

Identification of metallopeptidases from germ cell conditioned medium using pH gradient 2-D electrophoresis and ECL immunodetection

二次元電気泳動およびECL Western Blottingを用いた培養生殖細胞上清からの metallopeptidaseの同定

本報では、精細胞由来のタンパク質をサンプルとして二次元電気泳動を行い、その後ECLによるウェスタンブロットティングによって特定のタンパク質スポットを同定した二次元ウェスタンブロットティングをご紹介します。二次元電気泳動後、メンブレンにタンパク質を転写し、metallopeptidaseに対する抗体を用いてウェスタンブロットティングを行いました。これらの解析によって、N-arginine dibasic convertase、aminopeptidase B、thimet oligopeptidaseを含む既知の生殖細胞由来 metallopeptidaseを同定することができました。

はじめに

この10年間、齧歯類の減数分裂や精子形成の特定のステージで発現するタンパク質を二次元電気泳動により比較解析する研究がいくつか行われてきましたが（文献1~4参照）、これらの研究は二次元電気泳動の結果の再現性の低さやゲルイメージを解析する有用なソフトウェアがないことから制限されていました。しかし、近年二次元電気泳動やゲルイメージ解析ソフトウェアの改良によって、複雑なタンパク質の発現パターンも容易に比較解析できるようになりました。

二次元電気泳動を高感度の銀染色や金コロイド染色、ECLウェスタンブロットティングと組み合わせることで、培養生殖細胞の培養上清（以下、GCCM）の分泌タンパク質としてN-arginine dibasic (NRD) convertase (narlysin, EC 3.4.24.61)、aminopeptidase B (ApB, EC 3.4.11.6)、thimet oligopeptidase (TOP, EC 3.4.24.15) を同定することが出来ました。これらのタンパク質は既に生殖細胞由来のタンパク質として同定されています。

使用した製品

ECL Western Blotting Detection System	RPN2108
Immobiline Drystrip 3-10NL(18cm)	17-1235-01
Excel Gel SDS Gradient XL 12-14	17-1236-01
Multiphor II Electrophoresis Unit	18-1018-06
Novablot kit	18-1016-86
ECL Western Blotting Molecular Weight Marker	RPN2107
AuroDye Forte Kit	RPN490
Hybond-P	問合せ
Hyperfilm	問合せ

実験方法

培養生殖細胞からの培養上清の調製

Pineauらの方法に従って、SDラット成体より精巣を単離し、文献5の変法（精細管をトリプシン処理するところを物理的に破砕）によりGCCMを調製し濃縮しました。

一次元目電気泳動：等電点電気泳動

濃縮したGCCMから調製した50 µgのタンパク質を 400 µlのバッファー（8 M 尿素、0.5 % Triton X-100、0.2 % DTT、0.5 % (v/v) Pharmalyte 3-10、Orange G）に溶解しました。次に、サンプルをImmobiline DryStrip 3-10 NL（18 cm）に一晩膨潤添加させました。等電点電気泳動には恒温循環装置 MultiTemp III、パワーサプライEPS 3500XLと組み合わせた Multiphor IIを用いました。泳動条件は表7-1を参照してください。

二次元目電気泳動：SDS-PAGE

二次元電気泳動の前に、一次元目電気泳動の終了した Immobiline DryStripを6M尿素、2 % SDS、10 %グリセロール、0.5 % DTT、50 mM Tris-HC (pH 6.8) を含むバッファーで10分間平衡化させます。次に、DryStripを6M尿素、2% SDS、10%グリセロール、4.5%ヨードアセトアミド、50 mM Tris-HCl(pH 6.8)を含むバッファーで10分間平衡化させます。二次元目SDS-PAGEには、ExcelGel SDS Gradient XL 12-14を用い、マーカーとしてECL Western Blotting Molecular Weight Markerを泳動しました。泳動条件は表7-1を参照してください。

表7-1. 電気泳動条件

Step	Voltage (V)	Current (mA)	Power (W)	Time
IEF				
1	500	1	5	5 h
2	500	1	5	5 h
3	3,500	1	5	9.5 h
SDS-PAGE				
1	1,000	20	40	45 min
2	1,000	40	40	5 min
3	1,000	40	40	2 h 40 min

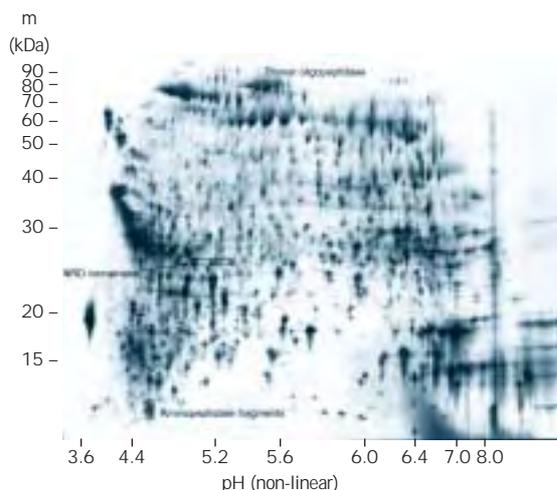


図7-1. 銀染色を行ったGCCMの二次元電気泳動

GCCMから回収したタンパク質 50 µgをIPG DryStrip 3-10NL (一次元目電気泳動) およびExcelGel SDS gradient 12-14% (二次元目電気泳動) により二次元電気泳動を行いました。GC特異的に発現している metallopeptidaseのウェスタンブロットング検出にはECLを用いました。

銀染色と金コロイド染色

銀染色は文献6の方法に従って行いました。泳動したタンパク質をPVDF膜に転写し、AuroDye Forte Kitを用いて、金コロイド染色を行いました。

タンパク質のメンブレンへの転写

PVDF膜へのタンパク質の転写にはセミドライ方式のNovablotを用い、ゲル1 cm²あたり 0.8 mAで1時間行いました。転写後すぐにウェスタンブロットングを行いました。

ECLを用いたWestern blotting

ECLを用いたウェスタンブロットングで少量のサンプルを高感度検出できるように最初に至適条件を検討しました。抗体の濃度はSDS-PAGE・ウェスタンブロットング (1Dウェスタンブロットング) により検討しました。

メンブレンへの転写後、3% BSA (deglycosylated) を含むTBS (50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl) で1時間 (室温) ブロッキングし、続いて一晩 (4℃) ブロッキン

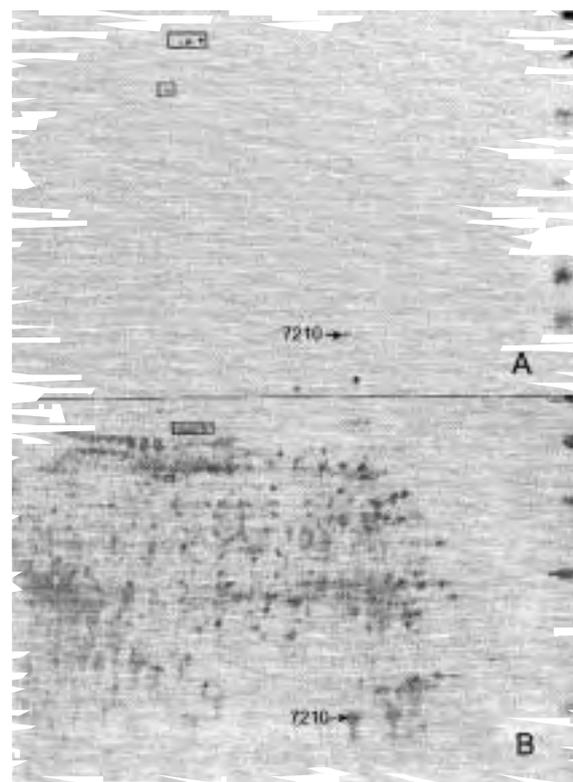


図7-2. ECLウェスタンブロットング (A) ならびに金コロイド染色 (B) を用いて検出したGCCM中のthimet oligopeptidaseのスポット

実験は図7-1と同様の方法で行い、ウェスタンブロットングによって検出されたタンパク質のスポットを長方形の枠で囲っています。Standard Spot Number 7210のタンパク質スポットは以前にN末端アミノ酸シークエンシングによってtesticular phosphatidylethanolamine binding proteinと同一タンパク質のフラグメントです。右側のレーンにはECL Western Blotting Molecular Weight Markerを泳動しています。サイズは上から、97,400、68,000、46,000、31,000、20,100、14,400 Daになります。

グを行いました。ブロッキング後、0.1%(v/v) Tween 20 / TBSで震とうしながら洗浄し、一次抗体 (1% BSA (deglycosylated) を含む0.1%(v/v) Tween 20 / TBSで希釈) とインキュベーションしました。実験に用いた全ての1次抗体 (ウサギ・ポリクローナル抗体) は1/8,000に希釈しました。インキュベーション後メンブレンを洗浄して2次抗体 (HRP 標識抗ウサギ抗体、1/3,000希釈) と反応させました。ECL反応はプロトコールに従い、Hyperfilmへ感光させました。

表7-2. ECLウェスタンブロットングにより検出されたmetallopeptidaseの特性

タンパク質	Standard Spot Number	m (kDa)	pI
thimet oligopeptidase	4907-4913-5915-5916-5917	74.4-75.2	5.46-5.59
NRD convertase	3402-3405-3417-3418-3422-3423-4402	23.5-25.4	5.05-5.31
aminopeptidase B	1004-1008-1010-1109	11.3-11.9	4.60-4.62

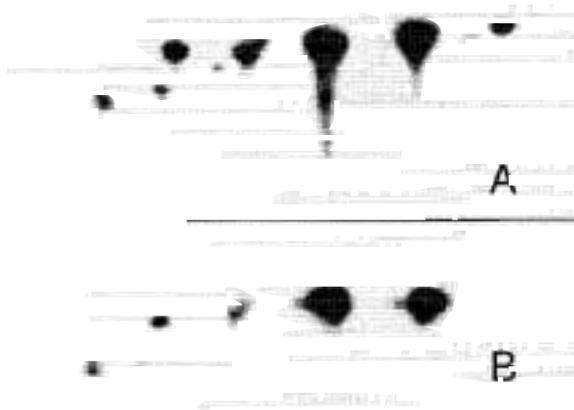


図7-3. ストリッピングによるウェスタンブロットティングのシグナルの影響
NRD convertaseをウェスタンブロットティングにより検出しました。一次抗体には抗NRD convertase抗体、二次抗体にはHRP標識抗ウサギ抗体を用いました(A)。メンブレンを本文中の方法によってストリッピングし、thimet oligopeptidaseのウェスタンブロットティング検出を行った後に再度メンブレンをストリッピングし、NRD convertaseの検出を行いました(B)。

リプロービング

メンブレンから抗体をストリッピングしてリプロービング実験を行うために、100 mM β メルカプトエタノール / 2%(w/v) SDS / 62.5 mM Tris-HCl(pH 6.7)溶液にメンブレンを入れて、50℃で30分震とうしながら洗浄しました。その後、0.1%(v/v) Tween 20 / TBS で10分、2回洗浄し、再度3% BSA (deglycosylated) を含むTBS (50mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl) で1時間 (室温) ブロッキングを行いました。この後の操作は最初に行った抗体反応と同様です。

結果と考察

GCCM中のmetallopeptidaseは、金コロイド染色、ECL検出とのパターン比較によって銀染色したゲル中に検出するこ

とができました(図7-1)。図7-2は図7-1の銀染色ゲルで見られたthimet oligopeptidaseを示しています。また、金コロイド染色の操作にかかわらず、ECLによって検出されたスポットの濃さは同じだったことから、金コロイド染色はECLの検出に影響しないことも分かりました。表7-2にウェスタンブロットティングによって検出できたタンパク質をまとめます。

メンブレンをストリッピングしてもスポットの濃さに影響がでなかったことは(図7-3)、解析するサンプルが貴重な場合や量が限られている場合にきわめて重要です。このようにプロットしたメンブレンを金コロイド染色してもシグナルの濃さが変わらなかったことからメンブレンを再利用できることが分かりましたが、ECL Western Blotting Molecular Weight Markerのシグナルは弱くなりました。これはおそらくタンパク質とビオチンの結合が熱によって壊れたためと考えられます。

結論

ECLを用いた二次元ウェスタンブロットティングによって、培養精細胞から分泌されたさまざまなmetallopeptidaseの検出を行いました。複数の抗体でメンブレンをリプロービングできることはプロテオーム解析、とりわけサンプルが限られている場合やスポットの同定が失敗できない場合などには有用です。一次抗体と二次抗体を完全に除去することによって同じメンブレンから複数のタンパク質を連続して同定することができます。

参考文献

1. Boitani, C. *et al.*, *Cell Differentiation* **9**, 41-49 (1980).
2. Kramer, J. M. and Erickson, R. P., *J. Reprod. Fert.* **64**, 139-144 (1982).
3. Jutte, N. H. P. M. *et al.*, *J. Exp. Zool.* **233**, 285-290 (1985).
4. O' Brien, D. A., *Biol. Reprod.* **37**, 147-157 (1987).
5. Pineau, C. *et al.*, *J. Androl.* **14**, 87-98 (1993).
6. Heukeshoven, J. and Dernick, R., *Electrophoresis* **9**, 28-32 (1988).