



Technically Speaking

By Michael Curtin, B.S.
Promega Corporation

Anti-ACTIVE® 抗体とMAPKシグナル経路



"Anti-ACTIVE®" 抗体とは、正確にはどのような製品ですか？

プロメガのAnti-ACTIVE®抗体は、MAPK(ERK)、JNK、p38それぞれの活性化型の酵素を特異的に認識するように設計されています。キナーゼ群は、いずれも触媒中心のリン酸化ループと呼ばれる部位に、Thr-X-Tyrという保存された(コンセンサス)配列を持ちます(表1)。これらのキナーゼは、保存配列中のチロシンとスレオニンの両残基がリン酸化されたときのみに活性化します。プロメガのAnti-ACTIVE®抗体シリーズのMAPK、JNKおよびp38はリン酸化したコア配列のペプチドに対する抗体として作製され、二重リン酸化した活性化型を特異的に認識する抗体です。同ファミリー内において、あるいは単一リン酸化型、非リン酸化型との交差反応はほとんど見られません。

表1. プロメガのAnti-ACTIVE®抗体ファミリーによって認識されるアミノ酸のコア配列

Anti-ACTIVE®抗体	触媒中心
MAPK	pThr ¹⁸³ -Glu ¹⁸⁴ -pTyr ¹⁸⁵
JNK	pThr ¹⁸³ -Pro ¹⁸⁴ -pTyr ¹⁸⁵
p38	pThr ¹⁸⁰ -Gly ¹⁸¹ -pTyr ¹⁸²



Anti-ACTIVE®抗体はどのような目的に使えますか？

プロメガのAnti-ACTIVE®抗体を用いれば放射性同位元素による標識を使用せず、簡単に活性化型キナーゼを検出できます。これらの抗体は活性化型のERK(MAPK)やJNK、p38を発現しているPC12(rat pheochromocytoma)細胞を用いて、各ロットごとにテストされており、免疫染色についても確かめられています。そのため、Anti-ACTIVE®抗体を使用したアッセイは、ゲルシフトアッセイやゲル中キナーゼアッセイ、免疫沈降ベースのキナーゼアッセイ、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットングなどの様々な手法の代わりに用いることができます。MAPKファミリーのAnti-ACTIVE®抗体はウェスタン解析と免疫細胞染色の詳しいプロトコル(1)が添付されています。



Anti-ACTIVE®抗体に対してどのような二次抗体を使うべきですか？

プロメガのAnti-ACTIVE®抗体はウサギの血清から精製されるポリクローナル抗体なので、抗ウサギIgG二次抗体を検出に使用する必要があります。二次抗体に由来するバックグランドシグナルがどれだけあるかを確かめるために、二次抗体のみを用いた(一次抗体を使わない)コントロール実験を推奨します。プロメガではAnti-ACTIVE®抗体用に最適化された二次抗体として、horseradish peroxidaseまたはalkaline phosphataseを結合した、二種類のDonkey Anti-Rabbit IgG secondary antibody(カタログ番号V7951またはV7971)を提供しています。



プロメガにはAnti-ACTIVE®抗体を用いる際の、コントロール試薬としてどのようなものがありますか？

プロメガでは近年、Anti-ACTIVE®抗体を用いたウェスタン解析において、陽性コントロールとなるPC12細胞抽出液を導入しました。PC12細胞はnerve growth factor(NGF)で処理すると、ERK1および2が二重リン酸化し、Anti-ACTIVE® MAPK pAbを用いたウェスタンブロットで検出できるようになります。Anti-ACTIVE® MAPK pAbを用いて実験する場合には、2.0μg のPC12 Cell Extract, NGF-treated(カタログ番号V8110)を陽性コントロールとして使用することを推奨します。Sorbitolで処理(浸透圧ストレス処理)したPC12細胞は、活性化型のJNK1、2 およびp38各キナーゼを発現しているため、Anti-ACTIVE® JNKおよびp38ポリクローナル抗体の陽性コントロールとして使用できます。PC12 Cell Extract, Sorbitol-treated(カタログ番号V8100)の場合、10μgを使用します。NGFおよびSorbitol-treated PC12 Cell Extractsは陰性コントロールである、未処理のPC12細胞抽出液と共に供給されます。



MEK Inhibitor U0126とはどのようなものですか？ またPD98059との違いは？

MEK1/2はERK1/2をリン酸化して活性化させる酵素です。MEK Inhibitor U0126(カタログ番号V1121)は新規のMEK1/2の選択的阻害剤です。PD98059と同じく、U0126はMAPKの活性化を阻害します。U0126は有機化合物の一種(1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene; MW= 426.5)で、MEKに非競合的に結合して触媒活性を阻害することにより、ERKリン酸化による活性化を妨げます。しかもMEK1およびMEK2を同等に阻害します (*in vitro*でMEK1に対するIC₅₀=72nM、MEK2に対するIC₅₀=58nM)。一方、MEK inhibitor PD98059(カタログ番号V1191)は、RafによるMEK1の活性化を妨げる阻害剤です(PD98059はMEK2の阻害効果はほとんどありません。*in vitro*でMEK1に対するIC₅₀=4μM、MEK2に対するIC₅₀=50μM)。PD98059は不活性化型のMEK1に結合し、Rafによるリン酸化を妨げます。しかし、すでに活性化しているMEK1にはほとんど作用しません。つまり、U0126はMEK1/2の活性化状態によらず、ERK1/2の活性化の下流にある酵素の活性化を阻害します。さらに、U0126はPD98059よりも*in vitro*および*in vivo*の両方で高い阻害効果を示します。細胞内でU0126はIC₅₀値0.07μMで安定に活性化型MEK2を阻害します。一方、PD98059のIC₅₀値は5.00μMよりも大きくなります(IC₅₀値はキナーゼの種類や細胞種によってそれぞれ異なります)。

参考文献

1. Anti-ACTIVE® MAPK, JNK and p38 Polyclonal Antibodies and Anti-ACTIVE® Qualified Secondary Antibody Conjugates Technical Bulletin #TB262, Promega Corporation.

Anti-ACTIVE is a trademark of Promega Corporation and is registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

上記製品については **MAPKキャンペーン実施中！！**

詳細は最終ページ参照