

# 昆虫培養細胞由来無細胞合成系を用いたhuman Cu/Zn superoxide dismutaseの合成

○江連徹<sup>1</sup>, 鈴木崇<sup>1</sup>, 安藤英治<sup>1</sup>, 綱澤進<sup>1,2</sup>  
 (1島津製作所・バイオ臨床ビジネスユニット, <sup>2</sup>阪大・蛋白研)



**はじめに**  
 生体内において多種類の金属イオンが蛋白質などの生体高分子と結合する事によって存在し、多種多様な機能を発揮している。全ゲノムにコードされている全蛋白質の約30%は、金属イオンの結合した金属蛋白質であるとされている。これら金属蛋白質は金属イオンの結合によって、より幅広いあるいは新規の機能を獲得しており、エネルギー代謝、物質代謝、情報伝達といった、重要な生理機能の多くの部分を担っている。そこで本研究では、昆虫培養細胞由来無細胞蛋白質合成系を用いて、金属蛋白質の合成について検討を行った。

**実験方法と結果**  
**金属イオンの反応系に与える影響**  
 金属イオンを必要としないモデル蛋白質合成時に、様々な濃度で酢酸銅および酢酸亜鉛を単独もしくは等モル濃度混合で添加し、その影響を調べた結果、50μM程度であれば大きな影響をおよぼすことはないことが判明した (Fig. 1)。

**hSOD1の発現と反応系の最適化**  
 pTD1-strep-hSOD1より調製したmRNAを用いて、翻訳反応を行った。その際に、酢酸銅と酢酸亜鉛を等モルで0~400μMの濃度で添加した。各条件下での反応液をアフィニティ精製した後、SOD活性測定と蛋白質定量を行い、比活性を算出した (Scheme 1)。アフィニティ精製後のSDS-PAGEの結果、ほぼ単一のバンドとして検出され、反応液1mLよりおよそ30μgのhSOD1を取得できた (Fig. 2)。そして各25μMの酢酸銅と酢酸亜鉛を反応系に添加した場合に、Controlと比較して約120%の最も高い比活性を示すことが明らかとなった (Fig. 3)。

**hSOD1のジスルフィド結合の解析**  
 hSOD1は細胞質に局在し、1本の分子内ジスルフィド結合を有したホモダイマーであることが知られている (Fig. 4)。このジスルフィド結合を同定するために、最適条件下で合成しアフィニティ精製したhSOD1に以下に示す3種類の前処理を施した: type1;還元アルキル化処理, type2;アルキル化処理, type3;未処理。次にトリプシン消化を行い、このトリプシン消化産物をMALDI-TOF MSにより分析した (Scheme 2)。

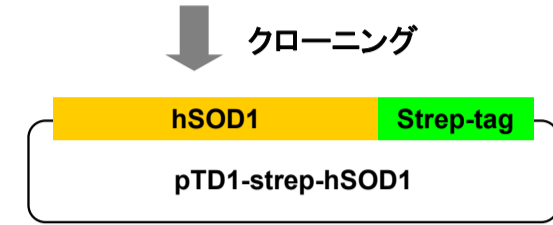
その結果、m/z 3086.91, 4092.22, 4532.28にtype2とtype3において特異的なピークが検出され、これらはジスルフィド結合を有するペプチドピークであることが示唆された (Fig. 5A)。3086.91のピークは、Cys7-Cys112のジスルフィド結合を有するペプチドの理論値と一致しており、Cys7-Cys112のジスルフィド結合と同定された。4092.22のピークは、Cys7-Cys58のジスルフィド結合を有するペプチドの理論値と一致しており、Cys7-Cys58のジスルフィド結合と同定された。4532.28のピークは、Cys58-Cys147のジスルフィド結合を有するペプチドの理論値と一致しており、Cys58-Cys147のジスルフィド結合と同定された。これまでの報告により知られているのはCys58-Cys147のみである。しかしながら、Controlを用いた実験でも同様のMSスペクトルが得られているため (Fig. 5B)、他の2本については前処理中に生じたものあるいは天然型においても一部生じ得るジスルフィド結合と考えられた。以上より、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系において、金属蛋白質であるhSOD1は、反応系に適切な金属イオンを添加することにより、天然型と同等の活性型の蛋白質として合成可能であることを見出した。

**結論**  
 我々が開発した昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系は、適切な金属イオンを反応系に添加することで、金属蛋白質の合成に対応可能であることが示唆された。また、今回用いた還元剤を含む反応系においてもhSOD1のようにジスルフィド結合を形成する蛋白質が存在し、蛋白質によってジスルフィド結合形成用に関与した還元剤フリーの系と使い分ける必要があることが判明した。

## Experimental procedures

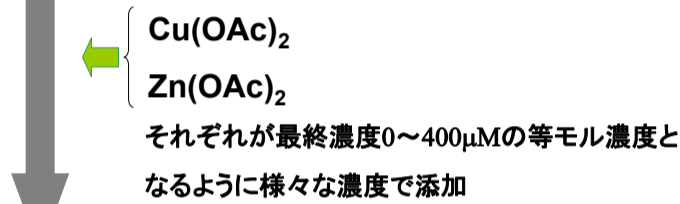
### Scheme 1

human Cu/Zn superoxide dismutase



試験管内転写反応

Transdirectを用いたタンパク質合成



アフィニティ精製

SOD活性測定

蛋白質定量

比活性の算出

反応系への銅イオン、亜鉛イオンの添加量最適化

### Scheme 2

最適条件下での翻訳反応

アフィニティ精製

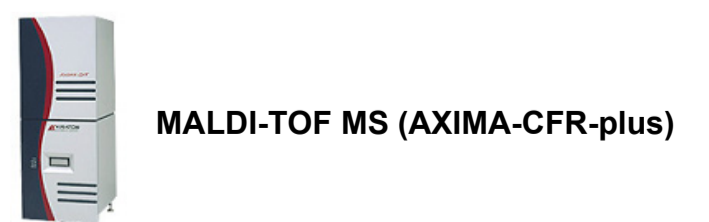


非還元SDS-PAGE

Type 1 Type 2 Type 3

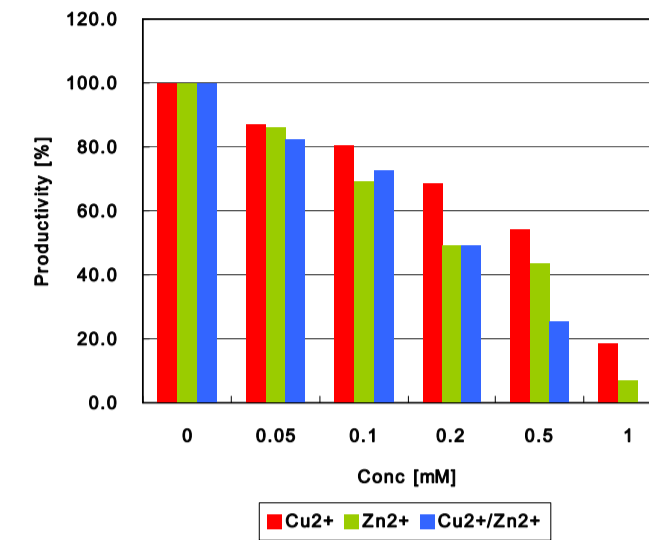
還元アルキル化 アルキル化 未処理

トリプシン消化



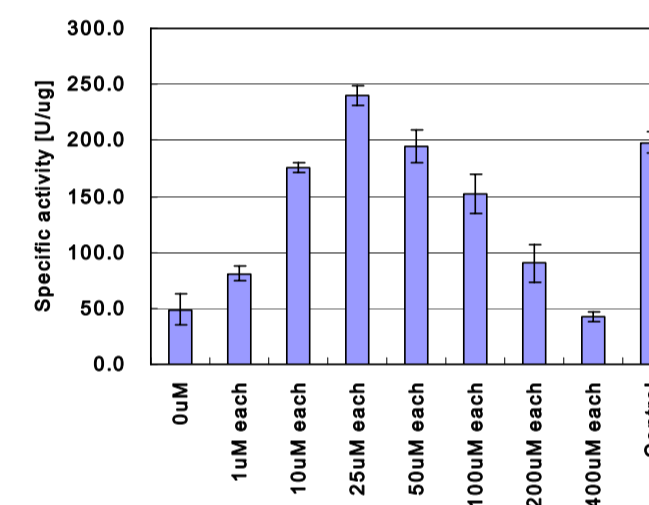
ジスルフィド結合の解析

## Results



金属イオンを必要としないモデルタンパク質合成時における金属イオンの影響を調べた。添加しない場合を100%とした相対合成量を示す。

Fig. 1. 反応系への金属イオン添加の影響



それぞれの添加濃度において合成したhSOD1をアフィニティ精製後、SOD活性測定、蛋白質定量を行い、比活性を算出した。

SOD活性測定: SOD Assay Kit-WST (DOJINDO)  
 Control: SOD from human erythrocytes (SIGMA)

Fig. 3. hSOD1の比活性への金属イオン濃度の影響

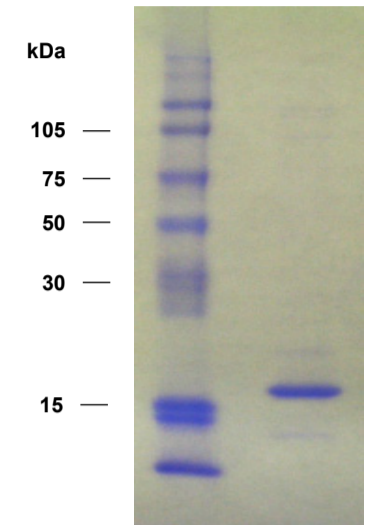


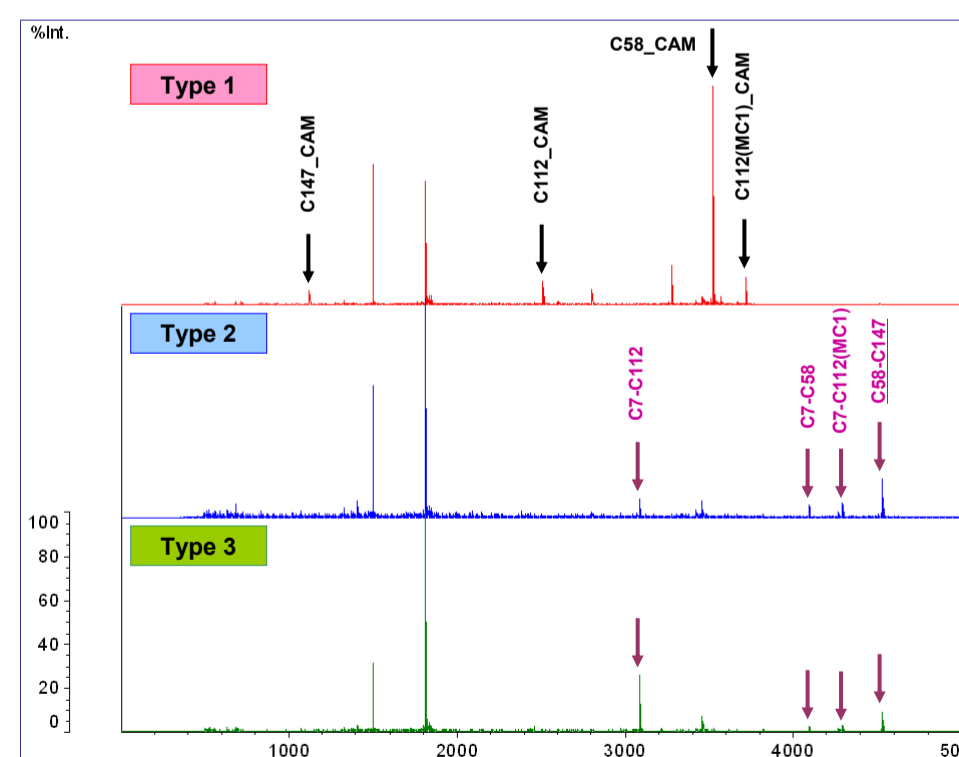
Fig. 2. アフィニティ精製したhSOD1のSDS-PAGE

MATKAVCVLK GDGPVQGIIN FEQKESNGPV  
 KVVWGSIKGLT EGLHGFVHFE FGDNTAGCTS  
 AGPHFNPLSR KHGGPKDEER HVGDLGNVTA  
 DKDGVADVSI EDSVISLSGD HCHIGRTLTVV  
 HEKADDLGKG GNEESTKTGN AGSRLACGVI  
 GIAQ  
 KGTGSGGGGG GGGWSHPQFE K

システインを含むトリプシン消化ペプチド鎖をカラーで示した。赤色はジスルフィド結合により架橋される。

Fig. 4. hSOD1のアミノ酸配列

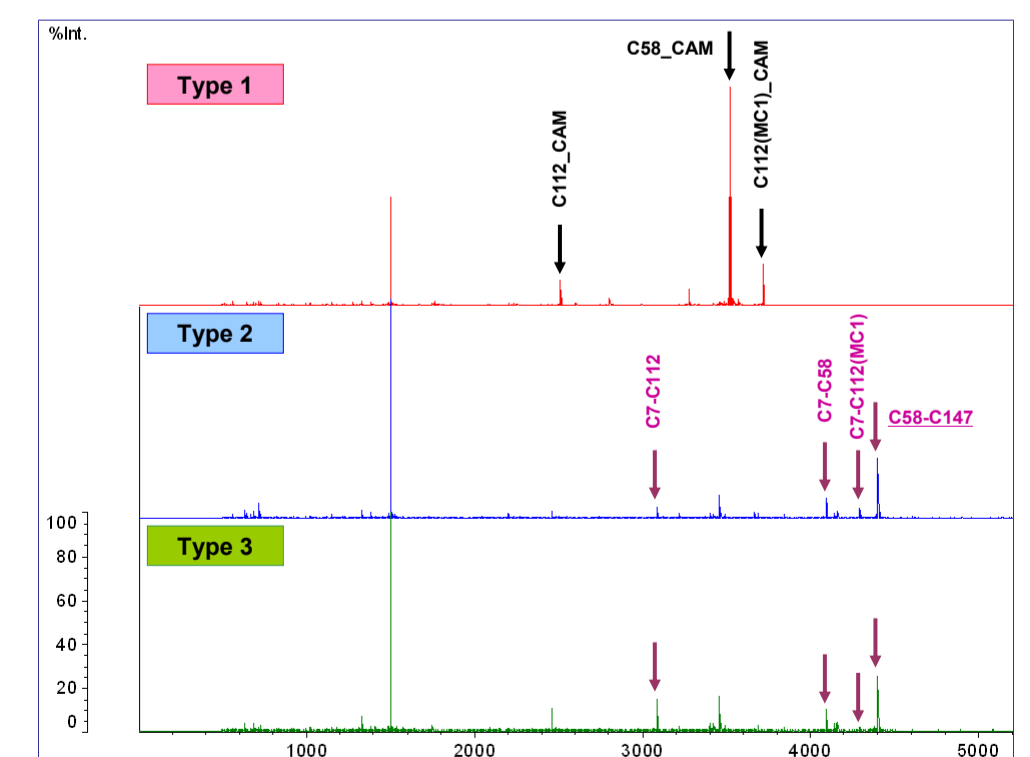
A: Cell-free



mass	Cys_CAM	C7	C58	C112	C147
C7	632.38	689.40			
C58	3462.60	3519.62	4091.98	5916.80	
C112	2457.19	2514.21	3086.57	5916.80	C112
C147	1072.62	1129.64	1702.00	4532.22	3526.81
C112(MC1)	3663.79	3720.81	4293.17	7123.39	-
					4733.41

CX: アミノ酸X番目のCysを含むトリプシン消化ペプチドを示す  
 Cys\_CAM: Cysがカルバミドメチル化された場合を示す  
 検出されたジスルフィド結合により架橋されたペプチドは黄色で示した  
 タグ配列の影響により、C147を含むペプチドのみ理論値がControlと異なる

B: Control



mass	Cys_CAM	C7	C58	C112	C147
C7	632.38	689.40			
C58	3462.60	3519.62	4091.98	5916.80	
C112	2457.19	2514.21	3086.57	5916.80	C112
C147	944.52	1001.54	1573.90	4404.13	3398.72
C112(MC1)	3663.79	3720.81	4293.17	7123.39	-
					4605.31

Fig. 5. MALDI MSスペクトルとシステインを含むトリプシン消化ペプチドの理論値

左図は無細胞系にて調製したhSOD1, 右図はControlを用いた場合のPMF解析