

第73回日本電気泳動学会総会：一般口演【2】電気泳動全般  
論文種目：総合論文

光重合性 Phos-tag 含有アクリルアミドゲルを用いる  
リン酸化化合物の高感度検出システムの開発

山本佐知雄\*・矢野祥子・鈴木茂生・木下充弘

近畿大学薬学部

(受付 2022 年 9 月 24 日, 受理 2022 年 10 月 20 日)

SUMMARY

Novel methods were developed for the specific entrapment and separation of phosphorylated compounds using Phos-tag polyacrylamide gels fabricated at the channel crossing points of the microfluidic electrophoresis chips. The channel intersection of the microchip was filled with a solution comprising acrylamide, *N,N*-methylene-bis-acrylamide, Phos-tag acrylamide, and 2,2'-azobis [2-methyl-*N*-(2-hydroxyethyl)propionamide], which functioned as a photocatalytic initiator. *In situ* polymerization at the channel crossing point was performed by irradiation with a UV LED laser beam. The electrophoretically trapped phosphorylated compounds were released from the gel by switching the voltage to deliver high concentrations of phosphate and EDTA in a background electrolyte and fluorometrically detected at the end of the separation channel. Under the optimized conditions, the phosphorylated compounds were concentrated by a factor of 100-fold, and the peak resolution was comparable to that obtained by pinched injection that a common microchip electrophoresis analysis method. This method was successfully utilized to preconcentrate and analyze phosphorylated peptides.

Key words: online preconcentration, phosphorylated compounds, *in situ* photopolymerization, Phostag acrylamide

序 論

タンパク質のリン酸化はヒトの翻訳後修飾において非常に重要であることがわかってきており、タンパク質における一連のリン酸化・脱リン酸化は、シグナル伝達、代謝などの調節に重要な役割を果たす<sup>1)</sup>。このタンパク質のリン酸化を網羅的に解明するリン酸化プロテオミクスにおいてはタンパク質をトリプシンなどの酵素でペプチド断片とした後、質量分析装置 (MS) あるいは LC-MS などで測定を行う手法が主流となっている。しかしながら、試料溶液中には大量のリン酸化されていないペプチドが存在しており、この非リン酸化ペプチドの存在によりリン酸化ペプチドのイオン化が抑制され、MS によるリン酸化ペプチドの感度低下を引き起こすことが多い。そこで微量にしか含まれないリン酸化ペプチドを高感度に検出するための特異的

検出法あるいは高感度検出法が開発されている<sup>2,3)</sup>。少量のリン酸化タンパク質またはペプチドを捕捉するためにはあらかじめリン酸化ペプチドを特異的に濃縮する必要がある。リン酸化ペプチドを濃縮する方法としては、固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィーなどのリン酸化ペプチド濃縮方法が開発されており、複雑な生体サンプルから何千ものリン酸化ペプチドを同定することが可能となっている<sup>4)</sup>。1,3-Bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-ol (Phos-tag) は、このリン酸基を特異的に認識する化合物であり、SDS-PAGE などでリン酸化タンパク質の特異的検出に利用されている<sup>5)</sup>。

ところで我々は様々な機能を有するアクリルアミドゲルをマイクロチップの流路中にピンポイントで作製する技術を開発し、糖タンパク質糖鎖などを特異的にオンライン濃縮し、高感度に分離可能な方法を開発している<sup>6,7)</sup>。本論

Microchip electrophoresis utilizing an *in situ* photopolymerized Phos-tag acrylamide gel for specific entrapment and highly sensitive analysis of phosphorylated compounds

Sachio Yamamoto, Shoko Yano, Shigeo Suzuki, Mitsuhiro Kinoshita  
Faculty of Pharmacy, Kindai University

\* Corresponding author: Sachio Yamamoto; Faculty of Pharmacy, Kindai University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-osaka, Osaka 577-8502, Japan  
E-mail: yamamoto@phar.kindai.ac.jp

第73回日本電気泳動学会総会：一般口演【2】電気泳動全般

文では Phos-tag を含有したアクリルアミドゲルを流路交差部にピンポイントで作製することによりリン酸化化合物を高感度に検出した結果について紹介する。

市販の poly(methylmethacrylate) 製マイクロチップと Phos-tag アクリルアミドゲルを用いたリン酸化化合物のオンライン濃縮<sup>8)</sup>

我々は今までに市販の poly(methylmethacrylate) (PMMA) 製マイクロチップの流路の一部に様々な機能を有するアクリルアミドゲルをピンポイントで作製し、イオン性試料などの高感度濃縮法を開発している。

使用した PMMA 製マイクロチップは流路が幅 100  $\mu\text{m}$ 、深さ 30  $\mu\text{m}$  であり一か所の流路交差部を有する。このマイクロチップに Phos-tag アクリルアミドゲル溶液を導入し、流路交差部にピンポイントで LED を照射することで Phos-tag アクリルアミドゲルを作製した。このマイクロチップのレイアウトと流路交差部に作製した Phos-tag アクリルアミドゲルの写真を Fig. 1 に示す。まず、試料として FITC で標識したリン酸化セリンを用いオンラインでの試料濃縮と、濃縮後の分離検出が可能か調査した。流路交差部に Phos-tag アクリルアミドゲルを作製した後、流路と R2 に 25 mM Tris/リン酸緩衝液 (pH 7.0) を、R3 に Phos-tag からリン酸化化合物を解離させるための緩衝液として 100 mM Tris/リン酸緩衝液 (pH 7.0) と 10 mM EDTA を混合した溶液を、R4 には 200 mM ホウ酸ナトリウム (pH 11.0) を配置した。また、これらの緩衝液には試料がマイクロチップ流路に非特異的に吸着することを防ぐために 0.5% (w/v) となるようにヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を添加した。この時の Phos-tag ゲルにおける

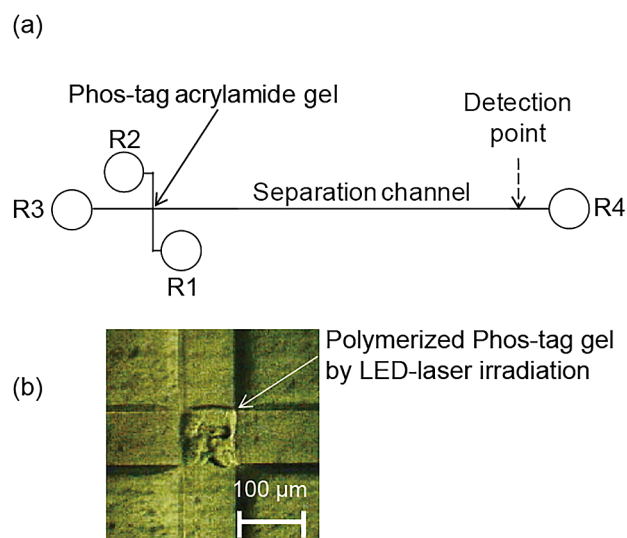


Fig. 1 Schematic diagram of the poly(methylmethacrylate) microchip (a) and fabricated Phos-tag acrylamide gel formed at the channel crossing point (b). (Reprinted with permission from ref. 8)

蛍光強度の変化を記録したものを Fig. 2 に示す。試料と対角方向 (R2) に 200 V を印加すると時間経過とともに Phos-tag ゲルの蛍光強度が増大した。濃縮を 2 分間行った後、R3 から R4 に向けて電圧を切り替えると高濃度のリン酸緩衝液と EDTA がゲル内に導入されることにより 20 秒後にはゲル内の蛍光強度はほとんど観察されなかった。以上の結果よりアクリルアミドゲル中の Phos-tag はその活性を保持しており、流路内での濃縮が達成可能なことが分かった。また、高濃度のリン酸と EDTA の混合溶液でスムーズな脱離を達成することが可能となった。続いて濃縮効率の算出を試みた結果、Phos-tag アクリルアミドゲル

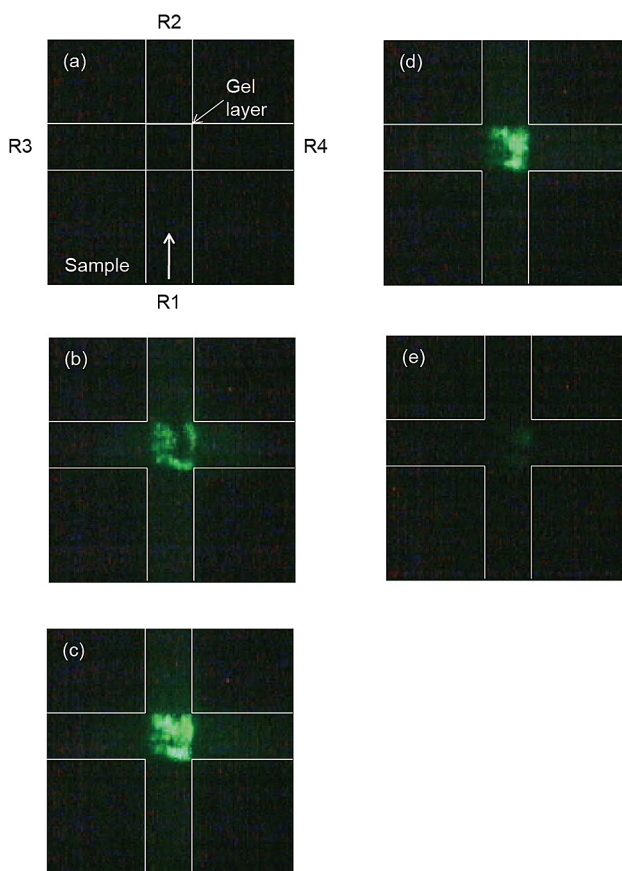


Fig. 2 Time-course of the concentration and release of the FITC-labeled phosphoserine at the channel crossing point in the Phos-tag acrylamide gel. All the channels and the upper chamber (R2) were filled with 25 mM Tris acetate buffer (pH 7.0)/0.5 w/v% HPC. Next, the left chamber (R3) was filled with 100 mM Tris phosphate buffer (pH 7.0)/10 mM EDTA/0.5 w/v% HPC, the right chamber (R4) was filled with 200 mM sodium borate buffer (pH 11.0)/0.5 w/v% HPC and the lower chamber (R1) was filled with  $10^{-8}$  M FITC-labeled phosphoserine. Next, 200 V was applied between R1 and R2 for 0 s (a), 30 s (b), or 120 s (c). The voltage settings were then changed to 200, 200, 0, and 800 V for R1, R2, R3, and R4, respectively. Images (d) and (e) show the decrease in the fluorescence intensities of FITC-labeled phosphoserine, after 10 and 20 s, respectively. (Reprinted with permission from ref. 8)

と Phos-tag を含有せずに作製したアクリルアミドゲルを対象として比較したところ、100 倍程度感度が上昇していることが分かった。また、この濃縮効率はアクリルアミドゲル中に存在する Phos-tag の含量と相関があり、Phos-tag 含量が十分に高ければ試料に含まれるほとんどのリン酸化ペプチドを濃縮できる可能性が示唆された。開発した方法をタンパク質のトリプシン消化物中のリン酸化ペプチドの特異的検出に応用した。試料にはリン酸化タンパク質であるオバルブミンを用い上記の方法で濃縮と分離を行ったところ、オバルブミンの2カ所のリン酸化結合部位に相当する2本のリン酸化ペプチドのみを特異的、かつ高感度に検出することが出来た。

#### 多分岐の PDMS/glass 製マイクロチップと

#### Phos-tag アクリルアミドゲルを用いたリン酸化化合物のオンライン濃縮・標識・分離システムの開発<sup>9)</sup>

先の研究では市販の PMMA 製マイクロチップを用いることによりリン酸化ペプチドのみを特異的に濃縮することが可能となったが、用いた試料はあらかじめ FITC で標識化を行った後、過剰試薬の除去を行った試料を使用していたため、オンライン濃縮などに要する時間に対して試料を調製するまでに長時間を要した。また、この実験で用いた PMMA 製マイクロチップは4つのリザーバーのみを有する構造であったため、これ以上の前処理機能を追加することが困難であった。そこで3カ所の流路交差点を有する poly(dimethylsiloxane) (PDMS) 製のマイクロ流路を作製し、これをスライドガラスと張り合わせたチップの流路中に Phos-tag アクリルアミドゲルを作製することでリン酸化ペプチドのオンライン濃縮、蛍光標識、分離検出をマイクロチップ上で達成することが可能な方法の開発を試みた。この実験に用いたマイクロチップと流路交差点に作製した Phos-tag アクリルアミドゲルを Fig. 3 に示す。

このマイクロチップを用いてオンライン濃縮、オンライン蛍光標識の最適化を行った。まず、fluorescein isothiocyanate (FITC), 5-(4,6-dichlorotriazinyl) aminofluorescein (DTAF), 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) をオンライン蛍光標識化試薬として選定し、あらかじめこれらの試薬でリン酸化ペプチドを標識し、Phos-tag ゲルで濃縮が起こるかを確認した。その結果 FITC と DTAF において濃度依存的な明確な濃縮を確認することが出来た。続いて未標識のリン酸化ペプチドを Phos-tag ゲルに捕捉させた後、過剰の FITC と DTAF をゲルに送液することでオンラインでの蛍光標識を試みた。その結果、DTAF を用いた場合のみ電圧印加による送液のみで蛍光標識化を達成することが出来た。オンラインで蛍光標識化した試料は、先の研究と同様に高濃度のリン酸緩衝液と EDTA の混合溶液を用いることで、Phos-tag アク

リルアミドゲルからのスムーズな脱離を達成し、その後、分離レーン末端でピークを検出することが出来た。以上の過程により得られたエレクトロフェログラムを Fig. 4 に示す。試料には  $\beta$ -カゼイン由来のリン酸化ペプチドを用いているがリン酸基の有無と 1.1 分に検出されたピークに相関があることがわかる。以上の結果から本法を用いればオンラインでのリン酸化化合物の濃縮・蛍光標識化・分離検出を行うことが可能となった。

#### おわりに

近年、タンパク質のリン酸化を測定する手法としてはリン酸化プロテオミクスやバイオイメージングが主流となりつつある。しかしながら細胞内のシグナル伝達に伴うリン酸化・脱リン酸化は分オーダーで変化し、さらにタンパク質全体から考慮するとその変化は非常に微量であるため高

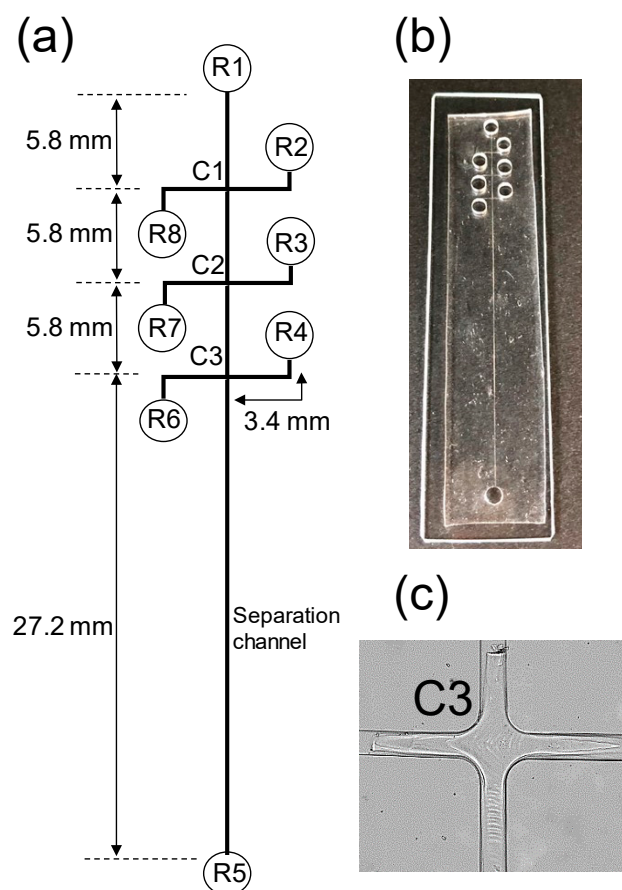


Fig. 3 Schematic diagram of polydimethylsiloxane (PDMS)/glass microchip (a); photograph of the PDMS/glass microchip (b); Phos-tag acrylamide gel formed at the channel crossing point (c). R1=dissociation buffer reservoir; R2=washing buffer reservoir; R3=buffer reservoir; R4=fluorescent reagent waste reservoir; R5=alkaline buffer reservoir; R6=fluorescent reagent waste reservoir; R7=fluorescent reagent reservoir; R8=sample reservoir; C1-C3=channel crossing point. (Reprinted with permission from ref. 9)



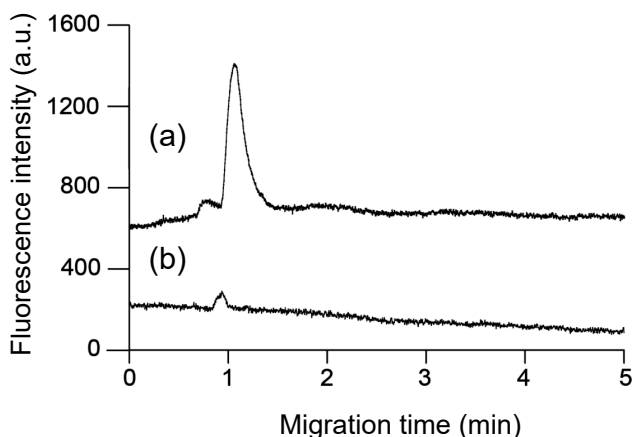


Fig. 4 Electrophoretic separation of 5-(4,6-dichlorotriazinyl) aminofluorescein (DTAF)-labeled monophosphorylated  $\beta$ -casein after online preconcentration and derivatization at the channel crossing in the polydimethylsiloxane/glass microchannels with *in situ* fabricated Phos-tag acrylamide gel (a), and utilizing alkaline phosphatase to dephosphorylate  $\beta$ -casein (b). (Reprinted with permission from ref. 9)

速、かつ高感度な解析方法が必要とされている。このタンパク質のリン酸化を高速、かつ高感度に分析する手法として、我々はマイクロチップ電気泳動の応用を試みた。これまでに、リン酸化化合物の特異的濃縮法とオンラインでの濃縮・蛍光標識化法を開発し、従来の方法とは全く異なるアプローチでリン酸化反応を解析出来る可能性を示した。しかしながら、検出感度はLC-MSに比べるとはるかに劣っている。今後は試料をリザーバーに導入した後は電圧印加のみで必要とする情報を感度良く得られるような方法に発展させたいと考えている。

本論文に関して開示すべき利益相反状態は無い。

#### 文献

- 1) Hunter T. Signaling—2000 and Beyond. *Cell*. 2000;100:113–127.
- 2) Yang C, Zhong X, Li L. Recent advances in enrichment and separation strategies for mass spectrometry-based phosphoproteomics. *Electrophoresis*. 2014;35:3418–3429.
- 3) Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, Larsen MR. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteom*. 2008;7:661–671.
- 4) Stensballe A, Andersen S, Jensen ON. Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics*. 2001;1:207–222.
- 5) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, *et al*. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteom*. 2006;5:749–757.
- 6) Yamamoto S. In situ photopolymerization of functionalized polyacrylamide-based preconcentrators for highly sensitive specific detection of various analytes by microchip electrophoresis. *Chromatography*. 2021;42:29–36.
- 7) Yamamoto S. In situ photopolymerization of polyacrylamide-based preconcentrator on a microfluidic chip for capillary electrophoresis. *Yakugaku Zasshi*. 2012;132:1031–1035.
- 8) Yamamoto S, Himeno M, Kobayashi M, *et al*. Microchip electrophoresis utilizing an in situ photopolymerized Phos-tag binding polyacrylamide gel for specific entrapment and analysis of phosphorylated compounds. *Analyst*. 2017;142:3416–3423.
- 9) Yamamoto S, Yano S, Kinoshita M, *et al*. In situ pinpoint photopolymerization of phos-tag polyacrylamide gel in poly(dimethylsiloxane)/glass microchip for specific entrapment, derivatization, and separation of phosphorylated compounds. *Gels*. 2021;7:268.