

〔付録〕

プロトコール集
フォスタグテクノロジーを用いたリン酸化タンパク質解析法

木下恵美子*・木下英司・小池 透

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

目 次

1. Phos-tag SDS-PAGEによるリン酸化タンパク質の分離.....s52
1-1. LaemmliのSDS-PAGE系を用いるMn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE.....s53
1-2. Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGEによる200 kDa以上のタンパク質解析.....s61
1-3. 中性Bis-TrisゲルのSDS-PAGE系を用いるZn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE.....s64
2. ビオチン化Phos-tagによるリン酸化タンパク質の検出.....s66
3. Phos-tagアガロースによるリン酸化タンパク質の分離・濃縮.....s70
3-1. 細胞抽出液からの網羅的なリン酸化タンパク質の分取.....s70
3-2. リン酸化タンパク質のウェスタン解析のためのサンプル前処理法.....s73

はじめに

これまでに開発した Phos-tag を基盤とした技術は大きく分類して3つである。それらは、リン酸基捕捉分子としての Phos-tag に他の機能性分子を導入することによって、生命科学におけるリン酸化タンパク質解析法として利用されることを目的としたものである。1つは、Phos-tag アクリルアミド (図1左) を用いて電気泳動によってタンパク質のリン酸化状態を分離分析する技術、2つめはビオチン化

Phos-tag (図1中央) を用いて PVDF 膜やペプチドアレイ上に固定されたリン酸化タンパク質を化学発光検出する技術、3つめは Phos-tag アガロース (図1右) を用いてリン酸化タンパク質を選択的に分取するクロマトグラフィー技術である。本特集号の紙面をお借りして、それぞれについてのプロトコールをお示ししたいと思う。実際の解析例、コツなども含めて、本プロトコールをリン酸化タンパク質の研究にお役立ていただければ幸いである。

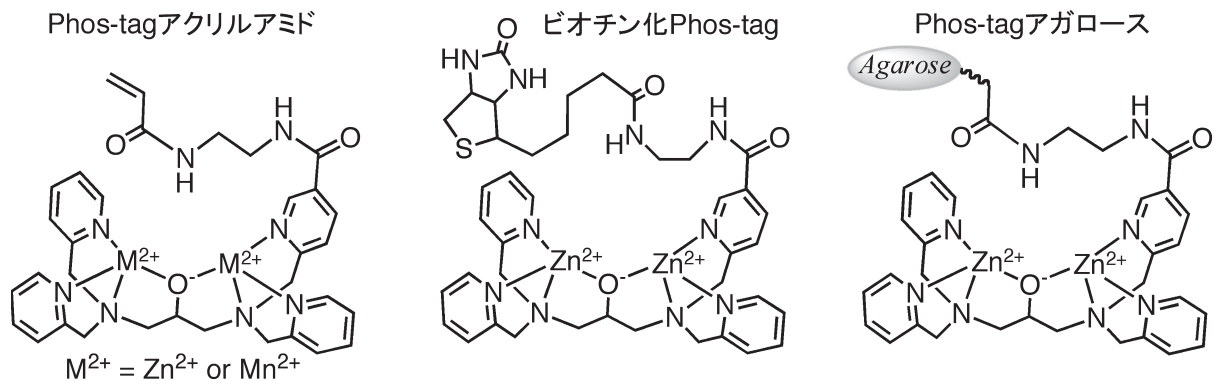


図1. Phos-tag テクノロジーの基盤となる3種の Phos-tag

1. Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化タンパク質の分離

概要

Phos-tag SDS-PAGE 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リン酸基アフィニティ電気泳動法である。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するため、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ことになる(図2)。

本電気泳動法では、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。

筆者らは2006年に、Phos-tag の原理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公表した¹⁾。Laemmli 法では、泳動中のゲル内 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ン Phos-tag 錯体を使用した(図2での $M^{2+} = Mn^{2+}$)。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。そのプロトコールはこの章の第1項目「Laemmli の SDS-PAGE 系を用いる Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE」に示す。また、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では、200 kDa を超える高分子量タンパク質のリン酸化状態を低濃度のアクリルアミドを用いて分離分析する方法を確立したので、そのプロトコールを第2項目「 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE による 200 kDa 以上のタンパク質解析」に示す。一方、 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。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(図2での $M^{2+} = Zn^{2+}$) を中性条件下で泳動する SDS-PAGE 系に適用させることで、問題解決を図った。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。このプロトコールを第3項目「中性 Bis-Tris ゲルの SDS-PAGE 系を用いる Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE」に示す。

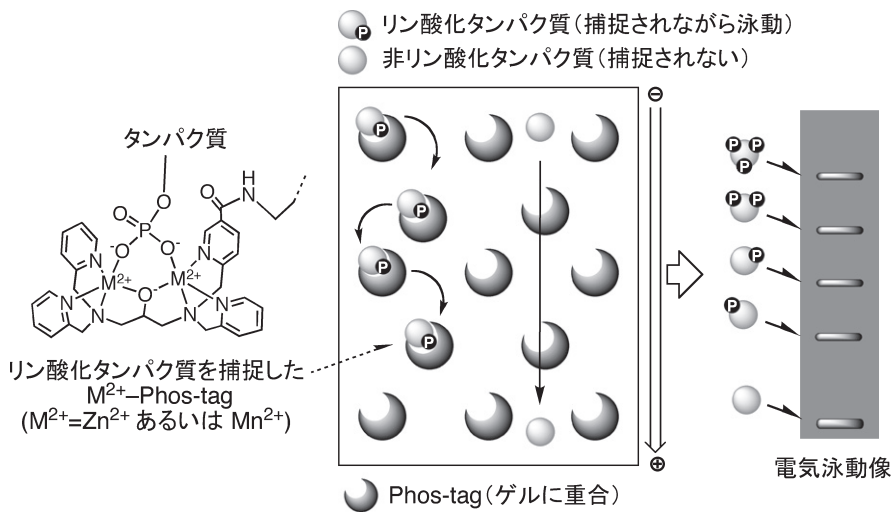


図2. Phos-tag SDS-PAGE の概要

1-1. Laemmli の SDS-PAGE 系を用いる Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE

電気泳動で使用する溶液とその調製法

● 40% (w/v) アクリルアミド, 100 mL

	最終濃度	使用量
・ アクリルアミド	40% (w/v)	40 g

蒸留水に溶解後, 100 mL にメスアップする (*1).

(*1) アクリルアミドと N,N' -メチレンビスアクリルアミドを分けて調製, 保存することで, 実験目的に合わせて架橋度 (%C アクリルアミド) の異なるゲルを作成できる.

● 2.5% (w/v) N,N' -メチレンビスアクリルアミド (ビス), 100 mL

	最終濃度	使用量
・ N,N' -メチレンビスアクリルアミド	2.5% (w/v)	2.5 g

蒸留水に溶解後, 100 mL にメスアップする (*1).

● 4×分離ゲルバッファー, 100 mL

	最終濃度	使用量
・ Tris	1.5 M	18.2 g
・ SDS	0.40% (w/v)	0.40 g

蒸留水に溶解後, 塩酸で pH 8.8 に調整し, 蒸留水で 100 mL にメスアップする (*2).

(*2) 分離・濃縮ゲルバッファーは, 最も広く使用されている Laemmli の SDS-PAGE 法のものと同じである.

● 4×濃縮ゲルバッファー, 100 mL

	最終濃度	使用量
・ Tris	0.50 M	6.1 g
・ SDS	0.40% (w/v)	0.40 g

蒸留水に溶解後, 塩酸で pH 6.8 に調整し, 蒸留水で 100 mL にメスアップする (*2).

(*3) AAL-107 は和光純薬工業株式会社から発売されている.

● 5.0 mM Phos-tag アクリルアミド, 3.3 mL

	最終濃度	使用量
・ Phos-tag アクリルアミド (AAL-107)	5.0 mM	10 mg
・ メタノール	0.030% (v/v)	0.10 mL

0.10 mL のメタノールを AAL-107 (*3) の製品のチューブに入れ, ピペティングして溶解する. それを, 溶液保存用の遮光ビンの中に予め入れておいた 3.2 mL の蒸留水中に移す (*4). スターラーで攪拌して溶解する (*5).

(*4) AAL-107 は 0.10 mL のメタノールに溶解するが, それを水に混合したとき, 油滴となり白濁する. 攪拌により完全に溶解する. 製品チューブに僅かに残った AAL-107 は, 水溶液となった分を使って何度もピペティングして洗い込む.

● 10 mM 塩化マンガン, 50 mL

	最終濃度	使用量
・ 塩化マンガン 4 水和物	10 mM	0.10 g

蒸留水に溶解後, 50 mL にメスアップする (*5).

(*5) AAL-107, 塩化マンガン溶液共に, 遮光ビン中, 室温で 1 年以上保存できる.

● 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム (APS), 0.30 mL

	最終濃度	使用量
・ 過硫酸アンモニウム	10% (w/v)	30 mg

蒸留水 0.30 mL に溶解する. 使用直前に調製する.

● N,N,N',N' -テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)

● 50% (v/v) イソプロパノール, 50 mL

	最終濃度	使用量
・ イソプロパノール	50% (v/v)	25 mL

蒸留水で 50 mL にメスアップする.

● 10×泳動バッファー, 1 L

	最終濃度	使用量
・ Tris	0.25 M	30 g
・ グリシン	1.92 M	144 g
・ SDS	1.0% (w/v)	10 g

蒸留水に溶解後, 1L にメスアップする. pH 調整はしない.

(*6) 泳動バッファー, サンプルバッファーは, 最も広く使用されている Laemmli の SDS-PAGE 法のものと同じである.

● 1×泳動バッファー, 1 L

用時, 0.10 L の 10×泳動バッファーを蒸留水で 1 L にメスアップする (*6).

(*7) グリセロールは粘性が高いので, 80% (v/v) 水溶液を別に作成しておき, それを 3.75 mL 使用してもよい.

● 3×SDS-PAGE 用サンプルバッファー, 10 mL

	最終濃度	使用量
・ 4×濃縮ゲルバッファー (Tris-HCl [pH 6.8] として)	(195 mM)	3.9 mL
・ グリセロール (*7)	30% (v/v)	3.0 mL
・ SDS	9.0 % (w/v)	0.90 g
・ プロモフェノールブルー (BPB)	0.10% (w/v)	10 mg
・ 2-メルカプトエタノール (*8)	15% (v/v)	1.5 mL

(*8) 2-メルカプトエタノールは酸化されやすいので, 用時添加しても良い. その場合, その他の成分は常温保存できる.

蒸留水で 10 mL とする. 10 mL のメスシリンダーを使用する. 1.0 mL ずつマイクロチューブに分けて -20°C で保存する.

ゲルの作成

スラブゲル電気泳動装置はいずれのメーカーのものでも, どのようなサイズでも使用可能であるが, ここでは例として, アトー社製の 8 (H) × 9 (W) cm, 1 mm 厚のミニスラブゲル装置を使用して, 100 μM Phos-tag を含む 10%T, 3.3%C の分離ゲルを作成する場合について述べる.

操作 1. 以下の表に示す組成で分離ゲル, 濃縮ゲルの溶液を準備する. 10% (w/v) APS 以外のものを, コニカルチューブ中で混合する.

	分離ゲル (*9) (10%T, 3.3%C)	濃縮ゲル (4%T, 3.3%C)
40% (w/v) アクリルアミド	1.692 mL	0.217 mL
2.5% (w/v) ビス	0.934 mL	0.120 mL
4×分離ゲルバッファー	1.750 mL	—
4×濃縮ゲルバッファー	—	0.500 mL
5.0 mM Phos-tag アクリルアミド	0.140 mL	—
10 mM 塩化マンガン (*10)	0.140 mL	—
TEMED	0.015 mL	0.010 mL
10% (w/v) APS	0.100 mL	0.050 mL
蒸留水	2.229 mL	1.103 mL
Total	7.00 mL	2.00 mL

(*9) アクリルアミドの %T, %C は実験目的によって変える.

(*10) Phos-tag 1 分子に対して 2 分子の Mn²⁺ を配位するので, Phos-tag に対して塩化マンガンは 2 等量である.

- 操作 2. 分離ゲル溶液に 10% (w/v) APS を加えて混合し、すぐにゲル板間隙に注ぐ。
- 操作 3. 分離ゲル上部に、液面を乱さないように静かに 50% (v/v) イソプロパノールを 1 mL 注ぐ。
- 操作 4. 10 分以上経過して、分離ゲルが重合したら、イソプロパノールを捨て、ろ紙で分離ゲル上部を拭き、完全にイソプロパノール水溶液を除く。
- 操作 5. 濃縮ゲル溶液に 10% (w/v) APS を加えて混合し、すぐに分離ゲル上部に注ぐ。
- 操作 6. 濃縮ゲルを注いだら、直ちにコウムを挿す。
- 操作 7. 10 分以上経過して、濃縮ゲルが重合したら、泳動バッファーをコウムにかけて、静かにコウムを引き抜く。
- 操作 8. 予め下部バッファーを入れた電気泳動槽にゲル板をセットする。ゲル底面に気泡が入らないように注意する。

■ サンプルの作成

通常、Laemmli の SDS-PAGE 法に適用できるサンプルのほとんどは、 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE でも適用できる。ここでは、典型的な 4 種類のサンプル調製法を示す。

■ 1. 精製したタンパク質試料

蒸留水あるいはバッファーに溶解したタンパク質溶液に対して、3×SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 1/2 容量加え、95°C で 3 分間加熱したものをアプライする。(→実験例 1 を参照)

■ 2. キナーゼアッセイなどの反応液中のタンパク質試料

反応液に対して、3×SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 1/2 容量加え、95°C で 3 分間加熱したものをアプライする (*11)。(→実験例 2 を参照)

■ 3. 細胞溶解液を用いて調製した細胞由来タンパク質試料

細胞培養の培地成分、TBS、PBS はできるだけ混入させない。遠心により、不溶性の沈殿物を十分に除去した上清(可溶性画分)に対して、3×SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 1/2 容量加え、95°C で 3 分間加熱したものをアプライする。不溶性の沈殿物に対しては、1×SDS-PAGE 用サンプルバッファーを加えて溶解し、95°C で 3 分間加熱したものをアプライする (*11)。

(→実験例 3 を参照)

(*11) キナーゼ反応バッファーや細胞溶解液には、泳動パターンに影響を及ぼす塩類、EDTA、EGTA が含まれることが多い。 Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE では、通常の SDS-PAGE よりもそれらによるバンドの歪みが顕著なので、隣り合うレーン(あるいはゲルの全レーン)に同じバッファー組成の試料を同じ容量アプライしてレーン間の歪みを防ぐ必要がある。

●細胞溶解液の例：RIPA バッファー，100 mL 分

	最終濃度	使用量
・ Tris	50 mM	0.61 g
・ 塩化ナトリウム	150 mM	0.87 g
・ デオキシコール酸ナトリウム	0.25% (w/v)	0.25 g
・ ノニデット P-40	1.0% (v/v)	1.0 mL
・ EDTA	1.0 mM	0.050 g

蒸留水に溶解後、塩酸で pH 7.4 に調整し、蒸留水で 96.7 mL にメスアップする。

この溶液は室温で保存できる。

以下の、プロテアーゼ阻害剤、フォスファターゼ阻害剤は高濃度ストックを作成しておき、用時、必要量の RIPA バッファーに対して添加する (*12)。

10 mL の阻害剤含 RIPA バッファーを用時調製する場合

	最終濃度	使用量
・ 上記 RIPA バッファー		9.67 mL
・ 1.0 mg/mL アプロチニン	1.0 µg/mL	10 µL

(*12) 市販のプロテアーゼ阻害剤、フォスファターゼ阻害剤カクテルを上記 RIPA バッファーに添加しても良い。

• 1.0 mg/mL ペプスタチン	1.0 µg/mL	10 µL
• 1.0 mg/mL ロイペプチン	1.0 µg/mL	10 µL
• 0.10 M バナジン酸ナトリウム	1.0 mM	0.10 mL
• 0.10 M フッ化ナトリウム	1.0 mM	0.10 mL
• 0.10 M PMSF メタノール溶液	1.0 mM	0.10 mL

4. 1×SDS-PAGE用サンプルバッファーを用いて調製した細胞由来タンパク質試料

(→実験例4を参照)

細胞培養の培地成分, TBS, PBS はできるだけ混入させない. 超音波破碎機により核酸の粘性を除いて, 95°C で3分間加熱したものをアプライする.

分子量マーカーの選定

分子量マーカーは, 市販のものを適用できるが, 次のような注意点がある.

1. 各社のカラーマーカー (プレステインマーカー) は, レーンの歪みが顕著で, バンドとして検出することができない. 通常の SDS-PAGE では, ウェスタンブロッティングの転写効率を確かめる目的で使用される場合もあるが, Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE では, カラーマーカーのレーンだけが極端に歪むことがあるので, その使用を推奨しない.
2. Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE の各タンパク質の移動度は分子量を反映しないので, ラダーマーカーなどによる詳細な分子量推定は不可能である.
3. Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE 用のマーカーとして推奨するのは, 精製した天然タンパク質の混合物でバンド数が少ないものである. たとえば, 以下に示す組成の APRO サイエンス社, APRO Marker (low range) は, 実験例1に示したように, リン酸化タンパク質である ovalbumin (卵白アルブミン) のシフトアップが他のバンドよりも顕著であることから, Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE の操作の成否を確認することができるので便利である (→実験例1を参照). ただし, サンプルの分子量を推定する目的では使用できない.

APRO Marker (low range)

タンパク質 (由来)	分子量
Phosphorylase b (rabbit muscle)	97,200
Bovine serum albumin (bovine)	66,400
Ovalbumin (chicken egg white) <u>リン酸化タンパク質</u>	45,000
Carbonic anhydrase (bovine)	29,000
Soybean trypsin inhibitor A (soybean)	20,100
Lysozyme (chicken egg)	14,000

Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE通電条件

Laemmli の SDS-PAGE に適用している条件で行う. 例えば, アトー社製の 8(H) × 9(W) cm, 1 mm 厚のミニスラブゲル泳動装置では, ゲル1枚あたり 30 mA で泳動フロント (BPB 色素) がゲル下端に到達するまで, 約 65 分である. 2枚のゲルをセットできる泳動装置ならば, Phos-tag を含まないゲルとともに泳動をしても両者の泳動時間は変わらない.

Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGEゲルの染色

CBB 染色法, SYPRO Ruby などの蛍光染色法, 銀染色法 (各メーカーの銀染色キット) を使用できる.

Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE後の質量分析

CBB 染色法, SYPRO Ruby などの蛍光染色法, 銀染色法で可視化したタンパク質スポットを一般的なプロトコールにしたがって質量分析に供することができる.

Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE後のウェスタン解析

一般的なタンク式の転写装置を使用する。Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGEはPhos-tagを含まないゲルよりも転写効率が劣るので、より高い転写効率を要する実験においては、セミドライ転写装置は推奨しない。試薬の調製法は以下の通りである。

●転写バッファー, 5 L

	最終濃度	使用量
・ Tris	25 mM	15 g
・ グリシン	192 mM	72 g
以上を蒸留水約 4 L に溶解した後、以下を混合する。		
・ メタノール	10% (v/v)	0.50 L
蒸留水で 5 L にメスアップする。		

● 0.50 M EDTA (pH 8.0), 500 mL

	最終濃度	使用量
・ EDTA, 2Na	0.50 M	93.1 g
約 400 mL の蒸留水中で攪拌しながら溶解し、NaOH 水溶液を添加して pH 8.0 に調整する。 蒸留水で 500 mL にメスアップする。		

● 1.0 mM EDTA 含む転写バッファー, 100 mL

	最終濃度	使用量
・ 転写バッファー		99.8 mL
・ 0.50 M EDTA (pH 8.0)	1.0 mM	0.20 mL

● TBS-T 水溶液, 1 L

	最終濃度	使用量
・ Tris	10 mM	1.21 g
・ 塩化ナトリウム	0.10 M	5.84 g
・ Tween 20	0.10% (v/v)	1.0 mL

蒸留水に溶解後、塩酸で pH 7.5 に調整し、蒸留水で 1 L にメスアップする (*13)。

(*13) 10×TBS (Tween 除く) を調製、保存しておき、用時 1×TBS-T に希釈してもよい。

● 10% (w/v) SDS, 100 mL

	最終濃度	使用量
・ SDS	10% (w/v)	10 g

(*14) EDTA による Mn²⁺ のキレートにより、Phos-tag のタンパク質への結合能が低下し、転写効率が向上する。

操作 1. 電気泳動後のゲルを 1.0 mM EDTA 含む転写バッファーに浸し、10 分間振とうする (*14)。8 (H) × 9 (W) cm, 1 mm 厚のミニスラブゲルなら、1 枚あたり 100 mL 要する。

操作 2. 転写バッファーに浸し、10 分間振とうする。

操作 3. ゲルと PVDF 膜を転写装置のカセットにはさみ、タンクにセットする。

操作 4. タンクに転写バッファーを満たした後、10% (w/v) SDS を 1/100 容量 (最終濃度 0.10% [w/v]) タンク内に添加する (*15)。

操作 5. 冷却装置がないタンク式転写装置を用いる場合で、4–6 V/cm (電極間の距離が 5 cm の装置ならば 20–30 V)、16 時間転写する。冷却装置がある装置を用いる場合、20–22 V/cm、1 時間転写する (*16)。

操作 6. 転写後の PVDF 膜を TBS-T に 1 時間以上振とうし、その後ウェスタン解析を行う。

(*15) SDS の添加により、転写効率が向上する。操作途中で泡立つのを防ぐため、通電の直前に添加する。

(*16) ここに記載した転写バッファーの組成や通電条件は、1 例である。転写の最適条件は各研究者においてノウハウがあるので、それを適用されてもよい。

実験例 1 分子量マーカーと精製リン酸化タンパク質の分離^{1,3)}

分子量マーカーと精製リン酸化タンパク質である β -カゼイン、 α -カゼイン、卵白アルブミン、また、それらをアルカリフォスファターゼ処理したものを Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE で分離した。

試薬

- APRO Marker (low range), APRO サイエンス社, SP-0110 (分子量マーカー)
- α -Casein from bovine milk, シグマ社, C6780 (α -カゼイン)
- β -Casein from bovine milk, シグマ社, C6905 (β -カゼイン)
- Ovalbumin from chicken egg white, シグマ社, A5503 (卵白アルブミン)
- Alkaline phosphatase, シグマ社, P5521 (アルカリフォスファターゼ)

操作 1. 100 μ M Mn^{2+} -Phos-tag を含む 10%T, 3.3%C ポリアクリルアミドゲルを作成する。

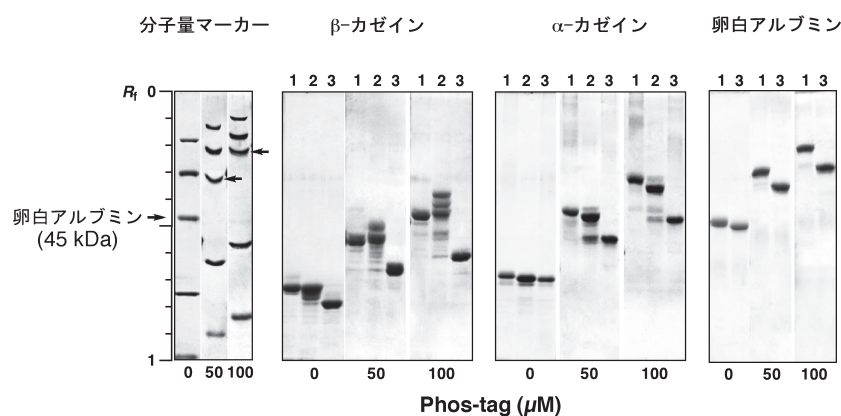
操作 2. β -カゼイン, α -カゼイン, 卵白アルブミンは 10 mg/mL になるように蒸留水に溶解する。

操作 3. アルカリフォスファターゼ処理は 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.0 mM $MgCl_2$, 9.0 mg/mL タンパク質, 適量のアルカリフォスファターゼの反応液中で行う。

操作 4. β -カゼイン, α -カゼイン, 卵白アルブミン, およびそのアルカリフォスファターゼ処理物は 1 \times SDS-PAGE サンプルバッファー中に希釈し, 1.0 μ g/lane になるようにアプライする。分子量マーカーは製品溶液を 2.0 μ L/lane アプライする。

操作 5. 泳動後, CBB 染色によりタンパク質を検出する。

分子量マーカーの卵白アルブミン (図中 \rightarrow) は, リン酸化タンパク質であるので, その他のバンドよりも, Phos-tag 濃度依存的に, シフトアップの度合いが大きくなる。 β -カゼイン, α -カゼイン, 卵白アルブミンは, リン酸化フォームが完全脱リン酸化フォームに比べてシフトアップしている。また, 部分的脱リン酸化物において, β -カゼインは 5 つのセリン残基, α -カゼインは 8 つのセリン残基のリン酸化状態の違いに基づく複数のリン酸化フォームが検出される。 β -カゼインは, 部分的脱リン酸化フォームのいくつかは, 完全リン酸化フォームよりもシフトアップした位置に検出される。



1. アルカリフォスファターゼ処理なし
2. アルカリフォスファターゼによって部分的脱リン酸化処理
3. アルカリフォスファターゼによって完全に脱リン酸化処理

実験例 1. 分子量マーカーと, 精製リン酸化タンパク質の分離 (文献 3 より転載)

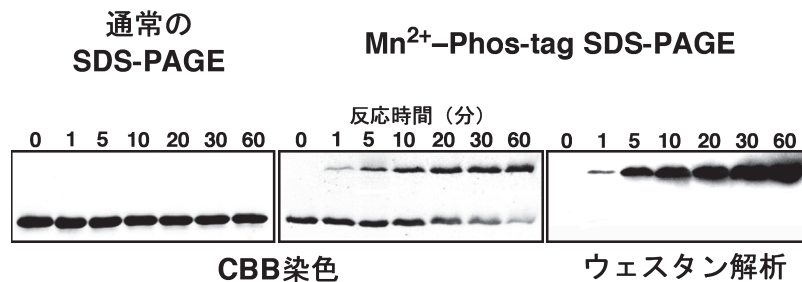
実験例 2 *In vitro* チロシンキナーゼ (Abl) 反応のモニタリング¹⁾

試薬

- 基質タンパク質: Abltide-GST, ミリポア社, Cat. #12-525
- チロシンキナーゼ: Recombinant Abl, ミリポア社, Cat. #14-459

- キナーゼ反応バッファー: 20 mM MOPS (pH 7.2), 25 mM β -glycerol phosphate, 5.0 mM EGTA, 1.0 mM sodium orthovanadate, 1.0 mM DTT, 1.0 mM ATP, 75 mM $MgCl_2$
- 抗リン酸化チロシン抗体, マウスモノクローナル (clone PY20), GE ヘルスケア社

- 操作 1. 100 μ M Mn^{2+} -Phos-tag を含む 12.5%T, 3.3%C ポリアクリルアミドゲルを作成する.
- 操作 2. Abltide-GST (10 μ g) と Recombinant Abl (50 ng) を含むキナーゼ反応バッファー 100 μ L 中で反応を行う (反応温度は 30°C).
- 操作 3. 0, 1, 5, 10, 20, 30, 60 分ごとに 14 μ L サンプリングして 1/2 容量の 3 \times SDS-PAGE 用サンプルバッファーを加え, 95°C, 3 分加熱後, アプライする (1.4 μ g Abltide/lane).
- 操作 4. 泳動後 CBB 染色によってタンパク質を検出する. あるいは, PVDF 膜に転写する.
- 操作 5. 転写した PVDF 膜は抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタン解析を行う.



実験例 2. *In vitro* チロシンキナーゼ (Abl) 反応のモニタリング (文献 1 より転載)

通常の SDS-PAGE (図左) では, 基質がリン酸化されていることは確認できない. 一方, Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE においては, リン酸化反応の進行に伴って泳動が遅れるバンドが出現し, それと対照的に, 泳動の早いバンドの染色度が減少することがわかった. そして, この泳動の遅いバンドがリン酸化フォームであることが, 抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタン解析によって証明された.

実験例 3 A431 細胞の EGF 刺激による MAPK リン酸化反応のモニタリング²⁾

細胞内リン酸化シグナル伝達がよく研究されている上皮増殖因子 (EGF) 刺激後のヒト扁平上皮癌 A431 細胞の抽出液をサンプルとし, 有糸分裂活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) のリン酸化状態の経時変化を解析した.

試薬

- EGF, シグマ社, E1257
- 抗 MAPK1/2 (Erk1/2) 抗体, ミリポア社, Cat. #06-182
- 抗リン酸化 MAPK1/2 (Erk1/2) pT²⁰²/pY²⁰⁴ 抗体, セルシグナリング社, Cat. #9101

操作 1. A431 細胞の EGF 刺激と細胞抽出液の調製

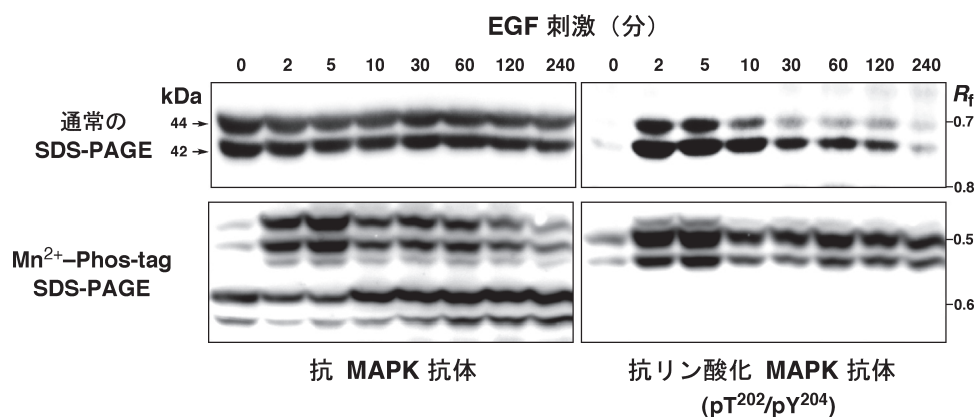
1. 10% の血清を含む RPMI1640 培地 (3.0 mL) を用いて, 直径 3 cm のシャーレで 10^6 個の A431 細胞 (接着細胞) を 80% コンフルエントまで培養する.
2. EGF (TBS バッファーに溶解したもの) を 250 ng/mL になるようにシャーレに添加して素早く攪拌し, CO_2 インキュベーター内で 2, 5, 10, 30, 60, 120, 240 分置く (0 分の未刺激サンプルは TBS バッファーを添加後, すぐに以下の操作に移る).
3. 刺激後, シャーレから素早く培地を除き, 室温の細胞洗浄用 TBS バッファーで洗浄する.
4. シャーレを氷上に置き, 氷冷した細胞溶解液 (阻害剤含 RIPA バッファー) を 0.10 mL 添加して 15 分間緩やかに振とうする.
5. セルスクレイパーを用いて細胞溶解液をマイクロチューブに回収する.

6. 14,000 g, 10分遠心後, 上清を新しいチューブに移す.
7. この調製法では約 2.0 mg タンパク質 /mL となる. 1 ウェルあたり 10-20 μg のタンパク質をアプライできるよう試料を新しいチューブに移しとり, 1/2 容量の 3×SDS-PAGE 用サンプル調製液を添加する.
8. 95°C, 3分の加熱処理を行い, 泳動用試料とする.

操作 2. 25 μM Mn²⁺-Phos-tag を含む 7.5%T, 3.3%C ポリアクリルアミドゲルを作成する.

操作 3. 泳動後のゲルを PVDF 膜に転写する.

操作 4. 転写した PVDF 膜は抗リン酸化 MAPK1/2 (Erk1/2) pT²⁰²/pY²⁰⁴ 抗体ウェスタン解析を行う. その後, 同じ膜を抗 MAPK1/2 (Erk1/2) 抗体でリプロービングする.



実験例 3. A431 細胞の EGF 刺激による MAPK リン酸化反応のモニタリング (文献 2 より転載)

MAPK は EGF 刺激後の細胞内における代表的なリン酸化タンパク質であり, リン酸化を受けると核内に移行して転写因子にシグナルを伝達する役割を担う. まず, 通常の SDS-PAGE (7.5% [w/v] ポリアクリルアミド) に細胞抽出液を 15 μg タンパク質 /lane となるようにアプライし, 抗 MAPK1/2 抗体 (44/42 kDa) によるウェスタン解析を行った. 各サンプルの MAPK 量はほぼ同じであることがわかった (図, 左上). MAPK1/2 は, 通常の SDS-PAGE においてゲルの条件を最適化すればリン酸化フォームがシフトするとの報告があるが, 本条件ではそれは検出できなかった. さらに, 同じプロット膜を抗リン酸化 MAPK1/2 (pThr²⁰²/pTyr²⁰⁴) 抗体で解析したところ, EGF 刺激後 10 分までにリン酸化量が急速に増加してその後徐々に減少することがわかった (図, 右上). 25 μM の Phos-tag を含む 7.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルで分離した場合, 抗 MAPK1/2 抗体による解析において, 5つのバンドが確認できた (図, 左下). 同じプロット膜を抗リン酸化 MAPK1/2 (pThr²⁰²/pTyr²⁰⁴) 抗体で解析すると R_f 値の小さい3つのバンドが交差性を示すことから (図, 右下), Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE における MAPK1/2 のシフトアップはリン酸化によるものであることがわかる. なお, この実験における Phos-tag 濃度は 25 μM としたが, 25, 50, 75, 100 μM でも検討したところ, ゲルの中程 (R_f 値 0.5-0.6) において, 最も分離度が鮮明に複数のバンドを検出できる条件としてこの濃度を選択した.

引用文献

- 1) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T. Mol Cell Proteomics. 2006;5:749-757.
- 2) Kinoshita-Kikuta E, Aoki Y, Kinoshita E, Koike T. Mol Cell Proteomics. 2007;6:356-366.
- 3) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E. Proteomics. 2011;11: 319-323.

1-2. Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE による 200 kDa 以上のタンパク質解析

1-1. 項で述べた Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE は、一般的な Laemmli の SDS-PAGE 法でもそうであるように、200 kDa 以上の高分子量タンパク質の分離は困難である。通常、解析対象のタンパク質の分子量が大きくなるほど低濃度のポリアクリルアミドゲルを用いるが、電気泳動後の染色や PVDF 膜への転写の操作に耐えるゲルの強度を保持するための最低限度濃度は 3-4% (w/v) である。本項では総アクリルアミド濃度が 4% (w/v) 以下の低濃度ゲルに対してアガロースゲルをブレンドしてゲル強度を高めた Mn²⁺-Phos-tag ゲルの作成法について述べる。また、その方法を用いて 200 kDa 以上の高分子量タンパク質のリン酸化解析を行った例を示す。

電気泳動で使用する溶液とその調製法

- 40% (w/v) アクリルアミド (1-1. 項と同じ)
- 2.5% (w/v) *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (ビス) (1-1. 項と同じ)
- 4×分離ゲルバッファー (1-1. 項と同じ)
- 4×濃縮ゲルバッファー (1-1. 項と同じ)
- 5.0 mM Phos-tag アクリルアミド (1-1. 項と同じ)
- 10 mM 塩化マンガン (1-1. 項と同じ)
- 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム (APS) (1-1. 項と同じ)
- *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) (1-1. 項と同じ)
- 1×泳動バッファー (1-1. 項と同じ)
- 3×SDS-PAGE 用サンプルバッファー (1-1. 項と同じ)
- 1.5% (w/v) アガロース, 50 mL

最終濃度 使用量

- SeaKem Gold Agarose (Lonza 社 Cat. #50152) (*17) 1.5% (w/v) 0.75 g

(*17) SeaKem Gold アガロース (1.5% [w/v] で 3500 g/cm² 以上のゲル強度) の代替品として、アガロース LO3 (タカラ社製, 1.5% [w/v] で 2200 g/cm² 以上)、アガロース KANTO (関東化学社製, 1.5% [w/v] で 900-1400 g/cm² 以上)、アガロース KANTO ME (関東化学社製, 1.5% [w/v] で 1200-1500 g/cm² 以上)、アガロース KANTO LE (関東化学社製, 1.5% [w/v] で 1400-1700 g/cm² 以上) の適合を確認している。Lonza 社製の NuSieve GTG (4% [w/v] で 500 g/cm² 以上) と NuSieve 3:1 (4% [w/v] で 1400 g/cm² 以上) は代替品として不適合であった。

ゲルの作成と通電条件

本項では例として、アトー社製の 8 (H) × 9 (W) cm, 1 mm 厚のミニスラブゲル装置を使用して、20 μM Phos-tag を含む 3%T, 3.3%C の分離ゲルを作成する場合について述べる。

操作 1. 以下の表の通りに分離ゲル, 濃縮ゲルの溶液を準備する。1.5% (w/v) アガロースと 10% (w/v) APS 以外のものを, コニカルチューブに混合する。

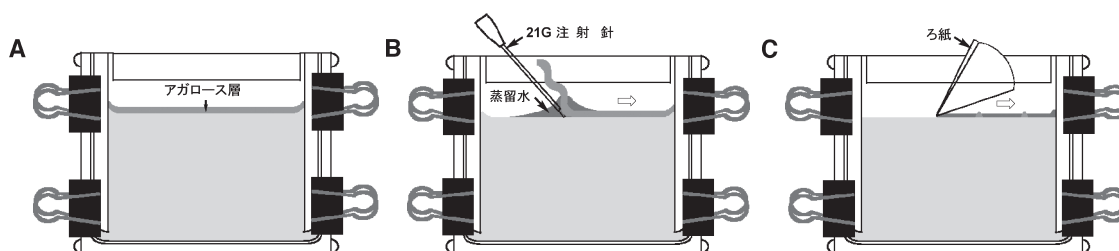
	分離ゲル 3%T, 3.3%C	濃縮ゲル (*18) 3%T, 3.3%C
40% (w/v) アクリルアミド	0.507 mL	0.146 mL
2.5% (w/v) ビス	0.329 mL	0.083 mL
4×分離ゲルバッファー	1.750 mL	—
4×濃縮ゲルバッファー	—	0.500 mL
5.0 mM Phos-tag アクリルアミド	0.028 mL	—
10 mM 塩化マンガン	0.028 mL	—
TEMED	0.015 mL	0.010 mL
蒸留水	1.100 mL	0.544 mL
1.5% (w/v) アガロース (*19)	2.333 mL	0.667 mL
10% (w/v) APS	0.100 mL	0.050 mL
Total	7.00 mL	2.00 mL

(*18) 濃縮ゲルの %T は分離ゲルと同じかそれ以下にする。

(*19) アガロースの最終濃度は 0.5% (w/v) となる。

- 操作 2. 1.5% (w/v) アガロースを電子レンジで溶解する. 100 mL マイヤーを使用し, 蒸発分を後で補うために, 加熱前に水面の位置に印をつけておく.
- 操作 3. アガロースがゲル化しないように速やかに, 10 mL 容量のピペットマンを用いて 2.333 mL をとり, 分離ゲル混合溶液に加えて混ぜ, その後直ちに 10% (w/v) APS を加えて混ぜ, ゲル板間隙に注入する. 熱いので正確には吸引できないが, ピペットマンチップの 2.333 mL の容量の位置に印をつけておき, それを目安に吸引する.
- 操作 4. 10 分以上経過してアクリルアミドがゲル化したら, 分離ゲル上部にアガロースゲル層ができる (下図 A). 0.1 mL の蒸留水を加え, アガロースゲル層を 21G の注射針を用いて取り除く (下図 B). アガロースのかけらと蒸留水は, ろ紙で完全に拭き取る (下図 C) (*20).

(*20) アガロース層を完全に除去しなければ分離ゲルと濃縮ゲルが密着しない.



- 操作 5. 濃縮ゲルを同様に作成して, 直ちにコウムを挿す.
- 操作 6. 10 分以上経過して濃縮ゲルが重合したら, 泳動バッファーをコウムにかけて, 静かにコウムを引き抜く.
- 操作 7. 予め下部バッファーを入れた電気泳動層にゲル板をセットする.
- 操作 8. サンプルをアプライして通電する. 通電条件は, 8 (H) × 9 (W) cm, 1 mm 厚のミニスラブゲルの場合, 1 枚のゲルあたり 15 mA とする. 電流値を高くすると, 泳動中の発熱により, アガロースが溶解するので, いずれの電気泳動装置を使用する場合にも, 発熱を防ぐことが出来る範囲の電流値に設定する.

サンプルの作成

1-1. 項と同じ.

アガロース入り Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGEゲルの染色

CBB 染色法と SYPRO Ruby などによる蛍光染色法は可能であるが, アガロースを含むため, 銀染色法は適用できない.

アガロース入り Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE後のウェスタン解析

1-1. 項と同じ操作であるが, 通電条件が異なる. タンク式の転写装置を用いるが, 電圧値が高いと, アガロースゲルが局所的に溶解して PVDF 膜に貼り付くので, 低電圧で長時間 (3.3 V/cm, 16 時間) 転写する. 冷却装置がある機種を用いる場合でも, 高電圧, 短時間のプロトコールは推奨しない.

実験例 4 DNA 損傷応答タンパク質 ATM (350 kDa) の解析^{4,5)}

DNA 損傷刺激に伴う HeLa 細胞内の毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子産物である ataxia telangiectasia-mutated kinase (ATM, 350 kDa) のリン酸化状態の変化を解析した. ATM は DNA 損傷刺激における細胞内シグナル伝達の上流に位置するタンパク質キナーゼであり, 刺激を受けると自己の 1981 番目のセリン残基をリン酸化する. 自己リン酸化により活性化した ATM は, 基質となる他の DNA 損傷応答タンパク質をリン酸化する. 本実験では, DNA 損傷刺激剤として DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ阻害剤である Actinomycin D (2 μM, 5 時間処理) を用いた.

試薬

- Actinomycin D, シグマ社, E1257
- 抗 ATM 抗体, マウスモノクローナル (clone 2C1), Santa Cruz 社, sc-23921
- 抗リン酸化 ATM pS¹⁹⁸¹ 抗体マウスモノクローナル (clone 10H11.E12), Rockland 社, 200-301-400

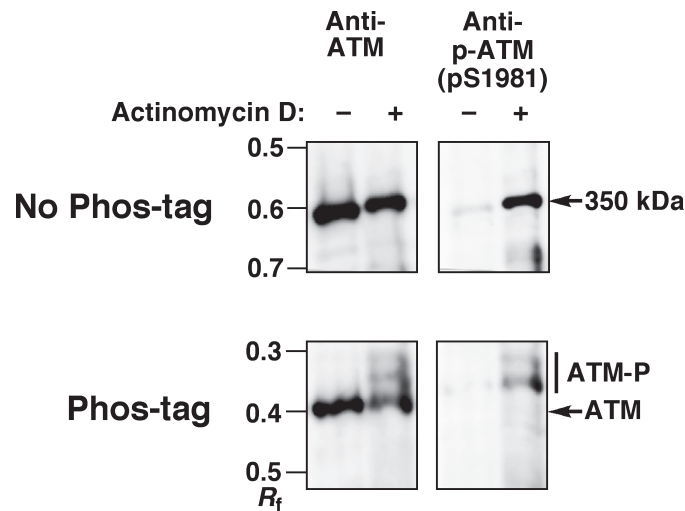
操作 1. HeLa 細胞の Actinomycin D 処理と細胞抽出液の調製

1. 10% の血清を含む DMEM 培地 (3.0 mL) を用いて, 直径 3 cm のシャーレで 10⁶ 個の HeLa 細胞 (接着細胞) を 80% コンフルエントまで培養する.
2. 2 mM Actinomycin D (DMSO に溶解したもの) を 2 μM になるように 1/1,000 容量添加して素早く攪拌し, CO₂ インキュベーター内で 2 時間置く (未刺激サンプルは DMSO を添加).
3. 刺激後, シャーレから素早く培地を除き, 室温の細胞洗浄用 TBS バッファーで洗浄する.
4. 1× SDS-PAGE 用サンプルバッファーを 0.10 mL 添加して, 細胞を溶解する.
5. セルスクレイパーを用いて細胞溶解液をマイクロチューブに回収する.
6. 超音波破砕機で DNA による粘性を除く.
7. 95°C, 3 分の加熱処理を行う. この調製法では約 2 mg タンパク質/mL となる.

操作 2. 25 μM Mn²⁺-Phos-tag を含む 3%T, 3.3%C アクリルアミドゲル (0.5% [w/v] アガロースを含む) を作成する.

操作 3. 泳動後のゲルを PVDF 膜に転写する.

操作 4. 転写した PVDF 膜は抗リン酸化 ATM pS¹⁹⁸¹ 抗体によるウェスタン解析を行う. その後, 同じ膜を抗 ATM 抗体でリプロービングする.



実験例 4. DNA 損傷応答タンパク質 ATM (350 kDa) の解析 (文献 4 より転載)

Phos-tag を含まない 3%T ゲル (0.5% アガロース含む) に Actinomycin D 処理 (+) および無処理 (-) の細胞溶解試料を 20 μg タンパク質 /lane でアプライしたとき, 抗 ATM 抗体によるウェスタン解析で, 各試料の ATM 量がほぼ同じであることがわかる (図, 左上). 同じプロット膜を抗リン酸化 ATM (pS1981) 抗体で解析すると, ATM の自己リン酸化が確認できる (図, 右上). 20 μM の Phos-tag を含む 3%T ゲル (0.5% アガロース含む) で同様の解析を行ったところ, 抗 ATM 抗体による解析において, Actinomycin D 処理後の試料では R_f 値 0.3–0.4 の範囲で 3 つのバンドが確認できた (図, 左下). 同じプロット膜を抗リン酸化 ATM (pS1981) 抗体で解析すると R_f 値の小さい 0.35 と 0.31 の 2 つのバンドが ATM のリン酸化フォームであることがわかった (図, 右下).

引用文献

- 4) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Ujihara H, Koike T. Proteomics. 2009;9:4098–4101.
- 5) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Nat Protoc. 2009;9:513–1521.

1-3. 中性 Bis-Tris ゲルの SDS-PAGE 系を用いる Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE³⁾

1-1. と 1-2. 項で述べた Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE は、一般的な Laemmli の SDS-PAGE 法を適用しており、簡便ではあるが、いくつかのタンパク質において、そのリン酸化フォームと非リン酸化フォームを分離することができない事例がある。Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE では泳動中のゲル内 pH が 9 以上となるのに対して、中性 Bis-Tris ゲルの SDS-PAGE 系を用いる Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE は Phos-tag が最も高いリン酸基捕捉能を示す中性 pH での泳動が可能であり、その分離能力が飛躍的に改善した。本項では中性 Bis-Tris ゲルの SDS-PAGE 系を用いる Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE 法について述べる。また、Mn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE と比較しながら、タンパク質のリン酸化解析を行った例については、本特集号の木下(恵)らの稿を参照していただきたい。

電気泳動で使用する溶液とその調製法

- 40% (w/v) アクリルアミド (1-1. 項と同じ)
- 2.5% (w/v) N,N'-メチレンビスアクリルアミド (ビス) (1-1. 項と同じ)
- 5.0 mM Phos-tag アクリルアミド (1-1. 項と同じ)
- 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム (APS) (1-1. 項と同じ)
- N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) (1-1. 項と同じ)
- 50% (v/v) イソプロパノール (1-1. 項と同じ)
- 3×SDS-PAGE 用サンプルバッファー (1-1. 項と同じ)
- 10 mM 塩化亜鉛, 50 mL

	最終濃度	使用量
・塩化亜鉛	10 mM	68.1 mg
蒸留水に溶解後, 50 mL にメスアップする (*20).		

(*20) 塩化亜鉛溶液は、遮光ビン中、室温で1年以上保存できる。

- 分離 / 濃縮ゲルバッファー (Bis-Tris-HCl [pH 6.8]), 100 mL

	最終濃度	使用量
・Bis-Tris	1.0 M	20.9 g
蒸留水に溶解後, 塩酸で pH 6.8 に調整し, 蒸留水で 100 mL にメスアップする。		

- 5×泳動バッファー, 1 L

	最終濃度	使用量
・MOPS	0.50 M	104.6 g
・Tris	0.50 M	60.6 g
・SDS	0.50% (w/v)	5.0 g
蒸留水に溶解後, 1 L にメスアップする。pH 調整はしない。		

- 1×泳動バッファー, 1 L

	最終濃度	使用量
・5×泳動バッファー		0.20 L
・Sodium bisulfite	5.0 mM	0.531 g
蒸留水で溶解後, 1 L にメスアップする (*21).		

(*21) Sodium bisulfite は SH 還元剤として添加する。用時溶解する。

ゲルの作成

操作手順は 1-1. 項で述べた方法と全く同じであるが、ゲル組成が異なる。アトー社の 8 (H) × 9 (W) cm, 1 mm 厚のミニスラブゲル装置を使用して、100 μM Phos-tag を含む 10%T, 3.3%C の分離ゲルを作成する場合、ゲル組成は以下の表の通りである。

	分離ゲル (*22) (10%T, 3.3%C)	濃縮ゲル (4%T, 3.3%C)
40% (w/v) アクリルアミド	1.692 mL	0.217 mL
2.5% (w/v) ビス	0.934 mL	0.120 mL
分離 / 濃縮ゲルバッファー (*23)	2.500 mL	0.715 mL
5.0 mM アクリルアミド化 Phos-tag	0.140 mL	—
10 mM 塩化亜鉛	0.140 mL	—
TEMED	0.015 mL	0.010 mL
10% (w/v) APS	0.100 mL	0.050 mL
蒸留水	1.479 mL	0.888 mL
Total	7.00 mL	2.00 mL

(*22) アクリルアミドの %T, %C は実験目的によって変える。

(*23) Bis-Tris-HCl (pH6.8) の最終濃度は 357 mM となる。

Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE通電条件

アトー社製の 8 (H) × 9 (W) cm, 1 mm 厚のミニスラブゲル泳動装置では, ゲル 1 枚あたり 40 mA で泳動フロント (BPB 色素) が下端に到達するまで, 約 85 分である。

サンプルの作成

分子量マーカーの選定

Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGEゲルの染色

Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE後の質量分析

Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE後のウェスタン解析

1-1. 項と同じ。

2. ビオチン化 Phos-tag によるリン酸化タンパク質の検出

概要

リン酸化タンパク質の研究において抗リン酸化抗体は欠かせないツールといえるだろう。網羅的なリン酸化タンパク質の解析にあたっては、抗リン酸化チロシン抗体の pY20 や 4G10 などの優れたモノクローナル抗体が販売されている。しかしながら、セリンやスレオニン残基がリン酸化されたタンパク質を一網打尽に解析するための抗体に関しては、特異性や感度について満足できない場合が多い。一方、Phos-tag はチロシン/セリン/スレオニンのいずれのリン酸基にもほとんど同じ親和性を持ち、小分子であるため抗体よりもリン酸化部位の周囲の構造に影響されにくい利点を有す。筆者らは、Phos-tag を抗体に替わる網羅的なリン酸化タンパク質解析ツールとして「ビオチン化 Phos-tag」を開発した。

ビオチン化 Phos-tag は、PVDF 膜上のリン酸化タンパク質を特異的に検出できる分子である。この検出法の概要を図 3 に示す。ビオチン化 Phos-tag を、予め市販品の HRP (西洋わさびペルオキシダーゼ) 結合型ストレプトアビジンと 4:1 の複合体を形成させておき、ブロット膜をプロービングする。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 Phos-tag は、市販の化学発光基質 (GE ヘルス

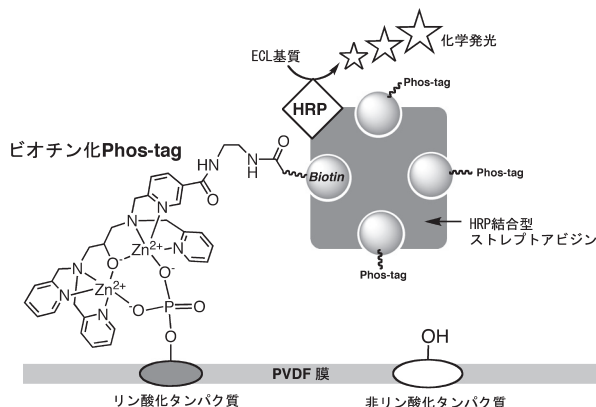


図 3. ビオチン化 Phos-tag によるリン酸化タンパク質の検出の概要

ケア社の ECL キットなど) と HRP の反応によって検出される。これは、一般的なウェスタン解析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 Phos-tag に替えただけの簡便な方法である。また、通常ウェスタン解析では、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しない。さらに 2 次抗体によるプロービングの段階が不要であるので時間と手間を大幅に節約できる。

使用する溶液とその調製法

● 10× Tris-buffered saline (TBS), 1 L

	最終濃度	使用量
• Tris	0.10 M	12.1 g
• 塩化ナトリウム	1.0 M	58.4 g

蒸留水で溶解後、塩酸で pH 7.5 に調整し、蒸留水で 1 L にメスアップする。

● 10% (v/v) Tween 20, 50 mL

	最終濃度	使用量
• Tween 20	10% (v/v)	5.0 mL

蒸留水で溶解後 50 mL にメスアップする。

● 1× TBS-T, 1 L

	最終濃度	使用量
• 10× TBS		0.10 L
• 10% (v/v) Tween 20	0.10% (v/v)	10 mL

蒸留水で溶解後 1 L にメスアップする。

● 10 mM ビオチン化 Phos-tag, 1.3 mL

	最終濃度	使用量
・ ビオチン化 Phos-tag (BTL-104) (*24)		10 mg
・ 0.13 mL メタノール	10% (v/v)	0.13 mL
・ 1 × TBS-T		1.17 mL

(*24) BTL-104 は和光純薬工業株式会社から発売されている。

メタノールをビオチン化 Phos-tag の製品チューブに加えて溶解後 1 × TBS-T を加えて混合する。

● 10 mM 硝酸亜鉛, 50 mL

	最終濃度	使用量
・ 硝酸亜鉛 6 水和物	10 mM	0.15 g

蒸留水に溶解して 50 mL とする (*25)。

(*25) BTL-104 溶液, 硝酸亜鉛溶液とも室温で 1 年以上安定に保存できる。10 mM 硝酸亜鉛は, 前述の 10 mM 塩化亜鉛 (参照 1-3. 項) でも代替可能である。

● HRP 結合型ストレプトアビジン

- ・ ECL Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (GE ヘルスケア社, RPN1231)

● ECL キット

- ・ ECL Prime Western Blotting Detection reagent (GE ヘルスケア, RPN2232)
- ・ Lumigen TMA-6 (Lumigen 社, #TMA-100) (*26)

(*26) Lumigen 社の TMA-6 は 2011 年 12 月に GE ヘルスケア社からの販売が中止となった ECL Advance Western Blotting Detection reagent の同等品である。

● 限外ろ過遠心式ユニット

ミリポア社, アミコンウルトラ-0.5 30 K
ポール社, NANOSEP 30K OMEGA など。

● 化学発光検出装置

各種イメージアナライザあるいは X 線フィルム (*27)。

(*27) ECL キットや検出機器 (各種イメージアナライザや X 線フィルム) によって検出感度はかわる。筆者らは, 富士フィルム社製 LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザを用いて検出を行った。

リン酸化タンパク質の検出

操作 1. ビオチン化 Phos-tag と HRP 結合型ストレプトアビジンとの複合体の調製

1. 以下の割合の各溶液を 1.5 mL 遠心チューブ中で混合した後, 室温で 30 分間置く。

・ 1 × TBS-T	469 μ L
・ 10 mM ビオチン化 Phos-tag	10 μ L
・ 10 mM 硝酸亜鉛水溶液	20 μ L
・ HRP 結合型ストレプトアビジン	1 μ L

2. 上記混合液を限外ろ過遠心ユニットに移し, 室温で 14,000 g, 20 分遠心する。
3. 限外ろ過ユニットに残る液量が 10 μ L 以下になったら (それ以上ならば, 10 μ L 以下になるまでさらに 14,000 g で遠心する), 1-30 mL の 1 × TBS-T で希釈し, 新しいチューブに移す (1 × TBS-T での希釈率は使用する ECL キットと検出機器によって変わる。イメージアナライザを使用する時, ECL Prime の場合は 1-10 mL, Lumigen TMA-6 の場合は 30 mL に希釈することが最適であることを確認している)。

操作 2. プロット膜を十分に 1 × TBS-T と馴染ませる (*28)。

(*28) プロット膜が TBS-T と馴染んでいないと, すべてのタンパク質バンドが白く, バックが黒く, 反転した結果になる。

操作 3. ハイブリバッグあるいはタッパー中で, プロット膜とビオチン化 Phos-tag と HRP 結合型ストレプトアビジン複合体溶液を 30 分以上プロービングする (*29)。

(*29) 抗体によるウェスタン解析のようなブロッキングは不要である。

操作 4. プロービング後のプロット膜は、タッパー内で十分量の 1×TBS-T で洗浄後（10 分×3 回）、直ちに化学発光検出を行う。

ビオチン化Phos-tag検出後の他の抗体によるリプロービング

一般的な抗体除去液での処理後、リプロービング操作が可能である。

●抗体除去液, 0.1 L

	最終濃度	使用量
• 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	62.5 mM	12.5 mL
• 10% (w/v) SDS	2.0% (w/v)	20 mL
• 2-メルカプトエタノール	0.1 M	0.7 mL

蒸留水で 100 mL にメスアップする。

(*30) 抗体除去液に浸した後、50-70°C に加熱する必要はない。

操作 1. 化学発光検出後のプロット膜をタッパー内の抗体除去液に浸し、15 分間振とうする (*30)。

操作 2. 十分量の 1×TBS-T で洗浄（10 分×3 回）後、他の抗体でプロービングする。

実験例 5 *In vitro* チロシンキナーゼ / フォスファターゼ反応のモニタリング¹⁾

試薬

- チロシン脱リン酸化酵素: Recombinant protein tyrosine phosphatase (TC-PTP), Calbiochem, Cat. #539732
- その他の試薬は、1-1. 項で述べた実験例 2 と同じ。

操作 1. 12.5%T, 3.3%C アクリルアミドゲルを作成する。

操作 2. 1-1. 項で述べた実験例 2 と同じ操作でキナーゼ反応を行う。

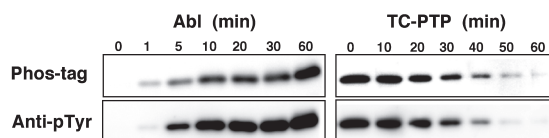
操作 3. フォスファターゼ反応を行う（反応温度は 30°C）。

Abltide-GST 10 μg, TC-PTP 30 units を含む反応バッファー（50 mM Tris-HCl [pH 7.5]）100 μL 中で反応を行い、0, 1, 5, 10, 20, 30, 60 分ごとに 14 μL サンプルングして 1/2 容量の 3×SDS-PAGE 用サンプルバッファーを加え、95°C, 3 分加熱後、アプライする（1.4 μg/lane）。

操作 3. SDS-PAGE を行い、泳動後のゲルを PVDF 膜に転写する。

操作 4. ビオチン化 Phos-tag と HRP 結合型ストレプトアビジンとの複合体による検出を行う。

操作 5. 抗リン酸化チロシン抗体によるリプロービングを行う。



実験例 5. *In vitro* チロシンキナーゼ (Abl) / フォスファターゼ (TC-PTP) 反応のモニタリング (文献 1 より転載)

上段のプロットがビオチン化 Phos-tag 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、抗リン酸化チロシン抗体(下段, Anti-pTyr)を用いたイムノブロッティングによっても確認できた。

実験例 6 EGF 刺激による A431 細胞内タンパク質のリン酸化反応解析¹⁾

試薬

- EGF, シグマ社, E1257
- SYPRO Ruby gel stain, インビトロジェン社
- Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain, インビトロジェン社
- 抗リン酸化チロシン抗体, マウスモノクローナル (clone PY20), GE ヘルスケア社
- 抗リン酸化セリン抗体, Zymed 社, Cat# 61-8100
- Alkaline phosphatase, シグマ社, P5521 (アルカリフォスファターゼ)

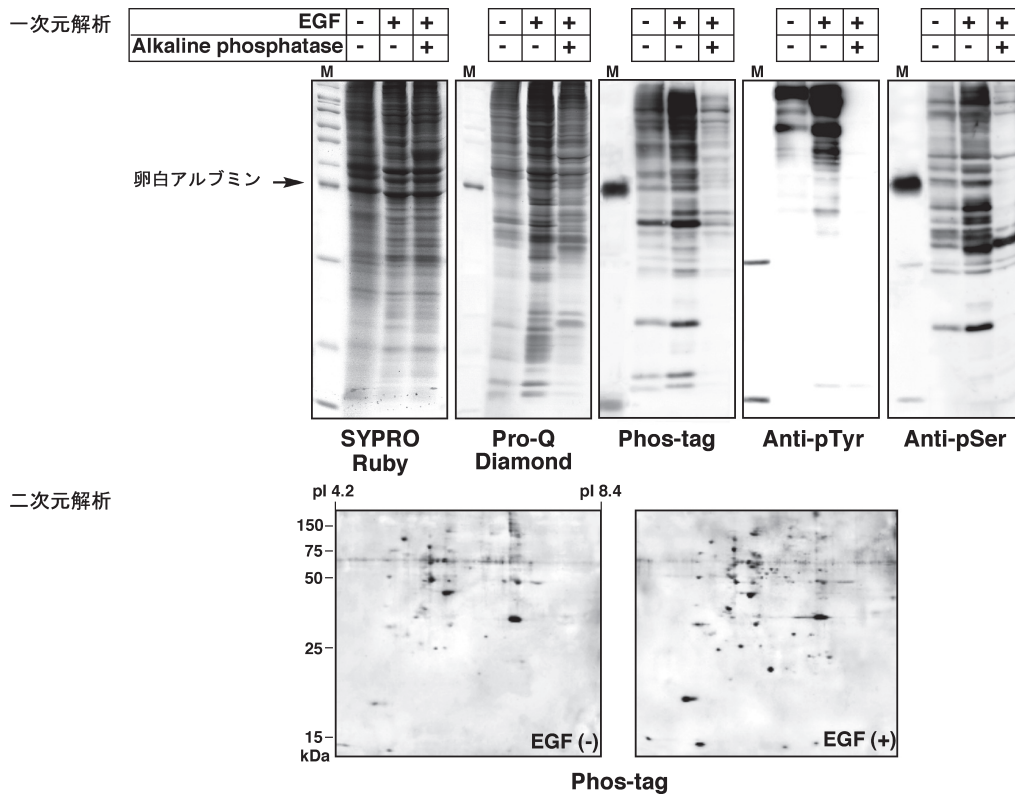
操作 1. 一次元の解析用に 10%T, 3.3%C ポリアクリルアミドゲルを作成する.

操作 2. 二次元の解析用に, pH 3-10 の勾配を持つ等電電気泳動用のゲル (一次元目) と, 10%T, 3.3%C ポリアクリルアミドゲル (二次元目) を作成する.

操作 3. A431 細胞の EGF 刺激 (250 ng/mL, 5 分) したものと, 刺激しないものの細胞抽出液を調製する. 1-1. 項の実験例 3 と同じ操作.

操作 4. 一次元解析用には, 7.5 µg/lane になるようにサンプルをアプライする. 二次元解析用には, 50 µg/gel になるように等電電気泳動ゲルにアプライする.

操作 5. 泳動後, ゲル染色, あるいは PVDF 膜への転写とビオチン化 Phos-tag による検出と抗体による検出を行う.



実験例 6. EGF 刺激による A431 細胞内タンパク質のリン酸化反応解析 (文献 1 より転載)

一次元解析では SYPRO Ruby による総タンパク質の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染色で, 細胞内タンパク質のリン酸化状態が変化していることがわかる. Phos-tag による検出では, 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. また, 分子量マーカーの卵白アルブミンが特異的に染色される. また, 抗リン酸化チロシンおよびセリン抗体による解析結果と比較しても, Phos-tag によるリン酸化状態の変化の解析結果は信頼度の高いものである. 二次元解析では, EGF 刺激後にリン酸化タンパク質として検出されるスポットのシグナル強度とその数が増大していることが分かる.

3. Phos-tag アガロースによるリン酸化タンパク質の分離・濃縮

概要

生体内に存在する全てのタンパク質のうち、60%以上がリン酸化されるタンパク質であるといわれる。しかし、リン酸化タンパク質は、ダイナミックに変化するキナーゼ/フォスファターゼ反応によって刻一刻とリン酸化と脱リン酸化を繰り返しており、実際にリン酸化状態にあるのは極微量である可能性が高い。そのようなリン酸化タンパク質を研究する上で、リン酸化タンパク質を生体内の環境に近い条件で分離、濃縮することは非常に有効な手法である。筆者らは生理的 pH でリン酸基を捕捉するという Phos-tag

の特性を利用したリン酸基親和性クロマトグラフィー担体、Phos-tag アガロースを合成し、リン酸化タンパク質の分離濃縮法の開発を行った。Phos-tag アガロースではリン酸化ペプチドおよびリン酸化タンパク質の分離、濃縮、精製が可能である。また、サンプルの量や実験目的によって、使用するカラムサイズを自在に変えることができる(図4)。ここでは、プロテオミクス解析を目的とした、1 mLのカラムスケールでのリン酸化タンパク質の分離・濃縮法(3-1項)と、ウェスタン解析のサンプル前処理を目的としたスピンカラムスケールでのリン酸化タンパク質の分離法(3-2項)について述べる。

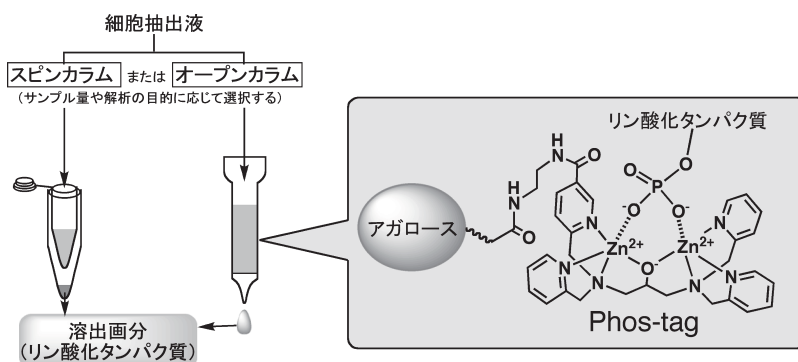


図4. Phos-tag アガロースカラムの概要

3-1. 細胞抽出液からの網羅的なリン酸化タンパク質の分取

使用する溶液とその調製法

● Phos-tag アガロース (*31)

● カラム結合・洗浄液, 0.1 L

	最終濃度	使用量
・ Tris	0.10 M	1.21 g
・ 酢酸ナトリウム	1.00 M	8.21 g

蒸留水に溶解後、酢酸で pH 7.5 に調整し、蒸留水で 100 mL にメスアップする。

● 10 mM 酢酸亜鉛, 0.1 L

	最終濃度	使用量
・ 酢酸亜鉛 2 水和物	10 mM	0.220 g

● カラム平衡化液, 0.1 L

	最終濃度	使用量
・ カラム結合・洗浄液		99.8 mL
・ 10 mM 酢酸亜鉛	20 μM	0.20 mL

(*31) Phos-tag アガロースは和光純薬工業株式会社より販売されている。

● 0.10 M リン酸二水素ナトリウム, 0.1 L

	最終濃度	使用量
・リン酸二水素ナトリウム 2 水和物	0.10 M	1.56 g

蒸留水に溶解後, NaOH 水溶液で pH 7.5 に調整し, 蒸留水で 100 mL にメスアップする.

● カラム溶出液, 0.1 L

	最終濃度	使用量
・ Tris	0.10 M	1.21 g
・ 塩化ナトリウム	1.0 M	5.80 g

約 80 mL の蒸留水で溶解後, 酢酸で pH 7.5 に調整し, さらに 10 mL の 0.10 M リン酸二水素ナトリウム (最終濃度 10 mM) を加えた後, 蒸留水で 100 mL にメスアップする.

● 限外ろ過遠心ユニット

ミリポア社のアミコンウルトラ-0.5 10K など.

● エンプティカラム

キアゲン社のポリプロピレンカラムなど.

細胞抽出液の調製

1-1. 項, 実験例 3 と同様に, 阻害剤含 RIPA バッファーを用いて細胞抽出液 (可溶性タンパク質画分) を調製する.

カラム操作

操作 1. エンプティカラムに 2 mL の Phos-tag アガロース懸濁液 (50% [v/v]) をピペットマンを用いて充填する (実質アガロース容積は 1 mL).

操作 2. カラム結合・洗浄液で洗浄する (3 mL × 1 回). この操作で保存液を除去する.

操作 3. カラム平衡化液で平衡化する (3 mL × 1 回).
この操作で Phos-tag 亜鉛錯体を形成する (*32).

(*32) Phos-tag アガロースは亜鉛錯体として販売されているが, 使用前に再度亜鉛を含むバッファーで平衡化する.

操作 4. カラム結合・洗浄液で洗浄する (3 mL × 1 回).
この操作で過剰の亜鉛を洗浄する.

操作 5. RIPA バッファーに溶解したタンパク質試料 0.50 mg, 容積 0.25 mL を上限として, 試料容積の 4 倍容量のカラム結合・洗浄液を加えて混合し (*33), カラムに滴下しながら全量をアプライする.

(*33) カラムに添加する試料中の RIPA バッファーの組成の相対量を減らすために 5 倍希釈する.

操作 6. カラムから排出された溶液は素通り・洗浄画分として回収する.

(*34) カラム結合・洗浄液中の酢酸ナトリウムは, Phos-tag とタンパク質中の COOH 基との非特異的結合を阻止する.

操作 7. カラム結合・洗浄液で非結合タンパク質を洗浄する (3 mL × 1 回) (*34). カラムから排出された溶液は, 素通り・洗浄画分として回収する.

(*35) カラム溶出液中の塩化ナトリウムは, Phos-tag アガロースカラムとタンパク質の静電的結合を解除し, 無機リン酸によるリン酸化タンパク質の溶出を促進する.

操作 8. カラム溶出液で結合タンパク質を溶出する (3 mL × 1 回) (*35).

実験例 7 EGF 刺激後の A431 細胞のリン酸化タンパク質の分離・濃縮⁶⁾

試薬

- EGF, シグマ社, E1257
- SYPRO Ruby gel stain, インビトロジェン社
- Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain, インビトロジェン社
- 抗リン酸化 MAPK1/2 (Erk1/2) pT²⁰²/pY²⁰⁴ 抗体, セルシグナリング社, Cat. #9101
- 抗リン酸化 SHC pY³¹⁷ 抗体, ミリポア社, Cat. #07-206
- 抗リン酸化 Erb B2/HER-2 pY¹²⁴⁸ 抗体, ミリポア社, Cat. #06-229

操作 1. A431 細胞の EGF 刺激と細胞抽出液の調製は 1-1. 項の実験 3 と同様に行う.

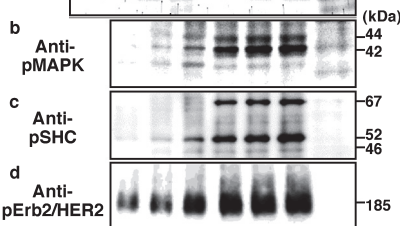
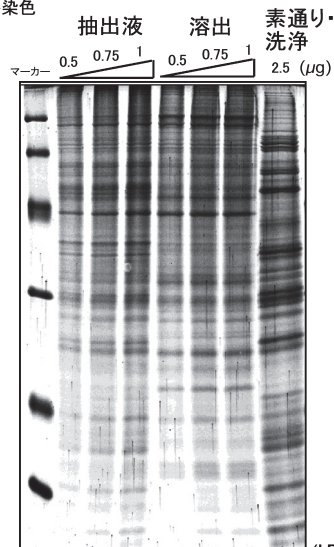
操作 2. 0.50 mg タンパク質, 0.25 mL 容量の試料に対して 1 mL のカラム結合・洗浄液を加えて混合し, Phos-tag アガロースカラムにアプライする.

操作 3. 各画分は限外ろ過遠心ユニットで濃縮する.

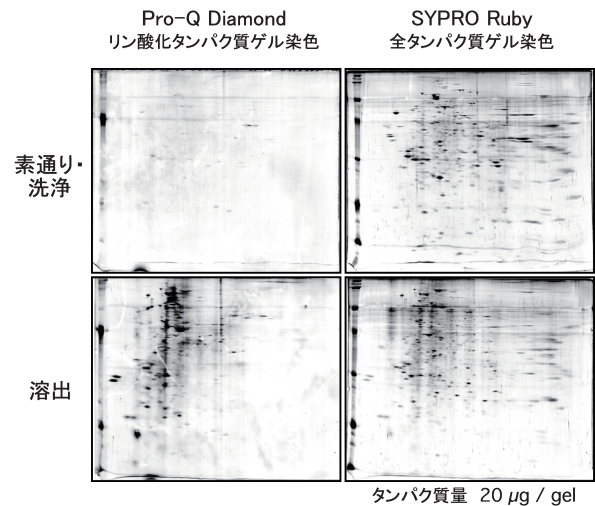
操作 4. SDS-PAGE と二次元電気泳動法を用いてリン酸化タンパク質の分離・濃縮について検証する.

A リン酸化タンパク質の濃縮の検証

a 全タンパク質ゲル染色



B 各画分の二次元解析



C オープンカラム法における各画分の収量

	タンパク質量 (割合)
カラム添加量	500 μg (100%)
素通り・洗浄画分	250 μg (50%)
溶出画分	110 μg (22%)
ロス	140 μg (28%)

実験例 7. EGF 刺激後の A431 細胞のリン酸化タンパク質の分離・濃縮 (文献 6 より転載)

0.50 mg のタンパク質を含む細胞抽出液をオープンカラム法で分離し, その効果を検証した. 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 μg, 素通り・洗浄画分は 2.5 μg になるように SDS-PAGE に供した (A). 全タンパク質ゲル染色像 (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ことが確認できた. さらに MAPK, SHC, Erb2/HER2 (いずれも EGF 刺激後にリン酸化が亢進することが分かっている) の抗リン酸化抗体を用いたウェスタン解析 (b-d) から, 分離前の細胞抽出液ではシグナルが弱い, あるい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. また, 各画分のタンパク質 (20 μg) を二次元電気泳動解析した (B). 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. 二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, その後の質量分析に有効である. この実験ではオープンカラム法で 0.50 mg の細胞タンパク質を分離したが, 0.25 mg (50%) を非リン酸化タンパク質として排除し, 0.11 mg (22%) のタンパク質を溶出画分に得た (C). 0.14 mg (28%) のロスがあったが, そ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.

引用文献

6) Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Yamada A, Koike T. Proteomics. 2006;6:5088-5095.

3-2. リン酸化タンパク質のウェスタン解析のためのサンプル前処理法

Phos-tag アガロースのさらなる適用法として, 抗リン酸化抗体によるイムノブロッティングの特異的シグナルを増感させるための, 細胞抽出液の前処理カラムとしての利用法を紹介する. 特定のタンパク質の細胞内でのリン酸化状態を抗リン酸化抗体によるイムノブロッティングで解析しようとするとき, 様々なタンパク質が混在する試料においては, 目的バンドのシグナルが微弱であったり, 非特異的なシグナルが多かったりして, 目的タンパク質のリン酸化状態が判断できないというトラブルに多々遭遇する. 抗体は, タンパク質研究にとってとても有用なツールであり, 高価な試薬でもある. ゆえに, それを用いて出来る限りの正確なデータを得ることが望まれる. 細胞からの試料調製法を変える, あるいはイムノブロッティングにおけるブロッキング剤を変えることによって, 結果が改善することもあるため, 条件検討に時間を費やすことも有用ではある. 一方, リン酸化タンパク質のイムノブロッティングにおいては, リン酸化タンパク質だけを Phos-tag アガロースで分取した試料を用いることにより劇的な結果の改善が見られる. ここでは, マイクロチューブを使って作製できる簡易的なスピнкаラムを用い, Phos-tag アガロースビーズで細胞抽出液を前処理する方法について述べる.

使用する溶液とその調製法

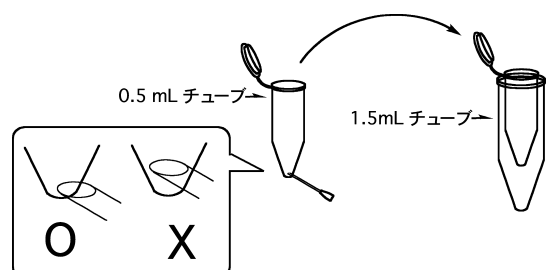
- Phos-tag アガロース (3-1. 項と同じ)
- カラム結合・洗浄液 (3-1. 項と同じ)
- カラム平衡化液 (3-1. 項と同じ),
- カラム溶出液 (3-1. 項と同じ)
- 3×SDS-PAGE 用サンプルバッファー (1-1. 項と同じ)
- 1.5 mL マイクロチューブ (グライナー社, マイクロチューブ, Product #616201 など)
- 0.5 mL マイクロチューブ (グライナー社, PCR チューブ, Product #672201 など)
- 21G 注射針

細胞抽出液の調製

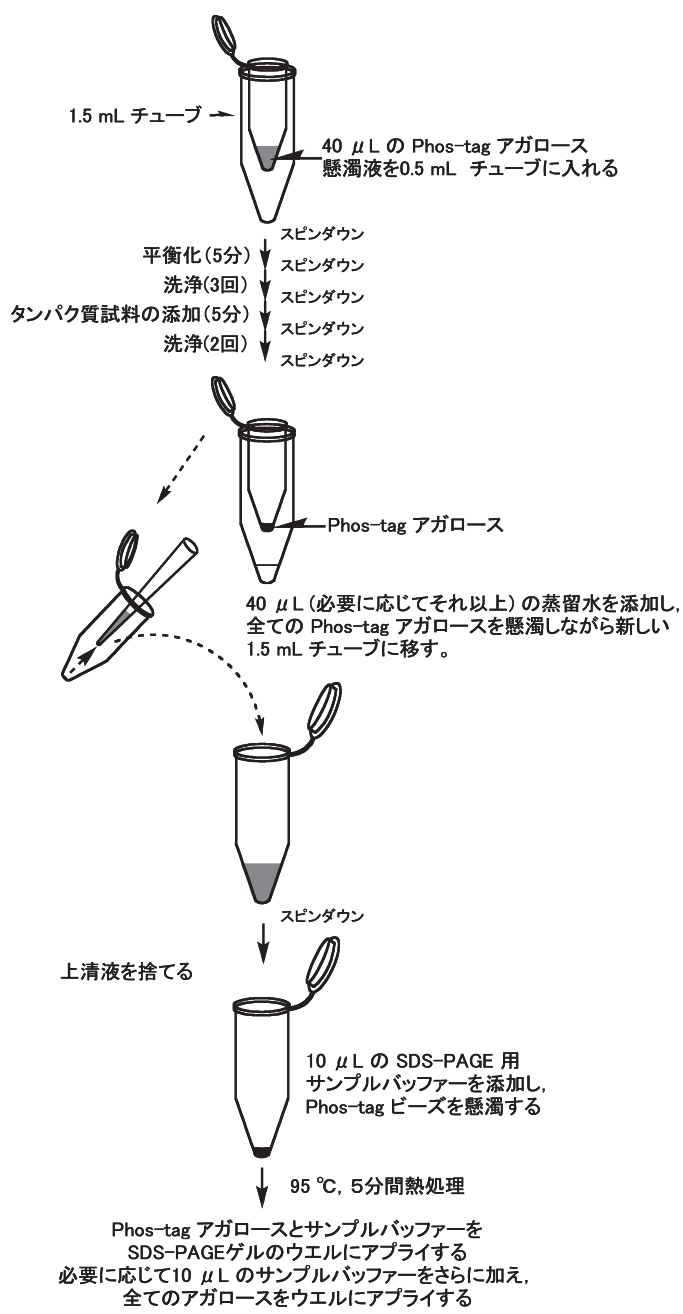
1-1. 項の実験例 3 と同様に, RIPA バッファーを用いて細胞抽出液 (可溶性タンパク質画分) を調製する. SDS を初めとする陰イオン性界面活性剤は Phos-tag の機能を阻害するので, それらを含む細胞溶解液を使用するサンプル調製は推奨しない. 尿素を含む細胞溶解液は使用できる.

簡易カラム作成法

操作 1. 21G の注射針で 0.5 mL のチューブの底に小さな穴をあけ, フタを切り取った 1.5 mL マイクロチューブに重ねる (右図). このとき, 針を貫通させて穴を大きくしないように注意する.



- 操作 2. 40 μL の Phos-tag アガロース懸濁液 (実質 Phos-tag アガロースは 20 μL) を 0.5 mL チューブに入れ, スピンドアウン (簡易卓上遠心機 2,000 g で 30 秒) する.
- 操作 3. カラム平衡化液 (40 $\mu\text{L} \times 1$ 回) を加え, スピンドアウンする.
- 操作 4. カラム結合・洗浄液 (40 $\mu\text{L} \times 3$ 回) を加え, スピンドアウンする.
- 操作 5. タンパク質試料 20–40 μg (10–20 μL の容量) を加え, 5 分置き, スピンドアウンする.
- 操作 6. カラム結合・洗浄液 (40 $\mu\text{L} \times 2$ 回) を加え, スピンドアウンする.
- 操作 7. 40 μL の蒸留水 (必要に応じてそれ以上) を加え, Phos-tag アガロースを懸濁しながら新しいチューブに全て移す. 結合したタンパク質が水に溶出することはない, この操作で, カラム用バッファーに含まれるナトリウム塩が洗浄され, 泳動の乱れが軽減される.
- 操作 8. 懸濁液をスピンドアウンし, 上清液を除去する.
- 操作 9. 10 μL の 1 \times SDS-PAGE 用サンプルバッファーを加え, Phos-tag アガロースを再び懸濁して, 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 分加熱する.
- 操作 10. 懸濁液を SDS-PAGE にアプライする. 必要に応じてサンプルバッファーを追加し, すべての Phos-tag アガロースをアプライする.



実験例 8 リン酸化 MAPK とリン酸化 SHC のウェスタン検出における適用⁷⁾

試薬

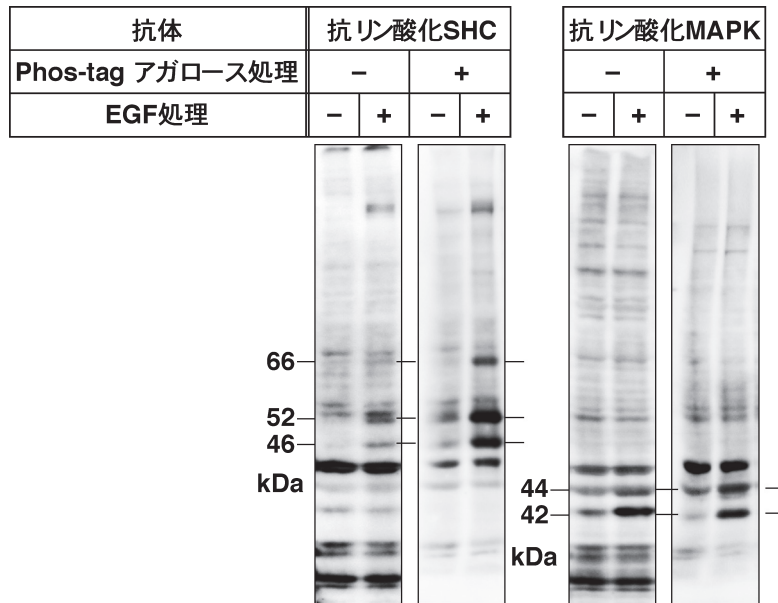
- EGF, シグマ社, E1257
- 抗リン酸化 MAPK1/2 pT²⁰²/pY²⁰⁴ 抗体, マウスモノクローナル (clone 12D4), ミリポア社, Cat. #05-481
- 抗リン酸化 SHC pY³¹⁷ 抗体, ミリポア社, Cat. #07-206

操作 1. A431 細胞の EGF 刺激 (250 ng/mL, 5 分) したものと, 刺激しないものの細胞抽出液を調製する. 1-1. 項の実験例 3 と同じ操作.

操作 2. 20 μg タンパク質, 10 μL 容量の試料を Phos-tag アガロース簡易カラムで精製する.

操作 3. 8%T, 3.3%C ポリアクリルアミドゲルの SDS-PAGE にアプライする.

操作 4. 泳動後のゲルを PVDF 膜に転写し, 抗リン酸化 MAPK1/2 pT²⁰²/pY²⁰⁴ 抗体, あるいは抗リン酸化 SHC pY³¹⁷ 抗体でウェスタン解析する.



実験例 8. リン酸化 MAPK とリン酸化 SHC のウェスタン検出における適用 (文献 7 より転載)

処理前の抽出液と処理後の Phos-tag アガロース画分を SHC および MAPK の抗リン酸化抗体を用いてイムノブロッティングした. Phos-tag アガロース未処理の細胞抽出液ではシグナルが弱い, あるいは非特異的シグナルが多いために, SHC および MAPK の EGF 刺激によるリン酸化が判断できない. それに対して, Phos-tag アガロースで前処理した試料は, 明瞭なシグナルを検出でき, EGF 刺激によって SHC および MAPK のリン酸化量が増大していることが分かる.

引用文献

7) Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Koike T. Anal. Biochem. 2009;389:83-85.

Protocols for the analysis of phosphoproteins using Phos-tag technology

Emiko Kinoshita-Kikuta, Eiji Kinoshita, Tohru Koike

Department of Functional Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

* Corresponding author: Emiko Kinoshita-Kikuta; Department of Functional Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Kasumi 1-2-3, Hiroshima 734-8553, Japan

Fax: 082-257-5336

E-mail: kikuta@hiroshima-u.ac.jp