

# リン酸アフィニティークロマトグラフィーを用いた 細胞内のリン酸化タンパク質の分離・濃縮法

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

KIKINOSHITA Emiko: Enrichment of phosphorylated proteins from cell lysate using a novel phosphate-affinity chromatography at physiological pH.

## 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)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)は生命科学の重要な課題の一つである。プロテインキナーゼはヒトでは518種類もの遺伝子が明らかにされており、その複雑で多様なネットワークによって行われる生体内のタンパク質リン酸化反応を理解することは、様々な生命現象や病気発症メカニズムの解明、さらに病気の治療法の開発につながる。

生体内のタンパク質リン酸化反応の全体像を解析するためには、複雑な生体試料液中に存在する微量なリン酸化タンパク質を網羅的に分離・濃縮することが重要な技術となる。本稿において、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のフォスタグ(Phos-tag)<sup>1)</sup>を用いた細胞抽出液中のリン酸化タンパク質の分離・濃縮方法を報告する<sup>2, 3)</sup>。本法の長所は、生体試料からリン酸化タンパク質を変性させることなく分離・濃縮できることであり、溶出したリン酸化タンパク質は様々な解析方法に適用できる。

## 2. リン酸アフィニティークロマトグラフィー担体としての Phos-tag アガロース

Phos-tag は、2つの亜鉛イオンを持つ錯体化合物で、中性 pH の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

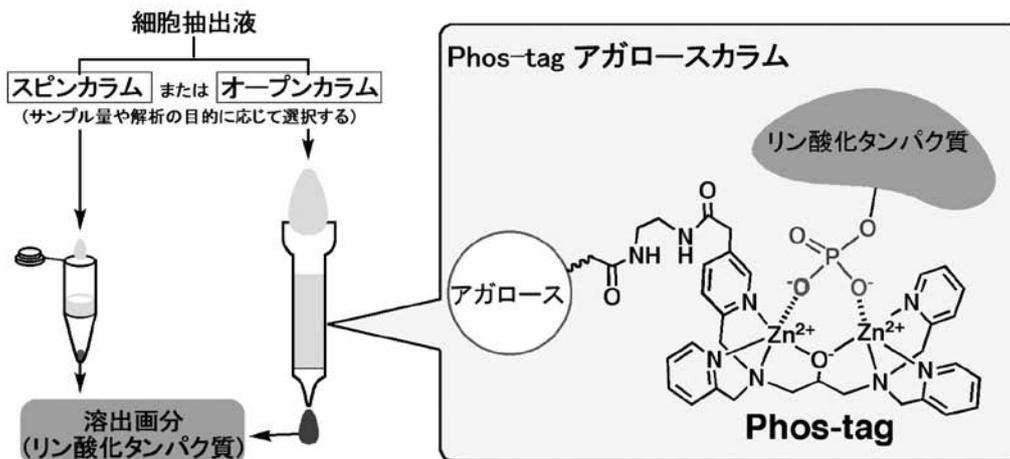
する。この Phos-tag にアガロースビーズを結合させた Phos-tag アガロースは、リン酸アフィニティークロマトグラフィーの担体として私達が開発したものである(図1A)<sup>4)</sup>。以前に私達はこれを用いてリン酸化ペプチドの精製法を確立し、現在 Phos-tag アガロースは <http://www.phos-tag.com> において日本国内向けに販売されている。

## 3. 細胞抽出液からリン酸化タンパク質を分離するクロマトグラフィーの概要

今回は、細胞抽出液からリン酸化タンパク質を分離するカラムとして Phos-tag アガロースを利用する方法を開発した。Phos-tag アガロースはサンプル量や解析の目的に応じて、スピンカラム法(スモールスケール)とオープンカラム法(ラージスケール)を選択できる(図1A)。カラム操作の流れと使用バッファーを、図1Bに示す。

様々なタンパク質が混在する複雑な試料の分離においては、ペプチドの分離に用いた条件を大きく改善する必要があった。細胞抽出液を試料とする際の問題点は、目的としないタンパク質が非特異的に吸着してしまうことと、結合した目的の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、Phos-tag 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氣的結合が考えられたが、結合バッファーに1Mの酢酸ナトリウムを添加することによって、酢酸イオンによるカ

### A Phos-tagアガロースカラムの概要



### B. 操作の流れ

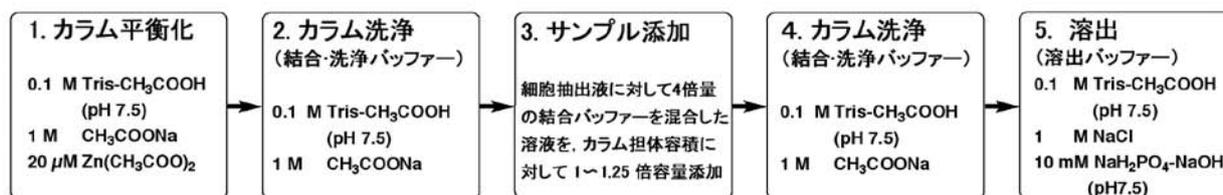


図1 Phos-tag アガロースを用いた細胞抽出液からのリン酸化タンパク質分離の概略 (文献3より転載)

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結合の緩和の両方の効果を得た。また、細胞抽出液には、Phos-tag とリン酸基の結合を阻害する可能性のある試薬 (EDTA, 界面活性剤, バナジン酸など) が含まれる場合が多い。したがって、細胞抽出液に対して4倍量以上の結合バッファーを混合したサンプルをカラム容積の1.25倍を超えないように添加することで、結合至適条件を維持した。溶出においては、Phos-tag 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な結合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を得られたため、溶出バッファーは10mMのリン酸緩衝液と1Mの塩化ナトリウムを添加することにした。

### 4. EGF 刺激後の A431細胞抽出液からのリン酸化タンパク質分離・濃縮例

実施例として、細胞内タンパク質リン酸化反応についてよく研究されている EGF 刺激後の A431細胞の抽出液からリン酸化タンパク質を分離、濃縮した結果を示す。EGF 刺激した A431細胞 (10<sup>7</sup>個) を、Tris-buffered saline (TBS) で洗浄後、0.5mL の細胞溶解液 (50mM Tris-HCl (pH7.4), 0.15M 塩化ナトリウム, 0.25% デオキシコール酸ナトリウム, 1.0%NP-40, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 各1μg/mL アプロチニン, ロイペプチン, ペプスタチン, 1mM バナジン酸ナトリウム, 1mM フッ化ナトリウム) で溶解し、2mg/mL のタンパク質濃度の抽出液を調整した。

図2A に、20μg のタンパク質を含む細胞抽出液をスピンカラム法 (ゲル容積50μL) で分離し、素通り・洗浄画分と溶出画分を分析した結果を示す。各画分を限外ろ過ユニットで濃縮し

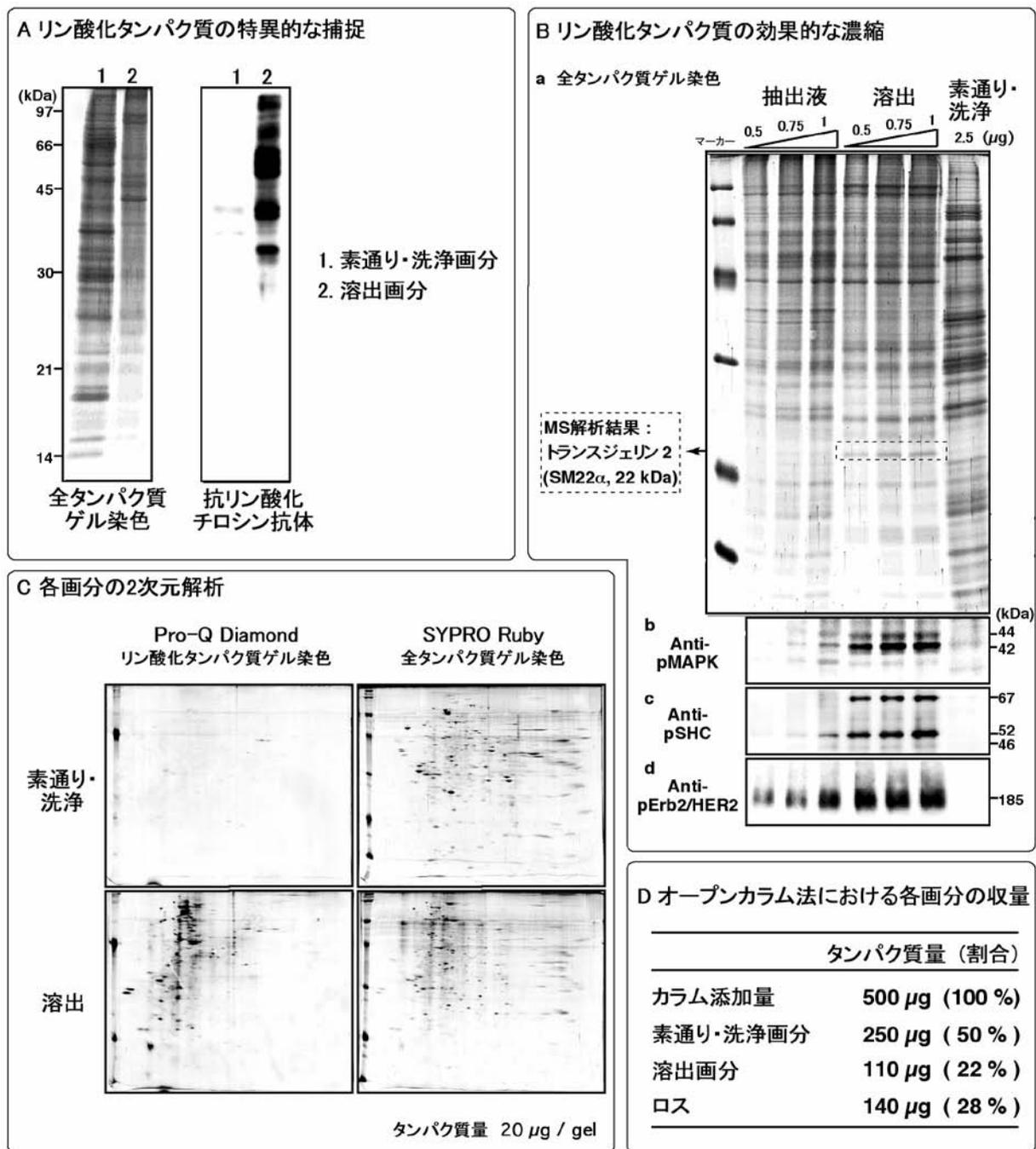


図2 EGF 刺激後の A431細胞抽出液からのリン酸化タンパク質の分離・濃縮 (文献2および3より改変・転載)

て半量づつを SDS-PAGE, および抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタン解析に供した. 溶出画分のタンパク質量は, 素通り・洗浄画分のそれよりも少なかった. 一方, チロシンリン酸化タンパク質はほぼ全て溶出画分に得られた. これは, Phos-tag アガロースがリン酸化タンパク質を特異的に捕捉したことを示している. 図2B に, 0.5mg のタンパク質を含む細胞

抽出液をオープンカラム法 (ゲル容積1mL) で分離した結果を示す. 分離前の細胞抽出液と溶出画分を1レーンあたりのタンパク質量が 0.5-1 $\mu$ g, 素通り・洗浄画分は2.5 $\mu$ g になるように SDS-PAGE に供した. ゲル染色像 (a) から, 分離前および各画分の3者のバンドパターンが異なる事が確認できた. 溶出画分の22kDa 付近の明瞭なバンドを切り出し, MS 解析を行なっ

た結果、リン酸化タンパク質として報告されているトランスジェリン2であることが分かった。さらにEGF刺激によってリン酸化レベルが上昇することが知られているMAPK, SHC, およびErb2/HER2の3種類のタンパク質の抗リン酸化抗体を用いたウエスタン解析から (b-d), 分離前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との区別がつかない結果だったものが, 溶出画分では明瞭なシグナルとして検出でき, これらのリン酸化タンパク質を効果的に濃縮できたことが示された。図2Cに, オープンカラム法で得た各画分のタンパク質 (20 $\mu$ g) を2次元電気泳動解析した結果を示す。Pro-Q Diamond リン酸化タンパク質ゲル染色とSYPRO Ruby 全タンパク質ゲル染色の比較からも, Phos-tag アガロースカラムによってリン酸化タンパク質が特異的に分離されたことが証明された。2次元電気泳動ゲルにおいてリン酸化タンパク質が明瞭なスポットとして確認できることは, その後のMS解析での網羅的解析などに有効であろう。図2Dに, オープンカラム法で得た各画分の収量を示す。Phos-tag アガロースカラムで50%のタンパク質を非リン酸化物として排除し, 22%のタンパク質を溶出画分に得た。ロスの原因は, アガロースビーズに吸着するタンパク質があることや, 限外ろ過ユニットで各画分を濃縮する操作によって失われることが考えられる。

## 5. まとめ

Phos-tag アガロースを用いたリン酸アフィニティークラムクロマトグラフィーによって, 細胞抽出液から効果的にリン酸化タンパク質を分離・濃縮する方法を確立した。この方法はタンパク質を変性させない条件で操作を行うという特徴を持つので, 得られたリン酸化タンパク質は多様な解析法と組み合わせた網羅的リン酸化タンパク質研究に適用できる。市販されているカラムなど, 既存のリン酸アフィニティークロ

マトグラフィー法ではタンパク質を変性させる条件を用いるためにその後に適用できる解析法が限られたが, 本法はその問題点を解決する技術といえる。

Phos-tag を用いた技術は本稿で報告した以外にも, PVDF膜上のリン酸化タンパク質を化学発光シグナルとして検出するウエスタン解析法<sup>5)</sup>, タンパク質のリン酸化状態の違いを移動度の違いとして分離する電気泳動法<sup>5-6)</sup>, 遺伝子の一塩基多型 (SNP) をタイピングするための電気泳動法<sup>7)</sup>なども開発しており, Phos-tag 技術が今後の生命科学の広い研究分野で大きく貢献することと期待している。

## 参考文献

- 1) Kinoshita E, Takahashi M, Takeda H, Shiro M, Koike T: Dalton Trans., : 1189-1193, 2004
- 2) Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Yamada A, Endo M, Koike T: Proteomics, 6 : 5088-5095, 2006
- 3) 木下英司, 木下恵美子, 小池 透: 羊土社, バイオテクノロジージャーナル, 7, 217-220, 2007
- 4) Kinoshita E, Yamada A, Takeda H, Kinoshita-Kikuta E, Koike T: J. Sep. Sci., 28: 155-162, 2005
- 5) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T: Mol. Cell. Proteomics, 5: 749-757, 2006
- 6) Kinoshita-Kikuta E, Aoki Y, Kinoshita E, Koike T: Mol. Cell. Proteomics, 6: 356-366, 2007
- 7) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T: Anal. Biochem., 361:294-298,2007

## 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。