



# 安定同位体標識した蛋白質の作成方法と相互作用解析

2012年 葉月 2-3日 (木・金)

蛋白質研究所

先端研究施設共用促進事業

先端核磁気共鳴装置群の産業利用支援プログラム

NMR 実践講習会「蛋白質測定基礎」

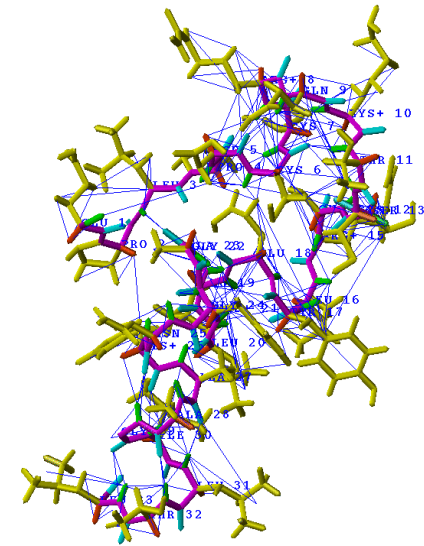
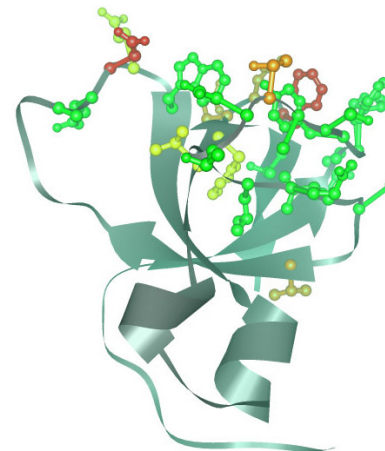
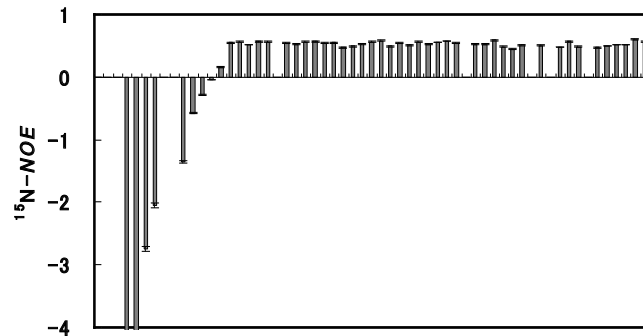
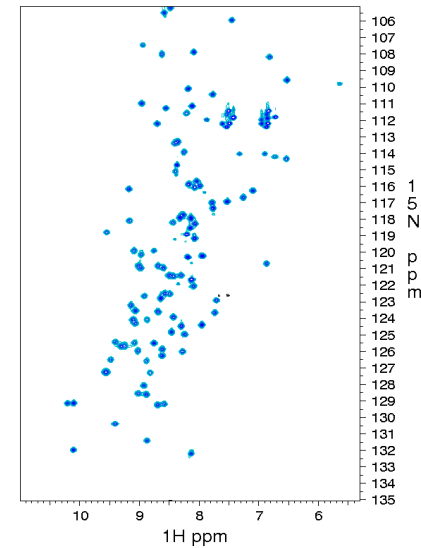
池上貴久

大阪大学蛋白質研究所



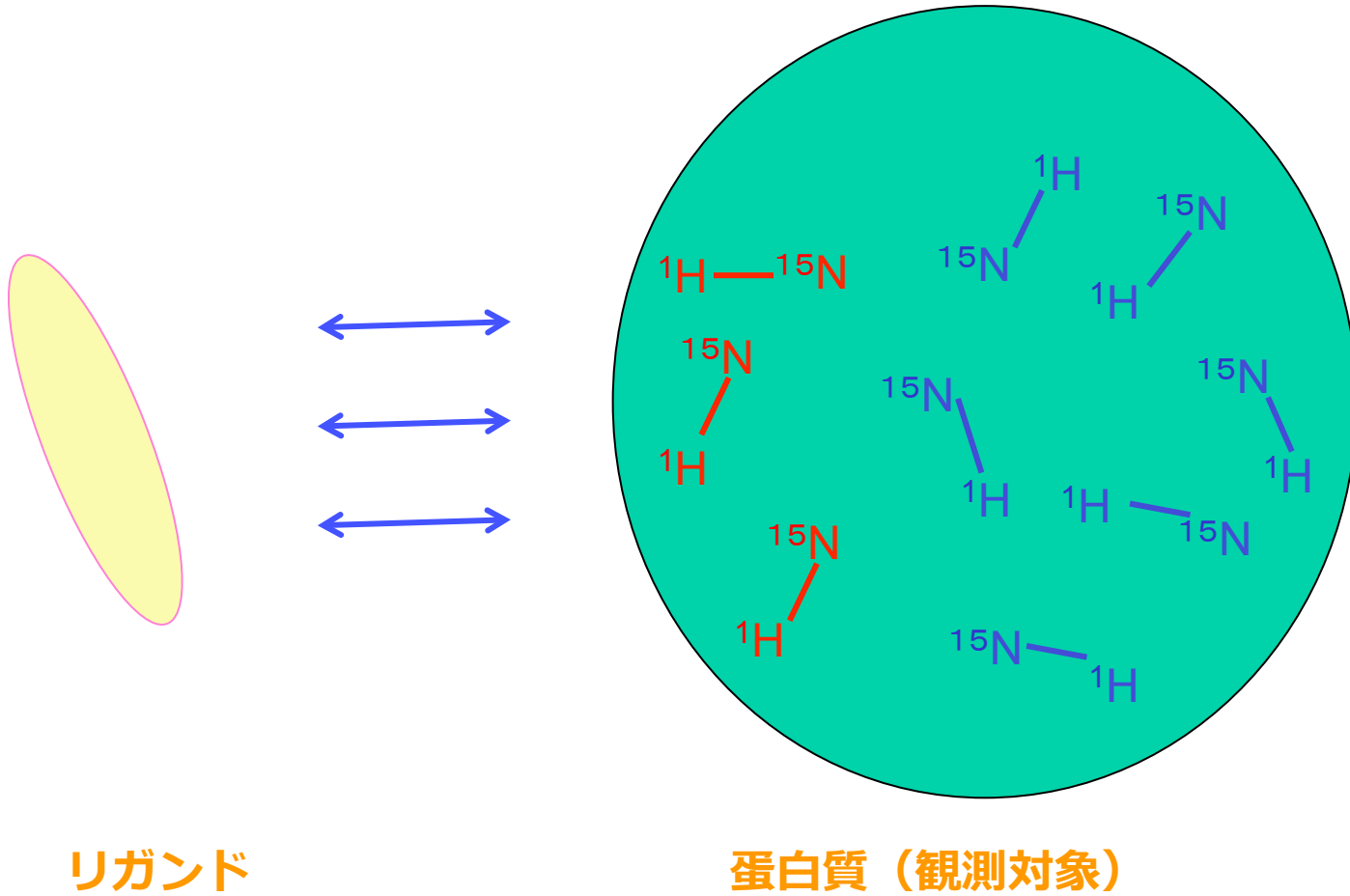
# 蛋白 NMR

- Resonance assignments  
共鳴の帰属
- Structure calculation  
構造の計算
- Interaction analyses  
相互作用の解析
- Dynamics analyses  
動的構造の解析

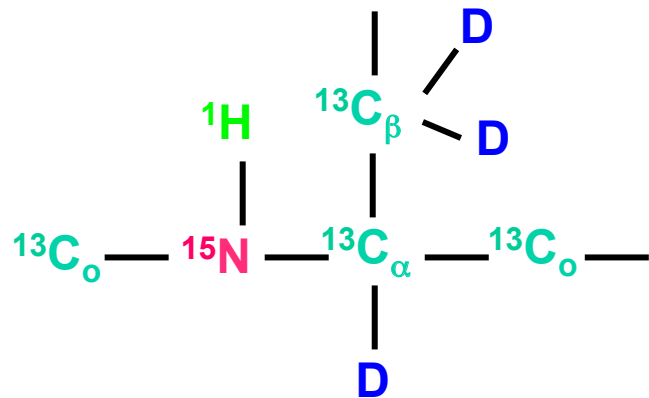


# 化学シフト摂動法

接触領域の磁気的環境がリガンドの結合により変化  
→ 化学シフト（共鳴）値が変化



## NMR で観測できる安定同位体



アミド基  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  は孤立していて、何かと理想的。

メチル基  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}_3$  なら、natural-abundance でも測定可能かも。

$^1\text{H}$	99.98 %	無尽蔵
$^2\text{H}$	0.015	原発からのおこぼれ
$^3\text{H}$	0	放射能汚染
$^{13}\text{C}$	1.108	何とか安く！
$^{15}\text{N}$	0.37	空気には一杯
$^{19}\text{F}$	100	無尽蔵だが稀
$^{31}\text{P}$	100	無尽蔵 (核酸に多数)



このようなクリーンベンチがあれば ..... 。



**ガスバーナが中にあるので安全  
大腸菌は意外にもコンタミしにくい**



## 蛋白質を発現させるための 大腸菌培養用の装置

机上だとガスバーナが危険  
遺伝子組換え P1



## 蛋白質を精製するための カラムとポンプ

Akta が無くてもペリスタと  
HiTrap-カラム（手詰めカラ  
ムも）で頑張る。



フェルメンターが無くとも、バツフル付きフラスコで頑張る。



pH-スタット、金魚  
ぶくぶく、還流装置  
が欲しいところ。



# 1L M9 medium for $^{15}\text{N}$ ( $^{13}\text{C}$ ) culture

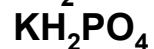
## (1) 10 x salt



autoclave **separately!**

7.0 g

should adjust moles if you use hydrated ones



3.0 g

pH becomes **7.15** automatically



0.5 g

the total concentration becomes 130 mM

## (2) vitamin & nucleic-acids autoclave **separately!**

thymidine (T)

20 mg

nucleosides (need not be nucleotides)

adenosine (A)

20 mg

guanosine (G)

20 mg

cytidine (C)

20 mg

thiamine

20 mg

vitamin B<sub>1</sub>

biotin

20 mg

vitamin H (difficult to be dissolved in water)

10 mM  $\text{FeCl}_3$

1.0 mL

1M  $\text{MgSO}_4$

2.0 mL

not  **$\text{MgCl}_2$** !

50 mM  $\text{MnCl}_2$

1.0 mL

## (3) stable-isotope

filter



1.0-2.0 g

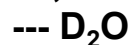


1.0-4.0 g



1.0-4.0 g

only for  $^2\text{H}$ -labelling



50-100%

only for  $^2\text{H}$ -labelling

(4) 50mM  $\text{CaCl}_2$

2.0 mL

(5) glycerol

1/1000 (=1mL)

only for  $^{15}\text{N}$ -single-labelling

(6) ampicillin

50-100 ug/mL

(7)  $\text{ZnCl}_2$

20 uM

only for **zinc-finger** proteins

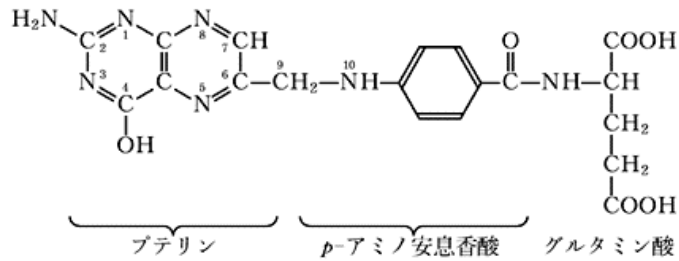
蛋白質科学会  
アーカイブに  
詳細あり。

Never mix (1)-(7) up while they are still hot!

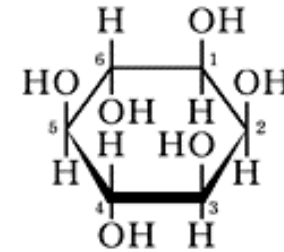
When you culture with  $^{13}\text{C}/^2\text{H}$  (1-2g/L glucose and no glycerol), it would be recommended to add these vitamins because the amount of carbons in media is less than with only  $^{15}\text{N}$  (4g/L glucose and 0.1% glycerol).

(1) folic acid (folate)	(vitamin M)	1mg
(2) choline chloride	(vitamin B)	1mg
(3) nicotin-amide	(vitamin B)	1mg
(4) D-pantothenic acid	(vitamin B)	1mg
(5) pyridoxal	(vitamin B <sub>6</sub> )	1mg
(6) riboflavin	(vitamin B <sub>2</sub> ,G)	0.1mg
(7) inositol		2mg

These vitamins should be dissolved in filtered 1mL H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O), and stored frozen as aliquot (eppendorf) or each usage.

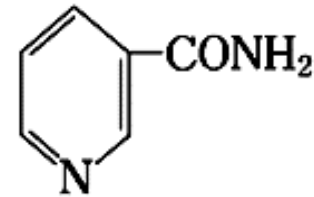
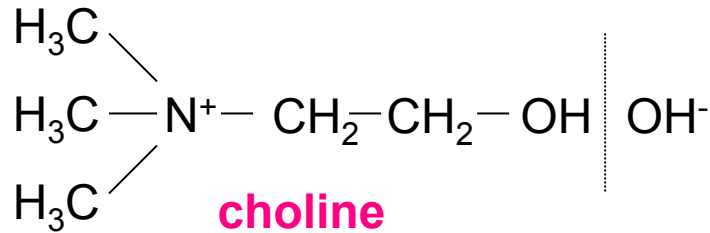


**folic acid**

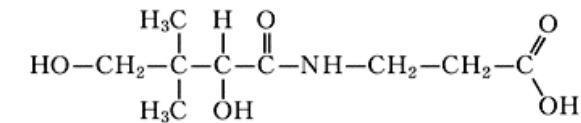


myo-イノシトール

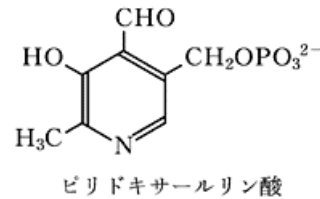
**inositol**



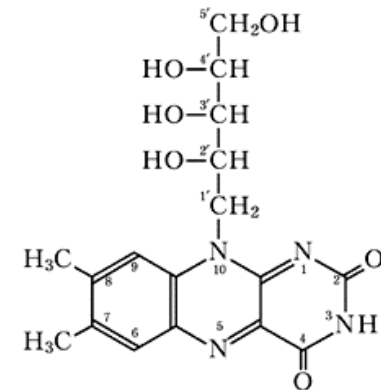
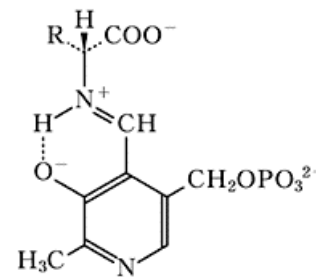
**nicotin-amide**



**D-pantothenic acid**



**pyridoxal**

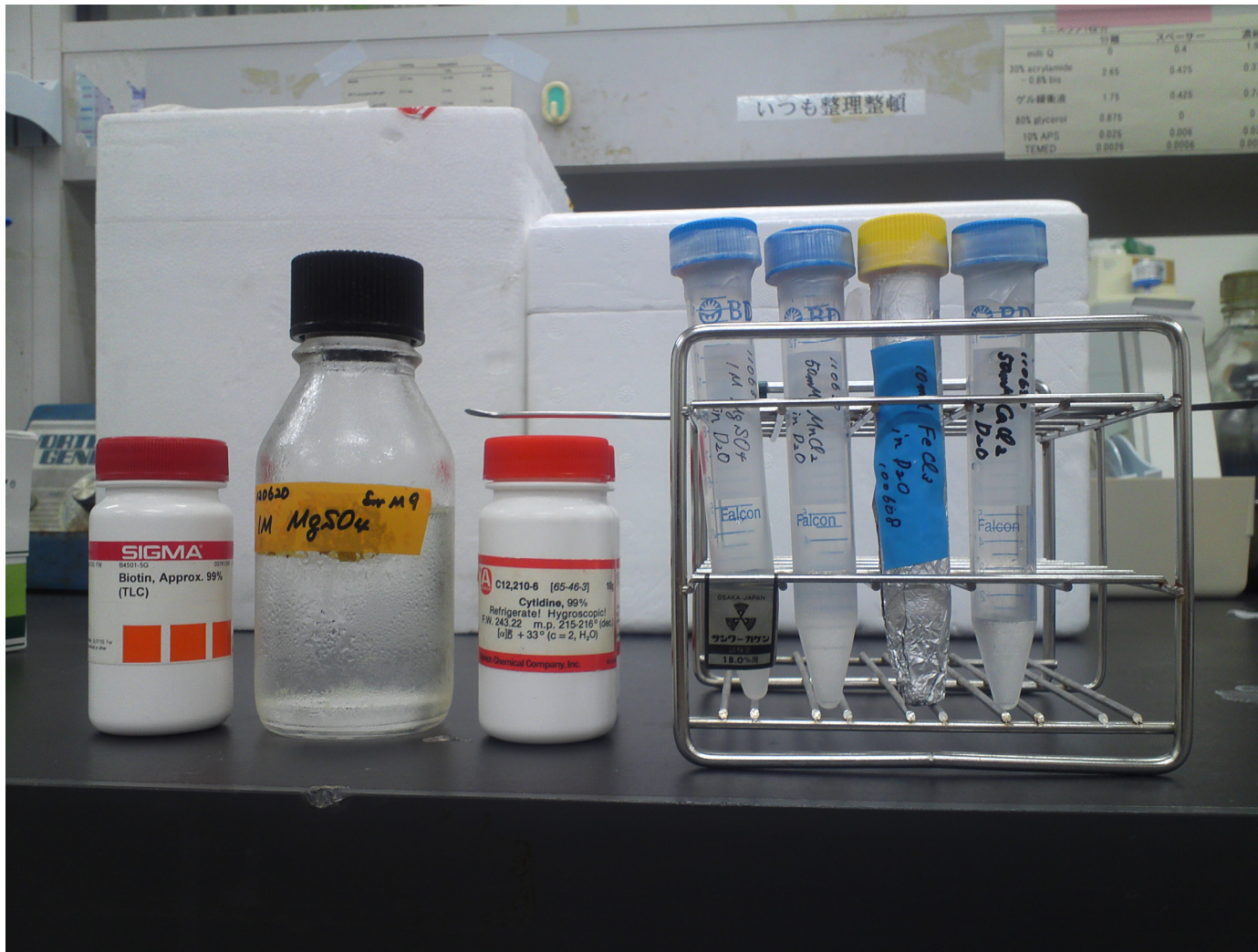


リボフラビン

**riboflavin**



# ミネラル類は H<sub>2</sub>O (D<sub>2</sub>O) ストックにしておくと便利



もしかして、次のようなミネラルも効く？



左記ミネラルは、5 uM 程度入れる。各 50 mM ストックを作成しておき、1 万分の 1 を加える。

クエン酸か EDTA (25 uM) などのキレート剤が培地に必要  
(さんまにレモン効果)



大腸菌は寒天プレートに蒔いておいて、元気なのを拾う



グリセロールストックは弱り切っていて駄目



## 大腸菌は薄め過ぎないように注意して植え次ぐ

グリセロールストックを寒天プレートに蒔く。

↓ overnight

コロニーを幾つか拾って 3mL (LB) で育てる。

↓ 3 hr.

100mL (M9) に入れて育てる。

↓ overnight (25°C) 適応 adaptation

1L (M9) に入れて育てる。

↓ 4 hr. (37°C)

対数増殖期に発現誘導をかける。

↓ 2 hr. ~ overnight (15~37°C)

集菌して冷凍保存する。

codon-usage を大腸菌に最適化して合成したプラスミドでは、発現し過ぎて困るので、温度を下げる。

時には冷やして振盪培養したい時もある





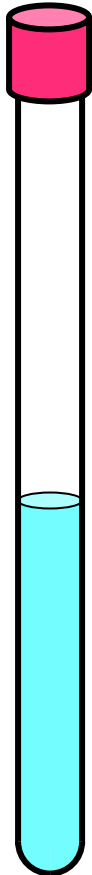
# 遠心限外濾過濃縮器を一晩以上水に漬ける





## 試料調製

## -- 試料の分量は？ --



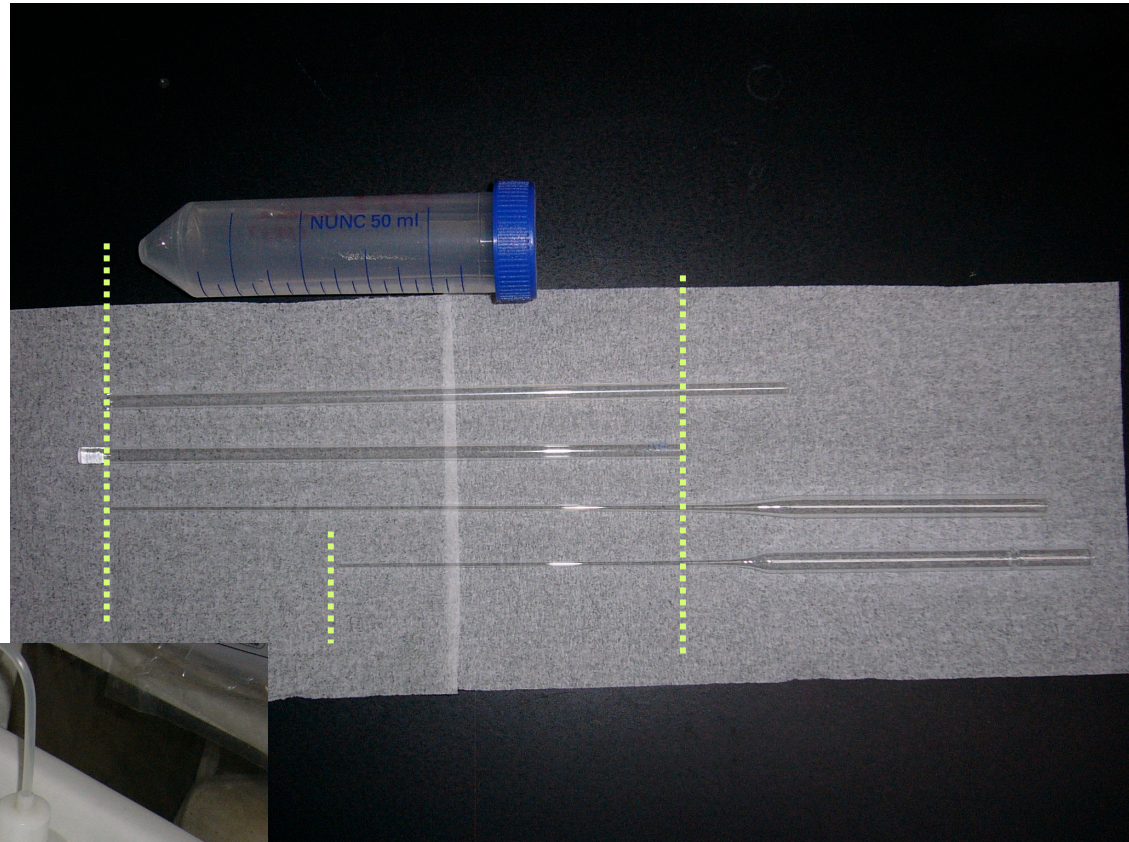
- **安価**である。（安過ぎるのは同心円柱ではない。）
- 溶液を充分量入れれば、**シム**が調整しやすい。逆に溶液量が少なければ、シムを合わせにくい。（最低 500~600  $\mu\text{L}$  欲しい）
- 溶液量が多いと、上下で実際の温度が異なる。さらに**対流**や滴の落下が起き易い。
- pulse-照射、検出や静磁場の **inhomogeneity** が起き易い。（90 度パルス長が少し長くなる？）
- 泡が溜まりにくいのは良い。ただし、長時間の測定では蒸発するため、自動シム調整を同時に作動させるとよい。
- 滴定実験には適している。



- 試料の量が **280  $\mu\text{L}$**  程度で最適！（1.8 cm 高さ）
- 各溶媒の**磁化率**に合わせたガラス製品を使うとよい。
- 溶液量が少ないので、実際の**温度**が上下で比較的均一であり、対流が小さい。
- pulse-照射、検出や静磁場の **inhomogeneity** が起き難い。特に**溶媒信号の消去**には効果が高い。
- **泡**が生じてシムが台無しになることが多い。
- ピストンを抜き差しすると溶液量が減るので、滴定実験には適していない。
- **高価**であるので多数の試料には痛い（dispo ではない）。

## 長いパスツール

試料を泡立てずに試料管の底に「置く」ことができる。また、回収率も高い。

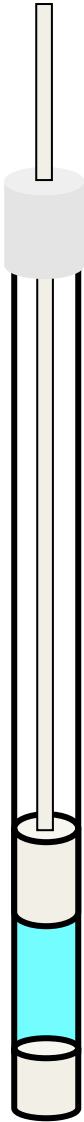


## 便利で簡単なすすぎ装置

汚れた試料管に EDTA、その後、ママレモンを入れた後、水でよくすすぐ。

## 試料管に関するその他の注意事項

- 洗剤で洗う。簡単なすすぎ装置が役に立つ。
- シリコンでコーティングするとプラス荷電性の分子がガラス表面に引っ付き難くなる。
- 長めの特注パスツールピペットを使うと、試料の出し入れが簡単。手回し遠心機を使うより安全である。
- 脱気後に窒素ガスを詰めて封管できれば、試料を酸化から守ることができ、さらに線形が細くなる。ただし、封管時の加熱は試料管の形を歪める。
- NMR で窒素ガスを使用している場合は、むしろ蓋をしない方が得か？その代わりに試料の蒸発が激しいので、シムが変動しやすい。



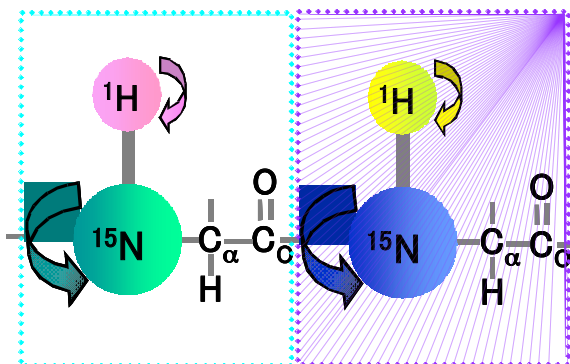




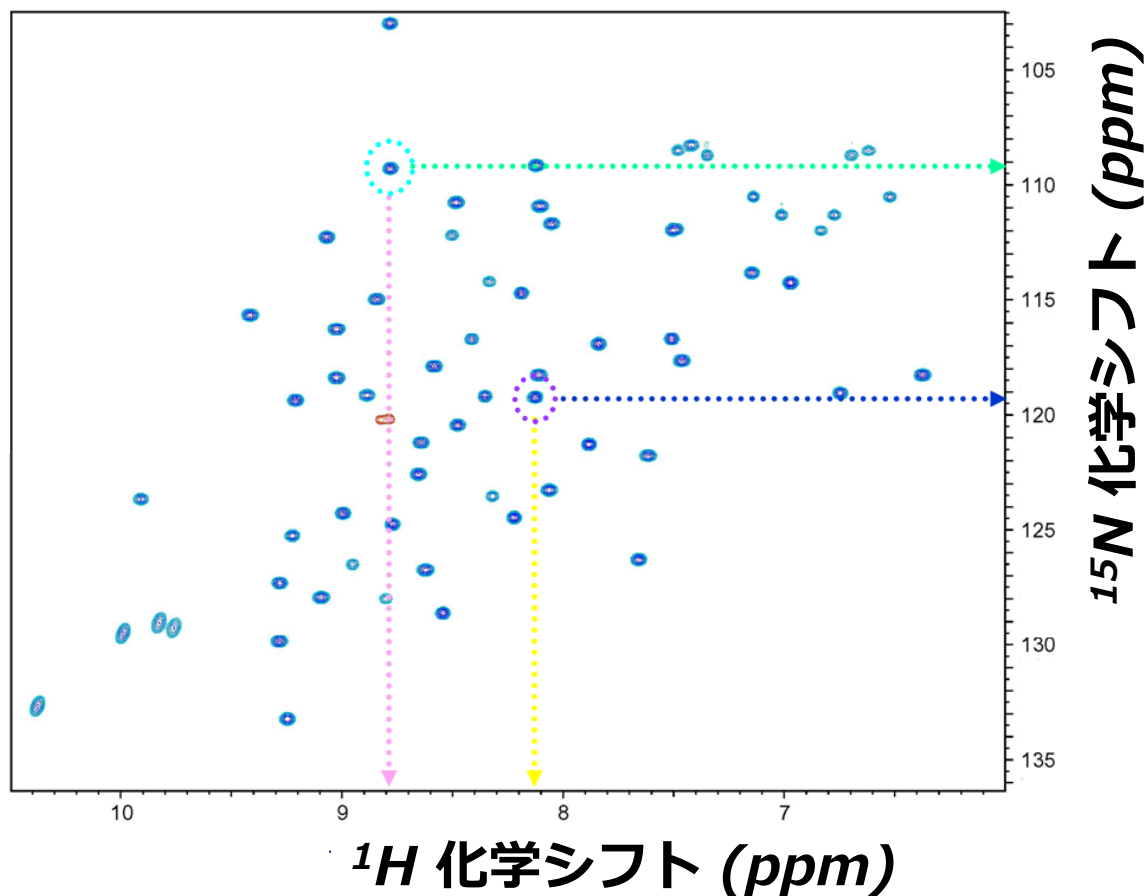
- 試料管のロットによっては、どうしてもアーティファクトのピークを消せない場合がある。（返品できる？）
- 水溶液が凍ると、やはり試料管は割れ、プローブの洗浄が必要になる。
- 時々、EDTA 溶液を通すと、常磁性緩和のもととなる遷移金属を除去できる。金属はガラス表面によく付着する。
- ガラス表面には水分子が多数ついているので、軽水の信号を極力少なくしたい場合には、目的の重水素溶媒ですすぐ。
- シゲミ試料管は、スピニングをしない（ピistonにより傷がつくため？）。
- スピナーの位置合わせは、できるだけ正確に行う。
- ピistonの上部には、十分量の溶液を載せる。
- 半日後にもう一度、磁石から取り出して泡を抜く。



# A 2D NMR spectrum correlating the amide resonances アミド基の共鳴 ( $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ ) の相関を示す二次元スペクトル



ChBD<sub>ChIC</sub> 52 残基

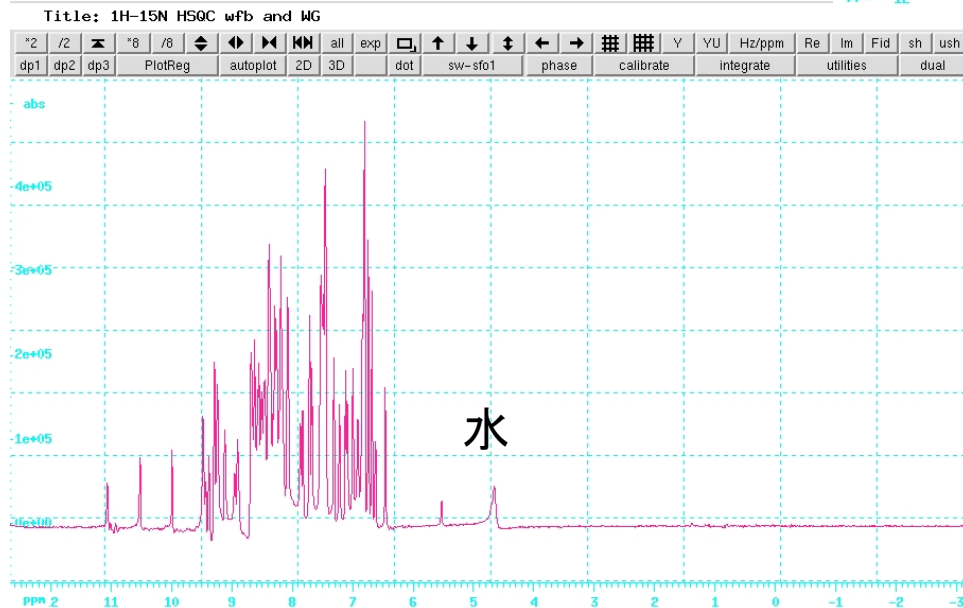
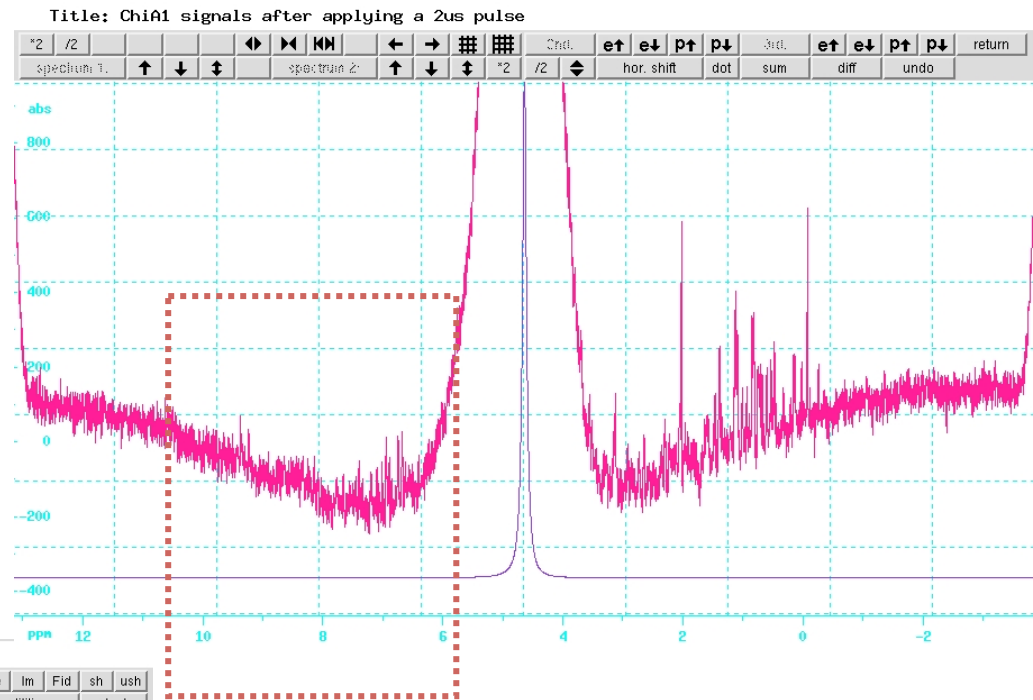


# アミド基水素領域 ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ )

## 溶媒信号の消去

溶質 (蛋白質) のピーク強度と  
溶媒 (水) のピーク強度の比較

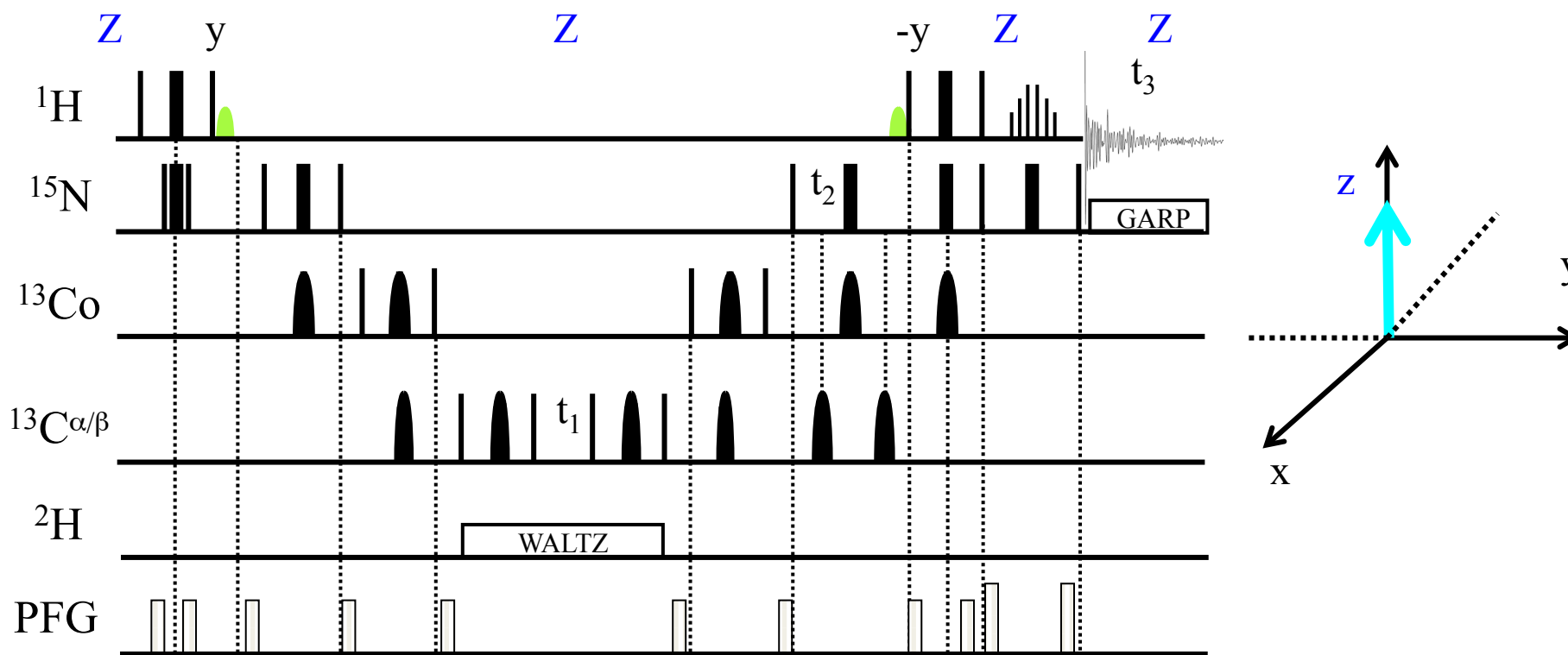
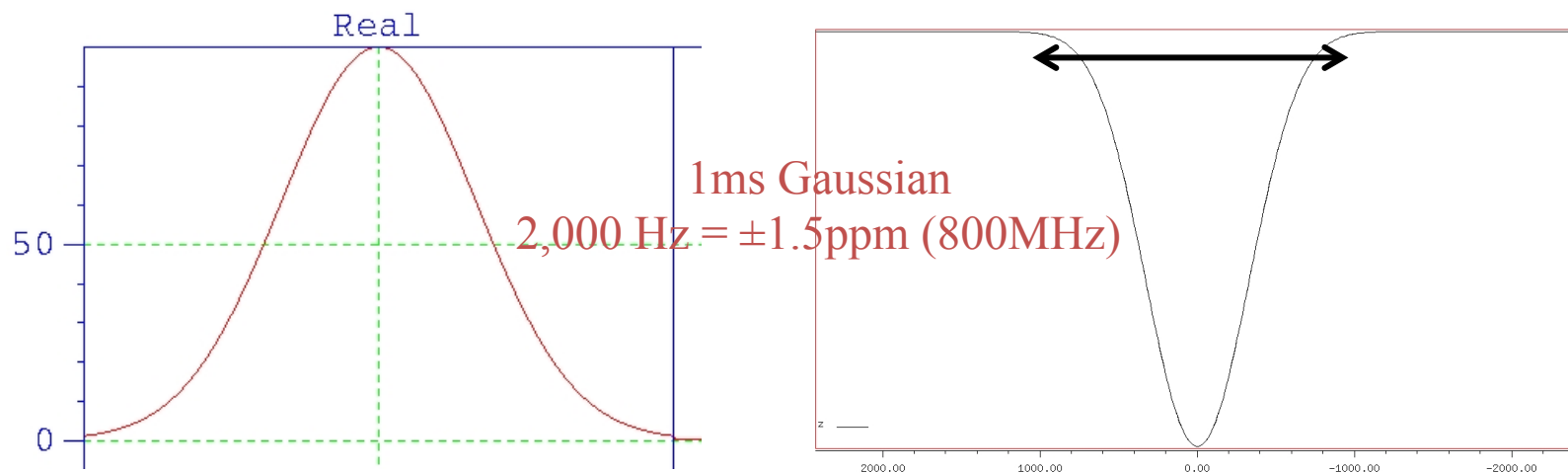
[ $^{15}\text{N}$ ]-蛋白質 (8 scans)



$\text{H}_2\text{O}$ :  
分子量 = 18 g/mol  
比重 = 1,000 g/L  
濃度 =  $1,000 / 18 = 55.6$  mol/L  
 $^1\text{H}$  の濃度 = 110 M  
蛋白質の濃度 < 1 mM



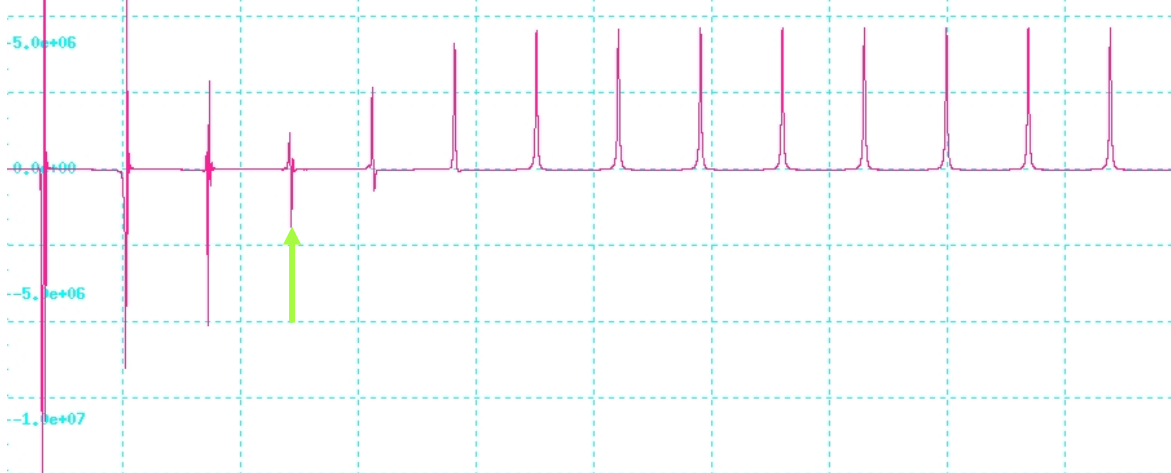
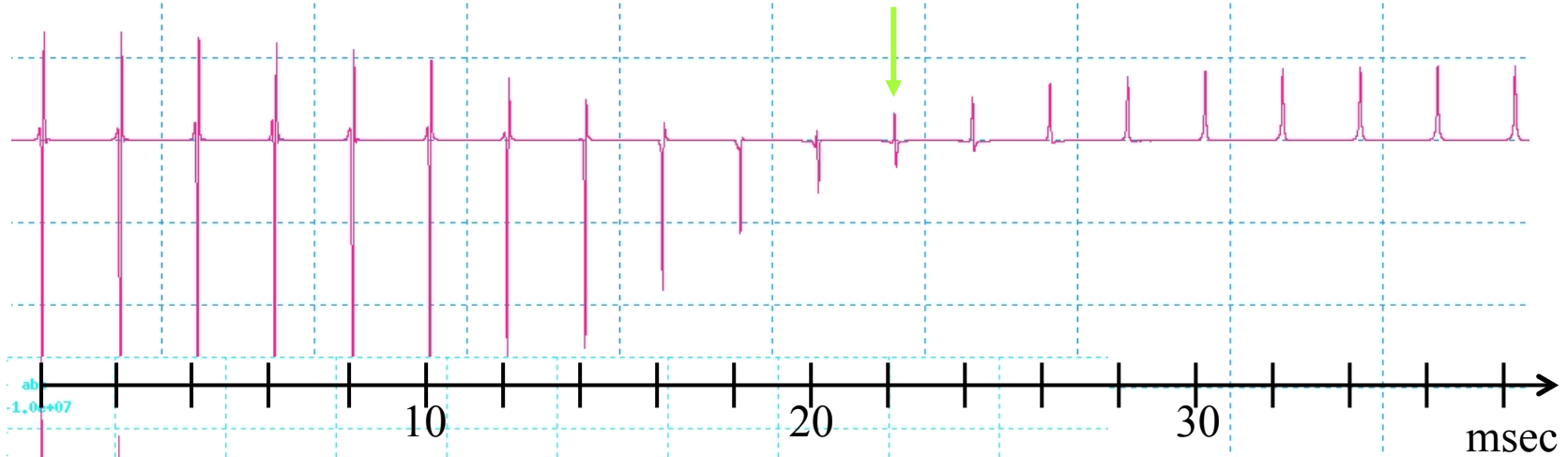
# 選択パルスによる water-flip-back 3D TROSY-HN(CO)CACB



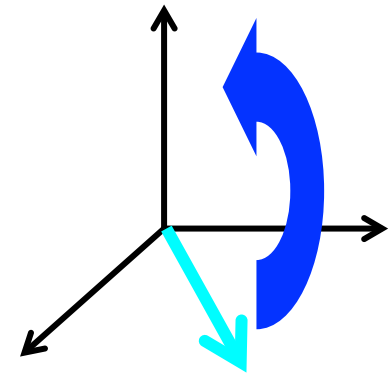


# 水の radiation-damping (放射減衰)

Normal probe 室温検出器 (500 MHz)



Cryogenic probe 極低温検出器 (800 MHz)

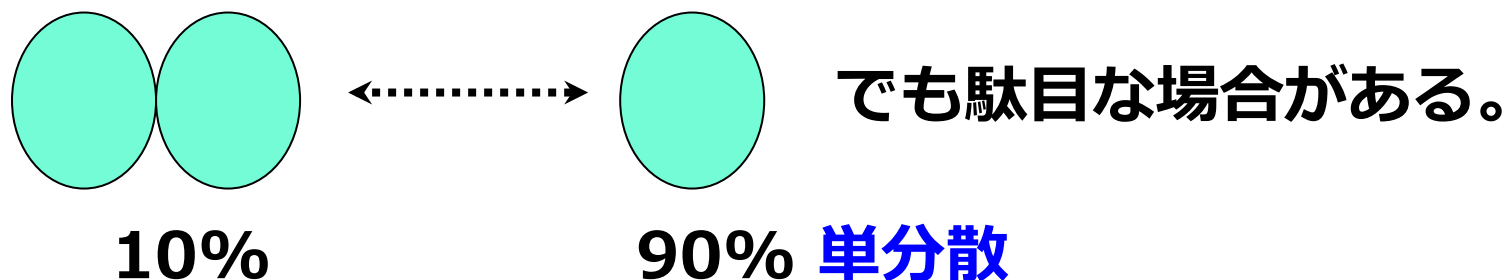


# 蛋白 NMR 解析で本当に力を入れないといけない事

試料調製  
精製度  
溶媒条件 (pH、塩濃度、添加物)

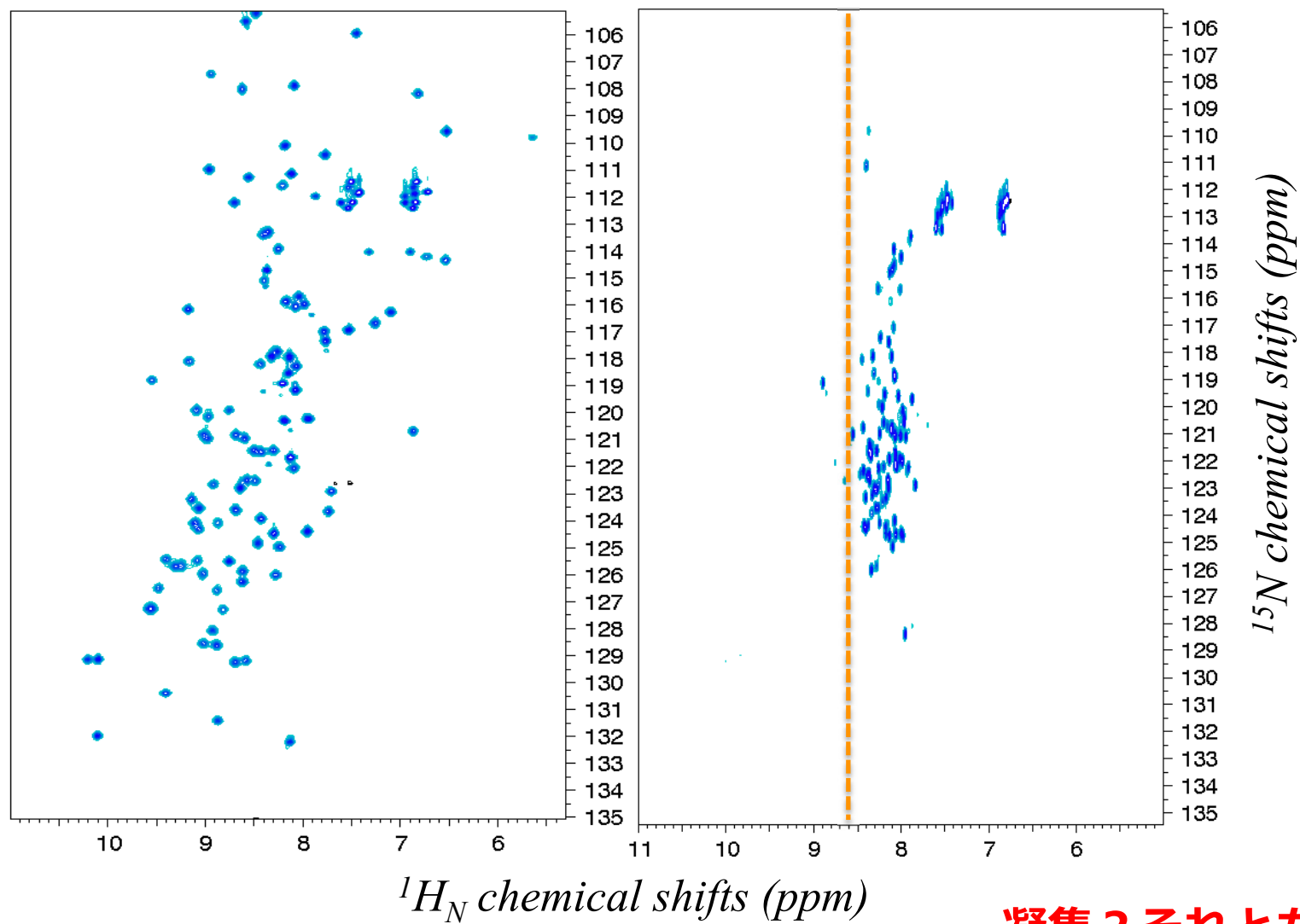
## 現在の蛋白 NMR での最大の問題点

非特異的に起こる疎水的相互作用によるかすかな凝集



150-200 種類の蛋白質を測定した結果、上例が >90% を占める。

## $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ 相関 (HSQC) スペクトルにみる蛋白質の状態



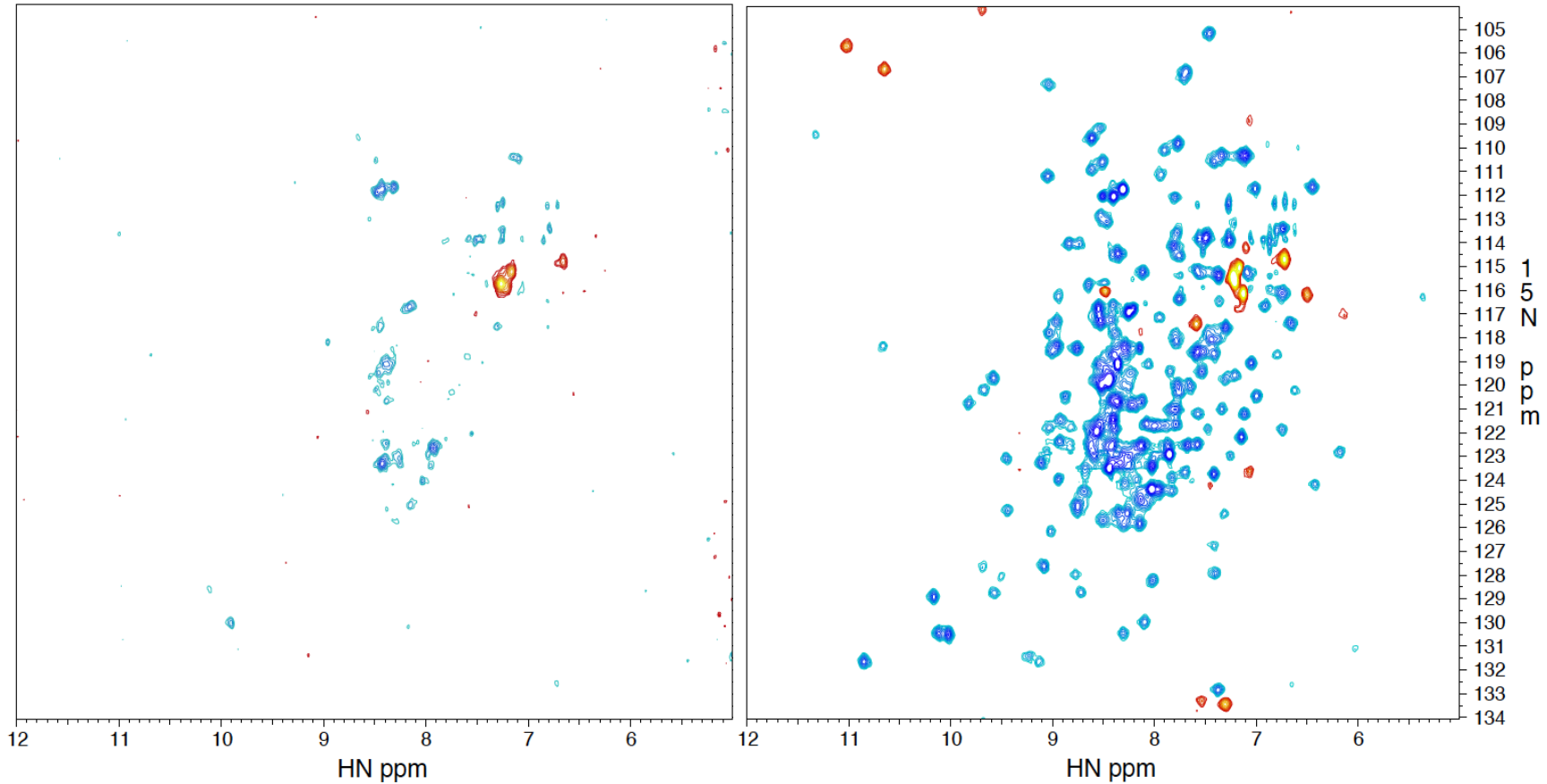
凝集？それとも unfold？



# pH によるスペクトルの変化

pH 6.0

pH 4.0



100  $\mu$ M <sup>15</sup>N-labeled in 20 mM Na-Pi  
(pH 6.0) and 10% D<sub>2</sub>O

170  $\mu$ M <sup>15</sup>N-labeled in 20 mM Na-  
acetate (pH 4.0) and 10% D<sub>2</sub>O

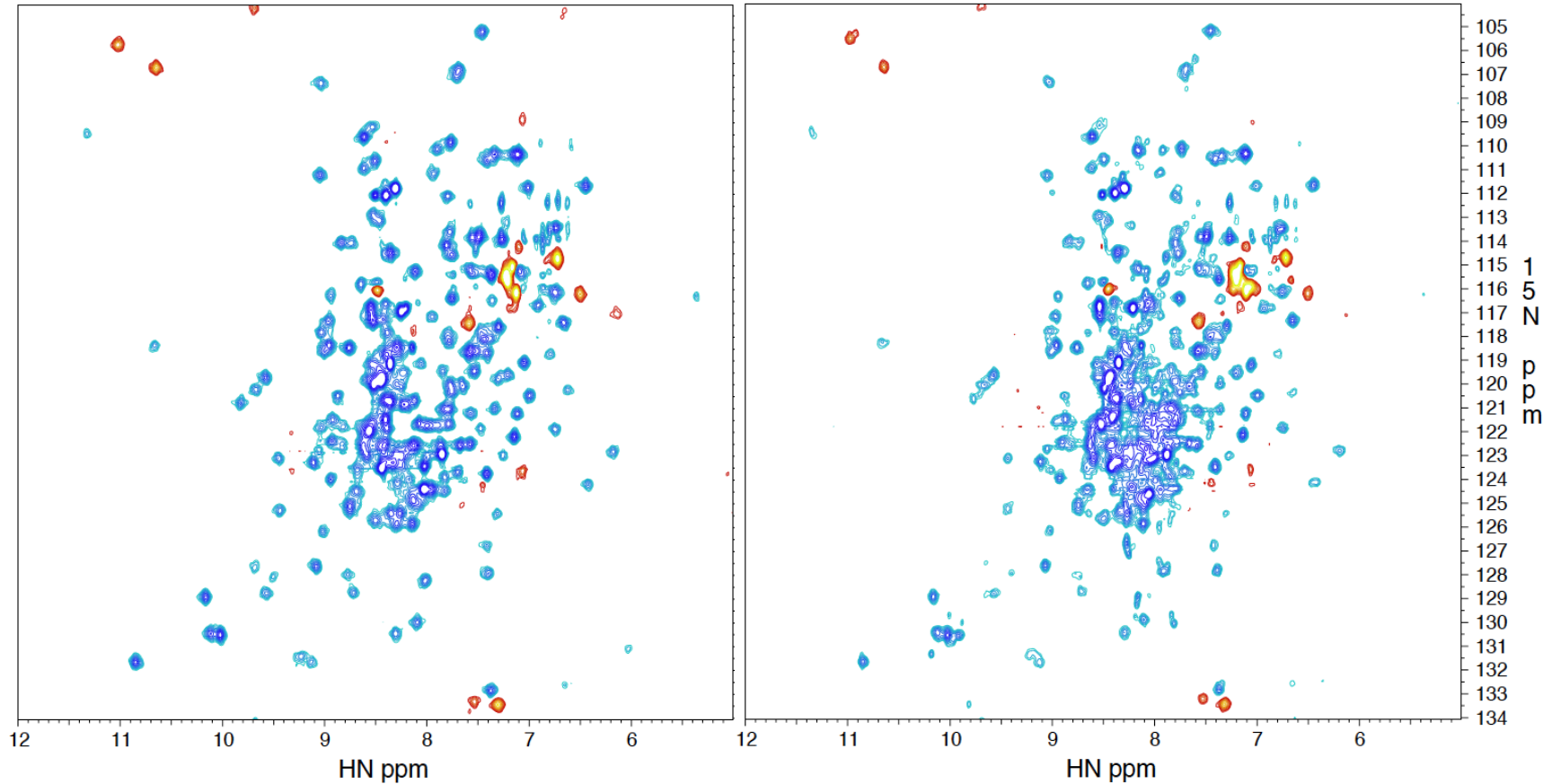
2D FHSQC-TROSY wfb and WG at 298K on 400MHz (1024\* x 128\*)

pH 8.0 では、全くピークが出なかった。

## pH によるスペクトルの変化 (2)

pH 4.0

pH 3.2



170  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 20 mM Na-acetate (pH 4.0) and 10%  $\text{D}_2\text{O}$

146  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 20 mM Acetate (pH 3.2) and 10%  $\text{D}_2\text{O}$

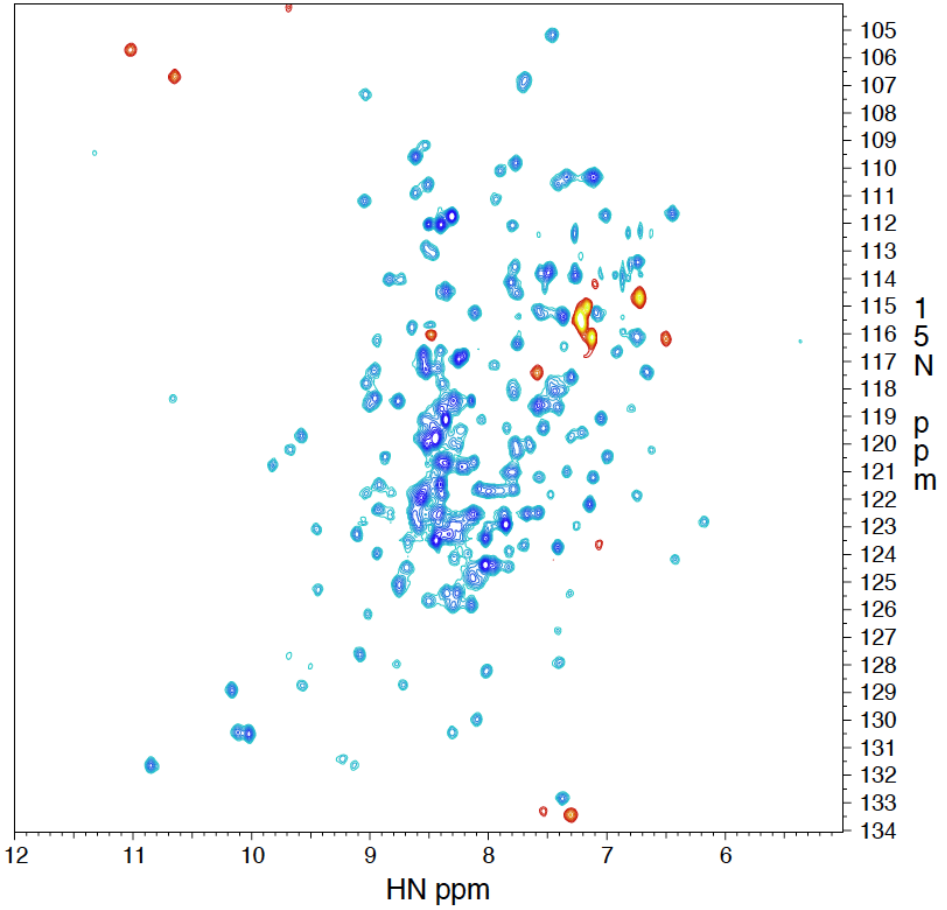
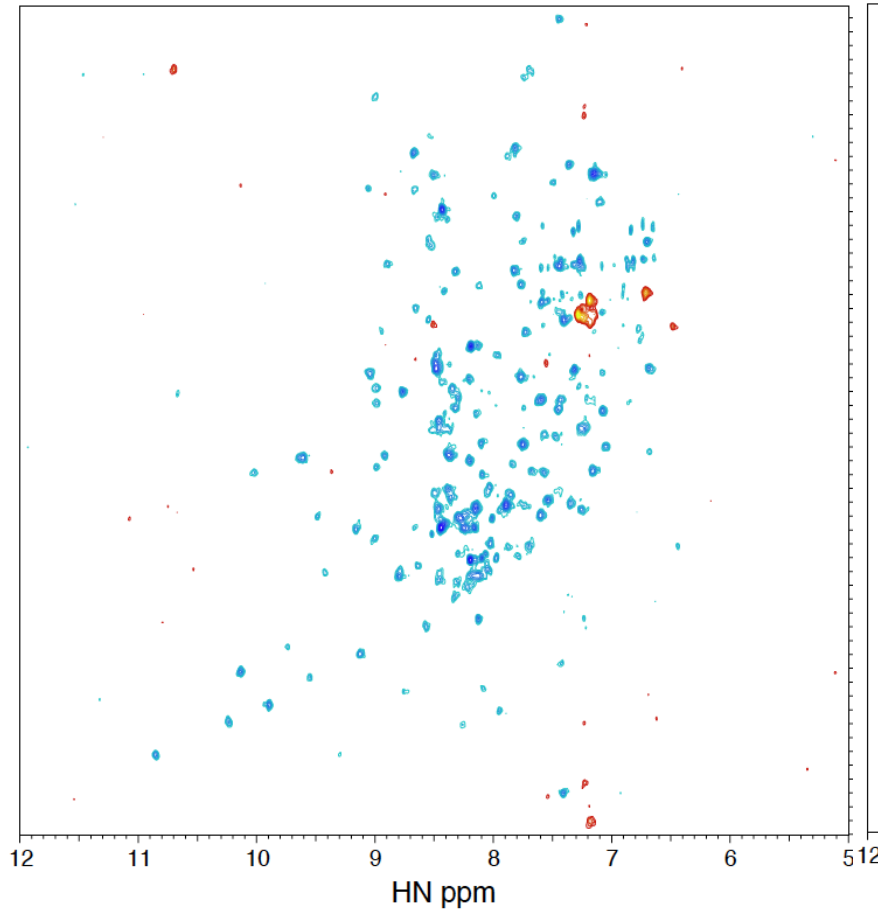
2D FHSQC-TROSY wfb and WG at 298K on 400MHz (1024\* x 128\*)

pH を 3.2 と下げ過ぎると、逆にスペクトルの質が悪くなった (酸変性)。

# 添加物によるスペクトルの変化

pH 6.0

pH 4.0



~80  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 50mM Glu-  
and 50mM Arg+

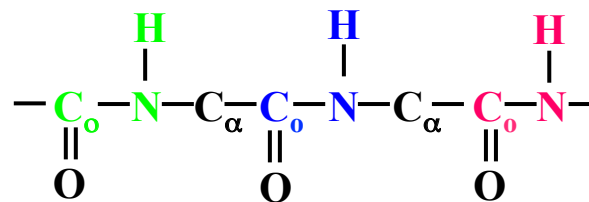
2D FHSQC-TROSY wfb and WG  
at 298K on 600MHz (1024\* x 100\* LP)

170  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -labeled in 20 mM Na-  
acetate (pH 4.0) and 10%  $\text{D}_2\text{O}$

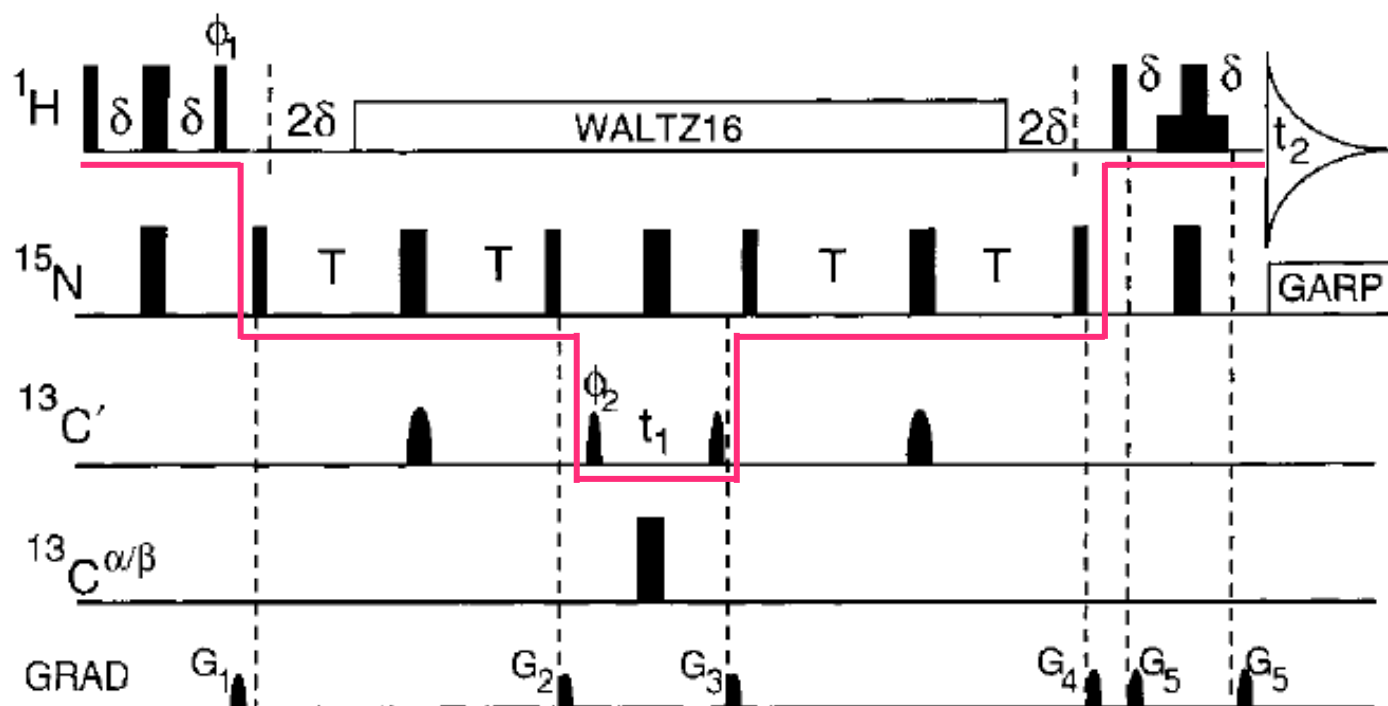
2D FHSQC-TROSY wfb and WG  
at 298K on 400MHz (1024\* x 128\*)

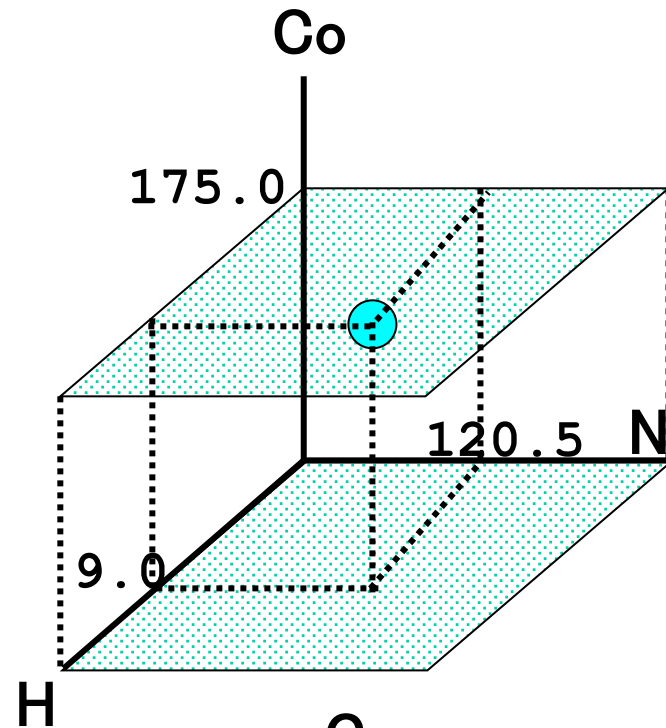
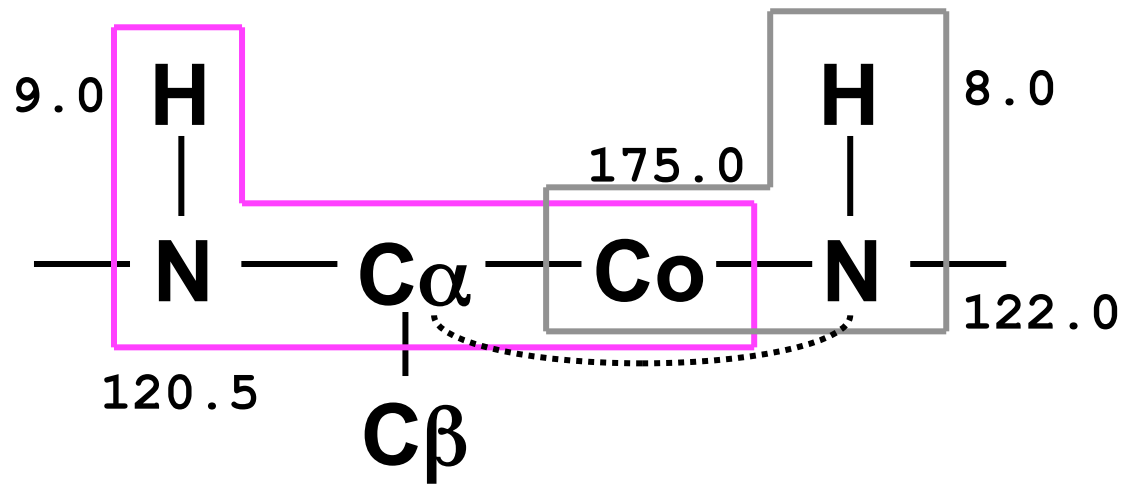


# 連鎖帰属のための 3、4次元の実験



## 3D-HNCO



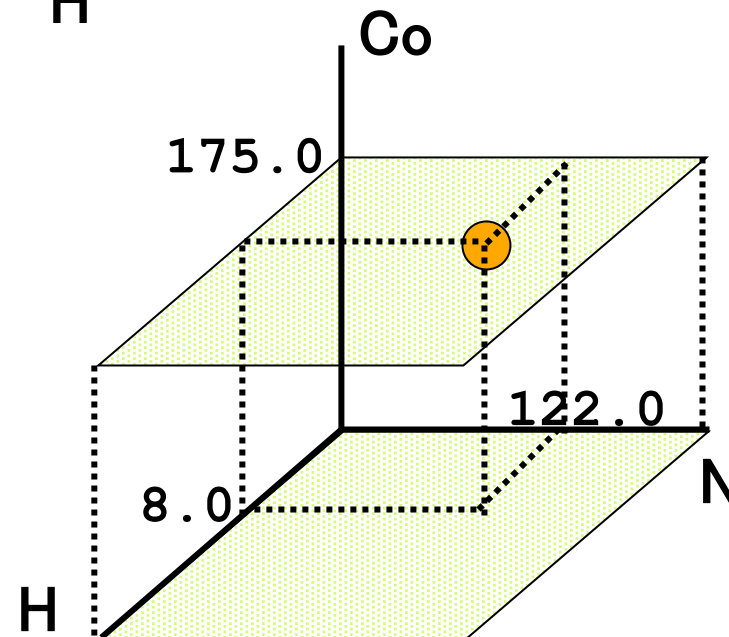


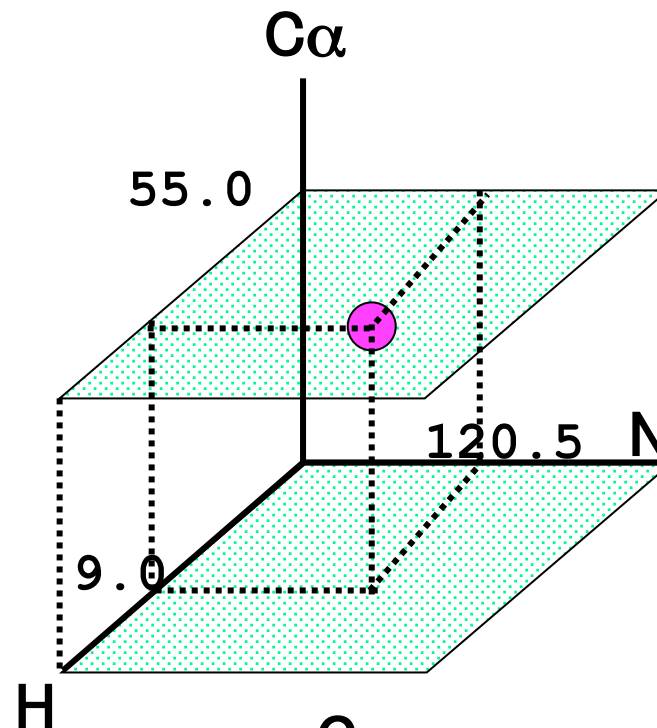
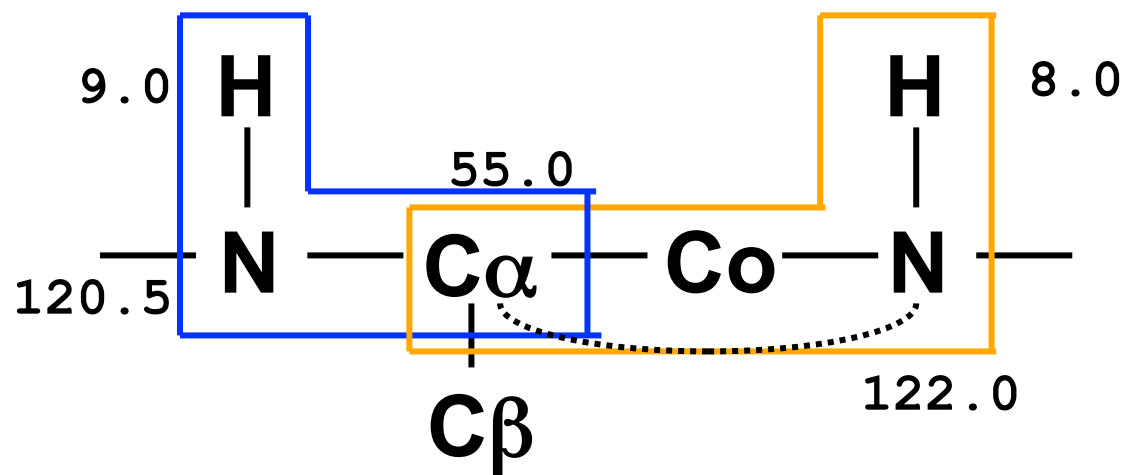
HN(C $\alpha$ )CO ●

$$(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) = (9.0, 120.5, 175.0)$$

HNC $\beta$ O ●

$$(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) = (8.0, 122.0, 175.0)$$





**HNCA** ●

$(x, y, z)$

$$= (9.0, 120.5, 55.0)$$

**HN(CO)CA** ●

$(x, y, z)$

$$= (8.0, 122.0, 55.0)$$

