

高分子量タンパク質の NMR 研究のための重水素化されたバックグラウンド上でのアラニンメチル基の同位体標識技術

Chenyun Guo, Raquel Godoy-Ruiz and Vitali Tugarinov

高分子量タンパク質の NMR 研究のために一般に使用される最高水準の同位体標識技術はタンパク質の構造とダイナミクスの NMR 研究用に多くの高品質プローブを提供しています。高濃度に重水素化された環境（一般的に「ILV 標識技術」と呼ばれる）で Ile^{δ1}、Leu^δ と Val^γ 側鎖のメチル基にプロトンと ¹³C 同位体を選択的に導入にするのに使われています。Robust ILV 標識法^{1,2} と タンパク質構造の疎水性コアの ILV 側鎖の戦略的な位置は大きなタンパク質と高分子集合体⁵の NMR 研究のために欠くことができない道具に ILV 標識を変えました。

10年以上前に、Gardner と Kay はタンパク分子⁶のプロトン化された Ile^{δ1} メチル位置に選択的に導入する技術を開発した。後に、選択的メチル標識/プロトン化法は Kay のグループ^{7,8}によって Leu^δ と Val^γ メチルサイトに改良され拡張された。Spectroscopy⁹を最適化したメチル横緩和の導入(methyl-TROSY)は改善された標識化スキームの発達を刺激した。Methyl-TROSY 技術との相乗作用で重水素化されたバックグラウンド上で大きなタンパク質の ILV メチルサイトの選択的な標識は分子量が~800kDa までの大きなタンパク質集合体の構造とダイナミクスについての NMR 研究に重要な影響を与えた。¹²⁻¹⁵それにもかかわらず、たった3つの ILV プローブの利用が大きなタンパク質の構造とダイナミクスの研究に重大な制限を提示しています。メチル同位体標識の最近の進歩は、アラニン(Ala^β)のメチル位置への ILV 標識の方法論の拡張に関して集中しています。

アラニンのメチル基は、ILV 標識方法論の興味あるテーマになりました。

アラニンのメチルは背骨のすぐ近くにありますが；その結果、それらの柔軟性はタンパク質中のその他のメチルを含んだ側鎖と比較して減少します。アラニンはタンパク質の疎水性コアで最もよく出会う残基の1つであり、また分子のインターフェースになります。¹⁶近年いくつかの報告は大きなタンパク質の Ala^β のメチル位置の（選択的な）標識で ILV 方法論を広げること集中しています。Isaacson et al.は重水素化されたバックグラウンド上でのアラニン残基の ¹³CH₃ 基の選択的な導入のための標識戦略を導入した。¹⁷ 最少 D₂O-ベース細菌培地に最少バックグラウンド標識 (<1%) で 95%のレベルで Ala^β メチルの特異的な ¹³C 標識とプロトン化は大量の選択的に ¹³C 標識 α 重水素化アラニンと 3つの重水素化化合物：(1) α-ketoisovalerate-D₇, (2)succinate-D₄, (3)L-isoleucine-D₁₀ の共添加について Boisbouvier と共同研究者によって報告された。¹⁸ この標識プロトコールは 73 個のメチル基を含む 82-kDa の酵素 {²H;Ala^β- [¹³CH₃] }-labeled Malate Synthase G^{19,20}(MSG)の製造

のために密接な関係があります。MSG ではアラニンが全アミノ酸含有量の 10.1%であり、最も大量の残基です。図 1 は付録 1 でより詳細に述べられているプロトコールを使って調製された MSG の methyl-TROSY ^1H - ^{13}C 相関図を示しています。

利用できるメチルプローブの数を最大にするために、ILV メチル標識で Ala 位置の選択的な標識を組み合わせることは明らかに有利である。²¹

(i) Ile $^{\delta 1}$ 位置の標識のために選択的に $^{13}\text{CH}_3$ 標識 α -ketobutyrate (ii) Val $^{\gamma}$ と Leu $^{\delta}$ のサイトの標識のための $^{13}\text{CH}_3/^{12}\text{CD}_3$ -標識 α -ketoisovalerate と (iii) 重水素化された succinate の組み合わせで選択的に $^{13}\text{CH}_3$ -標識 Ala $^{\beta}$ ($\{2\text{-D},3\text{-}^{13}\text{C}\}$ -L-alanine) の使用は実際この目的を達成している (使用された化合物の詳細については付録 1 を見てください。)

図 2 は、 $\{\text{Ala}^{\beta}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Ile}^{\delta 1}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Leu,Val}\text{-}[^{13}\text{CH}_3/^{12}\text{CD}_3]\}$ -標識 MSG で記録された ^1H - ^{13}C methyl-TROSY 相関図を示しています。Ala $^{\beta}$ 基内の共鳴のオーバーラップが非常にたくさんあるが、MSG Ala $^{\beta}$ 信号の中に Val $^{\gamma}$ と Leu $^{\delta}$ の methyl 基とは重なりません。以前の記録との完全な一致¹⁸により、アラニンから他のアミノ酸への同位体標識の交差が起こる兆候がないことがどちらのサンプルでも検出された。実際に、 $\{\text{U-}^2\text{H}; \text{Ile}^{\delta 1}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Leu,Val}\text{-}[^{13}\text{CH}_3/^{12}\text{CD}_3]\}$ -標識 MSG (Ala $^{\beta}$ 標識なし) で得られるのと $\{\text{U-}^2\text{H}; \text{Ala}^{\beta}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Ile}^{\delta 1}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Leu,Val}\text{-}[^{13}\text{CH}_3/^{12}\text{CD}_3]\}$ -標識サンプルでの ILV methyls の信号強度の比較は ILV methyl 位置での同位体混合のレベルは培地への標識アラニンの大量の添加によってもあまり影響はありませんでした。これは Ile $^{\delta 1}$ 位置への標識の混合を導く生合成の回路が、培地に適当に標識された α -ketobutyrate の添加により短回路になり、Val $^{\gamma}$ と Leu $^{\delta}$ サイトの標識を導く回路が α -keto-isovalerate の前駆物質の添加により短回路になっている間は起こります。Ile $^{\delta 1}$ の methyl 位置に $^{13}\text{CH}_3$ を標識するのを確実にするには重水素化された isoleucine の代わりに培地に α -ketobutyrate の添加により Ile $^{\gamma 2}$ methyl サイトに部分的に $^{13}\text{CH}_3$ を標識することになるだろう ($[\text{U-}^2\text{H}]\text{-glucose}$ から完全に重水素化された pyruvate の代わりに Ile $^{\delta}$ の生合成サイクルに入る alanine-derived $[3\text{-}^{13}\text{CH}_3]\text{-pyruvate}$ から生じる)。それにもかかわらず、Ile $^{\gamma 2}$ ^1H - ^{13}C 相関は、タンパク質製造の間ピルビン酸塩の分子が $[\text{U-}^2\text{H}]\text{-glucose}$ から主に生じることを示しています。 $\{\text{Ala}^{\beta}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Ile}^{\delta 1}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Ile}^{\delta 1}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Leu,Val}\text{-}[^{13}\text{CH}_3/^{12}\text{CD}_3]\}$ -MSG について記録された ^1H - ^{13}C methyl-TROSY スペクトルで検出されなかった。

タンパク質背骨へのアラニン側鎖の近接とそれらの high degree of order は、多くのアプリケーションにおいて Ala $^{\beta}$ methyl 基は優れた NMR プローブになっています：(i) Ala $^{\beta}$ methyls の ^1H - ^{13}C residual dipolar couplings (RDCs) の測定、(ii) 酵素の機能的に重要なサイトでの fast (pico-to-nanosecond) と slow (μs -to-millisecond) ダイナミクスの特徴化、(iii) 従来の ILV 標識方法論と比較して距離制限の誘導のため methyl プローブの数を増やしている $\{\text{U-}^2\text{H}; \text{Ala}^{\beta}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Ile}^{\delta 1}\text{-}[^{13}\text{CH}_3]; \text{Leu,Val}\text{-}[^{13}\text{CH}_3/^{12}\text{CD}_3]\}$ -標識サンプルで実行できる methyl-TROSY NOE 分光学などです。

付録 1 $^{13}\text{CH}_3$ 基を持つ Ala^β 位置への選択的な標識 ($\{\text{U-} [^2\text{H}] ; \text{Ala}^\beta\text{-} [^{13}\text{CH}_3]\}$ -標識サンプル) は、E.coli 培地の主炭素源として $\text{U-} [^2\text{H}]$ -D-glucose と 1mM の IPTG.によるタンパク質過剰発現の誘導の 1 時間前に D_2O ベース M9 培地 1L に(i) $\{2\text{-D},3\text{-}^{13}\text{C}\}$ -L-alanine 800mg, (ii)succinate- D_4 2.5g, (iii) α -keto-isovalerate- D_7 200mg, と (iv) L-isoleucine- D_{10} 60mg の添加による Ayala らのプロトコールを用いて達成された。 Ala^β methyl $\{\text{U-} [^2\text{H}] ; \text{Ala}^\beta\text{-} [^{13}\text{CH}_3] ; \text{Ile}^{\delta 1}\text{-} [^{13}\text{CH}_3] ; \text{Leu,Val-} [^{13}\text{CH}_3/^{12}\text{CD}_3]\}$ -標識サンプル) といっしょに全ての ILV 位置の選択的な $^{13}\text{CH}_3$ 標識は前と同じ炭素源に誘導 1 時間前に培地 1L に (i) $\{2\text{-D},3\text{-}^{13}\text{C}\}$ -L-alanine 800mg ;(ii)succinate- D_4 2.5g ; (iii) α -ketoisovaleric acid,sodium salt(3-methyl- $^{13}\text{C};3,3\text{-D}_2$) 120mg と (iv) α -Ketobutyric acid,sodium salt(3-methyl- $^{13}\text{C};3,3\text{-D}_2$) 60mg を添加することにより達成された。MSG の $\{\text{Ala}^\beta\text{-} [^{13}\text{CH}_3]\}$ -と $\{\text{Ala}^\beta\text{-} [^{13}\text{CH}_3] ; \text{Ile}^{\delta 1}\text{-} [^{13}\text{CH}_3] ; \text{Leu,Val-} [^{13}\text{CH}_3/^{12}\text{CD}_3]\}$ -標識サンプルは 0.9mM と 0.75 mM のタンパク濃度であり、それぞれ 25mM sodium phosphate buffer(pH7.1, 未調整),20mM MgCl_2 ,5mM DTT と 0.05% NaN_3 を含む 99% D_2O 中で実施された。

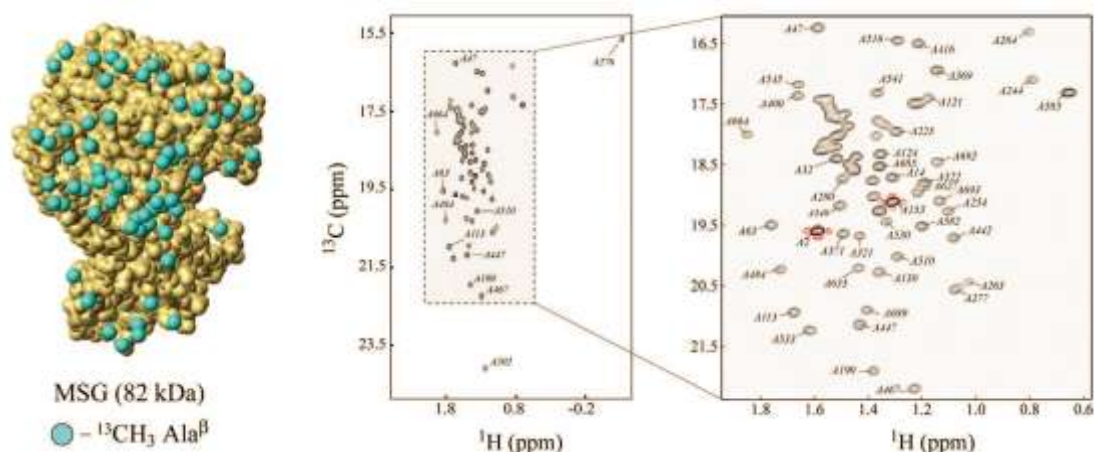


図 1 左 : シアン色の球で示した Ala^β 炭素原子の位置情報付きの Malate Synthase G (82kDa;73 個のアラニン) の構造略図。

中央 : 0.9mM $\{\text{U-} [^2\text{H}]; \text{Ala}^\beta\text{-} [^{13}\text{CH}_3]\}$ -標識 MSG について記録された Methyl $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMQC 相関図(37°C、600MHz)

右 : 中心でハイライトしている相関図の「ズーム」部分。分離された Ala^β クロスピークの選択された割り付けが示されています。22 マイナスの等高線は赤で示されています。

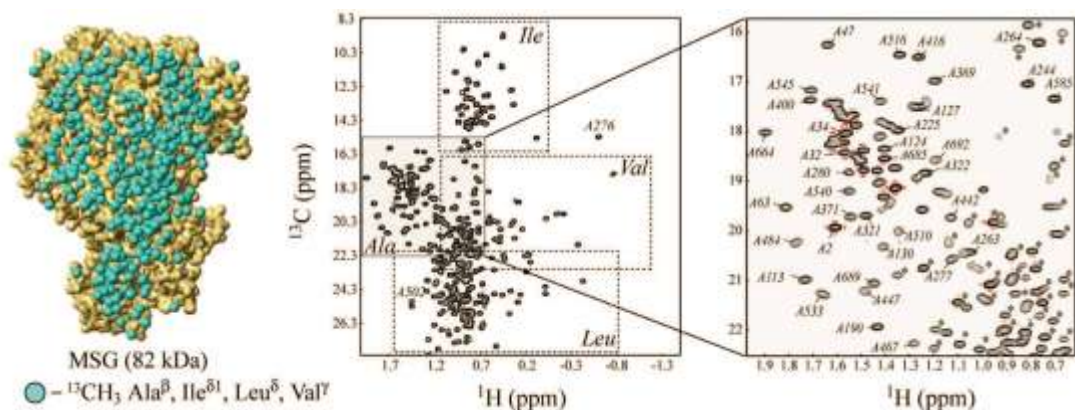


図2 左 :シアン色の球で示されている Ala $^\beta$ 、Ile $^{\delta 1}$ 、Leu $^\delta$ と Val $^\gamma$ 位置の methyl 炭素位置情報付きの MSG の構造略図。

中央 : 0.75mM {Ala $^\beta$ - [$^{13}\text{CH}_3$] ;Ile $^{\delta 1}$ - [$^{13}\text{CH}_3$] ;Leu,Val- [$^{13}\text{CH}_3/^{12}\text{CD}_3$] }-標識 MSG について記録された Methyl ^1H - ^{13}C HMQC 相関図(37°C ; 600MHz)。ほぼ Ile $^{\delta 1}$ 、Val $^\gamma$ と Leu $^\delta$ Methyl 位置と一致している図の領域は、点線の長方形の部分です。実線の長方形の部分と、ハイライトした領域は、Ala $^\beta$ methyl と一致します。

右 : 中央のハイライトした領域をズームした図の Ala $^\beta$ 部分。Val $^\gamma$ と Leu $^\delta$ 相関が起因している交差ピークは、星印が付いています。Ala $^\beta$ の割り付けは、選択された methyls.を示しています。²²

CIL Products

// VIVO ILVA METHYL LABELING KIT

CIL Catalog # CDLM-8806-KIT

This kit contains four separate vials of the following compounds in the amounts indicated:

Compound Name	Catalog No.	Amount
Succinate (U-D ₄)	DLM-584	2.5 g
↳-Ketoisovaleric acid, sodium salt (3-methyl- ¹³ C: 3,4,4,4-D ₄)	CDLM-7317	0.12 g
↳-Ketobutyric acid, sodium salt (3-methyl- ¹³ C; 3,3-D ₂)	CDLM-7318	0.06 g
Alanine (2-D, 3- ¹³ C)	CDLM-8649	0.8 g

The materials in this kit are to be used in conjunction with 1L of deuterated minimal media. 1L of minimal media that is suitable for use with this product typically contains 2 g of glucose-D₇, 1 g of ammonium salt (either ¹⁵N labeled or unlabeled, depending on preference of the user), and 11.3 g of M9 salts in D₂O.

IN VIVO* ALANINE METHYL LABELING KIT*CIL Catalog # CDLM-8805-KIT**

This kit contains four separate vials of the following compounds in the amounts indicated:

Compound Name	Catalog No.	Amount
Succinate (U-D ₄)	DLM-584	2.5 g
↳-Keto Isovalerate (U-D ₇)	DLM-4646	0.2 g
Isoleucine (U-D ₁₀)	DLM-141	0.06 g
Alanine (2-D, 3- ¹³ C)	CDLM-8649	0.8 g

The materials in this kit are to be used in conjunction with 1L of deuterated minimal media.^{1,2} 1L of minimal media that is suitable for use with this product typically contains 2 g of glucose-D₇, 1 g of ammonium salt (either ¹⁵N labeled or unlabeled, depending on preference of the user), and 11.3 g of M9 salts in D₂O.

¹ Ayala, I.; Sounier, R.; Use, N.; Gans, P.; Boissbouvier, J. J. *Biomol. NMR* 2009, 43, 111-9.

² Isaacson, R.L.; Simpson, P.J.; Liu, M.; Cota, E.; Zhange, X.; Freemont, P.; Matthews, S. *J Am Chem Soc* 2007, 129, 15428-9.

Don't see your desired labeling pattern? Want preweighed labeled components for your media

preparation? We can usually package our reagents to your specifications at no extra charge – please see your local Sales Representative for a quote.

参考

1. Tugarinov, V.; Kanelis, V.; Kay, L.E. *Nat. Protocols* **2006**, 1, 749.
2. Sprangers, R.; Velyvis, A.; Kay, L.E. *Nat. Methods* **2007**, 4, 697.
3. Gardner, K.H.; Rosen, M.K.; Kay, L.E. *Biochemistry* **1997**, 36, 1389.
4. Rosen, M.K.; Gardner, K.H.; Willis, R.C.; Parris, J.E.; Pawson, T.; Kay, L.E. *J. Mol. Biol.* **1996**, 263, 627.
5. Tugarinov, V.; Hwang, P.M.; Kay, L.E. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 107.
6. Gardner, K.H.; Kay, L.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7599.
7. Gardner, K.H.; Zhang, X.; Gehring, K.; Kay, L.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11738.
8. Goto, N.K.; Gardner, K.H.; Mueller, G.A.; Willis, R.C.; Kay, L.E. *J. Biomol. NMR* **1999**, 13, 369.

9. Tugarinov, V.; Hwang, P.M.; Ollerenshaw, J.E.; Kay, L.E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10420.
10. Tugarinov, V.; Kay, L.E. *J. Biomol. NMR* **2004**, 28, 165.
11. Gans, P.; Hamelin, O.; Sounier, R.; Ayala, I.; Dura, M.A.; Amero, C.D.; Noirclerc-Savoye, M.; Franzetti, B.; Plevin, M.J.; Boisbouvier, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 1958.
12. Tugarinov, V.; Choy, W.Y.; Orekhov, V.Y.; Kay, L.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 622.
13. Sprangers, R.; Kay, L.E. *Nature* **2007**, 445, 618.
14. Religa, T.L.; Sprangers, R.; Kay, L.E. *Science* **2010**, 328, 98.
15. Velyvis, A.; Yang, Y.R.; Schachman, H.K.; Kay, L.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 8815.
16. Fernandez, A.; Scott, L.R.; Scheraga, H.A. *J. Phys. Chem.* **2003**, 107, 9929.
17. Isaacson, R.L.; Simpson, P.J.; Liu, M.; Cota, E.; Zhang, X.; Freemont, P.; Matthews, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15428.
18. Ayala, I.; Sounier, R.; Use, N.; Gans, P.; Boisbouvier, J. *J. Biomol. NMR* **2009**, 43., 111.
19. Howard, B.R.; Endrizzi, J.A.; Remington, S. *J. Biochemistry* **2000**, 39, 3156.
20. Tugarinov, V.; Muhandiram, R.; Ayed, A.; Kay, L.E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10025.
21. Godoy-Ruiz, R.; Guo, C.; Tugarinov, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132(51) 18340.
22. Sheppard, D.; Guo, C.; Tugarinov, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1364.