

## 構造生物学での安定同位体の利用

Gerhard Wagner, Ph.D.

Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology,

Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

NMR による構造生物学と薬の発見において、安定同位体の使用が重要な役割を演じることになりました。過去四半世紀にわたって、新しい同位体標識法が、NMR 分光法の進歩におけるいくつかの大躍進につながりました。NMR に新しい核種を導入するか、陽子を重陽子と入れ替える同位体標識法は、新しい相関関係を得ることと、スペクトルの複雑さを減らすのに用いられています。このように、同位体標識法は特定の構造とダイナミックな情報を得るのを非常に容易にしました。新しい同位体標識法は、NMR 実験の発達を非常に刺激しました。今日同位体標識法は現在の最高水準の NMR 技術の重要な要素で、将来の開発において主役を演ずることが期待されています。

新しい標識法が一般的に大学の研究所から始まり、学生とポスドクのメンバーとすべての関心を持つ研究機関で同位体製造法を習得することは通常無駄があります。このようなことは CIL のような民間企業が受け持つべきです。例えば、CIL は長期間にわたり同位体標識試薬を科学界に提供し、NMR コミュニティのためにも素晴らしいサービスを提供しています。

1970 年代初期までは、NMR 分光法は主に低分子のキャラクタリゼーションのために、化学者により化学構造と反応生成物の純度をチェックするために使われてきました。タンパク質と核酸の研究では、パルス法 NMR のためのより高いフィールドと新しいコンソールで高分解能超伝導磁石の出現、二重共鳴実験の発達、核オーバーハウザー効果の知的な使用が 2D NMR の導入で可能になりました。

新しいコンピュータプログラムの開発により、多数の構造パラメータの収集ができるようになり、最初の構造の解が 1980 年代前中期に NMR で決定されました。しかし、この方法では 10kDa から 15kDa までのタンパク質に限られ、このプロセスは非常に時間がかかりました。

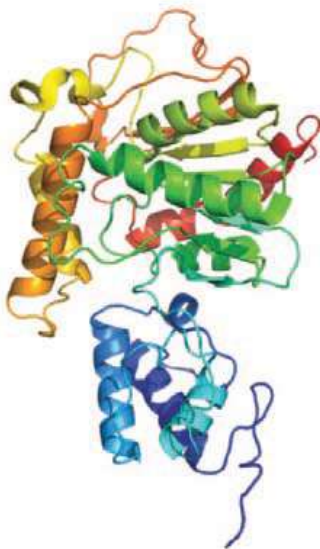
幸いにも、細菌発現システム<sup>1,2</sup> を用いて同位体標識タンパク質を製造する技術が開発されました。<sup>15</sup>N 標識タンパク質の利用が最初の大躍進を可能にしました。三次元 <sup>15</sup>N 分散 NOESY 実験では、信号分散とスペクトルの簡略化ですばらしい進歩を導きました。これにより、より大きな構造を、短時間でより高い精度で結果を得ることができるようになりました。<sup>15</sup>N・<sup>13</sup>C 標識タンパク質の日常的な製造へのアプローチはタンパク質ダイナミクスのまったく新しい分野も開きました。それ以来ずっと成功をおさめています。例えば酵素において、タンパク質がどのように振動するか、どのように機能するかについての新しい知見を供給してきました。

$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  標識タンパク質を製造することにより、形態から独立した連続アサインメントのための三重共鳴実験の開発を可能にしました。これらの実験はタンパク質 NMR の第 2 の大躍進を引き起こして、より信頼できて非常に効率的なアサインメントにしました。三重共鳴実験は今日タンパク質の全てのアサインメントの基礎になっています。

もう一つの大躍進は  $^2\text{H}_2\text{O}$  中での過剰発現タンパク質による重水素化の導入でした。そして、これによりプロトン希釈による共鳴の双極子広がり減らしを減らします。分光器使用術は測定のための  $\text{H}_2\text{O}$  中で重水素化されたタンパク質を溶解することにより再導入することができるアミドプロトンで基本的におこなわれました。アミドタンパク質の線幅の減少は劇的であり、これが紹介されたとき現場のみんなが興奮しました。重水素化は TROSY (横緩和最適化分光法) 実験の性能の鍵になる必要条件です。そして、これがもう一つの性能飛躍をもたらし、今日より大きなタンパク質のほとんど全ての NMR 研究に使われています。

重水素化されたタンパク質で、骨格アサインメントは、やや大きなタンパク質についても少し日常的な分析になっています。挑戦は、距離制約を測るために十分に多くの数のプローブを持つことです。このように、重水素化されたタンパク質への選択的にプロトン化された基の導入は、非常に重要になります。標識化のための前駆物質として  $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -ketoisovalerate と  $\alpha$ -ketobutyrate を使ったプロトン化された ILV メチルの導入は、最も有名です。ILV 標識化\*のほかに重水素化されたタンパク質にプロトン化された基を導入する広範囲にわたるアプリケーションがあります。最も洗練されたアプリケーションは距離測定のために多数のプロトンを維持している間に、双極子広がりを最小にする SAIL (Stereo-Arrayed Isotope Labeling) アプローチです。

図 1 37kDa EntF-T-TE di-domain<sup>5</sup> の構造



我々の研究所では、プロトン化された残基を少し持つ重水素化されたバックグラウンド中での ILV 標識の使用により、距離制約の主要な源が methyl-methyl と methyl-aromatic 接点に由来するいくつかの大きな構造を解明することができました。

唯一のプロトンとして amides からの methyl 信号の明確な分離がもっともな時間内で time-shared manner で multiple high-resolution 4D NOESYs を記録することを可能にしました。図 1 は最も大きな距離制約がこのような同位体標識サンプルから得られた enterobactin synthase 37 kDa EntF T-TE di-domain の構造を示しています。

最近の開発は、同位体の使用が NMR 分光法を強化する更なる可能性を探っています。これには、 $^{13}\text{C}$  と  $^{15}\text{N}$  の直接検出のために最適化される新しい低温プローブの出現を含んで

います。カルボニル炭素の直接検出のために最初に使われて、直接検出は炭素がプロトンより常磁性中心により近く観察される常磁性タンパク質に主として適しているように思われた。しかし、交替に  $^{13}\text{C}$ - $^{12}\text{C}$  標識化を使うと、直接に  $^{13}\text{C}$  検出がどんなタンパク質についても強力でありえることが、わかりました、LeMaster によって最初に記述されたように炭素源として  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$  または  $[1,3\text{-}^{13}\text{C}_2]$  glycerol を使うときに得られます。これは大多数の one-bond carbon-carbon couplings を除きます。さらにタンパク質を重水素化すると、炭素の共鳴は非常に鋭くなり、新しい long-range 相関関係は骨格と側鎖核を通して観察することができます。これは特にプロリンをアサインすることに特に関心を引き起こします。これはタンパク質の調節ドメインのリン酸化サイトに隣接してしばしば見つかりますが、従来の NMR 法ではキャラクタリゼーションが困難でした。同位体標識の将来の開発はこのアプローチを強化することにあります。

現在では、NMR 研究のための同位体標識タンパク質で最も大きいハードルは、真核生物または哺乳類の発現システムを用いて同位体標識タンパク質を効率的に生産する方法が不足していることです。関心がある多くの哺乳類タンパク質はジスルフィドを形成することに対するもののように真核細胞中に存在している折りたたむ機能が不足しているために細菌システムで発現するとき折り曲げられません。昆虫細胞、酵母または CHO (中国ハムスターの卵巣) 細胞の製造には特別な生長培地を用いることにより可能です、しかしプロセスはまったく効率的なものではありません。

タンパク質に比較して、核酸の NMR での同位体の利用は遅れています。低いプロトン密度のために、双極子の広がりについては、核酸で問題はより少ない。また、リンによる結合性は、大きな化学シフト異方性のため、能率が悪い。このように、アサインメントは主に NOE 相関関係で作られます。しかし、新しい標識法<sup>9</sup>と重水素化ヌクレオチドの挿入というまい使用法は大きな核酸の構造研究に相当な影響を与えました。

過去に同位体標識法が NMR の発達に大きな影響を与えたことを考えると、将来いままでと同じかより大きな役割を演ずることが予想されています。

\*ILV 標識化は高濃度に重水素化された環境で Ile<sup>δ1</sup>、Leu<sup>δ</sup>、Val<sup>γ</sup> 側鎖のメチル基にプロトンと  $^{13}\text{C}$  同位体を選択的に導入すること。

## References

1. LeMaster, D.M.; Richards, F.M. **1985**. Proton-nitrogen-15 heteronuclear

- NMR studies of *Escherichia coli* thioredoxin in samples isotopically labeled by residue type. *Biochemistry*, 24, 7263-7268.
2. McIntosh, L.P.; Dahlquist, F.W.; Redfield, A.G. **1987**. Proton NMR and NOE structural and dynamic studies of larger proteins and nucleic acids aided by isotope labels: T4 lysozyme. *J Biomol Struct Dyn*, 5, 21-34.
  3. LeMaster, D.M. **1989**. Improved large scale culture of *Methylophilus methylotrophus* for <sup>13</sup>C / <sup>15</sup>N labeling and random fractional deuteration of ribonucleotides. *Methods Enzymol*, 177, 23-43.
  4. Frueh, D.P.; Vosburg, D.A.; Walsh, C.T.; Wagner, G. **2006**. Non-uniformly sampled double-TROSY hNcaNH experiments for NMR sequential assignments of large proteins. *J Biomol NMR*, 34, 31-40.
  5. Frueh, D.P.; Arthanari, H.; Koglin, A.; Vosburg, D.A.; Bennett, A.E.; Walsh, C.T.; Wagner, G. **2008**. Dynamic thiolation-thioesterase structure of a nonribosomal peptide synthetase. *Nature*, 454, 903-906.
  6. LeMaster, D.M. **1996**. Protein Structure Refinement Using <sup>13</sup>C $\alpha$  Chemical Shift Tensors. *J Am Chem Soc*, 118, 9255-9264.
  7. Takeuchi, K.; Ng, E.; Malia, T.J.; Wagner, G. **2007**. 1-<sup>13</sup>C amino acid selective labeling in a 2H<sup>15</sup>N background for NMR studies of large proteins. *J Biomol NMR*, 38 (1), 89-98.
  8. Takeuchi, K.; Frueh, D.P.; Sun, Z.Y.; Hiller, S.; Wagner, G. **2010**. HNCA-TOCSYCANH experiments with alternate <sup>13</sup>C-<sup>12</sup>C labeling: a set of 3D experiment with unique supra-sequential information for mainchain resonance assignment. *J Biomol NMR*, 47, 55-63.
  9. Thakur, C.; Sama, J.; Jackson, M.; Chen, B.; Dayie, T. **2010**. Selective <sup>13</sup>C labeling of nucleotides for large RNA NMR spectroscopy using an *E. coli* strain disabled in the TCA cycle. *J Biomol NMR*, 48, 179-192.
  10. Lu, K.; Miyazaki, Y.; Summers M.F. **2010**. A topical issue: production and labeling of biological macromolecules for NMR investigations *J Biomol NMR*, 46, 113-125.