

# Global analysis of phosphorylated proteins involved in the MAP kinase signaling pathway using Ettan DIGE system

Ettan DIGEシステムを使用したMAPキナーゼ経路関連リン酸化タンパク質の網羅的解析

H. Kosako<sup>1</sup>, M. Ushiyama<sup>1,2</sup>, J. Hirano<sup>2</sup>, and S. Hattori<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Cellular Proteomics, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan

<sup>2</sup> GE Healthcare Bio-Sciences KK, Tokyo, Japan

主要な細胞内シグナル伝達経路のひとつであるMAPキナーゼ/ERK経路を選択的に活性化あるいは不活性化した細胞からの抽出液を用いて、MAPキナーゼ/ERK経路に位置するリン酸化タンパク質をEttan DIGEシステムで網羅的に検出・解析しました。Ettan DIGEシステムの蛍光多重標識技術と適切なサンプル前処理の組み合わせにより発現量の低いシグナル伝達因子のリン酸化の変動を高感度に検出できることを確認しました。本研究では、さらに抗体による検出法(ウェスタンブロットによる解析)と併用することによりERK経路を構成する代表的なタンパク質キナーゼが複数同定されました。また、活性化によって変化が認められたタンパク質の一部をEttan MALDI-ToF Pro質量分析計で同定しました。

## はじめに

MAPキナーゼ経路は酵母からヒトまで高度に保存された細胞内シグナル伝達系であり、細胞の増殖・分化などに深く関与しており、その研究は生命現象を理解する上で重要です。MAPキナーゼは哺乳類培養細胞において微小管結合タンパク質MAP2をリン酸化する酵素活性として発見され(1, 2)、現在では主にERK(3, 4)、JNK(5~7)、p38(8)の3種のキナーゼがMAPキナーゼファミリーに属することが知られています。ERK経路の場合図1に示すようなキナーゼカスケードが構成されており、MAPキナーゼキナーゼ/MEK(9~11)によってリン酸化・活性化されたERKが多数の基質タンパク質をリン酸化することで多彩な生理機能を果たしていると考えられています(12)。新規なERK基質の同定やERKの活性化が異なる細胞応答を引き起こす分子機構の解明をさらに進めていく上で、より効率的・網羅的な解析手法が必要になると考えられます。Ettan DIGEシステムは蛍光多重標識、高いスループット、定量精度、再現性を特長とするタンパク質発現差異解析システムです。タンパク質はリン酸化されると二次元電気泳動において酸性側にシフトした異なるスポットを生じ、そのシフトは時にはpH 0.05といわずかなシフトとして現れるため、Ettan DIGEシステムのように、再現性がよくか

つ、定量精度が高いデータを得ることができるシステムは、リン酸化の変動を検出するのに適しています。本報ではEttan DIGEシステムを用いたERK経路関連リン酸化タンパク質の網羅的解析と、特異抗体によるERK経路構成因子の同定、さらにEttan MALDI-ToF Pro質量分析計でのタンパク質同定を行った結果をまとめました。

## サンプル調製

エストロゲン受容体との融合タンパク質として活性化型B-Rafを発現しているマウスNIH3T3細胞を用いて、エストロゲンアンタゴニスト4-HTでRaf-MEK-ERK経路を選択的に活性化した細胞と、MEK阻害剤U0126処理によってERK経路を特異的に不活性化した細胞から抽出液を調製しました。薬剤処理は短時間(30分間)としてタンパク質合成の影響を無視できる程度としました。低発現量のERK経路関連リン酸化タンパク質を検出するために、それぞれの細胞粗抽出液はリン酸化タンパク質精製カラム(PhosphoProtein Purification Kit, QIAGEN)で精製しました。その後、各サンプル溶液を2-D Clean-Up Kitで処理し、得られたペレットをLysis Buffer(4% CHAPS, 2M thiourea, 7M urea, 30 mM Tris-HCl, pH 8.5)に溶解しました。

## Ettan DIGEシステムによる2D DIGE解析

ERK経路活性化サンプルとERK経路不活性化サンプルを等量ずつ混合したものを内部標準サンプルとしました。各サンプルを表1に示すようにCyDye DIGE Fluor minimal dyes(Cy2, Cy3, Cy5)で標識しました。DeStreak Reagent, Pharmalyte 3-10を加えた後、全てのサンプルを混合し、ゲル枚数n=3で蛍光標識二次元ディフェレンスゲル電気泳動を行いました。一次元目の電気泳動にはEttan IPGphor Isoelectric Focusing Unitを使用しました。Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 24 cmの膨潤時に膨潤バッファーにサンプルを添加し、膨潤(20、12時間)しました。泳動は、500 V(1時間)、1,000 V(1時間)、8,000 V(60,000 Vhrまで)で行いました。Immobiline DryStripを平衡化バッファー中で還元アルキル化後、二次元目の電気泳動を行いました。二次元目の電気泳動には、Ettan DALTwelve Large Electrophoresis Systemを用い、10%ポリアクリルアミドゲルを使用しました。泳動後のゲルはTyphoon 9400でスキャンし、それぞれCy2, Cy3, Cy5で標識した3サンプルのゲルイメージを取り込みました。ゲルイメージの解析にはDeCyder 2D Softwareを使用してスポット検出、ゲル

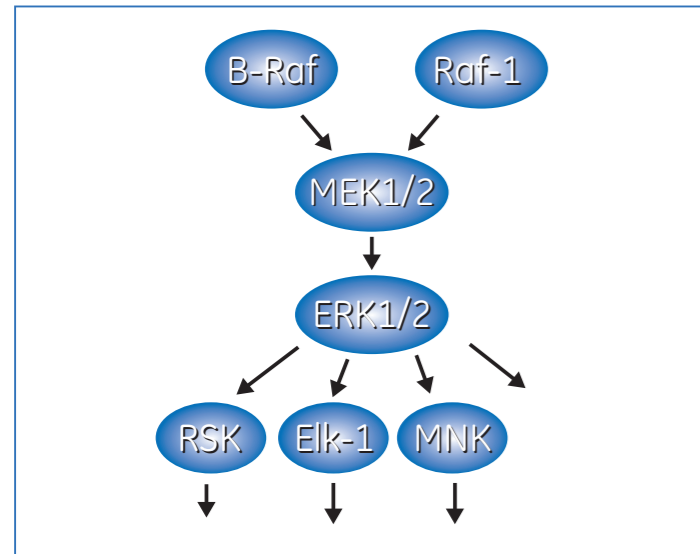


図1. MAPキナーゼ/ERK経路でみられるシグナル伝達の概要  
B-RafやRaf-1がMEK1/2をリン酸化すると、MEK1/2は活性化して下流のERK1/2をリン酸化・活性化します。活性化ERK1/2はさらに下流のRSK、Elk-1などをリン酸化します。タンパク質のリン酸化はその酵素活性・細胞内局在などの機能を制御することにより、シグナル伝達系において重要な役割を果たしています。

表1. Ettan DIGE解析でのCyDye DIGE Fluors標識とサンプルの組合せ  
内部標準はMAPキナーゼ経路活性化サンプルとMAPキナーゼ経路不活性化サンプルを等量ずつ混合したものをしました。Cy3とCy5間の標識効率の差異による誤差を避けるためにゲル3では組合せを逆にしました。

ゲル番号	Cy2 標識	Cy3 標識	Cy5 標識
1	内部標準	活性化サンプル	不活性化サンプル
2	内部標準	活性化サンプル	不活性化サンプル
3	内部標準	不活性化サンプル	活性化サンプル

間のスポットマッチング、スポット強度の定量化と標準化、Student's t-testによる有意差検定を行いました。

ERK経路を活性化したサンプルと不活性化したサンプルのゲルイメージを図2に示します。ゲルイメージの比較より、活性化したサンプル(赤)に固有あるいは増加しているスポットが多数みられます。薬剤処理起因のタンパク質合成は無視し得る程度であると考え、これらのスポットはERK経路の活性化によってリン酸化が亢進したタンパク質である可能性が高いと考えられます。横方向に一列に並んだ複数のスポットは、複数部位がリン酸化された同一タンパク質に対応していると考えられます。ここでは同一ゲル上で2種類のサンプルを同時に泳動、検出しているため、スポットの微妙なずれまで容易に解析できました。3枚のゲルに共通してみられるスポットについて、有意差検定での危険率が0.05以下(p < 0.05)のものを定量解析したところ、ERK経路活性化サンプルと不活性化サンプル間の強度が平均1.5倍以上異なるスポットが72個検出されました。そのうちの24個は強度が2倍以上、8個は強度が3倍以上変化していました。ERK経路を活性化したサンプルと不活性化したサンプルを別々に二次元電気泳動して比較した以前の報告(13)に比べて、感度と定量性に優れた結果が得られました。

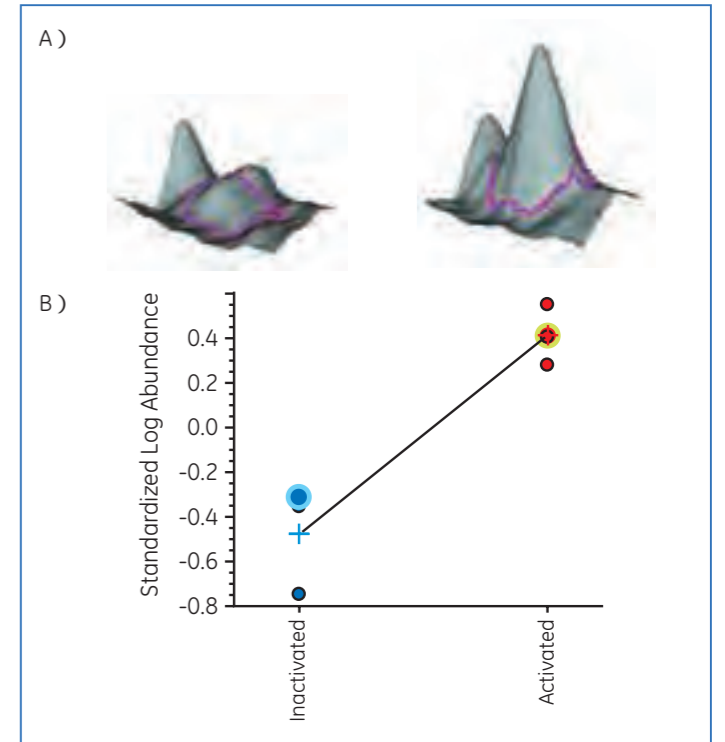


図3. ERK経路の活性化によって大きな変化のみられたスポットの1つ(図2で丸印をつけたスポット)

(A)スポットの3D表示。左はERK経路不活性化サンプル、右は活性化サンプルを表しています。(B)スポット強度の変化。左側の青色の点は不活性化サンプル、右側の赤色の点は活性化サンプルを表しています。それぞれ3つの点は3枚のゲルに対応しています。直線は各点の平均を結び、活性化サンプルで強度が増加していることを示しています。

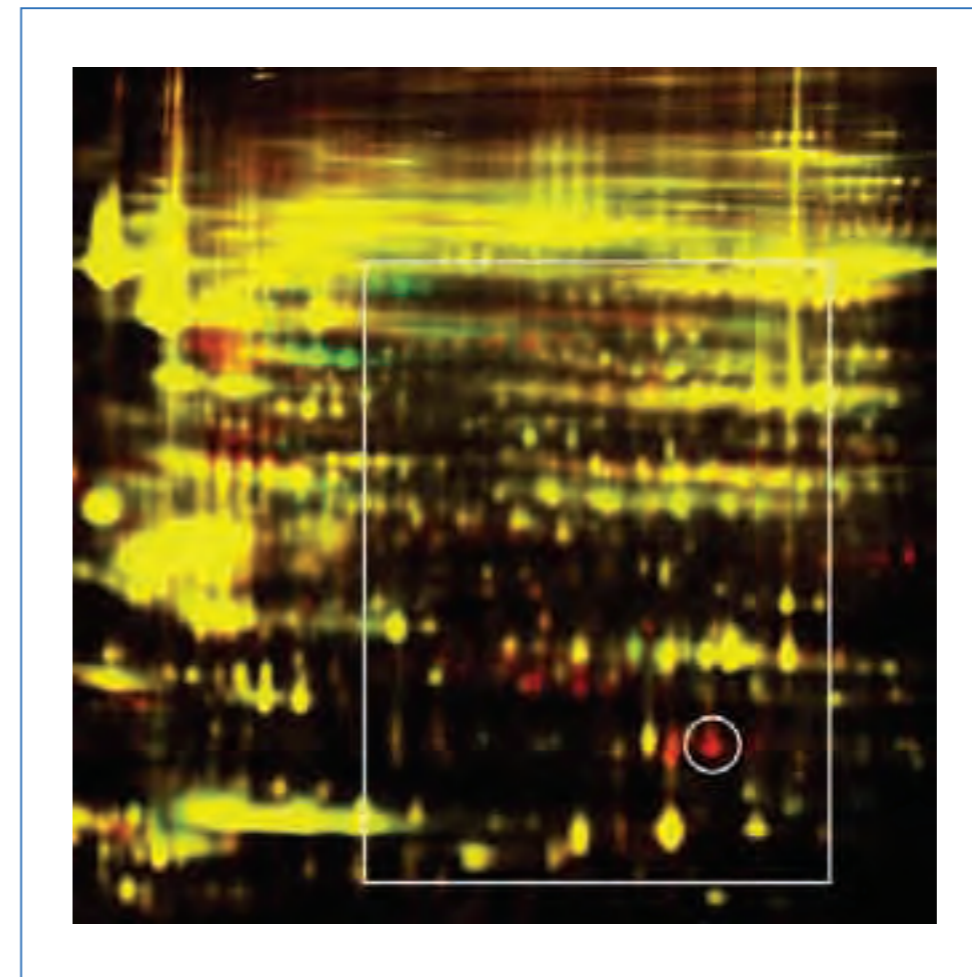


図2. ERK経路を活性化したサンプルと不活性化したサンプルのEttan DIGEゲルイメージ  
ERK経路活性化サンプルのスポットを赤色で、不活性化サンプルのスポットを緑色であらわしています。同時に泳動した内部標準サンプルのゲルイメージはここには示していません。スポットの見かけの色は2サンプル間のスポット強度比に依存し、比率が等しいときには黄色になります。同一ゲル上で電気泳動しているため、スポットの微妙なずれを高精度に解析可能です。丸印をつけたスポットは図3に詳しく示しています。四角で囲んだ部分は図5でウェスタンブロット解析の結果を示しています。



図4. ERK 経路活性化サンプルと不活性化サンプルのウェスタンブロット解析

抗MEK1/2抗体(A)、抗ERK1/2抗体(B)、抗リン酸化RSK抗体(C)によるウェスタンブロット解析を示しています。それぞれレーン1、3はERK経路不活性化サンプル、レーン2、4は活性化サンプル、また、レーン1、2は細胞粗抽出液サンプル、レーン3、4はリン酸化タンパク質精製カラムで処理したサンプルです。抗MEK1/2抗体、抗ERK1/2抗体でみられるバンドのシフトはタンパク質のリン酸化を示唆しています。精製操作後の不活性化サンプルではバンドが検出されていませんが、活性化サンプルでは検出されています。抗リン酸化RSK抗体では活性化サンプルのみでバンドが検出されており、活性化処理によるRSKのリン酸化を意味しています。抗MEK1/2抗体はanti-MEK1 (BD Biosciences)、抗ERK1/2抗体はERK1(K-23)(Santa Cruz Biotechnology)、抗リン酸化RSK抗体はPhospho-p90RSK(Thr573)Antibody(Cell Signaling Technology)を用いました。

### ウェスタンブロットによる解析

はじめにERK経路活性化サンプルと不活性化サンプルにおける、ERK経路を構成する複数のタンパク質キナーゼに対する抗体との反応性をウェスタンブロットで調べました(図4)。MEK1/2、ERK1/2、リン酸化RSKがこれらの抗体によって検出できること、ERK経路活性化サンプルではこれらのタンパク質キナーゼのリン酸化が起きていることが確認できました。

次に2D DIGE解析ゲルでのウェスタンブロット解析を行いました。ゲル中のタンパク質をPVDFメンブレン(Hybond-P)にトランスファーし、ERK経路構成因子に対する抗体、続いてHRP標識二次抗体と反応させました。このメンブレンをECL Plus Western Blotting Detection Reagentsで処理し、このときに反応中間物質が生じる蛍光をTyphoon 9400で検出しました。同時にメンブレン上のCy5イメージをスキャンし、これを指標として抗体検出イメージと2D DIGE解析ゲルイメージとのマッチングを行いました。

メンブレン上のウェスタンブロット解析とCy5のイメージを同時にスキャンしているため、抗体検出イメージと2D DIGE解析ゲルイメージのマッチングは容易にできました。ウェスタンブロット解析イメージを図5Aに、2D DIGE解析ゲルイメージを図5Bに示します。抗MEK1/2、抗ERK1/2、抗リン酸化RSK各抗体で複数のスポットが検出され、それらは2D DIGE解析ゲルイメージにおいてERK経路活性化サンプルのみで検出されるスポットあるいは増加しているスポットに一致しています。つまり、ERK経路の活性化に伴うリン酸化タンパク質の変動がEttan DIGEシステムで検出できることが示されました。

### Ettan MALDI-ToF Pro 質量分析計による解析

Ettan DIGEシステムによる定量解析の結果、強度が変化しているスポットを質量分析サンプルとしました。スポットの切り出し用ゲルとしては、2D DIGE解析用とは別に二次元電気泳動後、SYPRO Ruby (Invitrogen)染色したものをしました。Ettan Spot Pickerによってスポットを切り出し、トリプシン消化の後、Ettan MALDI-ToF Pro 質量

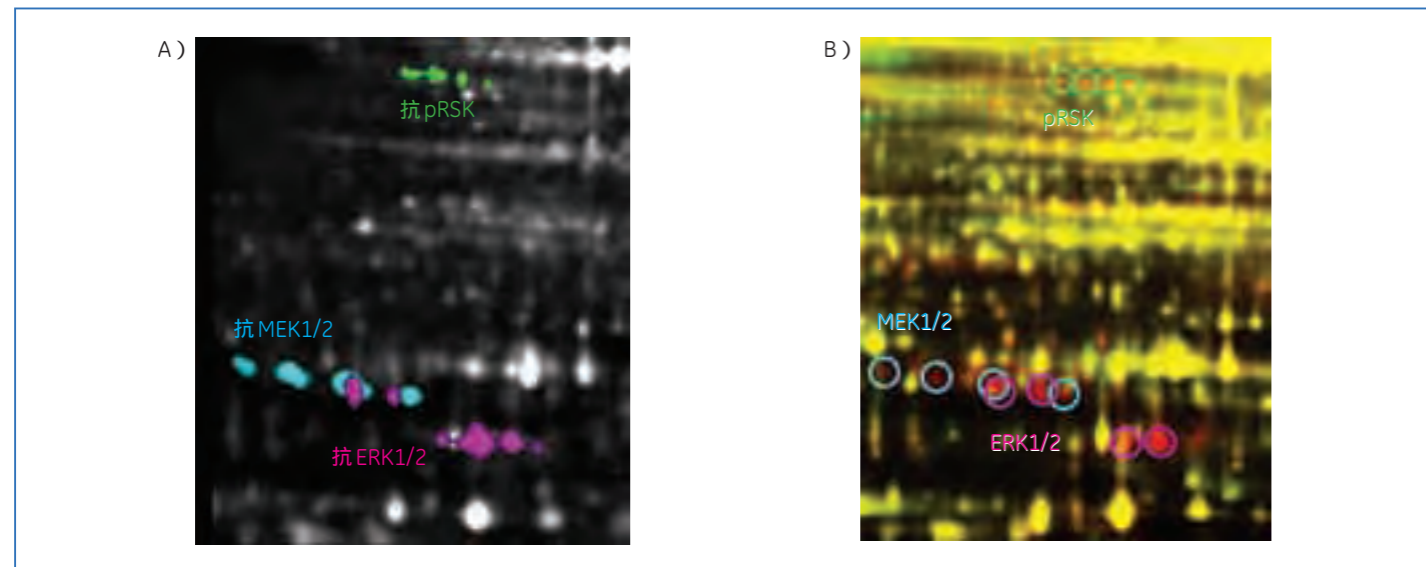


図5. ウェスタンブロット解析イメージ

図2に示したゲルイメージのうち四角で囲んだ部分に対応しています。(A)2D DIGE解析ゲルをメンブレンにブロットし、抗リン酸化RSK(緑色)、抗ERK1/2(紫色)、抗MEK1/2(青色)で検出しました。ECL Plus Western Blotting Detection Reagentsでは、蛍光性の反応中間物質が生成するため、蛍光スキャンで検出できます。メンブレン上のCy5イメージも同時にスキャンし重ね合わせて表示しました(白色)。(B)抗体で検出されたスポットを2D DIGE解析ゲルイメージ上のスポットに対応させて表しました。メンブレン上の抗体ブロットのシグナルとCy5のイメージを同時にスキャンしているため、この対応づけは容易にできます。(A)と(B)のイメージ間で若干の差がみられるのはゲルが異なるためです。

分析計を用いてPeptide Mass Fingerprinting (PMF) 解析をしました。タンパク質同定はProFoundで行いました。

同定されたタンパク質の一部を図6と表2に示します。これらのタンパク質はERK経路の活性化によってリン酸化状態が変化していることから、ERK経路と関連している可能性が考えられます。また、これらの中にはMEK1やERK2が含まれていたことから、Ettan DIGEシステムとそれに続く質量分析解析によってシグナル伝達因子のような発現量の低いタンパク質を同定できることが示されました。

### まとめ

MAPキナーゼ/ERK経路に位置するタンパク質をEttan DIGEシステムで網羅的に検出し、ウェスタンブロット解析での同定を行いました。適切なサンプル前処理を行うことで目的とする低発現量のタンパク質を濃縮し、2D DIGE技術で分離・検出できることが示されました。リン酸化タンパク質のようにわずかなスポットシフトが生じた場合でも高感度かつ定量的に検出できました。また、活性化によって変化がみられたタンパク質をEttan MALDI-ToF Pro 質量分析計で同定しました。ERK経路活性化サンプルで増加しているスポットを質量分析計で解析することは、新規なERKの基質タンパク質の同定につながるものと期待されます。ヒトゲノムの解読完了により、ヒトには全遺伝子の約1.7%に相当する518個ものタンパク質キナーゼをコードする遺伝子が存在することが判明しました(14)。これらの中の特定のキナーゼがリン酸化する多数の基質タンパク質を網羅的に同定することは、基礎研究のみならず診断・創薬などの臨床応用の見地からみても極めて意義深いと考えられます。種々のタンパク質キナーゼ阻害剤(15)を用いて目的のキナーゼを特異的に活性化・阻害する系を構築することにより、Ettan DIGEシステムはさまざまな細胞内シグナル伝達経路の研究において、より効率的・網羅的な解析手法を提供し得ると考えられます。

### 参考文献

1. Ray, L.B. and Sturgill, T.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1502-1506 (1987)
2. Hoshi, M. *et al. J. Biol. Chem.* 263, 5396-5401 (1988)
3. Boulton, T.G. *et al. Science* 249, 64-67 (1990)
4. Gotoh, Y. *et al. Nature* 349, 251-254 (1991)
5. Minden, A. *et al. Cell* 81, 1147-1157 (1995)
6. Whitmarsh, A.J. *et al. Science* 281, 1671-1674 (1998)
7. Davis, R. *J. Cell* 103, 239-252 (2000)



図6. Ettan MALDI-ToF Pro 質量分析計によるPMF解析結果  
Ettan DIGEシステムによる定量解析の結果、強度が変化しているスポットをPMF解析しました。

表2. 質量分析計によるPMF解析結果

スコアは同定されたタンパク質候補に対する確率的な信頼性を示しています。値が大きいほど得られた結果の信頼性が高いことを意味し、1.65以上であれば一般的に信頼性は高いといえます。

タンパク質名	カバー率(%)	スコア(Est'dZ)
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	28	2.10
eukaryotic translation elongation factor 2	12	2.12
MEK1	30	2.38
ERK2	34	2.37

8. Han, J. *et al. Science* 265, 808-811 (1994)
9. Ahn, N.G. *et al. J. Biol. Chem.* 266, 4220-4227 (1991)
10. Crews, C.M. *et al. Science* 258, 478-480 (1992)
11. Kosako, H. *et al. EMBO J.* 12, 787-794 (1993)
12. Tanoue, T. *et al. Nature Cell Biol.* 2, 110-116 (2000)
13. Lewis, T.S. *et al. Mol. Cell* 6, 1343-1354 (2000)
14. Manning, G. *et al. Science* 298, 1912-1934 (2002)
15. Cohen, P. *Nature Rev. Drug Discovery* 1, 309-315 (2002)