

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 26700

(P2003 - 26700A)

(43)公開日 平成15年1月29日 (2003.1.29)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 K 16/40	ZNA	C 0 7 K 16/40	ZNA 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 数)

(21)出願番号 特願2001 - 213536(P2001 - 213536)

(22)出願日 平成13年7月13日 (2001.7.13)

(71)出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所

東京都千代田区霞が関1 - 3 - 1

(72)発明者 茂里 康

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政

法人産業技術総合研究所関西センター内

(72)発明者 達 吉郎

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政

法人産業技術総合研究所関西センター内

(72)発明者 湯元 昇

大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政

法人産業技術総合研究所関西センター内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素を認識する抗体

(57)【要約】

【課題】数多くのゲノムの中から、情報伝達系で重要な働きを担っているセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素の機能を有するゲノムを検出する方法の提供。

【解決手段】セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素間で共通性が見られる11ヶ所のサブドメインのうち、もっとも酵素間での類似性の高いサブドメインVIB部分のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドを抗原として抗体を作成することによって、各種のセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素を認識する抗体が得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体。

【請求項 2】 さらに、CaMKII、CaMKIV、プロテインキナーゼ A、プロテインキナーゼ C、MAPキナーゼ及びMAPキナーゼキナーゼから選択される少なくとも 1 種のタンパク質に反応性を示す請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】 配列番号 1 で表されるペプチド又はそのキャリア蛋白結合体を免疫抗原として、ヒトを除く温血動物に免疫して得られる請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】 ウサギ抗血清である請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】 ポリクローナル抗体である請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 6】 請求項 1 に記載の抗体を使用して免疫学的アッセイを行うことを特徴とする、セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素を検出又は測定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素に反応性を示す抗体及び該抗体を用いたセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素の検出又は測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】細胞の情報伝達系は、主に細胞膜上に伝達された刺激が、細胞膜上の受容体やチャンネルタンパク質などを活性化することにより始まる。次いでカルシウムイオンやcAMPなどのセカンドメッセンジャーの増減や、各種タンパク質リン酸化酵素の活性化及び不活性化が起こることにより、刺激は順次細胞内に伝達されていく (Cano, E., and Mahadevan, L. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. Trends Biochem. Sci. 20, 117-122)。

【0003】それらの一連の情報伝達系で重要な働きを担っているタンパク質リン酸化酵素は、動植物細胞内には、千種類以上が存在すると言われており、これまでに数百種の酵素の一次構造が決定され報告されている。これらのタンパク質リン酸化酵素は大きく二つに分けられる。一つは、ターゲットとなるタンパク質のTyr残基をリン酸化するタンパク質で、Tyrタンパク質リン酸化酵素と呼ばれている。このリン酸化酵素は、増殖因子受容体自身である場合が多い。もう一つは、ターゲットとなるタンパク質のSer又はThr残基をリン酸化するセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素である。セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素の代表的なものとして、プロテインキナーゼ A、プロテインキナーゼ C、多機能性Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMKII、CaMKIV)、MAPキナーゼなどがあげられる。

【0004】これまで報告されたセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素の一次構造の比較により、タンパ

ク質リン酸化酵素間で共通に保存された11ヶ所のサブドメイン構造が存在することが知られている (Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. FASEB J. 9, 576-596)。従来の研究では、特定の酵素に対し特異性の高い抗体を調製して、目的の酵素の細胞内での動向を調べたり、分布を調べたりすることが盛んに行われてきた。しかし、最近では、ポストゲノムの時代となり、ゲノムの多様な機能を発見することが求められている。そのような状況において、数多くのゲノムの中から、前記のように情報伝達系で重要な働きを担っているセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素の機能を有するゲノムを検出することは非常に有用である。しかしながら、実用に耐える検出方法は未だ供給されていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素に反応性を示す抗体及び該抗体を用いたセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素の検出又は測定方法の提供を目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記従来技術の問題点に鑑み鋭意検討を重ねた結果、セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素間で共通性が見られる11ヶ所のサブドメインのうち、もっとも酵素間での類似性の高いサブドメインVIB部分のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドを抗原として抗体を作成し、該抗体が各種のセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素を認識することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】すなわち、本発明は、以下の抗体、検出又は測定方法を提供するものである。

項 1 . 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体。

項 2 . さらに、CaMKII、CaMKIV、プロテインキナーゼ A、プロテインキナーゼ C、MAPキナーゼ及びMAPキナーゼキナーゼから選択される少なくとも 1 種のタンパク質に反応性を示す項 1 に記載の抗体。

項 3 . 配列番号 1 で表されるペプチド又はそのキャリア蛋白結合体を免疫抗原として、ヒトを除く温血動物に免疫して得られる項 1 に記載の抗体。

項 4 . ウサギ抗血清である項 3 に記載の抗体。

項 5 . ポリクローナル抗体である項 3 に記載の抗体。

項 6 . 項 1 に記載の抗体を使用して免疫学的アッセイを行うことを特徴とする、セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素を検出又は測定する方法。

【0008】

【発明の実施の形態】本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸などの略号による表示は IUPAC、IUB の規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)及

び当該分野における慣用記号に従うものとする。

【0009】本発明に係る抗体は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド又はこれを含む免疫抗原を利用して、一般的な抗体の製造法に従い製造することができる。該抗体には、温血動物の抗血清や鶏卵抗体等のポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が包含される。また、本発明の抗体は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに反応性を有し、さらにセリン-トレオニンタンパク質リン酸化酵素に反応性を有する。

【0010】かかる特性を有する本発明抗体は、特定の免疫抗原を温血動物(ヒトを除く)に免疫することにより取得することができ、その方法乃至手法は、常法に従うことができる。例えば、免疫抗原となる配列番号1で表されるペプチドを温血動物に免疫することによって、抗体を該温血動物の血液等の体液内又は該温血動物が産卵した卵内に産生させ、それらより取得することができる。

【0011】前記免疫抗原としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、タンパク質等が使用される。該ペプチドは常法にしたがったペプチド合成により製造でき、該タンパク質はセリン-トレオニンタンパク質リン酸化酵素として入手できる。また、配列番号1で表されるペプチドのキャリア蛋白結合体は、該ペプチドを、常法に従い、例えば該ペプチドのN末端にシステインを付加し、これにキーホールリンペットヘモシアニン(keyhole limpet hemocyanin)(KLH)とコンジュゲートさせることにより製造される。前記キャリア蛋白としては、抗原乃至ハプテンの免疫原性を高めるものとして当該分野で慣用される各種キャリア蛋白をいずれも使用できる。その例としては、アルブミン、グロブリン、ヘモシアニン等の各種動物タンパク質やポリリジン等の人工ポリペプチド等を例示できる。これらキャリア蛋白は、慣用の試薬を用いた縮合反応等により、配列番号1で表されるペプチドとの結合体とすることができる。該試薬としては、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)等のような水溶性カルボジイミド類や、ジメチルスルフェイミデート(DMS)のような縮合剤等が使用される。前記のようにして得られるキャリア蛋白結合体は、それ自体所望の免疫原性を有し、本発明抗体製造用の免疫抗原として使用できる。

【0012】前記免疫抗原を用いた免疫化及び所望抗体の取得操作も、常法に従うことができる。例えば、ポリクローナル抗体の製造は、ウサギ、ヒツジ、モルモット、ニワトリのような温血動物に、前記免疫抗原を通常フロイントの完全アジュバントとともに1又は複数回免疫することにより抗血清を産生させ、そしてその血液を採取し、常法に従い抗血清を取得することにより実施できる。また、温血動物としてニワトリを用いる場合に

は、前記免疫抗原を1又は複数回免疫して、該ニワトリが産卵する鶏卵にイムノグロブリンY(IgY)を産生させ、そして該鶏卵の卵黄より、常法に従いIgYを取得することによってもポリクローナル抗体を得ることができる。

【0013】本発明の抗体は、常法に従い、モノクローナル抗体としても取得可能である。該モノクローナル抗体は、例えば、上記免疫抗原をフロイントの完全アジュバントとともにマウスに1又は複数回投与して免疫化し、抗体を産生させるとともに、例えば細胞融合法等の常法に従い得られる抗体産生細胞と骨髓脾細胞とを融合し、クローニングし、目的とする抗体を産生する単クローン細胞を分離し、該細胞の培養により取得することができる。

【0014】このようにして得られる本発明の抗体は、所望により、硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の常法に従いさらに精製することができる。

【0015】而して、本発明の抗体の取得に際しては、取得された抗体と配列番号1で表されるペプチドとの反応性を試験することにより、さらに必要に応じてセリン-トレオニンタンパク質リン酸化酵素との反応性を試験することにより、例えば、免疫された温血動物の個体間より、或いはクローン化された単クローン間より、適宜行うことができる。当該反応性の試験は、抗体と供試物との免疫反応性が確認できる限りにおいて特に制限はなく、例えば後述の実施例に記載の測定法に従い良好に実施することができる。

【0016】かくして得られる本発明の抗体を使用した一般の免疫学的アッセイにより、セリン-トレオニンタンパク質リン酸化酵素の検出又は測定が可能である。該免疫学的アッセイとしては、例えば、酵素イムノアッセイ(EIA)、酵素イムノメトリックアッセイ(ELISA)、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ等を制限なく使用することができる。これらのアッセイは、一般的な競合法やサンドイッチ法等の手法に従って実施することができる。好ましくは、EIAが使用される。

【0017】EIA法において、本発明の抗体は固相化抗体として使用され、固相化する担体としては、特に制限はなくEIA法において常用されるものをいずれも使用することができる。例えば、ポリスチレン製の96ウェルのマイクロタイタープレートが挙げられる。抗体を固相化させるには、例えば、抗体を含む緩衝液を担体上に載せ、4で一晚静置することによって行える。緩衝液の組成、濃度は常法に従えばよい。本発明の抗体の抗原は、酵素と結合させられ、酵素結合体となる。結合させる方法は酵素と抗原とが結合する方法であれば特に制限はなく、常法に従えばよい。前記のようにして得られた固相化抗体と酵素標識抗原とを用いたEIA法によ

て、セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素の検出、測定が可能である。

【0018】尚、前記セリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素の測定・検出を行うに際しては、本発明の抗体を有効成分として含有する測定キットを利用するのが簡便である。かかるキットには、本発明抗体に加えて、当該測定・検出を実施するに際して必要な任意の他の試薬を更に包含させることができる。その例としては、前記の標識抗原及び/又は標準抗原液、さらにはアッセイ緩衝液等を例示することができる。

【0019】

【実施例】以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

【0020】(i) Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼIIの132位~146位のアミノ酸配列のN末端にシステインを付加したペプチド(CVVHRDLKPENLLLAS)は、島津製作所製のペプチド固相合成機PSSM8を使用し、フル

オレニルメトキシカルボニルペプチド(fmoc)合成法により合成した。ペプチドは逆相カラムクロマトグラフィー(OVS-80Tm, トーソー社製)を用い、高速液体クロマトグラフィーにより精製した。ペプチドの分子量決定には、FAB質量分析機を用いた。

【0021】(ii) CaMKIIはラット大脳皮質から精製した。CaMKIVとプロテインキナーゼCはラット脳から精製した。プロテインキナーゼA(触媒サブユニット)は牛心臓から精製した。MAPキナーゼ及びMEK(MAPキナーゼキナーゼ)はUpstate Biotechnology社から購入した。

【0022】(iii) ウェスタンブロット法は既存の方法により行った(Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

【0023】実施例1

前記(i)において合成された合成ペプチドのN末端のシステインを、キャリアタンパク質であるキーホールリンペットヘモシアニン(keyhole limpet hemocyanin (KLH))と結合させ抗原性を増すために、以下の操作を行った。KLHを10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2)に溶かし14.5 (mg/ml)の溶液を546 μ l作成した。N-(6-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド(N-(6-maleimidocaproyloxy) succinimide) (同仁化学製)をジメチルホルムアミドに溶かした溶液(24.5 mg/ml)を56 μ l加え、室温で30分攪拌した。10,000rpmで5分遠心し、上清をゲル濾過クロマトグラフィー-Sephadex G50 (Amersham Pharmacia Biotech社製)に負荷し、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)で溶出し、280 nmにピークのある画分を回収した。1mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)の1mlに合成ペプチドの5mgを溶解した溶液をさらに加え、

室温で3時間攪拌し、抗原溶液を作成した。注射器内で完全フロイントアジュバント(Freund's complete adjuvant) (FCA)と抗原溶液を攪拌し、乳濁液を作成し、ウサギ(Japanese white)に免疫した。以後二週間ごとに計4回免疫した。ただし、二回目の免疫からはFCAの代わりに、不完全フロイントアジュバント(Freund's incomplete adjuvant)を使用した。免疫したウサギから少量採血し、ラット大脳皮質から精製したCaMKIIを使用し、ドットブロット解析を行い抗体価が上がっていることを確認した。その後、ウサギから大量採血を行った。血液を3.5時間室温放置後48時間低温に放置して血餅を作らせ、その後3000gで遠心して血清を得た。この血清を50%飽和の硫酸アンモニウムを加えて4.5時間攪拌後、沈殿を集めて4 で保存し抗体(以下、KI98抗体とする)として使用した。

【0024】実施例2

実施例1で得られた抗体KI98の反応特異性を調べるために、精製したセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素をSDS電気泳動したのち、タンパク質染色とウェスタンブロット法を行った(図1)。KI98は、調べたCaMKII、CaMKIV、プロテインキナーゼA、プロテインキナーゼC、MAPキナーゼを全て検出することが出来た。またデータは示していないがMEK(MAPキナーゼキナーゼ)を検出できることも確認した。

【0025】次にこの抗体により検出可能な抗原量の限界を調べるためにドットイムノバインディングアッセイ(Dot immunobinding assay) (Hawkes, R., Niday, E., and Gordon, J. (1982) *A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies*. *Anal. Biochem.* 119, 142-147)を行った。この方法では、ニトロセルロースフィルター上に様々な量を变化させた抗原タンパク質(CaMKIV、プロテインキナーゼA、MAPキナーゼ)をスポットし、KI98抗体により検出を試みた。図2に示したように、調べたCaMKIV、プロテインキナーゼA、MAPキナーゼともに、スポットした最少量の抗原(0.2 ng)まで検出可能であることがわかった。

【0026】実施例3

次にKI98抗体を用いたウェスタンブロット法により、細胞抽出液に含まれる様々なセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素を検出した。ラットの大脳、小脳、脾臓、肝臓、腎臓、肺、心臓の可溶性画分(細胞質タンパク質)と顆粒画分(膜タンパク質、核タンパク質など)をSDS電気泳動で分離した後、ウェスタンブロット法による分析を試みたところ、図3に示したように臓器により異なる染色バンドが検出された。ラット脳に豊富に存在することが知られているCaMKII (Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. F. T., Xuong, N-H., Taylor, S. S., and Sowadski, J. M. (1991) *Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent proteinkin*

inase. Science 253, 414-420) に関しては、大脳抽出液では サブユニットと サブユニットがそれぞれ予想される50kDaと60kDaの分子量の位置に認められ、また小脳抽出液中にはCaMKIIの サブユニットと思われるバンドがはっきり観察された。また、その他の臓器にもそれぞれ異なる多様なバンドが見られることから、様々なセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素がこの抗体によって検出されていることが確認される。

【0027】

【発明の効果】様々なセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素間で特に一次構造の保持されたサブドメイン VIBでも、アミノ酸配列は酵素により微妙に異なってい

る。しかし、今回得られたKI98抗体によれば各種のセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素を認識可能である。このため、数多くのゲノムの発現クローニングに際し未知のセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素を一網打尽に捉え、その解析をすすめるための重要な検出ツールとして使うことができる。以上のようにKI98抗体はセリン - トレオニンタンパク質リン酸化酵素を広く検出するための非常に有用なツールになるものと考えられる。

【0028】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science

<120> Antibody recognizing serine-threonine kinase

<130> 113MS0288

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn
Leu Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Ile Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn
Leu Leu Tyr Ala Thr

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Leu Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn
Leu Leu Ile Asp Gln

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

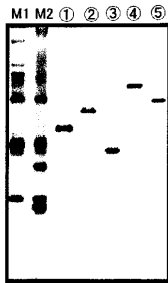
<212> PRT

<213> Human

<400> 4

【図1】

A タンパク染色



B ウェスタンブロッティング



【図2】

A. KI98 抗血清

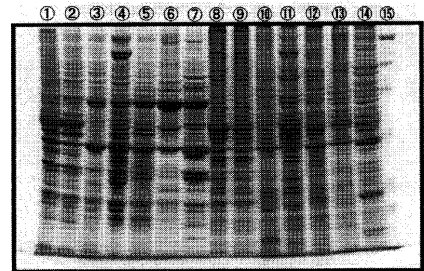
Protein Kinase (ng)		10	5	1	0.5	0.2
PKIV		●	●	●	●	●
PKA		●	●	●	●	●
MAPK		●	●	●	●	●

B. コントロール血清

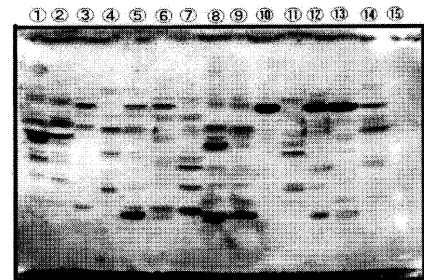
Protein Kinase (ng)		10	5	1	0.5	0.2
PKIV						
PKA						
MAPK						

【図3】

A タンパク染色 (CBB)



B ウェスタンブロッティング



フロントページの続き

(72)発明者 石田 敦彦
 北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号
 旭川医科大学内

(72)発明者 木下 俊
 香川県木田郡三木町大字池戸2393 香川大
 学農学部内
 (72)発明者 亀下 勇
 香川県木田郡三木町大字池戸2393 香川大
 学農学部内

Fターム(参考) 4H045 AA11 CA42 DA75 EA50 FA74

专利名称(译)	抗体识别丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶		
公开(公告)号	JP2003026700A	公开(公告)日	2003-01-29
申请号	JP2001213536	申请日	2001-07-13
申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	茂里康 達吉郎 湯元昇 石田敦彦 木下俊 龜下勇		
发明人	茂里康 達吉郎 湯元昇 石田敦彦 木下俊 龜下勇		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/40		
FI分类号	C07K16/40.ZNA G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测具有丝氨酸 - 苏氨酸蛋白磷酸化酶功能的基因组的方法，其发挥信息传递系统的重要作用。解决方案：基于具有丝氨酸 - 苏氨酸蛋白磷酸化酶之间最高相似性的亚结构域VIB部分的氨基酸序列的合成肽，在具有酶之间共性的11个亚结构域中用作抗原以制备抗体它识别许多丝氨酸 - 苏氨酸蛋白磷酸化酶。

