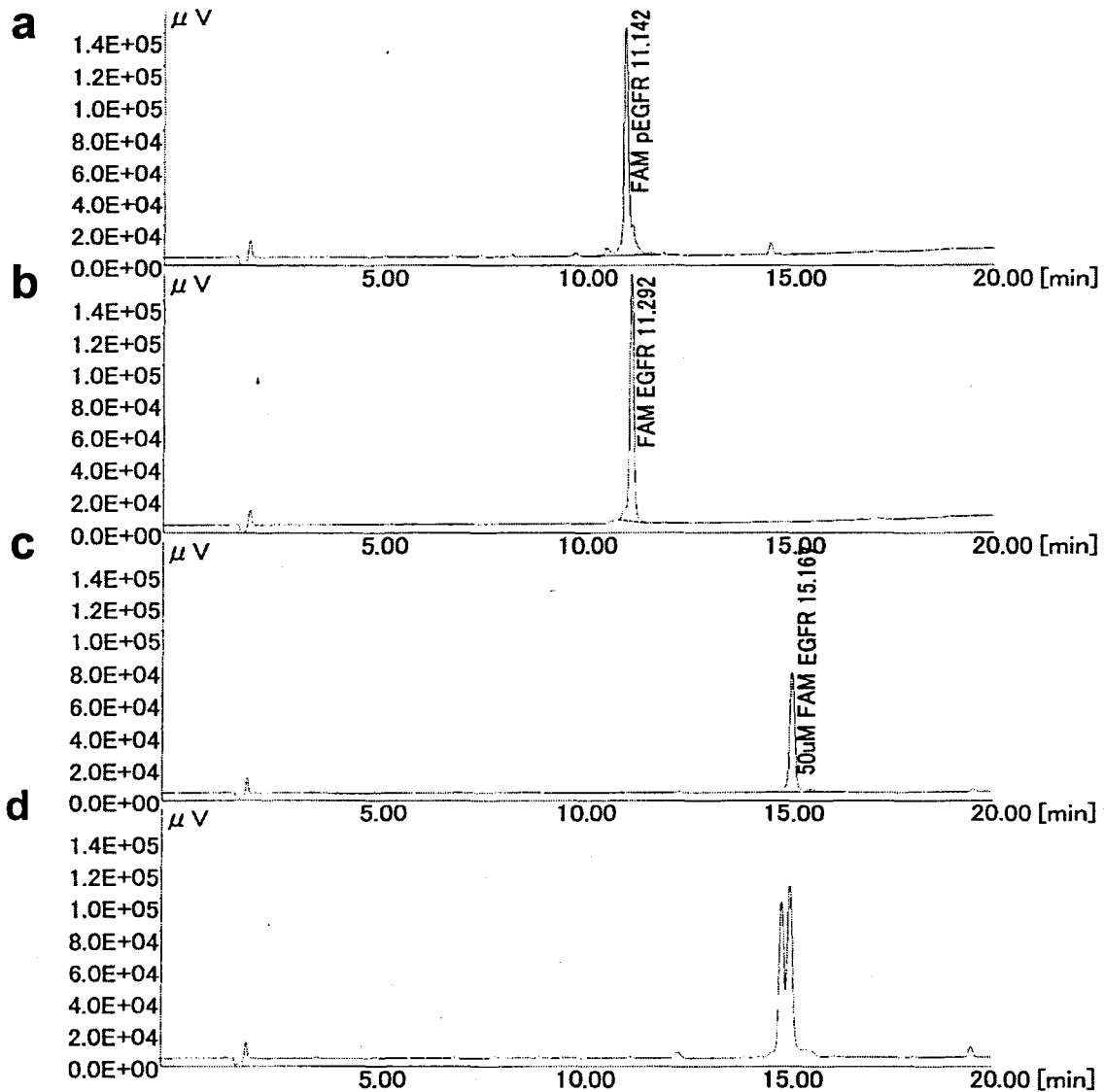
Data 5-3. 5-FAM-labeled nonphosphorylated EGF receptor 661-681 の MALDI-TOF MS スペクトル



Data 5-4. 5-FAM-labeled phosphorylated EGF receptor 661-681, 5-FAM-labeled nonphosphorylated EGF receptor 661-681, AMCA-Phos-tag 混合試料の MALDI-TOF MS スペクトル



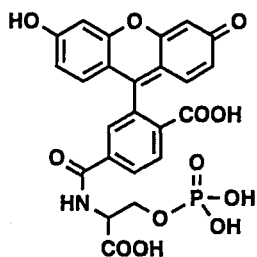
**Data 5-5. 5-FAM-labeled phosphorylated EGF receptor 661-681 と
5-FAM-labeled nonphosphorylated EGF receptor 661-681 の
HPLC 分析結果**



- 分析結果 a. 100 μ M 5-FAM-labeled phosphorylated EGF receptor 664-681 のクロマトグラム
- 分析結果 b. 100 μ M 5-FAM-labeled EGF receptor 664-681 のクロマトグラム
- 分析結果 c. 50 μ M 5-FAM-labeled EGF receptor 664-681 のクロマトグラム
- 分析結果 d. 50 μ M 5-FAM-labeled phosphorylated EGF receptor 664-681 と 50 μ M 5-FAM-labeled EGF receptor 664-681 混合試料のクロマトグラム

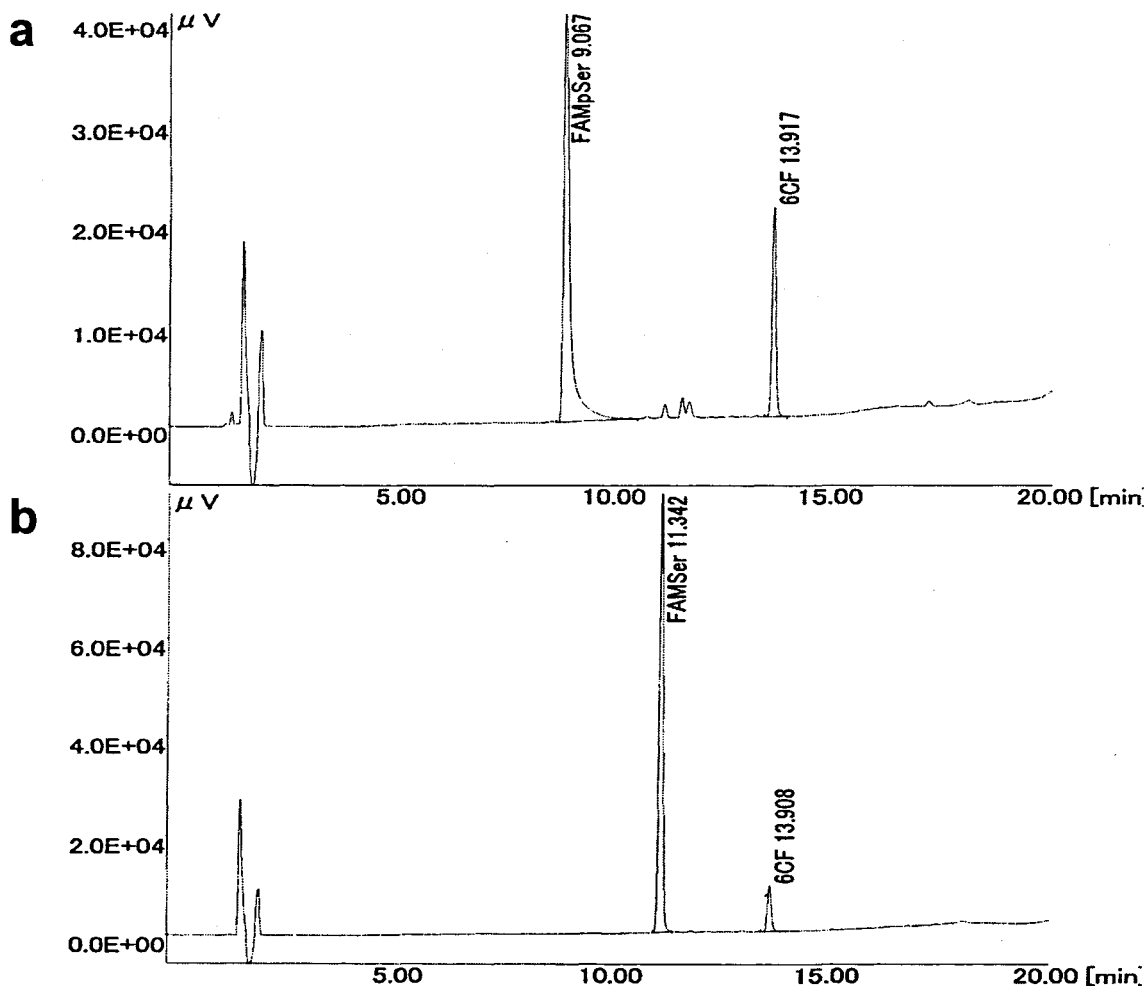
※ 分析結果 a,bはグラジエントプログラム2で溶離した結果
分析結果 c,dはグラジエントプログラム3で溶離した結果

Data 6-1. 6-FAM-labeled phosphoserine の構造



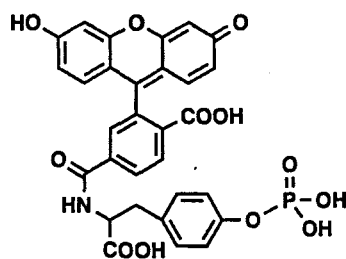
Exact Mass: 543.06
Molecular Weight: 543.37

Data 6-2. 6-FAM-labeled phosphoserine と
6-FAM-labeled serine の HPLC 分析結果



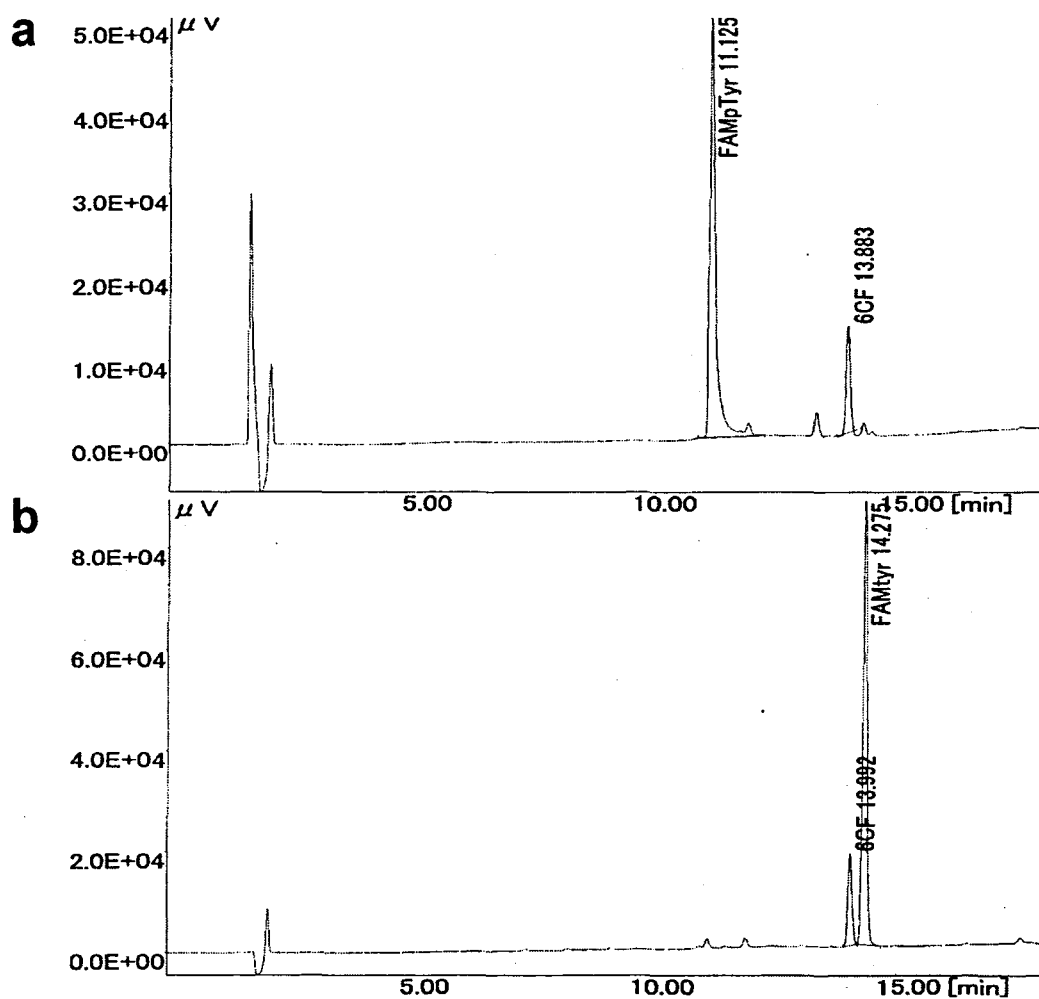
分析結果 a. 50 μM 5-FAM-labeled phosphoserine のクロマトグラム
分析結果 b. 50 μM 5-FAM-labeled serine のクロマトグラム
※ 6-CF = 6-Carboxyfluorescein

Data 7-1. 6-FAM-labeled phosphotyrosine の構造



Exact Mass: 619.09
Molecular Weight: 619.47

Data 7-2. 6-FAM-labeled phosphotyrosine と 6-FAM-labeled tyrosine の HPLC 分析結果



分析結果 a. 50 μ M 5-FAM-labeled phosphotyrosine のクロマトグラム

分析結果 b. 50 μ M 5-FAM-labeled tyrosine のクロマトグラム

8-4. AMCA-フォスタグの量子収率の測定

光化学反応において、反応系に吸収された光量子の数に対する反応した分子の数の比のことを量子収率といい、蛍光における量子収率は吸収された光量子数と放出された光量子数との比で表される。蛍光量子収率の測定法には、光量子数の比を直接求める絶対測定と、標準蛍光物質の蛍光と比較して求める相対測定の2種類がある。相対測定を行う際の標準物質（既知の量子収率を持つもの）は試料物質と同じ波長領域に発光ピークを示す物質を選択する。測定条件は試料物質と同一条件下（分光蛍光光度計、励起波長、スリット幅、温度などを同一にする）で行い、その蛍光強度と比較した相対強度値（相対量子収率）を算出する。今回の測定では、標準物質としてキニーネの0.1 N 硫酸水溶液 ($\phi = 0.54$) を用い、相対測定により量子収率を求めた。

8-4-1. 標準蛍光物質の溶液調製

キニーネ（右図）の0.5 Mの0.1 N 硫酸水溶液を調製した。調製した溶液を0.1 N 硫酸水溶液によって希釈し、100, 50, 25, 12.5 μM のキニーネ溶液を調製した。これらの溶液を吸光度測定用溶液とした。さらに、5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.0 μM 溶液を調製し、これらを蛍光測定用溶液とした。

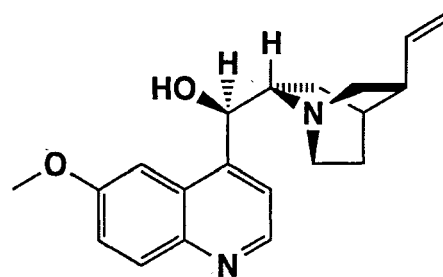


図. キニーネ

8-4-2. AMCA-フォスタグの溶液調製

AMCA-フォスタグの100 μM 溶液を調製した。溶媒は、0.5 M NaCl と 20%(v/v) EtOH を含む 10 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.4) である。調製した溶液を同緩衝液で希釈し、100, 50, 25, 12.5 μM の AMCA-フォスタグ溶液を調製した。これらの溶液を吸光度測定用溶液とした。さらに、5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.0 μM 溶液を調製し、これらを蛍光測定用溶液とした。

8-4-3. 量子収率の計算

各溶液の吸光・蛍光測定を行い、試料の濃度と、吸光度または蛍光強度に比例関係があることを確認した。蛍光測定はキニーネ、AMCA-フォスタグともに励起波長 345

nm で行った。得られた吸光・蛍光スペクトルから、次式を用いて量子収率を計算した。

$$\phi_x = \phi_{st} \cdot FA_x \cdot A_{st} / FA_{st} \cdot A_x$$

ϕ_x : 試料物質 (AMCA-フオスタグ) の量子収率

ϕ_{st} : 標準物質 (キニーネ) の量子収率

FA_x : 試料物質のピーク積分値

FA_{st} : 標準物質のピーク積分値

A_x : 試料物質の吸光度

A_{st} : 標準物質の吸光度

8-5. AMCA-フォスタグと FAM が相互作用しないことの確認

Carboxyfluorescein (FAM, 下図) は、フェノール基やカルボキシル基を持つ化合物である。これらの官能基がフォスタグと相互作用しないことを蛍光スペクトル測定によって確認した。

AMCA-フォスタグ (0.8 μM) 溶液に対して、0~2 μM の 6-FAM を共存させ、蛍光スペクトルを測定した。測定に用いた溶媒は、0.5 M NaCl と 20%(v/v) EtOH を含む 10 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.4) である。励起波長 345 nm で測定を行った。下図の測定結果 a を見ると、フリーの AMCA-フォスタグに対応する 445 nm の蛍光強度は減少していない。このことから、6-FAM は AMCA-フォスタグと相互作用しないことが確認できた。

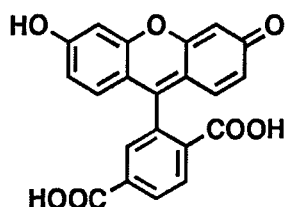
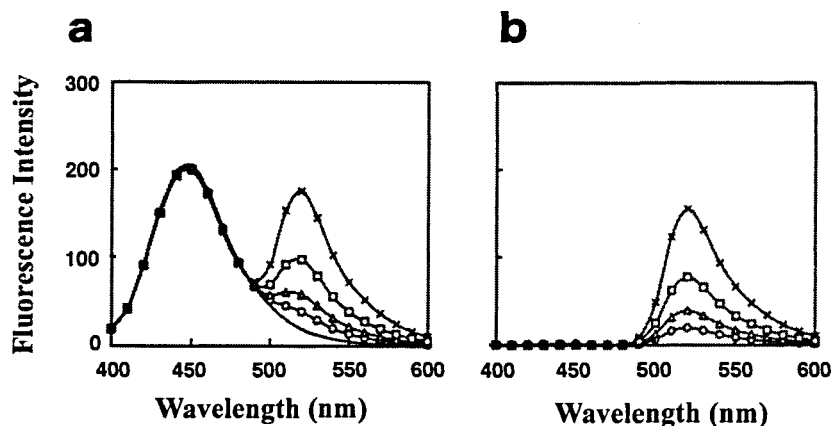


図. 6-Carboxyfluorescein の構造



- 図 a. AMCA-フォスタグ (0.80 μM) に対し 6-FAM (0~2 μM) を共存させた時の蛍光スペクトル
[6-FAM] = 0 (—), 0.25 (○), 0.5 (△), 1.0 (□), 2.0 (×) [μM]
- 図 b. 6-FAM (0~2 μM) の蛍光スペクトル
[6-FAM] = 0 (—), 0.25 (○), 0.5 (△), 1.0 (□), 2.0 (×) [μM]

8-6. 亜鉛二核錯体形成からリン酸化分子捕捉過程の 蛍光スペクトル変化

AMCA-フォスタグ配位子 (0.6 μM) と 6-FAM-リン酸化セリン (0.8 μM) を含む溶液に 0~2.0 μM の ZnCl_2 溶液を添加していき、蛍光スペクトル変化を測定した。対照実験として、6-FAM-リン酸化セリンを共存させない条件でも同様の操作を行った。

8-6-1. 亜鉛イオン添加による AMCA-フォスタグと 6-FAM-リン酸化セリンの 複合体形成確認

AMCA-フォスタグ配位子 (0.6 μM) と 6-FAM-リン酸化セリン (0.8 μM) を含む溶液を調製した。溶媒は、0.5 M NaCl と 20%(v/v) EtOH を含む 10 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.4) である。この溶液 3 mL を蛍光測定用セルへ移し、スターラーで攪拌しつつ、100 μM ZnCl_2 溶液を 6 μL ずつ添加した。 ZnCl_2 溶液を添加するたびに蛍光スペクトルを測定した。励起波長 345 nm で測定を行った。

8-6-2. 対照実験

AMCA-フォスタグ配位子 (0.6 μM) を含む溶液を調製した。溶媒は、0.5 M NaCl と 20%(v/v) EtOH を含む 10 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.4) である。この溶液 3 mL を蛍光測定用セルへ移し、スターラーで攪拌しつつ、100 μM ZnCl_2 溶液を 6 μL ずつ添加した。 ZnCl_2 溶液を添加するたびに蛍光スペクトルを測定した。励起波長 345 nm で測定を行った。

下図の測定結果 a は、6-FAM-リン酸化セリンを共存させなかった場合の蛍光スペクトル (対照実験)、b は共存させた場合の蛍光スペクトルである。

測定結果 a からは、AMCA-フォスタグ配位子に 1 当量の亜鉛イオンを添加すると蛍光強度が減少することがわかった。2 当量目からは蛍光強度変化はほぼ検出されていない。次に測定結果 b からは、AMCA-フォスタグ配位子に 1 当量の亜鉛イオンを添加している間は、FRET は検出されず (FAM 由来の蛍光強度は変化せず)、AMCA

由来の蛍光強度の減少のみが検出されることがわかる。さらに2当量目の亜鉛イオンを添加し始めると、FRETが検出された（AMCA由来の蛍光強度の減少とFAM由来の蛍光強度の増加）。これらの事実から、まずAMCA-フォスタグ配位子が亜鉛錯体を形成すると蛍光強度が減少することがわかった。さらに、AMCA-フォスタグ配位子に対して1当量の亜鉛イオンしか共存しない場合には、亜鉛二核錯体はほぼ存在せず、リン酸基捕捉能を持たないことがわかった。2当量目の亜鉛イオンが存在して初めてリン酸基を捕捉する。これらは、フォスタグが2つの亜鉛イオンを介してリン酸基を捕捉する事実と一致する。

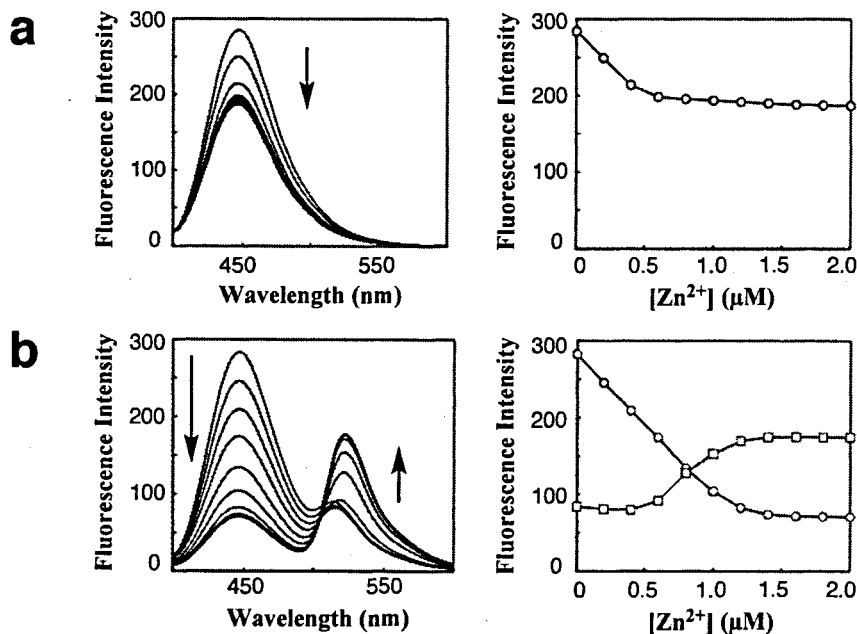


図 a 左. AMCA-フォスタグ配位子 (0.60 μM) に対し ZnCl₂ (0~2 μM) を添加させた時の蛍光スペクトル
 図 a 右. 図 a 左の 445 nm の蛍光強度変化を ZnCl₂ 濃度に対してプロットしたもの
 図 b 左. AMCA-フォスタグ配位子 (0.60 μM) と 6-FAM-リン酸化セリン (0.8 μM) の共存溶液に対し、ZnCl₂ (0~2 μM) を添加させた時の蛍光スペクトル
 図 b 右. 図 b 左の 445 nm (○) と 520 nm (□) の蛍光強度変化を ZnCl₂ 濃度に対してプロットしたもの

8-7. AMCA-フォスタグによる脱リン酸化反応の検出

開発した FRET システムを用いて、アルカリフォスファターゼによる脱リン酸化反応を検出した。基質として、6-FAM-リン酸化セリンと 5-FAM-リン酸化ペプチド (5-FAM-DADE-pY-LIPQQG-OH または 5-FAM-GGGPA-pT-PKKAKKL-OH) を用いた。

まず、 $0.8 \mu\text{M}$ の AMCA-フォスタグと 0.8 または $1.0 \mu\text{M}$ の FAM-リン酸化分子を 0.5 M NaCl と $20\%(\text{v/v}) \text{ EtOH}$ を含む 10 mM HEPES-NaOH 緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) 中に溶解させ、この溶液のうち 3 mL を蛍光測定用セル中へ移した。この条件では、AMCA-フォスタグと FAM-リン酸化分子の大部分は $1:1$ の複合体を形成する。よってこの溶液を 345 nm の光で励起すると FRET 現象が起き、FAM からの蛍光が強く観察される。続いてこの蛍光測定用セル中の溶液をスターラーで攪拌しつつ、アルカリフォスファターゼを添加し、一定時間ごとに蛍光スペクトルを測定した。脱リン酸化反応が起こると、 $1:1$ 複合体は解離し、FRET 現象は消失すると予想される (下図)。

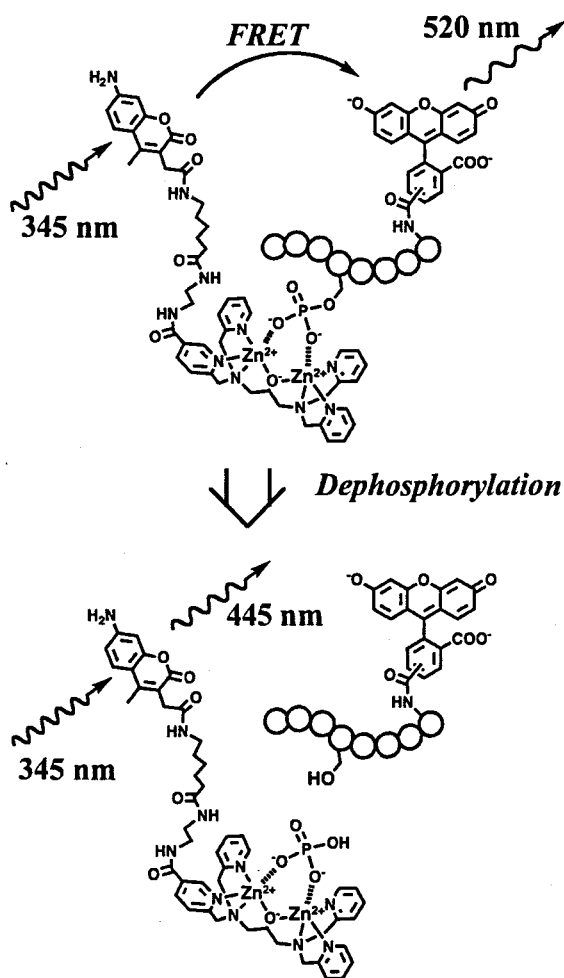


図. 脱リン酸化による FRET 消失の仕組み

8-7-1. 6-FAM-リン酸化セリンの脱リン酸化反応

下図は、0.05~0.81 $\mu\text{g/mL}$ のアルカリフォスファターゼを 6-FAM-リン酸化セリン (0.8 μM) と AMCA-フォスタグ (0.8 μM) を含む溶液に対して添加した結果である。アルカリフォスファターゼ添加前を 0 分とし、添加後 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 分後の蛍光スペクトルを重ね書きしてある。これらの結果より、時間経過とともに 445 nm の蛍光強度が増加し、520 nm の蛍光強度が減少していくことがわかった。445 nm の蛍光強度は溶液中のフリーの AMCA-フォスタグの濃度に依存し、520 nm の蛍光強度は 1:1 複合体の濃度に依存する。よって検出された蛍光スペクトル変化は、アルカリフォスファターゼの添加により 6-FAM-リン酸化セリンのリン酸基が取り除かれ、1:1 複合体が解離していく様子を示している。また下図からは、添加するアルカリフォスファターゼの量に依存して、脱リン酸化反応の速度が変化することもわかる。蛍光強度変化の速度をわかりやすくするために、アルカリフォスファターゼ添加後の 445 nm の蛍光強度変化を時間軸に対してプロットしたものが 22 ページの Fig. 4a である。

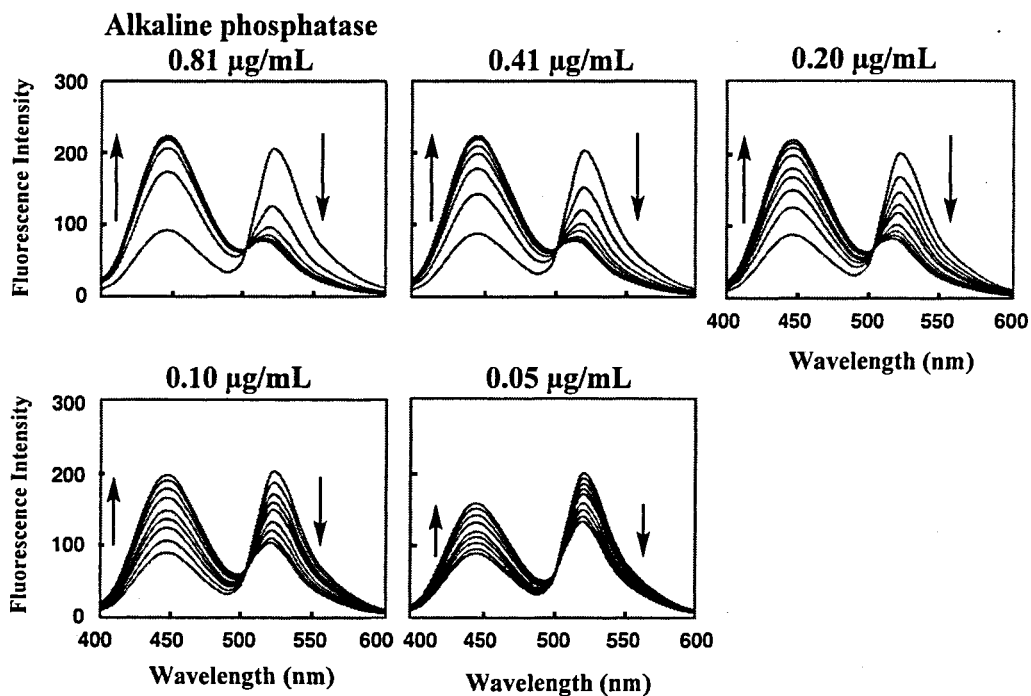


図. アルカリフォスファターゼによる 6-FAM-リン酸化セリンの脱リン酸化反応

8-7-2. 5-FAM-リン酸化ペプチドの脱リン酸化反応

図 b は、5-FAM-DADE-pY-LIPQQG-OH (1.0 μM) を基質として脱リン酸化反応を検出した結果である。6-FAM-リン酸化セリンを基質とした場合と同様の蛍光スペクトル変化が検出された (図 b-1, 22 ページの Fig. 4b と同じ)。アルカリフォスファターゼ添加後の 445 nm の蛍光強度変化を時間軸に対してプロットしたものが図 b-2 である。

図 c は、5-FAM-GGGPA-pT-PKKAKKL-OH (1.0 μM) を基質として脱リン酸化反応を検出した結果である。蛍光スペクトル変化が観察されていないので、脱リン酸化反応が進行していないことがわかる。点線で示したスペクトルは、脱リン酸化反応が進行し、完全に複合体が解離した場合の予想される蛍光スペクトル (0.8 μM の AMCA-フォスタグのみ, 1.0 μM の 5-FAM-GGGPA-pT-PKKAKKL-OH のみの蛍光スペクトルを足し合わせたもの) である。

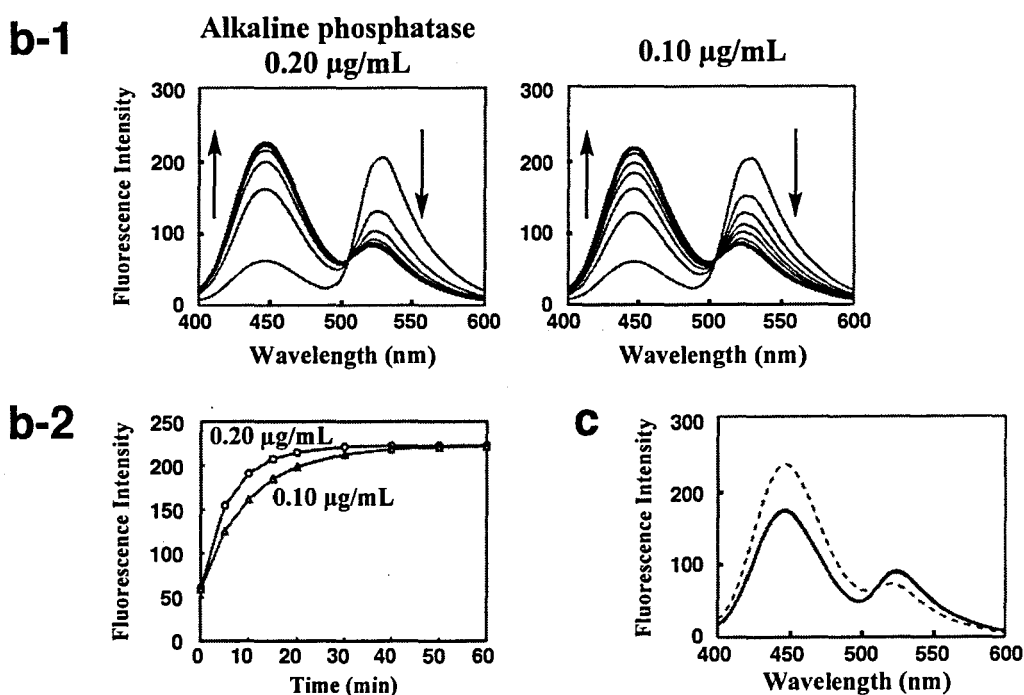


図 b-1. 5-FAM-DADE-pY-LIPQQG-OH の脱リン酸化反応

図 b-2. 脱リン酸化反応による 445 nm の蛍光強度変化

アルカリフォスファターゼ濃度 : 0.10 $\mu\text{g/mL}$ (Δ), 0.20 $\mu\text{g/mL}$ (\circ)

図 c. 5-FAM-GGGPA-pT-PKKAKKL-OH の脱リン酸化反応

点線は 5-FAM-GGGPA-pT-PKKAKKL-OH (1.0 μM) の蛍光スペクトルと AMCA-フォスタグ (0.8 μM) の蛍光スペクトルを足したもの

8-8. フォスタグとの親和性に影響を与えるリン酸基周辺の構造

これまでのフォスタグを用いた様々な実験で、リン酸基周辺の構造によってリン酸化分子のフォスタグとの親和性が異なることがわかっている。この実験では、開発した FRET システムを用いて、以下に示した低分子リン酸化分子のフォスタグへの親和性の違いを明らかにする。

- ・リン酸 : Sodium dihydrogenphosphate, dihydrate (片山化学工業)
- ・フェニルリン酸 : Phenylphosphoric acid disodium (ナカライテスク)
- ・リン酸化セリン : *O*-phospho-L-serine (Sigma-Aldrich)
- ・リン酸化スレオニン : *O*-phospho-L-threonine (Sigma-Aldrich)
- ・リン酸化チロシン : *O*-phospho-L-tyrosine (Sigma-Aldrich)
- ・D-グルコース-6-リン酸 : D-Glucose-6-phosphate disodium salt hydrate (ナカライテスク)
- ・D-リボース-5-リン酸 : D-Ribose-5-phosphate disodium salt dihydrate (Sigma-Aldrich)

AMCA-フォスタグ (0.8 μM) と FAM-リン酸化セリン (0.8 μM) の複合体溶液に上記のリン酸化低分子を 0~100 μM の範囲で添加し、溶液の蛍光スペクトルを測定した。測定に用いた溶媒は、0.5 M NaCl と 20%(v/v) EtOH を含む 10 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.4) である。各リン酸化低分子は、FAM-リン酸化セリンと競合して AMCA-フォスタグと相互作用するため、FRET 現象は消失していく。FRET 消失を顕著に引き起こすリン酸化低分子は、AMCA-フォスタグとの親和性が高いと考えられる。

以下の図 a は、AMCA-フォスタグ (0.8 μM) と FAM-リン酸化セリン (0.8 μM) の複合体溶液に対し、0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μM となるよう各リン酸化低分子を添加し、添加後およそ 1 分の蛍光スペクトルを測定、重ね書きしたものである。また、各リン酸化低分子についての 445 nm の蛍光強度変化をプロットしたものが図 b である。図 a,b より、フェニルリン酸、リン酸、リン酸化チロシンを添加した場合の蛍光スペクトル変化は、リン酸化セリンやリン酸化スレオニンを添加した場合に比べ大きく、フォスタグとの親和性が高いことがわかる。

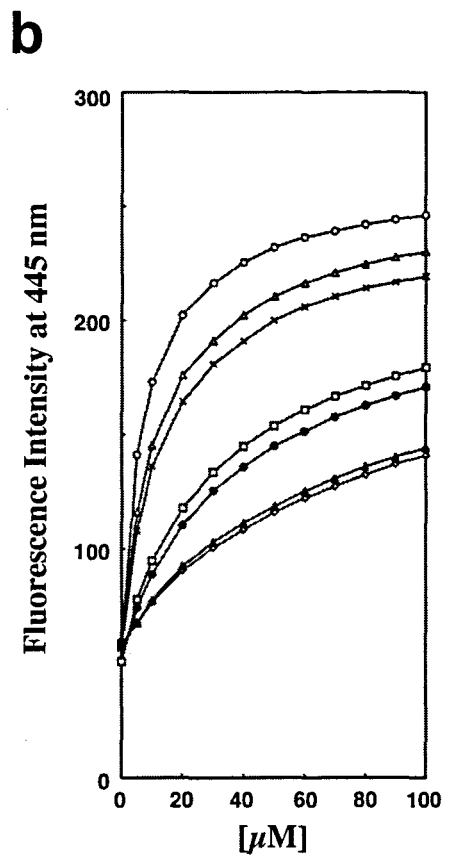
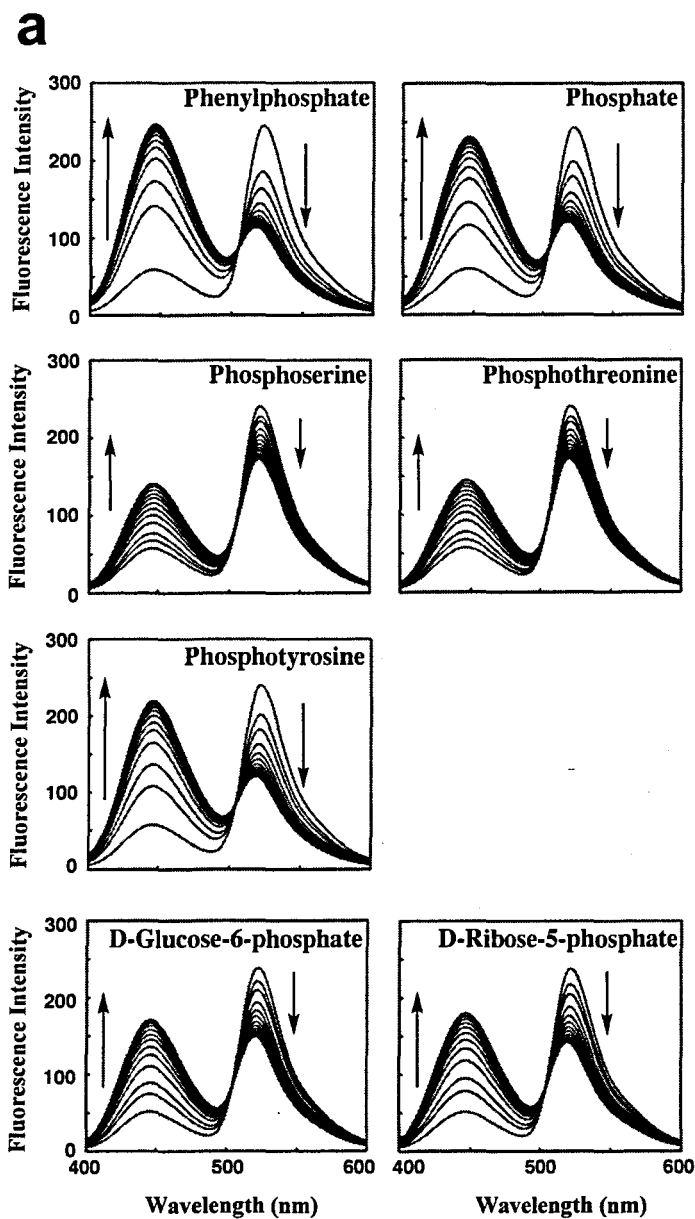


図 a. 競合阻害実験

0.8 μM AMCA-フォスタグ-0.8 μM FAM-リン酸化セリン複合体に対して、リン酸化分子を 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μM 共存させた場合の蛍光スペクトル

図 b. 445 nm の蛍光強度変化

図 a の 445 nm の蛍光強度変化をリン酸化分子の濃度に対してプロットしたもの
 フェニルリン酸 (○), リン酸 (△), リン酸化セリン (◇),
 リン酸化スレオニン (▲), リン酸化チロシン (×),
 D-グルコース-6-リン酸 (●), D-リボース-5-リン酸 (□)

実験条件下での各リン酸化分子の AMCA-フォスタグとの親和性の順位は以下のようになる。

フェニルリン酸		リン酸 リン酸化チロシン		D-グルコース-6-リン酸 D-リボース-5-リン酸		リン酸化セリン リン酸化スレオニン
20	>	8	>	2	>	1

上記の親和性を表すおおまかな数値（リン酸化セリン，リン酸化スレオニンについての値を1とした）は，図 b 中の AMCA-フォスタグと FAM-リン酸化セリンの複合体の示す蛍光強度（リン酸化分子 0 μ M 共存下）を半分回復させるために必要なリン酸化分子の濃度から計算した。このような，フォスタグとの親和性の違いを生じさせる要因として考えられるものを以下に示した。

- ・リン酸基の pK_a の違い
- ・リン酸基周辺の立体障害
- ・芳香環の効果

リン酸基の pK_a がわかれば，ある pH でのリン酸基のプロトン解離の状態を知ることができる。以下に示した表は，Robert M. Smith and Arthur E. Martell 著の「Critical stability constants」から引用した数値である。イオン強度 0.1 での値を比較すると，リン酸の値と D-リボース-5-リン酸の値はフェニルリン酸，リン酸化セリン，リン酸化スレオニンの値に比べて大きい。リン酸や D-リボース-5-リン酸に比べ，リン酸化セリンやリン酸化スレオニンのリン酸基の pK_a が小さいのは，近傍に存在するアミノ基の正電荷によってリン酸基の負電荷が安定化されるためと考えられる。このため，これらアミノ酸のリン酸基の負電荷はアミノ基の正電荷によって弱められ，AMCA-フォスタグとの親和性が小さくなると予想できる。実際，リン酸化セリン，リン酸化スレオニンの AMCA-フォスタグとの親和性はリン酸やリン酸化糖（D-グルコース-6-リン酸または D-リボース-5-リン酸）より小さい。

分子内に正電荷を持たないリン酸とリン酸化糖の間でも，AMCA-フォスタグとの親和性は4倍程度異なる。下表のリン酸と D-リボース-5-リン酸の pK_a を比較すると，リン酸の方が大きい。 pK_a が大きいことは高い pH 条件下でなければプロトン (1+) が解離しないことを示し，すなわちプラス性のイオンとの親和性が高いことを示す。

よって3+の正電荷を持つ AMCA-フォスタグと強く相互作用する可能性がある。以上のようにリン酸基の pK_a は、リン酸化分子のフォスタグとの親和性に影響を与えると予想した。

リン酸化分子	イオン強度							
	0	0.1	0.15	0.2	0.5	1.0	2.0	
実験に用いたリン酸化分子								
Phosphoric acid	7.2	6.7	-	6.8	6.6	6.5	6.4	
Phenylphosphate	6.3	5.8	-	-	-	-	-	
Phosphorylserine	6.2	5.6	-	-	-	-	-	
Phosphorylthreonine	-	5.8	-	-	-	-	-	
D-Ribose-5-phosphate	6.7	6.3	-	-	-	-	-	
参考								
O-Phosphorylethanolamine	5.8	5.6	-	-	-	-	-	
Glycerol-1-phosphate	6.7	6.1*	-	-	-	-	-	
Glycerol-2-phosphate	6.7	-	-	-	-	-	-	
O-Phosphorylpicolinol	-	6.3	-	-	-	-	-	
D-Fructose-1-phosphate	-	5.8*	-	-	-	-	-	
D-Glucose-1-phosphate	6.5	-	-	-	-	-	-	
Pyridoxal-5-phosphate	-	6.0	-	-	5.83	-	5.75	
Phosphoric acid 1-naphthylester	6.4	5.7	-	-	-	5.4	-	
Phosphoric acid 2-naphthylester	6.2	5.7	-	-	-	5.3	-	
DL-Phosphoserine	-	-	5.4	-	-	-	-	
Glycyl-DL-phosphoserine	-	-	6.0	-	-	-	-	

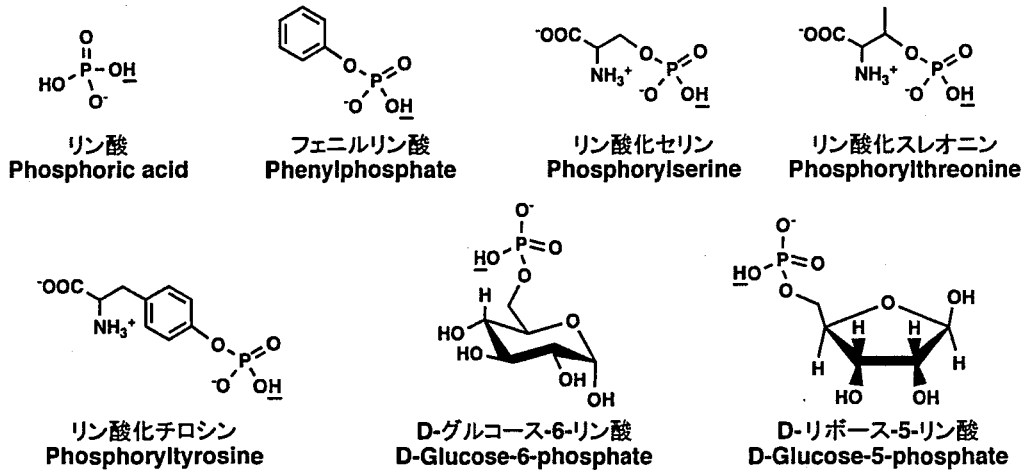
表. リン酸基の2つめのプロトンの pK_a ($R-OPO_3H^1 \leftrightarrow R-OPO_3^{2-} + H^+$) (25°C)
(Critical stability constants より引用) *は測定条件 20°C

加えて、リン酸化糖はリン酸イオンに比べ、リン酸基周辺の立体障害が大きいこともこれらの分子の AMCA-フォスタグに対する親和性の違いに影響を与えていると予想した。

また、フェニルリン酸とリン酸化セリンのリン酸基の pK_a は同程度であるが、AMCA-フォスタグとの親和性は20倍程度異なる。この原因として、芳香環の存在が考えられる。実際、リン酸化セリンやリン酸化スレオニンに比べ、リン酸化チロシンはAMCA-フォスタグとの親和性が大きい。

以上のようにこの実験から、リン酸化分子のフォスタグに対する親和性には、リン酸基の pK_a 、リン酸基周辺の立体障害、また芳香環が影響を与えると予想できる。

実験に用いたリン酸化分子



その他のリン酸化分子 (68 ページの表中に示したもの)

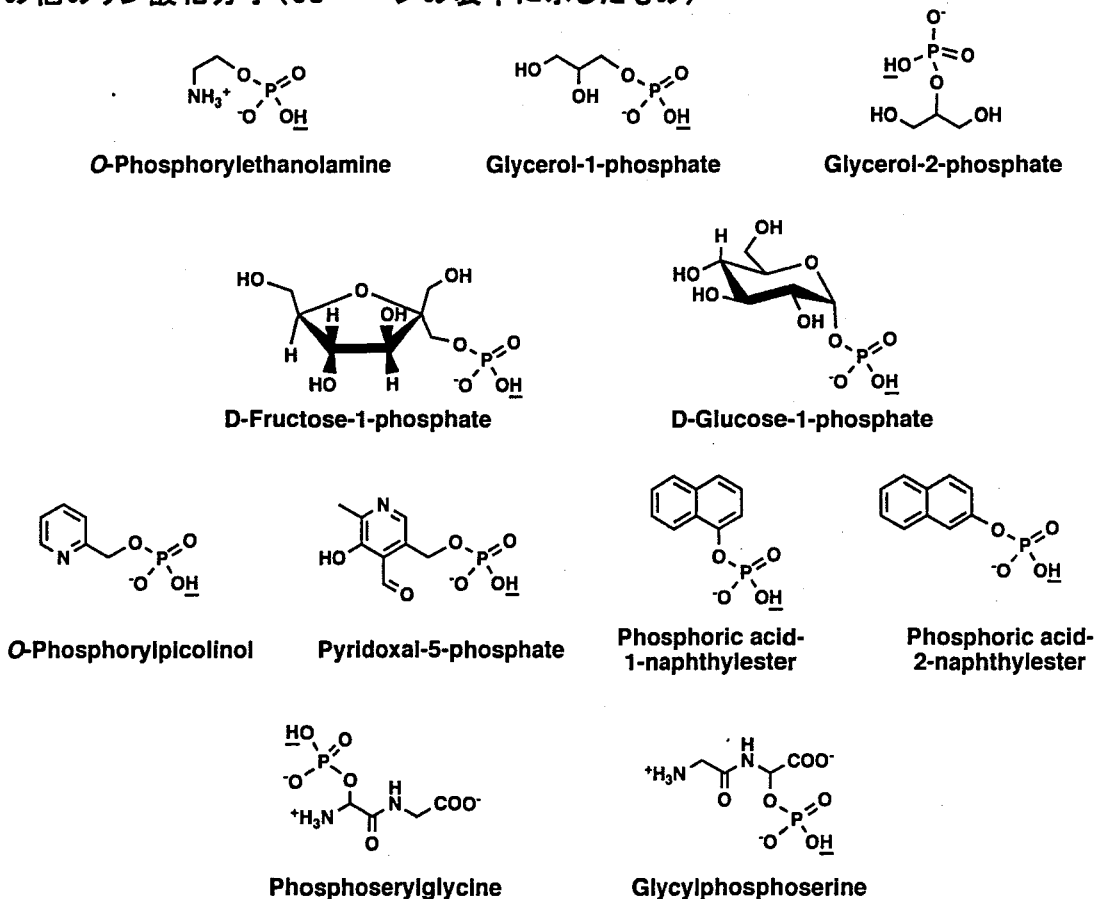


図. リン酸化分子の構造

9. Acknowledgments

I would like to express my sincere gratitude to my supervisor, Professor Tohru Koike. His wide knowledge and his logical way of thinking have been of great value for me. His understanding, encouraging and personal guidance have provided a good basis for the present thesis.

I wish to make my deep acknowledgement to Associate professor Eiji Kinoshita, Associate professor Yasuyuki Matoba, and Assistant professor Emiko Kinoshita for valuable advice and helpful suggestions throughout the course of this thesis work.

Thanks are due to Professor Hideaki Otsuka, Professor Hidetoshi Tahara, and Lecturer Yaichiro Kotake for reading the manuscript and making a number of helpful suggestions.

I am also indebted to Mr. Atsushi Yamada, Ms. Yuri Aoki, Mr. Yoshitake Fujioka, Mr. Yusuke Kubo, Mr. Norikazu Ishimura, and Ms. Hiromi Nakashima. I am also thankful to all members of Functional Molecular Science Department for their considerate advice and invaluable contributions.

Also, I appreciate my sister, my brother, and my friends.

Last but not least, I would like to thank my parents for giving me the opportunity to study for a Ph. D at Hiroshima University.

2009

Kei Takiyama