

Summary

任意の炭素鎖長からなるN-アシル化タンパク質の合成法の確立を目的としてN-ミリスチル化タンパク質であるtGelsolinをモデルタンパク質とし、種々の炭素数(8-18)からなる飽和脂肪酸のCoAエステルを昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成反応液に添加して無細胞タンパク質合成を行い、合成タンパク質に生じた修飾をMALDI-TOF型質量分析装置を用いて解析した。その結果、炭素数16以上ではアシル化は検出されなかったが、炭素数8、10、12、14では、添加したアシルCoAに応じたN末端アシル化が確認された。

Materials and Methods

tGelsolinのC末端にstrep-tagを導入し、発現ベクターpTD1にクローニングした。得られたプラスミドよりmRNAを合成し、Transdirect insect cellを用いて1mLのスケールで翻訳反応を行った。その際飽和脂肪酸のCoAエステルを終濃度50μMとなるよう添加した。アフィニティ精製後、SDS-PAGEに供した。タンパク質バンドを還元アルキル化後、トリプシン消化を行った。消化断片を抽出しMALDI-TOF MSおよびMALDI-QIT-TOF MSを用いて解析した。

Results

tGelsolinの発現と精製

1mLのスケールで翻訳反応を行い、アフィニティ精製した結果、約20μgのタンパク質が得られた(Fig.1)。アシルCoAを添加した場合においても同様の収量および精製度が得られた。

N-ミリスチル化

tGelsolinのwild-typeにおいて翻訳反応液にミリスチルCoAを添加した場合のみ、N-ミリスチル化が生じたと考えられる1926.2のピークが検出された(Fig.4)。MS/MS解析により本ペプチドピークはミリスチル基を含むN末端のペプチド断片であることが明らかとなった(Fig.5)。一方G2A変異体ではミリスチル化が生じたペプチド断片に相当するピークは全く検出されなかった。以上の結果より、翻訳反応液に基質となるミリスチルCoAを添加した場合のみN-ミリスチル化が生じることが示唆された。

N-アシル化

C8-C18の飽和脂肪酸CoAエステルを翻訳反応液に添加し合成を行った。合成タンパク質の解析は上記記載の方法と同様にして行った。その結果C8-C14の炭素鎖長からなるN-アシル化が生じたと考えられるペプチドピークが検出された(Fig.6)。MS/MS解析の結果、C8-C14において翻訳反応液に添加した基質の炭素鎖長に応じたN-アシル化が生じたことが明らかとなった(Fig.7)。

一方C8およびC18において、N-アシル化が生じたピークは全く検出されなかった。これは、C8およびC18のアシルCoAはN-ミリスチルトランスフェラーゼの好ましい基質ではないためであると考えられる。

Conclusion

Transdirect insect cellを用いた無細胞タンパク質合成において、翻訳反応液に基質を添加することで、N-ミリスチル化が生じることが明らかとなった。さらに、添加する脂肪酸の炭素鎖長に応じたN-アシル化が生じることが示された。以上より、本方法は、無細胞合成タンパク質のN末端を任意の脂肪酸で特異的に修飾する新規の手法となり得ることが示された。

本発表の成果はBiosci. Biotechnol. Biochem.に投稿し、採択されました。



昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いた任意の炭素鎖長からなるN-アシル化タンパク質の合成

Preparation of N-acylated proteins modified with fatty acids having a specific chain length using an insect cell-free protein synthesis system

○鈴木 崇1, 伊東 昌章1, 江連 徹1, 四方 正光1, 安藤 英治1, 内海 俊彦2, 綱澤 進1, 西村 紀1, 3

(1島津製作所・ライフサイエンス研, 2山口大院・医・応用分子生命, 3阪大・蛋白質研)

○Takashi Suzuki1, Masaaki Ito1, Toru Ezure1, Masamitsu Shikata1, Eiji Ando1, Toshihiko Utsumi2, Susumu Tsunasawa1, Osamu Nishimura1, 3

(1Shimadzu Corp., Lifescience. Lab., 2Yamaguchi Univ., Grad. Sch. Med., Dept. Appl. Biol. Sci., 3Osaka Univ., Inst. Protein Res.)



Introduction

タンパク質機能改変のアプローチの一つにタンパク質の脂肪酸による人為的なアシル化が挙げられる。タンパク質のアシル化は、生体膜への結合性等を付与し得ることから、タンパク質が機能する場を変化させたり限定するなどの応用が可能である。タンパク質をアシル化する方法として化学修飾および遺伝子工学的手法が知られているが、アシル基の導入部位を特定でき、且つ脂肪酸の鎖長を制御する方法は確立されていない。そこで本研究では、任意の炭素鎖長からなるN-アシル化タンパク質の合成法の確立を目的とした。

Results



Fig. 2. Protein N-myristoylation. タンパク質N-ミリスチル化は一般的に翻訳反応と共役した修飾で開始メチオニンの脱離が生じた後、新たに生じるN末端グリシン残基に炭素数14からなる飽和脂肪酸がN-ミリスチルトランスフェラーゼによって転移される。

Table with 4 columns: Wild-type, 推測されるN末端の構造 (Predicted N-terminal structure), Mass value, and Observed value. It lists various N-terminal structures and their corresponding mass values and observed values.

Fig. 3. Deduced N-terminal structure of the tryptic digests and those calculated mass value.

Experimental procedures

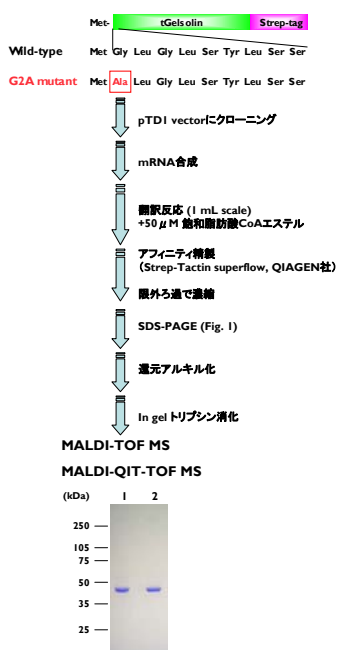


Fig. 1. SDS-PAGE of the purified tGelsolins. 精製タンパク質(1μg)をSDS-PAGE(10%ゲル)にアブラした。Lane1: wild-type Lane2: G2A変異体 アシルCoAを添加した系においても同様の泳動パターンであった(結果は示さず)。

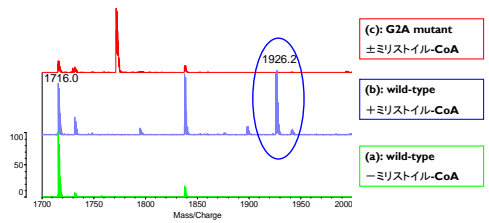


Fig. 4. MALDI-mass spectra of tryptic digests of the wild-type and G2A mutant. Transdirectを用いてtGelsolinのwild-typeまたはG2A変異体を合成した。その際、翻訳反応液にミリスチルCoAを添加または非添加で合成を行った。アフィニティ精製したタンパク質のバンド(1μg)を還元アルキル化後、ゲル中でのトリプシン消化した。消化産物をAXIMACFR-plusで解析した。

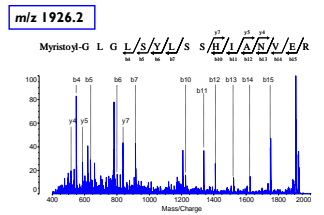


Fig. 5. MALDI-MS/MS spectrum of the N-terminal peptide from the wild-type. 1926.2のピーク(Fig.4-(b))をブリークサーイオンとしてAXIMA-QITを用いてMS/MS解析を行った。

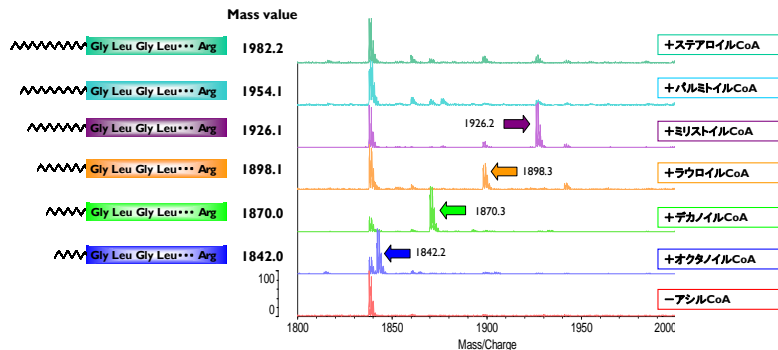


Fig. 6. MALDI-mass spectra of tryptic digests. 翻訳反応液にアシルCoA(C8-C18)を50μMとなるよう添加しtGelsolinを合成した。合成産物をFig.4と同様にして解析した。N-アシル化が生じたと考えられるペプチドピークを箇中矢印で示した。

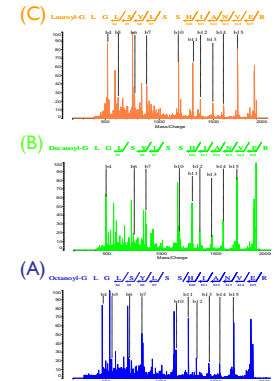


Fig. 7. MALDI-MS/MS spectra of the probable N-acylated peptides. 1842.2(A), 1870.3(B), 1893.3(C)のピークをブリークサーイオンとしてAXIMA-QITを用いてMS/MS解析を行った。