第18回日本電気泳動学会奨励賞（服部賞）受賞者論文
論文種目：技術

マルチ PK 抗体を用いたプロテインキナーゼ研究の新展開

杉山康憲*・上里裕樹・亀下 勇

香川大学農学部応用生物科学科

（受付 2017 年 11 月 17 日，受理 2018 年 2 月 22 日）

SUMMARY

Protein kinase expression and activity play pivotal roles in various cellular events thorough regulation of phosphorylation signaling. Aberrant expression and activity of protein kinases cause various diseases such as cancer. Therefore, analysis of protein kinase expression and activity is important for understanding their pathogenesis of these condition. In previous reports, various methods for analyzing protein kinases were developed and used to investigate the expression or activity of many protein kinases. However, a method for analyzing the expression and activation of total cellular protein kinases has not been established. To analyze intracellular protein kinases, we generated monoclonal antibodies, designated Multi-PK antibodies, which recognize a wide variety of protein kinases. These Multi-PK antibodies can be used to profile the protein kinases expressed in cells, identify kinases of special interest, and analyze protein kinase expression and phosphorylation state. Additionally, these antibodies could be useful for analysis of various diseases and cellular functions such as glucotoxicity in type 2 diabetes, pathogenesis of ulcerative colitis and epigenetics. Here we introduce newly analytical methods using Multi-PK antibodies combined with Phos-tag 2D-PAGE to analyze the expression and phosphorylation state of total cellular protein kinases. In this review, we focus on recently developed technologies for kinomics studies that use Multi-PK antibodies, which represent a useful analytical tool.

Key words: protein kinase, monoclonal antibody, phosphorylation, proteomics, 2D-PAGE

はじめに

プロテインキナーゼは細胞外からの刺激を細胞内へと伝達するシグナル因子として働くことにより，細胞の増殖，生存，アポトーシスといった多様な生命現象において中心的な役割を果たしている．プロテインキナーゼによるシグナル伝達は，上流のキナーゼが下流のキナーゼをリン酸化することで伝わる．この一連の流れはシグナルカスケードと呼ばれている．シグナルカスケードにおいてプロテインキナーゼは上流のキナーゼによるリン酸化もしくは自己リン酸化によって活性が制御される¹⁾．そのため，キナーゼの活性とキナーゼのリン酸化状態は密接に関係することが知られている．このようなシグナル伝達経路においてプロテインキナーゼの発現量や活性の異常は，がんをはじめと

する様々な疾病の発症の原因となることが明らかとなっている．

現在，ゲノムプロジェクトの完了によってヒトでは 518 種類のプロテインキナーゼの存在が知られている²⁾．これらのキナーゼは主にセリン・スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼの 2 種類に大別され，それぞれが様々なサブファミリーを形成している．このように多種多様なプロテインキナーゼはそれぞれ異なる発現パターンと活性制御機構を持つと考えられている．そのため，これらプロテインキナーゼの発現量と活性化状態（リン酸化状態）を調べることは，様々な生命現象の解明や疾病の発症の原因究明において非常に重要な意味を持つ．本稿では，これまで到我々が開発したプロテインキナーゼを幅広く検出できるモノクローナル抗体であるマルチ PK 抗体を用いたプロテ

Expansion of protein kinase study using Multi-PK antibody

Yasunori Sugiyama, Yuuki Uezato, Isamu Kameshita

Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University

* Corresponding author: Yasunori Sugiyama; Department of Life Sciences, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Ikenobe 2393, Miki-cho, Kagawa 761-0795, Japan

E-mail: sugiyama@ag.kagawa-u.ac.jp

第18回日本電気泳動学会奨励賞（服部賞）受賞者論文

ンキナーゼの発現量および活性化状態（リン酸化状態）の解析手法について紹介する。

プロテインキナーゼの発現量解析法

現在、一般的に用いられているプロテインキナーゼの発現量の解析方法は、特定のキナーゼに対する特異的抗体を用いたウエスタンブロット解析である³⁾。また、mRNA レベルでの解析には qRT-PCR やリアルタイム PCR が広く利用されている⁴⁾。これらの手法は簡便に用いることができ、特定のキナーゼの解析において非常に有効である。一方、細胞内に発現するプロテインキナーゼをまとめて解析する方法としては、mRNA レベルでのマイクロアレイ解析が知られている⁵⁾。この方法は高価な専用の装置が必要であるが、現在では多くの受託解析がなされており、そのハードルは下がりつつある。一方、タンパク質レベルでの網羅的解析手法については全く報告されていなかった。そこで我々は、プロテインキナーゼを網羅的に認識する抗体の作製を試み、モノクローナル抗体であるマルチ PK 抗体の作製に成功した^{6,7)}。マルチ PK 抗体はプロテインキナーゼの触媒領域の中で最も高度に保存されているサブドメイン VIB 配列を認識することにより、幅広いプロテインキナーゼを検出することが可能である。このマルチ PK 抗体には、セリン・スレオニンキナーゼを認識できる M1C 抗体と M8C 抗体に加え、チロシンキナーゼに対する YK34 抗体の 3 種類が存在する。ここでは詳細を省くが、マルチ PK 抗体の反応特異性については電気泳動 61 巻で説明しているのでこちらを参照していただきたい。

マルチ PK 抗体を用いたプロテインキナーゼの発現解析には主にウエスタンブロットが用いられており、他には dot immunobinding assay や免疫沈降にも利用されている。組織抽出液や細胞抽出液を SDS-PAGE で分離し、マルチ PK 抗体を用いたウエスタンブロットによりプロテインキナーゼの発現量を解析すると、一度に多数のキナーゼバンドを検出することができる。この方法を用いると、細胞内に発現するプロテインキナーゼの全体像を簡便に把握することができる。しかし、同一分子量のキナーゼを区別して検出できないという問題点がある。我々はこの問題を解決するために、一次元目には等電点勾配ゲルまたは液相等電点分離を利用した 2 種類の二次元電気泳動法を用いている。細胞内に発現しているタンパク質を網羅的に解析する手法として最も広く利用されている IPGphor (GE Healthcare) を用いた等電点勾配ゲルを利用した場合、様々な抽出液から多くのキナーゼスポットを検出することが可能である。この方法は等電点での分離能が非常に高く、再現性が得やすく、操作も簡便であるという利点を持つ。一方、欠点としては、アプライできるサンプル量が少ないことと、高分子量タンパク質の検出に向かない点である⁸⁾。

Fig. 1 Expression pattern analysis of protein kinases after separation by SDS-PAGE or 2D-PAGE

Crude extract from rat testis was applied on SDS-PAGE (A), 2D-PAGE using IPGphor in the first dimension and SDS-PAGE in the second dimension (B), and 2D-PAGE using MicroRotor/SDS-PAGE (C), and analyzed by Western blotting with YK34 antibody.

Table 1 Feature of each method in detection of protein kinases

Method	Sensitivity	Separatory	Operativity
SDS-PAGE	○	△	◎
2D-PAGE using IPG gel	△	◎	○
2D-PAGE using MicroRotor	◎	○	△

これに対して、MicroRotor (BIO-RAD) を用いた液相等電点分離法の場合は、多量のサンプルを解析に用いることができるため、非常に高感度であり、高分子量タンパク質を効率良く検出することが可能である。しかしながら、等電点分離においては 10 区画にしか分離できないため、分離能においては等電点勾配ゲルに劣っている⁹⁾。Fig. 1 には、これらの各手法を用いてラット精巣からチロシンキナーゼを検出した結果を示す。また、各手法を用いた場合の特徴を Table 1 に示したので、参考にしていただきたい。

プロテインキナーゼの活性解析法

プロテインキナーゼ活性の解析法は基質のリン酸化を調べることによって直接キナーゼ活性を解析する方法と、キナーゼ活性を制御するリン酸化部位を解析する間接的な

方法に分けられる。直接解析する方法としては、*in vitro* キナーゼアッセイが最も利用されている¹⁰⁾。この方法は、精製したプロテインキナーゼや細胞抽出液により基質タンパク質または基質ペプチドを³²P-ATPを用いてリン酸化し、オートラジオグラフィや液体シンチレーションカウンターによりリン酸化された基質を検出してキナーゼ活性を解析できる。加えて、インゲルキナーゼアッセイも広く利用されている。この方法では、SDS-PAGEにおけるポリアクリルアミドゲル中に基質タンパク質を固定した後、精製キナーゼや細胞抽出液を泳動して分離する。泳動後、ゲル内でキナーゼの立体構造を巻き戻し、³²P-ATPを用いてゲル内基質をリン酸化する。オートラジオグラフィによって基質のリン酸化を検出することでキナーゼ活性を解析することができる¹¹⁾。一方、間接的にキナーゼ活性を検出するために最も利用されているのは、活性を制御するリン酸化部位に対する抗体を用いたウエスタンブロット解析である³⁾。この方法は、特定のプロテインキナーゼの活性に関わるリン酸化部位が明らかであり、そのリン酸化に特異的な抗体が必要であるが、細胞内におけるプロテインキナーゼの活性の有無を非常に簡便に解析することが可能である。

近年、タンパク質のリン酸化を解析するツールとしてタンパク質のリン酸基に特異的に結合する化合物 Phos-tag が開発された¹²⁾。Phos-tag アクリルアミドはアクリルアミドと重合することにより SDS ポリアクリルアミドゲル中に固定することができる。ゲル中に封入された Phos-tag はリン酸化タンパク質と親和性があるため、リン酸化タンパク質の移動度を低下させる。そのため、この Phos-tag ゲルを用いて電気泳動を行うと、リン酸化タンパク質をシフトアップバンドとして非リン酸化タンパク質と分離することが可能である。そこで我々は、マルチ PK 抗体と Phos-tag 電気泳動を組み合わせることによって、細胞内のプロテインキナーゼのリン酸化状態をまとめて検出できるユニークな手法を開発した¹³⁾。まず、泳動サンプルとして予め λ プロテインホスファターゼによって脱リン酸化処理を行った細胞抽出液や組織抽出液と処理を行っていないサンプルを準備する。これらのサンプルを Phos-tag ゲルを用いて泳動し、マルチ PK 抗体を利用したウエスタンブロットにて解析する。この方法を用いると、マルチ PK 抗体によって細胞内のプロテインキナーゼをまとめて検出でき、Phos-tag ゲルによりリン酸化キナーゼと非リン酸化キナーゼを分離して検出することができる。さらに、脱リン酸化処理を行ったサンプルと未処理のサンプルの結果を比較することにより、細胞内プロテインキナーゼのリン酸化状態を解析することが可能である。しかしながら、Phos-tag ゲルを用いた一次元の電気泳動解析では、リン酸化シフトバンドがどのキナーゼバンド由来であるかが分からな

いという問題があった。

そこで我々はこの問題を解決するため、一次元目に等電点勾配ゲルを、二次元目に Phos-tag ゲルを用いた Phos-tag 二次元電気泳動とマルチ PK 抗体を組み合わせることにより、細胞内プロテインキナーゼをプロファイルする新規手法を考案した。Fig. 2 では、ヒト前骨髄性白血病細胞である HL-60 細胞に TPA 処理を行って分化させた際の細胞内チロシンキナーゼの発現を YK34 抗体を用いて解析した結果を示す。一次元の SDS 電気泳動で解析すると、

Fig. 2 Profiling of intracellular tyrosine kinases analyzed using Multi-PK antibody and Phos-tag 2D-PAGE

HL-60 cells were induced to differentiation by treatment with 10 nM TPA for 0, 2, 4 days (A) or 0, 4 days (B, C). The cell extracts were dephosphorylated with λ PPase and were separated by Phos-tag SDS-PAGE (A) or Phos-tag 2D-PAGE (B). After separation, the immunoreactive bands and spots were detected by Western blotting with YK34 antibody. The outlined area of (B) showing spots changed in expression and/or phosphorylation level (C).

HL-60 細胞から約 8 本のチロシンキナーゼバンドが検出され、TPA 処理によって白矢尻で示すバンドの発現量に変化した (Fig. 2A, 左図)。また、Phos-tag 電気泳動を用いると、黒矢尻で示す 3 本のチロシンキナーゼバンドのリン酸化レベルが TPA 処理によって変化することが示された (Fig. 2A, 右図)。一方、Phos-tag 二次元電気泳動を用いた場合、約 10 のスポットが検出された。このうち、Fig. 2B のスポット 3 と 4 のように同一分子量のキナーゼを分離して検出することができた。また、Fig. 2C のスポット 1 や 2 のように TPA 処理によってリン酸化レベルが変化するチロシンキナーゼが検出された。これらの結果より、マルチ PK 抗体と Phos-tag 二次元電気泳動を組み合わせた手法は、細胞内プロテインキナーゼのリン酸化状態をプロファイルするための有効なツールであると考えられる。

おわりに

様々な生命現象において中心的な役割を果たしているリン酸化シグナリングはプロテインキナーゼによってコントロールされている。これまでの研究により、プロテインキナーゼの発現と活性の異常は多くの疾病の発症に関与することが知られている^{14,15)}。そのため、プロテインキナーゼの発現や活性を解析するための様々な方法が開発されてきた。本稿では、これまでに開発されてきたキナーゼ解析法と、我々が開発したマルチ PK 抗体を用いた解析法について最新の情報を解説した。特にマルチ PK 抗体と Phos-tag 二次元電気泳動を組み合わせた方法は、細胞内プロテインキナーゼの発現量とリン酸化状態をプロファイリングできる新手法である。これまでに、マルチ PK 抗体を用いることでエビジェネティクス¹⁶⁾、2 型糖尿病の糖毒性¹⁷⁾、潰瘍性大腸炎¹⁸⁾ などに関わるキナーゼの同定と解析が行われてきた。ほとんど全ての生命現象にタンパク質のリン酸化が関わっていることから、マルチ PK 抗体の有用性はさらに高まっていくものと思われる。今後、マルチ PK 抗体を利用した手法が、さらに多くの生命現象の解明や疾病の原因究明に役立つことを期待する。

本論文に関して開示すべき利益相反状態は無い。

文 献

- 1) Adams JA. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem Rev.* 2001;101:2271–2290.
- 2) Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002;298:1912–1934.
- 3) Ruschel A, Ullrich A. Protein tyrosine kinase Syk modulates EGFR signalling in human mammary epithelial cells. *Cell Signal.* 2004;16:1249–1261.
- 4) Wang J, Pan C, Wang Y, *et al.* Genome-wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber. *BMC Genom.* 2015;16:386.
- 5) Johannes G, Carter MS, Eisen MB, *et al.* Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1999;96:13118–13123.
- 6) Kameshita I, Tsuge T, Kinashi T, *et al.* A new approach for the detection of multiple protein kinases using monoclonal antibodies directed to the highly conserved region of protein kinases. *Anal Biochem.* 2003;322:215–224.
- 7) Sugiyama Y, Sueyoshi N, Shigeri Y, *et al.* Generation and application of a monoclonal antibody that detects a wide variety of protein tyrosine kinases. *Anal Biochem.* 2005;347:112–120.
- 8) Righetti PG, Castagna A, Herbert B, *et al.* How to bring the “unseen” proteome to the limelight via electrophoretic pre-fractionation techniques. *Biosci Rep.* 2005;25:3–17.
- 9) Sugiyama Y, Sueyoshi N, Kameshita I. Two-dimensional expression pattern analysis of protein kinases after separation by MicroRotofor/SDS–PAGE. *Anal Biochem.* 2006;359:271–273.
- 10) Kameshita I, Taketani S, Ishida A, *et al.* Detection of a variety of Ser/Thr protein kinases using a synthetic peptide with multiple phosphorylation sites. *J Biochem.* 1999;126:991–995.
- 11) Kameshita I, Fujisawa H. A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal Biochem.* 1989;183:139–143.
- 12) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, *et al.* Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5:749–757.
- 13) Sugiyama Y, Katayama S, Kameshita I, *et al.* Expression and phosphorylation state analysis of intracellular protein kinases using Multi-PK antibody and Phos-tag SDS–PAGE. *MethodsX.* 2015;2:469–474.
- 14) Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 2001;411:355–365.
- 15) Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995;267:1782–1788.
- 16) Kameshita I, Sekiguchi M, Hamasaki D, *et al.* Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377:1162–1167.
- 17) Sugiyama Y, Murao K, Imachi H, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV involvement in the pathophysiology of glucotoxicity in rat pancreatic β -cells. *Metabolism.* 2011;60:145–153.
- 18) Ma Y, Semba S, Maemoto A, *et al.* Oxazolone-induced overexpression of focal adhesion kinase in colonic epithelial cells of colitis mouse model. *FEBS Lett.* 2010;584:3949–3954.