

全身性自己免疫疾患（膠原病）の新規診断マーカーの開発を目的とした自己抗原 U1-68K の疾患特異的低リン酸化体の簡便な定量法の検討

永井 宏平¹, 齊藤 壱騎¹, 有戸 光美², 黒川 真奈絵², 加藤 智啓²

要旨

全身性エリテマトーデス (SLE) や混合性結合組織病 (MCTD) などの自己免疫疾患患者の末梢血リンパ球では、自己抗原 U1-small nuclear ribonucleoprotein 68k (U1-68k) のリン酸化が外れた低リン酸化亜型が増加していることが近年発見された。この低リン酸化 U1-68k は自己免疫疾患の新たな早期診断マーカーとなる可能性がある。しかしながら、従来法である細胞の核分画を用いた二次元 western blot 法は全行程に 5 日かかることから、より簡便な定量法の開発が必要である。そこで、本研究では phos-tag SDS-PAGE 後に western blot を行う方法 (phos-tag western blot 法) と、等電点電気泳動を行った後に直接 western blot を行う方法 (等電点 western blot 法) を検討した。その結果、phos-tag western blot 法は U1-68k のリン酸化亜型を十分に分離することができず低リン酸化 U1-68k の定量には不適であることが示された。それに対し、等電点 western blot 法では、pI6.8-9.1 の間に 10 本の U1-68k のバンドが確認され、また、そのうちの 1 本が目的とする低リン酸化体の等電点に一致した。ここから本方法が従来法に代わる方法として使用できる可能性が示された。我々は更に、細胞核画分の代わりに細胞の全抽出液を用いることが可能かを評価した。5 種類の細胞抽出液による全細胞抽出液を比較したところ、SDS-PAGE に通常用いられる SDS 処理液が最も効率的に U1-68k を抽出することができ、また二次元 western blot 法によって U1-68k が複数のスポットとして検出できることを確認した。しかしながら、スポットが観察される領域は大きく酸性側にシフトしており、タンパク質に強く結合した SDS を除去する必要があることが示唆された。

キーワード：自己免疫疾患、診断マーカー、自己抗原、リン酸化

1. 結論

全身性エリテマトーデス (SLE) や混合性結合組織病 (MCTD) などの全身性自己免疫疾患 (膠原病) は免疫システムが自分自身の生体分子を異物とみなすことで全身の様々な臓器で慢性的な炎症が起こる難治性の疾患である⁽¹⁾。原因は不明であることから、根本治療は不可能である。しかしながら、免疫抑制剤や生物学的製剤 (モノクローナル抗体製剤) などの薬剤の開発により、疾患の活動性を抑え、緩解導入に至らせるための治療法は格段の進歩を見せており、適切な治療を施すことで、患者の予後や Quality of life を格段に向上させることができるようになった⁽¹⁾。そのため、発症初期に、他の炎症性疾患と鑑別して速やかに治療を開始することが、これまで以上に重要な意味を持ってきている。自己免疫疾患の患者の血清には、自己の細胞成分に反応する様々な種類の抗体 (自己抗体) が存在し、この自己抗体が病名を診断するための診断マーカーとして使われている⁽¹⁾。しかしながら、これらは発症の最初期から生産されるとは限らず、発症初期には疾患名を確定できない場合も多い。そこで、発症初期においても検出可能な診断マーカーの開発が求められている。

SLE や MCTD 患者で検出される <抗 RNP 抗体> の対応自己抗原である U1-small nuclear ribonucleoprotein 68k (U1-68k) は、mRNA のスプライシングに関わる U1-RNP 分子の構成成分である。

原稿受付 2014 年 11 月 21 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No. 12-IV-6, 2013 の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 聖マリアンナ医科大学大学院 疾患プロテオーム・分子病態治療学 〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1

本タンパク質は C 末端領域に高度にリン酸化された Arginine serine rich-domain (RS ドメイン) を有し、本ドメインのリン酸化の制御が U1-RNP 分子の mRNA スプライシング活性に重要であることが知られている⁽²⁻³⁾。U1-68k の理論分子量は 51,557, 理論等電点は 9.94 であるが、二次元電気泳動で展開した後に western blot で検出すると、リン酸化の違いによって分子量 65~68kDa, 等電点 6~8 の間に 20 個以上の異なるスポットとして検出されることから、細胞内にはリン酸化状態の異なる様々な U1-68k の翻訳後修飾亜型が存在すると考えられている⁽⁴⁾。研究代表者は、最近、MCTD や SLE 患者の末梢血リンパ球において、二次元 western blot において最も高い pI を示す低リン酸化 U1-68k 亜型の量が増加していることを明らかにした⁽⁴⁾。この U1-68k の異常な脱リン酸化は、U1-68k の抗原性を変化させて抗 RNP 抗体の産生に関わる一方で、mRNA のスプライシング異常を通じて、白血球の機能異常を起し、両疾患の病態形成に関わっている可能性が考えられる。研究代表者は、この U1-68k の脱リン酸化が自己抗体産生よりも上流の現象であると考えられることから、抗原病を発症初期に診断するためのバイオマーカーとして利用できる可能性があると考えた。

疾患特異的低リン酸化 U1-68k を定量するために我々が用いている核分画の二次元 western blot 法は再現性の高い優れた方法であるが、解析結果を出すのに時間がかかるという問題点がある。具体的には、患者からの血清採取から核分画の採取に 1 日、一次元目の電気泳動に 1 日、二次元目の泳動から蛍光染色に 1 日、画像取得からタンク式転写装置による転写に 1 日、western blot に 1 日と全行程を行うのに 5 日かかる。また、同時に解析できる検体数にも限りがある。今後、多くの検体を解析して診断マーカーとしての有用性を評価すること、更に将来的に医療の現場で利用することを考慮すれば、より簡便に低リン酸化 U1-68k を定量する方法を開発する必要がある。もっとも有望な方法として、低リン酸化 U1-68k の脱リン酸化部位を認識する抗体を作成し、ウェスタンブロット法や ELISA 法で定量する酵素免疫学的手法が考えられる。我々は、こうした酵素免疫学的手法を開発するために、質量分析計を用いた U1-68k のリン酸化部位の同定を試みてきたが、U1-68k のリン酸化はアルギニンとセリンの多い特殊な配列を持つ RS domain 上に存在し、適度な大きさに断片化するプロテアーゼが存在しないことから、未だに明らかにできていない⁽⁴⁾。

そこで本研究では、二次元 western blot 法における二次元電気泳動を、より短時間でできる二種類の泳動方法、phos-tag SDS-PAGE と等電点電気泳動法に変えることで検出時間を短縮することが可能かどうか検討した。phos-tag とは、Ser/Thr/Tyr すべてのリン酸化部位を捕捉する機能分子である⁽⁵⁾。この phos-tag をアクリルアミド分子に結合させた phos-tag アクリルアミドを SDS-PAGE の分離用ゲルに添加して電気泳動を行うと、ゲル中の phos-tag がリン酸化タンパク質をトラップすることで泳動を遅らせることができる⁽⁶⁾。この phos-tag SDS-PAGE を用いることで U1-68k のリン酸化の異なる亜型を分離することができるのではないかと我々は考えた。本研究ではヒト T リンパ球由来 Jurkat 細胞株の核分画タンパク質を phos-tag SDS-PAGE もしくは等電点電気泳動にかけた後に PVDF 膜に転写して抗 U1-68k 抗体で検出することで、U1-68k のリン酸化亜型を分離できるか、特に疾患特異的低リン酸化 U1-68k を個別に定量できるかどうかを検討した。

更に我々はタンパク質の抽出法の改善も試みた。現在、我々は細胞の核分画を調整した後にタンパク質を抽出し、U1-68k の検出を行っている。しかしながら、核分画の調整には時間がかかり、特別な技能を必要とする。したがって、将来的に診断マーカーとして使用することを考えれば、より簡便な抽出法を検討する必要がある。そこで、本研究では、一般的に用いられる 5 種類の細胞抽出液を用いて Jurkat 細胞の全細胞抽出液を調整し、効率よく U1-68k を抽出する方法を検討した。更に二次元 western blot 法に適用可能かどうか検討した。

2. 材料と方法

2.1 材料

Jurkat E6.1 細胞 (ECACC 88042803) は住商ファーマインターナショナル株式会社より購入した。Fetal bovine serum (SH30910.03) は Hyclone 社より購入した。等電点電気泳動の strip gel (Immobiline Drystrip) は GE ヘルスケア社より、phos-tag アクリルアミドは Wako 社より購入した。抗 U1-68k 抗体は Santa Cruz 社の polyclonal anti-U1-68k (C-18) を使用した。また Western blot の二次抗体として Dako 社の HRP 標識 Rabbit anti-goat IgG を使用した。その他の試薬は特に注釈の無い場合、Wako もしくは Sigma 社より購入した。

2.2 Jurkat 細胞タンパク質溶液の調整

Jurkat細胞は10% FBSと抗生物質を含んだRPMI1640培地を用いて、37°C、0.5% CO₂の条件で培養した。培養した細胞はPBSで3回洗浄し、次のタンパク質調整に用いた。

Jurkat細胞からの核画分の方法は、Yuanらの方法を改変したもの⁽⁷⁾、もしくは、Nuclear/Cytosol Fractionation Kit (BioVision社) を用いて調整した。Yuanらの方法では、 1×10^8 個の細胞に5 mLのBuffer A (10 mM Tris-HCl (pH 7.9)、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF、Complete protease inhibitor cocktail (Roche社)) を加え、氷上で5分置いた後に、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーでホモジナイズした。生じたホモジネートを4°C、500 x gで5分間遠心し、沈殿を回収した。沈殿を3 mLのS1 溶液 (0.25 M sucrose、10 mM MgCl₂) を加えて懸濁した。そこに、3 mLのS2 溶液 (0.35 M sucrose、0.5 mM MgCl₂) を静かに重層した。更に、4°C、1430 x gで5分間遠心し、沈殿をS1溶液で一度洗浄した。沈殿に、600 µLのBuffer C (20 mM Tris-HCl (pH 7.9)、420 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF、Complete protease inhibitor cocktail (Roche社)) を加えて良く攪拌し、タンパク質を抽出した。抽出液は4°C、15,000 rpmの条件で30分間遠心し細胞残渣を取り除いた。Nuclear/Cytosol Fractionation Kitを用いた方法では、 1.0×10^7 個の細胞を用い、メーカーの操作マニュアルに従って核分画タンパク質溶液を作成した。

Jurkat細胞からの全細胞抽出液は、5種類の細胞溶解液、①二次元電気泳動用 lysis solution (7 M Urea、2 M Thiourea、4 % CHAPS)、②SDS-PAGE 用 SDS 処理液 (25 mM Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、10% グリセロール、1% 2-メルカプトエタノール)、③RIPA buffer A (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% デオキシコール酸、0.1% SDS)、④RIPA buffer B (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl、1% NP-40)、⑤RIPA buffer C (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl、1% NP-40、1% CHAPS) を用いて調整した。これらの抽出液には、プロテアーゼインヒビターとして使用直前に 0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF、Complete protease inhibitor cocktail (Roche 社) を加えた。 1.0×10^7 個の細胞に対して 200 µL の細胞溶解液を加えボルテックスで細胞を溶解した。SDS 処理液の場合のみ、98°Cで3分間加熱処理した。次に、4°C、15,000 rpm で30分間遠心分離し、上清を回収した。

上記の方法で得られた2種類のJurkat細胞核画分抽出液、及び5種類の全細胞抽出液に、氷冷した30% TCA 溶液を等量加え、氷上で30分間静置することでタンパク質を沈殿させた。4°C、15,000 rpm で30分間遠心分離した後、上清を除去し、1 mLのアセトンを加え、沈殿を洗浄した。4°C、15,000 rpm で10分間遠心分離した後、上清を除去し、風乾させた。乾燥したことを確認し、二次元電気泳動用 lysis solution 100 µL に沈殿を溶解した。各溶液のタンパク質濃度は IgG をスタンダードとして、BIORAD 社 Protein Assay 法を用いて測定した。SDS-PAGE にかける際には、2×SDS 処理液で等倍希釈し、室温で30分以上静置することで SDS 化した。

2.3 Western blot 法

1-10 μg のタンパク質を含む溶液を自作の 12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によって分離した。泳動は Atto 社のミニゲル用泳動装置を用い 30 mA 定電流で 45 分間泳動した。泳動したゲル上のタンパク質を日本エイドー社のタンク式転写装置で 16 時間かけて PVDF 膜に転写した。転写後の膜を PBS-T で洗浄した後に、Block Ace 溶液 (DS ファーマバイオメディカル社) 中で一時間浸透し Blocking を行った。PVDF 膜を PBS-T で 10 分 3 回洗浄した後に、Block Ace 溶液で 10,000 倍に希釈した一次抗体溶液につけ、室温で 1 時間震盪した。再び PBS-T で 10 分 3 回洗浄した後に、Block Ace 溶液で 20,000 倍希釈した二次抗体溶液につけ、室温で 1 時間震盪した。PBS-T で 10 分 3 回洗浄した後 ECL-Advance (GE ヘルスケア社) を用いて検出した。

2.4 二次元 Western blot 法

一次元目の等電点電気泳動は Immobiline Dry-Strip (GEヘルスケア社、pH6-11、13 cmもしくは pH3-11NL、24 cm) を用いて行った。Dry-stripはタンパク質を溶解した 2DE用 lysis buffer で 10 時間以上膨潤させたのちに、IPGphor IEF system (GEヘルスケア) を用いて泳動を行った。泳動はメーカーの推奨条件で行った。泳動後のストリップを 25 mg の DTT を溶解させた 10 ml の平衡化 buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、6M Urea、2% SDS、30% glycerol、微量の bromopenol blue) 中で 15 分間浸透し、更に 250 mg の Iodoacetamide を溶解させた 10 ml の平衡化 buffer 中で 15 分間浸透して平衡化した。平衡化した strip を次に 16 cm \times 16 cm の 10% SDS-PAGE ゲルの上端に乗せ、日本エイドー社の泳動装置でゲル 1 枚あたり 20 mA の定電流で泳動を行った。泳動後のゲルは SYPRO Ruby (Invitrogen社) を用いて染色し、ゲル撮影装置 Typhoon9400 (GEヘルスケア社) を用いて撮影した。ゲル中のタンパク質はタンク式の転写装置 (日本エイドー社) を用いて PVDF 膜に転写し、前述した条件で Western blot を行い U1-68k を検出した。

2.5 phos-tag western blot 法

6% アクリルアミドゲルを作成する際に、phos-tag アクリルアミド (Wako社) を最終濃度が 0.2 – 20 μM となるように加え、phos-tag アクリルアミドゲルを作成した。本ゲルに 10 μg のタンパク質を含む Jurkat 細胞核画分溶液をアプライし、ゲル 1 枚あたり 30 mA 定電流の条件で泳動を行った。泳動後のゲルは 10 mM EDTA を含む転写 buffer で 10 分間 3 回洗浄しゲル中の Mn イオンを取り除いた。その後、分離されたタンパク質をタンク式の転写装置 (日本エイドー社) を用いて PVDF 膜に転写し、前述した条件で Western blot を行い U1-68k を検出した。

2.6 等電点 western blot 法

2.4 に記述した方法により Jurkat 細胞核画分タンパク質を等電点電気泳動で分離した。泳動後の strip を Tris-buffered saline (TBS) でゆすぎ、余分なシリコンオイルを取り除いた。ろ紙 (20 \times 10 cm) を 2 枚重ね、TBS 溶液に浸した後、余分な液をキムタオルに吸い取らせた。その上に、TBS で膨潤させた PVDF 膜 (15cm \times 10cm) を載せ、更に strip をゲル面を下にして乗せた。再び TBS で湿らせた 2 枚重ねのろ紙を載せて、全体をラップで包み、重しをのせて 3 時間放置して strip 上のタンパク質を PVDF 膜に転写させた。その後、前述した条件で western blot を行い U1-68k を検出した。

3. 結果

3.1 Phos-tag western blot 法の検討

初めに、phos-tag SDS-PAGE によって、U1-68k をリン酸基の数によって分離し、翻訳後修飾亜型ご

とに分離、定量することが可能かどうかを検討した。初めに、メーカー推奨の条件であるアクリルアミド濃度 6%、phos-tag 濃度 5-20 μ M の条件で泳動を行い、western blot で U1-68k を検出した (図 1A)。その結果、Phos-tag 濃度が 0 の条件では、U1-68k は既存の位置 (68kDa) に現れたが、phos-tag を入れたゲルでは U1-68k のバンドはゲルの上端に現れ、ほとんど移動していなかった。また、リン酸化の異なる亜型もほとんど分離されていなかった。そこで次に、移動度を上げるために、phos-tag の濃度を 0.2~5 μ M に下げ、更に、泳動時間を 45 分から 60 分に伸ばした。また、タンパク質量を 10 μ g から 5 μ g へと減らすことでバンド間の分離能を上げることが可能かどうかを検討した (図 1B)。その結果、phos-tag 濃度が減るにしたがって U1-68k のバンドの移動度が上がり、それに従って、複数のバンドが検出されるようになった。しかしながら、明確なバンドは 2 本程度しか確認されず、また、バンドの境界も不明瞭であった (図 1C)。二次元 western blot では 20 個以上のスポットが検出できることを考えれば、本方法による U1-68k の分離能力は不十分であると考えられた。また、タンパク質量 10 μ g と 5 μ g の結果を比較すると、10 μ g のバンドの方が歪みが大きく、また移動度も高かった。したがって、本方法では添加するタンパク質量の違いによってタンパク質の移動度が異なる可能性が考えられた。

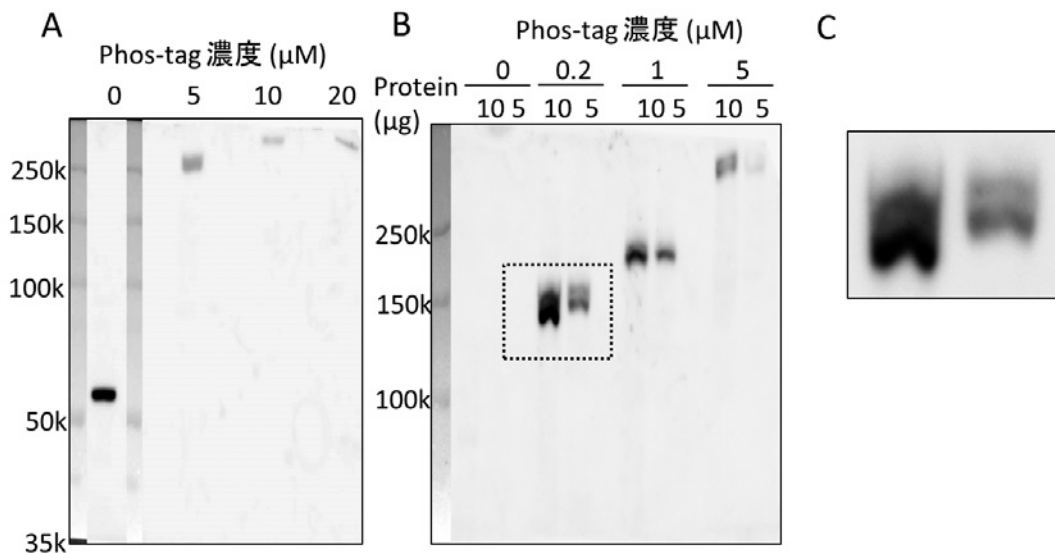


図 1. phos-tag SDS-PAGE による U1-68k 翻訳後修飾亜型の分離

Jurkat 細胞核画分タンパク質を phos-tag SDS-PAGE で分離した後に、PVDF 膜に転写し抗 U1-68k 抗体を用いて western blot を行った。A: アクリルアミド濃度 6%、phos-tag 濃度 5-20 μ M、タンパク質量 10 μ g での検討。B: アクリルアミド濃度 6%、phos-tag 濃度 0.2-5 μ M、タンパク質量 5 もしくは 10 μ g での検討。C: B における点線部分の拡大図。

3.2 等電点 western blot 法の検討

次に、等電点電気泳動を行った後の strip に含まれるタンパク質を PVDF 膜に直接転写し、western blot で検出する等電点 western blot 法で U1-68k のリン酸化修飾亜型を分離できるかどうかを検討した。50 μ g の Jurkat 細胞核画分タンパク質を pI6-11, 13 cm strip を用いた等電点電気泳動によって分離し、泳動後の strip 中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。当初は、通常の western blot で用いるタンク式の転写装置を用いて転写を試みたが、strip に裏打ちされたプラスチックシートの影響のため、安定した転写が行えなかった (Data not shown)。そこで、電流をかけずに自然拡散で転写させる方法 (材料と方法 2.6 章参照) を試みた。その結果、pI 6.8 - 9.1 の範囲に 10 本のバンドが検出された (図 2A)。同じ Jurkat 核画分タンパク質 100 μ g を用いて二次元 western blot を行ったところ (図 2B)、等電点ウエスタンブロットに

おける pI6.8, pI6.9, pI7.0, pI7.2, pI7.5, pI7.9 の 6 本のバンドに対応する位置にスポットが検出された。更に、等電点ウエスタンブロット法では pI8.0-9.1 の間に、二次元 western blot 法で検出されたことの無かった 4 本のバンドが検出され、等電点電気泳動の方が検出感度が高いことが示唆された。

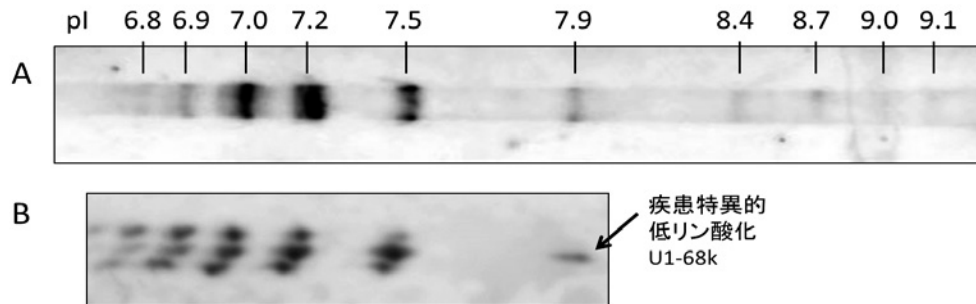


図 2. 等電点電気泳動 western blot による U1-68k リン酸化亜型の分離

A : 50 μg の Jurkat 細胞核画分タンパク質を pI6-11 の strip を用いて等電点電気泳動を行った後に PVDF 膜に転写し、抗 U1-68k 抗体を用いて western blot を行った。B : 等電点電気泳動を行った後に、2 次元目の SDS-PAGE (10% アクリルアミドゲル) を行い、抗 U1-68k 抗体を用いて western blot を行った。

3.3 全細胞抽出液を用いた検討

次に、Jurkat 細胞の全細胞抽出液を用いて二次元 western blot による U1-68k の検出が可能かを試すために、Jurkat 細胞を 2DE 用 cell lysis buffer、SDS-PAGE 用 SDS 処理液、RIPA buffer A-C の 5 種類の細胞抽出液で溶解し、タンパク質を抽出した。また、ポジティブコントロールとして、Nuclear/Cytosol Fractionation Kit を用いて Jurkat 核画分抽出タンパク質を作成した。抽出液中のタンパク質量を Protein Assay 法で測定したところ、SDS-PAGE 用 SDS 処理液を用いた抽出液の濃度が最も高く、 1.0×10^7 個の細胞から 345.7 μg のタンパク質が抽出された (表 1)。次に、5 μg のタンパク質を含有する 5 種類の全細胞抽出液と核画分抽出液を用いて western blot を行った

(図 3)。その結果、全細胞抽出液の中では SDS-PAGE 用 SDS 処理液だけで U1-68k のバンドが検出された。核画分には及ばないものの、SDS 処理液が最も効率的に U1-68k を抽出することが判明した。そこで、更に、SDS 処理液で作成した全細胞抽出液を用いて 2 次元ウエスタンブロットを行った。初めに、300 μg のタンパク質量を用いて pI6-11, 13 cm の strip を用いて等電点電気泳動を行い western blot を行ったが、U1-68k のバンドは検出できなかった (Data not shown)。そこで、次に、等電点の範囲を広げるために、pI3-10, 24 cm の strip を用いて 300 μg のタンパク質を分離した。等電点泳動後 strip を半分に分断して、pI3-6 の部分と pI6-10 に分け、それぞれの strip に対して 2DE-western blot を行った (図 4)。その結果、核画分を用いた時に通常 U1-68k が観察される pI6-9 の範囲にはスポットは観察されず、pI3-5 の酸性領域にスポットが観察された。

表 1. Jurkat 細胞からのタンパク質抽出量

抽出液	総タンパク質量 (μg) (細胞数 : 1.0×10^7)
2DE 用 Cell lysis solution	334.1
SDS 処理液	345.7
RIPA buffer A	225.5
RIPA buffer B	207.9
RIPA buffer C	102.2
核画分 (分画 Kit 使用)	160.0

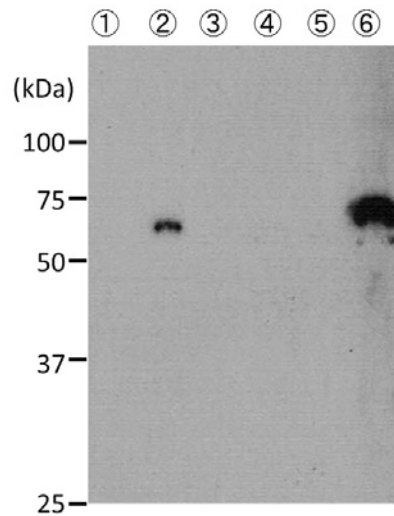


図 3. Jurkat 細胞全細胞抽出液中を用いた U1-68k の western blot。①2DE 用 Lysis solution、②SDS-PAGE 用 SDS 処理液、③RIPA buffer A、④RIPA buffer B、⑤ RIPA buffer C、⑥核分画。タンパク質量は全て 5 μ g にそろえた。

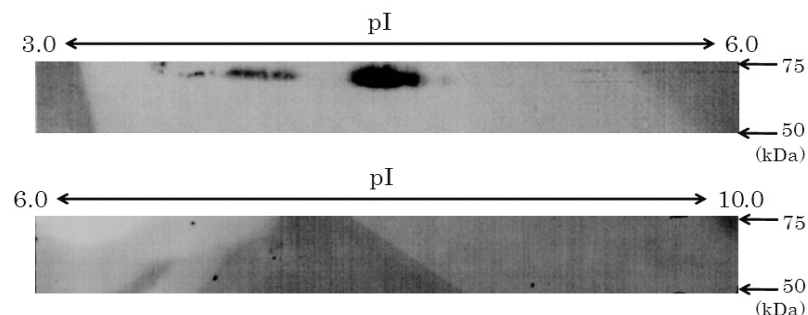


図 4. SDS-処理液による Jurkat 細胞全細胞抽出液を用いた 2DE-western blot による U1-68k リン酸化亜型の検出。300 μ g のタンパク質を pI3-10、24 cm のストリップを用いて一次元電気泳動を行い、strip を半分に分けた後に、2次元目の SDS-PAGE を行った。PVDF に転写後 U1-68k を western blot により検出した。

4. 考察

本研究では、SLE や MCTD などの全身性自己免疫疾患（膠原病）の末梢血リンパ球で疾患特異的に増加する自己抗原 U1-68k タンパク質の低リン酸化体を、より簡便に定量する方法を開発することを目的として、(1) 二次元電気泳動に変わる電気泳動法の検討と、(2) 細胞核画分ではなく全細胞抽出液で検出が可能かどうかの二つの検討をヒト T リンパ球由来細胞株である Jurkat 細胞を用いて行った。

まず、(1) については、U1-68k をリン酸化の量に応じて分離する泳動法の使用が求められる。我々はまず、タンパク質のリン酸化の量によって移動度が変わる phos-tag SDS-PAGE[®]を利用する方法を検討した。Jurkat 細胞核画分タンパク質を、0.2 から 5 μ M まで様々な濃度の phos-tag アクリルアミドを含む SDS-PAGE 用ゲルを用いて分離し、PVDF 膜に転写した後に抗 U1-68k 抗体で検出した。その結果、phos-tag 濃度を 0.2 μ M まで下げることで、少なくとも 2 本の U1-68k のバンドを検出することができたが、バンド間の境界線は不明瞭であった（図 1）。従来の 2 次元電気泳動法では、少なくとも 20 個の U1-68k のリン酸化亜型のスポットが検出できることを考えれば、phos-tag SDS-PAGE による U1-68k のリン酸

化亜型の分離能力は不十分であり、これ以上の改善も難しいと思われた。

次に我々は二次元電気泳動の二次元目の SDS-PAGE を省略し、等電点電気泳動が終了した時点で PVDF 膜に転写し western blot を行う方法（等電点 western blot 法）で解析時間の短縮が可能か検討した。等電点電気泳動で用いる Immobiline Drystrip はアクリルアミドの濃度が低い柔らかいゲルの下面をプラスチックのシートで裏打ちした状態で市販されている。ゲルを破損しないように、このシートを外すことは困難なため、PVDF 膜への転写もシートを付けた状態で行わなければならない。初めは、通常のタンク式の転写装置で電圧をかけることで転写を行っていたが、電流を通さないプラスチックシートが存在するためか転写結果が安定しなかった。そこで、我々は、電流をかけない自然拡散による転写方法に切り替えた。その結果、PVDF 膜と strip を接触させて 3 時間放置した時点で、十分な量のタンパク質が転写され western blot によって U1-68k のリン酸化亜型が検出できることが確認された。また、バンドは二次元 western blot を行った時と同じ等電点の位置に検出され、また、疾患特異的低リン酸化 U1-68k の位置にもバンドが確認された（図 2）。このことから、等電点ウエスタンブロット法を疾患特異的低リン酸化 U1-68k の簡便な定量法として使用できることが示唆された。二次元 western blot 法に比べて感度の低下が心配されたが、倍の量のタンパク質を流した場合の結果と比較しても遜色ない結果が得られ、また二次元 western blot では検出されなかった pI8 以上の領域にもバンドが観察されるなど、むしろ感度が増加していることが示唆された。前述したように等電点電気泳動用の strip ゲルは SDS-PAGE で使うよりもアクリルアミド濃度の低い網目のゆるいゲルでできているため、電圧をかけなくとも自然拡散のみで効率的に転写が行われたと考えられる。

更に我々は、調整に時間のかかる細胞核画分抽出液に変えて、調整の簡単な全細胞抽出液を用いることが可能か検討した。効率よく U1-68k を抽出する条件を調べるために、二次元電気泳動で一般的に用いられる Lysis solution、SDS-PAGE で一般的に用いられる SDS 処理液、免疫沈降で一般的に用いられる 3 種類の RIPA buffer A, B, C を用いて全細胞抽出液を作成し、U1-68k の含有量を western blot で比較した。ここで Lysis solution の組成は 7M Urea、2M Thiourea、4% CHAPS であり、SDS 処理液は 0.25M Tris-HCl (pH6.8)、10% glycerol、1% 2-mercaptoethanol、2% SDS、3 種類の RIPA buffer は、50mM Tris-HCl pH8.0、150mM NaCl を基本組成として、界面活性剤が A には 0.5% Deoxycholic acid、0.1% SDS、1.0% NP-40、B には 1.0% NP-40、C には 1.0% CHAPS、1.0% NP-40 が含まれている。5 種類の抽出液を比較した結果、SDS 処理液が最も多くタンパク質を抽出し、また、U1-68k の含有量も最も高かった（表 1、図 3）。SDS 処理液と他の抽出液の違いとしては、高濃度（2.0%）の SDS が含まれていること、pH が中性付近（pH6.8）に合わせられていること、高濃度の還元剤が含まれていることなどが挙げられる。どの要因が効率的な U1-68k の抽出を可能にしているのかは今後検討する予定である。次に我々は、SDS 処理液を用いた全細胞抽出液を二次元 western blot 法にかけ、U1-68k のリン酸化亜型を分離、検出できるかどうかを検討した。サンプル溶液中に SDS のような荷電性物質が含まれていると一次元目の等電点電気泳動を阻害することが知られているため、一度 TCA 沈殿法を用いて SDS を除去した後に泳動を行った。その結果（図 4）、U1-68k は複数のスポットに分かれて検出されたが、その位置は、従来の核画分を用いた場合に観察される pI6-9 の塩基性領域ではなく、pI3-5 の酸性領域であった。U1-68k には正に強く荷電している 2 か所の RS domain を分子内に有している。負電荷をもつ SDS 分子が、この RS domain に強く結合した結果、TCA 沈殿法では除去しきれず、等電点電気泳動における U1-68k の検出位置を酸性側に大きくシフトさせたのではないかと考えられた。したがって、このタンパク質に強く結合している SDS を除去することが必要であると思われた。抽出液中の SDS 濃度を下げる、もしくは市販の SDS 除去

Kitを用いることでこの問題を改善できる可能性がある。

5. 結論

以上より、我々は疾患特異的低リン酸化 U1-68k を検出するために等電点 western blot 法が有効であることを示した。本方法は、従来の二次元 western blot 法と比較して、二次元目の電気泳動を省略している分、実験時間が短縮できる。また、タンク式転写装置を用いた転写方法から、自然拡散を利用した転写方法に変えたことによって転写時間を 16 時間から 3 時間に短縮できる。以上のことから、従来は 5 日かかっていたところを 3 日に縮めることが可能になる。また、今後更なる検討を行う必要があるが、核画分に変えて全細胞抽出液を使用できる可能性も示された。これが可能になれば、これまで患者からの血液採取から核画分の調整まで 10 時間ほどかかっていたところを 3 時間程度にまで短縮できる。また、全細胞抽出液は冷凍保存した細胞からも調整できるという利点がある。これにより、患者から採取されたリンパ球サンプルを冷凍保存しておき、複数のサンプルがそろった時点でまとめて細胞抽出液を調整することが可能になり、更なる効率化が可能になる。今後は、全細胞抽出液の調整方法を更に改良し、全細胞抽出液と等電点 western blot 法を用いた疾患特異的低リン酸化 U1-68k の検出・定量法を完成させることを試みる。それができれば、本方法を用いて、多くの自己免疫疾患患者の検体を解析し、疾患特異的低リン酸化 U1-68k の診断マーカーとしての有用性を評価することを予定している。

6. 謝辞

本研究は、近畿大学生物理工学部戦略的研究費 (No. 12-IV-6, 2013) により行われたものであり、ここに深謝いたします。

7. 参考文献

- (1) 中村耕三、原まさ子、山本一彦 (2001) リウマチナビゲーター、メディカルレビュー社
- (2) Woppmann, A., Patschinsky, T., Brinqmann, P., Godt, F., Lührmann, R., (1990) Characterisation of human and murine snRNP proteins by two-dimensional gel electrophoresis and phosphopeptide analysis of U1-specific 70K protein variants. *Nucleic Acids Res.* 18, 4427–4438.
- (3) Tazi, J., Kornst " adat, U., Rossi, F., Jeanteur, P., Cathala, G., Brunel, C., Lührmann, R., (1993) Thiophosphorylation of U1-70K protein inhibits pre-mRNA splicing. *Nature* 363, 283–286.
- (4) Nagai, K., Arito, M., Takakuwa, Y., Ooka, S., Sato, T., Kurokawa, M. S., Okamoto, K., Uchida, T., Suematsu N., Kato, T., (2012) Altered posttranslational modification on U1 small nuclear ribonucleoprotein 68k in systemic autoimmune diseases detected by 2D Western blot. *Electrophoresis* 33, 2028–2035.
- (5) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, K., Takiyama K, Koike., T. (2006) Phosphate-binding tag: A new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 749-757.
- (6) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., (2009) Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 4, 1513-1521.
- (7) Yuan, X., Kuramitsu, Y., Furumoto, H., Zhanq, X., Hayashi, E., Fujimoto, M., Nakamura, K., (2007) Nuclear protein profiling of Jurkat cells during heat stress- induced apoptosis by 2-DE and MS/MS. *Electrophoresis* 28, 2018–2026.

英文抄録

Trial for establishment of a new convenient method for quantification of the disease-specific dephosphorylated isoform of an autoimmunogen U1-68k.Kouhei Nagai¹, Kazuki Saito¹, Mitsumi Arito², Manae S Kurokawa², and Tomohiro Kato²

Systemic autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) or mixed connective tissue diseases (MCTD) are immunologically characterized by generation of various species of autoantibodies in sera from patients. Recently, using 2DE-western blot, we have found that a dephosphorylated form of U1-68k, a major autoantigen to the anti-RNP autoantibody, was increased in peripheral blood lymphocytes from SLE or MCTD patients. This dephosphorylated U1-68k might be used as a new diagnostic marker which could diagnosis the diseases in earlier phase. In this paper, to establish a new convenient method for quantification of the dephosphorylated form, U1-68k isoforms in nuclear fraction of Jurkat cells were separated and detected by two methods, a western blot followed by a phos-tag SDS-PAGE (phos-tag-western blot), and a western blot followed by an isoelectric focusing electrophoresis (IEF-western blot). As a result, phos-tag-western blot showed only two bands of U1-68k isoforms, indicating that this method is inadequate for our purpose. On the other hand, IEF-western blot showed at least 10 bands of U1-68k within pI range of 6.8-9.1, and one of the bands showed the same pI value (7.9) as those of the disease-specific dephosphorylated U1-68k detected by 2DE-western blot. This indicated that the IEF-western blot could be used as a new convenient method for quantification of the dephosphorylated form. In addition, we examined whether U1-68k isoforms in a whole cell extract could be detected by 2DE-western blot. We tested 5 popular cell lysis solutions, and found that the SDS sample buffer, which is commonly used for SDS-PAGE, extract U1-68k with the highest yield, and showed multiple U1-68k spots by the 2DE-western blot. However, these spots were detected in the acidic pI regions (pI 3-5), indicating that SDS molecules may bound strongly to the U1-68ks and shift their isoelectric points. Therefore, it must be needed to eliminate the strongly combined SDS-molecules before 2DE or IEF-western blot.

Key words : systemic autoimmune diseases, diagnostic marker, autoimmunogen, phosphorylation

1. Development of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Clinical Proteomics and Molecular Medicine, St. Marianna University Graduate School of Medicine, Kawasaki, Kanagawa 216-8511, Japan.