質量分析計を用いた無細胞合成タンパク質の翻訳後修飾解析

○鈴木　崇[1], 小林　慎一郎[1], 伊東　昌章[1], 江連　徹[1], 四方　正光[1], 内海　俊彦[2]

はじめに

無細胞タンパク質合成系を用いた翻訳後修飾の解析法として、代謝標識法が知られている。この手法は、遺伝子産物に生じる翻訳後修飾を簡便に検出することが可能であるが、質量分析計を用いて得られるような、詳細な修飾構造を解析することは困難である。我々は、高い修飾能を有すると考えられる昆虫培養細胞由来のTransdirect™ *insect cell*を用いて、その翻訳後修飾能を確認するとともに、質量分析計での解析手法の確立を目的とした。

方法

モデルタンパク質：翻訳後の*N*-ミリストイル化が生じることが知られているt-ゲルゾリンを用いた。(Fig. 2)
また、*N*-アセチル化に関しては、*N*-アセチル化が生じるように改変したt-ゲルゾリン（L3D変異体）を用いた。(Fig. 3)

実験方法：

●mRNA合成は、T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System(Promega社製)を用いた。
●ミリストイルCoA、アセチルCoAはSIGMA社より購入した。滅菌蒸留水に5mMとなるよう溶解し、翻訳反応液に終濃度50μMとなるよう添加した。
●50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH8.0(BufferA)で平衡化した*Strep*-Tactin ® superflow(QIAGEN社製)に翻訳反応液をアプライし、BufferAで洗浄後、2mM desthiobiotinを含むBufferAで溶出した。
●精製タンパク質(1μg)をSDS-PAGEで分離後、還元アルキル化を行った。Trypsin Gold, Mass Spec Grade(Promega社製)を用いて、タンパク質の断片化を行った。50%アセトニトリル、0.1%TFAによりペプチドを抽出し、MALDI-TOF-MS(AXIMA-CFR plus)およびMALDI-QIT-TOF-MS(AXIMA-QIT)により解析した。

結果

①精製タンパク質の精製
t-ゲルゾリンのC末端に*strep*-tag® を導入することで、簡便に目的タンパク質を精製することができた。また反応液1mLあたり約20μgの精製タンパク質を取得することができた。(Fig. 4)

②PMF解析
t-ゲルゾリンのトリプシン消化産物をMALDI-TOF-MSによって解析した。その結果、約70%の配列をピークとして検出することができた。(Fig. 4)

③*N*-ミリストイル化の解析
t-ゲルゾリン野生型のmRNAを鋳型とし、翻訳反応液にミリストイルCoAを添加した。その結果、*N*-ミリストイル化が生じたと考えられるN末端のペプチドフラグメントが検出(m/z = 1926.2)された。MS/MS解析を行ったところ、本ピークはミリストイル基を含むN末端のペプチドフラグメントであると同定された。(Fig. 5)

④N-アセチル化の解析
t-ゲルゾリンのL3D変異体にて、翻訳反応液にアセチルCoAを添加することで、開始メチオニン脱離後の*N*-アセチル化が生じたと考えられるN末端のペプチドフラグメントが検出(m/z = 1759.7)された。本ピークのMS/MS解析を行ったところ、アセチル基を含む化N末端のペプチドフラグメントであると同定された。(Fig. 6)

考察

Transdirect™ *insect cell* は、開始メチオニンの脱離、*N*-ミリストイル化、*N*-アセチル化などN末端に生じる典型的な翻訳後修飾能を有することが示された。また、*N*-ミリストイル化モチーフに関して3位のアミノ酸を酸性アミノ酸に変異させることにより開始メチオニン脱離後の*N*-アセチル化が生じたことから、その配列要求性も哺乳類の翻訳系と同様の傾向にあることが示された。さらにTransdirect™ *insect cell* を用いて合成したタンパク質の翻訳後修飾について、質量分析計によって詳細な解析が可能であることが示された。

SHIMADZU BIOTECH
bringing analysis to life

代謝標識法　cDNA ➡ 修飾が生じるか否かを簡便に検出可能

無細胞系 ＋ 質量分析計

Transdirect™ *insect cell*

遺伝子産物に生じる翻訳後修飾を修飾部位、修飾様式を含め詳細な解析ができるのでは？

Fig. 1. 本研究の目的

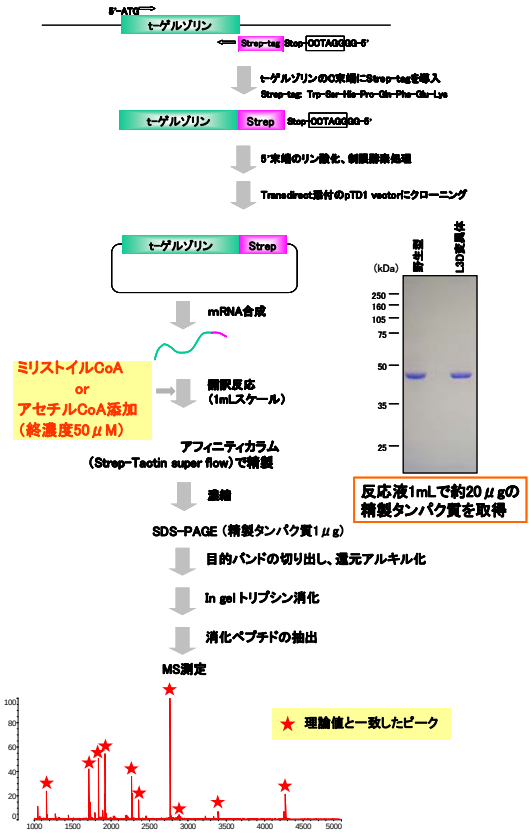


Fig. 4. 実験方法

t-ゲルゾリン：ゲルゾリンのカスパーゼ3消化後のC末端側 フラグメント
翻訳後に*N*-ミリストイル化が生じ、抗アポトーシス活性を示す

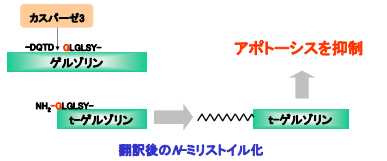
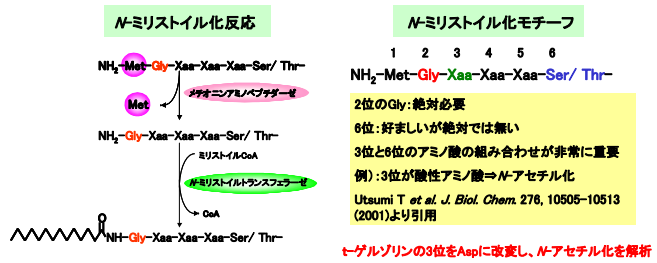


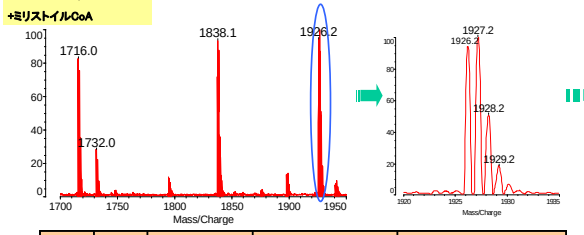
Fig. 2. モデルタンパク質(t-ゲルゾリン)



t-ゲルゾリンの3位をAspに改変し、*N*-アセチル化を解析

Fig. 3. *N*-ミリストイル化

t-ゲルゾリン野生型
+ミリストイルCoA



mass	position	artif.modification(s)		modification		peptide sequence
1848.95	1-17	MSO	1862.94			MGLGLSYLSSHIANVER
1715.91	2-17			*N*-myristoylation	1926.11	GLGLSYLSSHIANVER
1715.82	373-387	MSO	1731.82			AMAELAAWSHPQFEK

MS/MS

Myr-GLGLSYLSSHIANVER: 1926.11

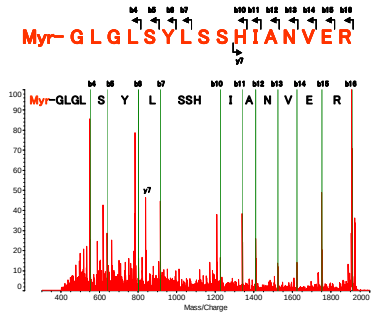
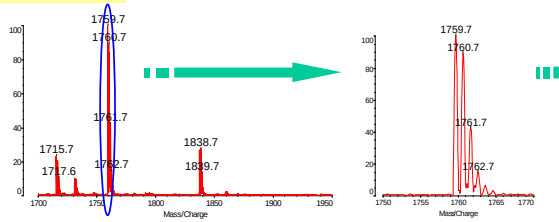


Fig. 5. *N*-ミリストイル化の解析

t-ゲルゾリンL3D変異体
+アセチルCoA



mass	position	artif.modification(s)		modification		peptide sequence
1848.89	1-17	MSO	1864.89			MGDGLSYLSSHIANVER
1717.85	2-17			*N*-acetylation	1759.86	GDGLSYLSSHIANVER
1715.82	373-387	MSO	1731.82			AMAELAAWSHPQFEK

MS/MS

Ac -GDGLSYLSSHIANVER : 1759.86

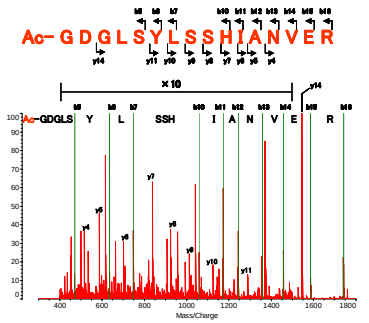


Fig. 6. *N*-アセチル化の解析

結論

- Transdirect™ *insect cell* は開始メチオニンの脱離、*N*-ミリストイル化、*N*-アセチル化を生じさせる十分な翻訳後修飾能を有する
- 無細胞合成タンパク質の翻訳後修飾を、質量分析計によって詳細に解析することができた

Transdirectと質量分析計の組み合わせが、特定の遺伝子産物に生じる翻訳後修飾を解析する優れたツールとなる