

Immunoprecipitation (3)

Introduction

細胞内のタンパク質の分解には、UPS(ユビキチン-プロテアソームシステム)などのシステムが機能しており、多数のタンパク質が複雑に関与していることが知られています。これまでに、UPSのメカニズム解明に向けたプロテオミクス解析が精力的に行われており、多くの成果が出てきています。

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質の加水分解を行う巨大な酵素複合体であり、プロテアソームのサブユニットであるRpt2は、出芽酵母を含めた多くの真核生物でN-ミリスチル化修飾を受けていることが知られています。最近の研究により、Rpt2のN-ミリスチル化はプロテアソームの核と細胞質での局在をダイナミックに変化させ、それが細胞内局所でのUPSに複雑に影響することが明らかになってきました。

Rpt2のN-ミリスチル化がUPSに及ぼす現象を調べるため、出芽酵母プロテアソームのRpt2において、N-ミリスチル化部位の変異有り(Rpt2-G2A、Rpt2-G2Δ) および変異無し(Rpt2-WT)の株を用い、質量分析法による網羅的なユビキチンプロテオーム解析を行ったところ、細胞質のミスフォールドタンパク質の核内への輸送に関わるHsp70ファミリー、Ssa1とSse1では、変異株において有意にユビキチン化増加を示すデータが得られました。そこで、野生株と2種の変異株のSsa1のユビキチン化について、Anti-Ssa1抗体とAnti-ubiquitin抗体によるIP-WBでの評価を行いました。

Result

0.25ugのAnti-Ssa1抗体と出芽酵母ライセートを反応させ、そこに25ulの各社プロテインGビーズを加えて抗原-抗体コンプレックスの回収を行い、SDS-PAGE後にウエスタンブロットングを行いました。

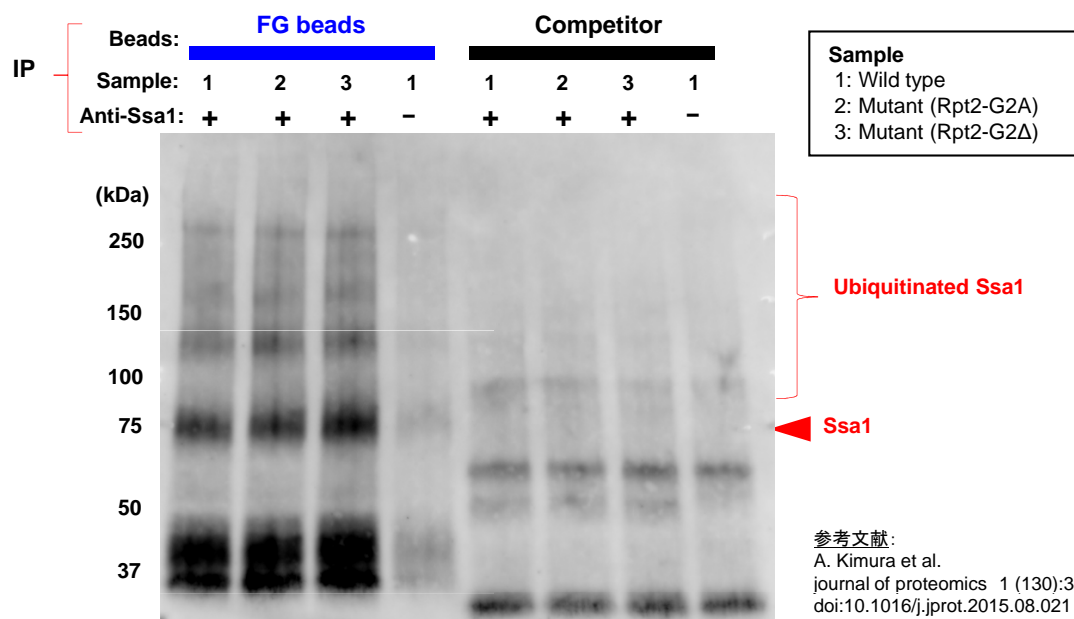
ウエスタンブロットングの結果から、質量分析での結果と同様に、野生株と比べて2種両方の変異株において、Ssa1のユビキチン化が上昇していることが確認できました。また、3種の酵母株において、質量分析とウエスタンブロットングによりライセート中に含まれるSsa1の量を調べたところ、3種間において有意な差の無いことが確認されています。

このことから、Rpt2のN-ミリスチル化の阻害は、Ssa1のユビキチン化を上昇させる効果があることが確認されました。

また、FGビーズと他社ビーズについて、以下の点が確認できます。

★他社ビーズではSsa1およびユビキチン化Ssa1が回収できていないが、FGビーズでは高回収量で回収できている。

★他社では(+)画分と(-)画分が同じ構成であるが、FGビーズでは(+)と(-)のS/N比が高い。



Western blotting : Anti-ubiquitin

参考文献:
A. Kimura et al.
journal of proteomics 1 (130):33-41 (2016)
doi:10.1016/j.jprot.2015.08.021

Materials and method

Materials

1. Protein G beads
2. *S.cerevisiae* lysate
3. Lysis buffer (20mM HEPES(pH8.0) , 9M Urea)
4. Protease inhibitor cocktail (from Nacalai Tesque)
5. PR-619 (Life Technologies)
6. Triton buffer (1% Triton-X100, 20mM Tris-HCl(pH7.4), 150mM NaCl, 2mM EDTA)
7. Anti-Ssa1 antibody (from Santa Cruz)
8. SDS sample buffer
9. Anti-mono- and polyubiquitinated conjugates antibody (FK2H) HRP-conjugate (from Enzo Life Sciences)
10. PBS-T buffer (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.5mM KH₂PO₄, 0.1% Tween 20)
11. Blocking buffer (5% skim milk in PBS-T buffer)

FG beads® information

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

Method 1 (Lysate Preparation)

1. Yeast culture

Culture yeast for 3 days at 30°C in synthetic complete medium lacking leucine (SC-Leu).

2. Harvest and homogenize

Centrifuge at 3000 × g for 10min, wash twice in sterile water, and resuspend in lysis buffer with protease inhibitor cocktail and 50uM PR-619.
Vortex with glass beads and centrifuge to obtain lysate.

Method 2 (Immunoprecipitation)

1. Lysate dilution

Add 9 volume of Triton buffer to lysate.

2. Reaction

Incubate lysate containing 125ug of total protein and 0.25ug of Anti-Ssa1 antibody at room temperature for 60min on microtube mixer.

3. Collect antigen-antibody complex

Add 25ul of Protein G beads, incubate at room temperature for 60min on microtube mixer.

4. Wash

Separate magnetically and remove supernatant.
Wash beads with Triton buffer 5 times.
Separate magnetically and remove supernatant.

5. Elution

Add SDS sample buffer and resuspend beads.
Incubate for 10min at 70°C and remove the beads.

Methods 3 (Western blotting)

1. Perform SDS-PAGE.
2. Transfer the protein from the gel to a PVDF membrane using Trans-Blot® Turbo™.
3. Block the membrane with the Blocking buffer for 120min at room temperature.
4. Dilute the Anti-ubiquitine antibody with the Blocking buffer to 1/1000.
5. Incubate the membrane for 120min at room temperature.
6. Wash the membrane with PBS-T buffer 3 times.
7. Detect with a chemiluminescence substrate.

データ提供

横浜市立大学 先端医科学研究センター 木村鮎子先生

私たちの研究室では、タンパク質の機能をダイナミックに制御する、リン酸化・アセチル化・ユビキチン化などの翻訳後修飾について、質量分析や電気泳動を用いた網羅的な検出や、これらの修飾の機能・疾患との関連を調べる研究を行っています。私は、多数のタンパク質サブユニットから構成され、翻訳後修飾による精密な機能制御を受けると考えられるプロテアソームの翻訳後修飾に着目し、その中でも唯一の脂質修飾であり、真核生物で広く保存されていることから重要な機能をもつことが予測される、N-ミリスチル化の研究を進めています。これまでに、本修飾部位に変異導入した酵母を用いた研究により、N-ミリスチル化がプロテアソームの細胞内局在を制御を介して、核や細胞質内でのタンパク質分解を制御することが明らかになっています。今後、ヒト培養細胞などを用いて、さらに本修飾の生理機能解明を進めていきたいと考えています。