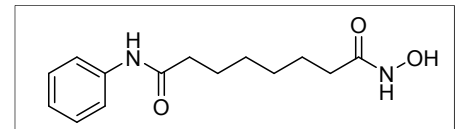


Isolation of drug target protein (3) Histone Deacetylase Inhibitor【Vorinostat】

Summary

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) とはクロマチン構造における主要な構成因子であるヒストンの脱アセチル化を行う酵素であり、Vorinostat (SAHA) はHDAC阻害剤のひとつとして知られています。今回、ある条件下におけるVorinostatのターゲットタンパク質を分離する実験を行ったので紹介します。本実験ではFGビーズ(NHSビーズ)へVorinostatアミノ化誘導体を固定化し、HeLa細胞抽出液から結合タンパク質をアフィニティ精製しました。その結果、いくつかの結合タンパク質が精製され、ウェスタンブロットングにより4種類のHDACが、MS解析によりECHS1 (Enoyl CoA hydratase, short chain 1) が同定されました。FG beadsに固定化する化合物量によって精製される結合タンパク質の種類や量は変化するので、条件を変えながら検討することが必要となります。



Vorinostat

Experimental Information

VorinostatはFGビーズに固定化するのに有効な官能基を持たないため、Vorinostatアミノ化誘導体を合成しました。誘導体を合成する場合は、化合物の活性に重要でない位置に新たに官能基を導入したものを合成します。

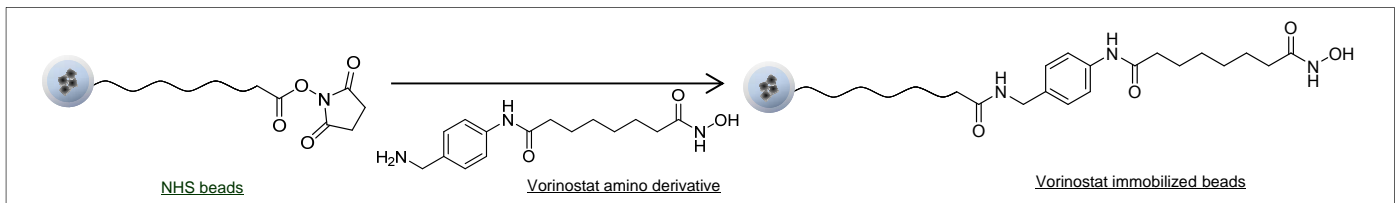
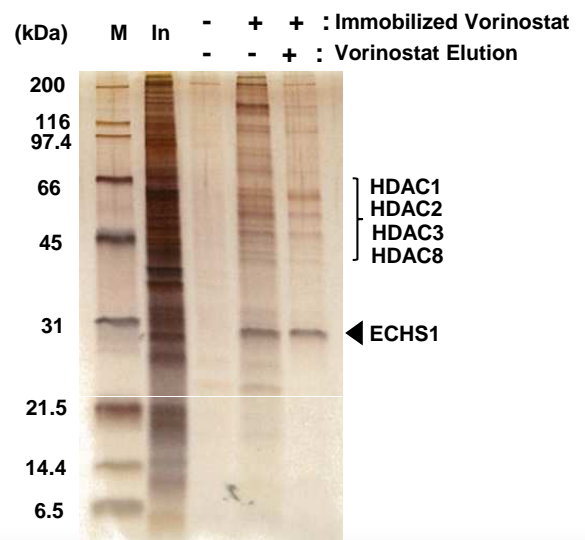


Fig.1 Immobilization of Vorinostat amino derivative on NHS beads

Result

- FGビーズを使用して幾つかの結合タンパク質が回収されました。Vorinostatで競合溶出させることによって回収されるタンパク質は、それらのタンパク質が特異的にVorinostatと結合することを示しています。ウェスタンブロットングを実施したところ、右図の4種類のHDACが確認できました。更にMS解析を実施したところ、ECHS1が同定できました。



Materials and method

Materials

1. Vorinostat amino derivative
2. NHS beads
3. HeLa cell extracts (cytosolic fraction) – 3mg/ml
4. Binding & Washing Buffer (20mM HEPES-NaOH(pH7.9), 100mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂, 0.2mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 0.2mM PMSF)
5. Elution Buffer (0.0625M Tris-HCl (pH6.8), 0.005% BPB, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercapto ethanol)
6. Vorinostat
7. Rabbit polyclonal anti-HDAC1 (from Santa Cruz Biotechnology)
8. Rabbit polyclonal anti-HDAC2 (from Santa Cruz Biotechnology)
9. Rabbit polyclonal anti-HDAC3 (from Santa Cruz Biotechnology)
10. Rabbit polyclonal anti-HDAC8 (from Santa Cruz Biotechnology)
11. Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (from GE Healthcare)
12. Starting Block™ (TBS) Blocking Buffer (from Thermo scientific)
13. TBS-T buffer (137mM NaCl, 2.68mM KCl, 25mM Tris-HCl, pH7.4, 0.1w/v% Tween-20)

Methods 1 (Immobilization)

1. Apply
 - 0.5mg NHS beads and 0.3mM vorinostat amino derivative in 100ul DMF
 - 0.5mg NHS beads and NO vorinostat amino derivative in 100ul DMF (Negative Control)
2. Reaction
 - 1) Immobilization
 - 70min at r.t.
 - 2) Masking
 - Inactivate unreacted NHS according to recommended conditions.

Methods 2 (Affinity purification)

1. Wash
 - Wash beads with washing buffer 3 times at 4°C (on ice).
2. Add sample solution
 - Add 1000ul HeLa cell extracts to beads.
3. Reaction
 - Incubate for 240min at 4°C.
4. Wash
 - Remove sample solution.
 - Wash beads with washing buffer 3 times at 4°C (on ice).
5. Elution
 - Vorinostat elution : -
 - Add 40ul elution buffer and resuspend beads.
 - Boil for 5min at 98°C and remove beads.
 - Vorinostat elution : +
 - Add 30ul of 25mM vorinostat in washing buffer and resuspend beads.
 - Place the tube on ice for an hour to allow bound proteins to elute by tapping at intervals.
 - After spin down, separate magnetically.
 - Transfer the supernatant to a new clean tube.
 - Add 10ul of 4 × elution buffer to the tube.
 - Boil for 5min at 98°C.
6. Analyze the samples by SDS-PAGE and silver staining

FG beads information

Product name	NHS beads
Product number	TAS8848N1141
Storage temperature	-20°C
Storage buffer	Isopropyl alcohol
Size of beads	190nm ± 20nm
Functional groups	200 - 300nmol/mg

Methods 3 (Western blotting)

1. Perform SDS-PAGE and transfer the protein to a PVDF membrane.
2. Block the membrane with the blocking buffer for 15min at room temperature.
3. Dilute the anti-HDAC antibody with the blocking buffer to 1/200.
4. Incubate for 60min at room temperature.
5. Dilute the secondary antibody with the TBS-T buffer to 1/1000.
6. Incubate for 60min at room temperature.
7. Wash the membrane with TBS-T buffer three times.
8. Detect with a chemiluminescence substrate.

Methods 4 (MS)

1. Excising the bands from the gel.
2. Wash the band pieces, then dry the band pieces.
3. Add 500ul/band of 10mM DTT/25mM NH₄HCO₃.
4. Incubate for 60min at 56°C.
5. Add 500ul/band of 55mM iodeacetamide/25mM NH₄HCO₃.
6. Incubate for 60min at room temperature.
7. Wash the band pieces with 200ul of 25mM NH₄HCO₃ for 10min.
8. Wash the band pieces with 500ul of 25mM CH₃CN/NH₄HCO₃ (50:50 v/v) for 10min.
9. Dry the band pieces.
10. Add 10ul/band of 10ug/ml trypsin in 25mM NH₄HCO₃.
11. Incubate overnight at 37°C.
12. Add 50ul/band of 25mM CH₃CN/trifluoroacetic acid/ultrapure water (50:5:45 v/v).
13. Incubate for 30min at room temperature.
14. Transfer supernatant to a new clean tube.
15. Dry the peptides in the tube.
16. Injection on the MS.