

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/40		C 0 7 K 16/40	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/15	4 B 0 6 4
15/02		33/50	4 B 0 6 5
15/09	ZNA	C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 27 O L (全 29数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 29774(P2001 - 29774)	(71)出願人	390004097 株式会社医学生物学研究所 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5F
(22)出願日	平成13年2月6日(2001.2.6)	(72)発明者	田路 真悟 長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063 - 10 3 株式会社医学生物学研究所内
		(72)発明者	玉井 克之 長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063 - 10 3 株式会社医学生物学研究所内
		(74)代理人	100062007 弁理士 川口 義雄 (外 2 名)
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 タンパク質リン酸化酵素活性の測定方法、測定用キット及び測定に用いる抗体

(57)【要約】

【課題】 ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素によりリン酸化された基質を特異的に認識して結合する抗体を用いてヒトAurora2リン酸化酵素の活性を測定する方法、活性を測定するためのキット、活性を測定するための抗体及びヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害若しくは促進する化合物をスクリーニングする方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素によりリン酸化された基質、例えばヒトLats2タンパク質を特異的に認識して結合する抗体を用いて該基質のリン酸化を免疫学的に測定し、ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素のリン酸化活性を測定する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素と、これによってリン酸化される基質を接触させて、リン酸化基質を合成するリン酸化ステップと、リン酸化された基質のみを認識する抗体とリン酸化された基質を結合させる抗体結合ステップと、リン酸化基質と前記抗体との結合物を測定する測定ステップと、を含むことを特徴とするタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

【請求項 2】 前記抗体結合ステップの次に、前記抗体を認識する標識抗体を前記結合物と反応させる 2 次抗体結合ステップを含むことを特徴とする、請求項 1 記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

【請求項 3】 前記ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

【請求項 4】 前記基質がヒトLats2タンパク質の83番目のアミノ酸を含む全長或いは部分配列であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

【請求項 5】 前記基質がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

【請求項 6】 前記抗体が 83 番目のセリン残基がリン酸化されたヒトLats2タンパク質の 78 番目から 87 番目のアミノ酸配列（配列番号 1）からなるペプチドを認識する抗体であることを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

【請求項 7】 前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

【請求項 8】 少なくとも、ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素によってリン酸化される基質と、該タンパク質リン酸化酵素によって該基質をリン酸化して得られるリン酸化基質のみを認識する抗体と、を含むことを特徴とする、タンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

【請求項 9】 さらに、リン酸化された基質が固相化される担体を含む請求項 8 に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

【請求項 10】 前記ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素を、さらに含むことを特徴とする請求項 8 または 9 に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

【請求項 11】 前記抗体を認識する標識抗体を、さらに含むことを特徴とする、請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

【請求項 12】 前記ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする、請求項 8 から 11 のいずれか 1 項に記載のタンパク

質リン酸化酵素の活性測定キット。

【請求項 13】 前記基質がヒトLats2タンパク質の83番目のアミノ酸を含む全長或いは部分配列であることを特徴とする請求項 8 から 12 のいずれか 1 項に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

【請求項 14】 前記基質がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする請求項 8 から 13 のいずれか 1 項に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

【請求項 15】 前記抗体が 83 番目のセリン残基がリン酸化されたヒトLats2タンパク質の 78 番目から 87 番目のアミノ酸配列（配列番号 1）からなるペプチドを認識する抗体であることを特徴とする、請求項 8 から 14 のいずれか 1 項に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

【請求項 16】 前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 から 15 のいずれか 1 項に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

【請求項 17】 ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素と化合物を接触させた後に、ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素と、これによってリン酸化される基質を接触させて、リン酸化基質を合成するリン酸化ステップと、リン酸化された基質のみを認識する抗体とリン酸化された基質を結合させる抗体結合ステップと、リン酸化基質と前記抗体との結合物を測定する測定ステップと、を含むことを特徴とするヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 18】 前記抗体結合ステップの次に、前記抗体を認識する標識抗体を前記結合物と反応させる 2 次抗体結合ステップを含むことを特徴とする、請求項 17 に記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 19】 前記ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする、請求項 17 または 18 に記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 20】 前記基質がヒトLats2タンパク質の83番目のアミノ酸を含む全長或いは部分配列であることを特徴とする請求項 17 から 19 のいずれか 1 項に記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 21】 前記基質がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする請求項 17 から 20 のいずれか 1 項に記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 22】 前記抗体が 83 番目のセリン残基がリン酸化されたヒトLats2タンパク質の 78 番目から 87 番目のアミノ酸配列（配列番号 1）からなるペプチドを

認識する抗体であることを特徴とする、請求項17から21のいずれか1項に記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項23】 前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項17から22のいずれか1項に記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項24】 83番目のセリン残基がリン酸化されたヒトLats2タンパク質の78番目から87番目のアミノ酸配列(配列番号1)からなるペプチドを認識する抗体。

【請求項25】 モノクローナル抗体である請求項24に記載の抗体。

【請求項26】 請求項25に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項27】 ハイブリドーマ株3B11F3F4(受託番号FERMP-18174)である請求項26に記載のハイブリドーマ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素と、リン酸化された基質アミノ酸を特異的に認識して結合する抗リン酸化ペプチド抗体との結合物を定量化することによりタンパク質リン酸化酵素の活性を測定する方法、活性を測定するためのキット、活性を測定するための抗体及びヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害若しくは促進する化合物をスクリーニングする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】細胞周期はDNA合成準備期(G1)→DNA合成期(S)→細胞分裂準備期(G2)→分裂期(M)→G1...という4つの時期からなる周期である。このなかでM期は前期、前中期、中期、後期、終期、細胞質分裂という順番に、複製された染色体の凝縮・分離・脱凝縮、核膜の崩壊と再形成、紡錘体形成、細胞質分裂などきわめて複雑な事象が時間的かつ空間的に秩序正しく起き、均等に染色体と細胞質が娘細胞に分配される期間である。細胞が遺伝情報を正確に次の世代に伝えるためには、染色体複製が正確に完了することが必須である。もし何らかの原因でDNA複製が遅れたときには細胞周期を停止し、複製の完了を待つしくみがあり、これをDNA複製のチェックポイントと言う。チェックポイントはG1/S、G2、M期において作動し、染色体の安定性を維持するための監視機構である。チェックポイント機構が異常を感知した場合、細胞周期を停止させると同時に、修復に関わる分子を活性化する。修復できた場合は再び細胞周期は回り始めるが、修復不可能な場合は細胞死を誘導し、異常細胞を除去する。このシステムの破綻は癌の特徴である、染色体数が過剰或いは不足した異数体(aneuploid)や倍

数体(polyploidy)と呼ばれる染色体数(ploidy)が異常となった細胞を生じさせる。近年、癌の悪性化と深く関わっている染色体数の異数化を生じる原因として、G2/M期のチェックポイント機構の問題が注目されている(参考文献1,2,3、以下同じ)。なかでもM期チェックポイントはG1/S、G2期のチェックポイントを何らかの原因により回避してきた細胞周期を停止させるための最後の関門である。したがってこのM期チェックポイントの破綻は、染色体数の変化を起こす原因であるばかりでなく、そのような異常細胞の生存を許容し、個体にとって危険な状況を生む原因になると考えられている。したがってM期チェックポイントを活性化する薬剤が次世代の抗癌治療を担うものとして期待されている。

【0003】Aurora及びIpl1pはそれぞれショウジョウバエと出芽酵母においてM期の染色体分離において異常を起こす原因遺伝子の1つとして同定されたセリン/スレオニンリン酸化酵素である。このファミリーはその後の解析によりM期における分裂装置の重要な構成成分であると共に、M期チェックポイントの制御に中心的な役割を担っていると考えられるようになっている(4,5,6,7)。Aurora/Ipl1pファミリーはヒトでは3種類の遺伝子が報告されている(8,9)。

【0004】Aurora1(AUR1/ARK2/AIK2/AIM-1/STK12/STK-1)は344アミノ酸で構成され、17番染色体短腕13に位置し、タンパク質量はG2からM期にかけて増加し、タンパク質リン酸化活性はM期の後期と終期に高く、細胞質分裂期に出現する中央体に存在することが明らかにされている(10,11)。

【0005】Aurora2(AUR2/ARK1/AIK1/BTAK/STK15)は403アミノ酸で構成され、20番染色体長腕13.2に位置し、タンパク質量はG2からM期にかけて増加し、タンパク質リン酸化活性はG2期の後半からM期の前期に高く、M期以外の間期には中心体に位置し、M期の間は分裂装置の主役である有糸分裂紡錘体に存在することが報告されている(10,12,13,14,15,16,17)。

【0006】Aurora3(AIE2/Aik3/STK13)は309アミノ酸で構成され、19番染色体長腕13.4に位置し、睾丸特異的な発現パターンを示すことから減数分裂に関わると予測されている。M期の後期に中心体に局在していることが報告されている(18,19,20)。

【0007】3種類のAuroraはN末端側に39-129アミノ酸からなる領域とそれに続きリン酸化酵素活性を示すコンセンサス領域と15-20アミノ酸からなる短いC末端領域をもつ。N末端領域はほとんど相同性を示さないが、KEN(リジン-グルタミン酸-アスパラギン)及びQRVL(グルタミン-アルギニン-バリン-ロイシン)という共通に保存されたアミノ酸配列を有する事が報告されており、基質特異性、局在、代謝、或いはAuroraのリン酸化活性の制御に関与している領域であると予想されている(8,21)。またリン酸化酵素領域は3種類のAuroraで67-76%の

同一性を示す。なおC末端領域にはD-boxと呼ばれるタンパク質分解に関与するコンセンサス配列が存在し、実際にユビキチン/プロテアソーム依存性タンパク質分解システムによりM期終了とともに急速に分解されることが報告されている(22, 23)。

【0008】Auroraはその局在と活性がM期に高いことからM期において重要な機能を担うと予測されている、特筆すべきは3種類のAuroraが癌細胞で過剰発現している点である。なかでもAurora2は、癌患者検体を用いた解析でAurora2がマップされている染色体20q13領域において増幅、転座、あるいは欠失という染色体異常が高頻度に観察されている(10, 12, 15)。Aurora2は、結腸癌で過剰発現しているリン酸化酵素としてPCRスクリーニング法で最初に単離されたが(10)、これは以前乳癌において異常増幅が報告されている20番染色体長腕13(20q13)におけるアンプリコンで同定されたリン酸化酵素BTAK (breast-tumor-amplified kinase) と同一の遺伝子であった(12)。20q13の増幅は様々な癌で観察されているが、特に結腸癌、胃癌、乳癌で顕著であることが報告されている(24, 25, 26, 27, 28, 29)。約60%の原発結腸癌、6-18%の原発性乳癌、BRCA2陽性乳癌の約60%で低いレベルの増幅が報告されている。また予後が非常に悪い悪性の乳癌においては高いレベルで20q13の増幅が報告されている(30)。次にAurora2遺伝子の増幅は52%の原発性結腸癌と(10)、12%の原発性乳癌で報告されている(15)。また培養細胞を用いた解析でも、乳癌、卵巣癌、結腸癌、前立腺癌、神経芽腫や子宮頸癌などの様々な頸部癌でAurora2遺伝子の増幅が確認されている(10, 15)。更にAurora2は正常繊維芽細胞をトランスフォームして癌化させる事が実験的に証明されていることから、20q13染色体領域における癌遺伝子本体である可能性が極めて高い(10, 15)。Aurora2特異抗体を用いた病理学的解析により、血管浸潤性の乳癌において94%もの高い確率で患部においてのみAurora2タンパク質を検出し、正常部位においては全く検出できなかったと言う報告がなされている。これは癌細胞の病理診断に用いられているPCNAの陽性率が40%前後であることを考えると驚異的な数字である。さらにAurora2タンパク質の局在は細胞質に変化しており、20q13の遺伝子増幅が観察されない患者検体においてもAurora2タンパク質の異常発現が観察された(31)。これらのことより、Aurora2タンパク質の異常発現とその蓄積により、M期チェックポイントの破綻を来し、中心体形成異常→紡錘体形成異常→染色体分離異常を生じ癌の特徴的な表現型である異数体に至ると言う、発癌に関わる点も強く示唆されている。これらの報告はAurora2を中心とするAuroraファミリーの阻害剤が有望な抗癌剤になり得る事を示している。

【0009】ヒトAuroraを介したシグナル伝達系はまだ明らかにされていない。Auroraタンパク質をリン酸化或いは脱リン酸化して活性を制御するであろう因子、或い

はAuroraタンパク質に結合して基質特異性や局在性、或いは結合することでAuroraタンパク質の活性を制御しているであろう因子については今後の研究を待たねばならない。またAuroraがリン酸化する生体内の基質についてもまだ明らかにされていない。しかしながら、これまでの知見より、Aurora2の過剰発現により、下流のシグナル伝達が過剰に活性化されることが癌化を誘発していると考えられる。Auroraファミリーはセリン/スレオニンキナーゼであることより、Auroraを介するシグナル伝達は標的分子のリン酸化に担われている。Auroraが標的分子をリン酸化する活性を指標にAuroraのリン酸化活性を阻害あるいは促進する分子のスクリーニング系の構築は癌に代表される細胞の異形成によって生じる疾患のみならず、形成不全による疾患の治療薬を開発する有効なツールになる。我々は、3種類のヒトAuroraタンパク質のなかで、最も癌との関係が深いと思われるAurora2に関してその基質がヒト癌抑制遺伝子Lats2であることを特定し、この阻害剤或いは促進剤を、安全で簡便かつ迅速にして大量にスクリーニングするシステムの構築に成功した。

【0010】ショウジョウバエの癌抑制遺伝子 *lats* (large tumor suppressor)/wartsはその欠失により、ショウジョウバエの全身に上皮性の腫瘍が発生することが報告されている(32, 33)。99年にその哺乳動物オースログ *Lats1* もまた癌抑制遺伝子であることが報告された(34, 35, 36, 37)。*Lats 1* は細胞周期依存的にM期にリン酸化され、*cdc2* に結合し、そのリン酸化活性を抑制する。この知見は、他の癌抑制遺伝子である、*p53* や *Rb* で証明されてきたように *Lats1* にも細胞周期を停止させる機能が存在することを示している。彼らはヒトの *Lats1* がショウジョウバエの *lats* を完全に相補する事、*Lats1* ノックアウトマウスは軟部組織の肉腫及び卵巣実質に腫瘍が生じる事を明らかにした。これらのことは *lats* がショウジョウバエのみならず、ヒトにおいても癌抑制遺伝子として機能していることを強く示している。

【0011】我々は、マウスの精子形成過程においてmRNAの発現が誘導される新規遺伝子として、*Lats1* のヒト及びマウスホモログを単離し、これをそれぞれヒト *Lats2*、マウス *Lats2* と命名し、機能解析を行った(38, 39)。

【0012】ヒト *Lats2* とマウス *Lats2* の遺伝子産物はそれぞれ1088アミノ酸、1042アミノ酸からなり、そのC末端領域にセリン・スレオニンキナーゼドメイン(40)を有していた。アミノ酸レベルでのホモロジー検索の結果、ヒト *Lats2* とマウス *Lats2* のホモロジーは80%であり、ヒト *Lats2* とヒト *Lats1*、マウス *Lats1* 及びショウジョウバエ *lats* とのホモロジーは全体でそれぞれ50%、46%、36%であった。またC末端領域でのホモロジーは、ヒト *Lats2* とマウス *Lats2* が91%、ヒト *Lats2* とヒト *Lats1*、マウス *Lats1* 及びショウジョウバエ *lats* はそれぞれ74

%, 74%, 69%の高いホモロジーが認められた。しかしながらキナーゼドメインよりN末端領域ではヒトLats2とマウスLats2では72%のホモロジーが認められたが、ヒトLats2とヒトLats1、マウスLats1及びショウジョウバエLatsとはそれぞれ33%、25%、17%の低いホモロジーであった。この事は哺乳動物のLats2とLats1は細胞内においてN末端領域に由来する異なった機能がある可能性を示唆している。Lats2のC末端領域に存在するキナーゼ・ドメインを大腸菌において発現させ、精製したリコンビナントタンパク質を用いた試験管内リン酸化アッセイにより、Lats2はマンガンイオン要求性のセリン・スレオニンキナーゼであり、自己リン酸化活性は存在するが、様々なリン酸化酵素の良い基質となるヒストンH1、H3、ミエリン塩基性タンパク質やβ-カゼインなどの外来性タンパク質に対するリン酸化活性は観察されなかった(41)。これはこの領域において高い相同性を示すNdr (nuclear, Dbf2-related) タンパク質リン酸化酵素で示された結果と同じである(42, 43)。また、ホスホアミノ酸解析によりこの自己リン酸化部位がセリン残基であることを明らかにした(41)。

【0013】ヒトLats2 遺伝子は染色体座位は第 13 染色体上(13q11-q12)にマップされ、この近傍には癌抑制遺伝子RB (13q14), BRCA2(13q12-q13)が位置し、多くの癌患者で LOH (loss of heterozygosity, ヘテロ接合性の消失)が見られる領域(44, 45, 46, 47, 48, 49, 50)であることから、Lats2が臨床的にも重要な癌抑制遺伝子である可能性が考えられる(39)。

【0014】マウスLats2はどの組織でも発現が見られるが、とりわけ卵巣と精巣 で高い発現がみられた。これに対して、ヒトLats2は心臓と筋肉で高い発現が観察された(39)。

【0015】ヒトLats2タンパク質に対する特異的モノクローナル抗体(3D10)を用いた解析によりLats2タンパク質はおおよそ125 kDaの移動度を示し、HeLa細胞など幾つかの細胞株においてリン酸化によるバンドシフトが確認された(39)。さらに、同調した培養細胞を用いて細胞周期におけるLats2タンパク質の発現とリン酸化シフトを調べた。その結果、Lats2タンパク質の発現は細胞周期依存的な変動は認められなかったが、リン酸化状態はG0期以外の細胞周期で常にリン酸化されているものの、M期(分裂期)にはリン酸化状態が亢進された。興味深いことに、微小管重合阻害剤であるノコダゾールで処理すると、通常の細胞周期では見られない高リン酸化シフトが観察された(41)。このことはヒトLats2タンパク質が細胞周期、特に分裂期の進行において重要な機能を担っている可能性を示唆している。また3D10抗体を用いた間接蛍光抗体法により Lats2タンパク質は間期において核に局在することが明らかになった(41)。これは Lats2タンパク質が分画した核画分から塩濃度依存的に溶出されてくることとよく一致する(39, 41)。

【0016】以上の知見より、セリン/スレオニンリン酸化酵素であるヒトLats2タンパク質はリン酸化/脱リン酸化によって厳密に機能が制御されており、特にM期においてリン酸化レベルが上昇することから細胞周期に關与するリン酸化酵素によるリン酸化制御を受けていると考察された。そして前述のAurora2によってLats2は少なくとも2箇所以上がリン酸化され、そのうち83番目のセリン残基がリン酸化の標的になっていることを発見した。Lats2の83番目のセリン残基のリン酸化はG1/S期において顕著である。83番目のセリン残基のリン酸化がLats2の機能にどのような影響を与えるか今後の検討を待たなければならないが、Lats2の基質特異性、リン酸化活性、局在あるいは代謝に關与することが明らかになれば、Aurora2の活性測定以外にも、生理検体を用いてLats2の83番目のセリン残基のリン酸化状態を検出することで、疾患との関連性を探る診断スクリーニングとしての用途も示唆される。

【0017】参考文献

- (1) Lengauer C et al., Nature. 1997 Apr 10;386(6625):623-627.
- (2) Lengauer C et al., Nature. 1998 Dec 17;396(6712):643-649. Review.
- (3) Cahill DP et al., Nature. 1998 Mar 19;392(6673):300-303.
- (4) Chan CS et al., Genetics. 1993 Nov;135(3):677-691.
- (5) Glover DM et al., Cell. 1995 Apr 7;81(1):95-105.
- (6) Tung HY et al., Mol Cell Biol. 1995 Nov;15(11):6064-6074.
- (7) Biggins S et al., Genes Dev. 1999 Mar 1;13(5):532-544.
- (8) Giet R et al., J Cell Sci. 1999 Nov;112 (Pt 2):3591-3601. Review.
- (9) Bischoff JR et al., Trends Cell Biol. 1999 Nov;9(11):454-459. Review.
- (10) Bischoff JR et al., EMBO J. 1998 Jun 1;17(11):3052-3065.
- (11) Terada Y et al., EMBO J. 1998 Feb 2;17(3):667-676.
- (12) Sen S et al., Oncogene. 1997 May 8;14(18):2195-2200.
- (13) Shindo M et al., Biochem Biophys Res Commun. 1998 Mar 6;244(1):285-292.
- (14) Kimura M et al., J Biol Chem. 1997 May 23;272(21):13766-13771.
- (15) Zhou H et al., Nat Genet. 1998 Oct;20(2):189-193.
- (16) Kimura M et al., Cytogenet Cell Genet. 1997;79(3-4):201-203.

- (17) Kimura M et al., Cytogenet Cell Genet. 1998;82(3-4):147-152.
- (18) Tseng TC et al., DNA Cell Biol. 1998 Oct;17(10):823-833.
- (19) Kimura M et al., J Biol Chem. 1999 Mar 12;274(11):7334-7340.
- (20) Bernard M et al., Genomics. 1998 Nov 1;53(3):406-409.
- (21) Pfleger CM et al., Genes Dev. 2000 Mar 15;14(6):655-665.
- (22) Farruggio DC et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 22;96(13):7306-7311.
- (23) Honda K et al., Oncogene. 2000 Jun 1;19(24):2812-2819.
- (24) Muleris M et al., Cancer Genet Cytogenet. 1987 Dec;29(2):289-301.
- (25) Kallioniemi A et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Mar 15;91(6):2156-2160.
- (26) Tanner MM et al., Cancer Res. 1994 Aug 15;54(16):4257-4260.
- (27) Courjal F et al., Br J Cancer. 1996 Dec;74(12):1984-1989.
- (28) Reznikoff CA et al., Semin Oncol. 1996 Oct;23(5):571-584. Review.
- (29) James LA et al., Oncogene. 1997 Mar 6;14(9):1059-1065.
- (30) Isola JJ et al., Am J Pathol. 1995 Oct;147(4):905-911.
- (31) Tanaka T et al., Cancer Res. 1999 May 1;59(9):2041-2044.
- (32) Justice RW et al., Genes Dev. 1995 Mar 1;9(5):534-546.
- (33) Xu T et al., Development. 1995 Apr;121(4):1053-1063.
- (34) Kemp CJ, Nat Genet. 1999 Feb;21(2):147-148.
- (35) Tao W et al., Nat Genet. 1999 Feb;21(2):177-181.
- (36) St John MA et al., Nat Genet. 1999 Feb;21(2):182-186.
- (37) Turenchalk GS et al., Biochim Biophys Acta. 1999 Oct 29;1424(2-3):M9-M16. Review.
- (38) Fujii T et al., Genomics. 1999 Apr 1;57(1):94-101.
- (39) Yabuta N et al., Genomics. 2000 Jan 15;63(2):263-270.
- (40) Hanks SK et al., Science. 1988 Jul 1;241(4861):42-52. Review.
- (41) 田路真悟、薮田紀一、野島博、玉井克之, Human Lats2の機能解析, 第22回日本分子生物学会年会 平成11年12月7日~10日
- (42) Millward T et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 23;92(11):5022-5026.
- (43) Millward TA et al., J Biol Chem. 1999 Nov 26;274(48):33847-33850.
- (44) Lee EY et al., Science. 1988 Jul 8;241(4862):218-221.
- (45) Wang HP et al., Cytogenet Cell Genet. 1988;48(2):72-78.
- (46) Weston A et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Jul;86(13):5099-5103.
- (47) Sato T et al., Cancer Res. 1991 Oct 1;51(19):5118-5122.
- (48) Cairns P et al., Oncogene. 1991 Dec;6(12):2305-2309.
- (49) Friend SH et al., Nature. 1986 Oct 16-22;323(6089):643-646.
- (50) Black D, Curr Biol. 1994 Nov 1;4(11):1023-1024. Review.
- 【0018】
- 20 【発明が解決しようとする課題】これまでタンパク質リン酸化酵素の活性測定においては、放射性同位元素である ^{32}P で標識された $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを用い、放射性同位元素ラベルされたリン酸基が基質に転移される活性を測定する。その操作手順の概略は、1) リン酸化酵素と阻害剤或いは促進剤候補物質との接触 2) 1) と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPと基質との接触 3) リン酸基転移反応に利用されなかった $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPの除去 4) 放射性同位元素ラベルされた基質の検出、という段階を経て通常行われる。このため、放射性同位元素を用いて活性測定を実施するにあたり、科学技術庁の許可を得た特別な施設が必要となり、放射性同位元素の厳重な管理、使用者の制限、定期的な健康チェックなどの多くの制約が課せられる。また放射性同位元素には半減期という制約が存在する上に、これら実験を行う実施者に精神的苦痛が生じることも忘れてはならない。したがって、安全で簡易かつ迅速に大量の候補物質のスクリーニングを行うことが困難であった。
- 30 【0019】本発明は、上述の問題点を解決すべく、安全で簡易かつ迅速に、ヒトAurora2のリン酸化酵素活性を測定できる、タンパク質リン酸化酵素の活性測定方法、タンパク質リン酸化酵素の活性測定キット、タンパク質リン酸化酵素の活性を測定するための抗体、タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法を提供することを目的とする。
- 【0020】
- 【課題を解決するための手段】本発明者はヒトAurora2がヒトLats2タンパク質の少なくとも2箇所以上をリン酸化することを発見し、そのうちの1箇所についてリン酸化されるアミノ酸残基を特定した。このリン酸化アミノ酸特異的な抗体を用いることで、放射性同位元素を用い
- 50

ることなくAurora2リン酸化酵素活性測定系の構築に至った。

【0021】すなわち、本発明は、

(1) ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素と、これによってリン酸化される基質を接触させて、リン酸化基質を合成するリン酸化ステップと、リン酸化された基質のみを認識する抗体とリン酸化された基質を結合させる抗体結合ステップと、リン酸化基質と前記抗体との結合物を測定する測定ステップと、を含むことを特徴とするタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

(2) 前記抗体結合ステップの次に、前記抗体を認識する標識抗体を前記結合物と反応させる2次抗体結合ステップを含むことを特徴とする、(1)記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

(3) 前記ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする、(1)または(2)記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

(4) 前記基質がヒトLats2タンパク質の83番目のアミノ酸を含む全長或いは部分配列であることを特徴とする(1)から(3)のいずれかに記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

(5) 前記基質がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする(1)から(4)のいずれかに記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

(6) 前記抗体が83番目のセリン残基がリン酸化されたヒトLats2タンパク質の78番目から87番目のアミノ酸配列(配列番号1)からなるペプチドを認識する抗体であることを特徴とする、(1)から(5)のいずれかに記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

(7) 前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする(1)から(6)のいずれかに記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定方法。

(8) 少なくとも、ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素によってリン酸化される基質と、該タンパク質リン酸化酵素によって該基質をリン酸化して得られるリン酸化基質のみを認識する抗体と、を含むことを特徴とする、タンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

(9) さらに、リン酸化された基質が固相化される担体を含む(8)に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

(10) 前記ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素を、さらに含むことを特徴とする(8)または(9)に記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

(11) 前記抗体を認識する標識抗体を、さらに含むことを特徴とする、(8)から(10)のいずれかに記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

(12) 前記ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする、(8)から(11)のいずれかに記載のタンパク質リン

酸化酵素の活性測定キット。

(13) 前記基質がヒトLats2タンパク質の83番目のアミノ酸を含む全長或いは部分配列であることを特徴とする(8)から(12)のいずれかに記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

(14) 前記基質がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする(8)から(13)のいずれかに記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

(15) 前記抗体が83番目のセリン残基がリン酸化されたヒトLats2タンパク質の78番目から87番目のアミノ酸配列(配列番号1)からなるペプチドを認識する抗体であることを特徴とする、(8)から(14)のいずれかに記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

(16) 前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする(8)から(15)のいずれかに記載のタンパク質リン酸化酵素の活性測定キット。

(17) ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素と化合物を接触させた後に、ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素と、これによってリン酸化される基質を接触させて、リン酸化基質を合成するリン酸化ステップと、リン酸化された基質のみを認識する抗体とリン酸化された基質を結合させる抗体結合ステップと、リン酸化基質と前記抗体との結合物を測定する測定ステップと、を含むことを特徴とするヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

(18) 前記抗体結合ステップの次に、前記抗体を認識する標識抗体を前記結合物と反応させる2次抗体結合ステップを含むことを特徴とする、(17)に記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

(19) 前記ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする、(17)または(18)に記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

(20) 前記基質がヒトLats2タンパク質の83番目のアミノ酸を含む全長或いは部分配列であることを特徴とする(17)から(19)のいずれかに記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

(21) 前記基質がリコンビナントタンパク質であることを特徴とする(17)から(20)のいずれかに記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

(22) 前記抗体が83番目のセリン残基がリン酸化されたヒトLats2タンパク質の78番目から87番目のアミノ酸配列(配列番号1)からなるペプチドを認識する抗体であることを特徴とする、(17)から(21)

のいずれかに記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

(23) 前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする(17)から(22)のいずれかに記載のヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法。

(24) 83番目のセリン残基がリン酸化されたヒトLats2タンパク質の78番目から87番目のアミノ酸配列(配列番号1)からなるペプチドを認識する抗体。

(25) モノクローナル抗体である(24)に記載の抗体。

(26) (25)に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

(27) ハイブリドーマ株3B11F3F4(受託番号FERM P-18174)である(26)に記載のハイブリドーマ。である。

【0022】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。汎用されている手法についてはJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ed Harlow and David Lane (1988) Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 大海忍、辻村邦夫、稲垣昌樹(1994)細胞工学別冊 実験プロトコルシリーズ 抗ペプチド抗体実験プロトコル 株式会社 秀潤社; 右田俊介、紺田進、本庶佑、濱岡利之(1995)免疫実験操作法I・II、株式会社南江堂等の当業者によく知られた成書に従って行なえばよい。

【0023】ヒトAurora2は、ヒト組織から単離精製されたものでもよいし、リコンビナントタンパク質でもよい。リコンビナントタンパク質を用いれば、天然のヒトAurora2を入手する必要がなく安定的にリコンビナントヒトAurora2をリン酸化活性の測定に供給することができる。

【0024】リコンビナントヒトAurora2は、例えば以下のような方法で得ることができる。

【0025】ヒトAurora2遺伝子の塩基配列情報を基に、ヒトAurora2遺伝子を増幅するためのプライマーを合成し、ヒト組織細胞のcDNAライブラリーから、遺伝子増幅法により、ヒトAurora2遺伝子を単離することができる。この際、プライマーは、DNA合成装置を用いた通常の化学合成により得ることができる。遺伝子増幅は、PCR法が一般的であるが、その他当業者に知られた遺伝子増幅法を用いることもできる。

【0026】遺伝子増幅産物を、適当な制限酵素とリガーゼを用いる通常の方法でベクターに組み込むことができる。

【0027】用いるベクターは、宿主中で複製可能なも

のであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等があげられる。プラスミドDNAとしては、pBR322, pBR325、pUC118、pUC119等の大腸菌由来のプラスミド、pUB110等の枯草菌由来のプラスミド、YEp13、YCP50等の酵母由来のプラスミドなどがあげられ、ファージDNAとしては、 λ ファージ等があげられる。さらに、レトロウイルスまたはワクシニアウイルス等の動物ウイルス、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクターも使用することができる。また、発現ベクターとして、原核生物遺伝子融合ベクターも好ましく、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を含むpGEX4T-1等が利用できる。

【0028】宿主も本発明の遺伝子を発現できるものであれば限定されず、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母および動物細胞などが用いられる。プロモーターおよびターミネーターに関しても該ベクターを用いて形質転換する宿主に対応したものであれば特に限定されず、宿主に応じて適切な組み合わせを選択することができる。

【0029】ベクターの宿主細胞への導入も塩化カルシウムを用いる方法、エレクトロポレーション法等の通常の方法により行うことができ、これらの方法により形質転換体を得ることができる。

【0030】塩基配列の決定は、例えば、マキサム・ギルバート法(Maxam, A.M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 560, 1977)又はジデオキシ法(Messing, J et al., Nucl. Acids Res., 9, 309, 1981)等により行うことができる。これらの原理を応用した塩基配列自動解析装置を用いて配列を決定することもできる。

【0031】得られた形質転換体は、通常の方法により培養することができ、本発明遺伝子によりコードされる目的のタンパク質が生産、発現される。培養時の培地としては、宿主細胞に応じて通常使用されるものを適宜使用でき、培養条件も宿主細胞の生育に適した条件を適宜採用することができる。

【0032】リコンビナントタンパク質は、各種の分離精製方法により、分離・精製することができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換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を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。この際、発現産物がGST等との融合タンパク質として発現される場合は、目的タンパク質と融合しているタンパク質の性質を利用して精製することもできる。例えば、GSTはグルタチオンに対して親和性を有するので、グルタチオンを担体に結合させたカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより効率的に精製することができる。この場合、以下に述べるリン酸化反応も融合タンパク質として用いることも可能である。

【0033】得られたAurora2のリン酸化酵素活性は、

適当な基質を用いて測定することができる。例えば、ヒトAurora2は外来性のMBP（ミエリン塩基性タンパク質）をリン酸化することが知られているので、MBPを基質として用いることができる。活性の測定は該基質のリン酸化の程度を測定することにより可能である。例えば、リン酸化酵素活性を測定しようとするAurora2、前記基質および ^{32}P 標識ATPを適当な温度で適当な時間接触させ、 ^{32}P の取り込みをオートラジオグラフィで検出することにより、リン酸化酵素活性を測定することができる。

【0034】また、ペプチドを基質に用いた場合にはリン酸化反応の後に、カルボキシルペプチダーゼ等により限定分解し、マススペクトルに供することによりリン酸化部位の決定およびリン酸化の程度を検出することもできる。

【0035】また、ヒトAurora2は、ヒトAurora2のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素活性を有するタンパク質でもよい。さらに、ヒトAurora2のリン酸化活性を有する部分ペプチドも用い得る。

【0036】ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の基質としては、ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素によりリン酸化されるものならば特定のものに限られないが、例えば、ショウジョウバエ癌抑制遺伝子のホモログであるLats2タンパク質が用いられる。Lats2タンパク質は、ヒト由来のものが望ましいがマウス等由来のLats2タンパク質も用いることができる。

【0037】Latsタンパク質は、適当な組織から単離精製したものでよいし、リコンビナントタンパク質でもよい。リコンビナントタンパク質を用いれば、天然のLats2タンパク質を入手する必要がなく安定的にリコンビナントLats2タンパク質をリン酸化活性の測定に供給することができる。

【0038】例えば、ヒトLats2リコンビナントタンパク質は以下のようにして調製することができる。

【0039】ヒトLats2遺伝子DNAを適当な発現ベクターに組み込み、該ベクターを適当な宿主細胞に移入することにより形質転換体を得ることができる。ベクター、宿主細胞は特定のものに限られず、上に述べたものを用いることができる。この形質転換体を培養することによって、ヒトLats2タンパク質を製造することができる。

【0040】Lats2タンパク質は、アミノ酸の全長配列を有していてもよいし、またリン酸化の標的となり得る部分を少なくとも有する部分ペプチドであってもよい。また、Lats2タンパク質は、Lats2タンパク質のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素によりリン酸化され得るタンパク質でもよい。また、GST等との融合タンパク質と

して発現させることもでき、この融合タンパク質を基質として用いることもできる。

【0041】ヒトLats2タンパク質では、83番目のアミノ酸がリン酸化されるので、83番目のアミノ酸を含むペプチドが基質として用いることができる。例えば、ヒトLats2タンパク質の79番目から118番目までのアミノ酸を含むペプチド、79番目から257番目までのアミノ酸を含むペプチド、マウスLats2タンパク質は、78番目から117番目及び151番目から436番目のアミノ酸の領域が、リン酸化される領域であり、またはこれらの配列を含むペプチドが基質として用い得る。

【0042】ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素によりリン酸化される基質がリン酸化された場合にのみ特異的に該基質を認識して結合するが、リン酸化されていない基質を認識しない抗体を作製する。抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。また、抗体は、完全抗体であっても、Fab、F(ab)'等のフラグメントであってもよい。基質は、ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素によりリン酸化されるものであれば何でもよい。例えば、ヒトLats2タンパク質が用いられる。

【0043】リン酸化された基質の全部またはリン酸化された部分を含む一部断片を免疫原として、当業者によく知られた方法に従い、所望の抗体を得ることができる。例えば、免疫原として、リン酸化されたアミノ酸を含むペプチドを使用することができ、該ペプチドは少なくとも5個のアミノ酸を含むことが望ましい。該ペプチドは基質タンパク質を断片化して得ることもできるし、化学合成により得ることもできる。また、該ペプチドにペプチドをキャリアタンパク質に結合するための残基、例えばシステイン残基を付加してもよい。基質がヒトLats2タンパク質の場合、83番目のセリン残基がリン酸化されるので、このセリン残基を含むペプチドを免疫原として用いることができ、例えばヒトLats2タンパク質の78番目から87番目のアミノ酸配列（配列番号2、アミノ酸配列REIRYSLLPF）を有し、83番目のセリン残基（配列番号2で表されるアミノ酸配列の6番目のセリン残基）がリン酸化されているペプチド（配列番号1、アミノ酸配列：REIRYS(p)LLPF）、配列番号1で表されるペプチドの末端にペプチドをキャリアタンパク質に結合するためにシステイン残基を導入したペプチド（HsLats2-S83、配列番号4、アミノ酸配列CREIRYSLLPF）のアミノ酸番号7のセリンがリン酸化されたもの（配列番号3、phospho-HsLats2-S83、アミノ酸配列：CREIRYS(p)LLPF）を用いることができる。この場合、ヒトLats2のアミノ酸配列83番目のセリン残基がリン酸化されたヒトLats2の83番目のリン酸化されたセリン残基を含むエピトープ、即ち配列番号1で表されるペプチドに含まれるエピトープを認識する抗体が得られる。免疫原

として用いるペプチドの分子量が小さい場合、例えば5,000~10,000以下の場合には、キャリアタンパク質と結合させて用いるのが望ましい。キャリアタンパク質として、アルブミン、ミオグロビン、ヘモシアニン、グロブリン等が用いられる。キャリアタンパク質とペプチドは、当業者に周知の方法により結合させることができる。

【0044】このようにして調製した免疫原をマウス、モルモット、ウサギ、ヤギ等の動物の皮下、筋肉内、腹腔内、静脈等に複数回接種し、十分に免疫した後に動物から採血し、ポリクローナル抗体を得ることができる。この際、フロイントの完全アジュバント等の公知のアジュバントを使用することもできる。

【0045】モノクローナル抗体も例えば、ケーラーとミルステインの方法(Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975)等の公知の方法により作製し得る。例えば、ヒトLats2タンパク質で免疫したマウスの脾細胞またはリンパ節細胞とマウスのミエローマ細胞との細胞融合により得られるハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマの培養上清又は該ハイブリドーマを腹腔内に投与したマウスの腹水から調製することができる。被免疫動物は、マウスに限定されずラット、モルモット等も利用可能である。ミエローマ細胞は、一般に被免疫動物と同種の動物より得られたものを用いるが、異種間でも可能な場合がある。また、免疫されていない動物の脾細胞またはリンパ節をin vitroで免疫して、感作細胞を得ることもできる。ハイブリドーマのスクリーニングは、種々の免疫化学的方法で実施することができる。例えばELISA法、ウエスタンブロット法等が利用できる。ハイブリドーマ上清またはマウス腹水からのモノクローナル抗体の調製は、当業者に知られた免疫グロブリン精製法を用いればよく、例えば、硫酸分画法、イオン交換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により行うことができる。

【0046】モノクローナル抗体として、例えば抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株3B11F3F4(受託番号FERM P-18174)の産生するものを用いることができる。

【0047】また、得られたポリクローナル抗体からは、リン酸化された基質のみを認識する抗体を精製する必要があり、当業者に知られた方法で精製することができる。例えば、硫酸分画法、免疫原を利用したアフィニティークロマトグラフィー等を必要に応じ適宜組み合わせで行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーは、リン酸化基質を結合させたカラム(特異反応抗体精製用カラム)や非リン酸化基質を結合させたカラム(非特異反応抗体吸収用カラム)を用いて行うことにより、リン酸化基質のみに結合する抗体画分が効率よく精製できる。

【0048】調製した抗体の力価検定及び特異性検定

は、ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)などのEIA (Enzyme Immunoassay)、RIA (Radio Immunoassay)等の当業者に知られた方法で行うことができる。

【0049】ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素による基質のリン酸化は、リン酸化バッファーを用いて行われる。リン酸化バッファーとしては、当業者に知られたものを用いることができ(Bischoff JR et al., EMBO J, 1998, 17(11): 3052-3065; Kimura M et al., J Biol Chem, 1997, 272(21): 13766-13771)、これを適宜修飾して用いることもできる。例えば、20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 1 mM DTT, 20 μM ATP, 10 mM β-glycerophosphate, 1 mM NaF, 100 μM Na₃VO₄が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0050】このようにして得られたリン酸化された基質を認識する抗体を使用して、Aurora2タンパク質リン酸化酵素活性を測定することが可能になる。その方法としては、当業者に知られた抗原-抗体反応を利用した抗原を検出・定量する方法を採用すれば特に限定されないが、例えばサンドイッチ法、競合法などが挙げられる。これらの方法においては、リン酸化された基質、リン酸化された基質に対する抗体(1次抗体)または1次抗体に対する抗体(2次抗体)が系に応じて標識されて用いられる。標識は、酵素、蛍光物質、金属、色素等を使用して、当業者に知られた方法により行うことができる。

【0051】例えば、以下に説明するサンドイッチ法によりリン酸化活性を測定することができる。サンドイッチ法においては、リン酸化基質が固相担体に固相化される。基質のリン酸化は、基質の固相化の後に行われてもよいし、あらかじめリン酸化された基質を固相化してもよいが、基質を固相化した担体を用いてリン酸化反応とその後のアッセイを連続して行うのが効率的である。基質のリン酸化は、上述の方法により行われる。固相化担体としては、マイクロタイタープレート、樹脂ビーズ、磁性化ビーズ等が用いられ、物理吸着や化学結合によって固相化することができる。

【0052】基質の固相化量は、特に限定されないが担体がマイクロタイタープレートの場合、1ウェル当たり数ngから数十μgが望ましい。

【0053】固相化は固相化すべき基質を適切なバッファーに溶解し、担体と接触させ行うことができる。例えば、マイクロタイターウェルを用いる場合、基質溶液をウェルに分注し一定時間置くことにより固相化することができる。基質を固相化した後は、アッセイ中の非特異的結合を防ぐためにBSA等を含んだブロッキング溶液を用いてブロッキングを行うのが望ましい。

【0054】次いで、固相化したリン酸化基質とリン酸化基質に対する抗体(1次抗体)とを反応させ、リン酸化基質-抗体結合物を生成させる。洗浄後、1次抗体と結合し得る2次抗体を反応させる。この2次抗体は様々な標識酵素によって標識された物、例えば、β-D-ガラ

クトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼやグルコースオキシダーゼなどで標識された2次抗体を用いれば良い。また用いた標識酵素の酵素活性を利用して発色或いは比色させて検出を行う。感度を考えた場合ペルオキシダーゼ標識2次抗体を用いる事が推奨される。また標識抗体(2次抗体)を用いる利点は、リン酸化基質ペプチドに結合した1次抗体が少ない場合でも、多数の標識抗体(2次抗体)が結合する事で、よりリン酸化を高感度で検出可能となることである。ただし、必ずしも2次抗体結合ステップは必要ではなく、1

次抗体を標識する事で簡略化することも可能である。例えば、標識した免疫グロブリンに対する抗体が2次抗体として用いることができる。また、標識2次抗体の代わりに標識したプロテインA、プロテインG等も用いることができる。洗浄後、標識抗体のシグナルを測定することにより、Aurora2タンパク質リン酸化酵素のリン酸化活性を測定することができる。リン酸化活性とシグナルの大きさはサンドイッチ法では比例関係にあり、競合法では反比例関係にある。

【0055】リン酸化活性は、あらかじめまたは同時に作成した検量線に基づいて定量することができる。検量線は、例えばヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素の希釈系列を調製して、リン酸化反応-抗原抗体反応を行わせることによって作成できるし、またリン酸化の程度が判明している基質を標準試料として反応を行わせて作成することもできる。

【0056】シグナルの測定は、アッセイ系に応じた信号読取装置、例えばマイクロプレートリーダーを用いて行うことができる。

【0057】サンドイッチ法の一例として、固相酵素免疫検定法(ELISA)が挙げられ、多数のウェル(例えば、96穴)を有するマイクロタイタープレートに基質を固相化させ、ウェル中でリン酸化反応、抗原抗体反応を連続的に行わせることにより一度に大量測定が可能になる。また、用いるリン酸化酵素、基質および抗体の使用量を非常に少なくすることも可能である。さらに、さらに全自動EIA測定装置(MAOS2, MBL社)やラボオートメーションシステム(Biomek2000, BECKMAN社)などの自動測定機器を用いる事も可能になる。

【0058】本発明は、上記リン酸化酵素測定方法を可能にするキットの提供をも目的とするが、該キットは少なくとも該リン酸化酵素の基質、該リン酸化酵素によりリン酸化された該基質に特異的に結合し得る抗体を含む。

【0059】該キットは、基質を固相化する担体を含んでいてもよく、基質があらかじめ担体に結合していてもよい。該キットは、さらに該リン酸化酵素またはリン酸化酵素によりリン酸化された基質に特定の結合し得る*

*抗体(1次抗体)に結合する標識された抗体(2次抗体)を含んでいてもよい。標識が酵素により行われる場合は、該酵素の基質も含み得る。さらに、適宜、ブロッキング溶液、リン酸化溶液、抗体希釈液、基質希釈液、反応溶液、反応停止液、対照試料、検量線作成用標準試料等を含んでいてもよい。基質、1次抗体、2次抗体、固相化担体、リン酸化酵素は上に述べたものを用いることができる。

【0060】本発明は、ヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素活性阻害剤または促進剤のスクリーニング方法をも提供する。阻害剤または促進剤の候補物質とヒトAurora2タンパク質リン酸化酵素を接触させたものを、試料として上述のリン酸化酵素活性測定法を行うことにより、阻害剤または促進剤のスクリーニングを行うことが可能である。

【0061】上述のELISAを用いてスクリーニングを行うことにより、一度に多数の阻害剤または促進剤候補物質をスクリーニングすることができるし、またこれらの物質の使用量を非常に少なくすることも可能である。

【0062】従って、本発明を用いることによって³²Pのような放射性同位元素を用いることなくAurora2リン酸化酵素の活性測定をより、安全に迅速かつ簡便で大量に測定することが可能になる。この結果、Aurora2のリン酸化活性を阻害する阻害剤、あるいは促進させる促進剤のスクリーニングを迅速に行うことができる。

【0063】また本発明で提供されるシステムではヒトLats2タンパク質の79番目から257番目のアミノ酸をコードするタンパク質を基質の1つとして提案するもので、検出にはヒトLats2タンパク質の83番目のセリン残基のリン酸化を特異的に認識して結合する特異抗体を提供する物であるので、ヒトLats2タンパク質の83番目のセリン残基を特異的にリン酸化する酵素であればAurora2に限らず、そのタンパク質リン酸化活性を測定することも可能である。

【0064】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

【0065】実施例1 ヒトAurora遺伝子のクローニングとタンパク質精製

1-1 Aurora遺伝子の単離

1-1-1 プライマーの設定

3種類のヒトAurora遺伝子、すなわちAurora1(全長344アミノ酸)、Aurora2(全長403アミノ酸)、Aurora3(全長309アミノ酸)をコードするcDNA配列を増幅するため、以下に示すプライマーを合成した。GenBank Accession numberはそれぞれAB011450、AF008551、AF054621である。

Aurora1-F1: 5'-ATA GGA TCC ATG GCC CAG
AAG GAG AAC TCC-3'
Aurora1-R1: 5'-ATA CTC GAG TCA GGC GAC
AGA TTG AAG GGC-3'

Aurora2-F1: 5'-GGA GGA TCC ATG GAC CGA

TCT AAA GAA AAC-3'

Aurora2-R1: 5'-CCA CTC GAG AGA CTG TTT

GCT AGC TGA TTC-3'

Aurora3-F1: 5'-ATA GGA TCC ATG AGC TCC

22

5'側の3つの塩基は制限酵素処理を円滑に行わせるために付加した。5'側4番目が69番目までのAGGATCCAGCTCAGGA AGはそれぞれ制限酵素BamHIとXhoIの recognition site である。

【0066】1-1-2 PCR

鋳型cDNAとしてAurora1とAurora2はヒト胎盤由来の、Aurora3はヒト睾丸由来のcDNAライブラリーを用い、耐熱性DNAポリメラーゼに添付された能書に従いPCR法にてヒトAurora cDNAをPCR産物として増幅した。反応は、Gene Amp PCR System 2400 (PERKINELMER社製)を用い、下記のプログラムで行った：

- a) 94 5分
- b) 94 1分、55 2分、72 3分を1サイクル
- c) 94 1分、65 1分、72 2分を35サイクル
- d) 72 10分

反応後、増幅されたPCR産物を1 %アガロース電気泳動によって確認した。

【0067】1-1-3 大腸菌発現ベクターへのクローニング

増幅されたPCR産物を、常法に従い制限酵素BamHIとXhoIで処理後、アガロースゲル電気泳動にて分離し、目的のサイズのバンドを切り出した。これをGENECLEAN II KIT (BIO 101社製)にて精製した。これを予め制限酵素BamHIとXhoIで処理後、同様に精製した大腸菌発現ベクターpGEX4T-1(Amersham-Pharmacia社製)へ、ライゲーションし、pGEX4T1-Aurora1、pGEX4T1-Aurora2野生型(以下WT, wild type)とpGEX4T1-Aurora3を得た。これを用いて大腸菌株(DH5α)を形質転換し複数のシングルコロ *

Aurora2-F2: 5'-GGA GAG CTT AAA ATT GCA

GAA TTT GGG TGG-3'

下線は一塩基置換部位を示す。R2プライマーはAurora2-F2とAurora2-R2の5'側から10番目が53番目までが、Aurora2-R2の10番目から30番目に相補的になるように設計した。

【0070】1-2-2 PCRとクローニング

pGEX4T1-Aurora2 WTを鋳型プラスミドとしてAurora2 - F2とAurora2 - R2プライマーを使い、α型の耐熱性pfu DN Aポリメラーゼ (STRATAGENE社製)を用い、PCR反応は、GeneAmp PCR System 2400にて、下記のプログラムで行った：

- a) 95 30秒
- b) 95 30秒、55 1分、68 13分を1サイクル
- c) 95 30秒、60 1分、68 12分を16サイクル
- d) 68 10分

PCRの反応後、制限酵素DpnI処理を37℃、1時間行い、メチル化された鋳型DNAを特異的に切断した。この反応液1 μlを用いて大腸菌株(DH5α)を形質転換し、複数の

*ニーを取得した。シングルコロニーからプラスミドDNAを精製しAurora遺伝子の塩基配列をサンガー法に基づき、オートシーケンサーで行い、データベース上に公開されているAuroraの塩基配列と比較してそれぞれ同一であることを確認した。

【0068】1-2 非活性型ヒトAurora2の構築

一般にリン酸化酵素はコンセンサス領域を持ち、これは11個のサブドメインより構成されており、それぞれの機能領域の研究が進んでいる(Hanks SK et al., Science, 241(4861): 42-52)。例えばAurora2では、サブドメインIIに位置する162番目のリジン(K)残基はプロトントランスファーに必須のアミノ酸であり、これをメチオニン(M)やアルギニン(R)などに置換することで、Aurora2のリン酸化活性を消失させた非活性型Aurora2を人為的に作製することが可能である(Bischoff JR et al., EMBO J, 1998, 17(11): 3052-3065)。ここでは、サブドメインVII内でATP結合に必須な領域に含まれるアミノ酸である273番目のアスパラギン酸(D)をグルタミン酸(E)に置換することで非活性型Aurora2(以下Aurora2 KD, kinase deadと記す)を構築し、これをAurora2によるリン酸化活性測定系のネガティブコントロールに用いた。

【0069】1-2-1 Aurora2 KD プライマーの設定

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社製)を用いて1アミノ酸置換非活性型ヒトAurora2を構築するために以下のプライマーを合成した。

シングルコロニーを得た。シングルコロニーからプラスミドDNAを精製し塩基配列をサンガー法に基づき、オートシーケンサーで解析した。その結果、273番目のアスパラギン酸(D)がグルタミン酸(E)に置換した非活性型Aurora2 (Aurora2 KD)であることを確認した。

【0071】1-3 リコンビナント ヒトAuroraタンパク質の発現と精製

pGEX4T1-Aurora1、pGEX4T1-Aurora2 WTおよびpGEX4T1-Aurora2 KD、pGEX4T1-Aurora3はそれぞれAuroraタンパク質のN末端側に分子量約26 kDaのGST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)が結合した融合タンパク質として、形質転換された大腸菌内で発現される。このGST融合Auroraタンパク質はアフィニティー担体を用い極めて穏やかな条件下で精製することが可能である。

【0072】1-3-1 リコンビナント ヒトAuroraタンパク質の発現

4種類のpGEX4T1-Auroraで形質転換されているそれぞれの大腸菌株 (DH5 α) をLB-アンピシリン培地中で37℃で一晩振盪培養した。その培養液を新しいLB-アンピシリン培地に約100倍希釈になるように加え、37℃で振盪培養した。濁度が0.6付近で培養を中断し、流水中にて約20℃まで温度を下げ、GST-Aurora融合タンパク質を発現誘導するためにIPTG (isopropyl - β -D(-)-thiogalactopyranoside) を終濃度0.1 mMになるように添加し、さらに一晩20℃で振盪培養後、遠心操作にて集菌した。

【0073】1-3-2 リコンビナント ヒトAuroraタンパク質の精製

菌体を氷冷した1% Tween-20/PBS, pH8.5によく懸濁し、超音波発生器を用い菌体を完全に破碎した。破碎液を遠心し上清を、GSH-セファロース4Bカラム (pharmacia社製) に通してGST融合タンパク質をカラム吸着させた。カラムをWEバッファー (10 mM β -メルカプトエタノール、2 mM MgCl₂、20 mM Tris-HCl, pH7.5) で十分に洗浄した後、Gバッファー (10 mM GSH、50 mM Tris-HCl, pH9.6) を用いてGST-Aurora融合タンパク質を溶出した。溶出液を50% グリセロール、1 mM DTT、1 mM EDTA、50 mM Tris-HCl, pH7.5で濃縮およびバッファーの置換を行なった。適量をSDS-PAGEにて泳動し、染色液 (0.2% Coomassie Brilliant BlueR-250、40% メタノール、10% 酢酸) にて染色後、脱色液 (7% メタノール、7% 酢酸、3% イソプロパノール) にて脱色し、それぞれ融合タンパク質の濃度と精製度を確認した。

【0074】1-4 リコンビナントAurora2リン酸化活性の測定

リコンビナントAurora2 WT及びリコンビナントAurora2 KDのリン酸化活性を測定するために、Aurora2の外来性の基質と報告されているMBP (ミエリン塩基性タンパク質、SIGMA社製) に対するリン酸化活性の検出を試みた。リン酸化アッセイバッファーは論文で用いられている組成を参考にして調製した (10, 14)。

【0075】リン酸化アッセイバッファー

20 mM Tris-HCl, pH7.4、10 mM MgCl₂、5 mM MnCl₂、1 mM DTT、20 μ M ATP、10 mM β -glycerophosphate、1 mM NaF、100 μ M Na₃VO₄、10 μ Ci [γ -³²P]ATPリン酸化アッセイは20 μ lの反応系で行なった。リン酸化アッセイバッファーにGST-Aurora2 WTあるいはGST-Aurora2 KD融合タンパク質を約1 μ g加え、これにMBPを2 μ g加え30℃で30分間保温した。これに3X Laemmli's sample bufferを10 μ l加え反応を停止させ、5分間煮沸処理後、15 μ lをSDS-PAGEにて分離した。泳動終了後、ゲルを染色液にて固定染色し、脱色処理後紙上でGEL DRYER (Bio-Rad社製) を用いて減圧乾燥し、オートラジオグラフィにて結果を解析した。

【0076】結果を図1のレーン2に示す。大腸菌にて発現させたリコンビナント ヒトAurora2 WTは約21kDaのMBPに対するリン酸化活性が検出されたが、273番目の

アスパラギン酸 (D) がグルタミン酸 (E) に置換した非活性型Aurora2 (Aurora2 KD) にはリン酸化活性が存在しなかった。また約70kDaに観察されるAurora2の自己リン酸化と考えられるバンドも消失していた。従ってこれ以降の実験にはこれら酵素を用いることとした。

【0077】実施例2 ヒトLats2をリン酸化するリン酸化酵素の検索

2-1 ヒトLats2タンパク質の調製

ヒトLats2タンパク質をリン酸化する酵素を検索するために、ヒトLats2タンパク質を2分割した大腸菌の発現系を構築した。哺乳動物発現ベクターpAP3neoのマルチクローニングサイトに挿入されたヒトLats2 cDNA (79 - 1088アミノ酸に相当) を制限酵素EcoRI/HpaIにて処理し、得られたDNA断片をpGEX4T2のEcoRI/SmaIサイトにサブクローニングした。こうして得られたpGEX-HsLats2NはヒトLats2タンパク質の79番目のアミノ酸から621番目までのアミノ酸をコードしている。あるいは制限酵素HincII/NotIで処理し、得られたDNA断片を哺乳動物細胞発現ベクターであるpCMVmyc(+1)の制限酵素部位EcoRV/NotIにサブクローニング後、これを制限酵素BamHI/XhoIにて処理して得られたDNA断片をpGEX4T(+1)の制限酵素部位BamHI/XhoIにサブクローニングしてフレームを合わせた。こうして得られたプラスミドpGEX-HsLats2CはヒトLats2タンパク質の622番目のアミノ酸から1088番目までのアミノ酸をコードするcDNAを持つ。前述の方法を用いてこれらプラスミドによって形質転換された大腸菌株よりGST融合タンパク質を精製しリン酸化アッセイの基質に用いた。

【0078】2-2 サイクリン(Cyclin)/CDKファミリーによるリン酸化の検討

我々は細胞周期調節系で重要な機能を担っているCyclin/CDKファミリーによってヒトLats2タンパク質がリン酸化修飾される可能性を検討した。Cyclin D1/CDK4はRbタンパク質をリン酸化することでRbを不活性化し、その結果転写因子E2Fが活性化されS期開始に必須の遺伝子群が転写される事が知られている。Cyclin B/CDC2はM期の誘導に働き、Cyclin E/CDK2はG1チェックポイント通過を誘導し、続いてCyclin A/CDK2はS期のDNA複製装置の活性化に必要なと考えられている。これらの酵素を用い、論文等で報告されているリン酸化アッセイバッファーを用いて、前述の方法にてHsLats2NとHsLats2Cタンパク質がリン酸化されるか検討した。

【0079】結果を図2に示す。陽性コントロールおよび陰性コントロールとの比較から見て、Cyclin D1/CDK4、Cyclin B/CDC2、Cyclin E/CDK2とCyclin A/CDK2はHsLats2NとHsLats2Cタンパク質をリン酸化しなかった。なおそれぞれの酵素が活性を有していることは、これまでに報告されている基質に対してのリン酸化能の結果より明らかである。すなわちCyclin D1/CDK4はRb(New England BioLabs社製)をCyclin B/CDC2、Cyclin E/CDK2とCyc

lin A/CDK2はヒストン (Histone) H1をリン酸化することが報告されている。

【0080】2-3 チェックポイントに関与するリン酸化酵素を用いた検討

前述のM期の染色体分離において重要な機能を担っていると考えられるAurora2、DNA傷害性チェックポイントを制御していると考えられるリン酸化酵素ヒトChk2、DNA修復に関わるDNA依存的リン酸化酵素DNA-PK (Promega社製)、M期の進行において重要な機能を担っているリン酸化酵素PLK1やNLK1を用いてヒトLats2タンパク質がリン酸化されるか検討した。リン酸化酵素の陽性コントロールとしてこれまで論文で紹介されている基質を用いた。Aurora2とDNA-PKはMBPを、Chk2はHistone H3を、PLK1とNLK1はβ-caseinを用いた。これらの酵素を用い、論文等で報告されているリン酸化アクセシバッファーを用い、前述の方法にてHsLats2NとHsLats2Cタンパク質がリン酸化されるか検討した。

【0081】結果を図3に示す。Aurora2とChk2はヒトL*

プライマーの設定

HsLats2-F2: 5' -GCG GAA TTC GAA ATC AGA

TAT TCC TTG TTG-3'

Lats2-F3: 5' -ATA GAA TTC GAC CAG GAG AT

G GCT GGC-3'

HsLats2-F10: 5' -ATA GGA TCC TTC CCG CTG

GAC GTG GAG TAC-3'

HsLats2-F11: 5' -CCG GAA TTC ATG AGG CCA

AAG AGT TTT CCT-3'

5'側の3つの塩基は制限酵素処理を円滑に行わせるため、ACA *ACGに付加した。5'側4番目から9番目までのGGATCC、GAATTCとCTCGAGはそれぞれ制限酵素BamH I、EcoRI、XhoIの認識配列である。

TC CTG GTC-3'

【0084】鋳型cDNAとして哺乳動物発現ベクターpGEX4T-HsLats2(1-1088)のcDNAを用いて、前述の方法でPCR法にて目的の遺伝子産物を得た。これを適切な制限酵素CAA GGCで処理後、大腸菌発現ベクターpGEX4T-31にサブクローニ

ングし、得られたプラスミドDNAを前述の方法にてシー *

*ats2タンパク質のN末端側 (HsLats2N) を強くリン酸化する。PLK1はヒトLats2タンパク質のN末端側 (HsLats2N) をリン酸化しているが陽性コントロールと比較して必ずしも良い基質になっているとは言えない。DNA-PKとNLK1はヒトLats2タンパク質に対するリン酸化活性が観察されなかった。また陽性コントロールとの比較においてAurora2はMBPに対するリン酸化活性よりもHsLats2Nをリン酸化する活性のほうが強いことから、ヒトLats2タンパク質のN末端側がAurora2の基質になっている可能性が高いと判断された。

【0082】実施例3 Aurora2によるヒトLats2タンパク質のリン酸化領域の同定

3-1 PCRによるヒトLats2デリーションコンストラクトの構築

ヒトLats2タンパク質のN末端側がAurora2の良い基質になっている可能性が高いと判断されたことから、この領域を更に細分化しリン酸化される領域の特定を試みた。

【0083】

5'側の3つの塩基は制限酵素処理を円滑に行わせるため、ACA *ACGに付加した。5'側4番目から9番目までのGGATCC、GAATTCとCTCGAGはそれぞれ制限酵素BamH I、EcoRI、XhoIの認識配列である。

TC CTG GTC-3'

【0084】鋳型cDNAとして哺乳動物発現ベクターpGEX4T-HsLats2(1-1088)のcDNAを用いて、前述の方法でPCR法にて目的の遺伝子産物を得た。これを適切な制限酵素CAA GGCで処理後、大腸菌発現ベクターpGEX4T-31にサブクローニ

ングし、得られたプラスミドDNAを前述の方法にてシー *

ACGに付加した。5'側4番目から9番目までのGGATCC、GAATTCとCTCGAGはそれぞれ制限酵素BamH I、EcoRI、XhoIの認識配列である。

TC CTG GTC-3'

【0084】鋳型cDNAとして哺乳動物発現ベクターpGEX4T-HsLats2(1-1088)のcDNAを用いて、前述の方法でPCR法にて目的の遺伝子産物を得た。これを適切な制限酵素CAA GGCで処理後、大腸菌発現ベクターpGEX4T-31にサブクローニ

【0085】

アミノ酸番号 プライマーの組み合わせ 予想分子量 (kDa)

HsLats2 1-78 aa HsLats2-F11とHsLats2-R9 35

1-118 aa HsLats2-F11とLats2-R3 39

1-151 aa HsLats2-F11とLats2-R2 43

【0086】3-2 制限酵素処理によるデリーションコンストラクトの構築

pGEX4T-HsLats2 79-257 aa: ヒトLats2タンパク質の79番目のアミノ酸から257番目までのアミノ酸をコードしているpGEX4T-HsLats2Nを制限酵素Not Iで処理して得られた約1.1kbのDNA断片を取り除き、ベクターをセルフライゲシ

【0087】pGEX4T-HsLats2 255-621 aa: pGEX4T-HsLats2Nを制限酵素Not I/XhoIで処理して得られた約1.1kbの

500-625 aa HsLats2-F10とHsLats2-

DNA断片をpCMVmycのNotI/XhoIサイトにサブクローニングし、ここから制限酵素EcoRI/XhoIで目的とする約1.1kbのDNA断片を切り出し、これをpGEX4T1のEcoRI/XhoIサイトにクローニングして構築した。このプラスミドによって形質転換された大腸菌株は発現誘導処理によりGST融合ヒトLats2タンパク質の255番目のアミノ酸から621番目までのアミノ酸からなる約66kDaのタンパク質を産生する。

【0088】pGEX4T-HsLats2 255-382 aa : pGEX4T-HsLats2 255-621 aaを制限酵素BamHI/PstIで処理して得られたDNA断片を、スーパーリンカーファージミドpSL1180 (アマシャム ファルマシア バイオテック社製)のBamHI/PstIサイトにサブクローニングし、ここから制限酵素BamHI/XhoIで目的とするDNA断片を切り出し、これをpGEX4T1のBamHI/XhoIサイトにクローニングして構築した。このプラスミドによって形質転換された大腸菌株は発現誘導処理によりGST融合ヒトLats2タンパク質の255番目のアミノ酸から382番目までのアミノ酸からなる約40kDaのタンパク質を産生する。

【0089】pGEX4T-HsLats2 255-491 aa : pGEX4T-HsLats2 255-621 aaを制限酵素BamHI/SphIで処理して得られたDNA断片を、pSL1180のBamHI/SphIサイトにサブクローニングし、ここから制限酵素EcoRI/XhoIで目的とするDNA*

マウスLats2cDNA増幅用プライマーの設定

MsLats2-F1 : 5'-CGC GAA TTC ATG AGG CCA

AAG ACT TTT CC-3'

MsLats2-R4 : 5'-GCG CTC GAG CCT GAG AGC

5'側の3つの塩基は制限酵素処理を容易に行わせるために付加した。5'側4番目から9番目までのGAATTCとCTCGAGはそれぞれ制限酵素EcoRIとXhoIサイトである。鋳型cDNAとして哺乳動物発現ベクターpAP3neo-MsLats2を用い、前述の方法でPCR法にて目的の遺伝子産物を得た。これを適切な制限酵素で処理後、大腸菌発現ベクターpGEX4T-1にサブクローニングし、得られたプラスミドDNAを前述の方法にてシークエンスし、目的の遺伝子断片に変異

アミノ酸番号	プライマーの組み合わせ	予想分子量 (kDa)
MsLats2 1-77aa	MsLats2-F1とMsLats2	
-R4 35		
1-117aa	MsLats2-F1とLats2-R3	
39		
1-150aa	MsLats2-F1とLats2-R2	
43		

【0096】結果を図5に示す。Aurora2によるヒトLats2とマウスLats2のタンパク質のリン酸化領域は2箇所に絞ることができた。1.78番目のアミノ酸から117番目のアミノ酸までの領域 2.113番目のアミノ酸から36番目のアミノ酸までの領域である。

【0097】ヒトLats2とマウスLats2のアミノ酸レベルのホモロジー検索の結果より、マウスにおける1の領域

*A断片を切り出し、これをpGEX4T1のEcoRI/XhoIサイトにクローニングして構築した。このプラスミドによって形質転換された大腸菌株は発現誘導処理によりGST融合ヒトLats2タンパク質の255番目のアミノ酸から491番目までのアミノ酸からなる約52kDaのタンパク質を産生する。

【0090】3-1及び3-2で得られたヒトLats2デリションコンストラクトによって形質転換された大腸菌株より前述の方法でGST融合タンパク質を精製し、Aurora2を酵素として用いてリン酸化活性の検出を試みた。

【0091】結果を図4に示す。Aurora2によるヒトLats2タンパク質のリン酸化領域は少なくとも2箇所に絞ることができた。1.79番目のアミノ酸から112番目のアミノ酸までの領域 2.383番目のアミノ酸から491番目のアミノ酸までの領域である。

【0092】実施例4 Aurora2によるマウスLats2タンパク質のリン酸化領域の同定
ヒトLats2とN末端領域において72%の相同性を示すマウスLats2タンパク質をAurora2がリン酸化するか検討するために6種類のGST融合デリションコンストラクトを構築した。

【0093】

が存在しないことを確認した。これらプラスミドによる形質転換大腸菌株より前述の方法にてGST融合タンパク質を精製し、リン酸化アッセイの基質に用いた。

【0094】構築したデリションコンストラクトのアミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0095】

【0098】実施例5 Aurora2によるヒトLats1タンパク質のリン酸化領域の同定Aurora2によってヒトLats1がリン酸化されるかどうか検討するために、6種類のGST融合デリション コンストラクトを構築した。ヒトLats2とヒトLats1のホモロジーは全体で50%、C末端領域

でのホモロジーは、74%の高いホモロジーが認められるがN末端領域では33%と低い。

【0099】ヒトLats1 cDNA増幅用プライマーの設定 *

HsLats1-F1: 5'-GCG GGA TCC TTC ATG AAG

AGG AGT GAA AAG-3'

HsLats1-F2: 5'-GCG GGA TCC CAG GAA ATT

CGA AAC TCT CTG-3'

HsLats1-F3: 5'-CGC GAA TTC CAA ATG AGA

AAG ATG CTT TGC-3'

HsLats1-F4: 5'-GCG GAA TTC ATC TCC CGA

ATC TCT CCT GTC-3'

HsLats1-R1: 5'-GTG CTC GAG CTG CTC TCG

5'側の3つの塩基は制限酵素処理を円滑に行わせるため

に付加した。5'側4番目から9番目までのGGA TCCは制限

酵素BamHIサイトである。下線は一塩基置換部位を示す。

【0100】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0101】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0102】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0103】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0104】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0105】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0106】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0107】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0108】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0109】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0110】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0111】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0112】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0113】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0114】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0115】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0116】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0117】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0118】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0119】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0120】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0121】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0122】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0123】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0124】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0125】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0126】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0127】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0128】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0129】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0130】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0131】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0132】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0133】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0134】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0135】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0136】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0137】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0138】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

【0139】PCR TAC TAG ATC GCG-3'

*ヒトLats1タンパク質の様々な部分をコードするcDNA配列を増幅するため、以下に示すヒトLats1特異的プライマーを合成した。

を前述の方法にてシーケンスし、登録されている配列

と同一であることを確認した。これらプラスミドによる

形質転換大腸菌より前述の方法にてGST融合タンパク質

を精製しリン酸化アッセイの基質に用いた。

【0101】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0102】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0103】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0104】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0105】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0106】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0107】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0108】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0109】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0110】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0111】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0112】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

【0113】構築したデリーションコンストラクトのア

ミノ酸番号とPCRプライマーの組み合わせ及びGST融合タ

ンパク質の予想される分子量を以下に示す。

アミノ酸番号 プライマーの組み合わせ 予想分子量 (KDa)

HsLats1 1-80aa HsLats1-F1とHsLats

1-R2 35

79-150aa HsLats1-F2とHsLats1-R

1 34

1-150aa HsLats1-F1とHsLats1-R

【0103】結果を図6に示す。Aurora2によるヒトLat

s1タンパク質のリン酸化は、少なくとも151番目のアミノ酸残基が存在する。83番目のセリン、91番目のセ

リノ酸から381番目のアミノ酸までの領域と、285番目のア

ミノ酸から679番目のアミノ酸までの領域で観察され

た。しかしながら、その活性は、ヒトLats2タンパク質

の79番目のアミノ酸から257番目のアミノ酸までの領域

をリン酸化する活性よりも低く、外来性の基質であるMB

Pと同程度のリン酸化しか観察されなかった。つまりヒ

トLats1タンパク質に対するAurora2のリン酸化はヒトLa

ts2タンパク質に対するリン酸化活性よりも明らかに低

かった。この事はAurora2によるリン酸化はLats1よりも

Lats2に特異性が高い事を示しており、同時にLats2はLa

ts1と異なった機能を有することを強く示唆している。

【0104】実施例6 Aurora2によってリン酸化修飾

されるヒトLats2タンパク質上のアミノ酸残基の特定

Aurora2によってリン酸化修飾されるヒトLats2タンパク

質の79番目のアミノ酸から118番目のアミノ酸までの領

域はマウスLats2タンパク質の78番目のアミノ酸から117

番目のアミノ酸までの領域に相当し、この領域における

アミノ酸配列はヒトとマウスで100%一致する。Aurora2

は分類上セリン/スレオニン キナーゼであるためリン

酸化修飾のターゲットとなるアミノ酸残基はセリン(S)

50

とスレオニン(T)である。この領域には4つのセリン/ス

レオニン残基が存在する。83番目のセリン、91番目のセ

リン、93番目のスレオニン、94番目のセリン残基であ

る。これらのセリン残基は、ヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

とヒトLats1-F2とHsLats1-F3とヒトLats1-F4とHsLats1-F3

これをpGEX4T1のBamHI/XhoIサイトにクローニングした。

【0106】

pGEX4T-HsLats2 S91C 79-118aa用のプライマー

Lats2 - S91C - F1 : 5'-AAT GAA TGT GGC ACC T

CT GCA GCT GCA GAA-3'

Lats2 - S91C - R1 : 5'-TGC AGA GGT GCC ACA T

TC ATT AGC AAA AGG-3'

pGEX4T-HsLats2 T93D 79-118aa用のプライマー

Lats2 - T93D - F1 : 5'-AAT GAA TCG GGC GAC T

CT GCA GCT GCA GAA-3'

下線は塩基置換部位を示す。T93DプライマーはヒトLats2の89から98番目のアミノ酸領域に相当するcDNA配列でR1プライマーは86から95番目のアミノ酸領域に相当するcDNA配列と相補的になるように設計した。前述のQuikChange Site-Directed Mutagenesisを用いてpGEX4T-HsLats2 T93Dを構築し、目的のアミノ酸が置換されていることを確認し、前述の方法に従い、GST融合タンパク質を精製しAurora2リン酸化アッセイの基質にした。

【0107】結果を図7に示す。左図はオートラジオグラフィによる解析結果で、右図はゲルを染色した写真である。83番目のセリン残基をシステイン残基へ置換した変異体（S83C）のみがAurora2によってリン酸化されなかった。従ってAurora2はヒトLats2タンパク質の83番目のセリン残基を特異的にリン酸化することが明らかになった。

【0108】実施例7 Aurora1とAurora3によるヒトLats2のリン酸化の検討

Aurora1やAurora3によってヒトLats2がリン酸化修飾を受けるかどうか検討した。Aurora2の1番良い基質であるヒトLats2の79～257番目までのアミノ酸領域を基質に用い、それぞれの酵素のコントロールには、MBP、Histone H1、Histone H3、 β -Caseinを用いた。前述のリン酸化アッセイバッファーを用いて、リン酸化アッセイを行った。

【0109】結果を図8に示す。Aurora2がリン酸化するMBPとヒトLats2の79～257番目までのアミノ酸領域のリン酸化状態の比較から考察すると、Aurora1とAurora3がMBPをリン酸化する活性と、ヒトLats2の79～257番目までのアミノ酸領域をリン酸化する活性は同程度である。したがって、Aurora2ほどにはヒトLats2のこの領域を基質として好まないことが明らかになった。これにより3種類のAuroraの中で、ヒトLats2の83番目のセリン残基のリン酸化はAurora2に非常に特異的であることが強く示された。

【0110】実施例8 抗リン酸化ペプチド抗体の作製 Aurora2はヒトLats2の83番目のセリン残基を特異的にリン酸化することが明らかになったので、次に83番目のセ

リン残基のリン酸化を検出するためのツールとして、83番目のセリン残基がリン酸化された場合にのみ特異的に認識する抗リン酸化特異抗体を作製した。

【0111】8-1 免疫原の作製と免疫

ペプチドの作製

リン酸化サイトとして確定したヒトLats2タンパク質の83番目のセリン残基を含む、78番目から87番目までのアミノ酸配列に相当する以下の2本のペプチドをペプチド合成機を用いて作製した。

リン酸化ペプチド（phospho-HsLats2-S83と記す）：CREIRYS(p)LLPF（配列番号3）

非リン酸化ペプチド（HsLats2-S83と記す）：CREIRYSLLPF（配列番号4）

上記のペプチド配列は、一文字表記で、アミノ末端からカルボキシル末端方向に記されている。S(p)は、リン酸化セリン残基を示す。アミノ末端のシステイン（C）残基は、ペプチドをキャリアタンパク質に共有結合させるために導入したものである。これらのペプチドは、HPLCにより、95%以上の純度であることを確認した。リン酸化ペプチドは免疫原に用い、抗体力価の測定、ハイブリドーマの選別及び抗体精製にリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドを用いた。

【0112】8-1-2 ペプチドのキャリアタンパク質への結合

合成した短いペプチド単独では抗原性が低いので、通常ペプチドをキャリアタンパク質に結合させて動物に免疫する。キャリアタンパク質としては、アルブミン、ミオグロビン、ヘモシアニン等が用いられるが、今回はヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin, 以下KLH、CALBIOCHEM社製）を用いた。成書に従いphospho-HsLats2-S83とKLHを架橋剤であるMBS（m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, SIGMA社製）を用いて共有結合させ、KLH-phospho-HsLats2-S83を合成した。

【0113】8-1-3 免疫原の調整と免疫方法

KLH-phospho-HsLats2-S83 20 μ g/100 μ lおよび10 μ g/100 μ lをそれぞれウサギおよびマウスの1回あたりの免疫に用いた。これに100 μ lのフロイント完全アジュバント（ヤトロ社製）を加え、エマルジョン化し免疫原とした。ネズミに対する免疫は腹腔内注射で、ウサ

ギには背中皮内に注射にて免疫を行った。免疫は2週間ごと3回から5回行い、マウスは眼窩静脈叢あるいは尾静脈から採血し、ウサギは耳動脈から採血後その血清を回収した。抗体力価の測定には、phospho-HsLats2-S83とHsLats2-S83を固相化したマイクロタイタープレートを用いたELISA法にて行った。

【0114】8-2 抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体の作製

8-2-1 ハイブリドーマの作製

十分な抗体力価を確認後、このマウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞をマウスミエローマ細胞株P3U1と融合させた。細胞融合にはウイルス(HVJ)を用いる方法、ポリエチレングリコール(PEG)を用いる方法、高電圧パルスによる方法等があるが、今回はPEGを用いて常法に従って行った。ハイブリドーマの選別培養は、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)培地で行い、ハイブリドーマの培養上清を用いてELISA法により、非リン酸化ペプチド(HsLats2-S83)よりもリン酸化ペプチド(phospho-HsLats2-S83)に対して高い反応性を示すクローンを選別し、限界希釈法にて単一コロニーとし、抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株3B11F3F4を得た。

【0115】8-2-2 腹水の採取と抗体の精製

限界希釈法により得られたハイブリドーマ株3B11F3F4を、75cm²フラスコで培養した後、ハイブリドーマ細胞浮遊液をマウス腹腔に注射した。ハイブリドーマを注射する10日前に1 mlのプリステン(2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane, SIGMA社製)を、3日前には、0.5 mlのプリステンをマウスに腹腔内に注射しておいた。1~2週間後、マウスの状態を見ながら、随時腹水の採取を行った。採取した腹水に最終濃度 50% になるように硫酸アンモニウムを添加し、攪拌後、遠心分離を行い沈澱物を回収した。最小限の純水で沈澱物を完全に溶解した後、PBSに対して透析した。完全に平衡化させた後、protein Aセファロース(ファルマシア社製)カラムに通し、PBS/150 mM NaClでカラムを洗浄した。0.17 M Glycine HCl(pH4.0)を用いてprotein Aセファロースから、抗体を溶出させ、続いて0.17 M Glycine HCl(pH3.0)で溶出した。溶出した抗体は直ちに1 M Tris-HCl(pH8.0)を適量加えて中和し、PBS に対して透析した。透析後、適量をSDS-PAGEにて電気泳動あるいは、吸光度を測定して濃度を決定した。

【0116】8-3 抗phospho-HsLats2-S83ポリクローナル抗体の作製

8-3-1 ウサギからの本採血

十分な抗体力価の確認の後、翌週より、採血(最初の1週間)、休息(次の1週間)、免疫(最後の1週間)を1サイクルとし、これを4回繰り返した。採血は、抗体力価の確認の際と同様に、耳動脈より行った。1回の採血あたり、およそ60~70mlの血液を採取した。最後の

採血では、カテーテルを用いて心臓より直接血液を回収した。

【0117】8-3-2 ウサギ血清の回収、保存及び抗体分画の分離

採取した血液は、4 で一晩静置し、血清と血餅に分離させ、上澄み部分の血清を回収した。分離回収した血清に、終濃度 50 %となるように、硫酸アンモニウムを添加し攪拌後、遠心分離を行い、IgG分画を含む沈澱物に最小限の純水を加え完全に溶解した後、PBSに対して透析を行った。完全に PBS に平衡化した後、この粗精製抗体分画をカラムにかけて、抗体の精製を行った。

【0118】8-3-3 特異化カラム及び吸収用カラムの作製

特異化カラム作製には、phospho-HsLats2-S83合成ペプチドを用い、吸収用カラム作製には、HsLats2-S83合成ペプチドを用いた。合成ペプチド1 mgを5 mlの0.1 M炭酸バッファーに溶解し、1 mM塩酸で平衡化したCNBr活性化セファロース 4B(ファルマシア社製)を加えた。4 で一晩穏やかに混和し、これをカラムに充填した。5~10倍量のPBSでカラムを洗浄後、セファロース 4B 表面に残っている活性基をブロッキングするために1 M Tris-HCl(pH7.5)でカラムを平衡化した。ブロッキング後、PBSで洗浄および平衡化し、抗体精製に使用した。

【0119】8-3-4 抗phospho-HsLats2-S83ポリクローナル抗体の精製

抗リン酸化ペプチド抗体を精製するため、前述の粗精製抗体分画を特異化カラムに通した。PBS/0.1% TritonX100で洗浄した後、カラムに吸着している抗リン酸化ペプチド抗体を、0.17 M glycine-HCl (pH2.5)で溶出した。溶出した抗体は直ちに1 M Tris-HCl(pH8.0)を適量加えて中和し、PBS に対して透析し、抗phospho-HsLats2-S83抗体分画とした。完全に PBS に平衡化させた後、これを吸収用カラムであるHsLats2-S83セファロース 4Bカラムに通した。吸収用カラムに通すことにより、抗phospho-HsLats2-S83抗体分画中に存在する非リン酸化ペプチドとも反応する抗体を取り除くことができる。一方、抗リン酸化ペプチド特異抗体は、カラムに吸着せずに、カラムを素通りする。吸収用カラムをPBS/0.1% TritonX100で洗浄し、吸収用カラムに結合した抗体は、0.17 M glycine-HCl (pH2.5)で溶出した。溶出後、カラムは、再びPBS/0.1% TritonX100で平衡化し、非リン酸化ペプチド抗体がほぼ完全に吸収されるまで、抗phospho-HsLats2-S83抗体分画を吸収用カラムに、繰り返し通した。非リン酸化ペプチド感作プレートを用いたELISAによって、非リン酸化ペプチドとも反応する抗体が除去できている事を確認した。リン酸化ペプチド感作プレートを用いたELISAによって、そのリン酸化ペプチドに対する特異性を最終的に確認した。

【0120】8-4 抗体の検定

8-4-1 抗体力価及び抗体の特異化検定用ELISAプレート

の作製

ペプチドを 1 µg/ml になるように 0.1 M 炭酸バッファに溶かした。これを ELISA 用の 96 穴マイクロタイタープレートに、1 穴あたり 50 µl ずつ分注した。これを 4 で一晩放置し感作した。感作後、ペプチド溶液を除き、ブロッキング溶液 (1% BSA, 5% Sucrose, 0.1% Na₃/PBS) を、1 穴あたり 200 µl ずつ分注して、室温で 1 時間程度放置した。ブロッキング液を完全に除去し、ドラフト内で風乾させた (固相化)。リン酸化ペプチド (phospho-HsLats2-S83) 固相化プレートは、それぞれ抗体力価の測定、抗リン酸化セリン残基特異抗体の吸収確認、抗リン酸化ペプチド抗体の特異性の確認に用いた。また、非リン酸化ペプチド (HsLats2-S83) 固相化プレートは、カラムによる非特異抗体の吸収の確認に用いた。

【0121】8-4-2 ELISA 法による各種検定方法

力価検定用の血清は、PBS を用いて 200 倍希釈から、精製抗体は 1 µg/ml から、4 倍ずつ段階的に希釈し、希釈したサンプルは、感作プレート 1 穴あたり 50 µl 添加した。添加後、室温に 1 時間静置した (1 次抗体反応)。反応液を捨て、各穴を、PBS で 4 回以上洗浄した。Horse radish Peroxidase (HRP) などで標識された抗マウスあるいは抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (2 次抗体) を PBS で適当に希釈し、これを各ウェルに 50 µl ずつ添加し、室温で 30 ~ 60 分間反応させた (2 次抗体反応)。血清あるいは抗体が、ウサギ由来であれば、2 次抗体は anti-Rabbit IgG (H+L-chain) conj. Peroxidase (MBL 社製) を用い、マウス由来であれば anti-Mouse IgG (H+L-chain) conj. Peroxidase (MBL 社製) を用いた。2 次抗体反応液を捨て、各穴を、PBS で 4 回以上洗浄した。発色基質 (750 µM TMB, Tetramethylbenzidine) 溶液を 1 穴あたり 50 µl 添加し、30 で 5 ~ 20 分間発色させた (発色反応)。反応停止液 (1.5 N H₃PO₄) を 50 µl ずつ加えて、発色反応を停止させた。最後に、マイクロプレートリーダーを用いて、450 nm における吸光度を測定した。

【0122】8-4-3 抗phospho-HsLats2-S83抗体の特異性確認

抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体、抗phospho-HsLats2-S83ポリクローナル抗体を、それぞれ 1 µg/ml (抗体) から 4 倍ずつ段階的に希釈し、リン酸化ペプチド (phospho-HsLats2-S83) 固相化プレートと非リン酸化ペプチド (HsLats2-S83) 固相化プレートを用いて、ELISA 法にて特異性を確認した。図 9 は、pH4.0 および pH 3.0 で抽出した抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体の、図 10 は抗phospho-HsLats2-S83ポリクローナル抗体の特異性を確認した結果である。

【0123】両図から、抗体濃度が高くなるに従い、phospho-HsLats2-S83リン酸化ペプチド固相化プレートでは吸光度が高くなる一方で、HsLats2-S83非リン酸化ペ

プチド固相化プレートでは吸光度がほぼゼロを維持していることがわかる。したがって、両抗体とも、ヒトLats2の83番目のセリン残基のリン酸化を特異的に認識する抗体であることが証明された。抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体は pH4.0 で抽出した抗体の方が感度が高いことが明らかになった。また抗phospho-HsLats2-S83ポリクローナル抗体の方が、低い抗体濃度で高い吸光度が得られることから、感度が高いことが明らかになった。

【0124】実施例 9 Aurora2リン酸化酵素活性測定用 ELISA 系の構築

9-1 基質と抗体の選択

96 穴マイクロタイタープレート内で Aurora2 リン酸化酵素活性を測定するために、用いる基質となるヒトLats2の83番目のセリン残基を含む領域と、抗phospho-HsLats2-S83抗体の選択を行った。具体的には放射性同位元素を用いたリン酸化アッセイにおいて Aurora2 の良い基質となることが分かったヒトLats2の79 ~ 257 番目までのアミノ酸領域の GST 融合タンパク質と、78 番目から 87 番目までのアミノ酸配列に相当する非リン酸化ペプチド (HsLats2-S83) を基質として検討した。抗phospho-HsLats2-S83抗体は pH4.0 で抽出したモノクローナル抗体 (3B11F3F4) と、ポリクローナル抗体の比較検討を行った。

【0125】9-1-1 GST-HsLats2 (79-257 aa) 固相化プレートの作製

0.1 M 炭酸バッファを用いて GST-HsLats2 (79-257 aa) を 5 µg/ml に希釈し、ELISA 用マイクロタイタープレートに、1 穴あたり 50 µl ずつ分注して、4 にて一晩感作した。感作溶液を除き、ブロッキング溶液 (1% BSA, 5% Sucrose, 0.1% Na₃/PBS) を、1 穴あたり 200 µl ずつ分注して、室温で 1 時間程度放置した。ブロッキング溶液を完全に除去し、ドラフト内で風乾させ、使用まで 4 で保存した。この操作によりマイクロタイタープレートの内壁に GST-HsLats2 (79-257 aa) を固相化した。

【0126】9-2 Aurora2の活性測定方法

リコンビナントタンパク質 GST-HsLats2 (79-257 aa) あるいは非リン酸化ペプチド (HsLats2-S83) を固相化したウェル中において、タンパク質リン酸化反応を行う。その後、同じウェル中で、連続して ELISA を行う。

【0127】1 倍 (x1) から 2 倍ずつ 64 倍まで希釈したリコンビナント Aurora2 希釈系列をリン酸化バッファを用いて調製した。これを 50 µl ずつ固相化プレートのウェル中に添加した (タンパク質リン酸化反応)。30 で一定時間保温した後、リン酸化反応液を捨て、各ウェルを PBS で 4 回以上十分に洗浄した。1 µg/ml となるように、抗体希釈液 (1% BSA, 0.1% Na₃/PBS) で希釈した一次抗体、すなわち抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体 (pH4.0 抽出) あるいは抗phospho-HsLats2-S83ポリクローナル抗体を、各ウェルに 50 µl ずつ添加

して、室温で30～60分間反応させた(1次抗体反応)。1次抗体反応液を捨て、各ウェルをPBSで4回以上十分に洗浄した。Horseradish Peroxidase(HRP)などで標識された抗マウスあるいはウサギ免疫グロブリン抗体(2次抗体、MBL社)をPBSで1000倍に希釈し、これを各ウェルに50 μ lずつ添加し、室温で30～60分間反応させた(2次抗体反応)。2次抗体反応液を捨て、各ウェルを、PBSで4回以上洗浄した。発色基質溶液を1ウェルあたり50 μ l添加し、5～20分間発色させた(発色反応)。反応停止液を50 μ lずつ加えて、発色反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用いて、450 nmにおける吸光度を測定した。

【0128】結果を図11に示した。この結果より、本発明で提供される、抗リン酸化ペプチド抗体を用いたELISA法によって、Aurora2のタンパク質リン酸化酵素活性を測定できることが明らかになった。このリン酸化酵素活性測定系に用いる基質は、リコンビナントタンパク質GST-HsLats2(79-257 aa)が好ましいことが明らかになった。非リン酸化ペプチド(HsLats2-S83)がこの活性測定系に利用できない原因としてはリン酸化部位を含む領域が短く、Aurora2が標的とする83番目のセリン残基を認識することが難しい事が予想される。また同様な考察を行うことによって、GST-HsLats2(79-118 aa)も本測定系における基質の1つとして提供することも可能と考えられる。なお、抗phospho-HsLats2-S83抗体はポリクローナル抗体もモノクローナル抗体も本測定系において同程度に有効であることが証明された。大量に安定供給が可能なことから、以降の検討は抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体(pH4.0抽出)を用いた。

【0129】実施例10 Aurora2とそれ以外のリン酸化酵素による検討

本測定系において、他のリン酸化酵素を用いた場合の検討を行った。GST-HsLats2(79-257 aa)感作プレートと抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体(pH4.0抽出)を用いた。酵素には前述のAurora2(野生型、WT)、非活性型Aurora2(KD)、およびヒトLats2の79～257アミノ酸領域をリン酸化するが、83番目のセリン残基をリン酸化しない事が明らかになっているヒトChk2、PLK1を用い、それぞれの希釈系列にて活性測定を行った。

【0130】結果を図12に示す。Aurora2 WTは酵素を4倍まで希釈するに従い、吸光度すなわち83番目のセリン残基のリン酸化が低下することが観察された。これはリン酸化酵素活性が存在しないAurora2 KDでは観察されなかった。固相化した基質をリン酸化するが、83番目のセリン残基をリン酸化しないChk2ではPLK1と同様に吸光度の変化は観察されず、干渉しないことが明らかになった。これらの事より、本測定系においてAurora2特異的なリン酸化活性の測定が可能であることが証明された。

【0131】実施例11 ラジオフィルタアッセイとELISA測定系の比較

ラジオフィルタアッセイは、酸不溶性画分への放射性同位元素[γ - 32 P]ATPの取り込みを利用して、基質に対するリン酸化を検出する方法であり、リン酸化活性を測定する場合に比較的良く用いられる。この方法と本発明で提供されるELISA測定系における感度を比較した。1 μ gのリコンビナントタンパク質GST-HsLats2(79-257 aa)に、1倍(x1)から2倍ずつ64倍まで希釈したりコンビナントAurora2希釈系列をリン酸化バッファーを用いて調製し、全量を50 μ lにした。30分で一定時間保温した後、1 mlの10%トリクロロ酢酸、0.2% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ を加え反応を停止させた。この酸不溶性画分をGFCフィルター(Whatman社製)にトラップし、2%トリクロロ酢酸、0.02% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ を用いて3回洗浄した。基質に取りこまれた[γ - 32 P]ATPのカウントを液体シンチレーションカウンターで測定した。

【0132】結果を図13に示す。それぞれ1倍のAurora2酵素濃度における、ラジオフィルタアッセイではカウント(cpm)をELISAでは吸光度を100%として相対値(%)にて示した結果である。ELISA法による測定においては、x8まで100%であることより、放射性同位元素[γ - 32 P]ATPを用いた測定系と比較して、約1/8の酵素量で測定できることが示された。またELISA法で用いる基質の量は1ウェルに計算上0.25 μ gであるのに対し、ラジオフィルタアッセイでは約4倍量の1 μ g必要とする点、また酵素量ゼロにおけるバックグラウンドがELISA法ではほとんど存在しない事からも、放射性同位元素を使用せずに測定できる利点以上に、感度も高く、かつ用いる基質と酵素も少なくでき、本発明で提供されるELISA測定系が如何に優れているかが証明された。

【0133】実施例12 Aurora2リン酸化活性阻害物質の検索実施例

リン酸化酵素の阻害剤として知られるK-252a(CALBIOCHEM社製)は、CaMキナーゼIIやプロテインキナーゼA、プロテインキナーゼC、プロテインキナーゼGなど、様々なリン酸化酵素の阻害剤として知られている。このK-252aとAurora2リン酸化活性阻害剤候補物質A及びBを用いて、本発明で提供されるELISA系にて検討した。それぞれの希釈系列を調製し、これとリン酸化アッセイバッファーで調製したAurora2とを混合し、全量を50 μ lにした。これをGST-HsLats2(79-257 aa)を固相化したウェルに添加し、前述の方法でAurora2リン酸化活性をELISA法にて検討した。

【0134】結果を図14に示す。K-252aはリン酸化酵素に対する特異性の低い阻害剤であることから、Aurora2によるリン酸化活性を濃度依存的に抑制する結果が得られた。また候補物質BにおいてもK-252aと比較すると抑制効果が低いものも阻害作用が検出できた。したがって候補物質Bについては誘導体を合成し、そのAurora2リン酸化活性の阻害効果を検討することで、更に阻害効果を高めた薬剤を得る事も可能と考えられる。このこと

39

から、実際にAurora2のリン酸化活性阻害剤の薬剤スクリーニングにも有効であることが示された。

【0135】

【発明の効果】本発明により、ヒトAurora2リン酸化酵素によりリン酸化された基質を特異的に認識して結合する抗体、該抗体を用いてヒトAurora2リン酸化酵素の活性を測定する方法及びキット、並びにヒトAurora2リン酸化酵素の活性を阻害若しくは促進する化合物をスクリーニングする方法が提供される。

【0136】Aurora2リン酸化酵素は癌で過剰発現していることが報告されていることから、臨床生理サンプルを用い、本発明で提供される方法またはキットを用いてAurora2タンパク質リン酸化酵素のタンパク質リン酸化活性の検出、またはLats2タンパク質の83番目のセリン残基がリン酸化される活性を検出し、診断することが可能である。

【0137】また、本発明で提供される方法またはキットを用いて、Aurora2タンパク質リン酸化酵素のリン酸化活性阻害剤または促進剤の薬剤スクリーニングも可能になる。

【0138】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD

<120> A method, kit and antibody for detecting a protein kinase activity

<160> 4

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD RES

<222> (6)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially Synthesized Peptide.

<400> 1

Arg Glu Ile Arg Tyr Ser Leu Leu Pro Phe

1

5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially Synthesized Peptide.

<400> 2

Arg Glu Ile Arg Tyr Ser Leu Leu Pro Phe

1

5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD RES

<222> (7)

<223> PHOSPHORYLATION

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially Synthesized Peptide.

<400> 3

Cys Arg Glu Ile Arg Tyr Ser Leu Leu Pro Phe

1

5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially Synthesized Peptide.

<400> 4

Cys Arg Glu Ile Arg Tyr Ser Leu Leu Pro Phe

1

5

【図面の簡単な説明】

【図1】リコンビナントAurora2リン酸化活性の測定の結果を示すオートラジオグラフィーの写真である。

30 【図2】Cyclin/CDKファミリーによるリン酸化の検討の結果を示すオートラジオグラフィーの写真である。

【図3】チェックポイントに関与するリン酸化酵素を用いた検討の結果を示すオートラジオグラフィーの写真である。

【図4】ヒトLats2欠損タンパク質を用いたリン酸化部位の検討の結果を示すオートラジオグラフィーの写真である。

40 【図5】マウスLats2欠損タンパク質を用いたリン酸化部位の検討の結果を示すオートラジオグラフィーの写真である。

【図6】ヒトLats1欠損タンパク質を用いたリン酸化部位の検討の結果を示すオートラジオグラフィーの写真である。

【図7】Aurora2によってリン酸化されうるLats2タンパク質アミノ酸残基の決定の結果を示すオートラジオグラフィーの写真である。

【図8】Aurora1とAurora3によるヒトLats2のリン酸化の検討の結果を示すオートラジオグラフィーの写真である。

50 【図9】抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体の

特異性の確認の結果を示す図である。

【図10】抗phospho-HsLats2-S83ポリクローナル抗体の特異性の確認の結果を示す図である。

【図11】リン酸化活性測定系構築のための基質と抗体の選択のために行った実験の結果を示す図である。

【図12】Aurora2とそれ以外のリン酸化酵素によるリ *

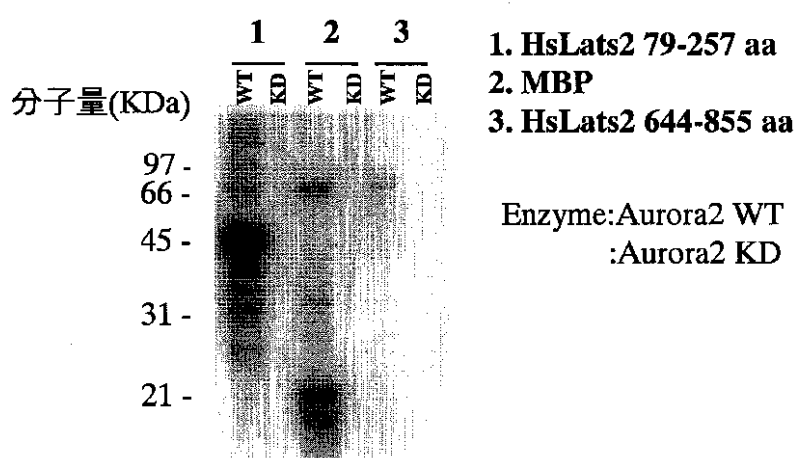
*ン酸化の検討の結果を示す図である。

【図13】ラジオフィルタアッセイとELISAによるリン酸化活性の測定系の比較の結果を示す図である。

【図14】Aurora2リン酸化活性阻害物質のスクリーニングの実施例を示す図である。

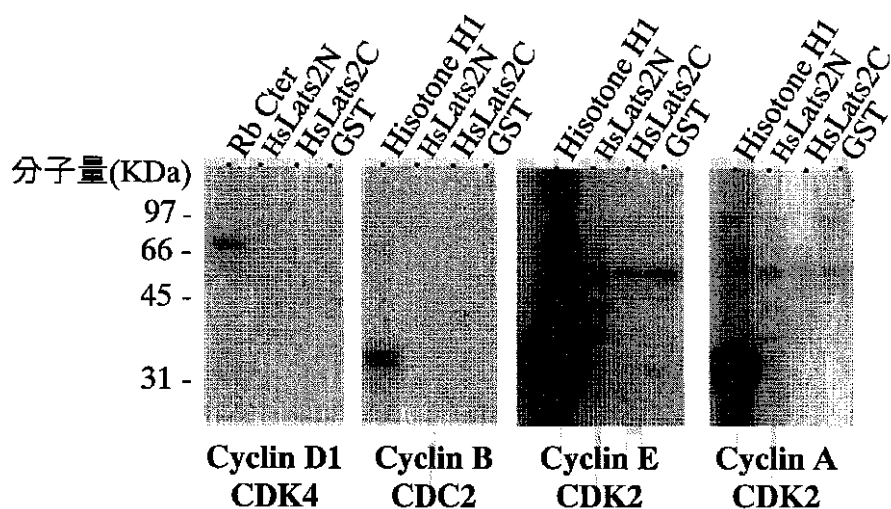
【図1】

図1 リコンビナントAurora2リン酸化活性の測定



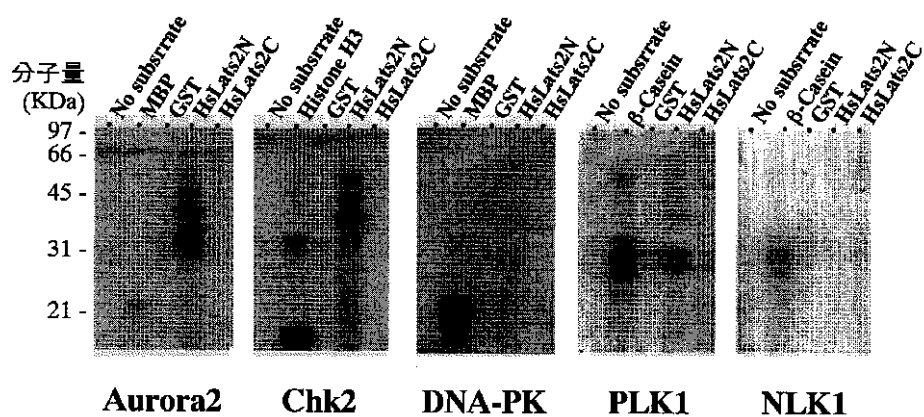
【図2】

図2 Cyclin/CDKファミリーによるリン酸化の検討



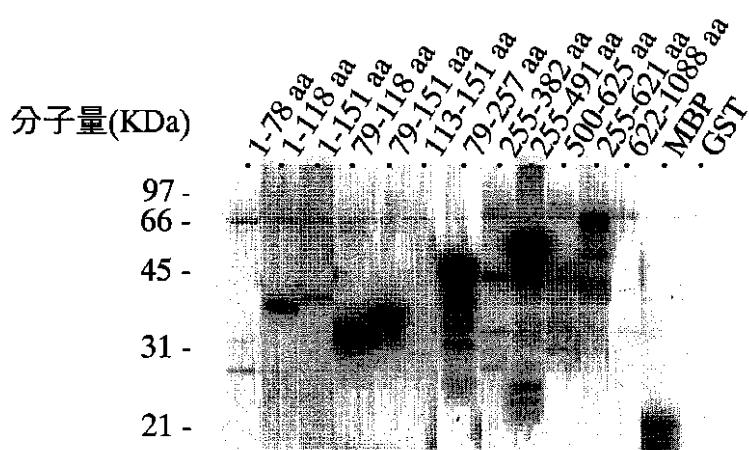
【図3】

図3 チェックポイントに関与するりん酸化酵素を用いた検討



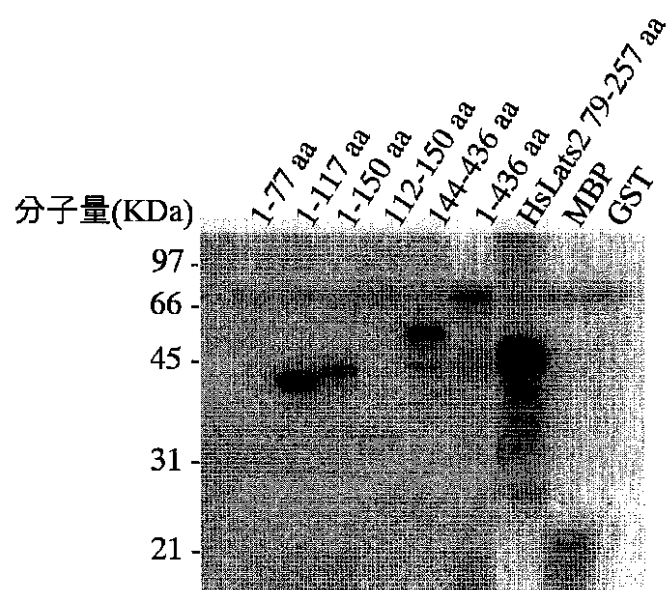
【図4】

図4 ヒトLats2欠損タンパク質を用いたリン酸化部位の検討



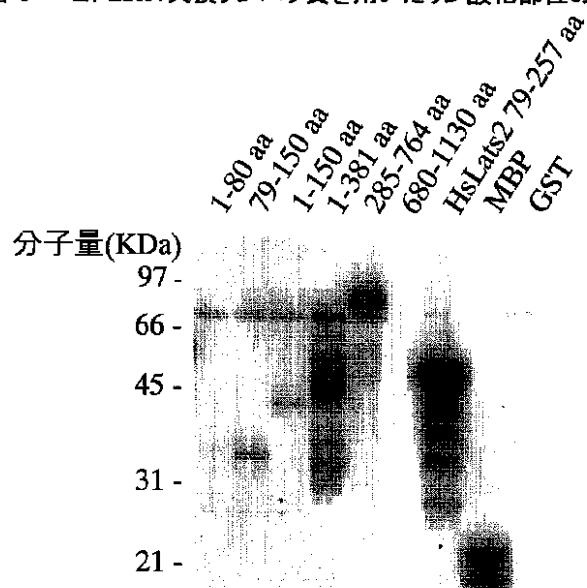
【図5】

図5 マウスLats2欠損タンパク質を用いたリン酸化部位の検討



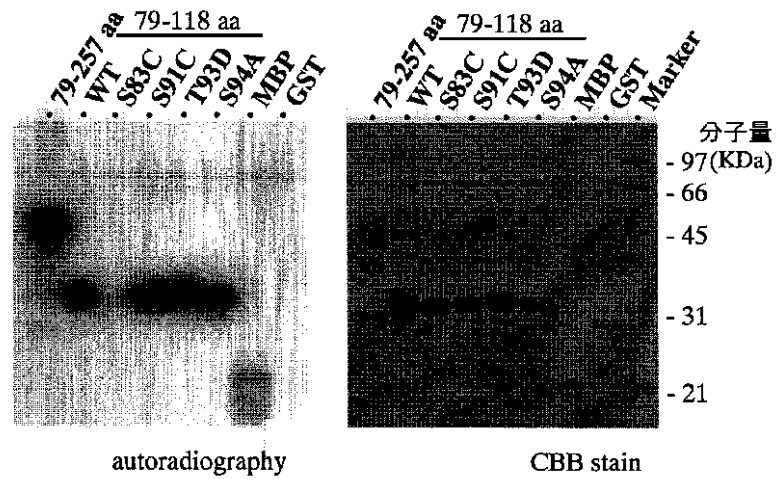
【図6】

図6 ヒトLats1欠損タンパク質を用いたリン酸化部位の検討



【図7】

図7 Aurora2によってリン酸化される
Lats2タンパク質アミノ酸残基の決定



【図8】

図8 Aurora1とAurora3によるヒトLats2のりん酸化の検討

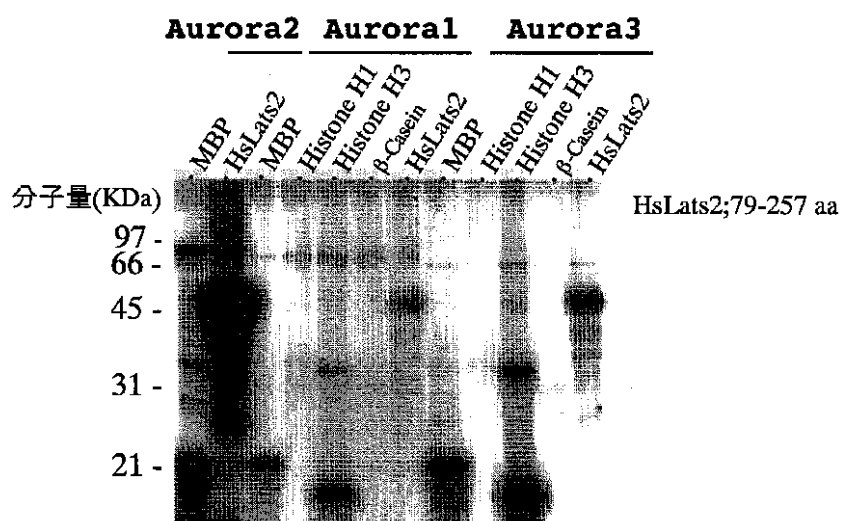
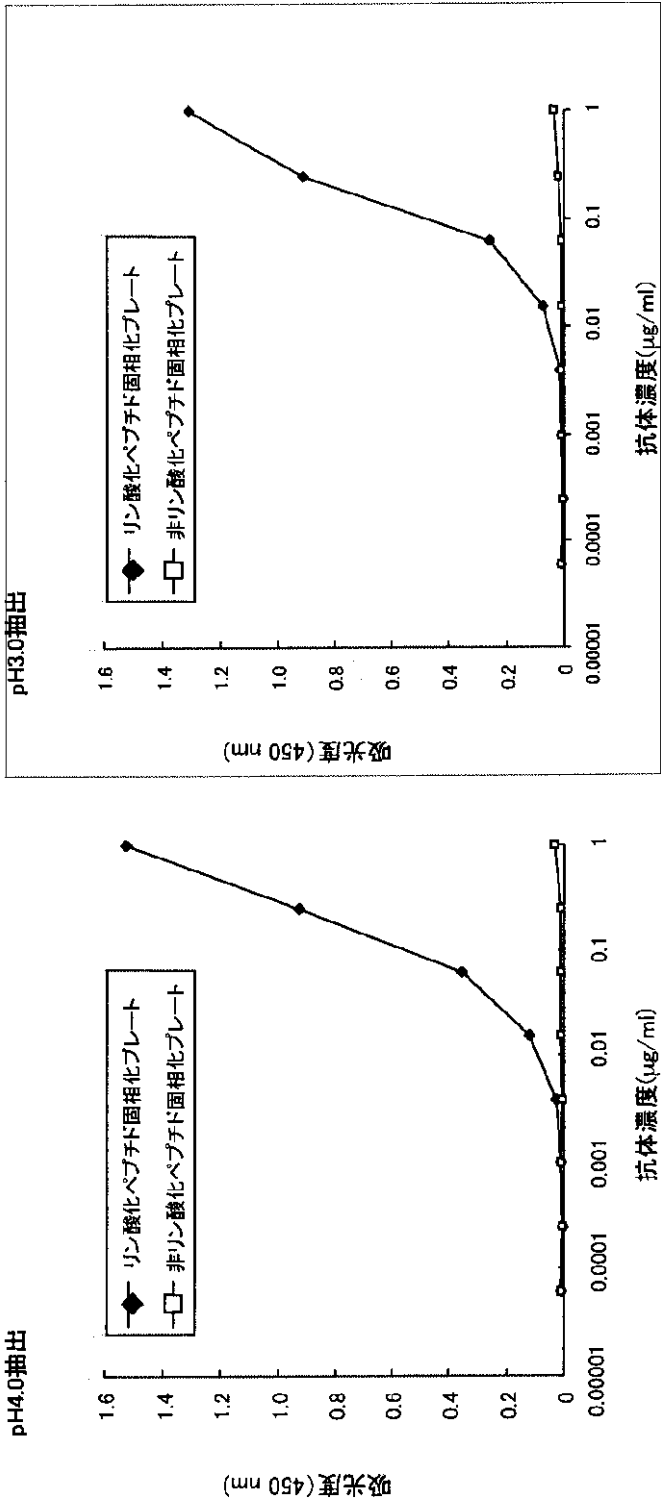


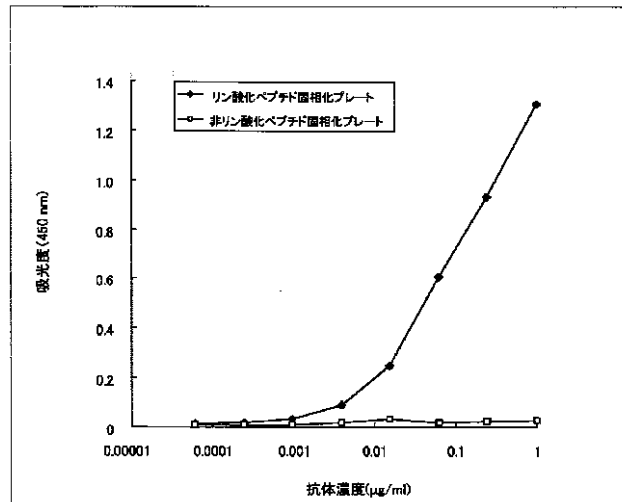
図9 抗phospho-HsLats2-S83モノクローナル抗体の特異性の確認



【図9】

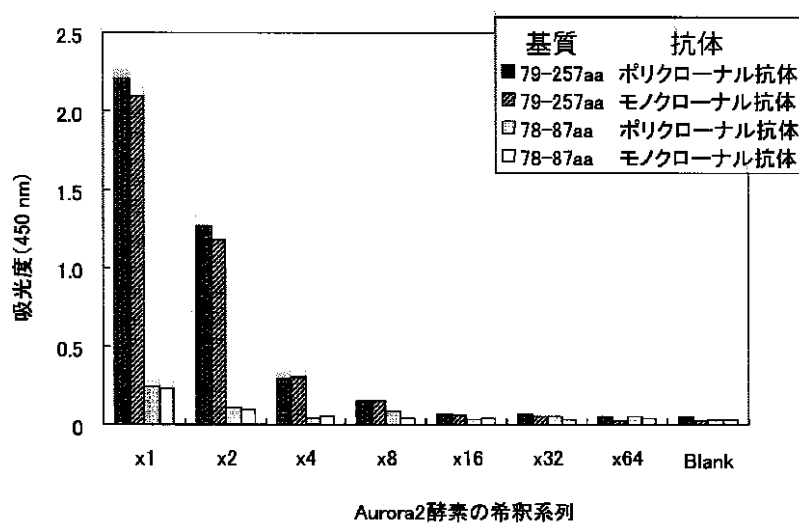
【図10】

図10 抗phospho-HsLats2-S83 ポリクローナル抗体の特異性の確認



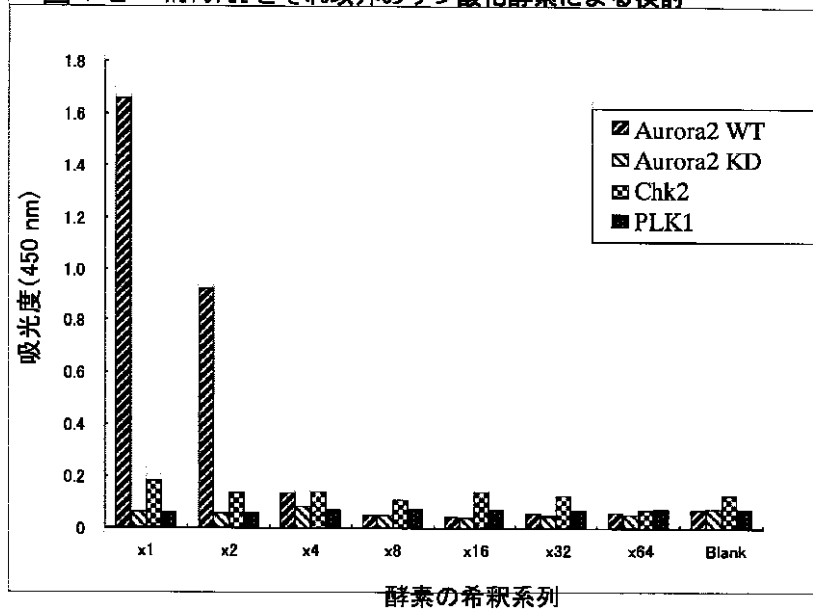
【図11】

図11 測定系構築のための基質と抗体の選択



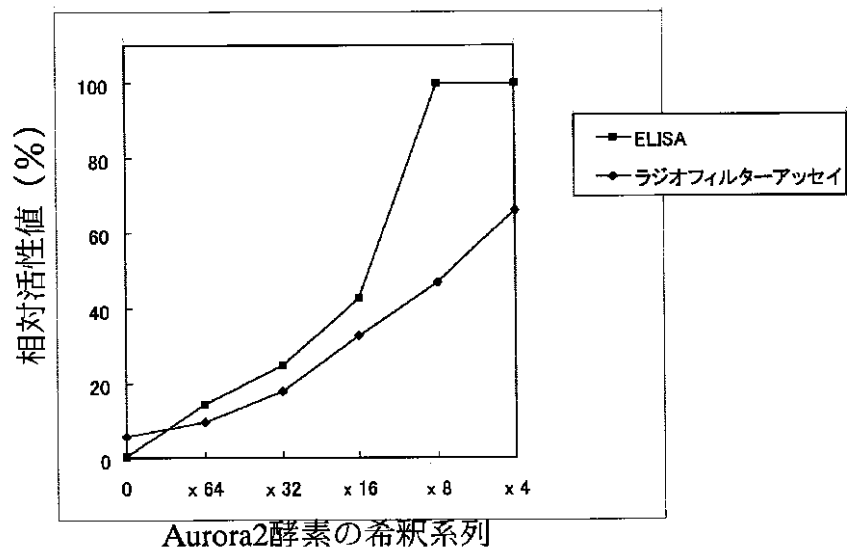
【図12】

図12 Aurora2とそれ以外のリン酸化酵素による検討



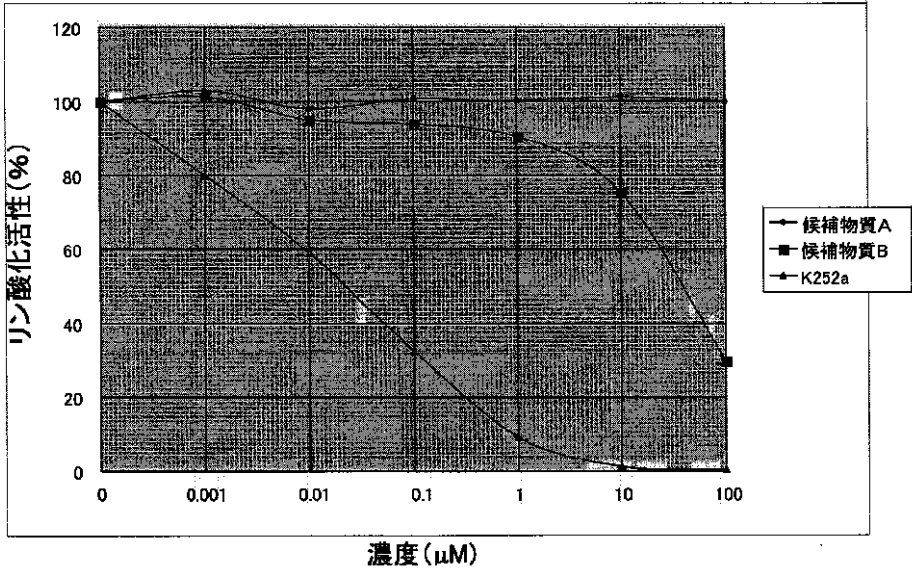
【図13】

図13 ラジオフィルターアッセイとELISA測定系の比較



【図14】

図14 Aurora2リン酸化活性阻害物質の検索実施例



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/15		C 1 2 N 5/00	B
33/50		15/00	C
// C 1 2 P 21/08			Z N A A

(72)発明者 小林 稔子	F タ-ム(参考)
長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063 -	2G045 AA40 DA36 FA26 FA29 FB01
103 株式会社医学生物学研究所内	FB02 FB03 FB05 FB08 GC10
	4B024 AA11 BA10 BA53 CA04 CA07
	DA06 EA04 GA03 GA11 HA15
	4B064 AG27 CA02 CA10 CA20 CC24
	DA13
	4B065 AA26X AA92X AB01 AB05
	AC14 BA02 BA08 CA25 CA29
	CA46
	4H045 AA11 AA30 BA10 BA15 BA41
	CA40 DA75 DA76 EA50 FA20
	FA72 FA73 FA74 HA05 HA07

专利名称(译)	测量蛋白激酶活性的方法，测定试剂盒和测量抗体		
公开(公告)号	JP2002236125A	公开(公告)日	2002-08-23
申请号	JP2001029774	申请日	2001-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社医学生物学研究所		
[标]发明人	田路真悟 玉井克之 小林稔子		
发明人	田路 真悟 玉井 克之 小林 稔子		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/40 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/50		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/40 G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12P21/08 C12N5/00.B C12N15/00.C C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FA26 2G045/FA29 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/GC10 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA29 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/HA05 4H045/HA07		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：使用特异性识别并结合人Aurora2蛋白激酶磷酸化的底物的抗体来测量人Aurora2磷酸化酶的活性，测量活性的试剂盒和测量活性的方法。一个目的是提供用于测量的抗体和用于筛选抑制或促进人Aurora 2蛋白激酶活性的化合物的方法。解决方案：使用特异性识别并结合人Aurora2蛋白磷酸酶磷酸化底物的抗体，通过免疫学方法测量人Aurora2蛋白的磷酸化。测量激酶的磷酸化活性。

【図2】

図2 Cyclin/CDKファミリーによるリン酸化の検討

