

Quick protein binding analysis by label-free thermal shift analysis on the Tycho NT.6

Mariam Mohamadi, Nuška Tschammer and Dennis Breitsprecher

NanoTemper Technologies GmbH, Floessergasse 4, 81369 Munich

Introduction

著名な化学者のエミール フィッシャーによって最初に提唱された鍵と鍵穴モデルでは、酵素と基質は両者の生理学的機能を満たすために、鍵と鍵穴のようにお互いが適合する必要があると提案しています。この生物学的システムがその金属的な名前とはかけ離れていることが明らかになって長いですが、3次元的に相互作用している分子についてのその原理は、ほぼすべての生物学的プロセスの基礎となっています。もちろん、これは酵素だけに限らず、全てのタンパク質相互作用にあてはまります。タンパク質でも、正しくフォールディングされて、構造的に完全である分子だけが、その機能を正しく働かせることができます。それゆえタンパク質にかかわっている研究者にとって、タンパク質の構造と機能を解析することは、根本的に重要なのです。

Tycho™ NT.6 は、タンパク質機能が短時間で簡単かつ容易にチェックできて、その結果、その品質がすぐわかります。

タンパク質が機能を持ち、相互作用のパートナーあるいはリガンドと結合できるかどうかを決定するために、Tycho NT.6では標識不要のサーマルシフト解析を行うことで、タンパク質 - リガンド相互作用を評価できます。対象のリガンドはイオン、糖、低分子化合物、核酸から脂質まで幅広く利用できます。高い精度でアンフォールディングプロファイルを記録、比較することによって、蛍光特性でモニタリングされているタンパク質安定性におけるリガンド起因の変化で、リガンドの結合を結論づけることができます。したがって、Tycho NT.6システムは数分でタンパ

ク質機能を評価できて、簡単に精製ワークフローまたはアッセイ開発ルーチンに組み込むことも可能です。

Results

この研究では、一連のタンパク質のアンフォールディングプロファイルを、標的タンパク質との結合が既知のリガンドの有無で評価しました。Fig. 1Aと1Bはそれぞれp38 α キナーゼのMg²⁺イオンと低分子阻害剤の結合をみたものです。両方物質とも、アンフォールド遷移がより高温側の変曲点温度(T_i)にシフトしました。これは、相互作用が起こったことを示唆します。低分子阻害剤SB203580の結合はまた、フォールディング状態の比(initial ratio)も変化させました。これはおそらく低分子のトリプトファン蛍光放射への影響によって引き起こされたものです。

Fig.2では、マルトース結合タンパク質(MBP)とマルトースとの相互作用を示しています。マルトースの存在は、変曲点温度の56.3°Cから58.5°Cへのシフトを引き起こしました。さらに、initial ratioの値も変化しており、これはマルトースの結合

による著しいタンパク質の構造変化によるものと考えられます。

最後にFig.3で示したのは、リゾチームと大腸菌細胞壁構成物質の3'NAGの相互作用です。アンフォールド遷移が1.8°C上昇したほかに、3'NAG存在下でのリゾチームのinitial ratioの値は単独の時よりも大きく低下しています。これはリガンドの結合が、今までとは別の方法で露出しているトリプトファン残基を覆い隠し、その結果トリプトファン蛍光が短波長側へとシフトしたため、低いinitial ratioになることを示唆しています¹。

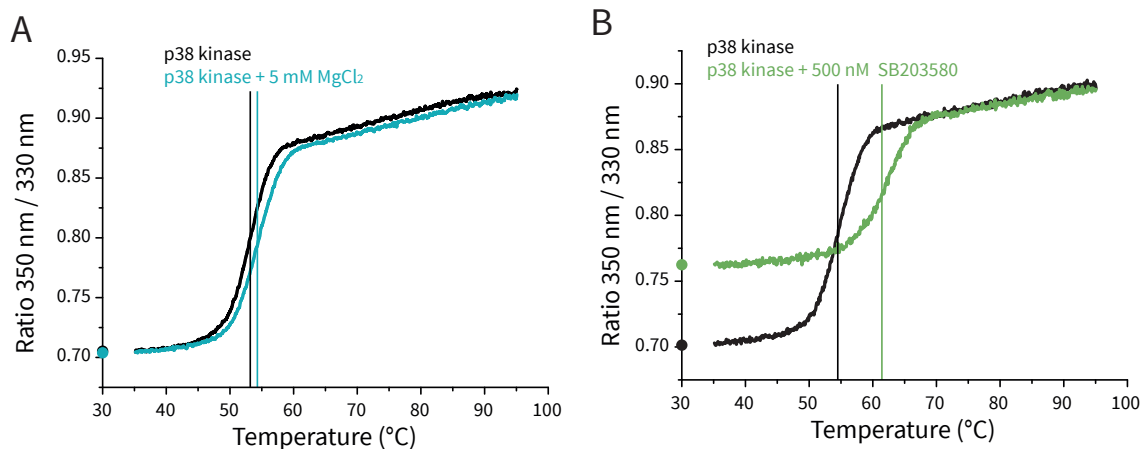


Figure 1: Monitoring p38 kinase binding activity using a label-free thermal shift analysis. A) Interaction of 4 μ M p38 α kinase with 5 mM Mg²⁺ ions. B) Interaction of 4 μ M p38 α kinase with 500 nM SB203580. Vertical lines indicate inflection temperatures (T_i), colored circles on the y-axis indicate initial ratio values.

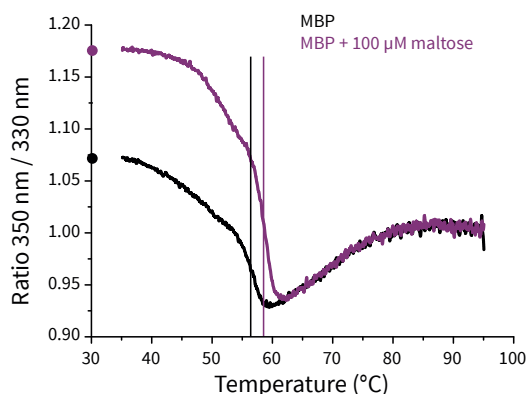


Figure 2: Label-free thermal shift analysis of 10 μM maltose-binding protein (MBP) interacting with 100 μM maltose using Tycho NT.6. Dramatic differences in the initial ratio values are likely due to the conformational changes of MBP upon binding of maltose. Vertical lines indicate inflection temperatures (T_i), colored circles at the y-axis indicate initial ratio values.

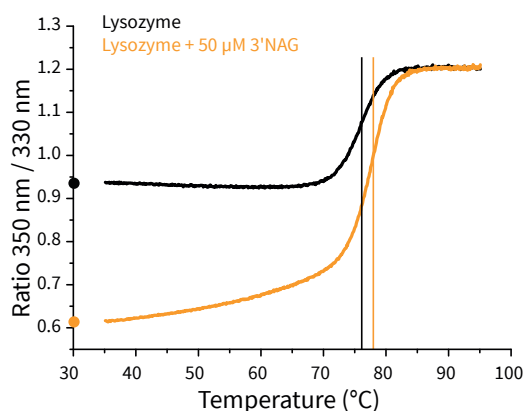


Figure 3: Testing the interaction of bacterial cell wall complex (NAG) with lysozyme using the Tycho NT.6. 5 μM lysozyme was incubated with 50 μM 3'NAG and analyzed. Vertical lines indicate inflection temperatures (T_i), colored circles at the y-axis indicate initial ratio values.

Conclusions

これらの例は、Tycho NT.6システムが標識不要のサーマルシフトアッセイで、迅速かつ信頼性のあるyes/no結合チェックができることを示しています。さらに、システムが検出する相互作用はタンパク質の機能予測、初期試験としても利用可能です。リガンドと相互作用していると予測されたタンパク質は、下流の実験においてもふさわしい機能を維持しています。Tycho NT.6での実験は短時間で簡単に行えて、マイクロリットルのサンプルだけで必要で、タンパク質研究をされている科学者の標準品質確認ツールとして役立ちます。

Reference

1. Telmer, P.G. and B.H. Shilton, Insights into the conformational equilibria of maltose-binding protein by analysis of high affinity mutants. *J Biol Chem*, 278(36): p. 34555-67 (2003).

お問い合わせ先:

株式会社 **エムエス** テクノシステムズ

東京: 〒162-0805 東京都新宿区矢来町113 Tel: 03-3235-0673 FAX: 03-3235-0669
 大阪: 〒532-0005 大阪市淀川区三国本町2-12-4 Tel: 06-6396-6616 FAX: 06-6396-6644
 UR: <http://www.mstechno.co.jp> Email: technosales@technosaurus.co.jp

NANOTEMPER

nanotempertech.com