

## Phos-tag 親和電気泳動法の開発

木下英司

(広島大学 大学院医歯薬学総合研究科 医薬分子機能科学研究室)

**はじめに：** 現在、生体内のタンパク質リン酸解析法の主流は、抗リン酸化抗体を用いて標的タンパク質のリン酸化の有無を検出する種々の手法である。抗体は生体試料中に存在する微量なタンパク質を検出できる優れたツールである。しかし、抗リン酸化抗体に関しては市販品がない、製造工程が複雑で入手までに時間と経費が掛かる、入手できたとしても特異性や感度が劣るなどといった問題に遭遇する。また、特定の部位に特異性を示す 1 種類の部位特異的な抗リン酸化抗体を用いても、標的タンパク質が複数部位にわたってリン酸化されている場合、分子全体のリン酸化状態を同時に知ることはできない。近年の質量分析装置を用いたリン酸化プロテオーム解析法の発展もめざましいが、同じタンパク質分子の様々なリン酸化状態を同時に識別、同定するとすると、依然として困難である。

**電気泳動によるタンパク質リン酸解析：** 電気泳動を用いてリン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を分離することは、タンパク質のリン酸化状態を知ることができる簡便な方法である。タンパク質の分離に広く使われる SDS-PAGE では、リン酸化されることによって泳動シフトをおこすタンパク質があり、そのことがリン酸化の指標になる場合がある。また、等電点電気泳動法では、理論上、リン酸化によるタンパク質の等電点の変化によってリン酸化量に応じたタンパク質の分離が可能となる。しかし、これらの方法ではリン酸化によって泳動に変化がおこるかどうかはタンパク質の構造など固有の特性に依存しており、実際には解析できるタンパク質は限られる。そこで私たちは、ゲル担体とリン酸基の親和作用に基づくリン酸化タンパク質分離法を考案し、リン酸化されたタンパク質をゲルシフトバンドとして視覚化できる新しい親和電気泳動法を開発した。

**Phos-tag の創製：** 私が所属する研究室の成果の 1 つに「亜鉛二核錯体構造が、アルカリフォスファターゼの基質である 2 価のリン酸モノエステルアニオンを特異的に捕捉するために必須である」という発見がある。この酵素モデル研究の成果を基盤に、近年、私たちは、生理条件下（中性 pH）でナノモル濃度のリン酸モノエステルジアニオンを認識する機能性分子、Phos-tag の創製に成功した。Phos-tag が亜鉛錯体の場合、リン酸ジアニオンの親和性は、1 価のカルボン酸アニオンとの親和性よりも 1 万倍以上大きくなる。

**Phos-tag 親和電気泳動法の樹立：** このリン酸親和 Phos-tag のアミン誘導体にアクリル酸をアミド結合させて合成したアクリルアミド結合型 Phos-tag は、SDS-PAGE の分離ゲルに適量を共重合させることで、電気泳動中のリン酸化タンパク質を特異的に捕捉する媒体となる。通常の SDS-PAGE では、1 つのタンパク質のリン酸化型と非リン酸化型の泳動度は同じであることがほとんどである。一方、アクリルアミド結合型 Phos-tag を共重合させたゲルでは、Phos-tag にリン酸化型のもものがトラップされながら泳動が進行するため、リン酸化型を非リン酸化型から分離できる。つまり、リン酸化型はゲルシフトしたバンドとして検出される。また、1 つのタンパク質分子内に複数のリン酸化部位が存在して、様々なリン酸化状態が混在するタンパク質については、その状態の違いを泳動度の異なるバンドとして検出できる。

**Phos-tag 親和電気泳動法の利点：** この Phos-tag 親和電気泳動法は、1) リン酸化状態を泳動距離の差で検出する（放射性同位体リンを使用しない）、2) セリン/スレオニン/チロシン/ヒスチジン/アスパラギン酸といったアミノ酸の種類を問わず、すべてのリン酸化体を検出できる、3) リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質を同時に定量できる、4) 様々なリン酸化状態にある同一タンパク質分子を複数の異なる泳動バンドとして検出できる、5) 同じリン酸化量のリン酸化タンパク質でもリン酸化部位の違いで分離検出できる、6) 電気泳動後にウェスタン解析が適用できるので、極微量なリン酸化タンパク質でも感度よく検出できる、などの大きな利点をもつ。転写効率は通常の SDS-PAGE ゲルよりも劣るが、Phos-tag に配位させた金属イオン除去のための 1 mM EDTA を含む転写緩衝液によるゲルの洗浄作業により著しく改善する。

**今後の展望：** 細胞内シグナル伝達の解析にこの技術を用いれば、抗体からだけでは得られなかった過剰リン酸化反応の可視化やその経時的リン酸化反応など、タンパク質リン酸化状態における新たな情報を得られる可能性が高い。また、リン酸化部位の未同定、あるいは抗リン酸化抗体が未開発なタンパク質のリン酸化を解析する際にも有効となる。今後本法が、タンパク質リン酸化と関連した各種病態の診断や治療、創薬を目的とした制御分子のスクリーニングなどを含むタンパク質リン酸化反応研究で汎用されることを期待する。