



リン酸化酵素活性を持つキナーゼ作成のお話

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続けております。なぜなら、薬剤はまず活性を指標に評価するべきであると考えているからです。

しかし評価にご利用頂くキナーゼタンパク質を大腸菌はもとより昆虫細胞を用いて単に作成しても、活性が検出できないケースが多々あります。そこで、「目的の活性」のあるキナーゼを製造するためにカルナではどのような工夫を施しているか少し紹介させていただきます。

そもそも細胞内に存在するキナーゼは常に活性を持っているのでしょうか。例えば、受容体型チロシンキナーゼ。これらは通常受容体に対する成長因子などの刺激によってはじめて活性を示します。また MAP キナーゼなどは、上流のキナーゼによりリン酸化を受けて活性化します。さらに CDK のように細胞周期依存的に発現する Cyclin と複合体を作ることにより、その活性を発揮するものもあります。

私共の製品の中にはこれらの生体内の現象をできるだけ正確に、かつ容易な方法で再現することによって活性のあるキナーゼを製造しているものがあります。

ATP 存在下プレインキュベーション

受容体型チロシンキナーゼなどでは、細胞で発現したあとアゴニスト刺激を受けることによって活性化したものを製品化すればよいのですが、膜タンパク質を単離することは容易ではありません。そのためカルナでは、受容体型チロシンキナーゼの細胞内ドメインのみを作成し、自己リン酸化を促すように ATP 存在下でインキュベートした後精製することによって活性を高め提供しているキナーゼがあります。

上流キナーゼとの共発現 or プレインキュベーション

MAP カスケードを代表とするリン酸化カスケードをとるキナーゼ群のように、上流キナーゼによりリン酸化されるキナーゼを製造する場合は、タンパク質を昆虫細胞で発現させる際に、上流キナーゼと共発現させ、その後タグの違いを利用した精製を行うことにより昆虫細胞でリン酸化を受けて活性のある目的キナーゼを得ることができます。(図 1)

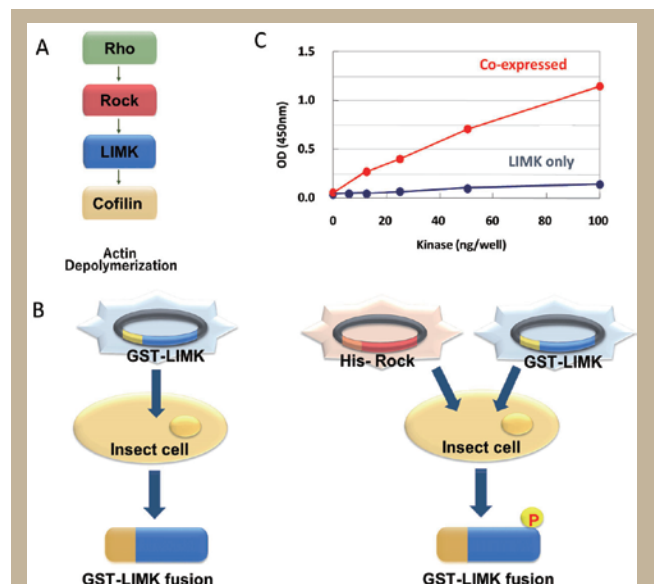


図 1.

- A) Rock によりリン酸化された LIMK は cofilin をリン酸化しアクチン細胞骨格の再編成を誘導する。
- B) 上流キナーゼとの共発現ある・無しによる LIMK の作成
- C) B) により製造されたそれぞれのキナーゼ活性

あるいはもっと単純に、精製済みの目的キナーゼを ATP 存在下で上流キナーゼとインキュベートした後に再度精製を行うことにより活性のあるキナーゼを得る方法もあります。(図 2)



CARNA COFFEE BREAK -TECHNICAL NOTE - No.1

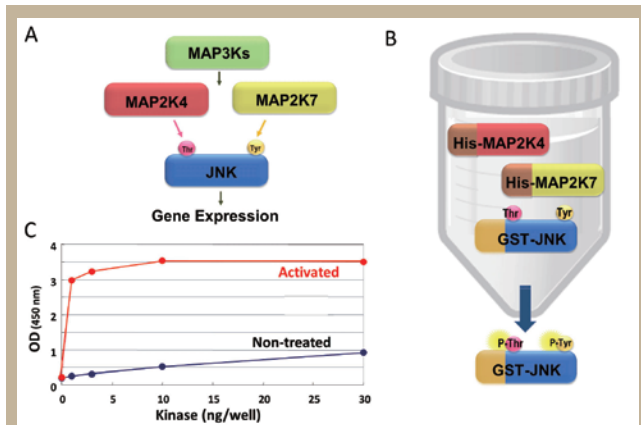


図 2.

- A) JNK が最大限活性化されるには、Thr-Pro-Tyr モチーフの Thr および Tyr が MAP2K4 および MAP2K7 によりリン酸化される必要がある。
 B) GST-JNK を His-MAP2K4 および His-MAP2K7 で処理する
 C) 活性化処理ある・無しそれぞれのキナーゼ活性

GST タグ切断サイト

一方で人工的な製造がゆえに活性を失うこともあります。カルナでは、GST タグを優先的に利用していますが、GST は 26kDa もあるタンパク質の為、融合タンパク質の活性に影響を及ぼさないとは限りません。そこで、カルナの GST 融合キナーゼにはキナーゼから GST を切り出せるよう必ず PreScission Protease (cytiva 社) 切断サイトが組み込まれています。図 3 の TSSK キナーゼを一例として、タグの切断により活性を高めているものがあります。

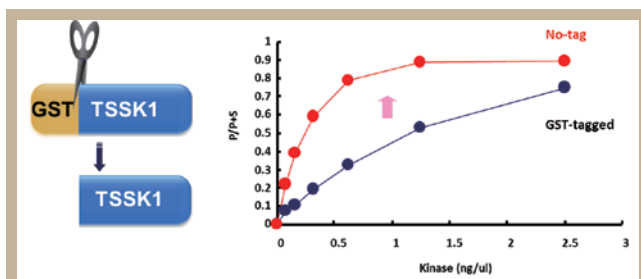


図 3. GST-TSSK1 の PreScission protease 処理を行う。

脱リン酸化処理

さらにユニークなものとして、GSK3 のように特定のリン酸化サイトがリン酸化されることにより活性が低くなるキナーゼがあります。GSK3 の場合、Ser21 (GSK3a) あるいは Ser9 (GSK3b) がリン酸化を受けることにより不活性化することが報告されている為、フォスファターゼ処理を施すことにより活性を取り戻すことができます。(図 4)

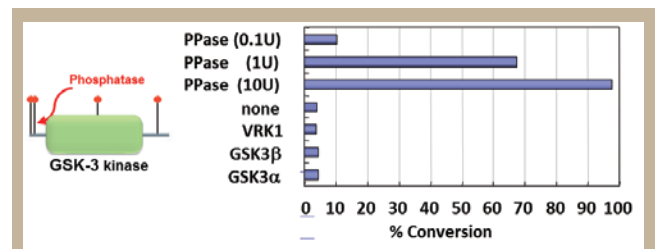


図 4. GST-GSK3 kinase にフォスファターゼ処理を施し活性を取り戻すことができる。最終製品には、phosphatase 活性は検出されていない。

単に発現だけでは活性を得られないキナーゼも、カルナではこれまで培ってきたキナーゼについての経験や知識を基にキナーゼごとに最適化を行った上記のような手法や処理を用いることにより高い活性のある高品質なキナーゼとして皆様に提供し続けております。各キナーゼ製品の詳細は共にお届けする Product information sheet でご確認頂けます。

ご存知でしたか？カルナのプロファイリング受託試験サービスでは自社製造のキナーゼのみを用いてアッセイを提供しております。お届けするデータから私共のキナーゼの品質を実感頂けるはずです。