

(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2008-104356

(P2008-104356A)

(43) 公開日 平成20年5月8日(2008.5.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/48 (2006.01)	C12Q 1/48 ZNAZ	2G045
C07K 17/02 (2006.01)	C07K 17/02	4B063
C12Q 1/42 (2006.01)	C12Q 1/42	4H045
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2005-29690 (P2005-29690)
 (22) 出願日 平成17年2月4日 (2005.2.4)

(71) 出願人 000006677
 アステラス製薬株式会社
 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (72) 発明者 沖津 修
 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号
 藤沢薬品工業株式会社内
 (72) 発明者 長島 建之
 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号
 藤沢薬品工業株式会社内
 (72) 発明者 村元 正和
 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号
 藤沢薬品工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リン酸化-脱リン酸化反応検出用基質群およびそれを用いた検出方法

(57) 【要約】

【課題】 プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼの反応性を簡便に測定可能な手段の提供。

【解決手段】 プロテインキナーゼの天然に存在する基質に含まれるアミノ酸配列中のセリン残基をスレオニン残基に置換してなる人工ペプチド基質を少なくとも1種含有するプロテインキナーゼの基質群、前記基質群を固定してなるペプチドアレイ、前記ペプチドアレイおよび抗リン酸化スレオニン抗体を用いることを特徴とする、リン酸化および/または脱リン酸化反応を検出する方法、前記ペプチドアレイおよび抗リン酸化スレオニン抗体を用いることを特徴とする、プロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼの活性化および/または不活性化に基づく疾患の診断方法、ならびに前記ペプチドアレイおよび抗リン酸化スレオニン抗体を用いることを特徴とする、プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ活性を変動させる被検物質のスクリーニング方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテインキナーゼの天然に存在する基質に含まれるアミノ酸配列中のセリン残基をスレオニン残基に置換してなる人工ペプチド基質を少なくとも 1 種含有するプロテインキナーゼの基質群。

【請求項 2】

プロテインキナーゼの天然に存在する基質に含まれるアミノ酸配列中のセリン残基をリン酸化スレオニン残基に置換してなる人工ペプチド基質を少なくとも 1 種さらに含有する、請求項 1 に記載の基質群。

【請求項 3】

前記人工ペプチド基質が 5 ~ 30 のアミノ酸残基を有するものである、請求項 1 または 2 に記載の基質群。

【請求項 4】

前記プロテインキナーゼがセリン/スレオニンキナーゼである請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の基質群。

【請求項 5】

前記セリン/スレオニンキナーゼが c A M P 依存性プロテインキナーゼ A である、請求項 4 に記載の基質群。

【請求項 6】

前記セリン/スレオニンキナーゼがプロテインキナーゼ C である、請求項 4 に記載の基質群。

【請求項 7】

前記セリン/スレオニンキナーゼが A M P 活性化プロテインキナーゼである、請求項 4 に記載の基質群。

【請求項 8】

前記人工ペプチド基質が配列番号 11 ~ 299 に記載のアミノ酸配列群から選択されるアミノ酸配列を有するものである請求項 1 ~ 7 いずれかに記載の基質群。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 いずれかに記載の基質群を固定してなるペプチドアレイ。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のペプチドアレイおよび抗リン酸化スレオニン抗体を用いることを特徴とする、リン酸化および/または脱リン酸化反応を検出する方法。

【請求項 11】

前記抗リン酸化スレオニン抗体がポリクローナル抗体である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

下記工程：

被験者由来の生体試料からプロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼを含む画分を調製する工程；

前記画分と請求項 9 に記載のペプチドアレイとを接触させる工程；

前記接触工程前後のペプチドアレイについて、抗リン酸化スレオニン抗体を用いてリン酸化ペプチドおよび/または脱リン酸化ペプチドを検出する工程；ならびに

前記検出結果を、対照における検出結果と比較し、疾患の有無に応じて変化するプロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼ活性を判定する工程

を含むプロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼの活性化および/または不活性化に基づく疾患の診断方法。

【請求項 13】

前記疾患が癌、悪性腫瘍、糖尿病、糖尿病性合併症、代謝性疾患、自己免疫疾患、免疫異常疾患、免疫不全、神経変性疾患、虚血性疾患、内分泌疾患、肝疾患または骨疾患である請求項 12 に記載の診断方法。

10

20

30

40

50

【請求項14】

下記工程：

プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼおよび被検物質を含む試料と、請求項9に記載のペプチドアレイとを接触させる工程；

前記接触工程前後のペプチドアレイについて、抗リン酸化スレオニン抗体を用いてリン酸化ペプチドおよび/または脱リン酸化ペプチドを検出する工程；ならびに

前記検出結果を被検物質を含まない試料における検出結果と比較し、被検物質の有無により変化するプロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ活性を判定する工程を含む、プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ活性を変動させる被検物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リン酸化 - 脱リン酸化反応検出用基質群およびそれを用いた検出方法に関する。詳しくは、本発明は、Non-RI法でリン酸化 - 脱リン酸化反応を高感度に検出するペプチド性基質群およびそれを用いたリン酸化 - 脱リン酸化反応の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体内のタンパク質は、様々な生理的条件下で生化学的修飾を受けることによってその性質を変化させている。リン酸化は、タンパク質の主要な翻訳後修飾反応の1つであり、その反応は瞬時かつ可逆的におこるため、タンパク質の活性/不活性をコントロールする基本的な素過程の1つとして、生体内で重要な役割を担っていることが推測される。実際、真核細胞においては細胞内タンパク質の多くはリン酸化されており、多くのシグナル伝達系において、タンパク質リン酸化が情報伝達の方法として広く用いられていることが知られている。

【0003】

一般に、タンパク質がリン酸化反応、あるいは脱リン酸化反応を受けると、タンパク質を構成するアミノ酸残基の局所的な極性に変化が生じることにより、結果としてタンパク質の高次構造に基づく機能や活性度に変化を生じることにより、タンパク質の活性/不活性がコントロールされていると考えられている。このように、細胞内情報伝達に深く関わっているタンパク質リン酸化酵素の働きを調べることは、細胞機能を解析する上で大変重要である。さらに、医薬品探索研究やポストゲノム研究として注目されているプロテオームの研究にも関連し大変興味深い。プロテオーム解析のツールとして、タンパク質またはペプチドを基盤上に固定するマイクロアレイ技術が知られている（特許文献1および2、非特許文献1～6）。

【0004】

タンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）は、タンパク質の特定の部位をリン酸化してその機能を変える働きをもち、その基質であるタンパク質のセリンまたはスレオニン残基をリン酸化する「セリン/スレオニンキナーゼ」と、チロシン残基をリン酸化する「チロシンキナーゼ」の2つに大別される。ここで、「チロシンキナーゼ」は細胞膜内あるいは近傍に存在し情報伝達の最上流に位置し細胞外の環境変化を直接検知する場合が多く、「セリン/スレオニンキナーゼ」は上流からの信号を受けて逐次的に情報伝達を行い、細胞機能の直接的な調節に関与する場合が多い。

【0005】

プロテインキナーゼは、細胞外部からの刺激を細胞内部に伝達し、これらの刺激に対する細胞の応答に関与する。このように、プロテインキナーゼはリン酸化を通して、代謝、増殖、分化、情報伝達、運動などの多彩な細胞機能の調節を担っている。細胞内でのプロテインキナーゼは特定のタンパク質を基質として認識することで特異性の高いリン酸化反応を進行させ、これらリン酸化反応の逐次的反応の組み合わせとして、細胞外の環境変化や薬剤に対する応答として信号を伝達し細胞機能を調節している。遺伝子配列の解析から

10

20

30

40

50

、約800種類のプロテインキナーゼが存在して細胞内のシグナル伝達に関与していると予想されている。タンパク質リン酸化の異常は、癌、糖尿病、関節炎などの様々な疾患の原因または結果と考えられている。

【0006】

一方、プロテインホスファターゼは、リン酸化されたタンパク質を基質として脱リン酸化を触媒する酵素であり、タンパク質リン酸化の可逆性を保障している。プロテインキナーゼは、それ自体がキナーゼの基質でもあり、スレオニン、セリン（ホスホリラーゼなど）、チロシン（srcなどガン遺伝子関連のタンパク質に例が多い）などのいずれかの残基がリン酸化されたプロテインキナーゼは、プロテインホスファターゼによって再び元の酵素に戻り、次の情報による活性化に備える。シグナル伝達経路の共通の特徴として、その反応の一過性がある。この一過性は、シグナル伝達分子の量や活性化状態の一過性の反映である。タンパク質のリン酸化は、ある場合には活性化を、ある場合には不活性化を引き起こす。実際、タンパク質の脱リン酸化反応が積極的なスイッチオンの役割を担っている場合も知られている。

10

【0007】

プロテインキナーゼは、その基質特異性が高いことが特徴であるが、基質タンパク質の被リン酸化部位を含むアミノ酸配列からなるペプチド性部分を抽出したペプチドもまた基質としてリン酸化を受けることが広く知られている。そのため、プロテインキナーゼの反応性を調べる際には、ペプチド性基質を用いて調べることが可能である。

20

【0008】

前記「プロテインキナーゼの反応性」は、その適当な基質を用いてリン酸化反応を行わせ、生成物であるリン酸化基質やADPの増加、あるいは出発物である基質やATPの減少を何らかの方法で計測することで判定が可能である。今日では、タンパク質リン酸化は、放射性核種³²Pの取り込みを直接測定する方法か、または抗リン酸化タンパク質抗体を用いる方法が一般的である。

30

【0009】

最近では、基質に含まれるリン酸化セリン残基、リン酸化スレオニン残基またはリン酸化チロシン残基を、抗体および表面プラズモン共鳴によって検出する方法（特許文献3）や、適当なキレート性検出試薬および表面プラズモン共鳴によって検出する方法（特許文献4）が注目されている。これらの方法では、放射性物質を取り扱う必要がなく操作性にも優れているが、抗体や検出試薬の認識能力に強く依存し、これらの認識能力を基とした間接的な検出と測定を行うことになる。そのため、認識能力の優れた抗体や検出試薬の開発が重要かつ不可欠となる。

40

【0010】

チロシン残基のリン酸化の検出に関しては、タンパク質またはペプチド配列内のリン酸化チロシン残基を幅広く認識する多くの優れた抗リン酸化チロシン抗体が知られており、市販されている。そのため、それらの抗体を用いることでチロシンキナーゼの反応性は比較的容易に測定可能である。一方、セリン/スレオニンキナーゼの場合は、幅広くかつ一般的にリン酸化セリンあるいはリン酸化スレオニン残基を認識可能な優れた抗体は知られていない。そのため、抗体を使ってセリン/スレオニンキナーゼの反応性を調べる場合、特定のリン酸化タンパク質あるいはリン酸化ペプチドを特異的に認識する抗体をその都度作製して用いなければならず、セリン/スレオニンキナーゼの反応性を抗体により一般的かつ簡便に検出し測定する方法はほとんど知られていない。

40

【特許文献1】WO 02/083933 A2

【特許文献2】WO 02/083884 A2

【特許文献3】特開2004-283114号公報

【特許文献4】特開2004-309303号公報

【非特許文献1】M. Bettencourt-Dias, R. Giet, R. Sinka, A. Mazumdar, W. G. Lock, F. Balloux, P. J. Zafiroopoulos, S. Yamaguchi, S. Winter, R. W. Carthew, M. Cooper, D. Jones, L. Frenz, D. M. Glover. Nature. 2004, 432, 980-7.

50

【非特許文献2】G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam. Science. 2002, 298, 1912-1934.

【非特許文献3】S. J. Lee, S. Y. Lee. Anal. Biochem. 2004, 330, 311-316.

【非特許文献4】R. C. Panicker, X. Huang, S. Q. Yao. Comb. Chem. High Throughput Screen. 2004, 7, 547-56.

【非特許文献5】D. S. Y. Yeo, R. C. Panicker, L. P. Tan, S. Q. Yao. Comb. Chem. High Throughput Screen. 2004, 7, 213-221.

【非特許文献6】B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mrksich. Nature Biotech. 2002. 20. 270-274.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

上述の理由から、現在においては、セリン/スレオニンキナーゼのアッセイに関しては、放射性核種の ^{32}P の取り込みを直接測定する方法が一般的となっているが、実験施設や作業環境に制約があり、また実験者の放射能被曝の問題もある為、あまり大規模なハイスループット (high throughput) 解析には適さないという問題がある。したがって、大規模なプロテオーム解析を実施して疾患とタンパク質リン酸化カスケードの関連を調べる上で、放射化標識されたATP等を用いないNon-RI法で、タンパク質のリン酸化/脱リン酸化を高感度に検出するアッセイを可能にすることが重要な課題となっている。

本発明の目的は、プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼの反応性を簡便に測定可能な手段の提供である。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、上記問題点に鑑み、鋭意検討した結果、プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼの基質として以下に示すような人工ペプチドを用いることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本願発明は、以下に示す通りである。

【0013】

〔1〕 プロテインキナーゼの天然に存在する基質に含まれるアミノ酸配列中のセリン残基をスレオニン残基に置換してなる人工ペプチド基質を少なくとも1種含有するプロテインキナーゼの基質群。

〔2〕 プロテインキナーゼの天然に存在する基質に含まれるアミノ酸配列中のセリン残基をリン酸化スレオニン残基に置換してなる人工ペプチド基質を少なくとも1種さらに含有する、前記〔1〕に記載の基質群。

〔3〕 前記人工ペプチド基質が5～30のアミノ酸残基を有するものである、前記〔1〕または〔2〕に記載の基質群。

〔4〕 前記プロテインキナーゼがセリン/スレオニンキナーゼである前記〔1〕～〔3〕いずれかに記載の基質群。

〔5〕 前記セリン/スレオニンキナーゼがcAMP依存性プロテインキナーゼAである、前記〔4〕に記載の基質群。

〔6〕 前記セリン/スレオニンキナーゼがプロテインキナーゼCである、前記〔4〕に記載の基質群。

〔7〕 前記セリン/スレオニンキナーゼがAMP活性化プロテインキナーゼである、前記〔4〕に記載の基質群。

〔8〕 前記人工ペプチド基質が配列番号11～299に記載のアミノ酸配列群から選択されるアミノ酸配列を有するものである前記〔1〕～〔7〕いずれかに記載の基質群。

〔9〕 前記〔1〕～〔8〕いずれかに記載の基質群を固定してなるペプチドアレイ。

〔10〕 前記〔9〕に記載のペプチドアレイおよび抗リン酸化スレオニン抗体を用いることを特徴とする、リン酸化および/または脱リン酸化反応を検出する方法。

〔11〕 前記抗リン酸化スレオニン抗体がポリクローナル抗体である、前記〔10〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔 1 2 〕 下記工程：

被験者由来の生体試料からプロテインキナーゼおよび／またはプロテインホスファターゼを含む画分を調製する工程；

前記画分と前記〔 9 〕に記載のペプチドアレイとを接触させる工程；

前記接触工程前後のペプチドアレイについて、抗リン酸化スレオニン抗体を用いてリン酸化ペプチドおよび／または脱リン酸化ペプチドを検出する工程；ならびに

前記検出結果を、対照における検出結果と比較し、疾患の有無に応じて変化するプロテインキナーゼおよび／またはプロテインホスファターゼ活性を判定する工程

を含むプロテインキナーゼおよび／またはプロテインホスファターゼの活性化および／または不活性化に基づく疾患の診断方法。

10

〔 1 3 〕 前記疾患が癌、悪性腫瘍、糖尿病、糖尿病性合併症、代謝性疾患、自己免疫疾患、免疫異常疾患、免疫不全、神経変性疾患、虚血性疾患、内分泌疾患、肝疾患または骨疾患である前記〔 1 2 〕に記載の診断方法。

〔 1 4 〕 下記工程：

プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼおよび被検物質を含む試料と、前記〔 9 〕に記載のペプチドアレイとを接触させる工程；

前記接触工程前後のペプチドアレイについて、抗リン酸化スレオニン抗体を用いてリン酸化ペプチドおよび／または脱リン酸化ペプチドを検出する工程；ならびに

前記検出結果を被検物質を含まない試料における検出結果と比較し、被検物質の有無により変化するプロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ活性を判定する工程

を含む、プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ活性を変動させる被検物質のスクリーニング方法。

20

【発明の効果】

【 0 0 1 4 〕

本発明のプロテインキナーゼの基質群によると、適切に設計されたアミノ酸配列に基づいて合成した人工基質を含むことから、Non-RI法で高感度にタンパク質のリン酸化または脱リン酸化を測定可能な一連の基質を提供することが可能となり、さらにコンビナトリアルケミストリーの技術を応用すれば、ペプチド基質ライブラリーを作製することができるため、プロテインキナーゼおよび／またはプロテインホスファターゼのハイスループット解析に供することができる。

30

本発明のペプチドアレイおよびそれを用いたリン酸化および／または脱リン酸化の検出方法によると、プロテオーム解析の手段として、ハイスループット解析が可能であるとともにリン酸化と脱リン酸化を1つのアレイで同時に検出することも可能である。

本発明の診断方法によると、セリン／スレオニンキナーゼによるリン酸化および／またはプロテインホスファターゼによる脱リン酸化を高感度かつ迅速に検出することが可能であるので、かかるリン酸化および／または脱リン酸化が関与する疾患の有無を迅速に判定することができる。

本発明のスクリーニング方法によると、セリン／スレオニンキナーゼによるリン酸化またはプロテインホスファターゼによる脱リン酸化を高感度かつ迅速に検出することが可能であるので、プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ活性を促進または阻害する物質を効率よく選択することができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 5 〕

本発明においてプロテインキナーゼとは、大別してセリン／スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼとを含む概念であるが、以下、これまで有用なキナーゼ活性の測定方法が開発されていなかったセリン／スレオニンキナーゼを中心に述べる。

【 0 0 1 6 〕

セリン／スレオニンキナーゼとしては、アミノ酸配列中のセリンまたはスレオニンをリン酸化する酵素であれば特に限定されるものではないが、例えば、cAMP依存性プロテインキナーゼ（PKA）、cGMP依存性プロテインキナーゼ（PKG）、カルシウム依

50

存性プロテインキナーゼ、AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)、二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ、カゼインキナーゼ、リボソームタンパク質S6キナーゼ、Rafキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)などがあげられ、前記カルシウム依存性プロテインキナーゼとしては、ホスホリラーゼキナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼ、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ、リン脂質依存性プロテインキナーゼ(プロテインキナーゼC:PKC)などがあげられる。これらの中でも、細胞内における役割が解明されつつあり、疾患との関連が示唆されているPKA、AMPK、PKCなどが好ましい。

【0017】

本発明においてプロテインホスファターゼとは、リン酸化セリン/スレオニン残基、リン酸化チロシン残基またはリン酸化セリン/スレオニン/チロシン残基のリン酸エステル結合を加水分解する酵素をいい、好ましくはリン酸化セリン/スレオニン残基のリン酸エステル結合を加水分解する酵素である。具体的には、リン酸化されたセリン/スレオニン残基に特異的なホスファターゼとしては、PP1、PP2A、PP2BおよびPP2Cなどのホスファターゼがあげられる。これらは、それぞれ基質特異性や阻害剤に対する感受性、金属イオン要求性の違いによって分類されている。PP2Cは単量体酵素であるが、PP1、PP2AおよびPP2Bは、調節サブユニットと活性サブユニットで構成される複合体を形成し、細胞内での局在性は、その調節サブユニットとの相互作用により調節されていると言われている。タイプ2Bは、一般に、カルシニューリンともよばれている。一方、リン酸化されたチロシン残基を特異的に脱リン酸化するホスファターゼとしては、細胞膜貫通ドメインを持つ受容体型と、それらをもたない細胞質型が存在し、それぞれに分子構造や活性調節機構を異にする多様な分子種を含んでいる。またリン酸化されたセリン/スレオニン/チロシン残基を脱リン酸化するホスファターゼとしても、基質特異性を異にする複数の分子種が存在することが知られている。

【0018】

本発明において基質とは、プロテインキナーゼが認識するアミノ酸配列を含有するペプチドまたはタンパク質をいう。前記ペプチドまたはタンパク質を構成するアミノ酸としては、天然アミノ酸として知られるアミノ酸、アミノ酸もしくはアミノ酸に加えて、それらを化学的に修飾したもの、さらにはアミノ酸のアミノ基または水酸基とカルボキシル基やスルフォニル基やフォスフォリル基等を介してペプチド様化学結合を行うことが可能な分子量約800以下の化学構造を有する部分化学構造体もその範囲に含まれる。

【0019】

前記基質としては、人工的に適切なアミノ酸配列を設計、合成可能で、かつ、保存性および操作性に優れているペプチド基質が好ましい。

【0020】

本発明において天然に存在する基質とは、プロテインキナーゼの基質として知られているタンパク質を構成するアミノ酸配列の全部または一部からなるものをいい、セリン/スレオニン残基、好ましくはセリン/スレオニンキナーゼが認識してリン酸化可能なセリン/スレオニン残基を1つまたは複数含むアミノ酸配列からなるものである。天然に存在する基質におけるアミノ酸残基の数としては、5~タンパク質の全長のアミノ酸残基の数であり、好ましくは5~30、より好ましくは10~20である。

【0021】

本発明において人工ペプチド基質とは、前記天然に存在する基質に含まれるアミノ酸配列中のセリン残基をスレオニン残基に置換したものをいい、好ましくはセリン/スレオニンキナーゼが認識してリン酸化可能なセリン残基をスレオニン残基またはリン酸化スレオニン残基で置換したものである。人工ペプチド基質は、酵素の特異性や検出の容易性を担保するためには、セリン/スレオニンキナーゼが認識可能なセリン残基をスレオニン残基(またはリン酸化されたスレオニン残基)に置換した部位を1つ含むものであることが好ましい。人工ペプチド基質中のアミノ酸残基の数としては、セリン/スレオニンキナーゼが認識できる程度のペプチド長となれば特に限定されるものではないが、通常5~500

、好ましくは5～30、より好ましくは10～20である。

【0022】

なお、前記人工ペプチド基質は、前記天然に存在する基質から設計されたものであるから、天然に存在する基質中のセリン/スレオニンキナーゼが認識できる程度のアミノ酸残基からなるペプチド部分を含有していればよく、人工ペプチド基質および天然に存在する基質のアミノ酸残基の数が互いに一致する必要はない。

【0023】

本発明のプロテインキナーゼの基質群は、前記人工ペプチド基質を少なくとも1種含有することを特徴とする。「セリン/スレオニンキナーゼ」は、タンパク質性またはペプチド性基質のセリンおよび/またはスレオニン残基をリン酸化するが、セリン残基とスレオニン残基ではそれらの反応性に若干の差はあるものの共にリン酸化を受けるものと考えられる。そこで、本発明では、セリン/スレオニンキナーゼのリン酸化能を調べる目的のためにセリン/スレオニンキナーゼの基質として被リン酸化セリン残基をスレオニン残基に置換した人工ペプチド基質を用いる。あるいは、プロテインホスファターゼの脱リン酸化能を調べる目的のために、前記被リン酸化セリン残基をリン酸化スレオニン残基に置換した人工ペプチド基質を用いてもよい。

10

【0024】

本発明の基質群に含まれる基質の数は、前記人工ペプチド基質を少なくとも1種含有していれば特に限定されるものではないが、好ましくは、1～100000、より好ましくは2～50000、さらにより好ましくは10～5000である。かかる範囲内の基質群は、ペプチドアレイまたはペプチドチップとして、1個の担体上に固定化することが可能である。

20

【0025】

本発明の基質群は、そのすべてが前記人工ペプチド基質であってもよく、前記人工ペプチド基質と天然に存在する基質とを含んでもよく、本発明の検出方法等に用いる場合に、陽性対照および/または陰性対照となる人工ペプチド基質または天然の基質を含んでもよい。陽性対照および陰性対照となる人工ペプチド基質には、セリン残基をリン酸化スレオニン残基またはアラニン残基に置換した人工ペプチド基質も含まれる。

【0026】

人工ペプチド基質の具体的な配列は、配列番号11～299に記載のアミノ酸配列群から選択されるアミノ酸配列が好ましい。かかるアミノ酸配列を全部用いてもよく、あるいは、対象とするプロテインキナーゼに応じて適宜組み合わせ用いてもよい。

30

【0027】

本発明の人工ペプチド基質は、天然に存在する基質に含まれるアミノ酸配列中の被リン酸化セリン残基をスレオニン残基またはリン酸化スレオニン残基に置換することによって調製することができる。以下、かかる人工ペプチド基質配列の設計と調製方法について説明する。

【0028】

基質配列設計の方法としては、ゲノム情報またはタンパク質情報からセリン/スレオニンキナーゼの基質となるタンパク質の被リン酸化部位を含むペプチド断片を予測し抽出する。抽出したペプチド断片を、セリン/スレオニンキナーゼのペプチド性基質配列として既に知られているものをも含め、「ペプチド基質の基本配列」と定義して用いる。

40

【0029】

次に、前記ペプチド基質の基本配列の被リン酸化部位(セリン残基)を全てスレオニン残基に置換し、その他のアミノ酸残基は基本配列と同様にしてもよいし、適当な方法で一部のアミノ酸残基をさらに他のアミノ酸残基に置換してもよい。さらなる置換は、セリン/スレオニンキナーゼの人工ペプチド基質の製造、固定化等に有利な置換基を導入するために行われる。このように人工的に配列設計されたペプチドを、基質群(集合体あるいはペプチド基質ライブラリー)として供する。配列設計するペプチド配列は、化学合成の効率と活性発現を担保するために、40アミノ酸残基以下とすることが好ましい。

50

【0030】

前記ライブラリーには、被リン酸化部位をリン酸化スレオニンに置換した基質を少なくとも1種含有してもよい。リン酸化スレオニン置換した基質は、リン酸化の陽性対照となるばかりでなく、プロテインホスファターゼの基質ともなり、リン酸化/脱リン酸化を同時に検出することができるので好ましい。

【0031】

「配列設計されたペプチド性基質の集合体（ペプチド性基質ライブラリー）」は、一般的な化学的ペプチド合成方法（例えば、Fmoc法での固相合成等）により化学合成されて供与される。ここで重要な点は、天然に存在する被リン酸化部位としてのセリン残基を取ってスレオニン残基に置換して配列設計し、化学合成することである。

10

【0032】

上記の方法によって設計し化学合成した人工ペプチド基質を含有する基質群を、溶液状態または「固相状態」でセリン/スレオニンキナーゼによるリン酸化反応の基質として用いる。キナーゼ反応の生成物であるペプチド性リン酸化基質を抗リン酸化スレオニン抗体で認識させ検出することで、セリン/スレオニンキナーゼの種々の条件下での反応性を検出し測定することができる。逆に、ホスファターゼ反応の生成物である脱リン酸化基質が抗体で検出されなくなることで、プロテインホスファターゼの種々の条件下での反応性、好ましくはセリン/スレオニンキナーゼとの競合性を検出し測定することができる。

【0033】

ここでいう「固相状態」とは、ペプチド性基質を種々の固相担体に直接またはリンカーと呼ばれる適当な化学構造体を介して結合した状態をいう。固相担体としては、有機高分子もしくは無機高分子材料（プラスチック等）、ガラス、金属等で作製された平板、試験管（生化学分野で一般的にプレートと呼称されるものを含む）、薄膜、微粒子等を指す。

20

【0034】

「リンカー」としては、特に限定されるものではないが、例えば、酸素、窒素、硫黄またはリン原子を含む鎖状または環状構造を含む炭化水素基などがあげられる。

【0035】

「固相担体とペプチド性基質との直接またはリンカーを介した結合」としては、共有結合、静電的結合、水素結合、疎水結合、吸着、接着等が含まれる。当然ながら、生化学分野で96穴プレート、384穴プレート、1536穴プレートと一般的に呼ばれている実験器材にペプチド性基質を結合させたものやスライドガラスや金薄膜上に微細格子状にペプチド性基質を結合させたペプチドアレイも本発明における「固相状態」の範疇に含まれる。

30

【0036】

本発明においては、本発明の基質群を固定してなるペプチドアレイが好ましく用いられる。

【0037】

本発明のリン酸化および/または脱リン酸化反応を検出する方法は、前記ペプチドアレイおよび抗リン酸化スレオニン抗体を用いることを特徴とする。具体的には、前記ペプチドアレイを用いることで多様なセリン/スレオニンキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼの反応を行い、抗リン酸化スレオニン抗体を用いることで、多様なセリン/スレオニンキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼの反応性を幅広くかつ同時に検出する。

40

【0038】

前記抗リン酸化スレオニン抗体は、リン酸化スレオニン残基を認識するものであれば特に限定されるものではなく、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体でもよいが、基質の配列に限定されずにリン酸化スレオニン残基を認識する可能性が高いという観点から、ポリクローナル抗体が好ましい。かかる抗体は、公知の方法（Current Protocol in Molecular Biology, Chapter 11.12~11.13(2000); Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11

50

.11)により製造することができる。あるいは、市販の抗体の中から本発明の目的に合うものを適宜選択することもできる。好適な市販品の抗体としては、ポリクローナル抗リン酸化スレオニン抗体 (Zymed) などがあげられる。

【0039】

さらに、ポリクローナル抗リン酸化スレオニン抗体を用いれば、リン酸化スレオニン残基を含むペプチド性基質配列のみならずリン酸化セリン残基を含むペプチド性配列をも幅広く一般的に検出することが可能である。リン酸化セリン残基を含むペプチド配列に対する抗リン酸化セリン抗体の親和力は、抗リン酸化スレオニン抗体の親和力よりも低い傾向がある。

【0040】

反応性を検出する「プロテインキナーゼ」としては、生体試料から抽出した画分中に含まれるキナーゼ；遺伝子組み換えにより発現精製されたキナーゼ；プロテインキナーゼ遺伝子からタンパク質として発現されたプロテインキナーゼであって精製されることなく細胞抽出液もしくは細胞破砕液として適当な緩衝溶液に可溶化された状態のキナーゼ；細胞培養時に分子量約1000以下の化学物質（医薬品、生理活性化合物を含む）、ペプチド、核酸、糖鎖等を培地に添加して刺激を与えることで細胞状態を変化させて培養して得られる細胞抽出液もしくは細胞破砕液に含まれるキナーゼ；または種々の機能既知もしくは未知遺伝子を導入することで、細胞状態を変化させて培養して得られる細胞抽出液もしくは細胞破砕液に含まれるキナーゼなどがあげられる。

【0041】

反応性を検出する「プロテインホスファターゼ」としては、生体試料から抽出した画分中に含まれるホスファターゼ；遺伝子組み換えにより発現精製されたホスファターゼ；プロテインホスファターゼ遺伝子からタンパク質として発現されたプロテインホスファターゼであって精製されることなく細胞抽出液もしくは細胞破砕液として適当な緩衝溶液に可溶化された状態のホスファターゼ；細胞培養時に分子量約1000以下の化学物質（医薬品、生理活性化合物を含む）、ペプチド、核酸、糖鎖等を培地に添加して刺激を与えることで細胞状態を変化させて培養して得られる細胞抽出液もしくは細胞破砕液に含まれるホスファターゼ；または種々の機能既知もしくは未知遺伝子を導入することで、細胞状態を変化させて培養して得られる細胞抽出液もしくは細胞破砕液に含まれるホスファターゼなどがあげられる。

【0042】

本発明において、セリン/スレオニンキナーゼの基質配列内のセリン残基とスレオニン残基を互いに置換しあった配列を準備し、それらの反応性の違いを比較検討した結果、セリン/スレオニンキナーゼが基質ペプチド配列を認識する場合には、被リン酸化部位を含むある一定の周辺配列を認識し局所的な被リン酸化部位としてのセリンあるいはスレオニン残基の構造の違いを厳密に区別してはいないものと考えられる。

【0043】

本発明の検出方法は、本発明のペプチドアレイに前記検出対象の「セリン/スレオニンキナーゼ」および/または「プロテインホスファターゼ」を含む溶液を加えて、キナーゼ反応および/またはホスファターゼ反応が進行する条件下でインキュベートする。かかる工程を、以下、接触工程とも称する。前記条件は、検出対象のキナーゼまたはホスファターゼに応じて適宜設定することができるが、通常、0.05~0.5 mMのATP存在下、pH6.5~7.5、温度30~40 で、5分~24時間である。なお、プロテインキナーゼおよびプロテインホスファターゼの分子種は、いずれも大変多岐に渡るため、単独の阻害剤としては、それぞれの全ての分子種に対して十分に効果的な阻害効果を示す汎用的なものは見当たらない。したがって、キナーゼ反応のみを進行させる場合は、それぞれ特異性を異にする公知の複数の種類のプロテインホスファターゼ阻害剤を溶液中に共存させることが好ましく、また、ホスファターゼ反応のみを進行させる場合には、それぞれ特異性を異にする公知の複数の種類のキナーゼ阻害剤を溶液中に共存させることが好ましい。また、いずれの反応を行う場合でも、さらに公知のプロテアーゼ阻害剤を溶液中に

10

20

30

40

50

共存させることが好ましい。

【0044】

前記ホスファターゼ阻害剤としては、例えば、オカダ酸、カリキュリンA、トウトマイシンなどがあげられ、前記キナーゼ阻害剤としては、PKCに比較的特異性の高い Calphostin C、Hypericin、Phloretin、H-7等；PKAに比較的特異性の高いKT5720等；PTKに特異性の高いCurcumin、AG1024等；カルモジュリンキナーゼに特異性の高いHA1077、Lavendustin Cなどがあげられる。前記プロテアーゼ阻害剤としては、PMSEF (phenylmethanesulfonyl fluoride)、ロイペプチン (leupeptin)、アプロチニン (aprotinin)、ペプスタチン (pepstatin)、E-64、AEBSEF (4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride)、DFP (diisopropyl fluorophosphate)、ZPCKE (N-carbobenzoxy-L-phenylalanine chloromethyl ketone)などがあげられる。以上は例示的に挙げたにすぎず、今日では、数多くのホスファターゼ阻害剤、キナーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤が市販されているので、通常の知識を有する当業者であれば、それらの市販された特異性の異なる複数の試薬を適宜組み合わせることでカクテルとして使用することにより、容易に目的を達成することができる。

10

【0045】

次に、前記キナーゼおよび/またはホスファターゼ反応が終了した後、抗リン酸化スレオニン抗体を用いて、ペプチドアレイ上のリン酸化スレオニンの有無を検出する。

【0046】

検出手段としては、ペプチドアレイ上のリン酸化スレオニンに対する抗リン酸化スレオニン抗体の認識能を検出可能な適当な物理化学量に変換する手段をとる。具体的には、抗体を蛍光標識化することで蛍光強度に変換すること、化学発光色素を発する酵素を結合させた2次抗体(抗リン酸化スレオニン抗体の非可変部位を認識する)を用いて蛍光強度や吸光強度に変換すること、抗体結合による分子量増加分による表面プラズモン共鳴強度に変換すること等があげられる。

20

【0047】

例えば、マイクロタイタープレートを用いて作製したプレートアレイでセリン/スレオニンキナーゼの反応性を測定する手段は、「酵素結合抗体法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA)」である。このELISAを応用した本発明の検出方法を、より詳細に説明する。マイクロタイタープレートとしてアミノコートプレート(住友ベークライト、コーニング製)を用い、リンカー構造としてグルタルアルデヒドを介して本発明のペプチド基質群を固定化する。牛血清アルブミン等でブロッキング操作を行った後、対象とするセリン/スレオニンキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼによるリン酸化および/または脱リン酸化反応を固相上で行う。反応液を除いた後、洗浄操作を繰り返して、1次抗体としてポリクローナル抗リン酸化スレオニン抗体(Zymed)等でリン酸化スレオニン残基を認識させる。続いてホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合性2次抗体等で1次抗体を認識させ、ペルオキシダーゼ反応による発色を測定する。

30

【0048】

別の態様として、スライドガラスを用いて作製したペプチドアレイでのセリン/スレオニンキナーゼの反応性を測定する手段は、前記ELISAと同様である。ただし、酵素による発色反応を測定するのではなく、蛍光標識化された抗体を用いて蛍光強度を測定することが好ましい。より詳細に説明すると、ガラス表面がアミノ修飾されたDNAマイクロアレイ用スライドガラスを基本基板(例えば、松浪ガラス製高密度アミノ修飾スライドガラス)として用いる。これに対して、両末端にカルボン酸を有する直鎖型リンカーを活性エステルとし、基本基板に作用させる。その結果、ガラス表面に活性エステル基を有するスライドガラスが作製される。一方、ペプチド性基質のN末端にはシステイン残基を導入したものを合成し準備しておく。ペプチド性基質をリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解させ、DNAマイクロアレイ作製用アレイヤーで微細格子状に微量分注(約1nL/スポット)する。ガラス表面の活性エステルとペプチド性基質のN末端のシステイン残基が位置選択的に反応し、ペプチド性基質が微細格子状にスライドガラスに固定化される。過剰の

40

50

溶液を洗い流した後、大部分のガラス表面を占める活性エステルを化学的にブロックする。即ち、ブロック剤として適度に親水性と親油性とが制御された性質を持ち1級アミノ基を有する化学構造体を作製し、ペプチド性基質が微細格子状に固相化されたスライドガラス表面全体に作用させる。このことで、キナーゼまたはホスファターゼによるリン酸化/脱リン酸化反応と抗体反応が円滑に行われ得るペプチドマイクロアレイが作製される。作製されたマイクロアレイを、プレートアレイと同様に牛血清アルブミン等でブロックし、対象とするセリン/スレオニンキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼによるリン酸化/脱リン酸化反応をマイクロアレイ上で行う。反応液を除いた後、洗浄操作を繰り返し、蛍光標識化されたポリクローマル抗リン酸化スレオニン抗体 (Zymed) 等でリン酸化スレオニン残基を認識させる。過剰の抗体溶液を洗い流し乾燥させた後、DNAマイクロアレイ解析用蛍光スキャナーで蛍光強度を測定することで、対象とするセリン/スレオニンキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼの反応性を調べることが可能となる。

10

【0049】

本発明の検出方法において、プロテインホスファターゼの反応性は、抗リン酸化スレオニン抗体によって認識され得るリン酸化スレオニン残基に置換したペプチド性基質の量を、ホスファターゼの添加前後において比較定量することにより可能である。さらに、例えば、反応液にプロテインキナーゼとプロテインホスファターゼが共存することもあり得るが、この場合は両酵素が共に反応しうる条件下で、酵素間の競合反応を測定することも可能である。その際、それぞれの特異的な配列を有する基質について、前述の特定のキナーゼ阻害剤やホスファターゼ阻害剤を適宜添加した場合と無添加の場合の反応性を比較することによって、それらの酵素間の関係を詳細に解析できる可能性がある。

20

【0050】

本発明の検出方法により、

- (1) 単離精製されたセリン/スレオニンキナーゼのペプチド性基質を見いだすこと
 - (2) セリン/スレオニンキナーゼを適当な細胞で遺伝子から発現させ、単離精製することなく細胞抽出液のまま使用しペプチド性基質を見いだすこと
 - (3) 細胞培養の際に薬剤刺激、対象遺伝子の導入に対する細胞の応答や細胞機能変化をリン酸化反応変化として検出可能なペプチド性基質を見いだすこと
- が可能である。

30

【0051】

上記のペプチド性基質を見いだす際に、ペプチドアレイ上の多数のペプチド性基質は、単離精製セリン/スレオニンキナーゼ、遺伝子導入細胞の細胞抽出液、薬剤刺激細胞の細胞抽出液といったリン酸化条件に応答する形でリン酸化反応性を示し、あるパターンを与える。この得られたリン酸化パターンにより元の単離精製セリン/スレオニンキナーゼの機能、遺伝子導入に用いた遺伝子の機能、薬剤刺激をかけた刺激薬剤の機能を定義づけることが可能となる。ここでは、このような機能の定義づけを「リン酸化プロファイリング (Phosphorylation Profiling)」と称する。

【0052】

本発明のプロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼの活性化および/または不活化に基づく疾患の診断方法は、下記工程：
 被験者由来の生体試料からプロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼを含む画分を調製する工程；
 前記画分と前記ペプチドアレイとを接触させる工程；
 前記接触工程前後のペプチドアレイについて、抗リン酸化スレオニン抗体を用いてリン酸化ペプチドおよび/または脱リン酸化ペプチドを検出し、対照と比較する工程；ならびに前記比較結果に基づき、疾患の有無に応じて変化するプロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼ活性を判定する工程を含むことを特徴とする。

40

【0053】

50

前記診断対象となる疾患としては、癌、悪性腫瘍、糖尿病、糖尿病性合併症、代謝性疾患、リウマチや関節炎等の自己免疫疾患、免疫不全やアレルギー性疾患などの免疫異常疾患、アルツハイマー病、ハンチントン病、プリオン病などの神経変性疾患、肥大性心疾患、脳梗塞、心筋梗塞、肝硬変等の虚血性疾患、内分泌疾患、肝疾患、骨疾患等の様々な疾患があげられるが、これらに限定されない。

【0054】

被験者由来の生体試料としては、特に限定されるものではないが、血液、尿、粘膜、各種組織などがあげられる。

【0055】

前記生体試料からプロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼを含む画分の調製は、自体公知のタンパク質の精製方法により行うことができる。生体試料が細胞の場合、細胞抽出液、細胞膜画分、細胞質画分、細胞核画分などの調製が可能である。

10

【0056】

前記画分と前記ペプチドアレイとの接触工程は、前記本発明の検出方法で記載したとおりである。

【0057】

前記接触工程前後のペプチドアレイについて、抗リン酸化スレオニン抗体を用いてリン酸化ペプチドおよび/または脱リン酸化ペプチドを検出する工程は、前記したとおりである。

【0058】

次に、比較工程において、前記検出工程で得られた結果を対照と比較する。ここで、対照としては、正常者由来の生体試料を被験者由来の生体試料の場合と同様にして前記検出工程に供して得られた結果；予め正常範囲となる基準のリン酸化または脱リン酸化を決定しておいた基準などがあげられる。比較結果は、特定の基質のリン酸化または脱リン酸化の有無として得られる。それぞれの基質のリン酸化または脱リン酸化の有無と疾患との関連を調べることにより、疾患の有無で反応性の異なっている特定の基質のアミノ酸配列を同定することが可能となる。そして、タンパク質配列データベースが整備されてきた今日では、それらの配列をクエリーとして既存の配列データベースをホモロジーサーチすることによって、当該配列に相当する部分配列を含むタンパク質を同定し、その実態を解明できる可能性がある。それらの疾患関連タンパク質は、特定のプロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼが作用する標的として機能しており、例えば、治療薬開発におけるスクリーニング系に利用できる可能性がある。

20

30

【0059】

最後に、判定工程において、前記比較結果に基づき、疾患の有無に応じて変化するプロテインキナーゼおよび/またはプロテインホスファターゼ活性を判定する。ここで、あらかじめ精製されたプロテインキナーゼまたはフォスファターゼによる同一基質群の反応性を確認しておくことで、疾患の有無で反応性が変化しているプロテインキナーゼまたはフォスファターゼを同定することが可能となる場合も有り得る。

【0060】

これまでに特定の疾患と特定のタンパク質のリン酸化との関連については、多くの研究がなされているが、それらを制御するキナーゼやフォスファターゼの実態については、必ずしも明確になっていない場合が多い。例えば、アルツハイマー病においては、tau タンパク質の過剰かつ異常なリン酸化が神経変性の引き金となることを示唆する報告が多いが、実際にどのような制御因子がtau タンパク質のリン酸化に関与しているかについては、諸説あって未だに解明されていない。また、Pin 1タンパク質のリン酸化と神経変性疾患との関連や、p53 や Myc、EGFRのリン酸化と癌、悪性腫瘍との関連を示唆する報告も多いが、リン酸化の生理的意味については、必ずしもよく理解されてはいない。本発明の方法は、プロテオーム技術の網羅的方法として利用されることにより、これらの疾患特異的な重要な分子メカニズムを解明する上での有力な手段を提供することができる。

40

【0061】

50

本発明のプロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ活性を変動させる被検物質のスクリーニング方法は、下記工程：

プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼおよび被検物質を含む試料と、前記ペプチドアレイとを接触させる工程；

前記接触工程前後のペプチドアレイについて、抗リン酸化スレオニン抗体を用いてリン酸化ペプチドおよび/または脱リン酸化ペプチドを検出し、前記検出結果と被検物質を含まない試料における検出結果とを比較する工程；

被検物質の有無により変化するプロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ活性を判定する工程

を含むことを特徴とする。

10

【0062】

前記被検物質としては、いかなる公知物質および新規物質であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、タンパク質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分などがあげられる。

【0063】

プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼおよび被検物質を含む試料としては、生体試料から抽出した画分中に含まれるキナーゼまたはホスファターゼに被検物質を添加したもの；遺伝子組み換えにより発現精製されたキナーゼまたはホスファターゼに被検物質を添加した試料；プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ遺伝子からタンパク質として発現されたキナーゼまたはホスファターゼであって精製されることなく細胞抽出液もしくは細胞破碎液として適当な緩衝溶液に可溶化された状態のキナーゼまたはホスファターゼに被検物質を添加した試料；細胞培養時に被検物質を培地に添加して刺激を与えることで細胞状態を変化させて培養して得られる細胞抽出液もしくは細胞破碎液中に含まれるキナーゼまたはホスファターゼ；または種々の機能既知もしくは未知遺伝子を導入することで、細胞状態を変化させて培養して得られる細胞抽出液もしくは細胞破碎液に含まれるキナーゼまたはホスファターゼに被検物質を添加した試料などがあげられる。

20

【0064】

プロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼおよび被検物質を含む試料と、ペプチドアレイとの接触工程は、前記本発明の検出方法に記載したとおりである。

30

【0065】

プロテインキナーゼ活性を変動させる被検物質のスクリーニング方法の場合、ペプチドアレイにはスレオニン残基を含むペプチド基質を固定させ、陽性対照としてリン酸化スレオニン残基を含むペプチド基質を固定させたものを用いることが好ましい。次いで、検出工程において、接触工程前後のペプチドアレイについて抗リン酸化スレオニン抗体を用いてリン酸化ペプチドを定性的または定量的に検出し、比較工程において、前記検出結果と被検物質を含まない試料における検出結果とを比較する。

【0066】

プロテインホスファターゼ活性を変動させる被検物質のスクリーニング方法の場合、ペプチドアレイにはリン酸化スレオニン残基を含むペプチド基質を固定させ、陽性対照としてスレオニン残基を含むペプチド基質を固定させたものを用いることが好ましい。次いで、検出工程において、接触工程前後のペプチドアレイについて抗リン酸化スレオニン抗体を用いたリン酸化ペプチドの検出を介して、脱リン酸化により検出されなくなったペプチド基質を定性的または定量的に検出し、比較工程において、前記検出結果と被検物質を含まない試料における検出結果とを比較する。

40

【0067】

最後に、判定工程において、被検物質の有無により変化するプロテインキナーゼまたはプロテインホスファターゼ活性を判定する。プロテインキナーゼ活性は、抗リン酸化スレ

50

オニン抗体により検出されるペプチド基質の数および検出強度で示すことができる。プロテインホスファターゼ活性は、抗リン酸化スレオニン抗体により検出されなくなったペプチド基質の数および検出強度で示すことができる。

【0068】

前記判定工程において、プロテインキナーゼ活性が促進されている場合、被検物質は、プロテインキナーゼの活性化を介した疾患の治療剤の候補として選択することができる。プロテインキナーゼ活性が阻害されている場合、被検物質は、プロテインキナーゼ活性の抑制化を介した疾患の治療剤の候補として選択することができる。被検物質は、プロテインキナーゼ調節剤または研究用試薬としても有用である。あるいは、前記判定工程において、プロテインホスファターゼ活性が促進されている場合、被検物質は、プロテインホスファターゼの活性化を介した疾患の治療剤の候補として選択することができる。プロテインホスファターゼ活性が阻害されている場合、被検物質は、プロテインホスファターゼ活性の抑制化を介した疾患の治療剤の候補として選択することができる。被検物質は、プロテインホスファターゼ調節剤または研究用試薬としても有用である。

10

【実施例】

【0069】

次に、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。なお、本実施例において市販のキットあるいは試薬を用いた部分については、特に断りのない限り添付のプロトコールに従って実験を行った。本実施例で汎用的に使用した試薬、培地、緩衝溶液を以下に記す。

20

【0070】

ペプチド基質

被リン酸化部位としてスレオニンまたはセリン残基を含みN末端にシステイン残基を含む10から18アミノ酸からなるペプチド配列を通常のFmoc法による化学合成を行い使用した。

以下の10配列は、合成した粗精製品を逆相クロマトグラフにより精製を行い使用した。pS⁺はリン酸化セリン残基、pT⁺はリン酸化スレオニン残基を示す。

【0071】

P K A 用基質ペプチド

Kemptide(A): CGGLRRAALG-NH₂ (配列番号1)
 Kemptide(S): CGGLRRASLG-NH₂ (配列番号2)
 Kemptide(T): CGGLRRATLG-NH₂ (配列番号3)
 Kemptide(pS⁺): CGGLRRA(pS⁺)LG-NH₂ (配列番号4)
 Kemptide(pT⁺): CGGLRRA(pT⁺)LG-NH₂ (配列番号5)

30

A M P K 用基質ペプチド

SAMA: CGGHMRSAMAGLHLVKRR-NH₂ (配列番号6)
 SAMT: CGGHMRSAMTGLHLVKRR-NH₂ (配列番号7)

P K C 用基質ペプチド

IQAA: CGGAAKIQAAFRGHMARKK-NH₂ (配列番号8)
 IQAT: CGGAAKIQATFRGHMARKK-NH₂ (配列番号9)
 IQA(pT⁺): CGGAAKIQA(pT⁺)FRGHMARKK-NH₂ (配列番号10)

40

【0072】

以下に示す289配列は、合成した粗精製品を精製することなく使用した。pTはリン酸化されていてもよいスレオニン残基を示す。

PT001: CGGHMRSAM(pT)GLHLVKRR (配列番号11)
 PT002: CGGAMARAA(pT)AAALARRR (配列番号12)
 PT003: CGGHQKFLQ(pT)FAGSPLY (配列番号13)
 PT004: CGGKSGELLA(pT)WAGSPPY (配列番号14)
 PT005: CGGKSGEPLS(pT)WAGSPPY (配列番号15)
 PT006: CGGQKDKFLQ(pT)FAGSPLY (配列番号16)

50

PT007: CGGSDGEFLR(pT)SAGSPNY	(配列番号 1 7)	
PT008: CGGTFGNKLD(pT)FAGSPPY	(配列番号 1 8)	
PT009: CGGTLGSKLD(pT)FAGSPPY	(配列番号 1 9)	
PT010: CGGTVGGKLD(pT)FAGSPPY	(配列番号 2 0)	
PT011: CGGTVGNKLD(pT)FAGSPPY	(配列番号 2 1)	
PT012: CGGVGDSLLE(pT)SAGSPHY	(配列番号 2 2)	
PT013: CGGKSAEPLS(pT)WAGSPPY	(配列番号 2 3)	
PT014: CGGVGDSLFE(pT)SAGSPHY	(配列番号 2 4)	
PT015: CGGTVGGKID(pT)FAGSPPY	(配列番号 2 5)	
PT016: CGGKSGEPLS(pT)WAGSPPH	(配列番号 2 6)	10
PT017: CGGTLGSKLD(pT)FAGNPPY	(配列番号 2 7)	
PT018: CGGTVAGKLD(pT)FAGSPPY	(配列番号 2 8)	
PT019: CGGVGDSLLE(pT)SAGSPHH	(配列番号 2 9)	
PT020: CGGVGDSLLE(pT)SAASPHY	(配列番号 3 0)	
PT021: CGGYQKFLQ(pT)FAGSPLY	(配列番号 3 1)	
PT022: CGGKSGELLA(pT)WSGSPPY	(配列番号 3 2)	
PT023: CGGSDGEFLR(pT)TAGSPNY	(配列番号 3 3)	
PT024: CGGKSGDPLS(pT)WAGSPPY	(配列番号 3 4)	
PT025: CGGTFGNKLD(pT)FAGSPPF	(配列番号 3 5)	
PT026: CGGTVANKLD(pT)FAGSPPY	(配列番号 3 6)	20
PT027: CGGKSGEPLS(pT)WAGTPPY	(配列番号 3 7)	
PT028: CGGKSGEPLS(pT)LAGSPPY	(配列番号 3 8)	
PT029: CGGTIGNKLD(pT)FAGSPPY	(配列番号 3 9)	
PT030: CGGSDGEFLK(pT)SAGSPNY	(配列番号 4 0)	
PT031: CGGTLGSKLD(pT)FAGSPAY	(配列番号 4 1)	
PT032: CGGSDGEFLR(pT)SAGSPNF	(配列番号 4 2)	
PT033: CGGKSGELLA(pT)WAASPPY	(配列番号 4 3)	
PT034: CGGTVGNKLD(pT)LAGSPPY	(配列番号 4 4)	
PT035: CGGKSGEPLT(pT)WAGSPPY	(配列番号 4 5)	
PT036: CGGHQKFLQ(pT)FAGSPLH	(配列番号 4 6)	30
PT037: CGGTVGGKLD(pT)FAASPPY	(配列番号 4 7)	
PT038: CGGHQKFLQ(pT)IAGSPLY	(配列番号 4 8)	
PT039: CGGKSAELLA(pT)WAGSPPY	(配列番号 4 9)	
PT040: CGGKTGELLA(pT)WAGSPPY	(配列番号 5 0)	
PT041: CGGQKDKFLQ(pT)FAGSALY	(配列番号 5 1)	
PT042: CGGQKDKFIQ(pT)FAGSPLY	(配列番号 5 2)	
PT043: CGGTVGGKLD(pT)FAGNPPY	(配列番号 5 3)	
PT044: CGGTLGGKLD(pT)FAGSPPY	(配列番号 5 4)	
PT045: CGGHQKLLQ(pT)FAGSPLY	(配列番号 5 5)	
PT046: CGGKSGEPLS(pT)WAGSPPF	(配列番号 5 6)	40
PT047: CGGTFGNKLD(pT)LAGSPPY	(配列番号 5 7)	
PT048: CGGVGDSLLE(pT)SAGSPYY	(配列番号 5 8)	
PT049: CGGQKDRFLQ(pT)FAGSPLY	(配列番号 5 9)	
PT050: CGGVGDSLLE(pT)SAGSPHF	(配列番号 6 0)	
PT051: CGGTVGGKLD(pT)FAGSPAY	(配列番号 6 1)	
PT052: CGGHQKFLQ(pT)FAGSPFY	(配列番号 6 2)	
PT053: CGGSVGKLD(pT)FAGSPPY	(配列番号 6 3)	
PT054: CGGTVGGKLD(pT)FAGSAPY	(配列番号 6 4)	
PT055: CGGVGDSLVE(pT)SAGSPHY	(配列番号 6 5)	
PT056: CGGKSGEPLS(pT)WAASPPY	(配列番号 6 6)	50

PT057:	CGGTLGSKLE (pT) FAGSPPY	(配列番号 6 7)	
PT058:	CGGSDGEFLR (pT) SAGSANY	(配列番号 6 8)	
PT059:	CGGSDGELLR (pT) SAGSPNY	(配列番号 6 9)	
PT060:	CGGRSGEPLS (pT) WAGSPPY	(配列番号 7 0)	
PT061:	CGGHQKFLQ (pT) FAGSPIY	(配列番号 7 1)	
PT062:	CGGTFGNKLD (pT) FAGSAPY	(配列番号 7 2)	
PT063:	CGGQKDKFLQ (pT) FAGSPVY	(配列番号 7 3)	
PT064:	CGGKSGELLA (pT) LAGSPPY	(配列番号 7 4)	
PT065:	CGGKTGEPLS (pT) WAGSPPY	(配列番号 7 5)	
PT066:	CGGTVGGKLD (pT) FAGTPPY	(配列番号 7 6)	10
PT067:	CGGSDGEFLR (pT) SAGTPNY	(配列番号 7 7)	
PT068:	CGGQKDKFLQ (pT) FSGSPLY	(配列番号 7 8)	
PT069:	CGGIGDSLLE (pT) SAGSPHY	(配列番号 7 9)	
PT070:	CGGQKDKFFQ (pT) FAGSPLY	(配列番号 8 0)	
PT071:	CGGVGDSLLE (pT) TAGSPHY	(配列番号 8 1)	
PT072:	CGGTFGNKLD (pT) FAGSPAY	(配列番号 8 2)	
PT073:	CGGVGDSLLE (pT) SAGSAHY	(配列番号 8 3)	
PT074:	CGGTLGSKLD (pT) FAGSAPY	(配列番号 8 4)	
PT075:	CGGAGDSLLE (pT) SAGSPHY	(配列番号 8 5)	
PT076:	CGGQKDKFLQ (pT) FAGSPFY	(配列番号 8 6)	20
PT077:	CGGVGDSILE (pT) SAGSPHY	(配列番号 8 7)	
PT078:	CGGQKDKILQ (pT) FAGSPLY	(配列番号 8 8)	
PT079:	CGGLGDSLLE (pT) SAGSPHY	(配列番号 8 9)	
PT080:	CGGQKDKFLQ (pT) LAGSPLY	(配列番号 9 0)	
PT081:	CGGQKDKFLQ (pT) FAASPLY	(配列番号 9 1)	
PT082:	CGGHQKFLQ (pT) FAGSPVY	(配列番号 9 2)	
PT083:	CGGQKDKFLQ (pT) FAGSPLH	(配列番号 9 3)	
PT084:	CGGVGESLLE (pT) SAGSPHY	(配列番号 9 4)	
PT085:	CGGVGDSLLE (pT) SAGSPRY	(配列番号 9 5)	
PT086:	CGGSDGEFLR (pT) SAGSPNH	(配列番号 9 6)	30
PT087:	CGGHQKILQ (pT) FAGSPLY	(配列番号 9 7)	
PT088:	CGGSEGEFLR (pT) SAGSPNY	(配列番号 9 8)	
PT089:	CGGKSGELVA (pT) WAGSPPY	(配列番号 9 9)	
PT090:	CGGHQKFLQ (pT) FAGSPLF	(配列番号 1 0 0)	
PT091:	CGGQKDKFVQ (pT) FAGSPLY	(配列番号 1 0 1)	
PT092:	CGGKSGDLLA (pT) WAGSPPY	(配列番号 1 0 2)	
PT093:	CGGSDAEFLR (pT) SAGSPNY	(配列番号 1 0 3)	
PT094:	CGGVGDSLLED (pT) SAGSPHY	(配列番号 1 0 4)	
PT095:	CGGSDGEFLR (pT) SAASPNY	(配列番号 1 0 5)	
PT096:	CGGTFGNKLE (pT) FAGSPPY	(配列番号 1 0 6)	40
PT097:	CGGQRDKFLQ (pT) FAGSPLY	(配列番号 1 0 7)	
PT098:	CGGHQAKFLQ (pT) FAGSPLY	(配列番号 1 0 8)	
PT099:	CGGQKDKFLQ (pT) FAGNPLY	(配列番号 1 0 9)	
PT100:	CGGQKDKFLQ (pT) FAGTPLY	(配列番号 1 1 0)	
PT101:	CGGQKEKFLQ (pT) FAGSPLY	(配列番号 1 1 1)	
PT102:	CGGHQKFLQ (pT) FAGNPLY	(配列番号 1 1 2)	
PT103:	CGGSDGEFVR (pT) SAGSPNY	(配列番号 1 1 3)	
PT104:	CGGHQKFLQ (pT) FAGSPLY	(配列番号 1 1 4)	
PT105:	CGGKSGEPLS (pT) WAGSPAY	(配列番号 1 1 5)	
PT106:	CGGVGNLLE (pT) SAGSPHY	(配列番号 1 1 6)	50

PT107:	CGGKSGEPVS (pT)WAGSPPY	(配列番号 1 1 7)	
PT108:	CGGVADSLLE (pT)SAGSPHY	(配列番号 1 1 8)	
PT109:	CGGVGDSLLE (pT)SAGTPHY	(配列番号 1 1 9)	
PT110:	CGGKSGELLV (pT)WAGSPPY	(配列番号 1 2 0)	
PT111:	CGGVGDSVLE (pT)SAGSPHY	(配列番号 1 2 1)	
PT112:	CGGHQKFLQ (pT)FAGSALY	(配列番号 1 2 2)	
PT113:	CGGHQKFLQ (pT)LAGSPLY	(配列番号 1 2 3)	
PT114:	CGGQKDKFLQ (pT)IAGSPLY	(配列番号 1 2 4)	
PT115:	CGGHQKFLQ (pT)FAGTPLY	(配列番号 1 2 5)	
PT116:	CGGHQKFLQ (pT)FSGSPLY	(配列番号 1 2 6)	10
PT117:	CGGKSGELLA (pT)WAGTPPY	(配列番号 1 2 7)	
PT118:	CGGKNGELLA (pT)WAGSPPY	(配列番号 1 2 8)	
PT119:	CGGTVGKLE (pT)FAGSPPY	(配列番号 1 2 9)	
PT120:	CGGKSGEPLS (pT)WSGSPPY	(配列番号 1 3 0)	
PT121:	CGGKSGEPLS (pT)WAGSAPY	(配列番号 1 3 1)	
PT122:	CGGKSGELLA (pT)WAGSPPF	(配列番号 1 3 2)	
PT123:	CGGQKDKLLQ (pT)FAGSPLY	(配列番号 1 3 3)	
PT124:	CGGQKDKFLQ (pT)FAGSPLF	(配列番号 1 3 4)	
PT125:	CGGHQGRFLQ (pT)FAGSPLY	(配列番号 1 3 5)	
PT126:	CGGHQKFLQ (pT)FAASPLY	(配列番号 1 3 6)	20
PT127:	CGGQKDKFLQ (pT)FAGSPIY	(配列番号 1 3 7)	
PT128:	CGGKSGELLA (pT)WAGSPAY	(配列番号 1 3 8)	
PT129:	CGGVGDSLLE (pT)SSGSPHY	(配列番号 1 3 9)	
PT130:	CGGKSGELLA (pT)WAGSAPY	(配列番号 1 4 0)	
PT131:	CGGHQKFLQ (pT)SAGSPHY	(配列番号 1 4 1)	
PT132:	CGGKSGELLA (pT)FAGSPLY	(配列番号 1 4 2)	
PT133:	CGGTVGNKLD (pT)SAGSPHY	(配列番号 1 4 3)	
PT134:	CGGKSGEPLS (pT)SAGSPHY	(配列番号 1 4 4)	
PT135:	CGGVGDSLLE (pT)SAGSPNY	(配列番号 1 4 5)	
PT136:	CGGLALHIRS (pT)WSGLHLV	(配列番号 1 4 6)	30
PT137:	CGGLHIRSSW (pT)GLHLVKQ	(配列番号 1 4 7)	
PT138:	CGGLEMVKAA (pT)ETNLPLL	(配列番号 1 4 8)	
PT139:	CGGHNMLDDS (pT)DPILTTI	(配列番号 1 4 9)	
PT140:	CGGYRYPRPA (pT)VPPSPSL	(配列番号 1 5 0)	
PT141:	CGGPSLSRHS (pT)PHQSEDE	(配列番号 1 5 1)	
PT142:	CGGSSGSPAN (pT)FHFKEAW	(配列番号 1 5 2)	
PT143:	CGGSPRVRTL (pT)GSRPPLL	(配列番号 1 5 3)	
PT144:	CGGNLMLDRL (pT)GKILHID	(配列番号 1 5 4)	
PT145:	CGGVTHTFSG (pT)IEYMAPE	(配列番号 1 5 5)	
PT146:	CGGVTHTFAG (pT)IEYMAPE	(配列番号 1 5 6)	40
PT147:	CGGSQFDSKF (pT)RQTPVDS	(配列番号 1 5 7)	
PT148:	CGGNQVFLGF (pT)YVAPSVL	(配列番号 1 5 8)	
PT149:	CGGEPMRRSV (pT)EAALAQP	(配列番号 1 5 9)	
PT150:	CGGWTEKKQ (pT)FKQTGEF	(配列番号 1 6 0)	
PT151:	CGGEPLERRL (pT)LVPDSEQ	(配列番号 1 6 1)	
PT152:	CGGRVPTMRP (pT)MSGLHLV	(配列番号 1 6 2)	
PT153:	CGGPTMRPSM (pT)GLHLVKR	(配列番号 1 6 3)	
PT154:	CGGKTPNLRM (pT)EKKSSWA	(配列番号 1 6 4)	
PT155:	CGGLNVESVS (pT)HRERSED	(配列番号 1 6 5)	
PT156:	CGGLNVESVA (pT)HRERSED	(配列番号 1 6 6)	50

PT157: CGGNPLMRRN(pT)VTPLASP	(配列番号 1 6 7)	
PT158: CGGPLASPEP(pT)KKPRINS	(配列番号 1 6 8)	
PT159: CGGEPSPRAPA(pT)LLPPAPE	(配列番号 1 6 9)	
PT160: CGGYYSIKR(pT)GSQAHEQ	(配列番号 1 7 0)	
PT161: CGGWRKRKE(pT)SNTDSAG	(配列番号 1 7 1)	
PT162: CGGVEDPPAP(pT)EPVAVEQ	(配列番号 1 7 2)	
PT163: CGGPQLLRLL(pT)TLAEEPR	(配列番号 1 7 3)	
PT164: CGGTSRIRTQ(pT)FSLQERQ	(配列番号 1 7 4)	
PT165: CGGHFAI AAD(pT)EAEQDSW	(配列番号 1 7 5)	
PT166: CGGSGDYMPM(pT)PKSVSAP	(配列番号 1 7 6)	10
PT167: CGGQHLRLST(pT)SGRLLYA	(配列番号 1 7 7)	
PT168: CGGPLGSGES(pT)STRRSSE	(配列番号 1 7 8)	
PT169: CGGQHLRLST(pT)SGRILYA	(配列番号 1 7 9)	
PT170: CGGTSRIRTQ(pT)ISLQERQ	(配列番号 1 8 0)	
PT171: CGGNKRSRTR(pT)DTYSAGQ	(配列番号 1 8 1)	
PT172: CGGDSLPPSP(pT)TATPHSQ	(配列番号 1 8 2)	
PT173: CGGSHMVHNR(pT)KINLQDL	(配列番号 1 8 3)	
PT174: CGGRSRTRTD(pT)YSAGQSI	(配列番号 1 8 4)	
PT175: CGGPTMRPSM(pT)GLHLVRR	(配列番号 1 8 5)	
PT176: CGGLHIRSSW(pT)GLHLLKQ	(配列番号 1 8 6)	20
PT177: CGGLHIRSSW(pT)GLYLVKQ	(配列番号 1 8 7)	
PT178: CGGQHLRVST(pT)SGRLLYA	(配列番号 1 8 8)	
PT179: CGGDTLPSSP(pT)SATPHSQ	(配列番号 1 8 9)	
PT180: CGGTSRIRTQ(pT)FSFQERQ	(配列番号 1 9 0)	
PT181: CGGNPLMRRN(pT)VTPLANP	(配列番号 1 9 1)	
PT182: CGGSHMFHNR(pT)KINLQDL	(配列番号 1 9 2)	
PT183: CGGLHIRSSW(pT)GLHVVKQ	(配列番号 1 9 3)	
PT184: CGGRSRTRTD(pT)YTAGQSV	(配列番号 1 9 4)	
PT185: CGGQHLRLST(pT)SGRLIYA	(配列番号 1 9 5)	
PT186: CGGQHLRLST(pT)SGRLLYG	(配列番号 1 9 6)	30
PT187: CGGPTMKPSM(pT)GLHLVKR	(配列番号 1 9 7)	
PT188: CGGTSRIRTQ(pT)FSLQERQ	(配列番号 1 9 8)	
PT189: CGGLHIRSSW(pT)GLHLVRQ	(配列番号 1 9 9)	
PT190: CGGESLPSSP(pT)SATPHSQ	(配列番号 2 0 0)	
PT191: CGGTSRIRTQ(pT)FTLQERQ	(配列番号 2 0 1)	
PT192: CGGSHMIHNR(pT)KINIQDL	(配列番号 2 0 2)	
PT193: CGGNPLMRRN(pT)VTPLGSP	(配列番号 2 0 3)	
PT194: CGGQHLRLTT(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 0 4)	
PT195: CGGNPFMRRN(pT)VTPLASP	(配列番号 2 0 5)	
PT196: CGGDSIPSSP(pT)SATPHSQ	(配列番号 2 0 6)	40
PT197: CGGSHMIHNR(pT)KVNQDL	(配列番号 2 0 7)	
PT198: CGGATMRPSM(pT)GLHLVKR	(配列番号 2 0 8)	
PT199: CGGLHIRSSW(pT)ALHLVKQ	(配列番号 2 0 9)	
PT200: CGGQRLRLST(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 1 0)	
PT201: CGGNPVMRRN(pT)VTPLASP	(配列番号 2 1 1)	
PT202: CGGNPLMRRN(pT)VNPLASP	(配列番号 2 1 2)	
PT203: CGGQHLRLST(pT)SGRVLVA	(配列番号 2 1 3)	
PT204: CGGQHLRLST(pT)SGRVLVA	(配列番号 2 1 4)	
PT205: CGGNPLMRRN(pT)VTPIASP	(配列番号 2 1 5)	
PT206: CGGNPLLRN(pT)VTPLASP	(配列番号 2 1 6)	50

PT207: CGGPSMRPSM(pT)GLHLVKR	(配列番号 2 1 7)	
PT208: CGGPTMRPSM(pT)GFHLVKR	(配列番号 2 1 8)	
PT209: CGGLHIRTSW(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 1 9)	
PT210: CGGDSVPSSP(pT)SATPHSQ	(配列番号 2 2 0)	
PT211: CGGNPLMRRN(pT)ATPLASP	(配列番号 2 2 1)	
PT212: CGGQHLRLST(pT)TGRLLYA	(配列番号 2 2 2)	
PT213: CGGDSLPPSSP(pT)SATAHSQ	(配列番号 2 2 3)	
PT214: CGGPTMRPSL(pT)GLHLVKR	(配列番号 2 2 4)	
PT215: CGGPTMRASM(pT)GLHLVKR	(配列番号 2 2 5)	
PT216: CGGQHFRLLST(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 2 6)	10
PT217: CGGDSLPPSSP(pT)SATPHNQ	(配列番号 2 2 7)	
PT218: CGGLHIRSSW(pT)GLHLAKQ	(配列番号 2 2 8)	
PT219: CGGLHIRSNW(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 2 9)	
PT220: CGGQYLRLST(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 3 0)	
PT221: CGGQHLHLST(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 3 1)	
PT222: CGGTSRIRTQ(pT)FSLQDRQ	(配列番号 2 3 2)	
PT223: CGGSHMIHMK(pT)KINLQDL	(配列番号 2 3 3)	
PT224: CGGLRIRSSW(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 3 4)	
PT225: CGGSHMIHNR(pT)RINLQDL	(配列番号 2 3 5)	
PT226: CGGVHIRSSW(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 3 6)	20
PT227: CGGLHIRSSW(pT)GLRLVKQ	(配列番号 2 3 7)	
PT228: CGGNPLMRRN(pT)VSPLASP	(配列番号 2 3 8)	
PT229: CGGQHLRLST(pT)SGRLLHA	(配列番号 2 3 9)	
PT230: CGGQHLRLSS(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 4 0)	
PT231: CGGNKRSRTK(pT)DSYSAGQ	(配列番号 2 4 1)	
PT232: CGGQHIRLST(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 4 2)	
PT233: CGGNPIMRRN(pT)VTPLASP	(配列番号 2 4 3)	
PT234: CGGQHLRLST(pT)SGRFLYA	(配列番号 2 4 4)	
PT235: CGGSHMIHNR(pT)KINVQDL	(配列番号 2 4 5)	
PT236: CGGDSLPPSSP(pT)SATPYSQ	(配列番号 2 4 6)	30
PT237: CGGSYMIHNR(pT)KINLQDL	(配列番号 2 4 7)	
PT238: CGGQHILRFST(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 4 8)	
PT239: CGGTSRIRTQ(pT)FSLQEHQ	(配列番号 2 4 9)	
PT240: CGGNKRSRTR(pT)DSYSGGQ	(配列番号 2 5 0)	
PT241: CGGEAMRRSV(pT)EAALAQP	(配列番号 2 5 1)	
PT242: CGGPTMRPSM(pT)GLRLVKR	(配列番号 2 5 2)	
PT243: CGGQHLRLST(pT)SGRLLFA	(配列番号 2 5 3)	
PT244: CGGDSLPTSP(pT)SATPHSQ	(配列番号 2 5 4)	
PT245: CGGTHMIHNR(pT)KINLQDL	(配列番号 2 5 5)	
PT246: CGGRSRTRTD(pT)YSAGQSL	(配列番号 2 5 6)	40
PT247: CGGQHLRLST(pT)SGHLLYA	(配列番号 2 5 7)	
PT248: CGGLHVRSSW(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 5 8)	
PT249: CGGLHIRSSW(pT)GLHLIKQ	(配列番号 2 5 9)	
PT250: CGGLHIRSSW(pT)GFHLVKQ	(配列番号 2 6 0)	
PT251: CGGSHMIHNR(pT)KINFQDL	(配列番号 2 6 1)	
PT252: CGGPTMRPSM(pT)GLHLVKK	(配列番号 2 6 2)	
PT253: CGGPTMRPSM(pT)GVHLVKR	(配列番号 2 6 3)	
PT254: CGGTNRLRSE(pT)IAFIEEN	(配列番号 2 6 4)	
PT255: CGGPTLRPSM(pT)GLHLVKR	(配列番号 2 6 5)	
PT256: CGGPTMRPNM(pT)GLHLVKR	(配列番号 2 6 6)	50

PT257: CGGQHVRLST(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 6 7)	
PT258: CGGLHIKSSW(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 6 8)	
PT259: CGGLHIRSSW(pT)GVHLVKQ	(配列番号 2 6 9)	
PT260: CGGDSLPPSS(pT)SATPHTQ	(配列番号 2 7 0)	
PT261: CGGDSLPPSSA(pT)SATPHSQ	(配列番号 2 7 1)	
PT262: CGGLHIRSSL(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 7 2)	
PT263: CGGNPLMRRN(pT)VTPLVSP	(配列番号 2 7 3)	
PT264: CGGLHIRSSW(pT)GLHIVKQ	(配列番号 2 7 4)	
PT265: CGGLHIRSTW(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 7 5)	
PT266: CGGPTMRPSM(pT)GIHLVKR	(配列番号 2 7 6)	10
PT267: CGGPTMRPSM(pT)GLHVVKR	(配列番号 2 7 7)	
PT268: CGGQHLRIST(pT)SGRLLYA	(配列番号 2 7 8)	
PT269: CGGQHLRLST(pT)SARLLYA	(配列番号 2 7 9)	
PT270: CGGPTMRPSM(pT)GLHLAKR	(配列番号 2 8 0)	
PT271: CGGDSFPSSP(pT)SATPHSQ	(配列番号 2 8 1)	
PT272: CGGPTMRPSM(pT)GLHLLKR	(配列番号 2 8 2)	
PT273: CGGLYIRSSW(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 8 3)	
PT274: CGGPNMRPSM(pT)GLHLVKR	(配列番号 2 8 4)	
PT275: CGGQHLRLST(pT)SGRLFYA	(配列番号 2 8 5)	
PT276: CGGFHIRSSW(pT)GLHLVKQ	(配列番号 2 8 6)	20
PT277: CGGLRRA(pT)LG	(配列番号 2 8 7)	
PT278: CGGRPRAA(pT)F	(配列番号 2 8 8)	
PT279: CGGFKK(pT)FKL	(配列番号 2 8 9)	
PT280: CGGTIYRRG(pT)RRWRKL	(配列番号 2 9 0)	
PT281: CGGQKRPRRKD(pT)P	(配列番号 2 9 1)	
PT282: CGGRKR(pT)RAE	(配列番号 2 9 2)	
PT283: CGGAPGLI(pT)PGGPP	(配列番号 2 9 3)	
PT284: CGGKKALHRQE(pT)VDAL	(配列番号 2 9 4)	
PT285: CGGMHRQE(pT)VDCLK	(配列番号 2 9 5)	
PT286: CGGHA(pT)PPKKKRK	(配列番号 2 9 6)	30
PT287: CGGPK(pT)PKKAKKL	(配列番号 2 9 7)	
PT288: CGGRRADD(pT)DDDDD	(配列番号 2 9 8)	
PT289: CGGRRRDDD(pT)DDD	(配列番号 2 9 9)	

【 0 0 7 3 】

T B S - T 緩衝溶液：

0.05%のTween 20を含むトリス塩酸緩衝生理食塩水(pH 7.5)を使用した。

ブロッキング緩衝溶液：

3%牛血清アルブミンと0.05%のTween 20を含むトリス塩酸緩衝生理食塩水(pH 7.5)を使用した。

抗リン酸化セリン抗体緩衝溶液：

市販品(後述)をブロッキング緩衝溶液で500倍希釈して使用した。

抗リン酸化スレオニン抗体緩衝溶液：

市販品(後述)をブロッキング緩衝溶液で500倍希釈して使用した。

ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウス抗体緩衝溶液：

市販品(Zymed)をブロッキング緩衝溶液で5000倍希釈して使用した。

ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ウサギ抗体緩衝溶液：

市販品(Zymed)をブロッキング緩衝溶液で1000倍希釈して使用した。

P K A 酵素：市販品(Promega, Madison, WI、またはUpstate Biotechnology, Lake Placid, NY)を用いた。

10

20

30

40

50

P K C 酵素：市販品 (Upstate) を用いた。

A M P K 酵素：市販品 (Upstate) を用いた。

P K A 反応緩衝溶液：以下の組成の緩衝溶液を用いた。

40 mM	Tris/HCl (pH 7.2)
15 mM	MgCl ₂
0.2 mM	ATP

A M P K 反応緩衝溶液：以下の組成の緩衝溶液を用いた。

40 mM	HEPES (pH 7.4)
80 mM	NaCl
5 mM	Mg(OAc) ₂
1 mM	DTT
0.2 mM	5' -AMP
0.2 mM	ATP

10

P K C 反応緩衝溶液 (全垂型共通)：以下の組成の緩衝溶液を用いた。

20 mM	MOPS (pH 7.2)
25 mM	-glycerophosphate
5 mM	EGTA
0.2 mM	DTT
1 mM	CaCl ₂
20 mM	MgCl ₂
1/5	Lipid Activator (Upstate)
0.2 mM	ATP

20

カルシウムとマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (P B S -) :

塩化ナトリウム80g、塩化カリウム2g、リン酸水素ナトリウム11.5g、リン酸二水素カリウム2gを精製水1Lに溶解したものを10倍希釈しオートクレーブで滅菌したものをを用いた。

細胞剥離液：

トリプシン - E D T A 液 (GIBCO) を滅菌 P B S - で10倍希釈して用いた。

H E K 2 9 3 細胞生育培地：

500 mLのDulbecco's リン酸緩衝生理食塩水 (Sigma) に50 mLの牛胎児血清 (56 で30分間加熱し非働化したもの) と5 mLのペニシリン/ストレプトマイシン (10000 units/ml、10000 mg/ml) 加えたものをを用いた。

30

P K A プラスミド：

市販品 (Stratagene) を使用した。

G F P プラスミド：

市販品 (CloneTech) を使用した。

プラスミド溶液：

プラスミド4 μgを250 μLのOptiMem I (Invitrogen) と250 μLのLipofectamine 2000 (Invitrogen) の混合液に溶解させたものを細胞培養用6穴プレートの1穴あたり用いた。

H E K 2 9 3 細胞抽出用緩衝液：以下の組成の緩衝溶液を用いた。

40

20 mM	Tris/HCl (pH 7.2)
0.5 %	TritonX-100
150 mM	NaCl
20 mM	-glycerophosphate
2 mM	EGTA
5 mM	EDTA
1 mM	Na ₃ VO ₄ (sodium orthovanadate)
0.2 mM	PMSF
5 mg/ml	Aprotinin
3 mg/ml	Pepstatin A

50

L 6 細胞生育培地 :

500 mLの MEM (Sigma) に50 mLの牛胎児血清 (56 で30分間加熱し非働化したもの)、5 mLのペニシリン/ストレプトマイシン (10000 units/ml、10000 mg/ml) と10 mLの200 mMグルタミンを加えたものを用いた。

L 6 細胞分化培地 :

500 mLの MEM (Sigma) に10 mLの牛胎児血清、5 mLのペニシリン/ストレプトマイシン (10000 units/ml、10000 mg/ml) 混合液と10 mLの200 mMグルタミンを加えたものを用いた。

L 6 細胞抽出用緩衝液 : 以下の組成の緩衝溶液を用いた。

30 mM	HEPES (pH 7.4)	10
2.5 mM	EGTA	
3.0 mM	EDTA	
70 mM	KCl	
0.1 %	Nonident P-40	
20 mM	-glycerophosphate	
20 mM	NaF	
2 mM	NaPPi (sodium pyrophosphate)	
1 mM	Na ₃ VO ₄ (sodium orthovanadate)	
0.2 mM	PMSF	
0.01 mM	Pepstatin A	20

【0074】

実施例 1 : マイクロタイタープレートでの抗体認識反応 (1)

1% グルタルアルデヒドの50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) を96穴アミノプレート (住友ベークライトまたはコーニング製) に50 µLずつ注ぎ入れ、37 で2時間反応させ、プレート表面を活性化させた。反応液を取り除き、精製水で洗浄した。ペプチド基質を50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) に溶解させ (ペプチド濃度1 µM ~ 20 µM)、活性化させた96穴マイクロタイタープレートの各穴に50 µLずつ注ぎ入れた。37 で2時間反応させた後、反応液を除いた。TBS-T緩衝溶液と精製水で順次洗浄することでペプチド基質を固定化した。ペプチド基質を固定化させたマイクロタイタープレートを、ブロッキング緩衝溶液を用いて30 で1時間ブロッキング処理した。TBS-T緩衝溶液で3回洗浄した後、抗リン酸化セリン抗体緩衝溶液または抗リン酸化スレオニン抗体緩衝溶液を1穴あたり50 µLずつ用いて30 で1~2時間抗体認識反応を行った。反応液を除いた後、TBS-T緩衝溶液で3回洗浄した。続いて、HRP標識抗マウス緩衝溶液あるいは抗ウサギ抗体緩衝溶液で認識反応させた。認識反応は1穴あたり50 µLずつ用いて30 で1時間行い、反応液を除いた後、TBS-T緩衝溶液で4回洗浄した。TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン) 溶液を100 µL加え、30 で約10分間反応させた。2N硫酸水溶液で反応を停止した後、吸光度計で450 nmでの吸光度を定量した (図1および2、表1)。その結果、下記抗体16がリン酸化セリンおよびリン酸化スレオニンの両方を認識することがわかった。

【0075】

評価した抗リン酸化セリン抗体10種類と抗リン酸化スレオニン抗体6種類を以下に示す。

抗体 1 . マウスモノクローナル抗リン酸化セリン抗体 :

クローン7F12、Alexis Biochemicals (San Diego, CA)

抗体 2 . マウスモノクローナル抗リン酸化セリン抗体 :

クローン16B4、Alexis Biochemicals (San Diego, CA)

抗体 3 . マウスモノクローナル抗リン酸化セリン抗体 :

クローンQ5、Qiagen (Valencia, CA)

抗体 4 . マウスモノクローナル抗リン酸化セリン抗体 :

クローンab6639、Abcam (Cambridge, UK)

10

20

30

40

50

- 抗体 5 . マウスモノクローナル抗リン酸化セリン抗体 :
クローンPSR-45、Sigma (St. Lois, MO)
- 抗体 6 . マウスモノクローナル抗リン酸化セリン抗体 :
クローン608、Zymed (South San Francisco, CA)
- 抗体 7 . マウスモノクローナル抗リン酸化セリン抗体 :
クローン1C8、Calbiochem (San Diego, CA)
- 抗体 8 . マウスモノクローナル抗リン酸化セリン抗体 :
クローン4A3、Calbiochem (San Diego, CA)
- 抗体 9 . マウスモノクローナル抗リン酸化セリン抗体 :
クローン4A9、Calbiochem (San Diego, CA)
- 抗体 10 . ウサギポリクローナル抗リン酸化セリン抗体 :
Zymed (South San Francisco, CA)
- 抗体 11 . マウスモノクローナル抗リン酸化スレオニン抗体 :
クローンPTHR-1E11、nanoTools (Germany)
- 抗体 12 . マウスモノクローナル抗リン酸化スレオニン抗体 :
クローンPTHR-4D11、nanoTools (Germany)
- 抗体 13 . マウスモノクローナル抗リン酸化スレオニン抗体 :
クローンPTHR-14B3、nanoTools (Germany)
- 抗体 14 . マウスモノクローナル抗リン酸化スレオニン抗体 :
クローンQ7、Qiagen (Valencia, CA)
- 抗体 15 . ウサギポリクローナル抗リン酸化スレオニン抗体 :
CHEMICON (Temecula, CA)
- 抗体 16 . ウサギポリクローナル抗リン酸化スレオニン抗体 :
Zymed (South San Francisco, CA)

10

20

【 0 0 7 6 】

【 表 1 - 1 】

リン酸化セリン残基の抗体認識反応

抗体	A450nm (n=1)			
	Kemptide(S)	Kemptide(A)	Kemptide(pS*)	
抗体1	7F12	0.125	0.1785	0.207
抗体2	16B4	0.532	0.5425	0.6085
抗体3	Q5 (Qiagen)	0.14	0.1425	0.1905
抗体4	ab6639 (Abcam)	0.196	0.222	0.3695
抗体5	PSR-45 (Sigma)	0.25	0.303	0.472
抗体6	608 (Zymed)	0.1155	0.1475	0.127
抗体7	1C8	0.0715	0.0705	0.0935
抗体8	4A3	0.0645	0.0655	0.0985
抗体9	4A9	0.0575	0.0605	0.0765
抗体10	Zymed anti-pS	0.1515	0.1585	0.277
抗体11	PTHR-1E11	0.05035	0.05075	0.06175
抗体12	PTHR-4D11	0.04815	0.04875	0.05345
抗体13	PTHR-14B3	0.06915	0.0671	0.3091
抗体14	Q7	0.17135	0.15855	0.41145
抗体15	CHEMICON	0.12515	0.12235	0.62825
抗体16	Zymed anti-pT	0.07885	0.0806	0.85815

30

40

【 0 0 7 7 】

【表 1 - 2】

リン酸化スレオニン残基の抗体認識反応

抗体	A450nm (n=1)		
	Kemptide(A)	Kemptide(pS*)	Kemptide(pT*)
抗体11 PTHR-1E11	0.0528	0.05355	0.05575
抗体12 PTHR-4D11	0.04975	0.04645	0.0488
抗体13 PTHR-14B3	0.0736	0.07425	0.0802
抗体14 Q7	0.2627	0.31525	0.30095
抗体15 CEMICON	0.18095	0.28465	0.43875
抗体16 Zymed anti-pT	0.121	0.313	3.555

10

【0078】

実施例 2 : マイクロタイタープレートでの抗体認識反応 (2)

実施例 1 で見出した抗体 16 について、N 末端にシステイン残基を有しリン酸化スレオニン残基を含む 10 から 18 アミノ酸からなる 289 種類のペプチド配列 (PT001 ~ PT289) に対する認識能を調べた。

抗体認識能は、実施例 1 に示すように 1 次抗体としての抗リン酸化スレオニン抗体 (抗体 16) と 2 次抗体としての抗ウサギ抗体とを組み合わせで調べた。しかし、1 次抗体としての抗リン酸化スレオニン抗体 (抗体 16) の機能をより詳細に調べる目的で 289 ペプチドの全配列について以下の 2 つの条件で抗体認識反応を比較した。さらに実験に用いる各プレートには実施例 1 で用いた Kemptide(A)、Kemptide(T)、Kemptide(pT*) を標準サンプルとして常に固相化させ比較検討した (表 2) 。

20

【0079】

条件 1 : 1 次抗体 (-)、二次抗体 (+)

ペプチド性基質を実施例 1 と同様の方法で固定化させた 96 穴マイクロタイタープレートをブロッキング緩衝溶液を用いて 30 で 1 時間ブロッキング処理を行った。TBS-T 緩衝溶液で 3 回洗浄した後、HRP 標識抗ウサギ抗体緩衝溶液で認識反応させた。認識反応は 30 で 1 時間行い、反応液を除いた後、TBS-T 緩衝溶液で 4 回洗浄した。TMB 溶液を 100 μ L 加えいれ 30 で約 10 分間反応させた。2 N 硫酸水溶液で反応を停止した後、吸光光度計で 450 nm での吸光度を定量した。

30

【0080】

条件 2 : 1 次抗体 (+)、二次抗体 (+)

ペプチド性基質を実施例 1 と同様の方法で固定化させた 96 穴マイクロタイタープレートをブロッキング緩衝溶液を用いて 30 で 1 時間ブロッキング処理を行った。TBS-T 緩衝溶液で 3 回洗浄した後、抗体 16 の抗リン酸化スレオニン抗体緩衝溶液により 30 で 1 ~ 2 時間反応させた。反応液を除いた後、TBS-T 緩衝溶液で 3 回洗浄した。続いて、HRP 標識抗ウサギ抗体緩衝溶液で認識反応させた。認識反応は 30 で 1 時間行い、反応液を除いた後、TBS-T 緩衝溶液で 4 回洗浄した。TMB 溶液を 100 μ L 加えいれ 30 で約 10 分間反応させた。2 N 硫酸水溶液で反応を停止した後、吸光光度計で 450 nm での吸光度を定量した。

40

【0081】

【表 2 - 1】

抗体16のリン酸化スレオニン残基認識反応(1)

ペプチド基質	A450 nm (n=1)	
	条件1 (-/+)	条件2 (+/+)
no peptide	0.05845	0.2339
Kemptide (A)	0.0619	0.2524
Kemptide (T)	0.0562	0.2621
Kemptide (pT*)	0.0595	2.1418
PT001	0.069	2.0404
PT002	0.0532	2.037
PT003	0.052	2.0577
PT004	0.0562	2.1176
PT005	0.0544	2.0113
PT006	0.0538	2.1333
PT007	0.0728	2.0931
PT008	0.055	1.9689
PT009	0.054	1.9601
PT010	0.0542	2.1753
PT011	0.0528	2.089
PT012	0.0505	2.2042
PT013	0.0506	2.1523
PT014	0.0511	2.0565
PT015	0.0563	1.9264
PT016	0.0526	2.0036
PT017	0.0512	1.9428
PT018	0.0559	2.0022
PT019	0.0517	1.8909
PT020	0.0519	2.1786
PT021	0.0582	2.056
PT022	0.0554	1.9205
PT023	0.0506	1.9491
PT024	0.0513	1.8609
PT025	0.0575	1.8755
PT026	0.0529	1.7501
PT027	0.0497	2.0402
PT028	0.0546	2.0235
PT029	0.0911	2.0424
PT030	0.053	1.9554
PT031	0.0511	2.0048
PT032	0.0528	1.8685
PT033	0.0505	2.0056
PT034	0.0499	2.0072
PT035	0.0585	1.898
PT036	0.0637	2.1257
PT037	0.0534	2.1571
PT038	0.0576	1.788
PT039	0.0507	1.988
PT040	0.0506	1.9986
PT041	0.0519	1.8634
PT042	0.0518	1.9845

10

20

30

40

【 0 0 8 2 】

【表 2 - 2】

抗体16のリン酸化スレオニン残基の認識反応(2)

ペプチド基質	A450 nm (n=1)	
	条件1 (-/+)	条件2 (+/+)
no peptide	0.058475	0.15105
Kemptide (A)	0.061	0.2032
Kemptide (T)	0.0605	0.1967
Kemptide (pT*)	0.0566	2.169
PT043	0.059	2.0972
PT044	0.06	2.126
PT045	0.0555	2.2023
PT046	0.0663	2.1651
PT047	0.0605	2.0647
PT048	0.0571	2.0879
PT049	0.0766	2.0504
PT050	0.055	2.0757
PT051	0.0575	2.0772
PT052	0.0563	1.6707
PT053	0.0599	2.1561
PT054	0.0573	2.1598
PT055	0.0557	2.0754
PT056	0.058	2.0556
PT057	0.0554	2.0208
PT058	0.0571	1.942
PT059	0.0517	1.8595
PT060	0.0582	2.0947
PT061	0.0553	1.9598
PT062	0.0549	2.1112
PT063	0.0618	2.0115
PT064	0.0552	1.998
PT065	0.0552	1.8965
PT066	0.0573	2.0256
PT067	0.0643	2.0663
PT068	0.0551	2.0609
PT069	0.051	1.9296
PT070	0.0597	1.939
PT071	0.0545	1.9919
PT072	0.0553	2.1266
PT073	0.0552	2.1273
PT074	0.0555	2.0633
PT075	0.0564	1.8953
PT076	0.0572	2.021
PT077	0.0541	1.9136
PT078	0.0597	2.1761
PT079	0.0576	2.1331
PT080	0.0563	2.2051
PT081	0.0587	2.2336
PT082	0.0604	2.2129
PT083	0.0577	2.015
PT084	0.0558	1.9605

10

20

30

40

【 0 0 8 3 】

【表 2 - 3】

抗体16のリン酸化スレオニン残基の認識反応(3)

ペプチド基質	A450 nm (n=1)	
	条件1 (-/+)	条件2 (+/+)
no peptide	0.064425	0.1223
Kemptide (A)	0.065	0.1426
Kemptide (T)	0.0654	0.1314
Kemptide (pT*)	0.06	2.2926
PT085	0.059	2.0073
PT086	0.0624	2.0235
PT087	0.0646	2.1935
PT088	0.0593	1.9648
PT089	0.0646	2.095
PT090	0.0634	2.0957
PT091	0.0728	1.8514
PT092	0.061	2.0114
PT093	0.0623	1.9905
PT094	0.0592	2.0631
PT095	0.0594	2.0591
PT096	0.0639	1.994
PT097	0.0614	1.9384
PT098	0.0671	1.8067
PT099	0.0614	1.9453
PT100	0.0647	2.0517
PT101	0.0643	2.1721
PT102	0.0655	2.1322
PT103	0.0588	1.5416
PT104	0.0597	2.0846
PT105	0.0645	2.0651
PT106	0.0637	2.0693
PT107	0.0614	2.0222
PT108	0.0579	2.2204
PT109	0.0582	1.9157
PT110	0.0611	2.0345
PT111	0.0591	2.1353
PT112	0.0651	1.6956
PT113	0.0605	2.11
PT114	0.0691	2.1828
PT115	0.0637	2.2875
PT116	0.067	1.9905
PT117	0.0641	2.0776
PT118	0.0593	1.9882
PT119	0.0663	2.0059
PT120	0.063	1.7962
PT121	0.0658	2.2337
PT122	0.0658	2.2955
PT123	0.0635	2.1141
PT124	0.0663	2.2777
PT125	0.064	2.0503
PT126	0.0794	2.1623

10

20

30

40

【表 2 - 4】

抗体16のリン酸化スレオニン残基の認識反応(4)

ペプチド基質	A450 nm (n=1)	
	条件1 (-/+)	条件2 (+/+)
no peptide	0.06225	0.12445
Kemptide (A)	0.0642	0.1328
Kemptide (T)	0.0714	0.1243
Kemptide (pT*)	0.0765	2.2484
PT127	0.064	1.9106
PT128	0.0643	2.1822
PT129	0.0657	2.1402
PT130	0.0714	2.3454
PT131	0.0851	2.2133
PT132	0.0699	2.0165
PT133	0.0642	1.7807
PT134	0.064	2.1362
PT135	0.0734	2.0663
PT136	0.0971	0.9392
PT137	0.1083	2.1968
PT138	0.0751	1.3796
PT139	0.0648	1.5846
PT140	0.0665	1.5086
PT141	0.0722	0.827
PT142	0.0722	1.7833
PT143	0.0813	2.1438
PT144	0.0748	2.2198
PT145	0.084	1.8605
PT146	0.0657	2.0796
PT147	0.079	1.9762
PT148	0.0695	2.0189
PT149	0.0685	0.3377
PT150	0.0787	0.8443
PT151	0.0745	2.1413
PT152	0.0783	2.014
PT153	0.0841	2.3045
PT154	0.0831	1.2391
PT155	0.0623	2.2598
PT156	0.0659	2.0933
PT157	0.0733	1.7704
PT158	0.0631	1.2306
PT159	0.0645	2.1512
PT160	0.0659	2.4086
PT161	0.0603	2.0038
PT162	0.0603	2.0412
PT163	0.0589	1.5711
PT164	0.0677	1.8262
PT165	0.0575	2.3874
PT166	0.0587	1.4465
PT167	0.0608	2.2294
PT168	0.0666	1.8054

10

20

30

40

【表 2 - 5】

抗体16のリン酸化スレオニン残基の認識反応(5)

ペプチド基質	A450 nm (n=1)	
	条件1 (-/+)	条件2 (+/+)
no peptide	0.054375	0.108875
Kemptide (A)	0.0544	0.1203
Kemptide (T)	0.0566	0.1123
Kemptide (pT*)	0.0553	2.0217
PT169	0.053	1.7026
PT170	0.053	1.2279
PT171	0.0577	1.5493
PT172	0.0535	1.5514
PT173	0.0558	1.6843
PT174	0.0556	1.997
PT175	0.06	2.1468
PT176	0.059	2.0042
PT177	0.0572	1.6918
PT178	0.0539	1.6699
PT179	0.0528	1.2183
PT180	0.0533	0.722
PT181	0.0674	1.4582
PT182	0.0578	1.7037
PT183	0.0545	1.9531
PT184	0.0561	1.8561
PT185	0.0522	1.582
PT186	0.0536	2.1463
PT187	0.062	2.0587
PT188	0.0552	1.3316
PT189	0.0597	1.95
PT190	0.0552	1.02
PT191	0.0728	0.519
PT192	0.0568	1.4214
PT193	0.0533	1.6214
PT194	0.0549	2.1186
PT195	0.0528	1.5253
PT196	0.0611	1.9091
PT197	0.0577	1.797
PT198	0.0646	2.0279
PT199	0.0607	1.7674
PT200	0.056	1.9245
PT201	0.0562	1.4804
PT202	0.0554	1.7451
PT203	0.0581	2.0415
PT204	0.0589	2.021
PT205	0.0556	1.9419
PT206	0.0573	1.6413
PT207	0.0614	2.1487
PT208	0.0606	2.2128
PT209	0.0583	2.0352
PT210	0.0598	1.7599

10

20

30

40

【表 2 - 6】

抗体16のリン酸化スレオニン残基の認識反応(6)

ペプチド基質	A450 nm (n=1)	
	条件1 (-/+)	条件2 (+/+)
no peptide	0.057025	0.107075
Kemptide (A)	0.0526	0.128
Kemptide (T)	0.0584	0.1401
Kemptide (pT*)	0.0584	2.0575
PT211	0.061	2.2076
PT212	0.0588	2.1826
PT213	0.0574	2.2018
PT214	0.0608	2.2949
PT215	0.0614	2.1581
PT216	0.0607	2.1916
PT217	0.05	2.1658
PT218	0.063	2.2791
PT219	0.0618	2.195
PT220	0.0511	2.1944
PT221	0.0575	2.2606
PT222	0.0602	1.844
PT223	0.0569	1.8141
PT224	0.0645	2.17
PT225	0.0556	1.9622
PT226	0.0567	2.2309
PT227	0.0591	2.1921
PT228	0.0542	2.0353
PT229	0.0596	1.9541
PT230	0.0573	2.102
PT231	0.0662	2.1155
PT232	0.0581	2.1215
PT233	0.0545	1.793
PT234	0.0556	2.2349
PT235	0.0576	1.8864
PT236	0.0601	2.0585
PT237	0.0578	1.6626
PT238	0.0741	2.2629
PT239	0.0572	1.9687
PT240	0.0637	2.1806
PT241	0.0563	1.4702
PT242	0.0664	2.1788
PT243	0.0572	2.1607
PT244	0.0572	2.1348
PT245	0.0743	2.0834
PT246	0.0589	2.0727
PT247	0.0603	2.2368
PT248	0.067	2.328
PT249	0.0625	2.266
PT250	0.0628	1.908
PT251	0.06	1.7752
PT252	0.0734	2.3055

10

20

30

40

【 0 0 8 7 】

【表 2 - 7】

抗体16のリン酸化スレオニン残基の認識反応(7)

ペプチド基質	A450 nm (n=1)	
	条件1 (-/+)	条件2 (+/+)
no peptide	0.054875	0.1168
Kemptide (A)	0.0546	0.1529
Kemptide (T)	0.054	0.1567
Kemptide (pT*)	0.0544	2.2857
PT253	0.060	2.3679
PT254	0.0591	2.3469
PT255	0.0628	2.5651
PT256	0.0699	2.5522
PT257	0.0583	2.3546
PT258	0.1316	2.468
PT259	0.0642	1.9431
PT260	0.057	2.3241
PT261	0.0562	2.2395
PT262	0.0637	2.4162
PT263	0.0593	2.0055
PT264	0.0623	2.309
PT265	0.0595	2.4789
PT266	0.0667	1.6331
PT267	0.0586	2.3535
PT268	0.0564	2.0088
PT269	0.0579	1.3359
PT270	0.0586	2.3866
PT271	0.0516	1.8244
PT272	0.0656	2.4034
PT273	0.0653	0.8753
PT274	0.0634	2.347
PT275	0.0585	2.1072
PT276	0.0564	2.3244
PT277	0.0565	2.08
PT278	0.0571	2.4407
PT279	0.055	1.4662
PT280	0.0561	0.9242
PT281	0.0535	2.3087
PT282	0.0567	2.0049
PT283	0.055	1.1844
PT284	0.054	1.862
PT285	0.0565	1.9227
PT286	0.0539	0.3384
PT287	0.0628	0.2304
PT288	0.0596	1.9628
PT289	0.0547	2.0943

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

実施例 3 : プレートでの精製 P K A でのリン酸化検出

P K A 用基質ペプチドを実施例 1 と同様の方法で 9 6 穴マイクロタイタープレートに固定化し、1 穴あたり 1 U または 1 5 0 m U の P K A (Promega, Madison, WI または Upstate) を含む P K A 反応緩衝溶液を 1 穴あたり 5 0 μ L ずつ用いて 3 0 分でリン酸化反応を行い経時変化を追った。反応溶液を除いた後、T B S - T 緩衝溶液と精製水で洗浄した。

50

実施例 1 に示す方法で、生成物であるリン酸化ペプチドを抗体 16 を用いて測定した（図 3 - 1、3 - 2）。

図 3 - 1、3 - 2 より、PKA は基質ペプチド（配列番号 2 および 3）中のセリンおよびスレオニン残基を経時的にリン酸化し、抗体 16 は、リン酸化セリンおよびリン酸化スレオニンを同程度に認識することがわかった。

【0089】

実施例 4：プレートでの精製 AMPK でのリン酸化検出

AMPK 用基質ペプチドを実施例 1 に示した方法で 96 穴マイクロタイタープレートに固定化し、1 穴あたり 10 mU の AMPK (Upstate) を含む AMPK 反応緩衝溶液を 1 穴あたり 50 μ L ずつ用いて 30 でリン酸化反応を行い経時変化を測定した。反応溶液を除いた後、TBS - T 緩衝溶液と精製水で洗浄した。さらに、実施例 1 に示す方法で、生成物であるリン酸化ペプチドを測定した。AMPK 反応緩衝溶液から ATP と AMP を除いた場合、AMP だけ除いた場合のリン酸化反応も同時に測定した（図 4）。

図 4 より、AMPK は基質ペプチド SAMT（配列番号 7）を経時的にリン酸化し、抗体 16 を用いて当該リン酸化を検出することにより、ATP の存在下よりも AMP と ATP の共存下の方がリン酸化の程度が強いことがわかった。

【0090】

実施例 5：プレートでの精製 PKC でのリン酸化検出

PKC 用基質ペプチドを実施例 1 と同様の方法で 96 穴マイクロタイタープレートに固定化し、各穴あたり 6.3 mU の PKC (Upstate) を含む PKC 反応緩衝溶液を 1 穴あたり 50 μ L ずつ用いて 30 で 1 時間リン酸化反応を行った。用いた PKC は、PKC、PKC II、PKC、PKC、PKC、PKC および PKC であった。反応溶液を除いた後、TBS - T 緩衝溶液と精製水で洗浄した。実施例 1 に示す方法により、生成物であるリン酸化ペプチドを抗体 16 を用いて測定した（図 5）。

図 5 より、用いた PKC はすべて基質ペプチド IQAT（配列番号 9）を ATP 存在下でリン酸化することがわかった。

【0091】

実施例 6：HEK 293 細胞で PKA と GFP 遺伝子を発現させた細胞抽出液でのリン酸化反応の検出

50 mL の滅菌済み試験管に HEK 293 細胞を入れ、37 に温めた HEK 293 細胞生育培地 20 mL をゆっくりと加え懸濁した。毎分 1000 回転で 5 分間遠心分離して細胞を沈殿させ上清を捨てた。HEK 293 細胞生育培地 15 mL を加えて細胞を再懸濁した。得られた懸濁液を細胞培養用 F75 フラスコ（コーニング）に移し、二酸化炭素培養装置内で 37 で培養した。細胞が約 80% コンフルエント状態に達したら、次のように継代を行った。フラスコ内の培地を捨て、10 mL の PBS - で 2 回洗浄した。約 10 mL の細胞剥離液で細胞をはがした。HEK 293 細胞生育培地で細胞を回収し、毎分 1000 回転で 5 分間遠心分離し、細胞を沈殿させ上清を捨てた。HEK 293 細胞生育培地を加えて細胞を再懸濁した。得られた細胞懸濁液の一部を使い、新しい細胞培養用 F75 フラスコで同じように増殖させた。必要量の細胞数を得るために継代を繰り返した。継代を繰り返して得た HEK 293 細胞を 300,000 / mL の密度で細胞培養用 6 穴プレート（SUMILON MS-8496F5）に播き、1 穴あたり HEK 293 細胞生育培地で約 2 mL にし、PKA もしくは GFP 遺伝子のプラスミド溶液を加え入れ、37 で約 4 時間遺伝子導入処理を行った。4 時間後、継代作業と同じように新しい HEK 293 細胞生育培地に交換し、コンフルエント状態に達するまで細胞を増殖させた。培地を取り除き、冷やした PBS - で 2 回洗浄した。PBS - EDTA 緩衝液で細胞を回収した。毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した後上清を除き、HEK 293 細胞抽出用緩衝液を加え、4 で細胞成分を溶解させた。得られた溶解液を毎分 15,000 回転で遠心分離し、上清を細胞抽出液として得た。得られた細胞抽出液を各穴あたり 0.03 μ g のタンパク量になるように PKA 反応緩衝液 50 μ L に混合した溶液を用いて、実施例 3 と同様に、PKA 用基質ペプチドを固定化した 96 穴マイクロタイタープレートでリン酸化反応を 30 で 1 時間

行い、実施例 1 と同様にして、リン酸化ペプチドを抗体 1 6 により検出した (図 6) 。

図 6 より、本発明のペプチドアレイを用いて、細胞抽出液中に含まれる P K A 活性を測定できることがわかった。

【 0 0 9 2 】

実施例 7 : L 6 培養細胞の細胞抽出液でのリン酸化反応の検出

5 0 m L の滅菌済み試験管に L 6 細胞を入れ、3 7 に温めた L 6 細胞生育培地 2 0 m L をゆっくりと加え、懸濁した。毎分 1 0 0 0 回転で 5 分間遠心分離して細胞を沈殿させ、上清を捨てた。L 6 細胞生育培地 1 5 m L を加えて細胞を再懸濁した。得られた懸濁液を細胞培養用 F 7 5 フラスコ (コーニング) に移し、二酸化炭素培養装置内で 3 7 で培養した。約 8 0 % コンフルエント状態で、以下のように継代を行った。フラスコ内の培地を捨て、1 0 m L の P B S - で 2 回洗浄した。約 1 0 m L の細胞剥離液で室温下処理し細胞をはがした。L 6 細胞生育培地で細胞を回収し、毎分 1 0 0 0 回転で 5 分間遠心分離して細胞を沈殿させ、上清を捨てた。L 6 細胞生育培地を加えて細胞を再懸濁した。得られた細胞懸濁液の一部を使い、新しい細胞培養用 F 7 5 フラスコで同じように増殖させた。継代を繰り返し、必要量の細胞数に達したら分化を行った。継代の際と同じようにして得た所定の密度の L 6 細胞生育培地で懸濁した細胞を細胞培養用 6 穴プレート (SUMILON MS-8496F5) に 1 0 0 μ L ずつ分注して培養した。コンフルエント状態にして培地を完全に除き、L 6 細胞分化培地 1 0 0 μ L に置換した。そのまま 1 ~ 3 日間培養し、筋芽が筋管に分化したのを確認した後、9 0 μ L の L 6 細胞分化培地に交換した。A I C A R (5- amino-4- imidazole carboxamide) とメトフォルミンを所定の 1 0 倍濃度に L 6 細胞分化培地で希釈し、各ウェルに 1 0 μ L ずつ添加し 2 時間インキュベートした。2 時間後、培地を取り除き、冷やした P B S - で 2 回洗浄した。各ウェルあたり 5 0 μ L の L 6 細胞抽出用緩衝液を加え、4 で攪拌しながら細胞成分を抽出した。抽出物を毎分 5 0 0 0 回転で遠心分離し、上清を得た。作製した細胞抽出液を各穴あたり 0 . 1 μ g のタンパク量になるように A M P K 反応緩衝液 5 0 μ L に混合した溶液を用いて、実施例 4 と同様に、A M P K 用基質ペプチドを固定化した 9 6 穴マイクロタイタープレートでリン酸化反応を 3 0 で 1 時間行い、実施例 1 と同様にしてリン酸化ペプチドを抗体 1 6 により検出した (図 7) 。

図 7 より、本発明のペプチドアレイを用いて、A I C A R またはメトフォルミンで誘導した A M P K 活性を測定できることがわかった。

【 0 0 9 3 】

実施例 8 : C y 3 標識化抗体 1 6 の緩衝溶液の調製

5 0 m M 炭酸ナトリウム緩衝液 (p H 9 . 5) で 2 倍に希釈した抗体 1 6 を C y 3 標識キット (アマシャムバイオサイエンス : コード番号 PA33001) を用いて添付手順書に従って C y 3 標識化した。得られた C y 3 標識化抗体 1 6 をブロッキング緩衝溶液で 1 0 0 0 倍に希釈し C y 3 標識化抗体 1 6 の緩衝溶液とした。

【 0 0 9 4 】

実施例 9 : スライドガラス表面に固定化したペプチド基質を用いてのリン酸化検出

高密度化アミノ基導入コート D N A マイクロアレイ用スライドガラス (松浪ガラス : 品番 SDM0011) に 4 - マレイミドブチル酸の N - スクシイミドエステル (CAS No. 80307-12-6 : Fluka) の 1 0 0 m M の D M F 溶液を室温下 1 2 時間反応させた後、反応液を D M F で洗い流した。さらに、D M F、精製水、エタノールを用いて順に 2 回ずつ洗浄し、減圧室温下乾燥した。得られたスライドガラスに D N A マイクロアレイ作製用アレイヤー (Gene tic Microsystems : GMS417 Arrayer) を用いて 0 . 3 8 μ m 間隔で P K A 用基質ペプチドの 1 0 0 μ M リン酸緩衝生理食塩水溶液 (p H 7 . 2) を分注し固定化した。固定化したスライドガラスを室温下 3 時間静置した後、水、D M F、水、エタノールで順に 2 回ずつ洗浄し、減圧室温下乾燥した。乾燥したスライドガラスをブロッキング緩衝溶液で室温下 1 時間ブロッキング処理した後、実施例 3 および実施例 6 と同様の方法でスライドガラス上でリン酸化反応を行った。P K A を使った場合は、スライドガラス 1 枚あたり 1 5 0 m U の酵素量を、P K A および G F P 発現細胞抽出液を使った場合は、スライドガラス 1 枚

10

20

30

40

50

あたり $0.1 \mu\text{g}$ のタンパク質量を用いた。30 で1時間反応させた後、スライドガラスを TBS - T 緩衝溶液および精製水で2回ずつ洗浄し、再度ブロッキング緩衝溶液で室温下1時間ブロッキング処理した。実施例8で作製した Cy3 標識化抗体16の緩衝溶液をスライドガラスに30 で1時間作用させた。TBS - T 緩衝溶液で2回と精製水で5回洗浄を行った後、毎分500回転の遠心操作を行い乾燥させた。得られたスライドガラスは DNA マイクロアレイ用蛍光スキャナー (ScanArray 5000: GSI Lumonics) を用いて、励起波長 (543 nm) 検出波長 (570 nm) で蛍光イメージング画像を取得した (図8)。

図8の写真は、左からそれぞれ、キナーゼを加えないコントロール [Kinase(-)]、PKA 酵素を使った場合 [PKA(+)]、PKA 発現細胞抽出液を使った場合 [PKA Lysate(+)]、GFP 発現細胞抽出液を使った場合 [GFP Lysate(+)] の結果を示す。マイクロタイタープレートを用いて作製したプレートアレイでの結果と同様に、スライドガラス上に作製したマイクロアレイ上でも、PKA 遺伝子を発現させた未精製の細胞抽出液を作用させることによって、精製された PKA 酵素を作用させた場合と同様に、PKA によるリン酸化反応が円滑に進行している状態が検出できた。

【産業上の利用可能性】

【0095】

本発明は、これまで標準とされてきた放射化標識された ATP を用いたリン酸化検出方法に置き換わる新しいリン酸化検出方法ならびにその実施に使用される基質群およびペプチドアレイを提供する。さらに、より優れたポリクローマル抗リン酸化スレオニン抗体を

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】リン酸化セリン残基の抗体認識反応を 450 nm での吸光度により定量 ($n = 1$) した図である。抗体1~抗体16は、それぞれ、[表1-1]の各抗体を意味する。

【図2】リン酸化スレオニン残基の抗体認識反応を 450 nm での吸光度により定量 ($n = 1$) した図である。抗体11~抗体16は、それぞれ、[表1-2]の各抗体を意味する。

【図3-1】PKA によるセリン残基のリン酸化の抗体16を使った検出を示す図である。PKA 1 U / well、30 で反応 A 450 nm ($n = 3$)、* 平均値 ± 標準誤差 ($n = 3$)

【図3-2】PKA によるスレオニン残基のリン酸化の抗体16を使った検出を示す図である。PKA 1 U / well、30 で反応 A 450 nm ($n = 3$)、* 平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$)

【図4】AMPK によるスレオニン残基のリン酸化の抗体16を使った検出を示す図である。AMPK 10 mU / well、30 で反応 A 450 nm ($n = 3$)、* 平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$)

【図5】PKC によるスレオニン残基のリン酸化の抗体16を使った検出を示す図である。PKC 6.3 mU / well、30 で1時間反応 A 450 nm ($n = 3$)、* 平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$)

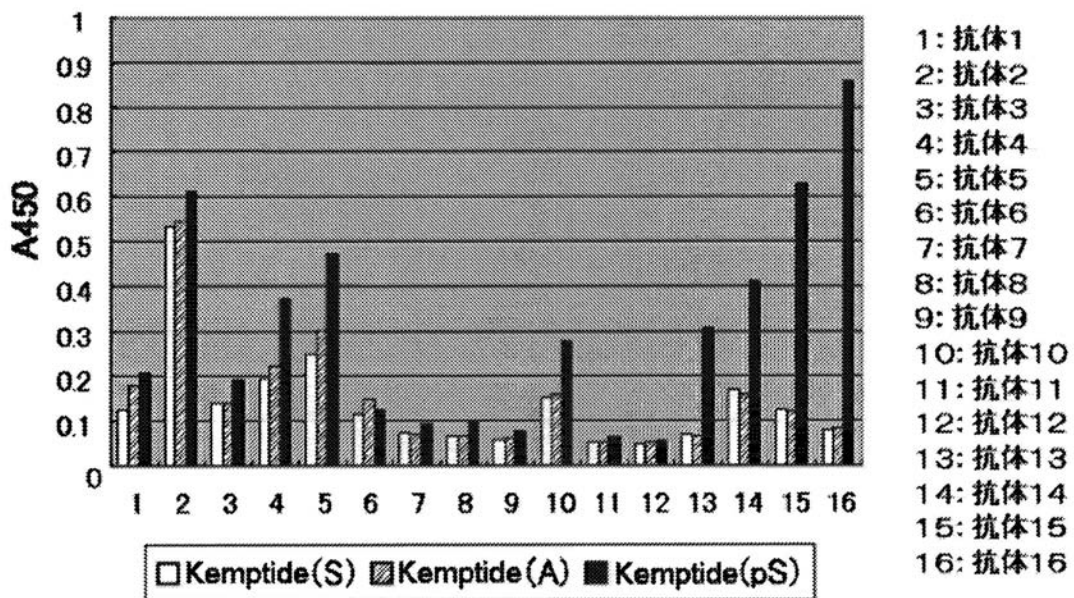
【図6】HEK293細胞でPKAとGFP遺伝子を発現させた細胞抽出液でのリン酸化反応の検出を示す図である。タンパク量 $0.03 \mu\text{g} / \text{well}$ 、30 で1時間反応 A 450 nm ($n = 3$)、* 平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$)

【図7】L6細胞でのメトフォルミンとAICAR刺激細胞抽出液でのリン酸化反応の検出を示す図である。タンパク量 $0.1 \mu\text{g} / \text{well}$ 、30 で1時間反応 A 450 nm ($n = 3$)、* 平均値 ± 標準偏差 ($n = 3$)

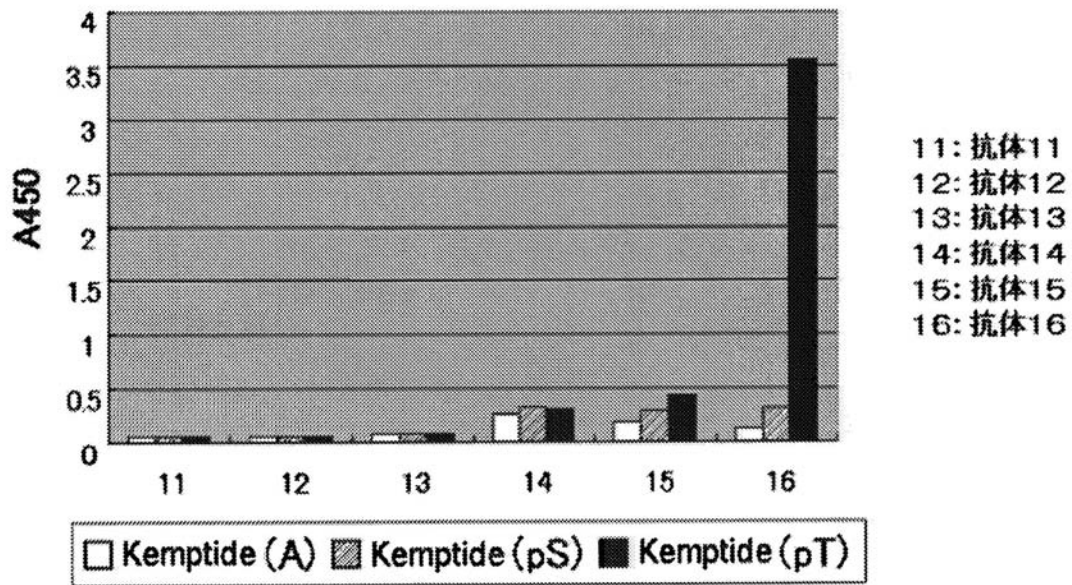
【図8】スライドガラス表面に固定化したペプチドアレイを用いて、リン酸化反応を蛍光イメージング画像で示した図である。写真は、左からそれぞれ、キナーゼを加えないコントロール [Kinase(-)]、PKA 酵素を使った場合 [PKA(+)]、PKA 発現細胞抽出液を使っ

た場合〔PKA Lysate(+)〕、GFP発現細胞抽出液を使った場合〔GFP Lysate(+)〕の結果を示す。

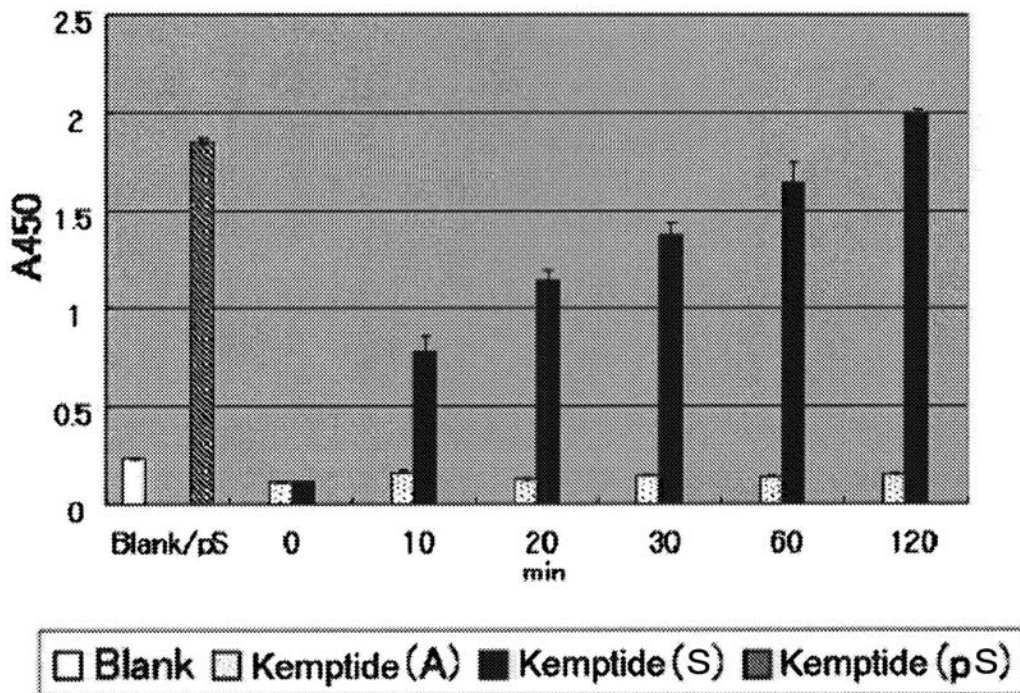
【 図 1 】



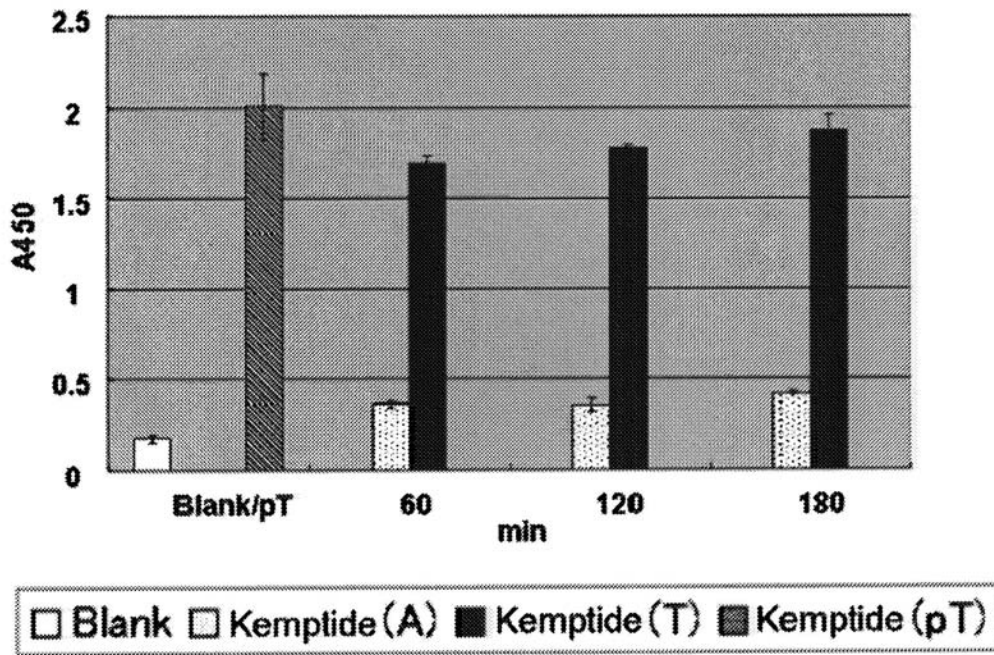
【图 2】



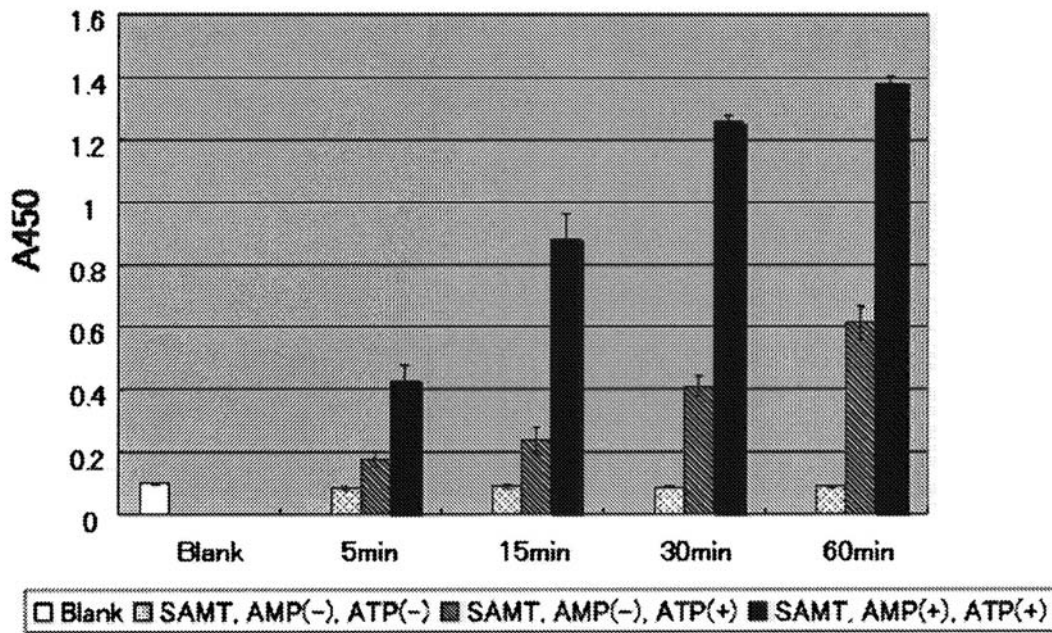
【图 3 - 1】



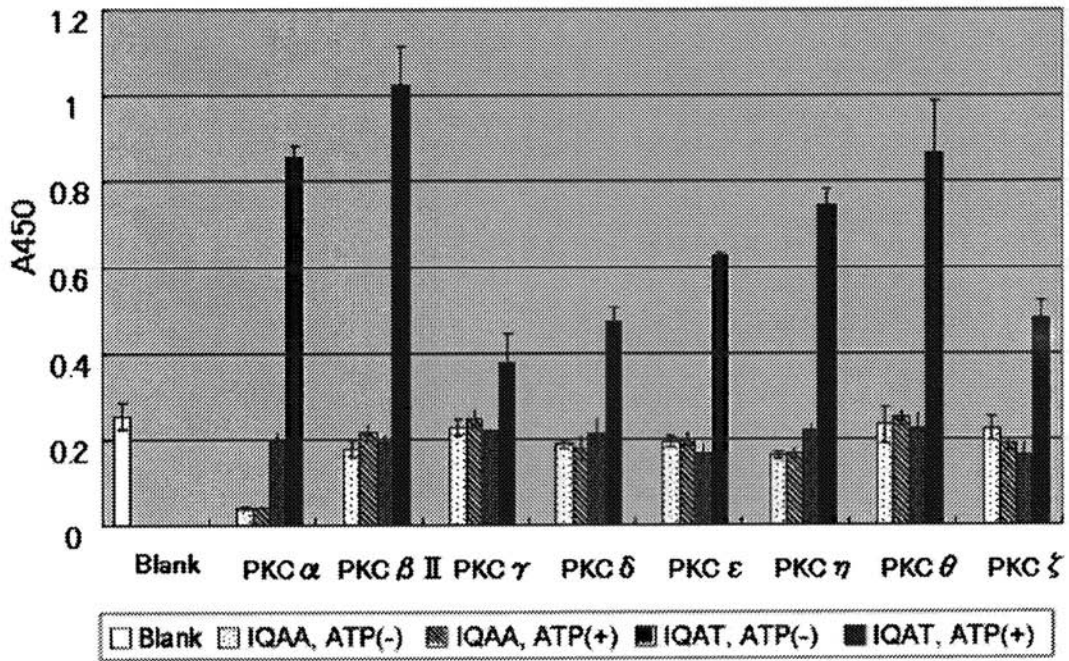
【 図 3 - 2 】



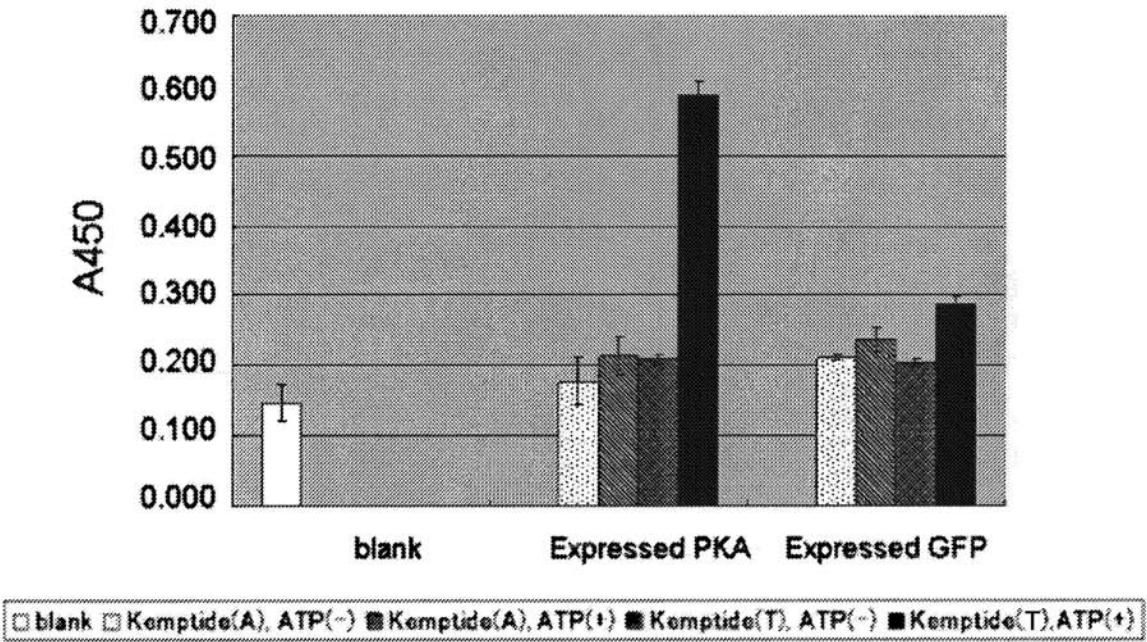
【 図 4 】



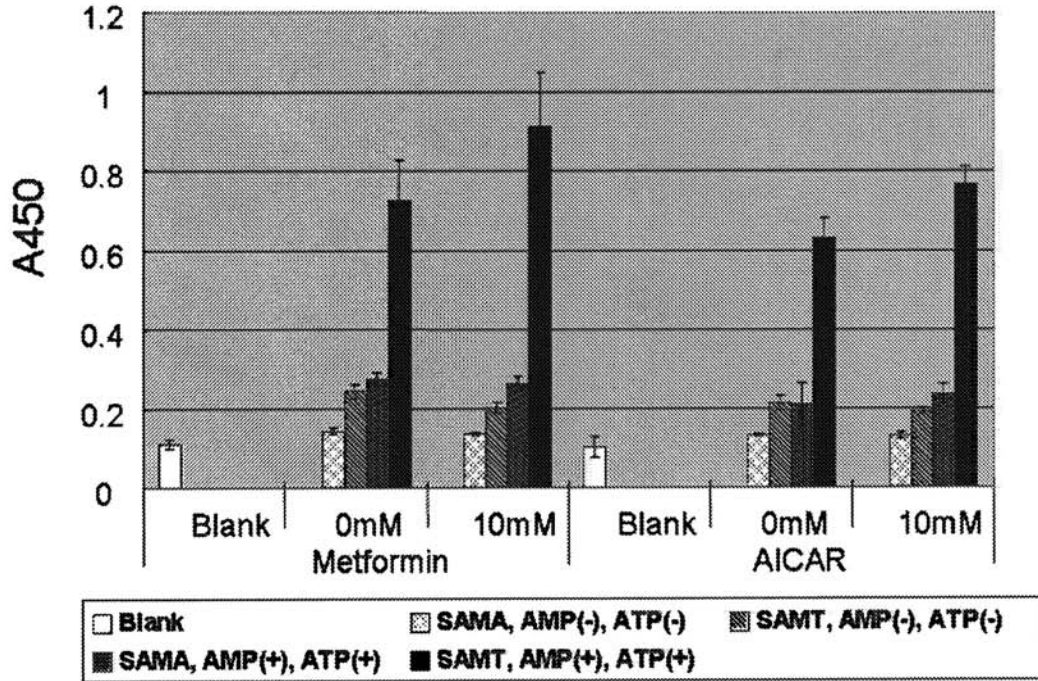
【 図 5 】



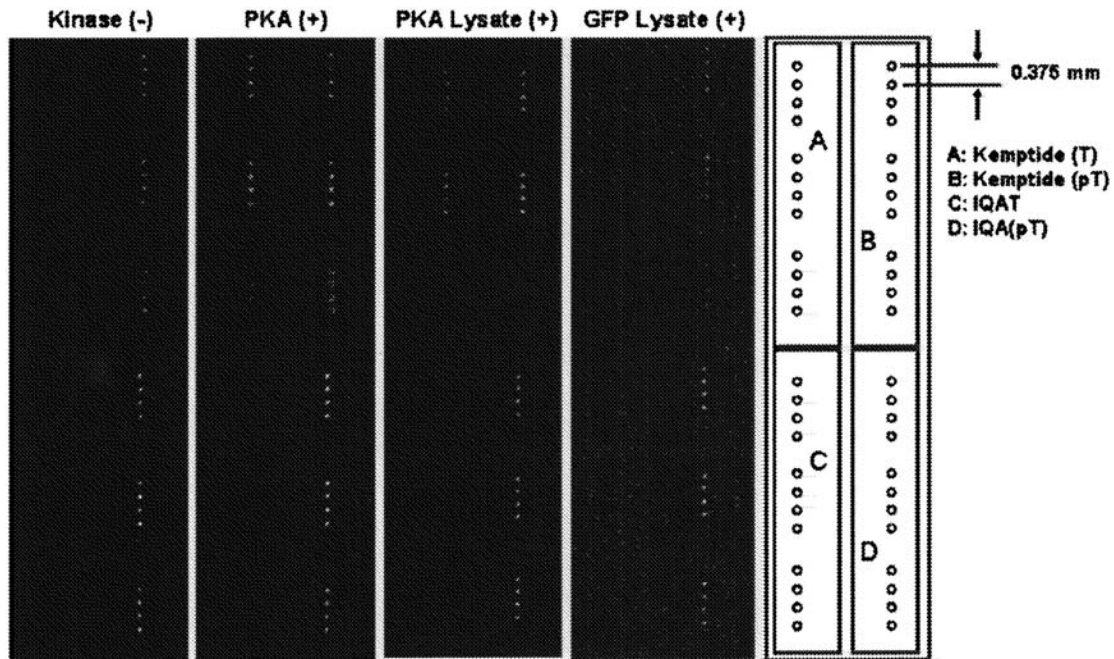
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

200810435600001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)			G 0 1 N 33/53			D
C 0 7 K 7/06 (2006.01)			C 0 7 K 7/06			
C 0 7 K 7/08 (2006.01)			C 0 7 K 7/08			
C 0 7 K 14/00 (2006.01)			C 0 7 K 14/00			

- (72)発明者 和田 卓也
大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 西村 伸太郎
大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内
- (72)発明者 片山 佳樹
福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大学大学院工学研究院応用化学部門内
- (72)発明者 園田 達彦
福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大学大学院工学研究院応用化学部門内
- (72)発明者 喜多 康浩
愛知県半田市東本町1-6 リヴィエール半田4C
- (72)発明者 高橋 紀代子
茨城県つくば市桜2-26 メゾンクレール C-106
- (72)発明者 土田 暁子
茨城県土浦市大町14-16-804

Fターム(参考) 2G045 AA34 CB01 DA36 FB01 FB03
4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ27 QQ95 QQ96 QR07 QR48 QR82 QS26
QS33 QX01
4H045 AA10 BA15 BA16 BA17 BA18 BA60 EA50 EA51 FA20

专利名称(译)	用于检测磷酸化 - 去磷酸化反应的底物组和使用其的检测方法		
公开(公告)号	JP2008104356A	公开(公告)日	2008-05-08
申请号	JP2005029690	申请日	2005-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	安斯泰来制药股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	安斯泰来制药公司		
[标]发明人	冲津修 長島建之 村元正和 和田卓也 西村伸太郎 片山佳樹 園田達彦 喜多康浩 高橋紀代子 土田曉子		
发明人	冲津 修 長島 建之 村元 正和 和田 卓也 西村 伸太郎 片山 佳樹 園田 達彦 喜多 康浩 高橋 紀代子 土田 曉子		
IPC分类号	C12Q1/48 C07K17/02 C12Q1/42 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00		
CPC分类号	C07K7/08 C07K7/06 C12Q1/42 C12Q1/485		
FI分类号	C12Q1/48.ZNA.Z C07K17/02 C12Q1/42 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C12Q1/48.ZZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ27 4B063/QQ95 4B063/QQ96 4B063/QR07 4B063/QR48 4B063/QR82 4B063/QS26 4B063/QS33 4B063/QX01 4H045/AA10 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA60 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA20		
代理人(译)	高岛肇		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种简单地装置可测量反应蛋白激酶或蛋白磷酸酶。A，其包括在包含于所述衬底以与天然存在的蛋白激酶与含有蛋白激酶的至少一个基板组苏氨酸残基的肽人造基底，在基底基取代的氨基酸序列的丝氨酸残基固定包含肽阵列，其特征在于通过使用肽阵列和抗磷酸苏氨酸抗体，检测磷酸化和/或去磷酸化，利用肽阵列和抗磷酸苏氨酸抗体的方法其特征，其特征在于通过使用基于激活和/或蛋白激酶和/或蛋白磷酸酶的失活和肽阵列和抗磷酸苏氨酸抗体，蛋白激酶或蛋白磷酸酶的疾病的诊断方法改变活动一种筛选待测试物质的方法。系统技术领域

リン酸化セリン残基の抗体認識反応

抗体	A450nm (n=1)			
	Kemptide(S)	Kemptide(A)	Kemptide(pS ⁺)	
抗体1	7F12	0.125	0.1785	0.207
抗体2	16B4	0.532	0.5425	0.6085
抗体3	Q5 (Qiagen)	0.14	0.1425	0.1905
抗体4	ab6639 (Abcam)	0.196	0.222	0.3695
抗体5	PSR-45 (Sigma)	0.25	0.303	0.472
抗体6	608 (Zymed)	0.1155	0.1475	0.127
抗体7	1C8	0.0715	0.0705	0.0935
抗体8	4A3	0.0645	0.0655	0.0985
抗体9	4A9	0.0575	0.0605	0.0765
抗体10	Zymed anti-pS	0.1515	0.1585	0.277
抗体11	PTHR-1E11	0.05035	0.05075	0.06175
抗体12	PTHR-4D11	0.04815	0.04875	0.05345
抗体13	PTHR-14B3	0.06915	0.0671	0.3091
抗体14	Q7	0.17135	0.15855	0.41145
抗体15	CEMICON	0.12515	0.12235	0.62825
抗体16	Zymed anti-pT	0.07885	0.0806	0.85815