

総合論文

リン酸化プロテオミクスのための Phos-tag テクノロジー

木下 英司^{®1}, 木下恵美子¹, 小池 透¹

Phos-tag は、中性の水溶液中においてリン酸モノエステルジアニオンを選択的に捕捉する機能性分子である。Phos-tag のリン酸モノエステルジアニオンに対する親和性は、生体中に存在する他のアニオン、例えばカルボン酸アニオンに対するそれよりも 1 万倍以上大きい。著者らは、Phos-tag を基盤としたリン酸化プロテオミクスに有用な技術 (Phos-tag テクノロジー) を開発し、実用化している。本稿では、これまでに実用化した三つの技術について概説する。一つ目は、Phos-tag アクリルアミドを用いた電気泳動によってリン酸化タンパク質を分離する技術、二つ目はビオチン化 Phos-tag を用いてウェスタンブロット膜上に転写されたリン酸化タンパク質を検出する技術、三つ目は Phos-tag アガロース、あるいは Phos-tag トヨパールを用いてリン酸化タンパク質を分離・濃縮するクロマトグラフィー技術である。

1 緒言

ヒトゲノム解析の完了とともにクローズアップされるようになったタンパク質の機能解析 (プロテオミクス) の中でも、リン酸化タンパク質の研究 (リン酸化プロテオミクス) は大きな課題の一つである。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といえる。ゲノム解析によって、ヒトの遺伝子は 2 万数千個存在することが解明されたが¹⁾、それに対してリン酸化タンパク質は 1 万 4 千個以上、リン酸化部位としては 10 万箇所以上もが報告されている (Cell Signaling Technology 社, PhosphoSitePlus <<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>>)。このことから、リン酸化反応が多くのタンパク質において最も優位な機能制御の手段となっていることがうかがえる。タンパク質のリン酸化/脱リン酸化反応を司るのは、518 の遺伝子が明らかになっているプロテインキナーゼ²⁾³⁾と、約 150 の遺伝子が報告されているプロテインフォスファターゼ⁴⁾⁵⁾ (いずれもヒトにおいて) である。これらのキナーゼ/フォスファターゼの複雑で多様なネットワークは、速やかに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/フォスファターゼの協調が乱れることが多くの疾病の原因となり得ることを意味する⁶⁾。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。

近年めざましい発展を遂げる質量分析を基盤とした種々の技術、また従来からリン酸化タンパク質の研究に用いられてきた放射性同位元素の ³²P や抗リン酸化抗体などを用いた研究技術は、タンパク質リン酸化に関する数々のデータを生み出している。しかし、時間的及び空間的に変化する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、さらに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。実際に、最新の質量分析装置を用いても、あるタンパク質の生体内における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、既存の技術に加えて、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が必要である。

著者らの研究グループは、リン酸基を特異的に捕捉することができる機能性分子のフォスタグ (Phos-tag) を用いて、リン酸化プロテオミクスに有用な新しい原理に基づく技術 (Phos-tag テクノロジー) を開発している。Phos-tag は二つの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⁷⁾。亜鉛 Phos-tag 錯体 (Zn²⁺-Phos-tag) と様々なアニオン性基質との複合体形成反応を pH 滴定法により調べると、アニオン性基質との 1:1 複合体の解離定数は、フェニルリン酸イオン $K_d = 25 \text{ nM}$ 、酢酸イオン $K_d = 0.40 \text{ mM}$ 、水酸化物イオン $K_d = 63 \text{ nM}$ 、硫酸イオン $K_d = 0.13 \text{ mM}$ 、塩化物イオン $K_d = 20 \text{ mM}$ (25 °C, $I = 0.10 \text{ NaNO}_3$) となる。このことから、この Zn²⁺-Phos-tag は、リン酸ジアニオンをカルボン酸アニオンよりも約 16000 倍も強く捕捉するといえる。また、生体高分子であるリン酸化タンパク質に対しても、Phos-tag はリン酸化アミノ酸残基の種類にかかわらず捕捉

[®] E-mail: kinociji@hiroshima-u.ac.jp

¹ 広島大学大学院医歯薬保健学研究院医薬分子機能科学研究室: 734-8553 広島県広島市南区霞 1-2-3

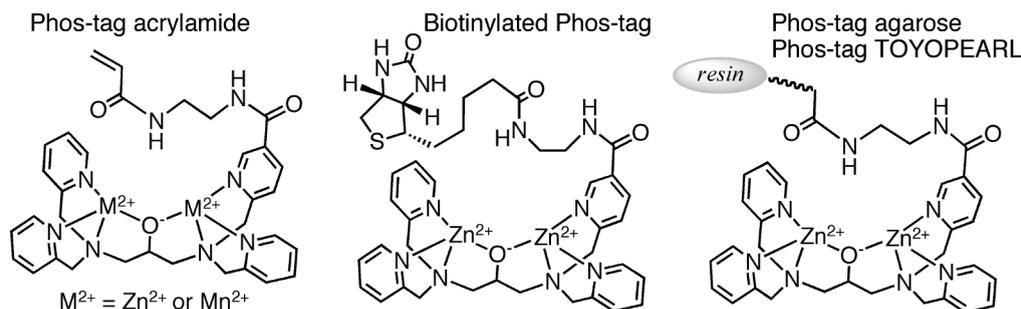


Fig. 1 Three kinds of Phos-tag derivatives for Phos-tag technology

Phos-tag acrylamide for phosphate affinity SDS-PAGE (left), biotinylated Phos-tag for Western blotting (center), and Phos-tag agarose and Phos-tag TOYOPEARL for phosphate affinity chromatography (right).

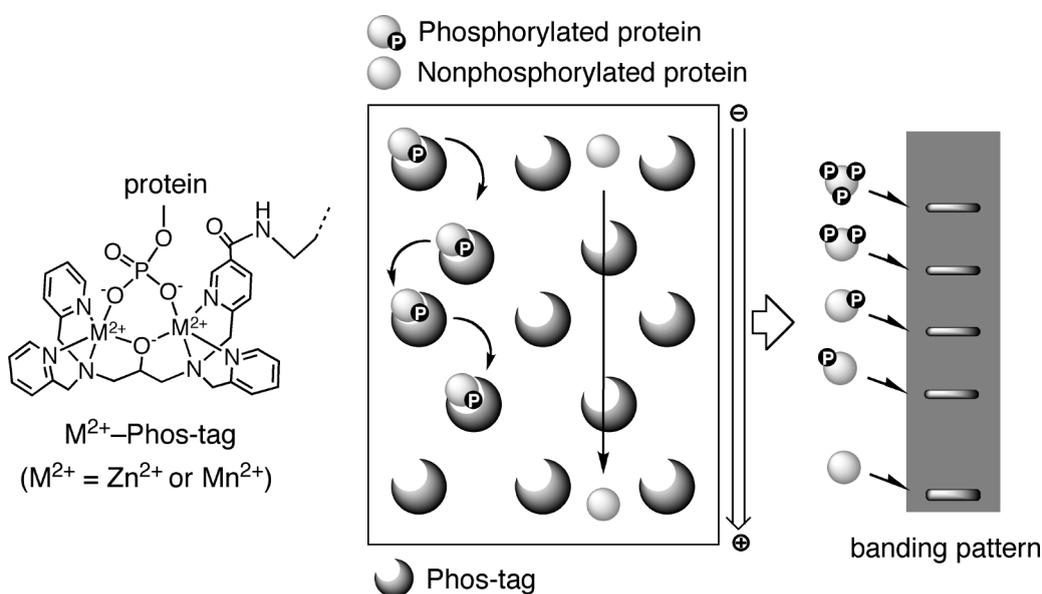


Fig. 2 Structure of the polyacrylamide-bound M^{2+} -Phos-tag capturing a phosphorylated protein and schematic representation for the principle of Phos-tag SDS-PAGE

The polyacrylamide-bound M^{2+} -Phos-tag shows preferential trapping of the phosphorylated proteins, resulting in the separation of phosphoproteins from their nonphosphorylated counterparts.

することができる。本稿では、タンパク質のリン酸化状態の違いを電気泳動法で分析する Phos-tag アクリルアミド (Fig. 1 左)、ウェスタンブロット膜上に転写されたリン酸化タンパク質を化学発光法との併用によって検出するビオチン化 Phos-tag (Fig. 1 中央)、細胞溶解液など雑多なタンパク質混合試料からリン酸化タンパク質を分離・濃縮するクロマトグラフィー担体の Phos-tag アガロース、あるいは Phos-tag トヨパール (Fig. 1 右) について概説し、それらを用いたリン酸化タンパク質研究法の実例を紹介したい。

2 Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化タンパク質の分離

2・1 概要

Phos-tag SDS-PAGE (SDS-PAGE, sodium dodesyl sulfate-

polyacrylamide gel electrophoresis) 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 Phos-tag アクリルアミド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、すでに確立された SDS-PAGE 法と全く同じである。リン酸化タンパク質は、ゲルに固定された Phos-tag と可逆的な結合を繰り返しながら泳動されるため、相当する非リン酸化タンパク質よりも移動が遅れ、泳動像としては非リン酸化タンパク質よりもシフトアップする (Fig. 2)。

Phos-tag SDS-PAGE では、あるタンパク質について、リン酸化されているアミノ酸残基数が同じであってもその部

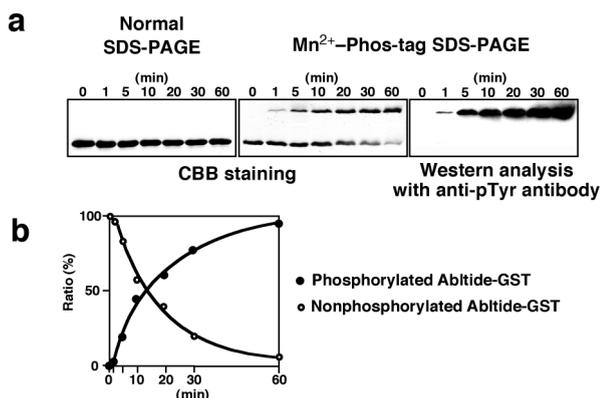


Fig. 3 *In vitro* Abl kinase assay by using Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE

(a) Phosphorylation of Abltide-GST (0.10 μg protein/lane) by Abl was monitored for 0–60 min in normal SDS-PAGE [12.5 % (w/v) polyacrylamide] and in Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE [12.5 % (w/v) polyacrylamide containing 100 μM Mn²⁺-Phos-tag]. The Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE gel was analyzed by subsequent immunoblotting with an anti-pTyr antibody. (b) Quantitative analyses of phosphorylated and nonphosphorylated Abltide-GST observed in the CBB-stained Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE gel (center panel of a). Reprinted with permission from Ref. 9 © (2006) The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

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。すなわち、リン酸化状態の違いを分析することができる。リン酸化タンパク質と Phos-tag の親和性はリン酸モノエステルイオンと Phos-tag の親和性に基づくので、原理的にはセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化のいずれに対しても区別はなく、また、リン酸化数が同じであれば同じ親和性を示すと考えられる。しかし、実際には個々のリン酸化タンパク質の高次構造やリン酸基周辺の一次構造などの影響を受けて、同じリン酸化数の場合もその親和性に差異が生じる。

著者らは2006年に、Phos-tag アクリルアミドと広範に利用されている Laemmli の SDS-PAGE⁸⁾を組み合わせた電気泳動法を発表した⁹⁾。Laemmli 法では、泳動中のゲルの pH が9以上のアルカリ性になるため、その条件下でリン酸基捕捉能を有するマンガン Phos-tag 錯体を使用した (Fig. 2での M²⁺ = Mn²⁺)。この方法は一般的な SDS-PAGE ができる機器と試薬さえあれば、どの研究室でもすぐに実行できるという簡便さゆえ、数年間のうちに多数の研究者に利用され、数多くの成果が報告された。これについては、2・2 項の「Laemmli の SDS-PAGE 系を用いる Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE」で述べる。一方、Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE では、いくつかのタンパク質についてリン酸化フォームを検出できないという事例が生じた。Phos-tag は、元来、亜

鉛錯体として中性水溶液中で最も高いリン酸基捕捉能をもつ分子であるので、Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE の条件は至適とは言えなかった。そこで、亜鉛 Phos-tag 錯体 (Fig. 2での M²⁺ = Zn²⁺) を中性条件で泳動する SDS-PAGE 系に適用させることで問題解決を図った。この改善により多くのタンパク質において分離能力が顕著に向上し、生体内タンパク質のリン酸化状態を詳細に解析することが可能になった¹⁰⁾¹¹⁾。これについては、2・3 項「中性 pH の SDS-PAGE 系を用いる Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE」で述べる。

Phos-tag SDS-PAGE を利用しようとする研究者にとって、マンガン錯体と亜鉛錯体のいずれを適用するかは、研究目的によって選択することになる。試薬作成などの点において低コストで簡便な Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE は、標的タンパク質のリン酸化の有無に関する情報を得るための第一選択肢となるであろう。また、Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE は、複数のリン酸化フォームの分離など、より詳細な解析を目的とする場合に有用である。本稿では、それぞれの方法によって得たデータを示し、それらの特性を解説したい。

2・2 Laemmli の SDS-PAGE 系を用いる Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE^{9)12)~19)}

2・2・1 *In vitro* チロシンキナーゼ (Abl) 反応のモニタリング⁹⁾～リン酸化反応の定量解析～

Abl は慢性骨髄性白血病の患者の大半で活性の亢進がみられるチロシンキナーゼである²⁰⁾。この Abl の *in vitro* における反応を Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE を用いてモニタリングした (Fig. 3a)。Abl 及びその基質となるペプチド (Abltide) とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) の融合タンパク質 (Abltide-GST, H₂N-GST-Glu-Ala-Ile-Tyr-Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-Lys-Lys-Lys-COOH) (28 kDa) はいずれもリコンビナントタンパク質を用いた。通常の SDS-PAGE [12.5 % (w/v) ポリアクリルアミド] ではキナーゼ反応の時間経過にかかわらず1本のバンドだが、100 μM の Mn²⁺-Phos-tag を含む SDS-PAGE [12.5 % (w/v) ポリアクリルアミド] では、反応後に2本のバンドを検出した。反応経過に伴って、移動度の小さいバンドの濃度が増え、移動度の大きいバンドは減少していく。移動度の小さいバンドがリン酸化フォームであることは、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタン解析により証明された。Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE は、反応液中にあるリン酸化フォームと非リン酸化フォームのバンドを同時に検出できるので基質タンパク質の全体量からキナーゼ反応の進行を定量的に解析できるという利点がある。さらには、キナーゼの酵素反応に伴う基質タンパク質の分解の有無も電気泳動像から確認できる。Fig. 3a の Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE のゲル染色像から、Abltide のリン酸化フォームと非リン酸化フォームをデンストグラ

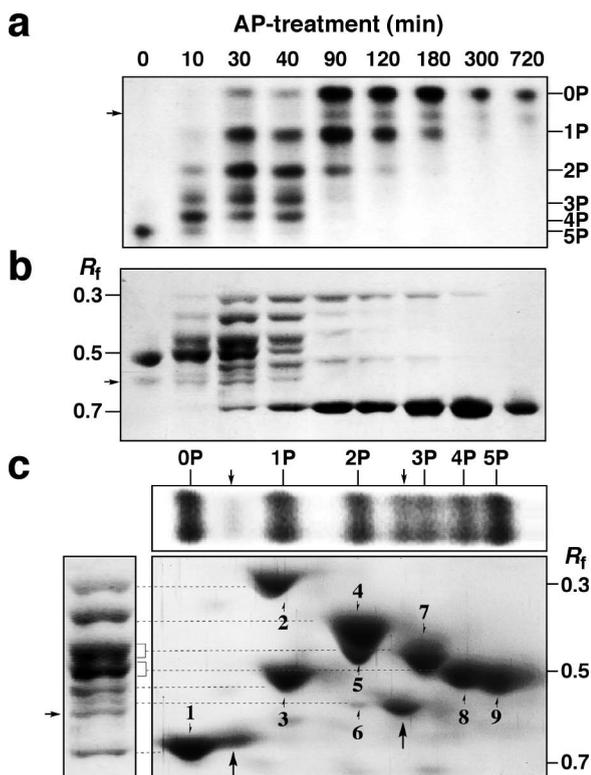


Fig. 4 Separation of the phosphorylated species of β -casein by urea-PAGE and Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE

(a) Urea-PAGE [4.0 M urea and 6.0 % (w/v) polyacrylamide]. (b) Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE [10 % (w/v) polyacrylamide containing 100 μM Mn^{2+} -Phos-tag]. The reaction times with AP were 0 (no treatment of AP), 10, 30, 40, 90, 120, 180, 300, and 720 min. Lanes of 0 and 720 min contain the completely phosphorylated and dephosphorylated forms of β -casein (1.5 μg), respectively. Lanes of 10–300 min contain multiple phosphorylated species of β -casein due to differences in the phosphorylation status (10, 180, and 300 min : 4.0 μg , 120 min : 5.0 μg , 30, 40, and 90 min : 7.5 μg). (c) 2-DE coupling urea-PAGE [4.0 M urea and 6.0 % (w/v) polyacrylamide] and Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE [10 % (w/v) polyacrylamide containing 100 μM Mn^{2+} -Phos-tag]. A mixed sample of the completely phosphorylated (1.5 μg), completely dephosphorylated (1.5 μg), and partially dephosphorylated (treatment of AP for 40 min, 7.5 μg) forms of β -casein was applied to the first-dimensional urea-PAGE. Subsequently, the sample lane separated by urea-PAGE was cut and then subjected to Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE. The migration spots on the 2-DE gel are indicated as #1–#9. The reclined upper panel corresponds to the first-dimensional urea-PAGE. The left panel corresponds to the lane of 30 min of (b). All gels were subjected to SYPRO Ruby gel staining. The arrowed band is a faint band, which is a contaminant in the commercially available β -casein. The R_f value of 1.0 is defined as the position of the BPB dye. Reprinted with permission from Ref. 16 © (2009) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

フィーによって定量したものが Fig. 3b である。一方、抗リン酸化チロシン抗体でのウェスタン解析では、バンドの強度がそこに存在するタンパク質量を反映するわけではなく、定量性に欠けることが分かる。

2.2.2 β -カゼインのリン酸化解析¹⁶⁾～リン酸化部位の異なるモノリン酸化フォームの分離～ 牛乳のタンパク質成分である β -カゼイン (24 kDa) は5箇所のセリンがリン酸化されている。 β -カゼインをアルカリフォスファターゼ (AP) で処理すると、時間経過に伴ってリン酸基が除去されるが、この反応の経過を尿素 PAGE と Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE (100 μM Mn^{2+} -Phos-tag を含む) で解析した (Fig. 4a, b)。尿素 PAGE ではリン酸基の電荷の数が減るほど移動度が小さくなるが、経過時間によって五つのリン酸基 (5P) が脱リン酸化されて、リン酸基のない β -カゼイン (0P) へと変化してゆく様子が分かる。一方、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では30分後に最も多い7本のバンドが現れ、その後720分までに最も移動度の大きい1本のバンドに収束した。興味深いことに、完全リン酸化 β -カゼイン (5P) よりも部分的に脱リン酸化されたほうが、移動度が小さくなることもあり、10～40分間でそのようなバンドが3本観察される。最も移動度の小さいバンドは、300分まで観察された。このことは、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE が、一分子あたりのリン酸化数に依存せず、そのリン酸化部位の違いに基づくリン酸化状態の異なるリン酸化フォームを分離していることを示している。

β -カゼインのリン酸化数と Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE における移動度の関係を、尿素 PAGE を一次元目とした二次元電気泳動によって解析した (Fig. 4c)。脱リン酸化反応途中にある β -カゼインにおいて、9個のスポットが検出され、モノリン酸化フォーム (1P) であるスポット2と3は、それぞれ、Ser-50 と Ser-34 がリン酸化されたものであることを質量分析によって同定した。このように、同じリン酸化数であってもその部位が異なれば Phos-tag SDS-PAGE において移動度の異なるバンドとして分離されることは他の電気泳動法にはない特徴である。

2.3 中性 pH の SDS-PAGE 系を用いる Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE¹⁰⁾¹¹⁾²¹⁾

2.3.1 Bis-Tris-HCl をゲルバッファーとした Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE¹⁰⁾¹¹⁾ 2.1項で述べように、pH 9 以上の泳動環境になる Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では、いくつかのタンパク質においてリン酸化フォームを分離できない事例があった。そのため、Bis-Tris-HCl をゲルバッファーとする中性 pH の SDS-PAGE システムと、Phos-tag の亜鉛錯体を組み合わせた改良型の Phos-tag SDS-PAGE (Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE) を開発するに至った¹⁰⁾。Bis-Tris-HCl をゲルバッファーに用いる SDS-PAGE システム

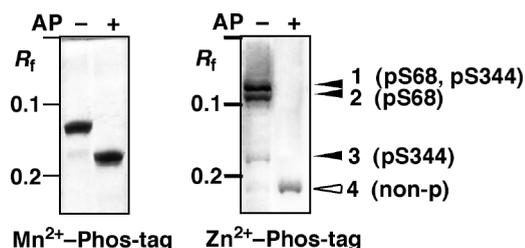


Fig. 5 Comparison of the separation patterns of ovalbumin in Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE and in Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE

The left and right lanes contained the AP-untreated and AP-treated ovalbumin, respectively. The gels containing 10 % (w/v) polyacrylamide and 100 μM Mn^{2+} -Phos-tag or Zn^{2+} -Phos-tag were stained with CBB. Four bands (arrowed bands of 1, 2, 3 and 4) were excised from the Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE gel. The phosphorylation sites determined by mass spectrometry are shown to the right of the Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE gel. The R_f value of 1.0 is defined as the position of the BPB dye. Reprinted with permission from Ref. 21 © (2012) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

は近年いくつかのメーカーからプレキャストゲルとして販売されている。 Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEでは、これらと類似したゲル組成、泳動バッファーを適用した。分離ゲルは357 mM Bis-Tris-HCl (pH 6.8) をゲルバッファーとし、5~20 % (w/v) の範囲のポリアクリルアミドゲル、濃縮ゲルは同じゲルバッファーとその濃度を用いた4 % (w/v) ポリアクリルアミドゲルとした。泳動バッファーは0.10 M Tris, 0.10 M 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), 0.10 % (w/v) SDS, 5.0 mM sodium bisulfite とした。サンプルバッファーはLaemmli法に使用するものと同じ65 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1.0 % (w/v) SDS, 5.0 % (v/v) 2-mercaptoethanol, 10 % (v/v) glycerol, 0.03 % (w/v) BPB (bromophenol blue) とした。Bis-Tris-HClゲルを用いた中性 Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEでは、従来の Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEと比較してタンパク質のリン酸化フォームの分離における顕著な改善が見られた。

2.3.2 卵白アルブミンのリン酸化状態の解析¹⁰⁾²¹⁾ ~ 分離能力の改善 (1) ~ 卵白アルブミン (45 kDa) は2箇所セリンがリン酸化されることが報告されている。Native PAGEではリン酸基に基づく電荷の違いによって三つのバンドが検出され、それぞれ卵白アルブミン A1 (2箇所リン酸化), A2 (1箇所リン酸化), A3 (非リン酸化) と名付けられている²²⁾。卵白アルブミンを、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEで分離すると、リン酸化フォーム (AP, -) と非リン酸化フォーム (AP, +) の移動度の差は観察できるが、リン酸化フォームにおけるA1とA2を分離することはできなかった (Fig. 5)。一方、 Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEで

は3本のリン酸化フォームのバンド (1, 2, 3) と1本の非リン酸化フォームのバンド (4) を検出した。検出された4種類のバンドの質量分析により、一番移動度の小さいバンド1がSer-68とSer-344がリン酸化されたジリン酸化フォーム、バンド2及び3がそれぞれSer-68とSer-344がリン酸化されたモノリン酸化フォーム、バンド4が非リン酸化フォームであることが分かった。卵白アルブミンの2種類のモノリン酸化フォームを分離し、Ser-68のリン酸化フォームの存在比率が高いことを解明できたのは本法の特徴を反映した発見であった。また、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEと比較してその分離能力が優れていることも明らかである。

2.3.3 細胞内シグナル伝達分子 β -catenin のリン酸化解析¹⁰⁾ ~ 分離能力の改善 (2) ~ Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEの分離能力の改善は、より生体試料に近いタンパク質試料を用いた解析においても確かめることができた。ここではヒト大腸癌細胞株 SW480 の β -catenin のリン酸化状態を解析した例を示し、前述の Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEとの差異について述べる。 β -Catenin は細胞内で複数のキナーゼの制御を受け、そのリン酸化状態は多様で常に変化する。E-カドヘリン結合分子としての細胞骨格系の機能では複数のチロシンキナーゼの制御を受け²³⁾、Wntシグナル系の一員としての転写因子の機能では、タンパク質キナーゼA (PKA) やB (AKT) によるSer-552, Ser-675のリン酸化を受ける^{24)~26)}。WntシグナルがOFFの時にはcasein kinase IによるSer-45のリン酸化、glycogen synthase kinase 3 β によるSer-33, Ser-37, Thr-41のリン酸化を引き金として、ポリユビキチン化、プロテアソームによる分解を受け、細胞質内における量を制御される²⁴⁾。このように、複数の機能を担う β -catenin は複数のキナーゼの制御を受け、そのリン酸化状態は多様で常に変化する。

85 kDa の β -catenin は通常のLaemmliのSDS-PAGE法と続く抗 β -catenin抗体 (anti- β -catenin) による検出で、プロテアーゼによってN末側が切断されたものを含む4本のバンドとして検出された (Fig. 6aの上段)。図中に示した各抗リン酸化 β -catenin抗体 (anti-p- β -catenin) では1本のバンドを検出し、それぞれの部位のリン酸化が確認できた。同じ試料を Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEで分離し、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEと分離パターンを比較した (それぞれFig. 6aの中段と下段)。85 kDaの完全長 β -cateninと分解されたものとを区別するため、一次元目を通常のSDS-PAGEとした二次元電気泳動を行った (Fig. 6a中段と下段の最も左の図)。完全長 β -cateninのスポットは Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEで10個、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEで6個特定した。最も移動度の大きいものは、非リン酸化 β -cateninである。完全長の β -cateninのスポット (10個) を、一次元の Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEに続くウェスタン解析のバン

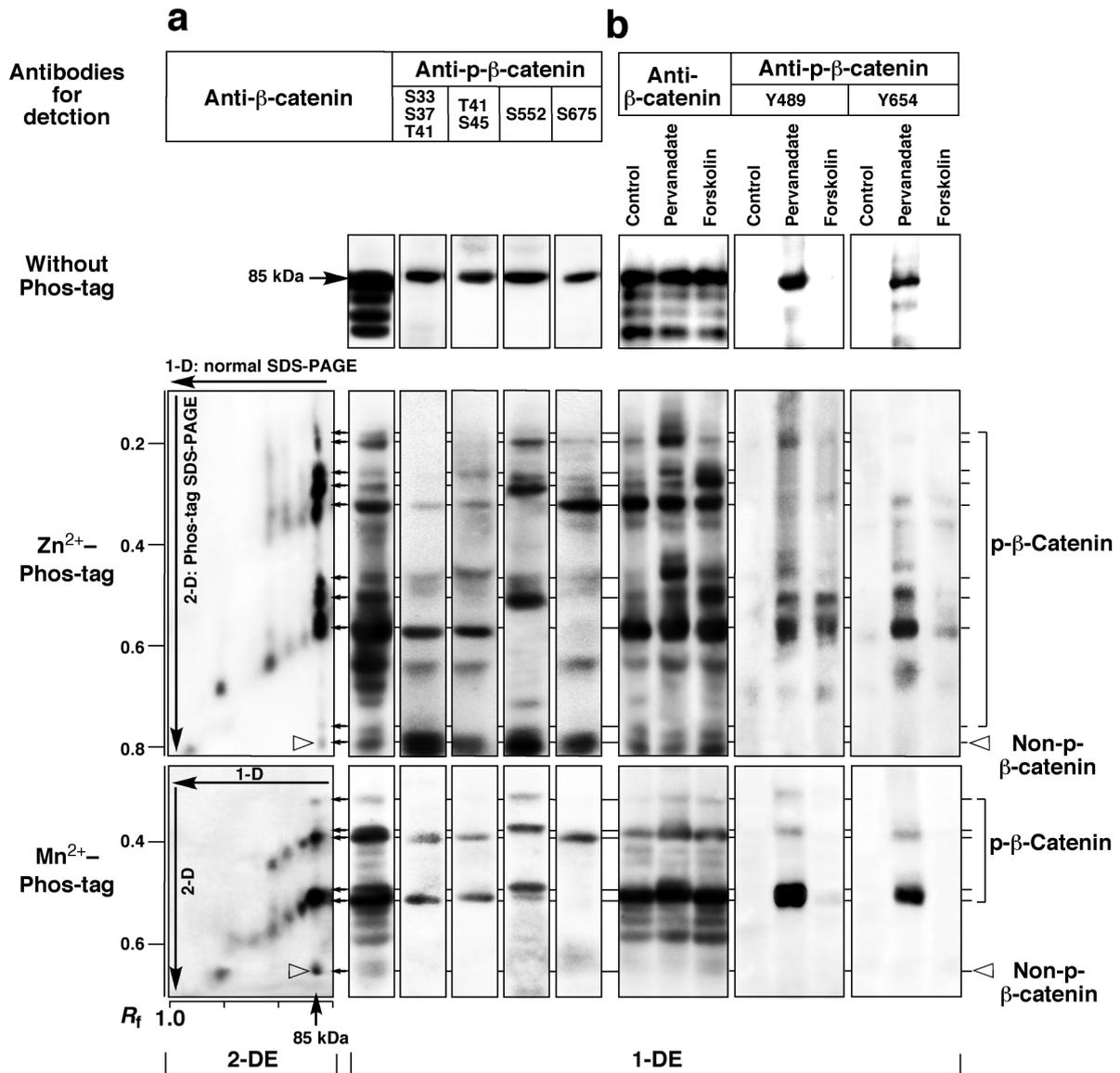


Fig. 6 Profiling of phosphorylation of intracellular β -catenin

Laemmli's normal gels using 1-DE and 2-DE consisted of 5.5 % (w/v) and 6.0 % (w/v) polyacrylamide, respectively. Each Phos-tag gel consisted of 5.5 % (w/v) polyacrylamide containing 25 μ M Phos-tag. β -Catenin was detected by immunoblotting with antibodies shown above each panel. (a) The lysate was prepared from cells treated without drug. (b) The lysates were prepared from cells treated without any drug (control) and with pervanadate (1.0 mM) for 30 min, or with forskolin (10 μ M) for 30 min. The top panels represent the results of analyses by Laemmli's normal 1-D SDS-PAGE. The center panels represent the results of analyses by Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE. The left-most panel shows 2-DE coupling of Laemmli's normal SDS-PAGE as the first dimension (1-D, a horizontal arrow) and Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE as the second dimension (2-D, a vertical arrow). The bottom panels represent the results of analyses by Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE. The left-most panel shows 2-DE coupling of Laemmli's normal SDS-PAGE as the first dimension (1-D, a horizontal arrow) and Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE as the second dimension (2-D, a vertical arrow). The R_f value of 1.0 is defined as the position of the BPB dye. Reprinted with permission from Ref. 10 © (2010) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

ドと照合したところ (Fig. 6a 中段において 10 本の横線矢印で示す), アップシフトバンドはすべていずれかの抗リン酸化抗体によって検出された. そのような部位特異的なリン酸化フォームの検出数も Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE のほうが多かった. Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE では優れた分離能力により同一タンパク質のリン酸化状態を詳細に解析

できることが示された.

さらに, 細胞外からの薬剤刺激によって変化する β -catenin のリン酸化状態の動態観察についても改良型と従来の Phos-tag SDS-PAGE の差異が明らかとなった. SW480 細胞をチロシンフォスファターゼ阻害剤である pervanadate あるいは PKA 活性化剤 (アデニル酸シクラー

ゼ活性化剤)である forskolin で処理したとき, Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では, 特定のリン酸化 β -catenin のバンドが増大したが, Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では, 差異がほとんど見られなかった (Fig. 6b, 中段と下段). Pervanadate 処理 (過酸化水素・バナジン酸処理) によっては, Tyr-142, Tyr-489, Tyr-654 などのリン酸化亢進, forskolin 処理によっては Ser-552, Ser-675 のリン酸化亢進が予想される. Pervanadate 処理サンプルの Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE において増大したバンドは, 抗リン酸化 β -catenin 抗体 (pY489 と pY654) によって検出された. また, Ser-552 と Ser-675 については Fig. 6a の抗リン酸化 β -catenin 抗体 (pS552 と pS675) によって検出されたバンドと照合することによって, それらのリン酸化が亢進していることが分かる. このように, Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE ではリン酸化フォームを詳細に分離できた結果, 薬剤刺激によるリン酸化状態の変化を高感度に捉えることができるようになった.

2・3・4 DNA 損傷応答タンパク質 ATM (350 kDa) の解析¹¹⁾18)19) ~ 200 kDa 以上の高分子解析のための Tris-AcOH バッファー系 ~ 一般に 200 kDa 以上の高分子量タンパク質を SDS-PAGE で分離する場合は, 4% (w/v) 以下の低濃度のポリアクリルアミドゲルや, 2% (w/v) を最低濃度とする濃度勾配ゲルを用いる. しかしながら, Bis-Tris-HCl をゲルバッファーに用いた中性 pH の Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では, そのような低濃度のポリアクリルアミドゲルを作成することができず, 200 kDa 以上の高分子量タンパク質のリン酸化解析は不可能である. なぜなら, 三級アミンである Bis-Tris は, *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) と過硫酸アンモニウムによるアクリルアミドモノマーの重合反応の際に, TEMED と同様にラジカル種となり, アクリルアミドの重合反応に対してラジカルクエンチャーとしての機能を示すからである²⁷⁾. よって, 4% (w/v) 以下の低濃度アクリルアミドを重合させようとする場合, その影響が特に大きくなり, 十分な分子篩い効果を持つゲルを作成することはできない. そこで, 三級アミン以外の中性 pH のゲルバッファーである Tris-AcOH を用いた SDS-PAGE システム²⁸⁾を適用することによって, 高分子量タンパク質のリン酸化解析に利用できる Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE を開発した. これを用いて 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 ATM (ataxia telangiectasia-mutated kinase, 350 kDa) のリン酸化状態の変化を解析した例を示す¹¹⁾. 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 Ser-367, Ser-1893, Ser-1981, 及び Ser-2996 を自己リン酸化することが報告されている²⁹⁾³⁰⁾. 自己リン酸化により活性化した ATM は, 基質となる他の DNA 損傷

応答タンパク質をリン酸化する. 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 actinomycin D (2 μ M, 5 時間処理) を用いた. 200 mM Tris-AcOH (pH 7.0) をゲルバッファーとし, 3% (w/v) のポリアクリルアミドゲルを作成したが, 一般に 5% (w/v) 以下のゲルは柔軟で扱いにくいいため, アガロースゲルを最終濃度が 0.5% (w/v) になるように混合して補強した¹⁸⁾¹⁹⁾. 濃縮ゲルは作成しなかった. 泳動バッファーは 50 mM Tris, 50 mM Tricine, 0.10% (w/v) SDS, 5.0 mM sodium bisulfite とした. サンプルバッファーは Laemmli 法に使用するものと同じ 65 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1.0% (w/v) SDS, 5.0% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.03% (w/v) BPB とした. 20 μ M の Phos-tag を含むゲルに actinomycin D 処理 (+) 及び無処理 (-) の細胞溶解試料を 1 レーン当たり 20 μ g タンパク質になるようにアプライした. 泳動に続く抗 ATM 抗体によるウェスタン解析で, actinomycin D 処理後の試料では ATM の自己リン酸化に伴う三つのアップシフトバンドが確認できた (Fig. 7). 一方, 2・2 項で述べた Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE [0.5% (w/v) アガロースを含む 3% (w/v) ポリアクリルアミドゲル] では 2 本のアップシフトバンドしか検出されない. このことから, 200 kDa 以上の高分子タンパク質のリン酸化解析においても Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE の優位性が示された. Tris-AcOH 系ゲルバッファーの SDS-PAGE システムを Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE に適用することによって, 4% (w/v) 以下の中性ポリアクリルアミドゲルを作成する際の Bis-Tris-HCl 系ゲルバッファーの欠点を補完し, 広い分子量範囲の Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化解析を可能にすることができた.

2・3・5 二次元蛍光ディファレンシャル法と組み合わせた細胞内タンパク質のリン酸化状態の差異解析¹¹⁾ ~ Bis-Tris-HCl 系と Tris-AcOH 系ゲルバッファーの特性比較 (1) ~ 疾患プロテオミクスにおいて, 検体間の翻訳後修飾の違いを見分ける手法として, 二次元蛍光ディファレンシャル法 (2D-DIGE) は非常に有用である³¹⁾. 一次元目に通常の SDS-PAGE, 二次元目に Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE を用いた 2D-DIGE によって, 二つの検体間のリン酸化状態の差異を解析した例を示す. またこの実験例では, 200 kDa 以下のできるだけ多くのタンパク質における Bis-Tris-HCl 系と Tris-AcOH 系での分離能力についての比較も行った. 二次元目の泳動像は, ゲル平面に対して対角線状のスポットの配置となるが, 複数のリン酸化状態が存在するタンパク質については, その対角線からシフトアップしたスポットが検出される. リン酸化状態の差異が顕著な二つの検体として, Ser/Thr フォスファターゼ阻害剤である calyculin A を処理したもの, あるいは未処理の HeLa 細胞のタンパク質抽出溶液を調製した. 泳動像におけるスポッ

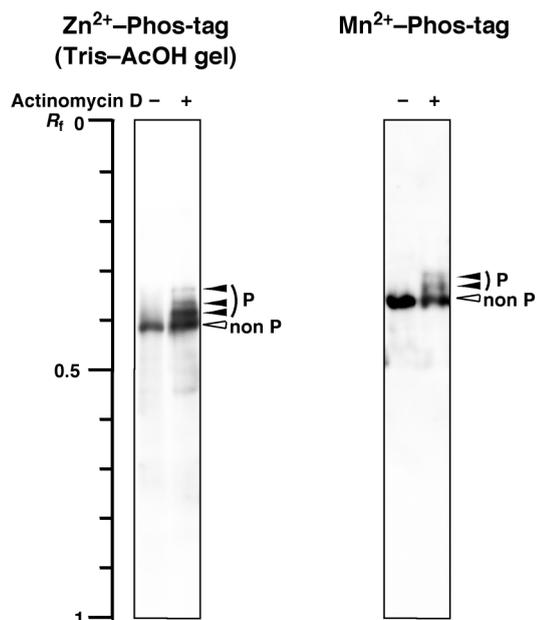


Fig. 7 Comparison of mobility of phosphorylated ATM in Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE and in Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE

The cells (10^7 cells) were treated with 0 μM (-) or 2 μM actinomycin D (+) for 2 h. The lysates were subjected to Phos-tag SDS-PAGE on 3.0 % (w/v) polyacrylamide gel strengthened with 0.5 % (w/v) agarose containing 20 μM Phos-tag, followed by immunoblotting with an anti-ATM antibody. The Tris-AcOH buffer system and Laemmli's buffer system were used in Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE (left panel) and in Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE (right panel), respectively. Each lane contained 10 μg proteins. The R_f value of 1.0 is defined as the position of the BPB dye. Reprinted with permission from Ref. 11 © (2012) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

トの複雑性を軽減するために、タンパク質分画を行い、不溶性タンパク質の画分について解析した。GEヘルスケア社のCyDye DIGE Fluor, minimal labelling kitを用いてcalyculin A処理試料はCy5標識、未処理の試料はCy3標識し、両者を混合して一次元目のSDS-PAGE [8~12 % (w/v) ポリアクリルアミド濃度勾配ゲル, ゲル長 30 cm] にアブライした。一次元目のゲルは、10~30 kDa, 30~50 kDa, 50~200 kDaの三領域に切り分け、それぞれ、二次元目の50 μM Zn^{2+} -Phos-tagを含むポリアクリルアミドゲルにアブライした (Fig. 8a)。Cy5とCy3をスキャンして得られた画像はそれぞれ緑とピンクであらわし、両者を重ね合わせたとき、重なるスポットを白であらわしている。Fig. 8aの上段はBis-Tris-HCl系、下段はTris-AcOH系で泳動した結果である。分子量範囲に対して適当なゲル濃度を選んで用いたが、その濃度は各図の下部に記載した。Bis-Tris-HCl系では緑あるいはピンクのスポットが多く検出され、

calyculin A処理の有無による両検体のリン酸化状態の違いが明らかとなった。緑とピンクのスポットで、縦方向に並ぶものは、同一のタンパク質の複数のリン酸化フォームである。それらのうち図中に番号で示した六つのスポットについて質量分析による解析を行ったところ、#1はhistone H3 (15 kDa)、#2はkeratin 18 (47 kDa)、#3はkeratin 8 (53 kDa)、#4はvimentin (54 kDa)、#5はlamin A/C (74/65 kDa)、#6はelongation factor 2 (95 kDa)と同定された。Histone H3についてウェスタン解析でも、2D-DIGEの結果と同様に、calyculin A処理後の試料において3本のシフトアップバンドを検出することができた (Fig. 8b 左端パネル)。さらに、Thr-3, Ser-10, Thr-11, Ser-28に対するそれぞれの抗リン酸化抗体によって、3本の各バンドに含まれるリン酸化アミノ酸残基が同定された。一方、Tris-AcOH系では白いスポットが多く、それらの分離度も小さく狭い範囲に密集している。スポット#1のhistone H3と#6のelongation factor 2では、複数のリン酸化フォームの分離がほとんど見られない。このことから、200 kDa以下の多くのタンパク質において、Bis-Tris-HCl系の Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEの方がより詳細なリン酸化状態を解析できると考えられる。しかしながら、Tris-AcOH系は、200 kDa以上のタンパク質のリン酸化解析においてBis-Tris-HCl系よりも優位であることを、ここに改めて強調し、述べておく。

2・3・6 細胞外シグナル調節キナーゼ Erk のリン酸化解析¹¹⁾ ~ Bis-Tris-HCl系と Tris-AcOH系ゲルバッファの特性比較 (2) ~ 前項の2D-DIGEに加えて、200 kDa以下のタンパク質解析におけるBis-Tris-HCl系とTris-AcOH系ゲルバッファの特性の違いを、Erkのリン酸化解析の例を示して解説したい。ErkはMAPK (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ) ファミリーの一つであり、細胞外からの刺激にตอบสนองして核へと情報を伝達するMAPKカスケードの一員として、そのリン酸化に関する多くの研究がなされている。Erkの活性化は上流のキナーゼであるMEK (MAPKキナーゼ) によってThrとTyr [Erk1 (44 kDa) ではThr-202とTyr-204, Erk2 (42 kDa) 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³²⁾³³⁾。 Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEとそれに続くウェスタン解析によって、EGF (上皮成長因子) の刺激後のヒト扁平上皮癌細胞株A431のErk1/2を検出したところ、EGF刺激後には、Bis-Tris-HCl系とTris-AcOH系のいずれの Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEにおいても3本のシフトアップバンドが検出された (Fig. 9a)。一次元目を通常のSDS-PAGE、二次元目を Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEとした二次元電気泳動で、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分かった。次に、EGF刺激後の時間経過とリン酸化状態の変化を追跡し

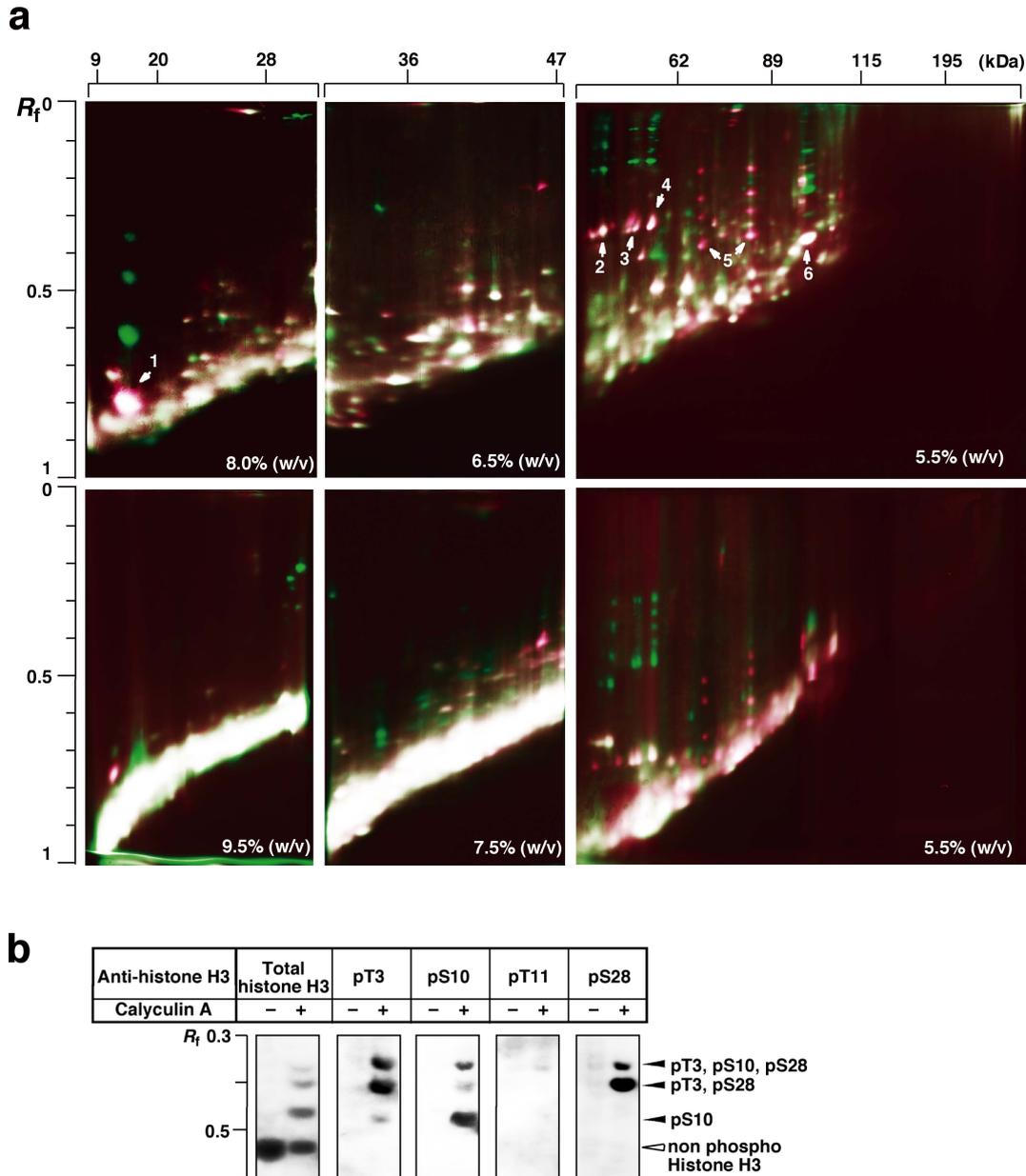


Fig. 8 Phosphate affinity 2-D DIGE analysis of cellular proteins

(a) A mixture of HeLa lysate (50 μ g proteins) labeled with Cy3 and lysate from calyculin A-treated HeLa cells (50 μ g proteins) labeled with Cy5 was subjected to normal SDS-PAGE [8–12 % (w/v) gradient polyacrylamide gel] as the first dimension. The separated sample lane was cut into three parts corresponding to 10–30 kDa, 30–50 kDa, and 50–200 kDa, and then subjected to Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE (50 μ M Zn^{2+} -Phos-tag) as the second dimension. The upper and lower panels are differential migration images of 2-DE Phos-tag gels with buffering by Bis-Tris-HCl and Tris-AcOH, respectively. Apparent molecular weights, measured in 1-DE gel by using colored markers, are indicated at the top of the panels. (b) Phosphorylation profiling of histone H3 using Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE with the Bis-Tris-HCl system followed by immunoblotting analysis. HeLa whole lysate (–, 10 μ g proteins) and calyculin A-treated cell lysate (+, 10 μ g proteins) were subjected to Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE [12 % (w/v) polyacrylamide containing 25 μ M Zn^{2+} -Phos-tag]. The R_f value of 1.0 is defined as the position of the BPB dye. Reprinted with permission from Ref. 11 © (2012) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

た (Fig. 9b). 活性型 Erk1/2 に対する抗体である抗リン酸化 Erk1/2 (pT202/pY204) 抗体によって, Bis-Tris-HCl 系では一番上, Tris-AcOH 系では上から二番目のバンドが活性型であることが分かった. 活性型 Erk1/2 は 2~10 分で最大に達する. 活性型以外の二本のバンドは, Thr-202 と

Tyr-204 のそれぞれのリン酸化を認識する抗リン酸化抗体によってそのリン酸化部位を同定した. Bis-Tris-HCl 系では上から二番目のバンドが Tyr-204, 一番下のバンドが Thr-202 を含むモノリン酸化フォームであることが分かった (Fig. 9c 左). 一方, Tris-AcOH 系では, 一番上のバン

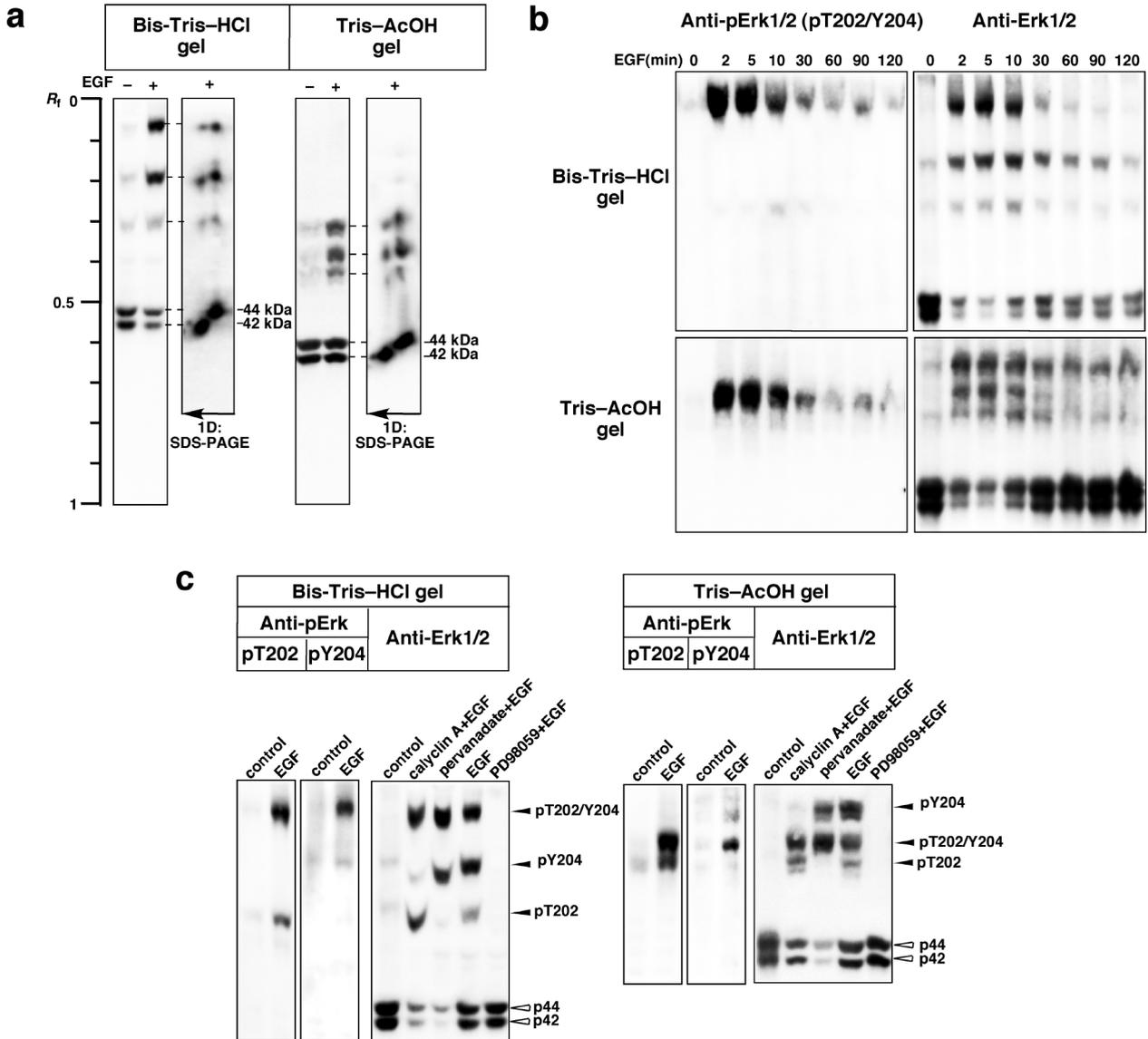


Fig. 9 Comparison of mobility of phosphorylated Erk between the Bis-Tris-HCl buffer system and Tris-AcOH buffer system

(a) A431 whole lysate (–, 10 μ g proteins) and lysate from EGF-stimulated cells (+, 10 μ g proteins) were subjected to Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE [8.0% (w/v) polyacrylamide containing 25 μ M Zn^{2+} -Phos-tag] with buffering by Bis-Tris-HCl or Tris-AcOH. The gels were analyzed by Western blotting with an anti-Erk1/2 antibody. The lysate from the EGF-stimulated cells (10 μ g proteins) was analyzed by 2-DE consisting of normal SDS-PAGE [8.0% (w/v) polyacrylamide] as the first dimension and Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE [8.0% (w/v) polyacrylamide containing 25 μ M Zn^{2+} -Phos-tag] as the second dimension. The R_f value of 1.0 is defined as the position of the BPB dye. (b) The time-course of phosphorylation of Erk1/2 after stimulation with EGF (250 ng/mL) was analyzed by Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE [8.0% (w/v) polyacrylamide containing 25 μ M Zn^{2+} -Phos-tag] with buffering by Bis-Tris-HCl or Tris-AcOH. Each lane contains 10 μ g of proteins. The gels were analyzed by Western blotting with an anti-pT202/Y204 antibody, and then the same blot was re-probed with the anti-Erk1/2 antibody. (c) A431 whole lysate (control, 10 μ g proteins) and lysate from EGF-stimulated cells (10 μ g proteins, 250 ng/mL of EGF for 5 min) were subjected to Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE [8.0% (w/v) polyacrylamide containing 25 μ M Zn^{2+} -Phos-tag] with buffering by Bis-Tris-HCl or Tris-AcOH, followed by immunoblotting with an anti-pT202 antibody or an anti-pY204 antibody (left and center panels, respectively, in both systems). Lysates from EGF-stimulated cells (10 μ g proteins, 250 ng/mL of EGF for 5 min) pretreated with calyculin A (100 nM, 30 min), pervanadate (1.0 mM, 30 min), or PD98059 (100 μ M, 60 min) were similarly analyzed with the anti-Erk1/2 antibody (right panels in the both systems). Reprinted with permission from Ref. 11 © (2012) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

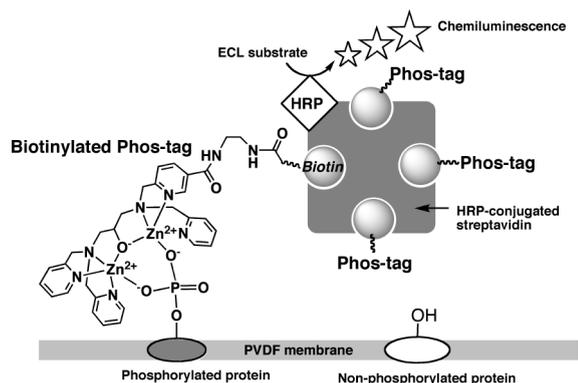


Fig. 10 Schematic representation of ECL detection of phosphorylated proteins on PVDF membrane by using biotinylated Phos-tag

The protein-blotting PVDF membrane was probed with the complex of the biotinylated Phos-tag and HRP-conjugated streptavidin, and then the Phos-tag-bound phosphorylated proteins were detected by an ECL system.

ドが Tyr-204, 一番下のバンドが Thr-202 を含むモノリン酸化フォームであった (Fig. 9c 右)。二つのゲルバッファー系において, Erk のリン酸化部位と移動度の関係が一致しないことは, Zn^{2+} -Phos-tag とリン酸化タンパク質の結合がゲル pH 以外の要因 (バッファーの種類, leading ion や trailing ion) の影響を受けることを示唆している。

観察されたモノリン酸化フォームの Erk1/2 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る。なぜなら, MEK は Erk1/2 の活性化過程において Thr-202 と Tyr-204 を同時にリン酸化するという反応機構 (プロセシブモード) が提唱されているからである³⁴⁾。リン酸化 Erk1/2 に対するフォスファターゼは 10 種以上が報告されているが³⁵⁾, Tyr フォスファターゼ阻害剤である pervanadate, あるいは Ser/Thr フォスファターゼ阻害剤である calyculin A の存在下で EGF 刺激を与えたところ, 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 (Fig. 9c)。このことから, モノリン酸化フォームの Erk1/2 は, フォ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る。なお, MEK の阻害剤である PD98059³⁶⁾ の存在下では, いずれのリン酸化 Erk1/2 のバンドも検出されないことから, これらは MEK 依存的なリン酸化フォームであることも証明された。このように, 本法を用いることで連続的に進行するキナーゼ/フォスファターゼ反応を一枚のゲルで詳細に分析することができる。

3 ビオチン化 Phos-tag によるリン酸化タンパク質の検出

3.1 概要

リン酸化タンパク質の研究において抗リン酸化抗体は欠かせないツールといえるだろう。網羅的なリン酸化タンパク質の解析にあたっては, 抗リン酸化チロシン抗体の pY20 や 4G10 クローンなどの優れたモノクローナル抗体が販売されている。しかしながら, セリンやスレオニン残基がリン酸化されたタンパク質を一網打尽に解析するための抗体に関しては, 特異性や感度について満足できない場合が多い。一方, Phos-tag はチロシン, セリン, スレオニンのいずれのリン酸基にもほとんど同じ親和性を持ち, 小分子であるため抗体よりもリン酸化部位の周囲の構造に影響されにくい利点を有す。著者らは, Phos-tag を抗体に替わる網羅的リン酸化タンパク質解析ツールとしてビオチン化 Phos-tag を開発した。

ビオチン化 Phos-tag は, ウェスタンブロット膜である PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜上のリン酸化タンパク質を特異的に検出できる分子である。この検出法の概要を Fig. 10 に示す。ビオチン化 Phos-tag を, あらかじめ市販品の HRP (horseradish peroxidase, 西洋ワサビペルオキシダーゼ) 結合ストレプトアビジンと 4:1 の複合体を形成させておき, PVDF 膜をプロービングする。膜上のリン酸化タンパク質と特異的に結合したビオチン化 Phos-tag は, 市販の化学発光基質 (GE ヘルスケア社の ECL キットなど) と HRP の反応によって検出される。これは, 一般的なウェスタン解析法に準じたものであり, 使用するバッファー, 試薬などは特別なものではなく, 抗体をビオチン化 Phos-tag に替えただけの簡便な方法である。また, 通常ウェスタン解析では, PVDF 膜と抗体の非特異的な結合を防止する目的でブロッキング操作を行うが, この方法はそれを必要としない。さらに二次抗体によるプロービングの段階が不要であるので時間と手間を節約できる。

3.2 *In vitro* キナーゼ・フォスファターゼ反応の解析⁹⁾

タンパク質のリン酸化及び脱リン酸化反応を検出するためのウェスタン解析にビオチン化 Phos-tag を応用した例を Fig. 11 に示す。サンプルは, Abl の基質である Abltide-GST で, この基質中のチロシンがリン酸化・脱リン酸化される様子を Phos-tag によって視覚化した。キナーゼ及びフォスファターゼはリコンビナントの Abl と TC-PTP (T-cell protein tyrosine phosphatase) をそれぞれ用いた。上段のプロットが Phos-tag で検出したもので, 基質が時間経過に伴って, リン酸化・脱リン酸化されている様子が分かる。これらの反応は, 既存の方法である抗リン酸化チロシン抗体 (Anti-pTyr) を用いた解析によっても, 確認することができた (下段)。

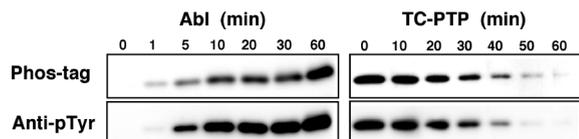


Fig. 11 Western blotting analysis of *in vitro* kinase and phosphatase reactions

Abltide-GST (0.13 μ g protein/lane) was incubated with a tyrosine kinase, Abl (left panels), and the phosphorylated Abltide-GST (50 ng proteins/lane) was incubated with a tyrosine phosphatase, TC-PTP (right panels). The incubation time is shown above each lane. The protein-blotting PVDF membranes were probed with biotinylated Phos-tag (upper panels), and then the same membranes were reprobed with the anti-pTyr antibody (bottom panels). Reprinted with permission from Ref. 9 © (2006) The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

3・3 細胞内タンパク質のリン酸化状態の解析⁹⁾

次に、A431細胞抽出液のリン酸化タンパク質の解析をFig. 12に示す。Fig. 12aのSDS-PAGEの各レーンには、分子量マーカー(M)、EGF刺激前後の細胞抽出液、EGF刺激後の細胞抽出液をAPで処理したものを左のレーンから順にアプライした。市販のタンパク質蛍光ゲル染色剤であるSYPRO Rubyとリン酸化タンパク質特異的蛍光ゲル染色剤であるPro-Q Diamondを用いたゲル染色の結果、SYPRO Rubyによる総タンパク質のゲル染色(a)から各レーンのタンパク質量が等しいことが分かり、Pro-Q Diamondによるリン酸化タンパク質のゲル染色(b)で、細胞のリン酸化状態が変化していることが各レーンの染色度合いから推測できた。一方、ビオチン化Phos-tagによる検出(c)では、分子量マーカーの卵白アルブミンが特異的に染色されており、またリン酸化状態の変化がPro-Q Diamondよりもはっきりと観察できる。このようにEGF刺激によってECL (enhanced chemiluminescence) シグナルが増加し、AP処理によって著しく減少することから、Phos-tagによって検出されたタンパク質はリン酸化タンパク質であるといえる。Pro-Q Diamondによる染色像とビオチン化Phos-tagによる検出像を比較すると、観察されるタンパク質バンドの位置や濃度が異なることが分かる。その理由としては、各タンパク質に対するPro-Q DiamondとPhos-tagの親和性や選択性の違いなどが考えられる。特に、Pro-Q Diamondは、リン酸化の有無にかかわらず酸性タンパク質に対して強い染色性を示し、逆に、リン酸化されているにもかかわらずアルカリ性タンパク質に対しては染色性が弱い⁴⁰⁾。ビオチン化Phos-tagと複合体を形成していないHRP-ストレプトアビジンのみ(d)では、いくつかのバンドが検出されるが、ビオチン含有タンパク質の存在や非特異的な結合によるものと考えられる。複合体形成の

際に過剰のビオチン化Phos-tagをHRP-ストレプトアビジンと混合することによって、これらの偽陽性バンドの検出を抑止することができる(ただし、複合体形成後には、加えた過剰のビオチン化Phos-tagを遠心過剰ユニット等で排除する必要がある)。また、ビオチン化Phos-tagとHRP-ストレプトアビジンの複合体をプロービングで使用する際に重鉛のキレート剤であるEDTAを共存させると、全くシグナルが観察されなくなる(e)。この結果は、ビオチン化Phos-tagが重鉛錯体として機能していることを示している。ビオチン化Phos-tagによって明瞭に検出された細胞内タンパク質のリン酸化状態の変化は、抗リン酸化チロシン抗体(f, Anti-pTyr)や抗リン酸化セリン抗体(g, Anti-pSer)によっても確認された。

さらに、EGF刺激前後のA431細胞抽出液を二次元電気泳動した後に、PVDF膜に転写してビオチン化Phos-tagによるリン酸化タンパク質の変動の解析を行った結果がFig. 12h, iである。刺激後には検出されるスポットの数が顕著に増加していることが分かる。同じプロット膜を抗リン酸化チロシン抗体、及び抗リン酸化セリン抗体でリプロービングした図がそれぞれjとkである。Fig. 12iの図中の破線の部分を拡大し、ビオチン化Phos-tagによる検出像とそれぞれの抗体による検出像を重ね合わせた像がそれぞれlとmである。Phos-tagによって検出されたスポットを緑、それぞれの抗体によって検出されたスポットをピンク、両者の重なったスポットを白で表示したところ、多くの重なるスポットが確認できた。重ならないスポットもあることについては、各タンパク質に対する抗体とPhos-tagの親和性の違いや、抗体の非特異的結合及び認識部位周囲のアミノ酸配列に起因する各タンパク質への親和性の違いなどが原因として考えられる。このことは、Phos-tagによる解析と抗体による解析を行うことで、どちらか一方のみの解析から得られる情報よりも多くの情報を得られる可能性があることを示している。

4 Phos-tagを用いたリン酸基親和性クロマトグラフィー

4・1 概要

生体内に存在するリン酸化タンパク質は、ダイナミックに変化するキナーゼ/フォスファターゼ反応によって刻一刻とリン酸化と脱リン酸化を繰り返しており、実際にリン酸化状態にあるのは極微量である可能性が高い。そのようなリン酸化タンパク質を研究する上で、リン酸化タンパク質を生体内の環境に近い条件で分離、濃縮することは非常に有効な手法である。著者らは生理的pHでリン酸基を捕捉するというPhos-tagの特性を利用したリン酸基親和性クロマトグラフィー担体、Phos-tagアガロース^{37)~39)}とPhos-tagトヨパール⁴⁰⁾を合成し、リン酸化タンパク質の分離・

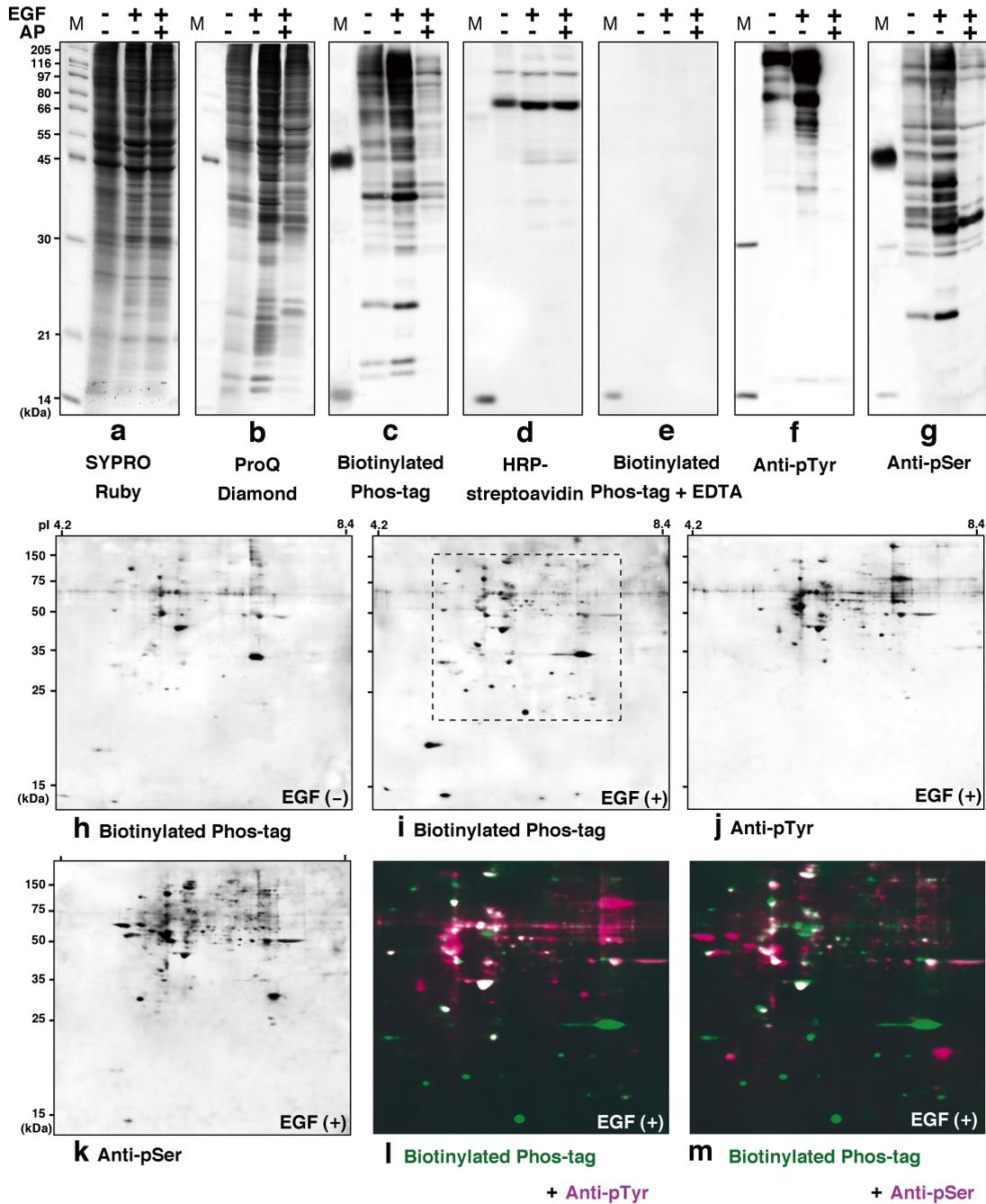


Fig. 12 Comparison of different detection methods for 1-D SDS-PAGE (a-g) and 2-D IEF/SDS-PAGE (h-m) of A431 cell lysate

(a) Fluorescent gel staining with SYPRO Ruby (*i.e.*, staining of all proteins). (b) Fluorescent gel staining with Pro-Q Diamond (*i.e.*, staining of the phosphorylated protein). (c) ECL detection using the complex of the biotinylated Phos-tag and HRP-streptavidin. (d) ECL detection using the HRP-streptavidin only. (e) ECL detection using a complex of the biotinylated Phos-tag ligand and HRP-streptavidin in the presence of 1 mM EDTA. (f) ECL detection using the anti-pTyr antibody. (g) ECL detection using an anti-pSer antibody. Each lane (a-g) contains 7.5 μ g protein of the A431 cell lysate before (lane 1) and after (lane 2) EGF stimulation or 7.5 μ g protein of the AP-treated lysate of EGF-stimulated A431 cells (lane 3). The molecular weight standards [MW : 205, 116, 97, 80, 66, 55, 45 (ovalbumin), 30, 21, and 14 kDa from the top] are shown in lane M. 2-DE (IEF/SDS-PAGE) analysis followed by ECL detection of the proteins of the A431 cells before (h) and after (i) EGF stimulation (50 μ g proteins) using the complex of the biotinylated Phos-tag and HRP-streptavidin. The blotting membrane was subsequently probed with the anti-pTyr (j) and anti-pSer antibody (k). Superimposed images of the area surrounded with a dotted square in i : (l) using the biotinylated Phos-tag (green) and anti-pTyr antibody (magenta), (m) using the biotinylated Phos-tag (green) and anti-pSer antibody (magenta). Proteins detected by both methods appear as white spots in l and m. Reprinted with permission from Ref. 9 © (2006) The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

濃縮法の開発を行った。これらの担体ではリン酸化ペプチド及びリン酸化タンパク質の分離、濃縮、精製が可能で、その能力や使用方法に差異はほとんどないが、トヨパールは耐圧性に優れたクロマト担体であることから、圧力をかけて送液するクロマト機器への適用に向けたプロトコルを開発中である。本稿では、Phos-tag トヨパールを用いた細胞抽出液中のリン酸化タンパク質の分離・濃縮(4・2項)と、Phos-tag アガロースを用いたウェスタン解析のサンプル前処理を目的としたリン酸化タンパク質の分離法(4・3項)について述べる。

4・2 Phos-tag トヨパールを用いた細胞抽出液中のリン酸化タンパク質の分離・濃縮⁴⁰⁾

培養細胞から調製したタンパク質試料は、様々な性質のタンパク質が含まれるだけでなく、脂質や低分子化合物などの種々の生体成分が混在する。このような複雑な試料からリン酸化タンパク質のみを分離・精製する際の問題点は、目的としない生体分子(特に、非リン酸化タンパク質)がカラムに非特異的に吸着してしまうことと、結合したリン酸化タンパク質が溶出困難なことである。非特異的結合の原因として、亜鉛 Phos-tag 錯体と酸性タンパク質のカルボン酸基との親和性や、アガロース本体とタンパク質の静電的相互作用が考えられる。これに対しては、酢酸ナトリウムを結合バッファーに添加することによって、酢酸イオンによるカルボン酸基との結合阻害及びイオン強度増大による静電的相互作用の緩和の両方の効果を得ることができたため、結合バッファーは 0.10 M Tris-AcOH (pH 7.4) に 0.50 M 酢酸ナトリウムを添加したものに決定した。溶出においては、亜鉛 Phos-tag 錯体とリン酸基の結合を無機リン酸の添加によって競合的に解離させるが、タンパク質サンプルの場合、タンパク質とカラム担体との静電的相互作用を解除するような適切な塩を添加する必要がある。塩化ナトリウムで高い溶出効果が得られたため、溶出バッファーは 0.10 M Tris-AcOH (pH 7.4) に 10 mM のリン酸バッファー (pH 7.4) と 1.0 M の塩化ナトリウムを添加したものに決定した。カラム操作の流れとしては、カラム容器に Phos-tag トヨパールを充填し、結合バッファーでの平衡化、サンプルの添加、非結合物質の結合バッファーによる洗浄、溶出バッファーでの溶出の各ステップを経る。得られた画分は、遠心戸過ユニット等を用いて脱塩・濃縮を行い、電気泳動など次のアプリケーションに用いる。

ここでは、細胞内タンパク質リン酸化反応がよく研究されている EGF 刺激後の A431 細胞の抽出液をサンプルとし、リン酸化タンパク質を分離・濃縮した例を示す (Fig. 13)。EGF 刺激した A431 細胞 (10^7 個、直径 10 cm のシャーレ 1 枚分) を、TBS (Tris-buffered saline) で洗浄後、

0.5 mL の細胞溶解液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M 塩化ナトリウム, 0.25 % デオキシコール酸ナトリウム, 1.0 % (v/v) Nonidet P-40, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 各 1.0 μ g/mL アプロチニン, ロイペプチン, ペプスタチン, 1.0 mM パナジン酸ナトリウム, 1.0 mM フッ化ナトリウム] で溶解し, 2.0 mg/mL のタンパク質濃度の抽出液を 1 mL 調製した。この抽出液のうち, 0.25 mL, 0.50 mg タンパク質を 1 mL の Phos-tag トヨパール (実質体積) を使用し, オープンカラム法にて分離・精製した。上記の細胞溶解液には, 亜鉛 Phos-tag 錯体とリン酸基の結合を阻害する可能性のある試薬 (EDTA, 陰イオン性界面活性剤, パナジン酸等) が含まれる場合が多いが, 細胞抽出液に対して 4 倍量の結合バッファーを試料に混合することで, 本実験で使用した試薬の有意な影響は確認されなかった。最終的に, 1 mL の Phos-tag トヨパールカラムには計 1.25 mL の試料溶液を添加した。リン酸化タンパク質の濃縮効果は, 分離前の細胞抽出液 (レーン 1), 分離後の溶出画分 (レーン 2), 及び素通り・洗浄画分 (レーン 3) のそれぞれを, 1 レーン当たり 6.0 μ g のタンパク質量に調製して SDS-PAGE し, 様々な細胞内リン酸化タンパク質に対する抗体を用いたウェスタン解析によって検証した。CBB (Coomassie Brilliant Blue-R250) 染色像 (a) では, これら三つの画分はバンドパターンが異なり, それぞれに異なる種類や濃度のタンパク質が存在することが示された。また, ビオチン化 Phos-tag (b, 3 項参照) と抗リン酸化セリン抗体 (c) による解析で, 多くの細胞内リン酸化タンパク質が溶出画分に濃縮されたことが確認できた。さらに, EGF 刺激によってリン酸化されるタンパク質に対する 4 種の抗リン酸化抗体による解析では, それぞれが溶出画分に明瞭なバンドとして検出された (d-g)。

4・3 リン酸化タンパク質のウェスタン解析のためのサンプル前処理法³⁹⁾

前項では Phos-tag トヨパールを用いたリン酸化タンパク質の分離・濃縮について述べたが, 著者らはこれまでに Phos-tag アガロースを使用した同様の実験例も報告しているので, それについては, 文献 37, 38 を参照していただければ幸いである。ここでは, Phos-tag アガロースのさらなる適用法として, 抗リン酸化抗体によるイムノプロットの特異的シグナルを増感させるための, 細胞抽出液の前処理カラムとしての利用法を紹介する。特定のタンパク質の細胞内でのリン酸化状態を抗リン酸化抗体によるイムノプロットで解析しようとするとき, 様々なタンパク質が混在する試料においては, 目的バンドのシグナルが微弱であったり, 非特異的なシグナルが多かったりして, 目的タンパク質のリン酸化状態が判断できないという

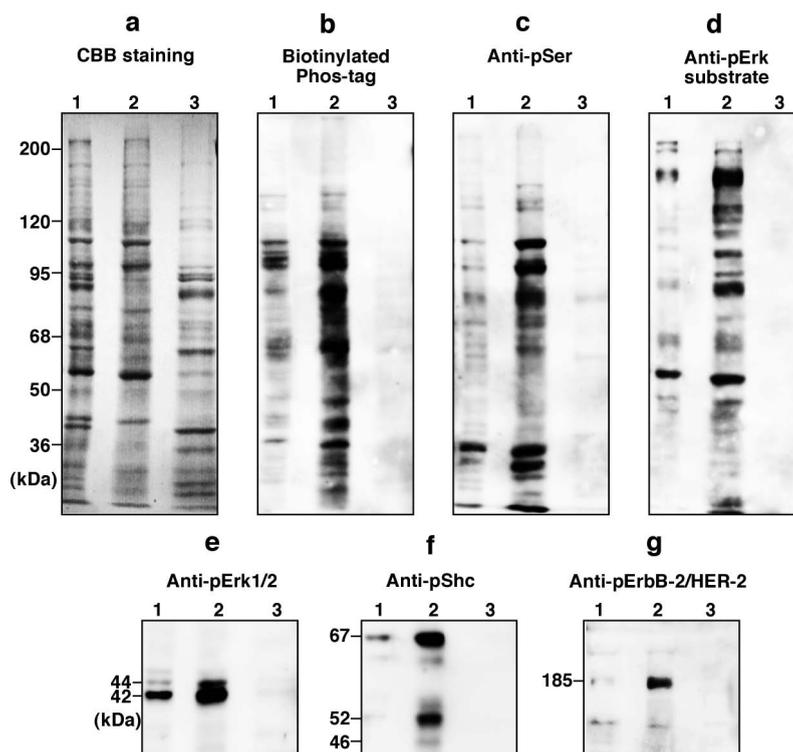


Fig. 13 Comparisons of the relative amounts of phosphoproteins from an EGF-stimulated A431 cell lysate before and after phosphate affinity chromatography

The EGF-stimulated A431 cell lysate before loading on the column (lane 1), the eluting fraction (lane 2), and flowthrough/washing fraction (lane 3) were subjected to SDS-PAGE. Each lane contains 6 μ g proteins. The proteins in SDS-PAGE gels were electrotransferred to PVDF membranes, and visualized by CBB staining (a), and Western blotting with biotinylated Phos-tag (b), anti-pSer (c), anti-pErk substrate (PTXT) antibody (d), anti-pErk1/2 (e), anti-pShc (f), and anti-pErbB-2/HER-2 (g) antibodies. Reprinted with permission from Ref. 40 © (2011) Proteomass 2010.

トラブルに多々遭遇する。抗体は、タンパク質研究にとってとても有用なツールであり、高価な試薬でもある。ゆえに、それを用いてできる限りの正確なデータを得ることが望まれる。細胞からの試料調製法を変える、あるいはイムノプロットティングにおけるブロッキング剤を変えることによって、結果が改善することもあるため、条件検討に時間を費やすことも有意義ではある。一方、リン酸化タンパク質のイムノプロットティングにおいては、リン酸化タンパク質だけを Phos-tag アガロースで分取した試料を用いることにより劇的な結果の改善が見られる。ここでは、マイクロチューブを使って作製できる簡易的なスピнкаラムを用い、Phos-tag アガロースで細胞抽出液を前処理する方法について述べる。

Phos-tag アガロースはサンプル量や解析の目的に応じて、スピнкаラム法 (スモールスケール) とオープンカラム法 (比較的大量のサンプル量に対応) を選択できる。イムノプロットティングに用いる細胞抽出液などの試料は、

SDS-PAGE のサンプルウエルにアプライする量、すなわち 10~50 μ g の総タンパク質量、10~20 μ L の容量と、カラム操作に供するタンパク質試料としては微量である。したがって、本法では、0.5 mL と 1.5 mL のマイクロチューブを組み合わせることで少容量の簡易スピнкаラムを作製し、20 μ L の Phos-tag アガロース (保存液に懸濁した担体の容量では 40 μ L) を充填する。簡易スピнкаラム作製、操作の流れの概略を、Fig. 14 に示した。

まず、0.5 mL のチューブの底に、注射針 (21G) で Phos-tag アガロースが漏れない程度の小さな穴をあける。それを、フタを切り落とした 1.5 mL のチューブに重ね、簡易スピнкаラムとする。0.5 mL のチューブに 40 μ L の Phos-tag アガロースを入れ、卓上遠心機でスピンドウン (2000 g, 20 秒) し、1.5 mL のチューブに落ちた保存液は捨てる。次に結合バッファーによる平衡化、20 μ g のタンパク質を含む 10 μ L の細胞抽出液の添加、結合バッファーによるカラム洗浄を行う。結合バッファーと細胞溶解液の各組成は、

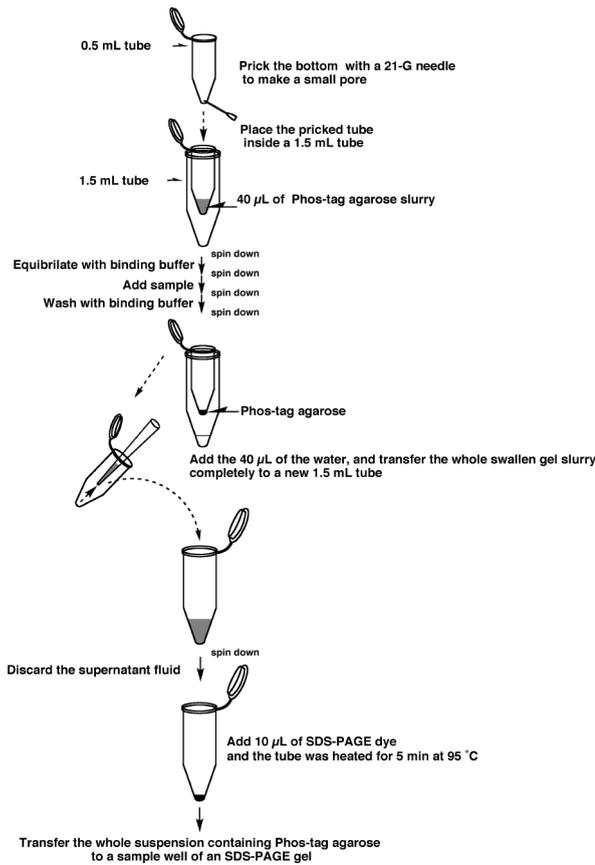


Fig. 14 Scheme of Phos-tag agarose spin column methods for purification of phosphoproteins in cellular extract

Reprinted with permission from Ref. 39 © (2009) Elsevier Inc.

Phos-tag トヨパールの項に記載したものとほぼ同じであるが、結合バッファの酢酸ナトリウムの濃度が 1.0 M である点が異なる。この時点で、Phos-tag アガロースにはリン酸化タンパク質が結合しているが、結合したタンパク質をロスなくすべてイムノプロットングに使用するために、Phos-tag アガロースごとすべてを SDS-PAGE にアプライする。そのために必要なステップとして、まず 0.5 mL のチューブにある Phos-tag アガロースビーズのすべてを蒸留水で十分に懸濁（ピペッティング）して新しいチューブに移し、それをスピンドウンして蒸留水を捨てる。この操作によって、結合バッファに含まれていた酢酸ナトリウムが排除され、SDS-PAGE の泳動の乱れが軽減される。Phos-tag アガロースに結合したリン酸化タンパク質が水に溶出することはない。次に、10 µL の SDS-PAGE 用のサンプルバッファを添加して、95 °C、5 分間の熱処理を行い、Phos-tag アガロースを含む全量を SDS-PAGE のサンプルウェルにアプライする。Phos-tag アガロースが残存するようであれば、適宜サンプルバッファを追加して全量アプライする。

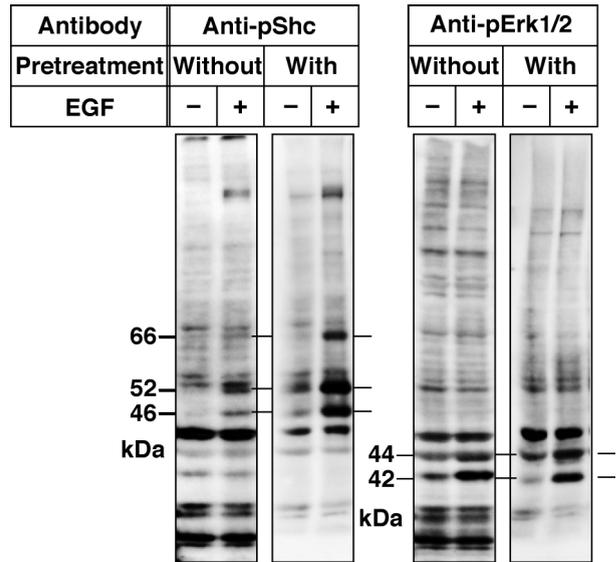


Fig. 15 Evaluation of the utility of the pretreatment procedure using Phos-tag agarose for immunoblotting. The A431 cell lysates (20 µg proteins) with or without pretreatment using Phos-tag agarose were subjected to SDS-PAGE [8 % (w/v) polyacrylamide] followed by immunoblotting with an anti-pShc (pY317) antibody or an anti-pErk1/2 (pT202/pY204) antibody. The A431 cells (10^7 cells) were stimulated with 0 ng/mL (-) or 50 ng/mL (+) EGF for 5 min and lysed in an RIPA buffer. The concentration of the solubilized proteins was adjusted to 2.0 mg/mL. The positions of three Shc isoforms (66, 52, and 46 kDa) and two Erk isoforms (44 and 42 kDa) were independently determined by using an anti-Shc antibody and an anti-Erk1/2 antibody, respectively. Reprinted with permission from Ref. 39 © (2009) Elsevier Inc.

Fig. 15 に、Phos-tag アガロース簡易カラム処理前の抽出液と、処理後の Phos-tag アガロース画分を Shc 及び Erk1/2 の抗リン酸化抗体を用いてイムノプロットングした結果を示す。Phos-tag アガロース未処理の細胞抽出液ではシグナルが弱い、または非特異的シグナルが多いため、Shc 及び Erk1/2 の EGF 刺激によるリン酸化が判断できない。一方、Phos-tag アガロースで前処理した試料は、シグナルが明瞭に検出でき、EGF 刺激によって Shc 及び Erk1/2 のリン酸化量が増加していることが分かる。Phos-tag アガロース簡易カラムによる細胞抽出液の前処理によって、抗リン酸化抗体を用いたリン酸化タンパク質のイムノプロットングの結果が劇的に改善されることを示した。Phos-tag アガロース簡易カラムが、抗リン酸化抗体を用いて、より正確なデータを得たいと望む研究者のための援助ツールになることを期待している。

5 結 言

本研究は、二核金属錯体である Phos-tag とリン酸基の溶

液内相互作用を化学的に追求し、その成果を実用的な技術へ応用展開させたものである。その例として、ここでは、既に実用化に成功した三種類の Phos-tag 誘導体を用いたリン酸化タンパク質研究法を紹介した。

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フォーム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 Bis-Tris-HCl ゲルや Tris-AcOH ゲルの SDS-PAGE システムに適用することによって、今までに分離・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。解析できるタンパク質の数は飛躍的に増加し、研究対象のタンパク質の多くをカバーできるであろう。また、 Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE ではタンパク質のリン酸化状態（複数のリン酸化フォーム）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。そうして得られた泳動像は、リン酸化状態の存在比率や、その変化を可視化させ、特定のタンパク質で起こっているリン酸化反応を全体的に捉えることができるものである。また、2D-DIGE への応用により、細胞内タンパク質群のリン酸化フォームに関する詳細な網羅的分析も益々発展することが予想される。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/フォスファターゼ依存的なダイナミクスがより詳細に解析されることを期待している。

ビオチン化 Phos-tag を応用した PVDF 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かか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、PVDF 膜は抗体でのリプロービングが可能なので、イムノブロットング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。ごく最近では、新たな改良型のビオチン化 Phos-tag 誘導体の開発も進められており⁴¹⁾、ウェスタン解析だけでなく、ペプチドマイクロアレイを用いた分析など幅広いアプリケーションが生み出されつつある。今後のさらなる進展に期待される。

Phos-tag アガロースや Phos-tag トヨパールを用いたリン酸基親和性クロマトグラフィーは、Phos-tag のリン酸基捕捉条件（生理的 pH での迅速な吸脱着）を活かし、試料の調製からカラムとの結合・溶出までを中性 pH で行うこと、各操作に長時間のインキュベーションを要しないことが特徴である。このようにタンパク質を生理環境に近い条件で迅速に分離・濃縮した試料は、その後続く多様な解析法に適用させることができる。市販されているカラムな

ど、既存のリン酸基親和性クロマトグラフィーではタンパク質を変性させてしまう条件を用いるためにその後適用できる解析法に限られたが、本法はその問題点を補完する技術である。また、この Phos-tag クロマトビーズを用いた簡易カラムによる細胞溶解液の前処理によって、抗リン酸化抗体を用いたリン酸化タンパク質のウェスタンブロットング検出の結果が劇的に改善されることを紹介した。検出に諦めて研究室のフリーザーに埋もれてしまっている高価な抗リン酸化抗体があれば、是非、このサンプル前処理法をお試しいただきたい。

以上のように、著者らの開発した Phos-tag テクノロジーが、リン酸化プロテオミクスを行う世界中の研究者にとって、使いやすく、そして、確かな情報を与えるものとして貢献することを期待してやまない。

文 献

- 1) L. D. Stein : *Nature*, **431**, 915 (2004).
- 2) G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam : *Science*, **298**, 1912 (2002).
- 3) S. A. Johnson, T. Hunter : *Nat. Methods*, **2**, 17 (2005).
- 4) A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, Y. Masterin : *Cell*, **117**, 699 (2004).
- 5) D. Kerk, G. Templeton, G. B. Moorhead : *Plant Physiol.*, **146**, 351 (2008).
- 6) J. Brognard, T. Hunter : *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 4 (2011).
- 7) E. Kinoshita, M. Takahashi, H. Takeda, M. Shiro, T. Koike : *Dalton Trans.*, **2004**, 1189.
- 8) U. K. Laemmli : *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 9) E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, T. Koike : *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 749 (2006).
- 10) E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta : *Proteomics*, **11**, 319 (2011).
- 11) E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike : *Proteomics*, **12**, 192 (2012).
- 12) S. Yamada, H. Nakamura, E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike, Y. Shiro : *Anal. Biochem.*, **360**, 160 (2007).
- 13) E. Kinoshita-Kikuta, Y. Aoki, E. Kinoshita, T. Koike : *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 356 (2007).
- 14) E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, M. Matsubara, S. Yamada, H. Nakamura, Y. Shiro, Y. Aoki, K. Okita, T. Koike : *Proteomics*, **8**, 2994 (2008).
- 15) 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 : *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 1138 (2008).
- 16) E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, M. Matsubara, Y. Aoki, S. Ohie, Y. Mouri, T. Koike : *Electrophoresis*, **30**, 550 (2009).
- 17) E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike : *Curr. Proteomics*, **6**, 104 (2009).
- 18) E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, H. Ujihara, T. Koike : *Proteomics*, **9**, 4098 (2009).
- 19) E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike : *Nat. Protoc.*, **9**, 1513 (2009).

- 20) S. Li, A. D. Couvillon, B. B., Brasher, R. A. Van Etten : *EMBO J.*, **20**, 6793 (2001).
 - 21) E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, T. Koike : *Electrophoresis*, **33**, 849 (2012).
 - 22) N. Kitabatake, A. Ishida, E. Doi : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 967 (1988).
 - 23) J. Lilien, J. Balsamo : *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 459 (2005).
 - 24) A. Kikuchi : *Cancer Sci.*, **94**, 225 (2003).
 - 25) S. Taurin, N. Sandbo, Y. Qin, D. Browning, N. O. Dulin : *J. Biol. Chem.*, **281**, 9971 (2006).
 - 26) D. Fang, D. Hawke, Y. Zheng, Y. Xia, J. Meisenhelder, H. Nika, G. B. Mills, R. Kobayashi, T. Hunter, A. Lu : *J. Biol. Chem.*, **282**, 11221 (2007).
 - 27) P. Sepulveda, J. G. P. Binner : *Chem. Mater.*, **13**, 4065 (2001).
 - 28) M. Cubillos-Rojas, F. Amair-Pinedo, I. Tato, R. Bartrons, F. Ventura, J. L. Rosa : *Electrophoresis*, **31**, 1318 (2010).
 - 29) S. V. Kozlov, M. E. Graham, C. Peng, P. Chen, P. J. Robinson, M. F. Lavin : *EMBO J.*, **25**, 3504 (2006).
 - 30) S. V. Kozlov, M. E. Graham, B. Jakob, F. Tobias, A. W. Kijas, M. Tanuji, P. Chen, P. J. Robinson, G. Taucher-Scholz, K. Suziku, S. So, D. Chen, M. F. Lavin : *J. Biol. Chem.*, **286**, 9107 (2011).
 - 31) T. Kondo, S. Hirohashi : *Nat. Protoc.*, **1**, 2940 (2006).
 - 32) C. M. Crews, A. Alessandrini, R. L. Erikson : *Science*, **258**, 478 (1992).
 - 33) R. Seger, N. G. Ahn, J. Posada, E. S. Munar, A. M. Jensen, J. A. Cooper, M. H. Cobb, E. G. Krebs : *J. Biol. Chem.*, **267**, 14373 (1992).
 - 34) K. Aoki, M. Yamada, K. Kunida, S. Yasuda, M. Matsuda : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 12675 (2011).
 - 35) M. K. Stephen : *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 186 (2000).
 - 36) D. R. Alessi, A. Cuenda, P. Choen, D. T. Dudley, A. R. Saltiel : *J. Biol. Chem.*, **270**, 27489 (1995).
 - 37) E. Kinoshita, A. Yamada, H. Takeda, E. Kinoshita-Kikuta, T. Koike : *J. Sep. Sci.*, **28**, 155 (2005).
 - 38) E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, A. Yamada, M. Endo, T. Koike : *Proteomics*, **6**, 5088 (2006).
 - 39) E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, T. Koike : *Anal. Biochem.*, **389**, 83 (2009).
 - 40) E. Kinoshita-Kikuta, A. Yamada, C. Inoue, E. Kinoshita, T. Koike : *J. Integrated OMICS*, **1**, 157 (2011).
 - 41) E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, Y. Sugiyama, Y. Fukada, T. Ozeki, T. Koike : *Proteomics*, **12**, 932 (2012).
-

Phos-tag Technology for Phosphoproteomics

Eiji KINOSHITA^{®1}, Emiko KINOSHITA-KIKUTA¹ and Tohru KOIKE¹

[®] E-mail : kinoeiji@hiroshima-u.ac.jp

¹ Department of Functional Molecular Science, Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 734-8553

(Received December 7, 2011 ; Accepted April 5, 2012)

Reversible protein phosphorylation is a key signaling mechanism for modulating the functional properties of proteins in various cellular processes. More than 500 protein kinases and more than 100 protein phosphatases are known or predicted in the human proteome alone. The numbers clearly reflect the importance of protein phosphorylation. In fact, abnormal phosphorylation by perturbation of the balance of these enzyme reactions is deeply related to a wide range of human diseases, including cancer, diabetes mellitus, neurodegeneration, and immune/inflammatory disorders. Methods for the determination of the phosphorylation status of a certain protein are thus very important with respect to evaluating the basis for understanding the molecular origins of diseases, and for drug design. Recently, we found that a dinuclear metal complex (Phos-tag) of 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)-amino]propan-2-olato acts as a novel phosphate-binding tag molecule in an aqueous solution under physiological conditions. Phos-tag has a vacancy on two metal ions, which is suitable for the access of a phosphomonoester dianion ($R\text{-OPO}_3^{2-}$) as a bridging ligand. A dinuclear zinc(II) complex (Zn^{2+} -Phos-tag) strongly binds to phenyl phosphate dianion ($K_d = 2.5 \times 10^{-8}$ M) at a neutral pH. The anion selectivity indexes against SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , and the bisphenyl phosphate monoanion at 25 °C are 5.2×10^3 , 1.6×10^4 , 8.0×10^5 , and $> 2 \times 10^6$, respectively. By utilizing the Phos-tag molecule and its derivatives, we developed three major Phos-tag technologies, and put them into practical use for a phosphoproteome study. Herein, we describe convenient and reliable methods for the detection of phosphorylated proteins, such as affinity electrophoresis using Phos-tag acrylamide, Western blotting using biotinylated Phos-tag, and affinity chromatography using Phos-tag agarose or Phos-tag TOYOPEARL.

Keywords : affinity chromatography ; affinity electrophoresis ; phosphoproteomics ; Phos-tag ; Western blotting.