

抗 ATF6 α 抗体, マウスモノクローナル (37-1)

73-505 100 μ g

保存: 4°Cまたは-20°Cで送付、-20°Cで保存

免疫源: リコンビナント ATF6 α (GST 結合 ATF6 α N 末端フラグメント)

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

アイソタイプ: マウス IgG1 κ

エピトープ: 決定されてない

反応性: ヒトおよびマウス ATF6 α (ヒト用にはクローン1-7, #73-500の方が優れている)

用途: (詳細なプロトコールは下記に)

1. ウェスタンブロッティング
2. 免疫沈降 (IP) (免疫沈降にはクローン 1-7 #[73-500](#)のほうが有効)

この抗体は免疫蛍光染色には適さない。

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)

文献:

1. Hai T *et al* (1989) "Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers." *Genes Dev* **3**: 2083-2090 PMID [2516827](#)
2. Haze K *et al* (1999) "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress". *Mol Biol Cell* **10**: 3787-3799 PMID: [10564271](#)
3. Yamamoto K *et al* (2007) "Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1". *Dev. Cell* **13**: 365-376 PMID:

抗ヒト ATF6 α モノクローナル抗体(37-1)を用いた ATF6 α 解析法のプロトコール

下記に記した手順により、抗ヒト ATF6 α モノクローナル抗体クローン 37-1 を用いたウエスタンブロッティングによって、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)。

クローン 37-1 はマウス ATF6 α とも反応するので、NIH3T3 細胞などのマウス細胞におけるウエスタンブロッティングによって 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 2)。

図 1 ヒト細胞抽出液における、この抗体を用いたウエスタンブロッティング: DTT または tunicamycin 処理細胞における pATF6 α (P)から pATF6 α (N)への転換

- 1) 未処理
 - 2) DTT: 1mM dithiothreitol (還元剤) 1 時間処理
 - 3) Tm: 2 μ g/ml tunicamycin (N-glycosylation の阻害剤) 3 時間処理
 - 4) Tm: 2 μ g/ml tunicamycin (N-glycosylation の阻害剤) 7 時間処理
- ★は非グリコシル化型 pATF6 α (P)

ATF6 α は pATF6 α (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 pATF6 α (N) (>50-kDa タンパク質)に転換される。

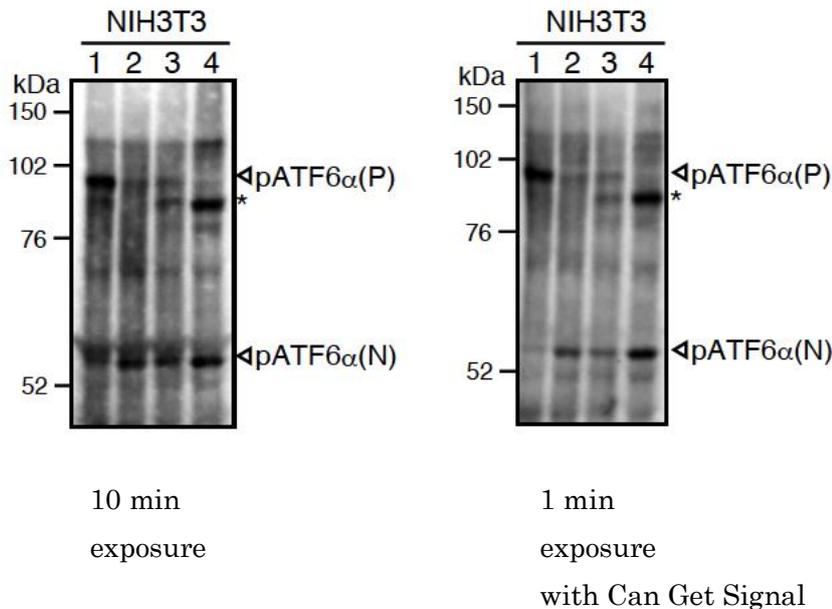
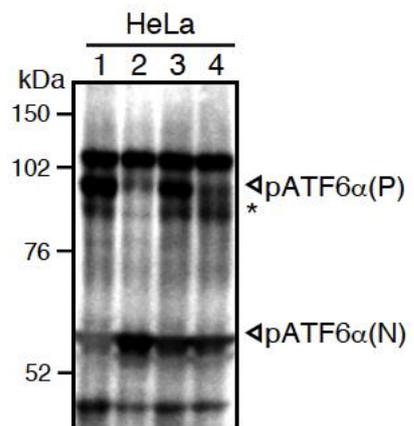


図 2 マウス細胞抽出液における、この抗体を用いたウエスタンブロッティング: DTT または tunicamycin 処理細胞における pATF6 α (P) から pATF6 α (N)への転換

- 1) 未処理
 - 2) DTT: 1mM dithiothreitol 処理 1 時間
 - 3) Tm: 2 μ g/ml tunicamycin 処理 3 時間
 - 4) Tm: 2 μ g/ml tunicamycin 処理 7 時間
- ★は非グリコシル化型 pATF6 α (P)

ATF6 α は pATF6 α (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 pATF6 α (N) (>50-kDa タンパク質)に転換される。

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 dish で培養した HeLa または NIH3T3 細胞)

- (1) 細胞を ice-cold PBS で洗う。
- (2) 細胞を ice-cold PBS (+ protease inhibitor cocktail and 10 μ M MG132) 500 μ l 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) 還元剤なしの SDS-sample buffer (+ protease inhibitor cocktail and 10 μ M MG132) 100 μ l で細胞を溶かす。
- (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) もし lysate がまだ粘稠な場合、再び沸騰させ、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定する。

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 (**overnight でインキュベーションすることが重要**)。
- (13) membrane を、Blocking buffer (1:500-1:1000)で希釈した 1 次抗体液で、室温 1 時間または 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 次抗体液中で、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) を推奨。
- (15) membrane を PBST で各回 5 分間、3 回洗う。
- (16) 適当な発光試薬でシグナルを検出する。

*一次抗体および 2 次抗体とのインキュベーション時に‘Can Get Signal (TOYOBO NKB-101T)’をそのインストラクションマニュアルに従って用いると、より鮮明な結果が得られる。