

27L-pm14S

キナーゼ特異的人工基質を用いた細胞内キノーム活性計測

○坂本 大¹, 石川 菜津美¹, Pasrawin TAECHAWATTANANANT¹, 若林 真樹¹,
杉山 直幸¹, 石濱 泰¹ (¹京大院薬)

【目的】 プロテインキナーゼの過剰発現や活性化変異等に起因する細胞内シグナル伝達異常は、がんを含む様々な疾患の発症因子の 1 つである。個人や疾患の進行度によって多様に変化するシグナル伝達系を把握し、創薬研究や個別化治療を推進するためには、細胞内キナーゼの挙動を包括的に捉えることが非常に重要である。近年、LC-MS を用いたリン酸化プロテオミクスの発展により、1 度の分析で大量の細胞内リン酸化部位を定量することが可能になった。しかし、これらの大規模データにはリン酸化を直接担った責任キナーゼの情報が含まれておらず、現状の手法では細胞内キナーゼ活性を大規模にプロファイルするには至っていない。そこで本研究では、当研究室で取得した約 400 種のキナーゼに関する *in vitro* 基質情報を基に、特異的かつ高感度な人工基質ペプチドを創出し、これら人工基質を用いた細胞内キノーム活性評価法の構築を試みた。

【方法・結果】 *In vitro* 基質情報より特異的かつ目的キナーゼのリン酸化モチーフを有する基質配列を、複数のキナーゼについて選出し合成を行った。これら基質ペプチドの混合物に対して認識配列の異なる 30 種の組換えキナーゼを個別に処理し、それぞれ LC-MS 分析を行うことで基質のキナーゼ選択性を評価した。続いて、細胞内キナーゼ活性を評価するため、先述の基質ペプチド混合物と細胞抽出物によるリン酸化反応後、同様に LC-MS 分析を行った。その結果、我々がデザインした基質ペプチドは高いキナーゼ選択性を有し、指向性が類似しているキナーゼ群の活性を区別して評価できることが示された。また、本ペプチドを用いて細胞抽出物由来キナーゼ活性を定量的に計測することにも成功した。