

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

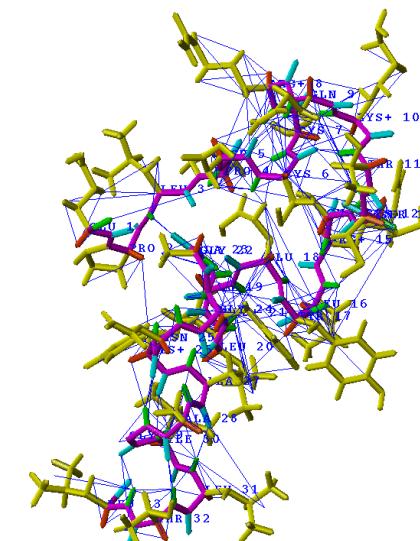
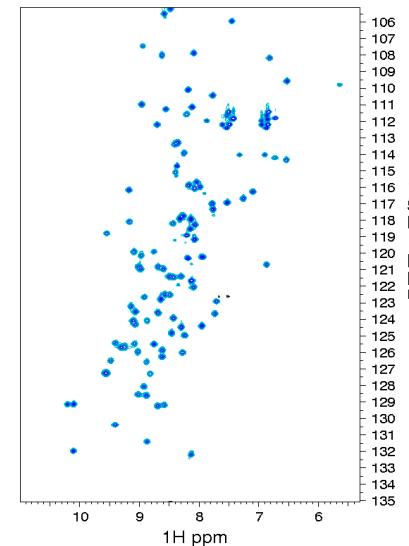
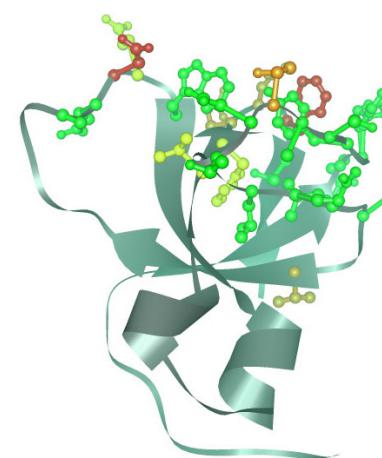
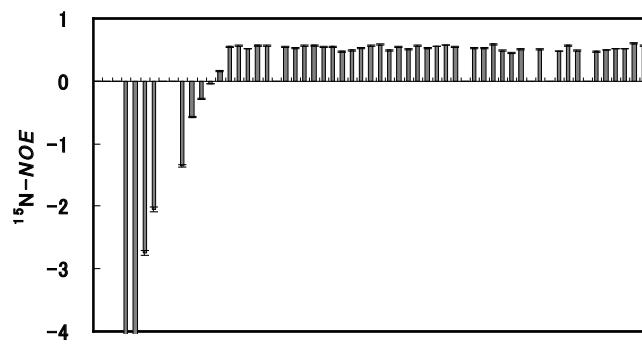
先端核磁気共鳴装置群の産業利用支援プログラム

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**

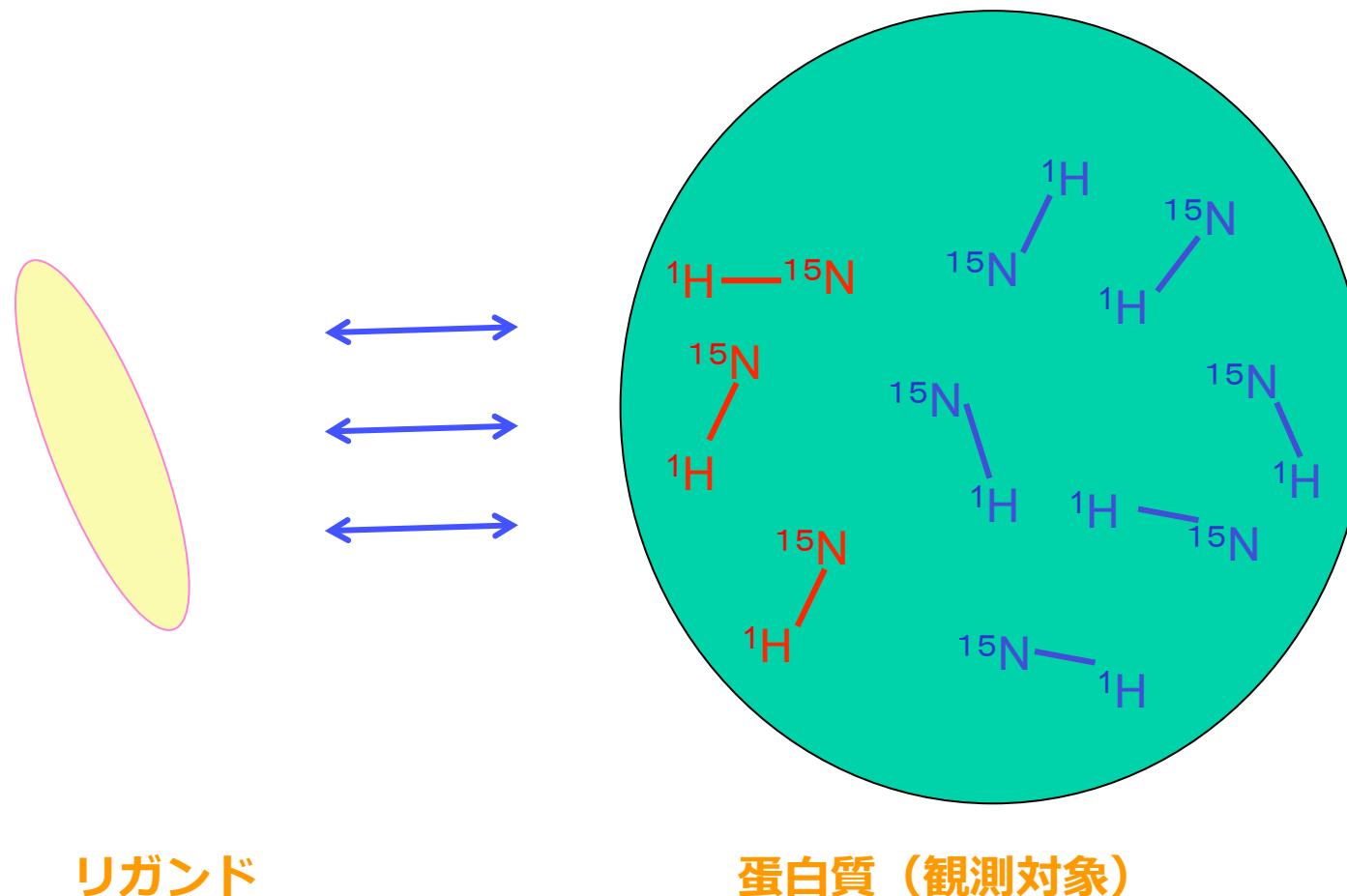
蛋白 NMR

- 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

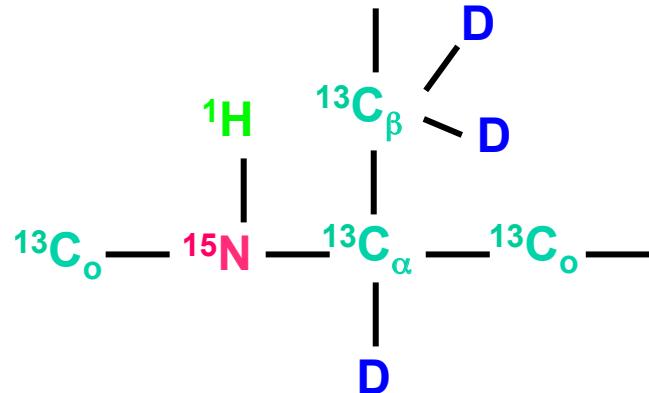


化学シフト摂動法

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。

^1H 99.98 % 無尽蔵

^2H 0.015 原発からのおこぼれ

^3H 0 放射能汚染

^{13}C 1.108 何とか安く！

^{15}N 0.37 空気には一杯

^{19}F 100 無尽蔵だが稀

^{31}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。

ファーメンターが無くとも、バッ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}N (^{13}C) culture

(1) 10 x salt

Na_2HPO_4	7.0 g	autoclave separately! should adjust moles if you use hydrated ones
KH_2PO_4	3.0 g	pH becomes 7.15 automatically
NaCl	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 ₁
biotin	20 mg	vitamin H (difficult to be dissolved in water)
10 mM FeCl_3	1.0 mL	
1M MgSO_4	2.0 mL	not MgCl_2 !
50 mM MnCl_2	1.0 mL	

(3) stable-isotope

	filter	
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	1.0-2.0 g	
^{13}C -glucose	1.0-4.0 g	
^{2}H , ^{13}C -glucose	1.0-4.0 g	only for ^{2}H -labelling
--- D ₂ O	50-100%	only for ^{2}H -labelling

蛋白質科学会
アーカイブに
詳細あり。

(4) 50mM CaCl_2

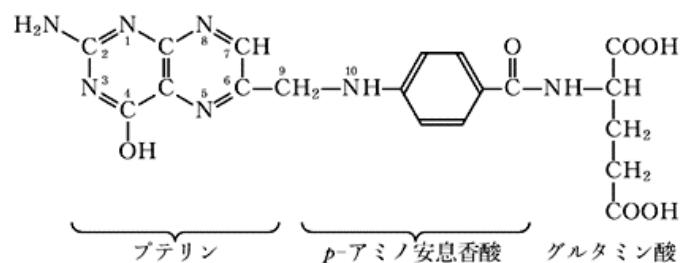
50mM CaCl_2	2.0 mL	
glycerol	1/1000 (=1mL)	only for ^{15}N -single-labelling
ampicillin	50-100 ug/mL	
ZnCl_2	20 uM	only for zinc-finger proteins

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

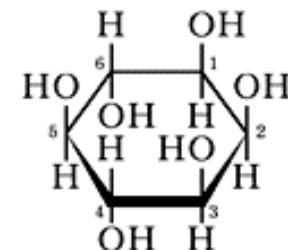
When you culture with $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ (1-2g/L glucose and no glycerol), it would be recommended to add these vitamins because the amount of carbons in media is less than with only ^{15}N (4g/L glucose and 0.1% glycerol).

(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 B₆)	1mg
(6) riboflavin	(vitamin B_{2,G})	0.1mg
(7) inositol		2mg

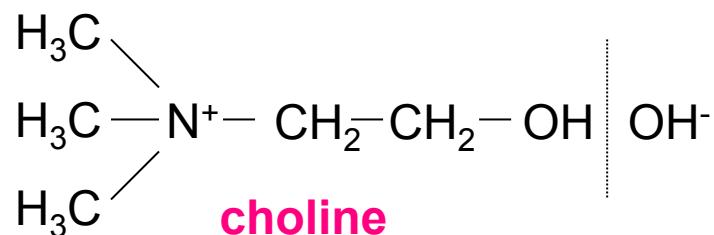
These vitamins should be dissolved in filtered 1mL H₂O (D₂O), and stored frozen as aliquot (eppendorf) or each usage.



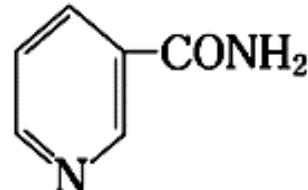
folic acid



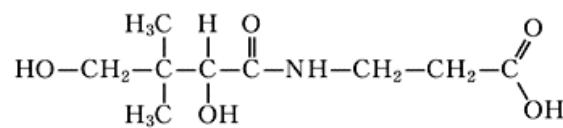
myo-イノシトール



choline



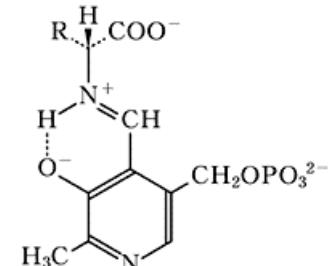
nicotin-amide



D-pantethenic acid

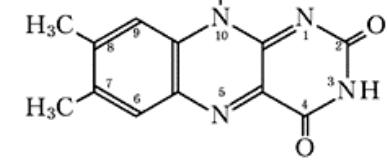
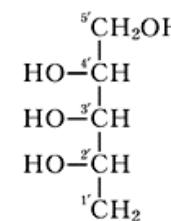


pyridoxal



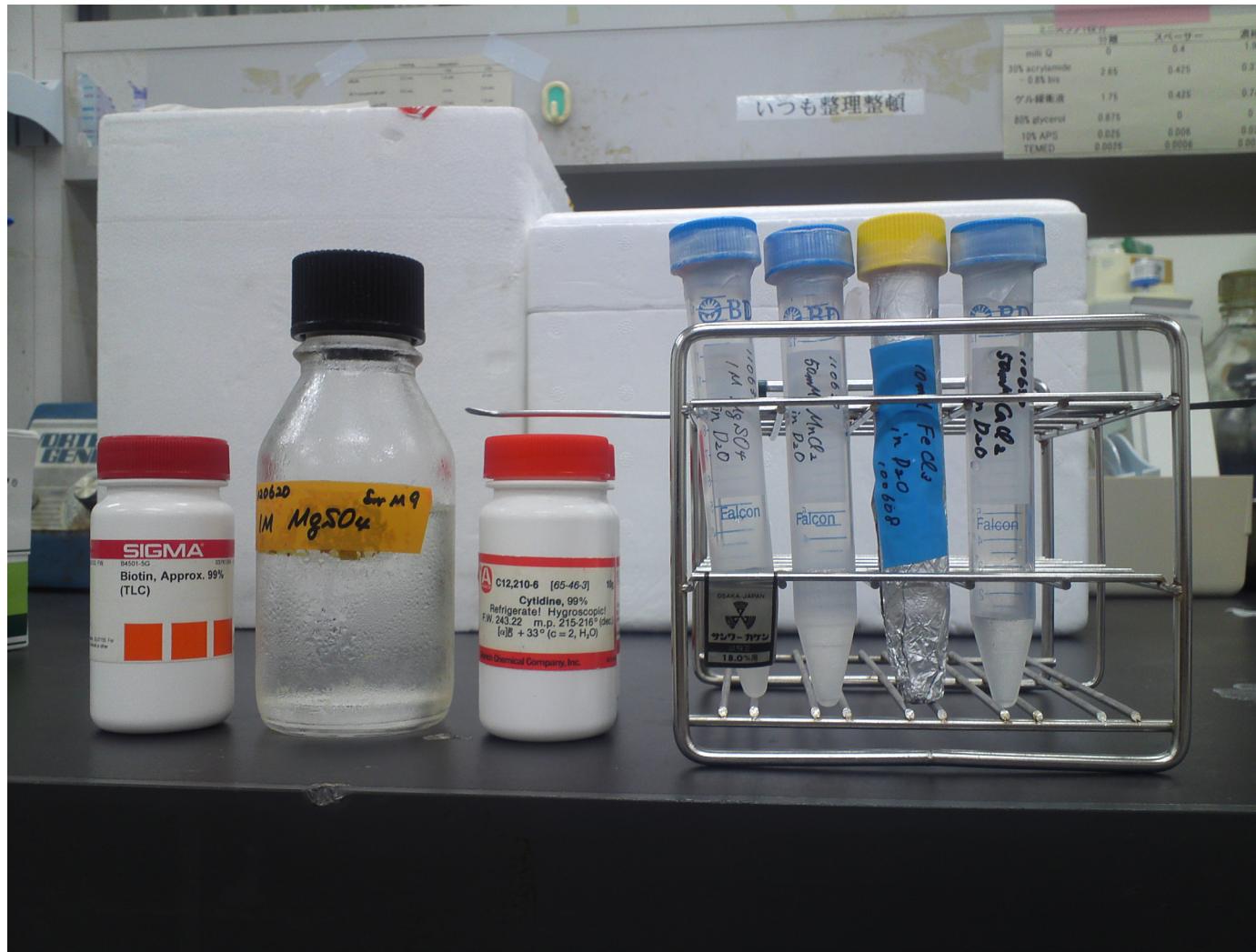
アミノ酸と形成する
シップ塩基

inositol



riboflavin

ミネラル類は H₂O (D₂O) 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？

ZnSO_4
 CoCl_2
 Na_2MoO_4
 CuCl_2
 H_3BO_3

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



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

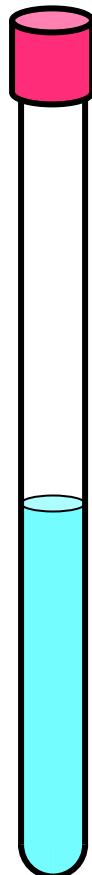


遠心限外濾過濃縮器を一晩以上水に漬ける

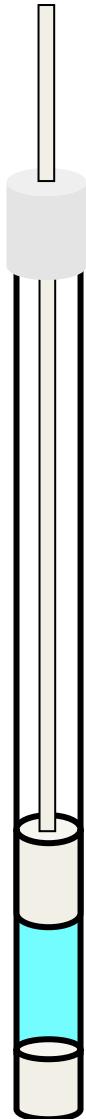


試料調製

-- 試料の分量は？ --



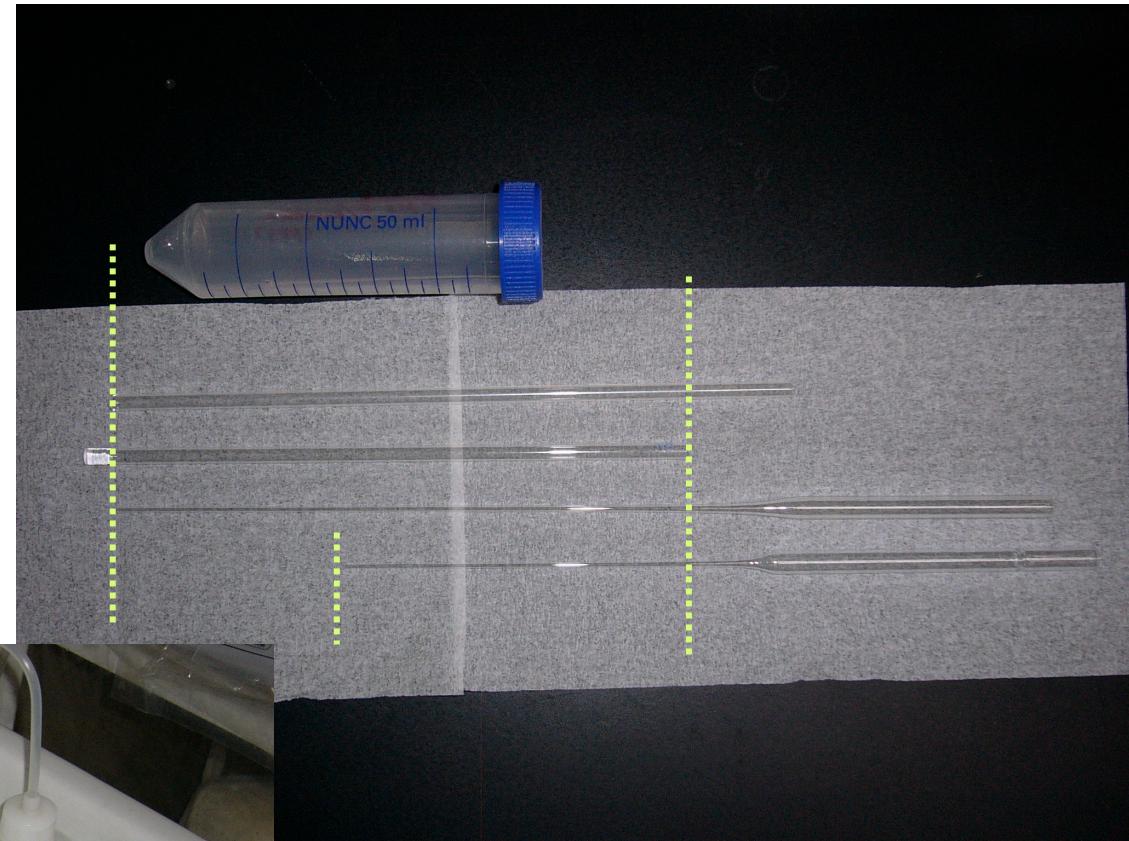
- 安価である。（安過ぎるのは同心円柱ではない。）
- 溶液を充分量入れれば、シムが調整しやすい。逆に溶液量が少なければ、シムを合わせにくい。（最低 500~600 μL 欲しい）
- 溶液量が多いと、上下で実際の温度が異なる。さらに対流や滴の落下が起き易い。
- pulse-照射、検出や静磁場の *inhomogeneity* が起き易い。（90 度パルス長が少し長くなる？）
- 泡が溜まりにくいのは良い。ただし、長時間の測定では蒸発するため、自動シム調整を同時に作動させるとよい。
- 滴定実験には適している。



- 試料の量が **280 μL** 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) 。

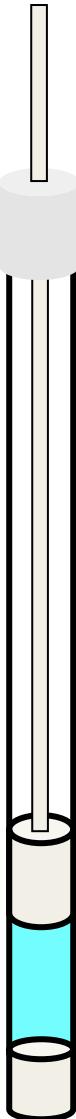
長いパストール

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。



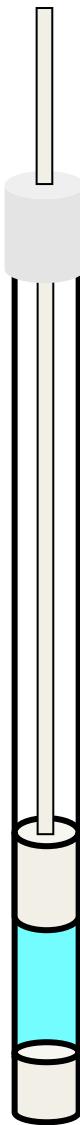
便利で簡単なすすぎ装置

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。



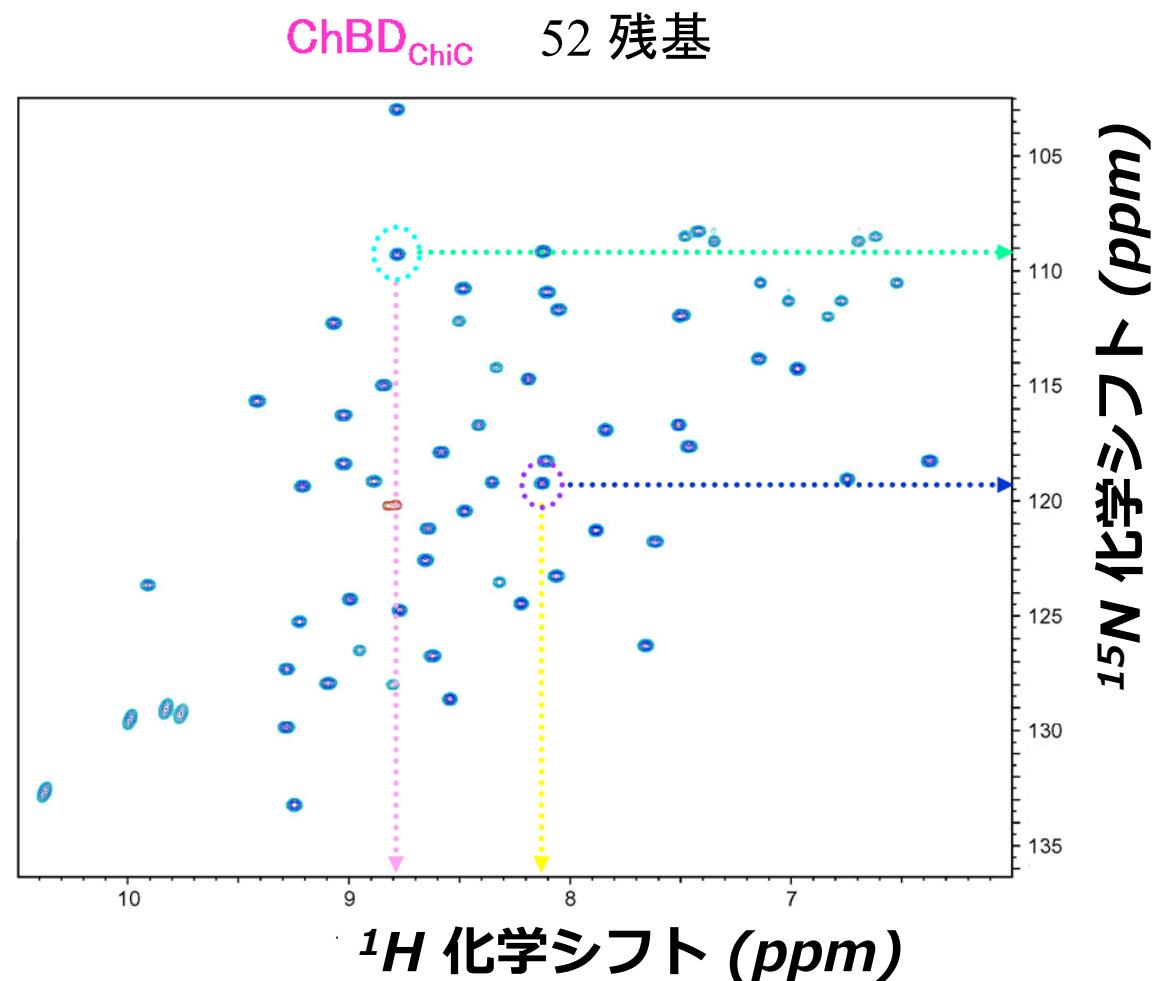
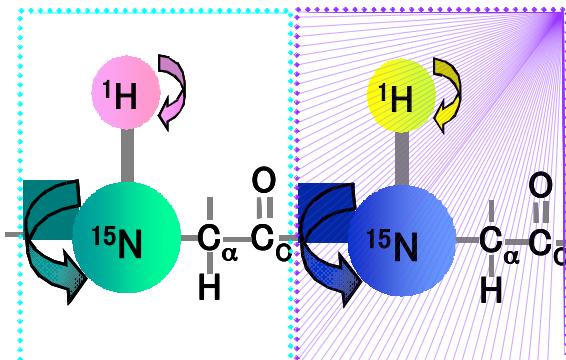
試料管に関するその他の注意事項

- 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き難くなる。
- 長めの特注パスト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（ピストン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。
- ピストンの上部には、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。

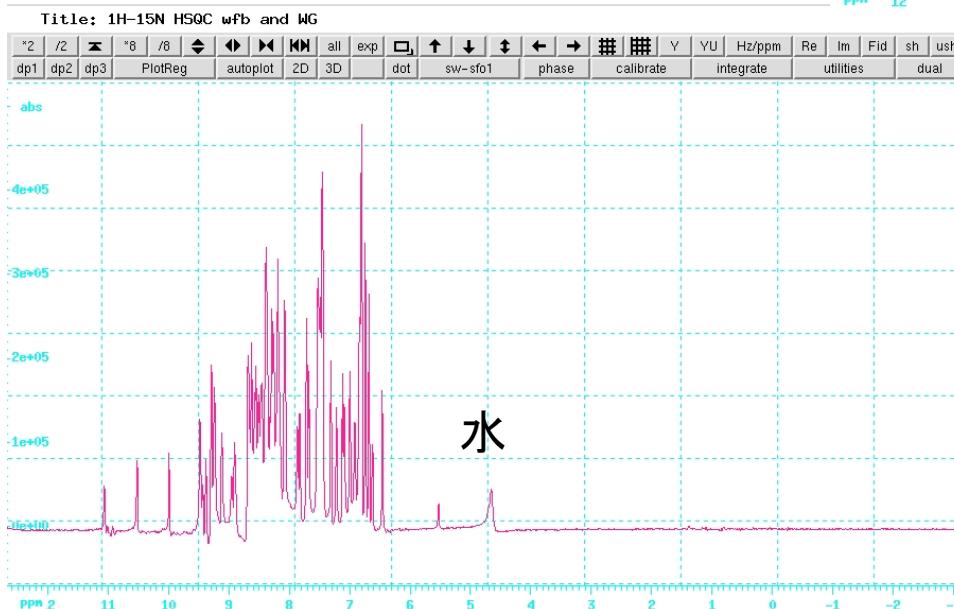
A 2D NMR spectrum correlating the amide resonances アミド基の共鳴 (^1H , ^{15}N) の相関を示す二次元スペクトル



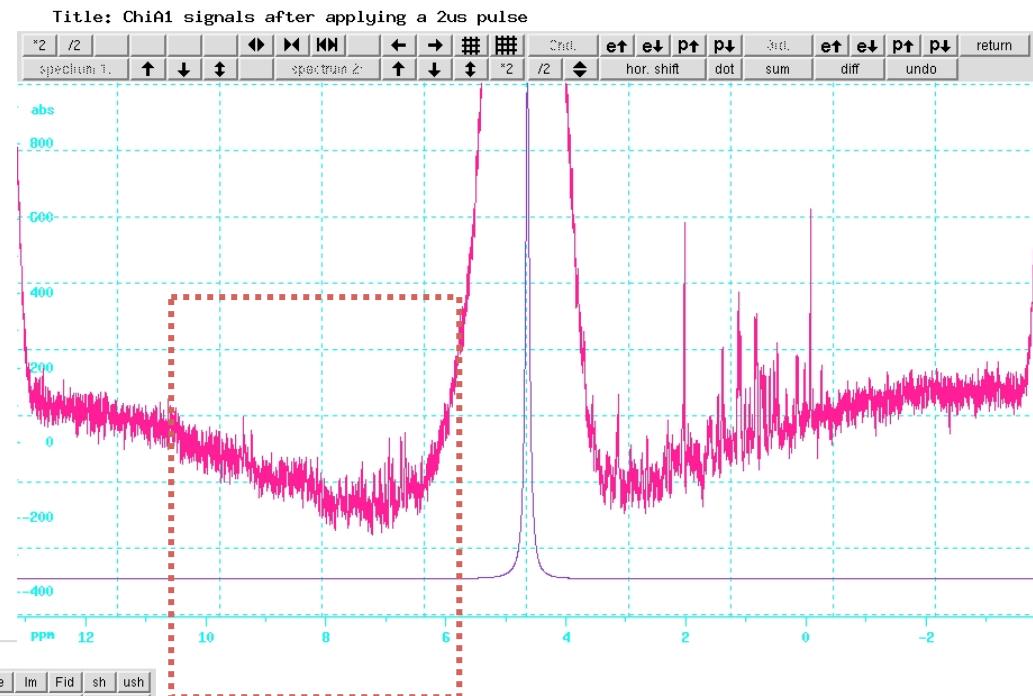
溶媒信号の消去

溶質（蛋白質）のピーク強度と
溶媒（水）のピーク強度の比較

[¹⁵N]-蛋白質 (8 scans)

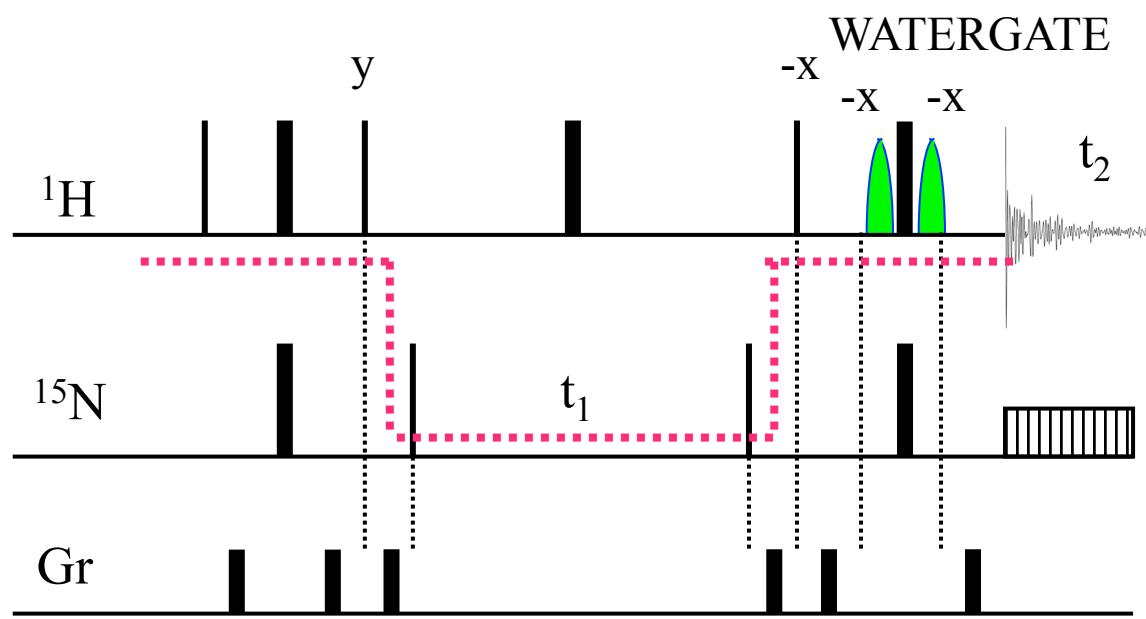
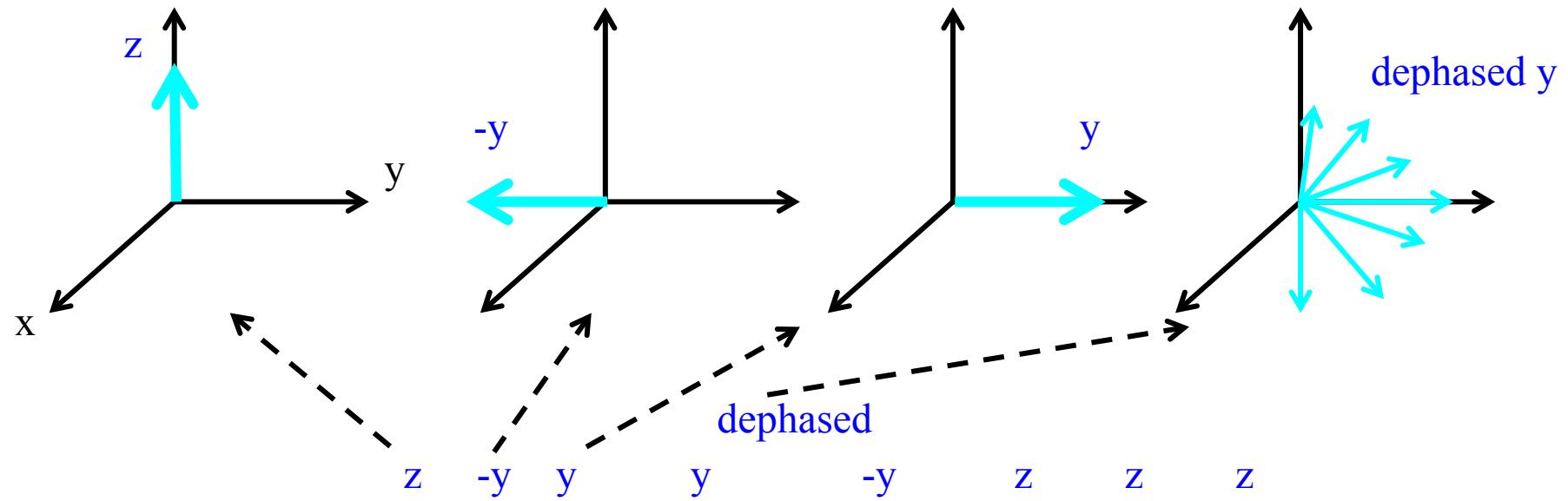


アミド基水素領域 (¹H-¹⁵N)



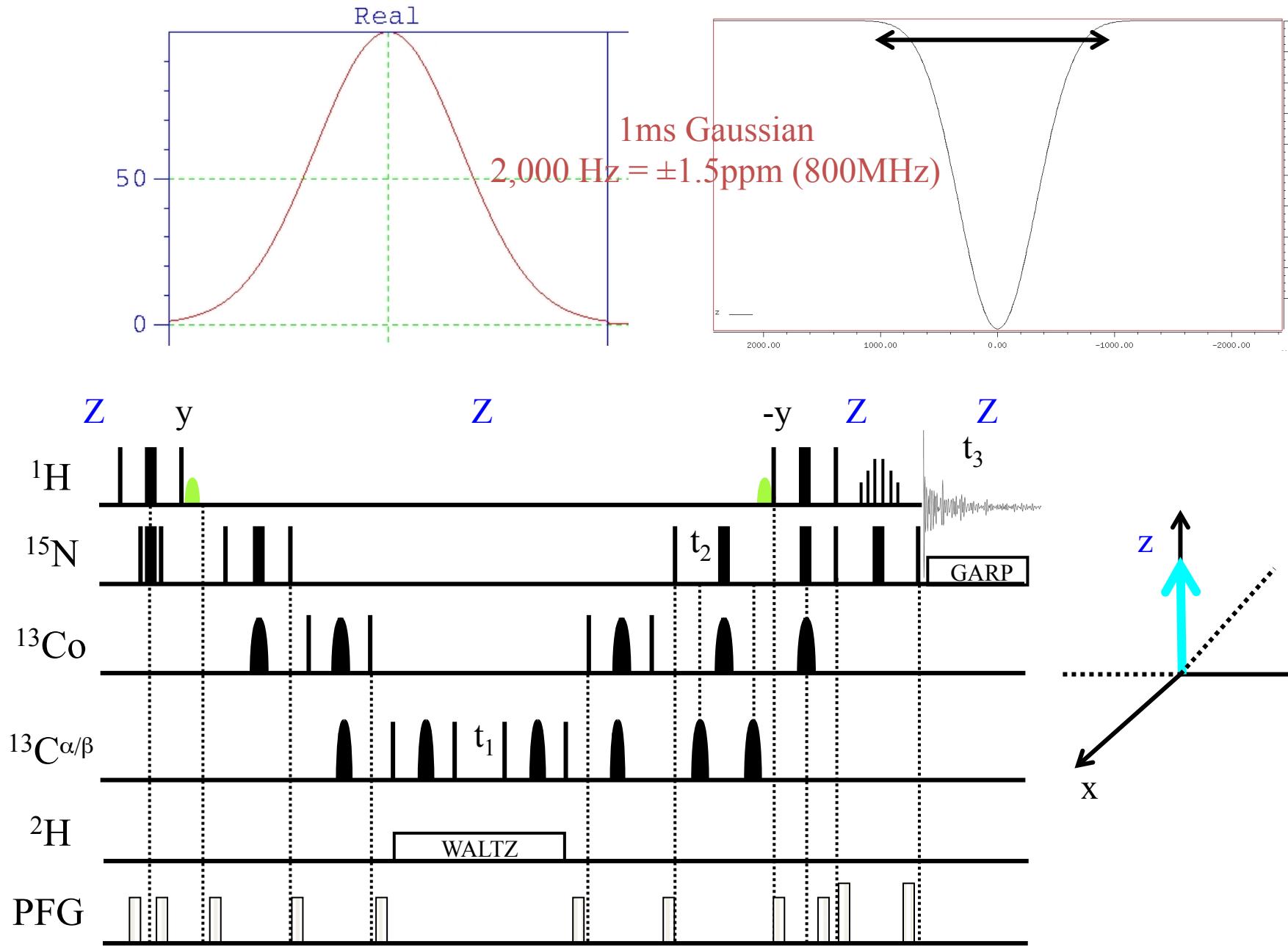
H_2O :
分子量 = 18 g/mol
比重 = 1,000 g/L
濃度 = 1,000 / 18 = 55.6 mol/L
¹H の濃度 = 110 M
蛋白質の濃度 < 1 mM

Water flip-back & WATERGATE ^1H - ^{15}N HSQC



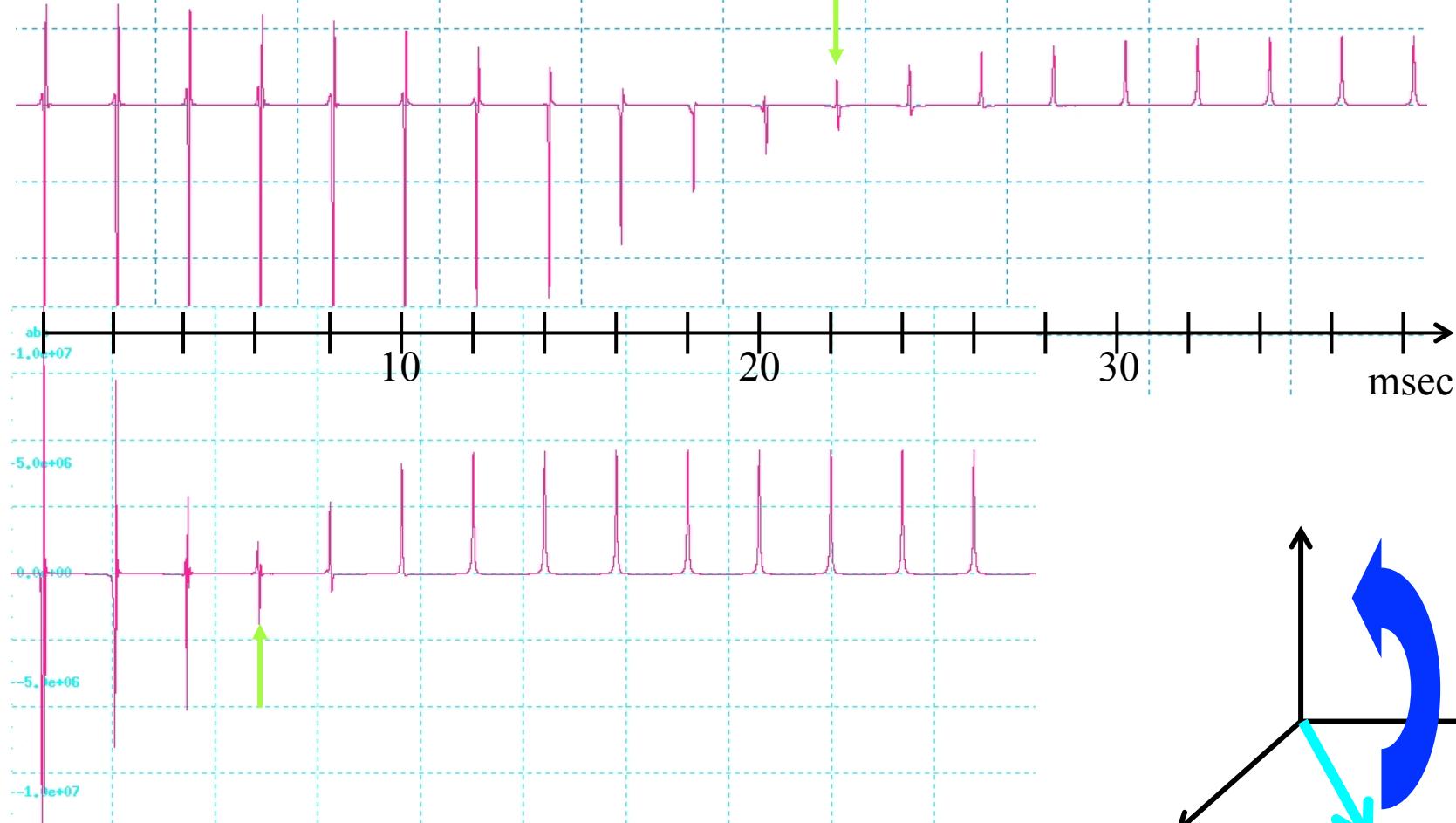
fhsqcf3gpph

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

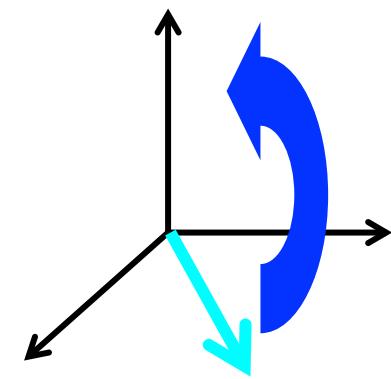


水の radiation-damping (放射減衰)

Normal probe 室温検出器 (500 MHz)



Cryogenic probe 極低温検出器 (800 MHz)

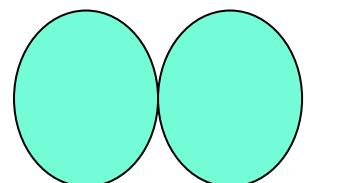


蛋白 NMR 解析で本当に力を入れないといけない事

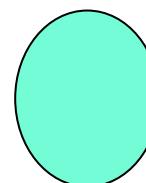
試料調製
精製度
溶媒条件 (pH、塩濃度、添加物)

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



10%

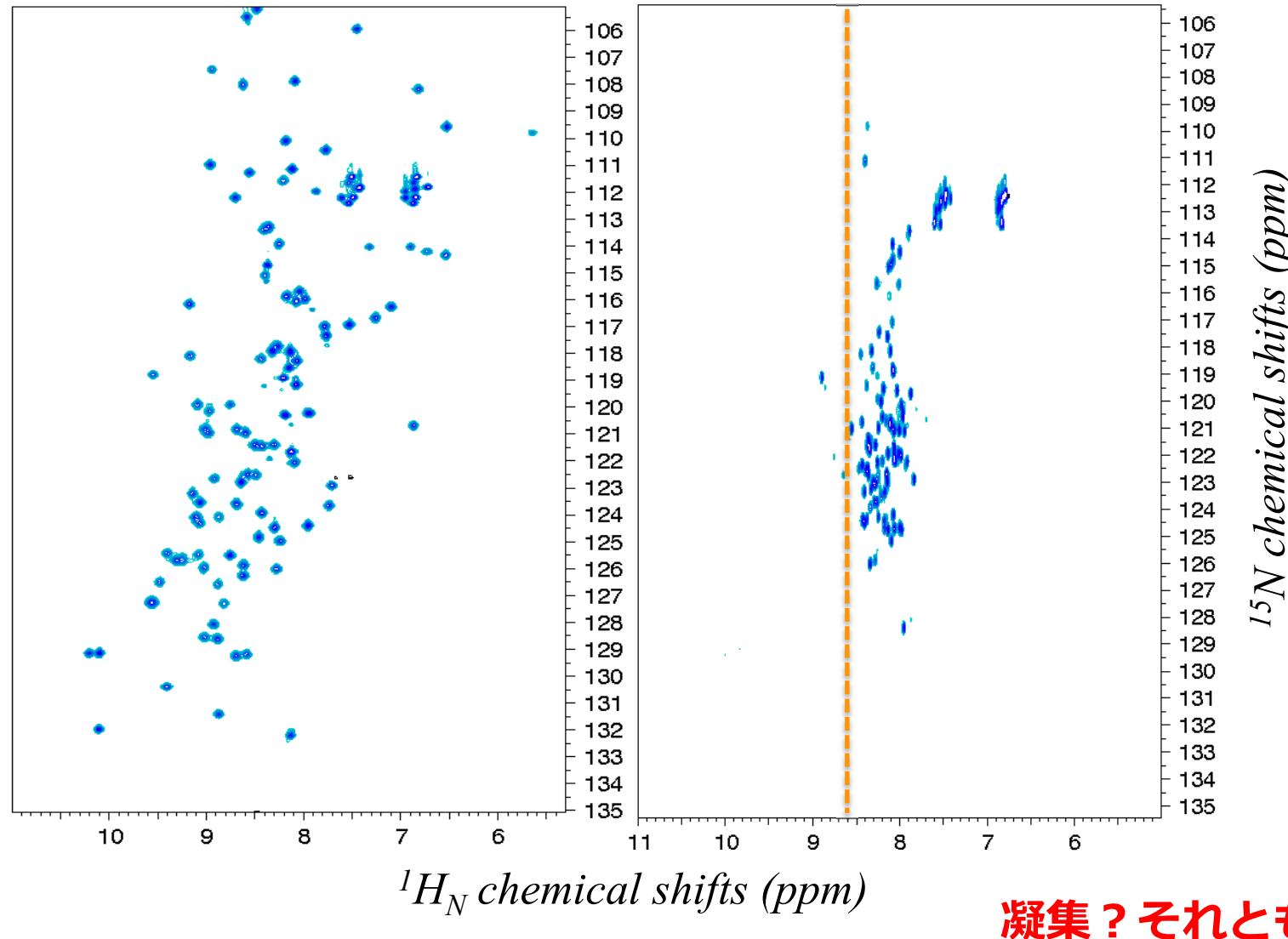


でも駄目な場合がある。

90% 単分散

150-200 種類の蛋白質を測定した結果、上例が >90% を占める。

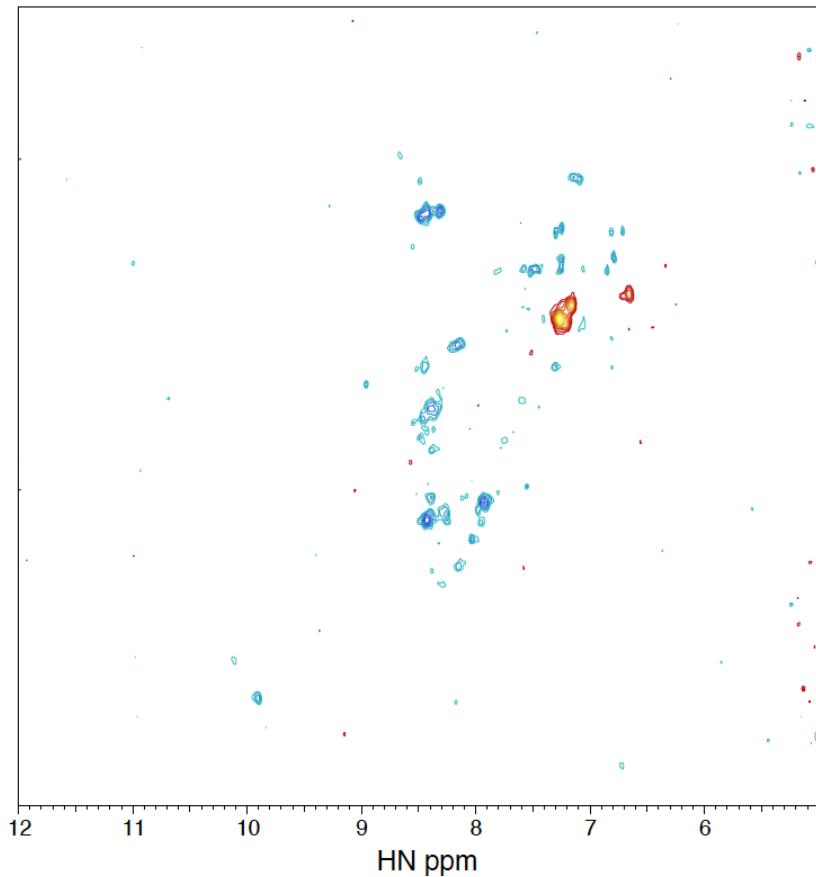
^1H - ^{15}N 相関 (HSQC) スペクトルにみる蛋白質の状態



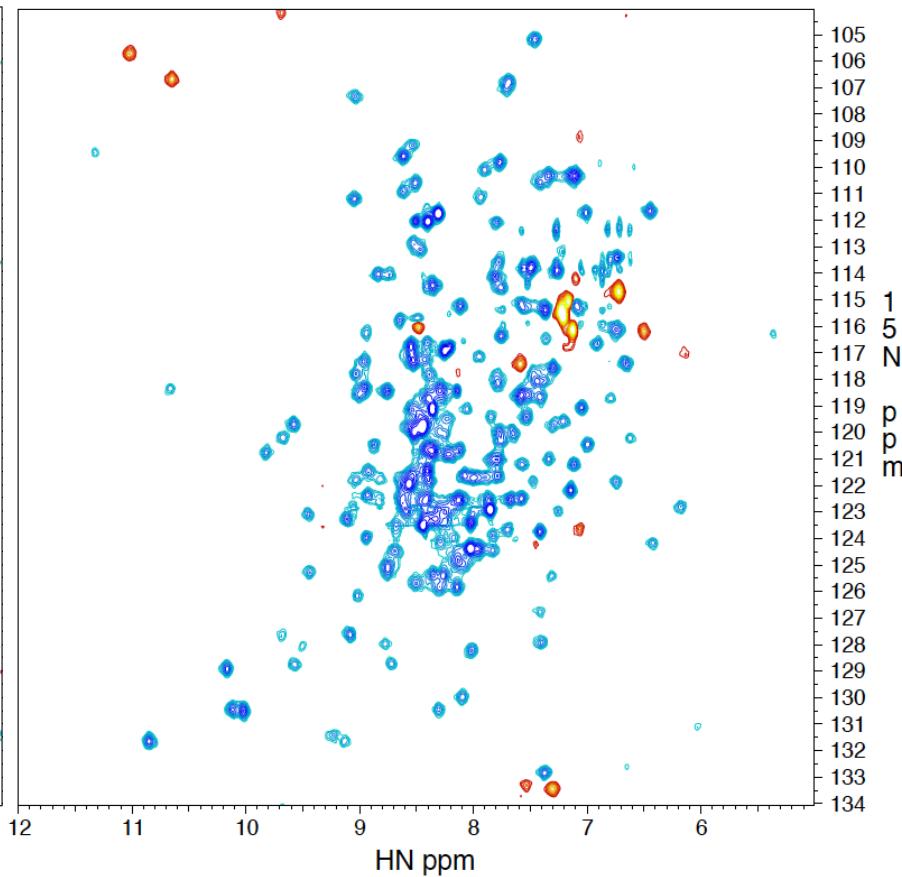
凝集？それとも unfold？

pH によるスペクトルの変化

pH 6.0



pH 4.0



100 uM ^{15}N -labeled in 20 mM Na-Pi
(pH 6.0) and 10% D_2O

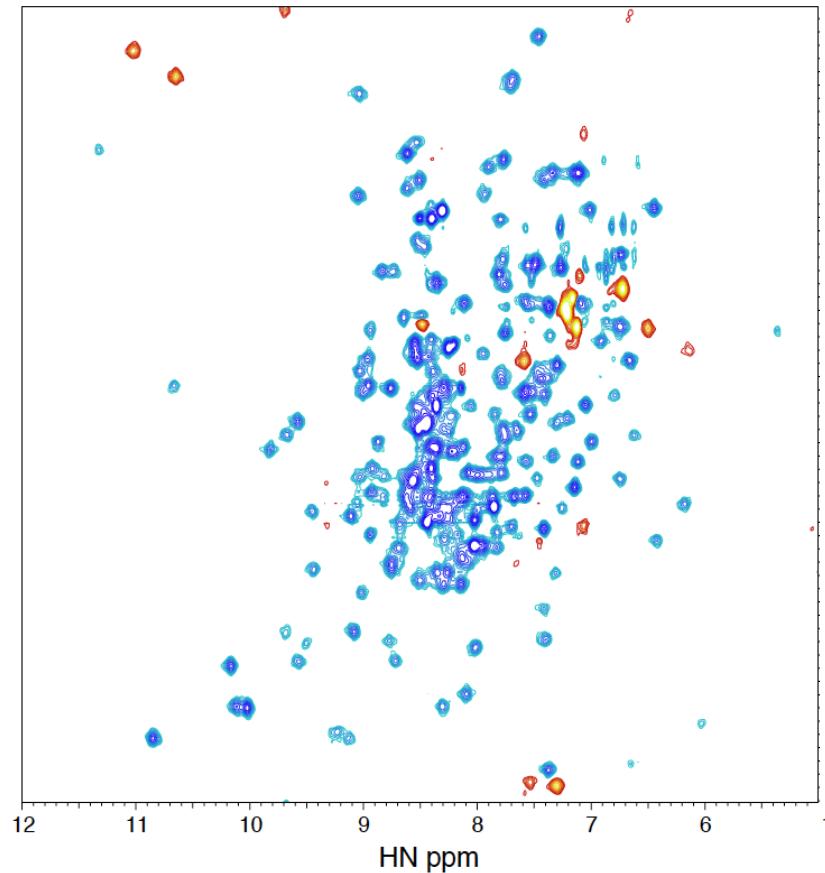
2D FHSQC-TROSY wfb and WG at 298K on 400MHz (1024* x 128*)

pH 8.0 では、全くピークが出なかった。

170 uM ^{15}N -labeled in 20 mM Na-acetate (pH 4.0) and 10% D_2O

pH によるスペクトルの変化（2）

pH 4.0

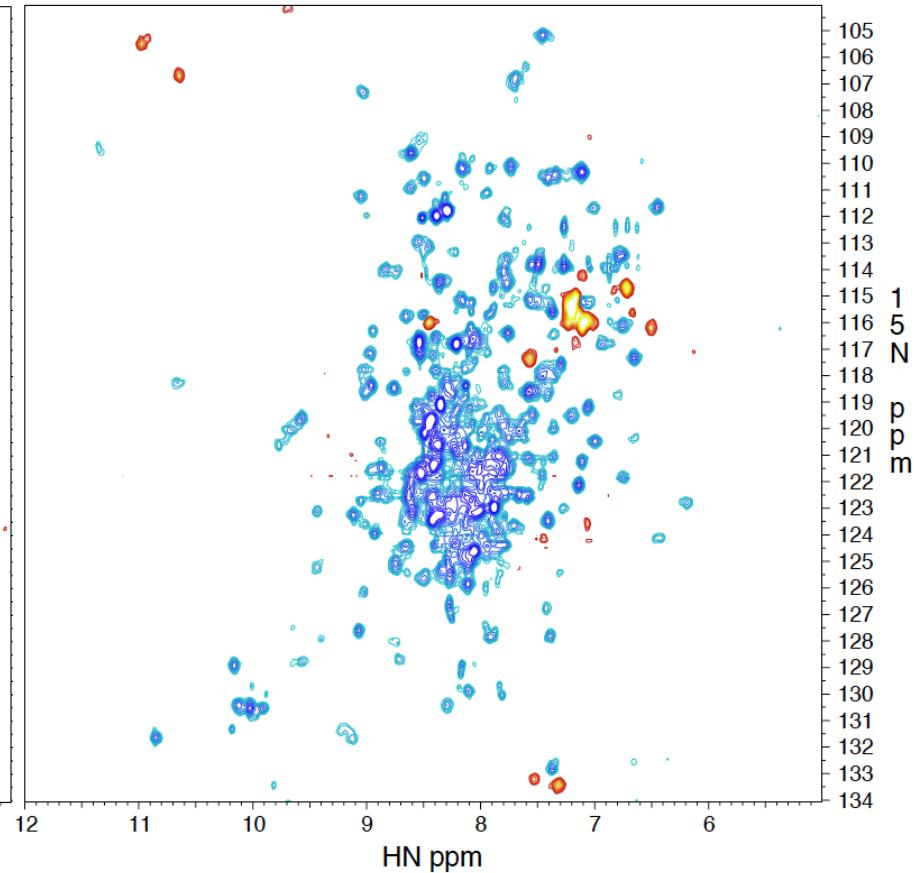


170 uM ^{15}N -labeled in 20 mM Na-acetate (pH 4.0) and 10% D_2O

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つた（酸変性）。

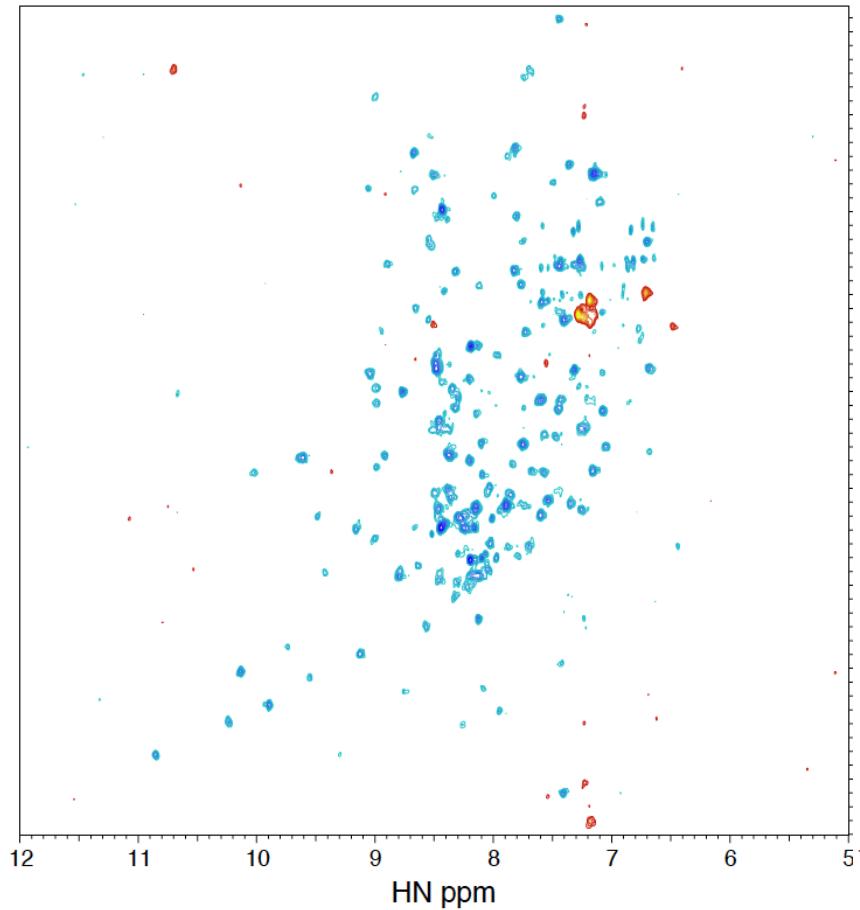
pH 3.2



146 uM ^{15}N -labeled in 20 mM Acetate (pH 3.2) and 10% D_2O

添加物によるスペクトルの変化

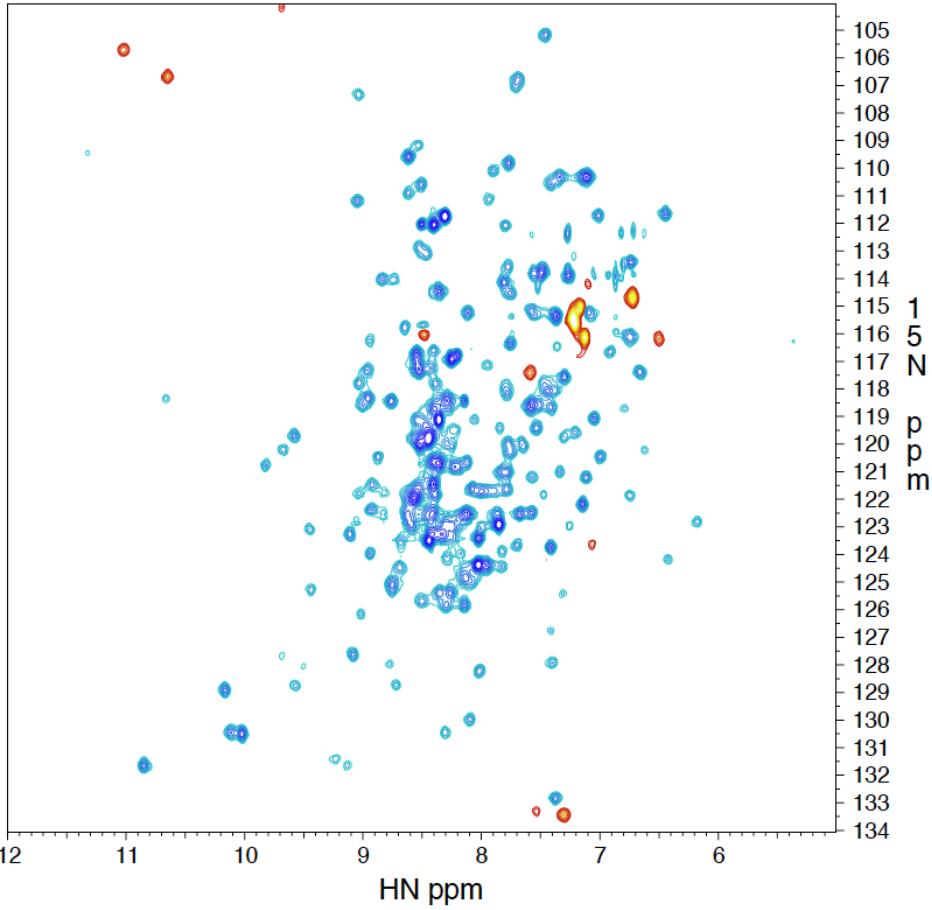
pH 6.0



~80 uM ^{15}N -labeled in 50mM Glu-
and 50mM Arg+

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

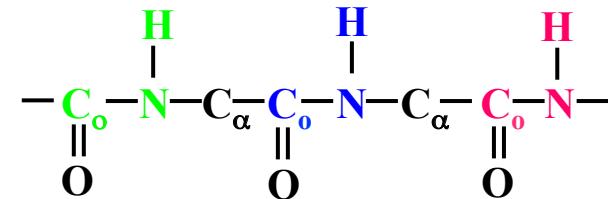
pH 4.0



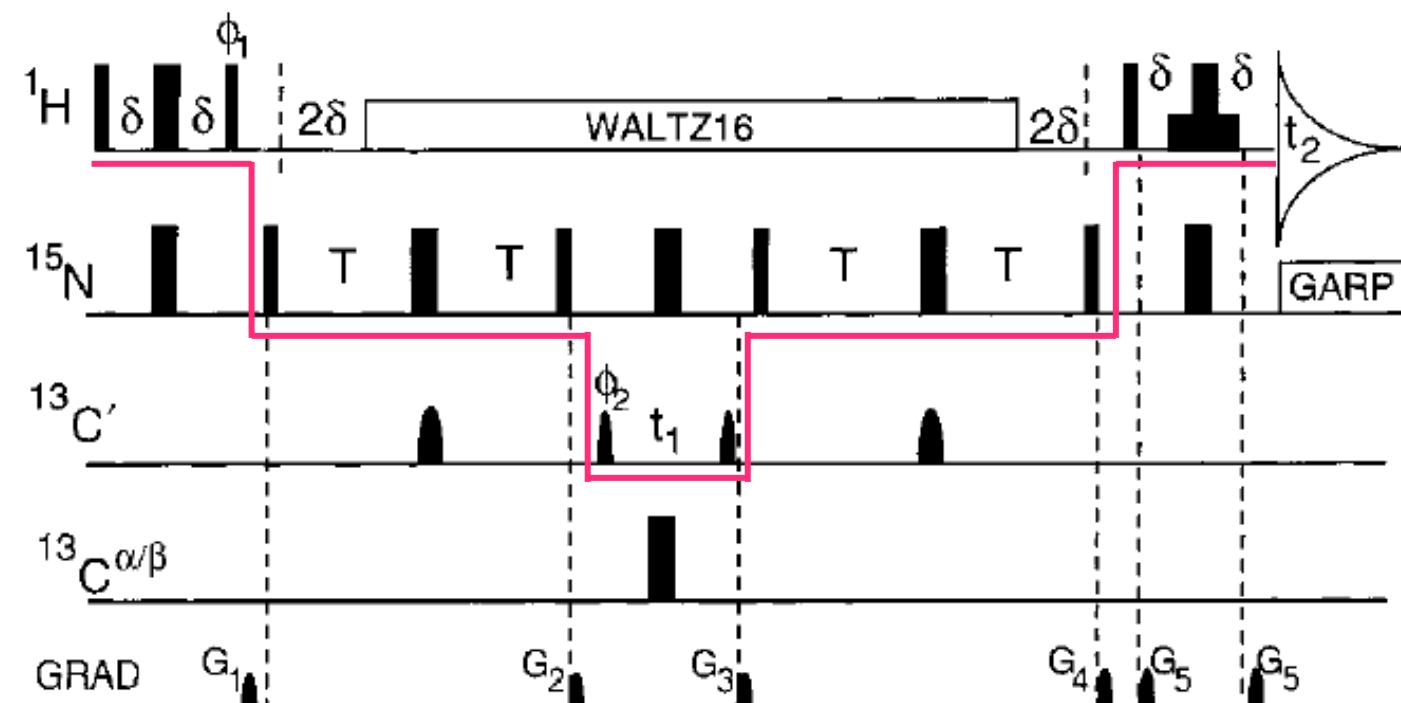
170 uM ^{15}N -labeled in 20 mM Na-acetate (pH 4.0) and 10% D₂O

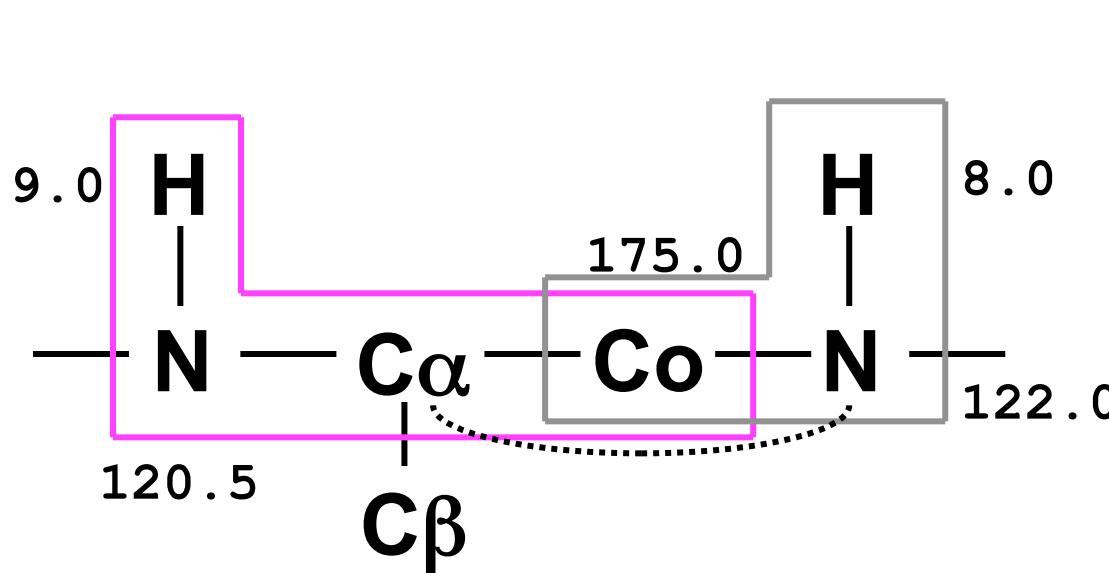
2D FHSQC-TROSY wfb and WG
at 298K on 400MHz (1024* x 128*)

連鎖帰属のための 3、4次元の実験



3D-HNCO



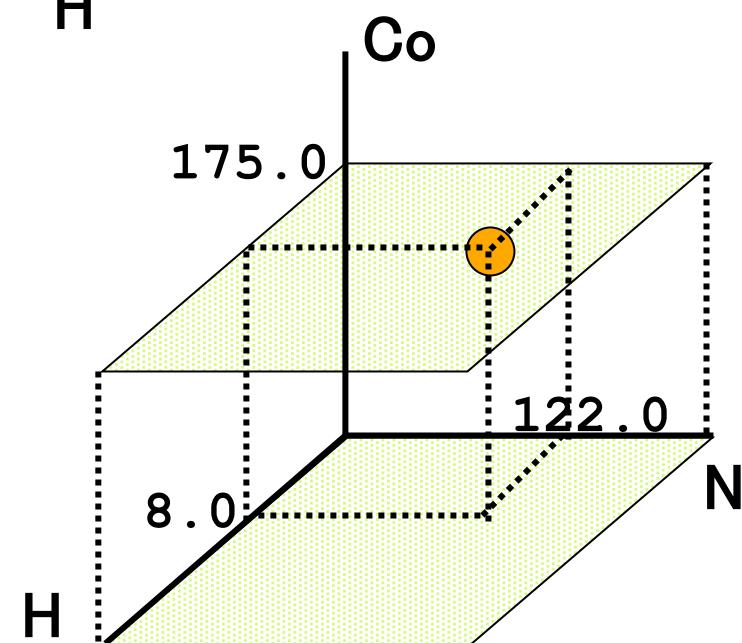
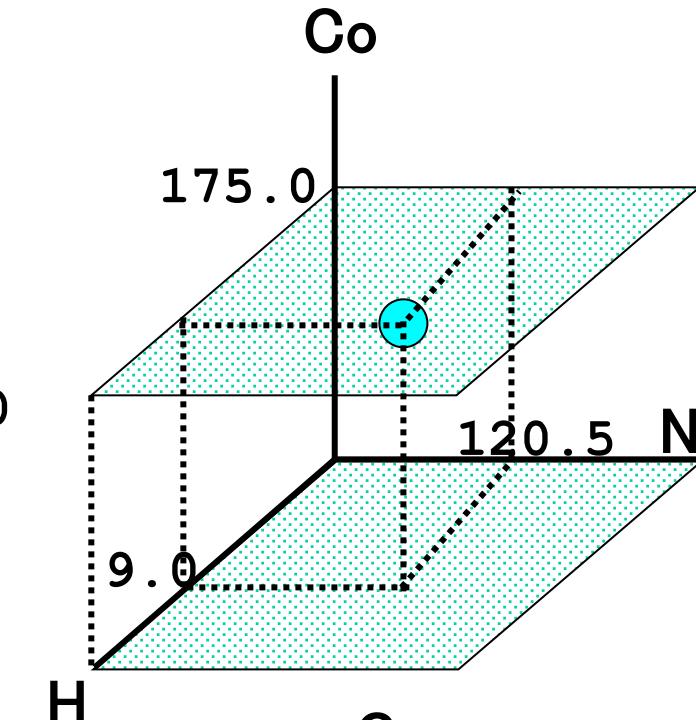


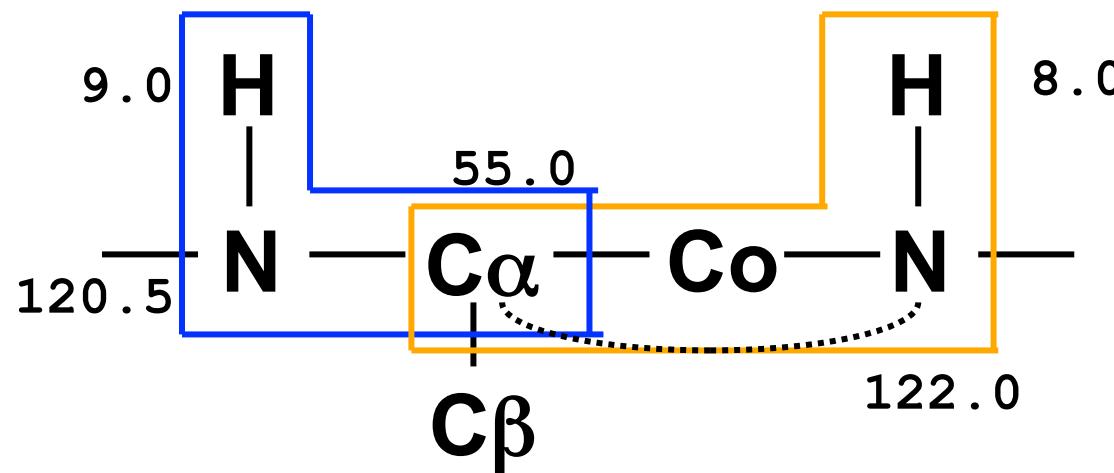
HN(CA)CO ●

$$\begin{aligned} & (\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) \\ &= (9.0, 120.5, 175.0) \end{aligned}$$

HNCO ●

$$\begin{aligned} & (\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) \\ &= (8.0, 122.0, 175.0) \end{aligned}$$





HNCA ●
 (x, y, z)
 $= (9.0, 120.5, 55.0)$

HN(CO)CA ●
 (x, y, z)
 $= (8.0, 122.0, 55.0)$

