

1. 実験プロトコル

基本的には、結晶構造解析で用いられているリジンのメチル化修飾プロトコル (Walter et al, Structure 14, 1617-1622 (2006)) を用いる。メチル化は簡単な操作を数回繰り返すだけであり、反応は1日で終わる。タンパク質を 1 mg/ml 以下になるように調製し (濃度が濃いと反応中に沈殿しやすくなるため)、バッファーは第1級アミンをもたないものを用いる (論文中では 50 mM HEPES, pH 7.5, 250 mM NaCl を用いている。Tris buffer は使用できない)。塩はあってもなくても良い。pH が重要であり、ずれると副反応が起こりやすくなる (そのため 50mM 程度のバッファー濃度を推奨)。

<プロトコル>

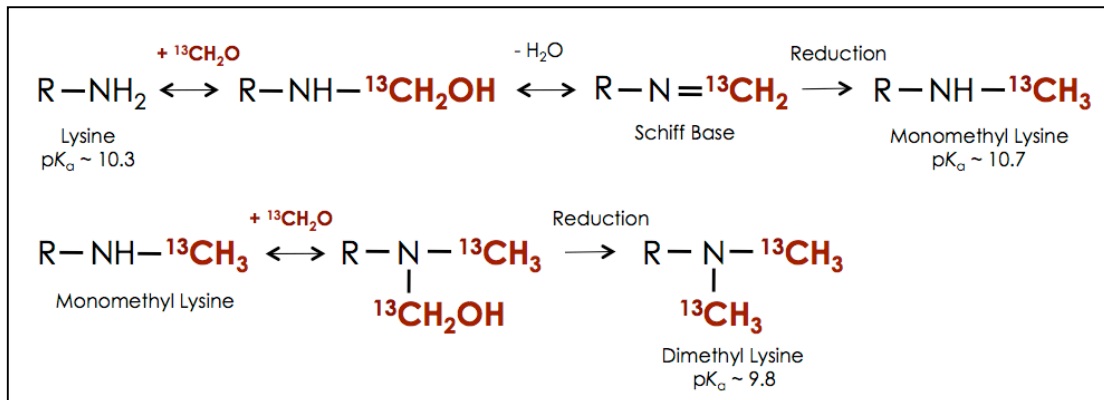
1. タンパク質溶液は 50mM HEPES, pH 7.5 (塩強度は 10-300mM 程度) に透析し、1mg/ml 程度の濃度にしておく。還元剤は反応を阻害するので完全に除く。
↓
2. サンプル 1 ml 当たり 20 μ l の 1 M dimethylamine-borane complex (ABC)^{*1}、40 μ l の 1 M formaldehyde^{*2} を加え、穏やかに混合する^{*3}
↓
3. 4°C, 2 時間 インキュベート
↓
4. サンプル 1 ml 当たり 20 μ l の 1 M ABC、40 μ l の 1 M formaldehyde-¹³C を加え、穏やかに混合する
↓
5. 4°C, 2 時間 インキュベート
↓
6. サンプル 1 ml 当たり 10 μ l の 1 M ABC を加え、穏やかに混合する
↓
7. 4°C, overnight インキュベート
↓
8. ゲルろ過によりサンプルとメチル化試薬を分離、精製 (この時、Tris buffer を用いるとメチル化反応を止めることができる)

*1: ALDRICH から Borane- dimethylamine complex, 97 %が販売されている。溶液は要時調製 (使用 1 分前に粉末を DW で溶かして調整)。可燃性粉末。4°C保存。アミン臭。Sigma cat. no. 180238-5G ¥3,300

*2: SIGMA から Formaldehyde solution, for molecular biology, 36.5 %が販売されている。古くなるとパラホルムアルデヒドが生じ、メチル化産物の均一性などに影響するので注意する。12 倍希釈すると 1 M 溶液になる。¹³C-ラベル化を行う場合は、Cambridge Isotope Lab (CIL) より出ている Formaldehyde-¹³C (99 %), 20 %を使用して、1M に希釈して使用する。CIL Cat No. CLM-806, 1ml. ¥47,000。要時調製。

*3: ABC、formaldehyde の混合はドラフト内で行う。

2. 反応式（反応は二段階）



3. 注意点など（これまでの経験より）

- ◆ 反応スケールは数 ml 程度ならエッペン、ファルコンで、数十 ml ならガラスビーカーでスターラーを回しながらやると良い（on ice で）。反応時は蛋白質濃度は上げず（1 mg/ml）、最後 ABC を加えて overnight 反応させた後に amicon で濃縮を行ってゲル濾過にかけた方がよい。その場合も極端に濃縮（5 mg/ml 以上）はせず、ゲル濾過の回数を増やすべき。ゲル濾過時はカラムボリュームに対してあまり多量にロードすべきではない（試薬が残る）。Superdex 75 Hiroad 26/60 (bed vol. 320 ml) ならロードは 2ml に押さえる。これで一回 10mg 分離出来る（2 ml x 5 mg/ml）。試薬はおそらく細胞毒性があるので、ゲル濾過後の蛋白質溶液にアミン臭がしていないか注意する。
- ◆ 反応溶液には DTT、βメルカプトエタノールなどの還元剤は決して含んではならない。副反応が起こって蛋白質が沈殿する。反応後もゲル濾過でメチル化試薬を除去する前には加えてはならない。沈殿する。ゲル濾過後であれば、加えるのは問題ない。
- ◆ 反応後、反応溶液に高濃度の Tris を加えると沈殿が起こることがある。反応を止めるのは、反応液を直接 50mM Tris 等で平衡化したゲル濾過にかけするのが最も安全である。透析は少量のメチル化試薬は残るので、ゲル濾過にかけずらい膜蛋白質等の場合以外おすすめしない。
- ◆ 反応後のメチル化試薬の除去にはゲル濾過カラムを推奨するが、HiPrep Deasaltng (GE) や MicroSpin G-25 Column (GE) も使用できる。
- ◆ 反応を止めるのにアミノ酸を用いても良い（Glycine など）。アミノ基を持っていれば使用できる。
- ◆ 急に沈殿が出るような場合は反応自体でなくバッファー組成の問題である事が多い。その場合は反応時は出来るだけ余計な成分を除いてバッファーのみで反応時間を短縮（30min, 30min, 1hr）して行う。その後、反応を止めてから必要な成分を足す。
- ◆ 反応時に気泡が生じるが、遠心で除くとよい。
- ◆ 反応後は必ずマススペクトルで導入効率をチェックする。
- ◆ 初めてメチル化反応を行う際には 15N ラベル蛋白質を用い、反応前後で 15N-HSQC スペクトルを比較する。Ubiquitin の場合は K27 のアミノ基が蛋白質内部に埋もれて他の残基と水素結合を組んでおり、メチル化を行うと K27 周辺の 15N-HSQC シグナルが比較的大きく変化するが、FKBP や試した他の蛋白質ではそれほど大きな変化は見られない。
- ◆ このプロトコル（formaldehyde 過剰量）を使用すれば 100% のリジンがジメチル化されるが、aldehyde 量を減らすと（タンパク質 Lys モル数 : aldehyde=1:5 とか）、タンパク質内部や塩橋を組んでいるリジンがメチル化されなかったり、モノメチル化され

た産物が出てくる。

- ◆ 有機化学の専門家から聞いた話だが、ABC が imine に結合してなかなか取れない事もあるようだ。