

平成 30 年度 日本分光学会 NMR 分光部会 集中講義

「NMR 解析に向けた試料調製・標識・測定法～基礎から最先端技術まで～」

大腸菌発現系を用いた様々な特異的標識法の紹介

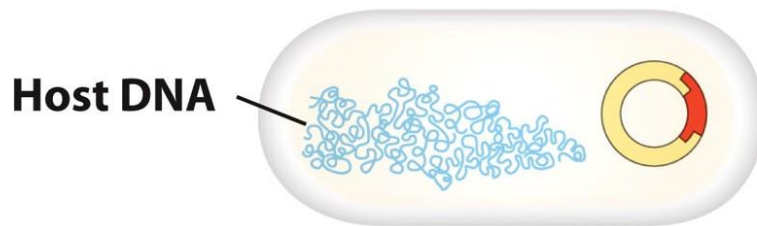
2018 年 10 月 10 日（水） 9:55-10:55

場所：東大薬学部講堂

池上貴久（横浜市立大学）

安定同位体で標識した蛋白質の大腸菌による発現

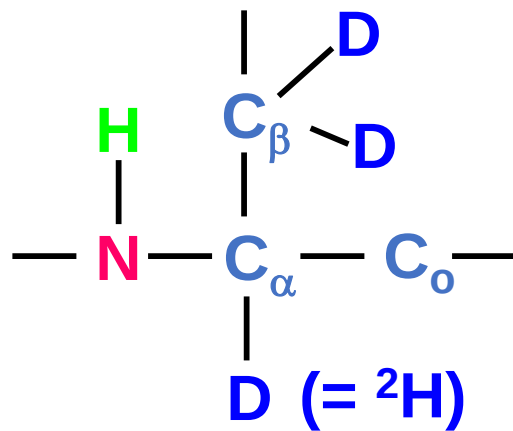
- 培養装置が簡単（熱帯魚屋さんで入手可能）
- 培地が安価（安定同位体を除けば水と塩だけ）
- 100% 重水でも適応させれば育つ（哺乳類細胞では $D_2O < 35\%$ ）
- 形質転換しやすい



ブクブク
サーモスタット
海水



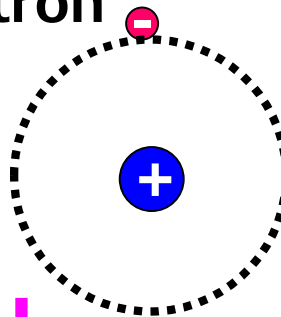
重水 (D₂O) と軽水 (H₂O)



Hydrogen 水素

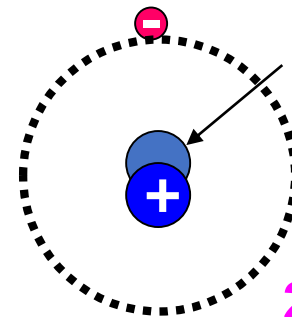
Electron
電子

¹H



Neutron
中性子

²H



	Proton ¹ H	Deuteron ² H
存在比	99.985 %	0.015 %
分子量 (水)	18	20
凝固点 (水)	0 °C	3.81 °C
粘度 (水)	1.002 mPas	1.248 mPas
水素イオン濃度	pH	pD = pH* + 0.41
マウス死亡濃度	0	35 %

凍結乾燥してから D₂O を注ぐ あるいは
H₂O で校正した pH メータで 0.4 低い値になるように滴定する。

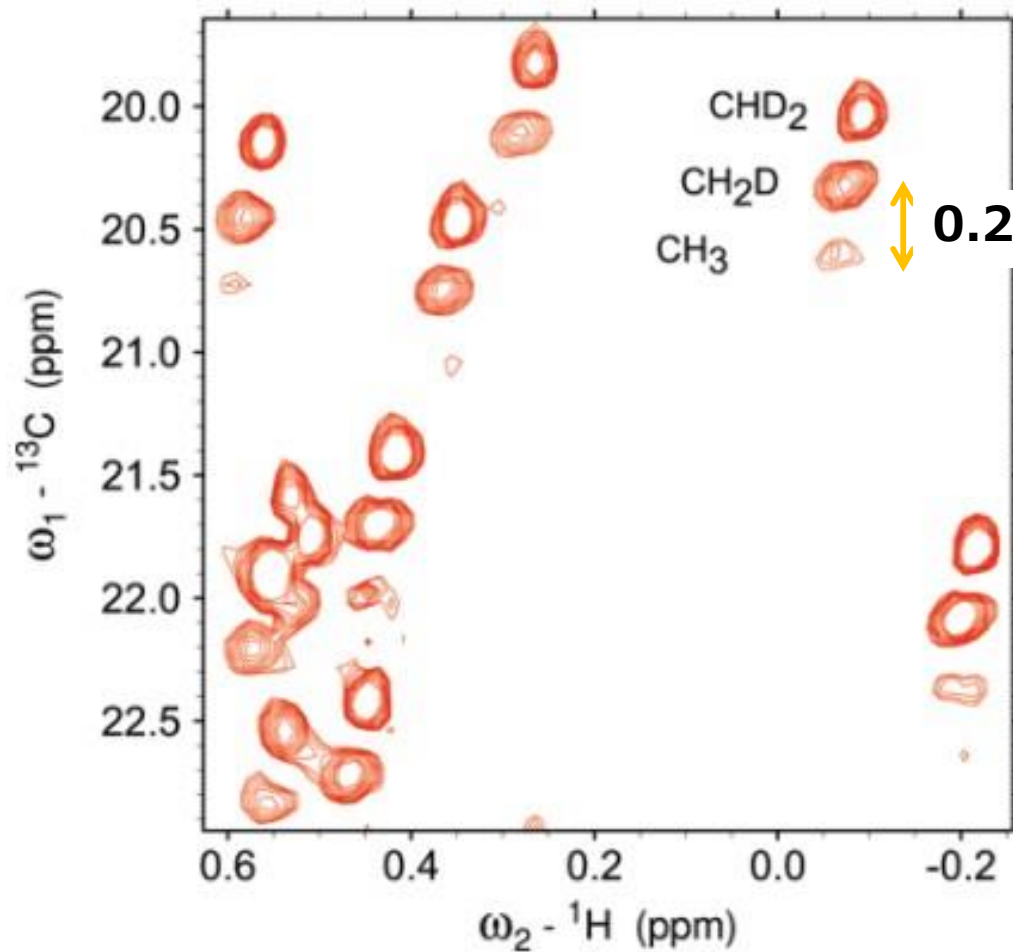
重水培養

- できれば BL21(DE3) など B-strain 系の強い大腸菌を使う (T7 phage の RNA polymerase を含む)
- BL21(DE3) Star などは本当に必要な場合のみ仕方なく使う
- 抗生物質が 2 種類必要な場合でも 1 種類だけを培地に入れる
- グリセロールストックは弱っているので、そのままでは使わない。事前に寒天プレートに蒔く。シングルコロニーを拾うべきという派とコロニー全てを入れてよいという派とがある
- 重水への適応 adaptation はおこなうべきという派としなくてもよいという派がある

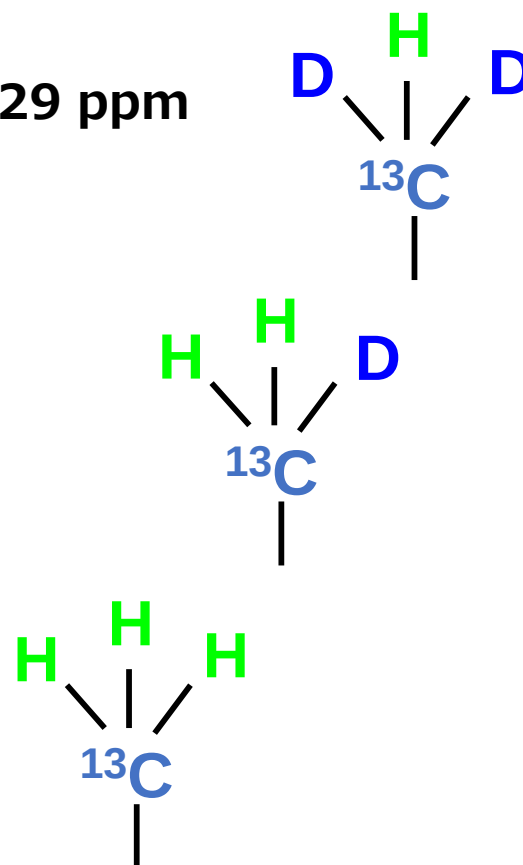
重水培養

- 軽水のコンタミを防ぐため、遠心して菌体だけを次に植える
- 水蒸気のコンタミを防ぐため、梅雨時は培養を避ける？
- 重水培地はオートクレーブしない。フィルター処理もしなくてもよい？
- 微量元素 (Co, Ni etc.) を入れる。代わりに激安の FeCl_3 を多めに入れる。ビタミン (葉酸、リボフラビン etc.) を入れる
- 金属蛋白質の場合はリン酸系の M9 より MOPS 系がよい (リン酸カルシウムなどが沈殿するため) ただし ^{15}N 標識

重水素化率を 100% に近づける！



Isotope shift による
複数のピーク

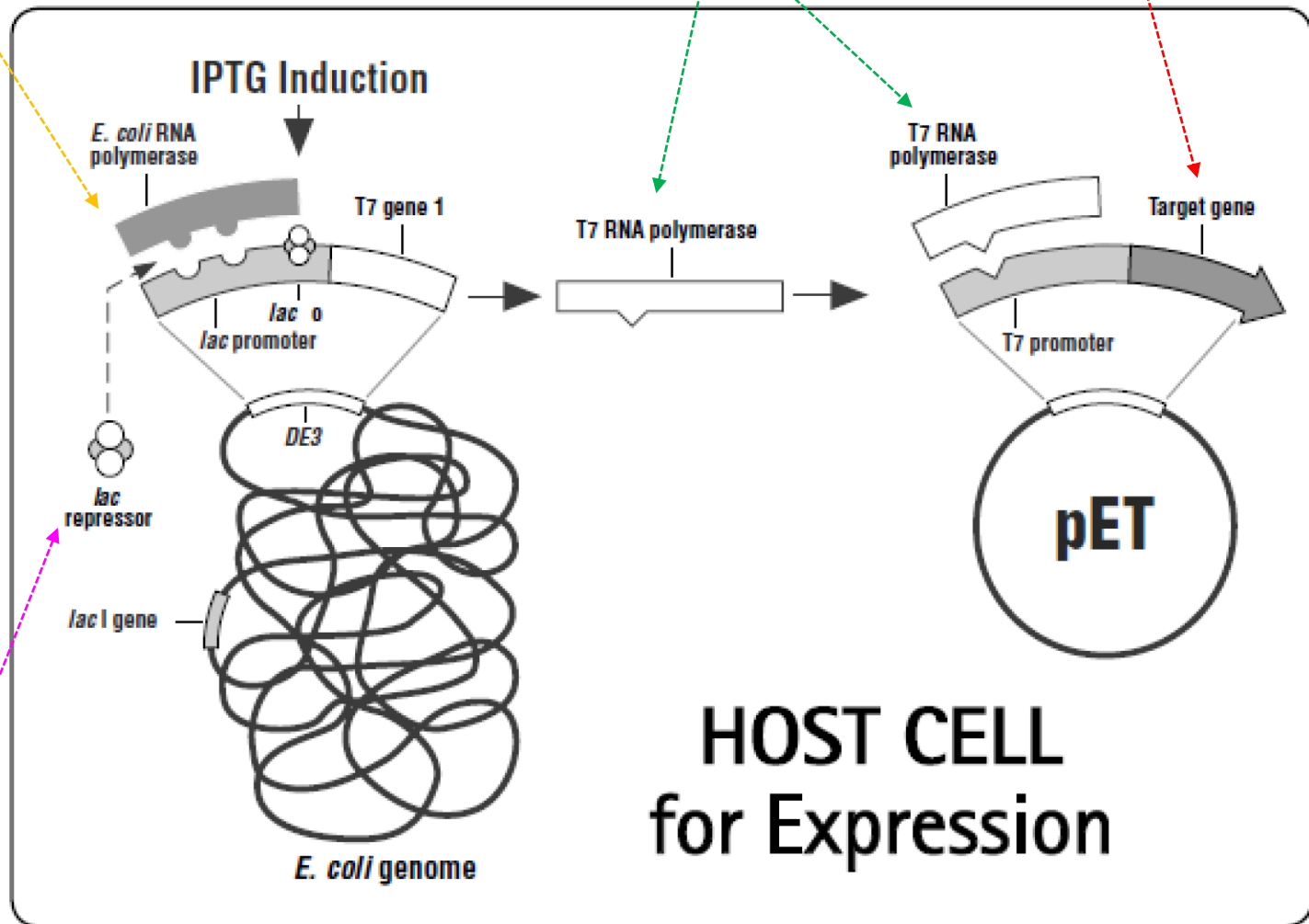


Otten, R. *et al.* (2010) *JACS* 132, 2952.

大腸菌の RNApolymerase

T7 の RNApolymerase

目的の蛋白質の遺伝子



lac-リプレッサ蛋白質

isopropylthiogalactoside (IPTG)

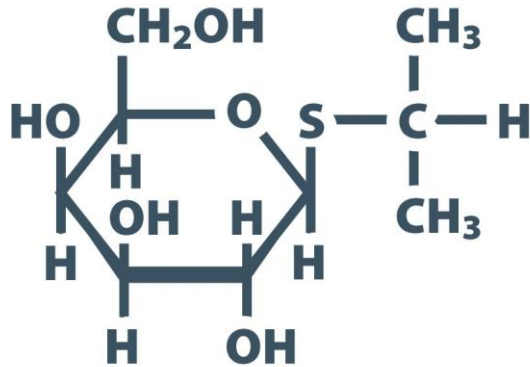


Figure 22.8b Introduction to Genetics (© Garland Science 2012)

目的の蛋白質の DNA を載せたプラスミドで形質転換された大腸菌

(さらに、バクテリオファージ T7 の RNA ポリメラーゼの遺伝子も持つ)

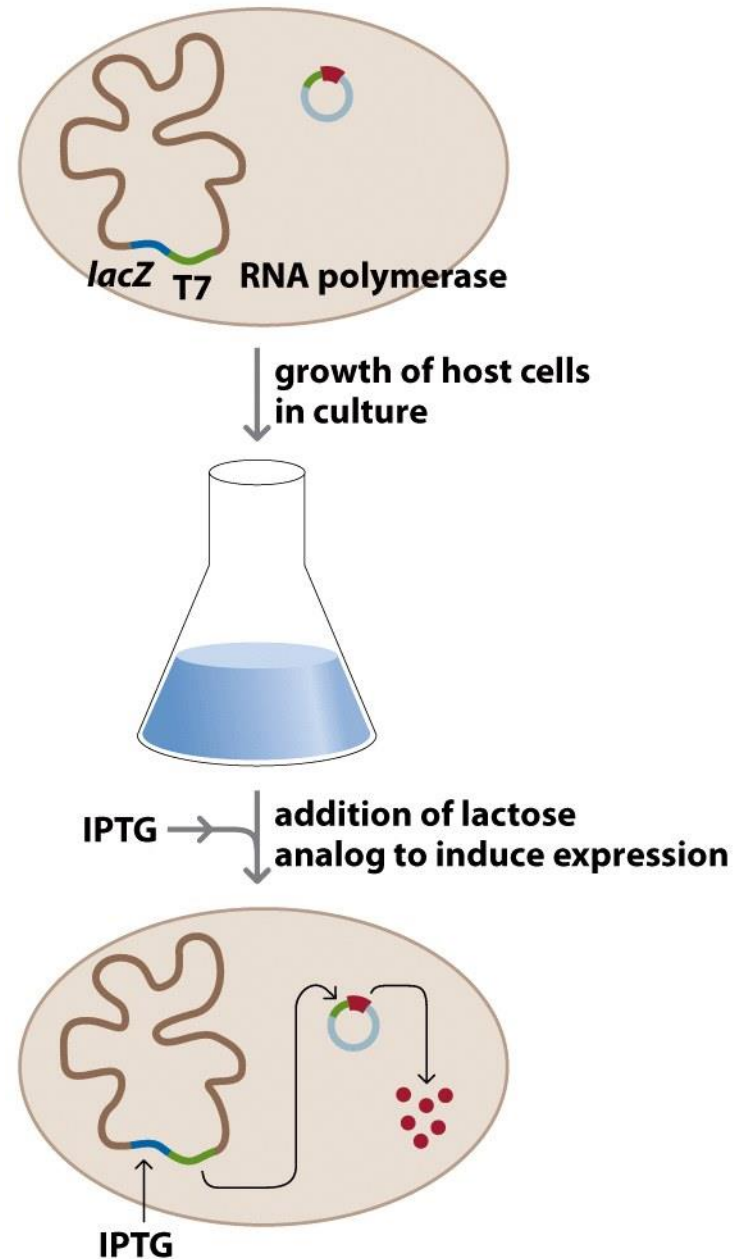


Figure 6.11 part 2 of 2 Human Molecular Genetics, 4ed. (© Garland Science)

Lac-オペロン on

- Glucose ↓ cAMP ↑
CAP が結合
RNA polymerase を
呼び寄せる

&

- Lactose ↑
リプレッサが
DNA から解離

Catabolite-
repression

異化代謝産物抑制

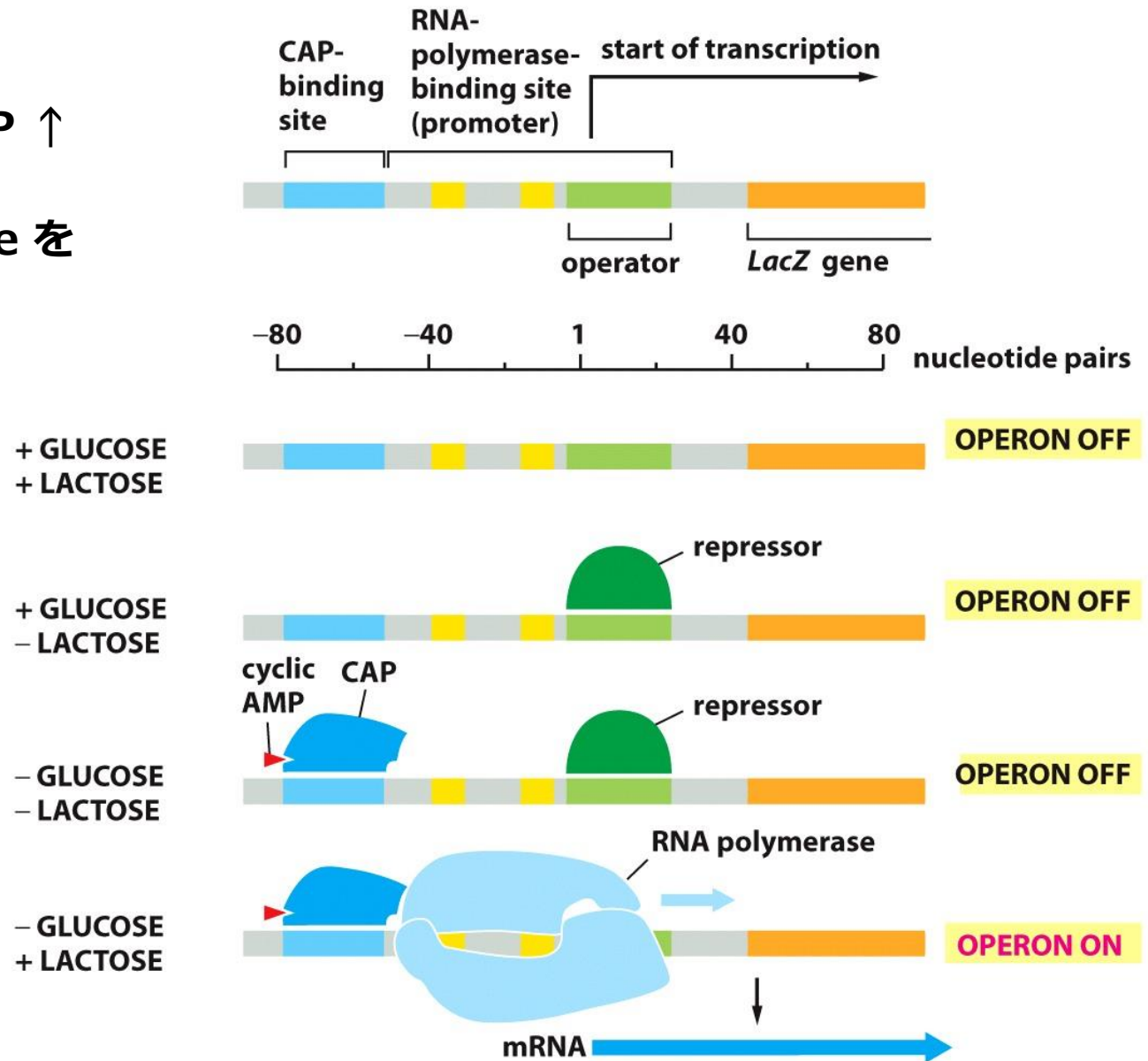
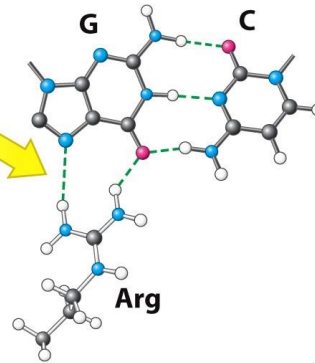
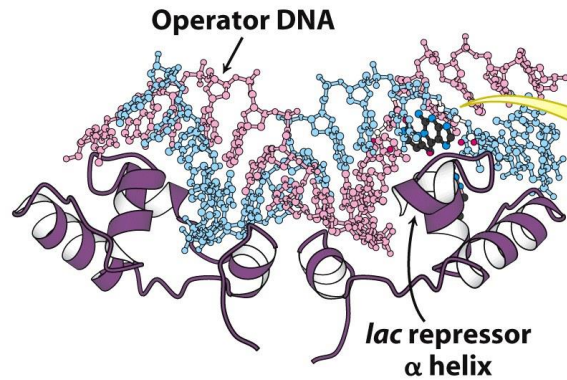


Figure 8-9 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)



lac-リプレッサ蛋白質

Figure 31.2
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

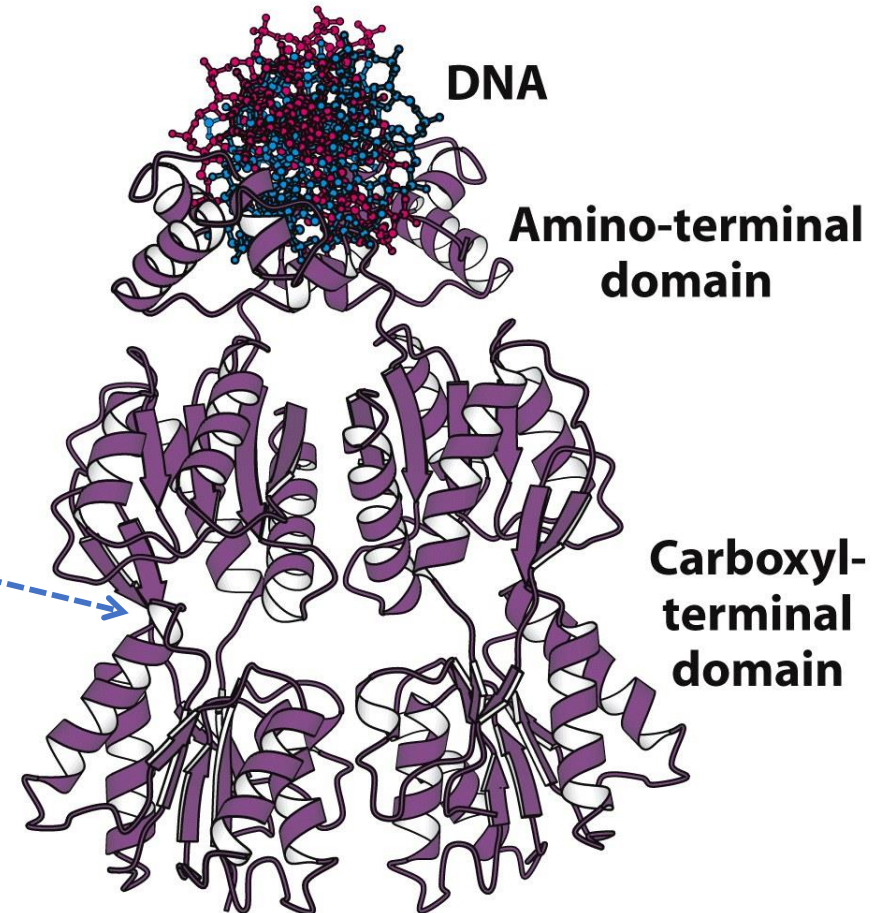
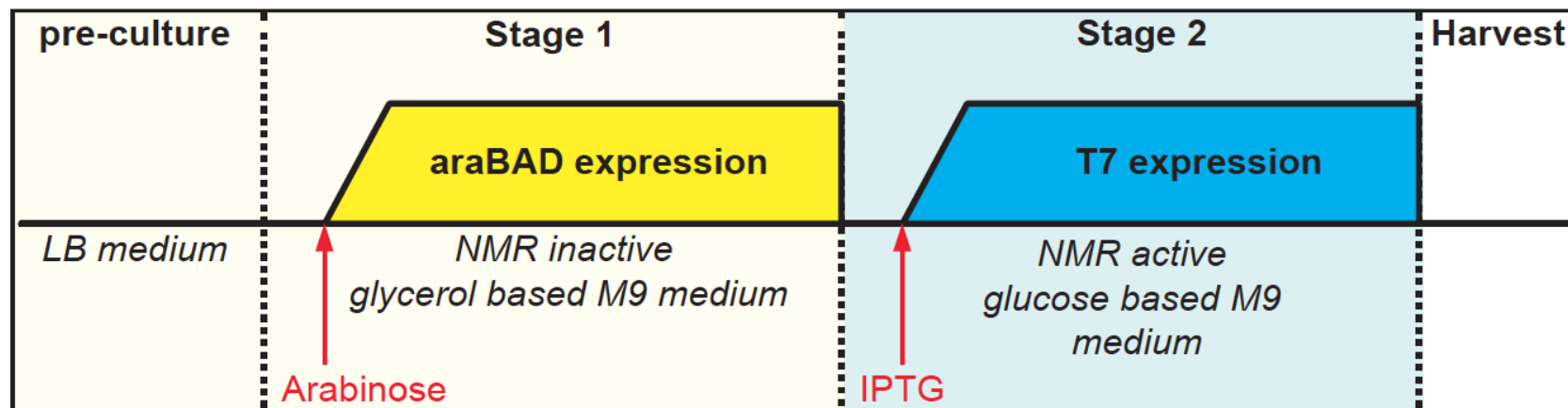


Figure 31.8
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

ここにアロラクトース、あるいは IPTG などの誘導物質が付くとリプレッサ蛋白質の立体構造が変わり DNA から離れる。

LEGO-NMR

Mund, M. *et al.* (2013) *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 11401.



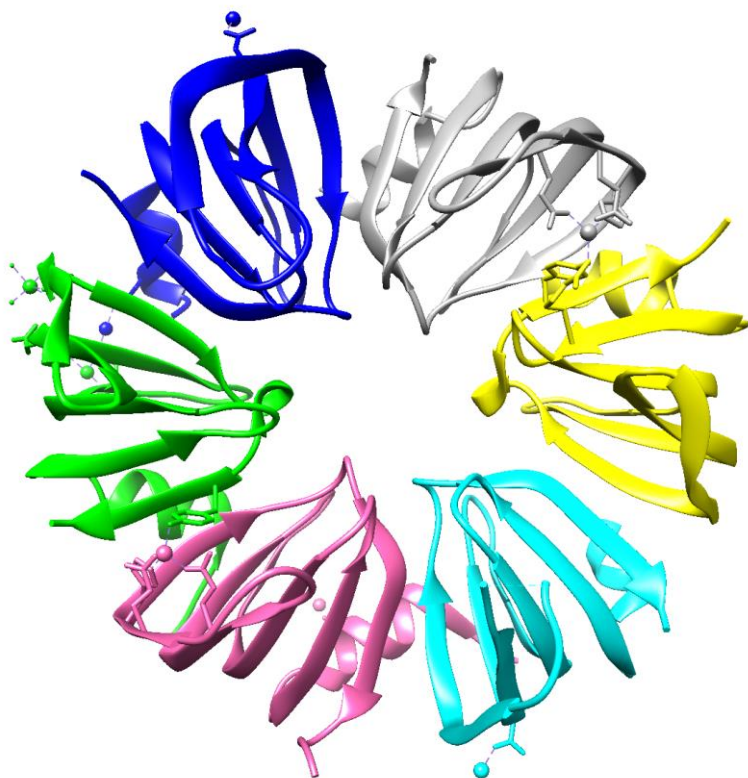
非標識

[^{13}C , ^{15}N]-標識



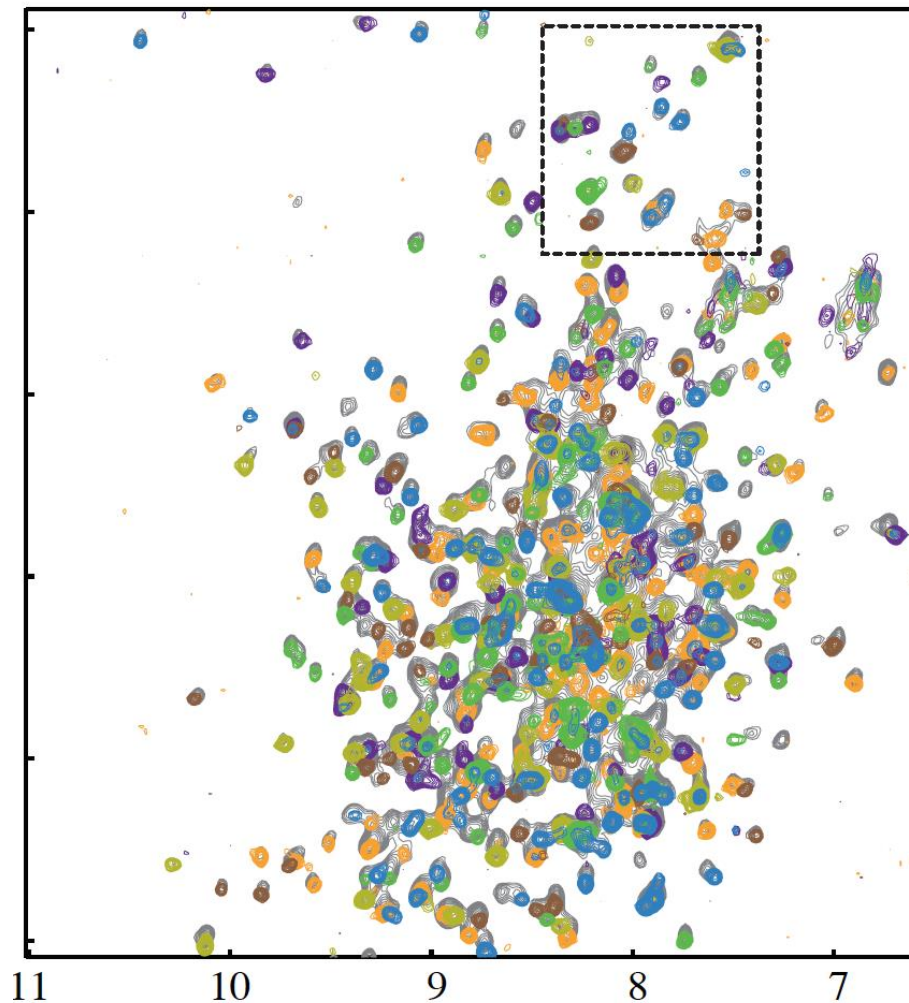
[^{13}C]-glucose が
araBAD ベクターか
らの発現を止める。

7つのサブユニットを一つずつ標識

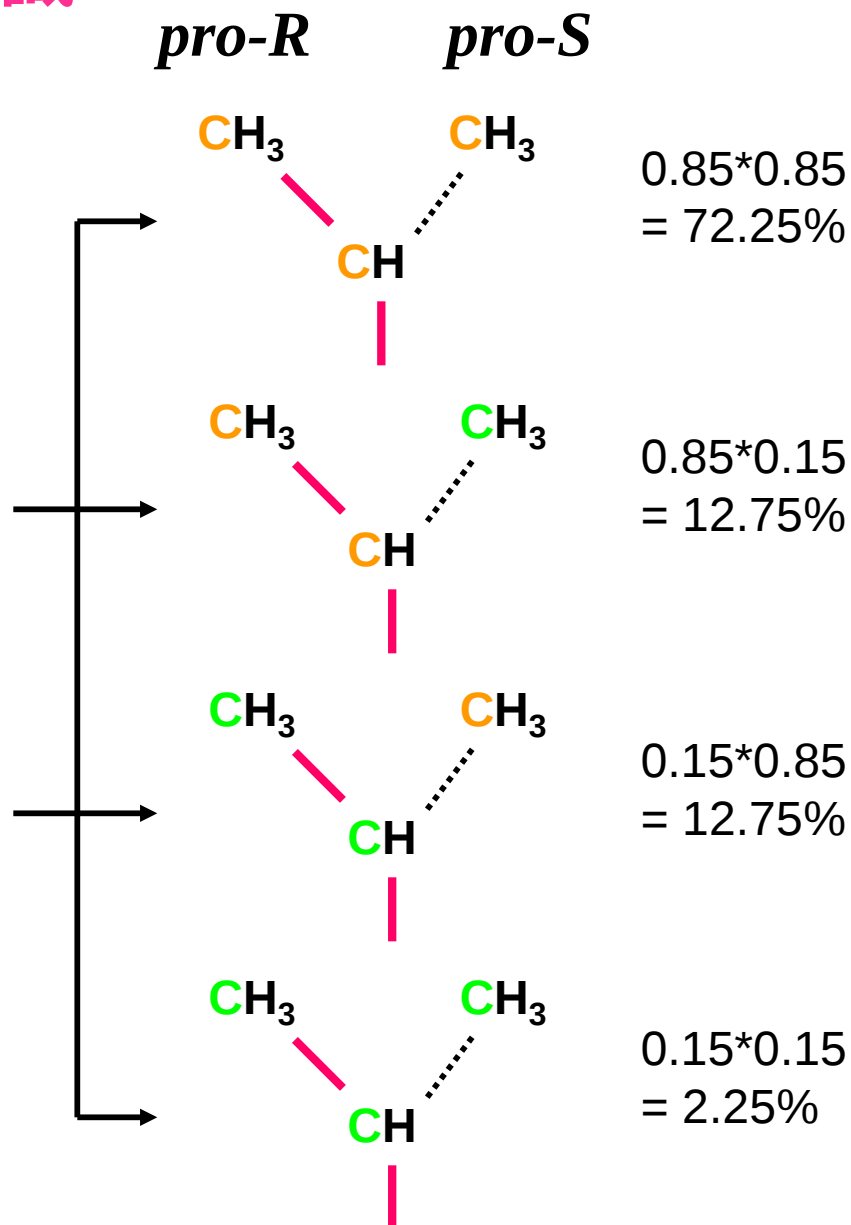
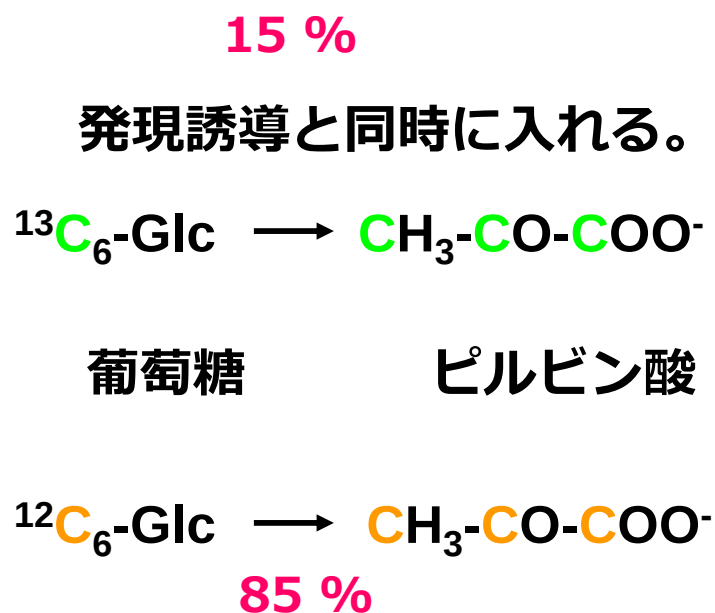


U6 snRNP スプライソソーム
核内低分子リボ核蛋白質

ヘテロ7量体



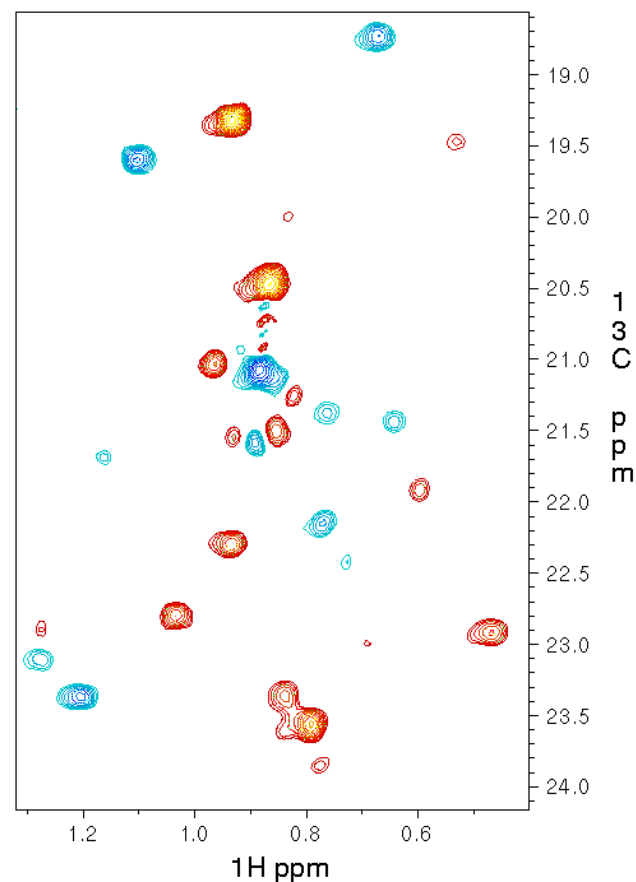
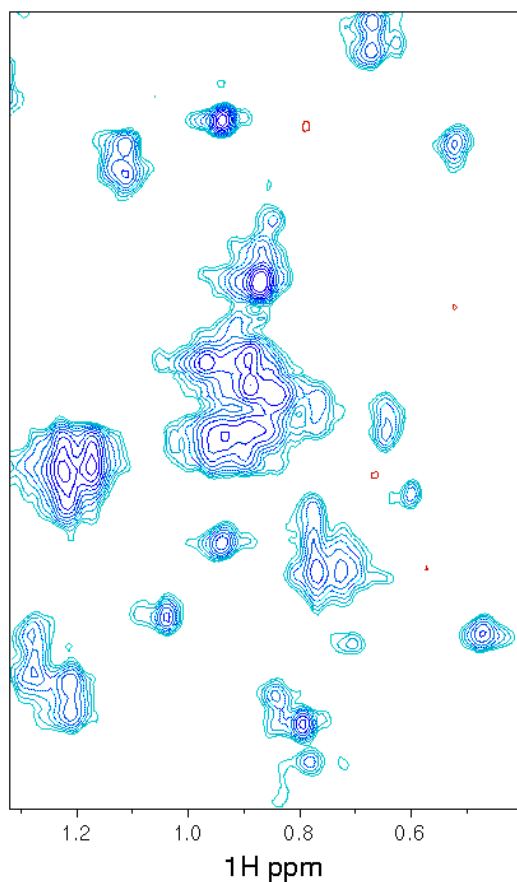
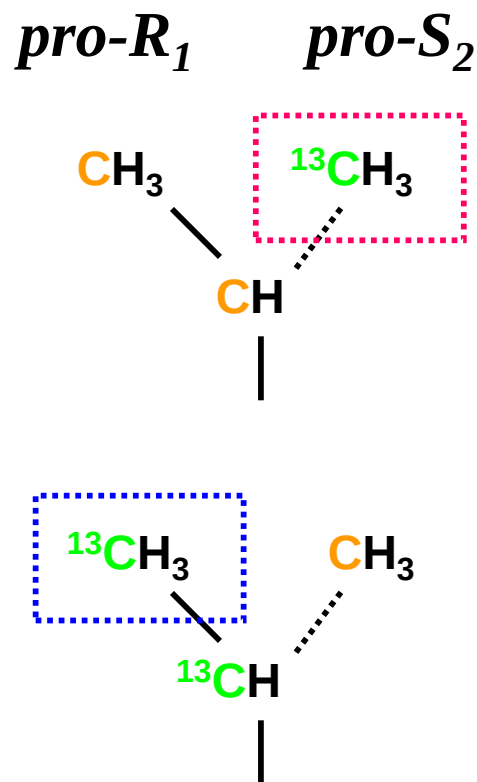
メチル基の立体特異的標識



Val, Leu メチル基の立体特異的帰属

$^1J_{CC}$ で分裂

$^1J_{CC}$ で反転



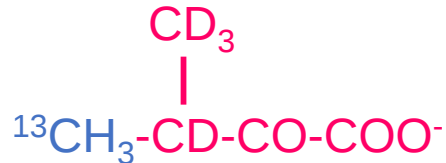
I, L, V のメチル基以外が重水素化された蛋白質

[^{12}C , ^2H]-glc, 100% D_2O



2-keto-3,3- d_2 -4- ^{13}C -butyrate
 α -ketobutyric acid methyl- ^{13}C 3,3- d_2

2-オキシ酪酸

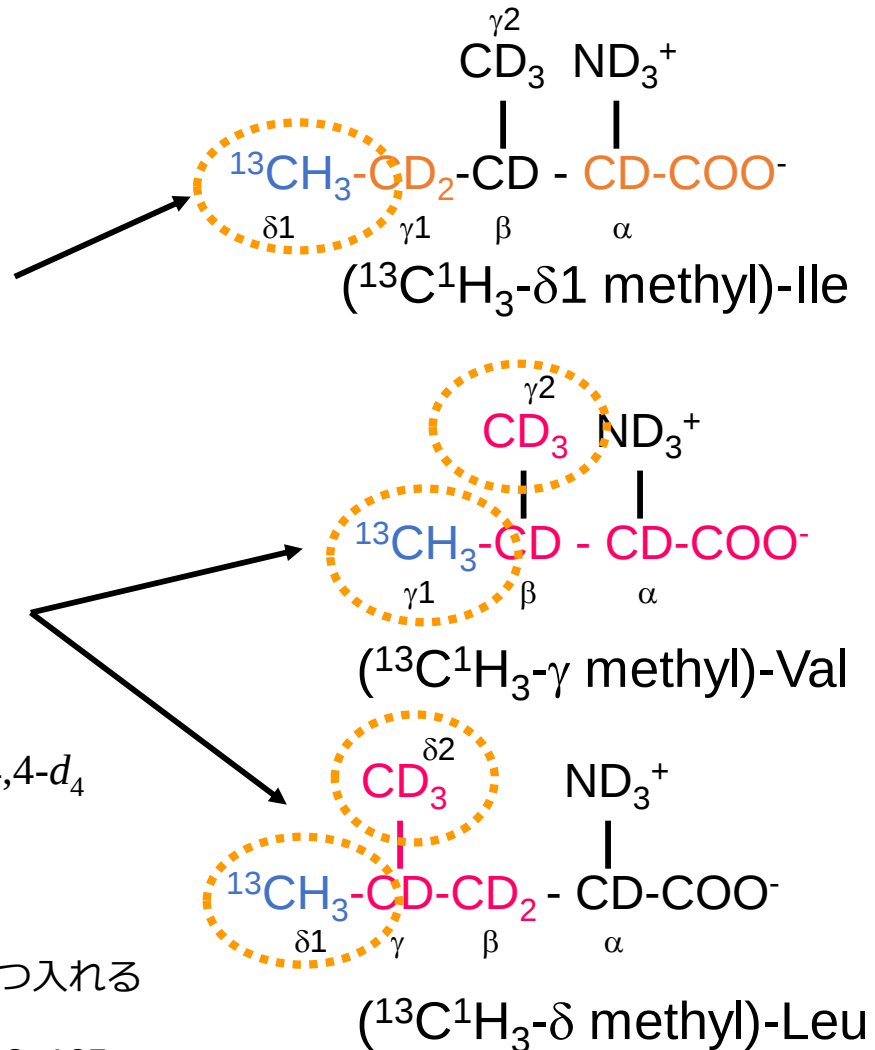


2-keto-3-methyl- d_3 -3- d_1 -4- ^{13}C -butyrate
 α -ketoisovaleric acid 3-methyl- ^{13}C 3,4,4,4- d_4

2-オキシイソ吉草酸

発現誘導の1時間前に 125, 200 mg/L ずつ入れる

Tugarinov, V. et al. (2004) *J. Biomol. NMR* 28, 165.

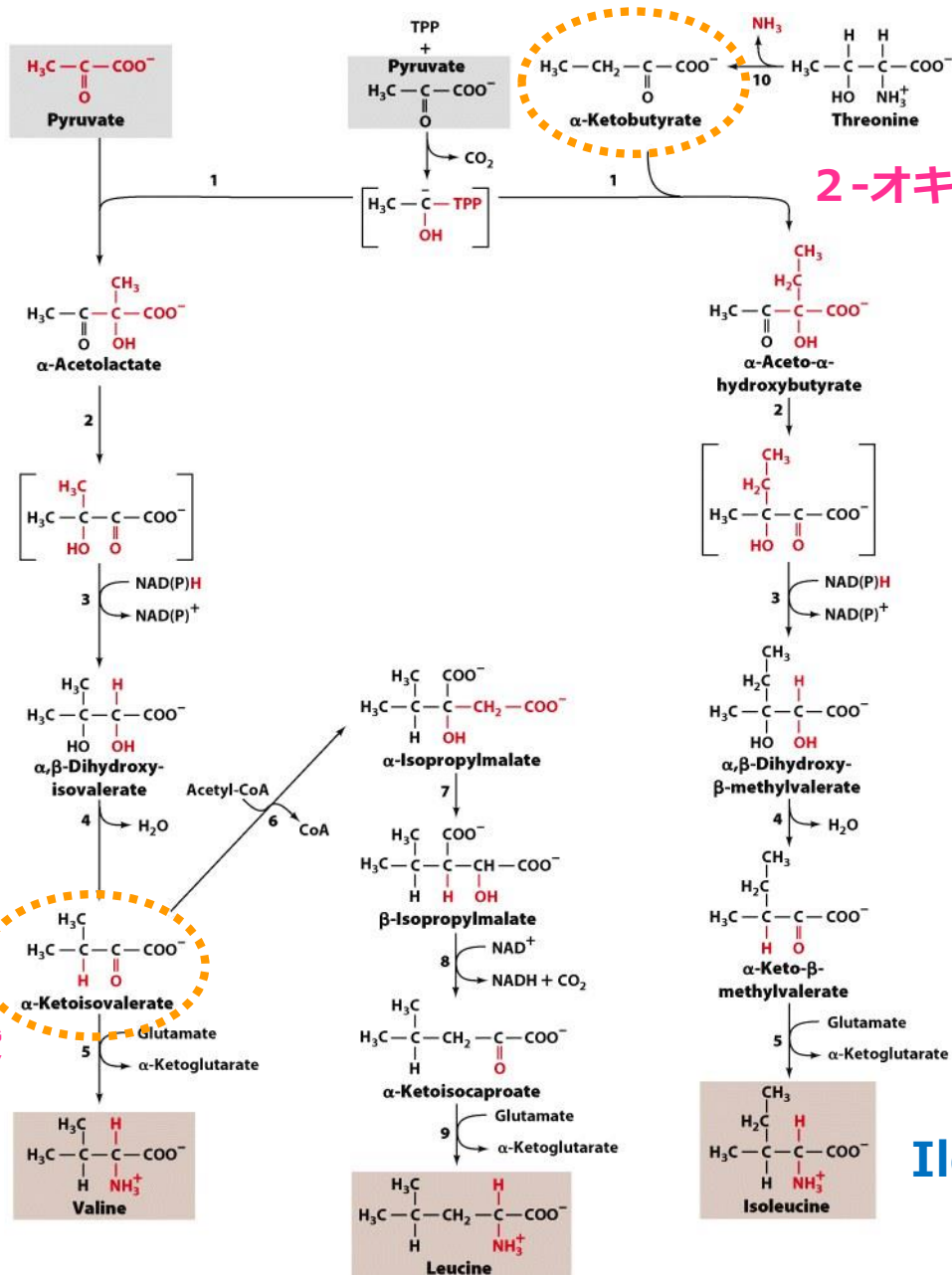


ピルビン酸

アセト乳酸

2-オキシイソ吉草酸

Val



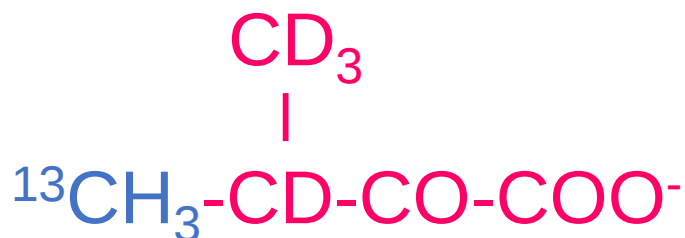
2-オキシ酪酸

Ile

Leu

「2-オキソイソ吉草酸」 ラセミ体

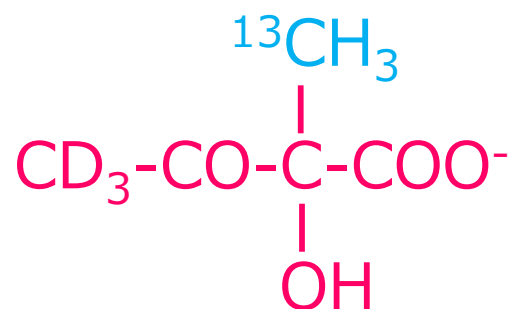
- メチル ^1H どうしの双極子間相互作用による横緩和は減らせるが
- *Pro-R, pro-S* の両方のピークがオーバーラップする。



溶液からある 1 分子だけを取ってくると、メチル基が両方とも ${}^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ になることはない。しかし、NMR ピークは両方とも見える。

アセト乳酸

2- ^{13}C -methyl-4- $^2\text{H}_3$ -acetolactate



^{13}C は *pro-S* に入る

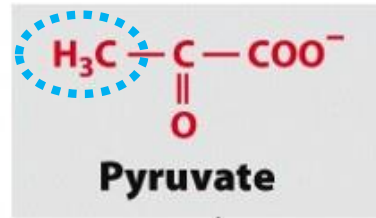
Leu, Val を立体特異的に帰属することができる。

アセト乳酸からアセトインなどができ、お酒をまずくする。

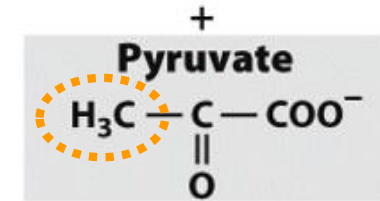
Gans, *et al.* (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 1958.

Plevin, *et al.* (2011) *J. Biomol. NMR* 49, 61.

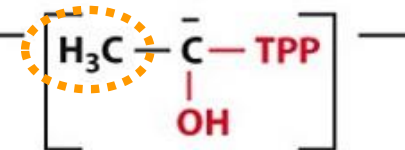
ピルビン酸



TPP (チアミンニリン酸)



CO_2

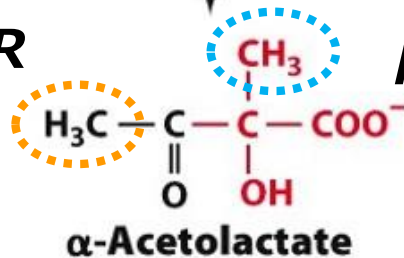


1

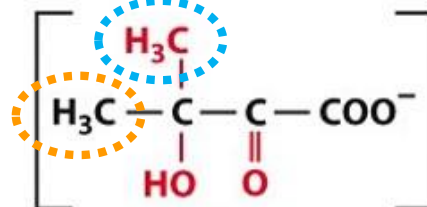
pro-R

pro-S

アセト乳酸



2



Leu, Val まで立体特異性が維持される。

pro-R の C と隣の C は同じピルビン酸を起源とする。

Neri, D. *et al.* (1989) *Biochemistry* 28, 7510.

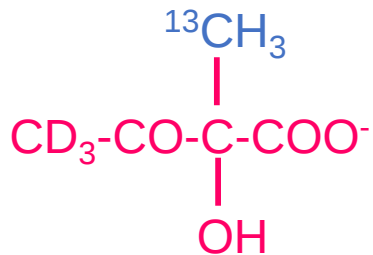
Leu, Val

2-オキシイソ吉草酸

アセト乳酸

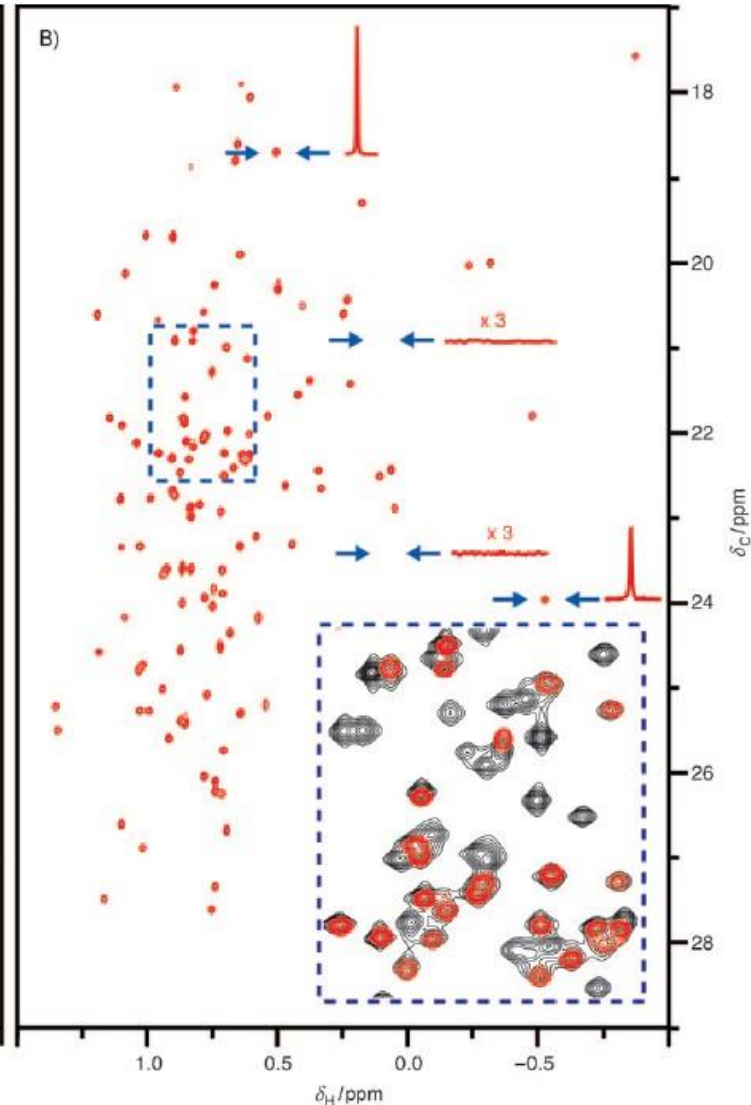
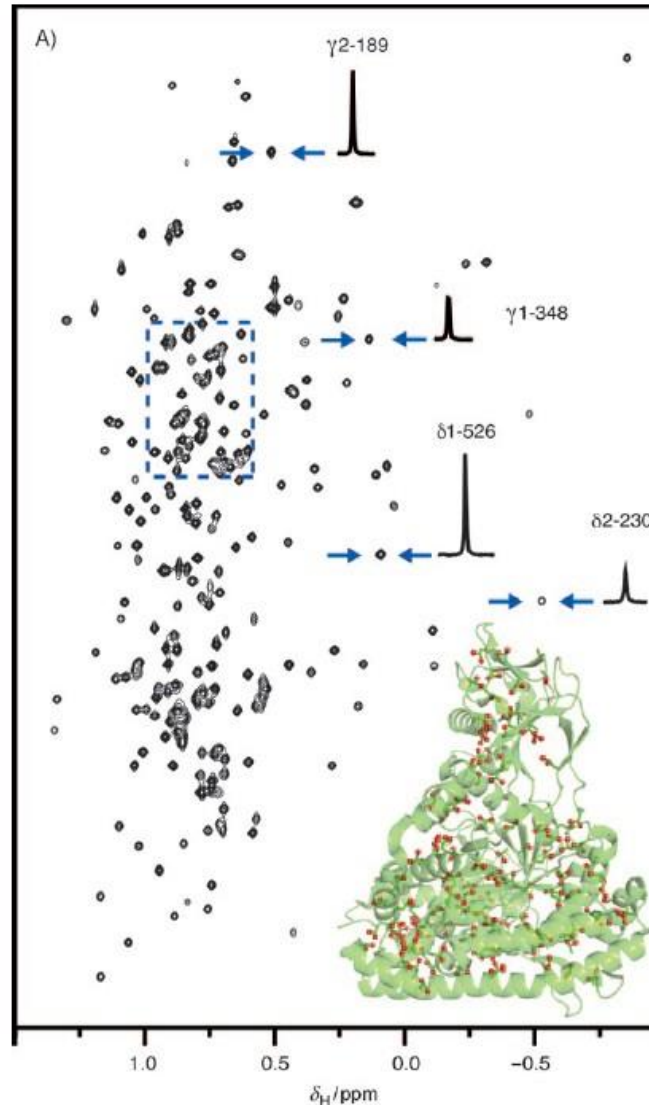


2-オキシイソ吉草酸
(ラセミ体)



アセト乳酸

^{13}C は *pro-S* に入る
Leu- δ_2 Val- γ_2

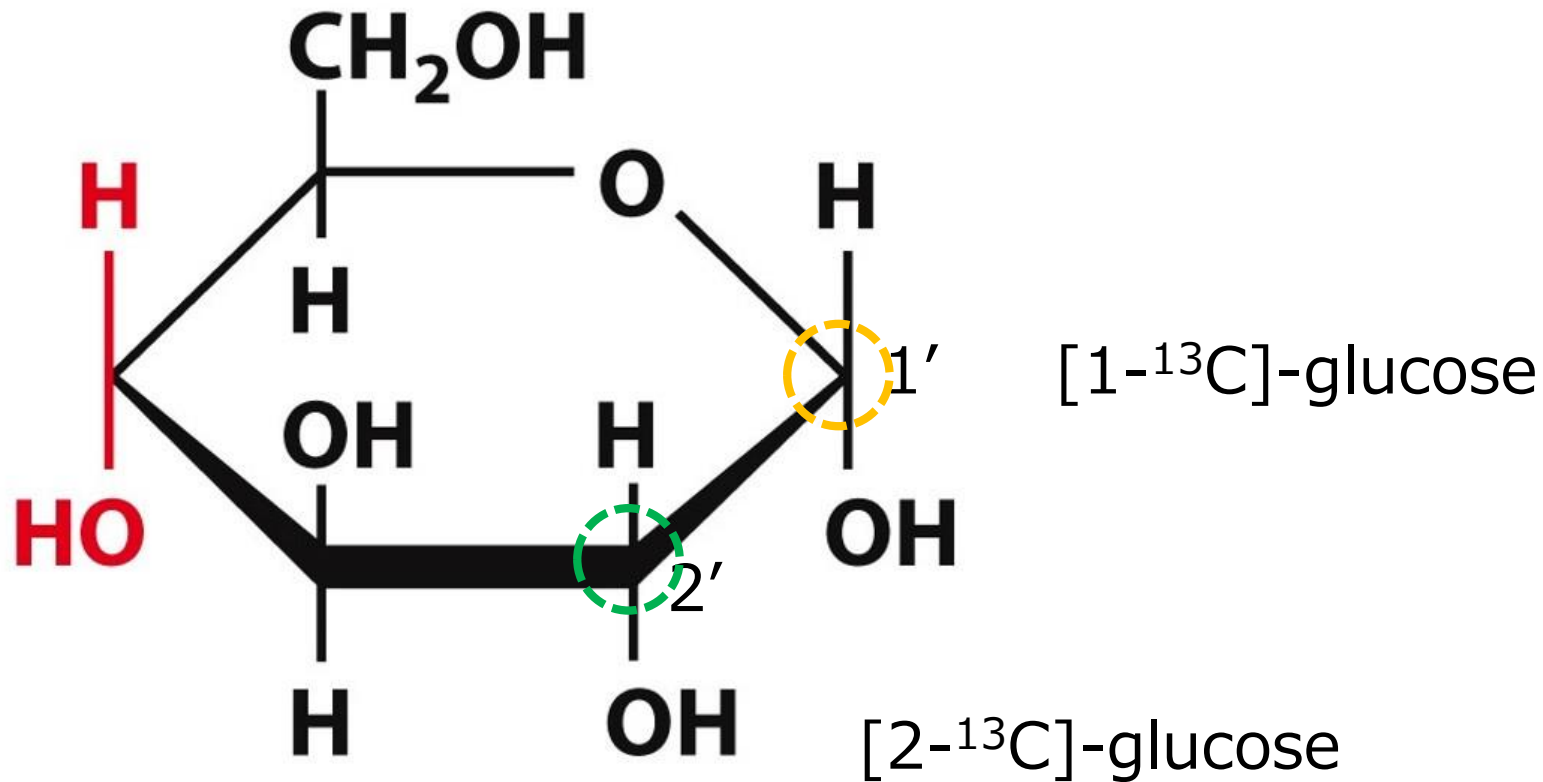


***Pro-R* は観えない**

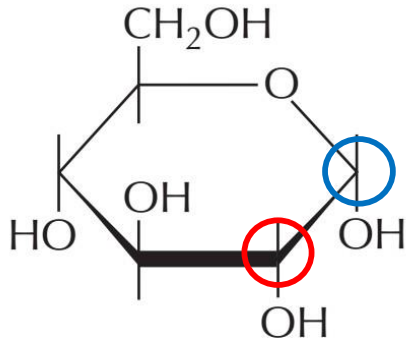
$^{13}\text{CHD}_2$ などの isotopomer も無い

Gans, et al. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 1958.

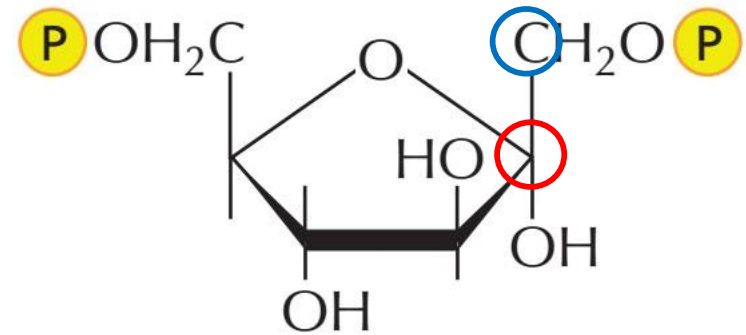
特異的に標識された「グルコース」



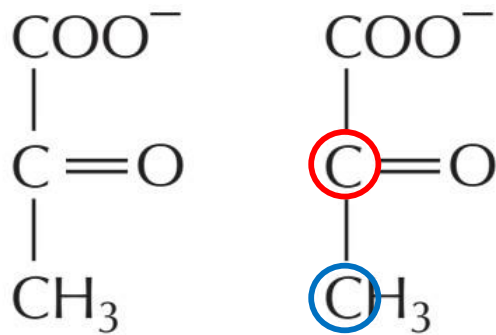
解糖系でグルコースが2つに分割 → 標識率 50%



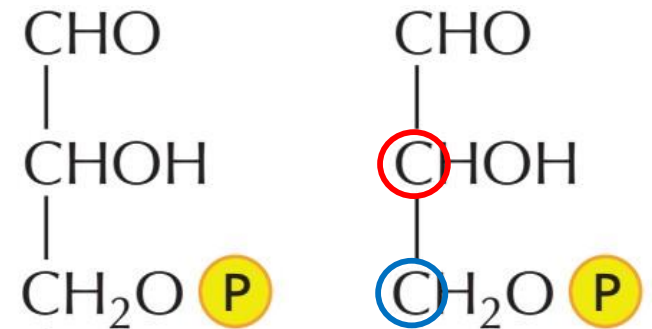
グルコース



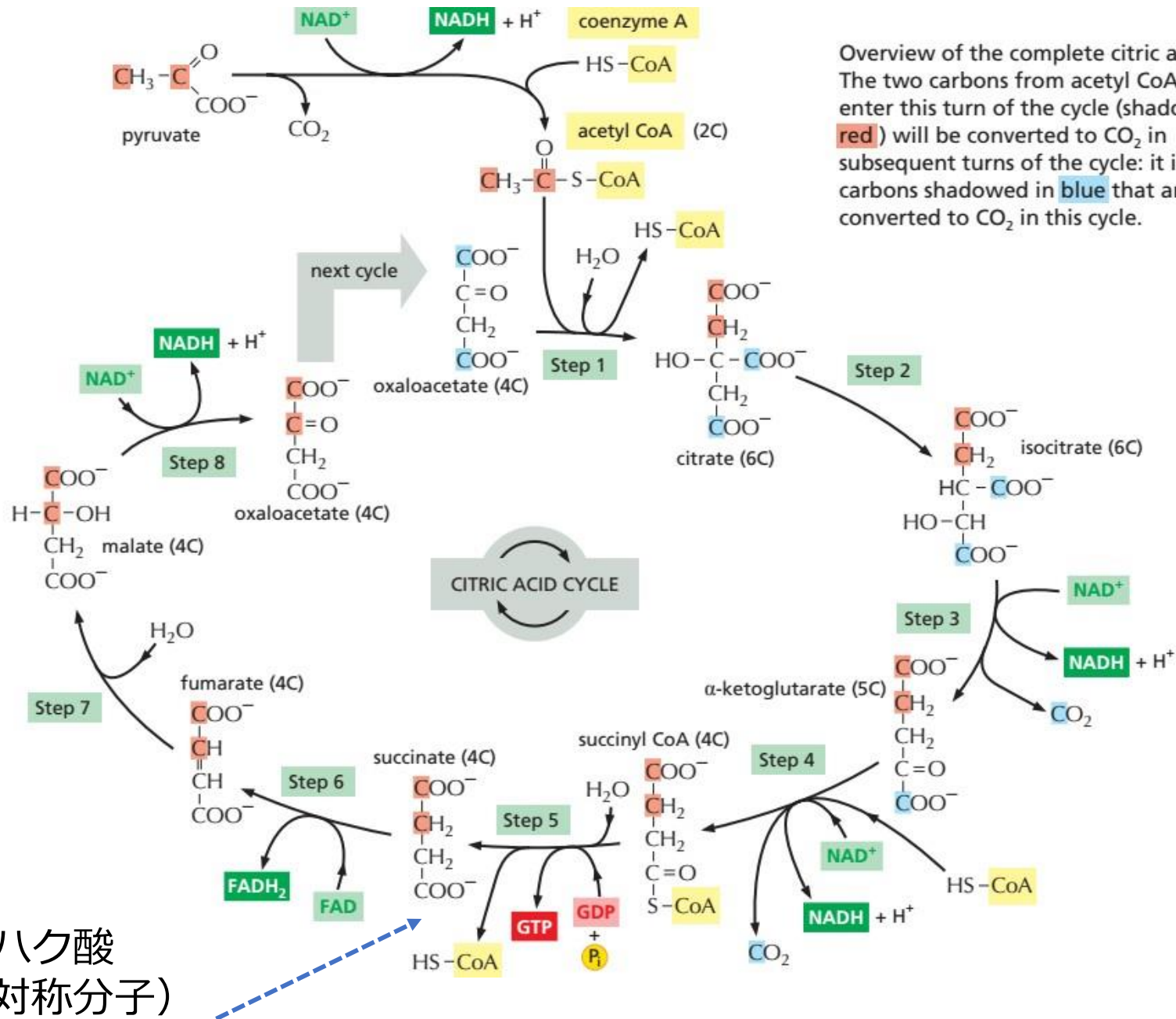
フルクトース 1,6-2リン酸



ピルビン酸

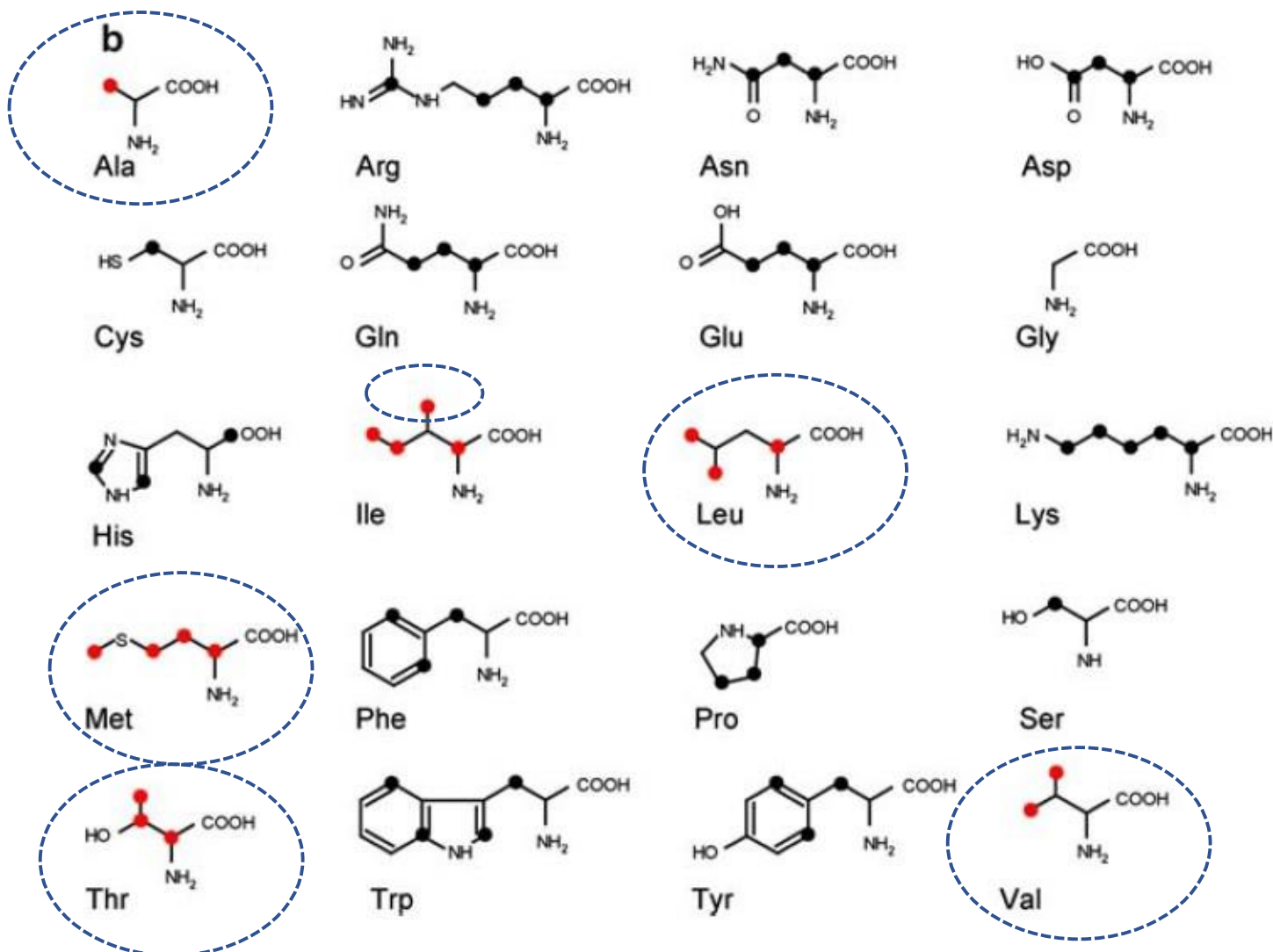


グリセルアルデヒド 3-リン酸



コハク酸
(対称分子)

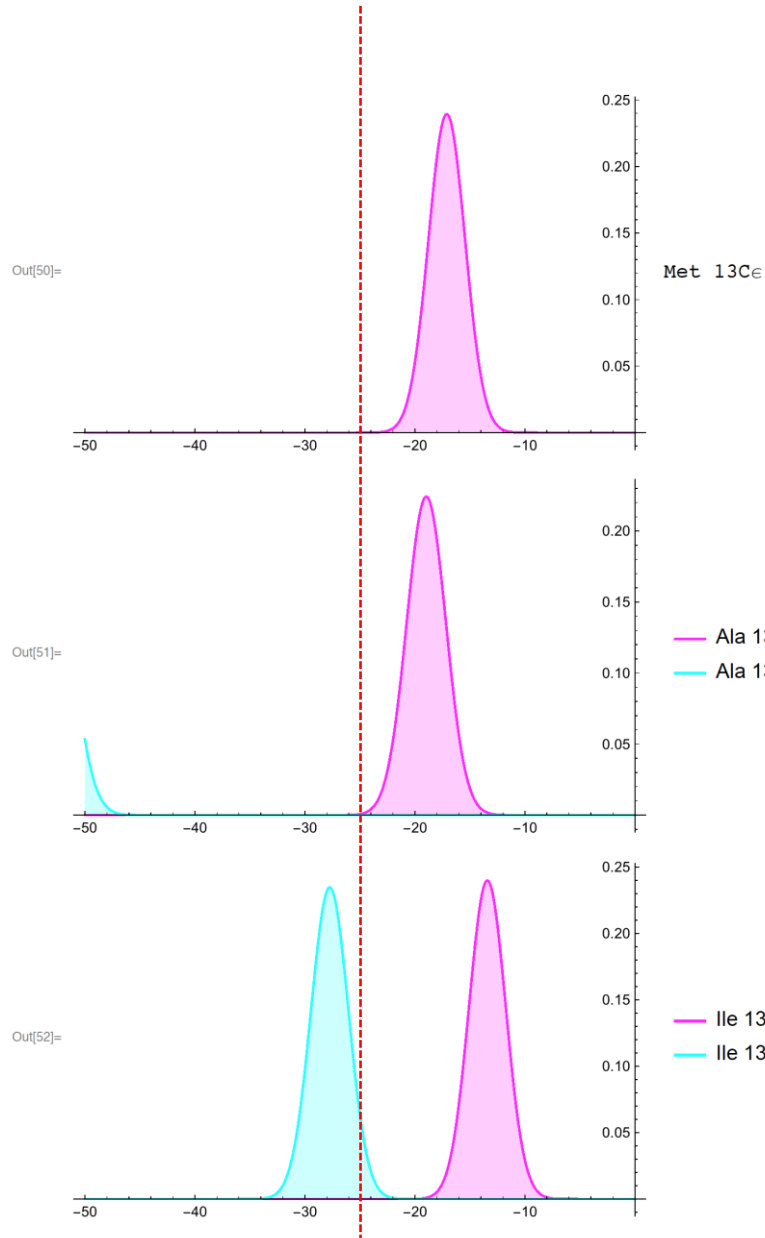
[1-¹³C]-glucose で特異的に標識される部位



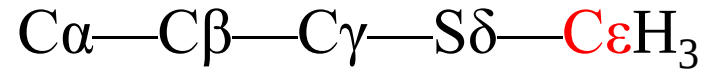
Thr C β : 70 ppm

Lundström, P. *et al.* (2007) *J. Biomol. NMR* 38, 199.

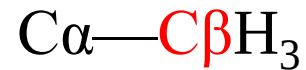
25 ppm より低磁場側を t_1 に ^{13}C -decoupling



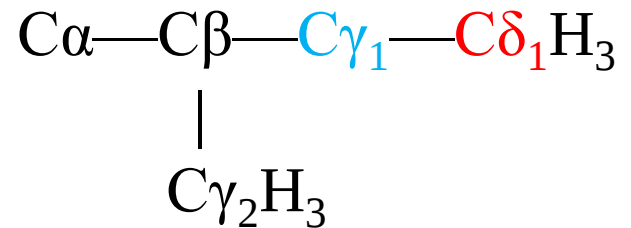
Met



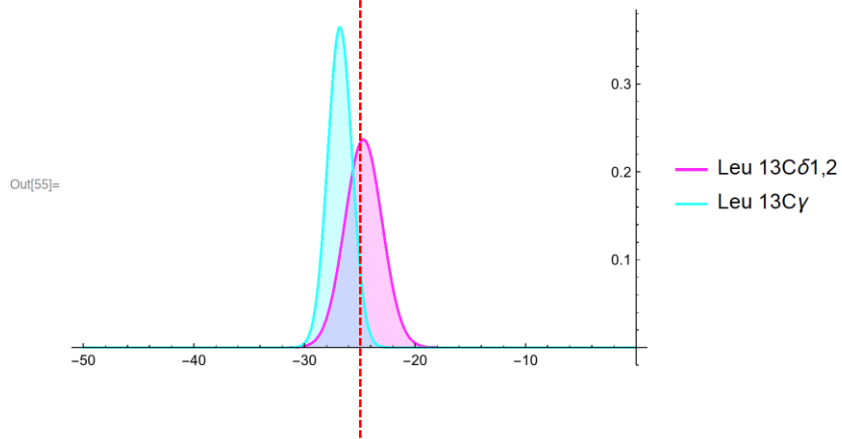
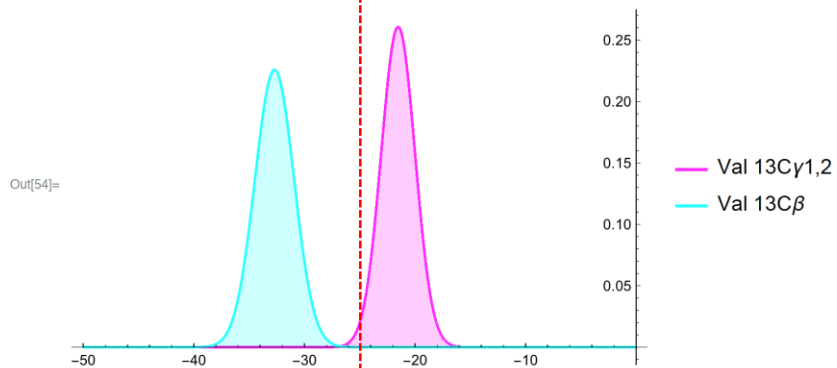
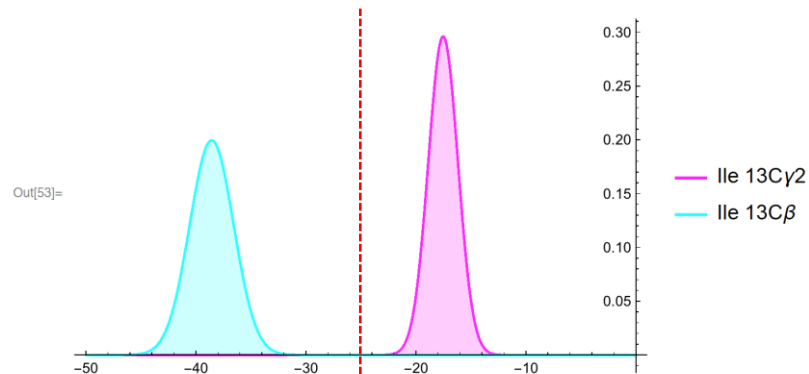
Ala



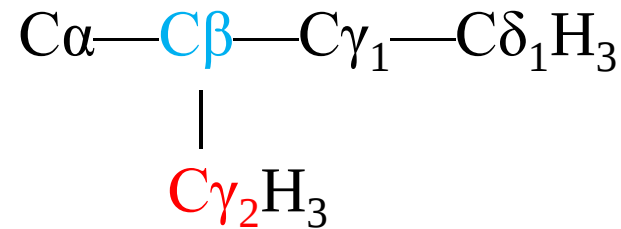
Ile



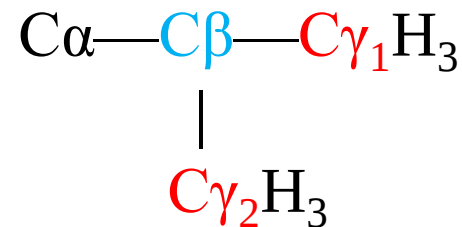
Leu さえ無ければ . . .



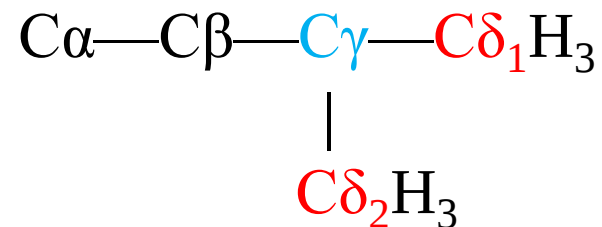
Ile



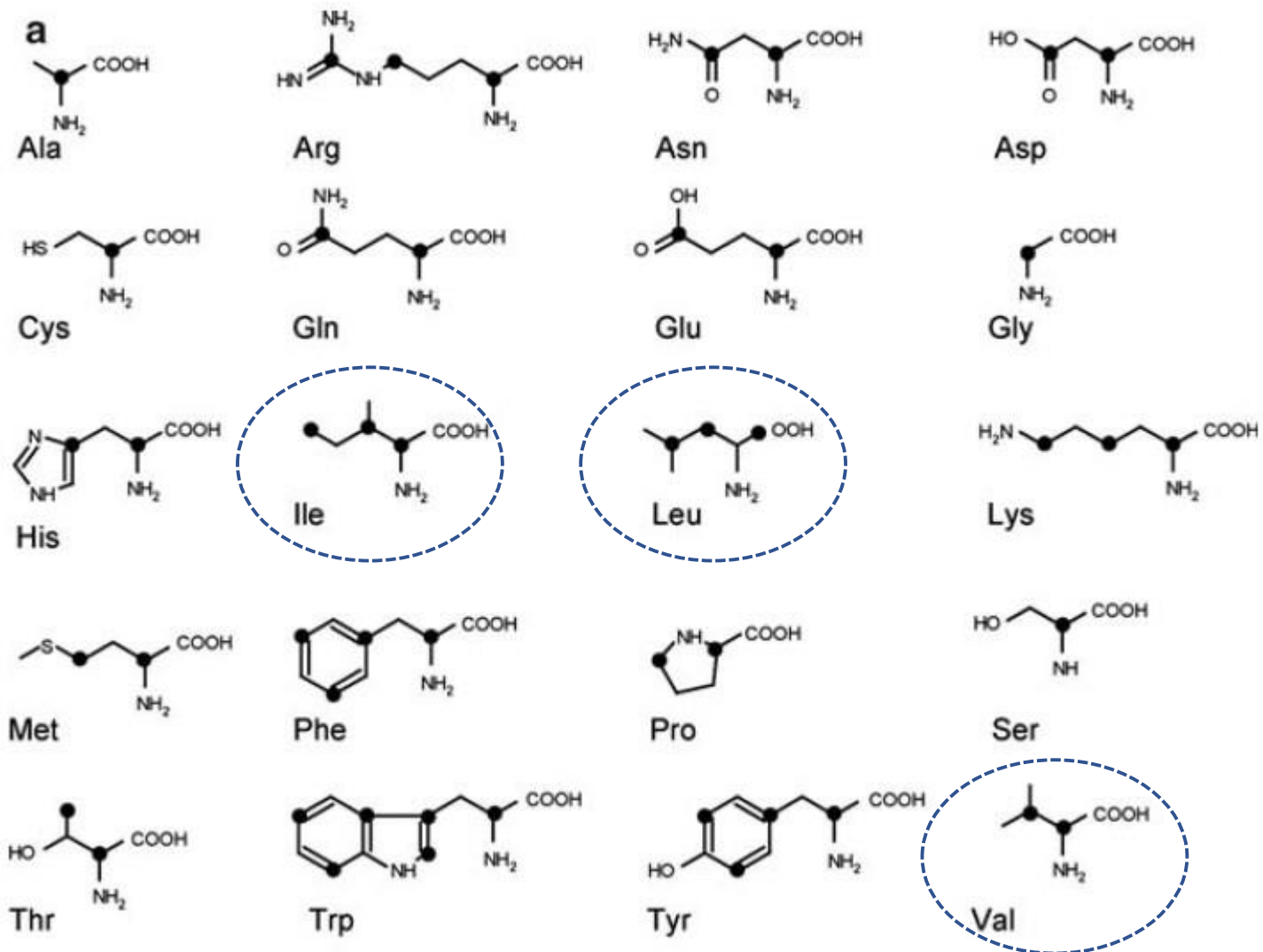
Val



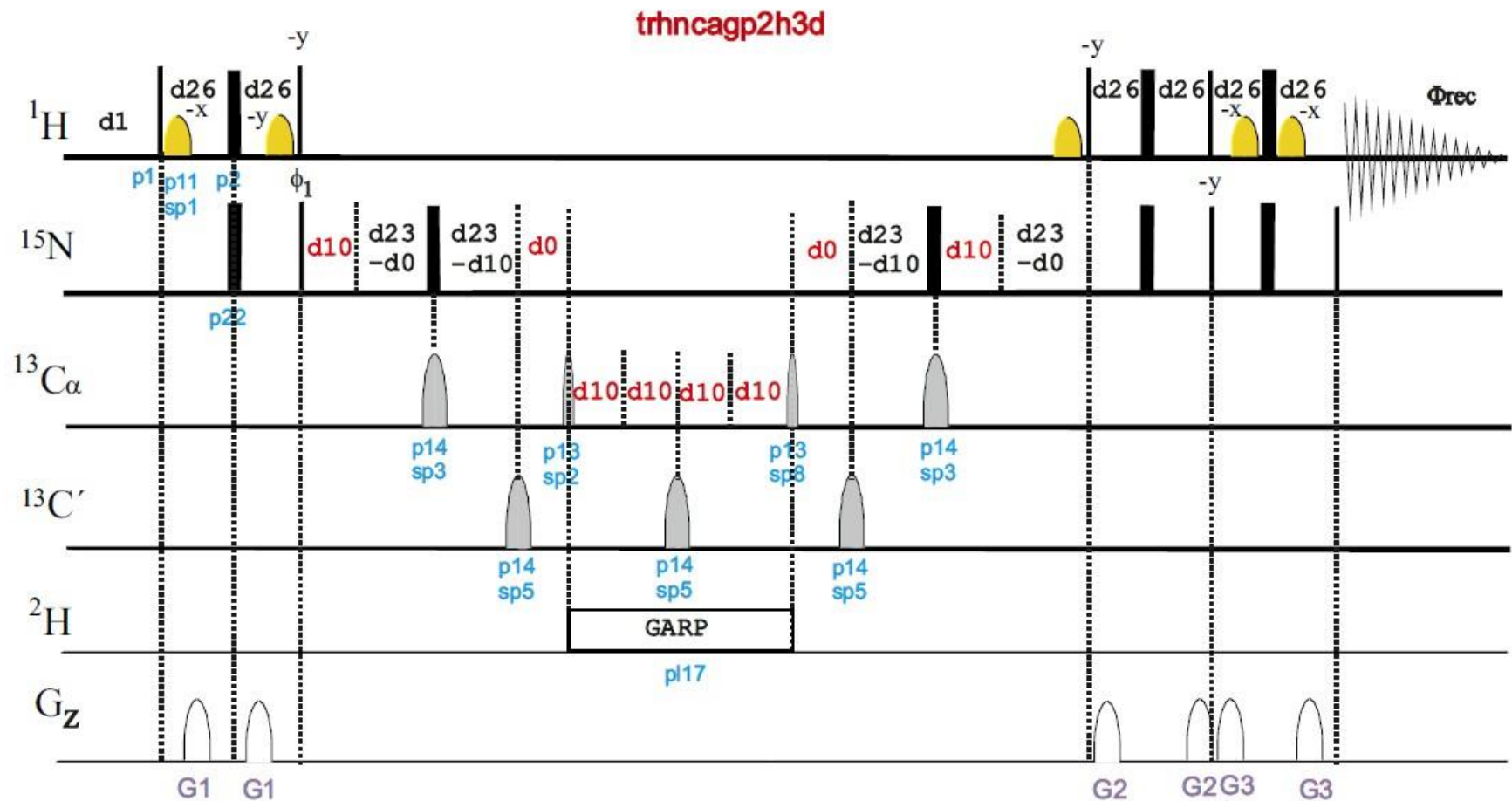
Leu



$[2-^{13}\text{C}]\text{-glucose} \rightarrow ^{13}\text{Ca}-^{12}\text{C}\beta$ (ただし 17 a.a.)

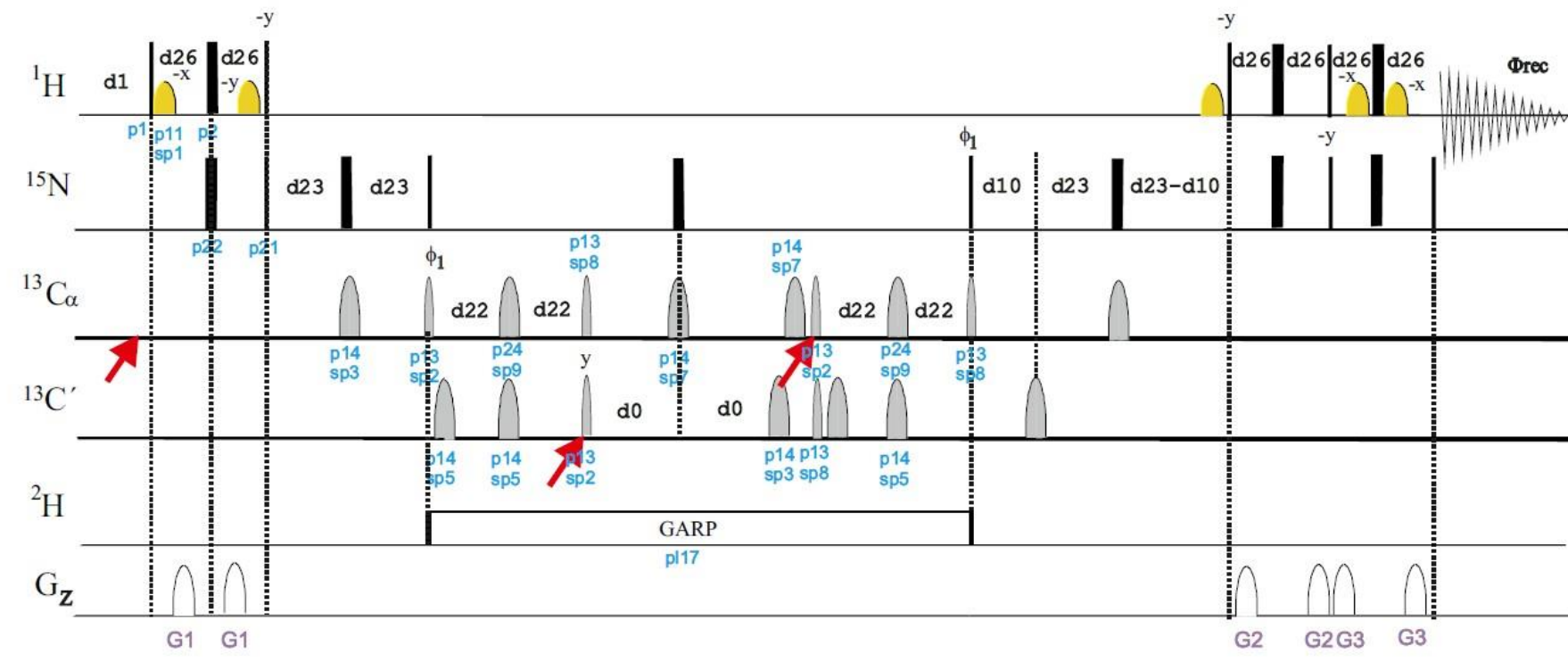


3D HNCA では $^{13}\text{C}^\beta$ に磁化が逃げるのが問題



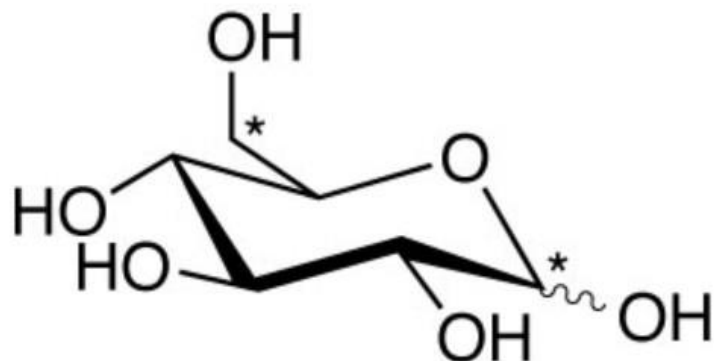
3D HNCACO でも $^{13}\text{C}^\beta$ に磁化が逃げることが問題

trhncacogp2h3d

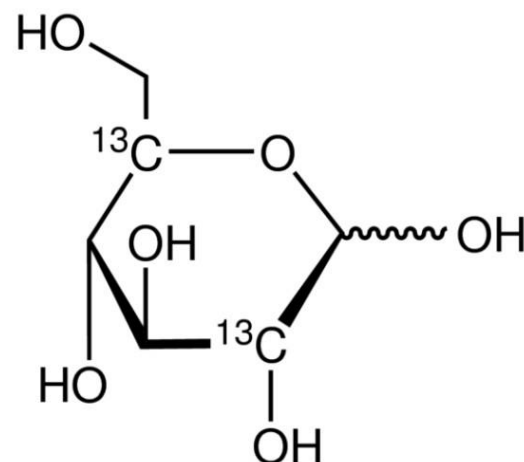


C^α と C^β が同時に ^{13}C 標識されていないので、
このスライドは忘れてください。

[1,6 $^{13}\text{C}_2$]-glucose



[2,5 $^{13}\text{C}_2$]-glucose



これらは高価そう . . .

[^2H , 1- ^{13}C]-glc, [^2H , 2- ^{13}C]-glc はなさそう。

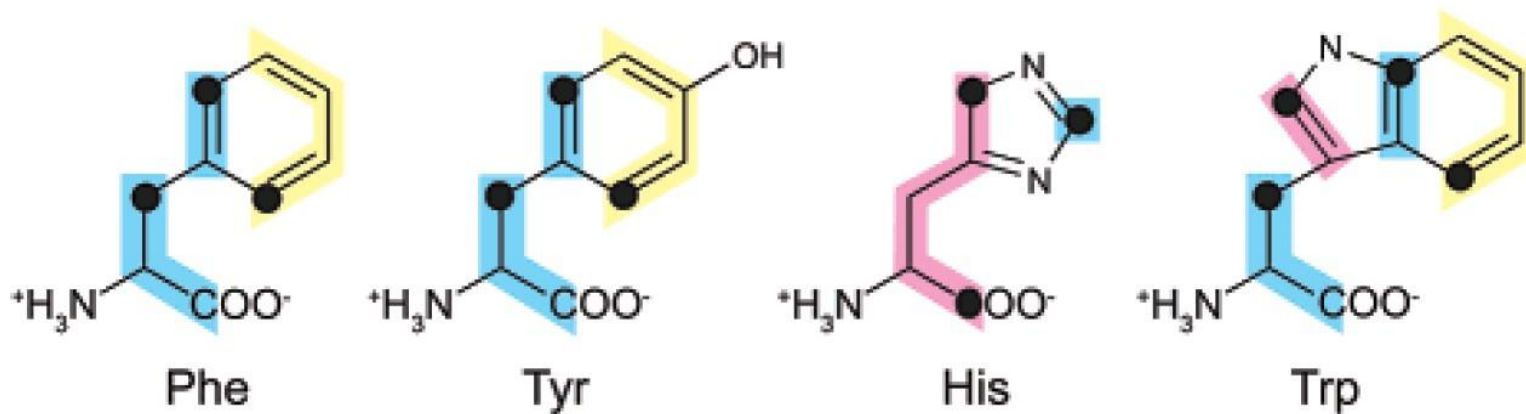
[2- ^{13}C]-glc in D_2O で大腸菌を培養

→ Ha はほとんど ^2H 化される (HNCA などにはよい) 。

→ メチル基は $\text{CHD}_2 : \text{CH}_2\text{D} : \text{CH}_3 = 0.65 : 0.3 : 0.05$

(メチル TROSY がうまく機能しない。CHD₂ だけを選ぶ。)

[1-¹³C]-glucose で特異的に標識される芳香環



Phosphoenolpyruvate (解糖系の9番目過程で生じる)

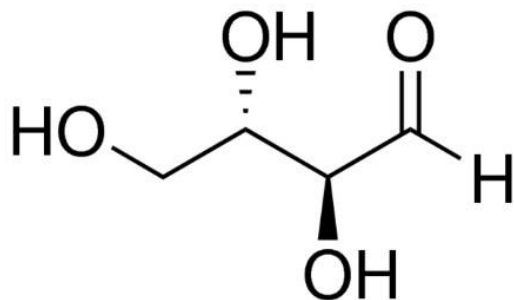
Ribose-5-phosphate (AMP, GMP の前駆体)

Erythrose-4-phosphate

¹³C が隣り合わない (¹J_{CC} coupling がない) ので

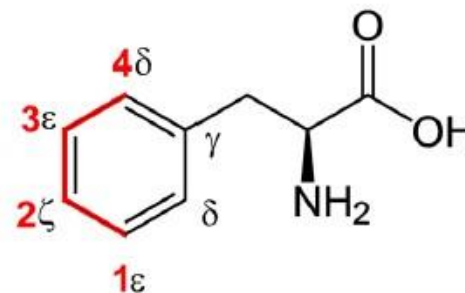
- 普通の ¹H-¹³C HSQC でも高分解能
- 芳香環でも CPMG 実験ができる

エリスロースによる芳香環の部位特異的標識



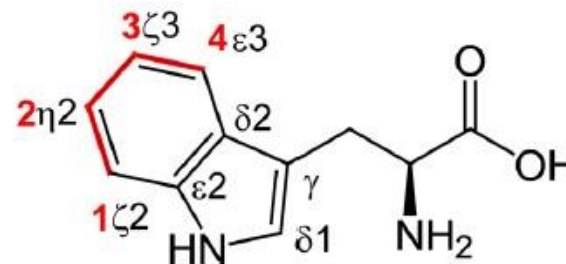
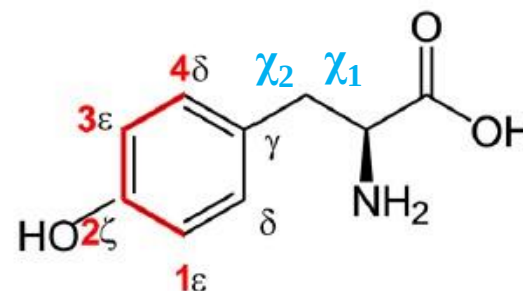
[1- ^{13}C]-erythrose (58,000 円/g)

→ 片側の ε だけを ^{13}C 標識



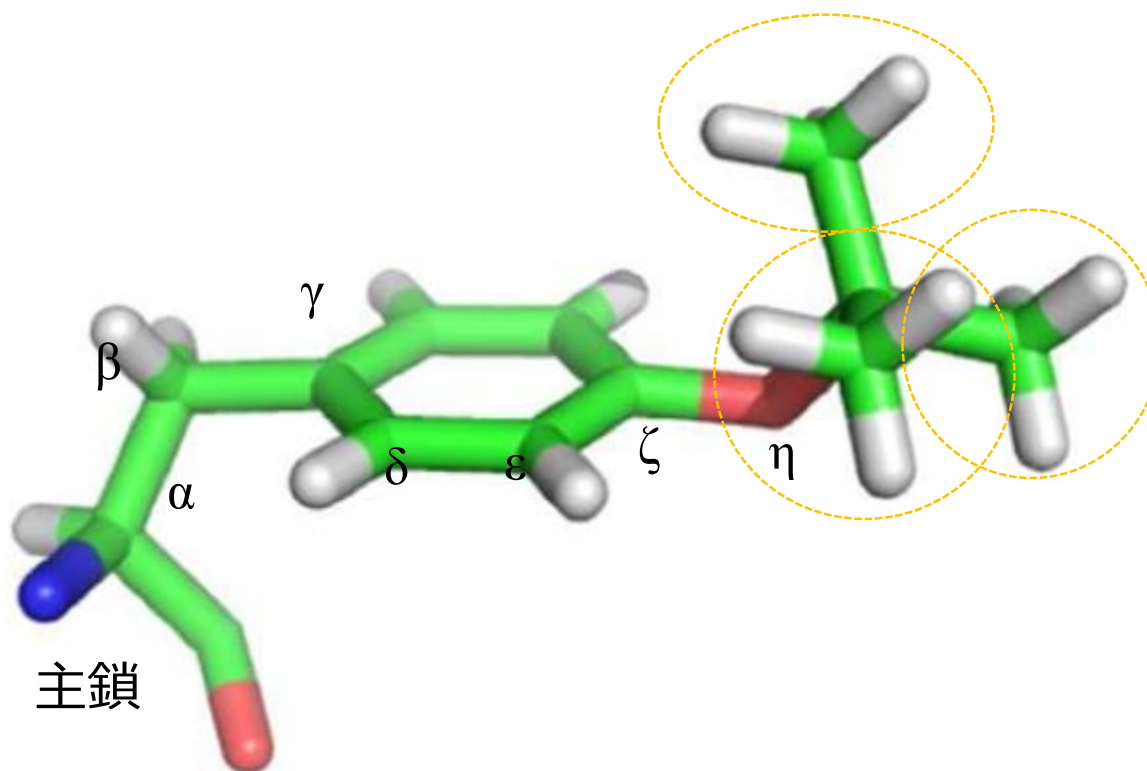
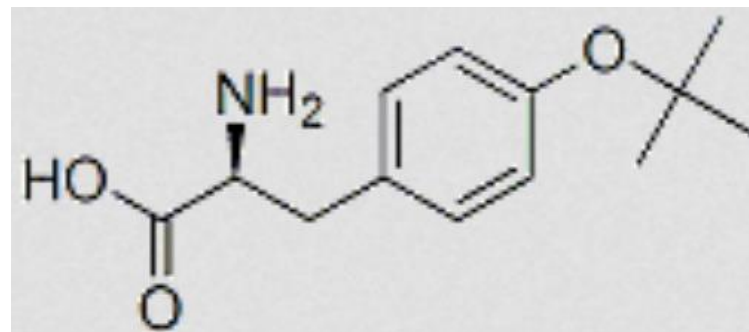
[2- ^{13}C]-erythrose (161,000円/g)

→ ζ を ^{13}C 標識する

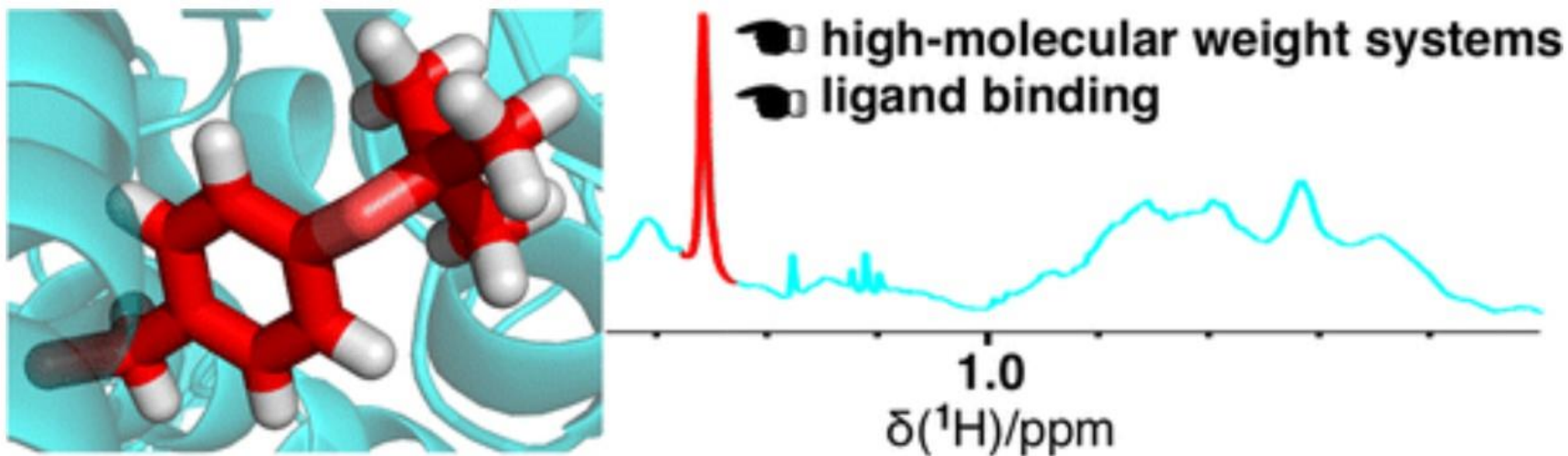


1~3 g/L の添加で 20% 前後の標識率

O-*tert*-butyl-L-tyrosine



Chen, W.N. *et al.* (2015) *J.Am.Chem.Soc.* 137, 4581.



メチル基が3つ

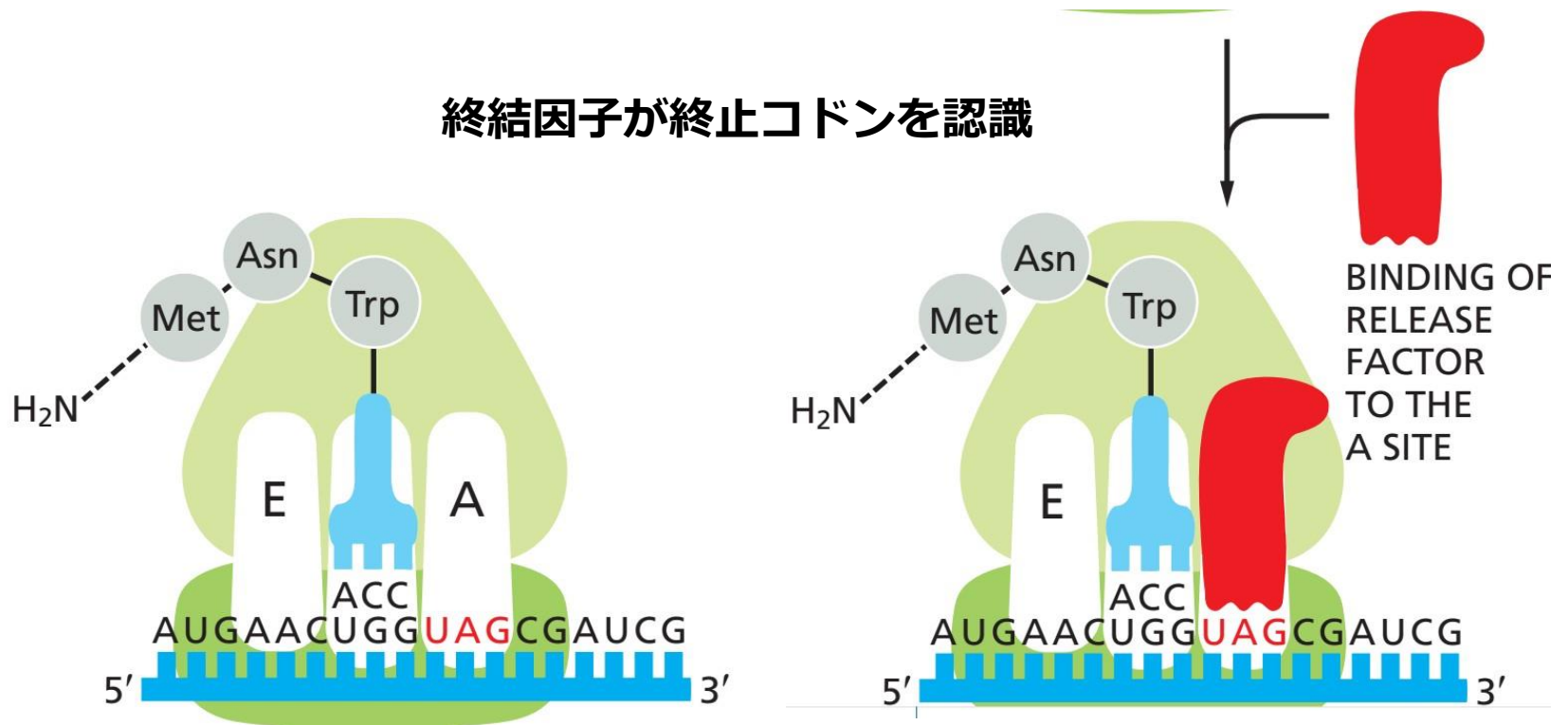
→ 高感度

→ 非標識の蛋白質で ^1H 一次元でピークを検出。

→ 高分子量 (e.g., 320 kDa)

→ 薄い濃度での K_d ($< 1 \mu\text{M}$) の見積もり可能

終止コドンの一つである TAG (UAG) を人工アミノ酸に割り当てる



aminoacyl-tRNA synthetase

それぞれのアミノ酸に対して 1 種類ずつの synthetase が存在する。

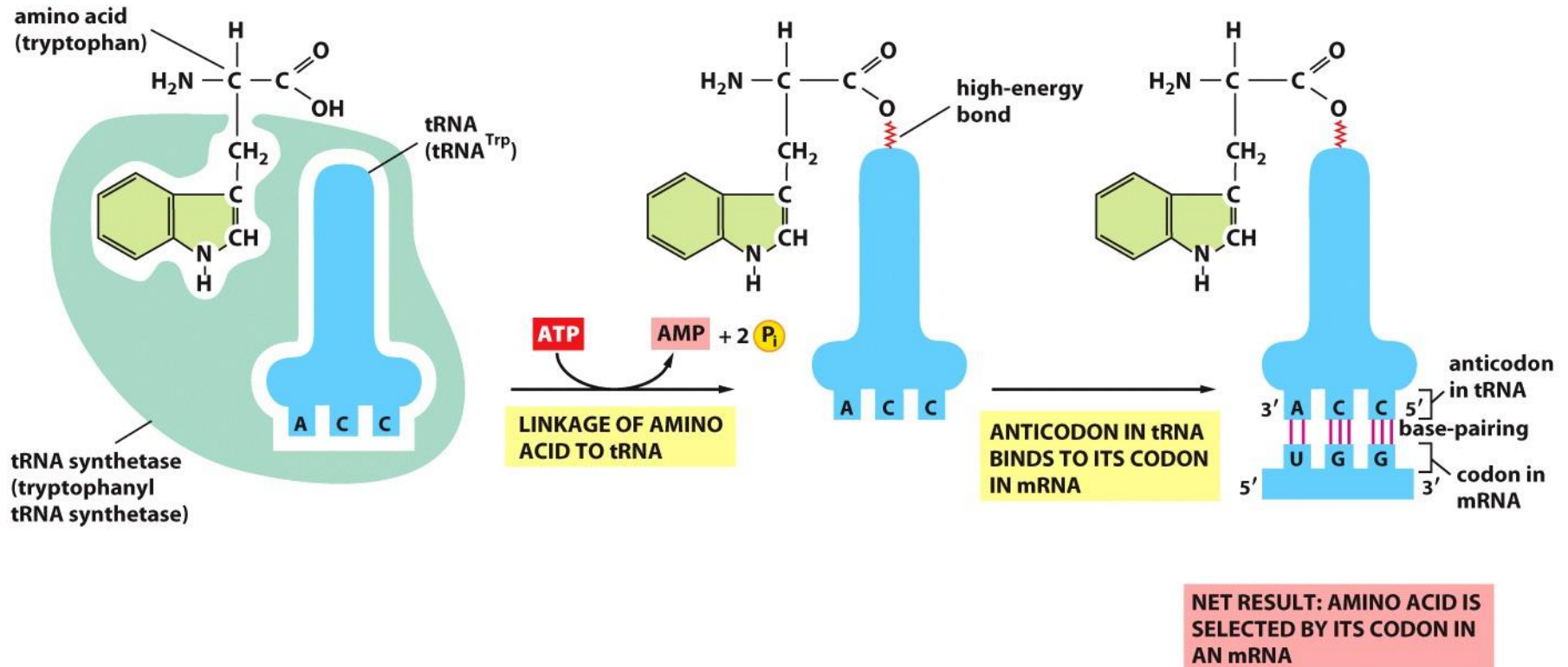
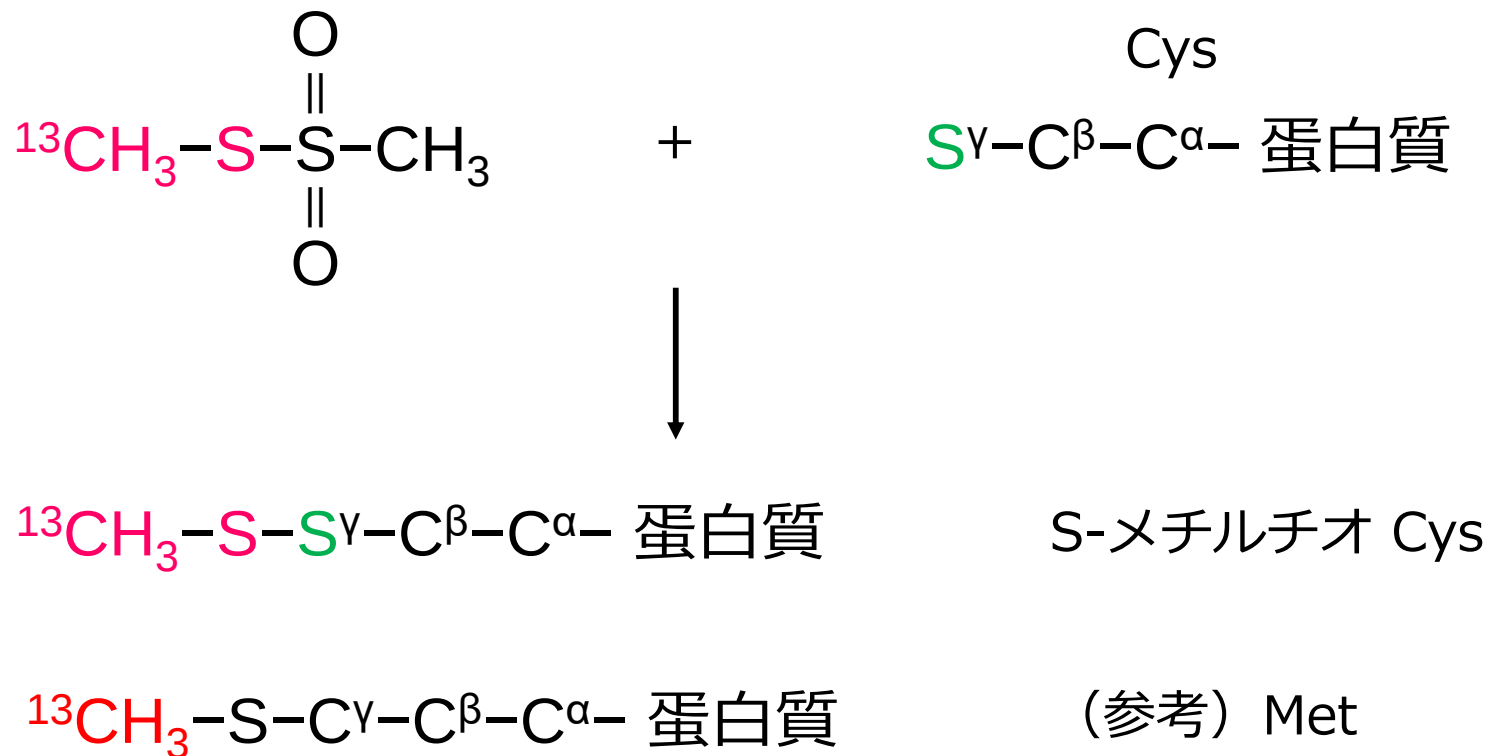
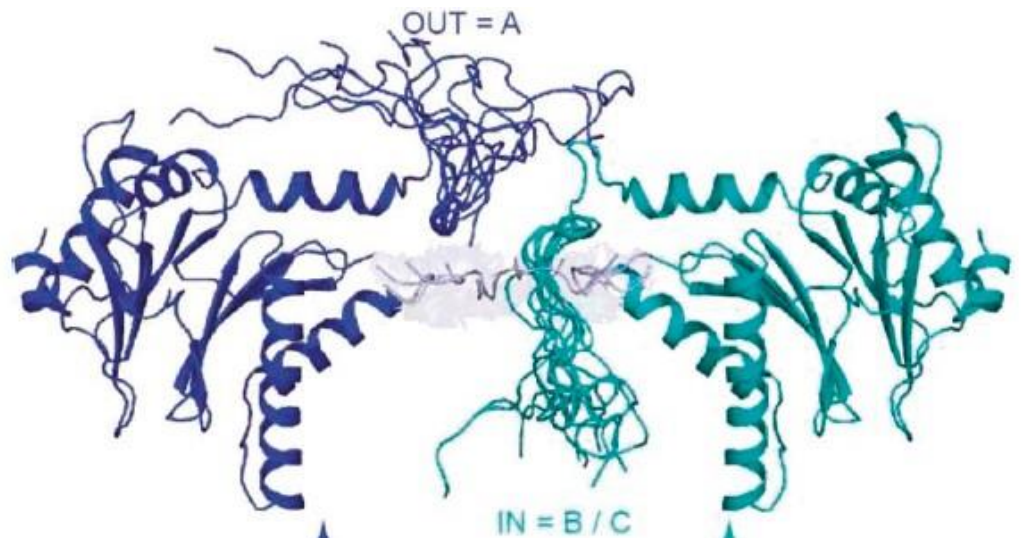


Figure 7-30 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

超好熱性メタン菌の *p*-cyanophenylalanyl-tRNA synthetase を無細胞系で使う。

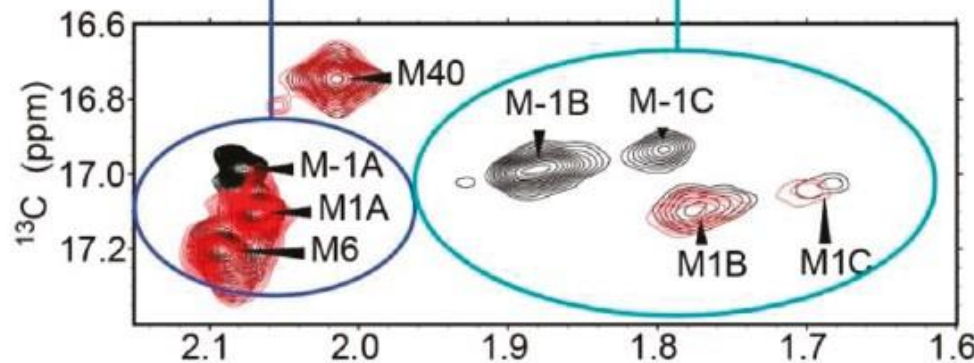
メタンチオスルホン酸-S-メチル (MMTS)



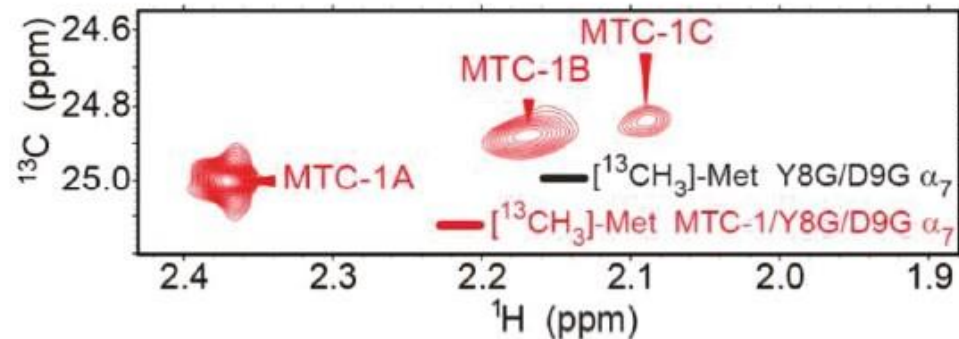


180 kDa のプロテアソーム
($\alpha 7$ -ring のみ) に適用

もし全体を重水素化しな
かった場合には、感度は
 $1/2 \sim 1/4$ となる。



← $[^{13}\text{CH}_3]$ -Met

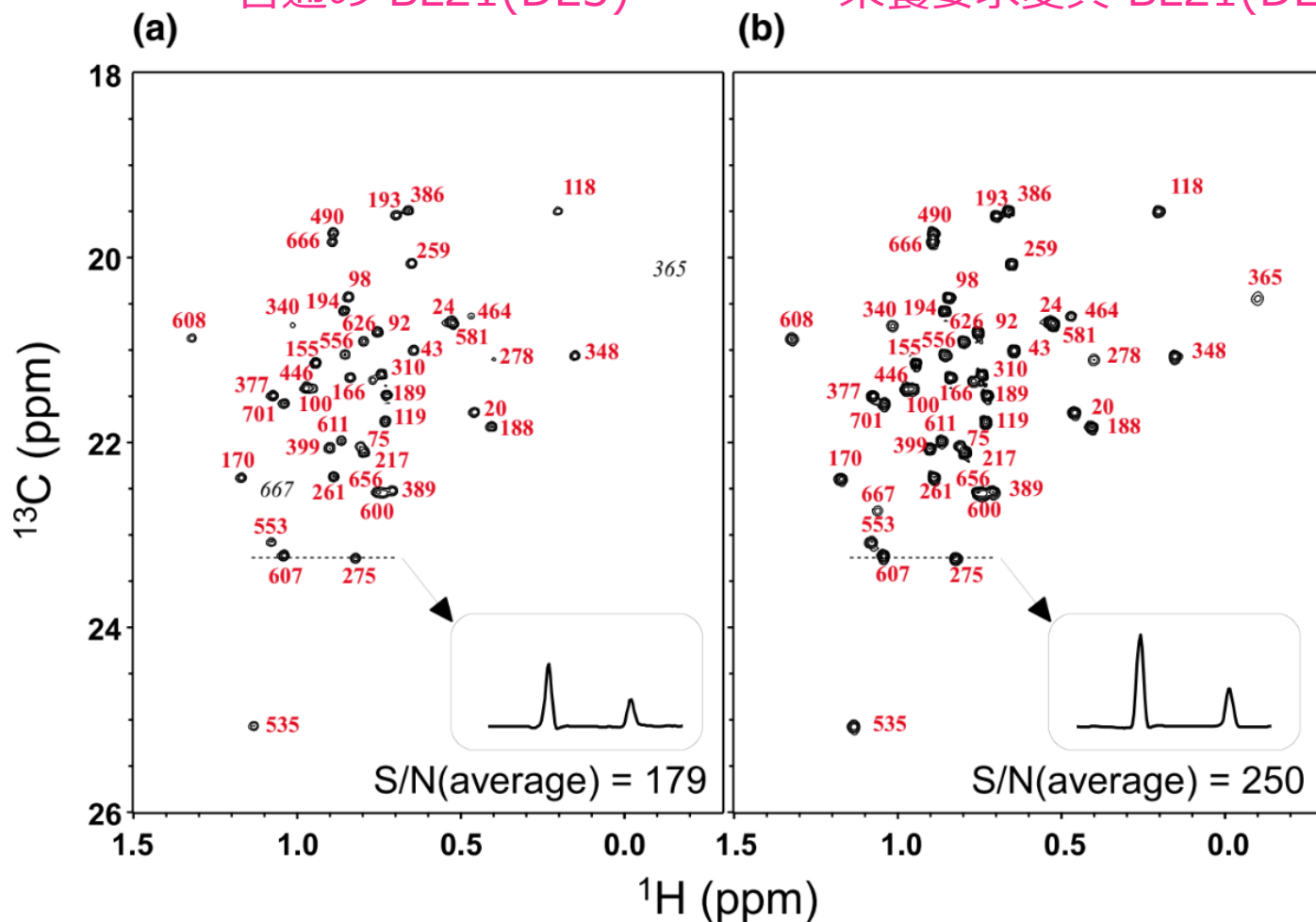


← Met¹ を Cys に変異
 $[^{13}\text{CH}_3]$ -MTC

Religa, *et al.* (2011)
J. Am. Chem. Soc. 133, 9063.

普通の BL21(DE3)

栄養要求変異 BL21(DE3)



Val の生合成は強く、なかなか阻害することができない。Val を培地に 100 mg/L 入れたとしても完全には生合成を阻害できず、60-80% 程度の効率でしか蛋白質に取り込まれない。

酵素 4, 8 を潰した大腸菌を利用。これによって、I, L, V の生合成を完全に阻害している。SAIL が完全に発現蛋白質の中に入る。

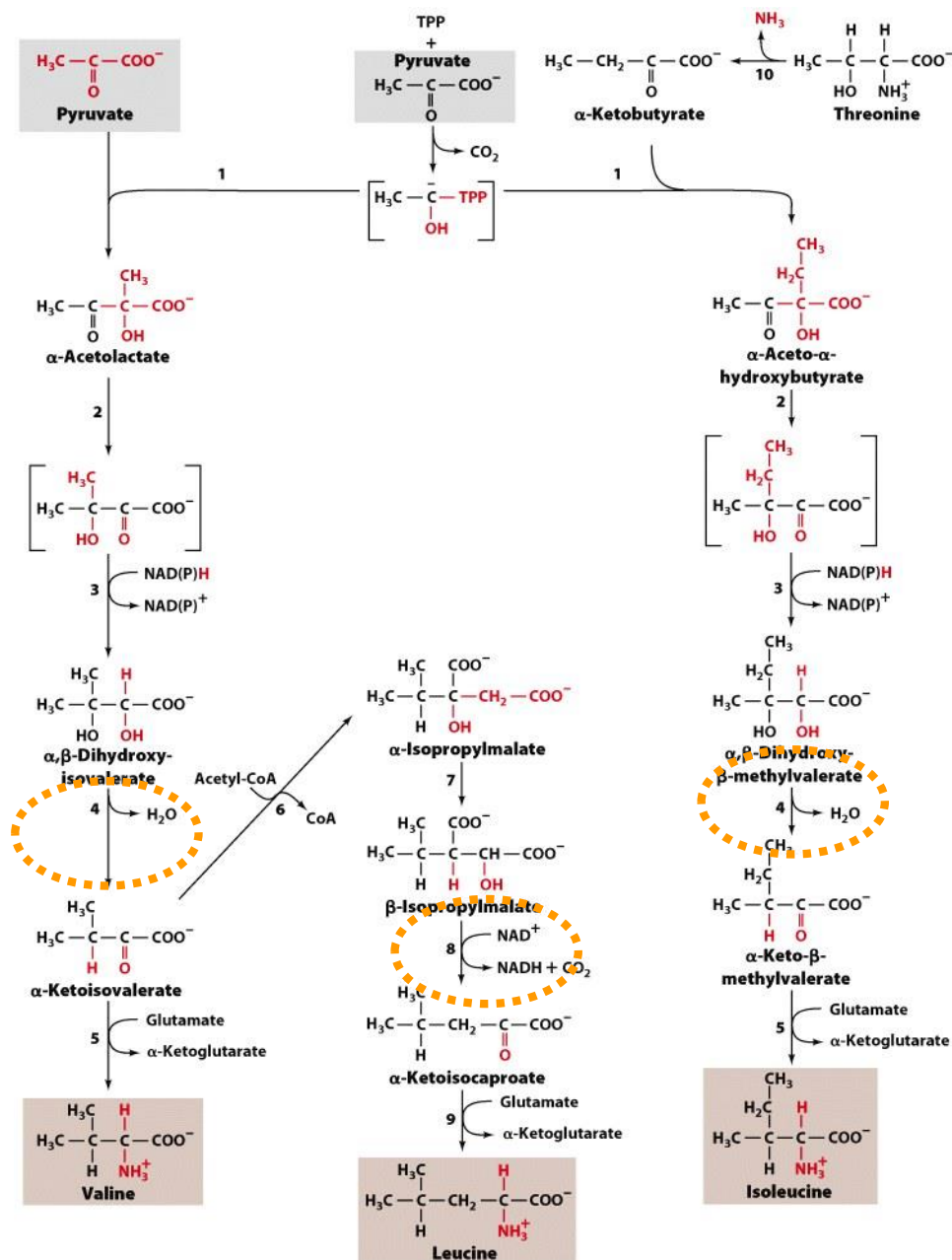
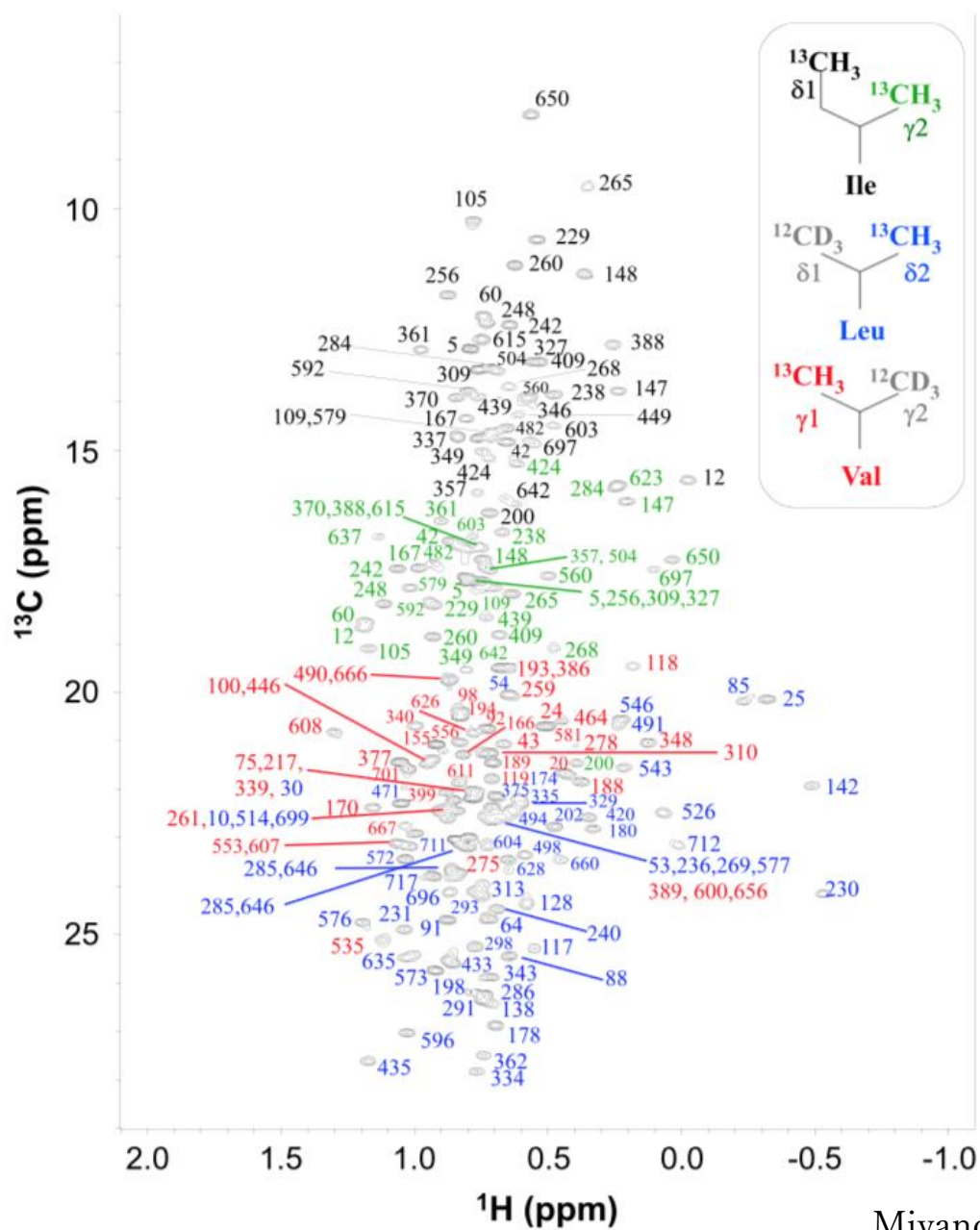


Figure 26-61

© John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.



アミノ酸選択的標識において 代謝スクランブルを防ぐ方法

杉木、古板、藤原、児嶋

Amino acid selective ^{13}C labeling and ^{13}C scrambling profile analysis of protein α and side-chain carbons in *Escherichia coli* utilized for protein nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* (2018) 57 (26), 3576–3589.

無細胞発現系を使った選択的標識

重水素化の膜蛋白質の発現などでは、大腸菌培養より安価とのこと。

酵母発現系を使ったメチル基選択的標識

鈴木、坂倉、森、藤井、明石、高橋

Methyl-selective isotope labeling using α -ketoisovalerate for the yeast *Pichia pastoris* recombinant protein expression system. *J. Biomol. NMR* (2018) 71 (4), 213–223.