

DNAダメージ刺激によるp53のリン酸化解析

FCMによるタンパク質翻訳後修飾の評価

癌抑制タンパク質p53はDNAダメージ応答シグナルの最も中心的な役割を担っています。DNAダメージによりp53はリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を受け、それによりp53の細胞内タンパク質量の増加（安定化）や転写機能の活性化がおり、細胞周期停止やアポトーシスなどのDNAダメージ応答が誘導されます。本アプリケーションノートでは、p53およびそのリン酸化の検出による、フローサイトメーター（FCM）RF-500を用いたタンパク質翻訳後修飾の評価についてご紹介します。

結果

DNAダメージに応じてp53の15位セリンがリン酸化を受け、それによりp53の安定化・活性化が起こることが知られています。CamptothecinまたはEtoposide刺激によりDNAダメージ誘導したA549細胞において、p53タンパク質量およびp53のリン酸化（15pS）の増加が観察され、細胞のDNAダメージ応答が示唆されました。

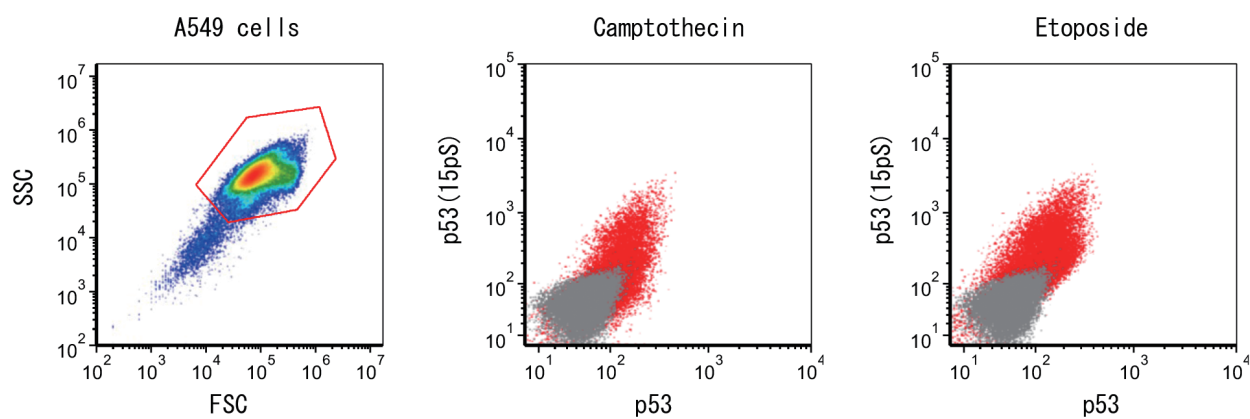


図1 Control（灰色）とDNAダメージ刺激（赤色）後のp53およびp53（15pS）発現量

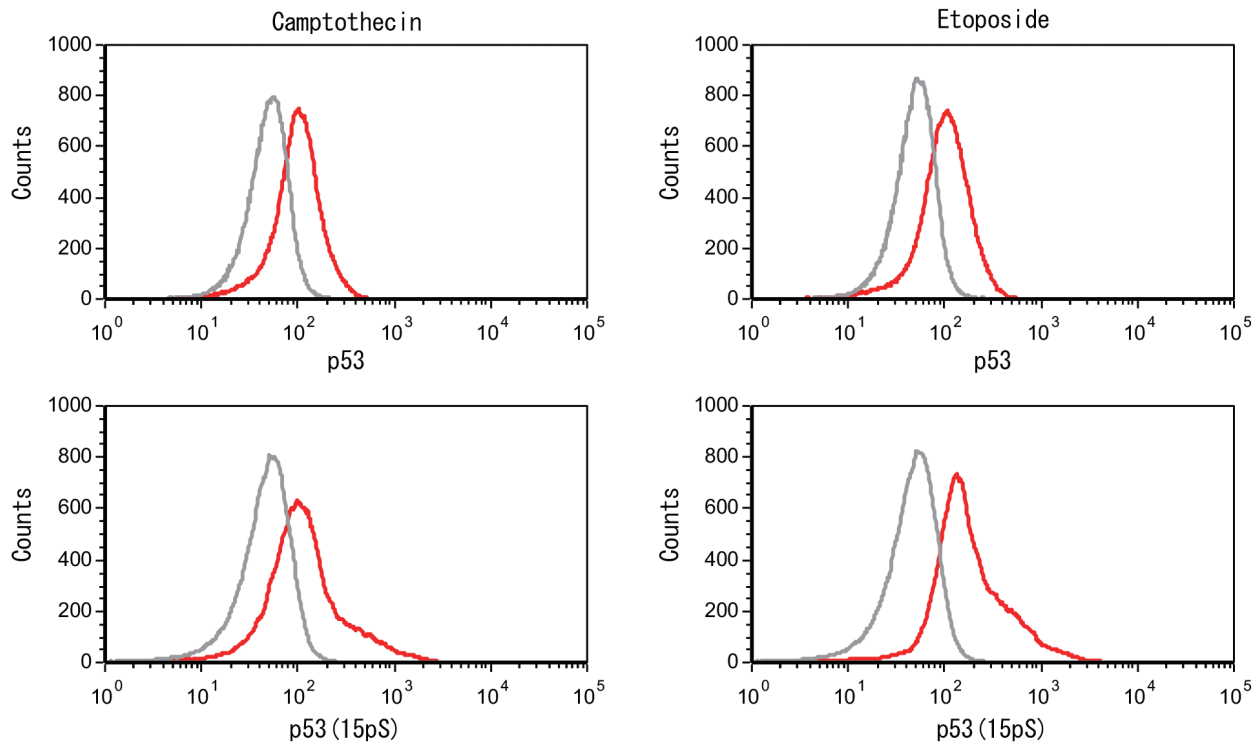


図2 Camptothecin (左列赤線) またはEtoposide (右列赤線) 処理によるp53およびp53 (15pS) の増加を示したヒストグラム

サンプル調製

A549細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株) を10% FBS含有RPMI1640に播種し、その後アポトーシス誘導試薬 (Camptothecin (トポイソメラーゼI阻害剤) またはEtoposide (トポイソメラーゼII阻害剤)) を添加し、18時間培養しました。

刺激後の細胞をトリプシン処理により回収し、Foxp3 Staining Buffer Setにより固定・膜透過処理を行い、p53およびその翻訳後修飾 (15pS) 認識抗体により染色し、フローサイトメーター RF-500を用いて測定を行いました。

試薬・装置

- ・ Anti-human p53 FITC (BioLegend, clone DO-7, cat# 645804)
- ・ Anti-human p53 (15pS) PE (Cell Signaling Technology, clone 16G8, cat# 8514)
- ・ Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience, cat# 00-5523-00)
- ・ Camptothecin - Apoptosis Inducer Set (TaKaRa, cat# PK-CA577-K121-5)
- ・ Etoposide (和光純薬工業, cat# 055-08431)
- ・ フローサイトメーター (対応可能機種) : RF-500, CyFlow Cube 6/8, CyFlow Space
(すべて研究用機器のため診断には使用できません。)

本誌の内容を無断で複製・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。

お問い合わせ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I営業部

リョーショセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-992-6272 Fax 078-991-2317

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557