

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659138

研究課題名(和文)リン酸化ヒスチジン特異的抗体の開発と解析法の確立

研究課題名(英文)Development and application of antibody against phosphohistidine.

研究代表者

三浦 芳樹 (MIURA, YOSHIKI)

久留米大学・分子生命科学研究所・講師

研究者番号：90279240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒスチジン残基のリン酸化反応は、その化学的な不安定さより抗体が作製できず簡便な同定法が存在しない。本研究では化学的に安定なリン酸化ヒスチジンアナログを用いることにより抗リン酸化ヒスチジン抗体の作製を試みた。マウスをリン酸化ヒスチジンアナログ含有ペプチドで免疫し、リン酸化ヒスチジンとの反応が強いクローンを得たが、リン酸化ヒスチジンのみならず弱いながらもリン酸化セリン、トレオニン、チロシンとの反応がみられた。一方、ウサギで作製した抗体をリン酸化ヒスチジンカラムで精製することにより他のリン酸化アミノ酸との反応が低い特異的な抗体を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Histidine residue is one of the major site of protein phosphorylation. Raising antibodies against phosphohistidine has been difficult due to its chemically labile nature. Using chemically stable phosphohistidine analogue, we developed mouse monoclonal antibodies against phosphohistidine. However, specificity of these antibodies were alone insufficient to identify phosphohistidine, they also react but weakly with phosphoserine, phosphothreonine and phosphotyrosine. On the other hand, polyclonal antibodies raised in rabbit were highly specific to phosphohistidine. After affinity purification using phosphohistidine column, purified antibodies only recognized phosphohistidine.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：リン酸化ヒスチジン 抗体

1. 研究開始当初の背景

リン酸化ヒスチジンは真核細胞のリン酸化の6%を占めると言われているもののセリン、トレオニン、チロシン残基等のリン酸化アミノ酸に比べ、哺乳類細胞で研究は少ない。これは phospho-nitrogen 結合の化学的安定性が低く(特に酸性側での安定性が悪い)容易に分解する為である。哺乳類細胞での研究は原核生物での研究に比べ少ないものの、ヒスチジン残基リン酸化の報告は存在する。今までにヒスチジン残基リン酸化が明らかになっているタンパク質としては、ヒストン H4、血小板 P-セレクチン、気道上皮細胞アネキシン、三量体 G タンパク質 鎖(G)、Calcium-activated K⁺ channel KCa3.1 等がある。この内、ヒスチジン残基のリン酸化が活性化に関わっていると報告されているのは G と KCa3.1 で前者は G の活性化を、後者は T 細胞でチャンネルの活性化を起こし T 細胞の活性化に係ると報告されている。

一方、ヒスチジン残基をリン酸化するキナーゼは細菌などの2つのサブユニットからなるキナーゼがよく知られているが、哺乳類にはこれに相当するキナーゼは存在しない。現在の所、ヌクレオシド2リン酸キナーゼ(Nucleoside diphosphate kinase、NDPK)が共沈実験や活性に関わる His 残基変異体の発現実験よりヒスチジンキナーゼであると考えられている。しかし、その活性制御機構は不明であり、この他にもヒスチジンキナーゼが存在する可能性も示唆されている。申請者は既に G のヒスチジンリン酸化部位に非水解性リン酸化ヒスチジン残基アナログを導入したペプチドを抗原として家兎ポリクローナル抗体を作製しているが、得られた抗体は興味深いことに G 以外のヒスチジンリン酸化タンパク質も認識することより G だけではなく、リン酸化ヒスチジン特異的な抗体が産生されていると考えられた。

2. 研究の目的

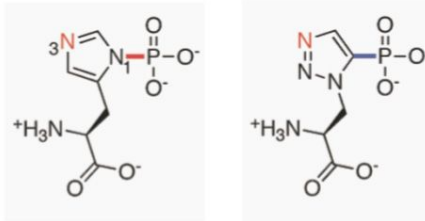
リン酸化による情報伝達機構は細菌から人に至るまで最も重要でかつ普遍的な反応の一つである。しかし、セリン、トレオニン、チロシン残基のリン酸化反応の解析に比べてヒスチジン残基などの化学的に不安定なリン酸化タンパク質のシステマチックな解析はほとんど行われていない。ヒスチジン残基のリン酸化はリン酸化酵素などの活性中間体だけではなく、三量体 G タンパク質鎖やイオンチャンネルなどのシグナルに係る分子でも報告されており、このリン酸化が酵素の活性制御やシグナル伝達などの生命反応の根源に関わっていると考えられる。しかし現時点では化学的に不安定なこのヒスチジン残基リン酸化反応を簡便かつ高感度に検出する方法がなく、研究の障害となっている。その為ヒスチジンリン酸化の意義を明ら

かにするにはリン酸化ヒスチジン残基を特異的に認識する抗体の開発が必須である。

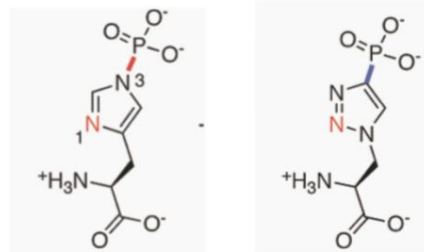
3. 研究の方法

(1) リン酸化ヒスチジン残基アナログ含有ペプチドを用いたモノクローナル抗体の作製

ウサギにリン酸化ヒスチジンアナログを含むペプチドを免疫することによりリン酸化ヒスチジンに対するポリクローナル抗体を得ているが、再現性と特異性を高めるためにリン酸化ヒスチジン残基特異的なモノクローナル抗体(mAb)の作製を行った。ウサギを免疫した時に用いたリン酸化ヒスチジンアナログを含むペプチドをキーホールリンペットヘモシアニンに架橋し、これをマウスに免疫した、ヒスチジン残基のリン酸化状態には下図の様に2種類のリン酸化状態が考えられる為、それぞれのアナログを含むペプチドを合成し免疫を行い、定法によりモノクローナル抗体を作製した。



N1-リン酸化ヒスチジンとそのアナログ



N3-リン酸化ヒスチジンとそのアナログ

抗原として用いるリン酸化ヒスチジンアナログ

図左のリン酸化ヒスチジンの N-P 結合を右の安定な C-P 結合に置換している。Cγ を N に、また N1 のアナログでは C4 を、N3 のアナログでは C2 を N に置換している。

スクリーニングには、それぞれのペプチドをオボアルブミン架橋したものをを用いた。また自己ヒスチジン残基のリン酸化が良く研究されているヌクレオシド2リン酸キナーゼ(NDPK)を大腸菌で発現させ、これに ATP を加え自己ヒスチジンリン酸化を起こさせたものをリン酸化ヒスチジン(N1 位リン酸化ヒスチジン)のコントロールとしてスクリーニングを行った。リン酸化ヒスチジンアナログ含有ペプチド、NDPK 共に認識するクローンを確立した。

(2) リン酸化ヒスチジンタンパク質の同定

とその動態変化の解析

ヒスチジン残基がリン酸化されるタンパク質については未だ報告例は少なく、まずはヒスチジン残基がリン酸化されるタンパク質の細胞別のプロファイリングと主要リン酸化タンパク質の同定を行う。血球系細胞、付着細胞などの代表的な細胞に対して細胞の細胞質と膜画分それぞれについてプロットティングを行った。既にヒスチジンリン酸化タンパク質として報告のあるものについては抗体を用い行った。

現在の所、刺激に応じてヒスチジン残基がリン酸化される報告があるものは血小板 P-セレクチンのみであり、トロンピンやコラーゲン刺激に応じて速やかにリン酸化・脱リン酸化されることが報告されている。そこで、まずは血小板にターゲットを絞って外部刺激によるヒスチジンリン酸化タンパク質の動態を解析する。洗浄血小板に対してトロンピン、コラーゲンを加え血小板を活性化し、それに伴うヒスチジンのリン酸化タイムコースについて検討する。GPCR であるトロンピン受容体を介した活性化経路とコラーゲン受容体 GPVI を介したチロシンキナーゼ系による活性化経路によりヒスチジン残基がリン酸化されるタンパク質の動態変化を検討する。この際、P-セレクチンのリン酸化を確認すると共に他のタンパク質のヒスチジンリン酸化を調べた。

また、組織特異的なヒスチジンリン酸化パターンを明らかにする為にマウスより各種組織を採取し、界面活性剤存在下で抽出し SDS 電気泳動の後、リン酸化ヒスチジン抗体を用いてウェスタンプロットティングを行った。

(3) ヒスチジンリン酸化活性の測定法の開発

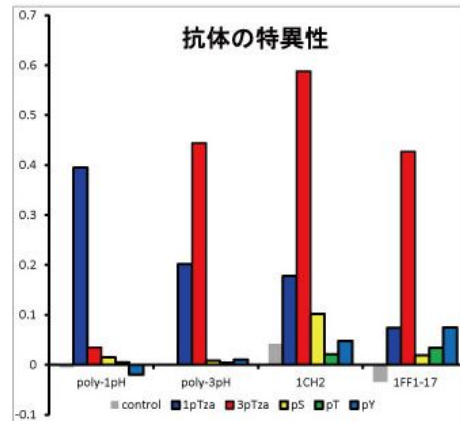
現在ヒスチジンリン酸化活性を簡便に測定する方法はない。そこで、抗リン酸化ヒスチジン抗体を用いた測定法を開発する。ヒスチジン残基がリン酸化される部位が特定されているタンパク質のリン酸化部位周辺を含むペプチドを末端ピオチン修飾ペプチドとして合成し、このペプチドのヒスチジンリン酸化を抗リン酸化ヒスチジン抗体を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) リン酸化ヒスチジン残基アナログ含有ペプチドを用いたモノクローナル抗体の作製

リン酸化ヒスチジン残基アナログを含むペプチドと自己リン酸化 NDPK に結合するクローンを確立し、その解析を行った。リン酸化ヒスチジン残基に対して強い結合を示すものの多くは NDPK との結合が弱く、リン酸化ヒスチジン残基 (N1 位リン酸化ヒスチジン) を認識するとは考えられなかった。また、

両方に結合するクローンにおいても ELISA では反応するもののウェスタンプロットティングには使用できないクローンであった。その内 1 CH2, 1 FF1-17 はリン酸化ヒスチジンアナログ、リン酸化 NDPK に結合し、更にウェスタンプロットティングで、家兎抗リン酸化ヒスチジン抗体のパターンとよく似たプロットティングのパターンを示した。そこでこれらのクローンの他のリン酸化アミノ酸に対する反応を検討した。下図の poly-1pH、-3pH はリン酸化 NDPK を用いてアフィニティ精製した家兎ポリクローナル抗体、1 CH2, 1 FF1-17 はモノクローナル抗体を示す。



図中の control はリン酸化修飾を行っていないペプチド、1pTza、3pTza はリン酸化ヒスチジンアナログを含むペプチドを、pS、pT、pY はそれぞれリン酸化セリン、トレオニン、チロシンを含むペプチドを表す。Poly-1pH は N1 リン酸化ヒスチジンアナログに特異的に結合し、他のリン酸化アミノ酸との結合は極めて少なかった。これに対して N1 リン酸化ヒスチジンを持つ NDPK アフィニティ精製した poly-3pH は N1 位アナログにも結合するものの N3 位アナログに対して強く結合した。これに対して 1 CH2, 1 FF1-17 ではリン酸化セリン、トレオニン、チロシンに対しても弱いながら反応が見られた。さらに、これらのモノクローナル抗体を用いて NDPK のリン酸化状態を測定できるか検討したところ、ATP 非存在下に於いても NDPK との結合が見られた。そこで、完全に NDPK の自己リン酸化部位である 118 番目のヒスチジンをフェニルアラニンに変異させた NDPK H118F 変異体を作製し、この変異体に対する結合を見た所、やはり ATP 非存在下での正常 NDPK と同程度の結合を示したことからリン酸化ヒスチジン以外の残基と反応していることが考えられた。大腸菌で発現した NDPK の質量分析計を用いた解析によるとセリン、トレオニン残基のリン酸化が検出されていることより、大腸菌中でリン酸化を受けたアミノ酸と反応していることが考えられた。このため本モノクローナル抗体のみをリン酸化ヒスチジンの検出に用いるには不適切であると考えられた。そのため、NDPK H118F をネガティブコン

トロールとして、更にスクリーニングを行っている。

(2)リン酸化ヒスチジタンパク質の同定とその動態変化の解析

(1)の実験結果得られたクローン単独ではリン酸化ヒスチジンを誤検出してしまう為、家兎リン酸化ヒスチジン抗体を用いて刺激した血小板でのリン酸化変動をウェスタンブロットング法により検討した所、トロンビン刺激により分子量4万前後のバンドの増減が見られた。これに対してコラーゲンによる刺激では変導が少なく、この変導がGPCRを介している可能性が示唆されたが、Gタンパク質阻害剤を用いた実験が必要と考えられる。血小板では刺激時にP-セレクチンの細胞質ドメインのヒスチジン残基がリン酸化されるという報告がされているが、P-セレクチンを免疫沈降させブロットングを行ったが抗体との反応は現在の所見されていない。

また、マウス各種組織を可溶化しウェスタンブロットングを行った所、大脳と小脳、心筋と骨格筋では全体的に似通ったバンドが検出されたが、肝臓、脾臓、肺、大腸、腎臓では分子量4万前後のバンドは共通してみられるものの、そのパターンには大きな違いがあり、今後の質量分析計を用いることによりタンパク質の同定を行う計画である。

(3)ヒスチジンリン酸化活性の測定法の開発

家兎リン酸化ヒスチジン抗体を用いてペプチド基質のヒスチジンリン酸化の測定方法を検討した。既にヒスチジン残基のリン酸化が報告されているタンパク質のリン酸化部位周辺のピオチン化ペプチドとして合成し、これを細胞抽出液とATPもしくはGTP存在・非存在下に於いてインキュベートした後、アビジンカラムを用いて回収、家兎リン酸化ヒスチジン抗体の結合を検出できるか検討した。アビジンカラム結合物はATP・GTP存在下に於いてのみ細胞抽出液依存的にアビジンカラムへのHRP-家兎2次抗体の結合がみられたことより本方法によりヒスチジンリン酸化活性の測定が可能であることが示唆された。今後、本方法を用いてヒスチジンリン酸化キナーゼの精製を行う計画である。

* (2)のリン酸化パターンについては論文準備中であるため、また(3)の測定法については特許出願の計画があるため詳細は省かせていただきました。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 芳樹(MIURA, Yoshiki)
久留米大学分子生命科学研究所・講師
研究者番号：90279240

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：