

特集●タンパク質リン酸化調節異常と疾患

---

## リン酸化タンパク質のプロテオーム解析

戸田年総

# リン酸化タンパク質のプロテオーム解析

戸田年総

東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究グループ

ヒトゲノム計画と入れ替わるように登場したプロテオーム解析は、ゲノム解析を補完するものとして注目されている。細胞増殖の制御やアポトーシスの誘導などにおいて重要なリン酸化タンパク質は、プロテオーム解析が得意とする翻訳後修飾の一つである。二次元電気泳動によって分離されたリン酸化タンパク質は、Pro-Q Diamond 染色と SYPRO Ruby 染色のディファレンシャルディスプレイによって検出され、MALDI-TOF 質量分析によってタンパク質の同定とリン酸化部位の特定が行われる。

**Key words** proteome, phosphoprotein, 2-D electrophoresis, mass spectrometry

リン酸基をもつタンパク質が天然に存在することは古くから知られていたが、最初にその生理的な意義が注目されるきっかけとなったのは、リン酸化によるグリコーゲンホスホリラーゼの活性化<sup>1)</sup>の研究であった。その後、多くのタンパク質リン酸化酵素(プロテインキナーゼ)が同定され、細胞内シグナルの伝達や微小管形成の調節など、さまざまな細胞機能調節にタンパク質のリン酸化がかかわっていることが明らかにされた<sup>2~4)</sup>。また、アルツハイマー病の  $\tau$  タンパク質<sup>5, 6)</sup> やパーキンソン病の  $\alpha$  シヌクレイン<sup>7, 8)</sup> にみられるように、神経変性疾患をはじめとするさまざまな慢性疾患においても、病態の発症とタンパク質リン酸化との間には深いかかわりがあることが明らかにされており、疾患研究においてもリン酸化タンパク質を解析することの重要性が高

まっている。しかしこれまでの研究で、タンパク質のリン酸化カスケードは相互に連動していることがわかっており、疾患病態とタンパク質リン酸化異常との関係を解明するためには、リン酸化タンパク質の全体像を定量的にプロファイリングすることができる分析手法が必要であり、それには、「網羅的なタンパク質解析法」としてのプロテオーム解析<sup>9, 10)</sup>が最適であるものと思われる。そこで本稿では、近年開発された新しい技術を中心に、「リン酸化タンパク質のプロテオーム解析」<sup>11, 12)</sup>の現状と今後の展望を述べる。

## ● 電気泳動法によるリン酸化タンパク質の分析

従来のリン酸化タンパク質の分析は、タンパク質

### Proteomic analysis of phosphorylated proteins

Tosifusa Toda

とだ・としふさ 1977年大阪大学大学院理学研究科修士課程修了。同年東京都老人総合研究所生化学部基礎第二研究室助手。88年大阪大学理学博士学位取得、88~89年カリフォルニア大学サンフランシスコ校皮膚科学教室客員研究員、93年東京都老人総合研究所分子生物学部門主任研究員を経て、2002年より東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究グループ・グループリーダー(現在に至る)。研究テーマ: タンパク質の加齢変化のプロテオーム解析。

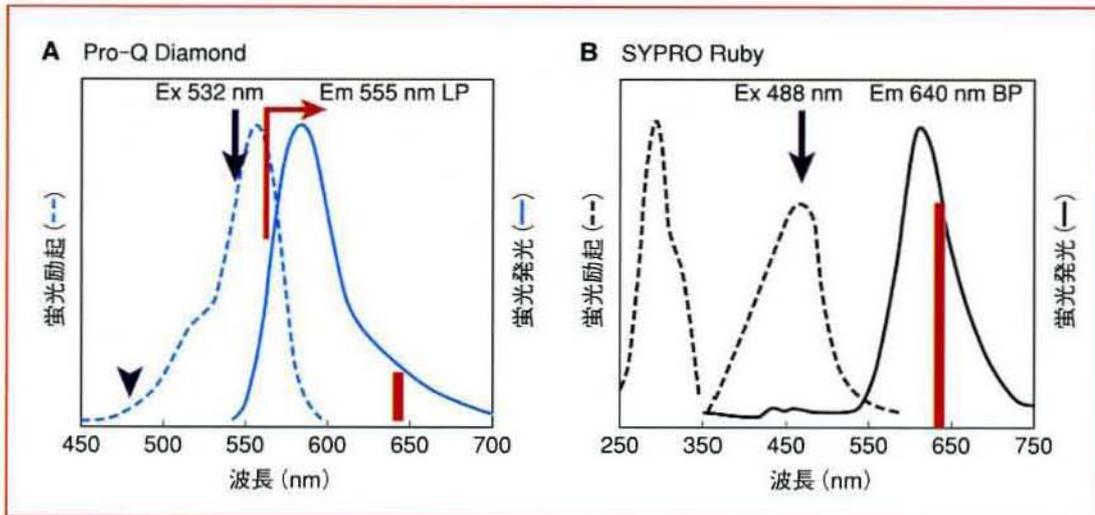


図1 Pro-Q DiamondとSYPRO Rubyの吸光スペクトルと発光スペクトル

筆者らは、青色の矢印で示した波長で励起し、Pro-Q Diamondでは555 nm以上の長波長側を通すフィルターを用いて画像を取り込み、SYPRO Rubyでは640 nm前後の波長のみを通すフィルターを用いて蛍光画像の取り込みを行っている。

を細胞の培養や動物の飼育の段階で<sup>32</sup>P標識し、電気泳動で分離した後にオートラジオグラフィーによって検出するという方法がとられていた<sup>13, 14)</sup>。ラジオアイソトープで標識されたタンパク質はセリン、スレオニン、チロシンのいずれのリン酸化も高感度で検出でき、非常に有用な手法であるが、患者検体の場合には標識すること自体が困難であり、臨床研究には利用できない。これに対し、抗リン酸化タンパク質抗体を用いたウェスタンブロット法<sup>15, 16)</sup>は、あらかじめタンパク質を標識しておく必要がなく、放射線管理区域外でも分析ができることから、臨床サンプルの分析に適した方法である。しかしこれまで報告された研究の多くは、抗チロシンリン酸化抗体を用いたものであり、セリン、スレオニンのリン酸化に対する抗体は特異性および感度の点で問題が残っている。このため、リン酸化タンパク質を網羅的にプロファイリングする目的には適さない。これに対し、近年のプロテオミクス研究で注目を集めているPro-Q Diamond<sup>17, 18)</sup>は、セリン、スレオニン、チロシンのすべてのタイプのリン酸化を高感度で検出できる蛍光色素であり、電気泳動後のゲルを直接染色することによって、リン酸化タンパク質の全体像を簡単にプロファイリングできるものであることから、今後臨床研究をはじめとするさまざまな分野で、幅広く利用されるようになるものと思われる。

Pro-Q DiamondとSYPRO Rubyは、図1に示すような吸光スペクトルと発光スペクトルをもってい

るが、筆者らは、たまたまBio-Rad社のMolecular Imager FX レーザースキャナーを使っていたので、二次元電気泳動後のゲルを最初にPro-Q Diamondで染色し、532 nmの内部レーザーで励起、555 nmのロングパス(LP)フィルターでリン酸化タンパク質のパターンを取り込んだ後にSYPRO Rubyで染色、今度は488 nmの外部レーザーで励起し、640 nmのバンドパス(BP)フィルターを用いて全タンパク質の発現プロファイルを読み取っている。そしてPDQuest二次元電気泳動画像解析ソフトウェアの機能を利用して両者の画像を重ね合わせることによって、タンパク質リン酸化の状態をスポットごとに分析するというを行っている。

図2は、まず最初に予備的な実験として、大腸菌のタンパク質に内部標準としてウシのβカゼインを混合して二次元電気泳動し、上記の手順で2段階染色を行った結果である。矢印で示したスポットがβカゼインで、その蛍光強度を基準としてサンプル中に含まれるリン酸化タンパク質のレベルを相対的に定量することができる。しかし、筆者らは当初Pro-Q Diamondの特異性に若干疑問を抱いていたので、特異性を確認するために、フッ化水素酸処理による化学的な脱リン酸化を行い、染色性の変化を調べてみた。その結果が図3である。レーン左からそれぞれ1：市販のβカゼイン、2：47%フッ化水素酸で2時間処理し完全にリン酸基をはずしたβカゼイン、3：両者を混合したもの、をSDS-ポリア

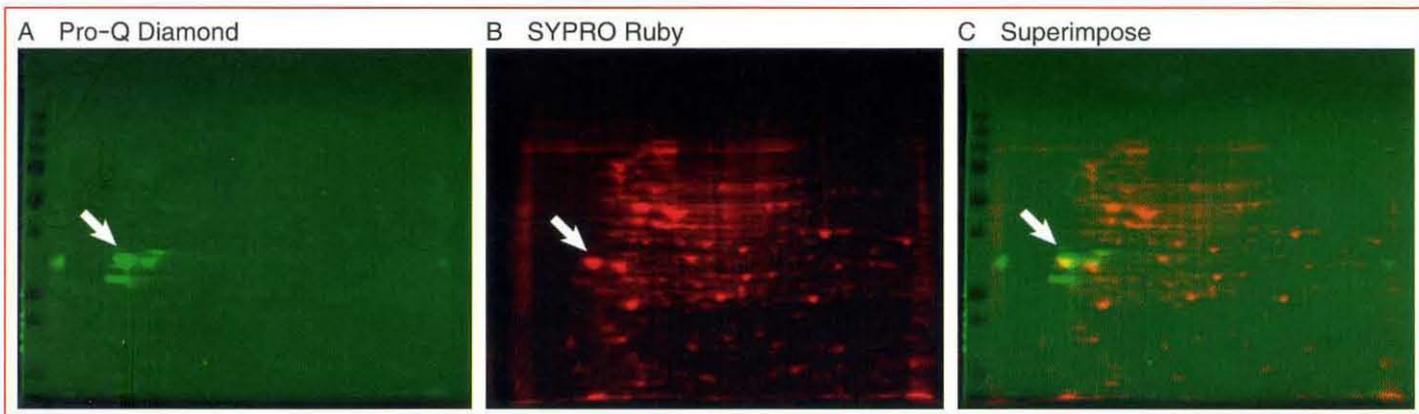


図2 大腸菌の抽出タンパク質に、内部標準としてウシの $\beta$ カゼインを混合して二次元電気泳動し、Pro-Q DiamondとSYPRO Rubyで2段階染色を行った結果

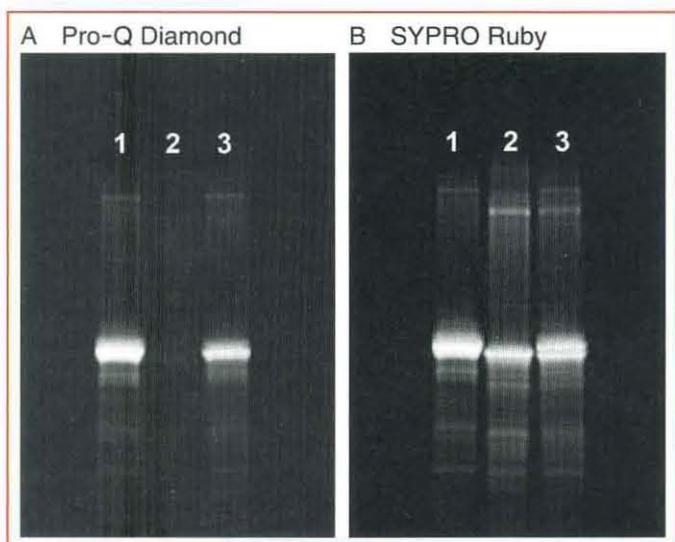


図3 フッ化水素酸処理によって化学的に脱リン酸化された $\beta$ カゼインに対するPro-Q Diamondの染色性

レーン1：市販の $\beta$ カゼイン，2：47%フッ化水素酸で2時間処理し完全にリン酸基をはずした $\beta$ カゼイン，3：両者を混合したもの

クリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) についで、上記のように、最初Pro-Q Diamond染色を行ってリン酸化カゼインのパターンを取り込み (図3A)、さらにSYPRO Rubyで染色して全タンパク質のパターンを読み取った (図3B)。その結果、47%フッ化水素酸で2時間処理するとPro-Q Diamondによる染色性は完全に消失しており、リン酸化タンパク質に特異的であることが確かめられた。

筆者らはこの方法を用いてラットの脳の二次元電気泳動パターンを二重染色し、図4のような結果を得ている。矢印1と2が内部標準として加えて泳動

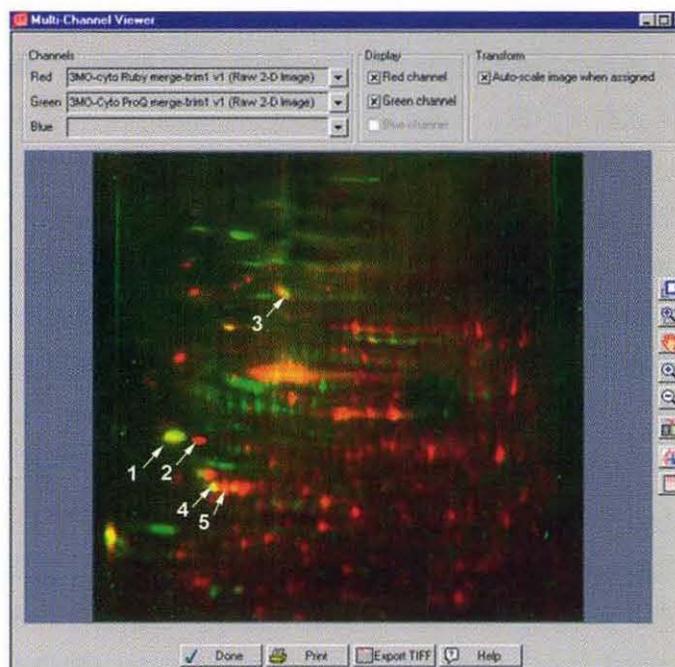


図4 ラットの大脳皮質から抽出されたタンパク質の二次元電気泳動パターン

赤色がSYPRO Rubyで染色された全タンパク質スポットを示し、緑色がPro-Q Diamondで染色されたリン酸化タンパク質のスポットを示している。両者が重なったところは黄色で示されている。矢印1と2が内部標準として加えて泳動したウシの $\beta$ カゼインおよびそれをフッ化水素酸であらかじめ脱リン酸化したものである。後に述べる質量分析によって、スポット3はHSP-90、スポット4と5は14-3-3タンパク質と特定された。

したウシの $\beta$ カゼインおよびそれをフッ化水素酸であらかじめ脱リン酸化したものである。赤色がSYPRO Rubyで染色された全タンパク質スポットを示し、緑色がPro-Q Diamondで染色されたリン酸化タンパク質のスポットを示している。両者が重な

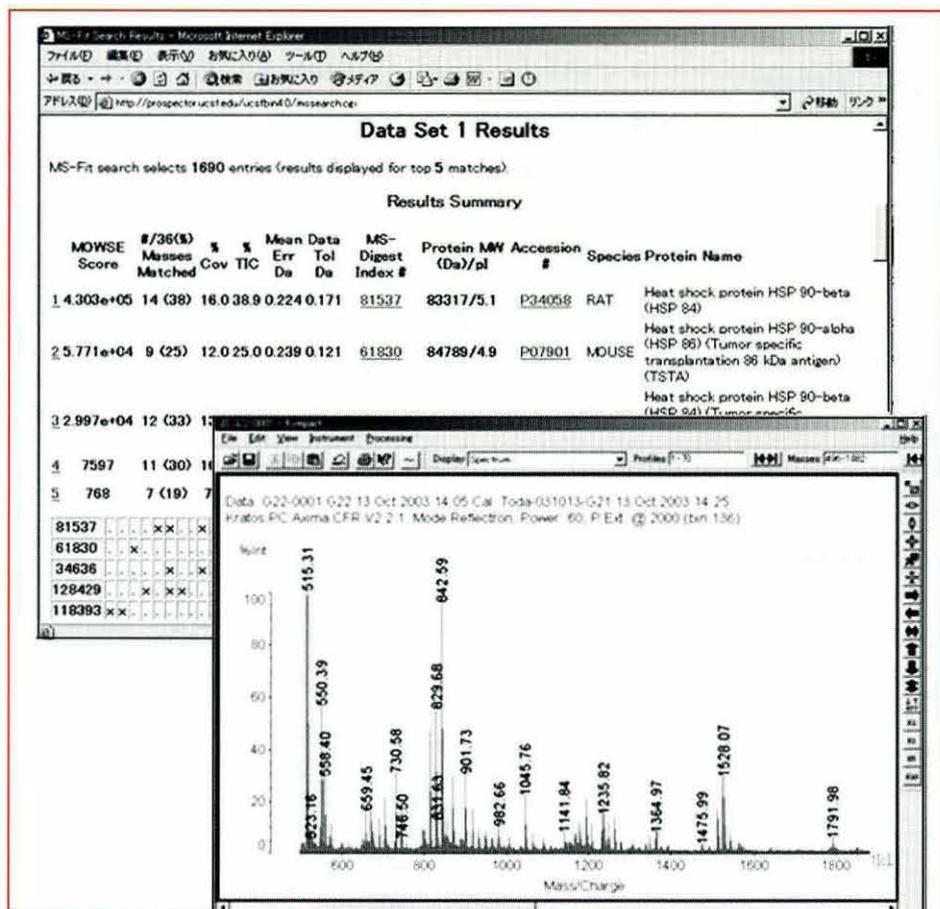


図5 図4のスポット3について解析を行った結果

下段がトリプシン消化ペプチドの質量スペクトル、上段がそのピークの質量のリストをMS-Fitデータベース検索エンジンに投げて検索を行った結果を示している。

ったところは黄色で示されている。

## ●質量分析によるリン酸化タンパク質の解析

このように二次元電気泳動後にPro-Q DiamondとSYPRO Rubyによる二重染色を実施することにより、リン酸化タンパク質全体像のプロファイリングが容易に行える。しかしながらまだこの段階では、どのようなタンパク質のどの部位にリン酸化が起きているのかを解析することはできない。これは、次に述べる「質量分析によるリン酸化タンパク質の解析」<sup>19,20)</sup>によって行われる。

通常プロテオーム解析におけるタンパク質の同定は、二次元電気泳動によって分離されたタンパク質をゲル内でトリプシン消化し、得られたペプチド断片の質量をMALDI (matrix assisted laser desorption ionization)-TOF (time of flight) 型などの質量分析計で正確に分析、その情報 (ペプチドマスフィンガープリント) をデータベースに投げかけて検

索し、最もよく一致するタンパク質を探し出すというやり方で行われる。図5に、図4のスポット3について解析を行った結果を示す。下段のような質量スペクトルが得られ、そのモノアイソトピックピーク\*の質量の値をMS-Fitのペプチドマスフィンガープリントサーチエンジン (<http://prospector.ucsf.edu/ucshtml4.0/msfit.htm>にて無料で利用できる) に送ることによって得られた結果を上段に示す。スポット3はHSP-90βであると同定され、詳細な質量の一致情報 (図6) から、Ser556, Thr479, およびSer445もしくはThr446のいずれかがリン酸化を受けている可能性があることが示唆された。

ペプチドのリン酸化を確認する方法はPSD (post-source decay)<sup>21)</sup>を利用することである。これは図7Cに模式的に示すように、イオン化したペ

\* 質量分析で得られる1価のイオンの質量スペクトルは、<sup>13</sup>Cの存在比によって1Daずれた一連のピークとなって現れる。このうち一番左のピークはすべての炭素が<sup>12</sup>Cで構成されたイオンのピークであり、これをmono-isotopic peakと呼ぶ。

Detailed Results									
1. 14/36 matches (38%)									
Acc. #: P34252 Species: RAT Name: Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90)									
Index: 81517 MW: 83317 Da pl: 5.1									
m/z	Identified	Delta	Modifications	Start	End	Missed	Database		
Submitted	Matched	Da				Cleavages	Sequence		
829.6800	829.5300	0.15		331	337	0	(R)ALLFIPR (R)		
831.6300	831.3323	0.30	1PO4	552	557	1	(K)KMEESK(A)		
844.6100	844.3640	0.25	1PO4	476	481	1	(R)MKETQK(S)		
901.7300	901.5260	0.20		285	291	0	(K)TKPWTR (K)		
951.6400	951.4648	0.18		169	177	0	(R)ADHGEPIGR (Q)		
1045.7600	1045.6006	0.16		575	583	1	(K)VEKVTISNR (L)		
1141.8400	1141.5602	0.28		439	448	0	(K)GIHEDSTNR (R)		
1208.9200	1208.6315	0.29		339	348	1	(R)APFDLEFKK (K)		
1237.8600	1237.6289	0.23		169	180	1	(R)ADHGEPIGRITK (V)		
1249.9300	1249.6177	0.31		482	502	0	(K)EIVANSFVER (V)		
1348.8700	1348.6650	0.21		320	330	0	(K)EIVSVEGDLFEK (A)		
1514.0400	1513.7862	0.25		379	382	0	(K)VVVDSDELPLNSR (E)		
1528.0700	1527.7443	0.33		307	319	0	(K)SLTNDWEDHLAVK (H)		
1576.7500	1576.7465	0.0015	1PO4	436	448	1	(K)NKLGIHEDSTNRR (R)		

図6 詳細な質量の一致情報

この結果から、このHSP-90スポットではSer556, Thr479, およびSer445もしくはThr446のいずれかがリン酸化を受けている可能性があることが示唆された。

プチドのうち特定の質量をもつものだけをイオンゲートで選択し、反射 (reflectron) モードのTOF型質量分析計内を飛行させた場合、熱力学的に不安定なリン酸化構造部分が途中で壊れ、80 Daもしくは98 Da小さいイオンが検出されるというものである。このときの質量減少を neutral loss と呼ぶ。HSP-90  $\beta$  においてリン酸化が示唆された1576.75 Daのイオンをこの方法でPSD分析した結果を図8に示す。確かにこのイオンでは80 Da および98 Daの neutral loss が検出されており、この部分にリン酸化が起きていることが確認された。Ser445とThr446のいずれかがリン酸化されているのかを特定するためにはさらに、Q (quadrupole)-TOF型やQIT (quadrupole ion trap)-TOF型などのいわゆるタンデム型質

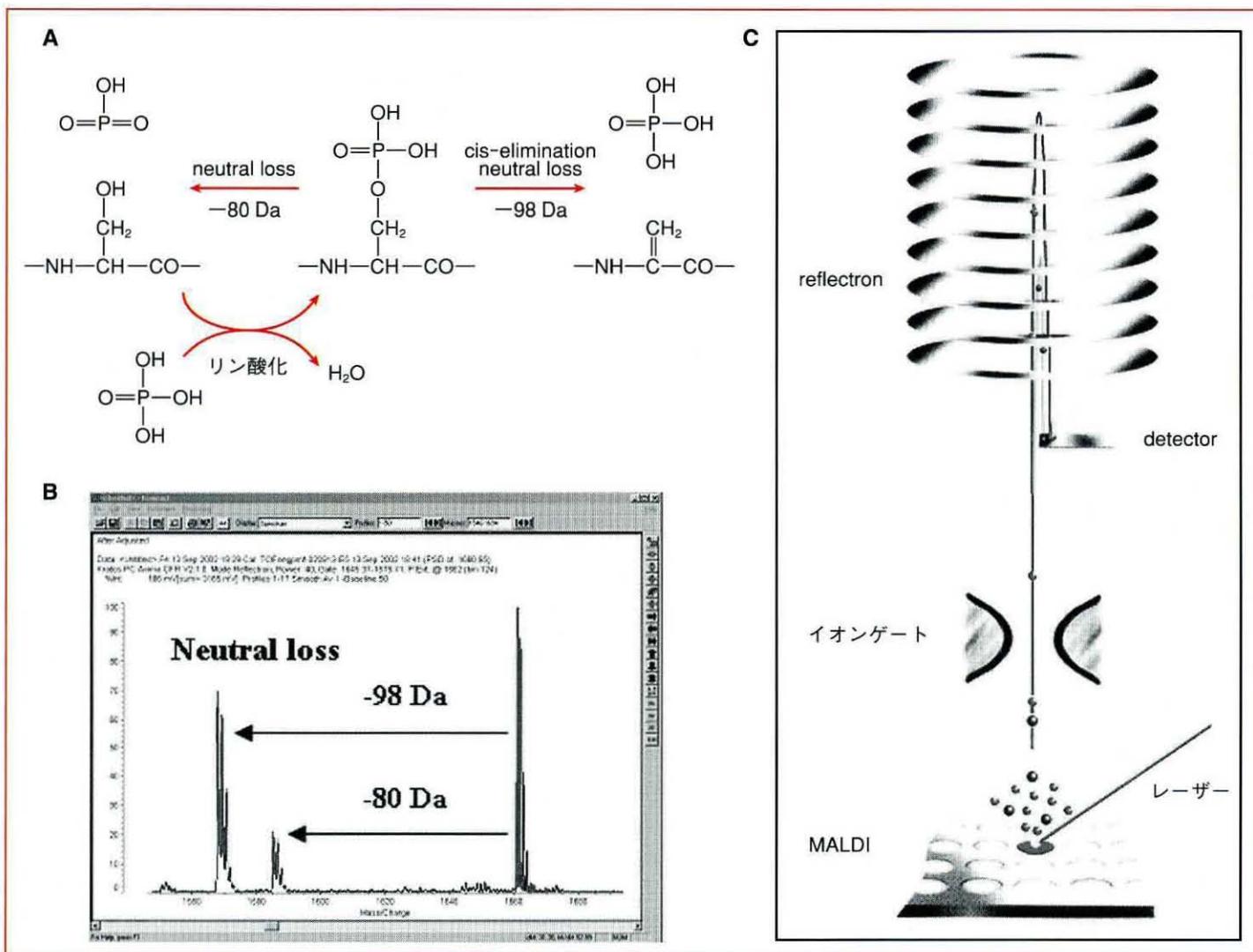


図7 PSD (post-source decay) によるリン酸化ペプチド分析の原理

リン酸化されたペプチドの場合、イオンゲートを通過後に80 Daもしくは98 Daの質量減少が起こる。

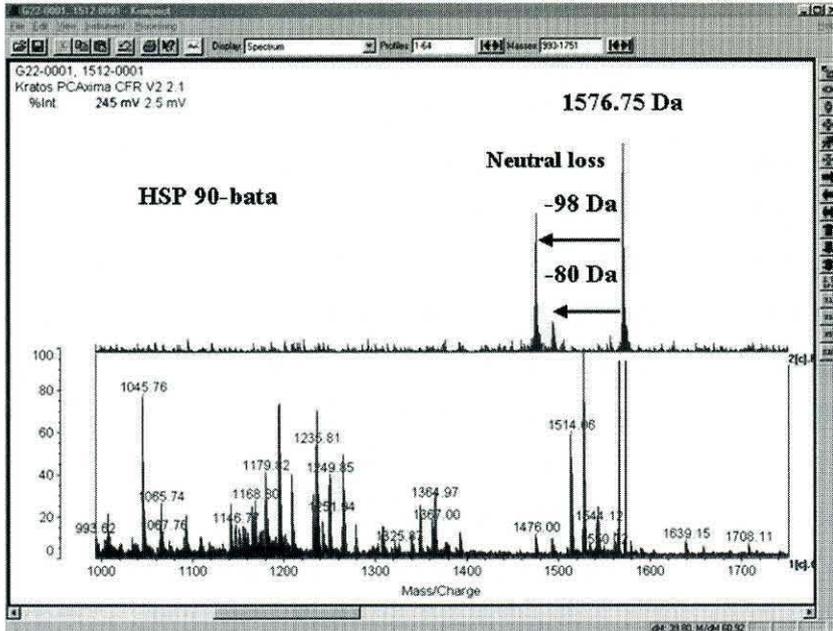


図8 HSP-90 $\beta$ においてリン酸化が示唆された1576.75 DaのイオンのPSD分析  
下段は、通常のMALDI-TOF/MSの全スペクトル、  
上段が、1576.75 Daのイオンをゲーティングして  
得られたPSDのスペクトル。

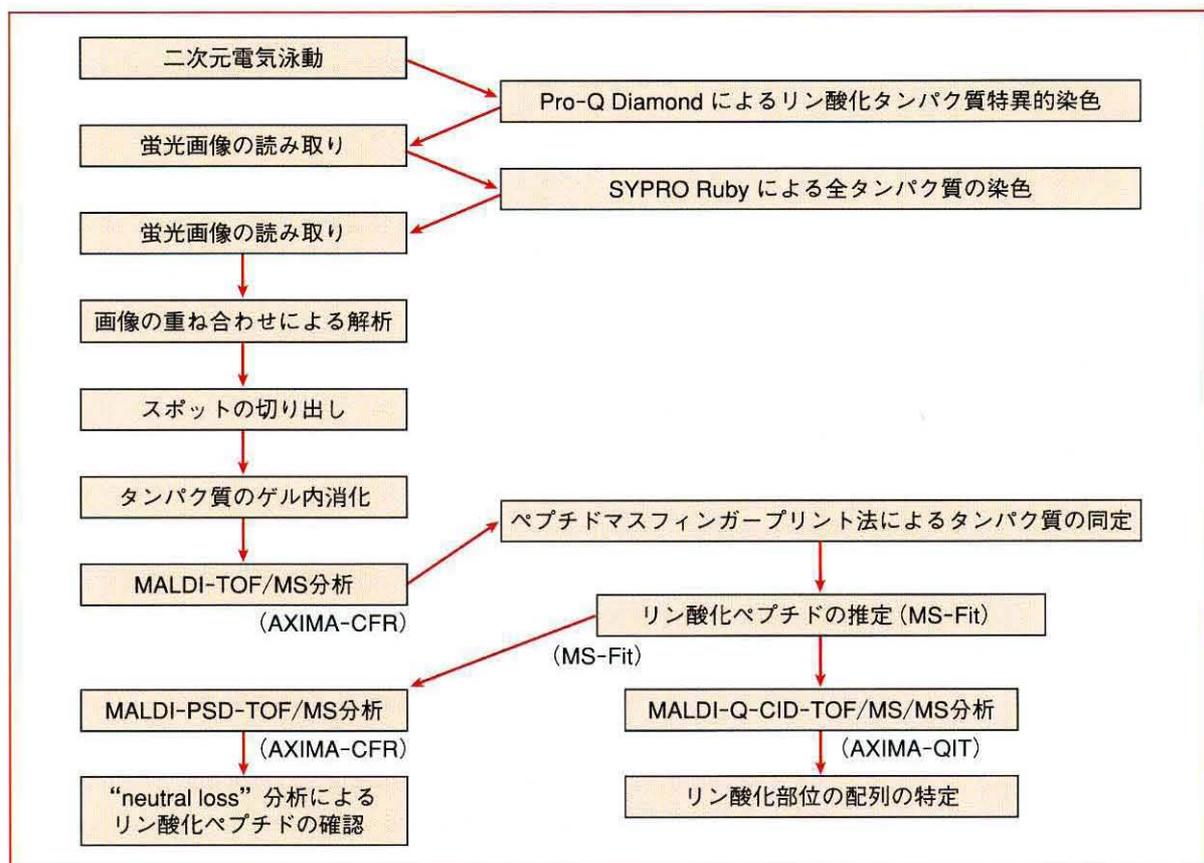


図9 リン酸化タンパク質の網羅的なプロテオーム解析の流れ

量分析計を用いてMS/MSを行い、ペプチドの配列を解読する必要がある。この一連の操作の流れをまとめたものが図9である。前半の二次元電気泳動と蛍光染色および画像解析までの段階では、主にリン酸化タンパク質の網羅的プロファイリングと定量的

なディファレンシャル解析が行われ、後半の質量分析では、タンパク質の同定とリン酸化部位の特定が行われる。筆者らはこの一連の操作を行うことによって、細胞の老化や分化、アポトーシスの誘導、酸化ストレス応答などに伴うタンパク質リン酸化の変

動の解析や、疾患病態とタンパク質リン酸化とのかわりを明らかにしたいと考えている。

このようにリン酸化タンパク質のプロテオーム解析では、これまで個別に行われてきた古典的な方法に比べると非常に簡単に多くの情報が得られるようにはなった。しかし、細胞内シグナル伝達にかかわるリン酸化タンパク質のなかには、可溶化が困難であったり、非常に微量であるために検出が困難であったりするものが多い。このようなリン酸化タンパク質を分析するためには、更なる工夫が必要になる。たとえばTritonでも可溶化されずに膜に強固に結合したリン酸化タンパク質の場合には、あえて二次元電気泳動にこだわらず、膜成分だけを集めて比較的溶解性の高いものを除いた後にSDSで可溶化し、SDS-PAGEで一次的に分離して、それ以後は同様な方法で分析する。

また、非常に微量な成分についてはあらかじめ濃縮を行う必要があるが、リン酸化タンパク質やリン酸化ペプチドを濃縮する方法としては抗体を用いる方法と金属キレートクロマトグラフィーの原理を用いる方法 (IMAC法)<sup>22, 23)</sup> とがある。抗チロシンリン酸化抗体を用いた場合には特異性は高いものの、

セリンやスレオニンがリン酸化されたものを見逃すので注意が必要である。

これに対しIMAC法はチロシンのリン酸化のみならず、セリンやスレオニンがリン酸化されたものも濃縮できる利点はあるが、抗体法に比べると特異性が低く、特にグルタミン酸やアスパラギン酸を多く含む酸性タンパク質も濃縮されるので、これによって濃縮されたタンパク質を図9に示す流れでプロテオーム解析する必要がある。IMAC法はむしろ、トリプシン消化後のリン酸化ペプチドの濃縮に向いている。図4にみられるようにPro-Q Diamondでは比較的強く染まるのに対し、SYPRO Rubyではほとんどスポットが見えないものについては、このままタンパク質をゲル内消化しても、質量分析で十分に強いシグナルが得られないことがある。このような場合には、数枚のゲルから得られたペプチドを回収してIMAC法で濃縮し、質量分析にかけることによって同定とリン酸化部位の特定が可能になる。IMAC法の具体的な操作についてはここでは述べないが、筆者らが行っている方法については別著<sup>24)</sup>で詳しく紹介しているので、興味がある方はそちらをご覧ください。

## 文献.....

- 1) Krebs EG. Phosphorylation and dephosphorylation of glycogen phosphorylase : A prototype for reversible covalent enzyme modification. *Curr Top Cell Regul* **18**, 401-19 (1981)
- 2) Goodman DB, Rasmussen H, DiBella F & Guthrow CE Jr. Cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate-stimulated phosphorylation of isolated neurotubule subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **67**, 652-9 (1970)
- 3) Ueda T, Maeno H & Greengard P. Regulation of endogenous phosphorylation of specific proteins in synaptic membrane fractions from rat brain by adenosine 3': 5'-monophosphate. *J Biol Chem* **248**, 8295-305 (1973)
- 4) Browning M, Bennett W & Lynch G. Phosphorylase kinase phosphorylates a brain protein which is influenced by repetitive synaptic activation. *Nature* **278**, 273-5 (1979)
- 5) Ihara Y, Nukina N, Miura R & Ogawara M. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem (Tokyo)* **99**, 1807-10 (1986)
- 6) Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 4913-7 (1986)
- 7) Okochi M, Walter J, Koyama A, et al. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated  $\alpha$ -synuclein. *J Biol Chem* **275**, 390-7 (2000)

- 8) Ellis CE, Schwartzberg PL, Grider TL, Fink DW & Nussbaum RL.  $\alpha$ -synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* **276**, 3879-84 (2001)
- 9) Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes : *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090-4 (1995)
- 10) Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. Progress with proteome projects : Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* **13**, 19-50 (1996)
- 11) Larsen MR, Sorensen GL, Fey SJ, Larsen PM & Roepstorff P. Phospho-proteomics : Evaluation of the use of enzymatic de-phosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis. *Proteomics* **1**, 223-38 (2001)
- 12) Conrads TP, Issaq HJ & Veenstra TD. New tools for quantitative phosphoproteome analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 885-90 (2002)
- 13) Engstrom L. Studies of phosphoprotein functions. III. The effect of some inhibitors of oxidative phosphorylation on the incorporation rate of  $^{32}\text{P}$  into trichloroacetic acid-soluble nucleotides and protein phosphorylserine of baker's yeast. *Acta Soc Med Ups* **63**, 149-54 (1958)
- 14) Turkington RW & Topper YJ. Casein biosynthesis : Evidence for phosphorylation of precursor proteins. *Biochim Biophys Acta* **127**, 366-72 (1966)
- 15) Goh KC, Lim YP, Ong SH, et al. Identification of p90, a prominent tyrosine-phosphorylated protein in fibroblast growth factor-stimulated cells, as 80K-H. *J Biol Chem* **271**, 5832-8 (1996)
- 16) Takahashi S, Conti M, Prokop C, Van Wyk JJ & Earp HS 3rd. Thyrotropin and insulin-like growth factor I regulation of tyrosine phosphorylation in FRTL-5 cells. Interaction between cAMP-dependent and growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem* **266**, 7834-41 (1991)
- 17) Martin K, Steinberg TH, Goodman T, et al. Strategies and solid-phase formats for the analysis of protein and peptide phosphorylation employing a novel fluorescent phosphorylation sensor dye. *Comb Chem High Throughput Screen* **6**, 331-9 (2003)
- 18) Steinberg TH, Agnew BJ, Gee KR, et al. Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics* **3**, 1128-44 (2003)
- 19) Hunter AP & Games DE. Chromatographic and mass spectrometric methods for the identification of phosphorylation sites in phosphoproteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **8**, 559-70 (1994)
- 20) Resing KA, Johnson RS & Walsh KA. Mass spectrometric analysis of 21 phosphorylation sites in the internal repeat of rat profilaggrin, precursor of an intermediate filament associated protein. *Biochemistry* **34**, 9477-87 (1995)
- 21) Kaufmann R, Spengler B & Lutzenkirchen F. Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* **7**, 902-10 (1993)
- 22) Gauthier J, Amiot J & Vijayalakshmi MA. Preparative separation of small molecular weight peptides from casein hydrolysate using gel filtration and immobilized metal ion affinity chromatography. *Prep Biochem* **20**, 23-50 (1990)
- 23) Anguenot R, Yelle S & Nguyen-Quoc B. Purification of tomato sucrose synthase phosphorylated isoforms by Fe(III)-immobilized metal affinity chromatography. *Arch Biochem Biophys* **365**, 163-9 (1999)
- 24) 戸田年総. 金属キレートアフィニティを用いたリン酸化タンパク質のプロテオミクス. *生物物理化学* **47**, 1-6 (2002)