

## Immunoprecipitation (4)

### Introduction

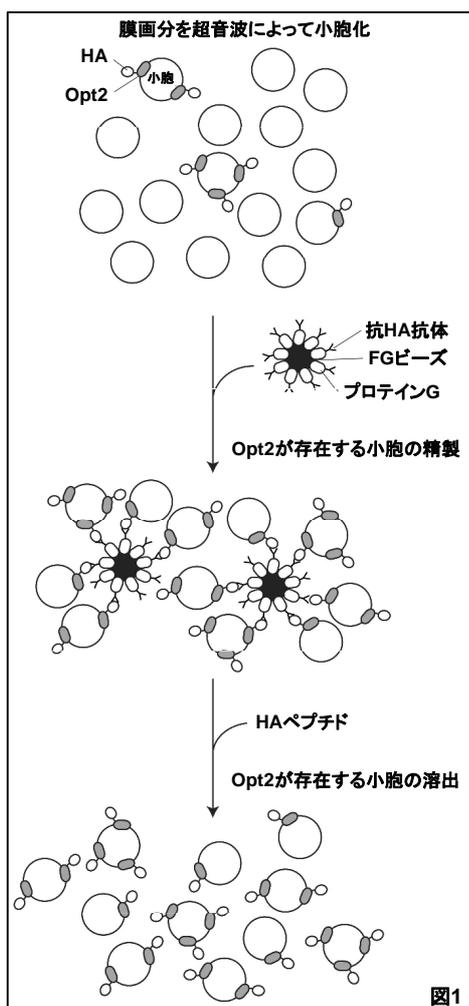
脂質分子は細胞の構成に深く関わる重要な分子であり、最も重要な役割として、細胞や細胞内小器官の‘膜を構成する材料’であることが挙げられます。これらの膜は脂質二重層で形成されており、外側と内側の脂質分子では組成や役割が全く異なることが知られています。この非対称性が常に適切に調節されることにより、膜を通じた物質の輸送、感知などが正常に機能することができず。

脂質非対称性の状態変化は、フリップ・フロップという脂質分子の内外層間の動きによりもたらされ、これにはフリッパーゼ・フロッパーゼというタンパク質が関与しています。最近の研究により、従来のフロッパーゼとは構造等が大きく異なる、新種のフロッパーゼの可能性のあるOpt2というタンパク質が見いだされました。

そこで、Opt2のフロップ活性の有無を検討するため、Opt2の精製と回収を行いました。Opt2は主にゴルジ体の膜に局在する膜タンパク質ですが、膜の小胞化とOpt2へのHAタグの付加により、膜に埋め込まれた状態のままでの免疫沈降による回収が可能となっています。

### Result

ネイティブな状態のOpt2を回収するために、まずはライセートに超音波処理を行ってゴルジ体の膜をいくつもの小胞に分裂させ、Opt2を含む小胞を調製しました。次に、Opt2のN末端に付加したHAタグを利用し、FGビーズ(プロテインG)と抗HA抗体を用いてOpt2を含む小胞の免疫沈降を行いました。溶出では、HAペプチドによる競合法により、非変性的に溶出を行いました。(図1) そして、溶出した小胞の一部をSDS-PAGE、ウエスタンブロットングに供し、精製の状態を評価しました。(図2)



ウエスタンブロットングの結果から、Input画分に対し、非結合画分にはOpt2がほとんど存在せず、溶出画分に多くのOpt2を確認することができます。また、溶出画分への非特異的な小胞の混入(バックグラウンド)も確認するために、Pma1、Dpm1、Pho8、Pep12といった膜タンパク質(それぞれ、細胞膜、小胞体、液胞、エンドソームに局在)についても評価を行ったところ、いずれのタンパク質も溶出画分には存在せず、非結合画分にほとんどが存在することが確認されました。Opt2はエンドソームにもわずかに局在するため、エンドソームの膜が小胞化した際に、そこにOpt2とPep12が混在することもあるため、Pep12はわずかに検出されています。

本実験では、FGビーズの優位性として以下が確認されています。

★他社ビーズではOpt2が回収されなかったが、FGビーズではOpt2を高回収量で回収することができた。

★非特異的な吸着が少なく、Opt2を含む小胞を比較的に高い特異性で回収することができた。

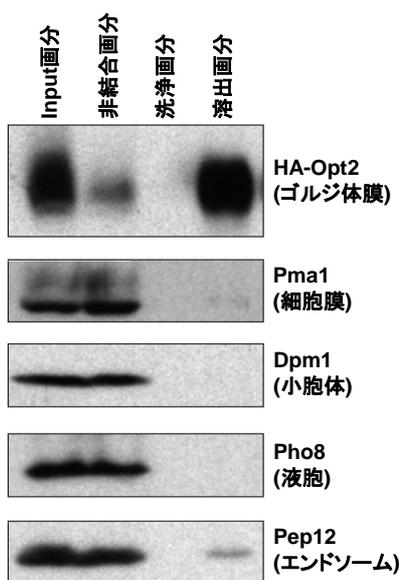


図2

#### 参考文献

S. Yamauchi et al.  
Journal of Cell science, 127, 61 (2015)

## Materials and method

### Materials

1. Protein G beads
2. *S. cerevisiae* cells expressing HA-Opt2
3. PBS(-)
4. Lysis buffer (PBS(-), 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1x protease inhibitor cocktail)
5. Wash buffer (10 mM HEPES-NaOH(pH7.9), 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10%(v/v) glycerol)
6. Anti-HA-tag antibody (TANA2; from MBL)
7. Anti-Pma1 antibody (yN-20; from Santa Cruz)
8. Anti-Dpm1 antibody (5C5A7; from Thermo Fisher)
9. Anti-Pho8 antibody (gift from Prof. Y. Ohsumi (Tokyo Institute of Technology))
10. Anti-Pep12 antibody (2C3G4; from Thermo Fisher)
11. HA peptide buffer (1 mg/mL HA peptide (from MBL) in PBS(-))
12. TBS-T buffer (TBS(-), 0.1% Tween 20)
13. Blocking buffer (5% skim milk in TBS-T buffer)
14. Anti-mouse antibody HRP conjugate (from GE Healthcare)
15. Anti-rabbit antibody HRP conjugate (from GE Healthcare)

### Method 1 (Lysate Preparation)

1. **Yeast culture**  
Culture yeast cells to log phase in YPD medium (1% yeast extract, 2% pepton, 2% glucose).
2. **Harvest and homogenize**  
Collect cells by centrifugation and wash with PBS(-). Resuspend cells with Lysis buffer, and lysis them by vigorously mixing with glass beads for 10 min at 4°C. Transfer the lysate to new tube without taking beads.
3. **Vesiculate membrane**  
Sonicate the lysate (10 sec x 3) to vesiculate the membrane. Centrifuge at 13,000 g for 15 min. Ultracentrifuge the supernatant at 100,000 g for 30 min. Remove the supernatant, resuspend the pellet with Lysis buffer, and sonicate (10 sec x 2) ("Vesiculated membrane").

### Method 2 (Immunoprecipitation)

1. **Beads preparation**  
Transfer 1 mg (50 ul) of beads to a tube. Wash beads with 200 ul ice-cold PBS(-) twice.
2. **Bind Antibody**  
Add antibody (50 ug in 200 ul PBS(-)) to beads. Mix for 30 min at room temperature. Wash beads bound to antibody with Wash buffer 3 times, and store at 4°C in 200 ul Wash buffer.
3. **Immunoprecipitation**  
Add 100 ul beads bound to the antibody to "Vesiculated membrane", and incubate overnight at 4°C with rotation.
4. **Wash**  
Separate beads magnetically from the suspension, and collect a part of supernatant for immunoblot analysis (Unbound fraction). Wash beads 3 times with PBS(-).  
Optional\*: Resuspend beads with HA peptide buffer and stand for 5 min at 4°C. Separate magnetically and collect supernatant.  
\*, In some cases, vesicles containing HA-tagged protein may be released from the beads during this short period of incubation. If so, omit this process.
5. **Elution**  
Resuspend beads with HA peptide buffer and incubate for 8 h at 4°C with rotation. Separate the beads magnetically and collect supernatant (Elution fraction).

### FG beads® information

Product name	Protein G beads
Product number	TAS8848N1173
Storage temperature	2-8°C
Storage buffer	10 mM HEPES(pH7.9), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol
Size of beads	190 nm ± 20 nm
IgG binding capacity	>100 ug mouse IgG /mg of beads

### Methods 3 (Western blotting)

1. Perform SDS-PAGE.
2. Transfer proteins from the gel to a PVDF membrane.
3. Block the membrane with Blocking buffer for 60 min at room temperature.
4. Dilute the each primary antibody with the Blocking buffer. (Anti-HA; 1/2,000, Anti-Pma1; 1/1,000, Anti-Dpm1; 1/500, Anti-Pho8; 1/1,000, Anti-Pep12; 1/1,000)
5. Incubate the membrane for 60 min at room temperature.
6. Wash the membrane with TBS-T buffer 3 times.
7. Diluted the Secondary antibody with TBS-T buffer to 1/7,500, and incubate the membrane for 60 min at room temperature.
8. Wash the membrane with TBS-T buffer 3 times.
9. Detect with a chemiluminescence substrate.

### データ提供

北海道大学大学院薬学研究院 創薬科学部門 生体機能科学分野 小原圭介先生

生体膜の脂質は、二重層間でも、あるいは同じ平面上でも不均一に分布しています。また、オルガネラ間でも脂質組成が異なり、各オルガネラを特徴付ける脂質も存在します。多細胞生物では、組織間でも脂質組成が大きく異なる場合もあります。この様に、様々な階層で脂質の不均一性が存在しています。その不均一性が形成・調節される仕組み、生理機能などにはまだまだ未知の部分が残されています。

脂質分子は、タンパク質と異なって遺伝子に直接コードされていないため、実験上の制約も多々あり、研究には常に困難がつきまといまいます。ここで紹介した実験系も、まだまだ道半ばな“半精製系”ですが、山内さんと内堀君という学生さんの頑張りによって、一歩前進することができました。