

## P-1 SuperSep Phos-tag を用いた低分子量リン酸化タンパク質の解析

◎脇本理恵子、木下恵美子、木下英司、小池 透  
広島大学 薬学部薬学科 医薬分子機能科学研究室

**目的：**当研究室では、リン酸基を選択的に捕捉する金属錯体「Phos-tag」を電気泳動ゲルに均一に固定化することで、タンパク質のリン酸化状態の違いを分離検出できるリン酸親和性電気泳動法（ $Zn^{2+}$ -Phos-tag SDS-PAGE）を開発している。その方法で使用する長期保存可能な中性 pH のプレキャストゲル（SuperSep Phos-tag）は、和光純薬工業より市販化されている。

一般的な中性 pH の SDS-PAGE でタンパク質解析を行う場合、泳動バッファーとして Tris-glycine よりも Tris-Tricine を用いる方が高い分離能が得られることが知られている。そこで本研究では、Tris-Tricine 泳動バッファーと SuperSep Phos-tag を用いた低分子量領域のリン酸化タンパク質の分離能について検討を行った。

**方法：**SuperSep Phos-tag と、Tris-glycine または Tris-Tricine 泳動バッファーを併用し、分離結果を比較した。試料は、Histone H3 (15 kDa), Thymosin  $\beta$  10 (5,026 Da), Vimentin (54 kDa) を用いた。Calyculin A または Colcemid で処理した細胞の抽出液を泳動し、泳動バッ

ファーによる Histone H3 のリン酸化体の分離の違いを見て、さらに部位特異的抗リン酸化抗体 (pT3, pS10, pT11, pS28) によるマッピングも行った。同様に Calyculin A 処理した細胞の抽出液を泳動し、Thymosin  $\beta$  10 のリン酸化体の分離の様子を比較した。また、比較的分子量の大きい Vimentin を分離検出することで、SuperSep Phos-tag における解析可能な分子量の上限を検討した。

**成績：**Histone H3, Thymosin  $\beta$  10 の両方で、Tris-Tricine の方がリン酸化体の泳動バンドがよりシャープに見られた。Vimentin では、SuperSep Phos-tag (12.5 %T) よりも自作の Bis-Tris ゲル (8 %T) の方が、リン酸化体の泳動バンドが多く見られた。

**考察：**SuperSep Phos-tag を用いる場合、Tris-glycine を Tris-Tricine に替えることで、10 kDa 以下のリン酸化タンパク質にも適用できることが分かった。しかし、解析可能分子量範囲は 10 kDa 以下～50 kDa タンパク質の分子量領域に限られており、今後、高分子に適応できるゲル組成の異なるプレキャストゲルの市販化が望まれる。