



目的のキナーゼ固有の酵素活性を検出する

カルナバイオサイエンスは、創業以来常に活性の検出できるキナーゼを創薬支援に向けて製造してきました。なぜなら活性を指標に薬剤を評価するのが望ましいと考えているからです。カルナの製造するキナーゼは、ほとんど昆虫細胞を利用しタンパク質発現後精製し、ペプチドマスフィンガープリンティングで目的のアミノ酸配列を確認していますが...

リコンビナントキナーゼ X を ATP 存在下にてペプチド基質 S と反応させて検出されたリン酸化反応生成物（リン酸化ペプチド基質あるいは ADP）は、本当にキナーゼ X のリン酸化能によるもののでしょうか。

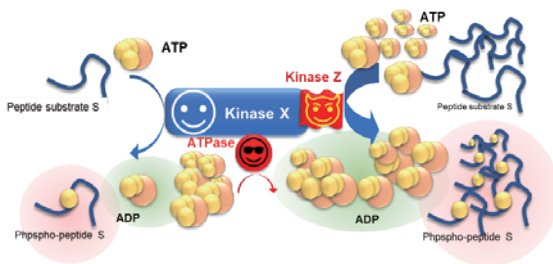


図 1. もし Kinase X にわずかな Kinase Z が混在すると検出されるリン酸化基質の産生は Kinase X によるものと言えるだろうか？また ATPase が混在すると産生される ADP は、どうだろうか？

仮にキナーゼ X の精製度は 99% として、残り 1% がほかのキナーゼ Z であったとします。わずか 1% といえども、キナーゼ Z の方がキナーゼ X よりも ATP およびペプチド基質 S に対する親和性が高かったらどうなるでしょう。タンパク質レベルではほんのわずかでも、リン酸化プロダクトのほとんどはキナーゼ Z によるものかもしれません。加えて、ATPase の混入があると、ADP 産生によるキナーゼ活性検出に影響を及ぼします。

果たして、得られるリン酸化活性は目的のキナーゼによるもののでしょうか。

[昆虫細胞を用いた発現、His タグを利用した精製に潜む落とし穴]

大腸菌を用いて作成したキナーゼタンパク質は、キナーゼ活性を検出できないことが多々ありカルナではほとんどのキナーゼ製造に昆虫細胞を利用しています。ところがこの昆虫細胞には、活性が高いのみならず、基質選択性が低いというちょっと嫌な特徴を持ち合わせた特有のキナーゼがあることにカルナは気が付きました。さらにこの昆虫細胞由来キナーゼは、精製のために His タグを用いると、精製をした後も、分離できず残存しやすいことがわかりました。実際チロシンキナーゼを 95% 以上の精製度をもってしても、強力なセリンスレオニンキナーゼ活性を示した例もあるほどです (図 2)。

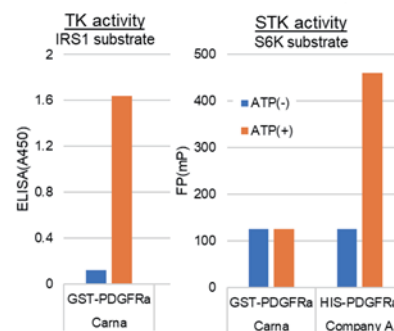


図 2. GST-PDGFR α (Carna) と HIS-PDGFR α (A社) の比較 (すべて 10ng)。

HIS-PDGFR は、S6K の Ser/Thr リン酸化能を有していた。GST-PDGFR α は、IRS1 ペプチドの Tyr リン酸化能を示しながらも、S6K ペプチドのリン酸化は検出されなかった。PKC ϵ pseudo-substrate を基質にしても同様の結果が得られた。



CARNA COFFEE BREAK - TECHNICAL NOTE - No.2

これが、カルナがキナーゼ製造に用いるタグの第一選択に GST を利用している所以です。この昆虫細胞由来キナーゼは、表 1 に示すような基質において、特にリン酸化活性が認められました。

phosphorylation site	substrate
Tyr	Lyn-peptide
	Gastrin-peptide
	PKCε-pseudopeptide
Ser / Thr	S6K-peptide
	SRPKtide
	MBP
	Casein

表 1. 昆虫細胞由来キナーゼによりリン酸化されやすい基質

[目的のキナーゼに適切な基質を用いる重要性]

さらに、不適当な基質の利用、あるいは基質と抗体を用いて検出する場合にも、昆虫由来キナーゼを検出することがありました。

例えば、昆虫細胞由来キナーゼの混入を抑える GST-キナーゼとして作成した場合でさえも、ヒストン H3 を基質とし抗リン酸化スレオニン-ヒストン H3 抗体を利用して検出する場合にも、夾雑物キナーゼ活性を検出する場合があります (図 3)。

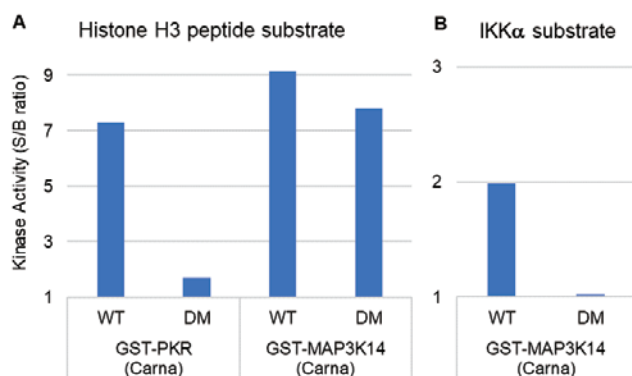


図 3. A) GST タグを用いて製造した PKR の wild type および K296R (dead mutant: 図中 DM), MAP3K14 の wild type および K429A/K430A (dead mutant: 図

中 DM) のキナーゼ活性 (各キナーゼ 10nM)。基質に Histone H3 peptide および抗リン酸化 H3(Thr3) 抗体を用いて検出した。

B) GST タグを用いて製造した MAP3K14 の wild type および K429A/K430A (DM) のキナーゼ活性 (キナーゼ 12.5nM)。基質に IKKαを用い、リン酸化された IKKαのキナーゼ活性を IKKαの基質 IKBαのリン酸化として検出 (Mobility Shift Assay) することにより MAP3K14 の IKKαリン酸化の指標とした。GST-PKR は WT のみで H3 peptide のリン酸化活性が認められたが、MAP3K14 は、DM でも H3 リン酸化活性が認められたため、これは MAP3K14 固有の活性ではないと考えられる。現在カルナでは、DMではリン酸化されない IKKαを基質に利用している。

このように、目的のキナーゼ活性を検出するためには、タンパク質として高純度であるのみならず、キナーゼ活性としての精製度、および最適な基質と抗体を利用することが極めて重要となります。

目的のキナーゼタンパク質が高度に精製されていても、実験で検出される活性は、目的のキナーゼ以外のキナーゼに由来している可能性があります。カルナでは、これまでに多くの製品製造から学んだことを反映し、活性が目的のキナーゼからのものであることを検証するために、さまざまなアプローチで分析するよう努めています。さらにこの様な努力により、製品の品質のみならず、これらのキナーゼを利用するアッセイサービスの品質も保証しています。

[キナーゼ製品リスト](#)

[ビオチン化キナーゼ製品リスト](#)