

[質量分析法による合成タンパク質のプレニル化の解析]

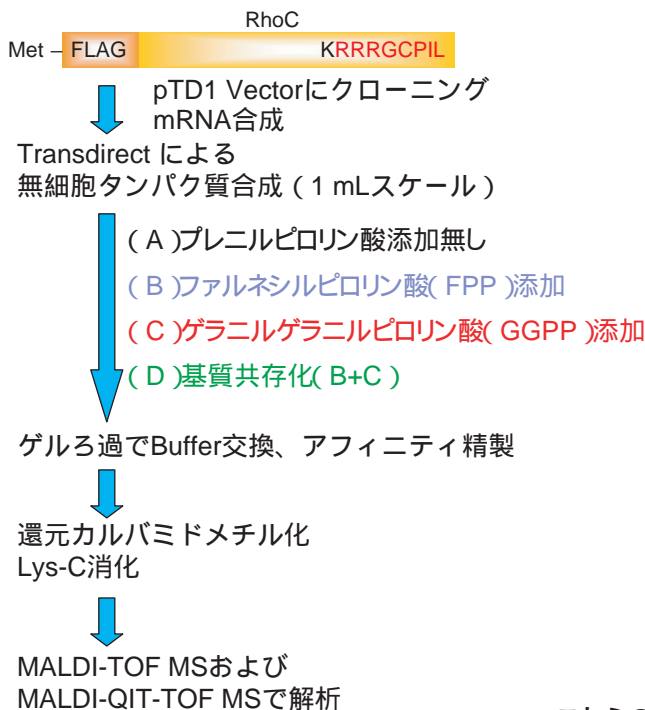
近年、タンパク質翻訳後修飾解析の重要性が高まっています。タンパク質プレニル化はC末端の脂質修飾で、Rasなどの低分子量GTP結合型タンパク質に多く認められ、タンパク質-膜またはタンパク質-タンパク質相互作用に重要な役割を果たすことが知られています。

TransdirectとMALDI-TOF型質量分析装置を組み合わせることで、効果的にタンパク質プレニル化を解析する手法をご紹介します。

タンパク質プレニル化：プレニル転移酵素によって炭素数15（ファルネシル基）または20（ゲラニルゲラニル基）のイソプレノイドがC末端近傍のシステイン残基に転移されます（下図参照）。ファルネシルトランスフェラーゼ（FTase）またはゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ（GGTase）がC末端の-Cys-Ali-Ali-COOH（Aliは脂肪族アミノ酸）モチーフを認識し、それぞれファルネシル基またはゲラニルゲラニル基を各々のプレニルピロリン酸を供与体としてシステイン残基に転移します。今回はゲラニルゲラニル化が生じることが知られているヒト由来RhoC（シグナル伝達に關与）をモデルタンパク質として解析を行いました。

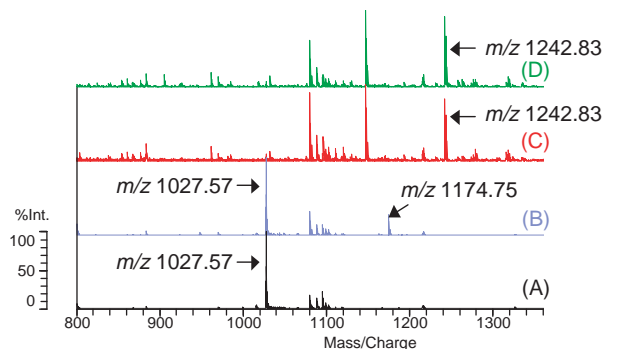
実験フロー

結果



裏面の方法もご参照ください。

推測されるC末端ペプチド断片の構造	理論値[M+H] ⁺
カルバミドメチル化 	1027.59
ファルネシル化 	1174.76
ゲラニルゲラニル化 	1242.82



Lys-C消化産物のMALDI-TOF MS解析

これらのデータは、山口大学大学院医学系研究科教授内海俊彦先生との共同研究による成果です（文献1）。

プレニルピロリン酸添加無し：カルバミドメチル化されたC末端ペプチド断片のみが検出されました。
FPP添加：一部ファルネシル化が生じたと考えられるm/z 1174.75のペプチドが検出されました。
GGPP添加（基質共存化も含む）：ゲラニルゲラニル化が生じたと考えられるm/z 1242.83のペプチドが検出されました。

以上より、Transdirectがタンパク質プレニル化に必要な活性のあるプレニル転移酵素を保持していること、さらに質量分析装置と組合わせた本手法が、プレニル化を解析する強力なツールとなることが示されました。

無細胞タンパク質合成試薬キット Transdirect insect cell

方法

・発現ベクター pTD1 へのサブクローニング及び mRNA の調製

N 末端に FLAG-tag[®] を導入した後、キット付属の取扱い説明書に従い、pTD1 にクローニングした。
その後、キット付属の取扱い説明書に従って mRNA の調製を行った。
FLAG-tag[®] は、SIGMA 社の登録商標です。

・タンパク質合成

キット付属の取扱い説明書に従って、1 mL の反応スケールでタンパク質合成を行った。
その際、基質となるファルネシルピロリン酸（和光純薬工業：065-04211）またはゲラニルゲラニルピロリン酸（MP Biomedicals, Inc.：198736）を終濃度 50 μ M となるよう反応液に添加した。
ここでファルネシルピロリン酸は必要量を分注後、減圧乾燥を行い、少量の滅菌水で懸濁し数分間超音波処理したものを反応液に添加した。ゲラニルゲラニルピロリン酸は直接反応液に添加した。

・タンパク質の精製

Transdirect insect cell アプリケーションデータ に記載の手順を改変した方法で精製した（詳細は文献 1 を参照ください）。

・MS 解析

精製タンパク質（約 0.5-1 μ g）を電気泳動した後、ゲルを切り出し還元カルボミドメチル化を行った。
ゲル中で Lys-C（和光純薬工業：125-05061）消化を行い、0.1% TFA を含む 50% アセトニトリルで消化ペプチドを抽出した。
抽出液を減圧乾燥により乾固させた後、10 μ L の 0.1% TFA を含む 50% アセトニトリルに溶解させた。
1 μ L 分をプレートにスポットし、AXIMA CFR plus および AXIMA QIT を用いて解析した。

・文献

1. Suzuki T., Ito M., Ezure, T., Shikata, M., Ando, E., Utsumi, T., Tsunasawa, S., and Nishimura, O.
Proteomics, 2007, 7, 1942-1950

技術に関するお問合せは・・・

分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット

TEL (075)823-1351
WEB <https://solutions.shimadzu.co.jp/form/biotech/contact.html>
E-Mail t-direct@shimadzu-biotech.jp

Transdirect insect cell (P/N 292-30000-91)

■キット内容 ・ Insect Cell Extract (黄) × 5 本 ・ Reaction Buffer (青) × 1 本
・ 4mM Methionine (赤) × 1 本 ・ 0.5 μ g/ μ L Control DNA (白) × 1 本
・ 0.5 μ g/ μ L pTD1 Vector (緑) × 1 本 ・ 取扱説明書

■反応回数：40 回（50 μ L 合成反応系）

■保存温度：-80

■価格：31,185 円（税込）

ご注意 ・ 試薬キットロット間の合成量には、多少の差が見られますがご了承ください。
・ 概観及び仕様は予告なく変更することがありますのでご了承ください。
・ 本製品の使用は試験研究用のみです。臨床、医薬品・食品製造用途には使用できません。

バルクキット（受注生産のため、詳細はお問い合わせください。）

■価格（税込）

20キット相当分 Transdirect insect cell バルクキット20 (P/N 292-30000-92)	404,250 円
50キット相当分 Transdirect insect cell バルクキット50 (P/N 292-30000-93)	924,000 円
100キット相当分 Transdirect insect cell バルクキット100 (P/N 292-30000-94)	1,617,000 円

バルクキットには、pTD1 Vector と Control DNA は含まれません。



価格は2008年10月1日現在のものです。
仕様および価格は改良のため、予告なく変更することがありますので、ご了承ください。

 島津製作所

分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

バイオ・臨床ビジネスユニット

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1 (075) 823-1351

<http://www.shimadzu-biotech.jp/>

取次店