〔特集：リン酸化生体分子解析のためのフォスタグテクノロジー〕

フォスタグケミストリー

木下英司*・木下恵美子・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

(受付 2011 年 9 月 6 日, 受理 2011 年 10 月 18 日)

SUMMARY

Recently, we found that an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex of 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olate acts as a novel phosphate capture molecule under physiological conditions. The dizinc(II) complex forms a stable 1:1 complex with a phosphate monoester dianion in aqueous solutions. The X-ray crystal analysis of the 1:1 dizinc(II) complex with a *p*-nitrophenyl phosphate dianion disclosed that each phosphate oxygen anion binds to a zinc(II) at the fifth coordination site and that the two zinc(II) ions are separated by a distance of 3.6 Å. Thus, the dizinc(II) complex having a vacancy on the two zinc(II) ions is suitable for the access of a phosphate monoester dianion. In an aqueous solution, the dizinc(II) complex strongly binds to the phenyl phosphate dianion ($K_d=2.5\times10^{-8}$ M) at a neutral pH. The anion selectivity indexes against SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , and the diphenyl phosphate monoanion at 25°C are 5.2×10^3 , 1.6×10^4 , 8.0×10^5 , and $>2\times10^6$, respectively. In addition, the 1:1 formation of the dizinc(II) complex and an inorganic phosphate dianion (HOPO_3^{2-}) was clearly detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) based on a characteristic mass shift and a total-charge change of the phosphate (from -2 to +1). This finding introduced a new procedure for the analysis of phosphorylated compounds using the dizinc(II) complex as an MS probe. Therefore, we termed the dinuclear metal complex “Phos-tag” as a phosphate-binding tag molecule.

Key words: Phos-tag, metal complex, zinc, phosphate monoester dianion, MALDI-TOF MS

1. はじめに

ヒトゲノムの解析が完了した現在、ゲノムがコードするタンパク質の機能解析へと研究ターゲットが移ってきている。タンパク質のリン酸化は、細胞内の様々な制御機能に関わる共通のメカニズムである。その重要性は、ヒトゲノムの数%がプロテインキナーゼの情報であるという事実からも明らかである。タンパク質のリン酸化部位を調べる場合、放射性のリン酸で標識したタンパク質を電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーにより解析するという手法が用いられる。放射性物質を用いない方法としては、リン酸化部位を認識する抗体を用いる方法がある。このようなタンパク質のリン酸化部位の決定やリン酸化の役割を調べる研究は、リン酸化プロテオーム解析と呼ばれている。現在では、電気泳動の他に質量分析法を用いたリン酸化プロ

テオーム解析法も数多く開発され発展している。

リン酸イオンの捕捉分子は、リン酸化プロテオーム解析に新しい技術をもたらす可能性をもつ機能性分子である。これまでに知られていたリン酸イオンの捕捉分子は、リン酸イオンと相補的な水素結合をする人工低分子である。それらの解離定数 $K_d = [\text{リン酸化分子}][\text{捕捉分子}] / [\text{リン酸化分子} - \text{捕捉分子}]$ は、クロロフォルムなどの有機溶媒中において mM ~ μM の範囲である。しかし、水溶液中ではそれらリン酸化分子と捕捉分子の水素結合はまったく機能しない。

筆者らの研究室では、亜鉛イオンを必須とする酵素（亜鉛酵素）の亜鉛イオンがアニオン性基質を捕捉し活性化する機能を持っていることに注目して、亜鉛酵素の活性中心を低分子化（モデル化）することにより、亜鉛イオンの機能や本質を浮き彫りにする研究を行ってきた。それらの研

Phos-tag chemistry

Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Tohru Koike

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

*Corresponding author: Eiji Kinoshita; 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: kinoeiji@hiroshima-u.ac.jp

研究成果の1つに「亜鉛二核錯体構造が、アルカリフォスファターゼの基質であるリン酸モノエステルを特異的に認識するために必須である」という発見がある^{1,2)}。それら亜鉛酵素モデル研究の成果を基礎として、筆者らは、中性の水溶液中で nM のリン酸モノエステルジアニオンを特異的に認識する機能性分子（フォスタグ, Phos-tag）の開発に成功した (Fig. 1)³⁾。「フォスタグ」の「フォス」はフォスフェートの頭文字を、「タグ」は標識を表している。フォスタグは2つの金属イオンを持つ錯体化合物で、水溶液中でリン酸基を選択的に捕捉できる。本稿では、フォスタグの化学的性質（フォスタグケミストリー）について概説し、その特性を利用したリン酸化生体分子研究法の実例を紹介したい。

2. 無機リン酸イオンの捕捉

フォスタグ ($[\text{Zn}^{2+}\text{-Phos-tag}]^{3+}\text{-CH}_3\text{COO}^-$) の構造確認をマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) により行った⁴⁾。リン酸緩衝液 (pH 6.9) に溶解したサンプルの MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 2 に示す。このスペクトルは、フォスタグと2価のリン酸アニオンとの 1:1 の複合体 ($[\text{Zn}^{2+}\text{-Phos-tag}]^{3+}\text{-HOPO}_3^{2-}$, 最大同位体ピーク m/z 679.1) の形成を示している。この結果は、フォスタグに結合した酢酸アニオン (CH_3COO^-) がリン酸緩衝液中で無機リン酸イオン (HOPO_3^{2-}) に定量的に置き換わることを示している。このことから、筆者らは、この二核亜鉛錯体がリン酸を捕捉する分子として使用でき

Fig. 1. Structure of a phosphate-binding tag molecule, Phos-tag and scheme for the reversible capture of a phosphate monoester dianion (ROPO_3^{2-}) by Zn^{2+} -Phos-tag.

Fig. 2. MALDI-TOF mass spectrum (positive mode) for acetate-bound Zn^{2+} -Phos-tag in a 10 mM phosphate buffer (pH 6.9) containing a neutral matrix, THAP.

Reprinted with permission from Ref. 4 © (2003) John Wiley & Sons, Ltd.

るのではないかと考え、さらなる性質の研究を行った。

3. X線結晶構造解析

フォスタグにモノリン酸エステルである *p*-ニトロフェニルリン酸ジアニオンを結合させ、その X 線結晶構造解析を行った (Fig. 3)。予想通り、リン酸基の2つの酸素アニオンが、2つの亜鉛イオンにそれぞれ結合していることが明らかとなった。亜鉛イオン間の距離は $3.6 \text{ \AA}$ であり、この二核亜鉛錯体はリン酸イオンを架橋配位子として捕捉している。亜鉛イオンとリン酸基の酸素アニオンの配位結合の距離は $1.96 \text{ \AA}$ であった。これは酢酸アニオンが結合した錯体の結合距離 $1.99 \text{ \AA}$ よりも短く、このリン酸-亜鉛結合がより強いものであることが明らかとなった。

4. 水溶液内平衡論の検討

フォスタグの酸解離平衡反応や錯体形成反応、様々なアニオン性基質との錯体形成反応を pH 滴定法により検討した。アニオン性基質との 1:1 錯体形成定数は、フェニルリ

Fig. 3. Crystal structure of *p*-nitrophenyl phosphate dianion-bound Zn^{2+} -Phos-tag.

Reprinted with permission from Ref. 3 © (2004) The Royal Society for Chemistry.

Fig. 4. Distribution diagram for Phos-tag ligand (10 μM) in the presence of zinc(II) ion (20 μM) and phenyl phosphate dianion (10 μM) as a function of pH in an aqueous solution at 25°C , $I=0.10$ (NaNO_3).

Reprinted with permission from Ref. 3 © (2004) The Royal Society for Chemistry.

ン酸イオン $K_d=25$ nM, 酢酸イオン $K_d=0.40$ mM, 水酸化物イオン $K_d=63$ nM, 硫酸イオン $K_d=0.13$ mM, 塩化物イオン $K_d=20$ mM (25°C, $I=0.10$ NaNO₃) である。このことから、フォスタグは、フェニルリン酸イオンを酢酸イオンよりも約 16000 倍も強く捕捉することが明らかとなった。フォスタグとフェニルリン酸（それぞれ 10 μM 濃度）の混合物の pH 依存的な水溶液内化学種の組成を Fig. 4 に示す。その結果、フェニルリン酸イオン (phenylphosphate²⁻) と亜鉛錯体の 1:1 複合体形成には pH 5 ~ 8 の条件（生理的 pH）が適していることが明らかとなった。

5. 亜鉛同位体による錯体形成

リン酸イオンの結合したフォスタグの MALDI-TOF MS スペクトル (Fig. 2 参照) が示す複雑なピーク群は、主に亜鉛の同位体 (天然存在比: ⁶⁴Zn, ⁶⁶Zn, ⁶⁷Zn, ⁶⁸Zn, ⁷⁰Zn=48.6, 27.9, 4.1, 18.8, 0.6%) によるものである。このようなピークの複雑化を避けるため、モノアイソトープ誘導体 ([⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag]³⁺) を調製した。亜鉛同位体とリン酸イオンの複合体の MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 5 に示す ([⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag]³⁺-HPO₄²⁻; m/z 677.1)。シグナルは、天然体に比べ強度が大きく非常にシンプルである。

6. リン酸化アミノ酸の質量分析

無機リン酸イオンの分析結果に基づき、(⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag)³⁺ を用いたリン酸化セリン (pSer) とリン酸化チロシン (pTyr) の MALDI-TOF MS 分析を行った (Fig. 6)。(⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag)³⁺ とリン酸化アミノ酸の 1:1 複合体 ([⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag]³⁺-pSer²⁻; m/z 764.1, [⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag]³⁺-pTyr²⁻; m/z 840.1) に帰属されるピークがそれぞれ観測された。市販されているマトリックスのうち、フェノール基をもつトリハイドロキシアセトフェノン (THAP) が最も適していた。サンプル水溶液の pH は、生理的 pH が適していた。これらのリン酸化アミノ酸の MALDI-TOF MS 分析では、1:1 複合体のピークの他に目立ったシグナルはほとんど検出されな

Fig. 5. MALDI-TOF mass spectrum (positive mode) for acetate-bond ⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag in a 10 mM phosphate buffer (pH 6.9) containing THAP.

Reprinted with permission from Ref. 4 © (2003) John Wiley & Sons, Ltd.

かった。この結果は、-2 電荷のリン酸化アミノ酸が +3 電荷のフォスタグと安定な +1 電荷の複合体を形成すること、さらにそれぞれのリン酸化アミノ酸は複合体形成により、同位体に対応した特有の質量数の増加 (+581.1 Da のマシフト) が起こることを示している。

7. リン酸化ペプチドの質量分析

現在行われているリン酸化ペプチドの質量分析は、2 つの化学原理に基づいている。1 つは分析装置の中でのリン酸エステル結合の不安定性を利用した方法である。この方法では、リン酸エステル結合の切断により生じたイオンを解析してリン酸化部位を決定する。もう 1 つは、タンパク質のリン酸基付加に伴う質量数の増加 (+80 Da) を検出することを利用した方法である。例えば、あるタンパク質のリン酸化反応は、そのタンパク質の消化物（ペプチド混合物）の質量数の違いにより検出することができる。また、それらのリン酸基は、酵素的分解（フォスファターゼ）や化学的脱リン酸化（酸性条件下）により除くことができる。

Fig. 7A に、非リン酸化ペプチド p60c-src Substrate II (Ac-Ile-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH₂) とリン酸化ペプチド、P-p60c-src Substrate II (Ac-Ile-pTyr-Gly-Glu-Phe-NH₂) の 1:1 の混合物を用いて分析した MALDI-TOF MS スペクトルを示す（酸性マトリックスを使用した一般的な条件）。いずれのペプチ

Fig. 6. MALDI-TOF mass spectra (positive mode) for phosphorylated serine (pSer²⁻) and phosphorylated tyrosine (pTyr²⁻) (each 50 pmol/μL) dissolved in a 10 mM Tris-borate buffer (pH 8.0) containing the acetate-bond ⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag (100 pmol/μL), THAP and 50% (v/v) CH₃CN.

Reprinted with permission from Ref. 4 © (2003) John Wiley & Sons, Ltd.

Fig. 7. MALDI-TOF mass spectra (positive mode) for an equimolar mixture of nonphosphorylated (p60c-src Substrate II, Ac-Ile-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH₂) and phosphorylated peptides (P-p60c-src Substrate II, Ac-Ile-pTyr-Gly-Glu-Phe-NH₂).

(A) p60c-src Substrate II (25 pmol/mL) and P-p60c-src Substrate II (25 pmol/mL) dissolved in a mixed solution of CH₃CN/EtOH/H₂O (1:1:2) containing α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (5 mg/mL). (B) p60c-src Substrate II (25 pmol/mL) and P-p60c-src Substrate II (25 pmol/mL) with the acetate-bond ⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag (50 pmol/μL) and THAP in a 10 mM Tris-borate buffer (pH 8.0) containing 50% (v/v) CH₃CN.

Reprinted with permission from Ref. 4 © (2003) John Wiley & Sons, Ltd.

どもナトリウムイオンやカリウムイオンの付加したピークとして検出された。リン酸化ペプチドのシグナル強度は、非リン酸化ペプチドのものよりかなり小さかった（一般的な傾向である）。同じ混合物を用いて、2 当量の (⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag)³⁺ の存在下、MALDI-TOF MS 分析を行った (Fig. 7B)。フォスタグとリン酸化型ペプチドの複合体 ([⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag]³⁺-P-p60c-src Substrate II; *m/z* 1327.4) に帰属されるピークのみが検出された。その感度は Fig. 7A に示す非リン酸化型ペプチドとほぼ同じであった。また、アルカリ金属イオンの付加したものや複数のフォスタグが結合した複合体は全く検出されなかった。これらの結果は、フォスタグがリン酸化ペプチドの質量分析の増感剤として利用できることを示している。

8. 他のリン酸化生体分子の質量分析

フォスタグを用いた質量分析法を、他のリン酸化生体分

Fig. 8. MALDI-TOF mass spectra (positive mode) for phosphorylated compounds (50 pmol/μL), 1-oleoyl-L-α-lyzophosphatidate (LPA²⁻) and acetylphosphate (AP²⁻), dissolved in a 10 mM Tris-borate buffer (pH 8.0) containing the acetate-bond ⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag (100 pmol/μL), THAP and 50% (v/v) CH₃CN.

Reprinted with permission from Ref. 4 © (2003) John Wiley & Sons, Ltd.

子であるリゾフォスファチジン酸 (LPA²⁻, 生体内情報伝達リン脂質), およびアセチルリン酸 (CH₃COPO₃²⁻, 不安定な活性リン酸化分子) の分析に応用できるかどうか検討した。これらの -2 電荷のアニオンは、一般的に酸性条件下で -1 電荷のアニオンとして検出される。いずれの場合も、2 当量の (⁶⁴Zn²⁺-Phos-tag)³⁺ 存在下で、それらリン酸化物の 1:1 複合体が感度よく検出された (Fig. 8)。一般に分析イオンの分解がよくおこるリフレクターモードにおいてもこれらの複合体は安定であり、分解物などの目立った他のピークは検出されなかった。

9. おわりに

フォスタグは従来のリン酸捕捉分子と異なり、生理条件において分析できるという利点がある。今後、フォスタグがリン酸化プロテオームやリン酸化生体分子の研究において分析のみならず、分離、精製など幅広く利用されることが期待される。

文 献

- 1) Koike T, Inoue M, Kimura E, Shiro M. Novel properties of cooperative dinuclear zinc(II) ions: the selective recognition of phosphomonoesters and their P-O ester bond cleavage by a new dinuclear zinc(II) cryptate. J Am Chem Soc.

- 1996;118:3091–3099.
- 2) Kinoshita E, Ishikawa K, Kinoshita-Kikuta E, Ohtani K, Shiro M, Koike T. An alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) hexaaza-cryptate: a novel phosphate capture molecule in aqueous solution. *Bull Chem Soc Jpn.* 2005;78:125–131.
- 3) Kinoshita E, Takahashi M, Takeda H, Shiro M, Koike T. Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Trans.* 2004;1189–1193.
- 4) Takeda H, Kawasaki A, Takahashi M, Yamada A, Koike T. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of phosphorylated compounds using a novel phosphate capture molecule. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17:2075–2081.