

Deuteration Aiming for Neutron Scattering

(DANS)

— 中性子散乱のための重水素化マニュアル —

新世代中性子構造生物学研究会

Ver. 1

目次

| | | |
|----------------------|--|----|
| Chapter 1 | 大腸菌発現系を用いたタンパク質重水素化法..... | 4 |
| Chapter 2 | タンパク質の重水素化率測定方法..... | 12 |
| Chapter 3 | D ₂ O 再利用方法..... | 20 |
| Chapter 4 | D ₂ O/H ₂ O 比率測定方法 | 27 |
| Supplemental Figures | | 31 |

DANS with Your Protein!

中性子溶液散乱(ここでは広義にとって SANS = 中性子小角散乱だけでなく NSE = 中性子スピネコー、QENS = 中性子準弾性散乱も含む)においてコントラスト変調/同調(CV/CM)法は他の手法が持ちえない最大の武器である。少なくとも生体高分子の溶液散乱研究に絞れば、この手法を利用しないならば中性子散乱実験をやる意義は無い!とも言えるであろう。手法適用の前提は観測対象物質(生体高分子)に散乱長密度の差が存在することなので、手法上の問題点は「如何にして生体高分子に散乱長密度の差を作り出すか?」に集約される。対象物質が糖鎖・脂質・核酸・蛋白質の複合体であれば、本来散乱長密度が異なるので、あとは溶媒の散乱長密度を精密に制御するだけであるが、蛋白質同士からなる複合体ではそうはいかない。そこで、蛋白質に他とは異なる散乱長密度を与える手法が「重水素化」である。ここまでは、ご存知の方も多いかと思うのだが、実際に自分の試料を重水素化して中性子溶液散乱までやろうと言う奇特な方はほとんどおられない。それは、試料の重水素化から実際の中性子溶液散乱に至るまでに存在している「厄介事の正体がわからない」「わかったとしてもどうすればいいのかわからない」事が大きな理由であると推察している。そこで、本稿では蛋白質重水素化から中性子散乱実験試料完成までに存在する厄介事(必要な手法)を4つ取り上げて、その手法をマニュアル化した。取り上げた4つの項目は

1. 重水素化率を制御した蛋白質重水素化法
2. MALDI-TOF-MASS を用いた重水素化率測定法
3. エバポレーターを用いた重水回収法
4. FT-IR を用いた溶媒中の重水比率測定法

である。いずれも全くの新規技術ではないが、中性子溶液散乱という視点から一つにまとめて、そのマニュアルを提供することに意義はあると考え、制作した。

さあ、皆さんも「Dans with Your Protein!」、中性子散乱実験を始めてみませんか?

新世代中性子構造生物学研究会
杉山正明

Chapter 1 大腸菌発現系を用いたタンパク質重水素化法

重水素と軽水素の散乱長の差を利用する中性子の小角散乱法においては、100 %もしくは75 %に重水素化されたタンパク質を得る必要がある。本項では大腸菌発現系において重水および重水素化グルコースを含む M9 培地で培養することにより、重水素化が100 %および75 %に精密に制御されたりコンビナントタンパク質を得る方法を紹介する。

1) 前準備

1-1) M9 培地添加物の作製

※以下、滅菌水は H₂O をオートクレーブしたものを使用する

● 2 M MgSO₄

| | | | final |
|------------|-------------------|-------|-------|
| MW:120.366 | MgSO ₄ | 2.4 g | 2 M |
| | 滅菌水 | 10 mL | |
| | Total | 10 mL | |

● 1 M CaCl₂

| | | | final |
|-----------|-------------------|----------|-------|
| MW:110.98 | CaCl ₂ | 111.0 mg | 1 M |
| | 滅菌水 | 1 mL | |
| | Total | 1 mL | |

● 0.1 M FeCl₃

| | | | final |
|----------|-------------------|---------|-------|
| MW:162.2 | FeCl ₃ | 40.6 mg | 0.1 M |
| | 滅菌水 | 2.5 mL | |
| | Total | 2.5 mL | |

● 50 mg/mL Thiamin

| | | | final |
|--|---------|-------|----------|
| | Thiamin | 50 mg | 50 mg/mL |
| | 滅菌水 | 1 mL | |
| | Total | 1 mL | |

- 1 mg/mL Biotin ※溶けにくいので vortex で攪拌して出来るだけ均一にする

| | | final |
|--------|-------|---------|
| Biotin | 12 mg | 1 mg/mL |
| 滅菌水 | 12 mL | |
| Total | 12 mL | |

- M9 培地用添加物 (1 L 分) ※調製後凍結乾燥し、-20 °C 保存

| | | final |
|-------------------------|----------|----------|
| 2 M MgSO ₄ | 1 mL | 2 mM |
| 1 M CaCl ₂ | 100 uL | 100 uM |
| 0.1 M FeCl ₃ | 216 uL | 21.6 uM |
| 50 mg/mL Thiamin | 48 uL | 2.4 ug/L |
| 1 mg/mL Biotin | 1.2 mL | 1.2 mg/L |
| Total | 2.564 mL | |

1-2) 抗生物質、誘導物質の凍結乾燥

以下の抗生物質および誘導物質 (e.g. IPTG)の必要量をエッペンチューブで凍結乾燥し、-20 °C 保存する

- 抗生物質 ※要フィルター滅菌

| 抗生物質 | 略 | ストック濃度 (mg/ml) | 溶媒 | 最終濃度 (μg/ml) |
|------------------------------|------|----------------|--------------------|--------------|
| アンピシリン (Ampicillin) | Amp | 50 (50~100) | Water or 50 % EtOH | 50 (20~200) |
| カルベニシリン (Carbenicillin) | CBPC | 50 (50~100) | Water | 50 (50~100) |
| カナマイシン (Kanamycin) | Kan | 15 (10~50) | Water | 15 (10~50) |
| テトラサイクリン (Tetracycline) | Tet | 12.5 (10~15) | 50 % EtOH | 12.5 (10~20) |
| クロラムフェニコール (Chloramphenicol) | Cm | 20 (10~50) | 100 % EtOH | 20 (10~20) |

- 1 M IPTG ※フィルター滅菌後、0.5 mL ずつ分注

| | | final |
|----------------|-------|-------|
| MW:238.31 IPTG | 2.4 g | 1 M |
| 滅菌水 | 10 mL | |
| | 10 mL | |

※発現させるタンパク質によっては 1 L 分の量が変わるので注意

1-3) 培養で使用する器具のオートクレーブ

・1000 mL ビーカー、スターラーチップ、秤量量スパチュラ (培地作製用)

- ・フィルター濾過一式 3 点セット (培地ろ過滅菌用)
 - ・三角フラスコ (培養用)
 - ・オートクレーブ可能なオークリッジ遠心管 (前培養菌体遠沈用)
- などを全てアルミホイルでぐるぐる巻きにしてオートクレーブする
 オートクレーブ後は乾燥機で十分に乾燥させる (100 °C、四日間以上)

1-4) 培地の作製

● 5 x LB 培地 ※オートクレーブする

| | | final |
|-------------------|-----------|-------|
| LB Broth (Miller) | 125 g | 5x |
| D. W | up to 1 L | |
| Total | 1 L | |

もしくは

| | | final |
|---------------------|-----------|-----------|
| bacto-tryptone | 50 g | 10 g/L x5 |
| bacto-yeast extract | 25 g | 5 g/L x5 |
| MW:58.44 NaCl | 50 g | 10 g/L x5 |
| 5 N NaOH | | pH 7.5 |
| D. W | up to 1 L | |
| Total | 1 L | |

● 10 x M9 培地 (75 % 重水素化に使用) ※オートクレーブする

| | | final |
|--|-----------|--------------|
| MW:53.491 NH ₄ Cl | 10 g | 18.69 mM x10 |
| MW:136.086 KH ₂ PO ₄ | 20 g | 14.7 mM x10 |
| MW:141.96 無水Na ₂ HPO ₄ | 63.4 g | 44.66 mM x10 |
| MW:58.44 NaCl | 5 g | 8.56 mM x10 |
| 滅菌水 | up to 1 L | |
| Total | 1 L | |

2) 培養

2-A) 75 % 重水素化編

2-A-1) 前培養@30 % D₂O 培地

以降、使用する D₂O 及び Milli Q (滅菌水)は全てフィルター滅菌を行う
 以下の混合比で 30 % D₂O LB 培地 5 mL を作製する

| | | final |
|------------------|--------|-------|
| 5x LB培地 | 1 mL | 1x |
| D ₂ O | 1.5 mL | 30% |
| 滅菌水 | 2.5 mL | |
| 抗生物質 (軽水溶解品) | 5 mL分 | |
| Total | 5 mL | |

※前培養で使用する D₂O は使い差しのものや、ある程度 H₂O が混入しているものでも問題ない

※抗生物質は軽水に溶かしたもので問題ない

グリセロールストックから植菌する

↓前培養1：37 °C, 12 時間以上培養

※D₂O 低比率含有培地での馴化段階の培養が上手くいかない場合は、大腸菌発現系の見直しをした方がよい

2-A-2) 前培養@60 % D₂O 培地

以下の通り 60 % D₂O LB 培地 5 mL×2 本を作製する

※培地 1 L に対して 10 mL の 60 % D₂O LB 培地を準備する必要がある

| | | final |
|------------------|-------|-------|
| 5x LB培地 | 1 mL | 1x |
| D ₂ O | 3 mL | 60% |
| 滅菌水 | 1 mL | |
| 抗生物質 (軽水溶解品) | 5 mL分 | |
| Total | 5 mL | |

30 % D₂O 前培養液 50 μL を植菌する

↓前培養2：37 °C, 12 時間以上培養

2-A-3) 本培養@75 % D₂O 培地

以下の通り 75 % D₂O M9 培地 1 L を作製する

| | | final |
|------------------|--------|-----------|
| 10x M9培地 | 100 mL | 1x |
| 重水素化グルコース | 1.5 g | 1.5 mg/mL |
| 軽水素化グルコース | 0.5 g | 0.5 mg/mL |
| D ₂ O | 750 mL | 75% |
| H ₂ O | 150 mL | |
| 抗生物質 (凍結乾燥品) | 1 L分 | |
| M9培地用添加物 (凍結乾燥品) | 1 L分 | |
| Total | 1 L | |

パラフィルムをして不用意な水分混入を避け、スターラーを入れて 30 分ほど溶解させる

※ 特に pH 調整はしないが、気になる場合は pH 試験紙での確認を行ってもよい
溶解後、75 % D₂O M9 培地のフィルター滅菌を行う

※D₂O にたびたび含まれる埃などのコンタミを除くためには 0.45 μm のフィルターが目詰まりしにくくて良い（大腸菌培養には 0.45 μm で問題ないが、厳密な滅菌には 0.22 μm が推奨される）

滅菌後の 75 % D₂O M9 培地を乾燥した培養用三角フラスコに移す

※三角フラスコはあらかじめ 37 °C で暖めておいた方がよい

滅菌後の 75 % D₂O M9 培地を 1 mL 分取し、凍結乾燥した誘導物質（e.g. IPTG）をあらかじめ溶解させておく

60 % D₂O 前培養液 10 mL をオークリッジ遠心管に移す

↓遠心:6,500 rpm、4 °C、7 min

※出来るだけ上清は電動ピペッターで取り除く

滅菌した 75 % D₂O M9 培地 5 mL を分取して菌体を懸濁し、懸濁液を本培養用の M9 培地に添加する

↓本培養 : 37 °C, ~OD₆₀₀=0.6~1.0

誘導物質（e.g. 0.5 M IPTG, 1 mL）を培地に添加する

↓誘導

2-B) 100 % 重水素化編

2-B-1) 前培養@30 % D₂O 培地

以降、使用する D₂O 及び Milli Q（滅菌水）は全てフィルター滅菌を行う

以下の通り 30 % D₂O LB 培地 5 mL を作製する

| | | final |
|------------------|--------|-------|
| 5x LB培地 | 1 mL | 1x |
| D ₂ O | 1.5 mL | 30% |
| 滅菌水 | 2.5 mL | |
| 抗生物質（軽水溶解品） | 5 mL分 | |
| Total | 5 mL | |

※前培養で使用する D₂O は使い差しのもので問題ない

※抗生物質は軽水に溶かしたもので問題ない

グリセロールストックから植菌する

↓前培養 1 : 37 °C, 12 時間以上培養

2-B-2) 前培養@60 % D₂O 培地

以下の通り 60 % D₂O LB 培地 5 mL を作製する

| | | final |
|------------------|-------|-------|
| 5x LB培地 | 1 mL | 1x |
| D ₂ O | 3 mL | 60% |
| 滅菌水 | 1 mL | |
| 抗生物質 (軽水溶解品) | 5 mL分 | |
| Total | 5 mL | |

30 % D₂O 前培養液 50 μL を植菌する
 ↓前培養 2 : 37 °C, 12 時間以上培養

2-B-3) 前培養@80 % D₂O 培地

以下の通り 80 % D₂O LB 培地 5 mL×2 本を作製する

※培地 1 L に対して 10 mL の 80 % D₂O LB 培地を準備する必要がある

| | | final |
|------------------|-------|-------|
| 5x LB培地 | 1 mL | 1x |
| D ₂ O | 4 mL | 80% |
| 抗生物質 (軽水溶解品) | 5 mL分 | |
| Total | 5 mL | |

60 % D₂O 前培養液 10 μL を植菌する
 ↓前培養 3 : 37 °C, 12 時間以上培養

2-B-4) 本培養@100 % D₂O 培地

以下の通り 100 % D₂O M9 培地 1 L を作製する

| | | final |
|--|--------|----------|
| MW:53.491 NH ₄ Cl | 1 g | 18.69 mM |
| MW:136.086 KH ₂ PO ₄ | 2 g | 14.7 mM |
| MW:141.96 無水Na ₂ HPO ₄ | 6.34 g | 44.66 mM |
| MW:58.44 NaCl | 0.5 g | 8.56 mM |
| 重水素化グルコース | 2 g | 2 mg/mL |
| D ₂ O | 1 L | 100% |
| 抗生物質 (凍結乾燥品) | 1 L分 | |
| M9培地用添加物 (凍結乾燥品) | 1 L分 | |
| Total | 1 L | |

パラフィルムをして不用意な水分混入を避け、スターラーを入れて 30 分ほど溶解させる

※特に pH 調整はしないが、気になる場合は pH 試験紙での確認を行ってもよい

溶解後、100 % D₂O M9 培地のフィルター滅菌を行う

※0.45 μm のフィルターが目詰まりしにくくて良い

滅菌後の 100 % D₂O M9 培地を乾燥した培養用三角フラスコに移す

※三角フラスコはあらかじめ 37 °C で暖めておいた方がよい

滅菌後の 100 % D₂O M9 培地を 1 mL 分取し、凍結乾燥した誘導物質 (e.g. IPTG) をあらかじめ溶解させておく

80 % D₂O 前培養液 10 mL をオークリッジ遠心管に移す

↓遠心:6,500 rpm、4 °C、7 min

※出来るだけ上清は電動ピペッターで取り除く

滅菌した 100 % D₂O M9 培地 5 mL を分取して菌体を懸濁し、懸濁液を本培養用の M9 培地に添加する

↓本培養 : 37 °C, ~OD₆₀₀=0.6~1.0

誘導物質 (e.g. 0.5 M IPTG, 1 mL) を培地に添加する

↓誘導

※本培養の M9 培地について、¹⁵N 標識 NH₄Cl を使うと ¹⁵N 標識タンパク質が、²H かつ ¹³C 標識のグルコースを使うと ²H, ¹³C 標識タンパク質を調製することが出来る

※集菌後、精製し、質量分析で重水素化率を測定すると 100 %、75 % 近く 重水素化されたタンパク質が作製できていることが確認された

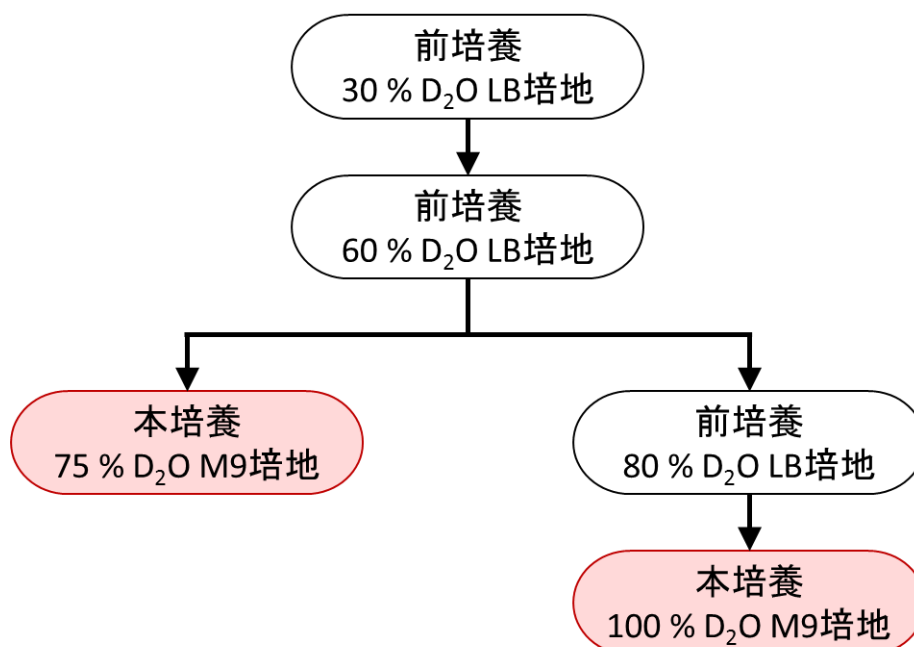


Fig. 1-1 D₂O 培地への馴化手順フローチャート

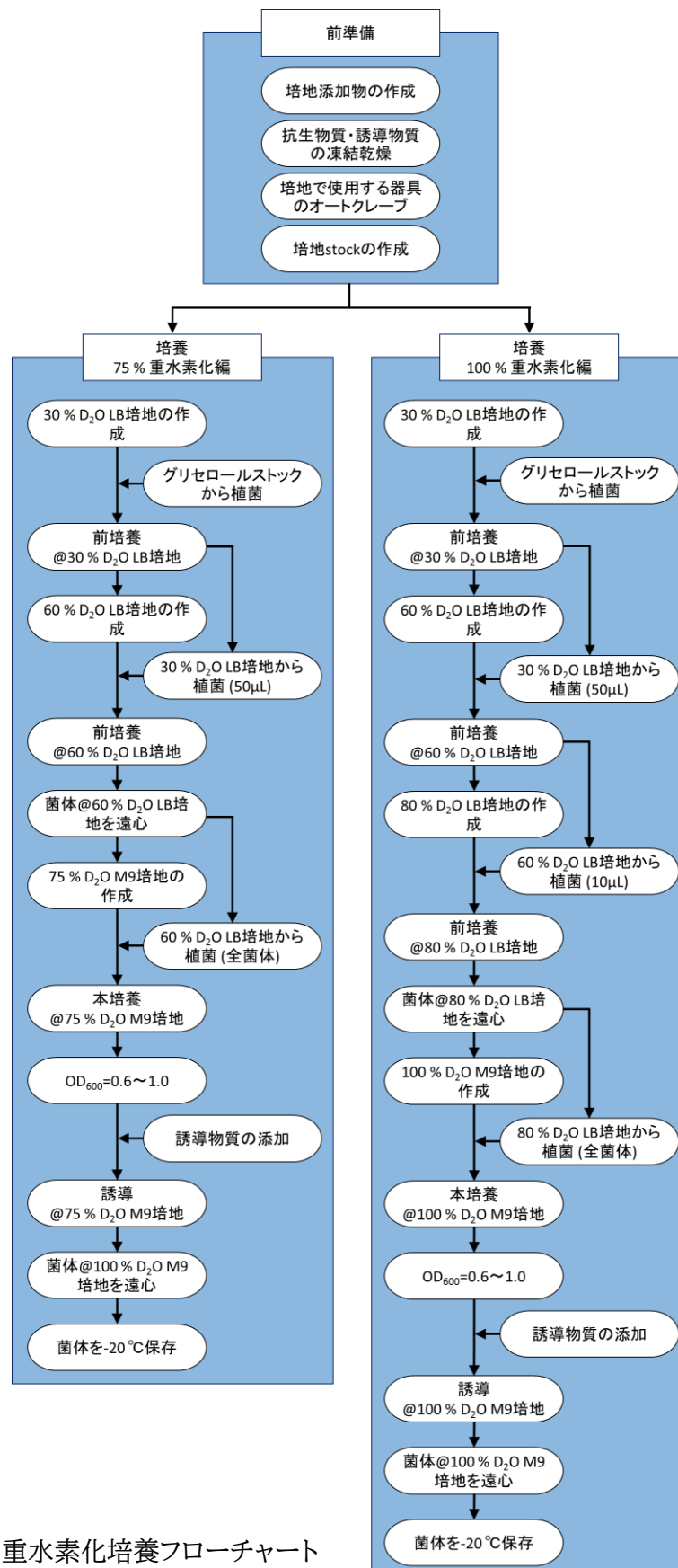


Fig. 1-2 重水素化培養フローチャート

Chapter 2 タンパク質の重水素化率測定方法

Chapter 1 で作製した重水素化タンパク質が任意の比率で重水素化されているとは限らない。そのため、中性子小角散乱実験において、良好なデータを得るためには事前にタンパク質の重水素化率を測定しておく必要がある。本項では MALDI-TOF/MS を用いた質量分析によるタンパク質の重水素化率測定法を紹介する。なお、基本的な方法は Bruker 社の microflexLT の使用マニュアルに準拠している。

1) 測定前の準備

1-1) サンプル準備

溶媒：0.1 % TFA 水溶液

※グレードは HPLC グレード以上のもの推奨

※Table 2-1 の夾雑物が許容されているが少ないほど良好に測定できるため、サンプル濃度が十分な時は溶媒で希釈する（特に Tris は装置内を汚しやすい）

※ゲルろ過クロマトグラフィ等で分離した Tris-HCl や NaCl を溶媒に含むサンプルでも 1 mg/mL 程度濃度があれば、マトリックスとの混合比率を 1 : 9 にするか TFA で10倍希釈することで、buffer 交換を行わずに良好に測定を行うことができる

Table 2-1 夾雑物許容量目安

| 夾雑物 | 許容濃度 | 夾雑物 | 許容濃度 | 夾雑物 | 許容濃度 |
|-------------|--------|-----------|---------|-------|---------|
| 一般界面活性剤類 | 0.10 % | 重炭酸アンモニウム | 100 mM | グアニジン | 1000 mM |
| SDS | 0.20 % | クエン酸ナトリウム | 20 mM | 尿素 | 1000 mM |
| オクチルグルコシド | 0.30 % | アジ化ナトリウム | 1 % | | |
| Tris buffer | 50 mM | アルカリ金属塩類 | 1000 mM | | |
| リン酸buffer | 20 mM | グリセロール | 2 % | | |
| リン酸カリウム | 25 mM | EDTA | 1 mM | | |
| リン酸ナトリウム | 100 mM | グリシン | 20 mM | | |

濃度：1 pmol/ μ L (1 μ M) - 数 10 pmol/ μ L (数 10 μ M)程度 (目安)

※夾雑物の多いサンプルや推奨されない溶媒の場合は buffer 交換を行うか、事前の精製段階の見直しが必要である

※簡易的な脱塩・精製には ZipTip (Fig. 2-1)を使用してもよいが、高い回収率と効果的な精製には技術的な習熟が必要である

※MALDI では溶媒による変性が起こるので、基本的には共有結合以外は切れると考えてよい

1-2) マトリックス溶液の準備

マトリックス : シナピン酸 (SA, Bruker, 品番: 8201345)

※未消化のタンパク質の場合は SA が推奨されるが、糖タンパク質や修飾タンパク質の場合は 2,5-Dihydroxybenzoic acid (2, 5-DHB) など、別のマトリックスを検討する必要がある

溶媒 : EtOH, TA30 (アセトニトリル : 0.1 % TFA = 30 : 70)

※2 種類の溶媒による 2 種類のマトリックスを用意する(イオン化しやすいサンプルであれば TA30 を溶媒としたマトリックス一層でも可)

※MS グレードの高純度なものが推奨される

濃度 : 飽和(溶媒 1 mL にスパチュラー杯を入れ, sonic もしくは vortex し、遠心後の上澄みを使用)

※遮光・常温で数週間保存可能

1-3) ターゲットプレート

Ground Steel(線状傷あり・汎用, Fig. 2-2)もしくは Polished Steel(表面研磨・有機溶媒使用時, Fig. 2-3)

1-4) キャリブレーションスタンダード

溶媒 : 0.1 % TFA 水溶液

濃度 : Protein calibration standard I (Bruker; m/z:3-20k)または Protein standard II (Bruker; m/z:20-200k; 精度があまり高くないので絶対的な質量測定には不十分)に溶媒を 125 μ L 加え、分注して -20 $^{\circ}$ C 保存

※精密な質量測定ではサンプルにキャリブレーションスタンダードを混合する内部キャリブレーションが望ましい

2) ターゲットへのサンプルアプライ

マトリックス溶液 (EtOH) 0.5 μ L をターゲットに滴下

※イオン化しやすいサンプルの場合はこの一層目は不要

乾燥させ薄膜を形成する

マトリックス溶液 (TA30)とサンプル溶液 (もしくはキャリブレーションスタンダード)を 1 : 1 で混合

※混合比は目安であるため 5 : 1 や 10 : 1 混合も可

※混合から滴下までをなるべく手早く行う

0.5 - 2 μ L をマトリックス溶液 (EtOH)の薄膜上に滴下

※良好な結晶を得るためには、滴下する際にチップの先端をターゲット表面に接触させないようにする

※H 体サンプルと D 体サンプルは隣接するスポットに滴下するか、混合して 1 スポットにして測定を行う

自然乾燥させる

※埃などのコンタミを防ぐ

ターゲットプレートを装置へ導入し、測定を行う

※ターゲット記録表に測定日とサンプル名を記入することで、どこにどのサンプルを滴下したか間違えないようにする

3) 測定操作

起動してある PC のデスクトップ上から flexcontrol を起動

※使用記録簿に使用開始時刻と Vacuum を記入する

ターゲットプレートを装置 (Fig. 2-4, microflexLT, Bruker)へ導入

※IN/OUT ボタンでターゲット導入部分を OUT→フタを持ち上げターゲットを置く (Fig. 2-5)

IN/OUT ボタンでターゲット導入部分を測定位置に戻す

※使わない時は常に IN の状態にしておく

flexcontrol method を選択し読み読み込む

※測定サンプルの分子量に合った質量レンジの method を選択する

Geometry でターゲットの種類を選択する

スタンダードサンプルのスポットへ移動する

ClearSum ボタンで前回のデータを消去

右下のステータスが緑の READY と IN になっているかチェックする

※黄色の PREPARING でもマウスオーバーで Laser standby になっていれば ok

形成されている結晶 (Fig. 2-6)を狙い、Start ボタンで測定開始

※レーザー照射位置を変えながら良好な位置・結晶を探して測定する

※レーザーパワーを低いところから調整しながら測定 (マウスホイールで操作)

※高分子量のものほど電圧を高くする必要がある (set up から変更可能)

良好なスペクトルが得られたら Add ボタンで積算していく

Sum Buffer のスペクトル SN 比が良好になるまで測定と積算を 3 - 5 回程度繰り返す

Calibration タブを選択しキャリブレーションを行う

※Sum Buffer のみを表示させる

※Mass Control List から適切なキャリブレーションスタンダードを選択する

※リストからキャリブラント名をクリックで選択し、スペクトルでピークピック

※Mode から校正曲線を選択する (2 点:Linear, 3 点:Quadratic, 5 点:Cubic Enhanced)

※Apply ボタンでキャリブレーション終了
サンプルのスポットへ移動しスタンダードサンプルと同様に測定する
※100 %および 75 % 重水素化タンパク質の MS スペクトルは Fig. S1, S2 の
ように、H 体タンパク質と比較して重水の質量の差の分、 m/z が大きく検出される
Save As ボタンでスペクトル保存
※ファイル名は LP_xxx_HighMass(リニア・ポジティブ_サンプル名_質量レンジ)
測定が終了したらターゲットプレートを取り出す
※使わない時は常に IN の状態にしておく
基本的に装置および PC は起動したままにしておく
※使用記録簿に使用終了時刻と Vacuum を記入する

4) データ処理

4-1) Mass List の取得

デスクトップ上から flexanalysis を起動

Open ボタン→Spectrum Browser からスペクトルデータを読み込む

※一度に複数データの読み込み可能

Smooth ボタンと Baseline Subtraction でスムージングとベースライン補正を行う

ピークピックしてスペクトルにラベルを表示させる

※Find Mass List (自動ピックアップ)と Edit Mass List (手動ピックアップ)

※ s/n が 50 ~ 100 以上ならピークとしてよい

File メニューの Export からスペクトルデータのエクспортを行う

※Mass Spectrum (テキスト (Ascii)データ)と Graphics (画像(EMF)データ)、Mass List (Excel か text ファイル)を出力する

flexanalysis を終了する

4-2) 重水素化率の計算

H 体サンプルと D 体サンプルについて Mass スペクトルから一価イオンのピーク(m/z)を用意する (Fig. S1, S2)

サンプルの全水素の数を ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)で算出し、各アミノ酸残基の個数と以下の Table 2-1 に示した各アミノ酸残基に含まれる可置換水素の数からタンパク質全体の可置換水素の数を算出する

Table 2-1 各アミノ酸残基の可置換水素の数

| アミノ酸 | | 可置換水素の数 |
|----------------|-------|---------|
| Alanine | Ala A | 1 |
| Arginine | Arg R | 6 |
| Asparagin | Asn N | 3 |
| Asparatic acid | Asp D | 1 |
| Cysteine | Cys C | 2 |
| Gulutamine | Gln Q | 3 |
| Gulutamic acid | Glu E | 1 |
| Glycine | Gly G | 1 |
| Histidine | His H | 1.5 |
| Isoleucine | Ile I | 1 |
| Leucine | Leu L | 1 |
| Lysine | Lys K | 4 |
| Methionine | Met M | 1 |
| Phenylalanine | Phe F | 1 |
| Proline | Pro P | 0 |
| Serine | Ser S | 2 |
| Threonine | Thr T | 2 |
| Tryptophan | Trp W | 2 |
| Tyrosine | Tyr Y | 2 |
| Valine | Val V | 1 |

Rep. Prog. Phys. 1976 **39** 911-953より

※当研究室ではアミノ酸配列から可置換水素の数、散乱長密度など中性子小角散乱法に必要な値を算出可能なプログラム (VolumeCalc1) を構築している (HPで公開)

溶媒が H₂O の場合、以下の式の通り重水素化率を算出する

$$\text{重水素化率 (\%)} = \frac{(\text{D 体サンプルの } m/z) - (\text{H 体サンプルの } m/z)}{(\text{タンパク質中の全水素の数}) - (\text{タンパク質中の可置換水素の数})} \times 100$$

4-3) 重水素化率の計算例

Fig. S1 の 100 % 重水素化タンパク質の全水素の数、可置換水素の数はそれぞれ 2257 個、510 個である。式にそれぞれの値を式に代入すると以下の通り、概ね 100 % 重水素化されていると算出された

$$\begin{aligned} 100 \% \text{ 重水素化タンパク質の重水素化率} (\%) &= \frac{(34614.595) - (32823.748)}{(2257) - (510)} \times 100 \\ &= 102.5 (\%) \end{aligned}$$

Fig. S2 の 75 % 重水素化タンパク質の全水素の数、可置換水素の数はそれぞれ 1411 個、316 個である。式にそれぞれの値を式に代入すると以下の通り、71.9 % 重水素化されていると算出された

$$\begin{aligned} 75 \% \text{ 重水素化タンパク質の重水素化率} (\%) &= \frac{(20980.99) - (20193.33)}{(1411) - (316)} \times 100 \\ &= 71.9 (\%) \end{aligned}$$



Fig. 2-1 ZipTip

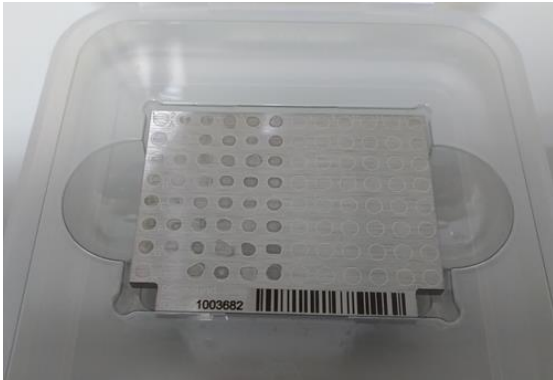


Fig. 2-2 Ground Steel

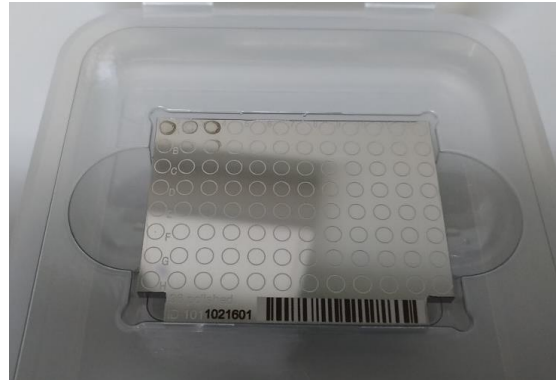


Fig. 2-3 Polished Steel

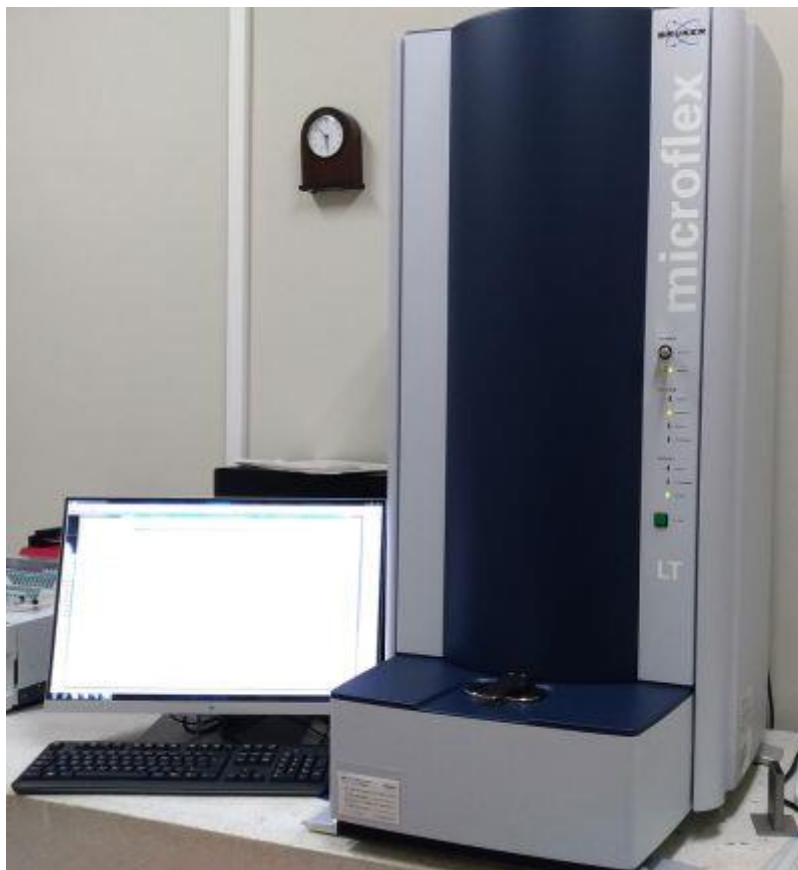


Fig. 2-4 microflexLT (Bruker)



Fig. 2-5 ターゲット導入部分

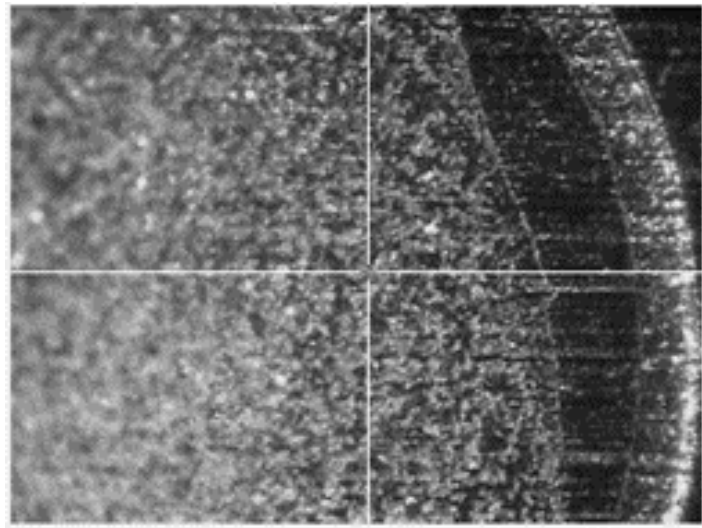


Fig. 2-6 タンパク質とマトリックスの結晶

Chapter 3 D₂O 再利用方法

大腸菌発現系を用いたタンパク質の重水素化法では高価な重水素ラベルされたグルコースおよび D₂O を使用するため、高コストである点が障壁となる。しかし、D₂O に関しては蒸発・凝縮を行うことで培地成分を除去し、再利用することが可能であるため、コストを抑えることができる。本項ではエバポレーターを用いた D₂O の再利用法を紹介する。

1) D₂O 培地の使用・回収

培養後の培地を遠心し、残存している菌体を取り除いた上清を回収する

※集菌の時と同じ条件で遠心（7,000 rpm、15 min 程度）

※上清回収後から日が経っている場合は直前に再度遠心する方が良いと思われる

2) エバポレーター（Rotavapor R-300, BUCHI）のセットアップ

エバポレーター（Fig. 3-1）、真空ポンプ（V-300; Fig. 3-2）、ヒーティングバス（B-305）、冷却ポンプ（LTB-125, AS ONE）の電源を ON にする

冷却ポンプの温度を 4 °C 前後に設定し、冷却管への水の循環を開始する

※冷却ポンプの冷媒は冷却効果を高めるために 50-70 % エターノールを使用する

ヒーティングバスに水を入れ、42 °C に設定する

専用のナス型フラスコ（1 L or 500 mL）に培地を入れる

※1 L には 600 mL 程度、500 mL には 300 mL 程度の培地を入れる

ナス型フラスコをエバポレーターに取り付ける

※コンビクリップを手でいっぱいまで締め付けてフラスコを確実に固定する

※ナス型フラスコの容量を変更した時は、フラスコの首部分とヒーティングバスの縁部の間隔が 1 cm 以下にならないように注意し、ロータリードライブの下限值を再設定する

ハンドルを使ってロータリードライブを下げ、ナス型フラスコをヒーティングバスに浸漬する

※ハンドルを奥に傾けると下降し、手前に傾けると上昇する

インターフェースで真空度と回転数の初期値を設定する

※真空度: 200 mbar、回転数: 140 rpm

3) 蒸留

インターフェースから start で減圧と回転を開始する

※減圧中に突沸しそうになったら、すぐに設定値を大きくして減圧を中断する（最初は培地中に溶けている空気が出てくるので突沸しやすい）

まずは常圧の状態から 200 mbar まで減圧し、設定値まで減圧されるのを待つ

圧力が設定値に到達したら、突沸しないように段階的に 30 mbar まで減圧していく

※減圧間隔の目安:200 mbar→100 mbar は 20 mbar ずつ、100 mbar→30 mbar は 5 mbar ずつ

※真空度が順調に下がらない場合はシステムに漏れがある可能性があるので、接続部分が緩んでいないか点検する

※真空度が下がらない場合でもガラスすり合わせ部分にはできる限り真空グリースは塗らないようにする

30 mbar まで下がったら冷却コンデンサー内の凝縮液の高さが Max Condensation Level を越えないかどうか、蒸留の進行が安定するまで見守る (Fig. 3-3)

※凝集液が Max Condensation Level を超える場合は真空度を高くする

※冷却ポンプの温度が蒸留中は 12~15 °C 付近まで上昇してしまうが、凝縮液の高さが Max Condensation Level を越えない限りは無視しても問題ない

※冷却ポンプのエラー (温度・水位)が出た場合は PUMP と COOLER が停止することがあるので注意する (Fig. 3-4)

凝縮液の高さが安定したらそのまま放置して蒸留を進める

1-2 時間で蒸留が完了し、培地中の溶質が濃縮されたドロドロの液体が残る (Fig. 3-5)

※冷却ポンプの温度が 4 °C で安定する状態に戻ったら冷却コンデンサー内の凝集液もなくなり、蒸留が完了している

回転数を 40 rpm ぐらいまで下げる

ロータリードライブを上方に移動させ、インターフェースから stop で蒸留を停止する

続けて蒸留する場合は残りの培地を追加し、再度減圧から開始する

※真空度を 200 mbar に再設定するのを忘れないようにする

4) エバポレーターの片付け

ナス型フラスコを洗浄し、乾燥させる

※ドロドロの液体はすぐに洗えばこびりつかずに楽に洗浄できる

水蒸気との交換を防止するために、ナス型フラスコの接続口をラップとアルミホイルで二重にカバーをする

受けフラスコをしっかりと保持してからボールジョイントクランプを外し、受けフラスコを外す (Fig. 3-6)

受けフラスコから蒸留された溶液を用意しておいた容器に移す

※容器はよく乾燥させたメディウム瓶などを使用する

冷却管とトラップは蒸留された D₂O のみが接触するので洗浄や乾燥はさせずにそのまま放置する

5) 活性炭の添加

蒸留後の D₂O 1 L に対し、活性炭 (C9157 500g, Sigma) を 1-2 g 程度加えて混合する (Fig. 3-7)

※スパチュラ 1-2 杯程度加え、厳密な秤量は不要

※活性炭はあらかじめ乾燥させておいたものを使用する

蓋をしっかりと閉めてパラフィルムで密閉し、常温で一晩以上放置する

※D₂O は使用直前までこの状態で保管する

6) 活性炭の除去

使用直前に D₂O から活性炭をフィルター除去し、D₂O 率を FT-IR で測定する (Fig. S3)

※D₂O のメインピークに対して、HOD のピークが見られる。低 D₂O 率では HOH のピークも見られるようになる

7) 回収実例

100 % 重水素化タンパク質を作製するために使用した 100 % D₂O 培地を培養・集菌後に約 1 年間保存していた。このうち 900 mL を上記の方法により蒸留すると、850 mL が回収され、回収率は約 94 % であった。

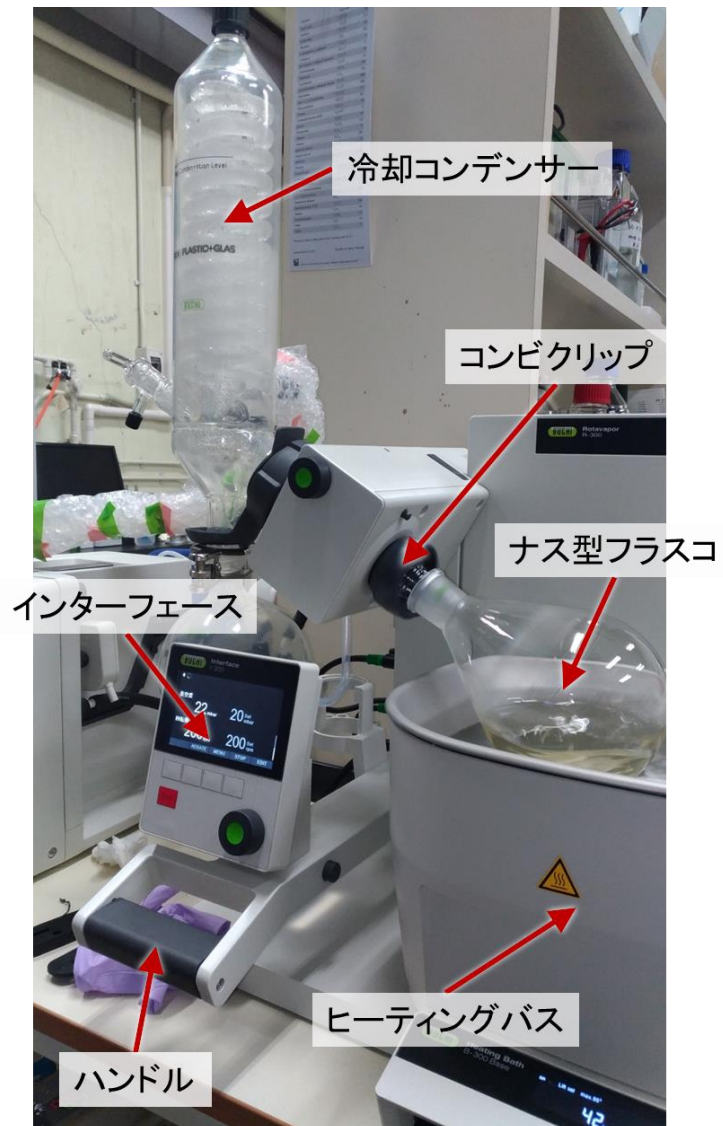


Fig. 3-1 エバポレーター



Fig. 3-2 真空ポンプ



Fig. 3-3 冷却コンデンサー内の凝縮液の高さ



Fig. 3-4 冷却ポンプ



Fig. 3-5 蒸留終了後の培地残渣



Fig. 3-6 回収 D₂O が受けフラスコに貯まる

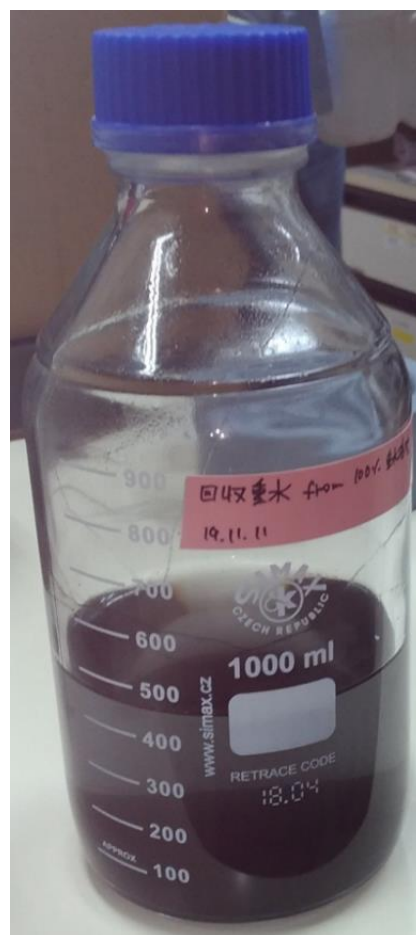


Fig. 3-7 活性炭を添加した回収 D₂O

Chapter 4 D₂O/H₂O 比率測定方法

Chapter 3 で使用済み培地から回収した D₂O は空気中の水蒸気との D-H 交換反応が起こっており、厳密には 75 % もしくは 100 % D₂O ではない。D₂O の再利用のためには D₂O/H₂O 比率を精密に測定意する必要がある。本項では FT-IR を用いた D₂O/H₂O 比率の測定法を紹介する。

1) フーリエ変換赤外分光光度計 (FT/IR-4600, 日本分光) の準備

光源の安定化のために、測定の約 15 分前から装置 (Fig. 4-1) の電源を入れておく

※FT/IR は湿度に左右されやすいので、適宜除湿や簡易グローブボックスを使用し、試料測定は手早く行う

PC を立ち上げ、デスクトップの測定ソフト「スペクトルマネジャー」を起動する

スペクトルマネジャーの「測定」から「スペクトル測定」を選択する

2) 検量線の作製

2-1) 標準試料の測定

スペクトルマネジャーにおいて以下の Table 4-1 の通りピーク高さの測定点とピーク面積積分範囲を指定する

※ピーク高さは「ベースなし」、積分範囲は「2 点ベース」を用いる

Table 4-1 D₂O/H₂O 標準試料 ピーク設定

| | ピーク高さ (cm ⁻¹) | ピーク面積積分範囲 (cm ⁻¹) |
|----------------|---------------------------|-------------------------------|
| Peak 1 (D-O-D) | 1205 | 1070 - 1300 |
| Peak 2 (H-O-D) | 1450 | 1350 - 1560 |
| Peak 3 (H-O-H) | 1640 | 1560 - 1790 |

開封直後の 99.9 % D₂O を使用して 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99.9 % の D₂O/H₂O 標準試料を作製する

本体のカバーを開き (Fig. 4-2)、試料台のカバー (Fig. 4-3) を外して、試料測定部分 (Fig. 4-4) を Milli Q とキムワイプでふき取る

※Milli Q が残らないようによくふき取る

※試料測定部分は汚染・劣化しやすいので長時間カバーを外したままにしない

試料台に D₂O/H₂O 標準試料を 5 μL 程度乗せる

試料台のカバーをかぶせ、本体のカバーを閉じ、スペクトルマネジャーの試料測定ボタンをクリックする

各比率の D₂O/H₂O 標準試料を全て測定する

2-2) 検量線の作製

任意の解析ソフト (Igor など) を使用し、 D_2O/H_2O 標準試料の測定で得られた Peak 1~3 のピーク面積範囲もしくはピーク面積比率を用いて D_2O/H_2O 比率に対する curve fitting を行い、適当な検量線を作製する

※当研究室においては D-O-D と H-O-D のピーク面積比 (Peak 2 / Peak 1) を用いて検量線を作成し、その検量線から D_2O 比率を決定している。

※当研究室では python で作成した GUI を用いて D-O-D と H-O-D のピーク面積比 (Peak 2 / Peak 1) を入力すれば D_2O/H_2O 比率を算出できる環境を整えている (python script は提供可能, Fig. 4-5)

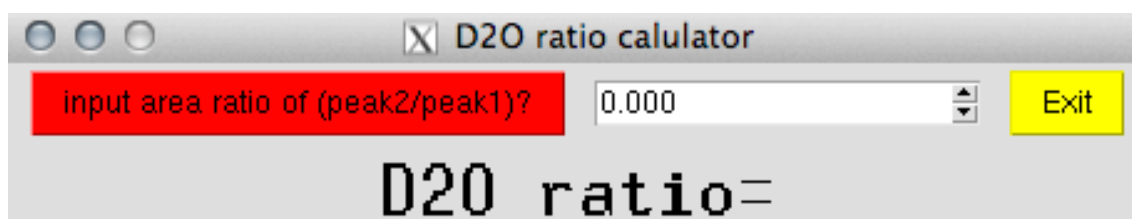


Fig. 4-5 重水比率算出 python GUI

2) D_2O/H_2O 比率の測定

スペクトルマネジャーにおいて作成した検量線において D_2O/H_2O 比率算出に必要なパラメータを得られるようにピーク高さの測定点とピーク面積積分範囲を指定する
本体のカバーを開き、試料台のカバーを外して、試料測定部分を Milli Q とキムワイプでふき取る

※Milli Q が残らないようによくふき取る

※試料測定部分は汚染・劣化しやすいので長時間カバーを外したままにしない

試料台に D_2O/H_2O 測定試料を 5 μ L 程度乗せる

試料台のカバーをかぶせ、本体のカバーを閉じ、スペクトルマネジャーの試料測定ボタンをクリックする

測定試料の FT-IR スペクトルとピーク高さ、ピーク面積が得られる (Fig. S3, Table S1)

3) フーリエ変換赤外分光光度計の片づけ

測定後の試料をキムワイプで拭きとる

試料測定部分を Milli Q とキムワイプでふき取る

試料台のカバーをかぶせ、本体のカバーを閉じる

装置本体の電源を切り、PC の電源を落とす

4) D_2O/H_2O 比率の計算

測定により得られたピーク面積やピーク面積比率を用いて作製した検量線の多項式を解き、

D₂O/H₂O 比率を算出する

※検量線は測定毎に取り直す必要はなく、基本的には一度正確に作成すれば長期間繰り返し使用可能と考えている

5) 測定実例

Fig. S3, Table S1 の再利用 D₂O の重水率は 99.6 %と算出された



Fig. 4-1 フーリエ変換赤外分光光度計
(FT/IR-4600, 日本分光)

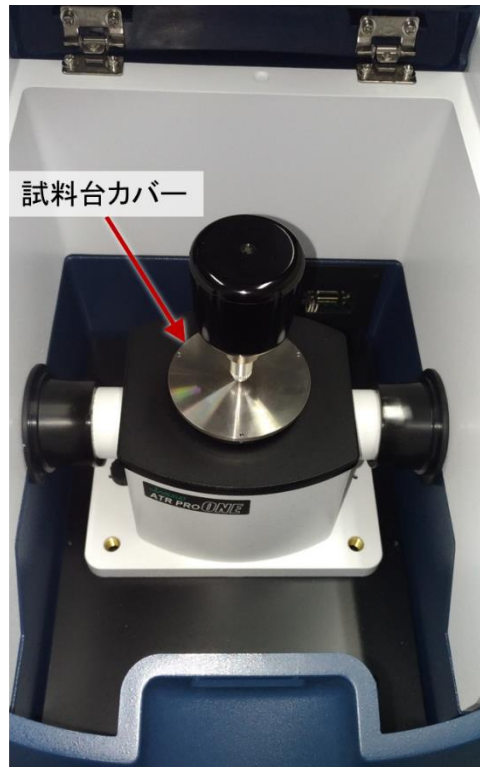


Fig. 4-2 装置内部

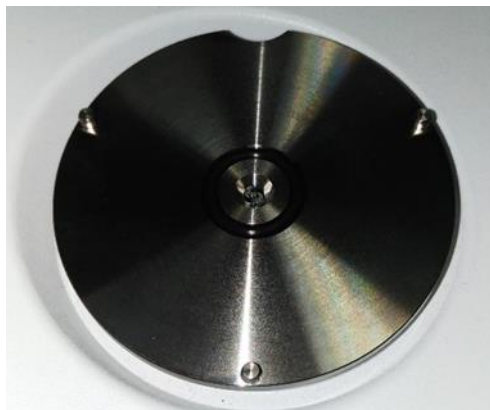


Fig. 4-3 試料台カバー (ウラ)

Supplemental Figures

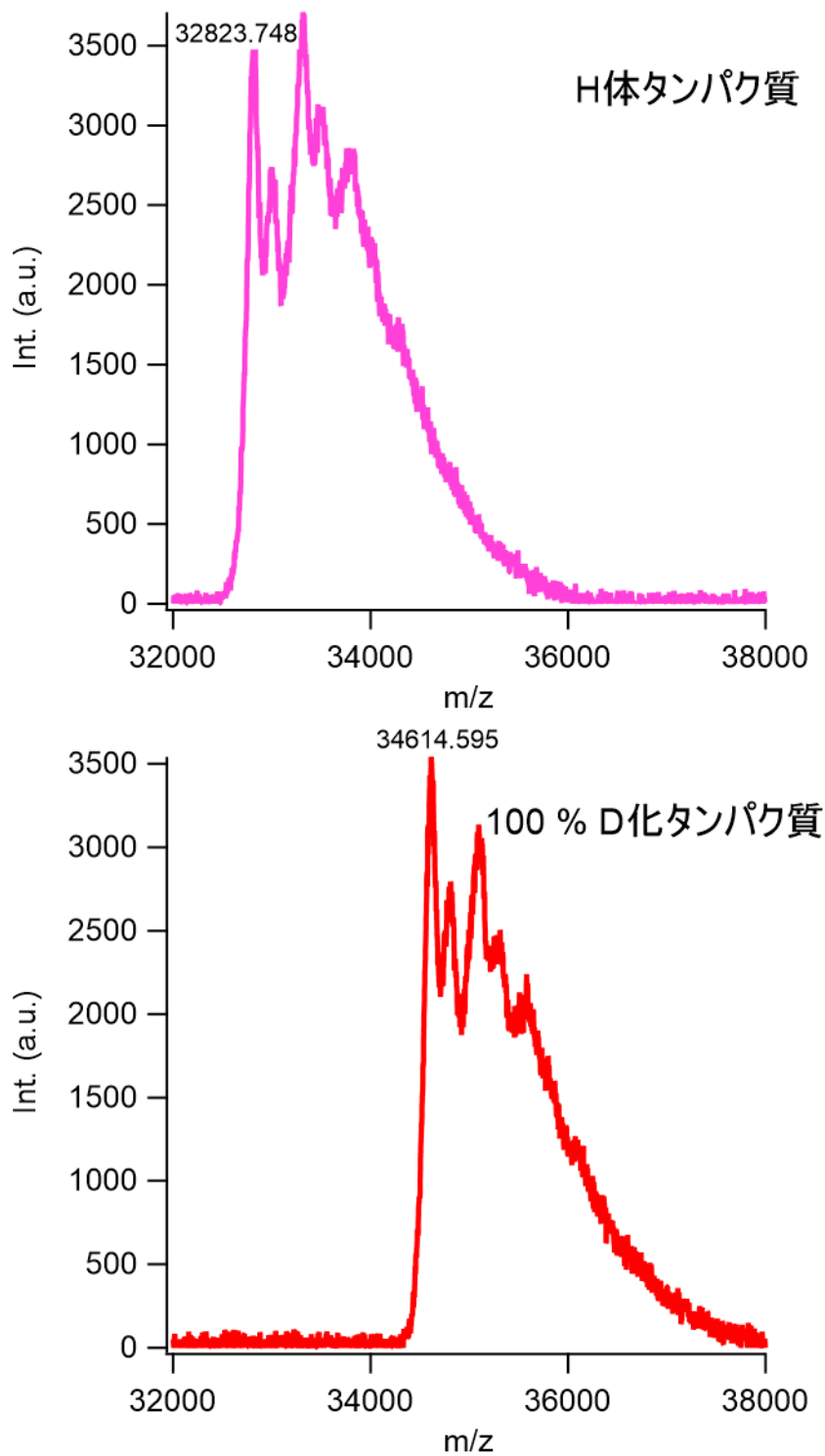


Fig. S1 100 % 重水素化タンパク質の MS スペクトル

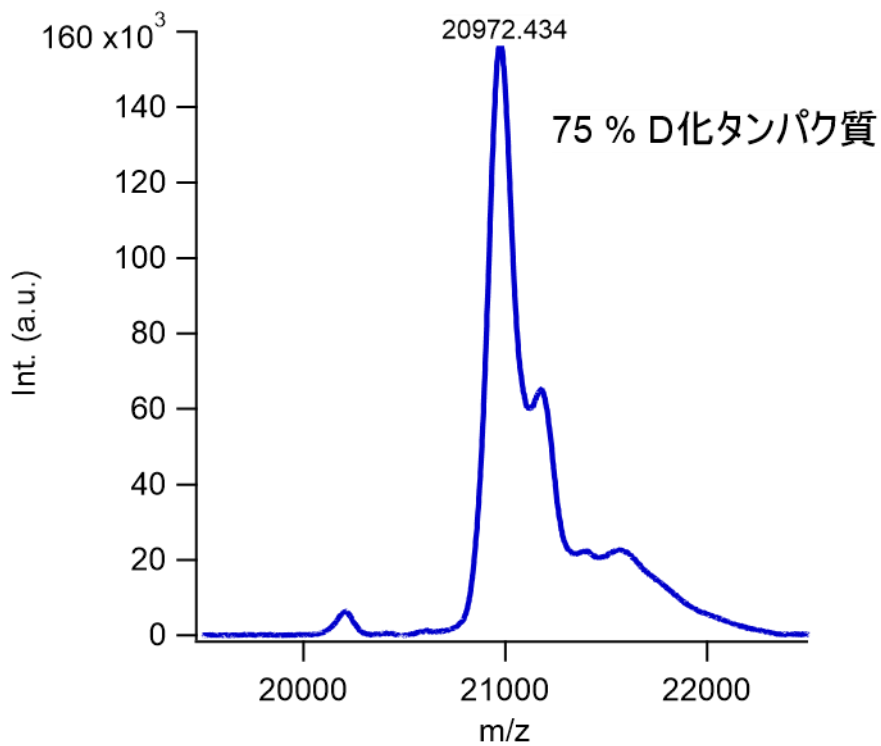
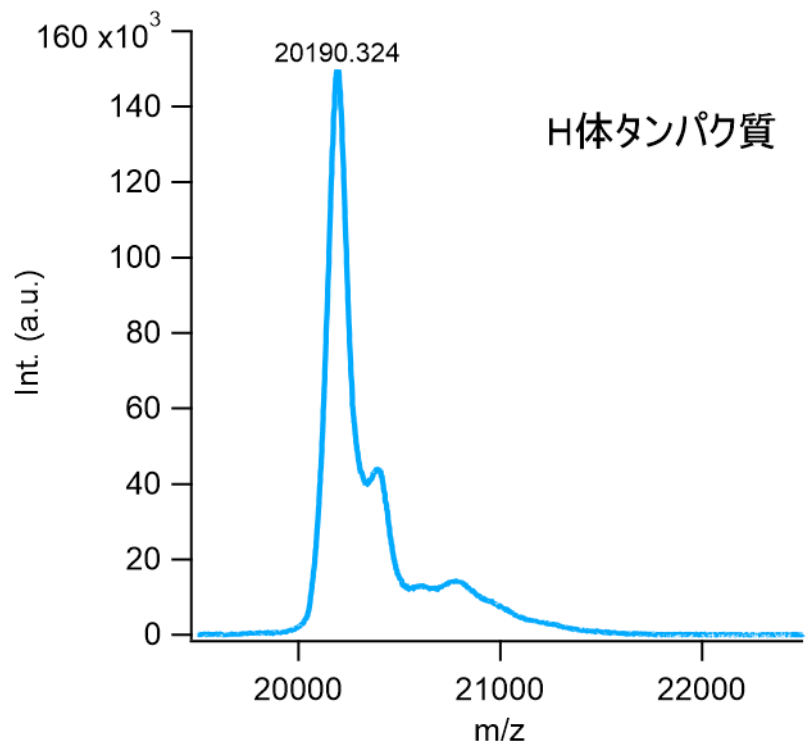


Fig. S2 75 % 重水素化タンパク質の MS スペクトル

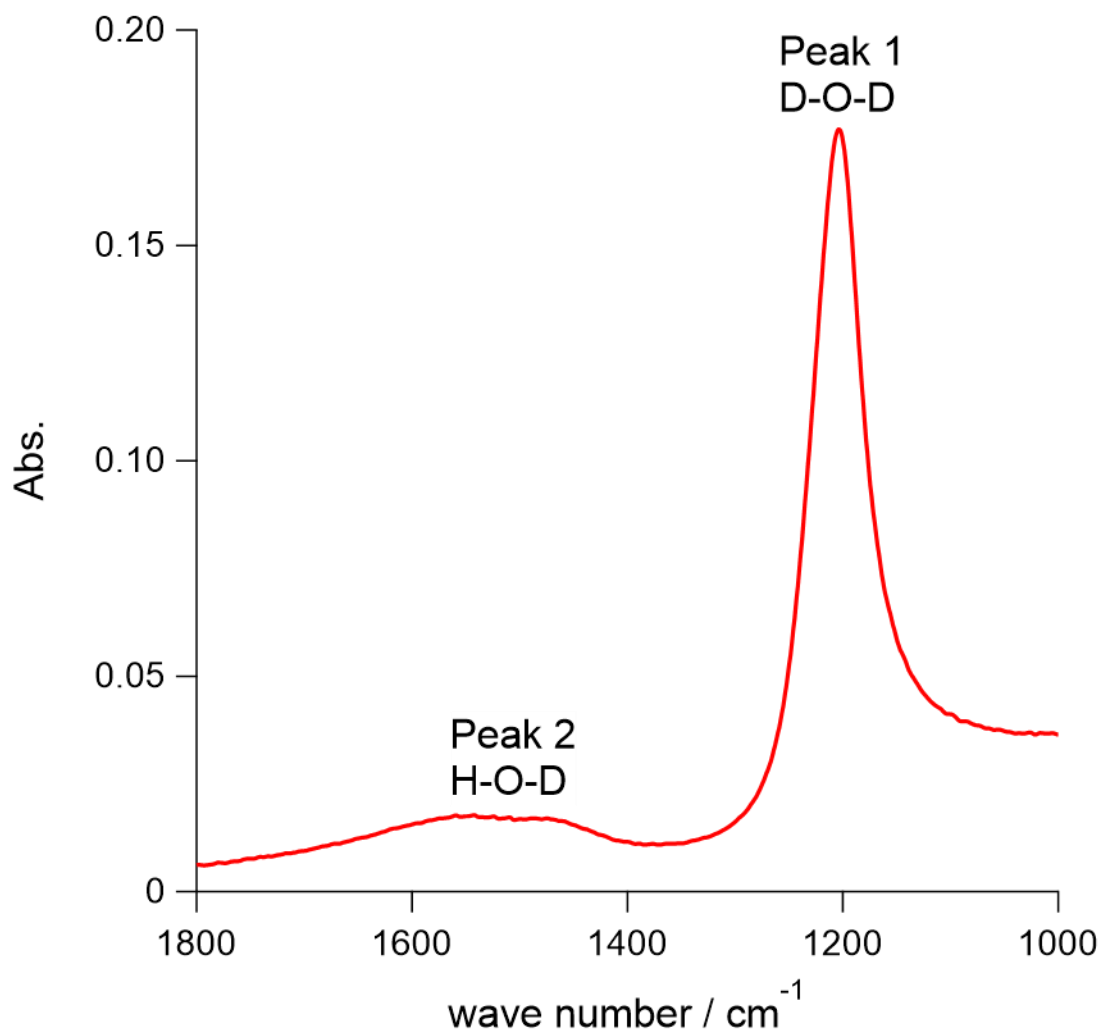


Fig. S3 再利用 D₂O の FT-IR スペクトル

Table S1 再利用 D₂O のピーク高さおよびピーク面積、ピーク面積比率

| ピーク高さ 1 | ピーク高さ 2 | ピーク面積 1 | ピーク面積 2 | ピーク面積比 1/2 | ピーク面積比 2/1 |
|----------|-----------|---------|----------|------------|------------|
| 0.176978 | 0.0155058 | 10.0142 | 0.122119 | 82.0032 | 0.0121946 |

謝辞

本稿は JSPS 科研費 JP18H05229 の助成を受けるとともに、日本科学協会の笹川科学研究助成による助成を受け、作成されたものです。心より感謝申し上げます。

Chapter 1 タンパク質の重水素化法については、矢木真穂 先生、加藤晃一 先生をはじめとした生命創成探究センター / 分子科学研究所の皆さまからの情報提供および技術指導を賜りました。Chapter 2 重水素化率測定法については、Bruker 社のユーザーマニュアルを参照するとともに同社の技術指導を賜りました。Chapter 3 D₂O 再利用方法については、北海道大学 齋尾智英 先生から情報提供をいただきました。また、本稿は京都大学複合原子力科学研究所 粒子線基礎物性研究部門 杉山研の皆さまからの監修を受け、同研究室の奥田綾が執筆し、研究会内で検討を行ったものです。

新世代中性子構造生物学研究会 メンバーリスト

佐藤 衛・小田 隆（横浜市立大学）

矢木真穂・加藤晃一（生命創成探究センター/分子科学研究所）

齋尾智英（北海道大学）

中川 洋（日本原子力研究開発機構）

苮口友隆（慶應義塾大学）

川北至信・高田慎一（JAEA）

富永大輝（CROSS）

日野正裕（京都大学）

杉山正明・裏出令子・井上倫太郎・佐藤信浩・守島 健・奥田 綾（京都大学（杉山 Gr.））

【改変履歴】

Ver. 1 作成:2020/3/9