

リン酸化解析におけるCCD Imagerのダイナミックレンジの重要性

タンパク質のリン酸化研究は、さまざまな疾患の原因究明や Kinase 阻害剤の開発につながるため重要です。

リン酸化の解析に現在用いられる方法として、質量分析計を用いたリン酸化部位の同定や、Western Blotting (WB) を用いたリン酸化状態の変動解析な

どがあげられます。

WB を用いた手法は、リン酸化／非リン酸化の割合を解析できる利点がありますが、図 1 左 Conventional WB のようにリン酸化によりシフトしたバンドが近接するため、従来の方法では解析が困難になることが多くありました。

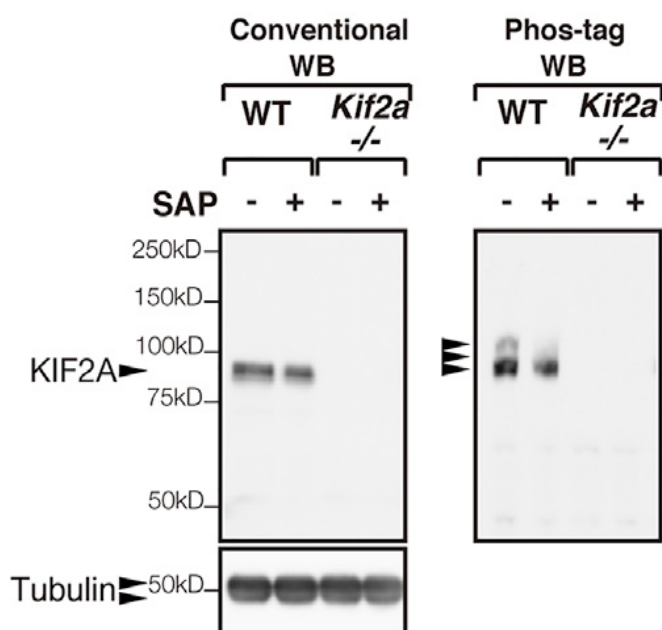


図 1. Conventional WB (左) と Phos-tag WB (右) によるリン酸化バンドの検出

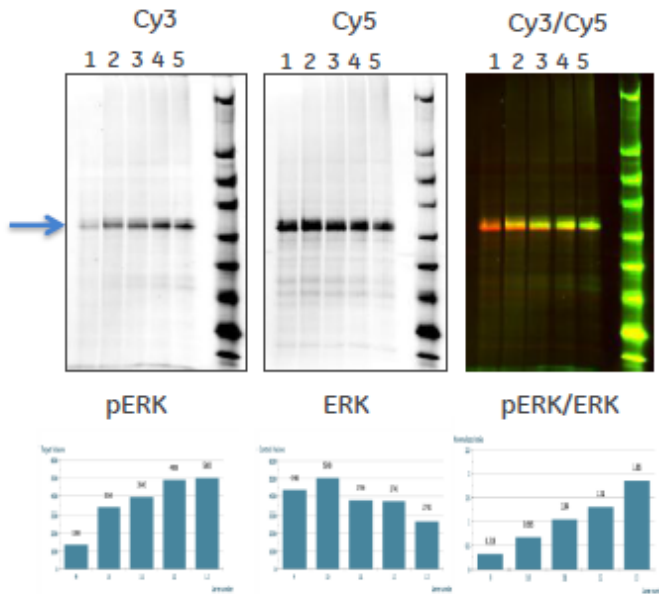


図 2. 蛍光 WB によるリン酸化検出

試料：Hela 細胞由来のライセート

UV 照射割合 1 (0%), 2 (25%), 3 (75%), 4-5 (100%)

一次抗体

rabbit anti - ERK

mouse anti - pERK

二次抗体

goat- α -rabbit IgG-Cy5

goat- α -mouse IgG-Cy3

蛍光 WB の多重検出によって評価することも可能です (図 2) が、蛍光での検出は感度が低く、抗体の入手が困難 (リン酸化体と非リン酸化体に対し、異なる生物種で作成した抗体が必要) な場合があります、うまくいかないことが多くあります。

しかし近年開発された Phos-tag SDS-PAGE によって、リン酸化の解析が容易になりました。この試薬は電

気泳動により、リン酸化レベルに応じてリン酸化/非リン酸化フォームを分離することができる手法で、泳動後に WB へ使用することも可能です。Phos-tag WB は部位の数や位置が異なるフォームも分離できるほか、通常の泳動に比べバンドシフトが大きくなるため解析も十分可能です (図 1 右 Phos-tag WB)。

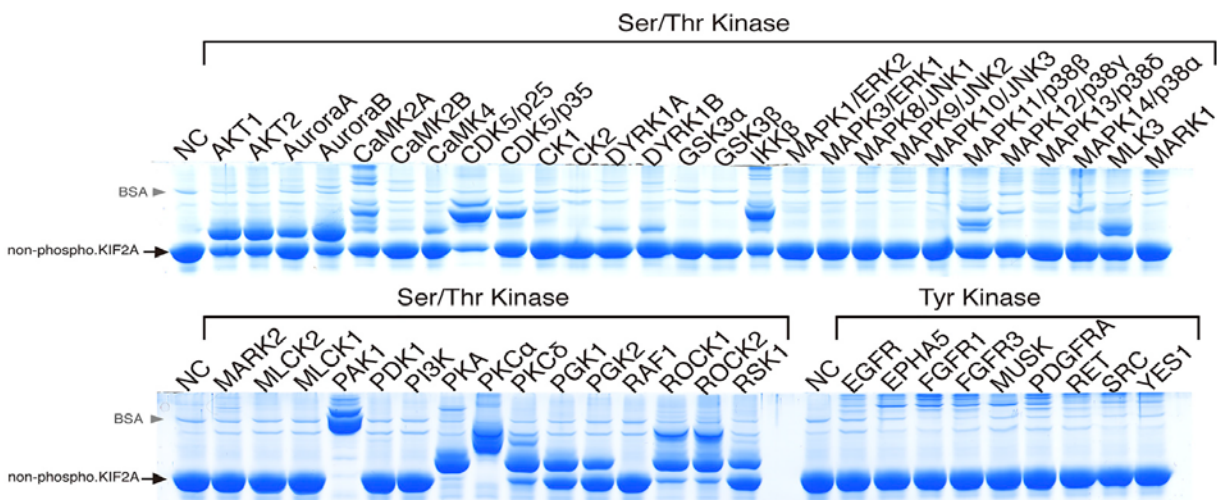


図 3. Phos-tag を利用した Kinase Assay

さらに、ターゲットとするタンパク質のリン酸化酵素の同定 (図 3 Kinase Assay) にも利用が可能です。このような Phos-tag WB の実験において、分離されたリン酸化フォームを解析するためには、シフトした濃いバンドから薄いバンドまでを同一画像で撮

影することが重要となるため、ダイナミックレンジの広い CCD Imager を検出に用いる必要があります。

ダイナミックレンジの重要性は通常の WB においても同様です。

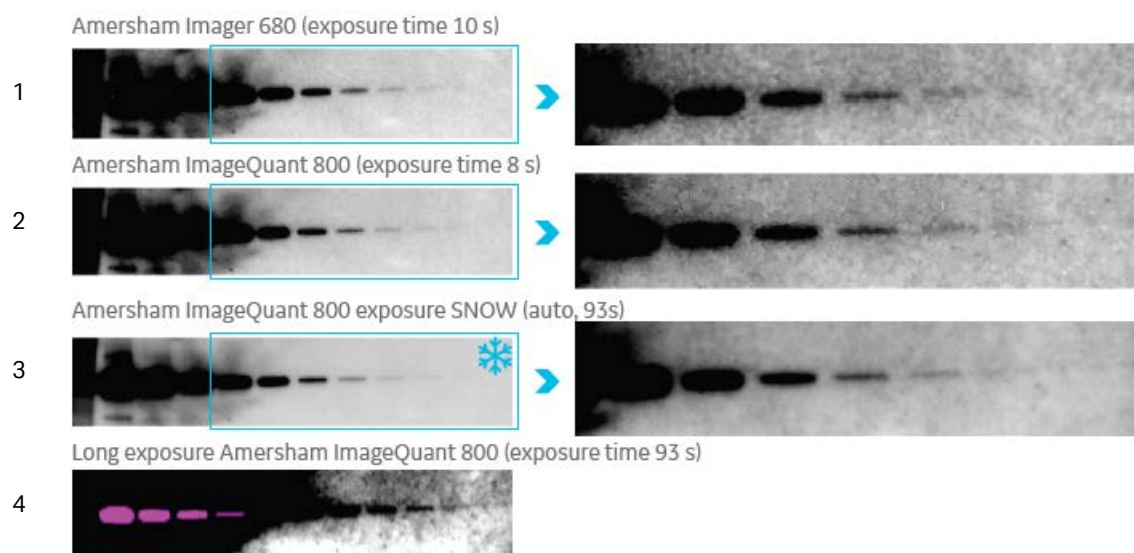


図 4. SNOW 検出モードによるノイズ低減例

たとえば、図 4-4 では薄いバンドを検出するため、露光時間を延ばしましたが (93 sec)、濃いバンドが飽和してしまいました (ピンク色)。

これに対して、Amersham ImageQuant 800 に搭載された SNOW (Signal-to-Noise Optimization Watch) モードを用いると、蛍光顕微鏡の画像取得に用いられている加算平均によりノイズが低減されるため、濃いバンドを飽和させることなく薄いバンドの検出が可能となります (図 4-3)。

このように、リン酸化検出など濃いバンドに潰されず薄いバンドを検出する例や、病態変動などでタンパク質量が大きく変わるような例では、ダイナミックレンジの広い CCD Imager を用いることが重要になります。

参考文献 ; Ogawa T, Hirokawa N. Microtubule Destabilizer KIF2A Undergoes Distinct Site-Specific Phosphorylation Cascades that Differentially Affect Neuronal Morphogenesis. Cell Rep. 2015; 12(11):1774-88

Cytiva (サイティバ)

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社
〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ: バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370

e-mail : Tech-JP@cytiva.com



Intertek
ISO 9001:2015
認証取得

掲載されている内容および価格は 2020 年 1 月現在のものです。価格は希望小売価格 (消費税は含まれておりません) であり、単なる参考価格のため、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただきます場合があります。