

メチオニン要求株を使わないセレノメチオニン標識蛋白質のつくりかた

産業技術総合研究所

中村 努、石川 一彦

(投稿日 2008/7/29、再投稿日 2008/8/21、受理日 2008/8/27、修正日 2013/11/29)

キーワード：セレノメチオニン、生合成阻害、X線結晶構造解析

概要

X線結晶構造解析において初期位相を決定する際、セレン原子による異常散乱を利用することが広く行われている。その時に必要になるのがセレノメチオニン(SeMet)標識蛋白質である。SeMet標識蛋白質の調製はメチオニン要求大腸菌株を用いることが一般的であり、蛋白質科学会アーカイブでもそのプロトコールが紹介されている(1)。筆者が2008年1月～8月の *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **70** (1) - **72** (3)内にある Structure Notes を調査したところ、SeMet標識蛋白質の調製法が論文中に明記されていた17報のうち、12報でメチオニン要求株を用いていた。

X線結晶解析においてSeMet標識蛋白質が必要となる時には、すでにネイティブ蛋白質の発現・精製・結晶化の方法が確立されていることが多い。そのため、ネイティブ蛋白質の発現系で用いた宿主大腸菌株(一般にメチオニン非要求株)をそのままSeMet標識蛋白質の発現に流用できれば、実験の簡便性の面でメリットがある。本稿では、メチオニン要求株を使わないSeMet標識蛋白質の調製法のうち、Doublieによるメチオニン生合成阻害剤を利用した方法(2)に筆者らの工夫を加えたプロトコールを紹介する。

装置・器具・試薬

ネイティブ蛋白質の培養・発現に用いる材料一般

セレノメチオニン (SeMet)

最少培地の材料 (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl , Glucose, Thiamine, Biotin, Adenosine, Guanosine, Cytidine, Thyimidine, FeCl_3 , MgSO_4 , MnCl_2 , CaCl_2)

メチオニン生合成阻害剤 (Lys, Phe, Thr, Ile, Leu, Val)

実験手順

第1日

- 1) 発現プラスミドによる大腸菌の形質転換および寒天培地による前培養
- 2) 液体培地の材料の調製

第2日

- 3) 植菌および本培養

4) 発現誘導および SeMet の添加

第 3 日

5) 集菌

実験の詳細

ここでは、筆者が実際に用いた pET 系発現プラスミド（アンピシリン耐性）と Rosetta (DE3) 株の組み合わせを例として実験方法を紹介する。

第 1 日

1) 発現プラスミドによる大腸菌の形質転換

ヒートショック法により、宿主大腸菌に発現プラスミドを導入する。適量を 0.1 mg/mL アンピシリンを含む LB 寒天培地にまく。

2) 液体培地の材料の調製

(1) 10 x 最少培地バッファーを調製し、オートクレーブする (1 Liter あたり)

Na ₂ HPO ₄	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g

(2) 20% (w/v) Glucose をフィルター滅菌する

(3) 最少培地栄養を調製し、オートクレーブする (1.76 Liter あたり)

Thiamine	40 mg
Biotin	40 mg
Adenosine	40 mg
Guanosine	40 mg
Cytidine	40 mg
Thymidine	40 mg
10 mM FeCl ₃	0.66 mL
1 M MgSO ₄	2 mL
50 mM MnCl ₂	2 mL

(4) 以下のものを混ぜて最少培地を調製する (この操作は第 2 日でもよい)

10 x 最少培地バッファー (1)	200 mL
20% (w/v) Glucose (2)	40 mL
最少培地栄養 (3)	1.76 L
50 mg/mL アンピシリン	2 mL
20% NH ₄ Cl	10 mL
1 M CaCl ₂	0.2 mL

第 2 日

3) 植菌および本培養

第 1 日 1) の操作により得られた寒天培地上のコロニーに滅菌済みの 150 mM NaCl (シャーレ 1 枚あたり約 5 mL) を直接投入し、コンラージ棒で表面をなでて、コロニーを懸濁する (「工夫とコツ」欄参照)。それを第 1 日 2) の操作で得られた最少培地に添加し、37°C で培養する。OD₆₀₀ が 0.3 になるまで待つ。

4) 発現誘導および SeMet の添加

本培養 3) により OD_{600} が 0.3 になったら、以下のものを添加する。添加する溶液はすべてあらかじめフィルター滅菌しておく。

100 mg/mL Lys	2 mL
10 mg/mL Phe	20 mL
50 mg/mL Thr	4 mL
10 mg/mL Ile	10 mL
10 mg/mL Leu	10 mL
10 mg/mL Val	10 mL
10 mg/mL SeMet	12 mL

引き続き培養し、 OD_{600} が 0.7 となったところで 1 mM IPTG (final) を添加する。そこから先の条件 (温度・時間など) は、ネイティブ蛋白質と同様。

工夫とコツ

寒天培地から直接大腸菌を液体本培養に移す

筆者らのグループでは、形質転換直後の寒天培地での培養を前培養ととらえ、そこからすべてのコロニーを液体培地で懸濁して直接本培養に移行している（文献3参照）。一般にはシングルコロニーから少量の液体培地で前培養する方法が主流であろう。その方法では前培養の時間が余計にかかるため、プラスミドを欠失した大腸菌が増加して蛋白質の発現量が低下することがある。一方、寒天培地上のすべてのコロニーを本培養に移行する方法では、時間の節約になる上、偶然ハズレのコロニーを拾ってしまうリスクを回避することができる。

本プロトコールではコロニーをサスペンドするために 150 mM NaCl を用いているが、それは浸透圧を調整するための最低限のモノを含ませるためである。前培養で少量の LB 液体培地を用いた場合、本培養への LB 培地の持ち込みを最小限にするために、大腸菌ペレットを洗浄するステップが必要である。しかし本プロトコールの場合、LB 培地由来の栄養は寒天部分に存在するため、洗浄操作なしに余分な栄養の持ち込みをほぼゼロにしたまま大腸菌のみを採取することができる。

実施例

筆者らは、本プロトコールにより *Aeropyrum pernix* K1 由来 Peroxiredoxin (Thioredoxin Peroxidase) に SeMet を導入し、MAD 法により構造決定した(4)。結晶化に用いた蛋白質を質量分析に供したところ、配列上ポリペプチドあたり 5 箇所ある Met のうち、プロセシングされた N 末端 Met を除く 4 箇所の Met がすべて SeMet に置換されていることが確認された（図 1）。また筆者らは *Pyrococcus furiosus* 由来 Chitinase (Catalytic Domain) (5) や *Pyrococcus horikoshii* 由来 Threonine Dehydrogenase (6) にも本プロトコールにより SeMet を導入し、それぞれ MAD 法および SAD 法により構造解析に成功している。

実験の安全

SeMet は毒物として規制されている。各研究機関にも内規があるはずなので、取扱いについては法令および内規を遵守されたい。

SeMet の扱いで特に注意を要するところは、秤量時に粉を撒き散らさないことである。割高になるが、少量のパッケージを購入することで秤量のリスクを避けることができる。例えばナカライテスクのセレノ-L-メチオニンには 5 g 入り (50,000 円) と 500 mg 入り (9,000 円) がある。500 mg 入りを購入してその量を信用し、50 mL プラスティックチューブの目盛りを信用すれば、天秤やスパチュラの使用を省略し、粉の飛散を最小限にして 10 mg/mL 溶液を 50 mL 調製することができる。

文献

- 1) 坂根勲, 蛋白質科学会アーカイブ, 1, e004 (2008)
- 2) Doublie, S., *Methods Enzymol.*, **276**, 523-530 (1997)
- 3) 萩原義久, 蛋白質科学会アーカイブ, 1, e001 (2008)
- 4) Nakamura, T. et al., *Proteins*, **62**, 822-826 (2006)
- 5) Nakamura, T. et al., *Acta Crystallogr. F*, **63**, 7-11 (2007)
- 6) Ishikawa, K. et al., *J. Mol. Biol.*, **366**, 857-867 (2007)

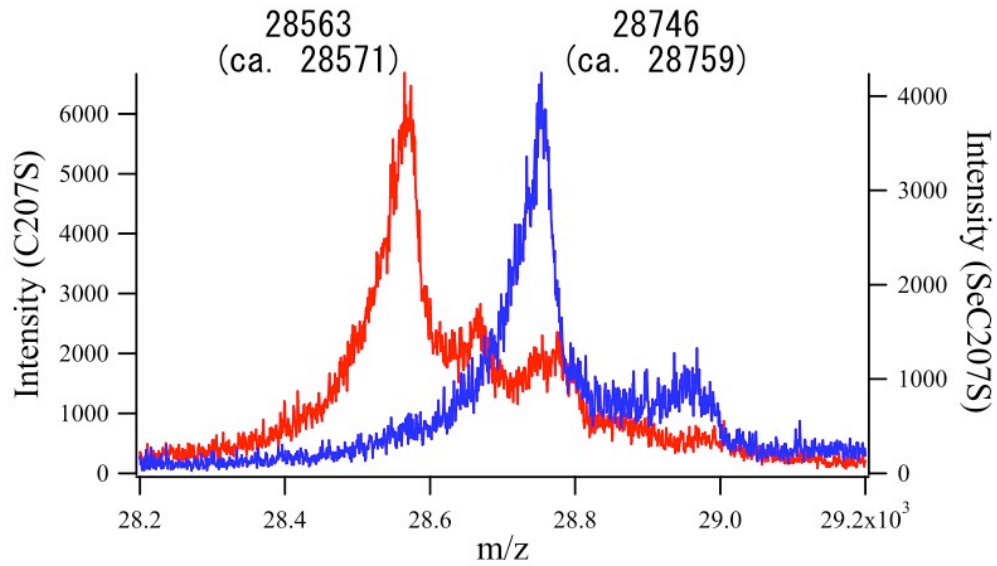


図 1 : ネイティブおよびSeMet標識蛋白質のMALDI-TOF MS
SeMet標識によって測定分子量が183Da増加している。1個のMetが完全にSeMetに置換されるとき分子量変化は46.9Daなので、4個のMetがほぼ完全にSeMetに置換されていると結論づけられる。サンプルは*A. pernix* K1由来Peroxioredoxin (C207S変異体)である。