言うまでもなく脅威の感染症である。我々は、前述のインジケーター細胞を用いて、Mincle が結核菌を認識することを見出した。この活性は実験室株のみならず、BCG株、強毒株においても認められた。そこで様々な溶媒で結核菌を処理し、活性画分の単離を試みたところ、その活性は脂溶性のクロロホルム:メタノール画分に抽出され、最終的にトレハロースジミコール酸(trehalose-6,6′-dimycolate、TDM)と呼ばれる糖脂質であることを見出した。

TDM は、コードファクターとも呼ばれ、古くから強い免疫賦活剤として知られていた結核菌由来の分子であった⁵⁾. 実際、TDM をマウスに投与すると、血中サイトカイン上昇、肺肉芽腫形成などの炎症応答が惹起されるが、Mincle 欠損マウスではこれらは全く誘導されなかった.Mincle は TDM 応答に必須の受容体であることも明らかとなった⁶⁾.

5. お わ り に

「生体の危機」を感知する受容体の全貌は未だ明らかで はない. Janeway らは、非自己病原体を認識する自然免疫 受容体, Toll 様受容体が危機の到来を生体に知らせ, 獲得 免疫応答を惹起するとする self vs. non-self 仮説を提唱し広 く支持されてきた⁶. ところが近年, Toll 様受容体が機能 しない状況下でも、獲得免疫が遜色無く発動することが判 明し",新たな受容体の関与が示唆されていた。また、組 織損傷や腫瘍に伴う「有害な自己」に対しては反応する必 要がある一方、常在菌などの「無害な非自己」には寛容で あるという免疫系の特性は、self vs. non-self 仮説には必ず しも合致しないものであった. このことから, 免疫応答の 惹起は、self vs. non-selfではなく、生体にとって「安全か vs. 危険か」という基準で決定されているという説(danger 仮説)が提唱された8). ストレスに伴って初めて誘導され、 「自己」「非自己」双方に起因する生体の「危機」を感知す る Mincle は、この概念をうまく説明する候補の一つとも 考えられる. 一方, こうした danger シグナルが誘導する 獲得免疫応答は、免疫賦活物質(アジュバント)の作用そ のものでもある. 実際, TDM は完全フロイントアジュバ ント (CFA) のコンポーネントであり⁹, TDM 及びその誘 導体はアジュバントとしても広く用いられてきた100. Mincle を始めとした C型レクチンファミリーが、どのように 様々な「danger」を感知しているのか、また多様な「danger」 の認識にひき続いて起こる免疫応答の惹起に、ITAM 特有 の「多能性」がどのように発揮されているのか、Mincle をターゲットとした新たなアジュバントの可能性を含め,

今後明らかにしていきたい.

- Matsumoto, M., Tanaka, T., Kaisho, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., & Akira, S. (1999) *J. Immunol.*, 163, 5039–5048.
- Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K., & Saito, T. (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 1179–1188.
- Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Tateno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., Takeda, K., Akira, S., & Saito, T. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 1897–1902.
- Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y.S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kinoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y., & Yamasaki, S. (2009) J. Exp. Med., 206, 2879–2888.
- Yamaguchi, M., Ogawa, Y., Endo, K., Takeuchi, H., Yasaka, S., Nakamura, S., & Yamamura, Y. (1955) Kekkaku, 30, 521– 524.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. (2002) Science, 296, 298– 300
- Gavin, A.L., Hoebe, K., Duong, B., Ota, T., Martin, C., Beutler, B., & Nemazee, D. (2006) Science, 314, 1936–1938.
- 8) Matzinger, P. (2002) Science, 296, 301-305.
- Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan,
 P.J., & Besra, G.S. (1997) Science, 276, 1420–1422.
- Azuma, I. & Seya, T. (2001) Int. Immunopharmacol., 1, 1249–1259.

山崎 晶

(九州大学生体防御医学研究所)

Self and non-self recognition through C-type lectin receptors Sho Yamasaki (Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3–1–1 Maidashi, Higashiku, Fukuoka 812–8582, Japan)

プロテインキナーゼ解析用ツールとしての 網羅的抗体

1. はじめに

細胞分裂,分化,物質代謝,ストレス応答,アポトーシス,免疫機能,神経機能など生体内で起きるほとんどの生命現象は、タンパク質リン酸化反応により巧妙に制御されている。このタンパク質リン酸化反応を司る酵素がプロテインキナーゼ (PK) であるが、その多彩な機能を反映して、酵素の種類は非常に多く、高等生物では全遺伝子産物の約2%を占めると言われている¹⁾.様々な生命現象の基本メカニズムにタンパク質リン酸化反応が重要な役割を果たしていることを示す論文が毎日のように出てくるが、こ

2011年 4月〕 331

のような研究において頻繁に利用されているのが、特定のPKを厳密な特異性で検出する抗体と、基質タンパク質のリン酸化状態を検出するリン酸化部位特異的抗体である。本稿では、上記のような従来から使われている特異性の厳密な抗体ではなく、筆者らが開発した幅広くPKを検出する網羅的抗体に関する最近の利用例について概説する。

2. タンパク質リン酸化反応と網羅的解析

細胞内のタンパク質のおよそ 1/3 がリン酸化を受けると言われており、これらのタンパク質はリン酸化反応を介して何らかの制御を受ける可能性が示唆されている². タンパク質リン酸化反応に関する研究は、様々な角度から様々なアプローチにより解析が進められている。それらは、特定の生命現象の制御メカニズムにおけるリン酸化反応の関与であったり、機能が分かっていない PK についての in vivo での機能解析であったり、また新たに見出された基質タンパク質のリン酸化の影響であったりと様々な内容を含んでいる。そのような個々の解析とは別に、細胞内でのリン酸化反応に関する網羅的解析も進められている。

タンパク質リン酸化に関する網羅的解析の例としては、細胞内でリン酸化されているタンパク質に焦点を当てたプロテオミクス, つまりホスホプロテオミクスがあるが, これは, 質量分析の普及とリン酸化タンパク質やリン酸化ペプチドを高感度に検出する技術の開発によって可能になった。また, ある特定の PK の標的タンパク質, つまり基質のスクリーニングも重要である. 基質タンパク質をスクリーニングするためのプロテインマイクロアレイなども行われているが, リン酸化される基質を見つけても, それが生体内での真のターゲットかどうかを判定するためには, さらに地道な検証が必要である. 生理的な基質を網羅的に, また簡単に決定する手法があれば非常に有用であるが, そのような便利な技術はこれまで確立していない.

タンパク質の総体をプロテオームと呼ぶのに対し、細胞内に存在するPKの総体を"キノム(kinome)"と呼ぶことが提唱されており、またプロテオミクスに対して"キノミクス(kinomics)"という語句も使われるようになってきた²⁾. ヒトには518種類のPKが存在すると言われており、また植物ではその2倍以上のPKが存在すると言われている。これらのPKすべてを網羅的に検出できれば、PK発現プロファイリング解析、つまりキノミクス研究も一気に展開することが期待されるが、技術的な問題が解決されておらず、これまでにそのような網羅的解析は報告されていない。そこで我々は、様々なPKを網羅的に検出す

るためのツールとして "マルチ PK 抗体", つまり, あらゆる PK を網羅的に検出できる抗体を作製し, その活用法について検討することにした.

3. マルチ PK 抗体

従来, 研究者にとって都合のよい抗体とは, 目的の抗原 を厳密に見分ける抗体であり、いわゆる非特異的反応の見 られない抗体を指している. 例えば、extracellular-signal regulated kinase (ERK) に対する抗体が多機能性 CaM キ ナーゼ (CaMK) や cAMP-dependent protein kinase (PKA) とも反応してしまっては、ERK に焦点を絞った解析ツー ルとしては使えない. しかし我々は、ERK、CaMK、PKA のみならず、その他の PK とも幅広く反応する抗体を取得 できれば PK の網羅的解析に使えるのではないかと考え, PK に対する網羅的抗体 (マルチ PK 抗体) の作製を試み た. PK はリン酸基転移酵素であり、基質となるタンパク 質は異なってもリン酸基を転移する反応は共通しているた め、PK 間で触媒ドメインの構造は類似している。Ser/Thr キナーゼも Tvr キナーゼも、その触媒ドメインには 12 箇 所のサブドメインが存在しており、その部分の配列は保存 されている⁴. その中でも特にサブドメイン VIB の配列が 高度に保存されていることから、この部分の配列を基に合 成したペプチドをマウスに免疫し、様々な PK を一網打尽 に検出する抗体を作製できないか検討した. 我々が合成し た抗原ペプチドのうち16PENペプチド(CVVHRDLK-PENLLLAS) を用いたときに、ウエスタンブロットで様々 な PK と反応性の見られる抗体が得られたので、この抗原 を免疫したマウスから反応特異性の異なる2種類のモノク ローナル抗体 (M1CとM8C) を取得した⁵⁾. しかし、こ れらの抗体は、様々な Ser/Thr キナーゼと反応するもの の、Tyrキナーゼとは全く反応性を示さなかった。そこで Tyr キナーゼのサブドメイン VIB のコンセンサス配列を参 考に 11RAAN ペプチド (CYVHRDLRAAN) を抗原にして, 新たに Tyr キナーゼを広く認識する抗体 (YK34) を取得

Ser/Thr キナーゼに対するマルチ PK 抗体を検出用ツールとして、動物^{5,7}、植物⁸⁾、キノコ⁹⁾の cDNA ライブラリーを用いた発現スクリーニングを行ってみたところ、様々な種類の PK 遺伝子が取得された。例えば、ミヤコグサの cDNA ライブラリーを用いた場合には、178 個のポジティブクローンを取得したが、そのうち 164 クローンがSer/Thr キナーゼの遺伝子であったことから、この抗体は PK 遺伝子を高い確率で選択的に取得するためのツールと

して利用できることが証明された.取得したこれらのクローンは、図1に示すように様々なサブドメイン VIB 配列を持つ15種類の PK に分類された.これらの抗原配列を抗体作製に使用した16PENペプチドと比較すると、抗原ペプチドのアミノ酸のうち半分以上のアミノ酸が入れ替わっているサブドメイン VIB 配列でも検出できることが明らかになった(図1、LNZ021、LNZ404).以上の結果から、特異的かつ網羅的に PK を検出するためのツールとしてマルチ PK 抗体が利用可能であることが示された.

4. マルチ PK 抗体を用いた研究例

4.1 DNAメチル基転移酵素に結合してリン酸化する Ser/Thr キナーゼ

DNA メチル化模様の維持に関与すると考えられている DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) の活性制御メカニズム に関しては未だ不明の点が多い. Dnmt1のN末端領域は ドメイン構造を形成しており、その部位には proliferating cell nuclear antigen (PCNA), methyl CpG binding protein 2 (MeCP2), histone deacetylase (HDAC) など様々なモジュ レータータンパク質が結合することが知られている. そこ で、Dnmt1 の N 末端ドメインを含む Dmnt1 (1-290) を用 いてアフィニティカラムを作製し、その領域に結合するタ ンパク質画分をマルチ PK 抗体 (M8C) を用いたウエスタ ンブロットで分析したところ, 抗体反応性を示す 110 kDa のタンパク質が検出された(図 2A). このタンパク質を質 量分析に供したところ, cyclin-dependent kinase like 5 (CDKL5) であることが明らかになった¹0). CDKL5 は Dnmt1 に結合し、DNA 依存的に Dnmt1 をリン酸化するだ けでなく、核内で Dnmt1 と共局在することが示された (図 2B). MeCP2 や CDKL5 の遺伝子の異常により、Rett 症候群が引き起こされることが報告されているがい。 MeCP2 だけでなく CDKL5 も Dnmt1 と複合体を形成する ことが判明したことから、Dnmt1を介して接点を持つこ れらのタンパク質の関わりは非常に興味深い. また, Dnmt1のN末端領域には、CDKL5以外にもCK1が結合 し、Dnmt1をリン酸化することも最近明らかになった. CK1 によってリン酸化されると、Dnmt1 の DNA 結合能は 低下するが、DNA メチル化活性そのものは影響を受けな いことが示された12).

4.2 インスリン分泌と相関して発現する Ser/Thr キナー ゼ

ラットインスリノーマ INS-1 細胞を培養する際, 培地中のグルコース濃度を 2.8, 5.6, 11.2 mM と順次上昇させ

るとインスリン分泌の増大が見られるが、さらに高グル コース濃度の 22.4 mM で培養すると逆にインスリン分泌 の低下がみられる(図3A).この状態が糖毒性の特徴であ り、慢性的な高血糖状況下にインスリン分泌が抑制され糖 尿病が深刻化する原因の一つとも言われている. 様々なグ ルコース濃度下で INS-1 を培養した時の細胞内 PK 発現パ ターンをマルチ PK 抗体 (M8C) で調べてみたところ, 図3BのようなPK発現パターンが観察された¹³. 特に顕 著な変化としては、矢印で示す 63 kDa のバンドがインス リン分泌と連動して増減していることである.この PK が INS-1 におけるインスリン分泌のカギを握っている可能性 を考え、同定を試みた、ここでは質量分析を用いずにこの PK を同定する手法を考案した¹⁴⁾. この 63 kDa の PK を, 一次元目の SDS-PAGE 後のゲル内で臭化シアンにて分解 し、二次元目の SDS-PAGE およびマルチ PK 抗体を用い たウエスタンブロッティングを行ったところ, サブドメイ ン VIB を含む断片のサイズが 19 kDa であることが明らか となった. また, この PK の等電点が 4.8 であったことか ら、データベースで探索したところ、これらの条件に合致 する PK として CaMKIV が候補として挙がった.この可 能性は、CaMKIV に対し厳密な特異性を示す特異的抗体を 用いて確認された(図3C). さらに CaMKIV の活性発現 に応じてインスリンプロモーターが ON/OFF 制御を受け ることが明らかになり、CaMKIVが INS-1 におけるインス リン合成に密接に関わっていることが示された. また、糖 尿病モデルラット OLETF とそのコントロールラットから 膵島細胞を調製し CaMKIV 発現レベルを比較したところ、 OLETFではコントロールラットに比較して、40%にまで 低下していることが判明した.これらの結果から、インス リンの合成・分泌において CaMKIV がきわめて重要な役 割を果たしていることが示された13).

4.3 潰瘍性大腸炎等の病態に関わる Tyr キナーゼ

チロシンキナーゼを検出するマルチ PK 抗体(YK34)の利用例としては、潰瘍性大腸炎等の病態と focal adhesion kinase(FAK)発現との関連を示した論文が最近報告された¹⁵⁾. オキサゾロンを投与することにより腸炎を誘発したマウスの腸上皮抽出試料を二次元電気泳動ならびに YK34 抗体を用いたウエスタンブロットで分析し、コントロールマウスと比較した。その結果、分子サイズが 120 kDa で、等電点が 6.3 のスポットが腸炎の誘発に相関して顕著に発現増大するのが観察された。このタンパク質が FAK であることが、FAK に対する特異的抗体との反応により確認された。また、炎症の重症度と FAK の発現量に相関関係

2011年 4月〕 333

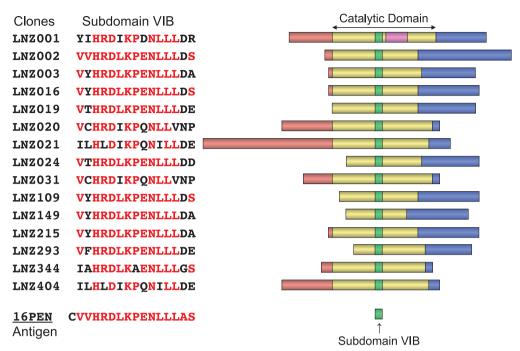


図 1 マルチ PK 抗体を用いた解析例①「マルチ PK 抗体は様々な配列を持つ PK を幅広くかつ特異的に検出する」

ミヤコグサ cDNA ライブラリーからマルチ PK 抗体を用いた発現スクリーニングにより 15 種類の PK を取得し、それらのサブドメイン VIB 配列を抗原ペプチド 16PEN と比較した。マルチ PK 抗体 は,LNZ021 や LNZ404 のように,抗原ペプチド中の半分以上のアミノ酸が入れ替わっている PK でも検出できた。

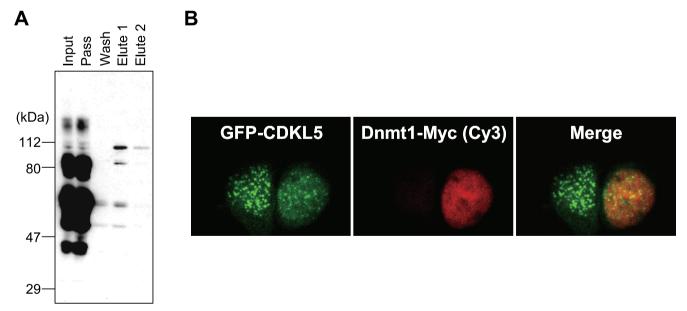


図2 マルチ PK 抗体を用いた解析例②「Dnmt1 に結合する PK の同定」

(A) ラット脳抽出液を Dnmt1(1-290)アフィニティカラムにアプライし、0.3M NaCl(Elute~1)および 1M NaCl(Elute~2)で順次結合タンパク質を溶出した.マルチ PK 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、各フラクション中に含まれる PK を検出した.(B) GFP-CDLK5 と Dnmt1-Myc を共発現している COS7 細胞(右側)では,CDLK5 のドット状の局在が不明瞭になった.細胞内でも CDLK5 と Dnmt1 が相互作用していることを示している.

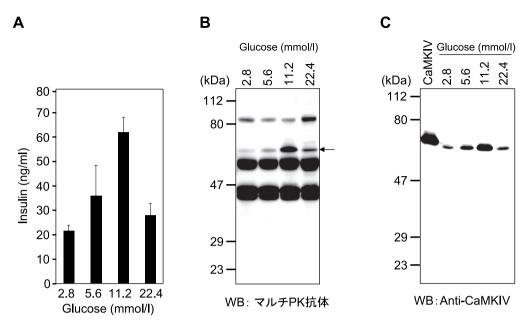


図3 マルチ PK 抗体を用いた解析例③「インスリン分泌と相関して発現量が変動する PK の同定」 (A) ラットインスリノーマ INS-1 細胞を培養する際, 培地中のグルコース濃度を 11.2 mM まで順次増加させるとインスリン分泌量が増大するが, 22.4 mM まで上昇させると逆にインスリン分泌が抑制される. (B) マルチ PK 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより, インスリン分泌と相関して発現量が増減する 63 kDa の PK (矢印) を見出した. (C) CaMKIV 特異的抗体を用いたウエスタンブロッティングによって, この PK は CaMKIV であることが確認された.

があることも報告されている150.

5. おわりに

本稿では、プロテインキナーゼの解析用ツールとしてのマルチ PK 抗体の利用例などについて紹介した.数百種類あるといわれている PK について、世界中の研究者が様々な角度から研究を進めているが、生理的な機能についての詳細が明らかにされている PK は、その中のほんの一部である.本稿で紹介したマルチ PK 抗体は、多様な PK の発現状況を網羅的に追跡する発現プロファイリング解析や、個々の生命現象の制御にかかわる PK を探索する際のツールとしても有用であることが証明されつつある.従来の厳密な特異性を示す抗体と、我々が開発した特異性の広いマルチ PK 抗体、および他の様々な方法を組み合わせることにより、PK に関する機能解析が今後大きく進展することが期待されている.

- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002) Trends Biochem. Sci., 27, 514–520.
- Johnson, S. A. & Hunter, T. (2005) Nature Methods, 2, 17– 25.
- 3) Reinders, J. & Sickmann, A. (2005) Proteomics, 5, 4052-

4061.

- 4) Hanks, S. K. & Hunter, T. (1995) FASEB J., 9, 576-696.
- Kameshita, I., Tsuge, T., Kinashi, T., Kinoshita, S., Ishida, A., Taketani, S., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, N., & Okazaki, K. (2003) Anal. Biochem., 322, 215–224.
- Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, N., Ishida, A., Taniguchi, T., & Kameshita, I. (2005) *Anal. Biochem.*, 347, 112–120.
- Kinoshita, S., Sueyoshi, N., Shoju, H., Suetake, I., Nakamura, M., Tajima, S., & Kameshita, I. (2004) *J. Biochem.*, 135, 619– 630.
- Kameshita, I., Nishida, T., Nakamura, S., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Umehara, Y., Nomura, M., & Tajima, S. (2005) J. Biochem., 137, 33-39.
- 9) Kameshita, I., Yamada, Y., Nishida, T., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Watanabe, Y., & Asada, Y. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, 1770, 1395–1403.
- Kameshita, I., Sekiguchi, M., Hamasaki, D., Sugiyama, Y., Hatano, N., Suetake, I., Tajima, S., & Sueyoshi, N. (2008) Biochem. Biophys. Res. Commun., 377, 1162–1167.
- 11) Mari, F., Azimonti, S., Bertani, I., Bolognese F., Colombo, E., Caselli, R., Scala, E., Badaracco, I., Grosso, S., Pescucci, C., Ariani, F., Hayek, G., Balestri, P., Bergo, A., Badaracco, G., Zappella, M., Broccoli, V., Renieri, A., Kilstrup-Nielsen, C., & Landsberger, N. (2005) Hum. Mol. Genet., 14, 1935–1946.
- 12) Sugiyama, Y., Hatano, N., Sueyoshi, N., Seutake, I., Tajima, S., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., & Ka-

2011年 4月〕 335

- meshita, I. (2010) Biochem. J., 427, 489-497.
- 13) Sugiyama, Y., Murao, K., Imachi, H., Sueyoshi, N., Ishida, T., & Kameshita, I. (2011) *Metabolism*, 60, 145–153.
- 14) Sugiyama, Y., Shimomura, S., Sueyoshi, N., & Kameshita, I. (2008) *Anal. Biochem.*, 373, 173–175.
- 15) Ma, Y., Semba, S., Takeuchi, M., Kameshita, I., Ishida, A., Kato, S., Katoh, T., Liu, Y., & Taniguchi, T. (2010) FEBS Lett., 584, 3949–3954.

亀下 勇,末吉 紀行 (香川大学農学部応用生物科学科)

Application of Multi-PK antibody that detects a wide variety of protein kinases

Isamu Kameshita and Noriyuki Sueyoshi (Department of Life Sciences, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Ikenobe 2393, Miki-cho, Kagawa 761–0795, Japan)