

2014年度 分子機能化学特論 第5回目 5月2日

1. 多核多次元NMRによる生体関連物質の分子構造解析

担当: 生物応用化学専攻 前田史郎

【授業の目標】

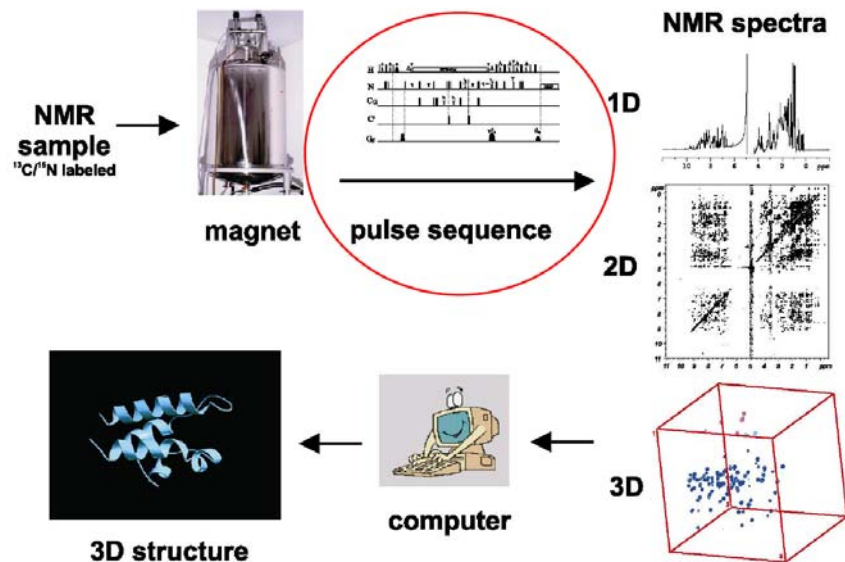
化学・生化学の分野で広く用いられているNMR法の原理と、タンパク質およびその生体関連物質との分子間相互作用を解明するのに用いられている各種NMR法を理解する。

【授業の内容（進展度合等）】

1. NMRの発展史 ーどのように発展し、何をj知ることができるかー
2. NMRの原理と装置 ー量子力学的な基礎と測定装置のしくみー
3. 2次元NMRの原理と応用 ーCOSY, J-分解, NOESYなどー
4. 多核2次元NMRの原理と応用 ーHETCOR(CH-COSY)などー
5. インバース法の原理と応用 ーHSQC, HMQC, HMBCなどー
6. 多核多次元NMRによる生体関連物質の分子構造解析
7. 固体高分解能NMRの基礎およびその高分子化合物の物性評価への応用

1

Structure determination by NMR



JEOL アプリケーションノート

Application Note NM-040004 (1)

磁場強度別 NMR データ集 (2004年度版)

使用装置 : JNM-ECA / ECX

使用磁場 : 磁場強度 (¹H共鳴周波数)

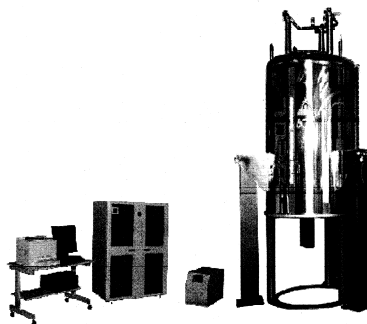
7. 05T (300MHz), 9. 39T (400MHz), 11. 74T (500MHz), 14. 09T (600MHz),
16. 44T (700MHz), 18. 79T (800MHz), 21. 6T (920MHz)

測定モード : ¹H測定

測定条件 : 各スペクトルに記載

測定サンプル :

Camphor (mol. wt:152. 23)
Cholesterol (mol. wt:386. 64)
Menthol (mol. wt:156. 26)
Sucrose (mol. wt:342. 30)
Raffinose (mol. wt:504. 46)
Gramicidin S (mol. wt:1141. 49)



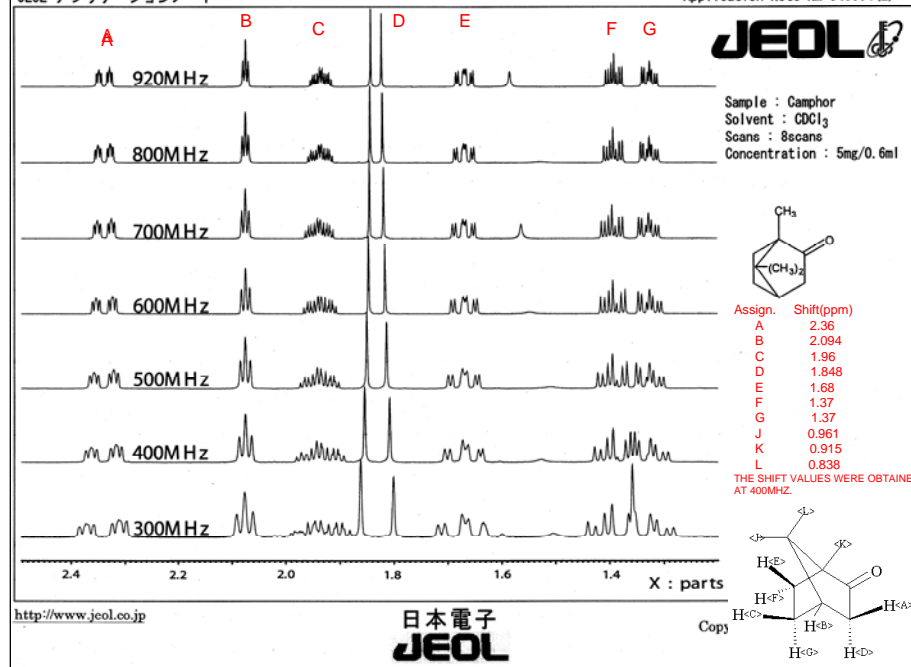
<http://www.jeol.co.jp>

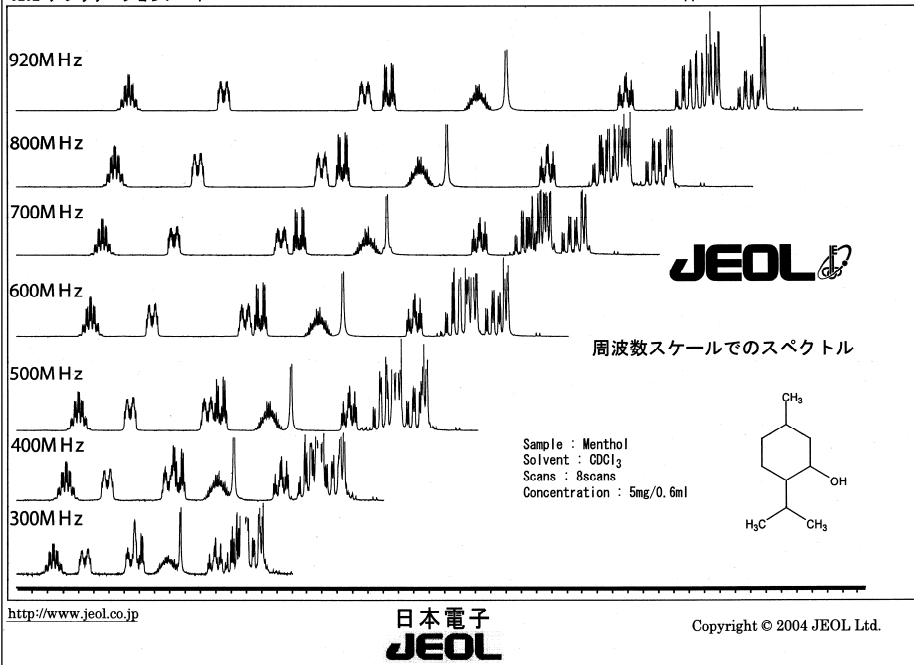
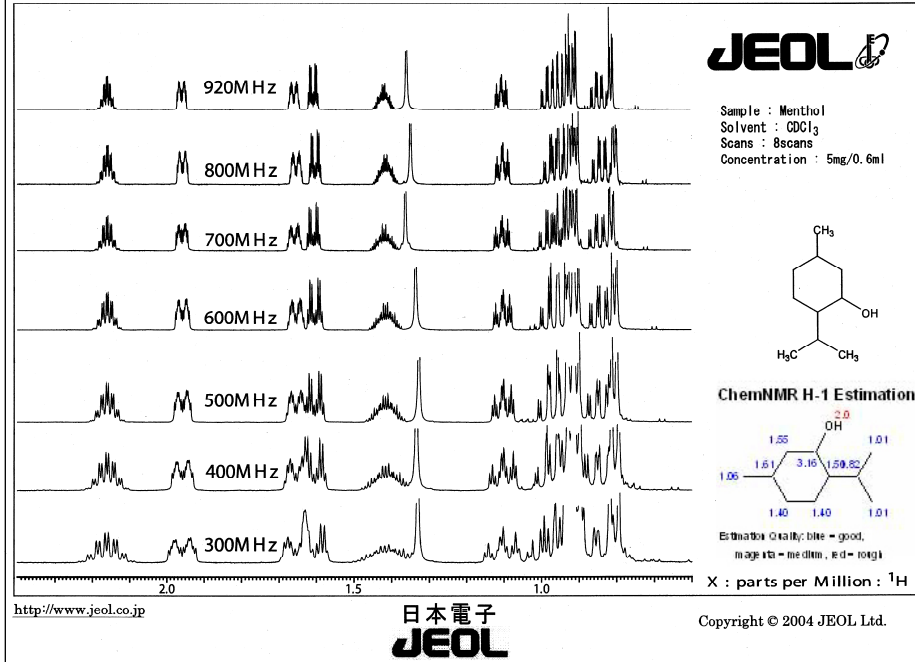
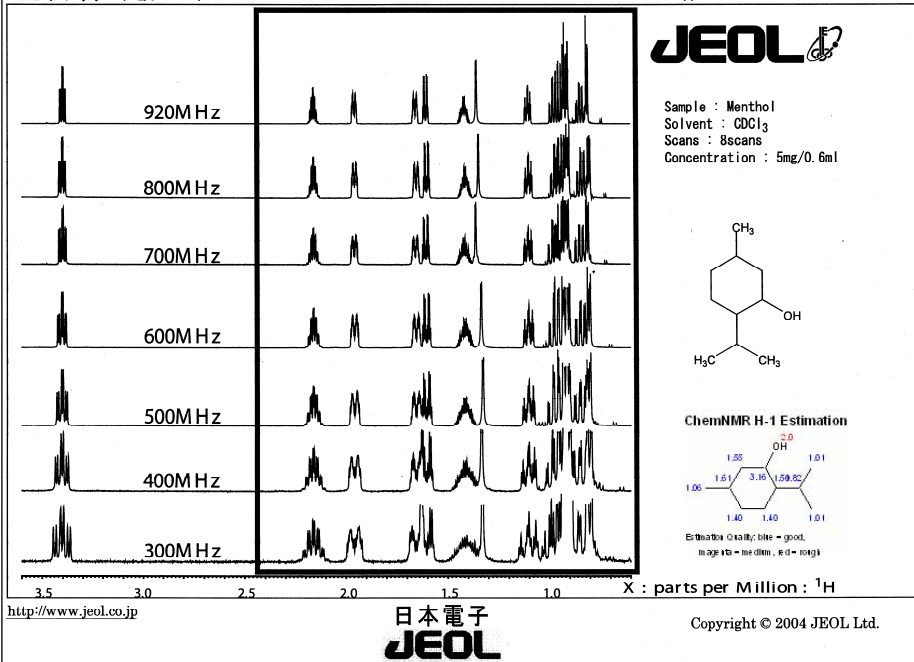
日本電子
JEOL

Copyright © 2004 JEOL Ltd.

JEOL アプリケーションノート

Application Note NM-040004 (2)





NMRを用いたタンパク質の高次構造決定法

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
NMRを用いた
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"

The Nobel Prize in Chemistry 2002

The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the Nobel Prize in Chemistry for 2002 "for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules" with one half jointly to John B. Fenn and Koichi Tanaka "for their development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules" and the other half to Kurt Wüthrich "for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution".

BACK

▶▶

Proteins in close-up

Living cells consist of myriads of molecules. The large molecules, which include the proteins, interact with one another and with other molecules in a never-resting molecular machinery. How can we understand what is happening inside the cell? One important step is to develop tools to "see" with, and this is what this year's Nobel Laureates in Chemistry have done.



John B. Fenn Koichi Tanaka Kurt Wüthrich



Contents:

| Introduction | Mass Spectrometry | NMR | From early diagnosis to new medicines | Further reading | Credits |

Web Adapted Version of the Nobel Poster from the Royal Swedish Academy of Sciences

9

The Nobel Prize in Chemistry 2002

BACK

NMR:

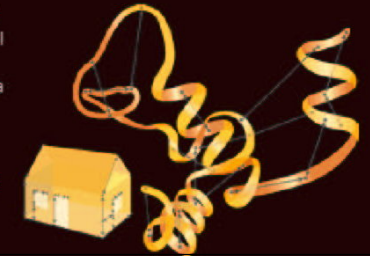
To understand, we need to see

With NMR the three-dimensional structure of different substances can be studied. Unlike the alternative method, X-ray crystallography, NMR can be applied to molecules in solution. This is a great advantage since the natural environment of the protein is the living cell.

In NMR the sample is placed in a strong magnetic field. Pulses of radio waves are beamed into the sample, the atoms of which "answer" by emitting new radio waves. The result is a spectrum in which each atomic nucleus causes one or more peaks. This is because the magnetic field around each atom is affected by its neighbouring atoms. A large protein gives rise to a very complicated spectrum with numerous peaks.

Many peaks in the spectrum – no problem!

Kurt Wüthrich had an idea how to find out which peaks correspond to which atoms. His method is called *sequential assignment*. It involves starting with a signal from a known atomic nucleus and then finding the nucleus in the peptide chain that is signalling that it is a neighbour of the first. Wüthrich matched each signal successively with its atom. With a similar method, which senses the distance between nuclei, he then determined a large number of pairwise distances in the protein, which gave the three-dimensional structure of that protein.



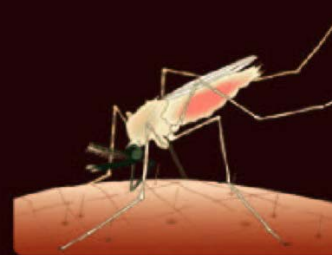
10

The Nobel Prize in Chemistry 2002

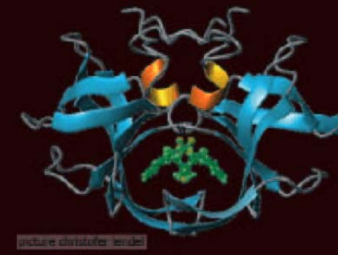
BACK

From early diagnosis to new medicines

Mass spectrometry and NMR have been around for a long time, but the ability to use them on molecules as large as proteins was something most scientists considered impossible. This year's Nobel prize Laureates showed that it could in fact be done! Their methods quickly turned out to be outstanding and have been further developed by other researchers to increase our understanding of the complicated life processes. To understand, we need to see - this year's Nobel prize has given us sharper sight.



Mass spectrometry has recently been reported as a successful method for early diagnosis of malaria. Different forms of cancer, such as breast, prostate and ovarian cancer, can also be discovered much earlier than with present-day methods.



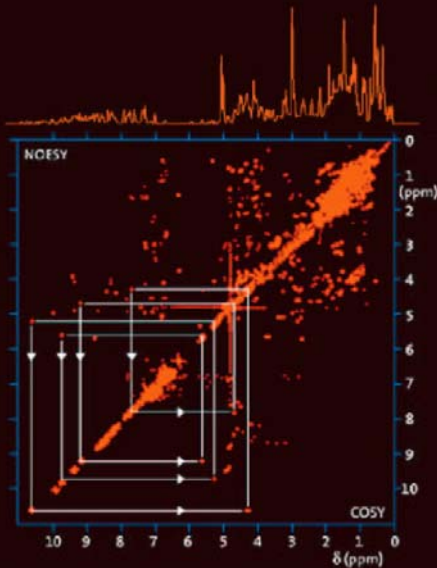
NMR is used in the pharmaceutical industry for determining the structure of proteins and other macromolecules that can be of interest as target molecules for new drugs. It is also possible to find out what small molecules bind to a given protein, thus making them into candidates for new drugs. The picture shows HIV protease with a molecule (in green) that blocks its function.

12

If one knows all the measurements of a house one can draw a three-dimensional picture of that house. In the same way, by measuring a vast number of short distances in a protein, it is possible to create a three-dimensional picture of that protein.



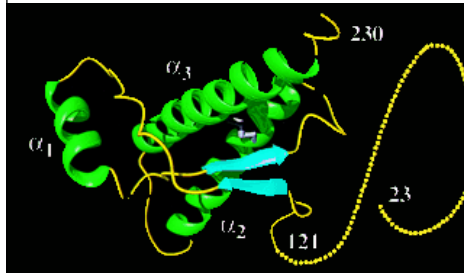
Kurt Wüthrich preparing a protein solution in an NMR tube. His measurement gives a three-dimensional picture of the protein structure in solution. Wüthrich works at ETH in Zürich, Switzerland and at the Scripps Research Institute, La Jolla, USA.



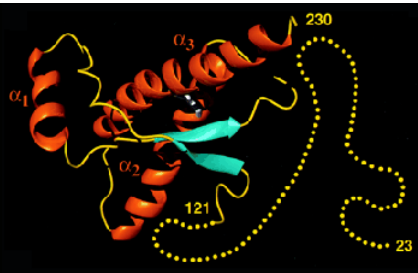
The different nuclei are identified one after the other in a two-dimensional NMR spectrum, here in a composite diagram in which one can navigate between 'cross-peaks' that signal atom proximity.

11

ウシ・プリオンのNMR構造



ヒト・プリオンのNMR構造



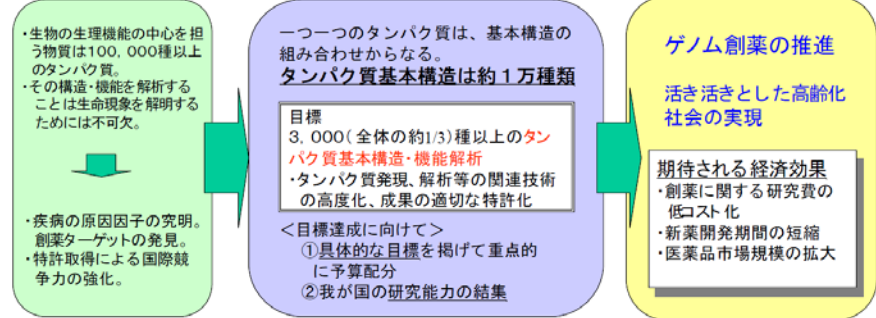
F.L.García, R. Zahn, R.Riek, and K.Wüthrich (2000).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(15), 8334-8339

R.Zahn, A.Liu, T.Lührs, R.Riek, C.Schroetter, F.L. Garcia,
M.Billeter, L.Calzolari, 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

- α-ヘリックス構造: 緑色またはオレンジ色
- β-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

タンパク3000プロジェクト

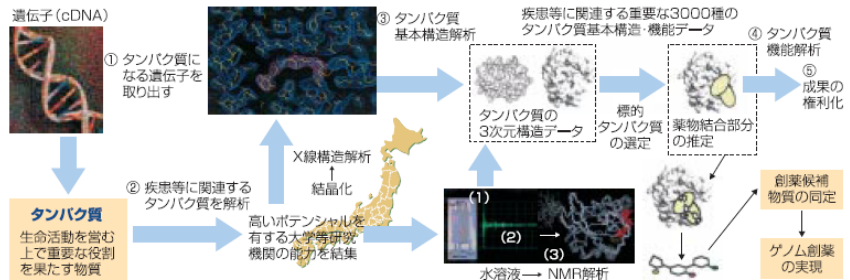


タンパク3000プロジェクト

<http://www.mext-life.jp/protein/>

プロジェクトの概要と目的

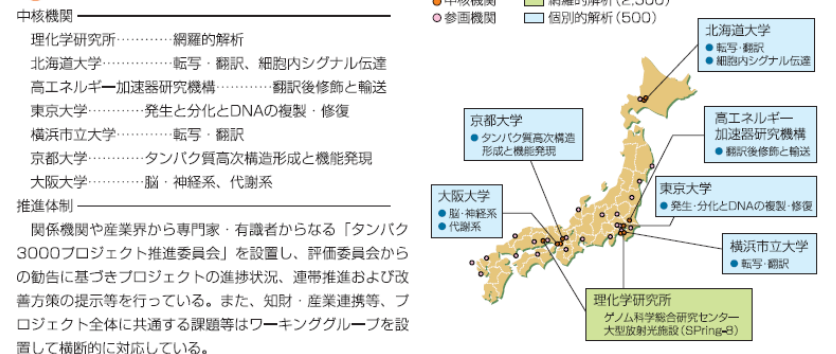
わが国発のゲノム創薬の実現等を目指し、世界最先端設備(NMR、大型放射光施設等)を駆使し、産官学の研究能力を結集して平成18年度までに生命を司るのに重要なタンパク質のうち1/3に相当する約3000種類以上のタンパク質の基本構造およびその機能の解析を行う。それに基づく薬剤設計や解析結果の特許化等を図ることにより、わが国発のバイオテクノロジーを駆使するゲノム創薬の実現に貢献し、ひいては医薬品生産額の増加や国際協力の強化等によりわが国の経済発展に資する。



プロジェクトの必要性と背景

タンパク質の構造・機能解析は熾烈な国際競争が起こっている分野であり、知的財産に結びつく可能性が高いことから、わが国としても早急に取り組み、進めなければ社会的・経済的にも大きな不利益を生ずることになる。このため、わが国のもてるポテンシャルを最大限に活用するとともに、産官学のセクターを超えた能力を結集し、明確な国家目標の下で効果的・効率的に事業を推進することがきわめて重要である。

実施体制



PDB (Protein DataBank)

世界中で解析されたタンパク質の立体構造は、国際的なデータベースのPDB (Protein DataBank) に登録され、誰でも無料で利用できる。日本では、日本蛋白質構造データバンク (PDBJ: <http://www.pdbj.org>) が、登録とデータのダウンロード、その他の解析サービスを行っている。



タンパク質研究が切り拓く世界

文部科学省タンパク質関連研究プロジェクト紹介

タンパク質3000プロジェクト
ターゲットタンパク質研究プログラム

プロジェクトの予算

平成14年度から18年度までに総額約580億円の予算が投じられました。

| 平成14年度 | 平成14年度補正 | 平成15年度 | 平成16年度 | 平成17年度 | 平成18年度 | 合計 |
|--------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 118億円 | 91億円 | 91億円 | 91億円 | 98億円 | 86億円 | 約580億円 |

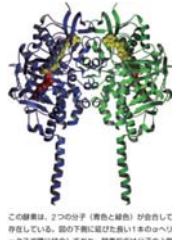
数字で見るタンパク質3000プロジェクトの成果

| | |
|-----------------------------|---------------|
| 構造解析されたタンパク質の数 (基本構造として) | 4517 4187) |
| PDB登録数 | 3923 |
| 出願特許数 | 403 |
| 発表論文数 | 4195 |

平成19年3月31日時点のデータ



GaIA (黄色の部分) でつくられたアンモニアが、オレンジ色の通路を通じてGaIB (緑色の部分) に運ばれ、グルタミン酸に結合する。



この酵素は、2つの分子(黄色と緑色)が結合して存在している。図中の黄色と緑色のヘリックスで裏に結合しており、緑色の部分は分子の上部で行われている。黄色の球で示したのは、緑色の部分の球で示したのと同様の構造。

平成19年度から23年度

| 平成19年度 | 平成20年度 |
|--------|--------|
| 55億円 | 52億円 |

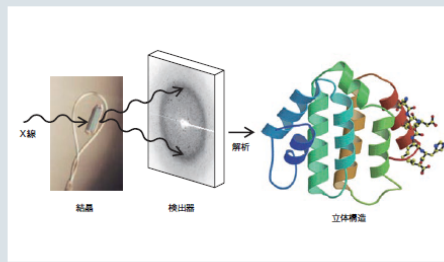
タンパク質の構造を調べる方法

1個のタンパク質分子はとて小さく、1mmの1万分の1以下という大きさです。このため、普通の顕微鏡で観察しても、その構造は見えません。タンパク質の構造を調べる

ために、おもに用いられるのは、「X線結晶構造解析」と「NMR(核磁気共鳴)」という方法です。最近では、「単粒子構造解析」という手法も利用されています。

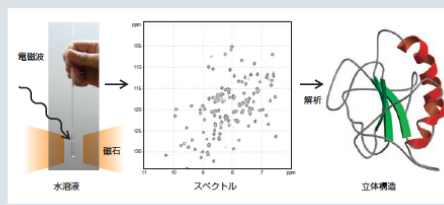
X線結晶構造解析

レントゲンでおなじみのX線を使う方法です。たくさんのタンパク質分子がきちんと詰まった結晶をつくり、それに強いX線をあてると、X線はいくつかの決まった方向に曲げられ(これを「回折」と言います)、スポットが並んだパターンを検出器に描き出します。このパターンは、結晶の中のタンパク質分子の構造を反映しているため、このパターンを解析すると、タンパク質の構造を得ることができます。



NMR(核磁気共鳴)

NMR(核磁気共鳴)は、原子核が極微の磁石のような性質をもつことを利用する方法です。とても強い磁場の中にタンパク質の水溶液を置き、電磁波をあてると、タンパク質分子をつくっている原子の原子核から信号が得られます。この信号を解析すると、原子同士の位置関係がわかり、タンパク質の構造が得られます。



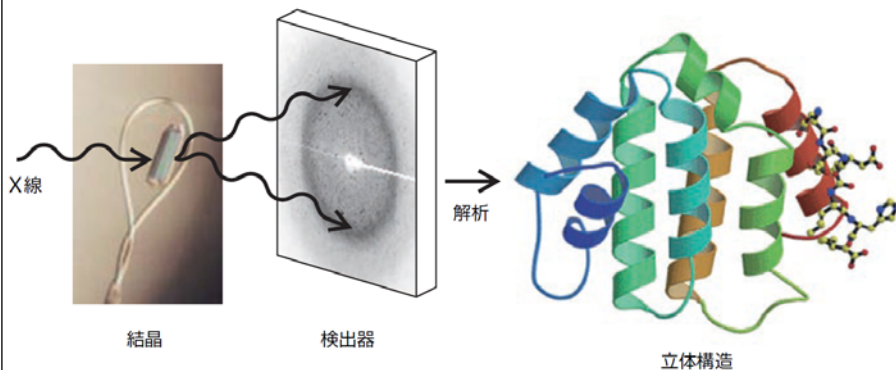
文科省タンパク質関連プロジェクト紹介パンフレットより

タンパク質の構造を調べる方法

文科省タンパク質関連プロジェクト紹介パンフレットより

(1) X線結晶構造解析

タンパク質結晶のX線回折パターンを解析する。



X線結晶構造解析

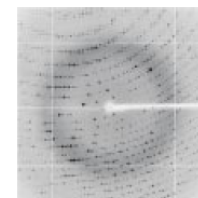
X線結晶構造解析では、

- ① まず遺伝子操作や生化学的な手法を駆使して目的とするタンパク質を大量に調整して結晶化する。この結晶化が構造解析の律速段階となることが多い。
- ② 作成した結晶にX線を照射して回折パターンを得る。このとき、大強度のX線を用いると小さな結晶でも鮮明な回折パターンが得られる。
- ③ 得られた回折パターンと結晶内のラベル原子からの位相情報をもとにタンパク質の電子密度図を得る。
- ④ その電子密度図に化学構造モデルをあてはめ、タンパク質全体の構造モデルを構築する。

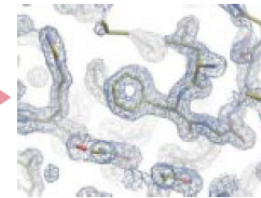
【特徴】 X線結晶構造解析には結晶が必須だが、タンパク質の大きさに制限がなく、構造を原子レベルで直接みられる。



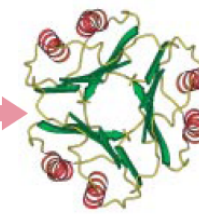
① タンパク質結晶



② X線回折パターン



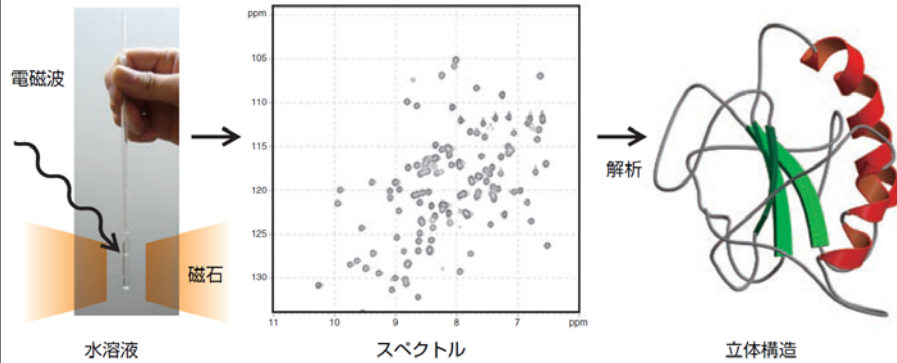
③ 電子密度図



④ 構造モデル

(2) NMR (核磁気共鳴)

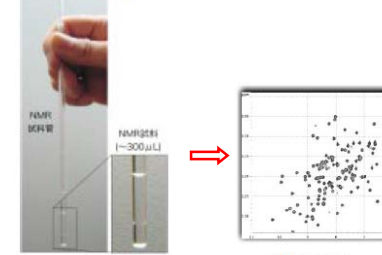
タンパク質試料を強い磁場中に置き、電磁波をあてて得られる原子核からの信号を解析する。



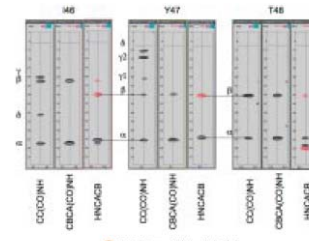
21

文科省タンパク質
関連プロジェクト紹介
パンフレットより

① 試料の調製



② NMR測定



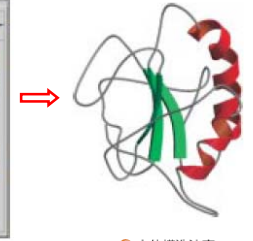
③ NMRスペクトル解析

- NMR (核磁気共鳴) 解析では、
- ① 安定同位体 (^{13}C , ^{15}N) で標識したタンパク質試料を調製する。
 - ② いろいろな原子核に対応する電磁波を与え、その応答を計測する。
 - ③ その計測結果を統合して、各種の多次元NMRスペクトルを得る。
 - ④ このNMRスペクトルを解析して、個々のシグナルが20種類のアミノ酸のどの原子に対応するかを決定する。
 - ⑤ タンパク質中の水素原子間の距離と角度についての情報等をもとに、立体構造を決定する。

【特徴】 NMRスペクトルでは水溶液の試料も対象にできるため、結晶化が困難なタンパク質の解析が可能である。

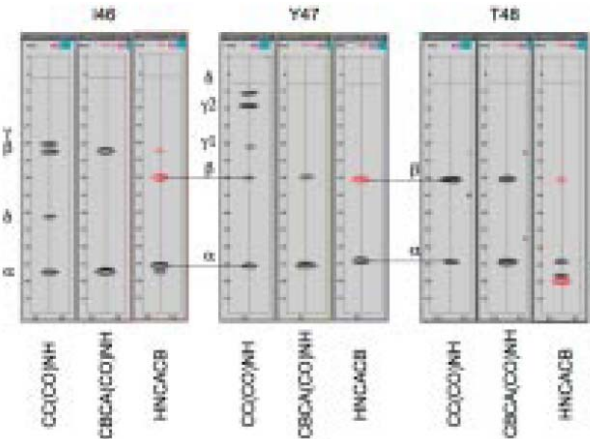


④ 距離情報の取得



⑤ 立体構造決定

22



タンパク質におけるアミノ酸の1次配列を決定するための連鎖帰属法

23

タンパク 3000 プロジェクト

基盤整備

構造解析のための施設・設備を構築しました

構造解析パイプラインの整備

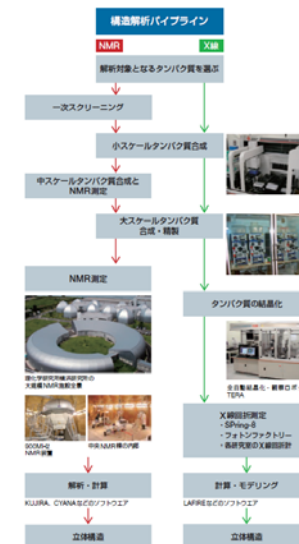
タンパク質の構造解析では、まず、DNAをもとにタンパク質を合成し、そのタンパク質が解析に適したものであるかを調べた上で大量に合成します。その後、NMRの場合は水溶液中で、X線結晶解析の場合は結晶化して、必要なデータを取得します。さらに、そのデータを解析することで元の立体構造が得られるのです。

理化学研究所は、この一連の過程の自動化、最適化を図り、一連の過程を「パイプライン」として整備しました。パイプライン化したことにより作業が効率化され、タンパク質の合成の生産性を高めるまでが非常にスピードアップしました。プロジェクト終了後、NMRのパイプラインは外部にも開放され、公費により民間企業が利用し始めています。

NMRの高効率化

理化学研究所横浜研究所には約40台のNMR装置があります。これらを用いてタンパク質の構造解析を進めるために、従来の解析手法を改良することに加え、解析効率の向上を進めました。また、物質・材料研究機構に協力し、より広い範囲で測定できる装置を開発しました。

これらにより、細胞内でDNAからタンパク質をつくる過程（転写・翻訳）にかかわるタンパク質を解析し、さまざまな機能のタンパク質の構造を決定することができました。



文科省タンパク質
関連プロジェクト紹介
パンフレットより

24



Wüthrich教授のノーベル賞受賞講演

- 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

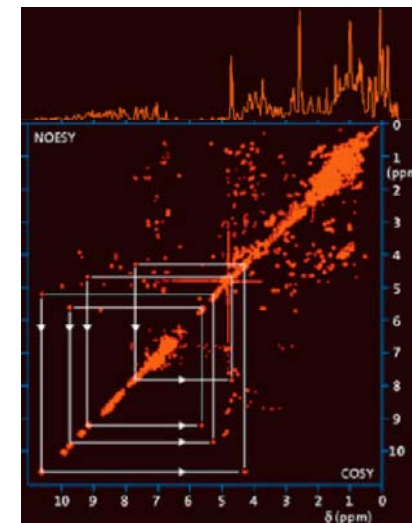
NMRの素晴らしい特徴の1つは、分子の中の1つ1つの水素原子からの信号を区別できることにある。しかし、タンパク質は数千個もの水素原子を含むので、どの信号がどの原子によるものであるかを帰属することは困難であった。Wüthrichは個々の信号をそれぞれの水素原子に帰属する系統的な方法を確立した。その方法は、3種類の核種 (^1H , ^{13}C , ^{15}N) に対する3次元NMRを組み合わせる1つ1つのアミノ酸残基の信号を順番に帰属することである、

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。

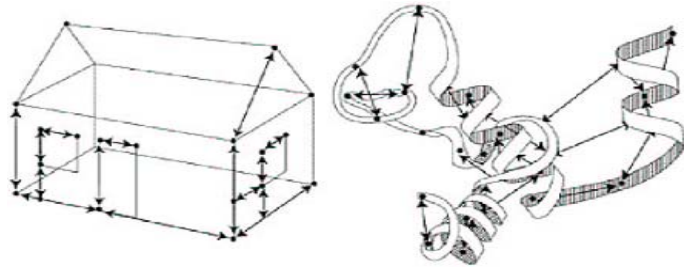
右の図はNOESYと呼ばれる2次元NMRスペクトルである。空間的に近い位置にある原子核の間に、交差ピークが現れる。

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。



(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でき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。

29

(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が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、①磁気双極子相互作用と、②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。

30

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 94, pp. 12366-12371, November 1997
Biophysics

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

双極子相互作用と化学シフト異方性の相殺によって抑制された T_2 緩和は、非常に大きな生体高分子の溶液中でのNMR構造への道筋を示している。

31

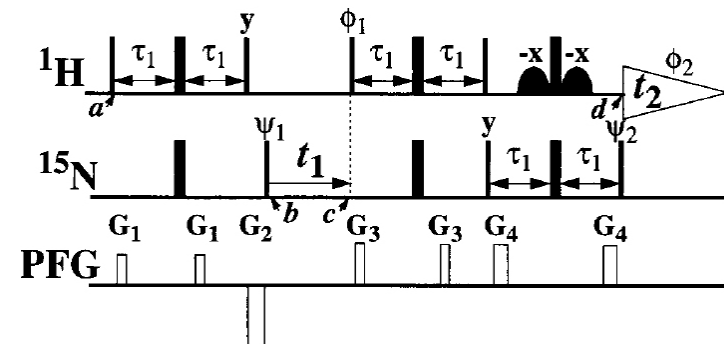
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 94, pp. 12366-12371, November 1997
Biophysics

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*

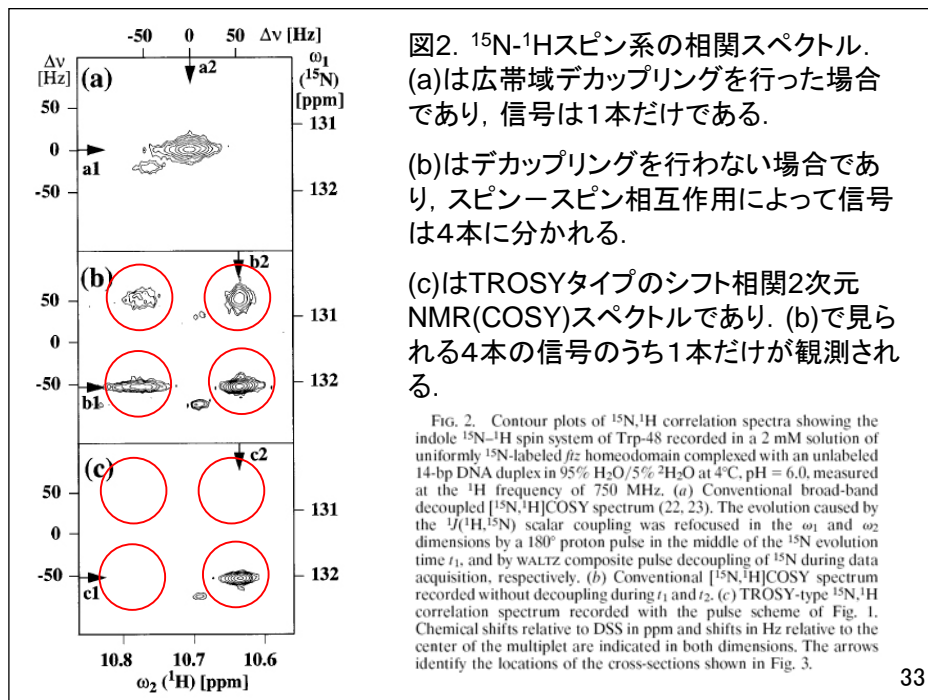
Institut für Molekularbiologie und Biophysik Eidgenössische Technische Hochschule Hönggerberg CH-8093 Zurich, Switzerland

Contributed by Kurt Wüthrich, September 3, 1997

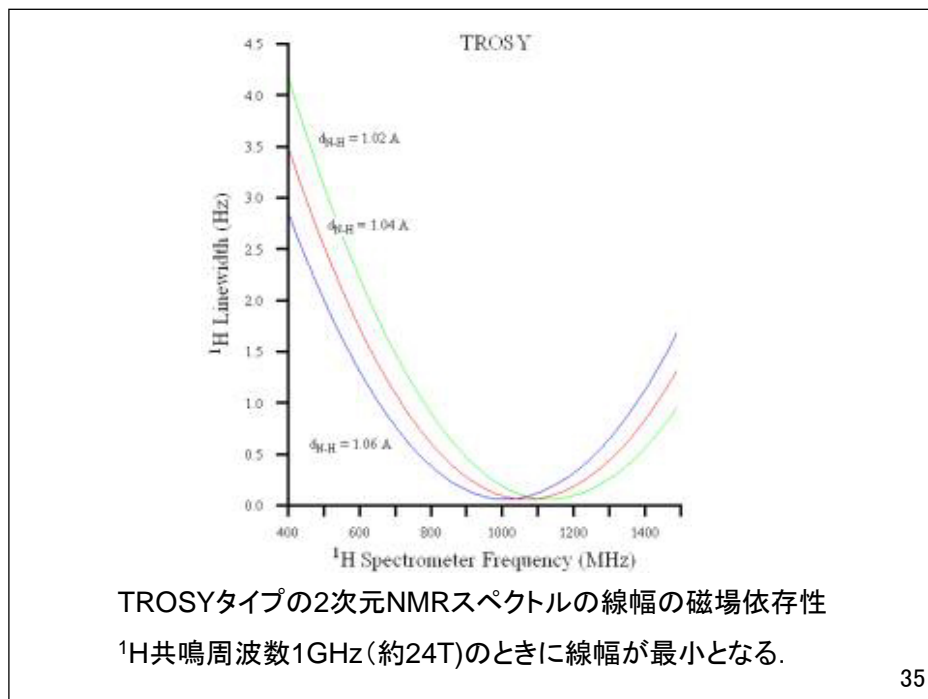
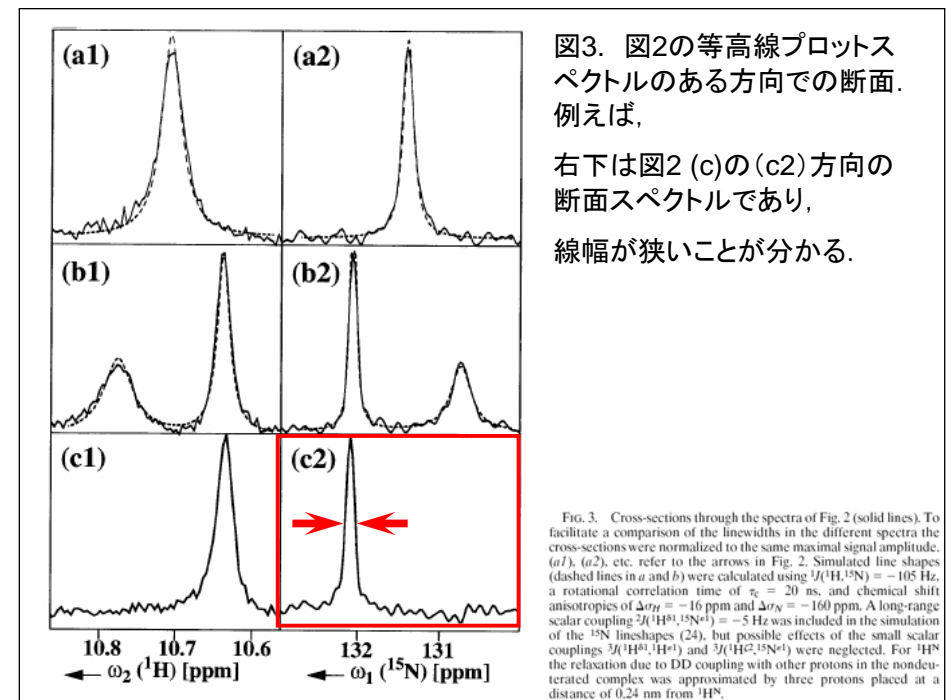


TROSYタイプの ^1H - ^{15}N 化学シフト相関2次元NMRのパルス系列

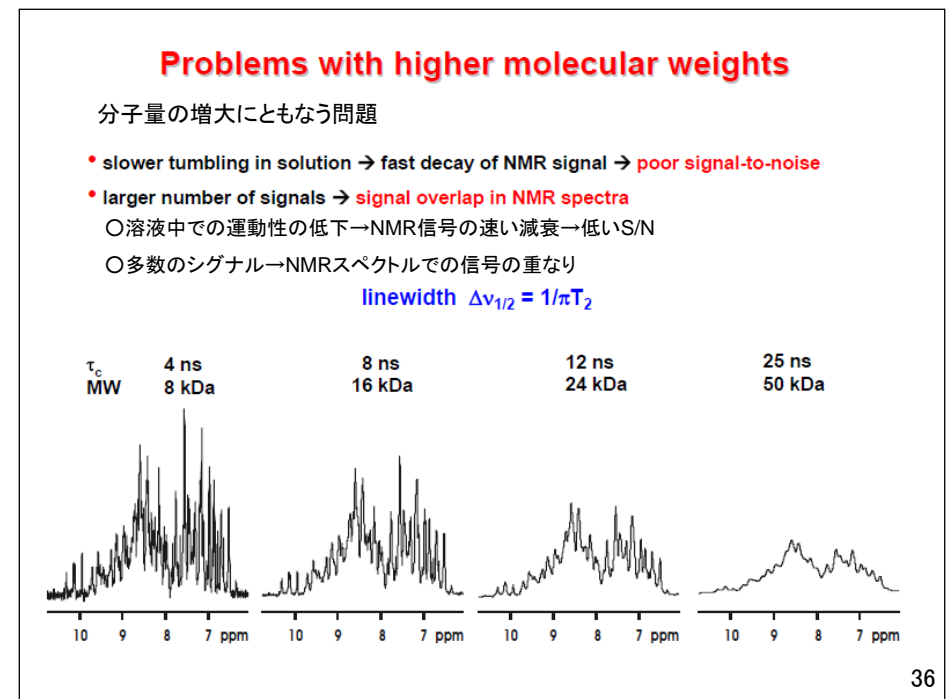
32



33

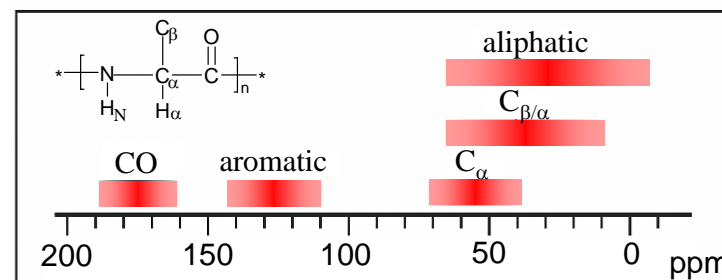
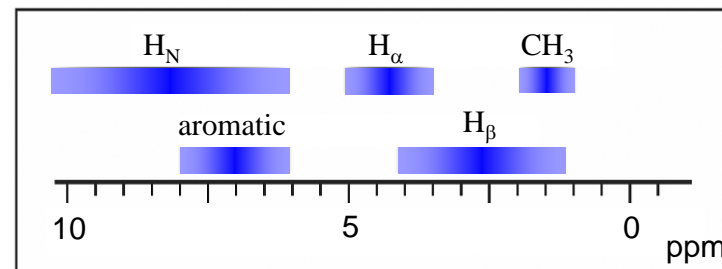
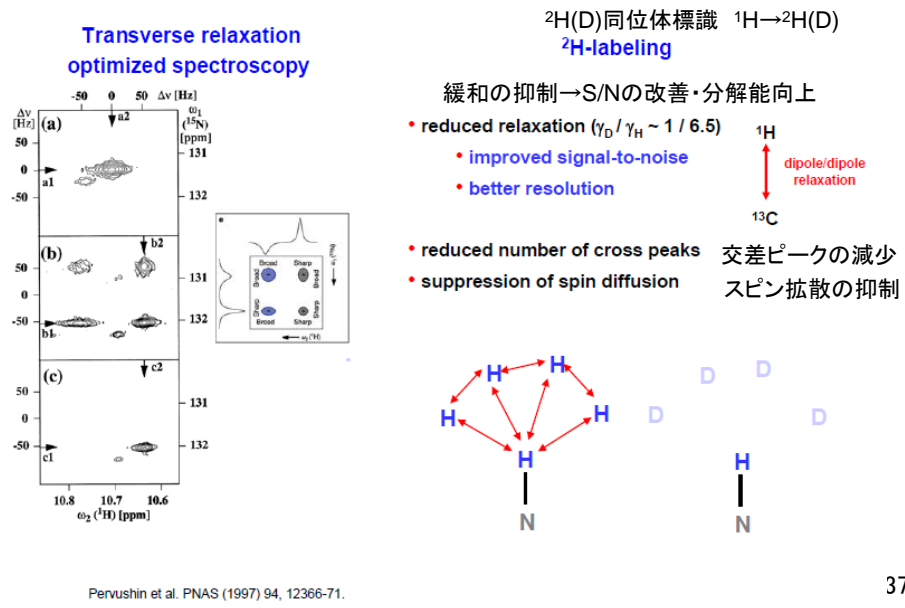


35



36

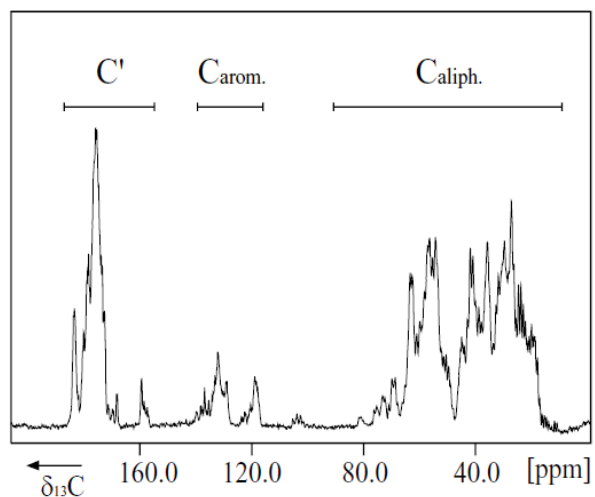
TROSY and ^2H -labeling for molecular weights > 50 kDa



タンパク質中の ^1H , ^{13}C の主な化学シフト

38

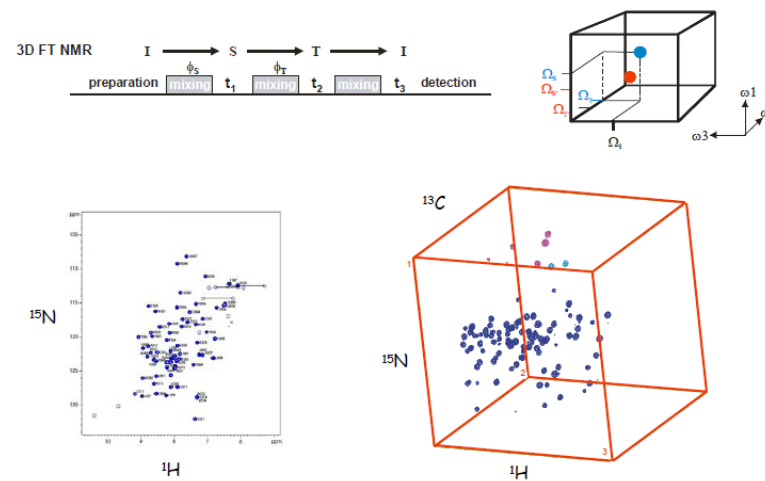
1D ^{13}C spectrum of a protein



39

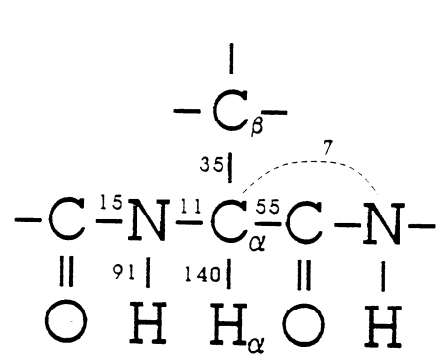
Multi-dimensional NMR experiments

- To resolve signal overlap with increasing molecular weight
- $1/\sqrt{2}$ loss of S/N per indirect dimension, but increased resolution



40

タンパク質のNMRにおけるシグナル帰属の手順



天然存在比
 $^1\text{H}:100\%$
 $^{13}\text{C}:1.1\%$
 $^{15}\text{N}:0.37\%$

Figure 5.20. Peptide fragment with typical (absolute) values of J coupling constants indicated.

タンパク質の構造解析では、スピン結合を利用するために、 ^{13}C および ^{15}N でフルラベルした試料が必要となる。

種々の3次元NMR法

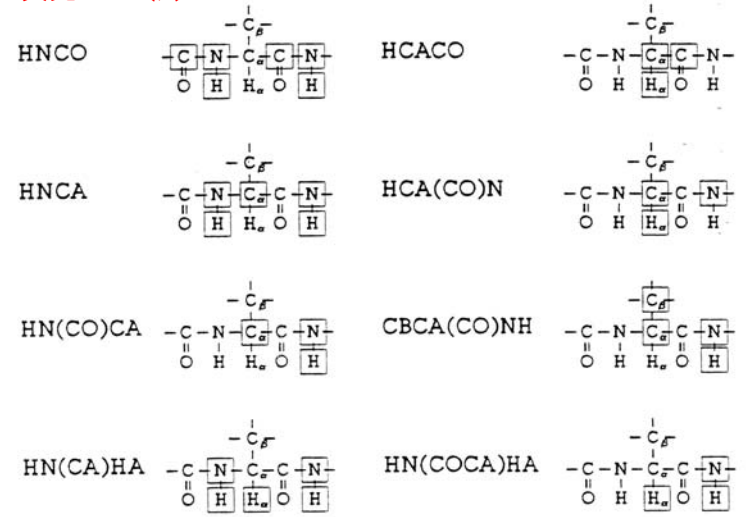
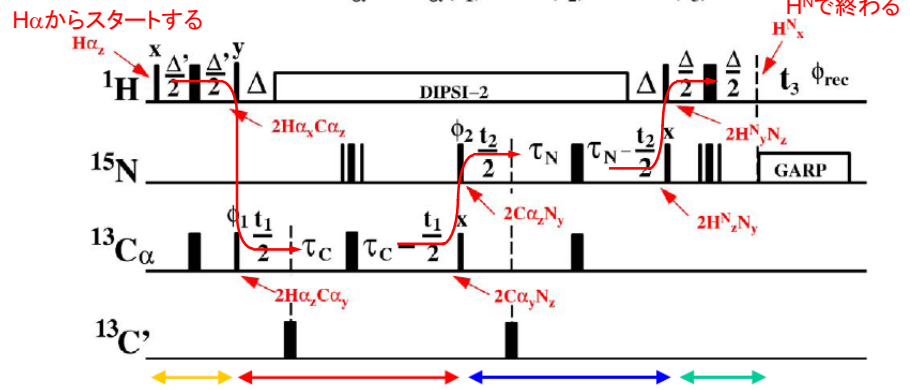


Figure 5.21. Collection of some of the 3D triple-resonance experiments used for the assignments of ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonances in proteins. The shaded boxes indicate the nuclei that are frequency labeled.

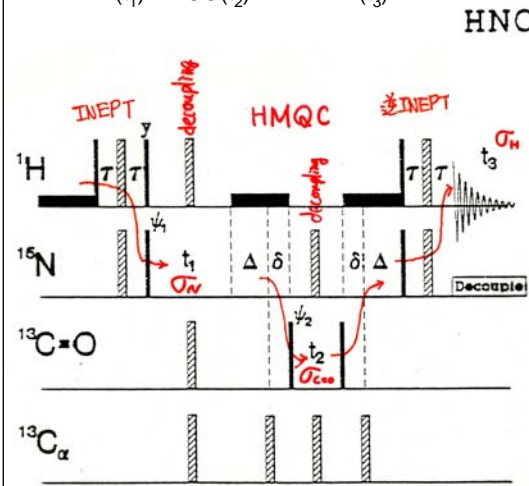
3D HNCA transfer: $\text{H}_\alpha \rightarrow \text{C}_\alpha(t_1) \rightarrow \text{N}(t_2) \rightarrow \text{HN}(t_3)$



Transfer amplitude including T_2 relaxation

- $\sin^2(\pi^1 J_{\text{H}\alpha, \text{C}\alpha} \Delta') \exp(-\Delta'/T_{2\text{H}\alpha})$
- $\sin(\pi^1 J_{\text{C}\alpha, \text{N}} 2\tau_1) \cos(\pi^2 J_{\text{C}\alpha, \text{N}} 2\tau_1) \cos(\pi^1 J_{\text{C}\alpha, \text{C}\beta} 2\tau_1) \exp(-2\tau_1/T_{2\text{C}\alpha})$
- $\sin(\pi^1 J_{\text{C}\alpha, \text{N}} 2\tau_2) \cos(\pi^2 J_{\text{C}\alpha, \text{N}} 2\tau_2) \exp(-2\tau_2/T_{2\text{N}})$
- $\sin^2(\pi^1 J_{\text{N}, \text{HN}} \Delta) \exp(-\Delta/T_{2\text{HN}})$

$\text{HN} \rightarrow ^{15}\text{N}(t_1) \rightarrow ^{13}\text{CO}(t_2) \rightarrow ^{15}\text{N} \rightarrow \text{HN}(t_3)$



直接結合している
 $\text{H}-\text{N}-\text{CO}$
 の間だけに交差ピーク
 が現れる。

Figure 5.22. Basic pulse sequence of the 3D HNCO experiment. The horizontal bars on the ^1H channel represent low-power irradiation of the H_2O resonance.

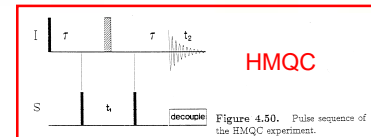
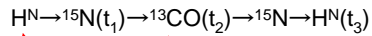
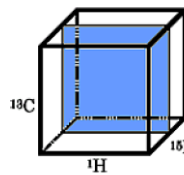
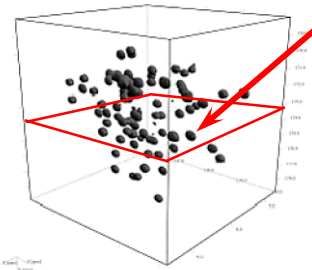


Figure 4.50. Pulse sequence of the HMQC experiment.

HNCO は、**主鎖のアミドプロトンと、アミド結合のカルボニル炭素との相関**を見るための 3D 実験です。 ^{15}N の化学シフトでスライスした 2 次元スペクトルには、特定のアミノ酸のアミドプロトンの化学シフトに、隣接するカルボニル炭素の化学シフトが交差ピークとして現われます。



着目したアミノ酸残基のアミド ^{15}N シグナル



(スライスしたアミドN
と同一残基内の H_N)

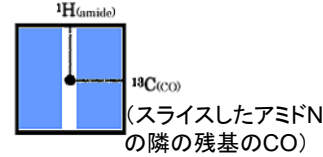
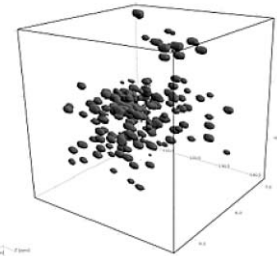
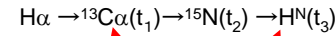


図13.2 HNCO スペクトルの3次元キューブ表示

図13.3 HNCO スペクトルの模式図

アミノ酸残基1つあたり1つのアミドNHシグナルがある。

HNCA は、アミドプロトンと、 α 位の炭素との相関を見るための3D実験です。 ^{15}N の化学シフトでスライスした2次元スペクトルには、特定のアミノ酸のアミドプロトンの化学シフトに、残基内の α -炭素およびカルボニル基をはさんで隣接する α -炭素の化学シフトが交差ピークとして現われます。



(スライスしたアミドN
と同一残基内の H_N)

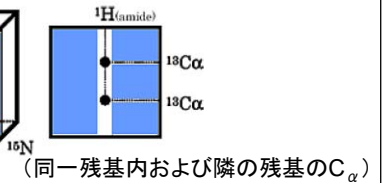
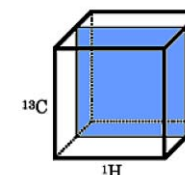
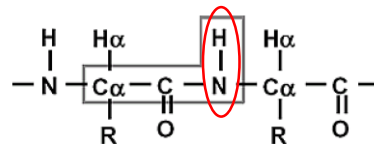


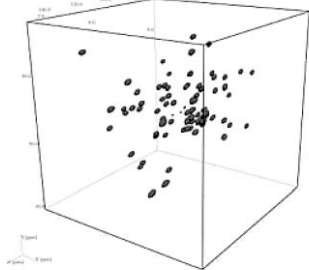
図14.2 HNCA スペクトルの3次元キューブ表示

図14.3 HNCA スペクトルの3次元キューブ表示

HN(CO)CA は、アミドプロトンと、 α 位の炭素との相関を見るための 3D 実験です。HNCA と異なり、磁化の移動がカルボニル炭素を経由するため、残基内の α -炭素とは相関信号が現われません。 ^{15}N の化学シフトでスライスした 2 次元スペクトルには、特定のアミノ酸のアミドプロトンの化学シフトに、カルボニル基をはさんで隣接する α -炭素の化学シフトが交差ピークとして現われます。



測定に関わるスピンス系



(スライスしたアミドN
と同一残基内の H_N)

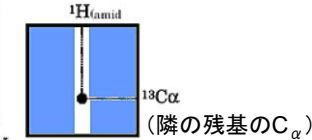
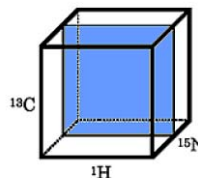
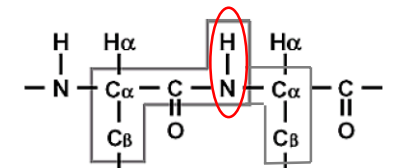


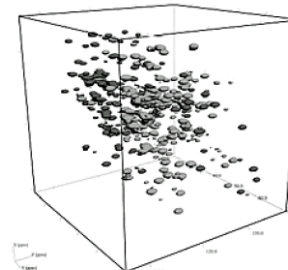
図15.2 HN(CO)CA スペクトルの3次元キューブ表示

図15.3 HN(CO)CA スペクトルの模式図

HNCACB は、アミドプロトンと、 α 位および β 位の炭素との相関を見るための 3D 実験です。 ^{15}N の化学シフトでスライスした 2 次元スペクトルには、特定のアミノ酸のアミドプロトンの化学シフトに、残基内およびカルボニル基をはさんで隣接する、 α -炭素と β -炭素の化学シフトが交差ピークとして現われます。また、 α -炭素と β -炭素では信号の位相が逆転して現われます。



隣の残基の $\text{C}_\alpha \cdot \text{C}_\beta$ 同一残基内の $\text{C}_\alpha \cdot \text{C}_\beta$
測定に関わるスピンス系



(スライスしたアミドN
と同一残基内の H_N)

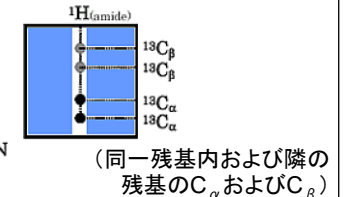
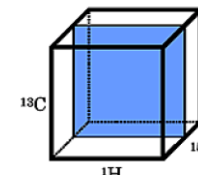
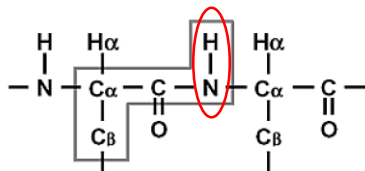


図16.2 HNCACB スペクトルの3次元キューブ表示

図16.3 HNCACB スペクトルの模式図

CBCA(CO)NHは、アミドプロトンと、 α 位および β 位の炭素との相関を見るための3D実験です。HNCACBと異なり、磁化の移動がカルボニル炭素を経由するため、残基内の炭素とは相関信号が現われません。 ^{15}N の化学シフトでスライスした2次元スペクトルには、特定のアミノ酸のアミドプロトンの化学シフトに、カルボニル基をはさんで隣接する、 α -炭素と β -炭素の化学シフトが交差ピークとして現われます。



測定に関わるスピンス系

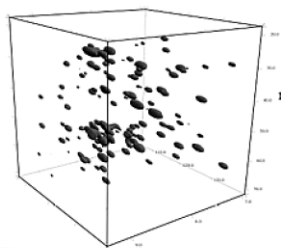


図17.2 CBCA(CO)NH スペクトルの3次元キューブ表示

(スライスしたアミドNと同一残基内の H_N)

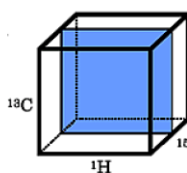
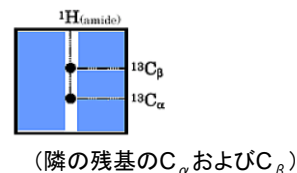
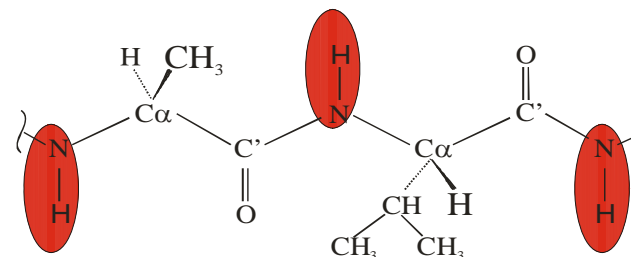


図17.3 CBCA(CO)NH スペクトルの模式図



(隣の残基の C_α および C_β)

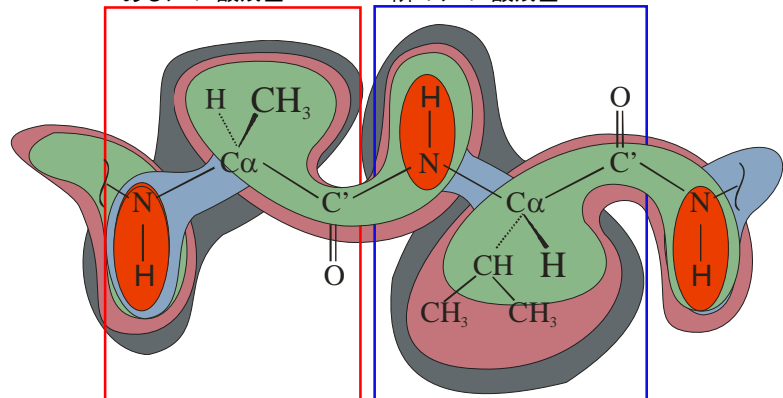
・HSQC測定でアミド結合の ^1H と ^{15}N ピークを帰属する



タンパク質中のそれぞれのアミド基が2Dスペクトルに1つの $^1\text{H}^\text{N}$ - ^{15}N 相関ピークを与える。

○残基内および残基間の相関シグナルの帰属

あるアミノ酸残基 隣のアミノ酸残基



2D HSQC(intra)

3D CBCA(CO)NH(inter)

3D CBCANH(intra)

3D HCC(CO)NH-TOCSY(intra)

3D TOCSY-HSQC(intra)

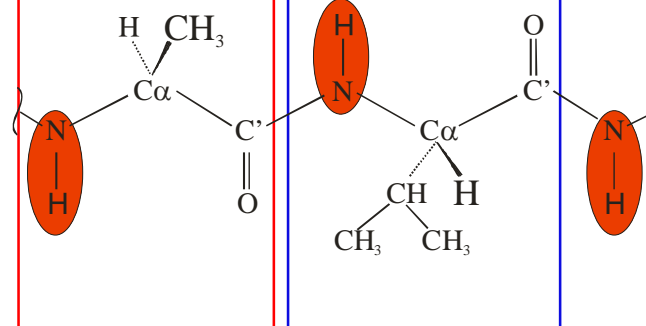
intra:残基内相関

inter:残基間相関

○残基内および残基間の相関シグナルの帰属

あるアミノ酸残基

隣のアミノ酸残基



2D HSQC(intra)

3D CBCA(CO)NH(inter)

3D CBCANH(intra)

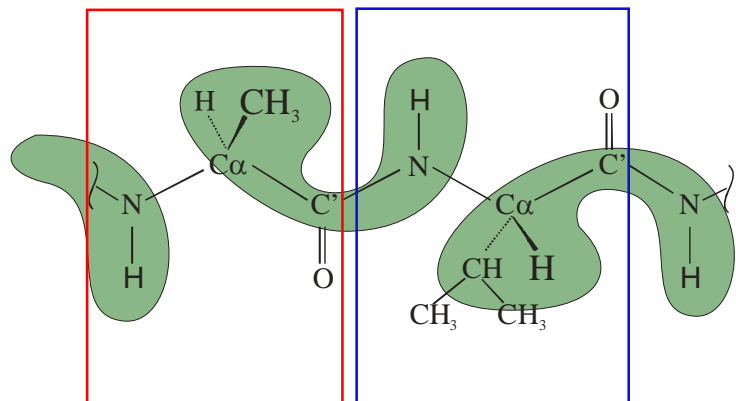
3D HCC(CO)NH-TOCSY(intra)

3D TOCSY-HSQC(intra)

intra:残基内相関

inter:残基間相関

○残基内および残基間の相関シグナルの帰属



2D HSQC(intra)

3D CBCA(CO)NH(inter)

3D CBCANH(intra)

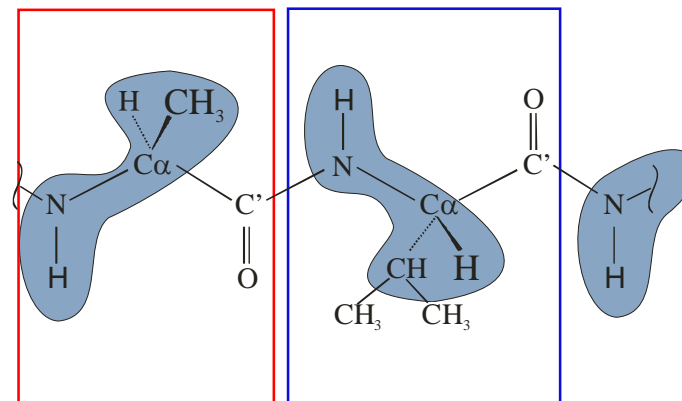
3D HCC(CO)NH-TOCSY(intra)

3D TOCSY-HSQC(intra)

intra:残基内相関
inter:残基間相関

53

○残基内および残基間の相関シグナルの帰属



2D HSQC(intra)

3D CBCA(CO)NH(inter)

3D CBCANH(intra)

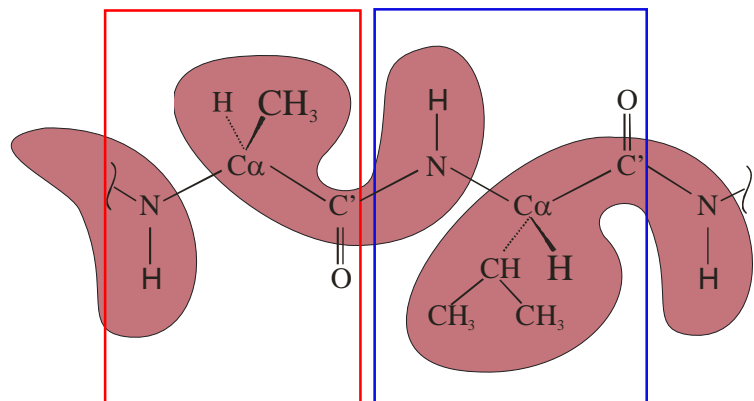
3D HCC(CO)NH-TOCSY(intra)

3D TOCSY-HSQC(intra)

intra:残基内相関
inter:残基間相関

54

○残基内および残基間の相関シグナルの帰属



2D HSQC(intra)

3D CBCA(CO)NH(inter)

3D CBCANH(intra)

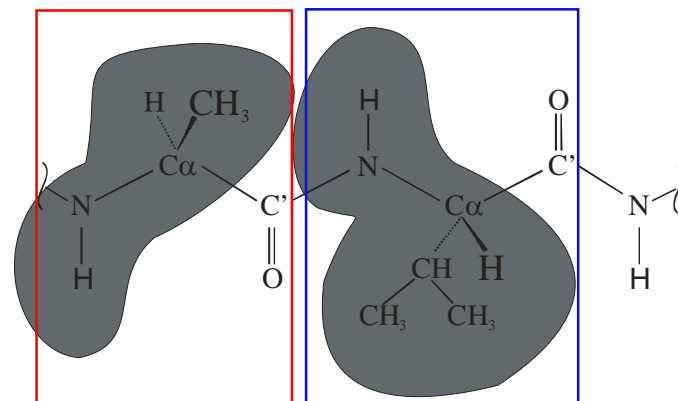
3D HCC(CO)NH-TOCSY(intra)

3D TOCSY-HSQC(intra)

intra:残基内相関
inter:残基間相関

55

○残基内および残基間の相関シグナルの帰属



2D HSQC(intra)

3D CBCA(CO)NH(inter)

3D CBCANH(intra)

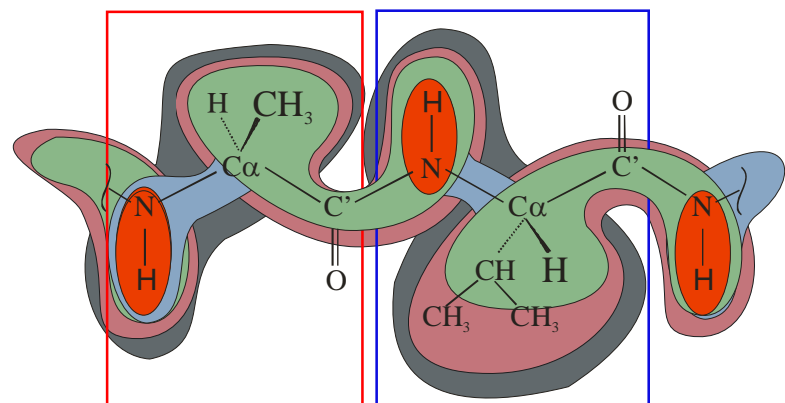
3D HCC(CO)NH-TOCSY(intra)

3D TOCSY-HSQC(intra)

intra:残基内相関
inter:残基間相関

56

○残基内および残基間の相関シグナルの帰属



2D HSQC(intra)

3D CBCA(CO)NH(inter)

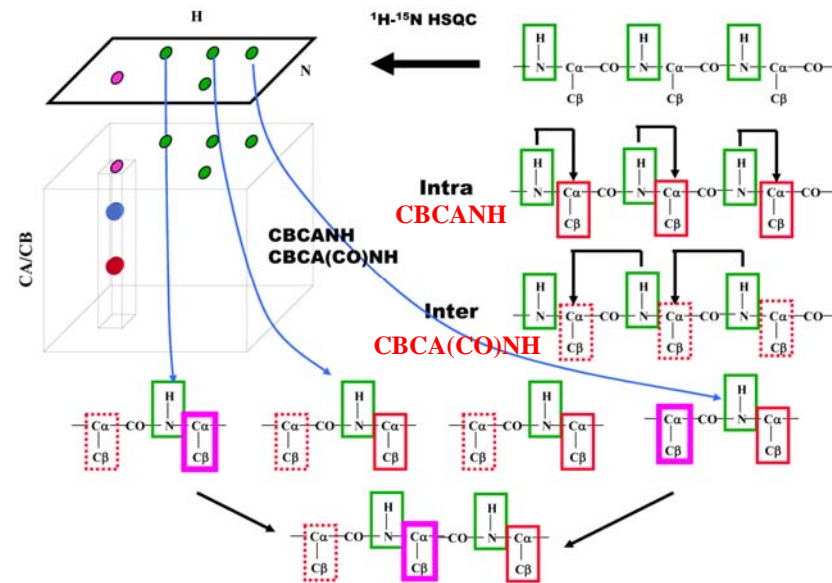
3D CBCANH(intra)

3D HCC(CO)NH-TOCSY(intra)

3D TOCSY-HSQC(intra)

intra:残基内相関
inter:残基間相関

主鎖の帰属(1) 3D-NMR解析の基本的な概念図



Assignment strategy for ¹³C/¹⁵N-labeled proteins

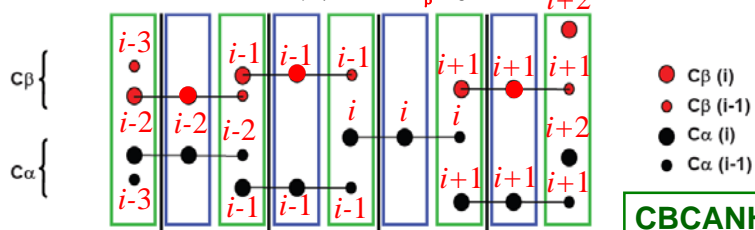
NHと隣の残基のCαとCβ

NHと残基内および隣の残基のCαとCβ

CBCANH
intra-/interresidue correlation
(strong/weak)

CBCA(CO)NH
interresidue correlation

グリシンにはCβはない



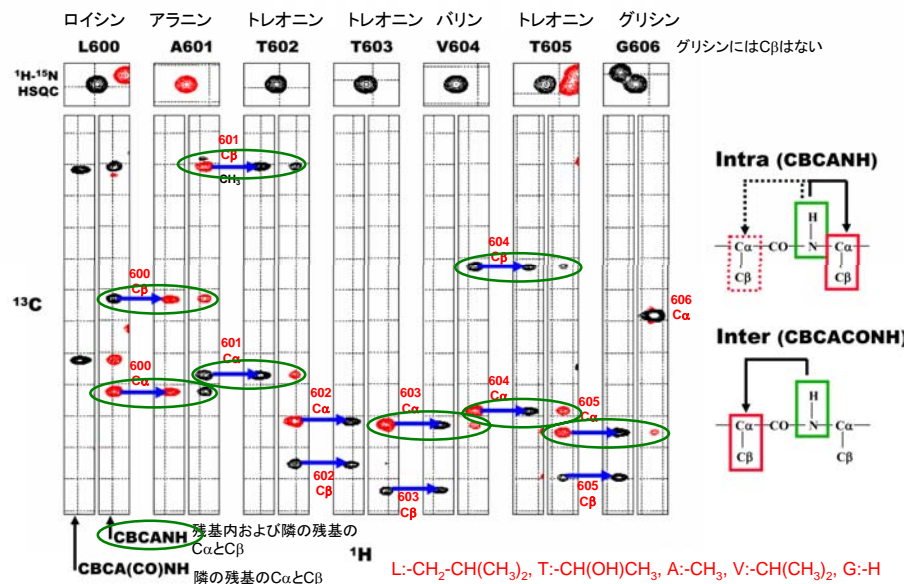
CBCANH

残基内のシグナルCα(i)とCβ(i)は強い。

隣の残基のシグナルCα(i-1)とCβ(i-1)は弱い。

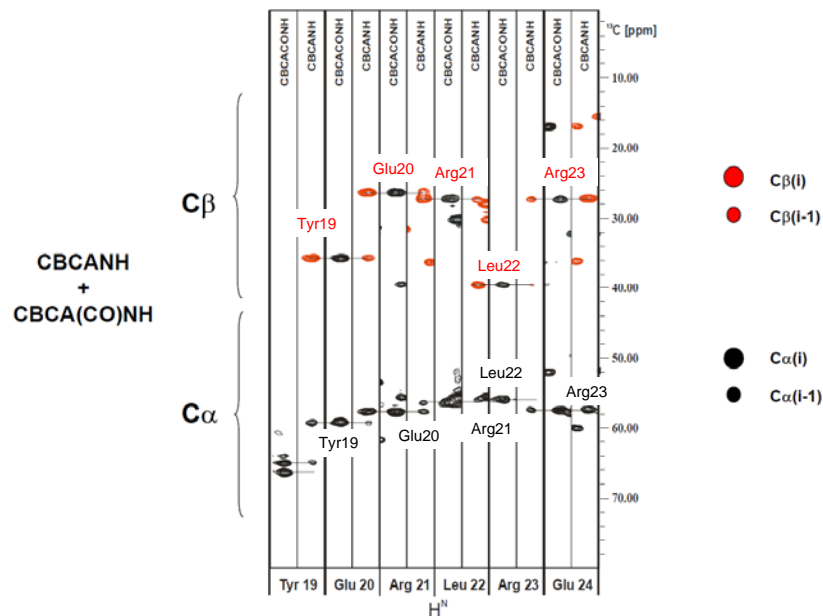
○: 残基内相関
□: 残基間相関

主鎖の帰属の例 Sequential assignment L600~G606

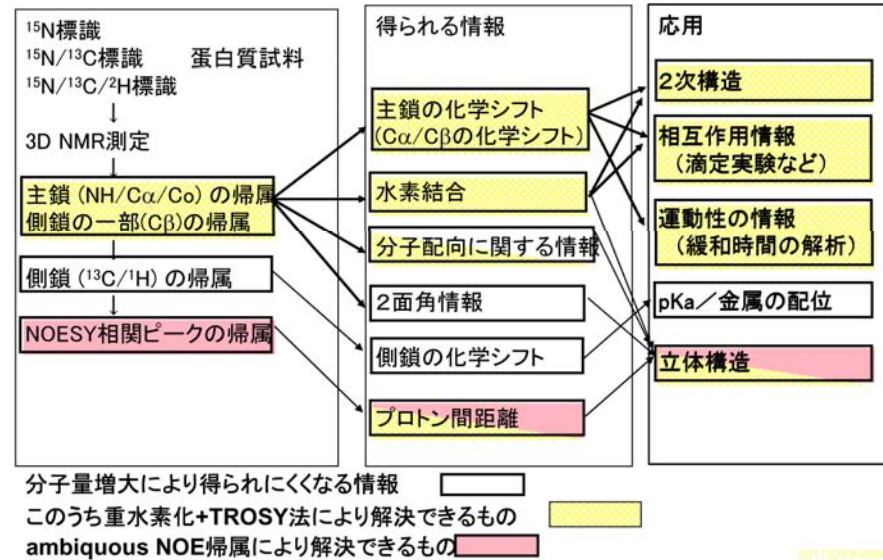


L:-CH₂-CH(CH₃)₂, T:-CH(OH)CH₃, A:-CH₃, V:-CH(CH₃)₂, G:-H

Chemical shift assignments

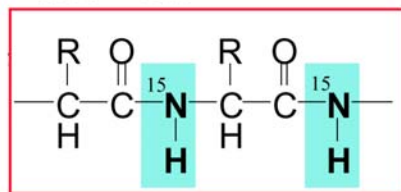


蛋白質のNMRにおけるシグナル帰属の手順



蛋白質のNMRにおける立体構造決定の流れ

1. ターゲットを決定する(含むドメイン切り出し)
2. 発現系の作成
3. 蛋白質試料(同位体標識)の作成・・・ $^{13}C/^{15}N/^2H$
4. 2次元・3次元・4次元NMR測定 (2~6週間)
5. シグナルの帰属 (例:100残基の蛋白質でプロトン700個) (2~12週間)
6. 構造情報の取得 (4~20週間)
 NOEの帰属→プロトン間距離の取得 (例:100残基の蛋白質で1500-2000個)
 結合定数(J)からの2面角制限情報の取得 (主鎖、側鎖 χ 1)
 水素結合 (~数十個) 分子配向
7. 立体構造計算
 上記制限情報を満たす構造のアンサンブルをディスタンスジオメトリ法
 *simulated annealing 法などで計算 (1-10min / 1 structure / 1PC)



標識試料作成の戦略

安定同位体標識の目安。

熟練者は5割増しの残基数でも可能かもしれない。

| アミノ酸残基数 | 同位体 | 備考 |
|-----------|------------------------|---|
| 20残基以下 | 1H のみ | ペプチド合成 |
| 20残基-40残基 | ^{15}N | 融合蛋白質* (gene10 / GST / Thioredoxin / Ub) |
| 100残基以内 | $^{15}N/^{13}C$ | |
| 100残基以上 | $^{15}N/^{13}C/^2H$ ** | (重水素化率50-80%) |
| 150残基以上 | $^{15}N/^{13}C/^2H$ | (重水素化率80%以上) |
| 300残基以上 | $^{15}N/^{13}C/^2H$ | (セグメント標識法) |

発現系に要するコスト

大腸菌 < 無細胞系~酵母 (Pichia) < 昆虫細胞 < 培養細胞

主鎖の帰属(2) アウトライン

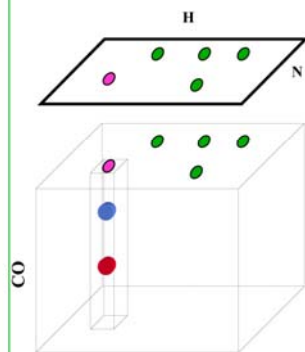
- ^{15}N -HSQCを測定する
- 溶媒条件・測定条件を決定する
- 主鎖の帰属に必要なスペクトルを測定する
- 主鎖を帰属する
 - peak picking
 - assembling (複数の3Dから同一のHN由来のpeakをくくる)
 - linking (隣り合ったspin系同士をつなぎ、伸ばしていく)
 - mapping (化学シフト情報を元に一次配列に当てはめていく)
- 側鎖の帰属に必要なスペクトルを測定する
- 側鎖を帰属する
 - HN-basedの3D → HC-basedの3Dの順に解析する
 - $\text{H}\alpha/\text{C}\alpha$, $\text{H}\beta/\text{C}\beta$ を帰属する
 - $\text{H}\gamma/\text{C}\gamma$, $\text{H}\delta/\text{C}\delta$, $\text{H}\epsilon/\text{C}\epsilon$, methyl, aromaticを帰属する
 - 交換性側鎖を帰属する
- 構造情報の取得に必要なスペクトルを測定する
- 構造情報の取得(主にNOE帰属)

主鎖の帰属(3) よく用いられる3D測定法と得られる情報

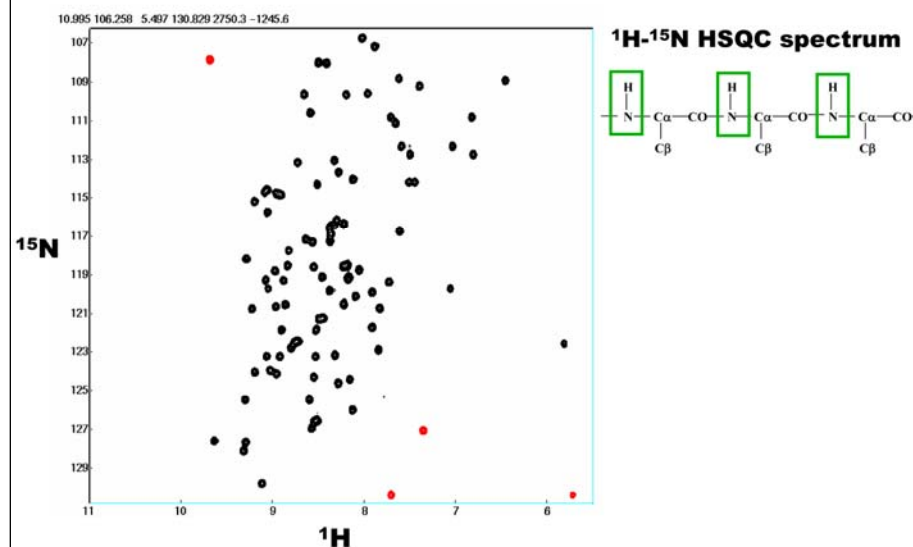
| | 残基内相関 | 残基間相関 | 得られる情報 |
|--|---|----------------------|--|
| 主鎖の帰属 | | | |
| 基準となるスペクトル | $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC | | |
| | HN(CA)CO | HNCO | CO 化学シフト |
| | HNCA | HN(CO)CA | $\text{C}\alpha$ 化学シフト |
| | HNCACB | CBCA(CO)NH | $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ 化学シフト |
| 主鎖プロトンの帰属 | | | |
| | HN(CA)HA | HBHA(CO)NH | $\text{H}\alpha$ ($\text{H}\beta$) 化学シフト |
| | ^{15}N -edited-TOCSY | | $\text{H}\alpha$ /側鎖プロトン |
| 側鎖の帰属 | | | |
| 基準となるスペクトル | $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC | | |
| | | CC(CO)NH / HCC(CO)NH | |
| 基準となるスペクトル | $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -CT-HSQC) | | |
| | CCH-COSY / CCH-TOCSY | | ^{13}C 化学シフト |
| | HCCH-COSY / HCCH-TOCSY | | ^1H 化学シフト |
| NOESYの測定 | | | |
| | ^{15}N -edited-NOESY / ^{13}C -edited-NOESY / ($^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$)-4D-NOESY / ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$)-4D-NOESY | | |
| *各測定が最適に行えるような標識試料や溶媒($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$)を適宜吟味すること。 | | | |

主鎖の帰属(4) 最初に行うこと

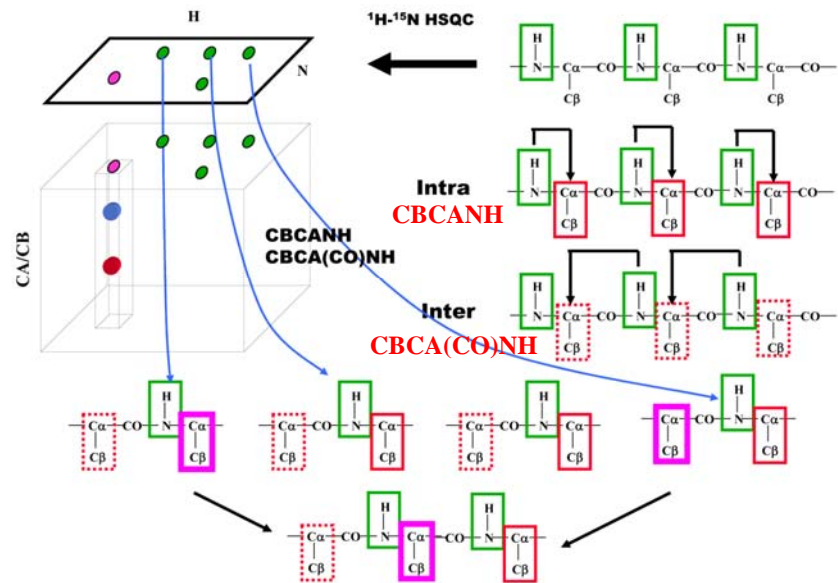
- どのようなソフトウェアを用いるにしても次の操作だけは最初にマスターしておきたい
 - ◆ 2D-HSQCのpeak pickingを行う
 - ◆ 3D-spectraのpeak pickingを行い、peak表を作成
 - ◆ 3D-spectraから、2D-HSQCの各HN peakに対応する短冊(strip)を作成し、画面に表示する・または印刷する
 - ◆ stripの並べ替えのやり方を調べておく
- ^{15}N -HSQCからpeak pickingを行う
主鎖peakの数を数え、 ^{15}N -HSQCが観測されていないpeakや重なっているpeakが総計いくつあるかの見積を行う peakが多い場合は試料の純度と多型を疑う
- HNCOをまず処理・解析する
HNCOから各HN peakに対応するstripを作成する
- 3でCOの相関シグナルが一つしか出ていないstripはHN peakが1アミノ酸残基に対応し、一つ以上出ているstripは複数のアミノ酸残基のHN peakが重なっているということである



主鎖の帰属(5) HSQCスペクトルが全ての基本である



主鎖の帰属(1) 3D-NMR解析の基本的な概念図

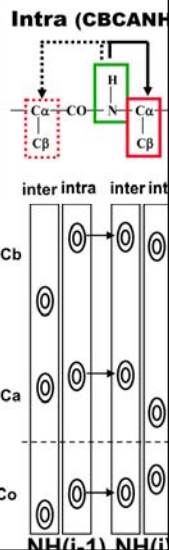


主鎖の帰属(6) アセンブリング

- minimal data setで示した6つの3D spectraを全てフーリエ変換する
- 基準となる ^{15}N -HSQC peakに対応するstripを作成する
- 基準となる ^{15}N -HSQC peakについて、その残基内および残基間(一残基前)のCa, Cb, COのそれぞれの ^{13}C 化学シフトを抽出して、それらを一組として、データの組を作る
紙に打ち出してもよいし、表を作成してもよい
- 以下のリンクング・マッピングの作業はすべてこのデータの組に対して行う
- 問題点**
前項で一つのHN peakに複数のアミノ酸残基が重なっている場合どうするか？
 - 線幅・線形などで区別できる場合は極力区別する
 - 区別できない場合でCa/Cbの化学シフトの傾向から、アミノ酸タイプが確定できてそれにより組合せが確定できる場合には区別する
 - 区別できない場合には、両方の組合せを考慮しながら以下の作業を行わなければならないため、困難が増す
 - 必要な場合は温度・pH・3Dのデータポイント数を変えて測定するなどの工夫も必要である

主鎖の帰属(7) リンキング

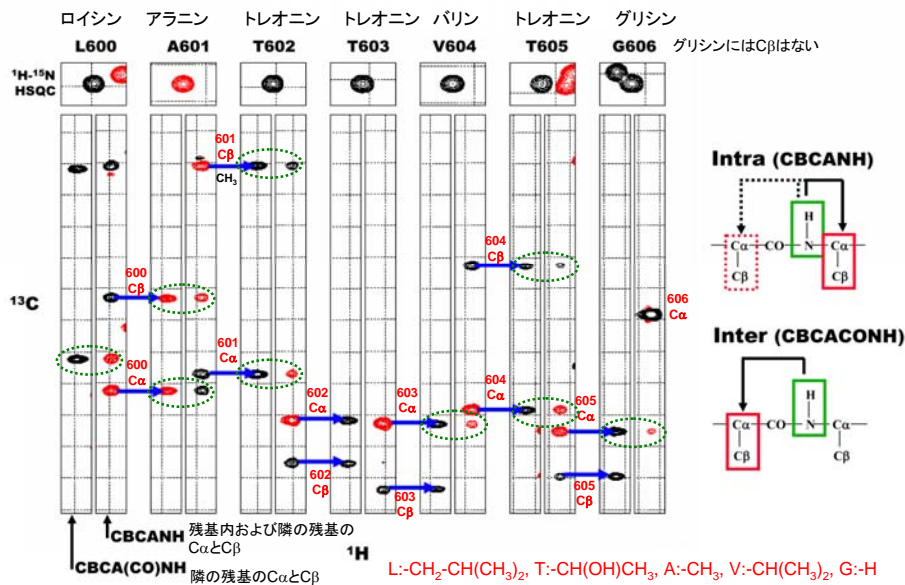
- ^{13}C の化学シフトに注目する
 - Ca/Cb/COのそれぞれの化学シフトで同じように行える
 - スペクトル感度の問題
HNCACB (CBCANH)とHN(CA)COが感度が悪いことがある
- 「残基内相関」と「残基間相関」の組として、隣り合っているスピンス系を結ぶ
- 複数の組合せでリンクングが可能なのは、その残基は保留する
- 一意的に(唯一の組合せで)結ぶことのできるリンクを作成し、確定していく
- プロリンの位置でスピンス系のつながりが切れるので注意
- ^1H の化学シフトに注目してHa→HN, HN→HNのNOEのつながりを確認することで、誤りを発見できる



主鎖の帰属(8) マッピング

- $^{13}\text{C}\alpha / ^{13}\text{C}\beta$ の化学シフト(絶対値)に注目する
- またCC(CO)NH、 ^{15}N -edited-TOCSYなどから側鎖 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ の有無・化学シフトに注目する
- それらより総合的にのおおのスピンスシステムがどのアミノ酸に該当するか、タイプ分けを行う
- 前項で作成した「スピンス系」の「リンク」の系列に各アミノ酸タイプをあてはめる。
- そのアミノ酸タイプの並びに合致する、実際の一次配列上の並びがあるかどうかを探す
- 確定する
- glycine, alanine, prolineなどの目印になりやすい特徴的な化学シフトの残基を優先的にmappingして、残りを埋めていく
- 確定した順にそれぞれの3D-spectraのstripを並べ替え、全体で矛盾がないか確認する
- さらに ^{15}N -edited NOESYのstripを同様に並べ替え、sequential NOEのつながりに矛盾がないか確認する
- できあがり!**

主鎖の帰属の例 Sequential assignment L600~G606



5月2日 学生番号 氏名

(1) CBCANHスペクトルとCBCA(CO)NHスペクトルの¹H-¹³Cスライスを特定の amino 酸残基のアミドプロトンの化学シフト位置で切り取って並べた短冊状のスペクトルが6枚ある。左側がCBCA(CO)NH, 右側がCBCANHである。

A, G, L, T1~T3, Vの6個の amino 酸残基の1次元配列を決定せよ(連鎖帰属せよ)。