

Simplifying Proteomics

PTMScan® Products and Services



CSTジャパン株式会社
Cell Signaling Technology®

プロテオミクスを よりシンプルに

選択的スプライシングや翻訳後修飾 (PTM) などのプロセスによって、限られた数の遺伝子から多種多様なタンパク質が生じます。PTMは、タンパク質の活性や細胞内局在、分解、タンパク質間相互作用などの多くの細胞機能にとって非常に重要なプロセスです。プロテオーム解析法は、PTMを網羅的に解析し、生理的・病理的な現象の全体像を把握する重要な手がかりとなります。これは、遺伝子レベルの解析では不可能です。

PTMには、以下のように様々な種類があります：

- › リン酸化
- › アセチル化
- › ユビキチン化
- › メチル化
- › スクシニル化
- › タンパク質の開裂

PTMScan®：質量分析ベースのプロテオミクス用の抗体を用いた修飾ペプチドの濃縮

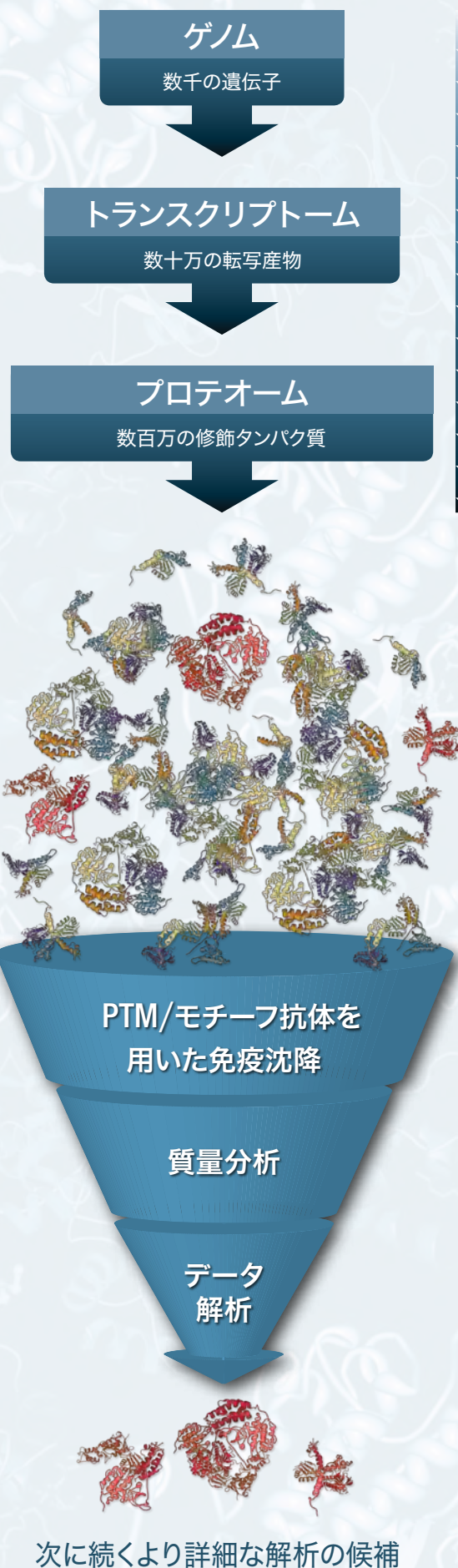
CST™ は、PTMScan® 技術を確立しました。これは、CSTが開発したPTMや基質モチーフに特異的な抗体を用いた独自のプロテオーム解析法であり、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) の前にPTMを受けたペプチドを濃縮する技術です。PTMScan® 技術によって、少量の修飾部位も含め数百から数千ものPTM部位が同定・定量化され、追跡すべきターゲットが絞り込まれていきます。PTMScan® は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) などの方法と比較して、PTMペプチドの濃縮に特化しています。

PTMScan® は、以下の目的に使用できます：

- リン酸化、ユビキチン化、アセチル化など新規のPTM部位の解析
- 薬物標的の同定と検証
- バイオマーカーの探索
- 薬物の非特異的な効果の解明
- 薬物/化学調節物質の作用機序の解明

目次

- 3 Key to Success: PTMScan® Antibodies
- 4 Discovery vs. Direct
- 5 PTMScan® Kits vs. Services
- 6 PTMScan® Discovery and Direct Services
- 7 Complementary Services
- 8 PTMScan® Discovery Products and Services
- 13 PTMScan® Direct Services
- 14 From Bench to Bedside
- 15 Support for Drug Discovery



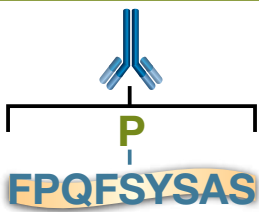
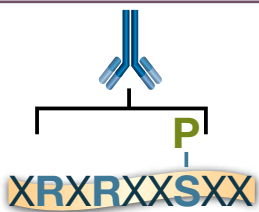
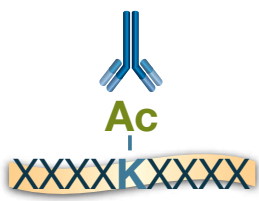
Key to Success: PTMScan® Antibodies

特徴と利点

PTMを含む特異的ペプチドの濃縮に用いられる抗体が、PTMScan®成功の鍵となります。

- CST社内で開発・製造されている
- 特異性、感度、ロット間の一貫性について、徹底的に検証されている
- イムノアフィニティー濃縮用に作製されている

PTMScan®技術で用いられる3種類の抗体

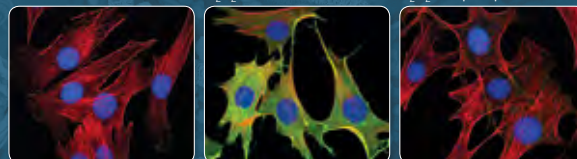
抗体の種類	抗体のターゲット	具体例	
特定のタンパク質のPTM抗体	特定のタンパク質の特定部位に、特定の修飾を受けたアミノ酸	Phospho-Akt1 (Ser473) 抗体は、リン酸化された473番目のセリン残基とその周辺のアミノ酸のみを認識します	
モチーフ抗体	特定のモチーフ内にある特定の修飾を受けたアミノ酸	Akt基質モチーフ抗体は、モチーフ内のセリン残基がリン酸化された場合のみ、あらゆるタンパク質のRXRXXS*配列を認識します (Xは任意のアミノ酸)	
PTM特異的抗体 (PTM抗体)	特定のPTMを持ったあらゆるペプチド	アセチル化リジン抗体は、隣接するアミノ酸配列に関係なく、すべてのアセチル化されたリジン残基を認識します	

MultiMab™ 抗体ミックスの取り逃しの少ない広範な認識性能

MultiMab™ ラビットモノクローナル抗体ミックスは、標的のPTM/モチーフを偏りなく認識できるように、別々のラビットモノクローナルクローンを最適な比率で組み合わせています。MultiMab™ 抗体ミックスは、PTMScan®サービスとキットに用いられていますが、他のアプリケーションでもご使用いただけます。

製品一覧は、弊社ウェブサイトでご確認ください：
www.cstj.co.jp/MultiMab

Serum-starved H₂O₂ Treated H₂O₂ + λ phosphatase



Phospho-Tyrosine (P-Tyr-1000) MultiMab™ Rabbit mAb mix #8954: Confocal IF analysis of C2C12 cells, serum-starved (left), treated with H₂O₂ (2 mM, 10 min; middle), or treated with H₂O₂ followed by λ phosphatase (right), using #8954 (green). Actin filaments were labeled with DyLight™ 554 Phalloidin #13054 (red). Blue pseudocolor = DRAQ5® #4084 (fluorescent DNA dye).

Discovery vs. Direct

お客様の研究に役立つのはどちらですか？

	PTMScan [®] Discovery (PTM/モチーフを濃縮したい)	PTMScan [®] Direct (質量分析装置を用いて抗体アレイをしたい)
解析したいシグナル伝達経路が決まっているか？	✗	✓
サンプルペプチドを抗体で濃縮するか？	✓	✓
LC-MS/MS解析を実施するか？	✓	✓
どのような抗体を用いるか？	PTM抗体またはモチーフ抗体 (標的タンパク質は限定されない)	既知の経路の特定のタンパク質に対する特異的抗体 (標的タンパク質のPTM特異的抗体/Total抗体)
免疫沈降用ビーズに標識されているのはどのような抗体か？	1種類のPTMまたはモチーフを認識する抗体	それぞれ異なる標的を認識する複数種類の抗体
使用可能な生物種は？	ヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエ、シロイヌナズナなど、様々な生物種由来のサンプルで使用可能	ヒトおよびマウスについては検証済み (他の生物種については弊社にお問い合わせください)
ケーススタディ	<p>“Deep, quantitative coverage of the acetylome using novel anti-acetyl-lysine antibodies and an optimized proteomic workflow.”</p> <p>Svinkina, T., et al (2015) <i>Mol. Cell. Proteomics</i> 14(9):2429–40.</p>	<p>“PTMScan Direct: identification and quantification of peptides from critical signaling proteins by immunoaffinity enrichment coupled with LC-MS/MS.”</p> <p>Stokes, M., et al (2012) <i>Mol Cell Proteomics</i>. 11(5):187–201.</p>
お勧めの用途	新規のPTMの同定や定量的解析に、PTMScan [®] Discoveryをお使いください	既知のシグナル伝達経路の構成因子の活性を細胞株間または薬物処理間で比較する定量的解析に、PTMScan [®] Directをお使いください

PTMScan® Kits vs. Services

PTMScan®キット

濃縮とLC-MS/MS解析をお客様自身で実施する際には、PTMScan®キットをお使いください。キットには、10回*のペプチド濃縮実験に必要なビーズ標識抗体、免疫沈降用バッファー、そして詳細なプロトコールが含まれています。[§]

* 製品は限られますが、3回分の試薬が入った小包装キットもあり、パイロット実験にお使いいただけます。

[§] キットには使用ライセンスも含まれます。



PTMScan®サービス

CSTが、プロジェクトの計画から包括的なデータセットの作成までお手伝いいたします。データセットには、以下が含まれます：

- 定性的/定量的データの表
- インフォマティクスの表
- 概要説明 (Microsoft® PowerPoint®ファイル)
- 今後の解析候補の選定に役立つ手引書 (Microsoft® Word®ファイル)



PTMScan® サービスのワークフロー

CSTの研究者とのディスカッション
(Discovery, Direct,
KinomeView®)

実験デザイン

作業明細書/見積もり

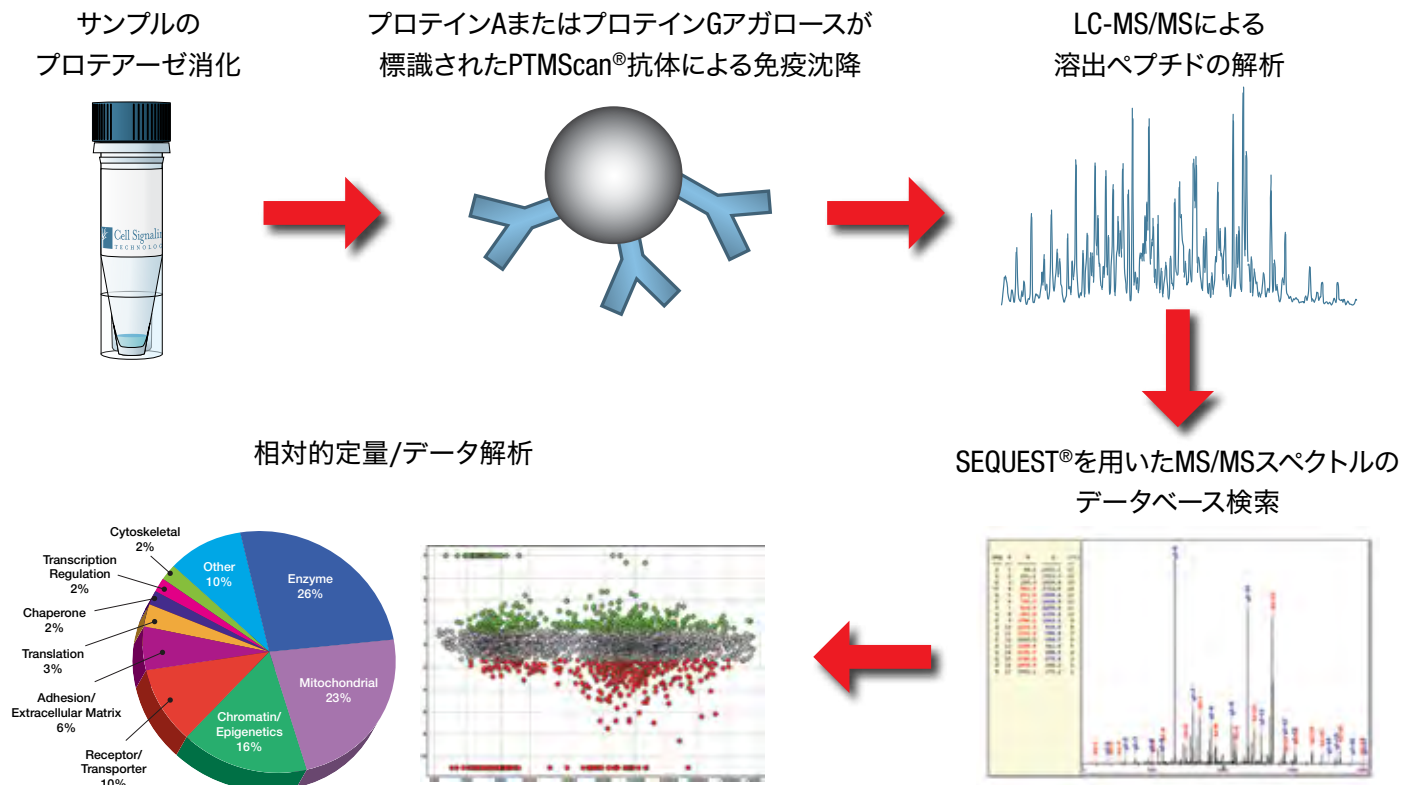
サンプルの提出

解析・データ取得

データセットの送付と
コンサルティング

PTMScan® Discovery and Direct Services

解析・データ取得までのワークフロー



PTMScan®サービスのデータ例

PTMScan®サービスで納品されるデータセットには、定量化したPTMの変化、同定した各タンパク質、および各修飾部位の位置情報が含まれます。

Normalized Fold Change		Protein Name	Site	-7/+ 7 Sequence	Peptide	Upstream Kinase
SU11274 vs. DMSO Control	Staurosporine vs. DMSO Control					
-5.0	-4.6	EphA2	897	RVSI ^R RLP ^S TSGSEGV	LPS ^T *SGSEGV ^P FR	Akt1
-13.6	-2.1	FOXO1A	319	TF ^R PR ^T S ^S NASTISG	TSS [*] NASTISGR	Akt1
-158.0	-7.2	FOXO4	32	QS ^R PR ^S CI ^S WPLPRPE	SCT [*] WPLPRPEIANQPSEPPEVEPDLGEK	Akt1
-3.4	1.8	QIK	358	DGR ^R QR ^R PS ^S TIAEQTV	RPS [*] TIAEQTVAK	Akt1, Akt2
-13.3	-29.4	S6	235, 236, 240	IAK ^R RR ^L S ^S SLRASTS	RLS [*] *LRAS [*] TSK	Akt1, Akt2, P70S6K β , PKA α , PKC α , PKC δ
-7.0	-24.5	S6	236, 240	AK ^R RR ^L S ^S LRASTSK	RLSS [*] LRAS [*] TSK	Akt1, Akt2, P70S6K β , PKA α , PKC α , PKC δ
2.6	1.1	BRAF	365	GQ ^R DR ^S S ^S APNVHIN	SSS [*] APNVHINTIEPVNIDDLIR	Akt1, Akt3
-7.0	-9.4	GSK3 β	9	SG ^R PR ^T T ^S FAESCKP	TTS [*] FAESCKPVQQPSAFGSMK	Akt1, AurA, CAMK2 β , GSK3 β , KHS1, PKA α , PKC α
-5.3	N.D.	GSK3 β	9, 21	SG ^R PR ^T T ^S FAESCKP	TTS [*] FAESCKPVQQPSAFGSMK	Akt1, AurA, CAMK2 β , GSK3 β , KHS1, PKA α , PKC α
-21.3	-3.0	PEA-15	116	KD ^I IR ^Q PS ^S EEEEIKL	DIIR ^Q PS ^S EEEEIK	Akt1, CAMK2 α , CK2 α 1
-2.1	-2.9	GSK3 α	21	SG ^R ART ^S S ^S FAEPGGG	TSS [*] FAEPGGGGGGGGGGGGGPGGSASGPGGTGGGK	Akt1, CAMK2 β , PKA α , PKC α , PKC β
-10.3	-1.8	RANBP3	126	VK ^R ERT ^S LTQFPSP	TSS [*] LTQFPSPQSEER	Akt1, ERK1, RSK2, p90RSK
2.7	2.5	eIF4B	422	RERS ^T GT ^S ESSQTGT	TGS [*] ESSQTGTSTSSR	Akt1, p70S6K, p90RSK
4.8	2.5	eIF4B	422, 425	RERS ^T GT ^S ESSQTGT	TGS [*] ESS [*] QTGTSTSSR	Akt1, p70S6K, p90RSK

SU11274またはスタウロスポリンで処理したMKN-45細胞を用いたPTMScan®解析データ：好塩基性Aktの基質モチーフであるRXRXX(S/T)とRXX(S/T)の典型的なデータを示しています。リン酸化ペプチドの相対的量的変化が2.5倍以上(処理 vs. コントロール)の場合は、緑(増加)または赤(減少)でハイライト表示しています。

Complementary Services

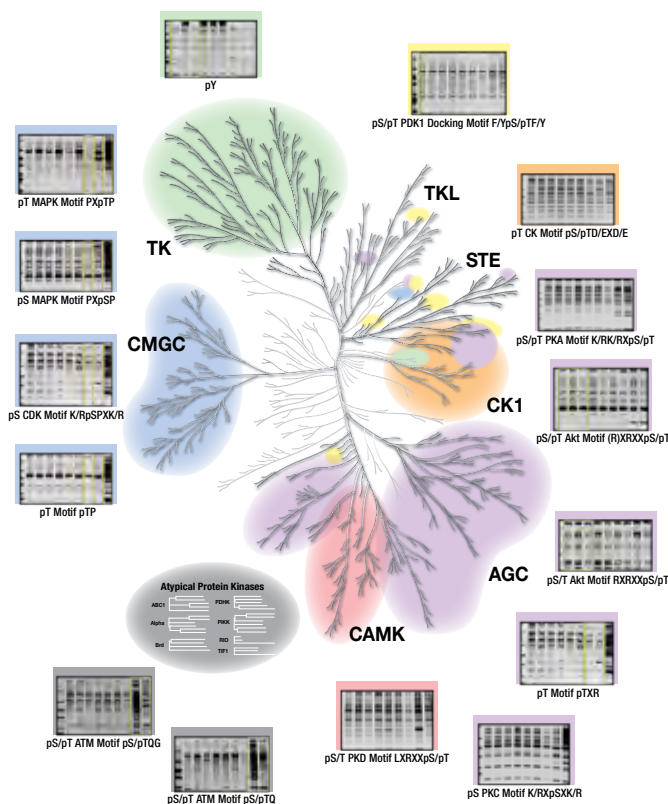
KinomeView®でのウェスタンブロットプロファイリング

KinomeView®プロファイリングは、PTMScan®解析と同じPTM抗体とモチーフ抗体を用いたウェスタンブロットによるプレスクリーニングです。

- シグナル活性全体の変化を複数のサンプルで比較検討
- PTMScan® Discovery実験に最適な抗体を選択
- 薬剤処理の用量、時間設定、用いる細胞株や組織などの実験条件を最適化

#9812 KinomeView® Profiling KitまたはKinomeView®プロファイリングサービスからお選びください

キット (#9812) には、ご自身でのウェスタンブロットを希望されるお客様向けに、カイノーム全体でリン酸化を調べるためのPTM抗体とモチーフ抗体が16種類入っています。KinomeView®プロファイリングサービスでは、キットに含まれていないモチーフ抗体も使用してウェスタンブロットを行います。このサービスはCSTの研究者が実施・提供するもので、データ解析と専門家によるリサーチコンサルティングが含まれます。



固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) サービス

IMACは、リン酸化ペプチドを濃縮するもう一つの方法です。この方法では、正電荷を帯びた金属イオンを用いて負電荷を帯びたリン酸化ペプチドを回収し、LC-MS/MSで解析します。

プロテオーム全体のプロファイリングサービス

PTMをもつペプチドの濃縮をせず、サンプルに含まれるペプチド全体を定量化します。

Ingenuity®パスウェイ解析

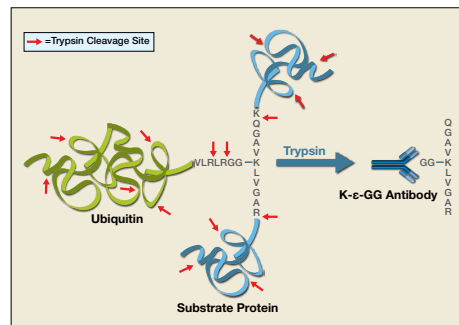
Qiagen社のIngenuity®パスウェイ解析 (IPA) ソフトウェアを用いて、PTMScan®の解析結果を既知のシグナル経路上にマッピングし、新たな相互作用ネットワークを見出します。

PTMScan® Discovery Products and Services

UbiScan® (ユビキチン化プロテオミクス)

タンパク質のユビキチン化は、プロテアソーム分解やエンドサイトーシス、DNA修復、細胞周期の制御および遺伝子発現など、多くの細胞プロセスに関与しています。異常なユビキチン化は、がんやメタボリックシンドローム、神経変性疾患などの疾患と関連しています。

UbiScan®プロテオミクスでは、ユビキチン化タンパク質がトリプシン消化された際に、リジン残基上に生じるジグリシンレムナント (K-ε-GG) に対するCST独自の抗体を使用します。このユビキチンレムナントモチーフ抗体を用いて、LC-MS/MS解析の前にトリプシン消化したサンプルからジグリシンレムナント含有ペプチドを濃縮します。



Ubiquitin Remnant Motif (K-ε-GG):
ユビキチンレムナントモチーフ (K-ε-GG) 抗体は、サンプル中のK-ε-GG含有ペプチドを濃縮するために用いられます。

UbiScan® – Ubiquitination Proteomics

Target	Motif	Antibody [‡]	PTMScan®		KinomeView®	
		No.	Kit	Service	Kit #9812	Service
Ubiquitin Remnant	K-ε-GG	–	#14482/#5562	✓	–	✓

UbiScan®の使用文献

Sook-Young, J. et al. (2015) Proteomic Analysis of Ubiquitin-Like Post-translational Modifications Induced by the Adenovirus E4-ORF3 Protein. *Journal of Virology* 89(3) 1744-55.

Kronke, J. et al. (2015) Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1α in del(5q) MDS. *Nature* 523(75599), 183–188.

Kronke, J. et al. (2014) Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* 343(6168), 301–305.

Theurillat, J.P. et al. (2014) Ubiquitylome analysis identifies dysregulation of effector substrates in SPOP-mutant prostate cancer. *Science* 346(6205), 85–89.

Mathew, R. et al. (2012) BTB-ZF factors recruit the E3 ligase cullin 3 to regulate lymphoid effector programs. *Nature* 491(7425), 618–621.

Emanuele, M.J. et al. (2011) Global identification of modular Cullin-RING ligase substrates. *Cell* 147(2), 459–474.

Kim, W. et al. (2011) Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol. Cell* 44(2), 325–340.

PhosphoScan® (リン酸化プロテオミクス)

リン酸化ペプチドの相補的な濃縮方法 (PTMScan® vs. IMAC)

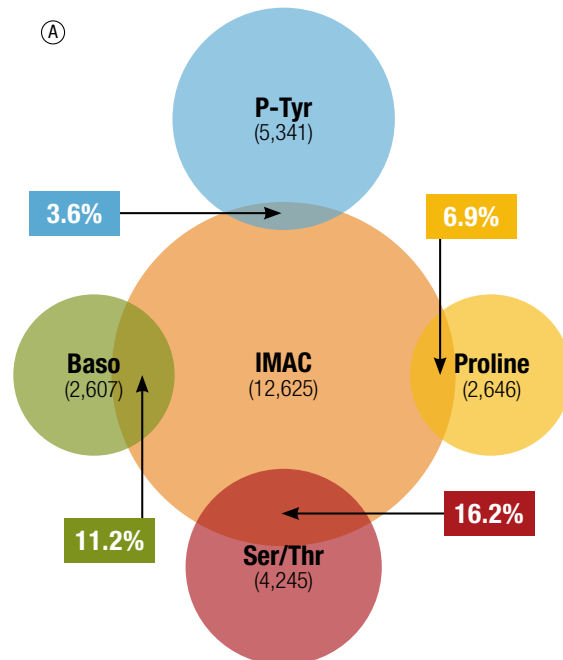
PTMScan®とIMACによる濃縮法の比較：ヒト胃がん細胞のPTMプロファイルリング

様々な種類のPTM/モチーフ抗体 (チロシン、プロリン、セリン/スレオニン、好塩基性)、またはIMACを用いて、リン酸化ペプチドを濃縮しました。

- サンプル全体で、20,000箇所を超えるリン酸化部位が同定されました。
- リン酸化ペプチドの濃縮について、抗体ベースの方法を用いた場合とIMACを用いた場合を比較したところ、重複はごくわずかしかなかった。
- 抗体ベースの方法は、目的とする種類のリン酸化ペプチドの濃縮に特化しています。

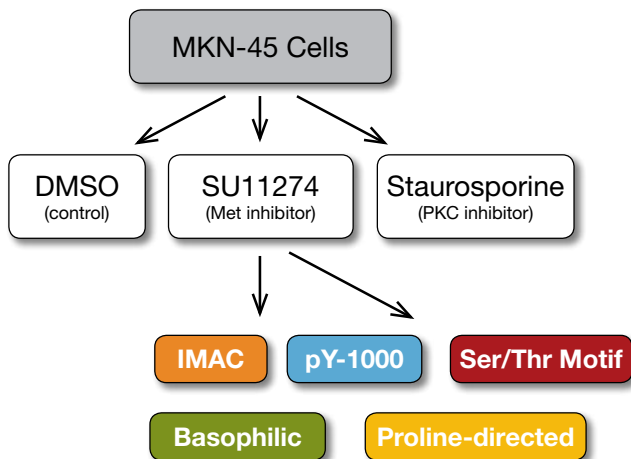
抗体ベースとIMACによる濃縮方法は高度に相補的であり、両方を用いることでリン酸化プロテオーム解析の範囲を最大限広げることができます。

Area proportional Venn diagram showing the overlap between motif antibody and IMAC enrichment of phosphopeptides from MKN-45 cells (A). Comparisons were made on unique proteins/sites. MKN-45 cells were treated and profiled as outlined (B). Combinations of motif antibodies were used to enrich phosphopeptides as indicated (C).



PTMScan® DiscoveryとIMACの相補性に関する詳しいデータは弊社ウェブサイトでご覧いただけます：www.cstj.co.jp/PTMScanIMAC

Ⓑ



Ⓒ

Antibody	Motif	pY	Baso	Pro	Ser/Thr
Phosphotyrosine	Y	●			
Akt Substrate	RXX(S/T)		●		●
Akt Substrate	RXRXX(S/T)		●		●
AMPK/PKD Substrate	LXRXX(S/T)		●		●
CDK Substrate	(K/R)(S/T)PX(K/R)		●		●
PKA Substrate	(K/R)(K/R)X(S/T)		●		●
PKC Substrate	(K/R)X(S/T)(K/R)		●		●
MAPK Substrate	PX(S/T)P			●	●
PLK Binding Motif	S(S/T)P			●	●
Tp Motif	(S/T)P			●	●
TPE Motif	(S/T)PE			●	●
TXR/TPR Motif	(S/T)(X/P)R			●	●
14-3-3 Binding Motif	(R/K)XX(S/T)XP			●	●
ATM/ATR Substrate	(S/T)Q				●
ATM/ATR Substrate	(S/T)QG				●
CK Substrate	(S/T)(D/E)X(D/E)				●

注意：ご希望のセリン/スレオニンモチーフ抗体を混ぜ合わせた抗体を解析サービス用にご用意できます。弊社へお問い合わせください。

PhosphoScan® – Phosphorylation Proteomics

Target	Motif	Antibody [‡]	PTMScan®		KinomeView®	
		No.	Kit	Service	Kit #9812	Service
14-3-3 Binding Motif	R/KXXSXP	#9601	–	✓	–	✓
Akt Substrate	RXX(S/T)	#9614	#5561	✓	✓	✓
Akt Substrate	RXRXX(S/T)	#10001	#5563	✓	✓	✓
(Ser/Thr) AMPK Substrate	(L/M)XRXX(S/T)	#5759	#5564	✓	✓	✓
(Ser) ATM/ATR Substrate	SQ	#9607	#12267	✓	✓	✓
(Ser/Thr) ATM/ATR Substrate	(S/T)QG, (S/T)Q	#6966	#12267	✓	✓	✓
(Ser) CDKs Substrate	(K/R)SPX(K/R)	#9477	–	✓	✓	✓
CK2 Substrate	(S/T)DX(D/E)	#8738	#12170	✓	✓	✓
MAPK/CDK Substrate	PXSP and SPX(K/R)	#2325	#4652	✓	✓	✓
PKA Substrate	(K/R)(K/R)X(S/T)	#9624	#5565	✓	✓	✓
(Ser) PKC Substrate	(K/R)XSX(K/R)	#6967	–	✓	✓	✓
(Ser/Thr) PKD Substrate	LXRXX(S/T)	#4381	–	✓	–	✓
(Thr) PLK Binding Motif	STP	#5243	#5566	✓	✓	✓
Thr-Pro-Glu Motif	TPE, TP	#3004	–	✓	✓	✓
Thr-Pro Motif	TP, TPP	#5757	#5567	✓	✓	✓
Thr-X-Arg Motif	TXR, TPR	#2351	–	✓	✓	✓
Tyrosine Rabbit (P-Tyr 1000)	Y	#8954	#14478/#8803	✓	✓	✓

[‡]他のアプリケーションでの使用について検証済み

PhosphoScan®の使用文献

Lee, M.E. et al. (2015) Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. *PNAS* 111(35), 12865–12870.

Paardekooper Overman, J. et al. (2014) PZR Coordinates Shp2 Noonan and LEOPARD syndrome signaling in zebrafish and mice. *Mol. Cell Biol.* 34(15), 2874–2889.

Siddoway, B. et al. (2013) Synaptic activity bidirectionally regulates a novel sequence-specific S-Q phosphoproteome in neurons. *Journal of Neurochemistry* 128(6):841–851.

Ren, H., et al. (2012) Identification of anaplastic lymphoma kinase as a potential therapeutic target in ovarian cancer. *Cancer Res.* 72(13) 3312–3323.

Carretero, J. et al. (2010) Integrative genomic and proteomic analyses identify targets for Lkb1-deficient metastatic lung tumors. *Cancer Cell* 17(6), 547–559.

Moritz, A. et al. (2010) Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases. *Sci. Signal* 3(136), ra64.

Rikova, K. et al. (2007) Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131(6), 1190–1203.

Griswold, I.J., et al. (2006) Kinase domain mutants of Bcr-Abl exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Mol Cell Biol.* 26(16) 6082–6093.

Rush, J. et al. (2005) Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat. Biotechnol.* 23(1), 94–101.

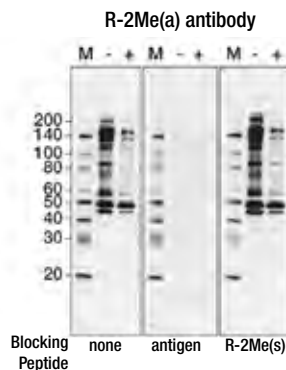
MethylScan® (メチル化プロテオミクス)

タンパク質のメチル化は一般的な翻訳後修飾 (PTM) であり、その多くはアルギニン残基とリジン残基で起こります。アルギニンのメチル化は、RNAプロセッシング、遺伝子転写、DNA損傷の修復、タンパク質の移行およびシグナル伝達などのプロセスを制御しています。リジンのメチル化は、ヒストン機能を制御することで最もよく知られており、遺伝子転写のエピジェネティックな制御に関与しています。

MethylScan®プロテオミクスでは、CST独自のメチル化アルギニン (Me-R) またはメチル化リジン (Me-K) 抗体を用いて、LC-MS/MS解析の前にトリプシン消化したサンプルからメチル含有ペプチドを濃縮します。

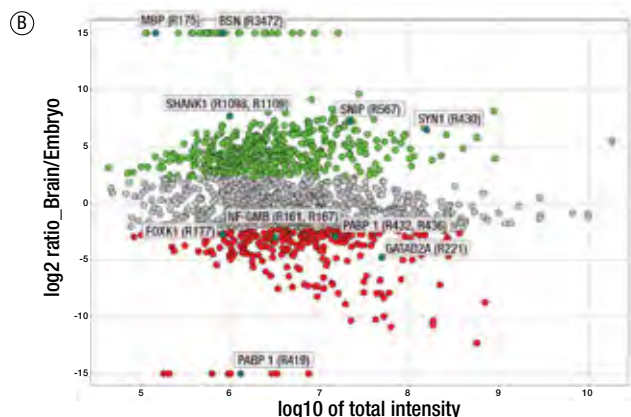
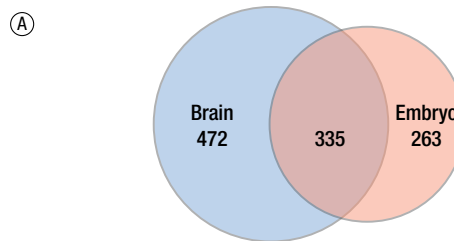
特徴と利点

- PTMScan®メチル化抗体は、下記のペプチド阻害実験で確認されており、とり極めて特異的な抗体であり、正確性の高い実験結果を保証します。
- PTMScan®技術は、多くの生物学的システムおよび生物種に適用可能で、多様な研究テーマで広く活用できます。
- 経験豊富なCSTの研究者によるPTMScan®ワークフロー全体を通じた技術サポートで、研究の進行をサポートします。



Western blot analysis of lysates from untreated (-) or AdOx-treated (+) HCT116 cells using asymmetric dimethyl arginine (R-2Me(a)) antibodies. The specific signal was blocked by antigen R-2Me(a) peptides (middle panel), but not by corresponding symmetric dimethyl arginine (R-2Me(s)) peptides (right panel).*

*This research was originally published in Molecular and Cellular Proteomics. Guo, A., et al. Immunoaffinity enrichment and mass spectrometry analysis of protein methylation. *Mol. Cell. Biol.* 2014; 13(1):372-387. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, and is licensed under CC BY 4.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



マウスの脳および胚におけるアルギニンメチル化の定量解析：上記ベン図は、マウスの脳および胚で同定されたモノメチル化アルギニン (R-Me) および非対称性ジメチル化アルギニン [R-2Me(a)] 部位の数を表す (A)。二つの組織におけるアルギニンのモノメチル化の定量的な比較。散布図の各プロットは、#12235 PTMScan® Mono-Methyl Arginine Motif [mme-RG] Kitで同定した個々のアルギニンモノメチル化ペプチドを表す。X軸はマウスの脳および胚のモノメチル化部位のペプチドの総強度をlog10の値で表し、Y軸はマウスの脳と胚のペプチドのlog2強度比を表す。カットオフ値を5倍に設定し、アルギニンモノメチル化ペプチド量が増加したことを緑点 (脳) または赤点 (胚) で示す。特定の組織にのみ存在する特徴的なメチル化ペプチドについては、任意のlog2比として15 (脳特異的) および-15 (胚特異的) を割り当てた (B)。*

MethylScan® – Methylation Proteomics

Target	Motif	Antibody [‡]	PTMScan®		KinomeView®	
		No.	Kit	Service	Kit #9812	Service
Mono-Methyl Arginine	R-Me	#8015	#12235	✓	—	✓
Asymmetric Di-Methyl Arginine	R-2Me(a)	#13522	#13474	✓	—	✓
Symmetric Di-Methyl Arginine	R-2Me(s)	#13222	#13563	✓	—	✓
Pan-Methyl Lysine	K-Me/K-2Me/K-3Me	#14117 (2Me) #14680 (3Me)	#14809	✓	—	✓

[‡] 他アプリケーションでの使用について検証済み

MethylScan®の使用文献

Guo, A. et al. (2014) Immunoaffinity enrichment and mass spectrometry analysis of protein methylation. *Mol. Cell. Proteomics* 13(1) 372-387.

Sylvestersen, K. B. et al. (2014) Proteomic analysis of arginine methylation sites in human cells reveals dynamic regulation during transcriptional arrest. *Mol. Cell. Proteomics* 13(8):2072-2088.

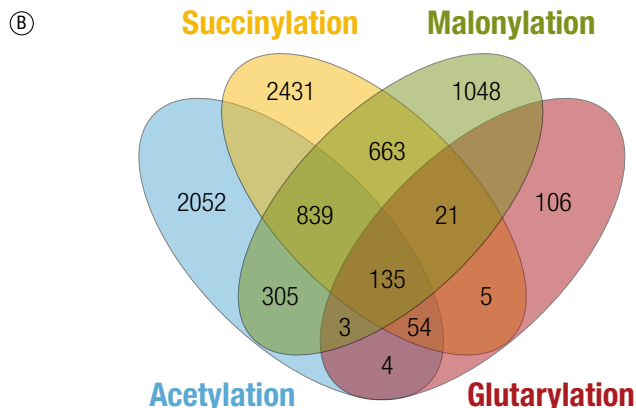
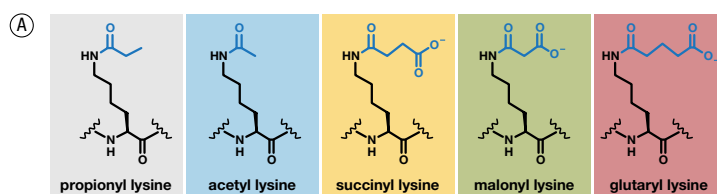
AcylScan™ (アシル化プロテオミクス)

リジン残基は様々な修飾を受けます。アシル基は、代謝中間体であるアセチルCoA、スクシニルCoA、マロニルCoA、グルタリルCoA、ブチリルCoA、クロトニルCoAから転移し、正電荷を帯びたリジンをすべて中和して構造を変化させ、基質タンパク質の機能に影響を及ぼします。

AcylScan™プロテオミクスでは、CST独自のアセチル化リジン (Ac-K)、グルタリル化リジン (Glut-K)、マロニル化リジン (Mal-K)、プロピオニル化リジン (Prop-K)、スクシニル化リジン (Succ-K) 抗体を用いて、LC-MS/MS解析の前にトリプシン消化したサンプルからそれぞれのアシル含有ペプチドを濃縮します。

特徴と利点

- AcylScan™では、特異性と感度の優れた抗体を用いることで、数千ものアセチル化、グルタリル化、マロニル化、プロピオニル化、およびスクシニル化イベントの定量的プロファイルが可能になります。
- PTMScan®技術は、多くの生物学的システムおよび生物種に適用可能で、多様な研究テーマで広く活用できます。
- 経験豊富なCSTの研究者によるPTMScan®ワークフロー全体を通じた技術サポートで、研究の進行をサポートします。



マウス (野生型、SirT5ノックアウト型) の肝臓ペプチドにおけるリジンアシル化プロファイリング: 5種類のアシル化PTM (A)。4種類のアシル化特異的抗体を用いて同定された修飾部位の重複度 (B)。

Target	Motif	Antibody [‡]		PTMScan®		KinomeView®	
		No.	Kit	Service	Kit #9812	Service	
AcetylScan® – Acetylation Proteomics							
Acetyl-Lysine	Ac-K	#9814	#14499/#13416	✓	–	–	✓
GlutarylScan™ – Glutarylation Proteomics							
Glutaryl-Lysine	Glut-K	–	#26101	✓	–	–	✓
MalonylScan™ – Malonylation Proteomics							
Malonyl-Lysine	Mal-K	–	#93872	✓	–	–	✓
PropionylScan™ – Propionylation Proteomics							
Propionyl-Lysine	Prop-K	–	#17848	✓	–	–	✓
SuccinylScan™ – Succinylation Proteomics							
Succinyl-Lysine	Succ-K	–	#13764	✓	–	–	✓

[‡]他のアプリケーションでの使用について検証済み

AcylScan™ の使用文献

Svinkina, T. et al. (2015) Deep, quantitative coverage of the lysine acetylome using novel anti-acetyl-lysine antibodies and an optimized proteomic workflow. *Mol. Cell Proteomics* 14(9), 2429–2440.

Bouchut, A. et al. (2015) Proteome-wide lysine acetylation in cortical astrocytes and alterations that occur during infection with brain parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE* 10(3), e0117966.

Ryder, D.J. et al. (2015) Identification of the acetylation and ubiquitin-modified proteome during the progression of skeletal muscle atrophy. *PLoS ONE* 10(8), e0136247.

Rardin, M.J. et al. (2013) SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab.* 18(6), 920–933.

Mielcarek, M. et al. (2013) HDAC4 Does Not Act as a Protein Deacetylase in the Postnatal Murine Brain In Vivo. *PLoS One* 8(11), e80849.

Jeffers, V. et al. (2012) Lysine acetylation is widespread on proteins of diverse function and localization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell* 11(6) 735–742.

PTMScan® Discovery Products and Services (cont.)

カスパーゼ開裂基質のプロテオミクス

アポトーシスの外因性 (extrinsic) および内因性 (intrinsic) 経路には、カスパーゼカスケードが関与します。ヒトプロテオームには、数千にも及ぶ既知のまたは推定上のカスパーゼ開裂部位が含まれています。カスパーゼ基質の大部分はアスパラギン酸残基で開裂し、一般的なDEXDモチーフを有しC末端にアスパラギン酸を持つ断片を生じます。

PTMScan®技術では、カスパーゼ開裂基質のプロテオミクスにDEXDモチーフに対する抗体を用います。LC-MS/MS解析の前処理として、トリプシン消化したサンプルから開裂カスパーゼ基質ペプチドをたとえ少量であっても効率よく濃縮します。

特徴と利点

- CST独自の開裂カスパーゼ基質モチーフ抗体は、数百から数千もの開裂カスパーゼ基質の定量的プロファイル用に作製されたユニークで感度に優れたツールです。
- PTMScan®技術は、多くの生物学的システムおよび生物種に適用可能で、多様な研究テーマで広く活用できます。
- 経験豊富なCSTの研究者によるPTMScan®ワークフロー全体を通じた技術サポートで、研究の進行をサポートします。



カスパーゼ開裂基質のプロテオミクス: PTMScan® LC-MS/MSの解析結果からC末端にアスパラギン酸を持つ1,044種類のトリプシン消化ペプチドを抽出し、上記モチーフロゴを作成しました。ペプチドサンプルは、アポトーシス誘導のために#9953 Staurosporine (1 μM, 3時間) 処理を行ったHeLa細胞から抽出しました。ペプチドの濃縮には、#12810 PTMScan® Cleaved Caspase Substrate Motif [DE(T/S/A/D) Kitを使用しました。モチーフロゴは、C末端がアスパラギン酸のペプチドにおける、アミノ酸の相対的な出現頻度を表しています。

Caspase Cleavage Substrate Proteomics		Antibody [‡]	PTMScan®		KinomeView®	
Target	Motif	No.	Kit	Service	Kit #9812	Service
Caspase Cleavage Substrate	[DE(T/S/A/D)]	#8698	#12810	✓	-	✓

[‡]他のアプリケーションでの使用について検証済み

カスパーゼ開裂基質プロテオミクスの使用文献

Anania, V.G. and Lill, J.R. (2015) Proteomic tools for the characterization of cell death mechanisms in drug discovery. *PROTEOMICS - Clinical Applications* 9(7-8) 671-683.

Pham, V.C. et al. (2012) Complementary proteomic tools for the dissection of apoptotic proteolysis events. *J. Proteome Res.* 11(5), 2947-2954.

PTMScan®のプロトコール関連製品

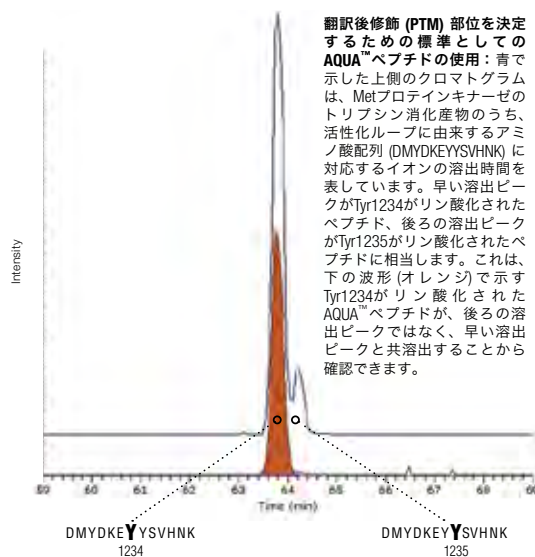
プロテオミクス実験をサポートするため、以下の検証済みのプロトコール関連試薬を取り揃えています:

- **マウスコントロールペプチド**: マウス肝臓を酵素消化し精製・凍結乾燥したペプチドです。弊社ウェブサイトにてPTMScan®キットを用いて解析した社内検証データとを公開しています。そのデータとお客様がコントロールペプチドで得られたデータとを比較することで、LC-MS/MSシステムの性能を確認できます。
- **Immunoaffinity Purification (IAP) バッファー**: 免疫沈降前の、凍結乾燥ペプチドの再懸濁に使用します。
- **AQUA™ ペプチド***: 安定同位体ラベルされた内部標準ペプチドを特注にて合成いたします。マーカータンパク質やPTMペプチドの厳密な同定および定量に使用します(右図参照)。

PTMScan® Companion Products

Product	No.
PTMScan® Trypsin Digested Control Peptides I	#12219
PTMScan® Lys-C Digested Control Peptides I	#12148
PTMScan® IAP Buffer (10X)	#9993

*この方法は、ハーバード大学医学部の研究者によって開発されており、ハーバード大学とのライセンス協定に基づいた限定的利用のみ許可されています。



翻訳後修飾 (PTM) 部位を決定するための標準としての AQUA™ ペプチドの使用: 青で示した上側のクロマトグラムは、Metプロテインキナーゼのトリプシン消化産物のうち、活性化ループに由来するアミノ酸配列 (DMYDKEYYSVHNK) に対応するイオンの溶出時間を表しています。早い溶出ピークがTyr1234がリン酸化されたペプチド、後の溶出ピークがTyr1235がリン酸化されたペプチドに相当します。これは、下の波形 (オレンジ) で示す Tyr1234がリン酸化された AQUA™ ペプチドが、後の溶出ピークと共溶出することから確認できます。

AQUA™ ペプチドや他のプロトコール関連製品の詳細は弊社ウェブサイトでご確認ください: www.cstj.co.jp/PTMScancompanion

PTMScan® Directサービス

薬物処理や病態での変動が知られている既知のシグナルタンパク質のPTMを一度に解析するために、右の6種類のPTMScan® Directサービスを提供しています。

PTMScan® Directサービスでは、右の製品コンセプトに沿って選定されたPTM特異的抗体およびTotal抗体を混ぜ合わせて使用します。LC-MS/MSの前処理として、酵素消化したサンプルから目的のシグナル伝達経路の関連因子や興味あるキナーゼ基質のペプチドを濃縮します。

	PTM部位数*	タンパク質数
PTMScan® Direct Multi-Pathway	1,006	409
PTMScan® Direct PI3K / Akt Signaling	296	105
PTMScan® Direct Apoptosis & Autophagy	175	100
PTMScan® Direct Cell Cycle & DNA Damage	263	168
PTMScan® Direct Ser/Thr Kinases	385	130
PTMScan® Direct Tyrosine Kinases	671	120

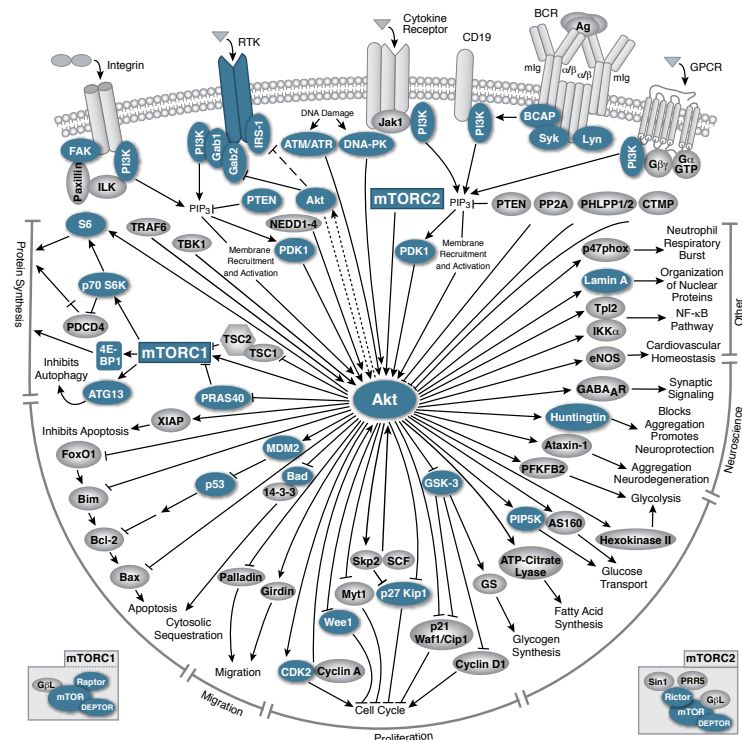
* 各PTMScan® Directサービスの標的一覧は弊社ウェブサイトでご確認ください：
www.cstj.co.jp/PTMScanDirect

PTMScan® Directマルチパスウェイ

PTMScan® Directマルチパスウェイサービスは、下記の19種類のシグナル伝達経路の多数の関連因子のペプチドを定量的に測定します。

- Adherens Junction Dynamics
- AMPK Signaling
- B Cell Receptor Signaling
- Cell Cycle Control: G1/S Checkpoint
- Cell Cycle Control: G2/M DNA Damage Checkpoint
- ErbB/HER Signaling
- G Protein-coupled Receptor Signaling to MAPK/Erk
- Insulin Receptor Signaling
- Jak/Stat Signaling: IL-6 Receptor Family
- MAPK Signaling Cascades
- MAPK/Erk in Growth and Differentiation
- NF-κB Signaling
- PI3 Kinase/Akt Signaling*
- Regulation of Actin Dynamics
- Regulation of Microtubule Dynamics
- SAPK/JNK Signaling Cascades
- Signaling Pathways Activating p38 MAPK
- T cell Receptor Signaling
- Toll-like Receptor Signaling

注意：PTMScan® Directマルチパスウェイサービスで解析されるPI3K/Akt経路内のタンパク質を、青色のノードで指します。



PTMScan® Directの使用文献

Stokes, M.P. et al. (2013) Quantitative profiling of DNA damage and apoptotic pathways in UV damaged cells using PTMScan Direct. *Int. J. Mol. Sci.* 14(1), 286–307.

Pease, B.N. et al. (2013) Global Analysis of Protein Expression and Phosphorylation of Three Stages of Plasmodium falciparum Intraerythrocytic Development. *J. Proteome Res.* 2(9):4028–4045.

Stokes, M.P. et al. (2012) PTMScan Direct: identification and quantification of peptides from critical signaling proteins by immunoaffinity enrichment coupled with LC-MS/MS. *Mol. Cell Proteomics* 11(5), 187–201.

PTMScan®解析後の追加検証

PTMScan® DiscoveryやPTMScan® Directで見出された解析候補分子の追加検証のために、以下の製品を取り揃えています：

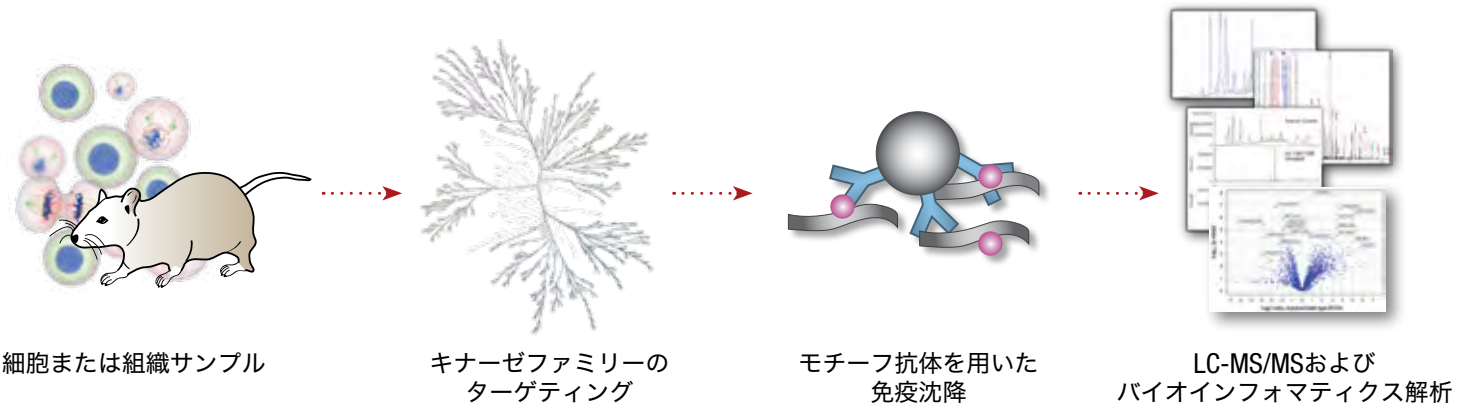
- CST社内で製造し、複数のアプリケーションで検証済みのPTM特異的抗体およびTotal抗体
- ヒトまたはマウスの特定タンパク質のノックダウンに用いるSignalSilence® siRNA
- 多様な細胞内タンパク質解析用のPathScan® Sandwich ELISAキットおよびELISA Antibody Pairキット
- 多重反応モニタリング (MRM) または免疫MRMによる質量分析アッセイ用のAQUA™ ペプチド

From Bench to Bedside

トランスレーショナルリサーチにおけるPTMScan®技術

NSCLCにおけるリン酸化チロシン修飾のPTMScan® Discoveryワークフロー

CSTは、非小細胞肺癌 (NSCLC) におけるチロシンキナーゼ活性について大規模な研究を行い、新規の疾患誘発因子を見出しました (1)。#5653 PTMScan® Phospho-Tyrosine Mouse mAb (P-Tyr-100) Kitを用いて、41のNSCLC細胞株および150のNSCLC腫瘍組織からリン酸化ペプチドを濃縮しました。この解析では、2,700種類を超えるタンパク質の4,551のリン酸化チロシン残基が同定されました。チロシンキナーゼであるALK (anaplastic lymphoma kinase) は、追加検証の候補分子、上位10種に含まれていました。

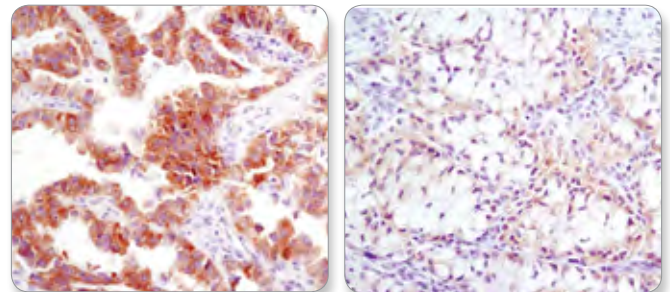
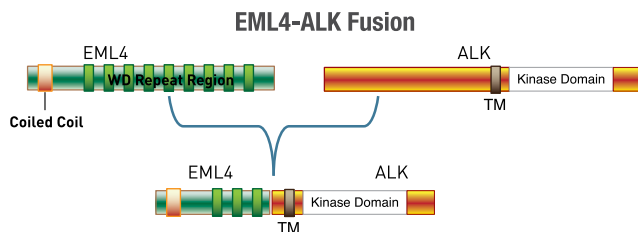


PTMScan®解析により発見されたがん関連融合タンパク質

さらなる解析によって、一部のNSCLC細胞株と腫瘍組織においてEML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) のN末端とALKのC末端が融合していることが明らかになりました。後続の研究により、NSCLC患者の3-7%において腫瘍内に融合タンパク質が発現していることが明らかにされ、高い発がん性が示唆されています (1-4)。EML4-ALK融合タンパク質を発現しているがん細胞は、低分子ALK阻害薬クリゾチニブへの感受性が高いため、2011年にクリゾチニブのALK陽性NSCLCへの適応がFDAによって承認されました (5)。

ヒト肺癌におけるALK融合タンパク質の検出

CSTは、特異性と感度の高い抗体である、#3633 ALK (D5F3®) XP® Rabbit mAbを開発しました。この抗体は、全長ALKタンパク質およびEML4-ALK融合タンパク質を検出します。FDAは、CSTがライセンス提供したALK D5F3®クローンを用いた免疫組織化学染色 (IHC) によるコンパニオン診断を承認しました (6)。これによって、医師がクリゾチニブ投与を検討すべきNSCLC患者を判断できるようになりました。



ALK (D5F3®) XP® Rabbit mAb #3633: IHC analysis of paraffin-embedded human lung carcinoma with high (left) and low levels (right) of ALK fusion protein expression using #3633.

参考文献:

1. Rikova, K. et al (2007) *Cell* 131(6), 1190-203.
2. Soda, M., et al (2007) *Nature* 448(7153), 561-6.
3. Koivunen, J.P., et al (2008) *Clin. Cancer Res.* 14(13), 4275-83.
4. Shaw, A.T., et al (2009) *J. Clin. Oncol.* 27(26), 4247-53.
5. Press Release: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm269856.htm>
6. Press Release: <http://www.ventana.com/site/page?view=press-release-jan21-2015>

Support for Drug Discovery

統合的なサービスとツール

CSTは、プロテオーム解析のサービスとキットに加えて、創薬および開発パイプラインの様々なステージをサポートするための多様なアプリケーションの製品群をご用意しています。

CSTのサービスとツール	創薬標的の 同定・検証	ヒット/ リードの 発見	薬効/毒性の バイオ マーカー	IVD/CDx
プロテオーム解析 » 翻訳後修飾 (PTM) 解析 » サービス&キットの包括的ラインナップ	●	●	●	
免疫蛍光染色法 (ICC、IHC) » 細胞内/組織内の発現・局在解析 » 多項目解析	●	●	●	
フローサイトメトリー » 単一細胞レベルの発現解析 » 多項目解析	●	●	●	
ELISAアッセイ » 多検体スクリーニング	●	●	●	
抗体アレイ » 多項目のミディアムスルーブットプロ ファイリング	●	●	●	
ChIP解析/シーケンシング » エピジェネティックな遺伝子制御の解析	●	●		
siRNAポートフォリオ » ノックダウン実験	●			
製品のカスタマイズ (特注品) » 特注標識 » 抗体保存液の組成変更 » バルク購入	●	●	●	



Troy, Product Scientist,
has been with CST since 2010.

テクニカルサポート

CSTが最も優先すること、それは優れた顧客サービスとテクニカルサポートの提供です。日々実験台に向かい、抗体の製造と検証に取り組んでいるCSTの研究者は、各抗体の性能について実践的な経験と詳細な知識を備えています。テクニカルサポートにおいては、これらの研究者がみずから培った貴重な参考情報を駆使して電話やEメールでお客様の質問にお答えし、実験のトラブルシューティングをお手伝いいたします。

www.cstj.co.jp/support

© 2015 Cell Signaling Technology, Inc.
Cell Signaling Technology, CST, AcetylScan,
GlutarylScan, KinomeView, MalonoylScan,
MethylScan, MultiMab, PathScan, PhosphoScan,
PropionylScan PTMScan, SignalSilence,
SuccinylScan, UbiScan, XP, and D5F3 are
trademarks of Cell Signaling Technology, Inc.
All other trademarks are the property of their
respective owners.

♻️ Printed on FSC® certified paper using vegetable inks and processed chlorine free.





CSTジャパン株式会社
Cell Signaling Technology®

Cell Signaling Technology (CST) は、博士研究者らによって設立された株式会社非公開の家族経営の会社で、生物医学研究における高品質な研究ツールの提供に全力で取り組んでいます。米国マサチューセッツ州にある本社の他、日本、中国、オランダにもオフィスを構え、全世界で従業員が働いています。私達CSTは研究者としての立場から、研究の成功が、用いる抗体に左右されると考えています。したがって、シグナル伝達の解析および基礎生物学研究を促進するために、積極的に技術開発に取り組んでいます。また、一次抗体を製造、検証した研究者みずからが、お客様のテクニカルサポートも担当しています。このようなシステムを用いているからこそ、CSTは、信頼性と一貫性を備えた実験結果を得るのに必要な試薬と情報をお客様に提供できるのです。



〒101-0047 東京都千代田区内神田1-6-10
Tel: 03-3295-1630 / Fax: 03-3295-1633
Support: info@cstj.co.jp
www.cstj.co.jp

www.cstj.co.jp

CST Antibody Performance Guarantee: To learn more, please visit: www.cellsignal.com/abguarantee.

COVER IMAGE: Cellular Landscape: Vesicle Trafficking www.cellsignal.com/VesicleTrafficking.

16BROPTMS0136JPN For Research Use Only. Not For Use in Diagnostic Procedures.