

# 昆虫培養細胞由来無細胞合成系を用いたhuman Cu/Zn superoxide dismutaseの合成とジスルフィド結合の解析

## Expression of human Cu/Zn superoxide dismutase in an insect cell-free system and analysis of their disulfide bonds

○江連徹<sup>1</sup>, 鈴木崇<sup>1</sup>, 安藤英治<sup>1</sup>, 綱澤進<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>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)

○Toru Ezure<sup>1</sup>, Takashi Suzuki<sup>1</sup>, Eiji Ando<sup>1</sup>, Susumu Tsunasawa<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Shimadzu Corp., Clinical & Biotechnology B.U., <sup>2</sup>Osaka Univ., Inst. Protein Res.)



### 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、金属イオンが結合した金属蛋白質であると考えられている。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

#### 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33μgのhSOD1を取得できた(Fig. 1)。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と比較してほぼ同等の比活性を示すことが明らかとなった(Fig. 2)。

#### hSOD1のジスルフィド結合の解析

hSOD1は細胞質に局在し、4つのシステイン残基を有する。これらのうち、Cys57とCys146は分子内ジスルフィド結合を形成し、その他の2個についてはフリーで存在している(Fig. 3)。無細胞合成したhSOD1のシステインの状態を確認するため、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 4532.31にtype2とtype3において特異的なピークが検出された(Fig. 4)。このピークは、Cys57-Cys146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、Cys57-Cys146のジスルフィド結合が同定された。また、Cys6とCys111のシステイン残基は未修飾の状態が存在する事も示唆された(Table 1)。

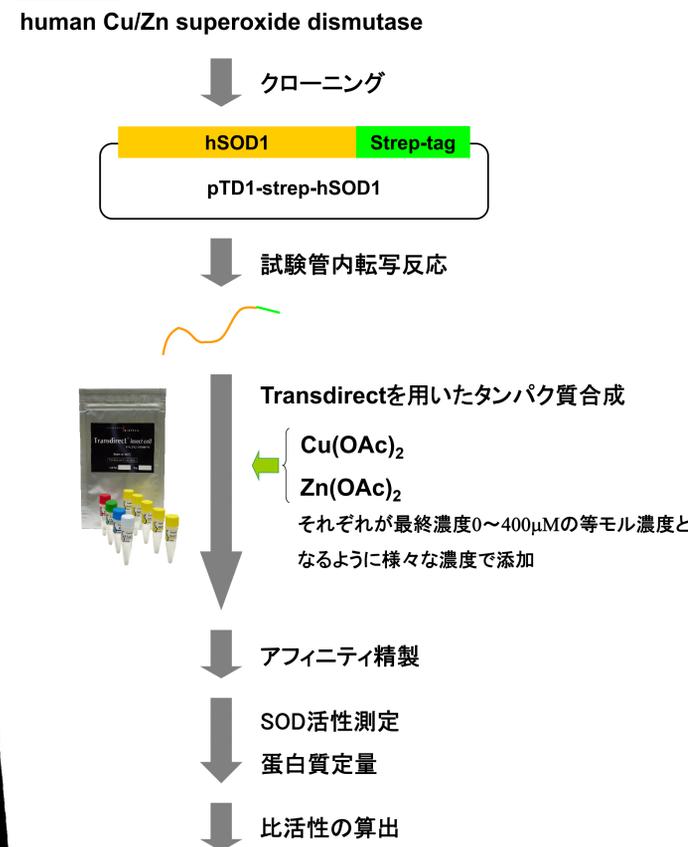
以上より、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク合成系において、金属蛋白質であるhSOD1は、反応系に適切な金属イオンを添加することにより、天然型と同等の比活性を有することを見出した。

### 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、目的蛋白質の局在やシステインの状態によって、ジスルフィド結合形成用に開発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。

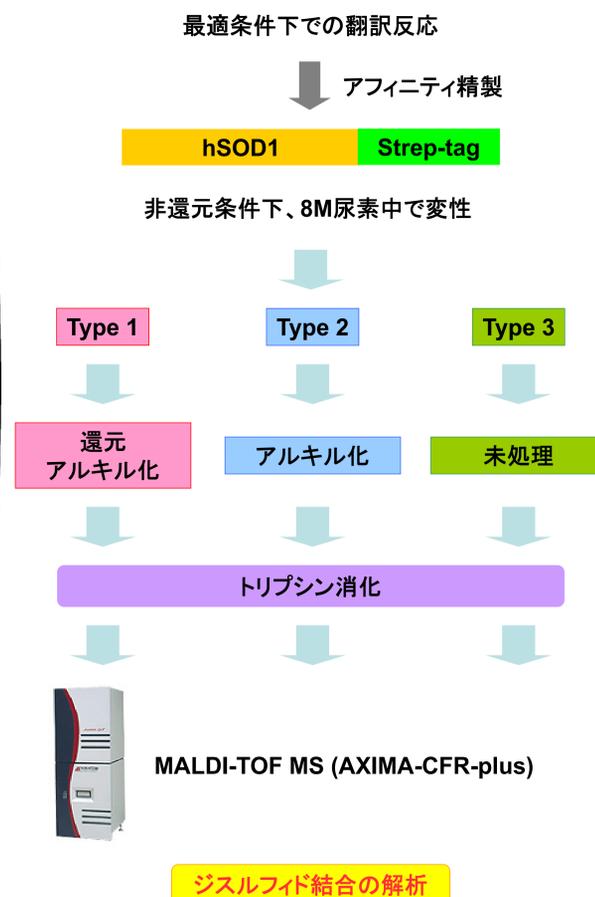
### Experimental procedures

#### Scheme 1



#### 反応系への銅イオン、亜鉛イオンの添加量最適化

#### Scheme 2



### Results

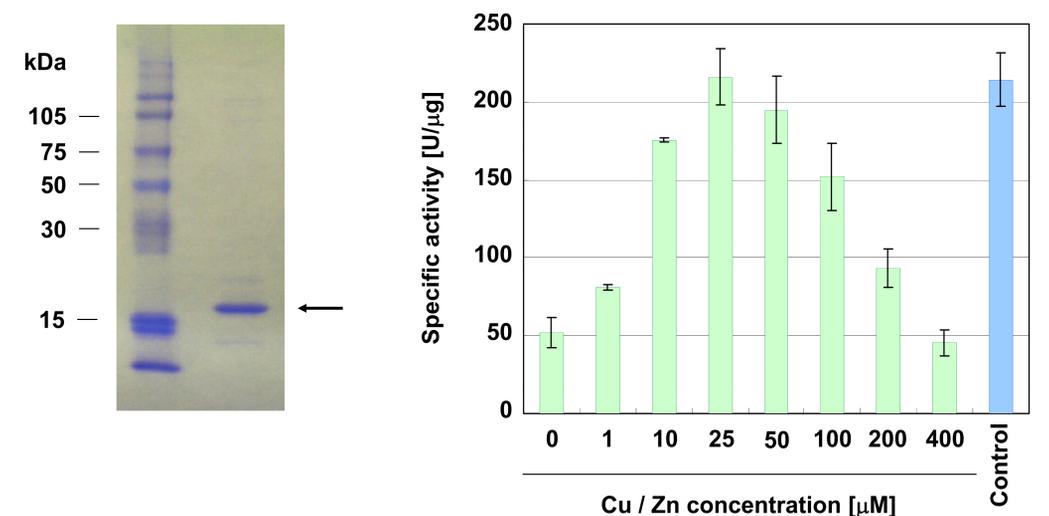


Fig. 1 アフィニティ精製したhSOD1の

#### SDS-PAGE

Fig. 2 hSOD1の比活性に与える金属イオン濃度の影響

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)

ATKAVC**V**L**K**G DGPVQGIINF EQKESNGPVK VWGSIK**G**L**T**E **G**LHG**F**H**V**HE**F**  
GDNTAG**C**T**S**A **G**PH**F**N**P**LS**R**K HGGPKDEERH VGD**L**GN**V**T**A**D **K**D**G**V**A**D**V**S**I**E  
DS**V**IS**L**SG**D**H **C**I**G**R**T**LV**V**H EKADD**L**G**K**GG NEEST**K**T**G**NA **G**S**R**L**A**C**G**V**I**G  
IA**Q**K**G**T**G**SG**G** GGGGG**G**WS**H**P **Q**F**E** **K**

Fig. 3 hSOD1のアミノ酸配列

アフィニティタグ配列を含む天然型hSOD1のアミノ酸配列を示す。アフィニティ精製用タグ配列はアンダーラインで、またシステインを含むトリプシン消化ペプチド鎖はカラーで示した。赤色で示したペプチド鎖はジスルフィド結合により架橋される。

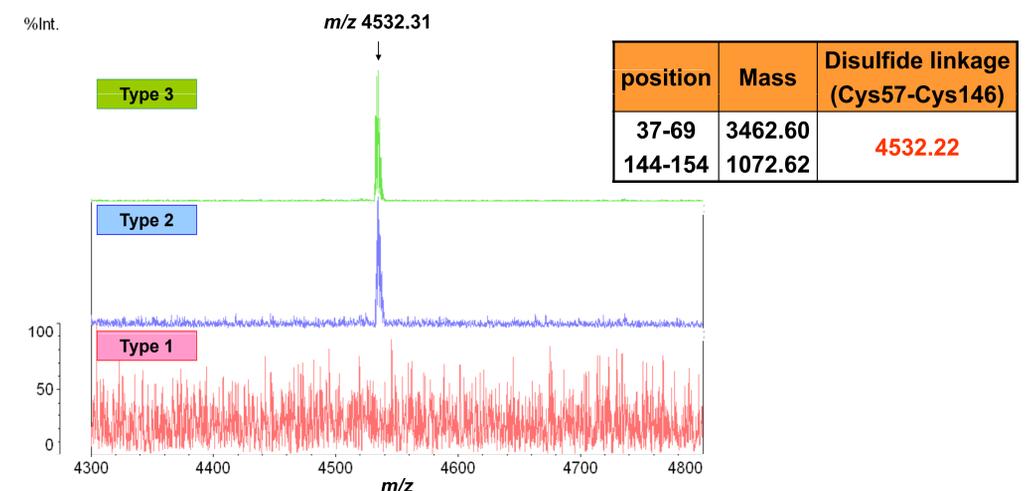


Fig. 4 hSOD1のMALDI MSスペクトルとジスルフィド結合を形成したトリプシン消化ペプチドの理論値

Table 1 PMFの結果から予測されたhSOD1中のシステイン残基の状態

	Type 1 還元アルキル化	Type 2 アルキル化	Type 3 未処理
Cys6	カルバミドメチル化	カルバミドメチル化	未修飾
Cys57	カルバミドメチル化	S-S結合形成	S-S結合形成
Cys111	カルバミドメチル化	カルバミドメチル化	未修飾
Cys146	カルバミドメチル化	S-S結合形成	S-S結合形成