

トランスブロットTurbo転写システムを活用したPhos-tagウェスタンブロットによるタンパク質のリン酸化の検出

徳島大学 先端酵素学研究所 藤井節郎記念医科学センター 細胞情報学分野 小迫 英尊 先生

■ はじめに

私たちはリン酸化を中心とした翻訳後修飾や新規セカンドメッセンジャーによる細胞内シグナル伝達機構の解明を目指しており、プロテオミクスやイメージング、相互作用解析などの様々な技術を開発・導入している。徳島大学にオープンラボ方式で新設された藤井節郎記念医科学センターにおいて、多くの共同研究者の協力を得て、現在は特に疾患の原因となる複数のタンパク質キナーゼの標的基質の大規模同定と生理・病理機能の解明を進めている。同定されたキナーゼ基質の機能を明らかにする上で、Phos-tagウェスタンブロットは欠かせない技術となっている。

Phos-tagはリン酸基を特異的に捕捉する二核金属錯体であり、アクリルアミドと結合したPhos-tag (Wako, AAL-107) を用いてゲルに含ませた状態でSDS-PAGEするとタンパク質のリン酸化レベルに応じて移動度のシフトが起こる。SDS-PAGE後にメンブレンに転写し、目的タンパク質に対する抗体でウェスタンブロットすることにより、細胞抽出液などの複雑な試料中でのリン酸化状態を評価することが可能になる。このPhos-tagウェスタンブロット法は細胞内における特定のタンパク質のリン酸化の変動を調べる上で極めて有効な方法であり、世界的に急速に普及している。特に、1) リン酸化特異的抗体や質量分析計を用いることなく手軽に細胞内でのリン酸化を検出できること、2) 何割また何箇所がリン酸化されているかがおおよそ分かること、等は優れた特長と言える。しかしながらクリアなPhos-tagウェスタンブロットの画像を得るためには幾つかの重要なポイントがあり、特にPhos-tagを含むゲルからメンブレンへの転写は通常のゲルに比べて困難である（特にリン酸化タンパク質はゲル中のPhos-tagとの親和性のために写りにくい）。

私たちの研究室ではトランスブロットTurbo転写システムを用いることで簡便かつ短時間で転写を行い、良好な結果を得ている。

■ Phos-tagウェスタンブロットにおける注意点

細胞抽出液に対してPhos-tagウェスタンブロットを行う上では転写のステップ以外にも幾つかの注意点がある。

- 1) 培養ディッシュ上の細胞を洗浄する際は、リン酸を含むPBSではなく、氷冷したHBS (20 mM Hepes-NaOH, pH7.4, 137 mM NaCl) などを用いる。
- 2) 抽出バッファーに含まれるEDTAやEGTAなどのキレート剤は1 mM以下にする（ゲル中でPhos-tagと錯体を形成している Mn^{2+} や Zn^{2+} イオンがサンプルの電気泳動中に奪われるため）。
- 3) 細胞または抽出バッファー由来の様々な成分によって泳動パターンが影響を受けやすいため、PAGE Clean Up Kit (Nacalai, 06441-50) などでタンパク質を沈殿、再溶解すると改善する場合が多い。特にPAGE Clean Up KitはSDS存在下でも沈殿可能なため、細胞抽出液を直接泳動した場合の結果が悪くなかった場合に、Laemmliサンプルバッファーで処理した抽出液に対しても使用できる。

■ トランスブロットTurbo転写システムの活用方法

- 1) 私たちは通常、25 μ M Phos-tagと50 μ M $MnCl_2$ を含む7.5% アクリルアミドゲルを用いて一般的なトリス-グリシン系のSDS-PAGEを行っている。
- 2) 泳動後のゲルはまず、1 mM EDTAを含む通常の転写バッファー (25 mM Tris, 192 mM グリシン, 10% メタノー

ル, 0.03% SDS) 中で10分間緩やかに振盪した後、EDTAを含まない転写バッファーでさらに10分間振盪する。この操作によってゲルから Mn^{2+} イオンが除かれ、リン酸化タンパク質が転写されやすくなる。

- 3) 専用のPVDF転写パックを開け、カセット中で濾紙、メンブレン、ゲル、濾紙の順に積層し、トランスブロットTurbo転写システムにセットする。
- 4) 目的タンパク質に応じて7分間または10分間の転写時間となるように設定し、高電流出力による高速転写を行う。
- 5) カセットを取り出し、メンブレンをTBS-Tで軽く洗った後、ブロッキングから一般的なウェスタンブロットの操作を行う。

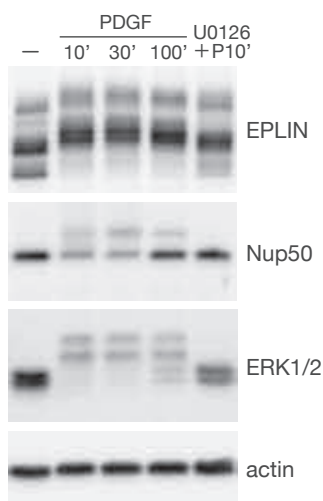
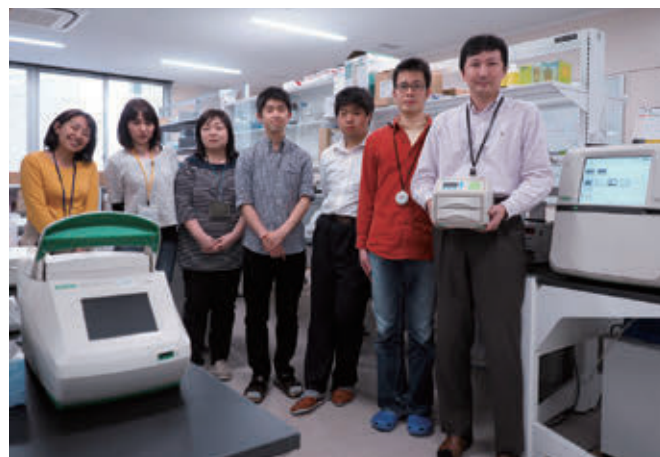


図1 Phos-tagウェスタンブロットによるERK/MAPキナーゼおよびその基質のリン酸化の検出

血清飢餓状態のマウスNIH/3T3細胞に対し、一定時間PDGF刺激を行ってから抽出液を調製した。一部の細胞にはMEK阻害剤U0126で前処理してからPDGF刺激を行った。得られた抽出液を Mn^{2+} -Phos-tagを含むゲルでSDS-PAGEした後、図に示したタンパク質に対する抗体でウェスタンブロットした。なお、EPLINとNup50は私たちが新たなERK基質として同定したタンパク質である (*Mol. Cell. Biol.*, 27, 8190-8204, 2007および*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 1026-1035, 2009)。

■ 終わりに

トランスブロットTurbo転写システムでは10分以内の短時間で転写できるためにバンドがシャープになり、リン酸化による移動度シフトが明瞭になるというメリットもある。なお、私たちはPhos-tagウェスタンブロットおよび通常のウェスタンブロットにおいて、発色試薬には室温での保存ができ、コストパフォーマンスにも優れたClarity Western ECL Substrateを用いている。さらにブロット画像の取得には、タッチパネルによる操作が便利なChemiDoc Touchイメージングシステムを使用している(付属の画像解析ソフトImage LabソフトウェアはWindowsとMacの両方に対応している上、直感的に使うことができる)。このようにBio-Rad社の複数の試薬と装置を利用することにより、良好なPhos-tagウェスタンブロットの結果が得られている(図1)。



小迫先生(右端)とご研究室メンバーの方々



トランスブロットTurbo
転写システム



ChemiDoc Touchと
Image Labソフトウェア



Clarity Western ECL
Substrate