

Simple Westernで内在性膜タンパク質の分析

イントロダクション

内在性膜タンパク質 (Integral membrane proteins; IMP) は、すべての細胞の重要な細胞機能に関与し、すべてのOpen reading frameの20~30%を占めています¹。ところがその独特な性質のために、IMPの生化学的分析は容易ではありません。球状タンパク質とは異なり、IMPは細胞と細胞内の構成要素 (コンパートメント) をカプセル化して包み込むように、脂質に富んだ疎水性の膜内に存在します。それらは膜貫通ドメインの疎水性アミノ酸で複数回その膜にまたがっていることがよくあります。実際の細胞膜からIMPを取り出すことは困難なことが多く、多くの場合、溶解および変性条件の検討や、界面活性剤の添加などが必要になります。

IMPの研究実験を行う前に、まず目的のIMPを抽出する方法を確立しなければなりません。界面活性剤を多く含んだlysisバッファの使用や²分画法により特定の細胞内コンパートメントを分離³します。このプロトコールではネバダ大学が行った研究を紹介しします。ネバダ大学では、超遠心機を使って細胞分画法で細胞膜結合インテグリンを分画しSimple Western™で分析しました。また、グリコシル化した膜タンパク質を扱う際のサンプル調製条件の検討方法のコツや、IMPの適切なローディングコントロールに関する助言を提供しています。

IMPsの溶解に関する考慮事項

IMPsを効率良く抽出するために、より厳密な可溶化手順をとることがよく必要となります^{2,3,6}。ProteinSimple RIPA buffer (PN 040-483)などのlysis bufferや、目的の膜タンパク質の抽出に同様に適している、もしくは確立されたbufferを使用することをお勧めします。膜抽出バッファを含めて検証済みバッファに関しては、Simple Western Buffer Compatibilityガイドをご覧ください。

IMPの変性に関する考慮事項

目的の標的タンパク質のサンプルを準備するプロトコールが既にある場合 (例えば文献から)、Simple Westernでそれらの条件を使用することをお勧めします。サンプル調製プロトコールをお持ちでない場合は、最初にデフォルトのサンプル調製条件から始めることをお勧めします。多くの膜タンパク質においては、これ

で上手くいきますが、一部のIMPは高熱で加熱すると疎水性ドメインが新たに露出し、好ましくないリフォールディングにより凝集することがあります⁹。このような場合、サンプルを95°Cで5分間加熱するなどのデフォルトのSimple Westernプロトコールは、目的の膜タンパク質に適しておらず、予想分子量 (MW) でシグナルを得られない場合や、使用している分離範囲の上端にシグナルを検出することがあります。

標的タンパク質がデフォルトのサンプル調製条件下で凝集する場合、もしくは安全を期したい場合は、さまざまな加熱時間と温度を評価する簡単な変性テストを行うことをお勧めします。まず、複数のチューブに分注することのできる1本のマスターサンプルを作成し、サンプルを各チューブに分注した後、各チューブを異なる変性条件で処理します。その後、並べてSimple Western機器で測定し、目的のIMPに最適な条件を特定します (図1)。

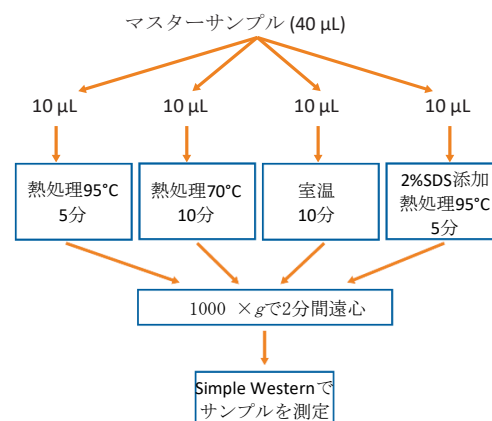


図1. 目的のIMPに適した変性条件を特定するワークフロー。

IMPの推奨熱変性条件検討:

1. 製品説明書に従い、8μLの5XのMaster Mixと32μLの希釈液ライセートを混ぜて、マスターサンプル(40 μL)を作成します。
2. このサンプルを4本のチューブに1チューブあたり10 μLずつ分注します。
3. 4つのチューブのうち、1つを95°Cで5分間、1つを70°Cで10分間、1つを室温で30分間放置します。2% SDSサンプルの場合、1μLのサンプルを取り除き、代わりに1μLの20% SDSを加え、チューブを95°Cで5分間放置します。

4. 熱変性したサンプルを2分間1000 x gで遠心します。

5. サンプルをSimple Westernのサイズアッセイで並行して測定し、最適な変性条件を検証します。

IMPは細胞表面と細胞内コンパートメントの境界に局在しています。調製サンプルには細胞内フラクションが含まれるため、IMPが発現している特定の膜を分離する必要があります。次の章では、日常的に膜画分の分離を行い、膜タンパク質分析を行っているネバダ大学の研究を紹介します。

超遠心による分画

細胞質シグナル伝達機構の存在は、IMPの研究を困難にすることがあります。超遠心分離画分は、サイトゾル（細胞質）タンパク質からIMPを分離する方法です⁶。ネバダ州リノにあるネバダ大学リノ校医学部の生理および細胞生物学科のブライアンA.ペリノ博士とアシュリーオルセン博士は、超遠心とSimple WesternプラットフォームWes™でインテグリンを媒介する平滑筋シグナル伝達メカニズムを研究しています。インテグリンは、細胞接着を介したシグナル伝達に関与するIMPのファミリーであり、 α および β ファミリーサブユニットはその組合せ対により、様々な活性化二量体受容体を形成することができます⁴。受容体の組み合わせは、異なる細胞におけるインテグリンサブセットの発現選択性によって制限（制御）されています。例えば、 $\alpha 8 \beta 1$ は平滑筋細胞に主に発現しており、フィブロネクチンや他の細胞外マトリックスタンパク質に結合することが示されています⁵。

ペリノ博士の研究室では、図2に示すように、超遠心で $\beta 1$ を含んだインテグリン二量体をほぼ純粋な膜画分に分離しました。Simple Westernでの超遠心分離画分の分析により、 $\beta 1$ インテグリンはヒト胃底と胃前庭部の平滑筋の両方から得た膜画分（100KP）に発現しており、サイトゾルのタンパク質を含んだ可溶性画分（100KSN）にはほとんど発現していないことを示しています。

同じ画分に $\alpha 8$ インテグリンも発現していることも確認しました。 $\alpha 8$ インテグリンは、ヒトの胃の平滑筋の100KPに発現していますが（図3、レーン1）、骨格筋には発現していませんでした（図3、レーン2）。 $\beta 1$ インテグリンのように、 $\alpha 8$ インテグリンは骨格筋ではなく平滑筋に特異的に発現しています。

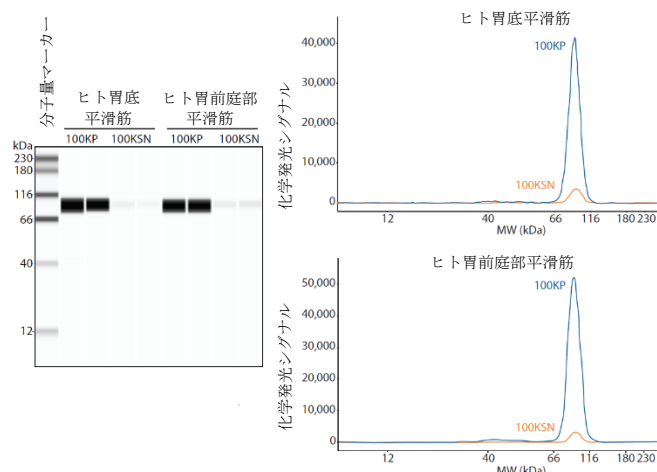


図2. Wesを用いた $\beta 1$ インテグリン発現の特性評価。
100,000 xgで遠心し、ヒト胃底と胃前庭部の平滑筋から超遠心分画を得た。遠心後、細胞膜画分（100KP、青線）と可溶性画分（100KSN、オレンジ線）を精製した。両方の画分は、PNGase F（PNGase F PRIME、Bulldog Bio）で脱グリコシル化し、8 M尿素で処理した後、1レーンあたり1.5 μ gのタンパク質を反復してロードした。抗 $\beta 1$ インテグリン抗体（Genetex、GTX128839、1 : 50）で $\beta 1$ インテグリンを検出した。

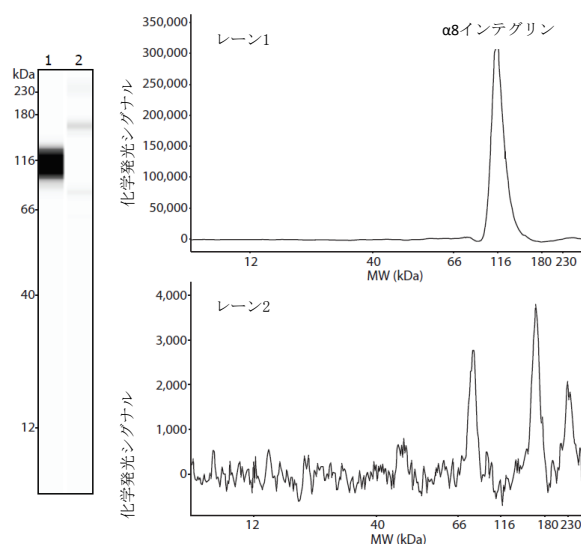


図3. 平滑筋細胞における $\beta 1$ インテグリンの結合タンパク質 $\alpha 8$ インテグリンの分析。
平滑筋（レーン1）および骨格筋（レーン2）の細胞膜画分をPNGase Fで処理後、1レーンあたり1.5 μ gのタンパク質をロードした。抗 $\alpha 8$ インテグリン抗体（Santa Cruz、sc-365798、1 : 50）で $\alpha 8$ インテグリンを検出した。

グリコシル化タンパク質の注意点

従来法のウェスタンブロットのように、タンパク質の特徴により、目的のタンパク質と分離マトリックス間で二次相互作用が起こり、アミノ酸配列による予想分子量と比較して見かけの分子量がシフトすることがあります。分子量シフトを引き起こすことのある一般的なタンパク質修飾の1つは、グリコシル化です。ここでは、目的のタンパク質のグリコシル化状態を検証するために、ペリノ博士らが開発し、使用した脱グリコシル化をするプロトコールについて説明します。

SIMPLE WESTERN用脱グリコシル化プロトコール:

1. 製品インサートに従って、変性条件下でPNGase F PRIME (Bulldog Bio、NZPP050) を使用して脱グリコシル化を行います。 PNGase Fを他から入手することも可能ですが、この場合は別途最適化が必要になる場合があります。
2. 酵素反応を省いたコントロールを含めることを推奨します。
3. コントロールおよび脱グリコシル化したサンプルに5X Master Mixを直接加え、最適化したサンプル調製の条件で変性します。
4. コントロールと脱グリコシル化したサンプルをWes用のプレートにロードします。

注:ペリノ博士のグループは、脱グリコシル化後に8 Mの尿素をサンプルに加えて、追加の (およびオプションの) 変性ステップを行いました。

膜タンパク質調製物のローディングコントロールの推奨

MerckのRoddyとその同僚は、アナセトラピブ投与後の肝臓ミクロソームのLDLr発現をSimple Westernで調べる際に、膜タンパク質ローディングコントロールとしてNa⁺/K⁺ ATPaseを使用しました (以下の論文スポットライトに含まれています)。このローディングコントロールは約110 kDaで検出されますが、さまざまな細胞や組織の細胞膜に発現しています¹⁰。

要旨

IMPは、あらゆるプラットフォームで分析することが本質的に難しいタイプのタンパク質です。適切に可溶化し変性すると、これらのタンパク質をSimple Westernで簡単に検出することができます。インテグリンについて示されているように、更なる細胞内フラクション、脱グリコシル化、もしくは他の処理が有益もしくは必要な場合があります。

以下は、研究者たちが膜タンパク質を扱うという課題に挑戦し克服した出版物の選択リストです...

論文スポットライト: 膜タンパク質

Chronic exposure to short chain fatty acids modulates transport and metabolism of microbiome-derived phenolics in human intestinal cells, E Van Rymentant, L Abrankó, S Tumova, C Grootaert, J Van Camp, G Williamson and A Kerimi, *J Nutr Biochem*, 2017; 39:156–168.

Incubation of cocaine cue reactivity associates with neuroadaptations in the cortical serotonin (5-HT) 5-HT2C receptor (5-HT2CR) system, S Swinford-Jackson, N Anastasio, R Fox, S Stutz and K Cunningham, *Neuroscience*, 2016; 324:50–61.

Overlapping substrate and inhibitor specificity of human and murine ABCG2, J Bakhsheshian, M Hall, R Robey, M Herrmann, J Chen, S Bates and M Gottesman, *Drug Metabolism and Disposition*, 2013; 41(10):1805–1812.

Role of Src family kinases in BDNF-mediated suppression of cocaine-seeking and prevention of cocaine-induced ERK, GluN2A, and GluN2B dephosphorylation in the prelimbic cortex, S Barry and J McGinty, *Neuropsychopharmacology*, 2017; 42(10):1972–1980.

Effects of anacetrapib on plasma lipids, apolipoproteins and PCSK9 in healthy, lean rhesus macaques, T Roddy, D McLaren, Y Chen, D Xie, K Dunn, A Kulick, D Szeto, G Forrest, K Albanese, M Donnelly, C Gai, A Gewain, H Lederman, K Jensen, X Ai, P Vachal, K Akinsanya, M Cleary, S Previs, H Dansky and D Johns, *Eur J Pharmacol*, 2014; 740:410–416.

参考文献

1. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms, E Wallin and G von Heijne, *Protein Science*, 1998; 7:1029–38.
2. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, A Seddon, P Curnow and P Booth, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004; 1666(1-2):105–17.
3. Strategies for the purification of membrane proteins, S Smith, In: D Walls and S Loughran, *Protein Chromatography. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 2017; 681:485–96.
4. Integrins: a family of cell surface receptors, R Hynes, *Cell*, 1987; 48(4):549–54.

5. The human integrin $\alpha 8 \beta 1$ functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin, L Schnapp, N Hatch, D Ramos, I Klimanskaya, D Sheppard and R Pytela, *Journal of Biological Chemistry*, 1995; 270(39):23196–202.
6. Membrane protein solubilization, K Duquesne and J Sturgis, In: I Mus-Veteau, *Heterologous expression of membrane proteins. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 2010; 601:205–17.
7. Mfge8 suppresses airway hyperresponsiveness in asthma by regulating smooth muscle contraction, M Kudo, S Amin, K Soltani, S Sakuma, W McKleroy, T Lee, P Woodruff, J Lee, K Huang, C Chen, M Arjomandi, X Huang and K Atabai, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013; 110(2):660–65.
8. Identification and characterization of protein glycosylation using specific endo- and exoglycosidases, P Magnelli, A Bielik and E Guthrie, *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2011; 58, 3749.
9. Aggregation of model membrane proteins, modulated by hydrophobic mismatch, membrane curvature, and protein class, D Parton, J Klingelhoef and M Sansom, *Biophysical Journal*, 2011; 101(3):691–99.
10. Mechanisms of sodium pump regulation, A Therien and R Blostein, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2000; 279(3):C541–66.