

抗 ATF6 α 抗体, マウス モノクローナル (1-7)

73-500, 50 μ g

保存温度: 4°Cで送付、-20°Cで保存。

反応特異性: ヒト ATF6 α . マウス ATF6 α とは反応しない。

本抗体は ATF6 α の**前駆体**と切断された活性化された**成熟型**の両方と反応する貴重な抗体である。

免疫原: リコンビナント ATF6 α (ATF6 α の N 末端フラグメント、His タグ付き)

用途: (詳細なプロトコールは下記に)

1. ウェスタンブロットティング
2. 免疫沈降 (IP)
3. 免疫蛍光染色 (IF/IC)

エピトープ: 決定されていない。

アイソタイプ: マウス IgG2a κ

形状: 精製モノクローナル抗体 (IgG) 1mg/ml in PBS, 50% glycerol, 濾過滅菌

背景: ATF6 (activating transcription factor 6) は小胞体 (ER) 膜結合型転写因子で、ER ストレスに反応して活性化される。unfolded protein が ER に蓄積してくると ATF6 は intramembrane proteolysis により切断される。この結果生じた N 端フラグメントは核へ移行し、ER シャペロンや ER 関連分解反応のコンポーネントなど、ER ストレス誘導遺伝子のプロモーター領域にある ER stress-response element に結合することによって転写を活性化する。ほ乳類では、ATF6 α と ATF6 β という互いに類似したアイソフォームがある。転写の制御には ATF6 β でなく、ATF6 α が重要な役割を果たしていると考えられる。

ATF6 α に対するモノクローナル抗体が京都大学森和俊教授の研究室で作成された。無血清培地で培養されたハイブリドーマの培養液より、独自のクロマト法などのマイルドな方法により、IgG を精製した。

データリンク: Swiss-Prot [P18850](#) (ヒト)

抗ヒト ATF6 α モノクローナル抗体を用いた ATF6 α 解析法のプロトコール

下記にプロトコール記した手順により、抗ヒト ATF6 α モノクローナル抗体クローン 1-7 を用いたウェスタンブロットティングによって、HEK293T、HEK293、HeLa 細胞などのヒトの細胞において、ATF6 α の endogenous precursor、pATF6 α (P) およびその切断フラグメント pATF6 α (N)を検出することができる(図 1)。結果の鮮明さは細胞のタイプや培養条件によって異なる。もし、HeLa や HEK293 細胞におけるウェスタンブロットティングで、図 1 右図のように鮮明な結果が得られない場合はウェスタンブロットの前に、下記に記したような手順による免疫沈降を試みるのがよい。

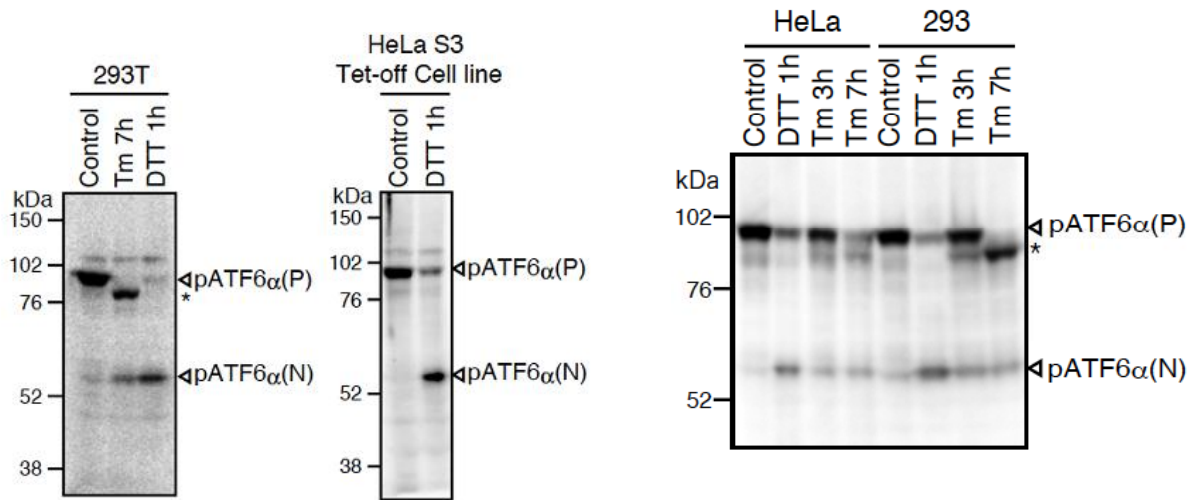


図1 ヒト細胞抽出液における、この抗体を用いた Western blot 解析: DTT または tunicamycin 処理細胞における pATF6α(P) から pATF6α(N) への転換

Tm: 2 μg/ml tunicamycin (N-glycosylation の阻害剤) DTT: 1mM dithiothreitol (還元剤)

★ は非グリコシル化型 pATF6α (P)

ATF6α は pATF6α(P) (~90-kDa タンパク質) として作られるが ER ストレスを受けた細胞では pATF6α(N) (>50-kDa タンパク質) に転換される。

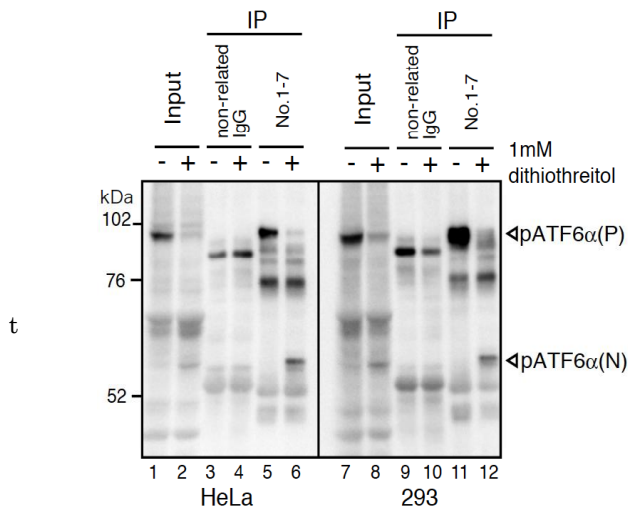


図2 ヒト細胞抽出液におけるこの抗体を用いた IP-Western blot 解析

この抗体 (No.1-7) を用いたウエスタンブロット解析 (Input; lanes 1, 2, 7, and 8) で ATF6α を検出した。

non-related IgG (IP; lanes 3, 4, 9, and 10) またはこの抗体 (No. 1-7) (IP; lanes 5, 6, 11, and 12) で免疫沈降を行った後、サンプルを SDS-PAGE にかき、この抗体 (No.1-7) または抗マウス IgG 抗体 (短鎖特異的) でウエスタンブロットした。

pATF6α(P) および pATF6α(N) の検出は IP-ウエスタンのほうがウエスタンブロッティングよりよかった。

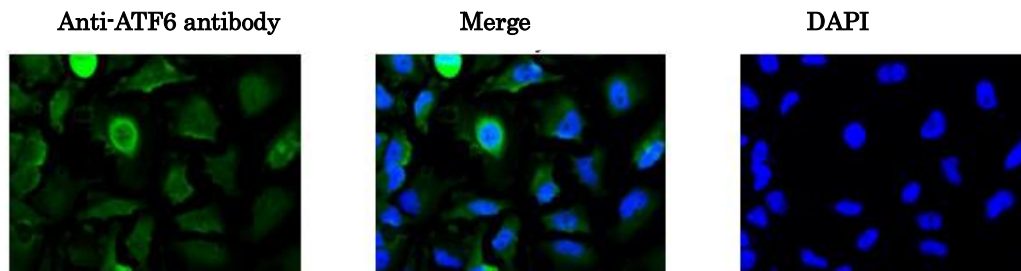


図3 .HeLa 細胞中の ATF6 α の免疫蛍光染色。

抗体は 1/100 希釈で使用した。ATF6 α はストレスがない状態では小胞体に膜タンパク質として存在し、ストレスを受けると切断されて、核内に移行してストレス応答の多数の遺伝子の転写を活性化する。

文献：本抗体は文献1に記載され、以下の論文に使用された。 .

1. Mori K .Divest yourself of a preconceived idea: transcription factor ATF6 is not a soluble protein!
Mol Biol Cell 21: 11435-8 (2010) PMID: [20219975](#) Review article
2. Maiuolo J *et al.* Selective activation of the transcription factor ATF6 mediates endoplasmic reticulum proliferation triggered by a membrane protein. PNAS 108: 7832-7 (2011) PMID: [21521793](#)
WB (human)
3. Amyot J *et al.* Binding of activating transcription factor 6 to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter does not mediate its transcriptional repression. [J Mol Endocrinol.](#) 2011 Sep 30;47(3):273-83.
PMID:[21821716](#) **WB (human)**
4. Higa A. *et al.* Role of pro-oncogenic protein disulfide isomerase (PDI) family member anterior gradient 2 (AGR2) in the control of endoplasmic reticulum homeostasis. [J Biol Chem.](#) 2011 Dec 30;286(52):44855-68
PMID:[22025610](#) **WB (human)**
5. Bouche-careilh M *et al.* Small GTPase Signaling and the Unfolded Protein Response. *Methods in Enzymology* Vol. 491; p. 343-360 (2011). PMID:[21329809](#) **WB (human)**
6. Kondo S. *et al.* Activation of OASIS family, ER stress transducers, is dependent on its stabilization *Cell Death and Differentiation* (2012) 19, 1939–1949. PMID: [22705851](#) **WB (human)**
7. Chiang WC *et al.* Selective Activation of ATF6 and PERK Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Pathways Prevent Mutant Rhodopsin Accumulation. [Invest Ophthalmol Vis Sci.](#) 2012 Oct; 53(11): 7159–7166. PMID:[22956602](#) **WB (human)**
8. Yi P *et al.* Sorafenib-mediated targeting of the AAA⁺ ATPase p97/VCP leads to disruption of the secretory pathway, endoplasmic reticulum stress, and hepatocellular cancer cell death. [Mol Cancer Ther.](#) 2012 Dec;11(12):2610-20. PMID: [23041544](#) **WB (human)**

9. Shoulders MD et al. Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ERproteostasis environments. [Cell Rep.](#) 2013 Apr 25;3(4):1279-92. PMID:[23583182](#) WB (human)
10. Kitai Y et al. Membrane lipid saturation activates IRE1 α without inducing clustering. [Genes Cells.](#) 2013 Sep;18(9):798-809. PMID:[23803178](#) WB (human)
11. Higa A. et al. Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6 α requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. [Mol Cell Biol.](#) 2014 May;34(10):1839-49. PMID: [24636989](#) WB (human)
12. Miyata S. et al. Xanthohumol Improves Diet-induced Obesity and Fatty Liver by Suppressing Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation. [J Biol Chem.](#) 2015 Aug 14;290(33):20565-79. PMID: [26140926](#) WB (human)
13. Plate L et al. Small molecule proteostasis regulators that reprogram the ER to reduce extracellular protein aggregation. [Elife.](#) 2016 Jul 20;5. pii: e15550. PMID:[27435961](#) WB (human)

プロトコール (詳細)

ウエスタンブロッティング

SDS-sample buffer: 50 mM Tris/HCl, pH6.8, containing 2% SDS, (100 mM DTT), 10% glycerol and BPB

PBST: PBS containing 0.1% Tween 20

Blocking buffer: PBS containing 0.1% Tween 20 and 5% skim milk

サンプルの調製 (6cm ディッシュで培養した HeLa または HEK293 細胞)

- (1) 細胞を ice-cold PBS で洗う。
- (2) 細胞を 500 μ l の ice-cold PBS (+ protease inhibitor cocktail and 10 μ M MG132) に 2 回かき取り、5,000 rpm で 2 分間遠心して細胞を集める。
- (3) 細胞を、還元剤を含まない 100 μ l の SDS-sample buffer (+ protease inhibitor cocktail and 10 μ M MG132) に溶かす。
- (4) 激しくボルテックスミックスする。
- (5) lysate を 5 分間加熱沸騰させ、よくボルテックスミックスする。
- (6) lysate がまだ粘稠な場合、再度沸騰させ、激しくボルテックスミックスする。
- (7) 14,000 rpm で 2 分間遠心する。

- (8) BCA protein assay kit でタンパク質濃度を測る。

SDS-PAGE と、抗体とのインキュベーション

- (9) 1/10 volume の 1 M DTT を加え、5 分間加熱沸騰させる。
- (10) 50 μ g の lysate を 8% SDS-PAGE にかける。
- (11) nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare など) に転写する。
- (12) membrane を Blocking buffer 中で 4°C で overnight インキュベーションする。
- (13) membrane を、blocking buffer (1:500-1:1000)で希釈した 1 次抗体液中で、室温で 1 時間 (あるいは 4°C で overnight) インキュベーションする。membrane を PBST で各回 5 分間、3 回洗う。
- (14) membrane を HRP-conjugated 2 次抗体で、室温 1 時間インキュベーションする。“ECL anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked F(ab')₂ fragment” (GE Healthcare NA9310V-1ML) または “Peroxidase-conjugated AffniPure Goat Anti-Mouse IgG, Light Chain Specific” (Jackson ImmunoResearch 115-035-174)を推奨する。
- (15) membrane を各回 5 分間、3 回 PBST で洗う。
- (16) 適当な発光試薬でシグナルを検出する。

免疫沈降 (6cm ディッシュで培養した HeLa または HEK293 細胞)

Lysis buffer: 50 mM Tris-HCl pH7.5, containing 150 mM NaCl, 1% NP-40, protease inhibitor cocktail and 10 μ M MG132)

- (1) 細胞を ice-cold PBS で洗った後、400 μ l の Lysis buffer に懸濁し、氷中に 10 分間おく。
- (2) 4°C で 14,000rpm、10 分間遠心して lysate を透明にし、新しいチューブに上清 300 μ l を移す。
- (3) 上清に抗 ATF6 α 抗体 (1-3 μ g) を加え、4°C でゆっくり回転させながら 2 時間から overnight インキュベーションする。
- (4) Lysis buffer に懸濁した 50%ProteinG-Sepharose slurry、30 μ l をチューブに加え、4°C で 1 時間ゆるやかに回転させながらインキュベーションする。
- (5) Sepharose ビーズを Lysis buffer で 2 回洗う。
- (6) Sepharose ビーズを PBS で洗う。
- (7) Sepharose ビーズを 100 mM DTT を含む SDS-sample buffer 30 μ l に再懸濁する。このうち 10ul をウエスタンブロッティングに用いる。

■ 重要なポイント ■

IP-ウエスタン解析では、短鎖特異的抗マウス IgG 抗体を 2 次抗体として用いるのがよい。
“Peroxidase-conjugated AffniPure Goat Anti-Mouse IgG, Light Chain Specific” (Jackson ImmunoResearch 115-035-174) を推奨。