

## Phos-tag アフィニティ電気泳動の開発と改良 ～リン酸化タンパク質の分析

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

Phos-tag アフィニティ電気泳動は、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（パネル1）。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。

演者らは 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-PAGE を組み合わせた電気泳動法を発表した<sup>1)</sup>。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ן Phos-tag 錯体を使用した。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。その一方で、 $Mn^{2+}$ -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<sup>2)</sup>。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、 $Mn^{2+}$ -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 錯体を中性条件で泳動する Bis-Tris-HCl ゲルや Tris-AcOH ゲルの SDS-PAGE システムに適用させることで問題解決を図った（パネル 2～5）。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<sup>3-5)</sup>。また、蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動法への応用（パネル 6）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期待される。

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簡便な  $Mn^{2+}$ -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、 $Zn^{2+}$ -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。本シンポジウムでは、それぞれの方法によって得たデータを紹介し、それらの特性について解説したい。

## Refs.

- 1) Kinoshita E, et al., Mol Cell Proteomics. 2006;5:749-757.
- 2) Kinoshita E, et al. Proteomics. 2008;8:2994-3003.
- 3) Kinoshita E & Kinoshita-Kikuta E, Proteomics. 2011;11:319-323.
- 4) Kinoshita E, et al. Proteomics. 2012; in press
- 5) Kinoshita E, et al. Electrophoresis. 2012; in press