

タンパク質チオール修飾解析のための 新規ビオチンラベル化剤 Biotin-HPDP(WS)

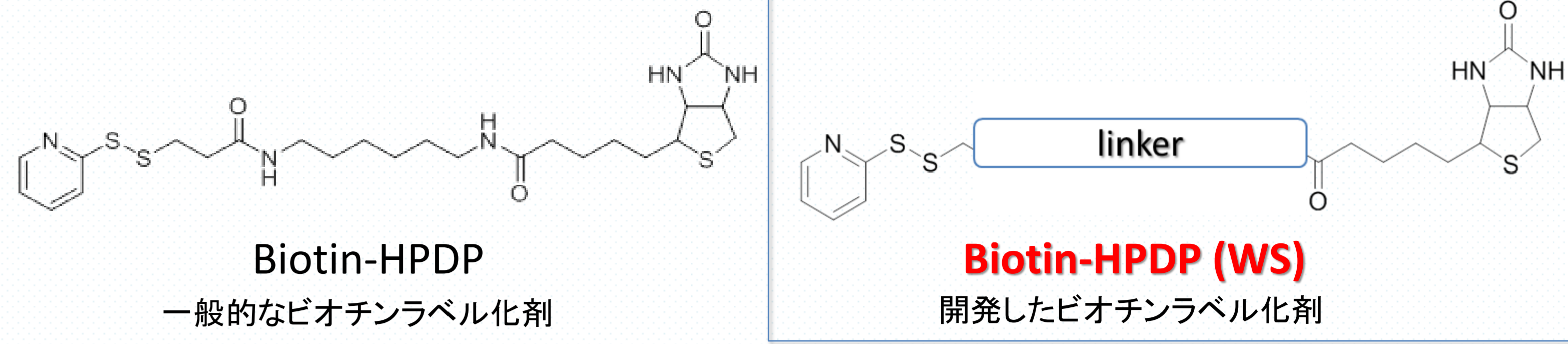
A Novel Biotin Labeling Reagent Biotin-HPDP(WS) for Protein Thiol Modification Analysis

株式会社 同仁化学研究所 ○大内雄也、立中佑希、田中敬子、佐々本一美、石山宗孝

Dojindo Laboratories ○ Yuya Ohuchi, Yuki Tatenaka, Keiko Tanaka, Kazumi Sasamoto, Munetaka Ishiyama

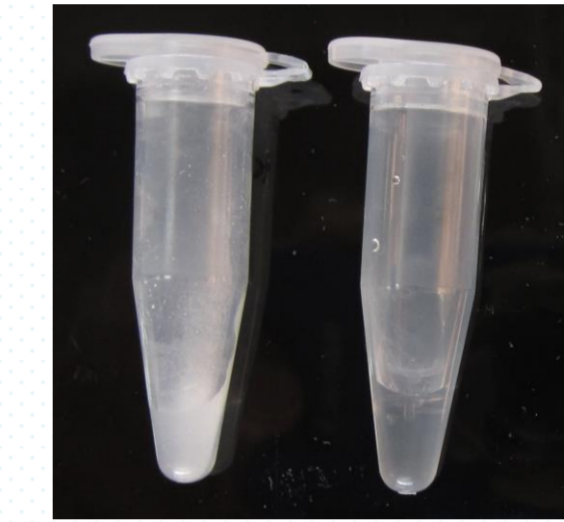
【要旨】

生体内のレドックス応答を研究する上で、どのようなタンパク質のチオール基がどのような修飾を受けているかを解析することが必要不可欠とされている。タンパク質チオール修飾には、スルフェニル化、ニトロシル化、グアニル化、パルミトイル化、グルタチオン化、ジスルフィド形成など数多く存在するが、特に近年においては、硫化水素をはじめとする反応性イオウ分子の生体内での存在が明らかとなり、スルフヒドリル化あるいはポリチオール化などの新しいチオール修飾が注目されている。一般的なタンパク質のチオール修飾解析の一つとして、**ビオチンラベル化剤を用いたBiotin Switch Assay**と呼ばれる手法が汎用されている。この手法では、フリーのチオール基を保護した後、修飾されたチオール基をビオチンラベル化剤であるBiotin-HPDPを用いて選択的にビオチン化し、検出あるいは精製する。Biotin-HPDPは分子内にピリジジスルフィド基を有するため、チオール基に対し、ジスルフィド結合を介してビオチンを付加することが可能である。このジスルフィド結合は、還元剤によって容易に切断できるため、ストレプトアビジン固定化樹脂などを用いたビオチンラベル化タンパク質の精製にも有用である。しかしながら、**Biotin-HPDPはDMSOや水のなどの極性溶媒への溶解性が極めて低く、溶液調製が困難、実験系に多くの有機溶媒が混入する、高濃度でのラベル化反応ができない、などの問題が存在する。**そこで、今回我々は**タンパク質チオール修飾解析に有用な新しいビオチンラベル化剤Biotin-HPDP(WS)**を開発した。今回の発表では、本試薬の基礎的な性能と有用性について議論したい。



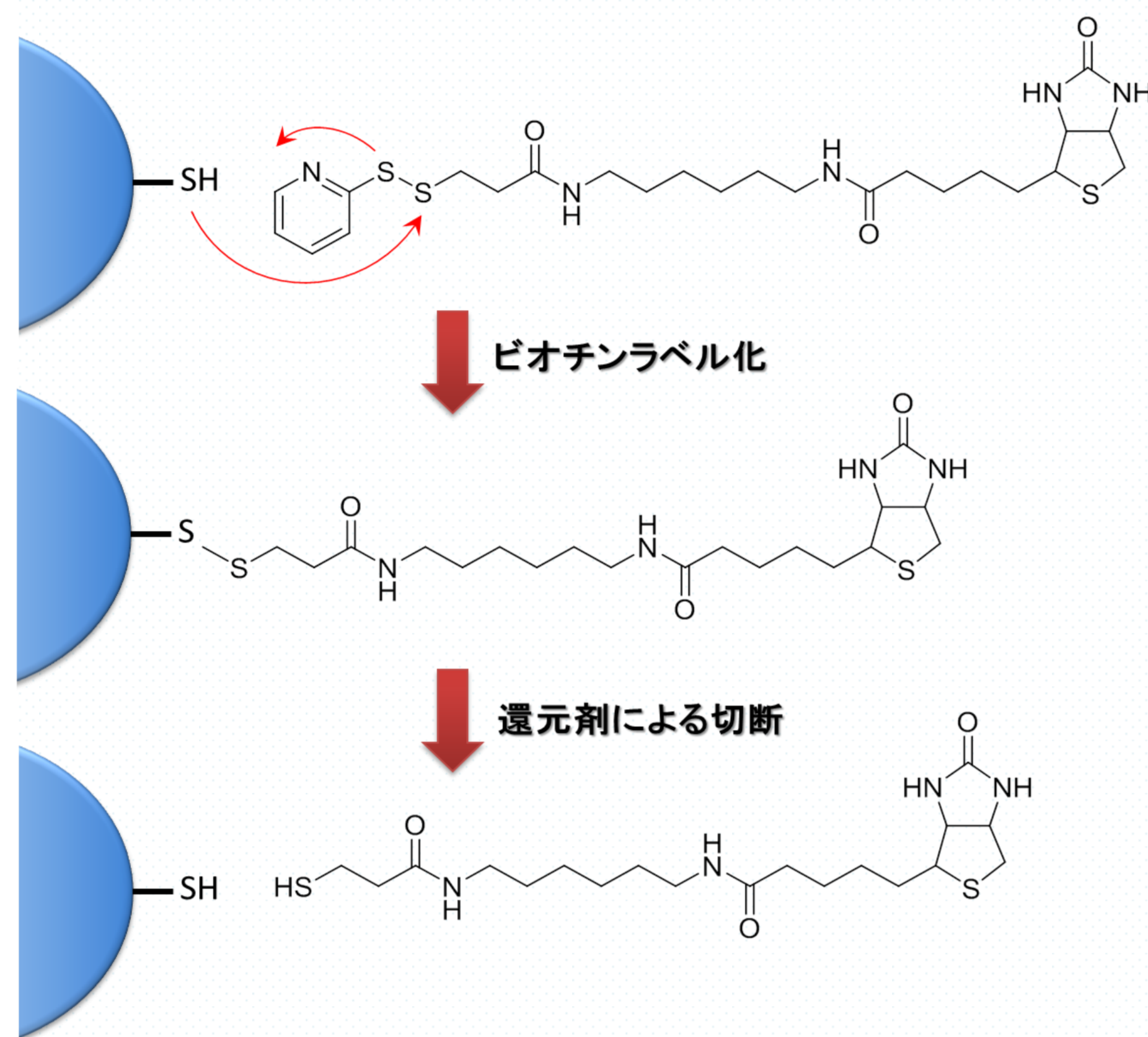
水に不溶
3.7 mM (DMF, DMSO)

※加温(40-50°C)しながら
10-15分超音波にかけて溶解

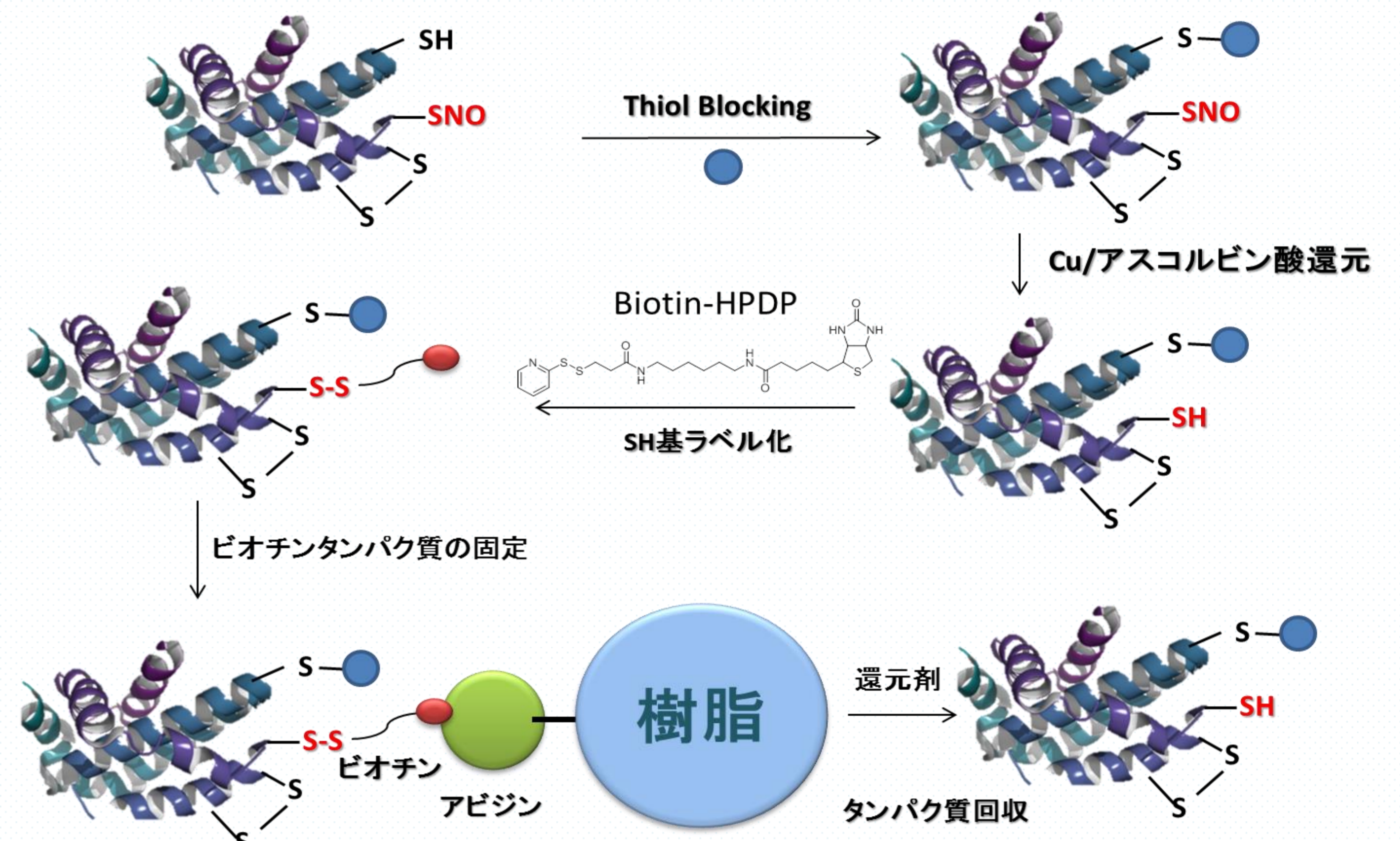


20 mM 水溶液

水に溶解 20 mM (H₂O)
100 mM (DMF, DMSO)



Biotin-HPDPを用いたビオチンラベル化

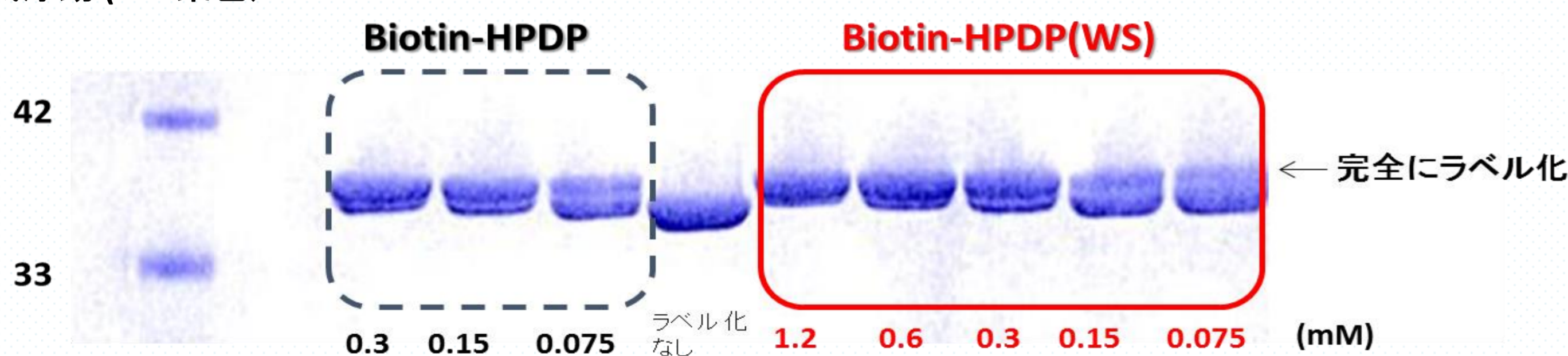


Biotin Switch Assayの原理

【実験】

①ラベル化効率の比較

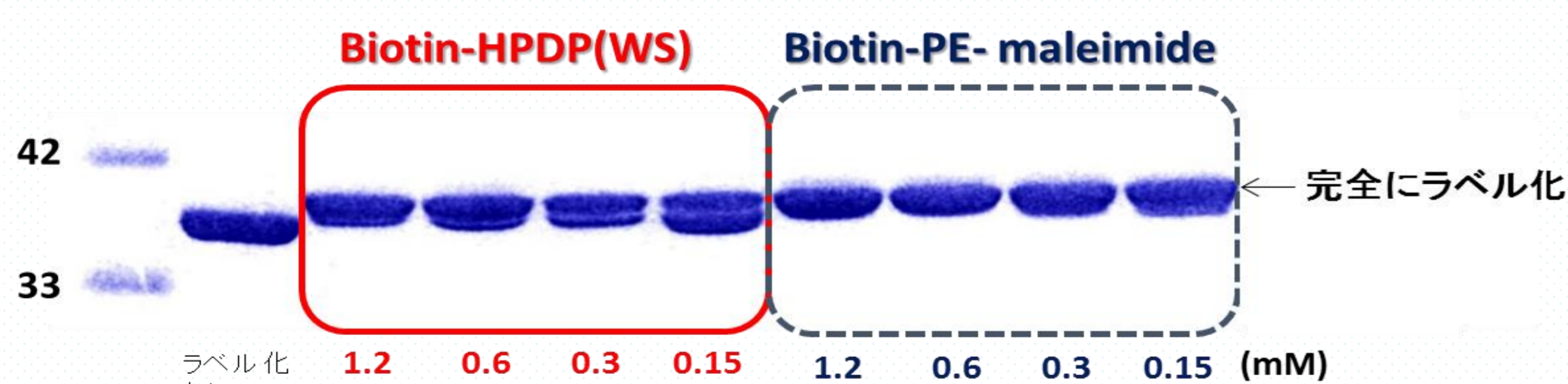
200μg/ml (5.4μM) GAPDH (Cys:3)
X mM Biotin-HPDP or Biotin-HPDP(WS)
↓ Incubate at 37 °C in RIPA buffer
電気泳動 (CBB染色)



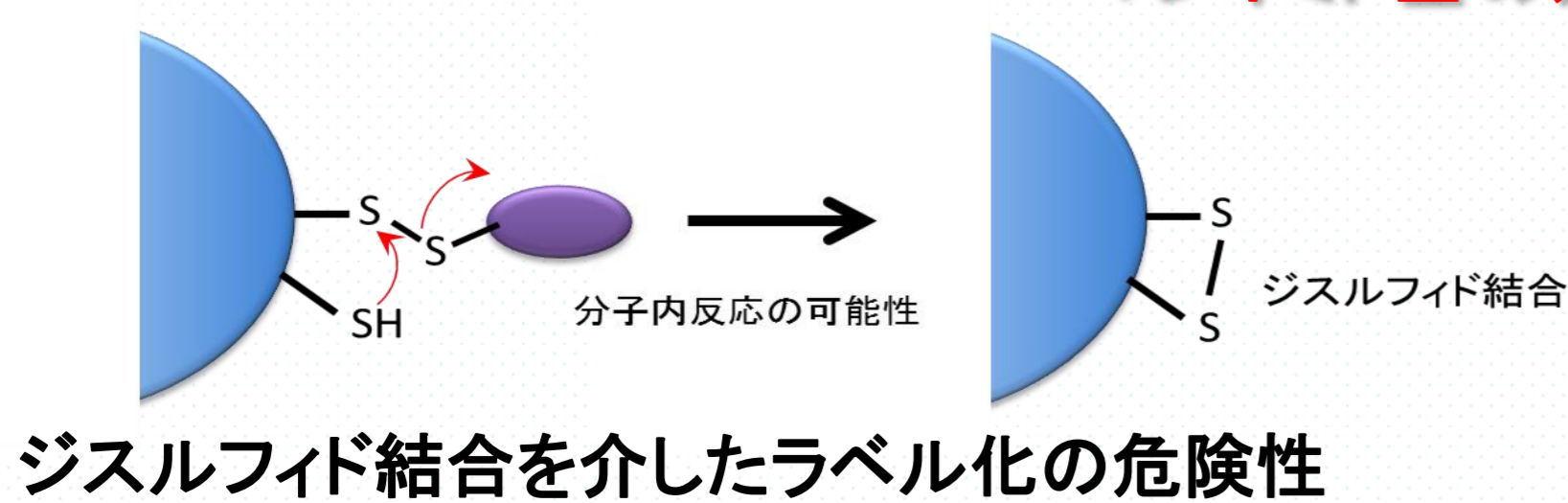
ラベル化効率は同等

②Biotin-PE-maleimideとのラベル化効率の比較

200μg/ml (5.4μM) GAPDH (Cys:3)
X mM Biotin-HPDP(WS) or Biotin-PE-maleimide
↓ Incubate at 37 °C in RIPA buffer
SDS-PAGE (CBB staining)

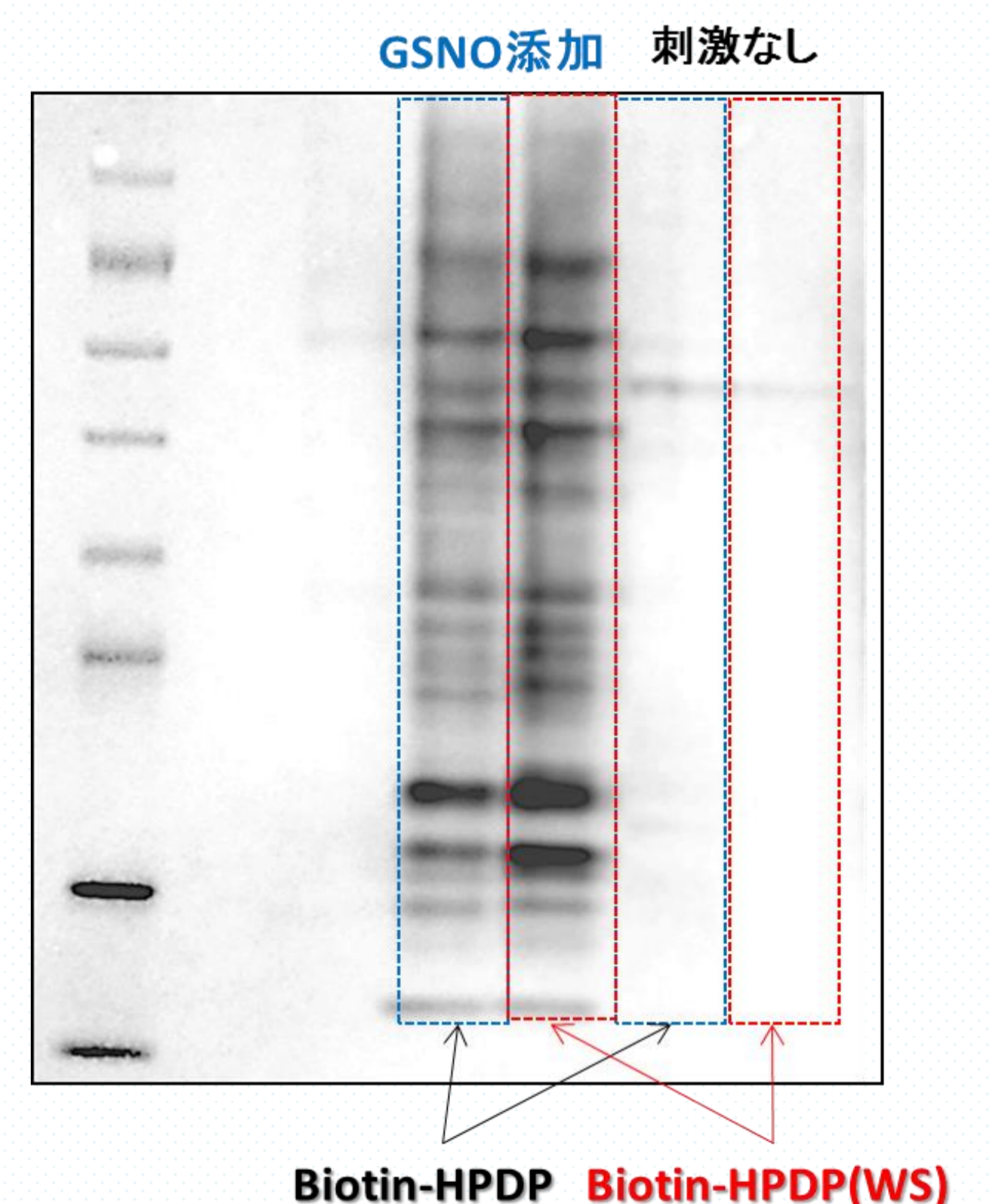


マレイミド基の方がラベル化効率が高い



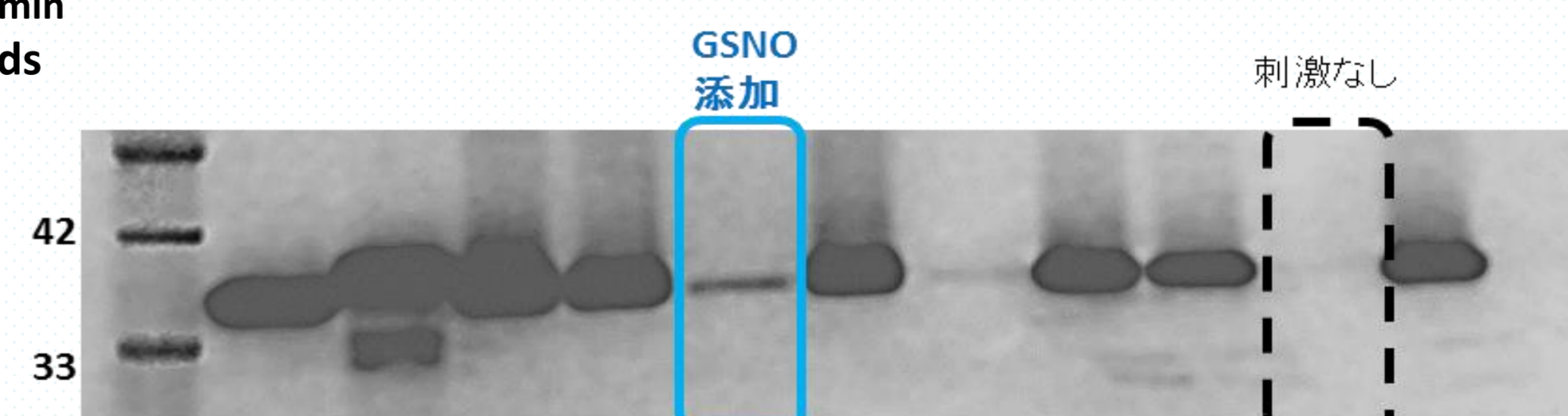
③ニトロシル化タンパク質の検出

CHO cells (Lysis buffer)
↓ 2 mM GSNO, 37°C, 45 min
↓ 1 mM NEM, 37°C, 10 min
↓ Acetone Precipitation
↓ Reducing agent
↓ 150μM Biotin-HPDP or Biotin-HPDP (WS), 37°C, 30min
Western Blotting
(HRP-Streptavidin, Chemiluminescence detection)



④ニトロシル化GAPDHの検出

CHO cells (Lysis buffer)
↓ 2 mM GSNO, 37°C, 45 min
↓ 3 mM NEM, 37°C, 10 min
↓ Acetone Precipitation
↓ Reducing agent
↓ 150μM Biotin-HPDP (WS), 37°C, 30min
Purification with Neutravidin-beads
↓ Western Blotting
(Anti-GAPDH antibody)



【結論】

- Biotin-HPDP (WS)は、
1. Biotin-HPDPよりも溶解性が極めて高い
 2. 高濃度でのラベル化が可能
 3. Biotin Switch Assayに適用できる

参考文献

- 1) S. R. Jaffrey and Solomon H. Snyder, "The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins", *Sci. STKE*, **2001**, 86, p1.
- 2) X. Wang, N. Kettenhofen, S. Shiva, N. Hogg, and M. Gladwin, "Copper dependence of the biotin switch assay: modified assay for measuring cellular and blood nitrosated proteins", *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, 44, 1362.

株式会社 同仁化学研究所
〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原2025-5
熊本テクノ・リサーチパーク
Tel.096-286-1515(代表) Fax.096-286-1525

DOJINDO