

リン酸基を捕捉する機能性分子を使った リン酸化タンパク質のビジュアル化技術の開発

技術センター 医学部等部門
総合薬学科技術班 木下 恵美子

KINOSHITA Emiko: Phosphate-binding molecules: A new tool to visualize phosphorylated proteins.

1. はじめに

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）は、現在の科学研究の主流を占める分野の一つである。その中でも、細胞の生存に関わる制御機構や病気の発症に関わるリン酸化タンパク質は、プロテオミクスの格好の標的分子である。リン酸化タンパク質に関連するプロテオーム（リン酸化プロテオーム）には、生体内リン酸化タンパク質の全貌を網羅的に解析する技術が必要である。従来の網羅的なリン酸化タンパク質の解析法は、主に以下の二種類が挙げられる。一つは、放射性同位体の ^{32}P でラベルしたリン酸化タンパク質を電気泳動で分離して、オートラジオグラフィーで検出したり、クロマトグラフィーで分離して、放射活性を測定したりする方法である。この方法は、チロシン、セリン、スレオニンのいずれのリン酸化タンパク質も好感度で検出することができるが、管理区域内で研究しなければならないという問題がある。もう一つは、リン酸化アミノ酸残基に特異的な抗体を用いて、ウエスタン解析を行う方法である。これは、チロシンリン酸化タンパク質に関しては信頼性の高い情報を得ることができるが、抗リン酸化セリン、抗リン酸化スレオニンタンパク質抗体は、特異性や感度が劣るといえる問題がある。

今回、私達の研究グループで開発した、リン酸基を捕捉する機能性分子、フォスタグ（Phos-tag）を利用した、リン酸化タンパク質解析技術を報告する¹⁾。これは PVDF 膜上に転写したリン酸化タンパク質を化学発光法で検出するウエスタン解

析技術に準じたものであり、チロシン、セリン、スレオニンの全てのリン酸化タンパク質を好感度でかつ網羅的に検出できる方法である。

2. リン酸基を捕捉する機能性分子、 フォスタグ (Phos-tag)



図1 Phos-tag とリン酸モノエステルイオンの結合

フォスタグは、亜鉛イオン (Zn^{2+}) を2つ持つ錯体化合物であり、水溶液中においてリン酸モノエステルイオン (R-OPO_3^{2-}) を選択的に捕捉する (図1)²⁾。リン酸モノエステルイオンとの K_d 値は 10^{-8} M 以下であり、硫酸イオン、酢酸イオン、塩化物イオンなどの陰イオンに比べ、それぞれ、5,000 倍、16,000 倍、800,000 倍以上の高い特異的親和性を示す。

3. ビオチン化フォスタグを用いた PVDF 膜上のリン酸化タンパク質の検出法

フォスタグにビオチン分子を結合させたビオチン化フォスタグは、PVDF 膜上にプロットした

リン酸化タンパク質を特異的に検出することができる分子である。この方法の原理を図2に示す。ビオチン化フォスタグを、予め市販品の HRP (西洋わさびペルオキシダーゼ) 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、ブロット膜とプロービングする。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フォスタグは、そのあとに続く HRP と ECL 基質 (市販のキット) との反応による化学発光を CCD カメラで撮影 (またはフィルムへの感光) することによって検出される。これは、一般的なウエスタン解析法、すなわち電気泳動 (SDS-PAGE) で分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、膜上で特定のタンパク質を抗体によって検出する方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、抗体をビオチン化フォスタグに替えただけの簡便な方法である。また、通常ウエスタン解析では、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せず、時間と手間の節約がはかれる。

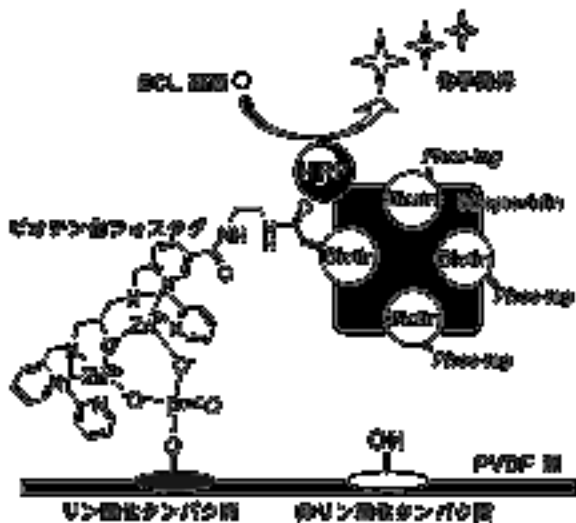


図2 ビオチン化フォスタグによる PVDF 膜上のリン酸化タンパク質の検出法の原理

この方法で、リン酸化タンパク質としてよく知られているカゼイン、卵白アルブミン、ペプシンを検出した例を図3に示す。各タンパク質は 250 - 8 ng をそれぞれ PVDF 膜にドットブロット

した。比較のため、非リン酸化タンパク質の牛血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、炭酸脱水素酵素、 α -ガラクトシダーゼ、また上記のリン酸化タンパク質をアルカリフォファターゼ処理によってリン酸基を除去したものもブロットした。化学発光シグナル、すなわち黒い像として検出されたのは、リン酸化タンパク質だけであり、脱リン酸化処理したものはシグナルが完全に消失した。また、タンパク質によって、シグナルの強さは異なるが、数 ng の量を検出することができた。検出限界については、使用する ECL 基質の違いなどに依存するので、さらに高感度で検出することも可能である。

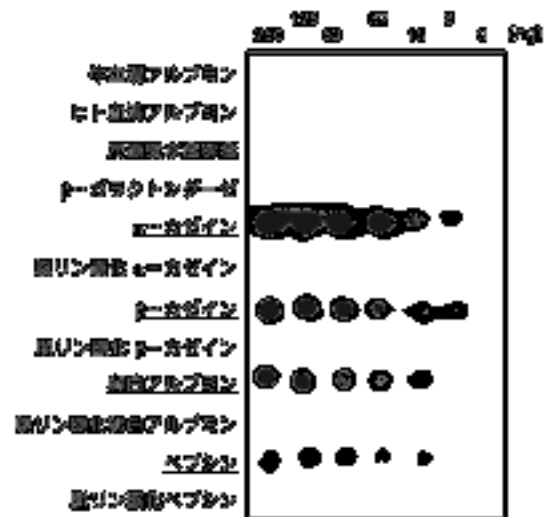


図3 ビオチン化フォスタグによる PVDF 膜上のリン酸化タンパク質の特異的検出

(文献 1, Fig. 2 より転載)

次に、タンパク質のリン酸化および脱リン酸化反応を検出するためのウエスタン解析にフォスタグを応用した例を図4に示す。サンプルは、チロシンキナーゼである Abl の基質となるペプチドと GST の融合タンパク質で、このペプチドのチロシンがリン酸化・脱リン酸化される様子をフォスタグによって視覚化した。キナーゼは Abl を用い、フォスファターゼはチロシン脱リン酸化酵素 TC-PTP を用いた。上段のブロットがフォスタグで検出したもので、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わかる。

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) を用いたイムノブロッティングによっても、確認することができた。

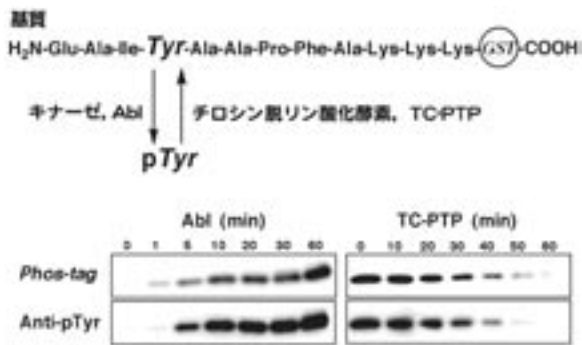


図4 タンパク質のリン酸化, 脱リン酸化反応の視覚化
(文献1, Fig. 2より転載)

次に、細胞抽出液におけるリン酸化タンパク質のウエスタン解析を図5に示す。サンプルは、EGF刺激後のリン酸化シグナルがよく研究されている A431 細胞を用いた。SDS-PAGE の各レーンには、分子量マーカー (レーン 1)、EGF 刺激前及び刺激後の細胞抽出液 (レーン 2 および 3)、EGF 刺激後の細胞抽出液をアルカリフォスファターゼ処理したもの

で処理したもの (レーン 4) をアプライした。左の二つの図は1枚のゲルを 2種類の蛍光染色剤によって染色したもので、SYPRO Ruby によるトータルタンパク質のゲル染色から各レーンのタンパク質量が等しいことがわかり、Pro-Q Diamondによるリン酸化タンパク質のゲル染色で、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る。真ん中の PVDF 膜にエレクトロブロットしたタンパク質をフォスタグで検出したものは、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 刺激によって化学発光シグナルが増加し、アルカリフォスファターゼ処理によって著しく減少することから、検出されているタンパク質はリン酸化タンパク質であると言える。右の二つの図は抗リン酸化チロシン抗体と抗リン酸化セリン抗体 (Anti-pSer) を用いてそれぞれ検出したもので、これら両者のイムノブロッティングの結果からも、リン酸化状態の変化という点で、フォスタグによる検出結果が矛盾しないことが確認できた。

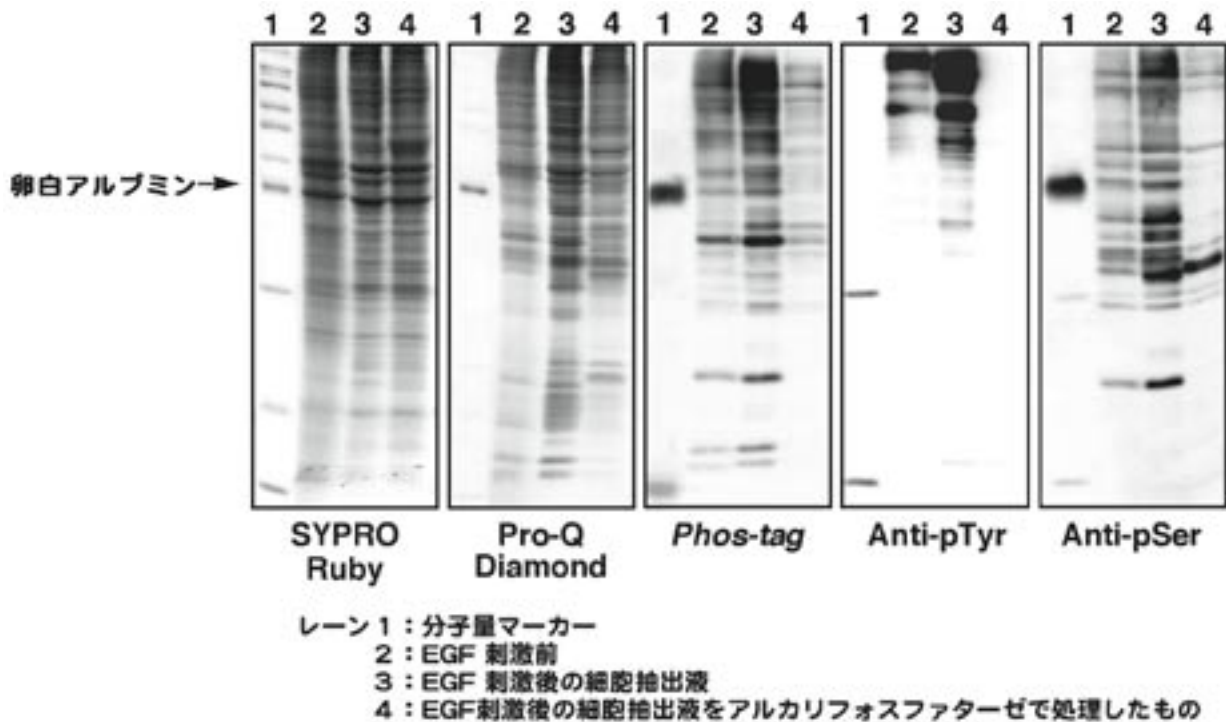


図5 A431 細胞の EGF 刺激による細胞内タンパク質のリン酸化状態の変化の検出 (文献1, Fig. 3より転載)

さらに、EGF 刺激後の細胞抽出液を 2 次元電気泳動した後に、エレクトロブロットティングしてリン酸化タンパク質の解析を行った結果を図 6 に示す。上の図がフォスタグでプロービングしたもので、図中の破線の部分を拡大し、抗リン酸化チロシン抗体、および抗リン酸化セリン抗体でリプロービングした像と重ね合わせたのがそれぞれ下の 2 つの図である。フォスタグによって検出されたスポットは赤、それぞれの抗体によって

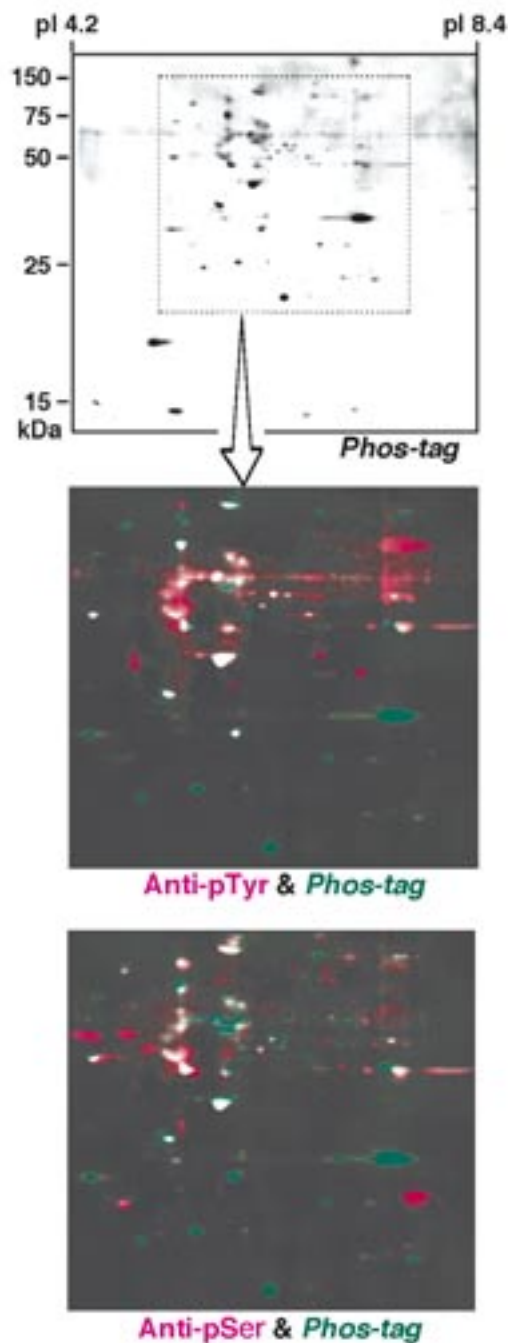


図 6 二次元展開による EGF 刺激後の A431 細胞の細胞内リン酸化タンパク質の解析 (文献 1, Fig. 3 より転載)

検出されたスポットは赤、両者が重なったスポットは白く見え、重なるスポットが多く観察された。一致しないスポットもあることについては、原因として各タンパク質に対する抗体とフォスタグの親和性の違いや、抗体の非特異的結合及び認識部位周辺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考えられる。この 2 次元電気泳動後の解析結果から、抗体とフォスタグを併用してリン酸化タンパク質を解析することによって、より多くの情報が得られることがわかった。

4. まとめ

PVDF 膜上でのリン酸化タンパク質の解析にビオチン化フォスタグを応用した結果、リン酸化タンパク質を高感度に検出できることがわかった。放射性同位元素や抗体を利用した従来の方法と比べた利点は、管理区域で実験をする必要がないこと、通常のコムキャスト解析の操作に準じていて特別な試薬を必要としないこと、PVDF 膜のブロッキング操作を必要としないこと、フォスタグの結合がアミノ酸あるいはその配列とは非依存的であるので、抗体のみでは得られなかった網羅的なリン酸化タンパク質の情報を得られる可能性があることなどが挙げられる。以上のことから、フォスタグを用いた技術が今後のリン酸化プロテオーム研究に大きく貢献することが期待できる。

参考文献

- 1) E. Kinoshita, E. K-Kinoshita, K. Takiyama, and T. Koike (2006) *Mol. Cell. Proteomics* 5, 749-757
- 2) E. Kinoshita, M. Takahashi, H. Takeda, M. Shiro, and T. Koike (2004) *Dalton Transactions*, 1189-1193

謝辞

この研究は広島大学大学院医歯薬学総合研究科創薬科学講座 小池 透 教授、木下英司 助教授のご指導のもとに行ったものであることを銘記し、心より感謝いたします。