



## 日本ヒトプロテオーム機構第3回大会

## 抗リン酸化アミノ酸含有蛋白特異モノクローナル抗体の抗原認識部位の構造解析 (I)

 \*佐々美里<sup>1)</sup>, 田中幸枝<sup>1)</sup>, 松川茂<sup>1)</sup>

1) 福井大学 総合実験研究支援センター バイオ実験機器部門

Abstract: 分子認識プローブとしての抗体分子の有効性は、医学生物学を始めとして多くの分野でその実績が証明されてきている。最近では新しい形の分子認識プローブの開発が盛んで、創薬研究の対象となっている。我々は、天然の産物である抗体のもつ多様性に魅せられているが、抗体が補足する分子との相互作用のことは余り知られていない。それは、分子認識に関係する領域、即ちCDR構造について余り情報がないからだろう。抗体分子の抗原認識部位は抗体の多様性の源であるが、裏を返せばその多様性のために抗原認識部位の構造を決めるには大変な努力が必要であろう。幸い、モノクローナル抗体は純度からみて精製済み蛋白として扱いうることや、その入手は比較的安価であることから、現在のプロテオーム解析精度でその構造解析の対象になりうるのではないかと考えられる。

我々は、抗リン酸化アミノ酸モノクローナル抗体のうち、部位特異的リン酸化により機能変換した蛋白を特異的に認識する抗体の新たな利用展開を図ることが可能かどうかを検討しているが、そのためにもこれら特異抗体の認識部位の一次構造解析が重要になる。

抗体はFabが抗原を認識する最小単位であり軽鎖と重鎖のうちFcを除いた部分である。この部分は抗体をプロテインGセファローズに結合させてから、パピインで消化し、溶出画分を集めて精製する。このFabを還元メチル化し、HPLCで軽鎖部と重鎖部に分離し、これを酵素処理後、ペプチドをHPLC分離する方法があるが、両者の分子量が約25,000であり、配列解析にはまだ大きいのでさらに効率的な方法を提案する。

即ち、リン酸化チロシンやリン酸化セリンを固定化した担体を用い、Fabと反応して複合体を形成させたうえで、酵素消化を行った。酵素消化後に固定化担体を洗浄し、複合体の形成に関係しない部位、即ちC<sub>L</sub>とC<sub>H</sub>由来のペプチドを回収する。また、固定化担体に保持される部分はSDSにより溶出されるが、そこにはV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>由来のペプチドが回収される。このようにして分画したペプチドをHPLCで分離後、または直接MALDI-TOF分析する。N末端のSPITC (sulfophenylisothiocyanate)修飾によりy系列をエンリッチして配列解析を容易にする改変PSD法により解析を試みたので報告する。

Keywords: phosphorylated amino acids; MALDI-TOF; de novo sequence

Copyright (c) 2005 日本ヒトプロテオーム機構

---

[Japan Science and Technology Information Aggregator, Electronic](#)

