

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-115528

(P2004-115528A)

(43) 公開日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07C 231/12	C07C 231/12	2GO45
C07C 237/06	C07C 237/06	4H006
C07C 323/58	C07C 323/58	
// GO1N 33/68	GO1N 24/08 510Q	
GO1R 33/465	GO1N 33/68	
審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-362292 (P2003-362292)	(71) 出願人	503387835
(22) 出願日	平成15年10月22日 (2003.10.22)		マーテック・バイオサイエンス・コーポ レーション
(62) 分割の表示	特願平6-518272の分割		Martek Biosciences Corporation
原出願日	平成6年2月7日 (1994.2.7)		アメリカ合衆国、21045 メリーラン ド州、コロンビア、ドビン・ロード 64 80
(31) 優先権主張番号	014,243		6480 Dobbin Road, C olumbia, MD 21045, U. S. A.
(32) 優先日	平成5年2月5日 (1993.2.5)	(74) 代理人	100066474
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田澤 博昭
		(74) 代理人	100088605
			弁理士 加藤 公延
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 タンパク質構造決定のための組成物類および方法類

(57) 【要約】

【課題】 NMR測定用の同位体標識タンパクを産生するための同位体標識グルタミン、アスパラギン、システインの調製方法および調製物を提供する。

【解決手段】 同位体標識グルタミンまたはアスパラギンの調製方法で、(a) 同位体標識グルタミン酸またはアスパラギン酸をN-保護基と反応させ、N-保護アミノ酸を形成させ(b) 前記N-保護アミノ酸を環化し、オキサソリジンを形成させ、(c) 前記オキサソリジンをアミド形成条件下でアンモニアと反応させ、環状アミド誘導体を形成させ、

(d) 前記環状アミド誘導体を加水分解し、N-保護アミノ酸を形成させ、(e) 前記N-保護アミノ酸を脱保護し、同位体標識グルタミンまたはアスパラギンを形成させる。同位体標識システインも提供される。

【選択図】 なし

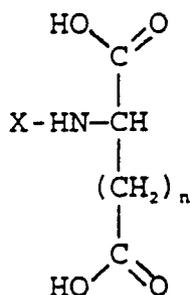
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

同位体標識グルタミンまたはアスパラギンの調製方法で、

(a) 同位体標識グルタミン酸またはアスパラギン酸を N - 保護基と反応させ、式

【化 1】

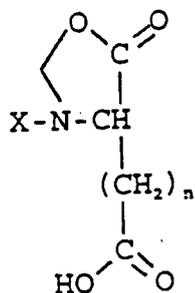


10

の N - 保護アミノ酸を形成させ

(b) 前記 N - 保護アミノ酸を環化し、式

【化 2】

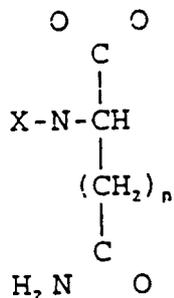


20

のオキサソリジンを形成させ、

(c) 前記オキサソリジンをアミド形成条件下でアンモニアと反応させ、式

【化 3】

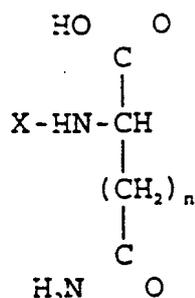


40

の環状アミド誘導体を形成させ、

(d) 前記環状アミド誘導体を加水分解し、式

【化 4】



10

の N - 保護アミノ酸を形成させ、

(e) 前記 N - 保護アミノ酸を脱保護し、同位体標識グルタミンまたはアスパラギンを形成させること、

(式中、n は 1 または 2 であり、および、X は、アミン保護基である) からなることを特徴とする前記方法。

【請求項 2】

20

炭素原子の実質的に全てが ^{13}C によって標識され、窒素原子の実質的に全てが ^{15}N によって標識され、および水素原子の約 20% 乃至約 100% が ^2H であることを特徴とするグルタミン調製物。

【請求項 3】

炭素原子の実質的に全てが ^{13}C によって標識され、窒素原子の実質的に全てが ^{15}N によって標識されていることを特徴とするアスパラギン調製物。

【請求項 4】

前記水素原子の約 20% 乃至約 100% が ^2H であることを特徴とする請求の範囲第 3 項記載の調製物。

【請求項 5】

30

炭素原子の実質的に全てが ^{13}C によって標識され、窒素原子の実質的に全てが ^{15}N によって標識され、および前記水素原子の約 20% 乃至約 100% が ^2H であることを特徴とする同位体標識システイン調製物。

【請求項 6】

炭素原子の実質的に全てが ^{13}C によって標識され、窒素原子の実質的に全てが ^{15}N によって標識されていることを特徴とする同位体標識システイン調製物。

【請求項 7】

窒素原子の実質的に全てが ^{15}N によって標識され、および前記水素原子の約 20% 乃至約 100% が ^2H であることを特徴とする同位体標識システイン調製物。

【発明の詳細な説明】

40

【発明の分野】

【0001】

本発明は、生体高分子類、特にタンパク質類の三次元構造の決定に関する。特に、NMR 分光分析によって、哺乳類または昆虫細胞培養物中で発現されたタンパク質類の三次元構造決定のための新規組成物類および方法類に関する。

【発明の背景】

【0002】

生体高分子、特にタンパク質類の三次元構造の決定には多年にわたり多大な関心が寄せられてきた。いわゆる“構造 - 機能”研究は、ある分子または分子属のどの構造特性が生体活性に重要であるかを決定する目的で、行われてきた。ノーベル賞授賞者であるペルツ

50

(Perutz) および共同研究者らのヘモグロビン構造に関する先駆的研究 (Perutz, M.F. ら、ネイチャー (Nature), 185, 416 - 422, (1960)) および DNA 構造に関するワトソン (Watson) およびクリック (Crick) の先駆的研究 (Watson, J.D., および Crick, F.H., Nature, 171, 737, (1953)) 以降、この分野は、生物科学で特に重要となっている。

【0003】

さらに最近になって、“合理的薬物設計” という概念が生まれてきている。薬物設計のためのこうした戦略では、タンパク質のようなある特定の生体分子の“活性部分” の三次元構造の決定を必要とする。たとえば、生体分子は、受容体、酵素、ホルモンまたはその他の生体活性分子であるかも知れない。活性部位の三次元構造を知ることによって、科学者は、分子の本来の生体活性を阻害し、模倣しまたは亢進する分子類を設計できるようになる。 (アペルト (Appelt, K) ら、J. Med. Chem., 34, 1925 (1991))。生体分子類の三次元構造の決定は、従って、実用的かつ商業的にも極めて重要となっている。

10

【0004】

三次元構造決定のために最初に開発された技術は、X線結晶学である。ヘモグロビンおよび DNA の構造が、両者とも、この技術を用いて決定された。X線結晶学は、調べる物質の1個の結晶をX線ビームで衝撃し、前記結晶中の配列された分子類の原子類によってX線が屈折されることが必要となる。分散されたX線は写真乾板に捕獲され、それを標準的手法によって現像する。以上のようにして、分散X線は前記乾板上の1群のスポットとして描出され、このパターンから、前記結晶中の分子類の構造が決められる。より大きな分子類については、相差によるあいまいさを排除するため、ルテニウムのような重イオンによって物質を結晶化することも必要である。

20

【0005】

さらに最近になって、もうひとつの技術である核磁気共鳴 (“NMR”) 分光分析が開発され、生体分子および特にタンパク質類の三次元構造が決定されている。NMR分光分析は1950年代に最初に開発され、分子量1000ダルトン以下のものであるような小化合物類の構造解析の強力な手段に変化していった。簡単に述べると、この技術では、(通常適切な溶媒中にある) 物質を強力な磁場に配置しそれを強度の高いラジオシグナルで照射することを必要とする。種々の原子類の核は、前記の磁場によって自身を配列し、このラジオシグナルによって励起されるようになる。それらは、その後、このエネルギーを吸収し、i) 核の種類および ii) 核の化学的環境 (主に結合によって決定される) に依存する周波数においてそれを再放射 (共鳴) する。さらに、共鳴は、結合によってまたは三次元空間を介してひとつの核から他の核に伝搬され、従って、特定の核およびその周辺の核の環境についての情報を付与する。

30

【0006】

しかし、全ての核がNMR活性であるとは限らないことを認識することが重要である。実際には、同一元素の全ての同位体類が活性であるとは限らない。たとえば、“通常の” 水素である ^1H はNMR活性である一方で、重い水素 (重水素) ^2H は活性ではない。従って、通常 ^1H 水素を含有するいかなる物質も、全ての ^1H 水素を ^2H と置換することによって、水素NMRスペクトルにおいて“描出不能” とすることができる。この理由のため、水溶性物質のNMRスペクトルは、水シグナルを回避するため、 H_2O 中溶液として求められる。

40

【0007】

これとは逆に、“通常の” 炭素である ^{12}C はNMR不活性であるにもかかわらず、天然の総炭素中に約1%で存在する安定同位体である ^{13}C が活性である。同様に、天然の総窒素中に同様に約1%で存在する安定同位体である ^{15}N が活性であるにもかかわらず、“通常の” 窒素である ^{14}N はNMR不活性である。小分子類については、実験を十分な量の物質類で十分な時間実行されれば、これらの低レベルの天然の含量で必要な実験情報が十分にもたらされることが、見いだされた。

【0008】

ハードウェアおよびソフトウェアが進歩するに伴い、これらの技術によって解析できる

50

分子の大きさが小タンパク質の大きさである約 10,000 ダルトンにまで拡大された。したがって、NMR 分光分析のタンパク質構造決定への適用は、数年前に始まったばかりである。この大きさの限定は、タンパク質類中において、NMR 不活性同位体類¹⁴N および¹²C を NMR 活性同位体類¹⁵N および¹³C で置換することによって、突破できることがすぐにわかった。この置換を達成する方法は、これらの同位体類で標識された増殖培地中においてタンパク質類産生可能な微生物類を増殖させることであった。

【0009】

過去 2 年乃至 3 年にわたり、タンパク質類の¹⁵N 標識化および¹³C 標識化によって、それぞれ、15 kd および 25 kd にまで分析上の大きさの限界が解消された。この同位体置換は、遺伝子工学によって形質転換され選択されたタンパク質を産生する細菌または酵母を¹³C および / または¹⁵N 標識基質類を含有する増殖培地中で増殖させることによって、達成された。実際には、これらの培地は、通常、¹³C 標識グルコースおよび / または¹⁵N 標識アンモニウム塩類からなる。(ケイ (Kay, L.) ら、サイエンス (Science), 249, 411 (1990)) およびそれに記載の参考文献類。) 最近、標識タンパク質加水分解物類を含有する細菌および酵母栄養培地が記載されている。国際特許出願、公報番号 W 0 9 0 / 1 5 5 2 5、1990 年 12 月 27 日公表参考。

10

【0010】

¹³C および¹⁵N 標識化によって、こうした技術でこれまで可能であったものに比べて実質的に大きいタンパク質類の NMR 構造決定が可能となったが、約 25 kd よりも大きいタンパク質類では、あいまいな結果しか得られていない。この大きさでは、各原子からの共鳴の多くがあまり広くなりすぎ、分解できない。最近の刊行物では、より大きな分子において、三重標識化、すなわち、重水素²H ならびに¹³C および¹⁵N の部分的取り込みによって、そうでなければ広くなる (スペクトル) 線を有意に狭くできることが報告されている。(バックス (Bax), J. Am. Chem. Soc., 115: 4369 (1993))。三重標識培地は、したがって、約 25 kd よりも大きいタンパク質類の NMR 構造決定用標識形態を調製するのに好適である。細菌性タンパク質類については、H₂O および²H₂O の混合物存在下において細菌を培養することによって、部分的²H 標識化が達成できる。この手法は、しかし、適切に標識された哺乳類タンパク質類の産生のためには不十分である。

20

【0011】

これまで、NMR 構造決定のための組成物類および方法類は、重要な限界に直面していた。構造機能研究で問題となるほとんどのタンパク質類は、由来が哺乳類である。さらに、合理的ヒト用薬物設計において問題となる実質的に全てのタンパク質類は、由来が哺乳類すなわちヒトである。しかし、X 線結晶学または NMR 分光分析のいずれも、哺乳類細胞で産生されたタンパク質類の研究において広い用途をこれまで有していなかった。X 線結晶学は当然結晶物質を必要とするが、哺乳類細胞タンパク質類は、その結晶化が恐ろしく難しい。今日までに抗体類および哺乳類由来レセプター類で結晶学に適した形態で結晶化されたものは、わずかしかない。結晶化されたものは、通常、ある分子の選択された断片であった。分子断片に由来する情報は、主要分子それ自体の部分の構造が全体の分子中における前記分子のその部分の構造と同一であるかどうかは全くわからないので、注意深く検討しなければならない。さらに、X 線結晶学は、結晶物質が得られない多くの場合において、適用できない。

30

40

【0012】

NMR 構造研究は、これまで、標識タンパク質類を細菌または酵母中で発現させる必要性によって限定されてきた。しかし、ほとんどの哺乳類タンパク質類は、細菌および酵母系では起こり得ない顕著な転写後改変を含んでいる。すなわち、それらは、適切に折り畳まれジスルフィド橋によって架橋されており、オリゴヌクレオチド側鎖結合物を有しているかも知れないし、またタンパク質分解によって切断され活性形となっているかも知れない。細菌または酵母産生タンパク質類は、哺乳類細胞産生タンパク質類の生体活性を有していないことが多い。実際に、いくつかの例では、哺乳類タンパク質類は、細菌では全く産生できない。これらの理由のため、1980 年代半ばにおいて、バイオテクノロジー業

50

界は、組織プラスミノゲン活性化因子、第VIII因子:C、エリスロポイエチン等のような治療用組換えタンパク質類の産生のため細菌発現系から哺乳類系へと移ってきた。数種の哺乳類細胞タンパク質類の一部は、問題の分子の断片の遺伝子を細菌中にクローニングし、前記細菌を同位体標識培地中で増殖させることによって前記断片を同位体標識形で発現させることによって、NMRによって研究されてきた。また、これらの系においては問題の分子の細菌中で発現可能な部分のみが研究可能である(例ドゥリスコル(Driscoll, P.C.)ら、Nature, 353, Oct. 24, 1991参照)。細菌発現においせ固有の転写後改変がないために、グリコシル化のような転写後改変がないままで前記の調べた分子部分が産生され、得られた構造の価値に関して再度疑いが生じることになった。X線結晶学についてと同様に、タンパク質断片から得られた構造情報の価値について、その後、疑念が生じることになった。

10

【0013】

哺乳類細胞および昆虫細胞の両者を用いた宿主-ベクター系が、開発されている。チャイニーズ(Chinese)ハムスター卵巣(CHO)細胞類のような哺乳類細胞株類、COS細胞類およびSpodoptera frugiperda細胞株SF9およびSF21(ラッコ(Luckow, V.A.)およびサマーズ(Summers, M.D.)、バイオテクノロジー(Biotechnology)、6, 47-55(1988))のような昆虫細胞株類が、天然のタンパク質のそれらに類似の転写後改変を有する組換え哺乳類タンパク質類を産生することが見いだされた。

【0014】

哺乳類および昆虫細胞産生タンパク質類に関するNMR研究は、 ^{13}C または ^{13}C および ^{15}N の両者のような安定同位体類を細菌のそれと同様の方法で普遍的に取り入れる手段が得られていないので、限られた価値しか有していない。細菌はグルコースおよび塩類の単純な混合物で増殖できる一方、哺乳類および昆虫細胞は、グルコースに加えて、増殖に必須のアミノ酸類全てを要求する。たとえば、 ^{13}C および/または ^{15}N で普遍的に標識されたタンパク質類を哺乳類細胞からうまく産生するためには、これらのアミノ酸類全てが存在していなければならない、かつ、全てが、 ^{13}C および/または ^{15}N で普遍的に標識されていなければならないであろう。

20

【0015】

同位体標識培地を産生するためのひとつの理論的方法として、同位体標識タンパク質の単純な加水分解物を使用することが挙げられる。残念なことに、タンパク質類を成分アミノ酸類へと加水分解すると、哺乳類細胞に有毒な副産物が同時に形成されることにもなる。未精製加水分解物を使用すると、細胞が急激に死滅することがわかった。さらに、従来の加水分解操作では、ある必須アミノ酸類が破壊され、こうした破壊を防止するために使用可能な手段によって、有害な影響が生じる。一方、個々のアミノ酸類の単離および精製のための技術が公知である。たとえば、レマスター(LeMaster)および共同研究者らは、 ^2H および ^{15}N アミノ酸類の精製を記載し論文を公表している(Anal. Biochem., 122, 238(1982))。カラムクロマトグラフィ段階としては5段階以上が必要であり、それでもなお、これらの研究者らは、完全に標識されたシステインおよびグルタミンを単離できず、一方、トリプトファンの収率は、“誤り”であった。これらのアミノ酸類の3種全てが、組換えタンパク質類の産生のために宿主細胞として使用されるほとんどの哺乳類細胞および昆虫細胞の増殖に必須である。さらに、本操作では、調製クロマトグラフィカラムからのアミノ酸類の重要な溶出液としてピペリジンを利用していた。ピペリジンは、極めて有毒な、管理対象物質であると報告されている。

30

40

【0016】

このように、個々のアミノ酸類の精製のための操作は、複雑で、時間を要しかつ低収率であり、従って、経済的に見合っていない。その結果、一部の ^{13}C および/または ^{15}N アミノ酸類は、商業的に入手可能であるとはいうものの少量でときどきしか得られず、ほとんどのものは入手可能となっていない。

【0017】

50

最近、フェシック (Fesik) および共同研究者らは、NMR 構造研究用哺乳類細胞からの同位体標識タンパク質類の産生のための方法を記載している。(バイオケミストリー (Biochemistry), 31, 第51巻, 12713, (1992))。これらの共同研究者らは、トリプトミンおよびイミダゾール存在下において、同位体標識藻類および細菌タンパク質類をメタンスルホン酸で加水分解した。後者の試薬類の目的は、アミノ酸類トリプトファンおよびヒスチジンの破壊を減ずるための“自殺塩基”として作用させることにあった。その後、加水分解物をレマスターおよび共同研究者らにより記載されている操作で精製した; すなわち、前記加水分解物を H^+ 形の陽イオン交換カラムにのせ、1群として前記アミノ酸類をカラムからピペリジンによって溶出することによって、精製した。前記アミノ酸含有分画をまとめ、蒸発乾燥させ、水に再溶解させ、水酸化ナトリウムで pH を 11.5 に調整し、生成した溶液を pH が一定になり、“これ以上アンモニアまたはピペリジンが除去されないことが示唆されるようになるまで”、蒸発させた。前記アミノ酸類をその後、分子量 500 のカットオフ膜でろ過し、不純物をさらに除去し、凍結乾燥させた。著者らは、生成したアミノ酸類を直接使用したのか(すなわち、高 pH で)または溶液の pH を中和しもしそうであればどの酸によって中和したのかを示唆していない。フェシックらの研究は技術的進歩を示しているが、にもかかわらず、明確な NMR 構造決定のために有用な哺乳類細胞発現タンパク質類を普遍的に標識するための手段を提供していない。まず第 1 に、用いた加水分解条件で、アスパラギン、グルタミンおよびシステイン残基類が分解され、単に“微量の”トリプトファンを残したに過ぎない(12715 頁、第 1 表)。第 2 に、本操作では、上記にも述べたように有害で管理対象物質であるピペリジンを溶出液として使用している。第 3 に、レマスターは、“自殺塩基類の”ひとつであるイミダゾールが、アミノ酸ロイシンと同時に溶出されることを彼の原著で述べている。レマスターは、ロイシンの結晶化によって前記イミダゾールを除去できた。フェシックらはこのような結晶化段階を記載しておらず、このような段階は、実際には、個々のアミノ酸類が分解されていないフェシックらの操作では不可能であろう。

10

20

【0018】

フェシックらは、溶液の pH を 11.5 まで上げ、pH が一定になるまで前記溶液を加熱蒸発させることによるピペリジン溶出液の除去を記載している。この pH においては、特にピペリジン(沸点 106) 除去に必要な高温において、ピペリジンおよび/または水酸化ナトリウム混合物によるアミノ酸類のラセミ化および/または求核的攻撃のリスクが生ずる。このような反応は、前記混合物中における活性の(viable)アミノ酸類の量を減少させ、増殖培地としてのその有効性を低下させることになるであろう。さらに、著者らが自身で認めているように、熱蒸発段階は、安定溶液 pH が“これ以上アンモニアまたはピペリジンは除去されない”ことを示唆すると、停止される。したがって、得られたアミノ酸混合物が極めて毒性の高い物質であるピペリジンを微量、含有する可能性がある。

30

【0019】

しかし、アミノ酸類アスパラギン、グルタミンおよびシステインが存在しないこと、および“微量”しかトリプトファンが存在しないことは、極めて重要である(12715 頁、第 1 表)。アスパラギン残基類が不足していることはフェシックらの研究した系では重要ではないことがわかっているが、グルタミンは、細胞増殖に必須であることが見いだされた(12716 頁、第 2 図)。著者らは、添加物としてのグルタミン酸からグルタミンを酵素合成する方法を示している。しかし、この重要な反応のためには、適切に標識されたグルタミン酸源が入手可能でなければならない。著者らが記載しているように、 ^{13}C 、 ^{15}N 標識グルタミン酸は市販されている。しかし、たとえば、三重標識グルタミン酸は市販されていない。

40

【0020】

対照的に、フェシックは、標識システイン調製の方法を示していない。安定同位体で標識されたシステインは、 ^{15}N 標識形でのみ市販されている。二重標識 ^{13}C 、 ^{15}N システインまたは三重標識 2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N システインはこれまで市販されていない。

50

その結果、フェシックおよび共同研究者らが採用した手法では、システインおよびトリプトファン残基が適切に標識されないので、単純な¹⁵N標識化の場合を除いて、いかなる場合においても普遍的に標識された産物を生成することはないであろう。さらに、細胞代謝によって、不所望の同位体の同位体漏洩が正確に標識されていないシステイン残基からその他のアミノ酸残基中へ起こることもあり得る。

【0021】

原則的に、三重標識システインを含む標識システイン産生の最も簡便な方法は、適切な標識培地中でシステイン含量が高い生体を培養し、その生体のタンパク質から前記システインを単離することである。このような生体類は、当業者には公知であり、*Rhodospseudomonas spheroides*および*Capsulata*のような紫硫黄細菌類、*Leptothrix discophora*および*Schizophyllum commune*のようなその他のシステイン含量豊富な生体類、およびヒトインシュリンA鎖を発現するように工学的に産生された大腸菌(*E. coli*)であるATCC31448のようなシステイン高含量のタンパク質を産生するように工学的に製造された細菌類が挙げられる。

10

【0022】

システインは、次に、加水分解によってタンパク質から単離されるであろう。しかし、システインを同時分解せずにタンパク質類を加水分解する唯一の公知の方法は、i)アルカリ性条件下で加水分解すること(オクダ(Okuda)、Pr. Acad. Tokyo, 2277参照)およびii)酵素加水分解である。残念ながら、これらの操作の両者ともに、標識された、および特に三重標識されたシステインの産生には不適切である。アルカリ性条件下における加水分解は、必要なL-システインのラセミ化を起こし、また、その他のいくつかの重要な同位体標識アミノ酸類の分解を起こし得る。酵素加水分解は、特にもし長期の加水分解が通常通り必要である場合、酵素分解産物による同位体夾雑物のリスクを有している。

20

【0023】

システインの場合と同様に、フェシックらが用いた混合物中に存在する“微量の”トリプトファンは、追加しないでは、細胞増殖に不十分であった(12715頁、第1表; 12716頁、第1図および第2図)¹⁵N標識トリプトファンは市販されているが、¹³C、¹⁵Nまたは三重標識トリプトファンはいずれも入手可能でない。したがって、単純な¹⁵N標識化の場合以外の全ての標識実験のための添加物として導入されたトリプトファンは、適切な標識システイン残基がないことによる同一問題、すなわち、不完全な同位体標識に関連した同一問題を生じることになるであろう。

30

【0024】

したがって、フェシックおよび共同研究者らが示した方法は、¹⁵N標識タンパク質類の場合にのみタンパク質類の普遍的な同位体標識化を生じるであろう。前記方法は、確かにひとつの進歩ではあるが、先にも述べたように、¹⁵N標識アミノ酸類は既に市販されている。¹³C、¹⁵N標識実験の場合、システインおよびトリプトファン残基類は、普遍的には標識されないであろうが、一方、²H標識実験および三重標識実験の場合、システイン、トリプトファンおよびグルタミン残基類が、不正確に標識されるであろう。

【0025】

さらに、哺乳類細胞のための培養培地調製のためにタンパク質加水分解操作を用いることのひとつの不利な点として、加水分解条件下では、出発タンパク質中に存在するアミノ酸類、グルタミンおよびアスパラギンが、それぞれ、グルタミン酸およびアスパラギン酸に変換されるかもしれないことが挙げられる。ほとんどの哺乳類細胞培地は、少量のグルタミン酸および実質量のグルタミンを含有している。これらの培地は、細胞生存性と産生の観点から、哺乳類細胞株の最適挙動をもたらすために開発された。実際に、NMR分析上問題となるタンパク質類を産生するほとんど全ての哺乳類細胞株が、低レベルのグルタミン酸および高レベルのグルタミンを含有する培地中で条件付けられた。

40

【0026】

最大限可能な範囲の細胞株での使用に適用可能であるためには、したがって、哺乳類細

50

胞タンパク質類の同位体標識用培地は、低比率のグルタミン酸と高比率のグルタミンを含有しているのが有益である。同様に、培地は、好適には、ほとんどまたは全くアスパラギン酸を含有しておらず、および高比率のアスパラギン酸を含有している。

【0027】

したがって、存在するその他のアミノ酸類の割合を変化させることなく、アミノ酸類混合物からグルタミン酸および/またはアスパラギン酸を特異的に除去し、このようにして単離されたグルタミン酸および/またはアスパラギン酸を適当に標識されたグルタミンおよび/またはアスパラギンに変換し、前記アミノ酸混合物にこのようにして得られたグルタミンおよび/またはアスパラギンを添加する方法が必要とされている。

【0028】

アミノ酸混合物からグルタミン酸を特異的に除去するための操作は全く当技術で記載されていない。グルタミン酸のグルタミンへの変換のための酵素技術は、公表されている(フェシクら、*Biochemistry*, 31(51), 12713(1992))。残念なことに、この反応は遅く(3-4日)、付随する酵素の分解によって天然に高含量のアミノ酸類が夾雑することになるのを除外できない。さらに、アミノ酸類の三重標識混合物類の場合、すなわち、²Hで部分的に標識されかつ¹³Cおよび¹⁵Nで普遍的に標識されたものの場合、²H原子類の存在が、²Hの同位体効果により、²Hで標識されたグルタミン酸のグルタミンへの酵素変換をさらに遅速させる。最後になるが、アスパラギン酸のアスパラギンへの変換のための酵素操作は、これまで当技術で記載されていない。

【0029】

また、最近、ヒュー(Hsu)およびアーミタージ(Armitage)は、免疫抑制剤サイクロスポリンがそのレセプターであるシクロフィリンに結合した構造をNMRによって決定することに関して、論文を公表している(*Biochemistry*, 31(51), 12778(1992))。これらの研究者らは、細菌中で発現されたシクロフィリンをNMR不活性の同位体²Hで標識した。彼らは、したがって、シクロフィリンからの信号に妨害されることなくサイクロスポリンA/シクロフィリン複合体の構造を調べることができた。したがって、哺乳類リガンド/レセプター相互作用の重要性を考慮すれば、同様に、哺乳類細胞タンパク質類、特にレセプター類が²Hで普遍的に標識される必要が生じる。これまで、この目的を達成するために標識された哺乳類栄養培地は得られていない。

【0030】

したがって、一般的な構造機能の両者の研究および特に合理的な薬物設計のため、哺乳類細胞タンパク質類、およびタンパク質複合体類の三次元構造を決定するための普遍的に標識された組成物類および方法類が必要とされている。その結果、ある範囲の安定同位体類で標識された普遍的に標識された形態の哺乳類細胞タンパク質類を産生する必要が生じる。

【発明の要約】

【0031】

本発明によれば、タンパク質の三次元構造情報を決定する方法は、(a)タンパク質産生条件下において、問題のタンパク質を産生可能な哺乳類または昆虫細胞培養物を前記細胞の増殖に必須である全てのアミノ酸類を含有しかつ炭水化物、必須無機物類および増殖因子類の吸収源を含有する栄養培地中で増殖させ、上記栄養培地中の前記アミノ酸類およびタンパク質合成のために細胞が使用するその他全ての基質がNMR活性同位体によって実質的に同位体標識されていることを特徴とし、(b)前記標識タンパク質を実質的に標識された形態で栄養培地から単離すること、および(c)前記タンパク質をNMR分光分析に供し、その三次元構造についての情報を求めることが必要となる。

【0032】

本発明のもうひとつの面では、タンパク質の三次元構造情報を決定する方法は、(a)タンパク質産生条件下において、問題のタンパク質を産生可能な哺乳類または昆虫細胞培養物を前記細胞株の増殖に必須である全てのアミノ酸類を含有しかつ炭水化物、必須無機物類および増殖因子類の吸収源を含有する栄養培地中で増殖させ、上記栄養培地中の前記

10

20

30

40

50

アミノ酸類および炭水化物源中の実質的に全ての炭素原子類が ^{13}C であることを特徴とし、(b)前記標識タンパク質を実質的に標識された形態で栄養培地から単離すること、および(c)前記タンパク質をNMR分光分析に供し、その三次元構造についての情報を求めることを必要とする。

【0033】

さらに本発明のもうひとつの面では、タンパク質の三次元構造情報を決定する方法は、(a)タンパク質産生条件下において、問題のタンパク質を産生可能な哺乳類または昆虫細胞培養物を前記細胞株の増殖に必須である全てのアミノ酸類を含有しかつ炭水化物、必須無機物類および増殖因子類の吸収源を含有する栄養培地中で増殖させ、上記栄養培地中における前記アミノ酸類および炭水化物源中の実質的に全ての炭素原子類が ^{13}C でありかつ上記栄養培地中のアミノ酸類の窒素原子類の実質的に全てが ^{15}N であることを特徴とし、(b)前記標識タンパク質を実質的に標識された形態で栄養培地から単離すること、および(c)前記タンパク質をNMR分光分析に供し、その三次元構造についての情報を求めることを必要とする。

10

【0034】

さらに別の面では、本発明は、第2分子と複合体となっている第1分子の三次元構造情報を決定することに関し、前記分子類の少なくともひとつがタンパク質であることを特徴とする。前記操作は、第1分子を安定NMR活性同位体で実質的に標識することおよび第2分子を重水素で実質的に標識すること、前記第1分子と第2分子の間で複合体を形成すること、および、前記複合体をNMR分光分析に供し、第1分子の三次元構造についての情報を求めることを必要とする。

20

【0035】

本発明のもうひとつの面は、哺乳類または昆虫細胞培養物の増殖を支持可能な新規栄養培地に関連し、前記培地は、前記細胞の増殖に必須である全てのアミノ酸類を含有しかつ炭水化物吸収源、必須無機物類および増殖因子類を含有し、上記栄養培地中における前記アミノ酸類およびタンパク質合成のために細胞が使用するその他全ての基質が、 ^{13}C によって、または、 ^{13}C および ^{15}N の両者によって実質的に標識されていることを特徴とする。

【0036】

さらにもうひとつの態様では、本発明は、実質的に完全に同位体標識された形態のアミノ酸類混合物を産生する方法に関し、前記方法は、(a)タンパク質生合成において基質として利用される実質的に全ての炭素が ^{13}C である栄養培地中において、微生物培養物を増殖させること；(b)前記微生物培養物からタンパク質分画を回収すること；(c)前記タンパク質を酸性、非酸化条件下でスルフヒドリル還元剤の存在下で加水分解し、アミノ酸粗混合物を産生すること；(d)前記アミノ酸粗混合物を陽イオン交換クロマトグラフィに供し、部分的に精製されたアミノ酸混合物を得ること；(e)前記部分的に精製されたアミノ酸混合物を陰イオン交換クロマトグラフィに供し、精製されたアミノ酸混合物を得ること；および(f)前記精製されたアミノ酸混合物に、哺乳類または昆虫細胞によるタンパク質産生を支持するために十分な量の ^{13}C 標識システインを添加することからなる。先の方法は、また、 ^{13}C 、 ^{15}N 二重標識アミノ酸類または ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 三重標識アミノ酸類を産生するため、または、 ^2H 標識アミノ酸類の混合物を産生するために、用いることができる。

30

40

【0037】

本発明は、さらに、それぞれ、グルタミン酸およびアスパラギン酸をグルタミンおよびアスパラギンに変換する方法を提供し、低レベルのグルタミン酸を含有しかつグルタミンを添加された同位体標識哺乳類細胞培地および適宜低レベルのアスパラギン酸を含有するかまたは全く含有せずかつアスパラギンを添加された培養培地を提供する。特に、本発明は、本文に記載の方法によって産生されたアミノ酸類混合物から特異的にグルタミン酸を除去すること、および、前記グルタミン酸をグルタミンに変換する方法を提供する。アスパラギンは、同一操作を用いて、アスパラギン酸から化学的に合成できる。本操作の有効

50

性は、 ^2H を含む同位体標識物類の存在によって影響されない。

【0038】

本発明は、さらに、標識されたポリペプチド類及びアミノ酸混合物類から同位体標識されたシステインを単離する方法を示している。この方法は、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N のいかなる組み合わせで標識されたシステインを産生するためにも使用できる。上記標識システインを添加されたアミノ酸混合物類も、また、記載されている。

【発明の説明】

【0039】

本発明は、哺乳類または昆虫細胞産生タンパク質類についての三次元構造情報を決定する手段を提供する。組換えDNAのための宿主として使用される哺乳類または昆虫細胞は、天然の三次元構造に類似のまたは等価の形態の複合タンパク質類を産生可能であるので、本発明は、生体活性タンパク質類の構造-機能関係の研究のために貴重な技術を提供する。本操作では、アミノ酸類の全てが1個以上のNMR活性同位体類で実質的に完全に標識されている栄養培地中における哺乳類細胞株の増殖を含んでいる。本発明によって、 ^{13}C または ^{15}N または両者によるタンパク質類の普遍的標識化および ^2H 、 ^{13}C および ^{15}N による三重標識化が可能となる。本発明は、さらに、タンパク質類をNMRで描出できないようにするために、 ^2H 単独によるタンパク質類の普遍的標識化を提供する。後者の技術は、特に、たとえば、ホルモン-レセプター複合体類のような複合体中における分子についての構造情報を得るために有用である。結合対のひとつをNMR描出不可とすることによって、その他の結合対の構造は1個以上のNMR活性同位体類で標識され、研究可能となる。

10

20

【0040】

本発明の哺乳類細胞株栄養培地は、微生物由来の同位体標識アミノ酸類を含有している。哺乳類および昆虫細胞のための合成栄養培地は周知である。これらの細胞の増殖要件は十分にわかっており、炭水化物、必須無機物類および増殖因子の吸収源を含有する合成培地は市販されている。これらの培地のいくつかは、さらに、微量のピルビン酸を含有している。この種の培地を所望である際には、適当に標識された形態でピルビン酸を添加することが有効である。ピルビン酸の同位体標識形は市販されている。血清を全く含まない合成培地は、市販されている。血清を全く含まない培地は、NMR分析のために実質的に純粋な標識タンパク質の回収を促進するために、本発明の実施において好適である。血清を含まない哺乳類または昆虫細胞培地からの前記標識タンパク質の精製は、さまざまな公知の技術のいかなるものによっても、達成できる。(ドイッチャー(Deutscher, M. P.), Guide to Protein Purification Methods in Enzymology, 第182巻(1990)参照。)

30

【0041】

タンパク質類の普遍的標識化は、必須アミノ酸類および標識された形態のタンパク質合成のために細胞が使用するその他全ての基質を添加することによって、達成される。本文で使用したように、タンパク質合成には、糖タンパク質類の場合炭水化物側鎖の生合成も含まれる。

【0042】

本発明は、アミノ酸類混合物を産生する簡便な手段を提供する。大量の標識培地がNMR解析のためにタンパク質を十分量産生するため必要となることを考慮すれば、それは実施が容易で、使用者に有害でなく、しかも容易にスケール調整が可能であり、このことは重要である。

40

【0043】

標識アミノ酸混合物産生の方法は、化合物の1属としてのアミノ酸類が陽電荷および陰電荷の両者を帯びることができるという事実に依存している。それらは、従って、酸性および塩基性イオン交換樹脂への吸収およびそれからの溶出によって、中性化合物類から、および、陽電荷のみまたは陰電荷のみを有する化合物類から、1属として分離できる。

【0044】

50

本文で使用したように、タンパク質が“実質的に標識されている”またはある分子中の特定元素の“実質的に全ての”原子が一定の同位体形態であるということは、前記分子の所望の同位体含量が十分に高くなっており、有意義なNMRスペクトル情報が得ることができることを意味している。 ^{13}C 、および ^{15}N のようなNMR活性同位体類の場合、添加の程度は、三次元構造がNMRスペクトルから推定できるような程度となるであろう。一般に、一定元素の原子の約95%以上が所望の同位体形状となっているであろうし、好適には、約98%を越えている。

【0045】

^2H 単独による添加の場合、添加の程度は、標識分子が、それに複合体となったNMR活性種の解析を妨害する程のNMR信号を産生しない程度となろう。この場合、添加の程度は、約70%よりも高く、約95%を越えることが特に好適である。

10

【0046】

これとは別に、 ^2H 添加の程度は、 ^1H 、 ^{13}C および ^{15}N のNMR活性核種からの信号が増強されるかまたはその分解が向上するような程度である。通常、このレベルの添加は、約20%から約100%の範囲であろう。

【0047】

アミノ酸混合物出発物質は、選択した安定同位体類で標識されたタンパク質加水分解物である。本発明によれば、出発タンパク質は、 ^{13}C によって、 ^{13}C および ^{15}N の両者によって、 ^{13}C 、 ^{15}N によっておよび少なくとも部分的に ^2H によって、または ^2H 単独によって実質的に標識されている。多くの技術がこうしたタンパク質類の産生のために公表されており、標識炭水化物および塩類の存在下における細菌の増殖(ケイラ、同上)、藻類溶解物中における細菌の増殖(チャブ(Chubb, R.T.)ら、*Biochemistry*, 30, 7718 (1991))、藻類溶解物中における酵母の増殖(パワーズ(Powers, R.)ら、*Biochemistry*, 31, 4334 (1992))、標識メタノール中における細菌および酵母の増殖(モート(Moat, A.G.)およびフォスター(Foster, J. W.)、*Microbial Physiology*, 第2版、John Wiley & Sons, New York (1988), 218頁)および同位体標識 $^{13}\text{C}\text{O}_2$ および/または ^{15}N 塩類の存在下における藻類の光栄養性培養(コックス(Cox, J.)ら、*Stable Isotopes in Pediatric Nutritional and Metabolic Research*, チャップマン(Chapman, T.E.)ら編著、インターセプト・リミテッド(Intercept Ltd.), Andover House, England (1950), 165頁)が含まれる。同様に、タンパク質類の加水分解につ

20

30

【0048】

本方法においては、酸加水分解が好適である。酸加水分解は、塩酸、硝酸または硫酸のような強鉱酸またはp-トルエンスルホン酸またはメタンスルホン酸のようなスルホン酸を用いて実施するのが有益であり、後者が好適である。酸濃度は、タンパク質基質の性質に応じて変化するが、通常、完全な加水分解を実施するのに十分である。典型的には、酸濃度は、約1Nから約6Nまでの範囲にあり、好適には、約2Nから約4Nまでの範囲に

40

【0049】

加水分解されるタンパク質は、約0.5g/10mlおよび5g/10mlの間の濃度で、好適には約1g/10mlから2.3g/10mlの濃度で加水分解培地に添加できる。

【0050】

加水分解は、ラセミ化または不安定なアミノ酸類の損失を最小としつつ、実質的に完全な加水分解を実施するために十分な温度および時間で実施される。加水分解温度は、通常

50

、約 90 から 140 の範囲であるが、しかし、アミノ酸類のラセミ化を最小とするため、好適には 100 乃至 115 の範囲にあるのが好適であり、特に 100 を好適とする。加水分解時間は、加水分解されるタンパク質に応じて、24 乃至 72 時間の範囲である。約 48 時間の加水分解時間が、好適に用いられる。

【0051】

酸化による分解を受けるアミノ酸類は、さらに、還元剤の存在によって保護される。好適には、チオグリコール酸のような強スルフヒドリル含有還元剤が用いられる（ファスマン（Fasman, G. D.）編著、Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC, New York (1989), 106頁）。還元剤の目的は、攻撃され易いトリプトファンおよびヒスチジン残基類を保護することだけにあるのではない。もしチオグリコール酸が用いられると、本発明の操作に従って、それは容易にその後除去できる。

10

【0052】

還元剤は、加水分解混合物中でトリプトファンおよびヒスチジンの実質的分解を防止するために十分な濃度で用いられる。チオグリコール酸の場合、上記濃度は通常、約 1 乃至約 7% v/v の範囲であり、好適には約 3 乃至約 5% v/v の範囲である。

【0053】

加水分解物は、陽イオン交換樹脂のカラムに添加される。陽イオン交換樹脂は、好適には酸形態である。原則として、樹脂のいかなる酸形態も用いられるが、樹脂が H^+ のような単純な酸、ピリジニウム、メチルアンモニウム等の形態であるのが好都合である。この方法で使用される陽イオン交換樹脂は、ミシガン州、ミッドランド（Midland）ダウ・ケミカル（Dow Chemical）社から市販されている Dowex 50X8-400 が挙げられる。加水分解物を前記樹脂に添加した後、中性および酸性夾雑物を、樹脂を酸性溶液で洗浄することによって除去する。原則として、いかなる酸も使用でき、塩酸、硫酸等のような単純な鉱酸が好都合に用いられる。酸性溶液は、ほとんどの酸性アミノ酸類の pK_a 以下の pH を有しているが、実質的ラセミ化を起こす程低くはない。通常、前記 pH は、約 1 乃至約 2 の範囲にあり、好適には約 2 である。酸性溶液の容量は、実質的に全ての材料及び酸性夾雑物類を除去するために十分な量である。約 2 - 6 ベッドボリュームによる溶出で、通常、十分である。

20

【0054】

酸溶液は、その後、前記樹脂から、樹脂カラムを水で洗浄することによって、除去される。夾雑物の除去を確実にするため、使用した水の容量は、好適には、2 - 6 ヘッドボリュームの範囲にある。

30

【0055】

酸を水洗浄で除去した後、陽イオン交換樹脂に付着したアミノ酸類および塩基性物質類は、塩基性溶液によって溶出する。原則として、いかなる塩基性溶液も使用できるが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムまたは一般式 $NR_1R_2R_3$ （式中、 R_1 、 R_2 および R_3 は、それぞれ、独立して、水素、または $C_1 - C_4$ アルキルまたはアルケニル群である）の窒素性塩基のような単純な塩基が使用できる。このような窒素性塩基類の例として、アンモニア水、メチルアミン水溶液、トリエチルアミン水溶液等が挙げられる。前記塩基性媒体は、結合したアミノ酸類および塩基性化合物類を同時に溶出することによって、酸性陽イオン交換樹脂を中和する。塩基性媒体の pH は、アミノ酸類のアミノ基類が中性で一方アミノ酸類のカルボキシル官能基が陰電荷を帯びているようなものである。塩基性媒体の pH は、好適には、約 10 よりも大きい。余り強い塩基性条件下における前記アミノ酸類のラセミ化を防止するため、前記 pH は、約 13 未満であるのが有益であり、好適には約 10 - 11 の範囲である。塩基性媒体は、結合したアミノ酸類および塩基性化合物類を同時溶出することによって、前記酸性陽イオン交換樹脂を中和する。

40

【0056】

前記アミノ酸混合物は、さらに、陰イオン交換クロマトグラフィによって精製できる。前記陽イオン交換カラムからの溶離液を塩基性形態の陰イオン交換樹脂カラムに添加する。原則として、前記樹脂のいかなる塩基性形態も使用でき、好適には、水酸化物のよう

50

単純な塩基形態が使用される。適切な陰イオン交換樹脂として、ミシガン州、ミッドランドのダウ・ケミカル社から市販されているDowex 1X8-100が挙げられる。前記アミノ酸類を前記塩基性イオン交換樹脂に吸収させるが、その理由として、それらのアミノ基類がここで全く陽電荷を有していない一方で、それらのカルボキシル官能基がここで陰電荷を帯びていることが挙げられる。

【0057】

前記塩基性および中性夾雑物類を、樹脂を塩基性溶液で洗浄することによって除去する。この段階で使用される塩基性溶液は、陽イオン交換カラムからのアミノ酸類の溶出について記載された塩基性溶液のいかなるものであってもよい。

【0058】

前記塩基性媒体は、水による溶出によって、陰イオン交換カラムから除去される。樹脂に結合したアミノ酸類と接触したまま塩基性媒体を全く残さないのが好適であり、従って、約2-8ベッドボリューム、好適には少なくとも約4ベッドボリュームの水を用いてカラムを洗浄する。

【0059】

前記アミノ酸類は、酸によって前記塩基性陰イオン交換樹脂から溶出される。原則として、いかなる酸溶液も使用できるが、好適には、その後の蒸発によって除去できる弱い揮発性の酸の溶液が使用される。したがって、ギ酸または酢酸のいずれかが好適である。使用した酸の濃度は、酸性溶液のpHが約2-6の範囲、好適には約3-5の範囲にある。精製されたアミノ酸類は、従って、前記カラムからオフホワイトの溶液として溶出される。さらに本発明の利点として、アスパラギン酸が他のアミノ酸類全ての後に溶出されることが挙げられる。たとえば、アスパラギン酸を除く全てのアミノ酸類が、前記カラムから0.25% v/v酢酸水溶液によって溶出できる。その後、アスパラギン酸をカラムから2.5% v/v酢酸水溶液によって溶出する。したがって、さらに本発明の面として、アミノ酸であるアスパラギン酸の簡便な精製法が挙げられる。下記にも述べるように、標識された形態となっているこのアスパラギン酸を標識されたアスパラギンに変換し、次に、それを用いて、標識アミノ酸類の混合物にさらに添加する。当業者であれば、上記溶出操作がいわゆる“段階-勾配”溶出であることがわかるであろう。さらに、溶出酸の濃度の直線勾配またはこれとは別に対数勾配も使用できることがわかるであろう。このような勾配類は、使用した勾配に応じて、アミノ酸類の混合物としてまたは単独のアミノ酸類としてのいずれかで、アミノ酸類を順次溶出することになるであろう。本発明のさらに別の面は、従って、単独でまたは混合物としてのいずれかでアミノ酸類を精製するための簡便な操作となる。本発明のもうひとつの面は、このように単離されたアミノ酸類を用いてアミノ酸混合物全体のアミノ酸プロフィールを変化させることができることにある。さらに本発明の別の面は、アミノ酸混合物全体をこのように一定の細胞株の要件に合うよう調整することにある。

【0060】

単離されたアミノ酸類を次に減圧下における蒸発および凍結乾燥のような標準的手法によって、分離できる。さらに本発明の別の面は、使用した酸が極めて揮発性であるので、前記アミノ酸類が実質的に純粋な形態で単離されるであろうということである。

【0061】

さらに本発明の利点として、1種のアミノ酸であるアルギニンが他の全てよりもはるかに塩基性であるという事実に関連している。したがって、それは、他のアミノ酸類の後および全ての夾雑物類の後、陽イオン交換カラムから最後に溶出されるであろう。10-12の範囲のpHにおける溶出に際して、アルギニンは全く正味の電荷を有していないであろう。このことは、10-12の範囲のpHで陽電荷を有しておりかつカルボキシル官能基の陰電荷を中和する極めて塩基性のグアニジニウム側鎖の存在によるのでであろう。したがって、アルギニンは、他の全てのアミノ酸類と異なり、全ての夾雑物の後陽イオン交換樹脂を通過し、その後単離され、かつ、たとえば標準的手法によって塩酸塩として結晶化される(コックス(Cox, G.J.), J. Biol. Chem., 78, 475 (1928))。さらに本発明の別の

10

20

30

40

50

面は、従って、アミノ酸アルギニンの簡便な精製法である。

【0062】

当業者であれば、本発明は、特にもしスルフヒドリル含有還元剤を加水分解段階に使用すれば、出発加水分解物中におけるのと同比率で各アミノ酸収率をほとんどまたは全く変動させることなく、純粋なアミノ酸類の混合物を生ずるであろう。本発明のもうひとつの面は、出発タンパク質中におけるのと同割合で純粋なアミノ酸類の混合物を調製する簡便な手段である。アミノ酸類の割合は、従って、適切な出発タンパク質またはタンパク質類混合物を選択することによって、制御できる。これとは別に、本発明に従って調製したアミノ酸類混合物は、商業的に入手可能であるかまたは合成可能であるアミノ酸またはアミノ酸類を添加することによって、補充できる。

10

【0063】

たとえば、システインは哺乳類細胞培地中において重要なアミノ酸であるが、しかし、ほとんどの細菌、酵母または藻類タンパク質中においては、哺乳類または昆虫細胞における哺乳類タンパク質生合成を支持するほど十分に高い濃度では存在していない。

【0064】

システイン合成の酵素的操作は、公知である。たとえば、本文で参考として引用したミヤハラ (Miyahara) らの米国特許第4,733,011号は、硫化水素との酵素反応によってL-セリンからL-システインを調製する方法を開示している。本文で参考として引用したイシワタ (Ishiwata) らの米国特許第4,782,021号は、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ存在下におけるリシンとホルムアルデヒドの反応によるL-セリンの産生を記載している。¹³C-システインおよび¹³C、¹⁵N-システインを含む同位体標識システインは、市販の基質類を使用しそれらの操作によって調製できる。

20

【0065】

上記に記載の同位体標識システインの酵素的調製方法は、適切に標識された三重標識出発物質類が入手できないために、三重標識²H、¹³C、¹⁵N-システインの産生には不利である。もしこのような基質類が入手できたにしても、酵素変換動態が重水素によって悪影響を受けるであろう。したがって、さらに本発明の態様は、三重標識システインを含む同位体標識システイン、および、このような同位体標識システインを含有するアミノ酸混合物を調製する新規方法に関連している。

【0066】

この方法において、三重標識システインを含む同位体標識システインは、適切に標識されたシステイン含有タンパク質の酸加水分解によって産生される。システインは、酸加水分解条件下において、不安定であることが公知であるので、従って、前記方法は、i) タンパク質加水分解時においてシステインを保護し、ii) 前記保護されたシステインを分離し、および、iii) 標識されたシステインを脱保護しかつ単離するための手段を含んでいる。

30

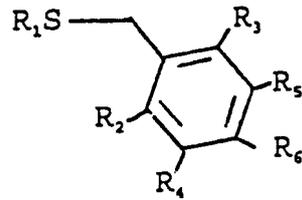
【0067】

チオール基のS-ベンジルエーテル類としての化学的保護は、以前から公知である。(総説については、グリーン (Green, T.) およびワッツ (Watz, P.G.), Protective Group Chemistry, 第二版, John Wiley & Sons, New York (1991) 参照。) 実際に、システイン残基類は、通常、ペプチド類の化学的合成時においてS-ベンジル基によって保護される。しかし、このような保護された化合物類は、それほど酸に安定ではなく、また、タンパク質加水分解に使用した条件によって分解される。

40

【0068】

前記チオール基は、式



(I)

10

(式中、R₁は、単独またはタンパク質分子の一部としてのシステイン残基であり、および、R₂ - R₆の少なくともひとつは、カルボキシ、C₁ - C₄カルボキジアルキルまたはC₁ - C₄カルボキシアルコキシのような酸性基であるかまたはC₂ - C₄ジアルキルアミノ、C₃ - C₆ジアルキルアミノアルキルまたはC₃ - C₆ジアルキルアミノアルコキシのような塩基性基であり、および残りのR₂ - R₆基は、単独または共に、水素、ハロゲン、C₁ - C₆アルキルまたはC₁ - C₆アルコキシである)の荷電ベンジルチオエーテルとして保護された際にタンパク質類の加水分解が可能な強、高温酸性培地中において安定であることが見いだされた。好適には、R₆は、カルボキシ、カルボキジメチルまたはカルボキシメトキシのような酸性基、またはジメチルアミノ、ジメチルアミノメチル、またはジメチルアミノメトキシのような塩基性基であり、残りの基類R₂ - R₅は、単

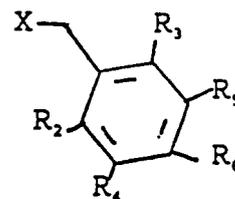
20

【0069】

化合物(I)は、システインチオール(II)をハロベンジル化合物(III)によって処理し、高収率で調製できる。



+



(II)

(III)

30

(式中、Xは、好適にはクロロまたはブロモであるハロゲンであり、およびR₂ - R₆は、塩基性媒体中において上記で定義したとおりであり、希アンモニアまたは水酸化ナトリウム水溶液である。)

40

【0070】

出発物質チオールが高温酸性条件下において保護されるように、(I)中における荷電した酸または塩基性基の存在が酸性培地中におけるベンジルチオールの安定性を増強し、また、溶解度差、イオン交換クロマトグラフィ等の手段によって他の分子種から保護された分子を分離する基盤を提供する。

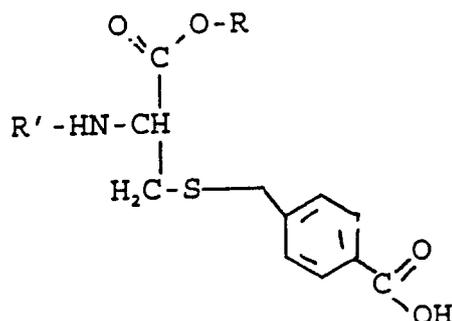
【0071】

前記チオール誘導体(I)は、たとえば、液体アンモニアまたはエタノール中のナトリウムのようなアルカリ金属による処理のような公知の技術によって、出発物質チオールに再変換できる。

【0072】

50

本発明の好適な面において、システイン(II)は、酸性p-カルボキシベンジルチオエーテル(IV)として保護される。



10

(式中、RおよびR'は、反応の出発物質が遊離のシステインである時それぞれ水素であるか、または、RおよびR'は、出発物質がポリペプチドである時前記ポリペプチド中における隣接するアミノ酸残基類を示している。)

【0073】

20

化合物(IV)は、遊離アミノ酸としてまたはポリペプチド中のペプチド残基としてのいずれかとしてのシステイン(II)を希アンモニア水または水酸化ナトリウム水溶液のような中等度の塩基性媒体中においてp-クロロメチル安息香酸によって処理することによって、高収率で調製できる。同位体標識システインの調製のため、希アンモニア水または水酸化ナトリウム水溶液の存在下で、チオールエーテル形成条件下で(III)によって適切に同位体標識されたタンパク質を処理する。適切なタンパク質類は当業者に周知であるが、*Rhodospseudomonas spheroides*および*capsulata*のような紫硫黄細菌類、*Leptothrix discophora*および*Schizosphaerulum commune*のようなその他のシステイン含量豊富な生体類、およびヒトインシュリンA鎖を発現するように工学的に産生された大腸菌(*E. coli*)であるATCC31448のようなシステイン高含量のタンパク質を産生するように工学的に製造された細菌類由来のものが好適である。前記生体類は、適切に標識された培地中において増殖されている。

30

【0074】

システイン誘導体(IV)は、高温、強酸培地中において安定であり、一方、酸および中性培地中において室温における溶解性が劣る。化合物(IV)は、その結果、タンパク質加水分解物中におけるその他のアミノ酸類から、たとえば、ろ過によってまたは冷却加水分解物の遠心分離によって、容易に分離される。対照的に、システイン誘導体(IV)は、たとえばエタノール性アンモニアのような塩基性有機溶媒中において極めて溶解性であり、従って、エタノール性アンモニア水のような溶媒類によって塩基性有機抽出によってタン

40

【0075】

これとは別に、システイン誘導体(IV)は、上記に述べたアミノ酸精製プロセスのバリエーションによってタンパク質加水分解物から単離できる。前記タンパク質加水分解物は、H⁺形態でイオン交換樹脂上に吸収され、夾雑物は、酸による溶出によって除去される。システイン誘導体(IV)を含む加水分解物のアミノ酸類は、H⁺レジンから溶出され、アンモニアによる溶出によってOH⁻レジン上に溶出される。水洗浄後、前記アミノ酸類をOH⁻レジンから希酢酸による溶出によって溶出させる。しかし、システイン誘導体(IV)は、安息香酸側鎖の存在により他のアミノ酸類よりも酸性がより強く、その結果、アスパラギン酸を含むその他全てのアミノ酸類よりも後で溶出される。システイン誘導体(

50

IV) は、その後、適切な分画を乾燥させるかまたは H⁺ レジン上での濃縮およびその後の希アンモニアによる溶出および適切な分画の蒸発によって、単離される。

【0076】

システイン誘導体 (IV) は、液体アンモニアまたはエタノール中のナトリウムのようなアルカリ金属による処理のような標準的技術によって、システイン (II) に再変換できる。

【0077】

システインは、非標識、単独標識、二重標識または三重標識形態で上記操作によって産生できる。システイン含有タンパク質発生物質の所望の同位体組成は、前記タンパク質産生に使用した栄養培地の組成を制御することによって、制御可能である。

10

【0078】

当業者であれば、哺乳類細胞培地がアミノ酸類およびグルコースに加えて、ビタミン類、脂肪酸類、必須無機物類および成長因子類のような種々の化合物類を含有していることがわかるであろう。本発明のもうひとつの面は、本発明によって産生された純粋な標識されたアミノ酸類混合物類がある細胞株のために調製された成長因子類のいかなる混合物にも添加でき、それによって、全ての哺乳類または昆虫細胞株のための同位体標識培地を産生することである。同位体標識アミノ酸類に加えて、タンパク質合成のために細胞が利用するその他の基質類は、標識された形態で提供できる。たとえば、グルコースのような炭水化物は、¹³C - 標識形態および/または重水素化された形態で提供できる。

【0079】

さらに、当業者であれば、タンパク質加水分解操作がアミノ酸類アスパラギンおよびグルタミンを分解し、同時に、それぞれ、酸性アミノ酸類であるアスパラギン酸およびグルタミン酸を形成することがわかるであろう。ほとんどの哺乳類細胞培地は、大量のグルタミンを含有している。本発明によって産生されたアミノ酸類の混合物へのグルタミンの添加は、予想に反して、ある哺乳類細胞の成長速度または組換えタンパク質生産性の最適化には必要ではない。しかし、グルタミン添加は、いくつかの哺乳類および昆虫細胞株の最適挙動を得る際に重要であることが見いだされた。本発明のさらにもうひとつの面は、本発明によって産生されたアミノ酸類混合物が培地を使用することになる特定細胞株の特性に応じて、グルタミンを添加しても添加しなくてもよいことである。本文に記載の好適な条件を用いると、検出可能なラセミ化が全く起こらないことが見いだされた。

20

30

【0080】

グルタミン酸がさらにクロマトグラフィ段階によってアミノ酸混合物から都合よく分離でき、その後、化学的または酵素的操作によってグルタミンに変換できることが見いだされた。このようにして産生されたグルタミンをその後用いて、必要に応じてアミノ酸混合物に添加できる。

【0081】

中性 pH において、アミノ酸混合物中のグルタミン酸残基類のみが、2 個のカルボキシ基および 1 個のアミノ官能基の存在により、正味の陰電荷を有しているであろう。その他のアミノ酸類は全て、全体としての荷電を全く有していないか (例グリシン) または中性 pH において正味の陽電荷を有している (例リシン)。

40

【0082】

したがって、グルタミン酸は、溶出酸を除去した後、たとえば、凍結乾燥によって、前記混合物を弱酸で調製した陰イオン交換樹脂に流すことによって、前記アミノ酸混合物から特異的に分離できる。原則として、全ての弱酸が適しているが、しかし、好適には、陰イオン交換樹脂は酢酸またはギ酸形態である。

【0083】

グルタミン酸は、その正味の陰電荷の故に、前記陰イオン交換樹脂に付着するであろうが、一方、中性または陽性荷電アミノ酸類は通過してしまう。アミノ酸類を樹脂から溶出し、樹脂を水で洗浄し前記グルタミン酸を適切な酸の溶液によってカラムから溶出できる。このように単離されたグルタミン酸を減圧下の蒸発または凍結乾燥のような標準的技術

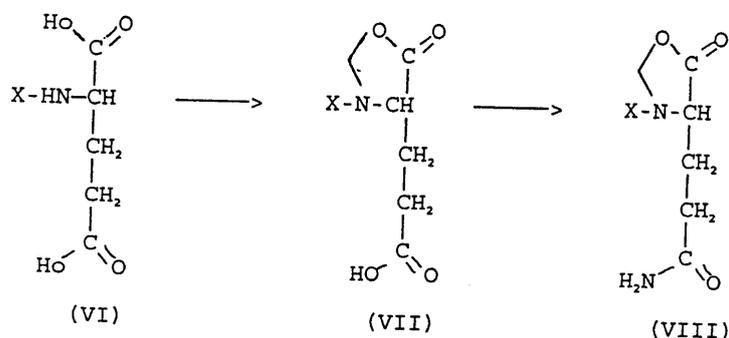
50

によって回収できる。

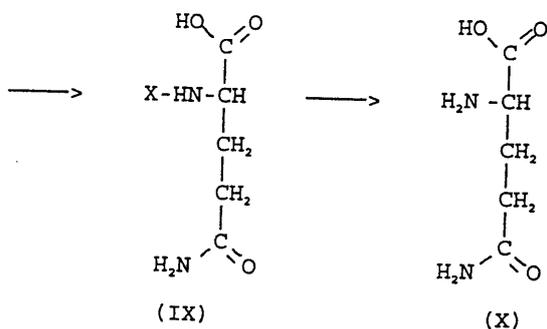
【0084】

その後、グルタミン酸を、フェシックらによって記載された酵素的操作のような公知の操作によってグルタミンに変換できる。しかし、上記にも示したように、酵素的操作は、重水素化および三重標識基質類には不利である。これとは別に、本発明によれば、スキーム1に概略を示した新規化学的操作を使用できる。

スキーム I



10



20

【0085】

前記グルタミン酸は、最初にそのアミノ官能基を保護され (IV) を生成する。多くの適切な保護基が当業者に公知であり、Fmoc, t-BOC等が含まれる。

30

【0086】

前記のN-保護グルタミン酸は、その後、環化され、オキサゾリジノン (VII) を生成する。この変換のための技術は当業者に公知であり、たとえば、イトウ (Itoh) (Chem. Pharm. Bull, 17, 1679, 1969) 参照。イトウの参考文献では、トルエンスルホン酸のような触媒量の強酸の存在下でトリオキサンで化合物 (VI) を処理し、公知の技術によって単離できる (VII) を産生する。(VII) の遊離のカルボン酸基は、その後ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、n-ブロモスクシンイミド等のような適切な活性化剤によって活性化される。当業者には、さらに、活性化剤が公知であろう。

【0087】

前記活性化されたオキサゾリジノンを、その後、アンモニアガスで処理し、環状アミド誘導体 (VIII) を生成する。¹⁵N-標識グルタミンを調製する時、アンモニアも¹⁵Nで標識する必要がある。全ての¹⁵N物質類と同様に、¹⁵N-アンモニアは高価である。さらに、ガスであるので、それは、正確に制御し測定するのが困難である。したがって、好適には、¹⁵N-アンモニアガスは、¹⁵N-塩化アンモニウム、¹⁵N-硫酸アンモニウム等のような¹⁵N塩類の溶液を別のフラスコ中で塩基で処理し、発生したアンモニアを活性化オキサゾリジノンの溶液中に通気することによって、製造される。適切な溶媒として、ジメチルスルホキシドおよびジメチルホルムアミドのような極性、非プロトン性溶媒類が挙げられるが、一方、適切な塩基類として、テトラメチルグアニジンおよび水酸化ナトリウムのような強または中等度の強混和性塩基類が挙げられる。

40

50

【0088】

環状アミド誘導体(VIII)を次に適切な溶媒中の弱い水性塩基によって加水分解し、N-保護グルタミン誘導体(IX)が生成する。多くのこのような塩基類が入手可能であるが、使用した塩基は、簡便なため、エタノール水溶液中の水酸化ナトリウムのような単純なアルカリである。アミド官能基の同時加水分解を最小とするため、塩基の1-5当量のみを最も好適な1-2当量とともに用いるのが好適である。

【0089】

生成したN-保護グルタミンは、その後、使用した保護基に応じて公知の操作によって脱保護される。(グリーンら, 同上。)グルタミン(X)を、たとえば、結晶化または減圧下における蒸発によって単離でき、たとえば、公知のクロマトグラフィ操作によって精製できる。

10

【0090】

当業者であれば、上記の操作が、また、アスパラギン酸をアスパラギンに変換するために使用できることがわかるであろう。本発明のもうひとつの面は、アスパラギンの製造方法である。

【0091】

上記の加水分解条件を標識システイングルタミンおよびアスパラギン調製のための操作と組み合わせて、²H、¹³Cおよび¹⁵Nのいかなる組み合わせによっても標識されたアミノ酸混合物の調製が可能となる。本発明のさらにもうひとつの面は、いかなる同位体置換のアミノ酸類も本発明のプロセスによって精製できることである。本発明はアミノ酸類のアミノおよびカルボキシル官能基のみをプロトン化することに依存しているため、いかなる同位体標識のアミノ酸混合物も、本発明によって精製できる。

20

【0092】

いかなる同位体標識化であろうと、精製したアミノ酸混合物は哺乳類または昆虫細胞類の増殖を支持する。しかし、本発明の別の面は、生成した哺乳類または昆虫細胞およびそれらの代謝産物が、出発物質としての同一同位体混合物によって普遍的に標識されることである。

【0093】

本発明は、下記の実施例によって例示するが、それらは例示のためのみに示されており、本発明の範囲を全く制限するものではない。

30

【発明の開示】

【発明の効果】

【0094】

本発明によれば、同位体標識グルタミンまたはアスパラギンの調製方法で、(a)同位体標識グルタミン酸またはアスパラギン酸をN-保護基と反応させ、N-保護アミノ酸を形成させ(b)前記N-保護アミノ酸を環化し、オキサソリジンを形成させ、(c)前記オキサソリジンをアミド形成条件下でアンモニアと反応させ、環状アミド誘導体を形成させ、(d)前記環状アミド誘導体を加水分解し、N-保護アミノ酸を形成させ、(e)前記N-保護アミノ酸を脱保護することにより、NMR測定において重要な同位体標識グルタミンまたはアスパラギンを提供ことができ、同位体標識また同様に適切な保護基を導入することにより同位体標識システインを提供することができるという効果が得られる。

40

【実施例1】

【0095】

クロレラ(Chlorella) s p 培養物由来の藻類バイオマス(500g)を希釈し(H₂O)約10%スラリーとし、水中に入れ、マイクロフルイダイザーを3回通して細胞を破碎した。生成したスラリーを5で15分間、5,000rpmで遠心分離した。上清を採取し、ペレットをH₂O中に再懸濁し、同一条件下で再遠心分離した。このプロセスを2回繰り返した。上清をまとめ、トリクロロ酢酸で処理し(最終濃度5%v/v)、全体を5で一晩保存した。

【0096】

50

生成した懸濁液を5 で30分間、5,000rpmで遠心分離した。上清を捨て、ペレットを等量のアセトン中に再懸濁し、全体を5 で15分間、5,000rpmで遠心分離した。上清を除去し、ペレットを500mlのエタノール/エーテル中に懸濁し、減圧下における過によって採取した。ペレットをエタノール/エーテルで洗浄し、減圧下で乾燥させた。

【0097】

上記に述べた可溶性タンパク質分画7gを4%v/vチオグリコール酸含有3Mメタン
スルホン酸(70ml)中で10 で48時間、インバキュオで加熱した。冷却後、加水
分解物を、氷浴中で冷却した水(70ml)上に注ぎ、生成した混合物を約10分間放置
した。生成した冷却溶液を遠心分離した(RC-3B、250ml容量、5,000rpm、10分)。上清を、FMI Lab Pump QSYを基部に付属したDowex
50x8イオン交換樹脂(H⁺形、500g)のカラムにポンプで入れた(36ml/分)。

10

【0098】

加水分解物全てをポンプでカラムに注入した時、希H₂SO₄水溶液(pH2.0、1.5L)次に水(2L)をカラムにポンプで入れた(36ml/分)。分画(標識H⁺、500ml)をカラム下端から採取した。

【0099】

H⁺カラムを次にポンプを介してDowex 1X8-100イオン交換樹脂(OH⁻形、500g)に接続した。希アンモニア水(1%v/v、9L)をH⁺カラムを介してポンプで注入し(36ml/分)、溶出液をOH⁻カラムに流した。分画(標識OH⁻、500ml)をOH⁻カラムの下端から次に採取した。

20

【0100】

TLC分析(Analtech Silica GS プレート、n-BuOH:AcOH:H₂O(2:1:1v/v)、展開剤:ニンヒドリン(MeOH:Glac AcOH(97:3v/v)中1%v/v))は、分画OH⁻13-18中にアルギニンの存在を示していた。

【0101】

アルギニン分画を溶出した後、ポンプを停止させ、OH⁻カラムに直接接続した。ポンプを再始動させ、一方、分画(500ml)をOH⁻カラムから連続して採取した。

30

【0102】

希酢酸水溶液(0.25%v/v、10L)をその後OH⁻カラムを介してポンプで注入し、一方、500ml分画をカラム下端から連続して採取した。ポンプ注入は、それ以上ニンヒドリン陽性スポットが溶出物中に検出されなくなるまで継続させた。

【0103】

TLC分析(Analtech Silica GS プレート、n-BuOH:AcOH:H₂O(2:1:1v/v)、展開剤:ニンヒドリン(MeOH:Glac AcOH(97:3v/v)中1%v/v))は、(分画OH⁻25-36中に)混合アミノ酸類の存在を明確に示していた。

【0104】

前記アルギニン含有分画および混合アミノ酸分画を、それぞれ、乾燥させ、凍結乾燥によって濃縮した。残渣を水に溶解し、0.22ミクロンのフィルターで滅菌瓶中にろ過し、再凍結乾燥させた。アルギニン分画を、Cox, J、同上に記載の操作に基本的に従って、塩酸塩として結晶させ、収量は0.31gであった。混合アミノ酸分画を淡黄色粉末として単離し、収量は4.6gであった。

40

【実施例2】**【0105】**

CHO細胞のために最適化した血清を含まない培地であるCHO-SSFM-1培地(Gibco)を、前記アミノ酸類を除外した状態で業者から購入した。2種の培地試料を下記のように調製した:

50

【0106】

アミノ酸を含まないCHO - S S F M - 1アリコット200mlに対して、

1. 混合アミノ酸類

(340mg) + システイン(20mg) + 結晶化アルギニン(40mg)

2. 混合アミノ酸類

(340mg) + システイン(20mg) + 結晶化アルギニン(40mg) + グルタミン(120mg)

を添加した。

【0107】

前記溶液を、0.22ミクロンのフィルターを通過させ滅菌し、アリコット(2-3ml)に対してCHO細胞を接種した(当初の濃度 $1 \times 10^5 / \text{ml}$)。細胞数および%生存細胞(%)を、対照CHO - S S F M - 1培地試料に対して、相対的に記録した。

	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Control	2.4(99)	5.2(96)	7.0(91)	7.0(91)	5.6(83)	4.0(64)
1	1.6(99)	3.8(93)	5.1(97)	12.0(92)	9.2(84)	5.0(72)
2	2.2(99)	4.0(95)	5.5(93)	7.2(95)	7.2(82)	7.0(69)

【0108】

これらの結果は、i)本実施例の方法によって得られたアミノ酸混合物が対照のそれと識別できない増殖特徴をもたらしたこと、および、ii)グルタミンの添加が細胞増殖に必要なでないことを示唆している。

【実施例3】

【0109】

二重標識アミノ酸類は、使用した藻類バイオマスが ^{13}C および ^{15}N をそれぞれ唯一の炭素および窒素源として利用し増殖させたクロレラ(chlorella) spの培養物由来であることを除き、実質的に実施例1に記載の方法によって調製した。 ^{13}C 、 ^{15}N -システインは、実質的に上記に記載のような酵素的操作によって調製した。

【0110】

CHO - S S F M - 1培地(Gibco)は、同様に、前記アミノ酸類、炭水化物類、中間代謝物類、およびタンパク質加水分解物を除外した状態で、業者から購入した。

【0111】

この培地1リットルに対して、

^{13}C 、 ^{15}N -混合アミノ酸類(^{13}C 、 ^{15}N -グルタミン酸を含む):3g

^{13}C 、 ^{15}N -アルギニン-HCl:240mg

^{13}C 、 ^{15}N -システイン:160mg

^{13}C -ピルビン酸ナトリウム(アイソテック(Isotec)社):70mg

^{13}C -D-グルコース:3.8g

を添加した。

【0112】

生成した溶液を0.22ミクロンフィルターを通過させ、滅菌した。この溶液250mlに対して、ヒト絨毛性ゴナドトロピンを発現し分泌するように工学的に設計されたCHO細胞株を接種し、最終濃度 3×10^6 細胞/mlとした。培養物を15時間損壊した後、細胞を遠心分離によって単離した。細胞ペレットを上記のようにして調製した ^{13}C 、 ^{15}N -標識培地500ml中に濃度 1.2×10^6 細胞/mlとなるように再懸濁し、全体を73時間損壊した。市民反のCHO - S S F M - 1を用いた対照培養物を、同一レジメに従って実施した。

【0113】

^{13}C 、 ^{15}N -標識hCGの濃度は、その後、hCGに対して作製した抗体を用いてRIAによって測定した。対照培養物中における非標識hCGの対照濃度が88時間において100pmol/mlであったのに比較して、 ^{13}C および ^{15}N 標識hCGの濃度は、73時間において90pmol/mlであることがわかった。

【実施例 4】

【0114】

実施例 4：アンモニウムシステイン - S - 4 - メチル安息香酸の調製

システイン (2.42 g、20 mmol) および 4 - クロロメチル安息香酸 (3.74 g、20 mmol) を H₂O (90 ml) 中に懸濁し、懸濁液を濃アンモニア水で処理した。生成した溶液を室温で 1 時間、攪拌した。前記溶媒約 50 ml をその後蒸発によって除去すると、沈澱が出現した。濃アンモニア水をその後沈澱が溶解するまで滴下した。さらに、沈澱が形成され始めるまで、蒸発によって溶媒を除去した。乾燥蒸留エタノールを次に滴下し、アンモニウムシステイン - S - 4 - メチル安息香酸を白色結晶として得た (実験値: C, 49.0; H, 5.8; N, 9.3; S, 11.6 C₁₁H₁₆N₂O₄S 10
理論値。C, 48.5; H, 5.9; N, 10.3; S, 11.8); 収量 4.9 g (90%)、R_f (2:1:1 v/v/v n-BuOH:H₂O:AcOH) 9.73. Delta H (D₂O, 300 MHz) 7.76 (2H, d, J 8 Hz), 7.37 (2H, d, J 8 Hz), 3.78 (2H, s), 3.73 (1H, dd, J 2, 5 Hz), 2.90 (2H, m)、Delta C (D₂O, 75 MHz) 175.30, 172.89, 141.18, 135.43, 129.34, 128.86, 53.60, 35.178, 31.78, 28.16.

【実施例 5】

【0115】

実施例 5：酸加水分解条件に対するアンモニウムシステイン - S - 4 - メチル安息香酸の安定性 20

アンモニウムシステイン - S - 4 - メチル安息香酸 (1 g) を Schlenk 試験管中のメタンサルホン酸 (3 M) およびチオグリコール酸 (4%) の凍結水溶液 (10 ml) に添加した。空気を真空ポンプで除去し、試験管を封印し、全体を 100 °C で 48 時間、加熱した。懸濁液を次に冷却し、アンモニウムシステイン - S - 4 - メチル安息香酸を遠心分離および水で洗浄し (3 x 50 ml)、定量的収率で単離した。

【実施例 6】

【0116】

実施例 6：アンモニウムシステイン - S - 4 - メチル安息香酸からのシステインの単離

アンモニウムシステイン - S - 4 - メチル安息香酸 (200 mg, 0.76 mmol) を、2口ナシ型フラスコに添加した。フラスコをドライアイス/アセトン浴中で冷却し、アンモニアガスでフラッシュした。約 10 ml の液体アンモニアを濃縮した後、ナトリウム金属 (約 50 mg) を永久的インジゴ色が得られるまで 1 分間隔で添加した。次に、ドライアイス (約 100 mg) をすぐに添加すると、白色沈澱が形成された。アンモニアを蒸発させ、残渣をさらにドライアイスで処理した。アンモニアが全て蒸発した後、水を添加し、濃塩酸を注意して添加し pH を約 8 に調整した。この混合物に空気を 24 時間吹き付け、pH をさらに濃塩酸を添加して約 pH 5 に調整し懸濁液を損壊した。生成した沈澱をろ過によって採取し、脱気水 (約 10 ml) に懸濁し、ジチオスレイトール (114 mg) によって処理し、全体を窒素中で 50 度で 2 時間、攪拌した。生成した懸濁液を Whatman No. 1 ペーパーでろ過し、ゴム状になるまで蒸発させた。乾燥蒸留エタノールを滴下し、白色板状物として 2 回に分けてシステインが収量 30 mg で得られた。 40

【実施例 7】

【0117】

実施例 7：リゾチームからのシステインの単離

リゾチーム (10 g) を水 (1 L) に溶解し、トリクロロ酢酸 (50 g) で処理し 4 で一晩、放置した。生成した沈澱を、遠心分離によって単離し、アセトンで洗浄し (300 ml, x 3)、乾燥させた。収量 9.95 g。

【0118】

変性リゾチームを窒素雰囲気中の脱気水に懸濁し、ジチオスレイトール (2.14 g) で処理した。生成した混合物を、室温で一晩、振とうした。 50

【0119】

乾燥蒸留エタノール(200ml)を添加し、溶液を5kで10分間、遠心分離した。ペレットをエタノール(200ml)中に再懸濁し再度遠心分離した。この最後の操作を繰り返した。

【0120】

4-クロロメチル安息香酸(1.54g)を脱気水(42ml)および濃アンモニア(7ml)中に溶解した。生成した溶液を上記の単離ペレットに添加し、全体を室温で窒素下で一晩、攪拌した。

【0121】

乾燥蒸留エタノール(200ml)を添加し、溶液を5kで10分間、遠心分離した。ペレットをエタノール(200ml)中に再度懸濁し、再遠心分離した。この最後の操作を繰り返した。このようにして得られたペレットをデシケーター中で乾燥し、単離した。 10

【0122】

上記で得られたエタノール洗浄液が、タンパク質性物質を含有していることがわかった。したがって、上記で得られた上清をまとめたものを、5kで10分間、遠心分離し、ペレットを単離した。脱気水(50ml)およびジチオスレイトールを添加し、全体を窒素中で室温で一晩振とうした。アセトン(100ml)を添加し、全体を5kで一晩、遠心分離した。

【0123】

ペレットを脱気水(125ml)中に溶解し、水(21ml)に溶解した4-クロロメチル安息香酸(0.77g)の溶液および濃アンモニア水(4ml)で処理した。全体を、窒素中で室温で一晩振とうした。アセトン(100ml)を添加し、全体を4kで10分間、遠心分離した。このようにして得られたペレットをデシケーター中で乾燥し、先に得られたペレットと一緒にした。総収量、9.5g(リゾチームアミノ酸配列に基づく、87%)。 20

【0124】

生成したタンパク質分画(9.5g)を、4%v/vチオグリコール酸含有3Mメタンサルホン酸(95ml)中で100で48時間、インバキュオで加熱した。冷却後、加水分解物を水(95ml)と混合し、生成した混合物を、FMI Lab Pump QSYを基部に付属したDowex 1X2-400イオン交換樹脂(H⁺形、2509)のカラムにポンプで入れた(50ml/分)。 30

【0125】

加水分解物全てをポンプでカラムに注入した時、希H₂SO₄水溶液(pH2.0、1L)次に水(1.25L)をカラムにポンプで入れた(50ml/分)。このH⁺カラムを次にポンプを介してDowex 50x8-100イオン交換樹脂(OH⁻形、5009)に接続した。希アンモニア水(2%v/v、L)を、H⁺カラムを介してポンプで注入し(50ml/分)、溶出液をOH⁻カラムに流した。分画(2L)をOH⁻カラムの下端から次に採取した。

【0126】

TLC分析(Analtech Silica GSプレート、n-BuOH:AcOH:H₂O(2:1:1v/v)、展開剤:ニンヒドリン(MeOH:GlacAcOH(97:3v/v)中1%v/v))は、分画2および3中にアルギニンの存在を明確に示していた。 40

【0127】

アルギニン分画を溶出した後、ポンプを停止させ、OH⁻カラムに直接接続し、水(2L)で溶出した。ポンプを再始動させ、一方、分画(2L)をOH⁻カラムから連続して採取した。

【0128】

希酢酸水溶液(0.25%v/v, 10L)をその後OH⁻カラムを介してポンプで注入し、一方、500ml分画をカラム下端から連続して採取した。ポンプ注入は、それ以 50

上ニンヒドリン陽性スポットが溶出物中に検出されなくなるまで継続させた。

【0129】

TLC分析 (Analtech Silica GS プレート、n-BuOH : AcOH : H₂O (2 : 1 : 1 v/v)、展開剤 : ニンヒドリン (MeOH : Glac AcOH (97 : 3 v/v) 中 1% v/v)) は、(分画 11、12 および 13 中に) 混合アミノ酸類の存在を明確に示していた。

【0130】

希酢酸水溶液 (2.5% v/v、12 L) をその後 OH⁻ カラムを介してポンプで注入し、一方、1 L 分画をカラム下端から連続して採取した。ポンプ注入は、それ以上ニンヒドリン陽性スポットが溶出物中に検出されなくなるまで継続させた。

10

【0131】

TLC分析 (Analtech Silica GS プレート、n-BuOH : AcOH : H₂O (2 : 1 : 1 v/v)、展開剤 : ニンヒドリン (MeOH : Glac AcOH (97 : 3 v/v) 中 1% v/v)) は、(分画 15 - 18 中に) アスパラギン酸の存在を、および、(分画 18 - 25 中に) システイン - S - 4 - メチル安息香酸) の存在を、明確に示していた。

【0132】

前記システイン - S - 4 - メチル安息香酸含有分画をまとめ、その pH を希硫酸で 2 に調整した。生成した溶液を Dowex 1 X 2 - 400 イオン交換樹脂 (H⁺ 形、25 g) のカラムに 2 ml / 分でポンプで入れた。加水分解物全てをポンプでカラムに注入した時、希 H₂SO₄ 水溶液 (pH 2.0、500 ml) 次に水 (500 ml) をカラムにポンプで入れた。

20

【0133】

希アンモニア水 (2% v/v、XXL) を、ポンプで注入した (25 ml / 分)。分画 (約 150 ml) を OH⁻ カラムの下端から次に採取した。

【0134】

TLC分析 (Analtech Silica GS プレート、n-BuOH : AcOH : H₂O (2 : 1 : 1 v/v)、展開剤 : ニンヒドリン (MeOH : Glac AcOH (97 : 3 v/v) 中 1% v/v)) は、分画 12 中にアンモニウムシステイン - S - (4 - メチル安息香酸) の存在を明確に示しており、それを蒸発させ、白色粉末として、アンモニウムシステイン - S - (4 - メチル安息香酸) を収量 0.47 g (誘導体化されたリゾチームを基準として、32%) で得た。

30

【実施例 8】

【0135】

実施例 8 : アンモニウム (50% ²H、¹³C、¹⁵N - 標識システイン) - S - 4 - メチル安息香酸の単離
グルタミン酸含有 50% ²H、¹³C、¹⁵N - 標識アミノ酸混合物 10 g (実施例 9 と同様に調製した) を H₂O 436.2 ml および ¹⁵NH₄Cl (8 g)、NaCl (5 g)、リン酸緩衝液 (pH 7、100 ml)、TK-M 金属塩類 (20 ml)、塩化カルシウム (濃、4 ml)、ビタミン混合物 (1.4 ml)、リボフラビン (2 ml)、p - アミノ安息香酸 (0.2 ml) 含有 D₂O 436.2 ml 中に溶解した。生成した溶液をろ過滅菌し、2 個の容量 500 ml の振とうフラスコ中に等量ずつ分配した。この溶液に対して、ATCC 31448 (ヒトインシュリン A 鎖を発現するように工学的に製造された大腸菌 (E. coli)) の培養物を接種し、37 °C で 24 時間、振とうした。

40

【0136】

次に、この培養物を、遠心分離し、細胞ペレットを凍結乾燥によって単離し、約 1.1 g の乾燥物を得た。

【0137】

この細胞ペレットを、その後、ジチオスレイトールおよび 4 - クロロメチル安息香酸で順次処理し、実施例 7 に記載の技術によって加水分解した。生成した誘導体化されたバイ

50

オマスを、Dowex 1X2-400イオン交換樹脂(H⁺形)およびDowex 50X8-100イオン交換樹脂(OH⁻形)を使用したこと以外、実施例7の技術に従って精製した。溶出されたアンモニウム(50%²H、¹³C、¹⁵N-標識-システイン)-S-4-メチル安息香酸含有分画をまとめ、そのpHを希硫酸で2に調整した。生成した溶液を、Dowex 1X2-400イオン交換樹脂(H⁺形、5g)のカラムに10ml/分でポンプで入れた。加水分解物全てをポンプでカラムに注入した時、希H₂SO₄水溶液(pH2.0、200ml)次に水(100ml)をカラムにポンプで入れた。

【0138】

希アンモニア水(2%v/v、1L)を、ポンプで注入した(10ml/分)。分画(約15ml)をOH⁻カラムの下端から次に採取した。TLC分析(Analtech Silica GS プレート、n-BuOH:AcOH:H₂O(2:1:1v/v)、展開剤:ニンヒドリン(MeOH:Glac AcOH(97:3v/v)中1%v/v)は、実施例1で調製したアンモニウムシステイン-S-(4-メチル安息香酸)と同一のRfの成分の存在を明確に示していた。適切な分画を蒸発させ、白色粉末として、アンモニウム(50%²H、¹³C、¹⁵N-標識システイン)-S-(4-メチル安息香酸)を収量30mgで得た。

【実施例9】

【0139】

クロレラ(*Chlorella*) spの培養物を、それぞれ、単一の炭および窒素源として>98%¹³CO₂および>98%K¹⁵NO₃存在下において、1:1v/v H₂O/D₂Oの溶液中で増殖させた。生成した藻類バイオマス(約500g)を約10%スラリーとなるように希釈(H₂O)し、氷中にいれ、細胞をホモジナイザーを3回通して、破碎した。生成したスラリーを5,000rpmで5で25分間、遠心分離した。上清を採取し、ペレットをH₂O中に同一条件下で再懸濁した。このプロセスを2回繰り返した。上清をまとめて、トリクロ酢酸で処理し(最終濃度5%v/v)、全体を5で一晩放置した。

【0140】

生成した懸濁液を5で30分間、5,000rpmで遠心分離した。上清を捨て、ペレットを等量のアセトン中に再懸濁し、全体を5,000rpmで5で15分間、遠心分離した。ペレットをエタノール/エーテル500ml中に懸濁し、減圧下で乾燥させた。

【0141】

生成した。50%²H、¹³C、¹⁵N-標識タンパク質52gを、4%v/vチオグリコール酸含有3Mメタンスルホン酸(520ml)中で100で48時間、インバキュオで加熱した。冷却後、加水分解物を、氷浴中で冷却した水(520ml)に注ぎ、生成した混合物を、約10分間放置した。生成した冷却溶液を、遠心分離した(RC-38, 250ml容量、5k、10分間)。上清をFMI Lab Pump Model QDを基部に付属し、Dowex 1X2-400イオン交換樹脂(H⁺形、2.5kg)のカラムにポンプで入れた(200ml/分)。

【0142】

加水分解物全てをポンプでカラムに注入した時、希H₂SO₄水溶液(pH2.0、7.5L)次に水(11L)をカラムにポンプで入れた(200ml/分)。その後、このH⁺カラムをポンプを介してDowex 50x8-100イオン交換樹脂(OH⁻形、2.5kg)に接続した。希アンモニア水(2%v/v、50L)を、H⁺カラムを介してポンプで注入し(200ml/分)、溶出液をそのままOH⁻カラムに導いた。分画(2L)をOH⁻カラム下端から次に採取した。

【0143】

TLC分析(Analtech Silica GS プレート、n-BuOH:AcOH:H₂O(2:1:1v/v)、展開剤:ニンヒドリン(MeOH:Glac Ac

OH (97 : 3 v / v) 中 1 % v / v)) は、分画 11 - 24 中に 50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識アルギニンの存在を明確に示していた。

【0144】

アルギニン分画の溶出後、ポンプを停止させ、OH⁻カラムに直接接続した。ポンプを再始動させ、水 (14 L) をこのOHカラムにポンプで入れた。分画 (2 L) を連続して採取した。

【0145】

希酢酸水溶液 (0.25 % v / v) をその後OH⁻カラムを介してポンプで注入し、一方、2 L分画をカラム下端から連続して採取した。ポンプ注入は、それ以上ニンヒドリン陽性スポットが溶出物中に検出されなくなるまで継続させた。

10

【0146】

TLC分析 (Analtech Silica GS プレート、n - BuOH : AcOH : H₂O (2 : 1 : 1 v / v)、展開剤 : ニンヒドリン (MeOH : Glac AcOH (97 : 3 v / v) 中 1 % v / v)) は、分画 46 - 58 中に 50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識混合アミノ酸類 (50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識グルタミン酸を含む) の存在を明確に示していた。この50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識混合アミノ酸類を淡黄色粉末として凍結乾燥によって単離した。

【0147】

上記の単離された50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識混合アミノ酸類を水 (8 L) に溶解し、Dowex 50 × 8 - 100 イオン交換樹脂 (酢酸形、5009) のカラムにポンプで流した。分間 (2 L) を採取した。全混合アミノ酸類溶液をカラムに添加した後、前記アミノ酸類が全て溶出されるまでカラムにポンプで注入した。

20

【0148】

TLC分析 (Analtec Silica GS プレート、n - BuOH : AcOH : H₂O (2 : 1 : 1 v / v)、展開剤 : ニンヒドリン (MeOH : Glac AcOH (97 : 3 v / v) 中 1 % v / v)) は、分画 1 - 6 中に (50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識混合アミノ酸類を除く) 50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識混合アミノ酸類の存在を明確に示しており、これは、淡黄色粉末として凍結乾燥によって単離した。収量、20.63 g。

【0149】

このカラムを次に希酢酸 (3 %、6 L) で洗浄し、50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識混合アミノ酸を単一のアミノ酸成分として分画 7 - 8 中に溶出し、凍結乾燥によって白色粉末として単離した。収量、2.9 g。Delta h (D₂O、300 MHz) 4.19、3.97、3.72、3.48、3.11、2.68、2.26、2.07 および 1.83 における ¹³C、¹⁵N および ²H カップリングにより、広い多重度。Delta C (D₂O、75 MHz) 177.30 (d), 173.92 (q), 54.20 (d), 53.49 (d), 51.58 - 50.37 (m), 35.50 - 34.28 (m), 30.36 (d), 29.64 (d), and 25.92 - 24.99 (m)。

30

【0150】

この50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識混合アミノ酸混合物を、HPLC (アミノ酸類は、オルトフタルアルデヒド誘導体類として、誘導体化した。Supelco Supelcosil LC - 18、15 × 4.6 mm カラム、100 % テトラヒドロフラン (10 %) : KH₂PO₄ (0.1 M) : KOAc (0.25 M) から 100 % メタノール (80 %) : 酢酸 (0.1 N、20 %) へ 55 分間に及ぶ非直線勾配) によって、50 % ²H、¹³C、¹⁵N - 標識グルタミン酸の除去前後において、例示した。このHPLC クロマトグラムは、グルタミン酸に対応するピークが酢酸レジソ通過後に完全に除去されていることを除き、実質的に同等であった。

40

【実施例 10】

【0151】

9 - フルオレニルメチルクロロホルムエーテル (3.88 g、15 mmol) および N - ヒ

50

ドロキシスクシンイミド (1.73 g、15 mmol) をジオキサン (20 ml) 中に溶解し、トリエチルアミン (2.09 ml、15 mmol) で処理した。生成した懸濁液を15分間、攪拌した。

【0152】

50% ²H、¹³C、¹⁵N - 標識グルタミン酸 (1.88 g、12 mmol) および無水炭酸ナトリウム (2.54 g、20 mmol) を水に溶解し、生成した溶液を上記で調製した9-フルオレニルメチル-N-ヒドロキシスクシニルホルメードの懸濁液に添加した。生成した懸濁液を室温で一晩攪拌した。

【0153】

この溶液を蒸発乾燥させ、クロロホルム (約200 ml) および水 (約200 ml) で分配した。水相を約pH2まで濃塩酸で酸性とし、酢酸エチルで抽出した。有機相を乾燥させ (無水硫酸マグネシウム)、および、減圧下で蒸発させ、推定N-フルオレニルメチル-50% ²H、¹³C、¹⁵N - 標識グルタミン酸誘導体を粉末として得た。

10

【0154】

トリオキサン (2.70 g、30 mmol) およびp-トルエンスルホン酸 (微量) を、上記で得た粉末に添加し、全体をトルエン中に懸濁し一晩還流した。次に溶液を冷却させ、減圧下で蒸発させ、ガム状にした。残渣を酢酸エチル (約200 ml) および水 (約200 ml) で分配し、水相を乾燥させ (無水硫酸マグネシウム)、減圧下で蒸発乾燥させ、粉末としてオキサゾリジノンを得た。

【0155】

このようにして得た粉末を無水テトラヒドロフラン (50 ml) 中に溶解し、ジイソプロピルカルボジイミド (2.06 ml、13.1 mmol) で処理し、室温で30分間攪拌後、ドライアイス/アセトン浴中で冷却した。

20

【0156】

これとは別に、¹⁵N - 塩化アンモニウム (2.86 g、52.5 mmol) をSchlenk試験管に入れ、ジメチルスルホキシド (25 ml) に溶解した。試験管蓋を閉め、溶液をドライアイス/アセトン浴中に浸漬し凍結させた。蓋を再度開け、水素化ナトリウム (2.1 g、60% オイル中分散剤、52.5 mmol、ヘキサンで前洗浄し窒素中で乾燥させてある) をこの試験管に添加した。蓋をすぐに閉め、通気管に接続した側腕をオキサゾリジノン誘導体を含有する冷却フラスコ中に入れた。

30

【0157】

Schlenk試験管中のジメチルスルホキシド溶液を融解させると、¹⁵N - アンモニアが発生し、オキサゾリジノン溶液中に凝縮された。¹⁵N - アンモニアの全てが蒸発した後、クランプを通気管におき、それによって管を閉とした。オキサゾリジノン溶液を室温まで一晩温めた。

【0158】

水 (約2 ml) を生成した溶液に添加し、全体を30分間、攪拌した。生成した溶液をその後、減圧下で蒸発乾燥させた。

【0159】

残渣をエタノール (50 ml) および水 (10 ml) に溶解した。溶液を水素化ナトリウム (1 M、10.5 ml) で処理し、2.5時間還流し、N-保護グルタミン誘導体を得た。冷却してすぐ、溶液をピペリジン (1.04 ml、10.5 mmol) で処理し、全体を室温で一晩攪拌した。

40

【0160】

生成した溶液を減圧下で蒸発乾燥させ、クロロホルム (約100 ml) と水 (約100 ml) に分配した。水相をジエチルエーテル (約100 ml) で抽出し、このpHを氷酢酸で約7に調整した。生成した溶液を、Dowex 1X2-400イオン交換樹脂 (NH⁺形、20 g) のカラムに流し、蒸発乾燥させた。残渣を水 (約100 ml) に溶解し、Dowex 50X8-100イオン交換樹脂 (酢酸形、10 g) のカラムに流し、生成した溶液を減圧下で蒸発乾燥させた。このようにして産生された50% ²H、¹³C、

50

^{15}N -標識グルタミンは結晶化しなかった。

【0161】

したがって、前記物質の一部を最小5 : 1 . 5 : 5 v / v / v イソプロピルアルコール : 水 : 氷酢酸に溶解し、EM Separation liChro prep Diol カラム (50 × 2 . 5 cm) に添加し、5 : 1 v / v / v イソプロピルアルコール : 氷酢酸で溶出した。適切な分画をまとめて、減圧下で蒸発させ、50% ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N -標識グルタミンをガム状として得た。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
C 0 7 M 5:00 C 0 7 M 5:00

(72)発明者 ブラウン, ジョナサン・マイルス

アメリカ合衆国、2 1 2 0 2 メリーランド州、ボルチモア、カルバート・ストリート 9 3 5、
ナンバー・ディー

Fターム(参考) 2G045 BB10 BB14 BB20 CB01 DA36 FA11 FB07
4H006 AA02 AA03 AB90 AC52 AC56 AC80 AC84 BB11 BB12 BB14
BB15 BB17 BB22 BB25 BB31 BE01 BE03 BE12 BE15 BS10
BU32 BV21 NB00