

## 二次元電気泳動による翻訳後修飾タンパク質 (モッドフォーム) の解析

平野 久\*・木村 弥生・井野 洋子・戸田 年総・香川 裕之

横浜市立大学先端医科学研究センター

Two-dimensional electrophoresis of post-translationally modified proteins (modforms)

Hisashi Hirano\*, Yayoi Kimura, Yoko Ino, Tosifusa Toda, Hiroyuki Kagawa

\* Corresponding Author

E-mail: hirano@yokohama-cu.ac.jp

(受付 2015年6月10日, 受理 2015年6月24日)

### はじめに

タンパク質は翻訳中あるいは翻訳後, 様々な修飾を受け, 多くの場合, 修飾された後, 本来の機能を獲得する. 翻訳後修飾 (本稿では翻訳中修飾を含めて翻訳後修飾と呼ぶ) には, 前駆体ポリペプチドのプロセッシング, アミノ酸の修飾などがある. このうちアミノ酸の修飾は種類が多く, 300種類以上あるといわれる. 翻訳後修飾は, タンパク質多型の主要な成因になっている. 翻訳後修飾を受けたタンパク質 [本稿ではこれをモッドフォーム (modform) と呼ぶ] は, 同一遺伝子から産生され, アミノ酸配列は同一かほぼ同一である. 同じタンパク質多型でも, 異なる遺伝子の産物で, アミノ酸配列に違いが見られ, 同一か類似した機能を持っているタンパク質, すなわち, アイソフォーム (isoform) とは異質のものである.

最近では, 生体から抽出したタンパク質をプロテアーゼなどにより特定部位で切断した後, 得られたペプチドを質量分析装置で分析し, タンパク質の翻訳後修飾を解析することが多い. しかし, 質量分析ではたいていタンパク質をペプチドに断片化してから分析を行うため, 同じタンパク質でも分子間で異なる翻訳後修飾 (部位) が存在する場合, その情報が失われてしまうことがある. これに対して, 例えば, O'Farrell の二次元電気泳動<sup>1)</sup>では, タンパク質を解離はするものの, 小断片化することがないので, 翻訳後修飾情報を失うことなく分析することができる. モッドフォームと非修飾タンパク質, ならびに異なるモッドフォームを容易に分別・検出できることも少なくない. また, 同じ種類の修飾でも, 修飾の程度の違いを識別できることもある. さらに, 一度に多数 (1,000種類以上) のタンパク質の翻訳後修飾状態を分析することができるのも大きな利点である. 従って, 二次元電気泳動は, モッドフォーム解析には欠かせない技術になっている.

### モッドフォームとアイソフォーム

タンパク質の翻訳後修飾は多様であるため, モッドフォームの二次元電気泳動パターンにはこれといった規則性はない. しかし, アセチル化やリン酸化によって生じたモッドフォームは, 二次元電気泳動では近接した位置にタンデムのスポットとして検出されることが多い. 一方, アイソフォームもしばしば二次元電気泳動では近接した位置にタンデムのスポットとして検出される. この場合は, 電気泳動の易動度からモッドフォームとアイソフォームを見分けることは容易でない. 修飾基の有無やアミノ酸配列が明らかになってはじめてモッドフォームであるのか, アイソフォームであるのかがわかる.

なお, O'Farrell の二次元電気泳動では, 試料溶解液や一次元目の等電点電気泳動ゲルに尿素が含まれる. そのため, 実験操作中に温度が上がるとタンパク質がカルバミル化されることがある. この場合も, 等電点の異なるスポットが二次元電気泳動ゲル上にタンデムに並んで出現する. これは人為的な修飾産物で, モッドフォームやアイソフォームとは異なる.

### モッドフォームの二次元電気泳動

二次元電気泳動を用いてモッドフォームを検出する場合には, 次のような方法がよく使われる. 第一の方法は, モッドフォームの検出を可能にするため, 試料を前処理してから電気泳動を行う方法, 第二の方法は, アフィニティーゲルを用いてモッドフォームを分離する方法, 第三の方法は, ジスルフィド結合の有無を検出する対角線電気泳動法, そして, 第四の方法は, 二次元電気泳動で分離されたモッドフォームを修飾基特異的な染色法を用いて検出する方法である.

### 1) モッドフォーム試料の前処理

モッドフォームから翻訳後修飾基を取り外す操作を行ったとき、電気泳動の易動度に変化が見られれば、タンパク質に取り外した修飾基が付加されていたことを確かめることができる。修飾基を取り除くために行われる試料前処理方法には、修飾基転移酵素欠損変異体を利用する方法、部位特異的変異を利用する方法、酵素による方法、化学的方法、修飾基転移酵素を阻害する方法などがある。

例えば、Kimuraら<sup>2)</sup>は、酵母の正常株と3種類のN-アセチル基転移酵素NatA, NatBおよびNatCそれぞれの構成サブユニット, NAT1, NAT3およびMAT3を欠損した変異株を作製し、正常株と変異株から20Sプロテアソームを精製した。そして、20SプロテアソームのサブユニットをO'Farrellの二次元電気泳動で分離した。正常株と変異株の間で一次元目の等電点電気泳動の易動度に差が見られるサブユニットスポットが、NAT1変異株で6つ、NAT3変異株で1つ、MAK3変異株で2つ認められた。アセチル化されているタンパク質のN末端アミノ基は電荷をもたないが、アセチル化されていないタンパク質は電荷をもつ。そのため、脱アセチル化によりタンパク質の等電点に変化する。すなわち、NAT欠損変異株で等電点電気泳動の易動度に変化したこれらのサブユニットは、正常株でN末端がNatA, NatBまたはNatCによりアセチル化されたタンパク質であると判断された。

一方、酵素により修飾基を除去する方法もよく用いられる。Kikuchiら<sup>4)</sup>は、酵母の26Sプロテアソームをホスファターゼ処理し、処理前後のプロテアソームサブユニットの二次元電気泳動の易動度を観察した。その結果、脱リン酸化によっていくつかのスポットが一次元目の等電点電気泳動で塩基性側にシフトすることがわかった。これらのタンパク質はリン酸化されていると考えられた。質量分析装置を用いたリン酸化タンパク質の網羅的な解析によってこれらのタンパク質のリン酸化が確認できた。しかし、26Sプロテアソームのすべてのリン酸化サブユニットが、ホスファターゼ処理された試料の二次元電気泳動で検出することはできなかった。ホスファターゼ処理によって完全に脱リン酸化できなかったものと推察される。

### 2) アフィニティーゲルを用いた電気泳動

アフィニティー（親和）電気泳動は、リン酸化やグリコシル化タンパク質の分析に用いられる。Phos-tagリガンドを用いたリン酸化アフィニティー電気泳動は、タンパク質のリン酸化状態を分析できる方法である<sup>5)</sup>。質量分析装置を用いたショットガン分析では捉えられなかった同じタンパク質の分子間で異なる翻訳後修飾（部位）を解析することができる。Kimuraら<sup>5)</sup>は、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質Kのリン酸化状態をPhos-tagアフィニティー電気

泳動で調べた。このタンパク質は、11ヶ所以上のリン酸化部位を持つことが明らかにされていた。しかし、細胞内でリン酸化状態がどのように変化するのかについては明らかでなかった。Phos-tagアフィニティー二次元電気泳動によって、このタンパク質が核内では4つのモッドフォームとして存在し、細菌のリポ多糖などの刺激に対して異なる反応を示すことが明らかにされた。

糖タンパク質の解析にはレクチンアフィニティー電気泳動がよく用いられる。レクチンは糖鎖に結合する性質がある。この方法で糖鎖構造の異なる分子種を分離することができる<sup>6)</sup>。例えば、糖タンパク質である $\alpha$ -フェトプロテインの分析では、レクチンを含むアガロース平板ゲルに血清を塗り、一次元目の泳動を行う。そして、抗 $\alpha$ -フェトプロテイン抗体を含むゲルで二次元目の交叉免疫電気泳動を行った後、 $\alpha$ -フェトプロテインを染色して検出する。

最近、PVDF膜を用いた分子マトリックスアフィニティー電気泳動を利用した二次元電気泳動によって糖タンパク質を分離する方法も開発されている。

### 3) 対角線電気泳動

一次元目の電気泳動を非還元条件下、そして、二次元目の電気泳動を還元条件下で行うと、ジスルフィド結合により結合しているタンパク質を同定したり、分子内にジスルフィド結合を有するタンパク質を検出したりすることができる。この電気泳動法は、ジスルフィド結合をもたないタンパク質が二次元目のゲル上で対角線上に並ぶことから、対角線電気泳動と呼ばれている。

この泳動では、分子間ジスルフィド結合を有するタンパク質は、対角線の下方に、一次元目と同じ易動度をもったスポットとして検出される。また、タンパク質分子内にジスルフィド結合がある場合には、還元することにより、タンパク質の密な高次構造がくずれ、易動度が小さくなるので、二次元目ゲルでは対角線より上にスポットが現れる。

### 4) 染色によるモッドフォームの検出

二次元電気泳動で分離されたタンパク質をゲル上で、または、ウエスタンブロットによってPVDF膜に転写し、修飾に特異的な染色法を用いて検出することができる。例えば、リン酸化タンパク質の場合、ProQダイヤモンドのような金属（Ga）と蛍光色素の錯体を用いて染色すれば、高感度で検出することができる。また、放射性同位元素で標識したリン酸基でタンパク質を修飾すれば、オートラジオグラフィーで高感度検出が可能である。さらに、抗ホスフォアミノ酸抗体によるウエスタンブロットティングでも検出が可能である。ウエスタンブロットティングに用いる、ホスフォアミノ酸に対するモノクローナル抗体は市販されている。セリン、トレオニン、チロシンのそれぞれの抗ホス

フォアミノ酸抗体が入手できるが、プロテオーム解析では特異性が高いといわれている抗ホスフォチロシン抗体が使用される場合が多い。

糖タンパク質については、過ヨウ素酸酸化により糖部分を酸化的に分解し、新たに生じるアルデヒド基にアミノ基のような官能基を有する色素を反応させてシッフ塩基を形成させて染色する方法 [過ヨウ素酸-シッフ塩基 (PAS) 反応] により染色する方法が一般的に用いられている。ProQ エメラルドは、アルデヒド基と反応させる色素として蛍光色素を PAS 反応に利用した市販の染色キットで、高感度に糖タンパク質を検出できる。

一方、二次元電気泳動で分離されたタンパク質を PVDF 膜に電気泳動的に転写し、翻訳後修飾に特異的な抗体を用いてモッドフォームを検出することができる。また、転写されたタンパク質を気相プロテインシークエンサーで分析すれば、アミノ酸配列と同時に翻訳後修飾されたアミノ酸の同定も行うことができる<sup>7)</sup>。

#### 5) 質量分析によるモッドフォームの検出

二次元電気泳動で分離されたタンパク質にどのような修飾基がついているのかは、スポットを切り取り、ゲル中でトリプシン消化し、得られたペプチドを質量分析装置 (MS/MS) で分析すれば明らかになることがある。N-アセチル化や N-メチル化のような修飾は比較的容易に、また、リン酸化やグリコシル化ペプチドのようなイオン化効率の

悪い修飾ペプチドは濃縮して分析すれば同定することができる<sup>7)</sup>。

#### 文献

- 1) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975;250:4007-4021.
- 2) Kimura Y, Takaoka M, Tanaka S, Sassa H, Tanaka K, Polevoda B, Sherman F, Hirano H. N<sup>α</sup>-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome. *J Biol Chem.* 2000; 275:4635-4639.
- 3) Kikuchi J, Iwafune Y, Akiyama T, Okayama A, Nakamura H, Arakawa N, Kimura Y, Hirano H. Co- and post- translational modifications of the 26S proteasome in yeast. *Proteomics.* 2010;10:2769-2779.
- 4) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Matsubara M, Yamada S, Nakamura H, Shiro Y, Aoki Y, Okita K, Koike T. Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE. *Proteomics.* 2008;8:2994-3003.
- 5) Kimura Y, Nagata K, Suzuki N, Yokoyama R, Yamanaka Y, Kitamura H, Hirano H, Ohara O. Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. *Proteomics.* 2010;10:3884-3895.
- 6) Taketa K, Ichikawa E, Sato J, Taga H, Hirai H. Two-dimensional lectin affinity electrophoresis of alpha-fetoprotein: characterization of erythroagglutinating phytohemagglutinin-dependent microheterogeneity forms. *Electrophoresis.* 1989;10:825-829.
- 7) 平野 久. 遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析. 東京: 東京化学同人; 1993, p. 244.