

ハウスキーピングの改善: Jessでタンパク質ノーマライゼーション

イントロダクション

ノーマライゼーション（標準化）が適切でないとウエスタンブロットでの定量的評価が難しくなることがあります。疾患状態や加える外部刺激の異なるサンプルや、複雑さの異なる生物試料間でタンパク質発現を比較分析する研究者にとって、その差を再現性よく適切に測定できるようなアプローチは非常に重要です。

ローディングコントロールとしても知られている「ハウスキーピング」タンパク質（Housekeeping proteins、HKP）は、タンパク質の標準化（ノーマライゼーション）およびウエスタンブロットの技術的なバラツキを排除するためによく使用されています。このアプローチでは、標的タンパク質の相対的な発現量をローディングコントロールの発現量と比較しますが、そのローディングコントロールは標的タンパク質の発現量に影響を受けず、またその発現量が不変でかつ恒常的であるようなタンパク質である必要があり、特にBアクチン、GAPDH、βチューブリンなどがよく利用されています。しかしながら、HKPの発現量も実験的な処理や培養条件、ストレス、細胞周期、増殖による状態、年齢や性別、病理学的な状態などさまざまな要因

の影響を受ける可能性があるため、HKPでの標準化は信頼性が低いとする論文がますます増えていきます¹⁻³。従ってノーマライゼーションの目的で、サンプル間でHKPが同程度発現しているとの仮定は、標的ターゲットについて不正確な仮説や結論を導き出すことになりかねません。

ローディングコントロールでのノーマライゼーションに比べ、試料中に存在する総タンパク質量を用いて標的タンパク質の存在量を標準化する方法は、技術的なエラーを排除し、タンパク質発現の変化率を観察するためのより正確な方法です。この方法では、市販の染色法あるいは非染色法の総タンパク質測定キットを用いて、抗体の良し悪しに拘わらず、ローディングコントロールの発現量の違いを最小限に抑えます。Jessに搭載された簡単実行機能を用いると、Simple Westernサイズアッセイでノーマライゼーションを簡単に行うことができます。このテクニカルノートでは、順を追ってこのプロトコルを説明し、Jessでのタンパク質のノーマライゼーションが実際にHKPの方法より優れていることを示します。

Jessでどのようにタンパク質ノーマライゼーションをするのか？

Jessなら一定量のタンパク質をロードしているかどうか簡単に確認することができます。独自の“in-capillary”タンパク質ノーマライゼーション試薬をアッセイプレートにロードするだけで、残りの工程は全てJessが行います。イムノアッセイと同じように、蛍光試薬は一貫および二級アミンとの相互作用を介して同じキャピラリー内で固

定されたタンパク質に結合します。結果は、即座にサンプルに一貫したタンパク質量がロードされているか確認して、実験のセットアップや操作上のエラーを特定することができます。そして効果的に標的タンパク質の発現を標準化するので、信頼性の高い正確で一貫したデータを得ることができます。



材料

このテクニカルノートで使用した製品を表1に示します。

製品	供給業者	カタログ番号
Protein Normalization Module	ProteinSimple	DM-TP02
Separation Module	ProteinSimple	SM-W004
β -Actin Mouse Monoclonal Antibody	R&D Systems	MAB8929
14-3-3 gamma Mouse Monoclonal Antibody	Novus Biologicals	NB100-406
Anti-Mouse Secondary NIR Antibody	ProteinSimple	043-821
Jurkat Cell Lysate	Santa Cruz Biotechnology	sc-24788
ヒトホール組織ライセート		
肝臓	Novus Biologicals	NB820-59232
肺	Novus Biologicals	NB820-59237
腎臓	Novus Biologicals	NB820-59231
大腸	Novus Biologicals	NB820-59205
胸	Novus Biologicals	NB820-59203
扁桃腺	Novus Biologicals	NB820-59272
脳	Novus Biologicals	NB820-59177

表1. このテクニカルノートで使用した製品

調製方法

2.5 mg / mLのJurkat細胞ライセートと5 mg / mLのヒトのホールセル組織ライセートを1X ProteinSimple Sample Bufferで希釈し、[Jess Separation Module](#) の製品説明書に従い、40 mM DTTと蛍光スタンダードを添加しました。Jurkat細胞ライセートの最終濃度は0.5 mg/mLから2.0 mg/mLの範囲で、ヒトホール組織ライセートは全て0.3 mg/mLでした。全てのサンプルは95°Cで5分間、還元剤存在下で熱変性しました。

14-3-3 gamma primary antibody (1 mg/mL)をAntibody Diluent 2で1:100倍希釈しました。凍結乾燥済み β -actin primary antibodyを0.5 mLの滅菌済みPBSで溶かし、Antibody Diluent 2で1:50倍に希釈しました。[Protein Normalization Module](#) の製品インサートの表に従い、Protein Normalization Reagentを希釈し準備しました。

ワークフローの概要

多くのラボでは、ウェスタンブロットを行う前にサンプル中の総タンパク質量の測定を行わずに、高発現量のタンパク質を過剰に流してしまうことが多く見られますが、この場合特にHKPを用いたノーマライゼーションでは不正確になります。シグナル強度は流した抗原量と強い相関関係があるため、適切な量のタンパク質をロードしている時のみ、信頼性の高い標準化したデータを得ることができます。これはノーマライゼーションのアッセイ条件がこの範囲内に収まるように、標的タンパク質と総タンパク質ノーマライゼーション用スタンダードに対する検出のリニア範囲を確立することによって行われます。

JessのProtein Normalization(PN)Moduleを使用してタンパク質の発現量を正確に標準化するには、まずPN Reagentと標的タンパク質の両方の発現量とシグナル強度の関係がリニア範囲に収まるような濃度を決め、ロードするサンプル量を決定します。言い換えると、イムノアッセイで検出する標的タンパク質とPN試薬の両方を様々な濃度でそれらに対応するシグナルを測定し、最終的に2つのシグナルを同時にプロットします。これで標的タンパク質とPN Reagentの検量線で両方がリニアになる範囲を選ぶことで、アッセイで使用する最適な濃度を決定します。ProteinSimpleでは、2.0 mg / mLから0.05 mg / mLのライセート濃度の検量線を推奨しています。図1では、PN試薬と14-3-3 γ (無数の細胞シグナル伝達経路に影響を与えるタンパク質ファミリーの一つ) の希釈系列のシグナル検出結果を示しています。

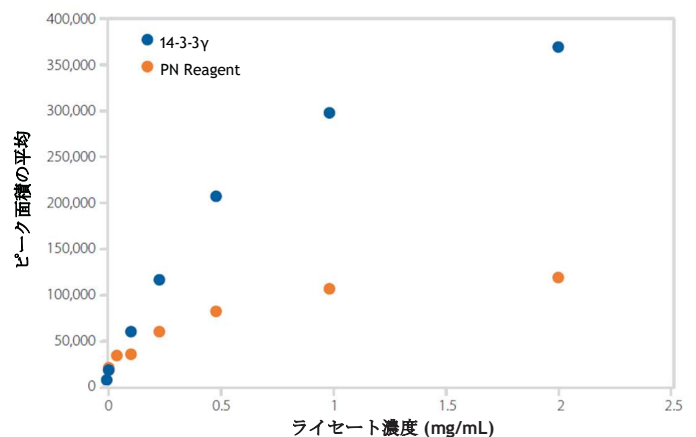


図1.一連のライセート濃度 (x軸) に対するPN Reagentおよび14-3-3 γ (ピクセル面積、y軸) のシグナル検出を示す滴定結果。

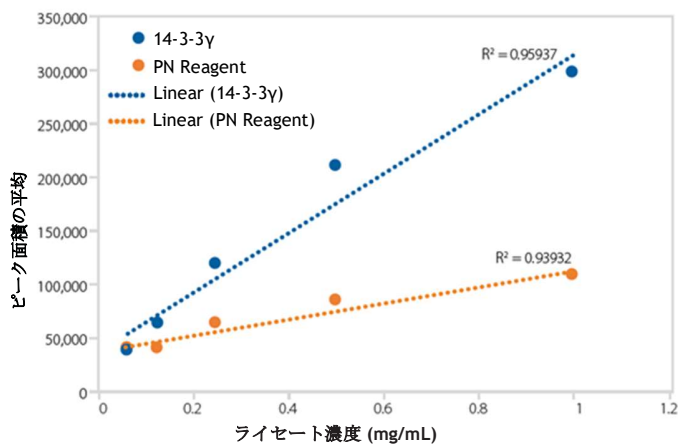


図2. アッセイに使用するライセート濃度は、標的タンパク質とPN Reagentの両方のシグナルが直線範囲内に収まるようにします。

図2では、図1の検量データをExcelで線形回帰分析を行い、これらの濃度範囲内で標的タンパク質とPN Reagentの発現の間に強い関係があることを示しています (14-3-3γ, $R^2 = 0.9594$, PN Reagent, $R^2=0.9393$)。これで両方が直線範囲内にあるライセートの濃度を、JessのSimple Westernアッセイで用いることができます。例えばこの場合、0.06 mg / mLから1 mg / mLの量を選択することができますが、この範囲内の0.3 mg / mL ~ 0.5 mg / mLを用いて始めるのが良いと思われます。

これで正しい濃度のライセートをロードして、最適なアッセイを行う準備が整いました! ウェルに正しい量の試薬とサンプルを分注する方法は、Protein Normalization Module 製品の製品説明書にある「Pipette your plate」の図に従います。次に「Start Jess」の手順に従って、Compass for Simple Westernソフトウェアでアッセイをロードして開始します。

測定が終了したら、標的タンパク質の発現量を各キャピラリーに含まれる総タンパク質量で標準化する準備ができます。Compass for Simple Westernでは、ユーザーは何もしなくても、標的の生ピーク面積値 (図3、[Area] 列) を標準化したピーク面積 (図3、[Corr. Area]列) に自動

的に変換し、面倒な計算をする必要がありません。

Compass for Simple Westernでレーンビューを用いると、各キャピラリー内の総タンパク質がレーンビューで表示され、従来法の総タンパク質をメンブレン染色で観察するようなわかりやすい画像が表示されます (図4、左)。ドットオーバーレイ機能を使って、さらに標準化したデータを即座に定量的に視覚化することができます (図4、中央および右)。Simple Westernアッセイ結果の分析に関する詳細なガイダンスについては、Compass for Simple Western [Quick Reference Guide](#) を参照してください。

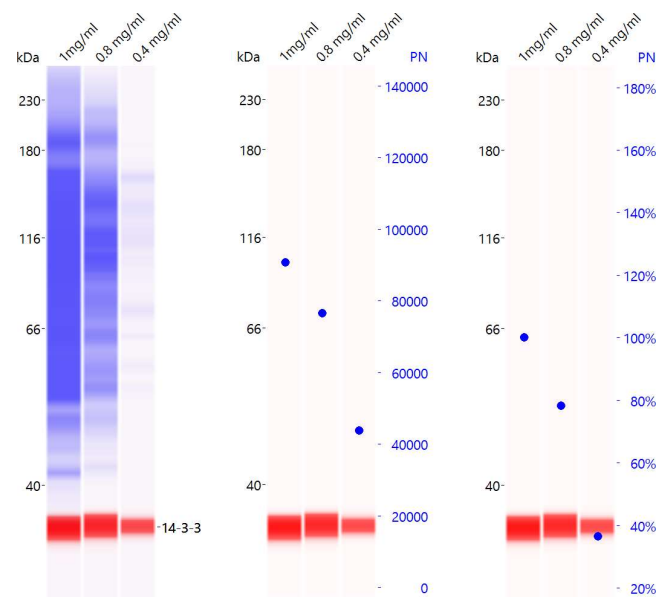


図4. Compass for Simple WesternソフトウェアとJessでのタンパク質ノーマライゼーションのレーンビュー。可視化のための3つの選択肢が示されています: 従来の総タンパク質「メンブレン染色」(左); 各「レーン」で測定された総タンパク質面積生データのドットオーバーレイ (中央); レファレンス「レーン」もしくは「キャピラリー」に対する総タンパク質面積百分率のドットオーバーレイ (右)。1 mg / mLサンプルに対する総タンパク質面積百分率を算出しました。

Sample	Primary	Secondary	Cap	Peak	Name	Position	MW (kDa)	Height	Area	% Area	Corr. Area	Width	S/N	Baseline	Channel
0.8 mg/ml	14-3-3	Anti-Mo...	15	1	14-3-3	330	35	21797.2	231044	100.0	236682.0	10.0	832.8	295.1	NIR
0.6 mg/ml	14-3-3	Anti-Mo...	16	1	14-3-3	331	36	19807.8	195776	100.0	238724.3	9.3	958.6	275.0	NIR
0.4 mg/ml	14-3-3	Anti-Mo...	17	1	14-3-3	332	35	15598.2	142643	100.0	255462.8	8.6	633.1	280.9	NIR
1mg/ml	14-3-3	Anti-Mo...	18	1	14-3-3	331	35	24625.7	257740	100.0	242451.3	9.8	1368.7	292.7	NIR
0.8 mg/ml	14-3-3	Anti-Mo...	19	1	14-3-3	332	35	23805.1	242293	100.0	254687.8	9.6	891.0	298.7	NIR
0.6 mg/ml	14-3-3	Anti-Mo...	20	1	14-3-3	333	36	21008.5	194730	100.0	263617.6	8.7	1011.5	332.4	NIR

図3. Compass for Simple WesternソフトウェアのPeaks Table。Areaカラム (左の円内) に生のピーク面積値を、Corr. Area column (右の円内) にノーマライズ (標準化) したピーク面積値を示しています。

図3に示すピークテーブルをエクスポートし、さらに解析を行うこともできます。例えば図5では、Excelを使用してエクスポートしたデータを棒グラフで表しました。さまざまな濃度のJurkat細胞ライセート内の14-3-3 γ タンパク質量（青棒）とJurkat細胞ライセート量で標準化した14-3-3 γ タンパク質の発現量（オレンジ棒）を、ピーク面積として示しています。各サンプル濃度で6回の反復試験を行い、Simple Westernアッセイ内スペックである20%をかなり下回るアッセイ内CV（変動係数）値を得られ、これはJessでタンパク質ノーマライゼーションを行うことが有効であることを証明しています。

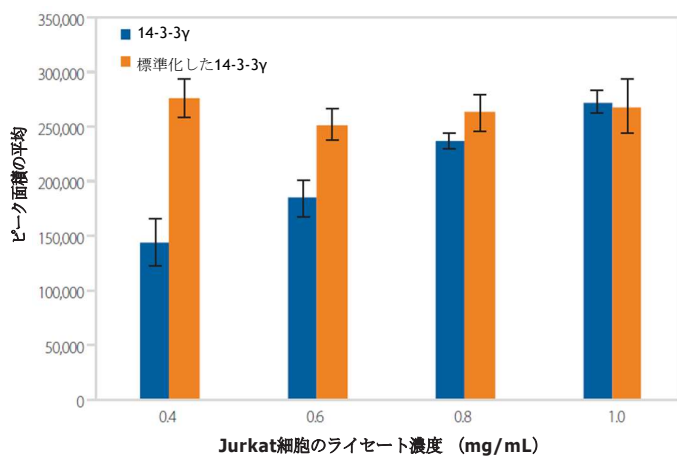


図5. 様々な濃度のJurkat細胞ライセート内の14-3-3 γ タンパク質発現量（青棒）および標準化した発現量（オレンジ棒）を示す比較データ。標的タンパク質はJessのNIRチャンネルで検出しました。

Jessでの総タンパク質と β -アクチンHKPのノーマライゼーションの比較

標的タンパク質発現の定量化は、とりわけ新規疾患バイオマーカーの同定、様々な標的療法の開発、および大規模タンパク質発現プロファイルの比較に必要不可欠です。存在量の変化をモニターするのに安定したレファレンスがないと、ウェスタンブロットのデータから正確な結論を導くことはできません。 β -アクチンもそのような場合によく使われるレファレンスですが、利用可能な疾患モデルならびにそれらに対応するコントロールにおいて、様々な組織における β -アクチンの異なる発現量が観察され、また発表されています³。

この点をより詳細に説明するために、0.3 mg/ml (n = 4) の6つの異なるヒト組織における β -アクチンの発現プロファイルを評価し、その結果とJessを用いたProteinSimple PN Reagent染色の結果を比較しました（図6）。実際に様々な組織間で β -アクチンの発現量に大きな変動がみられましたが、PN試薬で測定した総タンパク質量は同等のままでした。これらのデータからJessを用いた総タンパク質ノーマライゼーションは、 β -アクチンのようなHKPによるノーマライゼーションに比べて、標的タンパク質の発現変化を標準化し定量化するために、はるかに安定で信頼性が高いという結論が得られました。タンパク質の総量を用いてサンプル中の標的タンパク質の発現データを標準化することで、Simple Westernの実験とデータが正当で健全であるということを確認するだけでなく、データに関する信頼性がより高いものとなります。

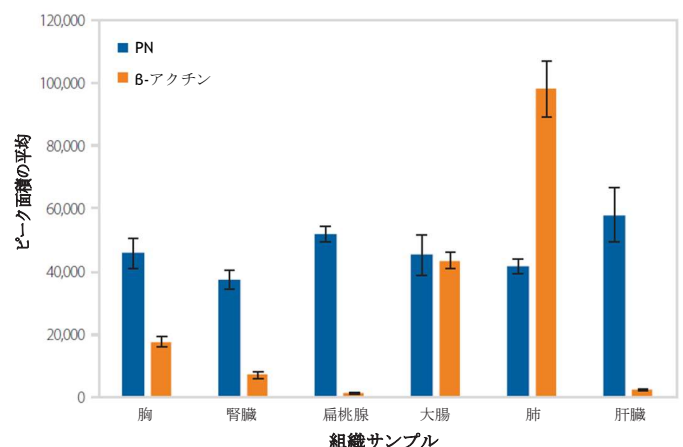


図6. Jessを用いて試験したヒトの6種類の組織から準備したホール組織ライセート (0.3 mg / mL) 内の総タンパク質データ（青棒）および β -アクチンの発現量（オレンジ棒）の比較。



図 7. 総タンパク質アッセイと標的タンパク質の標準化のためにSimple Western assayを開発および最適化するためのワークフロー。

まとめ

このテクニカルノートでは、Jessの簡単なワークフローを使ってどのように正確に正しくタンパク質ノーマライゼーションを行うか、そしてなぜ頻繁に使われているHKPを用いたタンパク質ノーマライゼーションが推奨されないかについて説明しました。推奨手順は図7に要約されています。

参考文献

1. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies, RE Ferguson, HP Carroll, A Harris, ER Maher, Selby PJ and RE Banks, [Proteomics, 2005; 5:566-71](#).
2. Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis, A Dittmer and J Dittmer, [Electrophoresis, 2006; 14:2844-55](#).
3. Total Protein Analysis as a Reliable Loading Control for Quantitative Fluorescent Western Blotting, SL Eaton, SL Roche, M Llaverro Hurtado, KJ Oldknow, C Farquharson, TH Gillingwater and TM Wishart, [PLoS One, 2013; 8:e72457](#).