

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**WO2005/054296**

発行日 平成20年2月28日 (2008. 2. 28)

(43) 国際公開日 **平成17年6月16日 (2005. 6. 16)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 16/18 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 16/18	4 B O 2 4
<b>C 1 2 P 21/08 (2006. 01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 15/02 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 15/00 C	4 H O 4 5
<b>G O 1 N 33/577 (2006. 01)</b>	G O 1 N 33/577 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2005-515969 (P2005-515969)	(71) 出願人 399115851 株式会社先端生命科学研究所 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2004/017959	
(22) 国際出願日 平成16年12月2日 (2004. 12. 2)	
(31) 優先権主張番号 特願2003-403313 (P2003-403313)	(74) 代理人 100062007 弁理士 川口 義雄
(32) 優先日 平成15年12月2日 (2003. 12. 2)	(74) 代理人 100114188 弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100140523 弁理士 渡邊 千尋
	(74) 代理人 100119253 弁理士 金山 賢教
	(74) 代理人 100103920 弁理士 大崎 勝真
	(74) 代理人 100124855 弁理士 坪倉 道明
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メチルリジンを認識する抗体及びその製造方法並びにその利用

**(57) 【要約】**

化学的にメチル化したヒストン以外のタンパク質で動物を免疫すること、及び免疫に用いたのとは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質に対する反応性でスクリーニング等を行うことにより、メチルリジン残基を含む多種類のタンパク質を認識し得る抗体を樹立した。加えて、その様な抗体の作製方法を確立した。

これらの抗体は様々なメチル化タンパク質の探索、研究に有用であり、殊にリジン残基のメチル化が重要な役割を果たす生体分子機能の制御や、メチルリジン含有タンパク質の検出による疾病診断において有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

メチルリジンを特異的に認識し、リジンを認識し得ない抗メチルリジン抗体。

## 【請求項 2】

周辺アミノ酸残基に影響されることなくタンパク質中のメチルリジン残基を特異的に認識し得る抗メチルリジン抗体。

## 【請求項 3】

ジメチルリジン及びモノメチルリジンと特異的に結合する抗メチルリジン抗体。

## 【請求項 4】

ジメチルリジンに対する反応性がモノメチルリジンに対する反応性よりも優れている請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の抗体。 10

## 【請求項 5】

ポリクローナル抗体である請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の抗体。

## 【請求項 6】

モノクローナル抗体である請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の抗体。

## 【請求項 7】

抗メチルリジン抗体を産生するハイブリドーマであって、MEK 3 D 7、MEK 4 E 1 0、MEK 5 F 7、MEK 2 - 5 A 1 1 及びMEK 2 - 5 B 1 1 から成る群より選択されるハイブリドーマ。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載のハイブリドーマより産生される抗メチルリジンマウスモノクローナル抗体。 20

## 【請求項 9】

請求項 5 に記載のポリクローナル抗体の製造方法であって、タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫し、得られた抗体を該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質またはメチルリジンを用いたアフィニティー精製を行うことを特徴とする前記方法。

## 【請求項 10】

請求項 6 に記載のモノクローナル抗体の製造方法であって、タンパク質を化学的にメチル化して得られた抗原で動物を免疫すること、および該抗原とは異なるタンパク質を化学的にメチル化したタンパク質を認識する抗体を分泌するハイブリドーマを選択することを特徴とする前記方法。 30

## 【請求項 11】

請求項 1 乃至 6 または 8 に記載の抗体を用いる、メチル化タンパク質の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、タンパク質の翻訳後修飾の一つであるメチルリジンの検出に使用し得る抗体及びその製造方法並びに該抗体を用いたメチル化タンパク質の検出方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

タンパク質は、翻訳された後そのままの形で機能を発揮する訳ではなく、様々な翻訳後修飾を受けることが知られる。例えば、タンパク質のリン酸化は細胞外シグナルを核まで伝達する際のシグナルカスケードとして、あるいは正常な細胞周期が進行するための制御因子として重要であるし、ヒストンのアセチル化は転写が効率的に進行するために重要である。タンパク質がユビキチン化されるとプロテアソームに運ばれ分解されて活性を失う。一方、小抱体膜に存在するシグナルペプチダーゼによってシグナルペプチドが切り取られることにより、多くのタンパク質は活性型になる。この様に、タンパク質は翻訳後に様々な修飾を受けることにより適切な時期に適切な場所でそれぞれの機能を発揮することになる。 40

## 【0003】

近年、注目されるようになって来たタンパク質の翻訳後修飾にタンパク質中のリジン残基のメチル化がある。例えば、コアヒストン分子においては、H3及びH4中のリジン残基がメチル化されることが知られ、H3の4番目のリジンのメチル化はH3のアセチル化並びに遺伝子の活性化された部位と正に相関するのに対して、H3の9番目のリジンのメチル化は逆にH3の低アセチル化並びに遺伝子発現が抑制されている部位と正に相関しているという報告がある（非特許文献1）。また、結核菌が上皮細胞へ接着するのに重要なヘパリン結合性赤血球凝集素（HBHA）分子が、そのヘパリン結合領域のメチル化によりプロテアーゼに対して抵抗性を増しているという報告もある（非特許文献2）。更に、アミノアシル-tRNA分子のGTP依存的なリボソーム結合を触媒するElongation factor 1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）においても、分子内のいくつかのリジン残基がメチル化されることが知られており（例えば、非特許文献3参照）、メチル化によりEF-1 $\alpha$ 活性が増強されるという報告もある（非特許文献4）。しかし、まだそれほど多くのメチルリジン含有タンパク質が見いだされているわけではなく、タンパク質のメチル化による機能制御がどの程度生体内で重要な役割を果たし、また疾患とどのような関係を有しているかという問題に関する研究はまだあまり進んでいない。今後、種々のメチルリジン含有タンパク質の発見とともに、その機能の解明が期待される現状である。

10

## 【0004】

タンパク質の翻訳後修飾を検出する有効な手段としては、修飾に特異的なプローブ分子を用いる方法が考えられる。例えば、リン酸化チロシンを認識する抗体は多種市販され、広く活用されている。今後新たな修飾タンパク質を見いだしてゆくのに有用な抗体は、まわりのアミノ酸配列にあまり依存せず、なるべく目的とする修飾アミノ酸の部分のみを認識できる抗体であると考えられる。リン酸化チロシンに関しては、その様な性質の抗体が開発、市販されている。しかし、メチルリジンに関してはその様な抗体についての報告はない。これまでに報告されている抗メチルリジン抗体に関する現状は以下の通りである。

20

## 【0005】

既に述べた通り、ヒストンに関してはそのメチル化部位特異的な機能に注目が集まっており、部位特異的にメチル化を解析する目的で部位特異的な認識能力をもつ抗メチル化ヒストン抗体（特許文献1）が開発され市販されているが（Santa Cruz社等から市販）、当然のことながら、これらの抗体は広く種々のメチルリジン含有タンパク質を認識するものではない。また、化学的にメチル化したヒストンH1分子を免疫原として取得した抗メチルリジン抗体（ウサギポリクローナル抗体）も開発市販されているが（abcam社）、この抗体はジメチルリジンしか認識できず、またヒストン以外のメチル化タンパク質の認識の能力も不十分なものである。更に、結核菌のHBHA分子を認識し結核菌の肺外への播種を阻止する能力をもつモノクローナル抗体mAb 4057D2がメチル化型のHBHA分子は認識するが、非メチル化型の分子を認識しないこと、及びHBHAと同様にリジンリッチなドメインを持つラミニン結合タンパク質のメチル化型も認識できるということが報告されている。従ってこの抗体はタンパク質の中に存在するメチルリジンのクラスターを認識していると考えられる。しかし、それ以外のリジンリッチなドメインを持たないメチル化タンパク質の認識能に関しては、決して強いものではないと考えられる（非特許文献5）。このように、周辺アミノ酸に影響されることなくタンパク質中のメチルリジン残基を認識し得る抗体について教示、示唆する報告はなく、種々のメチル化タンパク質を幅広く認識する方法はいまだ確立されていない。

30

40

## 【0006】

上述のように、種々のメチルリジン含有タンパク質の発見とともにその機能の解析が期待されており、このような状況下において、種々のタンパク質中に存在することが予想されるメチルリジン残基を、その周辺アミノ酸の種類にあまり依存しないで認識できる方法の必要性が強く望まれている。その様な方法を確立できれば、メチルリジン含有タンパク質に関する研究が飛躍的に進展することが期待される。

【特許文献1】国際公開第02/18418号パンフレット

50

专利名称(译)	识别甲基赖氨酸的抗体，其制备方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2005054296A1</a>	公开(公告)日	2008-02-28
申请号	JP2005515969	申请日	2004-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	小松靖彦 岩端寿子		
发明人	小松 靖彦 岩端 寿子		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 C12N5/10 C12N15/02 G01N33/577 G01N33/53 C07K16/44 C12N5/18		
CPC分类号	G01N33/577 C07K16/44		
FI分类号	C07K16/18 C12P21/08 C12N5/00.B C12N15/00.C G01N33/577.A G01N33/53.D C07K16/44		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92Y 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	2003403313 2003-12-02 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

甲基赖氨酸残基可通过用除化学甲基化组蛋白以外的蛋白免疫动物，并通过筛选与用于免疫的蛋白不同的蛋白与化学甲基化蛋白的反应性来检测。建立了能够识别多种蛋白质的抗体。另外，建立了产生这种抗体的方法。这些抗体可用于搜索和研究各种甲基化的蛋白质，特别是用于控制赖氨酸残基的甲基化起重要作用的生物分子功能，以及通过检测含甲基赖氨酸的蛋白质来诊断疾病。有。