

## NMR研究のための高濃度重水素化されたタンパク質の In Vitro での合成

**Touraj Etezady-Esfarjani, Sebastian Hiller, Cristina Villalba, Kurt Wuthrich**

40kDa 以上の構造を持つポリペプチドの溶液NMR研究において、高レベルの重水素化が必要不可欠であるということはよく文献でも言及されている(Fiaux et al.,2002;LeMaster 1989;Pachter et al.1992)。タンパク質構造/機能研究に加えて、残基の選択的安定同位体標識を利用して高濃度重水素化のバックグラウンドを知ることは、タンパク質機能研究における大きな関心事となりうる。残念なことに、ほとんどの場合、生体内での<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O ベースの培地において発現されるタンパク質の収量は、H<sub>2</sub>O ベースの生長培地に比べてきわめて低い。それは、たとえ細胞の十分な養成期間を経たのちであっても同じである。

無細胞タンパク質合成は、生体内でのタンパク質発現で、同位体置換や同位体希釈が一般的に起こる状況の中でポリペプチド鎖に選択的に標識アミノ酸を効率的に取り込むことが可能になる(Kigawa et al.1995;Ozawa et al.2004;Waugh1996),そして、これらの利用はプロテアーゼまたはアポトーシスに関係するタンパク質のような有毒なタンパク質にまで拡張できる(Adrain et al.2006)。今までのところ、ユニフォーム重水素化タンパク質での無細胞タンパク質合成プロトコールは一般的に収量が低く、重水素化のレベルも不均一である。このアプリケーションノートは、無細胞合成方法についての Etazady らの研究(2007)をまとめたもので、<sup>2</sup>H と <sup>15</sup>N で標識したアミノ酸の取り込みのために H<sub>2</sub>O ベースと <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O ベースの両方での E.coli 細胞抽出物を用いている。14kDa の FK506-binding protein(FKBP) と GroEL,800kDa の 14 個の同じサブユニットを持つ E.coli シャペロニン低重合体タンパク質を、NMRにより調べた(Xu et al.1997)。

### 材料と方法

#### 無細胞タンパク質合成

バッチ法での FKBP と GroEL の分析スケールでの無細胞合成は標識されていないアミノ酸を使って、温度・塩類・アミノ酸濃度の反応条件を最適化するために使われた。それから最適化された条件は [U-<sup>2</sup>H 98%,U-<sup>15</sup>N 98%] -アミノ酸混合物(CIL Catalog #DNLM-6818) を用いて U-<sup>2</sup>H,U-<sup>15</sup>N-標識 GroEL の分取スケールでの合成に使われた。大きなスケールでの反応はバッチ法か、連続交換無細胞(CECF)タンパク質合成のどちらかで実行された。バッチ法と CECF 法で使われた栄養物組成は、各アミノ酸 1.5mM であった(Etazady et al.2007)。

#### NMRデータの収集

FKBP の 2D [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H] -NOESY 実験では、25°Cで、標準 3 重共鳴プローブヘッドを搭載した Bruker DRX600 spectrometer で記録された。タンパク質濃度は、0.8mM に調整された。

混合時間は  $\tau_m=100\text{ms}$  であった。

128 transients が 1 秒の interscan delay で加えられ、測定時間は計 20 時間であった。1024 の complex points が 128ms の取得時間で記録され、フーリエ変換前に FID は  $75^\circ$  シフトされた sine bell で掛け算され、2048 complex points をゼロで埋められた。 $\omega_1(^1\text{H})$ 次元で、256 complex points が 32ms の maximal evolution time で測定され、データは cosin 関数で掛け算され、フーリエ変換前に 512 complex points にゼロで埋められた。

無細胞発現により製造された GroEL のために、2D [ $^{15}\text{N},^1\text{H}$ ] -CRIPT-TROSY スペクトルが  $35^\circ\text{C}$  で標準トリプル共鳴プローブヘッドを搭載した Bruker Avance900 spectrometer で記録された。タンパク質濃度はモノマーで  $0.7\text{mM}$  であり、転送時間は  $T=1.4\text{ms}$  であった (Fiaux et al.2002)。4048 transients が 300ms の interscan delay で測定時間は計 4 日間であった。 $\omega_2(^1\text{H})$ 次元では、1024 complex points が取得時間 81ms で記録された。フーリエ変換前に FID は cosin 関数で掛け算され 2048 complex points をゼロで埋められた。 $\omega_1(^{15}\text{N})$ 次元で、100 complex points が 20ms の maximal evolution time で測定され、フーリエ変換前に、データは  $20^\circ$  シフトされた sine bell で掛け算され 256 complex points をゼロで埋められた。

生体内で調製された GroEL のための、2D [ $^{15}\text{N},^1\text{H}$ ] -CRIPT-TROSY 実験は以下を除いて無細胞調製と同じ条件で記録された：

実験は DRX750 spectrometer で記録され、タンパク質濃度はモノマーで  $1.9\text{mM}$  で 512 transients が加えられ、取得時間は 97 ms で、 $\omega_1(^{15}\text{N})$ -次元で maximal evolution time は 97 ms であり、測定時間は計 12 時間であった。

全ての実験で、ベースラインは direct dimension で IFLAT 法 (Bartels et al.1995) を用いて補正され、indirect dimension で 2 次多項式により補正された。

## 結果と議論

### 無細胞合成のための重水素化 S30 抽出物(D-S30)の調製

$^2\text{H}_2\text{O}$  中での細胞抽出物は最適化されたろ過手順を用いて妥当な緩衝液交換コストで得られた (Etazady et al.)。D-S30 細胞抽出物の分取規模の製造のために、2 の希釈ファクター6 回のろ過サイクルが使われ、98%以上の  $^2\text{H}_2\text{O}$  レベルの中で行われた。より多くのろ過サイクルは D-S30 抽出物は翻訳効率を減少させた。無細胞反応機構のその他の成分中の避けられない残余  $\text{H}_2\text{O}$  含有量にかかわらず、D-S30 ベースの反応混合物中の最終  $\text{H}_2\text{O}$  濃度は 5% 以下であった。D-S30 抽出物の翻訳効率は  $\text{H}_2\text{O}$  中での S30 抽出物の約 65%であった。最終ろ過工程の前の精製されたりボゾームで補われた 1D-S30 抽出物はリボゾーム補強なしで  $\text{H}_2\text{O}$  中での S30 抽出物の効率の約 85%まで合成反応が増加することになった。

### $\text{H}_2\text{O}$ と $\text{D}_2\text{O}$ の生長培地における FKBP の無細胞発現

図 1 と図 2 に、D-S30 細胞抽出物と  $\text{H}_2\text{O}$  ベースの S-30 抽出物を用いた in vitro で製造さ

れた FKBP の 2D[1H,1H]-NOESY スペクトルを示しています。これらと他の NMR 実験により  $\alpha$ -と  $\beta$ -の位置での一部のプロトン付加が確認された。アミノ酸の逆プロトン付加率の予測が表 1 です。

### DS-30 抽出物の GroEL の合成

非標識または高濃度重水素化されたアミノ酸を用いた GroEL の合成のための新しい DS-30 抽出物の翻訳効率は同じであった。DS-30 の重水素化されたアミノ酸から合成された GroEL の MS 分析は約 95%の重水素化レベルを示した。

DS-30 抽出物で合成された 2D[<sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H]-CRIPT-TROSY と *in vitro* で発現された GroEL のスペクトルが図 3 に示すように同じであり、生物学的に活性がある 14 量体の無細胞で合成された GroEL モノマーが正しい集合をできていることが分かりました。

違いとしては図 3 b の赤で囲んだ部分でのピークの差異が認められ、*in vitro* で製造された GroEL の C-末端ポリペプチドの自由度が減少していることを示しています(Etazadi, et al 2007)。

### 結論

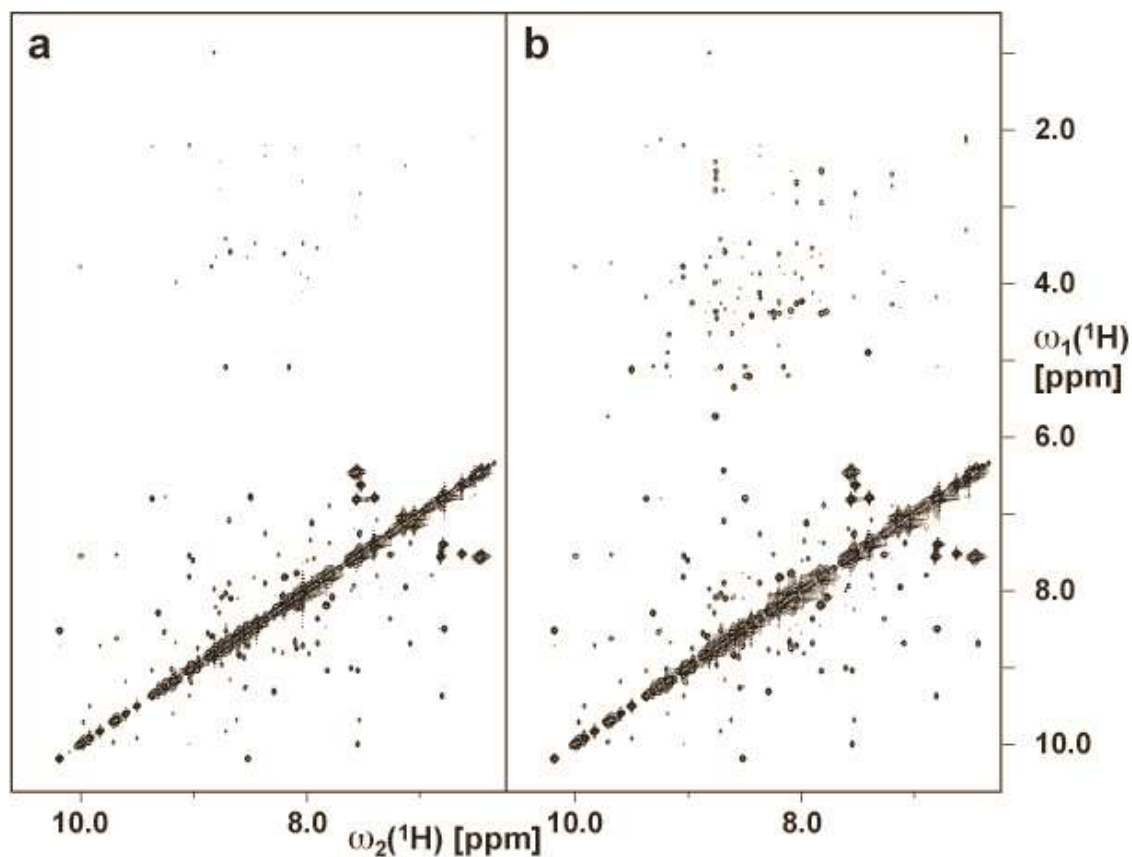
CIL 製[U-<sup>2</sup>H98%,U-<sup>15</sup>N98%]-標識アミノ酸を使った <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O ベースの E.coli 細胞抽出物は全ての安定な水素原子位置の高い重水素化レベル(例えば 95%)でタンパク質の効率的な生産ができる方法が開発された。このアプローチで、高濃度重水素化タンパク質の *in vitro* での合成は経済的に実行可能になるだろう。高濃度重水素化タンパク質の製造に加えて、プロトコールはより高度な同位体標識計画のために適応できるかもしれない、他の技術では容易に適用できないでしょう。例えば、ユニフォームの <sup>2</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>14</sup>N-バックグラウンド上にタンパク質中の独立の <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-標識アミノ酸タイプの選択的な混入は薬の発見と薬設計プロジェクトで実際的なアプリケーションとして酵素や受容体タンパク質の活性部位をスクリーニングするための新しい展望を開くことができた。E.coli 抽出物でここで用いられたアプローチはその他の無細胞システムでも原理的に適用できる、例えば、真核細胞たんぱく質製造のための小麦の胚または昆虫細胞の抽出物で。

表 1

Amino Acids	Relative degree of $\alpha$ and $\beta$ -back -protonation <sub>a</sub>
Asp, Asn, Gln, Glu	very high
Ala, Cys, Gly, Phe, Ser, Trp, Tyr	high
Arg, Ile, Leu, Lys, Val	medium
Thr, His, Met	low

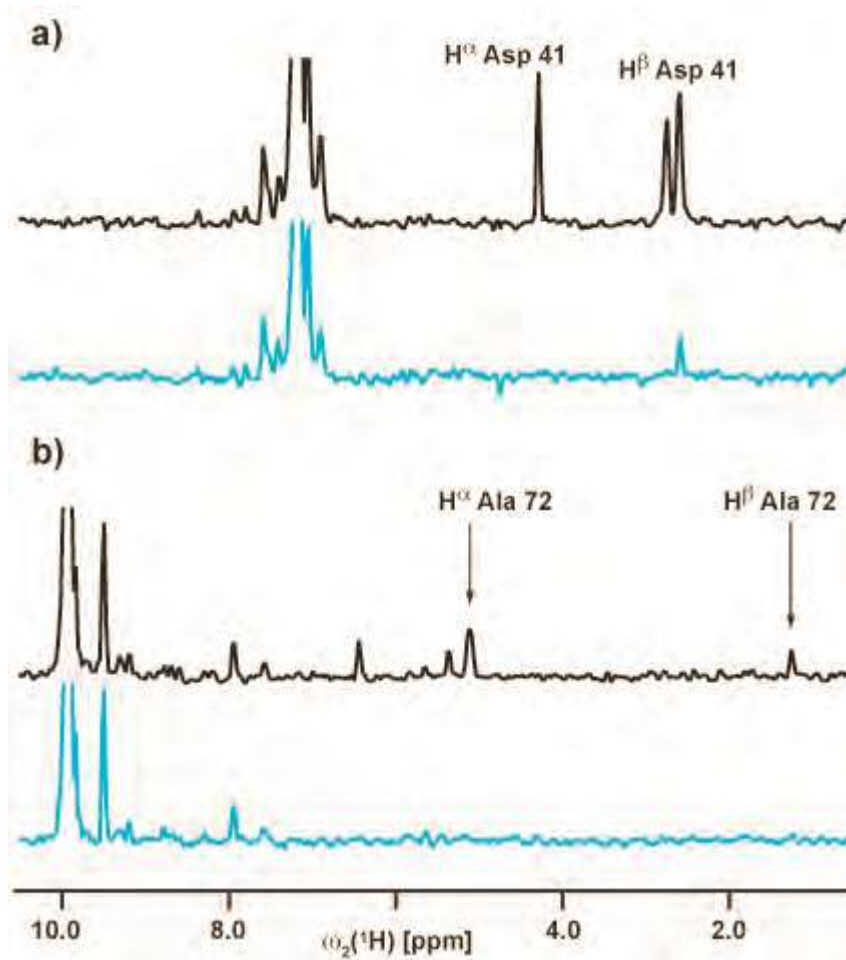
H<sub>2</sub>O ベースの生長培地で高濃度重水素化されたアミノ酸を用いた無細胞タンパク質合成での  $\alpha$ -と  $\beta$ -位置でのアミノ酸依存の逆プロトン化。タンパク質濃度は両方とも 800  $\mu$ M で測定は 23°C で、100ms の混合時間で実行され、2つのスペクトルが記録され同一の処理がされた。

図 1



D-S30 細胞抽出物(a)か H<sub>2</sub>O ベースの S30 抽出物(b)のどちらかを用いて *in vitro* で製造された FKBP の 600MHz 2D [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H] -NOESY スペクトルの比較により検出された FKBP の *in vitro* 合成中での高濃度重水素化アミノ酸の逆プロトン化。タンパク質濃度は両方のサンプルとも 800  $\mu$ M, 測定は 23°C、100ms の混合時間で実行され、2つのスペクトルが同一に処理され記録された。

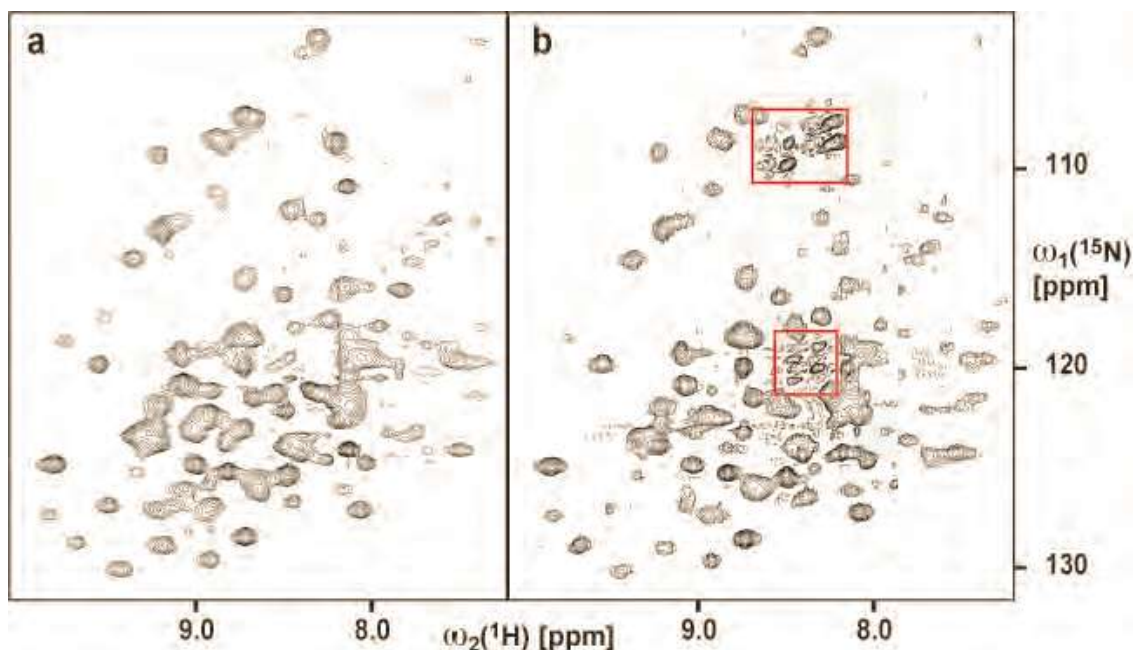
図 2



FKBP について記録された図 1 中の 2D  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY 実験で取られた 1D 横断面の比較によって検出されたアミノ酸の特異的な逆プロトン化。(a) Asp 41, (b) Ala 72. カラーコード：黒、 $\text{H}_2\text{O}$ -based S30 細胞抽出物中で調製されたサンプル；シアン、D-S30 細胞抽出物中での合成。両実験で、 $\text{U-}^2\text{H}$  98%,  $\text{U-}^{15}\text{N}$  98% アミノ酸が反応混合物中で使用された。



図 3



ユニフォーム  $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -標識 GroEL の 2つの異なるサンプルの 2D [ $^{15}\text{N},^1\text{H}$ ]-CRIPT-TROSY NMR スペクトル(Fiaux et al.2002;Riek et al. 2002). (a) E.coli 細胞中で *in vitro* で発現されたタンパク質 (b) D-S30 抽出物で *in vitro* に合成されたタンパク質。スペクトル(b)中で赤い長方形のハイライトしている 2つのスペクトル部分は本文中で論じられた 2つのスペクトルの間の局所の違いが確認できます。

#### 参考

Adrain C, Duriez PJ, Brumatti G, Delivani P, Martin SJ (2006) The cytotoxic lymphocyte protease, granzyme B, targets the cytoskeleton and perturbs microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem* 281: 8118-8125.

Bartels, C., Guntert, P. and Wuthrich, K. (1995) *J Magn Reson A* 117: 330–333. IFLAT – A new automatic baseline-correction method for multidimensional NMR spectra with strong solvent signals.

Etezady-Esfarjani T, Hiller, S, Villalba, C., Wuthrich, K (2007) Cell-free protein synthesis of perdeuterated proteins for NMR studies. *J Biomol NMR* 39: 229-238.

Fiaux J, Bertelsen EB, Horwich AL, Wuthrich K (2002) NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature* 418: 207-211.

Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S (1995) Cell-free synthesis and amino acidselective stable isotope labeling of proteins for NMR analysis. *J Biomol NMR* 6: 129-134.

LeMaster DM (1989) Deuteration in protein proton magnetic resonance.

Methods Enzymol 177: 23-43.

Ozawa K, Headlam MJ, Schaeffer PM, Henderson BR, Dixon NE, Otting G (2004) Optimization of an Escherichia coli system for cell-free synthesis of selectively  $^{15}\text{N}$ -labeled proteins for rapid analysis by NMR spectroscopy.

Eur J Biochem 271: 4084-4093.

Pachter R, Arrowsmith CH, Jardetzky O (1992) The effect of selective deuteration on magnetization transfer in larger proteins. J Biomol NMR 2: 183-194.

Riek R, Fiaux J, Bertelsen EB, Horwich AL, Wuthrich K (2002) Solution NMR techniques for large molecular and supramolecular structure. J Am Chem Soc 124: 12144-12153

Waugh DS (1996) Genetic tools for selective labeling of proteins with  $\alpha$ - $^{15}\text{N}$ -amino acids. J Biomol NMR 8: 184-192.

Xu Z, Horwich AL, Sigler PB (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP) $_7$  chaperonin complex. Nature 388: 741-750.