

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-120524

(P2009-120524A)

(43) 公開日 平成21年6月4日(2009.6.4)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C O 7 K 16/18 (2006.01)		C O 7 K	16/18 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 A	4 B O 6 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N	33/53 D	4 H O 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P	21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2007-295602 (P2007-295602)	(71) 出願人	501168814
(22) 出願日	平成19年11月14日 (2007.11.14)		独立行政法人水産総合研究センター 神奈川県横浜市西区みなとみらい二丁目3 番3号
		(74) 代理人	100133905 弁理士 石井 良夫
		(74) 代理人	100113837 弁理士 吉見 京子
		(74) 代理人	100127421 弁理士 後藤 さなえ
		(74) 代理人	100090941 弁理士 藤野 清也
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 リン酸化CDC48抗体およびそれを用いるリン酸化シグナル測定法

(57) 【要約】

【課題】リン酸化CDC48抗体の提供および当該抗体を用いたリン酸化CDC48測定用試薬、リン酸化CDC48測定法の提供。

【解決手段】ほ乳類由来CDC48/VCP/p97に由来するペプチドを動物に免疫して得られるリン酸化CDC48抗体を得た。ウエスタンブロット法、免疫組織化学染色等にこの抗体を用いることによってリン酸化CDC48測定法を得た。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列における 784 位のセリン残基がリン酸化された CDC48 / VCP / p97 を選択的に認識するリン酸化 CDC48 抗体。

【請求項 2】

配列番号 2 で示されるペプチドを含む抗原を動物に免疫して得られるリン酸化 CDC48 抗体。

【請求項 3】

前記動物がウサギまたはマウスである請求項 1 または 2 に記載のリン酸化 CDC48 抗体。

10

【請求項 4】

リン酸化ペプチドでアフィニティー精製したものである請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のリン酸化 CDC48 抗体。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のリン酸化 CDC48 抗体を用いるリン酸化 CDC48 の測定方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のリン酸化 CDC48 抗体を含有するリン酸化 CDC48 測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明はリン酸化 CDC48 に対して特異的に反応する特異抗体に関する。また、この抗体を用いるリン酸化 CDC48 の測定方法およびその測定用試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

CDC48 は、VCP (valosin-containing protein) または p97 と呼ばれ、AAA ファミリー (ATPase family associated with various cellular activities) に属する細胞内タンパク質である (非特許文献 1、参照)。この遺伝子は酵母の低温感受性変異体として発見された (非特許文献 2、参照)。

30

【0003】

現在、細胞生物学分野の研究によって、この CDC48 が多機能な分子シャペロンとして細胞内のタンパク合成、タンパク分解、膜融合、核移行、細胞分裂等のさまざまな細胞機能に関与することが知られている (非特許文献 3、4、参照)。CDC48 は細胞内のシグナル伝達に従ってリン酸化され、これによって分子構造が変化し、タンパク質の機能が変化または活性化すると推定されている。これまでの研究によって、魚類細胞およびヒト細胞ではチロシン残基 Tyr805 のリン酸化が細胞分化および細胞増殖に必須であることが明らかにされている (非特許文献 5、6、参照)。

【0004】

40

また、ヒト CDC48 のリン酸化部位としてセリン残基 Ser784 も同定されている。細胞への紫外線照射が刺激となって活性化した DNA-PK および他の PIKK ファミリーによって、CDC48 のセリン残基 Ser784 のリン酸化が生じる (非特許文献 7、参照)。この研究では、CDC48 のリン酸化を検出するため、酵素分解したリン酸化ペプチド断片を質量分析によって解析し、リン酸化を測定している。また、チェックポイント制限タンパク質 Chk2 リン酸化抗体が本来の基質である Chk2 のリン酸化部位とアミノ酸配列が類似していることを見だし、リン酸化された CDC48 と交差する作用を利用して、CDC48 のリン酸化を検出している。しかしながら、この抗体の特異性は低く、セリン残基 Ser784 がリン酸化された CDC48 だけでなく、ウエスタンブロットによってフィラミン、DNA-PK 等の他のタンパク質に対しても反応することが示

50

され、リン酸化CDC48だけを特異的に検出する抗体はこれまでに報告されていない。

【0005】

従って、紫外線、放射線、細胞分化等の刺激によって、リン酸化が生じ、CDC48分子の分子機能が活性化することが考えられるが、リン酸化されたCDC48の細胞内作用の解析のため、リン酸化CDC48を特異的に抗体で検出することは不可能であった。

【0006】

CDC48は、脳および筋肉の障害を引き起こす遺伝病の原因遺伝子であることが同定されている（非特許文献8～10、参照）。これらの医学的知見から、CDC48とそのリン酸化シグナルは重要な生理的役割を果たしていると考えられ、CDC48のリン酸化シグナルを検出し、定量化することによる病態の診断法や治療法の提供が望まれている。

【非特許文献1】Zalk R and Shoshan-Barmatz V., ATP-binding sites in brain p97/VCP (valosin-containing protein), a multifunctional AAA ATPase. *Biochem. J.* 2003; 374: 473-480.

【非特許文献2】Moir D et al., Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics*. 1982; 100: 547-563.

【非特許文献3】Rabinovich E et al., AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 626-634.

【非特許文献4】Mayr PS et al., Phosphorylation of p97 (VCP) and p47 in vitro by p34cdc2 kinase. *Eur. J. Cell Biol.* 1999; 78: 224-232.

【非特許文献5】Egerton M, Samelson LE: Biochemical characterization of valosin-containing protein, a protein tyrosine kinase substrate in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 11435-11441.

【非特許文献6】Imamura et al., Cold-inducible expression of the cell division cycle gene CDC48 and its promotion of cell proliferation during cold acclimation in zebrafish cells. *FEBS Lett.* 2003; 549: 14-20.

【非特許文献7】Livingstone M et al., Valosin-containing protein phosphorylation at Ser784 in response to DNA damage. *Cancer Res.* 2005; 65: 7533-7540.

【非特許文献8】Partridge JJ et al., DNA damage modulates nucleolar interaction of the Werner protein with the AAA ATPase p97/VCP. *Mol. Biol. Cell.* 2003; 14: 4221-4229.

【非特許文献9】Watts GD et al., Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protei

10

20

30

40

50

n. Nature Genetics. 2004; 36: 377 - 381.

【非特許文献10】Guyant-Marechal L et al., Valosin-containing protein gene mutations: clinical and neuropathologic features. Neurology 2006; 67: 644 - 651.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、セリン残基 (Ser 784) がリン酸化された活性型のCDC 48に対して特異的に反応してその存在を測定することができる特異抗体を得ることを目的とするものである。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、このリン酸化部位の周辺に位置する特定のアミノ酸配列のペプチドを抗原とすることで、活性型のCDC 48に特異的に反応する抗体が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、CDC 48のセリン残基Ser 784のリン酸化シグナルを特異的に検出するために、ほ乳類由来CDC 48 / VCP / p97に由来するペプチドを動物に免疫して得られるリン酸化CDC 48抗体を提供するものである。本発明者らは、このリン酸化CDC 48抗体を用いてリン酸化CDC 48の免疫学的測定法を提供し、更に、このリン酸化CDC 48抗体を含有するリン酸化CDC 48測定用試薬を提供するものである。

20

【0009】

すなわち、本発明は次の(1)～(6)に記載のリン酸化CDC 48抗体、リン酸化CDC 48の免疫学的測定法およびリン酸化CDC 48測定用試薬等に関する。

(1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列における784位のセリン残基がリン酸化されたCDC 48 / VCP / p97を選択的に認識するリン酸化CDC 48抗体。

(2) 配列番号2で示されるペプチドを含む抗原を動物に免疫して得られるリン酸化CDC 48抗体。

(3) 前記動物がウサギまたはマウスである上記(1)または(2)に記載のリン酸化CDC 48抗体。

30

(4) リン酸化ペプチドでアフィニティー精製したものである上記(1)～(3)のいずれかに記載のリン酸化CDC 48抗体。

(5) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のリン酸化CDC 48抗体を用いるリン酸化CDC 48の測定方法。

(6) 上記(1)～(4)のいずれかに記載のリン酸化CDC 48抗体を含有するリン酸化CDC 48測定用試薬。

【発明の効果】

【0010】

本発明のリン酸化CDC 48抗体を用い、CDC 48のリン酸化シグナルを検出し、定量化することによって検査対象における病態の診断法や治療法を提供することができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明の「リン酸化CDC 48抗体」には、配列番号1で示されるアミノ酸配列における784位のセリン残基がリン酸化されたCDC 48 / VCP / p97を選択的に認識できる抗体であればいずれのものも含まれる。

【0012】

本発明の「リン酸化CDC 48抗体」は、配列番号2で示されるペプチドを含む抗原を動物に免疫して得られるリン酸化CDC 48抗体であることが特に好ましい。

配列番号2で示されるペプチドのアミノ酸配列は、コンピュータ解析の結果、図1に示

50

されたように、広く動物由来のCDC48において、高度に保存されており、ヒト（アクセシオン番号NP_009057）、マウス（アクセシオン番号NP_033529）、ラット（アクセシオン番号NP_446316）、イヌ（アクセシオン番号1303334A）、ウシ（アクセシオン番号NP_001029466）等ほ乳類由来のCDC48で完全に保存されている。ニワトリ（アクセシオン番号BAE92937）ではセリンリン酸化部位周辺の1残基、アフリカツメガエル（アクセシオン番号NP_001005677）では2残基、ゼブラフィッシュ（アクセシオン番号BAC87740）では3残基だけでアミノ酸置換が見られるという、非常に保存されたアミノ酸配列を有している。また、このペプチドは抗原性および親水性が高く、ペプチド抗原として適していることが見出された。

10

【0013】

配列番号2で示されるリン酸化部位セリン784を中心とするポリペプチドはアブライドバイオシステムズ社製ABI 431A、パーセプティブ社製9050型、島津製作所製PSSM-8など等の一般に用いられている固相合成法による全自動ペプチド合成機で化学合成したものを用いることが好ましい。全自動ペプチド合成機で化学合成されたペプチドは、飛行時間型質量分析計、液体クロマトグラフ質量分析計などを用いて質量分析より目的のペプチドであることが確認できる。また、このポリペプチドは、合成を行う業者に委託して作成されたものも用いることができる。

【0014】

本発明の抗体の製造にあたり、用いられる抗原としては配列番号2で示されるペプチドをそのまま用いることもできるが、抗原性を高めるために、キャリアーを用いることが好ましい。

20

キャリアーとしてヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin、以下、KLHとする）、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン等を用いることができるが、特にKLHを用いることが好ましい。配列番号2で示されるペプチドのC末端にシステインを付加した抗原ペプチドとキャリアーと結合は、maleimidobenzoyl acid - N-hydroxysuccinimide エステル（MBS）を用いて抗原ペプチドのC末端に付加したシステイン残基のチオール基に対してキャリアーを架橋して結合させ、抗原として用いることが好ましい。また、グルタルアルデヒド、カルボジミドなど他の架橋剤を用いて抗原ペプチドとキャリアータンパク質とを結合させる方法や多重抗原ペプチド（MAP）によってキャリアータンパク質を用いないで抗原性を高める方法も利用できる。

30

【0015】

本発明の「リン酸化CDC48抗体」は一般的に知られている方法で製造することができる。上記のように調製した配列番号2で示されるペプチドを含む抗原を動物に免疫することで、本発明の「リン酸化CDC48抗体」を含む抗血清を得ることができる。具体的には、リン酸化CDC48ペプチド-KLH溶液を抗原としてフロイント完全アジュバントと混合し、ウサギ皮下に2週間に1回投与し、2～4ヶ月後静脈血を採取し、抗血清を得ることで製造することができる。免疫に用いる動物としては、一般によく使用されるウサギを初めとしてヤギ、ラット、マウス、ニワトリなどが挙げられる。この「リン酸化CDC48抗体」を含む抗血清も本発明の「リン酸化CDC48抗体」に含まれる。

40

【0016】

本発明によって得られた「リン酸化CDC48抗体」の抗体価の検定はELISA法によって行われることが好ましい。

ELISA法は一般的に知られているいずれの方法も用いる事ができるが、例えばリン酸化ペプチド溶液を96穴マイクロプレートに加え、室温にて一晚放置することによりペプチド抗原をプレートに固相化し、これを一次抗体として希釈した上記抗血清と反応させた後、0.05%ツイーン20を含有するPBSを加え、さらに二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体を反応させた後、0.05%ツイーン20および0.15M食塩を含有するトリス塩酸緩衝液（TBS-T）で洗浄することで行うことができ

50

る。そして、E L I S A 試薬（バイオラッド社）を基質として加えて発色させ、450 nmの吸光度を96穴マイクロプレートリーダーで測定することで、抗体価の検定をすることができる。

【0017】

本発明の「リン酸化CDC48抗体」、または「リン酸化CDC48抗体」を含む抗血清は、必要に応じて精製して用いることが好ましい。精製には、例えば、硫安分画、イオン交換クロマトグラフィー、分子篩クロマトグラフィー等の一般的な精製法を用いてもよいし、更に、リン酸化ペプチドでアフィニティー精製することが好ましい。リン酸化ペプチドでアフィニティー精製する場合には、セファロース4Bに抗原ペプチドであるリン酸化ペプチドを固定化したゲルカラムを用いることで、リン酸化CDC48抗体を高度に精製することができる。このようにして、CDC48のリン酸化部位ペプチドに対する抗体を容易に多量に得ることができる。

10

【0018】

このようにして製造された本発明の「リン酸化CDC48抗体」を用いてリン酸化CDC48の測定用試薬を調製することができる。例えば組織化学で用いられる代表的な酵素免疫分析用の試薬が挙げられ、具体的にはリン酸化CDC48抗体、ビオチン化二次抗体、アビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体、過酸化水素、ジアミノベンチジンからなる測定用試薬等が挙げられる。

【0019】

また、本発明の「リン酸化CDC48抗体」をリン酸化CDC48の測定法に用いることができる。本発明の「リン酸化CDC48抗体」を用いるリン酸化CDC48の測定法として、例えばウエスタンブロット法や免疫組織化学染色において「リン酸化CDC48抗体」を一次抗体として用いることで、対象試料に含まれるリン酸化CDC48を測定することができる。

20

測定の対象に用いる試料とは、CDC48を有するものであればいずれも用いることができるが、ヒト、マウス、ラット、ニワトリ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ等の培養細胞、生体組織等を用いる事ができ、このCDC48リン酸化の測定によって、ガンマ線照射、紫外線照射、熱ストレス、低温ショック、飢餓ストレス等の刺激による培養細胞および生体組織等の影響を調べることができる。

【0020】

例えば、「リン酸化CDC48抗体」を用いたリン酸化CDC48の測定法を用い、本発明者らは低線量ガンマ線照射によってアタキシア症原因酵素ATMキナーゼが活性化し、このATMキナーゼの作用によってCDC48セリン784残基のリン酸化が誘導されることを見いだしている。このように、本発明の「リン酸化CDC48抗体」を用いたリン酸化CDC48の測定法により、放射線によるDNAダメージによって引き起こされる細胞内リン酸化シグナルを解析することができる。

30

さらに従来、ATMキナーゼの基質として、p53、Chk2、Nbs1、Brca1、FancD2の5種類のタンパク質が見つかった（参考文献1、参照）が、この結果からCDC48はATMキナーゼの新しい基質として活性化されることが明らかとなった。このように、照射に伴って生じるDNAダメージによってリン酸化CDC48が誘導されることから、リン酸化CDC48は放射線生物学の新しいバイオマーカーとして利用されることが示された。

40

参考文献1：McKinnon PJ：ATM and ataxia telangiectasia. EMBO Rep. 2004；5，772-776.

【0021】

また、ラパマイシン標的タンパク質（以下、TORキナーゼとする）は飢餓およびオートファジーが生じる際にリン酸化が抑制されるという特徴をもつシグナル分子であることが知られている（参考文献2、3、参照）。

そこで、本発明者らは本発明の「リン酸化CDC48抗体」を用いたリン酸化CDC48の測定法により、TORキナーゼの基質として、CDC48のセリン784がリン酸化

50

を受けることを見いだした。そして、オートファジーのシグナル分子としてもCDC48がリン酸化され活性化するという新しい成果が得られた。このことより、TORキナーゼによって直接制御される分子としてCDC48がリン酸化によって活性化され、細胞内のタンパク分解、タンパク質の変性抑制などに関与する分子メカニズムが推定された。

参考文献2: Kim KW et al., Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and mammalian target of rapamycin signaling. J. Biol. Chem. 2006; 281(48), 36883 - 36890

参考文献3: 田中啓二・大隈良典編集、蛋白質核酸酵素「ユビキチン - プロテアソーム系とオートファジー」共立出版、2006年

【0022】

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0023】

1. 抗原の作製

配列番号2のペプチドのC末端にシステイン残基を導入したペプチドは、株式会社日本バイオサービスによって化学合成されたものを抗原として用いた。キャリアーとしてKLHを用い、抗原ペプチドのC末端のシステイン残基におけるチオール基とKLHとを架橋試薬MBS(PIERCE社製)を用いて結合させ、免疫源とした(参考文献4、5参照)。

参考文献4: T. Kitagawa and T. Aikawa. Enzyme coupled immunoassay of insulin using a novel coupling reagent. (1976). J. Biochem. 79, 233 - 236.

参考文献5: 大海忍・辻村邦夫・稲垣昌樹: 抗ペプチド抗体実験プロトコール、秀潤社、pp. 1 - 312、1994年

【0024】

2. 抗体の作製

このCDC48-Ser-784リン酸化ペプチド-KLH溶液(タンパク質濃度2mg/mL)を等量のフロイント完全アジュバンド(PIERCE社製)と混合した後、これを抗原として、ウサギに2週間に1回免疫し、133日後静脈血を採取し、抗血清を得た。こうして得られたウサギ抗血清をPBSで二倍に希釈した後、リン酸化CDC48ペプチド抗原を固定化したセファロース4Bゲルと37で1時間震盪して混合し、次に4

で8時間反応させた。次いで、ゲルをカラムに充填した後、0.1%Tween20を含むPBSおよびPBSで未反応の成分を洗浄し除去した。280nmにてタンパク質の溶出位置をモニターしながら、0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH2)にて抗体をカラムから溶出した。溶離した抗体溶液に対して、1Mトリス塩酸緩衝液(pH8)を添加して中和した。こうして、アフィニティー精製抗体1.8mg(タンパク質濃度367μg/mL)を得た。

【実施例2】

【0025】

抗体の特異性の確認

実施例1で得た抗体が、セリン残基(Ser784)がリン酸化されたCDC48に特異的に反応するかどうかをELISA法により調べた。すなわち、ペプチド抗原を希釈したものをマイクロプレートに分注し、ウェルに吸着させた後、BSAのブロッキング溶液でブロッキングすることで抗原ペプチドを固相化した96穴マイクロプレートに対してウェルを洗浄したあと、一次抗体としてこの抗体の希釈液を加え反応させたのち、PBSで洗浄した。さらにペルオキシダーゼ標識二次抗体を各ウェルに添加し反応させたあと、P

10

20

30

40

50

B Sで洗浄した。この各ウェルにT M B Z (3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン) 基質を加え発色させ、4 5 0 n mで吸光度を測定した (参考文献5 参照)。その結果、図2 に示すように、抗血清および精製した抗体はいずれもリン酸化ポリペプチドに対して反応した。一方、リン酸化していないペプチドを用いたE L I S A分析では、抗血清および精製した抗体はいずれも反応しなかった。これらの結果から、得られた抗体は、C D C 4 8 由来ポリペプチドのセリン残基 (S e r 7 8 4) がリン酸化されたものに対して高い特異性を有することが確認された。

【実施例3】

【0026】

リン酸化C D C 4 8の測定法

(ウエスタンブロット法による抗体解析)

上記で作成したリン酸化C D C 4 8抗体を用い、通常、タンパク質の抗体検出法に用いられているウエスタンブロット法により既報の分析法 (参考文献5、参照) に従って対象試料を解析した。すなわち、直径1 0 c mのシャーレを用いて牛胎児血清 (5 %)、ペニシリン (5 u n i t s / m L) およびストレプトマイシン (5 0 μ g / m L) 含むライボピッツL 1 5培地 (インビトロジェン社) を使用し3 0 で培養したゼブラフィッシュ培養細胞に対してγ線を照射したのち、サンプルバッファー (2 % S D S、0 . 1 % プロモフェノールブルー及びプロテアーゼ阻害剤カクテル (コンプリートミニ、ロッシュ社) を含む1 0 m M T r i s - H C l 緩衝液、p H 6 . 8) を用いて1 0 0 で2分間加熱処理して細胞を溶解し、電気泳動用試料を調製した。この試料をS D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動5 %ゲルまたは7 . 5 %ゲル (株式会社アトー製) を用いて分離したのち、P V D F膜 (G Eヘルスケアバイオサイエンス社) に電氣的に転写した。一次抗体としてアフィニティー精製抗体の1 0 0 0倍希釈液を用い、二次抗体として1 %カゼインを含むペルオキシダーゼ標識抗ウサギI g G抗体 (D a k o C y t o m a t i o n社) の1 0 0 0 0倍希釈液と反応させた後、T B S Tで洗浄後、ケミルミネッセンス反応キット (G Eヘルスケアバイオサイエンス社) を用いてX線フィルムに抗原抗体反応の化学発光シグナルを露光して検出した。

【0027】

分子量マーカーはM a g i c M a r k X P W e s t e r n P r o t e i n S t a n d a r d s (インビトロジェン社) を用いた。対照として、p 5 3抗体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y社)、p 5 3 (S e r - 1 5) リン酸化抗体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y社)、A T M抗体 (A b c a m社)、A T M (S e r - 1 9 8 1) リン酸化抗体 (A b c a m社) および本発明者が作製したゼブラフィッシュC D C 4 8アミノ酸配列におけるフェニルアラニン残基1 3 8位からメチオニン残基1 5 8位までの2 0残基のポリペプチド (配列番号3) を抗原とした抗体であるC D C 4 8抗体 (ウサギポリクローナル抗体) (非特許文献6、参照) を分析に用いた。その結果、図3 に示すように、本発明のリン酸化C D C 4 8抗体を用いることによって、ゼブラフィッシュ細胞抽出物にリン酸化C D C 4 8が存在することが確認された。

このC D C 4 8のS e r 7 8 4のリン酸化反応は、放射線照射によって自己リン酸化がA T M (S e r - 1 9 8 1) で生じるとともに、A T Mのリン酸化反応性の基質であるp 5 3 (S e r - 1 5) リン酸化も生じた。一方、通常のタンパク質に対する抗体p 5 3抗体、A T M抗体では、放射線で誘導されなかった。以上のように、C D C 4 8のリン酸化は放射線強度に依存して、リン酸化反応が生じたことから、C D C 4 8は、A T Mリン酸化によって生じる新しいタンパク質基質であることが明らかとなった。

【実施例4】

【0028】

C D C 4 8リン酸化シグナルの免疫組織化学染色キット及び測定法

リン酸化C D C 4 8抗体を用いて、動物組織および培養細胞を対象として、C D C 4 8のリン酸化シグナルが誘導された細胞を特異的に検出する目的に利用する検査キットを作製した。この検査キットに含まれる試薬類を表1 に示した。

【 0 0 2 9 】

このキット化された試薬類を用いることによって、既報の細胞組織染色法によって染色した。すなわち、ゼブラフィッシュ胚より樹立されたZ E細胞株を用いて、牛胎児血清（5 %）、ペニシリン（5 u n i t s / m L）およびストレプトマイシン（5 0 μ g / m L）含むライボピツル 1 5 培地（インビトロジェン社）を使用し3 0 で培養した。細胞をカバーガラスの上に培養して、4 %パラホルムアルデヒドを含むP B Sで1 5 分間固定した。P B Sでカバーガラスを洗浄後、3 %牛胎児血清を含むP B Sでブロッキングしたのち、一次抗体としてアフィニティー精製抗体の希釈液を用いて1 時間室温で処理した。次に、二次抗体として、f l u o r 4 8 8 蛍光標識抗ウサギI g Gと3 0 分間室温で反応したあと、P B Sで1 0 分間洗浄した。D A P I 染色液（和光純薬工業株式会社製）で対比核染色を行った後、カバーガラスをのせて顕微鏡で染色像を観察した。次に、共焦点レーザー顕微鏡（ライカ社）でリン酸化されたC D C 4 8 の細胞内の局在性を観察した。培地をP B Sで置き換えて1 時間培養することによる飢餓試験の結果、図4 に矢印で示すようにC D C 4 8 （S e r - 7 8 4）リン酸化が誘導され、核でのシグナルが増大し、飢餓によるシグナル活性化がC D C 4 8 で生じることが示された。従って、このキットを用いることで、C D C 4 8 のリン酸化シグナルが誘導された細胞を特異的に検出できることが確認された。

10

【 0 0 3 0 】

【表 1】

免疫組織化学染色キットの構成

20

試薬番号	試薬の構成
一次抗体	リン酸化C D C 4 8 抗体 (抗体I g G濃度, 0. 3 ~ 1 0 μ g / m L, 0. 1 %アジ化ナトリウムおよび0. 1 %ウシ血清アルブミンを含むP B Sに対してアフィニティー精製抗体を希釈した水溶液)
二次抗体	f l u o r 4 8 8 蛍光標識抗ウサギI g G抗体 (抗体I g G濃度1 ~ 1 0 μ g / m Lおよび1 %ウマ正常血清を含むP B Sで希釈した水溶液)

30

【産業上の利用可能性】

【 0 0 3 1 】

本発明によって得られたリン酸化C D C 4 8 抗体は、A T MキナーゼおよびT O Rキナーゼのシグナル経路の解析に関する放射線生物学、分子細胞生物学の新しい分析試薬として、生命科学研究の進展に対して寄与するとともに、A T MキナーゼおよびT O R関連の病態の解析、診断および治療などに関わる分析測定技術に活用される。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 2 】

【図 1】C D C 4 8 ペプチドのアミノ酸配列をコンピュータ解析した結果を示した図である。

【図 2】E L I S Aによる抗体の特異性の測定結果を示した図である（実施例 2）。

【図 3】ウエスタンブロットによるリン酸化抗体の特異性確認を示した図である（実施例 3）。

【図 4】C D C 4 8 セリン - 7 8 4 リン酸化抗体を用いる免疫組織化学染色を示した図である（実施例 4）。

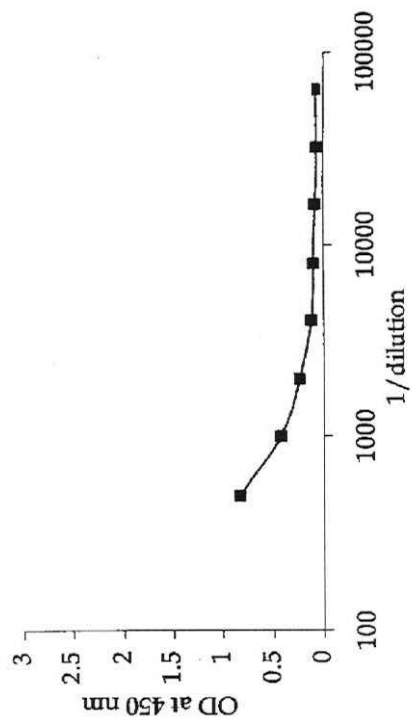
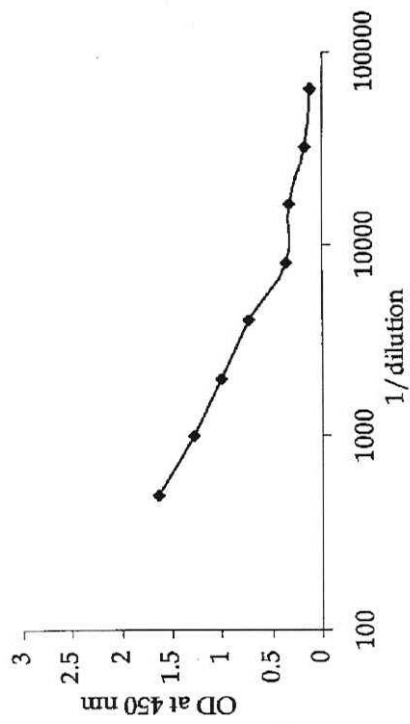
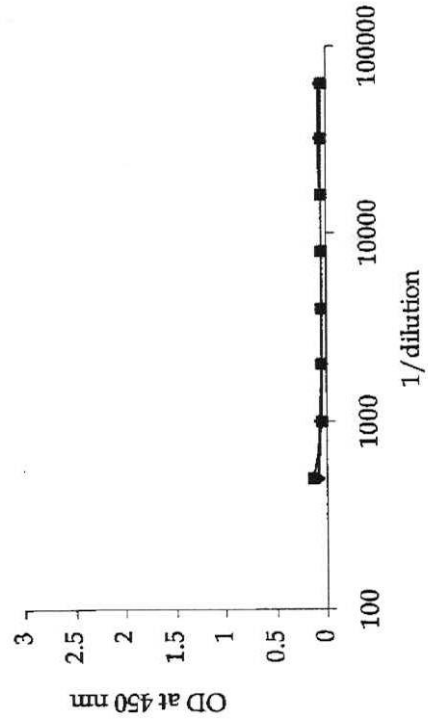
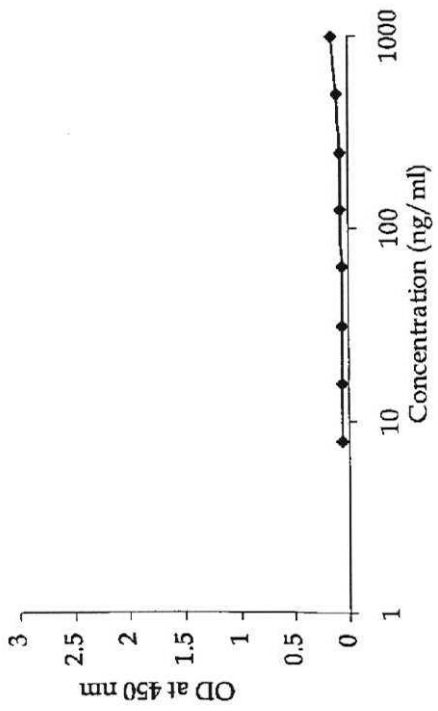
50

【図 1】

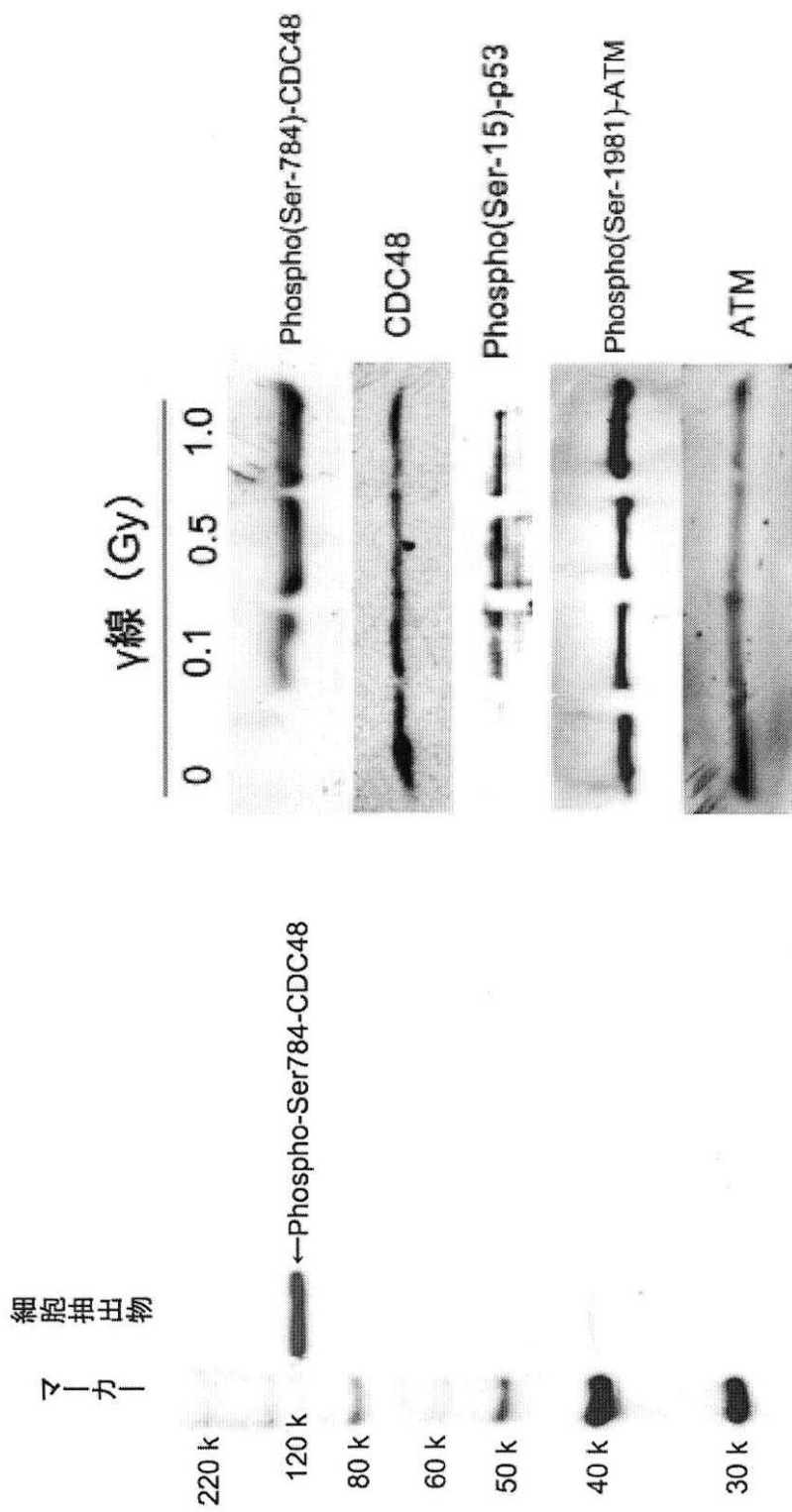
784

ヒト	GNQGGAGPSQGS	GG
マウス	GNQGGAGPSQGS	GG
ニワトリ	GNQGGAGPSQGT	GG
アフ리카ツメ	ガエル	GGQGGAGPSQGAGG
ゼブラフィッシュ		SNQGGSGPSQGS

【図 2】

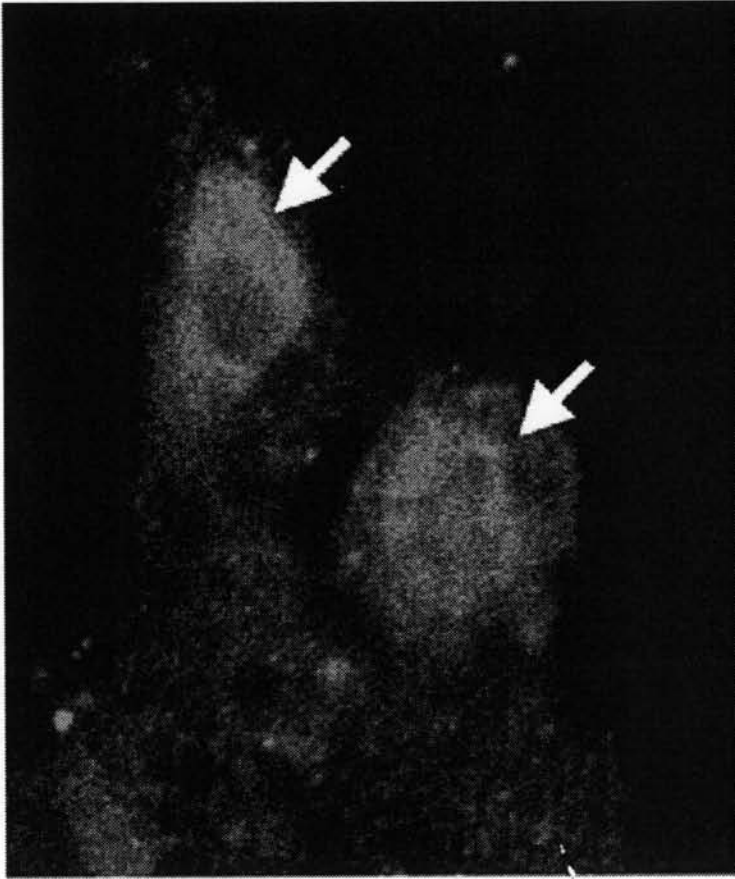


【 図 3 】

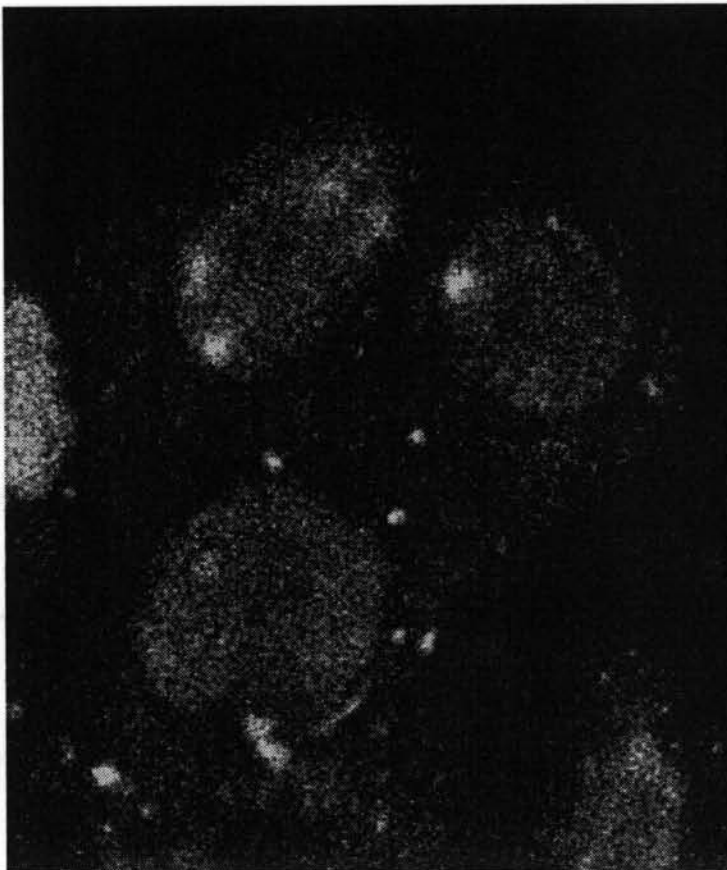


【 図 4 】

血清飢餓



対照区



【 配 列 表 】

2009120524000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 山下倫明
神奈川県横浜市金沢区福浦 2 - 1 2 - 4 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所内
- (72)発明者 藪健史
神奈川県横浜市金沢区福浦 2 - 1 2 - 4 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所内
- (72)発明者 今村伸太郎
神奈川県横浜市金沢区福浦 2 - 1 2 - 4 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所内
- F ターム(参考) 4B024 AA11 BA43 CA02
4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA13
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 GA26

专利名称(译)	磷酸化的cdc48抗体和使用该抗体测量磷酸化信号的方法		
公开(公告)号	JP2009120524A	公开(公告)日	2009-06-04
申请号	JP2007295602	申请日	2007-11-14
申请(专利权)人(译)	渔业研究中心研究所		
[标]发明人	山下倫明 藪健史 今村伸太郎		
发明人	山下倫明 藪健史 今村伸太郎		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/09 G01N33/53 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N15/00.A G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	石井雄 后藤早苗		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供磷酸化的CDC48抗体，使用该抗体测量磷酸化的CDC48的试剂以及磷酸化的CDC48测定方法。获得通过用衍生自哺乳动物CDC48 / VCP / p97的肽免疫动物而获得的磷酸化CDC48抗体。通过将该抗体用于Western印迹，免疫组织化学染色等，获得了磷酸化的CDC48测定法。[选择图]无

試薬番号	試薬の構成
一次抗体	リン酸化CDC48抗体 (抗体IgG濃度, 0.3~10μg/mL, 0.1%アジ化ナトリウムおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含むPBSに対してアフィニティー精製抗体を希釈した水溶液)
二次抗体	fluor488蛍光標識抗ウサギIgG抗体 (抗体IgG濃度1~10μg/mLおよび1%ウマ正常血清を含むPBSで希釈した水溶液)