

Phos-tag アフィニティ電気泳動と DIGE によって見える タンパク質のリン酸化状態の変動

平野 久

横浜市立大学先端医科学研究センター

タンパク質は、リン酸化、グリコシル化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化など多種多様な翻訳後修飾を受ける。しかし、多くのタンパク質の翻訳後修飾の動態、生理的、病理的な役割に関する研究は遅れており、これが生命科学研究の発展を阻んでいる。翻訳後修飾は、一過性で可逆的であることが多い。また、わずか数%のタンパク質分子の翻訳後修飾でも生体機能の発現に十分なこともある。さらに、同一のタンパク質が異なった部位に異なった翻訳後修飾を受けていることも少なくない。このような理由から、これまでは翻訳後修飾を解析することが必ずしも容易でなかった。しかし、質量分析装置 (MS) とその周辺技術、タンパク質配列データベース、データベースの効果的な利用を可能にするコンピュータソフトウェアなどが近年、急速に発達し、翻訳後修飾を高い感度、精度、スループットで解析することが可能になった。また、その機能を検証するための新しい技術が発達してきた (平野・大野編 翻訳後修飾のプロテオミクス, 講談社, 東京, 2011)。

リン酸化タンパク質に関しては、リン酸化ペプチドを濃縮して精製する方法とスキャン速度の速い高性能 MS の発達によってショットガン分析による網羅的な同定とリン酸化部位の決定が可能になった。しかし、ショットガン分析では、リン酸化タンパク質をハイスループットで網羅的に解析することはできるが、タンパク質のリン酸化状態の違いを完全に明らかにすることはできない。木下ら (Kinoshita E ら Nat Protoc. 4, 1513, 2009) によって開発された Phos-tag アフィニティ電気泳動法は、このショットガン分析の欠点を補う方法として優れている。私たち (Kimura Y ら Proteomics 10, 3884, 2010) は、理化学研究所

の小原收博士を中心とした研究チームを作り、Phos-tag アフィニティ電気泳動とMSを用いて、クロマチンの修飾、スプライシング、翻訳や mRNA の安定性制御に関わるヘテロ核リボヌクレオタンパク質 K (hnRNP K) のリン酸化状態を解析した。そして、リポ多糖体の刺激による hnRNP K のリン酸化状態の変化、核と細胞質に局在する hnRNP K のリン酸化状態の違いを明らかにすることができた。また、Phos-tag アフィニティ電気泳動とデファレンスゲル電気泳動(DIGE)を用いて巨大タンパク質複合体であるプロテアソームの解析を行った。そして、プロテアソームのリン酸化サブユニットのリン酸化部位とリン酸化状態を明らかにすることができた。これらの研究を例として、リン酸化タンパク質分析における Phos-tag アフィニティ電気泳動や DIGE の有用性について考察する。