

27J-am08S

人工基質ペプチドライブラリを用いた高選択的かつ高感度なキノーム活性計測
○八尾 一隆¹, 中園 純菜¹, 坂本 大², 高橋 知里², Chang HSIN-YI², 杉山 直幸², 石濱 泰²
(¹京大薬, ²京大院薬)

【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つであり、創薬研究や個別化治療を推進するためには、細胞内キナーゼ群(キノーム)の挙動を包括的に捉えることが非常に重要である。しかし、細胞内キナーゼ活性を測定するために用いられる既存の基質ペプチドの多くは選択性が低く、また、リン酸化プロテオミクスで得られる細胞内リン酸化部位情報の大部分は責任キナーゼが不明なため、現状の手法では細胞内キノーム活性プロファイルの一部しか測定することができない。そこで我々は、400種のヒトキナーゼの*in vitro*キナーゼ-基質間情報に基づくキナーゼ特異性を有する人工基質ペプチドライブラリ創出をめざし、検討を行ってきた。本発表では、合成した基質ペプチドについて実際に*in vitro*での反応を行い、特異性および感度の評価を行った。

【方法・結果】*in vitro* 基質情報をもとに設計されたキナーゼ選択的基質ペプチドの混合物に対して、ヒトキナーゼ組換え体を用いた*in vitro* 反応を行った後、nanoLC/MS/MSにより、リン酸化された基質ペプチドを定量した。評価した人工基質ペプチドのうち、チロシンキナーゼを対象としたもので29%、セリンスレオニンキナーゼで55%が高いキナーゼ選択性を示した。また、検出感度を優先して設計した高感度基質ペプチドについて同様の試験を行い、既存の基質ペプチドと感度および特異性を比較した。その結果、一部の基質ペプチドは、既存の基質ペプチドよりも高い感度を有し、かつ特異性も備えていることが確認された。本発表では、活性制御に関与するキナーゼ自身のリン酸化部位の定量解析に基づいたキノーム活性計測法の開発についても合わせて報告する。