

新規タンパク質チオール解析用試薬PEG-PCMalの開発

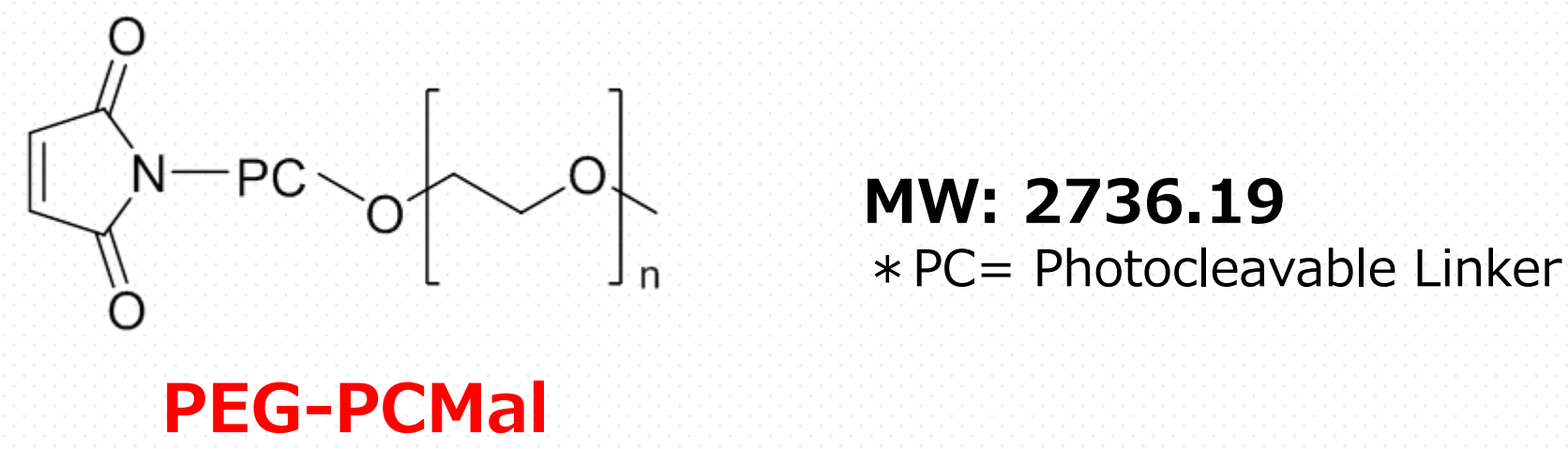
Development and application of a novel thiol labeling reagent PEG-PCMal for protein thiol analysis

株式会社 同仁化学研究所¹⁾ 東京工業大学 資源化学研究所²⁾ ○ 立中 佑希¹⁾、大内 雄也¹⁾、原 怜²⁾、久堀 徹²⁾、石山 宗孝¹⁾
 Dojindo Laboratories Chem. Res. Lab., Tokyo Tech. ○ Yuki Tatenaka, Yuya Ohuchi, Hara Satoshi, Hisabori Toru, Munetaka Ishiyama

【背景】

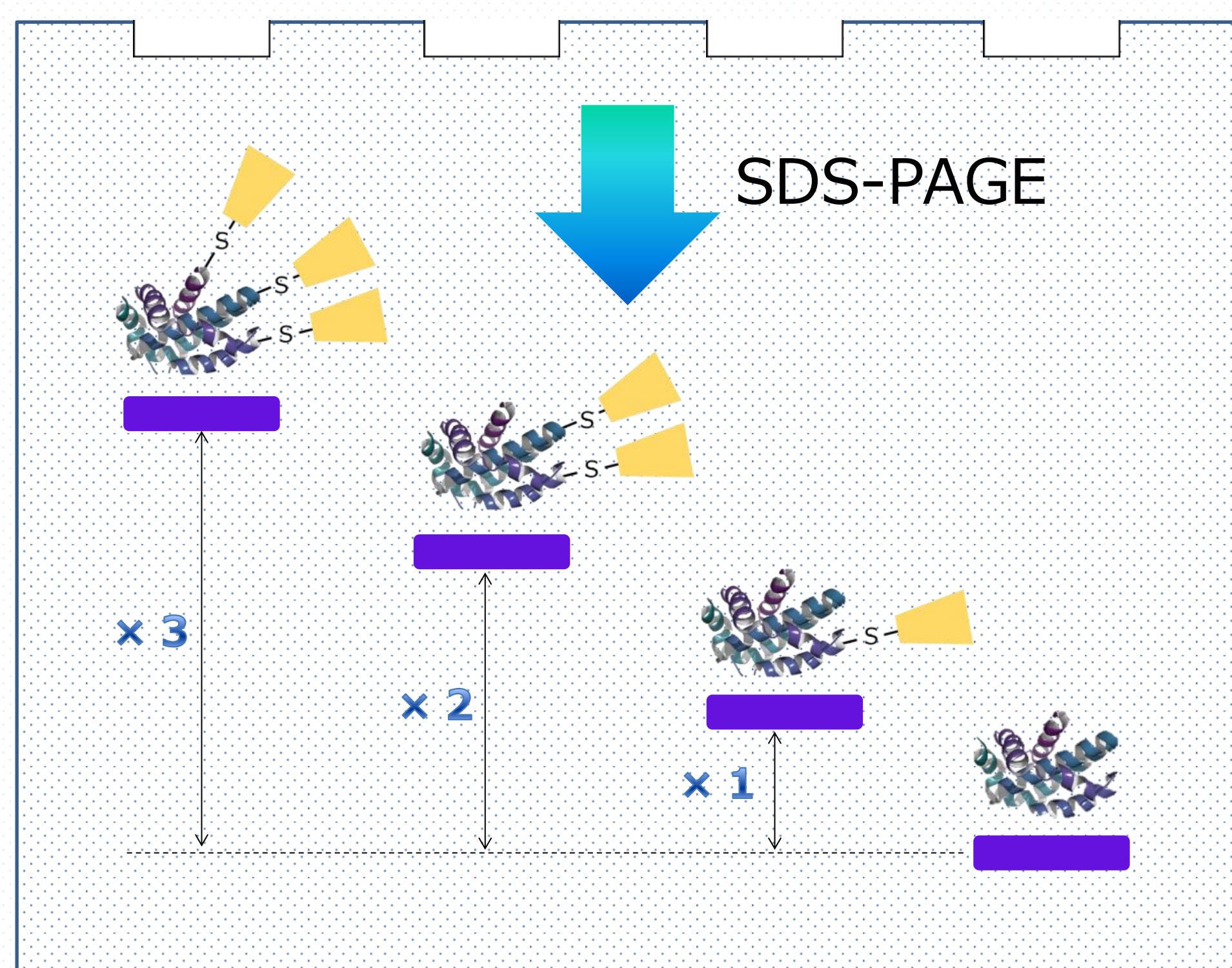
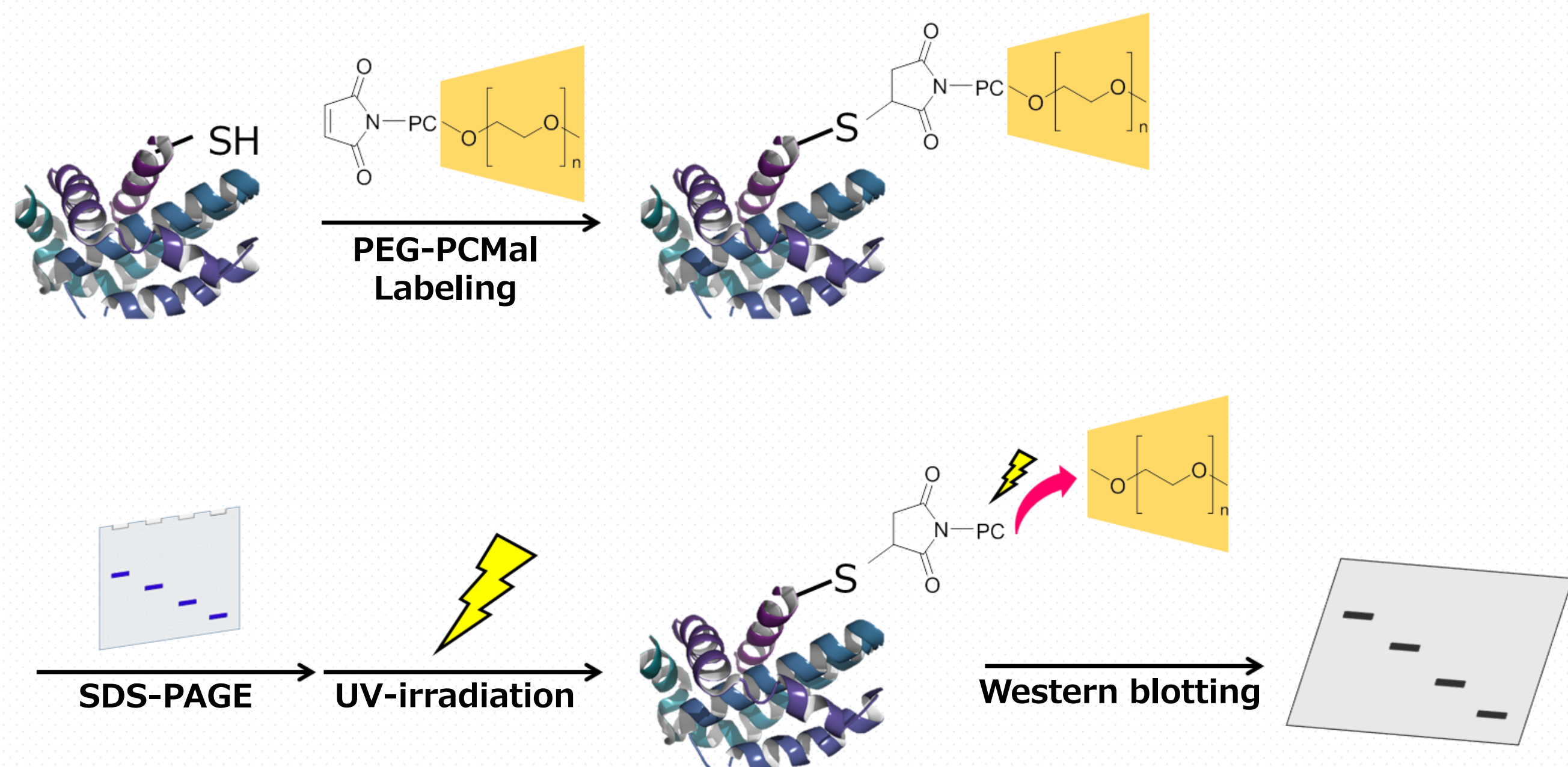
タンパク質は、様々な翻訳後修飾を受けることにより、その機能がコントロールされている。タンパク質システインのチオール基修飾は、代表的な翻訳後修飾の一つであり、生体内のレドックス変化に反応して生じる。例えば、ジスルフィド結合の形成やS-スルフィドリル化、S-ニトロシル化などである。今回、単一分子量のPEGを材料とした新規マレイミド試薬 **PEG-PCMal** (Polyethylene glycol-PhotoCleavable Maleimide) を新たに開発した。本試薬は、従来のPEG-マレイミド試薬では実現できなかった**シャープなバンドシフト**と**高い転写効率**を有している。また、1分子あたり約**5 kDa**のバンドシフトを与えるため、チオール基数が多いタンパク質に対しても適用が可能である。

今回の発表では、本試薬を用いたレドックス応答性タンパク質の解析について紹介する。



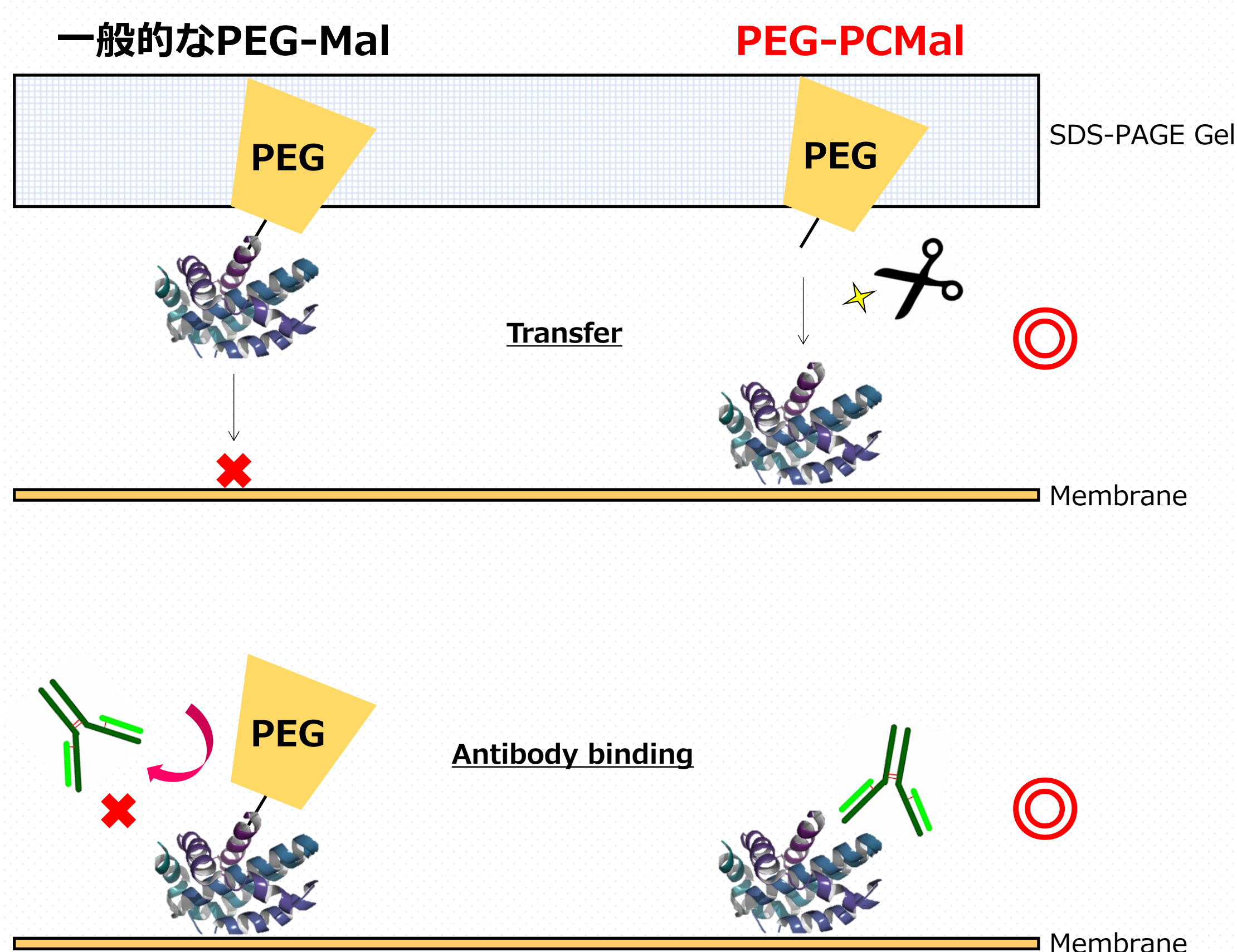
- 5 kDa相当の大きな移動度変化を与え、大きなタンパク質にも適用可能。
- タンパク質チオール基に結合したPEG鎖を、紫外線照射によって除去できる。(ウエスタンブロット時の転写効率の回復、抗体染色法に適用可)

【レドックス状態の見分け方】



フリーのチオール基数=マレイミドの結合数
 電気泳動で分離して、移動度変化(バンドシフト)を検出する。

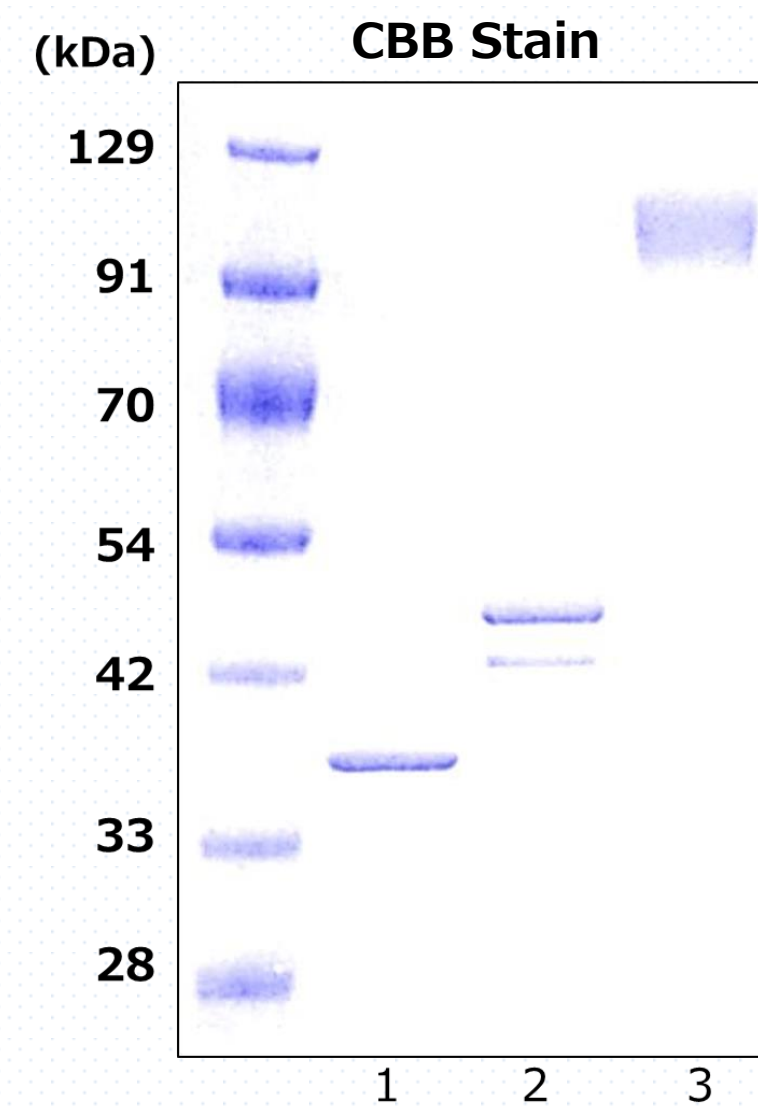
【ウエスタンブロット時のPEG-MalとPEG-PCMalの比較】



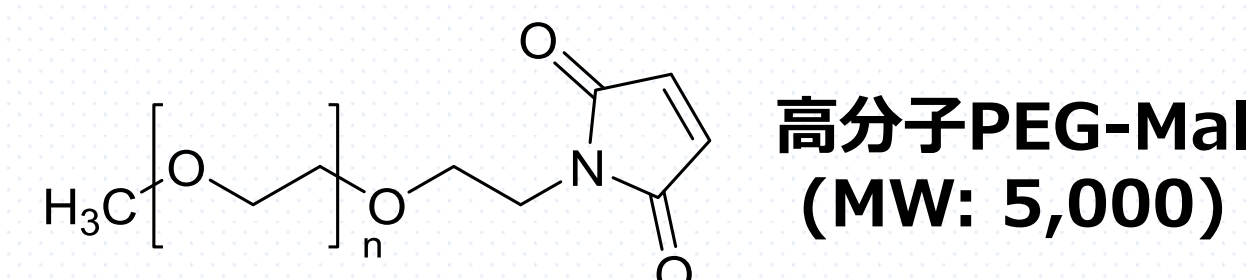
タンパク質を電気泳動した後、UV照射によりタンパク質からPEG鎖を切断する。

【PEG-PCMalとPEG-Malの性能比較】

・高分子PEG-Malとの比較

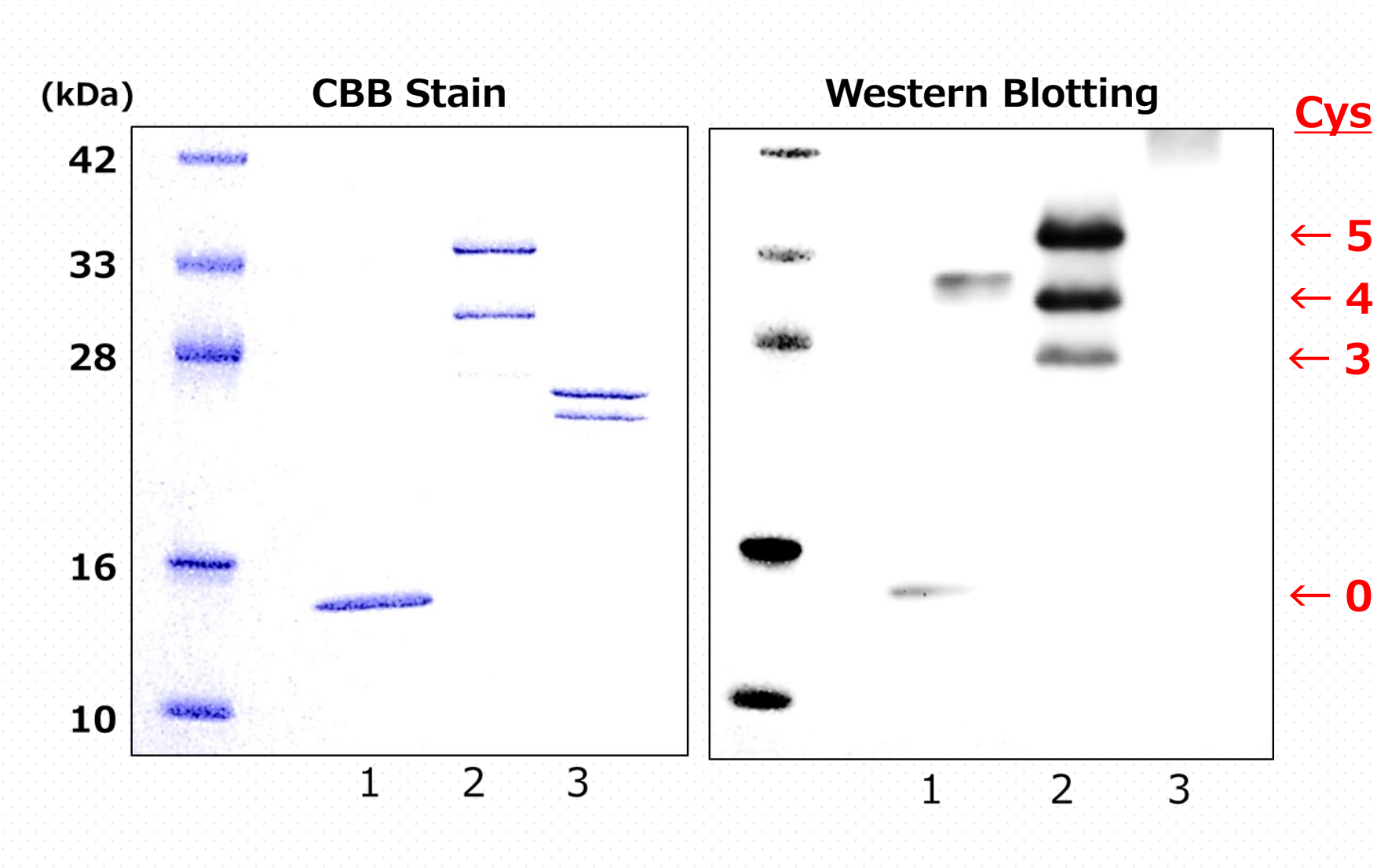


1. GAPDH, 2. PEG-PCMal, 3. 高分子PEG-Mal

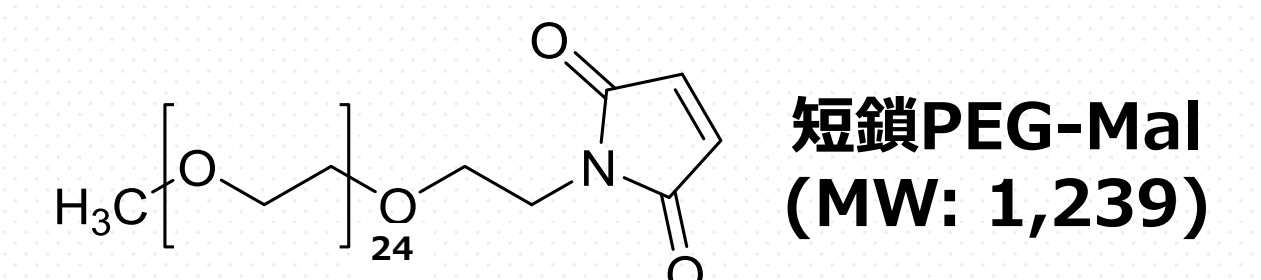


- 【欠点】
- 分子量が不均一なため、バンドが不明瞭。
 - タンパク質の電気泳動や抗体染色法に影響を及ぼす。

・短鎖PEG-Malとの比較



1. TRX, 2. PEG-PCMal, 3. 短鎖PEG-Mal



- 【欠点】
- 分子量が小さいため、電気泳動の変化が少ない
 - タンパク質の電気泳動や抗体染色法に影響を及ぼす。

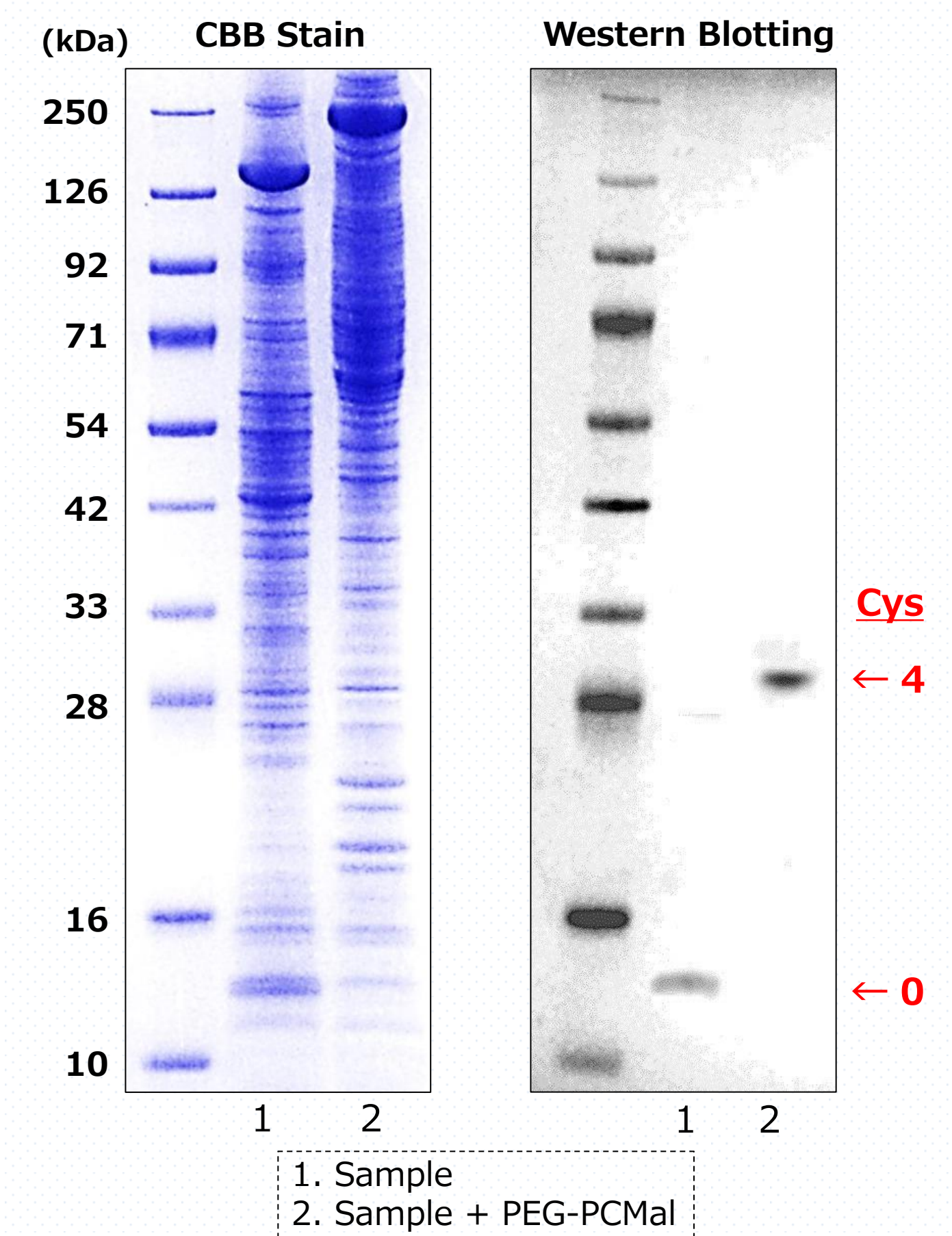
【マウス肝臓中 TRXのレドックス状態の解析】

【操作】

- Mouse liver tissues (5mg)
 ↓ Frost shattering (Liquid N₂)
 ↓ ± PEG-PCMal (Final: 4 mM)
 ↓ 37°C, 60 min
 ↓ SDS-PAGE
 CBB Stain
 ↓ UV-irradiation
 ↓ Blocking
 ↓ 30 min at RT
 ↓ Anti-GAPDH (Rabbit IgG)
 ↓ 60 min at RT
 ↓ Anti-Rabbit IgG (HRP-labeled)
 ↓ 60 min at RT
 ↓ Chemiluminescent detection (Luminol)
 Western Blotting

【タンパク質】

TRX
 (Thioredoxin)
 • Protein: TRX (Mouse)
 • Molecular weight: 12 kDa
 • Cysteine residues: 6



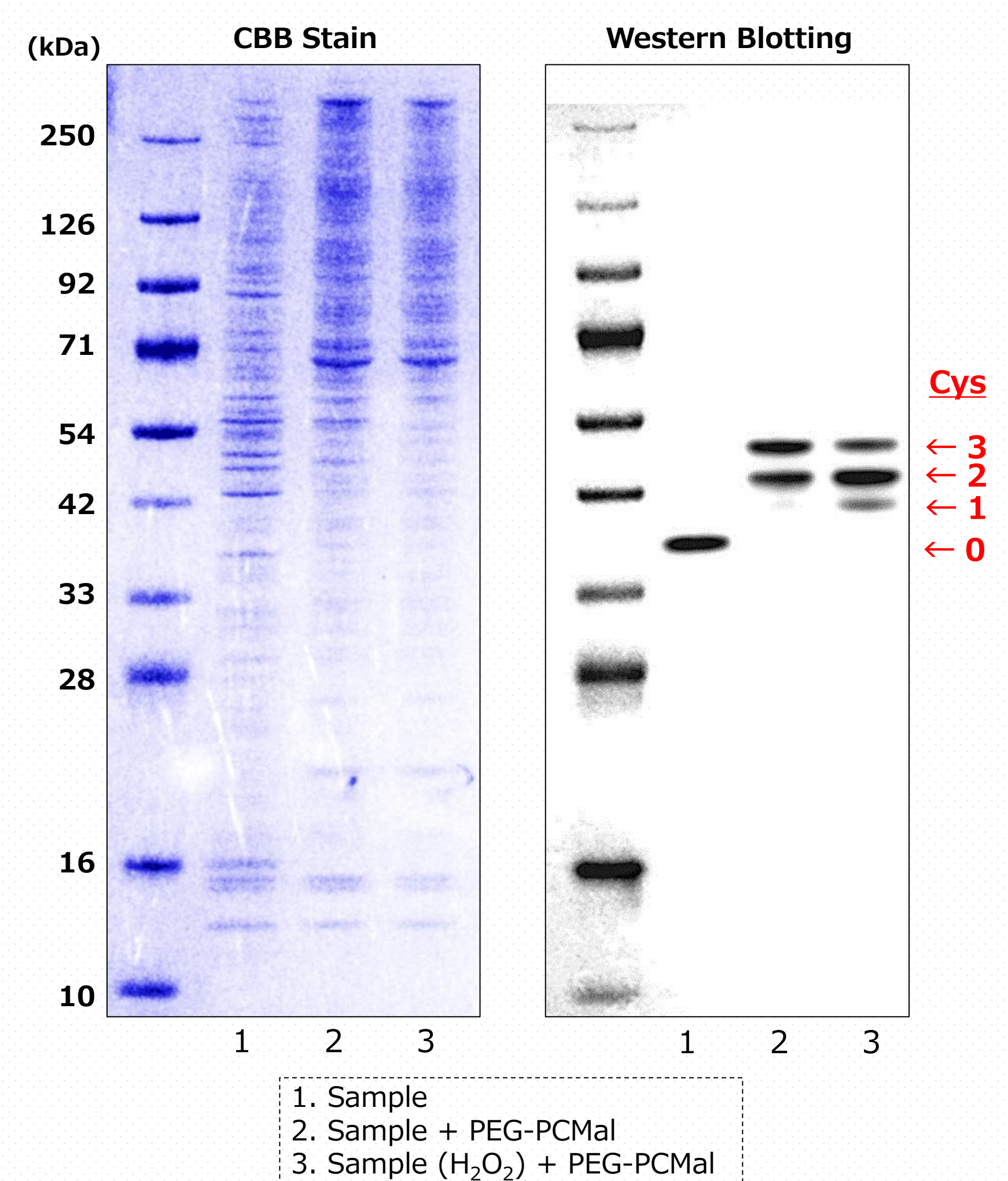
【HeLa細胞中のGAPDHにおける酸化剤に対する応答】

【操作】

- HeLa cells (MEM)
 ↓ HBSS wash × 2
 ↓ ± H₂O₂ (Final: 1 mM)
 ↓ 37°C, 30 min
 ↓ ± PEG-PCMal (Final: 4 mM)
 ↓ 37°C, 60 min
 ↓ SDS-PAGE
 CBB Stain
 ↓ UV-irradiation
 ↓ Blocking
 ↓ 30 min at RT
 ↓ Anti-GAPDH (Rabbit IgG)
 ↓ 60 min at RT
 ↓ Anti-Rabbit IgG (HRP-labeled)
 ↓ 60 min at RT
 ↓ Chemiluminescent detection (Luminol)
 Western Blotting

【タンパク質】

GAPDH
 (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)
 • Protein: GAPDH (Human)
 • Molecular weight: 37 kDa
 • Cysteine residues: 3



【結論】

- PEG-PCMalは、ウエスタンブロット解析においても高感度にバンドを検出し、非常にシャープなバンドを与えた。
- PEG-PCMalを用いることで、動物細胞、動物組織からレドックスタンパク質を検出することに成功した。
- 過酸化水素処理により、酸化修飾を受けたバンド(チオール基 x 1)を検出した。

参考文献

S. Hara, Y. Tatenaka, Y. Ohuchi, and T. Hisabori, "Direct determination of the redox status of cysteine residues in proteins *in vivo*", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2015**, 456(1) 339.

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

