

新しいAnti-ACTIVE® p38抗体による免疫染色



By Bruce W. Jarvis, Ph.D., and Shu-Cai Huang, Ph.D.
Promega Corporation

p38はMAPキナーゼスーパーファミリーに属すストレス誘導キナーゼの一つです。活性化型p38 kinaseはアルツハイマー病などの神経異常にも見とめられています。Anti-ACTIVE® p38 pAbは活性化型である2重リン酸化型 p38をウエスタンブロッティングや蛍光免疫染色の両方で検出するための有用なツールです。

はじめに

Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase は真核細胞におけるシグナル伝達で様々な細胞内イベントを調節する重要な役割を果たしています(1, 2)。MAP キナーゼスーパーファミリーには、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) およびp38 kinaseがあり、互いに交わる3つのシグナル伝達カスケードに位置しています。p38の経路はFasリガンド発現型のアポトーシスシグナルにも関わっています(3)。これらのキナーゼは分裂促進剤、成長因子および様々なストレスにตอบสนองして転写因子をリン酸化し、活性化します。ERK、JNKおよびp38はMEKとして知られるMAPキナーゼ・キナーゼにより活性化される際、pTxpY配列のスレオニンおよびチロシン残基の両方がリン酸化されます。つまり、ERK、JNKおよびp38の活性化にはスレオニン、チロシン両方のリン酸化が必要です。リン酸化されるとERKはホモダイマーを形成しますが、JNK、p38にはあてはまりません(4)。

p38経路は紫外線、サイトカイン、浸透圧ショックを与える試薬(例：ソルビトール)、タンパク質合成阻害剤(例：アニソマイシン)などにより活性化します。このような調節因子の広範さは、この経路が多くのストレス応答を伝える役割があることを示唆しています。これらのシグナルは細胞膜結合レセプターを経由し、様々な低分子量Gタンパク質からMEKキナーゼ(MEK1/2/3)に到達します。MEKKはMEK3/6を活性化し、それらのMEKが続いてp38を活性化し、それが転写因子(例：ATF-2)をリン酸化します。p38には α 、 β 、 γ 、 δ の4種類のアイソフォームが存在し、低酸素ストレス状態のPC12細胞では α と γ の各アイソフォームが活性化します(5)。

Anti-ACTIVE® p38 pAbはp38のpTGpY配列を含む合成ペプチドに対して作成されており(6)、Anti-ACTIVE®シリーズで以前にあったp38抗体を再調製したものです。Anti-ACTIVE® p38 pAbはヒトp38のpTGpYモチーフを含む2重リン酸化ペプチドをウサギに注入して作られ(5)、非リン酸化型ペプチドと反応する抗体産物を除くために2段階のアフィニティー精製を施しています。そのため、最終的な抗体産物は活性化キナーゼのpTGpYに特異性を持ち、 α 、 γ 、 δ の各アイソフォームを検出します。この新しい抗体はウエスタンブロッティングおよび蛍光免疫染色の両方で良好に機能します。また、Anti-ACTIVE® p38 pAbはプロメガにおいて、各ロットごとにPC12細胞を用いた免疫細胞染色と抽出液を用いたウエスタンブロッティングによるテストを通じて信頼性が確認されています。

神経細胞や組織におけるシグナリングにp38はどのように関連するのでしょうか？ いくつかの例がアルツハイマー病(AD)や炎症の研究分野から報告されています。p38キナーゼはアルツハイマー病患者の脳、特に神経突起斑、変性神経突起、神経原繊維変化を持つ神経細胞で活性化されます(7)。さらに、ADを特徴づける糸状型の β アミロイドが、培養した新生ラ

ットのミクログリアでp38活性化を一過性に誘導することが示されました(8)。その他、神経学的老化の原因として酸化的ストレスが挙げられます。シリアンハムスターの海馬CA1領域ミクログリアにおいて、一過性の虚血がp38の活性化を誘導することが観察されました(9)。また、ラットの海馬および小脳への電気ショックによってもp38が活性化します(10)。しかし、p38阻害剤であるSB203580を海馬CA1領域に投与しても、モーリスの水迷路学習に対するパフォーマンスを損なわないことから、p38はラットの長期空間学習には関連しないであろうと考えられます(11)。これらの研究の多くで活性化型(リン酸化型)p38キナーゼに対する抗体が使用されてきたことは特記すべきことです。

ウエスタンブロッティングにおけるパフォーマンス

図1はAnti-ACTIVE® p38 pAb (カタログ番号 V1211)を用いて行ったウエスタンブロッティングの結果です。この抗体は2000倍希釈で5ngのリコンビナント活性化型 p38を(レーン1) Sorbitol-Treated PC12 Cell Extract (カタログ番号 V8100) 20 μ gから活性化型 p38を(レーン2) 検出しています。PC12細胞にソルビトールを加えると浸透圧ショックを与える薬剤として働き、p38リン酸化の引きがねとなります(JNKも同様：データ未掲載)。

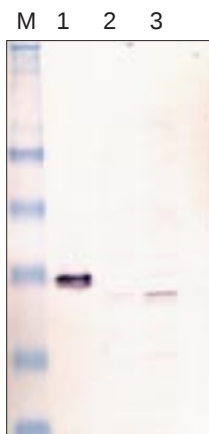
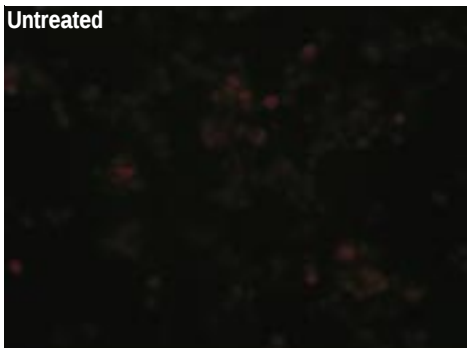


図1. Anti-ACTIVE® p38 pAb (カタログ番号 V1211)を用いて行ったウエスタンブロッティング。タンパク質は10%ポリアクリルアミドSDSゲルからニトロセルロースメンブレンにエレクトロブロッティングを行った。レーン1：リコンビナント活性化型 p38キナーゼ (5ng)、レーン2：Untreated PC12 Cell Extract (20 μ g)、レーン3：Sorbitol-Treated PC12 Cell Extract (カタログ番号 V8100) (20 μ g)、レーンM：分子量マーカー。メンブレンは新しいAnti-ACTIVE® p38 pAb (2,000倍希釈)で反応させた。2次抗体にはDonkey Anti-Rabbit IgG (H+L), AP (カタログ番号 V7971) (10,000倍希釈)を用い、発色にはWestern Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (カタログ番号 S3841)を用いた。リコンビナントの酵素は発現タグを持つ。プロトコルはプロメガで作成し、実施した。



Anti-ACTIVE® p38 pAb

Untreated



Sorbitol-Treated

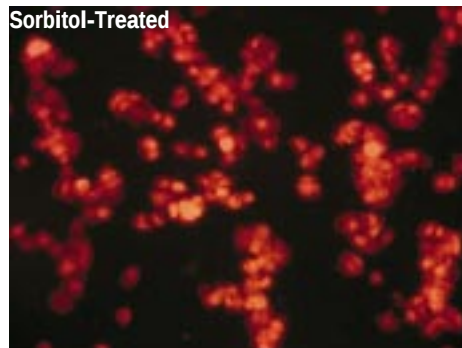


図2. 免疫細胞染色 (ICC) によるPC12細胞の p38の検出
細胞は1M ソルビトールで処理したものと未処理のものを用いた。Anti-ACTIVE® p38 pAbは500倍希釈で使用した。標識2次抗体はdonkey anti-rabbit CyTM3 conjugate (Jackson ImmunoResearch) を1,000倍希釈で使用した。染色像はZeiss® 蛍光顕微鏡で視覚化し、Optronicsデジタルカメラで撮影した(露光1/15秒)。プロトコルは表1と同様。

蛍光免疫染色におけるパフォーマンス

図2にAnti-ACTIVE®抗体を用いた免疫染色像を示しました。Anti-ACTIVE® p38 pAbは500倍に希釈して使用しました。左のパネルは未処理のPC12細胞を用いており、蛍光染色のわずかな痕跡のみが現れています。右のパネルはソルビトール処理(濃度1Mで30分間)したPC12細胞で多くの免疫蛍光が観察されています。免疫染色のプロトコルは表1に記載されています。

表 1. PC12 細胞の培養と免疫細胞染色の方法

1. ラット尾コラーゲンで4室スライド (Fisher 12-565-21)をコーティング (6µg/cm ² , 1時間)
2. スライド上でPC12細胞を1~2日培養
3. 2室分の細胞は以下のように活性化させ、残りの2室は未処理
4. ソルビトール処理: p38を活性化するために免疫細胞染色の前日、血清を除いた新しい培地を加える。免疫細胞染色の当日にソルビトールを培地に加え(終濃度1M)、37℃で30分間インキュベート
5. 冷却PBSで1回洗浄
6. 10%パラホルムアルデヒドで30分間、室温で固定
7. PBSで3回(各5分間)洗浄
8. 細胞を冷却メタノール(-20℃)で10分間、透過処理
9. PBSで3回(各5分間)洗浄
10. ブロッキングバッファー(1% BSA、5% ロバ血清を含むPBS)で3時間、室温でブロッキング
11. PBSで1回(5分間)洗浄
12. 抗体希釈バッファー(1% BSA、1% ロバ血清を含むPBS)で希釈したAnti-ACTIVE® p38 pAbで一晩、4℃でインキュベート(推奨希釈倍率は500倍)
13. PBSで5回(各15分間)洗浄
14. 暗室で donkey anti-rabbit Cy TM 3 conjugate (Jackson ImmunoResearch) を最終的に1000倍希釈になるように加え90分間、室温でインキュベート
15. 暗室でPBSにより5回(各15分間)洗浄。グリッドを取り除きDAPIを含むVectashield® (Vector Labs) でマウント
16. 蛍光顕微鏡で観察

PC12細胞(ATCC)をラット尾コラーゲン(6µg/cm²)で37℃、1時間コーティングした組織培養フラスコで培養します。培養は5% CO₂、37℃で行い、培地は細胞が~80%コンフルエンスになるまで毎日交換します。培地の組成は25mM HEPES、300mg/L L-グルタミン、10% ウマ血清、5% ウシ胎児血清、0.5mM EGTAを含むRPMI 1640です。

Anti-ACTIVE® p38 pAbは免疫細胞染色で検定されています。すなわち、図2の刺激された、または刺激されないPC12細胞と同様の染色結果が得られるように各ロットごとにテストされています。さらにAnti-ACTIVE® MAPK pAb (カタログ番号 V8031) と Anti-ACTIVE® JNK pAb (カタログ番号 V7931、V7932) も免疫染色で検定されています。

参考文献

1. Seger, R. and Krebs, E.G. (1995) *FASEB J.* **9**, 726.
2. Cano, E. and Mahadevan, L.C. (1995) *TIBS* **20**, 117.
3. Hsu, S.-C. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25769.
4. Cobb, M.H. and Goldsmith, E.J. (1999) *TIBS* **25**, 7.
5. Conrad, P.W. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 23570.
6. Han, J. *et al.* (1994) *Science* **265**, 808.
7. Hensley, K. *et al.* (1999) *J. Neurochem.* **72**, 2053.
8. McDonald, D.R. *et al.* (1998) *J. Neurosci.* **18**, 4451.
9. Walton, K.M. *et al.* (1998) *J. Neurochem.* **70**, 1764.
10. Oh, S.W. *et al.* (1999) *Neurosci. Lett.* **271**, 101.
11. Blum, S. *et al.* (1999) *J. Neurosci.* **19**, 3535.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Anti-ACTIVE® p38 pAb, Rabbit, (pTGpY)	100µl	V1211	14ページ参照
Anti-ACTIVE® MAPK pAb, Rabbit, (pTEpY)	40µl	V8031	14ページ参照
Anti-ACTIVE® JNK pAb, Rabbit, (pTPpY)	40µl	V7931	14ページ参照
	120µl	V7932	14ページ参照
Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase	100ml	S3841	7,000
Blot-Qualified BSA	10g	W3841	7,500

MAPKキャンペーン実施中！！

その他の関連製品については14ページをご覧ください。

Anti-ACTIVE and Western Blue are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Cy is a trademark of Amersham Pharmacia Biotech Ltd. Vectashield is a registered trademark of Vector Laboratories, Inc. Zeiss is a registered trademark of Carl-Zeiss-Stiftung.