

Phos-tagを用いた不安定なヒスチジンやアスパラギン酸のリン酸化タンパク質の解析

木下 恵美子¹, 木下 英司², 小池 透¹

1. はじめに

筆者らは、リン酸基を捕捉する機能性分子Phos-tag（フォスタグ）¹⁾を用いたオリジナルでユニークな原理に基づくリン酸化タンパク質解析技術を創出している。それらの技術のうち、本稿ではリン酸基親和性電気泳動法とリン酸化タンパク質ゲル染色法について紹介する。また、中性の水溶液中でタンパク質のリン酸基を捕捉するPhos-tagの性質を活かした、化学的に不安定で酸性、アルカリ性において加水分解されやすいヒスチジン（His）やアスパラギン酸（Asp）がリン酸化されたタンパク質の解析法について述べる。

2. His, Aspのリン酸化タンパク質

細菌や植物細胞では、HisやAspのリン酸化を介した細胞内情報伝達システムが存在する²⁾。これは2成分伝達系といわれ、細胞膜上のヒスチジンキナーゼ（HK）が外界からの刺激に反応して自身のHisをリン酸化し、そのリン酸基を応答分子のレスポンスレギュレーター（RR）に転移する。その後、リン酸化したRRは、関連する遺伝子の発現を制御する（図1）。この情報伝達システムは、環境に順応するための普遍的な役割を担うもので、HKの特徴的な領域の配列は広く保存されている²⁾。ところが、病原菌においては、2成分伝達系が普遍的な役割だけでなく細菌の病原性や薬剤耐性に関与する遺伝子発現の制御に関

わっていることが報告されている³⁾。そのため、HKは次世代型の抗生物質の標的分子として注目され、その阻害薬の開発が世界中で精力的に進められている^{4,5)}。

HisやAspに結合したリン酸基は、化学的に不安定で、特に酸性やアルカリ性条件下で加水分解されやすく、中性の水溶液中においても半減期は数時間から数日である⁶⁾。そのため、2成分伝達系におけるリン酸化シグナルカスケードの解析法は真核細胞のそれに比べて限られていた。質量分析は、サンプルを酸性の試薬で処理する過程があるため、リン酸化されたHisやAspを含むペプチドを検出することは難しいと考えられている。また、それらの化学的不安定さにより抗体を作製することも難しいと考えられていたが、リン酸化ヒスチジン構造類似体が開発されたことで、2015年によりよく抗リン酸化His抗体が実用化された⁷⁾。一方、Phos-tagを基盤とする分析法は、中性pH条件下、簡便な実験操作、短時間で行えるため、不安定なリン酸化Hisやリン酸化Aspのリン酸化解析に適用可能である。以下の項目では、Phos-tag技術を利用した細菌の2成分伝達機構に関わる不安定なリン酸化タンパク質の解析について述べる。

3. リン酸基親和性電気泳動法, Phos-tag SDS-PAGE を利用した細菌の2成分伝達機構のリン酸化シグナル解析

Phos-tagを基盤とした技術の中でも、2006年に発表した

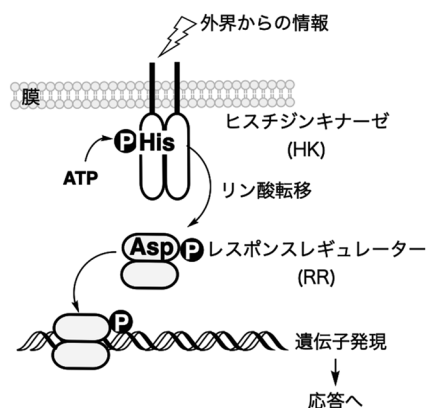


図1 細菌の2成分伝達機構の概略図

¹ 広島大学大学院医系科学研究科医薬分子機能科学研究室 (〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3)

² 広島文教大学人間科学部人間栄養学科 (〒731-0295 広島市安佐北区可部東 1-2-3)

Analysis of labile histidine and aspartic acid phosphorylated proteins using Phos-tag technologies

Emiko Kinoshita-Kikuta¹, Eiji Kinoshita² and Tohru Koike¹ (¹Department of Functional Molecular Science, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Kasumi 1-2-3, Hiroshima 734-8551, Japan, ²Department of Human Nutrition, Faculty of Human Sciences, Hiroshima Bunkyo University, Kabehigashi 1-2-1, Asakita-ku, Hiroshima 731-0295, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930877

© 2021 公益社団法人日本生化学会

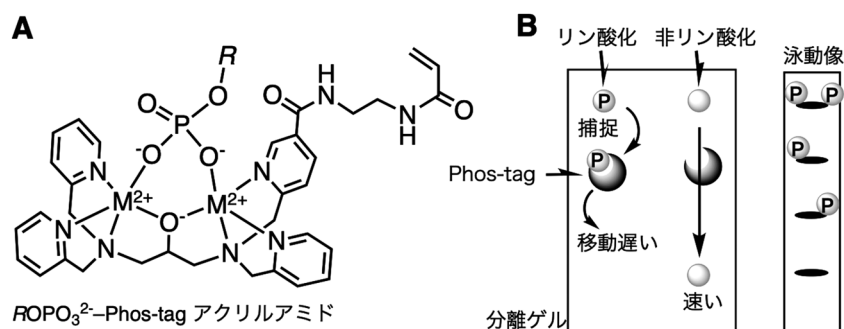


図2 Phos-tag SDS-PAGEによるリン酸化タンパク質の分離解析
(A)リン酸基を捕捉したPhos-tag アクリルアミド。(B)Phos-tag SDS-PAGEの原理の概略図。

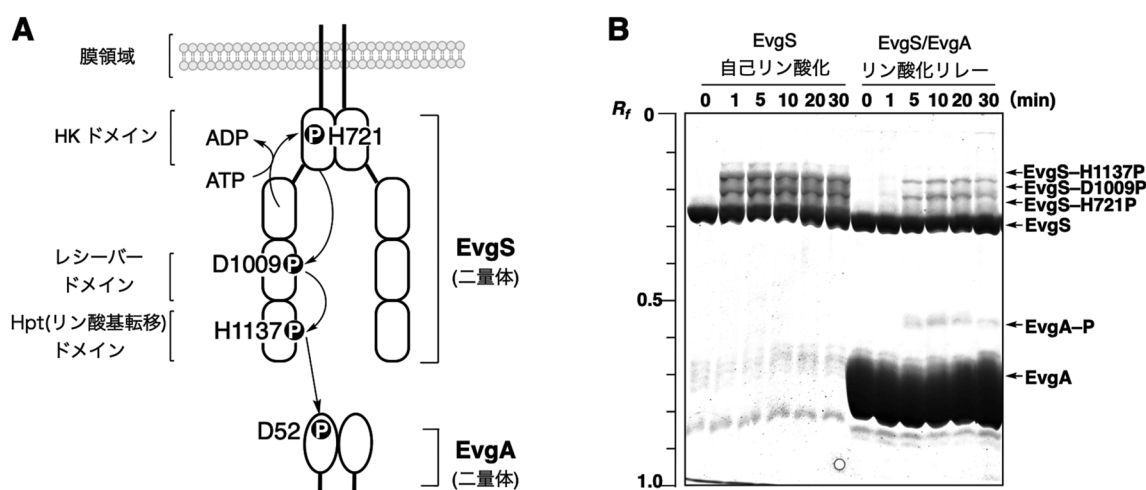


図3 Phos-tag SDS-PAGEによる大腸菌のEvgS/EvgAのリン酸化リレー反応の解析
(A) EvgS/EvgAのリン酸化リレー反応の概略図。(B)EvgS自己リン酸化反応, EvgS/EvgA共存下でのリン酸化リレー反応を行い, その反応液をPhos-tag SDS-PAGEによって分離し, そのゲルをCBB染色した(文献14より転載)。

リン酸基親和性電気泳動法のPhos-tag SDS-PAGEは, 多くの研究者に利用されている⁸⁻¹³⁾。ゲルの作製は, 一般的なSDS-PAGEの分離ゲル作製時にアクリルアミド化Phos-tag (図2A)を共重合(固定)させるだけである。このゲルではリン酸化タンパク質がPhos-tagに捕捉されながらゆっくり泳動するため, 同じタンパク質のリン酸化型と非リン酸化型を移動度の差として分離できる(図2B)。ちなみに, リン酸基の数に応じて分離されるのではなく, 同じ数のリン酸を含む同種のタンパク質の場合でも, リン酸化部位が異なればPhos-tagとの親和性に差異が生じて, 移動度の異なるバンドとして分離される。また, 一つのタンパク質分子内に複数のリン酸化部位が存在するためにさまざまなリン酸化状態が混在する場合には, そのリン酸化状態の違いが泳動度の異なる複数のバンドとして検出される。

大腸菌には29種類の2成分伝達系が存在する。その中でHis→Asp→His→Aspと分子内で多段階のリン酸基リレーを行うHKのEvgSと, それに対応するRRのEvgAについて, *in vitro*におけるリン酸化リレー反応をPhos-tag SDS-

PAGEで解析した¹³⁾。二量体として機能するEvgSは, 外界からの刺激に応じてHKドメインのH721が自己リン酸化する(図3A)^{13, 14)}。そのリン酸基は分子内のレシーバードメインのD1009, HptドメインのH1137へと転移され, 続いてEvgAのD52に転移される。EvgS単独の*in vitro*自己リン酸化反応をPhos-tag SDS-PAGEで解析した結果を図3Bに示す。H721, D1009, H1137の3か所のリン酸化に対応する三つのリン酸化型EvgSが検出された。リン酸化されるアミノ酸のアラニン置換体の分離パターンを調べることによって, この3本のバンドは図3B右に示した各リン酸化部位に対応することを確認した。EvgSとEvgAが共存するリレー反応の場合は, EvgAのD52にリン酸基が転移されるため, EvgAが共存しない場合に比べて顕著にEvgSの三つのリン酸化型のバンドは薄くなっている。また, EvgAに転移されたリン酸基は速やかに加水分解されるため, EvgAのリン酸化型バンドは非常に薄い。EvgS/EvgA以外にも, 超好熱性細菌のThkA¹⁵⁾, 根粒細菌のFixL/FixJ¹⁶⁾, 大腸菌のBarA/UvrY^{14, 17)}, ArcB/ArcA^{14, 17)}, PhoR/PhoB⁵⁾,

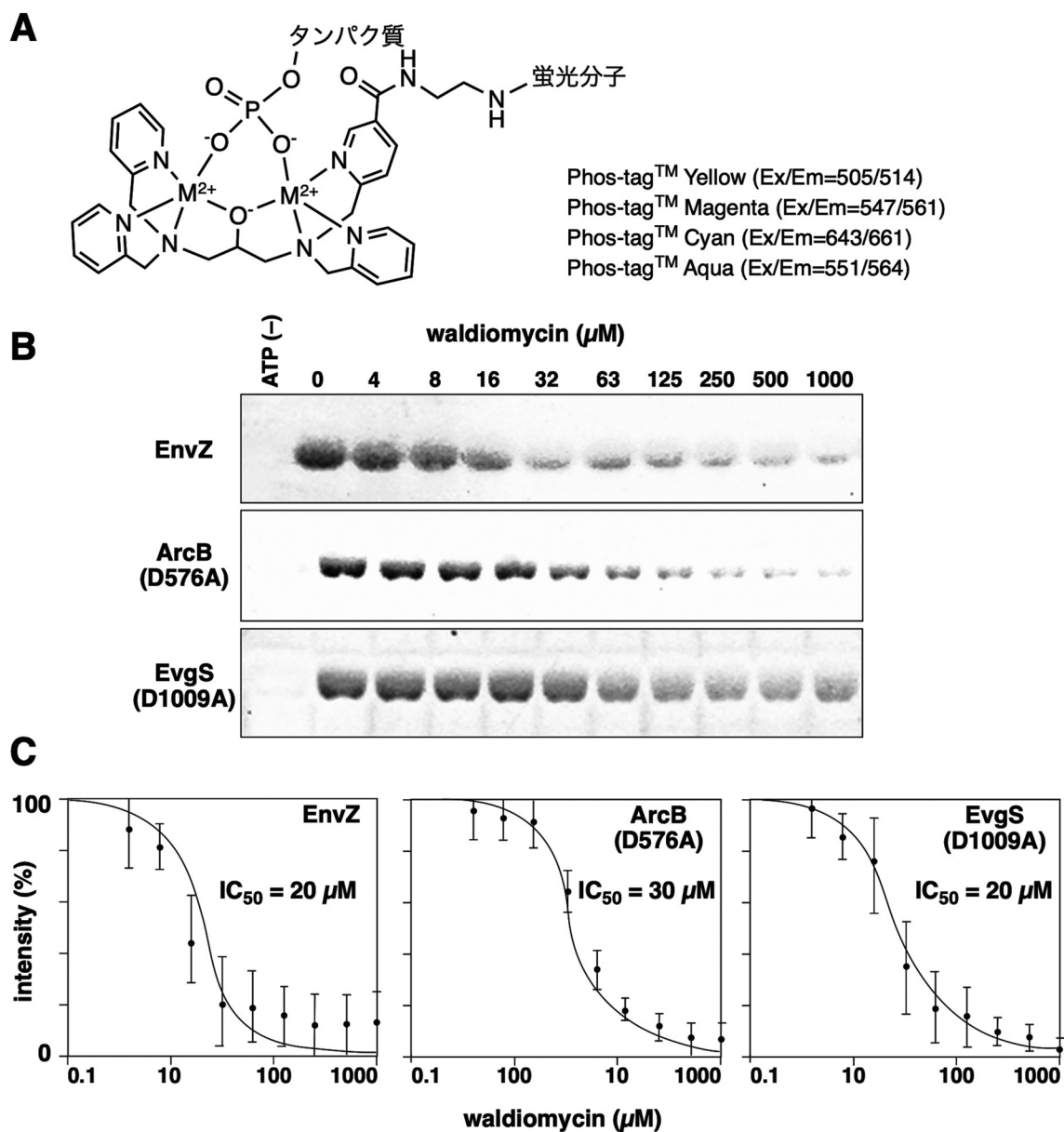


図4 HK阻害剤によるHK自己リン酸化反応の阻害プロファイル

(A) 蛍光Phos-tagの構造. 蛍光分子の種類により, 励起/蛍光波長が異なる4種類がある. Ex = 励起波長, Em = 蛍光波長 (nm). (B) waldiomycin存在下における3種のヒスチジンキナーゼ (EnvZ, ArcB, EvgS) の自己リン酸化反応を行い, 反応液をSDS-PAGEで分離した. そのゲルをPhos-tag Cyanで染色した. (C) (B)において検出されたバンドの濃度をデンスitrometry解析し, それぞれのHKのキナーゼアッセイにおけるwaldiomycinの阻害プロファイルとIC₅₀値を示した (B, Cは文献18より転載).

EnvZ/OmpR^{17, 18)} のリン酸化反応のダイナミクスを解析した例を報告しているのでご参照いただければ幸いです.

4. リン酸化タンパク質ゲル染色法を利用したHK阻害剤のスクリーニング

Phos-tagに蛍光分子を導入した蛍光性Phos-tagは, 特にSDS-PAGEのゲル内のリン酸化タンパク質の染色試薬で

ある^{18, 19)}. 励起/蛍光波長の違いにより, 4種類のラインナップがある (図4A). 一般的なCBB染色や蛍光ゲル染色法では, 酢酸とメタノールを含む酸性溶液中でタンパク質をゲルに固定する. 一方, Phos-tag蛍光ゲル染色では, 中性溶液をすべての染色ステップで使用する. Phos-tag試薬を用いた蛍光染色では, リン酸化にかかわらず非特異的に検出されるタンパク質もあるが, ゲル染色操作の簡便さから, タンパク質によっては非常に利用価値のある方法で

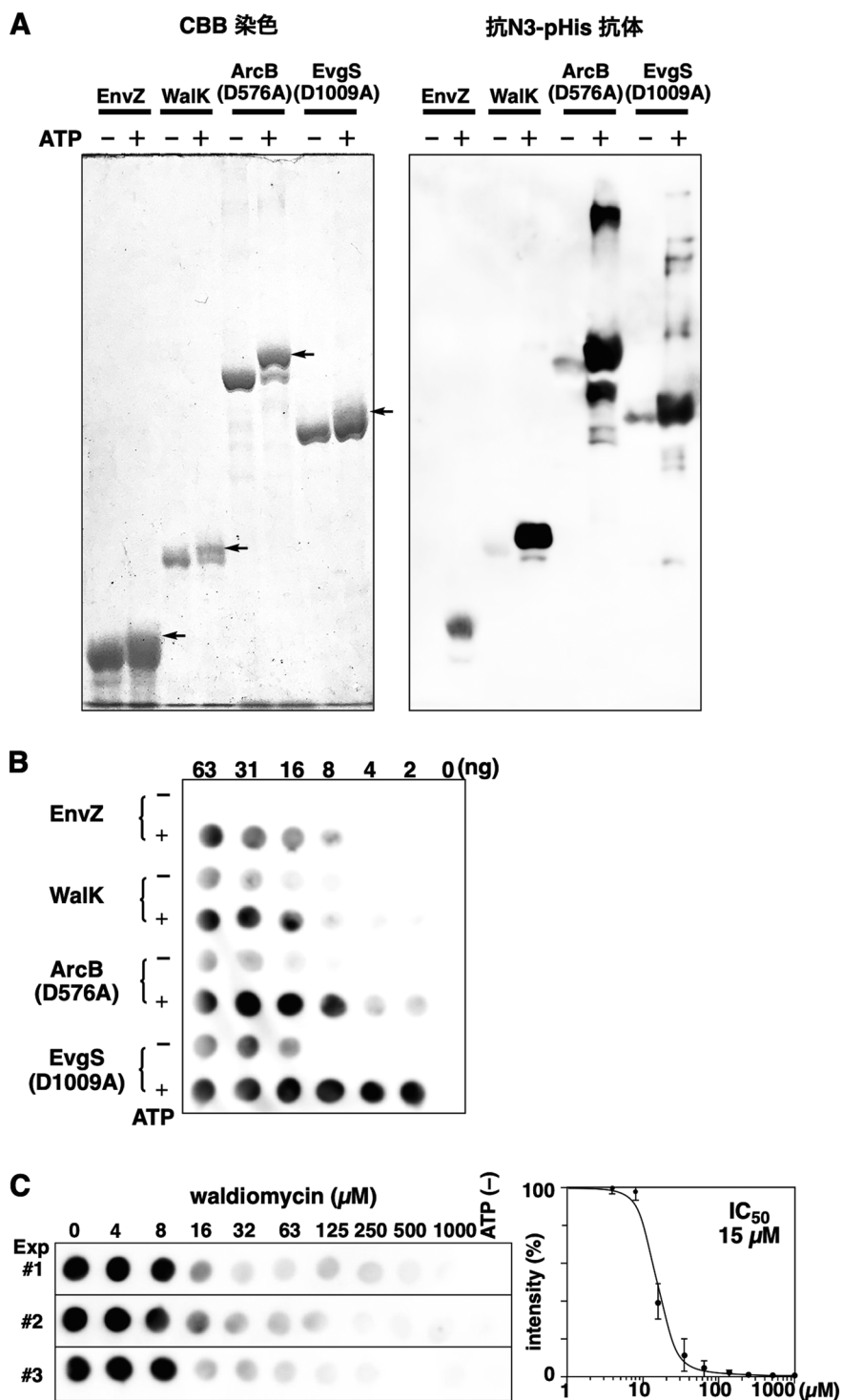


図5 抗リン酸化His抗体を利用したHK阻害剤のスクリーニング (文献22より転載)

(A) 4種ヒスチジンキナーゼ (EnvZ, WalK, ArcB, EvgS) の自己リン酸化反応を ATP (+) あるいは ATP (-) で行い、その反応液を Phos-tag SDS-PAGE で分離した。リン酸化型ヒスチジンキナーゼは CBB 染色においてシフトアップバンド (矢印) として分離され、それらは抗リン酸化His抗体によって検出された。(B) 4種ヒスチジンキナーゼ (EnvZ, WalK, ArcB, EvgS) の自己リン酸化反応を ATP (+) あるいは ATP (-) で行い、その反応液を PVDF 膜にドットプロットした。そのプロットを抗リン酸化His抗体で解析した。(C) waldiomycin 存在下における EnvZ の自己リン酸化反応を行い、その反応液を PVDF 膜にドットプロットした。そのプロットを抗リン酸化His抗体で解析した。検出されたドットの濃度をデンストメトリー解析し、waldiomycin の阻害プロファイルと IC₅₀ 値を示した。

ある。筆者らは、本試薬が大腸菌のHKである EnvZ, ArcB, EvgS の His リン酸化型を選択的に染色することを確認した。そして、これらの HK と HK 阻害活性が見いだされている抗生物質の waldiomycin を使用して、本蛍光染色試薬が HK 阻害剤のスクリーニングに適用できるかどうかを検討した。waldiomycin は、薬剤耐性菌にも有効な新規で特異的作用点を持つ抗菌薬のリード化合物として注目されている^{20, 21)}。その作用機序は、HK の二量体化に必要な高度に保存された H Box という領域に特異的に結合して HK を阻害するというものである。

EnvZ, ArcB, EvgS の *in vitro* 自己リン酸化反応に対し 0~1000 μ M の waldiomycin を添加し、その反応液を SDS-PAGE で分離後、Phos-tag Cyan 蛍光染色を行った (図 4B)¹⁸⁾。リン酸化された HK のバンドの蛍光量は waldiomycin の濃度依存的に少なくなった。デンストメトリー解析の結果、IC₅₀ は 20~30 μ M と決定された (図 4C)。本法は電気泳動法を基盤としているため、ハイスループットスクリーニングには適さないが、非常に簡便なスクリーニング法として利用できることが示された。

5. 抗リン酸化 His 抗体を利用した HK 阻害剤のスクリーニング²²⁾

最後に、前述の電気泳動に続くゲル染色法よりもスループット性の高いドットプロット法と抗 N3 リン酸化 His 抗体を組み合わせた HK 阻害剤スクリーニング法について述べる。まず、2015 年に初めて発売された抗 N3 リン酸化 His 抗体について、HK のリン酸化が特異的に検出できることを確認した。4 種類の HK (EnvZ, WalK, ArcB, EvgS) の自己リン酸化反応液 [ATP(+), ATP(-)] を Phos-tag SDS-PAGE で分離し、抗 N3 リン酸化 His 抗体によるウェスタン解析を行ったところ、ATP(+) のレーンにみられるシフトアップしたリン酸化型のバンドが特異的に検出された (図 5A)。これらの反応液を電気泳動で分離せずに、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜にドットプロットし、抗 N3 リン酸化 His 抗体で検出した場合、WalK, ArcB, EvgS については ATP(-) サンプルでも弱いシグナルが検出されたが、EnvZ については ATP(+) のサンプルのシグナルのみが検出された (図 5B)。次に、EnvZ をサンプルとして、自己リン酸化反応に対する waldiomycin の阻害効果を、ドットプロットと抗 N3 リン酸化 His 抗体を用いて調べた (図 5C)。バンドの蛍光強度は waldiomycin の濃度依存的に弱くなり、デンストメトリー解析により IC₅₀ が 15 μ M と決定された。大量サンプルを扱えるドットプロッターや自動分注機などを利用することにより、ドットプロット法は、96 や 384 フォーマットに拡大できるため、ハイスループットスクリーニングへの応用も可能である。

6. おわりに

Phos-tag 技術を用いた細菌の His や Asp のリン酸化解析について、いくつかの例を紹介した。Phos-tag 技術には、本稿で紹介した以外にもリン酸化タンパク質のウェスタン解析法 (ビオチン化 Phos-tag)⁸⁾、リン酸化タンパク質やリン酸化ペプチドの精製に利用可能なクロマトグラフィ担体 (Phos-tag agarose)²³⁻²⁵⁾、質量分析におけるリン酸化ペプチドの検出増感剤²⁶⁾がある。それら Phos-tag 試薬が、リン酸化プロテオミクスの発展に寄与できることを願っている。

文 献

- 1) Kinoshita, E., Takahashi, M., Takeda, H., Shiro, M., & Koike, T. (2004) Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Trans.*, 1189-1193.
- 2) Stock, A.M., Robinson, V.L., & Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 183-215.
- 3) Rajput, A., Seif, Y., Choudhary, K.S., Dalldorf, C., Poudel, S., Monk, J.M., & Palsson, B.O. (2021) Pangenome analytics reveal two-component systems as conserved targets in ESKAPEE pathogens. *mSystems*, **6**, e00981-e20.
- 4) Bem, A.E., Velikova, N., Pellicer, M.T., van Baarlen, P., Marina, A., & Wells, J.M. (2015) Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. *ACS Chem. Biol.*, **10**, 213-224.
- 5) Gotoh, Y., Eguchi, Y., Watanabe, T., Okamoto, S., Doi, A., & Utsumi, R. (2010) Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 232-239.
- 6) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Shiba, A., Eda, K., Inoue, Y., Yamamoto, K., Yoshida, M., & Koike, T. (2014) Profiling of protein thiophosphorylation by Phos-tag affinity electrophoresis: Evaluation of adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) as a phosphoryl donor in protein kinase reactions. *Proteomics*, **14**, 668-679.
- 7) Fuhs, S.R., Meisenhelder, J., Aslanian, A., Ma, L., Zagorska, A., Stankova, M., Binnie, A., Al-Obeidi, F., Mauger, J., Lemke, G., et al. (2015) Monoclonal 1- and 3-phosphohistidine antibodies: New tools to study histidine phosphorylation. *Cell*, **162**, 198-210.
- 8) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K., & Koike, T. (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 749-757.
- 9) Kinoshita-Kikuta, E., Aoki, Y., Kinoshita, E., & Koike, T. (2007) Label-free kinase profiling using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 356-366.
- 10) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., & Koike, T. (2009) Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat. Protoc.*, **4**, 1513-1521.
- 11) Kinoshita, E. & Kinoshita-Kikuta, E. (2011) Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics*, **11**, 319-323.
- 12) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., & Koike, T. (2012) Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions. *Proteomics*, **12**, 192-202.
- 13) Mizuno, T. (1998) His-Asp phosphotransfer signal transduction.

- J. Biochem.*, **123**, 555–563.
- 14) Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Eguchi, Y., Yanagihara, S., Edahiro, K., Inoue, Y., Taniguchi, M., Yoshida, M., Yamamoto, K., Takahashi, H., et al. (2015) Functional characterization of the receiver domain for phosphorelay control in hybrid sensor kinases. *PLoS One*, **10**, e0132598.
 - 15) Yamada, S., Nakamura, H., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., & Shiro, Y. (2007) Separation of a phosphorylated histidine protein using phosphate affinity polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **360**, 160–162.
 - 16) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Matsubara, M., Yamada, S., Nakamura, H., Shiro, Y., Aoki, Y., Okita, K., & Koike, T. (2008) Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE. *Proteomics*, **8**, 2994–3003.
 - 17) Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Eguchi, Y., & Koike, T. (2016) Validation of cis and trans modes in multistep phosphotransfer signaling of bacterial tripartite sensor kinases by using phos-tag SDS-PAGE. *PLoS One*, **11**, e0148294.
 - 18) Kinoshita-Kikuta, E., Kusamoto, H., Ono, S., Akayama, K., Eguchi, Y., Igarashi, M., Okajima, T., Utsumi, R., Kinoshita, E., & Koike, T. (2019) Quantitative monitoring of His and Asp phosphorylation in a bacterial signaling system by using Phos-tag Magenta/Cyan fluorescent dyes. *Electrophoresis*, **40**, 3005–3013.
 - 19) Kinoshita-Kikuta, E., Akayama, K., Kinoshita, E., & Koike, T. (2020) A dot-blot-staining method for detecting phosphoproteins with a Phos-tag Aqua fluorescent dye. *J. Electrophoresis*, **64**, 7–11.
 - 20) Igarashi, M., Watanabe, T., Hashida, T., Umekita, M., Hatano, M., Yanagida, Y., Kino, H., Kimura, T., Kinoshita, N., Inoue, K., et al. (2013) Waldiomycin, a novel WalK-histidine kinase inhibitor from *Streptomyces* sp. MK844-mF10. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **66**, 459–464.
 - 21) Eguchi, Y., Okajima, T., Tochino, N., Inukai, Y., Shimizu, R., Ueda, S., Shinya, S., Kigawa, T., Fukamizo, T., Igarashi, M., et al. (2017) Angucycline antibiotic waldiomycin recognizes common structural motif conserved in bacterial histidine kinases. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **70**, 251–258.
 - 22) Kinoshita-Kikuta, E., Maruta, S., Eguchi, Y., Igarashi, M., Okajima, T., Utsumi, R., Kinoshita, E., & Koike, T. (2020) An immuno-dot blot assay for screening histidine kinase inhibitors. *Anal. Biochem.*, **600**, 113765.
 - 23) Kinoshita, E., Yamada, A., Takeda, H., Kinoshita-Kikuta, E., & Koike, T. (2005) Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. *J. Sep. Sci.*, **28**, 155–162.
 - 24) Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Yamada, A., Endo, M., & Koike, T. (2006) Enrichment of phosphorylated proteins from cell lysate using a novel phosphate-affinity chromatography at physiological pH. *Proteomics*, **6**, 5088–5095.
 - 25) Yuan, E.T., Ino, Y., Kawaguchi, M., Kimura, Y., Hirano, H., Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., & Koike, T. (2017) A Phos-tag-based micropipette-tip method for rapid and selective enrichment of phosphopeptides. *Electrophoresis*, **38**, 2447–2455.
 - 26) Takeda, H., Kawasaki, A., Takahashi, M., Yamada, A., & Koike, T. (2003) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of phosphorylated compounds using a novel phosphate capture molecule. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2075–2081.

著者寸描

●木下 恵美子 (きのした-きくた えみこ)



広島大学大学院医科学部研究科助教。博士(薬学)。

■略歴 1995年広島大学医学部総合薬学科卒業, 97年同大学院医学系研究科博士課程前期修了, 97年広島大学薬学部職員, 2001年博士(薬学)(広島大学), 08年より現職。

■研究テーマと抱負 ゲノミクス, プロテオミクスに役立つ技術の開発。

■ウェブサイト <http://phostag.hiroshima-u.ac.jp>

<https://researchmap.jp/phos>

■趣味 映画鑑賞。

●木下 英司 (きのした えいじ)



広島文教大学人間科学部人間栄養学科教授。博士(薬学)。

■略歴 1997年3月広島大学大学院医学系研究科分子薬学系専攻にて博士号取得後, 同年4月La Jollaアレルギー免疫研究所(米国, サンディエゴ市)博士研究員を経て, 98年4月広島大学医学部助手, 2003年7月講師, 03年10月広島大学薬学部准教授, 21年4月より現職。

■研究テーマと抱負 新規ゲノミクス・プロテオミクス手法の

開発。世界中のバイオ研究の現場で使ってもらえるオリジナルな分析技術を開発し, 生命現象の謎解きに貢献したい。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/read0054173>

■趣味 野球観戦, 歴史散策。

●小池 透 (こいけ とおる)

広島大学大学院医科学部研究科教授。薬学博士。

■略歴 1981年3月広島大学薬学部卒業, 86年3月同大学院医学系研究科博士課程後期修了, 同年4月広島大学医学部総合薬学科助手, 講師, 助教授を経て, 98年9月同大学教授, 99年4月同大学大学院教授, 現在に至る。

■研究テーマと抱負 専門分野は「医薬分子機能科学」: 金属酵素モデルの基礎研究を基礎として, 生体機能分子のオリジナルな解析法の開発研究を行っている。リン酸化生体分子の解析法(Phos-tag技術)を産学連携研究により実用化している。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/tk1689>

■趣味 理科教育に関する資料の作成。