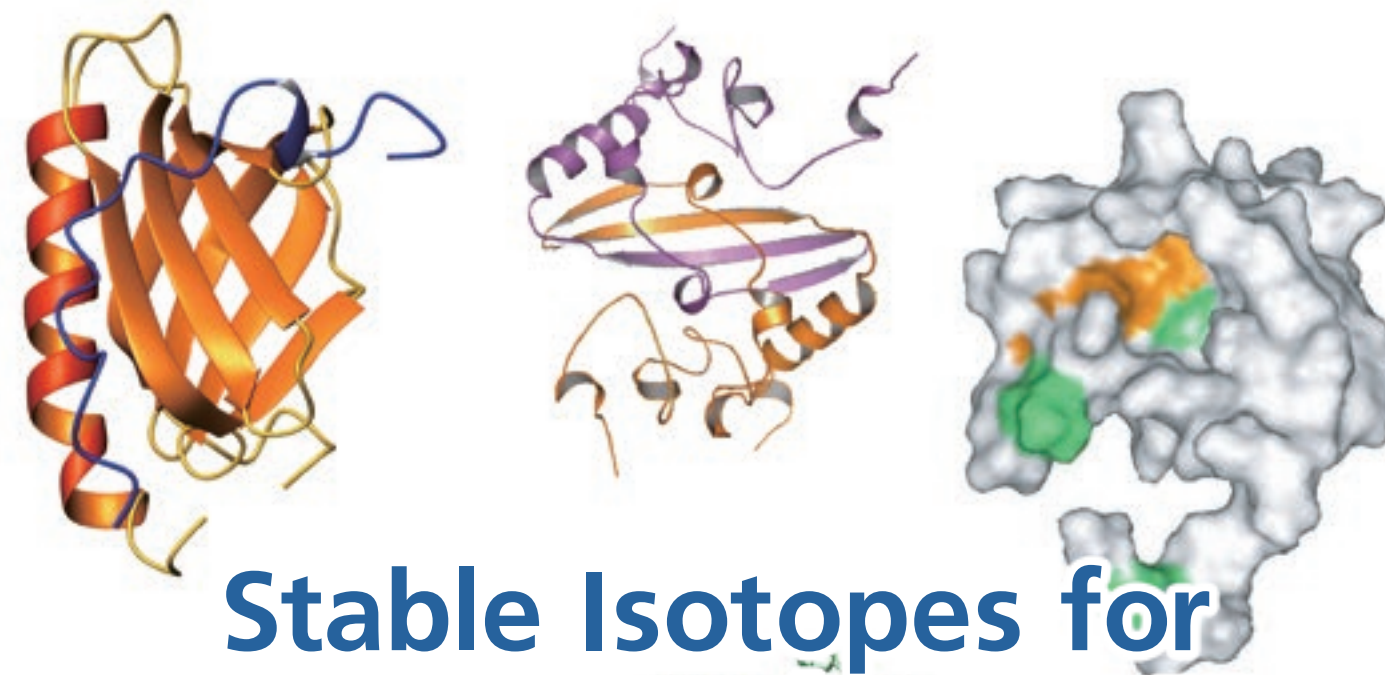
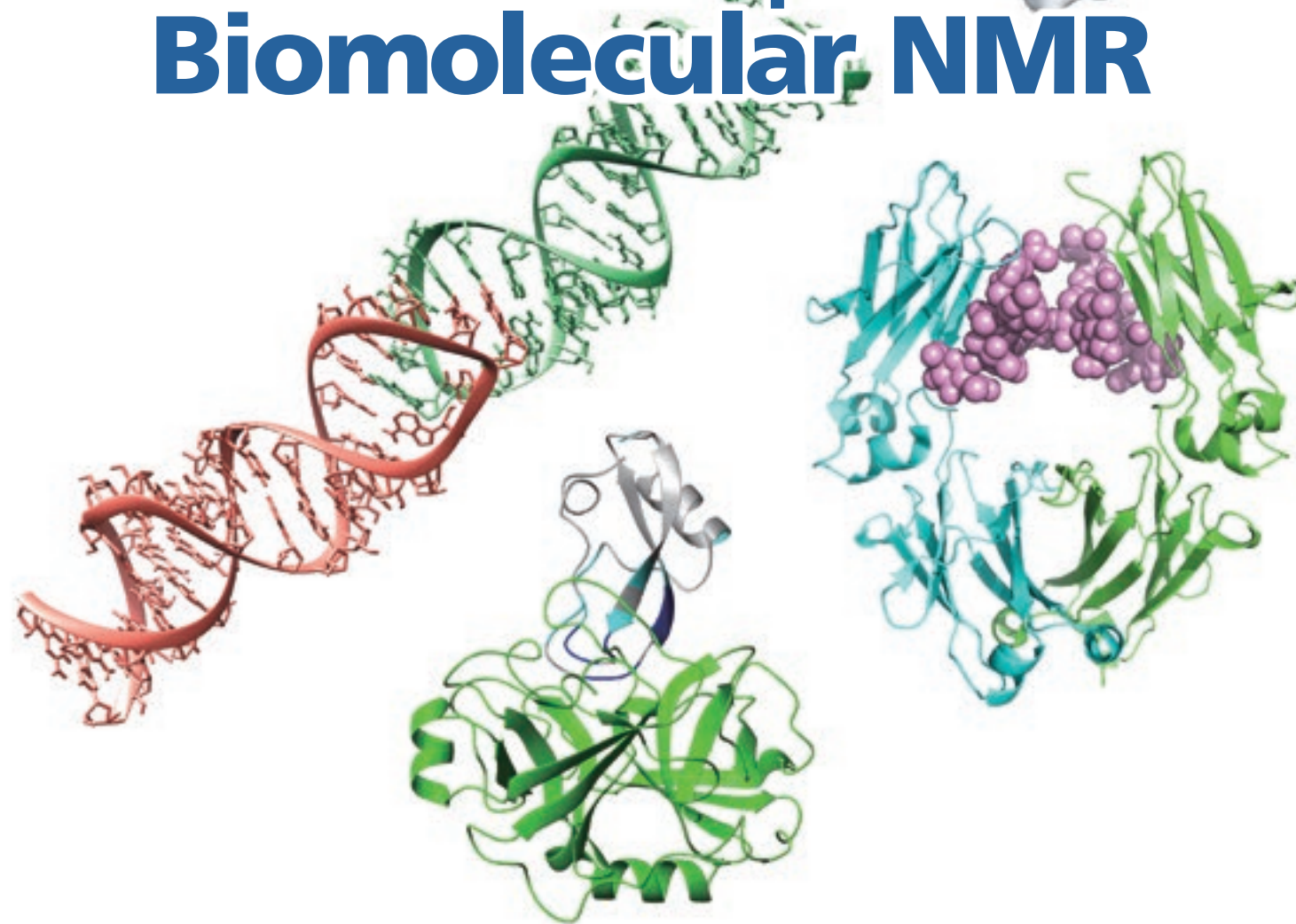




Stable Isotopes for Biomolecular NMR



ご挨拶

平素より、大陽日酸の安定同位体をご愛顧いただき、厚くお礼申し上げます。

このたび、Biomolecular NMR 専門の安定同位体カタログを発行することとなりました。

近年、生命科学分野において、核磁気共鳴法(NMR)は、生体分子の構造や相互作用を解析する手法として発展してきました。特に、生体分子試料を安定同位体標識する技術の高度化で、NMRのアプリケーションはさらに広がりを見せています。

本カタログでは、日本を代表する先端研究者の皆様に、Biomolecular NMR 研究における安定同位体利用技術についてご寄稿いただきました。これにあわせて、各種安定同位体(アミノ酸、ケト酸、核酸、培地等)やタンパク質合成キットをご紹介します。本カタログが、Biomolecular NMR 研究にたずさわる皆様の一助になることを確信しております。この場をお借りして、ご寄稿いただきました先端研究者の皆様に深く感謝いたします。

大陽日酸は、無細胞タンパク質合成キット「無細胞くん」をはじめとして、SAILテクノロジー製「SAILアミノ酸」、ISOTEC®製「D、¹³C、¹⁵N 標識化合物」等の幅広い品ぞろえで、Biomolecular NMR 研究に貢献してまいります。今後とも、大陽日酸の安定同位体をご愛顧いただきますよう、よろしくお願いいたします。

2015 年 6 月

大陽日酸株式会社
メディカル事業本部
SI 事業部

目次

ご挨拶	P1	■ 糖タンパク質の安定同位体標識	P25
安定同位体標識技術が拓く Biomolecular NMR	P2	加藤晃一（自然科学研究機構）	
巻頭言 荒田洋治	P3	■ 培地	
■ 無細胞タンパク質合成を用いる安定同位体標識	P5	● 標識培地 ISOGRO®	P27
木川隆則（理化学研究所）		● 標識培地用試薬	P27
■ タンパク質合成キット「無細胞くん」		■ 糖	P28
● 無細胞くん	P8	■ 安定同位体標識核酸を用いた NMR 解析	P29
● 無細胞くん用安定同位体標識アミノ酸	P8	河合剛太（千葉工業大学）	
● 特徴	P9	■ 核酸	
■ アミノ酸	P11	● DNA	P31
■ SAIL 法により広がるタンパク質 NMR の未来	P14	● RNA	P31
甲斐荘正恒（東京都立大学）		● 安定同位体標識 DNA/RNA 受託合成	P31
■ SAIL アミノ酸	P18	■ タンパク質とタンパク質や核酸等との相互作用	P32
■ メチル標識アミノ酸、芳香族標識アミノ酸	P19	西村善文（横浜市立大学）	
■ 膜タンパク質機能解明における安定同位体の利用	P21	■ 各種安定同位体標識試薬	
幸福裕、嶋田一夫（東京大学）		■ FMOC アミノ酸	P35
■ α-ケト酸		■ BOC アミノ酸	P36
● 2-Ketobutyric acid	P23	■ Water- ¹⁷ O	P36
● 2-Keto-3-methylbutyric acid	P24	■ バッファー、界面活性剤、還元剤 他	P37
		■ ユビキチン	P37
		■ ファージ	P37

<記号説明> ㊚㊛…… 毒物および劇薬取締法に基づく該当品目
㊜…… 労働安全衛生法に適用された品目

安定同位体標識技術が拓く Biomolecular NMR

タンパク質の立体構造、動態あるいは相互作用などを原子レベルで解析可能な NMR 法は、生命科学、医学および薬学などへの学術的意義に留まらず、医薬品、食品および環境関連分野を含む幅広い産業分野において不可欠な基盤技術へと発展してきました。特に最近では、創薬ターゲットとして膜タンパク質、抗体、糖タンパク質、核酸およびそれらの複合体などの重要性が高まっており、これらを対象とした NMR 測定・解析が盛んに行われております。しかしながら、これらの解析対象は、分子量の大きさに起因する NMR シグナルの広幅化や縮重などの問題に加えてサンプルの調製自体も難しく、解析に資する NMR スペクトルを得る事が困難な場合が多いのが現状です。

タンパク質の高分子量化に伴う広幅化や縮重に対する解決法として、高分子量タンパク質中のメチル基を観測対象とした Methyl-TROSY 法が広く利用されております。この Methyl-TROSY 法では、タンパク質中の特定のメチル基のみを観測可能にするメチル基選択的な安定同位体標識タンパク質を測定サンプルとして使用します。この技術では、安定同位体標識されたアミノ酸前駆体を大腸菌発現系などの培地に添加することにより、アミノ酸生合成経路を利用して系中においてメチル標識イソロイシン、ロイシン、バリンを合成し、これらの合成されたメチル標識アミノ酸がタンパク質合成に利用されることによりメチル選択的安定同位体標識タンパク質試料が調製されます。最近では化学合成された立体選択的メチル標識バリンやロイシンなどの遊離アミノ酸を各数十 mg/L 程度培地に添加することにより、タンパク質中のバリン残基の γ 1、 γ 2 あるいはロイシン残基の δ 1、 δ 2 のメチル基を立体選択的に標識する技術も開発されました。またアラニン、メチオニン、トレオニンなどのアミノ酸においても同様に、それらのメチル基を安定同位体標識したアミノ酸を用いることにより、これらのアミノ酸残基側鎖のメチル基を同位体標識したタンパク質の調製が可能です。

NMR 用の安定同位体標識タンパク質調製技術としては、無細胞タンパク質合成法が大腸菌発現系と並んで広く利用されるようになってきました。無細胞タンパク質合成系は、大腸菌系では発現が困難な細胞毒性を有するタンパク質の調製が可能であるという利点に加え、少量の標識アミノ酸を代謝拡散させずに目的のタンパク質に組み込ませることも可能なため、メチル標識技術をはじめ SAIL (Stereo-Array Isotope Labelling ; 立体整列同位体標識) 法などの特定のアミノ酸残基側鎖の位置・立体選択的安定同位体標識に最適なタンパク質合成法としても利用されております。

一方、核酸や糖タンパク質などは、解析対象としての重要性は理解されているものの、無細胞系や大腸菌系を用いた方法では安定同位体標識サンプルを調製することは困難な為、現在まで様々な安定同位体標識技術の研究が進められてきました。核酸の安定同位体標識においては、酵素合成法や安定同位体標識アミダイトユニットを用いた化学合成法による安定同位体標識技術が報告されており、これらに使用する様々な安定同位体標識核酸が市販されております。また糖タンパク質においては、動物細胞、昆虫細胞、酵母など様々な真核細胞発現系を利用した代謝標識技術が極めて有効であり、これらに使用する代謝前駆体の安定同位体標識の研究開発や製品化が展開されております。

Biomolecular NMR が今日の発展を遂げた背景には、過去半世紀にわたり積み重ねられた NMR 研究者による多大な安定同位体標識技術の研究成果が大きな基盤となっております。大陽日酸は、このような安定同位体標識技術の研究成果の普及を通じて、最先端の NMR 研究環境の整備や幅広い NMR 応用研究の支援に努めてまいります。

巻頭言

安定同位体と構造生物学

何ごとにも、歴史がある。石器時代があつて現代がある。

NMRの石器時代については、2011年4月、【NMR50年 I-V】をブログに書いた。
http://yojiarata.exblog.jp/12459664/

1960年、藤原鎮男先生の門を叩く。

ある時、「これを使いなさい」のお言葉と共に、 β 位の2個の水素原子のうちの1個が選択的に重水素化されているアスパラギン酸を渡された。例によって、どのように使いなさいとは、一切口にされない。

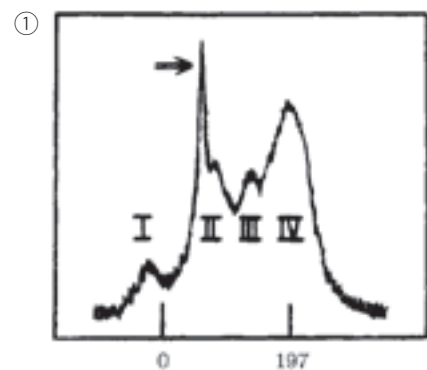
小さく細いガラスのチューブに“アスパラギン酸”は入っていた。今にして思えば、これが我が人生の岐路であった。

“アスパラギン酸”は、次の流れで私の手に渡ったことをあとで知った。

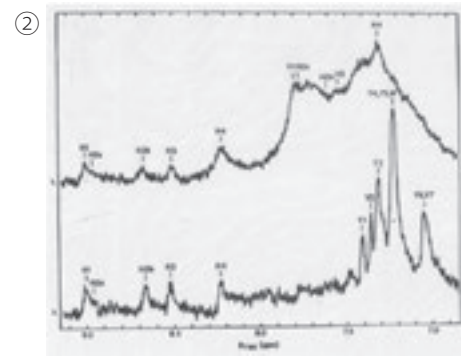
藤原鎮男(電気通信大学、当時)←田宮信雄(東京医科歯科大学、当時)←竹西忠男(味の素)←甲斐荘正恒(味の素、当時)

藤原研で、アミノ酸のNMRの測定を中心に研究を進めていた頃、アミノ酸どころかタンパク質のスペクトル①が、すでに、1957年のJACSに掲載されていることを知った。このスペクトルを見た私のような凡人の頭には、hopelessという言葉しか浮かばなかった。

しかし、これをhopelessと捉えない人物がいた。Oleg Jardetzkyである。祖国から、ナチス・ドイツの侵攻を逃れて渡米、Minnesota大学医学部で学位を取得、CaltechのLinus Paulingのポスドクになった。その後、Paulingとの親交は終生続くことになる。



① Saunders, M., Wishnia, A., Kirkwood, J. G. The nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease. J. Am. Chem. Soc., **79**, 3289-3290, (1957)



② John Markley 博士の博士論文より引用。Staphylococcus Aureusの生産するヌクレアーゼの芳香族領域の100MHz ¹H NMRスペクトル、フェニルアラニンは全重水素化されている。ヒスチジンのイミダゾール環の4位、チロシンのフェノール環の3位および4位は重水素化されている。



重水中で緑藻を培養中
(Jardetzky研究室, 1972年12月撮影)



重水100リットルの巨大なドラム缶
(Jardetzky研究室, 1972年12月撮影)



同じ頃、藤原先生から、「大切に使うように。」のお言葉とともに渡された重水1ミリリットル、余りの勿体無さのため、棚に飾ったまま未使用(後日、撮影)。

Jardetzkyのナチス・ドイツに対する怨念は渡米後も消えることがなかった。1986年、ドイツのTodtmoosで開かれた第XII回ICMRBSの招待講演者から外されたことに対する怒りの手紙を、学会主催者のHausser教授に送り、それに留まらず、コピーを多数の研究者にも送った。私もその手紙を受け取ったことから見て、世界中の研究者がこの手紙の内容を知るところとなったことは間違いない。この件以来、Jardetzkyは世界中のNMRコミュニティから孤立することになった。私の個人的な感想を言えば、鬼才を“失った”ことは如何にも残念である。タンパク質の選択的重水素化を世界で最初に始めたのもJardetzky。M. Cohen、R. G. Shulmanと共にICMRBS(1964年7月20-22日。ボストン)を立ち上げたのもJardetzkyだからである。

Jardetzkyは、Harvard大学医学部の助教授に就任後、独自にタンパク質のNMR研究を進めたのち、職を辞し(いつものように、一言多いのが災いしたと聞いた)、メルク社のNMR部門の所長として、タンパク質の選択的重水素化という大プロジェクトを立ち上げた。数年を要したこのプロジェクトの中心にいたのがHarvard以来の“凸凹コンビ” Oleg Jardetzky + John Markleyだった。最初の論文が、1968年のサイエンスに掲載された。培養技術と有機化学の融合による画期的な成果だった。(スペクトル②)

1971年1月、私は、Stanford University Medical Centerの分子薬理学研究室を主宰するJardetzky教授のポスドクになった。36歳のポスドクは気の毒だといって、教授会で、私を“客員助教授”に推挙してくれた。給与も上がり、有難かった。

医学部のANATOMYの看板が、STRUCTURAL BIOLOGYと書き換えられたのが丁度その頃だったと記憶している。Lubert StryerがYaleから招かれ、1976年、構造生物学センターの初代所長に就任した。

注目する特定の水素、炭素、窒素原子にピントを合わせ、“生きた”生体高分子を生きたまま見る。これは、NMRにしかできないことである。

現在では、この冊子に記述されているように、レベルの高い研究が日本でも活発に行われている。

今や、最新鋭のNMR分光計が揃った。若者よ、あとは実行あるのみだ！

平成27年5月31日

東京大学名誉教授

荒田 洋治

無細胞タンパク質合成を用いる安定同位体標識

木川隆則

理化学研究所
生命システム研究センター
チームリーダー



■ 緒言

近年、無細胞タンパク質合成系 (Cell-Free protein synthesis system、以下 CF) の技術の進展により、様々な真核生物および原核生物のタンパク質を大量に生産することが可能となった。大腸菌、ウサギおよびコムギ胚芽細胞抽出液を CF 反応液として用いる従来の系に加え、真核細胞抽出液を用いる新しい系が開発されるなど、多様な発現環境でタンパク質を得ることが可能となっている。一方、今世紀に入り、ヒトゲノムの解析が完了した結果、その機能としてのタンパク質の網羅的解析に科学的興味が増え、膨大な数のタンパク質試料を効率的かつ迅速に調製する必要性が高まった。CFは、自動化やハイ・スループット発現に容易に適用できるため、そのような必要性に応える最適な技術として、構造ゲノミクスおよびプロテオミクス・プロジェクトで利用され (Yokoyamaら、2003)、最も有用なタンパク質発現方法のひとつとして広く認められるようになった。現在、理化学研究所の構造生物学研究では、大腸菌細胞抽出液に基づく転写・翻訳共役 CF が標準的なタンパク質発現方法の一つとなっており、タンパク質およびタンパク質ドメインの1,300を超えるNMR構造と250を超えるX線結晶解析構造が決定されている。

■ タンパク質の大量生産

当初、CFではタンパク質を大量生産できないという問題があった。しかしこれは、CFの技術革新である連続交換法の開発 (Spirinら、1988) や反応条件の最適化 (Yabukiら、1998) 等により解決された。現在では、大腸菌細胞抽出液を CF 反応液として用いた連続交換法によって容易にタンパク質を大量生産することが可能となっている。連続交換法すなわち透析式 CF は、小量生産から大量生産まで最も普及している反応様式である (Kigawaら、2007)。透析膜内部の CF 反応液 (内液) を、

アミノ酸類やヌクレオチド三リン酸などの転写および翻訳の基質を含む外部溶液 (外液) に対して透析する。反応時間は数時間から一晩程度であり、CAT タンパク質の実施例では、10時間反応で反応混合物 1mL あたりタンパク質 7mg を超える生産となった (Kigawaら、2007)。1mL 内液 / 10mL 外液から 9mL 内液 / 90mL 外液までの反応スケールにおいて、反応液量に対する透析膜表面積の比率を最適化することで、反応液当たりの生産性を同等に維持できる。

CFでは、PCRにより増幅された直鎖状 DNA 断片を鋳型としてタンパク質を生産できる。そのため、遺伝子クローニングが不要であることが大きなメリットの一つとなっている。理化学研究所は、大腸菌細胞の培養温度をやや低い範囲 (20 ~ 34°C) にする細胞抽出液調製プロトコルにより、細胞抽出液中の直鎖状 DNA 分解活性を大幅に抑制することを見出し、それにより、透析系を用いる大スケールの生産であっても、PCR 増幅鋳型を用いて十分な生産性を実現することに成功した (Sekiら、2008)。

■ 自動化

前述のように、CFは自動化やハイ・スループット発現に容易に適用できる。そのメリットを最大限に活用するため、全自動 CF 装置が様々な機関で開発されている。理化学研究所では、1) タンパク質の発現確認を 768 試料同時に 9 時間以内で実施する装置 (鋳型作成のための PCR 反応 (Yabukiら、2007)、バッチ式 CF 反応 (30 μ L)、GFP 融合産物の蛍光測定 (Kigawaら、2007)、等の機能を有する)、2) タンパク質を 96 種類大量に半日で調製する装置 (透析式 CF (内液 1mL)、アフィニティ精製、等の機能を有する (Aokiら、2009))、を開発した。約 20,000 種類のタンパク質試料を、PCR 増幅直鎖状 DNA 鋳型を用いる透析法 CF により調製し、それらの NMR スペクトルの測定に成功した (Kigawaら、2007)。

■ 均一安定同位体標識

タンパク質の安定同位体 (stable isotope、以下 SI) 標識は、CF 反応液中の対象アミノ酸を SI 標識したものと置き換えることにより行う。一般に CF では、効率的な翻訳のためにカリウムイオンが必要であり、通常、カリウムイオン源として L-グルタミン酸カリウムが使用される (Kigawaら、1995)。しかし、高濃度の SI 標識されていない L-グルタミン酸カリウムの存在は SI 標識率を著しく低下させることとなる。そこで、高い SI 標識率を維持したうえ、生産性の高い CF を実現するために、カリウムイオン源として D-グルタミン酸カリウムを用いる CF (D-Glu 系) が開発された (Matsudaら、2007)。理化学研究所では、この D-Glu 系を用いて、ヒト、マウスおよびシロイヌナズナなどの高等真核生物由来の 1,000 を超える $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -均一標識タンパク質が調製されている。これらのタンパク質の NMR スペクトルは、高い SI 標識率で、これまでにない質を有していた。また、NMR 分光法における分子サイズの限界を広げることが期待される立体整列同位体標識 (Stereo-Array Isotope Labeling, SAIL) 法 (Kainoshoら、2006) は、CF による「均一」SI 標識の応用のひとつとして注目される。

通常、均一 SI 標識には、単離された SI 標識アミノ酸 1 ~ 20 種類が用いられるが、そのコストは高額となることが多い (Kigawaら、2010)。このコストを低減するためには、それらを用いる代わりに、SI 標識藻類由来タンパク質バイオマスの酸加水分解物から生産される、より安価な SI 標識藻類加水分解アミノ酸混合物 (algal amino acid mixture, AAAM) を使用することが推奨される。しかしながら、加水分解アミノ酸混合物 (アミノ酸 16 種類) には含まれておらず、はるかに高価な SI 標識アスパラギン、グルタミン、システインおよびトリプトファンが必要となる (Kigawaら、1999)。そのため、CF を用いる SI 標識のコストはこの 4 つの酸分解アミノ酸に大きく依存する。そこで、内在性代謝による変換をうまく利用することにより、CF 反応の際に SI 標識 AAAM、SI 標識インドールおよび硫化ナトリウムなどの安価な原材料からこれらの 4 つのアミノ酸を生成する (Yokoyamaら、2010) ことにより、単離された SI 標識アミノ酸 20 種類を使用する従来の場合と比べて、コストが大幅に削減された。

一般に、均一重水素 (^2H) 標識は、より分子量の大きなタンパク質の解析に利用されている。生細胞を用いた従来のタンパク質生産では困難な均一重水素標識が、均一重水素化標識アミノ酸を用いる CF により実現された (Etezady-Esfarjaniら、2007)。ただし、反応液に軽水 ($^1\text{H}_2\text{O}$)

を用いる従来の CF では、特定のアミノ酸の α -位および β -位において軽水素 (^1H) による重水素希釈が起こるために、大腸菌細胞抽出液をはじめとするすべての試薬を、重水 ($^2\text{H}_2\text{O}$) を用いて調製する必要があった。一方、アミノ酸における軽水素との交換は、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 要求性酵素により触媒されることが報告されている。これに着目し、PLP 要求性酵素の阻害剤を加えることにより、均一重水素標識アミノ酸を用いて、反応溶液に軽水を用いた CF によって、均一重水素標識タンパク質を調製、95atom% 以上の重水素標識率を達成した (Yokoyamaら、2011)。

■ アミノ酸選択的安定同位体標識

アミノ酸選択的 SI 標識は、NMR 低感度およびスペクトル重複という問題を解決するために広く用いられており、さらに、高分子量タンパク質とそれらの複合体を解析するために不可欠なものとなっている。一般の CF では、アスパラギン酸、アスパラギン、セリンおよびアラニンなどの特定のアミノ酸を除くほとんどすべての種類のアミノ酸の選択的標識を可能にするが、わずかな同位体スクランプリングおよび希釈を伴う (Kigawaら、1995)。CF の内在性代謝反応を、それらの化学阻害剤であるアミノオキシ酢酸、D-リンゴ酸、L-メチオニンスルホキシイミン、S-メチル-L-システインスルホキシイミン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、および 5-ジアゾ-4-オキソ-L-ノルバリンを用いて抑制することで、正確かつ完全なアミノ酸選択的標識が実現された (Yokoyamaら、2011)。SI 標識の正確さと完全性が、新しく開発された SI 標識戦略にとって有用であるため、この、スクランプリングおよび標識の希釈の起こらない SI 標識技術は、大きく複雑な生体系の NMR 解析に大きく貢献するであろう。アミノ酸代謝の抑制もまた標識効率を高める一因となり、SI 標識のコスト低減に貢献することが期待される。

イソロイシン、ロイシンおよびバリン残基のメチル基の選択的プロトン化もまた、NMR 分光法における分子量限界を高めた (Tugarinov および Kay、2003)。近年我々は、CF により調製された、メチル基を選択的にプロトン化した試料を用いて、約 400 残基のタンパク質の構造決定に成功している。

■ 部位特異的安定同位体標識

部位特異的 SI 標識は、関心部位のある特定のアミノ酸残基の観測およびシグナル帰属を大幅に簡素化する

本文は「ISOTEC® Stable Isotopes in vitro Protein Expression Kit (iPE)」への寄稿文を翻訳したものです。

ため、巨大タンパク質の局所構造およびタンパク質間相互作用の解析等において有用である。アンバー（コドン UAG）サプレッションを用いるCFにより、非天然アミノ酸の部位特異的取り込みが行われた（Norenら、1989）。我々は、ほぼ同じ方法を用いることにより、SI標識チロシンのRas タンパク質への部位特異的（Tyr³²）導入とその¹H-¹⁵N HSQC スペクトルの測定に成功した（Yabukiら、1998）。チロシン以外のSI標識アミノ酸の部位特異的な取り込みも、アミノアシル化されたサプレッサー tRNAの利用により可能である。

■膜タンパク質

現在、CFは、従来のin vivo生産の主要な制限を克服するための、構造解析用膜タンパク質の生産に適切な方法

参考文献

1) Yokoyama, S. (2003) Protein expression systems for structural genomics and proteomics. Curr. Opin. Chem. Biol., **7**, 39-43.
2) Yabuki, T., Kigawa, T., Dohmae, N., Takio,K., Terada, T., Ito,Y., Laue, E., Cooper, J., Kainosho, M.and Yokoyama, S. (1998) Dual amino acid-selective and site-directed stable-isotope labeling of the human c-Ha-Ras protein by cell-free syntesis. J. Biomol. NMR, **11**, 295-306.
3) Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y. and Alakhov, Y. B. (1988) A Continuous Cell-Free Translation System Capable of Producing Polypeptides in High Yield. Science, **242**, 1162-1164.
4) Kigawa, T., Matsuda, T., Yabuki, T. and Yokoyama, S. (2007) In Spirin, A. S. and Swartz, J. R. (eds.), Cell-free Protein Synthesis Methods and Protocols. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 83-97.
5) Seki, E., Matsuda, N., Yokoyama, S. and Kigawa, T. (2008) Cell-free protein synthesis system from Escherichia coli cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation. Anal. Biochem., **377**, 156-161.
6) Yabuki, T., Motoda, Y., Hanada, K., Nunokawa, E., Saito, M., Seki, E., Inoue, M., Kigawa, T. and Yokoyama, S. (2007) A robust two-step PCR method of template DNA production for high-throughput cell-free protein synthesis. J. Struct. Funct. Genomics, **8**, 173-191.
7) Aoki, M., Matsuda, T., Tomo, Y., Miyata, Y., Inoue, M., Kigawa, T. and Yokoyama, S. (2009) Automated system for high-throughput protein production using the dialysis cell-free method. Protein Expr. Purif., **68**, 128-136.
8) Kigawa, T., Inoue, M., Aoki, M., Matsuda, T., Yabuki, T., Seki,E., Harada, T., Watanabe, S. and Yokoyama, S. (2007) In Spirin, A. S. and Swartz, J. R. (eds.), Cell-free Protein Synthesis Methods and Protocols.Wiley-VCH, Weinheim, pp. 99-109.
9) Kigawa, T., Muto, Y. and Yokoyama, S. (1995) Cell-free synthesis and amino acid-selective stable isotope labeling of proteins for NMR analysis. J. Biomol. NMR, **6**, 129-134.
10) Matsuda, T., Koshiba, S., Tochio, N., Seki, E., Iwasaki, N., Yabuki, T., Inoue, M., Yokoyama, S. and Kigawa, T. (2007) Improving cell-free protein synthesis for stable-isotope labeling. J. Biomol. NMR, **37**, 225-229.
11) Kainosho, M., Torizawa, T., Iwashita, Y., Terauchi, T., Mei Ono, A. and Guntert, P. (2006) Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. Nature, **440**, 52-57.

として評価されている（Shimonoら、2009、Sobhanifarら、2010、Nguyenら、2010）。毒性およびタンパク質分解の回避などのCFの一般的な利点に加え、膜タンパク質は、機能的フォールディングのために共翻訳的に膜内に直接組み入れることが可能である。

■今後の展望

タンパク質の高度化されたSI標識を実現するために、CFにはまだ変更および改良の余地がある。新たなNMR法と組み合わせ、生体分子 NMRの可能性をさらに広げることが期待される。

12) Kigawa, T. (2010) Cell-free protein production system with the E. coli crude extract for determination of protein folds. Methods Mol. Biol., **607**, 101-111.
13) Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T. and Yokoyama, S. (1999) Cell-free production and stableisotope labeling of milligram quantities of proteins. FEBS Lett., **442**, 15-19.
14) Yokoyama, J., Matsuda, T., Koshiba, S. and Kigawa, T. (2010) An economical method for producing stable-isotope labeled proteins by the E. coli cell-free system. J. Biomol. NMR, **48**, 193-201.
15) Etezady-Esfarjani, T., Hiller, S., Villalba, C. and Wüthrich, K. (2007) Cell-free protein synthesis of perdeuterated proteins for NMR studies. J. Biomol. NMR, **39**, 229-238.
16) Yokoyama, J., Matsuda, T., Koshiba, S., Tochio, N. and Kigawa, T. (2011) A practical method for cell-free protein synthesis to avoid stable isotope scrambling and dilution. Anal. Biochem, **411**, 223-229.
17) Tugarinov, V. and Kay, L. E. (2003) Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods. J. Am. Chem. Soc., **125**, 13868-13878.
18) Noren, C. J., Anthony-Cahill, S. J., Griffith, M. C. and Schultz, P. G. (1989) A General Method of Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins. Science, **244**, 182-188.
19) Shimono, K., Goto, M., Kikukawa, T., Miyauchi, S., Shirouzu, M., Kamo, N. and Yokoyama, S. (2009) Production of functional bacteriorhodopsin by an Escherichia coli cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid. Protein Sci., **18**,2160-2171.
20) Sobhanifar, S., Reckel, S., Junge, F., Schwarz, D., Kai, L., Karbyshev, M., Lohr, F., Bernhard, F. and Dotsch, V. (2010) Cellfree expression and stable isotope labelling strategies for membrane proteins. J. Biomol. NMR, **46**, 33-43.
21) Nguyen, T. A., Lieu, S. S. and Chang, G. (2010) An Escherichia coli-based cell-free system for large-scale production of functional mammalian membrane proteins suitable for X-ray crystallography. J Mol Microbiol Biotechnol, **18**, 85-91.

タンパク質合成キット「無細胞くん」

理化学研究所の高度な無細胞タンパク質合成技術を開発しました。大腸菌抽出液を用いており、高い同位体標識効率で迅速・簡便にNMR測定に十分な量の安定同位体標識タンパク質を合成できます。

■無細胞くん

タンパク質合成キット「無細胞くん Quick」

タンパク質合成キット

無細胞くんQuick

■ キット内容

●無細胞くんQuick クイック液 1mL × 1本
(50μL 反応×20 回相当分)

●コントロールDNA(pUC-CAT)^{注2} 50μL × 1本



製品番号	製品名	数量
A29-0058	無細胞くんQuick ^{※1}	1キット

■ 特徴
タンパク質発現確認用キットです。クイック液には非標識アミノ酸をはじめ、必要な成分がすべて含まれておりますので、テンプレートDNAを添加して1時間インキュベートするだけで、簡便にタンパク質を合成できます（CAT タンパク質最大合成量 800μg/mL）。

安定同位体標識タンパク質合成キット「無細胞くん SI」

安定同位体標識タンパク質合成キット

無細胞くんSI

■ キット内容

●無細胞くんSI 内液 1mL × 1本 (1回分)

●無細胞くんSI 外液 10mL × 1本 (1回分)

●コントロールDNA(pUC-CAT)^{注2} 50μL × 1本

●非標識アミノ酸混合物水溶液 1mL × 1本

●透析カップ 1個 (1回分)



製品番号	製品名	数量
A29-0059	無細胞くんSI ^{※1}	1キット

■ 特徴
安定同位体標識タンパク質合成用キットです（CATタンパク質最大合成量 5mg/mL）。より大量のタンパク質が必要な場合には、複数のキットをまとめてスケールアップしてご使用ください。

安定同位体標識タンパク質合成キット「無細胞くん SI SS」

安定同位体標識タンパク質合成キット

無細胞くんSI SS

■ キット内容

●無細胞くんSISS内液 685μL × 1本

●無細胞くんSISS外液 7.25mL × 1本

●50mM 酸化型グルタチオン (GSSG) 1.2mL × 1本

●50mM 還元型グルタチオン (GSH) 1.2mL × 1本

●コントロールDNA(pUC-BAP)^{注3} 50μL × 1本

●非標識アミノ酸混合物水溶液 1mL × 1本

●透析カップ 1個 (1回分)



製品番号	製品名	数量
A89-0126	無細胞くんSI SS ^{※1}	1キット

■ 特徴
SS結合を持つ低分子化抗体やサイトカインなどの分泌系タンパク質合成用キットです。安定同位体標識タンパク質の合成に最適です。

注1: 本キットに含まれるアミノ酸は安定同位体標識されておりません。
注2: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) を発現します。
注3: アルカリホスファターゼ (BAP) を発現します。

■無細胞くん用 安定同位体標識アミノ酸

製品番号	製品名	数量	製品番号	製品名	数量
A107-0144	アミノ酸混合物水溶液 -UL-d	1mL	A42-0075	アミノ酸混合物水溶液 -UL- ¹³ C, ¹⁵ N,d	1mL
A39-0072	アミノ酸混合物水溶液 -UL- ¹⁵ N	1mL	A91-0128	アミノ酸混合物水溶液 -Lys,Arg-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL
A41-0074	アミノ酸混合物水溶液 -UL- ¹⁵ N,d	1mL	A92-0129	アミノ酸混合物水溶液 -Lys,Leu-UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL
A40-0073	アミノ酸混合物水溶液 -UL- ¹³ C, ¹⁵ N	1mL	A108-0145	アミノ酸混合物水溶液 -SeMet	1mL

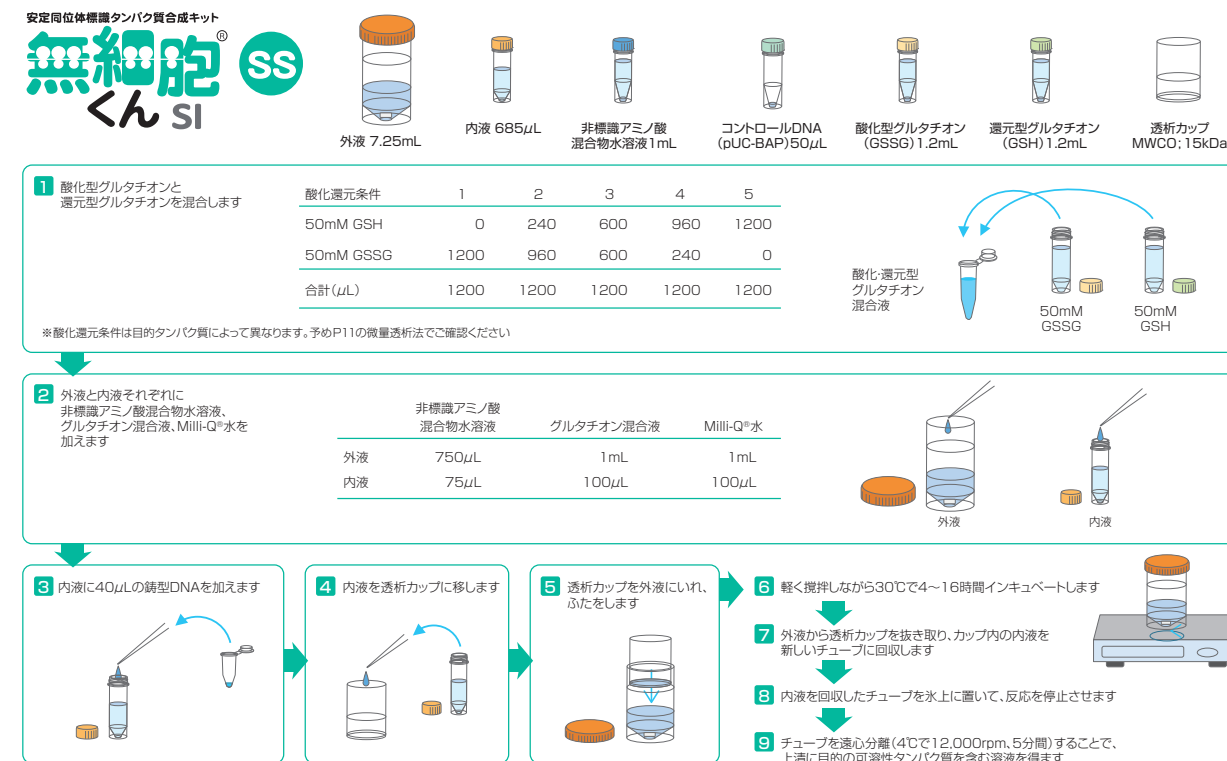
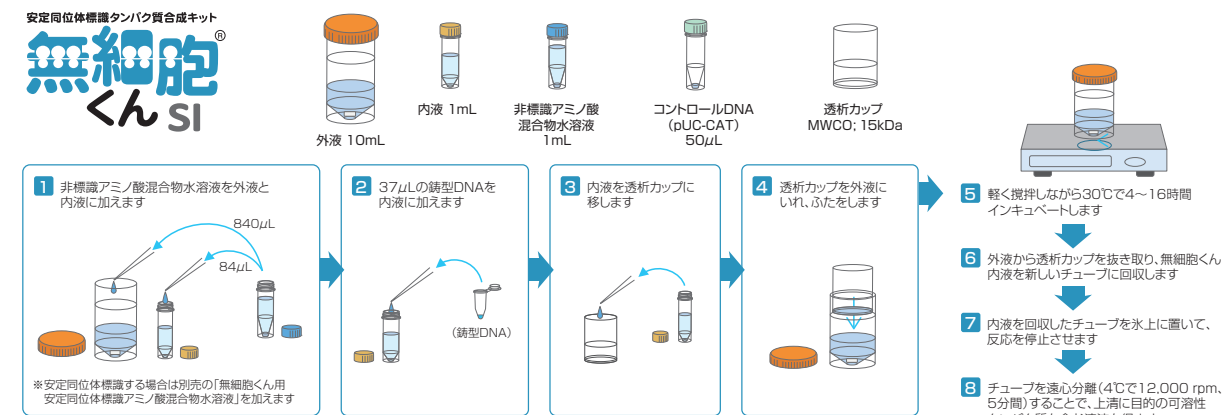
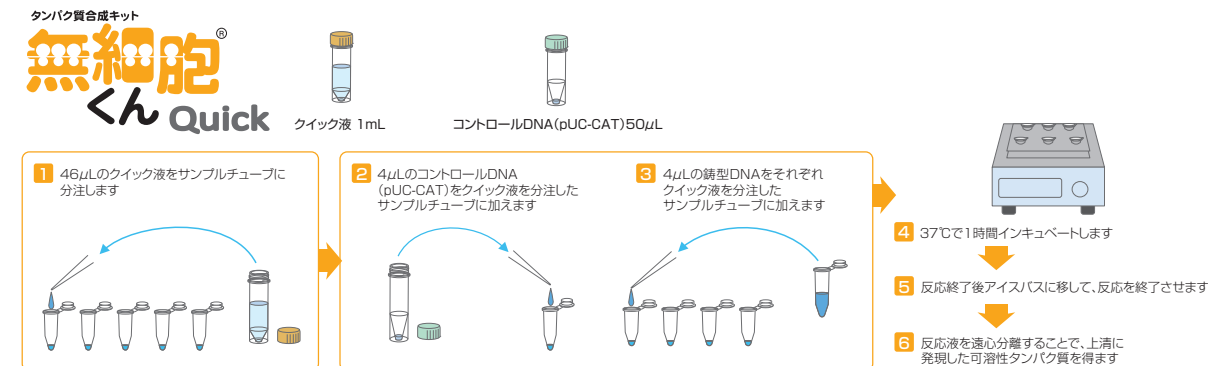
アミノ酸にはDTTが含まれております。「無細胞くんSI SS」にご利用の際には別途お問合せください。

※本製品は科学技術振興機構「産学共同シーズノベーション化事業」の支援を受け、開発された製品です。
※本製品に関する詳細情報は「無細胞くん」カタログ(別冊)をご参照ください。

特徴

(1) プロトコール

迅速・簡便にタンパク質を合成できます。

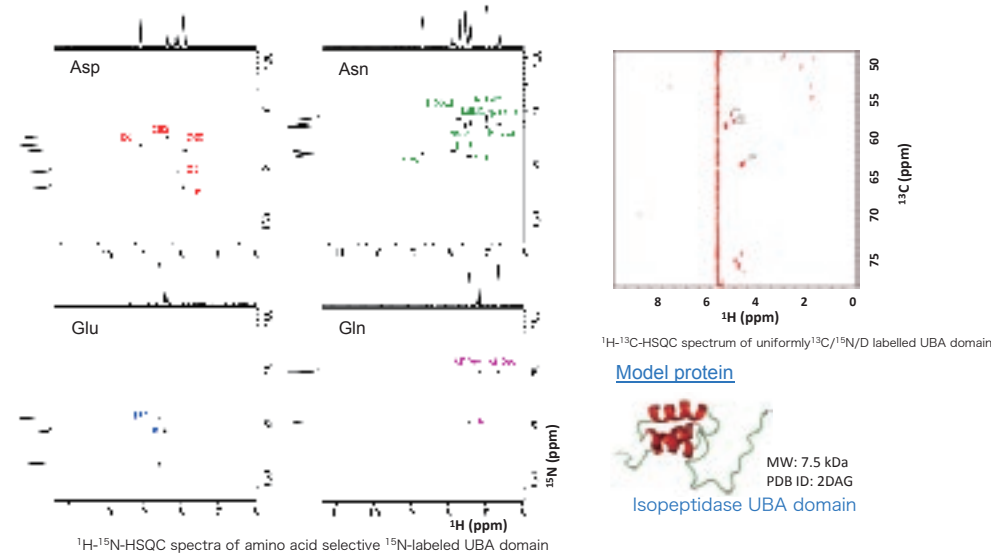


(2) 高い安定同位体標識率を実現

無細胞タンパク質合成におけるアミノ酸代謝を大幅に低減しました。

厳密なアミノ酸選択標識が可能です。

高い重水素標識率のタンパク質を合成可能です。

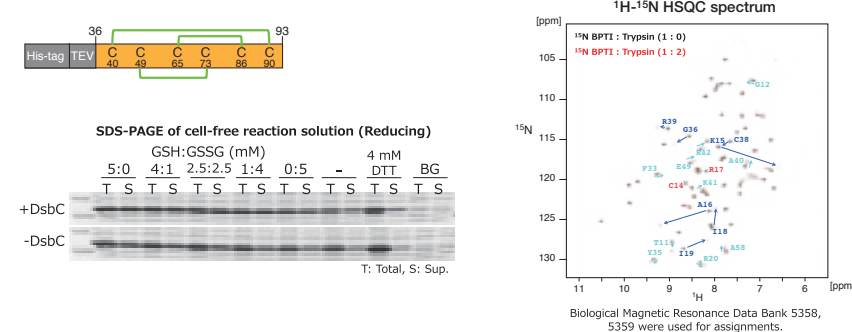


(3) 「無細胞くんSI SS」によるジスルフィド結合をもつタンパク質合成例

NMR測定に十分なタンパク質を合成できます。

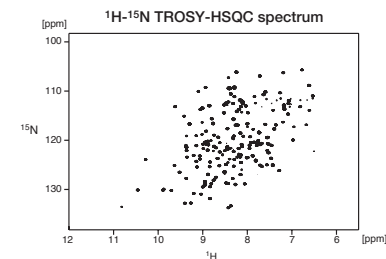
BPTI プロテアーゼインヒビター

- Source: Bovine
- Serine protease inhibitor
- Approx. Mw: 6.5 kDa
- Disulfide bond: 3



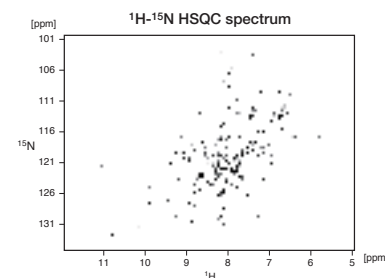
MR1-1 抗変異型EGF受容体一本鎖抗体

- Source: Mouse
- Single chain antibody
- Approx. Mw: 27 kDa
- Disulfide bond: 2



Urokinase プロテアーゼ

- Source: Human
- Serine protease
- Approx. Mw: 35 kDa
- Disulfide bond: 6



ご提供：理化学研究所生命分子システム基盤研究領域 NMRパイプライン高度化研究チーム殿

商標について

Milli-Q®はメルクミリポア社の商標です。
無細胞くん®は大陽日酸株式会社の商標です。

アミノ酸

製品番号	製品名	濃縮度
49,287-6	L-Alanine- ¹² C ₃	99.9 atom % ¹² C
48,986-7	L-Alanine-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,677-9	L-Alanine-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,994-8	L-Alanine-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,468-2	L-Alanine-2,3- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
48,987-5	L-Alanine- ¹³ C ₃ (95% CP)	98 atom % ¹³ C
33,212-7	L-Alanine- ¹⁵ N (98.7% CP)	98 atom % ¹⁵ N
60,905-6	β -Alanine- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
48,586-1	L-Alanine-2-d ₁ (98% CP)	98 atom % D
48,992-1	L-Alanine-3,3,3-d ₃	99 atom % D
48,584-5	L-Alanine-2,3,3,3-d ₄	98 atom % D
60,802-5	L-Alanine-1- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
48,585-3	L-Alanine-2- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
48,988-3	L-Alanine- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
49,082-2	β -Alanine- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
58,672-2	L-Alanine-1- ¹³ C,3,3,3-d ₃	99 atom % ¹³ C 99 atom % D
64,344-0	L-Arginine- ¹³ C ₆ ·HCl (95% CP)	99 atom % ¹³ C
60,908-0	L-Arginine- ¹⁵ N ₂ ·HCl (guanidineimino- ¹⁵ N ₂) (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
B01-0003	L-Arginine- ¹⁵ N ₄ (97% CP)	95 atom % ¹⁵ N
60,803-3	L-Arginine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄ ·HCl (97% L-,95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
57,986-6	L-Asparagine-4- ¹³ C·H ₂ O	99 atom % ¹³ C
58,869-5	L-Asparagine- ¹³ C ₄ ·H ₂ O (95% CP)	98 atom % ¹³ C
48,589-6	L-Asparagine- ¹⁵ N·H ₂ O (amide- ¹⁵ N)	98 atom % ¹⁵ N
48,996-4	L-Asparagine- ¹⁵ N·H ₂ O (amine- ¹⁵ N)	98 atom % ¹⁵ N
64,196-0	L-Asparagine- ¹⁵ N ₂ (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
48,591-8	L-Asparagine- ¹⁵ N ₂ ·H ₂ O (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
64,195-2	L-Asparagine- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂ (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,815-7	L-Asparagine- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂ ·H ₂ O (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
63,667-3	L-Asparagine- ¹⁵ N ₂ ,d ₈ (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N 98 atom % D
57,074-5	L-Asparagine- ¹⁵ N ₂ ,d ₈ ·D ₂ O	98 atom % ¹⁵ N 98 atom % D
63,659-2	L-Asparagine- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂ ,d ₈ (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N 98 atom % D
48,999-9	L-Aspartic-4- ¹³ C Acid	99 atom % ¹³ C
48,997-2	L-Aspartic Acid-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
57,979-3	L-Aspartic Acid-1,2- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
58,616-1	L-Aspartic Acid-3,4- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
60,485-2	L-Aspartic Acid- ¹³ C ₄	98 atom % ¹³ C
33,213-5	L-Aspartic- ¹⁵ N Acid	98 atom % ¹⁵ N
60,910-2	L-Aspartic- ¹⁵ N Acid, β -Benzylester Derivative	98 atom % ¹⁵ N
48,998-0	L-Aspartic-2,3,3-d ₃ Acid	98 atom % D
61,606-0	L-Aspartic-2,3,3-d ₃ Acid, N-Acetyl Derivative	98 atom % D
58,628-5	L-Aspartic Acid-1- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,770-3	L-Aspartic-2- ¹³ C, ¹⁵ N Acid	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

製品番号	製品名	濃縮度
60,783-5	L-Aspartic Acid- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
57,251-9	L-Aspartic- ¹⁵ N,2,3,3-d ₃ Acid	98 atom % D 98 atom % ¹⁵ N
60,010-5	L-Cystine- ¹⁵ N ₂ (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
A01-0001	L-Cystein- ¹⁵ N·HCl·H ₂ O	95 atom % ¹⁵ N
A02-0002	L-Cystein- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N·HCl·H ₂ O	98 atom % ¹³ C 95 atom % ¹⁵ N
A03-0021	L-Cystein- ¹⁵ N,d ₈ ·DCI·D ₂ O	95 atom % ¹⁵ N 95 atom % D
A04-0022	L-Cystein- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N,d ₇ ·DCI·D ₂ O	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N 98 atom % D
60,496-8	L-Glutamic Acid-1- ¹³ C (98% CP)	99 atom % ¹³ C
60,512-3	L-Glutamic-2- ¹³ C Acid	99 atom % ¹³ C
49,001-6	L-Glutamic-3- ¹³ C Acid	99 atom % ¹³ C
58,767-2	L-Glutamic-4- ¹³ C Acid	99 atom % ¹³ C
49,292-2	L-Glutamic-5- ¹³ C Acid	99 atom % ¹³ C
60,486-0	L-Glutamic Acid- ¹³ C ₅ (95% CP)	98 atom % ¹³ C
33,214-3	L-Glutamic- ¹⁵ N Acid	98 atom % ¹⁵ N
61,628-1	L-Glutamic-2,3,3,4,4-d ₅ Acid	98 atom % D
60,785-1	L-Glutamic Acid- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,456-0	L-Glutamic Acid- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N,d ₉	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N 98 atom % D
64,387-4	L-Glutamic Acid- ¹⁵ N,d ₉	98 atom % ¹⁵ N 98 atom % D
60,501-8	L-Glutamine-1- ¹³ C (98% CP)	99 atom % ¹³ C
60,508-5	L-Glutamine-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,494-1	L-Glutamine-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,469-0	L-Glutamine-5- ¹³ C (amide- ¹³ C)	99 atom % ¹³ C
60,522-0	L-Glutamine-1,2- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
60,516-6	L-Glutamine- ¹³ C ₅ (95% CP)	98 atom % ¹³ C
49,002-4	L-Glutamine- ¹⁵ N (amide- ¹⁵ N)	98 atom % ¹⁵ N
48,680-9	L-Glutamine- ¹⁵ N (amine- ¹⁵ N)	98 atom % ¹⁵ N
B02-0004	L-Glutamine- ¹⁵ N ₂	95 atom % ¹⁵ N
61,630-3	L-Glutamine-2,3,3,4,4-d ₅ (98% CP)	98 atom % D
60,812-2	L-Glutamine-2- ¹³ C, ¹⁵ N (amine- ¹⁵ N)	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
B06-0008	L-Glutamine- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₂	97 atom % ¹³ C 95 atom % ¹⁵ N
57,073-7	L-Glutamine- ¹⁵ N,d ₁₀	98 atom % ¹⁵ N 98 atom % D
63,508-1	L-Glutamine- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N,d ₁₀ (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N 96 atom % D
27,942-0	Glycine-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
27,943-9	Glycine-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
28,382-7	Glycine- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
29,929-4	Glycine- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
33,645-9	Glycine-2,2-d ₂	98 atom % D
17,583-8	Glycine-d ₅	98 atom % D
33,133-3	Glycine-N,N,O-d ₃	98 atom % D
29,934-0	Glycine-1- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

製品番号	製品名	濃縮度
29,932-4	Glycine-2- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
48,952-2	Glycine- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,816-5	Glycine- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N Ethyl Ester·HCl	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,677-4	Glycine- ¹² C ₂ , ¹⁴ N (¹³ C, ¹⁵ N-depleted)	99.9 atom % ¹² C 99.9 atom % ¹⁴ N
60,807-6	Glycine-1- ¹³ C,2,2-d ₂	99 atom % ¹³ C 98 atom % D
59,261-7	Glycine- ¹⁵ N,d ₅	98 atom % D 98 atom % ¹⁵ N
B03-0005	L-Histidine- ¹⁵ N ₃	95 atom % ¹⁵ N
60,922-6	L-Histidine-2- ¹⁵ N (α-amine- ¹⁵ N) (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
B07-0009	L-Histidine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₃	97 atom % ¹³ C 95 atom % ¹⁵ N
60,808-4	L-Histidine- ¹³ C ₆ ,2- ¹⁵ N (α-amine- ¹⁵ N)	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,477-1	L-Isoleucine-1- ¹³ C (98% CP)	99 atom % ¹³ C
60,901-3	L-Isoleucine- ¹⁵ N (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
60,809-2	L-Isoleucine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
Q36872	L-Isoleucine-2,3,4,4-d ₄ , ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	
49,005-9	L-Leucine-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,681-7	L-Leucine-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,482-8	L-Leucine-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,490-9	L-Leucine-1,2- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
60,523-9	L-Leucine- ¹³ C ₆ (95% CP)	98 atom % ¹³ C
34,096-0	L-Leucine- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
61,607-9	L-Leucine-3-d ₁	99 atom % D
61,597-8	L-Leucine-4-d ₁	99 atom % D
48,682-5	L-Leucine-5,5,5-d ₃	99 atom % D
49,294-9	L-Leucine-d ₁₀	98 atom % D
61,598-6	L-Leucine-d ₇ (isopropyl-d ₃) (98% CP)	98 atom % D
49,006-7	L-Leucine-1- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,765-7	L-Leucine-2- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,817-3	L-Leucine-3- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,806-8	L-Leucine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
59,627-2	L-Leucine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N (99% chiral purity basis)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,794-0	L-Leucine- ¹³ C ₆ ,d ₁₀	99 atom % ¹³ C 98 atom % D
Q36813	L-Leucine-2,3,3,4-d ₄ , ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	
Q36902	L-Leucine-2,3,3,4,5,5-d ₅ , 4-Methyl- ¹³ C, ¹⁵ N	
60,470-4	L-Lysine-1- ¹³ C·HCl (98% CP)	99 atom % ¹³ C
58,932-2	L-Lysine-2- ¹³ C·HCl (95% CP)	99 atom % ¹³ C
64,203-7	L-Lysine-6- ¹³ C·2HCl (98% CP)	99 atom % ¹³ C
58,936-5	L-Lysine-6- ¹³ C·HCl (98% CP)	99 atom % ¹³ C
64,345-9	L-Lysine- ¹³ C ₆ ·HCl (95% CP)	99 atom % ¹³ C
59,290-0	L-Lysine-2- ¹⁵ N·2HCl (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
60,896-3	L-Lysine-2- ¹⁵ N·HCl	98 atom % ¹⁵ N
60,897-1	L-Lysine-ε - ¹⁵ N·HCl	98 atom % ¹⁵ N
60,902-1	L-Lysine- ¹⁵ N ₂ ·HCl (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N

製品番号	製品名	濃縮度
61,619-2	L-Lysine-4,4,5,5-d ₄ ·HCl (98% CP)	98 atom % D
61,621-4	L-Lysine-3,3,4,4,5,5,6,6-d ₈ ·HCl	98 atom % D
60,804-1	L-Lysine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂ ·HCl (95% CP)	99 atom % ¹³ C 99 atom % ¹⁵ N
60,766-5	L-Lysine-6- ¹³ C, ε - ¹⁵ N·HCl (98% CP)	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
49,008-3	L-Methionine-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
58,977-2	L-Methionine-2- ¹³ C (98% CP)	99 atom % ¹³ C
29,914-6	L-Methionine-(methyl- ¹³ C)	99 atom % ¹³ C
60,924-2	L-Methionine- ¹⁵ N (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
58,983-7	L-Methionine- ¹⁵ N, N-Acetyl Derivative	98 atom % ¹⁵ N
58,980-2	L-Methionine-2-d ₁	98 atom % D
30,061-6	L-Methionine-(methyl-d ₃)	98 atom % D
58,982-9	L-Methionine-2- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,810-6	L-Methionine- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
65,140-0	L-Methionine-(methyl- ¹³ C,d)	99 atom % ¹³ C 98 atom % D
29,915-4	L-Methionine-(methyl- ¹³ C,d ₃)	99 atom % ¹³ C 99 atom % D
60,814-9	L-Methionine-1- ¹³ C,methyl-d ₃	99 atom % ¹³ C 99 atom % D
49,009-1	L-Phenylalanine-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
49,011-3	L-Phenylalanine-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
49,012-1	L-Phenylalanine-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,504-2	L-Phenyl-1- ¹³ C-alanine	99 atom % ¹³ C
60,487-9	L-Phenyl- ¹³ C ₆ -alanine	99 atom % ¹³ C
49,010-5	L-Phenylalanine- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
58,943-8	L-Phenylalanine-2-d ₁	98 atom % D
61,588-9	L-Phenylalanine-3,3-d ₂	98 atom % D
61,587-0	L-Phenyl-d ₅ -alanine	98 atom % D
49,014-8	L-Phenyl-d ₅ -alanine-2,3,3-d ₃	98 atom % D
60,801-7	L-Phenylalanine- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
Q36880	L-Phenylalanine-2,3,3-d ₃ , Phenyl-3,5-d ₂ , ¹³ C ₉ , ¹⁵ N	
Q36899	L-Phenylalanine-2,3,3-d ₃ , Phenyl-2,4,6-d ₃ , ¹³ C ₉ , ¹⁵ N	
58,949-7	L-Proline-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,899-8	L-Proline- ¹⁵ N (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
60,811-4	L-Proline- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
49,015-6	L-Serine-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,471-2	L-Serine-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,472-0	L-Serine-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
58,960-8	L-Serine-1,2- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
60,517-4	L-Serine-2,3- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
60,488-7	L-Serine- ¹³ C ₃ (95% CP)	98 atom % ¹³ C
60,900-5	L-Serine- ¹⁵ N (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
48,598-5	L-Serine-2- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
B09-0011	L-Serine- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,503-4	L-Threonine-1- ¹³ C (97% CP)	99 atom % ¹³ C
B04-0006	L-Threonine- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
60,777-0	L-Threonine- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

製品番号	製品名	濃縮度
B10-0012	L-Threonine- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N	97 atom % ¹³ C 95 atom % ¹⁵ N
60,483-6	L-Tryptophan-1- ¹³ C (98% CP)	99 atom % ¹³ C
60,484-4	L-Tryptophan-2- ¹³ C (Indole Ring- ¹³ C) (96% CP)	98 atom % ¹³ C
60,906-4	L-Tryptophan- ¹⁵ N (α-amino- ¹⁵ N)	99 atom % ¹⁵ N
B05-0007	L-Tryptophan- ¹⁵ N ₂	95 atom % ¹⁵ N
61,586-2	L-Tryptophan-2',4',5',6',7'-d ₅ (Indole-d ₅)	97 atom % D
B11-0013	L-Tryptophan- ¹³ C ₁₁ , ¹⁵ N ₂	97 atom % ¹³ C 95 atom % ¹⁵ N
B13-0020	L-Tryptophan- ¹⁵ N ₂ d ₈	95 atom % ¹⁵ N 95 atom % D
B12-0014	L-Tryptophan- ¹³ C ₁₁ , ¹⁵ N ₂ d ₈	97 atom % ¹³ C 95 atom % ¹⁵ N 95 atom % D
48,982-4	L-Tyrosine-1- ¹³ C (4-Hydroxyphenylalanine-carboxy- ¹³ C)	99 atom % ¹³ C
60,510-7	L-Tyrosine-2- ¹³ C	97 atom % ¹³ C
48,985-9	L-Tyrosine-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,509-3	L-Tyrosine-(phenyl-4- ¹³ C)	99 atom % ¹³ C
58,784-2	L-Tyrosine-1,2,3- ¹³ C ₃	99 atom % ¹³ C
48,979-4	L-Tyrosine-(phenyl- ¹³ C ₆)	99 atom % ¹³ C
49,286-8	L-Tyrosine- ¹³ C ₉ (95% CP)	98 atom % ¹³ C
33,215-1	L-Tyrosine- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
48,984-0	L-Tyrosine-(phenyl-3,3-d ₂)	98 atom % D

製品番号	製品名	濃縮度
48,582-9	L-Tyrosine-(phenyl-2,6-d ₂)	98 atom % D
48,980-8	L-Tyrosine-(phenyl-d ₄)	98 atom % D
59,098-3	L-Tyrosine-2- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,799-1	L-Tyrosine- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,984-6	L-Tyrosine-(4-hydroxy- ¹⁷ O)	40 atom % ¹⁷ O
60,991-9	L-Tyrosine-(4-hydroxy- ¹⁸ O)	95 atom % ¹⁸ O
49,016-4	L-Valine-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,491-7	L-Valine-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
49,017-2	L-Valine- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
48,602-7	L-Valine-d ₈	98 atom % D
60,014-8	L-Valine- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N (95% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
Q36848	L-Valine-2,3-d ₂ , ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	
Q36821	L-Valine-2,3,4,4,4-d ₅ ,3-Methyl- ¹³ C, ¹⁵ N	
42,619-9	Algal Amino Acid Mixture- ¹³ C	98 atom % ¹³ C
60,894-7	Algal Amino Acid Mixture- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
48,791-0	Algal Amino Acid Mixture- ¹³ C, ¹⁵ N	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
59,690-6	Algal Amino Acid Mixture- ¹⁵ N,d	98 atom % ¹⁵ N 97 atom % D
60,764-9	Algal Amino Acid Mixture- ¹³ C, ¹⁵ N,d	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N 97 atom % D

SAIL法により広がるタンパク質NMRの未来



甲斐荘正恒
東京都立大学
名誉教授

はじめに

X線結晶構造解析に代表されるタンパク質の立体構造決定手法は急速な発展を遂げ、以前は想像もできなかったような巨大、且つ複雑なタンパク質複合体の精密な立体構造が次々と解明されている。しかしながら、結晶中で整然と静止した状態における立体構造情報のみでは、実際に生物機能を果たすタンパク質の真の姿を理解するには十分ではない。タンパク質の立体構造と生物機能の関連をより深く理解するためには、生体内において各タンパク質が存在する環境にできる限り近い状態で、それらの立体構造・動態・相互作用を総合的に解明する手段が不可欠となる。数々の困難にもかかわらず、タンパク質のNMR研究が人々をひきつける理由がここにある。半世紀に渡るたゆみない努力の結果、TROSY(Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)法をはじめとして様々な技術が続々と開発され、NMR法の最大の弱点とされてきた分子量限界の大幅な拡張が実現しつつある。

ここで紹介するSAIL(Stereo-Array Isotope Labeling; 立体整列同位体標識)法もそのような成果の一つであるが、他の手法にはみられない際立った特徴がある。即ち、従来の技術開発では、高分子量タンパク質の主鎖アミド(¹⁵N'H)やIle、Leu、Val等のメチル基(¹³C'H₃)等の一握りのNMR情報を入手するために、他の原子団に由来するNMR情報の取得を犠牲にすることを前提としてきた。我々の開発したSAIL法は、安定同位体標識パターンを徹底的に最適化したアミノ酸(SAILアミノ酸)を合成し、それらで標識したタンパク質(SAILタンパク質)を用いることにより、あらゆる原子団由来のNMRシグナルを余すことなく観測しようとする技術である。SAIL標識した高分子量タンパク質のNMRスペクトルは著しく簡略化される一方、測定感度も大きく改善される。究極的なTROSY法とも云えるSAIL法は、これまで入手することが困難とされてきた原子団に関する様々な立体構造や動態に関する新たな情報を通じて、高分子量タ

ンパク質複合体の生物機能に迫るNMR技術として今後の発展が期待される¹⁾。

■タンパク質NMR研究における安定同位体利用技術

タンパク質の主要な構成元素、水素、炭素、窒素、酸素のうちで高分解能NMRシグナルが観測できる安定同位元素は¹H、¹³C、¹⁵Nの3種類である。水素(¹H)を除きこれらの元素は天然に存在する割合(天然存在比)が低いためにNMR観測には高濃度の同位体標識が必要となる。低分子化合物ならば、¹H-NMRスペクトルから必要十分な構造情報が得られるが、20種類のアミノ酸残基のみから構成されるタンパク質のNMRスペクトルで状況は大きく異なる。即ち、タンパク質の¹H-NMRスペクトルでは、近接した化学シフトを持つ膨大な¹H-シグナルが重なり合い、更に¹H-¹H間の双極子相互作用による線幅の広がりも加わるため、それらの解析には多大な困難が伴う。多次元NMR法に代表されるタンパク質構造解析技術の発展の基盤は、このような困難を軽減するために追求された、安定同位体標識技術の高度化に向けた膨大な努力から形成されている²⁾。

安定同位体標識法は、立体構造や生物機能への影響を最小限に抑えつつ、タンパク質NMRスペクトル上の特性を大きく変えることができる手法である。例えば、天然に存在する炭素と窒素の殆どは同位元素¹²C、¹⁴Nであるが、前者は核スピンを持たないためNMR測定にかからず、後者は核スピンが1のために高分解能NMR測定には不向きである。しかしながら、これらの元素を核スピン1/2を持つ安定同位体¹³C、¹⁵Nに置換することにより、タンパク質の骨格元素である炭素、窒素を溶液NMR法に組み込むことが可能となる。その結果、¹H、¹³C、¹⁵Nを含めた多核種多次元NMR測定法が成立し、高分子量タンパク質のNMRスペクトル解析は著しく容易となる。更に、水素の同位元素である重水素(²H)でタンパク質を標識すれば、¹H-NMRスペクトルは大幅に簡略化されると同時に、¹H-密度の低下に伴い重水素置換されず

に残った ^1H -シグナルのNMRシグナルの線幅は大幅に狭まり、延いては測定感度の著しい増加という恩恵がもたらされる。この結果、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -二重標識試料を用いた手法では、構造決定が可能な分子量上限が25 kDa程度であったものが、 $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -三重標識試料の利用による更なる分子量上限の拡張が可能となる。しかしながら、三重標識試料を用いて、タンパク質中の必要な部位の ^1H -NMR情報を得るためには、その部分の重水素化だけは選択的に避ける必要がある。試料調製の簡便さから、適当な重水素濃度に調整した重水中（例えば、60-80%程度）で、“ランダム”重水素化を施した三重標識試料を用い“残余 ^1H ”を観測する手法が試みられた。しかしながら、このような手法では重水素化の位置や濃度を制御できないために、無数の同位体異性体 (isotopomer) が混在することは避けられない。このような根本的な欠陥のために、現在ではほとんど利用されていない。

■SAIL- 立体整列同位体標識法の誕生

我々は、このような状況を根本的に解決するには、重水素化を含めた安定同位体標識技術をその限界まで高め、立体選択性を含めて標識位置を完全に制御したタンパク質試料を調製できるならば、得られる構造情報の精度を犠牲にせず、長い間の懸案事項であった分子

量限界を大幅に拡張できると考えた。これが、SAIL法の基本的な発想である¹⁾。このために、下記に列挙した原則に従い、タンパク質NMR解析に適した同位体標識パターンを持つアミノ酸を合成した。図1に示した標識パターンは、SAIL法の開発当初のもの(“第一世代”SAILアミノ酸)であるが、その後現在に至るまで多種多様な改良型SAILアミノ酸が開発され、様々な構造・動態情報の取得に利用されている。

- (1) アミノ酸に含まれる全てのメチレン基上のプロキラル水素のうち、一方のみを立体選択的に重水素化する。
- (2) アミノ酸に含まれるメチル基を $^{13}\text{CHD}_2$ 標識する。また、Leu、Valのプロキラルメチル基のうち、一方を立体選択的に $^{12}\text{CD}_3$ 、他方を $^{13}\text{CHD}_2$ とする(現在は経済性を考えて $^{13}\text{CHD}_2$ の代わりに $^{13}\text{CH}_3$ とするパターンを主に利用)。
- (4) 芳香族アミノ酸、Phe、Tyr、Trpの芳香環においては、観測対象とする炭素と水素のみ ^1H - ^{13}C とし、他は ^{12}CD とする。
- (5) 水素を持つ炭素は全て ^{13}C 、窒素は全て ^{15}N とすることにより、 ^{13}C - ^{13}C 、 ^{13}C - ^{15}N スピン結合を経由し側鎖原子団の帰属を可能とする。

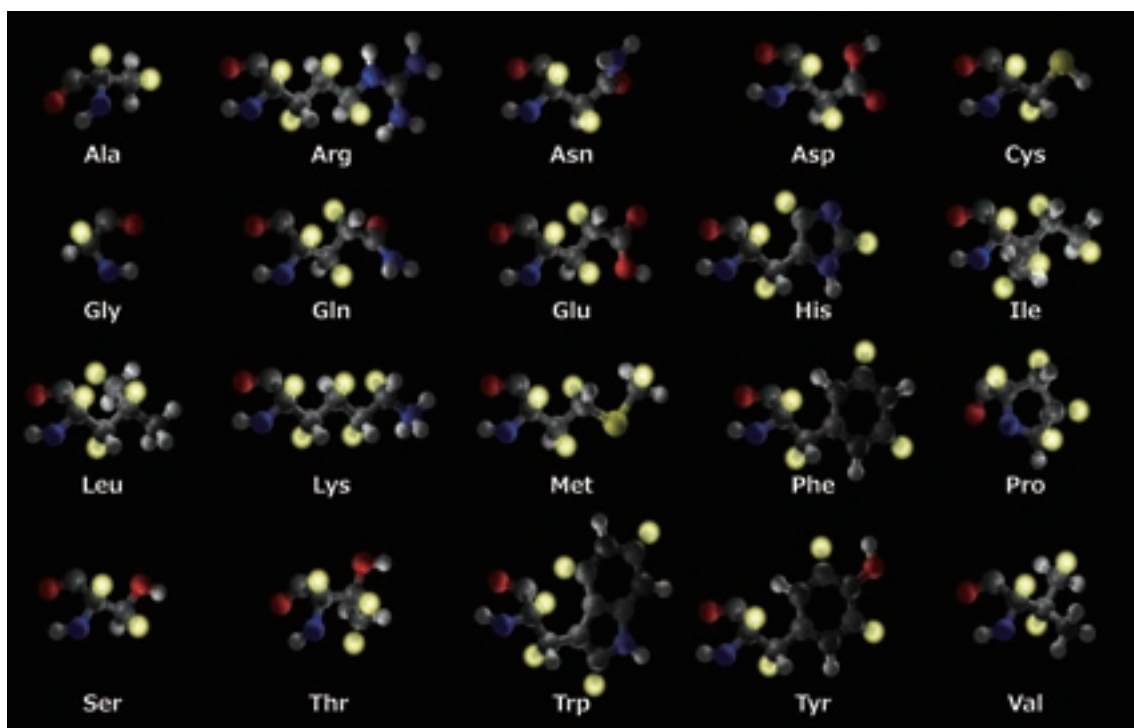


図1 タンパク質を構成する20種類の“第一世代”SAILアミノ酸の化学構造。 ^1H として残した側鎖水素はベージュ、重水素化したものは灰色で表示。その他、窒素は青、炭素は黒、酸素は赤、硫黄は黄色で表示してある。また、 ^1H の結合した炭素は全て ^{13}C 、窒素は全て ^{15}N で標識してある。(グラフィックスはKimmo Pääkkönen博士作成)

以上の原則に従った同位体標識パターンを持つタンパク質を構成する20種類のアミノ酸を“第一世代”のSAILアミノ酸と呼んでいるが、それらの合成が完了するには10年余の歳月を要した。SAILアミノ酸はプロキラルなメチレン、メチル基は立体選択的に同位体標識されているために、NMRによる構造精度に大きく影響する立体帰属に関する不確実性は全く存在しないため、重水素化により失われる情報量の減少を補って余りある情報の質的向上が得られる。もう一つのSAIL法の特記すべき特徴は、SAILアミノ酸のみから構成されるタンパク質(SAILタンパク質)は、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -二重標識タンパク質と比較して、タンパク質全体の水素密度は50-60%近く減少するにも関わらず、重水素化部位以外の水素(残余水素)は完全に保存される点である。従って、重水素化の位置・立体化学を制御できないランダム重水素化法では問題となる、同じ標識パターンを持つ分子が理論的には存在し得ないほど無数に存在する同位体異性体は、SAILタンパク質では只一種類の同位体異性体に集約される。このような全く新しい概念の安定同位体標識技術を立体整列同位体標識 (Stereo-array isotope labeling ; SAIL) 法と名付けた理由がここにある。SAILアミノ酸には合成が困難なものが幾つも含まれており、従ってこのような貴重なアミノ酸の効率的利用がSAIL法の実用化にとっての鍵となる。このためには、SAILアミノ酸の安定同位体標識パターンを保ったまま目的とするタンパク質に効率良く取り込ませることのできる大腸菌無細胞合成システムが最も有効である。このようにしてSAILアミノ酸のみからなるSAILタンパク質の調製が実現した。SAILタンパク質においては、全てのプロキラル基の一方が立体特異的に重水素化されているため、観測されるプロキラル基の立体帰属は全て確定している。このために、従来の立体帰属が不確実な場合に利用せざるを得ない擬原子 (pseudoatom) 近似が不要となるために、遥かに高精度 (precise)、且つ正確 (accurate) な立体構造が得られる^{1,2)}。以下に、その一例としてSARS コロナウィルス C末側 RNA結合ドメインの溶液構造決定を紹介する³⁾。

■SAIL法によるSARS コロナウィルスC末側ドメインの立体構造決定

数年前、世界を震撼とさせた重症呼吸器性症候群 (SARS) の発症原因となるコロナウィルス (SARS-CoV) は、ヌクレオキャプシドと呼ばれるタンパク質とRNAからなる集合体を形成している。SARS-CoVのキャプシ

ドタンパク質は、422残基のアミノ酸からなり、そのN末端側およびC末端側の2ヶ所に構造ドメインを持つ。両ドメインともRNA結合能を持つが、C末端側ドメイン (C-terminal domain; CTD) は、タンパク質の二量化形成の役割も担う。そのため、本研究の共同研究先の台湾中央研究院においてはSARS-CoV CTDの立体構造解明が重要な緊急課題となっていた。しかしながら、シグナルの縮重、及び線幅の拡がりに阻まれ、従来のNMR手法ではトポロジー構造の決定に留まっていた。SAIL法を用いた共同研究が持ちかけられたのはこのような事情による。SARS-CoV CTDの構造決定は数週間で完了したが、SAIL法の適用によりもたらされた最も大きなNMRスペクトル上の改善点は、芳香族領域のNMRスペクトルの劇的な向上にあった。図2-aに示すように、通常の $[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -標識体では、芳香環領域の ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルは複雑なスピン系のために、有用な構造情報が全く得られなかった。一方、SAIL-標識体の同じ芳香環領域では、極めて良質の ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルが容易に得られた(図2-b)。この芳香族領域のNMRスペクトルの質的改善がSARS-CoV CTDの迅速な精密構造決定の決め手となった。

SARS-CoV CTDは、4本鎖から構成される逆平行 β シート上に、 α ヘリックスが位置するいわゆる“domain-swapped dimer”構造を形成しており(図2-c)、このNMR構造は後に決定された結晶構造とも良く一致した。SAILタンパク質を用いた核酸滴定実験等の相互作用解析も実施し、SARSの薬剤開発に重要な基礎的知見が得られた³⁾。幸いなことに、SARSは終息後、現在に至るまで大きな流行が報告されていない。

■SAIL法の展望

本稿ではSAIL法の原理とNMR構造決定への応用に関して簡単に解説したが、現在も高分子量タンパク質への応用、タンパク質動態の研究手法の開発等に向けSAIL法の応用分野の開発が活発に進められている。SAILアミノ酸合成に関連した不斉有機合成技術の高度化、及び標識アミノ酸を用いて効率良く目的タンパク質を標識する無細胞系・細胞系発現技術は過去数年間で大きく発展し、新たなNMR研究技術の開発基盤を提供している。革新的安定同位体利用NMR技術であるSAIL法の更なる開発と普及は、生体系NMR研究の活性化に大きく寄与するだけでなく、我が国の生命科学基盤技術への国際貢献という点からも重要な課題であろう。

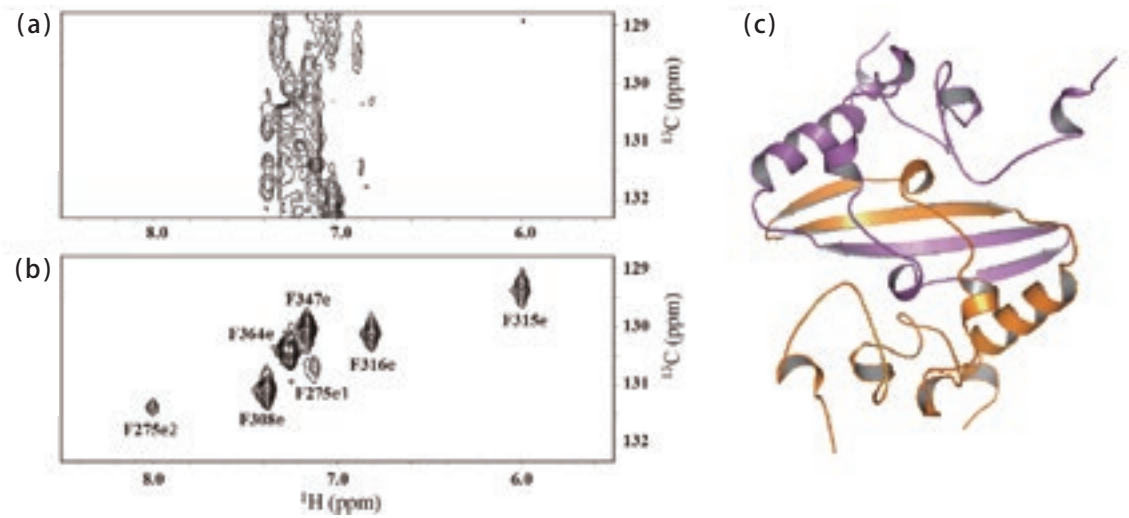


図2 芳香環領域の¹H-¹³C HSQC スペクトル : (a) [U-¹³C, ¹⁵N]-SARS CoV CTD, (b) SAIL SARS-CoV CTD. (c) SARS-CoV のNMR構造のリボン図. SAIL法ではCTDドメインに含まれる7残基 Pheの6残基の¹³C-¹Hεのシグナルが明瞭に観測された. なお, F275は芳香環の反転速度が遅いためε1, ε2が分裂して観測され, F287のε-シグナルは反転によるシグナルの広幅化により観測されない. このような芳香環の反転速度に関する情報はSAIL法がタンパク質動態の研究に有用であることを示している.

参考文献

1) “Optimal Isotope Labelling for NMR Protein Structure Determinations”, M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. M. Ono, and P. Guentert, *Nature*, **440**, 52-57 (2006); “SAIL- Stereo-array isotope labeling”, M. and P. Güntert, *Quarterly Reviews of Biophysics*, **42**, 247-300 (2009).

2) “Recent Developments in Stable-Isotope-Aided Methods for Protein NMR Spectroscopy”, S.-y. Ohki and M. Kainosho, *Modern Magnetic Resonance*, 211-218 (2006); “Stable Isotope Labeling Methods for Protein NMR Spectroscopy”, S.-y. Ohki and M. Kainosho, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **53**, 208-226 (2008).

3) “Solution Structure of the C-terminal Dimerization Domain of SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein Solved by the SAIL-NMR Method”, M. Takeda, C.-k.Chang, T.Ikeya, P. Güntert, Y.-h. Chang, Y.-l. Hsu, T.-h. Huang, and M. Kainosho, *J. Mol Biol.*, **380**, 608-622 (2008).

SAILアミノ酸

	構造式		構造式
Ala		Lys	
Arg		Met	
Asn		Phe	
Asp		Pro	
Cys		Ser	
Gln		Thr	
Glu		Trp	
Gly		Tyr	
His		Val	
Ile			
Leu			

メチル標識アミノ酸, 芳香族標識アミノ酸

製品番号	製品名	濃縮度	構造式
A-006a	L-Alanine-2-d,3- ¹³ C, ¹⁵ N		
Q36872	L-Isoleucine-2,3,4,4-d ₄ , ¹³ C ₆ , ¹⁵ N		
I-003	L-Isoleucine-2,3,4,4-d ₄ ,3-methyl,5- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N		
Q36813	L-Leucine-2,3,3,4-d ₄ , ¹³ C ₆ , ¹⁵ N		
Q36902	L-Leucine-2,3,3,4,5,5-d ₇ ,4-methyl- ¹³ C, ¹⁵ N		
L-003	L-Leucine-2,3,3,4, δ1-methyl-d ₇ , δ2-methyl- ¹³ C, ¹⁵ N		
29,914-6	L-Methionine-(methyl- ¹³ C)	99 atom% ¹³ C	
30,061-6	L-Methionine-(methyl-d ₃)	98 atom% D	
65,140-0	L-Methionine-(methyl- ¹³ C,d)	99 atom% ¹³ C 98 atom% D	
29,915-4	L-Methionine-(methyl- ¹³ C,d ₃)	99 atom% ¹³ C 99 atom% D	

製品番号	製品名	濃縮度	構造式
60,814-9	L-Methionine-1- ¹³ C,methyl-d ₃	99 atom% ¹³ C 99 atom% D	
M-003	L-Methionine-2,3,3,4,4-d ₅ ,methyl- ¹³ C, ¹⁵ N		
Q36880	L-Phenylalaine-2,3,3-d ₃ ,Phenyl-3,5-d ₂ , ¹³ C ₉ , ¹⁵ N		
Q36899	L-Phenylalaine-2,3,3-d ₃ ,Phenyl-2,4,6-d ₃ , ¹³ C ₉ , ¹⁵ N		
F-023	L-Phenylalaine-2,3,3-d ₃ ,Phenyl-2,3,5,6-d ₄ ,Phenyl-4- ¹³ C, ¹⁵ N		
Y-023	L-Tyrosine-2,3,3-d ₃ ,Phenyl-2,6-d ₂ ,Phenyl-3,5- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N		
T-006	L-Threonine-2,3-d ₂ ,4- ¹³ C, ¹⁵ N		
Q36848	L-Valine-2,3-d ₂ , ¹³ C _s , ¹⁵ N		
Q36821	L-Valine-2,3,4,4,4-d ₅ ,3-methyl- ¹³ C, ¹⁵ N		
V-003	L-Valine-2,3, γ2-methyl-d _s , γ1-methyl- ¹³ C, ¹⁵ N		

膜タンパク質機能解明における安定同位体の利用

幸福裕
東京大学
助教嶋田一夫
東京大学
教授■ 転移交差飽和法を用いたケモカイン MIP-1 α とその受容体 CCR5 との相互作用解析

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種であるケモカイン受容体 CCR5 と、そのリガンド MIP-1 α は、様々な免疫応答や HIV 感染に関与しており、その相互作用様式の解明が望まれている。一方で、CCR5 の収量や安定性が低いために、十分な測定感度にて、NMR による相互作用解析をおこなうことは困難であった。そこで、CCR5 の安定化のために、界面活性剤の代わりに、より生理的条件に近い再構成高密度リポタンパク質 (rHDL) の中に CCR5 を埋め込み NMR 試料とした (図1)。さらに NMR 測定の高感度化のために、大腸菌発現系により、

MIP-1 α のイソロイシン・ロイシン・バリン残基メチル基を選択的に ^{13}C 標識し、それ以外を ^2H グルコース、重水を用いて高度に ^2H 標識した。これらの試料を用いて、我々が開発した転移交差飽和 (TCS) 法¹⁾ により相互作用解析を行った (図2)。その結果、MIP-1 α 上の V59・V63 を含む領域が CCR5 と近接することを新たに同定した (図3)。この結果により、MIP-1 α E57 の変異が HIV 感染に影響する機構として、変異が CCR5 との相互作用に直接影響を与えることが示された²⁾。

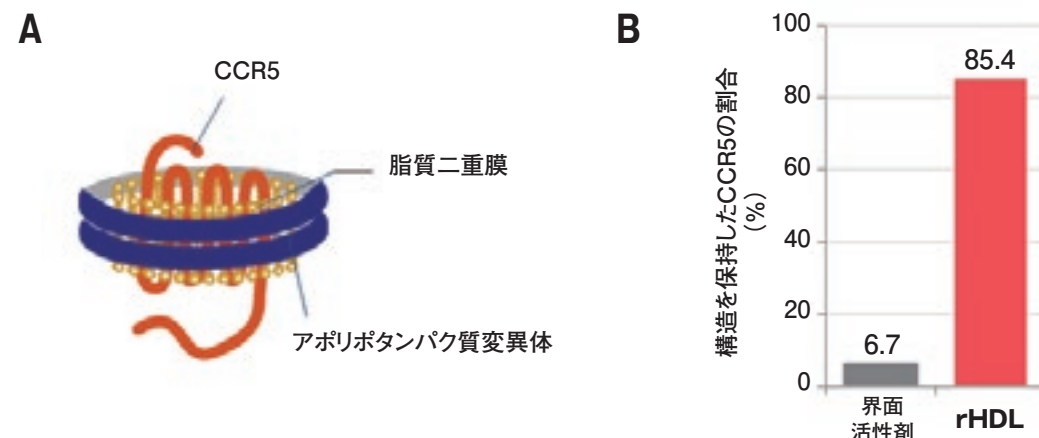


図1 CCR5 の rHDL への再構成. (A) rHDL 中の CCR5 の模式図. (B) 界面活性剤中および rHDL 中で 4℃ にて 24 時間静置後に構造を保持している CCR5 の割合.

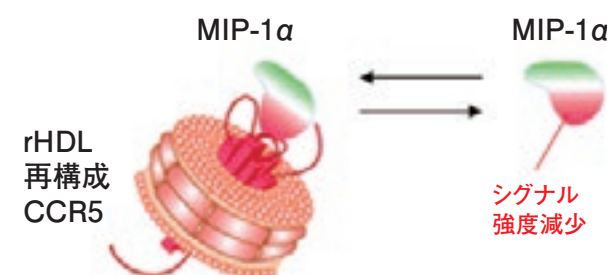


図2 TCS 法の模式図. CCR5 を選択的に飽和すると、その飽和は空間的に近接した MIP-1 α にも伝播する. MIP-1 α が結合状態と遊離状態を交換している場合には、遊離状態の MIP-1 α の CCR5 相互作用界面に対応する残基の NMR シグナル強度が選択的に減少する.

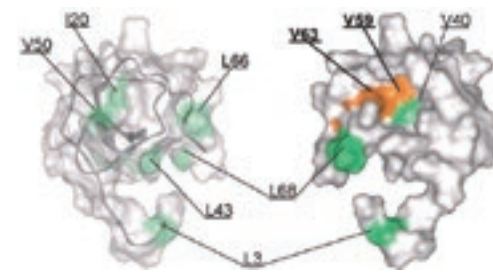


図3 TCS 法による解析結果. TCS の結果、強度減少した残基を MIP-1 α の構造上に橙で、それ以外の残基を緑で示す. V59・V63 を含む領域が CCR5 に近接することが明らかとなった.

■ β_2 アドレナリン受容体の動的構造の解析によるシグナル伝達機構の解明

GPCR の一種である β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) は、気管支拡張などの生理応答に関与するが、 β_2 AR を介したシグナル伝達強度が決まる機構は不明である。高分子量膜タンパク質である β_2 AR の高感度 NMR 解析には、メチル基の選択的 ^{13}C 標識や、その周囲の ^2H 標識が必須である。一方で、活性を保持した β_2 AR の大量発現に必要な昆虫細胞発現系では、大腸菌や酵母で一般的な重水やアミノ酸前駆体を用いた標識法が適用できない。そこで、我々は、昆虫細胞発現系において、標識アミノ酸を適切な量とタイミングで添加することにより、メチオニン残基メチル基を選択的に ^{13}C 標識し、その周囲を ^2H 標識する方法を新たに開発し、約 5 倍の感度向上を得た (図4)。これにより、rHDL の脂質二重膜中における β_2 AR の NMR シグナルを、高感度に観測することに初めて成功した。様々なリガンドが結合した β_2 AR の NMR シグナルの解析から、 β_2 AR が 2 種類の不活性化構造と 1 種

類の活性化構造の間の動的構造平衡にあること、平衡における活性化構造の割合により β_2 AR のシグナル伝達強度が決定されていることが明らかになった (図5)^{3, 4)}。

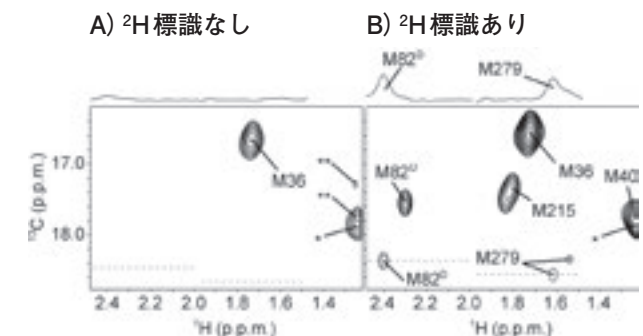


図4 ^2H 標識による β_2 AR の NMR シグナルの感度向上. (A) メチオニンメチル基を ^{13}C 標識した rHDL 再構成 β_2 AR の ^1H - ^{13}C 相関スペクトル. (B) メチオニンメチル基を ^{13}C 標識し、さらにその周囲を ^2H 標識した rHDL 再構成 β_2 AR の ^1H - ^{13}C 相関スペクトル. 点線部分の切り出しを各スペクトル上部に示す.

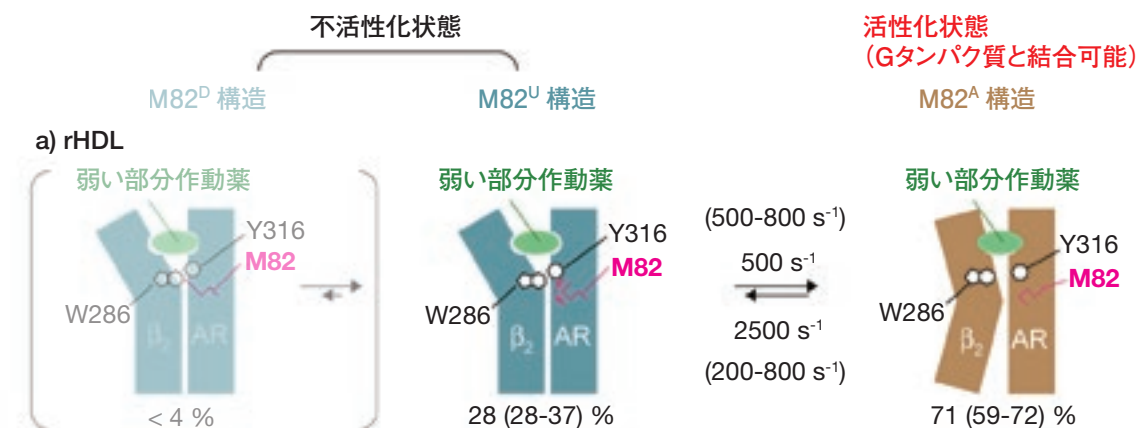


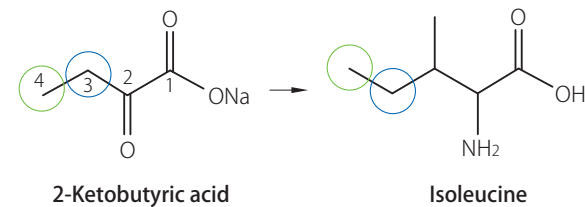
図5 安定同位体標識 β_2 AR の NMR 解析から明らかになった動的構造平衡. 弱い部分作動薬が結合した状態における、各構造の割合とその間の交換速度を示す.

参考文献

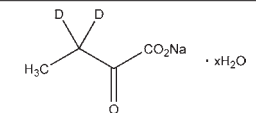
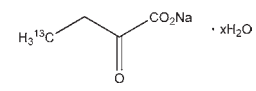
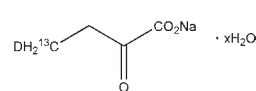
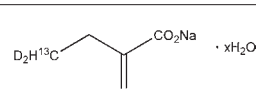
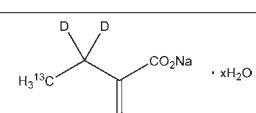
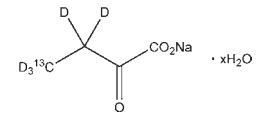
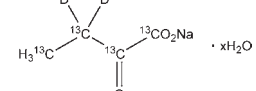
- 1) Ueda, T., Takeuchi, K., Nishida, N., Stampoulis, P., Kofuku, Y., Osawa, M., & Shimada, I. Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments. Q. Rev. Biophys., (2014), **47**, 143-187.
- 2) Yoshiura, C., Kofuku, Y., Ueda, T., Mase, Y., Yokogawa, M., Osawa, M., Terashima, Y., Matsushima, K., & Shimada, I. NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers. J. Am. Chem. Soc., (2010), **132**, 6768-6777.
- 3) Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Maeda, M., Tsujishita, H., & Shimada, I. Efficacy of the β_2 -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. Nature Communications, (2012), **3**, 1045.
- 4) Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Mizumura, T., Suzuki, S., & Shimada, I. Functional dynamics of deuterated β_2 -adrenergic receptor in lipid bilayers revealed by NMR spectroscopy. Angew. Chem. Int. Ed., (2014), **53**, 13376-13379.

α-ケト酸

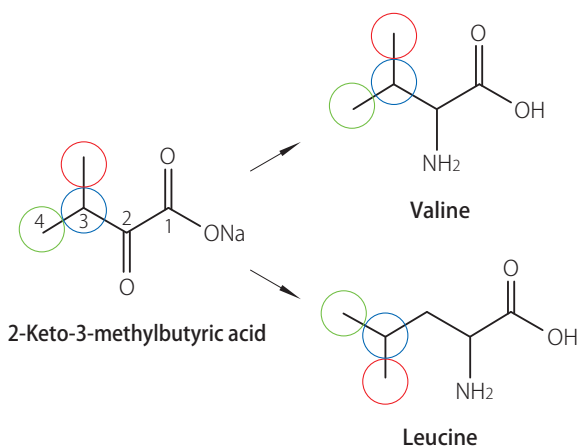
安定同位体標識されたα-ケト酸を培地に添加することにより、生細胞のアミノ酸合成経路を利用したメチル標識イソロイシン、ロイシン、バリンが合成され、これらの標識アミノ酸が、タンパク質に取り込まれる



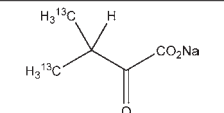
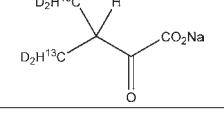
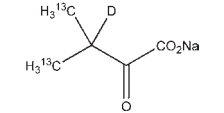
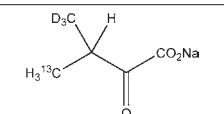
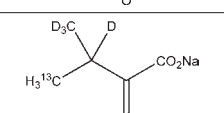
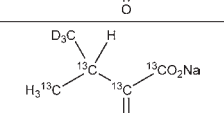
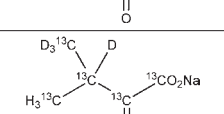
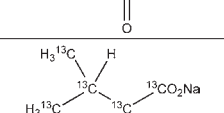
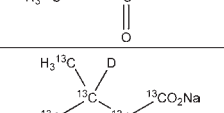
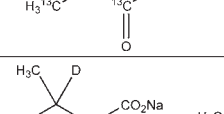
2-Ketobutyric acid

製品番号	製品名	濃縮度	構造式
71,715-0	2-Ketobutyric acid-3,3-d ₂ sodium salt hydrate (97% CP)	97 atom % D	
57,134-2	2-Ketobutyric acid-4- ¹³ C sodium salt hydrate (97% CP)	99 atom % ¹³ C	
63,783-1	2-Ketobutyric acid-4- ¹³ C,4-d ₁ sodium salt hydrate (98% CP)	99 atom % ¹³ C 97 atom % D	
63,472-7	2-Ketobutyric acid-4- ¹³ C,4,4-d ₂ sodium salt hydrate (98% CP)	99 atom % ¹³ C 98 atom % D	
58,927-6	2-Ketobutyric acid-4- ¹³ C,3,3-d ₂ sodium salt hydrate (98% CP)	99 atom % ¹³ C 98 atom % D	
60,753-3	2-Ketobutyric acid-4- ¹³ C,3,3,4,4-d ₅ sodium salt hydrate (98% CP)	99 atom % ¹³ C 50-70 atom % D (¹³ CD ₃) 97 atom % D (CD ₂)	
60,754-1	2-Ketobutyric acid- ¹³ C ₄ ,3,3-d ₂ sodium salt hydrate (98% CP)	99 atom % ¹³ C 98 atom % D	

ことにより、メチル選択的安定同位体標識タンパク質を作成することができます。太陽日酸は、各種α-ケト酸をラインナップしております。



2-Keto-3-methylbutyric acid

製品番号	製品名	濃縮度	構造式
57,133-4	2-Keto-3-(methyl- ¹³ C)-butyric acid-4- ¹³ C sodium salt (97% CP)	99 atom % ¹³ C	
63,437-9	2-Keto-3-(methyl- ¹³ C,d ₂)-butyric acid-4- ¹³ C, d ₂ sodium salt	98 atom % ¹³ C 98 atom % D	
58,906-3	2-Keto-3-(methyl- ¹³ C)-butyric acid-4- ¹³ C, 3-d ₁ sodium salt (97% CP)	99 atom % ¹³ C 98 atom % D	
59,490-3	2-Keto-3-(methyl-d ₃)-butyric acid-4- ¹³ C sodium salt	99 atom % ¹³ C 98 atom % D	
69,188-7	2-Keto-3-(methyl-d ₃)-butyric acid-4- ¹³ C,3-d ₁ sodium salt (97% CP)	99 atom % ¹³ C 97 atom % D	
59,641-8	2-Keto-3-(methyl-d ₃)-butyric acid-1,2,3,4- ¹³ C ₄ sodium salt	99 atom % ¹³ C 98 atom % D	
63,785-8	2-Keto-3-(methyl- ¹³ C,d ₃)-butyric acid-1,2,3,4- ¹³ C ₄ , 3-d ₁ sodium salt (98% CP)	99 atom % ¹³ C 98 atom % D	
66,398-0	2-Keto-3-methylbutyric acid- ¹³ C ₅ sodium salt	99 atom % ¹³ C	
60,756-8	2-Keto-3-methylbutyric acid- ¹³ C ₅ , 3-d ₁ sodium salt	99 atom % ¹³ C 98 atom % D	
71,716-9	2-Keto-3-methylbutyric-3-d acid, sodium salt hydrate (98% CP)	98 atom % D	

糖タンパク質の安定同位体標識

加藤晃一

自然科学研究機構
岡崎統合バイオサイエンスセンター
教授

タンパク質の多くは裸の状態ではなく糖鎖という衣装を身に纏って働いている。自然界に存在するタンパク質全種類の実に半数以上は糖鎖による修飾をうけているものと見積もられている。糖鎖は、タンパク質の溶解性や熱安定性といった物理化学的性質を規定しているばかりでなく、タンパク質機能部位の構造構築に積極的に関わり、レクチンと総称されるタンパク質との相互作用を通じて、様々な生命現象を媒介している。例えば、糖鎖は細胞の顔としてその表層を覆い、細胞同士のコミュニケーションにおける言語としての役割を演じており、その一方でウイルスが感染する際の標的にもなっている。タンパク質の細胞内外における運命もそれらが担う糖鎖とレクチンとの相互作用を通じて決定されている。特に最近、創薬の分野で糖鎖の存在が注目されている。主要なバイオ医薬は糖タンパク質であり、その性状と性能に糖鎖の構造が深く関わっていることが明らかになってきているからである。例えば、代表的なバイオ医薬である抗体においては、そのFc領域に結合している糖鎖の構造のわずかな違いによってがん細胞を殺傷する能力が100倍近くも変わってくることが知られている。

近年の構造生物学の進展によってタンパク質の立体構造情報は爆発的な勢いで蓄積されてきている。しかしながら、プロテインデータバンクに登録されているタンパク質3次元構造データ約10万件のうち糖タンパク質に関するものは全体の4%にも満たず、NMRで決定されたものは20例以下(0.02%)に留まっている¹⁾。しかもその大半はわずか糖1残基程度の情報を与えているにすぎない。構造生物学研究で広く用いられている大腸菌発現系や無細胞系で糖タンパク質を発現する方法が確立していないことがその大きな理由である。また、タンパク質を修飾する糖鎖の構造は化学的に不均一であるとともに高い柔軟性を有しているがゆえに結晶化が困難である。これらも糖鎖の構造生物学研究を阻んできた要因である。それゆえに、これまでの構造生物学は

糖鎖の存在を無視して解析を行うということが往々にして行われてきた。(ちなみに、このような状況は構造生物学に限らず生体分子研究に広くみられてきた風潮で、glycophobics と言い表されるほどである。) NMRは糖タンパク質のような動的不均一系の構造解析を可能とする潜在的能力を持っているが、その有用性を十分に発揮するためには試料に安定同位体標識を施すことが必要不可欠である。

現在のところ糖タンパク質の安定同位体標識に最も有効な方法は真核細胞を利用したタンパク質発現系を利用することである。動物細胞、昆虫細胞、酵母など様々な真核細胞発現系を利用した標識技術がこれまでに報告されている²⁾。私たちは、大陽日酸の支援のもとで哺乳動物細胞発現系を用いた糖タンパク質の代謝標識技術の開発と応用に取り組んできた。例えば、バイオ医薬品の生産に広く用いられているチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を代謝前駆体(アミノ酸、グルコース、ピルビン酸、コハク酸)をすべて安定同位体標識体で置き換えた無血清培地中で培養することによって、均一に¹³Cおよび¹⁵N標識した抗体を調製することができる³⁾。ヒト抗体IgGのFc領域(分子質量53kDa)に関しては最近、主鎖シグナルの帰属を公開した⁴⁾。こうした情報を利用することによって糖鎖改変やアミノ酸残基置換あるいは長期保存などに伴う抗体の構造変化を細やかに評価することが可能となり、抗体医薬の設計・開発にも役立つものと期待される。

このように培養動物細胞を利用した糖タンパク質の安定同位体標識は少しずつ普及してきているが未だ生産コストが高いことが懸案材料であろう。私たちは、哺乳類細胞以外の真核生物発現系にも注目して糖タンパク質の安定同位体標識技術を開発することにも取り組んでいる。例えば、出芽酵母を利用したシステムは、糖鎖プロセッシングに関わる遺伝子をノックアウトすることによって糖タンパク質の糖鎖構造を均一化した状態で同位体標識する技術へと発展しつつある(産総研糖

鎖医工学研究センター千葉靖典先生らとの共同研究)⁵⁾。また、トランスジェニックタバコを硝酸カリウム、硝酸アンモニウムを主な窒素源として水耕栽培することによって¹⁵N標識した抗体を生産しNMR計測を実施している(産業技術総合研究所 北海道センター松村健先生らとの共同研究)⁶⁾。ごく最近、生きたカイコにバキュロウイルスを感染させるシステムを利用して安定同位体標識した抗体を発現し、そのNMR解析に成功している⁷⁾。これは同位体標識した酵母から抽出したタンパク質を含む人工飼料を大陽日酸と共同で開発することによってはじめて実現されたものである。

糖鎖の構造はゲノムに直接コードされていないため、その構造を自由自在にコントロールすることはこれからの課題だが、糖鎖の生合成に関わる遺伝子の導入や発現制御などを通じてタンパク質の糖鎖構造をテーラーメイドなかたちで生産しようという試みも着実に進展しつつある。構造生物学がこれまで積極的に取り組ってこなかった糖タンパク質もNMR解析として益々身近なものとなるに違いない。こうした技術は基礎研究のみならずバイオ医薬品の設計・開発や高度化をはじめとする産業界のニーズに応えることにもつながるであろう。

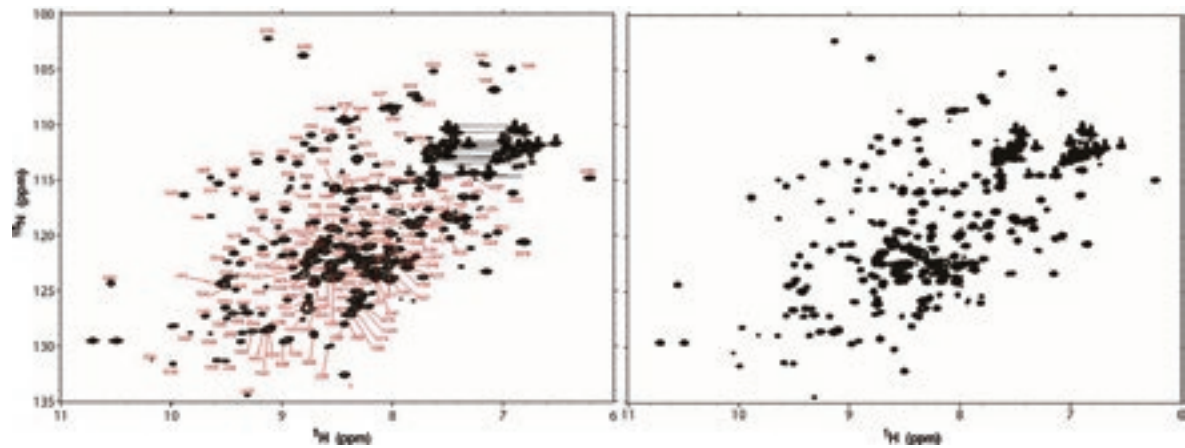


図 CHO細胞(左)およびカイコ(右)を用いて発現した抗体のFc領域の¹H-¹⁵N HSQCスペクトル(文献4および7より引用)

参考文献

- 1) Y. Kamiya, T. Satoh, and K. Kato: Curr Opin Struct Biol, **26**, 44-53 (2014)
- 2) K. Kato, Y. Yamaguchi, and Y. Arata: Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy, **56**, 346-359 (2010)
- 3) Y. Yamaguchi, and K. Kato: Methods in enzymology, **478**, 305-322 (2010)
- 4) H. Yagi, Y. Zhang, M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, S. Iida, Y. Yamaguchi, and K. Kato: Biomol. NMR assign., Oct. (2014) DOI 10.1007/s12104-014-9586-7
- 5) Y. Kamiya, S. Yamamoto, Y. Chiba, Y. Jigami, and K. Kato: J Biomol NMR, **50**, 397-401 (2011)
- 6) H. Yagi, N. Fukuzawa, Y. Tasaka, K. Matsuo, Y. Zhang, T. Yamaguchi, S. Kondo, S. Nakazawa, N. Hashii, N. Kawasaki, T. Matsumura, and K. Kato: Plant Cell Reports, **34**, 959-968 (2015)
- 7) H. Yagi, M. Nakamura, J. Yokoyama, Y. Zhang, T. Yamaguchi, S. Kondo, J. Kobayashi, T. Kato, Y. E. Park, S. Nakazawa, N. Hashii, N. Kawasaki, and K. Kato: J. Biomol. NMR, in press (2015) DOI 10.1007/s10858-015-9930-y

培地

■ 標識培地 ISOGRO®

製品番号	製品名	濃縮度
60,686-3	ISOGRO®- ¹³ C Powder-Growth Medium	99 atom % ¹³ C
60,687-1	ISOGRO®- ¹⁵ N Powder-Growth Medium	98 atom % ¹⁵ N
61,672-9	ISOGRO®-D Powder-Growth Medium	97-99 atom % D
60,683-9	ISOGRO®- ¹³ C, ¹⁵ N Powder-Growth Medium	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

ISOGRO® Powderを用いた大腸菌の培養例

ISOGRO®培地 100 mL 調製用：

1. ISOGRO® Powder 1gを約90mLのMilli-Q® 水に溶解します

2. 下記濃度の塩類等のストック溶液を作成の上、以下に示した分量を加えます
- | Salt | Conc. of Stock Soln. | Qty/100 mL medium |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------|
| K ₂ HPO ₄ | 100 g/L | 1.8 mL |
| KH ₂ PO ₄ | 50 g/L | 2.8 mL |
| MgSO ₄ | 50 g/L | 2.0 mL |
| CaCl ₂ ・H ₂ O | 37 g/L | 30 μL |
3. NaOHでpH7.0に調整し、Milli-Q® 水で100mLにフィリアップします

4. 0.22 μ mのフィルターを通し、オートクレーブ滅菌した振とう用フラスコに移します (例：50mL 培地に対して、500mL容フラスコ)

5. 大腸菌のプレートからISOGRO® 液体培地に接種します

6. 37℃に設定した培養器で振とう培養します

7. 増殖を吸光度 (OD600)測定により確認します

製品番号	製品名	濃縮度
60,830-0	ISOGRO®- ¹⁵ N,D Powder-Growth Medium	98 atom % ¹⁵ N 97 atom % D
60,829-7	ISOGRO®- ¹³ C, ¹⁵ N,D Powder-Growth Medium	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N 97-99 atom % D

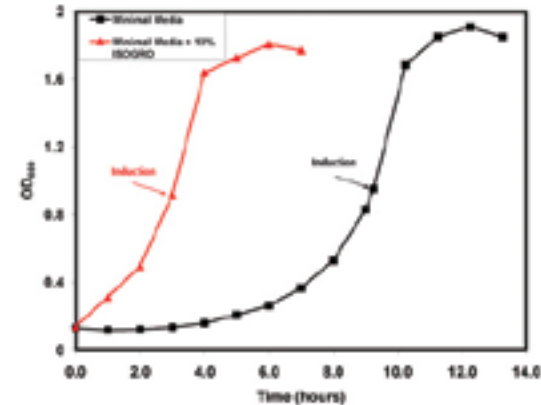


図 大腸菌 (cTnC(1-89) pLysS) の増殖曲線 (OD600)
赤線は、最少培地にISOGRO®を添加した場合、黒線は、最少培地のみで培養した場合の増殖曲線

上記のISOGRO® Powderを用いた大腸菌の培養例は、ISOTEC®のホームページ記載情報を翻訳したものです。

■ 標識培地用試薬

製品番号	製品名	濃縮度
29,925-1	Ⓐ Ammonium- ¹⁵ N chloride	98 atom % ¹⁵ N
59,409-1	Ammonium- ¹⁵ N,d ₄ deuterioxide solution,~3 N in D ₂ O	99 atom % ¹⁵ N 98 atom % D
48,801-1	ⒷⒶ Ammonium- ¹⁵ N hydroxide solution, ~3 N in H ₂ O	98 atom % ¹⁵ N
29,928-6	Ammonium- ¹⁵ N ₂ sulfate	98 atom % ¹⁵ N
15,188-2	Deuterium oxide	99.9 atom % D
61,738-5	Deuterium oxide	99.8 atom % D
43,576-7	Deuterium oxide	99 atom % D
61,342-8	Deuterium oxide	70 atom % D
49,507-7	D-Galactose-1-d ₁	98 atom % D
48,873-9	D-Glucosamine-1- ¹³ C・HCl	99 atom % ¹³ C
55,200-3	D-Glucose-C-d ₇	97 atom % D
61,633-8	D-Glucose-d ₁₂	97 atom % D
29,704-6	D-Glucose-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
38,937-4	D-Glocose- ¹³ C ₆	99 atom % ¹³ C
55,215-1	D-Glucose- ¹³ C ₆ ,1,2,3,4,5,6,6,-d ₇	99 atom % ¹³ C 97 atom % D

製品番号	製品名	濃縮度
44,749-8	Glycerol-d ₈ (98% CP)	98 atom % D
49,263-9	Glycerol-1,3- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
48,947-6	Glycerol- ¹³ C ₃	99 atom % ¹³ C
66,902-4	Glycerol- ¹³ C ₃ ,d ₈	99 atom % ¹³ C 98 atom % D
37,238-2	Sodium Bicarbonate- ¹³ C	98 atom % ¹³ C
49,073-3	Sodium Pyruvate-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
49,071-7	Sodium Pyruvate- ¹³ C ₃	99 atom % ¹³ C
49,070-9	Sodium Pyruvate-1- ¹³ C (Pyruvic acid-1- ¹³ C Sodium Salt)	99 atom % ¹³ C
49,339-2	Sodium Pyruvate-1,2- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
49,072-5	Sodium Pyruvate-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,619-1	Sodium Pyruvate-2,3- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
49,073-3	Sodium Pyruvate-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,848-3	Sodium Pyruvate-3- ¹³ C ₃ ,3,3-d ₃	99 atom % ¹³ C 50-60 atom % D
49,197-7	Succinic acid-1,2- ¹³ C ₂ (Butanedioic acid-1,2- ¹³ C ₂)	99 atom % D

糖

製品番号	製品名	濃縮度
41,555-3	D-Fructose-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
49,214-0	D-Fructose-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,539-5	D-Fructose-6- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
58,761-3	D-Fructose-1,6- ¹³ C ₂	98 atom % ¹³ C
58,762-1	D-Fructose- ¹³ C ₆	99 atom % ¹³ C
48,872-0	D-Fructose-6,6-d ₂	98 atom % D
41,554-5	D-Galactose-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,537-9	D-Galactose- ¹³ C ₆	98 atom % ¹³ C
49,507-7	D-Galactose-1-d ₁	98 atom % D
30,606-1	Glyce (ol-d ₃)	99 atom % D
48,948-4	Glycerol-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
49,263-9	Glycerol-1,3- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
48,947-6	Glycerol- ¹³ C ₃	99 atom % ¹³ C
45,452-4	Glycerol-1,1,2,3,3-d ₅	98 atom % D
44,749-8	Glycerol-d ₈ (98% CP)	98 atom % D
48,873-9	D-Glucosamine-1- ¹³ C・HCl	99 atom % ¹³ C
60,928-5	D-Glucosamine- ¹⁵ N・HCl	98 atom % D
60,821-1	D-Glucosamine-1- ¹³ C, ¹⁵ N・HCl	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
49,216-7	D-Glucose- ¹² C ₆ (Dextrose- ¹² C ₆)	99.5 atom % ¹² C
29,704-6	D-Glucose-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
31,079-4	D-Glucose-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,540-9	D-Glucose-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
31,080-8	D-Glucose-6- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
45,318-8	D-Glucose-1,2- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
45,319-6	D-Glucose-1,6- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C

製品番号	製品名	濃縮度
60,550-6	D-Glucose-2,5- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
60,546-8	D-Glucose-4,5- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
38,937-4	D-Glucose- ¹³ C ₆	99 atom % ¹³ C
60,685-5	D-Glucose- ¹³ C ₆	75 atom % ¹³ C
31,081-6	D-Glucose-1-d ₁	98 atom % D
31,082-4	D-Glucose-2-d ₁	98 atom % D
61,549-8	D-Glucose-3-d ₁	97 atom % D
28,265-0	D-Glucose-6,6-d ₂	98 atom % D
59,716-3	D-Glucose-6,6-d ₂ (For clinical investigational use)	98 atom % D
55,200-3	D-Glucose-C-d ₇	97 atom % D
61,633-8	D-Glucose-d ₁₂	97 atom % D
55,215-1	D-Glucose- ¹³ C ₆ ,C-d ₇	99 atom % ¹³ C 97 atom % D
60,823-8	D-Glucose- ¹³ C ₆ ,C-d ₇	99 atom % ¹³ C 80 atom % D
60,532-8	D-Lactose-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
41,553-7	D-Mannose-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,534-4	D-Mannose-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,538-7	D-Mannose-6- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
59,299-4	D-Mannose- ¹³ C ₆	98 atom % ¹³ C
48,918-2	D-Sorbitol-1- ¹³ C (D-Glucitol-1- ¹³ C)	99 atom % ¹³ C
60,552-2	D-Sorbitol-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,551-4	D-Sorbitol- ¹³ C ₆	99 atom % ¹³ C
61,620-6	D-Sorbitol-1,1,6,6-d ₄	98 atom % D
33,110-4	D-Xylose-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C

安定同位体標識核酸を用いたNMR解析



河合剛太
千葉工業大学
教授

■はじめに

核酸は古くから知られている分子であるが、特にRNAは、近年その生物学的な重要性が再認識され、構造生物学の研究対象として脚光を浴びている。タンパク質がさまざまな官能基をもつ20種類のアミノ酸からなり、そのNMRシグナルにバラエティがあるのに対して、核酸は4種類のヌクレオチドからなり、さらにいずれも塩基、糖、リン酸基という限られた化学構造でできていることから、NMRシグナルが密集する傾向にある。したがって、核酸のNMR解析において、安定同位体標識は必須である。

■安定同位体標識の方法

試料調製において、タンパク質の場合には、大腸菌など生細胞を利用した大量発現系あるいは細胞抽出液を利用した無細胞系が用いられているが、核酸の場合には、酵素合成あるいは化学合成が用いられる。これは主として、DNAは細胞中で大量に増えることはなく、またRNAについては細胞内あるいは細胞抽出液内で分解が速いことによる。

DNAの安定同位体標識：DNA試料は、化学合成あるいはPCRで調製することができる。DNAの場合には、化学合成の効率が良いので、100残基程度でも調製が可能である。安定同位体標識されたデオキシアミダイトユニットを用いれば、配列中の任意の位置を標識できる。PCRの場合には、安定同位体標識 dNTP を基質として用いることによって、標識 DNA の調製が可能である。4種類すべてを標識することもできるし、塩基の種類ごとに標識することもできる。なお、プライマーの部分は標識されない。短いDNA断片を作成する場合には、同じ配列を繰り返したDNAを用意して、PCRによって増やした後、制限酵素等で切断することによって効率良く調製することも可能である。

RNAの安定同位体標識：RNAの場合、30残基程度の短いものについては化学合成が可能であるが、それより長いものについては、試験管内転写法が用いられる。RNAの化学合成場合、リボースの2'位の水酸基の保護が必要となるため、DNAと比べて工程が煩雑であり、長いRNAの合成は効率が落ちる。それでも、任意の位置を標識できるメリットは大きく、安定同位体標識アミダイトユニットを用いたRNAの化学合成は重要である。試験管内転写法では、T7 RNAポリメラーゼを用いる方法が一般的であり、多くの場合、合成キットを用いた1 mLスケールの反応でNMR測定に必要な量のRNA試料が得られる。ただし、塩基配列によって転写反応の効率が大きく下がることもあり、また、5'末端がG残基であることが必要である。長いRNAの特定の位置を標識するためには、化学合成等で調製した標識 RNA断片を含む複数の断片をT4 RNA ligaseなどによって連結する方法が有効である。

■安定同位体標識核酸のNMRスペクトル解析

ワトソン・クリック塩基対が存在すると、グアニン(G)のNH1およびチミン(T)あるいはウラシル(U)のNH3のシグナルが10 ppmより低磁場に観測される。これらのイミノプロトンシグナルは、核酸の他のシグナルやタンパク質のシグナルと重ならないため、構造解析や相互作用解析において重要である。安定同位体標識核酸を用いると、 ^{15}N 核の化学シフトからGであるかT/Uであるかが明確に区別できる(図1)。

^{13}C 核の化学シフトを利用すると、アデニン(A)のCH2が他の塩基のCHと区別できる。また、シトシン(C)のCH5とUのCH5を区別できる。なお、DNAの場合には、CとTでスピン系が異なっているため、標識しなくても区別が可能である。核酸の場合には、各残基がリン酸基を介してつながっているため、タンパク質のような三重共鳴実験による連鎖帰属はできないが、安定同位体標識を行うことによって、一つの残基内の塩基と

リボースのシグナルを関連付けることができ、また、塩基の ^{15}N 核および ^{13}C 核の化学シフトを利用することで分離能を改善することができる。もちろん、残基選択的な標識を行えば、シグナルの帰属の手間は大きく軽減される。

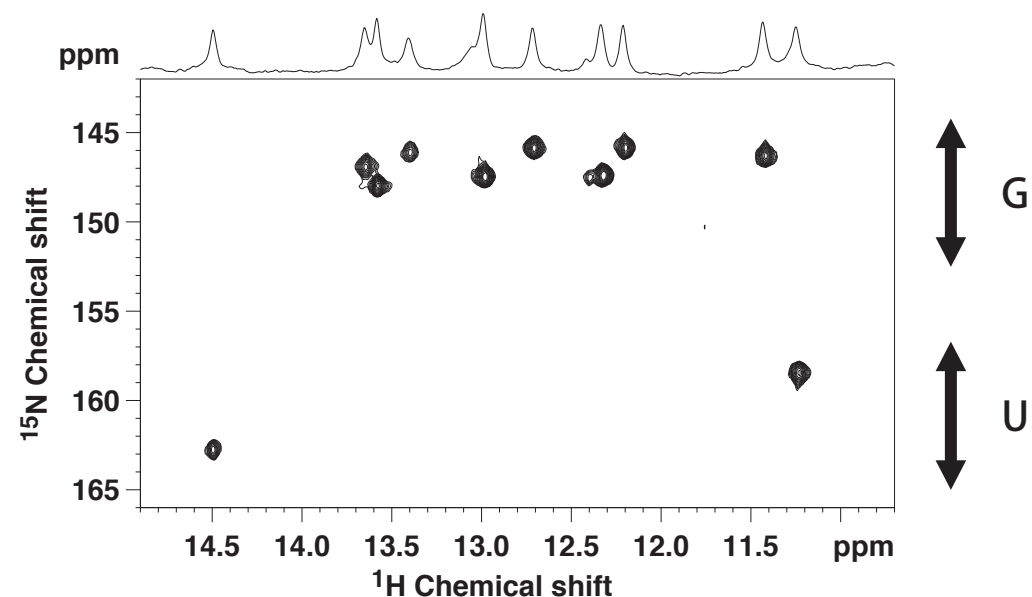


図1 RNAの ^{15}N - ^1H HMQC スペクトル (31 残基, 軽水中)
 ^{15}N 核の化学シフトの違いによって、GとUが明確に区別できる。11.3 ppm付近にG-U塩基対に由来する2つのシグナルが観測されているが、これについてもGとUが容易に区別できることがわかる。

核酸

創薬や生命科学の分野において、核酸 (DNA/RNA) の構造・機能解析の重要性が高まっており、NMR解析に必須な安定同位体標識技術 (酵素合成法や化学合成法等) が開発されております。大陽日酸は、これらの原料

■ DNA
2'-Deoxyribonucleotide-¹³C,¹⁵N 5'-monophosphates sodium salt (dNMPs-¹³C,¹⁵N)

製品番号	製品名	濃縮度
64,862-0	dAMP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,860-4	dGMP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,861-2	dCMP- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₃ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,859-0	TMP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

■ RNA
Ribonucleotide-¹⁵N 5'-monophosphates sodium salt (rNMPs-¹⁵N)

製品番号	製品名	濃縮度
66,265-8	AMP- ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹⁵ N
66,267-4	GMP- ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹⁵ N
66,268-2	CMP- ¹⁵ N ₃ (90% CP)	98 atom % ¹⁵ N
66,266-6	UMP- ¹⁵ N ₂ (90% CP)	98 atom % ¹⁵ N

Ribonucleotide-¹³C,¹⁵N 5'-Triphosphates sodium salt (rNTPs-¹³C,¹⁵N)

製品番号	製品名	濃縮度
64,570-2	ATP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,568-0	GTP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,569-9	CTP- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₃ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,567-2	UTP- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₂ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

■ 安定同位体標識DNA/RNA 受託合成
特徴 高 純 度 精 製：20%変性 PAGE/HPLC
大 量 調 製：20 ODU ～ (100 ODU 以上も合成可能)
標識パターン：¹³C,¹⁵N,D 標識、選択標識、等

となる高品質な安定同位体標識デオキシリボヌクレオチド (dNMP's)、リボヌクレオチド(rNTP's)およびアミダイト試薬 (DNA/RNA Phosphoramidites) を提供いたします。

2'-Deoxyribonucleotide-¹³C,¹⁵N 5'-triphosphates sodium salt solution (dNTPs-¹³C,¹⁵N)

製品番号	製品名	濃縮度
64,623-7	dATP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,621-0	dGTP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,622-9	dCTP- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₃ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
64,620-2	TTP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₂ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

* Supplied as sodium salt in 100 mM soln in H₂O, 5 mM Tris HCl buffer

Ribonucleotide-¹³C,¹⁵N 5'-monophosphates sodium salt (rNMPs-¹³C,¹⁵N)

製品番号	製品名	濃縮度
65,067-6	AMP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
65,068-4	GMP- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₅ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
65,069-2	CMP- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₃ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
65,137-0	UMP- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₂ (90% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

rN-Phosphoramidites-¹³C,¹⁵N

製品番号	製品名	濃縮度
A24-0054	 rA-Phosphoramidites- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₅	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
A25-0055	 rG-Phosphoramidites- ¹³ C ₁₀ , ¹⁵ N ₃	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
A26-0056	 rC-Phosphoramidites- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₃	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
A27-0057	 rU-Phosphoramidites- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₂	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

*5'-O-DMTr-2'-O-tBDMS-N-Pac-CE Phosphoramidites

タンパク質とタンパク質や核酸等との相互作用

西村善文
横浜市立大学
学長補佐



ヒトゲノムの解析により、ヒトは約23,000個の遺伝子を持っている事が分かった。これらの遺伝子は多くの場合、タンパク質に翻訳されて機能する。生じたタンパク質は様々な生体分子と相互作用して、その機能を発揮する。よって遺伝子の働きを知るためには、遺伝子産物であるタンパク質の働きを知る必要がある。タンパク質は他のタンパク質やDNA、RNA等の核酸や、様々な代謝化合物と相互作用して働く。その結合の詳細を知るために、タンパク質を構成している分子の原子レベルでの理解が必須となりつつある。タンパク質の働きは様々な生命機能の維持に必要なので、その働きが異常になると様々な病気になる。このような様々な病気に関わるタンパク質の働きを制御できれば、病気の治療も可能になる。病気の原因となるタンパク質は、様々な理由で機能が異常になっているが、機能異常を制御できる化合物が薬となる。タンパク質の相互作用を精密に制御するためには、タンパク質による相互作用の詳細を知る必要があり、タンパク質を構成する分子中の原子レベルでの相互作用を解明する必要がある。

このような合理的な考えかたで薬を創造していくためには、原子レベルでタンパク質の相互作用の実態を解明する必要がある。その中の手法の一つとして近年注目を浴びているのが、核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) である。NMRは、原子核のスピンの状態を検査する手法である。原子核のスピンは、陽子の数が同じ原子でも、構成している中性子の数によって変化し、質量が異なる同位体が存在する。タンパク質中の原子として非常に多いものには、水素原子、炭素原子、窒素原子がある。これらの原子核で、通常は質量が1の水素原子 (¹H) のみがNMRで活性である。炭素原子 (C) は、通常は質量が12 (¹²C) で全くNMR活性ではないが、安定同位体の質量が13の炭素原子 ¹³Cは、水素原子と同じ核スピンを持ち、NMR活性になる。また、窒素原子も通常は質量が14でNMR活性は弱い、質量が15の窒素原子 ¹⁵Nは水素原子と同じ核スピンを持ちNMR活性が強くなる。

NMRの測定のためには、タンパク質中の炭素原子の質量を13に、窒素原子の質量を15にする必要がある。タンパク質をこれら安定同位体でラベルするためには、通常、大腸菌を用いた組換えタンパク質として発現し、精製してNMRの測定に用いる。大腸菌は、リン酸と窒素化合物と糖があれば生育できる。窒素化合物として安定同位体ラベルした ¹⁵NH₄Clと、糖として安定同位体でラベルした ¹³C-グルコースをリン酸緩衝液中に溶解し、大腸菌を培養すると、大腸菌内のタンパク質の全ての炭素は ¹³Cでラベルされ、窒素は ¹⁵Nでラベルされる。その様にして調製したタンパク質を用いて、NMRによる構造解析を当研究室では行っている。また、分子量が大きなタンパク質では、¹⁵Nや¹³Cの測定に影響を及ぼす水素原子Hを質量2の重水素²H(D)に置き換えるために、大腸菌を重水(D₂O)中で培養する事もある。その様にして調製したタンパク質を通常の水(H₂O)に溶かすと、炭素原子などに結合した水素原子はDのままだが、アミドのように窒素原子に結合したDは溶媒中のHと交換し、¹H-¹⁵Nの相関を測定できる。また、更に大きなタンパク質では¹Hと¹⁵Nと¹³Cの全てを観測するのではなく、タンパク質中のメチル基のみを¹³C-¹H₃に置換し、他の原子を¹⁴Nと¹²C、Dにして観測するMe-TROSY法もよく使用される。その場合には、重水素化グルコースとメチル基をラベルした酪酸を培養に用いる。

また、タンパク質発現に必要な細胞の破碎液を用意し、細胞中ではなくセルフリーの系にタンパク質発現のための遺伝子 DNAを加えて、安定同位体ラベルタンパク質を得る事も行われている。この場合、安定同位体でラベルしたアミノ酸を加える必要があるが、¹⁵Nでラベルされたアミノ酸、¹⁵Nと¹³Cでラベルされたアミノ酸、¹⁵Nと¹³CとDでラベルされたアミノ酸、更にはメチレンやメチル基の水素原子の1個のみを立体特異的に¹Hとし、¹⁵Nと¹³CとDでラベルされたアミノ酸 (SAILアミノ酸) など、様々な安定同位体ラベルアミノ酸が市販されている。また、細胞破碎液としては、大腸菌由

来と小麦胚芽由来のものなどがあり、どちらも市販されている。

タンパク質の構造解析として、X線結晶構造解析がよく用いられる。結晶ができれば、巨大なタンパク質複合体でも構造が解析できるので、様々なタンパク質やその複合体構造が解析され、報告されている。

その様な状況で、NMRによるタンパク質の構造解析の利点があるとしたら、結晶化できないタンパク質の構造解析である。特に最近、真核生物の核内に存在するタンパク質の半分以上は、単独では特定の構造をとっていない天然変性タンパク質である事が知られるようになってきた。これら核内タンパク質は、遺伝子の総体であるゲノムが同じでも、表現形が異なるエピゲノムと呼ばれるゲノムを超えた現象に関係している。遺伝子 DNA が全く同じでも、DNA が核内でとるクロマチン構造が異なると、遺伝子の発現は異なる。遺伝子の発現は多くの場合、転写レベルで調節されているので、クロマチン構造や転写に関連するタンパク質が、エピゲノムの中心になっている。エピゲノムが重要視されるのは、同じ遺伝子を持っている生体の細胞に4種類の転写因子を発現させると、初期化細胞であるiPS細胞が誘導される事である。また、神経疾患やがん等の様々な病気でエピゲノムの変化が重要である事が分かってきた。これらエピゲノム関連タンパク質は、ほとんどの場合、天然変性領域を持っている。

p53はゲノムの守護神と呼ばれ、様々な生物学的過程に関与する非常に重要なタンパク質で、がん抑制タンパク質として知られ、悪性腫瘍の半分以上でp53遺伝子の異常が見つまっている。p53の働きを正常化できると、多くのがんは治癒できる可能性がある。p53は、N末約70アミノ酸領域の転写活性化ドメインと中央部約200アミノ酸領域のDNA結合ドメインとC末の4量体形成ドメインを持つ約400アミノ酸からなるタンパク質である。各々のドメインの複合体の構造解析は、そのタンパク質の重要性から長年にわたって多くの研究者により解析されてきた。N末の転写活性化ドメインは、9個のリン酸化されるセリン残基やトレオニン残基を持っている。各々のリン酸化が標的タンパク質との相互作用を制御しているので、p53の転写活性化ドメインの特定の部位のリン酸化が構造に及ぼす影響を研究する事は非常に重要である。約70アミノ酸からなるp53の転写活性化ドメインは、単独では特定の構造をとらない天然変性タンパク質であるので、標的タンパク質とどのように相互作用するかが注目されてきた。これまでもp53の転写活性化ドメイ

ンと7種類以上の標的タンパク質の複合体構造が解析されてきたが、解析されたその全てのp53の転写活性化ドメインは非リン酸化体であった。非リン酸化体のp53の転写活性化ドメインは、標的タンパク質の表面で両新媒性ヘリックスを形成していたので、結合に伴うヘリックス形成が重要な認識機構である事が示唆された。しかし、最近、当研究室の特任助教の奥田博士が、46番のセリンと56番のトレオニンがリン酸化されたp53の転写活性化ドメインと基本転写因子のTFIIHのp62サブユニットのPHドメインとの複合体構造をNMRで解析したところ、リン酸化したp53の転写活性化ドメインが、標的タンパク質の表面で伸びた紐状構造で結合している事を初めて解明した。この解明には、先ほど述べた安定同位体でラベルしたタンパク質を使用している。リン酸化された天然変性タンパク質が伸びた紐状構造で結合する様子を、初めて明らかにする事ができた。伸びた紐状の転写活性化ドメインは、リン酸化セリンとリン酸化トレオニンとアスパラギン酸やグルタミン酸を含んだ酸性ドメインなので、負に荷電した紐である。その紐がPHドメインの正に荷電した溝に埋まっている。さらに、この静電的な相互作用だけではなく、p53の転写活性化ドメイン中のトリプトファンの芳香環がPHドメインの疎水的な窪みに収まって、紐の位置を確定していた。この結合の様子は、既に我々が解析していたTFIIHと基本転写因子TFIIEとの相互作用と似ていた。遺伝子の発現の時にはTFIIHがTFIIEに結合してRNA合成酵素が活性化し、mRNAが合成される。遺伝子DNAが傷付くと、遺伝子の発現の転写を止めて遺伝子を修復する。その時には、損傷したDNAに応じてp53がリン酸化され、TFIIHのPHドメインに強く結合できるようになり、TFIIHとTFIIEの相互作用を妨げ、TFIIHをDNA損傷部位にp53がリクルートする。その時のp53の認識機構を我々は解明した(図1)。



図1 青で表示したp53のリン酸化転写活性化ドメインと標的タンパク質の複合体構造 (Okuda, M. and Nishimura, Y., Extended String Binding Mode of the Phosphorylated Transactivation Domain of Tumor Suppressor p53. J. Am. Chem. Soc., **136**, 14143-14152 (2014).)

また、安定同位体を利用したNMR構造解析の利点として、もう一つ例を挙げる。

遺伝子DNAは、細胞の核内でコンパクトに折りたたまれた染色体(クロマチン)構造をとっている。細胞毎にDNAの情報の発現は制御され、遺伝情報が発現しているところのクロマチンは緩んでいて、発現していないところでは非常に高度に凝集したヘテロクロマチンを形成する。ヘテロクロマチンの形成に関与するChp1タンパク質中のクロモドメインとヘテロクロマチンのヒストンとの複合体構造を、我々はNMRで解析した。その構造は、それまでX線を用いた結晶構造の結果とは異なり、図2の上部に長い紐状構造とそれに続く短いらせんが認められた。ヘテロクロマチンの形成には非コードRNAが関与する事が分かっているが、NMRで新たに解析できた紐状構造と短いらせん構造部位がRNA結合に必要である事を明らかにした。これは結晶構造では分からない事であった。

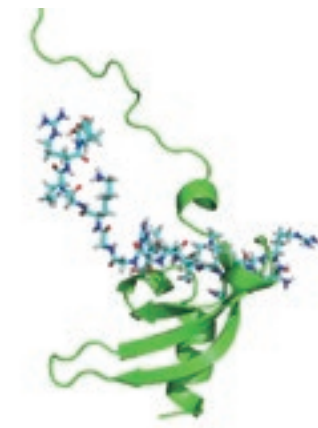


図2 水色で表示したヘテロクロマチンのヒストンに結合したChp1のクロモドメインを緑色で表示した。上部に伸びている短いらせんとそれに続くひも状構造は結晶構造では解析されていないが、その領域で非コードRNAと相互作用する事を見出した。(Ishida M, Shimojo H, Hayashi A, Kawaguchi R, Ohtani Y, Uegaki K, Nishimura Y, Nakayama J. Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing. Mol. Cell, **47**, 228-241 (2012).)

各種安定同位体標識試薬

大陽日酸は、Biomolecular NMR分野に最適な安定同位体標識試薬および関連商品を幅広く取り揃えております。カタログ商品以外も、お気軽にお問い合わせください。

FMOCアミノ酸

製品番号	製品名	濃縮度
48,675-2	FMOC-Ala-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,515-8	FMOC-Ala-OH-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,995-6	FMOC-Ala-OH-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,513-1	FMOC-Ala-OH- ¹³ C ₃	99 atom % ¹³ C
48,990-5	FMOC-Ala-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
61,604-4	FMOC-Ala-OH-2,3,3,3-d ₄	98 atom % D
48,588-8	FMOC-Ala-OH-3,3,3-d ₃	99 atom % D
66,706-4	FMOC-Ala-OH, ¹³ C ₃ , ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
65,365-9	FMOC-Arg(Pbf)-OH- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄ (97% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
66,874-5	FMOC-Asn(Trt)-OH- ¹⁵ N ₂ (95% CP)	98 atom % ¹⁵ N
57,989-0	FMOC-Asn-OH- ¹⁵ N ₂	98 atom % ¹⁵ N
60,913-7	FMOC-Asn-OH- α - ¹⁵ N (amine- ¹⁵ N)	98 atom % ¹⁵ N
66,875-3	FMOC-Asn(Trt)-OH- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂ (95% CP)	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
58,862-8	FMOC-Asp-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,526-3	FMOC-Asp-OH-4- ¹³ C	98 atom % ¹³ C
49,290-6	FMOC-Asp-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
59,407-5	FMOC-Asp(OtBu)-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
68,363-9	FMOC-Asp(OtBu)-OH- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N (97% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
67,660-8	FMOC-Cys(Trt)-OH- ¹⁵ N (97% CP)	98 atom % ¹⁵ N
49,000-8	FMOC-Glu-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
60,915-3	FMOC-Glu(OtBu)-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
60,518-2	FMOC-Gly-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,954-9	FMOC-Gly-OH-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
58,774-5	FMOC-Gly-OH- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
48,575-6	FMOC-Gly-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
48,577-2	FMOC-Gly-OH-2,2-d ₂	98 atom % D
49,269-8	FMOC-Gly-OH-1- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,345-7	FMOC-Gly-OH-2- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
48,953-0	FMOC-Gly-OH- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
67,696-9	FMOC-His(Trt)-OH- ¹⁵ N ₃ (97% CP)	98 atom % ¹⁵ N

製品番号	製品名	濃縮度
57,862-2	FMOC-Ile-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
59,722-8	FMOC-Ile-OH- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N (98% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
48,593-4	FMOC-Leu-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,595-0	FMOC-Leu-OH- ¹⁵ N (98% CP)	98 atom % ¹⁵ N
61,594-3	FMOC-Leu-OH-5,5,5-d ₃	99 atom % D
59,040-1	FMOC-Leu-OH-d ₁₀	98 atom % D
59,353-2	FMOC-Leu-OH- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
57,796-0	FMOC-Lys(BOC)-OH- ¹⁵ N ₂	98 atom % ¹⁵ N
65,363-2	FMOC-Lys(BOC)-OH- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂ (97% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,511-5	FMOC-Met-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,919-6	FMOC-Met-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
65,364-0	FMOC-Met-OH- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N (97% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
49,296-5	FMOC-Phe-OH-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,907-2	FMOC-Phe-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
61,599-4	FMOC-Phe-OH-phenyl-d ₅ -2,3,3-d ₃	98 atom % D
65,144-3	FMOC-Phe-OH- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N (98% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
58,951-9	FMOC-Pro-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
65,145-1	FMOC-Pro-OH- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,914-5	FMOC-Ser(tBu)-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
69,427-4	FMOC-Thr(tBu)-OH- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N (97% CP)	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,921-8	FMOC-Trp-OH- α - ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
64,830-2	FMOC-Trp-OH- ¹⁵ N ₂ (98% CP)	95 atom % ¹⁵ N
67,697-7	FMOC-Trp(Boc)-OH- ¹⁵ N ₂ (97% CP)	97 atom % ¹⁵ N
65,362-4	FMOC-Tyr-OH- ¹⁵ N (97% CP)	98 atom % ¹⁵ N
48,599-3	FMOC-Val-OH-1- ¹³ C (98% CP)	99 atom % ¹³ C
48,600-0	FMOC-Val-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
61,608-7	FMOC-Val-OH-d ₈	98 atom % D
64,288-6	FMOC-Val-OH- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

BOCアミノ酸

製品番号	製品名	濃縮度
49,288-4	BOC-Ala-OH- ¹² C ₃ (¹³ C-depleted)	99.9 atom % ¹² C
48,676-0	BOC-Ala-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,507-7	BOC-Ala-OH-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
49,289-2	BOC-Ala-OH-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,991-3	BOC-Ala-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
48,678-7	BOC-Ala-OH-3,3,3-d ₃	99 atom % D
60,344-9	BOC-Ala-OH-2- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
48,583-7	BOC-Ala-OH- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
57,978-5	BOC-Asn-OH- α - ¹⁵ N (amine- ¹⁵ N)	98 atom % ¹⁵ N
58,618-8	BOC-Asp-OH-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
58,640-4	BOC-Asp-OH-4- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
58,768-0	BOC-Glu-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
58,769-9	BOC-Glu-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
58,840-7	BOC-Glu-OBzl- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N (97% CP)	98 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
58,770-2	BOC-Gln-OH- ¹⁵ N ₂	98 atom % ¹⁵ N
48,669-8	BOC-Gly-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,578-0	BOC-Gly-OH-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,499-2	BOC-Gly-OH- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
48,670-1	BOC-Gly-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
58,771-0	BOC-Gly-OH-2,2-d ₂	98 atom % D
58,772-9	BOC-Gly-OH-1- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N

Water-¹⁷O

製品番号	製品名	濃縮度
60,294-9	Water - ¹⁷ O	20-24.9 atom % ¹⁷ O
60,302-3	Water - ¹⁷ O	25-29.9 atom % ¹⁷ O
60,300-7	Water - ¹⁷ O	35-39.9 atom % ¹⁷ O
60,296-5	Water - ¹⁷ O	40-44.9 atom % ¹⁷ O
60,303-1	Water - ¹⁷ O	45-49.9 atom % ¹⁷ O
60,986-2	Water - ¹⁷ O	90 atom % ¹⁷ O

製品番号	製品名	濃縮度
48,955-7	BOC-Gly-OH-2- ¹³ C, ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
58,773-7	BOC-Gly-OH- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
48,594-2	BOC-Leu-OH-1- ¹³ C・H ₂ O	99 atom % ¹³ C
49,293-0	BOC-Leu-OH- ¹⁵ N・H ₂ O	98 atom % ¹⁵ N
58,923-3	BOC-Leu-OH-2- ¹³ C, ¹⁵ N・H ₂ O	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
60,916-1	BOC-Lys(Z)-OH- α - ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
49,007-5	BOC-Lys(Z)-OH- ϵ - ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
48,596-9	BOC-Phe-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
60,520-4	BOC-Phe-OH-2- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
49,297-3	BOC-Phe-OH-3- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
49,295-7	BOC- ¹³ C-Phe-OH (carbonyl- ¹³ C)	99 atom % ¹³ C
48,683-3	BOC-Phe-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
58,955-1	BOC-Phe-OH-phenyl-d ₅	98 atom % D
48,597-7	BOC-Phe-OH-phenyl-d ₅ -2,3,3-d ₃	98 atom % D
67,286-6	BOC-Thr(Bzl)-OH- ¹³ C ₄ , ¹⁵ N (97% CP)	99 atom % ¹³ C 98 atom % ¹⁵ N
59,109-2	BOC-Tyr-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
60,497-6	BOC-Val-OH-1- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
48,601-9	BOC-Val-OH- ¹⁵ N	98 atom % ¹⁵ N
61,622-2	BOC-Val-OH-d ₈	98 atom % D

バッファー, 界面活性剤, 還元剤 他

製品番号	製品名	濃縮度
15,178-5	㊦ Acetic acid-d ₄	99.5 atom % D
17,657-5	Ammonium-d ₄ bromide	98 atom % D
17,567-6	㊦ Ammonium-d ₄ chloride	98 atom % D
17,670-2	㊦㊧ Ammonium-d ₄ deuterioxide solution, 25 wt. % in D ₂ O	99 atom % D
65,539-2	Bis-tris-d ₁₉ (98% CP)	98 atom % D
48,553-5	DL-Dithiothreitol-d ₁₀ (98% CP)	98 atom % D
48,561-6	Dodecylphosphorylcholine-d ₃₈	98 atom % D
48,937-9	EDTA-d ₁₂	98 atom % D
42,622-9	㊦㊧ Fomic acid-d ₂ ,95 wt.% in H ₂ O	98 atom % D
45,452-4	Glycerol-1,1,2,3,3-d ₅	98 atom % D
17,583-8	Glycine-d ₅	98 atom % D
64,382-3	HEPES-d ₁₈ (98% CP)	98 atom % D
36,602-1	Imidazole-d ₄	95 atom % D
61,522-6	㊦ 2-Mercaptoethanol-d ₆ (98% CP)	96 atom % D

ユビキチン

製品番号	製品名	標識核種
UB01	Ubiquitin his tagged	non-labeled
UB02	Ubiquitin-N his tagged	¹⁵ N
UB03	Ubiquitin-C his tagged	¹³ C
UB04-80	Ubiquitin-D his tagged	D
UB04-98	Ubiquitin-D his tagged	D
UB05-80	Ubiquitin-ND his tagged	¹⁵ N,D
UB05-98	Ubiquitin-ND his tagged	¹⁵ N,D
UB06	Ubiquitin-CN his tagged	¹³ C, ¹⁵ N
UB07-80	Ubiquitin-CD his tagged	¹³ C,D
UB07-98	Ubiquitin-CD his tagged	¹³ C,D
UB08-80	Ubiquitin-CND his tagged	¹³ C, ¹⁵ N,D
UB08-98	Ubiquitin-CND his tagged	¹³ C, ¹⁵ N,D

ファージ

- Pf1 co-solvent, Protease free
(in 10mM K-phosphate buffer pH7.6, 2mM MgCl₂ and 0.05% NaN₃)

製品番号	数量
P-50-P	50mg
P-100-P	100mg
P-300-P	300mg
P-500-P	500mg
P-700-P	700mg
P-1000-P	1000mg

製品番号	製品名	濃縮度
68,702-2	MES-d ₁₃ (98% CP)	98 atom % D
27,717-7	㊦㊧ Methanol- ¹³ C	99 atom % ¹³ C
29,386-5	㊦㊧ Methanol- ¹³ C,d ₄	99.5 atom % D 99 atom % ¹³ C
65,886-3	Octyl- β -D-glucopyranoside-d ₂₄ (97% CP)	98 atom % D
69,663-3	PIPES-d ₁₈ (98% CP)	98 atom % D
17,607-9	Sodium acetate-d ₃	99 atom % D
28,201-4	Sodium acetate- ¹³ C ₂	99 atom % ¹³ C
29,911-1	Sodium acetate- ¹³ C ₂ ,d ₃	99 atom % ¹³ C 99 atom % D
45,185-1	Sodium dodecyl sulfate-d ₂₅	98 atom % D
37,384-2	Sodium formate-d ₁	99 atom % D
48,835-6	Succinic acid-d ₆	98 atom % D
48,624-8	Tris-d ₁₁ solution,1 M in D ₂ O	98 atom % D
44,910-5	Tris-d ₁₁ (Crystalline) (98% CP)	98 atom % D

製品番号	製品名	標識核種
UB01-nt	Ubiquitin non tagged	non-labeled
UB02-nt	Ubiquitin-N non tagged	¹⁵ N
UB03-nt	Ubiquitin-C non tagged	¹³ C
UB04-nt-80	Ubiquitin-D non tagged	D
UB04-nt-98	Ubiquitin-D non tagged	D
UB05-nt-80	Ubiquitin-ND non tagged	¹⁵ N,D
UB05-nt-98	Ubiquitin-ND non tagged	¹⁵ N,D
UB06-nt	Ubiquitin-CN non tagged	¹³ C, ¹⁵ N
UB07-nt-80	Ubiquitin-CD non tagged	¹³ C,D
UB07-nt-98	Ubiquitin-CD non tagged	¹³ C,D
UB08-nt-80	Ubiquitin-CND non tagged	¹³ C, ¹⁵ N,D
UB08-nt-98	Ubiquitin-CND non tagged	¹³ C, ¹⁵ N,D

- Pf1 co-solvent, RNAase and Protease free
(in 10mM K-phosphate buffer pH7.6, DEPC-treated water)

製品番号	数量
P-50-RNA	50mg
P-100-RNA	100mg
P-300-RNA	300mg
P-500-RNA	500mg
P-700-RNA	700mg
P-1000-RNA 1	1000mg

【お問合せ・ご注文先】

E-MAIL：Isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
SI事業部ホームページ：http://stableisotope.tn-sanso.co.jp
TEL：03-5788-8550 月曜日～金曜日 9:00-17:50
※土日、祝祭日はお休みです。
FAX：03-5788-8710 ※ FAXは24時間受け付けています。

大陽日酸株式会社
メディカル事業本部 SI事業部
〒142-8558 東京都品川区小山1-3-26 東洋Bldg.