

# リン酸化モチーフ特異的抗体を用いる タンパク質リン酸化解析法

## Analysis of Protein Phosphorylation using Phosphorylation Motif-Specific Antibodies

研究代表者 北海道大学大学院理学研究科 教授 坂口 和靖

Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University

Kazuyasu Sakaguchi, Professor

タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は、様々な生命現象でのタンパク質機能の主たる制御機構であり、これからのゲノム・プロテオーム解析をもとにした生命現象の解明において、この制御機構を理解することは必須な要件である。申請者は、簡便・迅速なリン酸化解析法開発のために、リン酸化モチーフの概念を導入し、現在までに特定のリン酸化モチーフのみを特異的に認識し、他種のキナーゼによるリン酸化部位とは交叉反応しないモノクローナル抗体の作製に成功した。本研究においてはこれをさらに発展させ、各種キナーゼのリン酸化モチーフを特異的に認識する抗体の作製法を開発し、これを用いた簡便なタンパク質のリン酸化の解析法を確立する。これに際し、モノクローナル抗体の作製の効率向上のために、今回新規に考案した選択的融合法を検討する。本法は、リン酸化以外の各種タンパク質翻訳後修飾に対する特異的抗体の作製およびそれらの解析へも応用が強く期待できる。

Phosphorylation and dephosphorylation plays important roles in regulation of protein functions. Antibody specific to phosphorylation site modified by protein kinase is an essential tool for the study of protein phosphorylation. The special aim in this study is to develop "phosphorylation motif"-specific monoclonal antibody for analysis of protein phosphorylation. We have developed the monoclonal antibody that is specific to a particular phosphorylation motif and does not react with the other motifs or with unphosphorylated sequence. The phosphorylation motif specific monoclonal antibody was applied for phosphorylation study of proteins. We also examined a new procedure for selection of specific lymphocytes to produce hybridoma.

### 1. 研究目的

これからのゲノムおよびプロテオーム解析をもとにした生命現象の解明においてタンパク質機能がどのように制御されているのかを理解することは必須な要件である。現在、DNA マイクロアレイを用いて、遺伝子の転写制御による mRNA を介した制御機構が主

として研究されている。しかしながら、タンパク質の翻訳後修飾、特にリン酸化・脱リン酸化が、様々な生命現象の局面でのタンパク質の機能の主たる制御機構であり、リン酸化を触媒するプロテインキナーゼと脱リン酸化を触媒するプロテインホスファターゼにより協同的、可逆的に調節を受けている。こ

の制御機構の研究には翻訳後修飾を特異的に認識する抗体の使用が必須であるが、特異的抗体の作製には膨大な時間と費用を必要とし、容易ではないため、簡便・迅速な方法の開発が切望されている。

本研究では、『リン酸化モチーフ』という新しい概念を導入した。それぞれのキナーゼは、リン酸化するアミノ酸の周辺配列に対して特異性を有しており、ひとつのキナーゼはその特有の配列を持つ部位のみをリン酸化する。以降、本研究では、このリン酸化された特異的配列をキナーゼの『リン酸化モチーフ』と呼ぶ。例えば、遺伝毒性の DNA 損傷によって活性化されるプロテインキナーゼ ATM のリン酸化モチーフは、Ser(P)-Gln である。[ここで Ser(P) はリン酸化セリンを示す] 細胞内において、ひとつのキナーゼによる、標的タンパク質のリン酸化部位は通常 1 か所である。また、あるタンパク質中に含まれる任意のリン酸化モチーフは、統計的に数個に限られる。このため、リン酸化モチーフを特異的に認識する抗体を作製すれば、タンパク質リン酸化の解析を極めて簡便化できる。

今回、Ser(P)-Gln リン酸化モチーフを特異的に認識するモノクローナル抗体 3G9-H11 を使用し、タンパク質リン酸化解析法への応用を実施した。加えて、リン酸化モチーフ特異的モノクローナル抗体の新規作製法を検討した。

## 2. 研究経過

### 2.1. 3G9-H11 抗体の特異性

本研究では、電離性放射線の DNA 損傷によって活性化され、細胞周期の制御に重要な役割を果たしている ATM をプロテインキナーゼのモデルとして選択した。ATM のリン酸化モチーフは Ser(P)-Gln である。また、この Ser(P)-Gln 配列は ATM と同じ PI3 キナーゼファミリーに属する DNA-PK および ATR のモチーフでもある。

モノクローナル抗体 3G9-H11 は Ser(P)-Gln 配列を持つ 15 位および 37 位がリン酸化された p53 ペプチドのみを認識し、非

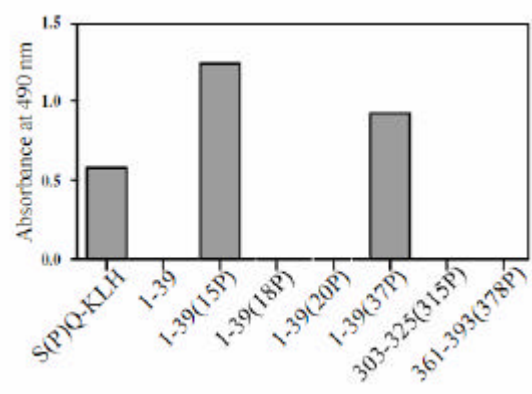


図1 3G9-H11 抗体の特異性

リン酸化ペプチドあるいは他のプロテインキナーゼの部位である 18 位 (CK1 キナーゼ部位)、20 位 (Chk キナーゼ部位)、315 位 (CDK キナーゼ部位)、378 位 (PKC キナーゼ部位) がリン酸化されたペプチドとは反応しなかった (図1)。この結果は、3G9-H11 抗体が、目的とする Ser(P)-Gln 配列すなわち ATM、ATR、DNA-PK のリン酸化モチーフのみを特異的に認識することを示した。

### 2.2. 3G9-H11 抗体を用いた in vitro リン酸化アッセイ

3G9-H11 抗体の特異性およびアビジン-ビオチンの極めて強い親和力とを用いる ELISA 法によるリン酸化および脱リン酸化活性測定法を検討した。

この方法は、まずビオチン化ペプチドとプロテインキナーゼ、あるいはビオチン化したリン酸化ペプチドとプロテインホスファターゼを試験管内で反応させる。このペプチド溶液を、アビジン ELISA プレートに結合させた後、リン酸化ペプチドのみを認識する一次抗体 3G9-H11 を反応させる。これをペルオキシダーゼ HRP を付加した二次抗体により基質 OPD の 490nm における吸収を測定する (図2)。この方法は 2 個以上のリン酸化部位をもつ基質ペプチドに対しても、Ser(P)-Gln 部位の脱リン酸化を特異的に測定可能である。

この方法における標準曲線は、図3に示すようになっており、リン酸化活性の測定

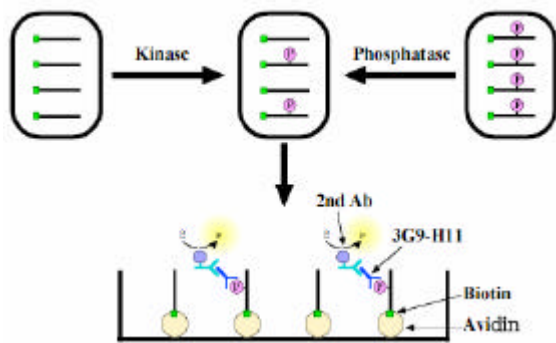


図2 3G9-H11 抗体を用いた活性測定法

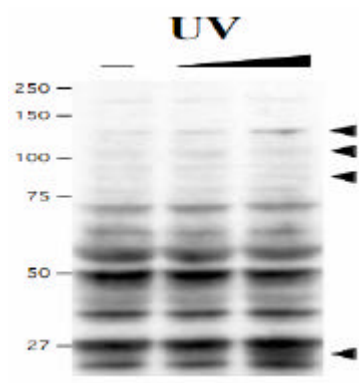


図4 A549 細胞における UV 照射

に適していることを示した。

### 2.3. 3G9-H11 抗体によるウエスタンブロッティング

UV 照射による ATR キナーゼの基質タンパク質の同定を目指した、3G9-H11 抗体によるウエスタンブロッティングを実施した。その結果、肺癌由来の A549 細胞を UV 照射したところ、明らかに増加している 4 種のバンドが見られた (図4)。これらのバンドは、ATR の *in vivo* 基質タンパク質である可能性があり、今後は二次元電気泳動等を用いた解析を行う予定である。

### 2.4. BIRL の合成

モノクローナル抗体の作製にあたり融合と選択の効率を上げる目的で、ビオチン-アビジンの高親和性を利用した新しいモノクローナル抗体の作製法を新たに検討した。この方法を行うために必要なビオチン化リ

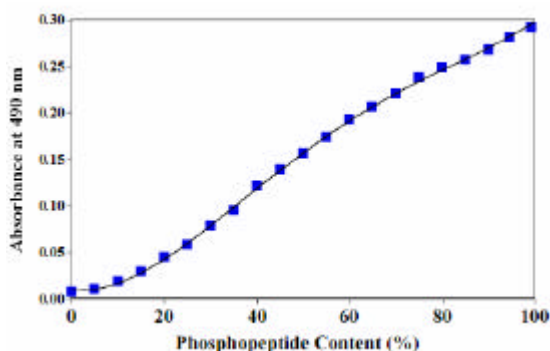


図3 3G9-H11 抗体による標準曲線

ジン誘導体 BIRL の合成を実施した。図5に示すように、BIRL は抗原ペプチドの結合のためのヨード酢酸部、特異的細胞選択のためのビオチン部および可視化のためのローダミン部を有している。この化合物を Fmoc-Lys(Boc)-OH を出発原料として、まずビオチン化リンカー付加した後、順にヨード酢酸化、ローダミン化を行い化学合成した。この BIRL は、Cys 残基あるいは遊離の SH 基を持つ抗原ペプチドを容易に蛍光ビオチン化できる。

### 2.5. 蛍光性ビオチン化ペプチドの on-resin 合成

より簡便な蛍光性ビオチン化ペプチドの合成のために on-resin 法を検討した。その結果、図6に示す Fmoc-Dap(Dde)-OH を用いる方法を見出した。この方法によりペプチド合成中の樹脂を使用し、効率良く Ser(P)-Gln モチーフを持つ蛍光性ビオチン化ペプチドが調製できた。

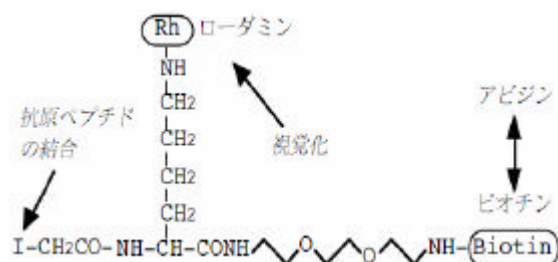


図5 蛍光性ビオチン化リジン誘導体 BIRL

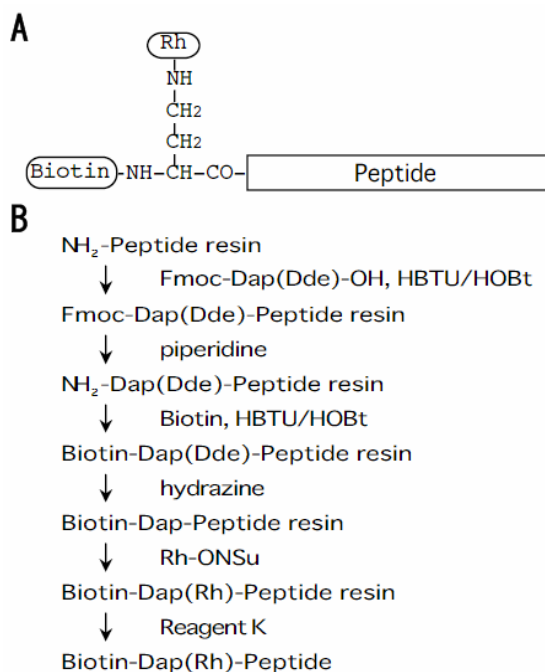


図6 蛍光性ビオチン化ペプチドの  
A. 構造および B. 合成

### 2.6. 蛍光性ビオチン化ペプチドの利用

合成した Ser(P)-Gln モチーフ蛍光性ビオチン化ペプチドを用いてハイブリドーマ調製のための新規方法の条件検討を行った。その結果、この蛍光性ビオチン化ペプチドは陽性細胞の表面のみに特異的に吸着することが示された(図7)。また、陽性細胞のトラップのための予備実験を行ったところ、この蛍光性ビオチン化ペプチド処理をしたアビジンビーズに細胞が吸着していることが示された。

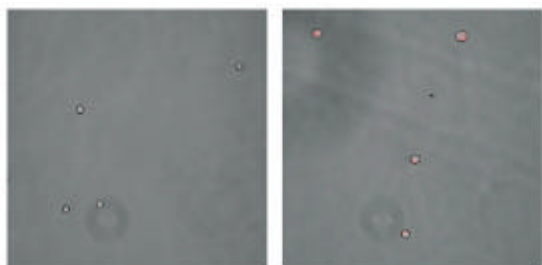


図6 蛍光性ビオチン化ペプチドの細胞への結合。(左)陰性細胞(右)陽性細胞。

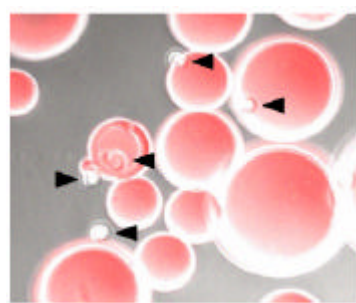


図7 蛍光性ビオチン化ペプチドを用いた陽性細胞のアビジンビーズによるトラップ

### 3. 研究成果

本研究では、Ser(P)-Gln リン酸化モチーフを対象に、このモチーフのみを特異的に認識し他種のキナーゼによるリン酸化部位とは交叉反応しないモノクローナル抗体 3G9-H11 を用いたタンパク質リン酸化測定を実施した。本法の最大の特徴は、タンパク質のリン酸化の解析において、個々のタンパク質のリン酸化部位特有の配列に対する抗体を毎回作製する必要がない点である。

さらに、リン酸化モチーフ抗体を産生するハイブリドーマの新規調製法の開発を実施し、その有効性を示した。

### 4. 今後の課題と発展

今後は、タンパク質リン酸化の研究のさらなる展開のために、本研究で開発した方法を用いて各種リン酸化モチーフ特異的抗体を作製し、それらを用いたタンパク質リン酸化解析法の開発を目指す。これにより広範囲なタンパク質リン酸化による制御機構の研究がさらに発展し、プロテオーム解析の推進に大きく貢献することが期待される。

### 5. 発表論文リスト

Phosphorylation site-specific monoclonal antibody recognizing Ser(P)-Gln Sequence. K. Sakaguchi, T. Honda, H. Onoue, and Y. Shimohigashi. Peptide Sci., 2002, 439 (2003).