

タンパク質のNMRによる構造解析

-ノーベル化学賞ビュートリッヒ教授の業績を中心に-

(1)Wuthrich教授の業績

(2)化学賞選考委員長Norden教授

(3)NMRの基礎

(4)ポリペプチドの固体高分解NMRによる分子構造解析

福井大学工学部

生物応用化学科

助教授 前田史郎

2002年度ノーベル化学賞



Kurt Wüthrich (クルト・ビュートリッヒ)

Eidgenössische
Technische
Hochschule (Swiss
Federal Institute of
Technology)
Zürich, Switzerland

1938 -

• 1986年

タンパク質の構造決定



The Nobel Prize in Chemistry 2002

「生体高分子の同定および構造解析のための手法の開発」

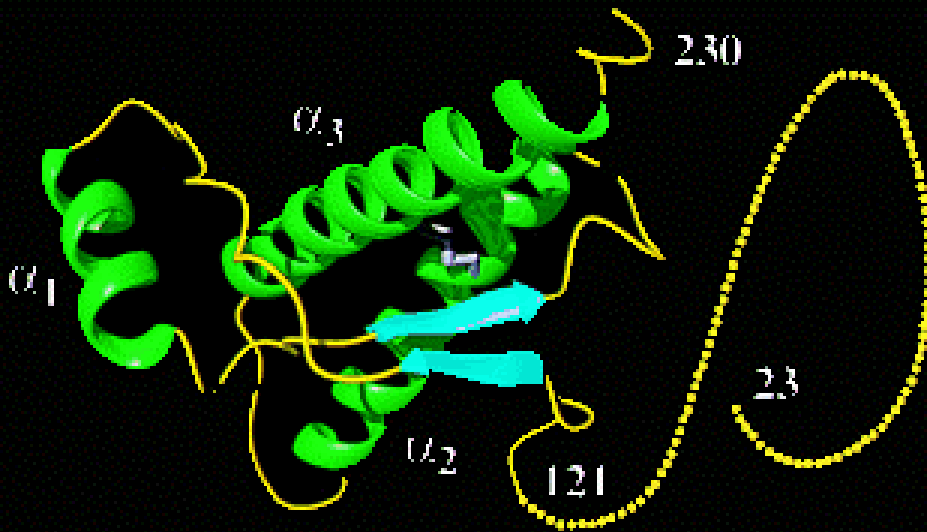
"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"

「溶液中の生体高分子の立体構造決定のためのNMRの開発」

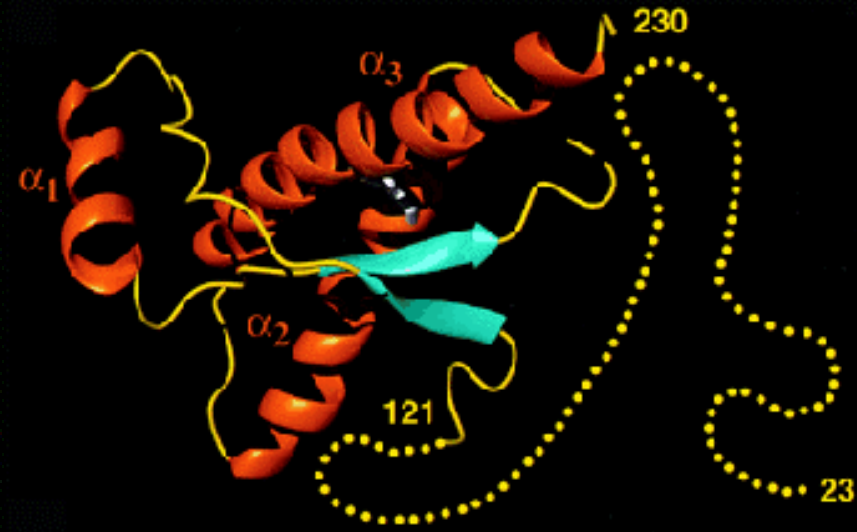
"for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution"



ウシ・プリオンのNMR構造



ヒト・プリオンのNMR構造



F.L.García, R. Zahn, R.Riek, and K.Wüthrich (2000).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(15), 8334-8339

R.Zahn, A.Liu, T.Lühns, R.Riek, C.Schroetter, F.L. Garcia,
M.Billeter, L.Calzolai, G.Wider, K.Wüthrich (2000).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(1), 145-150.

NMRによって決定されたプリオンの3次元構造

- ヘリックス構造: 緑色またはオレンジ色
- シート構造: 水色

C末端ドメインの不規則な二次構造: 黄色

フレキシブルな「しっぽ」: 黄色の点線

- 2D ^1H NMR
- Sequential ^1H assignments
 - Collect NOE distance constraints
 - 3D structure by distance geometry
 - Refinement by energy minimization



- Sequential ^1H assignments
- Collect NOE distance constraints
- 3D structure by distance geometry
- Refinement by energy minimization

(1)連鎖帰属法を用いて ^1H 信号を帰属する。

(2)NOESY測定を行って、原子核間距離の制限情報を得る。

(3)ディスタンス・ジオメトリ(DG)を用いて3次元構造を得る。

(4)エネルギー - が最小となる最安定構造を得る。

Wüthrichの業績

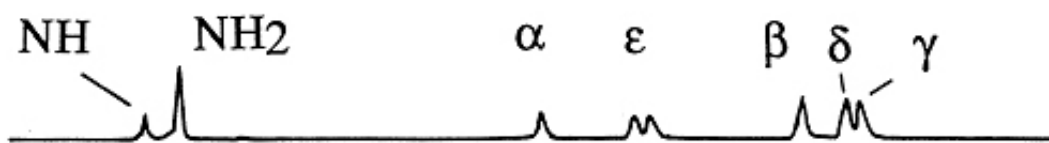
Wüthrich の方法を用いて，水溶液中のタンパク質分子の3次元構造をNMRによって決定することが出来るようになった．

Wüthrichの発見によって，タンパク質の自然な環境中での，すなわち細胞の中で水に取り囲まれている環境での，構造を知るのにNMRを用いることが出来るようになった．

(1)多次元NMRを用いた連鎖帰属法の確立

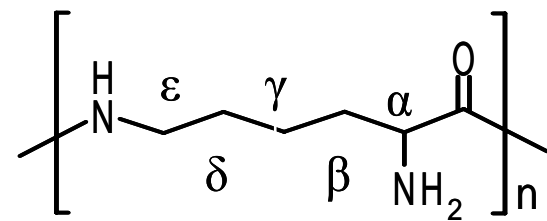
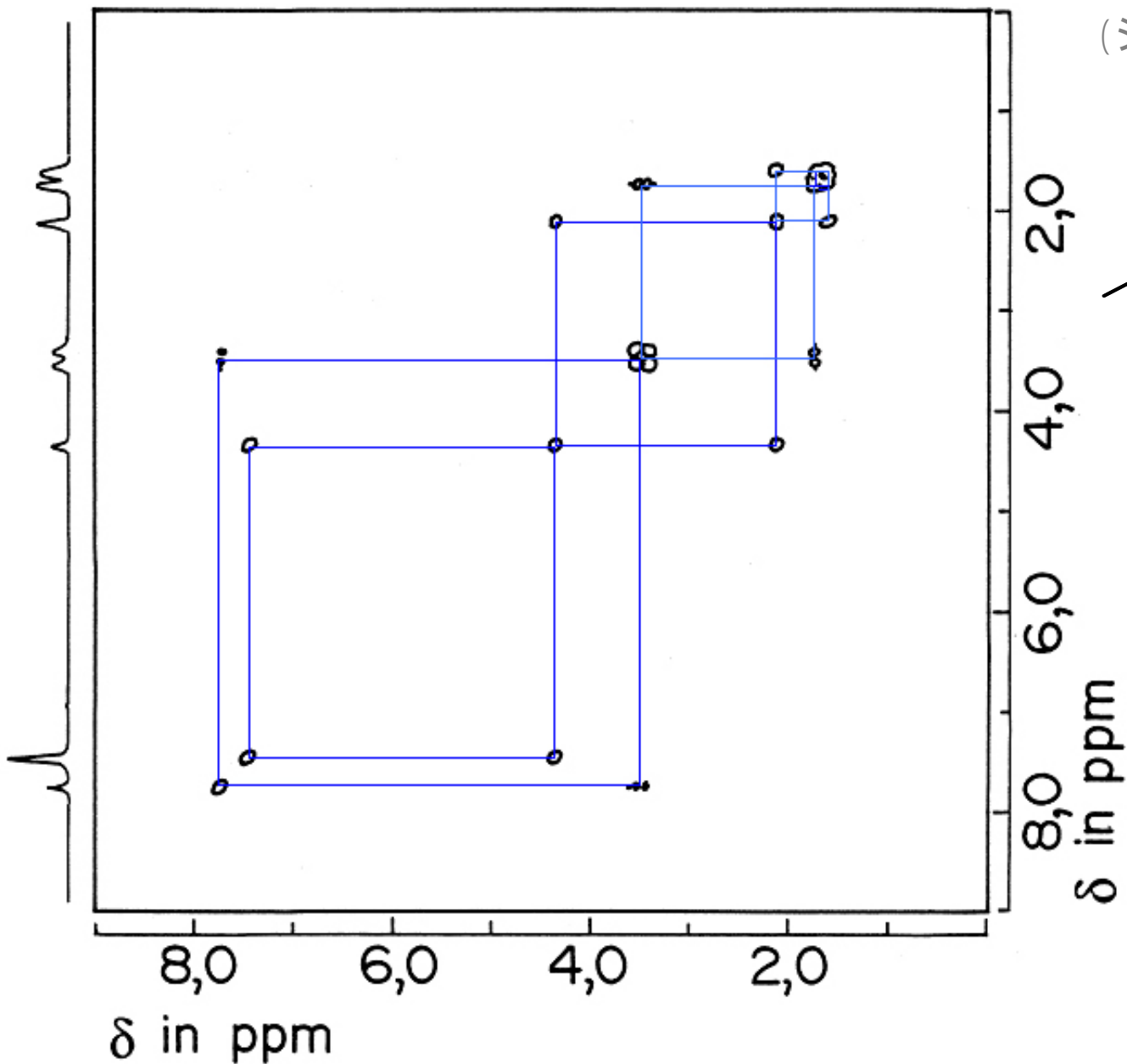
NMRの素晴らしい特徴の1つは，分子の中の1つ1つの水素原子からの信号を区別できることにある．しかし，タンパク質は数千個もの水素原子を含むので，どの信号がどの原子によるものであるかを帰属することは困難であった．

Wüthrichは個々の信号をそれぞれの水素原子に帰属する系統的な方法を確立した．その方法は，3種類の核種 (^1H ， ^{13}C ， ^{15}N) に対する3次元NMRを組み合わせて1つ1つのアミノ酸残基の信号を順番に帰属することである，

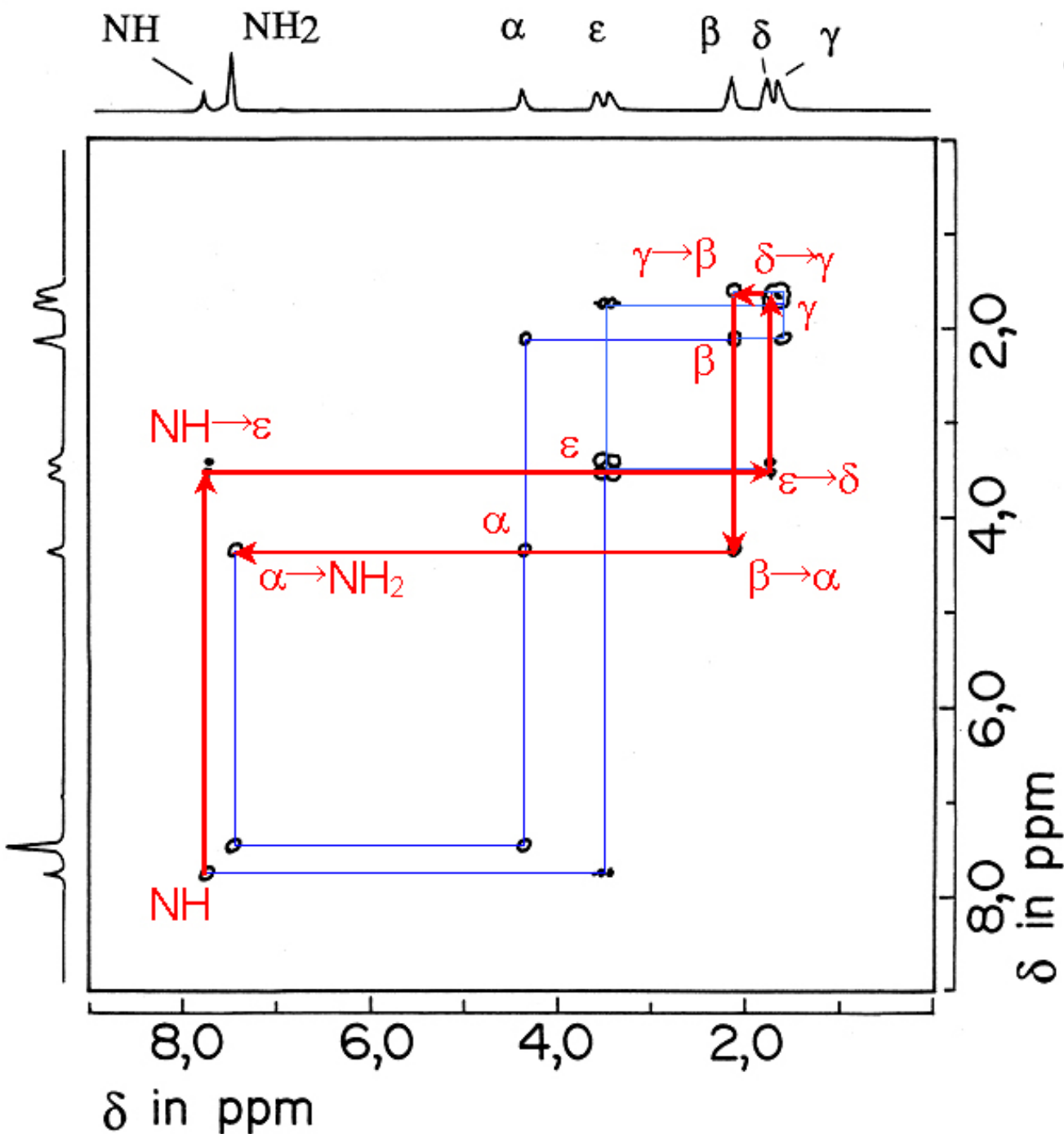


COSY

(シフト相関2次元NMR)

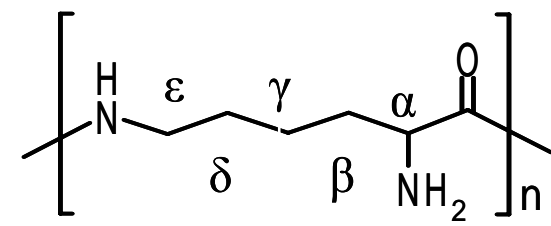


poly(ε-L-Lysine)



COSY

(シフト相関2次元NMR)



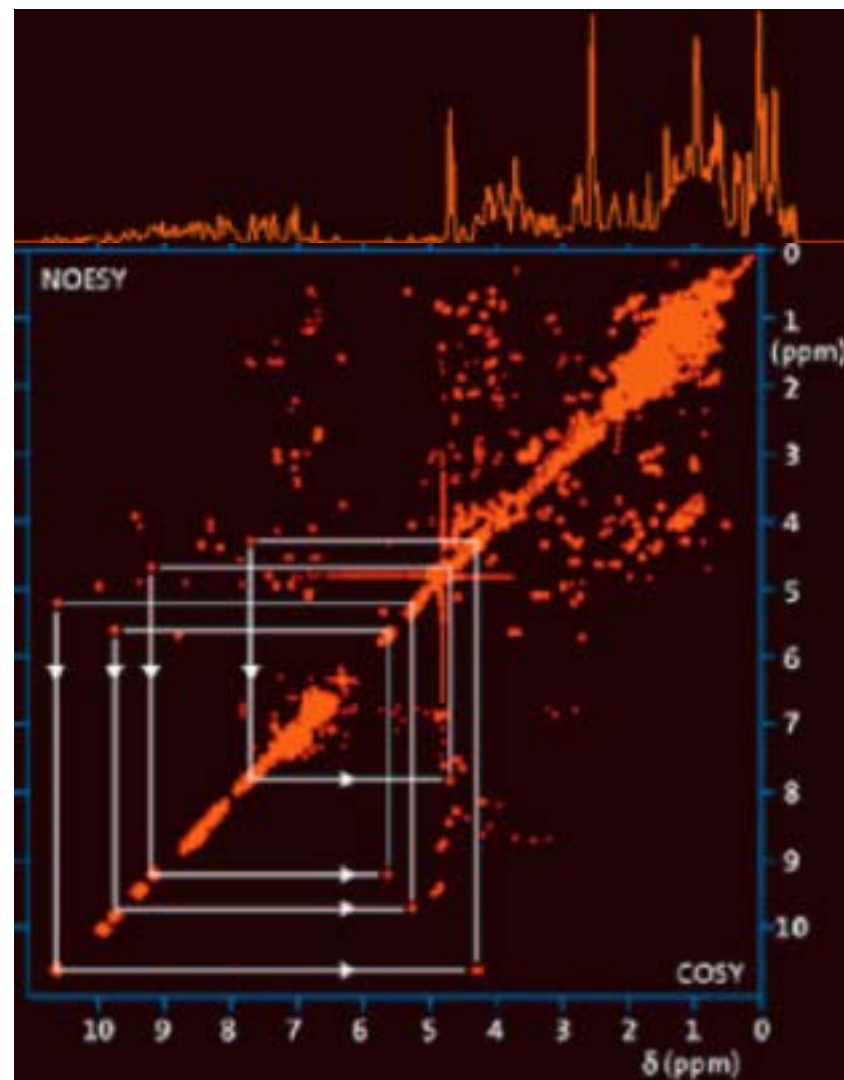
poly(ε-L-Lysine)

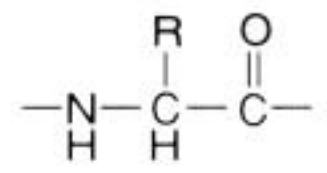
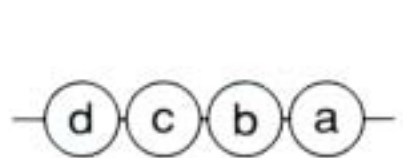
核オーバーハウザー効果(NOE)

核オーバーハウザー効果(NOE)とは、空間的に近い距離にある原子対の片方の原子核にラジオ波を照射すると、他方の原子核の信号が大きくなることである。NOEは原子核間距離を r とすると $1/r^6$ に比例している。

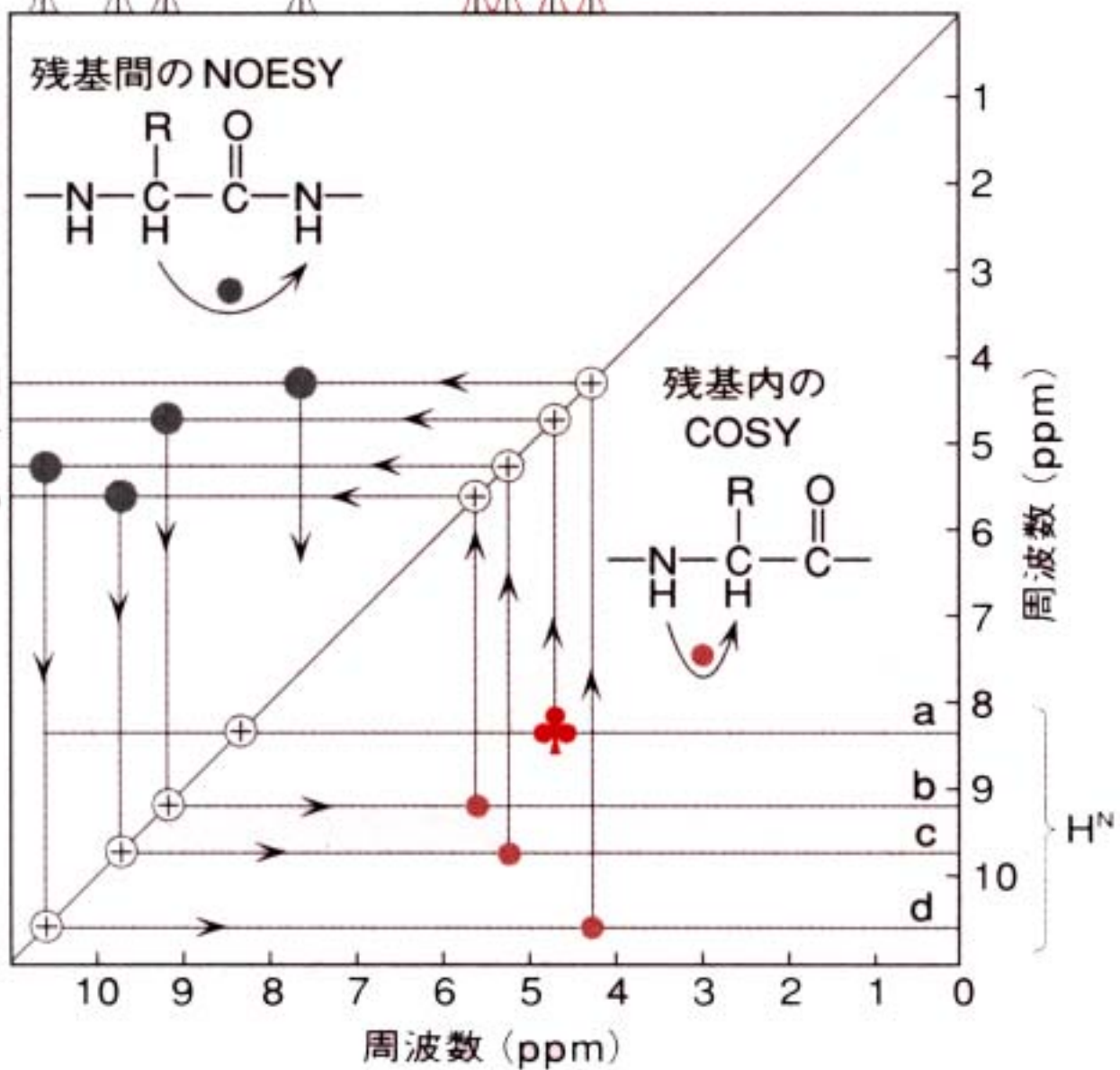
右の図はNOESYと呼ばれる2次元NMRスペクトルである。空間的に近い位置にある原子核の間に、交差ピークが現れる。

交差ピークの強度は、NOE効果の大きさを表わしており、空間的に近いほど信号強度が大きい。したがって、信号強度から原子核間距離情報を得ることができる。





アミノ酸残基

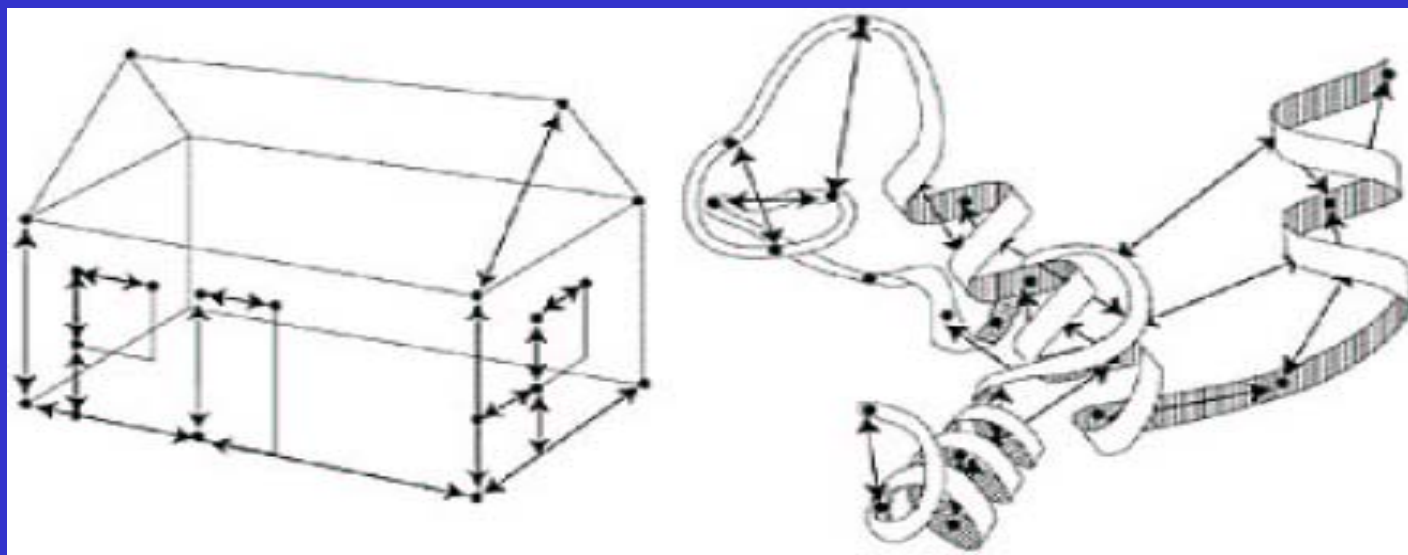


✚印の二次元ピークから出発し、反時計まわりに対角線上のピーク、非対角線上のピークと矢印のように順次つなげていくと、自然に主鎖の水素核を NH → CH → NH → CH とたどっていくことになる。これにより水素核二次元ピークの帰属が行われる。

図1 タンパク質主鎖の配置帰属法の概念図 (Nobel財団ホームページより)

(2) 立体構造決定のNOE-DG法の開発

Wüthrichは、多数の水素原子核間距離を決定することにより、タンパク質分子の3次元構造を計算することを可能にした。それは、ある建物の中の多数の距離を知ることによって、建物の絵を描くことが出来るようなものである。ディスタンス-ジオメトリ(DG)法は、2点間の距離情報を各点の位置ベクトル情報に変換するアルゴリズムである。



NOEによる距離制限情報を抑制条件として分子動力学計算によるエネルギー最適化を行うことにより、分子の3次元構造を決定することができる。

(3) 高分子量のタンパク質に対するNMR法 (TROSY) の開発

NMR構造解析法の最大の弱点は、緩和時間が短い大きなタンパク質では線幅が広くなるために分解能が低下し、信号の分離が悪くなることである。NMRで決定されたタンパク質構造も多くはアミノ酸残基数100前後の小さなタンパク質であった。分子量50kDaを越える大きなタンパク質に対してはNMR構造解析法を適用できなかった。

Wüthrichは、最近、超高磁場NMR (^1H 共鳴周波数で800MHz、磁場強度で19T以上) に適した方法であるTROSY(transverse relaxation-optimized spectroscopy)を考案し、100kDa以上の大きなタンパク質にもNMR構造解析法が適用できるようになった。

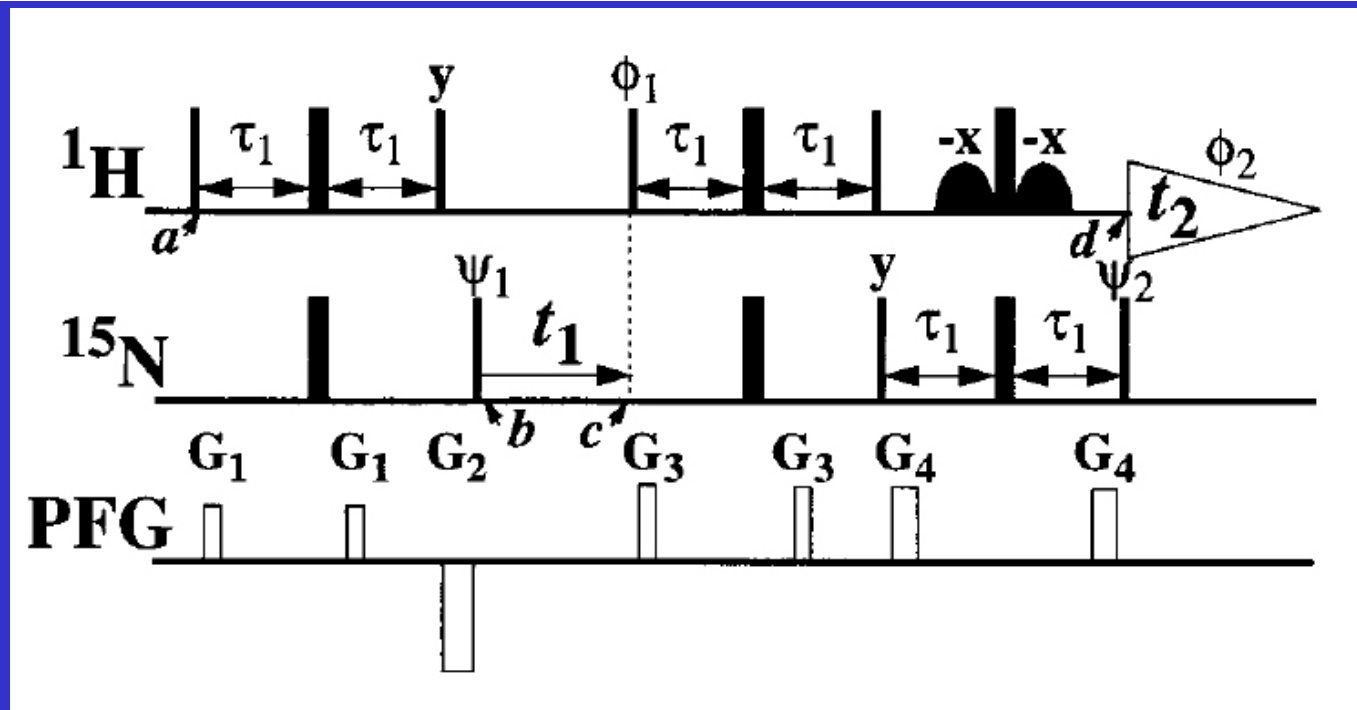
分子量の大きな分子では、核磁気緩和を支配するのは、磁気双極子相互作用と、化学シフト異方性である。超高磁場では、化学シフト異方性が非常に大きくなるために、緩和時間が短くなり、線幅が広がる。TROSYは、これら2つの相互作用を相殺することによって緩和時間を長くし、線幅を狭くする方法である。

Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole–dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution

KONSTANTIN PERVUSHIN, ROLAND RIEK, GERHARD WIDER, AND KURT WÜTHRICH*

Institut für Molekularbiologie und Biophysik Eidgenössische Technische Hochschule Hönggerberg CH-8093 Zurich, Switzerland

Contributed by Kurt Wüthrich, September 3, 1997



TROSYタイプの ^1H - ^{15}N 化学シフト相関2次元NMRのパルス系列

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \langle S_{12}^{\pm} \rangle \\ \langle S_{34}^{\pm} \rangle \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} \pm i\omega_S^{12} + R_{1212} + \frac{1}{T_{2S}} + \frac{1}{2T_{1I}} & 3(p^2 - \delta_I^2)J(\omega_I) - \frac{1}{2T_{1I}} \\ 3(p^2 - \delta_I^2)J(\omega_I) - \frac{1}{2T_{1I}} & \pm i\omega_S^{34} + R_{3434} + \frac{1}{T_{2S}} + \frac{1}{2T_{1I}} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \langle S_{12}^{\pm} \rangle \\ \langle S_{34}^{\pm} \rangle \end{bmatrix}. \quad [1]$$

ω_S and ω_I are the Larmor frequencies of the spins S and I , T_{2S} and T_{1I} account for the transverse relaxation of spin S and the longitudinal relaxation time of spin I , respectively, by all mechanisms of relaxation except DD coupling between the spins S and I and CSA of the spins S and I .

$$p = \frac{1}{2\sqrt{2}} \gamma_I \gamma_S \hbar / r_{IS}^3, \quad \delta_S = \frac{1}{3\sqrt{2}} \gamma_S B_0 \Delta\sigma_S$$

and

$$\delta_I = \frac{1}{3\sqrt{2}} \gamma_I B_0 \Delta\sigma_I,$$

where γ_I and γ_S are the gyromagnetic ratios of I and S , \hbar is the Planck constant divided by 2π , r_{IS} the distance between S and I , B_0 the polarizing magnetic field, and $\Delta\sigma_S$ and $\Delta\sigma_I$ are the differences between the axial and the perpendicular principal components of the axially symmetric chemical shift tensors of spins S and I , respectively. R_{1212} and R_{3434} are the transverse relaxation rates of the individual components of the S doublet (11) given by Eqs. 2 and 3,

$p \sim$ のとき, [2]に示すように緩和速度 R_{1212} が小さくなる, すなわち線幅は広くなる. 一方, [3]に示すように緩和速度 R_{3434} は大きくなる, すなわち線幅は狭くなる. 通常は, スピン - スピン相互作用のために分裂している4本の信号のうち, 1本だけ線幅が狭くなる.

$$R_{1212} = (p - \delta_S)^2(4J(0) + 3J(\omega_S)) + p^2(J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S)) + 3\delta_I^2 J(\omega_I), \quad [2]$$

$$R_{3434} = (p + \delta_S)^2(4J(0) + 3J(\omega_S)) + p^2(J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S)) + 3\delta_I^2 J(\omega_I), \quad [3]$$

where $J(\omega)$ represents the spectral density functions at the frequencies indicated:

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{5(1 + (\tau_c\omega)^2)}. \quad [4]$$

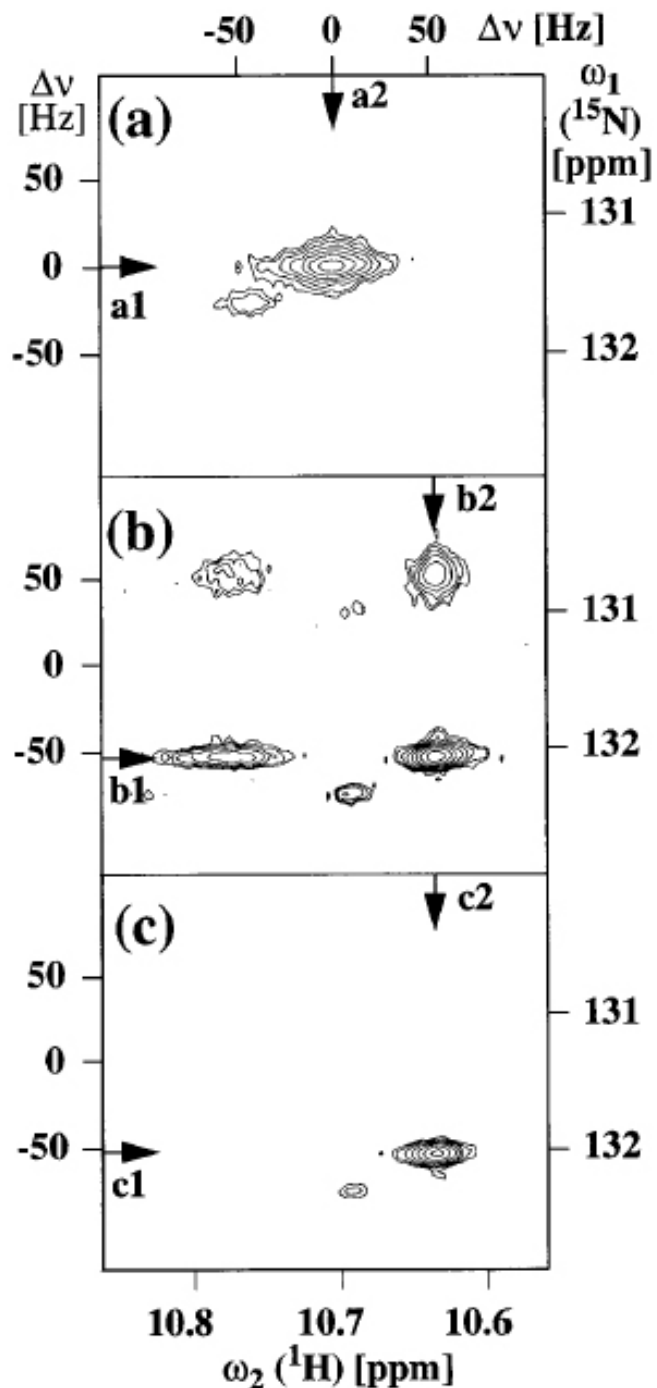


図2. (a)は広帯域デカップリングを行った場合であり, 信号は1本だけである.

(b)はデカップリングを行わない場合であり, スピン - スピン相互作用によって信号は4本に分かれる.

(c)はTROSYタイプのシフト相関2次元NMR(COSY)スペクトルであり. (b)で見られる4本の信号のうち1本だけが観測される.

FIG. 2. Contour plots of $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ correlation spectra showing the indole $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ spin system of Trp-48 recorded in a 2 mM solution of uniformly ^{15}N -labeled *fitz* homeodomain complexed with an unlabeled 14-bp DNA duplex in 95% $\text{H}_2\text{O}/5\%$ $^2\text{H}_2\text{O}$ at 4°C , $\text{pH} = 6.0$, measured at the ^1H frequency of 750 MHz. (a) Conventional broad-band decoupled $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ COSY spectrum (22, 23). The evolution caused by the $^1J(^1\text{H}, ^{15}\text{N})$ scalar coupling was refocused in the ω_1 and ω_2 dimensions by a 180° proton pulse in the middle of the ^{15}N evolution time t_1 , and by WALTZ composite pulse decoupling of ^{15}N during data acquisition, respectively. (b) Conventional $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ COSY spectrum recorded without decoupling during t_1 and t_2 . (c) TROSY-type $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ correlation spectrum recorded with the pulse scheme of Fig. 1. Chemical shifts relative to DSS in ppm and shifts in Hz relative to the center of the multiplet are indicated in both dimensions. The arrows identify the locations of the cross-sections shown in Fig. 3.

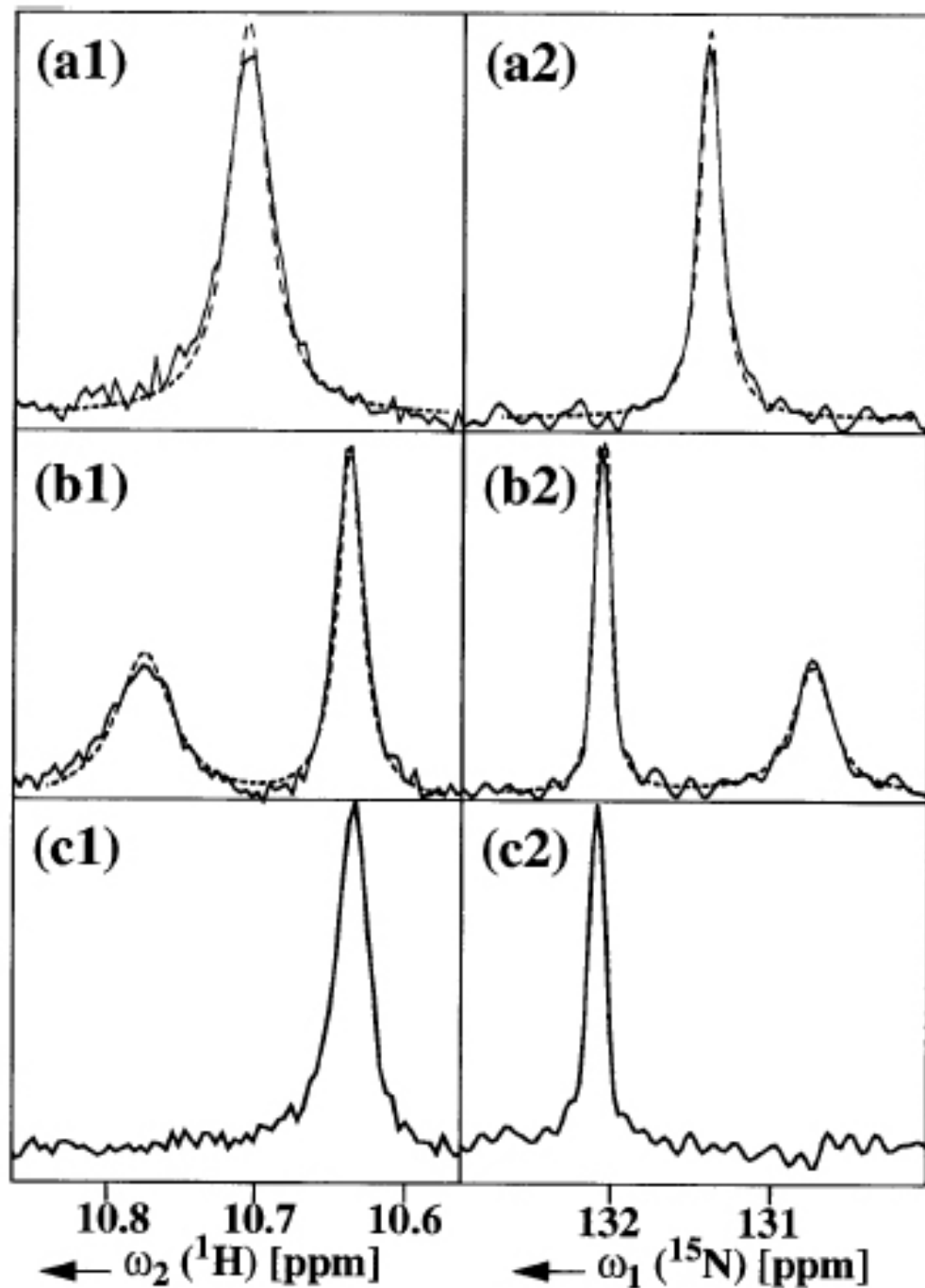
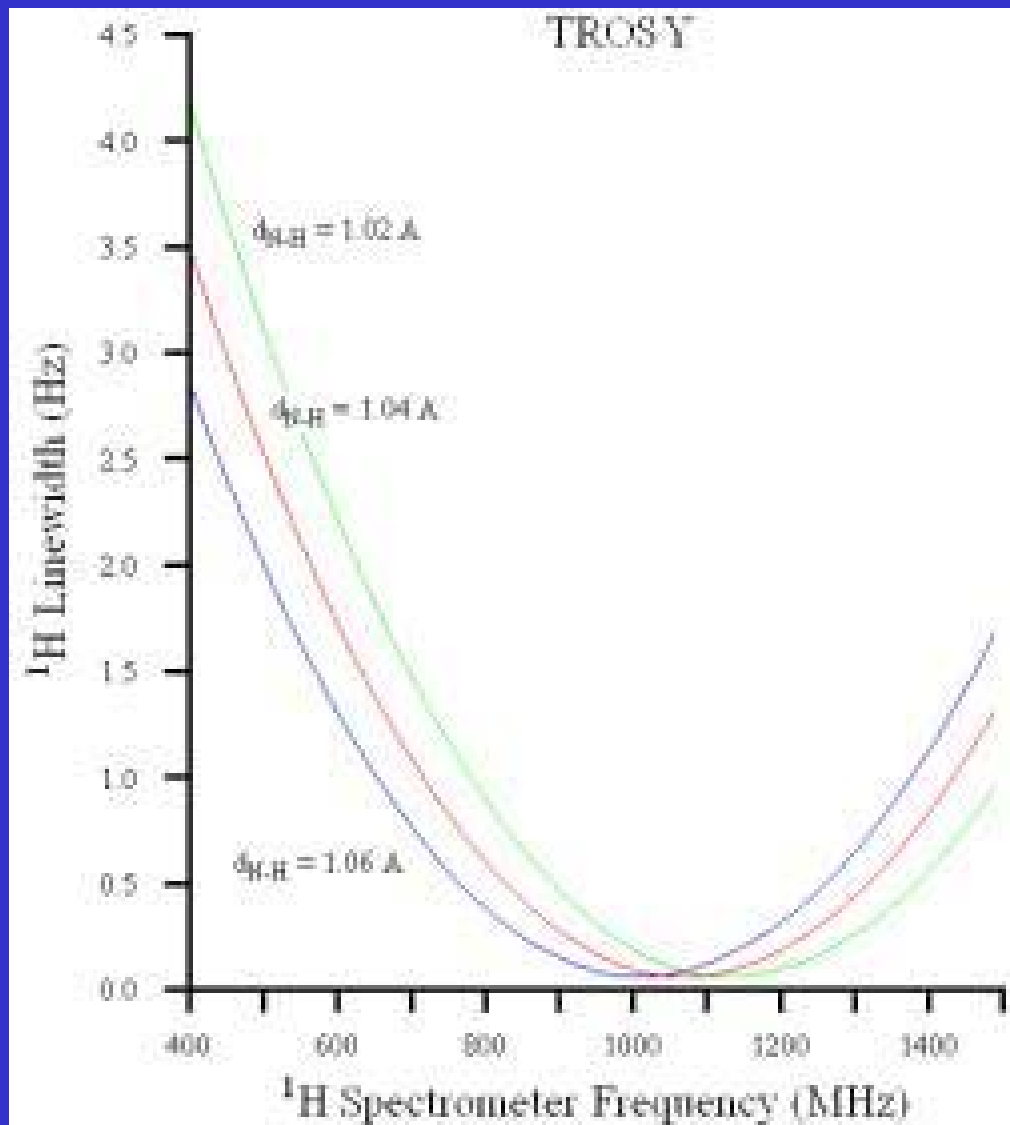


図3. 図2の等高線プロットスペクトルのある方向での断面。例えば、右下は図2 (c)の (c2) 方向の断面スペクトルであり、線幅が狭いことが分かる。

FIG. 3. Cross-sections through the spectra of Fig. 2 (solid lines). To facilitate a comparison of the linewidths in the different spectra the cross-sections were normalized to the same maximal signal amplitude. (a1), (a2), etc. refer to the arrows in Fig. 2. Simulated line shapes (dashed lines in a and b) were calculated using $^1J(^1\text{H}, ^{15}\text{N}) = -105$ Hz, a rotational correlation time of $\tau_c = 20$ ns, and chemical shift anisotropies of $\Delta\sigma_H = -16$ ppm and $\Delta\sigma_N = -160$ ppm. A long-range scalar coupling $^2J(^1\text{H}^{\delta 1}, ^{15}\text{N}^{\epsilon 1}) = -5$ Hz was included in the simulation of the ^{15}N lineshapes (24), but possible effects of the small scalar couplings $^3J(^1\text{H}^{\delta 1}, ^1\text{H}^{\epsilon 1})$ and $^3J(^1\text{H}^{\epsilon 2}, ^{15}\text{N}^{\epsilon 1})$ were neglected. For $^1\text{H}^{\text{N}}$ the relaxation due to DD coupling with other protons in the nondeuterated complex was approximated by three protons placed at a distance of 0.24 nm from $^1\text{H}^{\text{N}}$.

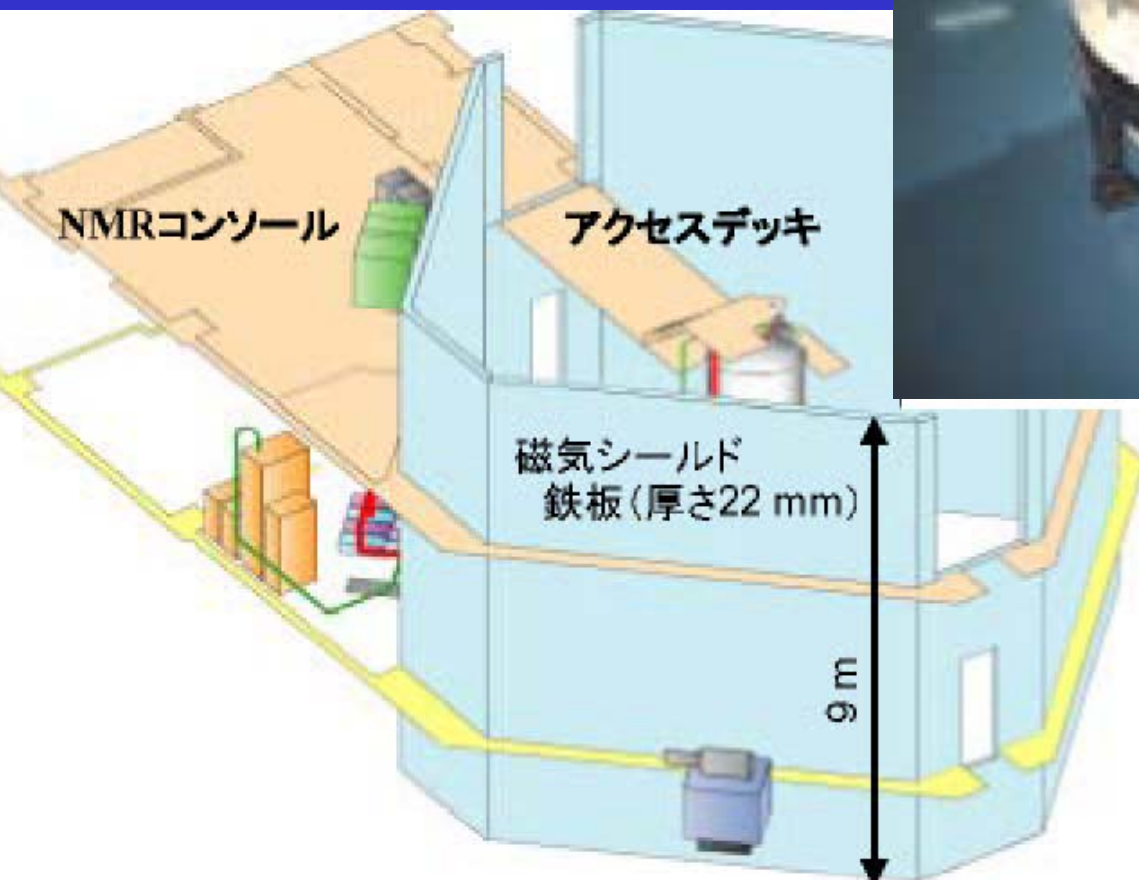


TROSYタイプの2次元NMRスペクトルの線幅の磁場依存性
 ^1H 共鳴周波数1GHz(約24T)のときに線幅が最小となる。



世界最大磁場強度である日本製920MHz装置

（理研と日本電子の協力を得て平成14年8月稼動開始，
独立行政法人物質・材料研究機構）





理研ゲノムプロジェクト(NMRパーク)(横浜)



BRUKER
600
UltraShield™

BRUKER
600
UltraShield™

BRUKER

AVANCE 600

Computer workstation with monitor and keyboard on a table.

Blue equipment case on a lower shelf of the table.



BRUKER
800
UltraStabilized

日本電気

Nobel lectureでWüthrichの紹介をする化学賞選考委員長Nordén教授
(Chalmers University of Technology, Sweden)

The Nobel Prize in Chemistry 2002



Kurt Wüthrich

- Born 1938 in Aarberg, Switzerland
- PhD in Inorganic chemistry 1964
- Professor in Biophysics at ETH Zürich, Switzerland
- Visiting Professor at the Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA

講義担当者(前田)が1999年
3月から5月までNordén研究
室に滞在した。



Professor Bengt J. F. Nordén

Chalmers University of Technology,
Department of Physical Chemistry,
Gothenburg, Sweden

Head of Department

The Head of the Department, Professor Bengt J. F. Nordén, was born in Lund in 1945. He performed his undergraduate and graduate studies at the University of Lund where he received his PhD in 1971 and in 1972 became Associate Professor of Inorganic Chemistry. In 1979 he was appointed to the Chair of Physical Chemistry at Chalmers University of Technology.

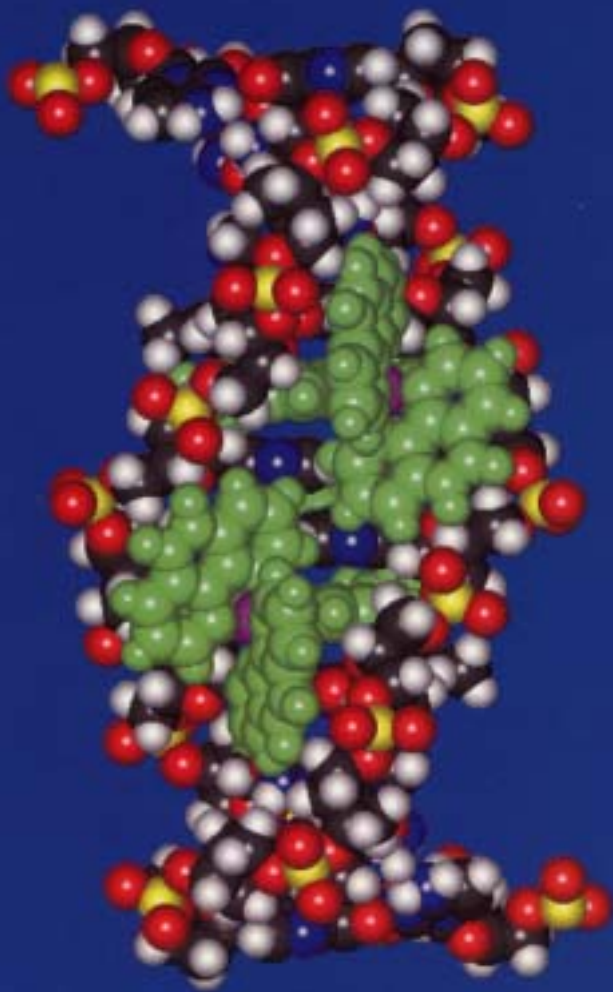
CUT所属だけで教授3名, 助教授5名,
ポスドク3名, Technician 2名, 大学院
生22名. 他にヨーテボリ大学の教職員も
同じフロアにいる.

田中氏のノーベル化学賞
受賞に関するインタビュー
を受けているNordén教授

スウェーデン生物物理学
会会長



CHALMERS



Molecular recognition

The DNA-binding propeller-shaped molecule $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ (green with ruthenium atom purple) exists in two forms: D and L, which are mirror images of each other. They show drastically different interactions with the DNA helix but also different mutual interactions between two molecules bound close to each other: L-L on the front page and D-D on the back of the card. The latter effect can be exploited to enhance recognition of DNA. Research at the Department for Physical Chemistry concerns among other things mechanisms of molecular recognition, a field of importance for development of gene-specific drugs and diagnostics.

分子認識

Ru金属錯体がDNAと複合体を形成していることをフローLD測定を用いて研究している。